

平成 28 年 5 月 19 日現在

機関番号：82112

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25450075

研究課題名(和文) 抵抗性品種に加害性を示すツマグロヨコバイ " バイオタイプ " の適応機構の解明

研究課題名(英文) Adaptation mechanism of virulent biotype of the green rice leafhopper to resistant varieties of rice

研究代表者

服部 誠 (Hattori, Makoto)

国立研究開発法人農業生物資源研究所・加害・耐虫機構研究ユニット・研究専門員

研究者番号：60370673

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

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は抵抗性イネ品種から吸汁できずに餓死するが、野外虫を多数さらすと抵抗性品種を吸汁可能な加害性バイオタイプが選抜される。本加害性は虫が吸汁時に吐出する唾液成分の遺伝的変異に起因すると考え、唾液タンパク質成分を同定したのち、cDNA配列をバイオタイプ間で比較した。その結果、加害性バイオタイプの唾液タンパク質の1つに1塩基の欠損が存在することがわかった。そこで加害、非加害バイオタイプを交配して得たF2分離世代を作成して、加害性とゲノムDNA変異との連鎖の有無を個体別に調べた。しかし、変異部分を含むゲノム領域に重複が存在し、正確な判別までには至らなかった。

研究成果の概要(英文)：The green rice leafhopper (GRH) is a major insect pest of rice in Japan. Field-collected GRHs normally do not survive on resistant rice varieties because they fail to feed on the phloem sap of these varieties. However, after rearing them on the resistant varieties, we found virulent GRHs that were capable of feeding on the resistant varieties and established biotypes. Based on the hypothesis that virulence is associated with a mutation in salivary components, we compared cDNA sequences of the salivary proteins among different biotypes. As a result, the mutation with 1 base pair deletion causing the frame shift was found in a protein of the virulent biotype. We examined correlation between the virulence and the mutation using individual insects in the F2 generation of crosses between virulent and avirulent GRH biotypes. However, because the genome DNA region containing the mutation is repeated, we have not succeeded to discriminate the genotype of insects.

研究分野：応用昆虫学

キーワード：バイオタイプ ツマグロヨコバイ 唾液タンパク質

### 1. 研究開始当初の背景

(1) ツマグロヨコバイは水稻の重要害虫であり、北陸や東北地域では吸汁害を引き起こし、西南暖地では萎縮病や黄萎病を媒介することにより被害を与える。本種の防除は基本的には農薬に依存しているが、薬剤によっては感受性の低下が問題となっている。さらに近年、環境保全型農業への指向の高まりとともに、抵抗性品種の育成が進められ、'彩のかがやき'(抵抗性遺伝子 *Grh1* 保有)や'大地の風'( *Grh3* 保有)が作付けされるようになった(藤井ら, 2005)。しかし、トビイロウンカやヘシアンバエの抵抗性品種において、広範な作付により、加害性バイオタイプの出現を招き、抵抗性の打破(breakdown)に至った事例が報告されている(Pathak and Khush, 1979; Ratcliffe et al., 1994)。従って、抵抗性品種の普及に際してはバイオタイプ対策を考慮に入れることが不可欠であり、そのための基礎的知見として加害性バイオタイプの抵抗性品種に対する適応機構を明らかにすることが必要である。

(2) インド型イネに由来するツマグロヨコバイ抵抗性遺伝子としてこれまで *Grh1, 2, 3* が知られており、加えて我々は Nona Bokra から *Grh7(t)* を見出し、DNA マーカー育種により、*Grh7(t)* を導入したコシヒカリを作出しつつある。しかし、これら抵抗性品種を野外採集したツマグロヨコバイ集団に与え室内選抜を繰り返すと、抵抗性品種に加害性を示すバイオタイプが選抜される。交配実験により、加害性を決定する因子はいずれも単一遺伝子支配であることが示唆されている。また、加害性バイオタイプの摂食行動を電気的測定法(EPG)により解析したところ、野生系統では抵抗性品種の篩管からの吸汁が阻害される(栄養が摂取できない)のに対し、加害性バイオタイプでは篩管吸汁が可能となっており、抵抗性品種に対し完全に適応していることが確認された。このことは、加害性バイオタイプでは篩管吸汁成立にかかわる何らかの単一因子で変異が生じていることを示唆している。その因子として最も可能性が高いのは、虫が篩管から吸汁する際にイネに注入する唾液成分と考えられることから、ツマグロヨコバイの唾液から酵素類を含むタンパク質を単離し、それら遺伝子をクローニングするとともに機能解析を進めてきた(Hattori et al., 2010; Hattori et al., 2012)。

(3) ツマグロヨコバイは関東、北日本と西南暖地の個体群間で明確な生態の違いがあることが知られている(寒川, 1983)。よって、*Grh1, 2, 3, 7(t)* の抵抗性品種に対する加害性バイオタイプを異なる地域(つくば、鹿児島、上越)で採集した野生系統から選抜を進めている。本課題ではつくば個体群から作出したバイオタイプを用いて解析するのを

基本とするが、鹿児島、上越個体群で作出したバイオタイプも活用して共通の変異を探すことにより、候補の絞り込みが容易になると考えられる。

### 2. 研究の目的

イネの抵抗性品種に対してツマグロヨコバイの加害性バイオタイプがいかにして適応しているかを明らかにする。そこで我々はツマグロヨコバイが篩管吸汁に際して吐出している唾液タンパク質に着目し、その遺伝的変異を見つけることで目的達成を目指す。すなわち、抵抗性品種加害性および非加害性バイオタイプの唾液タンパク質を2次元電気泳動で分離することにより、バイオタイプ間で異なるスポットを探索する一方、高感度分析法で可能な限り多くの唾液タンパク質を同定し、個々のタンパク質の遺伝子配列を比較することにより、加害性に関する遺伝子変異を探索する。見つかった遺伝子変異と抵抗性品種加害性の連鎖を確認するため、加害性および非加害性バイオタイプ交配による F<sub>2</sub> 分離世代を個体別に調べる。さらに、候補遺伝子を RNAi でノックダウンした虫の抵抗性品種上での生存率への影響を調べるなどして、加害性がいかなる遺伝子変異により決定されているかを明らかにする。

### 3. 研究の方法

(1) バイオタイプ間で差異のある唾液タンパク質を探索するため、加害性および非加害性バイオタイプの唾液腺摩砕物を二次元電気泳動で分離し、ゲル上で差異が見られるタンパク質スポットを探索・同定し、その遺伝子配列変異を調べた。

(2) これまでプロテインシークエンサーによりツマグロヨコバイ唾液から9種のタンパク質を同定しているが、加害性バイオタイプで起こっていると考えられる変異の探索対象となる唾液タンパク質の範囲を拡大するため、最新のプロテオーム解析手法であるゲルフリー-HPLC-MS/MSにより微量な唾液タンパク質を同定した。

(3) 同定した唾液タンパク質60種以上からできるだけ多くのタンパク質を対象として、その cDNA 配列を *GRH1, 2, 3, 7(t)* 加害性、非加害性バイオタイプ間で比較し、各バイオタイプで特異的な変異を探索した。その際、つくば個体群由来のバイオタイプで比較することを基本とし、さらなる変異の絞り込みのために鹿児島、上越個体群由来のバイオタイプを適宜用いた。

(4) *Grh7(t)* 加害性バイオタイプの遺伝様式は予備的実験で1遺伝子支配と推測されていたが、本バイオタイプで遺伝子変異が見つかったことから、改めて交配実験により詳細に解析した。*Grh7(t)* 加害および非加害バイ

タイプを交配して得た F1, F2 および戻し交配世代の孵化幼虫 5-7 頭を *Grh7* 保有の抵抗性芽出しイネが入った試験管内に放飼し、6 日後に生死を判定した。なお、各組み合わせにおいて 40-50 頭を検定に供した。

(5) 唾液タンパク質の cDNA 配列の比較により加害性バイオタイプで見つかった変異（遺伝子型）が、実際に加害性（表現型）と連鎖しているかどうかを個体別に調べた。すなわち、加害性および非加害性バイオタイプを交配して得た F2 分離世代を作出し、成虫期に 1 個体ずつ抵抗性品種を 2 日間与え、排泄物の pH により師管吸汁の有無を判定した。一方、同じ個体の胸部からゲノム DNA を抽出して、PCR により変異箇所の配列を調べた。

(6) cDNA 配列に変異が見つかった唾液タンパク質の遺伝子配列を基に合成した二本鎖 RNA（dsRNA）を 4 齢幼虫に注射したあと、抵抗性イネを与えて生存率への影響を調べた。また、羽化 1 日後の雌成虫に dsRNA を注射して、次世代孵化幼虫における生存率も調べた。

#### 4. 研究成果

(1) つくば個体群に由来する各バイオタイプの唾液腺抽出物を二次元電気泳動で展開したところ、*Grh3* 加害性バイオタイプでは、2 個並ぶ分子量 22kDa のスポットの一つが無いことがわかった（図 1）。

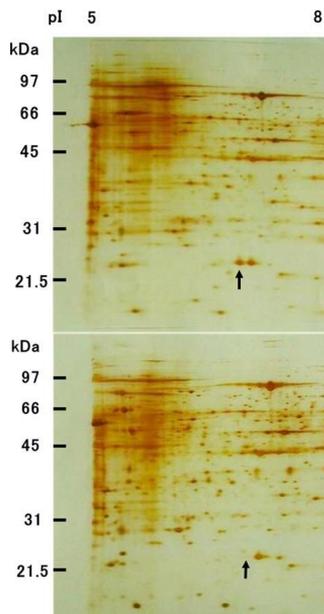


図 1 唾液腺磨砕物の 2 次元電気泳動像 *Grh3* 加害性バイオタイプでは 2 個並ぶ 22kDa のタンパク質の左側がない（矢印）。  
上: *Grh3* 非加害性バイオタイプ  
下: *Grh3* 加害性バイオタイプ

しかし、上越個体群から作出した *Grh3* 加害、非加害バイオタイプで比較をしたが、同様な違いは認められなかった。

(2) ツマグロヨコバイから集めた唾液を直接 HPLC-MS/MS で解析することにより、新たに 63 個のタンパク質を同定した。その中には、アブラムシの唾液で見ついている carbonic anhydrase, aminopeptidase N-like, apolipoprotein, regucalcin ホモログが含まれていた。一方、同定したうちの半数近くはツマグロヨコバイだけで特異的に存在する機能未知のタンパク質であった。

(3) 約 20 種の唾液タンパク質の cDNA 配列配列について、つくば個体群由来の *Grh1*, 2, 3, 7(*t*) 加害性バイオタイプ比較したところ、各バイオタイプで以下のような変異が見つかった。

*Grh1* および *Grh7(t)* 加害性バイオタイプ: 1 塩基欠失 (同一タンパク質の cDNA 配列上で各々異なる場所で変異) *Grh2* 加害性バイオタイプ: 3 塩基 (反復配列) の挿入、*Grh3* 加害性バイオタイプ: アミノ酸変異を伴う 3 塩基置換 (AAC が GGT) または 1 塩基 (C) 欠失、(図 2)

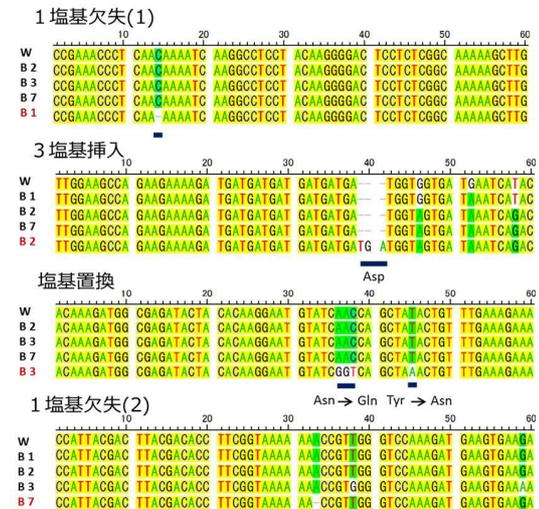


図 2 *Grh1*, *Grh2*, *Grh3*, *Grh7(t)* 加害性バイオタイプ (B1, B2, B3, B7) で検出された遺伝子変異、W は非加害性バイオタイプ (野生型) 異なる 3 種の唾液タンパク質の cDNA 配列の一部を抜粋して示した。1 番目と 4 番目は同一タンパク質の異なる領域。

つくば個体群由来のバイオタイプから得られた上記の変異が上越および鹿児島個体群由来のバイオタイプの cDNA にも存在するかどうかを調べたところ、*Grh1* と *Grh7(t)* 加害性バイオタイプでは同様な変異が見つかった。一方、*Grh2* と *Grh3* 加害性バイオタイプでは非加害性バイオタイプと違いがなかった。

(4) *Grh7(t)* 加害および非加害系統を交配して得た F1, F2 および戻し交配世代の検定より、加害性は常染色体上の優性単一遺伝子に支配されていることを確認した(図 2)。

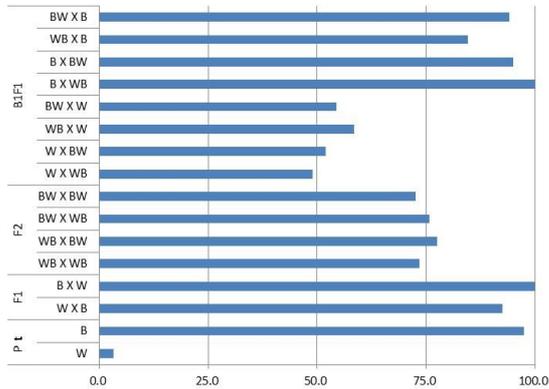


図3 *Grh7(t)*加害性バイオタイプの遺伝様式 横軸は抵抗性品種上での生存率

B: *Grh7(t)*加害バイオタイプ

W: *Grh7(t)*非加害バイオタイプ

(5) *Grh1* と *Grh7(t)* 加害性バイオタイプの cDNA で見つかった変異を個体別に確認するため、それぞれ加害性および非加害性バイオタイプを交配して得た F2 分離集団を作成して、成虫 1 個体ずつについて、加害性の有無とゲノム DNA 変異との連鎖解析を行った。しかし、変異箇所を含むゲノム DNA に重複が存在していたことから、変異を識別することができなかった。

(6) *Grh1* と *Grh7(t)* 加害性バイオタイプで変異が見つかった唾液タンパク遺伝子の dsRNA を注射した個体を抵抗性品種に与え、生存率への影響を調べたが明瞭な変化を見出せなかった。ただし、当該遺伝子の転写量が実際に下がっていたかどうかの確認実験はできなかった。

本研究では cDNA レベルで *Grh1* あるいは *Grh7(t)* 加害性バイオタイプに特異的と推測される変異を見出したが、同定した 60 種以上の唾液タンパク質のうち、約 20 種のタンパク質の配列しか比較を終えていない。したがって、今後残りの唾液タンパク質について配列を調べることで *Grh2* あるいは *Grh3* 加害性バイオタイプに特異的な変異が見つかる可能性があると考えられる。また、変異が見つかった候補タンパク質を RNAi 実験でノックダウンを試みたものの、生存率への影響を明確に示すことができなかったが、この点については CRISPR 等のゲノム編集技術により完全にノックアウトした個体を用いて調べる必要がある。

#### <引用文献>

Pathak, MD, Khush, GS Studies of varietal resistance in rice to the brown planthopper at the International Rice Research Institute, In: Brown Planthopper: Threat to Rice Production in Asia, 1979, 285-301

Ratcliffe R, Safranski G, Patterson F, Ohm H, Taylor P, Biotype Status of Hessian Fly (Diptera: Cecidomyiidae) Populations from the Eastern United States and Their Response to 14 Hessian Fly Resistance Gene, Journal of Economic Entomology Volume 87, 1994, 1113-1121

藤井潔、早野由里子、荒川誠、イネ病害。虫複合抵抗性品種の育成とその普及、植物防疫、59、2005、226-230

Hattori M, Tsuchihara K, Noda H., Konishi H, Tamura Y, Shinoda T, Nakamura M, Hasegawa T, Molecular characterization and expression of laccase genes in the salivary glands of the green rice leafhopper, *Nephotettix cincticeps*, Insect Biochemistry and Molecular Biology 40, 2010, 331-338

Hattori M, Nakamura M, Komatsu S, Tsuchihara K, Tamura Y, Hasegawa T, Molecular cloning of a novel calcium-binding protein in the secreted saliva of the green rice leafhopper *Nephotettix cincticeps*, Insect Biochemistry and Molecular Biology, 42, 2012, 1-9

寒川一成、佐藤昭夫、稲品種に対する反応を異にする上越および筑後産ツマグロヨコバイ個体群の形態および生理的形質の比較。応動昆、27 巻、1983、22-27

#### 5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計3件)

Nakamura M, Hattori M, Purification of  $\alpha$ -glucosidase from the salivary glands of the green rice leafhopper, *Nephotettix cincticeps* (Uhler) (Hemiptera: Cicadellidae), and its detection in the salivary sheath, Applied Entomology and Zoology, 査読有、48(4)、2013、489-497  
DOI: 10.1007/s13355-013-0210-6

Matsumoto Y, Suetsugu Y, Nakamura M, Hattori M, Transcriptome analysis of the salivary glands of *Nephotettix cincticeps* (Uhler), Journal of Insect Physiology, 査読有、71、2014、171-176  
DOI: 10.1016/j.jinsphys.2014.10.010

Hattori M, Komatsu S, Noda H, Matsumoto Y, Proteome analysis of watery saliva secreted by green rice leafhopper, *Nephotettix cincticeps*, PLoS ONE, 査

読有、10(4)、2015、e0123671  
DOI: 10.1371/journal.pone.0123671

〔学会発表〕(計4件)

服部 誠、松本 由記子、田村 泰盛  
(2014) 抵抗性イネ品種に対するツマグロヨコバイの加害性バイオタイプの適応機構について. 学会名 日本応用動物昆虫学会大会、発表年月日、2014年3月26日~2014年3月28日、高知大学(高知市)

服部 誠、松本 由記子、田村 泰盛、平江 雅宏(2015) 抵抗性品種加害性バイオタイプにおけるツマグロヨコバイ唾液タンパク質の遺伝的変異 第59回日本応用動物昆虫学会大会 2015年3月26日~2015年3月28日、山形大学(山形市)

松本 由記子・末次 克行・中村 匡利・小松 節子・野田 博明・服部 誠(2015) ツマグロヨコバイ唾液腺のトランスクリプトームおよび唾液タンパク質のプロテオーム解析 第59回日本応用動物昆虫学会大会、2015年3月26日~2015年3月28日、山形大学(山形市)

Hattori M, Hirae M, Matsumoto Y, Tamura Y (2015) An attempt to identify the genetic variation in the green rice leafhopper (*Nephotettix cincticeps*) associated with virulency against resistant rice varieties using its salivary protein sequences ESA2015 meeting, 2015年11月12日~2015年11月15日、Minneapolis(USA)

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況(計 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

服部 誠 (HATTORI, Makoto)  
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：60370673

(2) 研究分担者

松本 由記子 (MATSUMOTO, Yukiko)  
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：80414944

(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：4034399