

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 28 日現在

機関番号：82112

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25292204

研究課題名(和文)アワノメイガ属における食性進化と性フェロモンとの関連性の解明

研究課題名(英文)Evolutionary analysis of feeding traits and sex pheromone in *Ostrinia* moths

研究代表者

安河内 祐二 (Yasukochi, Yuji)

国立研究開発法人農業生物資源研究所・昆虫ゲノム研究ユニット・主任研究員

研究者番号：50355723

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,600,000円

研究成果の概要(和文)：害虫に好まれない作物を育種できれば、農薬に頼らず害虫被害を軽減でき抵抗性の発達も回避できる。害虫が無数の植物の中から食草を探索するのに植物が発する匂いを指標にしていることは十分考えられる。そこで、トウモロコシの害虫として知られるアワノメイガのゲノム塩基配列の概要を決定して、触角で匂いの検知に重要な役割を果たす嗅覚受容体遺伝子の構造を網羅的に解析した。さらに食性の異なる近縁種の遺伝子も解析して、食性の違いに寄与する相違がないかを検討した。

研究成果の概要(英文)：It is most likely that phytophagous insects find their edible plant by means of olfaction, and odorant receptor genes is one of the most important candidates determining on which plant female moths lay eggs. we determined 511 Mb whole genome sequences of the Asian corn borer, *Ostrinia furnacalis*, and isolated fosmid clones to determine OR gene structures precisely. Consequently, we found nearly 60 OR genes, some of which were in tandem arrays. Additionally, we screened genomic libraries of *O. nubilalis* and *O. latipennis*, congeners of *O. furnacalis*, and isolated clones containing OR genes, and determined their sequences for comparison.

研究分野：農学

キーワード：食性 嗅覚受容体 アワノメイガ 種分化 性フェロモン

1. 研究開始当初の背景

アワノメイガ属には広食性と単食性のものがいるので、食性の遺伝的背景の解明に適している。同所的に分布する食性の異なる種間には生殖的隔離があると考えられるが、その候補として第一に考えられるのが性フェロモンである。また、母蛾が食草を探索する際にも触角で発現している嗅覚受容体(OR)遺伝子が重要な役割を果たしていると考えられるので、ゲノム上のOR遺伝子を網羅的に解析することにより、食性の異なる種間で発現に影響を与えるような変化が起きていないかを明らかにすることを企図した。

2. 研究の目的

(1) アワノメイガの概要ゲノム配列を決定して、見出されたOR遺伝子の構造を、フォスミドクローンをを用いて正確に決定する。

(2) あわせて決定した周囲のゲノム塩基配列から、種間で保存されている遺伝子を見出して、FISH解析や連関解析とも組み合わせてカイコ等の他のチョウ目昆虫とのシンテナーを検討する。

(3) ヨーロッパアワノメイガやウスジロキノメイガの相同遺伝子の構造も決定し、アワノメイガと比較して食性や種分化と関連する可能性のある候補遺伝子を検索する。

(4) 母蛾が食草への選好性を評価できる実験手法を開発する。

3. 研究の方法

(1) アワノメイガのオス蛹1個体のゲノムDNAに対して、HiSeq2000シーケンサーを用いた100bpペアエンド解析を行い、SOAPdenovo2を用いて配列のアセンブルを行った。

(2) 連携研究者らが行ったRNA-seq解析により見出されたOR遺伝子(Yang et al. 2015 PLoS ONE 10:0121261)をクエリーとして、前項で得られたゲノム塩基配列に対して相同性検索を行い、ヒットしたOR遺伝子を含む配列からフォスミドライブラリーをPCRスクリーニングするためのプライマーを設計した。

(3) アワノメイガとウスジロキノメイガのフォスミドライブラリーとヨーロッパアワノメイガのBACライブラリーから前項のプライマーを用いてPCRスクリーニングによりクローンを単離した。

(4) 単離したクローンからDNAを精製して等量ずつ混合し、HiSeq2000シーケンサーを用いて100または125bpペアエンド解析を行った。アセンブリした配列に残る未同定配列はサンガー法により決定した。

(5) カイコゲノムデータベースのKaikobaseを用いて、得られた配列上にカイコの既知遺伝子や遺伝子モデルと相同性の高い配列がないかを検索した。

(6) ヨーロッパアワノメイガとアズキノメイガのF1メスにアズキノメイガのオスを戻し交雑した集団を対象に上述のプライマーによる連関解析と単離したクローンをプローブとしたFISH解析を行い、OR遺伝子の座乗する染色体を同定した。

(7) 野外個体の多型頻度を評価するために、圃場に栽培したトウモロコシとショウガからアワノメイガ属の幼虫や蛹を採集して、個体別にDNAを調製した。一部の幼虫は羽化させて、食草への選好性調査に利用した。

(8) 3箱のプラスチック容器を5cmのホースで連結した試験器具を試作して、中央の箱に母蛾を、左右の箱に食草を入れて、行動を観察した。

4. 研究成果

(1) 約29Gbのペアエンドリードをアセンブリして、総サイズ約511Mb、N50 = 930bpのアワノメイガ概要ゲノム配列が得られた。この配列を基にフェロモン受容体サブファミリー以外のOR遺伝子候補45種のプライマーを設計して、PCRスクリーニングを行った結果、アワノメイガで42種、ヨーロッパアワノメイガで33種、ウスジロキノメイガで10種の遺伝子について陽性クローンを単離することができた。

(2) 前項で単離したアワノメイガフォスミドクローン43個の塩基配列を決定した。その結果、スクリーニング対象とした遺伝子に加えて14種の新規OR遺伝子が見出された。その一部は2~5個の転写方向を同じくする遺伝子からなる11個のクラスターを形成していた。クラスター内の遺伝子配列の類似性には幅があり、遺伝子重複が生じてからの時間経過を反映しているものと考えられる。

(3) FISH解析によりアワノメイガ全31染色体を識別可能な細胞遺伝地図を構築した。その過程でカイコにおいて過去に起きた染色体付着部位を高精度に絞り込むことができた。

この地図を活用し、連関解析や前後の保存されている遺伝子の情報と総合して、約90%のOR遺伝子の座乗染色体を明らかにした。カイコの相同領域にあるOR遺伝子とは一つの例外を除いて分子系統樹上で近縁な位置にあったので、共通祖先から分岐後にいずれの系統でも転座が起きていない場合が多いと考えられた。このことは、我々が明らかにしてきたチョウ目昆虫の染色体構造の安定性を裏付けるものである。

(4) アワノメイガZ染色体と第23染色体にのフェロモン受容体遺伝子クラスターの構造を完全に決定した。周辺領域に存在する遺伝子の配置から、アワノメイガのZ染色体上のフェロモン受容体遺伝子クラスターがBmOR1遺伝子と相同な染色体領域に位置することを明らかにした。

また、アワノメイガのOR1遺伝子の発現が見られない(Yang et al. 2015)原因が、OR3遺伝子が重複したうちの一方のコピーがOR1遺伝子に挿入しているためと考えられた。このような重複は調査した限りではアワノメイガ種群の他種には見られなかったため、アワノメイガの種分化に重要な役割を果たしている可能性がある。

(5) ヨーロッパアワノメイガで23種、ウスジロキノメイガで6種のOR遺伝子の塩基配列が得られた。今回の手法の限界として、アワノメイガとの間でよく保存されている遺伝子しか解析できないことがある。アワノメイガ以外の種で特異的に進化した遺伝子を見出すためには、当該種でのRNA-seq解析や概要ゲノム配列の決定が必須と思われる。

その一方で、アワノメイガでゲノムワイドにOR遺伝子とその周辺の塩基配列を高精度に決定できた。これを参照配列として活用することにより、低予算・小規模のRNA-seq解析やゲノム塩基配列決定では容易ではない重複遺伝子と対立遺伝子の識別や遺伝子全長の把握が可能になり、同じ予算でより多くの種を比較でき幅広い知見が得られることが期待される。

また野外個体の遺伝的多様性を考えると、特定個体のゲノム配列に依拠した過度の一般化は危険なので、今回調製した500個体を越えるゲノムDNAを活用したアンプリコンシーケンシングを多数のOR遺伝子を対象にして行うことにより、より信頼性の高い解析が可能になるものと考えられる。海外研究者の協力も得て、より多くの検体を対象に研究を進める予定である。

(6) 近年はニカメイガやノシメマダラメイガなどメイガ上科のゲノムデータも増加しつつある。イネ科植物への適応は同上科内の複数の系統で独立に進化しているので、それぞれの非適応近縁種との比較を行うことなどにより、母蛾の食草探索行動に関与しているOR遺伝子に系統的な共通性があるのかが明らかになることが期待される。

また先述の通り、OR遺伝子座は系統的に相当異なる種間でもよく保存されているので、メイガ上科のように種数も多く食性も多様化している分類群で得られた知見を別の分類群の解析に活用することも期待される。

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 1件)

Yasukochi Y, Ohno M, Jouraku A, Shibata F, Nakano R, Ishikawa Y, Sahara K (2016) A FISH-based chromosome map for European corn borers yields insights into ancient chromosomal fusions in the silkworm. *Heredity* 116:75-83、査読あり、DOI:10.1038/hdy.2015.72

[学会発表](計 4件)

安河内祐二、アワノメイガの性フェロモン受容体遺伝子OR3遺伝子の重複・挿入によるOR1遺伝子の不活化、平成28年度蚕糸・昆虫機能利用学術講演会、平成28年3月18日、京都市

安河内祐二・上樂明也・松尾隆嗣・石川幸男、アワノメイガゲノム上の嗅覚受容体遺伝子の網羅的探索と他鱗翅目昆虫との比較、平成27年度蚕糸・昆虫機能利用学術講演会、平成27年9月27日、京都市

大野瑞紀・柴田洋・石川幸男・中野亮・安河内祐二・佐原健、第59回日本応用動物・昆虫学会、平成27年3月27日

安河内祐二・上樂明也・松尾隆嗣・石川幸男、次世代シーケンサーを用いたアワノメイガ3種の生フェロモン受容体遺伝子クラスターの構造解明、平成26年度蚕糸・昆虫機能利用学術講演会、平成26年3月11日、藤沢市

[図書](計 2件)

Yoshido A, Sahara K, Yasukochi Y (2014) Silk Moths (Lepidoptera) In “Protocols for Cytogenetic Mapping of Insect Genomes” edited by Sharakhov, I. V., pp. 217-254 CRC Press, Boca Ranton, FL.

Yasukochi Y (2014) Utilization of BAC and fosmid libraries to genome analysis of uncharacterized organisms. In “Genomics III, Methods, Techniques and Applications” iConceptPress, 63-78

6. 研究組織

(1) 研究代表者

安河内 祐二 (YASUKOCHI YUJI)
農業生物資源研究所・昆虫ゲノム研究ユニット・主任研究員
研究者番号：50355723

(2) 研究分担者

石川 幸男 (ISHIKAWA YUKIO)
東京大学大学院・農学生命科学研究科・教授

研究者番号：60125987

佐原 健 (SAHARA KEN)

岩手大学・農学部・教授

研究者番号：30241368

(3)連携研究者

松尾 隆嗣 (MATSUO TAKASHI)

東京大学大学院・農学生命科学研究科・

准教授

研究者番号：70301223