

論文の内容の要旨

論文題目:

Ecological and physiological studies on mechanisms for maintenance of
endosymbiotic bacteria
in natural population of the pea aphid,
Acyrtosiphon pisum

(エンドウヒゲナガアブラムシ *Acyrtosiphon pisum* 自然集団における
内部共生細菌の維持機構に関する生理生態学的研究)

氏名: 土田 努

微生物を体内に取り込んで密接な共生系を構築するという内部共生は、多くの生物に普遍的に見られる現象である。そのなかでも、エンドウヒゲナガアブラムシ (*Acyrtosiphon pisum*) は多種多様な内部共生微生物系を発達させており、内部共生進化研究の優れたモデル生物と考えられる。すべての *A. pisum* は、宿主の生存・繁殖に必須の共生細菌 *Buchnera* を体内に保有することが知られている。さらに一部の個体は、*Buchnera* に加え、二次的に獲得された多種多様な共生細菌 (二次共生細菌) を保有している。二次共生微生物が宿主に必須ではないのにも関わらず集団中に広く存在しているという事実から、宿主集団中に共生微生物が維持されるメカニズムは何か、という内部共生の進化生態学における重要な問題が提起される。

そこで本研究では、内部共生細菌の自然集団中での維持機構を明らかにすることを目的として、調査、観察、および実験をおこなった。

野外集団における二次共生細菌の感染実態

二次共生細菌が野外集団中にどのような機構で維持されているのかを理解するための出発点として、野外での感染実態を把握しておくことが必要である。まずは、どのような共生細菌が日本集団に存在しているかを明らかにするため、本州のほぼ全域をカバーする 81 地点から採集した 119 単一雌由来系統を材料に、特異的 PCR 法を用いて大規模なスクリーニングを行なった。検出対象としては、これまでにエンドウヒゲナガアブラムシから発見されている 5 種類の二次共生細菌 (PASS, *Rickettsia*, *Spiroplasma*, PAUS, PABS) に加えて、アブラムシからは発見されていないものの様々な昆虫の共生

細菌として知られている *Wolbachia* および *Arsenophonus* を選定した。その結果、4 種類の二次共生細菌 (PASS, PAUS, *Rickettsia* および *Spiroplasma*) がエンドウヒゲナガアブラムシ日本集団から検出された。そこで、それら 4 種類の二次共生細菌を対象に、本州の 43 地点で、より詳細な解析をおこなった (20 個体/地点) ところ、興味深いことに 4 種類の二次共生細菌は、それぞれ特徴的な集団内感染頻度および地理的分布を持っていることが示された。そのパターンは、PASS は全国に高頻度、PAUS は北日本に集中的に高頻度、*Rickettsia* および *Spiroplasma* は関東以南に低頻度というものであった。

二次共生細菌の地理的分布に関与する環境要因

感染実態の調査から、PAUS は実に興味深い分布のパターンを持っていることが示された。そこで PAUS に焦点を絞って、この共生細菌の分布の規定に関与している環境要因を明らかにしようと試みた。PAUS の感染頻度と相関が高い環境要因を明らかにする目的で共分散分析をおこなったところ、PAUS の感染頻度と環境要因との間に有意な相関が検出された。そして、PAUS の感染頻度は、シロツメクサ上で高頻度になる、年平均気温が低い地点で高頻度になる、また年平均降水量(湿度)が少ない地点で高頻度になるという傾向が示された。共分散分析によって抽出された 3 つの候補のうち、どの要因が実際に PAUS の維持にかかわっているのかを野外データに基づいて推察しようと、同一地点の異なる寄主植物上で、気温および降水量の変化に伴う PAUS の頻度変化を調査した。その結果、PAUS はシロツメクサ上でのみ高頻度で推移しており、気温や降水量の変化に対してはほとんど相関が見られず、この傾向は調査した 3 地点の全てで観察された。このことから、寄主植物の種類が PAUS の維持にもっとも影響を与えているらしいことが示唆された。

PAUS の微生物学的実態

PAUS は、これまで 16S rDNA 配列によって認識されているに過ぎず、微生物学的な実態はほとんど明らかにされていない。そこで、PAUS の形態、宿主体内での局在、微細構造、および感染能力が調査された。蛍光 in situ ハイブリダイゼーション(FISH)を用いた解析によって、PAUS は主に、一次共生細菌 *Buchnera* が存在する菌細胞の周辺部の鞘細胞、および体液中に存在していることが明らかになった。この *Buchnera* との空間的に密接な局在は、必須共生細菌と二次共生細菌のあいだで様々な生物間相互作用が生じていることを示唆している。また、感染個体の体液を非感染個体に注入することで PAUS の感染能力を調査したところ、PAUS は体液注入 9 日後から次世代に伝わり始め、13 日後以降に産まれてきた仔は全て PAUS に感染していた。感染した PAUS は安定して垂直伝播し、24 世代後にも安定して保持されていた。これらの結果から、PAUS は垂直感染の他に水平伝播する能力を有していることが示唆された。

異なる寄主植物上における PAUS の宿主適応度に及ぼす影響

シロツメクサ上で PAUS が高頻度に維持されている機構として、PAUS の感染がシロツメクサ特異的に宿主アブラムシの適応度を上昇させている可能性が考えられる (PAUS 感染による寄主特異的適応

度上昇仮説)。

この仮説を検証するためには、宿主の遺伝的背景による影響を除いて PAUS による影響だけを評価できる実験系が必要である。そこで抗生物質処理により、宿主に必須の一次共生細菌 *Buchnera* には影響を及ぼさずに、PAUS を選択的に除去する技術を開発した。エンドウヒゲナガアブラムシは単為生殖によって増殖するため、この方法の適用によって宿主の遺伝的背景はまったく均一で PAUS の有無だけが異なる系統を作成することができる。これらの系統について、カラスノエンドウとシロツメクサという野外における2種の主要な寄主植物上における、体重、産仔数、寿命といった各種の適応度指標を調査した。カラスノエンドウ上において PAUS 感染個体は、非感染個体よりも産仔数が若干増加する傾向を示した。一方、シロツメクサ上における PAUS 感染個体の産仔数は、非感染個体よりも劇的に増加し、総産仔数では約2倍もの差が現れた。これらの結果は、“PAUS 感染による寄主特異的適応度上昇仮説”を支持し、シロツメクサ上での感染個体の維持には PAUS の生物機能が大きく関与していることが示唆された。

総合考察

1) 維持機構および地理的分布の形成

PAUS のシロツメクサ特異的な維持メカニズムは、次のように考えられる。PAUS は、シロツメクサ上で特異的に宿主の適応度を大きく上昇させる。そのため、シロツメクサ上では PAUS の頻度は増加する。一方、カラスノエンドウ上では、PAUS 感染は宿主の適応度を若干増加させるにとどまるため、中頻度で PAUS は維持されることになる。

しかし、たとえシロツメクサ上の個体からでも、PAUS は南日本では検出されなかった。この理由としては、PAUS の地理的分布は、侵入・分散の歴史を反映しているということが考えられる。もう一つの可能性として、PAUS 感染個体の適応能力は、南日本では(相対的に)減少するのではないかということが考えられる。適応能力の減少に影響を与えている環境要因としては、高温、高降雨量の存在が本研究の結果から想定される。またこれまでに、別の種類の二次共生細菌 PASS が、高温条件下で宿主の適応度を上昇させるという報告がなされている。この報告から、PASS 感染虫が PAUS 感染虫を南日本のシロツメクサ上から競争的に排除しているという可能性も生じる。現時点ではどれがもっとも適当であるのかは定かではない。今後、実験的に明らかにしていく必要があるだろう。

2) 植物-昆虫相互作用系および進化に与える内部共生細菌の影響

本研究で得られた結果から、宿主にとって好適な植物が、PAUS 感染の有無によって、変化してしまうという非常に興味深い現象が示された。このことは、共生微生物が昆虫の寄主植物特異性(成長、繁殖、そして生存の効率などが寄主植物の種類に応じて異なるという性質)に大きく関与する場合があることを意味している。二次共生細菌が、寄主特異性に関与しているというのは本研究が初めての報告である。本研究(第4章)でも示されたように、PAUS は水平感染をたびたび起こしていると考えられる。そのことは、寄主植物への適応、寄主植物範囲の拡大、さらにはホストレースの誘導が、宿主昆虫の遺伝的変異を全く伴わずに、共生微生物の水平感染によって生じうることを示唆している。