

平成31年6月27日

海外特別研究員最終報告書

独立行政法人 日本学術振興会 理事長 殿

採用年度 平成29年度

受付番号 267

氏 名

大林 翼

(氏名は必ず自署すること)

海外特別研究員としての派遣期間を終了しましたので、下記のとおり報告いたします。

なお、下記及び別紙記載の内容については相違ありません。

記

1. 用務地(派遣先国名) 用務地: フランス国立科学研究センター(CNRS) (国名: フランス)

2. 研究課題名(和文) ※研究課題名は申請時のものと変わらないように記載すること。

Tn-seq であぶり出す昆虫内部共生現象の成立メカニズム

3. 派遣期間: 平成29年4月12日 ~ 平成31年3月31日

4. 受入機関名及び部局名

フランス国立科学研究センター(CNRS) 細胞統合生物学研究所(I2BC)

5. 所期の目的の遂行状況及び成果…書式任意 **書式任意(A4判相当3ページ以上、英語で記入可)**

(研究・調査実施状況及びその成果の発表・関係学会への参加状況等)

(注)「6. 研究発表」以降については様式10-別紙1~4に記入の上、併せて提出すること。

【本研究課題の目的】

本研究では、ホソヘリカメムシ-*Burkholderia* 共生系を研究対象とし、昆虫の共生細菌としては例外的に、*Burkholderia* 共生細菌(*B. insecticola*)が培養と遺伝子組換えが可能なことから、Tn-seq 解析および RNA-seq 解析により、*Burkholderia* 共生細菌の遺伝子を網羅的に探索し、カメムシ腸内における *B. insecticola* の定着機構の解明を目指した。

【本研究遂行状況及び成果】

本研究では以下3つの研究を遂行した。① 培養時 (*in vitro*) における *Burkholderia* 共生細菌の生育必須遺伝子の同定; ② ホソヘリカメムシ腸内に存在するボトルネックの解明; ③ カメムシ腸内 (*in vivo*) における Tn-seq 解析; ④ RNA-seq 解析による *in vivo* で高発現する遺伝子の探索; ⑤ヘリカメムシ (*Coreus marginatus*) における共生細菌のコミュニティー解析を行った。それら研究成果の詳細は以下に示す。

【研究成果①】

培養時における *Burkholderia* 共生細菌の生育必須遺伝子の同定

Burkholderia 共生細菌の Tn-seq 解析を行うために、まずトランスポゾン挿入変異株ライブラリーを作製した。Mariner transposon を含む pSAM EC プラスミドをもつ *Escherichia coli* MFD *pir* (DAP 栄養要求性変異株) およびリファンピシン耐性を持つ *B. insecticola* RPE75 株を用いて、接合伝達により 2×10^{10} CFU/ml の *Burkholderia* 共生細菌のトランスポゾン挿入変異株 (Tn) ライブラリーを作製することができた。次に、Tn ライブラリーを YG 培地、最少培地 (MM

with Glucose および MM with Succinate 培地) で培養し、培養時における *Burkholderia* 共生細菌の生育必須遺伝子の同定を試みた。その結果、YG 培地では、*Burkholderia* 共生細菌のゲノム中にある全 6,732 遺伝子のうち、1,080 遺伝子は他の遺伝子と比べてトランスポゾンの挿入が有意に少なく、生育必須遺伝子として同定することができた。それら遺伝子の中には解糖系や細胞壁合成などの遺伝子群が含まれていた。同様に、トランスポゾン挿入ライブラリーを MM with Glucose および MM with Succinate 培地で培養した結果、788 遺伝子および 883 遺伝子がそれぞれの培地における生育必須遺伝子として同定することができた。さらに、それらの生育必須遺伝子のうち 670 遺伝子は 3 種類すべての培地で生育必須遺伝子として同定された。トランスポゾンの挿入遺伝子に偏りがいないか調査したところ、*Burkholderia* 共生細菌のゲノム全体へランダムに挿入されていることが確認された。

【研究成果②】

ホソヘリカメムシ腸内に存在するボトルネックの解明

ホソヘリカメムシの共生器官手前には消化管が極端に細くなった狭窄部が存在し、*Burkholderia* 共生細菌の M4B 部への侵入が大幅に制限されている (Ohbayashi et al., 2015)。感染開始 6 時間後、*Burkholderia* 共生細菌は狭窄部を超えて M4B 部へ侵入し (Ohbayashi et al., 2015)、感染開始 16 時間後、狭窄部が閉塞し、それ以降、共生器官手前にいる *Burkholderia* 属細菌は M4B 部へ侵入できないことを突き止めた (Kikuchi, Ohbayashi and Mergaert, *in prep*)。そこで、*in vivo* Tn-seq を行う前に、何種類の *Burkholderia* 共生細菌がカメムシ 1 匹の共生器官に侵入できるかを調査し、全遺伝子をカバーするには何匹のカメムシを解剖すべきか検討する必要がある。まず、*Burkholderia* 共生細菌の野生株である RPE75 株と緑色蛍光タンパク質 (GFP) を発現する RPE225 株を異なる比率で混合し、総計 10^5 個の菌体をカメムシへ経口投与した。9 種類の GFP 株の希釈系 (1.0×10^{-1} , 1.0×10^{-2} , 1.0×10^{-3} , 6.0×10^{-4} , 2.0×10^{-4} , 1.0×10^{-4} , 6.8×10^{-5} , 2.1×10^{-5} , 4.5×10^{-6}) について、感染 3 日目における GFP 株の感染率を調査したところ、GFP 株の感染率はそれぞれ 100%、100%、90%、72.7%、37.5%、40%、16.7%、0%、7.7% であった。プロビットモデルから予測した感染 50% になる GFP 株の希釈系は 4.0×10^{-3} であった。次に、トランスポゾン挿入変異株ライブラリー (10^6 CFU/ μ l) の菌体懸濁液 1 μ l をカメムシに経口投与し、感染 3 日目のカメムシ中腸 M4 部に存在するトランスポゾン変異株を Tn-seq 解析により同定した。54 個体のカメムシを調査した結果、平均 1.0×10^4 種類のトランスポゾン変異株が 1 個体の中腸 M4 部で同定することができた。これらの結果を統合すると、*in vivo* Tn-seq を行うには 1 サンプルあたり 100 個体の M4 部が必要になることがわかった。

【研究成果③】

カメムシ中腸における *in vivo* Tn-seq 解析

Burkholderia 共生細菌のトランスポゾン挿入変異株ライブラリー (10^6 CFU/ μ l) 1 μ l をカメムシに経口投与し、感染 3 日目および 5 日目のカメムシを解剖した。1 サンプルにつき 100 個体の M4 部を 1.5ml チューブに回収し、ホモジナイズを行い、YG 培地に塗布し、2 日間 28 °C で培養した。その後、プレート上で生育したトランスポゾン挿入変異株を回収し、DNA 抽出を行い、Tn-seq 解析に供した。Tn-seq 解析は 3 反復で行った。Tn-seq 解析の結果、125 個の遺伝子が M4 部で有意に減少し、*in vivo* における生育必須遺伝子として同定することができた。それら遺伝子群の中には、べん毛運動性・走化性、プリン合成などに関わる遺伝子が含まれた。

【研究成果④】

カメムシ中腸で高発現する *Burkholderia* 属細菌の遺伝子の探索および *in vivo* *Burkholderia* 共生細菌のキャラクタリゼーション

培養時 [*in vitro*] (培養 3 時間、培養 8 時間、培養 16 時間) およびカメムシ中腸共生時 [*in vivo*] (5 齢 3 日目 M4 部) における *Burkholderia* 共生細菌から total RNA を抽出し、計 300M reads の RNA-seq 解析を行った。各群は 3 反復ずつ用意した。その結果、*in vivo* *Burkholderia* 共生細菌は、ラムノースやリボースといった単糖、および硫酸化合物やタウリンといった硫黄

化合物を資化する代謝経路の遺伝子が高発現していた。また、尿素やアラントインを代謝する経路の遺伝子の発現量が増加していた。尿素やアラントインは昆虫の老廃物としてよく知られていることから、*Burkholderia* 共生細菌は昆虫老廃物を効率よく資化しながら、腸内で増殖していることが示唆された。その一方、べん毛運動性、走化性、せん毛、および6型分泌装置といった細胞表面構造に関連する遺伝子が昆虫腸内で軒並み発現抑制していた。必須アミノ酸やビタミンB群の生合成に関わる遺伝子群は培養時および中腸共生の間に優位な差はみられなかったものの、両方で高発現していた。それら栄養素の中には大豆種子で含有量が少ないものが存在し、*Burkholderia* 共生細菌がそれら栄養素を宿主へ補給することで、宿主昆虫の成長促進および産卵数の増加に寄与していることが示唆された。また、顕微鏡およびフローサイトメトリーを用いてバクテリアの細胞を解析した結果、培養時と比べてカメムシ中腸共生時の *Burkholderia* 共生細菌は、①桿菌から球菌へ細胞形態の変化、②DNA量の減少、③細胞表面の構造変化が確認された。0.4%YG軟寒天培地を用いてバクテリアの運動性を評価したところ、*in vivo* の共生細菌はべん毛運動性が抑制されていることがわかった。さらに、13種類の細胞ストレス物質を用いて、*in vitro* および *in vivo* 細菌のストレス感受性試験をおこなった結果、SDSやポリミキシンBを含む7種類のストレス物質に対して *in vivo* 細菌の感受性が増大していた。これらのストレス物質は細胞膜に作用することから、*in vivo* 細菌でみられた細胞表面の構造変化がストレス物質の感受性増大に影響したことが考えられた。

【研究成果⑤】

ヘリカメムシ (*Coreus marginatus*) における共生細菌のコミュニティ解析

ホソヘリカメムシがフランスで飼育できない場合に備えて、フランスに生息するカメムシの飼育および共生細菌のコミュニティ解析を行った。ヨーロッパの7カ国および日本で採集した計173個体のヘリカメムシ (*C. marginatus*) を調べた結果、すべての個体が *Burkholderia* 属細菌を保有していることが明らかになった。さらに、16S rRNA 遺伝子を詳しく調べたところ、ヨーロッパで採取したカメムシの共生細菌は日本で採取したカメムシの共生細菌と異なる SBE 系統 (カメムシ共生 *Burkholderia* 属クレード) に属することがわかり、地理的種分化が起きていることが示唆された。また、共生細菌を取り除いた *C. marginatus* は高い致死性を示し、*Burkholderia* 共生細菌は *C. marginatus* の生存に必須であることが明らかになった (Ohbayashi et al., 2019 *in accepted*)。

以上のように、本研究では *Burkholderia* 共生細菌のトランスポゾン挿入変異株ライブラリーの作製、培養時の生育必須遺伝子の同定、カメムシ腸内におけるボトルネックの解明、*in vivo* Tn-seq 解析、および *in vivo* で高発現する遺伝子の同定を行うことができた。また、

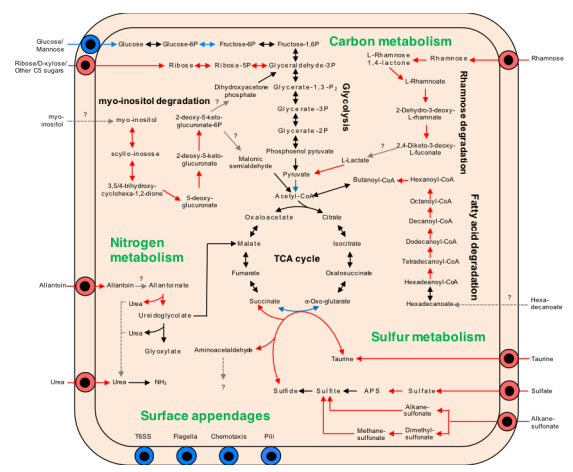
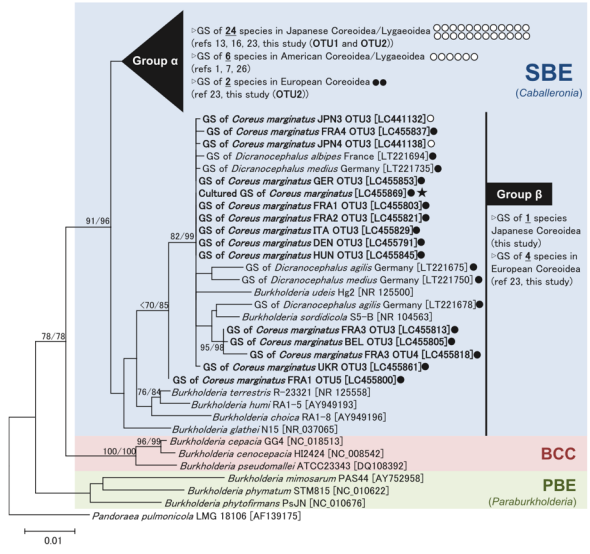


図 1

in vivo で発現変動がみられた代謝経路のまとめ

矢印の向きが代謝の方向、矢印の色は遺伝子の発現量を示し、*in vivo* で発現亢進 (赤色)・発現抑制 (青色)・変動なし (灰色) を意味する。



C. marginatus から同定した *Burkholderia* 共生細菌の 16S rRNA 遺伝子の系統解析結果

C. marginatus から同定した *Burkholderia* 共生細菌の 16S rRNA 遺伝子の系統解析結果

ヨーロッパで採集したヘリカメムシ (*Coreus marginatus*) における共生細菌のコミュニティ解析を行うことができた。これらの研究成果は以下の論文および学会で発表した。さらに、ドイツ・Bonn大学のKönig教授、スイス・チューリッヒ大学Eberl教授、フランス国立開発研究所(IRD)のMoulin研究主幹らと共同研究を開始し、国際的なネットワークを形成することができた。

【論文発表】

1. Crüseemann Max, Reher Raphael, Schamari Isabella, Brachmann Alexander O, **Ohbayashi Tsubasa**, Kuschak Markus, Malfacini Davide, Seidinger Alexander, Pinto - Carbó Marta, Richarz René. (2018) “Heterologous Expression, Biosynthetic Studies, and Ecological Function of the Selective Gq - Signaling Inhibitor FR900359” *Angewandte Chemie International Edition*, 57, 836-840.
2. Takeshita Kazutaka, Tamaki Hideyuki, **Ohbayashi Tsubasa**, Meng Xian-Ying, Sone Teruo, Mitani Yasuo, Peeters Charlotte, Kikuchi Yoshitomo, Vandamme Peter. (2018) “*Burkholderia insecticola* sp. nov., a gut symbiotic bacterium of the bean bug *Riptortus pedestris*” *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 68, 2370-2374.
3. **Ohbayashi Tsubasa**, Futahashi Ryo, Terashima Mia, Barrière Quentin, Lamouche Florian, Takeshita Kazutaka, Meng Xian-Ying, Mitani Yasuo, Sone Teruo, Shigenobu Shuji. (2019) “Comparative cytology, physiology and transcriptomics of *Burkholderia insecticola* in symbiosis with the bean bug *Riptortus pedestris* and in culture” *The ISME journal* ahead of e-printing
4. **Ohbayashi Tsubasa**, Itoh Hideomi, Lachat Joy, Kikuchi Yoshitomo, Mergaert Peter. (2019) “*Burkholderia* gut symbionts associated with European and Japanese populations of the dock bug *Coreus marginatus*” *in accepted*

【学会発表】

1. **Ohbayashi Tsubasa**, Kikuchi Yoshitomo, Mergaert Peter. [Poster presentation] “The stinkbug-*Burkholderia* symbiotic system: an ideal model of insect-microbe symbiosis” Poster presentation, International Conference on Holobionts, Paris, France, 2017 April 19-21
2. **Ohbayashi Tsubasa**, Futahashi Ryo, Shigenobu Shuji, Fukatsu Takema, Mergaert Peter Mergaert, Kikuchi Yoshitomo. [Oral presentation] “Comparative cytology, physiology and transcriptomics between free-living and symbiotic *Burkholderia* symbionts reveal adaptations for colonization of its bean bug host” Portland(USA), 2018 July 15-20