

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 25 日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2016

課題番号：26660042

研究課題名(和文) 薬剤抵抗性原因遺伝子を簡便に推定する連鎖・連鎖ゲノムマッピング法の確立

研究課題名(英文) Development of an acaricide resistance gene linkage mapping method

研究代表者

刑部 正博 (Osakabe, Masahiro)

京都大学・農学研究科・准教授

研究者番号：50346037

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：ナミハダニの薬剤抵抗性遺伝子を染色体地図上へのマッピングから推定する方法を確立する。このため、ゲノムデータのscaffold上の位置が分かっているマイクロサテライトSSRについて連鎖解析を行い、染色体構造を明らかにする。本研究では、ゲノムの90%以上をカバーする上位40個のうち26個のscaffoldsの染色体上の位置を推定できた。また、ゲノムデータを利用したQTL解析により、ピリダベン抵抗性因子をscaffold 7上に特定した。該当する位置に作用点であるミトコンドリア電子伝達系複合体I上のサブユニットPSSTが存在し、ピリダベン抵抗性に関与するアミノ酸置換の存在を明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Development of a new method analyzing acaricide resistance factor using genome mapping in the two-spotted spider mite was aimed in this study. To construct genome map, genetic linkages among microsatellite (SSR) loci, which position in scaffolds had been determined, were analyzed in the two-spotted spider mite. Consequently, 26 scaffolds of 40 largest scaffolds (> 90% of a hole genome) were mapped into the resulting five linkage groups of SSRs. Resistance genes to pyridaben, a mitochondrial electron transport complex I inhibitors, was analyzed by QTL analysis. A significant QTL was indicated at scaffold 7 where PSST gene, a component of the complex I, existed, and the significant QTL area was extended to the next 10 cM, where one pseudo and five full-length cytochrome P450 monooxygenase genes were found. Previous studies suggested involvement of pyridaben resistance with cytochrome P450 functions.

研究分野：応用昆虫学

キーワード：ハダニ ゲノム 染色体地図 薬剤抵抗性 遺伝子マーカー

## 1. 研究開始当初の背景

ナミハダニは最も多くの薬剤に抵抗性を獲得したコスモポリタンな農業害虫である。抵抗性機構の多くが未解明のまま新規薬剤が使われてきた結果、多くの薬剤間で交差抵抗性が発達し(複合抵抗性)、解決策が不明な深刻な状況に直面している。

申請者は長年に渡り、マイクロサテライト(SSR)を遺伝子マーカーとして用いたハダニ類の個体群構造解析を行ってきた。その一方で、ナミハダニのSSRについて連鎖解析を進め、12 遺伝子座からなる連鎖地図を作成した。それら SSR と薬剤抵抗性遺伝子の連鎖解析から、作用機差が異なる 5 種類の殺ダニ剤に対する抵抗性遺伝子の位置を調べた。その結果、いずれの薬剤抵抗性遺伝子も同一染色体上で連鎖していることが示唆された。

2011 年にナミハダニのゲノムデータが利用可能になったことにより、薬剤抵抗性の遺伝解析の飛躍的発展が期待されている。しかし、ゲノムデータは 640 の scaffolds に分かれており、それらが染色体(n=3)にどう配置されているか、すなわち染色体構造は未だ不明である。

一方、薬剤抵抗性の主要な要因は作用点変異と解毒機構によるものと考えられる。しかし、殺ダニ剤では作用点が不明な薬剤や複数の抵抗性因子が存在する場合などが知られている。さらに、関連する主要な解毒酵素(チトクロム P450、カルボキシエステラーゼ、グルタチオン S 転移酵素など)は多重遺伝子族であり、例えばチトクロム P450 ではゲノム中に 86 個の異なる遺伝子が確認されている。このため、薬剤抵抗性の原因遺伝子の特定には依然として多大な労力と時間が必要であり、方法論も確立していない。

## 2. 研究の目的

ナミハダニの薬剤抵抗性発達は著しく、抵抗性管理法の確立が急務であるが有効な方法は無い。申請者は、独自に作成した SSR 連鎖地図をもとに、ナミハダニゲノム中に抵抗性原因候補遺伝子を迅速に絞り込む方法を考案した。理論上、この方法は薬剤抵抗性が解毒酵素の働きによる場合や、薬剤の標的部(作用点)の変異による場合など、あらゆるタイプの抵抗性発現に対して有効であり、抵抗性原因遺伝子の特定効率が飛躍的に向上するものと期待される。

本研究では、新たな研究基盤として、SSR 連鎖地図上に scaffolds をマップし、薬剤抵抗性と SSR の連鎖解析から原因遺伝子を含む scaffold を特定し、候補遺伝子を簡便に推定するゲノムマッピング法を確立することを主目的とした。

一方、SSR と薬剤抵抗性の連鎖解析と、交配個体の子の死亡率を量的形質として SSR との組換え率をもとにした連鎖解析(QTL 解析)を用いて抵抗性遺伝子が推定できるかに

ついて、ピリダベン抵抗性をモデルとして検証した。

## 3. 研究の方法

### (1). SSR 連鎖解析と scaffolds のマッピング

当研究室では、本研究開始以前から多くの SSR 遺伝子座について、解析用のプライマーを設計していた。しかし、PCR 増幅の効率や特異性において問題があるものや、T<sub>m</sub> 値の低さから、以下に述べる multiplex PCR に不適当なプライマーなどが見られた。また、それらの内の何割かは、genomic DNA から直接 SSR をクローニングして作成されたものであり、増幅される SSR が必ずしも目的の scaffold 上に存在するとは限らないものも多かった。

そこで、先ずそれらの SSR の scaffold 上の位置を調べ、61 個の SSR を選出し、増幅の低いものならびに T<sub>m</sub> 値が低いものに関しては改めてプライマーを設計しなおした。さらに、scaffolds 1~40 について、SSR 用プライマーが設計されていないものを中心に、合計 45 個の SSR 用プライマーを作成した。これにより、scaffolds 1~40 の全てについて 1 個以上の SSR 用プライマーを得た。Scaffolds は大きい順に番号が付けられており、40 番まででナミハダニの全ゲノムサイズ(90 Mb)の 90%以上に相当する。

なお、ナミハダニは産雄単為生殖を行う。既交尾の雌成虫は二倍体の受精卵と半数体の未受精卵を共に産み、受精卵は雌に、未受精卵は雄に発育する。雌成虫は未交尾(処女)のままでも産卵し、それらは全て未受精卵であるため、半数体の雄に発育する。したがって、異なる系統の雌雄を交配して F<sub>1</sub> 雌を得ると、F<sub>1</sub> 雌で減数分裂により配偶子が形成される際に染色体の組換えが起こる。さらに、この F<sub>1</sub> 雌を処女のまま未受精卵を産卵させると、その組換えをそのまま遺伝子型に反映した F<sub>2</sub> 雄を得ることができる。このため、これら F<sub>2</sub> 雄の持つ SSR 遺伝子座の対立遺伝子の組み合わせを親世代の組み合わせと比較することにより、遺伝子座間の組換え率を調べることができる。本研究ではこの方法により、scaffold 上の位置が分かっている SSR 遺伝子座間の組換え率から連鎖群を解析し、関連する scaffold 間の連鎖地図上の位置を推定した。

実験では、先ず、マッピングのため、予備的に 8 つの飼育系統から 2 ないし 3 個体(雌成虫)を抽出して個体ごとに DNA サンプルを調整し、31 個の SSR について遺伝子型を解析した。SSR の解析では、Multiplex PCR Assay Kit (Takara)により増幅したフラグメントを、シーケンサーによりフラグメント解析し、Gene Mapper Software ver. 3.5 によりタイピングした。

この結果、最も変異が見られる系統の組み合わせを 2 組選び、それぞれの正逆交配を行い、F<sub>1</sub> 処女雌を得た。これらに F<sub>2</sub> 雄卵を産卵させて成虫まで飼育した。得られた F<sub>2</sub> 雄

成虫と交配親の雌雄について、それぞれ DNA サンプルを調整した。解析に用いた F2 雄は、それぞれの系統間の正逆交配の合計で、172 および 145 個体である。

フラグメント解析により得られた遺伝子型データを取りまとめ、R ソフトウェアの onemap パッケージを用いて組換え率から連鎖解析を行い、連鎖群ならびにマーカー間の距離を算出した。それらのデータをもとに MapChart ソフトウェアにより連鎖地図を製作した。

なお、次項の QTL 解析に当たって、あらかじめ SSR マーカーと抵抗性遺伝子の連鎖解析を行っており、それらの内、本項と同じ解析方法により得られた 15 遺伝子座 (F2 雄 192 個体) のデータを解析に加えた。このため、解析に用いた F2 雄の合計は 509 個体となった。また、解析用のデータが得られた SSR は 31 個の scaffold 上に分布する 39 遺伝子座であった。

#### (2). 薬剤抵抗性遺伝子の QTL 解析

ピリダベン抵抗性遺伝子の scaffold へのマッピング

ミトコンドリア電子伝達系複合体 I 阻害剤 (METI-Is) である殺ダニ剤は世界的に使用されており、各地で特にナミハダニにおいて抵抗性の発達が報告されている。しかし、そのメカニズムの詳細については不明であり、作用点変異については研究報告がなかった。

そこで、抵抗性系統と感受性系統の正逆交配により得られた F1 処女雌に未授精の雄卵を産卵させ、発育した F2 雄成虫にピリダベンを処理した。選抜後の生存個体について、個体ごとに DNA を調整し、それぞれ異なる scaffold (no. 3, 4, 7, 9, 35) 上にある 5 つの遺伝子座の SSR (TkMS15, TuCT13, TuCT09, TuCT67, Tu27; アクセション番号 AB107765, AB263085, AB263084, AB263090, AJ419831) の遺伝子型をフラグメント解析により調べた。交配親の各 SSR 遺伝子座についても調べ、抵抗性遺伝子と組換え率の低い遺伝子座を含む scaffold を特定した。

Scaffold 内におけるピリダベン抵抗性遺伝子の QTL 解析

ピリダベン抵抗性遺伝子の存在が特定された scaffold 内の SSR 遺伝子座を調べ、12 遺伝子座について QTL 解析用の PCR プライマーを設計し、既存のプライマー 2 つを合わせて系統間の変異を調査し、5 つの SSR 解析用プライマー (TuCT04, tu07ms\_g10, tu07ms\_g7, tu07ms\_g4, tu07ms\_g3; アクセション番号: AB263083, LC090067, LC090066, LC090065, LC090064) を選んだ。

抵抗性系統と感受性系統を正逆交配し、F1 雌に戻し交雑して B1 処女雌を得た。これらを個体ごとに隔離飼育して B2 雄卵を産卵させ、発育した B2 雄成虫についてピリダベンによる死亡率を調べた。この死亡率を各 B2 雌個体の量的形質とした。

一方で、交配親の雌雄ならびに産卵後の B1 雌から個体ごとに DNA サンプルを調整した。これらについて、scaffold 内の SSR 遺伝子型をフラグメント解析により調べた。

交配親と B1 雌の遺伝子型データ R ソフトウェアの onemap パッケージを用いて組換え率から連鎖解析を行い、連鎖群内における SSR 遺伝子座間の距離を算出した。次に、B2 雄の死亡率と SSR 遺伝子型、遺伝子座間の距離を用いて QTL 解析を行い、scaffold 内で抵抗性遺伝子が存在する領域を推定した。データ解析には R ソフトウェアの qtl パッケージを用いた。

#### 4. 研究成果

##### (1). SSR 連鎖解析と scaffolds のマッピング

解析した 39 遺伝子座の SSR の内、6 つの SSR では他の遺伝子座との連鎖は確認されなかった。連鎖が確認されたものについては、3 つ以上の遺伝子座による連鎖群が 5 つ (LG1 ~ 5) 確認され、その他に 2 遺伝子座の連鎖が 1 つ確認された。同一の scaffold 上に存在する SSR はいずれも連鎖地図上で隣り合った位置に存在するかもしれない連鎖が確認できなかったか、あるいは異なる場所にマップされることはなかった (図 1)。

当研究室における過去のデータも合わせたさらに多くのサンプルによる解析との比較から、5 つの連鎖群の内、LG1 (5 SSRs, 5 scaffolds) と LG4 (3 SSRs, 3 scaffolds) ならびに LG2 (8 SSRs, 7 scaffolds) と LG5 (7 SSRs, 4 scaffolds) は同一の連鎖群である可能性が示された。これらが正しければ、scaffolds はナミハダニの染色体数と一致する 3 本にまとめられるが、特に LG2 と LG5 の結合についてはさらに検討が必要である。これらの結果から、1 ~ 40 番の内、26 個の scaffolds について連鎖関係が示された (2 つの SSR の連鎖を加えると 28 scaffolds)。

今後は、さらにナミハダニの染色体構造の完全な解明を目指す予定であり、新たに国際的な協力関係を構築して解析を進めている。

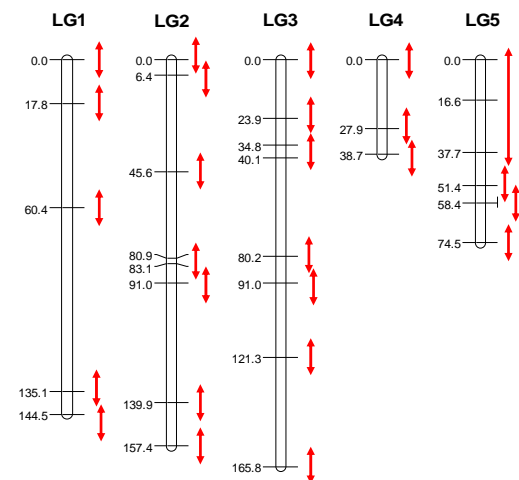


図1 SSR連鎖群 (LG) . 横棒と左の数字は各SSRの位置とそれらの遺伝的距離 (cM) を示す . 赤色の矢印は対応する scaffold の位置を示す .

## (2) 薬剤抵抗性遺伝子の QTL 解析

### ピリダベン抵抗性遺伝子の scaffold へのマッピング

ピリダベン抵抗性は scaffold 7 と scaffold 35 に存在する TkMS15 と TuCT13 と有意な連鎖が検出された。これらの内、全社との組み換え率は 5.73% と小さいのに対して後者とは 28.19% であった。これらの結果から、ピリダベン抵抗性遺伝子は scaffold 7 上に存在する可能性が高いと考えられた。

### Scaffold 内におけるピリダベン抵抗性遺伝子の QTL 解析

Scaffold 7 内に設計された 5 つの SSRs を用いた QTL 解析により、tu07ms\_g10 と tu07ms\_g7 の間、470,925 塩基の範囲にピリダベン抵抗性に関する QTL の存在が推定された (図 2b)。この領域にはピリダベンの作用点であるミトコンドリア電子伝達系複合体 I を構成するサブユニットの一つである PSST をコードする遺伝子 (*tetur07g05240*) が存在する。PSST はサブユニット 49kDa と共にキノン結合ポケットを形成しており、同じく METI-Is に含まれる殺ダニ剤であるフェンピロキシメートの結合に関与していると考えられている。

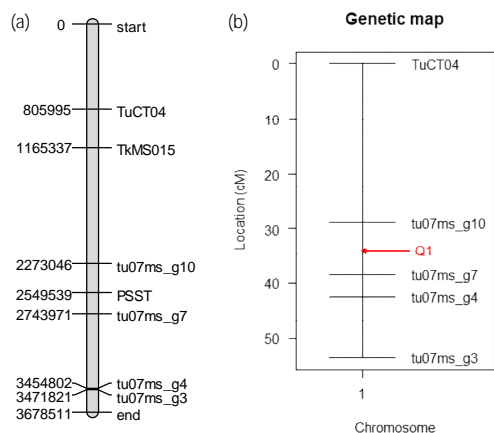


図2 (a) Scaffold 7 における SSR 遺伝子座の物理的 (塩基配列) 位置、(b) SSR の連鎖地図とピリダベン抵抗性遺伝子の予測位置 (Q1)。 (a) の左の数字は scaffold のスタート位置からの塩基数を示す。PSST は scaffold 7 上に存在するミトコンドリア電子伝達系複合体 I のサブユニットである PSST の遺伝子座を示す。

抵抗性系統と感受性系統の *tetur07g05240* の DNA 塩基配列を比較したところ、抵抗性系統では H110R のアミノ酸置換を引き起こす塩基置換 (A329G) が見つかった。選抜試験、交配実験等の結果からこの変異がピリダベン抵抗性に関与していることが明らかになった。

ロッド値プロットによれば、Q1 ~ tu07ms\_g4 の間、約 10 cM の位置にも有意な QTL 範囲が認められる (図 3)。Q1 はほぼ PSST の位置に相当すると仮定し、scaffold 7 の PSST ~ tu07ms\_g4 の範囲を調べたところ、1 つの偽遺伝子と 5 つのチトクロム 450 遺伝子 (*cyp* gene): CYP385A1 (*tetur07g05500*)、CYP392A1 (*tetur07g06410*)、CYP392A2p

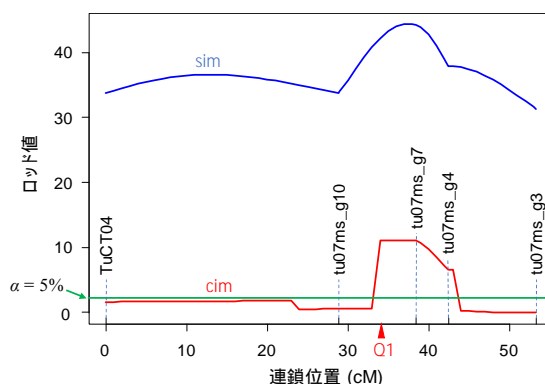


図3 Scaffold 7 上の SSR 連鎖位置と抵抗性のロッド値プロット (青線: simple interval mapping (sim), 赤線: composite interval mapping (cim)). 緑線:  $\alpha = 5\%$  (cim), Q1: QTL 位置, : チトクロム P450 遺伝子, : チトクロム P450 遺伝子クラスター。

(*tetur07g06440*)、CYP392A3 (*tetur07g06460*)、CYP392A4 (*tetur07g06480*)、CYP390B1 (*tetur07g08209*) が含まれていることが分かった。

過去の研究から、ピリダベン抵抗性系統の LC<sub>50</sub> 値はチトクロム P450 阻害剤であるピペロニルブトキシド (PBO) の処理によって顕著に低下することが明らかになっている。今回示された QTL 領域には *cyp* gene のクラスターも含まれていることから、それらの遺伝子の効果についても今後検証を進める予定である。

これらにより、抵抗性原因因子の解明の手段として、連鎖・連鎖解析による連鎖マッピングとゲノムデータの活用が有効であることが示された。また、本研究ではあらかじめ抵抗性遺伝子が存在する scaffold を連鎖解析により推定した後に QTL 解析を行った。しかし、ゲノム全体にわたる SSR およびそれらを含む scaffold の連鎖地図が完成して染色体の位置が分かるようになれば、最初から QTL 解析を行うことが可能になると考えられる。

## 5. 主な発表論文等 (研究代表者には下線)

### [雑誌論文] (計 3 件)

Osakabe, M., T. Imamura, R. Nakano, S. Kamikawa, M. Tadatsu, Y. Kunitomo, M. Doi. 2017. Combination of restriction endonuclease digestion with the  $\Delta\Delta Ct$  method in real-time PCR to monitor etoxazole resistance allele frequency in the two-spotted spider mite. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 139, 1–8. DOI: 10.1016/j.pestbp.2017.04.003. 査読有

Bajda, S., W. Dermauw, R. Panteleri, N. Sugimoto, V. Douris, L. Tirry, M. Osakabe, J. Vontas and T. Van Leeuwen. 2017. A mutation in the PSST homologue of complex I (NADH:ubiquinone oxidoreductase) from *Tetranychus urticae* is associated with resistance to METI acaricides. *Insect Biochemistry and*

Molecular Biology 80, 79–90. DOI: 10.1016/j.ibmb.2016.11.010. 査読有  
Khalighi, M., W. Dermauw, N. Wybouw, S. Bajda, M. Osakabe, L. Tirry and T. Van Leeuwen. 2016. Molecular analysis of cyenopyrafen resistance in the two-spotted spider mite *Tetranychus urticae*. Pest Management Science 72, 103–112. DOI: 10.1002/ps.4071. 査読有

〔学会発表〕(計6件)

刑部正博, 杉本直也, 井尻悠士, 上樂明也, S. Bajda, T. Van Leeuwen. QTL 解析によるピリダベン抵抗性遺伝子のナミハダニゲノムへのマッピング. 日本昆虫学会第76回大会・第60回日本応用動物昆虫学会大会・合同大会, 2016年3月26–29日, 堺市(大阪府立大学)

Osakabe, M. Recent progress in the linkage analysis among scaffolds in *T. urticae* genome. 7th Spider Mite Genome Meeting, 28 September–2 October 2015, Catalonia, Spain.

井尻悠士, 刑部正博, T. Van Leeuwen. ピリダベン抵抗性における卵限定的母性効果発現機構の解析. 第59回日本応用動物昆虫学会大会, 2015年3月26–28日, 山形市(山形大学)

伊原 嶺, 刑部正博, T. Van Leeuwen. ナミハダニのシフルメトフェン抵抗性における雌雄および系統間差異. 第59回日本応用動物昆虫学会大会, 2015年3月26–28日, 山形市(山形大学)

Osakabe, M. Adaptation to acaricide and UV radiation in spider mites. 6th Spider Mite Genome Meeting, 6–10 October 2014, Ibiza, Spain.

Osakabe, M., N. Sugimoto and R. Uesugi. Combination between classical genetic mapping tools and genomics in acaricide resistance study. XIV International Congress of Acarology, 14–18 July 2014, Kyoto, Japan.

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

刑部 正博 (OSAKABE MASAHIRO)  
京都大学・大学院農学研究科・准教授  
研究者番号: 50346037

### (2) 研究協力者

Thomas Van Leeuwen  
Associate Professor; Institute for  
Biodiversity and Ecosystem Dynamics,  
University of Amsterdam, the Netherlands