

チョウ目害虫における BT 剤および Bt 毒素抵抗性の現状と原因遺伝子の同定

独立行政法人農業生物資源研究所 ^{みやもと}宮本 ^{かずひさ}和久・^{あつみ}渥美 ^{しょうご}省吾・^{やまもと}山本 ^{きみこ}公子・
^{せづつ}瀬筒 ^{ひでき}秀樹・^{のだ}野田 ^{ひろあき}博明

はじめに

BT 剤は昆虫病原細菌の一種である *Bacillus thuringiensis* (Bt 菌) の培養物由来の殺虫剤である。本剤は 1960 年に米国で初めて殺虫剤として登録されたが、日本では養蚕業への影響などが懸念されたため導入が遅れ、1981 年に死菌製剤が、続いて 1982 年に生菌製剤が登録された (鮎沢, 1991)。

Bt 菌は生育環境が悪化すると細胞内に胞子を作るが、その際、ピラミッドを二つ重ねたような形状の結晶体も作る (図-1)。これは BT 剤が示す殺虫活性の本体で、分子量約 130 kDa の殺虫性毒素タンパク質が結晶化したものであり、Bt 毒素 δ -内毒素、あるいはクリスタル等と呼ばれている。ここでは殺虫性毒素タンパク質のことを Cry 毒素と呼ぶことにする。

BT 剤は昆虫の病原細菌由来の殺虫剤なので、他の化学薬剤とは異なり害虫の抵抗性は発達しにくいと考えられていたが、1980 年代後半よりコナガで抵抗性の発達が報告され始めた。さらに、近年、Cry 毒素遺伝子を組み込んで毒素タンパク質を植物体内で発現する害虫耐性作物 (Bt 作物) に対しても抵抗性害虫が出現して問題となっている。そこで、筆者らはチョウ目昆虫の中で遺伝子の研究が最も進んでいるカイコを用いて Cry 毒素抵抗性遺伝子の一つを明らかにした。ここではまず、BT 剤および Bt 作物に対する害虫の抵抗性発達状況の概要を説明する。その後、これまでに明らかになった Cry 毒素抵抗性の機構およびカイコを用いた Cry 毒素抵抗性遺伝子同定の経緯を紹介し、研究成果であるチョウ目害虫の Cry 毒素抵抗性発達制御への応用などについて考察する。

I チョウ目害虫の BT 剤および Bt 作物抵抗性発達状況

1 BT 剤抵抗性

BT 剤は他の化学薬剤に抵抗性となったコナガの防除に使われたが、1980 年代後半より BT 剤抵抗性コナガの出現が世界各地で報告された。1986 年から 1987 年にかけてハワイのクレソン栽培農家より採集されたコナガで抵抗性発達が認められたのを皮切りに、フィリピンや中国等でも同様にコナガの BT 剤抵抗性発達が認められた (FERRÉ et al., 1991; ZHAO et al., 1993)。我が国では 1988 年に温室で栽培されているクレソンを加害するコナガで BT 剤抵抗性の発達が報告された (田中・木村, 1991)。コナガ以外では、米国のブロッコリーを栽培している温室で、イラクサギンウワバ *Trichoplusia ni* が抵抗性を発達させた (JANMAAT and MYERS, 2003)。多くの場合、抵抗性形質は劣性遺伝する少数の遺伝子に支配されており BT 剤による選抜をやめると十数世代で感受性が元に戻っている (HAMA et al., 1992; TABASHNIK et al., 1994)。

2 Bt 作物抵抗性

遺伝子組換え技術により開発された、Cry 毒素を発現する耐虫性のトウモロコシやワタが、1990 年代後半から米国を中心に商業栽培され始め、2011 年には世界に

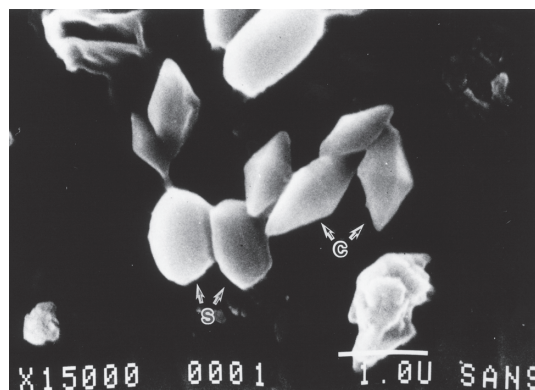


図-1 昆虫病原細菌 *Bacillus thuringiensis* の胞子 (S) と殺虫性タンパク質の結晶体 (C)

Bt Toxin Resistance in Lepidopteran Insect Pests and the Gene Related to the Resistance in the Silkworm, *Bombyx mori*. By Kazuhisa MIYAMOTO, Shogo ATSUMI, Kimiko YAMAMOTO and Hiroaki NODA

(キーワード: *Bacillus thuringiensis*, BT 剤, Cry 毒素, Bt 作物, チョウ目, 抵抗性遺伝子, ABC トランスポーター, カイコ)

* 現所属: 石原産業株式会社 中央研究所

おけるその栽培面積が 6 千 600 万 ha 以上に及んでいる (TABASHNIK et al., 2012)。一方で、コナガの BT 剤抵抗性発達を踏まえて、組換え作物に対する害虫の抵抗性発達を抑制する手法として、抵抗性遺伝子が劣性であることを利用して、組換えを行っていない作物を一定の面積栽培して優性の感受性遺伝子を害虫個体群内で維持させる手法 (Refuge 戦略) がとられた。さらに、抵抗性が簡単には発達しないよう殺虫作用の異なる二種類の Cry 毒素を組換え体で発現させる方法 (Cry gene stacking) も開発され、実際に栽培されている。こうした手法により、ターゲットの害虫の抵抗性発達は抑えられたかに思われた。しかし、2007 年に南アフリカでヤガ科の一種 *Busseola fusca* で Cry 毒素の一種の Cry1Ab 毒素を発現するトウモロコシに対して抵抗性発達が報告された。さらに、2008 年には米国でタバコガの一種 *Heriothis zea* が、そして、2011 年にはインドでワタアカミムシ *Pectinophora gossypiella* がそれぞれ Cry1Ac を発現するワタに対して抵抗性を発達させたことが報告された。一方、トウモロコシでは 2010 年にプエルトリコでヨトウガ *Spodoptera frugiperda* が Cry1F を発現するトウモロコシに対して抵抗性を発達させたことが、さらに 2011 年には、コウチュウ目でも、ハムシの一種が、コウチュウ目

に特異的な Cry3 に属する毒素を発現するトウモロコシに対して抵抗性になったことが報告された。(表-1)。これらの抵抗性発達の原因の一つとして、Refuge 戦略の徹底不足が推定されている (WAN et al., 2012)。

II 抵抗性発達のメカニズム

前述のように Cry 毒素に対してコナガをはじめ多くのチョウ目昆虫で抵抗性発達が報告された。そこで抵抗性発達のメカニズムの解明が進められている。まず、毒素の作用機構と関連させてこれまでに明らかになった知見を紹介する。

1 Cry 毒素の作用機構

δ -内毒素 (クリスタル) を構成する Cry 毒素タンパク質 (分子量約 130 kDa) はプロトキシンとも呼ばれ、そのままでは殺虫活性は示さない。昆虫がこのクリスタルを食下すると消化液のアルカリ性によりクリスタルが溶解し、消化液中のタンパク質分解酵素の働きでタンパク質の N 末端の数十残基とカルボキシル末端側から全体の約半分程度のアミノ酸残基が除去されて、分子量約 60 kDa の活性化毒素となり、これが中腸上皮細胞に作用して細胞を崩壊させ、昆虫を死に至らしめるとされている。細胞崩壊の機構については二つの説がある。一つ

表-1 Bt 作物に対して抵抗性が発達した害虫個体群の事例

報告年	供試虫の採集地	昆虫	Bt 作物	Bt 作物で発現する Cry 毒素	文献	備考
2007	南アフリカ	ヤガ科 <i>Busseola fusca</i>	トウモロコシ	Cry1Ab	Van Rensburg, 2007.	Bt 作物に対する野外での最初の抵抗性発達事例
2008	米国南東部	ヤガ科 <i>Helicoverpa zea</i>	ワタ	Cry1Ac	Tabashnik et al., 2008.	6 地点で採取したコロニーが LC ₅₀ 値比較で 100 倍以上の抵抗性
2010	プエルトリコ	ツマジロクサヨトウ <i>Spodoptera frugiperda</i>	トウモロコシ	Cry1F	Storer et al., 2010.	4 地点で採取したコロニーが LC ₅₀ 値比較で 10 倍以上の抵抗性、抵抗性は劣性遺伝
2010	オーストラリア	ヤガ科 <i>Helicoverpa punctigera</i>	ワタ	Cry1Ac Cry2Ab	Downes et al., 2010.	Cry2Ab 抵抗性遺伝子頻度が Bt ワタ栽培区で 8 倍に上昇、2 種類の Cry 毒素産生ワタにも抵抗性害虫出現
2010	インド西部	ワタアカミムシ <i>Pectinophora gossypiella</i>	ワタ	Cry1Ac	Dhuria and Gujar, 2011.	1 地点で採集したコロニーが LC ₅₀ 値の比較で 44 倍の抵抗性
2011	米国アイオワ州	ハムシ科 <i>Diabrotica virgifera virgifera</i>	トウモロコシ	Cry3Bb1	Gassmann et al., 2011.	コウチュウ目で野外で抵抗性が発達した最初の例
2011	中国北部	オオタバコガ <i>Helicoverpa armigera</i>	ワタ	Cry1Ac Cry2Ab	Zhang et al., 2011.	6 地点で採集したコロニーは LC ₅₀ 値が有意に高く、抵抗性発達の兆候がある
2012	中国揚子江流域	ワタアカミムシ	ワタ	Cry1Ac	Wan et al., 2012.	調査 11 箇所のうち 4 箇所で 4 倍以上の抵抗性

は活性化毒素が細胞の表面にあるカドヘリン様タンパク質という受容体に結合後、部分消化を受けてオリゴマー化して第二の受容体に結合し、細胞膜にイオンチャンネルを形成して、そこから水やイオンが細胞内に流入して細胞が膨潤して破裂するという説である。なお、第二の受容体として、アミノペプチダーゼ N やアルカリフォスファターゼ等があげられている。もう一つの説は、活性化毒素が中腸上皮細胞表面のカドヘリン様タンパク質受容体に結合することでシグナル伝達系が活性化され、細胞内の二次情報伝達物質とされる環状アデノシンリン酸 (cAMP) 濃度の上昇とプロテインキナーゼ A の活性化が起り、細胞死のプログラムの一つであるオンスコース (細胞の膨張による死) を誘導するという説である。なお、両説ともプロトキシンの活性化から活性化毒素が中腸上皮細胞膜上にあるカドヘリン様タンパク質に結合するところまでは同じである (BRAVO et al., 2011)。

2 抵抗性の機構

前述の毒素の作用発現に至る一連の機構のいずれかをブロックすることで、昆虫は Cry 毒素抵抗性を獲得することが予想されるが、これまでに判明した抵抗性の機構は作用段階により大きく二つに分けられる。一つはプロトキシンの活性化にかかわるところ、もう一つは活性化毒素の受容体への結合にかかわるところである。

前者については、毒素の活性化に重要な中腸消化液中のタンパク質分解酵素 (プロテアーゼ) の活性の変異が抵抗性の発達に関与する事例が見つかっている。すなわち、ノシメダラメイガの BT 剤抵抗性系統では中腸消化液中のプロテアーゼ活性の低下が認められ、主要なセリンプロテアーゼ活性を欠いていた。このプロテアーゼはプロトキシンの活性化に関与しており、その消失は抵抗性の発達と遺伝的にリンクしていた (OPPERT, 1999)。

一方、中腸上皮細胞の Cry 毒素受容体の変異に関しては、まず、中腸組織由来の刷子縁膜小胞 (BBMV) と毒素との結合性に関する研究が行われ、コナガにおいて、Cry1Ab 感受性系統の BBMV には、Cry1Ab 毒素が結合したが、Cry1Ab に 200 倍以上の抵抗性を示す系統の BBMV へは Cry1Ab 毒素の結合はほとんど認められないと報告 (FERRÉ et al., 1991) された。また、Cry1Ac 毒素抵抗性コナガ系統でも同様の結果が得られている (TABASHNIK et al., 1994)。

その他の抵抗性機構として考えられるのは、中腸上皮組織と消化液との間にある薄い膜でタンパク質、キチンおよびムコ多糖よりなると考えられている囲食膜に関連する抵抗性機構である。Cry1Ac に対して抵抗性のカイコで、Cry1Ac 毒素が囲食膜に結合することが観察され、

囲食膜による毒素の中腸上皮細胞への到達の阻害が抵抗性の一因ではないかと考えられている (HAYAKAWA et al., 2004)。

3 抵抗性の遺伝様式と遺伝子

チョウ目昆虫における BT 剤や BT トキシン抵抗性の遺伝様式については多くの研究が行われている。抵抗性は、劣性あるいは不完全な劣性を示す場合が多い。しかし、共優性に近い様式や、完全優性に近い遺伝様式も報告されている (FERRÉ and Van RIE, 2002)。コナガにおいては、*B. thuringiensis* serovar *kurstaki* HD-1 株抵抗性は、劣性の単一遺伝子座モデルによく適合していた (TABASHNIK et al., 1992)。HAMA et al. (1992) も同様な結果を得ている。一方、同じコナガでも、マレーシアの Cry1Ac 抵抗性系統では、抵抗性遺伝子は不完全優性であった (SAYYED and WRIGHT, 2001)。さらに、トウモロコシの重要な害虫の一つであるヨーロッパアワノメイガ *Ostrinia nubilalis* でも、実験室内での BT 剤による選抜で、約 70 倍の抵抗性を示し、不完全優性遺伝をする抵抗性遺伝子を持った系統が得られた (HUANG et al., 1999)。優性遺伝をする抵抗性遺伝子の発見は、抵抗性遺伝子が劣性遺伝をすることを前提に、Cry 毒素を発現するワタやトウモロコシ栽培等において実施されている Refuge 戦略が、害虫個体群における抵抗性の発達を防ぐうえで常に有効な手段とは言えないことを示している。

抵抗性遺伝子の座位、さらにはその本体の究明を目指した研究も行われている。コナガやニセアメリカタバコガ *Heliothis virescens* でそれぞれの分子遺伝子地図上への抵抗性遺伝子のマッピングが行われ、ニセアメリカタバコガでは、Cry1 グループの毒素に対する受容体の一つであるカドヘリン様タンパク質 (NAGAMATSU et al., 1999) の変異が Cry1Ac 抵抗性の原因である可能性が高いことが明らかになった (GAHAN et al., 2001)。また、ワタアカミムシの Cry1Ac に対する抵抗性、およびオオタバコガ *Helicoverpa armigera* の Cry1Ac 抵抗性についても同じカドヘリン様タンパク質遺伝子の変異が関与していると報告されている (MORIN et al., 2003; XU et al., 2005; YANG et al., 2007)。

さらには、ニセアメリカタバコガでは GPI アンカーによって細胞膜表面につなぎ止められたアルカリフォスファターゼの変異が Cry1Ac 抵抗性と関連しているとの報告もある (JURAT-FUENTES and ADANG, 2004)。また、カドヘリン様タンパク質と同様に以前から受容体の候補として知られているアミノペプチダーゼ N について、そのグループの一つの遺伝子がシロイチモジトウ

Spodoptera exigua の抵抗性系統で発現していないことから、この遺伝子の抵抗性への関与が示唆されている (HERRERO et al., 2005)。最近、ニセアメリカタバコガを用いた Cry1Ac 毒素抵抗性遺伝子のポジショナルクローニングにより、抵抗性は ABC トラnsポーター (ABCC2) という膜タンパク質をコードしている遺伝子の変異が原因である可能性が高いと報告された。ABCC2 は ATP のエネルギーを用いて膜を介した物質の輸送を担う膜タンパク質の一つで、ほ乳類では薬剤の排出等に関与している (新見ら, 2005)。ニセアメリカタバコガの ABCC2 タンパク質は約 1,300 個のアミノ酸により構成されているが、Cry1Ac 毒素抵抗性系統では ABCC2 遺伝子のアミノ酸をコードしている部分で 22 個の塩基対が欠失しており、フレームシフト変異により ABCC2 遺伝子は 100 番目のアミノ酸残基以降翻訳されていないと推定された (GAHAN et al., 2010)。さらに、この遺伝子の変異はコナガとイラクサギンウワバでも抵抗性発達に関与している可能性が高いと報告された (BAXTER et al., 2011)。

III カイコの Cry 毒素抵抗性

筆者らはコナガなどチョウ目害虫で問題となっている BT 剤抵抗性発達の機構解明に、同じくチョウ目昆虫で

分子生物学や遺伝学的研究が最も進んでいるカイコを利用できないかと考え、カイコ品種の Cry 毒素抵抗性を調査した。

1 カイコ系統の Bt 菌およびその Cry 毒素に対する抵抗性

BT 剤の養蚕業への影響を調べるため、あるいは BT 剤に強いカイコ系統の探索を目的にカイコ品種の BT 菌に対する抵抗性の程度が調査された。鮎沢ら (1962) は 2 種類の Bt 菌に対するカイコ交雑種 3 品種の感受性調査で、カイコ品種の感受性が有意に異なることを明らかにした。ついで、小野 (1966) は *B. thuringiensis* serovar *sotto* を用い、品種の感受性に 100 倍近い差異があることを示した。Liu (1984) は Bt 菌に対するカイコ 33 系統の感受性を比較し、134 倍の系統間差異を認めている。筆者らは上記目的により、カイコ地域型品種 126 種の Cry1Ab 感受性を調べたところ、最大約 2 万 5 千倍の差異があった。抵抗性の品種は日本種や中国種で多く認められ、感受性の品種は欧州種や熱帯種に多かった (宮本ら, 1999; 図-2)。次に、Cry1Ab に対する感受性に特徴のあったカイコ品種について Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac および Cry2Aa に対する感受性を比較したところ、Cry1Ab と Cry1Ac の品種間差異に関連が認められた。すなわち、供試したほとんどの品種が両毒素に対し

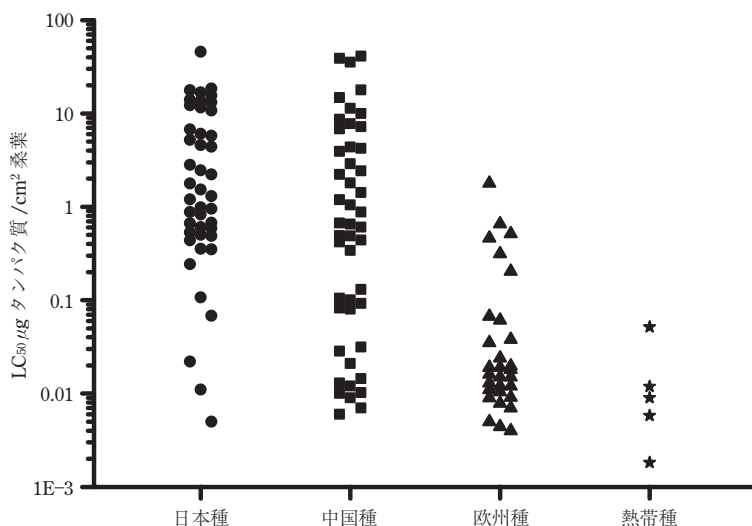


図-2 カイコ地理的品種の *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab 毒素に対する感受性の比較

日本種 (●) 44 品種, 中国種 (■) 47 品種, 欧州種 (▲) 30 品種, 熱帯種 (★) 5 品種を供試。大腸菌で発現させた Cry1Ab 毒素をアルカリ条件下で可溶化して 4 倍階段希釈後、各希釈液を桑葉に塗布 (10 μl/cm²) した。風乾後、カイコふ化幼虫に食下させ 25℃ で飼育した。4 日後の死亡率よりプロビット法で LC50 を求めた。カイコは各濃度区当たり約 30 頭供試した。

て同様の感受性を示した。一方, Cry1Ab と Cry1Aa および Cry2Aa 間には関連は認められなかった (宮本, 2004; 宮本ら, 2007)。この結果は, ニセアメリカタバコガ, ワタアカミムシ, コナガ等で見られた Cry1Ab と Cry1Ac に対する交差抵抗性と類似していた (GOULD et al., 1995; TABASHNIK et al. 2000; SAYYED and WRIGHT, 2001)。なお, Cry1Ab 抵抗性 1 系統 (支 2 号) と感受性 1 系統 (輪月) 間の比較では消化液中における Cry1Ab 毒素の活性化に関しては大きな差異は認められなかった。このことから中腸上皮細胞への結合の段階で差異があるのではないかと推定されたが, 結合性についても両系統間で差は見られなかった (ATSUMI et al., 2012)。

2 カイコの持つ Cry1Ab 毒素抵抗性遺伝子

カイコの持つ Cry1Ab 毒素抵抗性遺伝子の遺伝学的性状を調べるため, Cry1Ab 毒素抵抗性の支 2 号 (C2) と感受性の輪月 (Rin) との間で交配した雑種第一代 (F₁) の感受性を調査した。F₁ はすべて感受性であった。さらに, F₁ を C2 と交配した戻し交雑個体では抵抗性個体と感受性個体が 1:1 に近い比率で存在していた。このことはコナガなどで報告されているように, 抵抗性は劣性の主遺伝子により支配されていることを示している。そこで, HARA et al. (2005) は EST (expressed sequence tag, 発現配列タグ) をマーカーにして構築したカイコの分子遺伝子地図 (原ら, 2001) 上における座位を調査した。その結果, この遺伝子はカイコの 28 個の連関群 (染色体に対応) のうちの第 15 連関群 (第 15 番染色体) に座位していることがわかった。一方, 受容体の候補タンパク質であるカドヘリン様遺伝子とアミノペプチダーゼ N 遺伝子は第 15 連関群とは別の連関群に座位していた。この結果から, カイコの Cry1Ab 毒素抵抗性に関与する遺伝子は, これら, 受容体候補遺伝子とは直接の関連はないことがわかった。一方で, カイコのゲノム解読研究が進み, 遺伝子地図に基づいた遺伝子のクローニングが可能となってきたため, 筆者らはポジショナルクローニング法によるこの遺伝子のクローニングを試みた。ポジショナルクローニングとは遺伝子地図上の位置情報から遺伝子をクローニングするという手法である。この手法を用いて候補遺伝子が第 15 連関群 (染色体) のどの位置にあるかを詳細に調べた。抵抗性遺伝子が劣性の場合, 雑種第一代 (F₁) を抵抗性の親と交雑して得た戻し交雑個体では抵抗性個体と感受性個体の割合が 1:1 に分離する。このことを利用して抵抗性の雌と F₁ の雄との間で交配を行った。雄を F₁ にしたのは, カイコでは雄のみで相同染色体間で交差が起るためである。こうして得た戻し交雑個体のうち, 感受性の幼虫が致死す

る濃度の毒素を処理したクワを与えても生育した幼虫 (Cry1Ab 毒素抵抗性) から DNA を抽出して遺伝子解析を進めた。抵抗性を示した約 1,350 個体の遺伝子を解析して, 抵抗性遺伝子が座乗する領域を 81.9 kbp まで絞り込み, さらに毒素の標的である中腸で働く遺伝子に絞ったところ, 二つの遺伝子 (BGIBM007735, BGIBM007792-93) が候補として残った。そこで, カイコの両系統間で二つの遺伝子のアミノ酸配列を比較したところ, BGIBM007792-93 でのみ両系統間のアミノ酸配列に違いがあった。そこで, この遺伝子を抵抗性の候補遺伝子とし, さらに, Cry1Ab 毒素抵抗性カイコ 6 系統と感受性カイコ 9 系統について候補遺伝子のアミノ酸配列を推定して比較したところ, 抵抗性系統はいずれも N 末端から数えて 234 番目にチロシンが 1 個余分に入っており, これが抵抗性の原因と推定された (図-3)。このことから, BGIBM007792-93 を抵抗性遺伝子の本体と推定した。なお, この遺伝子は前述の ABC トランスポーター (ABCC2) と同じ遺伝子であった。

次にこの遺伝子が抵抗性遺伝子であることを裏付けるため, 遺伝子組換え技術を用いて, 感受性カイコの ABC トランスポーター遺伝子を抵抗性カイコに導入して中腸で働かせた。Cry1Ab 毒素抵抗性カイコ系統であ

J1_R	VQA	AVV	LYFLY	YIS	AGY	APFV	VGFF
Ki_R	VQA	AVV	LYFLY	YIS	AGY	APFV	VGFF
Be_R	VQA	AVV	LYFLY	YIS	AGY	APFV	VGFF
C2_R	VQA	AVV	LYFLY	YIS	AGY	APFV	VGFF
C7_R	VQA	AVV	LYFLY	YIS	AGY	APFV	VGFF
Csek_R	VQA	AVV	LYFLY	YIS	AGY	APFV	VGFF
N15_R	VQA	AVV	LYFLY	YIS	AGY	APFV	VGFF
Yosh_S	VQA	AVV	LYFLY	YIS	AGY	APFV	VGFF
Bag_S	VQA	AVV	LYFLY	YIS	AGY	APFV	VGFF
N65_S	VQA	AVV	LYFLY	YIS	AGY	APFV	VGFF
Eu12_S	VQA	AVV	LYFLY	YIS	AGY	APFV	VGFF
Ann_S	VQA	AVV	LYFLY	YIS	AGY	APFV	VGFF
CamM_S	VQA	AVV	LYFLY	YIS	AGY	APFV	VGFF
My_S	VQA	AVV	LYFLY	YIS	AGY	APFV	VGFF
PMY_S	VQA	AVV	LYFLY	YIS	AGY	APFV	VGFF
Rin_S	VQA	AVV	LYFLY	YIS	AGY	APFV	VGFF
e21_S	VQA	AVV	LYFLY	YIS	AGY	APFV	VGFF

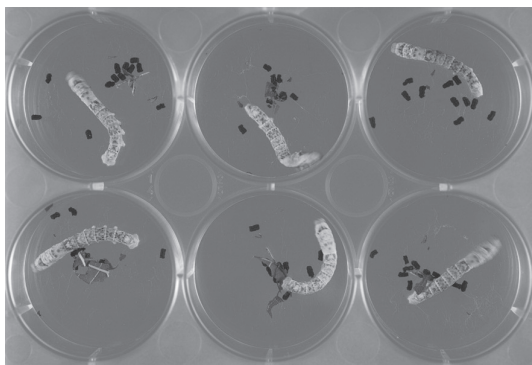
図-3 Cry1Ab 毒素抵抗性カイコ 7 系統および感受性カイコ 10 系統の抵抗性候補遺伝子 (007792-93) の推定されるアミノ酸配列の比較

N 末端より 223 ~ 246 番目までのアミノ酸シーケンスを比較したところ, 抵抗性系統 (上から 7 系統) では 234 番目にチロシン (Y) が共通に挿入されていた。一方, 感受性系統はすべて 234 番目のチロシンを欠いていた。左端のアルファベットや数字はカイコの系統名を示す。R: 抵抗性系統, S: 感受性系統。

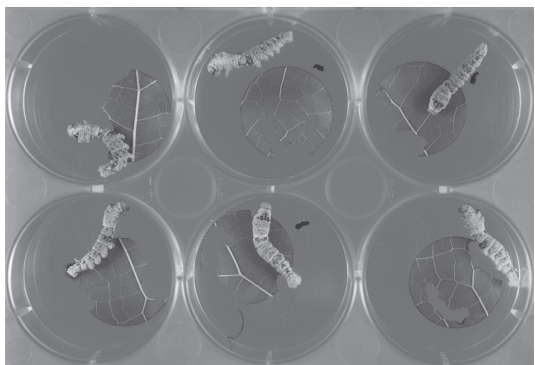
る C2 が持っている抵抗性遺伝子は劣性であるため、感受性系統に導入してもその形質はほとんど変化しないと予想される。一方、感受性カイコが持っている、抵抗性遺伝子の対立遺伝子である優性の感受性遺伝子を抵抗性系統の個体に導入して中腸細胞で発現させるとその個体は感受性に転ずると期待される。そこで、感受性カイコ系統 Rin が持っている抵抗性候補遺伝子の対立遺伝子を抵抗性のカイコの中腸細胞で発現させ、幼虫の Cry 毒素抵抗性が変化するかどうかを調査した。遺伝子組み換えで感受性系統の遺伝子を導入した抵抗性系統の 2 齢幼虫および 4 齢幼虫に、感受性系統が死ぬ濃度の Cry1Ab 毒素を食べさせたところ、すべて死んでしまい (図-4)、抵抗性が感受性に変わったことがわかった。この結果から、抵抗性は ABC トランスポーター遺伝子の変異が原因であることが証明された。

これまで、ゲノム情報を元に見つけられた抵抗性遺伝子としては、カドヘリン様タンパク質と ABC トランスポーター (ABCC2) があげられる。ニセアメリカタバコガでは Cry1 毒素の受容体とされているカドヘリン様タンパク質コード遺伝子へのレトロトランスポゾンの挿入で遺伝子が破壊されて、毒素が結合できずに抵抗性になったと考えられている (GAHAN et al., 2001)。ワタアカミムシでも同じくカドヘリン様タンパク質の変異 (少なくとも 8 個のアミノ酸残基の欠失) が抵抗性の原因とされた (MORIN et al., 2003)。ABCC2 については、同じくニセアメリカタバコガで、コードしている遺伝子のエクソン 2 で 22 塩基の欠失によりフレームシフトが起きて、

本来は 1,339 個のアミノ酸残基からなる ABCC2 のタンパク質が 99 個アミノ酸残基と非常に短くなってしまっていると報告された (GAHAN et al., 2010)。また、Cry1Ac 抵抗性コナガでは ABCC2 の 12 番目の膜貫通ドメインのところで 10 アミノ酸残基の欠失が起きており、この膜貫通ドメインがなくなったと推定されている。このように、これまで見つけられている変異は、その分子の持つ機能をなくしたり、弱めたりしていると考えられる。一方、今回、カイコで見られた、ABCC2 への 1 個のアミノ酸残基の挿入による抵抗性発達においては、1 個のアミノ酸の変異は ABCC2 自体が持っている機能にはあまり影響を与えていないのではないかと考えられる。変異部位は消化管腔側に出ていると推定されるので、毒素が結合する部分に起きた変異とも考えられる (図-5)。一方、抵抗性系統の中腸由来の刷子縁膜小胞と Cry1Ab 毒素との結合実験では、毒素が結合することを確認した。しかし、細胞は表面にカドヘリン様のタンパク質を持っていると予想されるので、Cry 毒素がこちらに結合した可能性もある。これらの結果から、筆者らは、Cry1Ab 抵抗性カイコでは、Cry1Ab 毒素が第一受容体のカドヘリン様タンパク質に結合するが、第二受容体である ABCC2 の結合部位にチロシンが 1 個余分にあるため結合できなくなって毒性発現が抑えられたのではないかと考えている。ところで、膜タンパク質として知られている ABCC2 は細胞内の毒素などの排出に関与しているとの報告もあり (新見ら, 2005)、今後は ABCC2 の持つ機能が抵抗性に関与しているのかどうかといった問



感受性カイコ由来の ABC トランスポーター遺伝子を導入したが中腸で転写をさせなかった、Cry1Ab 毒素抵抗性カイコの 4 齢幼虫



感受性カイコ由来の ABC トランスポーター遺伝子を導入し、中腸で転写させた、Cry1Ab 毒素抵抗性カイコの 4 齢幼虫

図-4 形質転換カイコの殺虫試験

感受性カイコ由来の ABC トランスポーター遺伝子を導入し、中腸での発現を抑制したカイコは、本来 Cry1Ab 毒素抵抗性のため、Cry1Ab 毒素を塗布したクワの葉を 1 日食べても元気だったが (写真 左)、感受性カイコ由来の ABC トランスポーター遺伝子を導入し、中腸で発現させた抵抗性のカイコは、毒素感受性に変化し、毒素を散布したクワの葉を食べている途中ですべて死んでしまい、クワの葉が残った (写真 右)。

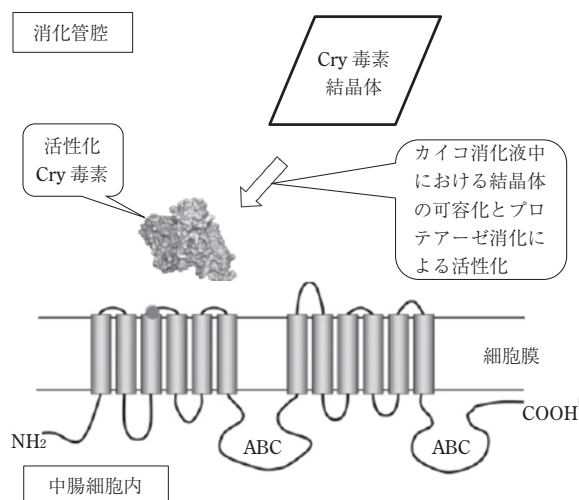


図-5 カイコの Cry1Ab 毒素抵抗性遺伝子コードタンパク質である膜タンパク質の一種「ABC トランスポーター (ABCC2)」の模式図

Cry1Ab 毒素抵抗性に関与している ABCC2 は 12 回膜貫通型のタンパク質で、ATP のエネルギーを用いて物質の輸送を行う膜輸送体の一つである。抵抗性カイコの持っている ABCC2 は、N 末端から 234 番目にチロシンが 1 個挿入されており (丸い印の部分)、細胞外の毒素が結合可能な部分で変異が起きていた。

ABC : ATP が結合するドメインで、ATP-binding cassette の略称

NH₂ : アミノ酸のアミノ基側

COOH : アミノ酸のカルボキシル基側

題も含めて、1 アミノ酸残基の挿入の有無で抵抗性形質が劇的に変わる原因を究明する必要がある。

IV 抵抗性遺伝子研究の今後の方向とその利用

本研究成果により、今後少なくとも二つの展開が可能となる。一つ目は、この ABC トランスポーターが、Cry 毒素が殺虫作用を示すうえでどのような働きをし、アミノ酸 1 個の挿入が抵抗性とうかがわれるのかを研究することで、まだ不明な点の多い Cry 毒素の作用の解明に寄与することである。

二つ目は、チョウ目害虫で見られる Cry 毒素抵抗性が、今回カイコで明らかにされた遺伝子と同じ遺伝子によって引き起こされているかどうかを調査することである。今回証明した抵抗性遺伝子に関しては、すでにコナガをはじめ一部の害虫で抵抗性への関与を示唆する報告が出ている。害虫の抵抗性遺伝子が解明されると、防除対象の害虫が Cry 毒素に抵抗性か否かを遺伝子解析により簡便にモニタリングする技術の開発が期待される。例えばコナガの場合は有機リン剤抵抗性系統では、有機

リン剤のターゲットであるアセチルコリンエステラーゼのアミノ酸の変異が原因であるとされている (Lee et al., 2007)。また、ピレスロイド抵抗性についてはナトリウムチャンネルにおけるアミノ酸の変異が原因とされており、この変異を遺伝子レベルで検出することで抵抗性遺伝子の野外個体群における頻度が調査されている (Sonoda et al., 2012)。このように、様々な殺虫剤抵抗性の原因が遺伝子レベルで判明してきており、薬剤抵抗性が発達しやすいコナガの場合は、将来、フェロモントラップなどで採取した個体の遺伝子を調べることで、防除対象となる地域の個体群における、各種薬剤に対する抵抗性遺伝子頻度の推定が可能となると考えられる。そして、ゲノム研究の進展の早さを考えると、薬剤抵抗性遺伝子頻度の推定から散布する薬剤を選択するといった日が訪れるのもそう遠くはないと思われる。

おわりに

筆者らが所属している独立行政法人農業生物資源研究所の前身の一つは蚕糸試験場であった。そのため、現在も、カイコを材料とした研究が続けられているが、蚕糸業の衰退に伴い、研究テーマはゲノムや遺伝子組換え等の先端的基礎的な方面に特化してきている。しかし、現在もカイコ遺伝資源として 477 系統を、また、クワ遺伝資源として 752 系統を保存している。カイコの遺伝資源には日本在来種のほか、中国在来種、ヨーロッパ在来種、熱帯種等世界各地から収集された様々な変異を持つ系統が含まれており、現地ではすでに消失してしまった系統も多く、世界的に見ても貴重な遺伝資源と考えられる。今回解明した Cry1Ab 毒素抵抗性遺伝子は地域系統間で大きな感受性変異を見つけたことが出発点となった。この地域系統間で認められた変異は連続的な変異であったが、これが ABC トランスポーターの変異だけで説明できるとは思われず、連続的な変異に関与する遺伝子の究明は今後の研究課題の一つである。カイコはチョウ目昆虫として見た場合、生理学、生化学、遺伝学、病理学等の多くの研究蓄積があり、ゲノム情報や遺伝子組換え技術等の分子生物学に必要なツールも充実している。さらには、前述のように遺伝資源も豊富であるため、今後、農業分野を含む昆虫研究、特にチョウ目昆虫の研究において様々な課題を遺伝子レベルで解明する際に、モデル昆虫として利用する価値が十分あると思われる。例えば、カイコは濃核病ウイルスというパルボウイルス科に属するウイルス感染に対しても抵抗性に大きな系統間変異があり、この抵抗性遺伝子のポジショナルクローニング法による解明からウイルスの受容体が明らかにされつ

つある (Iro et al., 2008)。カイコ遺伝資源の維持には多くの時間と労力が費やされてきているが、今回の研究を通して、この遺伝資源は膨大な遺伝子変異を含む世界的に大変貴重なコレクションであると感じた。筆者らは、現在コナガを用いてBT剤抵抗性の研究を行っているが、これからも、抵抗性遺伝子の究明にカイコ遺伝資源とゲノム情報や様々なツールを是非活用したいと考えている。

引用文献

- 1) 鮎沢啓夫 (1991): 新ファール昆虫記 (一億人の科学), 日本化学会編, 大日本図書: p. 182 ~ 194.
- 2) ———ら (1962): 日蚕雑 31: 253 ~ 257.
- 3) ATSUMI, S. et al. (2012): Proc. Natl. Acad. Sci. USA 109: E1591 ~ E1598.
- 4) BAXTER, S. W. et al. (2011): GENETICS 189: 675 ~ 679.
- 5) BRAVO, A. et al. (2011): Insect Biochem. Mol. Biol. 41: 423 ~ 431.
- 6) DHURUA, S. and G. T. GUJAR (2011): Pest Manag. Sci. 67: 898 ~ 903.
- 7) DOWNES, S. et al. (2010): PLoS ONE 5: e12567.
- 8) FERRE, J. et al., (1991): Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 88: 5119 ~ 5123.
- 9) ——— and J. Van RIE (2002): Annu. Rev. Entomol. 47: 501 ~ 533.
- 10) GAHAN, L. J. et al. (2001): Science 293: 857 ~ 860.
- 11) ——— et al. (2010): PLoS Genet. 6: e1001248.
- 12) GASSMANN, A. J. et al. (2011): PLoS ONE 6: e22629.
- 13) GOULD, F. et al. (1995): J. Econ. Entomol. 88: 1545 ~ 1559.
- 14) HAMA, H. et al. (1992): Appl. Entomol. Zool. 27: 355 ~ 362.
- 15) 原 和二郎ら (2001): 日蚕雑 70: 135 ~ 143.
- 16) HARA, W. et al. (2005): Biotechnology of *Bacillus thuringiensis*., Edited by N.D. Binh et al., Science and Technics Publishing House, Vietnam, Proceedings.
- 17) HAYAKAWA, T. et al. (2004): FEBS Letters 576: 331 ~ 335.
- 18) HERRERO, S. et al. (2005): BMC Genomics 6: 96 ~ 105.
- 19) HUANG, F. et al. (1999): Science 284: 965 ~ 967.
- 20) ITO, K. et al. (2008): Proc. Natl. Acad. Sci. USA 105: 7523 ~ 7527.
- 21) JANMAAT, A. F. and J. MYERS (2003): Proc. R. Soc. Lond. B. 270: 2263 ~ 2270.
- 22) JURAT-FUENTES, J. L. and M. J. ADANG (2004): Eur. J. Biochem. 271: 3127 ~ 3135.
- 23) LEE, D-W. et al. (2007): Biochem. Biophys. Res. Commun. 353: 591 ~ 597.
- 24) LIU, S. X. (1984): Sericologia 24: 377 ~ 382.
- 25) 宮本和久ら (1999): 平成 10 年度研究成果情報 (蚕糸・昆虫機能), 農林水産省 蚕糸・昆虫農業技術研究所: p. 42 ~ 43.
- 26) ——— (2004): 第 6 回昆虫病理研究会シンポジウム講要: p. 27.
- 27) ———ら (2007): 第 13 回 BT 研究会~新潟弥彦大会~プロシーディングス: p. 54 ~ 59.
- 28) MORIN, S. et al. (2003): Proc. Natl. Acad. Sci. USA 100: 5004 ~ 5009.
- 29) NAGAMATSU, Y. et al. (1999): FEBS Letters 460: 385 ~ 390.
- 30) 新見昌一ら (2005): 真菌誌 46: 249 ~ 260.
- 31) 小野恵子 (1966): 埼玉蚕試要報 38, 61 ~ 63.
- 32) OPPERT, B. (1999): Arc. Insect Biochem. Physiol. 42: 1 ~ 12.
- 33) SAYYED, A. H. and D. J. WRIGHT (2001): Pest Manag. Sci. 57: 413 ~ 421.
- 34) SONODA, S. et al. (2012): Pestic. Biochem. Physiol. 102: 102 ~ 105.
- 35) STOREY, N. P. et al. (2010): J. Econ. Entomol. 103: 1031 ~ 1038.
- 36) TABASHNIK, B. E. et al. (1992): J. Econ. Entomol., 85: 1046 ~ 1055.
- 37) ——— et al. (1994): Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 91: 4120 ~ 4124.
- 38) ——— et al. (2000): Appl. Environmen. Microbial. 66: 4582 ~ 4584.
- 39) ——— et al. (2008): Nature biotec. 26: 199 ~ 202.
- 40) ——— et al. (2012): J. Invertebr. Pathol. 110: 301 ~ 306.
- 41) 田中 寛・木村 裕 (1991): 応動昆 35: 253 ~ 255.
- 42) Van RENSBURG, J. B. J. (2007): S. Afr. J. Plant Soil. 24: 147 ~ 151.
- 43) WAN, P. et al. (2012): PLoS ONE 7: e29975.
- 44) XU, X. et al. (2005): Appl. Environ. Microbiol. 71: 948 ~ 954.
- 45) YANG, Y. et al. (2007): ibid. 73: 6939 ~ 6944.
- 46) ZHANG, H. et al. (2011): PLoS ONE 6: e22874.
- 47) ZHAO, J.-Z. et al. (1993): Resistant Pest Manage. 5: 11 ~ 12.

(新しく登録された農薬 15 ページからの続き)

移植水稻: 水田一年生雑草, マツバイ, ホタルイ, ウリカワ, ミズガヤツリ (北海道を除く), ヘラオモダカ (北海道, 東北), ヒルムシロ, セリ (北海道, 東北を除く)

●プロピリスルフロンのベンゾビスシクロン水和剤 ※新混合剤

23155: ブルゼータフロアブル (住友化学) 12/11/07

23156: SDS ブルゼータフロアブル (エス・ディー・エス バイオテック) 12/11/07

プロピリスルフロンの 1.7%

ベンゾビスシクロン: 3.9%

移植水稻: 水田一年生雑草, マツバイ, ホタルイ, ウリカワ, ミズガヤツリ (北海道を除く), ヘラオモダカ (北海道, 東北), ヒルムシロ, セリ (北海道, 東北を除く), オモダカ (九州を除く), クログワイ (北海道, 九州を除く), シズイ (東北), コウキヤガラ (関東・東山・東海, 九州)

●プロピリスルフロンのベンゾビスシクロン粒剤 ※新混合剤

23157: ブルゼータ 1 キロ粒剤 (住友化学) 12/11/07

23158: SDS ブルゼータ 1 キロ粒剤 (エス・ディー・エス

バイオテック) 12/11/07

プロピリスルフロンの 0.90%

ベンゾビスシクロン: 2.0%

移植水稻: 水田一年生雑草, マツバイ, ホタルイ, ウリカワ, ミズガヤツリ (北海道を除く), ヘラオモダカ (北海道, 東北), ヒルムシロ, セリ (北海道, 東北を除く), オモダカ (九州を除く), クログワイ (北海道, 九州を除く), コウキヤガラ (関東・東山・東海, 近畿・中国・四国, 九州)

●プロピリスルフロンのベンゾビスシクロン粒剤 ※新混合剤

23159: ブルゼータジャンボ (住友化学) 12/11/07

23160: SDS ブルゼータジャンボ (エス・ディー・エス バイオテック) 12/11/07

プロピリスルフロンの 4.5%

ベンゾビスシクロン: 10.0%

移植水稻: 水田一年生雑草, マツバイ (北陸を除く), ホタルイ, ヘラオモダカ (北海道, 東北), ミズガヤツリ (北海道を除く), ウリカワ, ヒルムシロ, セリ (関東・東山・東海, 近畿・中国・四国, 九州)