

トビイロウンカにおける odorant-binding protein 遺伝子の解析

2010年3月修了 学生証番号：86353

応用生物資源学分野 松本 宜晃

指導教員：野田 博明 客員教授

Keywords：トビイロウンカ、odorant-binding protein

【序論】

トビイロウンカは、イネだけを好んで吸汁するイネ害虫である。口器をイネに挿し込み、篩管液を吸汁するので、光合成産物の転流を妨げられ、イネが枯死する。吸汁性の昆虫には吸血性も含めて重要な害虫が多く、吸汁機構の解明は、作物の被害、耐虫性の作物の耐虫性機構や病原微生物の媒介などの理解に大きく寄与する。これまで、昆虫の吸汁には味覚が関与することは知られているが、実際の吸汁がどのように行われているかについては、ほとんど解明されていない。

そこで本研究では、吸汁の分子機構の一端を解明することを目的に、吸汁に関連する可能性のある遺伝子を探索し、クローニングすることにした。研究開始時点で、特定の分子を想定できなかったため、トビイロウンカの口器組織より作製した cDNA の塩基配列を解析し、EST データより関連しそうな分子の遺伝子を探索することにした。口器組織より取得した 4,483 本の EST の中には、相同性検索により嗅覚や味覚などの化学感覚に関与するとされる odorant-binding protein (OBP、匂い物質結合タンパク質) に相同性をもつ EST クローンが多く含まれていた。そこで、トビイロウンカの OBP 遺伝子について調査した。

【結果と考察】

口器 EST 解析

口器組織 (口針と唾腺を含む) の cDNA ライブラリーから、6,075 クローンの EST 配列を得た。相同性検索によりウンカのミトコンドリア、ウンカ共生ウイルス、クローニング時の大腸菌やバクテリア等の塩基配列を除き、4,483 本の EST を対象とした。塩基配列の相同性によりクラスタリングを行ったところ、1,463 クラスターに分けられた。61.1%にあたる 894 クラスターは、EST 数が 1 つからなる singlet

であり、複数の EST からなる contig を形成したのは残りの 569 クラスターであった (図 1)。EST 数の

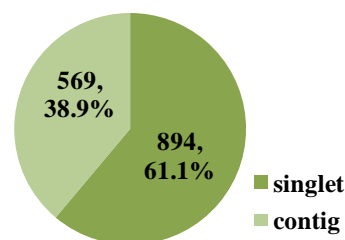


図 1. 口器 EST クラスターの内訳

表 1. *NIObp* の相同性検索結果

<i>NIObp</i> genes	Blastp	E-value
<i>NIObp1a</i>	odorant-binding protein [<i>Nilaparvata lugens</i>]	3.00E-94
<i>NIObp1b</i>	odorant-binding protein [<i>Nilaparvata lugens</i>]	2.00E-74
<i>NIObp2</i>	odorant-binding protein [<i>Nilaparvata lugens</i>]	2.00E-07
<i>NIObp3</i>	odorant-binding protein [<i>Nilaparvata lugens</i>]	1.00E-74
<i>NIObp4</i>	odorant binding protein 15 [<i>Tribolium castaneum</i>]	2.00E-13
<i>NIObp5</i>	odorant-binding protein 6 [<i>Myzus persicae</i>]	3.00E-16
<i>NIObp6</i>	odorant-binding protein [<i>Nilaparvata lugens</i>]	5.00E-40
<i>NIObp7</i>	odorant-binding protein RpadOBP5 precursor [<i>Rhopalosiphum padi</i>]	2.00E-42

数は、その遺伝子の発現量にある程度反映するので、EST 数の多い遺伝子が、口器組織において重要な機能を担っていると仮定し、EST 数の多い上位 30 クラスターをとりだした。コンティグの塩基配列をもとにアミノ酸配列に変換させ、BLAST 解析を行った。上位 30 中 low homology や no hits found のものが 7 個含まれており、ハウスキーピング遺伝子が 19 個見つかった。上位 30 位中には、昆虫の OBP 遺伝子に相同性があると判断されたクラスターを見出した。

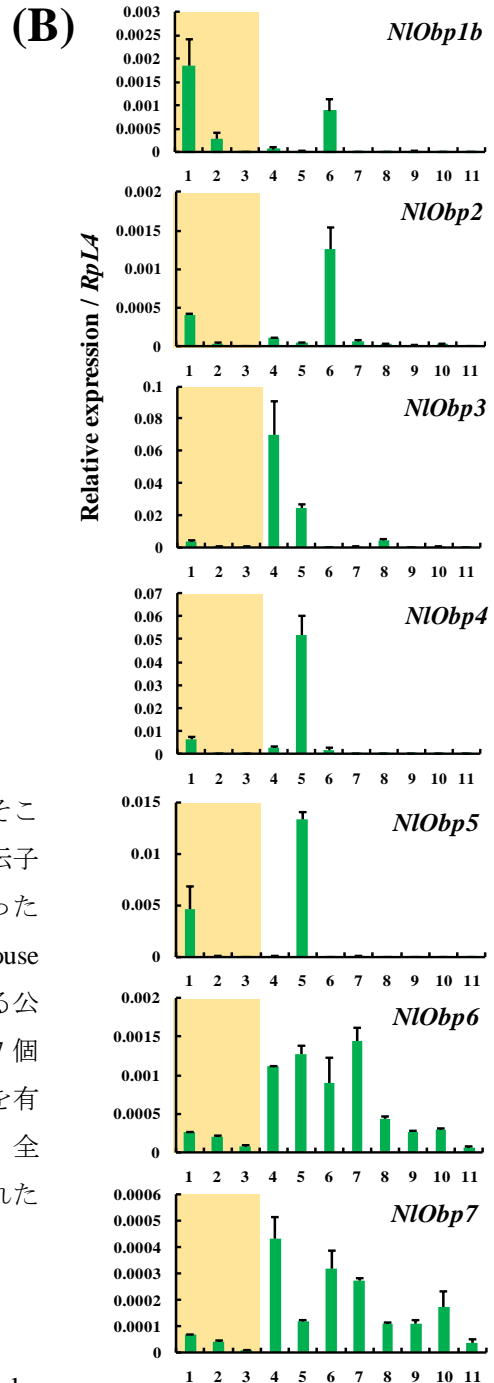
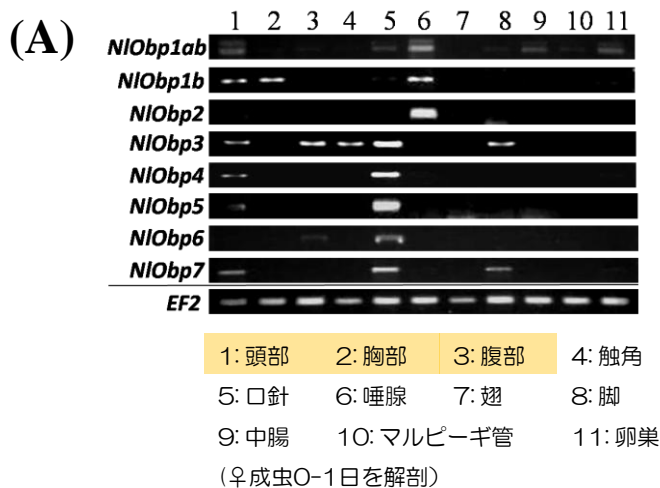


図 3. *NIObp* 組織別発現解析

(A) RT-PCR 発現解析

(B) Real time-PCR 定量解析

(A)、(B)ともに番号 1~11 は上記の各組織を表す。

NIObp 遺伝子の探索と全長解析

昆虫の OBP は、多くのファミリーが報告されている。そこで、EST から多く見つかったもの以外のウンカ OBP 遺伝子 (*NIObp*) を探索した。口器 EST クラスター内から見つかった *NIObp1a* の配列を基に、口器 EST クラスター内での In house blast 解析および NIAS ((独)農業生物資源研究所) の開設する公開データベース活用により、ウンカ OBP 候補遺伝子を全 7 個見つけ出した。5'RACE および 3'RACE により、ORF 全長を有する塩基配列を決定した。Blastp による相同性検索により、全ての遺伝子が昆虫の OBP 遺伝子と相同性があると判断された (表 1)。

NIObp 遺伝子の組織別発現解析

NIObp 遺伝子の口器組織での発現を、RT-PCR および Real time-PCR により調査した。*NIObp1b* と *NIObp2* は唾腺での発現が顕著であり (図 3(B))、吸汁の際に唾液に分泌されている可能性が示唆された。また、*NIObp4* と *NIObp5* は発現パターンが酷似しており、口針特異的な発現遺伝子であった。

【結論】

本研究では、吸汁に関連する可能性のある遺伝子候補として、ウンカの OBP 遺伝子に着目した。その結果、唾腺や口針特異的に発現している OBP 遺伝子の存在が明らかになった。吸汁に関連する組織や器官における OBP 遺伝子の働きを知るには、タンパクの発現部位特定などのさらなる調査が必要である。