

論文内容の要旨

論文題目 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

氏名 富澤 真

【序論】

昆虫は様々な微生物と共生しており、細胞内に微生物を保持している昆虫も多い。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、などの共生の本質に関わる現象の解明はあまり進んでいない。

ツマグロヨコバイ (*Nephotettix cincticeps*, *Nc*) は植物ウイルスやファイトプラズマを媒介するイネの主要害虫である。このツマグロヨコバイにはバクテリオーム (bacteriome) と呼ばれる特殊な器官が腹部に一对存在しており、この器官の細胞内にはβ-proteobacteria 綱の *Nasuia* と flavobacteria 綱の *Sulcia* の 2 種の細菌が共生している。このヨコバイと共生細菌との間には、宿主が生息場所を提供し、共生細菌が必須栄養素を供給するという相利共生関係が成り立っている。本研究では、宿主昆虫と細菌の共生の場である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。

【結果及び考察】

1. バクテリオーム特異的に発現する遺伝子の探索

本研究室で構築したツマグロヨコバイの各組織別 cDNA EST データベース (<http://ncest.dna.affrc.go.jp>) から、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。そして、その中からバクテリオームにおいてのみ発現することが予想される遺伝子を選別した。これらの上位 20 個中にペプチドグリカン認識タンパク (peptidoglycan recognition protein, PGRP)

表1 バクテリオームで高発現する上位20遺伝子

上位20 遺伝子	バクテリ オーム	大腸菌 接種	卵	幼虫 全体	他 組織	同源性検索
1	178	7	0	0	0	Unknown
2	140	5	6	1	4	Unknown
3	91	98	0	2	0	Unknown
4	61	17	0	0	0	PGRP
5	36	0	0	1	0	Unknown
6	34	9	0	0	3	Phosphatase
7	27	0	0	0	0	preproMP27-MP32
8	26	3	3	1	2	GlmU
9	25	1	0	1	0	Unknown
10	21	72	12	23	173	Arginine kinase
11	21	76	22	1	617	Ferritin
12	20	2	0	0	0	Unknown
13	18	1	0	0	2	Unknown
14	17	0	0	0	4	Unknown
15	16	3	1	1	6	Lipoyltransferase 1
16	14	0	0	0	0	3-phosphoadenosine 5-phosphosulfate synthase
17	13	0	0	0	0	Sarcosine dehydrogenase
18	12	3	0	0	0	PGRP
19	12	0	11	2	18	Ribosomal protein L19e
20	12	0	0	0	0	PGRP

当該遺伝子に分類されるバクテリオーム由来、大腸菌接種個体由来、卵由来、幼虫由来のESTの数及び他組織由来のESTの数を示した。バクテリオーム由来のESTが多い順に並べた。大腸菌接種、卵、幼虫全体はバクテリオームを含む。同源性検索 (BlastX) の結果、E-valueが0.1以上のものをUnknownとした。

遺伝子と相同性のある遺伝子が3個見つかった(表1)。PGRPは細菌の細胞壁を認識することで免疫応答に関与することが知られている。ツマグロヨコバイのPGRPが共生細菌と何らかの相互作用をすることで、共生細菌の増殖の制御などに関わる可能性を想定した。

また、機能が未知なタンパク質遺伝子がバクテリオーム内で特に重要な働きをしていると考え、バクテリオームで2番目に高発現する遺伝子(仮にTop2と名付けた)に着目して、その解析を進めた(表1)。また、1番目に高発現する遺伝子(Top1)は現在、解析を進めている。

2. ツマグロヨコバイ PGRP 遺伝子の発現解析

2-1. 網羅的 PGRP 遺伝子探索

バクテリオームで高発現する上位20遺伝子の中にPGRP遺伝子が3個見出されたため、ツマグロヨコバイにおけるPGRP遺伝子の総数を調査した。Blast検索の結果、ショウジョウバエのPGRPと相同性のある遺伝子がヨコバイESTデータベースから160個以上見つかった。また、虫体全体のRNA-Seq解析データを用いて同様に調べた結果、317個の遺伝子を見出した。これらの遺伝子は全てPGRPドメインを保持していた。PGRP遺伝子はショウジョウバエのゲノム中に13個が、カイコでは12個が見ついている。ツマグロヨコバイと同じ半翅目昆虫のエンドウヒゲナガアブラムシからはPGRP遺伝子は見つかっていない。ツマグロヨコバイはこれらのモデル生物と比較して、非常に多くのPGRP遺伝子を持っていた。

2-2. PGRP 遺伝子の組織別発現解析

全長配列解析を行ったツマグロヨコバイの18個のPGRP遺伝子(NcPGRP1-18)の組織別RT-PCRを行った。その結果、18種のPGRP遺伝子はバクテリオームで特異的に発現していた(図1)。

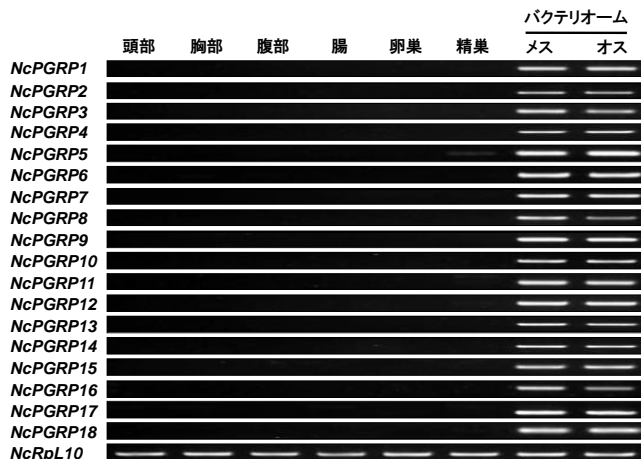


図1 RT-PCRによるPGRP遺伝子の組織別発現解析
コントロールとしてNcRpL10の遺伝子発現を示した。

2-3. 細菌感染個体の PGRP 遺伝子の発現量変化

PGRPは細菌の細胞壁を認識する能力を有しており、細菌の侵入により発現量が増加することが他の昆虫で知られている。そこで、外来の大腸菌をヨコバイに接種し、ツマグロヨコバイマイクロアレイ

表2 マイクロアレイ解析により発現量変化を示したPGRP遺伝子数

遺伝子発現量	有意差	大腸菌 3時間	大腸菌 12時間	Rickettsia
増加	p<0.01	0	0	11
	p<0.05	0	1	34
減少	p<0.01	0	0	3
	p<0.05	0	0	3
変化なし	-	297	296	246
	Total	297	297	297

大腸菌接種3時間後及び12時間後の個体、Rickettsia感染個体におけるPGRP遺伝子の発現量変化を調べ、297のPGRPプローブのうち、有意に発現量に変化したプローブの数を示した。有意差検定にはt検定を用いた。

を用いて網羅的に遺伝子発現量変化を調査した。ヨコバイアレイに登載されているPGRP遺伝子のプローブ297種(150遺伝子)のうち、有意に発現量に変化したものを調べた。その結果、接種個体では抗菌ペプチドなどの免疫応答遺伝子の発現量増加は認められたものの、PGRP遺伝子の発現量はほとんど変化しなかった(表2)。

ツマグロヨコバイには、バクテリオームに存在する2種の細菌の他に、全身に *Rickettsia* が感染している。この *Rickettsia* は宿主にとって必須の存在ではないため、抗生物質で除去できる。*PGRP* 遺伝子発現と *Rickettsia* 感染との関係を、感染個体と非感染個体との比較において調査した。*Rickettsia* 感染によって、発現量が増加する遺伝子が45個、減少する遺伝子が6個あった(表2)。一部の遺伝子において発現量の差は見られたが、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られた。

これらの結果から、外来の細菌及びヨコバイの細胞内共生細菌 *Rickettsia* の存在はツマグロヨコバイの *PGRP* 遺伝子の発現には影響しないと考えられる。

2. 新規タンパク質遺伝子 *Top2* (*NcPrp*) の機能解析

2-1. *Top2* 遺伝子の全長配列解析

Top2 遺伝子は250アミノ残基のタンパク質をコードし、プロリンに富んでいた。全体のアミノ酸の16.4%がプロリンであり、遺伝子産物はシグナルペプチドを持たず、バクテリオーム内で働くタンパク質と予想された。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。

2-2. *NcPrp* 遺伝子及びタンパク質の発現部位

EST解析では他組織からもESTが見つかったが、組織別RT-PCRの結果では、*NcPrp* 遺伝子はバクテリオームで特異的に発現していた(図2)。また、組織別ウェスタンブロットティングの結果、*NcPrp* はバクテリオームにだけ存在していた(図3)。

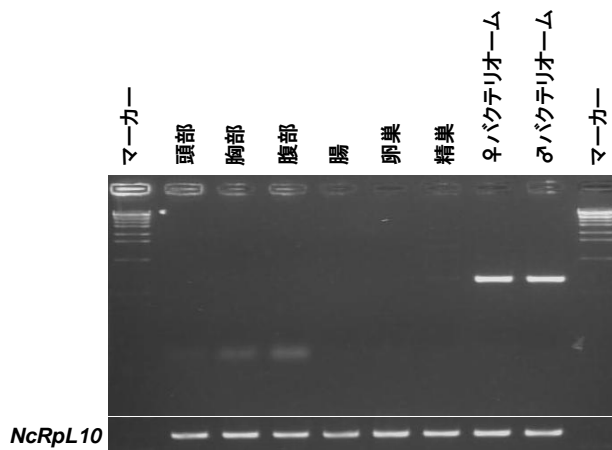


図2 RT-PCRによる*NcPrp* 遺伝子の組織別発現解析
コントロールとして*NcRpL10*の遺伝子発現を示した。

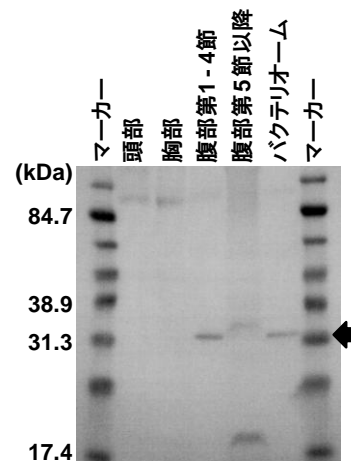


図3 *NcPrp*タンパクの組織別ウェスタンブロットティング
矢印は*NcPrp*タンパク質の位置を示している。

2-3. RNAiによる *NcPrp* 遺伝子の機能解析

NcPrp 遺伝子の機能を調べるために、RNAiを行った。471 bpのdsRNAを合成し、5齢幼虫に注入した。コントロール個体には、dsEGFPを注入した。RNAi個体における*NcPrp* 遺伝子のmRNA発現量はコントロールに比べて注入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。共生細菌の細菌数を測定した結果、注入4日後と7日後の個体においてコントロールに比べて*Nasuia*の細菌数が有意に減少した(図4)。バクテリオームは内層外層の二層構造をとっており、内層に*Nasuia*、外層

に *Sulcia* が感染している。
NcPrp 遺伝子の RNAi は、バクテリオーム内層への影響が大きい可能性が考えられる。

さらに、RNAi 個体の遺伝子発現量変化をツマグロヨコバイマイクロアレイにより調査した。発現量低下の著しい上位 20 遺伝子中 8 つが *PGRP* 遺伝子であった。また、297

の *PGRP* 遺伝子のプローブのうち 274 プローブで発現量が有意に減少していた。これらの結果から、*NcPrp* 遺伝子は *PGRP* 遺伝子の発現に関わっていることが明らかで、共生細菌の増殖制御に関与する可能性が考えられた。

【結論】

ツマグロヨコバイとそのバクテリオーム細菌との共生に関わる分子の候補として、*PGRP* 遺伝子と新規タンパク質遺伝子 *NcPrp* (*Top2*) を見出した。

ツマグロヨコバイにおいて *PGRP* 遺伝子が 100 種以上存在することが明らかになり、これほど多くの *PGRP* 遺伝子を保持している昆虫は他に見つかっていない。それらはバクテリオームで発現し、腸、脂肪体、血球細胞では発現していなかったことから、外来の細菌の侵入などによる免疫応答には関与していない可能性が示唆された。このことは、*PGRP* が共生現象に関与していることを強く示唆している。

NcPrp 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存在していた。RNAi による機能解析の結果、*NcPrp* は共生細菌 *Nasuia* の維持・増殖に何らかの関連を有していることが想定された。また、*NcPrp* RNAi 個体では *PGRP* 遺伝子の発現量が著しく減少したことから、*NcPrp* 遺伝子と *PGRP* 遺伝子発現との間に何らかの関係があり、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が示唆された。本研究は、昆虫とその共生細菌との間には、既知の分子の機能や新規の遺伝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、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。

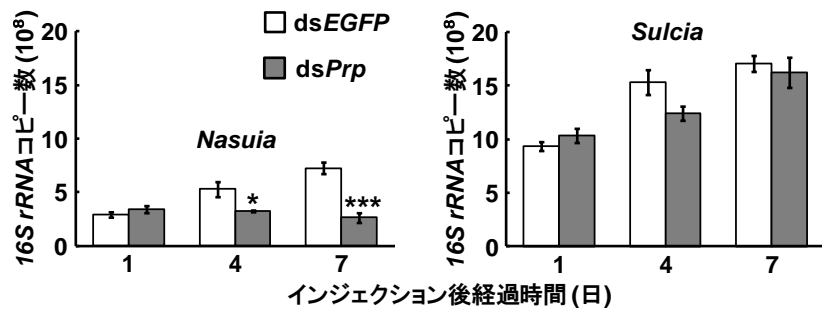


図4 RNAi個体における共生細菌の細菌数
 定量PCRにより16S rRNA遺伝子のコピー数を測定し、細菌数とした。エラーバーは標準誤差を示している。有意差検定には多重検定を用いた。*: p<0.05、***: p<0.001