

令和 3 年 6 月 8 日現在

機関番号：21401

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2020

課題番号：19K15850

研究課題名(和文) 昆虫細胞内共生の分子基盤の解明を目指したモデル共生系の確立

研究課題名(英文) Establishing a model symbiosis for elucidating the genetic basis of insect's intracellular symbiosis

研究代表者

竹下 和貴 (Takeshita, Kazutaka)

秋田県立大学・生物資源科学部・助教

研究者番号：40799194

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：オオホシカメムシは、昆虫としては例外的に培養可能な共生細菌(バークホルデリア属)を腸管上皮細胞内に細胞内共生させている。本研究では、このオオホシカメムシで見られる共生系を「昆虫細胞内共生の新規モデル共生系」として確立することに挑戦した。オオホシカメムシ継代飼育系の構築、オオホシカメムシ共生細菌の単離培養およびゲノム解読、オオホシカメムシ人工感染系の構築、共生細菌の遺伝子組換え実験系の構築を無事に完了できたことから、新規モデル共生系の立ち上げに成功したと言える。

研究成果の学術的意義や社会的意義

一般的な昆虫の細胞内共生細菌は、宿主の体内環境に高度に適応した結果、通常の培地上で生育できないほど多くの遺伝子を失っている。そのため昆虫細胞内共生の研究においては、共生細菌の遺伝子組換え等の遺伝学的実験アプローチが適用できなかった。しかし本研究により、オオホシカメムシを対象に、遺伝子組換え共生細菌の感染実験の実施が初めて可能となった。今後、本モデル共生系を用いて研究を進めることで、昆虫細胞内共生の分子基盤に迫りたい。

研究成果の概要(英文)：A bordered plant bug, *Physopelta gutta*, has the unique feature that the host insect possesses culturable symbiotic Burkholderia bacteria in epithelial cells of the midgut crypts intracellularly. In this project, I tried establishing a novel model insect's intracellular symbiosis system with this stink bug. I have achieved the establishment of a rearing system for this insect in the laboratory, the isolation and genome sequencing of Burkholderia symbionts derived from this insect, and the establishment of experimental infection of the cultured symbiont with this insect. Besides, I have developed a protocol for the genetic manipulation of the Burkholderia symbiont based on that for the other stink bug's symbiont. Therefore, I have completed this project successfully.

研究分野：微生物生態学

キーワード：細胞内共生 オオホシカメムシ バークホルデリア モデル共生系

## 1. 研究開始当初の背景

多くの昆虫はその体内に共生微生物を保持し、それら微生物を母から子へと代々受け継いでいる。共生微生物のゲノム配列が次々と解読されるにつれ、必須栄養素の供給など、共生微生物が宿主昆虫の生存にとって重要な役割を果たすことがわかってきた (Shigenobu *et al.*, *Nature*, 2000 など)。このように共生現象の機能的な側面が理解される一方で、共生関係の成立や維持に関わる分子基盤について明らかとなっていることは少ない。その最大の障壁は、共生微生物が宿主の体内環境に高度に適応した結果、通常の培地上で生育できないほど多くの遺伝子を失っており、共生細菌の遺伝子組換え等の遺伝学的実験アプローチが適用できない点にあった。

ホソヘリカメムシを始めとする一部のカメムシ類は、環境中に生息しているバークホルデリア (*Burkholderia*) 属細菌を、幼虫時に経口感染により獲得し、腸管後端部 (以下、共生器官) 内腔に特異的に保持する、“環境獲得型”の腸内共生系 (細胞外共生) を発達させている (Kikuchi *et al.*, *ISME J*, 2011)。一般的な昆虫の細胞内共生細菌 (母子間伝搬型) とは異なり、これらバークホルデリア共生細菌は単離培養が容易であり、遺伝子組換えが可能である (Kikuchi & Fukatsu, *Mol Ecol*, 2014)。このため、カメムシ類とバークホルデリアの環境獲得型の腸内共生系は、昆虫における共生の分子基盤へ実験的にアプローチするための有用なモデル系として近年注目されている (Takeshita & Kikuchi, *Res Microbiol*, 2017)。しかし、共生細菌が培養困難な昆虫細胞内共生に関しては、「細胞内共生関係の成立や維持に関わる (特に、共生細菌側の) 分子基盤を解明する」という学術的な問いに対して直接的にアプローチ可能なモデル系は依然として存在しない。このような背景において申請者は、オオホシカメムシ (図 1) が環境中から獲得したバークホルデリアを共生器官の細胞内に局在させること (“環境獲得型の細胞内共生系”) を発見した。



図 1. オオホシカメムシ

## 2. 研究の目的

本研究では、申請者がオオホシカメムシで発見した、バークホルデリアとの“環境獲得型の細胞内共生系”を昆虫細胞内共生の新規モデル共生系として確立し、本共生系に関する基礎データ収集することを目的とする。

## 3. 研究の方法

### (1) オオホシカメムシ由来のバークホルデリア共生細菌の単離培養およびゲノム解読

2019年7月に沖縄本島にて採集したオオホシカメムシの共生器官を解剖にて摘出し、共生器官に由来するバークホルデリア属細菌の単離培養を試みた。単離培養に成功した一部の菌株について、次世代シーケンサー PacBio RSII によるゲノム配列決定を行った。

### (2) オオホシカメムシ由来バークホルデリア共生細菌の遺伝子組換え実験

ホソヘリカメムシ由来のバークホルデリア共生細菌に用いられている手法 (Kikuchi & Fukatsu, *Mol Ecol*, 2014; Kim *et al.*, *Appl Environ Microbiol*, 2013) を適用し、オオホシカメムシ由来のバークホルデリア属細菌の緑色蛍光タンパク質発現変異株 (以下、GFP 株) および任意遺伝子欠損株の作製を試みた。

### (3) オオホシカメムシにおける共生細菌の感染動態調査

まず、実験室内で継代飼育を行っているオオホシカメムシに対して、バークホルデリア共生細菌を感染させる人工感染系を構築した。さらに、緑色蛍光タンパク質遺伝子を標的とした定量 PCR 実験系を構築した。

孵化直後のオオホシカメムシに GFP 株を感染させ、オオホシカメムシの各成長段階で共生器官を解剖により摘出し、DNA 抽出に供した。抽出した DNA に対して緑色蛍光タンパク質遺伝子を標的とした定量 PCR を実施することで、オオホシカメムシ各成長段階における個体あたりの感染菌数 (= 緑色蛍光タンパク質遺伝子コピー数) を計算した。

### (4) 各種バークホルデリア属細菌のオオホシカメムシへの感染実験

オオホシカメムシのバークホルデリア共生細菌、ホソヘリカメムシのバークホルデリア共生細菌に加えて、系統的に異なる各種バークホルデリア属細菌を対象に、それぞれオオホシカメムシへ感染させて成虫まで飼育する、感染飼育実験を行った。無菌状態での飼育実験も行い、成虫まで成長した個体割合をそれぞれ算出した。

## 4. 研究成果

### (1) オオホシカメムシ由来のバークホルデリア共生細菌の単離培養およびゲノム解読

2019年7月に沖縄本島にて採集したオオホシカメムシの共生器官に由来するバークホルデリア共生細菌4株の単離培養に新たに成功した。このうちの2株と、以前単離培養に成功していた1株の計3株に対して、次世代シーケンサー PacBio RSII によるゲノム配列決定を行い、全3株の完全ゲノム解読に成功した。3株の完全ゲノムの統計情報を表1にまとめる。

	PGU16	PGU19	F2
ゲノムサイズ (Mb)	9.47	11.25	9.28
GC含量 (%)	62.4	61.7	62.4
染色体数	2	2	2
プラスミド数	3	3	2
CDS数	8,498	10,280	8,284
rRNA数	12	14	12
tRNA数	71	70	71

表 1. オオホシカメムシ由来のバークホルデリア共生細菌の完全ゲノム。

これら3株のうち、PGU16株とPGU19株の2株の完全ゲノムに関し

ては、他のカメムシ由来のバークホルデリア共生細菌ゲノムとの比較ゲノム解析を行い、国際誌に発表した (Takeshita & Kikuchi, *Genes*, 2020)。

### (2) オオホシカメムシ由来バークホルデリア共生細菌の遺伝子組換え実験

オオホシカメムシ由来のバークホルデリア共生細菌 F2 株に対して、ホソヘリカメムシ共生細菌に用いられている方法を適用し、GFP 株および任意遺伝子欠損株の作製が可能であることを確認した。図2に作製した GFP 株を感染させたオオホシカメムシの消化管写真およびべん毛構成遺伝子 *fliF* 欠損株と野生株の運動性試験の結果を示す。

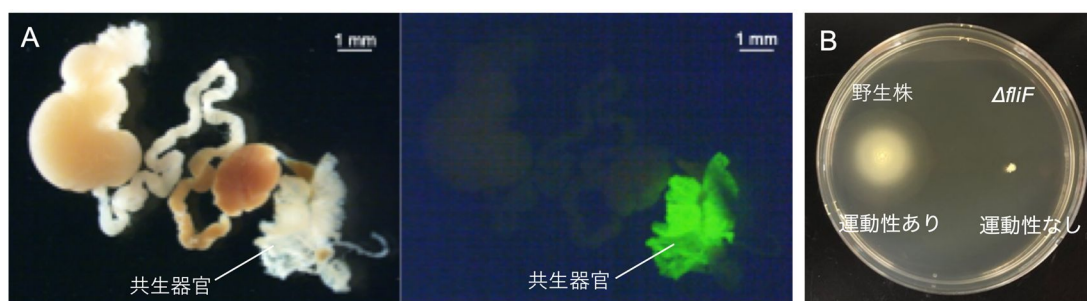


図 2. オオホシカメムシ由来のバークホルデリア共生細菌の遺伝子組換え実験。

(A) 作製した GFP 株を感染させたオオホシカメムシ消化管。右の蛍光顕微鏡像から、共生器官にのみ、GFP 株が感染していることがわかる。

(B) 作製した欠損株の運動性試験。べん毛構成遺伝子 *fliF* の欠損により、運動性が失われたことを示している。

### (3) オオホシカメムシにおける共生細菌の感染動態調査

まず、共生細菌を懸濁した蒸留水 ( $10^7$  CFU/ml) を孵化直後のオオホシカメムシに飲み水として与えることにより、共生細菌を人工的に感染させる人工感染系を構築した (図 2A)。

オオホシカメムシの各成長段階 (計 9 点) における感染菌数を定量した。感染 2 日後 (1 齢若虫) には、個体間のばらつきはあるものの、感染菌数が個体当たり  $10^7$  コピー程度まで達することがわかった。その後、成長するにつれて徐々に感染菌数は上昇していき、4 齢若虫時に定常状態に達することが示された。成虫における感染菌数は、性に関わらず、個体当たり  $10^9$  コピー近くまで達した。

### (4) 各種バークホルデリア属細菌のオオホシカメムシへの感染実験

まず、オオホシカメムシ共生器官から単離培養した株 (PGU16 株、PGU19 株、F2 株) を感染させ飼育した場合、6 割から 7 割の個体が成虫まで成長することを確認した。一方、共生細菌を与えずに飼育した場合、全個体が若齢若虫時に死亡し、成虫まで成長する個体は現れなかった。従って、オオホシカメムシとバークホルデリア共生細菌が必須共生関係にあると言える。

続いて、系統的に異なる各種バークホルデリア属細菌をオオホシカメムシに感染させて飼育した。オオホシカメムシ共生細菌に系統的に近縁なバークホルデリア属細菌を感染させた場合、成虫まで成長した個体の割合は 6 割以上と、オオホシカメムシ共生細菌と同等かそれ以上の生

存率を示した。中でも *Burkholderia terrae* は、感染させた 20 頭全てが成虫まで成長した。

ホソヘリカメムシ共生細菌を初めとする、オオホシカメムシ共生細菌から系統的に少し離れたパークホルデリア属細菌を感染させた場合は、非感染の場合と同様、全個体が若齢若虫時に死亡し、成虫まで成長する個体は現れなかった。従って、オオホシカメムシへの感染能や共生細菌としての機能発揮能は、パークホルデリア属細菌の一部に限られた系統の共通祖先で獲得された形質であることが示唆された。

以上のように本研究では、オオホシカメムシ継代飼育系の構築、オオホシカメムシ共生細菌の単離培養およびゲノム解読、オオホシカメムシ人工感染系の構築、共生細菌の遺伝子組換え実験系の構築を無事に完了させた。これらのことから、目的であった新規モデル共生系の確立に成功し、昆虫細胞内共生の成立や維持に関わる共生細菌側の分子基盤を解明するための準備が整ったと考えている。今後、本モデル共生系を用いて研究を進めていくことで、昆虫細胞内共生の分子基盤に迫りたい。

#### <引用文献>

Shigenobu S, Watanabe H, Hattori M, Sakaki Y, Ishikawa H. 2000. Genome sequence of the endocellular bacterial symbiont of aphids *Buchnera* sp. APS. *Nature*, 407:81–86.

Kikuchi Y, Hosokawa T, Fukatsu T. 2011. An ancient but promiscuous host-symbiont association between *Burkholderia* gut symbionts and their heteropteran hosts. *ISME J*, 5:446–460.

Kikuchi Y, Fukatsu T. 2014. Live imaging of symbiosis: spatiotemporal infection dynamics of a GFP-labelled *Burkholderia* symbiont in the bean bug *Riptortus pedestris*. *Mol Ecol*, 23:1445–1456.

Takeshita K, Kikuchi Y. 2017. *Riptortus pedestris* and *Burkholderia* symbiont: an ideal model system for insect-microbe symbiotic associations. *Res Microbiol*, 168:175–187.

Kim JK *et al.* 2013. Bacterial cell wall synthesis gene *uppP* is required for *Burkholderia* colonization of the stinkbug gut. *Appl Environ Microbiol*, 79:4879–4886.

Takeshita K, Kikuchi Y. 2020. Genomic comparison of insect gut symbionts from divergent *Burkholderia* subclades. *Genes*, 11:744.

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 Takeshita Kazutaka, Kikuchi Yoshitomo	4. 巻 11
2. 論文標題 Genomic Comparison of Insect Gut Symbionts from Divergent Burkholderia Subclades	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Genes	6. 最初と最後の頁 744
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/genes11070744	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 竹下 和貴、石神 広太、Jang Seonghan、菊池 義智	4. 巻 36
2. 論文標題 共生研究のためのモデル系：ホソヘリカメムシとBurkholderiaの魅力	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 日本微生物生態学会誌	6. 最初と最後の頁 3~12
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.20709/jsmeja.36.1_3	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3件（うち招待講演 1件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 竹下和貴
2. 発表標題 昆虫 - 微生物共生研究における “カメムシ” モデル共生系
3. 学会等名 秋田応用生命科学研究会第33回講演会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 竹下 和貴、菊池 義智
2. 発表標題 カメムシが環境中から獲得する細胞内共生細菌のゲノム特性
3. 学会等名 日本微生物生態学会第33回大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 竹下 和貴, 菊池 義智
2. 発表標題 オオホシカメムシが環境中から獲得する培養可能な細胞内共生細菌
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〕

Kazutaka Takeshita Website <a href="https://sites.google.com/view/kazutakatakeshita/home">https://sites.google.com/view/kazutakatakeshita/home</a>
---

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
研究協力者	菊池 義智  (Kikuchi Yoshitomo)		

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
---------	---------