

学位論文

イネ害虫トビロウンカにおけるSugar transporterの生理的役割

平成22年度 博士（生命科学）

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

菊田 真吾

目次

Summary	4
序論	7
第1章 トビイロウンカSugar transporter候補遺伝子の探索と発現プロファイル	
緒言	11
結果	14
考察	17
材料と方法	19
第2章 イネ師管液に含まれる糖の取り込みのメカニズムの解明	
緒言	33
結果	35
考察	42
材料と方法	47
第3章 脂肪体に発現するNISTトランスポーターの機能解析	
緒言	69
結果	71
考察	77
材料と方法	80
第4章 新規H⁺-トレハロースシンポーターの同定	
緒言	105

結果	107
考察	111
材料と方法	113
総合考察	128
結論	130
Supplemental data	
マイクロアレイを用いた摂食条件・飢餓条件・耐虫性イネ条件の遺伝子発現の比較	131
RNAi解析のための条件検討	135
試薬組成一覧	137
謝辞	139
引用文献	140

Identification and physiological roles of the sugar transporter genes in the rice plant pest, the brown planthopper *Nilaparvata lugens*

Summary

Sugars are important nutrient sources in the metabolism of all organisms and are delivered into cells by transporters in the cell membrane. Although the sugar transport systems of bacteria, plants and mammals have been studied in depth, those of insects remain unclear. The need for a greater understanding of this aspect of insect metabolism is particularly important for plant pest species, such as the brown planthopper (BPH, *Nilaparvata lugens*), which is a serious pest on rice crops because it sucks a large amount of sugar-rich phloem sap from the plants. In order to better understand the sugar transport system in the BPH, sugar transporter genes were cloned and their functions were analyzed using the *Xenopus* oocyte expression system. In particular, the analyses focused on i) the functions of sugar transporters expressed in the midgut (the equivalent of the mammalian stomach or intestine) in the metabolism of sugars from external food source, and ii) the role of a sugar transporter expressed in the fat body (the equivalent of the mammalian liver) in the maintenance of sugar homeostasis in the BPH.

The glucose transporter NIHT1 was recently identified in the BPH. The presence of this protein suggests that expression of sugar transporters in the midgut is essential for the uptake of sugars from the rice phloem-sap. In this study, I identified and cloned 18 sugar transporter genes from the BPH including *NIHT1* (*Nlst1*). Among these genes, *Nlst6* and *Nlst16* were of particular interest as they were expressed in the midgut. *Nlst6* expression was up-regulated in BPHs that are able to feed on the resistant rice variety ASD7, while *Nlst16* expression was up-regulated in BPHs that had fed on the rice plants. Sugar transporter genes were expressed in *Xenopus* oocyte exogenous gene expression system. In general, sugar transporters can be divided into two functional groups: i) facilitated transporters, which facilitate diffusion by sugars along gradients from regions of high concentration to those of lower concentration; and ii) secondary active membrane transporters, which move sugars via electrochemical membrane gradients of Na⁺ or H⁺ ions. NIST6 was found to be a facilitated glucose/fructose transporter, while NIST16 was a facilitated glucose transporter. NIST1 was also confirmed to be a facilitated glucose

transporter. The sugar gradient in the BPH midgut appears to be important for the efficient working of the sugar transporters. A significant difference in sugar concentration between the plant phloem-sap and the BPH hemolymph is required because these NIST transporters showed the characteristics of facilitated diffusion proteins. Rice phloem sap was found to contain 6–17% sucrose. The sucrose seemed to be degraded into glucose and fructose by sucrase in the BPH midgut and, consequently, this gut region was rich in glucose and fructose. However, the BPH hemolymph contained trehalose and myo-inositol, but not glucose and fructose. Consequently, the sugar concentrations were very different between the ingested rice phloem sap and BPH blood, enabling the sugar transporters in the midgut to work efficiently.

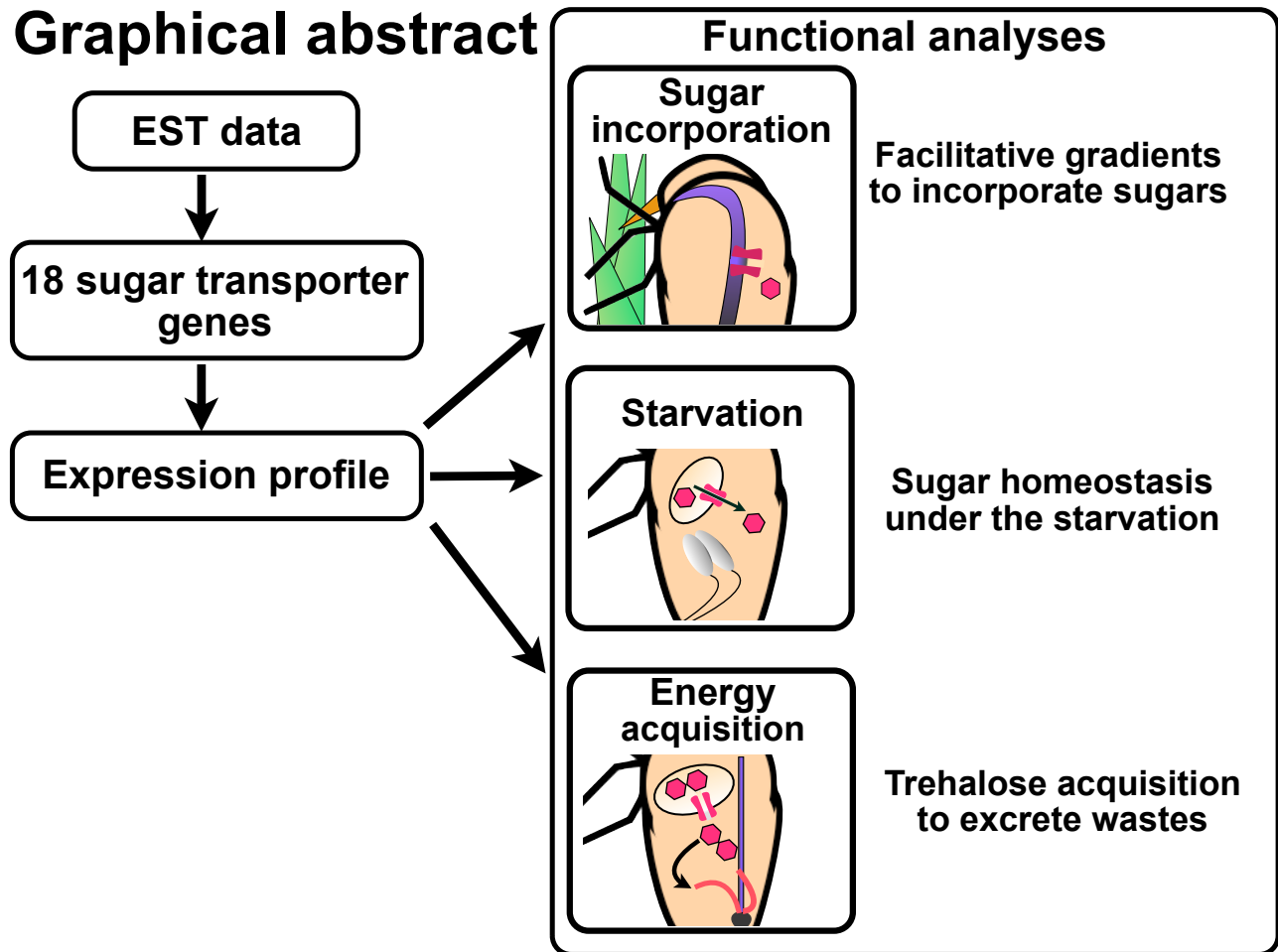
Nlst11, which was expressed in the fat body, was then studied, because the gene showed up-regulation in BPHs under starvation conditions. Analyses using the *Xenopus* oocyte expression system analyses showed that NIST11 was a facilitated glucose/fructose transporter. The exact role of this transporter is unclear but it may function in sugar transport from the fat body under nutrient deficient conditions to maintain the supply of sugars to various tissues. Glucose is usually produced by glycogen degradation in the fat body during starvation, and NIST11 may function in the transport of glucose to the hemolymph.

Nlst8 was found to be expressed in the fat body and Malpighian tubules. Phylogenetic analysis strongly suggested that *Nlst8* is a trehalose transporter gene, and is included in a monophyletic group with other trehalose transporters. Functional analyses indicated that NIST8 was an H⁺-trehalose symporter. This study is the first to identify a secondary membrane potential transporter for trehalose in a multicellular organism. Export of trehalose from the fat body to the hemolymph appeared to be mediated by NIST8 in the BPH. Expression of *Nlst8* in the Malpighian tubules might be involved in the importation of trehalose from the hemolymph. The Malpighian tubules require energy for the excretion of waste products and excess salts; imported trehalose might be used as an energy source.

The present study is the first comprehensive analysis for the sugar transport system in an insect species to investigate gene function using the *Xenopus* oocyte expression system. The data obtained from functional analyses of the molecular roles of transporter

genes have the potential to stimulate further genome-based investigations of the nutritional and metabolic requirements of insect species.

Graphical abstract



序論

トビイロウンカ (Brown planthopper; BPH, *Nilaparvata lugens*) はイネの篩管液を吸汁する害虫である。植物の葉で産生された栄養分は篩管液を通じて転流し、貯蔵されたりエネルギー源として利用される。BPHに加害されたイネは生育に必要な水分や栄養分が不足し、ひどい場合、イネが枯死する (Sogawa, 1982)。BPHに加害された場合のイネの収量の減少は甚大である。赤道直下の地域である東南アジアでは、イネを年間を通じて栽培するので、BPHは年間を通じて発生する (Dyck and Thomas, 1979)。BPHは熱帯性の昆虫であり、日本では越冬できないが、毎年、梅雨期に東南アジアや中国南部から日本へ飛来し、晩秋まで日本国内で繁殖する (Kishimoto, 1976; Mun et al., 1999; Otsuka et al., 2005)。BPHの個体数が増加するに伴い、イネの収穫が行われる8月末から10月に被害が発生する。BPHの飛来は、九州と西日本に多いが、北日本でもBPHの発生がみられる (Fig. 1A)。International Rice Research Institute (IRRI) の統計によると、世界の主要な炭水化物として、イネは全カロリー消費量の20%を占め、アジア地域では30%を占める。

1990年から1991年の間、タイやベトナムだけで害虫 (BPH以外の被害も含む) による年間の被害額は3000万ドルと考えられている (Gallagher et al., 1994)。世界人口が増加傾向にあることから近い将来の食料不足が懸念され、イネの需要は高まると考えられる。BPHは特に防除が急務であると考えられる農業害虫のひとつである。

これまで、BPHに対する様々な殺虫剤や耐虫性イネ品種が開発されてき

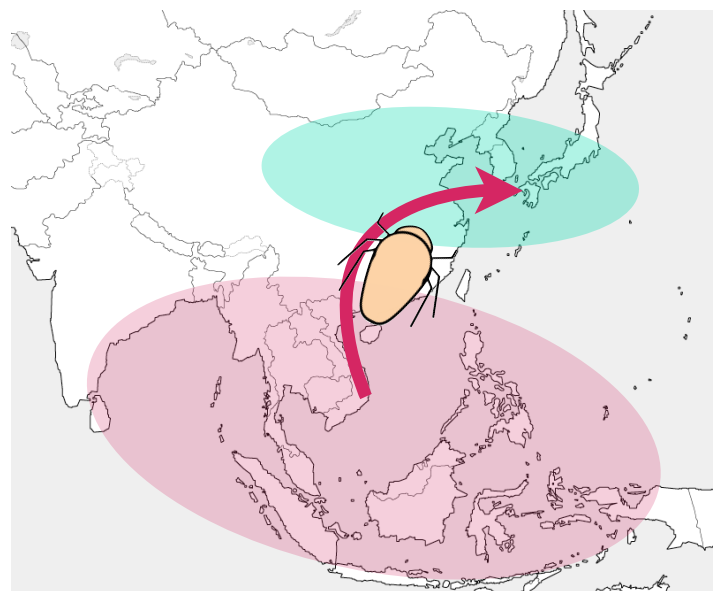


Fig. 1A トビイロウンカ (BPH) の生息分布
 BPHが年間を通して被害をもたらすエリア (赤の楕円)。
 BPHが夏から秋にかけて被害をもたらすエリア (緑の楕円)。

た。しかしながら、BPHは薬剤や耐虫性イネをことごとく打破してきた (Nagata and Masuda, 1980; Khan and Saxena, 1988; Gorman et al., 2008; Wang et al., 2008)。薬剤や耐虫性イネ品種の選択圧により、それらに耐え得る小数の個体が選抜されて、抵抗性系統として繁殖すると考えられる。1990年代にそれまで多く利用されてきた有機リン系、カーバメイト系あるいはピレスロイド系殺虫剤に加えて、ネオニコチノイド系殺虫剤が登場した。ネオニコチノイドはニコチンの構造式に近く、nicotinic acetylcholin receptors (nAChRs) のアゴニストとして、昆虫の神経組織に作用する (Millar and Denholm, 2007)。ネオニコチノイド系殺虫剤はウンカ類防除のために導入され、アジア地域において広く用いられるようになった。しかし、数年前からネオニコチノイド抵抗性を獲得したBPHが出現してきており (Puinean et al., 2010)、再びBPHの大発生が各地でみられるようになってきた。さらに耐虫性イネ品種を摂食できるBPH個体群が増え、イネの生産量は年間、ベトナムで70万トン、中国で277万トンが減少したと言われている (Normile, 2008)。殺虫剤に対する抵抗性の機序については、多くの昆虫で広範な研究が行われている。しかし、BPHが耐虫性イネをどのようにして打破するのかについてはほとんど明らかになっていない。

本研究室で継代飼育しているBPHには、耐虫性イネ品種ASD7を吸汁することが可能なBPHのタイプ (BPH-R) と吸汁できないタイプ (BPH-S) とが混在していた。そこでBPH-RとBPH-Sのそれぞれに耐虫性イネASD7を与え、これらのBPHの遺伝子発現差をオリゴマイクロアレイで解析したところ、様々な遺伝子の発現変動がみられた。しかし、両者のタイプに感受性イネ (コシヒカリ) を与え、遺伝子発現を確認したところ、ほとんどの遺伝子はBPH-RとBPH-S間で大きな差がみられなかった。また、摂食条件・飢餓条件の遺伝子発現量を比較したところ、耐虫性イネを摂食した影響によって発現に変化がみられた遺伝子群は、そのほとんどが摂食できないことによるものであることが考えられた。しかしながら、BPH-Rタイプにおいて、ASD7を摂食した場合にのみ遺伝子発現がみられた遺伝子が見出され、その遺伝子はsugar transporterをコードする遺伝子であった (Fig. 1B)。こ

れまで耐虫性イネを打破した昆虫において、sugar transporter遺伝子の発現が誘導されることは知られておらず、BPHのsugar transporterを解析することはBPHの抵抗性打破機構解明の糸口となるかもしれない。また、このsugar transporterとは別のトランスポーターがコシヒカリを摂食したときや飢餓状態で、遺伝子発現が誘導されることも明らかとなり、sugar transporterは環境条件に応じて遺伝子発現が誘導されると考えられる。すべての生物において糖はトランスポーターを通じて細胞間を輸送されることがわかってはいるものの、昆虫におけるsugar transporterの研究報告は非常に限られている。Sugar transporterの機能を明らかにし、生理的な役割を追究することは、BPHの糖の摂取メカニズムや糖の恒常性維持など昆虫の糖輸送システムの一端を明らかにできると考えられる。

本研究ではBPHのsugar transporterの機能を明らかにするために、まず、BPH cDNA ESTデータベースを利用して、sugar transporter候補遺伝子を探索した。そしてそれらの発現を調べ、sugar transporter候補遺伝子の全体像を得た(第1章)。耐虫性イネ品種ASD7により発現が誘導されるsugar transporter候補遺伝子は組織別ESTデータベースの解析から中腸に発現すると推定されたので、これと関連して、糖がどのようにして生体内へ取り込まれているのかを生化学的、生理学的側面から明らかにした。また中腸において、感受性イネ(コシヒカリ)を吸汁することで、発現が誘導されたsugar transporter遺伝子も見出されているので、この遺伝子の機能

も解析した(第2章)。BPHの糖輸送システムを明らかにするためには、生体内のsugar transporterにも着目する必要があると考え、次の2つのsugar transporter遺伝子の機能解析を行った。飢餓状態で発現が誘導されたsugar transporterと(第3章)、昆虫の主要な血糖で、エネルギーと

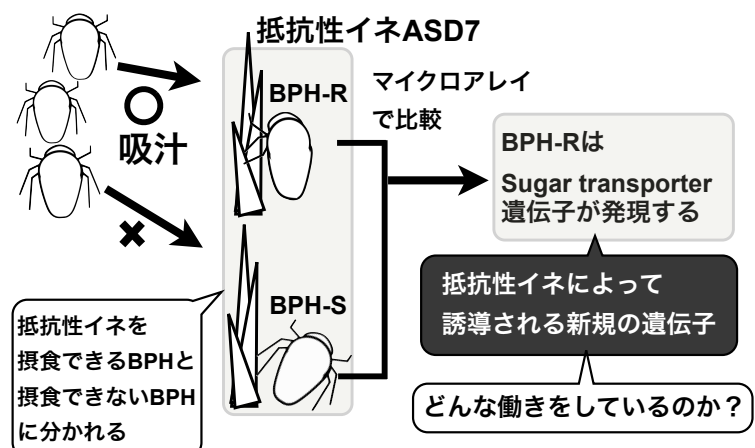


Fig. 1B Sugar transporter遺伝子の発現は抵抗性イネ摂食時に誘導される

して利用されるトレハロースを輸送するトランスポーターを同定し、機能解析を行った(第4章)。以上のように本研究では、これまで昆虫ではほとんど解析されていないsugar transporterに着目し、未解明の昆虫の糖輸送システムの一端を明らかにした。

第1章

トビイロウンカSugar transporter候補遺伝子の探索と発現プロファイル

緒言

BPHは単食性昆虫であり、イネ師管液を吸汁する (Sogawa, 1982)。師管液に含まれる糖であるスクロースは、BPHの重要なエネルギーのひとつであると考えられる。スクロースはグルコースとフルクトースから構成される二糖類であり、スクロースの状態では中腸から吸収されないとされている (Rhodes, 1997)。BPHやアブラムシ等のHemiptera目の昆虫において、中腸内ではスクラーゼという酵素が分泌され、スクロースはグルコースとフルクトースに加水分解されると考えられる (Price et al., 2007a)。したがって、これらの昆虫ではグルコースやフルクトースの形で生体内に糖を取り込んでいると考えられる。BPHは師管液の内容物すべてを吸汁するわけではなく、師管液の一部は腸を介してそのまま体外へ排出される (Fig. 1)。この液は甘露 (Honeydew) と呼ばれ、その名の如く、糖を多く含む (Sogawa, 1982)。甘露中の糖成分の検出を試みたところ、確かにスクロース、グルコースやフルクトースなどの糖が検出された (Fig. 4-8)。一般に、昆虫が糖などの栄養物を吸収するのは、ヒトの胃や小腸に相当する中腸と呼ばれる組織で行われると考えられている。しかし、中腸における糖の取り込みのメカニズムはほとんど明らかにされていない。

糖を輸送するためにはトランスポーターと呼ばれる「通路」の介在が不可欠である (Mueckler, 1994)。Sugar transporterは一般に12回膜貫通タンパクであり、N末端とC末端側が細胞質に露出した形状を示す (Fig. 2)。ほ乳類では一般に16種類のsugar

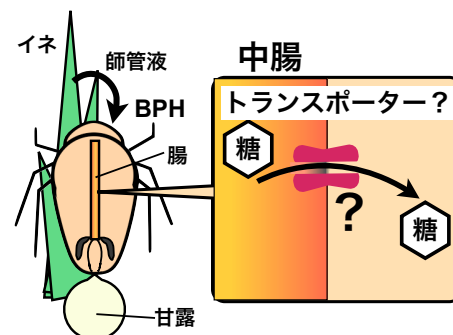


Fig. 1 BPHはイネを吸汁する害虫である。イネの師管液に含まれる糖は腸を介して生体内へ輸送されると推定される。師管液の一部は『甘露』と呼ばれる排泄物として排出される。

transporterが同定されており、SLC2/GLUTファミリーを形成し、輸送活性の特徴から二つに大別される (Mueckler, 1994)。糖の濃度勾配に従って、エネルギーを利用せずに糖を輸送するGLUTファミリー、もう一つが Na^+ イオンの電気化学的駆動により、二次的能動輸送で糖をイオンと共に輸送するSGLTファミリーである。前者には13種類のsugar transporterが知られ、最近になって、その輸送分子の全貌が明らかになりつつある。後者のSGLTトランスポーターとして3種類が知られている (Wood and Trayhurn, 2003)。ヒトの小腸上皮細胞では、刷子縁膜上で、糖の濃度勾配によって取り込まれるだけではなく、 Na^+ /グルコーストランスポーター SGLT1による共役輸送が重要である (Wright, 1993)。消化管内のグルコースやフルクトースの濃度は低いため、SGLT1によって濃縮的に細胞内へ糖が取り込まれる。一時的に細胞内の糖濃度が上昇するので、糖促進性の駆動を利用して、基底膜 (血管側) に発現するGLUT2などのトランスポーターを介して糖が促進的に細胞外へと輸送される (Drozdowski and Thomson, 2006; Wright et al., 2007)。グルコース・ガラクトース吸収不全症 (Glucose-galactose malabsorption) は、これらのトランスポーターの機能が失われた場合の疾患として知られている (Wright, 1998)。このようにトランスポーターは糖を輸送する上で重要な働きをもつ。

昆虫においては、sugar transporterが同定される最近になるまで、糖の浸透圧によって糖が自然に細胞膜を透過すると考えられていた (Downing, 1978; Douglas, 2006)。Sugar transporterが同定されたことで新規の農薬のターゲット作用部位として着目されているが、そもそもsugar transporterの機能解析が始まったばかりで、輸送分子やその生理的役割はほとんど何もわかっていない (Chen et al., 2006; Price et al., 2007b; Caccia et al., 2007)。また、ゲノム解読の進んでいる*Drosophila*

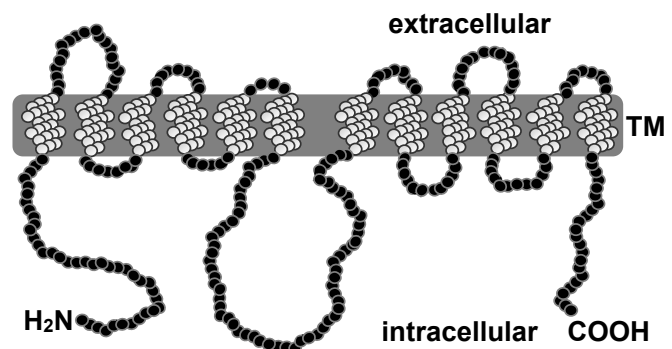


Fig. 2 Sugar transporterの二次構造
一般にSugar transporterは12回膜貫通タンパクであり、N末端とC末端が細胞質側に露出する。TMは膜貫通領域を示す。

*melanogaster*や*Anopheles gambiae*などの昆虫においてはアミノ酸配列の特徴から、sugar transporter候補遺伝子が推測されているが、その実体は不明である (Escher and Rasmuson-Lestander, 1999)。近年、昆虫において初めてsugar transporterの機能解析が報告された (Price et al., 2007b)。奇しくもこの機能が解析されたのはBPHであり、このsugar transporter遺伝子はNIHT1と命名され、その機能は糖の濃度勾配に依存し、エネルギー非依存的に輸送を行う糖促進性グルコーストランスポーターであった。NIHT1は研究室で研究が進められつつあった耐虫性イネ品種ASD7摂食時や飢餓状態に発現が誘導されるsugar transporter候補遺伝子とは異なる遺伝子であることがわかった。NIHT1の輸送活性はイネ師管液に含まれるスクロース濃度と比較して必ずしも高いものではなく、また、NIHT1によるフルクトースの取り込みはみられなかった。フルクトースはグルコースと同様、エネルギー代謝に利用されると考えられ、NIHT1以外にも糖の取り込みに寄与するsugar transporterの存在が予想された。2010年に、アブラムシゲノムコンソーシアムの一つのプロジェクトとして、エンドウヒゲナガアブラムシには何種類のsugar transporterが存在するのかが調査された (Price et al., 2010)。アブラムシはBPHと同様にHemiptera目に属し、昆虫種の中でもBPHと比較的近縁である。ゲノム情報からこのアブラムシには54種類のsugar transporter候補遺伝子があると推測されている (Price et al., 2010)。また、*D. melanogaster*では23種類 (偽遺伝子も含む) のsugar transporter候補遺伝子が推測されていることから、昆虫の生体内には多くの種類のsugar transporterがあるものと考えられる。BPH cDNA ESTデータベース (Noda et al., 2008) 上には、sugar transporter候補遺伝子として数十のESTクローンが存在したが、cDNA全長配列は明らかではなく、BPHに何種類のsugar transporter候補遺伝子が存在するのかは不明である。そこで本研究の第1章では、BPH sugar transporter遺伝子の配列や発現分布を調べ上げ、BPHにおけるsugar transporter遺伝子のプロファイリングを行う。

結果

1-1 データベース探索とBPH sugar transporter候補遺伝子の推定

本研究室で公開している37000 EST Cloneを含むcDNAライブラリー (Noda et al., 2008) からsugar transporter候補遺伝子の探索を行った。*Drosophila melanogaster*の18種類のsugar transporter候補遺伝子をQueryとし、cDNAライブラリーに対してProtein BLASTを行った。E value 10^{-3} 以下のEST クローンを除き、89のESTクローンを得た。次にこれらのクローンにクラスタリングされるクローンを探索・追加し、93 ESTクローンを得た。これらは25のクラスターに分類できた。25クラスターのうちの半数は1つのESTクローンから構成されており、Open reading frame (ORF) は未定であった。そこで、何種類のsugar transporter遺伝子があるのかを決定するために、各ESTクローン配列を基に3' RACEと5' RACEを行い、cDNA全長鎖を得た (Table 1-1)。25遺伝子のアミノ酸配列を基にして、相同性検索を行ったところ、18遺伝子がmajor facilitator superfamilyに属し、BPHのsugar transporterと推測され、これらを*Nlst*遺伝子と命名した (NCBI accession numbers, AB549994 – AB550011)。25遺伝子のうち、残りの7遺伝子はorganic cation transporterやsynaptic vesicleをコードする遺伝子であり、sugar transporterをコードする遺伝子ではなかった。93 EST クローン中、およそ半数の47 EST クローンで構成された*Nlst1*は、既知のトビイロウンカsugar transporter遺伝子*NIHT1*とほぼ一致し、その相同性は97.5%であった (Price et al., 2007b)。*Nlst1*と*NIHT1*を比較したところ、*Nlst1*に3塩基の欠失がみられ、ORFの膜貫通領域で一部のアミノ酸配列が*Nlst1*と*NIHT1*とで異なることが確認された。BPHの系統間でアミノ酸配列に差が生じた可能性も考えられたので、当研究室で継代飼育しているBPHのイズモ系統、ベトナム系統とフィリピン系統の*Nlst1*の配列を確認したところ、アミノ酸配列はこれらの系統では、*Nlst1*と完全に一致した。本研究では、アミノ酸配列の相同性から*NIHT1*は*Nlst1*と同一の遺伝子であると考えた。また、耐虫性イネASD7を摂食できるBPHで発現が誘導されたsugar transporter遺伝子を*Nlst6*と命

名した。コシヒカリを摂食することで発現が誘導されたsugar transporter遺伝子を*Nlst16*とし、飢餓状態で発現が誘導された遺伝子を*Nlst11*とした。

Sugar transporterはN末端とC末端側が細胞質側に露出する12回膜貫通タンパクである (Joost and Thorens, 2001, Fig. 2)。BPH sugar transporter候補遺伝子、*Nlst*遺伝子群の膜貫通領域をTMHMMとSOSUIプログラムを用いて推定をしたところ、*Nlst2, 8, 9*ならびに13が両プログラムにおいて、12回膜貫通タンパクであった。*Nlst1, 3, 4, 6, 7, 11*ならびに12がTMHMMにより、*Nlst15, 16*ならびに17がSOSUIで、12回膜貫通であると推測された。また、*Nlst5, 10, 14*ならびに18はどちらのプログラムにおいても12回膜貫通タンパクとは推測されなかった。Sugar transporterが属するmajor facilitator superfamilyは種を超えて多くの共通した特徴を有する。たとえば膜貫通ドメインは、互いに相同性が高かった。膜貫通領域 (Transmembrane regions, TMs) の5と7番目には、細胞外結合部位として機能するグルタミンがみられ (Mueckler et al., 1994)、タンパクがフレキシブルな構造を維持するために必要なプロリンはTM10で確認された (Tamori et al., 1994)。また、TM10にみられるトリプトファンはsugar transporter阻害剤のひとつであるCytochalasin Bの作用部位と推定される (Garcia et al., 1992)。TM11にみられるトリプトファンは輸送活性に重要になると考えられている (Garcia et al., 1992)。膜貫通領域外であるループ2, 8番目にGRR/Kモチーフがあることは、一般的なsugar transporterの構造を示していると考えられる。このように従来から知られているトランスポーターの特徴的な情報を得ることができた。しかしこれらのアミノ酸配列にみられた特徴はほ乳類のsugar transporterから見出された情報であり、昆虫のsugar transporterにおいて、ほ乳類と同様のモチーフ配列に活性があるのかどうかは定かではない。

1-2 BPH sugar transporter遺伝子の発現プロファイル

BPHのsugar transporter候補遺伝子の組織ならびにステージ別遺伝子発現を調査した。組織別遺伝子発現解析のために、BPHの体全体、昆虫の基本骨格となる頭部、胸部、腹

部、さらに中腸、卵巣、精巣、唾腺、マルピーギ管、脂肪体を摘出し、realtime RT-PCRを行った (Fig. 1-1)。その結果、18種類の*Nlst*遺伝子の発現組織は多様であった。中腸では*Nlst1, 4, 6, 9, 12, 16*や*18*が発現し、*Nlst1 (NIHT1)*の発現する組織が中腸であることは、Priceら (2007) による報告と一致した。*Nlst7, 8, 9, 12, 13, 15, 16*や*18*はマルピーギ管において高い発現がみられた。*Nlst9, 12, 16*や*18*は中腸とマルピーギ管にも発現がみられた。*Nlst5, 8, 10, 11*や*13*は脂肪体に発現がみられた。*Nlst3*は精巣に、*Nlst17*は唾腺において発現がみられた。*Nlst14*はいずれの組織にも発現がみられ、*Nlst10*はいずれの組織においても発現が低かった。

次に、*Nlst*遺伝子の胚子期から成虫までのステージ別遺伝子発現を解析した (Fig. 1-2)。幼虫から成虫までのステージはFig. 1-4に、胚子期3つのステージはFig. 1-5に示した。*Nlst2, 7, 8, 10, 15, 17*や*18*の遺伝子発現は、幼虫期よりも胚子期1-3ステージにおいて高かった。*Nlst7, 15, 17*や*18*は胚子期第3ステージで発現の上昇がみられた。

1-3 昆虫間におけるBPH sugar transporterの系統解析

アミノ酸配列を用いて、*Nlst*遺伝子を含む昆虫のsugar transporter候補遺伝子の系統樹を作成した (Fig. 1-3)。*D. melanogaster*、*A. gambiae*、コクヌストモドキ *Tribolium castaneum*、カイコ *Bombyx mori*、ミツバチ *Apis mellifera*、エンドウヒゲナガアブラムシ *Acyrtosiphon pisum*などゲノム解読の進んでいる昆虫からsugar transporter候補遺伝子を選んで系統樹に導入したところ、NISTトランスポーターはBPH単一のcladeにはならず、様々な昆虫種に混在していた。すなわち、sugar transporterの分化は昆虫種の分化よりも古いと考えられた。ネムリユスリカ *Polypedilum vanderplanki*をはじめ、種々の昆虫から同定されたトレハローストランスポーター TRET1は単一のcladeを形成することが明らかとなっている (Kanamori et al., 2010; Price et al., 2010)。BPHの*Nlst8*がTRET1ファミリーに属したことから、NIST8はトレハローストランスポーターであると考えられた。NIST8については、本論文の第4章で論述する。

考察

BPHのcDNA EST データベースからsugar transporter候補遺伝子の探索を行った。cDNA全長配列を解析した結果、18種類のsugar transporter候補遺伝子*Nlst*が見出され、発現する組織やステージは多様であった。

BPH cDNA ESTデータベース上には、89 ESTクローンが見出されたが、一般にデータベース上のESTクローン数はBPHの生体内で発現する遺伝子量と相関があると考えられる。そこでESTデータベース上に存在するsugar transporter候補遺伝子のうち、半数のESTクローンを占めた*Nlst1*が主要な働きをしていると推測された。アミノ酸配列から*Nlst1*は既に同定された*NIHT1*と考えられ、*NIHT1*は中腸に発現するグルコーストランスポーターであった (Price et al., 2007)。したがって、*NIST1*はイネの師管液に含まれる糖を生体内へ取り込むために機能すると考えられる。

既にゲノム解読の完了した*D. melanogaster*はおよそ20種類のsugar transporterを持ち、他のゲノム解読が終了した昆虫においても、多数のsugar transporter遺伝子の存在が確認されている (Escher and Rasmuson-Lestander, 1999; Price et al., 2010)。BPHと比較的近縁種と考えられる*A. pisum*は、2010年にゲノムが解読され、sugar transporter候補遺伝子の数は54種類であると報告された (Price et al., 2010)。BPHの正確なsugar transporter遺伝子の数は不明だが、ESTデータベース上で、少なくとも18遺伝子の存在が明らかとなった。37,000 EST クローン以上の中から、sugar transporterと推測されたクローンは僅か0.25%であった。この結果は*Nlst*の発現が低いことを示し、実際に得られたsugar transporter遺伝子の半数は一本のクローンしか見つからなかった。このことから、ESTデータベース上にはない未同定のトランスポーター遺伝子がまだ数多くあると推測される。

*Nlst*遺伝子の組織やステージの発現分布を調査したところ、18遺伝子の発現は非常に多様であることが明らかとなった。中腸はイネ師管液に含まれるスクロースならびにその構

成糖であるグルコースやフルクトースを取り込んでいると考えられる。スクロースはBPHの生体内から検出されないこと (Rhodes, 1997; Moriwaki et al., 2003b) と生体内でスクロース代謝系が明らかとなっていないことから、スクロースは生体内への取り込みが難しいのではないかと考えられる。中腸には少なくとも8つの*Nist*遺伝子が発現すると推定されたが、イネの師管液に含まれる糖の種類よりも*Nist*遺伝子数の方が多い。中腸に発現する*Nist*遺伝子はグルコースかフルクトースもしくはそれら両方を輸送する可能性が高く、NISTトランスポーターによる糖の取り込みは複数のトランスポーターにより、その機能が補償されている可能性がある。BPHでは中腸以外にも多くの組織で*Nist*遺伝子が発現していた。たとえば、ほ乳類の肝臓に相当する脂肪体は、生体内の代謝を司る組織である。脂肪体は体液中に含まれる血糖の生成の場としての機能をもつ。BPHの体液中にみられる血糖はトレハロースとミオイノシトールであることが報告されており (Moriwaki et al., 2003b)、脂肪体に発現するNISTトランスポーターはこれらの糖の輸送に関わっていると考えられる。中腸に次いで多くのトランスポーターの発現がみられたマルピーギ管では、主に排泄に関与すると考えられる。BPHの甘露中に含まれる糖は詳細には明らかにされていないが、おそらく、マルピーギ管では生体内の過剰な糖を排泄することで、糖の恒常性の維持に関与すると考えられる。唾腺はBPHがイネを吸汁する際に酵素など分泌物を産生、放出する組織であると考えられている。BPHと比較的近縁であるHemiptera属のヨコバイやアブラムシの唾腺では、糖が検出されている (Miles, 1972)。

ステージ別の*Nist*遺伝子発現を調査したところ、複数の遺伝子は胚子期に特に発現が誘導されることが明らかとなった。胚子期中どのような糖が働いているかは明らかにされていないが、胚子発育のために糖輸送が行われていると推測される。本章で扱ったように、昆虫のsugar transporterの特徴を包括的な視点で捉えたのは初めての報告である。Sugar transporterは生物種を超えて共通のアミノ酸配列の特徴を有しているが、輸送分子である糖をアミノ酸配列から推定することは困難である。そこで次章から示すように、個々のNISTトランスポーターの機能解析を行った。

材料と方法

1 昆虫

実験に供試したトビイロウンカ (Brown planthopper, BPH) は、当研究室で継代飼育しているイズモ系統を用いた。飼育条件は26°C、明期16時間、暗期8時間で、芽出しイネを用いて飼育した。以下、すべての実験にはイズモ系統を用いて解析を行った。

2 Total RNA抽出

成虫脱皮後24時間以内のメスBPH成虫からRneasy mini kit (Qiagen) を用いて、total RNAを抽出し、sugar transporter候補遺伝子のcDNA配列決定のために供試した。組織別遺伝子発現を解析するために、BPHメス成虫を解剖し、次の各組織を得た。体全体 (Whole body, WB)、昆虫の基本骨格となる頭部 (Head, HE)、胸部 (Thorax, TH) や腹部 (Abdomen, AB) からTotal RNAを抽出した。さらに、唾腺 (Salivary glands, SG)、中腸 (Midgut, MG)、マルピーギ管 (Malpighian tubules, MT)、卵巣 (Ovary, OV)、脂肪体 (Fat body, FB) を得た。精巣 (Testis, TS) は羽化後24時間以内のオス成虫から解剖してtotal RNA抽出を行った。また、ステージ別の遺伝子発現解析のために、1齢幼虫 (Nymph 1, N1) からN2、N3、N4、N5、および成虫からtotal RNAを抽出した (Fig. 1-4)。また、胚子期 (embryonic stage) はNasuとSuenagaらの方法 (1958) を参考に、以下に示した3つのステージの50個の卵をtotal RNA抽出に供試した。

3 胚子期の分類と採集法

BPHはイネの葉身の中に産卵する。産卵された卵の中で、胚子が成長し、孵化することで幼虫がイネの外へ出てくる。胚子のステージは25°Cでおよそ168時間であり (Nasu and Suenaga, 1958)、その期間中、卵の形態的变化がみられる性質を利用し、形態的特徴と産卵後の経過時間から、胚子期を特定した (Fig. 1-5)。産卵後24時間以内の胚子であ

るblastoderm stageをembryonic stage I (EM I) とし (Fig. 1-5 左)、次いで、産卵後96時間の胚子であるblastokinesis stageをembryonic stage II (EM II) とした (Fig. 1-5 中央)。最後に、産卵後168時間頃のanaphase of eye pigmentation stageと呼ばれる眼点を確認できるステージをembryonic stage III (EM III) とした (Fig. 1-5 右)。BPHの卵の採集には、イネの葉が3–4枚になった大きさのイネ苗を用意し、卵巣が発達したBPHを24時間接種した。その後、時間経過ごとにイネを解剖し、そこからBPHの卵を回収した。すべての実験は独立に3回行った。イネの飼育には、700 gの培養土をプラスチックケース (半径 5 cm、高さ 10 cm) に入れ、発芽前のイネの種子を6粒蒔いた。プラスチックケースの底に数カ所の穴を開け、底にキムワイプを敷いた。29 °Cのインキュベーターで、イネの葉が3–4枚になるまで、明期15.5時間、暗期8.5時間の条件で育てた。

4 BPH sugar transporter候補遺伝子のcDNA全長解析

BPHのsugar transporter候補遺伝子のcDNA配列はcDNA EST データベースから得た (<http://bphest.dna.affrc.go.jp/>)。Sugar transporter候補遺伝子のcDNA全長鎖は3' rapid amplification of cDNA ends (RACE, Clontech) 及び5' RACE (Invitrogen) により解析した。3' RACEと5' RACEで用いたプライマーはTableに示した (Table 1-2, 1-3)。PCR産物はpGEM-Tベクター (Promega) に直接組み込み、コロニーPCR (cPCR) により、インサートの確認をすると共にシークエンスのためのテンプレートを得た。シークエンスはBigDye Terminator (ABI Biosciences) 法によりDNAアナライザー (ABI Prism 3730) で配列を解析した。cPCR産物は複数のクローンをシークエンスし、GENETYX-MAC ver.13 (GENETYX) を用いて解析を行った。cDNA全長鎖からOpen Reading Frame (ORF) を推定し、TMHMM ver 2.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>; Sonnhammer et al., 1998) とSOSUI プログラム (<http://bp.nuap.nagoya-u.ac.jp/sosui/>; Hirokawa et al., 1998) を用いて膜貫通領域を推定した。Sugar transporter候補遺伝子はEST数の多い順に番号を付け、*N1st*と命名した。

5 Quantitative RT-PCR

First-strand cDNAはPrimeScript RT reagent kit (Takara) を用いて、100 ng total RNAから合成した。合成したcDNAはQuantitative RT-PCR (qRT-PCR) の解析のために10倍に希釈し、テンプレート量として5 ngを供試した。Realtime RT-PCRはSYBR Green I PCR Master Mix (Roche Applied Science) を用いてLightCycler 480 (Roche Applied Science) で解析を行った。内部標準としてRibosomal protein L4遺伝子 (*RP-L4*) を用いた。体全体を用いたサンプルに対して遺伝子の発現量を相対値で示した。プライマーの配列はTable 1-4に示した。生物サンプルは独立に3回分を準備した。

6 系統樹

Sugar transporter候補遺伝子である*Nlst*の系統関係は、塩基配列から推定したアミノ酸配列を用いて解析した。National Center for Biotechnology Information (NCBI) に登録されているキロショウジョウバエ *Drosophila melanogaster*, カイコ *Bombyx mori*, ハマダラカ *Anopheles gambiae*, ミツバチ *Apis mellifera*とエンドウヒゲナガアブラムシ *Acyrtosiphon pisum*のデータに基づき、昆虫のsugar transporter候補遺伝子を得た。*Nlst1*のアミノ酸配列をQueryとし、protein BLASTにより、E value 10^{-7} 以上の配列を得た。さらに、TMHMMプログラムにアミノ酸配列を当て、予想される膜貫通領域の回数が10回から12回までの遺伝子に絞り込みを行った。また、sugar transporterとして解析が進んでいるトレハローストランスポーター遺伝子を系統解析に加えた。ネムリユスリカ *Polypedilum vanderplanki* (PvTRET1; NCBI accession no. AB272983)、*A. gambiae* (AgTRET1; NCBI accession no. AB369548)、*B. mori* (BmTRET1; NCBI accession no. AB369550)、*A. mellifera* (AmTRET1; NCBI accession no. AB369549)、ヒアリ *Solenopsis invicta* (SiGLUT8; NCBI accession no. AY911645)、*A. pisum* (Ap_ST11; NCBI accession no. XP_001950990) と *D. melanogaster* (DmTRET1-1A, -1Bと-2; NCBI accession no. AB369552, AB369553とAB369551)。ClustalWを用いてアミノ酸配列アライメントを行

い、284アミノ酸残基を用いて、MEGA ver.4 (Tamura et al., 2007) によるneighbor-joining法で無根系統樹を作製し、1000反復のbootstrap分析により評価した。

Table 1-1 BPH sugar transporter genes

Gene	EST ¹	Clone name ²	ORF ³	TMHMM	SOSUI
<i>Nlst1</i> ⁴	47	MB0516	486	12	11
<i>Nlst2</i>	9	HT3692	486	12	12
<i>Nlst3</i>	8	MB1507	466	12	10
<i>Nlst4</i>	5	MB3064	478	12	11
<i>Nlst5</i>	4	OC1141	487	9	11
<i>Nlst6</i>	3	MB1040	495	12	11
<i>Nlst7</i>	3	MB0106	507	12	11
<i>Nlst8</i>	2	SG4295	499	12	12
<i>Nlst9</i>	2	NA6316	566	12	12
<i>Nlst10</i>	2	EA7235	504	10	10
<i>Nlst11</i>	1	AD0895	475	12	11
<i>Nlst12</i>	1	AD3130	527	12	11
<i>Nlst13</i>	1	EA7530	544	12	12
<i>Nlst14</i>	1	MA0017	450	10	11
<i>Nlst15</i>	1	MA5086	530	11	12
<i>Nlst16</i>	1	MB3026	549	11	12
<i>Nlst17</i>	1	NB0289	494	11	12
<i>Nlst18</i>	1	OC0495	478	10	11

1 The number of clones found in BPH cDNA EST database.

2 Representative clone names are shown.

3 The number of amino acid residues in open reading frame.

4 *Nlst1* corresponds to NIHT1 reported by Price et al. (2007b).

Transmembrane regions were analyzed by TMHMM and SOSUI programs.

Table 1-2 Primers for 3' RACE

Gene	1st forward primer	2nd forward primer
<i>Nlst2</i>	5'-TCAAGAAGGACGCCGTCGAA-3'	5'-GTGTA CTATTTCTGCCAGAAACC-3'
<i>Nlst3</i>	5'-CTTCTTTCTGCCTCTGCAAG-3'	5'-GGA ACTGATGTTGAATTGAATT-3'
<i>Nlst4</i>	5'-GTTACCCTTAATTGGACATCCA-3'	5'-TTCCAATCATTCTCACTACCA-3'
<i>Nlst5</i>	5'-TTGCACCCAACATGAAAGCAT-3'	5'-ATGTTGCCAGATAATTGATGT-3'
<i>Nlst6</i>	5'-CTACTTGCTTACAAAATCACAGC-3'	5'-GAGAGATTATTAGGATACGGTATC-3'
<i>Nlst7</i>	5'-GAGTTCGCATTGGGTTCTGGTG-3'	5'-TGGGAAGTGTGACATGTATGCT-3'
<i>Nlst8</i>	5'-TCTGTGTGGGAATTGCCTCATT-3'	5'-CAACTACTTTCGGAAATTCAGG-3'
<i>Nlst9</i>	5'-TCTTCCTTCTGATTGTCATCCATA-3'	5'-GCTCTATATGAGCGAAATATTC-3'
<i>Nlst10</i>	5'-GTAGAGCCTTTACCTGAATATA-3'	5'-GTAGAGCCTTTACCTGAATATA-3'
<i>Nlst11</i>	5'-CTGTTATGGCTATATGTCTGAT-3'	5'-GGGGATGGGTTCTCTGGTTTCT-3'
<i>Nlst12</i>	5'-GGCCAGGTGGACAAGTGTCCG-3'	5'-TGGTGAAAACGTTTCTCTGAT-3'
<i>Nlst13</i>	5'-ATCCTGGGCCTGGTGCAGCTGC-3'	5'-CGTGCACTGGACGGGCAAGCGA-3'
<i>Nlst14</i>	5'-ACCTCTAGTGGATCATCTTGGG-3'	5'-TTTGCATCCAGCATATGGCTTG-3'
<i>Nlst15</i>	5'-CCACAATTCTATTTGCCACTCA-3'	5'-CCTAGGAGGTCCTGGAGGAGGA-3'
<i>Nlst16</i>	5'-GATCATGATCGGCCTGATTCGG-3'	5'-GAGCCATCGTGTCCGGAGCCGG-3'
<i>Nlst17</i>	5'-GAGGACTGCGCGCTCTCTACCT-3'	5'-CTGATCTTCATCCAGCAGTTC-3'
<i>Nlst18</i>	5'-AGGTTTTGGTCCACTAGTGTGG-3'	5'-GATTGGCACCTCAACGTCAACC-3'

The sequence of 3' region of *Nlst1* was obtained from the BPH cDNA EST database.

Table 1-3 Primers for 5' RACE

Gene	1st reverse primer	2nd reverse primer
<i>Nlst5</i>	5'-GCTTTCATGTTGGGTGC-3'	5'-GCTTCCTGGTCAATGGAGCAGTG-3'
<i>Nlst8</i>	5'-CTCTTGCGGTGTGACGTGTAAGG-3'	5'-ACCTCAGCCGAGCCACGGCTGGG-3'
<i>Nlst9</i>	5'-GGTGTTATAGTGA CTCTAGCATT A-3'	5'-CAACAGGAGAGGGTGCATCAT-3'
<i>Nlst10</i>	5'-AATATGCAAACGTACGGCAGCC-3'	5'-AAGAGCAACTGCAAGAAGACAGG-3'
<i>Nlst11</i>	5'-GATATTATCTGAACATTGTCCG-3'	5'-GCAATGTAAGTGTACAAAATGCC-3'
<i>Nlst12</i>	5'-GATGGCATCTTGAATCAGAGGAA-3'	5'-ACAAACGTCAATGGCCTTCGTCC-3'
<i>Nlst13</i>	5'-TGTTCTCCAGGGCAGGAACGTGC-3'	5'-CTGAATGAAAACACCTAGAATGA-3'
<i>Nlst14</i>	5'-AGCCGTACGGAGACTCTGGGATCC-3'	5'-AAGAAGATGATCGGGAAGATGG-3'
<i>Nlst16</i>	5'-ATCATGATCGACACCAGGAACGG-3'	5'-TTCCACTGAACTGTTGAAAGAAG-3'
<i>Nlst17</i>	5'-GACGCAGCCGCCGACAGCGATCA-3'	5'-AGCCACGACTCGGGCGCCATCAGG-3'
<i>Nlst18</i>	5'-CCTCTTCCAGGCGCCCCTTGCGGAC-3'	5'-GGCGATTCCGGTGTGCGCGTGAA-3'

The sequences of 5' regions of *Nlst1*, 2, 3, 4, 6, 7, and 15 were obtained from the BPH cDNA EST database.

Table 1-4 Primers for realtime RT-PCR

Gene	forward primer	reverse primer
<i>Nlst1</i>	5'-TGACACCTGAGGATAGAAT-3'	5'-AATATGGTACAAATTATTCATCTA-3'
<i>Nlst2</i>	5'-AGGAAGTTCTGGACGGATTC-3'	5'-GTTAATACTGCTCTTCACTTCTAC-3'
<i>Nlst3</i>	5'-TGGTGTAACGCAGCTTTATTCT-3'	5'-ACATGATAATTCACCAATTTTGAT-3'
<i>Nlst4</i>	5'-CAGTGATTGTTGGCATCATTCA-3'	5'-CAATATTGCTAACGTCTTCACC-3'
<i>Nlst5</i>	5'-CCTGAGTAGAGATGACTAAAGTT-3'	5'-ATATGAGCTGGACTGAATTTTCAC-3'
<i>Nlst6</i>	5'-CCCAAATAATTATGAATGACTT-3'	5'-AAAGGATTAGTTGGATAGGCTAC-3'
<i>Nlst7</i>	5'-AAGATTTCTTCAAAGATAAAAGTCCC-3'	5'-TGCTGCAACCAGCTACTCTCC-3'
<i>Nlst8</i>	5'-TGGTCACAGTTTTTGGCGGCT-3'	5'-GGCATCAGACTTCCAATCCAT-3'
<i>Nlst9</i>	5'-GTGAAGCGGAACTCACGTGT-3'	5'-TCGTCACAACCAATTCAATATCT-3'
<i>Nlst10</i>	5'-TTGTGCCATTTCTATACTCGCA-3'	5'-TTAATGGATTTTCTCATTCTCTC-3'
<i>Nlst11</i>	5'-AGGCAAAGATATTGAAACCATAC-3'	5'-GTACTCAATAACTTTAATCAAATAA-3'
<i>Nlst12</i>	5'-ATCACGACTGTGAATAACAATAA-3'	5'-AACAATGTTCTCAATATTTCACG-3'
<i>Nlst13</i>	5'-CTGCTCCTCTCAACCAACCAT-3'	5'-CCATTGCATTTTCCAATCTCTTCG-3'
<i>Nlst14</i>	5'-ATAAATGTCAACACTGGAATTGAG-3'	5'-TCTATACTTCTATTCAATTTGTGATA-3'
<i>Nlst15</i>	5'-AACCTTGGGCAAGAGTCTAC-3'	5'-AAGATCCACTGTCAGTATTCCT-3'
<i>Nlst16</i>	5'-GCTCTGCTGGTGGCCGTTAT-3'	5'-CGATTTGACTTTTGTGTTGTCGG-3'
<i>Nlst17</i>	5'-ACTTGGAACGGTTTTTACCTATT-3'	5'-TGTATTATGCAAGTGATCCGCATT-3'
<i>Nlst18</i>	5'-AACGCATCATGACGGTGATAC-3'	5'-TGCCATTTATGGCACAGGCTT-3'
<i>RP-L4</i>	5'-TGACACCTGAGGATAGAAT-3'	5'-AACTCCCTTCTGTGGCGGTTTGA-3'

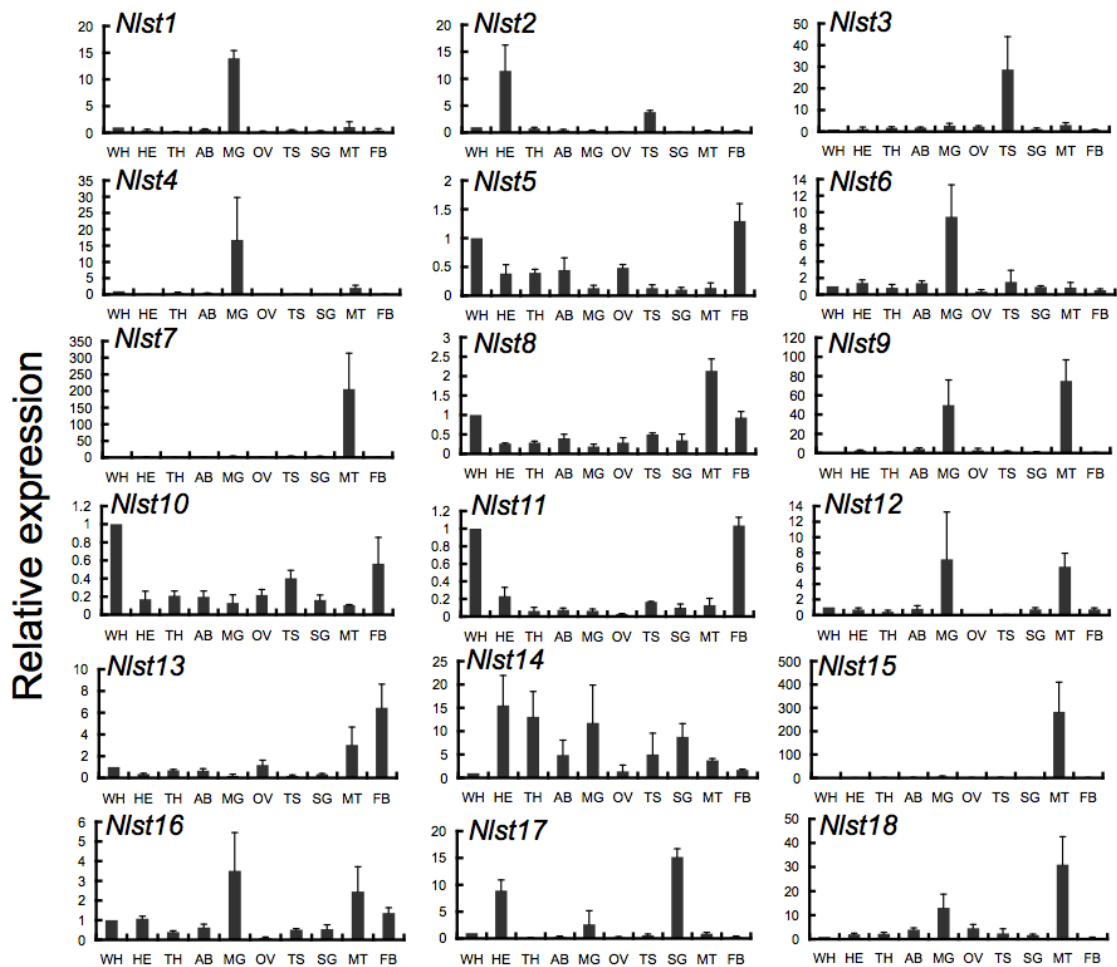


Fig. 1-1 Real-time RT-PCR analyses of the expressions of BPH sugar transporter genes in various tissues.

Tissue name abbreviations: WH, whole-body; HE, head; TH, thorax; AB, abdomen; MG, midgut; OV, ovary; TS, testis; SG, salivary glands; MT, Malpighian tubules and FB, fat body. Error bars represent standard deviation. Tissue samples were independently prepared 3 times. *RP-L4* was used for normalization.

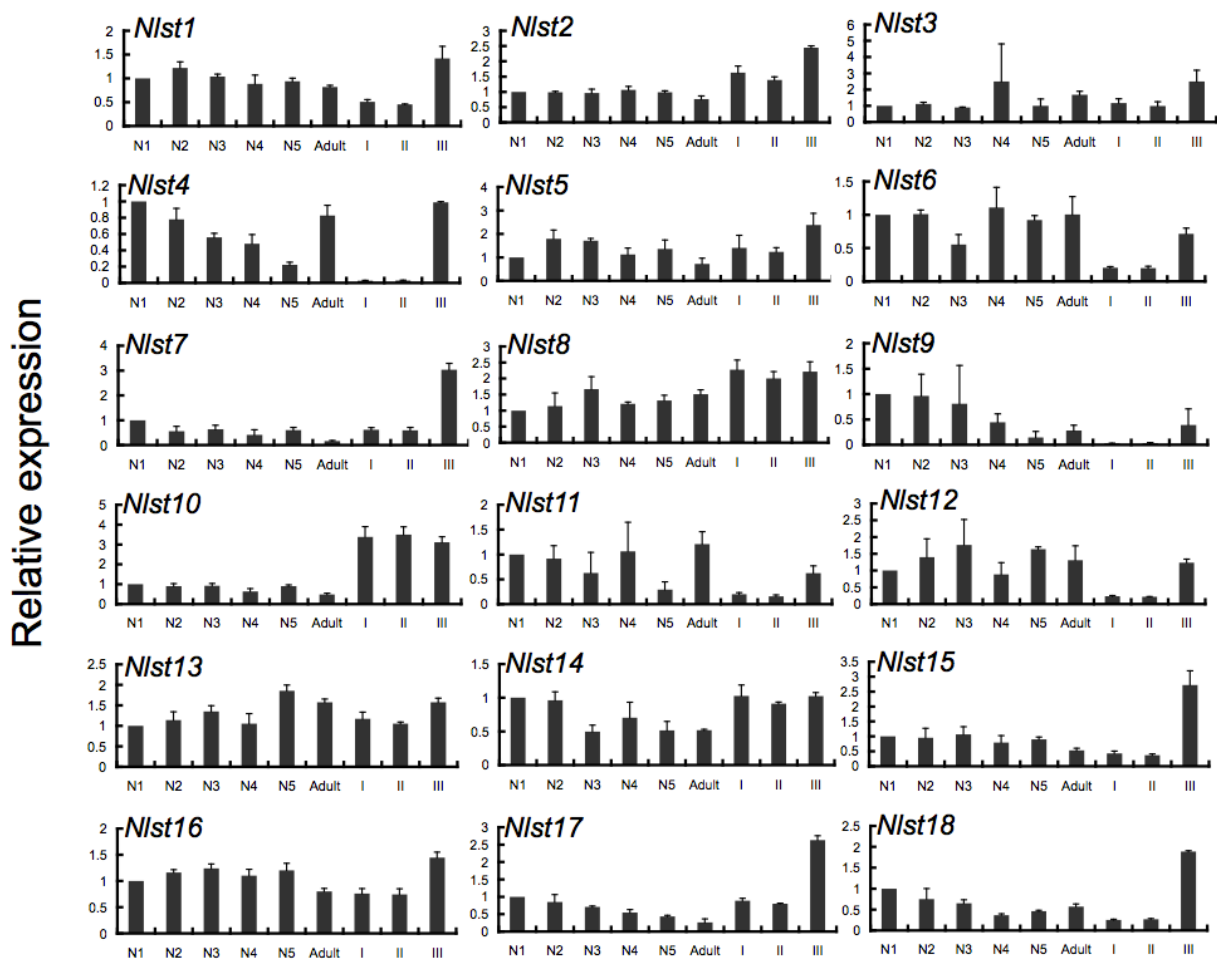


Fig. 1-2 Real-time RT-PCR analyses of the expressions of BPH sugar transporter genes at various developmental stages.

Stage name abbreviations: N1–N5, 1st to 5th instar nymphs; I, II, and III indicate BPH embryonic stages. (See detailed information in Materials and methods, and Fig. 1-4 and 1-5). Error bars represent standard deviation. Tissue samples were independently prepared 3 times. *RP-L4* was used for normalization.

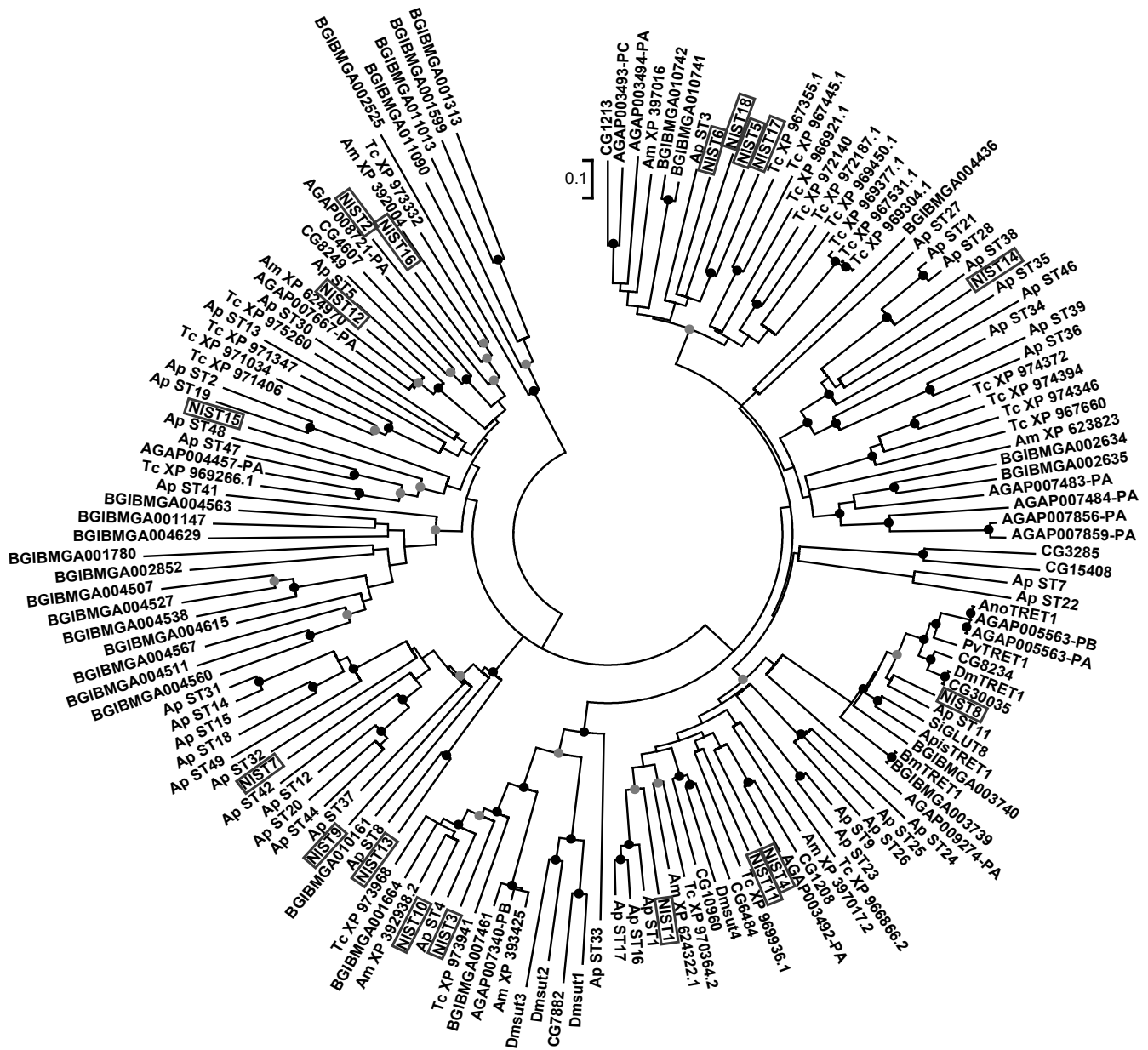


Fig. 1-3 Phylogenetic tree of insect putative sugar transporter genes.

Putative sugar transporter genes in insects were identified from insect genome sequences using the predicted amino acid sequence of *Nist1* as a query in a BLASTP search of the NCBI database with a cutoff E value of 10^{-7} . Genes that were predicted to have 10–12 transmembrane domains by TMHMM were included in the analysis. Amino acid alignment was performed using ClustalW. The unrooted tree was constructed with the neighbor-joining method using MEGA, ver. 4. The reliability of the trees was evaluated with 1,000 bootstrap replications. Circles show the nodes whose bootstrap values were above

90% (black) and 70% (gray). BPH sugar transporter genes are boxed. Scale bar represents 0.1 amino acid substitutions per site. Initial letters show the insect species: CG or Dm, *Drosophila melanogaster*; BGIBMGA, *Bombyx mori*; AGAP, *Anopheles gambiae*; Tc, *Tribolium castaneum*; Am, *Apis mellifera*; and Ap, *Acyrtosiphon pisum*. pvTRET1 is derived from *Polypedilum vanderplanki*, DmTRET1 from *D. melanogaster*, BmTRET1 from *B. mori*, AnoTRET1 from *A. gambiae*, ApisTRET1 from *A. mellifera*, and SiGLUT8 from *Solenopsis invicta*.

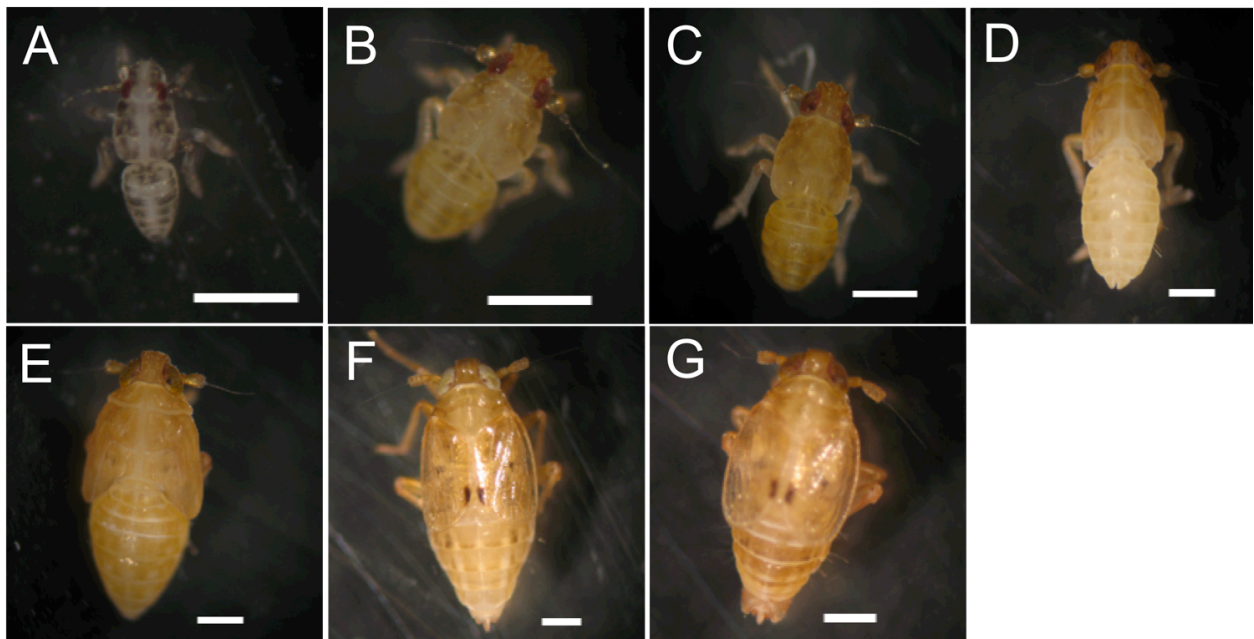


Fig. 1-4 Developmental stages in the BPH.

A: BPH Nymph 1 (N1), B: N2, C: N3, D: N4, E: N5, F: Female adult, G: Male adult.
Scale bars represent 500 μm .

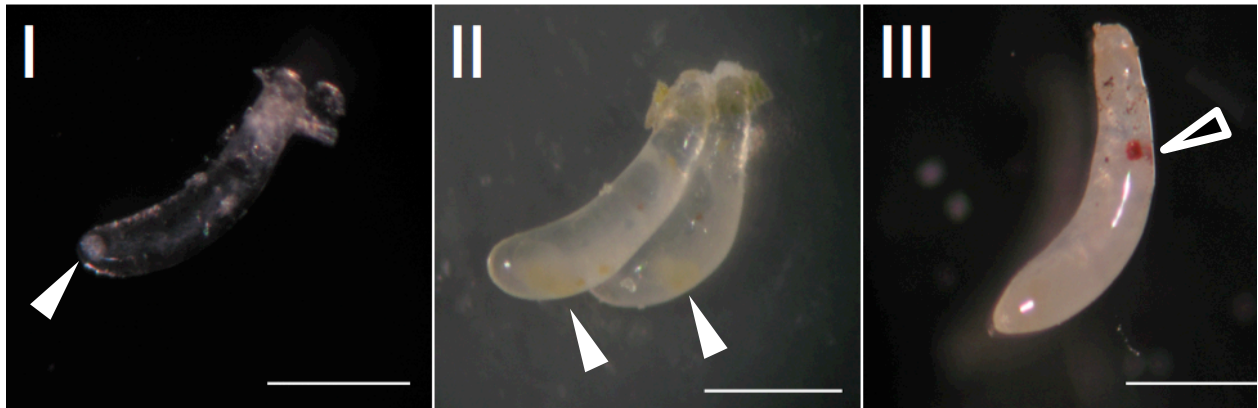


Fig. 1-5 Egg developmental stages in the BPH.

Stage I (left), an egg at about 24 h after oviposition (blastoderm stage). Stage II (center), an egg at about 96 h after oviposition (blastokinesis stage). Stage III (right), an egg at about 168 h after oviposition (anaphase of eye pigmentation stage). Scale bars represent 500 μm . White arrowhead indicates a symbiont ball or an aggregation of yeast-like symbionts. Black arrowhead indicates the eyespot.

第2章

イネ師管液に含まれる糖の取り込みのメカニズムの解明

緒言

糖は細胞内へ直接的に取り込まれるのではなく、sugar transporterを介して輸送される (Wood and Trayhurn, 2003)。BPHにおける糖の吸汁のメカニズムを明らかにする上でトランスポーターの機能は重要であると考えられる。昆虫はヒトの胃や小腸に相当する中腸において、外部から糖やアミノ酸等の栄養分を取り込んでいると考えられているものの、糖がどのようにして生体内へ取り込まれているのかはほとんど明らかにされていない。BPHのsugar transporterの組織別遺伝子発現の解析から、BPHの中腸には7種類のsugar transporter候補遺伝子が発現していた。これらのトランスポーターは糖の取り込みに寄与すると考えられるが、*NIHT1 (Nlst1)* 以外の輸送分子や輸送活性などは不明である。

近年、酵母にBPHのsugar transporter遺伝子である*NIHT1*やエンドウヒゲナガアブラムシのsugar transporterの*Ap_ST3*を発現させ、糖がどのようにして取り込まれるのかが解析された (Price et al., 2007b; 2010)。しかし酵母を利用した解析系では内在性のトランスポーター活性が高く、外来性の活性の取り込みを評価するには不利である。そこで本研究では、アフリカツメガエル卵母細胞を用いてsugar transporterの機能解析を行った。アフリカツメガエル卵母細胞発現系は、外来性の遺伝子の発現効率が高く、内在性の活性が低いと考えられている (Sobczak et al., 2010)。また、この発現系はsugar transporterのみならず、薬剤トランスポーターやアミノ酸トランスポーターなど多くのトランスポーターの解析に有効である。本研究では、*NIHT1 (Nlst1)* 遺伝子をアフリカツメガエル卵母細胞に発現させることで、*NIHT1*の機能の再現性、ならびにアフリカツメガエル卵母細胞を用いた機能解析系を検討した。次に、耐虫性イネ品種ASD7を吸汁することで遺伝子発現が誘導される*Nlst6*とイネ (コシヒカリ) を吸汁することで遺伝子発現が誘導される*Nlst16*の機

能解析を行う。さらに生理学的側面からNISTトランスポーターの働きを検討することで、BPHの糖の取り込みメカニズムを明らかにする。

昆虫は温度、乾燥、飢餓など様々な過酷な環境に対して生き延びるための戦略を備えている。特に食べ物を獲得することは生存、成長、発生のために特に重要である。昆虫が食べ物を獲得する戦略として、『探索行動』が良く研究されてきている。『探索行動』は、感覚器官を駆使し、食べ物を探求する行動を指す。しかし、昆虫が食物を得た後で、如何にして食物の栄養を効率良く吸収しているのかについては不明な点が多い。特に栄養分のうち、糖やアミノ酸などはトランスポーターを介して生体内へと輸送されることが示唆されているものの、その実体のほとんどは不明である。*Drosophila*が絶食時、糖摂食時や高い塩濃度を含む餌を摂食したときの生体内の遺伝子発現については、マイクロアレイを用いて解析されてきた (Zinke et al., 2002; Stergiopoulos et al., 2009)。こうした様々な摂食条件下において、sugar transporterの遺伝子発現が誘導されている。また、FlyAtlas (<http://www.flyatlas.org/>; Chintapalli et al., 2007) 上で、摂食時にsugar transporterをコードすると推定されるCG1208遺伝子の発現が誘導されることがわかった。しかしながら、これらのsugar transporterの機能解析は行われておらず、糖を取り込むための『生体内の分子の働き』はほとんど明らかにされていないと言える。本章では栄養を吸収する器官である中腸で発現しているsugar transporter遺伝子の機能を解析した。

結果

2-1 NIST1の機能解析 ～アフリカツメガエル卵母細胞を用いたsugar transporter機能解析系の検討～

BPHのsugar transporter, NISTが輸送する糖を同定するために、アフリカツメガエル卵母細胞にトランスポーター遺伝子を発現させる実験系を検討した。アフリカツメガエル卵母細胞発現系の確立のために、*NIHT1 (Nist1)* の輸送分子を解析した。*NIHT1*は*Nist1*とほぼ同じアミノ酸配列をもち、これらの遺伝子は共に中腸に発現することから (Price et al., 2007b; Fig. 1-1)、これらは同一のトランスポーターであると考えられた。まず、NIST1::AcGFP1を共発現させたアフリカツメガエル卵母細胞のGFP蛍光の局在を確認したところ、卵母細胞の膜上にGFPの蛍光が確認できた。このトランスポーター遺伝子を発現させた卵母細胞を糖液中に入れ、卵母細胞内への糖の取り込みを調査した。糖はHPLCやラジオアイソトープトレーサーで検出した。その結果、NIST1を発現させた卵母細胞内へのグルコースの取り込みが確認された (Fig. 2-1)。一方、フルクトースの取り込みがみられなかったことは、Priceらによる*NIHT1*の解析結果と一致した。

Sugar transporterは性質上、2つのタイプに分類される。1つ目は、糖促進性 (糖の濃度勾配) トランスポーターで、高い糖濃度から低い糖濃度の方へエネルギー非依存的に糖を輸送するタイプ。2つ目は、 Na^+ イオンや H^+ イオンの電気化学的勾配を利用して、糖をイオンと一緒に輸送する二次的能動輸送のトランスポーターのタイプである (Wood and Trayhurn, 2003)。このどちらであるかを確認するために以下の実験を行った。このトランスポーターの解析手法では、卵母細胞膜を隔てた外側のバッファ中には高濃度の糖があり、一方、カエル卵母細胞内には糖がほとんどない環境であることから、外側にある糖は糖促進性グルコーストランスポーターとしてのNIST1によって卵母細胞内に促進的に取り込まれた可能性が考えられる。

次にNIST1が二次的能動輸送型のグルコーストランスポーターの可能性を検討した。Na⁺イオンを含まないバッファを用いて、グルコースの取り込みを評価したところ、Na⁺イオンの有無に関わらずNIST1により、グルコースの取り込みがみられた (Fig. 2-2A)。したがってNIST1はグルコースとNa⁺イオンとの共役によって、グルコースを輸送する可能性はないと考えられた。また、H⁺イオンの影響については、バッファ中のpH濃度を変化させたときのグルコースの取り込みを検討することで評価した。その結果、NIST1によるグルコースの取り込みはpHの濃度に依存しなかった (Fig. 2-2B)。糖促進性グルコーストランスポーターの阻害剤であるCytochalasin Bを添加したところ、NIST1によるグルコースの取り込みは大きく阻害された (Fig. 2-2C)。以上の結果から、NIST1が糖促進性グルコーストランスポーターであることが明らかとなった。さらに、トランスポーターによる糖の輸送をMichaelis-Mentenの速度反応式に基づき計算したところ、 K_m 値が 2.0 ± 0.4 mMであり、 V_{max} が 37.9 ± 2.8 であった (Fig. 2-2D)。Pichiaを用いたNIHT1の K_m 値は3.0 mMであり、比較的近い値を示した。この結果は改めて、NIST1は既に機能が報告されているNIHT1と同一のトランスポーターであることを示しており、糖促進性グルコーストランスポーターであった。これらの解析結果から、アフリカツメガエル卵母細胞を用いたトランスポーター解析系が有効であると考えられた。

2-2 NIST6の機能解析

序論で述べたように、耐虫性イネ品種ASD7を摂食したBPHでは、*Nlst6*の遺伝子発現が誘導された。NIST6がどのようなsugar transporterであるかを突き止めるために機能解析を行った。NIST6の細胞膜への局在を確認するために、NIST6::AcGFP1を共発現した卵母細胞のGFP蛍光を調べたところ、細胞膜上への局在が確認された (Fig. 2-3A, E)。AcGFP1遺伝子だけを卵母細胞にインジェクションしたもの (AcGFP1 cRNA) や水だけを卵母細胞にインジェクションしたもの (Sham) では、細胞膜上のGFP蛍光は確認できなかった (Fig. 2-3B, C, D, F, G, H)。Nlst6が発現する組織は中腸なので、NIST1と同様にイ

ネ師管液に含まれる糖を吸収する機能をもつと推定される。そこで、イネ師管液に含まれる糖をインセクト・レーザー法で回収した (Fig. 2-10)。BPHの口針を通して回収した師管液は糖分析用カラム (HPX-87C) を搭載したHPLCで分析した。その結果、イネの師管液にはスクロースだけが検出され (Fig. 2-11A)、BPHはスクロースか、その構成糖であるグルコースあるいはフルクトースを生体内へ取り込んでいると考えられた。一般に昆虫ではスクロースの取り込みはないと言われており、BPHやアブラムシなどHemiptera目の中腸内で、スクラーゼという酵素によりスクロースはグルコースとフルクトースに加水分解される (Price et al., 2007a)。したがって、本研究では、中腸に発現する*Nist*はグルコースあるいはフルクトースを輸送すると推定し、それらの糖の取り込みを検討した。まずHPLCによる解析の結果、NIST6を発現させた卵母細胞内へグルコースとフルクトースの取り込みが確認された (Fig. 2-4A)。グルコースとフルクトースの取り込みには大きな差がみられ、フルクトースの取り込みが顕著であった。また、RI標識したグルコースとフルクトースを用いたラジオアイソトープトレーサー実験の結果もHPLCの結果と同様であった (Fig. 2-4B)。次にNIST6の輸送特性について調査した。グルコースの取り込みに関しては -Na^+ イオン条件下において、僅かに上昇した (Fig. 2-5A)。一方、フルクトースの取り込みでは Na^+ イオンの有無に関わらずNIST6による影響はみられなかった (Fig. 2-5B)。NIST6のpH依存性を調べたところ、グルコースの取り込みは有意な差がみられなかったものの (Fig. 2-5C)、フルクトースの取り込みには影響がみられた (Fig. 2-5D)。このフルクトース取り込みは低pHになると、取り込み量が増加する傾向ではなかったため、プロトン勾配によるフルクトース輸送が行われているとは考えられなかった。そこで、tris (hydroxymethyl)aminomethane (Tris) から、より低pH条件に緩衝性のある2-(N-morpholino)ethanesulfonic acid (MES) に置き換えて、バッファを作製し、HPLCで追試を行ったところ、フルクトース取り込みのpH依存性はみられなかった (Fig. 2-5E)。さらに、グルコースとフルクトースの両方がバッファ中に存在するときの糖の取り込み量への影響を検証した。RI標識したグルコースの5倍量の非標識フルクトースを添加した条件下

におけるグルコースの取り込みでは、グルコースの取り込みが抑制されたことから、これらの糖では競合が起こることが明らかとなった (Fig. 2-6A)。また逆の場合に、RI標識したフルクトースの5倍量の非標識グルコースを添加した条件下におけるフルクトースの取り込みを検討した場合もやはり、フルクトースの取り込みが抑制された (Fig. 2-6B)。

Cytochalasin B阻害剤をバッファに添加した場合はNIST6によるグルコースの取り込みは大きく阻害されたが、フルクトースの取り込みの阻害は僅かであった (Fig. 2-6C, D)。上記すべての結果から、NIST6は糖促進性のグルコース/フルクトーストランスポーターであると考えられた。NIST6の輸送活性を調べるために、グルコースとフルクトースのそれぞれにおいて、Michaelis-Menten式に当てはめたKinetic曲線を得た。NIST6によるグルコースの取り込みは K_m 値が 2.3 ± 0.6 mMであり、 V_{max} が 7.1 ± 0.8 であった (Fig. 2-7A)。一方、フルクトースの取り込みは K_m 値が 11.8 ± 4.3 mMであり、 V_{max} が 165.6 ± 34.7 であった (Fig. 2-7B)。以上の解析から、NIST6は主にフルクトースを輸送するトランスポーターであることがわかった。

2-3 摂食条件下で発現が誘導されるNIST16の機能解析

イネ (コシヒカリ) 摂食条件下と飢餓条件下 (水だけを与えた場合) の遺伝子発現差を比較したとき、摂食条件において*Nist16*の遺伝子発現が誘導された。NIST16の機能解析もこれまでの解析法と同様に、アフリカツメガエル卵母細胞発現系で輸送分子の同定を行った。NIST16::AcGFP1を共発現させた卵母細胞上の局在は細胞膜上に確認された。HPLCを用いて糖の取り込みを検討したところ、NIST16::AcGFP1を発現させた卵母細胞では、グルコースやフルクトースの取り込みは検出されなかった。GFPを付加したことでNIST16の構造に影響がみられ、糖の輸送ができなくなった可能性が考えられたので、NIST16だけを発現させた卵母細胞を用いて糖の取り込みを検討したところ、グルコースの取り込みが確認され、フルクトースの取り込みはみられなかった (Fig. 2-8A)。次に ^{14}C -グルコースと ^{14}C -フルクトースを用いて、NIST16による糖の取り込みを検討したところ、HPLCの結

果と同様に、グルコースの取り込みが確認された (Fig. 2-8B)。NIST16の特徴は、Na⁺イオンやpHの影響がみられず (Fig. 2-9A, B)、Cytochalasin B阻害剤を添加することで、グルコースの取り込みが大きく阻害されたことから、NIST16は糖促進性グルコーストランスポーターであることが明らかとなった (Fig. 2-9C)。NIST16によるグルコースの輸送反応速度を計算したところ、 K_m 値が 2.4 ± 0.6 mMであり、 V_{max} が 56.9 ± 5.4 であった (Fig. 2-9D)。

2-4 イネ師管液とBPH体液中の糖の検出

これまで、中腸に発現するBPH sugar transporter NISTトランスポーターの機能解析を行ってきた。NIST1, 6, 16はいずれも糖促進性トランスポーターであった。これらのトランスポーターが働くためには、中腸細胞を隔てた外部と内部には、糖の濃度差が必要であると考えられた。そこで、中腸内と生体内の糖含量の定量を試みた。中腸細胞内や中腸管内の糖の測定は非常に困難であったので、イネの師管液に含まれるスクロース含量と血体液中の糖、すなわち血糖を糖分析用カラムを搭載したHPLCを用いて測定した。イネ師管液に含まれるスクロース量は、イネのステージによって大きく異なっていた。3-5葉期のイネの師管液には、 $6.1 \pm 0.3\%$ のスクロースが、播種37日後のイネの師管液には $15.0 \pm 0.6\%$ のスクロースが含まれていた (Fig. 2-11B)。一方、BPH体液中には、トレハロースとミオイノシトールだけが検出され (Fig. 2-12A)、それぞれの濃度は0.52%と1.23%であった (Fig. 2-12B)。血糖からグルコースやフルクトースは検出されなかった。

2-5 イネを吸汁することで発現が誘導される*Nlst16*

マイクロアレイ解析の結果から、イネ (コシヒカリ) を吸汁すると中腸に発現する*Nlst16*の遺伝子発現が誘導されることが明らかとなっている。そこで*Nlst16*の遺伝子発現をqRT-PCRにより、追試を行ったところ、*Nlst16*はイネを吸汁2時間後から発現が誘導され、吸汁開始6時間後に水平状態に達した (Fig. 2-13B)。恒常的に高発現なSugar transporter遺

伝子である*Nlst1*や抵抗性イネにより発現が誘導される*Nlst6*の遺伝子発現は、このイネを摂食した条件において、大きく誘導されることはなかった (Fig. 2-13C, D)。以上の結果から、マイクロアレイの結果は妥当性があると考えられた。イネの師管液を吸汁することで、*Nlst16*の発現が誘導されたので、この発現を制御する因子はイネの師管液に含まれると推定した。*Nlst16*はグルコーストランスポーターをコードする遺伝子であることから、師管液に含まれる糖が*Nlst16*発現因子と考え、糖液を吸汁させたときの*Nlst16*の遺伝子発現を検討した。BPHの吸汁試験効果を検討するために、展長したパラフィルムで液体を覆い、BPHを吸汁させる手法が確立されている (Koyama, 1979)。この手法によってBPHの吸汁を確認するために、エオシンを含んだ20%スクロース溶液を24時間与え、中腸の色素沈着を確認した。その結果、中腸の色素沈着を確認することができた (Fig. 2-14A)。またエオシンを含まない糖液では、中腸は半透明から白色を呈していた (Fig. 2-14B)。したがって、パラフィルムを介した糖液の摂取法によりBPHに糖を与えることができると考えられた。イネは生育期により植物体内のスクロース含量が大きく変動する (Fig. 2-11B)。そこで、播種3日目のイネの芽生え (発芽直前の粃を播いた) と播種37日後のイネをBPHに与えたときの*Nlst16*の遺伝子発現量を測定したところ、共に同様な遺伝子発現量が示された (Fig. 2-14C)。スクロースならびにスクロース加水分解産物であるグルコースとフルクトースのそれぞれ20%の糖液を用意した。コントロールは播種3日目のイネの芽生えと水だけを与えた飢餓条件を用意した。これらの糖を単独で与えた場合には、*Nlst16*の遺伝子発現は誘導されなかった (Fig. 2-14D)。次に、濃度が高過ぎたことも考慮して、0–20%のスクロース液を用いて、同様の実験を行ったが、*Nlst16*の遺伝子発現は誘導されなかった (Fig. 2-14E)。アスパラギン酸、グルタミン酸、アスパラギン、アラニンやバリンなどのアミノ酸はBPHの吸汁促進作用があると考えられている (Sakai and Sogawa, 1976; Sogawa, 1982)。そこで文献を参考にし、これらのアミノ酸の混合液を作製し、*Nlst16*の遺伝子発現量を測定したが、やはり変化はみられなかった。また、このアミノ酸混合液に最終濃度20%スクロースを添加した場合においても、発現に変化がみられなかった (Fig.

2-14F)。これらの結果から、*Nlst16*の遺伝子発現を制御する因子はこれらの糖やアミノ酸以外のイネに含まれる因子である可能性が高い。

考察

これまで昆虫では、sugar transporterの機能解析がほとんど行われておらず、糖の取り込みのメカニズムは不明な点が多かった。2007年に昆虫で初めて機能解析が行われたsugar transporterはトビイロウンカ (BPH) のNIHT1である。しかし、酵母の一種である*Pichia*にトランスポーターを発現させる実験系では、内在性のトランスポーターの活性が高く、信頼性が高いとは言えなかった (Price et al., 2007b)。ただ、トランスポーターを介した糖の取り込みを示したことは重要な貢献であった。本研究では、アフリカツメガエル卵母細胞発現系でNIHT1の機能の追試を行った。NIHT1はNIST1と同じトランスポーターであり、グルコースの濃度勾配による輸送を行うトランスポーターであることが明らかとなった。cDNA EST データベース上では、NIST1のEST数はsugar transporter候補遺伝子の中で最もEST数が多いことから、遺伝子発現量は高いことが示唆され、BPHの中腸においてグルコースを取り込むために中心的な役割を果たすと考えられた。NIST1はグルコースを特異的に輸送するトランスポーターであり、イネの師管液に含まれるスクロースのもう一つの加水分解産物であるフルクトースの取り込みは担っていなかったこと、NIST1 (NIHT1) のグルコース輸送活性は低いことなどから、グルコースやフルクトースの取り込みには他のNISTトランスポーターの働きが関与することも示唆された (Price et al., 2007)。本研究の*Nist*の組織別遺伝子発現からBPHの中腸には7つの遺伝子が発現することが明らかとなっている。NIHT1が報告された2007年に時を同じくして本研究室のマイクロアレイ解析で、様々な摂食条件下において中腸に発現する2つの*Nist*遺伝子が見出された。これらのsugar transporter遺伝子は*Nist6*と*Nist16*であった。これらの遺伝子をアフリカツメガエル卵母細胞に発現させ、機能解析を行った。グルコースもフルクトースもNIST6を発現させた卵母細胞内に輸送された。BPHでフルクトースを取り込むためのトランスポーターを初めて同定した。耐虫性イネ品種ASD7の抵抗性を打破したBPHでは、より多くのフルクトースを取り込むことになると考えられる。特にNIST6による糖の輸送活

性は、同じ中腸に発現するグルコーストランスポーターNIST1やNIST16の輸送活性と比較しても、非常に高い輸送活性を示した。NIST6は、低い活性ではあるがグルコースの輸送活性も有している。フルクトースに対して高いグルコース濃度のときは、フルクトースの輸送活性が低下することが示された。この結果は、NIST6を介してフルクトースを取り込むためには、NIST1やNIST16などのグルコーストランスポーターの働きが重要となることを示唆している。師管液に含まれるスクロースはグルコースとフルクトースの二糖類で構成されており、中腸内でそれぞれに加水分解される。NIST6だけでフルクトースを取り込もうとした場合、中腸内のグルコース濃度が上昇し、NIST6によるフルクトース輸送活性が低下する。しかし、中腸にはNIST1やNIST16などのグルコーストランスポーターが機能するので、中腸内のグルコース濃度の上昇を抑制することができ、NIST6によるフルクトースの取り込みが可能になると考えられる。ASD7を吸汁できるBPHでは、NIST16の発現の誘導が確認されていないので、少なくとも恒常的に高発現しているNIST1による働きが重要なかもしれない。

一方、NIST16はNIST1と同様に糖促進性グルコーストランスポーターであった。*Nist16*はコシヒカリを吸汁することで迅速に発現が誘導されることから、遺伝子の発現を制御する因子の存在が示唆された。そこで、スクロースやグルコース、フルクトースの糖を人工環境下で与えた場合の*Nist16*の発現量を調査したところ、いずれの糖を用いた場合においてもイネを吸汁したときのような発現量の増加は示されなかった。また、BPHの吸汁促進作用があるとされる種々のアミノ酸やアミノ酸とスクロースの混合液を摂取させた場合も*Nist16*の遺伝子の発現には変化が見られなかった。イネの師管液に含まれるスクロース濃度は成長に伴い、著しく増加することが本研究で明らかとなった。スクロース含量が少ないイネの芽生えをBPHに24時間与え、*Nist16*の遺伝子発現量を調べたところ、大きく成長したイネを与えた場合の*Nist16*の発現量とほぼ同じであった。これらの結果から、糖やアミノ酸ではなく、恒常的にイネに含まれる因子によって発現が誘導されていると推定された。イネにはshaftside、neoschaftside、carlinosideやneocarlinosideなどのフラボノイド

やサリチル酸が含まれている (Sogawa, 1982, Besson, 1985)。これらの物質はイネ種子の中にも含まれていることから、芽生えのイネにも存在が示唆され、*Nlst16*の遺伝子発現に、これらの物質の関与についても検討する必要がある。

*Drosophila*において、糖を与えた場合や高濃度の塩を含む餌を与えた場合など様々な摂食条件下や飢餓状態における遺伝子発現がマイクロアレイで調べられており、sugar transporter候補遺伝子の発現が誘導される場合がある (Zinke et al., 2002; Chintapalli et al., 2007; Stergiopoulos et al., 2009)。また、吸血性昆虫である*A. aegypti*においても、血液の摂取によりsugar transporterの発現が誘導する (Sanders et al., 2003)。しかし、トランスポーター遺伝子の発現誘導は確認されているものの、そのトランスポーターの機能は不明である。本研究におけるBPHのマイクロアレイ解析の結果も合わせて、昆虫は摂食時にsugar transporter遺伝子の発現を誘導させる機能が備わっていると考えられる。本研究では、昆虫で初めて摂食に伴い発現が誘導されるsugar transporterの機能を明らかにした。

本研究で解析を行ったNIST1, 6, 16のいずれも糖の濃度勾配の性質により糖を輸送するトランスポーターであり、これらのトランスポーターが効率良く働くためには、中腸を隔てた外部と内部で糖の濃度差があると推定された。イネの師管液や体液中の糖濃度についてはこれまで報告されているが (Fukumorita and Chino, 1982; Hayashi and Chino, 1990; Moriwaki et al., 2003b)、改めてこれらの糖成分の解析を行ったところ、イネの師管液中には生育期により変動がみられるものの、6 – 17%の高濃度のスクロースが検出された。吸汁されたスクロースは中腸内でグルコースとフルクトースに加水分解されるので、非常に高濃度のグルコースやフルクトースが腸管内に存在することが示唆される。一方、BPHの血糖には、グルコースやフルクトースは検出されず、トレハロースやミオイノシトールだけが検出された。これらの結果は、以前の¹³C-NMR spectroscopyを用いた解析結果と一致した (Moriwaki et al., 2003b)。またBPH生体内へインジェクションした¹³C₁-グルコースはインジェクション直後には検出されるが、4時間後には検出されなくなっている (Moriwaki et al., 2003b)。BPHの血糖にグルコースやフルクトースが検出されなかった理

由として、中腸を通じて生体内へ取り込まれたこれらの糖は、体液を介して、速やかに各組織へ運ばれることが考えられた。本研究の結果とこれまでの研究報告を照合すると、BPHが餌とするイネ師管液中のスクロース濃度は非常に高く、一方、BPH体液中の糖濃度は非常に低い値を示し、中腸細胞を隔てて大きな糖の濃度差があった。このことからBPHは糖を吸収するために、糖の濃度勾配に依存した促進性の駆動を利用して、糖の取り込みを行っていると考えられる。2010年に、BPHと同じ吸汁性昆虫であるエンドウヒゲナガアブラムシのsugar transporter, Ap_ST3 糖促進性グルコース/フルクトーストランスポーターが同定された (Price et al., 2010)。このアブラムシは54種類のsugar transporterを有している。ほとんどの機能は不明であるが、アブラムシを含めたBPHなどの吸汁性昆虫は糖を取り込むためには、糖促進性の性質を利用していると考えられる。エンドウヒゲナガアブラムシの血糖はトレハロースで、その濃度は非常に高濃度の271 mMである (Moriwaki et al., 2003a)。何度も述べたように、糖促進性トランスポーターは糖の濃度差の駆動を利用して糖の輸送を行うが、体液中のトレハロース濃度は植物体の糖を取り込むためには影響がないと考えられる。また、昆虫の食性により糖の取り込みのメカニズムはそれぞれ異なることも考えられる。昆虫の食性は、動物性や植物性などの嗜好性があり、さらに、液性や固形などの嗜好性がみられる (Dow, 1986)。たとえば、吸汁性昆虫であるアブラムシやBPHは植物の液体を餌とするが、バッタやカイコなどの食植性昆虫は、植物体そのものが餌となる。前者の吸汁性昆虫では、糖が豊富にある師管液を吸汁するので、中腸管内には多くの糖が流れ込む。しかし固形物を栄養源とする昆虫の中腸では、師管液のように絶えず糖が流れ込んでくるわけではないので、中腸内の糖濃度は低いことが考えられる。このことから、食植性昆虫では、BPHのような糖促進性トランスポーターが積極的に機能せず、二次的能動輸送の性質を利用したトランスポーターが働いている可能性もある。バッタにおいてsugar transporterの同定までは至っていないが、Na⁺-ガラクトーストランスポーターの存在が示唆されている (Pascual et al., 2006)。このトランスポーターは二次的能動輸送型トランスポーターであり、糖促進性トランスポーターのエネルギー非依存的な

性質とは異なる。また、カのようにヒトの血液から栄養を摂取する場合、血中濃度は0.1%のグルコース程度しかみられないので、カが生体内へ血中グルコースを取り込もうとする場合、ヒトの小腸と同様に、 Na^+ -グルコーストランスポーター SGLT1のような二次的能動輸送による糖の取り込みが必要かもしれない。様々な昆虫における糖の取り込みのメカニズムは個々のトランスポーターの機能を明らかにすることが大切である。

材料と方法

1 昆虫

トビイロウンカの飼育はこれまでの材料と方法に準じた。

2 RNA抽出

Total RNAはメス成虫からRNeasy Mini kit (Qiagen) を用いて抽出した。シーケンスはBigDye Terminator (ABI Biosciences) 法によりDNAアナライザー ABI prism 3730で解析した。得られたシーケンス配列はGENETYX-MAC ver.13 (GENETYX) で解析した。

3 イネ師管液の回収

イネ師管液の回収は既に確立されているインセクト・レーザー法を採用した。インセクト・レーザー法は、BPHがイネを吸汁する性質を利用し、BPHの口針 (口器) をレーザーで焼き、流出した師管液を回収する手法である (Kawabe et al., 1980; Fig. 2-10)。甘露の存在はBPHがイネから師管液を吸汁していることを示す指標となるため、成熟したメスのBPHにイネを14時間与え、甘露の有無を確認した。口針をイネに刺したままのBPHをレーザー発射台に設置し、BPHの口針をレーザーで焼いた (YAG Laser, NEC, Tokyo, Japan)。口針を刺して自然に流出してきた師管液をキャピラリー (2 μ l) で回収し、分析するまで氷上で保存した。生物サンプルは独立に3回分を用意し、それぞれのアッセイには1 μ lの師管液を用いた。

4 BPH体液の回収

BPH体液の回収はMoriwaki et al. (2003b) による手法を基に、一部を改変して行った。羽化24時間以内のメスBPHを、イネで24時間飼育した。BPHの中脚をピンセットで除去

し、流出した体液をキャピラリー (World Precision Instruments, Inc., FL) で回収し、体液量の測定を行った。回収した体液を氷冷したPBSに集めた。

5 糖の検出と定量

糖の計測は、Watanabe et al. (2002) により報告されたHPLCを用いた解析を採用した。回収した師管液やBPH体液は量を計測した後、内部標準として1%ソルビトールを含むPBS中に集めた。水溶液を0.45 μ m PVDF フィルターカラム (Whatman) に通し、糖分析用カラム (HPX-87C, BioRad) を搭載したHPLCで分析した。80 °C、0.8 ml/min、100% 水の条件で分析した。糖含量の定量のために、HPLCクロマトグラムのピーク面積は Chromato-PRO (ランタイムインスツルメンツ, Japan) で測定した。

6 cRNAの作製

BPH sugar transporterをアフリカツメガエル卵母細胞に発現させるために、*Nlst*遺伝子のORFを組み込んだベクターコンストラクトを作製した。*Nlst*遺伝子特異的プライマーは Table 2-1A, Bに記載した。制限酵素配列を含んだプライマーを用いて、High-fidelity DNA polymerase (KOD plus, TOYOBO) により、増幅したPCR産物をpGEM-Tベクターに組み込んだ。このベクターコンストラクトをそれぞれの制限酵素で処理し、適切なバンドを切り出し、DNA抽出を行った。Capped RNA (cRNA) 合成用のベクター (pT7XbG2-AcGFP1, DDBJ accession number; AB255038 and pT7XbG2, DDBJ accession number; AB255037) も制限酵素で処理し、それぞれに*Nlst*遺伝子のORFを組み込んだ。このベクターコンストラクトをテンプレートにしてT7とT3 プライマーによりPCRを行い、増幅産物をcRNA合成に供試した。cRNA合成にはmMessage mMachine T7 kitを用いた。

7 アフリカツメガエル卵母細胞膜上へのトランスポーターの発現

アフリカツメガエルを手術し、卵母細胞塊を摘出した。術後のカエルは縫合し、1–2週間、個体飼育した。摘出した卵母細胞塊を0.2% (wt/vol) コラゲナーゼ, type II (Sigma-Aldrich) を含んだ Ca^{2+} -free Modified Barth's medium (MBS) (組成はSupplemental dataに示した) に浸した。コラゲナーゼ処理のバイアルを70分間、20°C条件下で、ゆっくり回転させながらインキュベートした後、コラゲナーゼ処理の反応を停止するために、 Ca^{2+} -MBSで卵母細胞をよく洗浄した。健全なV–VIステージの卵母細胞を回収し (Dumont, 1972)、瀟胞細胞をピンセットで除いた。卵母細胞の植物極側に 41.4 ngのcRNA (1 $\mu\text{g}/\text{nl}$) をマイクロインジェクションした (World Precision instruments)。インジェクションした卵母細胞を Ca^{2+} -MBS中で72時間、20°C条件下で保存し、毎日新鮮なバッファに交換した。

外来性トランスポーターの発現を確認するために、実体顕微鏡 (Leica) を用いて、UV条件下でGFPの蛍光を確認した。GFPの蛍光がみられた卵母細胞を回収し、トランスポーターの機能解析に供試した。卵母細胞の膜上のGFPの蛍光を確認するために、凍結切片を作製した。NIST::AcGFP1を共発現させた卵母細胞はO.C.T. compound (Tissue-Tek, Japan) に入れ、24時間、-80 °C条件下で保持した。クライオスタット (Leica, CM3050S) を用いて5 μm の凍結切片を作製し、GFP蛍光を確認した (Leica, DMR)。

8 トランスポーターアッセイ

トランスポーターを発現させた卵母細胞内への糖の取り込みの実験は2種の方法を用いて行った。まず、RI非標識の糖を用いて、HPLCで検出した。次にRI標識した糖を用いて、糖の取り込みを検討した。

Ca^{2+} -MBSに105 mMの糖を溶解した。そこにNISTトランスポーターを発現させたカエル卵母細胞を2時間、20 °Cの条件下でインキュベートした。その後、MBSバッファで卵母細胞を洗浄した。洗浄作業は3回繰り返した。HPLCを用いて、糖の分析を行うために、1%ソルビトールを含む80%エタノール中で卵母細胞をホモジナイズし、15,000 g、20 min

遠心を行い、上清を回収した。この上清を減圧遠心機を用いて、完全に固化した後、ペレットを200 μ lの水で溶解した。分析前のサンプルは、0.45 μ m PVDF フィルターカラム (Whatman) でゴミを除去した。糖分析用カラム (HPX-87C, BioRad) を搭載したHPLCで、80 °C、0.8 ml/min、100% 水の条件でサンプルを分析した。実験は独立に3回行った。卵母細胞内在性の活性を調べるNegative controlとして、*AcGFP1* cRNAをインジェクションした卵母細胞を用いた。

ラジオアイソトープトレーサー実験では、 14 C-標識グルコースと 14 C-標識フルクトースを用いた (GE Healthcare)。NISTトランスポーターを発現させた卵母細胞をRI標識した糖を含むMBSバッファに浸した。糖濃度はベクレル値から計算した。NIST1を発現させた卵母細胞を用いて、糖の取り込みのタイムコースを調べたところ、30 minで糖の取り込みが検出された。取り込み実験後の卵母細胞を80%エタノール中でホモジナイズし、15,000 g、20 minの条件で遠心した。上清を回収し、固体シンチレーション (Ready Cap, Beckman Coulter) に入れ、75 °Cで完全に乾燥させた。ラジオアイソトープ活性はシンチレーションカウンターで測定した (Quanta Smart, Perkin Elmer)。放射量と糖の検量線から取り込まれた糖濃度を算出した。内在性の活性を調べるために、Negative controlとして*AcGFP1* cRNAをインジェクションした卵母細胞を用いた。トランスポーターによる輸送反応のkineticsを得るために0 – 12 mMの糖濃度、20 min、常温で糖の取り込みを行い、計算した。 K_m 値と V_{max} はPrism 5 (GraphPad) で解析した。 Na^+ イオンと糖の共役輸送の可能性を検討するためにNaClの代わりに塩化コリンを用いてMBSバッファを作製したときの糖の取り込みを評価した。 H^+ イオンの影響を調べるために様々なpH条件下における糖の取り込みを評価した。糖の取り込みが不安定な場合、Trisよりも低pH条件で緩衝性のある4-morpholine ethanesulfonic acid (MES) を用いてMBSバッファを作製して、糖の取り込みを検討した。普通に糖の取り込みを行ったときのバッファのpHは7.8であった。統計処理は、2区間の比較にはStudent's t-testで評価し、多重比較検定のために一次分散分析

(one-way ANOVA) で全体に有意な差がみられた場合は、さらにTukey's testを行った (Prism 5)。

9 イネを吸汁させたときに中腸に発現するBPH sugar transporter遺伝子の発現

*Nlst*遺伝子の発現量を解析するために、羽化後24時間以内のBPHメス成虫を12時間、水だけを与えた飢餓状態においた後、0, 2, 6, 12, 24時間イネを与え、1区画につき10頭分ずつ中腸を摘出した (Fig. 2-13A)。回収した中腸からtotal RNAを抽出した。生物サンプルは独立に4回分を用意した。qRT-PCRは本論文第1章材料と方法5に準じた。

Table 2-1A Primers for capped RNA (cRNA) pT7XbG2-AcGFP1

Gene	forward primer	reverse primer
<i>Nlst1</i>	5'– CGAG GATATCCCACCATGAGCACCAA GGCAACGACTGTC–3'	5'– CGAC GAATTC AAATTTTGCAGGTTTCTGT C–3'
<i>Nlst6</i>	5'– CAT GATATCCCACCATGGCTTCGAAG GGCGATCA–3'	5'– CCT GAATTC TAGTTTCCTGTTGACAGGTC TC–3'
<i>AcGFP1</i>	5'–TAATACGACTCACTATAGGGCGA–3'	5'–ATTAACCCTCACTAAAG–3'

Table 2-1B Primers for cRNA pT7XbG2

Gene	forward primer	reverse primer
<i>Nlst16</i>	5'– TAGC GATATCCCACCATGGAATCCAAA AGAAGTAGAGA–3'	5'– GCTTC GAATTC TCATTTATTCTGTGCTTTCT GTA–3'

Bold fonts represent restriction enzyme sequences.

GATATC, *EcoRV*; GAATTC, *EcoRI*

Under lines show Kozak sequences.

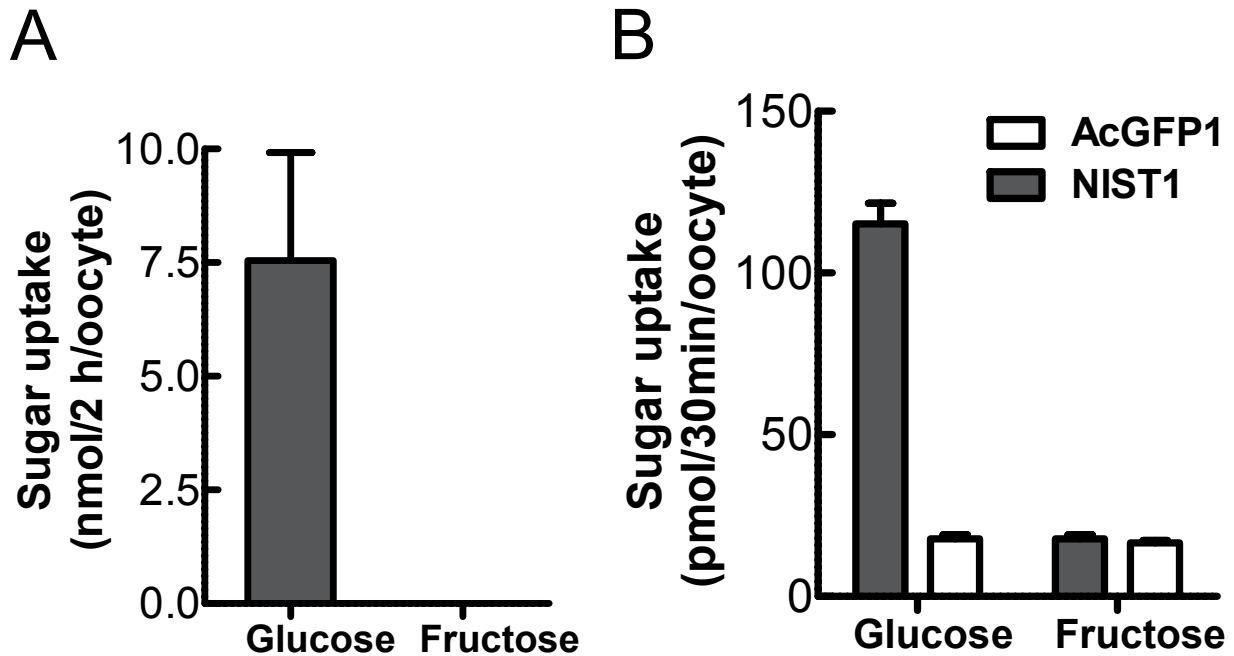


Fig. 2-1 Glucose uptake by NIST1.

Sugar uptake analyses using HPLC and radioisotope-labeled sugars. Transporters were expressed in the cellular membrane of *Xenopus* oocytes by injecting cRNA of *Nist1*. Error bars represent standard error ($n = 3$). Five oocytes were analyzed in each assay. A: HPLC analyses; Sugar uptake assays were examined, NIST1::AcGFP1-expressing oocytes were incubated with 105 mM sugar solutions for 2 h at 20 °C. Endogenous transport activities of sham (water injection) and *AcGFP1* cRNA injection were not detected using HPLC. B: Radioisotope tracer analyses; Sugar uptake assays using radioisotope were performed in 1 mM ^{14}C -glucose or ^{14}C -fructose solutions for 30 min at 20 °C. The white bar represents the endogenous transporter activity in oocytes expressing *AcGFP1* cRNA.

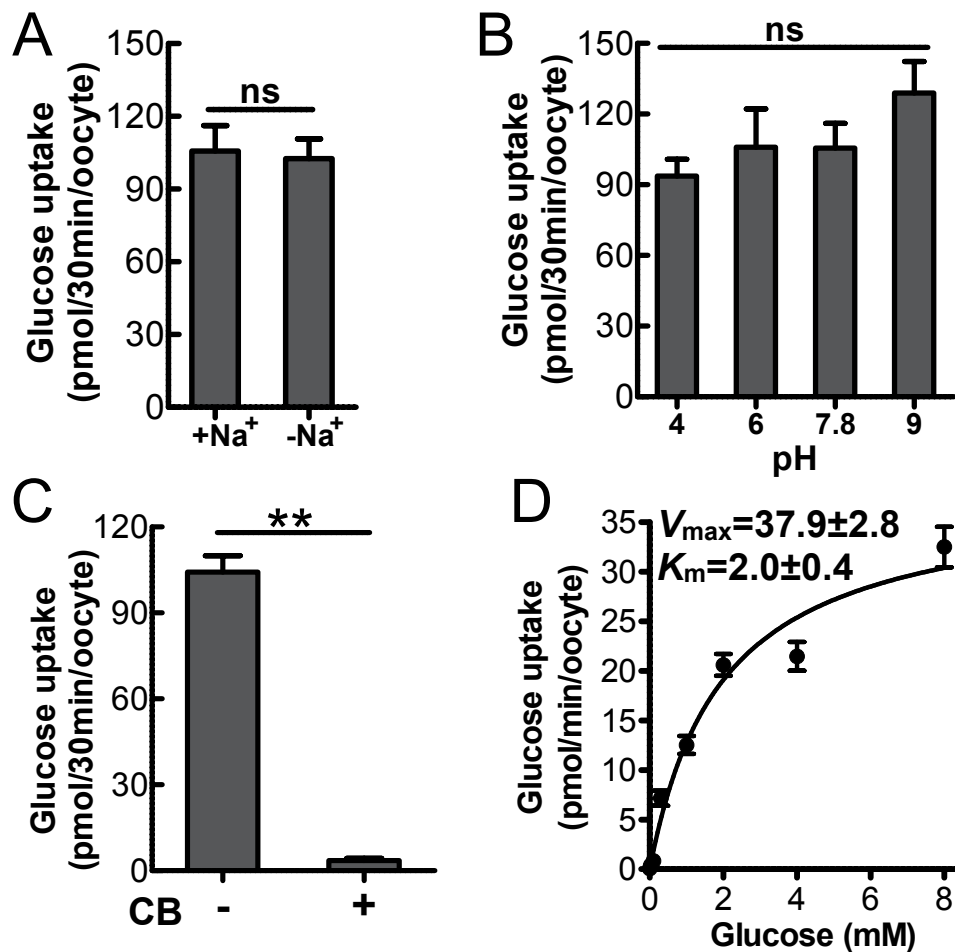


Fig. 2-2 Characterization of NIST1.

NIST1::AcGFP1 fusion protein was expressed in the cellular membrane of *Xenopus* oocytes. The endogenous transport activities of *Xenopus* oocytes were subtracted from NIST1::AcGFP1 activities. Error bars represent standard error ($n = 3$). A: The effect of Na⁺ deficiency was examined in a Na⁺-free buffer (-Na⁺). B: The pH dependency was examined across a range of pH values. C: An inhibition assay was performed using cytochalasin B (CB). D: Analysis of the kinetics of NIST1::AcGFP1 for glucose. A and C: Statistical analyses were evaluated by Student's t-test. B: Statistical analyses were evaluated by one-way ANOVA. "ns" indicates no significant difference, an asterisk indicates a significant difference (** $P < 0.001$). A: $P = 0.8059$, B: $P = 0.3012$, C: $P < 0.0001$.

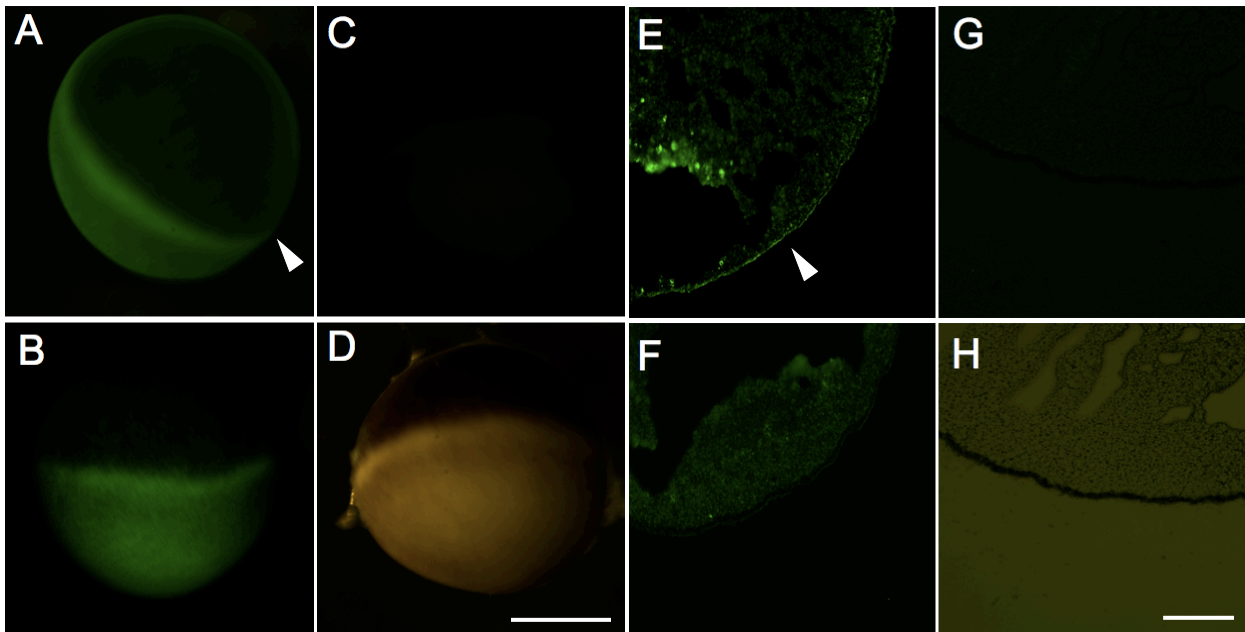


Fig. 2-3 Expression of NIST6 in the cellular membrane of a *Xenopus* oocyte as detected by the AcGFP1 fusion protein.

AcGFP1 fluorescence was observed in *Xenopus* oocytes (A–D) and in the cellular membrane in sections of frozen oocytes (E–H). A and E, NIST6::AcGFP1 fusion protein; B and F, AcGFP1 as a control; C and G, water injected; D and H, water injected (UV + visible light). Arrowheads indicate the fluorescence from the NIST6::AcGFP1 fusion protein. Scale bars show 500 μm (A–D) and 50 μm (E–H).

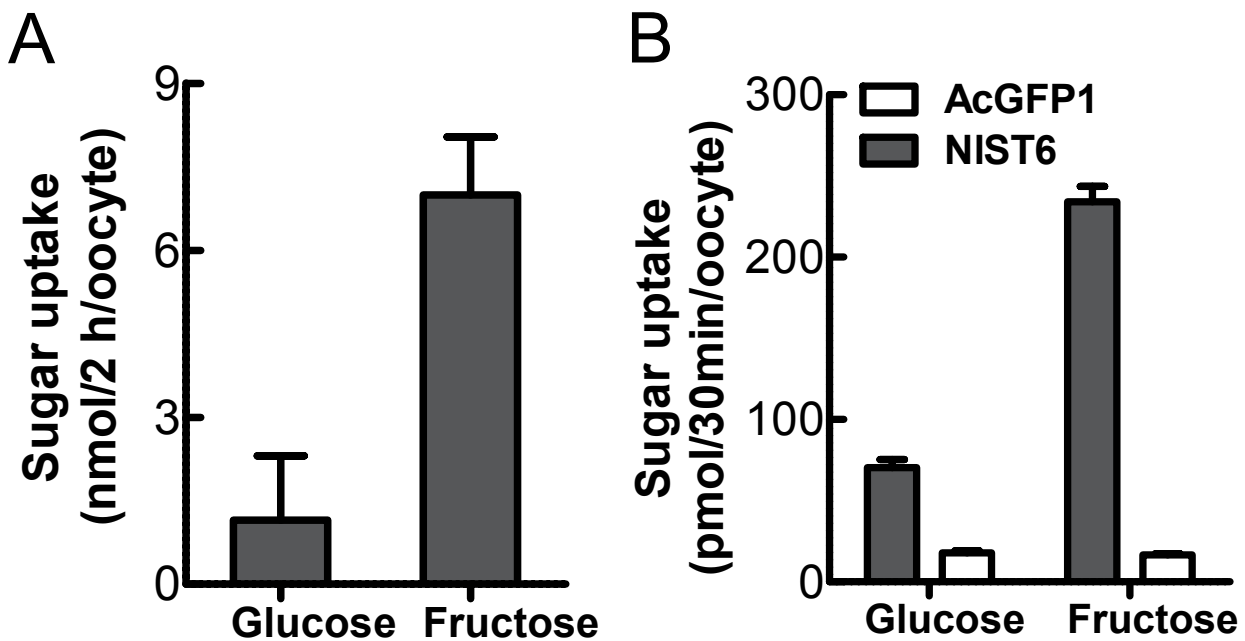


Fig. 2-4 Sugar uptake analyses of NIST6 using HPLC and radioisotope-labeled sugars.

Transporters were expressed in the cellular membrane of *Xenopus* oocytes by injecting cRNA of *Nist6*. Error bars represent standard error ($n = 3$). Five oocytes were analyzed in each assay. A: HPLC analyses; Sugar uptake assays were examined, NIST6::AcGFP1-expressing oocytes were incubated with 105 mM sugar solutions for 2 h at 20 °C. Endogenous transport activities of *AcGFP1* cRNA injection were not detected using HPLC. B: Radioisotope tracer analyses; Sugar uptake assays using radioisotope were performed in 1 mM ^{14}C -glucose or ^{14}C -fructose solutions for 30 min at 20 °C. The white bar represents the endogenous transporter activity in oocytes expressing *AcGFP1* cRNA.

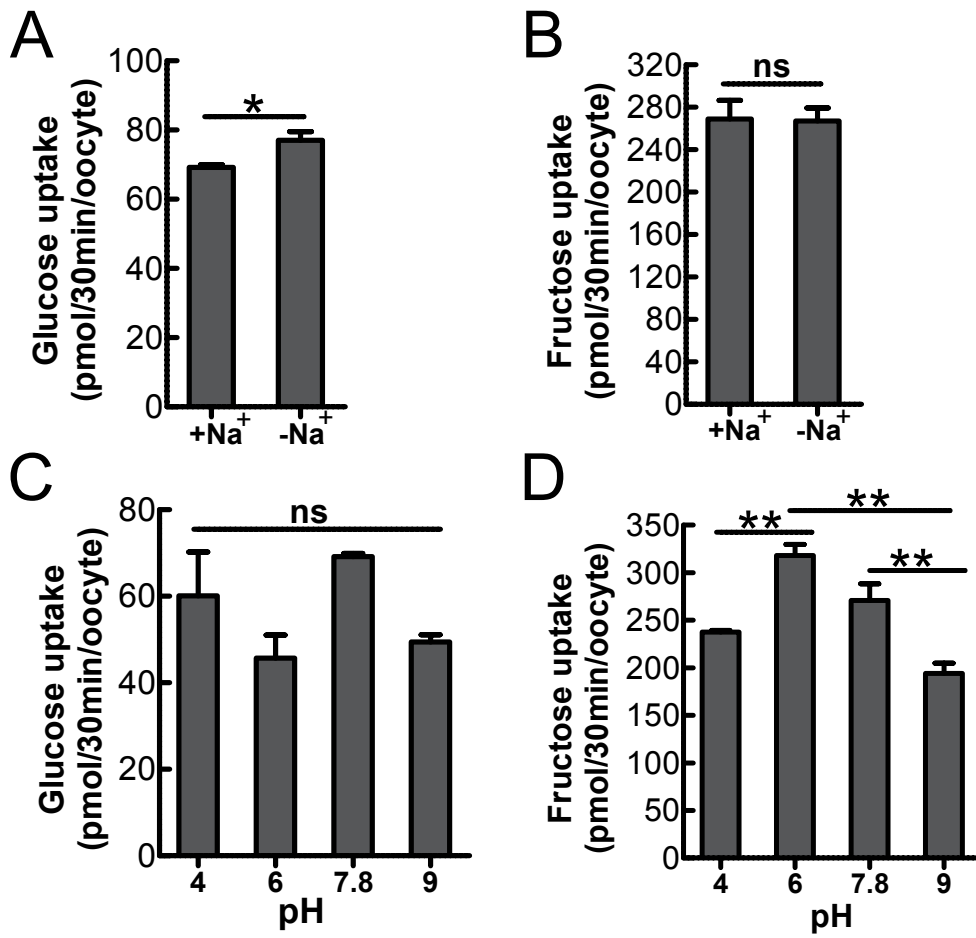


Fig. 2-5 NIST6 is a facilitated glucose/fructose transporter.

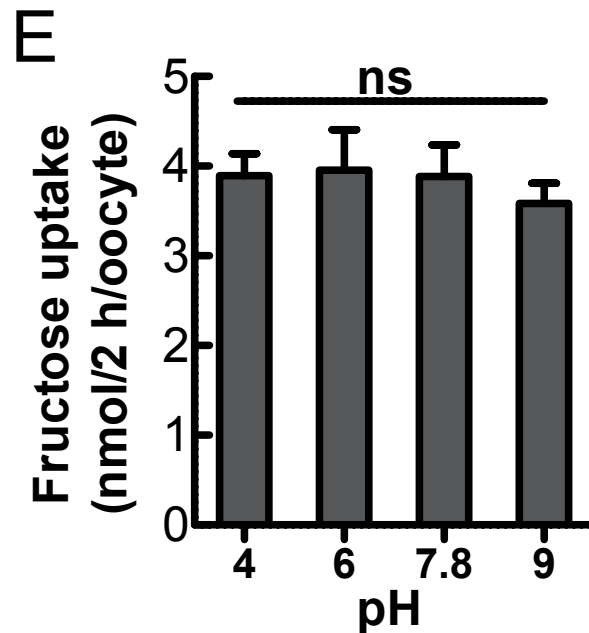


Fig. 2-5 NIST6 is a facilitated glucose/fructose transporter (continued).

Glucose and fructose uptake via NIST6::AcGFP1 was examined under Na⁺-free conditions (A, B) and different pH conditions (C, D). Sugar uptake assays were performed for 30 min at 20 °C at a concentration of 1 mM ¹⁴C-glucose or ¹⁴C-fructose. Five oocytes were used in each assay. The net transport content was calculated by subtracting the endogenous transport activities of *Xenopus* oocytes. Error bars represent standard error ($n = 3$). E: The transport activity of fructose for different pH values in *Xenopus* oocytes expressing NIST6::AcGFP1 was measured with HPLC using MBS buffer in which Tris was replaced with MES for the low pH values.. Sugar uptake assays were performed for 2 h at 20 °C. A and B: Statistical analyses by Student's *t*-test. C, D and E: Statistical analyses by one-way ANOVA before Tukey's multiple comparison tests. "ns" indicates no significant difference; an asterisk indicates a significant difference (* $P < 0.05$, ** $P < 0.001$). A: $P = 0.0467$, B: $P = 0.9689$, C: $P = 0.0753$, D: $P = 0.0005$.

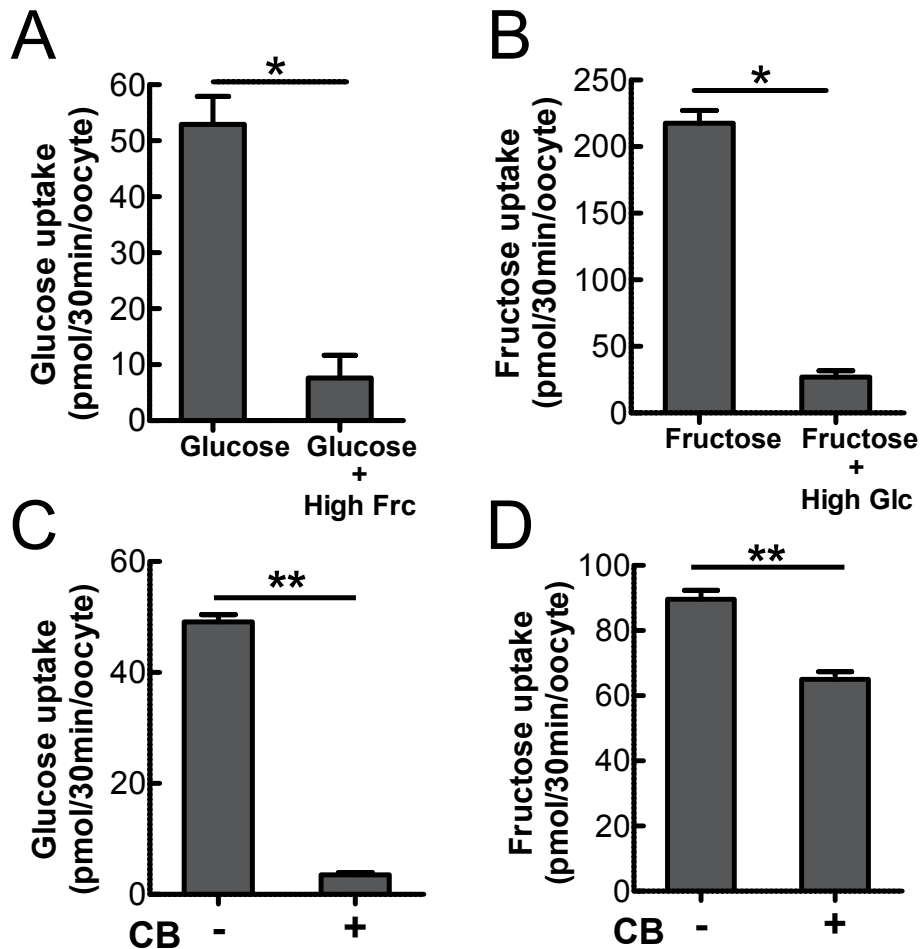


Fig. 2-6 Analyses of competition for NIST6 between glucose and fructose and of inhibition by cytochalasin B.

Experimental conditions were similar to those in Fig. 2-5. Error bars represent standard error ($n = 3$). A: ^{14}C -glucose uptake was measured in a solution containing 1 mM ^{14}C -glucose plus 5 mM unlabelled radioisotope fructose (High Frc). B: ^{14}C -fructose uptake was measured in a solution containing 1 mM ^{14}C -fructose plus 5 mM unlabelled radioisotope glucose (High Glc). C and D: Inhibitory assays with cytochalasin B (CB). *Xenopus* oocytes expressing NIST6::AcGFP1 were incubated for 30 min in a solution of 0.8 mM ^{14}C -glucose or ^{14}C -fructose with 10 μM CB. Statistical analyses were evaluated by Student's *t*-test. "ns" indicates no significant difference, an asterisk indicates a significant difference (* $P < 0.05$, ** $P < 0.001$). A: $P = 0.0006$, B: $P = 0.0007$, C: $P < 0.0001$, D: $P = 0.0023$.

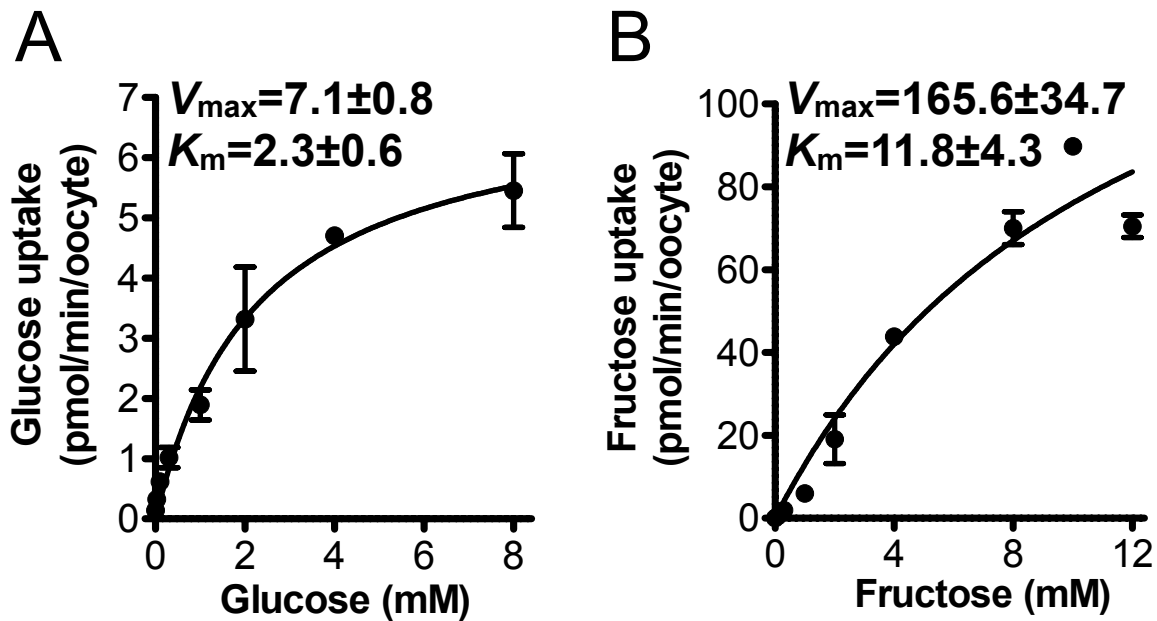


Fig. 2-7 Analysis of the kinetics of NIST6 for glucose (A) and fructose (B).

Oocytes expressing NIST6::AcGFP1 were incubated with various concentrations of radioisotope-labeled sugars for 20 min. Data were fitted to the Michaelis–Menten equation. Five oocytes were used for each assay. Endogenous transport activities in *Xenopus* oocytes were subtracted from NIST6::AcGFP1 net activities. Error bars represent standard error ($n = 3$).

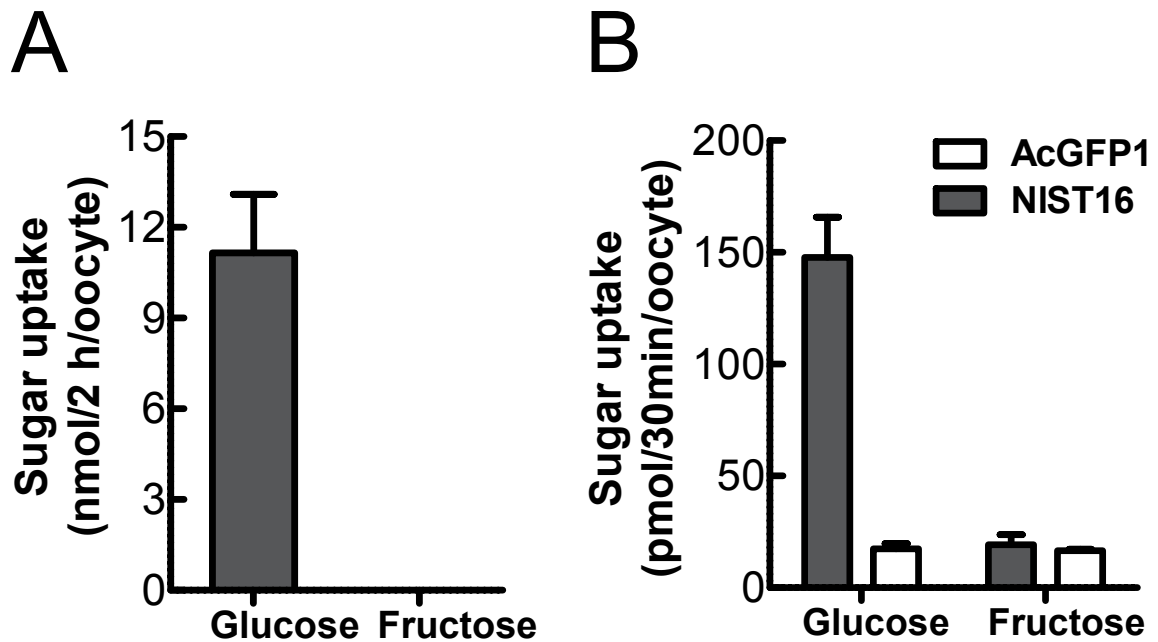


Fig. 2-8 Sugar uptake analyses of NIST16 using HPLC and radioisotope-labeled sugars.

Transporters were expressed in the cellular membrane of *Xenopus* oocytes by injecting cRNA of *Nist16*. Error bars represent standard error ($n = 3$). Five oocytes were analyzed in each assay. A: HPLC analyses; Sugar uptake assays were examined, NIST16-expressing oocytes were incubated with 105 mM sugar solutions for 2 h at 20 °C. Endogenous transport activities of *AcGFP1* cRNA injection were not detected using HPLC. B: Radioisotope tracer analyses; Sugar uptake assays using radioisotope were performed in 1 mM ^{14}C -glucose or ^{14}C -fructose solutions for 30 min at 20 °C. The white bar represents the endogenous transporter activity in oocytes expressing *AcGFP1* cRNA.

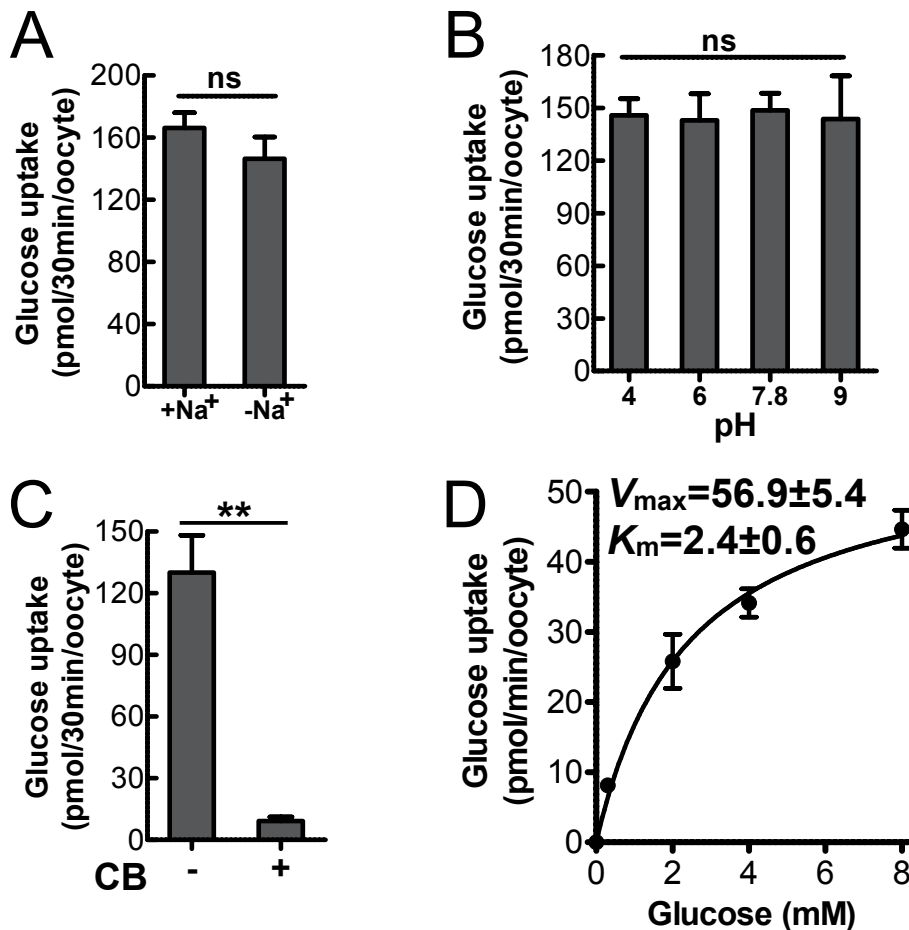


Fig. 2-9 Characterization of NIST16.

NIST16 was expressed in the cellular membrane of *Xenopus* oocytes. The endogenous transport activities of *Xenopus* oocytes were subtracted from NIST16 activities. Error bars represent standard error ($n = 3$). A: The effect of Na⁺ deficiency was examined in a Na⁺-free buffer (-Na⁺). B: The pH dependency was examined across a range of pH values. C: An inhibition assay was performed using cytochalasin B (CB). D: Analysis of the kinetics of NIST16 for glucose. A and C: Statistical analyses were evaluated by Student's t-test. B: Statistical analyses were evaluated by one-way ANOVA. "ns" indicates no significant

difference, an asterisk indicates a significant difference (** $P < 0.01$). A: $P = 0.3095$, B: $P = 0.9942$, C: $P = 0.0026$.

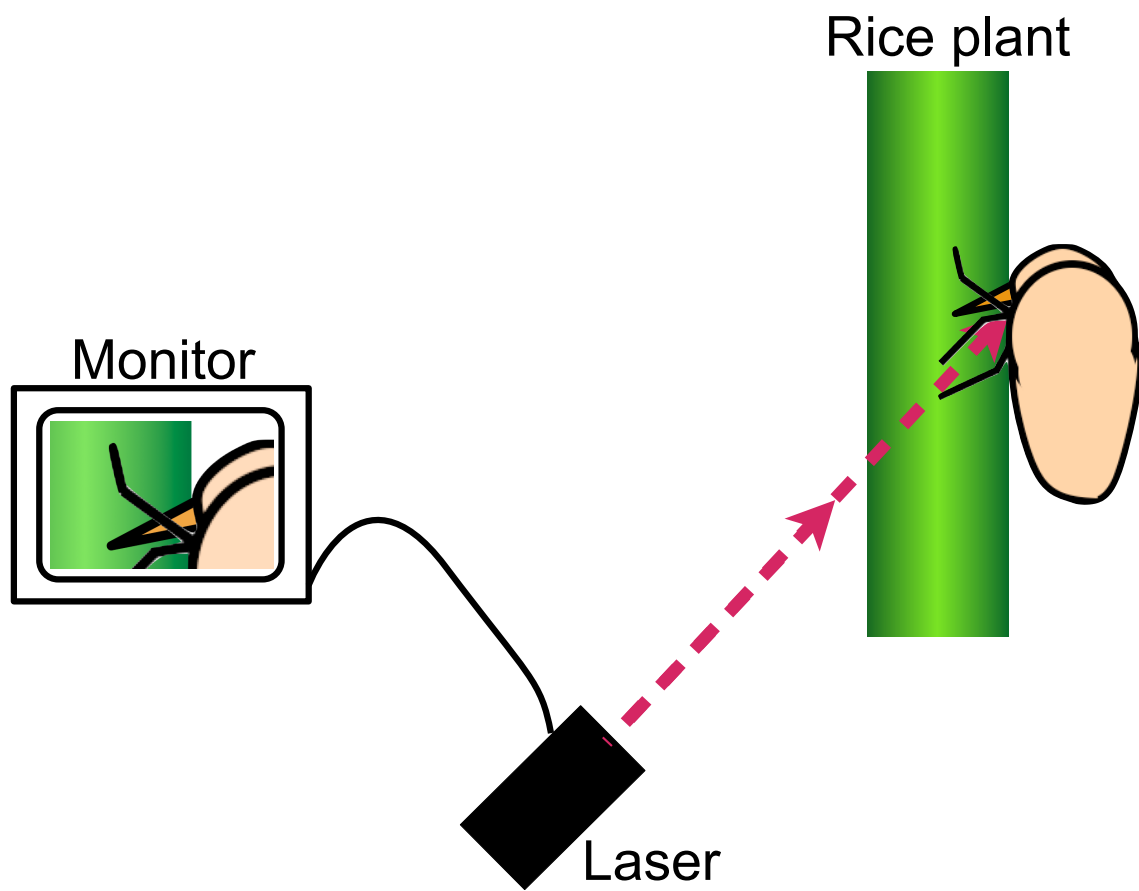


Fig. 2-10 Insect laser microdissection system.

The laser sight is fitted to the BPH stylet with monitor, and the BPH stylet was ablated using the beam of a YAG laser. The phloem-sap was collected using 2 μ l capillary tube.

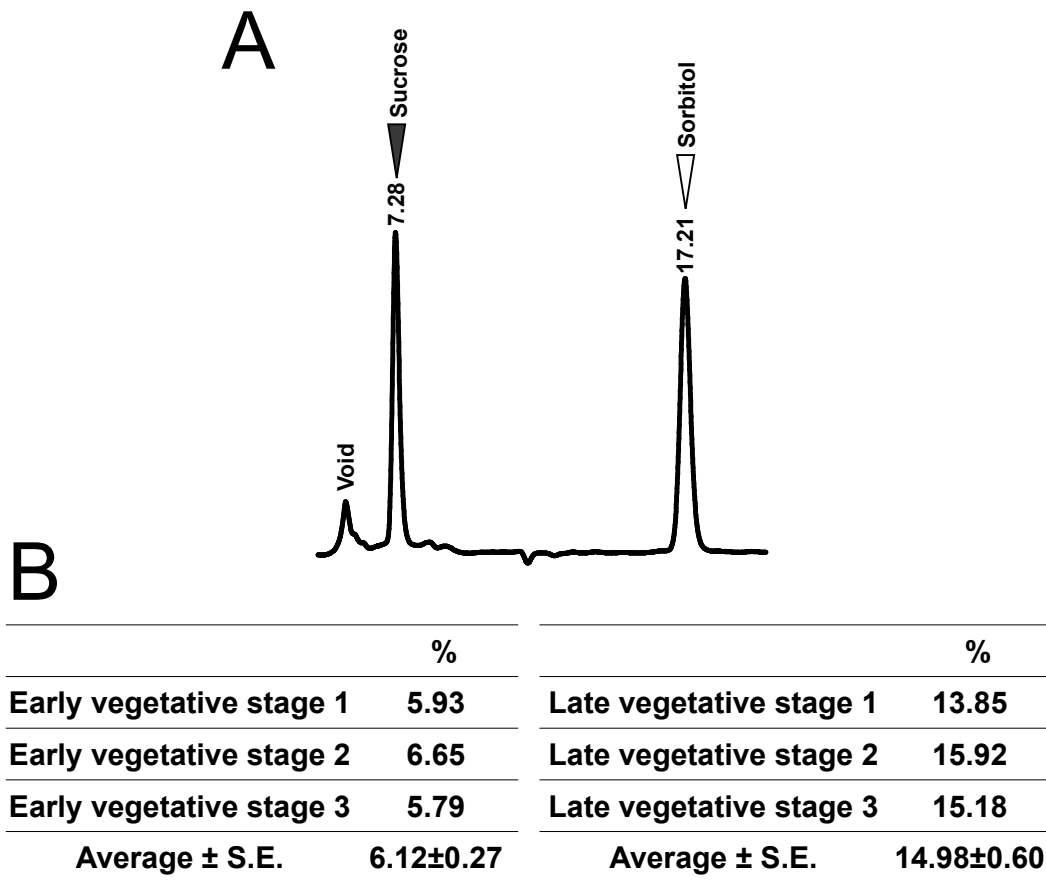


Fig. 2-11 Sugar detection and the concentrations of the rice plant phloem-sap.

A: HPLC chromatogram chart. Black arrowhead shows the sucrose peak, and white arrowhead shows sorbitol peak as an internal standard control. The numbers represent the retention time. B: The concentration of the sucrose. The concentration was measured in independent 3 samples (1–3). Early vegetative stage shows 3–5 leaf stages. Late vegetative stage shows at 37 days after seedlings.

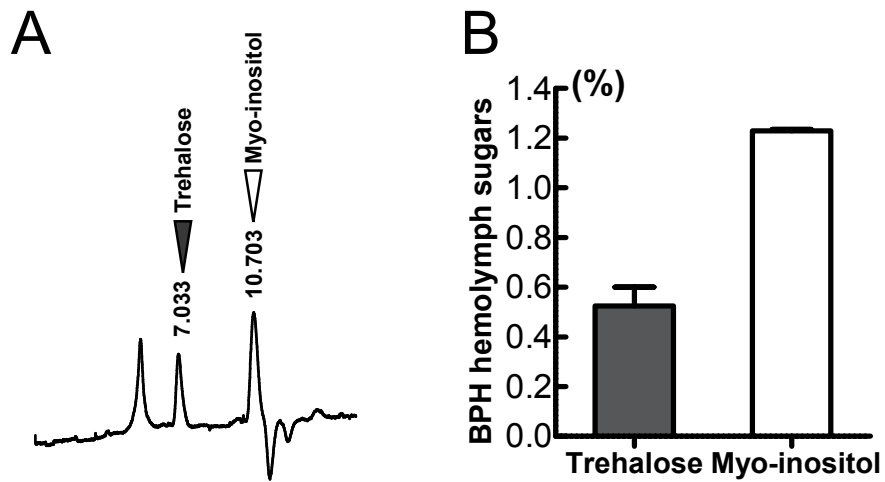


Fig. 2-12 Sugar detection and quantification of the BPH hemolymph sugars.

A: HPLC chromatogram chart for trehalose (black) and myo-inositol (white). B: Concentration of planthopper hemolymph sugars. Error bars represent standard error ($n = 3$), and each sample was collected from 10 BPH female adults independently.

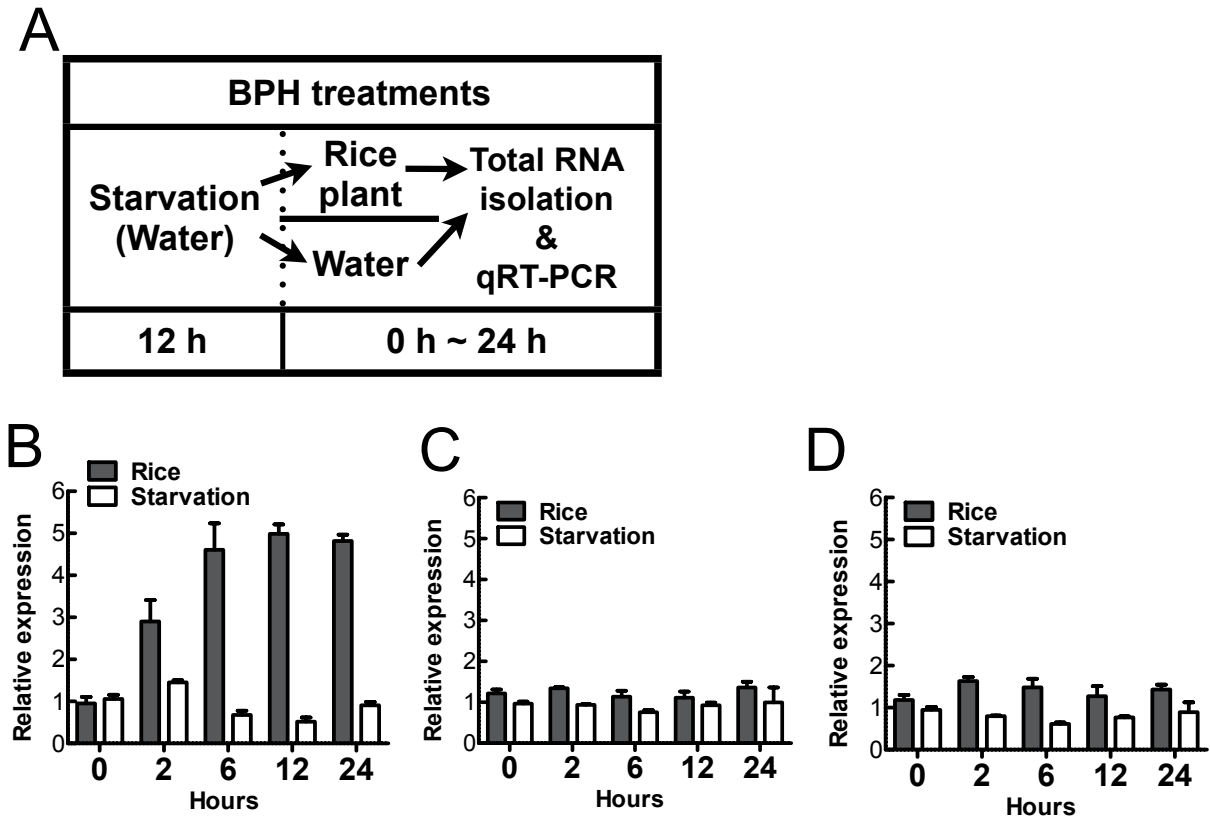


Fig. 2-13 Gene expressions of three sugar transporters in BPH feeding on rice plants and starved.

A: Schematic representation of nutrient condition. First, BPH female adults within 24 h after ecdysis were put on a water-soaked filter paper for 12 h. Second, Some BPH were put on the rice plant seedlings, another BPH populations were allowed to suck water through parafilm. Finally, total RNA of the BPH midgut were extracted at the 0, 2, 6, 12 and 24 h after feeding starts, and the gene expression was analyzed using quantitative RT-PCR. B–D: Gene expression *Nlst16* (B), *Nlst1* (C), and *Nlst6* (D) in feeding and starved conditions after 0–24 h. Error bars represent standard error ($n = 4$).

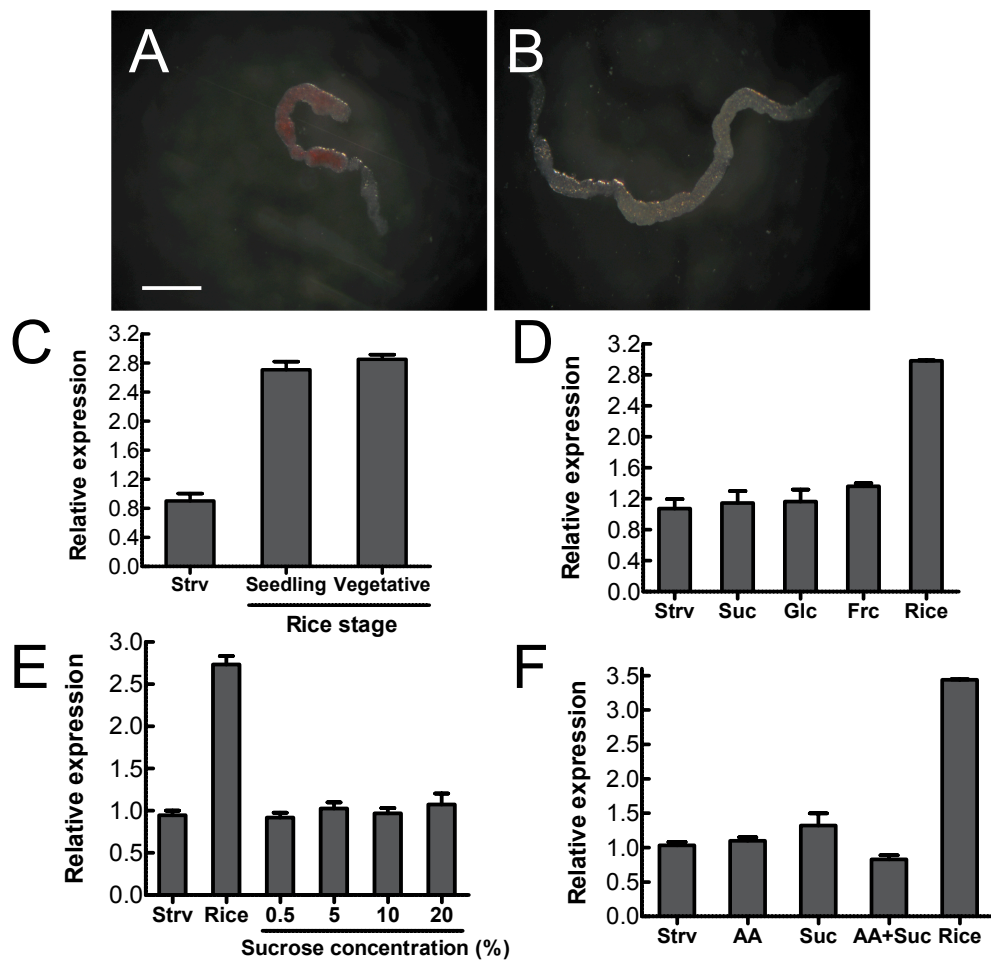


Fig. 2-14 Effect of sugars and amino acids on induction of *Nlst16* gene expression.

A, B: BPH often sucking of fluid. The 20% sucrose solution with (A) or without (B) eosin dye was given to BPH through the parafilm. Scale bar represents 500 μ m. C–F: Gene expression of *Nlst16* when BPH fed on various solutions or rice plants (Rice) for 24 h. Starvation means water supply only for 24 h (Strv). C: Effects of rice plant stages. Seedlings: the rice plant at 3 days after seedlings. Vegetative: the rice plant at the vegetative stage with 3–5 leaves. D: 20% various sugar solutions, Suc, sucrose; Glc, glucose; Frc, fructose, E: Effect of sucrose concentrations 0–20%. F: Effects of amino acids. Amino acid solution (AA) contained 1% each of aspartic acid, glutamic acid, asparagine, alanine and valine. Suc; 20 % sucrose.

第3章

脂肪体に発現するNISTトランスポーターの機能解析

緒言

多くの生物は飢餓状態におかれたとき、生き延びようとする生存戦略が備わっており、その範囲は細胞レベルでの応答から個体レベルにまで及ぶ。たとえば、飢餓状態に対して細胞レベルにおける反応の一つにオートファジーによる一過的な細胞死の回避がある (Levine and Klionsky, 2004)。オートファジーの自己消化作用によって、細胞質内に欠乏した栄養源を産生することで、新たに栄養を獲得するまで、細胞の寿命を伸ばそうとする働きがある。また、こうした生存戦略の例は、個体レベルにおいても知られている。たとえば、昆虫に寄生して昆虫体内の栄養分を摂取することで成長・発生を繰り返す昆虫病原性線虫は、栄養枯渇時に耐久型ステージへと成長し、餌がない環境下でも数ヶ月間、生き延びることが可能である (Kikuta et al., 2008; 2009)。このように、飢餓状態における生存戦略は生き延びるためのアプローチとして重要であると考えられる。

昆虫においても飢餓状態時に生体内でさまざまな因子が働き、個体の生存に影響を及ぼす。昆虫の脂肪体はヒトの肝臓に相当する組織であり、生体内の恒常性の維持に関わる重要な役割をもつと考えられている (Arrese and Soulages, 2010)。キイロショウジョウバエ *D. melanogaster* の脂肪体において、インスリン様の insulin like peptide (ILP) やグルカゴン様の adipokinetic hormone (AKH) などのシグナル伝達に関する研究が最近、報告されている (Baker and Thummel, 2007; Buch et al., 2008)。特にAKHは飢餓状態において応答を示すことが知られており、その分子機構や個体の行動について研究が行われている (Isabel et al., 2005; Kaun et al., 2008)。 *D. melanogaster* の飢餓状態において、sugar transporterの発現が誘導されることが知られているものの、トランスポーターの働きについては不明である (Baker and Thummel, 2007)。本研究の第2章では、中腸で働くトラン

スポーターを明らかにしたが、生体内へ取り込まれたグルコースやフルクトースは体液中からは検出されなかった (Fig. 2-12A)。これらの糖は脂肪体や卵巣などエネルギーが必要となる各組織へ速やかに輸送されることが示唆される。BPH sugar transporter遺伝子として推定された18遺伝子中、11遺伝子が生体内の様々な組織に発現していた。中腸以外の生体内のsugar transporterの機能を明らかにすることも、昆虫の糖輸送システムを明らかにするために重要であると考えられる。摂食と飢餓状態のBPHのマイクロアレイ解析で、飢餓状態で発現が大きく誘導された*Nist11*は脂肪体に発現していた (Fig. 1-1; Supplemental data)。このNIST11はBPHが飢餓状態の時に、特に働くと推定される。BPHが飢餓状態におかれたとき、NIST11を介して脂肪体へ糖を取り込むのか、もしくはBPHの血糖であるミオイノシトールやトレハロースが脂肪体内で合成され、NIST11を介して体液中へと排出されているのかなどいろいろなことが想定される。

結果

3-1 飢餓状態におけるNlst11の発現

摂食と飢餓条件下におけるNlst11の遺伝子発現をqRT-PCRで解析した (Fig. 3-1A)。その結果、24時間の飢餓条件で、Nlst11の遺伝子発現が大きく誘導された。糖新生時に働く酵素で、飢餓応答遺伝子として知られる*pepck*の発現をPositive controlとして検討したところ、飢餓状態での発現が高まった。

3-2 飢餓状態におけるNIST11の発現

摂食と飢餓条件下におけるNIST11のタンパク発現量をWestern Blottingで解析した (Fig. 3-1B)。その結果、24時間の飢餓状態で、タンパク量の増加が確認された。しかし、特定のタンパクが検出されただけでなく、目的のバンド位置以外にも非特異的反応が検出された。コントロールとして用いた β -tubulinと β -actinの発現を検出したところ、 β -tubulinは摂食・飢餓条件で発現差が大きく、飢餓状態で強く検出された。 β -actinの発現は β -tubulinに比べて安定的であった。また、脂肪体の組織切片上でNIST11の免疫組織化学的染色を試みたが、非特異的な反応がみられ、NIST11の局在は不明であった。

3-3 NIST11の機能解析

NIST11の機能解析はこれまでのNISTトランスポーターと同様、アフリカツメガエル卵母細胞発現系で検証した。脂肪体は血糖合成の場であることから (Wyatt, 1967; Arrese and Soulages, 2010)、BPHの血糖に着目した。BPHの血糖はトレハロースとミオイノシトールで構成されている (Moriwaki et al., 2003b; Fig. 2-12)。BPHの血糖であるトレハロースやミオイノシトールがNIST11により輸送されると推定して機能解析を行ったところ、HPLCによる検出で、これらの糖の取り込みは検出されず、NIST11により輸送される糖はグルコースとフルクトースであった (Fig. 3-2A)。次に、RI標識した糖を用いて、グル

コースとフルクトースの取り込みを調べたところ、HPLCと同様の結果が得られた (Fig. 3-2B)。NIST11が二次的能動輸送型のトランスポーターであるかどうかを検討するために、これまでの実験の解析と同様にNa⁺イオン、H⁺イオンの影響についてそれぞれ解析を行った。その結果、Na⁺イオンの有無に関わらず、NIST11によりグルコースやフルクトース共に取り込みがみられたことから、NIST11がNa⁺-sugar transporterである可能性はないと考えられた (Fig. 3-3A, B)。また、H⁺イオンの影響について調べたところ、pH値の変化に伴ってグルコースの取り込みに影響がみられた (Fig. 3-3C, D)。ただ、pH依存的な取り込みを示していたのではなかったため、pH値に対して、糖の取り込みが不安定であったと考えられた。そこで、緩衝液をTrisからMESに置き換えて実験し、HPLCを用いて、NIST11によるグルコースとフルクトースそれぞれの取り込みの追試を行ったところ、pH値による取り込みの影響はみられなかった (Fig. 3-3E, F)。さらに、NIST11はグルコースとフルクトースの両方を取り込むことが可能なため、これら互いの糖による競合が起こるかどうかを検討した。¹⁴C-グルコース量に対して、5倍量のフルクトースを添加したときのグルコースの取り込みを調べたところ、グルコースの取り込みは大きく抑制された (Fig. 3-4A)。また、同様の実験をフルクトースについても検討を行ったところ、多量のグルコースを添加した条件下では、フルクトースの取り込みも抑制された (Fig. 3-4B)。以上の結果から、NIST11によるグルコースとフルクトースの競合が起こることが示された。さらに、糖促進性グルコーストランスポーター阻害剤Cytochalasin Bの影響を検討した。阻害剤を添加したときの濃度、反応時間についてそれぞれの条件検討を行った結果 (Fig. 3-5A, B, C)、10 μMの濃度でNIST11によるグルコースの取り込みの阻害が確認された。阻害剤を添加したときNIST11によるグルコースの取り込みは大きく阻害された (Fig. 3-4C)。一方、フルクトースの取り込みにはほとんど影響がみられなかった (Fig. 3-4D)。本研究の解析により、NIST11は糖促進性グルコース/フルクトーストランスポーターであると結論した。NIST11による糖の輸送反応速度を計算したところ、グルコースの輸送は、K_m値が

17.3 ± 3.7 mMであり、 V_{max} が183.4 ± 25.9であった (Fig. 3-6A)。また、フルクトースの輸送は、 K_m 値が21.0 ± 8.3 mMであり、 V_{max} が246.4 ± 67.9であった (Fig. 3-6B)。

3-4 BPH生体内におけるNIST11により輸送されるグルコース・フルクトース

NIST11は吸汁時よりも飢餓時に発現が高く、飢餓時に働いている可能性が高い。BPHの体液中の糖の検出を試みたところ、飢餓状態においてもグルコースやフルクトースは検出限界以下の濃度で、HPLCを用いた糖の分析ではこれらの糖は検出されず、血糖であるトレハロースとミオイノシトールだけが検出された (Fig. 3-7A, B)。飢餓状態のBPHは、グルコースやフルクトースを外部から取り込んでいないため、NIST11が血中から脂肪体へこれらの糖を取り込むために機能するとは考えにくい。また、NIST11は糖促進性の輸送性質をもつことが明らかなので、高い糖濃度から低い糖濃度の方へエネルギー非依存的に糖を輸送する。濃度の低い体液中のグルコースやフルクトースをエネルギー非依存的に脂肪体内へ輸送するのは難しいと考えられる。

では、NIST11により輸送されるグルコースやフルクトースがどこから来るのか？またNIST11が飢餓状態で発現が誘導されるのはなぜか？という疑問が生じる。本研究では、NIST11が糖の濃度差を利用した輸送を行うという点に着目し、『脂肪体内に存在する糖をNIST11を介して脂肪体外へ排出する』と仮説を立てて検証した。そこで脂肪体内に存在する糖であるグリコゲンに着目した。脂肪体はほ乳類の肝臓に相当する組織であり、摂食により取り込まれた糖の一部は脂肪体へと輸送され、グリコゲンとして貯蔵される (Vardanis, 1963)。ほ乳類ではグリコゲンは栄養が必要な状態になると、グルコースに分解されて肝細胞から排出される (Thorens et al., 1990; Guillam et al., 1998)。そこで、BPHを飢餓状態においたときにグリコゲンの分解が行われているかどうかを調べるために、グリコゲンとグリコゲン分解産物であるグルコース・グルコース6リン酸量の定量を行った (Fig. 3-8)。

まず、比色定量法でBPHの糖の検出が可能かどうかをBPH虫体を用いて解析したところ、グリコゲン量ならびにグルコース・グルコース6リン酸量の計測が問題なく行えた (data not shown)。次に摂食・飢餓状態に24時間おいたBPHの脂肪体の一部を摘出してこれらの糖の検出を行った。飢餓状態においてグリコゲン量の減少がみられたので、グリコゲンの分解が示唆された (Fig. 3-9A)。さらに透過型電子顕微鏡により、グリコゲン顆粒を観察したところ、摂食時にはみられた脂肪体中のグリコゲン顆粒は24時間の飢餓状態ですべて消失していたことから (Fig. 3-9B, C)、BPHの脂肪体中のグリコゲンは飢餓状態において分解されることが明らかとなった。次に、グリコゲン分解産物の一つであるグルコースとグルコース6リン酸に着目した。グルコース6リン酸は単独では測定できなかったため、グルコース6リン酸とグルコースの合計を測定し、グルコースは別に測定した。グリコゲンの分解により産生されたグルコース6リン酸は脂肪体内において増加すると考えられたが、グルコース6リン酸量は摂食・飢餓状態共に安定であった (Fig. 3-9A)。このことからグルコース6リン酸は別の糖に変えられるために、脂肪体内のグルコース6リン酸量が増加しない可能性が考えられた。そこでNIST11によりグルコース6リン酸から作られたグルコースが排出される可能性を考えた。

NIST11を発現させたアフリカツメガエル卵母細胞を用いて、グルコース排出活性があるかどうかを検討した。ラジオアイソトープトレーサー実験で糖を含む溶液中にNIST11を発現させた卵母細胞を置き、糖を取り込んだ卵母細胞から外側への排出があるかどうかを調査した。その結果、NIST11によりグルコースとフルクトースの排出が確認された (Fig. 3-10A, B)。しかし、この実験ではカエル卵母細胞に内在しているsugar transporterによりグルコースが排出された可能性も否定できない。そこで、NIST11を発現している卵母細胞と発現していない卵母細胞とでグルコースの排出を比較した。NIST11を発現させないと卵母細胞内へあらかじめ糖を取り込ませることができないので、グルコースをそれぞれの卵母細胞 (NIST11あるいはAcGFP1を発現させた) にインジェクションした。そして時間経

過とともに、卵母細胞内のグルコース量をHPLCで測定したところ、明らかにNIST11を発現させた卵母細胞で排出が認められた (Fig. 3-10C)。

脂肪体内からグルコースを排出する際、脂肪体外には、0.1–0.5% トレハロースと1.2% ミオイノシトールが体液中に存在し (Fig. 3-7A, B)、これらの糖によって、糖の濃度勾配に障害が起きてグルコースの排出に影響がある可能性も考えられるので、この条件下におけるグルコースの排出を検討した。NIST11を発現させた卵母細胞を3時間、グルコース溶液に浸漬し、卵母細胞内に十分にグルコースを取り込ませた後、グルコースを含まないバッファに卵母細胞を移動させた。生体内の体液中の環境を再現するために、バッファ中に血糖と同濃度のトレハロース、ミオイノシトールを入れ、グルコースを取り込ませたNIST11発現卵母細胞を移動させたときの卵母細胞内のグルコース含量と比較した。その結果、バッファ中にトレハロースやミオイノシトールが存在する環境においても、まったく含まない環境と同様に、時間経過に伴って卵母細胞内のグルコース量が減少した (Fig. 3-10D)。以上のことから、NIST11はグルコースを排出する機能をもっていることが示唆された。

次に *Nlst11* double strand RNA (dsRNA) をインジェクションしたRNAi個体を用いて解析を行った。dsRNAをインジェクションした24時間後に、さらにBPHを飢餓状態においたときのmRNA量をrealtime PCRで測定したところ、*Nlst11* dsRNAをインジェクションしたBPHにおいて、*Nlst11*の発現上昇が抑制された (Fig. 3-11A)。BPHではRNAiにより遺伝子発現が数パーセント以下に抑えられることが他の遺伝子でも示されている。またタンパク量をWestern blottingで解析したところ、*Nlst11*_RNAi BPHでは飢餓状態でのNIST11の発現抑制が確認された (Fig. 3-11B)。そこで*Nlst11*_RNAi BPHにおける脂肪体中のグリコゲン、グルコース6リン酸、グルコース量の測定を行った。コントロールとして用いた *EGFP* dsRNAをインジェクションしたBPHを摂食・飢餓状態においたときの脂肪体中のグルコース6リン酸・グルコース量には変化がみられず (Fig. 3-11C)、Fig. 3-9Aのデータを再現していた。一方、*Nlst11*_RNAi BPHを摂食・飢餓状態においたときの脂肪体中のグル

コース6リン酸・グルコース量を測定したところ、脂肪体内のグルコース6リン酸量が増大し、グルコースはほとんど検出されなかった (Fig. 3-11D)。BPHの飢餓状態にグルコースがどのように産生されるかは明確ではないが、RNAiによりグルコース6リン酸が蓄積していることが明らかとなった。脂肪体で発現しているその他のトランスポーターについて、飢餓状態時での発現量を調べたところ、大きく発現が誘導されるトランスポーター遺伝子は見出されなかった (Fig. 3-12)。脂肪体内のグルコースは、ヘキソキナーゼ活性によりグルコース6リン酸へと変えられ、脂肪体からグルコースの流出を防ぐことが知られており、RNAi個体ではグルコースやフルクトースの排出が不十分でグルコース6リン酸として蓄積したのかもしれない。

考察

BPHが飢餓状態におかれたとき、発現が誘導される脂肪体のNIST11は糖促進性グルコース/フルクトーストランスポーターであった。アフリカツメガエル卵母細胞を用いた解析から、NIST11は糖の取り込みと排出を行うトランスポーターであることが明らかとなった。NIST11の飢餓状態においてグルコースを排出する生理的な役割はほ乳類の肝細胞に発現するGLUT2に相当する機能をもつと推定される (Thorens et al., 1990)。NIST11とGLUT2は共に糖促進性グルコース/フルクトーストランスポーターであり、非常に高い輸送活性をもつことから、これらのトランスポーターの生理的な役割は似ていると考えられる。しかし、NIST11とヒトGLUT2間のアミノ酸配列の相同性は、6.9% identity、28.9% similarityと低かった (Fig. 3-13A)。また、BPHの中腸に発現するグルコーストランスポーターNIST1とNIST11とのアミノ酸配列の相同性は、44% identity、68.4% similarityの相同性であり (Fig. 3-13B)、NIST11はヒトGLUT2よりもBPHのsugar transporterの配列と似ていた。さらに、ほ乳類のGLUT2やフルクトーストランスポーターGLUT5、昆虫のsugar transporterのアミノ酸配列を用いて遺伝子系統樹を作製したところ、ほ乳類のsugar transporterと昆虫のそれとは、別の系統に分かれた (Fig. 3-13C)。このように、ほ乳類のsugar transporterと昆虫のsugar transporterは同様な生理学的な役割をもつとしても、アミノ酸配列が大きく異なる。既に機能解析や輸送活性が明らかとなっているほ乳類のGLUTファミリーのアミノ酸配列の特徴から、昆虫のsugar transporterの機能を推定することは困難であろう。

昆虫ではグリコゲンを分解し、グルコース6リン酸を介してトレハロースが合成されるが (Wyatt, 1967; Mitsumasu et al., 2010)、糖新生、すなわち飢餓状態の過程にグリコゲンからグルコースが産生されることはあまりよくわかっていない。ほ乳類で糖新生の最終過程において、グルコース6リン酸からグルコースを産生するためには、グルコース 6-ホスファターゼという酵素の働きが必要となることが明らかとなっているが (Hutton and

O'Brien; 2009)、昆虫では*D. melanogaster*以外では見つかっておらず、BPHではグルコース 6-ホスファターゼ様遺伝子は推定されているものの、その機能は未知である。したがって現在のところ、飢餓状態でグルコースが作られ、NIST11を介してグルコースの排出があると結論づけるための十分なデータは揃っていない。

また、ほ乳類で脂肪体細胞や肝細胞でグルコースを産生するためには、細胞内でグルコース6リン酸が小胞体へ輸送されグルコースへと作り替えられることが必要とされているが、小胞体膜上のSugar transporterはほ乳類においても同定されていない。最近、ほ乳類の糖促進性トランスポーターGLUT1, 2, 4もしくは9が細胞膜上と小胞体膜上を循環して糖の輸送を行うことが示唆されており、小胞体膜特異的sugar transporterの存在が低いとも考えられるようになってきている (Takanaga and Frommer, 2010)。脂肪体におけるNIST11の局在部位は明らかにすることができなかったが、NIST11が小胞体膜上でグルコースやフルクトースを輸送する機能を有する可能性も考慮する必要がある。

昆虫は血糖を介して栄養供給を行うことが知られており (Wyatt, 1967)、ほとんどの昆虫の主要な血糖はトレハロースであるので、飢餓状態時に積極的なトレハロースの産生・体液への排出が行われていると考えられるが、飢餓状態時のBPHでは、トレハローストランスポーター遺伝子*Nist8*の発現に変化はみられなかった (Fig. 3-12)。また、飢餓開始6時間でBPHの体液中で検出されるトレハロース量は大きく低下した (Fig. 3-7A)。鱗翅目の昆虫であるタバコスズメガ幼虫 *Manduca sexta*は、9時間の飢餓で、体液中のトレハロース量が増加し、飢餓開始48時間においても、劇的なトレハロース減少はみられない (Siegert, 1987)。飢餓状態のカイコにおいても、血中トレハロースの大きな変化はみられていない (Satake et al., 2000)。これらの昆虫では飢餓状態時に脂肪体中のグリコゲンが分解されトレハロースが産生されて、血中のトレハロースの濃度が維持されていると考えられる。これらの結果から、BPHは他の昆虫にみられるような飢餓状態時のトレハロースの維持が十分行えていない可能性があり、血中に存在するトレハロースを速やかに消費して、生体内に不足する栄養源を供給しているのかもしれない。BPHの血糖中にはトレハ

ロースだけではなくミオイノシトールも検出される。ミオイノシトールを血糖にもつ昆虫はこれまで知られておらず、ウンカ類に特徴的な血糖である可能性が高い。BPHを飢餓状態においたとき、ミオイノシトール量は非常に安定的であったため (Fig. 3-7B)、グリコゲンが分解され、ミオイノシトールが輸送されるとも考えられる。また、摂食・飢餓状態のマイクロアレイ解析の結果から、一部のミオイノシトール合成酵素の発現が高く誘導されたことから、BPHの生体内においてミオイノシトールを介した栄養供給があるとも推定されるが、現在のところ、ミオイノシトールトランスポーターは同定されていない。ミオイノシトールはグルコースやトレハロースと同様にグルコース6リン酸を基質として産生される。BPHにおいてミオイノシトールを介した栄養供給があると仮定すると、ミオイノシトール分解酵素が各組織に存在し、ミオイノシトールを分解することでエネルギーを得ていると考えられるが、このような酵素は同定されていない。BPHの主要な血糖であるミオイノシトールはどのような役割があるのかなどを含めた飢餓状態における生体内の糖輸送の解明は今後の課題である。

材料と方法

1 昆虫

これまでの材料と方法に準じた。

2 摂食と飢餓状態の条件

羽化後24時間以内のメス成虫に播種3日後のイネの芽出し苗を与えた区画を摂食条件区とした。1つの試験管に5粒のイネ種子 (コシヒカリ) を発芽させ、3頭のBPHを接種した。一方、水で湿らせたろ紙 (1 cm × 9 cm) を与えた区画を飢餓条件区とした。

3 RNA抽出

メス成虫の脂肪体 (特に成虫脂肪体と呼ばれる組織) からtotal RNAをRNeasy Mini kit (Qiagen) で抽出した。

4 Quantitative RT-PCR

qRT-PCRは本論文第1章材料と方法5に準じた。プライマー配列はTable 1-4, 3-1に示した。

5 タンパク抽出

氷冷したホモジナイズバッファ (組成はSupplemental dataに示した) にBPHを5頭入れてペッスルですり潰した。800 g、10 min、4 °Cで遠心し、上清を回収した。この上清を氷冷しながら、超音波破碎 3秒 × 5回を行い、5 min氷上で保存した。その後、15000 g、30 min、4 °Cで遠心した。氷冷したホモジナイズバッファをペレットに加え、一部をタンパク定量に使用した。タンパク量の測定はタンパクアッセイキットに準拠した (BioRad)。595 nmの吸光度をマイクロプレートリーダー (BioRad) で分析した。サンプル液量に対して1/4量のSDSを含むサンプルバッファを加え、40 °C、10 minインキュベ-

シオンした。その後、15000 g、15 min、4 °Cで遠心して得た上清をタンパクサンプルとした。

6 Western Blotting

10%アクリルアミドゲルを用いて、スラブゲル電気泳動装置 (ATTO) を用いてSDS-PAGEを行った。セミドライ式ブロッティング装置 (BioRad) で、メタノール浸漬したPVDFメンブレンに展開したゲルを転写した。転写は15 Vで38 minで行った。メンブレンはTBS-Tweenに溶解した0.5%ブロッキング剤 (GE Healthcare) に一晩浸した。一次抗体処理し、TBS-Tweenで洗浄後に二次抗体処理を行った。ECL Plus (GE Healthcare) を用いて、ゲル撮影装置 (FAS 1000, Fuji film) で二次抗体を検出した。抗原はNIST11の細胞質側に露出しているN末端MVTEKNLETAAYGETIICとC末端CDELGGKKPELQLYDTKNのペプチドを合成した。抗NIST11ポリクローナルペプチド抗体はウサギを用いて作製した。免疫前血清を用いた場合、反応はみられなかった。コントロールの抗 β -actin、 β -tubulinについては、マウスやヒトのアミノ酸配列とBPHのactinとtubulinとの相同性が非常に高く、交差性があると考えられたので、マウスで作製されたモノクローナル抗体 (Monoclonal Anti- β Tubulin-FITC, Anti- β Actin-FITC, SIGMA-ALDORICH) を用いた。

7 cRNAの作製

cRNAの作製法は本論文第2章材料と方法6に準じた。*Nist11*遺伝子特異的プライマーはTable 3-2に記載した。

8 アフリカツメガエル卵母細胞膜上へのトランスポーターの発現

アフリカツメガエル卵母細胞の細胞膜上へNIST11を発現させる方法は本論文第2章材料と方法7に準じた。

9 トランスポーターアッセイ

NIST11による糖の取り込み実験は本論文第2章材料と方法8に準じた。

10 脂肪体中のグリコゲン、グルコース、グルコース6リン酸の定量

羽化後24時間以内のメスBPHを摂食・飢餓条件に24時間おき、成虫脂肪体を摘出した。1区画につき、10頭分ずつのBPHを用意し、生物サンプルは独立に3回分用意した。グリコゲン量、グルコース量、グルコース6リン酸量は比色定量法で計測し、それぞれの手法はプロトコルに準じた (SIGMA, Glycogen assay kit, Glucose reagent, Glucose (GO) assay kit)。補正のためにタンパク量の定量を同時に行った (Protein assay kit, BioRad)。糖の検出までのプロセスをフローチャートに示した (Fig. 3-8)。統計処理は、2区間の比較にはStudent's t-testで評価し、多重比較検定のために一次分散分析 (one-way ANOVA) で全体に有意な差がみられた場合、さらにTukey's testを行った (Prism 5)。

11 透過型電子顕微鏡 (TEM) による脂肪体中のグリコゲン顆粒の観察

TEMを用いて飢餓状態においたBPHの脂肪体のグリコゲンの分解を確認した。(1) 羽化24時間以内のBPHメス成虫に対して、摂食・飢餓条件処理を24時間行った。頭部を切除後、胸部と腹部を開いて、前固定処理を行った。(2) 前固定処理は、リン酸緩衝液 (PBS) を用いた2.5% グルタルアルデヒド液に、サンプルを入れて90 min浸漬固定した。その後、PBSで洗浄を繰り返し、4 °C条件で12時間以上、保存した。(3) 次に、サンプルを2% オスミウム液に入れ、2時間後固定した。(4) 脱水処理では、70%、80%、90%、95%、100% エタノールをそれぞれ10 minの間隔で常温下で取り替えた。さらに100%エタノールに入れた後、冷やしたプロピレンオキシドにサンプルを入れて、4 °C条件で10 min、2回処理した。その後、水溶性樹脂Quetol-651に浸漬した。(5) 樹脂 (組成はSupplemental dataで示した) とプロピレンオキシドを1:1で混合した液に、サンプルを浸漬し、常温で1時間、インキュベートした。その後、樹脂を入れ替えて、4 °C条件で12時間以上、保存し

た。包埋処理の前までに何度か樹脂を入れ替えた。(6) 包埋処理のために、60 °C条件で、2日間インキュベートした。(7) 包埋した試料はトリミングを行い、ガラスナイフを使ってウルトラミクロトーム (LKB) で切片を作製し、顕微鏡下で脂肪体を確認し、さらに余分な部分のトリミングを行った。(8) ウルトラミクロトームで、シルバーまたはシャンパンゴールド色の超薄切片を作製し、フォルムバール支持膜を貼ったグリッド上に回収した。(9) 2% 酢酸ウランで20–25 °C条件下で15 min、染色した。次に水でよく洗浄し、鉛溶液で重染色した。処理後、水でよく洗浄し、TEM (JEM-1010, 日本電子, Japan) で観察した。

12 double strand RNA (dsRNA) の作製

Nlst11 dsRNAはORFを含んだpGEM-TベクターのcDNAをテンプレートとして、T7 RiboMAX™ Express RNAi system (Promega) を用いて作製した。それぞれのプライマーをTable 3-3に示した。

13 RNAi

1000 ng/μlの*Nlst11* dsRNA液を羽化後24時間以内のBPHメス成虫の胸部と腹部の間の節間に Eppendorfのインジェクターを用いて、キャピラリーで注入した。インジェクション24時間後のmRNA量をqRT-PCRで解析した。dsRNA量の実験条件は*Nlst1*を用いてあらかじめ検討した (Supplemental data)。

14 BPH体液の回収

本論文第2章材料と方法4の手法に準じた。

15 摂食・飢餓条件においたBPH血糖の定量

摂食・飢餓条件に24時間おいたBPHから回収した体液を0.45 μ m PVDF フィルターカラム (Whatman) に通し、HPLCで分析した。分析法は本論文第2章材料と方法5の手法に準じた。

16 系統樹

Sugar transporter遺伝子のアミノ酸配列はNCBIから得た。*Rattus norvegicus* (Rat GLUT2; NCBI accession no. NP_037011.2)、*Mus musculus* (Mouse GLUT2; NCBI accession no. NP_112474.2)、*Homo sapiens* (Human GLUT2; NCBI accession no. NP_000331.1)、*Mus musculus* (Mouse GLUT1; NCBI accession no. NP_035530.2)、*Homo sapiens* (Human GLUT5; NCBI accession no. NP_003030.1)、*Acyrtosiphon pisum* (Aphid sugar transporter; NCBI accession no. XP_001942953.1)。アライメントをClustalWで実行し、系統樹はMEGA ver. 4 (Tamura et al., 2007) を用いて作製した。1000回のbootstrapによって評価した。

Table 3-1 Primers for realtime RT-PCR

Gene	forward primer	reverse primer
<i>pepck</i>	5'-CATACGATACGATAGAAAATCTAT-3'	5'-CCGGTTGTGGTAAAATTCAACT-3'
<i>GlyP</i>	5'-CATCTCTCCATTGTCCGGAT-3'	5'-CTCTGGAGTCATCTCGAAGA-3'

Table 3-2 Primers for capped RNA (cRNA) pT7XbG2-AcGFP1 vectors

Gene	forward primer	reverse primer
<i>Nlst11</i>	5'-	5'-
<i>plus</i>	CAGC GATAT <u>CCCACCATGGTAACTGAG</u>	CACAG GAATTC GTTCTTGGTGTCAATAAG
<i>AcGFP1</i>	AAAAATCTTGAG-3'	CTG-3'

Bold fonts represent restriction enzyme sequences.

GATATC, *EcoRV*; GAATTC, *EcoRI*

Under lines show Kozak sequences.

Table 3-3 Primers for double-strand (dsRNA) construction

Gene	forward primer	reverse primer
<i>Nlst11</i>	5'-TGCATAGGTACCTATCCATCAA-3'	5'-GCAATGTAAGTGTACAAAATGCC-3'
<i>EGFP</i>	5'-AAGTTCAGCGTGTCCGGCGA-3'	5'-GAAGTTCACCTTGATGCCGTT-3'

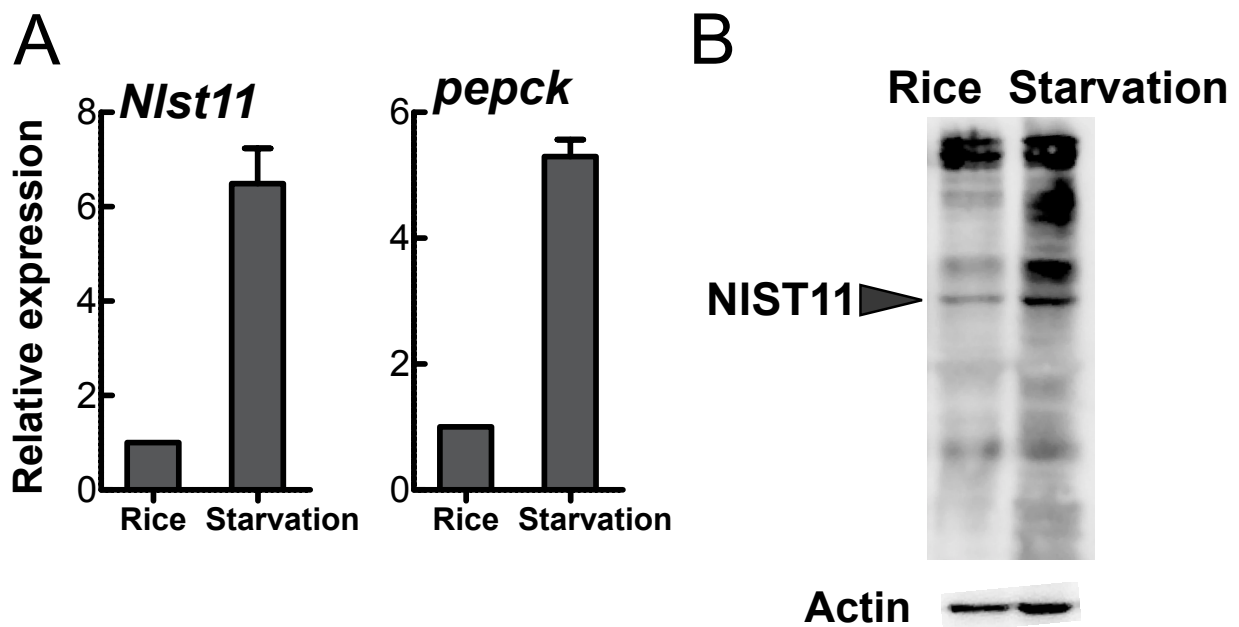


Fig. 3-1 Expression of *Nlst11* gene and NIST11 protein in BPH feeding on the rice plant or starved for 24 h.

A: Gene expressions of *Nlst11* with qRT-PCR. *RP_L4* is used as an internal standard. *pepck*, phosphoenolpyruvate carboxykinase gene is used as a positive control for starvation. Biological samples were prepared independently three times. B: Western blotting of NIST11. β -Actin of BPH was immune-detected by anti IgG against β -Actin of mouse.

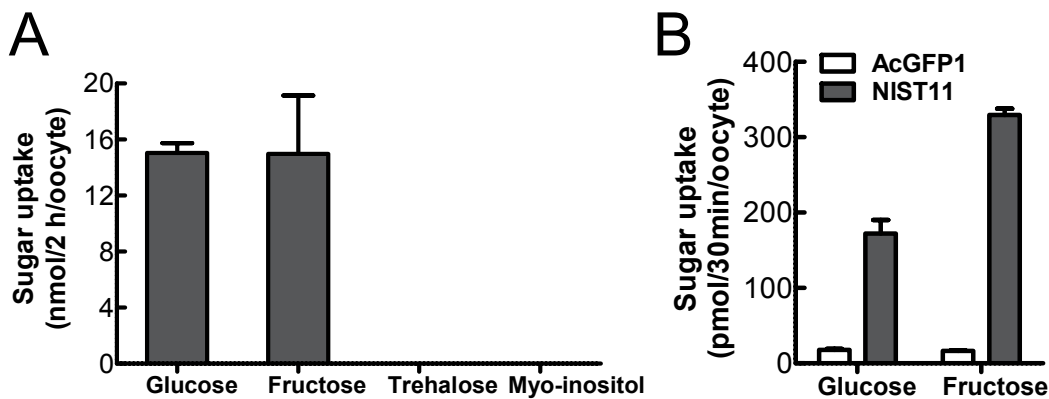


Fig. 3-2 Sugar uptake analyses of NIST11 using HPLC and radioisotope-labeled sugars.

Transporters were expressed in the cellular membrane of *Xenopus* oocytes by injecting cRNA of *Nist11*. Error bars represent standard error ($n = 3$). Five oocytes were analyzed in each assay. A: HPLC analyses; NIST11::AcGFP1-expressing oocytes were incubated with 105 mM respective sugar solutions for 2 h at 20 °C. Endogenous transport activities in the oocytes injected with *AcGFP1* cRNA were not detected using HPLC. B: Radioisotope tracer analyses; Assays were performed in 1 mM ^{14}C -glucose or ^{14}C -fructose solutions for 30 min at 20 °C. The white bar represents the endogenous transporter activity in oocytes injecting *AcGFP1* cRNA.

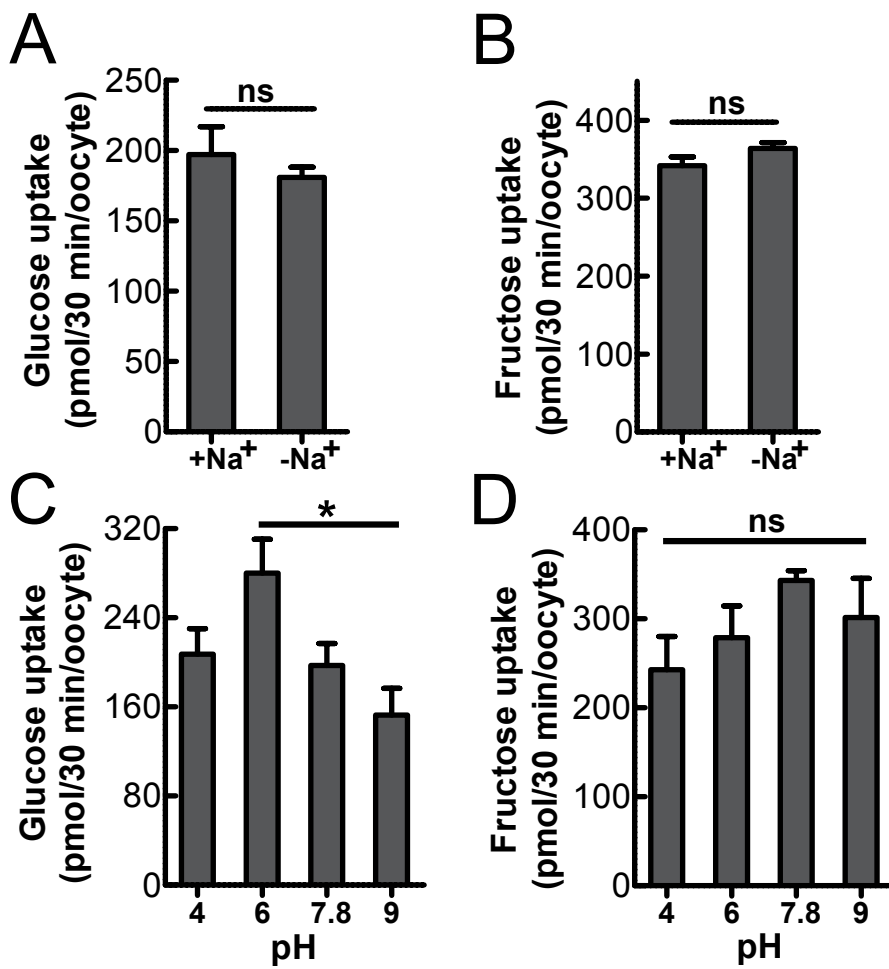


Fig. 3-3 Effect of Na⁺ and pH conditions by NIST11 sugar uptakes.

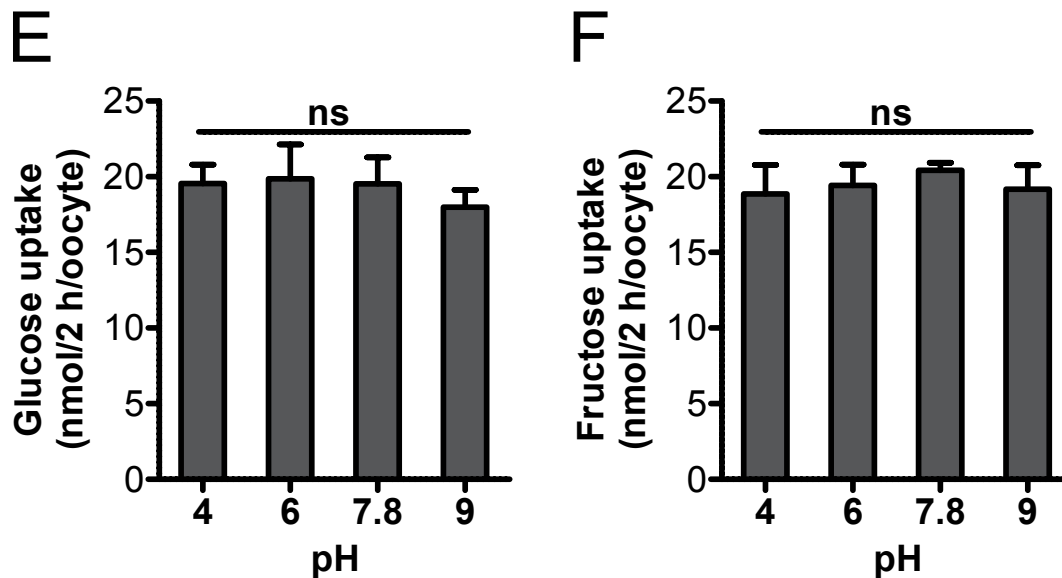


Fig. 3-3 Effect of Na^+ and pH conditions by NIST11 sugar uptakes (continued).

Glucose and fructose uptake via NIST11::AcGFP1 were examined under Na^+ and Na^+ -free conditions (A, B) and different pH conditions (C–F). A–D: Sugar uptake assays were performed for 30 min at 20 °C at a concentration of 1 mM ^{14}C -glucose or ^{14}C -fructose. Five oocytes were used in each assay. The net transport content was calculated by subtracting the endogenous transport activities of *Xenopus* oocytes. E–F: Transport activities of glucose and fructose were measured with HPLC using MBS buffer in which Tris was replaced with MES for the low pH values. Sugar uptake assays were performed with 105 mM sugar solution for 2 h at 20 °C. Error bars represent standard error ($n = 3$). A and B: Statistical analyses by Student's *t*-test. C–F: Statistical analyses by one-way ANOVA before Tukey's multiple comparison tests. "ns" indicates no significant difference; an

asterisk indicates a significant difference (** $P < 0.01$). A: $P = 0.4845$, B: $P = 0.1742$, C: $P = 0.0369$, D: $P = 0.2878$. E: $P = 0.8573$, F: $P = 0.878$.

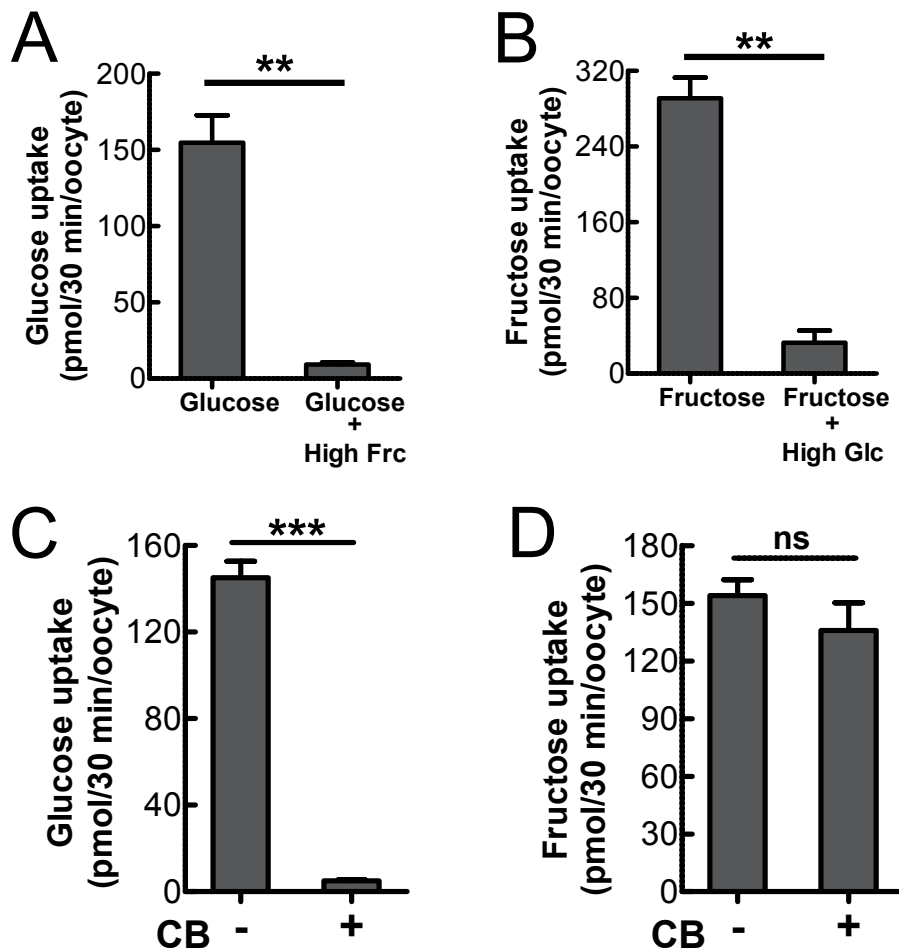


Fig. 3-4 Analyses of competition for NIST11 between glucose and fructose and of inhibition by cytochalasin B.

Experimental conditions were described previously in Fig. 3-2, 3-3. Error bars represent standard error ($n = 3$). A: ^{14}C -glucose uptake was measured in a solution containing 1 mM ^{14}C -glucose plus 5 mM unlabelled radioisotope fructose (High Frc). B: ^{14}C -fructose uptake was measured in a solution containing 1 mM ^{14}C -fructose plus 5 mM unlabelled radioisotope glucose (High Glc). C and D: Inhibitory assays with cytochalasin B (CB). *Xenopus* oocytes expressing NIST11::AcGFP1 were incubated for 30 min in a solution of

0.8 mM ^{14}C -glucose or ^{14}C -fructose with 10 μM CB. Statistical analyses were evaluated by Student's *t*-test. "ns" indicates no significant difference and an asterisk indicates a significant difference (** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$). A: $P = 0.005$, B: $P = 0.0013$, C: $P < 0.0001$, D: $P = 0.336$.

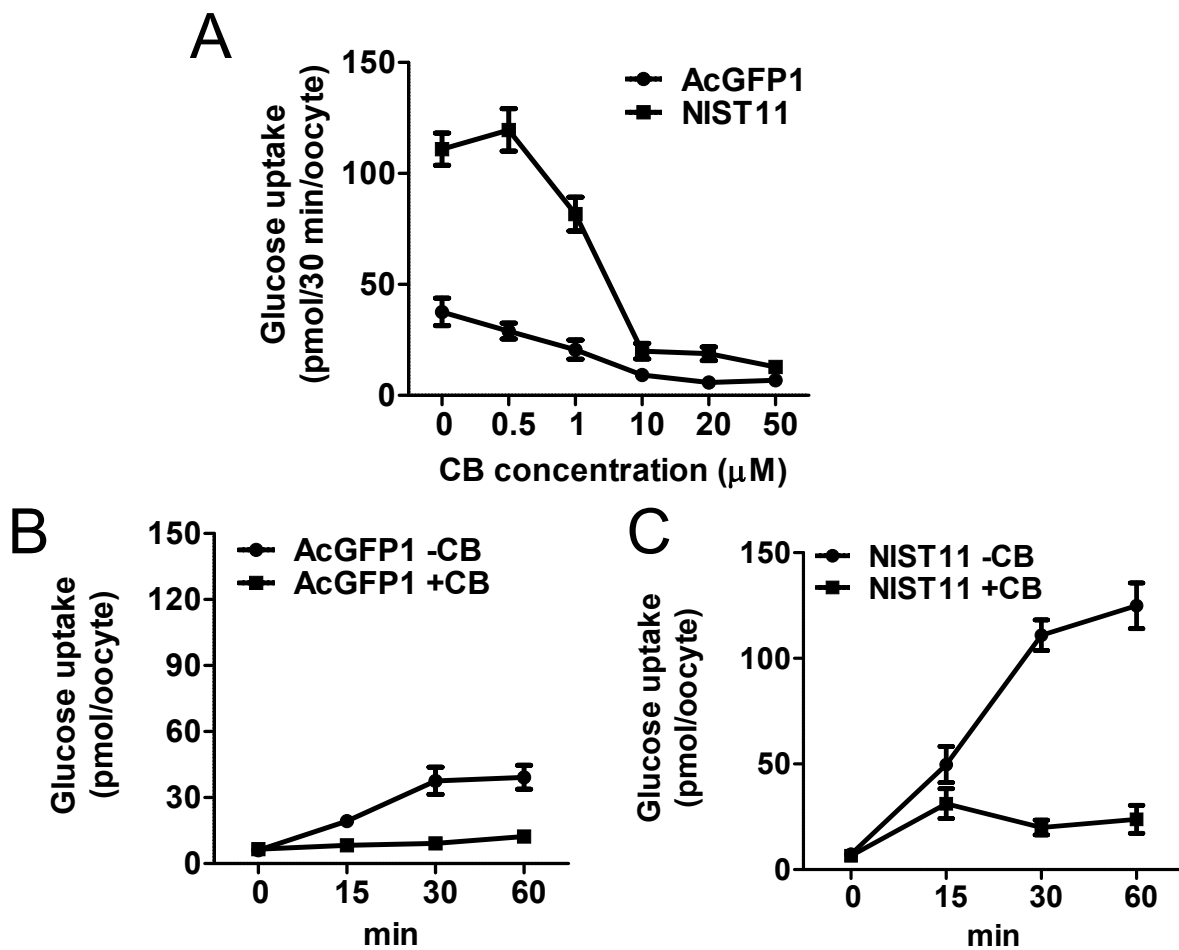


Fig. 3-5 Dose response and time course of the inhibitor, cytochalasin B (CB) for ^{14}C -glucose uptake by NIST11.

NIST11::AcGFP1-expressing oocytes were incubated in the MBS buffers contained 0.8 mM ^{14}C -glucose with various cytochalasin B. Error bars represent standard error ($n = 3$). A: For dose response analyses, the oocytes were incubated in the MBS for 30 min with various CB concentrations 0–50 μM . B, C: Time course analyses. *AcGFP1* cRNA injection oocytes were used as a negative control with CB 10 μM (B). Glucose uptake of NIST11-expressing oocytes with CB 10 μM (C).

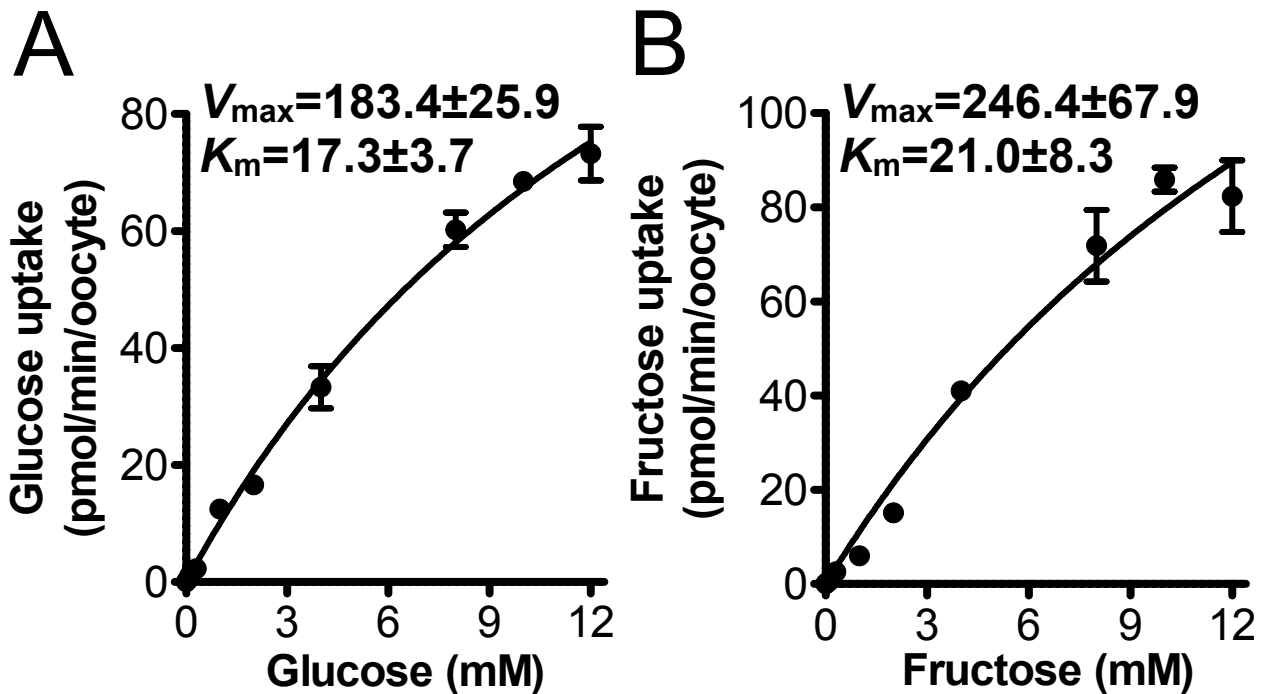


Fig. 3-6 Kinetics of NIST11 for glucose (A) and fructose (B).

Oocytes expressing NIST11::AcGFP1 were incubated with various concentrations of radioisotope-labeled sugars for 20 min. Data were fitted to the Michaelis–Menten equation. Five oocytes were used for each assay. Endogenous transport activities in *Xenopus* oocytes were subtracted from NIST11::AcGFP1 net activities. Error bars represent standard error ($n = 3$).

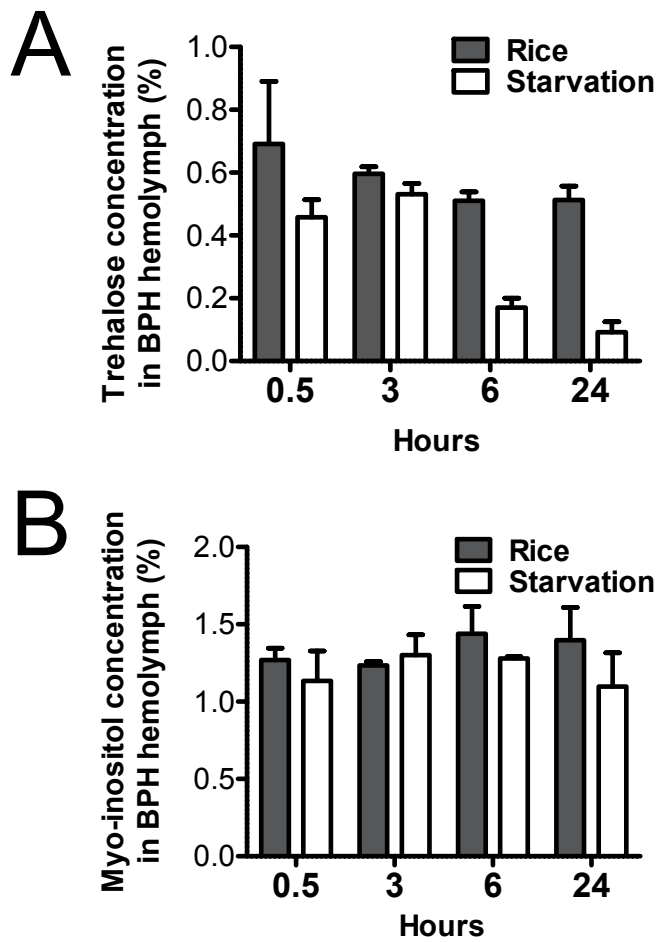


Fig. 3-7 Hemolymph sugar contents of BPH feeding on the rice plants and starved.

Trehalose (A) and myo-inositol (B) were detected using HPLC. BPH were allowed to feed on rice plant (black) or were provided only with water (white bar) after the starvation treatments for 12 h. Biological samples were prepared independently three times.

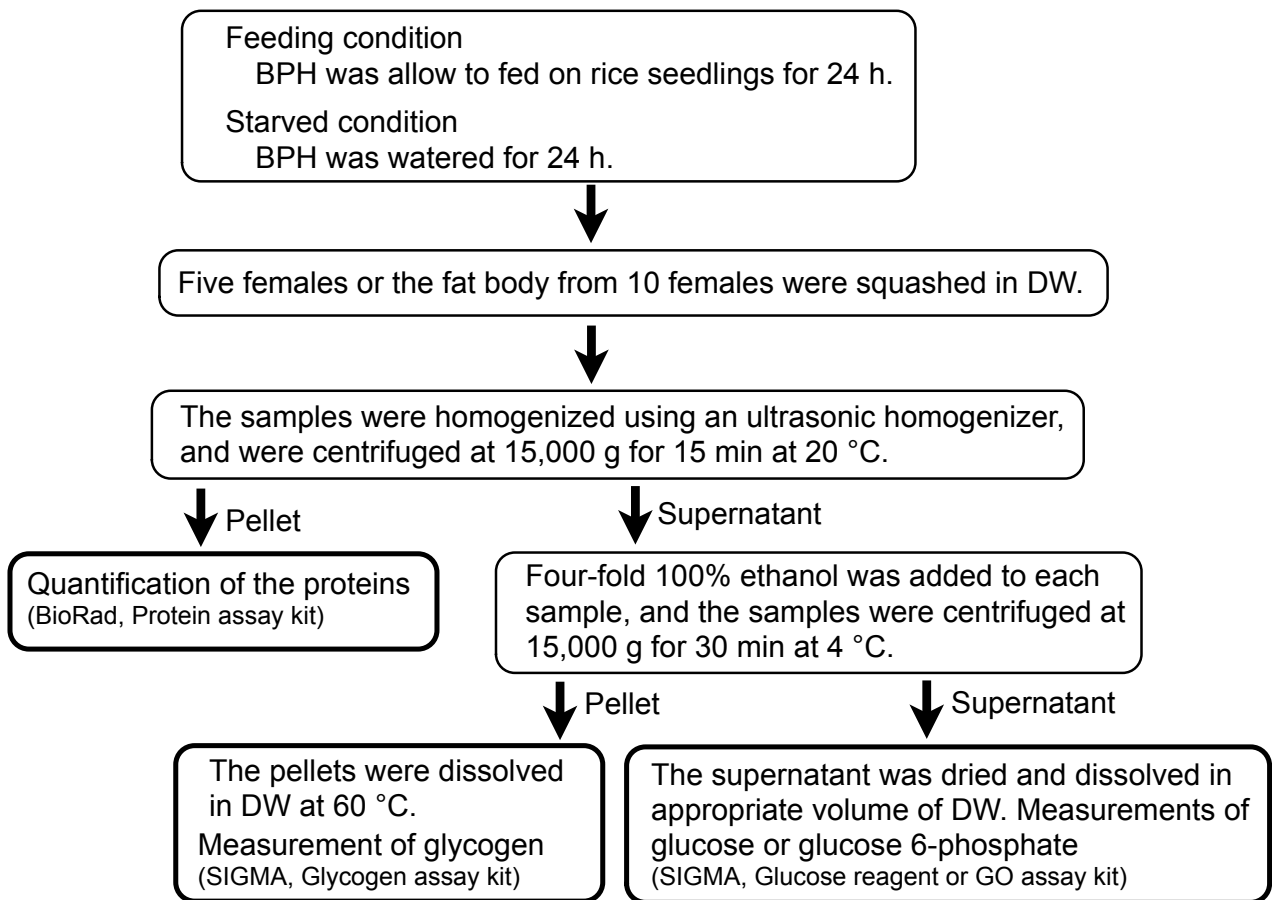


Fig. 3-8 Flowchart for the quantifications of glycogen, glucose and glucose 6-phosphate from whole-body or the fat body.

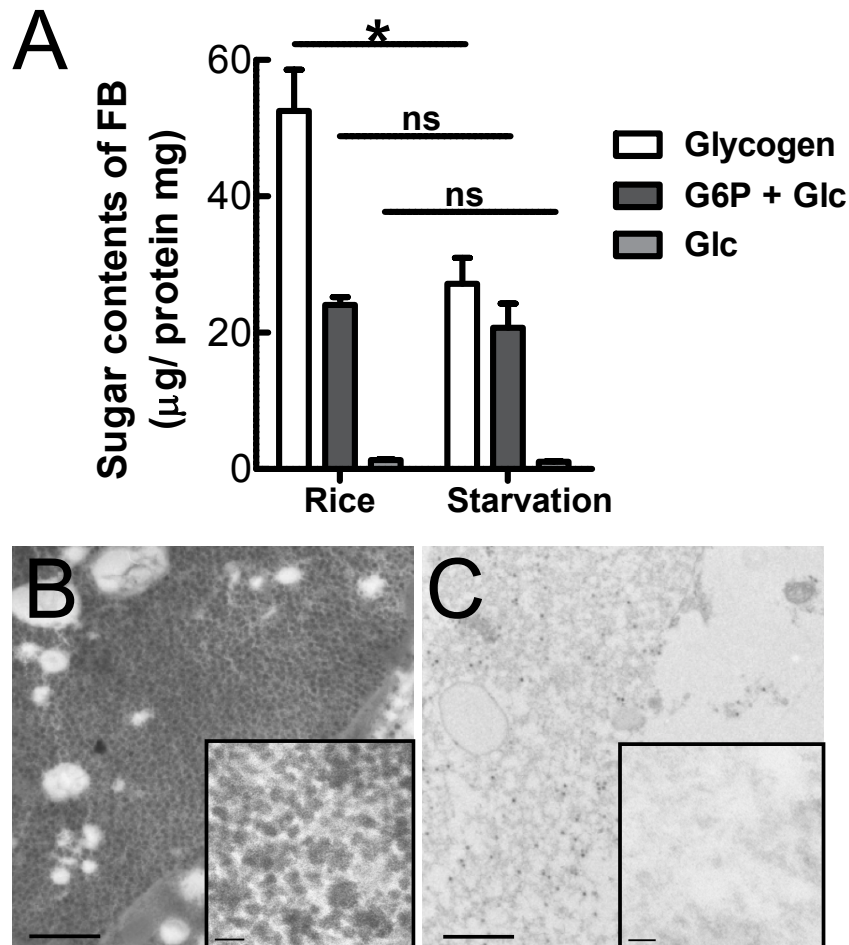


Fig. 3-9 Quantifications of glycogen, glucose 6-phosphate (G6P) and glucose (Glc), and observations of the glycogen granules in the fat body of BPH in feeding or starved condition.

A: Glycogen (white bars), G6P (black bars) and Glc (gray bars) contents in the fat body. Biological samples were prepared independently three times. Statistical analyses were evaluated by Student's *t*-test. "ns" indicates no significant difference and an asterisk indicates a significant difference ($* P < 0.05$). Glycogen: $P = 0.0240$, G6P: $P = 0.4224$, Glc: $P = 0.2189$. B-C: Scale bars represent 1 μm in large photos, and 50 nm in insets. B: Glycogen granules in feeding condition. C: Glycogen granules in starved condition.

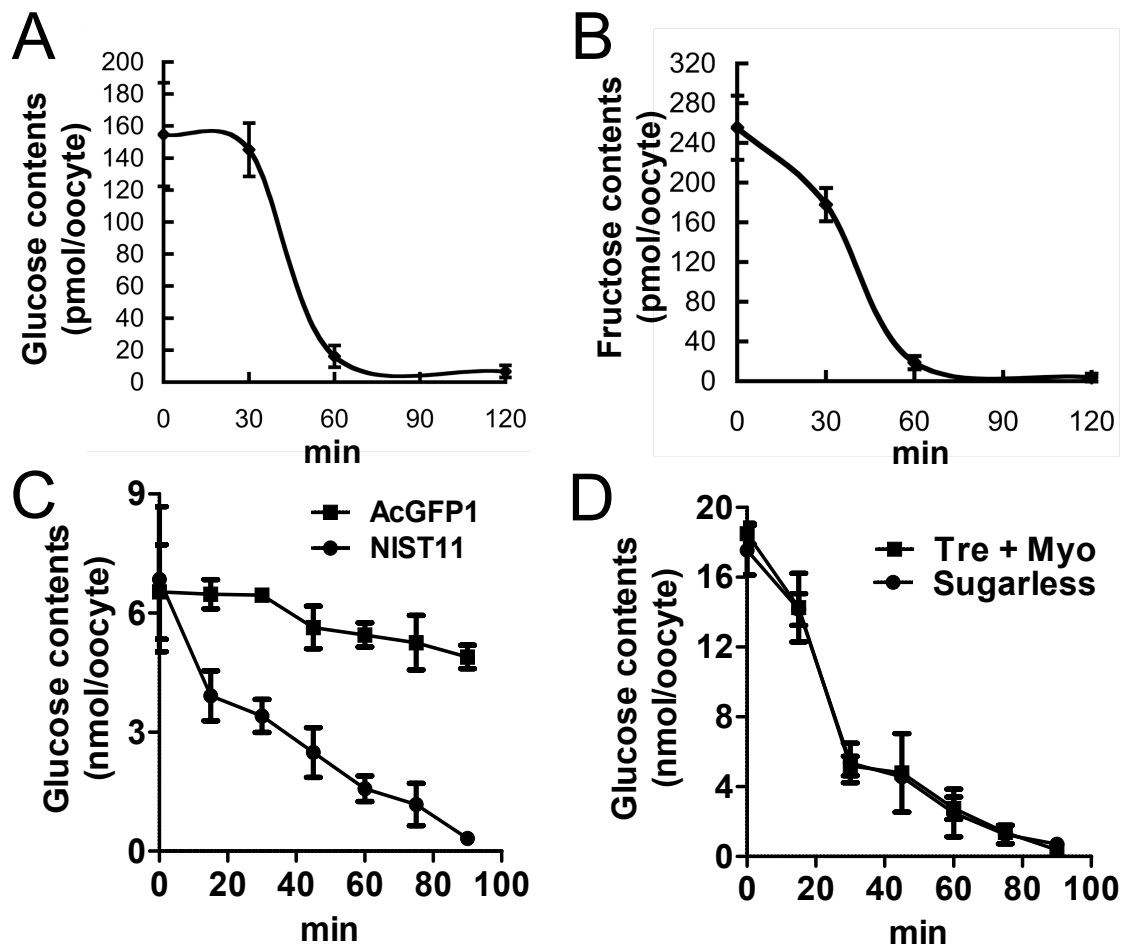


Fig. 3-10 Sugar export from *Xenopus* oocytes via NIST11.

A, B: Glucose (A) or fructose (B) were incorporated to NIST11::AcGFP1-expressing oocytes with MBS buffer containing 1 mM ^{14}C -glucose or ^{14}C -fructose for 60 min. Oocytes were then moved into fresh sugar-free MBS. Sugar amount in the oocytes were detected using radio isotope activity. C: Glucose solution was injected into the NIST11::AcGFP1- or AcGFP1-expressing oocytes. Glucose amount in the oocytes were detected using HPLC. D: Glucose export into MBS buffer containing trehalose (Tre) and myo-inositol (Myo). Trehalose and myo-inositol concentrations were 0.5% and 1.2%, respectively (Tre + Myo). Sugarless is the sugar free MBS buffers. NIST11::AcGFP1- or AcGFP1-expressing oocytes were incubated with MBS containing 105 mM glucose for 3 h before exporting

experiment as was in A and B. Glucose amount in the oocytes were analyzed using HPLC. Error bars represent standard error ($n = 3$).

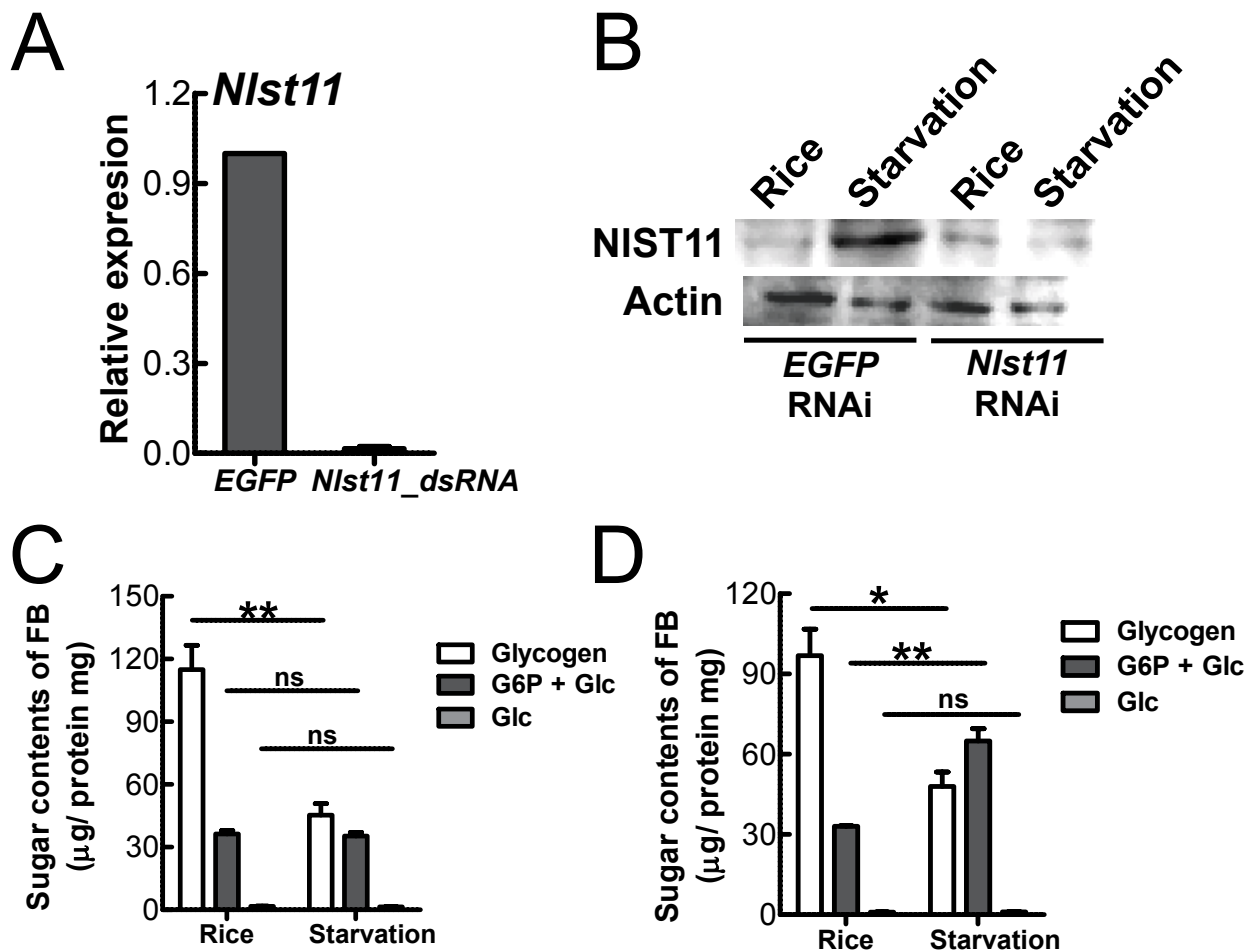


Fig. 3-11 RNAi of *Nlst11* gene and sugar contents of the fat body.

A: Gene expression of *Nlst11* at 24 h after *Nlst11* dsRNA was injected into 0-day-old females. *EGFP* dsRNA was injected as a negative control. B: Immune blotting when *Nlst11* dsRNA was injected into 0-day-old females. BPH were put in feeding or starved condition at 24 h after the injection. *EGFP* dsRNA injection is used as a negative control. C-D: Glycogen (white bars), G6P; Glucose 6-phosphate (black bars) and Glc; Glucose (gray bars) contents in the fat body. C: *EGFP* dsRNA injection. D: *Nlst11* dsRNA injection. Statistical analyses were evaluated by Student's *t*-test. "ns" indicates no significant difference; an asterisk indicates a significant difference (* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$). C: Glycogen: $P = 0.0056$, G6P: $P = 0.6996$, Glc: $P = 0.3883$. D: Glycogen: $P = 0.0125$, G6P: $P = 0.0023$, Glc: $P = 0.4634$. Biological samples were prepared independently three times.

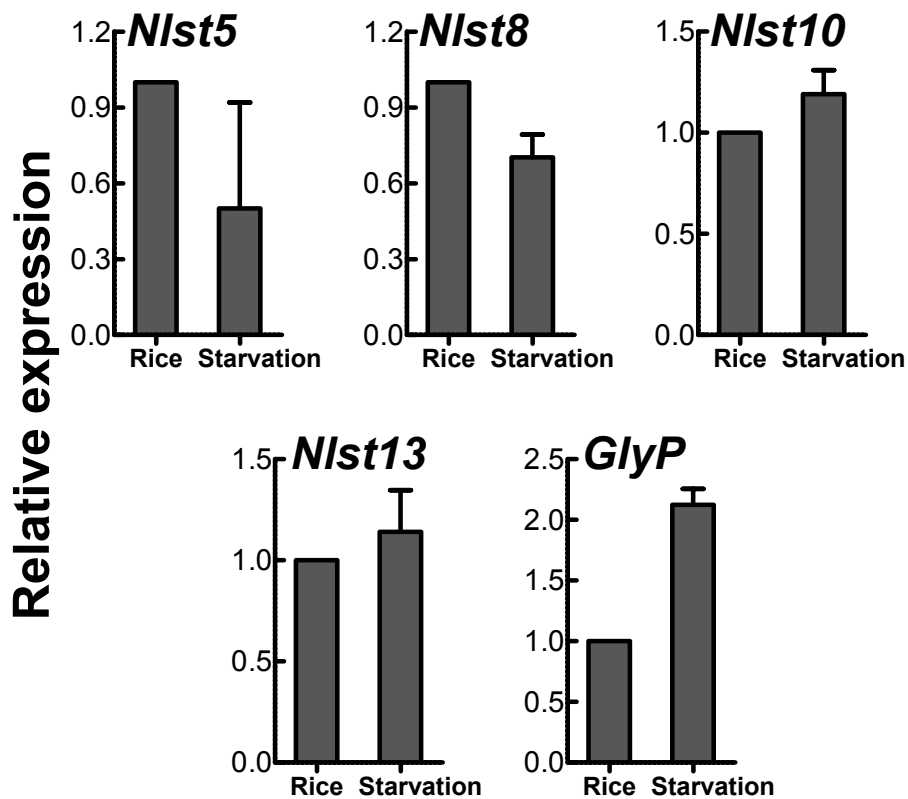


Fig. 3-12 Gene expression of the other four *Nlst* genes expressing in the fat body.

Nlst5, *8*, *10* and *13* were expressed in the fat body of BPH *Nlst* gene profiles. These *Nlst* gene expressions were analyzed using qRT-PCR when BPH fed on the rice plant or were starved for 24 h. *GlyP*: glycogen phosphorylase gene as a positive control. Statistical analyses by Student's *t*-test were performed in each assays. *Nlst5*: $P = 0.6096$, *Nlst8*: $P = 0.2562$, *Nlst10*: $P = 0.1328$, *Nlst13*: $P = 0.4133$, *GlyP*: $P = 0.0014$.

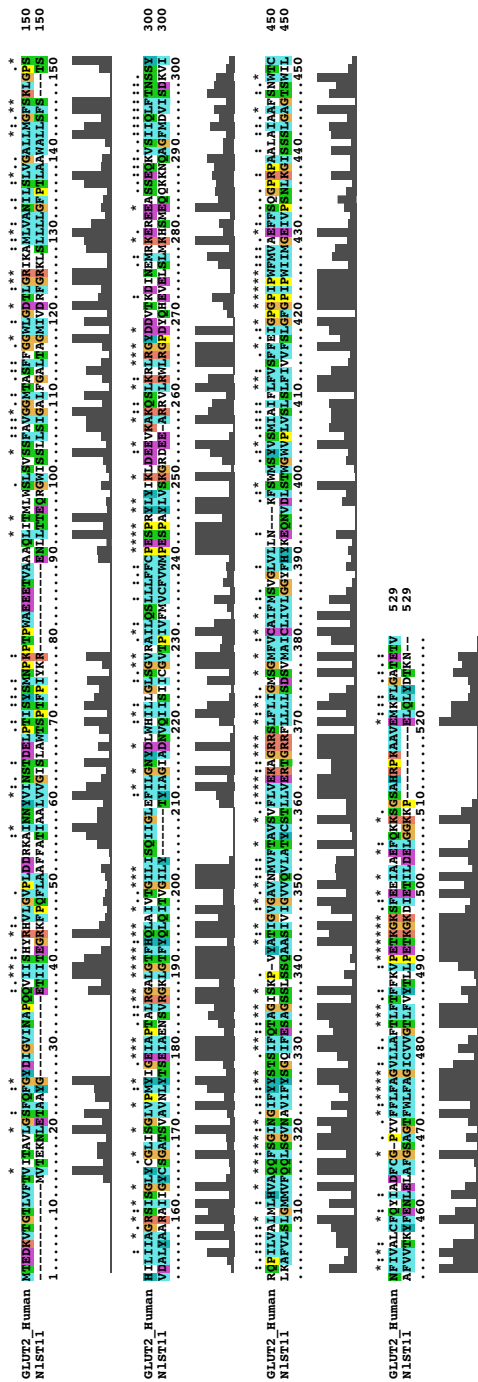


Fig. 3-13A Alignment of amino acid sequences between NIST11 and human GLUT2 (NCBI accession no. NP_000331.1).

Sequences were aligned using ClustalX.

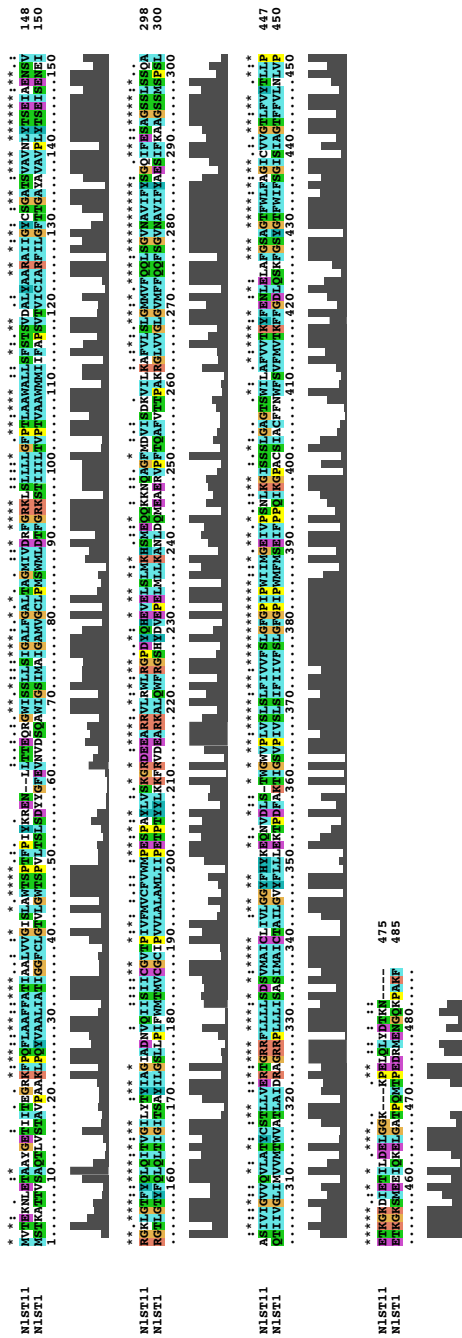


Fig. 3-13B Alignment of deduced amino acid sequences between NIST11 and NIST1.

Sequences were aligned using ClustalX.

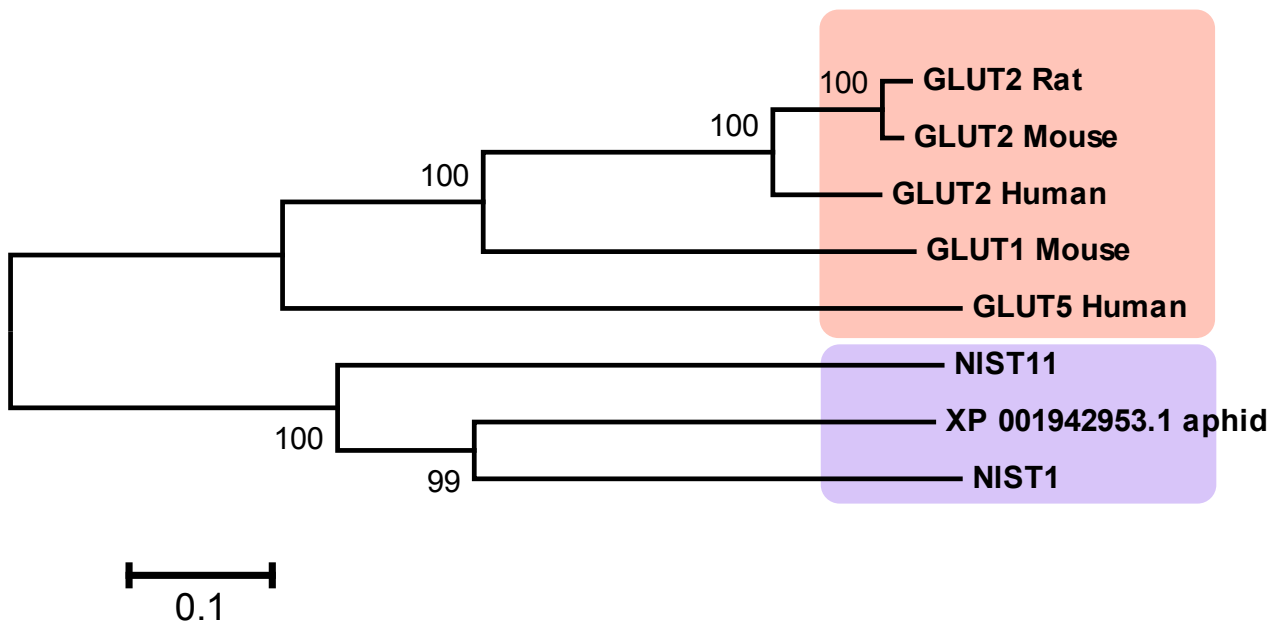


Fig. 3-13C Phylogenetic relation of sugar transporters of insects and mammals.

Amino acid alignment was performed using ClustalW. The tree was constructed with the neighbor-joining method using MEGA ver. 4. The reliability of the trees was estimated with 1000 bootstrap replications. Amino acid sequences of insect and mammalian sugar transporters were obtained from NCBI.

第4章 新規H⁺-トレハロースシンポーターの同定

緒言

トレハロースはグルコース2分子の α -1-1 グリコシド結合から構成される非還元糖であり、代謝のエネルギー源として利用されるだけでなく、乾燥や低温などのストレス環境下の保護物質の一つとしても役割をもつと考えられている (Arrese and Soulages, 2010; Crowe et al., 1998)。たとえば、*Locusta migratoria*や*Schistocerca gregaria*などのバッタ類は長距離飛行のとき、最初に用いるエネルギー源としてトレハロースを利用する (Vaandrager et al., 1989)。ネムリユスリカ (*Polypedilum vanderplanki*) 幼虫は乾燥条件下において、脂肪体でトレハロースを合成する。このトレハロースはガラス化の状態となり、保水の役割をもち、細胞を保護すると考えられている (Watanabe et al., 2002; Sakurai et al., 2008)。

すべての生物において糖を輸送するためにはトランスポーターが必要と考えられている。これまで、トレハローストランスポーターは酵母や昆虫で見つかった (Stambuk et al., 1998; Kikawada et al., 2007)。*Saccharomyces cerevisiae*は、トレハロース、ツラノース、マルトースなど様々な二糖類を輸送する α -グルコシドトランスポーター遺伝子 *AGT1p*をもつ。*AGT1p*は二次的能動輸送型でプロトン勾配に依存して糖を輸送するH⁺-グルコシドシンポーターである (Han et al., 1995)。昆虫ではネムリユスリカからトレハロースの濃度勾配に依存した促進性トランスポーターが同定されている (Kikawada et al., 2007)。このトレハローストランスポーター遺伝子 *Tret1*は、アミノ酸配列を用いた系統解析で、*D. melanogaster*やカイコなどの昆虫のモデル生物のいくつかの種にもみられ、昆虫種に幅広く存在すると考えられた (Kanamori et al., 2010)。

多細胞生物で二次的能動輸送型のトレハローストランスポーターは未だ同定されていないが、ナトリウムやプロトン勾配の駆動により糖を輸送するトランスポーターは昆虫以外

では良く知られている。たとえば、ヒトの小腸では、小腸上皮側に発現するNa⁺-グルコーストランスポーター SGLT1により、低グルコースの条件であっても二次的能動輸送によりグルコースを小腸細胞内に取り込む。各組織の状況に応じてエネルギーを消費してまでも糖を取り込むトランスポーターの存在は重要だと考えられる。

酵母で存在するようなH⁺-トレハローストランスポーターをアミノ酸配列から推定することは非常に困難である。というのも、major facilitator superfamilyの中で、H⁺-sugar transporterと糖促進性トランスポーターのアミノ酸配列の差は、ほんの僅かであると推測されている (Pao et al., 1998)。たとえば、植物のスクローストランスポーター、LjSUT4 (ミヤコグサ *Lotus japonicus*) とPsSUF4 (エンドウ *Pisum sativum*) はアミノ酸配列で73%の相同性を示すが、前者はH⁺-スクローストランスポーターであり、後者は糖促進性スクローストランスポーターである (Zhou et al., 2007; Reinders et al., 2008)。昆虫のトレハローストランスポーターはTRET1ファミリーに属し、他のsugar transporterとは別のcladeを形成することが明らかとなっている (Kanamori et al., 2010; Price et al., 2010; Kikuta et al., 2010)。BPHのsugar transporter遺伝子の中で唯一、NIST8だけがTRET1ファミリーに属していた (Fig. 1-3)。昆虫は脂肪体でトレハロースを合成し、体液中の主要な血糖となるが (Saito, 1963; Wyatt, 1967)、BPHは主要な血糖としてミオイノシトールも有する (Moriwaki et al., 2003b; Fig. 2-12)。BPHの体液から検出されるトレハロースの濃度は0.5% (5.8 mM) であり、カイコの体液中トレハロース濃度 (13.74 mM) やエンドウヒゲナガアブラムシのそれ (255 mM) と比較しても、非常に低濃度であった。従って、BPHの生体内において、これまで同定されてきたような糖濃度に依存するようなトレハローストランスポーターでは、トレハロースの組織間輸送が難しいのではないかと考えられる。そこで、BPHのTret1候補遺伝子 Nist8をアフリカツメガエル卵母細胞に発現させ、これまでと同様に機能解析を行ったところ、NIST8はH⁺-トレハローストランスポーターであることが明らかとなった。

結果

4-1 トビイロウンカNIST8の系統解析

アミノ酸配列を用いた系統解析において、BPHのsugar transporter候補遺伝子*Nist8*はトレハローストランスポーターTRET1ファミリーに属した (Fig. 1-3)。 *Nist8*以外の*Nist*トランスポーター遺伝子はTRET1ファミリーとは異なっていたことから、NIST8がトレハローストランスポーターであると推測された。NCBIに登録されているヒアリ *S. invicta*、トノサマバッタ *L. migratoria*、エンドウヒゲナガアブラムシ *A. pisum*のsugar transporter候補遺伝子のアミノ酸配列が*Nist8*を含むTRET1ファミリーと相同性が高く、オーソログであると考えられた。これらの昆虫とトレハローストランスポーターと推定されているネムリユスリカ *P. vanderplanki*、ハマダラカ *A. gambiae*、カイコ *B. mori*、ミツバチ *A. mellifera* やキイロショウジョウバエ *D. melanogaster*の各遺伝子を加えて、構成される系統解析を行ったところ、不完全変態昆虫のTRET1は単一のグループになった (Fig. 4-1)。

4-2 トビイロウンカNIST8はトレハローストランスポーターである

NIST8の輸送分子を同定するために、NIST8をアフリカツメガエル卵母細胞に発現させ、どのような糖を輸送するのかを検討した。NIST8::AcGFP1 cRNAを卵母細胞にインジェクションし、GFPの蛍光により、NIST8::AcGFP1が卵母細胞の膜上に発現することを確認した (Fig. 4-2A)。コントロールとして用いたAcGFP1 cRNAやSham (水打ち) では、細胞膜上のGFP蛍光は確認できなかった (Fig. 4-2B, C)。

NIST8によるトレハロースの取り込みを評価するために、105 mMのトレハロース液に2時間浸漬し、糖の取り込みを確認した。その結果、コントロールと比較してNIST8を発現させても卵母細胞へのトレハロース取り込み量はあまり増加していなかった。糖の取り込みはトランスポーターによって、活性が大きく変わるので、トレハロース液に浸す時間を長くして、最適な時間を検討した (Fig. 4-3)。NIST8を発現させた卵母細胞へのトレハ

ロースの取り込みは12時間までほぼ一次関数的に増加した。一方、水を打ち込んだ卵母細胞では細胞内へのトレハロースの取り込みの上昇はみられず、時間経過に伴い、外来遺伝子を発現させたトランスポーターによる取り込みが検出されやすくなった。したがってトレハロースの取り込みを評価する時間は3時間から12時間までの間が適切であると考えられた。本研究では卵母細胞をトレハロース液に浸漬する時間を6時間とした。次に、NIST8がトレハロース以外の糖の輸送を担うのかどうかを検討した。マルトース、ミオイノシトール、2-deoxy-D-glucose (2-DOG) を用いた。これらの糖の取り込みはShamと有意な差がみられなかったことから、NIST8はトレハローストランスポーターであると結論した (Fig. 4-4A)。Positive controlとして用いたネムリユスリカのトレハローストランスポーター PvTRETによるトレハロースの取り込みも同様の実験で確認した (Fig. 4-4B)。

4-3 NIST8はH⁺-トレハロースシンポーターである

2007年に、ネムリユスリカから同定されたトレハローストランスポーター TRET1は糖の濃度勾配に依存した糖促進性トランスポーターであった (Kikawada et al., 2007)。詳細に解析されていないが、*D. melanogaster*から同定されたDmTRET1も糖促進性トランスポーターの性質をもつことから (unpublished data)、TRET1ファミリーに属するトランスポーターは糖促進性によるトレハロースの輸送を行うと推測された。そこで、NIST8において、これまでのトランスポーターの解析と同様にNa⁺やH⁺イオンによるトレハロースの取り込みへの影響を調査した。Na⁺イオンの有無に関わらず、トレハロースの取り込み量に有意な差はみられなかった (Fig. 4-5A)。次に、pH依存性について検討を行ったところ、pH濃度によってトレハロースの取り込みに影響がみられた (Fig. 4-5B)。pH 5のトレハロース液では、通常pH条件であるpH 7.8よりも4倍の取り込み量がみられた。Negative controlとして、糖促進性トレハローストランスポーター PvTRET1によるトレハロースの取り込みを様々なpH濃度で検討した。その結果、これまで報告されている通り、

PvTRET1ではpH依存はみられず、糖促進性トランスポーターであることを再確認した (Fig. 4-6)。

次に、NIST8を発現させた卵母細胞をトレハロースを含む様々なpH溶液に浸漬し、6時間後の卵母細胞内のpHを測定した。その結果、細胞内pHが僅かに低下した。一方、Negative controlとして水を打ち込んだ卵母細胞内のpHを測定したところ、細胞内pHの低下はみられなかった (Fig. 4-5C)。これはNIST8を発現させたことで、トレハロースの取り込みが可能となり、卵母細胞内にトレハロースとH⁺イオンの流入があった可能性が考えられる。この結果から、NIST8はH⁺-トレハロースシンポーターである可能性が示唆された。そこで、H⁺イオンの流入を抑制する脱共役剤protonophore carbonyl cyanide m-chlorophenyl hydrazone (CCCP; SIGMA-ALDRICH) を添加した場合の卵母細胞内へのトレハロースの取り込みを調査した。植物のSUTやSUCといったH⁺-スクローストランスポーターの解析をカエル卵母細胞の発現系で実験した場合、CCCPは50 μMの濃度で行われている (Reinders et al., 2008)。本研究でもこのCCCP濃度を用いてみたところ、トレハロースの取り込みが阻害された。100 μM CCCP条件では、卵母細胞に負荷がかかり、細胞の損傷が激しかったので、50 μM CCCPを適用した (Fig. 4-5D)。pH 5の条件下においてトレハロースの取り込みは75%が抑制された (Fig. 4-5E)。pH 7.8の条件下においても、トレハロースの取り込みがさらに抑制された。以上の結果から、NIST8はH⁺-トレハロースシンポーターであると結論した。次に、NIST8によるトレハロース輸送反応速度を計算した。pH 7.8のとき、K_m値は75.5 ± 23.4 mMで、V_{max}が27.1 ± 3.5であった (Fig. 4-7A)。pH 5の条件下でのkineticsは、K_m値が19.2 ± 17.0 mMで、V_{max}は47.9 ± 7.0であった (Fig. 4-7B)。NIST8によるトレハロース輸送活性は低pH条件で高まった。

4-4 甘露に含まれる糖の検出とpH測定

BPHのNist8の発現する組織はマルピーギ管において高い発現が示された (Fig. 1-1)。マルピーギ管はヒトの腎臓に相当する組織であり、主に排泄機能を司ることが知られてい

る (Beyenbach et al., 2010)。BPHの血液中にはトレハロースとミオイノシトールが検出された (Fig. 2-12A)、マルピーギ管に発現する*Nlst8*によって、血糖の排出が行われている可能性が考えられる。そこで、BPHの排泄物である甘露の糖成分の検出と定量を試みたが、トレハロースは検出されなかった (Fig. 4-8B)。甘露のpHを測定したところ、pHは8.1であった。高pH条件下ではプロトン勾配の輸送活性は低いことからマルピーギ管を介して排泄物としてトレハロースを排出することは難しいと考えられる。

4-5 胚子期中の糖の検出と定量

ステージ別の*Nlst8*の遺伝子発現を解析したところ、胚子期における発現量は幼虫・成虫期に比べて高かった (Fig. 1-2)。そこで、胚子期の糖含量を測定したところ、I期からIII期にかけて、ミオイノシトール量が劇的に増加した。一方、トレハロースはI期からIII期にかけて大きな濃度変化がみられず、0.1%程度で安定的であった (Fig. 4-9)。前述したように、成虫期の血糖値はトレハロース0.5%、ミオイノシトール1.2%であり、主な血糖はミオイノシトールであった。この低濃度のトレハロース条件で輸送を行うためには、糖促進性トランスポーターであるよりも二次的能動輸送型トランスポーターの方が適している可能性がある。

考察

生化学的解析により、BPH sugar transporter, NIST8によるトレハロースの取り込みは低pH条件下において、著しく増加した。BPHからH⁺-トレハロースシンポーターを同定することができ、これは多細胞生物で初めてのプロトン・トレハロースシンポーターの報告である。

トレハローストランスポーター TRET1は完全変態昆虫のみならず、不完全変態昆虫にも共通してみられる。アミノ酸配列を用いた系統解析において、現在までのところ、不完全変態昆虫のトレハローストランスポーターはTRET1ファミリーの中でも、完全変態昆虫とは異なるサブグループを形成すると考えられる。これらの結果は、TRET1は進化的に完全変態昆虫と不完全変態昆虫に分化する前から存在することが示唆される。このことは昆虫の血糖であるトレハロースを輸送する分子であることから妥当な考えと思われる。TRET1ファミリーは昆虫のsugar transporterの中で比較すると、単一のcladeを示し、それらのアミノ酸配列の相同性は非常に高い。たとえば、NIST8とネムリユスリカのPvTRET1では、62.5%のアミノ酸配列が一致し、87.5%が類似したアミノ酸であった (Fig. 4-10)。NIST8と同様、プロトン勾配に依存した二糖類トランスポーターである酵母由来のAGT1と比較すると、15.5%が一致し、39.6%が類似したアミノ酸である。同じプロトンシンポーター同士よりも生物の系統関係の近いトランスポーター同士の方がアミノ酸配列の相同性が高いという結果である。また、植物のLjSUT4 (H⁺-スクローストランスポーター) とPsSUF4 (スクロースの濃度勾配によるトランスポーター) とのアミノ酸配列の相同性は73%である (Zhou et al., 2007)。すなわち、H⁺-トレハロースシンポーター活性は昆虫、酵母それぞれ特有に進化したと考えられる。ヒトのhSGLT1トランスポーターの204番目のアミノ酸残基アスパラギン酸がNa⁺/グルコースシンポーターの活性を持つことが明らかとなっており、このアミノ酸残基をグルタミン酸に置換したところ、プロトン勾配のトランスポーターの性質が20倍以上に増加し、Na⁺イオンの影響がみられなくなった

と報告されている (Quick et al., 2001)。残念ながら昆虫のTRET1には、この配列は見出せず、プロトン勾配の活性部位の同定は今後の課題である。

これまで、TRET1が発現する組織は脂肪体であることがネムリユスリカやカイコで確認されている (Kanamori et al., 2010)。ネムリユスリカではトレハロースは脂肪体で合成しており (Mitsumasu et al., 2010)、脂肪体内で合成されたトレハロースは血体腔中へとTRET1を介して輸送され、各組織へと運搬されてエネルギー源として利用されていると考えられる。キイロショウジョウバエ (*D. melanogaster*) 由来の*DmTret1*はFlyAtlas (<http://www.flyatlas.org/>, Chintapalli et al., 2007) で組織発現を確認したところ、脂肪体とマルピーギ管に発現がみられる。また、ヒアリ (*S. invicta*) でも*D. melanogaster*と同様、*Tret1*の発現する組織は脂肪体とマルピーギ管であった (Chen et al., 2006)。BPHの*Nist8*の発現する組織もこれらの昆虫と同様であり、特にマルピーギ管において高い発現が示された (Fig. 1-1)。マルピーギ管は代謝の最終産物や過剰な塩、生体内にとって有害な毒素などを排出すると考えられる。これらを排出するために、マルピーギ管の主細胞でH⁺-transporting vacuolar-ATPaseが働いている (Beyenbach et al., 2006)。この時、ATPが消費されるので、グルコースなどのエネルギーを必要とする。トレハロースはグルコース二分子で構成される二糖類であり、マルピーギ管におけるトレハロースの取り込みはエネルギー源を獲得し、生体内の恒常性を維持する役割をもつことが示唆される。

BPH cDNA ESTデータベースで発現しているミオイノシトール関連の遺伝子を調べてみると、トレハロースと同様にミオイノシトールも脂肪体内で産生されていると推定される。したがって、ミオイノシトールも血体腔へ輸送されるはずと考えられ、NIST8による輸送を検討したが、ミオイノシトールは輸送されなかった (Fig. 4-4A)。BPHは未同定のミオイノシトールトランスポーターをもつと推測される。

材料と方法

1 昆虫

トビイロウンカはこれまでの材料と方法に準じた。ネムリユスリカの*pvTret1* cDNA (農業生物資源研究所の黄川田氏より譲与された) はコントロールとして用いた。

2 RNA抽出

Total RNA抽出はこれまでの材料と方法に準じた。

3 系統樹

TRET1のアミノ酸配列はthe National Center for Biotechnology Information (NCBI) で得た。ネムリユスリカ *Polypedilum vanderplanki* (PvTRET1; NCBI accession no. AB272983)、ハマダラカ *Anopheles gambiae* (AgTRET1; NCBI accession no. AB369548)、カイコ *Bombyx mori* (BmTRET1; NCBI accession no. AB369550)、ミツバチ *Apis mellifera* (AmTRET1; NCBI accession no. AB369549)、ヒアリ *Solenopsis invicta* (SiGLUT8; NCBI accession no. AY911645)、トノサマバッタ *Locusta migratoria* (gastric caeca sugar transporter; NCBI accession no. AAT72921)、エンドウヒゲナガアブラムシ *Acyrtosiphon pisum* (Ap_ST11; NCBI accession no. XP_001950990)、キイロショウジョウバエ *Drosophila melanogaster* (DmTRET1-1A, -1Bと-2; NCBI accession no. AB369552, AB369553とAB369551)。アライメントはClustalWで実行し、系統樹はMEGA ver. 4 (Tamura et al., 2007) を用いて作製した。1000回のbootstrapによって評価した。NIST1はTRET1ファミリーのアウトグループとして用いた (NCBI accession no. AB549994)。

4 cRNAの作製

BPH sugar transporter遺伝子*Nlst8*発現ベクターの作製のために、制限酵素サイトを含むプライマーでPCR増幅を行った。プライマー配列はforwardプライマー 5'-GTCG**AGATCT**CCACCATGAAGCGATTGCTGCGTGC-3' 太字は*Bg*III制限酵素サイトを示し、下線部はKozak配列を示した。終止コドンを除いたreverseプライマー 5'-AGCTC**GATATCA**ATGGAGCTTGGAAAGCGGTTTG-3' 太字は*Eco*RV制限酵素サイトを示した。pT7XbG2-AcGFP1 (DDBJ accession number, AB255038) に、終止コドンが付加したreverseプライマー 5'-AGCTC**GATATC**CCTAAATGGAGCTTGGAAAGCGGTTTG-3' pT7XbG2 (DDBJ accession number, AB255037) をそれぞれ*Bg*IIIと*Eco*RVで制限酵素で処理し、PCR産物は直接ベクターに組み込んだ。Capを付加したRNA (cRNA) の合成のために、DNA テンプレートはT7とT3プロモーター配列を含むプライマーを用いて、high-fidelity DNA polymerase (KOD plus, TOYOBO, Japan) でPCR増幅した。*Nlst8*や*PvTret1* cRNAはmMessage mMachine T7キット (Ambion) を用いて作製した。*PvTret1*を組み込んだプラスミドベクター (Kikawada et al. 2007) は農業生物資源研究所の黄川田氏より譲与された。

5 アフリカツメガエル卵母細胞を用いたNIST8トランスポーターの発現

アフリカツメガエル (*Xenopus laevis*) 卵母細胞発現系の手法は既に確立した手法を用いた (Kikawada et al., 2007; Kikuta et al., 2010)。

6 糖の取り込み実験

NIST8を発現させた卵母細胞を糖の取り込み試験に供試した。NIST8の輸送分子の特異性を調査するためにトレハロース、マルトース、2-deoxy-D-glucose (2-DOG) とミオイノシトールの取り込みを評価した。PvTRET1を発現させた卵母細胞はPositive controlとして用いた。卵母細胞内のpHはトレハロース取り込み実験後の卵母細胞をペッスルで潰した後、ガラス電極式pHメーター (HORIBA, Japan) で測定した。

7 BPH胚子期の糖含量の定量

BPHの胚子の回収は、本論文の第1章材料と方法3に準じた。生物サンプルは独立に3回分を用意した。50頭の胚子を1%ソルビトールを含む80%エタノール中ですり潰し、糖分析用カラム (HPX-87C) を搭載したHPLCで分析した。

8 BPH甘露の回収と糖成分の検出

BPH甘露の回収はパラフィルム-サッシュ法で行った。播種後39日目のイネに小袋状に作製したパラフィルムを巻き付け、その中にBPHメス成虫10頭を接種し、乾燥を防ぐために完全に密封した。接種開始から16時間後に、小袋内の甘露を回収し、分析まで-30°C条件で保存した。糖成分の分析には、糖分析用カラム (HPX-87C, BioRadと CAPCELL PAK NH₂, SHISEIDO, Japan) をそれぞれ搭載したHPLCで分析を行った。HPX-87Cでの分析は、前述した本論文第2章材料と方法5に従った。NH₂カラムについては、アセトニトリル：水 = 75：25、35 °C、0.5 ml/minの条件で分析した。

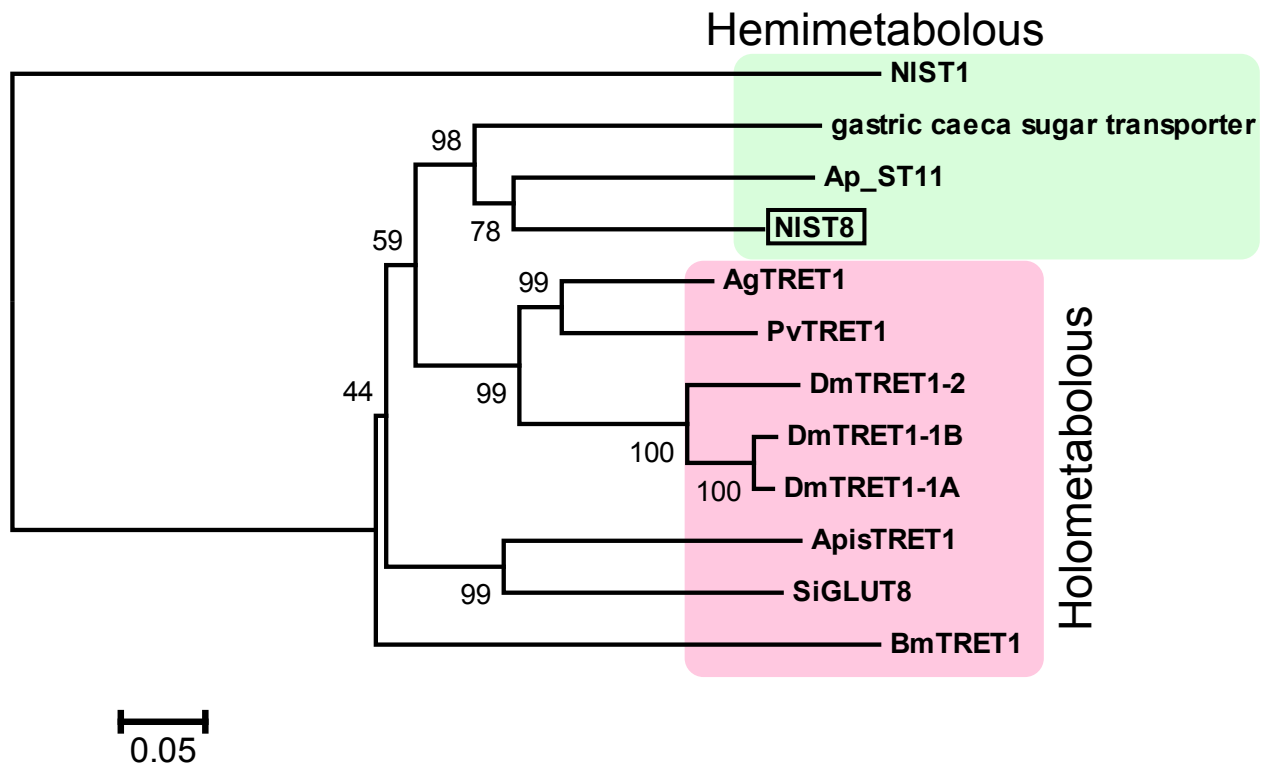


Fig. 4-1 Phylogenetic tree among insect trehalose transporters.

Amino acid sequences of the insect trehalose transporter were obtained from NCBI database. Amino acid alignment was performed using ClustalW. The rooted tree was constructed with the neighbor-joining method using MEGA ver. 4. The reliability of the trees was estimated with 1000 bootstrap replications. Holometabolous insects shown are in the pink box, and Hemimetabolous insects are in the green box. Initial letters represent the insect species: Ap, *Acrythosiphon pisum*; Ag, *Anopheles gambiae*; Pv, *Polypedilum vanderplanki*; Dm, *Drosophila melanogaster*; Apis, *Apis mellifera*; Bm, *Bombyx mori*. SiGLUT8 is the putative trehalose transporter of the fire ant, *Solenopsis invicta* and gastric caeca sugar transporter is from *Locusta migratoria*. NIST1 was used as an out group in the tree.

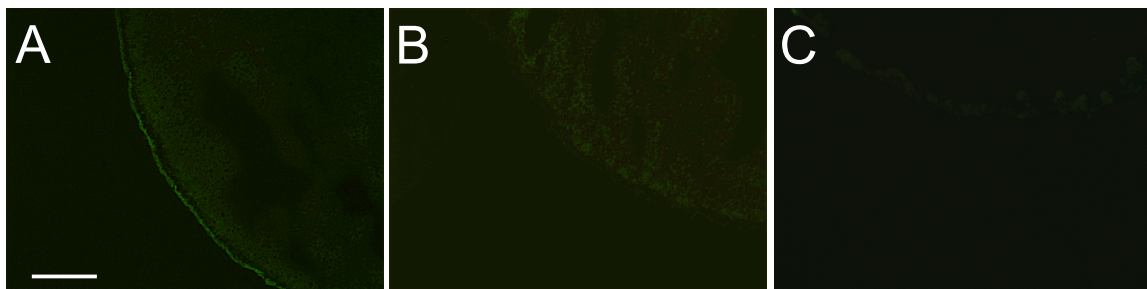


Fig. 4-2 Expression of NIST8 in the cellular membrane of a *Xenopus* oocyte as detected by the AcGFP1 fusion protein.

The AcGFP1 fluorescence was observed under UV light, and was detected in the cellular membrane of *Xenopus* oocyte expressing NIST8::AcGFP1 fusion protein (A). The GFP fluorescence was not detected in AcGFP1 cRNA injection (B) and sham (water injection) (C). Scale bar shows 20 μm .

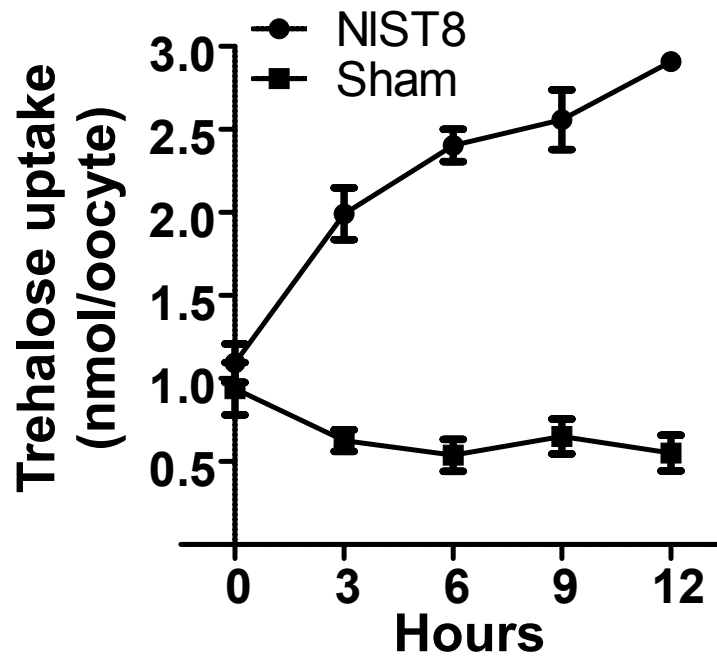


Fig. 4-3 Time course of the trehalose uptake via NIST8.

Trehalose uptake by NIST8 was examined with various time points. Sham (water injection) is as a negative control. Ten oocytes were analyzed in each assay, and error bars represent standard error ($n = 3$).

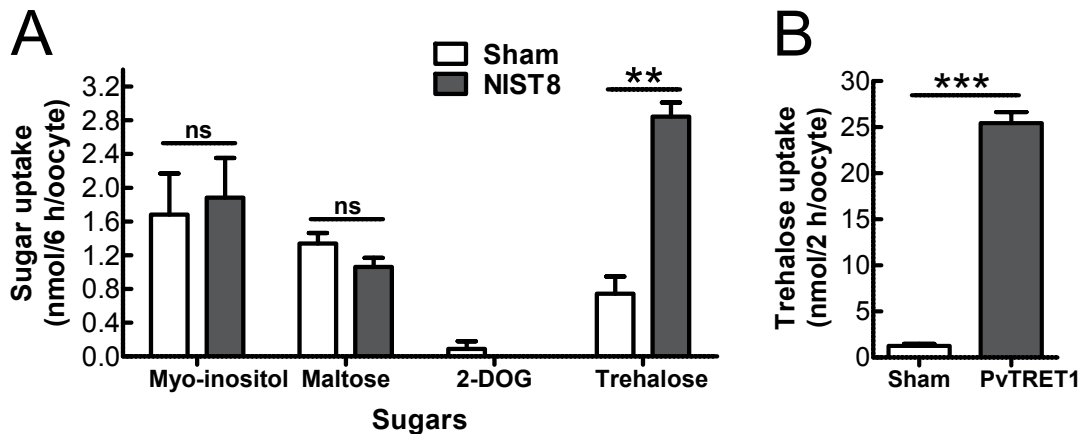


Fig. 4-4 Sugar uptake analyses of NIST8 using HPLC.

Transporters were expressed in the cellular membrane of *Xenopus* oocytes by injecting cRNA of *Nist8* (A) or *PvTret1* from *P. vanderplanki* (B). Sham (water injection) is as a negative control. Sugar concentration of each sugar was 105 mM. Ten oocytes were analyzed in each assay, and error bars represent standard error ($n = 3$). Statistical analyses by Student's *t*-test were performed in each assays. "ns" indicates no significant difference; an asterisk indicates a significant difference (** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$). (A) Myo-inositol: $P = 0.7834$, Maltose: $P = 0.1661$, Trehalose: $P = 0.0014$. (B) Trehalose: $P < 0.0001$.

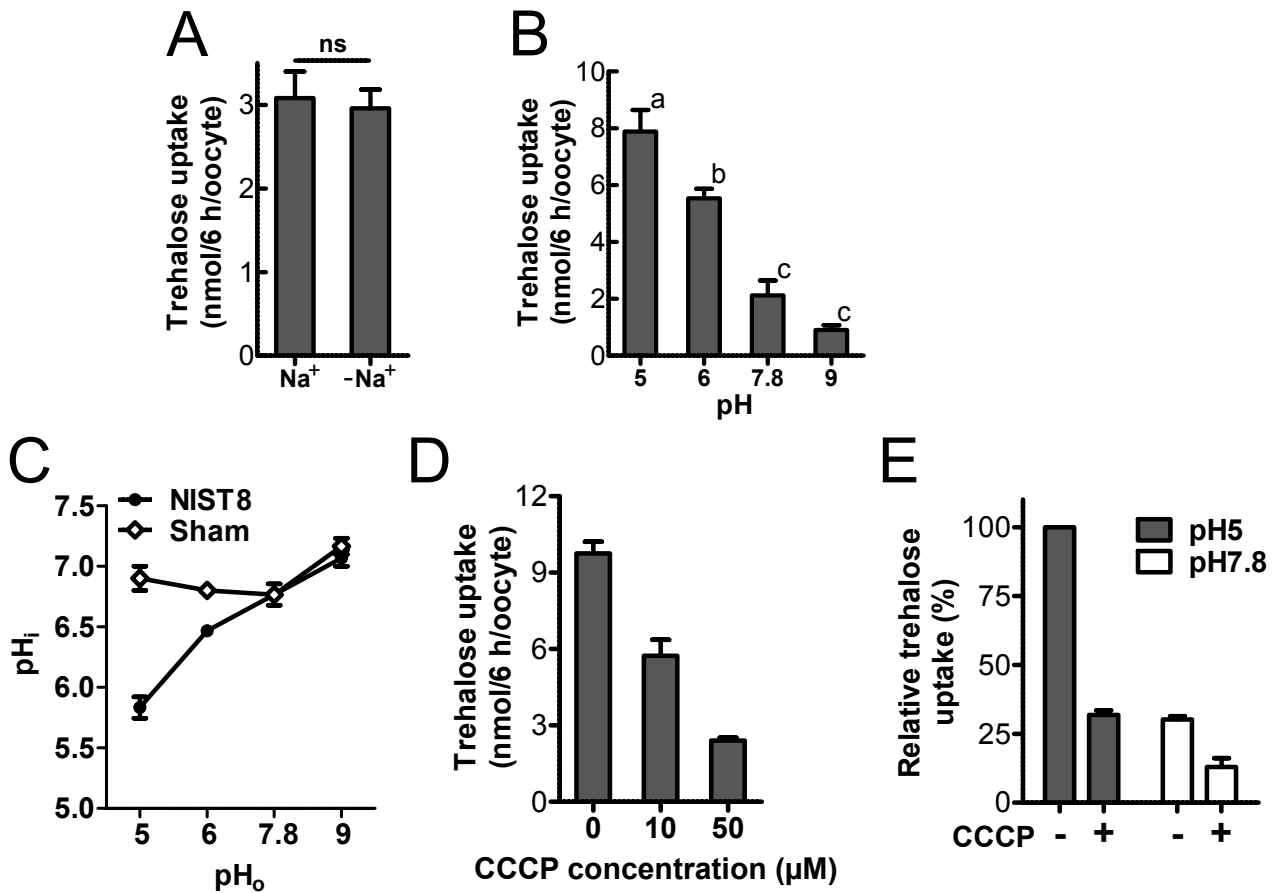


Fig. 4-5 NIST8 is a H⁺-trehalose symporter.

Ten oocytes were used in each assay at trehalose concentration 105 mM. Error bars represent standard error ($n = 3$). A: Trehalose uptake under Na⁺ and Na⁺-free conditions. “ns” indicates no significant difference by Student’s t-test ($P = 0.7686$). B: Trehalose uptake was examined under different pH conditions. Statistical analyses by one-way ANOVA before Tukey’s multiple comparison tests. Same letters show no significant difference ($P < 0.05$). C: Detection of intracellular pH in *Xenopus* oocyte after trehalose uptake. pH_i: internal pH in *Xenopus* oocyte. pH_o: pH of MBS buffer. Sham (water injection) is as a negative control. D: Trehalose uptake with oocytes expressing NIST8 were examined at pH5 with protonophore, CCCP. The concentration of CCCP was 0, 10 and 50 μM. E: Trehalose uptake with the presence of CCCP (50 μM). White bars show the

trehalose uptake at the pH 5 in 105mM trehalose solution, and black bars are at the pH 7.8. DMSO (dimethyl sulfoxide) was put into the buffer as a negative control in CCCP-free condition.

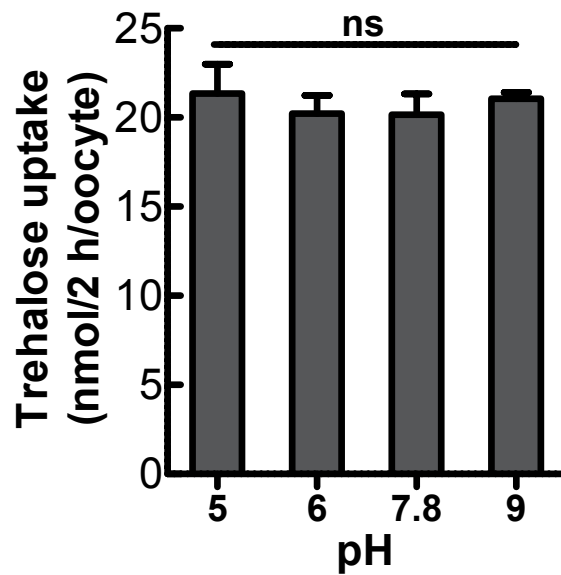


Fig. 4-6 Trehalose uptake via PvTRET1 different pH.

Ten oocytes were analyzed in each assay, and error bars represent standard error ($n = 3$). The PvTRET1-expressing oocytes were incubated in 105 mM trehalose solutions for 2 h. Pv, *Polypedilum vanderplanki*.

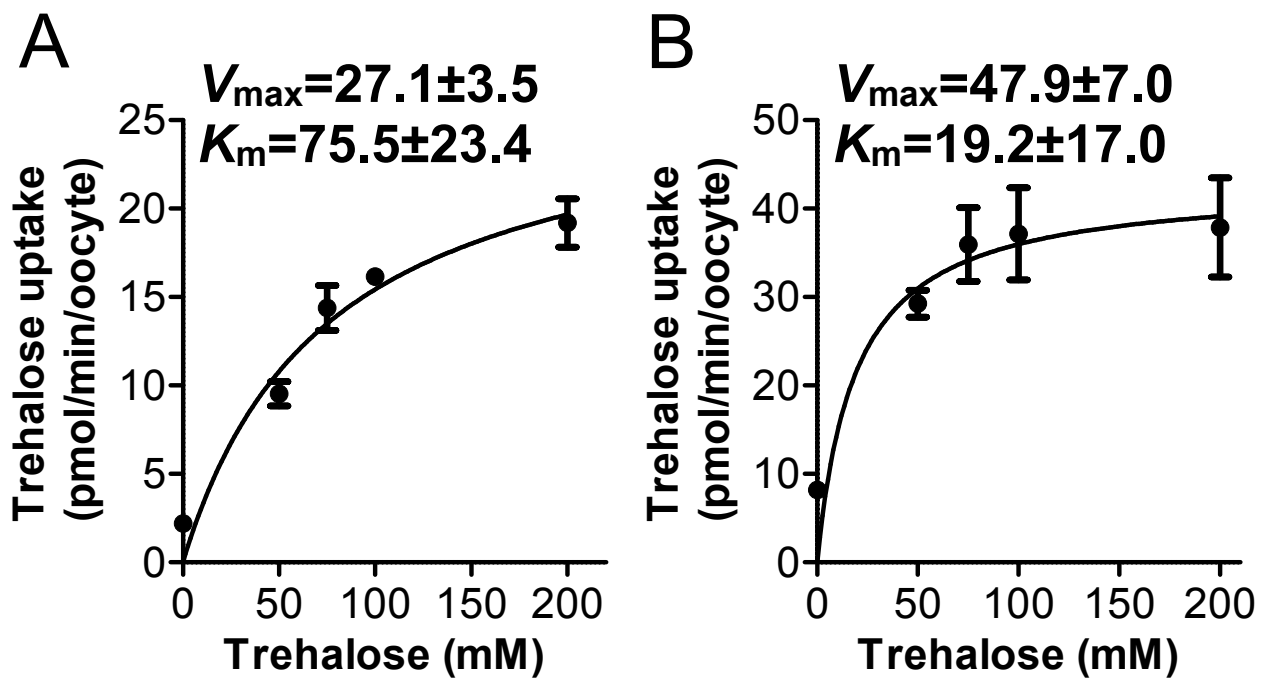


Fig. 4-7 Kinetic parameters of NIST8.

Trehalose uptakes were fitted to the Michaelis–Menten equation. Ten oocytes were analyzed in each assay, and error bars represent standard error ($n = 3$). A: Oocytes expressing NIST8 were incubated with various trehalose concentrations for 3 h at pH 7.8. B: at pH 5 for 1 h.

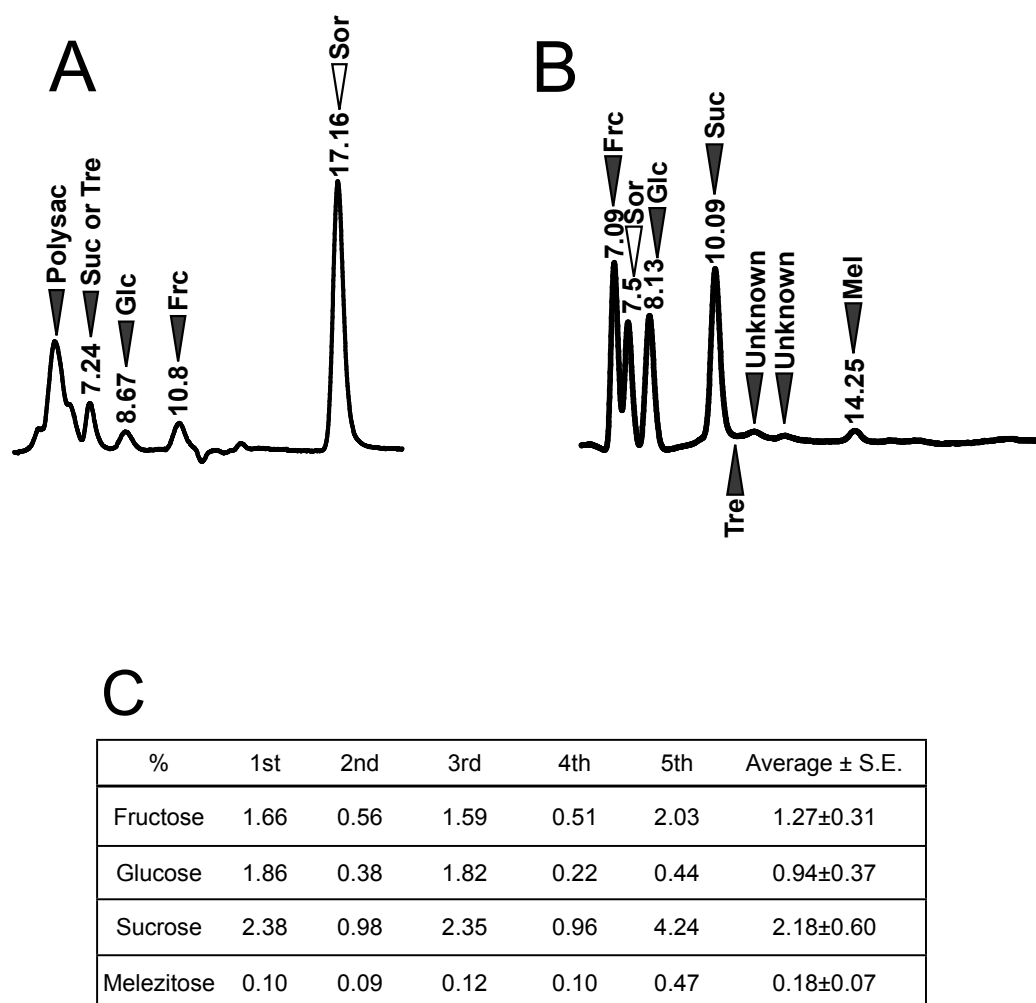


Fig. 4-8 Sugar detections in BPH honeydew.

Abbreviations, Polysac; polysaccharide, Suc; sucrose, Tre; trehalose, Glc; glucose, Frc; fructose, Mel; melezitose and Sor; sorbitol. Arrow head (white) represents sorbitol peak as an internal standard control. Numbers represent each retention time. A) Sugars in the honeydew of BPH using HPX-87C column in HPLC. Sucrose and trehalose peaks are not

clearly discriminated. B) Sugars of the honeydew are detected using CAPCELL PAK NH2.
C) Sugar concentrations of the BPH honeydew. Five honeydew samples were examined.

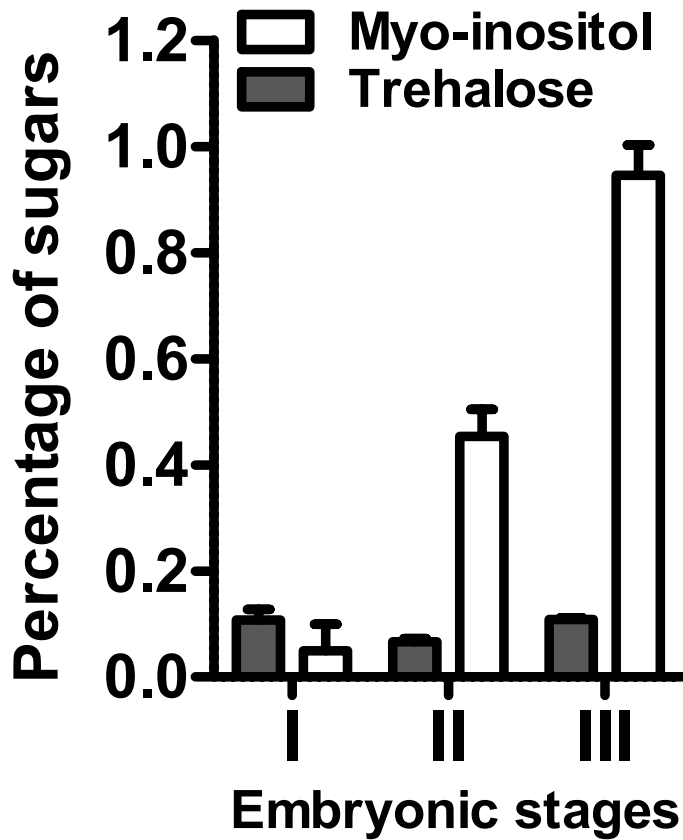


Fig. 4-9 Quantification of sugar concentrations during embryonic stages of BPH.

BPH embryonic stages were described in Fig. 1-6. Briefly described, Stage I; blastoderm stage, Stage II; blastkinesis stage, Stage III; anaphase of eye pigmentation stage. Sugar analyses were examined with 50 embryos at each stage using HPLC. Biological samples were prepared independently three times.

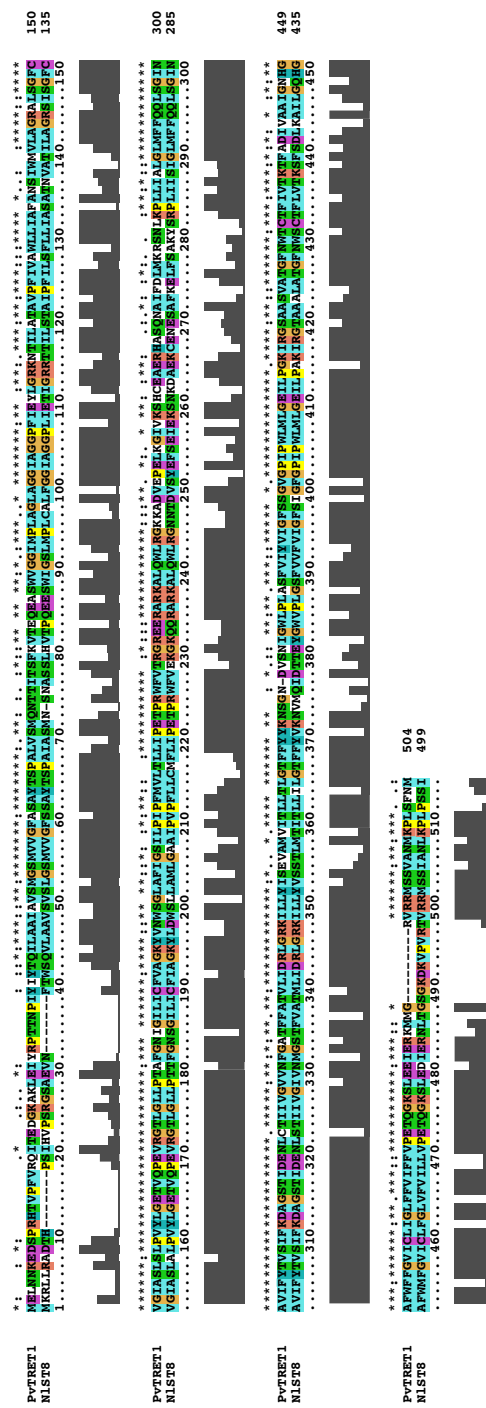


Fig. 4-10 Amino acid sequence alignment of between NlS78 and PvTRET1 derived from *P. vanderplanki*.

Sequences were aligned using ClustalX.

総合考察

生物において糖は重要なエネルギー源であり、生体内での輸送は、各器官がエネルギーを確保するためにも重要となる。昆虫では浸透圧を利用して糖の細胞膜間輸送を行うと一部では考えられてきたが (Downing, 1978; Douglas, 2006)、ほ乳類や植物のように糖を輸送するためにはトランスポーターの介在が必要であることが明らかである。Sugar transporterは生物全般に広く共通して存在するが、その機能は生物種ごとに解析することが不可欠である。たとえば、2006年にヒアリ (Fire ant) からsugar transporter候補遺伝子がクローニングされている (Chen et al., 2006)。アミノ酸配列を用いた遺伝子系統解析からヒトのGLUT8 (グルコーストランスポーター) と相同性が高かったので、Fire antのGLUT8はグルコーストランスポーターと考えられたが、Fire antのGLUT8は系統的に昆虫のトレハローストランスポーターのグループに属する。糖促進性トランスポーターと二次的能動輸送型のプロトン勾配によるトランスポーター遺伝子とはアミノ酸配列だけでは区別できない。たとえば、植物のスクローストランスポーター、LjSUT4 (from *Lotus japonicus*) とPsSUF4 (from *Pisum sativum*) のアミノ酸配列の73%が同一の配列であるが、前者は H⁺-スクローストランスポーターであり、後者は糖促進性トランスポーターであった (Zhou et al., 2007; Reinders et al., 2008)。また、本研究で明らかになったBPHのトレハローストランスポーター NIST8は、同じトレハローストランスポーターファミリーに属したにも関わらず、これまで知られていたトレハロースの濃度勾配によって輸送するトランスポーターの性質ではなく、プロトン勾配によるシンポーターであった。したがって、トランスポーターの特徴を明らかにするためには個々のトランスポーターの機能解析が不可欠である。昆虫のsugar transporterの解析は非常に限られているので、今後、様々なトランスポーターの解析を行うことで、たとえば、糖促進性の性質かプロトン勾配の性質なのかについてはアミノ酸配列からある程度推定できるようにはなるかもしれない。

イネに対して大きな被害をもたらすBPHが吸汁の過程において、どのようにして糖を生体内へ取り込んでいるのかについては、これまで不明であったが、2007年のPriceらによる研究と本研究の解析から、糖の濃度勾配の駆動を利用したトランスポーターの働きが重要な役割をもつことが明らかとなった。また、トランスポーターの機能解析だけではどこでどのように機能するのかわからない場合も多いが、本研究のように、生体内に存在する糖の検出、定量化を行うことで昆虫生体内でのトランスポーターの位置づけを明らかにできると考えられる。現在のところ、糖の取り込みを行う組織である中腸において、糖の濃度勾配の駆動を利用したトランスポーターだけが同定されているが、今後、 Na^+ や H^+ イオンの駆動を利用した二次的能動輸送型トランスポーターが同定されるかもしれない。生体内に発現するNIST8やNIST11のようなトランスポーターの生理的な働きについて考察する上でも、生体内の糖の量や動きに着目することが糖輸送システムの解明に一步近づくと考えられる。本研究において、個々の遺伝子がいつどこで発現するのかをプロファイルし、俯瞰的な視点で捉えた情報が研究の成果に大きく貢献したと考えられる。

抵抗性イネASD7を吸汁したBPHにおいて、発現が上昇した唯一の遺伝子はsugar transporter *Nlst6*であった。本研究のマイクロアレイの解析では、cDNA ESTデータベースを基にして発現をみているので、ESTデータベース上にはない、たとえば転写因子など摂食により一過的に発現が上昇するような未同定因子が存在することも考えられる。現在のところ、耐虫性イネにより誘導される因子が完全には明らかにされていないものの、ASD7を吸汁したことで、BPHが何らかのシグナルを受容し、*Nlst6*の発現を誘導させたことが示唆される。今後は、*Nlst6*の遺伝子発現制御機構の解明が、抵抗性イネとの関連において重要と考えられる。Sugar transporterという名称はその字の如く、『糖を輸送する担体』であるが、その実体は単純ではなく、その機能や生理的役割についてはまだまだ未解明である。本研究ではBPHのsugar transporterの解析を通して、昆虫の糖輸送システムの一端を解明できた。

結論

BPHのsugar transporterの遺伝子発現を明らかにし、複数のトランスポーターの機能解析を行うことによって、昆虫の知られざる糖輸送システムの一端が明らかになった。BPHは古くからイネの主要な害虫であり、これまでBPHがどのようにしてイネの糖を取り込むのかについては知られていなかったが、本研究の成果から、中腸に発現するsugar transporterによって、糖の濃度勾配を利用して糖が取り込まれることが明らかとなった。また、BPHの生体内において、飢餓状態の時に栄養源としての糖を輸送するトランスポーターを見出しただけでなく、生体内の恒常性の維持に関わるトランスポーターも同定できた。Sugar transporterに着目するきっかけとなった抵抗性イネASD7とsugar transporterとの関連は今後の研究に委ねなければならないが、本研究はsugar transporter研究に大きな足跡を残したと思われる。

既に多くの解析が行われている酵母、ほ乳類、植物のsugar transporterに関する文献と照合した結果、生物共通にみられるトランスポーターの特徴をもつ一方、アミノ酸配列や輸送分子、輸送活性などは互いに大きく異なることから、進化の過程で生物それぞれにsugar transporterの機能を発達させてきたと考えられた。今後は様々な昆虫のsugar transporterの解析を行うことで、昆虫の糖輸送システムの全貌解明が期待される。

Supplemental data

マイクロアレイを用いた摂食条件・飢餓条件・耐虫性イネ条件の遺伝子発現の比較

材料と方法

1 昆虫

トビイロウンカ (BPH; Brown planthopper, *Nilaparvata lugens* (strain: イズモ) はイネの芽だしを用いて、26°C、日長16時間、夜間8時間の人工飼育室で飼育した。

2 22K オリゴDNAマイクロアレイ

BPH 22K オリゴマイクロアレイスライド (60 mer oligo nucleotides on each 21,495 spots, Agilent Technologies #2514245) はBPH cDNA EST (expressed sequence tag) (Noda et al., 2008) に基づいて設計した。実験は独立に4回行われ、それぞれに反転させて実験を行った。Total RNA (400 ng each for Cy3 and Cy5) はTotal RNA抽出キット (Qiagen) を用いて抽出した。Cy3、Cy5標識RNAはLow RNA Linear Amplification Kit PLUS Two-Color Kit (Agilent Technologies) で作製した。次に、標識したcRNAは17時間、65°C、4 rpmの条件で、BPHマイクロアレイにハイブリダイズした。アレイはGene Expression Wash Buffer Kit (Agilent Technologies) で洗浄し、Agilent G2565BA Microarray scannerを用いて、10 μm の解像度でスキャンした。スキャンした結果はG2565AA Feature Extraction Software ver. 8.5 (Agilent Technologies) を用いて解析した。P-value、fold-change、error flagsに基づいて発現に差のある遺伝子を検出した。

3 44K オリゴDNAマイクロアレイ

Total RNA からの逆転写反応およびcRNAの合成は、Low RNA Input Linear Amplification Kit (Agilent technologies) とTwo-Color RNA Spike-In Kit (Agilent technologies)を用いた。RNAは400 ngを使用し、全てのサンプルをCy3とCy5の2つの色素でそれぞれ標識した。Total RNAを2.55 μ lのNuclease free waterに溶かし、2 μ lのSpike-In を加えて混合した。T7 Promoter プライマー 1.2 μ lを加え、65°Cで10分間加熱し、その後氷上で5分間冷却した。cDNA合成用のマスターミックス (5 \times First strand buffer 2 μ l, 0.1M DTT 1 μ l, 10mM dNTP Mix 0.5 μ l, MMLV-RT 0.5 μ l, RNase Inhibitor 0.25 μ l) を加えた後、40°Cで2時間インキュベートし、逆転写反応をさせて2本鎖cDNAを合成した。65°Cで15分間加熱し、逆転写反応を停止した後、氷上で5分間冷却し、10 mM Cyanine 3-CTP または10 mM Cyanine 5-CTP 1.2 μ lとcRNA合成用のマスターミックス (Nuclease-free water 7.65 μ l, 4 \times Transcription buffer 10 μ l, 0.1M 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、cDNAより蛍光標識したcRNAを合成した。標識したcRNAの精製にはRNeasy Mini Kit (QIAGEN) を使用した。Nuclease-free water 60 μ lと350 μ lのRLT Buffer, 250 μ lの99.5%のエタノールを加え混合した後、カラムに溶液を添加した。それ以後の操作は、RNA抽出と同様の方法で行った。精製後の溶液のO.D.値を測定し、RNA濃度を計算した。ハイブリダイゼーションには、Hi-RPM Gene Expression Hybridization Kit (Agilent technologies) を使用した。Cy3で標識したcRNA 0.825 μ gに相当する溶液とCy5で標識したcRNA 0.825 μ gに相当する溶液に、11 μ lの10 \times Blocking AgentとNuclease-free waterを加え、全体で52.8 μ lとした。cRNAを断片化するための25 \times フラグメンテーションバッファー2.2 μ lを加えて攪拌し、60°Cで30分間加熱した。55 μ lの2 \times GE Hybridization Bufferを加え混合し、溶液の100 μ lをガセットスライドに加え、マイクロアレイを上から被せた。65°Cで17時間インキュベートし、マイクロアレイ上のオリゴDNAとcRNA溶液

をハイブリダイゼーションさせた。マイクロアレイの洗浄にはGene Expression Wash Buffer Kit (Agilent technologies) を使用した。Buffer 1内でマイクロアレイをガセットスライドから外し、室温の同バッファー内で1分間洗浄した。次に37°CのBuffer内で1分間洗浄した。G2505Bマイクロアレイスキャナー (Agilent technologies) を用いて、スキャンした後、Feature Extraction ver 9ソフトウェア (Agilent technologies) で解析した。

Gene	EST Clone	Fold Change							
		1st Test		2nd Test		3rd Test		4th Test	
		BPH-R	BPH-S	BPH-R	BPH-S	BPH-R	BPH-S	BPH-R	BPH-S
<i>Nlst1</i>	HT3796	1.72	1.57	1.36	8.71	2.37	4.34	1.15	1.32
<i>Nlst2</i>	AB1102	1.54	1.13	2.22	1.06	1.38	1.23	2.71	1.13
<i>Nlst3</i>	MB1507	1.36	1.65	1.00	2.10	1.92	1.36	1.59	1.43
<i>Nlst4</i>	MA3755	1.85	2.12	1.96	8.63	1.79	3.72	1.36	1.00
<i>Nlst5</i>	OC1141	1.18	1.08	1.21	1.17	1.13	1.39	1.11	1.11
<i>Nlst6</i>	MB1040	4.45	1.48	4.16	1.77	2.70	1.16	5.19	2.00
<i>Nlst7</i>	MB0660	1.00	1.07	1.31	2.40	Error	1.11	1.48	1.64
<i>Nlst8</i>	SG4295	Error	1.36	2.08	Error	1.31	2.01	1.20	1.70
<i>Nlst9</i>	NA6316	1.71	1.34	1.23	1.14	Error	Error	1.76	2.01
<i>Nlst10</i>	EA8189	1.48	1.21	2.19	1.51	1.84	3.15	1.35	1.61
<i>Nlst11</i>	AD0895	3.24	1.94	2.03	Error	2.34	1.81	4.02	3.27
<i>Nlst12</i>	NLWF_47O22_R	2.19	1.57	1.09	1.16	1.27	Error	1.12	1.23
<i>Nlst13</i>	EA7530	1.79	1.06	Error	Error	Error	Error	Error	Error
<i>Nlst14</i>	MA0017	2.51	1.26	1.63	2.61	1.57	1.73	Error	1.20
<i>Nlst15</i>	MA5086	1.13	1.15	Error	1.59	Error	Error	Error	Error
<i>Nlst16</i>	MB3026	5.58	1.38	2.27	1.23	1.09	2.01	1.44	3.49
<i>Nlst17</i>	NB0289	1.00	1.00	1.63	Error	Error	Error	Error	Error
<i>Nlst18</i>	OC0495	Error	1.00	Error	Error	Error	Error	Error	Error
<i>pepck</i>	NA7503	1.60	1.72	5.18	4.52	1.65	3.52	1.04	1.24

Fig. S1 Microarray 22K analyses of *Nlsts* in BPH-R and BPH-S.

BPH was allowed to feed on the resistant rice variety ASD7 for 24 h, and were divided into two groups, BPH-R could attack the resistant variety and BPH-S could not. They were further reared for 24 h on susceptible variety (Koshihikari) and the total RNA was extracted. The experimental design is described in General introduction (Fig. IB). Different gene expression was shown in fold change between BPH-R and BPH-S (BPH-R/BPH-S). Phosphoenolpyruvate carboxykinase gene (*pepck*) is used as a positive control for starvation. Microarray analyses were independently performed 4 times.

	Fold Change		
	1st Test	2nd Test	3rd Test
<i>Nlst1</i>	2.5	1.64	3.16
<i>Nlst2</i>	1.14	1.07	1.17
<i>Nlst3</i>	Error	Error	Error
<i>Nlst4</i>	2.57	2.2	3.5
<i>Nlst5</i>	-1.08	-1.19	-1.6
<i>Nlst6</i>	1.16	1.52	1.82
<i>Nlst7</i>	Error	Error	Error
<i>Nlst8</i>	1.63	1.7	1.52
<i>Nlst9</i>	1.35	1.12	Error
<i>Nlst10</i>	-1.78	-1.66	-1.62
<i>Nlst11</i>	-2.88	-3.1	-2.14
<i>Nlst12</i>	1.46	1.85	2.06
<i>Nlst13</i>	1.3	Error	Error
<i>Nlst14</i>	Error	-1.23	Error
<i>Nlst15</i>	-1.65	-1.52	-2.18
<i>Nlst16</i>	3.62	4.54	3.29
<i>Nlst17</i>	Error	Error	1.5
<i>Nlst18</i>	1.63	Error	2.7
<i>pepck</i>	-3.89	-1.67	-3.83

Fig. S2 Microarray 44K analyses between BPH sucking the rice plant (Koshihikari) and BPH starved.

BPH were allowed to suck rice plant (Koshihikari) or were only supplied with water for 24 h. Fold changes show the different gene expression levels of each *Nlst* gene in starved BPH against feeding BPH. *pepck*: phosphoenolpyruvate carboxykinase. Microarray analyses were independently performed 3 times.

RNAi解析のための条件検討

BPHのRNAiはdouble strand RNA (dsRNA) を血体腔へインジェクションすることで、遺伝子発現を抑制できる。本研究では、予備実験として、BPHの体液中に*Nlst1* dsRNAをインジェクションしたときの様々なdsRNA量、時間経過における*Nlst1*遺伝子の発現量を検証した。その結果、1000 ng/ μ l、24時間もしくは500 ng/ μ l、48時間以上の条件下で*Nlst1*の発現は抑制された。

材料と方法

dsRNAは*Nlst1*遺伝子のcDNAをテンプレートとして、T7 RiboMAX Express RNAi system (Promega) を用いて作製した。Forward primerには5'-AAGTCTGCAAACAATTATAGTTG-3'をreverse primerには5'-TGTTCCAGCTATGGAAATTC-3'を用いた。dsRNAを羽化後48時間以内のBPHメス成虫の胸部と腹部の間の節間にキャピラリーでインジェクションした (Eppendorfインジェクター)。遺伝子発現量の測定では、10頭分の中腸から抽出したtotal RNAをcDNAへ逆転写し、qRT-PCRで解析した。生物サンプルは独立に3回分を準備した。

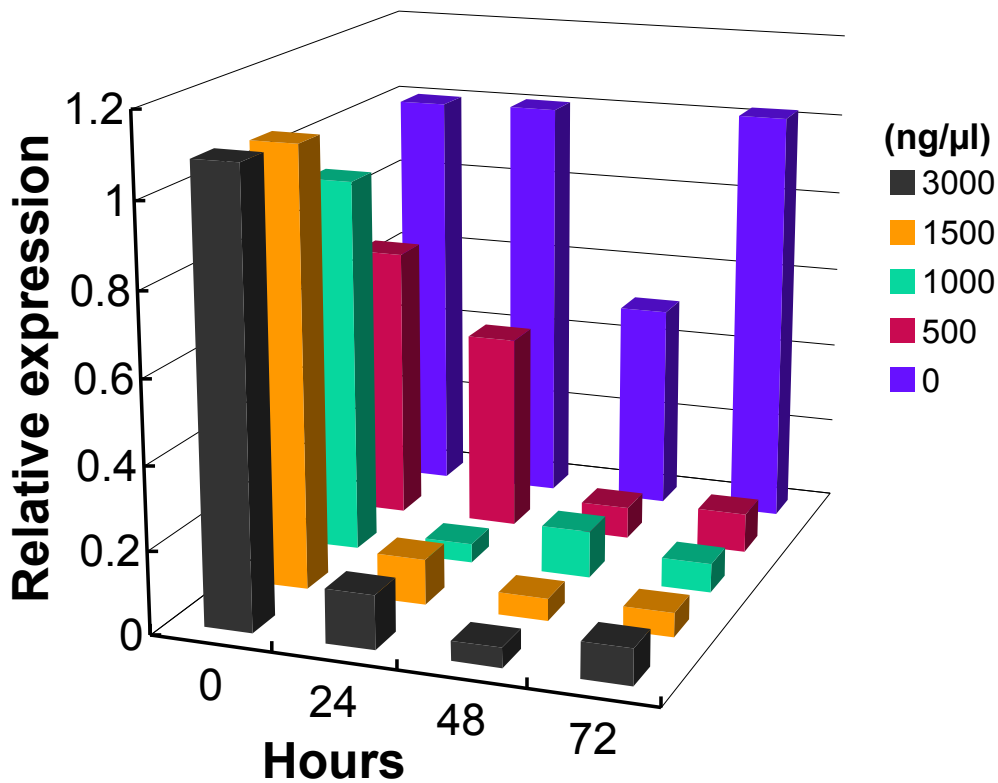


Fig. S3 mRNA levels in the midgut by *N/st1* dsRNA injection.

For RNAi analyses *N/st1* dsRNA was injected to the young female BPH. The concentrations dsRNA prepared were 0, 500, 1000, 1500 and 3000 ng/μl. The injected insects were reared on a rice sheath. The rice sheath was changed every day. Total RNA from the midgut of 10 females were extracted at 0, 24, 48, 72 h after dsRNA injection. cDNA was synthesized and qRT-PCR was performed.

試薬組成

Modified Barth's Saline (MBS)

88 mM NaCl

1.0 mM KCl

2.4 mM NaHCO₃

15 mM Tris-HCl (pH 7.6)

0.3 mM Ca (NO₃)₂·4H₂O

0.41 mM CaCl₂·2H₂O

0.82 mM MgSO₄·7H₂O

オートクレーブ滅菌処理後、実験直前に下記の抗生物質を添加する

10 µg/ml Sodium Penicilline

10 µg/ml Streptomycin sulfate

-Ca²⁺-MBSは上記の組成から Ca (NO₃)₂·4H₂OとCaCl₂·2H₂Oを除いて作製する

Trisの代わりに4-morpholine ethanesulfonic acid (MES) を用いた緩衝液をpHの実験に用いた。

タンパク抽出用ホモジナイズバッファ

10 mM HEPES-NaOH (pH 7.5)

83 mM NaCl

1mM MgCl₂

水でメスアップ後にオートクレーブ滅菌処理

電子顕微鏡 (TEM) で使用した樹脂

2.21 g Quetol-651 (水溶性エポキシ樹脂)

1.65 g NSA: Nonenyl succinic anhydride special grade (NISSIN EM CO, Ltd)

1.73 g MNA: Methyl nadic anhydride (NISSIN EM CO, Ltd)

60 μ l DMP-30: 2,4,6-tri(Dimethylaminomethyl)phenol (TAAB)

よく混合した後、プロピレンオキシドと1:1で混合する

謝辞

5年間の大学院在籍中に、多くの方々からご支援・ご指導を賜りました。本博士論文は次の方々の協力があって完成されたもので、深く感謝致します。

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 兼担 独立行政法人農業生物資源研究所 昆虫・微生物間相互作用研究ユニット ユニット長 野田博明先生、同研究所 同専攻客員教授 林誠先生、同研究所 同専攻客員教授 高野誠先生、同研究所 同専攻客員准教授 高橋透先生、同研究所 乾燥耐性研究ユニット主任研究員 黄川田隆洋博士、同研究所 乾燥耐性研究ユニット博士研究員 萩原 (薦田) 優香博士、同研究所 昆虫-昆虫・植物間相互作用研究ユニット上級研究員 服部誠博士、同研究所 昆虫・微生物間相互作用研究ユニット主任研究員 中島信彦博士、同研究所 昆虫・微生物間相互作用研究ユニットの研究スタッフのみなさま、同研究所 乾燥耐性研究ユニットの研究スタッフのみなさま、同研究所 昆虫-昆虫・植物間相互作用研究ユニットの研究スタッフのみなさま。

次の方々は、修士課程在籍時から多くの助言・有益な議論をしてくださり、私の研究に対する姿勢や考え方の礎となりました。心より感謝致します。この場を借りてお礼を申し上げます。

東京大学大学院新領域創成科学研究科 先端生命科学専攻教授 永田昌男先生、先端生命科学専攻教授 青木不学先生、東京大学大学院農学生命科学研究科 昆虫遺伝研究室 博士研究員 木内隆史博士、同大学院 先端生命科学専攻 資源生物制御学分野の研究スタッフのみなさま。

5年間、共に過ごした東京大学大学院新領域創成科学研究科同期生の友人たちにも、とても楽しく素敵な時間を過ごせたことを感謝致します。

引用文献

- Arrese, E. L., Soulages, J. L. 2010. Insect fat body: Energy, metabolism, and regulation. *Annu. Rev. Entomol.* 55, 207–225.
- Baker, K. D., Thummel, C. S. 2007. Diabetic larvae and obese flies-emerging studies of metabolism in *Drosophila*. *Cell Metab.* 6, 257–266.
- Besson, E., Dellamonica, G., Chopin, J., Markham, K. R., Kim, M., Koh, H-S., Fukami, H. 1985. C-glycosylflavones from *Oryza sativa*. *Phytochemistry* 24, 1061–1064.
- Beyenbach, K. W., Wieczorek, H. 2006. The V-type H⁺ ATPase: molecular structure and function, physiological roles and regulation. *J. Exp. Biol.* 209, 577–589.
- Beyenbach, K. W., Skaer, H., Dow, J. A. T. 2010. The developmental, molecular, and transport biology of Malpighian tubules. *Annu. Rev. Entomol.* 351–374.
- Buch, S., Melcher, C., Bauer, M., Katzenberger, J., Pankratz, M. J. 2008. Opposing effects of dietary protein and sugar regulate a transcriptional target of *Drosophila* insulin-like peptide signaling. *Cell Metab.* 7, 321–332.
- Caccia, S., Casartelli, M., Grimaldi, A., Losa, E., de Eguileor, M., Pennacchio, F., Giordana, B. 2007. Unexpected similarity of intestinal sugar absorption by SGLT1 and apical GLUT2 in an insect (*Aphidius ervi*, Hymenoptera) and mammals. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 292, 2284–2291.
- Chintapalli, V. R., Wang, J., Dow, J. A. T. 2007. Using FlyAtlas to identify better *Drosophila* models of human disease. *Nature Genetics* 39, 715–720.
- Chen, M. E., Holmes, S. P., Pietrantonio, P. V. 2006. Glucose transporter 8 (GLUT8) from the red imported fire ant, *Solenopsis invicta* Buren (Hymenoptera: Formicidae). *Arch. Insect Biochem. Physiol.* 62, 55–72.
- Crowe, J. H., Carpenter, J. F., Crowe, L. M. 1998. The role of vitrification in anhydrobiosis. *Annu. Rev. Physiol.* 60, 73–103.
- Douglas, A. E. 2006. Phloem-sap feeding by animals: problems and solutions. *J. Exp. Bot.* 57, 747–754.
- Dow, J. A. T. 1986. Insect midgut function. *Adv. Insect Physiol.* 19, 187–328.

- Downing, N. 1978. Measurements of the osmotic concentrations of stylet sap, haemolymph and honeydew from an aphid under osmotic stress. *J. Exp. Biol.* 77, 247–250.
- Drozdowski, L. A., Thomson, A. B. 2006. Intestinal sugar transport. *World J. Gastroenterol.* 12, 1657–1670.
- Dumont, J. N. 1972. Oogenesis in *Xenopus laevis* (Daudin). I. Stages of oocyte development in laboratory maintained animals. *J. Morphol.* 136, 153–180.
- Dyck, V. A., Thomas, B. 1979. The brown planthopper problem. In International Rice Research Institute (Eds.) Brown planthopper: Threat to rice production in Asia. pp. 3-17.
- Escher, S. A., Rasmuson-Lestander, A. 1999. The *Drosophila* glucose transporter gene: cDNA sequence, phylogenetic companions, analysis of functional sites and secondary structures. *Hereditas*, 130, 95–103.
- Fukumorita, T., Chino, M. 1982. Sugar, amino acid and inorganic contents in rice phloem sap. *Plant Cell Physiol.* 23, 273–283.
- Gallagher, K. D., Kenmore, P. E., Sogawa, K. 1994. In: Denno, R. F., Perfect, T. J. (Eds.), Planthoppers; Their Ecology and Management. Chapman & Hall, London, pp. 599–614.
- Garcia, J.C., Strube, M., Leingang, K., Keller, K., Mueckler, M.M. 1992. Amino acid substitutions at Tryptophan-388 and Tryptophan-412 of the HepG2 (GLUT1) glucose transporter inhibit transport activity and targeting to the plasma membrane in *Xenopus* oocytes. *J. Biol. Chem.* 267, 7770–7776.
- Gorman, K., Liu, Z., Denholm, I., Brueggen, K-U., Nauen, R. 2008. Neonicotinoid resistance development in the brown planthopper, *Nilaparvata lugen*. *Pest Manag. Sci.* 64, 1122–1125.
- Guillam, M. T., Burcelin, R., Thorens, B. 1998. Normal hepatic glucose production in the absence of GLUT2 reveals an alternative pathway for glucose release from hepatocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 95, 12317–12321.
- Han, E. K., Cotty, F., Sottas, C., Jiang, H., Michels, C. A. 1995. Characterization of AGT1 encoding a general alpha-glucoside transporter from *Saccharomyces*. *Mol. Microbiol.* 17, 1093–1107.
- Hayashi, H., Chino, M. 1990. Chemical composition of phloem sap from the uppermost internode of rice plant. *Plant Cell Physiol.* 31, 247–251.

- Hirokawa, T., Boon-Chieng, S., Mitaku, S. 1998. SOSUI: classification and secondary structure prediction system for membrane proteins. *Bioinformatics* 14, 378–379.
- Hutton, J. C., O'Brien, R. M. 2009. Glucose-6-phosphatase catalytic subunit gene family. *J. Biol. Chem.* 284, 29241–29245.
- Isabel, G., Martin, J-R., Chidami, S., Veenstra, J. A., Rosay, P. 2005. AKH-producing neuroendocrine cell ablation decreases trehalose and induces behavioral changes in *Drosophila*. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 288, R531–R538.
- Joost, H. G., Thorens, B. 2001. The extended GLUT-family of sugar/polyol transport facilitators: nomenclature, sequence characteristics, and potential function of its novel members. *Mol. Membr. Biol.* 18, 247–256.
- Kanamori, Y., Saito, A., Hagiwara-Komoda, Y., Tanaka, D., Mitsumasu, K., Kikuta, S., Watanabe, M., Cornette, R., Kikawada, T., Okuda, T. 2010. The trehalose transporter 1 gene sequence is conserved in insects and encodes proteins with different kinetic properties involved in trehalose import into peripheral tissues. *Insect. Biochem. Mol. Biol.* 40, 30–37.
- Kawabe, S., Fukumorita, T., Chino, M. 1980. Collection of rice phloem sap from stylets of homopterous insects severed by YAG laser. *Plant Cell Physiol.* 21, 1319–1327.
- Kaun, K.R., Chakabarty-Chatterjee, M., Sokolowski, M. B. 2008. Natural variation in plasticity of glucose homeostasis and food intake. *J. Exp. Biol.* 211, 3160–3166.
- Khan, Z. R., Saxena, R. C. 1988. Probing behavior of three biotypes of *Nilaparvata lugens* on different resistant and susceptible rice varieties. *J. Econ. Entomol.* 81, 1338–1345.
- Kikawada, T., Saito, A., Kanamori, Y., Nakahara, Y., Iwata, K., Tanaka, D., Watanabe, M., Okuda, T. 2007. Trehalose transporter 1, a facilitated and high-capacity trehalose transporter, allows exogenous trehalose uptake into cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 104, 11585–11590.
- Kikuta, S., Kiuchi, T., Aoki, F., Nagata, M. 2008. Development of an entomopathogenic nematode, *Steinernema carpocapsae*, in cultured insect cells under axenic conditions. *Nematology* 10, 845–851.
- Kikuta, S., Kiuchi, T., Aoki, F., Nagata, M. 2009. Recovery of infective juveniles of the entomopathogenic nematode *Steinernema carpocapsae* via factors produced by insect cells and symbiotic bacteria. *Nematology* 11, 611–618.

- Kikuta, S., Kikawada, T., Hagiwara-Komoda, Y., Nakashima, N., Noda, H. 2010. Sugar transporter genes of the brown planthopper, *Nilaparvata lugens*: A facilitated glucose/fructose transporter. *Insect. Biochem. Mol. Biol.* 40, 805–813.
- Kishimoto, R. 1976. Synoptic weather conditions inducing long-distance immigration of planthoppers, *Sogatella furcifera* Horvath and *Nilaparvata lugens* Stål. *Econ. Entomol.* 1, 95–109.
- Koyama, K. 1979. Rearing of the Brown planthopper, *Nilaparvata lugens* (STÅL) (Hemiptera : Delphacidae) on an Synthetic Diet (in Japanese). *Jap. J. Appl. Ent. Zool.* 23, 39–40.
- Levine, B., Klionsky, D. J. 2004. Development by self-digestion: molecular mechanisms and biological functions of autophagy. *Dev. Cell* 6, 463–477.
- Millar, N. S., Denholm, I. 2007. Nicotinic acetylcholine receptors: targets for commercially important insecticides. *Invert. Neurosci.* 7, 53–66.
- Miles, P. W. 1972. The saliva of Hemiptera. *Adv. Insect Physiol.* 9, 183–255.
- Mitsumasu, K., Kanamori, Y., Fujita, M., Iwata, K., Tanaka, D., Kikuta, S., Watanabe, M., Cornette, R., Okuda, T., Kikawada, T. 2010. Enzymatic control of anhydrobiosis-related accumulation of trehalose in the sleeping chironomid, *Polypedilum vanderplanki*. *FEBS J.* 277, 4215–4228.
- Moriwaki, N., Matsushita, K., Nishina, M., Kono, Y. 2003a. High concentrations of trehalose in aphid hemolymph. *Appl. Entomol. Zool.* 38, 241–248.
- Moriwaki, N., Matsushita, K., Nishina, M., Matsuda, K., Kono, Y. 2003b. High myo-inositol concentration in the hemolymph of planthoppers. *Appl. Entomol. Zool.* 38, 359–364.
- Mueckler, M. 1994. Facilitative glucose transporters. *Eur. J. Biochem.* 219, 713–725.
- Mun, J. H., Song, Y. H., Heong, K. L., Roderick, G. K. 1999. Genetic variation among Asian populations of rice planthoppers, *Nilaparvata lugens* and *Sogatella furcifera* (Hemiptera: Delphacidae): mitochondrial DNA sequences. *Bull. Entomol. Research* 89, 245–253.
- Nagata, T., Masuda, T. 1980. Insecticide susceptibility and wing-form ratio of the brown planthopper, *Nilaparvata lugens* (STÅL) (Hemiptera : Delphacidae) and the white backed planthopper, *Sogatella furcifera* (HORVATH) (Hemiptera : Delphacidae) of Southeast Asia. *Appl. Entomol. Zool.* 15, 10–19.

- Nasu, S., Suenaga, H. 1958. On the embryonic development of planthopper (in Japanese with English summary). *Bull. Kushu Agric. Expt. Stn.* 5, 71–84.
- Noda, H., Kawai, S., Koizumi, Y., Matsui, K., Zhang, Q., Furukawa, S., Shimomura, M., Mita, K. 2008. Annotated ESTs from various tissues of the brown planthopper *Nilaparvata lugens*: a genomic resource for studying agricultural pests. *BMC Genomics* 9, 117.
- Normile, D. 2008. Reinventing rice to feed the world. *Science* 321, 330–333.
- Otsuka, A., Watanabe, T., Suzuki, Y., Matsumura, M., Furuno, A., Chino, M. 2005. A migration analysis of the rice planthopper *Nilaparvata lugens* from the Philippines to East Asia with three-dimensional computer simulations. *Popul. Ecol.* 47, 143–150.
- Pao, S. S., Paulsen, I. T., Saier, M. H. Jr. 1998. Major facilitator superfamily. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 62, 1–34.
- Pascual, I., Berjón, A., Lostao, M. P., Barber, A. 2006. Transport of D-galactose by the gastrointestinal tract of the locust, *Locusta migratoria*. *Comp. Biochem. Physiol. B.* 143, 20–26.
- Price, D. R. G., Karley, A. J., Ashford, D. A., Isaacs, H. V., Pownall, M. E., Wilkinson, H. S., Gatehouse, J. A., Douglas, A. E. 2007a. Molecular characterisation of a candidate gut sucrose in the pea aphid, *Acyrtosiphon pisum*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 37, 307–317.
- Price, D. R. G., Wilkinson, H. S., Gatehouse, J. A. 2007b. Functional expression and characterisation of a gut facilitative glucose transporter, NIHT1, from the phloem-feeding insect *Nilaparvata lugens* (rice brown planthopper). *Insect Biochem. Mol. Biol.* 37, 1138–1148.
- Price, D. R. G., Tibbles, K., Shigenobu, S., Smertenko, A., Russel, C. W., Douglas, A. E., Fitches, E., Gatehouse, A. M. R., Gatehouse, J. A. 2010. Sugar transporters of the major facilitator superfamily in aphids; from gene prediction to functional characterization. *Insect Mol. Biol.* 19, 97–112.
- Puinean, A. M., Denholm, I., Millar, N. S., Nauen, R., Williamson, M. S. 2010. Characterisation of imidachloprid resistance mechanisms in the brown planthopper, *Nilaparvata lugens* Stål (Hemiptera: Delphacidae). *Pestic. Biochem. Physiol.* 97, 129–132.

- Quick, M., Loo, D. D. F., Wright, E. M. 2001. Neutralization of a conserved amino acid residue in the human Na⁺/glucose transporter (hSGLT1) generates a glucose-gated H⁺ channel. *J. Biol. Chem.* 276, 1728–1734.
- Reinders, A., Sivitz, A. B., Starker, C. G., Gantt, J. S., Ward, J. M. 2008. Functional analysis of LjSUT4, a vacuolar sucrose transporter from *Lotus japonicus*. *Plant Mol. Biol.* 68, 289–299.
- Rhodes, J. D., Croghan, P. C., Dixon, A. F. G. 1997. Dietary sucrose and oligosaccharide synthesis in relation to osmoregulation in the pea aphid, *Acyrtosiphon pisum*. *Physiol. Entomol.* 22, 373–379.
- Saito, S. 1963. Trehalose in the body fluid of the silkworm, *Bombyx mori* L. *J. Insect. Physiol.* 9, 509–519.
- Sakai, T., Sogawa, K. 1976. Effects of nutrient compounds on sucking response of the brown planthopper, *Nilaparvata lugens* (Homoptera: Delphacidae). *Appl. Entomol. Zool.* 11, 82–88.
- Sakurai, M., Furuki, T., Akao, K., Tanaka, D., Nakahara, Y., Kikawada, T., Watanabe, M., Okuda, T. 2008. Vitrification is essential for anhydrobiosis in an African chironomid, *Polypedilum vanderplanki*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 105, 5093–5098.
- Sanders, H. R., Evans, A. M., Ross, L. S., Gill, S. S. 2003. Blood meal induces global changes in midgut gene expression in the disease vector, *Aedes aegypti*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 33, 1105–1122.
- Satake, S., Kawabe, Y., Mizoguchi, A. 2000. Carbohydrate metabolism during starvation in the silkworm *Bombyx mori*. *Arch. insect Biochem. Physiol.* 44, 90–98.
- Siegert, K. J. 1987. Carbohydrate metabolism in starved fifth instar larvae of *Manduca sexta*. *Arch. insect Biochem. Physiol.* 4, 151–160.
- Stambuk, B. U., Panek, A. D., Crowe, J. H., Crowe, L. M., de Araujo, P. S. 1998. Expression of high-affinity trehalose-H⁺ symport in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim. Biophys. Acta.* 1379, 118–128.
- Stergiopoulos, K., Cabrero, P., Davies, S-A., Dow, J. A. T. 2009. Salty dog, an SLC5 symporter, modulates *Drosophila* response to salt stress. *Physiol. Genomics* 37, 1–11.
- Sobczak, K., Bangel-Ruland, N., Leier, G., Weber, W-M. 2010. Endogeneous transport systems in the *Xenopus laevis* oocyte plasma membrane. *Methods* 51, 183-189.

- Sogawa, K. 1982. The rice brown planthopper: feeding physiology and host plant interactions. *Annu. Rev. Entomol.* 27, 49–73.
- Sonnhammer, E. L., von Heijne, G., Krogh, A. 1998. A hidden Markov model for predicting transmembrane helices in protein sequences. *Proc. Int. Conf. Intell. Syst. Mol. Biol.* 6, 175–182.
- Takanaga, H., Frommer, W. B. 2010. Facilitative plasma membrane transporters function during ER transit. *FASEB J.* 24, 2849–2858.
- Tamori, Y., Hashiramoto, M., Clark, A.E., Mori, H., Muraoka, A., Kadowaki, T., Holman, G.D., Kasuga, M. 1994. Substitution at Pro(385) of GLUT1 perturbs the glucose transport function by reducing conformational flexibility. *J. Biol. Chem.* 269, 2982–2986.
- Tamura, K., Dudley, J., Nei, M., Kumar, S. 2007. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol. Biol. Evol.* 24, 1596–1599.
- Thorens, B., Cheng, Z. Q., Brown, D., Lodish, H. F. 1990. Liver glucose transporter: a basolateral protein in hepatocytes and intestine and kidney cells. *Am. J. Physiol.* 259, C279–C285.
- Vaandrager, S. H., Haller, T. B., Van, Marrewijk, W. J. A., Beenackers, A. M. Th. 1989. Fractionation and kinetic properties of trehalase from flight muscles and haemolymph of the locust, *Locusta migratoria*. *Insect Biochem.* 19:89–94.
- Vardanis, A. 1963. Glycogen synthesis in the insect fat body. *Biochim. Biophys. Acta.* 6, 565–573.
- Wang, Y., Chen, J., Zhu, Y. C., Ma, C., Huang, Y., Shen, J. 2008. Susceptibility to neonicotinoids and risk of resistance development in the brown planthopper, *Nilaparvata lugens* (STÅL) (Homoptera: Delphacidae). *Pest Mang. Sci.* 64, 1278–1284.
- Watanabe, M., Kikawada, T., Minagawa, N., Yukuhiro, F., Okuda, T. 2002. Mechanism allowing an insect to survive complete dehydration and extreme temperatures. *J. Exp. Biol.* 205, 2799–2802.
- Wood, I. S., Trayhurn, P. 2003. Glucose transporters (GLUT and SGLT): expanded families of sugar transport proteins. *Br. J. Nutr.* 89, 3–9.
- Wright, E. M. 1993. The intestinal Na⁺/glucose cotransporter. *Annu. Rev. Physiol.* 55, 575–589.

- Wright, E. M. 1998. Genetic Disorders of Membrane Transport I. Glucose Galactose Malabsorption. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 275, G879–G882.
- Wright, E. M., Hirayama, B. A., Loo, D. F. 2007. Active sugar transport in health and disease. *J. Intern. Med.* 261, 32–43.
- Wyatt, G. 1967. The biochemistry of sugars and polysaccharides in insects. *Adv. Insect Physiol*, 4, 287–360.
- Zhou, Y., Qu, H., Dibley, K. E., Offler, C. E., Patrick, J. W. 2007. A suite of sucrose transporters expressed in coats of developing legume seeds includes novel pH-independent facilitators. *Plant J.* 49, 750–764.
- Zinke, I., Schütz, C. S., Katzenberger, J. D., Bauer, M., Pankratz, M. J. 2002. Nutrient control of gene expression in *Drosophila*: microarray analysis of starvation and sugar-dependent response. *EMBO J.* 21, 6162–6173.