

令和 2 年 7 月 3 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：17K07687

研究課題名(和文) イネの抵抗性を打破するトビイロウンカが持つ加害因子の同定と加害機構の解明

研究課題名(英文) Identification of virulence factor of brown planthopper against resistant rice

研究代表者

小林 徹也 (Kobayashi, Tetsuya)

国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構・本部・上級研究員

研究者番号：90355321

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)：トビイロウンカ抵抗性遺伝子Bph1を保有するイネを加害するウンカバイオタイプが保有する加害因子について、遺伝学的手法による同定を試みた。Bph1加害バイオタイプと非加害バイオタイプの交配後代について個体別あるいは集団選抜により加害型ゲノムと非加害型ゲノムをサンプリングし、次世代シーケンシングによる解析により、加害性を制御する責任領域をウンカゲノム上に特定した。特定したゲノム領域に座乗する遺伝子、non coding RNA、small RNAを解析し、加害因子の候補配列を得た。

研究成果の学術的意義や社会的意義

イネの最重要害虫であるトビイロウンカの防除法として1970年代より抵抗性イネ品種の開発が進められてきたが、これを加害するウンカバイオタイプが野外で容易に発達することから、抵抗性品種の利用はウンカの被害防除法として成功しているとは言えない。我々の研究から、抵抗性打破はウンカゲノム上の非常に限られた霊異記に存在するおそらく一つの遺伝的因子により制御されていることが明らかとなった。また、その遺伝子の同定についても候補をかなり絞っている。イネの抵抗性を打破する因子とそれが働くメカニズムが明らかになれば、ウンカ抵抗性品種の開発や利用に大きく貢献し、殺虫剤に頼らないウンカの生物的防除の実現が近づく。

研究成果の概要(英文)：Genetic mapping of the virulence gene of the brown planthopper against BPH1 resistance gene was performed using inbred lines of BPH biotypes. Progenies of biotype1 (avirulent to BPH1) and biotype2 (virulent to BPH1) were individually collected after evaluation of virulence, then genome sequences were analyzed using NGS. SNPs common to virulent progenies were located within the specific genomic region of BPH. Genes, non-coding RNAs and small RNAs in the genomic region were analyzed to determine the virulence gene candidates against BPH1.

研究分野：植物保護科学、応用昆虫学、遺伝学

キーワード：トビイロウンカ バイオタイプ 虫害抵抗性 抵抗性遺伝子

1. 研究開始当初の背景

イネの重要害虫であるトビイロウンカに対する抵抗性イネの探索は 1960 年代から行われ、現在までに 20 以上の抵抗性遺伝子が見つかるとともに、一部は栽培イネ品種へ導入されて東南アジア諸国を中心に利用されている。しかし、野外のトビイロウンカはこれらの抵抗性品種に対して数年から 10 年という短期間に適応し、加害性の集団へ変化する。獲得された加害性は集団内で遺伝的に安定して維持されることから、農業現場における抵抗性遺伝子の利用の大きな障害となっている。本課題で扱う *Bph1* は最初にイネ品種に導入されたトビイロウンカ抵抗性遺伝子で、普及のわずか 2 年後には加害性ウンカ系統の発生が報告されている。

トビイロウンカ抵抗性遺伝子を保有するイネは、ウンカによる篩管液の吸汁行動を阻害することで抵抗性を発揮するが、イネ抵抗性とウンカ加害性の相互作用の分子メカニズムの詳細は明らかにされていない。近年、イネから複数のトビイロウンカ抵抗性遺伝子が同定され、これらが NBS-LRR (Nucleotide-Binding Site Leucine-Rich Repeat) タンパク質をコードすること、サリチル酸経路を活性化させることなどから、ウンカ抵抗性の機構がいもち病等の病害に対するイネの免疫機構と類似することが明らかになっている (Du et al. 2009; Tamura et al. 2014)。

トビイロウンカの加害に際してイネ体に送り込まれる様々な物質 (エフェクター) の中には、イネの免疫機構を活性化するものが含まれ、これが、吸汁活動の阻害を中心とする一連のウンカ抵抗性を誘導していると考えられている (Du et al. 2009)。トビイロウンカはイネの抵抗性を誘導するエフェクターを遺伝的に失う、または変異させることによって抵抗性の誘導を免れると考えられ、これが加害性バイオタイプ集団の発達メカニズムであると考えられる。近年コムギの害虫ヘシアンバエにおいて抵抗性品種に対する加害性を決定するエフェクターが複数同定され (Aggarwal et al. 2014)、害虫のエフェクターと抵抗性遺伝子の相互作用が作物の免疫反応を決定するという仮説の重要な証拠となっている。

報告者らは、イネのトビイロウンカ抵抗性を誘導するエフェクターを特定することで、イネ抵抗性遺伝子とウンカ加害性因子の相互作用、および抵抗性の打破機構を解明することができると考え、これまでに以下のような研究を行ってきた (Kobayashi et al. 2014, Kobayashi 2016)。その結果は以下のようにまとめられる。

1. イネのトビイロウンカ抵抗性遺伝子 *Bph1* に対するウンカの加害性は劣性の単一遺伝子に支配される。QTL 解析の結果、この加害遺伝子はトビイロウンカの第 10 染色体に存在する。
2. ddRAD-Seq (Restriction Site Associated DNA-Sequence) 法等による分子マーカーの開発と連鎖解析の結果、加害因子は 2 つの SNP マーカーに挟まれた 0.5-5MB の領域内に存在する。
3. *Bph1* 加害性と非加害性の近交系交配後代を用いた Homozygosity Mapping 法 (図 1) により、次世代シーケンサーデータから加害性に連鎖した SNP を効率よく抽出できる。
4. トビイロウンカゲノムは平均サイズ 250kb という比較的長い連続した DNA 配列 (Scaffold) として解読された (Xue et al. 2014)。ファインマッピングによる絞り込みに加え、上記の Homozygosity Mapping 法を併用することで目的遺伝子が座乗する DNA 断片 (Scaffold) とそこに座乗する加害遺伝子候補を特定することが可能であると考えられる。
5. 唾液線発現遺伝子の網羅的解析により、トビイロウンカのエフェクターとなりうる遺伝子をリスト化した。
6. 本種は RNAi による発現抑制が非常に有効なため、これを用いて加害因子候補遺伝子の機能を推定できる。

これらの背景をもとに、*Bph1* 加害因子を同定するための研究計画を立案した。

2. 研究の目的

本課題では、連鎖解析によってトビイロウンカバイオタイプが *Bph1* を加害するのに必要な遺伝因子が存在する領域をウンカゲノム上に特定し、そのゲノム配列を解析することによって加害因子候補を絞り込む。候補遺伝子の発現解析、機能解析を通じて、加害因子を同定する。また、抵抗性打破因子の解析を通じてイネの抵抗性とトビイロウンカの加害性の相互作用のメカニズムを解明する。

3. 研究の方法

(1) *Bph1* に対する加害因子の候補遺伝子の絞り込み

トビイロウンカ抵抗性遺伝子 *Bph1* を保有するジャポニカ系統西海 190 号に対して加害性のトビイロウンカ近交系 C89i と非加害性の近交系 I87i を実験に用いた。これらを両親とする交配後代において、*Bph1* が座乗する領域を挟む 2 つの分子マーカー-VLS00 と

R035122 の間で組換えがあり、なおかつ加害性を維持している個体を検定によって選んだ。これらの個体のゲノム DNA を次世代シーケンサーイルミナ社 HiSeq2000 で解析し、加害性の表現型と連鎖して C89i 型ホモとなっている SNPs をトビイロウンカのゲノム配列上にマッピングして(Homozygosity Mapping)、加害性と連鎖した SNP が乗るゲノム断片(Scaffold、平均約 250kb)を抽出した。交配後代については、これまでに作っていた系統の後代も含め F2,F3,F30,F40,F40×I87i バッククロス系統について、個体別あるいは集団において後代の加害性検定を行い、ゲノム DNA のシーケンスと in silico マッピング解析を行った。

また、リファレンスとなるウンカゲノム情報については、公開されている中国のウンカゲノムではデータ量が不足していたため、新たに Chromium シーケンスと PacBio シーケンスによる I87i ゲノム配列情報を使用した。PacBio については、本研究課題でシーケンスを行った。

さらに、ゲノムシーケンスに多く含まれる重複配列を除くため、同じサンプルから得た RNA の transcriptome 解析を行った。さらに、20-200bp の小さな RNA 配列のみを集めて解析する Small RNAseq を行い、遺伝子の発現制御に関与する可能性のある small RNA の情報も得た。

Heterozygosity mapping

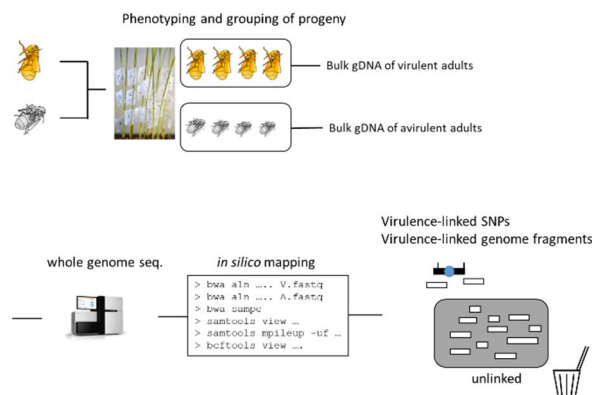


図 1 . マッピングと候補ゲノム領域の絞り込み方法

リファレンスゲノム上にマッピングされたリードの多型解析により、加害性連鎖ゲノム断片が特定された。リファレンスゲノムの配列情報と別途取得した transcriptome の常法から領域内に存在する遺伝子、non coding RNA、small RNA をリストアップした。エフェクターである加害因子をコードする遺伝子は、トビイロウンカの唾腺で多く発現し、シグナルペプチドを持つ可能性が高いため、これらの特徴を持つ候補遺伝子を絞り込んだ。また遺伝子発現調節因子が間接的にエフェクターの構成に関わっている可能性もあるため、これらも候補とする。

(2) 候補遺伝子のノックアウト系統と表現型の確認

候補遺伝子が加害因子であるかは最終的に機能解析によって確かめる必要があるため、RNAi 法による遺伝子発現の抑制を行った。候補遺伝子配列を部分的にコードする 2 本鎖 RNA を合成して羽化前の幼虫に注射することで、非加害系統のもつ候補遺伝子のアレルの発現を抑制することを試みた。注射後の幼虫は羽化まで 2 日以上飼育し、羽化後さらに 1 日待って、Bph1 を保有するイネ品種、西海 190 号のイネ体に放飼した。放飼はパラフィルム法を用い、48 時間の放飼後に成虫を回収し、排出した甘露量を測定したうえ、個体別に RNA を抽出して目的の候補遺伝子の発現量を測定・比較した。

4 . 研究成果

(1) Bph1 に対する加害因子の候補遺伝子の絞り込み

In silico マッピングにおいては、母親(加害)型、父親(非加害)型の SNP において、加害型のみで母親型ホモ接合となるものが大量に抽出された(図 2)。これらのゲノム上での位置は、報告者が以前 QTL 解析によって決定した領域の近傍であり、また世代やサンプル間の再現性が極めて高かった。したがって、加害因子はゲノム上のこの領域に存在することは間違いないと考えられた。一方、世代を重ねた交配後代の解析によってゲノム領域が顕著に狭まることはなく、

一定の領域サイズに収束する傾向があった。

最終的に、交配後代の F3 ~ F40 バッククロスまでの *in silico* マッピングの結果、3つの scaffold にまたがる Nkb (非公表) の加害性と連鎖する領域を特定した (図3)。

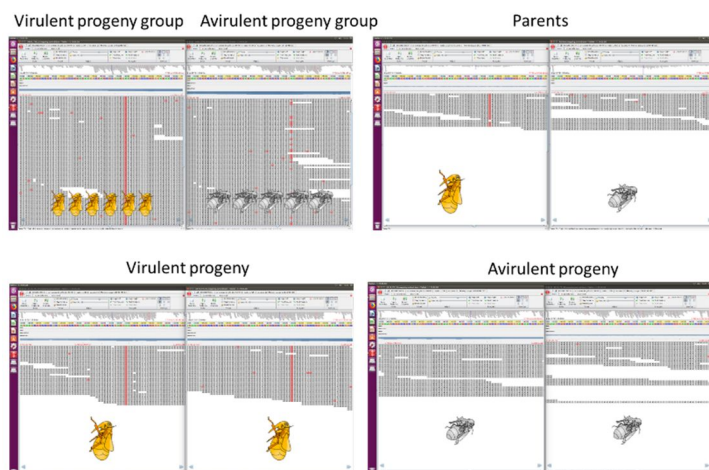


図2 加害性と連鎖する SNP の例。

(2) 候補遺伝子のノックアウト系統と表現型の確認

候補領域内には ORF をコードする複数の候補遺伝子と、多くの non coding RNA が存在した。このうち、コードするアミノ酸配列等から加害因子となりうるものについて、RNAi 法による発現抑制実験を行った。RNAi の効果は遺伝子により異なり、1/40 に抑制されるものから、80%程度にしか抑制されないものもあった。

これらのデータについて現在、論文化を進めている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Murata Mika, Kobayashi Tetsuya, Seo Shigemi	4. 巻 25
2. 論文標題 -Ionone, an Apocarotenoid, Induces Plant Resistance to Western Flower Thrips, <i>Frankliniella occidentalis</i> , Independently of Jasmonic Acid	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Molecules	6. 最初と最後の頁 17
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/molecules25010017	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Miwa Uchibori-Asano, Akiya Jouraku, Toru Uchiyama, Kakeru Yokoi, Gaku Akiduki, Yoshitaka Suetsugu, Tetsuya Kobayashi, Akihito Ozawa, Saki Minami, Chiharu Ishizuka, Yoshiaki Nakagawa, Takaaki Daimon, Tetsuro Shinoda	4. 巻 9
2. 論文標題 Genome-wide Identification of Tebufenozide Resistant Genes in the smaller tea tortrix, <i>Adoxophyes honmai</i> (Lepidoptera: Tortricidae)	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 4203
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-019-40863-5.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Kobayashi Tetsuya
2. 発表標題 Genetic fine mapping of virulence against the rice resistance gene in the brown planthopper
3. 学会等名 2nd annual meeting of Japan-France Plant-Insect-Symbiont Interaction network (PISI-net)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 村田未果、小林徹也、瀬尾茂美
2. 発表標題 誘導抵抗性物質、 γ -イオンはジャスモン酸非依存的にミカンキイロアザミウマに対する抵抗性を植物に付与する
3. 学会等名 第64回日本応用動物昆虫学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 小林徹也、真田幸代、松村正哉
2. 発表標題 トビイロウンカ抵抗性イネを加害するバイオタイプが持つ加害遺伝子の探索
3. 学会等名 第62回日本応用動物昆虫学会
4. 発表年 2018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
研究分担者	真田 幸代 (Sanada Sachiyo) (80533140)	国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構・九州沖縄農業研究センター・グループ長 (82111)	
研究分担者	松村 正哉 (Matsumura Masaya) (00370619)	国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構・本部・所長・部門長・部長・研究管理役等 (82111)	