

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 27 日現在

機関番号：18001

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26840116

研究課題名(和文) 昆虫における菌細胞共生進化解明のためのカメムシゲノム解読と形質転換システムの作製

研究課題名(英文) Genome sequencing and transgenesis of a heteropteran insect *Nysius plebeius* for studying bacteriocyte-associated symbiosis

研究代表者

松浦 優 (MATSUURA, Yu)

琉球大学・熱帯生物圏研究センター・助教

研究者番号：80723824

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：本課題では、菌細胞の形成機構と進化を解明するため遺伝学的な解析手法を確立することを目指し、ヒメナガカメムシを対象に次世代シーケンスとde novoアセンブルによりゲノム配列を取得した。近縁種ゲノムとともに解析して免疫関連遺伝子を同定し、共生細菌ゲノムと宿主遺伝子による栄養素合成系の補完関係を解明した。一方で形質転換システムの作製とゲノム編集の実験基盤となる多くの情報と技術を獲得することに成功した。

研究成果の概要(英文)：Preliminary genome sequencing and transgenic experiments of *Nysius plebeius* were performed in order to elucidate genetic and developmental basis of bacteriocyte-associated symbiosis independently evolved in small groups of heteropteran insects. With illumina-based paired end and mate pair library sequencing and de novo assembly using Platanus, we have generated genome scaffolds nearly full length of the insect genome as well as identifying immunity related genes and nutritional inter-dependence between the host and symbiont. On the other hand, new manual methods were established for injecting various foreign nucleic acids such as plasmid, mRNA and gRNA into early embryos of *N. plebeius*, although I have not succeeded in obtaining any transgenic or knockout lines so far. The study will continue based on these genetic and experimental resources for understanding the evolutionary basis of bacteriocyte in *N. plebeius*.

研究分野：進化生物学、共生生物学

キーワード：細胞内共生 ヒメナガカメムシ 菌細胞 ゲノム 共生細菌

1. 研究開始当初の背景

内部共生は普遍的な生命現象である。多くの昆虫類は共生微生物を体に取り込み維持することによって、自らの遺伝的な制約を脱して、本来ならば食べることでしか得られない必須栄養素の合成、難消化性の木質の消化、有害物質の分解などの新規生物機能を獲得してきたことが知られている。昆虫は体表面、腸内、脂肪体、体腔内などのさまざまな部位に共生微生物を保持しており、共生専用の細胞や器官が進化した例も多い。特に、アブラムシ、ツェツェバエやゾウムシなどをはじめ、昆虫種全体の約1割には「菌細胞」という共生に特化した細胞が存在すると見積もられ、その細胞質中には大量の細胞内共生微生物が詰まっている。必須栄養素を供給することに特化したこれらの共生微生物は宿主にとって不可欠な存在である。共生微生物は母から子へと伝達され、さらにその後菌細胞内へと定着する。昆虫が菌細胞を分化と形成するのに連動して、共生微生物定着の時期や動態は宿主の厳密な制御を受けていることが発生学的な観察により示唆されている。このように菌細胞が分化・形成される部位があらかじめ決まっているということは、それを制御する遺伝的基盤の存在を指し示している。ところが、菌細胞の進化発生および細胞分化の遺伝学的基盤は全くと言っていいほどわかっておらず、実は研究は古い発生学的記載からさほど進歩していない。その原因の一つに、菌細胞を有する多くの種において遺伝学的手法が確立していないことが挙げられる。

本研究で対象とするヒメナガカメムシをはじめ、いくつかのナガカメムシ種は菌細胞を発達させ、細胞内に特異的な細胞内共生細菌を保持している。しかし、ナガカメムシ類が属する植食性カメムシ類の大半の種においては中腸後端部の袋状組織に腸内細菌を保持する腸内共生系（細胞外共生）が優占している。菌細胞と腸内の袋状組織は発生学的に全く異なっていることから、かつて植食性カメムシ類の共通祖先で腸内共生系が進化・多様化したのち、何らかの理由でヒメナガカメムシの祖先が腸内共生を失ってからまたはその途上で、菌細胞を新規に獲得したと考えるのが妥当である。そこで、進化的な

起源が新しいヒメナガカメムシの菌細胞に焦点を絞って解析すれば、昆虫における菌細胞共生の進化的起源を追跡できる可能性がある。これまでの研究で、ヒメナガカメムシ類は新規な菌細胞を獲得し、それらは *Ubx* などのある特定の遺伝子の特異的発現を介して分化することがわれわれの研究によって明らかになった。このように、ある系統群の生物に新規な細胞や器官が進化するには、その生物の祖先のゲノムに配列の重複、挿入、欠失などの変異が起きたことが推察される。その予想が正しければ、菌細胞の進化をもたらしたある遺伝子の機能と発現調節機構の進化を厳密に調べるには、カメムシ類に有効な方法である RNAi のような一過性の遺伝子発現抑制だけでなく、ゲノム中の配列を欠失させたり、遺伝子配列を組み込んで発現量を上昇させたりした結果を観察するほうがより直接的な解析ができると想定された。

2. 研究の目的

本研究課題では、これまで本格的な遺伝学的実験手法が導入できていなかったカメムシ目昆虫種のうち、菌細胞を有するヒメナガカメムシを用い、ゲノムの解読と形質転換系の作製を行うことで、菌細胞共生系の進化の遺伝学的な解明を試みる。次世代シーケンサーを用いてヒメナガカメムシのドラフトゲノム配列を取得し、すでにゲノム解読が進んでいる菌細胞を発達させない近縁種との配列比較による菌細胞分化に重要な領域の推定を行い、原因遺伝子の候補を探索する。一方で、菌細胞に特異的に発現する転写因子やモルフォゲンなどを形質転換法により強制発現させ、菌細胞分化に重要な遺伝子の機能を解析するためのカメムシの遺伝子組み換え実験系を立ち上げる。ゲノム中に GFP 遺伝子と組み合わせた任意のプロモーター候補配列を導入することにより、そのゲノム断片がいつどこで発現を調節し、菌細胞共生を成立させているか検証すること、つまり菌細胞分化遺伝子の *cis* 制御領域のレポーターアッセイを将来的に実現することを目指した研究である。

3. 研究の方法

(1) ペアエンド法によるゲノムシーケンス
ヒメナガカメムシのゲノムの大規模シー

クエンスの核となるデータを取得するために、まずフローサイトメトリーによりカメムシのゲノムサイズを推定して必要なデータ量を計算する。宿主カメムシ以外の細菌のDNAが混入しないように、菌細胞、頭部、中腸、卵巣を除去してから抽出したヒメナガカメムシ1個体のDNAを断片化し、200bp、800bpのインサートサイズでライブラリ調整し、ペアエンド法により125塩基ずつイルミナ社HiSeq2500のシーケンスし、ゲノムサイズのx100程度の配列データを取得する。

(2)メイトペア法によるゲノムシーケンス

ペアエンド法に加えてヒメナガカメムシの5kb-12kbpの長い断片の両端を読むメイトペア法により100塩基ずつHiSeq1500でシーケンスする。

(3)ゲノムのde novoアセンブルと解析

SOAP denovoまたはPlatanusによって得られたショートリードのアセンブルを行って、contig配列とscaffoldを取得したのち、結果を解析と評価を実施する。

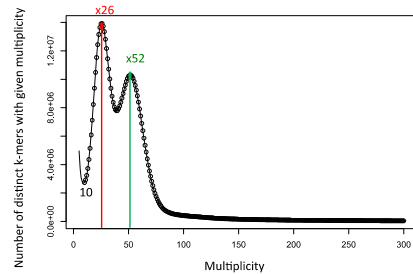
(4)ヒメナガカメムシを用いた形質転換系統の作製とゲノム編集

ヒメナガカメムシの卵を大量に回収し、任意の配列を組み込んだベクターをインジェクションすることでトランスジェニックカメムシを作製する。ショウジョウバエなどの昆虫種で高い発現を誘導できるプロモーター配列とGFPを組み込んだベクターとpiggyBacトランスポゾンカセットを初期胚に注射し、生殖細胞系列にランダムな挿入が発生し、次世代の卵において蛍光が観察されるかどうかスクリーニングする。さらに、CRISPR/Cas9のゲノム編集について条件検討とノックアウト系統の作製を試みる。

4. 研究成果

(1)フローサイトメトリー法によりヒメナガカメムシのゲノムサイズは803から903Mbp程度の範囲内に収まることが推定された。この結果は最も近縁なオオトウワタナガカメムシ(*Oncopeltus fasciatus*)の975Mbpと近く、想定内のサイズであった。これをもとにゲノム解析に必要なシーケンス量を推定し、40世代以上継代飼育した1個体メスから得たDNAから作製したライブラリをHiSeq2500で2レーン分シーケンスしたところ200bp(4.5億リード)、800bp(3500万リ

ード)の配列を取得した。1レーン分のk-mer分布図(図1)によるとそれぞれx26,x52のカバレッジを有する2つのピークが現れたことから2倍体ゲノム配列中のヘテロな領域が多く飼育系統の純化がうまくいっていないことが判明する一方で、十分なデータ量を確保することができた。



FACSによるゲノムサイズの推定 : 803 - 903 Mb (female diploid)
k-mer分布図によるゲノムサイズ推定 : ~823 Mb

Data Input : Trimomatic results
(paired end 125bp, 1 lane) Idx5: Np_200bp
trimmed QV >20, shortest= 40bp) Input Read Pairs: 229,293,540
Both Surviving: 226,134,952 (98.62%)
Idx7: Np_800bp
Input Read Pairs: 17,543,690
Both Surviving: 6,407,431 (36.52%)

図1 1レーン分のk-mer(21)の分布図

(2)ヒメナガカメムシDNAからメイトペア法により平均5.6kb(gel free)、9kb(gel-plus)のライブラリを作製した。HiSeq1500によりシーケンスを実施し、各ライブラリにつき2億リード、9300万リードの配列を得た。

(3)ペアエンド法のシーケンスから得られた配列のQV>20でフィルターし、1レーン分のデータを用いてSOPA denovoとPlatanusによるde novoアセンブルを試みたところ、ヘテロなゲノム配列のアセンブルに適した後の方がより良い結果が得られ、N50=1,555、最も長いScaffoldが572kbとなった。しかしながらこの長い配列は必須共生細菌のゲノムであり、宿主昆虫のゲノム配列はほとんどが短い断片となっている。そこで、メイトペア法も加えた全てのデータを用いて再度Platanusによりアセンブルしたところ、scaffold数857,241、全配列長が約809Mbとなり、推定された昆虫のゲノム長に近いデータを得ることに成功した。しかしながら、N50の値は3.5kbにとどまり、ヒメナガカメムシの近縁種*O. fasciatus* (N50=4.0kb)と比べて良好な結果であったとはいえなかった。この解析と並行して、ドイツを中心としたこの近縁種ゲノムi5kプロジェクトのアノテーションチームに参加し、特に免疫関連遺伝子群を同定した。ショウジョウバエで液性免疫応答の中心を担うImd経路とToll経路の遺伝子群および多く

の抗菌ペプチド様遺伝子を同定した。特に、同じカメムシ目のエンドウヒゲナガアブラムシが喪失していた *Imd* 遺伝子がこのナガカメムシに存在していることが確認できた。同時にこれらの遺伝子はヒメナガカメムシからも同定した。

前述の近縁カメムシ種のゲノム解析は現在も発表されておらず、同様にヒメナガカメムシも不完全なゲノムであることから、全ての遺伝子セットの比較解析を行うことはこの時点では不適切と判断し、並行して進めていた共生細菌ゲノムと宿主 RNA-seq データを加えて、特にそれぞれの栄養代謝機能を検討した。必須共生細菌 *シュナイデリア* の全 584 個の遺伝子から生物機能を推定すると、単独ではアミノ酸のほとんどを合成系できないが、宿主遺伝子が合成経路の間を埋めることにより必須アミノ酸 5 種を合成できることが示唆された。一方で、ビタミン B 類や補因子はビオチン、チアミン、パントテン酸以外の全てを共生細菌のみで合成できることが判明した。近縁な共生細菌ゲノムとの比較解析により、*シュナイデリア* ゲノムはウレアーゼオペロンを特異的に保有しており、共生細菌は窒素循環にも寄与することが示唆された。同様の状況はオオアリやゴキブリ類の共生細菌にも報告されており、進化的起源の異なる共生細菌間で窒素代謝に関わる収斂進化が生じていると考えられる。以上のように、一連の解析で菌細胞共生の進化に関する重要な知見を得ることに成功した。本来の最重要課題であった、昆虫のゲノム配列については解析を継続し、飼育系統の純化と PacBio による 1 分子シーケンスの導入を検討することでより適切なデータ取得を目指す。

(4) ヒメナガカメムシと *O. fasciatus* を用いて、遺伝子機能解析のための卵への微量注射およびトランスジェニックカメムシの作製に取り組んだ。2 種における注射法を確立するため、卵の後極側から水や蛍光色素 (FM4-64) を注射する条件を確立し (図 2)、経時的に観察することで色素の浸透と半数近くの孵化に成功した。続いて、バキュロウイルスと 3xP3 プロモーターにより GFP、DsRed タンパクを発現するベクターとヘルパープラスミドを 2 種のカメムシ卵それぞれ 514 個、316 個に注射し、2 世代にわたる蛍光スクリ

ーニングと PCR テストを実施したが、全ての個体の DNA に挿入配列は確認されず、蛍光も観察されなかったことから、今回用いた手法はナガカメムシの形質転換には最適ではないことがわかった。特に、完全変態昆虫でよく使われるプラスミドでは形質転換に必要なトランスポゾンが発現しないことが予想されたので、カメムシのゲノムからプロモーター配列を探索して発現誘導する実験系を検討する必要があることがわかった。

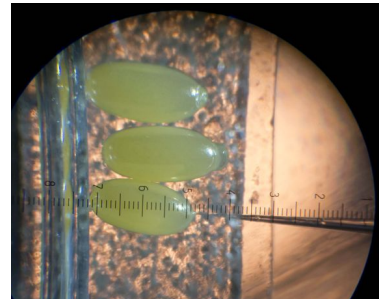


図 2 カメムシ卵への注射の様子

ゲノム編集 CRISPR/Cas9 の導入の前段階として、蛍光標識マーカー (H2B-RFP と GAP43-YFP) の mRNA を 250 個のカメムシ卵に 2 ~ 5ug/ul の濃度で注射することで一過性発現を試みたが、この条件では蛍光タンパクの遺伝子発現が誘導されなかった。同様に、ゲノム編集のため、ヒメナガカメムシを用いて CRISPR/Cas9 による *Pax6* と *Iaccase2* 遺伝子を対象とする gRNA を合成し、ノックアウト実験を開始したが、所属機関の異動により実験場所の変更を余儀なくされたので、結果を確認する前に実験を中断した。異動に伴って新たに必要な備品と消耗品を確保し、実験環境を整えたところで研究期間が終了したために全ての実験を完了できなかった。しかしながら、これら一連の試みにより、カメムシへの微量注入とゲノム編集について習得した技術と入手した実験基盤をこれからも活用することができるので、継続して菌細胞の発生と進化の遺伝学的解析を推進する予定である。

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 8 件)

(1) Hosokawa, T*, Matsuura, Y*, Kikuchi, Y., Fukatsu, T. (2016) Recurrent evolution

of gut symbiotic bacteria in pentatomid stinkbugs. *Zoological Letters*. 2 :24. (2016) (*=equal contribution) 査読有
DOI: 10.1186/s40851-016-0061-4
(2) Kuechler, S.M., Matsuura, Y., Dettner, K., Kikuchi, Y. (2016) Phylogenetically diverse *Burkholderia* associated with midgut crypts of spurge bugs, *Dicranocephalus* spp. (Heteroptera: Stenocephalidae). *Microbes and Environments*. 31: 145-153. 査読有
DOI: 10.1264/jsme2.ME16042
(3) Matsuura, Y., Kikuchi, Y., Miura, T., Fukatsu, T. (2015) *Ultrabithorax* is essential for bacteriocyte development. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 112:9376-9381. 査読有
DOI: 10.1073/pnas.1503371112
(4) 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). *Microbes and Environments*. 30:321-329.
査読有 DOI: 10.1264/jsme2.ME15153
(5) 松浦 優. (2014) 菌細胞の獲得と進化: ナガカメムシ類における菌細胞の多様性と発生学的起源. 蚕糸・昆虫バイオテック. 83, 3, 223-229. 査読無
他 3 件

[学会発表](計 15 件)

(1) Kuechler S.M., Matsuura Y., Koga R., Dettner K., Fukatsu T. Diverse patterns of symbiotic organ formation during embryonic development in lygaeoid bugs (Heteroptera: Lygaeoidea). FEMS 2017, 7th Congress of European Microbiologists. (2017年7月11日) Valencia (Spain)
(2) Matsuura Y., et al. Transcriptomic dissection of bacteriocyte symbiosis in a hemipteran insect, *Nysius plebeius*. Joint meeting of the 22nd International Congress of Zoology and the 87th meeting of Zoological Society of Japan. (2016年11月17,18日) 沖縄コンベンションセンター (沖縄県宜野湾市)
(3) 松浦 優ら. ヒメナガカメムシ菌細胞の形成に関わる遺伝子群の探索. 日本昆虫学会第76回大会・第60回日本応用昆虫学

会合同大会. (2016年3月29日)大阪府立大学中百舌鳥キャンパス(大阪府堺市)
(4) 松浦 優. *Hox* 遺伝子が司る共生器官の発生-ナガカメムシにおける菌細胞の進化-. 日本進化学会第17回東京大会. (2015年8月21日)中央大学後楽園キャンパス(東京都文京区)
(5) Matsuura, Y., et al. Bacteriocyte development regulated by *Hox* genes in an insect, *Nysius plebeius*. Gordon Research Conference, Animal-Microbe Symbioses. (2015年5月22日)New Hampshire (USA)
(6) 松浦優ら (2015) ヒメナガカメムシ菌細胞内共生細菌のゲノム解析. 第59回日本応用昆虫学会大会.
(7) Matsuura, Y. A *Hox* gene is essential for bacteriocyte development and localization of symbionts in an insect *Nysius plebeius*. Open Seminar at Instituto Cavanilles de Biodiversidad y Biología Evolutiva. (2014年10月5日) Valencia (Spain)
(8) Matsuura Y., et al. Development of symbiotic organ: *Hox* genes regulate development of bacteriome and localization of bacterial symbiont in seed bug *Nysius plebeius*. The fifth meeting of the European Society for Evolutionary Developmental Biology. (2014年7月25日) Vienna (Austria)
他 7 件

[図書](計0件)

[産業財産権]
出願状況(計0件)
取得状況(計0件)

[その他]
ホームページ等
琉球大学熱帯生物圏研究センター
<http://www.tbc.u-ryukyu.ac.jp/>
北海道大学 プレスリリース 2015年7月14
昆虫の共生のための細胞がどのようにできるかを解明
http://www.hokudai.ac.jp/news/150714_ees_pr.pdf

6. 研究組織

(1) 研究代表者
松浦 優 (MATSUURA Yu)
琉球大学・熱帯生物圏研究センター・助教
研究者番号: 80723824