

機関番号：82626

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2009～2010

課題番号：21880056

研究課題名（和文） 昆虫ホルモンを介した内部共生微生物の調節機構

研究課題名（英文） Hormonal regulation and molecular mechanisms of insect host-symbiont crosstalk

研究代表者

二橋 亮 (FUTAHASHI RYO)

独立行政法人産業技術総合研究所・生物プロセス研究部門・研究員

研究者番号：50549889

研究成果の概要（和文）：

本研究では、半翅目昆虫において、脱皮ホルモンによって引き起こされる絶食状態が、共生細菌の存在量の変化の直接的な原因となっている可能性が高いことが示された。また、EST データベースの作製および発現解析から、共生と関連する遺伝子を多数同定することに成功した。さらに、3種のカメムシで RNAi による遺伝子機能解析系を構築した。今回の共生細菌の感染に関わる新規遺伝子の単離と機能解析系の確立により、今後、共生細菌と宿主の相互作用の分子基盤の解明が飛躍的に進むと考えられる。

研究成果の概要（英文）：

I found that starvation induced by molting hormone is the main cause of reduction of the amount of symbiotic bacteria in hemipteran insects. Also I succeeded in obtaining many novel genes involved in insect symbiosis by the construction of EST database and quantitative expression analysis. Moreover, I established RNAi method for stinkbug insects. Identification of novel symbiosis-associated genes and establishment of functional analysis will allow significant advance in analysis of the molecular mechanisms of host-symbiont crosstalk.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,110,000	333,000	1,443,000
2010年度	1,010,000	303,000	1,313,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,120,000	636,000	2,756,000

研究分野：昆虫共生

科研費の分科・細目：農学・応用昆虫学

キーワード：共生細菌、絶食、昆虫ホルモン、EST、体色

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 非常に多くの生物が、微生物を体内に共生させている。この「内部共生」という現象は、多くの昆虫にとって生存に必須だけでなく、宿主の性比をコントロールしたり、性転換を行ったり、食性の変化や害虫化、さらには農薬耐性などさまざまな面で機能していることが近年の研究から明らかになって

きた。しかし、共生細菌がどのような分子機構で宿主に影響を与えているのかはいまだほとんど不明である。

(2) 共生細菌の実態を解明する研究が進む中、宿主の成長過程において、共生細菌の存在量が増加する例も報告されるようになってきた。1つの可能性として、宿主の成長に伴う内分泌環境の変化が、共生細菌の存在量や局

在に影響を与えている可能性が考えられたが、これまでに宿主のホルモンと共生細菌との関係を直接調べた研究は皆無であった。

(3)近年、共生細菌のゲノム配列の解析が進んでいる。しかしながら、いまだに宿主と共生細菌との相互作用に関わる機構はほとんど明らかになっていない。カメムシ目昆虫の中には、中腸の一部に外界から獲得した共生細菌が局在する種が存在し、感染個体・非感染個体を容易に比較できるという利点が考えられた。そこで、共生に関わる遺伝子を、感染/非感染の間での EST データベースの比較から同定する手法を検討した。

(4)一方、近年アブラムシやカメムシにおいて、内部共生細菌によって宿主の体色に変化する例が見つかった。不完全変態昆虫では、そもそも体色に関わる分子機構に不明な点が多いので、体色形成に関わる分子機構を明らかにすることで、共生に伴う外部形態の変化のメカニズムの一端が解明されることが期待された。

## 2. 研究の目的

本研究では、共生細菌の発生過程における挙動と宿主ホルモン、栄養状態の関係、および共生細菌が宿主体色に及ぼす影響を複数の昆虫で評価する。同時に、EST データベースの構築から、これまでほとんど知られていない共生関係に関与する具体的な遺伝子の同定を目指すものである。また、不完全変態昆虫で体色形成に関わる遺伝子の同定も同時に試みる。

## 3. 研究の方法

(1)共生細菌の発生過程における挙動と宿主ホルモン、栄養状態の関係を明らかにする。また、ホルモンを人為的に投与したときの共生細菌の存在量の変化を測定する。

(2)外界から共生細菌を獲得する半翅目昆虫において、感染個体と非感染個体から EST library を構築し、比較解析することで、共生に関わる遺伝子の同定を試みる。

(3)共生細菌の有無によって特にクチクラの着色が変化する場合が見られたので、クチクラ着色に関わるメラニン合成系遺伝子の発現・機能解析を行う。

## 4. 研究成果

(1)発生ステージが揃い、飼育の容易な半翅目昆虫ホソヘリカメムシを中心に、ステージによる共生細菌の存在量と宿主ホルモンとの関係を解析したところ、脱皮後 1 日以内に共生細菌の存在量が増加し、その後減少することが確認された。共生細菌の減少は、脱皮ホルモン (Makisterone A) が体内で上昇する時期と関連するが、同時に摂食量が減少する時期とも一致した。そこで、人工的に

Makisterone A を投与した場合と、共生的に絶食させた場合で共生細菌の量を比較したところ、絶食条件の方が、顕著に共生細菌量が変化することが確認された。Makisterone A の投与は絶食も引き起こすことから、脱皮ホルモンによる絶食の誘導が、共生細菌の存在量の変化に関わっていることが示唆された。(2)ホソヘリカメムシにおいて、感染個体/非感染個体それぞれで中腸の 3 つの部位 (内 2 つは共生器官) の EST データベースを作製し、遺伝子クラスターをまとめた上で、クローン数の比較解析を行った。その結果、感染個体では、共生器官において、機能未知の分泌蛋白質や、酵素類のクローン数が特異的に増加していることが確認された。定量的 RT-PCR の結果から、実際にこれらの大部分の遺伝子の発現量が顕著に増加していることが確認された。また、タンパク質分解酵素の 1 種であるカテプシン遺伝子については、酵素活性も感染によって増加することが確認された。一方で、非感染個体では、予想に反して抗菌ペプチドの発現量が多いことが確認された。不完全変態昆虫では、自然免疫に関わるメカニズムに不明な点が多いが、今回の結果から、完全変態昆虫と類似した抗菌ペプチド類を持つことが明らかになった。さらに、感染すると抗菌ペプチドの発現が低下したことから、共生を可能にするために宿主の自然免疫カスケードを、組織特異的に制御しているという新規なメカニズムが示唆された。一連の結果は、不完全変態昆虫の自然免疫および共生と免疫の関係を調べる上で重要な知見を与えるものであり、現在国際共同研究によりさらなる解析を進めているところである。(3)不完全変態昆虫のカメムシ類や、トンボにおいて、メラニン合成に関わる遺伝子が実際にクチクラの着色と関連した発現を示すことを明らかにした。特にホソヘリカメムシ、ヒメナガカメムシ、マルカメムシの 3 種のカメムシ類で、完全変態昆虫でクチクラ着色の鍵となる酵素の *Iaccase2* 遺伝子を nymphal RNAi 法で機能阻害したところ、いずれもクチクラの着色の顕著な阻害が確認された (図 1)。さらに、カメムシ目昆虫で広く RNAi 法を用いた機能阻害が有効であることが確認されたことから、共生に関わる宿主側の遺伝子の機能解析が、今後可能になった。また、*Iaccase2* 遺伝子は完全変態昆虫、不完全変態昆虫の両方において、宿主の脱皮ホルモンによって制御されている可能性が高いことも確認された。一連の研究結果については、国際誌で発表を行った。今回の共生細菌の感染に関わる新規遺伝子の単離と機能解析系の確立により、今後、共生細菌と宿主の相互作用の分子基盤の解明が飛躍的に進むと考えられる。

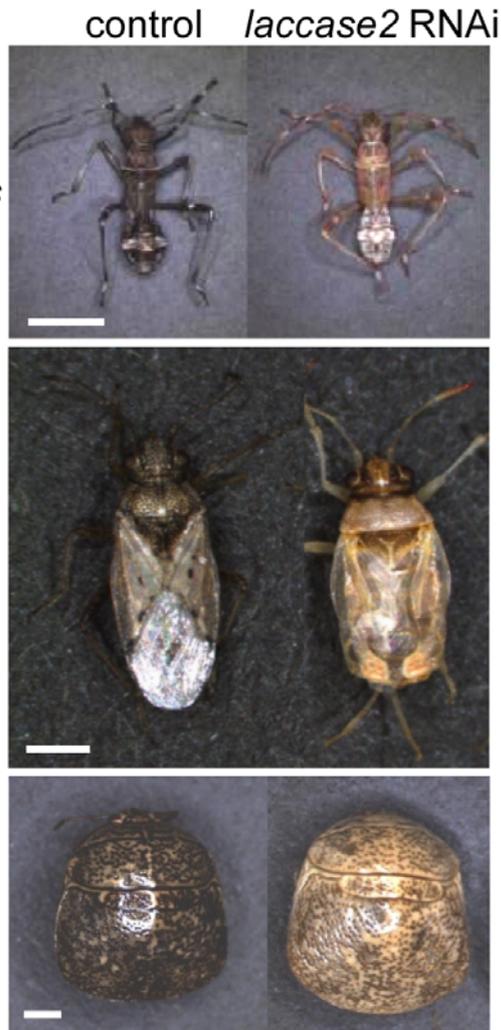


図1 ホソヘリカメムシ(上)、ヒメナガカメムシ(中)、マルカメムシ(下)における *laccase2* 遺伝子の RNAi による着色阻害(右)。Futahashi et al., 2010 より抜粋。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計5件)

① Futahashi R., Tanaka K., Matsuura Y., Tanahashi M., Kikuchi Y., Fukatsu T. *Laccase2* is required for cuticular pigmentation in stinkbugs. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*. 査読有, 41 巻, 2011 年, 191-196.

② Terenius O. ほか(23 番目の著者 Futahashi R.). RNA interference in Lepidoptera: an overview of successful and unsuccessful studies and implications for experimental design. *Journal of Insect Physiology*, 査読有, 57 巻, 2011 年, 231-245.

③ Liu C., Yamamoto K., Cheng T.C., Kadono-Okuda K., Narukawa J., Liu S.P., Han Y., Futahashi R., Kidokoro K., Noda H., ほか. Repression of tyrosine hydroxylase is responsible for the sex-linked chocolate mutation of the silkworm, *Bombyx mori*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 査読有, 107 巻, 2010 年, 12980-12985.

④ Shirataki H., Futahashi R., Fujiwara H. Species-specific coordinated gene expression and trans-regulation of larval color pattern in three swallowtail butterflies. *Evolution and Development*, 査読有, 12 巻, 2010 年, 305-314.

⑤ Futahashi R., Banno Y., Fujiwara, H. Caterpillar color patterns are determined by a two-phase melanin gene pre-patterning process: new evidence from tan and *Laccase2*. *Evolution and Development*, 査読有, 12 巻, 2010 年, 157-167.

[学会発表] (計14件)

① Futahashi R., Fukatsu T. Development and evolution of color pattern diversity in dragonflies. 第20回理研CDB会議. 2011年02月23日. 神戸.

② Futahashi R., Tanaka K., Tanahashi. M., Kikuchi Y., Fukatsu T. EST-based screening for genes involved in host-symbiont interactions in the bean bug *Riptortus pedestris*. 国際生物学賞記念シンポジウム. 2010年12月7日, つくば.

③ Futahashi R. Color-pattern evolution and speciation in dragonflies. カイコゲノム関連研究集会. 2010年11月10日, つくば.

④ Futahashi R. Comparison of color pattern evolution between dragonflies & butterflies. 第6回国際蝶類学会. 2010年06月30日. エドモントン(カナダ).

[図書] (計2件)

① 石川統 編(二橋亮, 分担執筆), 東京化学同人, 生物学辞典, 2010, pp. 1616.

② 二橋亮 (分担執筆), 共立出版, 分子昆虫学, 2009, pp. 448.

[その他]

ホームページ等

[http://staff.aist.go.jp/t-fukatsu/Futahashi\\_right.html](http://staff.aist.go.jp/t-fukatsu/Futahashi_right.html)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

二橋 亮 (FUTAHASHI RYO)

独立行政法人産業技術総合研究所・生物プロセス研究部門・研究員

研究者番号：50549889

### (2) 研究分担者

なし

### (3) 連携研究者

なし