

平成 28 年 5 月 24 日現在

機関番号：82107

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25871089

研究課題名(和文)性フェロモン剤(交信攪乱剤)抵抗性に関わるフェロモン受容体遺伝子変異の解明

研究課題名(英文)Molecular analysis of pheromone perceptions in a mating disruption-resistant moth

研究代表者

田端 純 (Tabata, Jun)

国立研究開発法人 農業環境技術研究所・その他部局等・主任研究員

研究者番号：20391211

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：チャノコカクモンハマキの性フェロモンは(Z)-11-テトラデセニルアセテートを含む4成分から構成され、この成分を性フェロモン剤として大量に処理すると、本種の配偶行動をかく乱し、交尾を抑制することができる。しかし、このようなかく乱効果を受けない抵抗性系統(R系統)が存在する。次世代シーケンスを利用してR系統のフェロモン受容体候補遺伝子を網羅的に解析し、対照系統(S系統)と比較した。その結果、R系統で明瞭に発現量が低下しているフェロモン受容体候補遺伝子が見つかった。受容体発現量の低下に伴うフェロモンの過剰受容を免れることで、R系統のオスは性フェロモン剤の影響を受けにくくなっている可能性がある。

研究成果の概要(英文)：Mating disruption (MD) is a strategy for reducing the population densities of pests by employing the wide scale application of synthetic copies of sex pheromones to interfere with mate location. A common pheromone constituent of leafrollers, (Z)-11-tetradecenyl acetate, was used to disturb their mate-finding behavior in tea orchards. The resulting "unnatural" pheromone signals from natural virgin females confused the males' ability to locate their mates. However, infestations of the smaller tea leafroller, *Adoxophyes honmai*, began to increase again after this time and the efficacy of the control also declined markedly. To elucidate why the disruptant was inefficient, we investigated pheromone perception of the resistant moths and uncovered that some receptor genes were down-regulated; the resistant males may locate a pheromone source because of evading "over input" of pheromone from MD.

研究分野：化学生態学

キーワード：フェロモン 化学受容 遺伝変異 抵抗性

### 1. 研究開始当初の背景

昆虫の性フェロモンによる雌雄間の情報交信は、最も劇的で顕著な生物間相互作用現象のひとつである。夜になるとガ類のメスが匂い様の「何か」を出し、それを嗅ぎ付けたオスがどこからともなくやってくることは古くから知られていたが、この「匂いの本体」がはじめて化学物質としてカイコガから取り出されたのは高々50年ほど前のことである。しかし、その後すぐに農業害虫管理への応用が提案され、急速に研究が進展した。性フェロモンと名付けられたこの「匂い」は、それほど強烈な活性をもつ天然化合物であった。

チャノコカクモンハマキ(図1)の性フェロモンは、農業害虫としては我が国ではじめて1970年代に化学構造解明された。このハマキガは茶樹をはじめ様々な果樹の害虫として知られるが、当時から殺虫剤抵抗性が顕在化しており、新しい管理技術の開発が求められていた。当時の最新鋭の分析機器を駆使することで、本種の性フェロモンは(Z)-11-tetradecenyl acetate (Z11TDA)と(Z)-9-tetradecenyl acetate (Z9TDA)の二つの主成分から構成されることが明らかとなった。このうち、Z11TDAは他種のハマキガのフェロモンにも含まれる共通成分であることがその後の研究で判明した。そこで、工業的に合成したZ11TDAを大量に圃場に充満させると、チャノコカクモンハマキを含む複数のハマキガの害虫の配偶行動をかく乱し、交尾を阻害することができた。過剰量の人工フェロモンによって害虫の天然フェロモンを干渉する交信かく乱法と呼ばれる害虫管理技術であり、Z11TDAは日本初の交信かく乱剤(フェロモン剤)として1983年に農薬登録された。



図1 合成フェロモンに反応するハマキガ

Z11TDA 剤は開発当初から優れた効果を発揮し、フェロモン剤の有用性を知らしめた。ところが、1990年代の後半になると、静岡県の一部でZ11TDA 剤が効かないハマキガが出現した。その後の研究で、これらのハマキガはZ11TDA 剤に対する抵抗性を身に付けていることが明らかとなった(Tabata et al. 2007a)。これは現在までに知られた唯一のフ

ェロモン剤抵抗性の事例である。

### 2. 研究の目的

抵抗性ハマキガには、Z11TDAにZ9TDA等の成分を追加した新製剤が効くので、現在でも問題なくフェロモン剤による防除を実施することができる。しかし、Z11TDA 剤に対する抵抗性が、どのようなメカニズムで生じたのか、詳細なプロセスは全く分かっていない。我々はZ11TDA 剤が効かない抵抗性系統(R系統)を作成した(図2)ので、これとZ11TDA 剤未経験の感受性系統(S系統)を比較することで、フェロモン剤抵抗性メカニズムの解明を目指している。なぜフェロモン剤に対し抵抗性を身に付けることができたのかを明らかにすることができれば、今後の類例を未然に防ぐことができるし、より効果的なフェロモン剤の施用法を提案することができる。

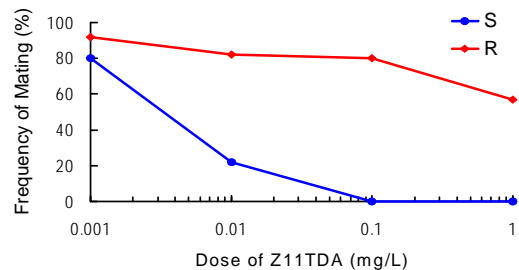


図2 Z11TDA 剤下のR系統とS系統の交尾率

これまでの研究で、R系統とS系統ではオス成虫のフェロモン反応行動に明瞭な差異が認められることが示されている(Tabata et al. 2007b)。そこで、本研究では、オス成虫の触角上でのフェロモン受容性に焦点を絞って研究を行った。すなわち、フェロモン受容体のR/S系統間変異を調査することで、フェロモン受容体分子レベルの差異がフェロモン剤抵抗性に関与しているかどうかを検証した。

フェロモン剤抵抗性はわずか10数年という短い期間で生じた人為選択による進化現象とも捉えることができる。本研究により化学受容の遺伝的・進化的変異を検出することができれば、基礎生物学的にも興味深い話題を提供できると予想される。

### 3. 研究の方法

本研究では、まず各系統のオス成虫の触角をそれぞれ合計約1000頭分集め、その触角からTotal RNAを抽出した。RNAの抽出に供するまで、触角組織は-78℃で保存した。RNAの抽出にはQuickGene RNA tissue kit SII (Kurabo)を用いた。

次に、抽出したRNA内のトランスクリプトームを次世代シーケンスによって網羅的に解析した。シーケンサーはIllumina HiSeq 2000を使用した。得られたリードをもとに、

既知のフェロモン受容体遺伝子と相同性の高い配列を抽出し、フェロモン受容体候補遺伝子配列とした。

それぞれのフェロモン受容体候補遺伝子配列について、定量 RT-PCR 法で発現量を評価した。また、近縁のガ類についても同様の手法でフェロモン受容体候補遺伝子を探索するとともに、メスの生産するフェロモン成分あるいはフェロモン前駆体についても分析を行い、情報を照らし合わせて解析した。

#### 4. 研究成果

フェロモン剤の利点としては、(1) 対象害虫のみに作用する、(2) 人畜魚毒性がない、(3) 残留性が低い、等が挙げられているが、もうひとつ、重要な特徴として、フェロモン剤による防除では殺虫剤で頻発するような抵抗性は生じにくいと考えられてきた(田端ら、2007)。性フェロモンは昆虫自身が生産し、交尾相手を誘引するために使用する化合物である。したがって、仮に害虫がフェロモン剤を「無毒化」する能力を身につけたとしても、そのような個体は交尾相手の性フェロモンを感知することができず、次世代を残すことができないと考えられたからである。実際に 1990 年代の中頃まで抵抗性の報告はなかった。つまり、Z11TDA 剤の開発から短期間のうちに抵抗性のハマキガが発生したのは「想定外」の出来事であった。本研究では、このような異例とも言えるフェロモン剤抵抗性を伴うフェロモン交信システムの遺伝的变化を以下のように分子レベルで検証した。

次世代シーケンスを用いたトランスクリプトーム網羅的解析により、フェロモン剤に強い抵抗性を示す R 系統のオスの触角上で発現するフェロモン受容体候補遺伝子のプロファイルを、フェロモン剤感受性の S 系統のものと比較した。得られた総リード数は 170126 リードで、そのうち少なくとも 13 リードは既知のフェロモン受容体遺伝子と相同性が認められた。これらの候補配列の発現量を R/S 系統間で比較したところ、R 系統では発現量が少ないフェロモン受容体候補が存在することが明らかとなった(図 3)。

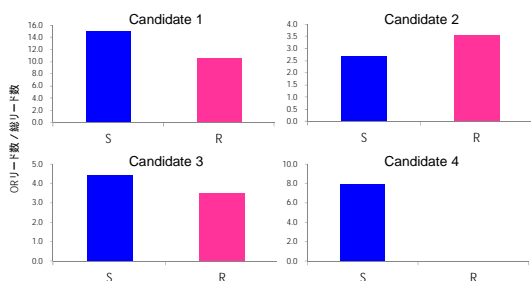


図 3 フェロモン受容体候補の発現量比較

すなわち、R 系統ではフェロモン成分の少なくとも一部を受容しにくくなっていることが示唆された。フェロモン成分を受容し

にくいということは、フェロモン剤の影響を免れやすいということでもある。このようなフェロモン受容体レベルでの変異がフェロモン剤抵抗性に関与しているものと考えられる。

しかし、フェロモン成分を受容しにくいのであれば、メスの放出する天然のフェロモンも感知しにくくなっているはずであり、そのようなオスは配偶活動において不利益を被るものと予想される。そのようなオスがなぜ存在し、選択されてきたのであろうか？実は、チャノコカクモンハマキのメスが生産するフェロモン成分(Z11TDAとZ9TDA)の比率には大きな個体変異がみられる。多くのメスは両者の比率が3:7のフェロモンを放出するが、一部の個体はその比率が極端に偏ったフェロモンを生産する。これらの成分比の違いはフェロモン生産に関わる酵素の基質特異性のわずかな違いによって生じる(Tabata & Ishikawa 2016)。このようなメスのフェロモン成分比の変異に対応するように、オスの反応性(フェロモンに対する好み)にも遺伝的な違いがある。

チャノコカクモンハマキの場合、S 系統では天然の成分比に近い3:7のフェロモンによく反応するが、それよりも成分比が偏ると反応活性は低下し、Z11TDA を含まない0:1や、反対にZ9TDA を含まない1:0のフェロモンには全く反応を示さない。ところが、R 系統は成分比によらず、どのようなフェロモンに対してもよく反応する。驚くべきことに、S 系統では全く反応がみられなかったZ11TDA あるいはZ9TDA どちらかを欠く0:1や1:0の成分比のフェロモンにも多くの個体が反応する(図4)(Tabata et al. 2007b)。つまり、抵抗性を有するR 系統のオスは、交信かく乱成分として使用されていたZ11TDA をもはやフェロモン成分として必要としなくなっているのである。つまり、このようなフェロモン成分を受容する必要がそもそもないので、本研究で示唆されたようなフェロモン受容体の発現頻度が少なくなっている、大きな支障なく配偶活動を営むことができると考えられる。

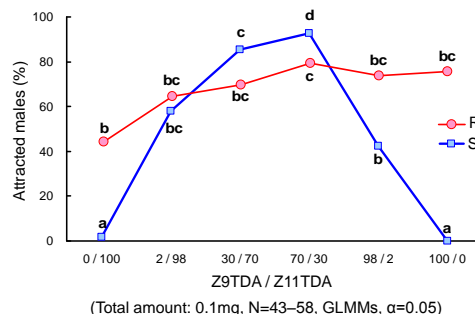


図 4 フェロモン成分比に対する反応性

ガ類のメスのフェロモンは、一般的には複数の成分が適当な比率で構成されていない

とオスを誘引することができない。フェロモン剤として、人工的に合成したフェロモン成分を過剰に与えると、その構成に歪みが生じ、フェロモンによる交信をかく乱することができる。ところが、チャノコカクモンハマキの場合、その構成比に関係なく反応するオスが集団内に存在し、そのような個体が選抜されることで抵抗性の発現に至ったと考えられる。最近の研究から、フェロモンの成分比は絶対的に決まったものではなく、集団間あるいは集団内でも変異に富み、しかもわずかな遺伝的変異によって大きく表現型が変化し得ることが示唆されている(田端. 2015)。今後は表現型あるいは遺伝子型レベルでの多様性を考慮した上でフェロモン剤開発を進めることが望まれる。

#### <引用文献>

- 1) Tabata, J., H. Noguchi, Y. Kainoh, F. Mochizuki, and H. Sugie (2007a) Sex pheromone production and perception in the mating disruption-resistant strain of the smaller tea leafroller moth, *Adoxophyes honmai*. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 122: 145-153.
- 2) Tabata, J., H. Noguchi, Y. Kainoh, F. Mochizuki, and H. Sugie (2007b) Behavioral response to sex pheromone-component blends in the mating disruption-resistant strain of the smaller tea tortrix, *Adoxophyes honmai* Yasuda (Lepidoptera: Tortricidae), and its mode of inheritance. *Applied Entomology and Zoology* 42: 675-683.
- 3) 田端 純, 杉江 元, 望月 文昭 (2007) 性フェロモン製剤(交信かく乱剤)に対する抵抗性. *植物防疫* 61: 46-49.
- 4) 田端 純 (2015) 性フェロモン剤の抵抗性現象の解明と新規製剤の開発に関する研究. *日本農学進歩賞講演要旨*
- 5) Tabata, J. and Y. Ishikawa (2016). Divergence of the sex pheromone systems in "Oriental" *Ostrinia* species. In: Allison JD & Cardé RT eds. *Pheromone Communication in Moths*. University of California Press, pp. 245-257.

#### 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6件)

- 1) Tabata, J. and S. Ohno (2015) Enantioselective synthesis of the sex pheromone of the grey pineapple mealybug, *Dysmicoccus neobrevipes* (Hemiptera: Pseudococcidae), for

determination of the absolute configuration. *Applied Entomology and Zoology* 50: 341-346. DOI: 10.1007/s13355-015-0337-8 [査読有]

- 2) Tabata, J. and R. Ichiki (2015) A new lavandulol-related monoterpene in the sex pheromone of the grey pineapple mealybug, *Dysmicoccus neobrevipes*. *Journal of Chemical Ecology* 41: 194-201. DOI: 10.1007/s10886-015-0545-2 [査読有]
- 3) Tabata, J., M. Teshiba, N. Shimizu, and H. Sugie (2015) Mealybug mating disruption by a sex pheromone derived from lavender essential oil. *Journal of Essential Oil Research* 27: 232-237. DOI: 10.1080/10412905.2015.1007219 [査読有]
- 4) Tabata, J. (2013) A convenient route for synthesis of 2-isopropyliden-5-methyl-4-hexen-1-yl butyrate, the sex pheromone of *Planococcus kraunhiae* (Hemiptera: Pseudococcidae), by use of , - to , -double-bond migration in an unsaturated aldehyde. *Applied Entomology and Zoology* 48: 229-232. DOI: 10.1007/s13355-013-0173-7 [査読有]
- 5) Lassance, J.-M., M. A. Liénard, B. Antony, S. Qian, T. Fujii, J. Tabata, Y. Ishikawa, and C. Löfstedt (2013) Divergence in moth sex pheromones regulated by one biosynthetic gene illustrates variation on a theme at the genus level. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 110: 3967-3972. DOI: 10.1073/pnas.1208706110 [査読有]
- 6) 田端 純 (2013) ガ類のフェロモンの種特異性とそれを制御する脂肪酸還元酵素. *アロマリサーチ* 14: 144-145. [査読無]

#### [学会発表](計4件)

- 1) 田端 純. 性フェロモン剤の抵抗性現象の解明と新規製剤の開発に関する研究. 第14回日本農学進歩賞受賞講演. 2015.11.27. 東京大学(東京都・文京区)
- 2) 田端 純. オスを惑わす「にせもの」のフェロモンで害虫の繁殖を防ぐ. 農業環境技術研究所公開セミナー. 2015.11.26. 秋葉原コンベンションホール(東京都・千代田区)
- 3) 田端 純. 性フェロモンの多様性と応用に関する研究. 第14回日本応用動物昆虫学会奨励賞受賞講演. 2014.3.26. 高知大学(高知県高知市)

#### [図書](計1件)

- 1) Tabata, J. and Y. Ishikawa (2016).

Divergence of the sex pheromone systems in “Oriental” *Ostrinia* species. In: Allison JD & Cardé RT eds. Pheromone Communication in Moths. University of California Press, pp. 245-257.

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

田端 純 (Tabata, jun)

国立研究開発法人農業環境技術研究所・

生物多様性研究領域・主任研究員

研究者番号：20391211