HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	Elucidation of evolutionary process and genetic basis of the stinkbug-Burkholderia gut symbiosis [an abstract of entire text]
Author(s)	竹下, 和貴
Description	この博士論文全文の閲覧方法については、以下のサイトをご参照ください。 https://www.lib.hokudai.ac.jp/dissertations/copy-guides/
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(農学)
Dissertation Number	甲第12255号
Issue Date	2016-03-24
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/62035
Type	doctoral thesis
File Information	Kazutaka_Takeshita_summary.pdf

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

学 位 論 文 内 容 の 要 約

博士の専攻分野の名称： 博　士（農学）　　氏名　　竹　下　　和　貴

学 位 論 文 題 名

Elucidation of evolutionary process and genetic basis of
the stinkbug-*Burkholderia* gut symbiosis
（カメムシ類‐*Burkholderia* 腸内共生系の進化過程および
遺伝的基盤に関する研究）

多くの昆虫がその体内に共生微生物を保持し、緊密な相互作用を行っている。共生微生物は宿主昆虫の生存・繁殖において重要な役割を果たし、それらの多くが母子間伝播によって次世代に連綿と受け継がれることが知られている。これまでに共生微生物の機能やゲノム進化に関する研究が広く行われてきたが、昆虫‐微生物間内部共生系の分子基盤については未だ十分に解明されていないのが現状である。その大きな理由の一つは、共生微生物の単離培養が困難な点にある。母子間伝播により受け継がれる昆虫内部共生微生物は、一般に、宿主体内の環境に高度に適応するよう進化してきた結果、それらのゲノムサイズおよび遺伝子数は極端に縮小している。それゆえに、そのような昆虫内部共生微生物はもはや宿主体内環境外で生存することができない。このため、共生系の分子基盤に関して、共生微生物の遺伝子組み換え等の遺伝学的実験アプローチによる実験的検証が非常に困難となっている。

ホソヘリカメムシ（*Riptortus pedestris*; ヘリカメムシ上科）をはじめとする一部のカメムシ類において、これら宿主昆虫が共生細菌の母子間伝播を行わず毎

世代環境土壌中から *Burkholderia* 共生細菌（β−プロテオバクテリア）を獲得し、消化管後端部に発達する袋状組織（盲嚢）に特異的に保持することが近年発見された。また、この母子間伝播を伴わない *Burkholderia* 共生細菌は、単離培養が容易であり、遺伝子組み換えが可能であることが見出された。この“培養が容易で遺伝子組換えが可能”という *Burkholderia* 共生細菌の特徴は、昆虫内部共生系における相互作用やその成立・維持の分子基盤の解明において極めて有益である。したがって、このカメムシ類 - *Burkholderia* 共生系は、実験的アプローチが可能なモデル共生系として近年世界的にも注目を集めている。さらに、系統分類学的に近縁な他のカメムシ系統においては、異なる内部共生系を保持する系統や共生微生物を保持しない系統が報告されていることから、カメムシ類は昆虫内部共生系の進化過程を明らかにする上でも非常に有用な研究対象であるといえる。

本研究では、まず、昆虫内部共生系の進化過程の理解を目指し、カメムシ類 - *Burkholderia* 共生系を対象にその進化的起原の解明に取り組み、その後の進化過程について考察した。続いて、昆虫内部共生系における共生の分子基盤の解明を目指し、ホソヘリカメムシやその近縁なカメムシと系統特異的な共生関係を築いている *Burkholderia* 共生細菌のゲノム解読および比較ゲノム解析に取り組み、共生に関連することが期待される候補遺伝子を多数見出した。

1）カメムシ類 - *Burkholderia* 共生系の進化的起原の解明

先行研究における日本産カメムシ約 130 種を対象とした共生細菌叢の調査から、カメムシ類 - *Burkholderia* 共生系の進化的起原はヘリカメムシ上科とナガカ

メムシ上科の共通祖先であると推定されていた。しかし、最新の解析により、上記の2つの上科と姉妹群になるホシカメムシ上科の種も*Burkholderia*と共生している可能性が示唆された。そこで本研究では、日本に生息するオオホシカメムシ科（ホシカメムシ上科）全3種15個体群を対象に、共生細菌の宿主消化管内での局在、共生細菌の系統学的位置、共生細菌の伝達様式に関して詳細に調査した。

FISH法による宿主消化管の観察、盲嚢由来DNAの16S rRNA遺伝子のクローン解析および次世代シークエンサによる共生細菌叢解析、卵における感染調査から、オオホシカメムシ類も外部環境中から共生細菌を獲得し、*Burkholderia*を盲嚢部特異的に共生させていることが明らかとなった。ヘリカメムシ上科とナガカメムシ上科の共生細菌は*Burkholderia*属内で単系統群を形成し、カメムシ共生グループ（Stinkbug-associated beneficial and environmental group; SBE）と呼ばれている。分子系統解析の結果、オオホシカメムシ類の共生細菌はSBEとは系統的に大きく異なる植物共生グループ（Plant-associated beneficial and environmental group; PBE）の*Burkholderia*であることが明らかとなった。これらの結果から、①カメムシ類 - *Burkholderia*共生系の起原は従来考えられていたものよりも古いこと、②カメムシ類の進化過程においてSBEからPBE（またはPBEからSBE）への共生細菌系統の入れ替わりが起きたことが示唆された。

2）*Burkholderia*共生細菌の同定およびゲノム解読

SBE系統に属するRPE64株の生化学的同定を行い、*Burkholderia insecticola*と命名した。またRPE64株に加え、近縁のRPE67株について完全長ゲノムを決定

した。これら共生細菌のゲノムサイズはそれぞれ 6.97 Mb、8.69 Mb であった。

3）*Burkholderia* 細菌の網羅的比較ゲノム解析による共生関連遺伝子の推定

ホソヘリカメムシは SBE 系統の *Burkholderia* を毎世代環境土壌中より獲得し盲嚢部特異的に共生させているが、土壌中には数 10 万種を超える極めて多様な細菌がいることを考えると、その共生特異性は驚異的と言える。本研究では、この共生特異性を裏打ちする共生細菌側の遺伝的基盤の解明を目指して、共生細菌 RPE64 株・RPE67 株と非共生性 *Burkholderia* のゲノム配列情報を利用して比較ゲノム解析を行った。

全 31 株の遺伝子レパートリを比較し、これまでに病原性 *Burkholderia* で報告のある病原性関連遺伝子群の有無を網羅的に調査したところ、興味深いことに 6 型分泌装置や接着線毛など病原性 *Burkholderia* において“病原性因子”として報告されている遺伝子クラスタがカメムシ共生細菌において高度に保存されていることが明らかとなった。さらなる網羅的遺伝子レパートリの比較により、SBE 系統にのみ特異的に存在する遺伝子を 283 個見出した。これら遺伝子の多くは機能未知であったが、リポ多糖生合成タンパク質や接着線毛など細菌の細胞表層構造に関わる遺伝子が多数含まれており、これらがホソヘリカメムシ類 - *Burkholderia* 共生系における共生者側の“共生因子”である可能性が強く示唆された。

以上のように本博士論文では、オオホシカメムシの内部共生系を詳細に解析し、カメムシ類 - *Burkholderia* 共生系の進化的起原を明らかにした。また、

Burkholderia 共生細菌のゲノム解読および比較ゲノム解析により、SBE 系統の *Burkholderia* に特異的な遺伝子（共生関連遺伝子の候補）を多数見出した。これは *Burkholderia* 共生細菌のゲノムについて網羅的かつ詳細に比較解析を行った初めての報告であり、本研究は今後の研究展開において重要なランドマークとなるであろう。今後共生因子の候補遺伝子について機能解析を進めることで、*Burkholderia* の特異的共生に関わる分子基盤が明らかになると期待される。