

令和 2 年 7 月 2 日現在

機関番号：82111

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K07685

研究課題名(和文) 吸汁を成立させるツマグロヨコバイ唾腺遺伝子の解析

研究課題名(英文) The salivary genes of *Nephotettix cincticeps* essential for phloem ingestion

研究代表者

松本 由記子 (MATSUMOTO, Yukiko)

国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構・生物機能利用研究部門・上級研究員

研究者番号：80414944

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：ツマグロヨコバイはイネを吸汁する害虫であるが、吸汁の際イネ側に自分の唾液を吐出し注入する。イネからの吸汁を可能にする成分がこの唾液の中に含まれていると考えられるが、その成分や機能はほとんどわかっていない。唾腺遺伝子および吐出タンパク質のデータを得て、RNAi法による遺伝子抑制で吸汁行動や生存率に変化を示す遺伝子を探索した。約70種類の遺伝子のうち、NcSP75遺伝子の抑制で篩管吸汁時間の減少が起こり、死亡率上昇、産卵数減少が起きた。おそらく篩管吸汁に必須の遺伝子であることを示した。また、NcLac5遺伝子抑制は脱皮(羽化)後に必須の遺伝子であることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

イネの重要害虫ツマグロヨコバイは篩管からの吸汁により栄養分を摂取しており、口針を挿入して、吸汁に至る過程で唾液を分泌する。イネは、単に穴をあけられただけなら篩管をふさぎ液の流出を止めることができるが、ツマグロヨコバイを含めたイネ害虫はこの防御反応を越えて吸汁を行っている。ツマグロヨコバイの唾腺遺伝子、吐出タンパク質のリストから、RNAiによる遺伝子抑制で吸汁行動や生存に影響を与える遺伝子を探索し、NcSP75がエフェクターであることを示唆した。NcSP75タンパク質の作用を選択的に阻害することができれば、他の有益な昆虫等に影響しない新しい害虫防除技術の開発につながると考えられる。

研究成果の概要(英文)： *Nephotettix cincticeps*, the green rice leafhopper, injects gelling and watery saliva into plant tissues during the sucking process. Certain components within the saliva are believed to interact with plant cellular constituents and play important roles in overcoming host plant defense responses, however, little is known about that. Based on our previous analysis of the salivary gland transcriptome and secreted saliva proteome of *N. cincticeps*, we screened the candidate genes involved in phloem feeding. Knockdown of NcSP75 (*N. cincticeps* salivary protein 75 kD) by RNAi showed a significantly shorter duration of phloem ingestion, therefore, reduced the longevity of treated nymphs, and reduced the number of deposited eggs and hatched nymphs. These results suggest that the NcSP75 protein contribute to successful ingestion. In addition, NcLac5, belong to multicopper oxidase family, was shown to be essential after molting (eclosion).

研究分野：昆虫遺伝学

キーワード：ツマグロヨコバイ 唾腺遺伝子 篩管

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

イネの重要害虫ツマグロヨコバイは篩管からの吸汁により栄養分を摂取しており、口針を挿入して、吸汁に至る過程で唾液を分泌する。イネは、単に穴をあけられたり篩管をふさぎ液の流出を止めることができるが、ツマグロヨコバイを含めたイネ害虫はこの防御反応を越えて吸汁を行っている。したがってイネに注入された唾液成分には吸汁開始・継続・イネからの防御応答抑制、イネのツマグロヨコバイ抵抗性打破に必須の成分が存在することが示唆されている。しかし、唾液中に含まれるいずれの成分がどのような機能を果たしているかは、ほとんどわかっていない。吸汁に必須の唾液成分を同定することで、害虫防除につなげたい。

2. 研究の目的

本研究では、これまでに得たツマグロヨコバイ唾腺トランスクリプトーム・唾液吐出成分プロテオームのデータに基づき、吸汁成立、生存に関与するツマグロヨコバイ唾腺遺伝子を同定し、その機能解析を行い、防除法の開発の糸口を得る。

3. 研究の方法

(1) 唾腺遺伝子、吐出タンパク質のリスト作成と利用

研究に先立って、ツマグロヨコバイ唾腺トランスクリプトームデータ (約 50,000 コンティグ) を得て遺伝子側からの解析を可能とした [Matsumoto et al., 2014]。さらに、ツマグロヨコバイが実際に吐出している漿液性唾液成分を採取し、トランスクリプトームデータを利用して 71 種のタンパク質を同定した [Hattori, Matsumoto et al., 2015]。

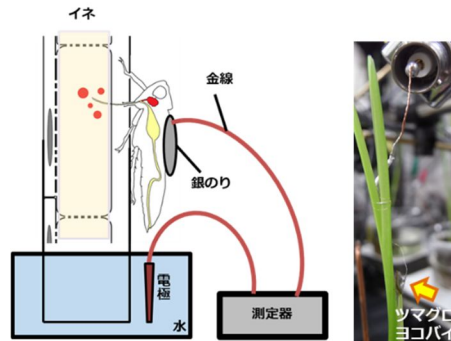
(2) RNAi (RNA interference)

高発現の唾腺遺伝子を中心に、二本鎖 RNA インジェクションによる遺伝子抑制実験を行った。ガラス針で虫の胸部と腹部の間にインジェクションを行った。ツマグロヨコバイでは幼虫 RNAi、成虫 RNAi とともに遺伝子抑制が効果的に起きる。遺伝子抑制により、篩管吸汁が阻害されるならば生存率や産卵数の減少が見られると考えられる。幼虫 RNAi で生存率を観察、成虫 RNAi で生存率・次世代産卵数・次世代幼虫の生存率・成虫の吸汁行動観察を行った。対照として EGFP (enhanced green fluorescent protein、ツマグロヨコバイには無い遺伝子) 遺伝子のインジェクション、またはインジェクションなし (untreated control) を行った。

(3) EPG (Electrical Penetration Graph)

成虫の背中に細い金線を銀のりでつけ、イネを吸汁させる。成虫に微弱電流を流すと、成虫の行動 (口針を刺す、唾液吐出、篩管吸汁、導管吸汁など) によって電圧が変化するので行動をモニターできる。

それぞれの行動要素について時間を計測する (図 1)。

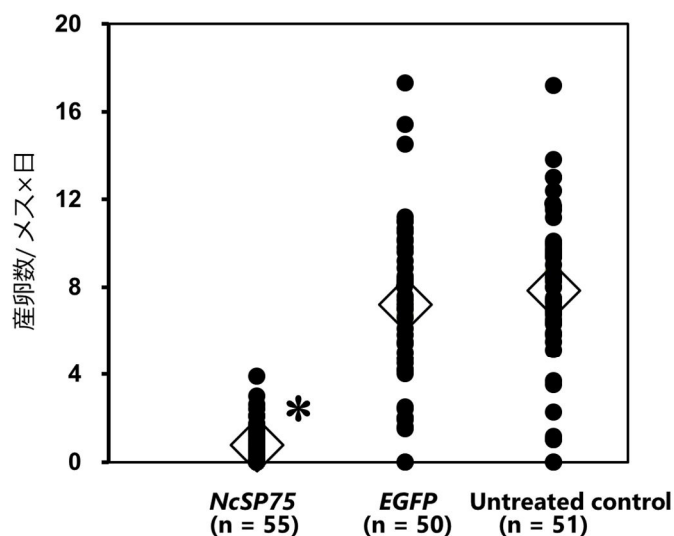


(図1) EPG。ツマグロヨコバイの背に銀のりをつけ、金線とつなぐ。イネをつけている水にも電極をつなぐ。微弱電流を流し、電圧の変化を測定する。口針をイネに刺していないと電圧はほぼゼロだが口針をイネに刺したり唾液を注入したり、吸汁したりすると電圧が変化する。行動によって波形が変化するので、どれだけの時間どのような行動をとったかを記録する。

4. 研究成果

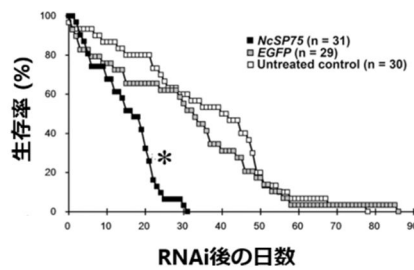
(1) *NcSP75* 遺伝子は吸汁に必須のエフェクターである

唾腺で高発現の遺伝子を中心に、約 70 種類の遺伝子について成虫 RNAi を行った。このうち *NcSP75* 遺伝子を抑制したとき、次世代幼虫数が減少した。この現象は産卵数の減少によるものであった (図 2)。*NcSP75* は唾腺の type III cell で特異的に発現していることを明らかにした。さらに幼虫 RNAi を行ったところ、対照よりも成長 (脱皮) の遅れおよび早死を示すことが明らかとなった (図 2)。 [Matsumoto & Hattori, 2018]。EPG (図 3) により吸汁行動がどうなるかを観察したところ、*NcSP75* 抑

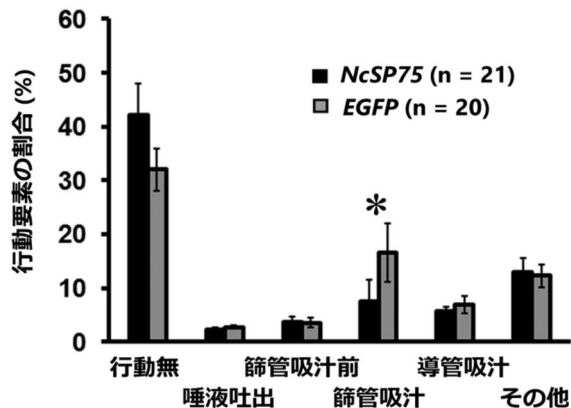
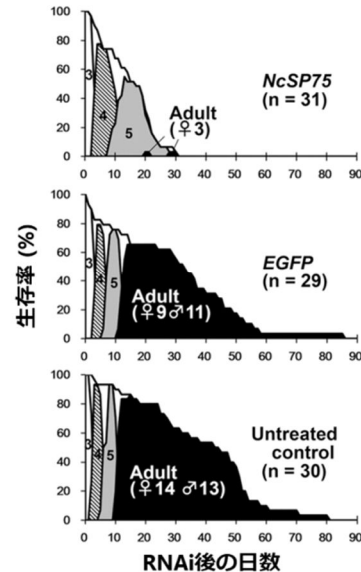


(図2) 羽化24時間以内のメス成虫にRNAi 4日後、芽出しイネを入れた試験管内で、オスと交配、産卵させた。産卵は羽化14日または死亡するまで行わせた。オスが死亡した場合は新たにオスを入れた。ヘアは2日ごとに新たな芽出しイネ試験管に移した。産卵後イネを解剖して卵数をカウントした。ひし形が平均値である。*NcSP75*抑制により産卵数が減少した。

制により篩管吸汁のみが対照より短くなっていった(図4)。篩管吸汁の時間には影響がなかった。ツマグロヨコバイが吸汁する篩管には大量の糖が含まれており、余剰は排泄物(甘露)として出されるが、*NcSP75* 抑制個体ではこの甘露中の糖含量が大きく減少していた。また、成虫 RNAi でイネではなく人工飼料を与えた場合は、*NcSP75* 抑制しても対照と同程度の期間生存できた。これらのことから、*NcSP75* 抑制で篩管吸汁が阻害され、栄養不良を起こし、成長の遅れや早死に、産卵数減少につながっていると考えられる。*NcSP75* はツマグロヨコバイの篩管吸汁に必須のエフェクターであり、防除の標的遺伝子となりうる。*NcSP75* は、吐出タンパクの1種として同定されているが、配列やドメインは既知のタンパクと相同性がなく機能は不明である [Hattori, Matsumoto et al., 2015]。ほかの吸汁害虫トビイロウンカやアブラムシなどでも唾液遺伝子やタンパクの解析が行われているが、それらともいまのところ相同性は見られない。

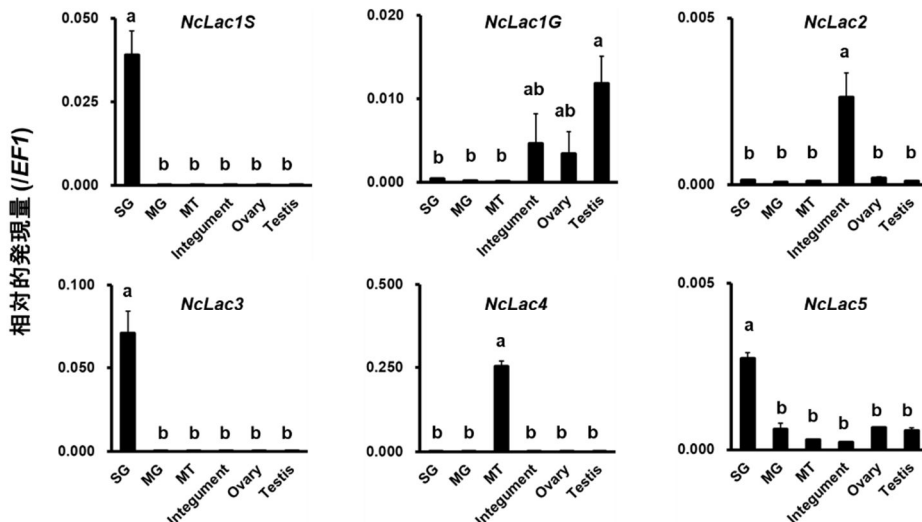


(図3) 脱皮24時間以内の3齢幼虫に RNAi 後、個体飼育を行い生存率、脱皮を観察した。*NcSP75* 抑制で生存率が減少した。また4齢期間、5齢期間が対象より長期化した。



(図4) 羽化24時間以内のメス成虫に RNAi 4日後、イネにつけ EPG により行動時間を測定した。各個体 18-24 時間記録した。*NcSP75* 抑制により、篩管吸汁時間のみに有意に短くなった。

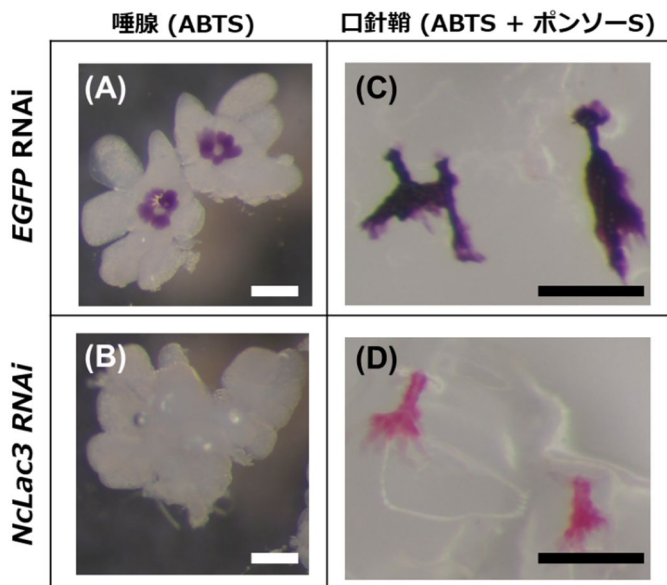
(2) 唾腺で発現する *NcLac5* は脱皮(羽化)後に必須である。また、*NcLac3* は唾腺ラッカーゼ遺伝子である。唾腺で吸汁に関与する候補としてラッカーゼ遺伝子が存在する。ツマグロヨコバイを含め吸汁性昆虫では、口針を植物体に突き刺す際、口針鞘と呼ばれる構造体を形成す



(図5) *NcLac1S*, *1G*, *2-5* 遺伝子の組織別定量。*NcLac1S*, *3*, *5*は唾腺、*1G*は精巣で比較的高発現、*2*は表皮、*4*はマルピーギ管で特異的に発現していた。SG (唾腺), MG (胃), MT (マルピーギ管), Integument (表皮), Ovary (卵巣), Testis (精巣) ($p < 0.05$).

る。口針鞘は唾液成分で固化し、口針を保護し篩管までの通り道となっているように見える。唾液成分および口針鞘にはラッカーゼが存在することが以前から知られており [Sogawa, 1968]、口針鞘の硬化に必須の遺伝子と予測されていた。ツマグロヨコバイでも防除の標的遺伝子の有力候補と考えられたため本研究でも詳細に検討した。ラッカーゼは Multicopper oxidase family の一種で、ツマグロヨコバイでは *NcLac1S*, *1G*, *2-5* の少なくとも 6 遺伝子が存在する [Hattori et al., 2010; Matsumoto & Hattori, 2019]。この 6 遺伝子のうち 3 遺伝子 *NcLac1S*, *3*, *5* が唾腺特異的 (または優位) に発現していた。*NcLac2* は表皮の硬化、黒化に関与し、抑制すると脱皮がうまくいかず死亡する。*NcLac1G* は精巣で比較的高く発現し *NcLac4* はマルピーギ特異的に発現していた (図 5)。*NcLac1S*, *NcLac3* はどちらも唾腺の type V cell で発現していたが [Hattori et al., 2010; Matsumoto & Hattori, 2019]、*NcLac3* を抑制したときのみ唾腺および口針鞘のラッカーゼ活性がほぼ完全に消失した (図 6)。したがって、ツマグロヨコバイの唾腺ラッカーゼ遺伝子は *NcLac3* であることが示された。しかし、*NcLac1S*, *3* を抑制しても生存率や幼虫の成長速度には影響が見られなかった。また *NcLac3* ラッカーゼが消失した口針鞘でもそれほど大きく形が崩れているようには見えず (図 6) ラッカーゼがなくとも口針鞘は十分形成されている。*NcLac3* 抑制しても生存率や産卵数には影響が見られず、このラッカーゼ活性の意義は現在のところ不明である。

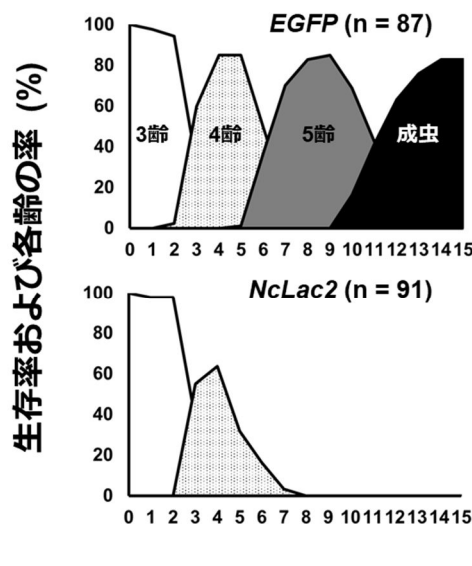
NcLac5 は唾腺優位に発現するが、その発現量はほかの Multicopper oxidase と比べると高くない。しかし、*NcLac5* 抑制により生存率は大きく低下した。3 齢、4 齢、5 齢幼虫および成虫で RNAi を行ったところ、この生存率低下は RNAi 後の脱皮 (または羽化) ののちに見られた (図 7、他省略)。*NcLac5* の成虫 RNAi では生存率は変化せず、さらに産卵数にも影響はなかった。*NcLac5* の唾腺での発現部位は明らかではない。また、アミノ酸配列からはほかの *NcLac* タンパクには見られるシグナル配列がないため *NcLac5* タンパクは分泌されていない可能性も高く、吸汁の際にイネ側に注入されていないとも考えられる。上記の *NcSP75* とは異なり、*NcLac5* 抑制では吸汁阻害を起こしているとは考えにくく、脱皮 (羽化) 後に必須ななんらかの機能を有することが示唆される。



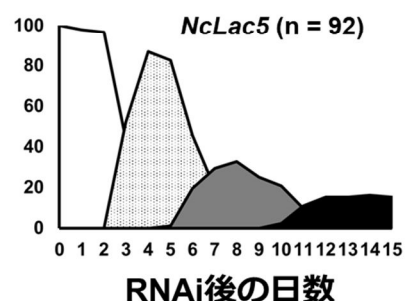
(図6) ツマグロヨコバイ雌成虫RNAiを行った。ラッカーゼ活性を検出する ABTSおよびタンパク質を染色するポンソーS を用いて唾腺および口針鞘を染色した。*NcLac3*を抑制すると唾腺および口針鞘のラッカーゼ活性(A, Cの紫色) がほぼ消失した (B, D)(Bar = 200 μm)

< 引用文献 >

Hattori et al (2010) Molecular characterization and expression of laccase genes in the salivary glands of the green rice leafhopper, *Nymphotettix cincticeps* (Hemiptera: Cicadellidae). Insect Biochem Mol Biol 40, 331–338.



(図7) 3 齢幼虫に RNAi 後の生存率と成長を示す。*NcLac2* 抑制では表皮の硬化が阻害され 4 齢までに全滅した。*NcLac5* 抑制では大多数が 4 齢にはなるがその後高い死亡率を示した。他の *NcLac* 遺伝子では死亡率や成長に対して影響がみられなかった



Matsumoto et al. (2014) Transcriptome analysis of the salivary glands of *Nymphotettix*

- cincticeps* (Uhler). J Insect Physiol 71, 170–176.
- Hattori, Matsumoto et al. (2015) Proteome analysis of watery saliva secreted by green rice leafhopper, *Nephotettix cincticeps*. PLoS One 10, e0123671.
- Matsumoto & Hattori (2018) The green rice leafhopper, *Nephotettix cincticeps* (Hemiptera: Cicadellidae), salivary protein NcSP75 is a key effector for successful phloem ingestion. PLoS One 10, e0202492.
- Matsumoto & Hattori (2019) Characterization of multicopper oxidase genes in the green rice leafhopper, *Nephotettix cincticeps* (Hemiptera: Cicadellidae), with focus on salivary gland specific genes. Arch Insect Biochem Physiol 102, e21602.
- Sogawa (1968) Studies on the salivary glands of rice plant leafhoppers. Appl Ent Zool 3, 13–25.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Matsumoto, Y. & Hattori, M.	4. 巻 13
2. 論文標題 The green rice leafhopper, <i>Nephotettix cincticeps</i> (Hemiptera: Cicadellidae), salivary protein NcSP75 is a key effector for successful phloem ingestion.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0202492	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Matsumoto, Y & Hattori, M.	4. 巻 102
2. 論文標題 Characterization of multicopper oxidase genes in the green rice leafhopper, <i>Nephotettix cincticeps</i> (Hemiptera: Cicadellidae), with focus on salivary gland specific genes	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Archives of Insect Biochemistry and Physiology	6. 最初と最後の頁 e21602
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/arch.21602	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 松本由記子、服部誠
2. 発表標題 ツマグロヨコバイ唾腺で発現しているマルチ銅オキシダーゼ
3. 学会等名 第63回日本応用動物昆虫学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 松本由記子、服部誠
2. 発表標題 ツマグロヨコバイ唾腺遺伝子解析
3. 学会等名 第62回日本応用動物昆虫学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 長谷川毅、松本由記子
2. 発表標題 ツマグロヨコバイの口針鞘に含まれるタンパク質成分の解析
3. 学会等名 第62回日本応用動物昆虫学会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考