

令和元年5月29日現在

機関番号：17701

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2018

課題番号：15K14899

研究課題名(和文)植物と昆虫に共通した共生戦略分子としてのシステインリッチペプチドの機能

研究課題名(英文) Cysteine-rich peptides as symbiotic strategic molecules common to plants and insects

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) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究の目的は、アブラムシ体内の共生器官であるバクテリオサイトの特異的なシステインリッチペプチド(BCR)が、細胞内共生細菌であるブフネラとの共生に必須かどうかを明らかにすることである。

エンドウヒゲナガアブラムシが保持する7種のBCRのうち6種を合成し、大腸菌および根粒菌を被験菌株として生理活性を検討した。その結果、5種には細胞膜の選択透過性を喪失させ、4種には強い抗菌活性があることが判明した。RNAiによるBCR遺伝子の発現抑制を試みたところ、BCR遺伝子の発現とブフネラの転写活性には負の相関が検出され、BCRがブフネラの制御に関与していることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

マメ科植物の根粒特異的なシステインリッチペプチド(NCR)は、根粒菌との共生に必須である。本研究により、アブラムシのBCRは、マメ科植物のNCRと生理活性も同じであることが判明した。独立した進化をたどったふたつの共生システムでありながら、互いによく似た「共生器官特異的なシステインリッチペプチドが共生微生物を制御している」という驚くべき収斂進化の具体例として、大きなインパクトとなるであろう。

アブラムシは、農作物・園芸作物に甚大な被害を及ぼす害虫である。BCRがブフネラとの共生に必須であることが判明すれば、アブラムシに選択的に効果を持つ新規な殺虫剤の開発のターゲットとして期待できる。

研究成果の概要(英文)：Bacteriocyte cysteine-rich peptides (BCRs), which are specific to the symbiotic organ of aphids, are investigated to be clarified whether they are essential to symbiosis with the endosymbiont Buchnera.

Six out of seven BCRs of the pea aphid, *Acyrtosiphon pisum*, were synthesized, and their physiological activities were examined using *E. coli* and *Sinorhizobium meliloti* as test strains. Five BCRs increased membrane permeability and four BCRs exhibited strong antimicrobial activity. RNAi of one of the BCR genes showed a negative correlation between the expression of the BCR gene and the transcriptional activity of Buchnera. These results suggest that BCR may be required to control the endosymbiont, similar to the nodule specific cysteine-rich peptides in legumes.

研究分野：植物-微生物相互作用

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

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19（共通）

1. 研究開始当初の背景

アブラムシは植物の篩管液を栄養源とする小型の昆虫であり、世界中で農作物や園芸植物に甚大な被害を与えている。アブラムシの旺盛な繁殖力を支えている大きな要因のひとつが、ブフネラとの共生である。ブフネラは、大腸菌と近縁であるが単独で増殖することはできず、アブラムシ体内の共生器官であるバクテリオサイトの細胞内でのみ増殖し、アブラムシ体内で母から子へと受け継がれる。本申請の連携研究者である基礎生物学研究所・重信教授らは、アブラムシとブフネラ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を明らかにした。また、エンドウヒゲナガアブラムシのバクテリオサイトで特異的に発現している7種のシステインリッチペプチドの遺伝子を同定し、BCR (Bacteriocyte Cysteine Rich peptide) 遺伝子と名付けた (Shigenobu and Stern, 2013)。BCR は、互いによく似たシグナルペプチドを持つものの、成熟ペプチドは、6または8のシステイン残基が保存されている以外は多様性に富んでいた。BCR は多くのアブラムシ種で存在が確認されており、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た。

代表者は、マメ科植物と根粒菌の共生の場である根粒に特異的なシステインリッチペプチド群を見いだして NCR (Nodule specific Cysteine Rich peptide) と名付け、共生に必須の分子であることを明らかにした (Mergaert *et al.*, 2006; Van de Velde *et al.*, 2010)。タルウマゴヤシの NCR は、700 種を超える遺伝子ファミリーを構成しているが、シグナルペプチドの保存性は高い。また、成熟ペプチドのアミノ酸配列は多様性に富むものの、4または6のシステイン残基が保存されていた。NCR は宿主植物由来であり、根粒細胞内に侵入した根粒菌に直接作用して、細胞膜の透過性を変化させたり、根粒菌の増殖を制御することにより共生を成立させている。根粒菌体に対する生理活性は、合成ペプチドを使用した実験でも再現可能であった。

システインリッチペプチドが、細胞内共生を確立している共生器官特異的に存在するという、昆虫と植物の垣根を越えた生物学的アナロジーは、「BCR は NCR と同様に、共生細菌を制御して共生を成立させるのに必須の分子ではないか？」という考えを抱かせる。しかし、BCR の生理活性についての情報は全くなかった。

2. 研究の目的

マメ科植物の NCR の生理活性を検討した方法を踏襲し、エンドウヒゲナガアブラムシの BCR の生理活性と共生における機能を明らかにすることを目的とした。そのために、次の二つのサブテーマとその目標を設定した。

- (1) BCR の生理活性の解明：合成 BCR を使用して、BCR が細菌菌体に及ぼす影響を明らかにする。
- (2) BCR が共生に必須な分子であることの証明の試み：BCR がブフネラとの共生に必須な分子であることの証明を試みる。

3. 研究の方法

(1) BCR の生理活性の解明

マメ科植物の NCR の生理活性は、合成ペプチドを根粒菌の培養菌体に与えることによって評価可能であった。ところが、アブラムシの共生細菌であるブフネラは絶対共生細菌であり、単離・培養は困難である。そこで、BCR の生理活性のバイオアッセイには、ブフネラと近縁の大腸菌を被検菌として使用した。また、NCR との比較のために、根粒菌も被検菌として使用した。

①菌株と培地

大腸菌は、ゲノム情報が充実している MG1655、BW25113、及び、BW25113 由来の *sbmA* 破壊株である JW0368 を使用した。根粒菌は NCR の生理活性の検討で使用したアルファルファ根粒菌 *Sinorhizobium meliloti* 1021 とその *bacA* 変異株 (Ferguson *et al.*, 2002) を使用した。いずれの菌株も M9 液体培地にて培養した。菌株の維持、及び、コロニー数を計測する際には、LB 培地 (大腸菌用) または TY 培地 (根粒菌用) を使用した。

②BCR と NCR

エンドウヒゲナガアブラムシの7種のBCRのうち、合成可能であった6種のBCR (BCR1

～BCR5, BCR8) を使用した。NCR は強い抗菌活性を有する合成 NCR247 を使用した。

③BCR 及び NCR による菌体の処理

培養液の OD₆₀₀ が 0.3 に達したら集菌し、OD₆₀₀ が 0.1 となるように 10 mM Tris-HCl 緩衝液 (pH7.5) に懸濁して菌体懸濁液を調製した。ペプチド (5 μM) を添加して 30°C で 3 時間インキュベートした。いずれの実験でも BSA を添加したものをコントロールとした。

④BCR 及び NCR の抗菌活性の検出

菌体懸濁液に BCR または NCR を添加して 30°C で 3 時間インキュベートしたあと、希釈系列を調製してテプレーティングし、出現したコロニー数を測定した。コントロールのコロニー出現数を 100% として、相対値を求めた。菌体細胞の形態の変化、及び、細胞膜の透過性の喪失は、ペプチドで処理した後の菌体懸濁液に 10 μg/mL となるように DAPI と PI を添加し、セルソーター (SH800, Sony) と共焦点レーザー顕微鏡 (A1, Nikon) で解析した。

(2) BCR が共生に必須な分子であることの証明の試み

①アブラムシの系統維持

ゲノム情報が充実している系統であるエンドウヒゲナガアブラムシ (*Acyrtosiphon pisum*) ApL を、明期 16 時間 : 暗期 8 時間の長日条件、26°C で飼育して実験に用いた。継代飼育には、ソラマメを発芽させた幼植物を使用した。

②人工飼料によるアブラムシの飼育

プラシャーレ (φ35 mm) に 2 枚の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 または 200 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。これらの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。人工飼料の摂餌を確認する場合は、blue FCF (3%, 食用色素) を添加した。人工飼料の給餌による抗生物質の効果を確認する際には、100 μg/mL となるようにリファンピシンを添加した。dsRNA を摂取させる場合は、一枚のシャーレ上でアブラムシ 20 個体を飼育した。

③合成 RNA による RNAi

BCR1 と BCR3 を標的として、RNAi による発現抑制を試みることにした。また、発現抑制の効果があつた場合、体色の変化などが期待できる *Lac2* 遺伝子も標的とすることとした。それぞれの遺伝子について、ゲノム情報に基づいて RNAi 用に適すると予想される塩基配列 (20 塩基程度) を 2 箇所決定し、合成した。相補鎖も合成し、dsRNA として使用した。一標的遺伝子に対して 2 種の dsRNA をそれぞれ 100 ng/μL となるように人工飼料に添加し、アブラムシを 3 日間飼育した。

④アブラムシからの RNA の抽出と発現量の定量

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。BCR1, BCR3, *Lac2* のそれぞれの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、定量 RT-PCR で解析した。

4. 研究成果

(1) BCR の生理活性の解明

①合成 BCR の抗菌活性

合成 BCR の抗菌活性として、菌体懸濁液にそれぞれの BCR を添加したあとの相対的なコロニー形成数を図 1 に示す。BCR1, BCR3, BCR5, BCR8 は、大腸菌 MG1655 に対して 5 μM の濃度で強い抗菌活性を示した。5 × 10⁷ 細胞の MG1655 に 5 μM の BCR1 を添加すると、生菌数は、約 5 × 10² 細胞に激減した。BCR3, BCR5, BCR8 を添加した場合は、コロニーは全く出現しなかった。BCR4 は弱い抗菌活性を示したものの、BCR2 は有意な抗菌活性を示さなかった。

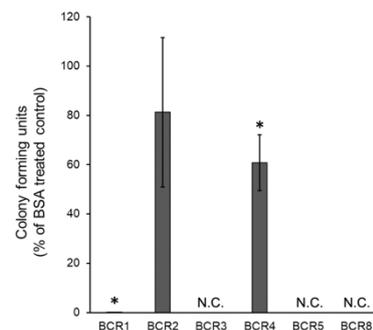


図 1. BCR の抗菌活性

②合成 BCR が細菌細胞に及ぼす影響

BCR が大腸菌体に引き起こす形態的变化について、細胞のサイズを表すパラメータ (FSC) と細胞の形態や細胞内部の複雑さを表すパラメータ (SSC) を指標としてセルソーターで分析した。BCR2, BCR3, BCR5, BCR8 は FSC (図 2A) と SSC の両方を増加させた。BCR1 と BCR4 は FSC をわずかに増加させた(図 2A)ものの、SSC に変化はなかった。コントロール細胞の多くは DAPI で染色された (図 2B)。BCR1, BCR3, BCR5, BCR8 で処理した菌体は、コントロールよりも広い分布を示し、BCR1, BCR5, BCR8 処理は、より強い蛍光を示す菌体数が増加した(図 2B)。PI で染色した大腸菌細胞をセルソーターで分析したところ (図 2C)、

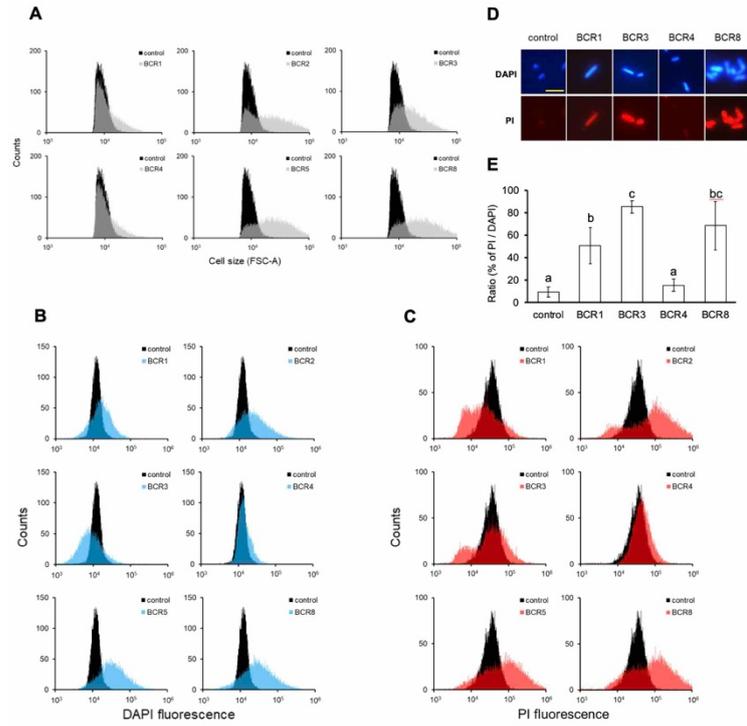


図 2. 大腸菌細胞に対するBCRの効果

より強い蛍光強度を示す細胞数が増加した。DAPI や PI による染色で強い蛍光を示すことは、細胞膜の選択透過性が喪失していることを示唆しており、BCR1, BCR2, BCR3, BCR5, BCR8 は、大腸菌の細胞膜の透過性に大きな影響を及ぼすものと考えられる。また、BCR1 と BCR3 で処理した菌体の分析では、より蛍光強度が低い領域でも検出されているが、これは、それぞれの BCR の活性により細胞が破壊され、細胞断片を検出した可能性がある。強い抗菌活性を示した BCR1 と BCR3, 及び、BCR5 と BCR8 のプロファイルは、互いによく似ていた。また、蛍光顕微鏡による観察結果 (図 2D, E) もよく似ており、これらの BCR の抗菌活性は、主に、細胞膜の透過性の変化、あるいは、細胞膜の破壊によるものと考えられた。BCR2 と BCR4 は、ともに抗菌活性はほとんどなかったものの、セルソーターでのプロファイルは、互いに異なっていた。BCR4 で処理した菌体の解析プロファイルや顕微鏡による観察の結果 (図 2D, E) はコントロールの菌体と大きな差はなかったが、BCR2 で処理した菌体のプロファイルは BCR5 や BCR8 と似ていた。これらのことは、BCR2 と BCR4 は、細胞膜に対する作用とバクテリオサイト内における機能が異なることを示唆している。

タルウマゴヤシの根粒共生系では、宿主由来の NCR に対する耐性には、根粒菌の BacA タンパク質が関与していることが知られており、*bacA* 変異株は NCR に対する感受性が高く、共生系を確立することができない。そこで、*bacA* 遺伝子のホモログである *sbmA* 遺伝子の変異大腸菌株とアルファルファ根粒菌の *bacA* 変異株について、BCR に対する感受性を検討した。その結果、大腸菌の *sbmA* 変異株は、BCR に対する感受性が高くなっていることが判明した (図 3A)。また、アルファルファ根粒菌 *bacA* 変異株も BCR に対する感受性が高かった (図 3B)。BCR で処理したアルファルファ根粒菌体をセルソーターで分析した。BCR1, BCR4, BCR8 のいずれも、大腸菌の場合と同様な結果であった。これらのことを総合すると、BCR の作用機構は、マメ科植物の NCR と共通していることを示唆している。

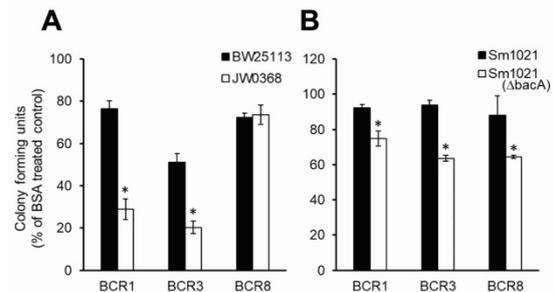


図 3. 大腸菌 *sbmA* 変異株および根粒菌 *bacA* 変異株の BCR に対する感受性。

本研究で、BCR と NCR の生理活性に多くの共通した特性を見いだした。NCR は、共生器官内部における所在や役割が異なることが示されている。BCR も生理活性に違いが見出されており、役割分担があるものと予想される。BCR の生理活性には、細菌細胞の細胞膜に存在するトランスポーターである *sbmA/bacA* 遺伝子が関与していることが明らかとなったが、ブフネラは、相同な遺伝子を保持していない。BCR は、*sbmA/bacA* 遺伝子が関与しない機構によって、ブフネラを制御している可能性がある。BCR の中には、強い抗菌活性を示すものが見出されたが、この活性は、バクテリオサイト内部のブフネラの増殖を制御するだけでなく、ブフネラ体内に侵入してくる様々な細菌の増殖を制御する役割を担っている可能性もある。ブフネラは、トランスポーター遺伝子をほとんど持っていない。BCR が細胞膜の選択透過性を喪失させる生理活性があることは、アブラムシとの代謝産物の交換に寄与していることも考えられる。

(2) BCR が共生に必須な分子であることの証明の試み

①人工飼料の摂取の確認と飼育

blue FCF を添加し人工飼料でアブラムシを2日間飼育して体色を比較したところ、blue FCF を添加した飼料で飼育したアブラムシの体色は、明らかに青い色を呈していた。人工飼料のみで飼育した場合の生存率は、6日後で40~50%程度であった。リファンピシンを添加して人工飼料で2日間飼育したのち、ソラマメに移して一週間飼育を継続した場合、アブラムシの繁殖能力は、極端に低下した。これらのことから、人工飼料に添加した物質はアブラムシに吸収され、効果を発揮することが期待された。

②合成 RNA の給餌とその効果

RNAi による発現抑制の標的遺伝子として、BCR1 と BCR3 の遺伝子を選んだ。合成 RNA の給餌3日後のアブラムシ集団 (20 個体) から抽出した RNA を試料として、*BCR1*, *BCR3*, *Lac2* 遺伝子の発現量とブフネラの *DnaK* 遺伝子の発現の相関を解析した。*BCR1* 及び *Lac2* 遺伝子については、発現の抑制効果が見られず、*DnaK* 遺伝子の発現との明確な相関を得ることができなかった。しかし、*BCR3* 遺伝子については、「発現が抑制されると *DnaK* 遺伝子の発現が増加する」という明確な負の相関を見いだすことができた (未発表)。このことは、*BCR3* 遺伝子の発現が抑制された結果、ブフネラの増殖を制御することができず、ブフネラ遺伝子の発現量または菌体数が増加したことを示唆している。今後は、より明確な実験結果を得るために、合成 RNA を給餌したアブラムシの遺伝子発現を、1 個体ごとに解析する必要がある。また、RNAi の効果を十分に発揮させるために、RNase による分解を回避できる修飾 RNA を使用することも重要であろう。*BCR* 遺伝子の発現が抑制された個体からバクテリオサイトを分離し、内部のブフネラの細胞数や形態について、無処理の個体と比較する必要もある。

本研究で、アブラムシの共生器官特異的なシステインリッチペプチドである BCR には、細菌の細胞膜の透過性に変化を引き起こす活性があり、強い抗菌活性を持つこと、その生理活性はマメ科植物の共生に必須な共生器官特異的システインリッチペプチド NCR と共通していること、BCR 遺伝子の発現がブフネラの増殖を制御している可能性があることが明らかとなった。これらのことは、アブラムシの BCR が、ブフネラとの共生に必須であることを強く示唆している。

【引用文献】

- Ferguson G.P. *et al.*, *J. Bacteriol.*, **184**, 5625-5632 (2002).
Mergaert P. *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **103**, 5230-5235 (2006).
Shigenobu S. and Stern D.L. *Proc R. Soc. B.*, **280**, 20121952 (2013).
Van de Velde W. *et al.*, *Science* **327**, 1122-1126 (2010).

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕（計1件）

Uchi N, Fukudome M, Nozaki N, Suzuki M, Osuki K, Shigenobu S, Uchiumi T, 2019. Antimicrobial activities of cysteine-rich peptides specific to bacteriocytes of the pea aphid *Acyrtosiphon pisum*. *Microbes and Environments*. doi: 10.1264/jsme2.ME18148. （査読あり）

〔学会発表〕（計4件）

- ①内 奈保子, 野崎 成美, 福留 光拳, 小薄 健一, 鈴木 みゆず, 重信 秀治, 内海 俊樹, 膜タンパク質変異菌株に対する共生器官特異的システインリッチペプチドの生理活性, 植物化学調節学会第52回大会, 2018
- ②内 奈保子, 野崎 成美, 福留 光拳, 小薄 健一, 鈴木 みゆず, 重信 秀治, 内海 俊樹, 膜タンパク質変異菌株に対する共生器官特異的システインリッチペプチドの生理活性, 植物微生物研究会第27回研究交流会, 2018
- ③内 奈保子, 重信 秀治, 九町 健一, 阿部 美紀子, 東 四郎, 内海 俊樹, 植物とアブラムシの共生器官特異的なシステインリッチペプチドの生理活性, 植物微生物研究会第25回研究交流会, 2015
- ④内 奈保子, 重信 秀治, 九町 健一, 阿部 美紀子, 東 四郎, 内海 俊樹, 共生器官特異的な宿主由来システインリッチペプチドの生理活性, 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 三学会合同福岡大会, 2015

〔図書〕（計0件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計0件）

○取得状況（計0件）

〔その他〕

ホームページ等

<https://www.kagoshima-u.ac.jp/researcher/2018/05/post-11.html>

Public Lecture, Universitas Sumatera Utara. 10 December, 2018. Medan Indonesia.
“Cysteine-rich peptides specific to the symbiotic organ control the microsymbionts”

6. 研究組織

(1)研究分担者

該当なし

(2)研究協力者

研究協力者氏名：重信 秀治

ローマ字氏名：Shigenobu Shuji

所属研究機関名：大学共同利用機関法人自然科学研究機構 基礎生物学研究所

部局名：生物機能解析センター 生物機能情報分析室

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。