

令和 3 年 6 月 14 日現在

機関番号：82111

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K05681

研究課題名(和文)産卵選好性に関わるアワノメイガ属嗅覚受容体遺伝子の探索

研究課題名(英文) Survey of *Ostrinia* odorant receptor genes associated with preference for egg-laying plants.

研究代表者

安河内 祐二 (Yasukochi, Yuji)

国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構・本部企画戦略本部・調整監・技術支援センター長等

研究者番号：50355723

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：チョウ目昆虫には農作物を食害する最大のグループであるが、産卵する成虫がどのように食草を見つけているのかは、明らかではない。嗅覚をつかさどる全遺伝子を遺伝的に近縁だが食草が異なるグループ間で網羅的に比較することにより、食草を検知することに関わる遺伝子の同定を目指した。具体的には、アワノメイガ属を対象にして、次世代シーケンサーを用いた解析を食性の異なる96個体、53遺伝子について行い、候補となる遺伝子を数個見出した。あわせて、これらの遺伝子の染色体上の位置も明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

化学農薬の使用量を抑制して、生態系を保全するとともに資源低投入の農業を確立することは、地球環境の保全と気候変動の対応において重要な意義がある。食草を探索する害虫の感覚を攪乱させることができれば、他の昆虫に影響を与えることなく収量も確保できることが期待できる。そのためには、害虫が食草を見出すメカニズムの解明が必要であり、アワノメイガ属という近縁でも食性が異なる種がいるグループを対象にして、関与している可能性がある嗅覚受容体遺伝子候補を絞り込んだ。

研究成果の概要(英文)：Lepidoptera is one of the most serious pest group feeding various crops. It is still known well how adult butterflies and moths find plants to lay eggs specific for the species. We performed a large-scale analysis comparing sequences of odorant receptor (OR) genes among genetically closely related populations of the genus *Ostrinia* feeding different plants to reveal candidate genes responsible for feeding traits. As a result, we found several candidates harboring polymorphisms which seem to associate with their feeding traits. Moreover, we identified chromosomal locations of the OR genes.

研究分野：昆虫遺伝学

キーワード：嗅覚受容体 アワノメイガ 食性 アンプリコンシーケンシング FISH

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

農作物を食害する主要な害虫グループであるチョウ目のゲノム上には、50 コピー以上の嗅覚受容体(OR)遺伝子が存在する。このいくつかが食草探索に関与しているものと考えられ、その遺伝子を同定することは食草選択機構解明の第一歩となる。しかし食草の発する匂い成分は多種多様であり、どの成分が昆虫を誘引するののかについては解明が進んでいない。

アワノメイガ属の場合、広食性の祖先種から特定の食草に特化した種が、進化的に比較的最近分化したと推察される。アワノメイガも、トウモロコシのほかショウガを食草とする個体があり、遺伝的な分化が進んでいるのか、興味を持たれる。研究代表者らはアワノメイガの概要ゲノム配列を決定するとともに、アワノメイガおよびウスジロキノメイガのフォスミドライブラリーを構築して、比較ゲノム解析が可能な研究基盤を整備しており、食草選択機構の遺伝基盤を解析する対象として、好適と考えられた。

2. 研究の目的

次世代シーケンサーで多様な PCR 産物(アンプリコン)を同時解析するアンプリコンシーケンシング法を用いた効率的な解析により、遺伝的には近縁であるにもかかわらず食草が異なる集団間で OR 遺伝子配列を網羅的に比較することにより、食性の違いと相関する遺伝子多型を検索して、食草選択に関わる候補遺伝子の絞り込みを図った。

3. 研究の方法

(1) アンプリコンシーケンシング

フォスミドクローンの配列決定により得られたアワノメイガの全 53 個の嗅覚受容体遺伝子周辺領域の高精度ゲノム塩基配列をもとに、250bp ペアエンド解析により効率的・高精度に塩基多型を検出できる 500bp 弱のアンプリコンをそれぞれの遺伝子特異的に設計して、イルミナ MiSeq での解析を行った。

解析に当たっては、PCR 反応を 2 段階で行い、2 段階目で 96 個体を識別可能なプライマーシステムを使用することにより、塩基配列結果を末端塩基配列から個別別に自動的に分類して de novo assembly を行ない、コンテイング配列を作成した。これらの配列から遺伝子ごとに系統樹を作成して、個体の食性との対応関係を調査して、食性に対応した樹形を示す遺伝子がないかを調査した。

(2) FISH 解析

上記の結果から、OR 遺伝子が座乗していることが判明した染色体について、他のチョウ目昆虫とのシンテニーから、当該染色体の両端付近など特徴的な位置にあることが予想された遺伝子を含むヨーロッパワノメイガ BAC 及びアワノメイガフォスミドクローンを選定して、OR 遺伝子を含む BAC 及びフォスミドクローンとともに、DNA を調製してプローブとして異なる蛍光色素でラベリングして FISH 解析を行い、染色体上の物理的に正確な位置を同定した。

4. 研究成果

(1) アンプリコンシーケンシング

アンプリコンシーケンシング解析は 2 回行った。1 回目では、OR 遺伝子の座乗する染色体を特定するための連鎖解析のため、96 個体中 24 個体をヨーロッパアワノメイガとアズキノメイガ間の BF1 集団を用い、その他はトウモロコシ、またはショウガから採集したアワノメイガ個体及びアワノメイガ属他種の個体を用いた。OR 遺伝子はクラスターを形成しているものが多いので、連鎖解析の結果、クラスター上のいずれかの遺伝子がマップできたものを含めると、全ての遺伝子について座乗する染色体を特定できた。

2 回目では、連鎖解析を行う必要がないため、上記の 24 個体は解析対象から外し、それ以外でも得られたデータ量の少ない個体は別個体と差し替えた。アンプリコンについても増幅効率が悪いもの、長すぎるためアンプリコンの中央部分の塩基配列が未確定等の問題があった遺伝子について、アンプリコンを短縮する等のプライマーの改良を行った。さらに 1 回目のデータが未取得の遺伝子については遺伝子ごとに 1 次 PCR 反応を行い、電気泳動により増幅を確認するなどした。

その結果、アワノメイガの 53 個の全嗅覚受容体遺伝子について、アンプリコンシーケンシング結果が得られた。得られた配列を個体ごとに de novo assembly を行ない、コンテイング配列を作成し、1 回目と 2 回目で共通の個体については、統合してデータの拡充を図った。

上記実験により得られた 53 個の嗅覚受容体遺伝子の多型について、種特異的、または食性特異的なものがないかを系統樹を作成して分析した。その結果、いくつかの OR 遺伝子について、食性特異的な分布を示している可能性があるものが見いだされた。

(2) FISH 解析

FISH 解析については、データが不良の BAC・フォスミドクローンについて、別のクローンを選択する、プローブとして使用する DNA を調製しなおす等の改良を行い、より完全なデータを取得

した。さらに、新たに公開された他のチョウ目昆虫のゲノムデータにおける嗅覚受容体遺伝子クラスターの分析を行い、アワノメイガ属における特異性をより明確化した。

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1件

1. 著者名 Yuji Yasukochi	4. 発行年 2020年
2. 出版社 Springer	5. 総ページ数 14
3. 書名 "Evolutionary History of Lepidopteran Genes Associated with Sex Pheromone Recognition" in Insect Sex Pheromone Research and Beyond edited by Yukio Ishikawa	

〔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
研究 分担者	佐原 健 (Sahara Ken) (30241368)	岩手大学・農学部・教授 (11201)	
研究 分担者	石川 幸男 (Ishikawa Yukio) (60125987)	摂南大学・農学部(農学部)・教授 (34428)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------