様　式　Ｃ－１９、Ｆ－１９－１、Ｚ－１９　（共通）

# 科学研究費助成事業　　研究成果報告書

令和　元 年 １０ 月 ２９ 日現在

機関番号：８２１１１
研究種目：挑戦的萌芽研究
研究期間：2014～2016
課題番号：２６６６００４５

研究課題名（和文）RNAi技術を利用したカメムシ目害虫防除における有用ターゲットの探索と評価

研究課題名（英文）Searching HIGS target gene of phytophagous hemipteran insects

研究代表者
長谷川　毅（Hasegawa, Tsuyoshi）

国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構・生物機能利用研究部門　昆虫制御研究領域・主任研究員

研究者番号：３０４１４９３１

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費）　　2,500,000円

研究成果の概要（和文）：害虫が持つ重要な機能に関する遺伝子の働きを抑えることによって害虫を制御する試みがなされてきている。人や他の生物への影響を考えたターゲット遺伝子の選定が必要である。本研究では、害虫の生存にとっては重要だが他生物の持たない機能の遺伝子の候補を探索することを目標とした。植物を吸汁するカメムシ目害虫が吐出する凝固するタイプの唾液成分タンパク質をツマグロヨコバイにおいて同定したところ他生物にはない新規のものであった。このタンパク質をコードする遺伝子を有望なターゲットとしてノックダウン実験を行った。同時に複数の遺伝子のノックダウンが必要と考えらえれ、今後の詳細な解析が必要である。

研究成果の学術的意義や社会的意義
　これまでほとんどわかっていなかった、アブラムシ目昆虫類の吸汁に関わる唾液成分を明らかにすることにより、アブラムシ目害虫類の作物に対する吸汁機構が明らかとなる。このことを利用した防除技術の開発が期待される。
　また、今回、解析された蛋白質は、新規の硬蛋白質群であり、無色透明で多くの薬物に対して可溶なものから不溶性を示すものまで、多種の素材の開発等にも役立つものと期待される。

研究成果の概要（英文）：Pest insect management using technics to reduce expression of important gene of insect survive is developing now. To select good target genes is a key of this method. Most of important genes for pest insects are also significant genes for other insects including natural enemies for pest insects. In this study, we identified several protein components of salivary sheath in the Green rice leafhopper. These proteins are thought to be important for sucking plant sap. These proteins are revealed to be novel and the genes coding these proteins are good candidates for above-mentioned pest management method. We checked the survival rate of insects which were knock downed salivary sheath component protein genes. No significant decrease of survival rate was found. Complementation within nine salivary sheath components may occurred in those knock downed insects. We need further investigation to use these genes as target for pest managements.

研究分野：応用昆虫学

キーワード：硬タンパク質　唾液腺

１．研究開始当初の背景

RNA を用いて特定の遺伝子をノックダウンさせることを用いた害虫防除が盛んに研究されるようになった。とくに作物を形質転換し、害虫の生存に必須な遺伝子に対するdsRNAを発現させるなどRNAを昆虫に導入することでRNAiを引き起こし害虫をコントロールする技術が、複数の害虫種で検討されている。しかし、これまで検討されている遺伝子は、対象とする昆虫種以外にも影響を及ぼす可能性のあるものであり、適当なターゲットの選定が重要であると考えられている。

昆虫と植物の「食う-食われる」の攻防は非常に複雑である。昆虫の食害を避ける植物側の因子として、植物の形態的な変化、２次代謝物質など化学的なものなどが報告されている。篩管液吸汁性の昆虫に対しては、加害対象である篩管液の流れを止める仕組み（篩管閉塞）なども報告されている。また維管束吸汁性の昆虫に対しては、イネ、コムギなどでの遺伝学的な解析から、抵抗性の遺伝子座が確認され、実際に利用されている。それらのうち、イネやトマトなどで抵抗性遺伝子が同定されている。現在、植物では、その昆虫抵抗性の機構を解明しようと多くの研究がなされている。しかし、その一方で、通常の状態において、それらの昆虫が植物に対してどのように吸汁を成立させているか、ほとんど解明されていない。

吸汁性の昆虫では、植物と昆虫の主な接点は、昆虫が植物体内に刺し込む口針と呼ばれる器官と口針から吐きだす唾液であり、唾液が昆虫と植物の関係に重要な働きを担っていることが考えられている。実際に、動物の血液を吸汁する昆虫の唾液には、動物の防御機構を打破する様々な因子があり、その医学的な重要性から研究がすすんでいる。また咀嚼性の植食生昆虫では、唾液中のタンパク質や低分子化合物が、植物の防御機構を誘導するキーとなっていることが報告されてきた。しかし、植食生吸汁昆虫の唾液に関しては、ほとんど研究がすすんでいない。イネの重要害虫であるトビイロウンカに関しては、唾液腺のプロテオーム解析が行われた。中には注目すべきタンパク質も存在するが、そのほとんどは唾液成分ではなく、転写や翻訳、輸送など唾液腺自体の機能を維持するものであった（2009, Konishi）。

これまでに植食性吸汁カメムシ目昆虫の唾液候補は、唾液腺のトランスクリプトーム解析を用いの推定も行われてきた。これらを通じて、唾液の候補として挙げられたもののうち多量に発現していると考えられるものの多くの機能が不明でありかつ新規のタンパク質であることが分かってきた。そしてそれらの多くがプロテオーム解析からは検出されていない。この多くが新規のタンパク質であり、他の生物への影響が少ないことがかんがえらえれ、安全性の観点からRNAiを用いた昆虫制御技術のターゲットとしては有望であると考えられる。しかし、一方で、その機能が推定に過ぎず、明確に示されていないために、現時点では積極的に安全であるとは言えない。

２．研究の目的

ウンカやヨコバイ、コナジラミ、アブラムシなど植食性吸汁性昆虫には、重要な農業害虫が多い。しかし、その基本的な摂食機構に関する知見は、非常に乏しい。これらのアブラムシ目昆虫は、植物の持つ防御を回避して吸汁を成立させているといわれている。しかし実際にそれらの昆虫が、植物の持つどのような防御機構を、如何にして打破しているかは、ほとんど知見がない。両者の接点の中心は植物体に突き刺す口針と考えられるが、実際には多くのカメムシ目植食性吸汁昆虫では、口針の挿入後その口針から唾液を吐出して、口針の周りもその唾液で覆っていることが知られている。そしてこの覆っている構造も加害・吸汁に重要だと考えられている。この構造物は口針鞘と呼ばれている。タンパク質が主成分であることも解析されている。カメムシ目植食性吸汁昆虫の唾液には、大きく分けて2 つのタイプがあり、１つは、一般的な唾液として認識されている液体状の漿液性の唾液であり、もう一つが固まる性質をもつ凝固性唾液である。この凝固性唾液により口針鞘が形成されている。

この構成成分タンパク質こそが、「背景」の項目で述べた、多量に発現すると考えられる機能不明の唾液タンパク質候補遺伝子の産物なのではないかと考えた。特にその多量にもかかわらず、プロテオーム解析からは見つかっていないことが、ヒントと考えた。すなわち、量が多くて、溶けにくいものがその成分の有力な候補かもしれないからである。

これらの遺伝子の機能が明らかとなれば、RNAi を用いた害虫制御のターゲットとして非常に有望なものとなる。その理由を挙げると、

・唾液腺で多大なコストをかけて多量に生産しているタンパク質であり、吸汁に極めて重要であることが考えられること。
・他の生物、哺乳類や他のグループの昆虫類に類似の遺伝子やタンパク質が見つかっていないことから環境や安全に配慮が可能となること。
・これまでの知見よりカメムシ目昆虫の中でもその配列や組成が大きく異なっていることが考えられ、害虫捕食者や害虫ではないカメムシ目昆虫類には影響を与えないなど、防除適用範囲が選定できる可能性があること。

などである。

本研究では、新規タンパク質を多く含むと考えられる口針鞘の構成タンパク質を解

析し、その遺伝子が RNAi 防除技術に用いるターゲットして有望な資質を持つか解析することを目的とする。

３．研究の方法

本研究では、イネの重要害虫であるツマグロヨコバイを材料として用いる。ツマグロヨコバイでも唾液腺発現遺伝子の発現量上位の遺伝子で機能が不明なものが非常に多い。ツマグロヨコバイの唾液腺で多量に発現していると考えられる多くの新規タンパク質遺伝子が口針鞘構成タンパク質成分であるかを解析し、RNAi を用いたターゲット遺伝子としての資質を調査する。

（１）ツマグロヨコバイ口針鞘回収手法の開発及び口針鞘の大量回収

口針鞘を植物体外で形成させる。口針鞘は微小であり、多数の回収が必須となる。人工飼料を包んだパラフィルムやプラスティックフィルムに口針鞘を作成させる方法などが開発されている。しかし多量の回収は難しい。本研究では、アガロースゲルに口針鞘を作成させることとした。口針鞘を形成させるためのゲル状人工飼料について、ゲルの固さ、糖濃度、吸汁促進低分子の混入などを検討して口針鞘回収に適したゲルの開発を行う。また卵、カビ、昆虫の死骸などゲル上の夾雑物の除去法の開発を行う。

（２）口針鞘の溶解と、架橋による非可溶成分の溶解法の開発

連携研究者の唾液腺トランスクリプトーム解析などを用いて、口針鞘成分の候補と凝固に関わる酵素類の探索を行い、凝固の様式を推定を推定する。これを参考に溶解法を開発し、口針鞘成分を可溶化する。

（３）口針鞘構成タンパク質の分離および同定

可溶化された構成タンパク質を SDS-PAGE や 2 次元電気泳動などの手法で分離を行う。これらをもとに、N 末端アミノ酸配列解析および LC-MS/MS を用いた解析を行う。連携研究者によるツマグロヨコバイ唾液腺トランスクリプトーム解析データとの比較解析により口針鞘構成タンパク質の同定を行う。

（４）RNAi 用 dsRNA の設計と dsRNA によるノックダウンの評価

同定された口針鞘構成成分遺伝子のノックダウンに適当な dsRNA の設計と合成を行う。dsRNA をツマグロヨコバイにインジェクションして死亡率等の変化によりノックダウンの効果を評価する。

（５）他種昆虫への影響評価

同定された遺伝子の他種昆虫での相同性配列の有無を調査する。特に近縁であるカメムシ目昆虫には、昆虫を捕食するアメンボなど一般に益虫と呼ばれる害虫の天敵昆虫も多く含まれることから、それらの昆虫に対する被害も考慮しなければならない。植物に対象遺伝子の RNA を発現させる手法を用いるときには、その RNA 産物は植物体外に毒性成分として漏れ出ることはない。しかしその一方で、この植物を加害した昆虫体内にはその RNA が存在することになる。そのため、この昆虫を捕食した益虫への影響を考えなければならないからである。

４．研究成果

（１）ツマグロヨコバイ口針鞘回収手法の開発及び口針鞘の大量回収

アガロース 1.5 %、シュークロース 1.0 % のゲルをアイスクリームカップの蓋で凝固させ、そのアイスクリーム容器の中にツマグロヨコバイ成虫を 12 時間、25℃の状態に置き、アガロースの作成された口針鞘を回収することにした。サリチル酸等、吸汁を促進する可能性のある化学物質などの混入を試みたが、作成数に顕著な差は見られなかった。これらの口針鞘を作成されたアガロースゲゲルから、熱処理、遠心分離、処理液等の組み合わせにより、夾雑物を除去する処理技術を開発し、成分の解析等に必要な口針鞘を回収した。口針鞘の直径約 20 μm で、髪の毛の約 1/5 くらいの太さであった。

（２）口針鞘の溶解と、架橋による非可溶成分の溶解法の開発

上記の手法により回収した口針鞘を界面活性剤、ジスルフィド結合を切断する薬剤、低分子化合物などを用いて LC-MS/MS 分析を行うことができるサンプルの調整が可能となった。

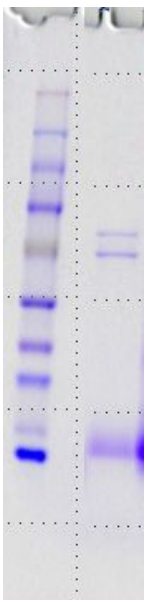


図１）可溶化した口針鞘成分の SDS-PAGE
M; 分子量マーカー
1; 可溶化した口針鞘サンプル
CBB 染色により可視化

（３）口針鞘構成タンパク質の分離および同定

SDS-PAGE により分離されたタンパク質のバ

ンド数本についてN末端配列の解析を行ったが、どのバンドについても解析不能であった。ブロックされ全く配列が解析できないもの、複数のアミノ酸が混ざったようなチャートを示すものなどがあった。

上記の図のレーン１のバンドに対してLC-MS/MS 分析を行った。また、LC-MS/MS の結果を利用してタンパク質の同定に用いるため唾液腺発現タンパク質のデータベースを作成した。連携研究者の開発した RNAseq によるツマグロヨコバイ唾液腺発現遺伝子データベースをもとに、EST データベースなどの情報を用いて、口針鞘構成タンパク質の有力候補となる、反復配列やアミノ酸の偏りが激しいタンパク質配列の修正等を行った。その結果、506,050 の配列からなるデータベースとなった。これらを用いて9個の配列が、ツマグロヨコバイ口針鞘の構成タンパク質として同定された。同定されたタンパク質はすべて新規のものであった。しかしその機能は不明である。

これまで報告のあった機能の分かるタンパク質とは相同性を示さなったものの、反復配列を高度に含んでいるものや、アミノ酸に高度の偏りのあるもの、特徴のある配列が多く見受けられた。

（４）RNAi 用 dsRNA の設計と dsRNA によるノックダウンの評価

今回口針鞘成分として同定されたタンパク質をコードする 4 個の遺伝子について RNAi を用いてノックダウンを試みた。その結果、生存率等に顕著な差異が見られなかった。想像を超えて多くの口針鞘成分が同定されたが、これらがお互いに補完しあう関係にあるかもしれない。このことについては、複数の遺伝子の同時のノックダウンなどを含めて、引き続き研究を進める必要がある。

（５）他種昆虫への影響評価

今回口針鞘構成成分タンパク質として同定された9種の配列について他の生物との相同性のある配列の検索を行った。反復配列を含む配列などについては、かなり閾値を低く設定しても相同性が見られる配列は見つからなかった。一方、アミノ酸に高度な偏りのある配列については、同じくアミノ酸に高度の配列の偏りのあるタンパク質との相同性が見られた。しかし単に、同種のアミノ酸が多く含まれるためにタンパク質の配列としては相同性をしめすものの、遺伝子（cDNA）の配列としては顕著な相動性を示すものはなかった。

＜引用文献＞

Konishi et al. (2009) Proteomic analysis of the salivary glands of the rice brown planthopper, Nilaparvata lugens (Stål) (Homoptera: Delphacidae). Applied Entomology and Zoology, 44, 525-534

５．主な発表論文等

〔雑誌論文〕（計０件）

〔学会発表〕（計１件）

① 長谷川　毅，松本　由記子．　ツマグロヨコバイの口針鞘を構成する難溶性タンパク質成分の解析．日本応用動物昆虫学会．2017.03.29　東京農工大学（東京都・小金井市）

６．研究組織

(1)研究代表者
長谷川　毅（HASEGAWA, Tsuyoshi）
国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構・生物機能利用部門　昆虫制御研究領域・主任研究員
研究者番号：３０４１４９３１

(3)連携研究者
松本　由紀子（MATSUMOTO, Yukiko）
国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構・生物機能利用部門　昆虫制御研究領域・主任研究員
研究者番号：８０４１４９４４