

(続紙 1)

京都大学	博士 (農 学)	氏名	杉本 直也
論文題目	Genetic study on acaricide resistance in the two-spotted spider mite, <i>Tetranychus urticae</i> (Acari: Tetranychidae) (ナミハダニの殺ダニ剤抵抗性に関する遺伝学的研究)		
(論文内容の要旨)			
<p>化学的防除が重要な役割を担う現代の害虫防除において、薬剤抵抗性は深刻な問題である。特に農業害虫であるナミハダニでは、殺ダニ剤に対する抵抗性の発達が著しく、本種が問題となる果樹・蔬菜等の作物では、抵抗性マネジメントが重要な課題となっている。</p> <p>薬剤抵抗性の生理機構は主に、解毒酵素の活性増大や薬剤作用点の構造的変異に大別される。それらが複数の薬剤に共通して作用することで、交差抵抗性が引き起される。従来、交差抵抗性は同一作用機作の薬剤間で生じると考えられてきたが、ナミハダニでは近年、異なる作用機作分類群間での交差抵抗性を示唆する報告事例がある。しかし、その実態やメカニズムについては知見がほとんどなかった。そこで本論文は、各種殺ダニ剤について抵抗性機構を解析し、異なる作用機作分類群間における交差抵抗性について検証した(第3・4・5章)。さらに、ナミハダニのゲノム全域を網羅するマイクロサテライト連鎖地図を作成し(第6章)、ゲノムワイドなQTLマッピングと網羅的遺伝子発現解析を組み合わせた手法を用いて、抵抗性機構の解明に取り組んだ(第7章)。</p> <p>第1章と第2章は、それぞれ研究の背景と、研究に用いたナミハダニ系統や殺ダニ剤について記されている。</p> <p>第3章では、呼吸鎖複合体Ⅱ阻害剤シエノピラフェンと、呼吸鎖複合体Ⅰ阻害剤ピリダベンにおける交差抵抗性について検証されている。まず、室内薬剤淘汰により、両薬剤に部分的な交差抵抗性があることを明らかにした。次に、共力効果や遺伝様式の調査を通じて、シエノピラフェンにはシトクロムP450とエステラーゼが、ピリダベンにはシトクロムP450と作用点変異が抵抗性に関与していることを明らかにした。結果として、両薬剤に認められた交差抵抗性は、共通の抵抗性機構によるものでなく、各薬剤で個別に選抜された解毒酵素遺伝子が、二次的に他方の剤を代謝することで生じたものと結論付けられた。</p> <p>第4章では、呼吸鎖複合体Ⅲ阻害剤であるアセキノシルとビフェナゼートにおける交差抵抗性を検証した。実験室選抜では、両薬剤の部分的な交差抵抗性を認めた。さらに、共力剤試験、交配実験、および作用点(シトクロムb)の塩基配列を解析し、アセキノシル抵抗性にはシトクロムbのG126S変異とシトクロムP450が関与していることを明らかにした。ビフェナゼートではG126Sの関与は認められず、交差抵抗性の要因はシトクロムP450によるものと結論付けられた。</p> <p>第5章では、呼吸鎖複合体Ⅱ阻害剤シフルメトフェン、シエノピラフェン、およびピフルブミドに対する抵抗性について報告した。日本の施設栽培イチゴ由来のナミハダニ系統の抵抗性レベルを調べたところ、過去の報告例と比較して、極めて高い抵抗性を示した。共力効果や遺伝様式の検討から、この高度抵抗性は常染色体遺伝で、解毒代謝に起因するものではないことが判明した。これらについては、第7章でさらに詳細に検討されている。</p> <p>第3章～第5章を通じて、日本の果樹・蔬菜のハダニ防除で使われる主な殺ダニ剤を中心に、抵抗性機構や交差抵抗性を明らかにした。これらの知見は、実用場面での防除薬剤の選定や、将来的な抵抗性発達のリスク評価に役立つと考えられる。</p> <p>第6章では、殺ダニ剤抵抗性研究の新たな研究ツールとして、ゲノム全域を網羅するマイクロサテライト連鎖地図を構築した。2012年に公開されたナミハダニの全ゲノ</p>			

ム配列のデータベースをもとに、63遺伝子座のマイクロサテライトマーカーを新たに設計した。次に、交配実験を通じて、これらのマーカーと従来のマーカー(11遺伝子座)と併せて連鎖解析を行い、ナミハダニの染色体数と同じ3つの連鎖群に集約した連鎖地図を構築した。この連鎖地図には全ゲノム配列の86.6%を整序することが可能であり、これによりゲノム全域レベルで遺伝子マッピングが可能となった。

第7章では、前章で構築した連鎖地図を用いたQTLマッピングを行い、第5章で扱った呼吸鎖複合体II阻害剤における高度抵抗性の機構を解析した。QTL解析の結果、シフルメトフェンとピフルブミドでは第1染色体末端に、シエノピラフェンでは第3染色体にQTL領域を見出した。前者には薬剤作用点を構成するサブユニットであるSdhBが、後者にはSdhCが含まれていた。さらに、RNA-seqや作用点シーケンス解析を行い、各薬剤の抵抗性をもたらす有力な原因候補因子として、作用点変異(シフルメトフェン/B-I260T、ピフルブミド/B-I260V、シエノピラフェン/C-S56L)を見出した。本章を通じて、ゲノムワイドなQTLマッピングと発現解析を組み合わせた手法が、抵抗性機構の解析に有効であることを実証した。

第8章(総合考察)では、本論文で明らかになった抵抗性機構や薬剤間の交差抵抗性について、応用面の観点から考察した。また、本研究で構築したマイクロサテライト連鎖地図を用いた抵抗性研究の手法が、遺伝子診断を用いた抵抗性モニタリングの確立や新規殺虫剤の開発など、将来的な抵抗性管理技術の発展に貢献しうることを論じた。

注) 論文内容の要旨と論文審査の結果の要旨は1頁を38字×36行で作成し、合わせて、3,000字を標準とすること。

論文内容の要旨を英語で記入する場合は、400～1,100 wordsで作成し
審査結果の要旨は日本語500～2,000字程度で作成すること。

(論文審査の結果の要旨)

殺虫剤抵抗性機構の解明は、抵抗性マネジメントや新規殺虫剤の研究開発において重要である。特にハダニ類は抵抗性発達が深刻化しており、抵抗性対策が喫緊の課題となっている。本論文では、日本の農業分野で使われる主要な殺ダニ剤を中心に、その抵抗性メカニズムや交差抵抗性の有無について明らかにした。さらに、抵抗性研究の基盤的技術として、独自にマクロサテライト連鎖地図を構築し、QTLマッピングを用いた抵抗性機構研究の手法を提示した。本論文の評価すべき点は以下の通りに要約できる。

1. ナミハダニにおける殺ダニ剤ピリダベン、アセキノシル、ビフェナゼート、シフルメトフェン、シエノピラフェン、ピフルブミドに対する抵抗性メカニズムや交差抵抗性の有無を明らかにした。
2. 薬剤抵抗性研究の基盤的ツールとして、ナミハダニのゲノム全域を網羅するマイクロサテライト連鎖地図を独自に構築した。
3. 上記連鎖地図を用いたゲノムワイドなQTLマッピングと発現解析を組み合わせた分析手法を開発し、これまで抵抗性の報告が無かった新規殺ダニ剤ピフルブミドを含めた呼吸鎖複合体Ⅱ阻害剤3剤（シフルメトフェン、シエノピラフェン、ピフルブミド）における高度抵抗性の原因遺伝子を明らかにした。

以上のように、本論文は、ナミハダニにおける薬剤抵抗性の機構を明らかにするとともに、遺伝的マーカー連鎖地図の構築・利用による害虫の薬剤抵抗性管理手法を提示したことから、抵抗性モニタリングや新規殺虫剤の開発など将来的な抵抗性管理技術の確立に貢献し、生態情報開発学、害虫管理学、農業ダニ学の発展に寄与するところが大きい。

よって、本論文は博士（農学）の学位論文として価値あるものと認める。

なお、令和3年12月15日、論文並びにそれに関連した分野にわたり試問した結果、博士（農学）の学位を授与される学力が十分あるものと認めた。

また、本論文は、京都大学学位規程第14条第2項に該当するものと判断し、公表に際しては、当該論文の全文に代えてその内容を要約したものとすることを認める。

注) 論文内容の要旨、審査の結果の要旨及び学位論文は、本学学術情報リポジトリに掲載し、公表とする。

ただし、特許申請、雑誌掲載等の関係により、要旨を学位授与後即日公表することに支障がある場合は、以下に公表可能とする日付を記入すること。

要旨公開可能日： 年 月 日以降（学位授与日から3ヶ月以内）