

## 論文の内容の要旨

### Beetles with Bacteriome: Ecology, Evolution, and Development (菌細胞塊を持つ甲虫の生態、発生、進化)

氏名 廣田 敏

#### 【序論】

昆虫類には、微生物を体内に取り込み、その能力を利用することで、貧栄養や乾燥などの過酷な環境に適応し、繁栄しているものが多い。なかでも高度な共生関係が進化したものでは、菌細胞という微生物を細胞内に保有するための細胞が分化しており、それらは集合して菌細胞塊という共生組織/器官を形成する。菌細胞塊はアブラムシ、セミ、トコジラミ（カメムシ目）、ツェツェバエ（ハエ目）、ゴキブリ（ゴキブリ目）、ゾウムシ（コウチュウ目）、アリ（ハチ目）など多様な系統の昆虫類から見出され、存在部位や形態も多様であり、それぞれ独立に獲得されたと考えられているが、その進化発生学的起源は未解明である。

菌細胞塊の発生に関する分子機構としては、エンドウヒゲナガアブラムシ、ヒメナガカメムシ、フロリダオオアリで、いくつかのホメオティック遺伝子（Hox遺伝子）が関与するという報告がある。しかし、これらの昆虫では遺伝子機能解析や安定飼育維持が容易でないなどの要因から、その後の研究はあまり進んでいない。

私は、これらの困難を克服可能な「菌細胞塊形成の分子機構の解明」にむけた新規実験系の確立をめざし、コウチュウ目（甲虫類）に着目した。甲虫類は、これまでに記載された生物種の過半数を占める昆虫綱の中で最大の目を構成しており、最も繁栄した分類群の1つと言える。甲虫類の中で、ハムシ科、ジョウカイモドキ科、ゾウムシ科、ナガシנקイ科、ホソヒラタムシ科、ヒメトゲムシ科、ヒゲブトコメツキ科における菌細胞塊の存在が、1950年代までの古典的な組織学的研究により知られていた [1]。私は修士課程において、甲虫類の中でも繁殖力が高く、全粒小麦粉のみで飼育できるホソヒラタムシ科の貯穀害虫ノコギリヒラタムシ *Oryzaephilus surinamensis* をモデル種として、菌細胞塊および共生細菌を詳細に記載し、微生物学的な実体を明らかにした [2]。また、FISH法を用いて胚発生過程における菌細胞塊の局在の可視化手法を確立した。

博士課程では、引き続きノコギリヒラタムシ菌細胞塊の胚発生過程を調べるとともに、系統的に近縁でないにも関わらず共生細菌は比較的近縁なナガシンクイ類において、菌細胞塊の胚発生を観察した。また、1930年代の共生系の初記載以降、研究例が皆無のヒメトゲムシ類について、菌細胞塊の存在を再確認するとともに、共生細菌の微生物学的実体および遺伝学的な解析を行ない、ヒメトゲムシの生育する樹液環境の解析を通じて共生細菌をもつことの生物学的意義の解明を試みた（図1）。

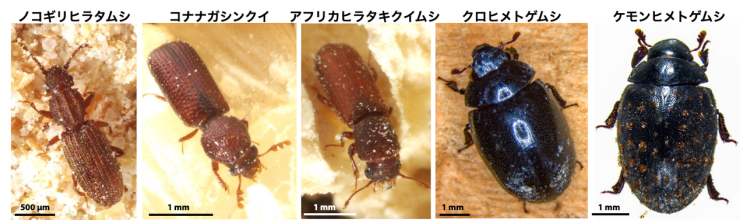


図 1：本研究で用いた甲虫類

### 【ナガシンクイ類の胚発生における共生細菌の局在】

ナガシンクイ科は乾燥した木材や穀物の害虫として知られる。先行研究において、腹部に一对の菌細胞塊をもつこと、ノコギリヒラタムシ共生細菌と近縁なバクテロイデス門の共生細菌を保有することなどがわかっていた。私は、胚発生過程における菌細胞塊形成をノコギリヒラタムシと比較検討するために、コナナガシンクイ *Rhyzopertha dominica* およびアフリカヒラタキイムシ *Lyctus africanus* において、修士課程で確立した卵のFISH法を駆使して、胚発生過程における共生細菌の局在を追跡した。コナナガシンクイ、アフリカヒラタキイムシともに、産卵直後は卵表面に散在していた共生細菌が、胚帯形成に伴い卵黄内に感染する過程、胚帯期に卵黄内に細菌が集合し、その後、胚帯の菌細胞塊内に感染していく過程、そして感染後に1対の菌細胞塊が形成される過程が観察された。これらの発生過程を8ステージに分類した。ナガシンクイ類における菌細胞塊の胚発生過程は、ノコギリヒラタムシとはかなり異なることが判明した。

### 【ノコギリヒラタムシ菌細胞塊の発生進化学的な研究】

修士課程で確立したノコギリヒラタムシ卵のFISH法を駆使して、胚発生を時系列順に追跡し、胚発生過程における菌細胞塊の形成過程をより詳細に明らかにした。また、転写因子群のRNAiをおこない、胚発生における菌細胞塊への影響を調べたところ、*abdominalA* (*abdA*)、*caudal* (*cad*)、*Krüppel* (*Kr*)、*hunchback* (*hb*)、*caudal* (*cad*) で菌細胞塊の形成が見られないこと、*AbdominalB* (*AbdB*)のRNAiで菌細胞塊の形態が異常になることを確認した（図2）。すなわち、これらの転写因子がノコギリヒラタムシで菌細胞塊の形成に関与する可能性が示唆された。

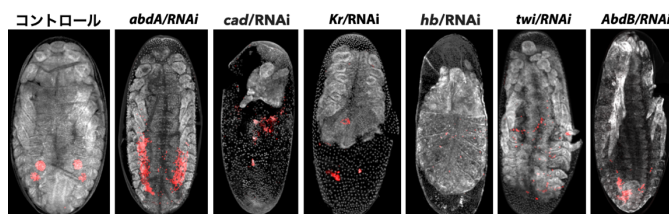


図 2：ノコギリヒラタムシ胚の RNAi 表現型

### 【ヒメトゲムシの菌細胞塊および共生細菌の記載】

ヒメトゲムシ科の甲虫は樹液中に棲息し、世界で3属91種が記載されているにすぎない小さな分類群である。1930年代にヨーロッパ産ヒメトゲムシ *Nosodendron fasciculare* で菌細胞塊の存在が簡潔に報告されたが、以来ヒメトゲムシ類の内部共生に関する研究は80年以上にわたり皆無であった。私はクロヒメトゲムシ *Nosodendron coenosum* およびケモンヒメトゲムシ *Nosodendron asiaticum* の菌細胞塊および共生細菌について、分子系統学および組織学的な解析を実施した (図3)。成虫と幼虫の中腸の両側面に沿って、一对の菌細胞塊が見られた。菌細胞塊は、中央が大きな菌細胞、表面が扁平な鞘細胞から構成されていた。FISH法により、菌細胞塊の細胞質内における単一共生細菌の占有を確認した。成熟メス成虫では、共生細菌は卵巣内の感染領域や発達中の卵母細胞の表面にも検出され、卵巣経路による共生細菌の垂直伝達が示唆された。透過型電子顕微鏡観察により、菌細胞の細胞質中に特異な形態の共生細菌細胞を確認した。分子系統解析の結果、ヒメトゲムシ共生細菌はバクテロイデス門の中で明確なクレードを形成していた。また、ヒメトゲムシ共生細菌は、ナガシクイ類の菌細胞塊共生細菌に最も近縁であり、ノコギリヒラタムシ共生細菌にも近縁であったことから、甲虫類の中では互いに遠縁と考えられているヒメトゲムシ科、ナガシクイ科、ホソヒラタムシ科間において、共生細菌は近縁であるという予想外の関係が明らかになった [3]。

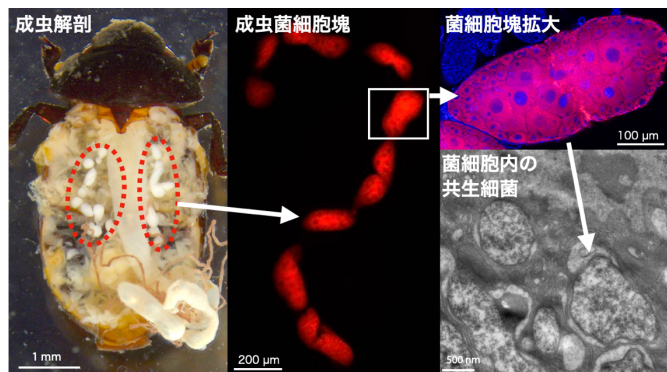


図 3：ヒメトゲムシ菌細胞塊および共生細菌

### 【ヒメトゲムシ共生細菌のゲノム解析および宿主生態の調査】

ヒメトゲムシ共生細菌の生物学的機能に洞察を得る目的で、ヒメトゲムシ共生細菌の全ゲノム配列を決定・解析した。さらに、宿主ヒメトゲムシが一生を通じて食物源としている樹液の特性を明らかにするため、ヒメトゲムシが来る樹液とヒメトゲムシの来ない樹液の化学組成および昆虫誘因性を比較解析した。ヒメトゲムシ類共生細菌のゲノムは0.18Mbと大腸菌の20分の1に満たないレベルまで縮小しており、GC含量も12%と極めて低く、既知の生物では最もATに偏った塩基組成であった。全遺伝子数は200未満で大部分の代謝系の遺伝子が失われている一方で、チロシン、フェニルアラニン、トリプトファンなど側鎖に芳香族をもつアミノ酸の合成経路であるシキミ酸経路の遺伝子群が例外的によく保存されていた。樹液に集まる昆虫群集を野外でモニタリングしたところ、ヒメトゲムシが棲息する樹液には、ヒメトゲムシ以外の昆虫種がほとんど確認されなかった。樹液中の微生物叢を分析したところ、ヒメトゲムシが棲息する樹液ではバクテリアの多様性が高くなる傾向にあった。樹液に含まれるアミノ酸と糖をLC-MSで分析したところ、ヒメトゲムシの生育する樹液は、ヒメトゲムシ以外の昆虫種が集まる樹液と比較してpHが高く、アミノ酸や糖類に乏しいことが明らかになった。すなわちヒメトゲムシは他の昆虫が利用していな

い栄養的に乏しい樹液をうまく利用していること、共生細菌の主な機能は芳香族アミノ酸の供給であることが示唆された。

### 【まとめと展望】

本研究では、菌細胞塊を持つ甲虫類について、FISH法やRNAi法を駆使し、菌細胞塊の形成に関与する遺伝子候補を同定した。また、古く菌細胞塊の存在が報告されていたが不明な点の多いヒメトゲムシ類では、共生細菌の研究を通じて多くの生態的な知見を得た。本研究成果により、菌細胞塊を持つ昆虫の多様性およびその進化に関する理解がさらに深まるものと期待される。

[1] Buchner P (1965) *Endosymbiosis of Animals with Plant Microorganisms*. Interscience, NY.

[2] Hirota B et al. (2017) *mBio* 8, e01482-17.

[3] Hirota B et al. (2020) *Frontiers in Microbiology* 11, 588841.