

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 6月17日現在

機関番号：82112

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2011～2013

課題番号：22580063

研究課題名（和文）ツマグロヨコバイの唾液に存在するカルシウム結合タンパク質の師管吸汁に果たす機能

研究課題名（英文）Role of a calcium-binding protein in the saliva of *Nephotettix cincticeps* in ingestion from the sieve tubes

研究代表者

服部 誠（HATTORI MAKOTO）

独立行政法人農業生物資源研究所・昆虫科学研究領域・研究専門員

研究者番号：60370673

研究成果の概要（和文）： イネ害虫のツマグロヨコバイは吸汁する際に唾液を吐出している。本研究では唾液中に分子量 84kDa のカルシウム結合タンパク質(NcSP84)が存在することを見出した。NcSP84 は唾液腺の主腺で大量に産生され、吸汁時にイネの師管内部に注入されていることを確認した。その遺伝子をクローニングして配列解析をしたところ、複数の EF-ハンドモチーフをもつ新規のカルシウム結合タンパク質であることがわかった。虫から精製した NcSP84 はカルシウムの混合量に応じて、SDS-PAGE において多段的にシフトすることを確認した。NcSP84 は損傷細胞から漏れたカルシウムを捕捉することで師管閉塞反応を抑制し、吸汁を達成していると推測された。本研究は師管吸汁性の昆虫の唾液から EF-ハンドモチーフをもつカルシウム結合タンパク質が見つかった初めての例である。

研究成果の概要（英文）： Green rice leafhoppers (*Nephotettix cincticeps*) secrete saliva during feeding. In this study, we found an 84 kDa calcium-binding protein (NcSP84) in the saliva. The NcSP84 was produced in the largest lobes in the primary salivary glands. The NcSP84 was detected in the phloem sap of rice exposed to leafhoppers, verifying that the NcSP84 protein was injected into the sieve tubes. The nucleotide and amino acid sequences of NcSP84 did not share homology with any sequences in public databases. Motif search predicted that this protein had multiple EF-hands, the most common motif found in Ca^{2+} -binding proteins. As predicted, NcSP84 exhibited Ca^{2+} -binding activity. The mobility of purified NcSP84 bound to Ca^{2+} declined during SDS-PAGE, depending on the concentration of $CaCl_2$ present. These results suggest that NcSP84 could be secreted into the sieve tubes during feeding, which might bind Ca^{2+} ions that flow into sieve tubes in response to stylet puncturing. This might suppress sieve-element clogging and facilitate continuous ingestion from sieve tubes. This is the first finding of gene cloning of an EF-hand Ca^{2+} -binding protein in the saliva of a vascular-feeding insect.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2011年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2012年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：応用昆虫学
キーワード：害虫管理・生物的防除

1. 研究開始当初の背景

稲の重要害虫であるツマグロヨコバイは篩管液や導管液を吸汁する過程で唾液を注入することが知られる。唾液は多種の物質から成り、植物側の防御反応を回避する働きをもつと考えられている。吸汁性昆虫に対する植物の防御には、二次代謝物質等の毒成分によるものと損傷を受けた師管が液の流亡を阻止する反応に大別される。前者の例の一つとして植物由来フェノール性物質が関与するキノンタンニン反応による中毒が挙げられ、ツマグロヨコバイでは唾液中存在するラッカーゼがフェノール性物質を無毒化することで対抗していると推測されている (Hattori et al., 2005 *J. insect Physiol.* 51: 1359-1365)。後者は師管が損傷を受けることで細胞から漏洩したカルシウムイオンが引き金となりカロース合成等が惹起される結果、損傷部を閉塞する反応であり師管からの吸汁の阻止に繋がる。さらに、最近マメ科植物では篩管液中存在する結晶性タンパク質が、損傷細胞から放出されたカルシウムと結合して伸張して、傷口を塞ぐことが報告された (Knoblauch et al., 2001, *Plant Cell* 13:1221-1230)。このようにカルシウムイオンは師管閉塞に関わる鍵物質であることが明らかになってきた。これに対し、マメ科植物を加害するアブラムシの唾液は篩管液に添加するとカルシウムと結合により伸長した結晶タンパク質の収縮を引き起こすことを見出された (Will et al., 2007, *PNAS*, 104:10536-10541)。すなわち、唾液中のタンパク質が篩管中の結晶タンパク質による閉塞反応を阻止していることが示唆された。この唾液タンパク質はカルシウム結合タンパク質と推測されているが詳細は分かっていない。研究代表者は、ツマグロヨコバイの唾液タンパク質の機能を調べる過程で予備実験よりカルシウム添加により高分子側にシフトするタンパク質を唾液腺抽出物から見出した。本タンパク質は唾液として植物に注入され安定的な師管吸汁に重要な役割を果たしている可能性があり、その解明は師管吸汁性昆虫の基本的な吸汁メカニズムを理解する上で極めて重要な意味をもつと考えられる。

2. 研究の目的

吸血性昆虫では唾液成分の研究の歴史は古く、血液の凝固阻害や血管拡張に作用する物質が特定されるなど吸血に機能するタンパク質の解析が急速に進展している (Ribeiro

et al., 2004, 他)。一方、植物吸汁性昆虫がどのように植物の師部での閉塞反応を阻止して、師管吸汁を達成しているかについては殆んど分かっておらず、分子レベルでの解明が望まれる。

本課題では、ツマグロヨコバイの唾液腺に含まれると予想されるカルシウム結合タンパク質が実際に唾液成分として植物師管内に注入されているかをまず確認する。さらに、本タンパク質の遺伝子をクローニングし、配列情報から分子構造を解析する一方、精製したタンパク質を用いて、生化学的特性すなわちカルシウム結合能を検証する。また、本タンパク質を師管断面に処理したときの閉塞反応を評価するとともに本タンパク質発現をノックダウンした虫の吸汁行動への影響を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) NcSP84 の唾液からの検出およびN末端アミノ酸配列の決定

ツマグロヨコバイ成虫 (約 1000 頭) にパラフィルム膜を介して蔗糖液を与えて採取した約 50ml の唾液吐出液および唾液腺磨砕液 (♀30 頭分) をそれぞれ SDS-PAGE と二次元電気泳動で分離後、PVDF 膜に転写して分子量 84kDa タンパク質バンド (スポット) のN末端アミノ酸配列をプロテインクエンサーで決定した。

(2) cDNA 全長配列の取得と配列解析

N末端アミノ酸配列に基づいて設計した縮重プライマーを用いて部分配列の PCR 増幅、RACE 法を経て cDNA 全長配列を取得した。ホモロジー検索、ドメイン解析等により分子的特徴を調べた。

(3) カルシウム結合タンパク質の大量発現と精製

NcSP84 の cDNA に基づき発現ベクター pET22b、pCold-Pros2 に組み込み、大腸菌 BL21 (DE3) RIL で発現させる一方、8000♀分の唾液腺を含む頭部抽出物から、アセトン沈殿、70%硫酸上清後、疎水およびゲル濾過クロマトグラフィーにより精製した。

(4) 精製タンパク質のカルシウム結合特性の解析

精製タンパク質 (♀4 頭相当) に 5 濃度段階で塩化カルシウム溶液を混和して 15°C, 1 時間置いた後、SDS-PAGE で泳動した。なお、残りの精製タンパク質は抗体作製に用いた。

(5) NcSP84の各種組織（器官）での発現比較および唾液腺組織内での分布

唾液腺、中腸、マルピーギ管、皮膚の各器官でのNcSP84mRNAの発現量をRT-PCRで調べた。また、唾液腺における細胞レベルでのmRNAの分布を調べるため組織切片を用いて *in situ* ハイブリダイゼーションを実施した。さらに唾液腺をホルマウントで免疫染色した。

(6) 虫に吸汁させたイネの師管液でのNcSP84の検出

約30日イネにプラスチック円筒（径1.5cm x 長さ5cm）をセットし、内部にツマグロヨコバイ成虫5頭を放飼し、16時間後にトビイロウンカ♀成虫に入れ替えた後、レーザースタイレトミー法で口針を切断して師管液を採取し、電気泳動後にウェスタンブロッティング法によりNcSP84を検出した。

(7) NcSp84の師管閉塞に及ぼす影響

30-35日イネの葉鞘を切断後、断面に本タンパク質溶液(50ug/20ul)を処理して2分後に500ul蒸留水を入れたチューブに立て、過湿暗条件下に5時間置いた。回収した溶液を濃縮し、薄層クロマトグラフィーで分離し蔗糖の有無を調べた。

(8) NcSp84遺伝子をノックダウンした個体の吸汁行動への影響

二本鎖RNA(約500ng/90nl)を5齢幼虫に注射し、羽化後3日後に吸汁量を測定する一方、NcSp84mRNAの発現量(他個体)をRT-PCRで調べた。

4. 研究成果

(1) NcSP84タンパク質は唾液および唾液腺のいずれにおいても最多量を占めていることがわかった。また、そのN末端アミノ酸配列をプロテインシークエンサーによりSSDTPVAEVQTIIVKTPGHであると決定した。

(2) cDNA全長配列のORFは2061bpから成り、19アミノ酸のシグナル配列と687アミノ酸で構成されることがわかった。配列解析により、カルシウム結合に寄与することで知られるEF-ハンドモチーフを複数個有する新規のタンパク質であることが分かった。

(3) NcSP84は組換え大腸菌で発現させることに成功したが、封入体を形成し可溶化に至らなかった。そこで、ツマグロヨコバイ頭部抽出物から各種クロマトグラフィーを経て完全精製物を得た。

(4) NcSP84(精製物)はカルシウム添加量の増加に伴って、高分子(陰極)側に二段階にシフトした。これは、カルシウムイオンが結合したことにより立体構造や荷電の変化が生じたことによると考えられた。また、二段階のシフトはカルシウム結合部位が複数個あることを示唆した。なお、他の2価金属イオン(マグネシウム、亜鉛)を添加してもシフトせず、カルシウムに特異的に結合特性を示した(図1)。

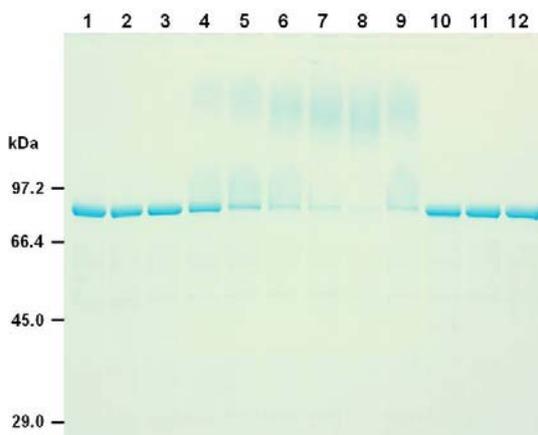


図1 カルシウムの添加濃度に依存して移動度がシフトするNcSP84 (SDS-PAGE) NcSP84(精製タンパク質1μg)を下記と混合したサンプルを泳動した。

1: 5 mM EDTA, 2: 脱イオン水
3: 0.015 mM CaCl₂, 4: 0.005 mM CaCl₂
5: 0.15 mM CaCl₂, 6: 0.5 mM CaCl₂
7: 1.5 mM CaCl₂, 8: 5 mM CaCl₂,
9: 0.5 mM CaCl₂ (非還元、非加熱サンプル)
10: 0.5 mM CaCl₂ (還元、加熱サンプル)
11: 5 mM MgCl₂, 12: 5 mM ZnCl₂
9, 10を除いて、サンプルは還元、非加熱処理後に泳動した。

(5) NcSP84遺伝子は唾液腺だけで特異的に発現しており、唾液腺主腺で最大の第三細胞組織内で強い発色が観察された(図2)。また、この組織は免疫組織染色によっても強く反応したところから、NcSP84は産生後にそのまま蓄積されていることがわかった。

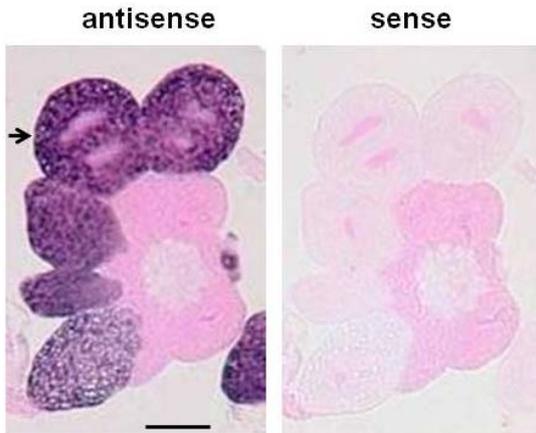


図2 *In situ* hybridizationにより発色した唾液腺切片におけるNcSP84 mRNAの発現部位
矢印は主腺第三細胞，横棒：100 μ m

(6) ツマグロヨコバイを接種したイネから採取した師管液においてNcSP84が抗体で検出されたことから、NcSP84は吸汁の過程で師管内に注入されていると考えられた。

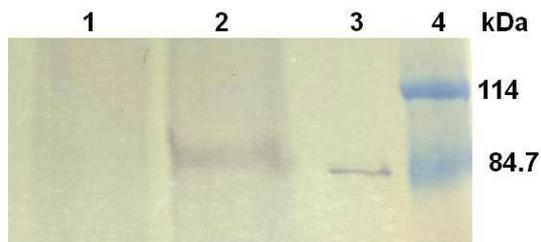


図3 ツマグロヨコバイが吸汁したイネの師管液から抗体で検出されたNcSP84
1: 虫が吸汁していないイネの師管液
2: 虫が吸汁したイネの師管液
3: 唾液腺磨砕物 (0.004♀)
4: 分子量マーカー

(7) NcSp84を切断面に処理したイネから回収した溶液から、僅かながら蔗糖が検出された。このことから、師管損傷時に漏洩するカルシウムイオンをNcSP84がトラップすることにより、カロール沈着などの師管閉塞反応を抑制している可能性が示唆された。

(8) 二本鎖RNAを注射した個体においてNcSp84mRNAの発現量はほとんど低下が見られず、吸汁量の減少も確認できなかった。本タンパク質は唾液腺で常時大量に発現していることがノックダウン至らなかった原因の一つと考えられた。

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)

- ① Hattori M, Nakamura M, Komatsu S, Tsuchihara K, Tamura Y, Hasegawa T (2012) Molecular cloning of a novel calcium-binding protein in the secreted saliva of the green rice leafhopper *Nephotettix cincticeps* *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 査読有 42(1):1-9

[学会発表] (計4件)

- ① Hattori M, Nakamura M, Komatsu S, Tsuchihara K, Tamura Y, Hasegawa T (2011) A novel calcium-binding protein in the watery saliva of the green rice leafhopper, *Nephotettix cincticeps* 3rd International Symposium Frontiers in Agriculture Proteome Research: Contribution of proteomics technology in agricultural sciences ():P-34
- ② Hattori M, Komatsu S, Nakamura M, Tamura Y (2012) A Calcium-binding and other functional proteins in the saliva of the green rice leafhopper, *Nephotettix cincticeps* The 20th Biennial International Plant Resistance to Insects Workshop ():23
- ③ 服部誠, 中村匡利 (2013) ツマグロヨコバイの唾液に含まれるカルシウム結合タンパク質とその機能 第57回日本応用動物昆虫学会大会 p.94
- ④ 長谷川毅, 服部誠, 野田博明 (2013) トビロウソウの口針鞘を構成するタンパク質成分の解析 第57回日本応用動物昆虫学会大会 p.95

6. 研究組織

(1) 研究代表者

服部 誠 (HATTORI MAKOTO)
農業生物資源研究所・昆虫科学研究領域
上級研究員 (開始時)
研究専門員 (終了時)
研究者番号：60370673