

令和元年6月11日現在

機関番号：12201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K07624

研究課題名(和文)コナガにおける遺伝子重複と殺虫剤抵抗性に関する分子生態学的研究

研究課題名(英文)Molecular ecological study on gene duplication and insecticide resistance in diamondback moth

研究代表者

園田 昌司 (Sonoda, Shoji)

宇都宮大学・農学部・教授

研究者番号：00325127

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)：コナガのジアミド剤抵抗性は、リアノジン受容体のアミノ酸変異(G4946E)による感受性の低下によって生じる。コナガ個体群中のG4946E頻度を推定するための手法を開発し、G4946E頻度とジアミド剤抵抗性には正の相関があり、ジアミド剤の効果はG4946E頻度に基づいて予測できることを明らかにした。また、G4946E頻度は季節的に変化し、春から夏にかけて上昇し、秋に低下することを明らかにした。ジアミド剤散布を停止するとG4946E頻度が低下したことから、G4946Eはフィットネスコストを伴うことが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

コナガのジアミド剤抵抗性に関わるG4946Eの頻度を個体群レベルで解析するための手法を初めて開発した。この手法を用いて抵抗性レベルの異なる野外個体群のG4946E頻度を調べ、ジアミド剤はG4946E頻度が40%未満の個体群に対して防除効果が期待できることを明らかにした。また、野外個体群のG4946E頻度の季節的な変化を調べ、晩秋のG4946E頻度と翌春のG4946E頻度はほぼ同じであることから、当該年のジアミド剤の効果は前年のG4946E頻度に基づいてあらかじめ予測できることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：A method to estimate proportions of the G4946E mutation in the ryanodine receptor gene, a major mechanism of diamide insecticide resistance, was developed for diamondback moth populations using quantitative sequencing (QS). Using the QS-based method, the relationship between proportions of the G4946E mutation and mortalities for diamide was examined using field-collected populations. Results showed that the populations might be classifiable according to the proportions. The seasonal proportion change of the G4946E mutation for diamondback moth populations was examined using the QS-based method. Results showed that the proportions of the G4946E mutation generally increased from spring through summer, but then decreased in autumn. After termination of diamide use, noticeable decrease of the proportions of the G4946E mutation was observed, suggesting fitness cost of the mutation.

研究分野：植物保護学

キーワード：殺虫剤抵抗性 ジアミド剤 コナガ フルベンジアミド クロラントラニリプロール アミノ酸変異  
リアノジン受容体

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

害虫管理において殺虫剤の果たしてきた役割は大きい。しかし、一方で、過剰な殺虫剤の使用は害虫の殺虫剤抵抗性を引き起こした。害虫の殺虫剤抵抗性は有機合成農薬が普及しはじめた 1940 年代半ばから顕在化した。現在では殺虫剤に対して何らかの抵抗性を発達させている農業害虫は 586 種にも達している (Sparks and Nauen 2015)。殺虫剤は総合的害虫管理 (IPM) における基幹的な防除手段であることから、殺虫剤抵抗性の解析は将来においても作物保護研究の最も重要な課題のひとつである。殺虫剤抵抗性をもたらす主な要因として「解毒分解酵素活性の増大」と「標的部位の感受性の低下」が知られている。1980 年代までは主に前者の機構についての解析が酵素レベルで行われていた。その後、分子生物学の進展により後者についても解析が可能になり、合成ピレスロイド剤、有機リン剤抵抗性には、それぞれの標的であるナトリウムチャンネル、アセチルコリンエステラーゼ (AChE) のアミノ酸変異による感受性の低下が関与していることが多くの害虫種で示されてきた。さらに最近では、次世代シーケンサーの登場により、遺伝情報に乏しい害虫種においても殺虫剤抵抗性に関わる解毒分解酵素遺伝子あるいは標的遺伝子の変異が明らかにされつつある。

遺伝子重複は「解毒分解酵素活性の増大」をもたらす要因のひとつとして知られている。一方、標的遺伝子の重複の殺虫剤抵抗性への関与については数例の報告があるにすぎない。具体的には、GABA 受容体遺伝子の重複がモモアカアブラムシのディルドリン抵抗性に、AChE 遺伝子の重複がアカイエカ、キイロショウジョウバエ、ハダニの有機リン剤抵抗性に関与していることが報告されており、いずれもアミノ酸変異によるフィットネスクオートの補償としての間接的な関与が指摘されている (Anthony et al. 1998, Labbe et al. 2007a, b, Charpentier and Fournier 2011, Calvalho et al. 2012, Kwon et al. 2010)。

コナガはキャベツ、ハクサイ、ダイコンなどのアブラナ科作物を加害する世界的な重要害虫である。また、これまで開発されたほとんど全ての殺虫剤に抵抗性を発達させてきた難防除害虫としても悪名高い。2007 年、コナガの有機リン剤抵抗性には、AChE のアミノ酸変異 (A298S および G324E) による感受性の低下が関与していることが報告された (Lee et al. 2007)。申請者は、それらのアミノ酸変異を持つ個体の個体群内における割合を知るために、各変異部位のジェノタイピングを個体レベルで行おうとした。ところが、ホモ個体ともヘテロ個体とも判別できない個体が多数出現し、断念するに至った。その後の解析で、その原因は AChE 遺伝子の重複にあることを突き止めた (Sonoda et al. 2014)。

2012 年、ジアミド剤抵抗性には標的であるリアノジン受容体 (RyR) のアミノ酸変異 (G4946E) が関与していることが報告された (Trocicka et al. 2012)。申請者も日本におけるコナガの RyR 遺伝子の解析を行い、G4946E を持つ個体の存在を明らかにしたが、AChE 遺伝子の場合と同様にホモ個体ともヘテロ個体とも判別できない個体が多数出現した。キイロショウジョウバエのゲノム情報に基づき、昆虫の RyR は単一の遺伝子によってコードされると考えられているが、コナガには RyR 遺伝子あるいはその部分配列が複数存在している可能性がある。2014 年、ジアミド剤抵抗性に関わる G4946E 以外のアミノ酸変異 (E1338D、Q4594L、I4790M) が報告されたが (Guo et al. 2014)、これらの変異が日本のコナガのジアミド剤抵抗性に関与しているかどうかは不明である。ジアミド剤抵抗性への「解毒分解酵素活性の増大」の関与については部分な関与が報告されているものの主要因とは考えられていない (Wang et al. 2013)。

## 2. 研究の目的

RyR 遺伝子が重複しているかどうかを調べる

ジアミド剤抵抗性に関わる RyR のアミノ酸変異(G4946E)のコナガ個体群内における頻度を推定するための手法を開発する。また、G4946E 頻度に基づいてジアミド剤の効果が予測できるかどうかについて検討する。

フェロモントラップを用いたコナガの発生消長調査を行うと同時に、捕獲された成虫を用いて G4946E 頻度の季節的变化を調べる

G4946E 以外のアミノ酸変異(E1338D、Q4594L、I4790M)のジアミド剤抵抗性への関与を検証する

### 3. 研究の方法

- (1) ジアミド剤に対する抵抗性レベルの異なるコナガ系統より個体毎に DNA を抽出する。抽出した DNA を鋳型として RyR 遺伝子の部分配列の増幅、クローニング、塩基配列決定を行い、G4946E 部位のジェノタイピングを行う。
- (2) 個体群内における G4946E の頻度を推定するための手法を量的シーケンシングを用いて開発する。その上で、様々な地域で採集されたジアミド剤に対する抵抗性レベルの異なるコナガ系統を用いて、抵抗性レベルと G4946E 頻度の関係について調べる。
- (3) 野外のキャベツ圃場にフェロモントラップを設置し、捕獲されたコナガの雄成虫数を基本的に 5 日おきに計数する。計数した雄成虫をトラップから回収し DNA を抽出し、(2)で開発された手法に供試する。
- (4) フェロモントラップに捕獲された雄成虫について G4946E 以外のアミノ酸変異(E1338D、Q4594L、I4790M)を含む遺伝子領域を増幅し、塩基配列を調べ、野外におけるジアミド剤抵抗性への関与を検証する。

### 4. 研究成果

- (1) 遺伝子型(抵抗性ホモ、ヘテロ、感受性ホモ)が判別できない個体が多数存在した。その理由として、リアノジン受容体遺伝子配列の重複が考えられたが、本手法では確かな証拠を得ることが出来なかった。今後、次世代シーケンサー等を用いた解析を行う必要がある。
- (2) 個体群内における G4946E 頻度を推定するための手法を開発した。その上で、様々な地域で採集された、ジアミド剤に対する抵抗性レベルの異なるコナガ個体群の G4946E 頻度を調べた。その結果、抵抗性レベルと G4946E 頻度の間には正の相関があること、G4946E 頻度に基づいてジアミド剤の防除効果を予測できることが示唆された。すなわち、G4946E 頻度が 40% 未満であればジアミド剤の効果が期待できるが、40% 以上であればジアミド剤の効果が期待できないので、他の系統の薬剤を中心とした防除を行なうことが望ましい(図1)。
- (3) (2)で開発した手法を用いて、野外におけるコナガ個体群の G4946E 頻度の季節的な変化を調べた。その結果、G4946E 頻度は春から夏にかけて上昇し秋に低下すること、晩秋の頻度と翌春の頻度はほぼ同じであることが明らかとなった(図2)。以上の結果は、当該年のジアミド剤の防除効果は、前年の G4946E 頻度に基づいて予測できることを示しており、コナガ管理において非常に重要である。G4946E 頻度が春から夏にかけて上昇する理由は薬剤散布と考えられるが、秋に低下する理由については現時点では不明である。1年目の調査では、調査圃場におけるコナガの G4946E 頻度が 40% を越えていたため、2年目と3年目はジアミド剤の使用を中止し、作用機作の異なる薬剤散布に切り替えた。その結果、3年目には G4946E 頻度がジアミド剤の効果が期待できる 40% 未満に低

下した(未発表)。このことは、G4946Eによるフィットネスコストを示唆している。

- (4) (3)で抽出したDNAを用いて、E1338D、Q4594L、I4790Mを含む領域を増幅し、ダイレクトシーケンシングを行ったが、これらの変異はほとんど検出されなかった。そのため、日本におけるジアミド剤抵抗性の主要因はG4946Eであると考えられる。

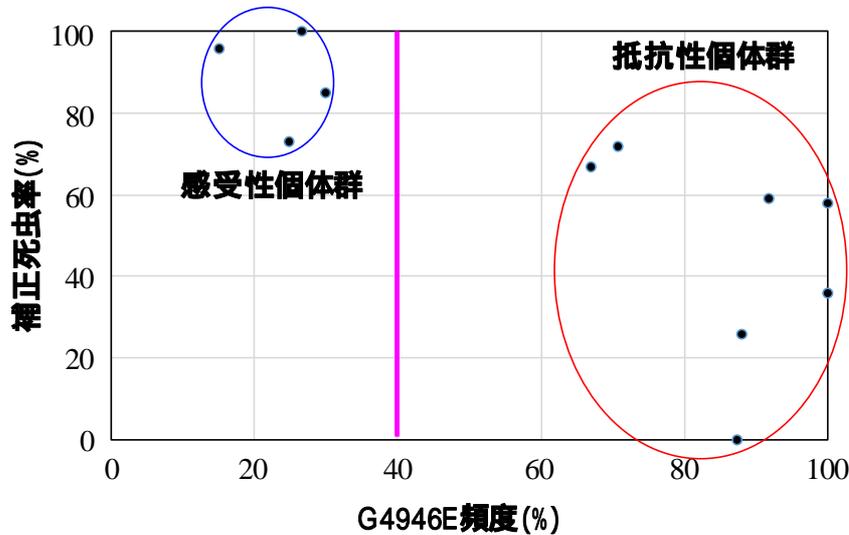


図1. コナガの抵抗性個体群と感受性個体群のG4946E頻度とジアミド剤に対する補正死虫率

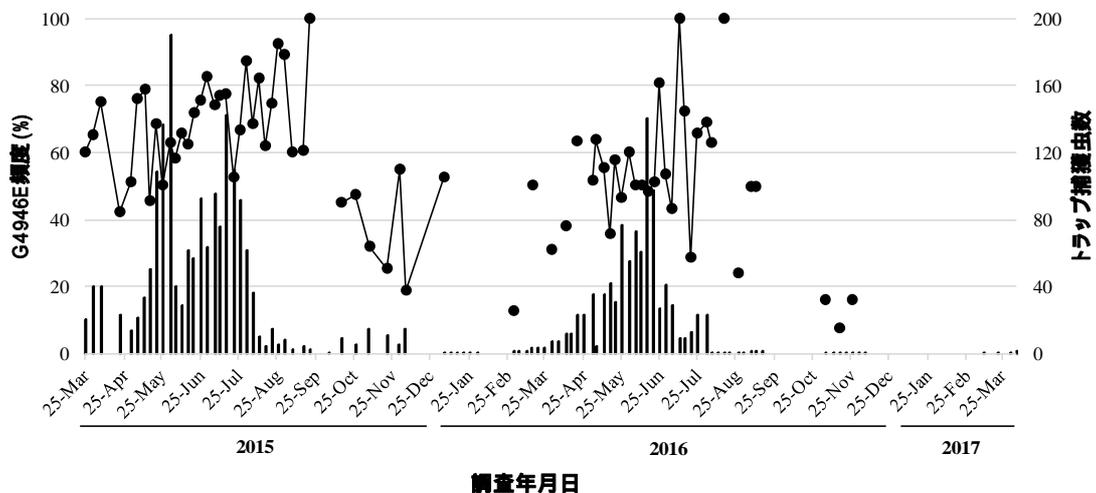


図2. フェロモントラップで捕獲されたコナガ雄成虫数(棒)とG4946E頻度(折れ線)の季節的变化

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計4件)

園田昌司 (2018) コナガにおけるジアミド剤抵抗性の発達を考慮した薬剤使用. 技術と普及 55: 34-36. (査読なし)

Yuki Itagaki, Shoji Sonoda (2017) Seasonal proportion change of ryanodine receptor mutation (G4946E) in diamondback moth populations. Journal of Pesticide Science 42: 116-118. (査読あり)

Shoji Sonoda, Kayo Inukai, Satoshi Kitabayashi, Seigo Kuwazaki, Akiya Jouraku (2017) Molecular evaluation of diamide resistance in diamondback moth (Lepidoptera: Yponomeutidae) populations using quantitative sequencing. Applied Entomology and Zoology 52: 353-357. (査読あり)

Shoji Sonoda, Yoko Kataoka (2016) Genotyping for the G4946E site of ryanodine receptor gene in *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Yponomeutidae) considering gene duplication. Applied Entomology and Zoology 51: 195-204. (査読あり)

[学会発表](計 3 件)

園田昌司, 板垣有紀: コナガ個体群におけるジアミド剤抵抗性の主要因であるリアノジン受容体遺伝子頻度の季節的变化, 第 62 回日本応用動物昆虫学会大会, 鹿児島, 2018.3.

園田昌司, 犬飼佳代, 北林聡, 桑崎誠剛, 上樂明也: 量的シーケンシングを用いたコナガ個体群のジアミド剤抵抗性に関する分子診断, 第 61 回日本応用動物昆虫学会大会, 小金井, 2017.3.

Shoji Sonoda: Genotyping for the G4946E site of the ryanodine receptor gene in *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Yponomeutidae) considering gene duplication, XXV International Congress of Entomology, Orland, FL, USA, 2016.9.

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。