

論文内容の要旨

論文題目 イネ害虫トビイロウンカにおける **Sugar transporter** の生理的役割

氏名 菊田 真吾

序論

トビイロウンカ (**Brown planthopper, BPH; *Nilaparvata lugens***) はイネから栄養分や水分を摂取する害虫である。これまで BPH を防除するために、様々な薬剤や耐虫性イネ品種が開発されてきた。しかし BPH はことごとく、こうした薬剤や耐虫性イネを打破してきた。残念ながら耐虫性イネに対する抵抗性の獲得の機構についてはほとんど明らかにされていない。本研究室で継代飼育している BPH には、抵抗性イネ ASD7 を摂食できるタイプと摂食できないタイプが混在していた。これらの差異をオリゴマイクロアレイを用いて、遺伝子発現を調査したところ、耐虫性イネ ASD7 を摂食できる BPH では、**sugar transporter** 遺伝子の発現が誘導された。BPH の **sugar transporter** に着目することにより、BPH の抵抗性打破機構を含むウンカ吸汁機構の解明の糸口が見つかるかもしれないと考えられた。また、生物において糖はトランスポーターを通じて細胞間を輸送されることがわかっているものの、昆虫における **sugar transporter** の研究報告は非常に限られている。**Sugar transporter** の機能を明らかにし、生理的な役割を追究することにより、BPH の糖の摂取メカニズムや糖の恒常性維持など昆虫の栄養生理の一端を明らかにできると考えられる。

結果と考察

Sugar transporter 候補遺伝子の探索と遺伝子発現プロファイル

BPH のみならず昆虫における **sugar transporter** 遺伝子の情報は十分ではない。そこで BPH の **sugar transporter** 遺伝子の配列、組織別発現状況に関する情報を得た。当研究室で構築された BPH cDNA EST データベース内に **sugar transporter** 候補遺伝子として 93 の EST クローンをみつけた。それらの cDNA 配列は不完全なため、3'RACE、5'RACE により、cDNA 全長解析を行ったところ、18 遺伝子 (*Nlst1* ~ 18) が **sugar transporter** をコードしていた。このうちもっとも EST 数が多かった *Nlst1*

は、2007年にイギリスの研究グループにより報告された NIHT1 グルコーストランスポーターであった (Price et al., 2007)。Nlst 遺伝子の組織発現ならびにステージ別発現分布を Realtime RT-PCR で解析したところ、これらの遺伝子の発現は組織やステージによって多様であった。

アフリカツメガエル卵母細胞を用いたトランスポーター機能解析系の検討

Sugar transporter はアミノ酸配列を比較すると共通の特徴を示すが、輸送分子の特定や輸送活性は、細胞に当該のトランスポーターを発現させて機能を解析する必要がある。本研究では、内在性トランスポーターの活性が低いと考えられているアフリカツメガエル卵母細胞に BPH のトランスポーターを発現させた。トランスポーター遺伝子の ORF を含むベクターコンストラクトから cRNA を作製し、アフリカツメガエル卵母細胞にインジェクションすることで、細胞膜上にトランスポーターを発現させた。発現させた卵母細胞を糖液に入れ、卵母細胞内に取り込まれた糖を糖分析用のカラムを備えた HPLC や RI 標識化合物により検出した。既知の NIHT1 (NIST1) について取り込みの検討をしたところ、グルコーストランスポーターであることが確認できた。トランスポーターの機能解析はアフリカツメガエル卵母細胞に発現させる実験系が有用であると考えられた。

中腸に発現する NIST トランスポーターの機能解析

昆虫は中腸を介して糖を吸収すると考えられているが、sugar transporter の解析がほとんど行われていないので、その実体の多くは不明である。本研究では中腸に発現する NIST トランスポーターのうち、耐虫性イネ ASD7 を摂食することで発現が誘導された Nlst6 と摂食時に発現が誘導された Nlst16 の機能解析を行った。BPH はイネの師管液を吸汁するので、イネの師管液をインセクト・レーザー法で回収し、糖成分を HPLC で分析したところ、スクロースだけが検出された。中腸に発現する NIST トランスポーターはスクロースあるいはその構成糖であるグルコースやフルクトースを取り込んでいる可能性が考えられた。機能解析の結果、NIST6 はグルコースやフルクトースの濃度勾配に依存したトランスポーターであった。NIST6 は耐虫性イネ ASD7 を摂食するとき発現が高まったが、スクロースから分解されたグルコースとフルクトースの取り込みと耐虫性イネとの関係は今後の課題である。

次に、NIST16 の機能を解析したところ、グルコースの濃度勾配によるトランスポーターであった。Nlst16 は摂食時に一過的に発現を上昇することで、NIST1 によるグルコースの取り込みをサポートしていると考えられた。NIST1, 6 と 16 はいずれも糖の濃度勾配によるトランスポーターである。そこで生理学的側面から、中腸においてエネルギー非依存的に糖の取り込みを行えるかどうかを、糖濃度を測定することにより検討した。師管液からは 15% のスクロースが検出された。BPH 体液中からは血糖 (トレハロースとミオイノシトール) のみが検出され、イネから取り込まれるグルコースやフルクトースは検出されなかった。従って、中腸を隔てた外部と生体内には大きなグルコースとフルクトースの濃度差があり、中腸に発現する NIST1, 6 と 16 は糖の濃度勾配により、エネルギー非依存的にグルコースやフルクトースを生体内へと輸送していると考えられた。

飢餓状態に脂肪体で発現する NIST11 の機能解析

NIST11 は飢餓条件下において発現が誘導され、その発現部位は脂肪体であった。昆虫の脂肪体はほ乳類の肝臓に相当し、生体内の代謝を司る機能をもつと考えられ、飢餓条件下では、生体内に不足する糖をトランスポーターを介して輸送していると考えた。NIST11 の機能解析を行ったところ、NIST11 はグルコース/フルクトーストランスポーターであった。脂肪体内に存在するグリコゲンは、飢餓状態において分解されたことから、グリコゲン分解産物であるグルコースが NIST11 を介して脂肪体外へと輸送されている可能性が考えられた。

マルピーギ管に発現する H⁺-トレハロースシンポーター NIST8 によるエネルギー獲得

昆虫のトレハローストランスポーターは様々な昆虫から同定されており (Kanamori et al., 2010)、遺伝子系統樹を作製すると、単一の **clade** を形成する。**NIST8** はこの **Clade** に属し、トレハローストランスポーターと考えられる。アフリカツメガエル卵母細胞を用いた解析では、**NIST8** は既知のトレハロース濃度勾配によって輸送するタイプとは異なり、プロトン勾配によるトレハロースシンポーターであった。**NIST8** は脂肪体とマルピーギ管に発現していた。トレハロースは脂肪体内で産生されて、体液へ輸送され血糖となると考えられる。マルピーギ管は排泄器官であるが、排泄物からはトレハロースは検出されなかった。生体内の過剰な塩や代謝最終産物などを排泄するためには、エネルギーが必要なので、**NIST8** は血糖のトレハロースをマルピーギ管へ輸送する働きがあると推定された。**BPH** の体液中のトレハロースの濃度は低く、体液からマルピーギ管へトレハロースを輸送するためには、トレハロースの濃度勾配の駆動による輸送よりも二次的能動輸送で積極的にトレハロースを取り込んでいる可能性がある。

本研究により昆虫の糖輸送システム的一端を明らかにした。耐虫性イネ吸汁によって誘導される **BPH sugar transporter** の同定をはじめ、様々な環境条件に応じて発現が誘導されるトランスポーターの生理的役割を追究した結果、次のような知見を得た。**1**, イネから糖を取り込むためにエネルギー非依存型の糖の濃度勾配のトランスポーターが機能する。イネ師管液と生体内の糖の濃度差を利用していると考えられる。**2**, 栄養供給が乏しい飢餓状態において、脂肪体から糖を供給するために機能すると考えられるグルコーストランスポーターを見出した。**3**, 多細胞生物で初めて **H⁺-トレハロースシンポーター** を同定した。このトランスポーターはトレハロースを輸送し、生体内の恒常性の維持に関わると考えられた。