

平成 21年 6月 3日現在

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2006～2008

課題番号：18380042

研究課題名（和文） 昆虫-植物間相互作用におけるプロテオーム解析

研究課題名（英文） Herbivore-plant interaction by proteome analysis

研究代表者

杉村 順夫 (SUGIMURA YUKIO)

京都工芸繊維大学・工芸科学研究科・教授

研究者番号：20273542

研究成果の概要：

クワ-カイコ実験系を用いて、タンパク質レベルでの相互関係を明らかにした。カイコ体内に取込まれるクワウレアーゼの accessory proteins (ureD, ureF, ureG) 遺伝子を単離・同定した。また、クワ幼苗でのウレアーゼ活性とそれら遺伝子の発現パターンを明らかにした。一方、カイコに取込まれる7種の新規タンパク質を見出し、その1つは sulfotransferase 類似タンパク質であると同定した。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	2,700,000	810,000	3,510,000
2007年度	2,600,000	780,000	3,380,000
2008年度	2,000,000	600,000	2,600,000
年度			
年度			
総計	7,300,000	2,190,000	9,490,000

研究分野：植物分子生理学

科研費の分科・細目：農学・応用昆虫学

キーワード：(1) 植物 (2) 昆虫 (3) タンパク (4) プロテオーム (5) 酵素

1. 研究開始当初の背景

カイコはクワのみを摂食する単食性昆虫であり、植物-昆虫間の相互関係を解明する優れた実験系と考えられる。これまでに、クワに含まれるウレアーゼが選択的にカイコ幼虫体内に取り込まれ、この酵素活性により体内で発生した尿素の分解に寄与していることを明らかにした。また、尿素の分解物であるアンモニアは、絹糸タンパク質合成のアミノ酸素材として利用されており、クワウレアーゼに依存した窒素代謝がカイコ体内で作動しているが予想される。

カイコ幼虫の消化液は pH 10 以上であり、高活性の好アルカリ性タンパク分解酵素類が検出されている。従って、クワウレアーゼはこの消化液による失活・分解から保護され、上皮細胞の絨毛突起から選択的に取り込まれ、体内移行すると考えられる。しかし、未だクワウレアーゼのカイコへの取り込みと体挙動については明らかにされていない。

植物-昆虫間の相互関係の解析は主として低分子有機化合物に限られ、植物から誘引物質、忌避物質、摂食促進物質などが抽出・同定されてきた。それ故に、摂食物中の含まれ

るタンパク質が活性を保持した状態で昆虫体内へと取り込まれ、昆虫体内で機能している知見とさらなる解析は、植物-昆虫間の相互関係を新しい視点で捉えることができると考えられる。

2. 研究の目的

クワウレアーゼのカイコ体内への取り込み機構を明らかにする研究課題とウレアーゼ以外タンパク質で、クワ葉に存在し、且つ、カイコ体内に取り込まれる新規タンパク質を探索する研究課題に大別できる。

(1)クワウレアーゼのカイコ体内への取り込み機構：ウレアーゼ (EC 3.5.1.5., urea amidohydrolase) はニッケルを活性中心に持つメタロ酵素であり、ニッケルが活性中心に付加することにより活性が発現する。活性中心にニッケルが付加されるには、細菌類では、ureD, ureE, ureF, ureG の4種類の accessory proteins と urease apo-protein が複合体を形成する必要があることが判っている。クワ葉内で accessory proteins の働きにより活性化された urease apo-protein は、単独もしくは、accessory proteins との複合体として、カイコ体内へと取り込まれる可能性が考えられるが、未だ明らかにされていない。同時にクワウレアーゼがカイコ体内に選択的に取り込まれるには、ウレアーゼのある特定のアミノ酸配列が中腸上皮細胞膜で認識されるものと推定される。このことを検証するためには、urease apo-protein 遺伝子 (取得済み) および accessory proteins 遺伝子を同定し、それをもとに各種の変異ウレアーゼタンパク質を創出し、検討必要がある。

本研究課題では、urease apo-protein 遺伝子の*大腸菌*での発現検討、accessory proteins 遺伝子の単離・同定、クワ幼苗での同定遺伝子の発現パターンとウレアーゼ活性との関連性について明らかにする。

(2)ウレアーゼ以外の取り込みタンパク質の探索：ウレアーゼ以外のタンパク質の取り込みについては全く未知である。ウレアーゼが極めて特異な事例であるのか、または、他のタンパク質の取り込みもあり、さらなる多様な植物-昆虫相互関係がタンパク質レベルで成立しているのかを明らかにする。

3. 研究の方法

(1)クワ accessory proteins 相同遺伝子の単離

すでに、細菌、高等植物から単離されている遺伝子から推定されるアミノ酸配列から、相同性が高い領域を見出し、この配列に対応した縮合プライマーを作成した。幼根から調製した cDNA を鋳型として、RT-PCR をおこない、増幅されてきた断片の配列を決定し、そこから推定されるアミノ酸配列をもとに判断しながら、遺伝子断片を得た。さらに、

その断片の 5'上流域および 3'下流域を 5', 3'RACE 法を用いてそれぞれクローニングし、最終的にアミノ酸配列がコードされていると予想される全領域をクローニングして塩基配列を決定した。なお、各遺伝子の発現解析は、クワ *Actin* (accession no. AB486005)を内部標準とし、RT-PCR を用いて半定量法により検討した。

(2)ウレアーゼ活性の検出とタンパク質の解析

ウレアーゼ活性染色は Kurahashi et al. (2005) の方法に準じて行った。各サンプルから粗タンパク質液を調製し、これを native-PAGE で分離した後、Nitroblue tetrazolium chloride を用いてフォルマジンバンドの強度により検出する in-gel 活性染色を行った。

クワウレアーゼタンパク質は、クワウレアーゼに交叉反応するナタマメウレアーゼに対する単クローナル抗体を用いて、western blot により検出した。

(3)カイコ体内に取り込まれる新規タンパク質の探索

クワ葉をリン酸緩衝液で抽出した全タンパク質を biotinylation kit を用いて標識した。この標識タンパク質を人工飼料育した 5 齢 6-7 日のカイコに経口投与したのち、8 日目に体液を採取した。陰イオンクロマト、ゲル濾過クロマト、陽イオンクロマト、疎水性相互作用クロマトを用いて体液に含まれる夾雑タンパク質を取り除いたのち、2次元 (2D) 電気泳動 (一次元、pH 5-8 ; 二次元 12.5%ゲル) により分離した。Biotin 標識タンパク質は、HRP 標識ストレプトアビジンによる ligand blot により検出した。

(4)クワ葉からの新規タンパク質の分離と同定

クワ葉から抽出した全タンパク質を陰イオンクロマトで分画し、2D 電気泳動で分離した。銀染色したのち、目的とする新規タンパク質のスポットをゲルから切り出し、ゲル内消化した後、MALDI-TOF MS による PMF (peptide mass fingerprint) 解析した。

4. 研究成果

(1) *大腸菌*発現系を用いたクワウレアーゼ発現系の構築

クワウレアーゼ遺伝子は、長岡らにより登録された (accession no. AB479106) を用い、His-, GST-tag を N 末端に有するタンパク質、全く持たないタンパク質を4種類発現する構成を構築し、これを*大腸菌*6種類の組み合わせでその発現方法を検討した。しかし、全ての組み合わせで、*大腸菌*が致死、もしくは、わずかに発現しても発現タンパク質が分解された。*A. thaliana* におけるウレアーゼは、ureD, ureF, ureG を同時に発現することにより、活

性を有するタンパク質として大腸菌で発現させることが出来る。すなわち、単独でクワウレアーゼタンパク質を大腸菌で発現させた場合、大腸菌のもつ *urease apo-protein* もしくは *accessory proteins* との関係により、大腸菌の生育状態に悪影響を与えた可能性が考えられる。活性を有するクワウレアーゼを発現させるためには、*accessory proteins* 遺伝子との共発現が必要と考えられ、これら *accessory proteins* 遺伝子の単離を行うことにした。

(2)クワ *accessory proteins* 相同遺伝子の単離

クワの *ureD*, *ureF*, *ureG* 相同遺伝子を播種後 6 日の幼根から単離した (accession no. AB479109, AB 479108, AB479107)。それぞれの配列から推定されるアミノ酸配列は、既知の *A. thaliana* などの高等植物と約 90 % の高い相同性を有していた。このことから、クワ *accessory proteins* はすべてクローニングでき、その配列を明らかに出来たものと判断した。特に、クワ *ureG* は、他の高等植物 *ureG* 同様、細菌における *ureE*, *ureG* が縮合した構造、すなわち、N 末端にニッケル結合性の His, Asp に富む領域とニッケルの受け渡しに必要な ATP, GTP が結合するのに必要と考えられるヌクレオチド結合モチーフ P-loop が推定アミノ酸配列から見出された。*K. aerogenes* では、*ureD*, *ureF* は複合体を作り、さらに、*ureD* を介してウレアーゼと化学的な結合を作っていることが知られている。高等植物の *urease apo-protein* および *accessory proteins* が同様な複合体を形成して、ウレアーゼ活性が発現されるのかについては報告されていない。本研究で単離された *accessory proteins* 遺伝子は、細菌のそれとも高い相同性を有していることから、同様の複合体形成が想定され、この複合体がそのままカイコ幼虫体内に選択的に取り込まれている可能性が考えられる。

(3)発芽-成長期におけるウレアーゼ活性と *urease apo-protein* 遺伝子及び *accessory proteins* 遺伝子の発現パターン

ウレアーゼ活性のカイコ体内での発現を考察するためには、ウレアーゼ関連遺伝子のクワ葉組織で発現を明らかにする必要がある。播種後 2 日、4 日の発芽開始種子および 6 日、8 日の実生苗を器官部位別 (幼根, 胚軸, 子葉) に収穫し、ウレアーゼ活性を測定した。その結果、6 日と 8 日の幼根のみに強いウレアーゼ活性が検出されると共に、*urease apo-protein* およびウレアーゼ関連遺伝子 (*ureD*, *ureF*, *ureG* 遺伝子) の発現が観察された。しかし、ウレアーゼ活性のない他のサンプルでも、*urease apo-protein* 遺伝子およびウレアーゼ関連遺伝子の発現が検出され、サン

プル間で著しい量的な差異が見られなかった。細菌のウレアーゼ関連遺伝子はひとつのオペロンを形成しており、その発現は協調的に制御されている。クワ発芽時におけるウレアーゼ関連遺伝子発現も同様に協調的に制御されている可能性が本実験から明らかになった。しかし、遺伝子発現が協調的に作動しているにもかかわらず、活性発現が伴わないことから、翻訳過程での制御、翻訳後の修飾、新規なウレアーゼ活性調節因子の関与などが考えられ、今後の検討が必要である。

(4)カイコ体内に取り込まれる新規タンパク質の探索

ビオチン標識したクワ葉タンパク質を 5 齢 6 日のカイコ幼虫に経口投与した。一晚飼育したのち、体液を採取し、取り込まれたタンパク質を 2D 電気泳動とリガンドブロッキングで分析した。その結果、以下の 7 種類のタンパク質が検出された:

タンパク質 1: 分子量 29 K, pI=5.71

タンパク質 2: 分子量 29 K, pI=5.93

タンパク質 3: 分子量 29 K, pI=6.20

タンパク質 4: 分子量 29 K, pI=6.57

タンパク質 5: 分子量 32 K, pI=6.02

タンパク質 6: 分子量 32 K, pI=6.32

タンパク質 7: 分子量 32 K, pI=6.70

これらのタンパク質を陰イオン交換クロマトグラフィーでクワ葉から分離し、2D 電気泳動で単一スポットとして確認できたタンパク質 5 と 6 について、PMF (peptide mass fingerprint) 分析した。その結果、タンパク質 5 はデータベースに対応するタンパク質がなく、現時点において未登録タンパク質であった。一方、タンパク質 6 は *Vitis vinifera* (ブドウ) の unnamed protein product と一致する 9 種類のペプチド断片が見出された。また、分子量、pI 値も極めて酷似していた。これらの結果からタンパク質 6 は unnamed protein product と相同性を有するタンパク質であると推定された。なお、unnamed protein product の推定アミノ酸配列の解析から、sulfotransferase ドメインの存在が示唆されている。従って、タンパク質 6 は sulfotransferase 類似タンパク質であると結論づけた。他のタンパク質については、今後の検討課題である。

以上の結果より、クワに含有されるタンパク質がウレアーゼだけではなく、少なくとも 7 種類のタンパク質が取り込まれることが明らかとなり、これらタンパク質は何らかの形でカイコ体内で機能している可能性があり、クワタンパク質に依存したカイコの生存戦略を解明する手がかりが得られたとものと判断される。

クワ葉にはカルシウム塩 (炭酸カルシウム、シュウ酸カルシウム) や粘性多糖類がある特定の細胞に局在していることを明らかにし

た。すでに、炭酸カルシウムはカイコの摂食行動に影響を与えていることが報告されており、これらの物質に注目した、新規なクワ-カイコの相互関係の解析が可能となった。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 5 件)

- (1) Katayama,H., Takano,R., Sugimura,Y. Localization of mucilaginous polysaccharides in mulberry leaves. *Protoplasma*, 233, 157-163 (2008) 査読あり。
- (2) Katayama,H., Fujibayashi,Y., Nagaoka,S., Sugimura,Y. Ultrastructural and immunochemical features of cell wall sac formed in mulberry (*Morus alba*) idioblasts. *J. Plant Res.*, 121, 201-205 (2008) 査読あり。
- (3) Sugimura,Y., Nitta,I. Cytological changes during cell wall sac formation in mulberry idioblasts. *Protoplasma*, 231, 123-125 (2007) 査読あり。
- (4) Katayama,H., Fujibayashi,Y., Nagaoka,S., Sugimura,Y. Cell wall sheath surrounding calcium oxalate crystals in mulberry idioblasts. *Protoplasma*, 231, 245-248 (2007) 査読あり。
- (5) Nitta,I., Kida,A., Fujibayashi,Y., Katayama, H., Sugimura,Y. Calcium carbonate deposition in a cell wall sac formed in mulberry idioblasts. *Protoplasma*, 228, 201-208 (2006) 査読あり。

[学会発表] (計 6 件)

- (1)大西祐作・間宮寛之・長岡純治・杉村順夫
カイコ幼虫体内へ取り込まれるクワ葉タンパク質の同定. 日本蚕糸学会九州支部・関西支部合同大会. 2008年11月14日. 福岡市
- (2)大西祐作・間宮寛之・長岡純治・杉村順夫
カイコ中腸組織からのウレアーゼ結合タンパク質の分離. 日本蚕糸学会第78回大会. 2008年3月21日. 名古屋市
- (3)中山美緒・間宮寛之・長岡純治・杉村順夫. クワ種子発芽時におけるウレアーゼ活性に関わる遺伝子の発現. 日本蚕糸学会九州支部・関西支部合同大会. 2007年11月9日. 京都市
- (4)間宮寛之・長岡純治・杉村順夫・平山 力. カイコ体液から検出されるクワ葉タンパク質. 日本蚕糸学会第77回大会. 2007年4月4日. 筑波市
- (5)中山美緒・間宮寛之・長岡純治・杉村順夫
クワ種子発芽時におけるウレアーゼ活性の発現. 日本蚕糸学会第77回大会. 2007年4月

4 日. 筑波市

- (6)長岡純治・中山美緒・高山尊之・間宮寛之・杉村順夫. 種子発芽時におけるクワウレアーゼ、UreG 遺伝子の単離および発現. 日本蚕糸学会九州支部・関西支部合同大会. 2006年11月10日. 福岡市

[図書] (計 2 件)

- (1)間宮寛之・杉村順夫. クワタンパク質を利用したカイコの生存戦略. 虫たちが語る生物学の未来. pp.10-13. (財)衣笠会. 京都 (2009)
- (2) Sugimura,Y., Nagaoka,S. Plant-herbivore interaction, with special references to mulberry leaves and the silkworm, *Bombyx mori*. *Insect Physiology: New Research* (ed. R.P.Maes), pp.1-5. Nova Sci. Publishers, New York (2008)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

杉村 順夫 (SUGIMURA YUKIO)
京都工芸繊維大学・工芸科学研究科・教授
研究者番号：20273542

(2) 研究分担者

尾山 廣 (OYAMA HIROSHI)
日本薬科大学・薬学部・教授
研究者番号：50221700

長岡 純治 (NAGAOKA SUMIHARU)
京都工芸繊維大学・工芸科学研究科・助教
研究者番号：00303933

(3) 連携研究者