

ツマグロヨコバイの菌組織特異的に発現する遺伝子の探索と機能解析

応用生物資源学分野 86336 富澤 真
指導教員 野田博明

序論

多くの昆虫は様々な微生物と共生関係にある。共生微生物の中には、難分解物質の消化、様々な栄養素の供給を行う種があり、宿主に非常に大きな利益を与えている。一方、共生微生物は宿主体内で、安定して生息できることから、共生微生物にも大きな利益がある。しかし、共生微生物と宿主との相互作用に関しては十分に解明されていない。

ツマグロヨコバイ (*Nephotettix cincticeps*, Nc) はイネの害虫であり、吸汁被害やイネ萎縮病ウイルスの媒介などの被害を引き起こす。このツマグロヨコバイは、細菌が共生している細胞から成る菌組織 (bacteriome) を腹部に1対有している。この特殊な器官である bacteriome にはβ-proteobacteria、flavobacteria の2種が生息している。β-proteobacteria と flavobacteria は宿主に必須栄養素の供給をしていることが予想されており、全ての個体に感染している。ツマグロヨコバイと共生細菌は互いの生存に必須であり、緊密な共生関係を構築している。昆虫と微生物の共生関係の研究において、ゲノム解読など共生細菌側の研究は行われているが、宿主側の組織である共生器官の研究は少ない。そこで、ツマグロヨコバイの bacteriome の機能を解析することで、宿主と細菌の共生関係に関する新たな知見が得られると考えた。本研究では bacteriome で特異的に発現している遺伝子に着目し、共生に重要な役割を持つと予想される遺伝子とその機能を明らかにすることを目的とした。

結果及び考察

1. Bacteriome 特異的遺伝子の探索

ツマグロヨコバイの cDNA EST データベースを用いて、ほぼ bacteriome 由来の EST クローンだけから形成された62の遺伝子(クラスター)を選抜した。この62遺伝子の相同性検索を行った結果、細菌の細胞壁成分であるペプチドグリカンを認識し、体液性免疫に関連するペプチドグリカン認識タンパク質 (PGRP) と相同性のある17のクラスター (*NcPGRP1-17*) を見出した。また、機能未知かつ高発現(クラスターを構成する EST 数が多い)であるクラスター C01739 が見出された。これら18遺伝子の中で、ORF が得られていない11遺伝子の全長配列解析を行った。全遺伝子の ORF を得た後、その遺伝子のアミノ酸配列の相同性検索を行った (Table 1)。

Table 1. *NcPGRP* 遺伝子及び C01739 の相同性検索結果

<i>NcPGRP</i>	AA	pBLAST (top)		E-Value
1	300	PGRP superfamily	SsPGLYRP1	5.00E-12
2	195	PGRP superfamily	BtPGLYRP2	3.00E-08
3	148	PGRP superfamily	similar to EcPGLYRP	3.00E-15
4	183	PGRP superfamily	AiPGRP	8.00E-18
5	178	PGRP superfamily	MmPGLYRP4	6.00E-11
6	228	PGRP superfamily	hypothetical protein [Eristalis tenax]	6.00E-14
7	205	PGRP superfamily	GE20821 [Drosophila yakuba]	1.00E-13
8	178	PGRP superfamily	PREDICTED: similar to TmPGRP SA	3.00E-22
9	163	PGRP superfamily	AaPGRP SA	1.00E-12
10	162	PGRP superfamily	similar to EcPGLYRP	1.00E-18
11	157	PGRP superfamily	HsPGLYRP1	6.00E-11
12	178	PGRP superfamily	NvPGRP	8.00E-14
13	164	PGRP superfamily	NvPGRP S2-like protein	1.00E-24
14	185	PGRP superfamily	HdPGRP1	1.00E-17
15	227	PGRP superfamily	PhPGRP, putative	6.00E-13
16	214	PGRP superfamily	similar to MdPGLYRP	2.00E-13
17	237	PGRP superfamily	IsPGRP, putative	3.00E-11
C01739	250	-	No significant similarity found	-

無脊椎動物 = PGRP 脊椎動物 = PGLYRP

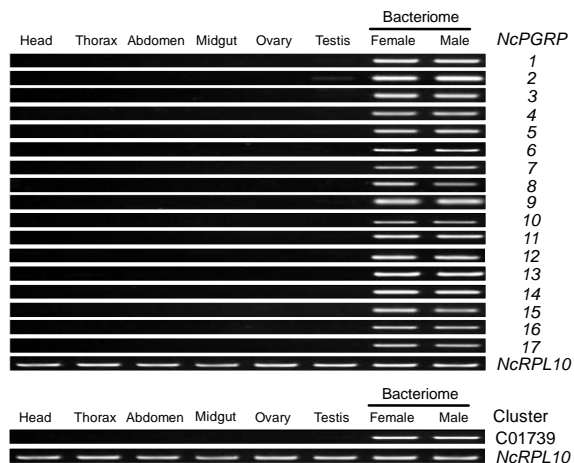


Fig. 1. 組織別 RT-PCR による遺伝子発現の比較

2. 組織別 RT-PCR による遺伝子発現の比較

17 種の *NcPGRP* 遺伝子と C01739 の発現組織が bacteriome 特異的であることを確かめるために、羽化 3 日のメス成虫の各組織における遺伝子発現を調べた (Fig. 1)。全ての *NcPGRP* 遺伝子及び C01739 は bacteriome 特異的に発現していた。ショウジョウバエの 13 種の *PGRP* 遺伝子は血球、腸、脂肪体など様々な組織で発現している。しかし、ツマグロヨコバイの 17 種全ての *PGRP* 遺伝子は bacteriome で特異的に発現していることから、ツマグロヨコバイの *PGRP* 遺伝子は共生細菌と何らかの相互作用をしていることが強く示唆された。

dsRNA インジェクションによる *NcPGRP1*, *NcPGRP5*, C01739 遺伝子の RNAi

17 種の *NcPGRP* 遺伝子において、発現量の多い遺伝子が重要な機能をしていると考え、*NcPGRP1* (定量 RT-PCR で最も発現量が高い) と *NcPGRP5* (EST 数が最も多い) の機能解析を行うことにした。また、機能未知の C01739 の機能解析も行うことにした。機能解析実験の 1 つである RNAi 法は有効かつ簡便であり、多くの昆虫種で行われている手法であることから、RNAi 法により機能解析実験を予備的に行った。昆虫において、最も有効で一般的に行われている RNAi 法は 500 bp 程度の dsRNA を虫体に注入する手法である。各遺伝子 (*dsPGRP1*, *dsPGRP5*, *ds01739*) の dsRNA を作製し、これらの dsRNA を注入した。コントロールに比べて注入 24 時間後に 2.3-13.4% に、72 時間後に 0.4-1.1% に、168 時間後に 0.3-3.2% に各遺伝子の mRNA 発現量は減少した (Fig. 2)。

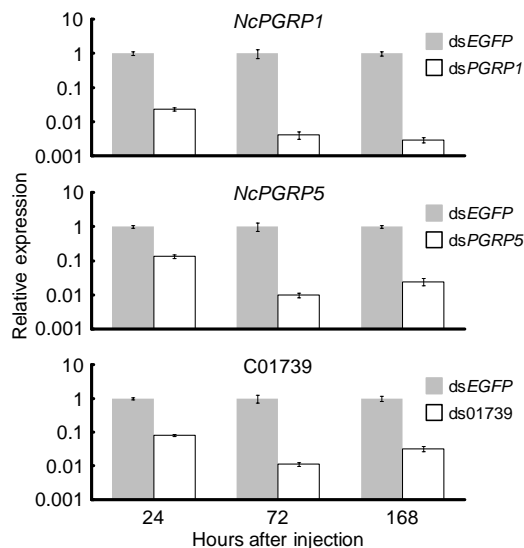


Fig. 2. dsRNA 注入による mRNA 発現量低下の確認
コントロールとして外因性の *dsEGFP*。 *NcEF1* により標準化。エラーバーは SE を示している。

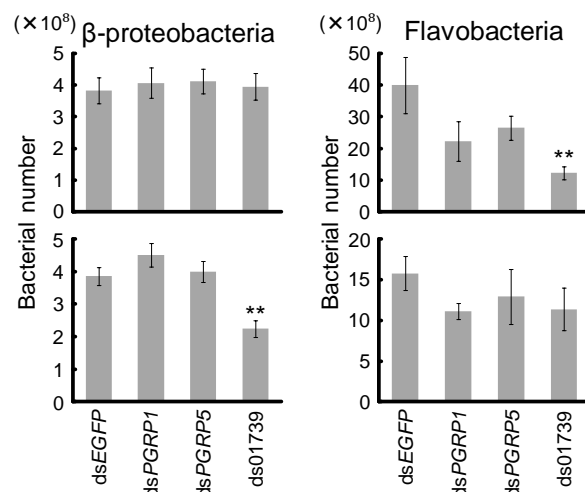


Fig. 3. mRNA 発現量減少個体における共生細菌数の計測結果
左図は β -proteobacteria を、右図は Flavobacteria、上図は注入 72 時間後、下図は 168 時間後の細菌数を示している。エラーバーは SE を示している。 **: P < 0.01。

NcPGRP1, *NcPGRP5*, C01739 タンパク質が bacteriome の共生細菌と何らかの関連を持つと考え、RNAi 表現型として細菌数を観察した。dsRNA 注入により *NcPGRP1*, *NcPGRP5*, C01739 の mRNA 発現量が減少した個体で β -proteobacteria と Flavobacteria の細菌数を計測した (Fig. 3)。C01739 mRNA 発現量が低下した個体 (ds01739) において、注入 168 時間後の β -proteobacteria の細菌数と注入 72 時間後の Flavobacteria の細菌数がコントロール (dsEGFP) と比べて有意に減少していた (Fig. 3 左下と右下)。C01739 の RNAi 実験において、mRNA 発現量は十分に減少し、細菌数は明瞭ではないものの減少傾向を示している。この結果から、C01739 が共生細菌と何らかの相互作用をしているのではないかと考えられた。*NcPGRP* 遺伝子及び C01739 と共生細菌との関係について、さらに詳細な検討が必要である。