

令和 4 年 6 月 17 日現在

機関番号：82111

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K06080

研究課題名(和文) チャバネアオカメムシにおける液性免疫と共生細菌の関係

研究課題名(英文) how insect immunity affect symbiotic bacteria in *Plautia stali*

研究代表者

西出 雄大 (Nishide, Yudai)

国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構・生物機能利用研究部門・主任研究員

研究者番号：50558096

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：チャバネアオカメムシの共生細菌と免疫の関係を調べた。チャバネアオカメムシは共生細菌を入れ替えることができるので、入れ替えた際の抗菌性タンパク質の発現を見た。その結果、さまざまな抗菌性タンパク質の発現が変化することが分かり、さらに発現が大きく上昇した抗菌性タンパク質をRNAiすると、共生細菌の数が増えたことから、共生細菌の数のコントロールに抗菌性タンパク質が関与していることが示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

多くの昆虫は共生細菌無しでは生きることができない一方で、昆虫は自身が有している免疫機構によって、体内に侵入した病原細菌等の異物を排除している。なぜ共生細菌は排除されないのか？ヒトも腸内に細菌を持ち、ある種の細菌は排除しある種の細菌は排除しない。カメムシを用いた本研究では、この疑問を少し解明することが出来た。

研究成果の概要(英文)：The relationship between symbiotic bacteria and humoral immunity in the brown-winged stink bug *Plautia stali* was investigated. Since the symbiotic bacteria in *P. stali* can be replaced, I evaluated the expression of antimicrobial proteins when the bacteria were replaced. The results showed that the expression of various antimicrobial proteins was altered and RNAi of the antimicrobial proteins increased the number of symbiotic bacteria. This indicates that antimicrobial proteins are involved in controlling the number of symbiotic bacteria.

研究分野：進化学

キーワード：共生 抗菌性タンパク質 液性免疫 Defensin

### 1. 研究開始当初の背景

多くの昆虫、特に植物を吸汁するカメムシ目昆虫は体内に共生細菌を保有しており、多くの場合で宿主昆虫の生存に必須である。一方で、昆虫は異物を効率よく排除する免疫機構を有している。昆虫はどのようにして自身に悪影響を及ぼす病原細菌を排除し、利益をもたらす共生細菌を受け入れるのだろうか？この疑問に対し、共生の研究が最も進んでいると言えるカメムシ目昆虫では、免疫機構を活性化させるカスケード自体が詳しく研究すらされていないため、ほとんど何も分かっていなかった。そこで、液性免疫のカスケードが分かっているチャバネアオカメムシを用いて、共生細菌と宿主免疫の関係を調べた。

### 2. 研究の目的

既知のチャバネアオカメムシの抗菌性タンパク質の中で、特に Lysozyme と Defensin が中腸内の共生部位で高発現していることが予備的な調査で明らかになっていた。そこで、これらの抗菌性タンパク質について研究を進めることで、共生と免疫の関係を調べた。

### 3. 研究の方法

チャバネアオカメムシは地域によって共生している細菌が異なることがある。特に、本州と沖縄では細菌が異なり、これらを人為的に入れ替えることが可能である。さらに言えば、チャバネアオカメムシは大腸菌とも共生し、生育することが出来る。そこで、細菌を入れ替えた場合の中腸内での抗菌性タンパク質の発現を見た。また、この際に特に発現上昇している抗菌性タンパク質については RNAi を施し、細菌に与える影響を見た。

また、これまでに報告された抗菌性タンパク質とは異なる抗菌性タンパク質がチャバネアオカメムシから見つかったため、これについても RNAi や定量 PCR、大腸菌での組換えタンパク発言などを通してその抗菌活性や発現パターンを明らかにした。

### 4. 研究成果

#### (1) 共生細菌と抗菌性タンパク質の関係

共生細菌を入れ替えると、共生部位での抗菌性タンパク質の発現は大きく変わった。特に Defensin2 では、本来の共生細菌である "A" の場合と比較して、沖縄産チャバネアオカメムシから単離した共生細菌 D、大腸菌 *E. coli* に入れ替えた場合で発現量が有意に増大した (図 1A)。一方で、もともと共生細菌の棲む共生部位でのみ高発現していた Lysozyme c2 は細菌を入れ替えると発現量を減らした (図 1B)。これらの事から、共生細菌のコントロールに抗菌性タンパク質が関与している可能性が示された。

さらに共生細菌を入れ替えると、発現量が増大する抗菌性タンパク質に対し、RNAi を行うことでこの抗菌性タンパク質の効果を評価した。その結果、共生細菌 D に入れ替えた場合に、Defensin2 を RNAi すると、共生細菌 D の菌量が増えることが分かった。これは、Defensin2 が直接的に共生細菌の数をコントロールしていることを示唆する。今後、さらにこれらの共生細菌と抗菌性タンパク質の関係を調査し、論文化する。

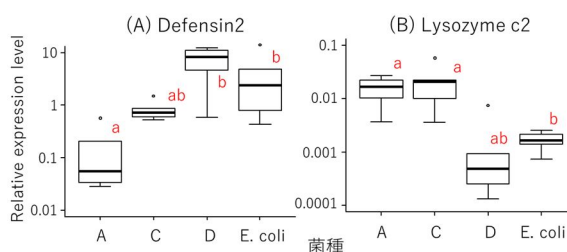


図1 共生細菌を入れ替えた場合のDefensin2とLysozyme c2の発現量。遺伝子発現はrpL32で標準化し、横軸は細菌種を示す。Aは本来の共生細菌、C、Dは沖縄チャバネアオカメムシ由来の細菌、E. coliは大腸菌に入れ替えた場合の発現量を示す。異なるアルファベットは有意差があることを示す (P < 0.05; Steel-Dwass test)。

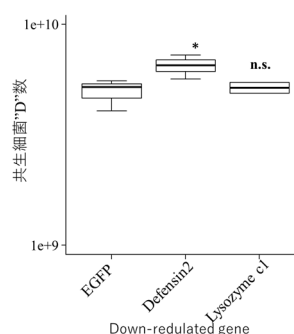


図2 共生細菌を"D"に入れ替え、高発現するようになったDefensin2, Lysozyme c1のRNAiをした場合の共生細菌"D"数。アスタリスクはコントロールとなるEGFPとの比較で有意差あり (Mann-Whitney U test; P < 0.05)

#### (2) 新規抗菌性タンパク質 Pentatomicin

これまでに、チャバネアオカメムシでは、Defensin2種、Hemipterisin、Lysozyme5種が見つかってきていた。しかし、さらに研究をすすめると、もう1種、新規の抗菌性タンパク質を発見した。このタンパク質の興味深い点は、昆虫の中でもカメムシ目昆虫と甲虫目昆虫にしか存在せず、他のメジャーな分類群であるチョウ目やハチ目には見られないことである。昆虫以外に目を向けると、このタンパク質に似た配列は、カブトガニに見つかり、さらに細菌であるシアノバクテリア、プロテオバクテリアでも類似の配列を持つことが分かった (図 3)。

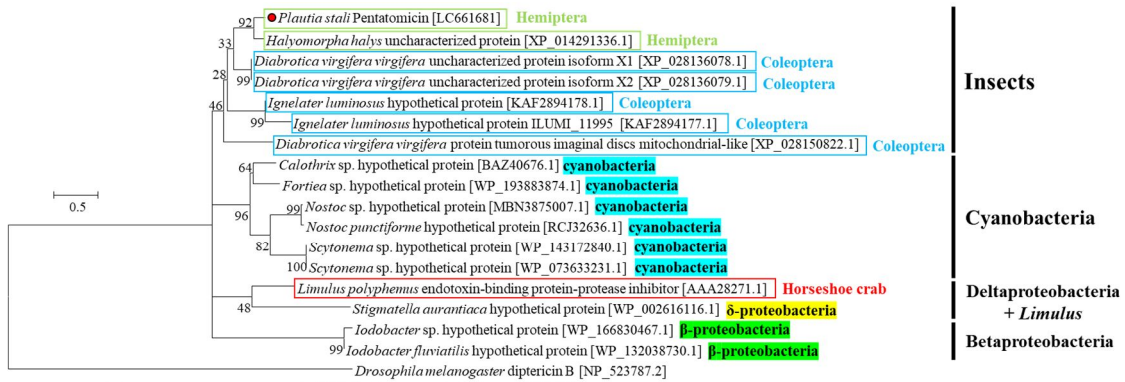


図3 Pentatomicinと関連タンパク質の系統樹  
 一番上がチャバネアオカメムシ(*P. stali*)の配列。  
 系統樹はML法(model: WAG + G model)で作成。各枝の数字はブートストラップ値。

この新規抗菌ペプチドの抗菌活性を調べるために、大腸菌にチャバネアオカメムシ Pentatomicin タンパク質を発現する遺伝子組み換え株を作成した。そこから、単離した Pentatomicin を培地に添加して、各種細菌を培養することで、抗菌活性を評価した。その結果、グラム陰性細菌には効果はない一方、多くのグラム陽性細菌の増殖を大きく抑えた(図4)。特に、*Micrococcus luteus* や *Staphylococcus aureus* に顕著な効果を示したが、同じグラム陽性細菌である *Enterococcus* 属には効果が見られなかった。これら Pentatomicin に関する結果をまとめ、現在論文投稿中である。

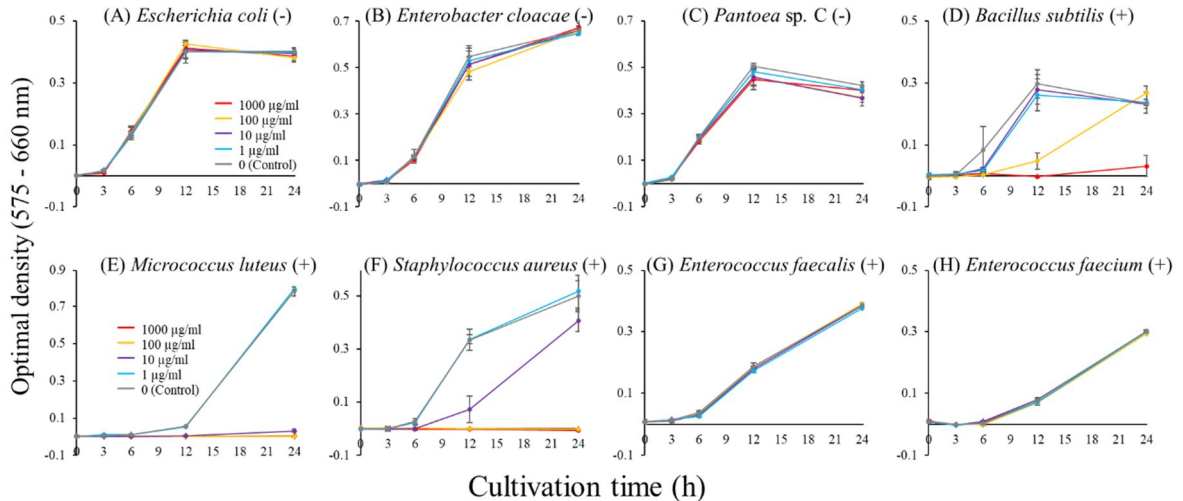


図4 チャバネアオカメムシPentatomicinの抗菌活性  
 8種の細菌に対する抗菌活性を示した。各細菌名の後ろのカッコ内はグラム陰性(-)とグラム陽性(+)を示す。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Nishide Yudai, Kageyama Daisuke, Tanaka Yoshiaki, Yokoi Kakeru, Jouraku Akiya, Futahashi Ryo, Fukatsu Takema	4. 巻 16
2. 論文標題 Effectiveness of orally-delivered double-stranded RNA on gene silencing in the stinkbug <i>Plautia stali</i>	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 e0245081
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1371/journal.pone.0245081	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Nishide Yudai, Kageyama Daisuke, Hatakeyama Masatsugu, Yokoi Kakeru, Jouraku Akiya, Tanaka Hiromitsu, Koga Ryuichi, Futahashi Ryo, Fukatsu Takema	4. 巻 10
2. 論文標題 Diversity and function of multicopper oxidase genes in the stinkbug <i>Plautia stali</i>	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-020-60340-8	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 西出 雄大
2. 発表標題 野外における液性免疫が生存に与える影響
3. 学会等名 第64回日本応用動物昆虫学会大会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------