科学研究費助成事業（基盤研究（Ｓ））公表用資料
〔平成２８年度研究進捗評価用〕

平成２５年度採択分
平成２８年２月１７日現在

昆虫—大腸菌人工共生系による共生進化および分子機構の解明

Artificial Symbiotic System between an Insect and *Escherichia coli* -Toward Molecular Genetics and Experimental Evolutionary Biology-

課題番号：25221107
深津　武馬（FUKATSU TAKEMA）
国立研究開発法人産業技術総合研究所・生物プロセス研究部門・首席研究員

研究の概要
我々が新規に開発した昆虫—大腸菌人工共生系を用いて、実験進化学的アプローチ、ゲノム科学的アプローチおよび分子遺伝学的アプローチを駆使することにより、共生に関わる細菌遺伝子を網羅的に取得し、また人工共生大腸菌の進化過程をリアルタイムで記載することにより、共生進化のプロセスおよびメカニズムの詳細な理解をめざす。

研　究　分　野：基礎生物学

キ　ー　ワ　ー　ド：実験進化学、比較ゲノム、機能進化

１．研究開始当初の背景

生物界において微生物との共生関係は普遍的であり、しばしば重要な生物機能を担っている。高度な共生関係が具体的にどのように始まり、成立したのかは進化生物学における重要な問題である。

我々は、チャバネアオカメムシという昆虫において、生存に必須な腸内共生細菌が自然集団で顕著な多型を示すことを発見した。さらに、もとの共生細菌と大腸菌の実験的置換により、正常な感染局在を示し、垂直伝達され、継代維持が可能であり、さまざまな操作実験や分子遺伝学の適用が可能な人工共生系の創出に成功した。

２．研究の目的

本研究課題では、この画期的なモデル共生系を用い、実験進化学的アプローチ、ゲノム科学的アプローチおよび分子遺伝学的アプローチを駆使して、共生進化の過程および機構の本質を理解することをめざす。

３．研究の方法

チャバネアオカメムシ腸内共生系について、以下の研究を推進する：

(1)　６種の共生細菌のゲノム解析
(2)　共生細菌の遺伝子操作系の確立
(3)　共生細菌フォスミドライブラリー導入大腸菌のスクリーニングによる共生関連遺伝子候補の網羅的取得
(4)　共生関連遺伝子の同定、機能解析
(5)　異なる共生細菌間での共生関連遺伝子群の比較解析
(6)　チャバネアオカメムシに人工共生させた大腸菌の実験共生進化解析

４．これまでの成果

<u>・チャバネアオカメムシ日本列島集団における環境細菌から必須共生細菌への進化</u>

前述したカメムシ自然集団における腸内共生細菌の多様性と機能についてさらに追求し、6 種の共生細菌はすべて宿主の成長に必須な同様の生理機能を担うこと、土壌環境中に培養可能な共生細菌（C, D, E）が *Pantoea* spp. として存在し、他種カメムシと生態的に共有されていること、多様な環境細菌の中には潜在的に共生能力を有するものがあること、すなわちカメムシ群集と環境細菌群集の間にダイナミックな関係があり、環境細菌から必須共生細菌への進化が現在進行中であることを示した（*Nature Microbiol* 2016）。

<u>・共生細菌のゲノム解析</u>

培養できない共生細菌 A(4.5 Mb), B(2.5 Mb)は単離中腸から、培養できる C(5.2 Mb), D(5.6 Mb), E(5.5 Mb), F(4.7 Mb)は培養菌体から DNA を調製し、ゲノム配列を決定した。

<u>・フォスミドスクリーニングによる共生関連遺伝子を含む共生細菌ゲノム領域の探索</u>

共生細菌ゲノム断片（～40 kb）を含むフォスミドライブラリーで形質転換した大腸菌クローンを共生細菌非感染幼虫に感染させて飼育し、羽化率、成虫の体色と体サイズを評価し，高いスコアを示した大腸菌クローンが保有する共生細菌ゲノム断片を選抜した。これまでに 105167 個の卵由来の 10623 頭の成虫を用い、共生細菌 C ゲノムの 91.7%

をカバーする 366 クローンの 1 次スクリーニングを行い 15 の候補クローンを得た。うち 4 クローンはほぼ同一領域で、近傍の 11 遺伝子が候補として浮上した。うち 5 遺伝子は並行して推進中の共生細菌 D ゲノムライブラリーのスクリーニングでも相同領域が良好なパフォーマンスを示し、特に有望と思われた。これら 5 遺伝子を含む約 9.5 kb の領域を大腸菌にクローニングして宿主に感染させて評価したところ、成虫体色の改善が観察され、羽化率の上昇も見られた。

今後は、これら候補フォスミドクローンに含まれる遺伝子の絞り込みを進め、強い効果が見られたものについては共生細菌の遺伝子欠損株を作成し、その影響を評価していく。

・大腸菌人工共生進化実験

高速進化大腸菌系統 Δ*mutS* に人工感染させたチャバネアオカメムシを継続的に累代飼育することで、共生関係の安定性や適応度の上昇を指標に、適応度効果の変遷をモニターした。特筆すべきことに、すでにいくつかの大腸菌感染カメムシ系統が 80%にも達する非常に高い羽化率を示しはじめた（大腸菌感染虫の羽化率は通常 10%以下）。さらに、それらの大腸菌系統のコロニーは小型で隆起しており、もとの系統の扁平なコロニーとは

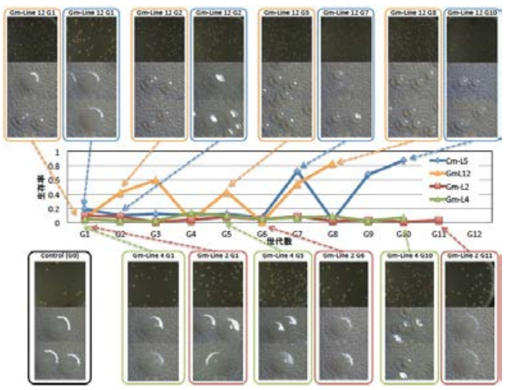

図１　人工共生進化実験における宿主羽化率および大腸菌コロニー形態の変遷

形態的に異なっていた（図１）。

今後はゲノムのリシーケンシングを進め、これら大腸菌変異株におけるゲノム変異を同定するとともに、RNAseq 等で遺伝子発現の変化を解析し、人工共生進化過程を表現型レベルとゲノムレベルの双方で継続的に記載していく。

・その他

日本各地でさまざまなカメムシ類試料を収集して共生細菌叢の探索を進める過程での副産物として、以下の特筆すべき研究成果がある：チャバネアオカメムシおよび近縁種における雌特異的な中腸共生器官の特殊化の発見（*Appl Env Microb* 2015）、クヌギカメムシ類における腸内共生細菌の卵塊ゼリー伝達の解明（*Curr Biol* 2014）、ヒメナガカメムシにおける菌細胞共生細菌の同定及び発生過程の解明（*PNAS* 2015）など。

５．今後の計画

大腸菌の高度な分子遺伝学的システムとリソースを駆使して共生の分子基盤を徹底的に明らかにし、さらに大腸菌が共生細菌に進化していく様子をリアルタイムで記述し、解析することにより、共生進化の過程および機構に関して従来にない画期的な理解をもたらすことをめざす。

６．これまでの発表論文等（受賞等も含む）

論文

1. Hosokawa T, Ishii Y, Nikoh N, Fujie M, Satoh N, *Fukatsu T (2016) Obligate bacterial mutualists evolving from environmental bacteria in natural insect populations. ***Nature Microbiol*** 1: 15011.
2. Hayashi T, Hosokawa T, Meng XY, Koga R, *Fukatsu T (2015) Female-specific specialization of a posterior end region of the midgut symbiotic organ in *Plautia splendens* and allied stinkbugs. ***Appl Environ Microbiol*** 81: 2603-2611.
3. Matsuura Y, Kikuchi Y, Miura T, *Fukatsu T (2015) *Ultrabithorax* is essential for bacteriocyte development. ***Proc Natl Acad Sci USA*** 112: 9376–9381.
4. Hosokawa T, Kaiwa N, Matsuura Y, Kikuchi Y, *Fukatsu T (2015) Infection prevalence of *Sodalis* symbionts among stinkbugs. ***Zool Let*** 1: 5.
5. Kaiwa N, Hosokawa T, Nikoh N, Tanahashi M, Moriyama M, Meng XY, Maeda T, Yamaguchi K, Shigenobu S, Ito M, *Fukatsu T (2014) Symbiont supplemented maternal investment underpinning host's ecological adaptation. ***Curr Biol*** 24: 2465-2470.
6. Matsuura Y, Hosokawa T, Serracin M, Tulgetske GM, Miller TA, *Fukatsu T (2014) Bacterial symbionts of a devastating coffee plant pest, the stinkbug *Antestiopsis thunbergii* (Hemiptera: Pentatomidae). ***Appl Environ Microbiol*** 80: 3769-3775.

受賞

1. 深津武馬（2014）日本進化学会学会賞
2. 深津武馬（2014）木村資生記念学術賞

ホームページ等

1. 昆虫―大腸菌人工共生系による共生進化および分子機構の解明
https://staff.aist.go.jp/t-fukatsu/KBNSHome.html
2. プレス発表「環境細菌から進化する共生細菌」
http://www.aist.go.jp/aist_j/press_release/pr2016/pr20160111/pr20160111.html