

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 6 月 5 日現在

機関番号：82401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K12270

研究課題名(和文)忌避成分産生植物を利用した住環境の持続的防虫技術の開発

研究課題名(英文) Development a sustainable insect-proof technology by phytochemicals with insecticidal activity

研究代表者

持田 恵一 (Mochida, Keiichi)

国立研究開発法人理化学研究所・環境資源科学研究センター・チームリーダー

研究者番号：90387960

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：除虫菊が生産する忌避成分の代謝に関連する遺伝子を網羅的に同定するために、障害ストレスに反応するトランスクリプトームの時系列解析を行った。損傷ストレスを与える前の葉と、損傷ストレスを与えてから継時的に葉を収集し、細胞内で誘導される遺伝子の網羅的に収集した。一連のRNA-seq法による解析で785,196,824のリードを得た。これらをアセンブリすることで、195,776のリファレンスとして利用する転写物の配列を得た。これらの遺伝子の機能注釈を行い、忌避成分生産を含む障害応答における関連遺伝子を網羅的に収集するための基礎的データを得た。

研究成果の概要(英文)：To identify genes associated with the biogenesis of the metabolite that have insecticide activities, we performed a time course transcriptome analysis in response to wounding stress in Pyrethrum. We sampled Pyrethrum leaves after wounding treatments and analyzed RNAs transcribed in the leaf tissues by a RNA-seq method. In the RNA-seq analysis, we obtained 785,196,824 reads and assembled these reads into 195,776 sequences corresponding to the expressed genes. We then established a genomic resource to explore comprehensively genes associated to the biogenesis of the metabolites that have insecticide activities in this plants through analyses ifor gene functional annotations and comparative analyses with genes in other plant species.

研究分野：ゲノム情報科学

キーワード：除虫菊 トランスクリプトーム 代謝

## 1. 研究開始当初の背景

地球温暖化により蚊の生息域が拡大し、感染症のリスクが増大している。蚊媒介性感染症にはデング熱、日本脳炎、マラリア等がある。これらは世界的に患者が多く、病原体を有する蚊に吸血されることで感染する。IPCC(気候変動に関する政府間パネル)や WHO(世界保健機関)は、気候変動によるアジアや南北アメリカでのデング熱の流行、マラリアの流行地域の世界的な拡大を警告している。除虫菊は忌避成分であるピレトリン(天然ピレスロイド)を花に蓄積する。和名「シロバナムシヨケギク」の通り、庭や畑に植えると虫除けになる。古くは蚊の防除に利用されたが、今では有機合成されたピレスロイド誘導体が殺虫剤として利用される。ピレスロイド類は昆虫の神経細胞に作用する神経毒であるが、哺乳類や鳥類に対する作用は弱く安全性が高い。

代謝物の増減と遺伝子の働き方を併せて調べること(代謝-遺伝子発現統合解析)は有用遺伝子の探索に極めて有効である(Yamazaki & Mochida et al. 2011, Mochida et al. 2009)。有用代謝物ピレスロイドの生産遺伝子を同定すれば、それを用いて多様な植物に防虫機能を付与できると考えられる。

そこで、本研究では、除虫菊の天然ピレスロイドの生産・蓄積にどんな遺伝子が働いているかを網羅的に調査し、ピレスロイド類の生合成に関わる遺伝子制御ネットワークとそれに含まれる遺伝子群を同定し、植物の忌避成分生産に関する遺伝子リソースの収集を行う。

現在の防虫は、合成殺虫剤の噴霧によるため持続性が無く、化石資源を原料にするため資源利用の点でも持続的ではないと考えられる。もし、忌避成分生産に関する遺伝子制御ネットワークが明らかとなり、生物生産性が可能になったり、任意の生物等での生産で可能になれば、防虫効果と資源利用の両面で「持続的な」防虫が可能になり、温暖化による感染症のリスクを低減する技術の開発に繋がると考えられる。

そこで、研究では、植物の忌避成分の生産機構を、トランスクリプトーム解析等の網羅的な研究手法によって総合的に明らかにし、防虫関連遺伝子の全てを遺伝子資源とすることを旨とする。このアプローチにより、ピレスロイド合成経路を触媒する酵素遺伝子だけでなく、その原料となる脂肪酸やイソプレンの生産に関する遺伝子、除虫菊の花だけにピレスロイドが蓄積する理由なども判明すると考えられる。

本研究で得られる遺伝子資源は、温暖化による感染症リスクが増大する社会にとって有益なリソースになる。

## 2. 研究の目的

本研究では、除虫菊が生産する忌避成分のピレスロイドの生産に関わる遺伝子を代謝-遺伝子発現統合解析によって明らかにし、任意の植物に忌避成分を蓄積させるために必要な遺伝子の獲得を目指す。そのため、除虫菊のトランスクリプトーム解析等により、ピレスロイドとその関連代謝物の生産に関わる遺伝子群を明らかにする。特に、花器官や障害ストレスに応答したピレスロイドの生産と蓄積に注目して解析する。また、他の植物のゲノム情報(遺伝子発現を制御するタンパク質やDNA配列等)を解析し、他の植物との遺伝子構成の違いなどから、忌避成分生産に関する遺伝子群の推定を行う。

## 3. 研究の方法

広島県因島に生育する除虫菊集団の個体を用いて、葉の障害ストレスに応答するトランスクリプトーム解析を行った。忌避成分の蓄積は、葉の損傷等によっても誘導しうるため、損傷ストレスを与える前の葉と、損傷ストレスを与えてから5分、30分、60分の葉を収集し、RNAを抽出した。生物学的な反復実験を三回行った。Illumina社のライブラリ作成キットを用いて、stranded-RNA-seq用のライブラリを作成し、HiSeq4000を用いて解読した。

得られた解読データをDe novo assemblyに供した。De novo assemblyは、まずTrinityを用いてContigを作成し、cd-hit-estによるクラスタリングを行った。各クラスタの最長リードをリファレンス配列用のアセンブリとして用いた。

リファレンス配列に対して、解読データのリードをマッピングし、発現遺伝子量を見積もった。マッピングにはBWAを用い、発現量はRPM値により算出した。各遺伝子の機能予測は、モデル植物であるシロイヌナズナの遺伝子や代謝マップのデータベースであるKEGG、植物遺伝子の機能分類を提供するMapMan等を用いた。

## 4. 研究成果

障害ストレスに応答する除虫菊のトランスクリプトーム解析を行い、忌避成分生産に関する遺伝子発現の網羅的かつ基本的なデータセットを得た。

一連のRNA-seqの解析で、785,196,824のリードを得た(Table S1)。これらをアセンブリし、195,776のリファレンスとして利用する配列を得た。アセンブリ結果を指標の一つであるN50値は、1,277 bpであった。これらの結果は、得られた発現遺伝子の種類数が高等植物の一般的な遺伝子の種類数と比べて多いことを示しており、除虫菊の遺伝子構成

が冗長であることを示唆している。このうち、82,245 がシロイヌナズナゲノムにコードされる遺伝子と同一性をしめした。また、これらの遺伝子の機能注釈を行い、忌避成分生産を含む障害応答における関連遺伝子を網羅的に収集するための基礎的データを得た。

Table S1. Summary of the reads Pyrethrum transcriptome.

Biological replicate	Sampling time	sample name	Number of total reads
1	0 min.	1	78,818,100
	5 min.	2	58,055,296
	30 min.	3	65,319,132
	60 min.	4	69,979,908
2	0 min.	5	78,002,858
	5 min.	6	59,182,922
	30 min.	7	49,676,672
	60 min.	8	56,387,450
3	0 min.	9	52,383,092
	5 min.	10	55,044,404
	30 min.	11	66,790,770
	60 min.	12	48,249,798
		13	47,306,422

次に、一連の RNA-seq の解析で得られたリードデータをリファレンス配列にマッピングした。概ね 80% のリードがマップされたことから、先に作成したリファレンス配列を十分に網羅的な遺伝子発現解析に利用できることが示唆された (Table S2)。

Table S2. Summary of the reads mapped to the contigs.

Biological replicate	Sampling time	sample name	Number of mapped reads	Percentage of mapped reads (%)
1	0 min.	1	64,387,221	81.69
	5 min.	2	45,935,224	79.12
	30 min.	3	52,671,656	80.64
	60 min.	4	57,282,749	81.86
2	0 min.	5	61,933,786	79.40
	5 min.	6	47,164,409	79.69
	30 min.	7	39,416,889	79.35
	60 min.	8	45,749,560	81.13
3	0 min.	9	42,438,834	81.02
	5 min.	10	43,805,665	79.58
	30 min.	11	53,590,542	80.24
	60 min.	12	39,228,557	81.30
		13	38,097,740	80.53

発現している遺伝子の割合を調査したところ、64,723 コンティグに相当する転写物が、発現遺伝子として同定された。これらの発現パターンを各時系列で比較することで、障害応答における関連遺伝子の選出を可能にした (図 1)。

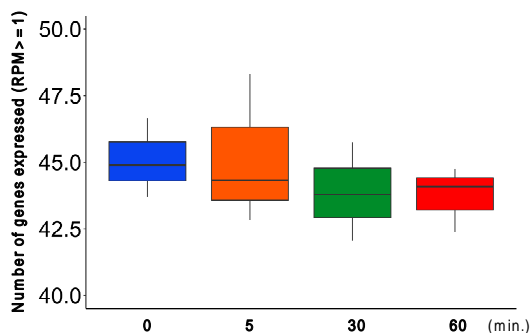


図 1. 障害ストレス時系列トランスクリプトームにおける発現

遺伝子 (RPM >= 1)

次に、得られた遺伝子発現データから、サンプル間の遺伝子の発現パターンの類似性を調査し、障害ストレスからの時間経過に沿った遺伝子発現の網羅的な変化を描出した。

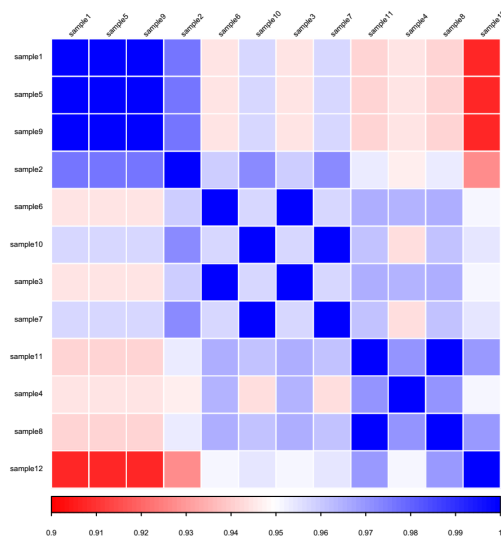


図 2. 障害ストレス時系列トランスクリプトームデータの類似性。青にちかづくほどサンプル間での遺伝子発現パターンが類似していることを示す。障害ストレスの発生からの時間経過に沿った遺伝子発現の変動を俯瞰したもの。

得られたトランスクリプトームデータは、除虫菊の損傷ストレス応答遺伝子や忌避成分生産に関わる代謝関連遺伝子を網羅的に探索し、他の植物との比較から関連遺伝子の機能を類推するうえでの有用なリソースになると考えられる。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔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

## 6. 研究組織

(1)研究代表者

持田 恵一 (Mochida Keiichi)  
国立研究開発法人理化学研究所・環境資源科学  
学研究センター・チームリーダー  
研究者番号：90387960

(3)連携研究者

櫻井 哲也 (Sakurai Tetsuya)  
国立研究開発法人理化学研究所・環境資源科学  
学研究センター・ユニットリーダー  
研究者番号：90415167

(4)研究協力者

山口 (上原) 由紀子 (Uehara-Yamaguchi  
Yukiko)  
国立研究開発法人理化学研究所・環境資源科学  
学研究センター・テクニカルスタッフ

井上小楨 (Komaki Inoue)

国立研究開発法人理化学研究所・環境資源科学  
学研究センター・テクニカルスタッフ

清水みなみ (Minami Shimizu)

国立研究開発法人理化学研究所・環境資源科学  
学研究センター・テクニカルスタッフ

吉田拓広 (Takuhiro Yoshida)

国立研究開発法人理化学研究所・環境資源科学  
学研究センター・テクニカルスタッフ

高萩航太郎 (Kotaro Takahagi)

公立大学法人横浜市立大学・生命ナノシステム  
研究科・学生