

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 19 日現在

機関番号：82112

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25292203

研究課題名(和文)コナガの薬剤及び天敵微生物耐性獲得機構解明への分子遺伝学的アプローチ

研究課題名(英文)Molecular and genetic approach for the drug or microbial resistance of the diamondback moth

研究代表者

山本 公子(Yamamoto, Kimiko)

国立研究開発法人農業生物資源研究所・昆虫ゲノム研究ユニット・ユニット長

研究者番号：40370689

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,700,000円

研究成果の概要(和文)：コナガの薬剤抵抗性系統を確立し、次世代シーケンサーによるゲノム解析とデータベースの高度化を進めた。Cry1Ac毒素とフルベンジアミド抵抗性の各候補領域のマッピングを進め、各該当領域に各々Cry1Ac毒素の受容体候補のABCC2遺伝子とジアミド剤の標的のリアノジン受容体(RyR)遺伝子が座上することを見出した。タイのコナガのフルベンジアミド抵抗性はRyR遺伝子のG4946E変異による可能性が高いことを確認した。

糸状菌に抵抗性を示すコナガ系統の作出のため複数のコナガ系統に昆虫病原糸状菌*B. bassiana*を接種し生存虫の継代を続け、コナガ系統間に本菌に対する感受性差異がある可能性を見出した。

研究成果の概要(英文)：In this program, we made genome and expression gene analyses of the diamondback moth (*Plutella xylostella*). Finally we got a lot of fruitful results as below about drug-resistance genes of the moth.

Drug-resistant strains of the diamondback moth were established. The KONAGAbase, a genomic database of the moth, was improved using the additional genomic data of the moth creating by the next-generation sequencing. The linkage analyses of the drug-resistant strains by RAD-Seq analyses strongly suggested that the ABCC2 gene of the moth had a critical role for the Cry1Ac toxin resistance. A point mutation G4946E in the ryanodine receptor gene was concluded the trigger of the flubendiamide resistance in the moth both from Japan and Thailand.

As a result of the trial experiments to create fungus-resistant strains of the moth, the sensitivity differences for the entomopathogenic fungus *B. bassiana* were found between several diamondback moth strains.

研究分野：分子生物学

キーワード：コナガ ゲノム解析 殺虫剤抵抗性 連鎖地図

1. 研究開始当初の背景

コナガはキャベツやハクサイなどアブラナ科野菜の重要害虫であり、熱帯から寒帯まで広く分布している。コナガの被害は日本では1960年代から目立ちはじめ、防除剤として使用された有機リン剤、合成ピレスロイド剤、BT剤、IGR剤に対して次々と抵抗性が発達した。抵抗性発達の原因の一つとしては一世代に要する期間が短いことが上げられる。1世代に要する期間は25で16日間前後で、温帯では年に少なくとも10世代程度発生を繰り返す。現在、コナガの防除は、複数の薬剤をローテーション散布して特定の薬剤への抵抗性の発達を回避する方法がとられているが、多剤耐性コナガの出現も危惧されている。一方、全く異なる作用機構を有するため既存の殺虫剤に抵抗性の害虫にも有効であったフルベンジアミドに対しても、近年、タイ等で抵抗性個体の発生が報告され始めている。糸状菌製剤に対しては現時点ではまだ抵抗性コナガの発生は確認されていないが、糸状菌製剤を反復接種したアカイエカの感受性が半減したという報告があり、多用された場合、抵抗性の発達が危惧される。最近、昆虫で糸状菌抵抗性を左右する遺伝子がいくつか報告され、カイコでも*B. bassiana*の近縁種である*B. brongniartii*に対するカイコの抵抗性が1遺伝子に支配されていることを我々のグループが突き止めた。それらの遺伝子との比較も本研究では視野に置いている。

2. 研究の目的

アブラナ科野菜の重要害虫であるコナガは、種々の殺虫剤に対する抵抗性を容易に発達させる難防除害虫であり、これまで抵抗性機構解明に生化学的な方面からのアプローチが数多く行われてきたが、ゲノム情報が少ないことのために遺伝学的なアプローチはあまり行われてこなかった。イネやカイコ等ゲノム解析が進んだ生物種では連鎖地図を利用したマップベースドクローニングにより多くの遺伝子単離が成功している。本研究は、これまでに得られたコナガのゲノム情報を利用し、詳細な連鎖地図を構築するとともに、最近問題になりつつあるフルベンジアミド抵抗性系統及び今後問題になると思われる糸状菌に抵抗性を示す系統を確立し、マップベースドクローニングによる責任因子の探索を進める事を目的とする。

3. 研究の方法

(1) コナガ連鎖地図構築 これまでに樹立したコナガの異なる2系統間の後代で、連鎖解析に使用するBC1集団を構築し、各個体からゲノムDNAを抽出する。また、これまでに獲得した両系統間のSNPを利用し、解析集団で利用可能な、且つ、ゲノム上にランダムに展開したSNPマーカーを選抜する。SNPマーカーの高精度化を進めるために、ゲノムデー

タベースの拡充を進める。

(2) コナガのフルベンジアミド等抵抗性系統確立と抵抗性因子の解析 タイ国より分与を受けたフルベンジアミド抵抗性コナガをさらに数世代フルベンジアミドで選抜して抵抗性形質の固定化を図る。同時に抵抗性の検証方法を確立し、LC50値が感受性系統より少なくとも千倍程度は高いことを確認後、感受性系統と交配して遺伝性を調査する。また、上記と同一地域においてBt毒素の内、Cry1C毒素に対しても抵抗性が生じている事から、入手した系統をCry1AaおよびCry1C毒素それぞれで選抜して、抵抗性系統の作出を図る。

(3) 糸状菌に抵抗性を示すコナガ系統の作出 コナガに弱い病原力を示す昆虫病原糸状菌*B. bassiana*株の分生子懸濁液を、各地から集められた複数のコナガ系統の幼虫に浸漬接種し、各系統の糸状菌感受性および個体群内における感受性の多様性を調査する。個体間で感受性にばらつきがある(遺伝的多様性がある)系統について、供試虫の半数以上が致死する程度の濃度の同菌分生子懸濁液に幼虫を浸漬接種し、生存個体を継代する。これを繰り返し、抵抗性系統の作出を図る。その際、非選抜系統も維持しておく。数回の選抜毎に、5段階の濃度の同菌分生子懸濁液に幼虫を浸漬接種し、半数致死濃度(LC50)を算出して、非選抜系統との感受性差異を調査する。

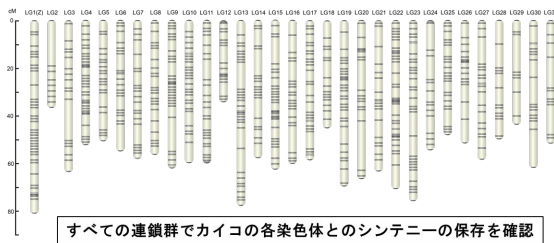
4. 研究成果

(1) タイ国よりH26年5月に導入した、ジアミド剤に抵抗性のSai-Noi系統の雌とジアミド剤感受性の日本のPXS系統の雄とを交配して得たF2をフルベンジアミド剤100ppmで選抜して生存していた抵抗性個体を系統化した。このタイ由来のジアミド剤抵抗性系統と日本の感受性系統を交配して得たF2をフルベンジアミド剤100ppmで選抜して生存していた抵抗性個体および明らかに感受性と識別できた個体を回収し、抵抗性の形質とリアノジン受容体遺伝子との連鎖解析等に提供した。

(2) BT剤(Cry1Ac)抵抗性のPXRと感受性の住友化学系統間のBC1集団のRAD-seq解析を行ない、31の連鎖群から成るコナガ連鎖地図(SNPマーカー数2402)を作成した(図1)。構築した連鎖地図を用いてPXR系統のCry1Ac毒素抵抗性のマッピングを行ない、抵抗性責任候補領域上にCry1Ac毒素の受容体と考えられているABCC2遺伝子が座上することを確認した(図2)。

(3) PXS系統のコナガゲノム配列をPacBioRSIIのロングリードを用いて拡張し、N50を59Kb(平均長43.5Kb、最大長3.08Mb)に改善した。拡張したゲノム配列において、リアノジン受容体遺伝子(CDS:15Kbp)が座上する約135Kbの領域を同定した。また、タイのコナガ(フルベンジアミド抵抗性のSai Noi

系統)と日本のコナガ(薬剤感受性の住友化学系統)間の F₂ 集団の ddRAD-seq 解析により、30 の連鎖群から成る連鎖地図(マーカー数 1,923、総マップ長 1,199cM)を作成した(図 3)。



連鎖群数	31
総マップ長(cM)	1,779
マーカー数	2,402

図1 PXR 系統と住友化学系統の BC₁ 集団に基づく連鎖地図。コナガの染色体数(n=31)と等しい連鎖群を生成。

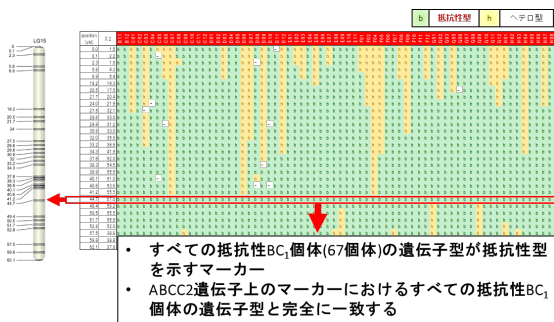
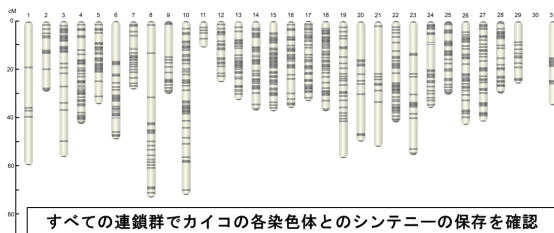


図2 BT 剤(Cry1Ac)抵抗性の責任候補領域を連鎖群 15 上に同定し、抵抗性の主な原因遺伝子と思われる ABCC2 遺伝子の座乗を確認



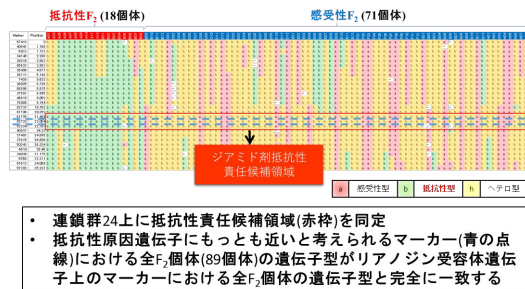
連鎖群数	30
総マップ長(cM)	1,199
マーカー数	1,923

図3 Sai Noi 系統と PXS 系統の F₂ 集団に基づく連鎖地図。コナガの染色体数とほぼ等しい30の連鎖群を生成。

構築した連鎖地図を用いて、フルベンジアミド抵抗性の候補領域をカイコの 23 番染色体とシンテニーが保存された連鎖群上に同定し、該当領域にジアミド剤の標的遺伝子であ

るリアノジン受容体(RyR)遺伝子が座上することを確認した(図4)。Sai Noi 系統のゲノムデータ(HiSeq 2000 ペアエンド)を RyR 遺伝子 CDS 配列全長にマッピングした結果、G4946E のアミノ酸変異(遺伝子型は抵抗性ホモ型)のみを確認した。

以上のゲノムワイド解析により、タイのコナガのフルベンジアミド抵抗性の主要因は標的遺伝子である RyR 遺伝子における G4946E 変異である可能性が高いことが確認された。



- 連鎖群24上に抵抗性責任候補領域(赤棒)を同定
- 抵抗性原因遺伝子にもっとも近いと考えられるマーカー(青の点線)における全F₂個体(89個体)の遺伝子型がリアノジン受容体遺伝子上のマーカーにおける全F₂個体の遺伝子型と完全に一致する

図4 フルベンジアミド抵抗性の責任候補領域を連鎖群 24 上に同定し、抵抗性の主な原因遺伝子と思われるリアノジン受容体遺伝子の座乗を確認

(4) 住化テクノサービスより購入したコナガの 3~4 令幼虫を、昆虫病原糸状菌 *Beauveria bassiana* (No.32) の分生子懸濁液に浸漬したキャベツ葉で飼育し、生存虫を継代した。これまでに継代を 10 回繰り返して、5 倍程度の抵抗性の増加傾向が認められた {LC50 値: 選抜区 2.6×10^8 ($5.7 \times 10^7 \sim 5.2 \times 10^9$)、無選抜区 4.9×10^7 ($1.2 \times 10^7 \sim 3.7 \times 10^8$)} が、有意差は認められなかった。また、大わしコナガ系統は、住友化学系統が 1 割程度致死する 1/20 の分生子濃度でも 100% 致死したことから、コナガ系統間に本菌に対する感受性差異があると考えられた。クボタ S 系統は、継代 5 代目において本菌 No.984 に対して 2 倍程度の感受性低下を示したが、同 No.32 に対しては選抜効果がほとんど上がらなかった。また、熊本系統では、選抜開始後 4 世代を経過しても濃度依存性が見られなかったことから、元々、飼育中のコナガ系統によって糸状菌抵抗性の程度が異なっており、系統内の抵抗性形質の遺伝的変異が少ないために選抜による抵抗性系統の作出が進まなかったと考えられた。

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 0 件)

〔学会発表〕(計 2 件)
上樂明也, 桑崎誠剛, 宮本和久, 山本公子 (2015) ddRAD-seq によるコナガの連鎖地図作成および薬剤抵抗性原因遺伝子

の探索 第 59 回日本応用動物昆虫学会大会、2015 年 3 月 28 日、山形大学小白川キャンパス ():116
上樂明也，桑崎誠剛，宮本和久，和田早苗，山本公子 (2016) ddRAD-seq によるタイと日本のコナガのジアミド剤抵抗性原因遺伝子のゲノムワイド探索 第 60 回日本応用動物昆虫学会大会、2016 年 3 月 28 日、大阪府立大学中百舌鳥キャンパス ():18

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山本 公子 (YAMAMOTO KIMIKO)
農業生物資源研究所・昆虫ゲノム研究ユニット・ユニット長
研究者番号：40370689

(2) 研究分担者

宮本 和久 (MIYAMOTO KAZUHISA)
農業生物資源研究所・昆虫微生物機能研究ユニット・上級研究員
研究者番号：10370686
和田 早苗 (WADA SANAE)
農業生物資源研究所・昆虫微生物機能研究ユニット・主任研究員
研究者番号：50414959
上樂 明也 (JOURAKU AKIYA)
農業生物資源研究所・昆虫ゲノム研究ユニット・主任研究員
研究者番号：60542115

(3) 連携研究者

野田博明 (NODA HIROAKI)
農業生物資源研究所・昆虫科学研究領域・特任上級研究員
研究者番号：40343991
佐藤令一 (SATO RYOICHI)
東京農工大学・農学研究科・教授
研究者番号：30235428