

令和 6 年 6 月 14 日現在

機関番号：82626

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20H03303

研究課題名（和文）異なる宿主で腸内共生と細胞内共生を行う細菌の遺伝的基盤

研究課題名（英文）Genetic basis for bacterial gut and intracellular symbioses in different hosts

研究代表者

菊池 義智（Kikuchi, Yoshitomo）

国立研究開発法人産業技術総合研究所・生命工学領域・研究グループ長

研究者番号：30571864

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 13,700,000円

研究成果の概要（和文）：多くの昆虫はその体内に細胞内共生細菌を持つと言われ、細胞内共生現象の理解に向けて古くから研究が行われてきた。しかし、それら細胞内共生細菌の多くが培養や遺伝子組み換えが難しく、細胞内共生の遺伝的基盤については理解が進んでいない。本研究では、我々が独自に発見した「培養できて遺伝子組み換えができる」ナガカメムシ類の細胞内共生細菌を対象に、細胞内共生の遺伝的基盤の解明を行った。共生細菌の遺伝子変異株のスクリーニングにより、細胞内共生に関わる共生細菌側の遺伝子を同定することに成功し、さらにそれを下支えする宿主カメムシ側の遺伝子の特定にも成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

あらゆる真核生物の共通祖先で生じたミトコンドリア獲得のインパクトからもわかるように、細菌との細胞内共生は生物進化において極めて重要な役割を果たしてきた。100万種以上が知られる昆虫はその約半数が何らかの細胞内共生細菌を持つと言われており、細胞内共生現象の理解に向けて古くから研究が行われてきた。しかしその一方で、細胞内共生の進化プロセスや共生の維持機構についてはほとんど解明されていないのが現状である。その大きな理由は、細胞内共生細菌の多くが宿主体外で培養ができず、遺伝子組換えが困難な点にある。これによって、細胞内共生の遺伝的基盤のほとんどが未解明であり、この意味で本研究の学術的意義は大きい。

研究成果の概要（英文）：About half of the more than one million known species of insects are estimated to possess intracellular symbiotic bacteria, and research has long been conducted to understand the phenomenon of intracellular symbiosis. However, most symbiotic bacteria are highly adapted to the host's internal environment, making culture and genetic recombination difficult, and genetic bases of intracellular symbiosis remain unclear. We have studied *Caballeronia*, the gut (extracellular) symbiont of the stinkbugs that can be genetically modified, and have recently discovered that this bacterium is the intracellular symbiosis in the lygaeoid stinkbugs. This study was conducted to thoroughly elucidate the genetic basis of this genetically manipulatable intracellular symbiont. By screening for mutants of the symbiotic bacterium, we succeeded in identifying a symbiont gene involved in intracellular symbiosis, and in addition, we succeeded in identifying a host gene that underpins the intracellular symbiosis.

研究分野：共生系進化学

キーワード：共生 昆虫 微生物 進化 遺伝的基盤

1. 研究開始当初の背景

あらゆる真核生物の共通祖先で生じたミトコンドリア獲得のインパクトからもわかるように、細菌との細胞内共生は生物進化において極めて重要な役割を果たしてきた。100万種以上が知られる昆虫はその約半数が何らかの細胞内共生細菌を持つと言われており、細胞内共生現象の理解に向けて古くから研究が行われてきた。細胞内共生細菌の多くは宿主の体内環境に高度に適応しており、単離培養することができないのが一般的である。近年の次世代シーケンス技術の発展により、培養ができない細胞内共生細菌についても容易にゲノム解読が可能となり、その代謝マップの解析から宿主への栄養供給の実態が比較的簡便に推定できるようになってきた。細胞内共生細菌のゲノムは多くの場合 0.2~0.5Mb 程度に縮退しており、この点もゲノム解析の容易さとその栄養代謝機能の推定のしやすさに繋がっていると考えられる。しかしその一方で、細胞内共生の進化プロセスや共生の維持機構については、現在においてもほとんど解明されていないのが現状である。その大きな理由は、それら細胞内共生細菌のほとんどが宿主の体内環境に高度に適応しているため、宿主体外で培養することが極めて難しく、遺伝子組換えのような逆遺伝学的アプローチをとることができない点にある。これによって、細胞内共生を支える分子メカニズムのほとんどが未だに解明されていない。

2. 研究の目的

これまでに我々は陸生カメムシ類（主にカメムシ下目 [Pentatomomorpha] に属する種）を対象に調査を進め、ヘリカメムシ上科やナガカメムシ上科のカメムシ種が *Caballeronia* 属細菌と共生していることを発見してきた。これらカメムシは *Caballeronia* 共生細菌を母子間伝播することなく、代わりに毎世代環境土壌中からこの共生細菌を獲得し、消化管に発達する袋状組織（盲囊）の中に保持する。これまでにヘリカメムシ上科に属するホソヘリカメムシ (*Riptortus pedestris*) をモデル系として研究を進め、以下の点を明らかにしてきた。即ち、①共生細菌は盲囊の内腔中に保持されている（腸内共生/細胞外共生）、②共生細菌は宿主の老廃物の再利用に役立っており、アミノ酸やビタミンを合成し供給している、③共生細菌を持たない非感染個体は、成長が遅れ、体サイズが小さく、産卵数も大幅に減少する。このようなカメムシ-*Caballeronia* 共生系の多様性を明らかにする目的で、様々なカメムシを採集して調査を行ったところ、ヘリカメムシ上科のカメムシは全てホソヘリカメムシ同様に腸内共生（細胞外共生）を行っていた一方、ナガカメムシ上科の一部において、*Caballeronia* 共生細菌が盲囊の上皮細胞内に侵入し、細胞内共生を行うことを発見した。注目すべきことに、この *Caballeronia* 共生細菌は一般的な細胞内共生細菌とは異なり容易に単離培養ができ、さらに遺伝子組み換えも可能である。本研究では、この我々が独自に発見した「培養ができて遺伝子組み換えができる細胞内共生細菌」を対象に、細胞内共生の分子基盤の解明を目指して研究を行った。

3. 研究の方法

ヒョウタンナガカメムシ科のコバネヒョウタンナガカメムシ (*Togo hemipterus*) はイネ科作物の害虫として知られ、体長 6 mm 程度の小さな徘徊性カメムシである (図 1A)。このコバネヒョウタンナガカメムシをモデル系として、*Caballeronia* 細菌による細胞内共生系の実態解明を行い、さらにその分子基盤の調査を行った。まず *Caballeronia* 共生細菌の GFP (緑色蛍光タンパク質) 発現株を作成し、これをコバネヒョウタンナガカメムシに感染させて体内動態や細胞内感染の詳細を顕微鏡観察した。また、共生細菌が宿主へ与える適応度効果についても飼育実験により調査を行った。加えて、共生の遺伝的基盤の解明を目的に *Caballeronia* 共生細菌の Tn-seq 実験系 (共生細菌のトランスポゾンランダム変異株を作成し、これをまとめてカメムシに感染さ

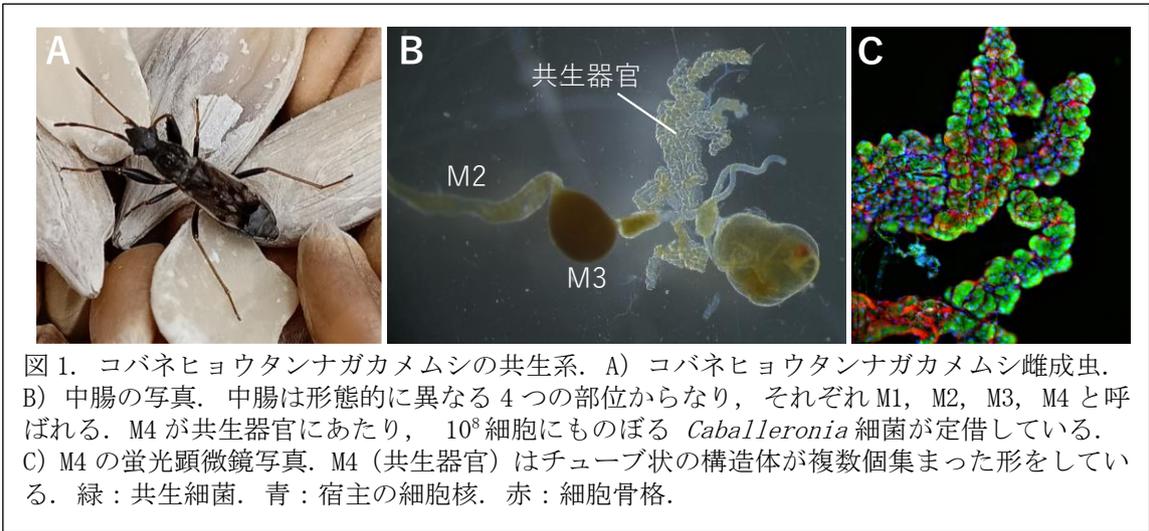


図 1. コバネヒョウタンナガカメムシの共生系. A) コバネヒョウタンナガカメムシ雌成虫. B) 中腸の写真. 中腸は形態的に異なる 4 つの部位からなり、それぞれ M1, M2, M3, M4 と呼ばれる. M4 が共生器官にあたり、 10^8 細胞にもものぼる *Caballeronia* 細菌が定着している. C) M4 の蛍光顕微鏡写真. M4 (共生器官) はチューブ状の構造体が複数個集まった形をしている. 緑: 共生細菌. 青: 宿主の細胞核. 赤: 細胞骨格.

せ、共生器官に定着した変異株をアンプリコンシークエンス解析により網羅的に同定する。共生器官に定着できなかった変異株のトランスポゾン挿入位置を特定することで、どの遺伝子が共生に重要であるか網羅的に推定することができる)を立ち上げ、コバネヒョウタンナガカメムシへの適用を試みた。またこれと並行して、我々が持つ *Caballeronia* 共生細菌の遺伝子変異株ライブラリーをコバネヒョウタンナガカメムシへと感染させ、細胞内への共生不全を起こす変異株のスクリーニングを行った。また、コバネヒョウタンナガカメムシ共生器官の RNA-seq 解析を行い、細胞内共生に関連する宿主側遺伝子を探索し、これを RNAi することで細胞内共生への関与を検証した。

4. 研究成果

まず *Caballeronia* 共生細菌の GFP (緑色蛍光タンパク質) 発現株を作成し、これをホソヘリカメムシおよびコバネヒョウタンナガカメムシに共生させたところ、同じ細菌株であるにもかかわらず、ホソヘリカメムシでは盲嚢内腔中に細胞内共生を行い、一方コバネヒョウタンナガカメムシにおいては盲嚢上皮細胞中に細胞内共生していた。このことは、細菌との細胞内共生の大きな決定因子は、細菌側というよりは宿主昆虫側にある可能性を強く示唆する結果と言える。

次に、コバネヒョウタンナガカメムシについて *Caballeronia* 共生細菌の影響調査を行ったところ、ホソヘリカメムシの場合とは異なり、ほとんどの個体が成虫になれずに死亡することが明らかとなった。この結果は餌植物の違いにあると考えられ、ダイズを主食とするホソヘリカメムシに比べ、イネ科種子を主食とするコバネヒョウタンナガカメムシでは不足する栄養素が大きく変わるものと考えられる。これによって共生細菌への依存度も大きく変わると考えられ、コバネヒョウタンナガカメムシにおいて *Caballeronia* は必須の細胞内共生細菌であると結論することができる。

Caballeronia 共生細菌の培養が容易であることから、遺伝子組み換え体を作成し、これをコバネヒョウタンナガカメムシに感染させることで、細胞内共生に関わる共生細菌側の遺伝的基盤を特定できるものと考え実験を進めた。研究期間中に、フランス CNRS との共同研究により *Caballeronia* 共生細菌の Tn-seq 実験系を立ち上げることに成功したが、まずその有効性を確かめるために共生モデル系であるホソヘリカメムシへ適用を行った。その結果、非常に良好な結果を得ることができ、腸内共生に関わる新たな遺伝子因子を多数突き止めることに成功した (Jouan et al. *ISME Commun* 2023; Lachat et al. *PNAS* 2024)。これら Tn-seq 系をコバネヒョウタンナガカメムシ (および近縁のオオモンクロナガカメムシ [図 2]) にも適用するべく予備的調査を進めたが、感染におけるボトルネックの影響や共生器官 (盲嚢) からの菌体回収がうまくいかず、良好な結果を得ることができなかった。盲嚢から共生細菌を分離培養することが難しい点はコバネヒョウタンナガカメムシやオオモンクロナガカメムシに特異的な現象であり、ホソヘリカメムシには見られないことから、細胞内に共生することと何らかの関連がある可能性が考えられる。

Tn-seq によるアプローチと並行して、我々が持つ *Caballeronia* 共生細菌の遺伝子変異株を用いて、コバネヒョウタンナガカメムシ 我々はこれまでにホソヘリカメムシを中心に研究を進めてきたが、その過程で細胞表面の構成成分に関する変異株や、べん毛運動性変異株、栄養代謝や抗生物質抵抗性に関わる遺伝子の変異株など、様々なタイプの遺伝子変異株を作成してきた。これら遺伝子変異株についてコバネヒョウタンナガカメムシに感染させ共生不全株のスクリーニングを行った。その結果、べん毛運動性変異株などいくつかの遺伝子変異株は共生器官への感染が全く見られなかったが、その体内動態の観察の結果、これら変異株は共生器官に到達する以前に腸内選別機構でソートアウトされてしまうことが明らかとなった。しかし、1 株だけ共生器官に感染し細胞内共生を行うものの、成長するにつれて少しずつ細胞内の細菌数が減少してしまう変異株が見つかった。これは抗生物質等の抵抗性にも重要と考えられる細胞表面のトランスポーターの遺伝子変異株であった。一方、コバネヒョウタンナガカメムシ共生器官の RNA-seq においては複数の抗菌ペプチドが高発現していることが明らかとなった。これら抗菌ペプチドの RNAi を行ったところ、上記トランスポーター変異株が細胞内共生可能となることが明らかとなった。以上の結果は、これまで全く分かっていなかった細胞内共生の維持機構について共生細菌と宿主昆虫両面の遺伝的基盤を同時に解明した成果であり、細胞内共生の進化を理解する絵でも非常に重要な成果と言える。

Jouan et al. *ISME Commun* 2023 [https://doi.org/10.1093/ismeco/ycad001]; Lachat et al. *PNAS* 2024 [https://doi.org/10.1073/pnas.2401802121]

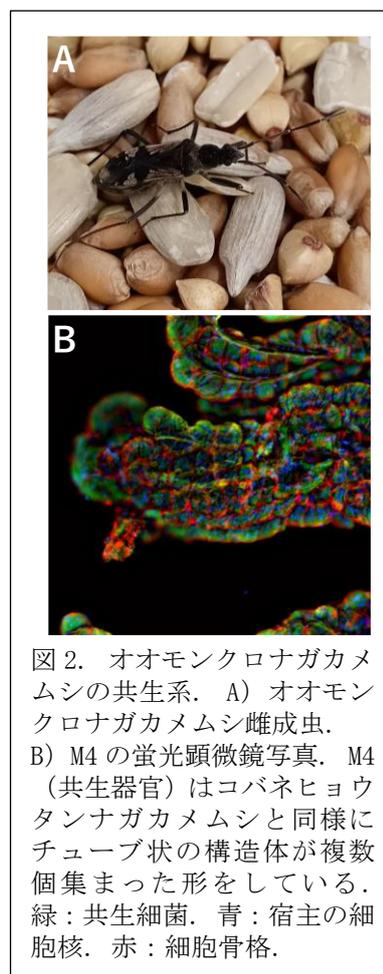


図 2. オオモンクロナガカメムシの共生系。A) オオモンクロナガカメムシ雌成虫。B) M4 の蛍光顕微鏡写真。M4 (共生器官) はコバネヒョウタンナガカメムシと同様にチューブ状の構造体が複数個集まった形をしている。緑：共生細菌。青：宿主の細胞核。赤：細胞骨格。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 8件/うち国際共著 3件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Ishigami Kota, Jang Seonghan, Itoh Hideomi, Kikuchi Yoshitomo	4. 巻 17
2. 論文標題 Insecticide resistance governed by gut symbiosis in a rice pest, <i>Cletus punctiger</i> , under laboratory conditions	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biology Letters	6. 最初と最後の頁 20200780
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1098/rsbl.2020.0780	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Jang Seonghan, Mergaert Peter, Ohbayashi Tsubasa, Ishigami Kota, Shigenobu Shuji, Itoh Hideomi, Kikuchi Yoshitomo	4. 巻 118
2. 論文標題 Dual oxidase enables insect gut symbiosis by mediating respiratory network formation	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Proceedings of the National Academy of Sciences	6. 最初と最後の頁 e2020922118
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1073/pnas.2020922118	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Sato Yuya, Jang Seonghan, Takeshita Kazutaka, Itoh Hideomi, Koike Hideaki, Tago Kanako, Hayatsu Masahito, Horii Tomoyuki, Kikuchi Yoshitomo	4. 巻 12
2. 論文標題 Insecticide resistance by a host-symbiont reciprocal detoxification	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 6432
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41467-021-26649-2	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 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 ~ 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 Takeshita Kazutaka, Jang Seonghan, Kikuchi Yoshitomo	4. 巻 9
2. 論文標題 Complete Genome Sequence of Burkholderia sp. Strain THE68, a Bacterial Symbiont Isolated from Midgut Crypts of the Seed Bug Togo hemipterus	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Microbiology Resource Announcements	6. 最初と最後の頁 e00041-20
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1128/MRA.00041-20	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 Jang Seonghan, Kikuchi Yoshitomo	4. 巻 41
2. 論文標題 Impact of the insect gut microbiota on ecology, evolution, and industry	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Current Opinion in Insect Science	6. 最初と最後の頁 33 ~ 39
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.cois.2020.06.004	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Jang Seonghan, Ishigami Kota, Mergaert Peter, Kikuchi Yoshitomo	4. 巻 121
2. 論文標題 Ingested soil bacteria breach gut epithelia and prime systemic immunity in an insect	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Proceedings of the National Academy of Sciences	6. 最初と最後の頁 e2315540121
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1073/pnas.2315540121	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Joy Lachat, Gaelle Lextrait, Romain Jouan, Amira Boukherissa, Aya Yokota, Seonghan Jang, Kota Ishigami, Ryo Futahashi, Raynald Cossard, Delphine Naquin, Vlad Costache, Luis Augusto, Pierre Tissiere, Emanuele G Biondi, Benoit Alunni, Tatiana Timchenko, Tsubasa Ohbayashi, Yoshitomo Kikuchi, Peter Mergaert	4. 巻 121
2. 論文標題 Hundreds of antimicrobial peptides create a selective barrier for insect gut symbionts	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Proceedings of the National Academy of Sciences	6. 最初と最後の頁 e2401802121
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1073/pnas.240180212	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 JANG Seonghan, 石神広太, 大林翼, 松浦優, MERGAERT Peter, 菊池義智
2. 発表標題 Homeobox遺伝子によって調節される共生器官の驚くべき形態変化！
3. 学会等名 日本進化学会第23回東京大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 石神広太, Jang Seonghan, 伊藤英臣, Mergaert Peter, 菊池義智
2. 発表標題 カビが運命付けるバクテリア-昆虫の相利共生
3. 学会等名 日本進化学会第23回東京大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 石神 広太, Seonghan Jang, 伊藤 英臣, 大林 翼, Peter Mergaert, 菊池 義智
2. 発表標題 カビが繋ぐ昆虫とバクテリアの共生系サイクル
3. 学会等名 日本微生物生態学会第34回大会
4. 発表年 2021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
研究分担者	竹下 和貴 (Takeshita Kazutaka) (40799194)	秋田県立大学・生物資源科学部・助教 (21401)	

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