

博士論文

果菜類の重要害虫ミナミキイロアザミウマの殺虫剤
抵抗性に関わる分子機構の解析

2014年9月

包 文学

岡山大学大学院
自然科学研究科

目次

第1章 序論	1
第2章 ミナミキイロアザミウマの合成ピレスロイド剤抵抗性機構の解析.....	13
第1節 ナトリウムチャネルの感受性の低下による抵抗性機構の解析.....	13
1. 緒言.....	13
2. 材料と方法.....	14
3. 結果および考察.....	21
第2節 合成ピレスロイド剤抵抗性に関わる解毒分解酵素の解析.....	38
1. 緒言.....	38
2. 材料と方法.....	39
3. 結果および考察.....	41
第3章 ミナミキイロアザミウマのスピノサド抵抗性機構の解析.....	52
1. 緒言.....	52
2. 材料と方法.....	53
3. 結果.....	56
4. 考察.....	58
第4章 ミナミキイロアザミウマのネオニコチノイド剤抵抗性機構の解析.....	67
1. 緒言.....	67
2. 材料と方法.....	68
3. 結果および考察.....	71

第5章 総合考察.....	81
謝辞.....	89
参考文献.....	90
学位公表論文.....	109

第1章 序論

戦後開発された有機合成殺虫剤はその卓抜した殺虫力で農作物の害虫を駆除し、日本の食糧増産に大きな役割を果たした(桑野ら, 2004)。特に DDT、BHC、パラチオンなどの殺虫剤は、安価で優れた殺虫効果を持っていたために大量に使用されたが、低い選択性と高い残留性によって天敵を含めた標的以外の生物への悪影響、土壌や水の汚染、食品への残留といった問題を引き起こした。また、過剰な殺虫剤の使用は害虫の殺虫剤抵抗性も引き起こした。その反省に基づき、総合的害虫管理(Integrated Pest Management, IPM)の理念が生まれ、生物的、耕種的、物理的な防除手段が見直されることになった(Jones, 1973; Smith et al., 1973)。また、より安全性の高い殺虫剤の開発も進んだ。しかしながら、IPMにおける基幹的防除手段である殺虫剤に対する抵抗性の問題は依然解決されていない。

殺虫剤抵抗性の最初の報告は、1914年、北米のヤノネカイガラムシ(*Unaspis yanonensis*)の石灰硫黄合剤に対する抵抗性である(Georghiou and Mellon 1983)。日本における最初の殺虫剤抵抗性の報告は、1950年のコロモジラミ(*Pediculus humanus*)における DDT 抵抗性であり、農業害虫に関しては、1958年のミカンハダニ(*Panonychus citri*)におけるシュラーダン抵抗性とされている(浜, 1996)。殺虫剤抵抗性とは「昆虫の正常な集団の大多数を殺す薬量に対して耐える能力がその系統に発達したこと」と定義されている(WHO, 1957)。殺虫剤に対して何らかの抵抗性を発達させた害虫は、全世界で 574 種に達している(IRAC: Insecticide Resistance Action Committee, 2012)。日本でも約 50 種において抵抗性が確認されている(浜, 1996)。抵抗性の発達は、あらかじめ存在する極めて少数の抵抗性個体が殺虫剤の連続散布により集団内での頻度を増加させていくプロセスである(Gordon, 1961; IRAC: 2011)。殺虫剤の散布により抵抗性個体が生じ

るのではない(Gordon, 1961; IRAC, 2011)。

殺虫剤抵抗性は、皮膚透過性の低下、共生細菌による解毒分解、解毒分解酵素活性の増大、標的部位の感受性の低下によってもたらされる(園田, 2012)。殺虫剤が昆虫体内に浸透しにくくなれば抵抗性に寄与するであろう。しかしながら、皮膚透過性の低下による抵抗性は研究例が少なく、またそれほど高いレベルの抵抗性には結びつかないと考えられている(園田, 2012)。

2012年、ホソヘリカメムシ(*Riptortus pedestris*)のフェニトロチオン抵抗性には、殺虫剤分解能を持つ共生細菌バークホルデリアが関与していることが報告された(Kikuchia et al., 2012)。また、野外においても、フェニトロチオン抵抗性を示すカンシャコバナネナガカメムシ(*Cavelerius saccharivorus*)は、殺虫剤分解能を持つバークホルデリアを獲得していることが確認された(Kikuchia et al., 2012)。しかしながら、共生細菌による解毒分解を通じた殺虫剤抵抗性は現時点では特異なケースと考えられている(園田, 2012)。

農業生産の現場で大きな問題となる殺虫剤抵抗性には主に解毒分解酵素活性の増大と標的部位の感受性の低下のいずれかあるいは両方が関与していると考えられる(園田, 2012)。解毒分解酵素活性の増大による昆虫体内での殺虫剤の分解、体外への排泄は殺虫剤抵抗性の重要なメカニズムである(Feyereisen, 1999; Scott, 1999; Hemingway et al., 2004)。昆虫種の殺虫剤抵抗性に関与する解毒分解酵素はチトクローム P450 (CYP450)、グルタチオン S-トランスフェラーゼ (GST)、カルボキシルエステラーゼ(CE)などである(Hemingway et al., 2004)。殺虫剤は害虫の作用点に強力に作用して、正常な機能を妨害することで殺虫活性を示す。標的部位の感受性の低下は遺伝子変異によって作用点の構造に変化が生じ、殺虫剤との相互作用が低下することで生じる(園田, 2012)。本研究ではミナミキイロアザミウマを用いて数種の殺虫剤に対する抵抗性機構の解析を行う。以下に使用する殺虫剤と抵抗性機構に関する知見について概説する。

1. 合成ピレスロイド剤抵抗性

1.1. 合成ピレスロイド剤

合成ピレスロイド剤は、シロバナムシヨケギク(除虫菊) (*Chrysanthemum cinerariaefolium*)に含まれるピレトリン I と II を主成分とする殺虫成分および関連合成化合物の総称である。合成ピレスロイド剤は、神経軸索の電位依存性ナトリウムチャンネル(以後ナトリウムチャンネルと表記)の開口状態を安定化し、脱分極を連続的に生じさすことによって殺虫効果を発揮する殺虫剤である(Sattelle and Yamamoto,1988; Bloomquist, 1993; Soderlund, 1995; Narahashi,1996)。合成ピレスロイド剤に対する抵抗性は、標的であるナトリウムチャンネルの感受性の低下とチトクローム P450 などの解毒分解酵素活性の増大によって付与されることが多くの昆虫種で報告されてきた(Scott, 1999; Soderlund et al., 2003)。

1.2. ナトリウムチャンネルの感受性の低下による合成ピレスロイド剤抵抗性

ナトリウムチャンネルは 1 つの α -サブユニットと複数の β -サブユニットで構成される(Goldin, 2001)。機能的に重要な α -サブユニットは 4 つのドメイン(I-IV)から構成され、各ドメインは 6 つの膜貫通セグメントに区分される(図 1-1) (Noda et al., 1984)。

ナトリウムチャンネルのアミノ酸置換による感受性の低下が合成ピレスロイド剤抵抗性に関与していることが最初に報告されたのは、イエバエ(*Musca domestica*) (Williamson et al., 1996; Miyazaki et al., 1996)とチャバネゴキブリ(*Blattella germanica*) (Miyazaki et al., 1996)である。合成ピレスロイド剤に対して抵抗性を示すイエバエ系統は、ナトリウムチャンネルのドメイン II セグメント(S) 6 の 1014 番目のアミノ酸(以下、アミノ酸番号はイエバエのナトリウムチャンネルに準拠)がロイシンからフェニルアラニン(L1014F)に、ドメイン IIS4-IIS5 の 918

番目のアミノ酸がメチオニンからスレオニン(M918T)に置換していた(Miyazaki et al., 1996; Williamson et al., 1996)。一方、チャバネゴキブリの合成ピレスロイド剤抵抗性系統は L1014F のみを持っていた(Miyazaki et al., 1996)。イエバエの L1014F のみを持つ抵抗性系統の合成ピレスロイド剤(デルタメトリン)に対する抵抗性レベルは感受性系統に比べて 5~30 倍なのに対し、L1014F と M918T の両方を持つ抵抗性系統の場合は 100 倍以上となることから、L1014F は抵抗性の基礎をなす因子であり、M918T はエンハンサーと推測された (Williamson et al., 1996; Foster et al., 2003)。これらのアミノ酸置換の合成ピレスロイド剤抵抗性における重要性はアフリカツメガエル(*Xenopus laevis*)の卵細胞を用いた電気生理学的実験によって立証された(Vais et al., 2001, 2003)。

1.3. 合成ピレスロイド剤抵抗性に関わる解毒分解酵素

CYP450 は小胞体もしくはミトコンリアに局在する膜結合型のタンパクで、酵素(Monooxygenase)として一原子酸素付加反応(monooxygenation)をはじめとする様々な反応を触媒する(Estabrook et al., 1971)。CYP450 は多くの重要な害虫種の有機塩素系殺虫剤、カーバメート剤、有機リン剤、合成ピレスロイド剤、昆虫成育制御剤に対する抵抗性の原因となっている(Oppenooth 1985; Scott 1999; Tsukamoto 1983)。合成ピレスロイド剤抵抗性への関与が最初に報告された CYP450 遺伝子はイエバエの CYP6D1 遺伝子である(Tomita and Scott 1995)。その後、キイロショウジョウバエ(*Drosophila melanogaster*) (Waters et al., 1992; Chung et al., 2007)、ネッタイエカ(*Culex quinquefasciatus*) (Itokawa et al., 2010) においても合成ピレスロイド剤抵抗性に関与する遺伝子が報告された。

GST は農薬を含む生体外異物に還元型グルタチオンを抱合させ、異物を体外へ排出する(Ranson and Hemingway 2005)。GST 遺伝子の高発現が合成ピレスロイド剤抵抗性に関与していることがトビイロウンカ(*Nilaparvata lugens*) (Vontas

et al., 2002)、カイコガ(*Bombyx mori*) (Yamamoto et al., 2009)、キイロシヨウジョウバエ(Li et al., 2007)、ガンビエハマダラカ(*Anopheles gambiae*) (Li et al., 2007)、ネッタインマカ(*Aedes aegypti*) (Li et al., 2007)で報告された。

CE はエステル、アミド、チオエステル結合を含む化合物を加水分解する酵素であり、殺虫剤を含む生体外異物の解毒や代謝活性化に関与する(細川 1998)。CE の合成ピレスロイド剤抵抗性への関与は、モモアカアブラムシ(*Myzus persicae*)で最初に報告された(Devonshire and Moores, 1982)。CE 遺伝子の発現はアカイエカ(*Culex pipiens*) (Field et al., 1988; Moughes et al., 1986)、オウシマダニ(*Boophilus microplus*) (Hernandez et al., 2002)、タバココナジラミ(*Bemisia tabaci*) (Alon et al., 2008)、イエバエ(Zhang et al., 2010)、ラセンウジバエ(*Cochliomyia hominivorax*) (Carvalho et al., 2010)の合成ピレスロイド剤抵抗性にも関与する。

2. スピノサド抵抗性

2.1. スピノサド

スピノサドは 1997 年に登録された土壌放線菌の一種(*Saccharopolyspora spinosa*)が産生するスピノシン A とスピノシン D の混合物である(Sparks et al., 1998; Thompson et al., 2000)。スピノサドは、昆虫の神経伝達部、主にニコチン性アセチルコリン受容体(nAChR)を活性化し、筋肉に痙攣を引き起し、最終的には麻痺死させる殺虫剤である(Salgado, 1997)。スピノサド抵抗性には、nAChR の感受性の低下(Salgado, 1997)や CYP450 などの解毒分解酵素活性の増大(Feyereisen, 1999; Scott, 1999; Hemingway et al., 2004)が関与していることがいくつかの昆虫種で示唆されてきた。

2.2. nAChR の感受性の低下によるスピノサド抵抗性

nAChR は神経の情報伝達に関わる膜タンパク質の複合体で、単一分子内に受容体とチャネルの2つの機能を持つリガンド依存性イオンチャネル(ligand-gated ion channel)である(Karlin, 2002; Corringer et al., 2000)。nAChR への神経伝達物質アセチルコリン(ACh)の結合により生じる一時的な構造変化が、受容体内部に存在するイオンチャネルを開口させ、細胞内外の濃度勾配により陽イオンが細胞内に取り込まれることで電気信号が生じる。nAChR はシナプス後膜を貫通する5個のサブユニットでイオンチャネル孔を形成している (Grutter and Changeux 2001; Miyazawa et al., 1999; Corringer et al., 2000)。哺乳類では、nAChR のサブユニットとして $\alpha 1$ - $\alpha 7$ 、 $\alpha 9$ - $\alpha 10$ 、 $\beta 1$ - $\beta 4$ 、 γ 、 δ 、 ϵ の16種類が報告されており、これらがヘテロもしくはホモ5量体を形成して受容体を形成している (Millar, 2003)。昆虫においてもキイロショウジョウバエ($\alpha 1$ - $\alpha 7$ 、 $\beta 1$ - $\beta 3$)、ガンビエハマダラカ($\alpha 1$ - $\alpha 9$ 、 $\beta 1$)、セイヨウミツバチ(*Apis mellifera*) ($\alpha 1$ - $\alpha 9$ 、 $\beta 1$ - $\beta 2$)、カイコガ($\alpha 1$ - $\alpha 9$ 、 $\beta 1$ - $\beta 3$)、コクヌストモドキ(*Tribolium castaneum*) ($\alpha 1$ - $\alpha 11$ 、 $\beta 1$)などでサブユニットの多様性が報告されている(Sattelle et al., 2005; Jones1 et al., 2005; Jones et al., 2006; Shao et al., 2007; Jones and Sattelle 2007)。昆虫の nAChR は2つの α サブユニットと3つの β サブユニットで構成される。各サブユニットは4回膜貫通ドメイン(M1、M2、M3、M4)を含む一本鎖ポリペプチドで、N末端は細胞外親水性領域となっており、6つのループ(D、A、E、B、F、C)を構成する (Miyazawa et al., 1999; Karlin, 2002) (図 1-2)。スピノサドに対する抵抗性機構の解析はキイロショウジョウバエの変異系統で最初に行われ、nAChR $\alpha 6$ サブユニットの変異が抵抗性と関連していることが示された(Perry et al., 2007)。その後、コナガ(Baxter et al., 2012)、ミカンコミバエ(*Bactrocera dorsalis*) (Hsu et al., 2012)、ミカンキイロアザミウマ(*Frankliniella occidentalis*) (Puinean et al., 2013)のスピノサド抵抗性においても nAChR $\alpha 6$ サブユニット遺伝子の変異との関連が報告された。

2.3. スピノサド抵抗性に関わる解毒分解酵素

アザミウマ目(Thysanoptera)のミカンキイロアザミウマのスピノサド抵抗性には CYP450、GST、CE などの解毒分解酵素による解毒代謝は関与しないという報告がなされた(Bielza et al., 2007; Zhang et al., 2008)。しかし一方で、イエバエを含むいくつかの昆虫種のスピノサド抵抗性には CYP450 による解毒分解が関与していることが報告されている(Markussen and Kristensen, 2011)。

3. ネオニコチノイド系殺虫剤抵抗性

3.1. ネオニコチノイド系殺虫剤

ネオニコチノイド系殺虫剤はタバコ葉に含まれるニコチン、ノルニコチン、アナバシンとその他の微量類縁アルカロイドに与えられた総合である。ネオニコチノイド剤は、アセチルコリンと同様、nAChR のアセチルコリン結合部位と高い親和性を示し、処理された昆虫は反復興奮とそれに続く伝導遮断により死に至る(園田, 2012)。最初のネオニコチノイド殺虫剤であるイミダクロプリドは、高殺虫活性・低毒性のニチアジンをリード化合物として 1992 年に開発された。

3.2. nAChR の感受性の低下によるネオニコチノイド系殺虫剤抵抗性

ネオニコチノイド系殺虫剤に対する抵抗性は、nAChR の感受性の低下によって付与されることがトビイロウンカ、モモアカアブラムシ、ワタアブラムシ (*Aphis gossypii*) で報告されている(Liu et al., 2005; Bass et al., 2011; Koo et al., 2014)。実験室内でネオニコチノイド剤(イミダクロプリド)によって選抜されたトビイロウンカ系統の nAChR 遺伝子にはアミノ酸置換(Y151S)が生じていた(Liu et al., 2005)。しかしながら、野外では Y151S を持つ個体は見つかっていない

い。一方、モモアカアブラムシのイミダクロプリド抵抗性には nAChR $\beta 1$ サブユニットのアミノ酸置換(R81T)が関わっていることを報告された(Bass et al., 2011)。

3.3. ネオニコチノイド系殺虫剤抵抗性に関わる解毒分解酵素

解毒分解酵素活性の増大もネオニコチノイド系殺虫剤に対する主要な抵抗性機構である。CYP450 による解毒分解酵素活性の増大がネオニコチノイド系殺虫剤に関与していることがイエバエ(Li et al., 2012; Markussen and Kristensen, 2010; Kavi et al., 2014)、トビイロウンカ(Wen et al., 2009; Ding et al., 2013)、タバココナジラミ(*Bemisia tabaci*) (Basit et al., 2013)、ネッタイシマカ(Riaz et al., 2013)などで報告されている。イエバエおよびネッタイシマカでは GST による解毒分解が抵抗性に関与していることが報告されている(Li et al., 2012; Riaz et al., 2013)。CE による解毒分解の関与もタバココナジラミ、イエバエ、ネッタイシマカで報告されている(Basit et al., 2013; Li et al., 2012; Riaz et al., 2013)。イエバエにおいては抵抗性に関わる CYP450 遺伝子がクローニングされた(Markussen and Kristensen, 2009)。キイロショウジョウバエの CYP6G1 遺伝子もネオニコチノイド系殺虫剤を代謝することが示された(Joussen et al., 2008)。

4. ミナミキイロアザミウマ

ミナミキイロアザミウマ(*Thrips palmi*)は、インドネシアのスマトラ島が原産地と考えられている(Smith et al., 1997)。日本では1978年に宮崎県のピーマンで初めて加害が確認された(野中・永井, 1980; 工藤, 1981)。現在、本種は東北・北陸を含む40 都府県において分布が確認されている(気賀沢ら, 1982; 河合, 2000)。本種は極めて広食で、日本で確認された寄主植物は34科117種に及ぶ(宮崎・工藤,1988)。ミナミキイロアザミウマにとって好適な寄主と考えら

れ、被害も大きい作物は、ウリ、ピーマン、メロン、ナス、スイカ、キュウリである。他に、カボチャ、インゲン、ハウレンソウなどの果菜類、タバコ、ササゲなどでも増殖し、被害をもたらす。ナス、ピーマンなどでの被害は、果実表面が加害されることによる被害果の増加として現れる。また、本種はメロン黄化えそウイルス(*Melon yellow spot virus*)の伝播を通じてメロン、キュウリ、シロウリ、ニガウリに被害をもたらす(Mumford et al., 1996)。本種の侵入初期には、キュウリ、メロン等で全面枯死する圃場、ナス、ピーマンでも収穫皆無となる圃場が多発し、発生面積も急速に増加し、日本における果菜類の最も重要な害虫となった(河合, 1995; 河合, 2000)。

本種の成虫の体長は1.0-1.4 mmであり、体色は他のアザミウマとは異なり、雌雄ともに黄色である(永井, 1994)。繁殖は産雄単為生殖であり(葭原と河合, 1982)、未交尾雌の次世代は全て雄になり、交尾した雌の次世代は70%-90%が雌となる(河合, 1986)。25°Cでの雌成虫の生存期間は16-26日、総産卵数は60-94個である(寺本ら, 1982 ; 河合, 1985)。卵は植物の組織の中に産み付けられ、幼虫の齢期は2齢であり、成熟2齢幼虫は土中あるいは落葉中で前蛹を経て蛹になる。

本種は侵入当初からいくつかの殺虫剤に対する抵抗性を発達させていたと考えられているが、1983年の徳島県の試験、1989年の広島県の試験、1992年の高知県での試験では一部の有機リン剤(スルプロホス乳剤、プロチオホス乳剤、DMTP、メチダチオン乳剤)やカーバメート剤(BPMC(フェノブカルブ乳剤、オキサミル粒剤)の防除効果が高いことが示されている(細田ら, 1990 山下, 1994 中野, 2003)。しかし、これら殺虫剤の効力は間もなく失われたため、当時登録のあった殺虫剤の混用による効力の増大が検討された。また、高知県では個体群間差はあるものの、シペルメトリンに対する抵抗性も報告された(山下, 1994)。1990年代初頭に本種に対して高い効果を示す殺虫剤は1992年に登録されたイ

ミダクロプリド(ネオニコチノイド剤)のみであった。しかし、2000年にはイミダクロプリドに対する感受性も高知県の多くの地域で低下してしまった(古味, 2003)。1996年に登録されたクロルフェナピルは当初、ナスなど多くの作物の防除で本種に対して高い効果を示した。しかし、2~3年後には抵抗性の発達が疑われる事例が発生した(山下, 1995)。1997年に登録されたスピノサドも2000年に高知県の全地域で感受性の低下が認められた(高知農技セ, 2000)。2010年には香川県においてもスピノサド低感受性の系統が確認された(渡邊, 2010)。このように、本種に有効な殺虫剤は現在ほとんど失われている状況である。しかしながら、本種の殺虫剤抵抗性に関わる分子機構はこれまで全く解析されていない。

本研究では、難防除害虫ミナミキイロアザミウマの合成ピレスロイド剤(シペルメトリン)、スピノサド、ネオニコチノイド系殺虫剤(イミダクロプリド)に対する抵抗性機構の解析を行った。また、CYP450をはじめとする解毒分解酵素が殺虫剤抵抗性に関与している可能性について検討した。

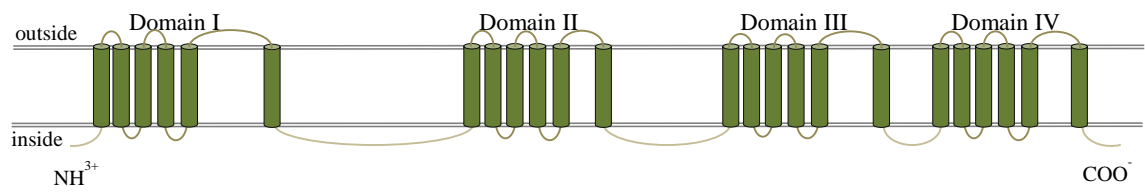


図 1-1. ナトリウムチャネルの模式図

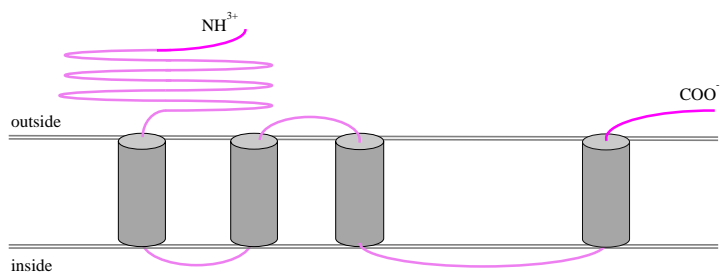


図 1-2. nAChR α もしくは β サブユニットの模式図。

第2章 ミナミキイロアザミウマの合成ピレスロイド剤抵抗性機構の解析

第1節 ナトリウムチャネルの感受性の低下による抵抗性機構の解析

1. 緒言

合成ピレスロイド剤に対する抵抗性は、標的であるナトリウムチャネルの感受性の低下とチトクローム P450 などの解毒分解酵素活性の増大によって付与されることが多くの昆虫種で報告されてきた(Scott, 1999; Soderlund et al., 2003)。

ナトリウムチャネルのアミノ酸置換による感受性の低下が合成ピレスロイド剤抵抗性に関与していることが最初に報告されたのはイエバエ (Williamson et al., 1996; Miyazaki et al., 1996)とチャバネゴキブリ (Miyazaki et al., 1996)においてである。イエバエの合成ピレスロイド剤抵抗性にはドメイン IIS4-IIS6 領域の L1014F と M918T が関わっていた(Miyazaki et al., 1996; Williamson et al., 1996)。一方、チャバネゴキブリの合成ピレスロイド剤抵抗性には L1014F のみが関わっていた(Miyazaki et al., 1996)。イエバエの L1014F と M918T の両方を持つ系統の合成ピレスロイド剤(デルタメトリン)に対する抵抗性レベルは、L1014F のみを持つ系統よりもはるかに高いことから、L1014F は基礎的な抵抗性因子であり、M918T はエンハンサーと推測された (Williamson et al., 1996; Foster et al., 2003)。コナガの合成ピレスロイド剤抵抗性においても、L1014F が抵抗性の基礎となる因子であり、929 番目のアミノ酸部位におけるスレオニンからイソロイシンへの置換(T929I)がエンハンサーとして関与していることが報告された (Schuler et al., 1998; Tsukahara et al., 2003)。コナガの一部の個体では、918 番目のアミノ酸部位におけるメチオニンからイソロイシンへの置換(M918I)が、T929I とは独立して、エンハンサーとして抵抗性に関与していることが報告された(Sonoda et al., 2008)。現在、ドメイン IIS4-IIS6 領域以外のアミノ酸置換も

合成ピレスロイド剤抵抗性に関わっていることが複数の害虫種で報告されている(Rinkevich et al., 2013; Dong et al., 2014)。これまで報告された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置換を表 2-1-1 に示した。

アザミウマ目ではミカンキイロアザミウマ(*Frankliniella occidentalis*)とネギアザミウマ(*Thrips tabaci*)において合成ピレスロイド剤抵抗性機構の解析が行われている(Forcioli et al., 2002; Toda et al., 2009)。ミカンキイロアザミウマでは、L1014F と 929 番目におけるアミノ酸置換(T929I、T929C)の両方が抵抗性に関わっている場合と、T929V、T929C、L1014F がそれぞれ単独に関わっている場合がある(Forcioli et al., 2002)。ネギアザミウマでは、T929I のみをホモ接合体として持つ抵抗性系統と M918T と L1014F の両方をヘテロ接合体として持つ抵抗性系統の存在が報告されている(Toda et al., 2009)。T929I のホモ接合体系統の抵抗性レベルは感受性系統の 19 倍であり、M918T と L1014F のヘテロ接合体系統の抵抗性レベルは 67 倍以上であった(Toda et al., 2009)。

第 2 章第 1 節では、合成ピレスロイド剤に対する感受性の異なるミナミキイロアザミウマ系統を用いてナトリウムチャンネル遺伝子のクローニングを用い、塩基配列決定後、アミノ酸配列を比較し、抵抗性に関わるアミノ酸置換を明らかにした。

2. 材料と方法

2.1. 供試昆虫

本研究で用いたミナミキイロアザミウマ系統を表 2-1-2 に示した。高知系統は 2008 年 11 月に島根県農業技術センターの奈良井祐隆氏より分譲していただいた。本系統は高知県農業技術センターの伊藤政雄氏が 2008 年 4 月に高知県安芸市のナス圃場において採集したものである。岡山系統は 2009 年 6 月に宇都宮大学の村井保氏より分譲していただいた。本系統は 1994 年に岡山県赤磐

市のナス圃場から採集されたものである。大阪系統は2010年11月に大阪府羽曳野市の大阪府立環境農林水産総合研究所のナス圃場において採集された。徳島系統(徳島1~徳島8)は2011年11月に徳島県農業技術センターの兼田武典氏、中野昭雄氏より分譲していただいた。これら系統は2011年6月に徳島県海部郡海陽町のナス圃場から採集されたものである。

各系統はキムタオルを敷いたプラスチック製容器(15 cm×10 cm×4 cm)内において発芽させたソラマメ *Vicia faba* の種子を餌として、25°C、16L : 8D にて累代飼育した(図 2-1-1A)。

2.2. 試薬

シペルメトリン(アグロスリン 6.0% EC)、展着剤(グラミン)はそれぞれ、住友化学(株)、三共アグロ(株)より購入した。各濃度のシペルメトリンには展着剤を最終濃度 0.1%となる様に加えた。

2.3. 生物検定

シペルメトリンに対する抵抗性レベルは、雌成虫を用いた葉片浸漬法(Fahmy et al., 1991)によって調べた。試験には5段階の濃度に希釈した殺虫剤を用いた。ソラマメ葉片(約 3.5 cm×2 cm)を希釈した殺虫剤に2分間浸漬した。ソラマメ葉片を展着剤のみを含む蒸留水に同じ時間浸漬したものを対照葉片とした。殺虫剤を処理したソラマメ葉片をキムタオルの上に載せ、室温で乾燥させた。その後、ソラマメ葉片を円筒型のプラスチックケース(直径 3.8 cm, 高さ 1.0 cm)に静置した後、供試虫を約 20 頭ずつ葉上に移した(図 2-1-2B)。プラスチックケースはパラフィルムを用いて密閉し、48 時間後に吸引ポンプ用のチップを用いた接触によって生死を判定した。各試験における繰り返しは最低 3 回とした。プロビット法により半数致死濃度(LC₅₀)を求めた(Abott, 1925)。

2.4. 全 RNA の抽出

全 RNA は Sepasol[®]-RNA I Super G (Nacalai Tesque, Inc.)を用いて抽出した。乳鉢と乳棒を用いて岡山および高知系統の雌成虫約 100 頭(50 mg)を磨碎し、1 ml の Sepasol[®]-RNA I Super G を加え懸濁した。全量を 1.5 ml のプラスチックチューブに移して、200 μ l のクロロホルムを加えて攪拌した後、4 $^{\circ}$ C、12000 rpm にて 15 分間遠心して上清を回収した。回収した上清に 500 μ l のイソプルパノールを加えて、4 $^{\circ}$ C、12000 rpm にて 10 分間遠心して全 RNA を沈殿させた。沈殿させた全 RNA は 70%エタノールで洗浄した後、アルミブロック恒温槽(Thermo Bath MG-2100)で乾燥させ、50 μ l の TE に溶解した。全 RNA の濃度は吸光度計 (Gene Spec I, Hitachi)を用いて測定した。

2.5. cDNA の合成

Sepasol[®]-RNA I Super G を用いて抽出した全 RNA を鋳型として、oligo-dT-M4 primer (Takara)と ReverTra Ace (Toyobo)を用いて逆転写反応を行った。5'末端領域増幅用の cDNA は SMART II A Oligonucleotide (5'-AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTAC-3')を用いて合成した。cDNA 合成反応溶液の組成は以下の通りである。

H ₂ O	13.6-X μ l
Oligo-dT-M4 primer (Takara)	1 μ l
dNTP mixture (10 mM)	1 μ l
total RNA (500 ng)	X μ l
ReverTra Ace	0.4 μ l
5 \times RT buffer	4 μ l
計	20 μ l

H ₂ O	12.6-X μl
SMART II A oligonucleotide (10 μM)	1 μl
Oligo-dT-M4 primer (Takara)	1 μl
dNTP mixture (10 mM)	1 μl
total RNA (500 ng)	X μl
ReverTra Ace	0.4 μl
5× RT buffer	4 μl
計	20 μl

反応条件は 42°C 90 分、99°C 5 分とした。

2.6. ナトリウムチャンネル遺伝子の増幅に用いたプライマー

ナトリウムチャンネル遺伝子の増幅に用いたプライマーを表 2-1-3 に示した。遺伝子断片 fragment D の増幅に用いた skdr/Dg1-F と kdr/2-R は Forcioli et al (2002)によって報告されたものである。縮重プライマーはネッタイイエカ (GenBank/ EMBL/ DDBJ accession no. AB453977)、オオタバコガ(*Heliothis virescens*) (accession no. AF072493)、ハマダラカ(*Anopheles gambiae*) (accession no. AM422833)、ミツバチヘギイタダニ(*Varroa destructor*) (accession no. AY259834)、キョウソヤドリコバチ(*Nasonia vitripennis*) (accession no. BN001093)、ネッタイシマカ(accession no. EU399179)、カイコガ(accession no. EU822499)、ワモンゴキブリ(*Periplaneta americana*) (accession no. GQ132119)のナトリウムチャンネル遺伝子の塩基配列に基づいて設計した。

2.7. PCR によるナトリウムチャンネル遺伝子の増幅

cDNAを鋳型としてナトリウムチャンネル遺伝子7断片(fragments B-H)の増幅を行った(図2-1-2)。5'および3'末端領域の遺伝子の増幅はRACE法で行った

(Frohman et al., 1988)。増幅反応はQuick Taq™ HS DyeMix (Toyobo)を用いて行った。反応条件は94°C 3分(1サイクル) ; 94°C 15秒, 50°C (縮重プライマー)もしくは55°C (特異的プライマー) 30秒, 72°C 2分(40サイクル) ; 72°C 7分(1サイクル)とした。

3'RACEについてはまず、cDNAを鋳型としてTP-Na-3RACE-1プライマーとアダプタープライマーM4(Takara)を用いた増幅反応を行った。続いて、TP-Na-3RACE-2プライマーとM4を用いた増幅反応を行い、fragment Iを増幅した。5'RACEについてはまず、5'RACE 用のcDNAを鋳型として、TP-NaI-5RACE-1プライマーと10× Universal Primer (10× UPM) (Clontech)を用いた増幅反応を行った。続いて、TP-NaI-5RACE-2プライマーとNested Universal Primer (NUP) (Clontech)を用いた増幅反応を行い、fragment Aを増幅した。増幅された断片は最も短いものが224 bp (fragment B)、最も長いものが1796 bp (fragment C)であった。3'RACEおよび5'RACEにはQuick Taq™ HS DyeMixを用いた。反応条件は94°C 3分(1サイクル) ; 94°C 15秒, 55°C 30秒, 72°C 2分(40サイクル) ; 72°C 7分(1サイクル)とした。

2.8. ゲノム DNA の抽出および PCR 反応

乳鉢と乳棒を用いて岡山および高知系統の雌成虫約 100 頭を磨砕し、400 µl の抽出バッファー (50 mM Tris-HCl pH 8.5, 10 mM EDTA pH 8.0, 100 mM NaCl, 2% SDS)で懸濁した。全量を 1.5 ml のプラスチックチューブに移し、40 µl の 3M 酢酸ナトリウム(pH 5.2)、400 µl のフェノール:クロロホルム:イソアミルアルコール(25:24:1)を加えて攪拌した後、12000 rpm にて 2 分間遠心して上清を回収した。この操作は 2 回繰り返した。回収された上清に 400 µl のイソプルパノールを加えて攪拌した後、13000 rpm にて 3 分間遠心して DNA を沈殿させた。沈殿させた DNA は 70%エタノールで洗浄した後、乾燥させ、100 µl の TE (10

mM Tris·HCl, 1 mM EDTA)に溶解した。

DNA 溶液に 0.5 μ l の RNase A (10 mg/ml)を加えて 37°Cで 30 分間保温した。RNase 処理後、10 μ l の 3M 酢酸ナトリウム(pH 5.2)と 100 μ l のフェノール:クロロホルム:イソアミルアルコール(25:24:1)を加えて攪拌し、12000 rpm にて 2 分間遠心して上清を回収した。回収した上清に 100 μ l のクロロホルム:イソアミルアルコール(24:1)を加えて攪拌した後、12000 rpm にて 2 分間遠心して上清を回収した。回収した上清に 250 μ l の 99.5%エタノールを加えて 4°C、13000 rpm にて 3 分間遠心して DNA を沈殿させた。沈殿させた DNA は 70%エタノールで洗浄した後、乾燥させ、50 μ l の TE に溶解した。DNA の濃度は吸光度計を用いて測定した。

ゲノム DNA を鋳型としてナトリウムチャンネル遺伝子 14 断片(fragment 1-14)の増幅を行った(図 2-1-2)。遺伝子増幅には Quick Taq™ HS DyeMix を用いた。反応条件は 94°C 3 分(1 サイクル) ; 94°C 15 秒, 50°C (重縮プライマー) もしくは 55°C (特異的プライマー) 30 秒, 72°C 2 分(40 サイクル) ; 72°C 7 分(1 サイクル)である。増幅された 14 断片は最も短いものが 244 bp (fragment 5)、最も長いものが 2081 bp (岡山系統の fragment 1)であった。

2.9. ライゲーション反応

増幅産物は 1.0%アガロースゲルで分画した。分画したゲルを臭化エチジウム溶液(5 μ g/ml)で 5~15 分間染色した。紫外線トランスイルミネーターを用いて目的の DNA 断片を切り出した。ゲルから切り出された DNA 断片は QIAEX II Gel Extraction Kit (Quiagen)を用いて精製した後、T4 DNA Ligase (TaKaRa)を用いて pGEM-T Easy (Promega)ベクターとのライゲーション反応(4°Cで 12~14 時間)を行った。反応溶液の組成は以下の通りである。

H ₂ O	7 μ l
PCR products (4 ng/ μ l)	10 μ l
pGEM-T Easy vector (4 ng/ μ l)	0.5 μ l
T4 DNA ligase (3 units/ μ l)	0.5 μ l
10 \times T4 DNA ligase buffer	2 μ l
計	20 μ l

2.10. 形質転換およびプラスミド DNA の精製

ライゲーション反応液 10 μ l をコンピテントセルに加えて氷中に 25 分間静置した後、50 $^{\circ}$ Cにて 30 秒間加熱処理し、再び氷中に 2 分間静置した。反応液に 1 ml の SOC 培地を加え、37 $^{\circ}$ Cで 45 分間保温した。培養液を 3000 rpm にて 1 分間遠心した後、約 100 μ l の培養液が残るよう上清を除去した。0.1 mM IPTG 10 μ l と X-Gal (20 mg/ml) 45 μ l を加え懸濁した後、アンピシリン(50 μ g/ml)とテトラサイクリン(10 μ g/ml)を含む LB 固型培地にスプレッダーで展開し、37 $^{\circ}$ C で 12~16 時間培養した。培養したプレートから白色のコロニーを選択し、アンピシリン(50 μ g/ml)を含む LB 液体培地で 12 時間培養し、塩基配列決定用のプラスミド DNA を抽出した。プラスミド DNA の精製には Plasmid Mini Extraction Kit (Bioneer)を用いた。

2.11. 塩基配列決定

塩基配列決定には Big Dye Terminator v 3.1 cycle sequencing Kit (Applied Biosystems)を用いた。反応溶液の組成は以下の通りである。

H ₂ O	7 μ l
Plasmid DNA	0.5 μ l
-21 or Reverse primer (2 pmol/ μ l)	0.25 μ l
Big Dye Terminator v 3.1 Ready Reaction Mix	0.5 μ l

5× sequence buffer	1.75 μl
計	10 μl

反応条件は 96°C 10 秒, 50°C 5 秒, 60°C 4 分(25 サイクル)である。反応液に 2 μl の 125 mM EDTA と 70 μl の 99.5%エタノールを加えて 4°C、13000 rpm にて 10 分間遠心し、沈殿させた。沈殿させた DNA は 70%エタノールで洗浄した後、乾燥させ、20 μl の HiDi formamide に溶解した。熱変性は 94°C で 2 分間加熱処理した後、水中で急冷した。

2.12. 塩基配列の解析

塩基配列の解析は Genetyx ver.11 (Genetyx Corp.)を用いて行った。相同性検索は BLAST Program (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)を用いて行った。塩基配列と推定アミノ酸配列の多重整列は Clustal W Program (<http://www.genome.jp/tools/clustalw/>)を用いて行った。系統樹は MEGA (Molecular Evolutionary Genetics Analysis) ver. 5.05 (Tamura et al., 2007) を用いて作成した。

3. 結果および考察

3.1. 生物検定

岡山県、高知県、大阪府、徳島県で採集された計 11 系統の合成ピレスロイド剤(シペルメトリン)に対する LC₅₀ 値を表 2-1-2 に示した。最も高い LC₅₀ 値を示したのは高知系統で 3922.9 mg/L、最も LC₅₀ 値が低かったのは岡山系統で 72.1 mg/L であった。高知系統の抵抗性レベルは岡山系統の 54.4 倍と見積もられた。以下の解析は最も抵抗性レベルの低い岡山系統と最も抵抗性レベルの高い高知系統を用いて行った。ただし、ナスにおけるシペルメトリンの常用濃度

は 60 mg/L なので、いずれの系統も抵抗性系統と考えられる。

3.2. ナトリウムチャンネル遺伝子のクローニングと塩基配列決定

岡山および高知系統の全 RNA から合成した cDNA を鋳型としてナトリウムチャンネル遺伝子のコーディング領域をカバーする 9 つの DNA 断片を PCR で増幅した(図 2-1-2)。また、岡山および高知系統のゲノム DNA を鋳型としてナトリウムチャンネル遺伝子の全長をカバーする 14 の断片を増幅した(図 2-1-2)。

両系統のナトリウムチャンネル遺伝子には 2039 アミノ酸からなるタンパク質をコードする 6117 bp のオープンリーディングフレーム(ORF)が含まれていた(岡山系統 : accession no. AB849920; 高知系統 : accession no. AB849921) (図 2-1-3)。Blast X 解析により両系統の推定アミノ酸配列はトコジラミ (*Cimex lectularius*) のナトリウムチャンネルのアミノ酸配列と最も高い相同性(80%)を示した(図 2-1-4)。

3.3. ナトリウムチャンネル遺伝子の構造解析

ゲノム配列と cDNA 配列の比較により、岡山系統には 18 のエキソン、高知系統には 16 のエキソンが存在することが明らかとなった(表 2-1-4)。岡山系統のゲノム DNA のエキソン 1 から 3 は高知系統のエキソン 1 に対応する(表 2-1-4)。両系統のエキソン数は既報のショウジョウバエ(*Drosophila virillis*) (29 エキソン)、キイロショウジョウバエ(29 エキソン)、ガンビエハマダラカ(33 エキソン)、ネッタイシマカ (32 エキソン)、セイヨウミツバチ(29 エキソン)、イエカ (*Culex pipiens*) (32 エキソン)、コクヌストモドキ(25 エキソン)、カイコガ(33 エキソン) (Davies et al., 2007) に比べて少なかった。岡山および高知系統にはそれぞれ、17 と 15 のイントロンが含まれていた(図 2-1-2)。全てのイントロンの末端配列は、GT (donor)-AG (acceptor) ルール(Breathnach et al., 1978) に合致してい

た。イントロンの塩基配列と鎖長は両系統間で完全に一致した(表 2-1-4)。

高知系統の fragment 11 に関しては2つタイプ(タイプ I とタイプ II)の塩基配列がゲノム DNA より増幅された(タイプ II の配列は accession no. AB853936 として登録)(図 2-1-5)。タイプ I はタイプ II より高頻度にクローニングされた(9 クローン中 7 クローン)。岡山系統のゲノム DNA よりクローニングされた 10 クローンは全てタイプ I に属した。cDNA を用いて fragment 11 に相当する領域を増幅した。タイプ II のクローンは低頻度ながら両系統より増幅された(岡山系統 : 16 クローン中に 2 クローン ; 高知系統 : 13 クローン中に 2 クローン)。タイプ I とタイプ II の塩基配列とアミノ酸配列の相同性はそれぞれ、82% と 84% であった(図 2-1-5)。タイプ II の推定アミノ酸配列を岡山および高知系統間で比較したがアミノ酸配列の違いは検出されなかった。

異なるアミノ酸配列を持つナトリウムチャンネルが選択的スプライシングによって生じる(Loughney et al., 1989; Olson et al., 2008; Lin et al., 2012)。タイプ I とタイプ II のクローンはイエバエにおける mutually exclusive exons (エキソン *k* とエキソン *l*) (Lee et al., 2012)、チャバネゴキブリにおけるエキソン G2 とエキソン G1 (Tan et al., 2002)、コナガにおけるエキソン 26a とエキソン 26b (Sonoda et al., 2008)に対応する領域をエキソン 16 (岡山系統)およびエキソン 14 (高知系統)に含んでいた(図 2-1-6)。

コナガのエキソン 18a とエキソン 18b (Sonoda et al., 2008)、イエバエのエキソン *c* とエキソン *d* (Lee et al., 2012)に対応する mutually exclusive exons はクロシヨウジヨウバエ(*Drosophila virilis*)、キイロシヨウジヨウバエ、ガンビエハマダラカ、ネッタイシマカ、アカイエカ(*Culex pipiens*)、カイコガを含むいくつかの昆虫種で保存されていた(Davies et al., 2007) (図 2-1-6B)。一方、チャバネゴキブリ(Dong et al., 1998)、セイヨウミツバチ(Davies et al., 2007)、キョウソヤドリコバチ (Davies et al., 2007)にはエキソン *c* とエキソン 18a に対応するエキソンの

みがコードされていた(図 2-1-6B)。ミナミキイロアザミウマのナトリウムチャンネル遺伝子は、コクヌストモドキ(Davies et al., 2007)で報告されたように、エキソン *d* とエキソン 18b に対応するエキソン(岡山系統のエキソン 10 および高知系統のエキソン 8)のみが検出された(図 2-1-6B)。本研究では両系統のナトリウムチャンネル遺伝子において optional exon は検出されなかった。

3.4. 合成ピレスロイド剤抵抗性に関わるアミノ酸変異

クローニングされたナトリウムチャンネル遺伝子の推定アミノ酸配列を岡山および高知系統間で比較した。両系統ともにドメイン IIS5 の 945 番目のアミノ酸(イエバエでは 929 番目に相当)部位に抵抗性型のアミノ酸(IIe)をコードしていた(T945I)。岡山および高知系統以外の 9 系統も T945I を持つことが明らかとなった(未公表データ)。

塩基配列決定では最も出現頻度の高い配列を採用した。その結果、両系統間のアミノ酸配列は 2 ヶ所で異なることとなった(図 2-1-3)。それらはドメイン I-II における 752 番目のアミノ酸部位の S752L(イエバエでは 744 番目に相当)とドメイン II-III における 1050 番目のアミノ酸部位の S1050Y(イエバエでは 1034 番目に相当)である。チャバネゴキブリではドメイン I-II におけるアミノ酸置換(E435 K および C785R)が L1014F のエンハンサーとして作用することが報告されている(Liu et al., 2000; Tan et al., 2002; Liu et al., 2002)。Tsagkarakou et al. (2009)はナミハダニ(*Tetranychus urticae*)のドメイン II-III のアミノ酸置換(A1215D)が合成ピレスロイド剤抵抗性に関与することを報告した。コナガでもドメイン II-III のアミノ酸置換(A1060T)の抵抗性への関与が報告されている(Sonoda et al., 2008)。ミナミキイロアザミウマで検出されたアミノ酸置換(S752L と S1050Y)は上に述べた合成ピレスロイド剤抵抗性に関わるアミノ酸置換とは異なっていた。また両アミノ酸置換を含むクローンは高知系統のみならず岡山

系統でも検出された。従って、S752LとS1050Yは合成ピレスロイド剤抵抗性とは関係のない単なる多型であると考えられる。以上の結果より岡山系統と高知系統の抵抗性レベルの違い(54倍)はナトリウムチャネルのアミノ酸配列の違いに由来しないことが明らかとなった。次節において両系統の各種解毒分解酵素活性について検討する。

岡山と高知系統は共に、アタマジラミ(*Pediculus humanus capitis*)において合成ピレスロイド剤抵抗性への関与が報告されているアミノ酸置換M843I(イエバエではM827Iに相当)(Lee et al., 2003; Yoon et al., 2008; Hodgdon et al., 2010)とナミハダニにおいて抵抗性への関与が報告されているアミノ酸置換A1231D(イエバエではA1215Dに相当)(Tsagkarakou et al., 2009)をコードしていた。以上の結果より、岡山系統と高知系統の合成ピレスロイド剤抵抗性にはM843I、T945I、A1231D(イエバエではM827I、T929I、A1215Dに相当)が関与している可能性がある(図2-1-3)。今後の課題としてこれらのアミノ酸置換の抵抗性への関与を、ミナミキイロアザミウマのナトリウムチャネル遺伝子を用いて、電気生理学的手法によって検証する必要がある。

A



B

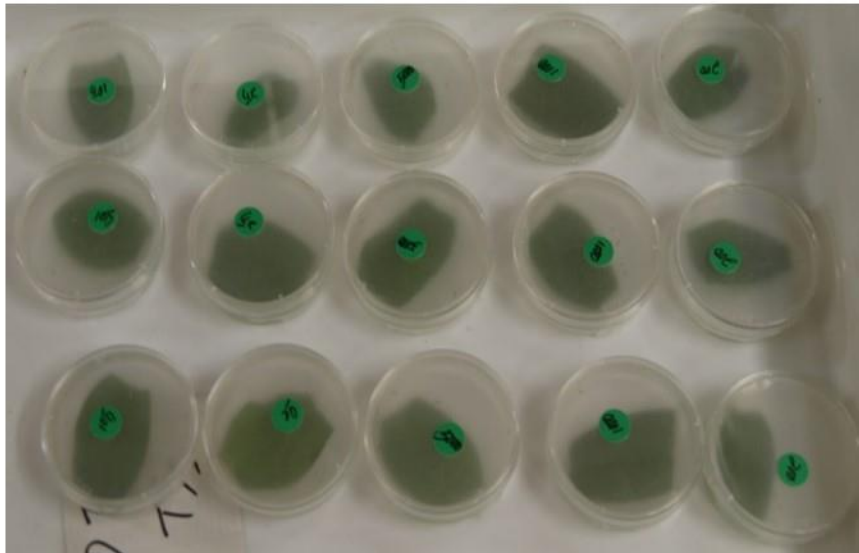


図 2-1-1. ミナミキイロアザミウマの飼育容器(A)および生物検定に用いた容器(B)

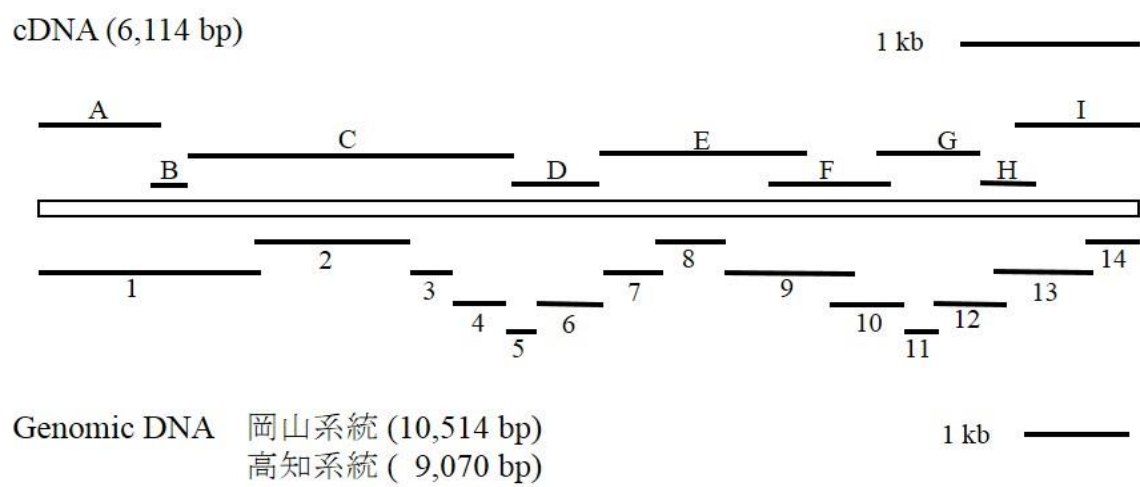


図 2-1-2. ナトリウムチャンネル遺伝子の cDNA およびゲノム配列のクローニングにおいて増幅された断片。

```

OK MSECSESVSEERSLFRPFTRESLAAIEQRIAEQEARHRELERKRAEGEDDFMGRKKSKEVRYEDSDEDEGPQDATLEQGAPIVVRMH 90
KC .....
      Intron 1
      IS1
OK GSFFAELASTPLEDIDTYHNRQTFVVISKGDIFRFSATDALWILDFNPIRRVAIYILVHPLFSLFIITILTNCILMIMPSSPKVES 180
KC .....
      Intron 2 IS2 IS3 Intron 3 (1) IS4 Intron 4 (2)
OK TEVIFTGIYTFESAVKVMARGFILQPFTYLRLDAWNWLDLDFIVIVLAYITMGIDLGNLAALRTFRVLRALKTVVAIVFGLKTIIVGAVIESVKN 270
KC .....
      ISS Intron 5 (3)
OK LRDVYIILTMFSLSVFALMGLQIYMGVLTQKCI RNFPDGSAGPLTHENWFAHASNKTNWECNDEDARDCPLCGNSSGAGMCEPGYTCTIQG 360
KC .....
      IS6
OK FGSNPNYGYTSFDTFGWALLSAFRMLTQDYWENLYQLVLR SAGPWHMLFFIVIFLGSFYLVNLILAIVAMSYDELQKKAEEEEAEAAA 450
KC .....
      Intron 6 (4) Intron 7 (5)
OK IREAEAAAQAKETRVRNRAAAHDARVHAAAEVAAAEEAAEAGSVAKSPSAFSCQSYELFVGQEKGNMDDNNKEKMSIRSDDCAESL 540
KC .....
      Intron 8 (6)
OK SEHHRVVGQTKSRKMSAASLSLPGSPFNIRRASRSSHQFAMRNPPRAGRWGDRKPLVNTYLDLQAEHLPYADDSNAVTPMSEENGAIVV 630
KC .....
OK PMYTNLGSRRHSYTSHASRLSYTSHGDLGALGGKQPTKESRLRSRSSRASQATPSQATPVVSOQPSLVQATAYREYEPADLGEEQRS 720
KC .....
OK KLQDNPFIDSSQVQNIIVNMKDVMLNDIIEQSHGRQSRQSDQAVSVYFQQTEDEEBEPTFKEKMAIASLRGIDFCVWDCWCWLFQH 810
KC .....
      IIS1 L IIS2 IIS3
OK WVGQLVDFPVELEFITLCIVVNTLFMALDHHIDINPEMDAALKSGNYFFTATFGIEATLKLIIAMSPKFYFQEGWNIIDFIIIVALSLELGL 900
KC .....
      IIS4 Intron 9 (7) IIS5 Intron 10 (8)
OK EGVQGLSVLRSFRLLRVFKLAKSWPTLNLLISIMGRMGALGNLIFVLCIIIFIFAVMGMQLFGKNYYDNVDFKFGGEMPRWNFINFMHS 990
KC .....
      IIS6
OK FMIVFRVLCGEWIESMWDCMLVGDWSCIPFFLATVVIGNLVVNLFLALLSNFGSSNLSAPTADSDTNKIAEAFDRISRFINWIKQCIR 1080
KC .....
      Intron 11 (9) Intron 12 (10)
OK DAIKMTVTKLNTQISDQVTHSNRELDLDLGADEILADGGHVFRDKKSPNTQLEMAIGDGMFTIHDLNKLRKKGFLNNTKAIGNSITGN 1170
KC .....
      Intron 13 (11) Intron 14 (12)
OK HQDNRFESDFIKHRYDDDNISNHSYSGSHKNRPFKDESHKGSLETLDGEEKDASKEDLEGRGETDLEGEAEAGEGEMDDIIADNTED 1260
KC .....
      IIS1 Intron 15 (13) IIS2
OK VLI GEYPADCCPDCYKRFPFPLAGDDDAPFWQGANLRLKTYQLIENKYFETAVITMILLSMALALEDVHLQSRPILQDILYMDRIFT 1350
KC .....
      IIS3 IIS4 IIS5
OK VIFFLEMLIKWLAGFQKYFTNAWCWLDLDFVIMVSLINFVASLVGAGGIQAFKTMRTLRLALRPLRAMSRMQGMRVVVVALVQAIPISFNV 1440
KC .....
      Intron 16 (14) Intron 17 (15)
OK LLVCLIFWLI FAIMGVQVLFAGKYFKVDANKTTLSHEIIPDRNACIAENYTWENSPMNFHDVHGKAYLCLFQVATFKGWIQIMNDAIDSRE 1530
KC .....
      IIS6
OK INKQPIRETNIYMYLVFVFFIIFGSFFTLNLFIVGIIIDNFNEQKKKAGGSLEMFMTEQKKYINAMKMGSKKPKMKAIPRPRWKPQAI 1620
KC .....
      IVS1 IVS2 IVS3
OK EIVTNKKFDMIIIMLFIGFNMLTMTLDHYQQSETFSMVLDHLNMI FIVIFSSECLMKVFALRYHYFVFPWNLDFVIVVILSILGLVLS 1710
KC .....
      IVS4 IVS5
OK EKYFVSPPTLLRVVRVAKVGRVLRVVKAGKIRTLFAPAMSLPALFNICLLFLVMFIFAI FGMSSFFMNVKDKSGLDDVYNFKTFGQSMI 1800
KC .....
      IVS6
OK LLFQMSTSAGWDGVL DGIINEEECDKPNNEMGIAGNCSSTIGITFLLSYLVISFLIVINMYIAVILENYSQATEDVQEGLTDDDDYDMYY 1890
KC .....
OK BIWQKFDPKGTQFISYSQLSDFVHTLEEPLQIPKPNKFKLISMDIPICVGDVYCV DILDALTKDFFARKGHVIEESVELAEVAPMKLGE 1980
KC .....
OK FEHISSTLWRQREVHCARILQKGRDYSVSRKALEAAPKLDRIDEGDEEQSAPSERHEM 2039
KC .....

```

図 2-1-3. 岡山および高知系統のナトリウムチャンネル遺伝子の推定アミノ酸配列の比較。 fragment 11 に関してはタイプ I のアミノ酸配列を示した。同一のアミノ酸は点、抵抗性型のアミノ酸部位を星、イントロンの位置を黒三角、多型部位を白三角で示した。下線の配列は、膜貫通セグメントを示す(イエバエに準拠)。

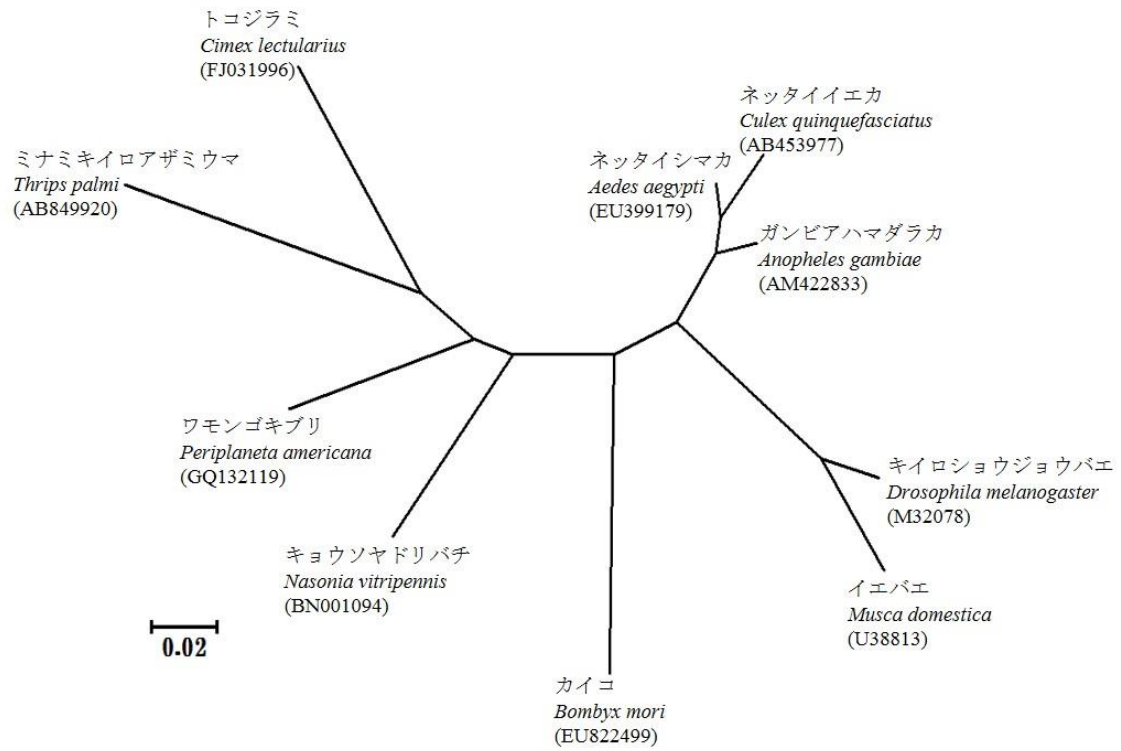


図 2-1-4. ミナミキイロアザミウマと他の昆虫種のナトリウムチャネルのアミノ酸配列の系統樹

A

```

Type I  ACAAAGTAGGCCCATTTTACAAGATATTCTTTACTACATGGACAGAATATTCACACTGTGAT 60
Type II  ..... 60

Type I  ATTCTTTCTTGAGATGTTAATAAAAATGGTTGGCACTGGGTTTCCAAAAGTATTTACAAA 120
Type II  ..... 120

Type I  CGCCTGGTGCTGGCTTGACTTCGTCATTGTCATGGTCTCCCTCATAAACTTCGTTGCGTC 180
Type II  .....C.G..T..GG.....C.A.CC..CAT 180

Type I  CCTGGTTGGGGCTGGTGGCATTCAAGCCTTCAAAAACAATGAGGACTCTCAGGGCTCTTAG 240
Type II  .A...CG..A..G.CA.A.....CT.....TCGGT.G...C.A..A..GC....G..CC. 240

Type I  GCCCCTTAGGGCTATGTCTAGAATGCAGGGAATGAGGGTTGTCGTCAATGC 291
Type II  C..G..CC.A..GG....GC.CTG.G....C...C.C..... 291

```

B

```

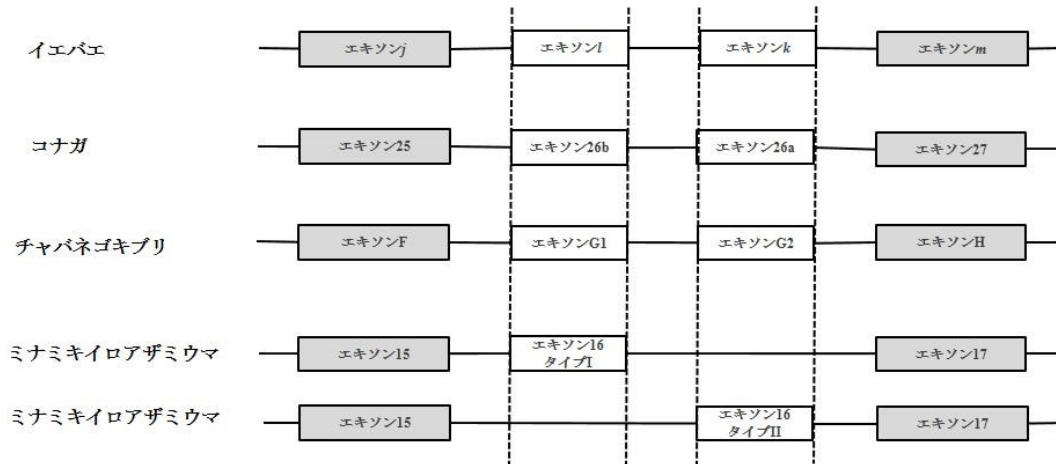
Type I  QSRPILQDILYYMDRIFTVIFFLLEMLIKWLALGFQKYFTNAWCWLDVFIVMVSLINVAS 60
Type II  .....L..V.LA.I 60

Type I  LVGAGGIQAFKTMRTLRLRPLRAMSRMQGMRVVVN 96
Type II  MA..AD.P..RS.....V..WE..... 96

```

図 2-1-5. 高知系統の fragment 11 として増幅された 2 種類のクローンの塩基配列 (A)および推定アミノ酸配列(B)。同じ配列は点で示した。

A



B

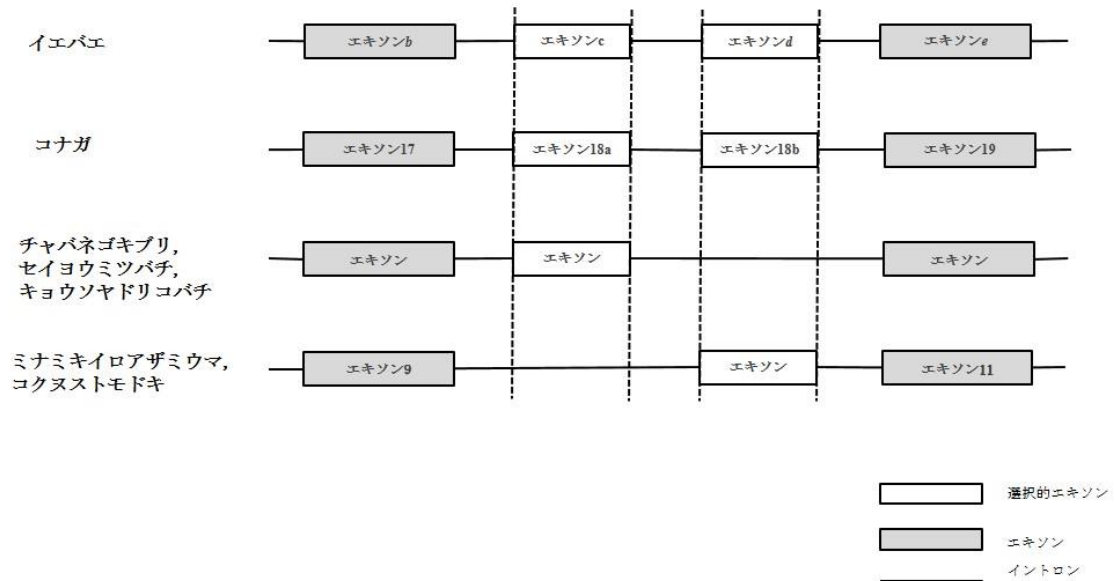


図 2-1-6. ナトリウムチャンネル遺伝子に存在する mutually exclusive exons

表 2-1-1. 合成ピレスロイド剤抵抗性に関わるナトリウムチャネルのアミノ酸置換 Rinkevich et al., 2013; Dong et al.,

2014 を改変

アミノ酸置換	種	アミノ酸番号	引用文献
D59G + E435K + C785R + L1014F + P1999L	<i>Blattella germanica</i>	D58G + E434K + C764R + L993F + P1888L	Liu et al., 2000
A99S	<i>Culex quinquefasciatus</i>	A109S	Xu et al., 2012
I254N	<i>Drosophila melanogaster</i>	I286N	Pittendrigh et al., 1997
V410M	<i>Helicoverpa zea</i>	V421M	Hopkins and Pietrantonio, 2010
	<i>Heliothis virescens</i>	V421M	Park et al., 1997
V410L	<i>Cimex lectularis</i>	V419L	Yoon et al., 2008
V410A	<i>Helicoverpa zea</i>	V421A	Hopkins and Pietrantonio, 2010
V410G	<i>Helicoverpa zea</i>	V421G	Hopkins and Pietrantonio, 2010
M827I	<i>Pediculus humanus capitis</i>	M815I	Hodgdon et al., 2010
M827I + T929I	<i>Pediculus humanus capitis</i>	M815I + T917I	Hodgdon et al., 2010
M827I + T929I + L932F	<i>Pediculus humanus capitis</i>	M815I + T917I + L920F	Lee et al., 2003
	<i>Pediculus humanus corporis</i>	M815I + T917I + L920F	Drali et al., 2012
M827I + L932F	<i>Pediculus humanus capitis</i>	M815I + L920F	Hodgdon et al., 2010
M918T	<i>Aphis gossypii</i>		Marshall et al., 2012
	<i>Tetranychus evansi</i>		Nyoni et al., 2011
M918T + L1014F	<i>Haematobia irritans irritans</i>		Guerrero et al., 1997
	<i>Liriomyza huidobrensis</i>		Davies et al., 2007
	<i>Musca domestica</i>		Williamson et al., 1996
	<i>Myzus persicae</i>		Eleftherianos et al., 2008
	<i>Thrips tabaci</i>		Toda and Morishita, 2009
	<i>Tuta absoluta</i>		Haddi et al., 2012
M918L	<i>Aphis gossypii</i>		Carletto et al., 2009
	<i>Hyalella azteca</i>		Weston et al., 2013
M918L + L925I	<i>Trialeurodes vaporariorum</i>		Karatolos et al., 2012
M918L + V1010A	<i>Thrips tabaci</i>		Wu et al., 2013
M918V	<i>Bemisia tabaci</i>		Morin et al., 2002
M918I + L1014F	<i>Plutella xylostella</i>		Sonoda et al., 2008
L925I	<i>Bemisia tabaci</i>		Morin et al., 2002
	<i>Cimex lectularis</i>		Yoon et al., 2008
	<i>Hyalella azteca</i>		Weston et al., 2013
	<i>Trialeurodes vaporariorum</i>		Karatolos et al., 2012
	<i>Rhipicephalus microplus</i>		Morgan et al., 2009
L925V	<i>Varroa destructor</i>		Gonzalez-Cabrera et al., 2013
T929I	<i>Thrips tabaci</i>		Toda and Morishita, 2009
	<i>Thrips palmi</i>		Bao and Sonoda, 2012
	<i>Trialeurodes vaporariorum</i>		Karatolos et al., 2012
	<i>Leptinotarsa decemlineata</i>		Rinkevich et al., 2012
	<i>Sitophilus zeamais</i>		Araujo et al., 2011
T929I + L932F	<i>Pediculus humanus capitis</i>		Lee et al., 2000
T929I + L1014F	<i>Frankliniella occidentalis</i>		Forcioli et al., 2002
	<i>Leptinotarsa decemlineata</i>		Rinkevich et al., 2012
	<i>Plutella xylostella</i>		Schuler et al., 1998
	<i>Tuta absoluta</i>		Haddi et al., 2012
T929I + L1014F + A1101T + P1879S	<i>Plutella xylostella</i>		Sonoda, 2010
T929C	<i>Frankliniella occidentalis</i>		Forcioli et al., 2002

表 2-1-1. 継続 1

アミノ酸置換	種	アミノ酸番号	引用文献
T929C + L1014F	<i>Frankliniella occidentalis</i>		Forcioli et al., 2002
T929V	<i>Bemisia tabaci</i>		Roditakis et al., 2006
	<i>Ctenocephalides felis</i>		Bass et al., 2004
	<i>Frankliniella occidentalis</i>		Forcioli et al., 2002
T929V + L1014F	<i>Ctenocephalides felis</i>		Bass et al., 2004
T929N + L1014F	<i>Leptinotarsa decemlineata</i>		Rinkevich et al., 2012
G933V	<i>Rhipicephalus microplus</i>	G72V	Jonsson et al., 2010
I936V	<i>Helicoverpa zea</i>	I951V	Hopkins and Pietrantonio, 2010
G943A	<i>Pediculus humanus capitis</i>		Kristensen, 2005
Q945R	<i>Lepocephtheirus salmonis</i>		Fallang et al., 2005
I1011M	<i>Aedes aegypti</i>	I104M	Brengues et al., 2003
I1011V	<i>Aedes aegypti</i>		Saavedra-Rodriguez et al., 2007
L1014F	<i>Anopheles gambiae</i>		Martinez-Torres et al., 1998
	<i>Anopheles stephensi</i>	L31F	Enayati et al., 2003
	<i>Anopheles subpictus</i>		Karunaratne et al., 2007
	<i>Aphis gossypii</i>		Marshall et al., 2012
	<i>Blattella germanica</i>	L993F	Dong, 2007a,b; Miyazaki et al., 1996
	<i>Ctenocephalides felis</i>		Bass et al., 2004
	<i>Culex pipiens pipiens</i>		Martinez-Torres et al., 1999a
	<i>Culex pipiens pallens</i>		Chen et al., 2010
	<i>Culex pipiens quinquefasciatus</i>		Xu et al., 2005
	<i>Cydia pomonella</i>		Brun-Barale et al., 2005
	<i>Frankliniella occidentalis</i>		Forcioli et al., 2002
	<i>Haematobia irritans irritans</i>		Guerrero et al., 1997
	<i>Haematobia irritans exigua</i>		Rothwell et al., 2011
	<i>Leptinotarsa decemlineata</i>		Lee et al., 1999
	<i>Liriomyza huidobrensis</i>		Davies et al., 2007
	<i>Liriomyza sativae</i>		Davies et al., 2007
	<i>Meligethes aeneus</i>		Nauen et al., 2012
	<i>Musca domestica</i>		Ingles et al., 1996; Miyazaki et al., 1996; Williamson et al., 1996
	<i>Myzus persicae</i>		Martinez-Torres et al., 1999b
	<i>Sitobion avenae</i>		Foster et al., 2013
	<i>Triatoma infestans</i>		Fabro et al., 2012
L1014F + F979S	<i>Myzus persicae</i>		Cassanelli et al., 2005
L1014F + N1575Y	<i>Anopheles gambiae</i>		Jones et al., 2012
L1014S	<i>Anopheles arabiensis</i>		Stump et al., 2004
	<i>Anopheles culicifacies</i>		Singh et al., 2010
	<i>Anopheles gambiae</i>		Ranson et al., 2000
	<i>Anopheles parilae</i>		Verhaeghen et al., 2010
	<i>Anopheles pedtaeniatus</i>		Verhaeghen et al., 2010
	<i>Anopheles sacharovi</i>		Luleyap et al., 2002
	<i>Anopheles sinensis</i>		Verhaeghen et al., 2010
	<i>Anopheles vagus</i>		Verhaeghen et al., 2010
	<i>Culex pipiens pallens</i>		Chen et al., 2010
	<i>Culex pipiens pipiens</i>		Martinez-Torres et al., 1999b
L1014S + V1010L	<i>Anopheles culicifacies</i>		Singh et al., 2010

表 2-1-1. 継続 2

アミノ酸置換	種	アミノ酸番号	引用文献
L1014H	<i>Helicoverpa zea</i>	L1029H	Hopkins and Pietrantonio, 2010
	<i>Heliothis virescens</i>	L1029H	Park et al., 1997
	<i>Liriomyza trifolii</i>		Davies et al., 2007
	<i>Musca domestica</i>		Liu and Pridgeon, 2002; Rinkevich et al., 2006
	<i>Stomoxys calcitrans</i>		Olafson et al., 2011
L1014C	<i>Anopheles sinensis</i>		Kim et al., 2007
	<i>Anopheles albimanus</i>		Lol et al., 2013
	<i>Culex pipiens pipiens</i>		Wang et al., 2012
L1014W	<i>Anopheles sinensis</i>		Tan et al., 2012
V1016G	<i>Aedes aegypti</i>	V109G	Bregues et al., 2003
V1016G + S989P	<i>Aedes aegypti</i>		Srisawat et al., 2010
V1016G + D1763Y	<i>Aedes aegypti</i>	D1794Y	Chang et al., 2009
V1016I	<i>Aedes aegypti</i>		Saavedra-Rodriguez et al., 2007
N1013S	<i>Anopheles sinensis</i>		Tan et al., 2012
F1020S	<i>Blattella germanica</i>	F999S	Pridgeon et al., 2002
	<i>Plutella xylostella</i>		Endersby et al., 2011
L1024V	<i>Tetranychus urticae</i>	L1022V	Kwon et al., 2010
A1101T + P1879S	<i>Plutella xylostella</i>	A1060T + P1836S	Sonoda et al., 2008
A1410V	<i>Drosophila melanogaster</i>	A1549V	Pittendrigh et al., 1997
A1494V	<i>Drosophila melanogaster</i>	A1648V	Pittendrigh et al., 1997
F1534C	<i>Aedes aegypti</i>	F1269C	Kawada et al., 2009
	<i>Aedes albopictus</i>		Kasai et al., 2011
F1538I	<i>Rhipicephalus microplus</i>	F1550I	He et al., 1999
	<i>Tetranychus cinnabarinus</i>		Feng et al., 2011
F1538I + A1215D	<i>Tetranychus urticae</i>		Tsagakarakou et al., 2009
M1524I	<i>Drosophila melanogaster</i>		Pittendrigh et al., 1997
F1528L + M1823I	<i>Varroa destructor</i>	F758L + M1055I	Wang et al., 2002
F1528L + L1596P + I1752V + M1823I	<i>Varroa destructor</i>	F758L + L826P + I982V + M1055I	Wang et al., 2002
D1549V + E1553G	<i>Helicoverpa armigera</i>	D1561V + E1565G	Head et al., 1998
	<i>Heliothis virescens</i>	D1561V + E1565G	Head et al., 1998
W1594R	<i>Culex quinquefasciatus</i>	W1573R	Xu et al., 2012

表 2-1-2. ミナミキイロアザミウマのシペルメトリンに対する抵抗性レベル

系統	n	LC ₅₀ (mg/L)	95%信頼限界	抵抗性比	採集場所	採集年
岡山	377	72.1	68.7-75.7	1.0	岡山県赤磐市	1994年
高知	780	3922.9	3122.9-5076.4	54.4	高知県安芸市	2008年
大阪	466	121.9	113.7-131.1	1.7	大阪府羽良野市	2010年
徳島1	397	163.2	148.5-180.5	2.3	徳島県海陽町	2011年
徳島2	560	382.1	347.7-423.7	5.3	徳島県海陽町	2011年
徳島3	416	354.2	327.7-385.0	4.9	徳島県海陽町	2011年
徳島4	376	1021.1	836.8-1285.4	14.2	徳島県海陽町	2011年
徳島5	365	532.2	441.6-660.5	7.4	徳島県海陽町	2011年
徳島6	501	494.3	442.7-558.1	6.9	徳島県海陽町	2011年
徳島7	394	738.2	630.8-881.9	10.2	徳島県海陽町	2011年
徳島8	451	505.1	437.0-594.4	7.0	徳島県海陽町	2011年

抵抗性比：各系統 LC₅₀ / 岡山系統 LC₅₀

表 2-1-3. 本研究で用いたナトリウムチャンネル遺伝子のプライマー

断片 (fragments)	5'プライマー		3'プライマー			
	プライマー名	配列	プライマー名	配列		
cDNA	A	1 st 10 × UPM	5'-CTAATACGACTCACTATAGGGC-3'	TP-NaI-5RACE-1	5'-CCCCATTAGCGCAAAATACAGAC-3'	
		2 nd NUP	5'-AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT-3'	TP-NaI-5RACE-2	5'-TCCTAAGTCGATCCCATCG-3'	
	B	TP-Na-IS-5	5'-CATGGAAYTGGYTNAYTTC-3'	TP-Na-IS-3	5'-CCCATRTARATYTNAGNCCCAT-3'	
	C	TP-NaII-5-2	5'-GTCTGTATTGCGCTAATGGG-3'	TP-NaII-5-2	5'-GAGACAACGCAACGATGATG-3'	
	D	sKdr/Dg1-F	5'-GCCCBAACTACTAYTCCAGGARGG-3'	Kdr/2-R	5'-GGAGAGATTGGAAGCCCAAAA-3'	
	E	TP-NaII-3-2	5'-CTTGCTTGCTCTGTCCAA-3'	TP-NaIII-II	5'-ACTAGGTATGGCTGCACCAAG-3'	
	F	TP-Na-III-5	5'-GARATGTTTRATCAARTGGYTDGC-3'	TP-Na-III-3	5'-CCCATYTTYTTCATDGCYRTRTAG-3'	
	G	TP-NaIII-IV	5'-GGAGGTTCCCTAGAGATGTTTCATG-3'	TP-NaIV-5-2	5'-GCGTTGTTTGCAGTTCATG-3'	
	H	TP-Na-IV-5	5'-GGVATGTCVTTYTTCATGMAYG-3'	TP-Na-IV-3	5'-GCCADATYTCRTAGTACATRTC-3'	
	I	1 st TP-Na-3RACE-1	5'-GACGATCAGGACTGTACACCAA-3'	M4	5'-GTTTTCCAGTCACGAC-3'	
		2 nd TP-Na-3RACE-2	5'-GTCATCCTGGAGAACTACAGTCAG-3'	M4	5'-GTTTTCCAGTCACGAC-3'	
	Genomic DNA	1	TP-Na-5-2	5'-ATGTCCGAGTCTCGGAGTC-3'	TP-Na-3-2	5'-GTACGCTAAAATAATGACAAT-3'
		2	TP-Na-IS-5	5'-CATGGAAYTGGYTNAYTTC-3'	TP-Na-IS-3	5'-CCCATRTARATYTNAGNCCCAT-3'
		3	TP-NaI-5-2	5'-GTCTGTATTGCGCTAATGGG-3'	TP-Na-3-1	5'-GGTACAGGTTTTCCCATAG-3'
4		TP-Na-5-1	5'-CTACTGGGAAAACCTGTACC-3'	TP-NaI2-1-R	5'-CAGCTCGTAGCTGTACAAGAGAAC-3'	
5		TP-NaI2-1	5'-GTTCTCTGTGACAGCTACGAGCTG-3'	TP-Na-5-5-R	5'-GTTGAGCACCAGTGGCTTTC-3'	
6		TP-Na-5-5	5'-GAAAGCCACTGGTGTCAAC-3'	TP-NaI2-2	5'-GTCATATTCTCGGTAGGCAGT-3'	
7		TP-NaI2-2-RR	5'-ACTGCTACCGAGAATATGAGC-3'	TP-NaII-5-2	5'-GAGACAACGCAACGATGATG-3'	
8		sKdr/Dg1-F	5'-GCCCBAACTACTAYTCCAGGARGG-3'	Kdr/2-R	5'-GGAGAGATTGGAAGCCCAAAA-3'	
9		TP-NaII-3-2	5'-CTTGCTTGCTCTGTCCAA-3'	TP-Na-3-3	5'-GTGGCTGCCATATGAGT-3'	
10		TP-Na-5-3	5'-TCACCAGGACAACCGCTTTG-3'	TP-Na-3-8	5'-AAATGGACATCCTCGAGAGC-3'	
11		TP-Na-3-8-R	5'-GCTCTCGAGGATGTCATT-3'	TP-NaIII-II	5'-ACTAGGTATGGCTGCACCAAG-3'	
12		TP-Na-5-4	5'-GAGGGTTGTCGTCATGC-3'	TP-Na-III-3	5'-CCCATYTTYTTCATDGCYRTRTAG-3'	
13		TP-NaIII-IV	5'-GGAGGTTCCCTAGAGATGTTTCATG-3'	TP-Na-IV-3	5'-GCCADATYTCRTAGTACATRTC-3'	
14		TP-Na-3'RACE-2	5'-GTCATCCTGGAGAACTACAGTCAG-3'	TP-Na-3-4	5'-TTACATTTCTGGCGCTCAC-3'	

表 2-1-4. 岡山および高知系統のナトリウムチャンネル遺伝子のエキソンとイントロン

エキソン (bp)					イントロン (bp)				
No.	岡山	No.	高知	Homology (%)	No.	岡山	No.	高知	Homology (%)
1	339	1	674	100	1	620	-	-	-
2	206	-	-	-	2	824	-	-	-
3	129	-	-	-	3	1152	1	1152	100
4	92	2	92	100	4	85	2	85	100
5	213	3	213	100	5	70	3	70	100
6	377	4	377	100	6	68	4	68	100
7	154	5	154	100	7	70	5	70	100
8	308	6	308	100	8	289	6	289	100
9	924	7	924	99.7	9	67	7	67	100
10	163	8	163	100	10	77	8	77	100
11	396	9	396	99.7	11	88	9	88	100
12	135	10	135	100	12	596	10	596	100
13	136	11	136	100	13	77	11	77	100
14	134	12	134	100	14	70	12	70	100
15	269	13	269	100	15	73	13	73	100
16	420	14	420	100	16	84	14	84	100
17	195	15	195	100	17	84	15	84	100
18	1527	16	1527	100					

第2節 合成ピレスロイド剤抵抗性に関わる解毒分解酵素の解析

1. 緒言

前節においてナトリウムチャンネル3ヶ所におけるアミノ酸置換(M827I、T929I、A1215D)が本種の合成ピレスロイド剤抵抗性に関わっていることが示唆された。しかしながら、解析に用いた系統(岡山系統および高知系統)間の抵抗性レベルの違い(54倍)をナトリウムチャンネルにおけるアミノ酸置換によって説明することはできなかった。

合成ピレスロイド剤抵抗性にはCYP450による解毒分解が関与していることが複数の昆虫種で報告されている。CYP450の合成ピレスロイド剤抵抗性への関与については、活性阻害剤である piperonyl butoxide (PBO)を用いた生物検定を通じて示唆されてきた。例えば、PBOを処理されたイエバエの合成ピレスロイド剤(ペルメトリン)に対する抵抗性レベルは無処理時の1/72に低下した(Liu and Scott, 1995)。アザミウマ目においてもPBOを処理されたミカンキイロアザミウマの合成ピレスロイド剤(デルタメトリン)に対する抵抗性レベルは無処理時の約1/13に低下することが報告された(Espinosa et al., 2005)。

昆虫には36~160個ほどのCYP450が存在し、それらは7つのファミリー(CYP4、CYP6、CYP9、CYP12、CYP15、CYP18、CYP28)に属する(Fogleman et al., 1998)。最初に合成ピレスロイド剤抵抗性への関与が報告されたCYP450遺伝子はイエバエのCYP6D1である(Wheelock and Scott, 1989; Zhang et al., 1996)。その後、ガンビエハマダラカ(CYP6Z1) (Nikou et al., 2003)、ネットアイエカ(CYP6F1、CYP4H34、CYP9M10) (Kasai et al., 2000; Komagata et al., 2013)、コナガ(CYP6BG1) (Bautista et al., 2007)、ミカンキイロアザミウマ(CYP6EB1、CYP6EC1) (Cifuentes et al., 2012)などでも合成ピレスロイド剤抵抗性に関わるCYP450遺伝子が報告された。

CYP450 以外の解毒分解酵素が合成ピレスロイド剤抵抗性に関わっている例として CE の関与がヒツジキンバエ(*Lucilia cuprina*)やイエバエ (Devonshire et al., 2007; Heidari et al., 2005)で、GST の関与がコクゾウムシ(*Sitophilus zeamais*)やネッタイシマカで報告されているが(Fragoso et al.,2007; Lumjuan et al., 2011)、その数は少ない。

第 2 章第 2 節では岡山および高知系統の合成ピレスロイド剤に対する抵抗性レベルの違いに解毒分解酵素活性の増大が関与しているかどうかを調べるために、CYP450、GST、CE の活性阻害剤を用いて、シペルメトリンに対する生物検定を行った。また、抵抗性に関与する CYP450 遺伝子のクローニングを試みた。

2. 材料と方法

2.1. 供試昆虫

実験に供試したミナミキイロアザミウマ系統は第 2 章第 1 節で述べた岡山および高知系統である(表 2-2-1)。

2.2. 供試試薬

シペルメトリンと展着剤(グラミン)については第 2 章第 1 節で述べた。本研究で用いた酵素活性阻害剤は CYP450 の阻害剤である PBO (和光純薬工業)、CE の阻害剤である DEF (Chem Service, Inc.)、GST の阻害剤である DEM (Nacalai Tesque, Inc.)である。

2.3. 活性阻害剤を用いたシペルメトリンに対する生物検定

活性阻害剤を用いた場合の抵抗性レベルは、雌成虫を用いた葉片浸漬法 (Fahmy et al., 1991)にて調べた。活性阻害剤を含むシペルメトリン液は以下のよう
に調製した。各活性阻害剤をアセトンで 20 倍希釈した後、展着剤を含む各濃

度のシペルメトリンと混合した。PBO、DEM、DEF の処理濃度はそれぞれ 0.295 mM、0.581 mM、0.318 mM とした(Zhang et al., 2008)。アセトンの含有量は 0.1% となるようにした。ソラマメ葉片 (約 3.5 cm×2 cm) を調製したシペルメトリン液中に 2 分間浸漬した。アセトンで希釈した活性阻害剤と展着剤を含む蒸留水の混合液中に 2 分間浸漬したものを対照葉片とした。生死判定は第 2 章第 1 節に述べた。

2.4. 全 RNA の抽出および CYP450 遺伝子の増幅

全 RNA の抽出は Sepasol[®]-RNA I Super G (Nacalai Tesque, Inc.)を用いて第 2 章第 1 節に記した方法で行った。

cDNA 合成は第 2 章第 1 節において述べた。CYP450 遺伝子は高知系統の cDNA を鋳型として PCR により増幅した。使用したプライマーを表 2-2-2 に示した。NB4-5'、NB4-3'、6XY-5'、6XY-3'(Bautista et al., 2007)、BT-CYP4-5'、BT-CYP4-3'、BT-CYP6-5'、BT-CYP6-3' (Karunker et al., 2008)、FO-CYP4-5'、FO-CYP4-3'、FO-CYP6-5'、FO-CYP6-3' (Cifuentes et al., 2012)は既報のプライマーである。反応条件は 94°C 3 分(1 サイクル) ; 94°C 15 秒, 50°C 30 秒, 72°C 1 分(40 サイクル) ; 72°C 7 分(1 サイクル)である。

2.5. PCR 産物のクローニングおよび塩基配列決定

PCR 産物のクローニングは pGEM-T Easy (Promega)ベクターを用いて第 2 章第 1 節に記した方法で行った。

塩基配列決定は Big Dye Terminator v 3.1 cycle sequencing Kit (Applied Biosystems)を用いて第 2 章第 1 節に記した方法で行った。塩基配列の解析に用いたソフトウェアについては第 2 章第 1 節に述べた。

2.6. 定量 PCR

第 2 章第 1 節に記した手法によりミナミキイロアザミウマの岡山、高知系統の雌成虫(50 頭)より全 RNA を抽出し、0.5 μg の全 RNA を用いて cDNA を合成した。cDNA 反応液 2.5 μl を鋳型として定量 PCR を行った。CYP450 遺伝子とコントロール遺伝子(β -アクチン)の増幅に用いたプライマーを表 2-2-2 に示した。定量 PCR に用いた反応溶液の組成は以下の通りである。

定量PCRの反応溶液	
H ₂ O	1.9 μl
Forward primer (10 pmol/ μl)	0.3 μl
Reverse primer (10 pmol/ μl)	0.3 μl
THUNDERBIRD TM SYBR [®] qPCR mix	5 μl
cDNA 溶液	2.5 μl
計	10 μl

反応溶液 7.5 μl をプレート(96 ウェル Piko PCR プレート)に注入した後、cDNA 2.5 μl を加え、3 回ピペッティングして混合した。反応液を入れたプレートを 2000 rpm でスピンドウンした後、プレートをフィルムで密閉し、PikoReal リアルタイム PCR システム(Thermo Scientific)に供した。

反応条件は 94 $^{\circ}\text{C}$ 3 分(1 サイクル) ; 94 $^{\circ}\text{C}$ 15 秒, 55 $^{\circ}\text{C}$ 30 秒, 72 $^{\circ}\text{C}$ 1 分(30 サイクル) ; 72 $^{\circ}\text{C}$ 7 分(1 サイクル)とした。得られたデータの解析は PikoReal ソフトウェアを用いて行った。試験は独立して抽出した全 RNA をもとに合成された cDNA を用いて 3 回行った。各試験における繰り返しは 2 反応とした。各 CYP450 遺伝子の発現レベルを岡山および高知系統間で $\Delta\Delta\text{Ct}$ 法(Livak and Schmittgen, 2001)を用いて比較した。有意差検定には Tukey の方法を用いた。

3. 結果および考察

3.1. 活性阻害剤がミナミキイロアザミウマのシペルメトリンに対する抵抗性レベルに及ぼす影響

PBO を処理された岡山および高知系統のシペルメトリンに対する LC₅₀ 値はそれぞれ、24.2 mg/L、 278.1 mg/L であった(表 2-2-1)。無処理時の岡山および高知系統のシペルメトリンに対する LC₅₀ 値はそれぞれ、72.1 mg/L、 3922.9 mg/L であったことから、抵抗性レベルはそれぞれ約 1/3、1/14 に低下したことになる。このことは両系統の合成ピレスロイドに対する抵抗性には共にチトクローム P450 が関与しているが、高知系統における関与の度合がより大きいことを示唆している。

PBO 処理により合成ピレスロイド剤に対する抵抗性レベルが低下することは他のアザミウマでも報告されている。スペインのミカンキイロアザミウマのアクリナトリン抵抗性系統(ACR9)のアクリナトリンに対する抵抗性レベルは PBO 処理により 1/93 に低下し、デルタメトリン抵抗性系統(DEL8)のデルタメトリンに対する抵抗性レベルは 1/13 に低下した(Espinosa et al., 2005)。フルバリネートに対して高い抵抗性を示すオーストラリアのミカンキイロアザミウマの WA および QLD 系統に PBO を処理したところ抵抗性レベルがそれぞれ、1/790 と 1/266 に低下した(Thalavaisundaram et al., 2008)。

活性阻害剤 DEM と DEF を処理された両系統のシペルメトリンに対する LC₅₀ 値に顕著な変化は認められなかった(表 2-2-1)。このことは GST や CE による解毒分解はミナミキイロアザミウマの合成ピレスロイド剤抵抗性にはほとんど関与していないことを示唆している。合成ピレスロイド剤抵抗性に GST や CE が関与していないことはミカンキイロアザミウマにおいても報告されている(Espinosa et al., 2005; Thalavaisundaram et al., 2008)。

3.2. CYP450 遺伝子のクローニングと塩基配列決定

高知系統の cDNA より増幅された断片をクローニングし、60 クローンについて塩基配列決定を行った。増幅された断片の長さは 443 bp (NB4-5' と NB4-3')、396 bp (6XY-5' と 6XY-3')、431 bp (BT-CYP4-5' と BT-CYP4-3')、390 bp (BT-CYP6-5' と BT-CYP6-3')、464 bp (FO-CYP4-5' と FO-CYP4-3')、682 bp (FO-CYP6-5' と FO-CYP6-3') であった。推定アミノ酸配列を用いた相同性検索により、29 クローンは CYP4 ファミリーに、31 クローンは CYP6 ファミリーに属することが示された(図 2-2-1)。CYP4 ファミリーに属する 29 クローンは 6 つのグループに、CYP6 ファミリーに属する 31 クローンは 4 つのグループに分けられた(図 2-2-1)。各グループの赤丸で示したクローンを用いて、グループ間の塩基配列と推定アミノ酸配列の相同性を表 2-2-3 と表 2-2-4 に示した。

後述の定量 PCR を行う際のプライマー設計に用いた CYP4 と CYP6 ファミリーに属するクローンの推定アミノ酸配列を図 2-2-2 に示した。いずれのクローンにおいても CYP450 の C-末端領域に特徴的なヘム結合部位(FXXGXXXCXG) (Danielson et al., 1997)が保存されていた。

Hlavica (2011)はアメリカタバコガ(*Helicoverpa zea*)、ミカンキイロアザミウマ、イエバエを含めた昆虫種の殺虫剤抵抗性に関与する CYP450 は基本的に CYP6 ファミリーに属していることを報告した。ミナミキイロアザミウマの CYP6-TPBT15 遺伝子(グループ 1)とアメリカタバコガの CYP6B8 遺伝子の塩基配列とアミノ酸配列の相同性はそれぞれ、50%、33%であった。CYP6-TPFO31 遺伝子(グループ 2)とミカンキイロアザミウマの CYP6EC1 遺伝子の相同性は塩基配列レベルで 67%、アミノ酸配列レベルで 61%であり、同 CYP6EB1 遺伝子との相同性は塩基配列レベルで 64%、アミノ酸配列レベルで 49%であった。CYP6-TPBT22 遺伝子(グループ 3)と CYP6-TP6XY8 遺伝子(グループ 4)はイエバエの CYP6D1 遺伝子の塩基配列とそれぞれ、44%、54%、アミノ酸配列とそれ

ぞれ、42%、46%の相同性を示した。

合成ピレスロイド剤抵抗性に関わる CYP4 ファミリー遺伝子はネッタイエカのみで報告されている(CYP4H34 遺伝子) (Kasai et al., 2000; Komagata et al., 2013)。ミナミキイロアザミウマの CYP4-TPNB1 遺伝子(グループ 1)、CYP4-TPNB3 遺伝子(グループ 2)、CYP4-TPNB5 遺伝子(グループ 3)、CYP4-TPNB8 遺伝子(グループ 4)、CYP4-TPFO22 遺伝子(グループ 5)、CYP4-TPFO25 遺伝子(グループ 6)とネッタイエカの CYP4H34 遺伝子の塩基配列レベルの相同性はそれぞれ、52%、58%、55%、55%、54%、56%であり、アミノ酸配列レベルの相同性はそれぞれ、38%、44%、39%、41%、41%、43%であった。

3.3. CYP450 遺伝子の発現解析

クローニングされたミナミキイロアザミウマの CYP450 遺伝子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調べるために、遺伝子発現を岡山系統と高知系統間で比較した。CYP4 ファミリーおよび CYP6 ファミリー遺伝子の各グループより 1 クローンを選び、定量 PCR 用の特異的プライマーを設計した。発現レベルを岡山および高知系統間で比較したが、両系統間の合成ピレスロイド剤に対する抵抗性レベルの違いを説明できる遺伝子は得られなかった($p > 0.05$) (図 2-2-3)。ミカンキイロアザミウマのアクリナトリン抵抗性には CYP6EB1 遺伝子と CYP6EC1 遺伝子の高発現が関与していることが報告されている (Cifuentes et al., 2012)。ミナミキイロアザミウマの CYP6-TPFO31 遺伝子(グループ 2)はミカンキイロアザミウマの CYP6EB1 および CYP6EC1 遺伝子と高い相同性を示したが、抵抗性への関与は示されなかった。

本研究では岡山系統と高知系統の定常時における CYP450 遺伝子の発現解析を行ったが、抵抗性に関わる遺伝子は殺虫剤処理により発現レベルが高まる可能性がある。今後、シペルメトリンを処理したミナミキイロアザミウマを用いて

CYP450 遺伝子の発現レベルを調べる必要がある。

A

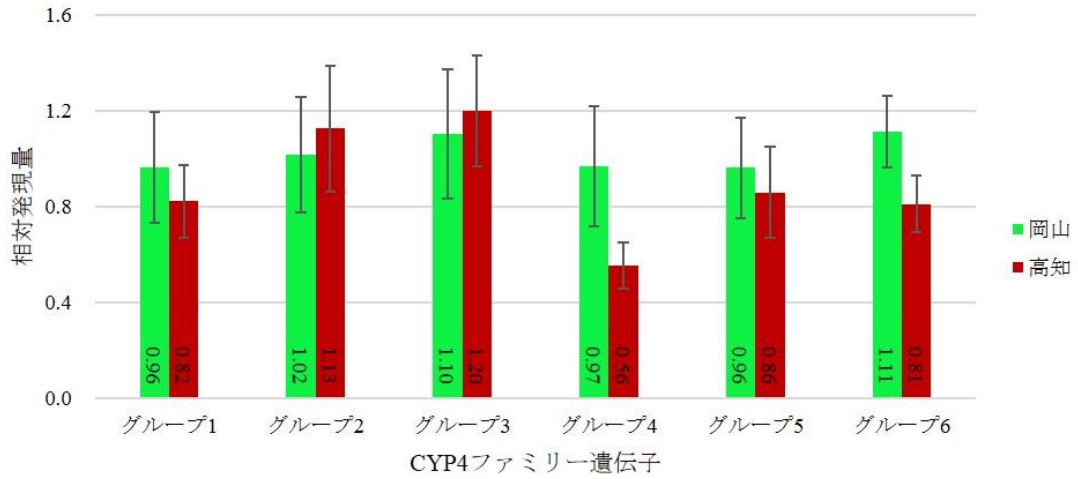
CYP4-TPNB1	DTFMFEGHDTMTSVCFTLFLATHPE-----VQDRVAEEARSVGGTST-----	44
CYP4-TPNB3G.AIS.G.YE.SKN..-----RQKAY..VV.I..EVGE-----	45
CYP4-TPNB5AAAMS.LFYN..AN.E-----...L...VAE.F.T.N-----	44
CYP4-TPNB8AAAIS.L.YCV.AN..-----QKL.D.MHEIF.D.D-----	44
CYP4-TPFO22S.TLH.A.L..GLNQDKQVCHLFAGV.CCDFNAFLFTIL.ACSRAGGRH	60
CYP4-TPFO25AAAIS.L.YCV.AN..-----QKL.D.MHEIF.D.D-----	44
CYP4-TPNB1	-----SAQLGELKYLEA-----VIKESLRLYPSVPLYSRHA	75
CYP4-TPNB3	--GGQVTT.D.AKM...R-----VFL.A.	81
CYP4-TPNB5	---GAVT.QD.AQ...T.R-----FA.F.	79
CYP4-TPNB8	---RPAT.QDVQNM..A.R-----T.....FA.FM	79
CYP4-TPFO22	LWRRPREGCDC.PQADALYGDVHQGRGKGFLEFRFWLVRYFCLLLKV....PAAFFA.TI	120
CYP4-TPFO25	---RPAT.QDVQNM..A.R-----V..T.....FA.FM	79
CYP4-TPNB1	HDEFKLP-----SGYTVPAGATLLINAYTMHHREYFKDPFAFKPERFLSGSSEESSRH	128
CYP4-TPNB3	.SDLV.PPVKGAKES.T...TSIFVSPF.L.V.ALWP..ER.D.D...EN.--VG..	139
CYP4-TPNB5	NE.LPIT-----G..VI...GA..AC.Q.N.NP.VWP..EK.D.D...ENC--TG..	130
CYP4-TPNB8	REDLEIS-----G..VI...NVT.SCFQ.G.NGNVWP..EK.D.D...AENI--AT..	130
CYP4-TPFO22	SED.QCD-----K.L..S.T.F.VLS.AI.RDP.VYEK.EH.L...APN.T--V..N	171
CYP4-TPFO25	REDLEIS-----G..VI...NVT.SCFQ.G.NPDVWPE.EK.D.D...ENT--AR..	130
CYP4-TPNB1	HFSYVFSAGYRNCIGQKKI	148
CYP4-TPNB3	P...I.....P.....KI	159
CYP4-TPNB5	PY.....P.....KI	150
CYP4-TPNB8	PYS.....P.....KI	150
CYP4-TPFO22	P.AFI.....P.....I-	190
CYP4-TPFO25	PY.....P.....I-	149

B

CYP6-TPBT15	-FSLHELALDEDIQEQLFQELSTNLDLSDPDCDEYLETVMRLPYFDSVIKETLRKYPVLA	59
CYP6-TPFO31	G.....NPEL.QRAAE.VRA--LKAKHGG-LTY.ALDRMDLIERI.R.S...WGPVG	57
CYP6-TPBT22	-.....KHP...KK.IE.IDG--VMAKHNGQPTYDAITEM..MEM..Q..M.M..PVP	57
CYP6-TP6XY8	WY.....KHPE..KK.IE.VDA--VLQKCNKGLTY.ATQDMHYM.M..Q...H..PVP	58
CYP6-TPBT15	RLERRVNVEKYNLGDQKIPLVKDQLVEVSVVAVHYDPDFYPEPFRFNPERFAPENKHLV	119
CYP6-TPFO31	I.T.EP-K.PFQ.PET.AVVD.TCM.WIP.FQMAH..EYFPD.E..D...TE.S.AQRH	116
CYP6-TPBT22	F.T.EA-NV.RT.PLTDLT.E.GTTLMIP.IGL.H..QYWE..H.Y..L..TE.A.KARP	116
CYP6-TP6XY8	F.T.QA-MV.RQ.PLTDVV.D.GMRHMIP.WSI.M..EYWED.T.YD.T..SE.A.SARP	117
CYP6-TPBT15	PYSFIFGDGPRNC	133
CYP6-TPFO31	..TYL.....	130
CYP6-TPBT22	NMVY.....RG	130
CYP6-TP6XY8	.GVYM...E....-	129

図 2-2-2. ミナミキイロアザミウマの CYP4 ファミリー(A)および CYP6 ファミリー(B)の推定アミノ酸配列の比較。CYP450 の特徴であるヘム結合部位配列(FxxGxxxCxG)を緑で囲んだ。相同なアミノ酸は点で、ギャップはダッシュで示した。

A



B

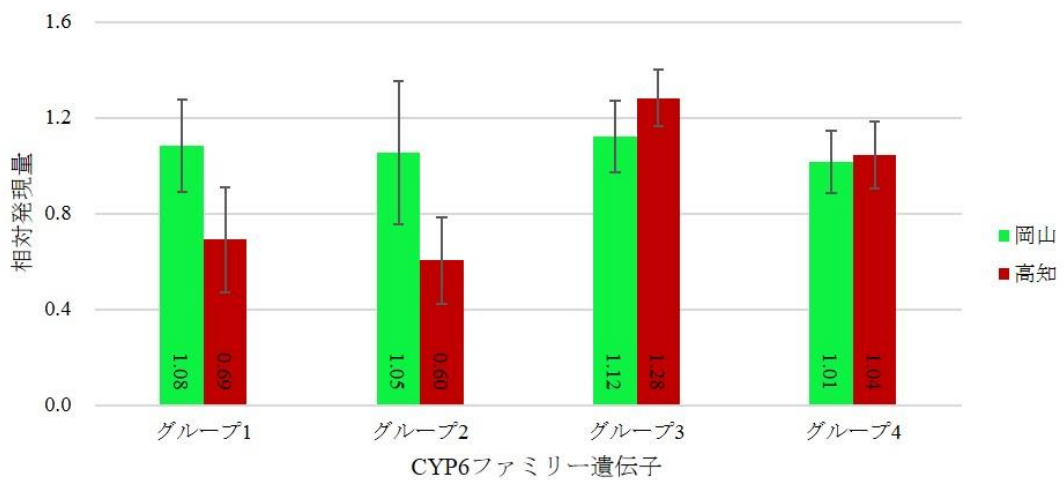


図 2-2-3. 定量 PCR による CYP4 ファミリー遺伝子(A)および CYP6 ファミリー遺伝子(B)の発現解析。CYP450 遺伝子の発現量は β -アクチン遺伝子の発現量を 1 とした相対値で棒内に示した。

表 2-2-1. 活性阻害剤がミナミキイロアザミウマのシペルメトリン抵抗性に及ぼす影響

系統	岡山系統				高知系統			
	n	LC ₅₀ mg/L	95% CL ^a	SR ^b	n	LC ₅₀ mg/L	95% CL ^a	SR ^b
シペルメトリン	377	72.1	68.7-75.7	1.0	780	3922.9	3122.9-5076.4	1.0
シペルメトリン+PBO	380	24.2	22.1-27.1	3.0	378	278.1	211.9-389.6	14.0
シペルメトリン+DEM	288	137.7	120.5-159.4	0.5	220	4911.4	2760.4-10661.4	0.8
シペルメトリン+DEF	353	124.5	79.9-233.4	0.6	198	3289.7	782.6-9826.7	1.2

a: 95%信頼限界

b: SR (共力効果比)=LC₅₀ シペルメトリン/LC₅₀ シペルメトリン + 活性阻害剤

表 2-2-2. 本研究で用いたプライマー

	3'プライマー				
	プライマー名	配列	プライマー名	配列	
遺伝子増幅に用いたプライマー	β-アクチン	actin-5'	5'-GACATGGAGAAGATCTGGCA-3'	actin-3'	5'-CCAGGGTACATGGTGGTACC-3'
	CYP4	NB4-5'	5'-GAYACITTYATGTTYGARGGNCAIY-3'	NB4-3'	5'-GCRATYTTYTYTGNCCDATRCARTT-3'
		BT-CYP4-5'	5'-TTYATG TTYGARGGIYAYGAY-3'	BT-CYP-3'	5'-AAYTTYTGICCDATRCARTT-3'
		FO-CYP4-5'	5'-GAYACNITYATGTTYGARGGNCAIYAC-3'	FO-CYP4-3'	5'-GCRATYTTYTGNCCDATRCARTT-3'
	CYP6	6XY-5'	5'-WSITAYRCIYITAYGARYTIGC-3'	6XY-3'	5'-ICKIGGCCYTCICCAAIGG-3'
		BT-CYP6-5'	5'-TTYRCIYITAYGARYTIGC-3'	BT-CYP6-3'	5'-RCARTTYCKBGGICCTCICCAA-3'
		FO-CYP6-5'	5'-GATGTGATYGGHAGYGTNGCSTTBGG-3'	FO-CYP6-3'	5'-CGNKBCCYTCDCCAAACGG-3'
	定量PCRに用いたプライマー	β-アクチン	TP-Qactin-5'	5'-CGTTCGTGACATCAAGGAGA-3'	TP-Qactin-3'
TP-CYP4-G1		TP-CYP1-5'	5'-GAGGCCGTCATCAAAGAGTC-3'	TP-CYP1-3'	5'-AACGGGACGTAGTGAAGTG-3'
TP-CYP4-G2		TP-CYP11-5'	5'-CGGCAAAAAGCTTACGAAGA-3'	TP-CYP11-3'	5'-AGGACTCTTTGGCTCCCTTG-3'
TP-CYP4-G3		TP-CYP111-5'	5'-ACACCGAAAAGGTCATCAAG-3'	TP-CYP111-3'	5'-GGATGTCTACCGGTGCAGTT-3'
TP-CYP4-G4		TP-CYP11V-5'	5'-ACGAGATCTTCGGTGACTCC-3'	TP-CYP11V-3'	5'-ATCTGGAAGCAGCTGATGGT-3'
TP-CYP4-G5		TP-CYPV-5'	5'-GCCATCTCCTTCCTGCTGTA-3'	TP-CYPV-3'	5'-ATCTCCAGGTCCTCCCTCAT-3'
TP-CYP4-G6		TP-CYP4-QG51	5'-ATTGCTGGGTCTCAATCAGG-3'	TP-CYP4-QG52	5'-CCGTCAAACCAACCAAAATC-3'
TP-CYP6-G1		TP-CYP6-1-5'	5'-TCGAGACGGTGATGAGACTG-3'	TP-CYP6-1-3'	5'-CCAGCTGGTCCTTAACCAGA-3'
TP-CYP6-G2		TP-CYP6-2-5'	5'-GAGAGGATCATCCGGGAGTC-3'	TP-CYP6-2-3'	5'-CACACCATGCAGGCTTGTGTC-3'
TP-CYP6-G3		TP-CYP6-3-5'	5'-AGAGACGATGCGGATGTACC-3'	TP-CYP6-3-3'	5'-CCGAAGGGGATGTACACCAT-3'
TP-CYP6-G4		TP-CYP6-4-5'	5'-TACAGAAGTGCAACGGCAAG-3'	TP-CYP6-4-3'	5'-CCATGTGGATGGACCAGAC-3'

表 2-2-3. CYP4 ファミリーグループ間の塩基配列および推定アミノ酸配列の相同性

アミノ酸配列 塩基配列	グループ1 (CYP4-TPNB1)	グループ2 (CYP4-TPNB3)	グループ3 (CYP4-TPNB5)	グループ4 (CYP4-TPNB8)	グループ5 (CYP4-TPFO22)	グループ6 (CYP4-TPFO25)
グループ1 (CYP4-TPNB1)		46%	45%	53%	54%	54%
グループ2 (CYP4-TPNB3)	53%		41%	40%	42%	46%
グループ3 (CYP4-TPNB5)	59%	53%		44%	42%	53%
グループ4 (CYP4-TPNB8)	63%	54%	60%		95%	68%
グループ5 (CYP4-TPFO22)	63%	55%	60%	92%		70%
グループ6 (CYP4-TPFO25)	58%	57%	57%	68%	71%	

表 2-2-4. CYP6 ファミリーグループ間の塩基配列および推定アミノ酸配列の相同性

アミノ酸配列 塩基配列	グループ1 (CYP6-TPBT15)	グループ2 (CYP6-TPFO31)	グループ3 (CYP6-TPBT22)	グループ4 (CYP6-TP6XY8)
グループ1 (CYP6-TPBT15)		36%	38%	35%
グループ2 (CYP6-TPFO31)	55%		44%	49%
グループ3 (CYP6-TPBT22)	55%	63%		67%
グループ4 (CYP6-TP6XY8)	52%	64%	77%	

第3章 ミナミキイロアザミウマのスピノサド抵抗性機構の解析

1. 緒言

スピノサド抵抗性は、標的である nAChR の感受性の低下(Salgado, 1997)、もしくは CYP450 などの解毒分解酵素活性の増大(Feyereisen, 1999; Scott, 1999; Hemingway et al., 2004)によって付与されることがいくつかの昆虫種で報告されてきた。

Perry et al. (2007)は、nAChR α 6 サブユニットが欠損したキイロショウジョウバエの変異系統は、スピノサドに対して高度の抵抗性を示すことを報告した。野外におけるコナガのスピノサド抵抗性では、nAChR α 6 サブユニット遺伝子の点突然変異に基づくミスプライミングによる新たなストップコドンの出現と、それに伴う不完全タンパク質の生成が関与していた(Baxter et al., 2012)。不完全タンパク質の生成がスピノサド抵抗性に関与していることはミカンコミバエ(*Bactrocera dorsalis*)でも報告されている(Hsu et al., 2012)。アザミウマ目ではミカンキイロアザミウマにおいて、nAChR α 6 サブユニットの 275 番目のアミノ酸部位におけるグリシンからグルタミン酸へのアミノ酸置換(G275E)がスピノサド抵抗性に関与していることが報告された(Puinean et al., 2013)。

CYP450 の活性阻害剤である PBO を用いた試験において、シロイチモジヨトウ(*Spodoptera exigua*) (Wang et al., 2006)、オオタバコガ(Wang et al., 2009)、ハスモンヨトウ(*Spodoptera litura*) (Rehan et al., 2014)、イエバエ(Markussen and Kristensen 2011)のスピノサド抵抗性には、CYP450 による解毒分解が関与していることが報告された。一方、これらの昆虫のスピノサド抵抗性には GST および CE は関与していなかった。トマトキバガ(*Tuta absoluta*)では、CYP450 のスピノサド抵抗性への関与が、活性試験を通じて示された(Reyes et al., 2012)。

第3章ではスピノサドに対する抵抗性レベルの異なるミナミキイロアザミウ

マ系統(岡山、徳島 1、徳島 5 系統)を用いて、本種のスピノサド抵抗性にもミカンキイロアザミウマ同様、nAChR α 6 サブユニットの G275E が関与しているかどうかを明らかにしようとした。また、各種活性阻害剤を用いて、解毒分解酵素 CYP450、CE、GST の抵抗性への関与を検討した。さらに、解毒分解に関わる遺伝子のクローニングを試みた。

2. 材料と方法

2.1. 供試昆虫

実験に供試したミナミキイロアザミウマ系統(表 3-1)と飼育方法の詳細については第 2 章第 1 節で述べた。

2.2. 試薬

スピノサド(スピノエース 20% WP)はダウケミカル日本より購入した。スピノサドは展着剤(グラミン, 三共アグロ)を最終濃度 0.1%となる様に加えて使用した。

2.3. 生物検定

スピノサドに対する生物検定は、第 2 章第 1 節に述べた通り、雌成虫を用いた葉片浸漬法(Fahmy et al., 1991)にて行った。試験には 5 段階の濃度に希釈した殺虫剤を用いた。処理したソラマメ葉片を静置したプラスチックケースに、供試虫を約 20 頭移し、パラフィルムで密閉した。48 時間後に生死を判定した。各試験における繰り返しは最低 3 回とした。プロビット法により半数致死濃度(LC₅₀)を求めた(Abott, 1925)。

活性阻害剤を用いた生物検定は、各活性阻害剤をアセトンで希釈した後、展着剤を含む各濃度のスピノサドと混合した。活性阻害剤の濃度は、第 2 章第 2 節に述べた通りである(PBO, 0.295 mM; DEM, 0.581 mM; DEF, 0.318 mM) (Zhang et

al., 2008)。アセトンの含有量は 0.1%となるようにした。活性阻害剤とアセトンの混合物を展着剤を含む蒸留水で希釈した溶液中に浸漬した葉片を対照区とした。生死判定と LC₅₀ 値の算出は上に述べた。

2.4. 全 RNA の抽出、RT-PCR、クローニング

全 RNA の抽出は Sepasol[®]-RNA I Super G (Nacalai Tesque, Inc.)を用いて第 2 章第 1 節に記した方法で行った。

全 RNA を鋳型として、第 2 章第 1 節と同様の方法で cDNA 合成を行った。ミナミキイロアザミウマの nAchR α 6 サブユニット(TP α 6)遺伝子断片を nAchR- α 6-1D (5'-GATGTKGAYGAGAAGAATCAA-3') と nAchR- α 6-2D (5'-CCATNGCVGCRAAYTTCCARTCGC-3')を用いた PCR によって増幅した。両プライマーはコクヌストモドキ(accession no. EF526088)、シナハマダラカ(*Anopheles sinensis*) (accession no. AY705401)、イエバエ(accession no. DQ498129)、セイヨウミツバチ(accession no. DQ026036)、キイロシヨウジョウバエ (accession no. AF321449)、カイコガ(accession no. EF127799)、キョウソヤドリコバチ(accession no. FJ821437)、コナガ(accession no. GU207836)の当該遺伝子の塩基配列に基づいて設計した。反応条件は 94°C 3 分(1 サイクル) ; 94°C 15 秒, 53°C 30 秒, 72°C 1 分 20 秒(40 サイクル) ; 72°C 7 分(1 サイクル)である。増幅断片は pGEM-T Easy ベクター(Promega)を用いたクローニングもしくはダイレクトシーケンシングに用いた。

2.5. 塩基配列決定

塩基配列決定は Big Dye Terminator v 3.1 cycle sequencing kit (Applied Biosystems)を用いて、第 2 章第 1 節に記した方法で行った。

ダイレクトシーケンシングに用いた TP α 6 遺伝子断片は、岡山系統、徳島 1

系統、徳島 5 系統の cDNA を鋳型として、nAchR- α 6-1 (5'-GGAATGGACGGACTACAACCTAAG-3') と TP- α 6RFLP-1 (5'-GCGAAGAGATCATCAACTGC-3')を用いた PCR で増幅した。反応条件は 94°C 3 分(1 サイクル) ; 94°C 15 秒, 55°C 30 秒, 72°C 1 分 20 秒(40 サイクル) ; 72°C 7 分(1 サイクル)である。nAchR α 6-3RACE-1 (5'-GTGAACATGTACGCCTGCTG-3')を用いてダイレクトシーケンシングを行った。

塩基配列の解析は Genetyx ver.11 (Genetyx Corp.)を用いて行った。相同性検索と塩基配列間と推定アミノ酸配列間の多重整列はそれぞれ、BLAST Program (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)と Clustal W Program (<http://www.genome.jp/tools/clustalw/>)を用いて行った。

2.6. 定量 PCR

岡山、徳島 1、徳島 5 系統の雌成虫(50 頭)より抽出した全 RNA (0.5 μ g)を用いて上記の手法に基づき cDNA を合成した。cDNA 反応液 2.5 μ l を鋳型として定量 PCR を行った。定量を行った CYP450 遺伝子とコントロール遺伝子(β -アクチン)の増幅に用いたプライマーは表 2-2-2 に示した。定量 PCR に用いた反応溶液の組成と反応溶液については第 2 章第 1 節に記した。反応液を含むプレートを 2000 rpm でスピンドウンした後、専用のフィルムで密閉し、PikoReal リアルタイム PCR システム(Thermo Scientific)に供した。反応条件は 94°C 3 分(1 サイクル) ; 94°C 15 秒, 55°C 30 秒, 72°C 1 分(30 サイクル) ; 72°C 7 分(1 サイクル)とした。

得られたデータの解析は PikoReal ソフトウェアを用いて行った。試験は独立して抽出した全 RNA をもとに合成された cDNA を用いて 3 回行った。各試験における繰り返しは 2 反応とした。各 CYP450 遺伝子の発現レベルを $\Delta\Delta$ Ct 法(Livak and Schmittgen, 2001)を用いて系統間で比較した。有意差検定には Tukey 法を用

いた。

3. 結果

3.1. 生物検定

岡山県、高知県、大阪府、徳島県で採集された計 11 系統のスピノサドに対する LC₅₀ 値を表 3-1 に示した。徳島 1 および徳島 5 系統の LC₅₀ 値は最も高く (2838.5 mg/L、6655.5 mg/L)、岡山系統(3.4 mg/L)の LC₅₀ 値は最も低かった。徳島 1、徳島 5 系統の抵抗性レベルはそれぞれ、岡山系統の 835 倍、1958 倍と見積られた。ナスにおけるスピノサドの常用濃度は 40-80 mg/L である。よって、岡山系統は感受性系統、徳島 1 および徳島 5 系統は抵抗性系統であると考えられる。以下の解析は岡山、徳島 1、徳島 5 系統を用いて行った。

3.2. TPα6 遺伝子のクローニングと塩基配列決定

岡山、徳島 1、徳島 5 系統の全 RNA から合成した cDNA を鋳型として TPα6 遺伝子断片を PCR で増幅した。増幅された DNA 断片(1189 bp)をクローニングし、塩基配列決定を行った(岡山系統：accession no. AB905365；徳島 1 および徳島 5 系統：accession no. AB905366)。増幅断片の推定アミノ酸配列は、他の昆虫の nAChRα6 サブユニット遺伝子(accession no. HE965755)のアミノ酸配列と高い相同性を示した(図 3-1)。最も高い相同性はミカンキイロアザミウマとの間で認められた(96%) (図 3-2A)。ミナミキイロアザミウマの TPα6 遺伝子の 275 番目のアミノ酸部位に岡山系統は、ミカンキイロアザミウマ感受性系統と同じく、グリシン(Gly: G)を、徳島 1 および徳島 5 系統は抵抗性系統と同じくグルタミン酸(Glu: E)をコードしていた(図 3-2A)。

ミナミキイロアザミウマの TPα6 遺伝子の増幅 DNA 断片中にはミカンキイロアザミウマの当該遺伝子の選択的エキソン(8a/8b)に対応する配列が認められた

(図 3-2B)。図 3-2A に含まれないエクソン 8b の塩基配列(87 bp)は DNA データバンクに登録した(accession no. AB902849)。選択的エクソン 8a と 8b にコードされるアミノ酸配列は 29 残基中 7 残基において異なっていた(図 3-2B)。本研究ではミカンキイロアザミウマの nAChR α 6 サブユニット遺伝子の選択的エクソン(3a/3b)に対応する配列は確認できなかった。

3 つの系統の TP α 6 遺伝子の 275 番目のアミノ酸部位における抵抗性遺伝子の系統内における頻度を、上記 DNA 断片のダイレクトシーケンシングによって調べた。感受性の岡山系統ではグリシンに関わる塩基グアニンのみが検出されたが、抵抗性の徳島 1 および徳島 5 系統ではグルタミン酸に関わる塩基アラニンのみが検出された(図 3-3)。

3.3. 活性阻害剤がスピノサドに対する抵抗性レベルに及ぼす影響

PBO を処理された徳島 1 および徳島 5 系統のスピノサドに対する LC₅₀ 値はそれぞれ、490.0 mg/L、738.2 mg/L となった(表 3-2)。無処理時の徳島 1 および徳島 5 系統のスピノサドに対する LC₅₀ 値はそれぞれ、2838.5 mg/L、6655.5 mg/L であったことから、抵抗性レベルはそれぞれ 1/6、1/9 に低下したと見積られた。PBO を処理された岡山系統のスピノサドに対する LC₅₀ 値は、無処理の LC₅₀ 値とほぼ同じであった。活性阻害剤 DEM や DEF の処理において、3 系統のスピノサドに対する抵抗性レベルが大きく変化することはなかった(表 3-2)。

3.4. CYP450 遺伝子のクローニングと発現解析

第 2 章第 2 節でクローニングされた CYP450 遺伝子の特異的プライマーを用いて、CYP450 遺伝子の発現レベルを岡山、徳島 1、徳島 5 系統において調べた(図 3-4)。6 つの CYP4 ファミリー遺伝子と 4 つの CYP6 ファミリー遺伝子の発

現レベルを調べたが、徳島 1 および徳島 5 系統の抵抗性に関わると考えられる遺伝子は得られなかった($p > 0.05$) (図 3-4)。

4. 考察

ミカンキイロアザミウマのスピノサド抵抗性には nAChR α 6 サブユニットの第 3 膜貫通ドメイン(M3)におけるアミノ酸置換(G275E)が関わっていることが報告された(Puinean et al., 2013)。ミナミキイロアザミウマのスピノサド抵抗性にも同様のアミノ酸変異が関わっているかどうかを調べるために、スピノサドに対する感受性が異なる 3 系統を用いて TP α 6 遺伝子の部分配列を増幅した。増幅産物をクローニングし、塩基配列を決定した。スピノサドに対して高い抵抗性レベルを示した徳島 1 と徳島 5 系統の TP α 6 遺伝子の 275 番目のアミノ酸部位には、抵抗性型のグルタミン酸がコードされていた。岡山系統(感受性系統)の当該部位では感受性型のグリシンが検出された。コナガとミカンコミバエのスピノサド抵抗性は、nAChR α 6 サブユニット遺伝子のミスプライミングとそれに伴う新たなストップコドンの出現と関連していることが報告された (Baxter et al., 2012; Rinkevich et al., 2010; Hsu et al., 2012)。ミナミキイロアザミウマの TP α 6 遺伝子のクローニングではこのような異常な転写産物は検出されなかった。本研究では完全長の TP α 6 遺伝子の解析を行っていない。今後、TP α 6 遺伝子の全塩基配列を決定し、コナガやミカンコミバエ同様のメカニズムや G275E 以外のアミノ酸置換の抵抗性への関与について検討する必要がある。

ダイレクトシーケンシングの結果より、徳島 1 および徳島 5 系統は TP α 6 遺伝子の 275 番目のアミノ酸部位に関して抵抗性型のアミノ酸(グルタミン酸)をコードするホモ接合体の集団であることが示唆された。両系統は採集後実験室内で殺虫剤の選抜なしに維持されてきた。このことはミナミキイロアザミウマのいくつかの野外系統では、スピノサド抵抗性に関わるアミノ酸置換 G275E が

飽和していることを示唆している。

徳島 1 および徳島 5 系統のスピノサド抵抗性には TP α 6 における G275E が関与していたが、両系統の抵抗性レベルの違いには別のメカニズムが関与していると考えられる。CYP450、GST、CE などの解毒分解酵素が殺虫剤抵抗性に関与していることが報告されてきた(Feyereisen, 1999; Scott, 1999; Hemingway et al., 2004)。活性阻害剤 PBO、DEM、DEF を用いた共力試験により、ミカンキイロアザミウマのスピノサド抵抗性には CYP450、GST、CE による解毒分解は関与していないことが示された(Bielza et al., 2007; Zhang et al., 2008)。コナガ(Zhao et al., 2002)、イエバエ(Shono and Scott, 2003)を含む他の昆虫種のスピノサド抵抗性においても解毒分解酵素の関与は極めて限定的、あるいは関与していないことが報告されている。一方、シロイチモジヨトウ(Wang et al., 2006)、オオタバコガ(Wang et al., 2009)、ハスモンヨトウ(Rehan and Freed, 2014)、イエバエ(Markussen and Kristensen, 2011)のスピノサド抵抗性には CYP450 の関与が認められた。トマトキバガではスピノサド抵抗性に Multi-function oxidase が関与していることが報告されている(Reyes et al., 2012)。本研究において徳島 1 および徳島 5 系統のスピノサドに対する抵抗性レベルは PBO 処理により低下したことから、CYP450 の抵抗性への関与が示唆された。一方、DEM や DEF を処理しても抵抗性レベルに大きな変化は認められなかったことから、GST や CE は本種のスピノサド抵抗性に関与していないと考えられる。ハスモンヨトウ(Rehan et al., 2014)、オオタバコガ(Wang et al., 2009)、シロイチモジヨトウ(Wang et al., 2006)、トマトキバガ(Reyes et al., 2012)においても DEF や DEM 処理によってスピノサドに対する抵抗性レベルは変化しなかった。

イエバエのスピノサド抵抗性には CYP6A1、CYP6D1、CYP6D3 遺伝子の高発現が関与していることが報告された(Markussen and Kristensen 2011)。本研究ではミナミキイロアザミウマのスピノサド抵抗性に関わる CYP450 遺伝子のクロー

ニングを試みたが、目的の遺伝子をクローニングすることはできなかった。抵抗性に関わる CYP450 遺伝子は殺虫剤処理後に発現が高まる可能性がある。今後、亜致死濃度のスピノサドを処理した個体を用いて CYP450 遺伝子の発現レベルを調べる必要がある。

以上の結果より、ミナミキイロアザミウマのスピノサド抵抗性には TP α 6 遺伝子のアミノ酸置換(G275E)と CYP450 活性の増大が関与していることが示唆された。PBO はいくつかの昆虫種の非特異的エステラーゼを阻害することが知られていることから(Gunning et al., 1998; young et al., 2005; Moores et al., 2009)、本種のスピノサド抵抗性に非特異的エステラーゼが関与している可能性もある。ミカンキイロアザミウマではスピノサド抵抗性は不完全優性の遺伝様式を示し、複数の遺伝子が抵抗性に関与していることが報告された(Zhang et al., 2008)。一方、本種のスピノサド抵抗性に関する遺伝様式は完全劣性である(奈良井, 未発表)。スピノサド抵抗性のメカニズムは同じアザミウマ目内でも異なっているのかもしれない。

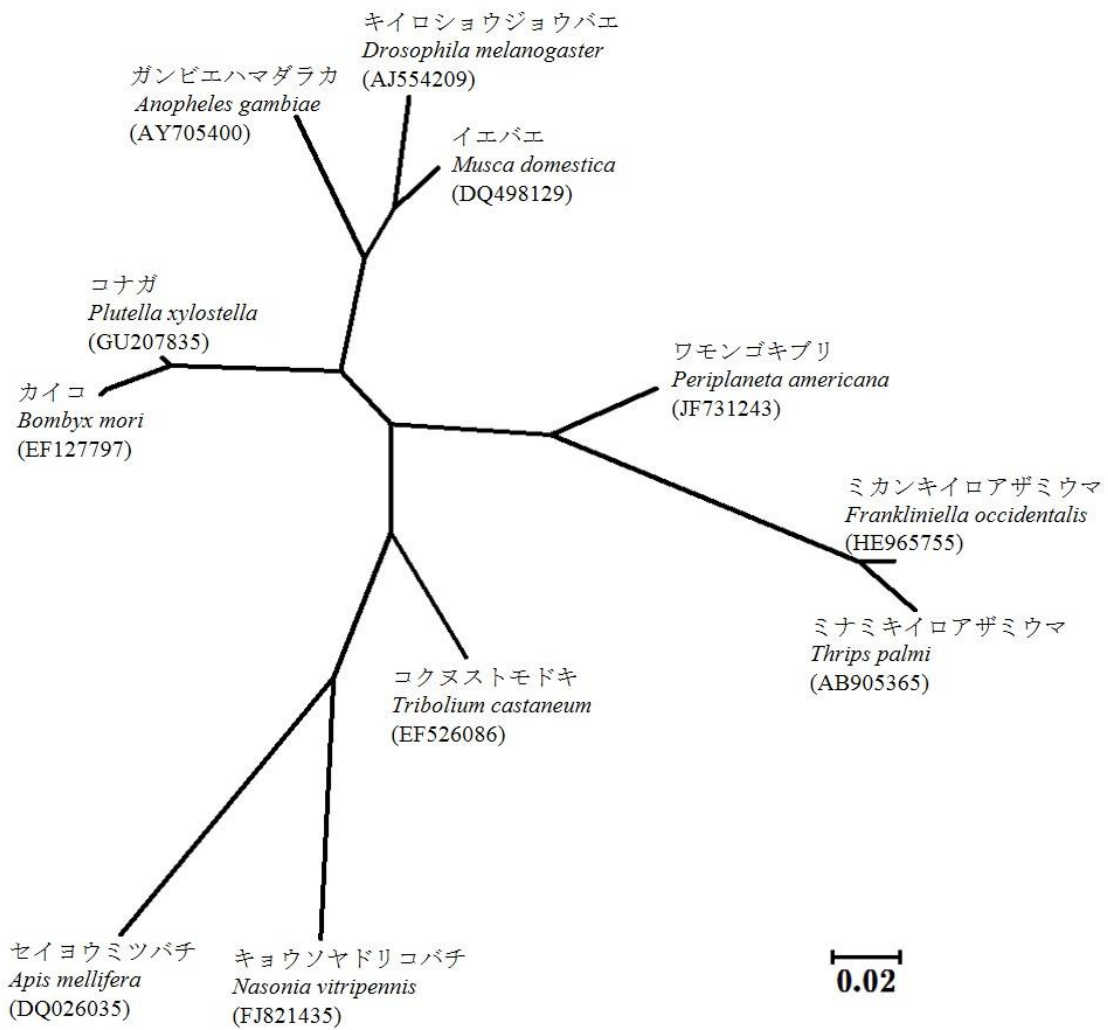


図 3-1. ミナミキイロアザミウマおよび他の昆虫の nAChR α 6 遺伝子のアミノ酸配列の系統樹。

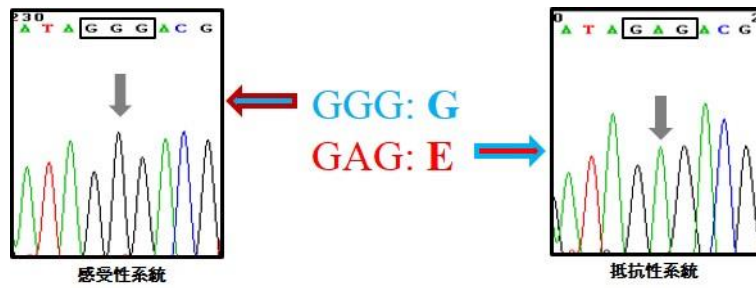


図 3-3. ミナミキイロアザミウマにおける nAChR α 6 サブユニット遺伝子において 275 番目のアミノ酸をコードする領域のダイレクトシーケンシング。感受性系統(岡山系統)の 275 番目のアミノ酸部位にはグリシン(GGG)のみがコードされ、抵抗性系統(徳島 1 および徳島 5 系統)の当該部位にはアラニン(GAG)のみがコードされていた。

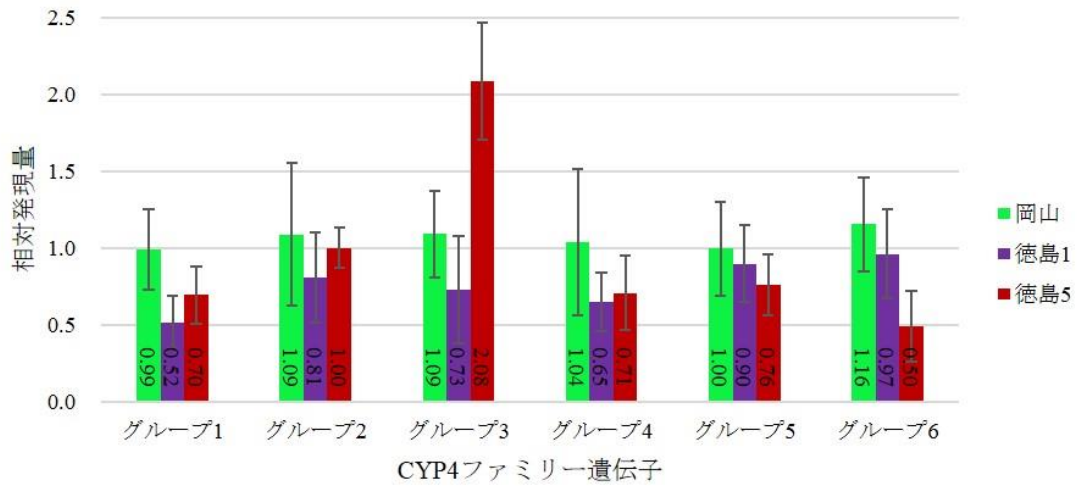
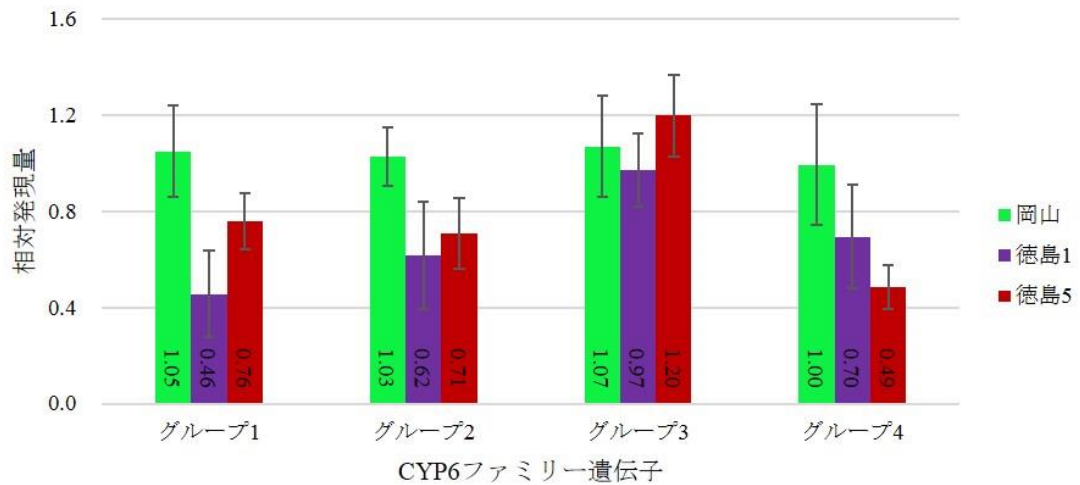
A**B**

図 3-4. 定量 PCR による CYP4 ファミリー遺伝子(A)および CYP6 ファミリー遺伝子(B)の発現解析。CYP450 遺伝子の発現量は β -アクチン遺伝子の発現量を 1 とした相対値で棒内に表した。

表 3-1. ミナミキイロアザミウマのスピノサドに対する抵抗性レベル

系統	n	LC ₅₀ (mg/L)	95%CL	RR	採集場所	採集年
岡山	331	3.4	3.2-3.7	1.0	岡山県赤磐市	1994年
高知	1181	52.7	46.1-60.4	18.8	高知県安芸市	2008年
大阪	446	14.7	13.1-16.2	5.3	大阪府羽曳野市	2010年
徳島1	242	2838.5	2392.3-3469.9	834.9	徳島県海陽町	2011年
徳島2	420	34.3	31.1-37.9	12.3	徳島県海陽町	2011年
徳島3	290	88.0	76.9-101.9	31.4	徳島県海陽町	2011年
徳島4	297	941.8	692.9-1353.7	336.4	徳島県海陽町	2011年
徳島5	316	6655.5	4926.7-9712.4	1957.5	徳島県海陽町	2011年
徳島6	307	60.6	54.6-67.6	21.6	徳島県海陽町	2011年
徳島7	337	185.5	156.2-224.7	66.3	徳島県海陽町	2011年
徳島8	261	253.0	204.1-323.2	90.4	徳島県海陽町	2011年

RR(抵抗性比)= LC₅₀ 徳島系統/LC₅₀ 岡山系統; 95% CL: 95%信頼限界

表 3-2. 活性阻害剤がミナミキイロアザミウマのスピノサド抵抗性に及ぼす影響

系統	スピノサド			スピノサド+PBO			スピノサド+DEM			スピノサド+DEF		
	n	LC ₅₀ (mg/L) (95% CL)	RR	n	LC ₅₀ (mg/L) (95% CL)	SR	n	LC ₅₀ (mg/L) (95% CL)	SR	n	LC ₅₀ (mg/L) (95% CL)	SR
岡山	331	3.4 (3.2-3.7)	1.0	353	3.0 (2.6-3.3)	1.1	346	4.0 (2.2-6.5)	0.9	386	4.3 (3.0-5.9)	0.8
徳島1	242	2838.5 (2392.3-3469.9)	834.9	295	490.0 (450.7-533.4)	5.8	297	2504.3 (1490.1-5028.8)	1.1	175	2675.4 (1555.2-5580.2)	1.1
徳島5	316	6655.5 (4926.7-9712.4)	1957.5	284	738.2 (689.1-793.4)	9.0	250	6043.7 (2899.4-17211.6)	1.1	258	7085.1 (3298.2-21204.9)	0.9

CL: 信頼限界 SR (共力効果比)=LC₅₀ スピノサド/LC₅₀ スピノサド+ 活性阻害剤

第4章 ミナミキイロアザミウマのネオニコチノイド系殺虫剤に対する抵抗性機構の解析

1.緒言

1992年に最初のネオニコチノイド系殺虫剤として上市されたイミダクロプリドは当初、ミナミキイロアザミウマに対して高い殺虫効果を示した(山下, 1995; 辻野ら, 2005; 柴尾ら, 2007)。しかし、2001年3月に高知県内で採集された本種の9個体群のイミダクロプリドに対する感受性は全般的に低かったことが報告された(古味, 2003)。

実験室内でイミダクロプリドによって選抜されたトビイロウンカ系統では、2つのnAChR α サブユニット(N1 α 1 と N1 α 3)のループBにおいて、チロシンからセリンへのアミノ酸置換(Y151S)が生じていた(Liu et al., 2005)。Y151Sはイミダクロプリド以外のネオニコチノイド系殺虫剤(アセタミプリド、クロチアニジン、ジノテフラン、ニテンピラム、チアクロプリド、チアメトキサム)に対する抵抗性にも関わっていた(Liu et al., 2006)。ところが、野外ではY151Sを持った個体は見つかっていない。その後、イミダクロプリドに対する抵抗性を発達させたモモアカアブラムシの野外系統の抵抗性には、nAChR β 1 サブユニットのループDにおけるアルギニンからスレオニンへのアミノ酸置換(R81T)が関与していることが報告された(Bass et al., 2011)。イミダクロプリドに対する抵抗性にnAChR β 1 サブユニットのR81Tが関与していることはワタアブラムシにおいても報告された(Koo et al., 2014)。

解毒分解酵素活性の増大もネオニコチノイド系殺虫剤に対する主要な抵抗性機構である。CYP450による解毒分解がネオニコチノイド系殺虫剤に関与していることが、セイヨウミツバチ(Iwasa et al., 2004)、イエバエ(Li et al., 2009; Markussen and Kristensen 2010; Kavi et al., 2014)、トビイロウンカ(Wen et al.,

2009; Ding et al., 2013)、タバココナジラミ(Basit et al., 2013)、ネッタイシマカ(Riaz et al., 2013)などで報告されている。イエバエおよびネッタイシマカの抵抗性には GST による解毒分解の関与が報告されている(Li et al., 2009; Riaz et al., 2013)。CE による解毒分解の関与もタバココナジラミ、イエバエ、ネッタイシマカで報告されている (Basit et al., 2013; Li et al., 2009; Riaz et al., 2013)。イエバエにおいては3つの CYP450(CYP6A1、CYP6D1、CYP6D3)遺伝子の関与が報告された(Markussen and Kristensen 2009)。トビイロウンカやネッタイシマカにおいても CYP450 遺伝子(トビイロウンカ, CYP6Y1 遺伝子; ネッタイシマカ, CYP6BB2 および CYP6N12 遺伝子)の高発現がイミダクロプリド抵抗性に関与していることが報告された(Ding et al., 2013; Riaz et al., 2013)。

これまでアザミウマ目においてネオニコチノイド系殺虫剤に対する抵抗性機構の解析は全く行われていない。第4章ではミナミキイロアザミウマのイミダクロプリド抵抗性に nAChR $\beta 1$ サブユニット(TP $\beta 1$)のアミノ酸置換(R81T)が関与しているかどうかを明らかにしようとした。また、各種活性阻害剤を用いて、解毒分解酵素 CYP450、CE、GST の抵抗性への関与を検討した。さらに、解毒分解に関わる遺伝子のクローニングを試みた。

2.材料と方法

2.1. 供試昆虫

実験に供試したミナミキイロアザミウマ系統を表 4-1 に示した。各系統の詳細は第2章第1節で述べた。

2.2. 試薬

イミダクロプリド(アドマイヤーフロアブル 20%)はバイエルクロップサイエンス株式会社より購入した。イミダクロプリドの使用に際しては、展着剤(グラミン, 三共アグロ)を最終濃度 0.1%となる様に加えた。

2.3. 生物検定

イミダクロプリドを用いた生物検定は、第 2 章第 1 節に述べた通り、雌成虫を用いた葉片浸漬法(Fahmy et al., 1991)にて行った。試験には 5 段階の濃度に希釈した殺虫剤を用いた。イミダクロプリドを処理したソラマメ葉片を静置したプラスチックケースに、約 20 頭の供試虫を移し、パラフィルムで密閉した。48 時間後に生死を判定した。各試験における繰り返しは最低 3 回とした。プロビット法により半数致死濃度(LC₅₀)を求めた(Abott, 1925)。

活性阻害剤を用いた生物検定は各活性阻害剤をアセトンで希釈した後、展着剤を含む各濃度のイミダクロプリドと混合した。活性阻害剤の濃度は、第 2 章第 2 節に述べた通りである(PBO, 0.295 mM; DEM, 0.581 mM; DEF, 0.318 mM)(Zhang et al., 2008)。アセトンの含有量は 0.1%となるようにした。活性阻害剤とアセトンの混合物を展着剤を含む蒸留水で希釈した溶液中に浸漬した葉片を対照区とした。LC₅₀ 値の算出法は上に述べた。

2.4. 全 RNA の抽出、RT-PCR、クローニング

遺伝子解析に用いた岡山および徳島 7 系統の全 RNA の抽出は Sepasol[®]-RNA I Super G (Nacalai Tesque, Inc.)を用いて第 2 章第 1 節に記した方法で行った。

全 RNA を鋳型として、oligo-dT-M4 primer (Takara)と ReverTra Ace (Toyobo)を用いて cDNA 合成を行った。TPβ1 断片の増幅は BP3 (ACHR4) (5'-ACIGTRTARAANARNGTYTT-3') (Huang et al., 1999; liu et al., 2005)と nAchR-β1-1D (5'-GGGAYGARGCDGAYTAYGG-3')を用いた PCR により行った。nAchR-β1-

1D はシナハマダラカ(accession no. AY705405)、ニセアメリカタバコガ(*Heliothis virescens*) (accession no. AF096880)、カイコガ(accession no. EU082071)、サバクトビバッタ(*Schistocerca gregaria*) (accession no. DQ153040)、トビイロウンカ(accession no. FJ358493)、シロイチモンジヨトウ(accession no. EU101456)、コクヌストモドキ(accession no. EF526094)、ワタアブラムシ(accession no. AF527786)、セイヨウミツバチ(accession no. DQ026038)、キクヅキコモリゲモ(*Pardosa pseudoannulata*) (accession no. GQ259335)、キョウソヤドリコバチ(accession no. FJ821444)の nAChR $\beta 1$ サブユニット遺伝子の塩基配列に基づいて設計した。反応条件は 94°C 3 分(1 サイクル) ; 94°C 15 秒, 53°C 30 秒, 72°C 1 分 20 秒(40 サイクル) ; 72°C 7 分(1 サイクル)である。

増幅断片のクローニングは pGEM-T Easy (Promega)ベクターを用いて第 2 章第 1 節に記した方法で行った。

2.5. 塩基配列決定

塩基配列決定は Big Dye Terminator v 3.1 cycle sequencing kit (Applied Biosystems)を用いて、第 2 章第 1 節に記した方法で行った。塩基配列の解析に用いたソフトウェアについても第 2 章第 1 節に述べた。

ダイレクトシーケンシングに用いた TP $\beta 1$ 遺伝子断片は TP-nAChR $\beta 1$ -LPD (5'-CAACGTGAATGAAAAGAACCA-3')と TP- nAChR $\beta 1$ -5RACE-1 (5'-GTAGAAGGTGATGTCCGTCTC-3')を用いて PCR により増幅した。反応条件は 94°C 3 分(1 サイクル) ; 94°C 15 秒, 52°C 30 秒, 72°C 1 分 20 秒(40 サイクル) ; 72°C 7 分(1 サイクル)である。ダイレクトシーケンシングは上述の増幅断片を鋳型として TP- nAChR $\beta 1$ -5RACE-2 (5'-CTTCCAGTAGTCCGACAAGTCC-3')を用いて行った。

2.6. 定量 PCR

岡山および徳島 7 系統の雌成虫(50 頭)より抽出した全 RNA (0.5 μ g)を用いて、上記手法に基づき cDNA を合成した。cDNA 反応液 2.5 μ l を鋳型として定量 PCR を行った。定量を行った CYP450 遺伝子とコントロール遺伝子(β -アクチン)の増幅に用いたプライマーは表 2-2-2 に示した。定量 PCR に用いた反応溶液の組成については第 2 章第 1 節に記した。反応液を含むプレートを 2000 rpm でスピンドウンした後、専用のフィルムで密閉し、PikoReal リアルタイム PCR システム(Thermo Scientific)に供した。反応条件は 94 $^{\circ}$ C 3 分(1 サイクル) ; 94 $^{\circ}$ C 15 秒, 55 $^{\circ}$ C 30 秒, 72 $^{\circ}$ C 1 分(30 サイクル) ; 72 $^{\circ}$ C 7 分(1 サイクル)とした。

得られたデータの解析は PikoReal ソフトウェアを用いて行った。試験は独立して抽出した全 RNA をもとに合成された cDNA を用いて 3 回行った。各試験における繰り返しは 2 反応とした。各 CYP450 遺伝子の発現レベルを $\Delta\Delta$ Ct 法 (Livak and Schmittgen, 2001)を用いて系統間で比較した。有意差検定には Tukey 法を用いた。

3. 結果および考察

3.1. 生物検定

解析した 10 系統のイミダクロプリドに対する LC₅₀ 値を表 4-1 に示した。LC₅₀ 値が最も高かったのは徳島 7 系統(115.0 mg/L)で、最も低かったのは岡山系統(9.4 mg/L)であった。徳島 7 系統のイミダクロプリドに対する抵抗性レベルは岡山系統の 12.2 倍と見積られた。ナスにおけるイミダクロプリドの常用濃度は 50 mg/L である。そのため、岡山系統は感受性系統、徳島 7 系統は抵抗性系統と考えられた。以後の解析は両系統を用いて行った。

3.2. TP β 1 遺伝子のクローニングと塩基配列決定

モモアカアブラムシのイミダクロプリド抵抗性には nAChR β 1 サブユニットにおける R81T が関与していることが報告された(Bass et al., 2011)。ミナミキイロアザミウマのイミダクロプリド抵抗性への R81T の関与について調べるために、抵抗性レベルの異なる岡山および徳島 7 系統の cDNA を用いて TP β 1 遺伝子断片の増幅を行った。増幅された断片をクローニングし、塩基配列決定を行った。増幅断片の鎖長は 454 bp で、コードされるアミノ酸配列は既知の nAChR β 1 サブユニット遺伝子と高い相同性を示した(図 4-1)。最も相同性が高かったのはミカンキイロアザミウマ(accession no. AB748926)の当該遺伝子のアミノ酸配列であった(98%)。

増幅断片は TP β 1 の R81T 部位を含む N 末端細胞外領域ループ D を含んでおり、岡山および徳島 7 系統の 81 番目のアミノ酸部位にはいずれも感受性型のアルギニンがコードされていた(図 4-2)。ダイレクトシーケンシングの結果より、徳島 7 系統は、岡山系統と同様、R81T 部位に関して感受性型のアルギニンのみをコードするホモ接合体の集団であることが示唆された(図 4-3)。以上の結果より徳島 7 系統のイミダクロプリド抵抗性には TP β 1 における R81T は関与していないことが示唆された。

3.3. 活性阻害剤を用いた生物検定

PBO を処理されたイエバエ、トビイロウンカのイミダクロプリドに対する抵抗性レベルはそれぞれ、1/37、1/8 に低下し(Markussen and Kristensen, 2010; Ding et al., 2013)、タバココナジラミのアセタミプリド選抜系統(Aceta-SEL)のイミダクロプリドに対する抵抗性は PBO 処理により 1/10 に低下した(Basit et al., 2013)。PBO を処理された徳島 7 系統のイミダクロプリドに対する LC₅₀ 値は 38.4 mg/L であった。無処理時の徳島 7 系統のイミダクロプリド剤に対する LC₅₀ 値は 115.0 mg/L であったことから、抵抗性レベルは 1/3 に低下したことに

なる(表 4-2)。PBO を処理された岡山系統のイミダクロプリドに対する LC₅₀ 値は無処理の LC₅₀ 値とほぼ同じであった(表 4-2)。以上の結果より、徳島 7 系統のイミダクロプリド抵抗性には CYP450 による解毒分解が関与していることが示唆された。

DEM、DEF 処理によりイエバエ(イミダクロプリド選抜系統)のイミダクロプリドに対する抵抗性レベルはいずれも 1/2 に低下した(Li et al., 2009)。ネッタイシマカ(イミダクロプリド選抜系統)におけるイミダクロプリド抵抗性は DEM、DEF 処理によりそれぞれ、1/2、1/3 に低下した(Riaz et al., 2013)。DEF を処理されたタバココナジラミ(アセタミプリド選抜系統)のイミダクロプリドに対する抵抗性レベルは 1/2 に低下した(Basit et al., 2013)。一方、DEM 処理されたトビイロウンカ(フェンバレレート選抜系統およびイミダクロプリド選抜系統)のフェンバレレート(Ling et al., 2011)とイミダクロプリド(Wen et al., 2009; Ding et al., 2013)に対する抵抗性レベルに変化は認められなかった。DEM および DEF を処理された岡山および徳島 7 系統間の LC₅₀ 値は非処理の場合とほぼ同じであり、CE および GST はミナミキイロアザミウマのイミダクロプリド剤抵抗性には関与していないことが示唆された。

3.4. CYP450 遺伝子の発現解析

イエバエのイミダクロプリド抵抗性には CYP6 ファミリーに属する遺伝子が関与していることが報告された(Markussen and Kristensen, 2009)。最近、トビイロウンカとネッタイシマカのイミダクロプリド抵抗性にはいずれも CYP6 ファミリー遺伝子の高発現が関与していることが報告された(Ding et al., 2013; Riaz et al., 2013)。本研究では第 2 章第 2 節でクローニングされた CYP6 ファミリー含む CYP450 遺伝子の特異的プライマーを用いて、各遺伝子の発現レベルを岡山および徳島 7 系統間で比較したが、両系統間のイミダクロプリドに対する抵抗

性レベルの違いをもたらすと考えられる遺伝子は得られなかった($p > 0.05$) (図 4-4)。抵抗性に関わる CYP450 遺伝子は殺虫剤処理後に発現が高まる可能性がある。今後、イミダクロプリドを処理した集団を用いて CYP450 遺伝子の発現レベルを調べる必要がある。

以上の結果より、ミナミキイロアザミウマのイミダクロプリド抵抗性には TPβ1 のアミノ酸置換(R81T)は関与しておらず、CYP450 による解毒分解酵素が関与していることを示唆された。PBO はいくつかの昆虫種の非特異的エステラーゼを阻害することが知られていることから(Gunning et al., 1998; young et al., 2005; Moores et al., 2009)、本種のイミダクロプリド抵抗性に非特異的エステラーゼが関与している可能性もある。

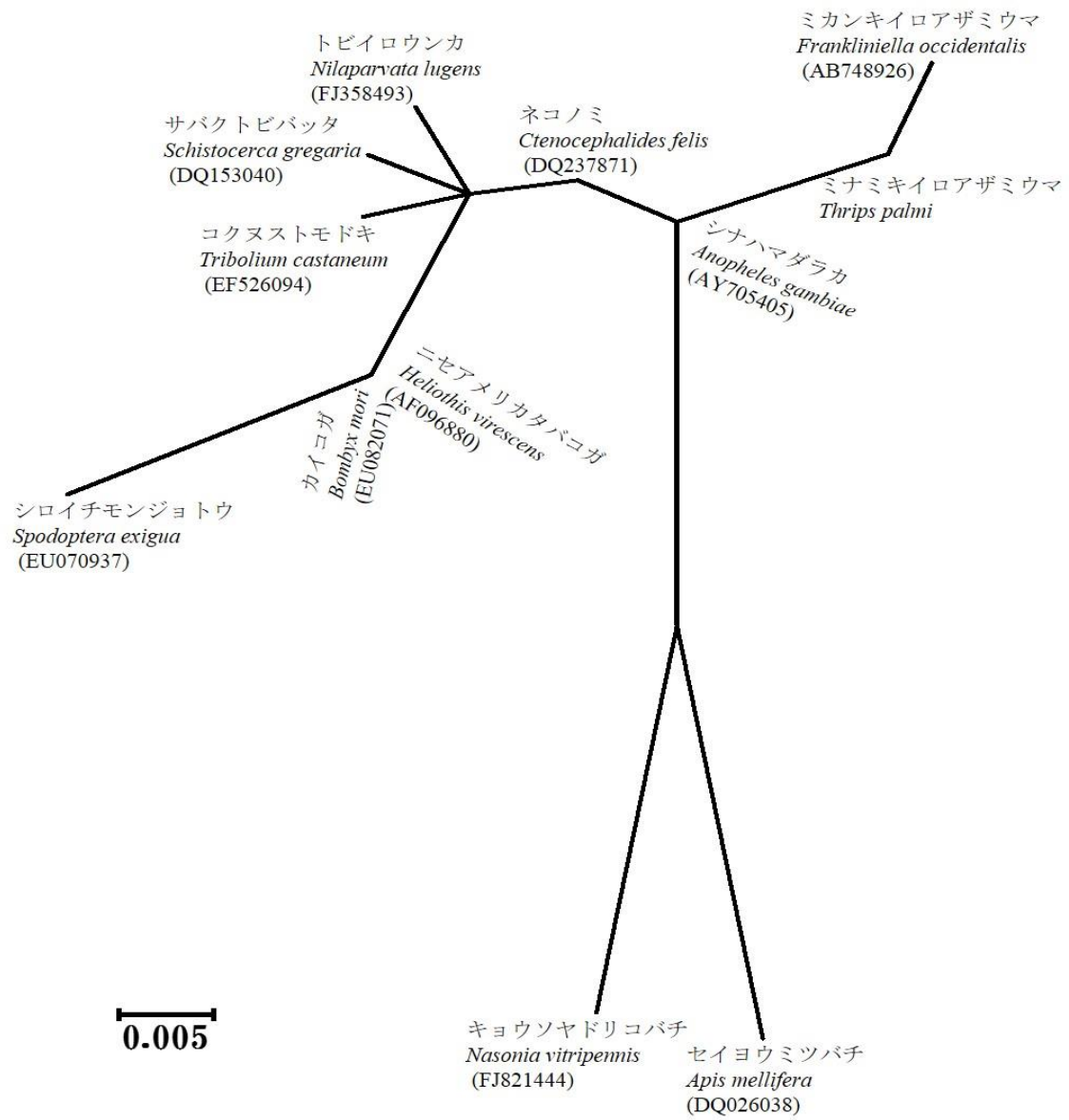


図 4-1. ミナミキイロアザミウマを含む昆虫種の nAChRβ1 サブユニット遺伝子のアミノ酸配列の系統樹

```

AATTATGAAATCGAATGTATGGTTGAGATTGGTATGGAGCGATTACCAGCTACAGTGGGA 60
  I M K S N V W L R L V W S D Y Q L Q W D
                    LPD
CGAGGCAGACTACGGAGGCATAGGAGTATTAAGACTGCCACCCGACAAAGTGTGGAAACC 120
  E A D Y G G I G V L R L P P D K V W K P

GGACATAGTGCTTTTTAACAACGCCGACGGCAACTACGAGGTGCGCTACAAGTCCAACGT 180
D I V L F N N A D G N Y E V R Y K S N V
  LPA
GCTCATCTACCCCAACGGCGAGGTCCTGTGGGTGCCGCCCGCCATCTACCAGAGCTCGTG 240
L I Y P N G E V L W V P P A I Y Q S S C
                    LPE
CACCATCGACGTGACGTACTTCCCCTTCGACCAGCAGACCTGCATCATGAAGTTCGGGTC 300
  T I D V T Y F P F D Q Q T C I M K F G S

GTGGACGTTCAACGGCGACCAGGTGTCGCTGGCGCTCTACAACAACAAGAACTTCGTGGA 360
W T F N G D Q V S L A L Y N N K N F V D
                    LPB                    LPF
CTTGTCGGACTACTGGAAGTCGGGCACGTGGGACATCATCGAGGTGCCGGCGTACCTGAA 420
  L S D Y W K S G T W D I I E V P A Y L N

CGTGTACACGGACGAGCAGAAGCGGCACCCCACC 454
V Y T D E Q K R H P T
                    LPC

```

図 4-2. ミナミキイロアザミウマの TPβ1 遺伝子 の部分塩基配列と推定アミノ酸配列。
 TPβ1 の N 末端細胞外領域に存在する 6 つのループ (D、A、E、B、F、C) を破線で示した。モモアカアブラムシの 81 番目のアミノ酸に対応するコドン(Y L N)を四角で囲んだ。

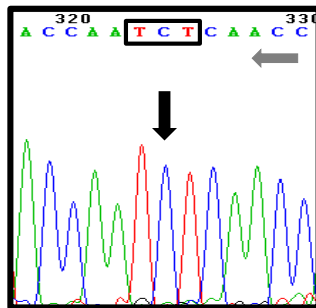


図 4-3. nAChR β 1 サブユニット遺伝子のダイレクトシーケンシング。図は相補鎖の配列を示す。岡山系統および徳島7系統の81番目のアミノ酸に対応するコドンに四角で囲んだ。

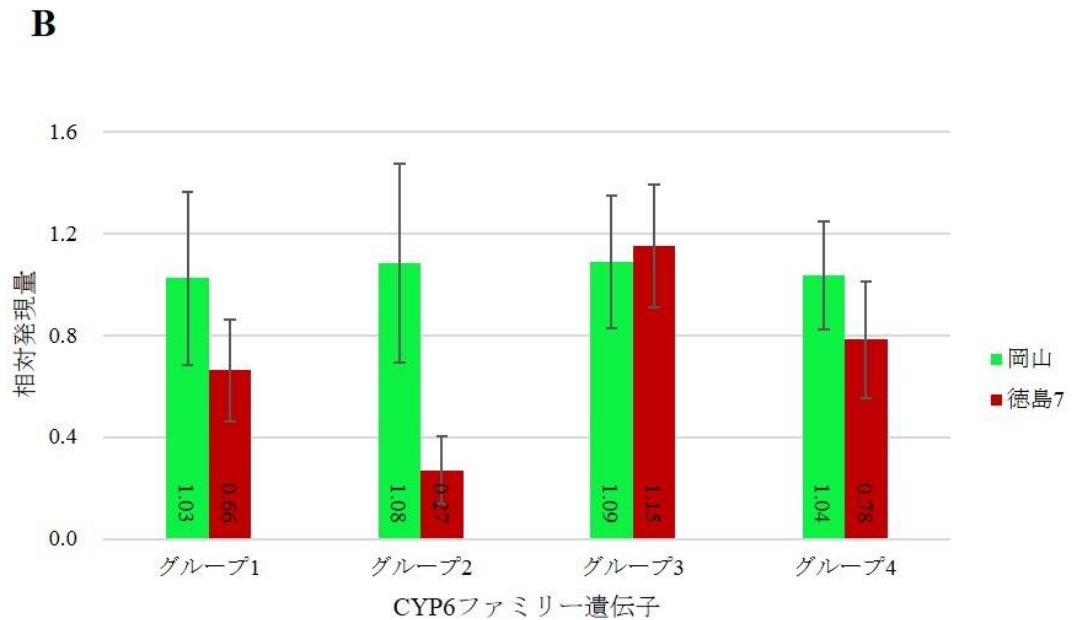
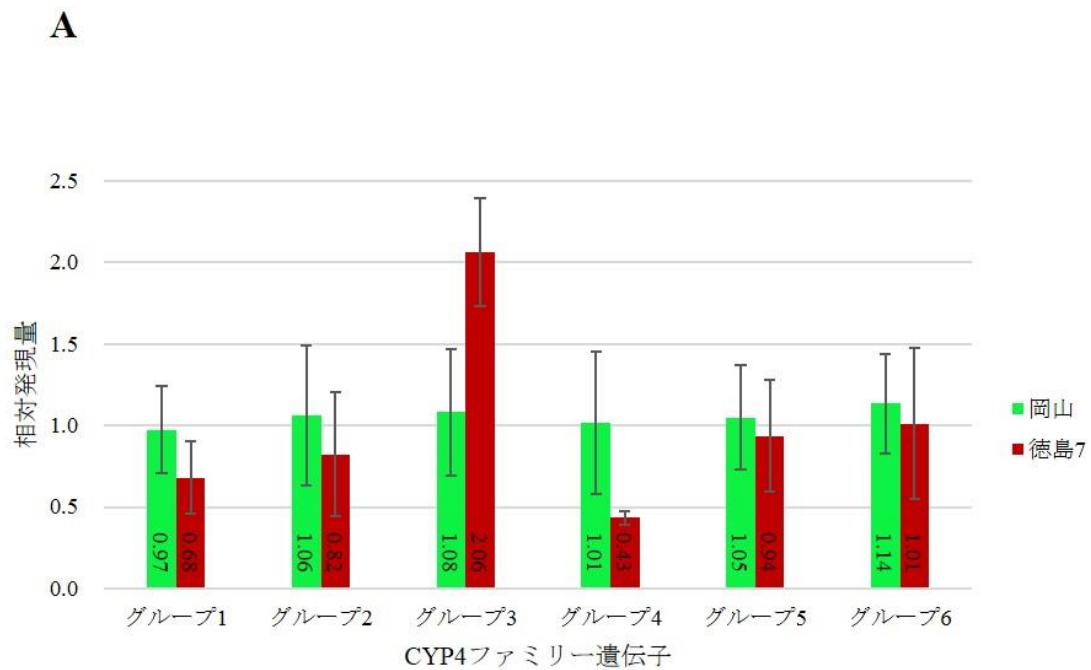


図 4-4. 定量 PCR による CYP4 ファミリー遺伝子(A)および CYP6 ファミリー遺伝子(B)の発現解析。CYP450 遺伝子の発現量は β -アクチン遺伝子の発現量を 1 とした相対値で棒内に表した。

表 4-1. ミナミキイロアザミウマのイミダクロプリドに対する抵抗性レベル

系統	n	LC ₅₀ (mg/L)	95%信頼限界	抵抗性比	採集場所	採集年
岡山	333	9.4	8.6-10.3	1.0	岡山県赤磐市	1994年
高知	217	20.3	19.3-21.3	2.2	高知県安芸市	2008年
大阪	282	52.4	49.8-55.1	5.6	大阪府羽良野市	2010年
徳島1	316	22.2	16.8-28.0	2.4	徳島県海陽町	2011年
徳島4	260	87.5	63.4-130.0	9.3	徳島県海陽町	2011年
徳島5	248	24.0	14.0-35.4	2.6	徳島県海陽町	2011年
徳島6	340	22.3	16.1-28.9	2.4	徳島県海陽町	2011年
徳島7	221	115.0	77.5-216.2	12.2	徳島県海陽町	2011年
徳島8	346	30.1	28.9-31.3	3.2	徳島県海陽町	2011年
奈良	251	26.2	18.6-34.0	2.8	奈良県磯城郡	2013年

抵抗性比：各系統 LC₅₀ / 岡山系統 LC₅₀

表 4-2 活性阻害剤がミナミキイロアザミウマのイミダクロプリド抵抗性に及ぼす影響

	岡山			徳島7			RR
	n	LC ₅₀ (mg/L) (95% CL)	SR	n	LC ₅₀ (mg/L) (95% CL)	SR	
イミダクロプリド	333	9.4 (8.6-10.3)	1.0	221	115.0 (77.5-216.2)	1.0	12.2
イミダクロプリド+PBO	254	15.9 (8.3-23.8)	0.6	314	38.4 (22.5-61.6)	3.0	2.4
イミダクロプリド+DEM	222	17.8 (9.4-26.4)	0.5	298	106.0 (78.0-161.5)	1.1	6.0
イミダクロプリド+DEF	241	12.7 (3.5-23.1)	0.7	238	136.6 (85.9-321.3)	0.8	10.8

CL: 信頼限界 RR(抵抗性比)=LC₅₀徳島7系統/LC₅₀岡山系統 SR(共力効果比)=LC₅₀イミダクロプリド/LC₅₀イミダクロプリド+活性阻害剤

第5章 総合考察

ミナミキイロアザミウマは、日本では主にナス・ピーマンなどの野菜類の重要害虫として恐れられている(河合, 2000)。ミナミキイロアザミウマは‘コスメティックペスト’と呼ばれるように、野菜類の品質に大きな影響を及ぼす。そのため、高品質野菜の生産において、ミナミキイロアザミウマの防除は最重要課題の一つである。ミナミキイロアザミウマの防除は殺虫剤を用いた化学的防除が一般的であったが、各種殺虫剤に対する抵抗性の発達により、持続可能な野菜生産が難しい状況に追い込まれつつある(河合, 2000)。殺虫剤抵抗性の発達を抑制、あるいは回避するためには、各種殺虫剤に対する抵抗性機構の解明が不可欠であるが、ミナミキイロアザミウマにおいてはその知見がほとんど存在しなかった。本研究では、ミナミキイロアザミウマの各種殺虫剤に対する抵抗性がどのようなメカニズムによって付与されているのかを明らかにし、本種の防除対策に貢献することを目的として行われた。

第2章において、ミナミキイロアザミウマの合成ピレスロイド剤抵抗性機構の解析を行った。イエバエにおける先駆的な研究により、合成ピレスロイド剤抵抗性は標的であるナトリウムチャンネルの L1014F と M918T が関与していることが報告された(Williamson et al., 1996; Miyazaki et al., 1996)。また、M918T は常に L1014F とリンクしており、単独では存在しないことから、イエバエの合成ピレスロイド剤抵抗性においては L1014F が抵抗性の基礎となる変異であり、M918T はエンハンサーと推測された(Williamson et al., 1996; Miyazaki et al., 1996)。コナガの合成ピレスロイド剤抵抗性には L1014F と T929I が関与していることが報告された(Schuler et al., 1998)。コナガの場合も、イエバエ同様、T929I はエンハンサーと推測された(Schuler et al., 1998; Tsukahara et al., 2003)。

M918T や T929I が常に L1014F とリンクしている理由については、単独置換

ではナトリウムチャンネル本来の機能が維持されないためと考えられてきた(Vais et al., 2003)。しかしながら、最近ではタバココナジラミの L925I や T929V (Morin et al., 2002; Alon et al., 2006; Roditakis et al., 2006)、ネギアザミウマの T929I (Toda and Morishita, 2009)、コクゾウムシの T929I (Araújo et al., 2011)等のように、918 番目近傍における置換が L1014F とは独立している昆虫の存在も報告されている。本研究において、ミナミキイロアザミウマの合成ピレスロイド剤抵抗性においても T929I が、L1014F とは独立して、抵抗性に関与していることが示唆された。

これまで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置換が 40 箇所以上報告されている(Rinkevich et al., 2013、Dong et al., 2014)。本研究では、アザミウマ目において初めて、ナトリウムチャンネル遺伝子の全塩基配列を決定した。これにより、ミナミキイロアザミウマでも T929I に加えて、M827I や A1215D といったアミノ酸置換が抵抗性に関与している可能性が示唆された。M827I と A1215D はそれぞれ、アタマジラミ(Lee et al., 2003; Hodgdon et al., 2010; Drali et al., 2012)とナミハダニ(Tsagkarakou et al., 2009)の合成ピレスロイド剤抵抗性への関与が報告されている。T929I と M827I の合成ピレスロイド剤抵抗性における重要性は電気生理学的に証明されているが、A1215D については未解析である。A1215D の合成ピレスロイド剤抵抗性における重要性と 3 つのアミノ酸置換の相互関係を電気生理学的に解析することが今後の課題として残った。

ミナミキイロアザミウマのナトリウムチャンネル遺伝子の全塩基配列決定の過程において、一部の領域において 2 種類の塩基配列が検出された。これまで、昆虫のナトリウムチャンネルは 1 種類とされてきたが、2009 年、ワモンゴキブリにおいて既知のナトリウムチャンネルと非常に近縁ではあるものの、新規なナトリウムチャンネルが発見された(Moignot et al., 2009)。この新規ナトリウムチャンネルは

既知のナトリウムチャンネルと同様、電位依存性であったが、神経細胞のみならず非神経細胞においても発現していた(Moignot et al., 2009)。ミナミキイロアザミウマで検出された2種類の塩基配列はワモンゴキブリ同様、2種類のナトリウムチャンネルの存在を示しているのかもしれない。あるいは、ミナミキイロアザミウマ内には異なるナトリウムチャンネルをもつ2つの系統あるいは個体群が存在する可能性もある。今後、ミナミキイロアザミウマの繁殖様式(産雄単為生殖)を利用して、1頭の雌成虫から増殖した集団を用いて、両仮説の検証を行う予定である。

ミナミキイロアザミウマの日本への侵入は1978年であることはすでに述べた。1980年に、本種とヒラズハナアザミウマ(*Frankniella intonsa*)に対する除虫菊(ピレスロイドを含む)の効果を調べたところ、本種の死虫率(5%)がヒラズハナアザミウマより明らかに低かった(佐々木, 1981)。また、本種の侵入当初、香川県において既存の殺虫剤の効果が調査された際も、1976年に初めて農業用合成ピレスロイド剤として上市されたフェンバレレートに対する感受性は低かった(渡邊, 私信)。このように、日本に侵入したミナミキイロアザミウマ個体群は、もともと合成ピレスロイド剤に対する抵抗性を発達させていた可能性が高い。1974年に採集されたコナガの乾燥標本のナトリウムチャンネルにおいてL1014Fが検出された(Kwon et al., 2004)。1950年代から1960年代にかけて様々な農業害虫の防除に使用されたDDTは合成ピレスロイド剤と同じく、ナトリウムチャンネルを標的とする。Kwon et al. (2004)は、コナガのL1014FはDDTの散布によって選抜されたと推測している。本種において検出されたナトリウムチャンネルにおける3つのアミノ酸変異も海外におけるDDT散布によって選抜されたのかもしれない。

第3章ではミナミキイロアザミウマのスピノサド抵抗性機構の解析を行った。スピノサドは上市された1997年当初、ミナミキイロアザミウマ防除における切り札的な存在であった。しかしながら、著者が本研究を始めた2008年

頃には、本種のスピノサド抵抗性が四国の一部地域において認められる状況となっていた。そこで、当初はスピノサド抵抗性のメカニズムを明らかにし、抵抗性個体と感受性個体を識別する遺伝子診断法の開発を目指した。しかしながら、間もなく本種のスピノサド抵抗性は東北北部および北海道を除く日本全域(分布域全体)に拡がってしまった。本種の移動分散力は比較的小さいと考えられているため(河合, 2000)、短期間におけるスピノサド抵抗性の蔓延は、野菜苗の移動を介した人為的な要因によると考えられている。遺伝子診断法は、抵抗性の発達、メカニズムの解明を経て初めて確立可能となるが、実際の抵抗性の発達速度に対応できていないのが実情である。殺虫剤抵抗性のメカニズムをあらかじめ予測し、抵抗性が現れる前に遺伝子診断技術が確立していることが実際の害虫防除においては理想である。最近、殺虫剤と標的分子の相互作用の解析がコンピュータを用いたシミュレーションにより可能になりつつあり、将来的には、抵抗性をもたらすメカニズムの事前予測と遺伝子診断法の事前確立も可能になるかもしれない。

ミカンキイロアザミウマのスピノサド抵抗性に関して、遺伝様式は不完全優性であること、抵抗性には CYP450、GST、CE をはじめとする解毒分解酵素活性の増大は関与していないことが報告された(Bielza et al., 2007; Zhang et al., 2008)。その後、抵抗性には nAChR α 6 サブユニットにおけるアミノ酸置換(G275E)が関与していることが報告された(Puinean et al., 2013)。本研究では、ミナミキイロアザミウマのスピノサド抵抗性にも TP α 6 サブユニットの G275E が関与しているのではないかと考え、スピノサドに対する感受性の異なる 3 系統を用いて当該部位の解析を行った。その結果、抵抗性 2 系統の TP α 6 サブユニットにおいて G275E が検出された。また、両抵抗性系統は G275E のホモ集団であることが示唆された。両系統は野外より採集した後、殺虫剤選抜を行わずに維持された系統であることから、採集時にすでに抵抗性ホモの集団であった

と推測された。現地において採集された母集団の数は不明であるが、観察結果は農業生産の現場における防除圧の高さを示しているのかもしれない。

スピノサド抵抗性 2 系統間における抵抗性レベルの違いを検討するために、各種解毒分解酵素(CYP450、GST、CE)の活性阻害剤を用いた生物検定を行った。その結果、両系統のスピノサド抵抗性には CYP450 による解毒分解が関与しており、両系統の抵抗性レベルの違いの少なくとも一部は CYP450 の解毒分解活性の違いに由来することが示唆された。ミナミキイロアザミウマのスピノサド抵抗性には、CYP450 による解毒分解は関与していないことをすでに述べた。以上の結果は、アザミウマ目においても種によってスピノサド抵抗性のメカニズムが異なることを示唆している。また、感受性系統では G275E は認められなかったことから、ミナミキイロアザミウマのスピノサド抵抗性では、TP α 6 サブユニットの G275E による感受性の低下が抵抗性の基礎となり、CYP450 による解毒分解が付加的に作用していると推測される。

ミナミキイロアザミウマは日本への侵入当初から合成ピレスロイド剤に対して抵抗性を備えていた可能性について述べた。また、有機リン剤に対する感受性も低く、当時は比較的殺虫効果の高かったカーバメート剤を中心とした防除が行われたという(渡邊, 私信)。しかしながら、カーバメート剤の効果も間もなく失われ、有効な薬剤がほとんどないという状況に陥った。この危機的状況は、ミナミキイロアザミウマの天敵であるヒメハナカメムシを用いた生物学的防除や、選択的殺虫剤との併用による総合的害虫管理の試みにつながった(永井, 1994)。しかしながら、1992 年に各種殺虫剤に対して抵抗性を発達させたミナミキイロアザミウマに対しても卓抜した効果を示すネオニコチノイド剤(イミダクロプリド)が上市されたことにより、化学合成殺虫剤中心のミナミキイロアザミウマ防除が根本的に変わることはなかった(國本, 2013)。ネオニコチノイド剤のミナミキイロアザミウマに対する効果が低下したと言われて久しいが、合

成ピレスロイド剤やスピノサドとは異なり、現在もその効力が完全に打ち破られたという報告はない。

昆虫と脊椎動物のキメラ nAChR を用いた解析により、両者の nAChR 間のイミダクロプリドに対する感受性の違いは $\beta 1$ サブユニットのループ D におけるアミノ酸の違い(R81T)に由来することが示唆された(Shimomura et al., 2002, 2003, 2004, 2006)。しかし、 $\beta 1$ サブユニットにおける R81T はキメラ nAChR の ACh に対する濃度応答反応にほとんど影響を及ぼさなかった(Shimomura et al., 2006)。そのため、R81T をもった抵抗性昆虫が生じた場合、フィットネスは大きな影響を受けず、野外においても生き残る可能性が高いと推測された(松田, 2012)。この推測を裏付けるように、野外において採集されたイミダクロプリド抵抗性のモモアカアブラムシでは、 $\beta 1$ サブユニットにおいて R81T が検出された(Bass et al., 2011)。 $\beta 1$ サブユニットにおける R81T は、イミダクロプリド抵抗性のワタアブラムシでも検出された(Koo et al., 2014)。松田(2012)は R81T が今後ネオニコチノイド剤抵抗性研究のトレンドになると予想したが、上記アブラムシ 2 種以外では R81T の報告はない。本研究においても、イミダクロプリドに抵抗性を示す系統の $\beta 1$ サブユニットにおいて R81T を見出すことはできなかった。多くのネオニコチノイド剤抵抗性害虫で R81T が認められないのは、当該変異が昆虫の nAChR においては大きなフィットネスコストを伴っているためかもしれない。多くの害虫におけるネオニコチノイド剤抵抗性は、解毒分解酵素活性の増大のみによって付与されており、その結果比較的低レベルの抵抗性として検出されているのかもしれない。R81T のフィットネスコストに関しては、nAChR の ACh に対する濃度応答反応だけでなく、フィットネスの本来的な定義「次世代に残すことのできる繁殖可能な産仔数」の計測を通じて評価されるべきである。

本研究において、ミナミキイロアザミウマの合成ピレスロイド剤抵抗性、ス

ピノサド抵抗性、イミダクロプリド抵抗性には CYP450 による解毒分解が関与していることが示唆された。しかしながら、本研究では各殺虫剤抵抗性に関わる CYP450 遺伝子をクローニングすることは出来なかった。オオタバコガによるゴシポール(綿実に含まれるポリフェノール色素)の解毒分解には CYP6AE14 遺伝子が関与していることが、標的遺伝子の二本鎖 RNA を合成する形質転換植物を用いた RNAi によって立証された(Mao et al., 2007)。一般に昆虫の RNAi は、標的遺伝子の二本鎖 RNA の注入によって行われるが、ミナミキイロアザミウマのような微細昆虫への適用は不可能である。ミナミキイロアザミウマは他のアザミウマ種とは異なり、ナス科植物を加害し、タバコにおいても生育できる(園田, 未発表)。そのため、抵抗性に関わる CYP450 遺伝子が得られた場合、抵抗性への関与について形質転換植物を用いた RNAi によって立証できる利点がある。本研究では、既知の CYP450 遺伝子の塩基配列を基に設計した縮重プライマーを用いて CYP450 遺伝子のクローニングを行ったが、今後は次世代シーケンサーを用いた抵抗性系統と感受性系統の転写物の比較(RNA seq)による CYP450 遺伝子をはじめとする抵抗性に関わる遺伝子の獲得も検討すべきと考える。

最後に今後のミナミキイロアザミウマ防除について私見を述べる。現在、岡山県においてミナミキイロアザミウマに有効な殺虫剤はエマメクチン安息香酸のみであるという(西, 2011)。そのため、ミナミキイロアザミウマ防除に用いる殺虫剤がエマメクチン安息香酸に偏重しつつあり、早晚抵抗性が生じると予想されている。現在のミナミキイロアザミウマ防除を取り巻く状況は、ネオニコチノイド剤が上市される直前の状況に良く似ている。仮に当時同様に新規殺虫剤が登場し、ローテーション散布等による抵抗性管理が行われたとしても、抵抗性の発達は不可避である。現在、前述のヒメハナカメムシに加え、スワルスキーカブリダニ(*Amblyseius swirskii*) (黒木, 1997)、タバコカスミカメ(*Nesidiocoris*

tenuis) (中石, 2014)を利用したミナミキイロアザミウマ防除が高知県などで大きな成果を挙げている。また、黄色あるいは青色粘着トラップによる捕殺(山本ら, 1981; 増井, 2010)、紫外線除去フィルムによる施設内への進入阻害(野中・永井, 1983; 増井, 2010)などの物理的防除、施設内で増殖したミナミキイロアザミウマの外部への分散を阻止するための管理法(松崎, 1986; 増井, 2010)などの技術も開発されている。天敵のみによるミナミキイロアザミウマ防除は理想ではあるが、化学防除と遜色ない質と量を維持できるかどうか、地域ぐるみの取り組みを行うことができるかどうかなど、クリアせねばならない問題も多い。天敵をはじめとする様々な防除手段と天敵類に影響の少ない選択的殺虫剤とを効果的に組み合わせた総合的ミナミキイロアザミウマ防除が取り組むべき直近の課題であろう。

謝 辞

本研究を遂行するにあたり終始懇意なる御指導、御鞭撻を賜った、岡山大学資源植物科学研究所植物・昆虫間相互作用グループの園田昌司准教授に心より御礼申し上げます。本研究を実施する上において多大な御配慮をいただいた岡山大学資源植物科学研究所植物・微生物相互作用グループの鈴木信弘教授、ゲノム制御グループの杉本学准教授に厚く御礼申し上げます。本研究の実施にあたり貴重な昆虫サンプルを提供していただいた高知県中央西農業振興センター高吾農業改良普及所伊藤政雄氏、宇都宮大学農学部村井保教授、島根県農業技術センター奈良井祐隆氏、徳島農業技術センターの兼田武典氏、中野昭雄氏、よき御助言をいただいた研究所の皆様、精神面で支えていただいた同期、後輩の方々に御礼申し上げます。

最後に、長年にわたる学生生活を理解し、支えてくれた家族に敬愛の意を表し、深く感謝する。

参考文献

- Abbott WS (1925) A method of computing the effectiveness of an insecticide. *J Econ Entomol* 18: 265-267.
- Alon M, Alon F, Nauen R, Morin S (2008) Organophosphates' resistance in the B-biotype of *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae) is associated with a point mutation in an ace1-type acetylcholinesterase and overexpression of carboxylesterase. *Insect Biochem Mol Biol* 38: 940-949.
- Alon M, Benting J, Lueke B, Ponge T, Alon F, Morin S (2006) Multiple origins of pyrethroid resistance in sympatric biotypes of *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae). *Insect Biochem Mol Biol* 36: 71-79.
- Amichot M, Tares S, Brun-Barale A, Arthaud L, Bride JM, Bergé JB (2004) Point mutations associated with insecticide resistance in the *Drosophila* cytochrome P450 Cyp6a2 enable DDT metabolism. *Eur J Biochem* 271: 1250-1257.
- Araujo RA, Williamson MS, Bass C, Field LM, Duce IR (2011) Pyrethroid resistance in *Sitophilus zeamais* is associated with a mutation (T929I) in the voltage-gated sodium channel. *Insect Mol Biol* 20: 437-445.
- Basit M, Saeed S, Saleem MA, Sayyed AH (2013) Can resistance in *Bemisia tabaci* (Homoptera: Aleyrodidae) be overcome with mixtures of neonicotinoids and insect growth regulators. *Crop Protection* 44: 135-141.
- Bass C, Puinean AM, Andrews M, Cutler P, Daniels M, Elias J, Paul VL, Crossthwaite AJ, Denholm I, Field LM, Foster SP, Lind R, Williamson MS, Slater R (2011) Mutation of a nicotinic acetylcholine receptor beta subunit is associated with resistance to neonicotinoid insecticides in the aphid *Myzus persicae*. *BMC Neurosci* 12: 1-11.
- Bautista MAM, Tanaka T, Miyata T (2007) Identification of permethrin-inducible cytochrome P450s from the diamondback moth, *Plutella xylostella* (L.) and the possibility of involvement in permethrin resistance. *Pestic Biochem Physiol* 87: 85-93.

- Baxter SW, Chen M, Dawson A, Zhao JZ, Vogel H, Shelton AM, Heckel DG, Jiggins CD (2010) Mis-Spliced Transcripts of Nicotinic Acetylcholine Receptor $\alpha 6$ Are Associated with Field Evolved Spinosad Resistance in *Plutella xylostella* (L.). PLoS Genetics 6: 1-10.
- Bielza P, Quinto V, Fernandez E, Gravalos C, Contreras J (2007) Genetics of spinosad resistance in *Frankliniella occidentalis* (Thysanoptera: Thripidae). J. Econ. Entomol 100: 916-920.
- Bloomquist JR (1993) Neuroreceptor mechanisms in pyrethroid mode of action and resistance. Rev Pestic Tox 2: 185-226.
- Breathnach R, Benoist C, Hare KO, Gannon F, Chambon P (1978) Ovalbumin gene: evidence for a leader sequence in mRNA and DNA sequences at the exon-intron boundaries. Proc Natl Acad Sci USA 75: 4853-4857.
- Carvalho RA, Limiaa CEG, Bassb C, Azeredo-Espin AML (2010) Changes in the frequency of the G137D and W251S mutations in the carboxylesterase E3 gene of *Cochliomyia hominivorax* (Diptera: Calliphoridae) populations from Uruguay. Veterinary Parasitology 170: 297-301.
- Chung H, Bogwitz MR, Cart CM, Andrianopoulos A, Ffrench-Constant RH, Batterham P, Daborn PJ (2007) Cis-regulatory elements in the Accord retrotransposon result in tissue-specific expression of the *Drosophila melanogaster* insecticide resistance gene Cyp6g1. Genetics 175: 1071-1077.
- Cifuentes D, Chynoweth R, Guillen J, Delarua P, Bielza P (2012) Novel Cytochrome P450 Genes, CYP6EB1 and CYP6EC1, Are Over-Expressed in Acrinathrin-Resistant *Frankliniella occidentalis* (Thysanoptera: Thripidae). J Econ Entomol 105: 1006-1018.
- Corringer PJ, Novere NL, Changeux JP (2000) Nicotinic receptors at the amino acid level. Annu Rev Pharmacol Toxicol 40: 431-458.
- Danielson PB, Macintyre RJ, Fogleman JC (1997) Molecular cloning of a family of xenobiotic-inducible drosophilid cytochrome P450s: Evidence for involvement in host-plant. allelochemical resistance. Proc Natl Acad Sci USA 94: 10797-10802.

- Davies TGE, Field LM, Usherwood PNR, Williamson MS (2007) A comparative study of voltage-gated sodium channels in the Insecta: implications for pyrethroid resistance in Anopheline and other Neopteran species. *Insect Molecular Biology* 16: 361-375.
- Devonshire AL, Moores GD (1982) A carboxylesterase with broad substrate specificity causes organophosphorus, carbamate and pyrethroid resistance in peach-potato aphids (*Myzus persicae*). *Pestic Biochem Physiol* 18: 235-246.
- Devonshire AL, Heidaria R, Huangb HZ, Hammockb BD, Russella RJ, Oakeshotta JG (2007) Hydrolysis of individual isomers of fluorogenic pyrethroid analogs by mutant carboxylesterases from *Lucilia cuprina*. *Insect Biochem Mol Biol* 37: 891-902.
- Ding Z, Wen Y, Yang B, Zhang Y, Liu S, Liu Z, Han Z (2013) Biochemical mechanisms of imidacloprid resistance in *Nilaparvata lugens*: Over-expression of cytochrome P450 CYP6AY1. *Insect Biochem Mol Biol* 43: 1021-1027.
- Dong K, Du YZ, Rinkevich F, Nomura Y, Xu P, Wang LX, Silver K, Zhorov BS (2014) Molecular biology of insect sodium channels and pyrethroid resistance. *Insect Biochem Mol Biol* 50: 1-17.
- Dong K, Valles SM, Scharf ME, Zeichner B, Bennett GW (1998) The Knockdown Resistance (kdr) Mutation in Pyrethroid-Resistant German Cockroaches. *Pestic Biochem Physiol* 60: 195-204.
- Espinosa PJ, Contreras J, Quinto V, Gravalos C, Fernandez E, Bielza P (2005) Metabolic mechanisms of insecticide resistance in the western flower thrips, *Frankliniella occidentalis* (Pergande). *Pestic Manag Sci* 61: 1009-1015.
- Estabrook RW, Hildebrandt AG, Baron J, Netter KJ, Leibman K (1971) A new spectral intermediate associated with cytochrome P-450 function in liver microsomes. *Biochem Biophys Res Commun* 42: 132-139.
- Fahmy AR, Miyata T (1991) Development and reversion of chlorfluazuron resistance in diamondback moth. In: Talekar NS (ed) *Diamondback moth and other crucifer*

- pests. proceedings of the Second International Workshop, Tainan, Taiwan 403-410.
- Feyereisen R (1999) Insect P450 enzymes. Annual Review of Entomology 44: 507-533.
- Feyereisen R, Koener JF, Farnsworth DE, Nebert DW (1989) Isolation and sequence of cDNA encoding a cytochrome P-450 from an insecticide-resistant strain of the house fly, *Musca domestica*. Proc Natl Acad Sci USA 86: 1465-1469.
- Field LM, Devonshire AL, Forde G (1988) Molecular evidence that insecticide resistance in peach potato aphids (*Myzus persicae* Sulz.) results from amplification of an esterase gene. J Biochem 251: 309-312.
- Fogleman JC, Danielson PB, MacIntyre RJ (1998) The molecular basis of adaptation in *Drosophila*: the role of cytochrome P450s. Evolutionary Biol 30: 15-77.
- Forcioli D, Frey B, Frey JE (2002) High nucleotide diversity in the para-like voltage-sensitive sodium channel gene sequence in the western flower thrips (Thysanoptera: Thripidae). J Econ Entomol 95: 838-848.
- Foster SP, Young S, Williamson MS, Duce I, Denholm I, Devine GJ (2003) Analogous pleiotropic effects of insecticide resistance genotypes in peach-potato aphids and houseflies. Heredity 91: 98-106.
- Fragoso DB, Guedesa RNC, Oliveira MGA (2007) Partial characterization of glutathione S-transferases in pyrethroid-resistant and -susceptible populations of the maize weevil, *Sitophilus zeamais*. J Stor Prod Res 43: 167-170.
- Frohmann MA, Dush MK, Martin GR (1988) Rapid production of full-length cDNAs from rare transcripts: amplification using a single gene-specific oligonucleotide primer. Proc Natl Acad Sci USA 87: 682-685.
- Georghiou GP, Mellon RB (1983) Pesticide Resistance in Time and Space. Pest Resist Pestic 1-46.
- Goldin AL (2001) Resurgence of sodium channel research. Annu Rev Physiol 63: 871-894.

- Grutter T, Changeux JP (2001) Nicotinic receptors in wonderland. *Trends Biochem Sci* 26: 459-463.
- Gunning RV, Moores GD, Devonshire AL (1998) Inhibition of resistance related esterases by piperonyl butoxide in *Helicoverpa armigera* and *Aphis gossypii*, in: D.G. Jones (Ed.), *Piperonyl Butoxide, Insecticide Synergist*. Academic Press London 215-226.
- Heidari R, Devonshire AL, Campbell BE, Dorrian SJ, Oakeshott JG, Russell RJ (2005) Hydrolysis of pyrethroids by carboxylesterases from *Lucilia cuprina* and *Drosophila melanogaster* with active sites modified by in vitro mutagenesis. *Insect Biochem Mol Biol* 35: 597-609.
- Hemingway J, Hawkes NJ, Carrol LM, Ranson H, (2004) The molecular basis of insecticide resistance in mosquitoes. *Insect Biochem Mol Biol* 34: 653-655.
- Hernandez R, Guerrero FD, George JE, Wagner GG (2002) Allele frequency and gene expression of a putative carboxylesterase-encoding gene in a pyrethroid resistant strain of the tick *Boophilus microplus*. *Insect Biochem Mol Biol* 32: 1009-1016.
- Hlavica P (2011) Insect cytochromes P450: Topology of structural elements predicted to govern catalytic versatility. *J Inorg Biochem* 105: 1354-1364.
- Hodgdon HE, Yoon KS, Previte D, Kim HJ, Aboelghar GE, Lee SH, Clark JM (2010) Determination of knockdown resistance allele frequencies in global human head louse populations using the serial invasive signal amplification reaction. *Pestic Manag Sci* 66: 1031-1040.
- Hsu JC, Feng HT, Wu WJ, Geib SM, Mao CH, Vontas J (2012) Truncated transcripts of nicotinic acetylcholine subunit gene *Bda6* are associated with spinosad resistance in *Bactrocera dorsalis*. *Insect Biochem Mol Biol* 42: 806-815.
- Huang Y, Williamson MS, Devonshire AL, Windass JD, Lansdell SJ, Millar NS (1999) Molecular Characterization and Imidacloprid Selectivity of Nicotinic Acetylcholine Receptor Subunits from the Peach–Potato Aphid *Myzus persicae*. *J Neurochem* 73: 380-389.

- Itokawa K, Komagata O, Kasai S, Okamura Y, Masada M, Tomita T (2010) Genomic structures of Cyp9m10 in pyrethroid resistant and susceptible strains of *Culex quinquefasciatus*. *Insect Biochem Mol Biol* 40: 631-640.
- Iwasa T, Motoyama N, Ambrose JT, Roe RM (2004) Mechanism for the differential toxicity of neonicotinoid insecticides in the honey bee, *Apis mellifera*. *Crop Protection* 23: 371-378.
- Jones AK, Grauso M, Sattelle DB (2005) The nicotinic acetylcholine receptor gene family of the malaria mosquito, *Anopheles gambiae*. *Genomics* 85: 176-187.
- Jones AK, Raymond-Delpech V, Thany SH, Gauthier M, Sattelle DB (2006) The nicotinic acetylcholine receptor gene family of the honey bee, *Apis mellifera*. *Genome Research* 16:1422-1430.
- Jones AK, Sattelle DB (2007) The cys-loop ligand-gated ion channel gene superfamily of the red flour beetle, *Tribolium castaneum*. *BMC Genomics* 1-16.
- Jones DP (1973) Agricultural entomology. *Annual Review Entomology* 307-332.
- Joussen N, Heckel DG, Haas M, Schuphan I, Schmidt B (2008) Metabolism of imidacloprid and DDT by P450 CYP6G1 expressed in cell cultures of *Nicotiana tabacum* suggests detoxification of these insecticides in Cyp6g1-overexpressing strains of *Drosophila melanogaster*, leading to resistance. *Pest Manag Sci* 64: 65-73.
- Karlin A (2002) Emerging structure of the nicotinic acetylcholine receptors. *Nat Rev Neurosci* 3: 102-114.
- Karunke I, Benting J, Lueke B, Ponge T, Nauen R, Roditakis E, Vontas J, Gorman K, Denholm I, Morin S (2008) Over-expression of cytochrome P450 CYP6CM1 is associated with high resistance to imidacloprid in the B and Q biotypes of *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae). *Insect Biochem Mol Biol* 38: 634-644.
- Kasai S, Weerasinghe IS, Shono T, Yamakawa M (2000) Molecular cloning, nucleotide sequence and gene expression of a cytochrome P450 (CYP6F1) from the pyrethroid-resistant mosquito, *Culex quinquefasciatus* Say. *Insect Biochem*

Mol Biol 30: 163-171.

Kavi LAK, Kaufman PE, Scott JG (2014) Genetics and mechanisms of imidacloprid resistance in house flies. *Pestic Biochem Physiol* 109: 64-69.

Kikuchia Y, Hayatsuc M, Hosokawad T, Nagayamae A, Tagoc K, Fukatsud T (2012) Symbiont-mediated insecticide resistance. *PNAS* 109: 8618-8622.

Komagata O, Kasai S, Tomita T (2010) Overexpression of cytochrome P450 genes in pyrethroid-resistant *Culex quinquefasciatus*. *Insect Biochem Mol Biol* 40: 146-152.

Koo HN, An JJ, Park SE, Kim JI, Kim GH (2014) Regional susceptibilities to 12 insecticides of melon and cotton aphid, *Aphis gossypii* (Hemiptera: Aphididae) and a point mutation associated with imidacloprid resistance. *Crop Protection* 55: 91-97.

Kwon DH, Choi BR, Park HM, Lee SH, Miyata T, Clark JM (2004) Knockdown resistance allele frequency in field populations of *Plutella xylostella* in Korea. *Pestic Biochem Physiol* 80: 21-30.

Lee SH, Gao JR, Yoon KS, Mumcuoglu KY, Taplin D, Edman JD, Lee MT, Clark JM (2003) Sodium channel mutations associated with knockdown resistance in the human head louse, *Pediculus capitis* (De Geer). *Pestic Biochem Physiol* 75: 79-91.

Lee SH, Ingles PJ, Knipple DC, Soderlund DM (2002) Developmental regulation of alternative exon usage in the house fly *Vssc1* sodium channel gene. *Invert Neurosci* 4: 125-133.

Li J, Wang Q, Zhang L, Gao X (2012) Characterization of imidacloprid resistance in the housefly *Musca domestica* (Diptera: Muscidae). *Pestic Biochem Physiol* 102:109-114.

Li X, Schuler MA, Berenbaum MR (2007) Molecular Mechanisms of Metabolic Resistance to Synthetic and Natural Xenobiotics. *Annu Rev Entomol* 52: 231-253.

Lin WH, Gunay C, Marley R, Prinz AA, Baines RA (2012) Activity-Dependent Alternative Splicing Increases Persistent Sodium Current and Promotes Seizure. *J*

Neuroscience 32: 7267-7277.

Ling S, Zhang H, Zhang R (2011) Effect of fenvalerate on the reproduction and fitness costs of the brown planthopper, *Nilaparvata lugens* and its resistance mechanism. *Pestic Biochem Physiol* 101: 148-153.

Liu N, Scott JG (1998) Increased transcription of CYP6D1 causes cytochrome P450-mediated insecticide resistance in house fly. *Insect Biochem Mol Biol* 28:531-535.

Liu Z, Tan J, Valles SM, Dong K (2002) Synergistic interaction between two cockroach sodium channel mutations and a tobacco budworm sodium channel mutation in reducing channel sensitivity to a pyrethroid insecticide. *Insect Biochem Mol Biol* 32: 397-404.

Liu Z, Valles SM, Dong K (2000) Novel point mutations in the German cockroach para sodium channel gene are associated with knockdown resistance (kdr) to pyrethroid insecticides. *Insect Biochem Mol Biol* 30: 991-997.

Liu Z, Williamson MS, Lansdell SJ, Denholm I, Han Z, Millar NS (2005) A nicotinic acetylcholine receptor mutation conferring target-site resistance to imidacloprid in *Nilaparvata lugens* (brown planthopper). *PNAS* 102: 8420-8425.

Liu ZW, Williamson MS, Lansdell SJ, Han ZJ, Denholm I, Millar NS (2006) A nicotinic acetylcholine receptor mutation (Y151S) causes reduced agonist potency to a range of neonicotinoids. *J Neurochem* 99: 1273-1281.

Livak KJ, Schmittgen DT (2001) Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ Method. *Methods* 25: 402-408.

Loughney, K., R.Dreber, B.Ganetzky (1989) Molecular analysis of the para locus, a sodium channel gene in *Drosophila*. *Cell* 58: 1143-1154.

Lumjuan N, Rajatileka S, Changsom D, Wicheer J, Leelapat P, Prapanthadara L, Somboon P, Lycett G, Ranson H (2011) The role of the *Aedes aegypti* Epsilon glutathione transferases in conferring resistance to DDT and pyrethroid insecticides. *Insect Biochem Mol Biol* 41: 203-209.

- Mao YB, Cai WJ, Wang JW, Hong GJ, Tao XY, Wang LJ, Huang YP, Chen XY (2007) Silencing a cotton bollworm P450 monooxygenase gene by plant-mediated RNAi impairs larval tolerance of gossypol. *Nature Biotechnol* 25: 1307-1313.
- Markussen MDK, Kristensen M (2010) Cytochrome P450 monooxygenase-mediated neonicotinoid resistance in the house fly *Musca domestica* L. *Pestic Biochem Physiol* 98: 50-58.
- Markussen MDK, Kristensen M (2011) Spinosad resistance in female *Musca domestica* L. from a field-derived population. *Pest Manag Sci* 68: 75-82.
- Millar NS (2003) Assembly and subunit diversity of nicotinic acetylcholine receptors. *Biochem Soc Trans* 31: 869-874.
- Miyazaki M, Ohyama K, Dunlap DY, Matsumura F (1996) Cloning and sequencing of the *para*-type sodium channel gene from susceptible and *kdr*-resistant German cockroaches (*Blattella germanica*) and house fly (*Musca domestica*). *Mol Gen Genet* 252: 61-68.
- Miyazawa A, Fujiyoshi Y, Stowell M, Unwin N (1999) Nicotinic acetylcholine receptor at 4.6 Å resolution: transverse tunnels in the channel wall. *J Mol Biol* 288: 765-786.
- Moignot B, Lemaire C, Quinchard S, Lapied B, Legros C (2009) The discovery of a novel sodium channel in the cockroach *Periplaneta americana*: Evidence for an early duplication of the *para*-like gene. *Insect Biochem Mol Biol* 39: 814-823.
- Moore GD, Philippou D, Borzatta V, Trincia P, Jewess P, Gunning R, Bingham G (2009) An analogue of piperonyl butoxide facilitates the characterization of metabolic resistance. *Pest Manag Sci* 65: 150-154.
- Morin S, Williamson MS, Goodson SJ, Brown JK, Tabashnik BE, Dennehy TJ (2002) Mutations in the *Bemisia tabaci* *para* sodium channel gene associated with resistance to a pyrethroid plus organophosphate mixture. *Insect Biochem Mol Biol* 32: 1781-1791.
- Moughes C, Pasteur N, Berge JB, Hyrien O, Raymond M, Robert B, Georghiou GP (1986) Amplification of an esterase gene is responsible for insecticide resistance in

- a California *Culex mosquito*. *Science* 233: 778-780.
- Mumford RA, Baker I, Wood KR (1996) The biology of the tospoviruses. *Ann Appl Biol* 128: 159-183.
- Narahashi T (1996) Neuronal ion channels as the target sites of insecticides. *Pharmacol Toxicol* 78: 1-14.
- Nikou D, Ranson H, Hemingway J (2003) An adult-specific CYP6 P450 gene is overexpressed in a pyrethroid-resistant strain of the malaria vector. *Anopheles gambiae*. *Gene* 318: 91-102.
- Noda M, Shimizu S, Tanabe T, Takai T, Kayano T, Ikeda T, Takahashi H, Nakayama H, Kanaoka Y, Minaminoto N, Kanagawa K, Matsuo H, Raftery MA, Hirose T, Inayama S, Hayasida H, Miyata T, Numa S (1984) Primary structure of Electrophorus electricus sodium channel deduced from cDNA sequence. *Nature* 312: 121-127.
- Olson RO, Liu Z, Nomura Y, Song W, Dong K (2008) Molecular and functional characterization of voltage-gated sodium channel variants from *Drosophila melanogaster*. *Insect Biochem Mol Biol* 38: 604-610.
- Oppenorth FJ (1984) Biochemistry of insecticide resistance. *Pestic Biochem Physiol* 22: 187-193.
- Oppenorth FJ (1985) Biochemistry and genetics of insecticide resistance. In: *Comprehensive insect physiology, Biochemistry and pharmacology* (Kerkut GA, Gilbert LI), Oxford, UK: Pergamon. 12: 731-774.
- Perry T, McKenzie JA, Batterham P (2007) A Da6 knockout strain of *Drosophila melanogaster* confers a high level of resistance to spinosad. *Insect Biochem Mol Biol* 37: 184-188.
- Puinean AM, Lansdell SJ, Collins T, Bielza P, Millar NS (2013) A nicotinic acetylcholine receptor transmembrane point mutation (G275E) associated with resistance to spinosad in *Frankliniella occidentalis*. *J Neurochem* 124: 590-601.

- Ranson H, Hemingway J (2005) Mosquito glutathione transferases. *Methods Enzymol* 401: 226-241.
- Rehan A, Freed S (2014) Selection, mechanism, cross resistance and stability of spinosad resistance in *Spodoptera litura* (Fabricius) (Lepidoptera: Noctuidae). *Crop Prot* 56: 10-15.
- Reyes M, Rocha K, Alarcon L, Siegwart M, Sauphanor B (2012) Metabolic mechanisms involved in the resistance of field populations of *Tuta absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae) to spinosad. *Pestic Biochem Physiol* 102: 45-50.
- Riaz MA, Proust AC, Villemant CD, Poupardin R, Jones CM, Strode C, Kloeckner MR, David JP, Reynaud S (2013) Molecular mechanisms associated with increased tolerance to the neonicotinoid insecticide imidacloprid in the dengue vector *Aedes aegypti*. *Aquatic Toxicology* 126: 326-337.
- Rinkevich FD, Chen M, Shelton AM, Scott JG (2010) Transcripts of the nicotinic acetylcholine receptor subunit gene P α 6 with premature stop codons are associated with spinosad resistance in diamondback moth, *Plutella xylostella*. *Invert Neurosci* 10: 25-33.
- Rinkevich FD, Du Y, Dong K (2013) Diversity and convergence of sodium channel mutations involved in resistance to pyrethroids. *Pestic Biochem Physiol* 106: 93-100.
- Roditakis E, Tsagkarakou A, Vontas J (2006) Identification of mutations in the para sodium channel of *Bemisia tabaci* from Crete, associated with resistance to pyrethroids. *Pestic Biochem Physiol* 85: 161-166.
- Salgado VL (1997) The mode of action of spinosad and other insect control products. *Down Earth* 52: 35-44.
- Sattelle DB, Jones AK, Sattelle BM, Matsuda K, Reenan R, Biggin PC (2005) Edit, cut and paste in the nicotinic acetylcholine receptor gene family of *Drosophila melanogaster*. *BioEssays* 27:366-376.

- Sattelle DB, Yamamoto D (1988) Molecular targets of pyrethroid insecticides. *Adv Insect Physiol* 20: 147-213.
- Schuler TH, Martinez-Torres D, Thompson AJ, Denholm I, Devonshire AL, Duce IR, Williamson MD (1998) Toxicological, electrophysiological, and molecular characterization of knockdown resistance to pyrethroid insecticides in the diamondback moth, *Plutella xylostella* (L.). *Pestic Biochem Physiol* 59: 169-182.
- Scott JG (1999) Cytochromes P450 and insecticide resistance. *Insect Biochem Mol Biol* 29: 757-777.
- Scott JG (1999) Insecticide resistance in insects. In: *Handbook of Pest Management* (D. Pimentel ed.), Boca Raton Florida USA: CRC Press 2: 663-677.
- Shao YM, Dong K, Zhang CX (2007) The nicotinic acetylcholine receptor gene family of the silkworm, *Bombyx mori*. *BMC Genomics* 1-10.
- Shimomura M, Okuda H, Matsuda K, Komai K, Akamatsu M, and Sattelle DB (2002) Effects of mutations of a glutamine residue in loop D of the $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptor on agonist profiles for neonicotinoid insecticides and related ligands. *Br J Pharmacol* 137:162-169.
- Shimomura M, Yokota M, Ihara M, Akamatsu M, Sattelle DB, Matsuda K (2006) Role in the Selectivity of Neonicotinoids of Insect-Specific Basic Residues in Loop D of the Nicotinic Acetylcholine Receptor Agonist Binding Site. *Mol Pharmacol* 70: 1255-1263.
- Shimomura M, Yokota M, Matsuda K, Sattelle DB, and Komai K (2004) Roles of loop C and the loop B-C interval of the nicotinic receptor α subunits in its selective interactions with imidacloprid in insects. *Neurosci Lett* 363:195-198.
- Shimomura M, Yokota M, Okumura M, Matsuda K, Akamatsu M, Sattelle DB, and Komai K (2003) Combinatorial mutations in loops D and F strongly influence responses of the $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptor to imidacloprid. *Brain Res* 991:71-77.
- Shono T, Scott JG (2003) Spinosad resistance in the housefly, *Musca domestica*, is due

to a recessive factor on autosome 1. *Pestic Biochem Physiol* 75: 1-7.

Smith IM, McNamara DG, Scott PR, Holderness M (1997). *Quarantine Pests for Europe*. Second Edition. Data sheets on quarantine pests for the European Union and for the European and Mediterranean Plant Protection Organization. CAB International, Wallingford, Oxon, UK

Smith RF, Mittler TE, Smith CN (1973) *History of Entomology*. Annual Review Inc, Palo Alto, CA.

Soderlund DM (1995) Mode of action of pyrethrins and pyrethroids. In: Casida JE, Quistad GB, editors. *Pyrethrum Flowers, Production, Chemistry, Toxicology, and Uses*. Oxford University Press; New York 217-233.

Soderlund DM, Knipple DC (2003) The molecular biology of knockdown resistance to pyrethroid insecticides. *Insect Biochem Mol Biol* 33: 563-577.

Sonoda S, Igaki C, Tsumuki H (2008) Alternatively spliced sodium channel transcripts expressed in field strains of the diamondback moth. *Insect Biochem Mol Biol* 38: 883-890.

Sonoda S, Tsukahara Y, Ashfaq M, Tsumuki H (2008) Genomic Organization of the Para-Sodium Channel α -Subunit Genes From the Pyrethroid-Resistant and -Susceptible Strains of the Diamondback Moth. *Archiv Insect Biochem Physiol* 69: 1-12.

Sparks TC, Thompson GD, Kirst HA, Hertlein MB, Larson LL, Worden TV, Thibault ST (1998) Biological activity of the spinosyns, new fermentation derived insect control agents, on *tobacco budworm* (Lepidoptera: Noctuidae) Larvae. *J Econ Entomol* 91: 1277-1283.

Tamura K, Dudley J, Nei M, Kumar S (2007) MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol Biol Evolut* 24: 1596-1599.

Tan J, Liu Z, Nomura Y, Goldin AL, Dong K (2002) Alternative Splicing of an Insect Sodium Channel Gene Generates Pharmacologically Distinct Sodium Channels. *J Neuroscience* 22: 5300-5309.

- Thalavaisundaram S, Herron GA, Clift AD, Rose H (2008) Pyrethroid resistance in *Frankliniella occidentalis* (Pergande) (Thysanoptera: Thripidae) and implications for its management in Australia. *Australian J Entomol* 47: 64-69.
- Thompson GD, Dutton R, Sparks TC (2000) Spinosad -A case study: an example from a natural products discovery programme. *Pest Manag Sci* 56: 696-702.
- Toda S, Morishita M (2009) Identification of three point mutations on the sodium channel gene in pyrethroid-resistant *Thrips tabaci* (Thysanoptera:Thripidae). *J Econ Entomol* 102: 2296-2300.
- Tomita T, Scott JG (1995) cDNA and deduced protein sequence of CYP6D1: the putative gene for a cytochrome P450 responsible for pyrethroid resistance in house fly. *Insect Biochem Mol Biol* 25: 275-283.
- Tsagkarakou A, Leeuwen TV, Khajehali J, Ilias A, Grispou M, Williamson MS, Tirry L, Vontas J (2009) Identification of pyrethroid resistance associated mutations in the para sodium channel of the two-spotted spider mite *Tetranychus urticae* (Acari: Tetranychidae). *Insect Mol Biol* 18: 583-593.
- Tsukahara Y, Sonoda S, Fujiwara Y, Nakasuji F, Tsumuki H (2003) Molecular analysis of the para-sodium channel gene in the pyrethroid-resistant diamondback moth, *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Yponomeutidae). *Appl Entomol Zool* 38: 23-29.
- Tsukamoto M (1983) Methods of genetic analysis of insecticide resistance. In: *Pest Resistance to pesticides* (G.P. Georghiou and T. Saito eds.), New York, USA: Plenum 71-98.
- Vais H, Atkinson S, Pluteanu F, Goodson SJ, Devonshire AL, Williamson MS, Usherwood PNR (2003) Mutations of the para sodium channel of *Drosophila melanogaster* identify putative binding sites for pyrethroids. *Mol Pharmacol* 64: 914-922.
- Vais H, Williamson MS, Devonshire AL, Usherwood PNR (2001) The molecular interactions of pyrethroid insecticides with insect and mammalian sodium channels. *Pest Manag Sci* 57: 877-888.

- Vontas JG, Small GJ, Nikou DC, Ranson H, Hemingway J (2002) Purification, molecular cloning and heterologous expression of a glutathione-S-transferase involved in insecticide resistance from the rice brown planthopper, *Nilaparvata lugens*. J Biochem 362:329-337.
- Wang D, Qiu XH, Ren XX, Niu F, Wang KY (2009) Resistance selection and biochemical characterization of spinosad resistance in *Helicoverpa armigera* (Hubner) (Lepidoptera: Noctuidae). Pestic Biochem Physiol 95: 90-94.
- Wang W, Mo JC, Cheng JA, Zhuang PJ, Tang ZH (2006) Selection and characterization of spinosad resistance in *Spodoptera exigua* (Hubner) (Lepidoptera: Noctuidae). Pestic Biochem Physiol 84: 180-187.
- Waters LC, Zelhof AC, Shaw BJ, Chang LY (1992) Possible involvement of the long terminal repeat of transposable element 17.6 in regulating expression of an insecticide resistance associated P450 gene in *Drosophila*. Proc Natl Acad Sci USA 89: 4855-4859.
- Wen Y, Liu Z, Bao H, Han Z (2009) Imidacloprid resistance and its mechanisms in field populations of brown planthopper, *Nilaparvata lugens* Stal in China. Pestic Biochem Physiol 94: 36-42.
- Wheelock GD, Scott JG (1989) Simultaneous purification of a cytochrome P-450 and cytochrome b5 from the house fly *Musca domestica* L. Insect Biochem 19: 481-488.
- Williamson MS, Martinez-Torres D, Hick CA, Devonshire AL (1996) Identification of mutations in the housefly *para*-type sodium channel gene associated with knockdown resistance (*kdr*) to pyrethroid insecticides. Mol Gen Genet 252: 51-60.
- Yamamoto K, Nagaoka S, Banno Y, Aso Y (2009) Biochemical properties of an omega-class glutathione S-transferase of the silkworm, *Bombyx mori*. Comp Biochem Physiol 149: 461-467.
- Yoon KS, Symington SB, Lee SH, Soderlund DM, Clark JM (2008) Three mutations identified in the voltage-sensitive sodium channel α -subunit gene of permethrin-

resistant human head lice reduce the permethrin sensitivity of house fly Vssc1 sodium channels expressed in *Xenopus oocytes*. *Insect Biochem Mol Biol* 38: 296-306.

Young SJ, Gunning RV, Moores GD (2005) The effect of PBO on pyrethroid resistance-associated esterases in *Helicoverpa armigera* (Hubner) (Lepidoptera: Noctuidae). *Pest Manag Sci* 61: 397-401.

Zhang L, Shi J, Shi XY, Liang P, Gao JP, Gao XW (2010) Quantitative and qualitative changes of the carboxylesterase associated with beta-cypermethrin resistance in the housefly, *Musca domestica* (Diptera: Muscidae). *Comp Biochem Physiol* 156: 6-11.

Zhang M, Scott JG (1996) Cytochrome b5 is essential for cytochrome P450 6D1-mediated cypermethrin resistance in LPR house flies. *Pestic Biochem Physiol* 55: 150-156.

Zhang SY, Kono S, Murai T, Miyata T (2008) Mechanisms of resistance to spinosad in the western flower thrips, *Frankliniella occidentalis* (Pergande) (Thysanoptera: Thripidae). *Insect Sci* 15: 125-132.

Zhao JZ, Li YX, Collins HL, Gusukuma-Minuto L, Mau RFL, Thompson GD, Shelton AM (2002) Monitoring and characterization of diamondback moth (Lepidoptera: Plutellidae) resistance to spinosad. *J Econ Entomol* 95: 430-436.

永井一哉 (1993) ミナミキイロアザミウマ個体群の総合的管理に関する研究. 岡山農試臨時報告 82: 1-55.

園田昌司 (2012) 殺虫剤抵抗性機構の解析と今後の課題. *植物防疫* 66: 162-167.

河合章 (1985) ミナミキイロアザミウマ個体群の生態学的研究 7. 増殖能力に及ぼす温度の影響. *応動昆* 29: 140-143.

河合章 (1986) ミナミキイロアザミウマ個体群の生態学的研究 10. 異なる作物上での増殖の比較. *応動昆* 30: 7-11.

河合章 (1995) ミナミキイロアザミウマが寄生した施設栽培ナスでの捕食性天敵ヒメハナカメムシ類(*Orius spp.*)の分散. *野菜茶試研報* 10: 25-32.

- 河合章 (2000) 最近話題の病虫害:ミナミキイロアザミウマ.農及園 75: 152-157.
- 気賀沢和男・松崎征美・武智文彦・佐々木善隆・野口義弘 (1982) ミナミキイロアザミウマの四国地域内における分布拡大. 四国植防 17: 23-28.
- 宮崎昌久・工藤巖 (1988) 日本産アザミウマ文献・寄主植物目録. 農環研資料 3: 1-246.
- 桑野栄一・首藤義博・田村廣人(2004) 農薬の科学(生物制御と植物保護). 1-4.
- 古味一洋 (2003) 高知県におけるミナミキイロアザミウマの薬剤感受性の状況. 高知農技セ研報 12: 21-25.
- 工藤巖 (1981) 果菜類を加害するミナミキイロアザミウマ. 植物防疫 35: 285-288.
- 国本佳範・井村岳男・竹中勲 (2013) 奈良県における近年の害虫防除研究と今後の展望. 日本応用動物昆虫学会誌 57: 69-78.
- 黒木修一・中村正和・川崎安夫 (1997) 施設ピーマンにおける主要害虫の防除に関する研究3. ミナミキイロアザミウマに対する捕食性天敵2種の防除効果. 九病虫研会報 43: 106-109.
- 佐々木美隆 (1981) 野菜の新害虫ミナミキイロアザミウマ.
<http://www.pref.kagawa.lg.jp/noshi/seika/houzyou/19pdf/19veg5.pdf>.
- 佐藤仁彦・宮本徹 (2003) 農薬学. P119.
- 佐藤隆徳 (2012) 近畿中国四国管内の野菜および花きの生産状況(平成22年度). 環境保全型野菜研究領域 1-55.
- 細川正清 (1998) カルボキシシルエステラーゼの分子多様性と種差. 薬物動態. 13: 405-417.
- 細田昭男・藤本大生・田中敏章・林英明 (1990) ミナミキイロアザミウマのスルプロホス剤に対する感受性低下. 日本応用動物昆虫学会大会講演要旨. 34:

238.

山下泉 (1994) ミナミキイロアザミウマの薬剤感受性実態と薬剤の効率的使用.
高知県農業技術センター.

http://www.naro.affrc.go.jp/org/warc/research_results/skk_seika/h06/94025.htm

山下泉 (1994) 高知県におけるミナミキイロアザミウマの薬剤感受性.
insecticide susceptibility of thrips palmi karny (thysanoptera: thripidae) in kochi.

山下泉 (1995) ミナミキイロアザミウマの薬剤感受性の状況. 高知県農業技術センター研究報告 4: 19-24.

山本栄一・永井清文・野中耕次 (1981) 果菜類を加害するアザミウマ類の生態と防除に関する研究. 第 1 報 成虫の飛しょう. 九病虫研会報 27: 98-99.

寺本敏・野中耕次・永井清文 (1982) 果菜類を加害するアザミウマ類の生態と防除に関する研究. 第6報 ミナミキイロアザミウマの産卵能力. 九病虫研会報 28: 128-129.

柴尾 学・岡田清嗣・田中 寛 (2007) スピノサド剤とクロルフェナピル剤に対して感受性の低いミナミキイロアザミウマの発生. 関西病虫研報 49: 85-86.

松崎征美・市川耕次・草川顕一・小川宏 (1986) 施設のナスを加害するミナミキイロアザミウマの防除に関する研究. II 物理的防除. 四国植防 21: 87-93.

松田一彦 (2012) 標的受容体の構造変異に起因する殺虫剤抵抗性と展望. 日本農薬学会 37: 402-404.

西優輔 (2011) 促成栽培ナスにおける難防除病害虫の減農薬防除体系の確立. 岡山県農林水産総合センター農業研究所.

http://www.naro.affrc.go.jp/org/warc/research_results/h24/pdf/02_kankyo_byochugai/20-0204.pdf

増井伸一 (2010) メロンにおけるLED光を利用したミナミキイロアザミウマ防除法の開発. 静岡県農林技術研究所.

http://www.maff.go.jp/j/syouan/syokubo/gaicyu/g_ipm/pdf/yosi_masui.pdf

中石一英 (2014) タバコカスミカメの生態と生物的防除資材としての有効性. 植物防疫.68: 20-25.

中野昭雄 (2003) <http://www.pref.tokushima.jp/files/00/01/23/48/100years/2-7.pdf>.

辻野護・長町知美・柴尾学 (2005) ナス葉片浸漬法およびソラマメ催芽種子浸漬法によるミナミキイロアザミウマの薬剤殺虫効果. 関西病虫研報 47: 147-148.

渡邊丈夫 (2010) ミナミキイロアザミウマに効果が期待できる殺虫剤. 豊穰 48: 22-23.

浜弘司 (1992) 害虫はなぜ農薬に強くなるか. 農山漁村文化協会.東京 30-31.

浜弘司 (1996) 殺虫剤抵抗性問題の現状と抵抗性管理. 農林水産技術研究ジャーナル 19: 25-31.

芳賀一・片井裕介・万年潤哉・増井伸一 (2014) カラーシート反射光、LED照射光に対するミナミキイロアザミウマ *Thrips palmi* Karny の誘引特性. 日本応用動物昆虫学会誌 58: 17-22.

野中耕次・永井清文 (1980) 宮崎県の果菜類におけるスリップス類の発生と防除. 農薬研究 27: 7-11.

野中耕次・永井清文 (1983) 果菜類を加害するアザミウマ類の生態と防除に関する研究. 第7報紫外線除去フィルムによるミナミキイロアザミウマの防除. 九病虫研会報 45: 119-120.

葭原敏夫・河合章 (1982) ミナミキイロアザミウマにおける未交尾雌の生殖. 九病虫研会報 28: 130-131.

公表論文

1. Bao WX, Sonoda S (2012) Resistance to cypermethrin in melon thrips, *Thrips palmi* (thysanoptera: thripidae), is conferred by reduced sensitivity of the sodium channel and CYP450-mediated detoxification. *Appl Entomol Zool* 4: 443-448, 2012.
2. Bao WX, Kataoka Y, Kohara Y, Sonoda S (2014) Genomic organization of sodium channel α -subunit genes from strains of melon thrips, *Thrips palmi*, with different sensitivities to cypermethrin. *Pestic Biochem Physiol* 108: 80-85, 2014.
3. Bao WX, Narai Y, Nakano A, Kaneda T, Murai T, Sonoda S (2014) Spinosad resistance of the melon thrips, *Thrips palmi*, is conferred by G275E mutation in $\alpha 6$ subunit of nicotinic acetylcholine receptor and cytochrome P450 detoxification. *Pestic Biochem Physiol* 112: 51-55, 2014.