

インド型イネ品種の保有するトビイロウンカ 抵抗性遺伝子 *BPH26* の単離とその利用に向けた展望

国立研究開発法人 農業生物資源研究所 昆虫科学研究領域
加害・耐虫機構研究ユニット

た 村 やす もり
田 村 泰 盛
やす い ひでし
安 井 秀

国立大学法人 九州大学大学院農学研究院 資源生物科学部門 植物育種学分野

はじめに

トビイロウンカ (*Nilaparvata lugens* Stål) はイネを唯一の寄主植物とする単食性の吸汁性昆虫であり、口針と呼ばれる針状の口をイネに挿入し、栄養豊富な篩管液を吸汁することで、イネを枯死させる。トビイロウンカは毎年、6月中旬から7月中旬の梅雨時に、前線の南側を吹く下層ジェット気流に乗り、中国南部などから日本に飛来侵入して増殖する(松村・真田, 2014)。日本ではイネの収穫後は餌がなくなり、寒さにも弱いため、越冬できずに死滅する。

トビイロウンカ抵抗性品種として知られるインド型イネ品種の‘ADR52’は、*BPH25*と*BPH26*という二つの抵抗性遺伝子を保有し、この二つの遺伝子が共存すると、それぞれの遺伝子単独では効かない、近年日本に飛来するトビイロウンカにも抵抗性を発揮することがわかっている(Myint et al., 2012)。

今回我々は、*BPH26*をマップベースクローニング法で単離することに成功した(Tamura et al., 2014)。本稿では、明らかになった*BPH26*の配列や機能、また今後のトビイロウンカ抵抗性遺伝子の利用法等について紹介する。

なお、本稿ではイネ遺伝子表記法(McCouch et al., 2008)に基づき、トビイロウンカ抵抗性遺伝子の遺伝子記号を、アルファベット大文字3文字と数字(斜体)で記述した。

I トビイロウンカ抵抗性遺伝子の探索の歴史

トビイロウンカ抵抗性を保有するイネは、1960年代半ばから国際イネ研究所(IRRI; International Rice Research Institute)で探索が行われた。Brar et al. (2009)

によると、44,335ものイネ系統がトビイロウンカ抵抗性のスクリーニングに用いられたことが記されており、いかに大規模な探索が行われたかがわかる。

これらのスクリーニングで得られた抵抗性品種のうち、インド型イネ品種の‘Mudgo’の持つ抵抗性遺伝子は*BPH1*と名付けられ、この遺伝子を導入した‘IR26’という品種が1973年に実用化された。‘IR26’は、フィリピン、インドネシア、ベトナム等、広範囲の国々で栽培されたが、この品種を加害できるタイプのトビイロウンカ(*BPH1*-加害性バイオタイプ)が出現し、わずか3年程度で抵抗性が崩壊してしまった(Brar et al., 2009)。その後、トビイロウンカの寄主植物ではない野生イネなどからも抵抗性遺伝子が探索され、現在までに30以上もの抵抗性に寄与する遺伝子の存在が報告され(Fujita et al., 2013)、これらの抵抗性遺伝子を用いた実用品種の開発が進められている。

これらの抵抗性遺伝子のうち、現在までに単離されて塩基配列まで明らかになった遺伝子は、野生イネ(*Oryza officinalis*)由来の*BPH14*(Du et al., 2009)、インド型イネ品種(*O. sativa*)由来の*BPH26*(Tamura et al., 2014)と*BPH17*(単離報告の論文では*BPH3*として誤用)(Liu et al., 2014)の3例しかない。抵抗性遺伝子の塩基配列を明らかにして機能を解析することは、遺伝子の持続的利用法の開発に有用な知見を与えると期待される。

II トビイロウンカ抵抗性遺伝子 *BPH26* の単離

*BPH26*は、抵抗性品種の‘ADR52’と感受性品種の‘台中65号’を用いたQTL解析により、‘ADR52’の第12染色体の長腕に見いだされた遺伝子である(Myint et al., 2012)。DNAマーカーで遺伝子型を調べながら‘ADR52’に‘台中65号’を繰り返して交配して作成したBC₆F₃の分離集団を用い、連鎖解析という手法によって、この遺伝子の座乗する染色体の候補領域を狭め、染色体上の約135 kbの範囲に候補領域を限定した(図-1)。イネのゲノムは‘日本晴’という品種で解読されており、DNAの塩基配列が公開されている。‘日本晴’(トビイロウンカには感受性)のゲノムDNAの塩基配列から、候補領

Identification of a Brown Planthopper Resistance Gene *BPH26* from *Oryza sativa* L. ssp. Indica Cultivar and Strategy for its Future Utilization. By Yasumori TAMURA and Hideshi YASUI
(キーワード: イネ, トビイロウンカ, トビイロウンカ抵抗性遺伝子, *BPH26*)

域の 135 kb の部分の塩基配列を抜き出し、イネアノテーションプロジェクトデータベース (RAP-DB: Rice Annotation Project Database) を用いて配列中に存在が予測される遺伝子を調べたところ、候補領域中に「病害抵抗性遺伝子」に類似した配列があることが示唆された。この配列部分に該当する‘ADR52’のゲノム DNA の塩基配列を読んだところ、この領域に病害抵抗性遺伝子様の遺伝子が一つ乗していることが示唆された。そこで、この予測遺伝子の配列情報を元に cDNA を単離し、実際にその遺伝子の mRNA が発現していることを確かめた。これを抵抗性にかかわる候補の遺伝子とし、候補遺伝子の全長を含む‘ADR52’のゲノムの断片を、感受性品種の‘台中 65 号’に形質転換し、形質が相補されるか (感受性品種が抵抗性を示すか) を確かめた。

候補遺伝子を感受性品種に形質転換で導入した系統 (1A5) と戻し交雑法によって作出した準同質遺伝子系統 (*BPH26*-NIL), *BPH26* を持たない感受性品種上でのトビイロウンカの生存数を調べたところ、候補遺伝子を導入した二つの系統ではいずれも、トビイロウンカ放

飼の 5 日後には生存数が減少した (図-2 A)。よって、この候補遺伝子がトビイロウンカ抵抗性遺伝子 *BPH26* であることが示された。

この抵抗性遺伝子の機能を調べるために、*BPH26* を導入した系統と感受性品種上では、トビイロウンカの吸汁行動がどう異なるかを調べた。測定には電気的測定装置 (図-3) を用いた。これは、トビイロウンカの背中に細い金線を伝導性樹脂 (ドータイト) で貼り付け、トビイロウンカとイネの間に微弱な電流を流して電気回路を作り、吸汁行動の各段階で得られる特徴的な波形をもとに、トビイロウンカの吸汁行動を解析する装置である。解析の結果、*BPH26* を導入した 2 系統のイネでは、トビイロウンカの口針は師部まで到達しており、吸汁を試みるものの、持続して師管液を吸汁できないことがわかった (図-2 B)。このように、*BPH26* は、師部での吸汁阻害を引き起こす遺伝子であることが判明した。トビイロウンカは師管液を吸汁できないことで栄養不足に陥り、死亡すると考えられる。

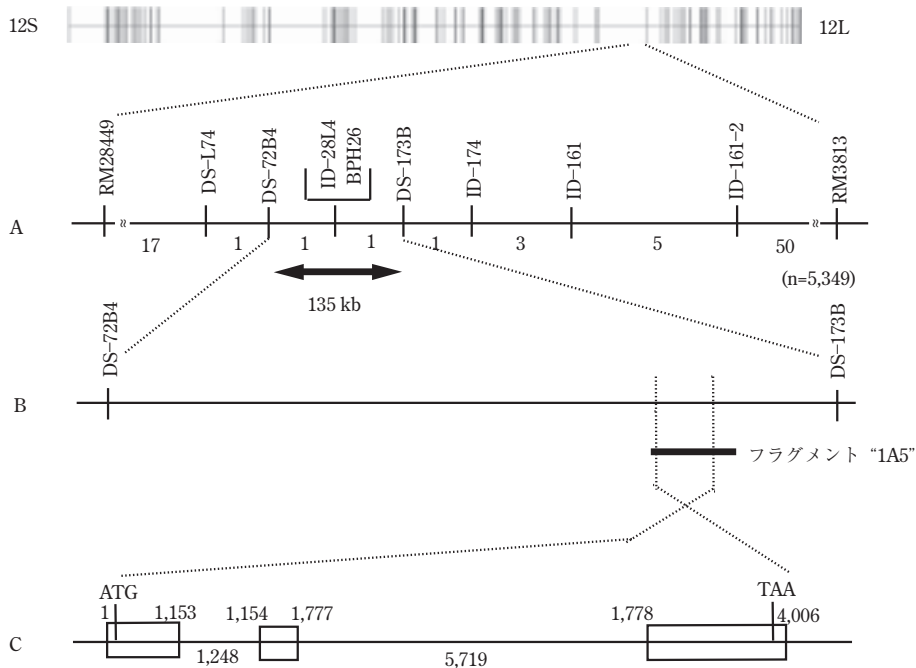


図-1 第 12 染色体上の *BPH26* の座乗位置

- A: 高密度連鎖地図。5,349 個体の分離集団の連鎖解析から、抵抗性遺伝子の候補領域を二つの DNA マーカー間 (DS-72B4 と DS-173B) の約 135 kb の範囲に限定。各マーカー間に記した数字は、マーカー間で得られた組換え個体の数を示す。
- B: 病害抵抗性遺伝子様の配列が見つかった領域 (2 本の点線の間)。
- C: ADR52 のゲノム DNA 上の *BPH26* 遺伝子の構造。この遺伝子の全長を含む DNA 断片 (フラグメント 1A5) を形質転換実験に使用。

(TAMURA et al., (2014) 中の図を改変して引用)

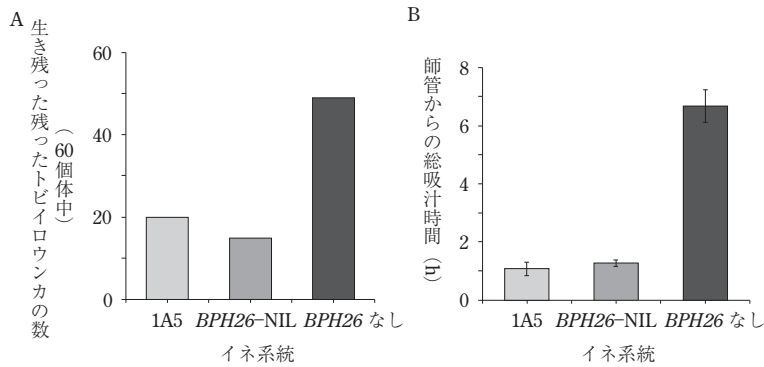


図-2 BPH26を導入した系統の抵抗性検定

A: BPH26の有無によるトビイロウンカ放飼5日後の生存数の比較. 実験条件の詳細はTAMURA et al., (2014)に記載.

B: BPH26の有無によるトビイロウンカの師管液総吸汁時間の比較. 計測中(10時間)に, トビイロウンカの師管吸汁波形が観察された時間の合計を示す (n = 10).

(A, BはTAMURA et al., (2014)中の図を改変して引用)

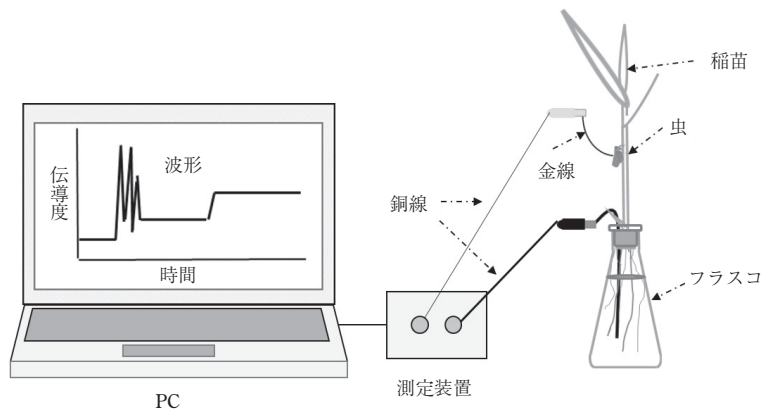


図-3 電気的測定法によるトビイロウンカの吸汁行動の解析

測定装置の概要. トビイロウンカとイネの間に電気回路を作り, 微弱な電流を流して伝導度を記録して波形として表示させ, 吸汁行動の各段階で得られる特徴的な波形をもとに吸汁行動を解析.

III トビイロウンカ抵抗性タンパク質 BPH26の特徴

BPH26遺伝子は, 三つのエクソンからなり(図-1C), CC-NBS-LRR (a coiled-coil-nucleotide-binding-site-leucine-rich repeat) と呼ばれるタンパク質をコードしていた(TAMURA et al., 2014)。このタンパク質は, 分子のN末端側にCC(コイルドコイル), 中央部にNBS(ヌクレオチド結合部位), C末端側にLRR(ロイシンリッチリピート)と呼ばれる特徴的なドメインを保有する。NBSドメインとLRRドメインを保有するタンパク質はNBS-LRRと呼ばれ, 植物の多くの病害抵抗性タンパク

質がこの構造を保有する。NBS-LRR構造を保有する, カビなどの病原菌に対するイネのいくつかの抵抗性タンパク質や, トビイロウンカ抵抗性タンパク質(BPH14)とBPH26との系統関係を調べたところ, BPH26は同じトビイロウンカ抵抗性を示すBPH14よりもむしろ, いもち病抵抗性タンパク質PIBと類似性が高いことが示唆された(図-4)。病害抵抗性のNBS-LRRタンパク質は, 病原菌の侵入を認識して活性化され, 防御反応を誘導する働きをしていると考えられている。BPH26タンパク質も類似の構造を保有することから, 同様にトビイロウンカの何らかの加害情報(例えば唾液成分)を認識して活性化され, 師部での吸汁阻害を誘導するものと予想さ

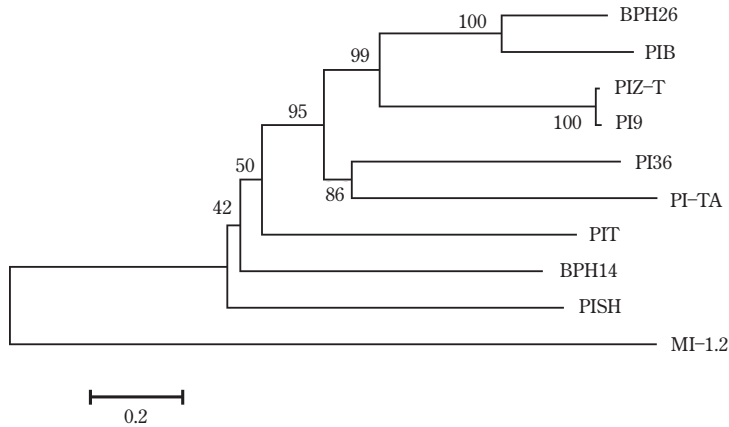


図-4 トビイロウンカ抵抗性タンパク質 *BPH26*, *BPH14* と、イネのいくつかのいもち病抵抗性タンパク質の系統関係
全長のアミノ酸配列を用い、MEGA6の系統樹推定プログラムでNJ法を用いて解析した（ブートストラップは1,000回反復による）。MI-1.2はトマトのアブラムシ抵抗性タンパク質。

れる。しかし、*BPH26* の働きを介して、どのようなメカニズムでトビイロウンカの吸汁を妨げているかはまだ不明であり、この解明は今後の課題である。

IV *BPH26* 配列の品種間比較

BPH26 の塩基配列を、‘ADR52’以外のいくつかのイネ品種でも解析し、塩基配列とアミノ酸配列を‘ADR52’の配列と比較した。感受性品種の‘日本晴’や‘台中65号’では、配列途中に終止コドンが出現するようなナンセンス変異があり、正常なタンパク質ができないために抵抗性を失っているものと考えられた (TAMURA et al., 2014)。

トビイロウンカ抵抗性遺伝子 *BPH2* はもともと劣性遺伝子として報告されていたが、後に日本イネに *BPH2* を導入した‘水稻中間母本農4号’で、優性遺伝子であることが報告された遺伝子である (MURAI et al., 2001)。*BPH2* は第12染色体上にマッピングされており、*BPH26* とは染色体上の座乗位置が近いのではないかと考えられた。そこで、*BPH2* を保有するインド型イネ品種‘ASD7’と‘IR1154-243’、さらに‘IR114-243’由来の *BPH2* 遺伝子を日本型イネ品種に導入した‘水稻中間母本農4号’で、ゲノムDNAを対象に *BPH26* に対応する配列を調べたところ、三つの系統すべてで塩基配列が‘ADR52’と同一であることがわかった。さらに、‘ASD7’と‘水稻中間母本農4号’で、cDNAを単離して配列を解析したところ、トビイロウンカ抵抗性を保有する *BPH26* と同じ配列の遺伝子が、実際にこれらの系統で発現していることが確かめられた (TAMURA et al., 2014)。よって *BPH2* を保有する代表的な系統は、いずれも

BPH26 を保有していたことになる。さらに、‘ASD7’を加害できる *BPH2*-加害性バイオタイプを、*BPH26* を感受性品種（‘台中65号’）に導入した準同質遺伝子系統と、*BPH2* を保有する‘水稻中間母本農4号’に放飼して生存率を調べたところ、*BPH2*-加害性バイオタイプは両方の系統を同じように加害して生存できることがわかった (TAMURA et al., 2014)。これらの結果から、*BPH2* のトビイロウンカ抵抗性には、*BPH26* が関与している可能性が高いと考えられる。

インド型イネ品種の‘Rathu Heenati’や‘Babawee’の抵抗性を示さない *BPH26* アリルは、‘ADR52’と比べるといくつかの変異があったが、日本型イネ品種で見られたようなナンセンス変異は存在しなかった (TAMURA et al., 2014)。変異はLRRドメイン上で比較的多く見られた。NBS-LRR構造を保有する病害抵抗性タンパク質のLRRドメインは、病原菌が生産する avirulence (Avr) タンパク質を間接的もしくは直接的に認識する役割を果たしている例が知られている (DeYOUNG and INNES, 2006)。今後、このような、トビイロウンカ抵抗性を示さない多くの系統と‘ADR52’で、*BPH26* の塩基配列を幅広く比較することで、抵抗性を示すために不可欠な部分配列などがわかってくるかもしれない。

V 他の吸汁性昆虫抵抗性遺伝子との比較

植物において、吸汁性昆虫に対する抵抗性遺伝子として最初に単離されたのは、トマトの持つアブラムシ抵抗性遺伝子 *Mi-1.2* であった (ROSSI et al., 1998; Vos et al., 1998)。この遺伝子はNBS-LRR型のタンパク質をコー

ドしており、地上部ではアブラムシなどの吸汁性昆虫に対する抵抗性、根ではセンチュウ抵抗性に寄与する珍しい性質を持っていた。野生イネ (*O. officinalis*) から単離されたトビイロウンカ抵抗性遺伝子 *BPH14* は NBS-LRR 型のタンパク質をコードしており (Du et al., 2009), 今回栽培イネ (*O. sativa*) から我々のグループが単離した *BPH26* も同様の構造を保有していた。NBS-LRR 型のタンパク質は植物の「病害」抵抗性タンパク質としてよく知られているが、それに比べて吸汁性昆虫に対する植物の抵抗性遺伝子としての報告例はまだ少ない。野生イネはトビイロウンカの寄主植物ではないため、野生イネ由来の抵抗性遺伝子は、トビイロウンカが克服できない特別な遺伝子ではないかと期待されていた。しかしながら、単離された遺伝子を見ると、野生イネ由来の抵抗性遺伝子も栽培イネ由来の抵抗性遺伝子も、同じ NBS-LRR 型のタンパク質をコードする遺伝子であったことは興味深い。野生イネ由来と栽培イネ由来の NBS-LRR 型の抵抗性タンパク質に性質の違いがあるかどうかは、今後の解明が待たれる。

また、インド型イネ品種 ‘Rathu Heenati’ では、第 4 染色体に座乗する 3 種類のレクチン受容体様キナーゼをコードする遺伝子のクラスターが、トビイロウンカ抵抗性に寄与することが報告された (Lu et al., 2014)。筆者も、‘Rathu Heenati’ の第 4 染色体の抵抗性遺伝子の抵抗性を様々な方法で検定しており、この遺伝子を持つと、トビイロウンカに被害はされてもイネが枯れにくいといった、*BPH26* の吸汁阻害とは異なる性質の抵抗性を示す可能性が示唆された (田村ら, 2014)。イネのトビイロウンカ抵抗性は、NBS-LRR 型のタンパク質を介した抵抗性だけでなく、レクチン受容体様キナーゼを介した抵抗性も加わり、今後の遺伝子単離と機能解析のさらなる進展により、どのような抵抗性遺伝子がトビイロウンカに打破されにくいといった知見も得られることが期待される。

VI トビイロウンカ抵抗性遺伝子の利用

今までに、国内では ‘Mudgo’ 由来のトビイロウンカ抵抗性遺伝子 *BPH1* を日本型イネ品種に導入した ‘水稻中間母本農 3 号’ (‘関東 PL4’) や ‘西海 190 号’ 等が開発された。さらに、‘IR1154-243’ 由来の *BPH2* 遺伝子を ‘あそみのり’ に導入した ‘水稻中間母本農 4 号’ (‘関東 PL5’) や、この中間母本から育成された ‘南海 133 号’ 等が開発された。しかしながら、*BPH1* と *BPH2* はトビイロウンカの飛来地域で使用されたため、日本に有害性バイオタイプが飛来するようになり、現在ではこれらの

系統は使われていない。

現在利用できる実用品種として、野生イネ (*O. officinalis*) 由来の抵抗性遺伝子 *BPH11* を ‘ヒノヒカリ’ に DNA マーカー育種で導入した ‘関東 BPH1 号’ や、この品種を用いて育成された、‘はるもに’ 等が開発されている。*BPH26* と *BPH25* については、それぞれの遺伝子を日本型イネ品種に導入した準同質遺伝子系統が作出できている。これらの遺伝子を用いた抵抗性品種の開発も今後期待できよう。国内で育種に利用できる抵抗性遺伝子の種類を増やすことが、今後も重要であると考えられる。

東南アジア地域で使用され、トビイロウンカに対して持続的に抵抗性を示すことが知られている ‘IR64’ は、既に抵抗性が崩壊したことで知られる *BPH1* を持つと考えられている。また、インドネシアにおいてトビイロウンカの防除に長年貢献してきた ‘IR36’ も、既に抵抗性が崩壊した *BPH2* を保有しているとされている (寒川, 2010)。*BPH26* と *BPH25* は、それぞれの遺伝子単独では抵抗性を示さないようなタイプのトビイロウンカに対しても、二つの遺伝子を共存させることで高度抵抗性を示す (Myint et al., 2012)。*IR64* が保有する *BPH1* や、*IR36* が保有する *BPH2* も、単独では抵抗性を示さなくても、他の遺伝子との共存により、それぞれの品種が持つ持続的な抵抗性に寄与している可能性がある。

トビイロウンカ抵抗性遺伝子は現在までに約 30 以上の遺伝子の存在が報告されているが、マッピングされている染色体上の位置が重なっているものが多く、品種などの由来が異なるために別名で報告されている遺伝子同士も、今後の解析で同じ遺伝子であることが証明される例もあると予想されることから、抵抗性遺伝子として使える遺伝子の数はもっと少ない。数に限りのある抵抗性遺伝子を、いかに効果を持続させながら使用していくかが今後の課題となる。抵抗性が崩壊したと考えられてきた *BPH1* や *BPH2* が、他の遺伝子と相互作用することで抵抗性が復活すれば、これらの遺伝子の再利用も期待できる。相互作用により抵抗性が持続する遺伝子の組合せを見つけ出して利用することは、抵抗性が持続する品種開発のために重要であると考えられる。

おわりに

1960 年代のころから探索され始めたトビイロウンカ抵抗性遺伝子は、イネゲノム研究の成果を活用することで、約 50 年の歳月を経てやっとその正体が明らかになりつつある。現在のところ、*BPH14* や *BPH26* のような NBS-LRR 型のタンパク質をコードする遺伝子のみならず、*BPH17* (単離報告の論文では *BPH3* と誤用) の

ようなレクチン受容体様キナーゼをコードする遺伝子が抵抗性に寄与することがわかってきた。このほかにも *BPH25* のような、NBS-LRR タンパク質をコードする遺伝子 (*BPH26*) と共存することで高度の抵抗性を発揮する未知の遺伝子の存在も明らかになった。

今後、さらに遺伝子単離と機能解析が進むことで、単独でも抵抗性が崩壊しにくい遺伝子や、抵抗性が持続する遺伝子の組合せ等の知見が集積され、抵抗性が持続する品種の開発や栽培方法の確立等に貢献することが期待できる。

謝辞 *BPH26* の単離と機能解析は、農業生物資源研究所 (田村泰盛, 服部 誠, 高橋 章, 呉 健忠, 千徳直樹), 九州大学大学院 (安井 秀), 名古屋大学大学院 (吉岡博文, 吉岡美樹) の3グループの共同研究として進められ、さらに作物研究所・矢野昌裕所長ほか、多数の方々のご協力を得て実施した。ご協力いただいた方々に深謝申し上げます。また本研究は、農業生物資源研究所運営交付金のほか、農林水産省 ゲノム情報を活用した農産物の次世代生産基盤技術の開発プロジェクト (LCT

-0010, 0011), 農林水産省 新農業展開ゲノムプロジェクト (QTL-2001) 等の支援を受けて実施した。

引用文献

- 1) BRAR, D. S. et al. (2009): *Planthoppers: New Threats to the Sustainability of Intensive Rice Production Systems in Asia*, International Rice Research Institute, Manila, p.401 ~ 427.
- 2) DEYOUNG, B. J. and R. W. INNES (2006): *Nat. Immunol.* **7**: 1243 ~ 1249.
- 3) DU, B. et al. (2009): *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **106**: 22163 ~ 22168.
- 4) FUJITA, D. et al. (2013): *Crit. Rev. Plant Sci.* **32**: 162 ~ 191.
- 5) LIU, Y. et al. (2014): *Nat. Biotechnol.* **33**: 301 ~ 307.
- 6) 松村正哉・真田幸代 (2014): *植物防疫* **68**: 336 ~ 340.
- 7) MCCOUCH, S.R. et al. (2008): *Rice* **1**: 72 ~ 84.
- 8) MURAI, H. et al. (2001): *Theor. Appl. Genet.* **103**: 526 ~ 532.
- 9) MYINT, K. K. M. et al. (2012): *Theor. Appl. Genet.* **124**: 495 ~ 504.
- 10) ROSSI, M. et al. (1998): *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **95**: 9750 ~ 9754.
- 11) 寒川一成 (2010): 緑の革命を脅かしたイネウンカ、ブイツーソリューション, 名古屋, p.100 ~ 124.
- 12) TAMURA, Y. et al. (2014): *Sci. Rep.* **4**: 5872 | DOI:10.1038/srep05872.
- 13) 田村泰盛ら (2014): 第58回日本応用動物昆虫学会大会講演要旨: 79.
- 14) Vos, P. et al. (1998): *Nat. Biotechnol.* **16**: 1365 ~ 1369.

登録が失効した農薬 (27.9.1 ~ 9.30)

掲載は、種類名、登録番号: 商品名 (製造者又は輸入者) 登録失効年月日。

〔殺虫剤〕

- マラソン・BPMC 粉剤
14160: マラバッサ粉剤 DL (協友アグリ) 15/9/27
- PAP 粉剤
17070: ホクコーエルサン粉剤 2DL (北興化学工業) 15/9/8
- パーティシリウム レカニ水剤
20691: マイコタール (アリスタ ライフサイエンス) 15/9/7
- MPP 乳剤
21788: 協友バイジット乳剤 (協友アグリ) 15/9/20
- クロラントラニプロール水剤
22467: シンジェンタプレバソフロアブル 5 (シンジェンタ ジャパン) 15/9/28

〔殺菌剤〕

- オキシロニック酸・トリフルミジール水剤
18798: 住化トリフミンスターナ SE (住友化学) 15/9/28

〔除草剤〕

- トリクロピル粉粒剤

- 15186: サンケイザイトロン微粒剤 (サンケイ化学) 15/9/1
- ベンタゾン粒剤
16119: ヤシマバサグラン粒剤 (ナトリウム塩) (協友アグリ) 15/9/24
- ベンタゾン液剤
16126: ヤシマバサグラン液剤 (ナトリウム塩) (協友アグリ) 15/9/24
- オキサジクロメホン・クロメプロップ・ブロモブチド・ベンスルフロンメチル粒剤
21762: ホクコーホームランキングLジャンボ (北興化学工業) 15/9/6
- オキサジクロメホン・ピラズルフロンエチル・ベンゾビシクロン粒剤
21774: シリウスいぶきジャンボ (日産化学工業) 15/9/20

〔植物成長調整剤〕

- エチクロゼート乳剤
16109: エルゴール乳剤 (日産化学工業) 15/9/24