

タバココナジラミ中腸円筒細胞の
トマト黄化葉巻ウイルスの取り込み機構の解明

2017年3月修了

先端生命科学専攻 資源生物創成学分野

学生番号 47-156306 氏名 浅野 遼

指導教員 宇垣 正志 教授、鈴木 匡 准教授

キーワード : whitefly、TYLCV、中腸円筒細胞、エンドサイトーシス

背景

トマト黄化葉巻病は世界各地に分布を拡大しており、農業生産に大きな被害を与えている。その病原であるトマト黄化葉巻ウイルス(*Tomato yellow leaf curl virus: TYLCV*) は、タバココナジラミ種複合体(*Bemisia tabaci species complex*)によってのみ媒介される。よって、タバココナジラミのTYLCV 媒介の特異性の機構の解明は、新たなウイルス防除戦略の構築につながると期待される。

TYLCV はタバココナジラミ中腸円筒細胞にエンドサイトーシス(EC)機構を利用して侵入していることが示唆されているが(内堀, 2013)、その詳細な機構は明らかになっていない。

そこで、本研究では、TYLCV の特異的細胞内侵入に関与するエンドサイトーシス経路の解析を目的とした。

方法・結果

本研究では、各 EC 阻害剤と共に TYLCV をタバココナジラミに吸汁させ、それぞれの阻害剤の影響を調べて TYLCV 侵入にかかわる EC 経路を推定した。ウイルス粒子が侵入したかどうかは、中腸円筒細胞に侵入しさらに脱出して血体腔に出てくるウイルスを高感度で検出することで判断した。そのためにはごく微量の TYLCV DNA を高感度で検出する必要がある。

①そこで、TYLCV 静岡焼津株(SzY) の感染葉から全 DNA を cetyltrimethyl ammonium bromide (CTAB)法で抽出した DNA を用い、微量の DNA を高感度で増幅する polymerase chain reaction (PCR) 法と rolling circle amplification (RCA)法の検出感度を比較した。

結果を図1に示す。PCR では408 bp、RCA では約3000 bpの位置にバンドが出る。PCR では試料 DNA を 10^9 倍希釈したものでも DNA を検出することができたのに対し、RCA では試料 DNA を 10^7 倍希釈したものでは検出することができなかったため本研究ではPCR法を使用するこ

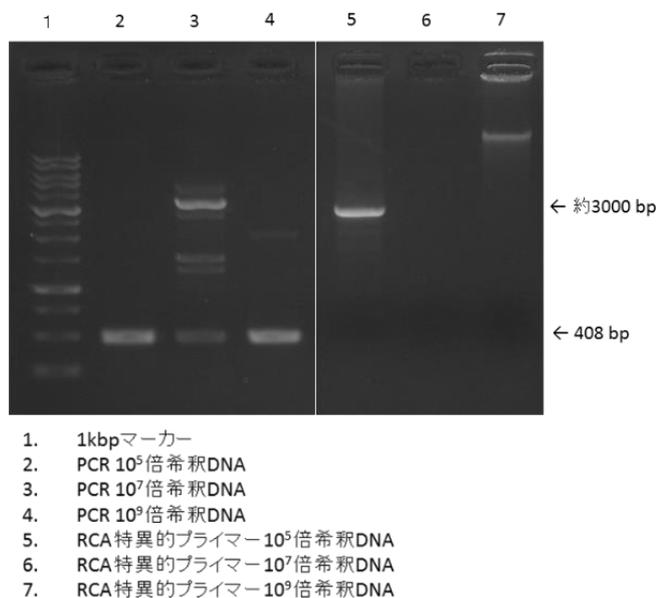


図1 DNA検出感度比較

とにした。

②タバココナジラミに各 EC 阻害剤を与え、48 時間後の生存率に影響が出ない濃度を検討した。また、ナイスタチンを溶解させるために DMSO を溶媒として使用するため、DMSO の濃度についても検討した。結果は表に示した。これから、阻害剤濃度条件は DMSO の終濃度 1 % [v/v] 以下、カベオラ／脂質ラフト仲介型 EC 阻害剤ナイスタチンの終濃度は 1.67 mM、クラスリン仲介型 EC の阻害剤クロルプロマジンの終濃度は 1.67 mM とした。

③蛍光標識したそれぞれの EC 内部移行マーカーを使い、EC 阻害剤によってタバココナジラミの EC が阻害されるかを調べた。内部移行マーカーの中腸円筒細胞での局在は共焦点顕微鏡で観察した。マーカーのみを吸わせたものでは直径 3 μm 以上の大きなドット状の蛍光が観察されたのに対して、阻害剤とマーカーを吸汁させた中腸細胞では、大きなドットは見られなかった。よって、ナイスタチン、クロルプロマジン共に、タバココナジラミの各 EC 経路を阻害する条件を確立できた。

④タバココナジラミに TYLCV 粒子とそれぞれの EC 経路の阻害剤を共に吸汁させ、脚から TYLCV DNA を検出した。その結果は図 2 に示した。カベオラ／脂質ラフト仲介型 EC の阻害剤であるナイスタチンを与えたタバココナジラミの脚から TYLCV DNA が検出されなかったことから、カベオラ脂質ラフト仲介型 EC が TYLCV のタバココナジラミの中腸円筒細胞侵入に関与していることが強く示唆された。

表 阻害剤濃度検討

	DMSO 終濃度 (% [v/v])	試験1 生存数 /全数	試験2 生存数 /全数
DMSO 30% スクロース 溶液	1	10/15	12/15
	3	6/15	7/15
	7	2/15	0/15
30% スクロース 溶液	0	12/15	14/15

	阻害剤 終濃度 (μM)	試験1 生存数 /全数	試験2 生存数 /全数
ナイスタチン in DMSO 30% スクロース 溶液	167	11/15	13/15
	833	14/15	10/15
	1667	12/15	11/15
30% スクロース 溶液	0	11/15	13/15

	阻害剤 終濃度 (mM)	試験1 生存数 /全数	試験2 生存数 /全数
クロルプロマジン in 滅菌水 30% スクロース 溶液	1.67	11/15	12/15
	8.33	2/15	3/15
	16.67	0/15	0/15
30% スクロース 溶液	0	12/15	13/15

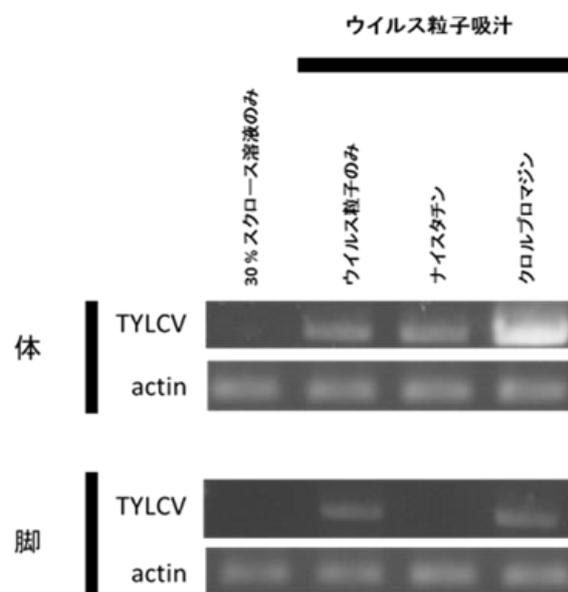


図2 阻害剤によるTYLCV侵入試験