

令和 6 年 5 月 20 日現在

機関番号：82111

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2023

課題番号：20K06065

研究課題名（和文）ツマグロヨコバイに対して抵抗性を保有するイネの篩部で発現する防御機構の解明

研究課題名（英文）Elucidation of the defense mechanism expressed in the phloem of rice that is resistant to *Nephotettix cincticeps* Uhler.

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・上級研究員

研究者番号：90370668

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000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。ツマグロヨコバイに抵抗性を示すイネ系統では、ツマグロヨコバイの口針はイネの篩部まで到達するが、そこから篩管液が吸汁できないことが示唆された。ツマグロヨコバイに対するイネの防御反応に、イネの篩管液に恒常的に存在するタンパク質が寄与するかを確かめるために、防御反応に関わる候補タンパク質の一つを抵抗性イネ系統でノックアウトしたところ、抵抗性の低下が確認された。イネの篩管液中のタンパク質が、ツマグロヨコバイに対する吸汁阻害に関与することを確かめた例はまだなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ツマグロヨコバイに対して抵抗性を示すイネ系統の篩部での吸汁阻害反応に、篩管液に恒常的に存在するタンパク質が関与することをCRISPR/Cas9の系を用いて明らかにした。ツマグロヨコバイ抵抗性イネの防御機構に、篩管液中のタンパク質が寄与する報告は今までなかった。イネを加害する他の吸汁性昆虫に対する抵抗性イネ系統でも共通の防御反応があるかどうかや、アブラムシに対する抵抗性トマト等、イネ以外の作物の抵抗性品種についても同様の防御機構が存在するかも同じ手法で解析できるため、関連する分野の研究にも波及効果があると期待される。

研究成果の概要（英文）：The green rice leafhopper (GRH), *Nephotettix cincticeps* Uhler (Homoptera: Cicadellidae), is an insect pest of rice and is distributed in temperate Asia. GRH causes direct damage by sucking sap from the phloem of susceptible rice varieties and indirect damage by transmitting viral and phytoplasmal diseases. It was suggested that GRH could not suck the phloem sap of resistant rice lines, although the mouthparts of GRH could reach the phloem. We conducted the experiment to determine whether proteins that are constantly present in the phloem sap of rice contribute to the defense response of rice against GRH. When one of the proteins in the phloem sap was knocked out using a resistant rice line, it was confirmed that the resistance decreased. This is the first report that a protein in the phloem sap of rice has been shown to be involved in sucking inhibition against GRH.

研究分野：植物保護学

キーワード：耐虫性作物 害虫抵抗性作物 昆虫植物相互作用

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、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。電氣的吸汁行動測定装置を用いて抵抗性イネ上でのツマグロヨコバイの吸汁行動を解析したところ、ツマグロヨコバイに抵抗性を示すイネ系統では、ツマグロヨコバイの口針はイネの篩部まで到達するが、そこから篩管液が吸汁できないことが示唆された。また、口針が篩部に到達した後、吸汁の成否が決定するまでの時間が、短い場合は数分と非常に短い時間で決まることから、篩部での防御応答は、遺伝子の発現を伴うものよりも、篩管液に恒常的に存在する成分により誘起される可能性が高いと予想した。ツマグロヨコバイに対するイネの防御反応に、イネの篩管液に恒常的に存在するタンパク質が寄与するという報告は今までなかった。

2. 研究の目的

ツマグロヨコバイ抵抗性イネ系統では、ツマグロヨコバイの口針はイネの篩部に到達することが知られているが、篩管液中に元々存在するタンパク質等の成分が篩部での防御反応に寄与するかどうかは不明であった。本研究では、ツマグロヨコバイに対する抵抗性イネの防御反応に、篩管液中に恒常的に含まれるタンパク質が関与するかを、CRISPR/Cas9 の系を用い、抵抗性タンパク質のノックアウト系統を作成することで明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

篩管液中に恒常的に含まれるタンパク質の分子種は 107 種類が同定されており (Aki *et al.*, 2008)、含有数の多い上位 10 種のタンパク質が、篩管液中の同定されたタンパク質全体の約 48% を占める。ここでは、含有数の多い 10 種のタンパク質の中から防御に関連する可能性があると考えられるタンパク質を選定し、CRISPR/Cas9 により抵抗性イネ系統のターゲット遺伝子をノックアウトした形質転換系統を作成した。候補遺伝子をノックアウトした抵抗性イネ系統で、抵抗性が低下するかをツマグロヨコバイの抵抗性検定により確かめた。

4. 研究成果

(1) 候補遺伝子の選定

篩管液中に含まれるタンパク質のうち、篩部での防御に関わることが予想される候補タンパク質 (RPP1 と仮称) を選定し、タンパク質をコードする候補遺伝子の cDNA 情報を RAP-DB (The Rice Annotation Project Database) のデータベースから収集した。オフターゲット効果の影響を排除するために、候補遺伝子の塩基配列上に変異を導入するターゲット配列を 2 か所決定し、2 か所のターゲット配列を「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それぞれ作成した。

(2) ノックアウト形質転換体の作成と抵抗性評価

抵抗性イネ系統からカルスを作成し、作成したコンストラクトを用いて形質転換体を作成した。形質転換当代 (T_0) で、候補遺伝子にナンセンス変異が導入された幾つかの系統が選抜できた。次に、変異が導入された系統の後代種子 (T_1) から、この変異がホモ接合体で固定し、さらに導入した Cas 遺伝子を持たない形質転換系統を選抜して、 T_2 種子を採種した。

このように作成した候補遺伝子のノックアウト系統を、浸種により発芽させた後、水を含んだ脱脂綿を入れた試験管に移して 7 日間栽培し、ツマグロヨコバイの孵化幼虫を試験管内に放飼して綿栓をした。ツマグロヨコバイの孵化幼虫の生存率の経日変化を測定したところ、抵抗性系統から作成したノックアウト系統で抵抗性が低下する傾向が確かめられた。

これによって、イネの篩部で発現する防御機構に、篩管液中のタンパク質が関与するという仮説が正しいことが実験的に確かめられた。イネの篩管液中のタンパク質が、ツマグロヨコバイに対する吸汁阻害に関与することを確かめた例はまだなかった。

(3) RPP1 の類似タンパク質の探索とノックアウト

RPP1 をコードする遺伝子のノックアウト個体で、抵抗性は低下したが、完全に消失したわけではなかった。完全に抵抗性が消失しない原因として、RPP1 と同様の機能を有する別の遺伝子が存在する可能性や、評価手法の問題等が考えられた。検索の結果、篩管液中のタンパク質の中には微量ではあるが、RPP1 と類似の配列を保有するタンパク質が含まれる可能性が示唆された (RPP1b と仮称)。そこで、CRISPR/Cas9 の系を用い、RPP1 以外に RPP1b もノックアウトした形質転換体を作成するためのコンストラクトを作成した。抵抗性系統のカルスに、作成したコンストラクトを導入したアグロバクテリアを感染させ、形質転換が成

功して抗生物質入りの培地で増殖したカルスを選抜し、再分化させた。現在は RPP1 と RPP1b の遺伝子の両方にナンセンス変異が入った個体を選抜中であり、これが選抜できれば、RPP1 と RPP1b のノックアウトで、完全に抵抗性が消失するかどうか確認することが可能になる。

(4) 新たな抵抗性評価法の開発

篩部での吸汁阻害の誘起に寄与するタンパク質のうち、吸汁阻害への寄与が弱い因子について、その効果の程度を数値化するために、新たな抵抗性の評価法の構築を試みた。ツマグロヨコバイに対する芽出し時期のイネの抵抗性の評価は、ツマグロヨコバイの孵化幼虫の生存率により行っていたが、芽出しの時期以降のイネで抵抗性の強度を数値化できる有用な手法が確立できていなかった。そこで、第6葉期前後のイネを用い、抵抗性の強度を数値化するための新たな評価手法の開発を試みた。トビイロウンカのような主に篩管液を吸汁する昆虫では、甘露の量により抵抗性の強度を評価する方法が開発されていた。しかし、ツマグロヨコバイでは抵抗性イネの篩管液が吸汁できない場合は導管液を吸汁して排泄するため、甘露量が減少せず、甘露量により篩部での吸汁阻害の程度を評価することができなかった。

糖を含む栄養豊富な篩管液を吸汁したツマグロヨコバイの甘露にはグルコースが含まれるが、篩管液を吸汁できず、導管液だけを吸汁したツマグロヨコバイの甘露にはグルコースが含まれない。これに着目し、ツマグロヨコバイの甘露のグルコース量を定量することにより、栄養豊富な篩管液をどの程度吸汁出来ているかを評価する新たな手法を開発した。ツマグロヨコバイに抵抗性を示すイネと感受性を示すイネ上で、ツマグロヨコバイから排泄される甘露を回収して凍結乾燥し、少量の緩衝液に溶解させてグルコース量を定量することで、抵抗性の程度を数値化できた。このような手法は、抵抗性に寄与する効果の弱い成分の検出に適応できると考えられる。

引用文献

Aki T. et al. (2008) Plant Cell Physiol. 49: 767-790.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Tatsuhiko Yokozeki, Yukiko Matsumoto, Yoshinori Hatakeyama, Yasumori Tamura	4. 巻 59
2. 論文標題 Evaluation of rice resistance against <i>Nilaparvata lugens</i> (Stål) (Hemiptera: Delphacidae) and <i>Nephotettix cincticeps</i> Uhler (Hemiptera: Cicadellidae) using glucometer analysis of honeydew	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Applied Entomology and Zoology	6. 最初と最後の頁 217-223
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s13355-024-00865-w	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 横関辰彦・松本由記子・山内歌子・向井喜之・畠山吉則・田村泰盛
2. 発表標題 ウンカ・ヨコバイ類に対する抵抗性イネ遺伝資源の探索と抵抗性遺伝子座のアリル解析
3. 学会等名 第67回日本応用動物昆虫学会大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 横関辰彦, 松本由記子, 畠山吉則, 田村泰盛
2. 発表標題 吸汁性昆虫に対する植物の抵抗性を甘露のグルコース量で評価する
3. 学会等名 日本昆虫学会第83回大会
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔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
---------------------------	-----------------------	----

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