

## 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24年 6月 11日現在

機関番号：15101

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2010 ～ 2011

課題番号：22880019

研究課題名（和文）

農業害虫エンドウヒゲナガアブラムシの生体防御機構の解析と創農薬への応用研究

研究課題名（英文）

Analysis of immune system in pea aphid (*Acyrtosiphon pisum*) for novel insecticide.

研究代表者

岩崎 崇 (IWASAKI TAKASHI)

鳥取大学・農学部・助教

研究者番号：30585584

研究成果の概要（和文）：

グラム陰性細菌感染を認識する免疫経路(Imd 経路)関連遺伝子を欠失しているアブラムシ(エンドウヒゲナガアブラムシ)は、実際にグラム陰性細菌感染に対して極めて脆弱であることを明らかにした。また、グラム陽性細菌感染を認識する免疫経路(Toll 経路)において、中心的な働きを担っている Spaetzle 遺伝子の候補遺伝子を特定した。アブラムシの Spaetzle 遺伝子を標的とすることで、Toll 経路を阻害し、グラム陽性・陰性細菌感染に対する免疫系を不全にする、新しいアブラムシ防除方法の開発が期待される。

研究成果の概要（英文）：

Insects recognize bacterial infection by Imd pathway against gram-negative bacteria and Toll pathway against gram-positive bacteria and fungi, respectively. However, in 2010, the International Aphid Genomic Consortium reported that pea aphid (*Acyrtosiphon pisum*) lacks Imd pathway-related genes largely.

In this study, actually, pea aphid lacking the Imd pathway-related genes showed fragile immune response against gram-negative bacterial infection. This result supported that the Toll pathway, recognition pathway for gram-positive bacterial infection, is a sole immune pathway in pea aphid and may be an effective target for insecticide to suppress pea aphid immune system. Insect Toll pathway is known to be activated by mediator protein named spaetzle, therefore the spaetzle is a good target molecule for inhibition of Toll pathway signaling. Real-time PCR analysis revealed that 3 spaetzle-like genes (*Spz 1-3*, *Spz 1-4*, *Spz 1-5*) may be associated with Toll pathway activation in pea aphid. From these results, the inhibition of spaetzle-like genes is expected to be an effective pest control strategy for pea aphid in the future.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,260,000	378,000	1,638,000
2011年度	1,160,000	348,000	1,508,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,420,000	726,000	3,146,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農芸化学・生物生産化学・生物有機化学

キーワード：昆虫、アブラムシ、自然免疫、生体防御、創農薬

## 1. 研究開始当初の背景

昆虫は、抗原抗体反応のような獲得免疫系を有しておらず、体内に侵入した異物の排除は、全て自然免疫系に依存している。自然免疫系において、生体内に侵入した真菌・グラム陽性細菌は Toll 経路、グラム陰性細菌は Imd 経路と呼ばれるそれぞれの免疫経路によって異物として認識され、次いで選択的な免疫応答（抗菌性ペプチドの発現）が誘導される。しかし、2010年に農業害虫エンドウヒゲナガアブラムシ (*Acyrtosiphon pisum*) のゲノム解析が行われた結果、幅広い昆虫種間で保存されている Imd 経路関連遺伝子の大部分が、アブラムシにおいては失われていることが判明した (図 1)。このことから、アブラムシの有する自然免疫経路は Toll 経路のみである可能性が示唆された。さらに、昆虫において、Toll 経路は自然免疫のみならず、胚発生時における背腹軸形成にも必須の経路であることが知られている。

以上のことから、アブラムシの自然免疫系において唯一残された免疫経路である Toll 経路を阻害することで、自然免疫および胚発生を抑制し、効率的にアブラムシの育成を制御することができる可能性が示唆された。

## 2. 研究の目的

本研究では、アブラムシ防除における阻害標的として Toll 経路に着目し、新たなアブラムシ防除法の開発基盤研究を行うことを目的とする。具体的な標的分子として、Toll 経路を活性化するタンパク質『Spaetzle』に着目し、Spaetzle の機能阻害による Toll 経路の阻害、すなわち自然免疫および胚発生 の両機構阻害を目指した創農薬研究を行う。本研究では、以下の二つの点を明らかにすることを目的とした (図 1)。

① エンドウヒゲナガアブラムシのゲノム解析より、アブラムシにはグラム陰性細菌の認識に寄与する Imd 経路が存在していない可能性が示唆された。しかし、上記はあくまでゲノム解析上の推測であり、実際にアブラムシ体内でグラム陰性細菌に対する免疫応答が行われているか否かは不明である。そこで、本研究ではエンドウヒゲナガアブラムシの微生物排除能を調べ、アブラムシ体内でグラム陽性細菌・陰性細菌に対して、どのような免疫応答が行われているかを明らかにすることにした。

② アブラムシの Toll 経路を阻害するために、Toll 経路を活性化するタンパク質『Spaetzle』に着目し、Spaetzle の機能阻害による Toll 経路の阻害、すなわち自然免疫および胚発生 の両機構阻害を目指した創農薬研究を行う。エンドウヒゲナガアブラムシのゲノムデータベースより、Toll 経路を活性

化する Spaetzle 遺伝子の存在を調べてみると、アブラムシには 9 種類の Spaetzle 様遺伝子が存在することが分かった。そこで、9 種類の Spaetzle 様遺伝子の中で、どの遺伝子が Toll 経路の活性化に関与しているかを明らかにすることを目的とした。

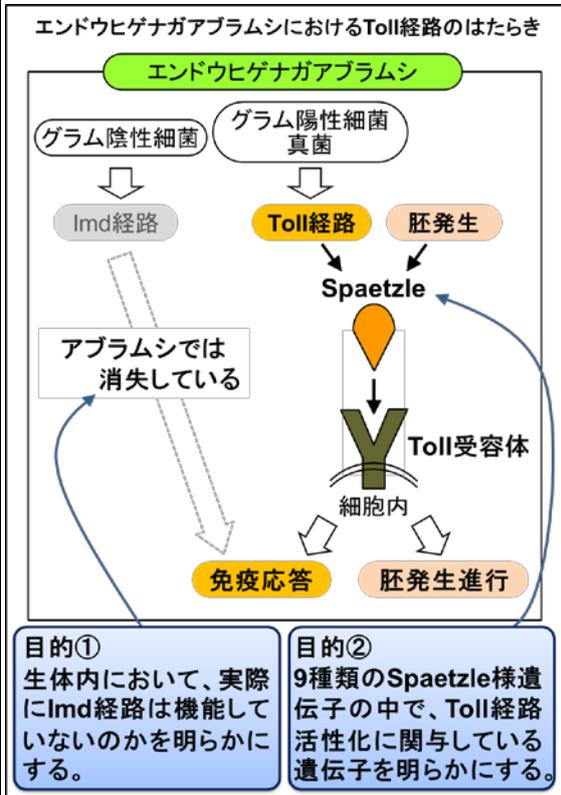


図 1. エンドウヒゲナガアブラムシにおける Toll 経路の重要性

## 3. 研究の方法

(1) 細菌感染に対するエンドウヒゲナガアブラムシの免疫応答を間接的に調べるために、アブラムシに対して細菌感染実験を行った。エンドウヒゲナガアブラムシに対して、マイクロインジェクション法を用いてグラム陽性細菌 (黄色ブドウ球菌: *Staphylococcus aureus*、枯草菌: *Bacillus subtilis*) またはグラム陰性細菌 (大腸菌: *Escherichia coli*、緑膿菌: *Pseudomonas aeruginosa*) を感染させ、経時的な生存率の変動を測定した。

(2) 細菌感染に対するエンドウヒゲナガアブラムシの免疫応答を調べるために、免疫誘導を行ったアブラムシにおける抗菌性ペプチドの発現を解析した。オートクレーブ処理を行ったグラム陽性細菌 (*S. aureus*) またはグラム陰性細菌 (*E. coli*) を注射し (約  $10^6$  CFU/アブラムシ個体)、アブラムシに免疫誘

導を行った 24 時間後に、体液を回収した。回収した体液を、アセトン脱脂ならびにエタノール抽出に供することで、ペプチド画分を得た。これらのペプチド画分におけるグラム陽性細菌 (*S. aureus*) またはグラム陰性細菌 (*E. coli*) に対する抗菌活性を測定すると同時に、HPLCにおけるピークプロファイルと比較することで、免疫誘導により発現された因子の存在を調べた。

(3) エンドウヒゲナガアブラムシのゲノム中に存在する 9 種類の Spaetzle 様遺伝子 (*Spz 1-1*, *Spz 1-2*, *Spz 1-3*, *Spz 1-4*, *Spz 1-5*, *Spz 2*, *Spz 3*, *Spz 4*, *Spz 6*) の中から、Toll 経路活性化に関与する Spaetzle 遺伝子を特定するために、他の昆虫種において Toll 経路を活性化する Spaetzle との相同性解析を行い、分子系統樹を作成した。また、アブラムシ成虫における各 Spaetzle 様遺伝子の発現量をリアルタイム PCR により解析した。同様に、オートクレーブ処理を行ったグラム陽性細菌 (*S. aureus*: 約  $10^6$  CFU/アブラムシ個体) を注射し、24 時間後に免疫誘導を行ったアブラムシにおける各 Spaetzle 様遺伝子の発現量をリアルタイム PCR により解析した。

#### 4. 研究成果

(1) グラム陽性細菌 (*S. aureus*, *B. subtilis*) ならびにグラム陰性細菌 (*E. coli*, *P. aeruginosa*) を、約  $10^2$  CFU/アブラムシ個体の菌濃度になるようにエンドウヒゲナガアブラムシに感染させたところ、グラム陽性細菌感染アブラムシ群は 48 時間後においても高い生存率を示したのに対して (*S. aureus* 感染群: 100%, *B. subtilis* 感染群: 90%)、グラム陰性細菌感染アブラムシ群は 48 時間後においてほぼ全ての個体が死亡した (*E. coli* 感染群: 5%, *P. aeruginosa* 感染群: 10%) (図 2)。この結果から、エンドウヒゲナガアブラムシの免疫機構はグラム陰性細菌に対して極めて脆弱であることを示しており、エンドウヒゲナガアブラムシ生体内においては、実際に Imd 経路は機能していない可能性が強く示唆された。またこの結果は同時に、アブラムシに残された免疫経路はグラム陽性細菌認識に関わる Toll 経路のみである可能性を示唆しており、Toll 経路はアブラムシ防除における重要な標的となり得ることを示している。

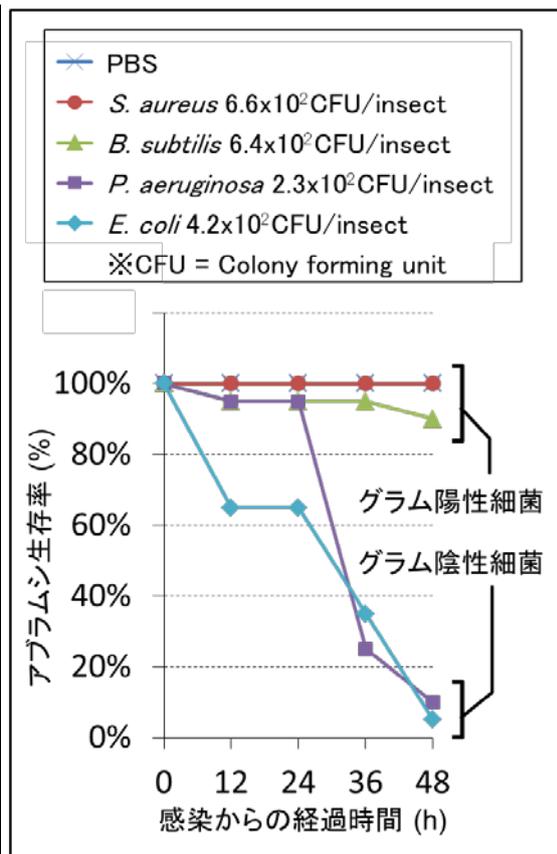


図 2. グラム陽性・陰性細菌感染に対するエンドウヒゲナガアブラムシの感受性

(2) オートクレーブ処理した *S. aureus*, *E. coli* または PBS を注射したアブラムシ体液からペプチド画分を調製し、HPLC によりピークプロファイルの解析を行った結果、いずれのアブラムシ体液においても、免疫誘導により特異的に出現するピークは検出できなかった。また、各画分について *S. aureus* および *E. coli* に対する抗菌活性を測定したが、顕著な抗菌活性を示す画分は確認されなかった。

アブラムシゲノム解読の結果から、エンドウヒゲナガアブラムシには他の昆虫種間で保存されている抗菌性ペプチド遺伝子が存在していないことも報告されていたが、本実験結果より実際にアブラムシでは免疫誘導により強い活性を有した抗菌性ペプチドは発現しないことが明らかとなった。

(3) 他の昆虫の Spaetzle 遺伝子および Spaetzle 様遺伝子と、エンドウヒゲナガアブラムシの Spaetzle 様遺伝子から推測されるアミノ酸配列を比較し、分子系統樹を作成した。その結果、エンドウヒゲナガアブラムシの 9 種の Spaetzle 様遺伝子のうち、5 種の遺伝子 (*Spz1-1*, *Spz1-2*, *Spz1-3*, *Spz1-4*, *Spz1-5*) が、他の昆虫種において Toll 経路活性化に関与する Spaetzle 遺伝子と近縁であ

り、Spz1 ファミリーに分類されることが明らかとなった(図 3)。

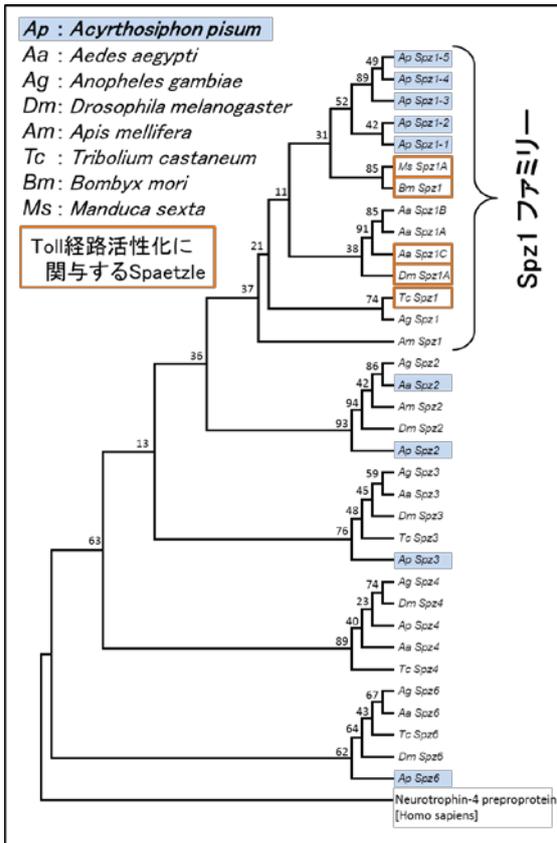


図 3. エンドウヒゲナガアブラムシの Spaetzle 様遺伝子と他の昆虫種の Spaetzle 遺伝子の分子系統樹

また、リアルタイム PCR 解析の結果、平常時のエンドウヒゲナガアブラムシにおいては、9 種の Spaetzle 様遺伝子の中でも *Spz1-3*、*Spz1-4*、*Spz1-5* の 3 種の遺伝子が極めて低い発現量を示した一方で(図 4)、グラム陽性細菌 (*S. aureus*) 注射により免疫誘導を行うことで、上記の 3 種の遺伝子のみ発現量が上昇するといった現象が観察された(図 5)。

他の昆虫種においては、Toll 経路を活性化する Spaetzle 遺伝子は Spz1 ファミリーに属し、またグラム陽性細菌を用いた免疫誘導によって発現量が上昇することが知られている。このことから、エンドウヒゲナガアブラムシにおいても、Spz1 ファミリーに属し、さらに *S. aureus* による免疫誘導によって発現量が上昇した 3 種の Spaetzle 様遺伝子 (*Spz1-3*、*Spz1-4*、*Spz1-5*) が、Toll 経路活性化に関与している可能性が強く示唆された。

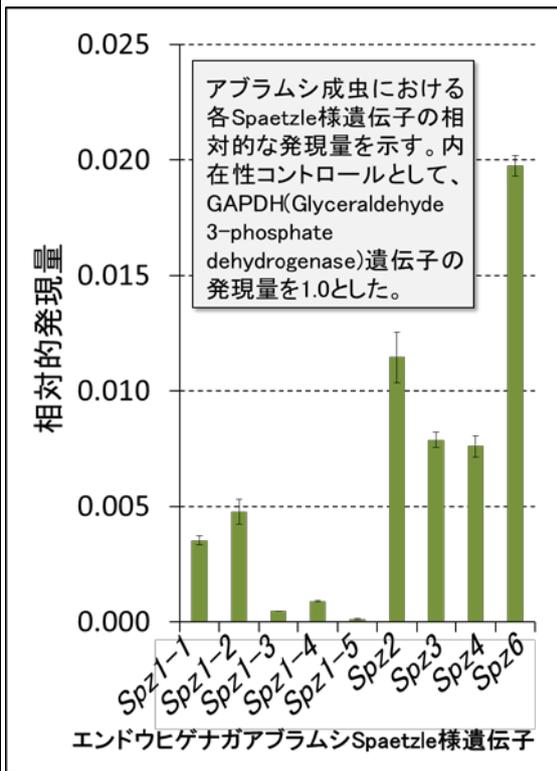


図 4. 平常時のエンドウヒゲナガアブラムシにおける Spaetzle 様遺伝子の発現量比較

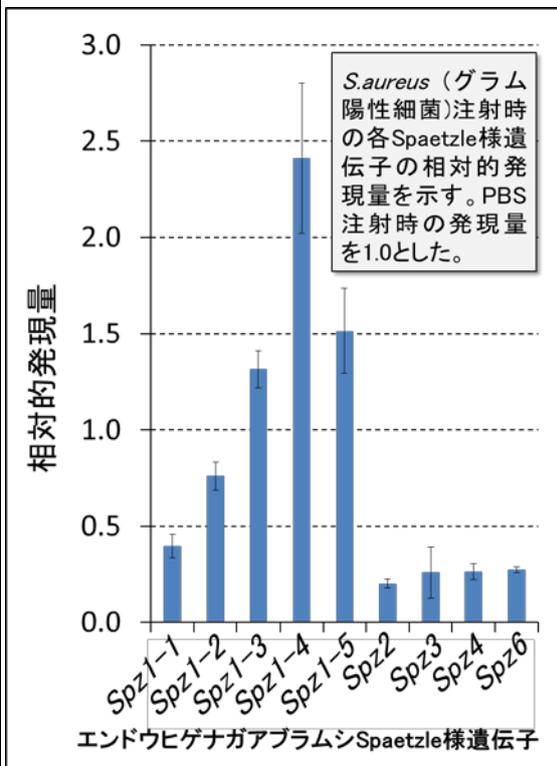


図 5. 免疫誘導時のエンドウヒゲナガアブラムシにおける Spaetzle 様遺伝子の発現量変化

本研究の結果から、エンドウヒゲナガアブラムシの生体内において Imd 経路は実際に機能していない可能性が強く示唆された。また、エンドウヒゲナガアブラムシの Toll 経路活性化に関与する Spaetzle 様遺伝子は、*Spz1-3*、*Spz1-4*、*Spz1-5* の 3 種の遺伝子の一部または全てである可能性が強く示唆された。今後は、上記の遺伝子に対して RNA 干渉法を用いて発現抑制を行い、ノックダウン個体の表現型を解析することで、Toll 経路活性化に関与する Spaetzle 遺伝子の特定を行う予定である。

今後、Toll 経路を活性化する Spaetzle を特定することができれば、Spaetzle を抑制することでアブラムシの Toll 経路を阻害し、免疫機構ならびに胚発生の両機構を抑制する害虫制御法開発への応用が期待される。

## 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)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

岩崎 崇 (IWASAKI TAKASHI)

研究者番号：30585584