

ノコギリカメムシにおける新奇な微生物共生系の研究

2021 年 1 月

西野 貴騎

ノコギリカメムシにおける新奇な微生物共生系の研究

筑波大学大学院

生命環境科学研究科

生物機能科学専攻

博士（学術）学位論文

西野貴騎

目次

目次	p. i-ii
第 1 章 序論	p. 1-2
図表	p. 3-4
第 2 章 ノコギリカメムシの後脚外部共生器官における糸状菌との共生現象の発見	
概要	p. 5
第 3 章 ノコギリカメムシの中腸共生器官における共生細菌の多様性および環境獲得の発見	
概要	p. 6
導入	p. 7-8
材料と方法	p. 8-11
結果と考察	p. 11-16
結論	p. 16-17
図表	p. 18-26
第 4 章 総括	p. 27-29
謝辞	p. 30

論文発表について

p. 30

引用文献

p. 31-37

第1章

序論

生物多様性と進化機構の解明は、生態学・進化生物学における大きな興味の対象である。共生とは、広義には異なる種類の生物が同じ空間や時間を共有することを指す概念であり、生物多様性と適応進化を説明する一つの重要な要素と考えられる (Futuyma 2003)。

実際に共生に関与した多様な生命現象が知られており、生態的レベルで見れば、発光、性比操作、栄養共生、防衛共生を含んだ高度な現象が、分子レベルでは遺伝子の水平伝搬やゲノムの縮退が実証されている (McFall-Ngai 1999; Zimmer 2001; Baumann 2005; Oliver et al. 2014; Janson et al. 2008; Moran 2006; Joy 2013; Bennett and Moran 2013; Kondo et al. 2002)。

これまでの研究で、細菌、真菌、原生動物、線虫などの微生物が昆虫と共生していることがわかっており、それらを対象とした数多くの研究がなされてきた (Buchner 1965; Breznak 1982; Campbell 1990; Gullan and Cranston 1994; Moran 2002; Bourtzis and Miller 2003; Baumann 2005; Moran and Degnan 2006)。しかしながら、すべての共生現象を網羅していると言うには及ばず、今後も多様な共生例に関する研究が求められている。特に、これまでの研究の多くは昆虫と細菌に関するもので、昆虫と真菌の共生については、その現象が広く知られつつも、あまり研究が進んでいない。

一方、昆虫と細菌の共生関係についても、その存在がほのめかされながら未だ詳細な報告のない昆虫の分類群は多数存在する。特に異翅亜目では、多くの分類群で多様な腸内共生細菌との共生様式が知られているものの、まだ腸内共生細菌の存在すら確認されていない分類群も存在している。そういった分類群において新規な共生細菌の

研究を行っていくことは、共生関係の進化や多様性を読み解く手がかりとなる。

ノコギリカメムシ科 (Hemiptera: Pentatomoidea: Dinidoridae) は約 17 属 100 種から成っており、様々な植物から吸汁する生活史を持つことから、一部は農業害虫として知られている (図 1-1) (Durai 1987; Rolston et al. 1996; Lis 2006; Kment and Kocorek 2014). そのなかにおいて、ノコギリカメムシ (*Megymenum gracilicorne*) はアジア東部に分布し、時にウリ科の農業害虫として扱われる種である。また、他の多くのカメムシ類で幼虫期が 5 齢までであるのに対して、幼虫期が 4 齢までしかないという特徴を持つ (図 1-2). ノコギリカメムシについては、古い学会報告で真菌との新奇な共生が示唆されながらもその後の研究はされておらず、また、中腸共生部位と思われる消化管形態の記載はあるが (Miyamoto 1961), 共生細菌についての報告はなかった。

本研究では、ノコギリカメムシと真菌の新奇な共生関係の解明、およびノコギリカメムシ科で初めてとなる腸内共生細菌についての研究を行った。前者については第 2 章で、後者については第 3 章でそれぞれ報告する。



A
ノコギリカメムシ
Megymenum gracilicorne
(Dinidoridae: Megymeninae)



B
ツマキクロカメムシ
Coridius chinensis
(Dinidoridae: Dinidorinae)



C
ヒロズカメムシ
Eumenotes pacao
(Dinidoridae: indertae sedis)

図 1-1 ノコギリカメムシ科の昆虫. (A) ノコギリカメムシ亜科のノコギリカメムシ. (B) ツマキクロカメムシ亜科のツマキクロカメムシ. (C) 亜科が定められていないヒロズカメムシ.

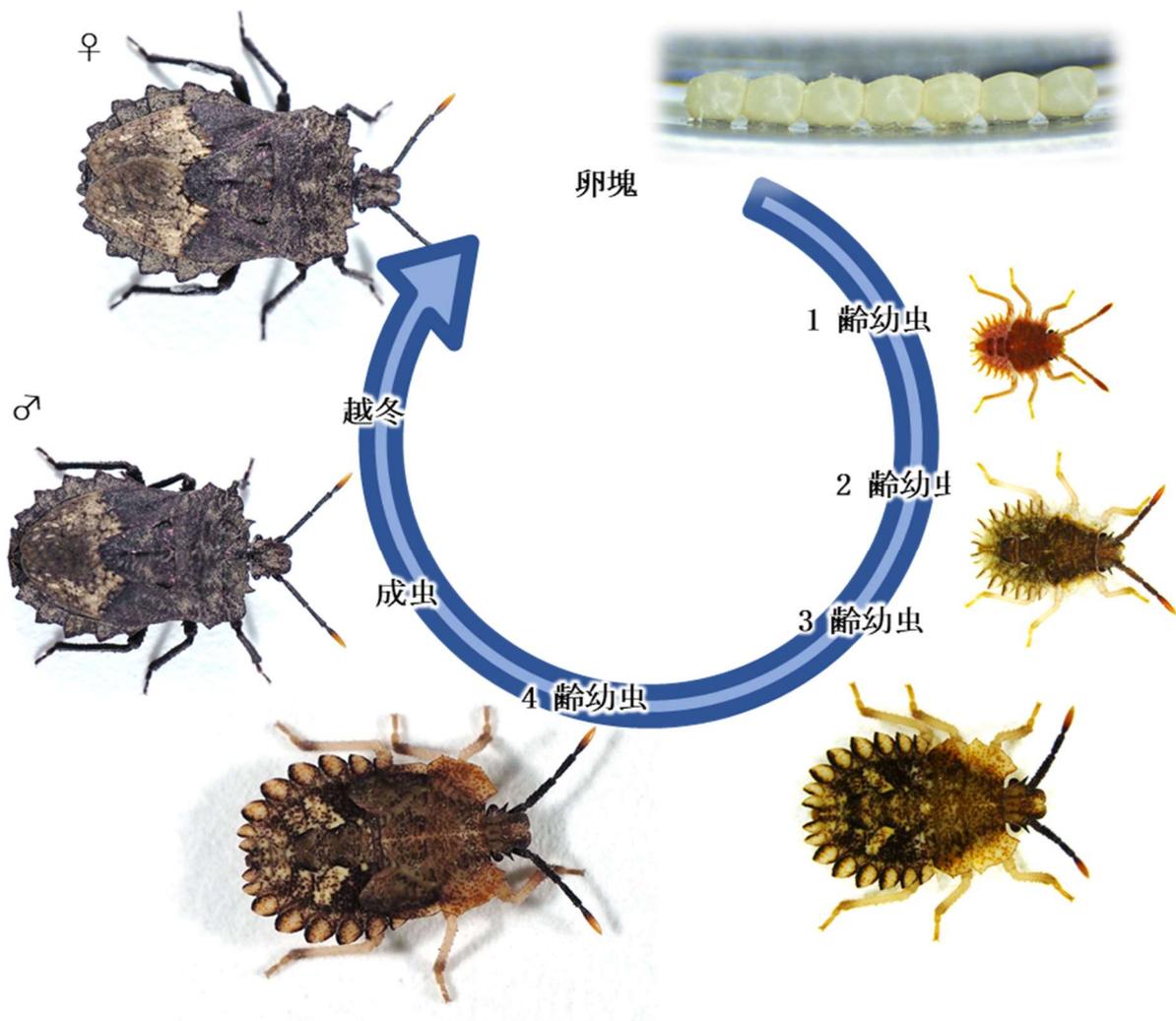


図 1-2 ノコギリカメムシの生活環。春に産卵し，4齢の幼虫期を経て，夏から初秋に羽化する。年1化で成虫越冬である。

第 2 章

ノコギリカメムシの後脚外部共生器官における糸状菌との共生現象の発見

概要

ノコギリカメムシ (*M. gracilicorne*) を含むノコギリカメムシ科 (Dinidoridae) の雌成虫は、後脚に扁平な器官を持つことが知られており、形態的な特徴から鼓膜器官 (tympanal organ) という聴音器官であるとされてきた。一方、1972 年の日本昆虫学会第 32 回大会において、成熟したノコギリカメムシの雌で後脚扁平部が菌糸様の物質で覆われること、産卵時に雌が後脚を器用に動かしてその物質を卵に塗り付ける行動を示すこと、そして卵表面も菌糸様の物質に覆われることが報告されたが、その後の研究は皆無であった。本研究では、ノコギリカメムシの雌成虫後脚器官および糸状物質の実態の解明を目指し、飼育・観察、真菌の単離培養、組織学的観察、菌叢解析を行った。

※近日中に学術論文として発表予定のため、本章の内容は非公開とする。

第 3 章

ノコギリカメムシの中腸共生器官における共生細菌の多様性および 環境獲得の発見

概要

カメムシ類の多くは中腸後端部が多数の盲嚢を備えた共生器官に特殊化し、その内腔に生理的に重要な共生細菌を保有している。ノコギリカメムシについては中腸後端部の形態的記載があったが、共生細菌の微生物学的な実体は不明であった。本章では、ノコギリカメムシの共生細菌について、体内局在、分子系統、伝搬様式、可培養性、宿主への適応度効果などの解明に取り組んだ。その結果、(i) 他のカメムシ上科のカメムシ類と同様に、共生細菌は中腸共生器官の盲嚢内腔の細胞外に局在していた、(ii) 各個体の中腸共生器官内には単一の系統の共生細菌が検出される場合が多かったが、個体によっては保有する共生細菌に多様性が見られた、(iii) 腸内細菌科 (Enterobacteriaceae) の *Pantoea* に近縁な複数系統の細菌が検出され、その多くは他種のカメムシ類で環境から獲得される共生細菌として報告されたものと共通していた、(iv) これら共生細菌の安定な垂直伝搬は見られず、毎世代環境中から共生細菌を獲得しているものと考えられた、(v) これら共生細菌は LB 培地上で培養可能であり、環境獲得であることと整合的であった、(vi) 孵化幼虫に共生細菌を経口摂取させて飼育すると生存率の上昇が見られ、宿主の生存に有益であることが示唆された。

導入

カメムシ類の多くが中腸後部に共生細菌を保有する特殊な盲嚢を持つ (Glasgow, 1914; Buchner, 1965). カメムシ上科の種では一般に, γ プロテオバクテリアを中腸盲嚢部に保有しており, 共生細菌の除去が宿主の正常な生育を妨げることから, 生理的に重要な機能を有することが示唆されてきた (Abe et al. 1995; Bistolas et al. 2014; Buchner, 1965; Duron and Noël, 2016; Fukatsu and Hosokawa, 2002; Hayashi et al. 2015; Hosokawa et al. 2006, 2012, 2013, 2016a, 2019; Itoh et al. 2017; Kafil et al. 2013; Kaiwa et al. 2014; Karamipour et al. 2016; Kikuchi et al. 2009, 2012; Prado et al. 2006, 2010; Prado and Almeida 2009; Tada et al. 2011; Taylor et al. 2014). 共生細菌の獲得には主に 2 つの経路がある. すなわち, 垂直伝搬と環境獲得である (Salem et al. 2015; Hosokawa and Fukatsu 2020). 多くのカメムシ上科の種では, 共生細菌の卵表面塗布や, 共生細菌を含む特殊な分泌物によって, 孵化幼虫が共生細菌を経口的に獲得する (Fukatsu and Hosokawa 2002; Hosokawa et al. 2012a; Kaiwa et al. 2014; Hayashi et al. 2015; Salem et al. 2015; Hosokawa and Fukatsu 2020). しかしながら, 宿主と共生細菌の系統学的関係は必ずしも一致しない場合も多く (カメムシ科, キンカメムシ科, ツチカメムシ科など) (Hosokawa et al. 2012b, 2016b, 2019), 共生細菌の置換や新規獲得, あるいは水平伝搬が頻繁に起こってきたことが示唆される. これまで, 多くのカメムシ類において共生細菌が同定されてきた. 一方, ノコギリカメムシでは古い形態学的な報告はあるが (Miyamoto 1961), ノコギリカメムシのみならずノコギリカメムシ科の昆虫で共生細菌に関する研究は皆無である.

本章では, ノコギリカメムシが保有する共生細菌について, 微生物学的な性状, 系統学的な位置, 組織学的な局在, 垂直感染の有無, 可培養性, 生存率への寄与などの

解明に取り組んだ。

材料と方法

昆虫の採集と維持

本章での研究に使用したノコギリカメムシ試料について表 3-1 に示した。野外より採集し (図 1-1A), 一部の個体は採集後直ちに実験に供し, それ以外は実験室内で飼育・維持した。昆虫の維持はプラスチック容器を用い, 25°C 恒明条件で, 紙タオルを敷き, 新鮮なキュウリを餌として与え, 滅菌水で湿らせた脱脂綿を与えた。飼育容器および餌は毎週交換した。産卵された卵塊は毎週回収し, 飼育あるいはその他の実験に使用した。

組織学的観察

消化管をリン酸緩衝液中で野外由来の成虫から剖出した (図 3-1A)。消化管全体を固定し, Koga et al. (2009) に記載された方法でホールマウント蛍光 in situ ハイブリダイゼーション (wFISH) に供試した。wFISH では, Alexa555 で標識したオリゴヌクレオチドプローブを使用して細菌を染色し, 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) で宿主の核を対比染色した。組織標本は, 共焦点レーザー走査型蛍光顕微鏡, 落射型蛍光顕微鏡, または蛍光実体顕微鏡で観察した。透過型電子顕微鏡による観察を行うため, 剖出された中腸盲嚢部を固定した。その後, 組織を脱水し, Epon812 樹脂に包埋してウルトラミクロトームで超薄切した。切片は銅メッシュにマウントした後, 酢酸ウランとクエン酸鉛で染色して透過型電子顕微鏡によって観察した。

共生細菌の培養および中腸盲嚢部からの共生細菌試料の調製

PBS 中で各成虫から中腸盲嚢部を剖出し、組織の半分を破碎、懸濁した。懸濁液は希釈して血球計算板を用いて細菌数の直接計測に供するとともに、段階希釈し、LB 平板培地に塗布した。細菌を接種した平板培地は 25°C 恒暗条件で 24 時間培養して、1 個体の中腸盲嚢部あたりのコロニー形成単位 (CFU) を計数・算出した。各中腸盲嚢部試料について、8 個の細菌コロニーをランダムに選び、細菌の 16S rRNA 遺伝子を標的としたコロニー-PCR に供した。懸濁液を作成した際に残った半分の中腸盲嚢部は DNA 抽出に供した。得られた DNA 試料は細菌 16S rRNA 遺伝子の配列決定を行う際の PCR 反応の鋳型として使用した。

細菌 16S rRNA 遺伝子の PCR, クローニング, 配列決定, 分子系統解析

剖出した中腸盲嚢部の DNA サンプルは、プライマー 16SA1 (5'-AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG-3') および 16SB1 (5'-TAC GGY TAC CTT GTT ACG ACT T-3') を用いた PCR に供した (Fukatsu and Nikoh 1998)。PCR 産物は T ベクターを用いた TA クローニングと、ケミカルコンピテントセルによる形質転換に用いた。形質転換した大腸菌はアンピシリンおよび X-gal を添加した LB 平板培地に塗布し、各中腸盲嚢部あたり 4 コロニーをプライマー Uni19 (5'-GTT TTC CCA GTC ACG ACG T-3') および Rev20 (5'-AGC TAT GAC CAT GAT TAC GC-3') を使用したコロニー-PCR に供した。これら PCR 産物は配列決定用プライマー Uni19 と Rev20 によるサンガーシーケンスに用いた (Eurofins Genomics に外注)。同じ中腸盲嚢部に由来する配列はほとんど同一の配列であった。一部に見られた PCR 反応のエラーや部分的なキメラ形成に起因すると思われる配列の違いについては、コンセンサス配列を作成して対応した。

中腸盲嚢部に由来する細菌コロニーの解析については、それぞれの中腸盲嚢部につ

いて8コロニーをランダムに選び、プライマー16SA1および16SB1を用いたコロニーPCRに供した。これらのPCR産物についてはさらにプライマー16SA2 (5'-GTG CCA GCA GCC GCG GTA ATA C-3'), 16SB2 (5'-CGA GCT GAC GAC ARC CAT GCA-3') (Fukatsu and Nikoh 1998) を用いた nested PCR を実施し、プライマー16SA2によるダイレクトシーケンスで配列決定を行った。得られた核酸配列のアラインメントを実施し、あいまいな座位やギャップは除去した。アラインメントした配列に基づき、MEGA X (Kumar et al. 2018) を用いて最尤法および近隣結合法による系統樹を作成した。各ノードの統計学的なサポートは500回のbootstrapリサンプリングによって算出し、塩基置換モデルはMEGA Xで算出された赤池情報量基準 (AIC) の値が最小となるものを選択した。本章で決定された核酸塩基配列は、DNA Data Bank of Japan (DDBJ) にアクセッションナンバー LC594073-LC594419 にて登録した (表 3-1)。

垂直伝搬の検証

野外採集した雌成虫7頭 (CKSI20-12-CKSI20-18; 表 3-1) を個別飼育して産卵させた。飼育開始後一番目の卵塊と二番目の卵塊は、新しいプラスチックシャーレに移して、濡らした脱脂綿で保湿しながら室温で維持した。それぞれの卵塊より、7日齢の卵2個、および7日齢の幼虫1頭をサンプリングした。すなわち7頭の雌成虫に対してそれぞれ、剖出された中腸盲嚢部のサンプルと、2つの7日齢の卵サンプルと、2つの7日齢の幼虫サンプルを得た。これらのサンプルは前述の方法にしたがい、DNA抽出、プライマー16SA2, 16SB2による細菌16S rRNA遺伝子のPCR増幅、1%アガロースゲル電気泳動による確認、クローニング、プライマーUni19を用いた配列決定に用いた。

共生細菌の供与/非供与下における飼育実験

野外採集した雌成虫 (TSKB13-01; 表 3-1) の中腸盲嚢部より単離, 保存しておいた共生細菌を, LB 液体培地で 25°C 恒暗条件で振盪培養し, 遠心分離, 滅菌水洗浄, 10^8 CFU/ml の共生細菌懸濁液を調製した. ノコギリカメムシの大量飼育容器から, 毎週卵を回収して新しい飼育容器に移すことにより複数の実験群を作成した (各群 100-500 卵). 1 齢幼虫期間に, 共生細菌供与群 (19OP+Sym01, 19OP+Sym02, 19OP+Sym03, 20OP+Sym01 and 20OP+Sym02; Table) では新鮮なキュウリと共生細菌懸濁液を添加した脱脂綿を与え, コントロール群 (19OP-Sym01, 19OP-Sym02, 19OP-Sym03, 20OP-Sym01 and 20OP-Sym02; Table) では新鮮なキュウリと滅菌水を添加した脱脂綿を与えた. いずれの実験群においても, 2 齢幼虫に脱皮した後は新たな飼育ケージに移し, 新鮮なキュウリと滅菌水を添加した脱脂綿を与えて飼育した. 飼育期間の約 3 か月間にわたり, 飼育容器, 餌, 水を毎週更新しながら, 虫の脱皮と死亡を記録した. 生存率は, 一般化ウィルコクソン検定を用いて各年度の共生細菌供与群とコントロール群間で統計的に比較した. 全ての卵が成虫になるか死滅したのち, 共生細菌供与群 (20OA+Sym01-20OA+Sym08; 表 3-1) とコントロール群 (20OA-Sym01-20OA-Sym08; 表 3-1) から, それぞれ 8 頭の成虫を無作為に選んで中腸盲嚢部を剖出した. 剖出された中腸盲嚢部は, 前述の方法に従って, DNA 抽出, プライマー 16SA2, 16SB2 を用いた細菌 16S rRNA 遺伝子の PCR 増幅, クローニング, プライマー Uni19 を用いた配列決定に供した.

結果と考察

ノコギリカメムシ中腸共生細菌の形態および局在

剖出されたノコギリカメムシの消化管には、他のカメムシ類で一般的に観察されるのと同様に、5つの形態的に異なる中腸部位が同定された。すなわち、M1, M2, M3, M4B, M4 部位である (図 3-1A) (Kikuchi et al. 2008; Matsuura et al. 2012; Ohbayashi et al. 2015; Oishi et al. 2019)。拡大して観察してみると、M4 部位には小さな盲嚢が 2 列に、あるいは部分的に 3~4 列に並んでいるのが観察された (図 3-1B) (Miyamoto 1961)。FISH で蛍光標識した細菌 16S rRNA のシグナルは盲嚢内腔に見られた (図 3-1C, D)。透過型電子顕微鏡による観察により、盲嚢内腔に桿状の細菌が充満していることが確認された (図 3-1E, F)。

ノコギリカメムシ野外由来個体の共生細菌の分子系統解析

ノコギリカメムシの腸内共生細菌の微生物学的実体について、中腸盲嚢部に由来する細菌 16S rRNA のクローニングおよび配列決定により調べた。野外採集個体の腸内共生細菌には多型が見られたが、ほぼ全てが *Pantoea* 属に近縁な γ プロテオバクテリアに属していた (図 3-2; 赤字)。それらのうち、3 地点 (筑西, 福岡, 高崎) 由来の 6 配列が、“type X2” と呼ばれる環境細菌の配列とほとんど同一であった。この “type X2” は環境細菌でありながらカメムシ上科カメムシ科のチャバネアオカメムシ *Plautia stali* の中腸盲嚢部に共生して宿主の生存を支持する能力があると報告されたものである (Hosokawa et al. 2016a)。高崎由来の 1 配列は *Leclercia adecarboxylata* に近縁、千葉と福岡由来の 3 配列は *Enterobacter ludwigii* に近縁、福岡由来の 1 配列はカメムシ上科ツチカメムシ科のヨコヅナツチカメムシ *Adrisa magna* の腸内共生細菌に近縁であった (Hosokawa et al. 2012b)。千葉由来の 1 配列は “type C” と呼ばれるチャバネアオカメムシの培養可能な共生細菌と完全に同一であった (Hosokawa et al. 2016a) (図 3-2; 赤字)。これらの結果が示唆するのは、(i) ノコギリカメムシは *Pantoea* 属に近縁

な γ プロテオバクテリアを中腸 M4 部位の盲嚢内に保有している, (ii) 共生細菌の系統は個体間や地域個体群間でかなりの多様性がある, (iii) 主要な共生細菌はチャバナエオカメムシへの共生能力で知られる環境細菌の type X2 である, (iv) その他, チャバナエオカメムシや他のカメムシへの共生能力をもつ培養可能な細菌がノコギリカメムシに共生している.

ノコギリカメムシ腸内共生細菌の可培養性

以上の結果より, ノコギリカメムシは培養可能な細菌と共生している可能性が考えられた. そこで 4 地点由来の野外採集雌成虫 12 個体 (表 3-1; 図 3-2) について, 腸内共生細菌の培養試験および細菌数の直接計測をおこなった. 細菌数の直接計測値は比較的一貫しており, 1 個体の中腸盲嚢部あたり 10^7 から 10^8 という値を示した (表 3-2). 一方で, LB 平板培地上のコロニー形成数から計算した 1 個体の中腸盲嚢部あたりの CFU は, ほとんどの個体で 10^4 から 10^5 という値を示した (表 3-2). このことは, 中腸盲嚢部に存在する細菌細胞のうち, ごく一部 ($\sim 1/1,000$) のみが平板培地上でコロニーを形成できることを意味している. このような低効率の理由として, 盲嚢中の細菌の大部分が生理的に増殖可能な状態にない可能性, または中腸盲嚢部の破碎を伴う実験操作中に大部分の共生細菌が死滅/ダメージを受けた可能性などが想定された. 同様の低い培養効率は, 他のカメムシ類の腸内共生細菌についても観察されている (Hosokawa et al., unpublished data). 注目すべきことに, 高崎由来の 3 個体 (および筑西由来の 1 個体) では, 1 個体の中腸盲嚢部あたりの CFU 値が 10^2 から 10^3 というきわめて低い値であった (表 3-2). また, それぞれの宿主 1 個体について, 8 つの細菌コロニーの 16S rRNA 遺伝子を配列決定して, 中腸盲嚢部由来の細菌 16S rRNA 遺伝子の配列と比較したところ, (i) ほとんどのコロニー由来の配列は, 中腸盲嚢部に由

来する共生細菌の配列と 100%一致し、ほとんどの共生細菌が培養可能であるらしい、(ii) いくつかの個体では（例えば筑西由来の 2 個体や千葉由来の 1 個体）、1 つないし 2 つの非共生細菌の配列が検出されたことから、低頻度で他種細菌が共生細菌と共感染している場合がある、(iii) 高崎由来の 3 個体について 8 配列すべてが共生細菌の配列と異なる多様な細菌由来であったことから、高崎個体群の共生細菌は例外的に培養困難である可能性がある（もっとも生理状態や健康状態が異常な個体（例えば農薬や除草剤の散布直後）である可能性も否定できない）、ことなどが判明した。

共生細菌の伝搬様式

ノコギリカメムシにおいて腸内共生細菌の垂直伝搬を確認するため、7 頭の雌成虫を野外から採集し、それらの卵と幼虫を集めて、それぞれから抽出した DNA を鋳型として細菌 16S rRNA 遺伝子の PCR 増幅、クローニング、配列決定を行った。その結果、過半数 (8/14) の卵試料において、8 クローンのうち母虫の中腸盲嚢部由来の配列と一致したものは皆無であり、大多数 (11/14) の幼虫試料においても母虫の中腸盲嚢部由来の配列と一致したのは 0 または少数クローンのみであった (表 3-3)。これらの結果から、ノコギリカメムシでは共生細菌の安定な垂直伝搬は起こっていないことが示唆された。一方で、一部の卵および幼虫では低頻度ながら（ほとんどが 8 クローン中 1, 2, 3 クローン、最大でも 5 クローン）共生細菌が検出され (表 3-3)、これらでは親由来または環境由来の共生細菌を環境獲得している可能性が示唆された。幼虫からは卵よりも高頻度で共生細菌が検出されたが、おそらく幼虫による共生細菌の探索が影響しているものと思われる。卵および幼虫より得られた共生細菌以外の細菌 16S rRNA 遺伝子の配列は、環境中の菌叢を反映してか、系統的に多様であった。

共生細菌がノコギリカメムシの生存率へ与える影響の推定

本章の最後に、ノコギリカメムシに対する共生細菌の生物学的な寄与を評価した。多数の野外採集個体を飼育して、容器内に産み付けられた多数の卵を回収し、100-500卵からなる複数の実験群を作成した。共生細菌供与群は1齢幼虫期間中に新鮮なキュウリと共生細菌添加水を与えて飼育し、コントロール群では1齢幼虫期間中に新鮮なキュウリと滅菌水を与えて飼育した。2齢幼虫期以降はどちらの実験群も新鮮なキュウリと滅菌水で飼育した。2019年に実施した飼育実験では、共生細菌供与群とコントロール群をそれぞれ3グループずつ作成した。どちらの実験群でも、一貫して1齢幼虫で高い死亡率を示したものの、2齢幼虫以降は比較的良い生存率を示した。共生細菌供与群では1齢幼虫からの羽化率が平均で25.6% (161/629) であり、コントロール群の羽化率9.5% (52/548) よりも有意に高かった (図 3-3A)。2020年に実施した飼育実験では共生細菌供与群とコントロール群をそれぞれ2グループずつ作成した。その結果、2019年に実施した飼育実験と同様に、1齢幼虫での高い死亡率、2齢以降の安定した生存率が一貫して観察された。共生細菌供与群では、1齢幼虫からの羽化率が平均で13.1% (62/474) であり、コントロール群の平均4.7% (25/532) よりも有意に高かった (図 3-3B)。これらの結果は、腸内共生細菌がノコギリカメムシの生存に有益に働く可能性を示唆している。

共生細菌を非供与のノコギリカメムシ腸内細菌の由来について

2020年に行った飼育実験では、共生細菌供与群とコントロール群においてそれぞれ羽化成虫8個体ずつについて腸内細菌の確認を行った。その結果、共生細菌供与群では、すべての個体から接種した共生細菌と同じタイプの細菌が検出された (表 3-4)。一方、コントロール群の一部の個体 (5/8) でも接種した共生細菌と同じタイプの細菌

が検出されたが、その他の個体 (3/8) ではチャバネアオカメムシや他のカメムシの培養可能共生細菌に近縁な細菌が検出された (表 3-4 ; 図 3-4)。共生細菌を非供与にもかかわらず、コントロール群はどこから共生細菌を獲得したのかについては、2つの経路が考えられる。すなわち、(i) 並行して実験を行っていた共生細菌供与群からの実験上のコンタミネーション、(ii) 野外に由来する餌キュウリからの環境由来のコンタミネーションである。ノコギリカメムシの卵からの飼育期間はおよそ3か月間にわたり、毎週飼育容器、水、キュウリの交換を行っていたため、気をつけてはいたものの、共生細菌供与群からの実験上のコンタミネーションが起こってしまった可能性は否定できない。一方、表面殺菌がキュウリの腐敗促進や飼育昆虫への悪影響につながる可能性を考慮して、水道水で洗浄したキュウリを実験に使用していたことから、餌由来で *Pantoea* 属に近縁な細菌が混入した可能性も考えられる (Hosokawa et al. 2016a)。先行研究において、チャバネアオカメムシを無菌状態で飼育していても、餌のピーナッツから偶発的に共生細菌でない腸内細菌を獲得することがあり、それによって無菌の虫よりも生育や生存率が改善されうるという報告があり (Nishide et al. 2017)、同様の状況である可能性もある。

結論

ノコギリカメムシにおける腸内細菌の局在、系統、伝達様式、可培養性、適応度への影響などについて、組織学的観察、野外個体の中腸盲嚢部に由来する細菌 16S 領域の配列決定、卵および幼虫に由来する細菌 16S 領域の配列決定、中腸摩砕物由来の菌の培養、菌の供与/非供与による飼育実験などを行った。組織学的解析により、桿状の共生細菌が中腸共生器官の盲嚢内腔に局在することが観察された。日本各地の野外個

体の共生細菌を調べたところ、*Pantoea* 属に近縁な腸内細菌科 (Enterobacteriaceae) の多様な細菌が検出され、多くは他のカメムシ類で環境由来の共生細菌として報告されてきたものであった。卵及び幼虫由来の細菌 16S の配列を解析したところ、母親の共生細菌と必ずしも共通しておらず、安定な垂直感染は見られず、共生細菌の環境獲得が示唆された。中腸摩砕物を培地に塗布したところ、ほとんどの共生細菌が培養可能であり、共生細菌の環境獲得仮説と整合的であった。腸内細菌を供与/非供与で孵化幼虫を飼育したところ、腸内細菌獲得により宿主の生存率が上昇することが示唆された。

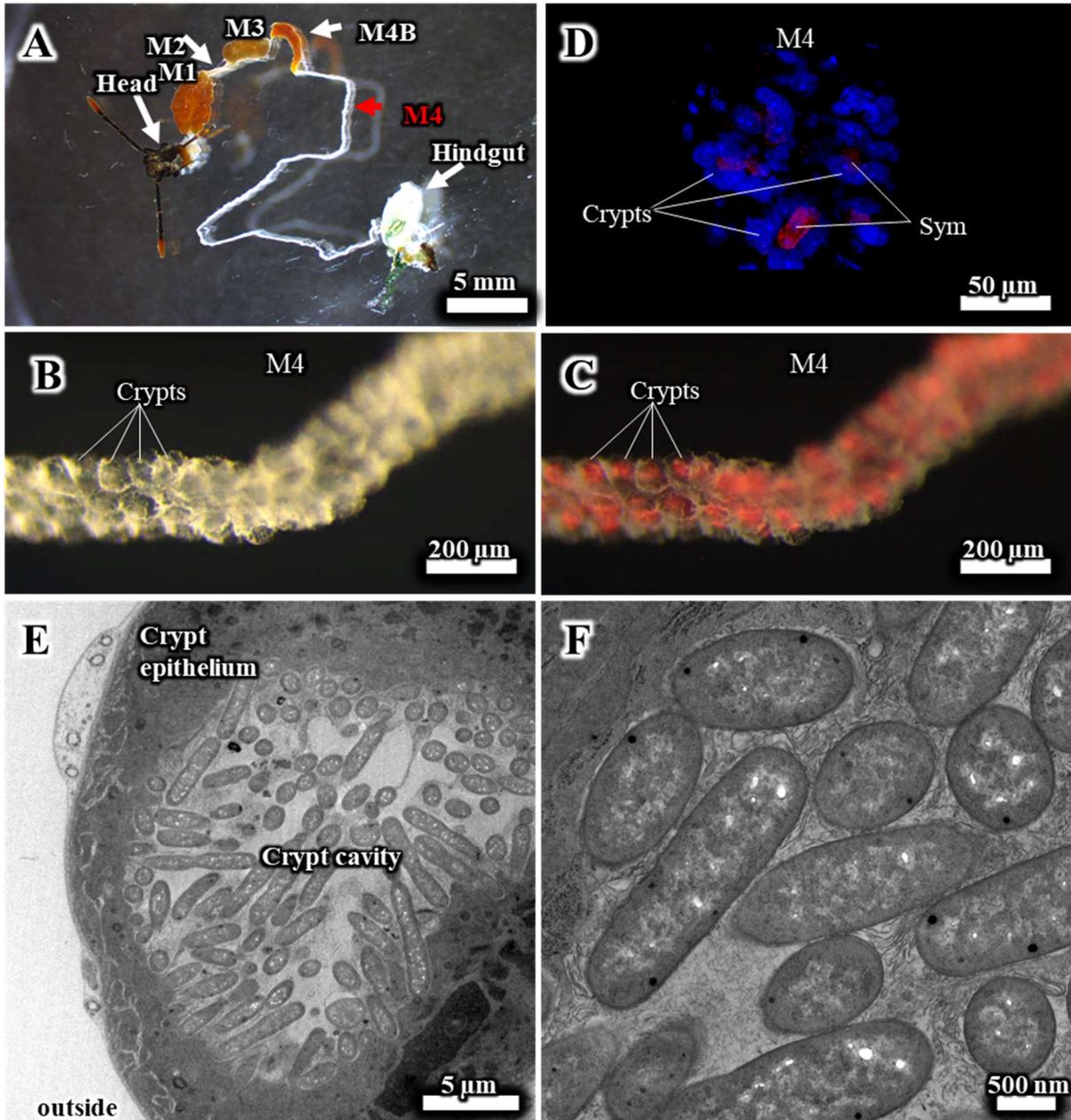


図 3-1 ノコギリカメムシ中腸盲嚢部の組織学的観察。(A)消化管の解剖像。中腸はM1, M2, M3, M3, M4B, M4 (盲嚢を持った共生器官)の5つの部位から構成される。(B)中腸M4部位の実体顕微鏡像。多数の盲嚢が2列に並んでいる;(C)中腸M4部位の実体顕微鏡像(B)に細菌rRNA 16Sの蛍光シグナル(赤色)を重ねたもの。盲嚢内腔に細菌の赤いシグナルが見られる;(D)レーザー走査型蛍光顕微鏡像。赤は細菌のシグナルで、青はDAPIによる宿主核の対比染色。細菌の赤いシグナルが盲嚢内腔に見られる;(E)、中腸盲嚢部の透過型電子顕微鏡像。中腸内腔に細菌が詰まっている;(F)、(E)で観察された細菌の拡大像。

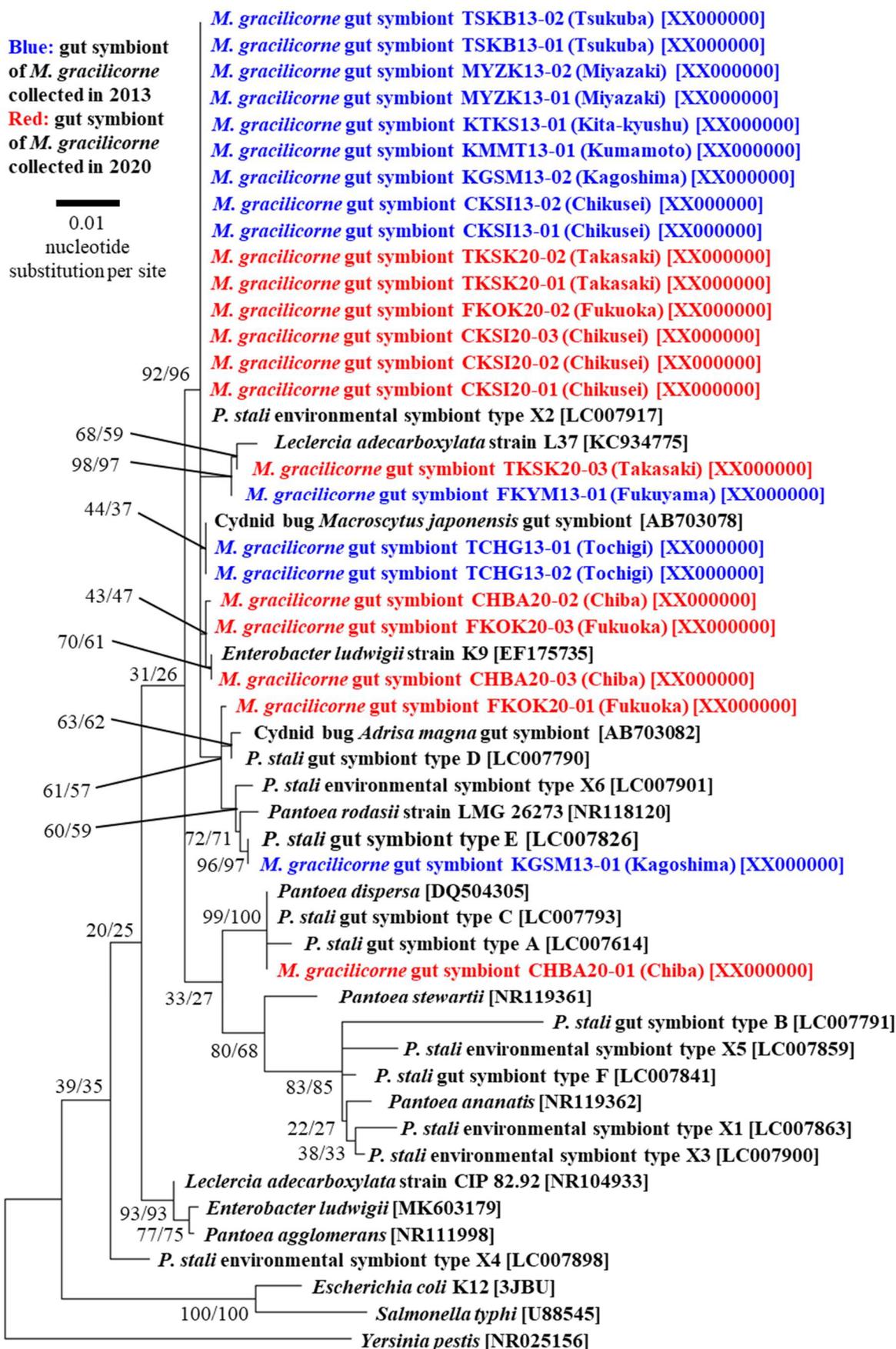


図 3-2 ノコギリカメムシ腸内共生細菌の分子系統学的位置づけ。1325塩基の16S rDNA配列情報に基づいてGTR+G+Iモデルで最尤系統樹を作成。Bootstrap値を最尤系統樹と近隣接合法系統樹について算出し、最尤系統樹/近接合法系統樹の順に表記した。

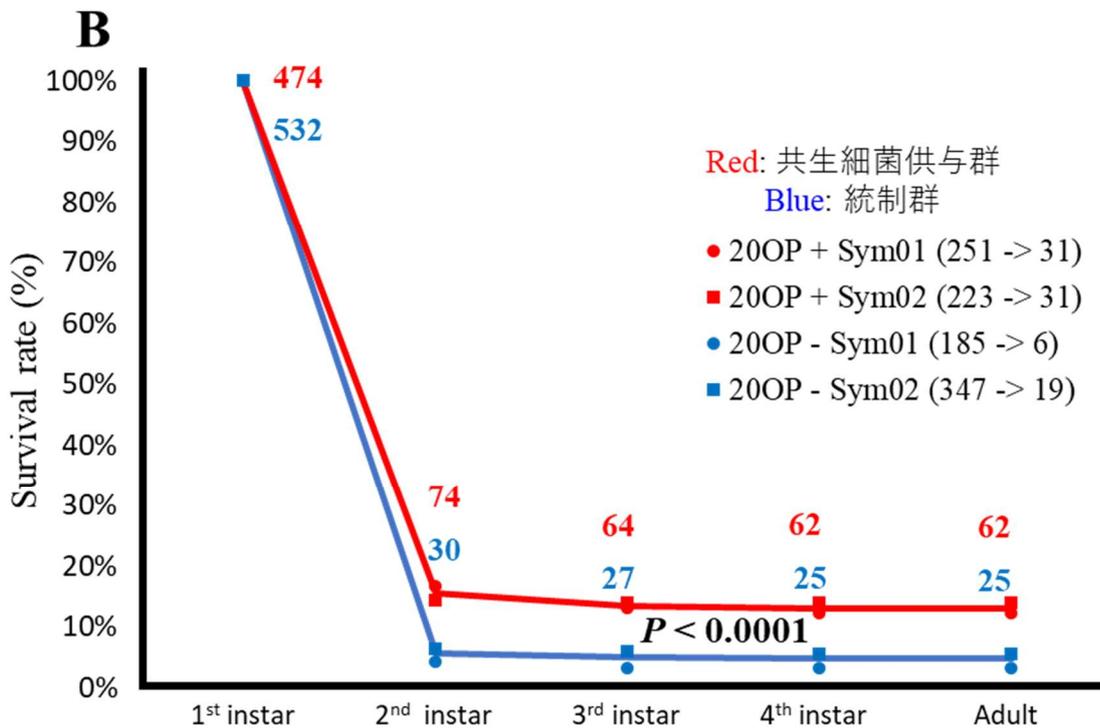
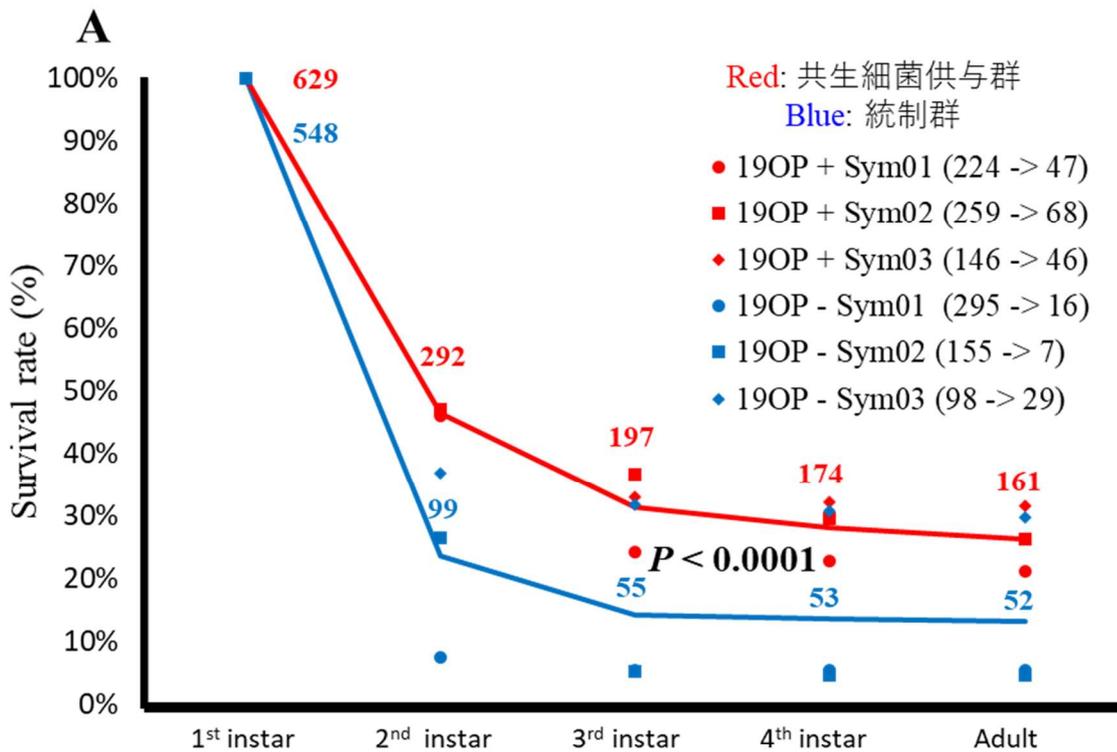


図 3-3 実験室で飼育したノコギリカメムシの生存曲線。(A)2019年に行った実験。(B)2020年に行った実験。赤は共生細菌供与群のデータを、青は統制群のデータを表す。各記号に添えた数値は各実験群の合計生存数を示す。2019年、2020年の実験のどちらでも、共生細菌供与群では生存率が有意に高かった($P < 0.0001$, 一般化ウィルコクソン検定)。

表 3-1. 第 3 章で使用したノコギリカメムシ試料

サンプル ID	性別, 成長段階など ^a	採集地点	採集日	採集者 ^b	宿主植物 ^c	使用目的 ^d	共生細菌の可培養性 ^e	細菌 16S rDNA accession numbers ^f
19OP+Sym01-19OP+Sym03	OP	茨城県, 筑西市; 大量飼育群の子孫	2019 年 6 月 4 日 (親)	TN	アレチウリ (<i>Sicyos angulatus</i>) -> キュウリ (<i>Cucumis sativus</i>)	MSC	-	-
19OP-Sym01-19OP-Sym03	OP	茨城県, 筑西市; 大量飼育群の子孫	2019 年 6 月 4 日 (親)	TN	アレチウリ (<i>Sicyos angulatus</i>) -> キュウリ (<i>Cucumis sativus</i>)	MSC	-	-
20OP+Sym01-20OP+Sym02	OP	茨城県, 筑西市; 大量飼育群の子孫	2020 年 5 月 14 日 (親)	TN	アレチウリ (<i>Sicyos angulatus</i>) -> キュウリ (<i>Cucumis sativus</i>)	MSC	-	-
20OP+Sym01-20OP+Sym02	OP	茨城県, 筑西市; 大量飼育群の子孫	2020 年 5 月 14 日 (親)	TN	アレチウリ (<i>Sicyos angulatus</i>) -> キュウリ (<i>Cucumis sativus</i>)	MSC	-	-
20OA+Sym01-20OA+Sym08	OA	茨城県, 筑西市; 20OP+Sym01-02 由来の成虫	2020 年 5 月 14 日 (親)	TN	アレチウリ (<i>Sicyos angulatus</i>) -> キュウリ (<i>Cucumis sativus</i>)	MSC SD MP		LC594073- LC594080
20OA-Sym01-20OA-Sym08	OA	茨城県, 筑西市; 20OP-Sym01-02 由来の成虫	2020 年 5 月 14 日 (親)	TN	アレチウリ (<i>Sicyos angulatus</i>) -> キュウリ (<i>Cucumis sativus</i>)	MSC SD MP		LC594081- LC594088
CKSI20-01	F	茨城県, 筑西市	2020 年 5 月 14 日	TN TF BH	アレチウリ (<i>Sicyos angulatus</i>)	SD MP SC	O	LC594116
CKSI20-02	F	茨城県, 筑西市	2020 年 5 月 14 日	TN TF BH	アレチウリ (<i>Sicyos angulatus</i>)	SD MP SC	O	LC594125
CKSI20-03	F	茨城県, 筑西市	2020 年 5 月 14 日	TN TF BH	アレチウリ (<i>Sicyos angulatus</i>)	SD MP SC	O	LC594134
CKSI20-04	F	茨城県, 筑西市	2020 年 5 月 14 日	TN TF BH	アレチウリ (<i>Sicyos angulatus</i>)	FISH	-	-
CKSI20-05	F	茨城県, 筑西市	2020 年 5 月 14 日	TN TF BH	アレチウリ (<i>Sicyos angulatus</i>)	FISH	-	-
CKSI20-06	M	茨城県, 筑西市	2020 年 5 月 14 日	TN TF BH	アレチウリ (<i>Sicyos angulatus</i>)	FISH	-	-

CKSI20-07	M	茨城県, 筑西市	2020年5月 14日	TN TF BH	アレチウリ (<i>Sicyos angulatus</i>)	FISH	-	-
CKSI20-08	F	茨城県, 筑西市	2020年5月 14日	TN TF BH	アレチウリ (<i>Sicyos angulatus</i>)	TEM	-	-
CKSI20-09	F	茨城県, 筑西市	2020年5月 14日	TN TF BH	アレチウリ (<i>Sicyos angulatus</i>)	TEM	-	-
CKSI20-10	M	茨城県, 筑西市	2020年5月 14日	TN TF BH	アレチウリ (<i>Sicyos angulatus</i>)	TEM	-	-
CKSI20-11	M	茨城県, 筑西市	2020年5月 14日	TN TF BH	アレチウリ (<i>Sicyos angulatus</i>)	TEM	-	-
CKSI20-12	F OE ON	茨城県, 筑西市	2020年7月 23日	TF	アレチウリ (<i>Sicyos angulatus</i>)	SD MP SC	-	LC594143- LC594175
CKSI20-13	F OE ON	茨城県, 筑西市	2020年7月 23日	TF	アレチウリ (<i>Sicyos angulatus</i>)	SD MP SC	-	LC594176- LC594208
CKSI20-14	F OE ON	茨城県, 筑西市	2020年7月 23日	TF	アレチウリ (<i>Sicyos angulatus</i>)	SD MP SC	-	LC594209- LC594241
CKSI20-15	F OE ON	茨城県, 筑西市	2020年7月 23日	TF	アレチウリ (<i>Sicyos angulatus</i>)	SD MP SC	-	LC594242- LC594274
CKSI20-16	F OE ON	茨城県, 筑西市	2020年7月 23日	TF	アレチウリ (<i>Sicyos angulatus</i>)	SD MP SC	-	LC594275- LC594307
CKSI20-17	F OE ON	茨城県, 筑西市	2020年7月 23日	TF	アレチウリ (<i>Sicyos angulatus</i>)	SD MP SC	-	LC594308- LC594340
CKSI20-18	F OE ON	茨城県, 筑西市	2020年7月 23日	TF	アレチウリ (<i>Sicyos angulatus</i>)	SD MP SC	-	LC594341- LC594373
CHBA20-01	F	千葉県, 千葉市	2020年5月 23日	TN	アレチウリ (<i>Sicyos angulatus</i>)	SD MP SC	O	LC594089

CHBA20-02	F	千葉県, 千葉市	2020年5月 23日	TN	アレチウリ (<i>Sicyos angulatus</i>)	SD MP SC	O	LC594098
CHBA20-03	F	千葉県, 千葉市	2020年5月 23日	TN	アレチウリ (<i>Sicyos angulatus</i>)	SD MP SC	O	LC594107
FKOK20-01	F	福岡県, 福岡市	2020年5月 23日	TH	アマチャヅル (<i>Gynostemma pentaphyllum</i>)	SD MP SC	O	LC594374
FKOK20-02	F	福岡県, 福岡市	2020年5月 23日	TH	アマチャヅル (<i>Gynostemma pentaphyllum</i>)	SD MP SC	O	LC594383
FKOK20-03	F	福岡県, 福岡市	2020年5月 23日	TH	アマチャヅル (<i>Gynostemma pentaphyllum</i>)	SD MP SC	O	LC594392
TKSK20-01	F	群馬県, 高崎市	2020年5月 24日	TN BH	アレチウリ (<i>Sicyos angulatus</i>)	SD MP SC	X	LC594401
TKSK20-02	F	群馬県, 高崎市	2020年5月 24日	TN BH	アレチウリ (<i>Sicyos angulatus</i>)	SD MP SC	X	LC594410
TKSK20-03	F	群馬県, 高崎市	2020年5月 24日	TN BH	アレチウリ (<i>Sicyos angulatus</i>)	SD MP SC	X	LC594419

^aF, 雌成虫; M, 雄成虫; OE, 出生卵 (offspring egg); ON, 出生幼虫 (offspring nymph); OA, 実験室内で飼育した子孫成虫 (offspring adult); OP, 実験室内で飼育した子孫虫 (offspring population).

^bAK, Atsushi Kikuchi; BH, Bin Hirota; KO; Kyosuke Okuda; MB, Mitsuo Baba; SM, Satoshi Maehara; TF, Takema Fukatsu; TH, Takahiro Hosokawa; TN, Takanori Nishino; TT, Taku Tsukada.

^cアレチウリ (*Sicyos angulatus*) -> キュウリ (*Cucumis sativus*) は野外のアレチウリで採集したノコギリカメムシを実験室内でキュウリ果実にて飼育したことを意味する.

^dMSC, 生存曲線の観察 (monitoring of survival curve); MP, 分子系統解析(molecular phylogenetic analysis); SD, 共生細菌の検出と確認 (symbiont detection); SC, 共生細菌の培養 (symbiont culturing); FISH, 細菌の fluorescence in situ hybridization; TEM, 共生部位の透過型電子顕微鏡観察 (transmission electron microscopy).

^e共生細菌の可培養性は, 中腸共生部位 (M4) を摩砕して LB 平板培地に塗布し, 培養することで判定した.

^fDNA Data Bank of Japan に登録した核酸配列の accession numbers.

表 3-2. 剖出されたノコギリカメムシ M4 部位あたりの細菌数の直接計数, コロニー形成単位 (CFU), 培養されたコロニー中の共生細菌検出頻度.

サンプル ID ^a	M4 部位あたりの細菌数 (直接計数) ^b	M4 部位あたりの LB 平板培地上 CFU ^b	培養されたコロニー中の共生細菌検出頻度 ^{b,c}
CKSI20_01	7.0×10^7	6.4×10^4	75.0% (6/8)
CKSI20_02	8.9×10^7	4.0×10^2	87.5% (7/8)
CKSI20_03	1.4×10^8	1.8×10^4	100% (8/8)
CHBA20_01	4.4×10^7	1.6×10^5	100% (8/8)
CHBA20_02	5.2×10^7	3.7×10^5	87.5% (7/8)
CHBA20_03	4.0×10^7	2.4×10^5	100% (8/8)
FKOK20_01	1.2×10^8	3.8×10^5	100% (8/8)
FKOK20_02	7.4×10^7	5.2×10^4	100% (8/8)
FKOK20_03	1.2×10^8	1.4×10^5	100% (8/8)
TKSK20_01	7.7×10^7	3.6×10^2	0.0% (0/8)
TKSK20_02	4.3×10^7	2.3×10^3	0.0% (0/8)
TKSK20_03	1.1×10^8	8.8×10^3	0.0% (0/8)

^a サンプル ID は表 3-1 を参照.

^b 各野外採集個体は M4 部位の剖出に供した. 剖出された M4 部位の半分は DNA 抽出, 16S rRNA の PCR, クローニング, シーケンスに供した. 残った半分は懸濁液にして細菌数の直接計測を行い, 同時に CUF の計測のため段階希釈して LB 平板培地に接種. 平板培地に出現したコロニーのうち 8 つを無作為に選んで DNA 抽出, 16S rRNA の PCR, ダイレクトシーケンスに供した.

^c 百分率は次の式で計算 (共生細菌由来のコロニー/16S rRNA のシーケンスに供した全てのコロニー). 共生細菌由来のコロニーかどうかは, コロニーから得られた塩基配列が M4 由来のコンセンサス配列と 100%一致しているかどうかで判定.

表 3-3. ノコギリカメムシ雌から子への腸内共生細菌の垂直感染率.

雌サンプル ID ^{a,b}	卵 1 ^b	幼虫 1 ^b	卵 2 ^b	幼虫 2 ^b
CKSI20-12	12.5% (1/8 クローン)	12.5% (1/8 クローン)	0.0% (0/8 クローン)	12.5% (1/8 クローン)
CKSI20-13	0.0% (0/8 クローン)	12.5% (1/8 クローン)	0.0% (0/8 クローン)	0.0% (0/8 クローン)
CKSI20-14	12.5% (1/8 クローン)	25.0% (2/8 クローン)	0.0% (0/8 クローン)	37.5% (3/8 クローン)
CKSI20-15	0.0% (0/8 クローン)	0.0% (0/8 クローン)	12.5% (1/8 クローン)	62.5% (5/8 クローン)
CKSI20-16	0.0% (0/8 クローン)	37.5% (3/8 クローン)	50.0% (4/8 クローン)	25.0% (2/8 クローン)
CKSI20-17	0.0% (0/8 クローン)	0.0% (0/8 クローン)	0.0% (0/8 クローン)	12.5% (1/8 クローン)
CKSI20-18	25.0% (2/8 クローン)	25.0% (2/8 クローン)	12.5% (1/8 クローン)	25.0% (2/8 クローン)

^a サンプル ID は表 3-1 を参照.

^b 各野外採集個体を個別飼育し, 1 度目に産卵された卵塊, 2 度目に産卵された卵塊を採集した. 1 度目に産卵された卵塊のうち 2 つの卵を“卵 1”と定義し, DNA 抽出, 16S rRNA の PCR, クローニングに供した. 卵 1 について 8 クローンをシーケンスした. 1 度目に産卵された卵のうち残ったものは維持され, 新生幼虫 1 頭を“幼虫 1”として, 同様の方法で 8 つの 16S rRNA 遺伝子クローンをシーケンスした. 同じように, 2 度目に産卵された卵塊のうち, 2 つの卵と幼虫 1 頭を“卵 2”, “幼虫 2”と定義して 8 つの 16S rRNA 遺伝子クローンをシーケンスした.

表 3-4. 共生細菌を供与または非供与の条件で実験室内飼育したノコギリカメムシの保有細菌.

サンプル ID ^a	供与共生細菌検出率 ^{b,c}	コンセンサス配列と接種菌株の配列との相同性 ^{d,e}
培養した共生細菌とともに飼育した実験群由来の個体 (20OP+Sym01 または 20OP+Sym02)		
20OA+Sym01	100% (7/7 クローン)	100% (515/515) [LC594073]
20OA+Sym02	87.5% (7/8 クローン)	100% (515/515) [LC594074]
20OA+Sym03	75.0% (6/8 クローン)	100% (515/515) [LC594075]
20OA+Sym04	100% (8/8 クローン)	100% (515/515) [LC594076]
20OA+Sym05	100% (8/8 クローン)	100% (515/515) [LC594077]
20OA+Sym06	87.5% (7/8 クローン)	100% (515/515) [LC594078]
20OA+Sym07	75.0% (6/8 クローン)	100% (515/515) [LC594079]
20OA+Sym08	50.0% (4/8 クローン)	100% (515/515) [LC594080]
共生細菌を供与せずに飼育した統制群由来の個体 (20OP-Sym01 または 20OP-Sym02)		
20OA-Sym01	0.0% (0/8 クローン)	98.8% (509/515) [LC594081]
20OA-Sym02	0.0% (0/8 クローン)	98.1% (505/515) [LC594082]
20OA-Sym03	100% (6/6 クローン)	99.8% (514/515) [LC594083]
20OA-Sym04	87.5% (7/8 クローン)	99.8% (514/515) [LC594084]
20OA-Sym05	75.0% (6/8 クローン)	100% (515/515) [LC594085]
20OA-Sym06	66.7% (4/6 クローン)	100% (515/515) [LC594086]
20OA-Sym07	100% (8/8 クローン)	99.8% (514/515) [LC594087]
20OA-Sym08	0.0% (0/8 クローン)	97.7% (503/515) [LC594088]

^a サンプル ID は表 3-1 を参照.

^b 共生細菌供与群 (20OP+Sym01 および 20OP+Sym02) では、一齢幼虫は新鮮なキュウリ果実と培養共生細菌 (CKSI13-01 に由来) を添加した水で飼育した. これらの幼虫は 2 齢幼虫に脱皮したのちに新しい飼育容器に移し、以後共生細菌を添加した水の代わりに滅菌水を与えた. 羽化後、8 頭の成虫 (20OA+Sym01-20OA+Sym08) を無作為に選び、個別に M4 部位を剖出した. それぞれの M4 部位は DNA 抽出、16S rRNA の PCR、クローニングに供し、8 クローンをシーケンスした. 統制群 (20OP-Sym01 および 20OP-Sym02) では一齢幼虫に共生細菌を添加した水を与える代わりに滅菌水を与え、同様の実験を行った.

^c 各クローンは 99% 以上の配列が CKSI13-01 由来の配列と一致していた場合に供与共生細菌として扱った.

^d 各昆虫について 16S rRNA 遺伝子のコンセンサス配列を生成し、CKSI13-01 由来の配列と比較した.

^e 百分率は次の式で計算(一致した塩基数/アライメントされた塩基数), ただし gap は無視. [] 内は accession number.

第 4 章 総括

本研究の要点は、ノコギリカメムシと糸状菌の共生関係という新規な共生関係の基本的な記載から詳細な解析への足掛かりまで、さらに同種の腸内共生細菌に関する検出から適応的効果の示唆まで、いずれも今まで研究されてこなかった共生関係について、詳細を明らかにしたことにあると考えている。また、これまで昆虫-細菌共生と比較してあまり研究例のなかった昆虫-真菌間の詳細な研究報告例であり、共生細菌の環境獲得を示唆したデータがとられている数少ない研究の一つでもある。本研究成果が各分野に与える影響としては、昆虫病原菌をコントロールする生命現象の発見から害虫防除や微生物の制御に展開する可能性、新規性の高い共生現象の発見から関連科学分野の発展に寄与する可能性、農業害虫であるノコギリカメムシの微生物共生理解が深まったことによる防除技術の開発に資する可能性などが挙げられる。

本研究 3 章では、多くのカメムシ上科の昆虫で腸内共生細菌は卵表面塗布や共生細菌含有分泌物を介した垂直伝搬が一般的であるのに対して、ノコギリカメムシでは腸内共生細菌の環境獲得が示唆された。カメムシ上科では一般に腸内共生細菌が生理的に重要な役割を果たしていることから、垂直伝搬によって子孫がより確実に共生細菌を獲得できることは適応的であると考えられる。それにもかかわらずノコギリカメムシが腸内共生細菌を環境獲得している理由として、ここで5つの可能性を考えた。(i) ノコギリカメムシの共生システムは比較的原始的な状態であり、垂直伝搬の機構が未発達な可能性、(ii) ノコギリカメムシは環境中の細菌と容易に共生関係を結ぶことができるため、垂直伝搬機構が必須でない可能性、(iii) 共生細菌をあえて環境獲得することにより、副次的な効果を得られる可能性、(iv) 多様な細菌を獲得することによって宿主も多様化することにより、進化的に有利になる可能性、(v) 卵殻表面の糸状菌と共生細菌が競合して、共生細菌を卵殻表面で維持できなくなった可能性。(i)は垂直伝

搬の適応的な利点から、いずれ進化した先には垂直伝搬機構が獲得されると考えて、ノコギリカメムシでは単純にニッチを獲得してから進化的歴史が浅く、垂直伝搬機構を未獲得なのではないか、とする説である。(ii)は、ノコギリカメムシの生育する環境中では共生細菌になる能力を持った細菌が多量に存在し、垂直伝搬機構が発達するような選択圧がかかっていないのではないかと考える説である。実際に実験室で毎週ケージと餌を交換していても、一部の菌非供与虫が共生細菌を獲得していた。(iii)は、例えばあえて環境中で生きていける細菌を獲得することによって、環境由来の毒素を効率的に分解できるなどの効果があるのではないかと、とする説である。実際に、共生細菌を環境獲得するホソヘリカメムシでは、薬剤を散布された土壌中から薬剤分解性の細菌を獲得して、耐性を得る現象が知られている (Kikuchi et al. 2012)。(iv)は、マルカメムシと台湾マルカメムシの例で知られるように (Hosokawa et al. 2007)、腸内共生細菌の種類は宿主の生態にまで影響することから、多様な細菌と共生することによって宿主も多様化することで、有利になっているのではないかと、とする説である。

(v) は、微生物間の相互作用によって一方の微生物が抑圧される可能性を考慮した説である。ノコギリカメムシは他のカメムシ類と異なって卵表面に糸状菌が繁茂するため、他のカメムシ類と同様に腸内細菌を卵表面にて伝達しようとしても、細菌が生存困難な可能性が考えられた。実際に、ノムシタケ科の糸状菌で抗菌活性をもつものが複数発見されている (Reis et al. 2013; Kuephadungphan et al. 2014)。ノコギリカメムシの近縁種で共生細菌の獲得様式を明らかにしていくことにより、ノコギリカメムシがひとたび獲得した垂直伝搬機構を後から失ったのか、あるいは一度も垂直伝搬機構を獲得したことがないのかについての洞察が得られるであろう。それに加えて、共生細菌の入れ替え実験や、土壌などの環境から共生細菌を獲得できる確率および適応的効果の評価、薬剤への暴露、後脚由来の糸状菌との共培養などの実験を行うことで、

前述の仮説をある程度検証することができるかもしれない。

本研究はノコギリカメムシ科の腸内共生系に関する初の報告であるが、他のカメムシ類の大部分では一つの科について多数の種で腸内共生細菌を調べた報告がある。今後、ノコギリカメムシ科の複数種について同様の研究の実施が必要である。また、完全に共生細菌を持たない個体を作成しての飼育実験、そして共生細菌の供与/非供与によらず1齢幼虫の高い死亡率を改善した実験系の確立によって、より明確に共生細菌の適応的効果を示せる可能性がある。共生細菌に着目した、害虫としてのノコギリカメムシ科昆虫の防除方法の検討を行うことによって、応用研究につながる可能性もありうる。

最後にノコギリカメムシに留まらない、共生という大きな分野における今後の展望について述べると、本研究のような新規な共生関係を数多く記載し、系統ごとに整理していくことが、共生関係の進化と多様性の理解につながると期待している。また、ノコギリカメムシと糸状菌の関係のような新奇な共生現象について、その機構と機能を解明していくことで、様々な分野の発展に貢献する可能性があるに違いない。多様性に富んだ昆虫と微生物の共生系は、脊椎動物等と比較して1世代が短く、ハンドリングが用意で、さらに倫理的問題も少ないことから、共生に関する研究を進めていくうえで理想的な研究対象の一つであると考えられる。

謝辞

本研究は日本学術振興会（JSPS）より，課題番号 17J00410 の支援を受けて遂行されたことを感謝いたします。立川周二博士，細川貴弘博士，向井裕美博士，廣田敏氏に昆虫採集に協力していただきました。ありがとうございます。研究活動を行うにあたってご指導いただいた産業技術総合研究所生物共生進化機構研究グループの皆様，筑波大学アドバイザー委員会の先生方に感謝の意を表します。最後に，特別熱心なご指導をしていただいた深津武馬博士には感謝の念にたえません。本当にありがとうございました。

論文発表について

本学位論文第 3 章の内容は，以下の学術論文として掲載受理済である。

Nishino T, Hosokawa T, Meng XY, Koga R, Moriyama M, Fukatsu T “Environmental acquisition of gut symbiotic bacteria in the saw-toothed stinkbug *Megymenum gracilicorne* (Hemiptera: Pentatomoidea: Dinidoridae)” *Zoological Science* in press (2021).

本学位論文第 2 章の内容は，以下の学術論文として近日中に投稿予定である。

Nishino T, Mukai H, Hosokawa T, Tanahashi M, Meng XY, Moriyama M, Tachikawa S, Fukatsu T “Defensive fungal symbiosis on insect hindlegs” (in preparation).

以下の共著者の方々に謝意を表します。

向井裕美博士（森林総研），細川貴弘博士（九州大学），棚橋薫彦博士（国立台湾師範大学），立川周二博士（東京農業大学），孟憲英氏，森山実博士，古賀隆一博士，深津武馬博士（産総研）。

引用文献

- Abe Y, Mishiro K, Takanashi M (1995) Symbiont of brown-winged green bug, *Plautia stali* Scott. Appl Entomol Zool 39: 109– 115
- Baumann P (2005) Biology bacteriocyte-associated endosymbionts of plant sap-sucking insects. Annu Rev Microbiol 59: 155-89
- Bennett GM, Moran NA (2013) Small, smaller, smallest: the origins and evolution of ancient dual symbioses in a phloem-feeding insect. Genome Biol Evol 5:1675–1688
- Bistolas KS, Sakamoto RI, Fernandes JA, Goffredi SK (2014) Symbiont polyphyly, coevolution, and necessity in pentatomid stinkbugs from Costa Rica. Front Microbiol 5: 349
- Bourtzis K, Miller T (2003) Insect symbiosis. CRC Press, Boca Raton
- Breznak JA (1982) Intestinal microbiota of termites and other xylophagous insects. Annu Rev Microbiol 36:323–343
- Buchner P (1965) Endosymbiosis of animals with plant microorganisms. Interscience Publishers Inc, New York
- Campbell RD (1990) Transmission of symbiotic algae through sexual reproduction in *Hydra*: movement of algae into the oocyte. Tissue Cell 22: 137-147
- Durai PSS (1987) A revision of the Dinidoridae of the world (Heteroptera: Pentatomoidea). Oriental Insects 21:163-360
- Duron O, Noël V (2016) A wide diversity of *Pantoea* lineages are engaged in mutualistic symbiosis and cospeciation processes with stinkbugs. Environ Microbiol Rep 8: 715–727
- Fukatsu T, Hosokawa T (2002) Capsule-transmitted gut symbiotic bacterium of the

- Japanese common plataspid stinkbug, *Megacopta punctatissima*. Appl Environ Microbiol 68: 389–396
- Fukatsu T, Nikoh N (1998) Two intracellular symbiotic bacteria of the mulberry psyllid *Anomoneura mori* (Insecta, Homoptera). Appl Environ Microbiol 64: 3599–3606
- Futuyma DJ (2003) Accounting for biological diversity. Evolution 57: 1216–1220
- Glasgow H (1914) The gastric caeca and the caecal bacteria of the Heteroptera. Biol Bull 26: 101-170
- Gullan PJ, Cranston PS (1994) Insects of soil, litter, carrion and dung. In “The insects: an outline of entomology” Ed by PJ Gullan, PS Cranston, Nelson Thornes Limited, pp. 199-211
- Hayashi T, Hosokawa T, Meng XY, Koga R, Fukatsu T (2015) Female-specific specialization of a posterior end region of the midgut symbiotic organ in *Plautia splendens* and allied stinkbugs. Appl Environ Microbiol 81: 2603–2611
- Hosokawa T, Kikuchi Y, Nikoh N, Shimada M, Fukatsu T (2006) Strict host-symbiont co-speciation and reductive genome evolution in insect gut bacteria. PLoS Biol 4: e337
- Hosokawa T, Hironaka M, Mukai H, Inadomi K, Suzuki N, Fukatsu T (2012a) Mothers never miss the moment: a fine-tuned mechanism for vertical symbiont transmission in a subsocial insect. Anim Behav 83: 293–300
- Hosokawa T, Kikuchi Y, Nikoh N, Fukatsu T (2012b) Polyphyly of gut symbionts in stinkbugs of the family Cydnidae. Appl Environ Microbiol 78: 4758–4761
- Hosokawa T, Hironaka M, Inadomi K, Mukai H, Nikoh N, Fukatsu T (2013) Diverse strategies for vertical symbiont transmission among subsocial stinkbugs. PLoS One 8:

e65081

- Hosokawa T, Ishii Y, Nikoh N, Fujie M, Satoh N, Fukatsu T (2016a) Obligate bacterial mutualists evolving from environmental bacteria in natural insect populations. *Nat Microbiol* 1:15011
- Hosokawa T, Matsuura Y, Kikuchi Y, Fukatsu T (2016b) Recurrent evolution of gut symbiotic bacteria in pentatomid stinkbugs. *Zool Let* 2: 34
- Hosokawa T, Imanishi M, Koga R, Fukatsu T (2019) Diversity and evolution of bacterial symbionts in the gut symbiotic organ of jewel stinkbugs (Hemiptera: Scutelleridae). *Appl Entomol Zool* 54: 359–367
- Hosokawa T, Fukatsu T (2020) Relevance of microbial symbiosis to insect behavior. *Curr Opin Insect Sci* 39: 91-100
- Itoh H, Matsuura Y, Hosokawa T, Fukatsu T, Kikuchi Y (2017) Obligate gut symbiotic association in the sloe bug *Dolycoris baccarum* (Hemiptera: Pentatomidae). *Appl Entomol Zool* 52: 51–59
- Janson EM, Stireman JO, Singer MS, Abbot P (2008) Phytophagous insect - microbe mutualisms and adaptive evolutionary diversification. *Evolution* 62: 997–1012
- Joy JB (2013) Symbiosis catalyses niche expansion and diversification. *Proc Biol Sci* 280: 2212–2228
- Kafil M, Bandani AR, Kaltenpoth M, Goldansaz SH, Alavi SM (2013) Role of symbiotic bacteria in the growth and development of the Sunn pest, *Eurygaster integriceps*. *J Insect Sci* 13: 99
- Kaiwa N, Hosokawa T, Nikoh N, Tanahashi M, Moriyama M, Meng XY, Maeda T, Yamaguchi K, Shigenobu S, Ito M, Fukatsu T (2014) Symbiont-supplemented

- maternal investment underpinning host's ecological adaptation. *Curr Biol* 24: 2465–2470
- Karamipour N, Fathipour Y, Meharabadi M (2016) Gammaproteobacteria as essential primary symbionts in the striped shield bug, *Graphosoma lineatum* (Hemiptera: Pentatomidae). *Sci Rep* 6: 33168
- Kikuchi Y, Hosokawa T, Nikoh N, Meng XY, Kamagata Y, Fukatsu T (2009) Host-symbiont co-speciation and reductive genome evolution in gut symbiotic bacteria of acanthosomatid stinkbugs. *BMC Biol* 7: 2
- Kikuchi Y, Hosokawa T, Nikoh N, Fukatsu T (2012) Gut symbiotic bacteria in the cabbage bugs *Eurydema rugosa* and *Eurydema dominulus* (Heteroptera: Pentatomidae). *Appl Entomol Zool* 47: 1–8
- Kment P, Kocorek A (2014) *Afromenotes hirsuta*, a new genus and species of Eumenotini from the Democratic Republic of the Congo (Hemiptera: Heteroptera: Dinidoridae). *Acta Entomologica Musei Nationalis Pragae* 54: 109–131
- Koga R, Tsuchida T, Fukatsu T (2009). Quenching autofluorescence of insect tissues for in situ detection of endosymbionts. *Appl Entomol Zool* 44: 281-291
- Kondo N, Nikoh N, Ijichi N, Shimada M, Fukatsu T (2002) Genome fragment of *Wolbachia* endosymbiont transferred to X chromosome of host insect. *Proc Natl Acad Sci USA* 99: 14280–14285
- Kuephadungphan W, Phongpaichit S, Luangsa-ard JJ, Rukachaisirikul V (2014) Antimicrobial activity of invertebrate-pathogenic fungi in the genera *Akanthomyces* and *Gibellula*. *Mycoscience* 55: 127-133
- Lis JA (2006) Dinidoridae Stål, 1867. In “Catalogue of the Heteroptera of the Palearctic

- Region. Volume 5. Pentatomomorpha II.” Ed by B Aulema, C Rieger, Netherlands Entomological Society, pp. 228–232
- Matsuura Y, Kikuchi Y, Hosokawa T, Koga R, Meng XY, Kamagata Y, Nikoh N, Fukatsu T (2012) Evolution of symbiotic organs and endosymbionts in lygaeid stinkbugs. *The ISME journal* 6: 397-409
- McFall-Ngai MJ (1999) Consequences of evolving with bacterial symbionts: insights from the squid–vibrio associations. *Annu Rev Ecol Syst* 30: 235–256
- Miyamoto S (1961) Comparative morphology of alimentary organs of Heteroptera, with the phylogenetic consideration. *Sieboldia* 2: 197–259
- Moran NA (2002) Genome evolution in symbiotic bacteria. *ASM News* 68: 499–505
- Moran NA (2006) Symbiosis. *Curr Biol* 16: R866–R871
- Moran NA, Degnan PH (2006) Functional genomics of *Buchnera* and the ecology of aphid hosts. *Mol Ecol* 15:1251–1261
- Nishide Y, Onodera NT, Tanahashi M, Moriyama M, Fukatsu T, Koga R (2017) Aseptic rearing procedure for the stinkbug *Plautia stali* (Hemiptera: Pentatomidae) by sterilizing food-derived bacterial contaminants. *Appl Entomol Zool* 52: 407-415
- Ohbayashi T, Takeshita K, Kitagawa W, Nikoh N, Koga R, Meng XY, Tago K, Hori T, Hayatsu M, Asano K, Kamagata Y, Lee BL, Fukatsu T, Kikuchi Y (2015) Insect’s intestinal organ for symbiont sorting. *Proc Natl Acad Sci USA* 112: E5179-E5188
- Oishi S, Moriyama M, Koga R, Fukatsu T (2019) Morphogenesis and development of midgut symbiotic organ of the stinkbug *Plautia stali* (Hemiptera: Pentatomidae). *Zoological Lett* 5: 16
- Oliver KM, Smith AH, Russell JA (2014) Defensive symbiosis in the real world –

- advancing ecological studies of heritable, protective bacteria in aphids and beyond. *Funct. Ecol.* 28: 341–355
- Prado SS, Daniel R, Almeida RPP (2006) Vertical transmission of a pentatomid caeca-associated symbiont. *Ann Entomol Soc Am* 99: 577–585
- Prado SS, Hung KY, Daugherty MP, Almeida RPP (2010) Indirect effects of temperature on stink bug fitness, via maintenance of gut-associated symbionts. *Appl Environ Microbiol* 76: 1261–1266
- Prado SS, Almeida RPP (2009) Role of symbiotic gut bacteria in the development of *Acrosternum hilare* and *Murgantia histrionica*. *Entomol Exp Appl* 132: 21–29
- Reis FS, Barros L, Calhelha RC, Ćirić A, van Griensven LJ, Soković M, Ferreira IC (2013) The methanolic extract of *Cordyceps militaris* (L.) Link fruiting body shows antioxidant, antibacterial, antifungal and antihuman tumor cell lines properties. *Food Chem Toxicol* 62: 91–98
- Rolston LH, Rider DA, Murray MJ, Aalbu RL (1996) Catalog of the Dinidoridae of the World. *Papua New Guinea J Agric For Fish* 39: 22–101
- Salem H, Florez L, Gerardo N, Kaltenpoth M (2015) An out-of-body experience: the extracellular dimension for the transmission of mutualistic bacteria in insects. *Proc R Soc B* 282: 20142957
- Tada A, Kikuchi Y, Hosokawa T, Musolin DL, Fujisaki K, Fukatsu T (2011) Obligate association with gut bacterial symbiont in Japanese populations of the southern green stinkbug *Nezara viridula* (Heteroptera: Pentatomidae). *Appl Entomol Zool* 46: 483–488
- Taylor CM, Coffey PL, Delay BD, Dively GP (2014) The importance of gut symbionts

in the development of the brown marmorated stink bug, *Halyomorpha halys* (Stal).

PLoS One 9: e90312

Zimmer C (2001) *Wolbachia*: a tale of sex and survival. Science 292: 1093–1095