

タバコカスミカメの全ゲノム解析

柴田 智文 (筑波大学 生物学類) 指導教員: 古川 誠一 (筑波大学 生命環境系)

【背景・目的】

現在の農業生産では、総合的害虫管理 (IPM) という、化学的防除や生物学的防除といった様々な手段を用いた害虫管理が求められている。タバコカスミカメ (*Nesidiocoris tenuis*) は、アザミウマ類やコナジラミ類といった農作物を加害する微小害虫に対する捕食性天敵昆虫の一種である。本種は体長が比較的大きく、活動量が高いため、微小害虫を旺盛に捕食する。ヨーロッパの地中海沿岸地域のトマト栽培では、本種が生物的防除資材として幅広く利用されている。日本では2021年に生物農薬として登録され、西日本では土着天敵として、東日本ではトマトの施設栽培で利用が進んでいる。

天敵昆虫を利用する上での一般的な問題点として、低温での活動性低下や圃場からの逃避などに起因する効果の不安定さが挙げられる。また、雑食性という性質による本種特有の問題も存在する。この性質は、餌となる微小昆虫が少ない時期でも、植物のみで個体数を維持できるというメリットとなる一方で、密度が上昇しすぎると農作物自体も加害するというデメリットとなることが懸念される。これらの問題を克服するための方法の一つとして、天敵昆虫から有用形質を持つ系統を選抜する育種的手法がある。天敵昆虫の育種は、数十年前からテーマとして存在するが研究例はごく少数しかない。また、近年、ゲノム解析やゲノム編集技術が進んではいるが、現状、天敵昆虫の育種は古典的な選抜による方法しか成功していない。

本研究では、本種のゲノム育種による有用形質を持った系統の作出を行う第一歩として、全ゲノム解析を行う。他国の研究チームから本種の全ゲノムが2020年に公開されたが、ゲノムの連続性を示す N50 の値や、正確性を示す BUSCO の値に改善の余地が残されている。また、本種の隠蔽種が国内に複数種報告されているため、国内で用いられている標準系統のゲノム解析が必要である。全ゲノムの解析は、責任領域探索の網羅的な解析手法の一つである、一塩基多型を利用した有用形質の探索への利用も期待される他に、ゲノム編集の際に必要な gRNA の設計にも役立つ。

【材料】

・タバコカスミカメ

株式会社アグリセクトが天敵製剤として販売している系統を室温 25°C、光条件 16L:8D 環境下にて継代し、得られた雄個体計 500 頭を以下の実験に供試した。

【方法】

・シーケンス

長鎖 DNA を用いた *de novo* assemble を行うため、シーケンスに用いる高分子 DNA (HMW DNA) は NucleoBond® HMW DNA (MACHEREY-NAGEL GmbH & Co. KG, Germany) を用いて抽出を行った。また、抽出した HMW DNA は Short Read Eliminator Kit (Circulomics Inc., U.S) を用いてサイズセレクションを行った。この read に対して Ligation Sequencing Kit (SQK-

LSK 109, Oxford Nanopore Technologies plc. (ONT), U.K) を用いてライゲーションを行い、MinION (ONT) を用い Flow Cell 上にてシーケンスを行い raw read を得た。

・アセンブリ&ポリッシング

得られた read は Guppy (v5.0.16) にて basecall を行い塩基配列データに変換した。配列データは Nanoplot (v1.35.5) を用いてクオリティを確認 (QC) した。QC 後の read を NECAT (v0.0.1_update20200803) を使って assemble し、contig 配列を得た。この配列に対して Racon (v1.4.20)、medaka (v1.4.4) を用いて error を訂正するポリッシングとミスアセンブリが疑われる箇所を切断をした。この次に purge_haplotigs (v1.1.1) を用いて、重複するハプロティグ配列の除去をした。より正確な contig 配列を得るため、Novaseq6000 (Illumina Inc., USA) にて読まれたペアエンド配列を利用して NextPolish (v1.1.0) にて最終的なポリッシングを行い正確性の高い配列を得た。得られたゲノムの品質は、配列の連続性 (N50) や core gene set の包含率 (BUSCO) に基づいて評価した。

・アノテーション

上記のようにして得られた contig 配列を、構造アノテーションを行うパイプラインである BRAKER2 (v2.1.6) を用いて、ゲノム中の遺伝子部位の予測を行った。予測された遺伝子は Trinotate (v3.2.2) を用いて、どのような機能を持つ遺伝子であるかを推定する機能アノテーションを行った。

【結果・考察】

MinION にてシーケンスを 4 回を行い、計 14.2 Gb (coverage = ×40) の raw read を得た。得られたゲノムを基に作成したタバコカスミカメのゲノム (Nt_JP) を表 1 に示す。今回の解析によって、これまでに公開されている本種のゲノムデータを大幅に改善することができた。

表 1. タバコカスミカメ全ゲノムの比較

	Nt_JP	Nt_v1.5 ^a
contig No.	1,150	36,510
genome size (Mbp)	322.819	355.12
contig N50 (Kbp)	639.43	13.37
gene No.	38,867	24,668
BUSCO (%)	94.8	87.5

a. Ferguson *et al.*, Insect Molecular Biology, 2020

また、今回予測された遺伝子のうち、機能アノテーションがされたものは 16,522 個であり、そのうち植食性に関係すると予測されたものは 61 個である。加えて、過去に行われた RNA-seq 解析では不完全長であった一部の配列の全長も得る事ができた。今後、他の遺伝子についても解析を進める事で、本種のゲノム育種に大きく寄与すると考えられる。