

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 6月17日現在

機関番号：82112

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2010～2012

課題番号：22780050

研究課題名（和文）トビイロウンカの相変異の誘導に関わる遺伝子の探索と機能解析

研究課題名（英文）Screening and functional analysis of genes responsible for phase-change induction in brown planthopper, *Nilaparvata lugens*

研究代表者

小林 徹也 (KOBAYASHI TETSUYA)

農業生物資源研究所・昆虫科学研究領域・主任研究員

研究者番号：90355321

研究成果の概要（和文）：

トビイロウンカを異なる翅型を誘導する2種類の密度条件で飼育し、翅型決定期である3、4齢の幼虫期にサンプリングを行った。トビイロウンカのすべてのステージからRNAを抽出し、網羅的な発現遺伝子情報を得て、マイクロアレイを設計した。このマイクロアレイを用いて、翅型決定期のサンプル間で発現量に差がある遺伝子を探索した。候補遺伝子についてRNAiによる発現抑制試験を行った。

研究成果の概要（英文）：

The brown planthopper, *Nilaparvata lugens* shows two wing forms, macropterous and brachypterous ones. The head and thorax of third instar and fourth instar nymphs were prepared from two different nymphal densities, solitary and crowded conditions. A new micro-array was designed from RNA-seq data obtained from all stages and tissues of *N. lugens*. The microarray experiments were conducted for screening genes responsible for phase-change of *N. lugens*.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	900,000	270,000	1,170,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2012年度	800,000	240,000	1,040,000
総計	2,700,000	810,000	3,510,000

研究分野：

科研費の分科・細目：

キーワード：

### 1. 研究開始当初の背景

農業害虫として重要な昆虫種には、相変異を起こすものが多くある。相変異は、生育環境に応じて成虫の体型を移住に適した移動型と、増殖に適した定住型の間で切り替える適応的なしくみである。農業においては、相変異を行う種は個体数の爆発的な増加と広範囲な被害の拡大を同時に引き起こすことで、大きな被害をもたらす。

イネの代表的な害虫であるトビイロウンカは、長距離移動に適した長翅型と、増殖に適した短翅型の2型の相変異を示す。毎年春に中国南部の水田で増殖したトビイロウンカは、現地の稲作に甚大な被害を与えたのち、生育環境の悪化に反応して長翅型となり、一部が南西風に乗り海を渡って日本に飛来する。日本の水田で、トビイロウンカは増殖に適した短翅型世代を繰り返して個体数を爆発的に増加させる。このように、トビイロウ

シカによるイネの被害は、本種の持つ相変異の性質に大きく依存している。

相変異を引き起こす環境条件は、トノサマバッタ、アブラムシ、ウンカ等の昆虫で解明されてきた。トビイロウンカにおいては、3-5 齢の幼虫期における餌条件が相変異の誘導に最も影響し、好餌条件で短翅型、悪餌条件で長翅型となる (Kishimoto 1956)。また、環境要因に対する相変異の反応は地域個体群間で異なり、遺伝的な要因の影響下にある (Iwanaga et al. 1985)。

一方、相変異を誘導する生理メカニズムについては、幼若ホルモン(JH)等によるシグナル伝達に関わることが、トノサマバッタやトビイロウンカなど数種の昆虫で明らかとされているものの、環境を受容して相変異を決定するメカニズムや、信号を受けた各組織がどのように分化するのかなど、重要な部分については、全く明らかにされていない。近年、この点について、分子生物学的な手法を用いたアプローチにより解明を試みる研究が各国で進められている。

応募者は、数年前からトビイロウンカの翅型決定に関わる候補遺伝子の探索のため、実験用の系統作出などの準備を進めてきた。また、予備的な実験から、昆虫において環境中の化学物質の受容に関わると推定される複数の遺伝子(Chemosensory Protein; CSP)が、長翅型と短翅型で異なる発現を示すことを明らかにしている。

## 2. 研究の目的

本研究はトビイロウンカの相変異を誘導する生理的なメカニズムを解明することを目的とする。特に、環境要因(主に餌条件)を受容した幼虫が、どのような機構を経て成虫の翅型を決定するのかに重点を置く。このため、長翅型を発現する幼虫と短翅型を発現する幼虫を別々に確実にサンプリングし、相変異決定期前半における遺伝子の発現を網羅的に比較することで、相変異の誘導に関わる遺伝子を探索する。RNAi 法によるノックダウンを有効に活用し、機能面からも効率的に遺伝子の絞り込みを行う。同時に、候補遺伝子としてすでに解析中の化学感覚タンパク質(CSP)や、JH 合成関連遺伝子についても、機能の解析を進める。

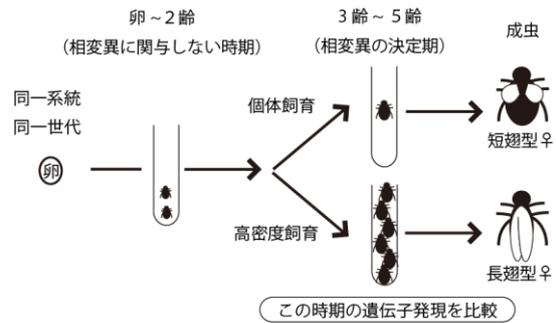


図 1. 研究のイメージ

## 3. 研究の方法

### 1. 実験材料と RNA のサンプリング

試験には、雌雄判別用の Y 染色体特異的マーカー(Kobayashi & Noda, 2007)について固定を完了した翅型解析専用のトビイロウンカ系統(HS2)を用いた。同一日に孵化した幼虫を回収し、2 齢期まで同じ条件で飼育した後、イネの芽出し苗を入れた試験管に高低 2 種類の飼育密度となるよう幼虫を移し、3 齢以降成虫まで飼育した。HS2 系統は、20 個体/試験管の密度で飼育した雌成虫は長翅型に、1 個体/試験管の雌成虫は短翅型になることがすでに明らかとなっているため、幼虫の段階で将来の翅型を確実に分けることができる。途中、両飼育条件下の 3 齢、4 齢、5 齢と羽化 2 日目成虫についてサンプリングを行い、頭胸部から RNA を抽出した。腹部は個別別に DNA 抽出し、Y 染色体特異的マーカーを用いて雌雄を判別した。各サンプリングステージについて、雌雄別々の cDNA ライブラリを作成した。遺伝子の発現量について統計的に差のある遺伝子を検出するため、飼育とサンプリングを 4 反復行った。

### 2. 次世代シーケンサーを用いたトビイロウンカの網羅的発現遺伝子解析とマイクロアレイの設計

トビイロウンカのすべてのステージで発現する遺伝子の配列を網羅的に把握するため、出雲系統近交系(sib8)について、以下の 10 のステージから total RNA を抽出した。胚子(産卵 1-3 日目)、胚子(産卵 4-6 日目)、胚子(産卵 7-9 日目)、2 齢幼虫、4 齢幼虫、5 齢幼虫、5 齢幼虫(集団飼育)、成虫(羽化 1 日目)、成虫(羽化 3 日目)、成虫(羽化 6 日目)。各ステージ由来の RNA 量がほぼ同じになるよう total RNA を混合し、cDNA ライブラリの作製とコピー数のノーマライゼーションを行った。ノーマライゼーションは、Duplex-specific nuclease (DSN) 酵素を利用して過剰なコピー数の配列を取り除く方法で

行った。得られた cDNA ライブラリについて、ロシユ社の 454GS FLX シーケンサーを用いて cDNA の塩基配列を網羅的に決定し、91 万個の EST を得た。MIRA3 によるクラスタリングの結果 10 万弱のユニークな遺伝子を得た。サンガー法によって得た 13 万のトビイロウンカ Expression Sequence Tags (ESTs) (Noda, 未発表) の情報も合わせ、ユニークな発現遺伝子配列を搭載したマイクロアレイを設計した。マイクロアレイは Agilent 社の 60K アレイを用いた。

### 3. マイクロアレイを用いた発現プロファイルの比較

1 で得た cDNA ライブラリについて 2 で設計したマイクロアレイを用いて網羅的な遺伝子発現量の比較を行った。得られたデータを解析し、異なる飼育条件下で統計的に有意な発現量の変化を示した遺伝子について、上位から順に、公共データベース上の既知遺伝子と配列を比較して大まかな機能を推定した。相変異の誘導に関わる可能性がある遺伝子をピックアップした。

### 4. RNAi を用いた候補遺伝子の発現抑制

トビイロウンカにおいては、2 本 RNA を注射することによる RNAi 法による遺伝子の発現抑制の効果が強い。3 で得た相変異誘導に関わる候補遺伝子について、dsRNA を合成し、これを 3 齢または 4 齢幼虫に注射して遺伝子発現抑制を試みた。トビイロウンカの相変異においては、翅型の他、体型、体色、筋肉、卵巣発達等において、異なる相間における表現型の違いが存在することから、上記の表現型について注射後の経過を観察した。RNAi の効果のコントロールとして *Laccase2* 遺伝子の配列をから作製した dsRNA あるいは同量の水を注射した。

さらに、dsRNA の注射法に代わる RNAi の実験法として、トビイロウンカに dsRNA を含む溶液を加える feeding RNAi を試した。蒸留水あるいは 30% ショ糖溶液に *Laccase2* の dsRNA 溶液 (200ng/ul) を 2 日間にわたって吸汁させ、その後の脱皮後の成虫の体色を観察した。

### 4. 研究成果

#### 1. 実験材料と RNA のサンプリング

密度別の飼育とサンプリングは 4 反復行った。結果、雌成虫が発現した短翅率は低密度飼育で 92-100%、高密度飼育で 0-20% となり、集団として十分に翅型発現の違いを示した (表 1)。4 反復合わせて 665 個体のサンプリング

を行い、雌雄を DNA マーカーによって判別した。これらのサンプルから雌雄別に得た total RNA は、その後候補遺伝子の発現量の解析に用いた。また、反復 3 と反復 4 でサンプリングした 3 齢と 4 齢の幼虫サンプルのうち、雌個体については、その total RNA をマイクロアレイによる網羅的発現量比較に用いた。

表 1. 飼育密度による翅型発現の変化とサンプリング個体数

#### 反復 1

	3 齢	4 齢	5 齢	成虫	短翅率(%)
低密度	16	16	16	8	♀100, ♂0
高密度	16	16	32	8	♀20, ♂0

#### 反復 2

	3 齢	4 齢	5 齢	成虫	短翅率(%)
低密度	24	24	16	8	♀100, ♂0
高密度	24	24	16	8	♀20, ♂0

#### 反復 3

	3 齢	4 齢	5 齢	成虫	短翅率(%)
低密度	40	34	32	8	♀96, ♂10
高密度	40	40	31	8	♀0, ♂0

#### 反復 4

	3 齢	4 齢	5 齢	成虫	短翅率(%)
低密度	40	40	-	-	♀92, ♂9
高密度	40	40	-	-	♀0, ♂13

### 2. 次世代シーケンサーを用いたトビイロウンカの網羅的発現遺伝子解析とマイクロアレイの設計

トビイロウンカの各ステージの全組織から抽出した total RNA をもとに作製したトビイロウンカの平均化 cDNA ライブラリーをロシユ 454GS FLX によって解析し、120 万リードの塩基配列情報を得た。これを既知のトビイロウンカ EST 13 万クローンと合わせてアセンブルし、約 11 万の転写産物のコンティグを得た。信頼性の高い塩基配列からなる 58,000 コンティグを選び、アジレント社製マイクロアレイ解析用のプローブを設計した。

### 3. マイクロアレイを用いた発現プロファイルの比較

方法 1 で得たサンプルを、方法 2 で設計したマイクロアレイを用いて解析比較した。結果、多くの発現変動遺伝子を得た (表 2、表 3)。

表 2. 短翅型発現に伴って up-regulate される遺伝子の例

クローン名	発現量比 (短翅/長翅)	p 値 (t-test)
CH_010602	6.9	0.004
CH_018986	2.2	0.007
CH_005952	9.3	0.031
CH_001751	6.7	0.026
CH_000279	2.5	0.019
CH_006809	8.8	0.023
CH_005110	7.4	0.032

表 3. 短翅型発現に伴って down-regulate される遺伝子の例

クローン名	発現量比 (短翅/長翅)	p 値 (t-test)
CH_003565	0.11	0.028
CH_004542	0.13	0.043
CH_003565	0.09	0.039
CH_006398	0.14	0.031
CH_004542	0.11	0.048
CH_003545	0.14	0.036
CS_010573	0.11	0.036
CH_038651	0.16	0.042
CH_900706	0.13	0.045
CH_006398	0.14	0.034
C4A025388	0.15	0.048
CH_021947	0.08	0.029
C4A017862	0.16	0.043
CH_004353	0.07	0.040
CH_038651	0.13	0.040
CH_021947	0.09	0.038
C4A010400	0.07	0.039
CH_008526	0.18	0.044
CH_003545	0.12	0.042
C4A010688	0.17	0.045
CH_031315	0.14	0.048

#### 4. RNAi を用いた機能破壊実験

マイクロアレイによって得られた相変異の誘導に伴って発現量が変化する遺伝子候補から、1)発現量の変化、2)統計有意差の有無、3)既知の遺伝子との配列比較による機能推定、の3点から、最初の候補遺伝子6種類を得た。それぞれの候補遺伝子について、3齢幼虫20~80個体に2本鎖RNAの溶液を注射し、その後の表現型を比較した結果、注射によって翅型が変化したと思われる遺伝子はなかった。配列と機能から特に有望と思われる1遺伝子についてはさらに97個体について注射し、コントロール48個体と翅型の出現率を比較したが、やはり翅型の出現率に差はなかった。Feeding RNAi については、2反復の試験で全く効果が見られなかった。

現在、引き続き候補遺伝子のピックアップと遺伝子発現量の確認、RNAi による発現抑

制実験を続けている。

#### 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計4件)

Jairin J, Kobayashi T, Yamagata Y, Sanada-Morimura S, Mori K, Tashiro K, Kuhara S, Kuwazaki S, Urio M, Suetsugu Y, Yamamoto K, Matsumura M, Yasui H (2013) A Simple Sequence Repeat- and Single-Nucleotide Polymorphism-Based genetic linkage map of the Brown Planthopper, *Nilaparvata lugens*. DNA Res 20:17-30

Kobayashi T, Takada M, Takagi S, Yoshioka A, Washitani I (2011) Spider predation on a mirid pest in Japanese rice fields. Basic Appl Ecol 12:532-539

Kobayashi T, Matsuki N, Yokosuka T (2011) Genetic isolation of the sorghum plant bug *Stenotus rubrovittatus* (Hemiptera: Miridae) in Fukushima and Ibaraki prefectures. Appl Entomol Zool 46:343-351

Kobayashi T, Sakurai T, Sakakibara M, Watanabe T (2011) Multiple origins of outbreak populations of a native insect pest in an agro-ecosystem. B Entomol Res 101:313-324

[学会発表] (計11件)

小林徹也, 末次克行, 真田幸代, 松村正哉 (2013) トビイロウンカ近交系を用いた抵抗性イネ品種に対する加害性の遺伝解析 第57回日本応用動物昆虫学会大会 95

菊田真吾, 小林徹也, 黄川田隆洋, 中島信彦, 野田博明 (2013) イネ吸汁応答性トビイロウンカグルコーストランスポーターの同定 第57回日本応用動物昆虫学会大会 205

Suetsugu Y, Kobayashi T, Daimon T, Joraku A, Nakamura Y, Kuwazaki S, Kayukawa T, Katayose Y, Kanamori H, Kurita K (2012) Progress in genome sequencing of the brown planthopper, *Nilaparvata lugens* XXIV International Congress of Entomology S1017TH19

Suetsugu Y, Daimon T, Jouraku A, Kobayashi T, Nakamura Y, Kuwazaki S, Kayukawa T, Katayose Y, Kanamori H, Kurita K, Sanada-Morimura S, Matsumura M, Tanaka Y, Tanaka H, Shiotsuki T, Shinoda T, Yamamoto K, Noda H (2012) Progress in genome sequencing

of the brown planthopper, *Nilaparvata lugens* 6th Annual Arthropod Genomics Symposium: Arthropod Genomics 2012: Taking Center Stage and i5k Community Workshop EG-17

Kobayashi T, Hattori M (2012) Strategies to identify genes mediating the virulence of brown plant hopper to resistant rice The 20th Biennial International Plant Resistance to Insects Workshop 23

Takada M B, Takagi S, Kobayashi T, Yoshioka A, Kubo T, Washitani I (2012) Horizontal webs of Tetragnatha spiders and abundant weeds enhance biological control of insect pests by spiders in organic paddy fields Joint Meeting of the 59th Annual Meeting of ESJ & The 5th EAFES International Congress 26

高田まゆら, 高木俊, 小林徹也, 吉岡明良, 鷲谷いづみ (2011) 環境保全型水田における広食性捕食者・雑草がイネ害虫に与える形質介在間接効果の重要性 第 27 回 個体群生態学会大会 33

小林徹也 (2011) イネウンカ類のバイオタイプ研究の現状と展望 公開シンポジウム「ポストゲノム時代の害虫防除研究のあり方」第 4 回-ウンカ防除の現状と展望-

小林徹也, 高田まゆら, 高木俊, 吉岡明良, 鷲谷いづみ (2011) DNA マーカーを用いた水田のクモ類による害虫の捕食量の推定 Acta Arachnologica 59(2):117

高田まゆら, 小林徹也, 高木俊, 吉岡明良, 鷲谷いづみ (2011) 環境保全型水田におけるクモ類の天敵としての役割 Acta Arachnologica 59(2):117-118

小林徹也 (2011) 遺伝的多様性からみた斑点米カメムシの被害拡大の過程と要因 第 27 回 個体群生態学会大会 25

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

小林 徹也 (KOBAYASHI TETSUYA)  
農業生物資源研究所・昆虫科学研究領域・主任研究員  
研究者番号：90355321

### (3)連携研究者

野田 博明 (NODA HIROAKI)  
農業生物資源研究所・昆虫科学研究領域・研究専門員  
研究者番号：40343991

末次 克行 (SUETSUGU YOSHITAKA)  
農業生物資源研究所・農業生物先端ゲノム  
研究センター・主任研究員  
研究者番号：80533471