

博士論文

ツマグロヨコバイの共生器官特異的に
発現する遺伝子の探索とその機能解析

富澤 真

Genes specifically expressed in the bacteriome of *Nephotettix cincticeps*

Summary

Insects maintain symbiotic relationships with various microorganisms, including intracellular bacteria. However, little is known about the molecular mechanisms of the regulation and formation of endosymbiosis phenomena occurring between two (or more) partners during evolutionary processes.

The green rice leafhopper, *Nephotettix cincticeps*, is an important rice pest that transmits both a virus and a phytoplasma to a rice plant. This insect has a pair of symbiotic organs known as the bacteriome in the anterior part of the abdomen. These organs are mainly composed of cells harboring *Nasuia* (a β -proteobacteria) and *Sulcia* (a flavobacteria). These bacterial endosymbionts are considered to supply nutrients for the leafhopper host and are indispensable for host development. To elucidate the molecular mechanism underlying interactions between leafhopper hosts and their endosymbionts, we searched for genes that are specifically expressed in the leafhopper bacteriome.

The top 20 highly expressed genes in the bacteriome were selected based on the cDNA expressed sequence tag (EST) database of *N. cincticeps* (<http://ncest.dna.affrc.go.jp/>). Most of the genes (except for three) appeared to show bacteriome-specific expression. Among them, three genes were found to be homologous with peptidoglycan recognition protein (*PGRP*) genes. PGRPs are known to be important molecules for the immune response by recognizing a peptidoglycan in the cell wall of invading bacteria. Since PGRPs are related to bacteria recognition and host immunity, *PGRP* genes were selected for further study. The number of different *PGRP* genes was determined based on the transcriptome data of the leafhopper. More

than 160 genes were found in the EST database and more than 300 genes were found in the RNA-Seq data. The leafhopper harbors an extremely large number of *PGRP* genes compared to other animals. Specific *PGRP* expression in the bacteriome was confirmed by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR); *PGRP* genes were expressed in the bacteriomes of both male and female leafhoppers, but seldom in other tissues.

The expression level of *PGRP* genes in insects usually increases in response to invasion of foreign bacteria. Therefore, the change in *PGRP* gene expression levels was examined by reference to a leafhopper microarray of an *Escherichia coli*-challenged leafhopper. Antimicrobial peptide genes (*defensin* and *diptericin*) were up-regulated following inoculation of *E. coli*, whereas the expression levels of almost all *PGRP* genes were unaffected. *N. cincticeps* also harbors a *Rickettsia* symbiont in the whole body. *Rickettsia* possesses a peptidoglycan, which may up-regulate *PGRP* genes. Therefore, the expression levels of *PGRP* genes were compared between microarrays obtained for leafhoppers that were infected and uninfected with *Rickettsia*. Many genes did not show any change in expression level, with some showing significant up- or down-regulation, indicating that the specific effect of the presence of *Rickettsia* on *PGRP* gene expression was not clear. These microarray results suggested that *PGRP* genes do not participate in the host immune system, but are instead likely related to facilitating symbiosis between the leafhopper host and its two endosymbionts, *Nasuia* and *Sulcia*. However, it remained unclear as to how PGRPs participate in the symbiosis, because *Nasuia* and *Sulcia* do not possess peptidoglycans.

To identify this mechanism, we next focused on the first, second, and third most highly expressed genes identified in the bacteriome. We designated these genes as *Top1–3*, which were all found by RT-PCR to be specifically expressed in the leafhopper bacteriome. The *Top2* gene was selected for further study. *Top2* putatively encodes 250 amino acid residues,

16.4% of which are proline. Accordingly, we named this protein *Nephotettix cincticeps* proline-rich protein (NcPrp). NcPrp did not have a signal peptide. Western blot analysis indicated that NcPrp is present in the bacteriome but not in other tissues. To explore the function of the *NcPrp* gene, we performed an RNA interference (RNAi) experiment. Double-stranded RNA (dsRNA) was injected into 5th instar nymphs, using *EGFP* gene as a control. The mRNA level in the leafhoppers at 4 and 7 days after injection was greatly reduced and proteins were hardly detected. We examined the effect of RNAi on the numbers of bacteriome symbionts, *Nasuia* and *Sulcia*. The number of *Nasuia* was reduced significantly at 4 and 7 days after injection, whereas the number of *Sulcia* was not significantly affected, indicating that NcPrp is specifically related to bacterial growth of *Nasuia*. Functional analysis of the *NcPrp* gene was further performed using the leafhopper microarray of the RNAi-treated leafhoppers. The leafhoppers injected with *NcPrp* dsRNA showed greatly reduced expression levels of most *PGRP* genes, indicating that the NcPrp level is involved in the regulation of *PGRP* gene expression.

In summary, PGRPs and NcPrp function in the leafhopper bacteriome. NcPrp is related to endosymbiont growth and expression of *PGRP* genes. These molecules are undoubtedly related to symbiosis between the leafhopper host and its endosymbionts. Symbiosis is a consolidated complex; thus, elucidation of the molecules involved in the symbiosis process can reveal the mechanism of symbiosis and its formation during evolutionary processes. The results of the present study provide important clues for uncovering the molecular basis of symbiosis.

目次

序論	1
第1章 ツマグロヨコバイの共生器官で特異的に発現する遺伝子の探索	
1-1 緒言	6
1-2 材料及び方法	8
1-3 結果	10
1-4 考察	12
図表	14
第2章 ツマグロヨコバイのペプチドグリカン認識タンパク質遺伝子の発現解析	
2-1 緒言	23
2-2 材料及び方法	27
2-3 結果	40
2-4 考察	53
図表	58
第3章 機能未知タンパク質遺伝子 <i>NcPrp (Top2)</i> の機能解析	
3-1 序論	96
3-2 材料及び方法	98
3-3 結果	103
3-4 考察	108
図表	113

総合考察	133
謝辞	136
引用文献	137
補足表	150

序論

昆虫などの無脊椎動物、哺乳類などの脊椎動物、植物は病原性の微生物から身を守るために、微生物に対する感染防御手段を進化の過程で発達させ、生体内から病原微生物を排除している。しかし、生体内から微生物を排除することなく、共生という関係を構築し、互いに利益を享受している生物も存在している。

昆虫では原生生物・菌類・ウイルスとの共生の例も見られるが、圧倒的に多いのは細菌との共生の例である。昆虫と細菌との共生関係において、カメムシ目のアブラムシでは多くの研究が行われており、一部を除きほとんどのアブラムシ科昆虫に γ -proteobacteria 綱の *Buchnera aphidicola* という細菌が共生している (Moran, 2006; Unterman et al., 1989)。エンドウヒゲナガアブラムシ (*Acyrtosiphon pisum*) の *Buchnera* は必須アミノ酸やビタミンなどの栄養素を合成し、宿主に供給している (Sasaki and Ishikawa, 1995; Nakabachi and Ishikawa, 1999; Shigenobu et al., 2000)。そのため、アブラムシは *Buchnera* 不在では生存できない。一方、アブラムシはバクテリオサイト (bacteriocyte、菌細胞) と呼ばれる細胞を持ち、*Buchnera* に安定的に生息できる場所を提供している。*Buchnera* はバクテリオサイト以外では生存できず、人為的に培養することもできない。*Buchnera* は厳密に次世代に伝えられ (Koga et al., 2012)、全ての個体に感染している。この *Buchnera* はおよそ 2 億年前にアブラムシの体内に入り込み、共に進化してきたと考えられている (Moran et al., 1993)。エンドウヒゲナガアブラムシと *Buchnera* のゲノム解読により、生存に必要な栄養素の合成酵素遺伝子群を互いに補完し合っていることがわかっている (Consortium, 2010)。このようなアブラムシと *Buchnera* のような栄養依存関係にある共生微生物 (細菌) を一次共生微生物 (細菌) と呼ぶこともある。このような一次共生細菌を持っている昆虫は、カメムシ目、ゴキブリ目、コウチュウ目、ハエ目、シラミ目など広い範囲で知られている。特に、吸汁性昆虫は餌に含

まれる栄養素が限られており、共生微生物（細菌）がそれを補っていると考えられている。

カメムシ目のヨコバイの一種である sharpshooter (*Homalodisca coagulata*)では、 γ -proteobacteria 綱の *Baumannia cicadellinicola* と flavobacteria 綱の *Sulcia muelleri* (Moran et al., 2003; Moran et al., 2005) という 2 種の細菌が共生している。この sharpshooter はバクテリオサイト（菌細胞）が集まって形成されたバクテリオーム (bacteriome、菌細胞塊) という組織を保持している (Moran, 2007)。このバクテリオームは赤い部分と黄色い部分の 2 つがあり、*Baumannia* は両方に感染しており、*Sulcia* は黄色い部分にのみ感染している。この 2 種の共生細菌のゲノムが解読された結果、*Buchnera* と同様に、宿主の生存に必須な栄養素の供給を行っていることが明らかとなった (Wu et al., 2006; McCutcheon and Moran, 2007)。*Baumannia* は主に補酵素及びビタミンを合成し、*Sulcia* は主にアミノ酸を合成していることが推定されている。また、一部の栄養素の合成に関して 2 種の共生細菌は互いの合成原料をやり取りしていると予想されている。Sharpshooter の 2 種類の共生細菌は経卵伝播をすることで厳密に次世代に伝えられる。

ハエ目のツェツェバエ類 (Glossinidae) はアフリカ睡眠病を発症させるトリパノゾーマ原虫の媒介虫であり、 γ -proteobacteria 綱の *Wigglesworthia glossinidia* を共生させている (Aksoy et al., 1995; Aksoy et al., 1997)。ツェツェバエは腸の外側に付着したバクテリオームを保持しており、この細胞中に *Wigglesworthia* が感染している。この共生細菌は宿主 (*Glossina brevipalpis*) にビタミンを供給していると推定されている (Akman et al., 2002)。ツェツェバエは卵から若齢幼虫期まで母親の胎内で過ごすことが知られており、若齢幼虫は母親の乳腺から供給される栄養素を摂取することで成長する。この母親 (*Glossina morsitans morsitans*) の乳腺にも *Wigglesworthia* が感染しており、栄養素と共に若齢幼虫に供給される (Attardo et al., 2008)。宿主と細菌の分子系統解析の結果、*Wigglesworthia* はツェツェバエの体内に入り込んだ後、共に進化してきたと考えられている (Chen et al.,

1999)。

上記の3種の昆虫以外にも多くの昆虫で一次共生細菌の例が知られている。カメムシ目のマルカメムシ (*Megacopta punctatissima*) には γ -proteobacteria 綱の *Ishikawaella capsulata* が共生しており (Hosokawa et al., 2006)、ゴキブリ目のゴキブリ類 (*Blattella germanica*, *Periplaneta americana*, *Periplaneta australasiae*, *Nauphoeta cinerea*, *Pycnoscelus surinamensis*) やムカシシロアリ (*Mastotermes darwiniensis*) には flavobacteria 綱の *Blattabacterium* sp. が (Bandi et al., 1994; Bandi et al., 1995)、ハチ目のオオアリ (*Camponotus floridanus*) には γ -proteobacteria 綱の *Blochmannia floridanus* が共生している (Gil et al., 2003)。コウチュウ目のコクゾウムシ (*Sitophilus oryzae*) には γ -proteobacteria 綱の *Sitophilus oryzae* primary endosymbiont が共生しており (Heddi et al., 1998)、シラミ目のコロモジラミ (*Pediculus humanus*) とアタマジラミ (*Pediculus capitis*) には γ -proteobacteria 綱の *Riesia pediculicola* が (Sasaki-Fukatsu et al., 2006)、ハトナガハジラミ (*Columbicola columbae*) には γ -proteobacteria 綱の *Columbicola columbae* (Fukatsu et al., 2007) がそれぞれ共生している。

これらの一次共生細菌の特徴として、ゲノムサイズが小さくなっていることが挙げられ、また一般に、ゲノムの GC 含有率が低下している。アブラムシの *Buchnera aphidicola* のゲノムサイズは 422–653 kb で、GC 含有率は 20.2–26.3% である (Degnan et al., 2005; Moya et al., 2008)。 *Baumannia cicadellinicola* (ゲノムサイズは 686 kb, GC 含有率 33.2%)、 *Sulcia muelleri* (245 kb, 22.4%)、 *Wigglesworthia glossinidia* (698 kb, 22.5%) も同様の特徴を有している。これに対し、遊離細菌の *Escherichia coli* K12 のゲノムサイズは 4,639 kb で、GC 含有率は 50.8% である。また、一次共生細菌は他の細菌と比べてゲノムの変異率が高いことが知られている (Moran et al., 2009)。これにより、ゲノムの AT 含有率が高くなり、塩基配列が「AAAAA」など同じ塩基が連続しやすくなることがある。そして、スリップ複製が起こり、遺伝子の機能が喪失することがあり、ゲノムの縮小の原因とも

なっていると考えられている。ゲノムサイズの縮小、GC含有率の低下などの一次共生細菌の特徴は、宿主と共生細菌が長い年月をかけて共に進化してきた結果と考えられる。また、これらの特徴は細胞小器官ミトコンドリアの特徴と良く似ている。一次共生細菌は遊離細菌から細胞小器官への共進化の過程にある例ではないかと考えられる (Moran, 2006)。

また、昆虫の共生細菌の中には互いの生存には必須ではないものの、宿主に有益な効果をもたらす二次共生細菌の例も多く知られている。アブラムシにおいて多くの二次共生細菌が見つかっており、その宿主への影響が調べられている。 γ -proteobacteria 綱の *Serratia symbiotica* は高温ストレス耐性を付与し (Montllor et al., 2002)、 γ -proteobacteria 綱の *Regiella insecticola* は病原性真菌に対する抵抗性の付与 (Scarborough et al., 2005) と宿主の最適な寄生植物種の決定に関与していると報告されている (Tsuchida et al., 2004)。 γ -proteobacteria 綱の *Hamiltonella defensa* は宿主の天敵である寄生蜂の寄生に対する抵抗性を宿主に付与している (Oliver et al., 2003; Oliver et al., 2005)。 α -proteobacteria 綱の *Rickettsiella* はアブラムシの体色変化に関与することが報告され (Tsuchida et al., 2010)、これは捕食者の目を欺くためだと考えられている。また、Mollicutes 綱の *Spiroplasma sp.* も二次共生細菌として知られている (Fukatsu et al., 2001)。ツエツエバエには *Wigglesworthia glossinidia* の他に γ -proteobacteria 綱の *Sodalis glossinidius* が共生している (Aksoy et al., 1995; Aksoy et al., 1997)。これらの二次共生細菌は垂直伝播することもあれば、水平伝播することもあり、宿主個体全てに感染しているわけではない。また、一次共生細菌のゲノムに見られるようなゲノムサイズの縮小やGC含有率の低下はあまり顕著ではない (Clark et al., 2010)。しかし、二次共生細菌も宿主の適応力を高めるなど、一次共生細菌と同様に非常に重要な役割を果たしていると考えられる。

共生細菌のゲノム解読は *Buchnera*、*Baumannia*、*Sulcia*、*Wigglesworthia* の他にも、ゴキブリの *Blattabacterium* やオオアリの *Blochmannia* でも行われ、これらの共生細菌も宿

主に栄養素を供給していると考えられている (Sabree et al., 2009; Gil et al., 2003)。このように昆虫と細菌の共生関係の研究において、細菌のゲノム研究が盛んに行われてきている。しかし、宿主昆虫はなぜ異物である微生物を排除しないのか、どのようにして微生物の増殖をバランスよく制御しているのかなど、共生の本質に関わる現象の解明はあまり進んでいない。共生の機構を深く理解するためには、宿主昆虫のバクテリオームなどの共生器官の機能解析を行うことが重要であると考えられる。

本研究は、イネ害虫であるツマグロヨコバイの共生器官 (バクテリオーム) で特異的に発現する遺伝子を探索し、その遺伝子の共生との関わりを解明することで、共生の分子機構を明らかにすることを目的としている。第1章では、バクテリオームで特異的に発現する遺伝子を探索し、ペプチドグリカン認識タンパク質 (peptidoglycan recognition protein, PGRP) 遺伝子といくつかの機能未知タンパク質遺伝子が存在することを明らかにした。第2章ではツマグロヨコバイ *PGRP* 遺伝子の発現解析を行った。*PGRP* は外来の細菌を認識することで免疫応答を引き起こす分子である (Kurata, 2014)。ツマグロヨコバイでは *PGRP* 遺伝子の数が他の昆虫のものに比べて桁はずれに多く、ほぼ全てが共生器官バクテリオームで発現していた。また、外来の細菌を認識することで引き起こされる免疫応答には関与しない可能性が示唆された。第3章では、機能未知タンパク質遺伝子のうちの1つについて機能解析を行った。EST解析によりバクテリオームで2番目に高発現する機能未知タンパク質遺伝子を対象にし、全長配列を解析した結果、新規の高プロリン含有タンパク質をコードしていることがわかり、*NcPrp* と名付けた。RNAiによる機能解析を行った結果、*NcPrp* は *PGRP* 遺伝子の発現に関与し、共生細菌の増殖にも影響していた。このようにツマグロヨコバイの共生機構は *PGRP* などの既知の分子と *NcPrp* などの新規の分子の機能を包含した複雑な分子機構であることがわかってきた。

第1章 ツマグロヨコバイの共生器官で特異的に発現する遺伝子の探索

1-1 緒言

ツマグロヨコバイ (*Nephotettix cincticeps*, 図 1-1a) は主要なイネ害虫であり、吸汁被害や植物ウイルス及びファイトプラズマの媒介などの被害を引き起こすことが知られている (Nasu, 1965; Jung et al., 2003)。このツマグロヨコバイには3種の細菌が共生している (Mitsuhashi and Kono, 1975; Noda et al., 2012)。共生器官バクテリオームの細胞中には β -proteobacteria 綱の *Candidatus Nasuia deltocephalinicola* (以後、*Nasuia* と略称する) と flavobacteria 綱の *Sulcia muelleri* (以後、*Sulcia* と略称する) が共生している。全身の細胞内には α -proteobacteria 綱の *Rickettsia* が共生している。

ツマグロヨコバイも sharpshooter と同様にバクテリオームを保持している (図 1-1b)。ツマグロヨコバイのバクテリオームは腹部の第2節から第4節かけて一対存在しており、黄緑色の豆状の形態をしている。このバクテリオームは二層構造をしており、内層と外層に分かれている (図 1-2a)。バクテリオーム内層の細胞には *Nasuia* が、外層の細胞には *Sulcia* が感染している (図 1-2b, c)。電子顕微鏡によりバクテリオーム内層と外層の境界を観察することによっても、両者がすみ分けていることが明らかである (図 1-3)。また、両者ともバクテリオーム細胞の細胞質を埋め尽くしている。*Sulcia* は *Nasuia* よりやや大きい。*Nasuia* の形態は不定形であり、明瞭な二重膜構造をしている (図 1-4a)。*Sulcia* の形態も不定形であり、不明瞭な膜構造をしている (図 1-4b)。全身の細胞内に感染する *Rickettsia* はバクテリオーム細胞の核内にも感染している (図 1-3, 5)。

ツマグロヨコバイの *Nasuia* と *Sulcia* は本研究室にてゲノム解読が行われており、宿主へ栄養素の供給を行っていることが予想されている (Noda et al., unpublished data)。特徴としてゲノムサイズの縮小及び GC 含有量の低下が見られた。栄養素の供給を受けているため、ツマグロヨコバイはこれらの共生細菌不在では生存できないと考えられている。

る (Noda et al., 2012)。 *Nasuia* と *Sulcia* は培養できず、バクテリオーム以外では生存できない。そのため、 *Nasuia* と *Sulcia* は経卵伝播することで厳密に次世代に伝えられている (図 1-6)。バクテリオームに感染している *Nasuia* と *Sulcia* は隣接する卵巣に移動し (図 1-6a)、卵巣を構成する卵巣小管に侵入する (図 1-6b)。そして、卵の後極に存在する球状の空間 (シンビオントボール) の中に収められる (奈須, 1963)。このような経卵伝播により、 *Nasuia* と *Sulcia* は全ての個体に感染する。垂直伝播により 100%の感染率であること、バクテリオームで安定的に生存していること、ゲノムサイズが縮小していること、ゲノムの GC 含有率が低下していることなど、 *Nasuia* と *Sulcia* は一次共生細菌としての特徴を有している。

ツマグロヨコバイのバクテリオームは一般の昆虫にはない特殊な器官である。細菌を共生させるための器官であり、アブラムシのバクテリオサイトなどの他昆虫の共生組織と比較して、より明確な構造物 (器官) として認識できる。同じヨコバイ類でも sharpshooter と異なり、内層と外層が解剖で分けられないほど融合している。また、 *Nasuia* と *Sulcia* は明確にすみ分けを行っている。これらの特徴により、ツマグロヨコバイのバクテリオームは共生のための組織の中でも、より共生に特化したものと言える。そのため、ツマグロヨコバイのバクテリオームで特異的に発現する遺伝子を探索し、その機能解析を行うことで、より明確に共生に係る分子の解明ができると考えられる。

本章では、まず、基礎データを得る目的で宿主ツマグロヨコバイの各発育ステージ毎の共生細菌数を明らかにしたのち、ツマグロヨコバイの EST データベースに含まれている遺伝子の中から、バクテリオーム特異的に発現している遺伝子を選びだした。

1-2 材料及び方法

ツマグロヨコバイの飼育条件

イネの芽生えを餌にして、26°C、16時間の明期、8時間の暗期の条件でツマグロヨコバイ（つくば系統）を飼育した。塩化ビニール製の飼育容器（26 cm×34 cm×34 cm）を用い、2週間に一度餌を替えた。

宿主発育に伴う共生細菌数の変化

ツマグロヨコバイの卵、幼虫、成虫における共生細菌数を推定するために、*Nasuia* 及び *Sulcia* の 16S ribosomal RNA (16S rRNA) 遺伝子、*Rickettsia* の citrate synthase (CS) 遺伝子のコピー数を定量 PCR により測定した。産卵後 5-7 日の卵を 20 個、1-2 齢 0 日齢の幼虫を各 10 頭、3-5 齢 0 日齢の幼虫を各 5 頭、羽化 0, 3, 7 日齢のメス成虫を各 1 頭、羽化 0, 3, 7 日齢のオス成虫を各 1 頭ずつ採取し、DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen) を用いて DNA を抽出し、DNA 溶液 50 µl を得た。

産卵 5-7 日の卵を得るために、メス 30 頭とオス 30 頭を芽出しイネ入りの瓶に入れた。ヨコバイを 3 日間産卵させた後に取り除き、除去 5 日後にイネの茎（主に最下部）を解剖することで卵を採取した。1 齢 0 日齢の幼虫を得るためには、メス 30 頭とオス 30 頭を芽出しイネ入りの瓶に入れた。ヨコバイを入れてから 9 日後に瓶中の全てのヨコバイを除去し、その翌日にふ化した 1 齢 0 日齢の幼虫を得た。脱皮後の日齢を合わせるには、採取する齢の前齢から試験管で個体ごとに飼育した後、脱皮を確認し、実験に用いる日齢のヨコバイを得た。

抽出した DNA 溶液を 20 倍希釈し、この希釈 DNA 溶液 5 µl をテンプレートとして LightCycler 480 SYBR Green I Master (Roche Applied Science) を用いて定量 PCR を行った。定量 PCR 反応液を 95°C で 5 分間保温後、95°C 10 秒、60°C 20 秒、72°C 10 秒のサイクルを 50 回反復した。解析機器として LightCycler 480 (Roche Applied Science) を用

いた。各々独立して作製したテンプレートを使用して、卵、幼虫の場合は3回、成虫の場合は5回の反復実験を行った。共生細菌数測定に用いたプライマーは補足表1に示した。

バクテリオームで特異的に発現する遺伝子の探索

バクテリオームで特異的に発現する遺伝子を探索するために、独立行政法人農業生物資源研究所で公開中の YOKOBAI EST を参照した (<http://ncest.dna.affrc.go.jp/>)。このデータベースは組織別 cDNA EST データベースとなっており、バクテリオーム由来の EST クローンが 3,095 個登録されている (表 1-1)。これにさらに眼などの EST 解析データを加え、合計 41,536 クローンの EST を対象にバクテリオームで多く発現するクローンを抽出した。同一遺伝子と考えられる EST クローンを同じグループに分類するために、CLOBB と呼ばれるプログラミング言語 Perl で書かれたクラスタリングソフトを使用した (Parkinson et al., 2002)。50 bp のサイズで 95% より高い値で一致するものを同一のクラスターとみなす条件で解析した。これにより、バクテリオームの解析から得られた EST クローンのうち、構成 EST 数が多い順に上位 20 クラスターを選抜した。各クラスターがどのような遺伝子であるかを知るために、核酸配列の相同性検索を行った (BlastX, NCBI, <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)。相同性検索により、E-value が 0.1 以上の遺伝子は「unknown」とした。

1-3 結果

共生細菌の宿主発育に伴う細菌数の変化

ツマグロヨコバイの卵、1-5 齢幼虫、メス成虫、オス成虫の 1 頭あたりにおける共生細菌の *16S ribosomal RNA* (*16S rRNA*) 遺伝子あるいは *citrate synthase* (*CS*) 遺伝子のコピー数を定量 PCR により測定した (図 1-7)。 *Nasuia* と *Sulcia* のゲノム解読が行われており、*16S rRNA* 遺伝子がゲノム中に 1 コピー存在することが明らかになっている。また、細菌類の *CS* 遺伝子もゲノム中に 1 コピー存在することがゲノム解読から確認できている。そのために、定量 PCR により増幅した *16S rRNA* 遺伝子あるいは *CS* 遺伝子のコピー数を細菌数と考えた。その際に、DNeasy Blood & Tissue Kit の抽出効率 (60%) で補正し (Nakamura et al., 2012, supplementary material)、1 個体当たりの細菌数として示した。

3 種の共生細菌数は卵から 5 齢まで発育するに従って増加した (図 1-7)。*Nasuia*、*Sulcia*、*Rickettsia* の卵における細菌数はそれぞれ 1.71×10^6 、 1.59×10^7 、 2.84×10^6 であり、5 齢幼虫では卵に比べ細菌数がそれぞれ 29 倍、57 倍、57 倍と増加した。オス成虫の細菌数は 5 齢幼虫のそれと大きな違いはなかった。しかし、メスにおける *Nasuia* の細菌数 (図 1-7a) は 5 齢幼虫から羽化 0 日齢にかけて 3.9 倍に増加し、羽化 3 日齢に最大 (4.51×10^8) となり、その後はあまり変化しなかった。同様に、メスにおける *Sulcia* の細菌数 (図 1-7b) は 5 齢幼虫から羽化 0 日齢にかけて 3.3 倍に増加し、羽化 3 日齢に最大 (3.93×10^9) となったが、羽化 7 日齢には 0.6 倍に減少した。また、メスにおける *Rickettsia* の細菌数 (図 1-7c) は 5 齢幼虫から羽化 0 日齢にかけて 1.1 倍に増加し、羽化 3 日齢のメス成虫において最大 (3.24×10^8) となり、羽化 7 日齢にかけて細菌数は変化しなかった。

バクテリオーム特異的に発現する遺伝子の探索

ツマグロヨコバイ EST データベースからバクテリオームで高発現する遺伝子 (実際には EST 数が多いクラスター) を探索した結果を表 1-2 に示した。遺伝子の発現部位を

EST クローン数により予想するために、バクテリオーム以外の他の組織の EST の数も調べた。大腸菌接種個体、卵、3-4 齢幼虫は虫体全体を用いており、バクテリオームも含んでいる。バクテリオームで 10 番目に高発現する遺伝子 (以後、「順位一番目の遺伝子」と略称する) は多くのバクテリオームを含まない組織由来の EST から検出されており、バクテリオームで特異的に発現していなかったと判断できる。順位 11 番目、19 番目の遺伝子の発現もバクテリオーム特異的ではない。バクテリオームで特異的に発現する遺伝子として、ペプチドグリカン認識タンパク質 (peptidoglycan recognition protein, PGRP) と相同性のある遺伝子が 3 個見出された (順位 4, 18, 20 番目)。PGRP は細菌の細胞壁を認識することで免疫応答を引き起こす分子であることが知られている (Kurata, 2014)。また、相同性検索の結果、機能未知のタンパク質をコードする遺伝子 (表中で unknown と記述) が 8 個あった。この機能未知タンパク質遺伝子の中で、バクテリオームで 1-3 番目に高発現する遺伝子 (順位 1-3 番目) は、特に重要な機能をしていると考え、これらの遺伝子を仮に *Top1*, *Top2*, *Top3* 遺伝子と名付けた。

順位 6, 10, 15, 16, 17 番目の遺伝子はホスファターゼやキナーゼなどの酵素と相同性があった。順位 7 番目の遺伝子は相同性検索の結果、major protein body membrane protein MP27-MP32 と相同性があったが、E-value が 0.090 であるため、機能未知のタンパク質をコードする遺伝子と予想した。順位 8 番目の遺伝子は相同性検索の結果、bifunctional protein glmU-like と予想された。これはホスホリラーゼとアセチルトランスフェラーゼの 2 つの機能を併せ持つタンパク質であった。順位 11 番目の遺伝子は鉄貯蔵タンパク質のフェリチンと相同性があった。順位 19 番目の遺伝子はハウスキーピング遺伝子の ribosomal protein L19e と相同性があった。

1-4 考察

ツマグロヨコバイの3種類の共生細菌 *Nasuia*、*Sulcia*、*Rickettsia* の細菌数を生育ステージ毎に測定した (図 1-7)。その結果、3種の細菌数は宿主の発育に伴い増加した。羽化3日齢のメス成虫において最大となり、*Nasuia* の細菌数が 4.51×10^8 、*Sulcia* では 3.93×10^9 、*Rickettsia* では 3.24×10^8 であった。アブラムシの一次共生細菌である *Buchnera* は宿主の発育に伴い細菌数が増加し、その数は最大で約 1×10^9 レベルに達する (Koga et al., 2003)。ツェツェバエの *Wigglesworthia* も宿主の発育に伴い細菌数が増加する (Rio et al., 2006)。また、アブラムシの二次共生細菌である *Rickettsia* は宿主の発育に伴い細菌数が増加し、最大で約 1×10^8 レベルに達する (Sakurai et al., 2005)。ツマグロヨコバイの3種類の共生細菌の細菌数は最大で 10^8 – 10^9 程度であり、他の共生細菌の虫体当りの感染量に匹敵する。また、*Sulcia* の羽化3日齢のメス成虫における細菌数は *Nasuia* の約9倍であった。*Sulcia* はバクテリオームの外層細胞に感染し、*Nasuia* は内層細胞に感染している。バクテリオーム外層は内層に比べて体積が大きいため *Sulcia* の細菌が *Nasuia* に比べて多いのかもしれない。また、メス成虫の細菌数はオスのそれに比べて多く、*Nasuia* で最大約5.7倍 (羽化7日齢)、*Sulcia* で最大約35倍 (羽化3日齢) の開きがあった。メス成虫では産卵にかかわる栄養やエネルギーを共生細菌から得ることが期待でき、また、数が多いことは経卵伝播にも有利に働くと考えられる。

ツマグロヨコバイのバクテリオームで高い発現を示す遺伝子を探索し、ペプチドグリカン認識タンパク質 (PGRP) 遺伝子と一部の機能未知タンパク質遺伝子を見つけることができた (表 1-2)。PGRP は宿主に侵入してきた外来細菌の細胞壁を認識することで宿主に免疫応答を引き起こし、これにより異物である細菌は排除される。共生細菌もその由来は外来の異物であると考えられるところから、共生細菌の排除や増殖制御に宿主の免疫応答が関与している可能性は十分にある。他の昆虫でも共生器官で PGRP 遺伝子

が発現していることが知られている。一次共生細菌 *Wigglesworthia glossinidia* が共生しているツェツェバエのバクテリオームでは *PGRP* 遺伝子が発現している (Attardo et al., 2006; Wang et al., 2009)。また、一次共生細菌 *Sitophilus zeamais primary endosymbiont* が共生しているコクゾウムシのバクテリオームでも *PGRP* 遺伝子が発現している (Heddi et al., 2005; Anselme et al., 2006)。このように他昆虫でも、共生機構に *PGRP* 遺伝子が関与する可能性が示唆されている。ツマグロヨコバイのバクテリオームは他昆虫のものに比べてより共生に特化した器官であり、ここで発現する *PGRP* 遺伝子の機能を調べることで、共生機構と免疫応答の関係を明らかにできるかもしれない。

バクテリオームで高発現する遺伝子の中に、9 個の機能未知のタンパク質をコードする遺伝子が見出された (表 1-2)。バクテリオームは共生細菌を生息させるための組織であり、他の昆虫組織では見られないタンパク質を有することが予想される。コクゾウムシは共生機構に関与する可能性がある機能未知タンパク質遺伝子を保持している (Vigneron et al., 2012)。カメムシ目のホソヘリカメムシには β -proteobacteria 綱の *Burkholderia* が共生しており (Kikuchi et al., 2005)、この虫も共生機構に関与する可能性がある機能未知タンパク質遺伝子を保持している (Futahashi et al., 2013)。バクテリオームの機能を明らかにするためには、このような機能未知タンパク質遺伝子の機能解析が必須である。高発現している遺伝子ほど重要な機能を果たしていると考え、ツマグロヨコバイのバクテリオームで 1-3 番目に高発現する機能未知タンパク質遺伝子 *Top1*, *Top2*, *Top3* に注目した。また、16 番目と 17 番目に高発現していた 2 つの酵素遺伝子はバクテリオーム以外の組織からは EST クローンが見つからなかったところから、これらの酵素がバクテリオーム特異的に発現しているかどうか、今後検討を要する。

表 1-1. ツマグロヨコバイの cDNA EST データベースの概要

ライブラリ名称	EST 数	組織	ステージ	性別
Bac	3968	虫体全体	成虫	メス
CCA	1693	培養細胞	-	-
CCB	2446	培養細胞	-	-
CE	603	眼	成虫	メス
EA	1288	卵	1-3 日	メス+オス
EB	1650	卵	5-7 日	メス+オス
FB	3227	脂肪体	成虫	メス
MG	4883	中腸	成虫	メス
MH	1025	中腸	成虫	メス
MYA	2317	バクテリオーム	若齢成虫	メス
MYB	778	バクテリオーム	老齢成虫	メス
NY	1603	虫体全体	3-4 齢幼虫	メス+オス
OV	4363	卵巣	成虫	メス
SGA	2394	唾液腺	老齢成虫	メス
SGB	4131	唾液腺	若齢成虫	メス
SGC	1909	唾液腺	若齢成虫	メス
TE	3258	精巢	成虫	オス
Total	41536			

17 種類の EST ライブラリの EST 数、由来する組織、ステージ、性別を示した。Bac、EA、EB、NY は虫体全体を用いているため、バクテリオームを含んでいる。

(<http://ncest.dna.affrc.go.jp/>)

表 1-2. バクテリオームで高発現する 20 遺伝子の相同性検索結果

	MYA	Bac	EA	NY	CC	CE	FB	MG	OV	SG	TE	Total	BlastX
MYB	EB	MH	EST										
1	178	7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	185	Unknown
2	140	5	6	1	0	0	3	0	1	0	0	156	Unknown
3	91	98	0	2	0	0	0	0	0	0	0	191	Unknown
4	61	17	0	0	0	0	0	0	0	0	0	78	Peptidoglycan recognition protein 4 [1e-010]
5	36	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	37	Unknown
6	34	9	0	0	0	0	3	0	0	0	0	46	Bis(5'-nucleosyl)-tetraphosphatase [1e-031]
7	27	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	27	preproMP27-MP32 [0.090]
8	26	3	3	1	0	0	0	0	0	1	1	35	Bifunctional protein glmU-like [2e-023]
9	25	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	27	Unknown
10	21	72	12	23	0	8	5	96	34	21	9	301	Arginine kinase [0.0]
11	21	76	22	1	0	0	10	571	12	20	4	737	Ferritin [8e-111]
12	20	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	22	Unknown
13	18	1	0	0	0	0	2	0	0	0	0	21	Unknown
14	17	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4	21	Unknown
15	16	3	1	1	0	0	6	0	0	0	0	27	Lipoyltransferase 1, mitochondrial-like [2e-141]
16	14	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	14	Bifunctional 3'-phosphoadenosine 5'-phosphosulfate synthase 1-like [5e-121]
17	13	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	13	Sarcosine dehydrogenase, mitochondrial [7e-109]
18	12	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	15	Peptidoglycan recognition protein 1-like [7e-021]
19	12	0	11	2	3	0	4	2	4	2	3	43	Ribosomal protein L19e [3e-120]
20	12	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	12	Peptidoglycan recognition protein S1S-like [2e-013]

EST データベースを用いた遺伝子探索の結果を示した。各組織 (11 種) 由来の EST の数、全 EST 数、相同性検索の結果をバクテリオーム由来 (MYA/MYB) の EST が多い順に並べた。Bac は大腸菌接種個体、EA/EB は卵、NY は 3-4 齢幼虫、CC は培養細胞、CE は眼とその周辺組織、FB は脂肪体、MG/MH は中腸、OV は卵巣、SG は唾液腺、TE は精巣由来の EST の数を示している。Bac, EA/EB, NY は虫体全体を用いているため、バクテリオームを含んでいる。相同性検索 (BlastX) の結果、E-value が 0.1 以上のものを unknown とした。

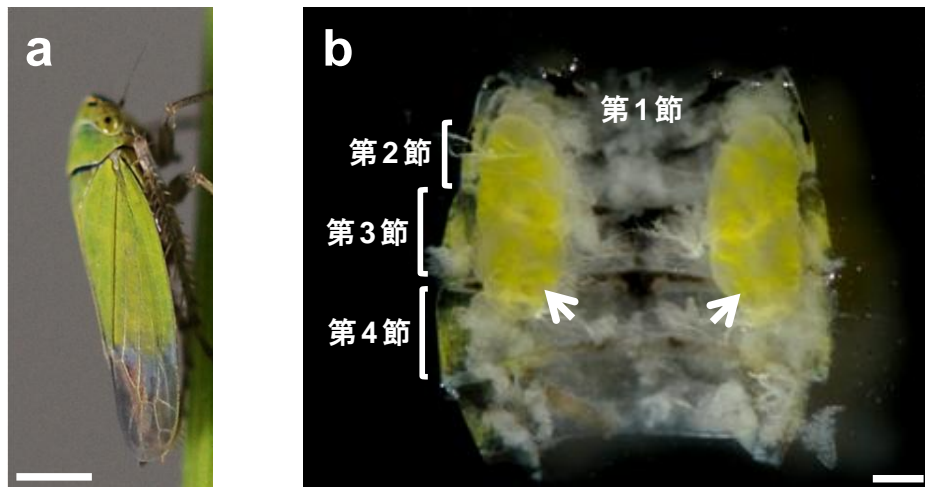


図 1-1. ツマグロヨコバイとそのバクテリオーム

(a) ツマグロヨコバイのメス成虫。Bar = 1 mm。 (b) 腹部内の様子。背側の表皮を取り除き、腹部第1節から第4節を示した。バクテリオーム (黄緑色) を矢印で示している。バクテリオームは腹部の第2節から第4節にかけて存在している。Bar = 0.2 mm。

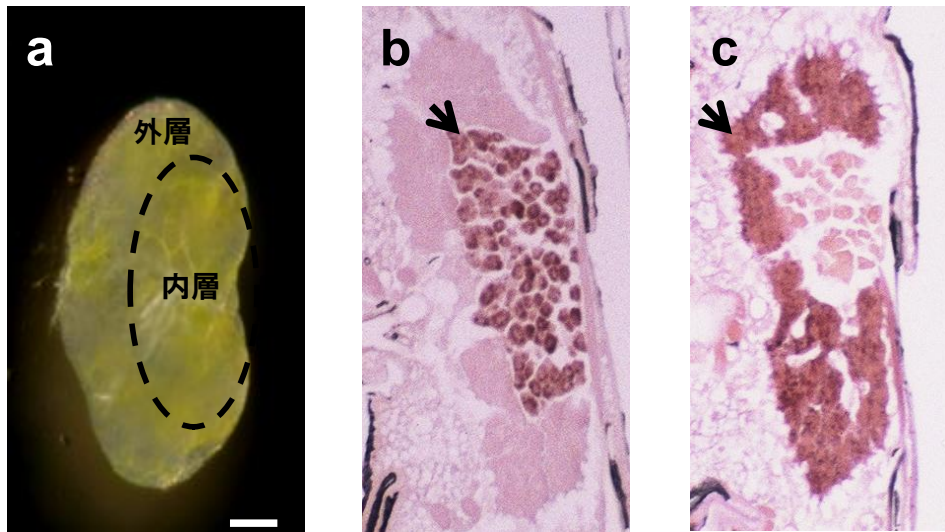


図 1-2. バクテリオームに感染する 2 種類の共生細菌

(a) バクテリオーム。内層と外層の二層構造をしている (模式図)。Bar = 0.1 mm。 (b) *in situ* hybridization による *Nasuia* の局在部位。 (c) *in situ* hybridization による *Sulcia* の局在部位。 *Nasuia* と *Sulcia* の 16S ribosomal RNA をそれぞれ検出した。細菌の局在部位を矢印で示している。 *Nasuia* は内層に、 *Sulcia* は外層に存在している。

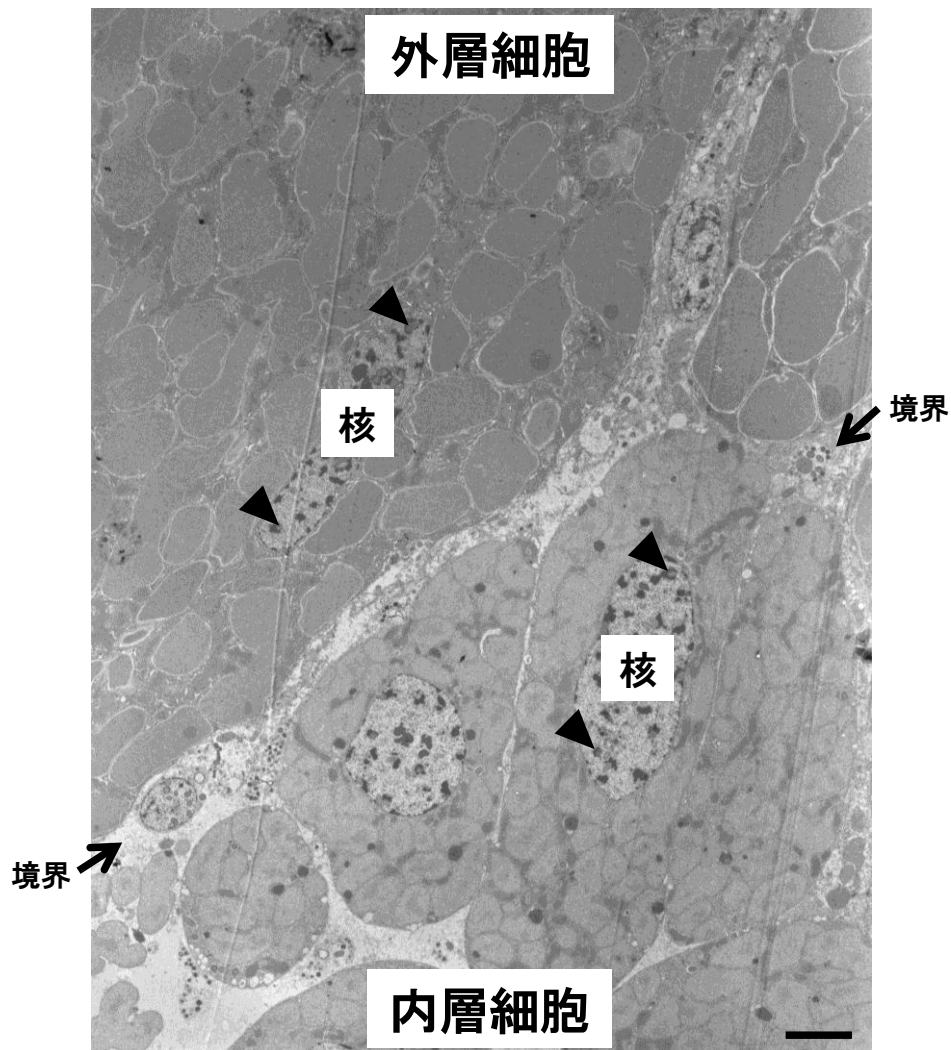


図 1-3. 電子顕微鏡により観察したバクテリオーム内層と外層の境界
バクテリオーム内層と外層の境界が図中の右上から左下であり、境界より下部が内層細胞、上部が外層細胞である。内層細胞には *Nasuia* が、外層細胞には *Sulcia* が感染している。両者は細胞質を埋め尽くしている。内層と外層の細胞の核には *Rickettsia* が感染している (矢尻)。矢印は内層外層の境界を示している。Bar = 5 μm 。

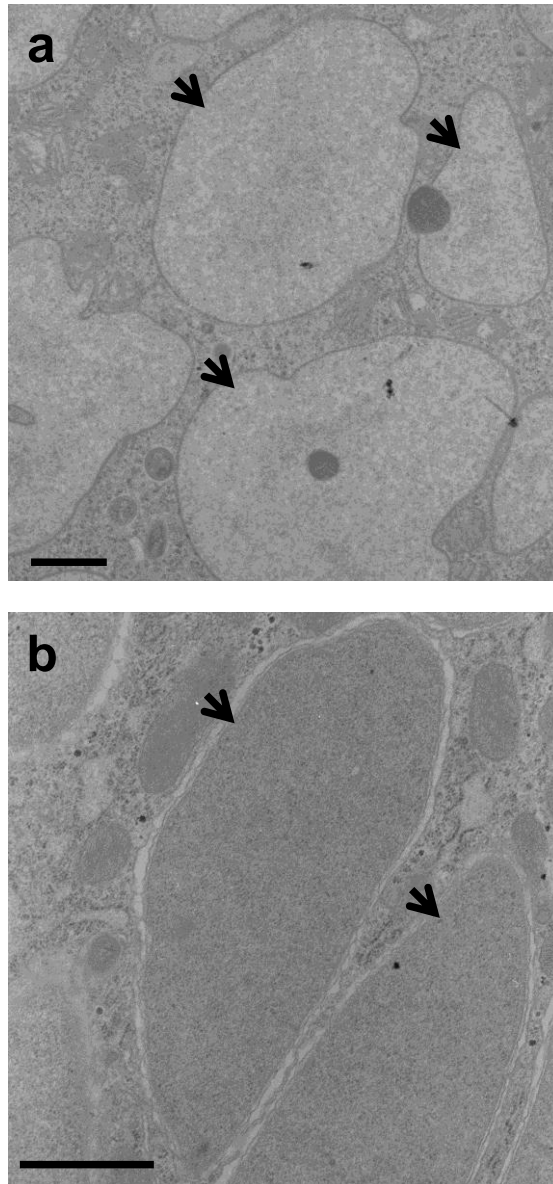


図 1-4. 電子顕微鏡により観察した 2 種類のツマグロヨコバイ共生細菌
(a) *Nasuia*。不定形であり、二重膜構造をしている。(b) *Sulcia*。不定形であり、不明瞭な膜構造をしている。それぞれの細菌を矢印で示した。 Bar = 1 μm 。

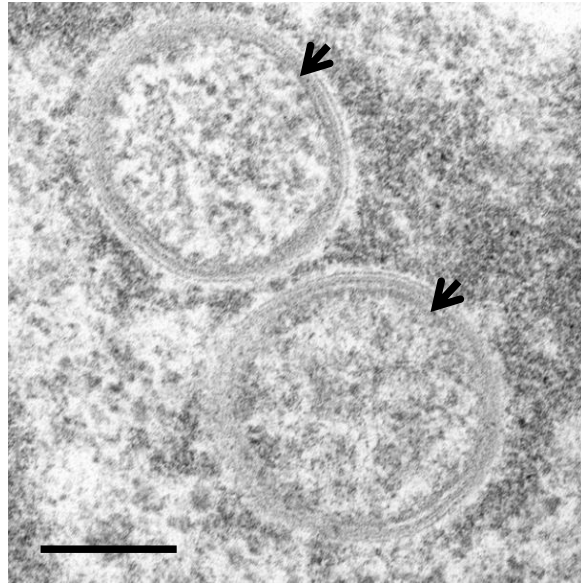


図 1-5. ツマグロヨコバイ共生細菌 *Rickettsia*

電子顕微鏡により観察した核内の *Rickettsia* を示した (矢印)。 Bar = 200 nm。

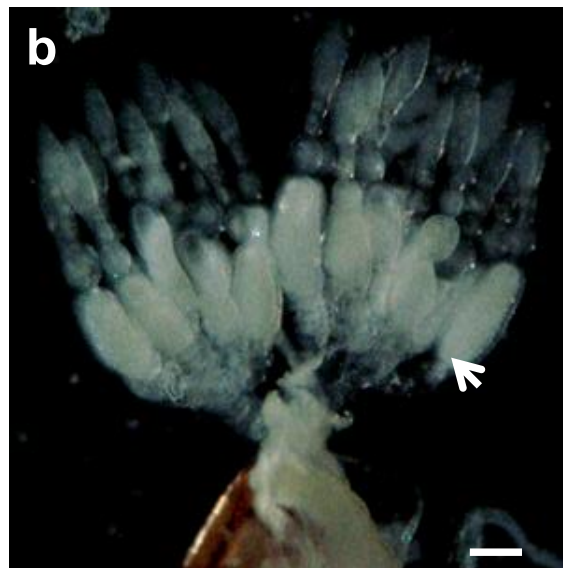
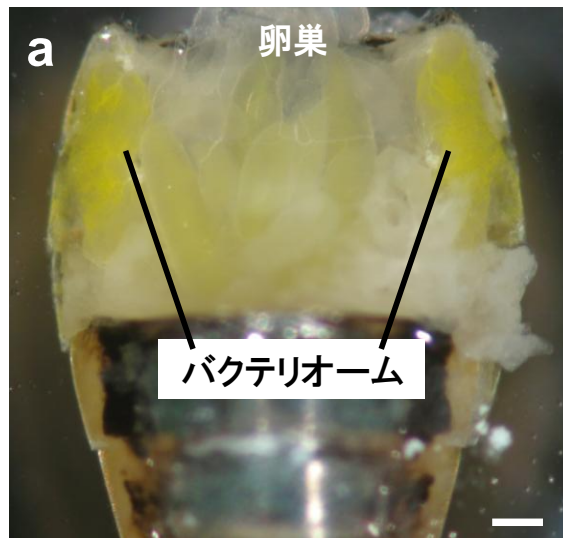


図 1-6. ツマグロヨコバイの卵巣の形態と共生細菌の経卵伝播

(a) 腹部内におけるバクテリオームと卵巣の位置。第 1 節から第 4 節の背側の表皮を取り除いた。卵巣はバクテリオームと隣接している。共生細菌はバクテリオームから卵巣に移動することで経卵伝播する。Bar = 0.2 mm。 (b) 卵巣の形態。左右約 20 本の卵巣小管 (図中の管状の構造) が 2 つの束となり、卵巣を構成している。共生細菌は矢印の位置から卵巣小管に侵入し、球状の構造物 (シンビオントボール) 内に取り込まれる。Bar = 0.2 mm。

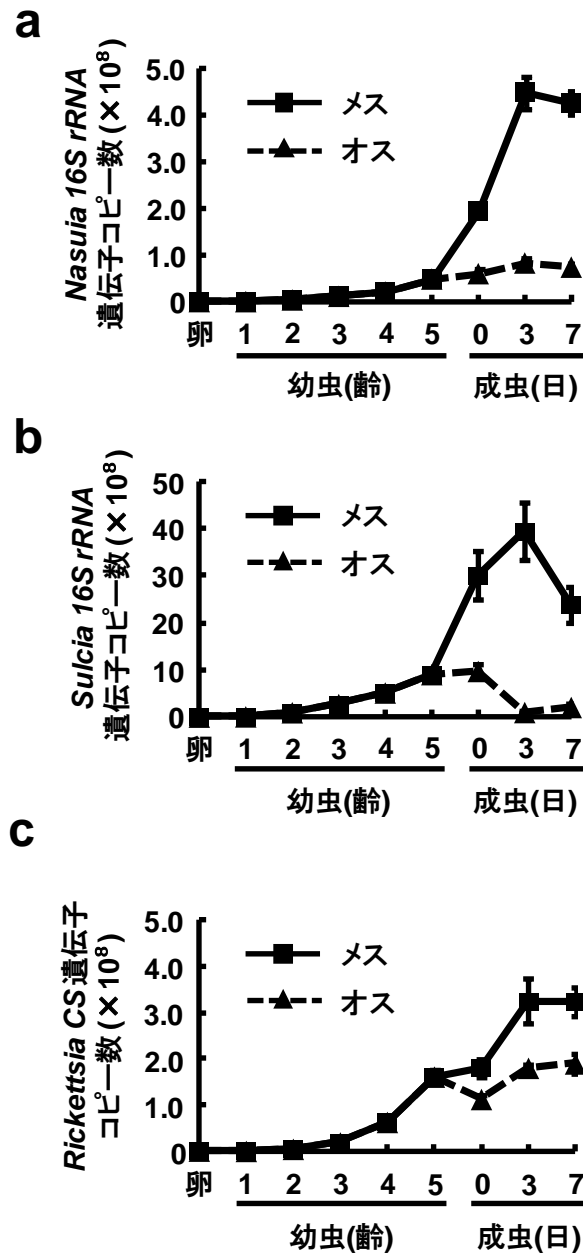


図 1-7. 宿主発育に伴う共生細菌数の変化

ツマグロヨコバイの卵、1-5 齢幼虫、成虫 1 頭あたりの共生細菌の 16S ribosomal RNA (16S rRNA) 遺伝子及び citrate synthase (CS) 遺伝子のコピー数を定量 PCR により測定した。(a) ツマグロヨコバイのステージを通じた *Nasuia* の 16S rRNA 遺伝子のコピー数の変化。(b) *Sulcia* の 16S rRNA 遺伝子のコピー数の変化。(c) *Rickettsia* の CS 遺伝子のコピー数の変化。卵、幼虫の場合、虫体全体 5-20 頭からテンプレートを作製し、成虫では虫体全体 1 頭からテンプレートを作製した。各々独立して作製したテンプレートを使用して 3-5 回の反復実験を行った。エラーバーは標準誤差。

第 2 章 ツマグロヨコバイのペプチドグリカン認識タンパク質遺伝子の発現解析

2-1 緒言

ペプチドグリカン認識タンパク質 (Peptidoglycan recognition protein, PGRP) は、カイコにおいて発見され (Yoshida et al., 1996)、細菌の細胞壁成分であるペプチドグリカン認識して、免疫応答を引き起こす分子である。昆虫は哺乳類のような獲得免疫系は持っていないが、自然免疫系を有しており (Hoffmann, 2003)、PGRP は自然免疫における微生物の認識を担っている。ショウジョウバエやカイコでは病原性細菌に対する感染防御に重要な役割を果たしている。

昆虫が持つ自然免疫は細胞性と体液性のものに分けられる。細胞性免疫としてマクロファージによる貪食や細胞内分解系のオートファジーが知られている (倉田, 2009)。貪食は体液中でマクロファージが微生物を取りこみ、ファゴソームを形成し、これとリソソームが融合することで微生物を分解する作用である。オートファジーは細胞内に侵入した微生物を膜で取り囲み、オートファゴソームを形成し、これにリソソームを融合させることで微生物を分解する作用である。体液性免疫には早期の段階で応答する反応 (一次反応) と遺伝子発現を誘導することで抗菌ペプチドを産生する反応 (二次反応) とがある。一次反応として prophenoloxidase (proPO) カスケードを介したメラニン化が知られている (Eleftherianos and Revenis, 2011)。表皮をメラニン化することで感染部位の傷の修復、微生物の隔離を行う。二次応答として、グラム陰性細菌の侵入により活性化する Imd 経路とグラム陽性細菌や真菌の侵入により活性化する Toll 経路がショウジョウバエで良く知られ (Imler, 2014)、これらの経路が細菌の侵入により活性化されることで、*cecropin*, *attacin*, *diptericin*, *defensin*, *drosomycin*, *drosocin*, *metchnikowin* などの遺伝子の発現が誘導され、抗菌ペプチドが産生される (Ferrandon et al., 2007)。

一方、PGRPにより認識されるペプチドグリカンには細菌のみが保持し、グラム陰性細菌とグラム陽性細菌で構造が異なる。ペプチドグリカンは両者共通の構造のグルカン部と両者で異なる構造のペプチド部がある (Schleifer and Kandler, 1972)。グルカン部は *N*-アセチルグルコサミンと *N*-アセチルムラミン酸が交互に結合することで形成されている。ペプチド部はグラム陰性細菌ではジアミノピメリン酸を含んだ軸ペプチド同士が直接架橋する構造であり (DAP 型ペプチドグリカン)、グラム陽性細菌ではリシンを含んだ軸ペプチド同士がオリゴペプチドにより架橋されている構造である (Lys 型ペプチドグリカン)。

PGRP は昆虫から哺乳類まで保存されており (Kang et al., 1998)、その遺伝子はキイロショウジョウバエで 13 個 (Royet and Dziarski, 2007)、カイコで 12 個、ハマダラカで 7 個見つかっている (Tanaka et al., 2008; Christophides et al., 2002)。ヒトでは 4 個存在している。ショウジョウバエは 13 個の PGRP 遺伝子から、選択的スプライシングなどにより、19 種のタンパク質が作られている (Werner et al., 2000; Werner et al., 2003)。現在、ショウジョウバエの PGRP は遺伝子の転写産物の長さにより Long-type と Short-type に分けられ、Long-type には PGRP-LA, LB, LC, LD, LE, LF が、Short-type には SA, SB1, SB2, SC1a, SC1b, SC2, SD が知られている (Werner et al., 2000; Werner et al., 2003)。キイロショウジョウバエにおいて PGRP の研究が盛んに行われ、細菌の細胞壁成分であるペプチドグリカン認識機能、アミダーゼ活性によりペプチドグリカン分解機能、免疫抑制を行う機能が明らかになってきている (Kurata, 2014)。

グラム陰性細菌を認識する PGRP として膜貫通タンパク質の PGRP-LC が良く知られており、Imd 経路の活性化に関与する (Choe et al., 2002; Ramet et al., 2002; Gottar et al., 2002)。PGRP-LC は細菌の細胞壁成分であるリポ多糖 (LPS) を認識していると考えられていたが (Boutros et al., 2002)、その後の研究により、グラム陰性細菌の DAP 型ペプチドグリカン認識していることが明らかになった (Leulier et al., 2003; Kaneko et al.,

2004)。PGRP-LE もグラム陰性細菌の DAP 型ペプチドグリカン を体液中で認識し、Imd 経路を活性化する (Takehana et al., 2002; Lim et al., 2006)。PGRP-LE は細胞内にも存在し (Kaneko et al., 2006)、細胞内に侵入したリステリア菌の DAP 型ペプチドグリカン を認識し、オートファジーの誘導に関与する (Yano et al., 2008)。このようにグラム陰性細菌感染時の Imd 経路活性化には PGRP-LC 及び PGRP-LE が重要な働きをし、抗菌ペプチド遺伝子 *diptericin* などの発現が誘導される。また、最近まで機能未知であったが PGRP-LA も Imd 経路の活性化に関与していることも明らかになってきた (Gendrin et al., 2013)。

グラム陽性細菌の Lys 型ペプチドグリカン を認識する PGRP として、体液中に存在する PGRP-SA が知られており、Toll 経路の活性化に関与している (Michel et al., 2001; Filipe et al., 2005)。また、PGRP-SD も体液中でグラム陽性細菌を認識し、Toll 経路の活性化に関与している (Bischoff et al., 2004)。Gram-negative binding protein 1 (GNBP1) は Toll 経路の活性化に関与し、PGRP-SA と相互作用をして機能している (Gobert et al., 2003; Pili-Floury et al., 2004)。ただし、GNBP1 は名前とは異なり、グラム陰性細菌の認識を行っていない。また、PGRP-SD は PGRP-SA と GNBP1 との相互作用を促進することが知られている (Wang et al., 2008)。このようにグラム陽性細菌感染時の Toll 経路活性化には PGRP-SA、PGRP-SD、GNBP1 が重要な働きをし、抗菌ペプチド遺伝子 *drosomycin* などの発現が誘導される。

昆虫の PGRP はバクテリオファージ T7 (Enterobacteria phage T7) の lysozyme と相同性があることが知られており (Steiner, 2004)、元々は アミダーゼ活性を有していたと考えられている。このうちのいくつかはアミダーゼ活性を失い、認識タンパク質になったと考えられている。アミダーゼ活性を失わなかった PGRP として LB, SB1, SC1a, SC1b, SC2 が知られている (Zaidman-Remy et al., 2006; Mellroth and Steiner, 2006; Bischoff et al., 2006)。これらの PGRP は *N*-アセチルムラミン酸-Lアラニンアミダーゼ活性を持ち、ペプチドグリカンのグルカン部とペプチド部の結合部を切断する。この切断により免疫応

答を引き起こすペプチドグリカンを分解することで昆虫自身に対する過剰免疫を防いでいると考えられている。

また、アミダーゼ活性を持たず、免疫抑制に働く **PGRP** として、**PGRP-LF** が知られている。このタンパク質はショウジョウバエの **PGRP** の中で唯一 2 つの **PGRP** ドメインを持ち、膜貫通領域を有し (Basbous et al., 2011)、**Imd** 経路の活性を抑制することが知られている (Maillet et al., 2008)。

第 1 章でツマグロヨコバイにおいてバクテリオームで特異的に発現することが予想される遺伝子を探索した結果、**PGRP** と相同性のある遺伝子が上位 20 個の遺伝子の中に 3 個存在した。免疫応答に関わる **PGRP** がバクテリオームで高発現していると考えられるところから、ツマグロヨコバイの **PGRP** 遺伝子がどのように共生現象に関わっているかを調査することにした。これらの遺伝子の発現組織を調査し、抗生物質を処理することで共生細菌数が減少した個体の **PGRP** 遺伝子発現量変化を調べた。また、大腸菌接種個体及び *Rickettsia* 感染個体における **PGRP** 遺伝子発現量変化を調査した。本章ではツマグロヨコバイの **PGRP** 遺伝子と共生細菌及び免疫応答との関係を明らかにしようとした。

2-2 材料及び方法

バクテリオームで特異的に発現する *PGRP* 遺伝子の探索

研究を開始した 2008 年 4 月の時点で、ツマグロヨコバイの EST データベースを構築中であり、1,722 個の培養細胞由来 EST クローン (ライブラリ名は CCA/CCB)、4,715 個の卵巣由来 EST クローン (ライブラリ名は OV)、3,313 個の精巣由来 EST クローン (ライブラリ名は TE)、8,598 個の唾液腺由来 EST クローン (ライブラリ名は SGA/SGB/SGC)、3,518 個のバクテリオーム由来 EST クローン (ライブラリ名は MYA/MYB)、総計 21,866 個の EST クローンをもとにクラスタリングを行った。クラスタリングには CLOBB プログラムを用い、50 bp, >95% の条件で行った。同一と判別された EST クローンを同一クラスターに分類することにより、約 6,700 クラスターを得た。6,700 クラスター (遺伝子) から、以下の 2 つの条件でバクテリオーム特異的に発現することが予想される遺伝子を選抜した。(1) バクテリオーム由来 EST クローンが 5 個以上かつバクテリオーム以外の組織の EST クローンがない。(2) バクテリオーム由来 EST クローンが 10 個以上かつバクテリオーム以外の組織の EST クローンが 1-2 個ある。選抜した遺伝子の核酸配列の相同性検索を行い (tBlastX, NCBI, <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)、*PGRP* 遺伝子と相同性のある遺伝子を選抜した。なお、第 1 章では 41,536 クローンを対象に解析したが、ここでは 21,866 クローンの解析から得られた結果をもとに研究を開始している。

ツマグロヨコバイ *PGRP* 遺伝子の全長配列解析

羽化 3 日齢のメス成虫からバクテリオームを取り出し、RNeasy Mini Kit (Qiagen) を用いて total RNA を抽出した。3' rapid amplification cDNA ends (RACE) に用いる cDNA は SuperScript II RNase H—Reverse Transcriptase (Invitrogen) により合成した。3' RACE における first PCR 及び second PCR は SMART™ RACE cDNA Amplification Kit (Clontech) 及び TaKaRa Ex Taq (Takara) を用いて行った。得られた PCR 産物は Sephacryl S-300 High

Resolution (GE Healthcare) を用いてゲルろ過した。5' RACE も 3' RACE と同様に行ったが、5' CDS プライマー (Clontech) を加えて、cDNA 合成を行った。5' RACE を行った一部の遺伝子において、上記の方法では全長配列が得られなかったため、5' RACE System for Rapid Amplification of cDNA Ends (Invitrogen) を用いてさらに 5' RACE を行った。用いたプライマーは補足表 2, 3 に示した。

DNA Ligation Kit (Takara) を用いて、3' RACE 及び 5' RACE で得られた PCR 産物を pGEM-T vector (Promega) に組み込んだ。ライゲーション反応液をコンピテントセル (DH5 α 大腸菌) 液に加え、形質転換を行った。*Tfi* DNA Polymerase (Invitrogen) を用いて、形質転換させた大腸菌のコロニーPCR を行った。電気泳動後、BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) を用いて、コロニーPCR 産物のシーケンス反応を行い、DNA 配列解析には Applied Biosystems 3730xl DNA Analyzer (Applied Biosystems) を用いた。

全長配列解析により遺伝子の ORF を得た後、BioEdit (フリーソフト) により各遺伝子のアミノ酸配列を予想した。ツマグロヨコバイの 18 個の *PGRP* 遺伝子を構成 EST 数の多い順に番号を付け、*NcPGRP1-18* とした。構成 EST 数が同じ場合はアミノ酸配列の長い順に番号を付けた。*PGRP* ドメイン配列を Werner et al., (2000) の論文を参考にし、推定した。シグナル配列予測を SignalP 4.1 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) と Phobius (<http://phobius.sbc.su.se/>) を用いて行った。膜貫通領域予測は TMHMM ver. 2.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>) と Phobius を用いた。

PGRP のドメイン構造と系統関係

アミノ酸配列比較にはツマグロヨコバイの *PGRP* を 18 個、ショウジョウバエの *PGRP* を 14 個、ハマダラカ、セイヨウミツバチ、カイコ、ツエツエバエ、コクゾウムシ、コクヌストモドキの典型的な *PGRP* を 2-4 個選び、合計 48 配列を用いた。これらの *PGRP*

アミノ酸配列のマルチプルアラインメントを ClustalX version 1.83 (フリーソフト) により行い、次に、BioEdit を用いて配列の補正を行った。

また、PGRP の機能を推定するために、PGRP と相同性のある *Enterobacteria phage T7 lysozyme* (T7 lysozyme) とツマグロヨコバイの PGRP のアミノ酸配列を比較した。T7 lysozyme、ツマグロヨコバイの PGRP を 18 個、ショウジョウバエの PGRP を 14 個用い、ClustalX version 1.83 (フリーソフト) によりこれらの PGRP アミノ酸配列のマルチプルアラインメントを行った。次に、BioEdit を用いて配列を補正した。

系統樹作成にはツマグロヨコバイの PGRP アミノ酸配列 18 個、ショウジョウバエ 14 個、その他昆虫 2-12 個、外群としてのマダニ 1 個、合計 65 配列を用いた。これらの PGRP アミノ酸配列を ClustalX version 1.83 によりアラインメントした。BioEdit を用いて配列を補正し、最終的に、ギャップも含まれている 164 残基のアミノ酸配列を用いた。MEGA version 4.1 を用いて Neighbor-Joining 法 (NJ) による解析で系統樹を作成した。NJ 法に基づく系統樹の信頼性を調べるためにブートストラップ検定法を用いて 1,000 回反復を行い、そのブートストラップ値を算定した。1,000 回反復のうち 500 回以上反復されたものを図に記した。PGRP のアミノ酸配列の accession number は補足表 4 に示した。カイコの PGRP のアミノ酸配列は Tanaka et al., (2008) の論文から得た。

ツマグロヨコバイ PGRP 遺伝子の組織別発現解析

羽化 3 日齢のメス成虫及びオス成虫の各組織を用いて、PGRP 遺伝子の組織別 RT-PCR を行った。5 齢幼虫を 1 頭ずつイネ芽出し入り試験管に入れ、羽化 3 日齢まで飼育した。羽化 3 日齢のメス成虫から頭部、胸部、腹部、腸、卵巣、バクテリオーム及び羽化 3 日齢のオス成虫の精巣、バクテリオームの計 8 組織を取り出し、RNeasy Mini Kit を用いて total RNA を抽出した。なお、腹部は腸とバクテリオームを除いたものを用いた。

バクテリオームから抽出した total RNA 溶液は 8 頭分であり、他の組織は 5 頭分であ

った。各組織 200 ng 分の total RNA を SuperScript II RNase H—Reverse Transcriptase を用いて逆転写した。逆転写反応で得られた cDNA 溶液を滅菌水で 10 倍に希釈した。この cDNA 2 ng 相当分をテンプレートとして、TaKaRa Ex Taq を用いて PCR を行った。PCR 反応液は 95°C で 1 分間保温後、95°C 30 秒、54–60°C 30 秒、72°C 1 分 30 秒のサイクルを 30–35 回反復した。最後に、72°C で 5 分間反応させ、RT-PCR 産物を 2% アガロースゲルで電気泳動した。コントロールとして *ribosomal protein L10 (RpL10)* 遺伝子を用いた。組織別 RT-PCR で用いたプライマーは補足表 5 に示した。

ツマグロヨコバイ *PGRP* 遺伝子の時期別発現量変化

PGRP 遺伝子のステージ別定量 RT-PCR を行った。産卵後 5–7 日の卵を 50 個、1 齢 0 日齢の幼虫を 30 頭、2 齢 0 日齢の幼虫を 20 頭、3–5 齢 0 日齢の幼虫を 10 頭、羽化 0, 3, 7 日齢のメス成虫を 5 頭、羽化 0, 3, 7 日齢のオス成虫を 5 頭ずつ採取し、卵は虫体全体から、幼虫と成虫は腹部から RNeasy Mini Kit を用いてそれぞれ total RNA を抽出した。各齢から抽出した total RNA 100 ng を PrimeScript RT reagent Kit (Perfect Real Time, Takara) を用いて逆転写した。5 ng 相当分の cDNA をテンプレートとして、LightCycler480 SYBR Green I Master を用いて定量 RT-PCR を行った。定量 RT-PCR の標準化コントロールとして *elongation factor 1 α (NcE1 α)* 遺伝子と *ribosomal protein L10 (NcRpL10)* 遺伝子を用いた。各々独立して作製したテンプレートを使用して 3 回の反復実験を行った。定量 RT-PCR に用いたプライマーを補足表 6 に示した。

ツマグロヨコバイ *PGRP* のタンパク質発現部位

羽化 3 日齢のメス成虫の頭部、胸部、腹部第 1–4 節、腹部第 5 節以降、バクテリオームを用いて組織別ウェスタンブロッティングを行った。各組織 10 頭分を 1% の Triton X-100 が入った 1×PBS buffer 300 μ l に入れ、ペッスルですり潰した。超音波破碎後、3,000

rpm 4°C で 5 分間遠心を行い、上清を回収した。得られた上清 250 µl に 2×sample buffer (0.1M Tris-HCl, 4% SDS、12% βメルカプトエタノール、20%グリセロール、0.005% Bromophenol blue) 250 µl を加え、95°C で 5 分間処理した。得られた溶液をタンパク質サンプルとした。

15 µl のタンパク質サンプルを用いて、12.5%アクリルアミドゲル (e-PAGEL E-T12.5L, ATTO) で SDS-PAGE を行った。泳動後、メタノールに浸漬しておいた PVDF メンブレン (GE Healthcare) にゲルのタンパク質を転写した。転写は 15V で 30 分間行った。転写後のメンブレンに対して ECL Blocking reagents (GE Healthcare) を用いて室温で 1 時間ブロッキング処理を行った。ブロッキング処理後、1,000 倍に希釈した抗 NcPGRP12 抗体にメンブレンを 4°C で一晩浸漬した。一次抗体処理後、TBS-Tween buffer で 10 分間の洗浄を 5 回行い、2,000 倍に希釈した抗マウス IgG 抗体 [Anti-IgG (H+L chain) (Mouse) pAb-HRP, MBL] にメンブレンを 1 時間浸した。二次抗体処理後、TBS-Tween buffer で 5 分間の洗浄を 5 回行った。HistoMark TrueBlue Peroxidase System (KPL) を用いてシグナルの検出を行った。NcPGRP12 抗体の作製には、大腸菌に発現させたタンパク質 (アミノ酸配列全長) を抗原とした。pET42a 発現ベクターを用い、BL21 大腸菌で発現させ、精製には His-tag を利用した (His Bind Kits, Novagen)。これをマウスに注入してポリクローナル抗体を作製した (北山ラベス)。

抗生物質処理個体における PGRP 遺伝子発現量変化

1. 抗生物質処理

メス 30 頭とオス 30 頭を芽出しイネ入りの瓶に入れた。入れてから 9 日後に瓶中の全てのヨコバイを除去し、その翌日に 1 齢 0 日齢の幼虫を得た。試験管に約 0.4 g の綿を詰め、0.05%抗生物質溶液を 2 ml 加え、イネの芽出しを育てた。この抗生物質で育てたイネの芽出しを餌として幼虫を 1 齢 0 日齢から 5 齢 0 日齢まで飼育した。餌替えは 5-7

日間隔で行った。

2. 抗生物質処理個体における共生細菌数の測定

抗生物質処理個体 (5 齢 0 日齢の幼虫) 虫体全体 から DNeasy Blood & Tissue Kit を用いて DNA を抽出し、DNA 溶液 100 μ l を得た。抽出した DNA 溶液を 10 倍希釈し、この希釈 DNA 溶液 5 μ l をテンプレートとして LightCycler 480 SYBR Green I Master を用いて定量 PCR を行った。*Nasuia* 及び *Sulcia* の *16S ribosomal RNA (16S rRNA)* 遺伝子、*Rickettsia* の *citrate synthase (CS)* 遺伝子のコピー数を測定した。12 頭から個別にテンプレートを作製した。

3. 抗生物質処理個体における *PGRP* 遺伝子の発現量測定

抗生物質処理個体 (5 齢 0 日齢の幼虫) の腹部第 1–4 節 5 頭分 から RNeasy Mini Kit を用いて total RNA を抽出した。抽出した total RNA 100 ng を PrimeScript RT reagent Kit (Perfect Real Time) を用いて逆転写した。5 ng 相当分の cDNA をテンプレートとして、LightCycler480 SYBR Green I Master を用いて定量 RT-PCR を行った。定量 RT-PCR の標準化コントロールとして *elongation factor 1 α (NcEf1 α)* 遺伝子を用いた。各々独立して作製したテンプレートを使用して 3 回の反復実験を行った。定量 RT-PCR に用いたプライマーを補足表 6 に示した。

ツマグロヨコバイ *PGRP* 遺伝子の網羅的探索

ツマグロヨコバイにおける *PGRP* 遺伝子の総数を調査した。ツマグロヨコバイ cDNA EST データベース (41,536 本) の中で、ショウジョウバエの 13 個の *PGRP* と相同性のある全ての EST クローンを選抜した。EST の長さや配列の部位によってはツマグロヨコバイの *PGRP* と他昆虫の *PGRP* との相同性があまり高くないものも存在したため、

E-value が 10 以下のものを選抜した。この相同性検索には BioEdit の in house Blast (tBlastN) を用いた。選抜した 487 個の EST クローンの BlastX 解析 (non-redundant protein sequence, NCBI) により PGRP との相同性を確認し、447 個の EST クローンをさらに選抜した。この 447 個の EST クローンのクラスタリングを Genetyx ATSQ ver. 5.1 (matching percentage 90%, minimum matching number 50) と CLOBB プログラム (95% identity, 50 bp coverage) により行い、PGRP 遺伝子を得た。

ツマグロヨコバイでは虫体全体の RNA-Seq (RNA sequencing) 解析データが得られており、RNA-Seq 解析データからも PGRP 遺伝子の総数を調査した。Trinity (<http://trinityrnaseq.sourceforge.net/>) による de novo assembly の結果、average length 1,115 bp、median length 456 bp の 102,723 個の contig 配列が得られた。BioEdit の in house Blast により、この中で、ショウジョウバエの 13 個の PGRP と相同性のある全ての contig 配列 (E-value が 10 以下) を選抜した。選抜した 572 個の contig 配列の BlastX 解析 (non-redundant protein sequence, NCBI) により PGRP との相同性を確認し、さらに 554 個の contig 配列を選抜した。この 554 個の contig 配列の中から isoform や paralog などを除き、独立した遺伝子を選抜した。網羅的探索に用いたショウジョウバエの PGRP アミノ酸配列の accession number は補足表 4 に示した。

大腸菌接種個体における免疫応答と PGRP 遺伝子発現量変化

1. マイクロインジェクション

マイクロインジェクションには glass capillary tube (DG-1, Narishige) を用いた。glass capillary tube を glass capillary puller (Narishige) で引き延ばして針状にした。液体を注入した glass capillary tube を manipulator model MYN-1 (Narishige) に装着した。マイクロインジェクションを行う前に、ツマグロヨコバイを氷上で 15 分間麻酔した。針状の glass capillary tube をヨコバイの胸部と腹部の間の節間膜に挿入した。液体の注入には

Transjector 5246 (Eppendorf) を用いた。およそ 0.03 μl の液体を虫体に注入した。

2. 大腸菌接種個体における抗菌ペプチド遺伝子 *defensin* の発現量測定

ツマグロヨコバイの免疫応答を調べるために、抗菌ペプチド遺伝子 *defensin* 発現量を定量 RT-PCR により測定した。大腸菌 (DH5 α) を 3 ml の液体 LB 培地で 12 時間培養した。培養後、3,000 rpm 室温で 5 分間遠心した。上清を除去し、1 ml の滅菌水を加えた。大腸菌濃度は 4.97×10^9 /ml であった。この大腸菌液を 100 倍希釈し、 -80°C で急速冷凍した後、室温で急速解凍した。そして、 1.5×10^3 相当の大腸菌を羽化 1 日齢のメス成虫に注入した。注入操作に必要な器具は洗浄後 70% アルコールで消毒してから用いた。大腸菌注入 3, 6, 12, 24, 48 時間後の 5 頭分の腹部から RNeasy Mini Kit を用いて total RNA を抽出した。この total RNA 400 ng を PrimeScript RT reagent Kit (Perfect Real Time) を用いて逆転写した。20 ng 相当分の cDNA をテンプレートとして、LightCycler480 SYBR Green I Master を用いて定量 RT-PCR を行った。定量 PCR の標準化コントロールとして *elongation factor 1 α* (*NcEfl α*) 遺伝子を用いた。各々独立して作製したテンプレートを使用して 3 回の反復実験を行った。定量 RT-PCR に用いたプライマーを補足表 6 に示した。

3. 大腸菌接種個体における *PGRP* 遺伝子の発現量測定

羽化 1 日齢のメス成虫に 1.5×10^3 の大腸菌を注入した。注入 3 時間と 12 時間後の 5 頭分の腹部から RNeasy Mini Kit を用いて total RNA を抽出した。各々独立して作製したテンプレートを使用して注入 3 時間後では 3 回、注入 12 時間後では 4 回の反復実験を行った。抽出した total RNA を用いてマイクロアレイ解析を行った。

4. マイクロアレイ解析

ツマグロヨコバイ DNA マイクロアレイには、実験用プローブ 15,118 個、補正等のプ

プローブ 60 個、コントロール用プローブ 356 個、合計 15,208 個のプローブを搭載した (Agilent Technologies 社製の 8×15K マイクロアレイ)。プローブはツマグロヨコバイ cDNA EST データベース (当時 38,363 本) に基づいて設計されている。9,180 個の遺伝子のうち、1 つのプローブが設計されている遺伝子が 3,242 個、2 つのプローブが設計されている遺伝子が 5,938 個である。

Total RNA からの cDNA 合成及び cRNA 合成には、Quick Amp Labeling Kit (Agilent Technologies) を用い、そのプロトコールに従った。Total RNA 400 ng を Nuclease-free water (DNase/RNase-Free water, Invitrogen) に加えて 2.55 μ l とし、これに T7 Promoter Primer 1.2 μ l と Spike-in Control 2 μ l を加えた。この混合液を 65°C で 10 分間静置した後、氷上で 5 分間冷却した。逆転写を行うために、cDNA 合成マスターミックス 4.25 μ l (5×First Strand Buffer 2 μ l, 0.1 M DTT 1 μ l, 10 mM dNTP Mix 0.5 μ l, MMLV-RT 0.5 μ l, RNase inhibitor 0.25 μ l) を加え、40°C で 2 時間インキュベートした。cDNA 溶液を 65°C に 15 分間置いて反応を停止させた後、氷上で 5 分間冷却した。次に、10 mM Cyanine3 CTP (Cy3) あるいは Cyanine5 CTP (Cy5) 1.2 μ l を加えた。転写反応を行うために、cRNA 合成マスターミックス 28.8 μ l (Nuclease-free water 7.65 μ l, 4×Transcription Buffer 10 μ l, 0.1 M DTT 3 μ l, NTP Mix 4 μ l, 50% PEG 3.2 μ l, RNase inhibitor 0.25 μ l, Inorganic Pyrophosphatase 0.3 μ l, T7 RNA Polymerase 0.4 μ l) を加え、40°C で 2 時間インキュベートし、蛍光標識した cRNA を合成した。合成した cRNA を RNeasy Mini Kit を用いて精製し、Nuclease-free water 60 μ l、Buffer RLT 350 μ l、99.5% エタノール 250 μ l を加えてピペッティングし、カラムに添加した。以後の操作は total RNA 抽出と同様に行った。抽出した cRNA 溶液を吸光度により濃度測定した。ハイブリダイゼーションには、*In situ* hybridization Kit Plus (Agilent Technologies) を用いた。Cy3 で標識した cRNA 溶液 300 ng 相当分と Cy5 で標識した cRNA 溶液 300 ng 相当分を Nuclease-free water に加え、19 μ l とした。これに 10×Blocking Agent 5 μ l と 25×Fragmentation Buffer 1 μ l を加え、ボルテッ

クスで混合し、60°C で 30 分間インキュベートした。断片化した cRNA 溶液に 2×hybridization buffer 25 µl を加え、ピペッティングし、この溶液 50 µl をハイブリチャンバーに充填した。65°C で 17 時間インキュベートすることでマイクロアレイ上のプローブと cRNA をハイブリダイゼーションさせた。洗浄には Gene Expression Wash Buffer Kit (Agilent Technologies) を用いた。0.005% の Triton X-102 が入った Wash Buffer 1 内でマイクロアレイスライドを取りだし、新しい同 buffer を用いて室温で 1 分間洗浄した。次に、0.005% の Triton X-102 が入った Wash Buffer 2 を用いて 37°C で 1 分間洗浄した。DNA Microarray Scanner (Agilent Technologies) により蛍光シグナルを検出後、Feature Extraction ソフトウェア (v9.5, Agilent Technologies) により解析した。さらに、GeneSpring (GX) ソフトウェア (v9, Agilent Technologies) でデータを解析した。

Rickettsia 感染個体における *PGRP* 遺伝子発現量変化

Rickettsia 感染個体の遺伝子発現量変化を網羅的に調べるために、マイクロアレイ解析を行った。*Rickettsia* 感染個体 (筑後系統) と *Rickettsia* 非感染個体 (筑後系統) の羽化 1 日齢のメス成虫を供試した。解剖により頭胸部と腹部に分け、頭胸部を用いて *Rickettsia* 感染の有無を調べ、腹部から total RNA を抽出した。頭胸部を STE buffer [100 mM NaCl, 1 mM EDTA (pH8.0), 10 mM Tris-HCl (pH8.0)] 200 µl 中で、ペッスルを用いてすり潰した。15,000 rpm 室温で 3 分間遠心後、190 µl の上清を回収した。上清に 10 µl の 2% proteinase K を加え、37°C で 30 分間インキュベートした後、95°C に 3 分間静置した。抽出した DNA をテンプレートとして *Rickettsia* 特異的プライマーにより PCR を行い、*Rickettsia* 感染の有無を調べた。Total RNA を腹部 5 頭分から RNeasy Mini Kit を用いて抽出した。抽出した total RNA を用いてマイクロアレイ解析を行った。各々独立して作製したテンプレートを使用して 4 回の反復実験を行った。*Rickettsia* 特異的プライマーは補足表 7 に示した。

dsRNA 注入のツマグロヨコバイへの影響

1. 二本鎖 RNA (dsRNA) 合成

dsRNA 領域を増幅するために、TaKaRa Ex Taq を用いて PCR を行った。テンプレート cDNA は 3' RACE を行う際に作製したものをを用いた。PCR 産物を pGEM-T Vector にライゲーションし、大腸菌を形質転換させ、コロニーPCR、シーケンス反応を行った。目的の配列を持った大腸菌のコロニーから Wizard Plus Minipreps DNA Purification System (Promega) を用いてプラスミドを抽出した。EGFP 遺伝子と NcPGRP1 遺伝子の dsRNA 領域はベクターに逆向きに挿入されていた。抽出したプラスミドを用いて PCR を行い、dsRNA 合成用のテンプレートを作製した。ベクターの T7 側に設計して 5' 側に T7 プロモーター配列を付加した RNAi 用プライマー (RNAi_forward プライマー) と増幅すべき遺伝子特異的プライマー及びベクターの SP6 側に設計して 5' 側に T7 プロモーター配列を付加した RNAi 用プライマー (RNAi_reverse プライマー) と増幅すべき遺伝子特異的プライマー、この 2 通りの組み合わせで PCR を行った。実際の組み合わせは以下の通りであった。EGFP 遺伝子は RNAi_forward プライマーと dsEGFP_forward プライマー、RNAi_reverse プライマーと dsEGFP_reverse プライマーであり、NcPGRP1 遺伝子は RNAi_forward プライマーと dsPGRP1_forward プライマー、RNAi_reverse プライマーと dsPGRP1_reverse プライマーであり、NcPGRP12 遺伝子は RNAi_forward プライマーと dsPGRP12_reverse プライマー、RNAi_reverse プライマーと dsPGRP12_forward プライマーであった。dsRNA 領域増幅に用いたプライマーを補足表 8 に示した。

次に、PCR 産物をエタノール沈殿処理した。PCR 産物 50 µl に対して、100%エタノール 125 µl、3 M Sodium acetate 5 µl を加え、ボルテックスで混合後、-80°C で 1 時間静置した。15,000 rpm 4°C で 20 分間遠心した後、上清を除去し、70%エタノール 350 µl を加えた。15,000 rpm 4°C で 10 分間遠心した後、上清を除去し、室温で乾燥させた。

エタノール沈殿後、RNase free water 50 μ l で DNA を溶解し、濃度を測定した。溶解した DNA を鋳型とし、T7 RiboMax Express RNAi System (Promega) を用いて、dsRNA を合成した。dsRNA 合成方法を以下に示した。

鋳型 DNA 1 μ g 相当分を RNase free water に加え、合わせて 8 μ l とした。RiboMAX 2 \times Buffer 10 μ l と Enzyme Mix 2 μ l を加え、20 μ l の転写反応液を作製し、37 $^{\circ}$ C で 30 分間静置した。転写反応液を 15 倍希釈し、混合した。混合液を 1.5 ml エッペンドルフチューブに 300 μ l ずつ分注し、70 $^{\circ}$ C で 10 分間加熱した後、室温に 30 分間静置し、一本鎖 RNA をアニーリングさせ、dsRNA を作製した。等量のイソプロパノールを加え、-80 $^{\circ}$ C で 1 時間静置し、15,000 rpm 4 $^{\circ}$ C で 20 分間遠心した。上清を除去し、室温で乾燥させた後、RNase free water 43 μ l で RNA を溶解し、dsRNA 溶液とした。次に、RNase A Solution 1 μ l, DNase I (Takara) 1 μ l, 10 \times DNaseI Buffer 5 μ l を加え、DNase 及び RNase 処理を行った。dsRNA 溶液をエタノール沈殿処理後、RNase free water 50 μ l で溶解し、濃度測定し、電気泳動によりバンドを確認した。また、RNAi 実験のコントロールとして用いるために *EGFP* 遺伝子の dsRNA も同様に作製した。

2. *NcPGRP1* 遺伝子と *NcPGRP12* 遺伝子の機能解析

2,000 ng/ μ l の dsRNA を羽化 0 日齢のメス成虫の胸部と腹部の間の節間膜に 0.03 μ l 注入した。虫体に注入された dsRNA は約 60 ng であった。

RNAi の対象とした *NcPGRP1* 遺伝子と *NcPGRP12* 遺伝子の mRNA 量は以下のように測定した。dsRNA 注入 1, 3, 7 日後の腹部第 1-4 から RNeasy Mini Kit を用いて total RNA を抽出した。この total RNA 100 ng を PrimeScript RT reagent Kit (Perfect Real Time) を用いて逆転写した。5 ng 相当分の cDNA をテンプレートとして、LightCycler480 SYBR Green I Master を用いて定量 RT-PCR を行った。定量 PCR の標準化コントロールとして *elongation factor 1 α* (*NcEfl α*) 遺伝子を用いた。10 頭の処理虫から個別に RNA を抽出し、

それぞれに RT-PCR を 1 回ずつ行った。

RNAi 個体の共生細菌数を以下のように測定した。dsRNA 注入 1, 3, 7 日後の虫体全体から DNeasy Blood & Tissue Kit を用いて DNA を抽出し、DNA 溶液 50 μ l を得た。抽出した DNA 溶液を 20 倍希釈し、この希釈 DNA 溶液 5 μ l をテンプレートとして LightCycler 480 SYBR Green I Master を用いて定量 PCR を行った。*Nasuia* 及び *Sulcia* の *16S ribosomal RNA (16S rRNA)* 遺伝子、*Rickettsia* の *citrate synthase* 遺伝子のコピー数を測定した。12 頭から個別にテンプレートを作製し、定量 PCR を行った。

3. dsRNA 注入のツマグロヨコバイへの影響

ツマグロヨコバイの胸部と腹部の間の節間膜に 0.03 μ l の dsRNA 溶液を注入し、注入 24 時間以内に死亡した個体はとり除いた。幼虫期間の調査には正常に羽化あるいは脱皮した個体のみを用いた。

5 齢 1 日齢の幼虫に対して dsRNA を注入した。RNAi の対象とした *NcPGRP12* 遺伝子の mRNA 量は以下のように測定した。注入 3 日後に腹部第 1-4 節から RNeasy Mini Kit を用いて total RNA を抽出した。この total RNA 100 ng を PrimeScript RT reagent Kit (Perfect Real Time) を用いて逆転写した。5 ng 相当分の cDNA をテンプレートとして、LightCycler480 SYBR Green I Master を用いて定量 RT-PCR を行った。定量 RT-PCR の標準化コントロールとして *elongation factor 1 α (NcEf1 α)* 遺伝子を用いた。3 頭から個別に定量 RT-PCR のテンプレートを作製した。

2-3 結果

ツマグロヨコバイの 18 種の PGRP 遺伝子

研究開始当初、ツマグロヨコバイ cDNA EST データベースは構築中であり、21,866 個のクローンを有していた。この cDNA EST をクラスタリングした後、バクテリウムで高発現かつ特異的に発現する PGRP 遺伝子を探索した。その結果、PGRP と相同性のある遺伝子を 18 個見出した (表 2-1)。それぞれ 3' RACE 及び 5' RACE により全長配列を得た。その結果、これらの遺伝子は 160-300 程度のアミノ酸をコードしており、全てが PGRP ドメイン構造 (通常約 160 残基からなる) を保持していた。多くの NcPGRP は開始メチオニンより 10-20 残基後にドメイン構造が始まり、ほぼ全長がドメイン構造と推定された。しかし、C 末端側の配列は保存性が低かった。他昆虫では膜貫通領域を保持する PGRP もあるが (PGRP-LC など)、ツマグロヨコバイの PGRP では見つからなかった。また、ショウジョウバエでは全 13 個の PGRP のうち、8 個がシグナルペプチドを保持している。NcPGRP10 は SignalP と Phobius で結果が異なっていた。SignalP のデータではシグナルペプチドはないと判断できたが、phobius ではシグナルペプチドの存在確率は 0.6 程度であった。シグナルペプチドを持つことが知られているショウジョウバエの PGRP-SA や PGRP-SB1 では phobius での存在確率は 1 に近い値であるところから、NcPGRP10 がシグナルペプチドを持つかどうかは不確実である。他の 17 個のツマグロヨコバイ PGRP はシグナルペプチドを保持しておらず、シグナルペプチドを明確に持つ PGRP は見つからなかった。ツマグロヨコバイの 18 個の PGRP 遺伝子の代表として、構成 EST が最多の NcPGRP1 遺伝子とアミノ酸配列が最長の NcPGRP12 遺伝子の cDNA 全長配列と推定アミノ酸配列を図 2-1 と図 2-2 にそれぞれ示した。

ツマグロヨコバイの PGRP を 18 個、ショウジョウバエの PGRP を 14 個、その他の昆虫の典型的な PGRP を 2-4 個、計 48 個用いて、PGRP ドメイン構造を昆虫間で比較したところ、ドメイン構造全体は昆虫間で比較的保存されていた (図 2-3)。そして、ドメ

インの中央あたりの領域 (図 2-3 の 2 ページ目の 1 残基から 20 残基まで) では各昆虫が同一のアミノ酸を有している割合が高く、特に良く保存されていた。そのコンセンサス配列は「DI X Y X F XX G X DG XX YEGRGW (下線はコンセンサス配列を示している)」であり、PGRP の特徴的な配列であった。18 種のツマグロヨコバイの PGRP がドメイン中央領域の特徴的な配列を保持していることは明らかであったが、上述のようにドメイン構造の C 末端領域は他の昆虫の PGRP とあまり相同性がないように思われた。

ツマグロヨコバイ PGRP の機能を推定するため、PGRP の機能に重要なアミノ酸配列を調べた (表 2-2)。Enterobacteria phage T7 の lysozyme はアミダーゼ活性を有し、その活性にアミノ酸配列 17 番目のヒスチジン (H)、46 番目のチロシン (Y)、122 番目のヒスチジン (H)、128 番目のリシン (K)、130 番目のシステイン (C) が重要であることが知られている (Cheng, 1994)。PGRP はこの T7 lysozyme と相同性があり、T7 lysozyme のアミダーゼ活性に必要な 5 つのアミノ酸のうち 4 つ以上を保持する PGRP はアミダーゼ活性を有し、3 個以下しか保持していないものはアミダーゼ活性を有していない (Persson et al., 2007)。ショウジョウバエの PGRP において、アミダーゼ活性を有する LB, SB1, SB2, SC1a, SC1b, SC2 は 5 つのアミノ酸のうち 4 つを保持している (表 2-2)。18 個のツマグロヨコバイ PGRP は 2 つ以下のアミノ酸しか保持しておらず、特にサイズが小さいので C 末端側のアミノ酸は欠落しているものが多い。ショウジョウバエの PGRP において T7 lysozyme のアミノ酸配列 40 番目のグリシン (G)、41 番目のトリプトファン (W)、60 番目のアルギニン (R) の位置に一致するアミノ酸はグラム陰性細菌の DAP 型ペプチドグリカンとの結合に関与することが知られている (Lim et al., 2006; Chang et al., 2006; Royet and Dziarski, 2007)。40 番目のグリシンを保持していたツマグロヨコバイ PGRP は 18 個中 10 個であった。41 番目のトリプトファンを保持しているものはなかった。60 番目のアルギニンを保持していたものは 18 個中 17 個であった。ツマグロヨコバイの PGRP はグラム陰性細菌の認識に関与するアミノ酸が多く認められる。しかし、

配列データからグラム陰性細菌と陽性細菌のどちらを認識するかは明確には言えない。また、ツマグロヨコバイの *PGRP* が細菌のペプチドグリカンに結合することも実験的に証明されていない。

ツマグロヨコバイの *PGRP* が他の昆虫の *PGRP* とどのような系統関係にあるか類推するために、系統樹を作成した (図 2-4)。ツマグロヨコバイの *PGRP* はひとまとまりのクレードを形成していた。ただし、そのクレードにはコクヌストモドキの *PGRP* (*TcPGRP-LF*) が入っていた。ツマグロヨコバイ以外では、同じ昆虫の *PGRP* 同士がクレードを形成していることはないように思われた。また、ツェツェバエのバクテリオームで遺伝子の発現が認められる *PGRP* (*GmmPGRP-LB*) とコクゾウムシのバクテリオームで遺伝子の発現が認められる *PGRP* (*SzPGRP1*) は、ツマグロヨコバイの *PGRP* とは系統的に遠かった。ブートストラップ値は低いが、ツマグロヨコバイの *PGRP* 遺伝子は祖先遺伝子の重複によりできた可能性がある。

ツマグロヨコバイ *PGRP* 遺伝子の組織別発現解析

ツマグロヨコバイの *PGRP* 遺伝子は EST データ解析によりバクテリオームで特異的に発現することが予想された。実際に *PGRP* 遺伝子がバクテリオームで特異的に発現することを確かめるために、18 種の *PGRP* 遺伝子 (*NcPGRP1-18*) の組織別 RT-PCR を行った (図 2-5)。その結果、18 個の *PGRP* 遺伝子はほぼバクテリオームだけで発現していた。ただし、*NcPGRP5* 遺伝子は精巣でわずかに発現が認められた。昆虫において脂肪体は多くの免疫関連遺伝子の発現の場であることが多いが、脂肪体を多く含む胸部や腹部、腸では発現が見られなかった。また、経卵伝播するために共生細菌が感染する卵巣でも発現していなかった。

ツマグロヨコバイ *PGRP* 遺伝子の時期別発現量変化

ツマグロヨコバイの卵、幼虫、成虫における *PGRP* 遺伝子の発現量変化を定量 RT-PCR により調べた (図 2-6)。ハウスキーピング遺伝子である *elongation factor 1 α* (*NcEf1 α*) 遺伝子と *ribosomal protein L10* (*NcRpL10*) 遺伝子に対する *NcPGRP1* 遺伝子と *NcPGRP12* 遺伝子の相対的発現量を示した。*NcEf1 α* 遺伝子に対する *NcPGRP1* 遺伝子の相対的発現量は 5 齢幼虫と羽化 0 日齢のメス成虫において高かった (図 2-6a)。*NcRpL10* 遺伝子に対する *NcPGRP1* 遺伝子の相対的発現量は卵や幼虫に比べ、成虫において高かった (図 2-6b)。*NcEf1 α* 遺伝子に対する *NcPGRP12* 遺伝子の相対的発現量は 1 齢幼虫と羽化 0 日齢のメス成虫において高かった (図 2-6c)。*NcRpL10* 遺伝子に対する *NcPGRP12* 遺伝子の相対的発現量は卵や幼虫に比べ、成虫において高かった (図 2-6d)。*NcPGRP1* 遺伝子及び *NcPGRP12* 遺伝子の発現傾向は標準化遺伝子により若干異なっており、ステージに特徴的な発現は見られなかった。そのため、*NcPGRP1* 遺伝子及び *NcPGRP12* 遺伝子は全てのステージで恒常的に発現していると考えられた。*Nasuia* と *Sulcia* の細菌数はオスに比べてメスで多かったが、*NcPGRP1* 遺伝子及び *NcPGRP12* 遺伝子の発現量はオスとメスでそれほど変わらなかった。

ツマグロヨコバイ *PGRP* のタンパク質発現部位

ツマグロヨコバイの *PGRP* 遺伝子はバクテリオームで発現しており、*NcPGRP* 遺伝子がコードするアミノ酸配列はシグナルペプチドを保持しないと予測された。そのため、*PGRP* はバクテリオーム内で働く可能性が高い。これを確かめるために、羽化 3 日齢のメス成虫の頭部、胸部、腹部第 1-4 節、腹部第 5 節以降、バクテリオームを対象に *NcPGRP12* 抗体を用いて組織別ウェスタンブロッティングを行った (図 2-7)。その結果、腹部第 1-4 節とバクテリオームでバンドが検出された。検出されたバンドは 47.3 kDa と 38.9 kDa のマーカーの間に位置しており、そのサイズはおよそ 42 kDa 程度であった。アミノ酸配列から予想されるタンパク質のサイズは 34.9 kDa であり、検出されたバン

ドのサイズはこれより大きかった。NcPGRP12 抗体はアミノ酸配列全長を抗原として作製したポリクローナル抗体であるが、単一バンドが検出されており、NcPGRP12 を検出したと考えた。

抗生物質処理個体における PGRP 遺伝子発現量変化

ツマグロヨコバイの PGRP 遺伝子はバクテリオームで発現し、タンパク質もバクテリオームに局在した。そのため、共生に関わる機能を有すると考えられる。そこで、まず検討すべき点として PGRP 遺伝子発現量を共生細菌の感染系統と非感染系統とで比較することが考えられる。しかし、共生細菌 *Nasuia* と *Sulcia* は栄養素を供給していることから、宿主にとって必須の存在であり、非感染系統の作製はできなかった。そのため、抗生物質を処理することで、共生細菌数を減少させた個体を作製した。抗生物質としてテトラサイクリン、リファンピシン、アンピシリンを用いた。経口投与を行い、幼虫を 1 齢 0 日齢から 5 齢 0 日齢まで飼育した。無処理個体の生存率は 81.1% であり、各抗生物質処理個体でも生存率はそれほど変わらなかった (表 2-3)。5 齢までならば、抗生物質処理はツマグロヨコバイの生存にはそれほど影響を与えないと考えられた。無処理、リファンピシン処理、アンピシリン処理個体の 5 齢到達に要する期間は 10-11 日程度であったが、テトラサイクリン処理個体は 15.7 日であり、生育の遅れが見られた。抗生物質処理個体のバクテリオームを観察した結果 (図 2-8)、アンピシリン処理個体のバクテリオームは色素の蓄積に欠ける部位が生じ、テトラサイクリン処理個体ではさらなる色素欠損が見られた (図 2-8b, d)。リファンピシン処理個体のバクテリオームは無処理個体のものと変わらなかった (図 2-8c)。テトラサイクリン処理はツマグロヨコバイの発達及びバクテリオームの外観に影響した。

次に、抗生物質処理個体の共生細菌 *Nasuia*、*Sulcia*、*Rickettsia* の細菌数を定量 PCR で測定した (図 2-9)。テトラサイクリン及びリファンピシン処理個体における *Nasuia*

の細菌数は無処理個体に比べてそれぞれ 19.3%、40.0%に減少した (図 2-9a)。テトラサイクリン処理個体における *Sulcia* の細菌数は無処理個体に比べて 24.6%に減少したが (図 2-9b)、リファンピシン処理個体では変わらなかった (95.2%)。テトラサイクリン及びリファンピシン処理個体における *Rickettsia* の細菌数はそれぞれ 0.5%、0.3%に減少した (図 2-9c)。アンピシリン処理個体における共生細菌数は無処理個体とそれほど変わらなかった。テトラサイクリンを処理すると *Nasuia*、*Sulcia*、*Rickettsia* の細菌数が減少し、リファンピシンを処理すると *Nasuia* と *Rickettsia* の細菌数が減少した。

PGRP 遺伝子発現への抗生物質処理の影響をみるために、*NcPGRP1-18* 遺伝子の発現量を定量 RT-PCR で測定した (表 2-4)。テトラサイクリン処理個体において無処理に比べて発現量が 0.1 以下に減少した遺伝子が 4 個あった。半分以下に発現量が減少した遺伝子がテトラサイクリン処理個体において 17 個、リファンピシン処理個体において 13 個、アンピシリン処理個体において 8 個あった。発現量が減少した *PGRP* 遺伝子はテトラサイクリン処理個体において最も多く、リファンピシン処理個体においても多くあった。ツマグロヨコバイの遺伝子発現に薬剤処理が大きく影響していた。抗生物質処理が宿主昆虫の生理に大きく影響を与えている可能性もあったので、抗生物質処理個体において α -tubulin 遺伝子と citrate synthase 遺伝子 (細菌ではなく宿主遺伝子) の発現量を測定した (図 2-10)。抗生物質処理個体における α -tubulin 遺伝子の発現量は無処理に比べて有意な差はなかった (図 2-10a)。Citrate synthase 遺伝子発現量においても無処理に比べて差はなく、ただ、アンピシリン処理個体において有意に増加していた (図 2-10b)。このことから、抗生物質処理は宿主の遺伝子発現にそれほど影響しておらず、バクテリアームにおける *PGRP* 遺伝子発現量の減少は共生細菌の減少など共生現象と関連するかもしれない。

ツマグロヨコバイ *PGRP* 遺伝子の網羅的探索

研究開始当初、約 2 万個の cDNA クローンにより構成されている EST データベースを用いて遺伝子の探索を行い、18 個の *PGRP* 遺伝子を得た。バクテリオームで高発現する遺伝子を選抜するために、遺伝子を構成する EST クローンは 5 個以上という条件で遺伝子探索を行った。ツマグロヨコバイはさらに多くの *PGRP* 遺伝子を保持していると考え、網羅的な探索を行った。最終的に 41,536 個の EST を対象に *PGRP* 遺伝子の探索を行った。EST 中にはショウジョウバエの 13 個の *PGRP* と相同性のある EST クローンは 447 個あった。Genetyx ATSQ ver. 5.1 と CLOBB を用いて、この 447 個の EST クローンのクラスタリングを行った。Genetyx ATSQ ver. 5.1 では contig が 75 個、unconnected sequence が 89 個の計 164 個のクラスターを得た。CLOBB では contig が 76 個、unconnected sequence が 87 個の計 163 個のクラスターを得た。

ツマグロヨコバイの虫体全体の RNA-Seq 解析データを得ており、RNA-Seq 解析データからも *PGRP* 遺伝子探索を行った。Trinity による de novo assembly を行った結果、102,723 個の contig を得た。この中で、ショウジョウバエの 13 個の *PGRP* と相同性のある contig を選抜し、isoform や paralog を除いた結果、*PGRP* と相同性のある配列を 554 個、*PGRP* 候補遺伝子 (クラスター) を 317 個得た。上記の EST クローンならびに RNA-Seq 解析から得られた *PGRP* 遺伝子はほとんどが *PGRP* ドメインを有しており、コンセンサス配列も認められた。

大腸菌接種個体における免疫応答と *PGRP* 遺伝子発現量変化

PGRP は細菌の細胞壁を認識する能力を有しており、ショウジョウバエにおいて細菌の侵入による *PGRP* 遺伝子発現量の増加が知られている (Werner et al., 2000)。ヨコバイに外来の大腸菌を接種し、*PGRP* 遺伝子の発現量がどのように変化するかを調べることにした。まず、大腸菌を接種した個体における抗菌ペプチド遺伝子 *defensin* の発現量を定量 RT-PCR で測定し、免疫応答を調べた (図 2-11)。大腸菌接種 3, 6 時間後の個

体では水注入個体に比べて発現量に違いはなかった。水注入 3, 6 時間後の個体において *defensin* 遺伝子発現量が無処理個体 (0 時間後) に比べてやや増加しているが、これはインジェクション操作によりわずかに雑菌が虫体に入ってしまったためかもしれない。しかし、大腸菌接種 12 時間後の個体においては、*defensin* 遺伝子発現量がコントロールに比べて有意に増加した。これは注入した大腸菌によりツマグロヨコバイの免疫応答が引き起こされたためと考えられる。

上記の結果をもとに、大腸菌接種 3 時間後と 12 時間後にマイクロアレイ解析を行った。まず、多くの遺伝子の中から抗菌ペプチド遺伝子である *defensin* と 2 種の *dipteracin* の計 3 個のプロープの発現量変化を調べた (表 2-5)。その結果、大腸菌接種 12 時間後の個体において抗菌ペプチド遺伝子の発現量がコントロールに比べて有意に増加した。しかし、大腸菌接種 3 時間後の個体において抗菌ペプチド遺伝子の発現量は変わらなかった。大腸菌接種により免疫応答が引き起こされることがマイクロアレイ解析でも確認された。

ツマグロヨコバイにおいて大腸菌接種により免疫応答が引き起こされることが確認できたため、大腸菌接種個体における *PGRP* 遺伝子の発現量変化を調べた (表 2-6)。ツマグロヨコバイマイクロアレイには 297 個 (150 遺伝子) の *PGRP* 遺伝子のプロープが搭載されており、この中でコントロールに比べて有意な発現量変化を示したプロープの数を調べた。大腸菌接種 3 時間の個体において有意な発現量変化を示したプロープはなかった。また、大腸菌接種 12 時間後の個体において有意な発現量変化を示したプロープは *NcPGRP7* 遺伝子のプロープ 1 個のみであり、1.13 倍に増加していた (表 2-7)。つまり、ショウジョウバエやカイコとは異なり、ツマグロヨコバイの *PGRP* 遺伝子は大腸菌の存在によりその発現が増加することはなかった。

大腸菌接種個体において発現量が著しく増加した遺伝子を表 2-8, 9 に、発現量が著しく減少した遺伝子を表 2-10, 11 に示した。

Rickettsia 感染個体における PGRP 遺伝子発現量変化

ツマグロヨコバイに外来の大腸菌を接種すると、抗菌ペプチド遺伝子の発現量は増加するものの、PGRP 遺伝子の発現には影響しなかった。PGRP 遺伝子はバクテリオームで発現し、そのタンパク質もバクテリオームで機能していることが予想されている。注入された大腸菌がバクテリオームに届き、PGRP に認識されているかどうか不明であった。そのために、バクテリオーム内に存在する *Rickettsia* の有無による PGRP 遺伝子発現への影響を調べた。ツマグロヨコバイの全身に感染する細胞内共生細菌 *Rickettsia* はペプチドグリカンを持しており、バクテリオーム細胞内にも感染している。また、宿主にとって必須な存在ではないため、抗生物質を処理することで非感染系統を作製することが可能である。この *Rickettsia* 感染個体と非感染個体との間でマイクロアレイ解析を行い、PGRP 遺伝子の発現量変化を調べた。まず、抗菌ペプチド遺伝子として、*defensin*、2 種の *diptericin* の計 3 個の遺伝子の発現量変化を調べた (表 2-12)。その結果、感染個体における抗菌ペプチド遺伝子の発現量は非感染個体に比べてやや増加していたが、有意な差はなかった。

次に、*Rickettsia* 感染個体における PGRP 遺伝子の発現量変化を実際に調べた (表 2-13)。ツマグロヨコバイマイクロアレイには 297 個 (150 遺伝子) の PGRP 遺伝子のプローブが搭載されており、この中でコントロールに比べて有意な発現量変化を示したプローブの数を調べた。*Rickettsia* 感染個体において有意に発現量が増加したプローブは 45 個 (32 遺伝子) あり、減少したプローブは 6 個 (6 遺伝子) であった。残りの 246 個のプローブは有意な発現量変化を示さなかった。ただし、1 つのプローブ名に対して、2 プローブ設計されているが、両プローブともに有意に発現量が増加したのは 13 個であった (表 2-14)。一部の遺伝子において発現量の差は見られたが、多くのプローブで発現量に差は認められず、感染個体と非感染個体との間で発現量に特徴的な変化はない

と考えた。しかし、*Rickettsia* の存在により発現量が増加する *PGRP* 遺伝子のプローブもあり、今後の検討課題である。*Rickettsia* 感染個体において発現量が著しく増加した遺伝子を表 2-15 に、発現量が著しく減少した遺伝子を表 2-16 に示した。

dsRNA 注入のツマグロヨコバイへの影響

RNAi によりツマグロヨコバイの *PGRP* 遺伝子の機能解析を行った。*NcPGRP1* 遺伝子と *NcPGRP12* 遺伝子の dsRNA (*dsPGRP1*, 450 bp; *dsPGRP12*, 481 bp) を合成し、羽化 0 日齢のメス成虫に注入した。多量の dsRNA を注入することにより、明確な表現型が得られると考え、60 ng を虫体に注入した。まず、dsRNA 注入による遺伝子発現量の減少を調べた (図 2-12)。*dsPGRP1* 注入個体における *NcPGRP1* 遺伝子発現量はコントロールに比べて注入 1 日後に 13.4%に、3 日後に 1.0%に、7 日後に 2.5%に減少した (図 2-12a)。*dsPGRP12* 注入個体における *NcPGRP12* 遺伝子発現量はコントロールに比べて注入 1 日後に 2.3%に、3 日後に 0.4%に、7 日後に 0.3%に減少した (図 2-12b)。RNAi の効果がどのように表れるかわからないので、表現型として共生細菌数を測定した (図 2-13)。*dsPGRP1*, *dsPGRP12* 注入個体における *Nasuia* の細菌数はコントロールと変わらなかった (図 2-13a)。*dsPGRP1*, *dsPGRP12* 注入個体における *Sulcia* の細菌数はコントロールと比べ、やや減少したが、有意な差はなかった (図 2-13b)。*dsPGRP1* 注入個体における *Rickettsia* の細菌数はコントロールに比べわずかではあるが有意に減少した(コントロール = 2.81×10^8 , *dsPGRP1* = 2.12×10^8 ; 図 2-13c)。しかし、*dsPGRP1* 注入個体における *Rickettsia* の減少は追試により確認することができず、*NcPGRP1* 遺伝子の RNAi によって *Rickettsia* の数が減少するとは結論できなかった。

RNAi 実験の過程において、高濃度の dsRNA (60 ng) をツマグロヨコバイに注入すると、多くの個体が死亡した。ツマグロヨコバイでは dsRNA 注入による RNAi 実験の前例がなかったため、ツマグロヨコバイの生存と発達に対するインジェクション操作及び

dsRNA 注入の影響、dsRNA 注入による遺伝子発現量減少などを調べた。生存と発達に対する影響として、生存率、成虫発生率、幼虫期間を調べた。翅形成に異常があった成虫及び成虫への羽化中に死亡した 5 齢幼虫を図 2-14 に示した。インジェクション操作は針状にした glass capillary tube を胸部と腹部の間の節間膜に挿入することで行った。dsRNA としてツマグロヨコバイが持っていない外因性の *EGFP* 遺伝子とツマグロヨコバイが持っている内因性の *NcPRP12* 遺伝子を用い、*NcPGRP12* 遺伝子の発現量減少も調べた。まず、ツマグロヨコバイの生存と発育に対するインジェクション操作の影響を検証した (図 2-15)。インジェクション操作として針刺し (glass capillary を挿入し、液体を注入しない) と水注入を 5 齢 0 日齢の幼虫に行った。針刺し、水注入個体における生存率は無処理個体とそれほど変わらなかった (図 2-15a)。ツマグロヨコバイでは翅の伸長が異常となる個体が現れることがあり、インジェクション操作とその後の飼育により一部で翅の伸長が不十分な個体が認められた。しかし、針刺し、水注入個体における正常及び翅異常成虫発生率は無処理個体とそれほど変わらなかった (図 2-15b)。水を注入されたオス個体と針を挿入されたメス個体における 5 齢幼虫期間はコントロールに比べて有意に長くなった (図 2-15c)。インジェクション操作はツマグロヨコバイの生存率と成虫発生率に影響しなかったが、5 齢幼虫期間に影響し、インジェクション操作によりツマグロヨコバイの発育が遅れた。

次に、*EGFP* 遺伝子の dsRNA 注入の影響を検証した (図 2-16)。6, 15, 30, 60 ng の ds*EGFP* を 5 齢 1 日齢の幼虫に注入した。60 ng の ds*EGFP* を注入した個体における生存率は注入 3 日後から急激に下がり、注入 8 日後に全ての個体が全滅した (図 2-16a)。6 ng の ds*EGFP* を注入した個体の生存率は注入 10 日後に 80% であり、水注入個体とそれほど変わらなかった。30, 15 ng の ds*EGFP* を注入した個体の生存率は注入 10 日後にそれぞれ 15%、45% であり、用量反応 (dose-response) が見られた。60 ng の ds*EGFP* を注入した個体における正常成虫の発生率が 30% であり、多くの個体が 5 齢幼虫時に死亡した

(図 2-16b)。15 ng の *dsEGFP* を注入した個体では正常成虫の発生率は 95% であり、死亡の多くは成虫時に起こった (図 2-16a, b)。水注入個体及び 30, 60 ng の *dsEGFP* を注入した個体の 5 齢幼虫期間はそれぞれ 5.27, 5.75, 5.86 日であり、有意な差はなかったものの幼虫期間が若干長くなった (図 2-16c)。高濃度の dsRNA ほどうツマグロヨコバイの生存と発達に影響し、生存率低下と発育の遅れが見られた。また、6 ng の dsRNA 注入では影響はほとんどなかった。

NcPGRP12 遺伝子の dsRNA 注入の影響も検証した (図 2-17)。6, 15, 30, 60 ng の *dsPGRP12* を 5 齢 1 日齢の幼虫に注入した。60 ng の *dsPGRP12* を注入した個体における生存率は注入 4 日後あたりから急激に下がり、注入 10 日後に 15% になった (図 2-17a)。6 ng の *dsPGRP12* を注入した個体における生存率は注入 10 日後で 95% であった。*dsEGFP* 注入個体と異なり、用量反応は顕著でなかったが、60 ng の *dsPGRP12* を注入した個体における翅異常個体の発生率は 55% であり、他の濃度に比べて非常に高かった (図 2-17b)。羽化中あるいは羽化直後に死亡した個体の発生率は 20% であり、60 ng の *dsPGRP12* 注入は羽化に何らかの影響を及ぼした可能性がある。60 ng の *dsPGRP12* を注入した個体の 5 齢幼虫期間は 6 ng, 15 ng に比べて有意に長くなったが、水注入個体と比べると有意な差はなかった (図 2-17c)。*dsEGFP* と同様に、高濃度の *dsPGRP12* 注入ほど生存と発育に影響した。6 ng の *dsPGRP12* 注入は、*dsEGFP* の場合と同様に影響はほとんどなかった。

さらに、60 ng の *dsEGFP* を 4 齢 0 日齢の幼虫に注入し、その影響を検証した (図 2-18)。*dsEGFP* 注入個体における生存率は注入 3 日後あたりから急激に下がり、注入 10 日後に全ての個体が死亡した (図 2-18a)。水注入及び 60 ng の *dsEGFP* を注入した個体における 4 齢幼虫期間は無処理個体に比べて有意に長くなった (図 2-18b)。*dsEGFP* 注入個体は 5 齢幼虫期間中に全滅してしまったため、無処理及び水注入個体における 5 齢幼虫期間を調べた (図 2-18c)。その結果、4 齢 0 日齢の幼虫に水を注入した個体における 5

齡幼虫期間は無処理個体と変わらなかった。インジェクション操作の影響は操作した次の齡では見られなかった。高濃度の dsRNA 注入は 4 齡幼虫の生存率にも影響した。

成虫への高濃度の dsRNA 注入の影響をみるために、60 ng の dsEGFP を羽化 0 日齡のメス成虫に注入した (図 2-19)。dsEGFP 注入個体における生存率は注入 5 日後から急激に下がり、注入 10 日後に 5% になった。高濃度の dsRNA 注入はメス成虫においても生存に影響し、生存率低下が見られた。

次に、dsRNA 注入による遺伝子発現量減少を調べた (図 2-20)。無処理、水注入、6, 15, 30, 60 ng の dsEGFP 及び dsPGRP12 注入個体の *NcPGRP12* 遺伝子発現量を定量 RT-PCR で測定した。水注入個体における *NcPGRP12* 遺伝子の相対発現量は 0.0188 であり、dsEGFP の各濃度を注入した個体におけるその遺伝子発現量は水注入個体に比べてやや高かったが (約 1.2–2.0 倍)、ほぼ同じぐらいのレベルであった。一方、6, 15, 30, 60 ng の dsPGRP12 注入個体における *NcPGRP12* 遺伝子発現量は水注入個体に比べてそれぞれ、1.2, 1.3, 1.1, 1.2% に減少した。ツマグロヨコバイでは RNAi が非常に良く効き、遺伝子発現量は確実に減少することが判明した。また、6 ng の dsRNA の注入でも *NcPGRP12* 遺伝子の発現を強く抑制できた。

2-4 考察

共生の分子機構を明らかにするために、ツマグロヨコバイの共生器官バクテリオームで特異的に発現することが予想される遺伝子を探索した結果、PGRP と相同性のある遺伝子を3つ見出した(第1章)。PGRP は免疫応答における細菌の認識を担っており、共生細菌と何らかの相互作用をしていると考えた。

ツマグロヨコバイ EST データベースを用いて、バクテリオームで高発現かつ特異的に発現するという条件で PGRP 遺伝子を探索した結果、18 個の遺伝子を見出した (*NcPGRP1-18*, 表 2-1)。全長配列解析により、予想されるアミノ酸配列を得た。ツマグロヨコバイの 18 個の PGRP は PGRP によくみられるドメイン配列を保持しており、グラム陰性細菌の細胞壁成分であるペプチドグリカンを認識する可能性が示唆された(図 2-3、表 2-2)。

ショウジョウバエにおいて、PGRP 遺伝子は血球、脂肪体、腸、気管、上皮で発現することが知られている (Royet and Dziarski, 2007)。ツマグロヨコバイ PGRP 遺伝子の発現部位を調査した結果、バクテリオームで発現し、血球、脂肪体、腸、気管、上皮では発現していなかった(図 2-5)。また、タンパク質はバクテリオームに存在していた(図 2-7)。バクテリオームにはグラム陰性細菌である *Nasuia* と *Sulcia* が感染していることから、ツマグロヨコバイの PGRP 遺伝子はこれらの細菌との共生に関係しているかもしれないと考えられた。そのために、抗生物質の処理により共生細菌数を減少させた個体における PGRP 遺伝子発現量変化を調査した。抗生物質処理個体において PGRP 遺伝子発現量は減少しており(表 2-4)、他のハウスキーピング遺伝子では発現量減少が見られなかったところから、ツマグロヨコバイの PGRP 遺伝子の発現は共生細菌の存在と関わっていることが示唆された。

一次共生細菌 *Wigglesworthia* が感染しているツェツェバエのバクテリオームでは

PGRP-LB 遺伝子が発現しており、共生細菌数の増加に伴い発現量が増加する (Wang et al., 2009)。また、RNAi による *PGRP-LB* 遺伝子発現抑制個体において抗菌ペプチド遺伝子 *attacin* の発現量が増加することが明らかになっている。ツェツェバエとショウジョウバエの *PGRP-LB* は相同性があり、アミダーゼ活性を持つことが予想されており、ツェツェバエの *PGRP-LB* は共生細菌の死骸のペプチドグリカンを分解し、過剰免疫を防いでいると考えられている。また、*Sitophilus zeamais* primary endosymbiont (SZPE) が感染しているコクゾウムシのバクテリオームにおいても *wPGRP* (*SzPGRP1*) が発現している。*wPGRP* 遺伝子もショウジョウバエの *PGRP-LB* 遺伝子と相同性があり、グラム陰性細菌の侵入により発現量が増加することが明らかになっている (Anselme et al., 2006)。ツマグロヨコバイの *PGRP* の機能を類推するために、他の昆虫の *PGRP* との系統関係を調査した結果、ツェツェバエとコクゾウムシの *PGRP* (*GmmPGRP-LB*, *SzPGRP1*) と特に近縁であるとは考えられなかった。ツマグロヨコバイの *PGRP* はアミダーゼ活性を有しないことが予想され、これらの昆虫の *PGRP* の働きとは異なる働きを持つと考えられる。*PGRP* 遺伝子はツマグロヨコバイの全てのステージで恒常的に発現していると考えられる (図 2-6)。*Nasuia* と *Sulcia* は経卵伝播により全ての個体、ステージに感染しており、ツマグロヨコバイの *PGRP* が共生に関係していると考えると、*PGRP* 遺伝子が恒常的に発現するという結果は妥当なものと考えられる。

現在、*PGRP* 遺伝子はショウジョウバエにおいて 13 個、カイコにおいて 12 個、ハマダラカにおいて 7 個存在することが知られている。ツマグロヨコバイの *PGRP* 遺伝子は、当初 EST データの中からバクテリオームで高発現かつ特異的に発現するという条件で探索し、18 個得られた。ツマグロヨコバイはさらに多くの遺伝子を保持していると考え、網羅的な探索を行った (第 2 章結果 ツマグロヨコバイ *PGRP* 遺伝子の網羅的探索)。EST データを用いた探索では 160 個以上の *PGRP* 候補遺伝子が得られた。RNA-Seq 解析データを用いた解析では 317 個の *PGRP* 候補遺伝子が得られた。同一の遺伝子が 2

つに分かれている可能性、isoform の可能性、2つの独立した遺伝子がキメラになっている可能性もまったくないわけではない。しかし、他の昆虫における *PGRP* 遺伝子数は多くとも十数個と考えられており、ツマグロヨコバイでは *PGRP* 遺伝子の数は他の昆虫に比べて圧倒的に多い。*PGRP* 候補遺伝子数は RNA-Seq 解析データからみて 300 個はあると考えられる。また、これらの遺伝子のコードするアミノ酸配列はほとんど *PGRP* ドメインと呼ばれる配列を有していた。なぜ、これほど多くの *PGRP* 遺伝子が存在するかは不明であるが、共生あるいは共生器官の進化と関係する可能性がある。

侵入してきた外来細菌は *PGRP* により認識され、免疫応答により排除される。ショウジョウバエにおいて、外来細菌侵入時に *PGRP* 遺伝子発現量が増加することが知られているため、ツマグロヨコバイに大腸菌を接種し、免疫応答と *PGRP* 遺伝子発現量変化を調査した。大腸菌接種 12 時間後の個体において抗菌ペプチド遺伝子の発現量が増加しており、免疫応答が引き起こされることは明らかであった (図 2-11、表 2-5)。しかし、発現量変化を示した *PGRP* 遺伝子はほぼなかった (表 2-6)。そのため、ツマグロヨコバイにおいては、他の昆虫で知られているような外来細菌の侵入により引き起こされる *PGRP* 遺伝子の発現増加はなく、免疫応答がショウジョウバエやカイコとは異なる可能性もある。

次に、*Rickettsia* 感染個体における免疫応答と *PGRP* 遺伝子発現量変化を調査した。*Rickettsia* は全身の細胞内に感染しており、ペプチドグリカンを保持している。大腸菌接種実験では大腸菌がバクテリオームにまで侵入していない可能性があったため、*Rickettsia* の存在に対する *PGRP* 遺伝子の発現への影響を調べておく必要があった。*Rickettsia* 感染個体と抗生物質処理により作りだした非感染個体とを比較した。*Rickettsia* 感染個体において抗菌ペプチド遺伝子発現量はやや増加していたものの有意な差はなかった (表 2-12)。そして、*Rickettsia* 感染個体と非感染個体において、*PGRP* 遺伝子の発現量に特徴的な変化はなく (表 2-13)、*Rickettsia* の存在によりその発現量は影響され

ないと考えた。大腸菌接種個体、*Rickettsia* 感染個体における *PGRP* 遺伝子発現量変化の調査により、ツマグロヨコバイの *PGRP* 遺伝子は、大腸菌と *Rickettsia* の存在により発現が影響されず、これまでの免疫応答における役割とは異なる役割を担うことが示唆された。

このように *PGRP* はツマグロヨコバイの共生現象に関与していると想定することが妥当と考えられる。エンドウヒゲナガアブラムシではゲノム解読の結果、全ての *PGRP* 遺伝子、多くの *Imd* 経路構成遺伝子、多くの抗菌ペプチド遺伝子が存在しないことが明らかである (Gerardo et al., 2010)。このアブラムシはバクテリオサイトに一次共生細菌 *Buchnera* が感染しており、この共生細菌に栄養依存していることから宿主にとって必須な存在である。この *Buchnera* を保護するために、他昆虫で見られるような免疫応答が働いていないと考えられている。また、コクゾウムシではバクテリオームで抗菌ペプチド遺伝子 *coleoptericin* が発現しており、この抗菌ペプチドが共生細菌の分裂を抑制すると考えられている (Anselme et al., 2008; Login et al., 2011)。ただし、*PGRP* 遺伝子の数、細菌感染時の発現量変化を考えると、この2種の昆虫の共生の分子機構とツマグロヨコバイのものとは明らかに異なると考えられる。ツマグロヨコバイの *PGRP* の働きは明らかではないが、この分子の働きを解明することで、より詳細な共生の分子機構が明らかになると考えられる。

RNAi によりツマグロヨコバイの *PGRP* 遺伝子の機能解析を行った (図 2-12, 13)。*PGRP* 遺伝子 (*NcPGRP1*, *NcPGRP12*) では当初、高濃度で処理する方が効果が高いと考えたため、60 ng の dsRNA を注入した。dsRNA 注入により遺伝子発現量は顕著に減少していた (図 2-12)。RNAi の表現型として共生細菌数を定量 PCR により測定した (図 2-13)。しかし、明瞭な結果を得ることができなかった。これはツマグロヨコバイには多数の *PGRP* 遺伝子があり、単独遺伝子の RNAi では明瞭な機能差が検出できなかった可能性がある。

ツマグロヨコバイにおける RNAi 効果検証のため、生存と発達に対する dsRNA 注入の影響、dsRNA 注入による遺伝子発現量減少などを調べた (図 2-15, 16, 17, 18, 19, 20)。その結果、低濃度 (6 ng) の dsRNA の注入は生存と発達に影響せず、また、遺伝子発現量を十分に減少させた。高濃度 (60 ng) の dsRNA の注入は遺伝子発現量を十分に減少させたものの、生存と発達に影響した。そのため、ツマグロヨコバイの RNAi は低濃度 (6 ng) の dsRNA 注入が最適であると考えられる。また、高濃度 (60 ng) の dsRNA 注入は死亡率を高めるので、注入 4 日後程度の短時間で実験を行う必要があると思われる。半翅目昆虫のトビイロウンカとヨコバイ類の sharpshooter では高濃度 dsRNA に抵抗性を持つ可能性がある。トビイロウンカでは 125 ng の dsRNA を注入した個体における生存率は 80–90% 程度であり、250 ng の生存率は 50–60% 程度であった (Liu et al., 2010)。Sharpshooter では 800 ng の dsRNA を注入した個体における生存率は 40–60% 程度であり、ubiquitin-conjugating enzyme 遺伝子の dsRNA 注入個体では 91% であった (Rosa et al., 2012)。ツマグロヨコバイでは dsRNA 注入によって、遺伝子発現量は約 1% に減少しており (図 2-20)、この RNAi 効果は他の昆虫に比べても非常に高いと考えられる (Huvenne and Smaghe, 2010; Li et al., 2013)。また、ツマグロヨコバイも他の昆虫と同様に dsRNA 量と遺伝子発現量減少に明確な用量反応を見ることはできなかった (Li et al., 2013)。

表 2-1. ツマゲロヨコバいの *PGRP* 遺伝子 (*NcPGRP1-18*) の全長配列解析の結果

遺伝子名	代表的 EST	EST 数	EST 数	アミノ酸数	シグナルペプチド			膜貫通領域	
					SignalP	Phobius	TMHMM	Phobius	Phobius
<i>NcPGRP1</i>	YA0448	64	178	-	-	-	-	-	-
<i>NcPGRP2</i>	YA0123	13	162	-	-	-	-	-	-
<i>NcPGRP3</i>	YA0517	12	227	-	-	-	-	-	-
<i>NcPGRP4</i>	YA0175	11	205	-	-	-	-	-	-
<i>NcPGRP5</i>	YA1177	11	195	-	-	-	-	-	-
<i>NcPGRP6</i>	YA0821	11	164	-	-	-	-	-	-
<i>NcPGRP7</i>	YA1162	11	157	-	-	-	-	-	-
<i>NcPGRP8</i>	YA0004	10	207	-	-	-	-	-	-
<i>NcPGRP9</i>	YA0523	10	185	-	-	-	-	-	-
<i>NcPGRP10</i>	YA1694	6	228	-	-	+	-	-	-
<i>NcPGRP11</i>	YA0332	6	148	-	-	-	-	-	-
<i>NcPGRP12</i>	YA0442	5	300	-	-	-	-	-	-
<i>NcPGRP13</i>	YA3488	5	237	-	-	-	-	-	-
<i>NcPGRP14</i>	YA2340	5	214	-	-	-	-	-	-
<i>NcPGRP15</i>	YA0426	5	183	-	-	-	-	-	-
<i>NcPGRP16</i>	YA0405	5	178	-	-	-	-	-	-
<i>NcPGRP17</i>	YA0449	5	178	-	-	-	-	-	-
<i>NcPGRP18</i>	YA4144	5	163	-	-	-	-	-	-

遺伝子名、代表的な EST 名、遺伝子を構成する EST 数、コードするアミノ酸数、シグナルペプチドの有無 (SignalP と Phobius)、膜貫通領域の有無 (TMHMM と Phobius) の結果を示した。シグナルペプチド及び膜貫通領域が存在することが予想されることが示された。-

表 2-2. PGRP の機能に重要なアミノ酸配列の比較

アミノ酸配列の位置	17	40	41	46	60	122	128	130
T7 lysozyme	H	G	W	Y	R	H	K	C
DmPGRP-LA	T	G	L	S	R	Q	T	S
DmPGRP-LB	H	G	W	Y	R	H	T	C
DmPGRP-LC	L	Q	K	Y	R	S	S	T
DmPGRP-LD	I	H	V	Y	Q	L	A	Q
DmPGRP-LE	L	G	W	Y	R	H	T	S
DmPGRP-LFw	V	G	Y	Y	R	D	-	-
DmPGRP-LFz	H	G	W	Y	R	H	T	S
DmPGRP-SA	H	D	F	Y	T	G	T	S
DmPGRP-SB1	H	N	F	Y	R	H	T	C
DmPGRP-SB2	H	K	F	Y	L	H	T	C
DmPGRP-SC1a	H	G	W	Y	R	H	T	C
DmPGRP-SC1b	H	G	W	Y	R	H	T	C
DmPGRP-SC2	H	G	W	Y	R	H	T	C
DmPGRP-SD	A	K	F	Y	R	H	T	S
NcPGRP1	V	G	D	Y	L	I	S	F
NcPGRP2	T	G	H	H	R	L	-	-
NcPGRP3	E	G	Y	Y	R	I	F	P
NcPGRP4	G	G	H	F	R	Y	K	V
NcPGRP5	Y	R	L	F	R	V	Q	A
NcPGRP6	Y	G	S	H	R	I	-	-
NcPGRP7	T	S	C	Y	R	F	L	-
NcPGRP8	S	G	L	Y	R	F	A	D
NcPGRP9	Y	N	I	Y	R	N	L	A
NcPGRP10	A	K	L	Y	R	L	K	V
NcPGRP11	G	V	A	Y	R	F	F	-
NcPGRP12	T	G	L	Y	R	Y	I	P
NcPGRP13	F	G	E	Q	R	E	H	K
NcPGRP14	T	G	L	Y	R	S	L	T
NcPGRP15	N	G	L	Y	R	L	-	-
NcPGRP16	T	K	M	Y	R	H	-	-
NcPGRP17	Y	D	K	Y	R	Y	-	-
NcPGRP18	L	E	F	F	R	R	Y	P

Enterobacteria phage T7 lysozyme (T7 lysozyme) のアミダーゼ活性に必要なアミノ酸 (ヒスチジン-17、チロシン-46、ヒスチジン-122、リシン-128、システイン-130) と、この部分に相当するショウジョウバエとツマグロヨコバイのPGRPアミノ酸を比較した。T7 lysozymeはPGRPと相同性がある。T7 lysozymeのアミノ酸配列と一致した部分を色付けした。赤; T7 lysozymeのアミダーゼ活性に必要なアミノ酸、青; グラム陰性細菌のDAP型ペプチドグリカンとの結合に参与するアミノ酸。(-) は対応するアミノ酸が存在しないことを示している。

表 2-3. ツマグロヨコバイの生存と発育に対する抗生物質処理の影響

	生存率 (%)	5 齢 0 日 齢 到 達 に 要 した 期 間 (日)
無 処 理	81.1	10.6
テ トラ サ イ ク リ ン	76.9	15.7
リ フ ァ ン ピ シ ン	91.6	11.8
ア ン ピ シ リ ン	86.4	11.0

抗生物質処理を行った 1 齢 0 日 齢 の 幼 虫 から 5 齢 0 日 齢 の 幼 虫 ま だ の 生 存 率 と そ の 期 間 を 調 べ た 。 0.05% の 抗 生 物 質 溶 液 で 育 て た イ ネ を 餌 と し て 、 ツ マ グ ロ ヨ コ バ イ の 幼 虫 を 飼 育 し た 。 抗 生 物 質 と し て テ トラ サ イ ク リ ン 、 リ フ ァ ン ピ シ ン 、 ア ン ピ シ リ ン を 用 い た 。 コ ン ト ロ ール と し て 無 処 理 の イ ネ で 飼 育 し た 個 体 を 用 い た 。 調 査 し た ヨ コ バ イ の 数 は 、 無 処 理 91 頭 、 テ トラ サ イ ク リ ン 109 頭 、 リ フ ァ ン ピ シ ン 107 頭 、 ア ン ピ シ リ ン 118 頭 で あ っ た 。

表 2-4. ヨコバイ *PGRP* 遺伝子発現に対する抗生物質処理の影響

遺伝子名	テトラ サイクリン	リファン ピシン	アンピ シリン
<i>NcPGRP1</i>	<u>0.02</u>	<u>0.19</u>	0.72
<i>NcPGRP2</i>	<u>0.07</u>	<u>0.13</u>	<u>0.39</u>
<i>NcPGRP3</i>	<u>0.07</u>	<u>0.14</u>	<u>0.35</u>
<i>NcPGRP4</i>	<u>0.26</u>	<u>0.33</u>	<u>0.49</u>
<i>NcPGRP5</i>	<u>0.31</u>	<u>0.36</u>	<u>0.43</u>
<i>NcPGRP6</i>	<u>0.35</u>	<u>0.34</u>	<u>0.33</u>
<i>NcPGRP7</i>	<u>0.13</u>	<u>0.21</u>	<u>0.36</u>
<i>NcPGRP8</i>	<u>0.24</u>	0.57	0.97
<i>NcPGRP9</i>	<u>0.14</u>	<u>0.13</u>	<u>0.27</u>
<i>NcPGRP10</i>	<u>0.15</u>	<u>0.20</u>	0.81
<i>NcPGRP11</i>	<u>0.20</u>	<u>0.29</u>	0.54
<i>NcPGRP12</i>	<u>0.07</u>	<u>0.13</u>	0.73
<i>NcPGRP13</i>	0.58	1.45	1.16
<i>NcPGRP14</i>	<u>0.49</u>	1.80	1.24
<i>NcPGRP15</i>	<u>0.13</u>	<u>0.18</u>	<u>0.40</u>
<i>NcPGRP16</i>	<u>0.27</u>	<u>0.35</u>	0.63
<i>NcPGRP17</i>	<u>0.46</u>	0.69	0.68
<i>NcPGRP18</i>	<u>0.26</u>	0.89	1.11

抗生物質処理個体における *PGRP* 遺伝子発現量を定量 RT-PCR で測定した。抗生物質処理個体における発現量を無処理個体の発現量に対する fold change (倍率変化、無処理個体の発現量を 1 としている) を示した。5 齢 0 日齢の幼虫 5 頭分の腹部 1-4 節からテンプレートを作製した。各々独立して作製したテンプレートを使用して 3 回の反復実験を行った。Fold change が 0.1 以下の値を赤下線で、0.5 以下の値を黒下線で示した。

表 2-5. 大腸菌接種個体における抗菌ペプチド遺伝子の発現量変化

遺伝子名	プローブ名	大腸菌接種 3 時間後		大腸菌接種 12 時間後	
		Probe-1	Probe-2	Probe-1	Probe-2
<i>Defensin</i>	NY2028	2.19	–	8.27**	–
<i>Diptericin</i>	MG2043	2.03	2.10	3.80**	5.99**
<i>Diptericin</i>	MG4985	1.97	2.26	3.46**	6.62*

大腸菌接種個体のマイクロアレイ解析により、免疫応答を調べた。大腸菌接種個体の遺伝子発現量を水注入個体の発現量に対する fold change の値で示した。抗菌ペプチド遺伝子としては *defensin* 1 種 (プローブ数 1 個)、*diptericin* 2 種 (MG2043 と MG4985、プローブ数各 2 個) がマイクロアレイ上に搭載されている。羽化 1 日齢のメス成虫に 1.5×10^3 の大腸菌 (DH5 α) を注入し、5 頭分の腹部からテンプレートを作製した。各々独立して作製したテンプレートを使用して注入 3 時間後では 3 回、注入 12 時間後では 4 回の反復実験を行った。t 検定を行った (*; $P < 0.05$, **; $p < 0.01$)。

表 2-6. 大腸菌接種個体における *PGRP* 遺伝子の発現量変化

遺伝子発現量	有意差	プローブ数	
		3 時間後	12 時間後
増加	P < 0.01	0	0
	P < 0.05	0	1
減少	P < 0.01	0	0
	P < 0.05	0	0
変化なし	—	297	296
総数		297	297

大腸菌接種個体のマイクロアレイ解析により、*PGRP* 遺伝子の発現量変化を調べた。ツマグロヨコバイマイクロアレイには *PGRP* 遺伝子のプローブが 297 種 (150 遺伝子) 搭載されており、この中で水注入個体に比べて有意な発現量変化を示したプローブの数を示した。有意差検定は t 検定による。実験条件は表 2-5 に準ずる。

表 2-7. 大腸菌接種個体における *NcPGRP1-18* 遺伝子の発現量変化

遺伝子名	プローブ名	大腸菌接種 3 時間		大腸菌接種 12 時間	
		Probe-1	Probe-2	Probe-1	Probe-2
<i>NcPGRP1</i>	Bac0930	1.05	1.08	1.02	0.98
<i>NcPGRP2</i>	MYB1719	0.92	0.97	0.95	1.05
<i>NcPGRP3</i>	MYA3814	1.05	1.04	1.03	1.03
<i>NcPGRP4</i>	MYA5788	1.02	1.00	0.97	0.96
<i>NcPGRP5</i>	MYA1300	0.90	0.93	0.75	0.85
<i>NcPGRP6</i>	MYA1448	1.02	1.04	1.00	1.00
<i>NcPGRP7</i>	Bac4333	1.12	1.19	1.13*	1.20
<i>NcPGRP8</i>	MYA5431	1.16	1.25	1.09	1.16
<i>NcPGRP9</i>	MYA6110	1.00	0.99	0.95	0.91
<i>NcPGRP10</i>	MYA3588	1.08	1.10	1.06	1.10
<i>NcPGRP11</i>	MYA5399	0.91	0.99	1.05	1.03
<i>NcPGRP12</i>	MYA2333	1.08	1.08	1.05	1.06
<i>NcPGRP13</i>	MYA5815	0.98	0.99	1.07	1.04
<i>NcPGRP14</i>	MYA5888	1.04	1.09	0.91	0.91
<i>NcPGRP15</i>	MYA0445	1.03	1.06	1.01	1.07
<i>NcPGRP16</i>	MYA1878	1.04	1.02	1.02	1.01
<i>NcPGRP17</i>	MYB1585	1.12	1.05	1.07	1.02
<i>NcPGRP18</i>	MYB0588	1.03	1.04	1.02	1.06

大腸菌接種個体のマイクロアレイ解析により、*NcPGRP1-18* 遺伝子の発現量変化を調べた。大腸菌接種個体の遺伝子発現量を水注入個体の発現量に対する fold change の値で示した。t 検定を行った (*; $P < 0.05$)。実験条件は表 2-5 に準ずる。

表 2-8. 大腸菌接種 3 時間後の個体において著しく発現量が増加した遺伝子

発現量 増加順	プローブ名	Fold change	タンパク質名 (相同性検索) [E-value]
1	MYA2230	24.25	Unknown
2	MG0733	18.68	Unknown
3	MYA1827	11.00	Unknown
4	MYA5769	10.61	Unknown
5	NY0836	9.81	Unknown
6	EB1704	9.66	Hypothetical protein [1e-008]
7	MYA4531	9.02	Unknown
8	EB0496	8.89	Unknown
9	MG0643	7.34	Unknown
10	MG8870	6.73	Outer membrane autotransporter [0.009]
11	MG10054	6.41	Unknown
12	CE0158	5.76	Vitellogenin [2e-034]
13	MG3797	5.58	Unknown
14	MYA1640	5.24	Unknown
15	MG3246	5.00	Unknown
16	OV9281	4.89	Vitellogenin [7e-045]
17	MG2088	4.87	Unknown
18	MG3478	4.80	Unknown
19	MG10029	4.55	Unknown
20	Bac2401	4.33	Vitellogenin [6e-028]

羽化 1 日齢のメス成虫に大腸菌を接種し、3 時間後にマイクロアレイ解析を行った。発現量の増加が著しい順に 20 遺伝子を示した。プローブ名、コントロールに対する fold change の値、相同性検索の結果を示した。相同性検索 (BlastX) の結果、E-value が 0.1 以上のものを unknown とした。実験条件は表 2-5 に準ずる。

表 2-9. 大腸菌接種 12 時間後の個体において発現量が著しく増加した遺伝子

発現量 増加順	プローブ名	Fold change	タンパク質名 (相同性検索) [E-value]
1	MG10054	16.59	Unknown
2	OV7763	13.32	Keratin [0.005]
3	OV6805	12.78	Glycosyl hydrolase [4e-030]
4	MG8870	11.13	Outer membrane autotransporter [0.009]
5	OV6983	8.86	Keratin [0.007]
6	NY2028	8.27	Defensin A [2.5] * ¹
7	MG11027	6.51	Unknown
8	SGB10637	6.43	Keratin [6e-004]
9	CCA1963	6.19	GD12469 [1e-123]
10	MG7235	6.17	Keratin [0.007]
11	MG4985	5.04	Diptericin [3e-004]
12	MG2043	4.89	Diptericin [3e-004]
13	Bac4361	3.51	Hypothetical protein [5e-009]
14	MG10058	3.37	Unknown
15	MG9872	3.29	Unknown
16	MG2178	3.27	GH19454 [7e-004]
17	Bac3293	3.21	Unknown
18	MG1934	3.20	Dihydrolipoyl dehydrogenase [4e-024]
19	MG8968	3.03	Hypothetical protein [2e-022]
20	MG3038	2.99	Unknown

羽化 1 日齢のメス成虫に大腸菌を接種し、12 時間後にマイクロアレイ解析を行った。発現量の増加が著しい順に 20 遺伝子を示した。プローブ名、コントロールに対する fold change の値、相同性検索の結果を示した。相同性検索 (BlastX) の結果、E-value が 0.1 以上のものを unknown とした。実験条件は表 2-5 に準ずる。*¹ NY2028 はツマグロヨコバイの *defensin* 遺伝子の EST クローンである。

表 2-10. 大腸菌接種 3 時間後の個体において発現量が著しく減少した遺伝子

発現量 減少順	プローブ名	Fold change	タンパク質名 (相同性検索) [E-value]
1	NY1133	0.29	Unknown
2	Bac3747	0.32	Unknown
3	MG4303	0.37	Hypothetical protein [6e-025]
4	SGB0475	0.40	Adipokinetic hormone 2 [2e-014]
5	OV7469	0.43	Neural/ectodermal development factor IMP-L2 [1e-007]
6	NY1539	0.45	Unknown
7	MYA5546	0.46	Hypothetical protein [2e-011]
8	OV3885	0.47	Conserved hypothetical protein [5e-046]
9	NY0840	0.50	Large neutral amino acids transporter [2e-024]
10	SGB8180	0.50	Lip13 protein [4e-011]
11	CE0552	0.50	Reverse transcriptase [9e-020]
12	CCB6995	0.52	Pleckstrin homology-like domain [1e-021]
13	Bac4143	0.53	Unknown
14	TE0572	0.53	Unknown
15	MG3218	0.53	Unknown
16	SGB9452	0.53	Transposase [7e-029]
17	TE3976	0.54	ABC transporter ATP-binding protein [0.076]
18	Bac1255	0.54	Unknown
19	Bac5936	0.54	Flavin-containing monooxygenase [9e-037]
20	CCB5749	0.54	Proteasome 26S subunit [2e-067]

羽化 1 日齢のメス成虫に大腸菌を接種し、3 時間後にマイクロアレイ解析を行った。発現量の減少が著しい順に 20 遺伝子を示した。プローブ名、コントロールに対する fold change の値、相同性検索の結果を示した。相同性検索 (BlastX) の結果、E-value が 0.1 以上のものを unknown とした。実験条件は表 2-5 に準ずる。

表 2-11. 大腸菌接種 12 時間後の個体において著しく発現量が減少した遺伝子

発現量 減少順	プローブ名	Fold change	タンパク質名 (相同性検索) [E-value]
1	CE0158	0.10	Vitellogenin [2e-034]
2	OV9281	0.12	Vitellogenin [7e-045]
3	Bac3277	0.13	Vitellogenin [1e-121]
4	CE0620	0.14	Vitellogenin [4e-084]
5	CE0543	0.15	Vitellogenin [5e-063]
6	Bac1332	0.15	Vitellogenin [1e-077]
7	CE0546	0.16	Vitellogenin [5e-026]
8	Bac1944	0.20	Vitellogenin [1e-112]
9	CE0286	0.20	Vitellogenin [6e-032]
10	Bac4915	0.20	Vitellogenin [5e-053]
11	CE0621	0.20	Vitellogenin [5e-020]
12	SGB2687	0.21	Vitellogenin [2e-018]
13	CCA0293	0.21	Vitellogenin [5e-095]
14	Bac6163	0.21	Vitellogenin [5e-051]
15	MYA4936	0.22	Hexamerin [2e-021]
16	NY0478	0.25	Unknown
17	Bac4325	0.26	Vitellogenin [1e-112]
18	Bac4839	0.26	Vitellogenin [1e-111]
19	Bac2740	0.28	Hexamerin 2 beta [4e-019]
20	EB0551	0.30	Unknown

羽化 1 日齢のメス成虫に大腸菌を接種し、12 時間後にマイクロアレイ解析を行った。発現量の減少が著しい順に 20 遺伝子を示した。プローブ名、コントロールに対する fold change の値、相同性検索の結果を示した。相同性検索 (BlastX) の結果、E-value が 0.1 以上のものを unknown とした。実験条件は表 2-5 に準ずる。

表 2-12. *Rickettsia* 感染個体における抗菌ペプチド遺伝子の発現量変化

遺伝子名	プローブ名	Probe-1	Probe-2
<i>Defensin</i>	NY2028	2.65	–
<i>Diptericin</i>	MG2043	1.87	2.73
<i>Diptericin</i>	MG4985	1.94	1.93

Rickettsia 感染の有無による抗菌ペプチド遺伝子の発現量変化をマイクロアレイで解析した。非感染個体に対する感染個体の発現量変化を fold change の値で示した。抗菌ペプチド遺伝子としては *defensin* 1 種 (プローブ数 1 個)、*diptericin* 2 種 (MG2043 と MG4985、プローブ数各 2 個) がマイクロアレイ上に搭載されている。羽化 1 日齢のメス成虫 5 頭分の腹部からテンプレートを作製した。各々独立して作製したテンプレートを使用して 4 回の反復実験を行った。

表 2-13. *Rickettsia* 感染個体における *PGRP* 遺伝子の発現量変化

遺伝子発現量	有意差	プローブ数
増加	P < 0.01	11
	P < 0.05	34
減少	P < 0.01	3
	P < 0.05	3
変化なし	—	246
総数		297

Rickettsia 感染の有無により発現量に変化した *PGRP* 遺伝子の数をマイクロアレイで調べた。ツマグロヨコバイマイクロアレイには *PGRP* 遺伝子のプローブが 297 種 (150 遺伝子) 搭載されており、この中で非感染個体に比べて有意な発現量変化を示したプローブの数を示した。有意差検定は t 検定による。実験条件は表 2-12 に準ずる。

表 2-14. *Rickettsia* 感染個体で有意に発現量が増加した *PGRP* 遺伝子の fold change の値

プローブ名	Probe-1	Probe-2
Bac1388	1.53*	—
Bac4333	1.27*	—
MYA0253	1.29*	—
MYA0291	1.61*	1.62*
MYA0600	2.60**	2.60**
MYA1263	1.33**	1.57**
MYA1300	1.59*	1.75*
MYA2232	1.39*	—
MYA2532	1.48**	—
MYA2707	1.62*	1.65*
MYA2720	1.33*	1.32**
MYA3290	1.50*	—
MYA3588	1.41*	1.37*
MYA3624	1.39*	1.40*
MYA3907	1.57*	1.48*
MYA3916	1.65**	1.68**
MYA4109	1.59*	—
MYA4287	2.36**	2.60**
MYA4629	1.70*	—
MYA4912	1.47*	—
MYA5633	2.54**	—
MYA5700	1.59*	—
MYA5726	1.44*	1.38*
MYA5815	1.17*	—
MYA5839	1.47*	—
MYA5876	1.24*	—
MYA6142	1.28*	—
MYA6164	1.56*	—
MYB0681	1.46*	—
MYB0789	1.48*	1.48*
MYB1102	1.43*	—
MYB1719	1.41*	—

Rickettsia 感染の有無による *PGRP* 遺伝子の発現量変化をマイクロアレイで調べた。*PGRP* 遺伝子のプローブ 297 個 (150 遺伝子) の中で、コントロールに比べて有意に発現量が増加したプローブの fold change の値を示した。t 検定を行った (*; $P < 0.05$, **; $p < 0.01$)。実験条件は表 2-12 に準ずる。

表 2-15. *Rickettsia* 感染個体において発現量が著しく増加した遺伝子

発現量 増加順	プローブ名	Fold change	タンパク質名 (相同性検索) [E-value]
1	NY0782	35.02	Conserved hypothetical protein [0.001]
2	MG8840	22.97	Unknown
3	SGB0475	20.73	Adipokinetic hormone 2 [2e-014]
4	NY2307	16.25	Deviate [7e-034]
5	Bac0680	14.88	Ferritin [5e-047]
6	Bac3843	13.72	GA18418 [9e-037]
7	MYA5287	11.39	Unknown
8	SGB7325	10.06	Unknown
9	MYA6255	9.75	Unknown
10	EB1175	9.68	N-terminal asparagine amidohydrolase [5e-029]
11	TE2174	9.41	Unnamed protein product [0.045]
12	TE2467	9.31	Mitochondrial Solute Carrier family member [2e-034]
13	OV6534	8.76	Chitinase 1 [1e-004]
14	NY1517	8.34	Vacuolar protein sorting 33A [7e-035]
15	EA0757	8.08	Conserved hypothetical protein [7e-006]
16	EB0789	7.88	Pupal cuticle protein 78E [1e-030]
17	MG10054	7.07	Unknown
18	CCA0188	6.68	26S protease regulatory subunit S10B [1e-144]
19	TE3789	6.17	Glutamate dehydrogenase [1e-062]
20	SGB11539	6.15	Unknown

Rickettsia 感染個体のマイクロアレイ解析を行った。発現量の増加が著しい順に 20 遺伝子を示した。プローブ名、コントロールに対する fold change の値、相同性検索の結果を示した。相同性検索 (BlastX) の結果、E-value が 0.1 以上のものを unknown とした。実験条件は表 2-12 に準ずる。

表 2-16. *Rickettsia* 感染個体において発現量が著しく減少した遺伝子

発現量 減少順	プローブ 名	Fold change	タンパク質名 (相同性検索) [E-value]
1	EB0496	0.00	Unknown
2	EB1704	0.00	Hypothetical protein [1e-008]
3	CCA3702	0.02	Unknown
4	OV9997	0.06	Coiled-coil-helix-coiled-coil-helix domain-containing protein 2 [4e-018]
5	EB0002	0.10	Myosin IIIA [7e-007]
6	MG10603	0.10	G-protein coupled octopamine receptor [1e-020]
7	SGB3552	0.16	Nejire CG15319-PB [5e-073]
8	TE1832	0.16	ATP-dependent protease Ia 2 [4e-005]
9	TE2751	0.17	Hypothetical protein [2e-005]
10	MYA2186	0.20	Unknown
11	SGA0428	0.21	Gustatory receptor 64f [2e-016]
12	SGB11738	0.22	Hypothetical protein [3e-032]
13	MG0748	0.24	Salivary secreted protein [0.001]
14	NY1130	0.26	Unknown
15	MG9174	0.26	Gamma-aminobutyric acid type B receptor subunit 2 [1e-074]
16	SGB0247	0.27	Unknown
17	SGB3456	0.29	Unknown
18	Bac4178	0.30	Unknown
19	TE3391	0.31	Unknown
20	OV5642	0.31	Conserved hypothetical protein [4e-038]

Rickettsia 感染個体のマイクロアレイ解析を行った。発現量の減少が著しい順に 20 遺伝子を示した。プローブ名、コントロールに対する fold change の値、相同性検索の結果を示した。相同性検索 (BlastX) の結果、E-value が 0.1 以上のものを unknown とした。実験条件は表 2-12 に準ずる。

```

AACAAATTATTGTGGAGCAGATTAGGATCTGTCAAGTGCAAAACAATATTTCTACCATATAAATAGTCTACATATTTTCAAACAGATAAGT 90
ATTTTTTTAGTATGAAGAGGGGATAAATACGTAAACAATATCAATGAAACTACGAAAAGCCTTCGTAGGTTATTGTAGTTAACATAAGAAA 180
CTAAAACCTATTGAGGTGGTCAAACATGTAAGGCACCGGTGAAATTGAAGGTACTTCCCTATGGATGAAGAAGCTGAGGAAAAGCACTAAA 270
                                   M D E E A E E S T K
CCAGCAAGGAAATCAAAGGTCCTTTGCCTTTTCGTGCTGATAACTCGAAAGAAATGGGGAGCAACGGCGGGAGAGACGCCGAAGAATCAG 360
P A R K S K V P L P F V L I T R K K W G A T A G E T P K N Q
CGACTGAAGTACCCGGCGAACTTCGTGAGGTTTCGTGGAGACCACGACGACACTGAGGGGTATGACGACTGCTCCGAGTACATGCGAGAG 450
R L K Y P A N F V R F V E T T T T T E G Y D D C S E Y M R E
GTGCAGAAGTTCGCGATCAACACTGGTGACACGGACATCCCATACAATTTTCGTGATTGGACCAGACAACGTAGCGTACGAGGGTCTCGGT 540
V Q K F R I N T G D T D I P Y N F V I G P D N V A Y E G L G
TGGAAGATGGATGTTGGCCCTGGGAGGGGTCTCAAGCTTAAGTATCTACCGGTGACTGTGTGGACATCGCGTTCATCGGTTCTCTGGAA 630
W K M D V G P G R G L K L K Y L T G D C V D I A F I G S L E
GAGGGATTTATGCCTACCAGTGAAATGTTTAAAGTCGCTATTGATATTATTAATATGGGCTAGAAATGAACTACATATCTCCAACCTTAT 720
E G F M P T S E M F K V A I D I I K Y G L E M N Y I S P T Y
CTCCAGATACCTATCGACGGATGGCGGCCCTCATACTTCCTAAAACCACATCGGTAAAATTGACTATCTAGACGTCTAAATCGGCCACCT 810
L Q I P I D G W R P S Y F L K P H R *
GTAAACAAAAGTGTGATCAATTCAATAAATTAAGAATTCCAATGAGGTGACTTAAGACTAAATTTAAATACGTTACACITTAAGTTTTI 900
CATTATATGCTTAAATTGCTCTCAAAAAGTTTGAAGAATTAACCAAAATATTTTTATGATGTATGCACATTTACAACACAATTCAACAGTA 990
CACTTTTCACCAATTTCTGTAGCTTTTCCACAAATTAAGCTTTATGGATTTATTAATTTGTATGTTCTTAAAAATTTGGTTAATTCGA 1080
ACAAAATAATATATTTTGTATTACCTCTCCTTATTATAACCTTTTTGGTATTTACCGGCCATTATTCTTTGGACTTAGATTGCTAGCTGI 1170
ATGTATGTGATTCACGTGCAAAAAAAAAAAAAAAAAA 1204

```

図 2-1. *NcPGRP1* 遺伝子の cDNA 全長配列とアミノ酸配列

予想されるアミノ酸配列をコドンの第一塩基の下に示した。PGRP ドメインを赤色の太字で示した。* はストップコドンを示している。178 アミノ酸をコードしている。dsRNA 合成に用いた塩基配列を下線で示した (450 bp)。

CTTTAAAGGTTTAGAAAGGAACGGTCACATACCACTGGTTCTAATTATAACCCGTTAGATTACGAGTTTGTGCATCAGTTTTAGTTTGAATT 92
 CCGTCAGTTCCTTTTAGATCTGCAAAATACAACATAAAATGGGGGACATACCAGATGCTTTTGACCCGAAGAGGTTCCATAACATGGAGATA 182
 M G D I P D A F D P K R F H N M E I
 GATGGCATGGTGTGGAATGGATTGAGATGGAAGAAGAAGGACGAGGGGCTGATGAGGACGAGTCTTATGAGAAGCCGTACTTCTTGGAA 272
 D G M V W N G L R W K K K D E G P D E D E S Y E K P Y F L E
 GAACCTGGAATTCATTGCCAATCACCTCTAGAAAAGCCATCCAGACTGGCCTTACGTGCTCGACCTAGAATCGAAGCCATGACAGAC 362
 E P G I P L P N H P L E S H P D W P Y V L D P R I E A M T D
 GAGGAGGATGAAGACGAGAAACCCTTGGTCTTCGAAGATATGAGGGTAGACCCTTCCAAAGAGGACATTACTTACGTGCCCCCGTGGCTG 452
 E E D E D E K P L V F E D M R V D P S K E D I T Y V P P W L
 AGGCCGTACATCCC GCCGCCACCCGAGCCAGTATTAGGGAGGGCGAAAAGATCATCAACAAGCCGTGCTATATTGACGACGACCCCGC 542
 R P Y I P P P T R A S I R E G E K I I N K P C Y I D D D P R
AACACGTGGGTCTACAAGGAGCCGCACACCCACCCCTCGCCACCGTGTACGGGAGGAATGGGGCGCCCAAGGGTTCAAGCCCAAGTCA 632
 N T W V Y K E P H T P T L A T V S R E E W G A Q G F K P K S
CCCCTCGACGTCCTGTCAAACATGTGCGGTTACCTACACAGGTGGCGAAACTGATGACTTCCC CGAAGCTCTTGGCATACTGCAGACG 722
 P L D V P V K H V R F T Y T G G E T D D F P E A L G I L Q T
ATGCAGCAGAAGCACAAGGACCTGGGACTGGACGACATCGCTTACAACACTTGTATCGGGAGAGACGGCGCCATATACGAGGGCCGAGGA 812
 M Q Q K H K D L G L D D I A Y N Y L I G R D G A I Y E G R G
ATGTACGCGGACGCCAAGAGACCCAGGGAGTTCGATTACCTCAAAGGAGACTGCTTGGATATTGCTTACCTTGGAGATTTCAAAAACCTCA 902
 M Y A D A K R P R E F D Y L K G D C L D I A Y L G D F K N S
GACCCTGAGTGGTACCTTCTCAAATCTGCCATCGAAGTTATCAACCACGCCCTTGACAGATAAAAGTGCTTGTCTAACTTCAAGGTCATT 992
 D P E W Y L L K S A I E V I N H A L Q I K V L D P N F K V I
CCATACCGAACAATCAACAGATCACGCCTAACAATAATAAATGTGTTTTATCAGAATATTTATTTTACCTCTCTACATTTTTGGGTGA 1082
 P Y R T N Q Q I T P K Q *
 TCTATTTTTTATTTAGGTTGACTAGAAAACTTCTAAGATAAATTATTTTTAGTAACACATTTATTGGTAAACTCGGGTAATATAATAGG 1172
 CTATATTATTATTACCATAACCATGTAGAACTTGGATATCTTTAGTTTCGAAGTTTGTAAAGATTTACTTATTTTCATATGTTTACCATTG 1262
 CTTATGTAACAGTAACTAAAAGTTCTAATCATAAAAAAAAAAAAAAAAA 1309

図 2-2. *NcPGRP12* 遺伝子の cDNA 全長配列とアミノ酸配列
 予想されるアミノ酸配列をコドンの第一塩基の下に示した。PGRP ドメインを赤色の太字で示した。* はストップコドンを示している。300 アミノ酸をコードしている。dsRNA 合成に用いた塩基配列を下線で示した (481 bp)。

```

AgPGRP-LB  YVTRDFWSALPPKR---IEHFAGPIPYVVIHHSYRPA-----CYNGLQCIAAMQSMQKMHQD--ERQWN 60
AgPGRP-LC  LVTRTEWLAQPPRE--ELTDLKLVPNNVIAHT-ATEG-----CTTQTKCMYQVKLIQEFHSSPDSRNF 62
AmPGRP-LB  IVSRKEWQARPPVA--RELMDDKPKPYVVVHHGGI IQY-----CFDVKTCSAIVREYQNMHL D--ERG 61
AmPGRP-LC  FIERKEWGAQPPTT--QLIKMKLPVYVVIISHT-ATQF-----CSTQSECTFYVRFQTFHI E--SRN 60
AmPGRP-SA  IIKRNEWTNVQAKN---LNYLIIPIPYVVIHHT-VSLE-----CNSKDTCSINIEINIRSYHMD--TLN 59
BmPGRP-L6  IVSRSDWLAKLPV-ESKYLAKLSHPVWVVIISHT-ATES-----CSNQSQCVLVRVLIQT FHI E--SR 61
BmPGRP-S1  VVSKKQWDGLIPVH---VSYLARPVSLVIVQHT-VTFP-----CRTDAGCEELVRNIQTNHME--ALQ 59
BmPGRP-S2  IPIT-EWSGTESRR---KQPLKSPIDLVIQHT-VSND-----CFTDEECLLSVNSLRQHML--LAG 58
BmPGRP-S3  FVSR EEWGARPPMT--TSPLKVPVPIVVIHHSYIPKI-----CLVRAD CERDLRNMQRVHQV--TNG 61
DmPGRP-LA  VVDR EQWGASKNSH--GLT IPLKRP IYVVIITHIGVQSLP-----CDNIYKCSIKMRTIQD SAIA--EK 63
DmPGRP-LB  LLSRSDWGARLPKS---VEHFQGPAPYVVIHHSYMPAV-----CYSTPDCMKSMRDMQDFHQL--ER 60
DmPGRP-LC  FVERQQWLAQPPQK--EIPDL ELPVGLVIALPT-NSEN-----CSTQAI CVLRVRL LQTYDIE--SS 60
DmPGRP-LD  IVGHGIWSDMELQG---RGT LFDPIGVGTVI FHTG SN-----ECHDDCPDVLHKLERSHV G-- 54
DmPGRP-LE  IIPRSSWLAQKPM D--EPLPLQLPVKYVVIHT-ATES-----SEKRAINVR LIRD MQCFHIE--SR 60
DmPGRP-LFw  IVTRPYWLAQPPIV--PLTPLKLP IESVRFVAT-NTPS-----CFTQAECTFRVRL LQNWHIE--SNG 60
DmPGRP-LFz  ILDRSEWLGEPSPG--KYPHLKLPVSNIIHHT-ATEG-----CEQEDVCIYRMKTIQA FHMK--SFG 60
DmPGRP-SA  IKLRQWGGKPSLG---LHYQVRPIRYVVIHHT-VTGE-----CSGLLKCAEILQNMQAYHQN--EL 59
DmPGRP-SB1  IEPSSWGA V SARS--PSRISGAVDYVVIHHSNDPNP-----CSTSEQCKRMIKNIQS DHKG--RR 60
DmPGRP-SB2  IVPSSWCVPIISP--RMPRLMVPVRLIIHHT-VTAP-----CFNPHQCQLVLRQIRADHM--RR 59
DmPGRP-SC1a  VVSKAEWGGRGAKW---TVGLGNLYSYAVIIHHT-AGSY-----CETRAQCNAV LQSVQNYHMD--SL 59
DmPGRP-SC1b  VVSKAEWGGRGAKW---TVGLGNLYSYAVIIHHT-AGSY-----CETRAQCNAV LQSVQNYHMD--SL 59
DmPGRP-SC2  IISKS EWGGSATS---KTS LANYLSYAVIIHHT-AGNY-----CSTKAACITQLQNIQAYHMD--L 59
DmPGRP-SD  IVTRA EWNAKPPNG--AIDSMETPLPRAVIAHT-AGGA-----CADDVTC SQHMQNLQNFQMS--K 60
GmmPGRP-LB  I IARS EWGARDPIL---VEKFIGPSAFVIVHHSYTPEA---CYTTDDCKKAMRSMQDFHQL--ER 60
GmmPGRP-LC  LVTRKEWFARPHRD--TVVPLNLPV ERVIVSHT-ASDI-----CKTLEACIYRLGFIQNFHMD--SR 60
NcPGRP1  LITRKKWGATAGETPKNQRLKYPANFVRFVETTTTT EG-----YDDCS EYMR EVQKFRIN--TG 59
NcPGRP2  VVTRKQWNAHPPGK--KTRDL SLPVANI RFTHT-GTSP-----CGTFDECKKTLKKIQFEHMD--TL 60
NcPGRP3  IVSR EEWGALPRPGGEEVFTAKVPFVHQELNSG--TSQ-----CYSFEEC SRIVREI QRRDK E--L 60
NcPGRP4  HVSR EEWGAKPPTS--AVPFDKLPVREI ILGYT-ETET-----CDSKETCIKLMQDLQTKHMA--E 59
NcPGRP5  -LVREFW GALPHRG--EKPKYNTPTVSTVLVYDYLRCKP-----CVSDMDC TREVQAIQLRQR--RR 60
NcPGRP6  TISRE EWSAKTPRE--RRVQVLP AHTVTI SYT-DTEP-----CTTREECVRRVQTIQKLD MQ--E 59
NcPGRP7  VVRWDHWC KATYQSDTLV EALTMP ISTIIITL EERFDS-----CYTAE ECQQRMR EVQDHYAT--E 63
NcPGRP8  VIRR EEWGALPGKG---LEPMDLP I KHVLFSAENEFQY-----CLDEQECTHSVRSIQKH YLD--K 59
NcPGRP9  LITRE EWGAV EPRD--AKIIKLP AFHVI FTYCT-DAELRKWPLCKTQE ECSTKMQMQNYHME--E 65
NcPGRP10  METREK WYADPPSS---TKPLIGQAKYLF CAMQTECEP-----CKDKQHCGSLMREMQYEHAK--Y 60
NcPGRP11  VVSRQIWGALPPKK---SFRNIPI EYVYNGIT-RSPP-----CSNFQQCQHILQSIQTSHMA--V 57
NcPGRP12  TVSR EEWGAGGFKP---KSPLDVVPVKHVLVYASHTRC-----CYSLDECSAQLRNLQQRCFD--K 60
NcPGRP13  LIVREDW GAR EPLH---IDEYFELQADVLVNFDT EE-----CANNVHECIKAVQDLQKAHMD--A 58
NcPGRP14  VVPRAEWGA VSAL ETLAMEPTALPVDNVILTYFTNTAN---CEDSDSCHRKLREIQVAHMS--R 62
NcPGRP15  LI PRDEW GALPAKS---ETPMKLP LNHIRYNQT-MTDT-----CIAKEDCIKIVKDIQKHLD--K 58
NcPGRP16  MVTRDAWGA AASLE---METLVTPVSNICTYTG-TGT-----CSTQE EC SQILKDLQNNHMD--E 59
NcPGRP17  IVPRETWGAAPARV--ETPLPGGVVKNHVLVYASHTRC-----CYSLDECSAQLRNLQQRCFD--K 60
NcPGRP18  -----KPMHKPIQIAMFLHT-KTEE-----CNSREECVRF LQERKLDME--EFD 42
SzPGRP1  IVTRDEW GAKPPTG---VENLTLVPVYVVIHHSYIPAA-----CSTKEEC INDMQWMQNYHME--N 60
SzPGRP2  ILKRAEWGAR PALS--TSLLRQEPAPFVLIHHS-DTPQ-----CINEVACKLRLHGIQNYHMD--K 60
TcPGRP-LE  IVARRTWLAQPLD PDDVKFFKPKPKFVICH S-ASEE-----AYTQTDNNLLVRLIQQFHV--SR 62
TcPGRP-LF  ITVREWQAHV P SSS--TMPKLELPVRRVLF PANTTS-----CGSKSHCAKVLQELQLQHML-- 60
TcPGRP-SA  IVSRTRWGARTALE---VDYALIPVENVVVHHT-VTNT-----CSTEECAAILRNIQNFHME--NL 59
. * * * . . * . . * * * .

```

図2-3. 昆虫 PGRP のドメイン構造図 (1 ページ目)

PGRP アミノ酸配列のマルチプルアラインメントを行い、160 アミノ酸程度の PGRP ドメインを示した (3 ページに分割)。Ag, ハマダラカ (*Anopheles gambiae*); Am, セイヨウミツバチ (*Apis mellifera*); Bm, カイコ (*Bombyx mori*); Dm, ショウジョウバエ (*Drosophila melanogaster*); Gmm, ツエツエバエ (*Glossina morsitans morsitans*); Nc, ツマグロヨコバイ (*Nephotettix cincticeps*); Sz, コクゾウムシ (*Sitophilus zeamais*); Tc, コクヌストモドキ (*Tribolium castaneum*)。アミノ酸配列の accession number を補足表 4 に示した。各昆虫間でアミノ酸が 80% 一致した部分をアスタリスク (*) で、50% 一致した部分をピリオド (.) で示した。DmPGRP-LF は 2 つのドメインを保持しており、両ドメインを分割して各々をアラインメントした (DmPGRP-LFw, DmPGRP-LFz)。

AgPGRP-LB	D I G Y S F A V G G D G H V Y Q G R G F N V I G A H A P R	-----YNNRSVGI	C L I G D W V A	-----DLPPKNM	-----	L	113
AgPGRP-LC	D I A Y Q F L V G G D G N A Y E G R G W T K Q G A H T K G	-----FNVDSI	C I A F I G T F I A	-----DPPPIAQ	-----	L	115
AmPGRP-LB	D I G Y S F V I G E D G N A Y E G R G W D Y V G A H A P G	-----YNTQSI	G I C T I G D F S N	-----RLPNNAA	-----	L	114
AmPGRP-LC	D I G Y N F L V G G D G Y V Y V G R S W D Y M G A H A F G	-----YNNISIG	I S F I G T F N T	-----VKPSKQK	-----	L	113
AmPGRP-SA	D I G Y S F L I G G D G N I Y E G C G W N H E G A H T Y G	-----YNNKSI	S I A F I G N F Q N	-----KSASNKM	-----	L	112
BmPGRP-L6	D I G Y N F L V G G D G S A Y C G R G W D S V G A H T L G	-----YNNFAIG	I S F I G T F N N	-----NDPPKEQ	-----	L	114
BmPGRP-S1	D I G P S F L V G G N G K V Y E G S G W L H V G A H T Y G	-----YNSRSIG	V A F I G N F N T	-----DEPSGAM	-----	L	112
BmPGRP-S2	D L G Y S F V A G G N G K I Y E G A G W N H I G A H T L H	-----YNNISIG	I G F I G D F R E	-----KLPTQQA	-----	L	111
BmPGRP-S3	D I G Y S F A V G G E G T V F E G R G W S S I G A H A F G	-----VNTRSIG	I L L I G D F I T	-----NQPPQAK	-----	L	114
DmPGRP-LA	D I Q S N F Y V S E E G N I Y V G R G W D W A N T Y A N Q	-----TLAITFM	G D Y G R	-----FKPGPKQ	-----	L	112
DmPGRP-LB	D I G Y S F G I G G D G M I Y T G R G F N V I G A H A P K	-----YNDKSVG	I V L I G D W R T	-----ELPPKQM	-----	L	113
DmPGRP-LC	D I A Y N F L I G G D G N V Y V G R G W N K M G A H M N N I	-N-YDSQSL	S F A Y I G S F K T	-----IQPSAKQ	-----	L	115
DmPGRP-LD	E L P Y N F L V A G D C Q V F E A Q G W H Y R S Q Y P R D L N	-----GIDSL	V M A F V G N F S G	-----RPPIDCQ	-----	L	108
DmPGRP-LE	D I A Y N F L V G C D G N I Y E G R G W K T V G A H T L G	-----YNRISL	G I S F I G C F M K	-----ELPTADA	-----	L	113
DmPGRP-LFw	D I I Y N F V A A G D E N I Y E A R G W D	-----HSC	E P	-----PSSSN	-----	K	105
DmPGRP-LFz	D I G Y N F L V G G D G Q I Y V G R G W H I Q G Q H V N G	-----YG	A I S V S I A F I G T F V N	-----MEPPARQ	-----	I	113
DmPGRP-SA	D I G Y N F L I G N D G I V Y E G T G W L R G A H T Y G	-----YNAIG	T G I A F I G N F V D	-----KLPSDAA	-----	L	112
DmPGRP-SB1	D I G Y N F I V A G D G K V Y E G R G F L Q G S H S P N	-----YNRKSI	G I V F I G N F E R	-----SAPSAQM	-----	L	113
DmPGRP-SB2	D I G Y N F L I G G D G R I Y E G L G F G I R G E H A P R	-----YNSQSI	G I A F I G N F Q T	-----GLPPSQM	-----	L	112
DmPGRP-SC1a	D I G Y N F L I G G D G N V Y E G R G W N N M G A H A A E	-----WN	P Y S I G I S F L G N Y N W	-----DTLEPNM	-----	I	112
DmPGRP-SC1b	D I G Y N F L I G G D G N V Y E G R G W N N M G A H A A E	-----WN	P Y S I G I S F L G N Y N W	-----DTLEPNM	-----	I	112
DmPGRP-SC2	D I G Y N F L I G G D G N V Y E G R G W N V M G A H A T N	-----WNSKSI	G I S F L G N Y N T	-----NTL TSAQ	-----	I	112
DmPGRP-SD	D I G Y H Y L I G G N G K V Y E G R S P S Q R G A F A G P	-----NND	G S L G I A F I G N F E E	-----RAPNKEA	-----	L	113
GmmPGRP-LB	D I G Y S F G I G G D G N I Y V G R G F N V I G A H A P K	-----YNDKSVG	I C L I G D W R N	-----DLPTDKM	-----	L	113
GmmPGRP-LC	D I G Y N F L L G S D G R V Y E G R G W D L Q G A H T K G	-----YNSN	S L G I S F I G T F N T	-----GVPNDAQ	-----	L	113
NcPGRP1	D I P Y N F V I G P D N V A Y E G L G W K M D V G P G R G	-LKLKYL	T G D C V D I A F I G S L E E G	-----FMPTSEM	-----	F	118
NcPGRP2	D I C H N F M I G G Q G W V F E G R G W S H E P D M P S M Y S	-E-GNSQSL	Q I A Y I G D F E D	-----EAPPEL	-----	L	116
NcPGRP3	D I R Y N F L V G D D W N V Y E G R G W Y V T P E K T N E L P	-KYHAKY	E V A L I G N M N R P	-----NHPTFLQ	-----	S	117
NcPGRP4	D I R F S Y V V G L D N R V Y E G R G F R I Q A G E H P R Y P	-ALKGISV	E V V L T G E R G D	-----LPNGEN	-----	SW	115
NcPGRP5	D M Q F N F L V G S M G R V Y E G R G W H V K P E V D K R	--HKDL	E D D C L L V A M I G R D L D E	-----EFGPHRKKR	-----	FMMM	122
NcPGRP6	D I E H H F L V G G D G R V Y E G R G W R S T G R Q Y S Q E Q L A A	-LNNRSI	D I A Y I G Y Y E E	-----KEPNRKM	-----	V	117
NcPGRP7	N I P Y N F M I A N D G L V Y E G R G W K E K P W K S R L Y D	--DLK	R T M D I A V L G R D K V K	-----QEEALNV	-----	L	119
NcPGRP8	D I P Y N F I V G N D G N V Y E G R G W N N K P G P D V Q K D	-PSFKNN	P T L D I G V I C G H K E I	-----TPDKMDLVR	-----SAF	122	
NcPGRP9	D I P Y N F V V G G D G R M Y E G R G W Y L R P A K N K N	-WTC-I	Y G T S I E I A Y M G D H H A	-----KRPHKKM	-----	W	121
NcPGRP10	D I K Y N F L I G G D G R V Y E G R G W N V R P T L P Q R Y S	--DLSD	Q S Y Y I G F I G D L T E	-----EPSEIM	-----	L	115
NcPGRP11	D I R Y N F L I G S D M L I Y E G R G W F V Q P G L S S D Y	--WA-Q	K K K A L Y I G Y I G S F G L	-----DLPEGPK	-----	I	113
NcPGRP12	D I A Y N Y L I G R D G A I Y E G R G M Y A D A K R P R E	--FDY	L K G D C L D I A Y L G D F K N	-----SDPEWYL	-----	L	113
NcPGRP13	D I K Q N F L V G N D G H I Y E G R G F H T K P P F D P K W P	--DIS	N C M I T I A Y I G K R G M F P K K G M V R R A M E F I D V S R Q	-----		L	125
NcPGRP14	D I A Y N L L I G G D L K I Y E G R G W D W K P E K H D L F P	--DI	H D D S I E I A F I G D Y R D V	-----QAEIMGN	-----	L	120
NcPGRP15	D I K Y N F L I G G D G T F Y E G R G W N N K P E I H A A L K	-----DKDY	D V A Y I G K Y G D	-----DFPSWDQ	-----	S	112
NcPGRP16	D I L Y N F V I G G D G K I Y E G R G W T T Y A P P A L K G K R Y S G L D K K S I N V A M I G D Y K D	-----		-----TDPPENM	-----	H	118
NcPGRP17	D I F Y N F M I G G D G Q V Y E G R G W H L A P D K Y L R L G D H	--MD	P A T I Y V A Y I G D F A D	-----INPNIKQ	-----	W	117
NcPGRP18	D I Q F N F Y I S S D G A V Y E G R G W D I E A D K N S E D	--YET	A N R S V D I A Y I G D F E N	-----KDLSDQL	-----	I	98
SzPGRP1	D I G Y N F A V G G D N R I Y V G R G W T A V G A H A P R	-----Y	N A R S I G I V L I G D W T E	-----ILPPEEQ	-----	M	113
SzPGRP2	D I G Y N F M I G G D G T I F E G R G W G L T G A H A V K	-----Y	N S L S I G I C L L G N F Q E	-----TNPSAAQ	-----	L	113
TcPGRP-LE	D I S Y N F L V G A E G S V Y E G R G W K T V G A H T Q G	-----Y	N S V S I G I C F I G C Y I Q	-----NLPPSVA	-----	L	115
TcPGRP-LF	D I S Y N F I M T A D G R I F E G R G W D F E T S V Q N C T	-----V	N D T V T V A F L D E L D A	-----KAPTFRQ	-----	A	113
TcPGRP-SA	D I G Y N F L V G G D G Q I Y E G A G W H K V G A H T R G	-----Y	N S R S L G L G F I G N Y T T	-----QLPNKKQ	-----	I	112

** *.*. *.** ***** * *

図 2-3. 続き (2 ページ目)

```

AgPGRP-LB TAAQNLI EYGVNGLI AQNYTLLGHRQVRTT ECP - - - - GDRL FEEI KTWPHFDPMT D 166
AgPGRP-LC SAAQQLILLGMKENYLA SNYSLYGHRQLAPFESP - - - - GKALFDII KTWPHWSNKL G 168
AmPGRP-LB KTL EALIKYGISL GKISQDYHIIGHRQTKNTLCP - - - - GDKFY EYVQKFP RWT SKPI 167
AmPGRP-LC YVVQKLI ELGV EKGKIAPDYKLLGHRQVSTVLF - - - - SILTHFDR E IYERKCLKI E 166
AmPGRP-SA NAAHKLILCGSKGILREDVRVIGGKQVIATLSP - - - - GFELYKQIQNWP EWVSTP - 164
BmPGRP-L6 EACRKLIKRGVDL GKI AKDYKLF GHRQLSSTLSP - - - - GDKLF E I I V E W P H F A S D F T 167
BmPGRP-S1 EALRSLLRCGV ERGHL AGDYRVVAHRQLIASESP - - - - GRKLYNQIRRWPEWL ENVD 165
BmPGRP-S2 QAVQDFLACGV ENNLLT EDYHVVGHQQLINTLSP - - - - GAVLQSEI ESWPHWLDNAR 164
BmPGRP-S3 QSVKDLI EAGVRLGHIRSDYKLI GHRQVTPT ECP - - - - GQRLFDEI SKWDH FSLNWD 167
DmPGRP-LA EGVQFLLAHAVANRNI D VDYKLV AQNQTKVTRSP - - - - GAYVYQEIRNWP H F Y G C G M 165
DmPGRP-LB DAAKNL IAFGVFKGYI DPAYKLLGHRQVRT ECP - - - - GGRLFAEISSWPHFTHIND 166
DmPGRP-LC SVTRLLL ERGVKLGKI APSYRFTASSKLMPSVTD - - - - FKADALYASFANWTHWS - - - 166
DmPGRP-LE MAAQALIL ESKRRILQPIYQLFVLGSYT - - - - - - - - DALQR ELRHWP HYASH 163
DmPGRP-LD NMCRRLLARGV EDGHISTDYRLICHCCQNSTESP - - - - GRRLYEEIQTWPHFY - NI E 155
DmPGRP-LFw KIALELIKGGIKLGHISKNYSLI - - - - - - - - DDL - EKS - - - - - 134
DmPGRP-LFz EAAKRLMDEGVRHLHRLQPDYHIY AHRQLSPTESP - - - - GQKLFELMQNWP RFTQDPT 166
DmPGRP-SA QAAKDL LACGVQQGELS EDYAL IAGSQVISTQSP - - - - GLTLYNEIQEWPHWLSNP - 164
DmPGRP-SB1 QNAKDLI ELAKQRGYLKDNYTLFGHRQTKATSCP - - - - GDALYNEIKTWPHWRQN - 164
DmPGRP-SB2 QAARTL IIAVQRRQVSPNYSVVGHCQTKATACP - - - - GIHLLELKKWPNWRPKP - 164
DmPGRP-SC1a SAAQQLLNDAVNRGQLSSGYILY GHRQVSAT ECP - - - - GTHIWN EIRGWSHWSG - - - 162
DmPGRP-SC1b SAAQQLLNDAVNRGQLSSGYILY GHRQVSAT ECP - - - - GTHIWN EIRGWSHWSG - - - 162
DmPGRP-SC2 TAAKGLLSDAVSRGQIVSGYILY GHRQVGS ECP - - - - GTNIWNEIRTWSNWK A - - - 162
DmPGRP-SD DAAKELL EQAVKQAQLV EGYKLLGHRQVSATKSP - - - - GEALYALIQQWPNWS EEM - 165
GmmPGRP-LB QATRDLI AFGLSQGYI HRQYQLL GHRQVRAT ECP - - - - GDRLYKEIKTWPHFSPVFN 166
GmmPGRP-LC QAFRLLI DEALRLK KLVENYKLYGARQFAPTESP - - - - GLALYKLIQTWPHWTNET E 166
NcPGRP1 KVAIDI IKYGLEMNYISPTYLQIP - - - - - - - - I D G W R P S Y F L K P H R - - - - 156
NcPGRP2 KAAMEI VVYITRKRMI FHF FKG IHLN - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - 142
NcPGRP3 KMLWSVFKKGLEELKVMDDQNFTL - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - 156
NcPGRP4 VMYRLLDVAAFEDGTIEFDEPMYTLDDDPPTDY - - - - DNMAAKEVDELNKISRPI L 168
NcPGRP5 KGLEEWLRYSVENNYITPNFLQYVGPSARQGAV - - - - DIPDHILKMKQKPEYRPKL 175
NcPGRP6 DAVIELLRFGLYRKFIDSRLLKVS DILGHE - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - 146
NcPGRP7 - - LHTFVINCM DMKAIADNYTVKSRGETKLF - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - 149
NcPGRP8 QLAEDFVKFGIQEKKVEADYEFEGFSDDVKAPDE - - - - PSLNDKLEADFE EFALKHPD 176
NcPGRP9 RAAWDFIVFAVMNNLLARDYEFIE NYDQERLDAI - - - - QRTKWPYKQYYHYMGV - - - 171
NcPGRP10 ESRDLLMTHMLNSHKLNSKFLHFMLTRLDLKFVM - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - 155
NcPGRP11 PGGMVELANNLVLYGLENGYIRQN - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - 144
NcPGRP12 KSAIEVINHALQIKVLDPNFKVIP - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - 177
NcPGRP13 DPNCLQPNVGVYLDYFDPTPMTDELYNYLHTKE - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - 148
NcPGRP14 KECLSIIDLGVQKNVREFFHIKESTPKLRLDTLGN DERGGTRIKRT EL EECPIYPV 172
NcPGRP15 VAGTKFIKFGLEKEYINRGHGITN - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - 142
NcPGRP16 MARKDLIDYAKEQNYIDPSTAA MW HGF - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - 145
NcPGRP17 HAGWKLLEHGFRNKIISERDFFMY - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - 144
NcPGRP18 QVGCDLIFWAKKIPGLLHEHINI TTFWEDHIHIL - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - 151
SzPGRP1 LAAKQLINMGI RDGYIS ENYKLI GHRQVRET ECP - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - 166
SzPGRP2 TALESLIECGVKEEKIHTQYRLMGHRQVSATACP - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - 164
TcPGRP-LE RKAKELIRYGVKIGAI SEDYTL LGHCQCRSTESP - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - 168
TcPGRP-LF EAAKMFL EVAVTEGKLERCFNTAVWGGNKFFIDL - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - 162
TcPGRP-SA QAAKDFLQCGVELGELGSKFKLFGARQVSATESP - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - 165

```

図 2-3. 続き (3 ページ目)

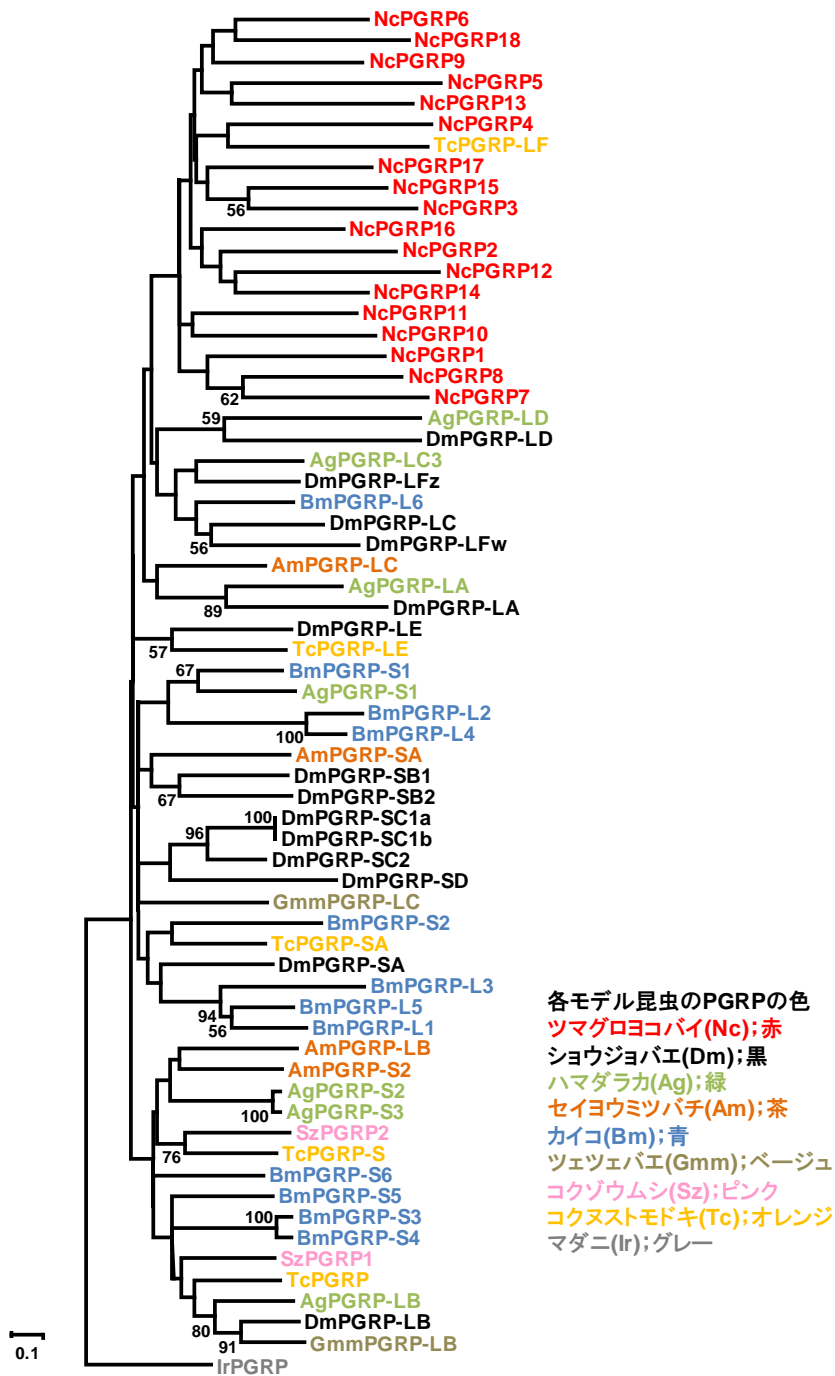


図 2-4. 昆虫における PGRP の系統関係

Neighbor-Joining 法 (NJ) により系統樹を作成した。図中の数字は 1000 回反復によるブートストラップ値のうち 500 回以上反復したものを 1/10 表記で示した。Ag, ハマダラカ (*Anopheles gambiae*); Am, セイヨウミツバチ (*Apis mellifera*); Bm, カイコ (*Bombyx mori*); Dm, ショウジョウバエ (*Drosophila melanogaster*); Gmm, ツェツェバエ (*Glossina morsitans morsitans*); Nc, ツマグロヨコバイ (*Nephotettix cincticeps*); Sz, コクゾウムシ (*Sitophilus zeamais*); Tc, コクヌストモドキ (*Tribolium castaneum*)。外群としてマダニ (*Ixodes ricinus*, Ir) の PGRP を用いた。DmPGRP-LF は 2 つのドメインを保持しており、各ドメインに分割した上で同時に解析した (DmPGRP-LFw, DmPGRP-LFz)。

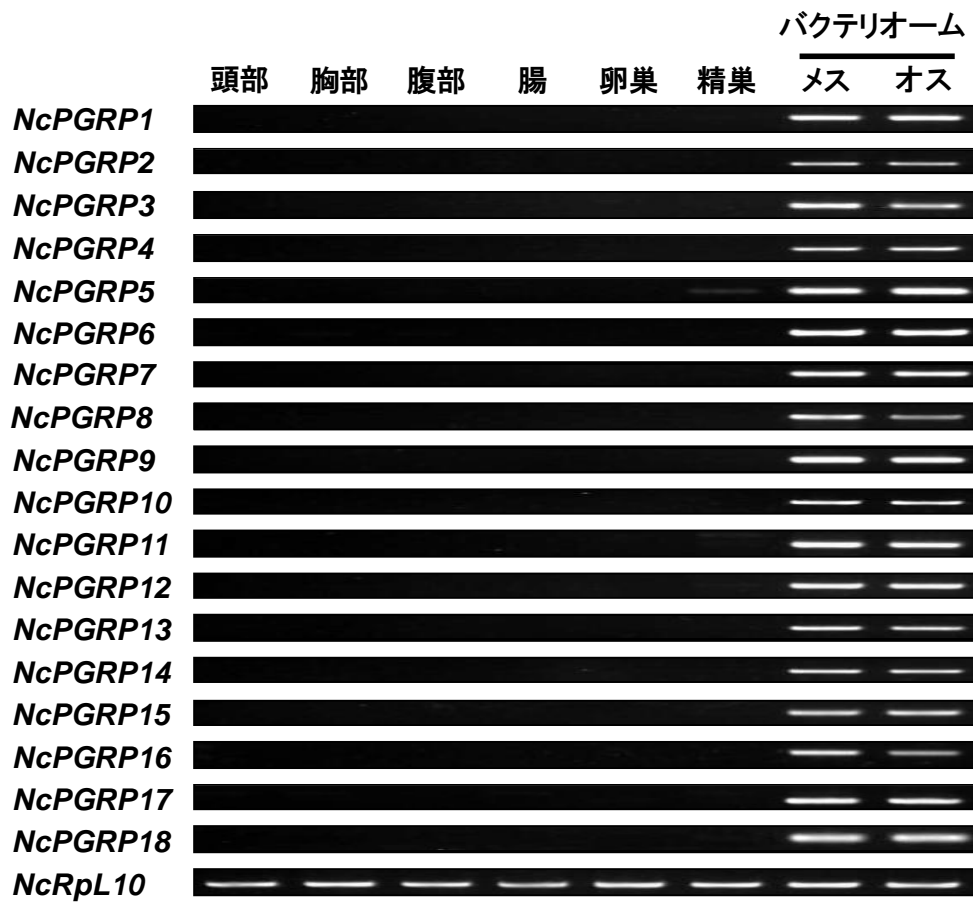


図 2-5. ツマグロヨコバイ *PGRP* 遺伝子 18 種 (*NcPGRP1-18*) の組織別発現解析
 羽化 3 日齢のメス成虫の頭部、胸部、腹部、腸、卵巢、バクテリオーム及び羽化 3 日齢
 のオス成虫の精巢、バクテリオームを用いて組織別 RT-PCR を行った。コントロールと
 して *ribosomal protein L10* (*NcRpL10*) の遺伝子発現を示した。腹部からはバクテリオーム
 を除いた。

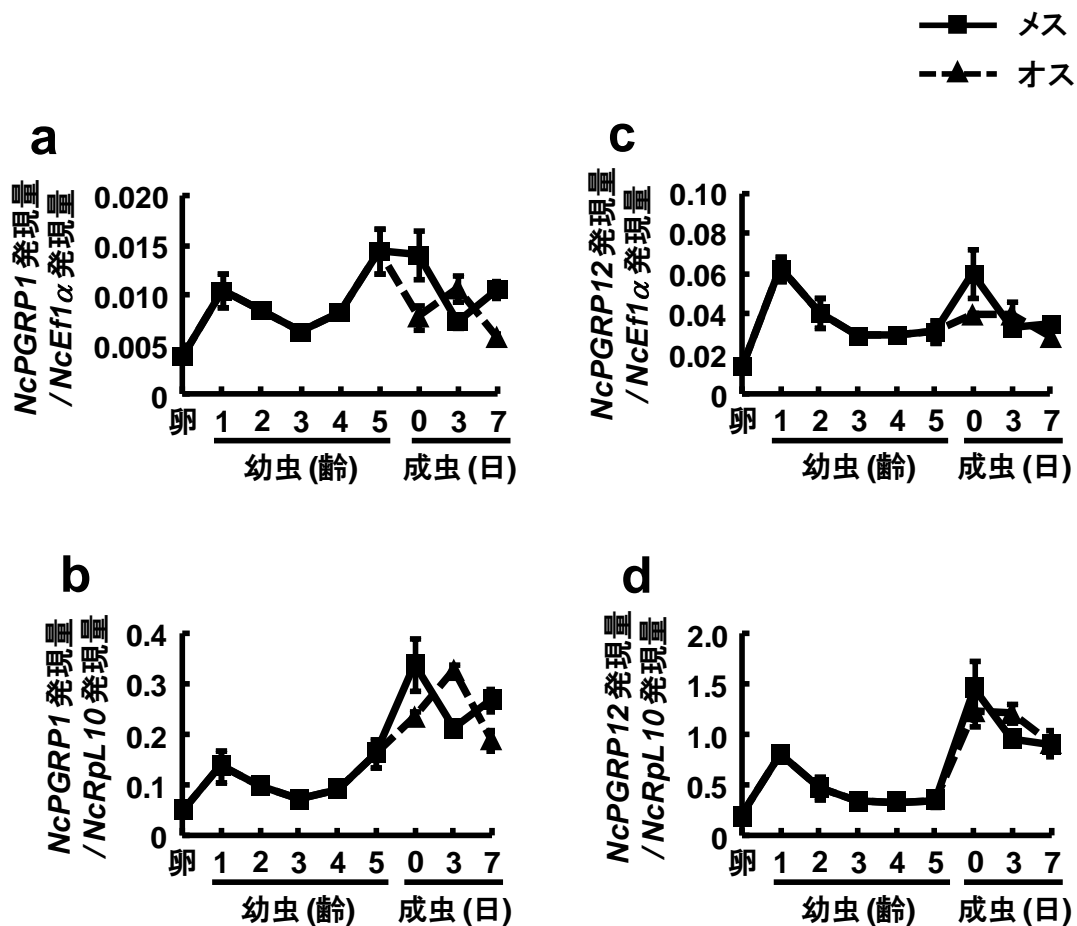


図 2-6. *NcPGRP1* 遺伝子と *NcPGRP12* 遺伝子の時期別発現量変化

ツマグロヨコバイの卵、1-5 齢幼虫、成虫における定量 RT-PCR による遺伝子の発現量変化。(a) 標準化遺伝子 *elongation factor 1α* (*NcEfl1α*) 発現量に対する *NcPGRP1* 遺伝子の相対的発現量。(b) 標準化遺伝子 *ribosomal protein L10* (*NcRpL10*) 発現量に対する *NcPGRP1* 遺伝子の相対的発現量。(c) *NcEfl1α* 発現量に対する *NcPGRP12* 遺伝子の相対的発現量。(d) *NcRpL10* 発現量に対する *NcPGRP12* 遺伝子の相対的発現量。卵は全体から、幼虫と成虫は腹部からテンプレートを作製した。各々独立して作製したテンプレートを使用して 3 回の反復実験を行った。エラーバーは標準誤差。

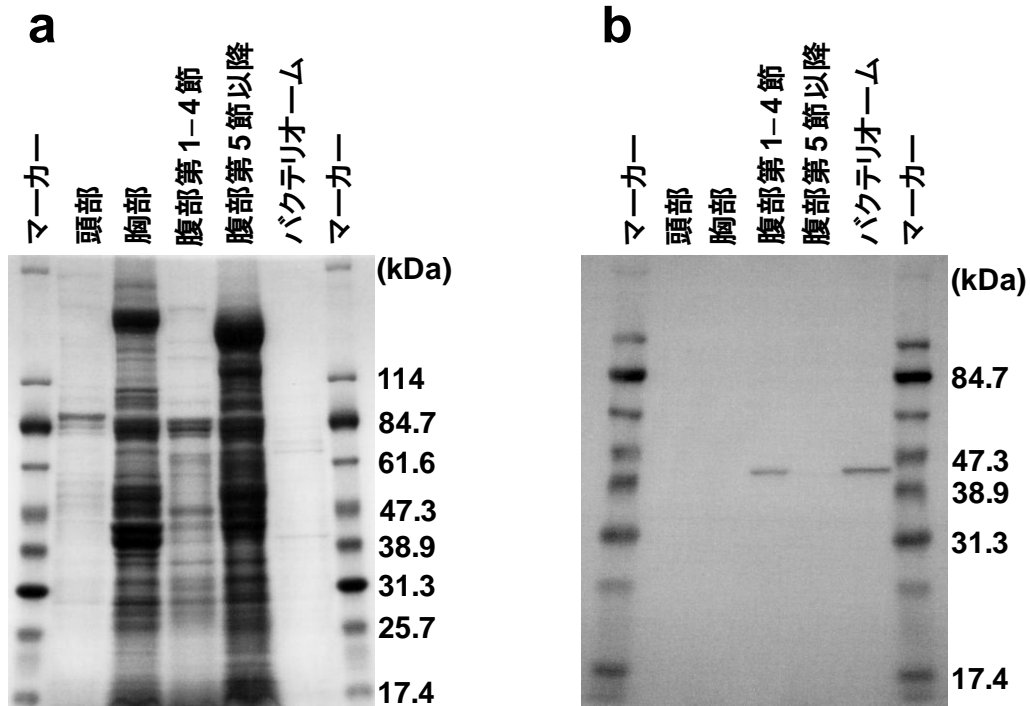


図 2-7. NcPGRP12 のタンパク質発現部位

羽化 3 日齢のメス成虫の頭部、胸部、腹部第 1-4 節、腹部第 5 節以降及びバクテリオームを用いて組織別ウェスタンブロッティングを行った。(a) Coomassie Brilliant Blue 染色。(b) NcPGRP12 抗体によるウェスタンブロット。10 頭分の各組織からサンプルを製作した。腹部第 1-4 節はバクテリオームを含んでいる。

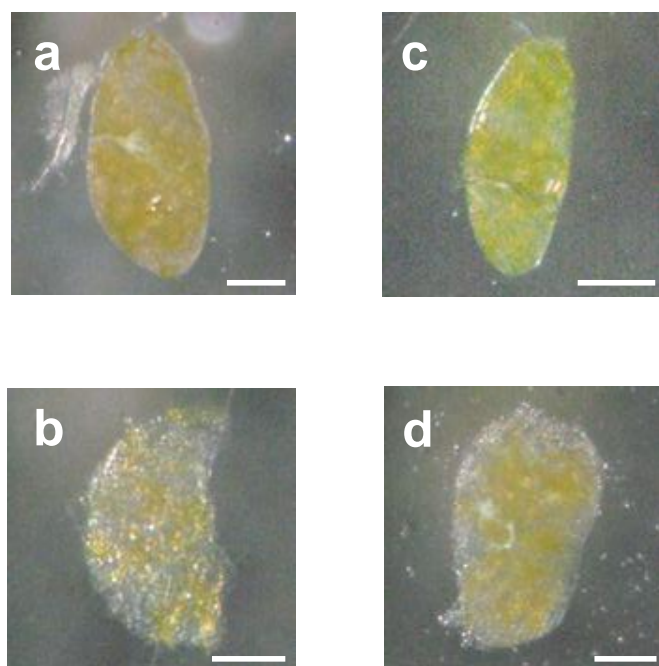


図 2-8. 抗生物質処理のバクテリオームに対する影響

0.05%の抗生物質溶液で育てたイネを餌として、ツマグロヨコバイ幼虫を1齢0日齢から5齢0日齢まで飼育した。(a) 無処理の5齢幼虫のバクテリオーム。(b) テトラサイクリン。(c) リファンピシン。(d) アンピシリン。Bar = 0.1 mm。

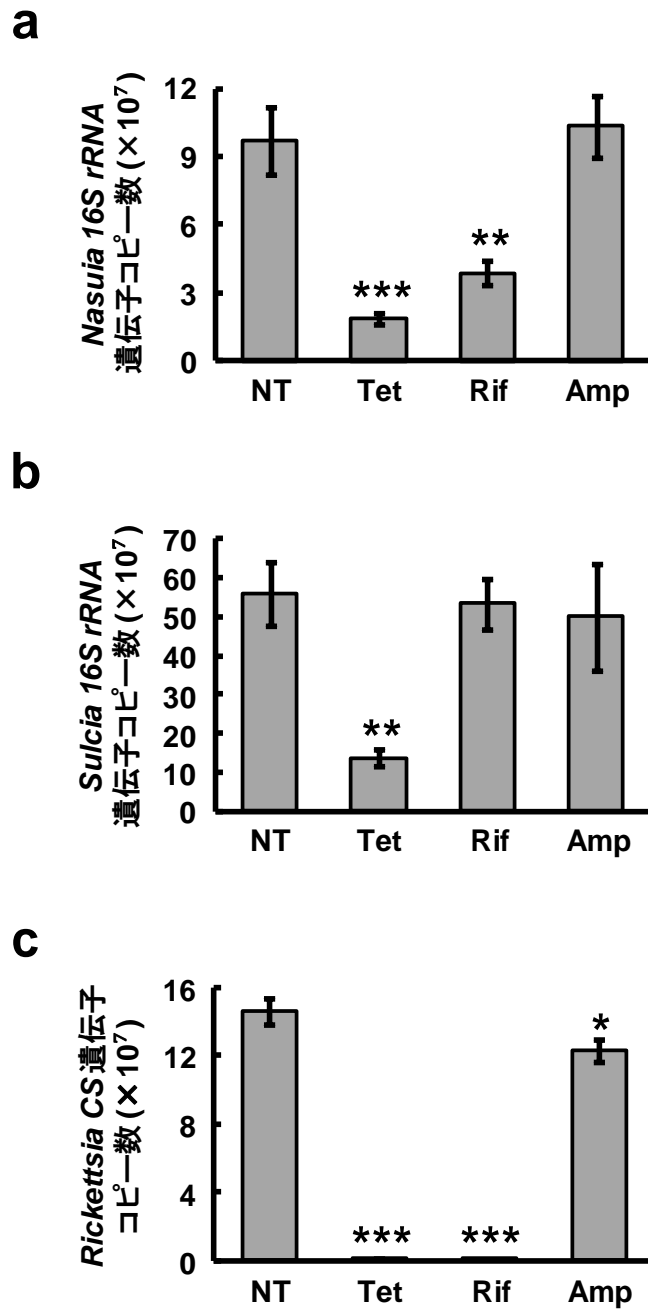
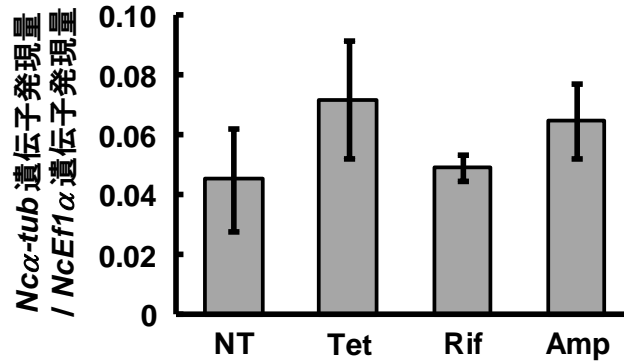


図 2-9. 共生細菌に対する抗生物質処理の影響

抗生物質処理個体 5 齢 0 日齢における共生細菌数を定量 PCR で測定した。(a) *Nasuia* の 16S ribosomal RNA (16S rRNA) 遺伝子の 1 個体あたりのコピー数。(b) *Sulcia* の 16S rRNA 遺伝子の 1 個体あたりのコピー数。(c) *Rickettsia* の citrate synthase (CS) 遺伝子の 1 個体あたりのコピー数。NT, 無処理; Tet, テトラサイクリン (Tetracycline) 処理; Rif, リファンピシリン (Rifampicin) 処理; Amp, アンピシリン (Ampicillin) 処理。5 齢 0 日齢の幼虫全体からテンプレートを作製した。12 頭から個別にテンプレートを作製した。Turkey の多重比較検定を行った (**; $P < 0.01$, ***; $P < 0.001$)。エラーバーは標準誤差。

a



b

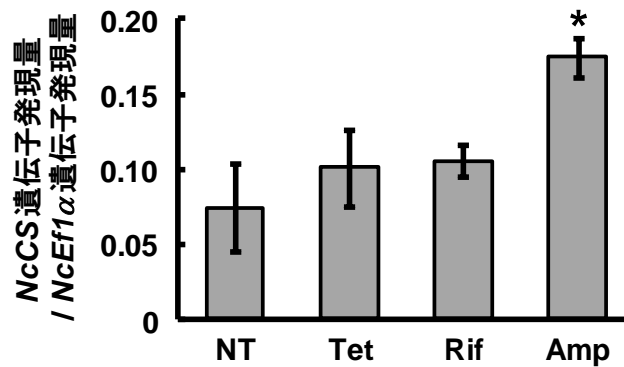


図 2-10. ハウスキーピング遺伝子 (α -tubulin, citrate synthase) の発現に対する抗生物質処理の影響

(a) 抗生物質処理個体における α -tubulin (*Ncα-tub*) 遺伝子の発現量を定量 RT-PCR により測定した。(b) 抗生物質処理個体における citrate synthase (*NcCS*) 遺伝子の発現量。NT, 無処理; Tet, テトラサイクリン (Tetracycline) 処理; Rif, リファンピシリン (Rifampicin) 処理; Amp, アンピシリン (Ampicillin) 処理。5 齢 0 日齢の幼虫 5 頭分の腹部第 1-4 節からテンプレートを作製した。各々独立して作製したテンプレートを使用して 3 回の反復実験を行った。標準化遺伝子として *elongation factor 1α* (*NcE1α*) 遺伝子を用いた。Turkey の多重比較検定を行った (*; $P < 0.05$)。エラーバーは標準誤差。

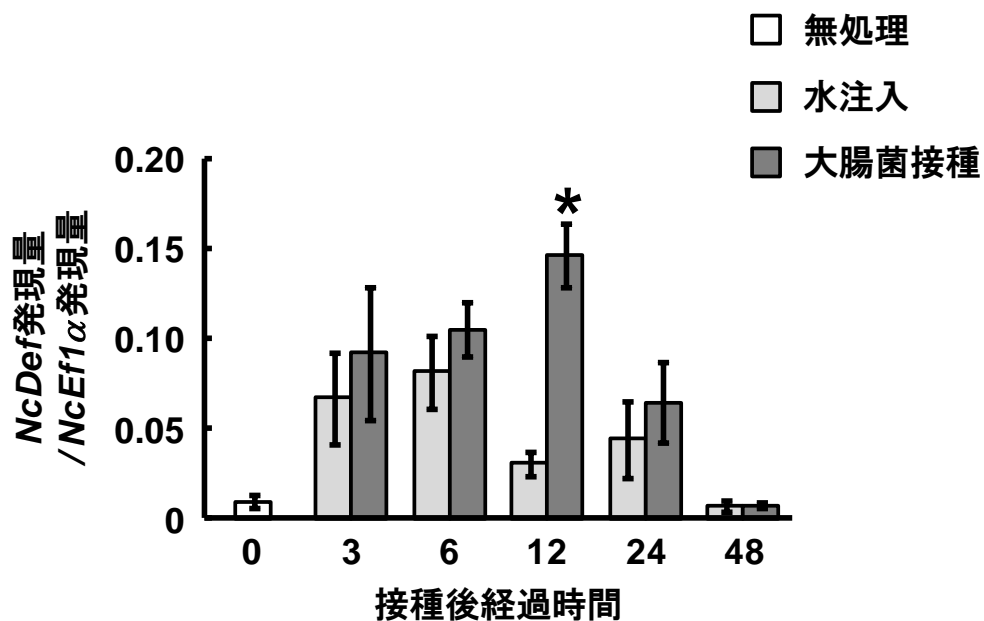


図 2-11. 大腸菌接種によって引き起こされるツマグロヨコバイの免疫応答
 大腸菌を接種した個体の抗菌ペプチド遺伝子 *defensin* (*NcDef*) の発現量を定量 RT-PCR で測定した。羽化 1 日齢のメス成虫に 1.5×10^3 の大腸菌 (DH5 α) を注入し、腹部 5 頭分からテンプレートを作製した。各々独立して作製したテンプレートを使用して 3 回の反復実験を行った。標準化遺伝子として *elongation factor 1 α* (*NcEf1 α*) 遺伝子を用いた。Turkey の多重比較検定を行った (*; $P < 0.05$)。エラーバーは標準誤差。

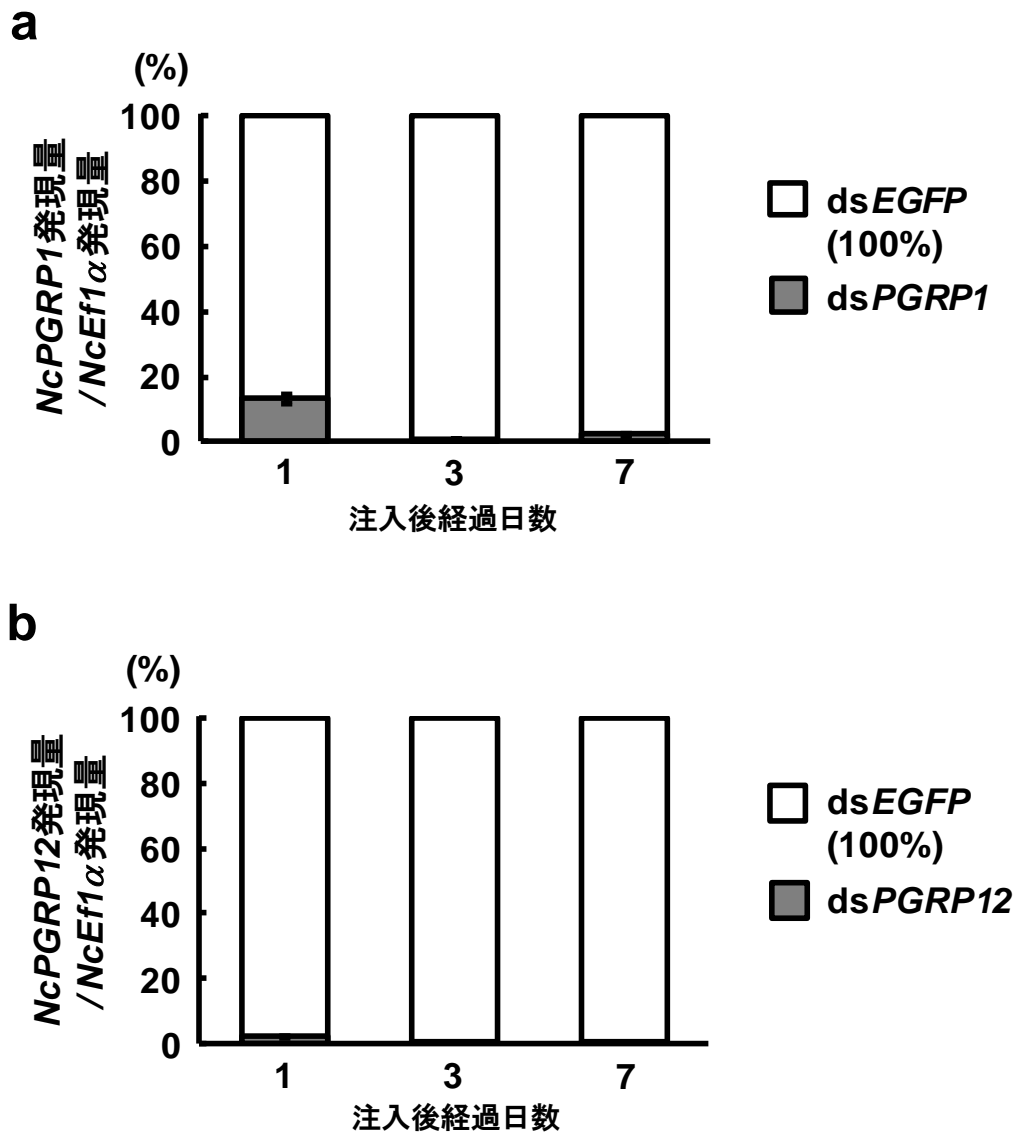


図 2-12. *NcPGRP1* 遺伝子と *NcPGRP12* 遺伝子の RNAi (メス成虫)

羽化 0 日齢のメス成虫に dsRNA 60 ng を注入した。注入 1, 3, 7 日後に遺伝子発現量を調査した。コントロールとして *EGFP* 遺伝子の dsRNA を注入した。(a) *NcPGRP1* 遺伝子の発現量。(b) *NcPGRP12* 遺伝子の発現量。コントロール個体の発現量を 100% とした。腹部第 1-4 節からテンプレートを作製した。10 頭から個別にテンプレート作製した。標準化遺伝子として *elongation factor 1α* (*NcEfl1α*) 遺伝子を用いた。エラーバーは標準誤差。

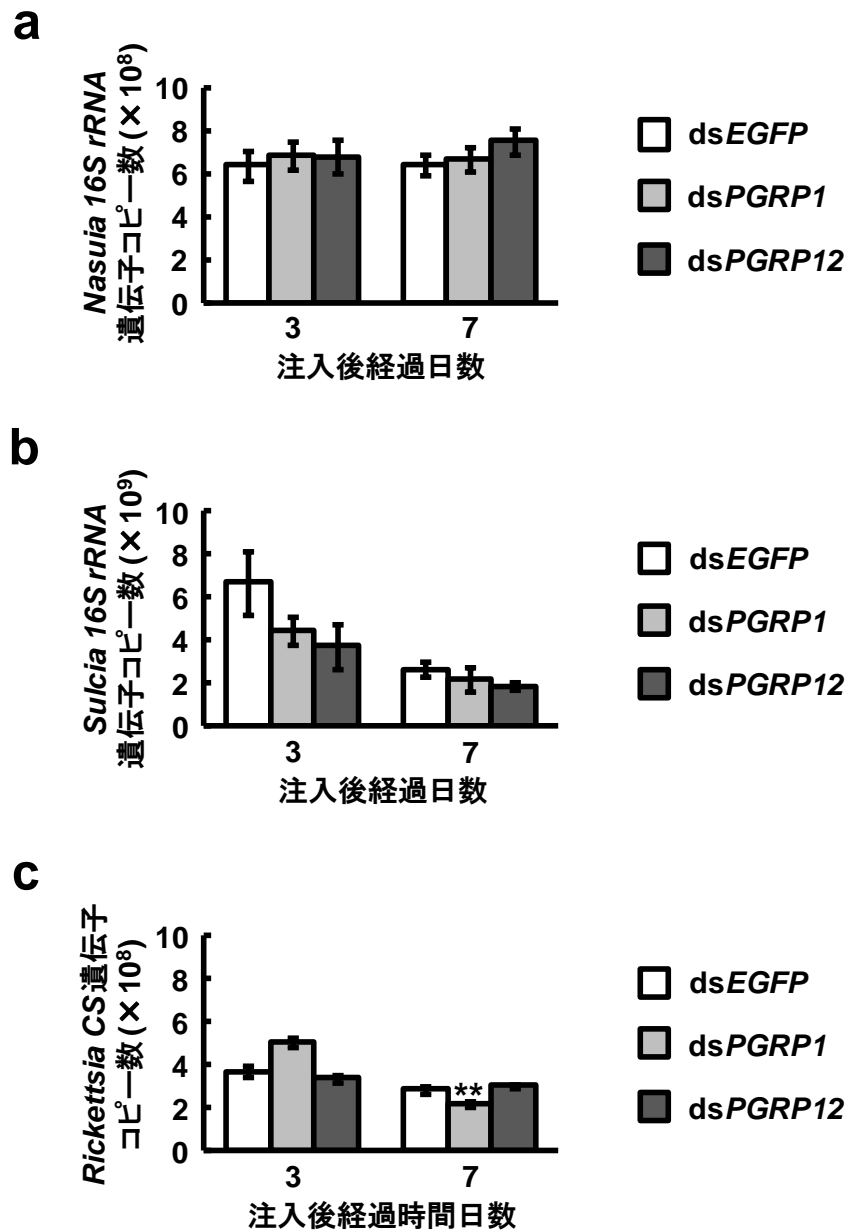


図 2-13. dsPGRP1, dsPGRP12 注入個体における共生細菌数の測定 (メス成虫)
 RNAi 表現型として共生細菌数を定量 PCR で測定した。(a) *Nasuia* の 16S ribosomal RNA (16S rRNA) 遺伝子のコピー数。(b) *Sulcia* の 16S rRNA 遺伝子のコピー数。(c) *Rickettsia* の citrate synthase (CS) 遺伝子のコピー数。羽化 0 日齢のメス成虫に 60 ng の dsRNA を注入し、1, 3, 7 日後の虫体全体からテンプレートを作製した。12 頭から個別にテンプレートを作製した。コントロールとして *EGFP* 遺伝子の dsRNA を注入した。Turkey の多重比較検定を行った (**; $P < 0.01$)。エラーバーは標準誤差。

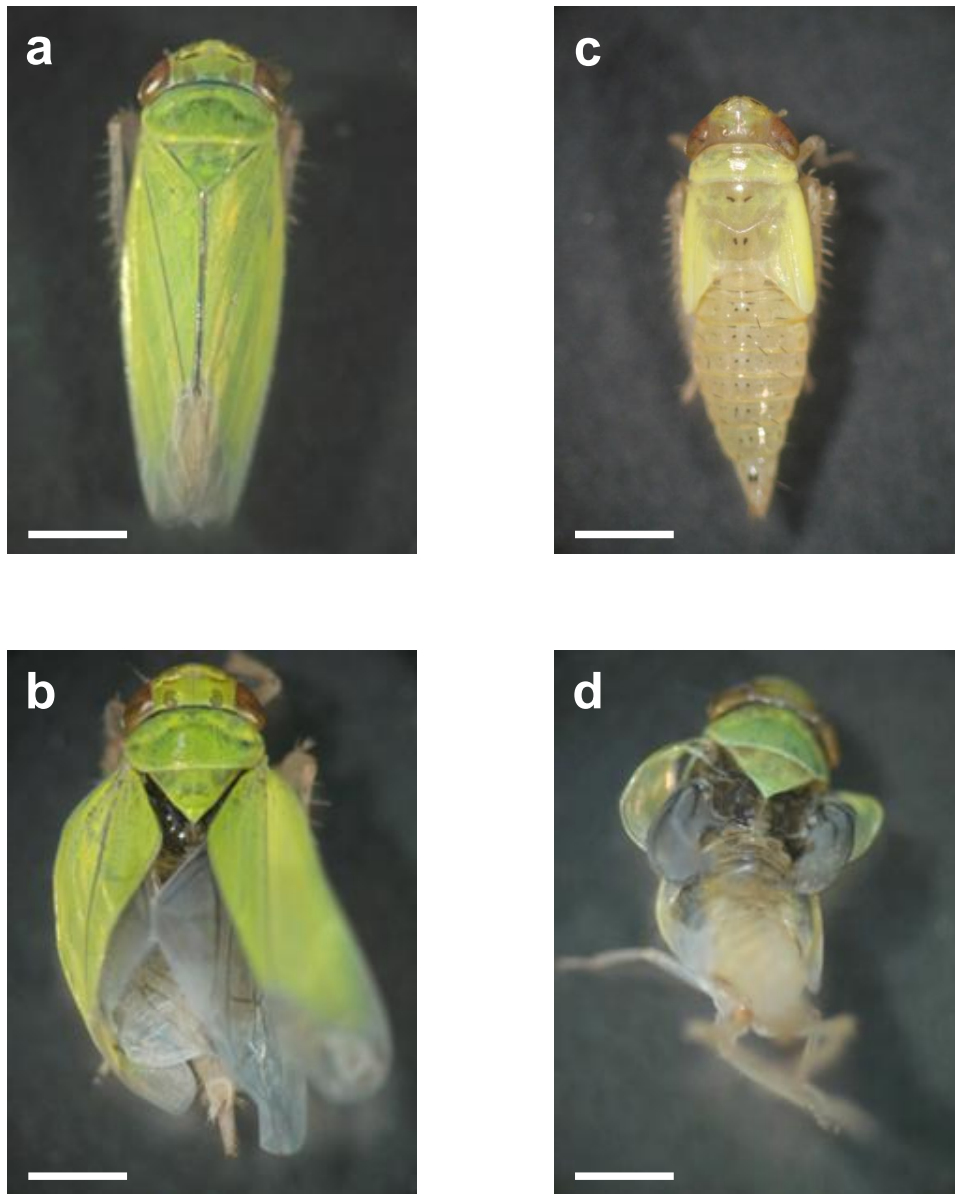


図 2-14. 成虫への羽化に失敗した個体

(a) 正常個体 (メス)、(b) 翅異常個体 (メス)、(c) 正常個体 (5 齢幼虫)、(d) 羽化中に死亡した個体 (5 齢幼虫) を示した。Bar = 1 mm。

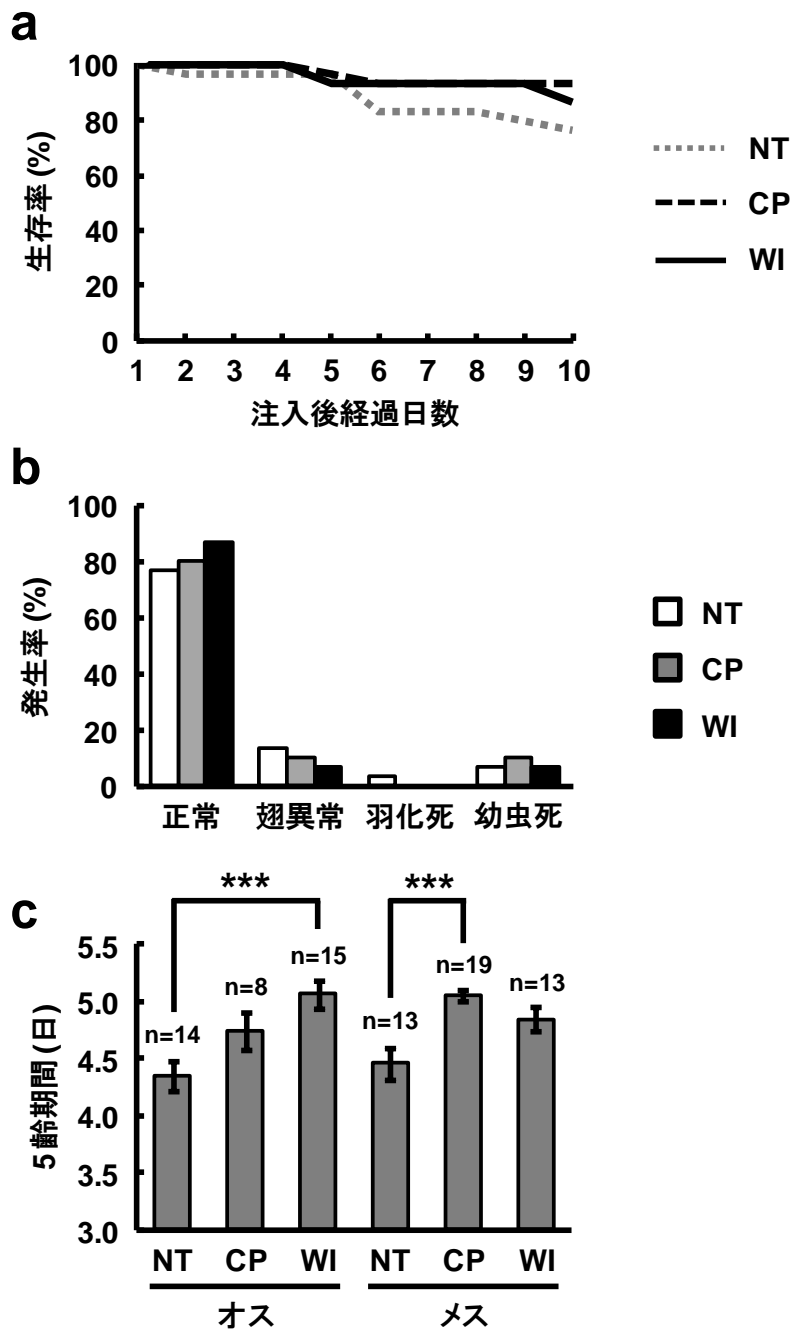


図 2-15. 5 齢幼虫の生存と発達に対するインジェクション操作の影響

5 齢 0 日齢の幼虫にインジェクション操作を行った。(a) インジェクション操作を行った個体の生存率。インジェクション 1 日後から生存していた 30 頭をさらに 9 日間観察した。(b) インジェクション操作を行った個体の成虫発生率。正常、正常に羽化した個体；翅異常、羽化時に翅の異常が見られた個体；羽化死、羽化中あるいは直後に死亡した個体；幼虫死、5 齢幼虫時に死亡した個体。(c) インジェクション操作を行った個体の 5 齢幼虫期間。NT, 無処理 (non-treatment); CP, 針刺し (capillary piercing); WI, 水注入 (water injection)。実験に用いた頭数 (n) を図中に示した。Bonferroni 補正をした t 検定を行った (***)。エラーバーは標準誤差。

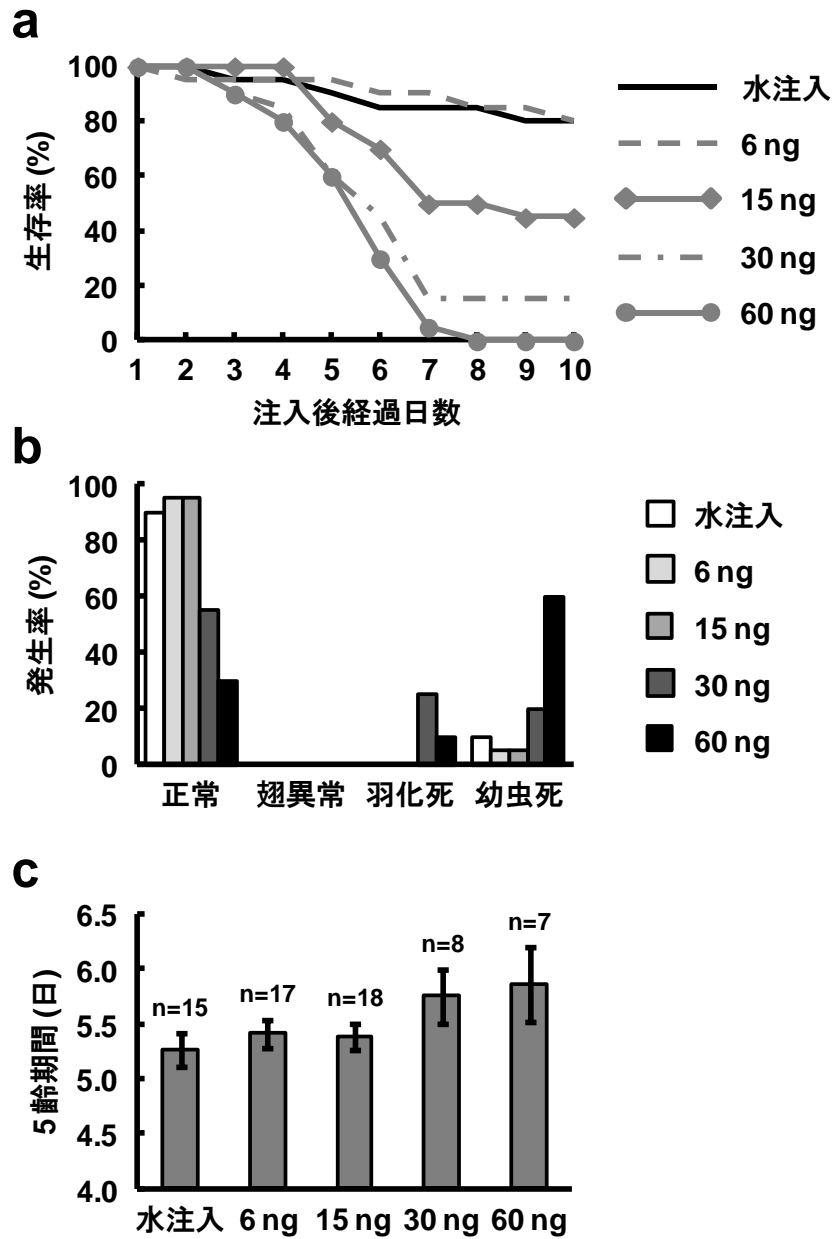


図 2-16. 5 齢幼虫の生存と発達に対する dsEGFP 注入の影響

5 齢 1 日齢の幼虫に *EGFP* 遺伝子の dsRNA を 6, 15, 30, 60 ng 注入した。(a) 注入個体の生存率。注入 1 日後に生存していた 30 頭を、さらに 9 日間観察した。(b) 注入個体の成虫発生率。正常、正常に羽化した個体；翅異常、羽化時に翅の異常が見られた個体；羽化死、羽化中あるいは直後に死亡した個体；幼虫死、5 齢幼虫時に死亡した個体。(c) 注入個体の 5 齢幼虫期間。オス個体の数が少なかったため、メス個体のみを用いた。実験に用いた頭数 (n) を図中に示した。エラーバーは標準誤差。

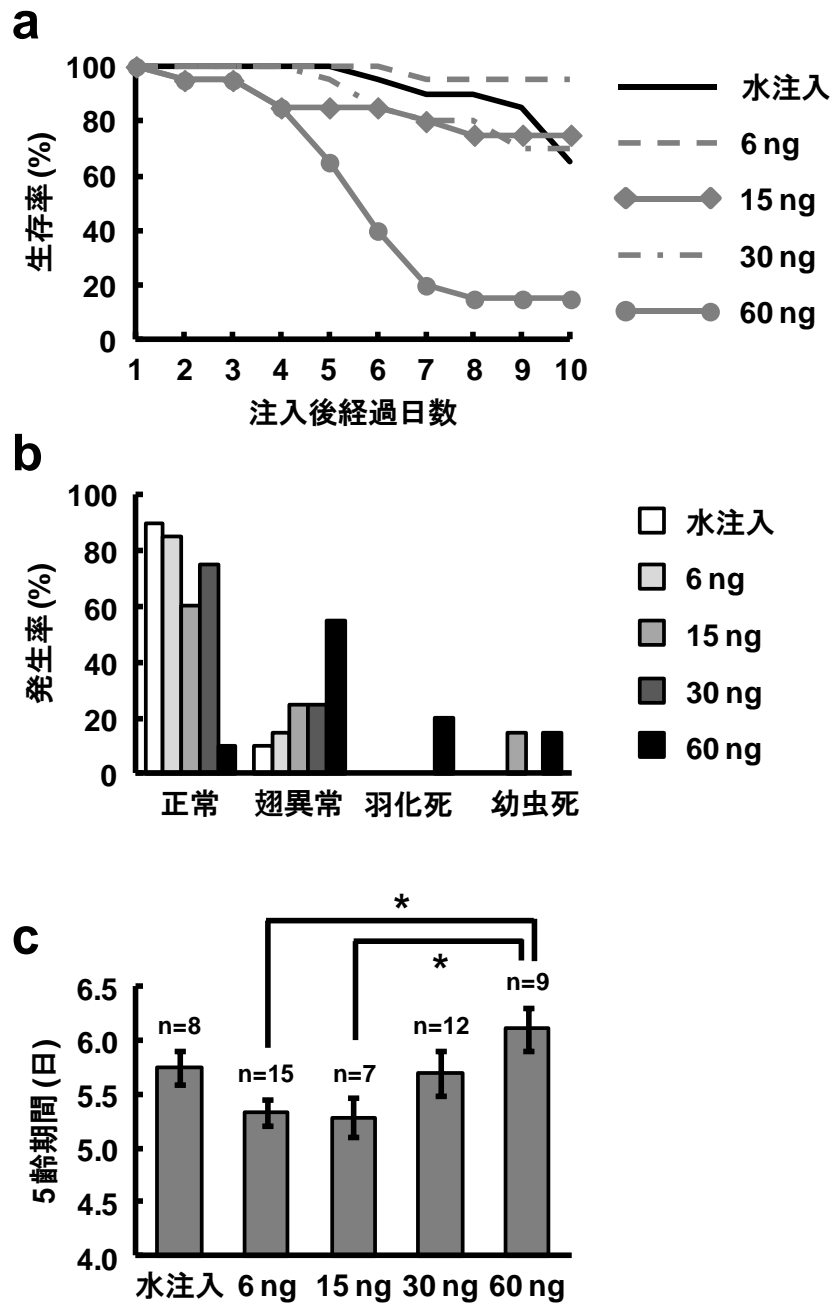


図 2-17. 5 齢幼虫の生存と発達に対する dsPGRP12 注入の影響

5 齢 1 日齢の幼虫に *NcPGRP12* 遺伝子の dsRNA を 6, 15, 30, 60 ng 注入した。(a) 注入個体の生存率。注入 1 日後に生存していた 30 頭を、さらに 9 日間観察した。(b) 注入個体の成虫発生率。正常、正常に羽化した個体；翅異常、羽化時に翅の異常が見られた個体；羽化死、羽化中あるいは直後に死亡した個体；幼虫死、5 齢幼虫時に死亡した個体。(c) 注入個体の 5 齢幼虫期間。オス個体の数が少なかったため、メス個体のみを用いた。実験に用いた頭数 (n) を図中に示した。Turkey の多重比較検定を行った (*; $P < 0.05$)。エラーバーは標準誤差。

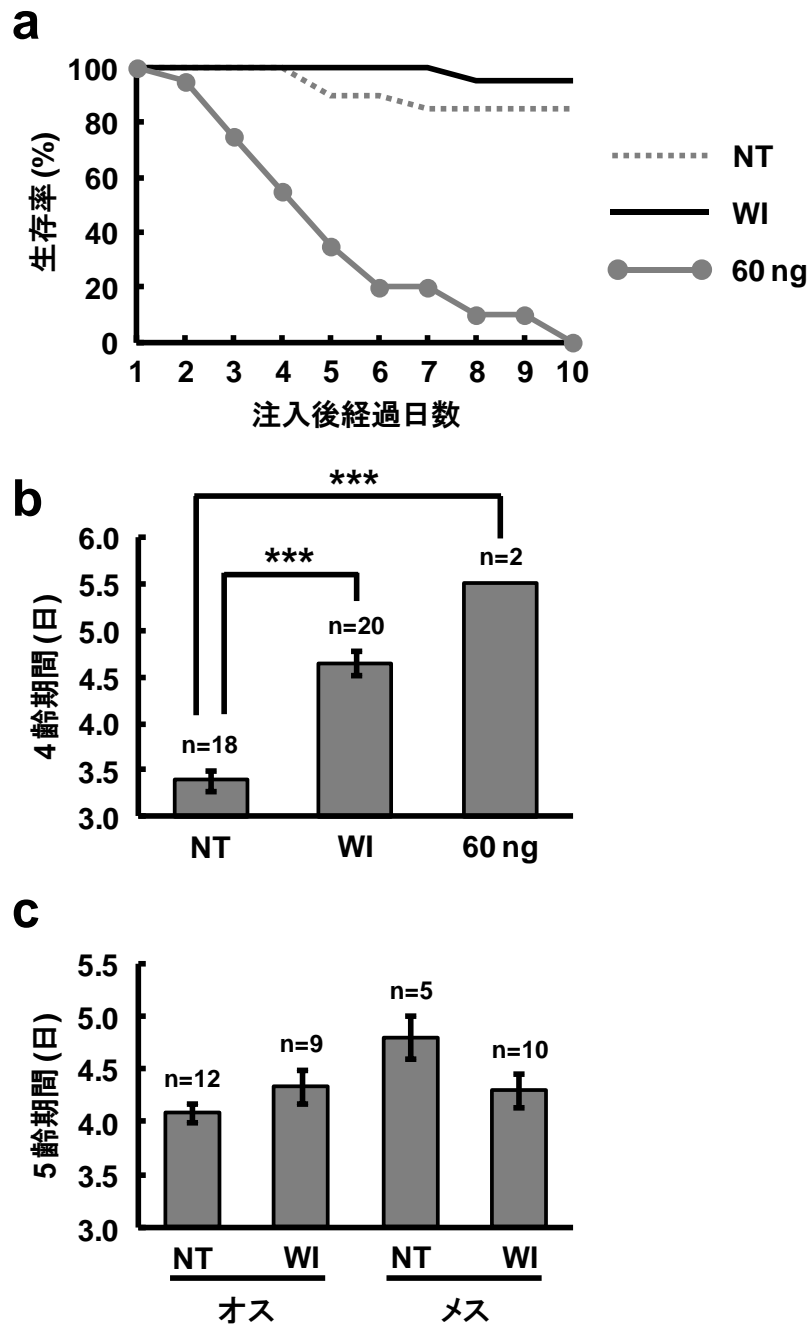


図 2-18. 4 齢幼虫の生存と発達に対する dsEGFP 注入の影響

4 齢 0 日齢の幼虫に *EGFP* 遺伝子の dsRNA 60 ng を注入した。(a) 注入個体の生存率。注入 1 日後に生存していた 20 頭を、さらに 9 日間観察した。(b) 注入個体の 4 齢幼虫期間。(c) 注入個体の 5 齢幼虫期間。実験に用いた頭数 (n) を図中に示した。Bonferroni 補正をした t 検定を行った (***, $P < 0.001$)。NT, 無処理 (non-treatment); WI, 水注入 (water injection); 60 ng, 60 ng の dsEGFP 注入。エラーバーは標準誤差。

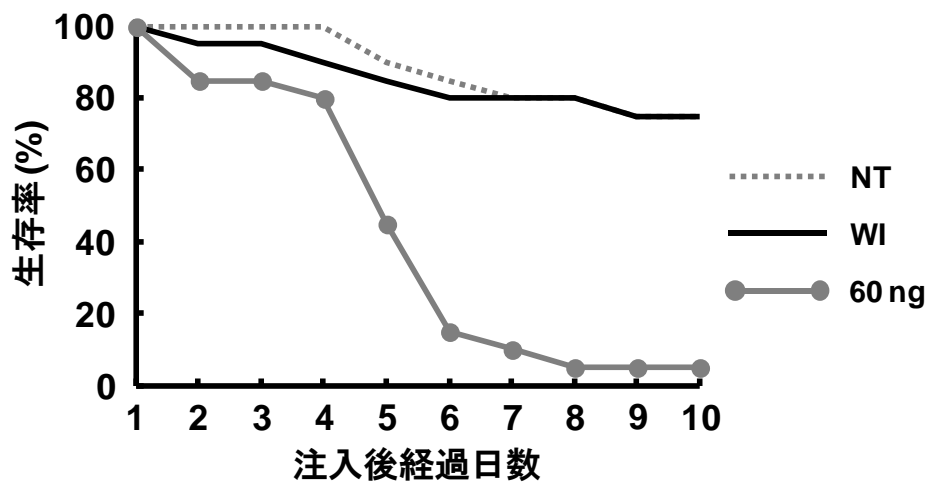


図 2-19. メス成虫の生存に対する dsEGFP 注入の影響

羽化 0 日齢のメス成虫に *EGFP* 遺伝子の dsRNA を 60 ng 注入し、注入個体の生存率を示した。注入 1 日後に生存していた 20 頭を、さらに 9 日間観察した。NT, 無処理 (non-treatment); WI, 水注入 (water injection); 60 ng, 60 ng の dsEGFP 注入。

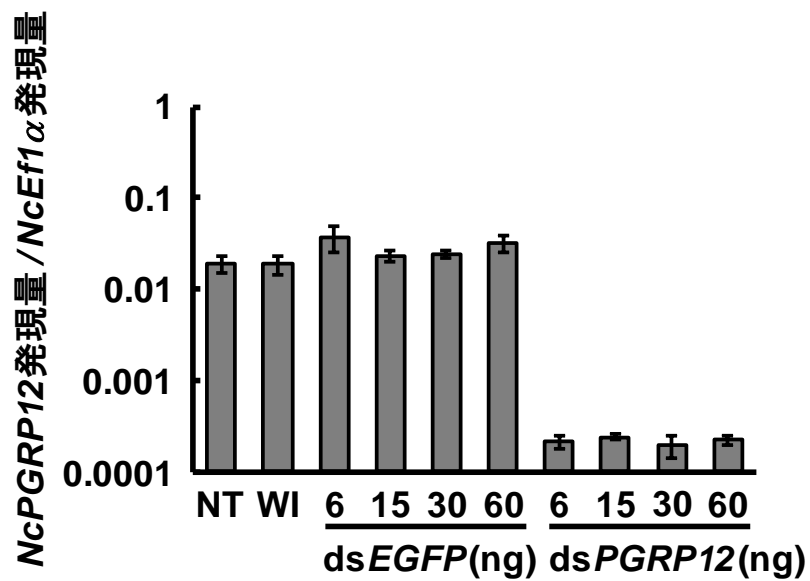


図 2-20. dsRNA 注入による遺伝子発現量減少

5 齢 1 日齢の幼虫に *NcPGRP12* 遺伝子の dsRNA を 6, 15, 30, 60 ng 注入し、3 日後に遺伝子発現量を定量 RT-PCR により測定した。コントロールとして *EGFP* 遺伝子の dsRNA を注入した。腹部第 1-4 節からテンプレートを作製した。3 頭から個別にテンプレートを作製した。標準化遺伝子として *elongation factor 1α* (*NcE1α*) 遺伝子を用いた。NT, 無処理 (non-treatment); WI, 水注入 (water injection)。エラーバーは標準誤差。

第3章 機能未知タンパク質遺伝子 *NcPrp (Top2)* の機能解析

3-1 緒言

エンドウヒゲナガアブラムシの一次共生細菌 *Buchnera* はペプチドグリカンやリポ多糖などの合成酵素遺伝子を持ち (Shigenobu et al., 2000)、ショウジョウバエの S2 細胞に免疫応答を引き起こさせる (Douglas et al., 2011)。そのために、宿主であるアブラムシは多くの免疫応答遺伝子をゲノム中から無くし、免疫応答を弱めることで共生細菌を保護している (Gerardo et al., 2010)。また、一次共生細菌 *Sitophilus zeamais primary endosymbiont* が感染するコクゾウムシでは抗菌ペプチド *coleopteracin* が共生細菌の増殖制御に関与している (Login et al., 2011)。しかし、詳細な共生の分子機構は未だ明らかになっていない。共生器官は細菌を感染させるための組織であり、他の組織では見られないタンパク質が機能することが予想される。これらの機能が未知のタンパク質遺伝子の機能を解析し、共生細菌及び免疫応答との関係を明らかにすることでより詳細な共生の分子機構が解明できると考えた。

コクゾウムシではバクテリオームでだけ発現することが予想される機能未知タンパク質遺伝子が見出されている (Vigneron et al., 2012)。しかし、詳細な解析は行われていない。また、ホソヘリカメムシの共生器官である中腸盲のう部には共生細菌 *Burkholderia* が感染しており、*Burkholderia* 感染個体と非感染個体における中腸の EST ライブラリから、共生機構に関与する遺伝子を探索している (Futahashi et al., 2013)。その結果、感染個体の中腸盲のう部で発現することが予想される機能未知分泌タンパク質が見出され、遺伝子の発現解析により、実際に *Burkholderia* 感染個体の中腸盲のう部で発現していた。また、感染個体の中腸盲のう部で発現する高システイン含有分泌タンパク質が見出されている。さらに、エンドウヒゲナガアブラムシでも一次共生細菌 *Buchnera* がバクテリオサイトに感染しており、このバクテリオサイトで発現する新規タ

ンパク質遺伝子がいくつか見出されている (Shigenobu and Stern, 2013)。そして、*in situ hybridization* によりこれらの遺伝子が実際にバクテリオサイトで発現することが確かめられている。しかし、ココクゾウムシ、ホソヘリカメムシ、アブラムシの機能未知タンパク質遺伝子の機能は明らかになっていない。

ツマグロヨコバイの共生器官バクテリオームで高発現することが予想される遺伝子を探索した結果、20 個の遺伝子の中に、機能未知タンパク質遺伝子が 9 個見出された。共生の分子機構を解明するためには、このような機能未知タンパク質遺伝子の解析が必須であり、高発現している遺伝子ほど重要な機能をしていると考え、1-3 番目に高発現する機能未知タンパク質遺伝子 *Top1*, *Top2*, *Top3* に着目した。

バクテリオームから得られた 3,095 個の EST クローンのうち、178 個が *Top1* 遺伝子、140 個が *Top2* 遺伝子、91 個が *Top3* 遺伝子由来であり、各遺伝子ともに高発現していることが予想される。*Top2* 遺伝子はバクテリオームを含まない組織の EST クローンにもわずかに含まれており、バクテリオームで特異的に発現するかどうかを調べる必要があった。*Top3* 遺伝子についてはさらに大腸菌接種個体から 98 個の EST クローンがみつかり、免疫応答にも関与する遺伝子である可能性がある。

まず、これらの遺伝子の実際の発現部位を調査し、全長配列を解析した。*Top2* 遺伝子の全長配列のみが得られたため、RNAi により *Top2* 遺伝子の機能解析を行うことで、共生の分子機構の解明を試みた。

3-2 材料及び方法

Top1, Top2 (NcPrp), Top3 遺伝子の組織別発現解析

Top1-3 遺伝子の組織別 RT-PCR を行った。第 2 章材料及び方法の「ツマグロヨコバイ PGRP 遺伝子の組織別発現解析」で作製した cDNA を用い、プライマーは補足表 5 に示した。

Top2 (NcPrp) 遺伝子の全長配列解析

3' RACE における first PCR 及び second PCR は SMART™ RACE cDNA Amplification Kit (Clontech) 及び TaKaRa Ex Taq (Takara) を用いて行った。第 2 章材料及び方法の「ツマグロヨコバイ PGRP 遺伝子の全長配列解析」で作製した cDNA を用いた。5' RACE には 5' RACE System for Rapid Amplification of cDNA Ends (Invitrogen) を用いた。プライマーを補足表 2, 3 に示した。

全長配列解析により遺伝子の ORF を得た後、シグナル配列予測を SignalP 4.1 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) と Phobius (<http://phobius.sbc.su.se/>) を用いて行った。膜貫通領域予測は TMHMM ver. 2.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>) と Phobius を用いた。

NcPrp 遺伝子の時期別発現量変化

NcPrp 遺伝子のステージ別定量 RT-PCR を行った。第 2 章材料及び方法の「ツマグロヨコバイ PGRP 遺伝子の時期別発現量変化」で作製した cDNA を用い、プライマーを補足表 6 に示した。

NcPrp のタンパク質発現部位

第 2 章材料及び方法の「ツマグロヨコバイ PGRP のタンパク質発現部位」で作製した

タンパク質サンプルを用いた。

15 μ l のタンパク質サンプルを用いて、12.5%アクリルアミドゲル (e-PAGEL E-T12.5L, ATTO) で SDS-PAGE を行った。泳動後、メタノールに浸漬しておいた PVDF メンブレンにゲルのタンパク質を転写した。転写は 15V で 30 分間行った。転写後のメンブレンに対して ECL Blocking reagents (GE Healthcare) を用いて室温で 1 時間ブロッキング処理を行った。ブロッキング処理後、500 倍に希釈した抗 NcPrp 抗体にメンブレンを 4°C で一晩浸漬した。一次抗体処理後、TBS-Tween buffer で 10 分間の洗浄を 5 回行い、1,000 倍に希釈した抗ラビット IgG 抗体 [Anti-IgG (H+L), Rabbit, Goat-Poly, HRP, KPL] にメンブレンを 1 時間浸した。二次抗体処理後、TBS-Tween buffer で 5 分間の洗浄を 5 回行った。洗浄後、HistoMark TrueBlue Peroxidase System (KPL) を用いて二次抗体の検出を行った。NcPrp 抗体は合成したペプチドをウサギに注入して作製したポリクローナル抗体である (医学生物学研究所)。N 末端の 39 残基を合成してペプチド抗原とした。

抗生物質処理個体における *NcPrp* 遺伝子発現量変化

抗生物質処理個体の *NcPrp* 遺伝子発現量を定量 RT-PCR で測定した。第 2 章材料及び方法の「抗生物質処理個体における *PGRP* 遺伝子発現量変化」で作製した cDNA を用いた。

NcPrp 遺伝子の RNAi

1. dsRNA 合成

NcPrp cDNA の前半約 3 分の 2 の領域を組み込んだプラスミドを鋳型として PCR を行い、dsRNA 合成用のテンプレートを作製した。プライマーの組み合わせは RNAi_forward プライマーと dsPrp_reverse プライマー、RNAi_reverse プライマーと dsPrp_forward プライマーの 2 通りであった。RNAi_forward プライマーと RNAi_reverse プライマーは各々

T7 プロモーター配列を含む。この DNA を鋳型とし、T7 RiboMax Express RNAi System を用いて、dsRNA を合成した。用いたプライマーを補足表 8 に示した。

2. dsRNA 注入

200 ng/μl の dsRNA を 5 齢 0 日齢の幼虫の胸部と腹部の間の節間膜に 0.03 μl 注入した。dsRNA 約 6 ng を虫体に注入した。

3. 遺伝子発現量とタンパク質量減少の確認

dsRNA 注入 1, 4, 7 日後の 3 頭分の腹部から RNeasy Mini Kit を用いて total RNA を抽出した。この total RNA 200 ng を PrimeScript RT reagent Kit (Perfect Real Time) を用いて逆転写した。10 ng 相当分の cDNA をテンプレートとして、LightCycler480 SYBR Green I Master を用いて定量 RT-PCR を行った。定量 PCR の標準化コントロールとして *elongation factor 1α (NcEflα)* 遺伝子を用いた。各々独立して作製したテンプレートを使用して 4 回の反復実験を行った。

dsRNA 注入 1, 4, 7 日後の腹部を取り出し、10 頭分から 200 μl のタンパク質サンプルを得た。15 μl のタンパク質サンプルを用いてウェスタンブロッティングを行った。方法は第 3 章材料及び方法の「NcPrp のタンパク質発現部位」に準じた。

4. dsRNA 注入個体における共生細菌数の測定

dsRNA 注入 1, 4, 7 日後の虫体全体から DNeasy Blood & Tissue Kit を用いて DNA を抽出し、DNA 溶液 200 μl を得た。抽出した DNA 溶液を 10 倍希釈し、この希釈 DNA 溶液 5 μl をテンプレートとして LightCycler 480 SYBR Green I Master を用いて定量 PCR を行った。*Nasuia* 及び *Sulcia* の *16S ribosomal RNA (16S rRNA)* 遺伝子、*Rickettsia* の *citrate synthase* 遺伝子のコピー数を測定した。6 頭から個別にテンプレートを作製した。

5. マイクロアレイ解析

dsRNA 注入 1, 4, 7 日後の 3 頭分の腹部から RNeasy Mini Kit を用いて total RNA を抽出した。この total RNA を用いてマイクロアレイ解析を行った。方法は第 2 章材料及び方法の「大腸菌接種個体における免疫応答と *PGRP* 遺伝子発現量変化」に準じた。各々独立して作製したテンプレートを使用して 4 回の反復実験を行った。

6. 電子顕微鏡観察

dsRNA 注入個体のバクテリオームを透過型電子顕微鏡で観察した。dsRNA 注入 7 日後の個体から摘出した腹部第 1–4 節を固定液に入れ、氷上に 2 時間静置した。固定液は 1%パラホルムアルデヒドと 1%グルタルアルデヒドの入った 0.06 M phosphate buffer を用いた。固定後、固定液を捨て、0.06 M phosphate buffer を加え、4°C に一晩静置した。次に、2%オスミウム液に 4°C で 1 時間浸漬した。室温でエタノールシリーズ (70%, 80%, 90%, 95%) で脱水し、100%エタノールに置き換え、10 分間静置した。新しい 100%エタノールに 10 分浸漬後、プロピレンオキサドを加えた。新しいプロピレンオキサドに置き換え、さらに 10 分間静置した。Quetol 651 (Nisshin EM) とプロピレンオキサドを 1:1 で混合し、サンプルに加え、1 時間静置した。新しい Quetol 651 と入れ替え、包埋した。超薄切片を作製し、2%酢酸ウラニルと Sato's lead solution で染色し、JEM-1010 transmission electron microscope (日本電子) を用いて観察した。

7. メス成虫 0 日を用いた *NcPrp* RNAi

2,000 ng/ μ l の dsRNA を羽化 0 日齢のメス成虫の胸部と腹部の間の節間膜に 0.03 μ l 注入した。虫体に注入した dsRNA は約 60 ng である。

NcPrp (*Top2*) 遺伝子に対する RNAi を行ったヨコバイでの、当該遺伝子の mRNA

量は以下のように測定した。dsRNA 注入 1, 3, 7 日後の 5 頭分の腹部から RNeasy Mini Kit を用いて total RNA を抽出した。この total RNA 400 ng を PrimeScript RT reagent Kit (Perfect Real Time) を用いて逆転写した。20 ng 相当分の cDNA をテンプレートとして、LightCycler480 SYBR Green I Master を用いて定量 RT-PCR を行った。定量 PCR の標準化コントロールとして *elongation factor 1 α* (*NcEf1 α*) 遺伝子を用いた。各々独立して作製したテンプレートを使用して 4 回の反復実験を行った。

dsRNA 注入個体における共生細菌数の測定を以下のように行った。dsRNA 注入 1, 3, 7 日後の虫体全体から DNeasy Blood & Tissue Kit を用いて DNA を抽出し、DNA 溶液 200 μ l を得た。抽出した DNA 溶液を 10 倍希釈し、この希釈 DNA 溶液 5 μ l をテンプレートとして LightCycler 480 SYBR Green I Master を用いて、*Nasuia* 及び *Sulcia* の *16S ribosomal RNA* (*16S rRNA*) 遺伝子、*Rickettsia* の *citrate synthase* (*CS*) 遺伝子のコピー数を測定した。6 頭から個別にテンプレートを作製した。

マイクロアレイ解析に関しては、dsRNA 注入 1, 3, 7 日後の 5 頭分の腹部から RNeasy Mini Kit を用いて抽出した total RNA 用いた。この total RNA を用いてマイクロアレイ解析を行った。各々独立して作製したテンプレートを使用して 4 回の反復実験を行った。

3-3 結果

Top1, Top2 (NcPrp), Top3 遺伝子の組織別発現解析

組織別 RT-PCR によりバクテリオームで 1-3 番目に高発現する機能未知タンパク質遺伝子、*Top1*, *Top2*, *Top3* の発現部位を調べた (図 3-1)。*Top1* 遺伝子はバクテリオームの他に精巣でもわずかに発現が認められた (図 3-1a)。*Top2* 遺伝子は EST 解析では他組織からの EST も含んでいたが、バクテリオームで特異的に発現していた (図 3-1b)。*Top3* 遺伝子はバクテリオームだけで発現していた (図 3-1c)。また、*Top1-3* 遺伝子は胸部、腹部、腸、卵巣では発現していなかった。このことから、これらはバクテリオームで発現する遺伝子といえる。

Top2 (NcPrp) 遺伝子の全長配列解析

3 つの遺伝子のうち、全長配列が得られた *Top2* 遺伝子に集中して研究を進めた。*Top2* 遺伝子の cDNA 全長配列を図 3-2 に示した。コードしているアミノ酸は 250 残基であり、シグナルペプチドや膜貫通領域は保持していなかった。また、プロリンが多く、16.4% を占めていた。そのために、高プロリン含有タンパク質 (Proline-rich protein, NcPrp) 遺伝子と名付けた。

NcPrp 遺伝子の時期別発現量変化

NcPrp 遺伝子の発現時期を調べるために、卵、幼虫、成虫における遺伝子発現量を定量 RT-PCR により調べた (図 3-3)。*Elongation factor 1 α* (*NcEf1 α*) 遺伝子と *ribosomal protein L10* (*NcRpL10*) 遺伝子に対する相対的発現量を示した。*NcEf1 α* 遺伝子に対する *NcPrp* 遺伝子の相対的発現量は卵や成虫に比べて 1-5 齢幼虫でやや高かった (図 3-3a)。*NcRpL10* 遺伝子に対する *NcPrp* 遺伝子の相対的発現量は卵や幼虫に比べて成虫で高かった (図 3-3b)。*NcPrp* 遺伝子の発現傾向は標準化遺伝子により若干異なるものの、ス

テージ特異的な発現は見られなかった。*NcPrp* 遺伝子は全てのステージで恒常的に発現していた。

NcPrp のタンパク質発現部位

NcPrp 遺伝子はバクテリオームで発現し、コードしているアミノ酸配列からはシグナルペプチドを保持しないと予測された。そのために、そのタンパク質はバクテリオームで働くと考えた。これを確かめるために、羽化3日齢のメス成虫の頭部、胸部、腹部第1-4節、腹部第5節以降、バクテリオームを用いて組織別ウェスタンブロッティングを行った(図3-4)。その結果、腹部第1-4節とバクテリオームでバンドが検出された。検出されたバンドは38.9 kDa と 31.3 kDa のマーカーの間に位置しており、そのサイズは32-33 kDa 程度であった。アミノ酸配列から予想されるタンパク質のサイズは28.8 kDa であり、検出されたバンドのサイズはこれよりやや大きかったが、*NcPrp* を検出したと考えた。また、頭部と胸部で84.7 kDa より大きいサイズのバンドが、腹部第5節以降で38.9 kDa と 31.3 kDa のマーカーの間にバンドが検出された。バンドサイズと検出部位により、これは非特異バンドである可能性が高い。

抗生物質処理個体における *NcPrp* 遺伝子発現量変化

NcPrp 遺伝子と共生細菌との関わりを調べるために、抗生物質を処理することで共生細菌数が減少した個体における *NcPrp* 遺伝子の発現量を定量 RT-PCR により測定した(図3-5)。ツマグロヨコバイの生存、発育、バクテリオームに対する抗生物質処理の影響は第2章で述べており(表2-3, 図2-8)、抗生物質処理個体における共生細菌数も図2-9に示している。テトラサイクリンを処理すると *Nasuia*、*Sulcia*、*Rickettsia* の細菌数が減少し、リファンピシンを処理すると *Nasuia* と *Rickettsia* の細菌数が減少した。テトラサイクリン及びリファンピシン処理は共通して *Nasuia* と *Rickettsia* の細菌数を減少さ

せている。テトラサイクリン及びリファンピシン処理個体における *NcPrp* 遺伝子発現量は無処理個体に比べて 18.3%と 23.0%にそれぞれ減少し、有意な差があった (図 3-5)。また、第 2 章で *Rickettsia* 感染と非感染の個体間でマイクロアレイ解析を行ったが、その解析結果から *NcPrp* 遺伝子のシグナル値を感染と非感染で比較したところ、*NcPrp* 遺伝子発現は *Rickettsia* の存在には影響を受けていなかった (非感染個体に対する fold change は 1.09)。

NcPrp 遺伝子の RNAi

NcPrp 遺伝子の dsRNA (*dsPrp*, 471 bp) を合成し、5 齢 0 日齢の幼虫に注入した。虫体に注入した dsRNA は 6 ng である。

まず、dsRNA 注入による遺伝子発現量の減少を調べた (図 3-6a)。*dsPrp* 注入個体における *NcPrp* 遺伝子発現量はコントロールである *dsEGFP* 注入個体に比べて注入 1 日後に 11.4%に、4 日後に 3.0%に、7 日後に 5.1%に減少した。次に、dsRNA 注入によるタンパク質量の減少を調べた (図 3-6b)。*dsPrp* 注入個体における *NcPrp* のタンパク質量はコントロールに比べて注入 1, 4, 7 日後に減少していた。dsRNA 注入による遺伝子発現量及びタンパク質量の減少が確認でき、RNAi の効果は非常に高かった。また、*dsPrp* 注入 1 日後にはタンパク質の減少が認められたので、同様の実験をもう一度行ったが 1 日後にはタンパク質が大きく減少していることが確かめられた。

次に、5 齢幼虫の生存と発達に対する *dsPrp* 注入の影響を調べた結果、生存率、成虫発生率、5 齢幼虫期間はコントロールと変わらなかった (図 3-7)。*dsPrp* 注入は 5 齢幼虫の生存と発達に影響しなかった。

共生細菌に対する RNAi の影響を調査した (図 3-8)。コントロールである *dsEGFP* 注入個体における *Nasuia* の細菌数は時間経過により増加した (図 3-8a)。一方、*dsPrp* 注入個体における *Nasuia* の細菌数はコントロールに比べて注入 4, 7 日後に有意に減少し

た。*dsPrp* 注入個体における *Nasuia* の細菌数は *dsPrp* 注入 1-7 日後で増加しないか、減少しており、*dsEGFP* 注入で増加しているのに比べて差が出てきていることになる。*dsPrp* 注入個体における *Sulcia* と *Rickettsia* の細菌数はコントロールと変わらなかった (図 3-8b, c)。*NcPrp* の RNAi は *Nasuia* の増殖に影響していることが明らかになった。

さらに *NcPrp* 遺伝子の機能を調べるために、*NcPrp* RNAi 個体のマイクロアレイ解析を行い、網羅的に遺伝子発現量変化を調査した。*dsPrp* 注入個体において *NcPrp* 遺伝子は全遺伝子中で 3 番目に発現量が減少し、fold change は 0.04 (25 分の 1) であった (表 3-1)。マイクロアレイ解析でもツマグロヨコバイでの高い RNAi 効果 (遺伝子発現量の減少) を確認できた。また、*dsPrp* 注入個体において発現量が減少した上位 20 個の遺伝子中に *PGRP* 遺伝子が 8 個あった。そのため、*dsPrp* 注入個体における *PGRP* 遺伝子発現量変化を網羅的に調べた (表 3-2)。ツマグロヨコバイマイクロアレイには 297 個 (150 遺伝子) の *PGRP* 遺伝子のプローブが搭載されており、この中でコントロールに比べて有意な発現量変化を示したプローブの数を見ると、*dsPrp* 注入個体で有意に発現量が減少したプローブは 274 個あった。*NcPrp* はツマグロヨコバイの *PGRP* 遺伝子の発現に大きく影響していることが明らかになった。*dsPrp* 注入個体の抗菌ペプチド遺伝子の発現量変化も調べた。*dsPrp* 注入個体における *defensin* の発現量はコントロールに比べて有意に増加し、fold change の値は 3.07 であった (表 3-3)。*Diptericin* の発現量はコントロールに比べてやや増加していたものの、有意な差はなかった。*NcPrp* RNAi 個体において発現量が著しく増加した遺伝子を表 3-4 に示した。

次に、バクテリオームに対する *NcPrp* RNAi の影響を透過型電子顕微鏡により観察した (図 3-9)。*dsPrp* 注入個体におけるバクテリオームの細胞質は、コントロールである *dsEGFP* 注入個体のものに比べて空隙が目立った。また、*Nasuia* の電子密度は *dsPrp* 注入個体の方が高く、細菌の細胞質内にも膜状構造がみられるなど影響が見られた。これらが RNAi の影響である可能性があるが、どのような機序でこのようなことが起こって

いるかは、今後の検討課題である。

上記の実験は5齢幼虫に対して行ったものであるが、さらに羽化0日齢のメス成虫に対する *dsPrp* 注入の結果について以下に述べる。RNAi 実験開始時、より高濃度の dsRNA を用いることで、明瞭な表現型が得られると考えていた。そのために、羽化0日齢のメス成虫に 60 ng の dsRNA を注入することで RNAi を行った。*dsPrp* 注入個体における *NcPrp* 遺伝子発現量はコントロールに比べて注入1日後に 8.0%に、4日後に 1.1%に、7日後に 3.2%に減少した (図 3-10)。*dsPrp* 注入個体における *Nasuia* の細菌数はコントロールに比べてやはり注入7日後に有意に減少した (図 3-11a)。*Sulcia* と *Rickettsia* の細菌数はコントロールと変わらなかった (図 3-11b, c)。*NcPrp* RNAi をメス成虫に対して行い、マイクロアレイ解析をしたところ、*dsPrp* 注入個体において *NcPrp* 遺伝子は全遺伝子中で1番目に発現量が減少し、fold change は 0.02 であった (表 3-5)。また、*dsPrp* 注入個体において発現量が減少した上位 20 個の遺伝子中に *PGRP* 遺伝子が 13 個あった。*PGRP* 遺伝子発現量変化を網羅的に調べた結果、*dsPrp* 注入個体で有意に発現量が減少した *PGRP* 遺伝子のプローブは 297 個中に 233 個あった (表 3-6)。*dsPrp* 注入個体における抗菌ペプチド遺伝子の発現量はコントロールに比べて変化がなかった (表 3-7)。*NcPrp* RNAi 個体において発現量が著しく増加した遺伝子を表 3-8 に示した。しかし、この成虫を対象にした RNAi 実験では注入7日後には注入個体が羽化7日齢のメス成虫になり、老化の影響を受けている可能性があった。そのため、前述のように5齢0日齢の幼虫を対象に同じ実験を行った。以上のように成虫期の RNAi においても、5齢幼虫とほぼ同様の結果が得られた。

3-4 考察

Top1-3 遺伝子は EST 解析によりバクテリオームで特異的に発現することが予想された。組織別 RT-PCR の結果、*Top2*, *Top3* 遺伝子はバクテリオームで特異的に発現していた (図 3-1b, c)。*Top1* 遺伝子はバクテリオームとわずかに精巣で発現していた (図 3-1a)。しかし、精巣での発現はわずかであったため、*Top1* 遺伝子もバクテリオームで主に発現すると言える。

全長配列解析を行い、*Top2* 遺伝子の全長を得た (図 3-2)。そして以後、*Top2* 遺伝子の解析に焦点を絞った。*Top2* 遺伝子は 250 残基のアミノ酸をコードしており、プロリンが最も多かったため、高プロリン含有タンパク質 (Proline-rich protein, *NcPrp*) 遺伝子と名付けた。*NcPrp* はシグナルペプチドと膜貫通領域を保持せず、バクテリオームで機能することが予想され、実際にバクテリオームに存在していた (図 3-4)。そのため、共生と関係することが示唆された。抗生物質を処理することで共生細菌数を減少させた個体における *NcPrp* 遺伝子発現量変化を調査した結果、発現量は減少しており (図 3-5)、*NcPrp* 遺伝子発現と共生細菌の存在との関係が示唆された。*NcPrp* 遺伝子は全てのステージで恒常的に発現しており (図 3-3)、共生あるいはバクテリオームの維持に重要な役割を演じているのではないかと推察された。

5 齢 0 日齢の幼虫に 6 ng の dsRNA (*dsPrp*) を注入することにより、*NcPrp* 遺伝子の機能解析を行った (図 3-6, 7, 8, 9、表 3-1, 2, 3, 4)。*dsPrp* 注入個体における *NcPrp* 遺伝子発現量は 3.0-11.4% に減少した (図 3-6a)。また、*dsPrp* 注入個体におけるタンパク質量はウェスタンブロッティングで検出できないほどに減少した (図 3-6b)。*dsPrp* 注入 1 日後にはタンパク質量が減少していることから、*NcPrp* は代謝速度が速いタンパク質であると考えられる。*dsRNA* 注入による遺伝子発現量減少及びタンパク質量減少の程度から、ツマグロヨコバイでは RNAi の効果が高いと考えられる。RNAi の表現型として

共生細菌数を測定した結果、*Nasuia* の細菌数が *dsPrp* 注入 4 日後と 7 日後に有意に減少していた (図 3-8a)。*dsPrp* 注入個体における共生細菌数の測定は独立に 4 回行い、注入 4 日後の *Nasuia* の細菌数は 1 回のみ有意に減少した。注入 7 日後の *Nasuia* の細菌数は 4 回とも有意に減少したため、7 日後の *Nasuia* の減少は確実に起きていると判断した。*Sulcia* と *Rickettsia* の細菌数に影響がなかったことから (図 3-8b, c)、*NcPrp* は *Nasuia* の増殖にプラスに作用すると考えられ、*NcPrp* がバクテリオーム内層に局在する可能性もあるため、今後、免疫組織学的な手法で機能部位を検証する必要がある。

NcPrp RNAi 個体のマイクロアレイ解析では、*dsPrp* 注入個体において著しく発現量が減少した 20 個の遺伝子中に *PGRP* 遺伝子が 8 個あり (表 3-1)、多くの *PGRP* 遺伝子の発現量が有意に減少した (表 3-2)。第 2 章において *PGRP* が細菌共生と関係していることが推測されており、*NcPrp* が *PGRP* 遺伝子の発現を制御しているとする、*NcPrp* も細菌共生に深く関わっていると考えられる。上記の *Nasuia* の数の減少もこのことを示唆している。

共生細菌の *16S rRNA* 遺伝子数を定量 PCR により測定しているため、実際の細菌数減少と定量 PCR により見られた細菌の持つ *16S ribosomal RNA* 遺伝子の減少とは時間のずれがある。*NcPrp* 遺伝子の RNAi が引き起こした共生細菌数の減少と *PGRP* 遺伝子の発現量減少という 2 つの RNAi の効果のうち、どちらが先に引き起こされたのか不明である。因果関係をもう少し明らかにできる実験が必要である。

RNAi 実験開始時、より高濃度の dsRNA を注入した方が明瞭な表現型が得られると考え、羽化 0 日齢のメス成虫に 60 ng の dsNA を注入した (図 3-10, 11、表 3-5, 6, 7, 8)。*NcPrp* 遺伝子発現量の減少、*Nasuia* の細菌数減少、*PGRP* 遺伝子の発現量減少は 5 齢 0 日齢の幼虫に 6 ng の dsNA を注入した実験とほぼ同様の結果を示した (図 3-10, 11、表 3-5, 6)。しかし、抗菌ペプチド遺伝子の発現量は変化しておらず (表 3-7)、*Nasuia* の細菌数減少に抗菌ペプチドが関与しているとは考えにくい。

抗菌ペプチドの中には、アミノ酸配列中に多くのプロリンを含むものが知られている (Scocchi et al., 2011)。このような高プロリン含有抗菌ペプチド (Proline-rich antimicrobial peptide, PR-AMP) は 20–40 残基程度の短いアミノ酸配列であり、その特徴として、プロリン含有率が高いこと (25–50%)、アルギニン残基により正荷電を帯びること、グラム陰性細菌に抗菌活性を示し、細菌の細胞膜にダメージを与えないことが挙げられる。昆虫における PR-AMP として Drosocin, Apidaecin, Pyrrhocoricin が良く研究されている。これらの PR-AMP は負電荷を帯びた細菌の細胞壁成分のリポ多糖に結合することで細菌内に侵入し、シャペロンタンパク質である DnaK と結合することが明らかになっている (Otvos et al., 2000)。タンパク質のフォールディングを阻害することで、抗菌活性を示すと考えられている。Drosocin はショウジョウバエで見出されたタンパク質であり、19 残基のアミノ酸により構成され、O 結合型糖鎖がその活性に必須である (Bulet et al., 1993)。プロリン-アルギニン-プロリン (PRP) 配列を 3 個含み、最初の PRP 配列は 3–5 番目に位置している。11 番目のトレオニンに O 結合型糖鎖が付加され、リシン、アルギニン、ヒスチジンの正電荷アミノ酸を 6 個含んでいる。Apidaecin はセイヨウミツバチで見出されたタンパク質であり、18 残基のアミノ酸により構成されている (Casteels et al., 1989)。N 末端側に RP 配列、C 末端側に PRPPHRL 配列を含み、正電荷アミノ酸を 4 個含んでいる。Pyrrcoricin はカメムシ (*Pyrrhocoris apterus*) で見出されたタンパク質であり、20 残基のアミノ酸により構成され、O 結合型糖鎖がその活性に必須である (Cociancich et al., 1994)。PRP 配列を 2 個含み、11 番目のトレオニンに O 結合型糖鎖が付加され、正電荷アミノ酸を 4 個含んでいる。Drosocin, Apidaecin, Pyrrhocoricin は負電荷アミノ酸を含んでいない。

NcPrp はプロリンを多く含むので、PR-AMP である Drosocin, Apidaecin, Pyrrhocoricin と何か関係があるか調べた。まず、O 結合型糖鎖の付加位置を予測した結果 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/DictyOGlyc/>)、NcPrp のアミノ酸配列における 100 番目の

セリンと 145 番目のトレオニンに付加されることが予測された。また、91–93 番目のアミノ酸は PRP 配列であった。NcPrp の 89–107 番目のアミノ酸配列が Drosocin と似ていると考え、比較した (図 3–12)。NcPrp の 89–107 番目のアミノ酸配列は Drosocin と比較的似ており、高プロリン含有抗菌ペプチドと関連した機能を持つ可能性がある。しかし、NcPrp RNAi 個体において *Nasuia* の細菌数が減少したことから (図 3–8, 11)、NcPrp は抗菌的に働いているとは考えにくい。また、共生細菌は細胞壁成分のリポ多糖を合成していないと考えられ、上記の想定される抗菌作用が共生細菌に働いているとは考えにくい。また、NcPrp の 89–107 番目のアミノ酸中に、正電荷アミノ酸が 2 個、負電荷アミノ酸が 1 個含まれており、必ずしも正電荷を帯びるタンパク質とは言えない。このように、NcPrp は Drosocin と同様の機能をしているとは考えにくい。しかし、NcPrp の高プロリン含有という特徴は細菌への作用あるいは共生の維持に重要である可能性がある。

NcPrp における高プロリン含有以外の特徴を調べるために、NCBI の Conserved domain 検索を行った (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>)。その結果、NcPrp は DNA polymerase III の γ 及び τ サブユニットと相同性があった (E-value = 5.9e-06)。DNA polymerase III は細菌における DNA 複製を担っており、大腸菌では 10 個のサブユニットで構成されている (Kelman and O'Donnell, 1995)。 α サブユニットが DNA 合成酵素本体であり、 α , ε , θ サブユニットが DNA polymerase III の核を形成している。 τ サブユニットはこの核を二量体化させる。また、DNA 依存 ATPase でもある。 γ サブユニットは ATP 結合能を有している。 γ , τ サブユニットともに *dnaX* 遺伝子にコードされ、成熟タンパク質のサイズがそれぞれ、47.5 kDa, 71.1 kDa となる。

NcPrp 遺伝子は細菌の *dnaX* 遺伝子に由来するものである可能性もある。このような他生物遺伝子の水平伝播の例は多くの生物で知られている (Schonknecht et al., 2014)。エンドウヒゲナガアブラムシでも遺伝子の水平伝播の例が知られており、一次共生細菌 *Buchnera* や他の共生細菌の遺伝子が宿主のゲノムに水平伝播している (Nikoh et al.,

2010)。また、ヨコバイ類の sharpshooter に感染している *Sulcia muelleri* には *dnaX* 遺伝子が存在していないことが明らかになっている (McCutcheon and Moran, 2007)。*Nasuia* のゲノム中にも *dnaX* 遺伝子は存在していない。相同性が低く、DNA 複製に係る機能を持つとは考えにくいですが、DNA polymerase III と相同性がある NcPrp アミノ酸配列部位 (69–113, 142–165) は細菌への作用に重要な場所であるかもしれない。

表 3-1. *NcPrp* RNAi 個体において著しく発現量が減少した遺伝子 (5 齢幼虫)

発現量 減少順	プローブ名	Fold change	タンパク質名 (相同性検索) [E-value]
1	EB1704	0.02	Hypothetical protein [1e-008]
2	EB0496	0.03	Unknown
3	<u>MYA0110</u>	<u>0.04</u>	<u>NcPrp</u>
4	MYA1640	0.06	Unknown
5	<u>MYB0789</u>	<u>0.07</u>	<u>PGRP [2e-010]</u>
6	MYA4899	0.08	Unknown
7	<u>MYA2720</u>	<u>0.09</u>	<u>PGRP [5e-011]</u>
8	MYB0336	0.10	Unknown
9	MYA0623	0.10	Homocysteine methyltransferase [2e-043]
10	CCA3702	0.12	Unknown
11	<u>MYA2767</u>	<u>0.15</u>	<u>PGRP [2e-015]</u>
12	MYA3506	0.16	Unknown
13	<u>MYA5431</u>	<u>0.17</u>	<u>PGRP [1e-013]</u>
14	<u>MYA3916</u>	<u>0.17</u>	<u>PGRP [2e-014]</u>
15	<u>MYA3110</u>	<u>0.18</u>	<u>PGRP [9e-005]</u>
16	MYA2453	0.18	Serine hydroxymethyltransferase [1e-108]
17	MYA6087	0.19	Serine hydroxymethyltransferase [7e-050]
18	<u>MYA1013</u>	<u>0.19</u>	<u>GJ13386 [3e-010]</u> * ¹
19	<u>MYA3588</u>	<u>0.19</u>	<u>PGRP [1e-012]</u>
20	NY0612	0.19	Histidinol dehydrogenase [4e-012]

NcPrp 遺伝子の dsRNA を 5 齢幼虫に注入し、マイクロアレイ解析を行った。発現量の減少が著しい順に 20 遺伝子を示した。プローブ名、コントロールに対する fold change の値、相同性検索の結果を示した。相同性検索 (BlastX) の結果、E-value が 0.1 以上のものを unknown とした。*NcPrp* 遺伝子のプローブを黒い下線で示した。PGRP と相同性のあるプローブを赤い下線で示した。5 齢 0 日齢の幼虫に 6 ng の dsRNA を注入し、7 日後 (羽化 2 日齢のメス成虫) に 3 頭分の腹部からテンプレートを作製した。各々独立して作製したテンプレートを使用して 4 回の反復実験を行った。コントロールとして *EGFP* 遺伝子の dsRNA を注入した。*¹ ショウジョウバエ (*Drosophila virilis*) の GJ13386 は *Drosophila melanogaster* の PGRP-LF と相同性がある (E-value = 2e-159)。

表 3-2. *NcPrp* RNAi 個体における *PGRP* 遺伝子の発現量変化 (5 齢幼虫)

遺伝子発現量	有意差	プローブ数
増加	P < 0.01	0
	P < 0.05	0
減少	P < 0.01	243
	P < 0.05	31
変化なし	—	23
総数		297

NcPrp 遺伝子の dsRNA を 5 齢幼虫に注入し、マイクロアレイ解析を行った。ツマグロヨコバイマイクロアレイには *PGRP* 遺伝子のプローブが 297 種 (150 遺伝子) 搭載されており、この中でコントロールに比べて有意な発現量変化を示したプローブの数を示した。コントロールとして *EGFP* 遺伝子の dsRNA を注入した。有意差検定は t 検定による。実験条件は表 3-1 に準ずる。

表 3-3. *NcPrp* RNAi 個体における抗菌ペプチド遺伝子の発現量変化 (5 齢幼虫)

遺伝子名	プローブ名	Probe-1	Probe-2
<i>Defensin</i>	NY2028	3.07*	–
<i>Diptericin</i>	MG2043	1.66	2.11
<i>Diptericin</i>	MG4985	1.70	2.08

マイクロアレイ解析により *NcPrp* 遺伝子の dsRNA を注入した個体での抗菌ペプチド遺伝子の発現量を調べた。コントロールである *EGFP* 遺伝子の dsRNA を注入した個体の発現量に対する fold change の値で示した。抗菌ペプチド遺伝子としては *defensin* 1 種 (プローブ数 1 個)、*diptericin* 2 種 (MG2043 と MG4985、プローブ数各 2 個) がマイクロアレイ上に搭載されている。t 検定を行った (*; $P < 0.05$)。実験条件は表 3-1 に準ずる。

表 3-4. *NcPrp* RNAi 個体において著しく発現量が増加した遺伝子 (5 齢幼虫)

発現量 増加順	プローブ名	Fold change	タンパク質名 (相同性検索) [E-value]
1	SGB10875	7.88	GK17107 [0.013]
2	OV6805	7.48	Glycosyl hydrolase [4e-030]
3	NY0478	4.29	Unknown
4	OV4610	3.43	Matrix metalloproteinase [6e-039]
5	NY2028	3.07	Defensin A [2.5] * ¹
6	CE0341	2.81	Transposase [9e-006]
7	SGB7327	2.74	Unknown
8	SGB12306	2.73	Unknown
9	Bac2740	2.64	Hexamerin 2 beta [4e-019]
10	MG1934	2.61	Dihydrolipoyl dehydrogenase [4e-024]
11	OV7469	2.60	Neural/ectodermal development factor IMP-L2 [1e-007]
12	MG0748	2.59	Salivary secreted protein [0.001]
13	MG8870	2.37	Outer membrane autotransporter [0.009]
14	MG10054	2.36	Unknown
15	MG2310	2.36	Unknown
16	MG0600	2.35	Sodium/solute symporter [2e-009]
17	OV6983	2.32	Keratin [0.007]
18	SGA3720	2.28	Unknown
19	EB0551	2.27	Unknown
20	Bac5933	2.26	Macrophage metalloelastase [3e-030]

NcPrp 遺伝子の dsRNA を 5 齢幼虫に注入し、マイクロアレイ解析を行った。発現量の増加が著しい順に 20 遺伝子を示した。プローブ名、コントロールに対する fold change の値、相同性検索の結果を示した。相同性検索 (BlastX) の結果、E-value が 0.1 以上のものを unknown とした。実験条件は表 3-1 に準ずる。*¹ NY2028 はツマグロヨコバイの *defensin* 遺伝子の EST クローンである。

表 3-5. *NcPrp* RNAi 個体において著しく発現量が減少した遺伝子 (メス成虫)

発現量 減少順	プローブ名	Fold change	タンパク質名 (相同性検索) [E-value]
<u>1</u>	<u>MYA0110</u>	<u>0.02</u>	<u>NcPrp</u>
<u>2</u>	<u>MYA2720</u>	<u>0.10</u>	<u>PGRP [5e-011]</u>
<u>3</u>	<u>MYB0789</u>	<u>0.10</u>	<u>PGRP [2e-010]</u>
<u>4</u>	<u>MYA0600</u>	<u>0.13</u>	<u>PGRP [6e-010]</u>
<u>5</u>	<u>MYA2767</u>	<u>0.15</u>	<u>PGRP [2e-015]</u>
<u>6</u>	<u>Bac0930</u>	<u>0.17</u>	<u>Unknown</u> * ¹
<u>7</u>	<u>MYA5431</u>	<u>0.17</u>	<u>PGRP [1e-013]</u>
8	MYA0623	0.17	Homocysteine methyltransferase [2e-043]
9	MYB0336	0.17	Unknown
<u>10</u>	<u>MYA3588</u>	<u>0.18</u>	<u>PGRP [1e-012]</u>
<u>11</u>	<u>MYA1013</u>	<u>0.18</u>	<u>GJ13386 [3e-010]</u> * ²
<u>12</u>	<u>MYA4953</u>	<u>0.20</u>	<u>GJ13386 [1e-012]</u> * ²
13	MYA3941	0.21	PAPS synthetase [7e-080]
<u>14</u>	<u>MYB0220</u>	<u>0.22</u>	<u>GM25129 [1e-014]</u> * ³
<u>15</u>	<u>Bac4333</u>	<u>0.22</u>	<u>PGRP [3e-004]</u>
16	Bac1043	0.22	Unknown
17	MYB1550	0.23	NADP-dependent malic enzyme [2e-009]
18	MYA6087	0.24	Serine hydroxymethyltransferase [7e-050]
<u>19</u>	<u>MYA0291</u>	<u>0.24</u>	<u>PGRP [8e-011]</u>
<u>20</u>	<u>MYB1585</u>	<u>0.25</u>	<u>PGRP [2e-012]</u>

NcPrp 遺伝子の dsRNA をメス成虫に注入し、マイクロアレイ解析を行った。発現量の減少が著しい順に 20 遺伝子を示した。プローブ名、コントロールに対する fold change の値、相同性検索の結果を示した。相同性検索 (BlastX) の結果、E-value が 0.1 以上のものを unknown とした。*NcPrp* 遺伝子のプローブを黒い下線で示した。PGRP と相同性のあるプローブを赤い下線で示した。羽化 0 日齢のメス成虫に 60 ng の dsRNA を注入し、7 日後 (羽化 7 日齢のメス成虫) に 5 頭分の腹部からテンプレートを作製した。各々独立して作製したテンプレートを使用して 4 回の反復実験を行った。コントロールとして *EGFP* 遺伝子の dsRNA を注入した。*¹ Bac0930 プローブは *NcPGRP1* 遺伝子を構成する EST である。*² ショウジョウバエ (*Drosophila virilis*) の GJ13386 は *Drosophila melanogaster* の PGRP-LF と相同性があり、E-value は 2e-159 であった。*³ ショウジョウバエ (*Drosophila sechellia*) の GM25129 は *Drosophila melanogaster* の PGRP-LC, isoform A と相同性があり、E-value は 0.0 であった。

表 3-6. *NcPrp* RNAi 個体における *PGRP* 遺伝子の発現量変化 (メス成虫)

遺伝子発現量	有意差	プローブ数
増加	P < 0.01	0
	P < 0.05	0
減少	P < 0.01	186
	P < 0.05	47
変化なし	—	64
総数		297

NcPrp 遺伝子の dsRNA をメス成虫に注入し、マイクロアレイ解析を行った。ツマグロヨコバイマイクロアレイには *PGRP* 遺伝子のプローブが 297 種 (150 遺伝子) 搭載されており、この中でコントロールに比べて有意な発現量変化を示したプローブの数を示した。コントロールとして *EGFP* 遺伝子の dsRNA を注入した。有意差検定は t 検定による。実験条件は表 3-5 に準ずる。

表 3-7. *NcPrp* RNAi 個体における抗菌ペプチド遺伝子の発現量変化 (メス成虫)

遺伝子名	プローブ名	Probe-1	Probe-2
<i>Defensin</i>	NY2028	0.78	–
<i>Diptericin</i>	MG2043	1.00	1.11
<i>Diptericin</i>	MG4985	1.02	1.16

マイクロアレイ解析により *NcPrp* 遺伝子の dsRNA を注入した個体での抗菌ペプチド遺伝子の発現量を調べた。コントロールである *EGFP* 遺伝子の dsRNA を注入した個体の発現量に対する fold change の値で示した。抗菌ペプチド遺伝子としては *defensin* 1 種 (プローブ数 1 個)、*diptericin* 2 種 (MG2043 と MG4985、プローブ数各 2 個) がマイクロアレイ上に搭載されている。実験条件は表 3-5 に準ずる。

表 3-8. *NcPrp* RNAi 個体において著しく発現量が増加した遺伝子 (メス成虫)

発現量 増加順	プローブ名	Fold change	タンパク質名 (相同性検索) [E-value]
1	MG10058	10.17	Unknown
2	EA1546	3.57	Unknown
3	MYA4146	3.56	Prophenoloxidase activating factor [3e-046]
4	EB1585	3.48	Unknown
5	Bac3874	3.30	Elegaxobin-2 [3e-068]
6	MG2112	3.03	Unknown
7	MG4303	2.93	Hypothetical protein [6e-025]
8	NY0385	2.87	Unknown
9	MG12532	2.84	Hypothetical protein [0.035]
10	Bac4662	2.84	Unknown
11	EB1996	2.80	GL13082 [1e-022]
12	CE0167	2.75	Cuticle protein 7 [3e-013]
13	MG0748	2.73	Salivary secreted protein [0.001]
14	MG0099	2.71	unknown protein [0.032]
15	MG0643	2.66	Unknown
16	EB1521	2.65	Unknown
17	MG6239	2.64	Hypthetical protein [0.076]
18	NY1134	2.57	Unknown
19	SGB10464	2.53	Hypothetical protein [3e-038]
20	TE4032	2.52	Venom carboxylesterase-6 [9e-064]

NcPrp 遺伝子の dsRNA をメス成虫に注入し、マイクロアレイ解析を行った。発現量の増加が著しい順に 20 遺伝子を示した。プローブ名、コントロールに対する fold change の値、相同性検索の結果を示した。相同性検索 (BlastX) の結果、E-value が 0.1 以上のものを unknown とした。実験条件は表 3-5 に準ずる。

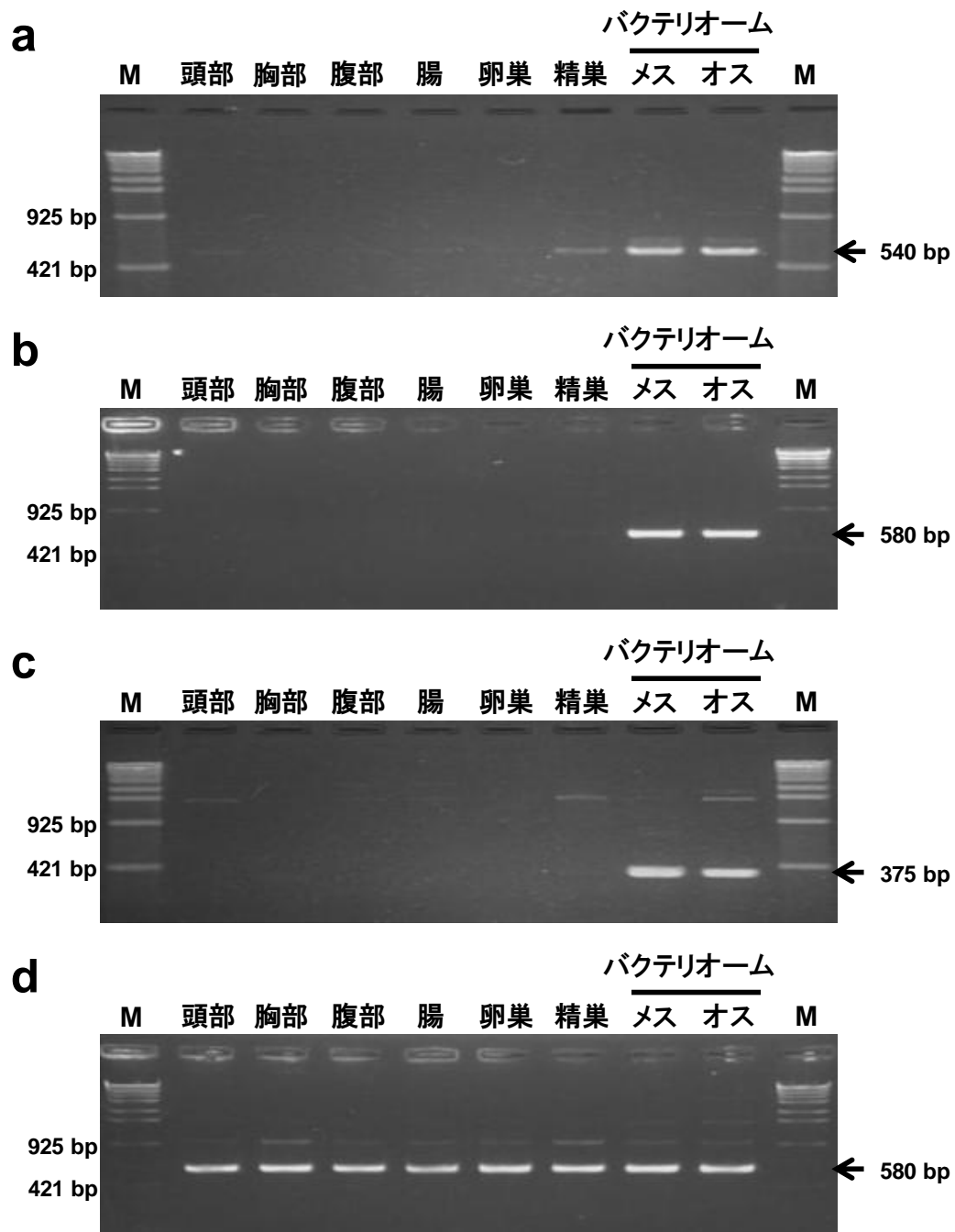


図 3-1. *Top1-3* 遺伝子の組織別発現解析

羽化 3 日齢のメス成虫の頭部、胸部、腹部、腸、卵巢、バクテリオーム及び羽化 3 日齢のオス成虫の精巢、バクテリオームにおける遺伝子発現を組織別 RT-PCR により調べた。(a) *Top1* 遺伝子の発現。(b) *Top2* 遺伝子の発現。(c) *Top3* 遺伝子の発現。(d) コントロールとして *ribosomal protein L10* の遺伝子発現を示した。M はマーカーを示す。腹部はバクテリオームを除いたものを用いた。

ATAGTTGTTGGAGACTTTGTACAGAGTAAGTCAAAATCATCCACAATGCGTTATCATAAGGACTTTGATAGTTCCAACCTTCGAGCGGCAC 91
 M R Y H K D F D S S N F E R H

GAGATCAAGACGTACCAACGCAAGGGCGACCAGGTGCGCAGCGAGTACGAGCGCCTCAACCCGGACGGCACCGTCACCAAGACCGTCGCC 181
 E I K T Y Q R K G D Q V R S E Y E R L N P D G T V T K T V A

TATGGAGACTGCAAGGAGGGACTTAAGTATCGTACCTACCACATGGGCTTGGACGGCGTGGTCCGCGAGATCCCGCAGGAGGTGGTCCAG 271
 Y G D C K E G L K Y R T Y H M G L D G V V R E I P Q E V V Q

CGGATGATGCAGATGCAAAACCAGCAGGTACCCCAAGTGGCGCCTCCACGGCCACAAGTGCCCCAGCGGCCTCACCAGCGCCCAAGGAG 361
 R M M Q M Q N Q Q V P P V A P P R P Q V P P A A S P A P Q E

AAACCAGCCAAGAAGCGTTCGCCTTCATGGTGAACCGAAGGAGACCCATGACGGTCAGTCGGTGTGGAGAGTCCGTCCACTGACCATC 451
 K P A K K A F A F M V E P K E T H D G Q S V W R V R P L T I

AAGACAAAGGAAGCGCCAGCTCAGCCACCCTCCACCACCACCACCAGCCCAACTCAGCCACAACTACCAACAGAGGACTCCCTTGG 541
 K T K E A P A Q P T P P P P P P P P T Q P Q P T N R G L P W

TGGTACGACACCCTCAAGGAGGCAATCAACGAGAGCATGAAGGAGGACAAGCCTCAGATCCCAAGCCGAACCTCCTCCACCGGAGCCT 631
 W Y D T L K E A I N E S M K E D K P Q I P K P E P P P P E P

GAGCCAAAGAAGTTGCGAAACGTCTCTTCGACTGGCTAGACGACGACTTCTTCGCCCTGAAGCCTATAAAAAGCGCTCCCAAACCAAAG 721
 E P K K L S K R L F D W L D D D F F A L K P I K S A P K P K

CTTTTGACAACCTACTCGGTGATTTTGACAAGCCTCTCCTCAACATTTTAACTCCAATGCTTGAGGACTTTTAAAGCTGTGGCTTA 811
 L F D N L L G D F D K P L L N I F N T P M L E D F *

AAATATAACGTTAAAAAAAAAAAAAAAA 838

図 3-2. *Top2 (NcPrp)* 遺伝子の cDNA 全長配列とアミノ酸配列

予想されるアミノ酸配列をコドンの第一塩基の下に示した。プロリンを赤色の太字で示した。プロリンが最も多く、16.4%を占めていた。* はストップコドンを示している。dsRNA 合成に用いた部分を下線で示した (471 bp)。250 アミノ酸をコードしていた。シグナルペプチドと膜貫通領域は存在しないと推定された。

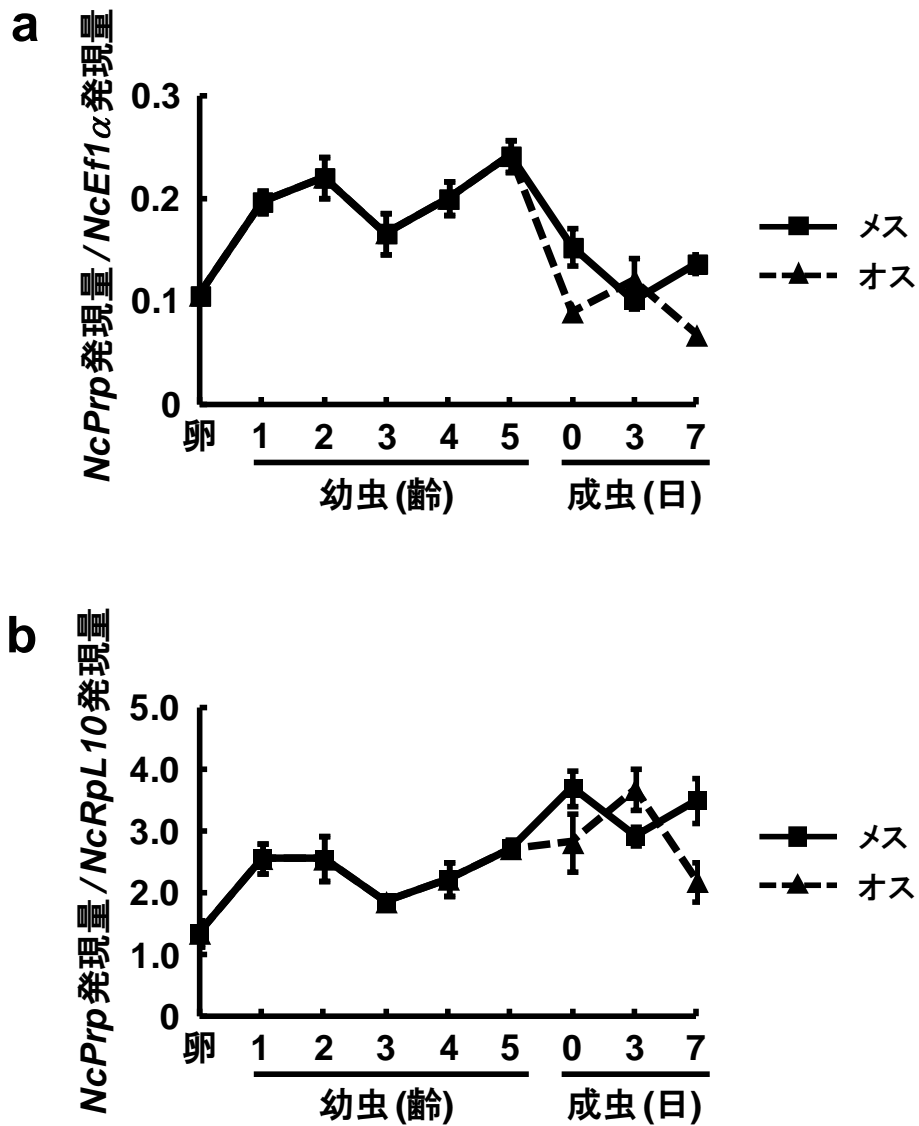


図 3-3. *NcPrp* 遺伝子の時期別発現量変化

ツマグロヨコバイの卵、1-5 齢幼虫、成虫における *NcPrp* 遺伝子の発現量変化を定量 RT-PCR により調べた。(a) 標準化遺伝子 *elongation factor 1α* (*NcEf1α*) の発現量に対する *NcPrp* 遺伝子の相対的発現量。(b) 標準化遺伝子 *ribosomal protein L10* (*NcRpL10*) の発現量に対する *NcPrp* 遺伝子の相対的発現量。卵は全体を、幼虫と成虫は腹部を用いてテンプレートを作製した。各々独立して作製したテンプレートを使用して 3 回の反復実験を行った。エラーバーは標準誤差。

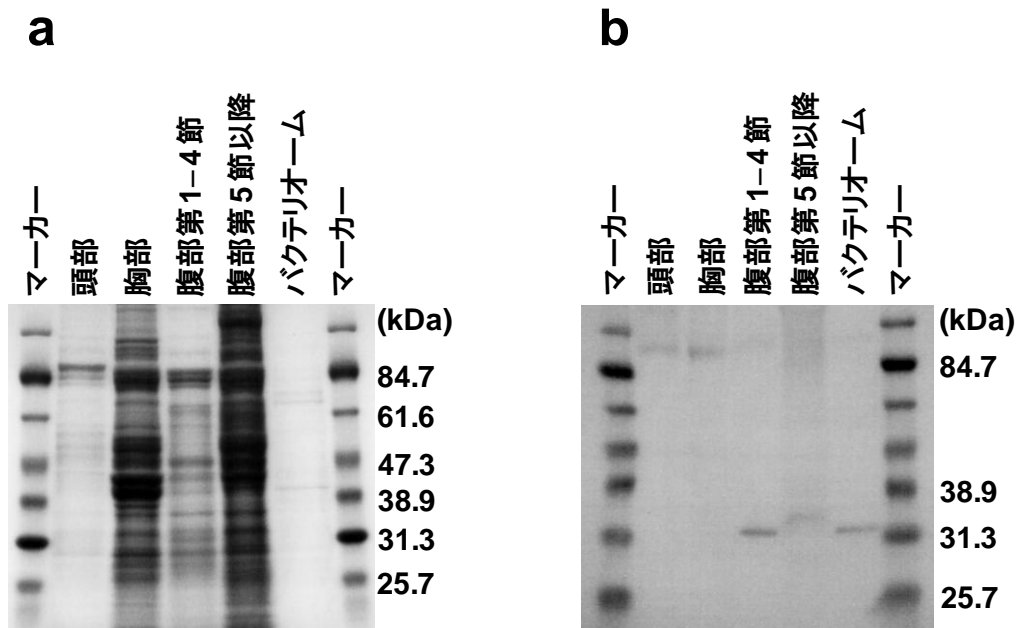


図 3-4. NcPrp のタンパク質発現部位

羽化 3 日齢のメス成虫の頭部、胸部、腹部第 1-4 節、腹部第 5 節以降及びバクテリオームを用いて組織別ウェスタンブロッティングを行った。(a) Coomassie Brilliant Blue 染色。(b) NcPrp 抗体によるウェスタンブロット。10 頭分の各組織からサンプルを作製した。腹部第 1-4 節はバクテリオームを含んでいる。

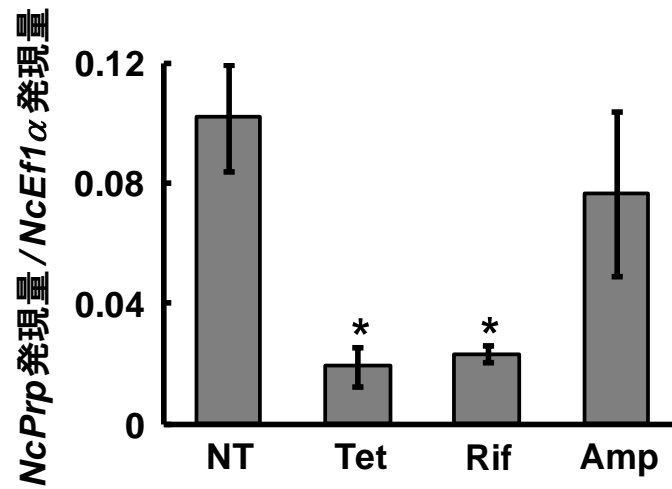


図 3-5. *NcPrp* 遺伝子発現に対する抗生物質処理の影響

抗生物質処理個体における *NcPrp* 遺伝子の発現量を定量 RT-PCR で測定した。NT, 無処理; Tet, テトラサイクリン (Tetracycline) 処理; Rif, リファンピシン (Rifampicin) 処理; Amp, アンピシリン (Ampicillin) 処理。5 齢 0 日齢の幼虫 5 頭分の腹部第 1-4 節からテンプレートを作製した。各々独立して作製したテンプレートを使用して 3 回の反復実験を行った。標準化遺伝子として *elongation factor 1α* (*NcEfl1α*) 遺伝子を用いた。Turkey の多重比較検定を行った (*; $P < 0.05$)。エラーバーは標準誤差。

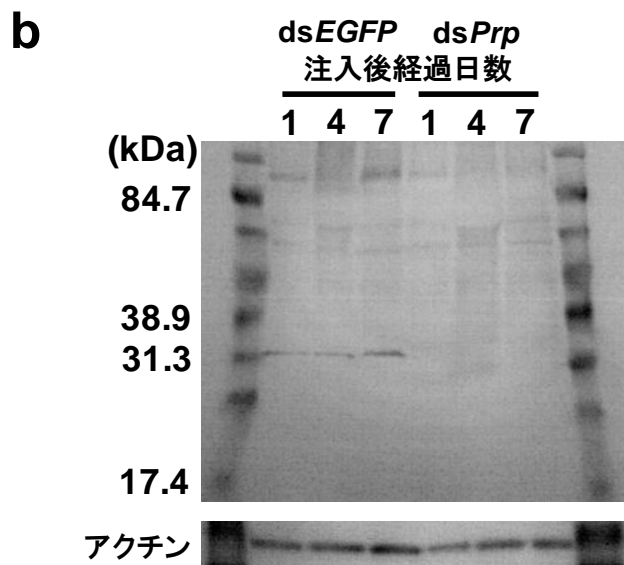
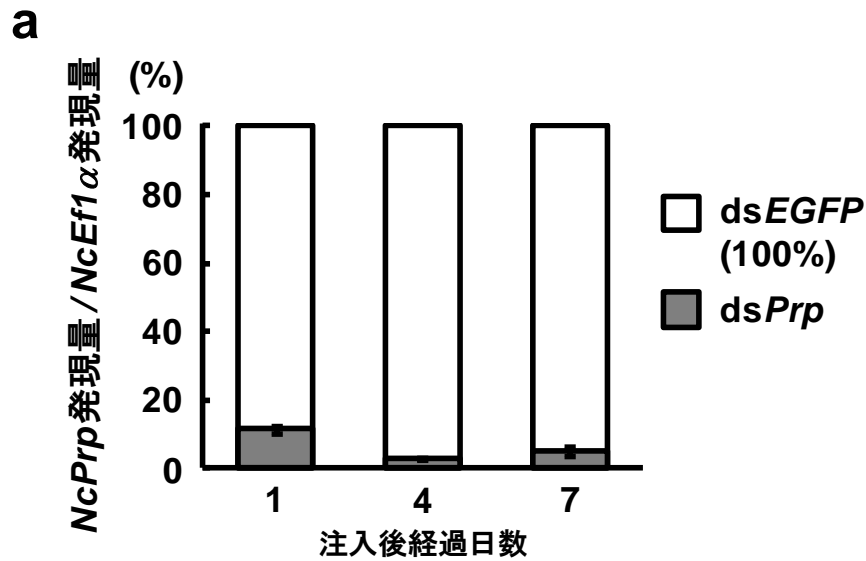


図 3-6. *NcPrp* 遺伝子に対する RNAi 効果の確認 (5 齢幼虫)

5 齢 0 日齢の幼虫に *NcPrp* 遺伝子の dsRNA 6 ng を注入した。注入 1, 4, 7 日後に遺伝子発現量 (a) とタンパク質量 (b) を調査した。コントロールとして *EGFP* 遺伝子の dsRNA を注入した。(a) *NcPrp* 遺伝子発現量の減少。コントロール個体の発現量を 100% とした。3 頭分の腹部からテンプレートを作製した。各々独立して作製したテンプレートを使用して 4 回の反復実験を行った。標準化遺伝子として *elongation factor 1α (NcEf1α)* 遺伝子を用いた。エラーバーは標準誤差。(b) ウェスタンブロッティングによるタンパク質量の確認。*NcPrp* 抗体を用いた。ウェスタンブロッティングのコントロールとして beta-actin 抗体を用いた。10 頭分の腹部第 1-4 節から試料を作製した。

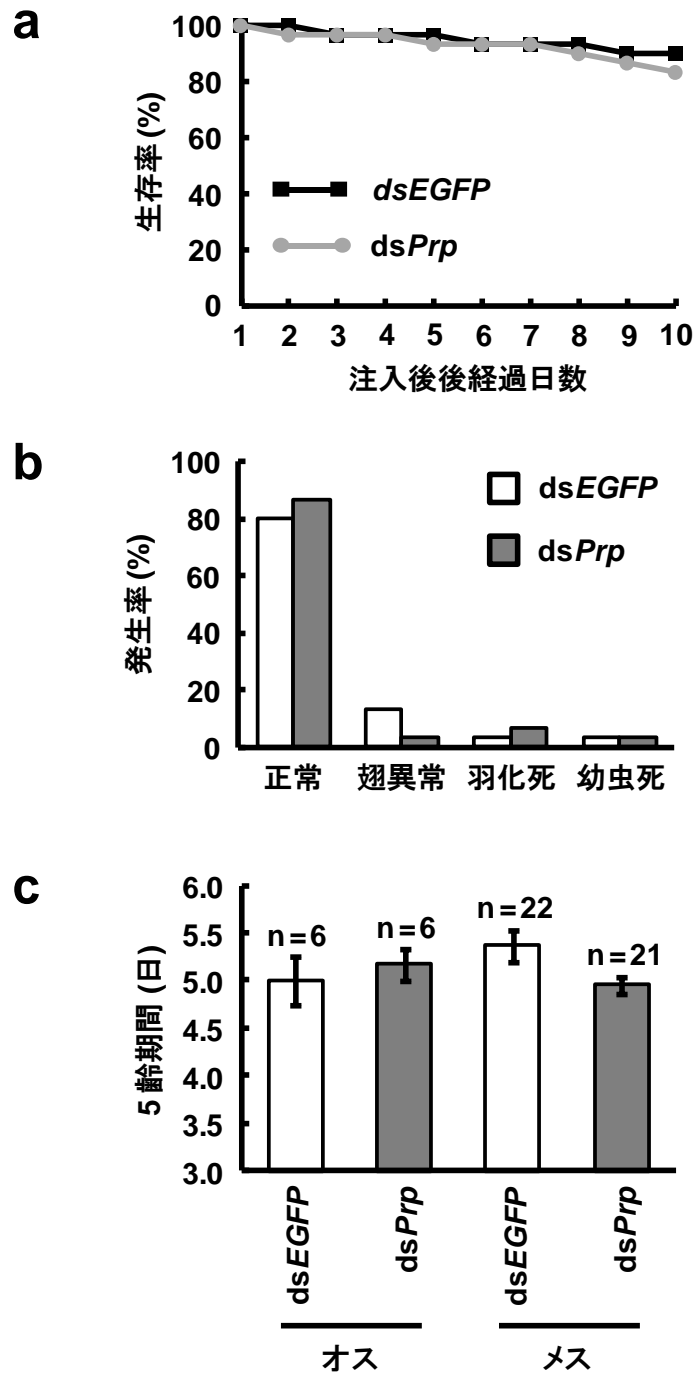


図 3-7. 5 齢幼虫の生存と発達に対する dsPrp 注入の影響

5 齢 0 日齢の幼虫に *NcPrp* 遺伝子の dsRNA 6 ng を注入した。コントロールとして *EGFP* 遺伝子の dsRNA を注入した。(a) dsPrp 注入個体の生存率。注入 1 日後に生存していた 30 頭を、さらに 9 日間観察した。(b) dsPrp 注入個体の成虫発生率。正常、正常に羽化した個体；翅異常、羽化時に翅の異常が見られた個体；羽化死、羽化中あるいは直後に死亡した個体；幼虫死、5 齢幼虫時に死亡した個体。(c) dsPrp 注入個体の 5 齢幼虫期間。実験に用いた頭数 (n) を図中に示した。エラーバーは標準誤差。

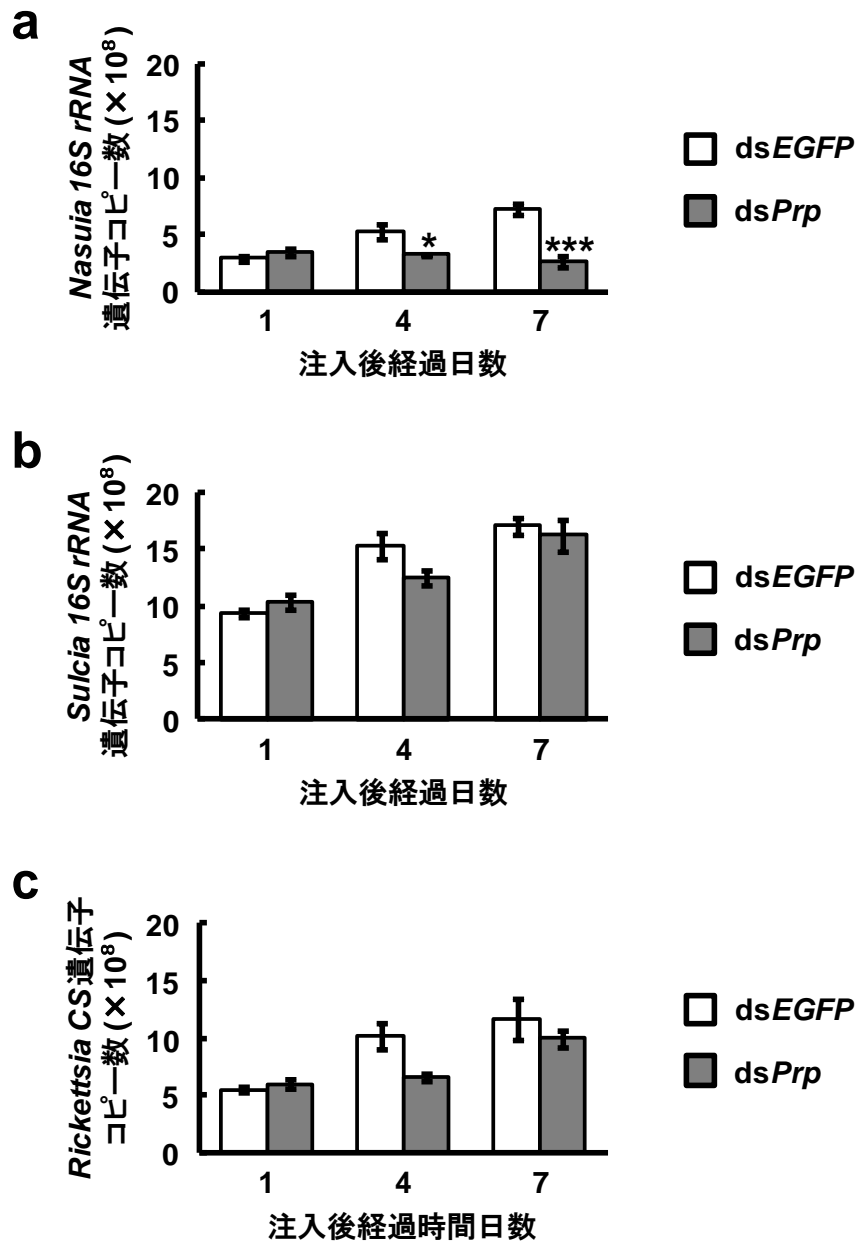


図 3-8. dsPrp 注入個体における共生細菌数の測定 (5 齢幼虫)

RNAi 表現型として共生細菌数を定量 PCR で測定した。(a) *Nasuia* の 16S ribosomal RNA (16S rRNA) 遺伝子のコピー数。(b) *Sulcia* の 16S rRNA 遺伝子のコピー数。(c) *Rickettsia* の citrate synthase (CS) 遺伝子のコピー数。5 齢 0 日齢の幼虫に 6 ng の dsRNA を注入し、1, 4, 7 日後の虫体全体からテンプレートを作製した。6 頭から個別にテンプレートを作製した。コントロールとして EGFP 遺伝子の dsRNA を注入した。Turkey の多重比較検定を行った (*; $P < 0.05$, ***; $P < 0.001$)。エラーバーは標準誤差。

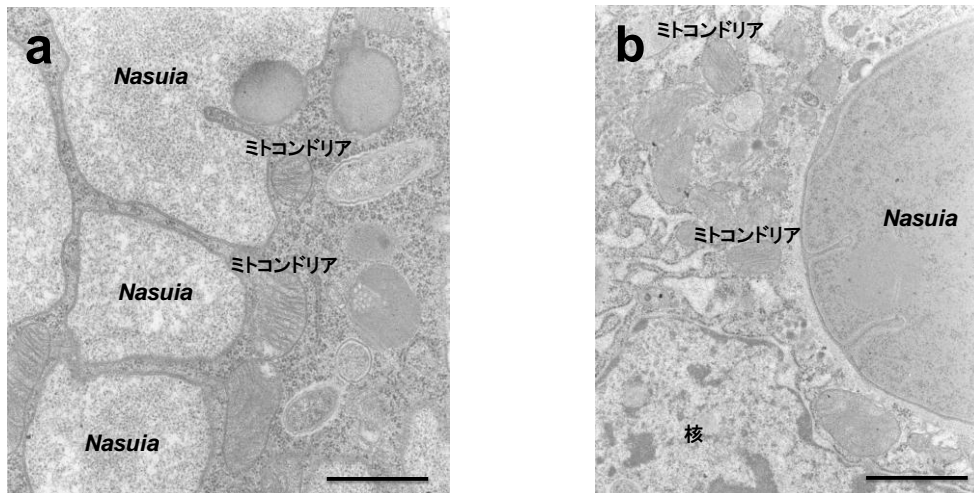


図 3-9. バクテリオームに対する *NcPrp* RNAi の影響 (5 齢幼虫)

dsPrp 注入個体のバクテリオーム細胞を透過型電子顕微鏡により観察した。5 齢 0 日齢の幼虫に *NcPrp* 遺伝子の dsRNA 6 ng を注入し、7 日後に固定した試料を観察した。コントロールとして *EGFP* 遺伝子の dsRNA を注入した。(a) *dsEGFP* 注入した個体のバクテリオームの細胞内。(b) *dsPrp* を注入した個体のバクテリオームの細胞内。Bar = 1 μ m。

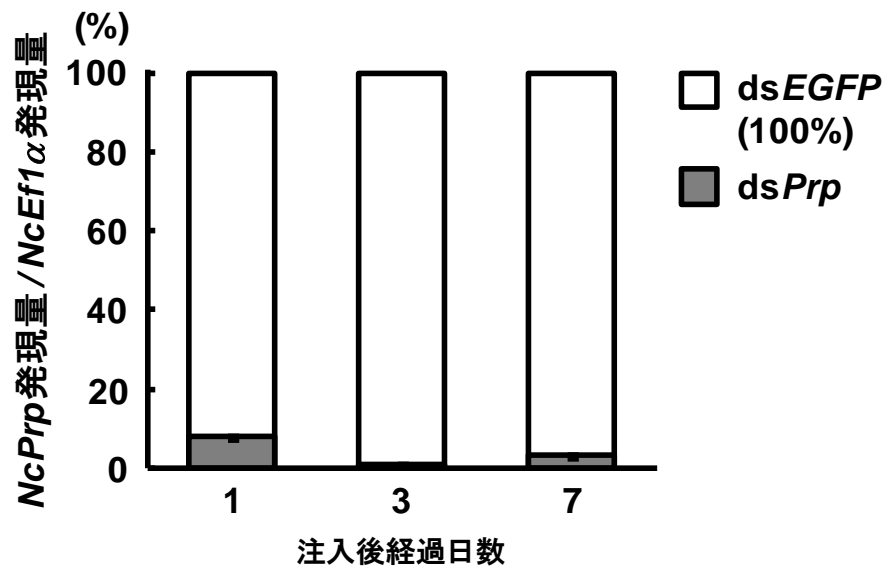


図 3-10. dsRNA 注入による遺伝子発現量減少 (メス成虫)

羽化 0 日齢のメス成虫に *NcPrp* 遺伝子の dsRNA 60 ng を注入し、注入 1, 3, 7 日後の遺伝子発現量を定量 RT-PCR により測定した。コントロール個体の発現量を 100% とした。5 頭分の腹部からテンプレートを作製した。各々独立して作製したテンプレートを使用して 4 回の反復実験を行った。コントロールとして *EGFP* 遺伝子の dsRNA を注入した。標準化遺伝子として *elongation factor 1α* (*NcEf1α*) 遺伝子を用いた。エラーバーは標準誤差。

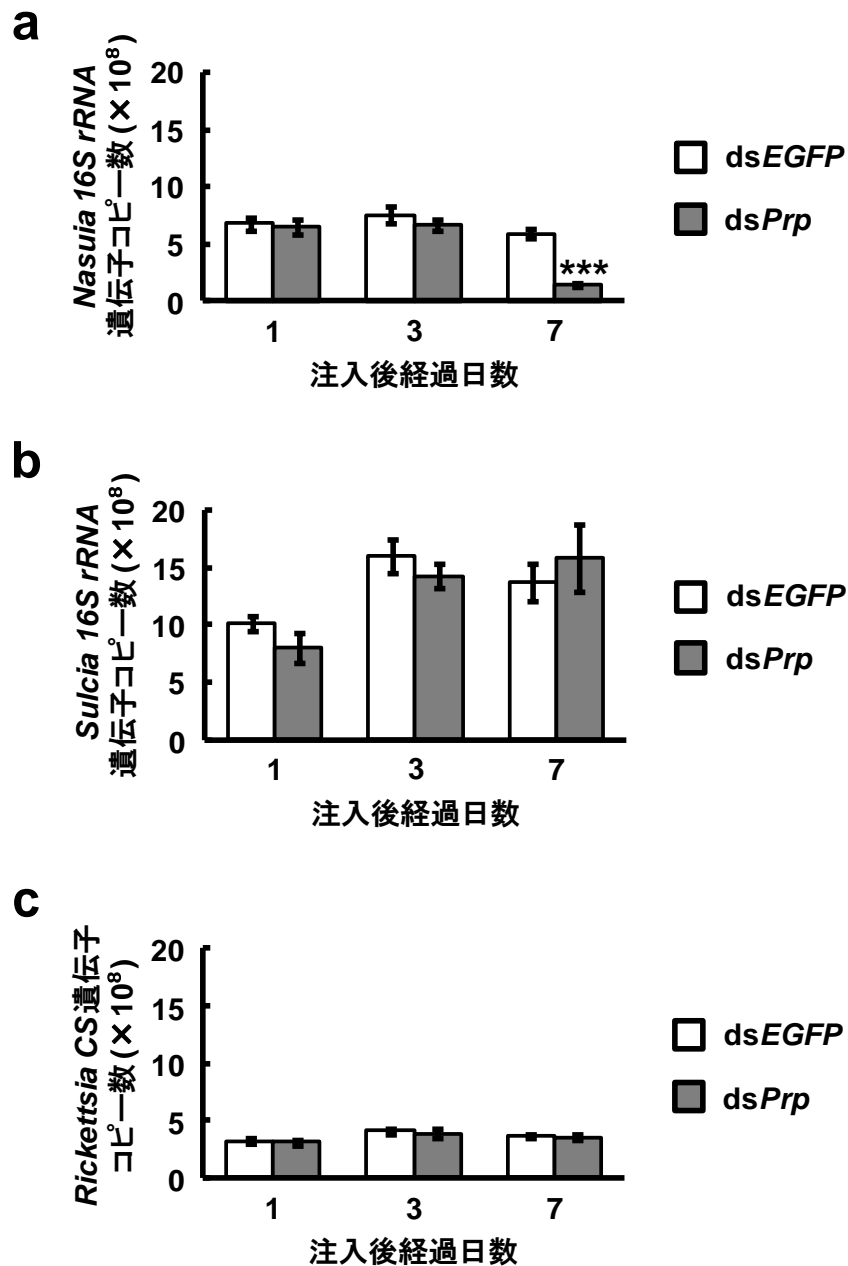


図 3-11. dsPrp 注入個体の共生細菌数の測定 (メス成虫)

羽化 0 日齢のメス成虫に *NcPrp* 遺伝子の dsRNA 60 ng を注入した。RNAi 表現型として共生細菌数を定量 PCR で測定した。(a) *Nasuia* の 16S ribosomal RNA (16S rRNA) 遺伝子のコピー数。(b) *Sulcia* の 16S rRNA 遺伝子のコピー数。(c) *Rickettsia* の citrate synthase (CS) 遺伝子のコピー数。注入 1, 3, 7 日後の虫体全体からテンプレートを作製した。6 頭から個別にテンプレートを作製した。コントロールとして *EGFP* 遺伝子の dsRNA を注入した。Turkey の多重比較検定を行った (***)。エラーバーは標準誤差。

NcPrp - APPRPQVPPAAS**PAPQEKP**
Drosocin - GKPRPYSPRPT**SHPRP I R V**
 * * * * *

図 3-12. NcPrp と Drosocin の配列比較

NcPrp の 89-107 番目のアミノ酸配列と Drosocin の 1-19 番目のアミノ酸配列を比較した。プロリンを下線で示した。O 結合型糖鎖付加位置を赤字で示した。アミノ酸が一致した部分をアスタリスク (*) で示した。Drosocin のアミノ酸配列を Scocchi et al., (2011) から得た。

総合考察

昆虫と微生物の共生関係が高度になるにつれて、微生物の生息場所は細胞外から細胞内へ、具体的には中腸ルーメンから中腸盲のう部、盲のう上皮細胞内、菌細胞内へと移り変わってきたと推定されている (石川, 1985)。ツマグロヨコバイのバクテリオームは共生細菌 *Nasuia* と *Sulcia* がそれぞれ感染している菌細胞が集まり、組織構造を呈している。また、*Nasuia* と *Sulcia* はバクテリオーム内ですみ分けを行っており、内層に *Nasuia* が、外層に *Sulcia* が感染している。ツマグロヨコバイを含む *Deltocephalinae* 亜科の昆虫とその共生細菌が長い年月をかけて共に進化してきた結果と考えられる (Noda et al., 2012)。

ツマグロヨコバイのバクテリオームで特異的に発現する遺伝子としてペプチドグリカン認識タンパク質 (PGRP) 遺伝子を見出した。ツマグロヨコバイ全体では約 300 個の遺伝子が存在しており、昆虫において最多であった。多くの PGRP 遺伝子がバクテリオームで発現しており、他の組織では発現していなかった。タンパク質は PGRP 特有のドメイン構造を保持しており、細菌のペプチドグリカンと結合することが予想されたが、外来の細菌の侵入などにより引き起こされる免疫応答に、ツマグロヨコバイの PGRP 遺伝子が関与するという結果は今のところ得られていない。*Nasuia* と *Sulcia* のゲノム解読の結果では、これらの共生細菌はペプチドグリカン合成酵素群を保持していなかった (Noda et al., unpublished data)。PGRP が実際にペプチドグリカンを認識しているとする、対象となる分子がどこに存在するか不明である。しかし、PGRP のアミノ酸配列がドメイン構造を保持することと、*NcPrp* RNAi 個体では *Nasuia* の細菌数が減少し、PGRP 遺伝子発現量が減少したことから、PGRP 遺伝子は偽遺伝子ではなく、機能的な遺伝子であり、PGRP がバクテリオーム内で機能していることが予想された。約 300 個のもの PGRP が必要である理由は不明のままであるが、*Nasuia* のみに作用するもの、*Sulcia* の

みに作用するもの、バクテリオーム内における共生細菌のすみ分けに関与するもの、経卵伝播に関与するものなど、機能を分担している可能性もある。

機能未知タンパク質遺伝子 *NcPrp* (*Top2*) はバクテリオームで特異的に発現し、そのタンパク質もバクテリオームに存在した。RNAiによる機能解析の結果、*NcPrp* は *Nasuia* の増殖に影響し、*PGRP* 遺伝子の発現に関与していることが明らかになった。このことは *PGRP* 遺伝子が直接あるいは間接的に共生細菌の増殖制御に関与していることをさらに示唆するものである。ツマグロヨコバイの共生の分子機構解明には、さらに *Top1* 遺伝子と *Top3* 遺伝子の解析が待たれる。*Top1* 遺伝子と *Top3* 遺伝子では開始メチオニンの上流にストップコドンはみつかっていないが、得られている *Top1* 遺伝子は 394 残基のアミノ酸配列を有しており、グルタミン酸、リシン、アスパラギン酸が多く、それぞれ 16.5%、13.2%、10.9% を占めていた。Conseved domain 検索を行った結果、AAA ATPase containing von Willebrand factor type A (vWA) domain と相同性があった (E-value = 5.52e-08)。AAA ATPase ファミリーは分子シャペロンとして知られており、タンパク質をアンフォールドする機能を持つものが多い (小椋・山田-稲川、2002)。*Top3* 遺伝子は 127 残基のアミノ酸配列を有し、アスパラギン酸、アルギニン、リシンが多く、それぞれ 11.0%、9.5%、9.5% を占めていた。Conseved domain 検索を行った結果、他のドメインとの相同性はなかった。

コクゾウムシにおいて、抗菌ペプチド遺伝子 *coleoptericin* が共生細菌の増殖制御に関与するという報告がある (Login et al., 2011)。ツマグロヨコバイでも *defensin* と 2 種の *diptericin* (MG2043 と MG4985) の計 3 個の抗菌ペプチド遺伝子が見ついている。*Defensin* は主にグラム陽性細菌に、*diptericin* は主にグラム陰性細菌に抗菌活性を示すことが知られている (Lemaitre and Hoffmann, 2007)。ツマグロヨコバイの *defensin* 遺伝子から推定されるアミノ酸配列はコロモジラミの *defensin-2 precursor, putative* と相同性があり (E-value = 1e-14)、*defensin* 特徴的なジスルフィド結合のためのシステイン残基

(Dimarcq et al., 1994) を保持していた。そのため、ツマグロヨコバイの *defensin* も抗菌活性を有する可能性が高い。ツマグロヨコバイの *diptericin* 遺伝子である MG2043 と MG4985 は全長配列が得られていないが、部分アミノ酸配列を用いて相同性検索を行った結果、MG2043 はサシガメ (*Rhodnius prolixus*) の *diptericin* と相同性があり (E-value = 4e-05)、MG4985 もサシガメ (*Rhodnius prolixus*) の *diptericin* と相同性があった (E-value = 2e-05)。これらの抗菌ペプチド遺伝子の発現量は大腸菌接種 12 時間後に 3.46–8.27 倍に増加した (表 2-5)。ショウジョウバエにおいて、*diptericin* 遺伝子の発現量は大腸菌の感染により数十倍程度に増加することが知られており (Gottar et al., 2002)、これと比べると増加率はやや低かった。ツマグロヨコバイの抗菌ペプチド遺伝子の発現部位を調査した結果、*defensin* 遺伝子は腹部、胸部、バクテリオームで発現し、*diptericin* 遺伝子 (MG2043 と MG4985) は腹部、腸、バクテリオームで発現していた。外来の細菌が侵入していない個体で抗菌ペプチド遺伝子がある程度発現していたため、大腸菌を接種しても発現量の増加は大きくなかったとも考えられる。また、ツェツェバエでは免疫応答の発達に共生細菌が必須であることがわかっており (Weiss et al., 2012)、ツマグロヨコバイでも抗菌ペプチドを含む免疫機構との関係を今後検討する必要がある。

本研究は、昆虫とその共生細菌との間には、PGRP など既知の分子の機能や NcPrp など新規の分子の機能を包含した複雑な分子機構が存在することを示したもので、昆虫の免疫機構も関わっていると考えられる。本研究により、共生機構の成り立ちやその維持機構を理解する上で、重要な糸口を提供したと考えている。

謝辞

本研究を進めるにあたり、東京大学大学院新領域創成科学研究科先端生命科学専攻客員教授兼独立行政法人農業生物資源研究所昆虫微生物機能研究ユニット長の中島信彦博士に御指導を賜り、深く感謝致します。また、独立行政法人農業生物資源研究所昆虫微生物機能研究ユニット特任上級研究員の野田博明博士には 2013 年 3 月まで指導教官を務めていただき、深く感謝致します。

東京農工大学大学院農学研究院生物システム科学部門生物システム応用科学府循環生産システム学専修助教の菊田真吾博士には多くの実験操作を懇切丁寧に指導していただき、深く感謝致します。独立行政法人農業生物資源研究所研究支援員の中村有希博士にはマイクロアレイ解析に協力していただき、深く感謝致します。独立行政法人農業生物資源研究所研究支援員の行弘文子博士には電子顕微鏡の使用に協力していただき、深く感謝致します。独立行政法人農業生物資源研究所昆虫微生物機能研究ユニット主任研究員の渡部賢司博士には *Rickettsia* 非感染系統のツマグロヨコバイを提供していただき、深く感謝致します。また、独立行政法人農業生物資源研究所の服部誠博士、松本由記子博士、河合佐和子さん、佐藤友紀さん、小泉蓉子さん、渡邊圭子さんには研究生活を送るにあたり様々なご助力を賜り深く感謝致します。修士課程の同期生として 2 年間を共に切磋琢磨して研究に励んできた松本宜晃君にも深く感謝致します。

これまでの 6 年間の研究生活を送るにあたり、東京大学大学院新領域創成科学研究科先端生命科学専攻応用生物資源学分野の皆さま、独立行政法人農業生物資源研究所昆虫微生物機能研究ユニットの皆さまには多くのご助力を賜り、深く感謝致します。

引用文献

- Akman, L., Yamashita, A., Watanabe, H., Oshima, K., Shiba, T., Hattori, M., and Aksoy, S. (2002) Genome sequence of the endocellular obligate symbiont of tsetse flies, *Wigglesworthia glossinidia*. *Nat Genet* **32**: 402–407.
- Aksoy, S., Pourhosseini, A.A., and Chow, A. (1995) Mycetome endosymbionts of tsetse flies constitute a distinct lineage related to Enterobacteriaceae. *Insect Mol Biol* **4**: 15–22.
- Aksoy, S., Chen, X., and Hypsa, V. (1997) Phylogeny and potential transmission routes of midgut-associated endosymbionts of tsetse (Diptera:Glossinidae). *Insect Mol Biol* **6**: 183–190.
- Anselme, C., Vallier, A., Balmand, S., Fauvarque, M.O., and Heddi, A. (2006) Host PGRP gene expression and bacterial release in endosymbiosis of the weevil *Sitophilus zeamais*. *Appl Environ Microbiol* **72**: 6766–6772.
- Anselme, C., Pérez-Brocal, V., Vallier, A., Vincent-Monegat, C., Charif, D., Latorre, A. et al. (2008) Identification of the weevil immune genes and their expression in the bacteriome tissue. *BMC Biol* **6**: 43.
- Attardo, G.M., Lohs, C., Heddi, A., Alam, U.H., Yildirim, S., and Aksoy, S. (2008) Analysis of milk gland structure and function in *Glossina morsitans*: milk protein production, symbiont populations and fecundity. *J Insect Physiol* **54**: 1236–1242.
- Attardo, G.M., Strickler-Dinglasan, P., Perkin, S.A., Caler, E., Bonaldo, M.F., Soares, M.B. et al. (2006) Analysis of fat body transcriptome from the adult tsetse fly, *Glossina morsitans morsitans*. *Insect Mol Biol* **15**: 411–424.
- Bandi, C., Damiani, G., Magrassi, L., Grigolo, A., Fani, R., and Sacchi, L. (1994) Flavobacteria as intracellular symbionts in cockroaches. *Proc Biol Sci* **257**: 43–48.

- Bandi, C., Sironi, M., Damiani, G., Magrassi, L., Nalepa, C.A., Laudani, U., and Sacchi, L. (1995) The establishment of intracellular symbiosis in an ancestor of cockroaches and termites. *Proc Biol Sci* **259**: 293–299.
- Basbous, N., Coste, F., Leone, P., Vincentelli, R., Royet, J., Kellenberger, C., and Roussel, A. (2011) The *Drosophila* peptidoglycan-recognition protein LF interacts with peptidoglycan-recognition protein LC to downregulate the Imd pathway. *EMBO Rep* **12**: 327–333.
- Bischoff, V., Vignal, C., Boneca, I.G., Michel, T., Hoffmann, J.A., and Royet, J. (2004) Function of the drosophila pattern-recognition receptor PGRP-SD in the detection of Gram-positive bacteria. *Nat Immunol* **5**: 1175–1180.
- Bischoff, V., Vignal, C., Duvic, B., Boneca, I.G., Hoffmann, J.A., and Royet, J. (2006) Downregulation of the *Drosophila* immune response by peptidoglycan-recognition proteins SC1 and SC2. *PLoS Pathog* **2**: e14.
- Boutros, M., Agaisse, H., and Perrimon, N. (2002) Sequential activation of signaling pathways during innate immune responses in *Drosophila*. *Dev Cell* **3**: 711–722.
- Bulet, P., Dimarcq, J.L., Hetru, C., Lagueux, M., Charlet, M., Hegy, G. et al. (1993) A novel inducible antibacterial peptide of *Drosophila* carries an O-glycosylated substitution. *J Biol Chem* **268**: 14893–14897.
- Casteels, P., Ampe, C., Jacobs, F., Vaeck, M., and Tempst, P. (1989) Apidaecins: antibacterial peptides from honeybees. *EMBO J* **8**: 2387–2391.
- Chang, C.I., Chelliah, Y., Borek, D., Mengin-Lecreulx, D., and Deisenhofer, J. (2006) Structure of tracheal cytotoxin in complex with a heterodimeric pattern-recognition receptor. *Science* **311**: 1761–1764.
- Chen, X., Li, S., and Aksoy, S. (1999) Concordant evolution of a symbiont with its host insect

- species: molecular phylogeny of genus *Glossina* and its bacteriome-associated endosymbiont, *Wigglesworthia glossinidia*. *J Mol Evol* **48**: 49–58.
- Cheng, X., Zhang, X., Pflugrath, J.W., and Studier, F.W. (1994) The structure of bacteriophage T7 lysozyme, a zinc amidase and an inhibitor of T7 RNA polymerase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**: 4034–4038.
- Choe, K.M., Werner, T., Stöven, S., Hultmark, D., and Anderson, K.V. (2002) Requirement for a peptidoglycan recognition protein (PGRP) in Relish activation and antibacterial immune responses in *Drosophila*. *Science* **296**: 359–362.
- Christophides, G.K., Zdobnov, E., Barillas-Mury, C., Birney, E., Blandin, S., Blass, C. et al. (2002) Immunity-related genes and gene families in *Anopheles gambiae*. *Science* **298**: 159–165.
- Clark, E.L., Karley, A.J., and Hubbard, S.F. (2010) Insect endosymbionts: manipulators of insect herbivore trophic interactions? *Protoplasma* **244**: 25–51.
- Cociancich, S., Dupont, A., Hegy, G., Lanot, R., Holder, F., Hetru, C. et al. (1994) Novel inducible antibacterial peptides from a hemipteran insect, the sap-sucking bug *Pyrrhocoris apterus*. *Biochem J* **300** (Pt 2): 567–575.
- Consortium, I.A.G. (2010) Genome sequence of the pea aphid *Acyrtosiphon pisum*. *PLoS Biol* **8**: e1000313.
- Degnan, P.H., Lazarus, A.B., and Wernegreen, J.J. (2005) Genome sequence of *Blochmannia pennsylvanicus* indicates parallel evolutionary trends among bacterial mutualists of insects. *Genome Res* **15**: 1023–1033.
- Dimarcq, J.L., Hoffmann, D., Meister, M., Bulet, P., Lanot, R., Reichhart, J.M., and Hoffmann, J.A. (1994) Characterization and transcriptional profiles of a *Drosophila* gene encoding an insect defensin. A study in insect immunity. *Eur J Biochem* **221**: 201–209.

- Douglas, A.E., Bouvaine, S., and Russell, R.R. (2011) How the insect immune system interacts with an obligate symbiotic bacterium. *Proc Biol Sci* **278**: 333–338.
- Eleftherianos, I., and Revenis, C. (2011) Role and importance of phenoloxidase in insect hemostasis. *J Innate Immun* **3**: 28–33.
- Ferrandon, D., Imler, J.L., Hetru, C., and Hoffmann, J.A. (2007) The *Drosophila* systemic immune response: sensing and signalling during bacterial and fungal infections. *Nat Rev Immunol* **7**: 862–874.
- Filipe, S.R., Tomasz, A., and Ligoxygakis, P. (2005) Requirements of peptidoglycan structure that allow detection by the *Drosophila* Toll pathway. *EMBO Rep* **6**: 327–333.
- Fukatsu, T., Tsuchida, T., Nikoh, N., and Koga, R. (2001) *Spiroplasma* symbiont of the pea aphid, *Acyrtosiphon pisum* (Insecta: Homoptera). *Appl Environ Microbiol* **67**: 1284–1291.
- Fukatsu, T., Koga, R., Smith, W.A., Tanaka, K., Nikoh, N., Sasaki-Fukatsu, K. et al. (2007) Bacterial endosymbiont of the slender pigeon louse, *Columbicola columbae*, allied to endosymbionts of grain weevils and tsetse flies. *Appl Environ Microbiol* **73**: 6660–6668.
- Futahashi, R., Tanaka, K., Tanahashi, M., Nikoh, N., Kikuchi, Y., Lee, B.L., and Fukatsu, T. (2013) Gene expression in gut symbiotic organ of stinkbug affected by extracellular bacterial symbiont. *PLoS One* **8**: e64557.
- Gendrin, M., Zaidman-Rémy, A., Broderick, N.A., Paredes, J., Poidevin, M., Roussel, A., and Lemaitre, B. (2013) Functional analysis of PGRP-LA in *Drosophila* immunity. *PLoS One* **8**: e69742.
- Gerardo, N.M., Altincicek, B., Anselme, C., Atamian, H., Barribeau, S.M., de Vos, M. et al. (2010) Immunity and other defenses in pea aphids, *Acyrtosiphon pisum*. *Genome Biol* **11**: R21.

- Gil, R., Silva, F.J., Zientz, E., Delmotte, F., González-Candelas, F., Latorre, A. et al. (2003) The genome sequence of *Blochmannia floridanus*: comparative analysis of reduced genomes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**: 9388–9393.
- Gobert, V., Gottar, M., Matskevich, A.A., Rutschmann, S., Royet, J., Belvin, M. et al. (2003) Dual activation of the *Drosophila* toll pathway by two pattern recognition receptors. *Science* **302**: 2126–2130.
- Gottar, M., Gobert, V., Michel, T., Belvin, M., Duyk, G., Hoffmann, J.A. et al. (2002) The *Drosophila* immune response against Gram-negative bacteria is mediated by a peptidoglycan recognition protein. *Nature* **416**: 640–644.
- Heddi, A., Charles, H., Khatchadourian, C., Bonnot, G., and Nardon, P. (1998) Molecular characterization of the principal symbiotic bacteria of the weevil *Sitophilus oryzae*: a peculiar G + C content of an endocytobiotic DNA. *J Mol Evol* **47**: 52–61.
- Heddi, A., Vallier, A., Anselme, C., Xin, H., Rahbe, Y., and Wäckers, F. (2005) Molecular and cellular profiles of insect bacteriocytes: mutualism and harm at the initial evolutionary step of symbiogenesis. *Cell Microbiol* **7**: 293–305.
- Hoffmann, J.A. (2003) The immune response of *Drosophila*. *Nature* **426**: 33–38.
- Hosokawa, T., Kikuchi, Y., Nikoh, N., Shimada, M., and Fukatsu, T. (2006) Strict host-symbiont cospeciation and reductive genome evolution in insect gut bacteria. *PLoS Biol* **4**: e337.
- Huvenne, H., and Smagghe, G. (2010) Mechanisms of dsRNA uptake in insects and potential of RNAi for pest control: a review. *J Insect Physiol* **56**: 227–235.
- Imler, J.L. (2014) Overview of *Drosophila* immunity: a historical perspective. *Dev Comp Immunol* **42**: 3–15.
- 石川統 (1985) 細胞内共生. 東京大学出版会.

- Jung, H.Y., Sawayanagi, T., Wongkaew, P., Kakizawa, S., Nishigawa, H., Wei, W. et al. (2003) "*Candidatus Phytoplasma oryzae*", a novel phytoplasma taxon associated with rice yellow dwarf disease. *Int J Syst Evol Microbiol* **53**: 1925–1929.
- Kaneko, T., Goldman, W.E., Mellroth, P., Steiner, H., Fukase, K., Kusumoto, S. et al. (2004) Monomeric and polymeric gram-negative peptidoglycan but not purified LPS stimulate the *Drosophila* IMD pathway. *Immunity* **20**: 637–649.
- Kaneko, T., Yano, T., Aggarwal, K., Lim, J.H., Ueda, K., Oshima, Y. et al. (2006) PGRP-LC and PGRP-LE have essential yet distinct functions in the drosophila immune response to monomeric DAP-type peptidoglycan. *Nat Immunol* **7**: 715–723.
- Kang, D., Liu, G., Lundström, A., Gelius, E., and Steiner, H. (1998) A peptidoglycan recognition protein in innate immunity conserved from insects to humans. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**: 10078–10082.
- Kelman, Z., and O'Donnell, M. (1995) DNA polymerase III holoenzyme: structure and function of a chromosomal replicating machine. *Annu Rev Biochem* **64**: 171–200.
- Kikuchi, Y., Meng, X.Y., and Fukatsu, T. (2005) Gut symbiotic bacteria of the genus *Burkholderia* in the broad-headed bugs *Riptortus clavatus* and *Leptocoris chinensis* (Heteroptera: Alydidae). *Appl Environ Microbiol* **71**: 4035–4043.
- Koga, R., Tsuchida, T., and Fukatsu, T. (2003) Changing partners in an obligate symbiosis: a facultative endosymbiont can compensate for loss of the essential endosymbiont *Buchnera* in an aphid. *Proc Biol Sci* **270**: 2543–2550.
- Koga, R., Meng, X.Y., Tsuchida, T., and Fukatsu, T. (2012) Cellular mechanism for selective vertical transmission of an obligate insect symbiont at the bacteriocyte-embryo interface. *Proc Natl Acad Sci U S A* **109**: E1230–1237.
- 倉田祥一郎 (2009) 昆虫の自然免疫機構を解き明かす—そこで働く化合物が創薬のカ

ギとなる. *化学* **64**: 12–17.

- Kurata, S. (2014) Peptidoglycan recognition proteins in *Drosophila* immunity. *Dev Comp Immunol* **42**: 36–41.
- Lemaitre, B., and Hoffmann, J. (2007) The host defense of *Drosophila melanogaster*. *Annu Rev Immunol* **25**: 697–743.
- Leulier, F., Parquet, C., Pili-Floury, S., Ryu, J.H., Caroff, M., Lee, W.J. et al. (2003) The *Drosophila* immune system detects bacteria through specific peptidoglycan recognition. *Nat Immunol* **4**: 478–484.
- Li, J., Wang, X.P., Wang, M.Q., Ma, W.H., and Hua, H.X. (2013) Advances in the use of the RNA interference technique in Hemiptera. *Insect Sci* **20**: 31–39.
- Lim, J.H., Kim, M.S., Kim, H.E., Yano, T., Oshima, Y., Aggarwal, K. et al. (2006) Structural basis for preferential recognition of diaminopimelic acid-type peptidoglycan by a subset of peptidoglycan recognition proteins. *J Biol Chem* **281**: 8286–8295.
- Liu, S., Ding, Z., Zhang, C., Yang, B., and Liu, Z. (2010) Gene knockdown by intro-thoracic injection of double-stranded RNA in the brown planthopper, *Nilaparvata lugens*. *Insect Biochem Mol Biol* **40**: 666–671.
- Login, F.H., Balmand, S., Vallier, A., Vincent-Monégat, C., Vigneron, A., Weiss-Gayet, M. et al. (2011) Antimicrobial peptides keep insect endosymbionts under control. *Science* **334**: 362–365.
- Maillet, F., Bischoff, V., Vignal, C., Hoffmann, J., and Royet, J. (2008) The *Drosophila* peptidoglycan recognition protein PGRP-LF blocks PGRP-LC and IMD/JNK pathway activation. *Cell Host Microbe* **3**: 293–303.
- McCutcheon, J.P., and Moran, N.A. (2007) Parallel genomic evolution and metabolic interdependence in an ancient symbiosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**: 19392–19397.

- Mellroth, P., and Steiner, H. (2006) PGRP-SB1: an *N*-acetylmuramoyl L-alanine amidase with antibacterial activity. *Biochem Biophys Res Commun* **350**: 994–999.
- Michel, T., Reichhart, J.M., Hoffmann, J.A., and Royet, J. (2001) *Drosophila* Toll is activated by Gram-positive bacteria through a circulating peptidoglycan recognition protein. *Nature* **414**: 756–759.
- Mitsuhashi, J., and Kono, K. (1975) Intracellular microorganisms in the green rice leafhopper, *Nephotettix cincticeps* UHLER (Hemiptera: Deltocephalidae). *Appl Entomol Zool* **10**: 1–9.
- Montllor, C.B., Maxmen, A., and Purcell, A.H. (2002). Facultative bacterial endosymbionts benefit pea aphids *Acyrtosiphon pisum* under heat stress. *Ecological Entomology* Volume 27, Issue 2 [WWW document]. URL <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1046/j.1365-2311.2002.00393.x/abstract>.
- Moran, N.A. (2006) Symbiosis. *Curr Biol* **16**: R866–871.
- Moran, N.A. (2007) Symbiosis as an adaptive process and source of phenotypic complexity. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104 Suppl 1**: 8627–8633.
- Moran, N.A., Tran, P., and Gerardo, N.M. (2005) Symbiosis and insect diversification: an ancient symbiont of sap-feeding insects from the bacterial phylum *Bacteroidetes*. *Appl Environ Microbiol* **71**: 8802–8810.
- Moran, N.A., McLaughlin, H.J., and Sorek, R. (2009) The dynamics and time scale of ongoing genomic erosion in symbiotic bacteria. *Science* **323**: 379–382.
- Moran, N.A., Munson, M.A., Baumann, P., and Ishikawa, H. (1993) A molecular clock in endosymbiotic bacteria is calibrated using the insect hosts. *Proc Biol Sci* **253**: 167–171.
- Moran, N.A., Dale, C., Dunbar, H., Smith, W.A., and Ochman, H. (2003) Intracellular symbionts of sharpshooters (Insecta: Hemiptera: Cicadellinae) form a distinct clade with

- a small genome. *Environ Microbiol* **5**: 116–126.
- Moya, A., Peretó, J., Gil, R., and Latorre, A. (2008) Learning how to live together: genomic insights into prokaryote-animal symbioses. *Nat Rev Genet* **9**: 218–229.
- Nakabachi, A., and Ishikawa, H. (1999) Provision of riboflavin to the host aphid, *Acyrtosiphon pisum*, by endosymbiotic bacteria, *Buchnera*. *J Insect Physiol* **45**: 1–6.
- Nakamura, Y., Yukuhiro, F., Matsumura, M., and Noda, H. (2012) Cytoplasmic incompatibility involving *Cardinium* and *Wolbachia* in the white-backed planthopper *Sogatella furcifera* (Hemiptera: Delphacidae). *Appl Entomol Zool* **47**: 273–283.
- Nasu, S. (1965) Electron microscopic studies on transovarial passage of rice dwarf virus. *Appl Entomol Zool* **9**: 225–237.
- 奈須壯兆 (1963) 稲ウイルス病を媒介するウンカ・ヨコバイ類に関する研究. 九州農業試験場彙報 **8**: 153–349.
- Nikoh, N., McCutcheon, J.P., Kudo, T., Miyagishima, S.Y., Moran, N.A., and Nakabachi, A. (2010) Bacterial genes in the aphid genome: absence of functional gene transfer from *Buchnera* to its host. *PLoS Genet* **6**: e1000827.
- Noda, H., Watanabe, K., Kawai, S., Yukuhiro, F., Miyoshi, T., Tomizawa, M., Koizumi, Y., Nikoh, N., and Fukatsu, T. (2012) Bacteriome-associated endosymbionts of the green rice leafhopper *Nephotettix cincticeps* (Hemiptera: Cicadellidae). *Appl Entomol Zool* **47**: 217–225.
- 小椋光・山田-稲川知子 (2002) AAA ファミリーATPase 蛋白質の立体構造をエネルギー依存的に積極的に変換するリング状シャペロン. 蛋白質 核酸 酵素 **47**: 1182–1188.
- Oliver, K.M., Moran, N.A., and Hunter, M.S. (2005) Variation in resistance to parasitism in aphids is due to symbionts not host genotype. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**:

12795–12800.

Oliver, K.M., Russell, J.A., Moran, N.A., and Hunter, M.S. (2003) Facultative bacterial symbionts in aphids confer resistance to parasitic wasps. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**: 1803–1807.

Otvos, L., O, I., Rogers, M.E., Consolvo, P.J., Condie, B.A., Lovas, S. et al. (2000) Interaction between heat shock proteins and antimicrobial peptides. *Biochemistry* **39**: 14150–14159.

Parkinson, J., Guiliano, D.B., and Blaxter, M. (2002) Making sense of EST sequences by CLOBBing them. *BMC Bioinformatics* **3**: 31.

Persson, C., Oldenvi, S., and Steiner, H. (2007) Peptidoglycan recognition protein LF: a negative regulator of *Drosophila* immunity. *Insect Biochem Mol Biol* **37**: 1309–1316.

Pili-Floury, S., Leulier, F., Takahashi, K., Saigo, K., Samain, E., Ueda, R., and Lemaitre, B. (2004) *In vivo* RNA interference analysis reveals an unexpected role for GGBP1 in the defense against Gram-positive bacterial infection in *Drosophila* adults. *J Biol Chem* **279**: 12848–12853.

Rio, R.V., Wu, Y.N., Filardo, G., and Aksoy, S. (2006) Dynamics of multiple symbiont density regulation during host development: tsetse fly and its microbial flora. *Proc Biol Sci* **273**: 805–814.

Rosa, C., Kamita, S.G., and Falk, B.W. (2012) RNA interference is induced in the glassy winged sharpshooter *Homalodisca vitripennis* by actin dsRNA. *Pest Manag Sci* **68**: 995–1002.

Royet, J., and Dziarski, R. (2007) Peptidoglycan recognition proteins: pleiotropic sensors and effectors of antimicrobial defences. *Nat Rev Microbiol* **5**: 264–277.

Rämet, M., Manfrulli, P., Pearson, A., Mathey-Prevot, B., and Ezekowitz, R.A. (2002) Functional genomic analysis of phagocytosis and identification of a *Drosophila* receptor

- for *E. coli*. *Nature* **416**: 644–648.
- Sabree, Z.L., Kambhampati, S., and Moran, N.A. (2009) Nitrogen recycling and nutritional provisioning by *Blattabacterium*, the cockroach endosymbiont. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**: 19521–19526.
- Sakurai, M., Koga, R., Tsuchida, T., Meng, X.Y., and Fukatsu, T. (2005) *Rickettsia* symbiont in the pea aphid *Acyrtosiphon pisum*: novel cellular tropism, effect on host fitness, and interaction with the essential symbiont *Buchnera*. *Appl Environ Microbiol* **71**: 4069–4075.
- Sasaki, T., and Ishikawa, H. (1995) Production of essential amino acids from glutamate by mycetocyte symbionts of the pea aphid, *Acyrtosiphon pisum*. *J Insect Physiol* **41**: 41–46.
- Sasaki-Fukatsu, K., Koga, R., Nikoh, N., Yoshizawa, K., Kasai, S., Mihara, M. et al. (2006) Symbiotic bacteria associated with stomach discs of human lice. *Appl Environ Microbiol* **72**: 7349–7352.
- Scarborough, C.L., Ferrari, J., and Godfray, H.C. (2005) Aphid protected from pathogen by endosymbiont. *Science* **310**: 1781.
- Schleifer, K.H., and Kandler, O. (1972) Peptidoglycan types of bacterial cell walls and their taxonomic implications. *Bacteriol Rev* **36**: 407–477.
- Schönknecht, G., Weber, A.P., and Lercher, M.J. (2014) Horizontal gene acquisitions by eukaryotes as drivers of adaptive evolution. *Bioessays* **36**: 9–20.
- Scocchi, M., Tossi, A., and Gennaro, R. (2011) Proline-rich antimicrobial peptides: converging to a non-lytic mechanism of action. *Cell Mol Life Sci* **68**: 2317–2330.
- Shigenobu, S., and Stern, D.L. (2013) Aphids evolved novel secreted proteins for symbiosis with bacterial endosymbiont. *Proc Biol Sci* **280**: 20121952.

- Shigenobu, S., Watanabe, H., Hattori, M., Sakaki, Y., and Ishikawa, H. (2000) Genome sequence of the endocellular bacterial symbiont of aphids *Buchnera* sp. *APS. Nature* **407**: 81–86.
- Steiner, H. (2004) Peptidoglycan recognition proteins: on and off switches for innate immunity. *Immunol Rev* **198**: 83–96.
- Takehana, A., Katsuyama, T., Yano, T., Oshima, Y., Takada, H., Aigaki, T., and Kurata, S. (2002) Overexpression of a pattern-recognition receptor, peptidoglycan-recognition protein-LE, activates imd/relish-mediated antibacterial defense and the prophenoloxidase cascade in *Drosophila* larvae. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**: 13705–13710.
- Tanaka, H., Ishibashi, J., Fujita, K., Nakajima, Y., Sagisaka, A., Tomimoto, K. et al. (2008) A genome-wide analysis of genes and gene families involved in innate immunity of *Bombyx mori*. *Insect Biochem Mol Biol* **38**: 1087–1110.
- Tsuchida, T., Koga, R., and Fukatsu, T. (2004) Host plant specialization governed by facultative symbiont. *Science* **303**: 1989.
- Tsuchida, T., Koga, R., Horikawa, M., Tsunoda, T., Maoka, T., Matsumoto, S. et al. (2010) Symbiotic bacterium modifies aphid body color. *Science* **330**: 1102–1104.
- Unterman, B.M., Baumann, P., and McLean, D.L. (1989) Pea aphid symbiont relationships established by analysis of 16S rRNAs. *J Bacteriol* **171**: 2970–2974.
- Vigneron, A., Charif, D., Vincent-Monégat, C., Vallier, A., Gavory, F., Wincker, P., and Heddi, A. (2012) Host gene response to endosymbiont and pathogen in the cereal weevil *Sitophilus oryzae*. *BMC Microbiol* **12 Suppl 1**: S14.
- Wang, J., Wu, Y., Yang, G., and Aksoy, S. (2009) Interactions between mutualist *Wigglesworthia* and tsetse peptidoglycan recognition protein (PGRP-LB) influence

- trypanosome transmission. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**: 12133–12138.
- Wang, L., Gilbert, R.J., Atilano, M.L., Filipe, S.R., Gay, N.J., and Ligoxygakis, P. (2008) Peptidoglycan recognition protein-SD provides versatility of receptor formation in *Drosophila* immunity. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**: 11881–11886.
- Weiss, B.L., Maltz, M., and Aksoy, S. (2012) Obligate symbionts activate immune system development in the tsetse fly. *J Immunol* **188**: 3395–3403.
- Werner, T., Borge-Renberg, K., Mellroth, P., Steiner, H., and Hultmark, D. (2003) Functional diversity of the *Drosophila* PGRP-LC gene cluster in the response to lipopolysaccharide and peptidoglycan. *J Biol Chem* **278**: 26319–26322.
- Werner, T., Liu, G., Kang, D., Ekengren, S., Steiner, H., and Hultmark, D. (2000) A family of peptidoglycan recognition proteins in the fruit fly *Drosophila melanogaster*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**: 13772–13777.
- Wu, D., Daugherty, S.C., Van Aken, S.E., Pai, G.H., Watkins, K.L., Khouri, H. et al. (2006) Metabolic complementarity and genomics of the dual bacterial symbiosis of sharpshooters. *PLoS Biol* **4**: e188.
- Yano, T., Mita, S., Ohmori, H., Oshima, Y., Fujimoto, Y., Ueda, R. et al. (2008) Autophagic control of listeria through intracellular innate immune recognition in drosophila. *Nat Immunol* **9**: 908–916.
- Yoshida, H., Kinoshita, K., and Ashida, M. (1996) Purification of a peptidoglycan recognition protein from hemolymph of the silkworm, *Bombyx mori*. *J Biol Chem* **271**: 13854–13860.
- Zaidman-Rémy, A., Hervé, M., Poidevin, M., Pili-Floury, S., Kim, M.S., Blanot, D. et al. (2006) The *Drosophila* amidase PGRP-LB modulates the immune response to bacterial infection. *Immunity* **24**: 463–473.

補足表

補足表 1. 共生細菌数測定用定量プライマー

	Forward primer	Reverse primer
<i>Nasuia</i>	5'-GGGGAAAACCTCGCGTTATA-3'	5'-CCACTGCTGCCTCTCGTAAG-3'
<i>Sulcia</i>	5'-GGGGACTCTAATAAGACTGC-3'	5'-CTGAGATCGGCTTCTGGAT-3'
<i>Rickettsia</i>	5'-AAATATTCAATAGGTCAGCCTT-3'	5'-GGATGATCCGACCAAACGTA-3'

補足表 2. 3' RACE 用プライマー

遺伝子名	3' RACE 1st PCR primer	3' RACE 2nd PCR primer
<i>NcPGRP1</i>	5'-CCAATTTCTGTAGCTTTTCCAC-3'	5'-CCGGCCATTATTCTTTGGAC-3'
<i>NcPGRP2</i>	5'-GAGAAACGTGAAATCTGTAGC-3'	5'-GTTTAATTTTTTCATGCACCGCT-3'
<i>NcPGRP7</i>	5'-AGCCAGCTGAGTGATGTCCG-3'	5'-GGTGCCAATTAATTTGTCCTTT-3'
<i>NcPGRP8</i>	5'-TTCTCCGACGACGTGAAGGC-3'	5'-GGAGGCGGACTTTGAGGAGT-3'
<i>NcPGRP9</i>	5'-AGGGTGGATACTGACATTAC-3'	5'-GTACTTTAGGTGTAATTTGAGTG-3'
<i>NcPGRP12</i>	5'-CAGGGAGTTCGATTACCTCAA-3'	5'-CCTCAAAGGAGACTGCTTGG-3'
<i>NcPGRP14</i>	5'-CTCGCCACCCTTACTATTCA-3'	5'-TATAGCATCAGAATTGTTCTC-3'
<i>NcPrp</i>	5'-TACCAACAGAGGACTCCCTT-3'	5'-CTGAGCCAAAGAAGTTGTCG-3'

補足表 3. 5' RACE 用プライマー

遺伝子名	5' RACE 1st PCR primer	5' RACE 2nd PCR primer
<i>NcPGRP1</i>	5'-TGTCACCAGTGTTGATGCGG-3'	5'-TGCACCTCTCGCATGTAICTC-3'
<i>NcPGRP5</i>	5'-CTCCACACTGTACCTTAGCC-3'	5'-TGCGGACCGAACTCTTCATC-3'
<i>NcPGRP8</i>	5'-GGATCCCGAACTTGACGAAA-3'	5'-CCTCCAAGCCCTTATCCAAG-3'
<i>NcPGRP9</i>	5'-CTTCCATGTAGTATTTTTGC-3'	5'-TGAGTCTTGACAGGGGCCA-3'
<i>NcPGRP12</i>	5'-AGGGTTTCTCGTCTTCATCC-3'	5'-TGGATGGCTTTCTAGAGGGT-3'
<i>NcPGRP13</i>	5'-GGCGTCCATGTGAGCCTTCT-3'	5'-CCGCTTGACAGCTCGAAATAC-3'
<i>NcPGRP17</i>	5'-CGTCCTTATCCTTATCGAAGC-3'	5'-GTCGAGCGAGTAACAGCAA-3'
<i>NcPGRP18</i>	5'-GAGGATGTGGATGTGGTCTT-3'	5'-AGATCCTGGCTGAGGTCCTT-3'
<i>NcPrp</i>	5'-TAAGTCCCTCCTTGCAGTCT-3'	5'-ATAGGCGACGGTCTTGGTGA-3'

補足表 4. アミノ酸配列の accession number

種名	タンパク質名	Accession number
<i>Anopheles gambiae</i>	PGRP-LA	XP_001688527.2
	PGRP-LB	XP_321943.2
	PGRP-LC (3)	XP_558599.3
	PGRP-LD	XP_001688678.1
	PGRP-S1	XP_310547.4
	PGRP-S2	XP_316360.1
	PGRP-S3	XP_316359.1
<i>Apis mellifera</i>	PGRP-LB	XP_001121036.2
	PGRP-LC	XP_392452.2
	PGRP-S2	NP_001157188.1
	PGRP-SA	NP_001157187.1
<i>Drosophila melanogaster</i>	PGRP-LA	Q95T64.2
	PGRP-LB	Q8INK6.1
	PGRP-LC	Q9GNK5.1
	PGRP-LD	Q9GN97.1
	PGRP-LE	Q9VXN9.1
	PGRP-LFw	Q8SXQ7.1
	PGRP-LFz	Q8SXQ7.1
	PGRP-SA	Q9VYX7.1
	PGRP-SB1	Q70PY2.2
	PGRP-SB2	Q9VV96.1
	PGRP-SC1a	Q9V3B7.1
	PGRP-SC1b	Q9V3B7.1
	PGRP-SC2	Q9V4X2.1
	PGRP-SD	Q9VS97.1
	<i>Glossina morsitans morsitans</i>	PGRP-LB
PGRP-LC		ABC25065.1
<i>Sitophilus zeamais</i>	PGRP1	ABZ80672.1
	PGRP2	ABZ80671.1
<i>Tribolium castaneum</i>	PGRP	XP_969556.1
	PGRP-LE	XP_968926.1
	PGRP-LF	XP_970847.1
	PGRP-S	XP_969402.1
	PGRP-SA	XP_969883.1
<i>Ixodes ricinus</i>	PGRP	JAA66820.1
Enterobacteria phage T7	Lysozyme	P00806.4

補足表 5. 組織別 RT-PCR 用プライマー

遺伝子名	Forward primer	Reverse primer
<i>NcPGRP1</i>	5'-TATGACGACTGCTCCGAGTA-3'	5'-GTGGAAAAGCTACAGAAATTGG-3'
<i>NcPGRP2</i>	5'-GAGAAACGTGAAATCTGTAGC-3'	5'-AGCTGCTTTTAGTAGTTCTGG-3'
<i>NcPGRP3</i>	5'-AGGTGTTACCCGCGAAGGTT-3'	5'-CACTCCTAAGCTTCAACAAA-3'
<i>NcPGRP4</i>	5'-CAGTTTGTTCGTGGTCTGGTA-3'	5'-TTCCTTCGGTATTCTTCTGC-3'
<i>NcPGRP5</i>	5'-TACAACCTCGCTATAACCGGC-3'	5'-GCAGTTTTTTCCACCGTTAC-3'
<i>NcPGRP6</i>	5'-ACACGGTTCAGATATCCTACA-3'	5'-CTCTTAGCTTTGGCATCCCT-3'
<i>NcPGRP7</i>	5'-AGCCAGCTGAGTGATGTCCG-3'	5'-TTTTGTCTCCCCACGGAAAG-3'
<i>NcPGRP8</i>	5'-AAGATGAACGTCATCCGTCG-3'	5'-TGCATCAGTTATGCAGCAGC-3'
<i>NcPGRP9</i>	5'-CCCTGTGCAAGACTCAGGAA-3'	5'-TCGTCCTTTGAATCGCATCC-3'
<i>NcPGRP10</i>	5'-TGAGAACAACCTGCATTGCCG-3'	5'-CACCAGTATCCTTGTATGGC-3'
<i>NcPGRP11</i>	5'-GTTGAGTGAGTAATGGCAAGC-3'	5'-TGCGTAATTTGAAACTGAGG-3'
<i>NcPGRP12</i>	5'-GGATGAAGACGAGAAAACCTT-3'	5'-GTTTAGGCGTGATCTGTTGA-3'
<i>NcPGRP13</i>	5'-GCCGTTGCATATAGACGAGT-3'	5'-GAGTATATTCGAGTGCTATG-3'
<i>NcPGRP14</i>	5'-GCGAAGGAATACAGAAAACC-3'	5'-CTTACTGGCAGTCTCGTGAG-3'
<i>NcPGRP15</i>	5'-GCGTTGCTGGAACGAAATTT-3'	5'-TGGTATAGCCTCTTTTCCTG-3'
<i>NcPGRP16</i>	5'-GTTCTAGTAGGTAACCTGATC-3'	5'-ATCCTTCCTCGCCATGTGCA-3'
<i>NcPGRP17</i>	5'-GGGGTTGTCAAGCATGTGTT-3'	5'-ACACAGATGCACTAGTGACG-3'
<i>NcPGRP18</i>	5'-TGAAACTGCGAACAGGAGTG-3'	5'-TCTCAAATGACACAAGCTG-3'
<i>Top1</i>	5'-TGGAGAAGAGGCAGAACCGT-3'	5'-CCCTAGTTTACGTTTTTCTCGG-3'
<i>Top2 (NcPrp)</i>	5'-AGACTGCAAGGAGGGACTTA-3'	5'-GTTGAGGAGAGGCTTGTCAA-3'
<i>Top3</i>	5'-CCAGAGTGACTGTGACTGTG-3'	5'-CGTCACTCGCTTGTCTGCTT-3'
<i>NcRpL10</i>	5'-ATGAGTGTGTCAATGCAGTC-3'	5'-AGAGACCTGACGTTCTGCCA-3'

補足表 6. 定量 RT-PCR 用プライマー

遺伝子名	Forward primer	Reverse primer
<i>NcPGRP1</i>	5'-GTCAAACATGTAAGGCACCGG-3'	5'-AGTCGCTGATTCTTCGGCGT-3'
<i>NcPGRP2</i>	5'-GAAGTACAGCTGCAGTGGAC-3'	5'-AGGTCCCTGGTCTTCTTGCC-3'
<i>NcPGRP3</i>	5'-CGGCAACATGAACAGACCAA-3'	5'-CGCAGCTTGTCTAAGATTTCG-3'
<i>NcPGRP4</i>	5'-GGCGTTCGAAGACGGCACTA-3'	5'-CCTTCGGTATTCTTCTGCAAATGG-3'
<i>NcPGRP5</i>	5'-GCTATAACCGGCCTCGGCTT-3'	5'-GCGCAAGAAGCGCTCACACA-3'
<i>NcPGRP6</i>	5'-GCGACATTCTAGGGCATGAG-3'	5'-CAGCAGTCAACGTAAAGGCC-3'
<i>NcPGRP7</i>	5'-CACCAGAACCAGTGGCGGTG-3'	5'-CTCTGCTGACACTCCTCAGC-3'
<i>NcPGRP8</i>	5'-TTTCGTCAAGTTCGGGATCC-3'	5'-GCGAACTCCTCAAAGTCCGC-3'
<i>NcPGRP9</i>	5'-GACCATCATGCAAAAAGGCC-3'	5'-CGTCCTTTGAATCGCATCCA-3'
<i>NcPGRP10</i>	5'-ACTACAGCTCGCTCTCGTCC-3'	5'-GCCATCGCTTCTCCTTCTTC-3'
<i>NcPGRP11</i>	5'-CCCGTAGTGTCTCGTCAGAT-3'	5'-CAGCCATGTGGGAGGTCTGG-3'
<i>NcPGRP12</i>	5'-GAAGATATGAGGGTAGACCC-3'	5'-CGTCGTCAATATAGCACGGC-3'
<i>NcPGRP13</i>	5'-ATTTTGACCCCGACACGCCG-3'	5'-TTTCCGAGCCGGATCCTTGG-3'
<i>NcPGRP14</i>	5'-CAACCCATTTAGGACGGCTC-3'	5'-TTGTCCACCGGGAGTGCCGT-3'
<i>NcPGRP15</i>	5'-ATAGAGTACGCCTCTCACCG-3'	5'-GCTTGAGTGGGCCACCAATTG-3'
<i>NcPGRP16</i>	5'-AGAAAGAGGAAGCCCCAGCG-3'	5'-CTGTACCCGTGTACGTGCAG-3'
<i>NcPGRP17</i>	5'-GTGGCATGCAGGCTGGAAAC-3'	5'-ACACAGATGCACTAGTGACG-3'
<i>NcPGRP18</i>	5'-CCACCTTCTGGGAAGACCAC-3'	5'-AACAGCTCAGTCCCACGGAG-3'
<i>NcDefensin</i>	5'-GTA ACTCACTGAACCATGCC-3'	5'-CACATTTTGATGGCACTGAC-3'
<i>NcPrp</i>	5'-TACCAACAGAGGACTCCCTT-3'	5'-AGTCGTCTGCTAGCCAGTCG-3'
<i>NcEflα</i>	5'-CAGTGAGAGCCGTTTTGAG-3'	5'-AGGGCATCTTGTCAGAGGGC-3'
<i>NcRpL10</i>	5'-GCGATGCTCTTATCAAGCAG-3'	5'-CCGCCACAGAGAGACACAAC-3'
<i>Ncα-Tubulin</i>	5'-GACCACCCATACTACTCTTG-3'	5'-GGA ACTCAGTCAGATCTACG-3'
<i>NcCitrate synthase</i>	5'-GGTGTCTCAGACCTACAAGA-3'	5'-ATCCGTGACATGGACTTGG-3'

補足表 7. *Rickettsia* 特異的プライマー

Forward primer	Reverse primer
5'-TATGGCTTTCCGTCCTCAGCT-3'	5'-TTGTGGAATACGGTCTATTGTCC-3'

補足表 8. RNAi 用プライマー

	Forward primer	Reverse primer
<i>NcPGRP1</i>	5'-CTCCAGATACCTATCGACGG-3'	5'-ACAGCTAGCAATCTAAGTCC-3'
<i>NcPGRP12</i>	5'-GCAACACGTGGGTCTACAAG-3'	5'-GGCGTGATCTGTTGATTTGT-3'
<i>NcPrp</i>	5'-ATGCGTTATCATAAGGACTTTG-3'	5'-TTGTGGCTGAGTTGGCGGGG-3'
<i>EGFP</i>	5'-AAGTTCAGCGTGTCCGGCGA-3'	5'-GAAGTTCACCTTGATGCCGTT-3'
RNAi*	5'-GGATCCTAATACGACTCACTATAGG CCGCCATGGCCGCGGGAT-3'	5'-GGATCCTAATACGACTCACTATAGGCAG GCGGCCGCACTAGTGAT-3'

* RNAi forward プライマーと reverse プライマーは T7 プロモーター配列を持つ (下線)。