

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 4月25日現在

機関番号：82626

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2012

課題番号：22780051

研究課題名（和文） 昆虫－細菌共生系における遺伝的基盤の解明

研究課題名（英文） Elucidation of genetic mechanisms underpinning a insect-microbe endosymbiosis.

研究代表者

菊池 義智（KIKUCHI YOSHITOMO）

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・主任研究員

研究者番号：30571864

研究成果の概要（和文）：本研究では、*Burkholderia* 共生細菌がホソヘリカメムシ共生器官に特異的に感染・定着する分子機構の解明を行った。約6,000株のトランスポゾン挿入変異株を調査し、特異的感染において共生細菌の鞭毛運動性が重要な役割を果たしていることが明らかとなった。

研究成果の概要（英文）：The aim of this study was to determine molecular mechanism as to how *Burkholderia* symbiont specifically localizes in the symbiotic organ of the bean bug. Over 6,000 transposon-inserted mutants were investigated, revealing flagella motility of the symbiont plays a pivotal role in colonizing the symbiotic organ.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2012年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農学・応用昆虫学

キーワード：応用動物、昆虫、微生物、細菌

1. 研究開始当初の背景

多くの植食性昆虫はその体内に共生細菌（内部共生細菌）を保有しており、緊密な相互作用を行っている。これら共生細菌は、食物の分解や栄養補償を行うなど、宿主の栄養代謝において極めて重要な役割を果たしている。例えば木材食性の害虫として知られるシロアリは、それ自身が木質を消化できるわけではなく、腸内に共生した細菌群がセルロ

ース分解機能を担っている。つまり、“ある餌を利用できる”という昆虫の性質は、昆虫自身ではなくその共生細菌が決定しているといってもよい。ほとんどの農業害虫が内部共生細菌を持つことを考えると、これら共生細菌を制御することで食害の低減や害虫の成長・繁殖抑制を図りうると考えられる。しかし、これまでも内部共生細菌をターゲットとした害虫防除技術の開発が試みられて

はいるが成功には至っていない。その大きな理由は、内部共生系における宿主-細菌間相互作用の分子メカニズムがほとんど解明されておらず、具体的な分子ターゲットを定めることが難しい点にある。

2. 研究の目的

昆虫の内部共生系において宿主-共生細菌間相互作用の分子メカニズムが明らかとなっていない大きな理由は、ほとんどの内部共生細菌が難培養性であり、形質転換などの細菌遺伝学的アプローチが全く取れないことにある。本研究では、昆虫の内部共生細菌としては例外的に単離培養が可能なホソヘリカメムシの *Burkholderia* 共生細菌を対象として、形質転換系の確立および変異株の *in vivo* スクリーニングを行い、内部共生の成立に重要な役割を果たす細菌側の遺伝的基盤を網羅的に明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

トランスポゾン random mutagenesis を用いて、宿主体内への定着不全変異株を大規模スクリーニングした。これにより、*Burkholderia* 共生細菌における共生関連遺伝子の網羅的同定を試みた。また、得られた共生関連遺伝子（候補）のいくつかについて定量 PCR や相補実験 (complementation) を行った

4. 研究成果

約4,000株のトランスポゾン挿入変異株のスクリーニングにより、*Burkholderia*共生細菌の鞭毛運動性がホソヘリカメムシ共生菌への感染と定着に重要な役割を果たすことが明らかとなった。さらに変異株のスクリーニングを行い、総計6,000株あまりのトランスポゾン挿入変異株のスクリーニングから、13株の運動変異株を得た。それら13株について（1）軟寒天培地中および液体培地中におけ

る運動性の観察、（2）鞭毛形態の電子顕微鏡による観察、（3）Tn挿入部位のinverse PCRによる同定、（4）ホソヘリカメムシへの感染能力の調査を行った。

（1）については、13株全てが軟寒天培地中で運動不全であった（図1）。（2）については（1）で運動性を示した4株では鞭毛

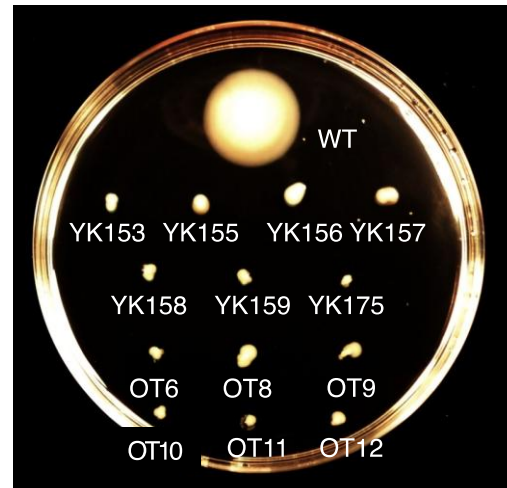


図1 *Burkholderia* 共生細菌の運動性変異株。0.4% 軟寒天培地中の変異株を示す。野生株（WT）は運動性があるため培地中を拡散し広がるが、運動性変異株（YK153-OT12）は培地中を泳げずに広がるができない。

の形成が観察されたが、液体中でも非運動性だった菌株のほとんどは鞭毛を欠いていた。

（3）の調査では、1株を除いた12株全てに

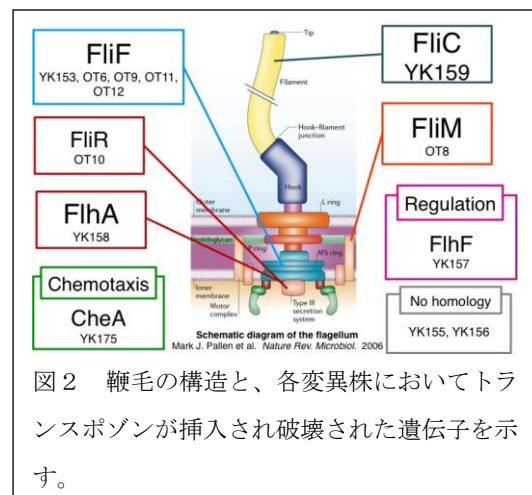


図2 鞭毛の構造と、各変異株においてトランスポゾンが挿入され破壊された遺伝子を示す。

において鞭毛形成に関わる遺伝子のいずれかに Tn が挿入されていることが明らかとなった (図 2)。(4) では、液体培地中で運動性を示した 4 株以外は共生器官に感染することができないことが明らかとなり (図 3)、共生細菌の鞭毛運動性がホソヘリカメムシ共生器官への定着に必須であることが明らかとなった。トランスポゾンで破壊された遺伝子の相補実験を試みたが、成功には至らなかった。

以上の成果については国内外の学会において発表を行うと共に、成果の一部はすでに論文として発表を行った。

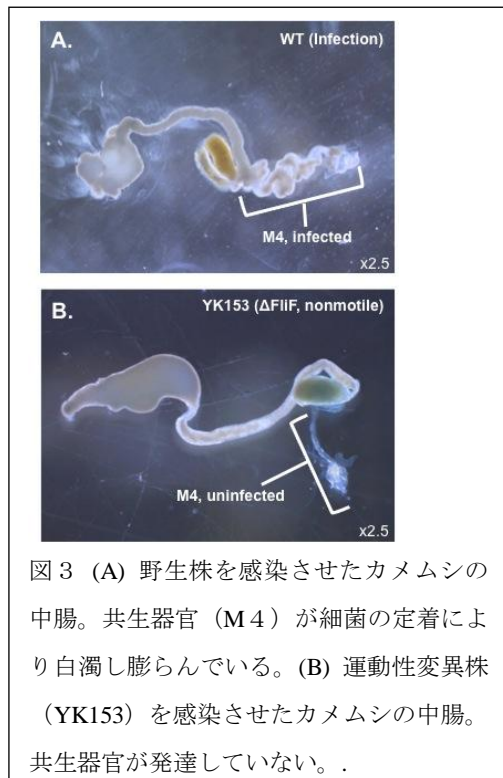


図 3 (A) 野生株を感染させたカメムシの中腸。共生器官 (M4) が細菌の定着により白濁し膨らんでいる。(B) 運動性変異株 (YK153) を感染させたカメムシの中腸。共生器官が発達していない。

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 13 件)

- ① Kikuchi, Y., et al., Efficient colonization of the bean bug *Riptortus pedestris* by an environmentally transmitted *Burkholderia* symbiont, *Applied and Environmental Microbiology*, 査読有, 79, 2013, 2088-2091, DOI: 10.1128/AEM.03299-12

- ② Kikuchi, Y., et al., Specific developmental window for establishment of an insect-microbe gut symbiosis, *Applied and Environmental Microbiology*, 査読有, 77, 2011, 4075-4081, DOI: 10.1128/AEM.00358-11
- ③ Kikuchi, Y., et al., Symbiont-mediated insecticide resistance, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 査読有, 109, 2011, 8618-8622, DOI: 10.1073/pnas.1200231109

[学会発表] (計 18 件)

- ① 菊池義智、Lee Bok Luel、深津武馬、共生細菌の感染がホソヘリカメムシ消化管の形態変化を引き起こす、第57回日本応用動物昆虫学会大会、日本大学、2013/3/28
- ② 菊池義智、Symbiotic gut bacteria confer insecticide resistance、第28回日本微生物生態学会大会、豊橋技術大学、2012/9/22
- ③ 菊池義智、細川貴弘、深津武馬、ホソヘリカメムシにおける *Burkholderia* 共生細菌の腸内選別、第27回日本微生物生態学会大会、京都大学、2011/10/8
- ④ 菊池義智、細川貴弘、深津武馬、Evolution of the symbiotic association between *Burkholderia* gut symbiont and stinkbugs, 3rd Conference on Beneficial Microbes, Hyatt Regency Miami (USA, FL)、2010/10/25

[図書] (計 1 件)

- ① 菊池義智、(編) 大園享司・鏡味麻衣子、微生物の生態学 (シリーズ現代の生態学 11) 「第 8 章 昆虫の共生微生物: その多様性と生態」、(ISBN978-4-320-05739-5)

[その他]

ホームページ:

<http://unit.aist.go.jp/bpri/bpri-env/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

菊池 義智 (KIKUCHI YOSHITOMO)

独立行政法人産業技術総合研究所・生物ブ

ロセス研究部門・主任研究院

研究者番号：30571864