

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年 5月31日現在

機関番号：16401
 研究種目：挑戦的萌芽研究
 研究期間：2011～2012
 課題番号：23658011
 研究課題名（和文） ツマグロヨコバイ 抵抗性機構の解明および抵抗性遺伝子の機能解明
 研究課題名（英文） Elucidation of mechanism for resistant rice plant and function of the resistant gene against green leafhopper.
 研究代表者
 金 哲史 （ KIM CHUL-SA ）
 高知大学・教育研究部総合科学系・教授
 研究者番号：30234339

研究成果の概要（和文）：イネの重要害虫であるツマグロヨコバイに対して *GRH2* 遺伝子と *GRH4* 遺伝子の両方を有する水稻は高度に抵抗性を示す。この抵抗性のメカニズムが未だ解明されていないことから、その遺伝子の機能解明も含め取り組んだ。*GRH2* 遺伝子と *GRH4* 遺伝子の両方を有する Lep-dumai から D-型ペプチドを含む 10 種の摂食阻害物質を単離し、これらが抵抗性の要因であることを明らかとした。

研究成果の概要（英文）：

Green leaf hopper is one of the serious rice pests. Rice plant with GRH2 and GRH4 genes shows a high level of the resistance against this insect species. In this study, the mechanism for the resistance has been tried to wluclidated. Ten compounds including one peptide with D-form were isolated and identified as antifeeedants against her.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農学・育種学

キーワード：antifeedant, resistant green leaf hopper rice plant, resistant gene

1. 研究開始当初の背景

ツマグロヨコバイ（*Nephotettix cincticeps* Uhler）は半翅目ヨコバイ科（Homoptera: Cicadellidae）に属する吸汁性昆虫である。成虫の体長は雄が 4.5mm、雌が 6.0mm。体色は鮮緑色であり、雄は末尾の約 1/3 が黒色、雌は淡黄色になっている。本種は日本を含めた東アジアで吸汁による直接被害やイネ萎縮病などのウイルス病の媒介によって稲作に被害を出すよく知られた害虫のひとつである。

本種の防除はそれまで農薬に頼ったものであったが 1960 年代前半に有機リン剤に対する抵抗性を持つものが各地で発生し問題となった。その後、カーバメート系殺虫剤の防除が有効とされ主流となったが、1970 年に本種のカーバメート剤に対する抵抗性の発達が確認された。そのため、農薬万能の防除を改め害虫を許容範囲内に抑えて管理する総合的害虫管理による防除が望まれるようになった。その試みの 1 つとして抵抗性イネの育種が行われた。日本型のイネ品種には抵

抗性を示す品種はなかったが、1966年に腰原らによって一部の東南アジア原産のインド型イネ品種が本種に対して抵抗性を有することが見出された。その後、東北農業試験場にてその抵抗性を日本型イネに導入した水稻中間母本6号が育成された。この品種はインド型品種の中で高度に抵抗性を示した Lepe-dumai と日本稲の優良品種 Toyonibshiki の組み合わせで戻し交配が繰り返され、日本稲の草型でツマグロヨコバイ抵抗性を示す系統の選抜を進めて育種された。1986年に農林水産省に品種登録されている。この抵抗性品種はいずれも、抵抗性遺伝子 *GRH2* 遺伝子と *GRH4* 遺伝子の両方を有しており、ツマグロヨコバイに対して高度に抵抗性を示す。しかしながら、なぜこれらの遺伝子群を持つ水稻が抵抗性を示すのかは明らかとなっていない。

2. 研究の目的

本研究はこの抵抗性のメカニズムを全容解明するとともに、この遺伝子の機能を近似遺伝子系統 (Near Isogenic Line) の水稻を用いて植物二次代謝産物の観点から明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

供試虫及び供試昆虫

(1) 供試昆虫

本実験に供試したツマグロヨコバイ (*Nephotettix cincticeps* Uhler) は本学昆虫飼育室で温度 25℃、16 時間照明 8 時間暗黒下でイネ幼苗 (品種: Toyonishiki 及び Natsuhikari) を与えて累代飼育している 2 齢幼虫を用いた。

(2) 供試植物

本実験で供試した耐虫性水稻

(Lepe-dumai) および感受性水稻

(Toyonishiki) は本学圃場にて栽培したも

のをを用いた。

(3) 生物試験方法

生物試験装置は下の図 (図 1) に示したようなものである。装置の組み立ては、まず有底ガラス管 (18mm φ × 60mm) に被検液を 0.45ml 入れ、薄く延ばしたパラフィルムの膜でガラス管の口を閉じ、口の外側を包帯で巻いた。そして、両切りガラス管 (20mm φ × 70mm) の一方の口を水で湿らせたポリウレタンで塞ぎ、もう一方の口に先ほどの被検液を入れた有底ガラス管を挿しこんだ。

この装置の両切りガラス管内にツマグロヨコバイ 2 齢幼虫を 8 頭入れ、装置ひとつを 1 区とした。装置は 2 日ごとに新しく取り替え、5 区を 1 連として 5 日間の生存率を調べた。

被検液は pH 7 になるように 2 M KOH 又は 2 M HCl を用いて調製した。そして、全ての被検液には摂食刺激物質として 2% 濃度のシュクロースを加えた。また、2% シュクロース水溶液をコントロールとして設けた。

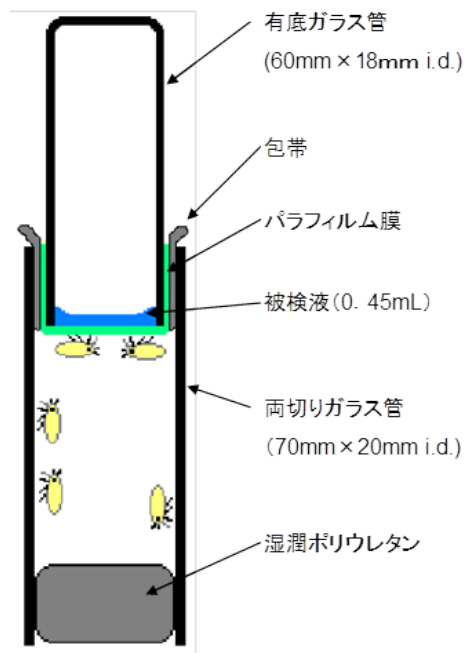


図 1 パラフィルム薄膜法による生物試験装置

(4) 水溶性画分の調整

出穂前の *Lepe-dumai* の茎葉部 (1.65kg) を約 5cm 長に刻み、90%メタノール/水に室温暗所で 3 日間浸漬した後、抽出液を濾別した。再び新たな 90%メタノール/水に 3 日間浸漬し、同様の操作でさらに抽出液を得た。得られたメタノール抽出液を減圧下で濃縮乾固し、メタノール抽出物 (65.0g) を得た。このメタノール抽出物を水に転溶した後、ヘキサンで脱脂して水溶性画分 (53.6g) を得た。

(図 2 参照)

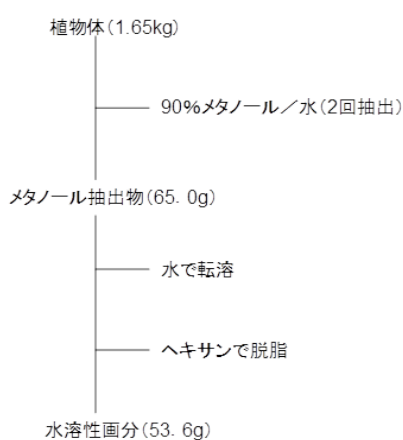


図 2 植物体から水溶性画分の調整

(5) 分画方法

Lepe-dumai 水溶性画分 (26.0g 茎葉 0.8kg 相当量) を水に転溶後、エーテル、酢酸エチル、水飽和ブタノールで順次抽出し、分配した。そして、それぞれの溶媒を減圧除去してエーテル層 (0.30g)、酢酸エチル層 (0.43g)、水飽和ブタノール層 (2.76g)、水層 (21.97g) を得た。

この中から水層 (11.0g 茎葉 0.4kg 相当量) を逆相系の ODS オープンカラム (100~200mesh) にチャージして、水、20%メタノール/水、40%メタノール/水、メタノールで順次溶出し、ODS 水溶出画分 (7.78g)、ODS20%メタノール溶出画分 (0.99g)、

ODS40%メタノール溶出画分 (0.24g)、ODS メタノール溶出画分 (0.06g) を得た。

これらの画分から ODS 水溶出画分 (7.78g 茎葉 300g 相当量) を陰イオン交換樹脂オープンカラム (Dowex 1×8、Formate form、200~400mesh、18mm φ×320mm) にチャージし、水と 20Nギ酸で順次溶出した。それぞれ溶媒を減圧除去し、中・塩基性画分 (6.30g) と酸性画分 (0.99g) を得た。中・塩基性画分を陽イオン交換樹脂オープンカラム (Dowex 50W×8、H⁺ form、200~400mesh、18mm φ×365mm、) にチャージし、水と 2Nアンモニア水で順次溶出した。それぞれ溶媒を減圧除去して、中性画分 (4.25g) と塩基性画分 (0.25g) を得た。

塩基性画分 (0.25g 茎葉 300g 相当量) を逆相系の HPLC でリテンションタイムに従って 6 つの画分 (Fr. 1~6) に分画し、未同定の画分 Fr. 4 を得た。さらに Fr. 1 を別の逆相系の HPLC によって 4 つの画分 (Fr. A~D) に分画した。(図 3 参照)

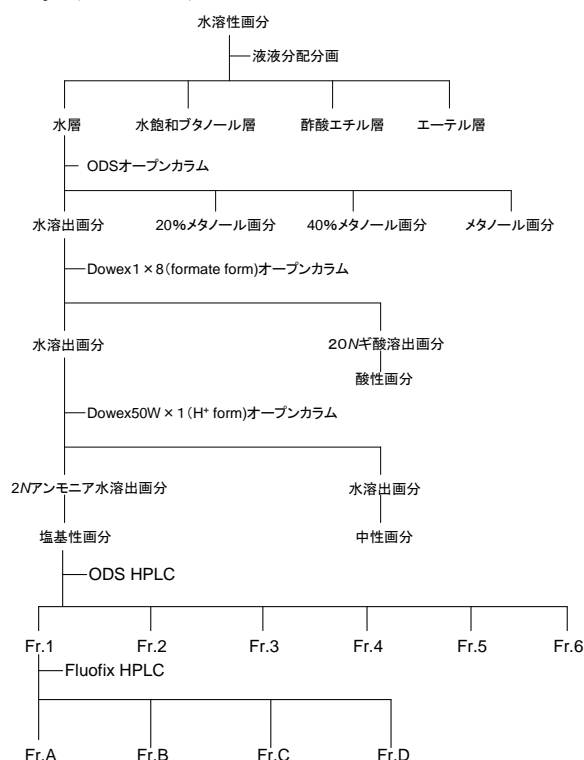


図 3 *Lepe-dumai* の水溶性画分の分画方法

4. 研究成果

(1) 植物抽出画分の活性

図4はツマグロヨコバイ耐虫性水稻 Lepe-dumai の水溶性画分(イネ茎葉 1 g 当量/ml)を図2-1に示した装置を用いてツマグロヨコバイ 2 齢幼虫に与えたときの生物試験の結果である。幼虫の生存率を生存数から算出した。[生存率 = { (一連全体の生存数) ÷ (最初に入れた一連全体の数) } × 100] また、生物検定の被検液の濃度はイネ茎葉部 1 g 当量/ml である。

一方、Lepe-dumai の水溶性画分を与えた場合には 5 日間で本種のほとんどが死亡する。供試した Lepe-dumai 水溶性画分中にも 2% のシュクロースが含まれているにも関わらず、供試虫のほとんどが死亡し、強い生存抑制活性がみられた。生物検定の途中に供試虫をイネ茎葉 1 g 当量/ml の水溶性画分から 2% シュクロース水溶液に移し替えて飼育すると、本種は正常に生存できる。このことから、Lepe-dumai が示す高度なツマグロヨコバイ抵抗性の要因は摂食阻害物質の存在に基づくことが明らかとなり、抵抗性遺伝子 *GRH2* 遺伝子と *GRH4* 遺伝子の両方は、これら摂食阻害物質の生産に関与しているものと推察された。そこで、この推察を明らかとするために、この水溶性画分からの活性成分の単離・精製を試みた。

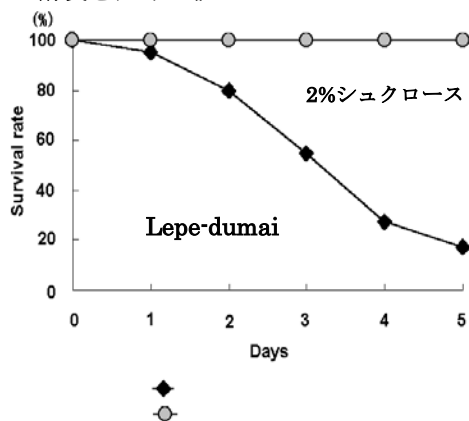


図4 Lepe-dumai 水溶性画分の活性

(2) 水溶性画分の液相間の分配を利用して分画した画分の活性

活性を有する Lepe-dumai 水溶性画分をエーテル層、酢酸エチル層、水飽和ブタノール層、水層に分配した。それぞれの生物検定を行った結果、水層に元の水溶性画分と同等の強い活性が見られ、エーテル層、酢酸エチル層、水飽和ブタノール層には活性がみられない。よって、この水層を逆相系の ODS オープンカラムを用いてさらに分画した。

(3) 水層の ODS 分画画分の活性

活性の有する水層を ODS オープンカラムによって、ODS 水溶出画分、ODS20%メタノール/水溶出画分、ODS40%メタノール/水溶出画分、ODS メタノール溶出画分に分画した。それぞれ生物検定に供したところ、ODS 水溶出画分は元の水層と同等の強い活性が見られる。一方、他の 3 つの画分では高い生存率を示し、活性がみられなかった。さらに、この ODS 水溶出画分をイオン交換樹脂オープンカラムによって分画した。

(4) ODS 水溶出画分のイオン交換樹脂分画画分の活性

強い活性が認められている ODS 水溶出画分を陰イオン交換樹脂オープンカラムによって、水で溶出し、次いで 20N のギ酸で溶出した。水溶出部から中・塩基性画分を、20N ギ酸溶出部から酸性画分をそれぞれ得た。さらに、中・塩基性画分を陽イオン交換樹脂オープンカラムによって、水、次いで 2N のアンモニア水で溶出した。水溶出部から中性画分を、2N アンモニア水溶出部から塩基性画分を得た。酸性画分・中性画分・塩基性画分それぞれを生物検定に供した。その結果、酸性画分と中性画分にはほとんど活性がみられないが、塩基性画分には強い活性がみられた。ODS 水溶出画分の活性が塩基性画分の活性とほぼ等しいことから、ODS 水溶出画分の活性

は塩基性画分に存在している。塩基性画分の活性は元の ODS 水溶出画分ほど強くはない。その原因は陽イオン交換樹脂を用いた際、中性画分は損失なく水で溶出してきたが、塩基性画分のあらゆる成分が 1/2 近く溶出してこないためである。よって、以後の生物検定は生葉 2g 当量/ml である。この塩基性画分を逆相系の充填剤の HPLC でさらに分画した。

(5) 塩基性画分の ODS HPLC 分画画分の活性

活性を有する塩基性画分を逆相系の ODS HPLC (SHISEIDO CAPCELL PAC C18 UG120 Å 5 μm 10mm φ × 250mm、100%水、3.0ml/min、UV210nm) により分析した。さらに、リテンションタイムに従い、Fr. 1 (tR=0~7.54min.)、Fr. 2 (tR=7.52~11.2min.)、Fr. 3 (tR=11.2~12.6min)、Fr. 4 (tR=12.6~25.0min)、Fr. 5 (tR=25.0~26.8min) Fr. 6 (tR=26.8~31.0min) の 6 つの画分に分画し、生物検定に供したところ、Fr. 1~6 を全て足したときのみ、元の塩基性画分の活性に等しくなることが分かった。また、Fr. 1-6 のうち Fr. 1 が最も強い活性を示すことが分かった。(図 5 参照)

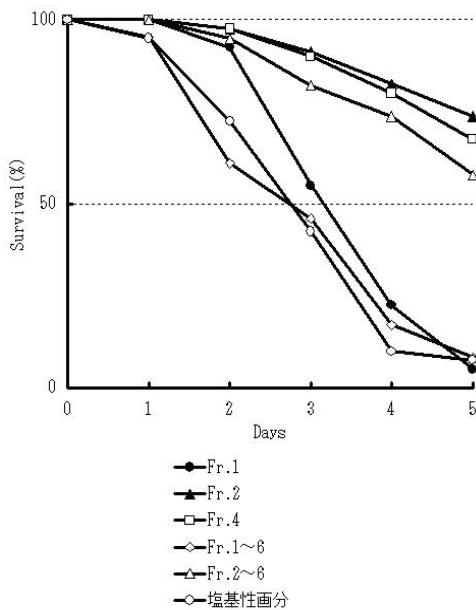


図 5 HPLC 分画画分の活性

これら活性の認められたフラクションのうち、Fr. 2 は 2 つの化合物から、Fr. 3, 5, 6 は単独の化合物から構成されており、各種機器分析の結果から、Fr. 2 の活性成分は、L-Isoleucine および L-Leucine、Fr. 3 の活性成分は、Cytidine、Fr. 5 の活性成分は、L-Phenylalanine、Fr. 6 の活性成分は、Nicotinamide と同定した。

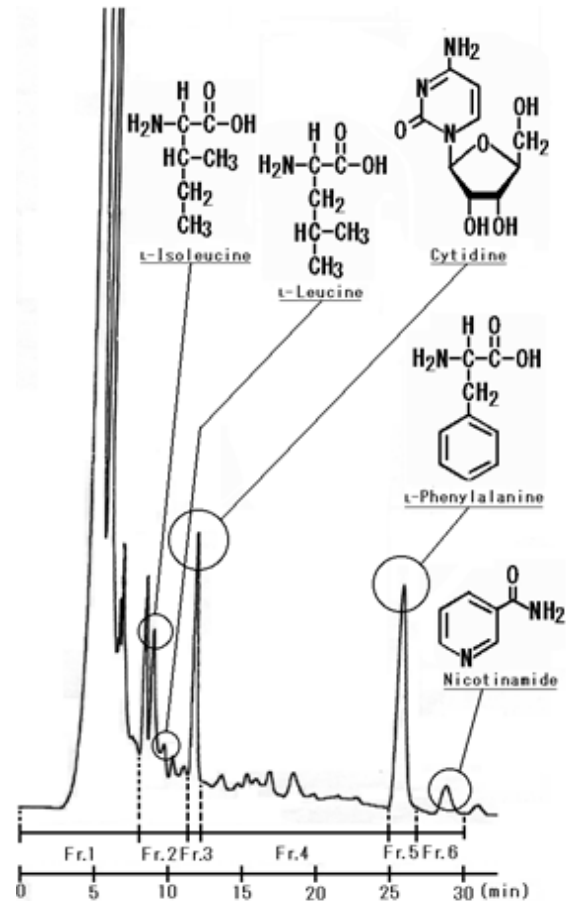


図 6 HPLC プロファイルと活性成分

(6) Fluofix カラムを用いた Fr. 1 の HPLC 分画画分の活性

単独で強い活性がみられる Fr. 1 を逆相系の HPLC (NEOS HPLC PACKED COLUMN Fluofix 120E 10mm φ × 250mm、水 : TFA=100 : 0.005、3.0ml/min、UV210nm) を用いて分析した。リテンションタイムに従って Fr. A (tR=0.00~8.12min)、Fr. B (tR=8.12~9.97min)、

Fr. C ($tR=9.97\sim 11.7\text{min}$)、FrD ($tR=11.7\sim 25.0$) の4つの画分に分画した。各画分を生物検定に供した結果、Fr. Aには活性がみられないものの、Fr. B~Cにはそれぞれ単独で活性が見られ、特に Fr. C に強い活性がみられた。

活性の認められた画分を各種機器分析に供し、Fr. Bの活性成分を1-Methylnicotinamide、Fr. Cの活性成分をD-Alanylglycine、Fr. Dの活性成分を4-Aminobutanamideと、単離・同定した。

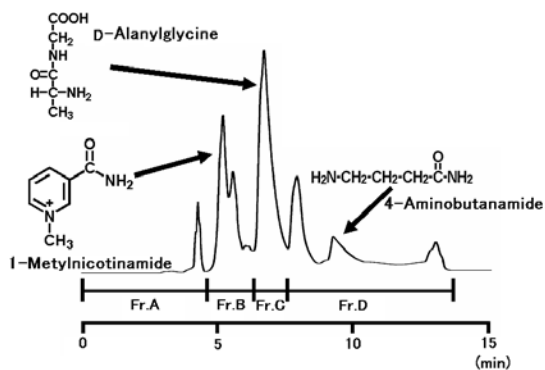


図7 Fr. 1のHPLCプロファイルと活性成分の構造

(7) Fr. 4の活性成分の同定

塩基性画分の分画画分において活性を有するFr. 4を逆相のODS HPLC(SHISEIDO CAPCELL PAK C₁₈ UG120Å 5μm 10mmφ×250mm、100%水、3.0ml/min、RI)により分析した。さらに、リテンションタイムに従い、主要なピーク、すなわちFr. 4-1($tR = 14.9\text{min.}$)、Fr. 4-2($tR = 15.8\text{min.}$)の2つの画分に分画した。各画分を生物検定に供した結果、いずれの画分も弱いながら活性を示し、これら2つの化合物も活性発現に関与しているものと考えられた。

これらの化合物を各種機器分析に供し、4-1及び4-2の構造を*N*-(1-Deoxy-D-fructos-1-yl)-L-isoleucineならびに*N*-(1-Deoxy-D-

-fructos-1-yl)-L-leucineと同定した。この化合物を合成し、その分析結果と比較しても矛盾はなかった。

これら10種の化合物を合わせたときのみ、元の塩基性画分の活性に等しい結果が得られ、これらの化合物群がツマグロヨコバイ抵抗性品種の抵抗性の要因と考えられた。

抵抗性遺伝子 *GRH2* 遺伝子と *GRH4* 遺伝子の機能解明までは至らなかったものの、これらの遺伝子が先に述べた10種の化合物群の合成に関与しているものと思われた。

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0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

○取得状況 (計0件)

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

金 哲史 (KIM CHUL-SA)

高知大学・教育研究部総合科学系・教授

研究者番号：30234339

(2) 研究分担者

該当なし

(3) 連携研究者

該当なし