

令和 6 年 6 月 12 日現在

機関番号：17701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K05619

研究課題名(和文) 共生器官特異的ペプチドを標的としたRNAiによるアブラムシの共生戦略の解明

研究課題名(英文) Elucidation of symbiotic strategies of pea aphid by RNAi targeting symbiotic organ-specific peptides

研究代表者

内海 俊樹 (Uchiumi, Toshiki)

鹿児島大学・理工学域理学系・教授

研究者番号：20193881

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：アブラムシは、体内の菌細胞とよばれる共生器官で、細菌ブフネラとの絶対共生を成立させており、そこには、機能不明の菌細胞特異的システインリッチペプチド(BCR)が存在する。本研究の目的は、「BCRはブフネラとの共生に必須である」ことを証明することである。エンドウヒゲナガアブラムシの菌細胞には、BCR1-6とBCR8の7種のBCRが存在する。それぞれのBCR遺伝子を標的としたsiRNAを混合した人工飼料の給餌により、発現の抑制を試みた。siRNAの給餌により、給餌開始72時間後までの生存率が著しく低下した。本研究により、アブラムシのBCRは、ブフネラとの共生に必須であることが強く示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

地球上の殆どのアブラムシは、ブフネラと共生している。BCRは、全てのアブラムシの菌細胞に共通して存在すると推定されている。従って、BCRの遺伝子発現やペプチド機能を抑制する薬剤の探索は、アブラムシ特異的な新規殺虫剤に結びつく可能性がある。マメ科植物と根粒菌の共生では、根粒中のシステインリッチペプチド(NCR)が必須である。NCRはマメ科植物由来であるが、生物学的特性はBCRと酷似している。本研究により、「アブラムシとマメ科植物は、完全に独立した進化を辿ったにも関わらず、よく似たシステインリッチペプチドで共生微生物を制御する。」という驚くべき共通原理の存在が明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：Aphids establish obligate symbiosis with Buchnera in their symbiotic organ, bacteriocytes, where Bacteriocyte Cysteine-Rich (BCR) peptides exist specifically. The aim of this research is to clarify that the BCR peptides are essential for the symbiosis with Buchnera. In the bacteriocytes of the pea aphid, Acyrthosiphon pisum, seven genes of BCRs, i.e. BCR1-6 and BCR8, are expressed specifically. We repressed their expression by feeding the aphids artificial diet containing siRNAs targeting each BCR gene. Feeding the aphids with siRNAs resulted not only in the reduction of the expression of the target gene but also in the significant reduction of their survival rate during 72 hours of feeding. This study demonstrates that BCRs of the aphid are essential for symbiosis with Buchnera.

研究分野：植物-微生物相互作用

キーワード：アブラムシ ブフネラ 共生 菌細胞 システインリッチペプチド RNAi マメ科植物 根粒

1. 研究開始当初の背景

植物の篩管液を栄養源とする小型の昆虫であるアブラムシは、世界中で農作物や園芸植物に甚大な被害を与えており、我が国の虫害発生でも第1位である(福田ら, *日植病報* 81, 127, 2015)。一月で 20,000 倍に増えるともいわれるアブラムシの繁殖力を支えているのは、ブフネラとの共生である。世界中の約 4,000 種のアブラムシは、ごく僅かの例外を除いて、ブフネラと共生している。この共生は細胞内共生の代表例であり、ブフネラは、共生器官であるバクテリオサイト(菌細胞)の細胞内部に存在している。アブラムシとブフネラの共生は、両者のゲノム解析により、互いに欠けている生合成系を相補う絶対的栄養共生であることが明らかとなっている。

菌細胞に特異的に発現しているシステインリッチペプチドの遺伝子が同定され、*BCR* (*Bacteriocyte specific Cysteine Rich peptide*) 遺伝子と名付けられた (Shigenobu and Stern, *Proc R. Soc. B.*, 280, 20121952, 2013)。例えば、エンドウヒゲナガアブラムシ (*Acyrtosiphon pisum*) ApL 系統は、そのゲノム上に 7 種の *BCR* 遺伝子を保持しており、高度に保存されたシグナル配列と、50~80 アミノ残基からなる成熟ペプチドを暗号化している。成熟ペプチドのアミノ酸配列は多様性に富んでいるが、6 または 8 個のシステイン残基の位置は保存されている。これまでに調べられた範囲では、*BCR* 遺伝子は、多くのアブラムシのゲノム上で確認されており (Loth *et al.*, *Int. J. Mol. Sci.*, 23, 12480, 2022)、ブフネラとの共生で重要な役割を担っていると予想される。

このような特徴を有するペプチドの遺伝子は、マメ科植物のゲノムにも存在しており、そのペプチドは、根粒菌との共生の場である根粒にだけ存在する。マメ科植物と根粒菌の共生もまた、典型的な細胞内共生であり、この根粒特異的システインリッチペプチド群は *NCR* (*Nodule specific Cysteine Rich peptide*) と名付けられた。*NCR* は、根粒細胞内に侵入した根粒菌に直接作用して細胞分裂を制御することによりバクテロイド(=共生状態の根粒菌)へと分化させる、根粒菌との共生に必須なマメ科植物の共生戦略分子であることが明らかとなった (Van de Velde *et al.*, *Science* 327, 1122, 2010)。

エンドウヒゲナガアブラムシの 4 種の合成 *BCR* ペプチドについて、強い抗菌活性や細胞膜の選択透過性を変化させる活性を有することが明らかとなった (Uchi *et al.*, *Microbes Environ.*, 34, 155, 2019)。*BCR* と *NCR* の生物学的アナロジーから、*BCR* は、ブフネラを制御する活性を有するアブラムシ由来の共生戦略分子であると予想できる。しかし、「*BCR* 遺伝子が機能しないアブラムシは生存不能である」かどうかは、未検討であった。

2. 研究の目的

本研究の目的は、「アブラムシの *BCR* はブフネラとの共生に必須であるか？」という問いに答えることである。*BCR* 遺伝子の発現抑制が、アブラムシの生存率に及ぼす影響を検討することにより、この問いに対して答えることとした。

3. 研究の方法

本研究では、エンドウヒゲナガアブラムシ(*Acyrtosiphon pisum*) ApL 系統を研究材料とした。アブラムシは形質転換系が確立されていないため、それぞれの *BCR* 遺伝子を標的とした siRNA を合成し、人工飼料に混合してアブラムシに給餌することにより発現を抑制する方法、即ち、RNA 干渉 (RNAi) による遺伝子ノックダウンを試みることにした。

(1) アブラムシの系統維持

アブラムシの継代飼育には、レース鳩飼育用のソラマメを発芽させた幼植物を使用した。アブラムシ個体数匹をソラマメの幼植物に乗せ、明期 16 時間 : 暗期 8 時間の長日条件、26°C で栽培・飼育して実験に用いた。

(2) 人工飼料によるアブラムシの飼育

プラスチックシャーレ(φ35 mm)に 2 枚重ねにしたパラフィルムを薄く伸ばしながら張り、その薄膜の間にアブラムシ用の合成人工飼料 100 μL を入れた。生後 24 時間以内のアブラムシを選抜し、ソラマメの幼植物を餌として 48 時間飼育したアブラムシをパラフィルム薄膜上に移し、明期 16 時間 : 暗期 8 時間の長日条件、26°C で飼育した。一枚のシャーレ上で、アブラムシ 10 個体を飼育した。

(3) 合成 RNA による RNAi

アブラムシ ApL 系統が有する全ての *BCR* 遺伝子について、RNAi による発現抑制を試みることにした。それぞれの *BCR* 遺伝子について、ゲノム情報に基づいて RNAi に適すると予想される塩基配列 (20 塩基程度) を 2 ヶ所決定し、センス鎖 RNA とアンチセンス鎖 RNA を化学合成した。塩基配列は、標的とする *BCR* 遺伝子以外とは相同性がないことを確認し、また、RNase による分解を回避するために、3'末端側の 2 塩基は DNA とした。合成したセンス鎖とアンチセンス鎖で塩基対を形成させ、siRNA とした。例えば、*BCR1* 遺伝子を標的とする 2 種の siRNA は、それぞれ *siBCR1-1* 及び *siBCR1-2* と表記することとした。人工飼料には、標的とする *BCR* 遺伝子用の 2 種の siRNA をそれぞれ 100 ng/μL となるように添加した。例えば、*siBCR1-1* と *siBCR1-2* の両者を混合した人工飼料は、*siBCR1* と表記した。

本研究では、RNase 活性に耐性を有する LNA (Locked Nucleic Acid) も合成して、発現抑制の効果が無修飾の siRNA と比較した。使用した LNA の塩基配列は、siRNA と同じとした。

オワンクラゲの *GFP* 遺伝子を標的とする siRNA を混合した人工飼料を *siGFP* とし、対照区のひとつに使用した。

(4) アブラムシからの RNA の抽出と発現量の定量

siRNA 給餌後に生存しているアブラムシ 1 個体ずつから、RNA を抽出した。アブラムシからの全 RNA の抽出には、RNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN) を使用した。それぞれの *BCR* 遺伝子の発現に加え、ブフネラ由来の遺伝子として *DnaK* 遺伝子の転写活性も解析した。遺伝子の転写活性は、内部標準として α -アクチン遺伝子を使用し、qRT-PCR で定量・解析した。

(5) 菌細胞の蛍光顕微鏡による観察

アブラムシを実体顕微鏡下で解剖し、菌細胞塊を取り出した。パラホルムアルデヒドで固定し、0.2% Tween 20 を含むリン酸緩衝液で洗浄した菌細胞塊を DAPI にて染色して、蛍光顕微鏡にて観察した。

4. 研究成果

(1) siRNA の給餌と *BCR* 遺伝子および *DnaK* 遺伝子の発現

siRNA 給餌開始から 72 時間後までの間、24 時間毎にアブラムシの生存個体から RNA を抽出し、標的とした *BCR* 遺伝子の発現を qRT-PCR で定量した。*BCR* 遺伝子の中で最も発現量が多い *BCR1* 遺伝子、抗菌活性が弱い *BCR2* 遺伝子、全てのアブラムシ類で保存されていると予想される *BCR3* 遺伝子について、それぞれを標的とする siRNA を含む 3 種の人工飼料 (*siBCR1*, *siBCR2*, *siBCR3*) を給餌した。給餌開始 48 時間後に生存していたアブラムシ個体の発現量を定量したところ、いずれの *BCR* 遺伝子も、対照区 (control, 合成 RNA を含まない人工飼料を給餌) の 50% 程度に低下していた (図 1)。しかしながら、72 時間後には、どの *BCR* 遺伝子の発現も対照区と同程度であった。後述するように、給餌開始 48 時間後から 72 時間後にかけて、アブラムシの生

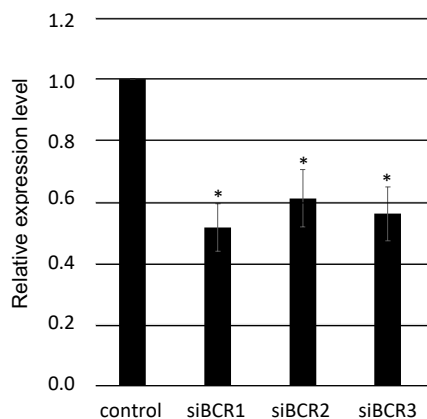


図 1. siBCR の給餌による *BCR* 遺伝子の発現抑制。siBCR 給餌開始 48 時間後の発現を qRT-PCR で定量した。siBCR を含まない人工飼料で飼育したアブラムシの発現 (control) を 1 とした。*, $p < 0.01$; $n = 9$ 。

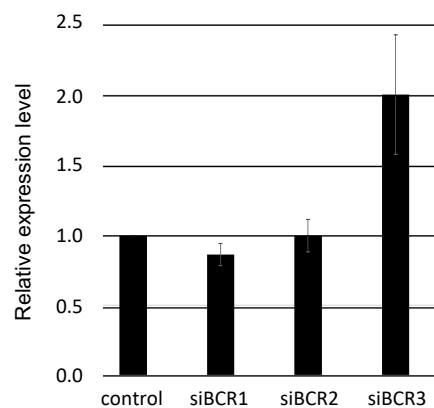


図 2. siBCR の給餌と *DnaK* 遺伝子の発現。siBCR 給餌開始 48 時間後のブフネラの *DnaK* 遺伝子の発現を qRT-PCR で定量した。siBCR を含まない人工飼料で飼育したアブラムシの発現 (control) を 1 とした。n=9。

存率が大きく低下したことを考慮すると、「給餌開始 48 時間後までは *BCR* 遺伝子の発現が抑制されているものの、まだ死に至っていない個体が多いために、発現量の値は対照区に比べて低い値を示した。しかし、発現が抑制された個体は 72 時間後までに死滅してしまい、72 時間後に生存している個体は、siRNA の効果が弱かったか、あるいは、抑制効果がなくなり *BCR* 遺伝子の発現量が回復したために、対照区と同程度の値を示した。」と考えることができる。

siRNA 給餌後のブフネラ数の指標として、給餌開始 48 時間後のブフネラの *DnaK* 遺伝子の発現を比較した (図 2)。siBCR1 および siBCR2 の給餌では、対照区と有意な差はなかったが、siBCR3 を給餌した場合は、対照区の 2 倍程度の高い値を示した。また、72 時間後の値は、対照区と有意差はなかった。

siRNA の給餌による標的 *BCR* 遺伝子の発現抑制効果が観察された (図 1) が、給餌した siRNA がアブラムシ体内の強い RNase 活性によって分解され、発現抑制の効果が十分には得られていないことも予想された。そこで、RNase に耐性である LNA を合成し、発現抑制の効果を検討した。siRNA と同じ塩基配列を有する合成 LNA を人工飼料に混合して給餌し、無修飾の siRNA と発現抑制の効果を比較した。その結果、LNA の給餌による発現抑制の効果は、無修飾の siRNA よりも低いことが判明した。本研究で使用した LNA は、RNase に耐性であるものの、RISC 複合体がうまく形成されず、発現抑制の効果が顕れなかったものと考えられる。本研究で使用した siRNA は、3'末端側の 2 塩基を DNA として合成した。このことにより、RNase による分解をある程度回避しながら RISC 複合体を形成し、RNAi を誘導することができたのではないかと考えられる。

(2) siRNA の給餌と生存率の変化

siRNA 給餌 72 時間後までのアブラムシの生存率を図 3 に示した。合成 RNA を含まない人工飼料を給餌した実験区を Control、また、*GFP* 遺伝子 (アブラムシには標的となる遺伝子が存在しない) の発現抑制のための siRNA を給餌した実験区を siGFP と示した。Control および siGFP 給餌は、72 時間後までの生存率に殆ど影響しない。一方、siBCR5 以外の siBCR の給餌は、生存率を低下させた。生存率は、48 時間後から 72 時間後にかけて大きく低下する傾向があった。このことは、siRNA による効果は給餌開始 24 時間後以降、72 時間までに顕在化することを示している。7 種の siBCR の中でも siBCR2, siBCR3, siBCR4 は、生存率を大きく低下させた。*BCR3* 遺伝子は、全てのアブラムシ類 (*Aphidinae*) に保存されており、ブフネラとの共生で特に重要な役割を担っていると考えられる。さらに、合成 *BCR3* は強い抗菌活性を有すること、*BCR3* 遺伝子の発現抑制は、ブフネラの *DnaK* 遺伝子の発現を高めること (図 2) を考え合わせると、*BCR3* は菌細胞内部のブフネラの増殖を制御することにより共生の成立に寄与していると考えられる。一方、*BCR2* と *BCR4* の合成ペプチドの抗菌活性、細胞膜や菌体に及ぼす影響は、非常に弱い。しかしながら、siBCR2 と siBCR4 の給餌は、生存率を大きく低下させた。このことは、*BCR2* と *BCR4* は、*BCR3* とは異なる生理活性で共生の成立に寄与していることを示唆している。根粒共

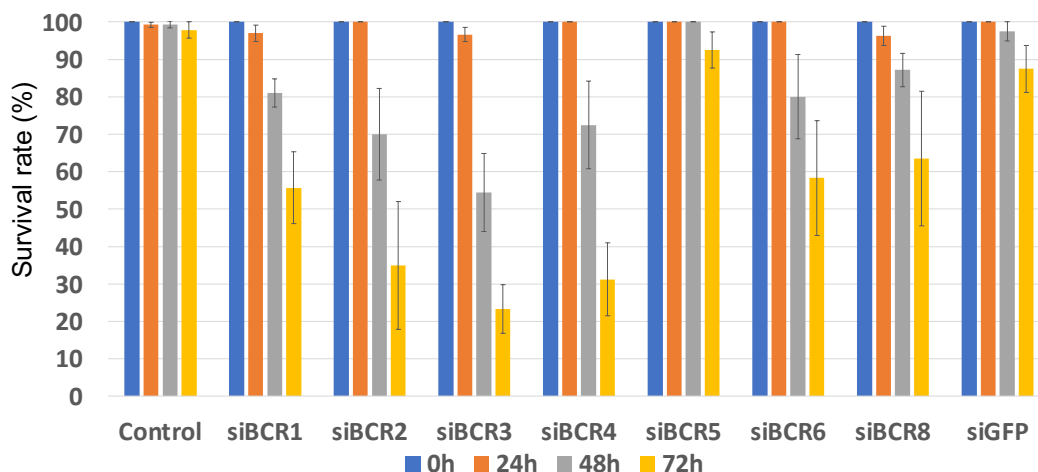


図 3. siBCR の給餌と生存率の変化. siBCR 給餌開始 72 時間後までのアブラムシの生存率を測定した。Control, siBCR を含まない人工飼料で飼育したアブラムシ; siGFP, *GFP* 遺伝子を標的とした siRNA を含む人工飼料で飼育したアブラムシ。n=8.

生では、NCR（またはNCR類似ペプチド）の多様な生理活性が複合的に作用して共生を成立させていると予想されている（Czernic *et al.*, *Plant Physiol.*, 169, 1254, 2015）が、アブラムシの菌細胞でも根粒共生と同様な現象が起きている可能性がある。

当初の研究計画では、単独の給餌では効果がなくとも、例えば、siBCR2 と siBCR3、あるいは、siBCR2 と siBCR4 のような siRNA の複合給餌で効果が出る場合もあると考え、複合 siRNA での飼育も計画していた。しかし、いずれの siBCR も単独給餌で生存率に影響を及ぼすことが判明したため、複合 siRNA の給餌については、詳細な検討は実施しないこととした。

（3）siRNA の給餌とアブラムシの生重量

siRNA 給餌 72 時間後の生存個体の生重量を測定した（図4）。siBCR1 または siBCR5 を給餌した場合には、有意に生重量が低下した。しかし、72 時間後の生存個体の中には、siRNA の効果が出ずに生き残った個体が含まれていると考えられ、*BCR* 遺伝子の発現抑制の効果を正確には評価できていない可能性がある。

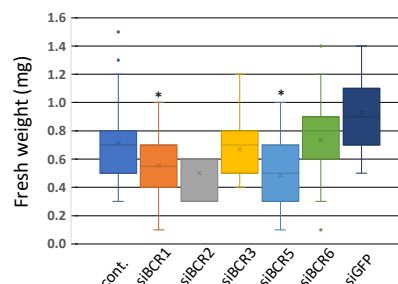


図4. siBCR給餌後のアブラムシの生重量。siBCR給餌開始72時間後のアブラムシ1個体の生重量を測定した。cont., siBCRを含まない人工飼料で飼育したアブラムシの生重量。*, $p < 0.01$; $n = 20$ 。

（4）siRNA 給餌後の菌細胞

siBCR1, siBCR3, siBCR8 給餌開始 48 時間後、および、72 時間後の生存個体から菌細胞を取り出し、DAPI で染色後、蛍光顕微鏡にて観察した。いずれの siRNA を給餌したアブラムシの菌細胞でも、人工飼料のみで飼育したアブラムシの菌細胞と比べて、明瞭な違いを見出すことはできなかった。

（5）今後の検討課題とまとめ

人工飼料を給餌している期間をとおして、アブラムシの行動に違いが見られた。即ち、人工飼料のみの場合、あるいは、siGFP を給餌した場合は、あまり動き回ることなく人工飼料を摂餌し続けたのに対し、siBCR を含む人工飼料を給餌した場合には、標的 *BCR* 遺伝子の種類に関係なく、アブラムシはフィルム上を頻繁に動き回り、排泄物（液体）の量も少ないようであった。これらのことは、siBCR を摂餌したアブラムシは、摂餌後短時間のうちに体内に異変が生じたために、別の適した餌を探し回る行動の現れかもしれない。さらに、排泄物（液体）の量の違いを考慮すると、siBCR 給餌による生存率の低下は、適した餌にたどり着くことができないまま、餓死に及んだ可能性を予想させる。今後は、アブラムシの行動および排泄物の量について、定量的に比較する必要があるだろう。併せて、菌細胞の顕微鏡による詳細な観察やある標的 *BCR* 遺伝子の siRNA 給餌後のアブラムシについて、標的以外の *BCR* 遺伝子の発現の解析（例えば、siBCR3 給餌後の *BCR1, 2, 4-8* 遺伝子の発現の解析）は、重要な課題である。詳細については検討の余地があるものの、siGFP の給餌では、生存率の低下は観察されなかったことを考え合わせると、siBCR の給餌が、特異的に生存率の低下を引き起こしたことは間違いない。

本研究で、「*BCR* 遺伝子を標的とした siRNA の給餌は、*BCR* 遺伝子の発現を抑制し、アブラムシの生存率を低下させる。」ことが明らかとなった。このことは、今後の課題を残してはいるものの、「アブラムシの *BCR* は、ブフネラとの共生に必須な共生戦略分子である。」ことを強く示唆している。

マメ科植物の出現は 6,500 万年前頃とされている（Lyson *et al.*, *Science*, 366, 977, 2019）ことから、*NCR* 遺伝子の出現もその頃と考えられる。*NCR* のような抗菌活性を有するシステインリッチペプチドの遺伝子は、広く植物界に存在しており、*BCR* のようなシステインリッチペプチドもまた、広く動物界に存在している。*BCR* と *NCR*、および、その他のシステインリッチペプチドの進化系統について検討する必要があるものの、独立して進化してきたアブラムシのブフネラ共生とマメ科植物の根粒共生で、互いによく似たシステインリッチペプチドが共生に必須な分子として機能している事実は、驚くべき収斂進化の一例と言えるであろう。抗菌活性を有するシステインリッチペプチドで共生細菌を制御して共生を成立させる機構は、動物・植物を問わず、生物界の共通原理なのかもしれない。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 2件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 梶原 太晴, 江 小語, 高見 龍輝, 重信 秀治, 内海 俊樹
2. 発表標題 アブラムシの共生器官特異的遺伝子を標的とするRNAiが生存率に及ぼす影響
3. 学会等名 植物微生物研究会 第32回研究交流会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 梶原太晴, 重信秀治, 内海俊樹
2. 発表標題 アブラムシの共生器官特異的遺伝子の発現抑制が生存率に及ぼす影響
3. 学会等名 日本動物学会九州支部 九州沖縄植物学会 日本生態学会九州地区会 三学会合同熊本大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 内海 俊樹
2. 発表標題 共生窒素固定のためのマメ科植物の巧妙な仕掛け
3. 学会等名 植物が好き！-植物科学が拓く新しい世界-2022 日本植物学会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 内海俊樹
2. 発表標題 Antimicrobial activities of cysteine-rich peptides specific to bacteriocytes of the pea aphid <i>Acyrtosiphon pisum</i>
3. 学会等名 日本微生物生態学会第34回大会（招待講演）
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

高校生・一般向け講演 内海 俊樹「植物も動物も同じ道具で共生菌を飼い馴らす」鹿児島県立甲南高等学校 SSH「研究を知る講座」, 2023年11月 内海 俊樹「植物も動物も同じ道具で共生菌を飼い馴らす」熊本県立北高等学校 SSH鹿児島研修, 2023年9月 内海 俊樹「共生窒素固定のためのマメ科植物の巧妙な仕掛け」日本植物学会一般向け講演会 植物が好き! さまざまな生き物と共生する植物の研究最前線 植物科学が拓く新しい世界2022, 2022年12月 内海 俊樹「サイエンス研修のための研究紹介」鹿児島県立国分高等学校 SSH「サイエンス研修」, 2022年11月 マスコミでの報道 南日本新聞2021年11月27日「かお」 ホームページ等 鹿児島大学 研究一直線 https://www.kagoshima-u.ac.jp/researcher/2018/05/post-11.html 鹿児島大学 トピックス https://www.kagoshima-u.ac.jp/topics/2021/10/a.html 鹿児島大学 トピックス https://www.kagoshima-u.ac.jp/topics/2020/09/post-1717.html
--

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------