



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	Histological and molecular bases underpinning host-symbiont specificity in the bean bug-Burkholderia gut symbiosis [an abstract of entire text]
Author(s)	大林, 翼
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12711号
Issue Date	2017-03-23
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/65965
Type	doctoral thesis
File Information	Tsubasa_Ohbayashi_summary.pdf



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 大 林 翼

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)

地球上の生きとし生けるものは皆、互いに影響を及ぼし合いながら共に生きている。その「共に生きる」究極の形は、動植物の体内や細胞内に微生物が棲み、高い空間的緊密性のもと相互作用を行う内部共生現象に見ることができる。現在では葉緑体やミトコンドリアのようなオルガネラは真核細胞に内部共生した微生物起源であることが証明されており、内部共生現象が生物の進化において決定的な役割を果たしてきたことは言うまでもない。昆虫類は世界中で 100 万種以上が知られる最も繁栄した生物群であり、その半数以上は体内に共生微生物を持ち、内部共生を営んでいる。これら昆虫の共生微生物はエサの分解や不足栄養素の補給に寄与し、宿主昆虫の栄養代謝において重要な役割を果たしている。このような昆虫の共生微生物について、これまで分類学的研究や生態学的研究が広く行われてきたが、共生成立に関わる遺伝子や分子メカニズムに関する研究はほとんど行われていない。その大きな理由は、共生微生物が昆虫の体内環境に高度に適応しているために単離培養が不可能であり、これによって遺伝子組換え等の実験手法が適用困難な点にあった。

ダイズの重要害虫であるホソヘリカメムシは消化管に「盲のう」と呼ばれる袋状組織を多数発達させ、その中に Betaproteobacteria 綱の *Burkholderia* 共生細菌を保持している。この共生細菌を持つカメムシは、非感染虫（共生細菌を持たないカメムシ）に比べ体サイズおよび産卵数が増加することから、*Burkholderia* 共生細菌は宿主にとって有益なことがわかっている。さらに、昆虫の共生微生物としては例外的に、*Burkholderia* 共生細菌は培養と遺伝子組換えが容易なことから、昆虫内部共生の分子基盤を研究するにあたって絶好の研究対象といえる。そこで本博士研究では、ホソヘリカメムシ-*Burkholderia* 共生系にみられる「共生特異性」を裏打ちするメカニズムの解明

を目指し、昆虫および共生細菌の双方からの実験アプローチによる研究を推進した。共生細菌の感染特異性を明らかにするために、宿主側からのアプローチとして食物の流れに着目し、カメムシ消化管の詳細な組織学的観察を行った（成果①）。また共生細菌側からのアプローチとして、共生細菌の遺伝子変異株作成と共生不全株のスクリーニング、およびその機能評価を行った（成果②）。共生細菌のカメムシ腸内への適応機構を明らかにするために、培養時およびカメムシ腸内共生時における *Burkholderia* 細菌の形態、生理、および遺伝子発現について多面的に解析した（成果③）。

成果① ホソヘリカメムシ消化管に発達する高度な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する。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。しかしながら、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たところ、色素は盲のう発達部位（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が明らかとなった。次に、食用色素と GFP（緑色蛍光タンパク質）発現 *Burkholderia* 共生細菌を同時に経口投与しその動態を観察したところ、色素は狭窄部で留まっていた一方、*Burkholderia* 細菌は狭窄部を超え共生器官に入ってゆくことが明らかになった。さらに、他の細菌がこの狭窄部を通過できるか確認するために、GFP 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観察したところ、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が確認された。*Bacillus* 属や *Pseudomonas* 属など他の土壤細菌もカメムシ共生器官に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、極めて高度な細菌選別機構が発達していることが明らかとなった。

成果② *Burkholderia* 共生細菌のべん毛運動性が内部共生成立に果たす役割の解明

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た結果、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が明らかになった。カメムシ中腸の構造は大きく 4 つの部位 (M1, M2, M3, 盲のう発達部 [M4]) に分かれ、*Burkholderia* 共生細菌は盲のうが発達した M4、および M3 と M4 を繋ぐ膨大部 (M4 Bulb [M4B]) に定着している。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 2 日後のカメムシ中腸各部位における共生細菌数を計測した。その結果、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、運動不全株は共生器官手前の M3 部には多数観察されたものの、狭窄部の先にある共生器官にはほとんど到達していないことが明らかとなった。これらの結果から、*Burkholderia* 共生細菌がホソヘリカメムシ中腸の細菌選別機構 (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することができる。

成果③ *Burkholderia* 共生細菌のホソヘリカメムシ腸内への適応機構の解明

いくつかの共生微生物においては、宿主体内への感染・定着に伴いその形態や生理代謝が劇的に変化することが知られている。例えばマメ科植物の根粒菌は共生に伴って肥大化・多核化し、窒素固定に特化した形態 (バクテロイド) へと変化する。これまでの研究から、ホソヘリカメムシ腸内共生時の *Burkholderia* 共生細菌は 1) 細胞壁の LPS 構造が変化し、2) ポリエステル(PHA) が蓄積することが報告されているが、これまでに得られた知見はいずれも特定の機能に着目した断片的なものばかりであった。そこで本研究では、*Burkholderia* 共生細菌の昆虫腸内への適応機構を総合的に理解するために、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した。その一部には細胞壁が細胞内部に貫入した変形構造が確認された。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たところ、*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が明らかになった。続いて、次世代シーケンサーを用いて *in vitro* と *in vivo* の *Burkholderia* 共生細菌の遺伝子発現を比較解析したところ、*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た。その一方、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が確認された。

これらの結果を総合すると、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ことが明らかとなった。その一方で、*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、（４）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およぼしている可能性が強く示唆された。*Burkholderia* 共生細菌は（５）他の昆虫の共生細菌で報告されているような必須アミノ酸・ビタミン類の生合成経路の高発現は見られず、特定の栄養素を供給している可能性は低いものと考えられる。先行研究ではカメムシ消化管の M4B 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考えられた。*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のかもしれない。

以上のように、本博士論文ではホソヘリカメムシ-*Burkholderia* 共生系を対象に宿主および共生細菌の双方から実験アプローチを行い、共生特異性を裏打ちする組織学的基盤および分子基盤を初めて明らかにすることができた。今後、腸内共生時に高発現していた共生細菌側の遺伝子についてさらに解析を進めることで、べん毛運動性以外の、ホソヘリカメムシ-*Burkholderia* 共生系を支えるさらなる分子メカニズムの解明に繋がることが大いに期待される。