HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	Ecological and evolutionary traits of pathogenic bacteria hijacking the Stinkbug-Caballeronia symbiotic system [an abstract of dissertation and a summary of dissertation review]
Author(s)	石神, 広太
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(農学)
Dissertation Number	甲第15293号
Issue Date	2023-03-23
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/89472
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/
Type	doctoral thesis
File Information	Ishigami_Kota_abstract.pdf, 論文内容の要旨

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

学 位 論 文 内 容 の 要 旨

博士の専攻分野の名称： 博　士（農学）　　氏名　　石神　広太

学 位 論 文 題 名

Ecological and evolutionary traits of pathogenic bacteria hijacking the Stinkbug-*Caballeronia* symbiotic system
（カメムシ-*Caballeronia* 共生系を乗っ取る病原性細菌の進化生態学的特性に関する研究）

地球上の多くの昆虫は、その体内に共生微生物を保持しており、厳密な相互作用をおこなっている。昆虫-微生物共生系は、その共生微生物の次世代への伝播様式により、親から子へ共生微生物が受け渡される垂直伝播共生系と、宿主が毎世代環境中から共生微生物を獲得する水平伝播共生系の２つに大別することができる。Coreoidea（ヘリカメムシ上科）に属する多くのカメムシは中腸の後端部に存在する盲嚢と呼ばれる袋状の組織に *Burkholderia* sensu lato 細菌を特異的に保有しており、そのほとんどは毎世代土壌中から共生細菌を獲得する水平伝播共生系である。*Burkholderia* sensu lato は系統的に明確に分かれた *Burkholderia*（sensu strico）属、*Paraburkholderia* 属、*Caballeronia* 属の３つの属に再整理されている。*Burkholderia*（sensu strico）属は、植物、動物およびヒトの多様な病原体からなる。*Paraburkholderia* 属は植物の成長を促進する根粒菌などが多く含まれ、一部にカメムシの腸内に共生する細菌グループが存在する。最後に *Caballeronia* 属は"stinkbug-associated beneficial and environmental" (SBE) clade とも呼ばれており、ヘリカメムシ上科に属するほとんどのカメムシはこのグループを腸内共生細菌として保有している。ヘリカメムシ上科に近縁のナガカメムシ上科では、腸内共生器官の組織学的な記載と *Burkholderia* sensu lato 共生細菌の報告は多いものの、その共生の実態についてはほとんど調べられていない。今回は、ナガカメムシ上科に属する *Paradieuches dissimilis*（チャモンナガカメムシ）と *Caballeronia* の共生関係についてその実態を解明し、また、チャモンナガカメムシから単離された「宿主カメムシに対して病原性を示す *Burkholderia* 属細菌」の生態学的特徴に関して研究を行った。

チャモンナガカメムシにおける *Caballeronia* 細菌との共生関係の解明

上述のようにヘリカメムシ上科の多くのカメムシは *Burkholderia* sensu lato 細菌を腸内の特異的な共生器官に共生させている。しかしながら、ナガカメムシ上科については共生の実態がほとんど調べられていない。そこで我々は、ナガカメムシ上科のチャモンナガカメムシをモデル系として、*Burkholderia* sensu lato 細菌との共生の実態解明を行った。

チャモンナガカメムシは、中腸の後端部に細長い管状の盲のうが発達していた。道内 10 箇所で採集したチャモンナガカメムシの腸内共生器官について 16S rRNA 遺伝子アンプリコンシークエンス解析を行ったところ、*Caballeronia* 属細菌が優占であることが明らかとなった。また、診断 PCR 調査により、卵には共生細菌が存在せず、新たに孵化した幼虫はそのままでは共生細菌を有しておらず、土壌から共生細菌を獲得することが明らかとなり、チャモンナガカメムシと *Caballeronia* 属細菌の共生系は水平伝播により維持されていることが示された。共生器官から分離培養した *Caballeronia* 共生細菌の感染・飼育実験の結果、共生細菌を保持していない個体は、共生個体と比較して体色が薄く、体サイズも減少した。さらに非共生個体は生存率も低くなり、成虫にはなれないことが明らかになった。このことから、チャモンナガカメムシにとって *Caballeronia* 共生細菌は、宿主の生存に不可欠であり、これは、今までに知られていたカメムシ-*Caballeronia* 共生系の中でも、最も緊密な共生系の一つであると考えられる。

カメムシ-*Caballeronia* 共生系を乗っ取る致死性病原細菌の解明

今までに調査されたカメムシ-*Burkholderia* sensu lato 共生系の多くは、宿主が共生細菌を環境中から獲得する水平伝播共生系であることが知られている。環境中には宿主にとって有益なものから病原性を示すものまで多様な細菌が存在する。このように、水平伝播共生系の場合、毎世代有害な細菌を取り込んでしまう可能性があることから、宿主に利益を与えず利己的に振る舞う寄生者の感染を防ぐ仕組みは、共生系の安定した維持において必須であると考えられている。カメムシ-*Caballeronia* 共生系のモデルとして良く研究されている *Riptortus pedestris* （ホソヘリカメムシ）では、共生細菌を選択的に取り込む仕組みが詳しく研究されてきたが、その中でも、中腸の消化管と共生器官の間に発達する「狭窄部（Constricted region [CR]）」と呼ばれる領域が共生者の選別に非常に重要であることが明らかとなっている。CR の内腔幅は非常に狭く(数 μ m)、その内部は粘液状物質で満たされており、大腸菌などの非共生細菌はこの部分を通過することができない。また、共生細菌はべん毛を菌体自身に巻き付けて進む特殊なドリル運動性を示し、これにより粘性の高い CR 内を通過して共生器官に到達していると考えられている。また、CR の次には M4B と呼ばれる抗菌ペプチドと消化酵素を高発現している器官があり、これら宿主の抗菌物質に耐える能力も共生者の選別に重要である。加えて、共生器官に定着したのちに、同時に感染した他の共生細菌との間に競争が生じることで、最終的に宿主-共生細菌の 1 対 1 の関係性が成立することが知られている。この際にも、宿主の共生器官における免疫反応への耐性が、細菌同士の競合に大きな影響を与えていると考えられている。今回我々は、チャモンナガカメムシから単離された *Burkholderia* sp. SJ1 株が、CR 部を突破して宿主カメムシの共生器官に定着するにも関わらず、最終的に宿主を殺してしまう、致死性の病原性細菌であることを明らかとした。

Burkholderia sp. SJ1 をホソヘリカメムシの幼虫に与えてみたところ、この細菌は CR を通過して共生器官に感染した。その感染率は 100%(10/10)であり、これは、ホソヘリカメムシの野外における共生細菌の 1 種である *C. insecticola* に匹敵する。共生器官の定量 PCR により、*Burkholderia* sp. SJ1 は *C. insecticola* と比較して共生器官内で増殖するのに時間がかかるものの、最終的には同程度の菌数にまで増加することが明らかとなった。また、*Burkholderia* sp. SJ1 に感染した個体は 80%以上の高い死亡率を示した。*Burkholderia* sp. SJ1 と *C. insecticola* の共感染実験を行ったところ、*Burkholderia* sp. SJ1 の病原性は若干弱まるものの、依然として 60%以上の高い致死率を示した。実体顕微鏡および共焦点顕微鏡による共生器官の観察から、*Burkholderia* sp. SJ1 に感染した昆虫の共生器官では、昆虫の免疫反応の一種であるメラニン化が起きており、また、宿主細胞内に *Burkholderia* sp. SJ1 が入り込んで無差別に増殖している様子が観察された。加えて、宿主体液から *Burkholderia* sp. SJ1 が検出されたことから、宿主の共生器官を破り体液中へと侵入していることが明らかとなった。培養した *Burkholderia* sp. SJ1 を実験的に宿主体液に注射すると、非常に高い毒性を示し、その 50%致死量（LD_{50}）は約 50CFU とごく微量であった。また、*Burkholderia* sp. SJ1 は M4B 内において *C. insecticola* よりも多く生存しており、宿主の抗菌ペプチド、消化酵素に対して強い耐性があることが示唆された。加えて、顕微鏡観察の結果、この細菌は CR を突破する際に重要であると考えられるドリル運動性を持つことが明らかとなった。これらの結果から、*Burkholderia* sp. SJ1 は、宿主が発達させた幾重もの選別機構を掻い潜る能力を持ち、宿主の共生器官に潜り込む致死性の病原性細菌であると言える。このような病原性細菌の存在は、共生者に対する宿主の選別機構に強い選択圧をかけるため、現在の洗練された共生細菌選別機構の進化を促してきた可能性が考えられる。また、*Burkholderia* sp. SJ1 の高い病原性を加味すると、今もなお、共生者選別機構と寄生者の間には進化的軍拡競争が生じている可能性が考えられる。