

氏 名 頼本 隼汰

学位(専攻分野) 博士(理学)

学位記番号 総研大甲第 2380 号

学位授与の日付 2022 年 12 月 31 日

学位授与の要件 生命科学研究科 基礎生物学専攻
学位規則第6条第1項該当

学位論文題目 Multi-partner symbiotic system in the eusocial aphid
Ceratovacuna japonica

論文審査委員 主 査 新美 輝幸
基礎生物学専攻 教授
重信 秀治
基礎生物学専攻 教授
川口 正代司
基礎生物学専攻 教授
深津 武馬
産業技術総合研究所 首席研究員

(様式3)

博士論文の要旨

氏名 Yorimoto, Shunta

論文題目 Multi-partner symbiotic system in the eusocial aphid *Ceratovacuna japonica*
(真社会性をもつササコナフキツノアブラムシにおける複合共生系について)

Endosymbionts, microorganisms that live inside the body or cells of host organisms, are widespread in eukaryotes, serving as important resources for evolutionary innovation for hosts. Aphids (Hemiptera; Sternorrhyncha; Aphidoidea) are plant sap-sucking insects with over 5,000 species. Almost all aphid species harbor the obligate mutualistic endosymbiont *Buchnera aphidicola*, which provides essential amino acids and vitamins to the host. While *Buchnera* genomes have experienced significant reductions down to ~0.6 Mb with ~600 protein-coding genes, they retain genes involved in the biosynthesis of essential nutrients for the host. *Buchnera* constitutes a monophyletic group in the γ -Proteobacteria and the molecular phylogenies of *Buchnera* and aphids are strictly congruent, suggesting a single original infection in the common ancestor of aphid species. In addition to *Buchnera*, aphids are often associated with facultative symbionts, which are not essential but can contribute to host fitness and phenotypes. Furthermore, co-obligate symbioses, where multiple species of symbionts are essential for host survival, have been found in several aphid lineages. However, the evolution of multi-partner symbiotic systems is not well-established.

In this study, I focused on the woolly aphid, *Ceratovacuna japonica* (Aphididae; Hormaphidinae; Cerataphidini) as a new model aphid, because Cerataphidini, the clade includes *Ce. japonica*, possesses biologically interesting characteristics, such as a complex life cycle, gall formation, and eusociality, which are not accessible with

precedent model aphids (e.g. the pea aphid). First, I established isofemale strains of *Ce. japonica* and the laboratory culturing system. In my rearing system, *Ce. japonica* is easy to maintain on the bamboo grass in the laboratory and produces soldiers throughout the year. My 16S ribosomal DNA amplicon sequencing uncovered co-infection with three bacteria in *Ce. japonica*, *Arsenophonus*, *Hamiltonella*, and *Buchnera*, a common obligate endosymbiont in aphids. Flow cytometry estimated the genome size of *Ce. japonica* into 662.9 Mb, which is the largest among sequenced aphid genomes.

I next report my discovery of a co-obligate symbiosis in *Ce. japonica*. My 16S rDNA amplicon sequencing with multiple natural populations unveiled consistent co-infection with a novel *Arsenophonus*-related symbiont and *Buchnera*. Both symbionts were housed within distinct bacteriocytes and were maternally transmitted. The *Buchnera* and *Arsenophonus*-related symbiont had streamlined genomes of 432,286 bp and 853,149 bp, respectively, and exhibited metabolic complementarity in riboflavin and peptidoglycan synthesis pathways. These anatomical and genomic properties were similar to those of independently evolved multi-partner symbiotic systems, such as *Buchnera*–*Serratia* in Lachninae and *Periphyllus* aphids, representing remarkable parallelism. My study provides the first example of co-obligate symbiosis in Hormaphidinae and gives insight into the evolutionary genetics of this complex system.

To understand the origin of the *Arsenophonus*-related symbiont of *Ce. japonica*, I analyzed bacterial communities of six Hormaphidinae species including three tribes, Hormaphidini, Nipponaphidini, and Cerataphidini. My 16S rDNA amplicon sequencing analysis showed that three of four Cerataphidini aphids were infected with *Arsenophonus* in addition to *Buchnera*, as observed in *Ce. japonica*. In contrast, one Hormaphidini and one Nipponaphidini species were infected with only *Buchnera*, suggesting that the establishment of an intimate association with *Arsenophonus* has occurred in the lineage leading to Cerataphidini after the divergence from the common ancestor of Hormaphidinae. Reconstructing the phylogenetic trees including four

Arsenophonus-related symbionts in Cerataphidini showed that the *Arsenophonus* of *Ce. japonica* belonged to distinct groups from those of other Cerataphidini species. This suggests that the novel *Arsenophonus* species has replaced the ancient *Arsenophonus* symbionts in *Ce. japonica*.

The eusocial aphid *Ce. japonica* provides a good opportunity to study the roles of symbiosis in eusociality. I observed the status of the bacterial symbionts and bacteriomes between normal and soldier nymphs of *Ce. japonica*. Quantitative PCR analyses indicated that soldiers of *Ce. japonica* harbor a significantly lower amount of both endosymbionts than normal nymphs. In addition, histological analyses showed the malformed bacteriomes and smaller bacterial symbionts in size in soldiers. These results suggest that the symbiotic association is depressed in soldiers of *Ce. japonica*. The mechanisms and biological significance of caste-dependent symbiosis in social insects are intriguing subjects for future exploration.

In summary, I established a new model insect *Ce. japonica* to understand the molecular mechanisms and evolutionary processes underlying a complex life cycle, gall formation, eusociality, and co-obligate symbiosis. By using this model, I revealed dynamic evolution of co-obligate symbiosis in aphids and found different status of symbiosis between social castes. *Ce. japonica* is a promising model that would provide good opportunities to study the roles of symbiosis in eusociality and the multi-layered biological interactions among insects, plants, and bacterial symbionts.

博士論文審査結果

Name in Full
氏名 頼本 隼汰Title
論文題目 Multi-partner symbiotic system in the eusocial aphid *Ceratovacuna japonica*

細胞内共生は真核生物に広く観察され、宿主の適応と進化に重要な役割を果たすことが知られている。半翅目昆虫のアブラムシは、細胞内共生を研究するための良いモデルである。ほぼ全てのアブラムシ種は、バクテリオサイトと呼ばれる特殊な宿主細胞に、絶対共生細菌 *Buchnera aphidicola* を保有し、垂直伝播により子孫に受け継ぐ。*Buchnera* はアブラムシが合成できず、かつ餌の植物師管液に欠乏する必須アミノ酸やリボフラビン（ビタミン B2）などの栄養を供給する。これら、アブラムシと *Buchnera* の細胞内共生は、主に実験室研究に広く用いられているエンドウヒゲナガアブラムシ *Acyrtosiphon pisum* をモデルに研究されてきた。しかしながら 5000 種以上が報告されているアブラムシの中には、複雑な生活史、ゴール（虫こぶ）形成、真社会性など、生物学的に興味深い特徴を持つ種が存在し、それらの形質に細胞内共生がどのように関与しているかはよくわかっていなかった。出願者は、本学位論文において、ササコナフキツノアブラムシ *Ceratovacuna japonica* を真社会性や共生研究のための新規モデル昆虫として確立し（第2章）、その過程で新たな複合共生系を発見した。その複雑で緊密な複合共生の機構や進化について分子生物学、ゲノム科学、イメージング技術を駆使した統合的なアプローチで詳細に解析した（第3章、第4章）。さらに細胞内共生と社会性の関連について検討した（第5章）。

出願者は、ササコナフキツノアブラムシ *C. japonica* (Aphididae; Hormaphidinae; Cerataphidini) に着目し、生活史進化、ゴール形成、真社会性研究のモデルとして人工飼育系と、isofemale 系統（1匹のメスから単為生殖でクローン増殖させた遺伝的背景が同一の系統）を樹立した。出願者が確立した飼育システムでは、ササコナフキツノアブラムシを実験室でササを餌として容易に維持でき、年間を通じて兵隊カーストを誘導することもできる。また、ササコナフキツノアブラムシには *Buchnera* 以外の細菌が共感染していることが判明し、当該昆虫が複合共生研究のモデルとしても有用であると考えられた。

出願者はササコナフキツノアブラムシが *Buchnera* と *Arsenophonus* の2種による二重絶対共生系を持っていることを発見した。日本の26地点から収集したササコナフキツノアブラムシ集団を16S rRNA アンプリコンシーケンス解析に供したところ、全ての集団において *Buchnera* に加えて *Arsenophonus* 属の細菌が共感染していることが明らかとなった。分子系統解析の結果、この *Arsenophonus* 属の細菌はシラミバエ等吸血昆虫の絶対共生細菌と単一系統群を形成したが、最も近縁なものとの16S rRNA の配列が93%しか一致しないことから新種と考えられた。*Buchnera* と *Arsenophonus* の局在を顕微鏡観察したところ、両共生細菌は、宿主が胸部の左右に一对保有する共生器官に共存しつつも、それぞれ異なる細胞に収容されていることがわかった。母親の生殖巣内で卵胎発生する胚に垂直

感染している様子も観察された。*Buchnera* と *Arsenophonus* のゲノムを解読したところ、それぞれ 432,286 bp と 853,149 bp の極少ゲノムを持ち、リボフラビンやペプチドグリカンの合成経路で代謝的な相補性が見られた。これらの解剖学的及びゲノム的特性は、オオアブラムシ等で報告されている *Buchnera-Serratia* 二重共生など、他の独立に進化した複合共生系と類似しており、並行進化を示すものであった。

真社会性アブラムシであるササコナフキツノアブラムシは、真社会性における共生の役割を研究する良いモデルとなり得る。出願者は、ササコナフキツノアブラムシの通常カーストと兵隊カーストの間で共生細菌や共生器官を比較した。定量的 PCR 解析の結果、兵隊カースト個体は通常カースト個体と比較して、*Buchnera*、*Arsenophonus* 両共生細菌の保有量が顕著に少ないことが示された。また、組織学的解析によると、兵隊カースト個体では共生器官が変形しており、共生細菌のサイズも小さくなっていた。これらの結果は、ササコナフキツノアブラムシでは社会カーストの違いによって共生状態が異なることを示している。

以上の通り、本研究で出願者が発見し詳細に解析したササコナフキツノアブラムシの複合共生系は、共生系の進化原理を理解する上で新たな洞察を与えるものである。また、社会カースト依存的な共生のメカニズム、複雑な生活史や植物との相互作用など、基礎生物学分野に数々の新しい課題を提示するものでもある。これらの成果から、審査委員会は学位の授与に値すると判断した。