

特集：アブラムシ生物学の新しい流れ

新規防除法開発の標的としてのアブラムシ栄養共生系

豊橋技術科学大学エレクトロニクス先端融合研究所 ^{なか}中 ^{ばち}鉢 ^{あつし}淳

はじめに

世界的な農業害虫として悪名高いアブラムシ（半翅目・腹吻亜目）は、栄養の乏しい植物の師管液のみを餌としながら、極めて旺盛な繁殖力を示す。これを可能にしているのは、微生物との共生関係である。アブラムシは腹部体腔内に「菌細胞（bacteriocyte, mycetocyte）」とよばれる特殊な細胞を数十個持ち、この細胞質中に大腸菌などに近縁な相利共生細菌「ブフネラ（*Buchnera aphidicola*, γ -proteobacteria）」を多数収納している（図-1）。ブフネラは師管液に乏しい必須アミノ酸（タンパク質を構成する 20 種類のアミノ酸のうち、後生動物が合成できず、食物などから摂取する必要があるもの。昆虫の場合は、トリプトファン、リジン、メチオニン、フェニルアラニン、トレオニン、パリン、ロイシン、イソロイシン、アルギニン、ヒスチジンの 10 種類）やリボフラビン（ビタミン B₂）等の栄養分を合成して提供することで、アブラムシの生存を支えており、アブラムシはブフネラなしでは繁殖することができない（NAKABACHI and ISHIKAWA, 1997; 1999）。一方で、腸内細菌に起源を持つブフネラは、2 億年ほど前にアブラムシの共通祖先と共生関係を結んだ後、宿主昆虫の親から子へと垂直感染のみによって受け継がれており、この過程で多くの遺伝子を失っているため、もはや菌細胞の外では増殖することができなくなっている。すなわち、宿主アブラムシ、ブフネラともに単独では生存できず、一つの生物として振る舞う複合体を形成しているといえる。こうした関係は、細胞内共生細菌に由来するミトコンドリアや葉緑体といったオルガネラと、宿主真核細胞の関係を想起させるものであり、基礎生物学的に極めて重要な研究対象である。一方で、この共生系はアブラムシの生存に必須でありながら、我々ヒトを含む周辺環境中の他の生物には存在しないため、選択性が高く、安全で効果的な新規害虫防除法開発の標的としても有望である。

本稿では、これら基礎・応用両面の課題を念頭に置き

ながら、菌細胞内共生系の存立基盤の解明を目指して来た、筆者らのこれまでの取り組みを紹介したい。なお、私どもが主に用いている材料昆虫は、エンドウヒゲナガアブラムシ（*Acyrtosiphon pisum*）である。同種は、寄主範囲が狭いこともあり、モモアカアブラムシやワタアブラムシ等と比べると害虫としての重要性は低い、比較的大型（～4.4 mm）で扱いやすく、また飼育が容易なことから、アブラムシ研究のモデル種として世界中で広く用いられており、生物学的知見が豊富である。「植物防疫」の観点からは魅力が少なくないが、おつきあいいただければ幸いである。

I 共生細菌ブフネラの小さなゲノム

まずはエンドウヒゲナガアブラムシにすむブフネラのゲノム解析（SHIGENOBU et al., 2000）から解説を始めたい。これは筆者らによる仕事ではないが、宿主アブラムシ・ブフネラ間相互作用の研究の本格的な出発点となった重要な研究である。この解析により、同ゲノムは 640,681 bp の染色体と二つの小型プラスミド（pLeu: 7,786 bp, pTrp: 3,629 bp）からなり、近縁種である大腸菌のゲノム（系統により異なるが、約 5 Mb）のおよそ 1/7 のサイズであることが明らかとなった。また、ゲノム上には 583 個の CDS（coding sequences: タンパク質をコードする遺伝子）が見いだされたが、それらのほとんどすべては大腸菌遺伝子のオーソログにあたり、ブフネラに固有の遺伝子は、ほぼ皆無であった。このことから、ブフネラゲノムは大腸菌ゲノムのいわばサブセットであり、共生進化の過程で多くの遺伝子が失われる一方、新たな遺伝子は全く獲得されなかったと推察できる。

ではどのような遺伝子が残ри、どのような遺伝子が失われたのか。ブフネラゲノム上に残存する遺伝子レパートリーでまず目に留まるのが、必須アミノ酸やリボフラビンといった、宿主であるアブラムシが合成できず、かつアブラムシの餌である師管液に乏しい栄養分の合成にかかわる遺伝子群が高度に保存されていることである。つまり、ブフネラゲノムは、縮小しながらも、宿主の栄養要求を満たすための遺伝子セットを保持して来たといえる。その一方で、アブラムシが合成可能な可欠アミノ酸（タンパク質を構成する 20 種類のアミノ酸のうち、

The Nutritional Symbiosis in Aphids : A Promising Target for Highly Selective Pest Control. By Atsushi NAKABACHI

（キーワード：アブラムシ、ブフネラ、菌細胞、栄養共生系、選択的防除）

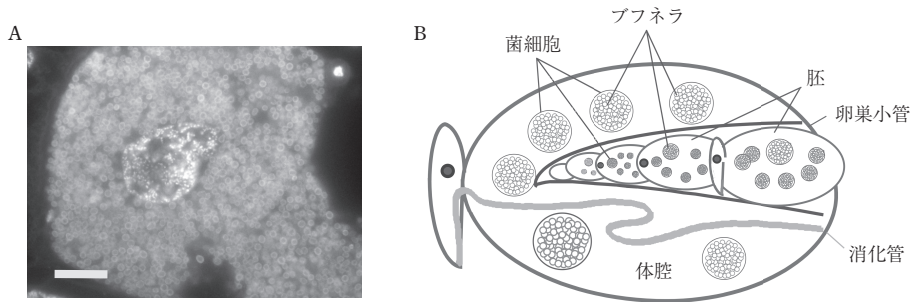


図-1 アブラムシの菌細胞内共生系

(A) 菌細胞の DAPI 染色像。中央は宿主核。細胞質を埋め尽くす無数の粒状の構造がプフネラ細胞 (Bar = 20 μ m)。

(B) 菌細胞内共生系の模式図。

後生動物の合成可能なもの。昆虫の場合はアラニン、アスパラギン、アスパラギン酸、システイン、グルタミン、グルタミン酸、グリシン、プロリン、セリン、チロシンの 10 種類) の合成にかかわる遺伝子は、ほとんどすべて失われていた。また、TCA 回路にかかわる遺伝子もほとんど存在しない。recA や uvrABC といった DNA の修復に重要な遺伝子も失われており、DNA 損傷に弱いものと考えられる。さらに、二成分系にかかわる遺伝子群や転写調節因子がない等、遺伝子発現制御系が大幅に失われていることから、環境変動への対応能力が低いと推察される。これらの特徴はすべて、動物の細胞内という安定な環境に、適応進化してきたことを反映しているものと考えられる。さらにおどろくべきことに、リン脂質合成にかかわる遺伝子を欠いているため、自らの細胞膜を作ることすらできないらしい。

その後、*Schizaphis graminum* (ムギミドリアブラムシ)、*Baizongia pistaciae*, *Cinara cedri*, *Acyrtosiphon kondoi* (コンドウヒゲナガアブラムシ)、*Uroleucon ambrosiae*, *Cinara tujaeflora* (コノテガシワオオアブラムシ) 等に由来するプフネラのゲノム配列も決定されたが、その遺伝子組成は、いずれもおおむね同様の傾向を示した。

II アブラムシ菌細胞のトランスクリプトーム解析

1 キャップトラッパー法に基づく EST 解析

ではこれほどまでに不完全なゲノムを持つプフネラの生存を支えるために、宿主である菌細胞はどのような遺伝子を発現し、宿主-プフネラ間にはどのような相互作用が存在するのだろうか。この問いに答えるため、筆者らはキャップトラッパー法を用いて菌細胞の cDNA ライブラリーを作製し、宿主側の転写産物に的を絞った

EST (Expressed Sequence Tag) 解析を行った (NAKABACHI et al., 2005)。約二千頭のエンドウヒゲナガアブラムシ単為生殖無翅成虫から解剖により取り出した七万個ほどの菌細胞から RNA を抽出し、cDNA ライブラリーを作製のうえ、2,870 クローンについて、有用な情報を多く含む 5' 端からの配列決定 (single-pass sequencing) を行った。その後、質の低い配列や、コンタミネーションと思われる少数の配列を除いたあとの 2,344 本の高品質配列をアセンブルし、336 個の非重複配列を得た。類似性検索に基づきこれらの配列のアノテーションを行い、転写産物ポピュレーションの解析を行った (表-1)。

2 宿主菌細胞の相補的な代謝系

得られた配列を、その推定機能ごとに分類して、アブラムシの虫体全体の転写産物ポピュレーションと比較してみると、「アミノ酸代謝」「輸送」「防御反応」等にかかわる遺伝子に対応するクローン数が有意に多いことが明らかとなった。さらに、リアルタイム定量的 RT-PCR 法により、個々のアミノ酸代謝関連遺伝子の発現が、菌細胞特異的に亢進していることが確認された (図-2 A)。その内訳を見ると、必須アミノ酸の利用にかかわる遺伝子群 (リジンやアルギニンを細胞内に取り込む輸送体 CAT2、フェニルアラニンやトリプトファンの異化にかかわるオキシゲナーゼ Henna、リジン分解にかかわるデヒドロゲナーゼ GCDH の各遺伝子等) や、可欠アミノ酸の合成関連遺伝子群 (グルタミンシンターゼ GS2、セリン合成関連酵素 PSAT の各遺伝子等) の発現が、菌細胞で著しく亢進していることがわかる。先述のように、プフネラは必須アミノ酸合成関連遺伝子群を保持しながら、可欠アミノ酸合成関連遺伝子群を大部分失っている。このため菌細胞内では、必須アミノ酸がプフネラから供給される一方、可欠アミノ酸は宿主側で過剰

表-1 菌細胞 EST 解析において多数のクローンが検出された転写産物 (上位 20 位)

ID	クローン数	アノテーション
R2C00037	134	Lysozyme i-1
R2C00204	71	Lysozyme i-1
R2C00172	70	ADP/ATP translocase
R2C00040	55	Glutamine synthetase 2 (CG1743 ; Gs2)
R2C00101	55	alpha-Tubulin at 84B (CG1913 ; alphaTub84B)
R2C00059	45	no hits
R2C00253	34	Cytosolic malate dehydrogenase
R2C00050	33	Ribosomal protein S9 (CG3395 ; RpS9)
R2C00038	27	Cationic amino acid transporter 2
R2C00023	26	Heat shock protein cognate 4 (CG4264 ; Hsc70-4)
R2C00089	26	Putative inorganic phosphate cotransporter (CG8098 ; Picot)
R2C00113	26	Ribosomal protein L15 (CG17420 ; RpL15)
R2C00020	25	Probable mitochondrial oxaloacetate transport protein
R2C00100	24	Phosphoenolpyruvate carboxykinase (CG17725 ; Pepck)
R2C00132	24	Glycine cleavage system T protein
R2C00244	23	ATP synthase subunit c
R2C00124	22	Ribosomal protein S14a (CG1524 ; RpS14a)
R2C00011	21	no hits
R2C00108	21	Ribosomal protein S3A (CG2168 ; RpS3A)
R2C00022	20	Diacetyl/L-xylulose reductase
R2C00106	20	5'-Nucleotidase precursor

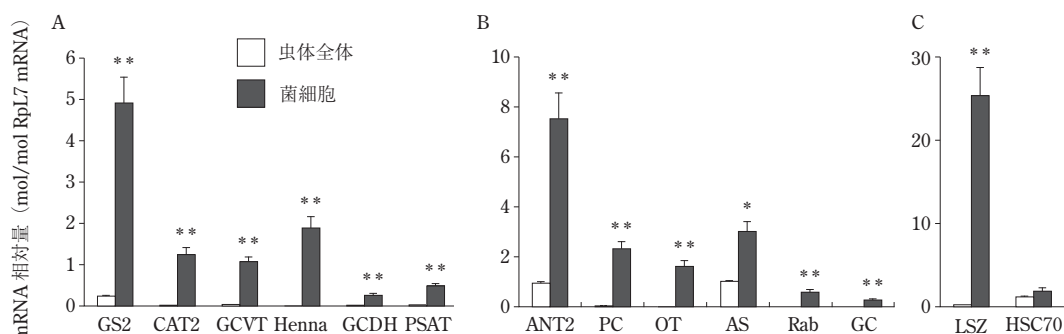


図-2 転写産物相対量

定量的 RT-PCR による。

(A) 「アミノ酸代謝」関連遺伝子群: GS2, glutamine synthetase 2 ; CAT2, cationic amino acid transporter 2 ; GCVT, glycine cleavage system T protein ; Henna, (phenylalanine 4-monooxygenase/Tryptophan 5-monooxygenase) ; GCDH, glutaryl-CoA dehydrogenase ; PSAT, phosphoserine aminotransferase.

(B) 「輸送」関連遺伝子群: ANT2, ADP/ATP translocase ; PC, inorganic phosphate cotransporter ; OT, mitochondrial oxaloacetate transport protein ; AS, ATP synthase subunit c ; Rab, Ras-like Rab GTPase ; GC, mitochondrial glutamate carrier.

(C) 「防御反応」関連遺伝子群: LSZ, lysozyme ; HSC70, heat shock protein cognate 4 (n = 10, Mann-Whitney U test ; *, p < 0.05 ; **, p < 0.01).

に生産してブフネラに与える必要があると推察される。本研究で明らかとなった、菌細胞内のこの転写産物ポピュレーションは、宿主菌細胞とブフネラが相補的な代謝系を構成していることを明示するもので、両者の分子レベルでの相互依存性を証明する重要な成果となった。

3 宿主-ブフネラ間の輸送

菌細胞内において、個々のブフネラ細胞は、宿主由来の一層の膜に包まれている。前項で挙げた CAT2 は、この膜上に存在し、ブフネラの合成した必須アミノ酸を菌細胞の細胞質内に取り込むのに利用されていると考えられる。また、これに加え、ミトコンドリア内膜において

ADP と ATP の交換輸送を担う ANT2, 同内膜でオキサロ酢酸を輸送する OT, 同じくグルタミン酸輸送を行う GC 等, ミトコンドリア関連の輸送体をコードする遺伝子の発現が亢進していた (表-1, 図-2 B)。これは, アミノ酸代謝に直接関与するとともに, 同代謝などに要する ATP を産生する, ミトコンドリアの活性が高まっていることの反映と推察される。さらに, プフネラゲノム上には TCA 回路関連の遺伝子が存在しないため, TCA 回路を回すミトコンドリアと, プフネラの間で呼吸関連代謝物の授受が行われている可能性もある。また, 脂質やタンパク質の膜輸送の制御にかかわる Rab 遺伝子の発現も, 菌細胞で亢進していた。プフネラは不完全な代謝系を持ち, 宿主からの物質の供給が不可欠なうえ, 宿主由来の膜に包まれているため, こうした膜輸送系が共生系の維持において重要な役割を果たしていると考えられる。

このように, アミノ酸代謝や輸送にかかわる遺伝子群が共生系の維持において重要な役割を果たしていることはほぼ確実だが, いずれも真核生物に広く保存されている遺伝子ばかりであり, 選択的防除の標的としてはあまり有望とは言えない。

4 ミステリアスなリゾチームホモログ

菌細胞 EST 解析において, 2,344 クローン中 205 クローン (8.7%) と, 最も多く検出された転写産物は, リゾチーム遺伝子に類似性を示すものであった (表-1)。菌細胞における, この著しい発現亢進は, 定量的 RT-PCR によっても確認された (図-2 C)。アブラムシの虫体全体と比べ, mRNA 相対量が 156 倍であるばかりでなく, 試料中の mRNA コピー数は, 今回校正に用いられ, 比較的発現レベルが高いことが知られているリボソームタンパク質 Rpl7 の mRNA の 25.3 倍と非常に多いものであった。リゾチーム (EC 3.2.1.17) は, 真正細菌の細胞壁を構成するペプチドグリカン加水分解して溶菌させる酵素で, ニワトリ型, ガチョウ型, 無脊椎動物型, 植物型, 細菌型, ファージ型に分類される。1965 年に, 酵素として初めて X 線結晶構造解析により構造が決定されるなど, 古くから研究の進んでいる「卵白リゾチーム」が, ニワトリ型であるのに対し, 菌細胞で検出されたものは, 比較的知見の少ない無脊椎動物型と類似するものであった。こうした抗菌タンパク質のホモログをコードする遺伝子が, 菌細胞で著しく高発現している事実は, この遺伝子が, プフネラの増殖制御や, 外界から侵入する細菌の排除等に関与している可能性を示唆するもので, 興味深い。本遺伝子の機能を阻害すれば, 共生系の崩壊につながる可能性が高く, また少なくともヒトに

はオーソログが存在しないため, 新規防除法開発の標的として有望である。(もっとも, 他の昆虫に類似遺伝子が存在するので, 選択性的見極めは慎重に行う必要がある。) 筆者らは, 現在, 様々な手法を用いてこの遺伝子の機能解析を進めている。

III アブラムシゲノム上の細菌由来水平転移遺伝子

菌細胞トランスクリプトーム解析においては, 上記事項に加えて, さらに興味深い新知見を得ることができた。プフネラゲノム上には対応する遺伝子が存在しないにもかかわらず, 細菌の遺伝子とのみ有意な類似性を示す 2 種類の転写産物が見いだされたのである。サザンブロット解析により, これらの遺伝子がアブラムシゲノムにコードされている事実は, 直ちに確認された。さらにこれらの転写産物の全長配列を決定し, 分子系統解析を行い, アブラムシゲノム上の対応する遺伝子領域をクローニングし, 定量的 RT-PCR 法にて発現解析を行った (Nikoh and Nakabachi, 2009)。その結果, 2 種類の遺伝子のうちの一方は, 細菌の細胞壁を構成するペプチドグリカンリサイクルするために必要な酵素「LD-カルボキシペプチダーゼ」をコードする細菌遺伝子 *ldcA* のオーソログであることが判明した (図-3 A)。また, 定量的 RT-PCR により, この遺伝子の発現が, 菌細胞で特異的に亢進していることも確認された (図-4)。プフネラは, ペプチドグリカンを持つものの, その代謝に必要な *ldcA* 遺伝子を欠いているため, こうした遺伝子の発現が菌細胞で亢進している事実は, 同遺伝子が, プフネラの遺伝子欠如を補い, その生存を支えている可能性を強く示唆するものと言える。さらに驚くべきことに, *ldcA* 遺伝子はプフネラの祖先種から水平転移したものではなく, 細胞内共生細菌の一つであるボルバキア (*Wolbachia*, α -proteobacteria) など, プフネラとは遠縁の細菌グループに由来するものであることが, 分子系統解析から明らかとなった。ボルバキアを含むリケッチア目細菌は, 昆虫など多くの節足動物から検出されるが, 本研究で解析に用いた系統のアブラムシには感染していないことが確認されている。つまりアブラムシは, かつて感染していたボルバキア様細菌から, 水平転移によりこの遺伝子を獲得し, 同細菌がアブラムシから失われた後も, プフネラの維持, 制御に利用していると考えられる。

もう一方の遺伝子は, 「レアリポプロテイン A」と呼ばれるタンパク質をコードする細菌遺伝子 *rlpA* のオーソログであった (図-3 B)。このタンパク質の機能は不明だが, 何らかの酵素機能を持つと考えられている。この *rlpA* オーソログについても, プフネラのゲノム上に

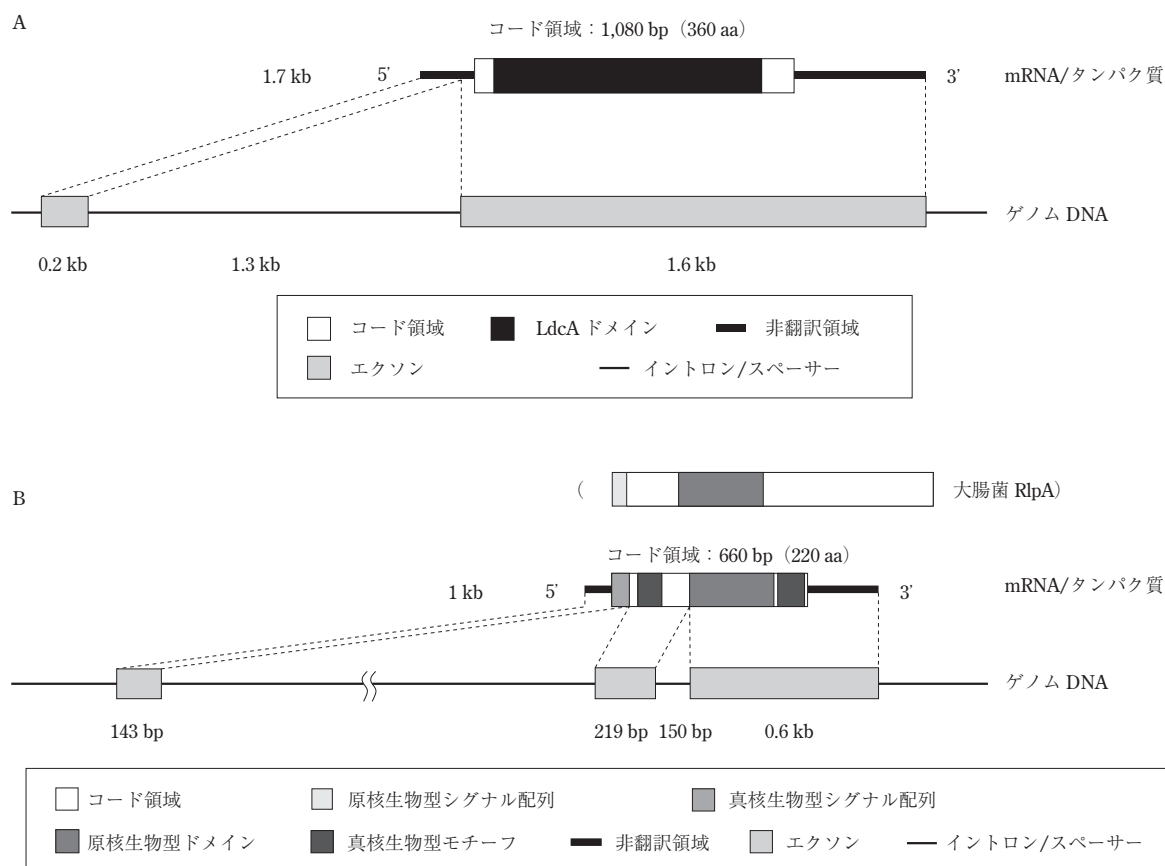


図-3 水平転移遺伝子の構造

A: *ldcA* オースログ, B: *rlpA* オースログ.

両オースログともに、スプライソソーム型のイントロンを持つ。またアブラムシの *RlpA* オースログは原核生物型の主要ドメインと真核生物型のモチーフから構成されるキメラ状の構造を持つことがわかる。括弧内は大腸菌の *RlpA*。

は対応する遺伝子が存在せず、さらにその発現が菌細胞で特異的に亢進している (図-4) ことから、やはりブフネラの生存に重要な役割を果たしていると推察される。今回の解析では、この遺伝子を供給した細菌系統を特定することはできなかったものの、アブラムシの“*RlpA* オースログ”が、細菌由来の主要ドメインに加えて、真核生物型のシグナルペプチドや複数のモチーフ構造等からなるキメラ状の構造を持つことが明らかとなった。これは、細菌から水平転移した配列と、アブラムシが従来持っていた配列が融合することで形成されたものと推定される。こうしたキメラタンパク質は、他の生物のタンパク質には存在しない独自の部域を持つため、防除薬の選択性を担保する標的として有望と言えよう。

さらに筆者は、発起人、およびプロジェクトリーダーのひとりとしてアブラムシの全ゲノム解析計画に携わったが (International Aphid Genomics Consortium, 2010),

これを用いた徹底的なスクリーニングと検証実験を行うことで、アブラムシが、細菌から 10 種類以上の遺伝子を獲得し、その多くを菌細胞で高発現させていることを明らかにした (Nikoh et al., 2010)。

加えて、筆者らは先ごろ、免疫化学的手法等を用いて、これらの水平転移遺伝子群から、タンパク質が真に、また菌細胞特異的に合成され、ブフネラ細胞に輸送されていることを証明 (未発表データ。論文作成中) した。これは、当該遺伝子群が、真核型の遺伝子構造を獲得してタンパク質合成が可能となり、さらに産物の機能のある共生体への輸送系が進化するなど、オルガネラ祖先由来の核ゲノム遺伝子と同様の地位を得ていることを示すものであり、進化学的に極めて重要な発見である。このブフネラ細胞へのタンパク質の輸送系も、アブラムシにおいて独自に進化したものに違いなく、少なくともその一部は、他の生物に存在しない機構を利用しているも

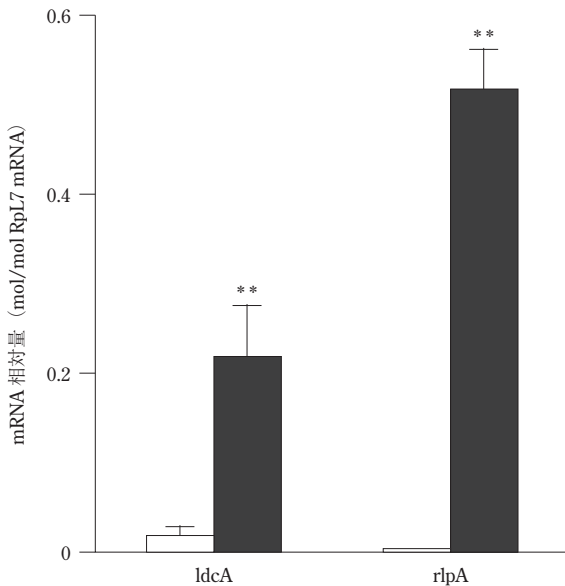


図-4 水平転移遺伝子の転写産物相対量
記号などの意味は図2と同様。ldcA オーソログ、
rlpA オーソログともに菌細胞で著しく発現が亢進し
ていることがわかる。

のと考えられるため、選択的防除の標的となりうる。

IV ブフネラの分裂制御にかかわるアブラムシ 新規タンパク質

筆者らは先ごろ、ブフネラの分裂面に沿ってリング状の構造を形成するアブラムシ新規タンパク質を複数、世界で初めて発見（未発表データ。論文作成中）した。同タンパク質は、ブフネラの分裂・増殖制御を担う宿主側の鍵分子である可能性が高く、基礎生物学的に重要な発見であると同時に、新規防除法開発の標的として、極めて有望な候補となる。

V ケミカルバイオロジー的アプローチによる タンパク質機能解析

これまでの研究により、共生系維持において重要な役割を果たすと考えられる多くの遺伝子が得られており、その機能解析が急がれる。ところが残念なことに、現状

では、アブラムシにおいて、遺伝子のノックダウン・ノックアウトの系を利用することができない。そこで現在、筆者らは、ケミカルバイオロジー的手法を適用することで、研究の突破口を探っている。すなわち「化合物アレイ」を用いて、個々のタンパク質に対する阻害剤の探索を行い、得られた阻害剤をアブラムシ生体に投与し、表現型の変化を精査することで、標的タンパク質の機能を解明する、という戦略である。化合物アレイとは、数千～数万個ほどの化合物をスライドガラス上に固定したもので、標的タンパク質と結合する物質のハイスループット探索を可能にする新規ツールである (MIYAZAKI et al., 2010)。得られた阻害剤は、各々のタンパク質の機能解明に重要な役割を果たすだけではなく、そのまま新規防除薬開発の有望なリード化合物となる。

おわりに

筆者らは、化合物アレイを用いて、3種類のタンパク質に対する阻害剤の探索を開始しており、すでに多数の有望な候補化合物を得ている。今後、多くの標的タンパク質を解析系に載せ、各タンパク質、遺伝子の機能を解明することで、菌細胞内共生系の存立基盤を明らかにすると同時に、選択性が高く、安全、効果的な防除薬の開発を進めていきたい。また半翅目に属する農業害虫には、アブラムシと類似する菌細胞内共生系を持つものが多い (NAKABACHI et al., 2006)。将来的には、こうした系にも同様の解析手法を適用し、より利用価値の高い成果を社会に還元していきたいと考えている。

引用文献

- 1) International Aphid Genomics Consortium (2010): PLoS Biol. 8(2): e1000313.
- 2) MIYAZAKI, I. et al., (2010): Nat. Chem. Biol. 6(9): 667 ~ 673.
- 3) NAKABACHI, A. and H. ISHIKAWA (1997): Insect Biochem Mol Biol. 27(12): 1057 ~ 1062.
- 4) ——— and ——— (1999): J Insect Physiol. 45(1): 1 ~ 6.
- 5) ——— et al. (2005): Proc Natl Acad Sci USA. 102(15): 5477 ~ 5482.
- 6) ——— et al. (2006): Science 314(5797): 267.
- 7) NIKOH, N. and A. NAKABACHI (2009): BMC Biol. 7: 12.
- 8) ——— et al. (2010) PLoS Genet. 6(2): e1000827.
- 9) SHIGENOBU S. et al., (2000) Nature 407(6800): 81 ~ 86.