

令和 2 年 5 月 18 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：17K07688

研究課題名（和文）イネの新規ツマグロヨコバイ抵抗性遺伝子の単離と機能解析

研究課題名（英文）Cloning and characterization of a new resistance gene to the green rice leafhopper in the indica rice variety.

研究代表者

田村 泰盛（Tamura, Yasumori）

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・ユニット長

研究者番号：90370668

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,800,000円

研究成果の概要（和文）：ツマグロヨコバイはイネの重要な害虫で、口針をイネに突き刺して篩管液を吸汁し、栄養の収奪やウイルス病の感染により稲作に被害をもたらす。本研究で、ツマグロヨコバイに抵抗性を示すインド型イネ品種の保有する抵抗性遺伝子を明らかにすることに成功した。抵抗性遺伝子がコードするタンパク質は、ツマグロヨコバイによる加害の情報を認識し、篩部での吸汁を阻害する防御反応を誘導する働きをしている可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ツマグロヨコバイはイネの重要な害虫で、針のような口（口針）をイネに突き刺して篩管液を吸汁し、栄養の収奪やウイルス病の媒介により稲作に被害をもたらす。日本型のイネ品種はツマグロヨコバイに抵抗性を持たないが、インド型イネ品種の中にはツマグロヨコバイ抵抗性遺伝子を保有する品種が存在する。当課題ではインド型イネ品種から新たなツマグロヨコバイ抵抗性遺伝子を単離した。これにより抵抗性遺伝子を導入したイネ品種の開発が進むと期待される。

研究成果の概要（英文）：The green rice leafhopper (GRH) is an insect pest of rice. GRH causes direct damage by sucking sap from the phloem of susceptible rice varieties and indirect damage by transmitting viral diseases. In this study, the resistance gene against GRH in an indica rice variety was identified. The resistance protein encoded by the resistance gene is considered to be a receptor related to signal perception and transduction. It might mediate sucking inhibition in the phloem sieve element.

研究分野：植物保護

キーワード：耐虫性品種

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

ツマグロヨコバイはイネの重要な害虫で、針のような尖った口(口針)をイネに突き刺して篩管液を吸汁し、栄養の収奪やウイルス病の感染により稲作に被害をもたらす。日本型のイネ品種はツマグロヨコバイに抵抗性を持たず、加害されてしまう。研究担当者らは、ツマグロヨコバイに強いイネ品種の探索を行い、ツマグロヨコバイに抵抗性を示すインド型イネ品種が存在することを見出した。研究担当者らはインド型イネ品種由来のツマグロヨコバイ抵抗性遺伝子について高密度連鎖地図を作成し、抵抗性遺伝子の座乗する染色体上の候補領域を、約 31 kb の範囲に限定した。この領域には、「NBS-LRR タンパク質」のような、既知の病虫害抵抗性タンパク質をコードする遺伝子の存在が予測されなかった代わりに、機能が未知の 2 つの遺伝子の存在が予測された(図 1)。2 つの遺伝子の位置関係は、片方の候補遺伝子のイントロン中に、もう 1 つの候補遺伝子が座乗しているというものであった。2 つの候補遺伝子の両方を含む抵抗性品種のゲノム断片(A)を、感受性品種に形質転換法により導入したところ、抵抗性が相補された。よって 2 つの候補遺伝子の片方もしくは両方が、抵抗性に寄与していることが示唆された。よって抵抗性系統で CRISPR/Cas9 を用い、これらの候補遺伝子をそれぞれ破壊した系統を作成することで、抵抗性遺伝子の本体が、片方の遺伝子によるものか、両方の遺伝子の相互作用によるものかが判定できると考えられる。さらに、抵抗性遺伝子と配列類似性の高い遺伝子が、イネ以外の他の作物種にも分布し、他の作物でも耐虫性に寄与している場合は、他の作物種の耐虫性研究への波及効果が大きいと期待される。

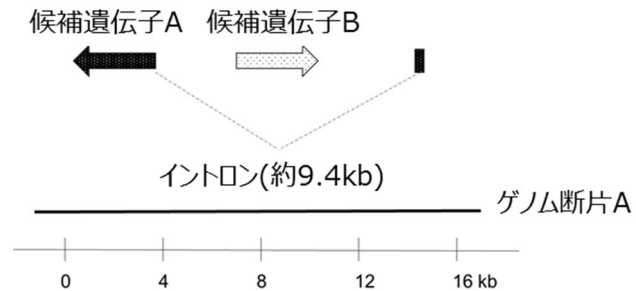


図1 候補遺伝子(AとB)のゲノム上の位置関係

抵抗性イネ系統上でのツマグロヨコバイの吸汁行動を、電気的測定装置(図 2)で解析したところ、ツマグロヨコバイの口針はイネの篩部まで到達しているが、そこから篩管液を吸汁できていないことが示唆された。篩管液を吸汁できない理由として何らかの化学物質が関与している可能性と、篩管が閉塞するような物理的な防御が関係している可能性が考えられた。物理的な防御の存在は、口針が挿入された加害部位の篩部を、透過型電子顕微鏡等を用いて詳細に解析することで確認することが可能である。吸汁性昆虫の抵抗性品種で、吸汁阻害反応が起きている篩部を透過型電子顕微鏡で詳細に観察した事例はなく、本研究を通じて、植物の保有する吸汁性昆虫に対する新たな防御機構の発見につながる成果が期待できる。

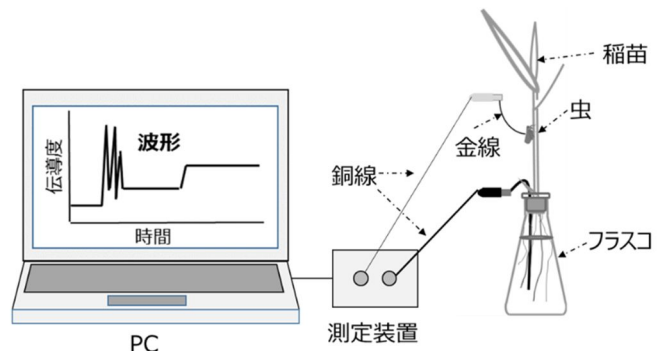


図 2 吸汁行動測定のための電気的測定装置の模式図

2. 研究の目的

本研究は、CRISPR/Cas9 の系を用いてツマグロヨコバイ抵抗性に寄与する 2 種の候補遺伝子をそれぞれ破壊することにより、新規ツマグロヨコバイ抵抗性遺伝子を明らかにすることを目的とする。また、加害された抵抗性イネの篩部を、透過型電子顕微鏡等を用いて詳細に解析することにより、ツマグロヨコバイがイネの篩管液を吸汁できない要因が、篩管閉塞等の物理的な防御によるものかどうかを検討する。

3. 研究の方法

(1) ツマグロヨコバイ新規抵抗性遺伝子の単離

コンストラクトの作成

抵抗性の候補遺伝子 A と B(図 1)のそれぞれについて、変異を導入するターゲット配列を決定し、ターゲット配列を「Cas9, guide RNA 一体型バイナリーベクター」に導入したコンストラクトを作成した。

遺伝子破壊系統の作成

抵抗性系統(日本型イネ品種の遺伝背景で、ツマグロヨコバイ抵抗性遺伝子を戻し交配により導入した準同質遺伝子系統(NIL))を材料として、上述のコンストラクトを用いて形質転換体の作出を行った。変異の導入が確認された遺伝子破壊系統(T_0)から後代種子(T_1)を採種した。

(2) 抵抗性イネの加害部位の防御反応の各種顕微鏡による観察

抵抗性イネの葉鞘にツマグロヨコバイを付け、電氣的測定装置(図3)で、ツマグロヨコバイの吸汁行動を解析した。次に、口針が篩部まで到達し、そこから篩管液が吸汁できないことを示す波形が観察された際に、イネ葉鞘の加害部位を切断した。感受性系統では、篩管吸汁が成立した加害部位のサンプルを採取した。

口針が挿入された篩管で、カロースの生成や、タンパク質の凝集による篩管閉塞が起きていないかを、光学顕微鏡、落射蛍光顕微鏡、透過型電子顕微鏡等を用いて観察した。抵抗性系統に特異的な反応であるかどうかを確かめるために、反復数を増やし、抵抗性と感受性で加害された篩管の反応に差があるかどうかを詳細に解析した。

4. 研究成果

(1) 初年度成果

ツマグロヨコバイ抵抗性系統から高密度連鎖解析等により、抵抗性の候補遺伝子を2つの遺伝子に絞り込んでいた。初年度は、抵抗性候補遺伝子の破壊系統を作出するための、コンストラクトの作成と形質転換体の作出を行った。

抵抗性候補遺伝子の破壊系統作成のためのコンストラクト作成

ツマグロヨコバイ新規抵抗性遺伝子の候補遺伝子2種について、1つの遺伝子につき2カ所ずつ、変異を導入するターゲット配列を決定し、ターゲット配列を「Cas9, guide RNA 一体型バイナリーベクター」に導入したコンストラクトを作成した。

形質転換体の作出と変異導入系統の選抜

抵抗性系統(日本型イネ品種の遺伝背景で、ツマグロヨコバイ抵抗性遺伝子を戻し交配により導入した準同質遺伝子系統)を材料とし、上述のコンストラクトを用いて形質転換体の作出を行った。形質転換体(T_0)からDNAを抽出し、候補遺伝子のターゲット配列部分をPCRで増幅してシーケンスし、変異がヘテロで導入された遺伝子破壊系統(T_0)を選抜できた。遺伝子破壊系統(T_0)を栽培し、 T_1 種子を採種した。 T_1 種子は、変異をホモで持つ個体やヘテロで持つ個体、変異を持たない個体が混在し、さらに、導入したCas遺伝子を持つ個体と持たない個体が混在していると考えられる。次年度は T_1 種子から、変異がホモで固定され、かつ、Cas遺伝子を含まない系統を選抜し、その T_2 種子を採種する。 T_2 種子のツマグロヨコバイ抵抗性を検定することで、2種の候補遺伝子のうち、どちらの候補遺伝子が抵抗性の責任遺伝子であるかを判定する。

(2) 2年目成果

昨年度、ツマグロヨコバイ抵抗性の候補遺伝子を2つに絞り込み、抵抗性系統を用いてそれぞれの遺伝子をCRISPR-Cas9システムでノックアウトした形質転換体(T_0)を作成し、後代種子(T_1)を採種した。本年度は導入した変異がホモに固定され、かつCas9遺伝子を含まない系統を T_1 種子から選抜し、この系統の後代種子(T_2)を用いてツマグロヨコバイ抵抗性の検定を行った。

その結果、2つの候補遺伝子のうちの1つで、フレームシフト変異の導入により抵抗性が消失することが確かめられた。この遺伝子は、異なる2か所にフレームシフト変異を導入した場合でも同様に抵抗性が消失したため、この遺伝子が抵抗性遺伝子であると考えられた。この抵抗性遺伝子は、現在までに機能未知とされてきた遺伝子で、植物の害虫抵抗性遺伝子として同定された例はまだなかった。この遺伝子と配列類似性の高い遺伝子は、イネ科だけでなく、植物に広く分布している可能性が示唆された。

(3) 最終年度成果

昨年度、ツマグロヨコバイ抵抗性の候補遺伝子をCRISPR-Cas9システムでノックアウトした形質転換体(T_2)を用いてツマグロヨコバイ抵抗性の検定を行った結果、候補遺伝子の一つで、ノックアウトにより抵抗性が消失することが確かめられた。抵抗性遺伝子がコードするタンパク質は受容体様のタンパク質であると予想された。イネにはこの抵抗性タンパク質が起点となり誘起される未知の防御機構が存在する可能性が示唆された。抵抗性タンパク質から下流の未知の防御機構を調べるために、コシヒカリの遺伝的背景で抵抗性遺伝子を導入した準同質遺伝子系統(near isogenic line: NIL)と感受性のコシヒカリで、ツマグロヨコバイに加害された箇所を透過型電子顕微鏡で詳細に解析した。その結果、2つの系統のツマグロヨコバイの加害部位で篩部の状態に差異が認められ、抵抗性タンパク質により誘起される防御反応の下流には、篩管閉塞等の物理的な吸汁阻害反応が関与する可能性が示唆された。

(4) 期間全体

吸汁性昆虫に対する植物の抵抗性遺伝子で単離・報告されたものは、トマトのアブラムシ抵抗性遺伝子(*Mi-1.2*)や、イネのトビイロウンカ抵抗性遺伝子(*BPH14*, *BPH26*, *BPH17*, 他)、メロンのアブラムシ抵抗性遺伝子(*Vat*)等があるが、病害抵抗性遺伝子に比べてまだ例が少ない。

今回単離されたツマグロヨコバイ抵抗性遺伝子は、今まで病害虫抵抗性遺伝子として報告されたことのない、機能未知とされてきた遺伝子であり、新規の抵抗性遺伝子が単離できたことは大きな成果である。吸汁性昆虫に対する植物の抵抗性遺伝子のうち、日本の研究グループにより単離されたのは、当研究担当者のグループが単離に成功した「栽培イネ由来のトビイロウンカ抵抗性遺伝子 *BPH26*」のみである(Tamura *et al.*, 2014)。ツマグロヨコバイに対するイネの新規抵抗性遺伝子が単離できたことで、新規性の高い研究成果を日本から発信することに貢献でき

ると期待される。この遺伝子と配列類似性の高い遺伝子は、イネ科だけでなく、植物に広く分布している可能性が示唆された。今後、様々な作物で吸汁性害虫に対する抵抗性遺伝子を探索する際に、当遺伝子の機能情報が活用されると期待できる。

また、抵抗性遺伝子は受容体様のタンパク質をコードする遺伝子であり、この抵抗性タンパク質が起点となり、イネの篩部で篩管閉塞等によるツマグロヨコバイの吸汁阻害反応が誘起される可能性が示唆された。アブラムシ抵抗性遺伝子 *Mi-1.2* は、吸汁性昆虫に対する植物の抵抗性発現のメカニズムの解析が最も進んでいる遺伝子であるが、最終的に何が原因でアブラムシに抵抗性を示すことができるのかは十分に分かっていない。透過型電子顕微鏡による加害部位の解析により、篩管閉塞等の物理的な防御反応が篩部に存在する可能性が示唆された。しかし、篩管閉塞が吸汁阻害の直接的な要因であることを確かめるためには、今後篩管閉塞に関わる物質の特定を進める必要がある。

< 引用文献 >

Tamura Y, Hattori M, Yoshioka H, Yoshioka M, Takahashi A, Wu J, Sentoku N and Yasui H, Map-based cloning and characterization of a brown planthopper resistance gene *BPH26* from *Oryza sativa* L. ssp. *indica* cultivar ADR52, *Scientific Reports*, 4(5872), 2014, 1-8.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

特許と論文を現在準備中である。

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
--	---------------------------	-----------------------	----