

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 14 日現在

機関番号：82112

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2010～2012

課題番号：22380041

研究課題名（和文）コナガのゲノム解析とその殺虫剤抵抗性機構解明への利用

研究課題名（英文）Genomics of a diamondback moth and contribution to clarify the insecticide resistance mechanism.

## 研究代表者

山本 公子 (YAMAMOTO KIMIKO)

独立行政法人農業生物資源研究所・昆虫ゲノム研究ユニット・ユニット長

研究者番号：40370689

研究成果の概要（和文）：EST 解析及び RNAseq を行い、約 3 万個の遺伝子候補配列を取得した。また、次世代シーケンサーを利用してコナガのゲノム概要塩基配列を獲得し、ゲノムおよび発現遺伝子情報について自動アノテーション情報を付加したゲノムデータベース KONAGAbase を構築し一般に公開した。Bt 菌毒素抵抗性形質とリンクする連鎖群を見だし、有望な候補遺伝子を得た。また、Bt 菌処理時及び非処理時の発現量比較解析から、コナガの Bt 菌毒素に対する抵抗性と薬剤代謝関連遺伝子の関連性が低いことを見いだした。

研究成果の概要（英文）：EST analysis and RNAseq were performed and more than 30,000 gene candidates were acquired. KONAGAbase that provides diamondback moth comprehensive transcriptomic and draft genomic sequences with useful annotation information was developed and opened to the public. The candidates of Bt toxin resistance related genes were found with genetic analysis. The result of gene expression profiling showed that the genes associated with medicine metabolism had the low relevance with Bt toxin resistance.

## 交付決定額

(金額単位：円)

|         | 直接経費        | 間接経費       | 合計          |
|---------|-------------|------------|-------------|
| 2010 年度 | 6,300,0001  | 1,890,0001 | 8,190,0001  |
| 2011 年度 | 5,500,0001  | 1,650,0001 | 7,150,0001  |
| 2012 年度 | 2,800,0001  | 840,0001   | 3,640,0001  |
| 年度      |             |            |             |
| 年度      |             |            |             |
| 総計      | 14,600,0001 | 4,380,0001 | 18,980,0001 |

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農学・応用昆虫学

キーワード：昆虫分子生物学

## 1. 研究開始当初の背景

コナガはキャベツやハクサイなどアブラ

ナ科野菜の重要害虫であり、熱帯から寒帯まで広く分布している。体長は幼虫が最大約

10mm、成虫は約 6mm と小型で、1 世代に要する期間が 25°C で 16 日間前後と短く、温帯では年に少なくとも 10 世代程度発生を繰り返すとされている。我が国ではコナガの被害は 1960 年代から目立ちはじめ、防除剤として使用された有機リン剤、合成ピレスロイド剤、BT 剤、さらには IGR 剤に対しても次々と抵抗性が発達した。この抵抗性発達の原因の一つとしては一世代に要する期間が短いことが上げられている。現在では、コナガの防除については、複数の薬剤をローテーション散布して特定の薬剤への抵抗性の発達を回避し薬剤を長持ちさせる方法がとられているが、多剤耐性コナガの出現も危惧されている。

## 2. 研究の目的

コナガの防除を考える上では殺虫剤抵抗性機構の究明が必要であり、これまでに抵抗性機構解明に向けた生化学的なアプローチは数多く行われており、ピレスロイド剤抵抗性などの機構解明も行われている。しかし、抵抗性に係わる遺伝子群の特定やその分子機構に即した抵抗性対策を推進するためには、遺伝学的アプローチが重要と考えられる。本研究は遺伝学的アプローチに必須の基礎データであるコナガゲノムおよび発現遺伝子情報を獲得し、遺伝地図構築のための解析集団構築と分子多型情報の獲得を目的とする。

## 3. 研究の方法

### (1) コナガの発現遺伝子情報の獲得

コナガの cDNA ライブラリーの構築と EST 塩基配列解析を行い、できるだけ多くの発現遺伝子情報を得る。獲得した塩基配列情報はデータベース化し、カイコ等の遺伝子情報との相同性から BT 剤抵抗性遺伝子や他の抵抗性関連遺伝子の候補遺伝子の探索が容易にできるようにする。

### (2) コナガのゲノム塩基配列情報の獲得

次世代シーケンサーを利用してコナガのゲノム塩基配列情報を獲得し、カイコゲノム情報との比較解析を行うとともに、得られた配列情報は(3)の遺伝地図構築に利用する。

### (3) コナガ遺伝地図構築

1 および 2 で獲得した塩基配列情報を元に SNP 等の分子多型を探索し、31 対あるとされるコナガの染色体それぞれを認識する分子遺伝地図を作製する。さらに、(1)の成果を利用してコナガの BT 抵抗性遺伝子の候補遺伝子のマッピングを行う。

## 4. 研究成果

### (1) コナガの発現遺伝子情報の獲得

幼虫の中腸、精巢、卵(初期胚)等から total RNA を精製し、cDNA ライブラリーを作成した。各々の cDNA ライブラリーから約 10,000 クローンを選び、DNA を抽出し、5' および 3' の配列データを得た。さらに幼虫各ステージや Bt 剤処理時、非処理時の RNAseq を行い(表 1)、網羅的な 84,142 のトランスクリプトーム配列(unigene 配列)を生成し、予測遺伝子 CDS 配列と合わせて、最終的に既知の遺伝子/ドメインと相同性を持つ 33,329 の遺伝子候補 CDS 配列を生成した(表 2)。

表 1 トランスクリプトーム配列データ

| ABI(B730)(EST)□     | 中腸、精巢、卵等□                  | 20Mbp(3.7万配列)□ |
|---------------------|----------------------------|----------------|
| HiSeq2000(101bp)SE□ | 幼虫 whole body(PXS)□        | 20Gbp□         |
| HiSeq2000(101bp)PE□ | 4ステージ (PXS)□               | 12Gbp□         |
| HiSeq2000(101bp)PE□ | 幼虫(PXR, Sumika)□           | 6Gbp□          |
| HiSeq2000(101bp)PE□ | 7組織 (PXS)□                 | 17Gbp□         |
| HiSeq2000(101bp)PE□ | 中腸 Bt 剤処理時・非処理時(PXS, PXR)□ | 10Gbp□         |

表 2 遺伝子候補データの詳細

|                     | ~H23<br>(EST + RNA-seq 1sampleのみ) | H24<br>(RNA-seq 18サンプル) |
|---------------------|-----------------------------------|-------------------------|
| # of sequences      | 32,807                            | 33,571                  |
| Total bases (bp)    | 25,972,498                        | 41,811,978              |
| N50 (bp)            | 1,063                             | 1,874                   |
| Average length (bp) | 791.7                             | 1,245.5                 |
| Max length (bp)     | 16,249                            | 28,350                  |

### (2) コナガのゲノム塩基配列情報の獲得

作出した近交系コナガ系統からゲノム DNA を抽出し、Roche 454 GS FLX Titanium 等の次世代シーケンサーを利用して、コナガゲノムの概要塩基配列情報を得た(表 3)。得られた配列情報をアセンブルする事で最終的に 372Mb、N50 が 13kb の概要配列を獲得した(表 4)。

表 3 ゲノム配列データ

| シーケンサー                            | 総サイズ         |
|-----------------------------------|--------------|
| 454 GS FLX Titanium single-end    | 1.9 Gbp (5x) |
| HiSeq2000 101bp PE (insert 250bp) | 42Gbp (114x) |
| HiSeq2000 101bp MP (insert 3Kbp)  | 23Gbp (62x)  |

表 4 ゲノムアセンブリ配列データ

|                     | ~H23年度<br>(454のみ) | H24年度<br>scaffolding by HiSeq2000<br>(250bp PE & 3kb MP) |
|---------------------|-------------------|--|
| # of sequences      | 441,279           | 230,828  |
| Total bases (bp)    | 364,972,502       | 372,361,225  |
| N50 (bp)            | 1,097             | 13,196   |
| Average length (bp) | 827.2             | 1,613.2  |
| Max length (bp)     | 24,960            | 336,095  |

更に、(1), (2) で生成した配列について各配列のリピート領域のマスキングを行い、ドラフトゲノムおよびトランスクリプトーム

配列データを中心に自動アノテーション情報を付加して格納したコナガのゲノムデータベース KONAGAbase を構築し、以下の URL で一般に公開した (図 1)。  
<http://dbm.dna.affrc.go.jp/px/>



図 1 KONAGAbase の TOP page

### (3) コナガ遺伝地図構築

Bt 菌 Cry1Ac 毒素抵抗性と感受性系統を交配して F1 および BF1 を作成した。(2) で得たゲノム配列を元に SNP を探索し、♀ヘテロの BF1 集団のジェノタイピングを行った。その結果、Cry1Ac 毒素抵抗性形質とリンクする連鎖群を見いだした。この連鎖群上にカイコ 15 番染色体上のマーカーのホモログが得られており、毒素抵抗性形質の原因遺伝子がこの連鎖群上に存在することが強く示唆され、いくつかの有力な候補遺伝子を見いだした。

更に、Cry1Ac 毒素の感受性および抵抗性系統の Bt 菌処理時および非処理時の中腸の発現量比較解析を行った結果、抵抗性系統において、(1) P450 等の代表的な薬剤代謝関連遺伝子の発現上昇はみられない、(2) 感受性系統に対して、Cry1Ac 毒素の受容体候補とされる ABC transporter 遺伝子等の発現低下がみられる、等が分かった。これにより、コナガの Bt 菌 Cry1Ac 毒素に対する抵抗性に薬剤代謝関連遺伝子は関与していない可能性が高いことがわかった (図 2)。

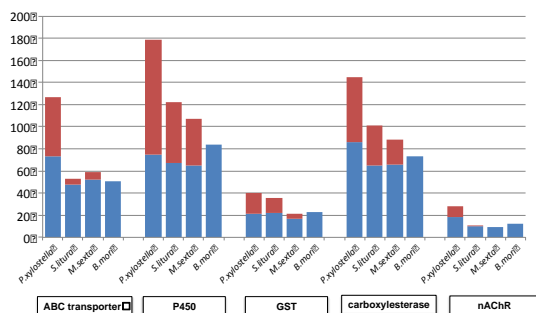


図 2 薬剤抵抗性関連遺伝子の網羅的探索

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 1 件)

①宮本和久、渥美省吾、山本公子、瀬筒秀樹、野田博明 (2013) チョウ目害虫における BT 剤および Bt 毒素抵抗性の現状と原因遺伝子の同定 植物防疫 67(1):27-34、査読有り

[学会発表] (計 7 件)

①Jouraku A, Yamamoto K, Kuwazaki S, Urio M, Suetsugu Y, Narukawa J, Miyamoto K, Kurita K, Kanamori H, Katayose Y, Matsumoto T, Noda H KONAGAbase: a genomic database of the diamondback moth 第35回日本分子生物学会年会、2012年12月12日、福岡

②上樂明也 殺虫剤抵抗性問題におけるゲノム情報基盤の活用 シンポジウム「ポストゲノム時代の害虫防除研究のあり方 第5回」- 殺虫剤抵抗性問題の最前線、2012年11月15日、秋葉原

③Jouraku A, Yamamoto K, Kuwazaki S, Urio M, Suetsugu Y, Narukawa J, Miyamoto K, Kurita K, Kanamori H, Katayose Y, Matsumoto T, Noda H The development of the genomic database of the diamondback moth (*Plutella xylostella*) and genomic analysis using it 6th Annual Arthropod Genomics Symposium: Arthropod Genomics 2012: Taking Center Stage and i5k Community Workshop、2012年06月01日、Kansas City, USA

④Jouraku A, Yamamoto K, Kuwazaki S, Urio M, Suetsugu Y, Narukawa J, Miyamoto K, Kurita K, Kanamori H, Katayose Y, Matsumoto T, Noda H Genome analysis of agricultural pests 2: Development of a genomic database of the diamondback moth and its application to genome analysis 第34回日本分子生物学会年会、2011.12.14、横浜

⑤Jouraku A, Yamamoto K, Kuwazaki S, Urio M, Suetsugu Y, Narukawa J, Miyamoto K, Kurita K, Kanamori H, Katayose Y, Matsumoto T, Noda H Current status of the development of the diamondback moth database Sixth International Symposium on Molecular Insect Science、2011.10.04、アムステルダム、オランダ

⑥山本公子、上樂明也、桑崎誠剛、瓜尾政博、末次克行、生川潤子、宮本和久、野田博明 農業害虫ゲノム解析-1. コナガゲノム塩基配列および発現遺伝子解析 第33回日本分子生物学会年会・第83回日本生化学会大会 合同大会、2010.12.9、神戸

⑦Jouraku A, Yamamoto K, Kuwazaki S, Urio M, Suetsugu Y, Narukawa J, Miyamoto K, Noda

H Development of a genomic database of the diamondback moth 第33回日本分子生物学会年会・第83回日本生化学会大会 合同大会、2010.12.8、神戸

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計0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0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

<http://dbm.dna.affrc.go.jp/px/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

山本 公子 (YAMAMOTO KIMIKO)  
農業生物資源研究所・昆虫ゲノム研究ユニット・ユニット長  
研究者番号：40370689

### (2) 研究分担者

宮本 和久 (MIYAMOTO KAZUHISA)  
農業生物資源研究所・昆虫微生物機能研究ユニット・上級研究員  
研究者番号：10370686  
上樂 明也 (JOURAKU AKIYA)  
農業生物資源研究所・昆虫ゲノム研究ユニット・任期付研究員  
研究者番号：60542115  
末次克行 (SUETUGU YOSHITAKA)  
農業生物資源研究所・昆虫ゲノム研究ユニット・主任研究員  
研究者番号：80533471  
野田 博明 (NODA HIROAKI)  
農業生物資源研究所・昆虫科学研究領域・

特任上級研究員

研究者番号：40343991

三田 和英 (MITA KAZUEI)

農業生物資源研究所・昆虫科学研究領域・

特任上級研究員

研究者番号：30159165

(3) 連携研究者

( )

研究者番号：