

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 13 日現在

機関番号：13201

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2011～2014

課題番号：23681050

研究課題名(和文) 共生器官の選択的機能阻害による害虫制御技術の基盤研究

研究課題名(英文) Fundamental studies for insect pest control by selective inhibition of the symbiotic organ

研究代表者

土田 努 (TSUCHIDA, Tsutomu)

富山大学・その他の研究科・准教授

研究者番号：60513398

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 21,000,000円

研究成果の概要(和文)：本課題では、害虫防除手法の開発を目指し、タバココナジラミの腹部体腔内に存在する“菌細胞共生系”を対象として、そこで発現する遺伝子群を明らかにした。タバココナジラミの菌細胞では、先行研究で明らかになっているアブラムシとは異なる独自の遺伝子群が高発現しており、データベース上に相同遺伝子が存在しない遺伝子のRNAiにより生存率の低下傾向が示された。併せて、野外集団におけるタバココナジラミの遺伝型や保有共生細菌についても解析し、日本にはアジア初検出の遺伝型 MED Q2が侵入していることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Towards the development of novel pest management agents, we identified bacteriocyte-specific expressed genes in *Bemisia tabaci*. Genes expressed in the *B. tabaci* bacteriocytes were remarkably different from the ones in *Acyrtosiphon pisum*, suggesting each symbiotic systems have been evolving in unique ways. RNAi of a bacteriocyte-specific orphan gene tends to shorten the longevity of *B. tabaci*. We also examined the genotypes and symbiotypes of *B. tabaci* in natural populations, and found novel invasive group MED Q2 in Japan, previously undetected in Asia.

研究分野：共生生物学、応用昆虫学

キーワード：タバココナジラミ 共生細菌 菌細胞

1. 研究開始当初の背景

農業害虫、衛生害虫として知られる昆虫の多くは、特定の微生物との間に密接な共生関係を築いており、微生物の持つ特殊な代謝機能に生存を委ねてしまっているものも存在する。タバココナジラミは、腹部体腔内に“菌細胞”と呼ばれる肥大化した細胞を持ち、その細胞質内に必須の共生細菌を住わせている。この必須の共生関係を成立させている菌細胞の分子基盤を詳細に明らかにすることで、タバココナジラミにのみ選択的に効き、環境被害の少ない防除法の開発につながる事が期待できるが、どのような遺伝子が菌細胞内で発現しているのかについては明らかになっていなかった。また、タバココナジラミでは複数の遺伝型(バイオタイプとも呼ばれる)が存在しており、また体内に複数の共生細菌が存在していることがそれまでの研究から明らかになってきたが、実際に野外集団中に存在する遺伝型やその保有共生細菌については不明な点も多い状況であった。

2. 研究の目的

本研究課題では近年急速な発展を遂げた次世代シーケンサーや共焦点顕微鏡解析等の遺伝子解析技術を用いて、共生器官で機能する遺伝子群と機能の網羅的解析を行うことを目的とした。あわせて、野外集団中におけるタバココナジラミの遺伝型と、その保有共生細菌との関係を明らかにすることを試みた。

3. 研究の方法

(1) 菌細胞で特異的に発現する遺伝子を探るため、RNA-seq 用ライブラリ作製法の検討を行った。タバココナジラミは体長 1mm 未満の微小な昆虫であり、従って解剖によって取り出した菌細胞からは、1 頭あたり数 ng の total RNA しか回収できない。次世代シーケンサーによる解析に最低限必要な 100ng 以上の mRNA を得る為には、数千頭を解剖し、菌細胞を回収しなくてはならない計算になる。これを回避するため、Ribo-SPIA 法により mRNA 特異的な増幅を試みた。

(2) 得られた cDNA からライブラリを作成し、次世代シーケンサー HiSeq 2000 を用いて、RNAseq 法により解析を行った。Trinity による De novo アセンブリを行い、Blast によるアノテーション、DEGseq による発現変動遺伝子の検出を行い、菌細胞特異的発現遺伝子のプロファイリングを行った。続いて RACE 法による全長配列の取得や、定量 PCR による発現定量、蛍光 in situ ハイブリダイゼーション(FISH)による発現部位の観察を行った。あわせて機能解析のための RNAi やタンパク質発現を明らかにするためのウエスタンブロットを試みた。

(3) 日本全国のトマトやナス圃場からタバココナジラミの採集を行い、DNA を抽出して、mtCOI 遺伝子を指標としてその遺伝型を明ら

かにした。同時に保有共生細菌についても、16S ribosomal RNA 遺伝子を指標に確認を行った。さらに、簡易識別法として、マルチプレックス PCR 法による遺伝型および保有共生細菌の識別手法を開発した。

4. 研究成果

(1) Ribo-SPIA 法による mRNA 増幅により、数 µg の cDNA を得ることに成功した。

(2) Ribo-SPIA 法によって取得された cDNA の Hi-seq2000 による解析から、rRNA の割合は低く抑えられており、宿主および共生細菌の mRNA が効率的に捉えられていることが確認された。

Trinity で de novo アセンブリされた配列は 138,275 contigs となり、そこから Blast 解析により原核生物由来と推定される配列を除去した昆虫自身の発現配列は 121,599 contigs であった。DEGseq により、菌細胞で高発現する遺伝子は 15,327 contigs、低発現する遺伝子は 13,570 contigs であった。高発現する遺伝子群から、発現量と体細胞との倍率変化がともに TOP200 以内に入る 14 contigs を絞り込んだ。

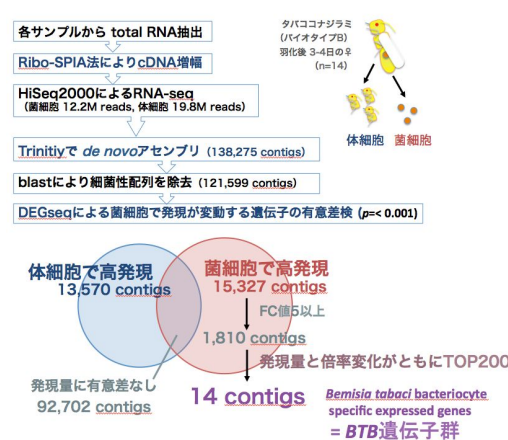


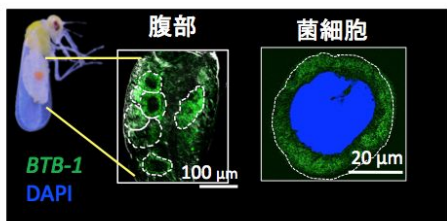
図 1: RNA-seq による菌細胞特異的発現遺伝子群の絞り込み

これらの菌細胞特異的高発現遺伝子群 (*Bemisia tabaci* bacteriocyte specific expressed genes = BTB 遺伝子群) の中には、微生物に対する応答性が報告されているペルオキシダーゼ様遺伝子といった既知の遺伝子と高い相同性を示すものも検出されたが、その多くはデータベース上に相同性を示すものが存在せず、遺伝子機能を推定することができなかった。タバココナジラミでは、先行研究によって明らかにされているエンドウヒゲナガアブラムシとも、コクゾウムシとも、その菌細胞特異的発現遺伝子が大きく異なっていた。先行研究の結果ともあわせて、昆虫の共生器官で発現する遺伝子は特異的なものであり、それぞれ独自の進化によって生じてきたことが示唆された。

RACE 法を用いて全長配列を取得し、定量

PCRやFISHにより菌細胞特異的高発現が確認された(図2)。また、ペルオキシダーゼ様遺伝子では複数のバリエーションが存在しており、菌細胞内で特異的に発現するバリエーションが検出された。このことから、これらのバリエーションが菌細胞特異的な機能を持つことが示唆された。

FISH + 共焦点顕微鏡による観察



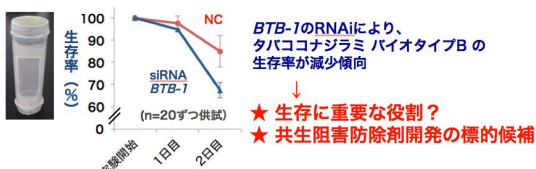
菌細胞の細胞質中で特異的に高発現

図2: FISHによる菌細胞特異的発現の確認

siRNAを用いたRNAi法により、BTB-1と名付けられた遺伝子群の発現抑制が、生存率の減少を引き起こす傾向があることが観察された(図3)。これは生存に必須の役割を担っていることが示唆され、防除標的の有力候補となるものである。現在、ウエスタンブロットティングや免疫組織化学を用いて、タンパク質としての実体の確認や機能部位の解析を行っている。

図3: RNAiによる菌細胞発現遺伝子の機能解析

RNAi siRNA (20μg/ml) を添加した人工飼料



(3) 日本のトマト・ナス圃場に存在するタバココナジラミの多くは、遺伝型 MED Q1 と MEAM1 と呼ばれる、いずれも外来性の遺伝型であった。これらは、アジアの多くの国にも侵入が確認されている害虫であるが、本研究ではアジア初確認となる遺伝型 MED Q2 を日本の特定地域から検出した(図4)。MED Q2 は近年、イタリア南部でも爆発的な増殖が報告されている害虫であり、今後のモニタリングが重要となることを提言した。

また、上述の遺伝型はそれぞれ特定の共生細菌を保有していることが明らかになり、共生細菌が遺伝型の表現型になんらかの影響を与えている可能性が示唆された。

また、マルチプレックスPCRを持ちいた遺伝型と保有共生細菌の判別手法を開発した。本手法により、時間と費用をそれぞれ1/3程度に抑えることが可能となった。

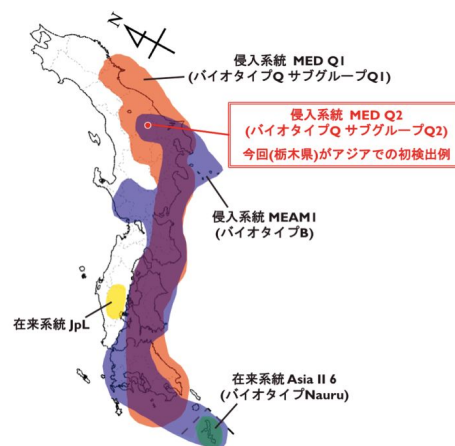


図4: 全国調査により、明らかになった日本の圃場に分布する遺伝型と新侵入系統

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 2件)

(1) Fujiwara A, Maekawa K, Tsuchida T*. "Genetic groups and endosymbiotic microbiota of the *Bemisia tabaci* species complex in Japanese agricultural sites" *Journal of Applied Entomology*, 139: 55-66 (2015年)

(2) Kurata A, Fujiwara A, Haruyama N, Tsuchida T. "Multiplex PCR method for rapid identification of genetic group and symbiont infection status in *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae)", *Applied Entomology and Zoology* 51: 167-172 (2016年)

[学会発表](計 7件)

(1) 藤原亜希子、土田 努 "タバココナジラミ内部細菌共生系を成立させる分子機構の解明と新規病虫害制御法開発に向けた取り組み" 第56回日本応用動物昆虫学会大会

(2) 土田 努 "共生微生物による昆虫の環境適応-その実態と機構解明に向けた取り組み" 第56回日本応用動物昆虫学会大会

(3) 土田 努、藤原亜希子、松山茂、古賀隆一、深津武馬 "Symbiont-mediated plant adaptation in phloem-feeding insects" 第55回日本植物生理学会年会

(4) 瀧沢美翔、若林もなみ、吉武和敏、重信秀治、前川清人、藤原亜希子、土田 努 "タバココナジラミと細菌の共生を可能にする宿主の分子機構の探索" 日本進化学会 第17回大会

(5) 藤原亜希子、倉田歩、前田太郎、重信秀治、孟憲英、鎌形洋一、土田 努 "タバココナジラミで独自進化した菌細胞内棲み分けによる複合共生系" 日本進化学会 第17回大会

(6) 土田 努 "Microbial partners that support the life of phloem-sap feeding insects"

第 12 回 日独先端科学 (JGFoS) シンポジウム
(7) 瀧沢美翔、吉武和敏、重信秀治、前川清
人、藤原亜希子、土田 努 “タバココナジラミの
菌細胞特異的に高発現するペルオキシダーゼ様遺
伝子の解析”平成 27 年度日本動物学会中部支部大
会

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

土田 努 (TSUCHIDA, Tsutomu)

富山大学・大学院理工学研究部 (理学)・

准教授

研究者番号 : 60513398