



Title	Histological and molecular bases underpinning host-symbiont specificity in the bean bug-Burkholderia gut symbiosis [an abstract of dissertation and a summary of dissertation review]
Author(s)	大林, 翼
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(農学)
Dissertation Number	甲第12711号
Issue Date	2017-03-23
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/65964
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/2.1/jp/
Type	doctoral thesis
File Information	Tsubasa_Ohbayashi_review.pdf, 審査の要旨



学 位 論 文 審 査 の 要 旨

博士の専攻分野の名称 博 士（農学） 氏名 大 林 翼

審査担当者	主 査	客員准教授	菊 池 義 智
	副 査	客員教授	鎌 形 洋 一
	副 査	教 授	曾 根 輝 雄
	副 査	研究主幹	Peter Mergaert（フランス国立科学研究センター）

学 位 論 文 題 名

Histological and molecular bases underpinning host-symbiont specificity in
the bean bug-*Burkholderia* gut symbiosis
(ホソヘリカメムシと *Burkholderia* の腸内共生系における宿主-共生者間特
異性の組織学的基盤および分子基盤)

本論文は英文 129 頁，図 22，表 7，4 章からなり，参考文献 2 編が付されている。

本研究は、ホソヘリカメムシ (*Riptortus pedestris*) とその腸内共生細菌 (*Burkholderia* sp.) の共生特異性について解析したものであり、1) 共生器官の組織学的解析と種々の感染実験、2) トランスポゾンを用いた共生細菌の遺伝子変異株の作成、および感染不全株のスクリーニング、3) 培養時と共生時の *Burkholderia* について形態およびトランスクリプトームの比較解析を行い、以下のような結果を得ている。

1. ホソヘリカメムシ消化管における細菌選別機構の発見

ホソヘリカメムシは孵化後、周辺土壤に生息する *Burkholderia* 共生細菌を経口的に獲得し、消化管に発達する盲嚢内に保持する事が知られている。土壤中には数 10 万種を超える多種多様な細菌が生息することを考えると、その共生特異性は極めて驚異的とも言えるが、これまでその共生特異性に関するメカニズムは全く分かっていなかった。本研究ではまず、食物がどのように消化管内を移動して行くのか食用色素を用いて調査し、色素は盲嚢発達部位（共生器官）手前の「狭窄部」で止まり、共生器官へまったく流入しないことを明らかにした。さらに、他の雑菌がこの狭窄部を通過できるか確認するために、GFP（緑色蛍光タンパク質）発現 *Burkholderia* 共生細菌と RFP（赤色蛍光タンパク質）発現大腸菌を同時に与え消化管内での動態を詳細に観察し、大腸菌は狭窄部の手前でのみ観察された一方、*Burkholderia* 共生細菌は狭窄部の手前およびその先の共生器官内にも多数感染していることを確認した。その他の土壤細菌もカメムシ共生器官には定着できなかったことから、ホソヘリカメムシ腸内には食物および他の雑菌を制限しつつ *Burkholderia* 共生細菌だけを特異的に通過させる、高度な細菌選別機構が発達していることを明らかにした。

2. 共生成立における細菌のべん毛装置の機能解明

次に、*Burkholderia* 共生細菌が狭窄部を通過するメカニズムを明らかにするために、トランスポゾンを用いて共生細菌のさまざまな遺伝子変異株を作成し、カメムシに共生できない共生不全株を探索した。計 10,464 株をスクリーニングし、べん毛運動性を持たない変異株はカメムシに共生できないこ

とを明らかにした。べん毛運動性が共生器官への到達におよぼす影響を確かめるため、経口投与後にカメムシ中腸各部位における共生細菌数を計測したところ、共生細菌の野生株（運動性を持つ株）は共生器官に到達していた一方、運動不全株は狭窄部以降の共生器官にはほとんど到達していないことを解明した。これらの結果から、*Burkholderia* 共生細菌がカメムシ中腸の狭窄部を通過するためには、べん毛運動性が必須であると結論した。

3. 共生細菌の形態およびトランスクリプトームの解析

さらに *Burkholderia* の共生メカニズムを特定するために、試験管培養時 (*in vitro*) および昆虫腸内共生時 (*in vivo*) の2種類の細菌細胞を用意し、共生に伴う細胞形態および遺伝子発現の変化を網羅的に調査した。まず、顕微鏡およびフローサイトメトリーを用いて *Burkholderia* 共生細菌の細胞形態を調べたところ、*in vitro* の細菌は楕円状の桿菌であったのに対し、*in vivo* の細菌は真円に近い球菌へと変化することを確認した。酸化ストレス、界面活性剤ストレス、抗菌ペプチドストレスなど各種環境ストレスへの耐性能を調査し、*in vivo* の細菌細胞は培養時の細胞に比べてこれらストレスに対する感受性が有意に高いことを明らかにした。続いて、次世代シーケンサーにより *in vitro* と *in vivo* の *Burkholderia* 共生細菌の遺伝子発現を比較解析し、*in vitro* に比べて *in vivo* の細菌は走化性やべん毛運動性に関わる遺伝子群の発現が減少していることを発見した。一方、DNA 複製、リボソーム合成、細胞壁合成、細胞分裂、ABC トランスポーター、PHA 合成、硫酸塩還元代謝、アラントイン代謝など複数の代謝系ではその発現が増加していることを明らかにした。これらの結果を総合し、カメムシ腸内において *Burkholderia* 共生細菌は（1）EMP 経路や硫酸塩還元代謝、フマル酸発酵経路が亢進していたことから嫌気代謝を行っており、（2）硫酸塩やアラントインなど宿主由来の老廃物を利用して活発に増殖し、（3）細胞壁合成や細胞表面の LPS 合成も転写レベルでは活発化していると考えた。その一方で、（4）生化学的解析では *in vivo* 細胞は LPS 構造が欠損し各種ストレスにも弱くなっていたことから、カメムシ腸内に見られる何らかの因子が *Burkholderia* 共生細菌の細胞表面に影響を及ぼしている可能性が考えられた。先行研究ではカメムシ消化管の前部において消化酵素の高発現が報告されており、この部位において共生細菌が消化されその栄養素がまるごと宿主カメムシに吸収されている可能性が示唆されている。このことから、*In vivo* の *Burkholderia* 共生細菌にみられた LPS 構造の変化やストレス感受性の向上は、この菌体消化の効率化に寄与しているものと考察した。

以上のように、ホソヘリカメムシ消化管には高度な細菌選別機構（狭窄部）が発達しており、*Burkholderia* 共生細菌はべん毛運動性によってこの狭窄部を突破していることを明らかにした。また、詳細な形態観察およびトランスクリプトーム解析により、*Burkholderia* 共生細菌はカメムシ共生器官への定着に伴ってその性質を大きく変化させ共生状態に適応していることを明らかにした。本研究は、多様な研究アプローチによって昆虫における内部共生現象の組織学的基盤および分子基盤を総合的に明らかにしたものであり、昆虫内部共生研究を新たな方向へと導くランドマーク的な研究と言える。

よって、審査員一同は、大林翼が博士（農学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと認めた。