

令和 6 年 6 月 11 日現在

機関番号：21401

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2023

課題番号：21K14865

研究課題名（和文）環境細菌が昆虫細胞内へ共生するために獲得/喪失した形質の探索と実証

研究課題名（英文）Investigation for genetic basis of traits that were acquired or lost in environmental bacteria to be insect intracellular symbionts

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） 3,600,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、遺伝子組換え共生細菌を用いた実験アプローチにより、宿主昆虫への細胞内共生を可能としている共生細菌側の責任遺伝子を同定することを目的とした。比較ゲノム解析により、候補遺伝子として136遺伝子を抽出した。そのうち、20遺伝子の欠損株を作製し感染実験を行ったが、いずれにおいても細胞内共生への関与は認められなかった。引き続き、その他候補遺伝子における検証を継続し、細胞内共生を可能とする責任遺伝子の同定を目指したい。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では細胞内共生に関わる細菌側責任遺伝子の同定には至らなかったものの、候補遺伝子のリストアップは完了した。これらの中には責任遺伝子だけでなく、共生系の進化において重要な役割を果たした遺伝子も含まれているはずであり、そのような候補を絞り込めた点で重要な成果と言える。残りの候補遺伝子を対象に引き続き検証実験を行い、昆虫細胞内共生の分子基盤や進化プロセスの解明に繋げたい。

研究成果の概要（英文）：In this study, I tried to identify the bacterial genes essential to intracellular symbiosis with the host insect via the experimental approach with genetically manipulated bacterial symbionts. By comparative genomic analysis, I extracted 136 genes as candidates. For the 20 candidates, I constructed deletion mutants of the bacterial symbiont and performed infection experiments with the host insect. However, all mutants were able to establish the normal symbiotic association with the host. Therefore, I concluded these 20 genes are not involved in intracellular symbiosis and will continue to examine the remaining candidates.

研究分野：微生物生態学

キーワード：細胞内共生 カメムシ パラバークホルデリア 進化 遺伝子組換え共生細菌

1. 研究開始当初の背景

昆虫細胞内共生の分子基盤や進化プロセスは、長らく興味深い研究対象であり続けているものの、それらの理解は思うように進んでいないのが現状である。この主な原因は、細胞内共生微生物の多くが宿主昆虫に高度に適応しているため培養困難であり、このため遺伝子組換え技術の適用ができないことにある。しかしながら私は、オオホシカメムシ(図1)の細胞内共生細菌が、培養可能で遺伝子組換え可能であることを見出した。そしてこれまでに、本共生系を昆虫細胞内共生の分子基盤や進化プロセスに実験的にアプローチ可能な新規モデル共生系として立ち上げるべく、各種実験系の構築や本共生系に関する基礎的知見の収集を行い、無事にそれらを完了させた。つまりオオホシカメムシ細胞内共生系を用いて、昆虫細胞内共生の分子基盤や進化プロセスを解明するための準備が整ったと言える。



図1. オオホシカメムシ.

オオホシカメムシは、環境中からパラバークホルデリア属の共生細菌を獲得し、細胞内に保持する「環境獲得型の細胞内共生系」を築く。これまでに、共生細菌を獲得できなかった非感染のオオホシカメムシは成虫になることができず死亡する必須共生関係であること、ごく限られた系統のパラバークホルデリア属細菌のみがオオホシカメムシに共生可能であることがわかっている。環境中から必須細胞内共生細菌を獲得しなければならないオオホシカメムシには、非共生細菌を細胞内に取り込んでしまうリスクが常につきまとうが、野外採集した個体を調べる限り、そのような“間違い”が実際に起こることはない。オオホシカメムシは共生細菌が持つ一体何を認識し、共生細菌と非共生細菌を区別しているのだろうか?

ごく限られた系統のパラバークホルデリア属細菌のみがオオホシカメムシに共生可能であることがわかっている。環境中から必須細胞内共生細菌を獲得しなければならないオオホシカメムシには、非共生細菌を細胞内に取り込んでしまうリスクが常につきまとうが、野外採集した個体を調べる限り、そのような“間違い”が実際に起こることはない。オオホシカメムシは共生細菌が持つ一体何を認識し、共生細菌と非共生細菌を区別しているのだろうか?

2. 研究の目的

オオホシカメムシ野外採集個体の共生細菌叢解析 (Takeshita *et al.*, *Microb Environ*, 2015; Takeshita & Kikuchi, *Genes*, 2020) およびオオホシカメムシへの一部細菌の感染実験により、パラバークホルデリア属を構成する多様な細菌のうち insect-associated PBE (iPBE) 系統と呼ばれる単系統群を構成する細菌のみが、オオホシカメムシへ共生可能ながわかってきた。これは、単系統群の共通祖先となる環境細菌(非共生細菌)が、オオホシカメムシの細胞内へ共生するために何らかの形質を獲得/喪失したことを意味する。本研究ではこの知見を足がかりとして、遺伝子組換え共生細菌を用いた実験アプローチにより、オオホシカメムシへの細胞内共生能に関わる細菌側の責任遺伝子を同定することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) バークホルデリア科細菌の網羅的感染実験

これまで進めてきた感染実験を拡大し、共生できないと予想される非 iPBE 系統の細菌を中心に、より多種多様な細菌をオオホシカメムシへ感染させ、羽化率を算出する。本共生系は必須共生であることから、共生関係が成立しなかった場合羽化率はゼロとなる。この実験により、オオホシカメムシ共生細菌の系統特異性(共生可能な細菌の単系統性)をより確かなものとする。

(2) 比較ゲノム解析による細胞内共生細菌に特異的な遺伝子の抽出

感染実験に供したバークホルデリア科細菌の比較ゲノム解析を実施し、オオホシカメムシに共生可能な種のみが特異的に保持/欠失している遺伝子を、(細胞内)共生に関連する候補遺伝子として網羅的にリストアップする。

(3) 遺伝子組換えオオホシカメムシ共生細菌を用いた検証実験

リストアップした候補遺伝子を対象に、オオホシカメムシ共生細菌における遺伝子組換え体(遺伝子欠損株および蛍光タンパク質発現変異株)を作製し、作製した組換え体のオオホシカメムシへの感染実験を実施する。羽化率の算出や、解剖により摘出した共生器官の蛍光顕微鏡観察・共焦点顕微鏡観察により、対象遺伝子の細胞内共生への関連を実験的に検証する。

(4) オオホシカメムシ共生細菌の新種記載

オオホシカメムシより単離培養した共生細菌およびその近縁種を対象に、生理・生化学的性状試験や分子系統解析を行う。新種と言えるような結果が得られた場合には、新種として提案するため論文発表を行う。

4. 研究成果

(1) バークホルデリア科細菌の網羅的感染実験

オオホシカメムシより単離した共生細菌 3 株を含むパラバークホルデリア属細菌 17 種とその他バークホルデリア科細菌 5 種の計 22 種（もしくは株）を対象に、オオホシカメムシへの感染実験を行い、それぞれ羽化率を算出した。

オオホシカメムシが成虫まで成長できた（つまり、羽化率が >0 だった）のは、オオホシカメムシ共生細菌を含む単系統群（iPBE 系統）に含まれる細菌を感染させた場合のみであった（図 2）。この結果は、野外採集個体の共生細菌叢解析の結果とも一致している（Takeshita *et al.*, *Microb Environ*, 2015; Takeshita & Kikuchi, *Genes*, 2020）。以上のことから、パラバークホルデリア iPBE 系統のみが特異的にオオホシカメムシに共生可能であることに加え、オオホシカメムシとの共生関係の起源が iPBE 系統の共通祖先にあることがより一層強く示唆された。

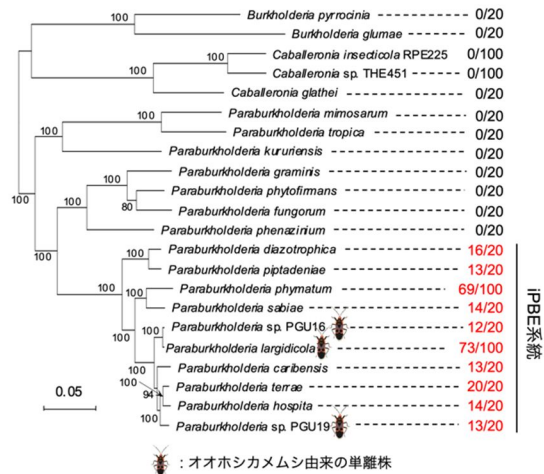


図 2. 網羅的感染実験の結果（羽化率）。
右側に示したのが羽化率（羽化個体数/感染個体数）。

(2) 比較ゲノム解析による細胞内共生細菌に特異的な遺伝子の抽出

オオホシカメムシとの共生関係の起源がパラバークホルデリア iPBE 系統の共通祖先にあると仮定した場合、iPBE 系統の細菌にはオオホシカメムシへ細胞内共生を行うため特異的に獲得/欠失した形質が共通して存在すると考えられる。そこで、そのような形質に関わる遺伝子の候補を絞り込むため、上記感染実験に用いたバークホルデリア科細菌 22 種のゲノム配列を対象に比較ゲノム解析を実施した。

オオホシカメムシと共生関係を築くことが確認できた細菌ゲノム（つまり、iPBE 系統の細菌ゲノム）に特異的に保持されている遺伝子あるいは欠失している遺伝子として、あわせて 136 遺伝子を抽出した（オオホシカメムシ共生細菌の全遺伝子数は、およそ 8,300 遺伝子）。本研究ではこれら遺伝子をオオホシカメムシへの細胞内共生を可能としている共生細菌側の責任遺伝子の候補とした。

(3) 遺伝子組換えオオホシカメムシ共生細菌を用いた検証実験

上記でリストアップした候補遺伝子を対象に、共生細菌ゲノム中の位置や機能アノテーションの情報をもとに、細胞内共生への関与がより強く疑われる候補遺伝子からオオホシカメムシ共生細菌において遺伝子欠損株を作製した。本研究期間中に 8 株の遺伝子欠損株およびそれらの蛍光タンパク質発現変異株の作製が完了している（欠損させた候補遺伝子はあわせて 20 遺伝子）。これら遺伝子の細胞内共生への関与を検証するため、作製した欠損株およびそれらの蛍光タンパク質発現変異株をオオホシカメムシへ感染させ、羽化率の算出と消化管内における局在を蛍光顕微鏡および共焦点顕微鏡を用いて観察した。

いずれの欠損株においても、野生株と比べて羽化率の減少は見られず（図 3）、野生株同様、消化管の上皮細胞内に局在していることが確認された。よって、これら 20 候補遺伝子は細胞内共生への関与が認められず、共生細菌側責任遺伝子ではないと結論づけた。今後は、その他候補遺伝子の欠損株作製と感染実験を継続し、引き続き細胞内共生を可能とする責任遺伝子の同定を目指す。また、遺伝子発現データなどと組み合わせることにより、より確度の高い候補遺伝子リストへの更新も検討したい。

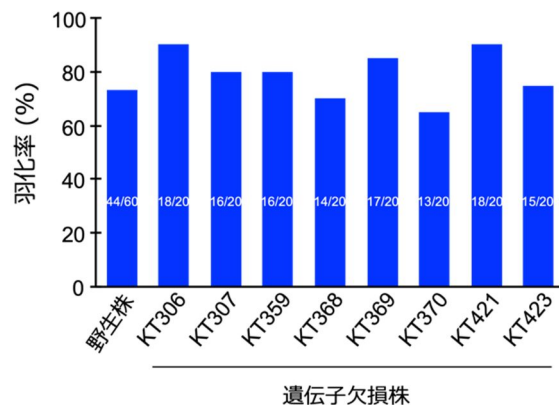


図 3. 候補遺伝子欠損株の感染実験の結果（羽化率）。

(4) オオホシカメムシ共生細菌の新種記載

オオホシカメムシより単離した共生細菌のゲノム情報および生理・生化学的性状を近縁種と比較した結果、当該共生細菌がパラバークホルデリア属の新種に相当することが判明した。そこでこの共生細菌に対して、オオホシカメムシ科（Largidae）にちなんで、“*Paraburkholderia largidicola*”という種名（“オオホシカメムシに住むもの”の意）で新種提案を行なった（Yashima *et al.*, *Int J Syst Evol Microbiol*, 2024）。

<引用文献>

Takeshita K., Matsuura Y., Itoh H., Navarro R., Hori T., Sone T., Kamagata Y., Mergaert P., & Kikuchi Y. 2015. *Burkholderia* of plant-beneficial group are symbiotically associated with bordered plant bugs (Heteroptera: Pyrrhocoroidea: Largidae). *Microb Environ*, 30(4), 321–329.

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

Yashima R., Terata Y., Sakamoto K., Watanabe M., & Takeshita K. 2024. *Paraburkholderia largidicola* sp. nov., a gut symbiont of the bordered plant bug *Physopelta gutta*. *Int J Syst Evol Microbiol*, 74(6): 006411.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Yashima Reona, Terata Yuan, Sakamoto Kaoru, Watanabe Miho, Takeshita Kazutaka	4. 巻 74
2. 論文標題 Paraburkholderia largidicola sp. nov., a gut symbiont of the bordered plant bug Physopelta gutta	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology	6. 最初と最後の頁 6411
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1099/ijsem.0.006411	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 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Kazutaka Takeshita & Yoshitomo Kikuchi
2. 発表標題 Obligate gut symbiosis with environmentally-acquired Paraburkholderia in a stink bug, Physopelta gutta (Pyrrhocoroidea: Largidae)
3. 学会等名 18th International Symposium on Microbial Ecology (ISME18) (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 竹下和貴, 近藤美洋, 菊池義智
2. 発表標題 昆虫との細胞内共生を可能にする細菌側責任遺伝子の探索
3. 学会等名 第67回日本応用動物昆虫学会大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 竹下和貴
2. 発表標題 昆虫細胞内共生系における共生細菌側責任遺伝子の探索
3. 学会等名 日本微生物生態学会第36回大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 竹下和貴
2. 発表標題 昆虫との細胞内共生に必須な共生細菌遺伝子の探索
3. 学会等名 日本昆虫学会第84回大会 第68回日本応用動物昆虫学会大会 合同大会
4. 発表年 2024年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

KAZUTAKA TAKESHITA WEBSITE
<https://sites.google.com/view/kazutakatakeshta/home>

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