

研究種目：若手研究（B）
 研究期間：2008～2009
 課題番号：20780040
 研究課題名（和文） カイコ寄主植物クワの乳液由来耐虫性タンパク質の毒性発現機構と
 応用利用
 研究課題名（英文） Mechanisms of toxicity of anti-insect proteins from latex of mulberry
 trees known as a host plant of silkworms.
 研究代表者 和佐野 直也 (WASANO NAOYA)
 独立行政法人農業生物資源研究所 昆虫－昆虫・植物間相互作用研究ユニット
 特別研究員
 研究者番号：00469850

研究成果の概要（和文）：

クワ耐虫性タンパク質(MLX56)大量発現シロイヌナズナの作出を目的として、シロイヌナズナに導入した結果、*mlx56* 遺伝子の発現が転写レベルで確認されたが、タンパク質の発現は見られず、エリサン、ヨトウガに対する毒性も確認されなかった。MLX56 をエリサン幼虫およびカイコ幼虫に供試し1日後の中腸組織の形態を観察したところ、中腸組織の崩壊は確認されなかったが、FITCで標識したMLX56を供試した結果、エリサン幼虫の囲食膜全体にわたってMLX56の結合が観察された。カイコ幼虫のそれには結合せず、MLX56は未消化のまま糞に排泄された。カイコ幼虫は食したMLX56をそのまま排泄することでクワの耐虫性機構を回避していることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：

A *mlx56* gene encoding mulberry anti-insect protein was introduced into *Arabidopsis thaliana* in order to elucidate the possibility of application use of a *mlx* gene. The expression of *mlx56* gene in leaves was observed at a transcription level, however, the MLX56 protein could not be detected by immunoblot analysis, and no toxicity was observed against larvae of the Eri-silkworms and the cabbage moth. The MLX56 bind at entire part of peritrophic membrane of larvae of the Eri-silkworm whereas little binding property was observed against that of larvae of the silkworm. The results strongly suggested that the target site of the MLX56 is the peritrophic membrane, and larvae of the silkworm circumvent from the MLX56 by developing low-affinity peritrophic membrane with the MLX56.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2009年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,300,000	690,000	2,990,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：応用昆虫学

キーワード：クワ、乳液、MLX56、耐虫性、シロイヌナズナ、囲食膜、エリサン、カイコ

1. 研究開始当初の背景

近年、カイコの餌として長年利用されてきたクワの乳液に強い耐虫効果があることが発見され、乳液に含まれる耐虫物質はデオキシノジリマイシン等の糖類似アルカロイド群であった。しかしながら、これらの成分を除去しても半分以上の耐虫活性が残った。そこで、さらに耐虫成分の精製を進めた結果、強い成長阻害活性を示す新規糖タンパク質(MLX56)を単離した。しかしながら、タンパク質の昆虫に対する作用機構はまったくわかっていない。

2. 研究の目的

(1) クワ耐虫性タンパク質(MLX56)大量発現シロイヌナズナの作出および耐虫性(*mIx*)遺伝子応用利用の可能性の検討し、遺伝子工学的手法を用いたクワ耐虫性タンパク質の農業を中心とした産業への利用を目指す。

(2) MLX56をカイコおよびエリサン幼虫に供試後の中腸組織の形態変化を観察し、MLX56がなぜ昆虫に成長阻害を引き起こすのか、またクワスペシャリストのカイコに対してなぜ毒性を示さないのか組織学的に調査する。

(3) クワの乳液になぜ新規耐虫性タンパク質が大量に含まれるのか、また他のクワ科植物においても同様な物質が含まれるのか興味深い。そこで、クワ科植物における耐虫性遺伝子の多様性と進化について検討を行う。

(4) 新たなクワ耐虫性タンパク質のスクリーニングを行う。

3. 研究の方法

1) シロイヌナズナ由来Atext1遺伝子のシグナルペプチドをクワ耐虫性遺伝子のそれと入れ替え、さらにタンパク質のC末端にインフルエンザ表面抗原の配列由来であるHAタグを付加し、タンパク質を容易に検出・精製ができるようにしたキメラタンパク質を発現させるためのコンストラクト(Atext-MLX-HApBI)を作製し、シロイヌナズナに遺伝子を導入した。対照区は空ベクターを導入して得られた形質転換体を用いた。得られた形質転換体(T1世代)を2ヶ月生長させ得られた葉から全RNAおよびタンパク質を抽出しRT-PCR、SDS-PAGEおよびimmunoblotによりタンパク質の発現を確認した。Immunoblotは、抗HA抗体と抗MLX56抗体を用いて行った。また、エリサン、ヨトウガ1齢幼虫を用いてバイオアッセイを行った。

(2) 精製したMLX56をエリサン幼虫およびカイコ幼虫に供試し、1日後の中腸組織

の形態を観察した。また、同時に糞を回収しSDS-PAGEによりタンパク質の構成成分を調査した。また、上記タンパク質をFITCで標識し、エリサン幼虫およびカイコ幼虫に供試し1日後に解剖し、各組織を蛍光顕微鏡により観察した。

(3) 11種類のクワ科植物をつくば、石垣島よりサンプリングし、それらの葉か全DNAを抽出した後、*mIx*遺伝子の存在をPCR法により調査した。増幅したDNA断片は塩基配列の決定を行い、ORF検索、アラインメント等解析を行った。

(4) カイコの餌として広く使用されるカラヤマグワ系栽培品種しんいちのせは、乳液に糖類似アルカロイドがほとんど含まれていないにもかかわらず、野生クワの一種シマグワのそれより強い昆虫成長阻害効果を示す。しんいちのせの乳液をタンパク質画分、糖類似アルカロイド画分に粗分画し、それぞれエリサン幼虫に対する毒性を検定した。また、乳液由来cDNAからESTデータベースを構築し、その中から耐虫性タンパク質候補のスクリーニングを試みた。

4. 研究成果

(1) MLX-HApBI、Atext-MLX-HApBI、ContpBIの3系統を構築した。それぞれの系統のT1世代を2株ずつ選抜し、生葉から全RNAを抽出し、RT-PCRを行った結果、MLX-HApBI、Atext-MLX-HApBI導入個体では*mIx56*遺伝子の発現が確認されたが、ContpBI導入株では*mIx56*遺伝子の発現は確認されなかった。葉タンパク質をSDS-PAGEで分析すると明確なMLX56タンパク質産生は観察されず、MLX56タンパク質およびHAペプチドに対する抗体を用いたimmunoblotでも対照区と比較してプロファイルの差は観察されなかった。また抗MLX56抗体によるimmunoblotでは少なくとも9種類のシロイヌナズナ葉タンパク質との交差反応が観察された。HAペプチドに対する抗体を用いたimmunoblotではまったくシグナルが検出されなかったため、導入した遺伝子の発現は翻訳レベルで停止していると思われた。エリサン、ヨトウガ1齢幼虫を用いて3種形質転換体に対するバイオアッセイにおいて、耐虫効果はまったく確認されなかった。

(2) 精製したMLX56をエリサン幼虫およびカイコ幼虫に供試し、1日後の中腸組織の形態を観察したところ、BT毒素を

供したときに観察されるような中腸組織の崩壊は確認されなかった。しかしながらFITCで標識したMLX56を上記幼虫に供試し、1日後に中腸の各組織を蛍光顕微鏡で観察したところ、エリサン幼虫の囓食膜全体にわたってMLX56の結合が観察されたが、カイコ幼虫のそれにはほとんど結合せず、MLX56のほとんどは未消化のまま糞に排泄された。MLX56の結合は他の中腸組織では確認されなかったことから、MLX56のターゲットは囓食膜であることが推測され、カイコ幼虫は食したMLX56をそのまま排泄することでクワの耐虫性機構を回避していることが示唆された。

(3) クワ *mlx56* 遺伝子を 11 種類のクワ科植物の全 DNA を鋳型にして PCR を行うと、*Morus* 属植物のみ 2kb の DNA 断片の増幅が観察され、クワ科植物において *mlx* 遺伝子はクワにのみ存在することが示唆された。また、クワから増幅してきた DNA の塩基配列を決定した結果、クワの *mlx56* 遺伝子は少なくとも 8 種類観察され、クワゲノム上で多重遺伝子ファミリーを形成していることが示唆された。特に、SPPPP が重複に並ぶエクステンシンモチーフで [SPPPP]10、[SPPPP]9、[SPPPPPP]1 の存在が確認し、またこれらの遺伝子はすべて発現していることを確認した。この遺伝子のイントロンは 2 つ存在し、その位置が植物の広く分布しているクラス 1 キチナーゼのそれらとまったく同じであることから、*mlx56* 遺伝子は植物クラス 1 キチナーゼ遺伝子群と共通祖先を持ち、これらの遺伝子群から派生してきたものと考えられ、耐虫活性を獲得したがキチナーゼ活性は消失してしまったものと思われる。さらに、遺伝子重複により複数のコピー遺伝子を形成した結果、植物の乳液に大量にタンパク質を産生すること可能にしていると考えられた。これらの結果から、クワ科植物の中でクワは、進化の過程で独自の耐虫防御機構を獲得しているということが示唆された。

(4) しんいちのせの乳液をタンパク質画分、糖類似アルカロイド画分に粗分画し、それぞれエリサン幼虫に対する毒性を検定した結果、タンパク質画分は強い成長阻害活性を示すが、糖類似アルカロイド画分はほとんど毒性を示さなかった。また、エリサン幼虫の成長を阻害する MLX56 の耐虫効果は乳液全タンパク質のその半分以下であり、乳液中に未同定の耐虫性タンパク質の存在が示唆された。そこで乳液由来 cDNA から EST データベースを構築し、その中から耐虫性タンパク質候補のスクリーニングを試みた結果、これまで報告されていない新規タンパク質を含む 10 種類以上の生体防御タンパク質

の発現が確認された。このうちガラクトースに特異的なレクチンについて精製を行い、エリサン幼虫に対する耐虫活性を調査した結果毒性は確認できなかった。

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 1 件)

Wasano, N., Konno, K., Nakamura, M., Hirayama, C., Hattori, M., Tateishi, K. A unique latex protein, MLX56, defends mulberry trees from insects. *Phytochemistry* 70(7), 880-888. (2009)

[学会発表] (計 6 件)

① 和佐野直也, 秦珠子, 中村匡利, 今野浩太郎, 平山力 クワ耐虫性タンパク質の 2 種鱗翅目幼虫の中腸に対する結合特性 第 54 回日本応用動物昆虫学会 千葉大 2010 年 3 月

② Wasano, N., Konno, K., Nakamura, M., Hirayama, C., Hattori, M., Tateishi, K., A unique latex protein, MLX56, with chitin-binding and extensin domains defends mulberry trees from insects. Entomological Society of America 57th Annual Meeting, December 13-16, 2009, Indianapolis

③ 和佐野直也, 中村匡利, 今野浩太郎, 平山力 新たなクワ耐虫性タンパク質のスクリーニング 第 53 回応用動物昆虫学会 北海道大 2009 年 3 月

④ 和佐野直也, 中村匡利, 今野浩太郎, 平山力, 立石剣 クワ耐虫性タンパク質の諸性状 平成 21 年度蚕糸・昆虫機能利用学術講演会 東京農工大 2009 年 3 月

⑤ 和佐野直也 カイコとクワ間の複雑な相互関係 -耐虫性タンパク質からのアプローチ- 平成 21 年度蚕糸・昆虫機能利用学術講演会グループ研究会「分子レベルで解明されるカイコとクワの複雑な関係」東京農工大 2009 年 3 月

⑥ Wasano, N., Nakamura, M., Hirayama, C., Tateishi, K., Hattori, M., Konno, K. A novel latex protein confers insect resistance on mulberry trees: Involvement of the chitin-binding protein in larval toxicity in the midgut of caterpillars. International Symposium of Insect Midgut Biology April 6-12, 2008 China

〔産業財産権〕

○取得状況（計1件）

名称：耐虫性タンパク質、該耐虫性タンパク質
をコードする耐虫性遺伝子

発明者：和佐野直也、今野浩太郎

権利者：農業生物資源研究所

種類：

番号：2008-255640

取得年月日：2008年10月16日

国内外の別：国内

6. 研究組織

(1) 研究代表者

和佐野 直也 (WASANO NAOYA)

独立行政法人農業生物資源研究所

昆虫－昆虫・植物間相互作用研究ユニット

特別研究員

研究者番号：00469850