

平成 22 年 3 月 16 日現在

研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2007～2009
 課題番号：19580055
 研究課題名（和文） コナガの抵抗性遺伝子の機能解析と防除への応用に関する基礎的研究
 研究課題名（英文） Functional analyses of genes conferring insecticide resistance and their application in control of *Plutella xylostella*
 研究代表者
 園田 昌司（SONODA SHOJI）
 岡山大学・資源生物科学研究所・准教授
 研究者番号：00325127

研究成果の概要（和文）：コナガの合成ピレスロイド剤抵抗性には主として解毒分解酵素活性の増大と標的部位の感受性の低下が関与している。コナガにおいて合成ピレスロイド剤の標的であるナトリウムチャネルのアミノ酸配列を解析したところ、3つのアミノ酸変異(L1014F、T929I、M918I)および2つのアミノ酸多型(A1101T、P1879S)が感受性の低下による抵抗性に関与していることが明らかとなった。また、T929I 部位は2つの選択的エクソン(18a および 18b)によってコードされ、18b を含む転写物は部位特異的な発現様式を示すことが明らかとなった。さらに、合成ピレスロイド剤抵抗性に関わる解毒分解酵素遺伝子(*CYP6BG1*)の発現とナトリウムチャネルのアミノ酸変異の関係を調べたところ、野外のコナガでは両抵抗性機構は独立して合成ピレスロイド剤抵抗性に関与していることが明らかとなった。

研究成果の概要（英文）：Pyrethroid resistance of the diamondback moth *Plutella xylostella* is mainly conferred by increased metabolic detoxification of the degradation enzymes and decreased sensitivity of the target site. Analysis of amino acid sequences of the sodium channel showed that three point mutations (L1014F, T929I and M918I) and two polymorphisms (A1101T and P1879S) on the channel are involved in the pyrethroid resistance. The T929I site was encoded by two mutually exclusive alternative exons (18a and 18b) and the splice variant containing 18b was expressed in a tissue specific manner. Analysis of the *CYP6BG1* expression and the sodium channel mutations showed that both resistance mechanisms are independently involved in pyrethroid resistance of the diamondback moth in the field.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,500,000	750,000	3,250,000
2008年度	700,000	210,000	910,000
2009年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

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：コナガ、殺虫剤抵抗性、ピレスロイド、ナトリウムチャンネル、チトクローム P450、選択的スプライシング

1. 研究開始当初の背景

コナガの合成ピレスロイド剤抵抗性にはナトリウムチャンネルのアミノ酸変異による感受性の低下が関与していることがイギリスのグループによって明らかにされていた。また、合成ピレスロイド剤の分解に関わる遺伝子の解析は名古屋大学のグループが進めていた。しかし、野外のコナガの合成ピレスロイド剤に対する抵抗性レベル、ナトリウムチャンネルにおけるアミノ酸変異の頻度、選択的スプライシング等についての解析は全く行われていなかった。

2. 研究の目的

これまで殺虫剤抵抗性の研究はショウジョウバエ、イエバエ、ゴキブリといったモデル昆虫を用いて分子生物学的、電気生理学的な観点から進められてきた。しかしながら、モデル昆虫で得られたデータは農業害虫には必ずしも当てはまらないことも多く、農業害虫を用いた抵抗性機構の解明が望まれている。コナガは飼育が比較的容易でこれまで開発されてきた殺虫剤のほとんど全てに抵抗性を発達させてきたことから抵抗性研究を行うにあたっては非常に好適な農業害虫であるといえる。本研究ではコナガの合成ピレスロイド剤抵抗性機構について分子生物学的手法を用いて以下の解析を行った。

- (1) 合成ピレスロイド剤抵抗性に関わるナトリウムチャンネルのアミノ酸変異の野外における頻度を明らかにする。
- (2) ナトリウムチャンネル遺伝子の全塩基配列を決定し、推定アミノ酸配列を室内の抵抗性系統と感受性系統間で比較し、抵抗性に関わる新たな変異の存在について検討する。
- (3) ナトリウムチャンネルの選択的スプライシングが合成ピレスロイド剤抵抗性に関与しているかどうかを明らかにする。
- (4) 合成ピレスロイド剤抵抗性に関わるチトクローム P450 遺伝子 (*CYP6BG1*) の発現を室内および野外系統を用いて調べる。また、コナガの合成ピレスロイド剤抵抗性におけるナトリウムチャンネルのアミノ酸変異と *CYP6BG1* の発現レベルとの関係を明らかにする。

3. 研究の方法

- (1) 野外 6 箇所(熊本、和歌山、三重、千葉、新潟、岩手)よりコナガを採集し、合成ピレ

スロイド剤に対する抵抗性レベルを調べた。室内の抵抗性系統および感受性系統の抵抗性レベルも同時に調べた。また、合成ピレスロイド剤抵抗性に関わる既知のアミノ酸変異 (L1014F および T929I) を含む cDNA 領域を個体ごとに PCR で増幅し、クローニングした後に塩基配列決定、あるいはダイレクトシーケンシングを行い、抵抗性に関わるアミノ酸変異の頻度を系統毎に明らかにした。

- (2) ナトリウムチャンネル遺伝子の cDNA 配列の塩基配列決定を室内の抵抗性系統および感受性系統を用いて行い、抵抗性に関わる新たなアミノ酸変異の有無を調べた。

- (3) ナトリウムチャンネル遺伝子のゲノム配列を室内の抵抗性系統および感受性系統において決定し、cDNA 配列との比較を行うことで選択的スプライシングの生じる部位を特定した。また、選択的スプライシングの生じている領域の PCR 産物のクローニング、塩基配列決定を行い、両系統間で増幅産物の比較を行った。
- (4) 室内および野外系統において合成ピレスロイド剤抵抗性に関わる *CYP6BG1* の発現レベルを調べ、抵抗性に関わるナトリウムチャンネルのアミノ酸変異の頻度との関連性を調べた。

4. 研究成果

- (1) 野外系統の抵抗性レベルは系統により異なるが(23.2-520.4 ppm)、室内の抵抗性系統(781.2 ppm)とほぼ同等の抵抗性レベルを示す系統も存在した。また、抵抗性に関わる既知のアミノ酸変異 (L1014F および T929I) の頻度はそれぞれ82.8%-100%、72.9%-94.4%と非常に高かった。野外の一部の個体はT918Iというこれまで報告されていなかった抵抗性に関わるアミノ酸をコードしていることを明らかにした。また、通常M918I部位は2つの選択的エクソンによってコードされているが、これらの個体にはゲノムの欠失によって1つのエクソンしか存在しないことを明らかにした。

- (2) 抵抗性系統と感受性系統のcDNAにコードされているアミノ酸の比較によりA1101T、

P1879Sという新たなアミノ酸変異が検出された。これらの合成ピレスロイド剤抵抗性への関与についてはアフリカツメガエルの卵母細胞で発現させるなどの手法を用いて検証する必要がある。

(3) cDNA配列およびゲノム配列の比較を行い、選択的スプライシングの生じる部位を特定した。抵抗性系統と感受性系統間で転写物の比較を行ったが、選択的スプライシングが合成ピレスロイド剤抵抗性に関与していることを示す証拠は得られなかった。

(4) *CYP6BG1*の発現を室内および野外系統を用いて調べた。室内系統を用いた解析では変異アミノ酸を100%の頻度でコードする抵抗性系統の*CYP6BG1*の発現レベルは変異アミノ酸を全くコードしない(0%)感受性系統よりも有意に高かった。しかし、野外系統ではアミノ酸変異の頻度と*CYP6BG1*の発現レベルの間に有意な相関は認められなかった。以上結果は、野外のコナガではナトリウムチャネルのアミノ酸変異による感受性の低下と*CYP6BG1*による解毒分解は互いに独立して合成ピレスロイド剤抵抗性に関与していることを示唆している。

(5) 感受性の低下による合成ピレスロイド剤抵抗性がナトリウムチャネルのアミノ酸変異によって付与されることが明らかにされて以来、「抵抗性研究=抵抗性に関わる遺伝子変異の比較」といった構図が出来上がっていた。本研究によって、抵抗性遺伝子は決して固定された静的な因子ではなく選択的スプライシングなどの機構によって多様な構造や機能をもった遺伝子産物を生み出すことが明らかとなり、殺虫剤抵抗性研究の新たな局面が切り拓かれた。今後は他の殺虫剤抵抗性に関与する遺伝子あるいは遺伝子変異についても解析を進めていく必要がある。

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 Sonoda, S. (2010) Molecular analysis of pyrethroid resistance conferred by target insensitivity and increased metabolic detoxification in *Plutella xylostella*. *Pest Management Science* (available on line) (DOI: 10.1002/ps.1918)

② Sonoda, S. (2009) Alternative splicing of *para*-sodium channel α -subunit genes from diamondback moth strains with different sensitivities to a pyrethroid. *Journal of Pesticide Science* 34, 173-176.

③ Sonoda, S., Igaki, C. and Tsumuki, H. (2008) Alternatively spliced sodium channel transcripts expressed in field strains of the diamondback moth. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 38, 883-890.

④ Sonoda, S., Tsukahara, Y. Ashfaq, M. and Tsumuki, H. (2008) Genomic organization of the *para*-sodium channel α -subunit genes from the pyrethroid-resistant and -susceptible strains of the diamondback moth. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology* 69, 1-12.

⑤ Sonoda, S. and Tsumuki, H. (2008) Gene expression of *hsp70* of the diamondback moth, *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Yponomeutidae), in response to heat shock and insecticides. *Applied Entomology and Zoology* 43, 241-247.

⑥ Ashfaq, M., Sonoda, S. and Tsumuki, H. (2007) Expression of two methionine-rich storage protein genes of *Plutella xylostella* (L.) in response to development, juvenile hormone-analog and pyrethroid. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part B* 148, 84-92.

[学会発表](計5件)

① Sonoda, S. (2009) Molecular analysis of pyrethroid resistance conferred by target insensitivity and increased metabolic detoxification in *Plutella xylostella*. *Japan-Korea Joint Seminar -New Trends in Insecticide Resistance*

Management-, November 20, 2009, Seoul National University, Seoul, Korea.

②園田昌司 (2009) コナガの合成ピレスロイド剤抵抗性とナトリウムチャンネルの発現. 第53回日本応用動物昆虫学会大会小集会, 2009年3月30日, 北海道大学.

③園田昌司・井垣智賀子・積木久明 (2009) コナガの合成ピレスロイド剤抵抗性に関する新たなナトリウムチャンネルの変異について. 第53回日本応用動物昆虫学会大会, 2009年3月30日, 北海道大学.

④Sonoda, S. (2008) Amino acid substitution and alternative exon usage of the *para*-sodium channel α -subunit genes from strains of the diamondback moth with different sensitivity to a pyrethroid. 4th Pan Pacific Conference of Pesticide Science. Honolulu, June 1-5, Hawaii, USA

⑤園田昌司・積木久明 (2008) コナガの合成

ピレスロイド剤抵抗性および感受性系統におけるナトリウムチャンネル・アルファサブユニット遺伝子の選択的スプライシング. 第52回日本応用動物昆虫学会大会, 2008年3月26日, 宇都宮大学.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

園田 昌司 (SONODA SHOJI)

岡山大学・資源生物科学研究所・准教授

研究者番号: 00325127

(2) 研究分担者

該当なし

(3) 連携研究者

該当なし