

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 12 日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23580072

研究課題名(和文)コナガの複合的殺虫剤抵抗性機構の解明

研究課題名(英文)Resistance mechanisms of the diamondback moth against various insecticides

研究代表者

園田 昌司 (Sonoda, Shoji)

岡山大学・資源植物科学研究所・准教授

研究者番号：00325127

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円、(間接経費) 1,260,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では有機リン剤(アセフェート)に対する感受性の異なるコナガ系統のアセチルコリンエステラーゼ(AChE)遺伝子の解析を行った。野外採集系統には抵抗性に関わるアミノ酸変異(A298SおよびG324A)の一方もしくは両方を備えた複数の遺伝子型を示す個体が存在した。さらに、塩基配列決定の結果、野外採集系統においてAChE遺伝子は高度に重複していることが示された。コピー数あるいはA298SとG324Aの集団内における割合と抵抗性レベルの間に相関は見られなかったことから、コナガのアセフェートに対する抵抗性には複数の機構が関与していると考えられた。

研究成果の概要(英文)：This study examined the acetylcholinesterase 1 gene (AChE1) in *Plutella xylostella* strains with different sensitivities to acephate. Multiple haplotypes of the gene were found in the field-collected strains including distinct haplotypes carrying one or both previously reported mutations (A298S and G324A). Moreover, sequencing results indicated the presence of duplicated copies of the gene in the field-collected strains. No correlation was found between copy numbers of AChE1 and levels of resistance to acephate suggesting that extensive AChE1 duplication is not a major resistance factor at least in some *P. xylostella* strains. Proportions of the A298S and G324A mutations showed no correlation with levels of resistance to acephate. This suggests that acephate resistance of *P. xylostella* is complex and cannot be evaluated based on the AChE1 copy number or proportions of the resistance mutations alone.

研究分野：農学

科研費の分科・細目：応用昆虫学

キーワード：アセチルコリンエステラーゼ コナガ 遺伝子重複 アミノ酸変異 有機リン剤

## 1. 研究開始当初の背景

コナガはこれまで開発されたほとんど全ての殺虫剤に対して抵抗性を発達させた難防除害虫である。コナガの殺虫剤抵抗性機構に関しては、有機リン剤抵抗性にアセチルコリンエステラーゼ(AChE)のアミノ酸変異(A298S、G324A)が、合成ピレスロイド剤抵抗性にナトリウムチャンネルのアミノ酸変異(M918I、T929I、L1014F)が関与していることが報告されていた。また、特定のチトクローム P450 遺伝子(CYP6BG1)の高発現が合成ピレスロイド剤抵抗性に関与していることも報告されていた。しかしながら、なぜコナガでは複数の抵抗性機構が同時に成立し、殺虫剤抵抗性を発達させることができるのかは不明であった。

## 2. 研究の目的

コナガが複数の殺虫剤に対して抵抗性を発達させることのできる原因を明らかにすることを最終的な目的として、まず、有機リン剤抵抗性と合成ピレスロイド剤抵抗性機構に関わるアミノ酸変異の関係を個体レベルで明らかにしようとした。

## 3. 研究の方法

### (1) 昆虫

日本、中国、タイで採集された野外系統 22 系統と室内系統 2 系統を解析に用いた。

### (2) 生物検定

有機リン剤としてアセフェートを用いた。葉片浸漬法によって試験を行った。LC<sub>50</sub> 値はプロビット法で算出した。

### (3) DNA 抽出

DNA の抽出は幼虫、蛹、もしくは成虫を用いて個体ごとに行った。

### (4) PCR

AChE 遺伝子の A298S および G324A 部位を含む領域を PCR で増幅した。増幅産物は

アミノ酸変異部位を直接的に読むためにダイレクトシーケンシング、もしくは量的シーケンシングを行うためにクローニングに供した。

### (5) 塩基配列決定

塩基配列決定は常法に従って行った。

### (6) 量的シーケンシング

量的シーケンシング(Kwon et al. 2008)を行い、集団内における A298S および G324A の割合を明らかにした。

### (7) 定量 PCR

各系統における AChE 遺伝子の発現レベルを定量 PCR で調べた。

### (8) 酵素活性測定

AChE の酵素活性を Ellman et al. (1961) の手法により測定した。

## 4. 研究成果

(1) アミノ酸変異部位のダイレクトシーケンシングを個体ごとに行った。その結果、野外系統のヘテロ個体の半数以上は抵抗性と感受性に関わるシグナルの比が 2 倍以上違っており、遺伝子型の判別ができなかった。この時点で、当初の目的であった有機リン剤抵抗性と合成ピレスロイド剤抵抗性機構に関わるアミノ酸変異の関係解明は断念せざるを得ない状況となってしまった。しかしながら、AChE 遺伝子のゲノム配列を詳細に解析したところ、多くの個体の AChE 遺伝子は重複しているという新たな発見につながった。定量 PCR の結果、野外採集系統のコピー数は室内の感受性系統の 2-4 倍と見積もられた。

(2) アセフェートに対する各系統の抵抗性レベルを調べた。その結果、野外採集系統は感受性系統よりも 5 倍-78 倍高い抵抗性レベ

ルを示すことが明らかとなったが、室内で選抜した抵抗性系統よりは低かった。

(3) 抵抗性レベルと AChE 遺伝子のコピー数の間の関連を調べたが、相関は認められなかった。抵抗性レベルと量的シーケンシングによって推定された集団内における抵抗性遺伝子の割合との間にも相関は認められなかった。このことは、コピー数も抵抗性遺伝子の頻度も単独では主要な抵抗性因子とはなり得ないことを示している。コナガでは複数の抵抗性因子が同時に関与していると考えられた。また、それぞれの因子の貢献度も系統ごとに異なると考えられた。

(4) 室内の感受性系統と抵抗性系統における AChE 活性を比較したが、違いは認められなかった。一般に遺伝子重複は遺伝子変異による適応度(フィットネス)の低下を補償するために起こると考えられているが、コナガにおいては必ずしも当てはまらないことが明らかとなった。

#### 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 2 件)

Sonoda, S., Shi, X., Song, D., Liang, P., Gao, X., Zhang, Y., Li, J., Liu, Y., Li, M., Matsumura, M., Sanada-Morimura, S., Minakuchi, C., Tanaka, T., Miyata T., Duplication of acetylcholinesterase gene in diamondback moth strains with different sensitivities to acephate. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 48, 83-90, 2014. (査読あり)

Sonoda, S., Shi, X., Song, D., Zhang, Y., Li, J., Wu, G., Liu, Y., Li, M., Liang, P., Wari, D., Matsumura, M., Minakuchi, C., Tanaka, T., Miyata, T., Gao, X., Frequencies of the M918I mutation in the sodium channel of the diamondback moth in China, Thailand and

Japan and its association with pyrethroid resistance. *Pestic. Biochem. Physiol.* 102, 102-105, 2012. (査読あり)

[学会発表](計 9 件)

園田昌司, コナガにおける AChE 遺伝子の重複と有機リン剤抵抗性. 第 58 回日本応用動物昆虫学会大会, 2014 年 3 月 29 日, 高知大学.

園田昌司, 殺虫剤の作用機作と抵抗性のメカニズム. 長野県病害虫防除シンポジウム, 2013 年 02 月 22 日, 松本市.

園田昌司, コナガのピレスロイド剤抵抗性-野外におけるナトリウムチャネルのアミノ酸変異-. NIAS 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, 東京都.

園田昌司, 難防除害虫の薬剤抵抗性メカニズム. 革新的農業技術習得支援事業(野菜の難防除害虫の IPM 技術), 2012 年 10 月 25 日, 津市.

園田昌司, コナガの殺虫剤に対する抵抗性および適応機構. 九州昆虫セミナー, 2012 年 10 月 22 日, 合志市.

Sonoda, S., Organophosphate resistance in the laboratory and field strains of the diamondback moth International Seminar on the Development of Insecticide Resistance and Its Management in the Diamondback Moth. August 27, 2012, Nagoya, Japan.

Sonoda, S., et al. Frequencies of the M918I, T929I and L1014F mutations in the sodium channel of the diamondback moth in China, Thailand and Japan. XXIV International Congress of Entomology, August 20, 2012, Daegu, Korea.

園田昌司, コナガの合成ピレスロイド剤抵抗性に関わるナトリウムチャネルのアミノ酸変異の頻度 -日本、中国、タイ系統の比較-. 日本農薬学会大会第 37 回大会, 2012 年 3 月 15 日, 岡山大学.

Sonoda, S., Sodium channel mutations associated with pyrethroid resistance and their frequencies in the field strains of the diamondback moth, *Plutella xylostella* collected at different Asian countries. International Symposium on Insecticide Resistance Management, September 20, 2011, Guiyang, China.

〔図書〕(計 1 件)

園田昌司, 殺虫剤抵抗性機構の解析と今後の課題. 植物防疫 66, 40-45, 2012.

6 . 研究組織

(1)研究代表者

園田昌司 (SONODA, Shoji)

岡山大学・資源植物科学研究所・准教授

研究者番号 : 00325127