

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 27 年 6 月 10 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24570023

研究課題名(和文)ハダニの寄主植物適応における分子メカニズムの解明

研究課題名(英文) Transcriptome analysis of two genetically distinct strains of Kanzawa spider mite to clarify the molecular mechanisms of host plant adaptation in the spider mite.

研究代表者

小澤 理香 (Ozawa, Rika)

京都大学・生態学研究センター・研究員

研究者番号：90597725

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、ハダニの寄主適応にかかわる遺伝子を明らかにする目的で、植物に異なる防衛反応を誘導するカンザワハダニの2系統(赤系統、白系統)を用いて、系統間のトランスクリプトーム解析を行った。その結果、赤系統では白系統よりも解毒関連酵素の発現量が高く、解毒関連酵素であるglutathion S-transferase (GST)とcarboxyl esteraseの活性も赤系統で白系統よりも高いことが示された。農薬(殺ダニ剤)に対する抵抗性を調べたところ、5種中3種の剤で赤系統で白系統よりも高い抵抗性が認められた。このことから、赤系統は潜在的に高い解毒能力を持つことが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Two strains of Kanzawa spider mite (KSM) - the white scar strain (W-strain) and the red scar strain (R-strain) - induce distinct defense response in the same Phaseolus leaves. In this study, we carried out RNAseq-based transcriptome analysis for mRNA of R-strain and W-strain on kidney bean plants (*P. vulgaris*) to identify KSM genes expressed specifically in either R-strain or W-strain. Of particular interest is the fact that some genes involved in the detoxification system in KSMs were expressed higher in R-strains than in W-strains. Some of detoxification enzyme activities were higher in R-strain than in W-strains as well. Further we investigated whether the differences in detoxification affect the tolerance of acaricides. R-strain showed less mortality than W-strain when they were treated with 3 out of 5 acaricides, suggesting that R-strain latently possesses higher detoxification ability than W-strain.

研究分野：化学生態学

キーワード：カンザワハダニ トランスクリプトーム解析 解毒酵素 農薬抵抗性

## 1. 研究開始当初の背景

植食性の節足動物(昆虫、ハダニ類)の寄主植物に対する適応は、植物の防衛機構と密接に関わっている。なぜなら植物の防衛機構を回避する能力(例えば、植物の防御物質に対する解毒能力)を獲得した植食者のみが、この植物種を餌ホストとして繁殖することができるからである。「植食者がどのように植物の防衛機構を回避しているのか」について遺伝子レベルで明らかにすることができれば、植食者と植物の共進化のメカニズムの解明につながり、かつ応用的に当該相互作用の制御を利用したこれまでにない害虫防除法の開発に結びつくことが期待できる。しかしながら、植食者の寄主適応性については、これまでに生態学的、行動学的、生物学的、化学的な視点から多岐にわたる研究が行われてきたものの、遺伝子レベルでの研究例はあまり見られなかった。

## 2. 研究の目的

植食者の食性幅の決定には、植食者と寄主植物の相互作用の特異性が重要な鍵となるが、その分子機構に関する研究は未だ少ない。本研究では、マメ科植物に異なる防衛反応を誘導する遺伝的に異なる2系統のカンザワハダニ(*Tetranychus kanzawai*)を用いて、これら2系統間のトランスクリプトーム解析と生物検定により、ハダニの食性にかかわる遺伝子群の単離・機能解析を試みた。本研究で注目するハダニ類は、食性幅が広く、生活環周期が短いことから、蔬菜や果樹などさまざまな農作物に被害を及ぼす、農業抵抗性のつきやすい難防除農業害虫である。それゆえ、ハダニの解毒能力の分子基盤に関する研究は、農業だけにたよらないハダニ制御法の開発のシーズとなりうる。

## 3. 研究の方法

### (1) 赤白系統の選抜およびトランスクリプトーム解析

広食性のカンザワハダニにはインゲンの葉に赤い食痕と白い食痕を残すものが存在する。カンザワハダニのインゲン葉上の食痕の色を指標に、赤系統2種(R1, R2)、白系統2種(W1, W2)を選抜した。これらの系統は、マメ科植物に対して異なる防衛応答を誘導する。選抜した各系統をインゲン葉上で維持し、その雌成虫を用いて、RNA-seq(Illumina HiSeq<sup>™</sup> 2000)によるトランスクリプトーム解析を実施した。各ハダニ系統について、

インゲンを餌としてあたえ、発現量に違いのある遺伝子のスクリーニングを行った。

### (2) 酵素活性の測定

解毒に関わる重要な酵素として、グルタチオンS-トランスフェラーゼ(GST)およびカルボキシルエステラーゼの酵素活性を測定した。ハダニより粗酵素を抽出し、GSTについては1-クロロ-2,4-ジニトロベンゼン(CDNB)を、カルボキシルエステラーゼについては1-ナフチルアセテートを基質とし、生成物の吸光度を測定することにより、活性を算出した。

### (3) ハダニのパフォーマンスの計測

ハダニのパフォーマンスは産卵数により測定した。直径1.5mmのリーフディスク上に雌成虫を1頭のせ、48時間後の産卵数を計測しパフォーマンスの指標にした。リーフディスクには異なる寄主植物を用いた。

### (4) 農薬(殺ダニ剤)耐性試験の方法

試験を行う殺ダニ剤は、推奨濃度の1/5, 1/50, 1/500の濃度に希釈した。1.5mm角のインゲン葉のリーフディスク上に雌成虫10頭を1日維持し、その後、希釈した殺ダニ剤にディスクごと10秒間浸漬した。再び水上に戻し、24時間後の死亡数を計測した。

## 4. 研究成果

### (1) 2系統のハダニのトランスクリプトーム解析

選抜した赤系統2種(R1, R2)、白系統2種(W1, W2)について、次世代シーケンサーを用いてトランスクリプトーム解析を実施した。その結果、各系統で発現している遺伝子機能には差は見られなかった(図1)。また、赤系統間(R1 - R2)、白系統間(W1 - W2)で発現量が2倍以下の遺伝子は、それぞれ98.9%と99.2%であり、系統内では発現量の違いは見られなかった。一方、系統間の違いを見たところ、2種の赤系統どちらでも、2種の白系統よりも2倍以上発現している遺伝子は、795個存在した。白系統の方で2倍以上発現している遺伝子は98個にとどまった。このうち、解毒関連の酵素遺伝子は、赤系統ではABCs(ABC-transporters)が11個、GSTs(glutathione-S-transferases)が8個、CCEs(carboxyl / cholin esterases)が9個、CYPs(chytochrome P450)が6個、peptidasesが20個であったが、白系統ではこれらの解毒関連酵素遺伝子は含まれなかった。このことから、赤系統では白系統よりも発現量が高い解毒遺伝子が多いことが示された。

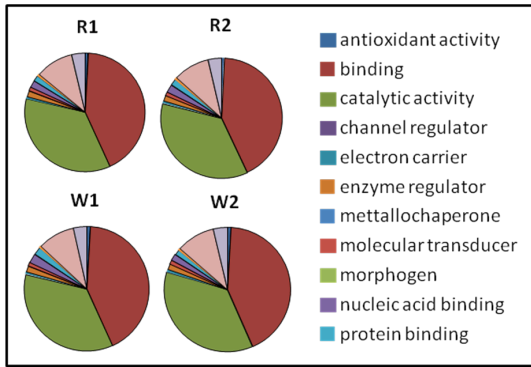


図1 各系統におけるGO図

(2) 解毒関連酵素の活性比較

上記の結果を踏まえて、解毒関連酵素であるGSTとカルボキシルエステラーゼの活性を測定し、赤白系統間での比較を行った。その結果、これらの酵素活性は赤系統で白系統よりも高く(図2)、先の遺伝子発現の結果が裏付けられた。

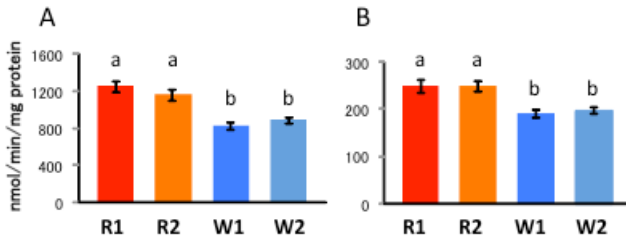


図2 各系統の解毒系酵素の活性 A: GST、B: カルボキシルエステラーゼ

(3) 異なる寄主植物上のパフォーマンス

異なる寄主植物に対する赤白系統の適応性を比較する目的で、インゲンのほか、二次代謝物質が多く含まれるシソ科2種(スペアミントとバジル)とアジサイ、コマツナの葉を用いて、各系統での産卵数を比較した。バジルおよびアジサイ上の産卵数は、インゲン上に比べてどの系統でも低かったが、赤白系統間の差は認められなかった(図3, 4)。コマツナとスペアミント上では、インゲン上とほぼ同様の産卵数が認められた。さらにスペアミント上では赤系統の産卵数が白系統の産卵数よりも有意に多いことが見出された(図3, 4)。これは、赤系統と白系統ではスペアミントの2次代謝物質を代謝する能力が異なることを示唆している。

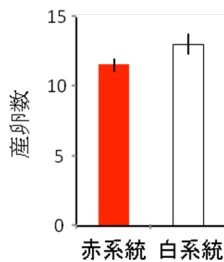


図3 インゲン葉上での赤白系統の産卵数

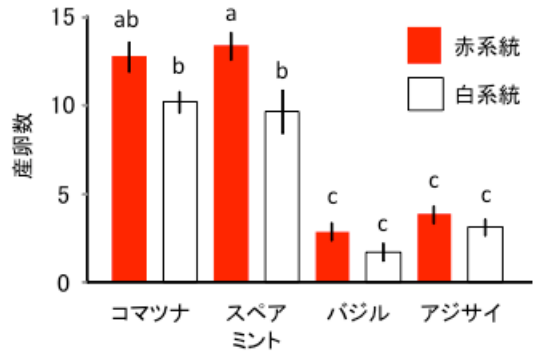


図4 異なる寄主植物上での赤白系統の産卵数の比較 ( $P < 0.05$ , Tukey-Kramer HSD test)

(4) 農薬に対する耐性

これまでに、農薬に対する抵抗性の変化の一因が、解毒代謝系酵素の変異にあることが知られている。先の実験で赤白系統間で解毒酵素の活性の差が認められたので、殺ダニ剤に対する耐性を調べることにした。殺ダニ剤として市販されている5種の薬剤について各系統の耐性を比較した。結果は死亡率で表す(表)。5種のうち3種(A, B, E)で、赤白系統間で死亡率が異なることが見出された。いずれの場合も、白系統の死亡率が赤系統のそれよりも高く、赤系統が潜在的に一部の殺ダニ剤に対する耐性を獲得している可能性が示された。

表 各系統の各種殺ダニ剤に対する抵抗性(死亡率%)を示す

acaricides	Recommend concentration (ppm)	mite types	Mortality(%)		
			1/5	1/50	1/500
A	150	R1	100	100	18 *
		R2	100	100	18
		W1	100	100	34
		W2	100	98	45
B	50	R1	99	27 *	10
		R2	88	27	17
		W1	90	62	20
		W2	94	53	10
C	200	R1	100	100	29
		R2	100	99	35
		W1	100	100	48
		W2	100	100	40
D	10	R1	100	100	68
		R2	100	100	67
		W1	100	100	68
		W2	100	100	65
E	150	R1	38 *	10	20
		R2	32	18	9
		W1	59	14	9
		W2	55	23	17

\* means significant difference between red and white strains ( $P < 0.05$ , Tukey-Kramer HSD test)

容易な農薬抵抗性の獲得は、ハダニの防除を難しくしている一因であり、今回の成果はハダニ防除への応用における1つの知見となりうる。

今後は、殺ダニ剤を処理されたハダニの次世代以降の抵抗性を精査し、系統間の抵抗性の違いがどのように伝達されるか調べていく。

#### 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 8 件)

- ① Okada K., Abe H., Arimura G. (2015) Jasmonates induce both defense responses and communication in monocotyledonous and dicotyledonous plants. *Plant and Cell Physiology* 査読有 56:16-27.  
doi:10.1093/pcp/pcu158
- ② Tahmasebi Z., Mohammadi H., Arimura G., Muroi A., Kant M.J. (2014) Herbivore-induced indirect defense across beans cultivars is independent of their degree of direct resistance. *Experimental and Applied Acarology*. 査読有 63:217-239.  
doi:10.1007/s10493-014-9770-6
- ③ Sugimoto K., Matsui K., Ozawa R. (他 7名) (2013) Induced defence in lima bean plants exposed to the volatiles from two-spotted spider mite-infested conspecifics is independent of the major protein expression. *Journal of Plant Interactions*. 査読有 8: 219-224.  
doi:10.1080/17429145.2013.789563
- ④ Ozawa R., Nishimura O., Yazawa S., Muroi A., Takabayashi J., Arimura G. (2012) Temperature-dependent, behavioral, and transcriptional variability of a tritrophic interaction consisting of bean, herbivorous mite, and predator. *Molecular Ecology*. 査読有 21: 5624-5635.  
doi:10.1111/mec.12052

[学会発表] (計 8 件)

- ①発表者：OZAWA R.  
発表表題：Transcriptome Analyses of Spider Mites and Predatory Mites Regarding Their Temperature and Host Adaptation.  
学会名：the 14th International Congress

of Acarology

発表年月日：2014年7月16日

発表場所：京都テルサ（京都府京都市）

#### ②発表者：小澤理香

発表表題：インゲンに異なる防衛反応を誘導するカンザワハダニ2系統の遺伝子発現解析

学会名：第58回日本応用動物昆虫学会大会

発表年月日：2014年3月28日

発表場所：高知大学（高知県高知市）

#### ③発表者：OZAWA R.

発表表題：RNA-Seq Analysis of Two Genetically Distinct Strains of Spider Mites that Differently Induce Volatiles in Kidney Bean Plants

学会名：Gordon Research Conferences Plant Volatiles

発表年月日：2014年1月30日

発表場所：ベンチュラ（アメリカ合衆国）

[図書] (計 1 件)

有村源一郎、矢崎一史、高林純示、川北篤 (2014) 植物アロマサイエンスの最前線 植物はなぜ香りを発するのか. フレグランスジャーナル社発行 p.167

[その他]

ホームページ等

<http://www.rs.tus.ac.jp/garimura/research/index.html>

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

小澤 理香 (OZAWA Rika)

京都大学・生態学研究センター・研究員  
研究者番号：90597725

##### (2) 研究分担者

有村 源一郎 (ARIMURA Genichiro)

東京理科大学・基礎工学研究科・准教授  
研究者番号：60505329