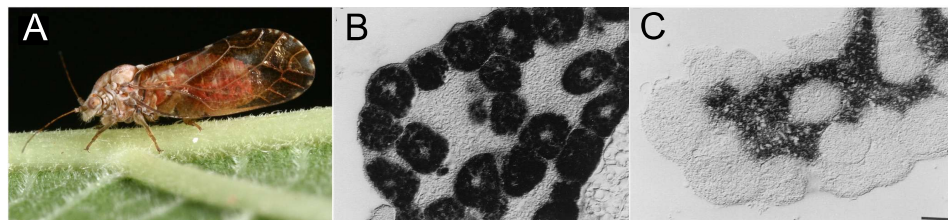


クワキジラミ共生細菌二種の相補的極小ゲノム

○安田 侑加¹, 井上 広光², 広瀬 侑¹, 中鉢 淳^{1,3}

(¹豊橋技大 応用化学・生命工学系、²農研機構 植物防疫研究部門 果樹茶病害虫防除研究領域、³豊橋技科大 先端農業・バイオリサーチセンター)

序論 多くの重要な農業害虫を含み、世界で約4,000種が記載されるキジラミ(半翅目:腹吻亜目:キジラミ上科)は、植物師管液を吸汁する昆虫で、体腔内の共生器官「バクテリオーム」に共生細菌を収納する。師管液に乏しい必須アミノ酸を宿主に供給する一次共生細菌“*Candidatus Carsonella ruddii*”(Gammaproteobacteria: Oceanospirillales)は全キジラミ種に共通する一方、もう一種の「二次共生細菌」はキジラミ系統により異なり、宿主の進化過程で頻繁に置換されて来たと推察される。こうしたバクテリオーム共生系は宿主の生存に不可欠なため、選択性の高い新規防除法開発の標的として有望であり、その成り立ちの理解が求められている。そこで本研究では、クワの害虫であるクワキジラミ*Anomoneura mori*(キジラミ科)の*Carsonella* (*Carsonella_AM*)と二次共生細菌(*Secondary_AM*, Gammaproteobacteria: Enterobacterales)のゲノムを解析した。



(A) クワキジラミ成虫(J Asia Pac Entomol (2018) 21(2): 603–608), (B) バクテリオームにおける*Carsonella*の局在、(C) 同二次共生細菌の局在(Appl Environ Microbiol (1998) 64(10): 3599–3606)。

実験

クワキジラミ成虫のバクテリオームからDNAを抽出し、TruSeq DNA PCR-Free Sample Preparation kitとNextera Mate Pair Sample Preparation kit(Illumina)を用いて、それぞれ800 bpペアエンドライブラリーと8 kbメイトペアライブラリーを調製した。ライブラリーはMiSeq Reagent kit v3(600サイクル; Illumina)を用いてMiSeqでシーケンスし、合計136万(754 Mb)のペアエンドリード、および103万(447 Mb)のメイトペアリードを得た。ペアリードのいずれかが*Carsonella*8系統(NC_018417.1, AP009180.1, CP003541.1, CP003542.1, CP003543.1, CP003545.1, CP003467.1, CP012411.1)と類似する高ATリードは、blastnとカスタムperlスクリプトを用いたローカルアライメント検索により収集した。配列エラーは、17-mer頻度に基づいてShortReadManagerを用いて修正した。合計126,000のペアエンドリード(72.6 Mb)と25,000のメイトペアリード(5.58 Mb)をNewbler version 2.9 (Roche)を用いてアセンブルし、5つのスキャフォールドと220の>0.5 kbのコンティグを得た。コンティグ間のギャップ配列はGenoFinisherとAceFileViewerを用いて決定した。遺伝子予測とアノテーションはまずDFASTとNCBI PGAPを用いて行い、その後RNAmmer 1.2 Server、NCBI ORFfinder、eggNOG-mapper v2、BLAST検索を用いて目視修正した。予測遺伝子の機能アノテーションはeggNOG-Mapper v2を用いて行い、代謝パスウェイはKEGG、ジヌクレオチドバイアスとGCスキャーはArcWithColor 1.62を用いて解析した。

結果・考察

- *Secondary_AM*のゲノムは*Carsonella_AM*同様、**極小で低GC**。

解析の結果、*Carsonella_AM*ゲノムは169,120 bp (16.2% GC)、*Secondary_AM*ゲノムは229,822 bp (17.3% GC)の単一染色体で構成されることが明らかとなった。注目すべきは、*Secondary_AM*ゲノムのサイズとGC含量が*Carsonella_AM*と同程度に極小かつ低GCであることで、*Secondary_AM*と宿主昆虫のきわめて**長期にわたる相互依存関係**が示唆される。これは、既報の2種のキジラミ*Ctenarytaina eucalypti*(1.4 Mb、GC43.3%)および*Heteropsylla cubana*(1.1 Mb、GC28.9%)由来の二次共生細菌ゲノムが、はるかに大きく、高GCであるのと対照的である。

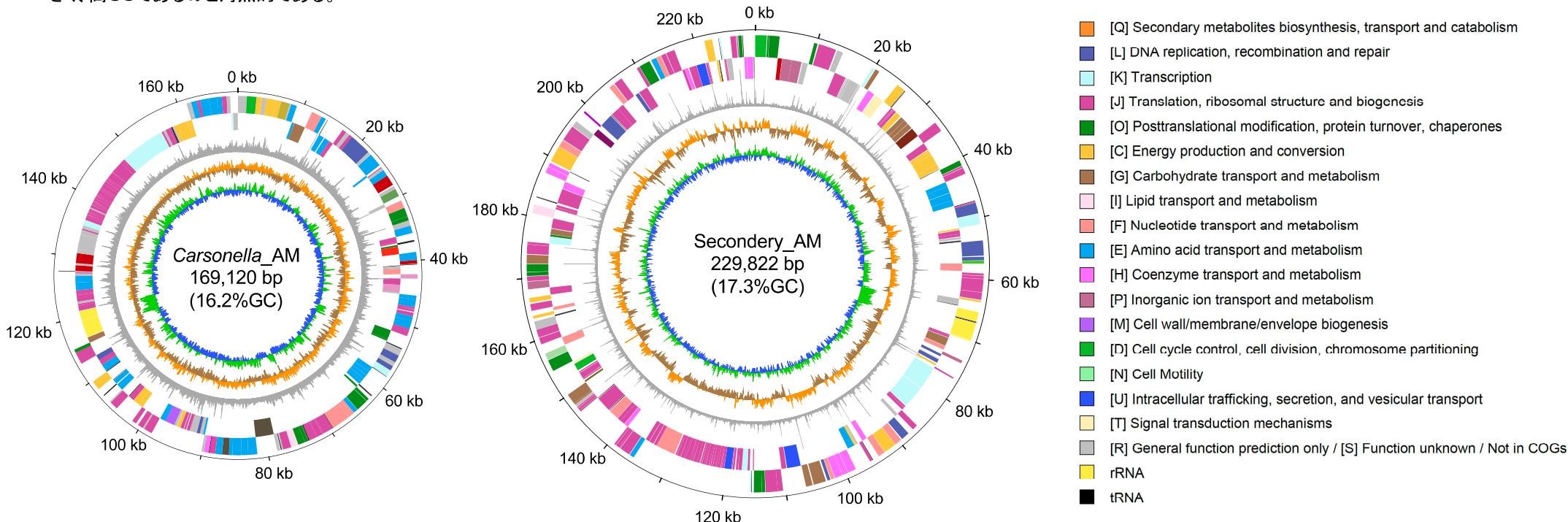


図1. クワキジラミ共生細菌ゲノムの環状図。同心円は外側から以下項目: (1) kbスケール、(2) 順鎖コード遺伝子、(3) 逆鎖コード遺伝子、(4) ジヌクレオチドの偏り、(5) GCスキャー、(6) G+C含量。(4)、(5)、(6)は、100 bpのスライディングウィンドウと10 bpのステップサイズを用いて算出。

- クワキジラミ、*Carsonella_AM*、*Secondary_AM*の代謝経路は**相補的**。

Essential amino acids

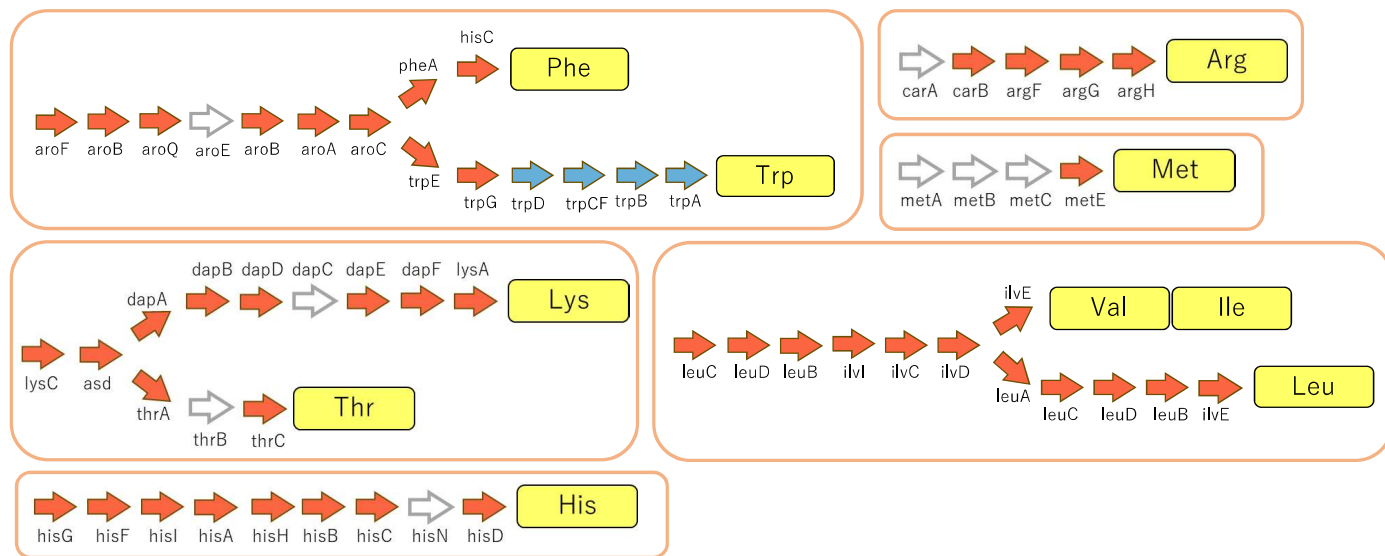


図2. 必須アミノ酸とビタミンの合成経路。赤、青、黄色の矢印は、対応する酵素遺伝子がそれぞれ*Carsonella_AM*、*Secondary_AM*、クワキジラミのゲノムにコードされているもの。白矢印は、これらに見られないもの。

*Carsonella_AM*ゲノムは、10種類の必須アミノ酸のうち8種類の合成に要する遺伝子を多く保持し、栄養共生体としての特性を示すが、経路は一部不完全で、特にトリプトファン合成経路では*trpE*と*trpG*の2遺伝子しか見つからなかった。これに対し、トリプトファン合成に必要な他の遺伝子(*trpD*、*trpCF*、*trpB*、*trpA*)は*Secondary_AM*のゲノムにコードされており、*Carsonella_AM*と*Secondary_AM*の**代謝的相補性**が明示された(図2)。*Secondary_AM*ゲノムが持つアミノ酸合成遺伝子はこれら4つのみで、その重要性が強調される。

*Secondary_AM*は、やはり師管液に乏しいビタミンB群であるビオチン、リボフラビンの合成遺伝子(それぞれ*bioA*、*bioB*、*bioD*と*ribA*、*ribB*、*ribD*、*ribH*)もコードしていた。リボフラビン合成の最終反応に必要な*ribE*は、共生細菌二種のいずれも欠いていたが、我々の先行研究により、キジラミがこの遺伝子を未同定細菌から水平転移により獲得したことが明らかとなっており、宿主-共生細菌間の代謝的相補性も示された。

(Highly reduced complementary genomes of dual bacterial symbionts in the mulberry psyllid *Anomoneura mori*, Yasuda Y, Inoue H, Hirose Y, Nakabachi A. **Microbes Environ.** 2024;39(3):ME24041.)

連絡先: nakabachi.atsushi.ro@tut.jp

結論 クワキジラミ共生細菌二種のゲノムの高度な縮小、クワキジラミとの間の相互補完的・融合的な三者関係が明らかとなった。