

研究終了報告書

「細菌の宿主体内適応に関わる分子基盤の解明」

研究期間： 2021 年 10 月～ 2024 年 3 月

研究者： 竹下 和貴

1. 研究のねらい

地球上のありとあらゆる動植物が共生微生物を保持し、緊密に相互作用している。宿主生物が本来持たない重要機能を共生微生物が担っていることも次々と明らかとなっている。研究者は「共生微生物の持つ“計り知れない能力”を自在に活用することができれば、様々な環境問題の解決に貢献できる」と考えた。しかし、単純に微生物を他の生物へ与えるだけでは、微生物が感染・定着することもない、共生微生物として機能を発揮することもない。共生微生物はいったいどのようにして宿主生物への適応を実現しているのか？

研究者はこれまで、カメムシ類における腸内共生に関して研究を行ってきた。その中である種のカメムシ(以下、カメムシ)が、自身の生存に必須な共生細菌を環境中から取り込み、腸管内に共生させる共生系を築いていること、そしてこの共生細菌が培養可能で遺伝子組換え可能であることを見出した。さらに、このカメムシ共生細菌に近縁で、植物への成長促進効果が知られている一部の細菌(以下、植物共生細菌)がこのカメムシへ共生できることを見出した。つまりこの植物共生細菌は、昆虫と植物を宿主生物として認識し、宿主体内への感染・定着と宿主にとって有益な共生機能の発揮、をそれぞれの宿主に対して行うことができる特殊な細菌と言える。

本研究では、植物共生細菌が昆虫と植物という全く異なる宿主体内環境に適応することを可能としている分子基盤の解明に挑戦する。本 ACT-X 研究では、“植物共生細菌が宿主カメムシ、宿主植物への定着に共通して必須な遺伝子(群)を持つ”と仮定し、これら共通必須遺伝子(群)の同定を目標とした。

2. 研究成果

(1)概要

研究項目1として、植物共生細菌がカメムシ共生細菌として機能することを実証することに取り組んだ。カメムシより分離した共生細菌および植物共生細菌をそれぞれカメムシへ感染させ、宿主の適応度、腸管内での感染菌数、腸管内での局在を比較した。これらに関して、カメムシ共生細菌と植物共生細菌との間で違いが認められなかったことから、植物共生細菌が本来の共生細菌に遜色なく、カメムシの共生細菌として機能することが実証できた。

研究項目2では、両宿主体内への定着に必須な植物共生細菌候補遺伝子の絞り込みに取り組んだ。本研究では、両宿主共生時および培養時の植物共生細菌の比較RNAseq解析を行い、培養時と比べて両宿主共生時に共通して高発現している遺伝子を候補とする計画であった。このためまず、植物への植物共生細菌感染実験系の構築を完了させた。培養時、カメムシ共生時のRNAseqは予定通り実施できたものの、植物からのRNA抽出で大きく躓いた。よって、カメムシ共生時に高発現していた遺伝子および、他の植物共生系における既知の共生必須遺伝子を候補とし、研究項目3を進めることとした。予定からは大きく遅れたものの、最終年度後半に植物共生時のRNAseqも完了させることができ、両宿主共生時に共通して高発現し

ていた遺伝子が 15 個見つかった。

研究項目 3 では、上記の候補遺伝子を対象に植物共生細菌遺伝子欠損株を作製し、カメムシおよび植物への感染実験を行い、両宿主への定着に必須な遺伝子を同定することを目指した。候補遺伝子 5 個それぞれの欠損株をカメムシへ感染させたところ、その中の 1 つがカメムシ共生系における必須遺伝子であることが示された。さらにその遺伝子欠損株の植物への感染実験を行ったところ、同遺伝子が植物共生系においても必須であることが示された。

(2) 詳細

研究項目 1「カメムシにおける植物共生細菌の感染動態調査」

本項目では、植物共生細菌がカメムシの腸管内へ共生し、本来の(カメムシより分離した)共生細菌と比べて遜色なく、“カメムシ共生細菌”として機能することを実証することを目指した。

これまでに、カメムシは腸管内に共生細菌を保持すること、共生細菌を持たない非感染のカメムシの羽化率(成虫まで成長した個体の割合)は 0 % (つまり、必須共生)であることがわかっている。カメムシより分離した共生細菌および植物共生細菌をそれぞれカメムシへ感染させ、①宿主の適応度(羽化率、成長速度[成虫に成長するまでに要した日数]、性別ごとの体長・体幅・体重)の算出、②定量 PCR による腸管内での感染菌数の定量、③蛍光顕微鏡を用いた腸管内での感染菌の局在観察を行い、比較した。植物共生細菌を感染させたカメムシの羽化率は 69 % であり(本来のカメムシ共生細菌では 73 %)、植物共生細菌がカメムシの必須共生細菌として機能することを示すことができた。その他宿主適応度の比較、カメムシの各成長段階(全 8 段階)における感染菌数の比較およびカメムシ腸管内における局在比較においても、両者に大きな違いは見られなかった。以上の結果から植物共生細菌は、カメムシ本来の共生細菌と比べて遜色なく、カメムシ共生細菌として機能できると結論づけた。

研究項目 2「宿主体内への定着に必須な植物共生細菌候補遺伝子の絞り込み」

本項目では、①植物への植物共生細菌感染実験系を構築すること、②カメムシ、植物両宿主共生時に共通して発現変動する植物共生細菌遺伝子を、両宿主体内へ定着するための共通必須遺伝子の候補としてリストアップすることを目指した。まずは植物への植物共生細菌感染実験系の構築に取り組み、無事に完了させた。培養時およびカメムシ共生時の RNAseq は計画通り実施できたものの、植物からの RNA 抽出は予定通りにいかず苦労した。この問題により、カメムシ共生時に高発現している、かつ共生に関連しそうなアノテーションを持つ遺伝子と他の植物共生系における既知の共生必須遺伝子を共通必須遺伝子の候補とするよう計画を変更し、研究項目 3 を進めることとした。

植物からの RNA 抽出は、ACT-X 同領域の高木大輔先生(摂南大)に依頼することで問題を解決した。計画からは大きく遅れたが、植物共生時の RNAseq も最終年度後半に完了した。各宿主共生時に高発現する遺伝子を抜きだしたところ、15 遺伝子が共通高発現遺伝子として同定された。

研究項目 3「遺伝子組換え植物共生細菌の感染実験による定着必須遺伝子の同定」

上述の候補遺伝子を対象に植物共生細菌遺伝子欠損株を作製し、カメムシおよび植物への感染実験を行い、両宿主への定着に必須な遺伝子を同定することを目指した。選定した

候補遺伝子 5 個それぞれの欠損株をまずはカメムシへ感染させたところ、その中の 1 つがカメムシ共生系における必須遺伝子であることが示された。さらにその遺伝子欠損株の植物への感染実験を行ったところ、同遺伝子が植物共生系においても必須であることが示された。当該遺伝子が両宿主への共生に必須であることを示すことができた一方で、“定着に必須かどうか”を検証するまでには至らなかった。また興味深い点として、当該遺伝子が両共生系で異なる役割を果たしている可能性が考えられた。

ACT-X 研究領域内での連携

植物からの RNA 抽出の際、市販のキットを使用したにも関わらず、RNAseq に必要な質・量の RNA が抽出できないでいた。このため、植物からの RNA 抽出に精通している ACT-X 同領域の高木大輔先生(摂南大)に RNA 抽出を依頼した。高木先生には市販のキットに依らない方法を試していただき、加えてサンプルにあった抽出条件を検討していただいた。その結果、必要な質・量の RNA を確保するに至った。これにより、当初の計画からは大きく遅れてしまったものの、RNAseq を完了することができた。

領域会議での交流を通して本研究で着目している植物共生細菌に興味を持ってくれた ACT-X 同領域の高田啓先生(京都産業大)とは、互いの研究について定期的な zoom オンラインミーティングや秋田県立大学開催した領域内セミナーでディスカッションを行ってきた。高田先生から頂いたコメントをもとに、現在、いくつかの遺伝子欠損株を作製中であり、作製でき次第カメムシへの感染実験を実施する予定である。また、高田先生が進めている研究へ活用していただくため、研究者からは植物共生細菌およびカメムシ共生細菌をサンプルとして提供した。以上のように、お互いの研究をサポートする形での共同研究をスタートさせている。

3. 今後の展開

今後まずは ACT-X 研究での成果をまとめ論文投稿することを目指す。加えて、新規の共通必須遺伝子の探索にも引き続き力をいれる。

研究者が最も魅力を感じている本植物共生細菌の特性は、昆虫と植物、どちらの宿主にも有益機能を与えられる点である。ACT-X 研究がひと段落した後には、これを達成しているメカニズムの解明に取り組みたい。まずは、植物共生細菌およびカメムシ共生細菌がカメムシにおいて果たしている機能の解明に取り組む。その先にはカメムシ、植物両宿主における機能解析実験系の構築も必要となると思われる。10 年後を目処に、それらも含めた独自の実験系を完成させ、昆虫共生系と植物共生系との比較研究を展開していきたい。以上により、植物共生細菌の共生分子基盤の解明に取り込むことで、①様々な宿主生物に共生でき、様々な有用機能を発揮できる共生細菌の創出、②既存の共生関係(共生機能)を外部から操作する技術の開発、へと繋げたい。

4. 自己評価

研究目的の達成状況

これまでの昆虫-微生物共生研究を軸としながら植物-微生物共生研究へと展開することが、研究者にとっての ACT-X におけるチャレンジだった。結果として、植物を対象とする感染実験系が確立でき、カメムシ、植物の両共生系を直接比較可能な独自の実験系が構築できた。さ

らに昆虫共生系と植物共生系との共通必須遺伝子を1つ同定できた。研究開始時点では共通必須遺伝子が存在するかも定かではなかったが、1 つ同定できたことで、独自の実験系、アプローチが有用であることを示すことができたと自負している。当該遺伝子が宿主体内への定着に必須かどうかの検証までは至らなかったものの、大方の目標は達成でき、研究者としての個を確立するための1歩を確実に踏み出せたと考えている。

研究の進め方(研究実施体制及び研究費執行状況)

本研究は、研究者1名で主に実施した。植物からのRNA抽出に躓き、計画変更を余儀なくされたが、最終的には当初の目標を概ね達成することができた。予想外の事態にも柔軟に対応できた経験は、今後の研究においても生きてくるに違いない。計画変更はサイトビジットにおける研究総括、アドバイザーの先生方の助言のおかげでもあり、大変感謝している。

初年度に植物栽培用の照明付きインキュベータを導入した。植物共生系研究の実績が全くない研究者がこのような研究に取り組むことができたのも、新たなチャレンジを応援してくれるACT-Xのおかげであり、自身の研究を大きく展開させるためにACT-Xをうまく活用できたと考えている。上述の通り、植物共生時のRNAseqの実施は計画から大幅に遅れたため、研究費の繰越申請を行なった。その他は概ね計画通り研究費を執行することができた。

研究成果の科学技術及び社会・経済への波及効果

本研究では、研究開始時点ではその存在も定かではなかった、昆虫共生系と植物共生系とに共通する必須遺伝子を発見することができた。さらに、この共通必須遺伝子が同じ細菌の同じ遺伝子であるにも関わらず、昆虫共生系と植物共生系とで異なる役割を果たしている可能性も見えてきた。これらは両共生系を比較したから明らかにできたことであり、異なる共生系を横断的に研究する重要性を示していると考えている。さらに共生だけに留まらず、共生と寄生、共生と病原性の比較研究へと発展させていくことができれば、生物間相互作用に関する様々な理解が深化するとともに、応用研究への波及効果も期待される。

5. 主な研究成果リスト

(1) 代表的な論文(原著論文)発表

研究期間累積件数: 0件

(2) 特許出願

研究期間全出願件数: 0件(特許公開前のものも含む)

(3) その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

国際学会 ポスター発表:

○ Kazutaka Takeshita & Yoshitomo Kikuchi. ISME18. PS18.604. 2022.8.18. SwissTech Convention Center, Lausanne, Switzerland.

国内学会 口頭発表:

○ 竹下和貴, 近藤美洋, 菊池義智. 日本微生物生態学会第35回大会. O12-2. 2022.11.2. 札幌コンベンションセンター.

公開

ACT-X 研究領域内セミナーの開催:

ACT-X「環境とバイオテクノロジー」微生物関連ミニセミナー in 秋田. 2023.6.26-27. 秋田県立大学. (研究者自身を含め 5 名の ACT-X 研究者が参加)