

## 変異型アセチルコリンエステラーゼの種による変異

誌名	Journal of pesticide science
ISSN	1348589X
著者名	古崎,利紀 岩田,陽一 鍋島,武
発行元	日本農薬学会
巻/号	35巻4号
掲載ページ	p. 569-575
発行年月	2010年11月

農林水産省 農林水産技術会議事務局筑波産学連携支援センター  
Tsukuba Business-Academia Cooperation Support Center, Agriculture, Forestry and Fisheries Research Council  
Secretariat



## 変異型アセチルコリンエステラーゼの種による変異

古崎利紀\*, 岩田陽一†, 鍋島武††

農業生物資源研究所昆虫科学研究領域

† 筑波大学大学院生命環境科学研究科

†† 長崎大学熱帯医学研究所

(平成22年8月4日受理)

Keywords: acetylcholinesterase, *Culex tritaeniorhynchus*, organophosphate, carbamate.

### はじめに

アセチルコリンエステラーゼ (acetylcholinesterase, AChE) はコリン作動性シナプスにおいて神経伝達物質であるアセチルコリン (acetylcholine, ACh) をコリンと酢酸に加水分解する酵素である。活性中心は aromatic gorge と呼ばれる約 10 個の芳香族アミノ酸側鎖で形成される窪みの奥にあり (図 1), プロトンリレーにより ACh を加水分解する catalytic triad (S200, E327, H440) とアシル基二重結合酸素と水素結合する oxyanion hole (G118, G119, A201) を挟んで ACh のコリン部分と結合する anionic subsite (AS); choline binding site (W84) と ACh のアシル基と疎水結合する acyl binding site (W233, F288, F290, F331) がある。さらに aromatic gorge の入り口近くには基質と結合してアロステリック効果を与える peripheral anionic site (PAS) がある。有機リン、カーバメート系殺虫剤は AChE に ACh と競合的に結合して ACh の分解を阻害する。その結果シナプス部位で異常興奮が起こり昆虫は死亡するとされる。

害虫防除に有機リン、カーバメート系殺虫剤を用いた結果、さまざまな種でこれら薬剤に対する抵抗性が発達した。ナミハダニ *Tetranychus urticae* の有機リン剤抵抗性<sup>1,2)</sup> やツマグロヨコバイ *Nephotettix cincticeps* のカーバメート剤抵抗性<sup>3-5)</sup> では、抵抗性の発達に伴って AChE の薬剤に対する感受性の低下が報告された。コガタアカイエカ *Culex tritaeniorhynchus* から同様の現象がみつき、その原因を明らかにするための研究が行われてきた。本報告ではコガタアカイエカにおける AChE の研究を振り返り、有機リン剤とカーバメート剤の抵抗性の発達に伴って出現した変異型の AChE についてまとめた。

### 1. 殺虫剤抵抗性コガタアカイエカにおける AChE の薬剤感受性低下

コガタアカイエカは水田で繁殖し、日本脳炎ウィルスを媒介する。1960 年代に有機リン剤が防除に使われた際は薬剤に対して感受性であった<sup>6)</sup>。その後、京都や横浜などから散発的に抵抗性の個体が出現し、1982 年に富山県で採取されたコガタアカイエカ (富山系統) は有機リン剤に対して非常に高い抵抗性を示した<sup>7)</sup>。そして 1984 年までには有機リン、カーバメート系殺虫剤に抵抗性のコガタアカイエカは日本各地で見られるようになった<sup>8)</sup>。

富山系統のコガタアカイエカは殺虫剤感受性である台湾系統の個体と比べて  $I_{50}$  で有機リン剤に対して 317~22929 倍、カーバメート剤に対して 53~314 倍の抵抗性を示した

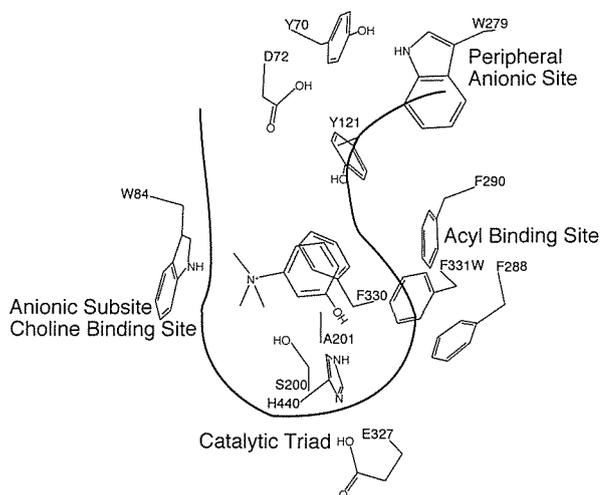


図 1. Edrophonium が配位した AChE 活性中心の模式図。PDB: 2ACK<sup>45)</sup>。コガタアカイエカの AChE では AChE の薬剤に対する感受性の低下に伴い acyl binding site に F331W の置換が生じていた。

\* 〒 305-8634 つくば市大わし 1-2

E-mail: kozakit@affrc.go.jp

© Pesticide Science Society of Japan

表 1. コガタアカイエカの台湾系統 (Taiwan) と富山系統 (Toyama) の AChE の 50% 阻害度,  $I_{50}$  [M]<sup>a)</sup> とその比

	Fenitroxon	Diclorvos	Propaphos-sulfone	Propoxur	Eserine	Ambenonium	Tacrine
Taiwan	$1.4 \times 10^{-7}$	$1.5 \times 10^{-8}$	$5.3 \times 10^{-7}$	$3.1 \times 10^{-7}$	$7.4 \times 10^{-8}$	$4.5 \times 10^{-6}$	$1.5 \times 10^{-6}$
Toyama	$1.2 \times 10^{-4}$	$1.0 \times 10^{-4}$	$1.1 \times 10^{-3}$	$3.4 \times 10^{-5}$	$1.7 \times 10^{-6}$	$8.1 \times 10^{-6}$	$4.0 \times 10^{-6}$
Toyama/Taiwan	838	6939	2024	111	23	2	3

<sup>a)</sup>Mamiya *et al.* 1997.

が、ピレスロイド剤に対しては 1.2 倍の違いしか示さなかった<sup>9)</sup>。可視劣勢マーカー遺伝子を持った個体との相反交雑もしくは戻し交配から、富山系統のマラチオン抵抗性は第 2 染色体上に存在する単一で不完全優性な因子に支配されていることが示された<sup>9)</sup>。さらにこの因子はカルボキシエステラーゼや MFO (mixed-function oxidases) ではなく、paraoxon に対して AChE の感受性を低下させる因子であることが示された<sup>9)</sup>。また別の実験で同様の因子が、別の殺虫剤感受性系統である高知系統と富山系統の交配から fenitroxon に対して AChE の感受性を低下させていることが示された<sup>10)</sup>。このようにして、富山系統のコガタアカイエカが有機リン剤に抵抗性を発達させた主要な機構は、薬剤に対する AChE の感受性の低下であり、それが何らかの因子により決定されていると考えられるようになった。

## 2. リガンドを用いた AChE の構造変化の探索

富山系統の AChE は薬剤に対して感受性を低下させているだけではなかった。虫体から調製した酵液における AChE の活性を調べると、至適 pH および acetylthiocholine (ATCh) を基質にした場合の基質の至適濃度は台湾系統で pH 8.36,  $1.3 \times 10^{-2}$  M であったが、富山系統ではその至適 pH および基質の至適濃度は消失していた<sup>11)</sup>。さらに本来の基質である ACh の  $K_m$  は台湾系統で  $7.19 \times 10^{-5}$  M であるのに対し富山系統で  $4.68 \times 10^{-5}$  M であり、富山系統の AChE で基質に対する親和性が高まっていた<sup>11)</sup>。

富山系統のコガタアカイエカで見られた AChE の薬剤に対する感受性の低下および基質に対する親和性の上昇は、AChE の構造変化に起因すると考えられ、それを明らかにするために各種リガンドを用いた酵素試験が行われた。

### 2.1. AS; choline binding site の構造変化

Tacrine は AChE の競合阻害剤であり、シビレエイの AChE を用いた X 線結晶解析から choline binding site のトリプトファンとその近傍のフェニルアラニンの側鎖に挟まれる形で酵素に結合して阻害活性を示すと考えられている<sup>12)</sup>。富山系統と台湾系統の AChE に対する tacrine の阻害活性の比は 3 倍であり、有機リン剤とカーバメート剤での比と比較して AChE の感受性に大きな違いはなかった (表 1)。ま

たアルキル基を置換した一連の阻害剤 3-alkylsulfonylphenyl methanesulfonate (図 2) との構造活性相関では、富山系統と台湾系統の AChE に対して阻害活性が高くなる至適な S-C 原子間の距離は約 4.55 Å であり、二つの系統において違いはなかった<sup>13)</sup>。そのため阻害剤のこの部位に対応する AChE の構造には変化は生じていないと考えられた。さらに AChE を精製するためのアフィニティゲル (図 2) に用いられた choline binding site に親和性の高いリガンドである *m*-carboxyphenyl-dimethylethylammonium, *p*-carboxyphenyl-dimethylethylammonium, edrophonium<sup>14,15)</sup> に対する AChE の感受性の比は富山系統と殺虫剤に感受性である高知系統と比較して 9~27 倍であり (表 2), 感受性の比は tacrine を用いた場合と同程度であると考えられた。以上のことから富山系統の AChE において choline binding site およびその周辺の構造に大きな変化が生じている可能性は低いと推測された。

### 2.2. PAS の構造変化

Ambenonium はヒト赤血球の AChE への阻害様式から ATCh と競合して PAS に結合して AChE を阻害するとされる<sup>16)</sup>。富山系統と台湾系統の AChE における ambenonium に対する感受性の比は 2 倍で有機リン剤やカーバメート剤に対する比より小さく<sup>11)</sup>、ambenonium が結合する部位の PAS には構造の変化はないと考えられた (表 1)。

Tetraethylammonium (TEA) の類似化合物である tetramethylethylammonium (TMA) はキイロショウジョウバエの AChE で PAS と AS の両方に作用する<sup>14)</sup>。TEA に対する富山系統

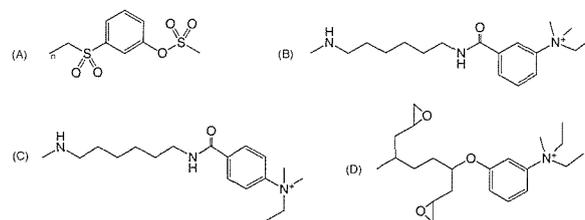


図 2. 3-Alkylsulfonylphenyl methanesulfonate (A) とコガタアカイエカの AChE を精製するために用いたアフィニティゲル: *m*-carboxyphenyl-dimethylethylammonium gel (B), *p*-carboxyphenyl-dimethylethylammonium gel (C), edrophonium gel (D)。

表 2. コガタアカイエカの高知系統 (Kochi) と富山系統 (Toyama) の AChE の 50% 阻害度,  $I_{50}$ [M]とその比

	<i>m</i> -Carboxyphenyl- dimethylethylammonium	<i>p</i> -Carboxyphenyl- dimethylethylammonium	Edrophonium <sup>a)</sup>	Tetraethylammonium (TEA)
Kochi	$7.5 \times 10^{-4}$	$9.2 \times 10^{-4}$	$6.2 \times 10^{-6}$	$8.4 \times 10^{-3}$
Toyama	$7.0 \times 10^{-3}$	$2.5 \times 10^{-2}$	$1.0 \times 10^{-4}$	$2.6 \times 10^{-3}$
Toyama/Kochi	9	27	16	0.3

<sup>a)</sup>Nabeshima *et al.* 2004.

と高知系統の AChE の感受性の比は 3/10 倍であった (表 2)。富山系統の AChE において AS のみに作用するリガンドと比べて TEA で感受性が逆転したのは, TMA と同様に TEA が PAS と AS の両方に作用したためであると考えられた。そのため TEA の濃度に依存した AChE の活性の変化が, 富山系統, 高知系統, 薬剤に感受性であるパキスタン系統において詳しく調べられた。TEA 濃度と AChE の残存活性の関係を見ると (図 3), 高知系統とパキスタン系統の AChE では TEA が 1 mM の時に活性が高くなったが, 富山系統の AChE ではこのような活性のピークは見られず, TEA 濃度の上昇に伴い AChE の活性は一様に低下した。AChE の PAS に基質が結合するとアロステリック効果により, 酵素の活性が高まる基質活性化 (substrate activation)<sup>17,18)</sup> や, 酵素の活性が抑制される基質抑制 (substrate inhibition)<sup>19,20)</sup> が起こることが知られている。1 mM の TEA で見られた感受性系統の AChE における活性の上昇は, TEA が PAS に結合することによって生じたアロステリック効果のために起きた基質活性であると推測された。一方で富山系統の AChE では TEA による AChE の活性化は見られず, 何らかの要因によりアロステリック効果が許容されにくくなっていると

考えられた。

### 2.3. ABS の構造変化

ACh に加えて ATCh, propionylthiocholine (PTCh) を基質に用いて富山系統と台湾系統の AChE で  $K_m$  を比較すると, ACh, ATCh, PTCh の順にその比は大きくなった (表 3)<sup>11)</sup>。富山系統の AChE は基質のアシル基が大きくなるにつれて基質を分解しにくくなっていた。基質のアシル基は酵素と基質が複合体を形成する際に ABS に入ることから, 富山系統の AChE では ABS に何らかの変化が生じていることがわかった。また多くの有機リンやカーバメート剤も ACh と同じように AChE の活性中心に入って酵素活性を阻害することから, これら薬剤の ACh のアシル基に相当する部位の構造が重要であることが示された。

### 3. AChE の薬剤感受性を決定する因子の QTL とアミノ酸置換

キイロショウジョウバエとムギミドリアブラムシから報告された AChE の配列<sup>21,22)</sup> を参考に縮重プライマーを設計して AChE をコードする cDNA が単離された<sup>23)</sup>。その配列を用いた RFLP による連鎖群解析から, キイロショウジョウバエの AChE に orthologous な AChE 遺伝子 (*ace* orthologous AChE: *AO-AChE: ace2*) は第 1 染色体上の *TY7* の 1.3 cM 以内に, キイロショウジョウバエの AChE に paralogous な AChE 遺伝子 (*ace* paralogous AChE: *AP-AChE: ace1*) は第 2 染色体上の AChE 薬剤感受性低下因子 *AChER*<sup>10)</sup> の 0.2 cM 以内にあることがわかった。一方でコガタアカイエカの *AP-AChE* の配列を高知系統と富山系統の個体と比較したところ, AChE の fenitroxon 感受性に呼応して F455 (331: *Torpedo* AChE における番号, 以下この番号を使用) W を生ずる一塩基置換 (SNP: single nucleotide polymorphism) が見つかった。F331 は ABS を構成するアミノ酸のひとつであり (図 1), またリガンドを用いた酵素試験で薬剤に低感受性の AChE において ABS での構造変化が示唆されていたため, *AP-AChE* に生じていた SNP が *AChER* である可能性が示された<sup>23)</sup>。

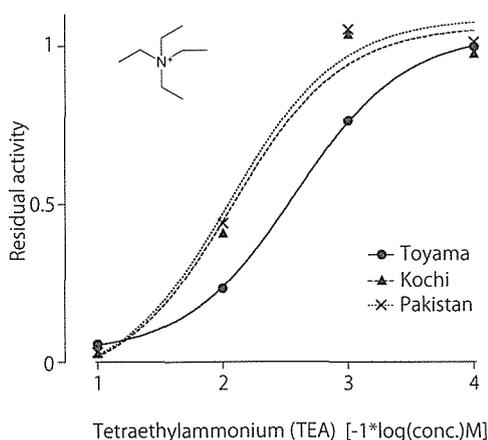


図 3. Tetraethylammonium (TEA) によるコガタアカイエカの AChE の阻害。富山系統 (Toyama) の AChE では TEA の濃度依存的な阻害が見られたが, 高知 (Kochi) およびパキスタン系統 (Pakistan) の AChE では TEA の濃度が 1 mM の時に AChE の活性が上昇した。

表 3. コガタアカイエカの台湾系統 (Taiwan) と富山系統 (Kochi) の AChE および組換え AChE の  $K_m$  の比

	Acetylcholine	Acetylthiocholine	Propionylthiocholine	Butyrylthiocholine
Toyama/Taiwan <sup>a)</sup>	0.65	5.75	7.77	
W331/F331 <sup>b)</sup>	0.83	7.06	10.52	20.87
AO <sup>c)</sup> /F331 <sup>b)</sup>	2.74	1.00	0.96	0.87

<sup>a)</sup>Mamiya *et al.* 1997, <sup>b)</sup>Oh *et al.* 2005, <sup>c)</sup>*Drosophila ace* ortholog (AO-AChE).

### 3.1. F331W の置換による AChE の変化

F331W の置換が ABS において AChE の活性に及ぼす影響は 2 つ考えられた。

まず酵素と基質の複合体の形成に及ぼす影響が挙げられる。疎水性の ABS に基質のアシル基もしくは阻害剤のそれに対応する部位が補足されて、それらリガンドの向きが揃い触媒反応が起こりやすくなる<sup>24,25)</sup>。F331W の置換は ABS の疎水性を弱め、さらに ABS の空間を狭めるために、基質や阻害剤が ABS へ補足される過程が変わると考えられた<sup>23)</sup>。第 2 の影響として静電場の変化が挙げられる。ヒトの AChE では catalytic triad の H440 が基質の加水分解の過程で正電荷の受け渡しをして配位を変える<sup>26,27)</sup>。F331 を aliphatic なアミノ酸に置換すると H440 の向きが大きく変わり、AChE の活性が変化することが示されている<sup>28,29)</sup>。昆虫の AChE においても F331 と H440 に同様の相互作用があると考えられ、F331W の置換によりこの部位の静電場が変わって H440 による正電荷の受け渡しに影響が及ぶと考えられた<sup>23)</sup>。

### 3.2. F331W の置換と薬剤感受性

富山系統のコガタアカイエカから得られた AChE の cDNA に部分変異を導入して、バキュロウィルスを用いて変異型

の AChE が作出された。ACh に対する  $K_m$  を調べると、高知系統の F331 が導入された AP-AChE では  $1.32 \times 10^{-5}$  M であったのに対し、W331 である富山系統の AP-AChE では  $1.10 \times 10^{-5}$  M であり<sup>30)</sup>、F331W の置換により ACh への親和性が高くなることが示された (表 3)。さらに基質に ATCh, PTCh, butyrylthiocholine を用いて  $K_m$  を比較すると、基質のアシル基が大きくなるのに伴い W331 の AP-AChE で顕著な基質親和性の低下が生じた<sup>30)</sup>。富山系統と台湾系統の虫体から調製した酵素液で見られた AChE の活性<sup>11)</sup>と同様の傾向が、F331W の部分変異を導入した AP-AChE の活性で再現された。

同様に各種阻害剤に対する AChE の感受性の低下も、F331W の置換により AP-AChE で起きることが示された (表 4)<sup>31)</sup>。阻害剤の構造とその阻害活性の関係を比較すると、モノメチルカーバメート (carbaryl, eserine) とジメチルカーバメート (pirimicarb) の間で AP-AChE の感受性の低下の比が大きく異なっていた。そのことから、ACh のアシル基に相当する阻害剤の部位の容積が阻害剤の阻害活性を決定すると結論された。ただし、その容積がほぼ同じ pirimicarb と dimethoxy 型の有機リン剤 (fenitroxon, dichlorvos) にも同程度の阻害活性があると予想されたが、dichlorvos ではさらに 2 倍程度の差が生じた。このような差は carbaryl と

表 4. コガタアカイエカの組み換え AChE の 50% 阻害度、 $I_{50}$  [M] とその比

	Fenitroxon	Dichlorvos	Propaphos-sulfone	Carbaryl	Eserine	Pirimicarb
F331 <sup>a)</sup>	$4.9 \times 10^{-7}$	$2.6 \times 10^{-7}$	$2.3 \times 10^{-6}$	$1.6 \times 10^{-7}$	$3.6 \times 10^{-9}$	$3.2 \times 10^{-5}$
F331 <sup>b)</sup>	$1.4 \times 10^{-7}$	$3.1 \times 10^{-7}$		$2.0 \times 10^{-7}$	$9.5 \times 10^{-10}$	$1.1 \times 10^{-5}$
W331 <sup>a)</sup>	$2.7 \times 10^{-3}$	$2.7 \times 10^{-3}$		$3.4 \times 10^{-5}$	$5.0 \times 10^{-7}$	$1.3 \times 10^{-1}$
S331 <sup>a)</sup>	$4.2 \times 10^{-7}$	$4.5 \times 10^{-6}$		$2.0 \times 10^{-6}$	$5.8 \times 10^{-9}$	$3.8 \times 10^{-7}$
C331 <sup>a)</sup>	$1.1 \times 10^{-7}$	$3.5 \times 10^{-6}$		$3.3 \times 10^{-6}$	$1.9 \times 10^{-8}$	$6.2 \times 10^{-6}$
AO <sup>b)c)</sup>	$1.8 \times 10^{-7}$	$9.7 \times 10^{-7}$		$1.3 \times 10^{-7}$	$7.1 \times 10^{-10}$	$8.6 \times 10^{-6}$
W331 <sup>a)/F331<sup>a)</sup></sup>	5487	10134	NA	211	139	4206
S331 <sup>a)/F331<sup>a)</sup></sup>	0.9	17	NA	13	2	0.01
C331 <sup>a)/F331<sup>a)</sup></sup>	0.2	13	NA	21	5	0.2
AO <sup>b)c)/F331<sup>b)</sup></sup>	1	0.003	NA	1	1	0.1

<sup>a)</sup>Oh *et al.* 2007, <sup>b)</sup>Oh *et al.* 2005, <sup>c)</sup>*Drosophila ace* ortholog (AO-AChE).

eserine の間にもあり, AP-AChE の阻害剤の対する感受性はアシル基に相当する部位の化学構造のみで決まるのではないことが示された. F331W による AChE の感受性の変化に酵素のアロステリック効果が関係しているのか, また H440 の動態に影響する静電場の変化が関係しているのかについては詳しく解析されていない.

### 3.3. ほかの昆虫における F331 の置換

ほかの種の殺虫剤に抵抗性の系統からも F331 における置

換が報告されている.

モモアカアブラムシの AP-AChE では S331F の置換が pyrimicarb に感受性を低下させた系統で起きており<sup>32)</sup>, この置換によりモモアカアブラムシがモノメチルカーバメートである carbofuran や carbaryl には感受性を低下させず dichlorvos に対して逆に感受性を高める負の相関関係が説明された (鍋島, 未発表).

ナミハダニにおいても有機リン剤に低感受性の AChE をもつ集団で F331C の置換が見つかり, この部分変異により

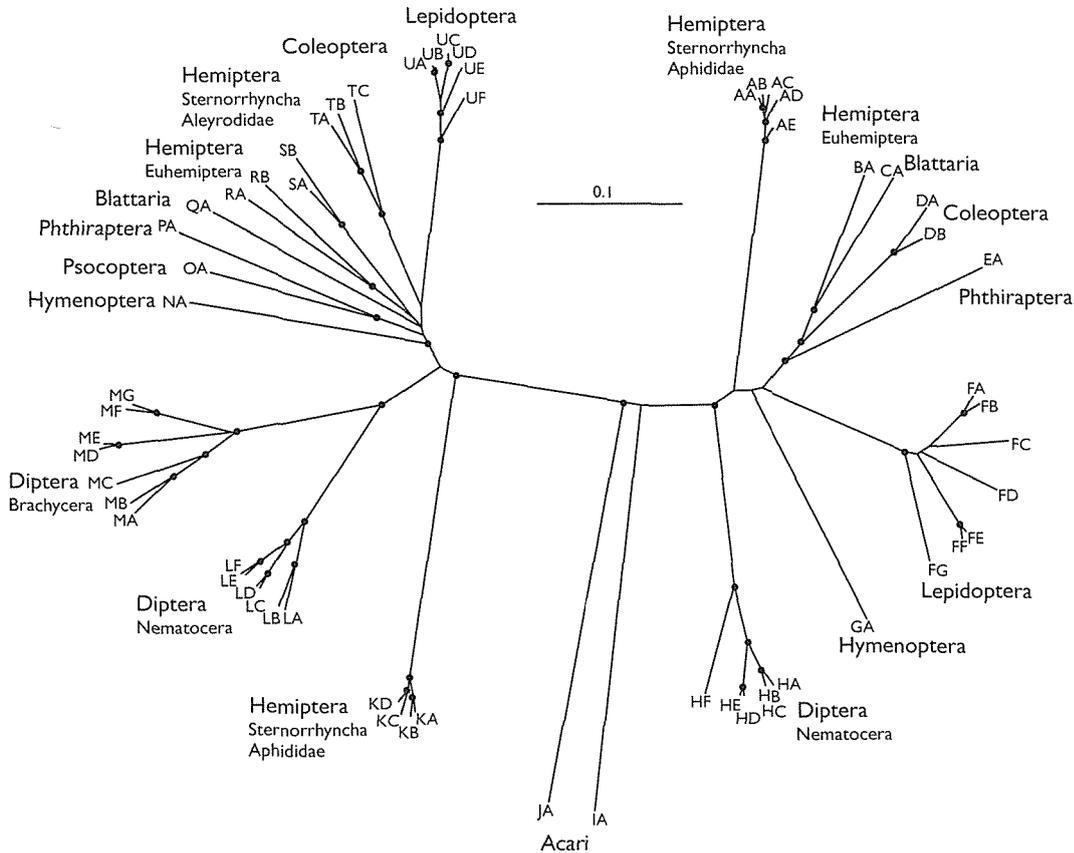


図4. 節足動物 AChE の分子系統樹<sup>46)</sup>. Bootstrap pseudo replicate は 1000 回計算された. Bootstrap value が 500% 以上の分岐は黒丸で示した. 種の分類は NCBI の定める体系に従った. AA (*Schizaphis graminum*, AAK09373), AB (*Rhopalosiphum padi*, AAT76530), AC (*Aphis gossypii*, AAM94376), AD (*Sitobion avenae*, AAV68493), AE (*Myzus persicae*, AAN71600), BA (*Nephotettix cincticeps*, AAP87381), CA (*Blattella germanica*, ABB89946), DA (*Tribolium castaneum*, XP\_973462), DB (*Alphitobius diaperinus*, EU086057), EA (*Pediculus humanus corporis*, BAF46105), FA (*Helicoverpa assulta*, AAY42136), FB (*H. armigera*, AAY59530), FC (*Chilo suppressalis*, ABO38111), FD (*Cydia pomonella*, ABB76666), FE (*Bombyx mandarina*, ABM66370), FF (*B. mori*, BAF33338), FG (*Plutella xylostella*, AAY34743), GA (*Apis mellifera*, XP\_393751)CHA (*Cx. pipiens pallens*, AAV28503), HB (*Cx. pipiens*, CAD33707), HC (*Cx. tritaeniorhynchus*, BAD06210), HD (*Aedes aegypti*, ABN09910), HE (*Ae. albopictus*, BAE71346), HF (*Anopheles gambiae*, XP\_321792), IA (*Tetranychus urticae*, AAO73450), JA (*Boophilus decoloratus*, CAA06980), KA (*M. persicae*, AAL99585), KB (*S. avenae*, AAU11286), KC (*A. gossypii*, AAM94375), KD (*R. padi*, AAU11285), LA (*An. stephensi*, 1808210A), LB (*An. gambiae*, AGAP000466-PA), LC (*Ae. aegypti*, AAB35001), LD (*Ae. albopictus*, BAE71347), LE (*Cx. tritaeniorhynchus*, BAD06209), LF (*Cx. pipiens*, CAJ43752), MA (*Musca domestica*, AAK69132), MB (*M. domestica*, AAS45645), MC (*Lucilia cuprina*, AAC02779), MD (*Bactrocera oleae*, AAM69920), ME (*B. dorsalis*, CAD57142), MF (*Drosophila melanogaster*, CAA29326), MG (*D. pseudoobscura*, XP\_1358489), NA (*Ap. mellifera*, BAE06051), OA (*Liposcelis bostrychophila*, ABO31937), PA (*P. humanus corporis*, BAF46104), QA (*B. germanica*, ABB89947), RA (*N. cincticeps*, AAF65202), RB (*Nilaparvata lugens*, CAH65679), SA (*Be-misia tabaci*, CAE11222), SB (*Trialeurodes vaporariorum*, CAE11223), TA (*T. castaneum*, XP\_970774), TB (*A. diaperinus*, EU086056), TC (*Lep-tinotarsa decemlineata*, AAB00466), UA (*H. armigera*, AAM90333), UB (*H. assulta*, AAV65638), UC (*B. mandarina*, ABM46999), UD (*B. mori*, BAF33337), UE (*Cy. pomonella*, ABB76665), UF (*P. xylostella*, AAK39639).

dichlorvos に対して  $k_i$  で AChE に 140 倍の差が生じていたと考えられた<sup>33)</sup>。

#### 4. 変異型の AChE の種による変異

昆虫における AChE の研究は最初にキイロシヨウジヨウバエで進み、キイロシヨウジヨウバエの殺虫剤に抵抗性の実験系統から見つかった部分変異が AChE の薬剤に対する感受性を低下させることが示された<sup>34)</sup>。それに続き、野外から採取されたイエバエの有機リン剤・カーバメート剤抵抗性の個体が持つ AChE (AO-AChE) から、キイロシヨウジヨウバエの AChE と同じ部位に同じアミノ酸置換が見つかり<sup>35-37)</sup>、ほかの種の AChE においても同様の部分変異が見つかることが期待された。しかし昆虫には 2 種類の AChE 遺伝子 (AO-AChE と AP-AChE) が存在することがムギミドリアブラムシの AChE<sup>22)</sup> が報告されてから知られるようになり (図 4)、薬剤に対する AChE の感受性の低下と関連した SNP は、主にキイロシヨウジヨウバエの AChE 遺伝子とは paralogous なグループに属する AChE 遺伝子 (AP-AChE) から見つかるようになった<sup>32,38)</sup>。

バキュロウイルスを用いて発現させたコガタアカイエカの AO-AChE の ACh に対する  $K_m$  は  $3.6 \times 10^{-5}$  M であり AP-AChE と比較して ACh への親和性は低い (表 3)。さらに AO-AChE ではアシル基が大きくなるほど基質に対して親和性が高くなり、その傾向は F331AP-AChE より強く、また W331AP-AChE とは逆転していた<sup>30)</sup>。薬剤に対する感受性では dichlorvos と pirimicarb に対する感受性が AO-AChE で高くなっていた (表 4)<sup>31)</sup>。このように AO-AChE は AChE としての性質が AP-AChE と異なっていることが示されている。

六脚類で昆虫より原始的とされるトビムシ目の *Orchesellavillosa* にも 2 つの AChE 遺伝子が存在しており<sup>39)</sup>、昆虫に分化する前にすでに 2 つの AChE 遺伝子が存在していたと考えられる。ハエ目の環縫短角群 (Cyclorhapha) では進化の過程で AChE 遺伝子がひとつ失われたとされる<sup>40)</sup>。チャパネゴキブリ *Blattella germanica* では、2 つの AChE の分布する組織が異なり<sup>41)</sup>、AP-AChE がゴキブリの神経系で主要な役割を担っていることが示唆された<sup>42)</sup>。しかし、2 つの AChE の機能の分担についての詳細はまだはっきりしない。

#### 5. おわりに

コガタアカイエカにおいて、有機リン剤とカーバメート剤の抵抗性の発達に伴って出現した変異型の AChE は、その遺伝子に生じた SNP が原因であることが明らかとなった。しかしモモアカアブラムシやナミハダニの AChE 遺伝子で見つかった SNP は、コガタアカイエカで見つかったものとは異なっていた。さらに AChE の別の部位に変異が生じて

いる例がほかの農業および衛生害虫から多数報告されている<sup>43)</sup>。種が変わり使用される薬剤が変われば、抵抗性の発達に伴い選抜される SNP も変わっていた。複数の昆虫種でゲノム情報が明らかになり、さらに新しいグループに属する AChE 遺伝子が昆虫から見つかる可能性は低い。一方で低感受性型の AChE 遺伝子が重複している例がアカイエカ *Culex pipiens* から報告されており<sup>44)</sup>、殺虫剤による選択圧で淘汰される AChE の形質が構造遺伝子の SNP だけでないことを示している。今後も AChE を標的とした殺虫剤が使用される限り AChE に生じる様々な変化を調べていく必要がある。

#### 謝 辞

本研究を行うにあたり、終始懇切なるご指導・ご鞭撻を頂いた筑波大学農林学系の河野義明教授に心から御礼申し上げます。アフィニティゲルの調製にあたり農業生物資源研究所の塩月孝博博士に、コガタアカイエカの飼育および本研究の構成について国立感染症研究所の富田隆史博士と葛西信治博士に、本原稿の作成には茨城県農業センター農業研究所の寺田充芳氏に多くのご助言・ご助力を頂いたことを感謝する。

#### 引用文献

- 1) H. Smitsaert: *Science* **143**, 129-131 (1964).
- 2) G. Voss and F. Matsumura: *Nature* **202**, 319-320 (1965).
- 3) H. Hama and T. Iwata: *Appl. Entomol. Zool.* **6**, 183-191 (1971).
- 4) T. Iwata and H. Hama: *J. Econ. Entomol.* **65**, 643-644 (1972).
- 5) H. Hama and T. Iwata: *Appl. Entomol. Zool.* **13**, 190-202 (1978).
- 6) K. Buei and S. Ito: *Jpn. J. Sanit. Zool.* **24**, 219-223 (1974) (Japanese).
- 7) K. Kamimura and Y. Maruyama: *Jpn. J. Sanit. Zool.* **34**, 33-37 (1983) (Japanese).
- 8) K. Yasutomi and M. Takahashi: *J. Med. Entomol.* **24**, 604-608 (1987).
- 9) M. Takahashi and K. Yasutomi: *J. Med. Entomol.* **24**, 595-603 (1987).
- 10) A. Mori, T. Tomita, O. Hidoh, Y. Kono and D. Severson: *Insect Mol. Biol.* **10**, 197-203 (2001).
- 11) A. Mamiya, Y. Ishikawa and Y. Kono: *Appl. Entomol. Zool.* **32**, 37-44 (1997).
- 12) M. Harel, I. Schalk, L. Ehret-Sabatier, F. Bouet, M. Goeldner, C. Hirth, P. Axelsen, I. Silman and J. Sussman: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**, 9031-9035. (1993).
- 13) A. Mamiya, Y. Ishikawa, A. Masui and Y. Kono: *Appl. Entomol. Zool.* **32**, 315-319 (1998).
- 14) J. Stojan, V. Marcel and D. Fournier: *Chemico-Biol. Interaction* **119-120**, 137-146 (1999).
- 15) Z. Xu and D. Bull: *J. Econ. Entomol.* **87**, 20-26 (1994).
- 16) A. Hodge, D. Humphrey and T. Rosenberry: *Molec. Pharmacol.* **41**, 937-942 (1992).
- 17) V. Marcel, L. Palacios, C. Pertuy, P. Masson and D. Fournier:

- Biochem. J.* **15**, 329–334 (1998).
- 18) V. Marcel, E. Estrada-Mondaca, F. Magn, J. Stojan, A. Kja and D. Fournier: *J. Biol. Chem.* **275**, 11603–11609 (2000).
- 19) A. Shafferman, B. Velan, A. Ordentlich, C. Kronman, H. Grosfeld, M. Leitner, Y. Flashner, S. Cohen, D. Barak and N. Ariel: *EMBO J.* **11**, 3561–3568 (1992).
- 20) Z. Radic, N. Pickering, D. Vellom, S. Camp and P. Taylor: *Biochemistry* **32**, 12075–12084 (1993).
- 21) L. Hall and P. Spierer: *EMBO J.* **5**, 2949–2954 (1986).
- 22) J. Gao, S. Kambhampati and K. Zhu: *Insect Biochem. Mol. Biol.* **32**, 765–775 (2002).
- 23) T. Nabeshima, A. Mori, T. Kozaki, Y. Iwata, O. Hidoh, S. Harada, S. Kasai, D. Severson, Y. Kono and T. Tomita: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **16**, 794–801 (2004).
- 24) N. Hosea, H. Berman and P. Taylor: *Biochemistry* **34**, 11528–11536 (1995).
- 25) A. Ordentlich, D. Barak, C. Kronman, H. Benschop, L. De Jong, N. Ariel, B. R. Y. Segall, B. Velan and S. A.: *Biochemistry* **38**, 3055–3066 (1999).
- 26) M. Massiah, C. Viragh, P. Reddy, I. Kovach, J. Johnson, T. Rosenberry and A. Mildvan: *Biochemistry* **15**; **40(19)**, 5682–5690 (2001).
- 27) C. Millard, G. Koellner, A. Ordentlich, A. Shafferman, I. Silman and J. Sussman: *J. Am. Chem. Soc.* **121**, 9883–9884 (1999).
- 28) P. Bar-On, C. Millard, M. Harel, H. Dvir, A. Enz, J. Sussman and I. Silman: *Biochemistry* **19**, 3555–3564 (2002).
- 29) A. Shafferman, A. Ordentlich, D. Barak, D. Stein, N. Ariel and B. Velan: *Biochem. J.* **318 (Pt 3)**, 833–840 (1996).
- 30) S. Oh, T. Kozaki, H. Mizuno, T. Tomita and Y. Kono: *Pest. Biochem. Physiol.* **82**, 154–161 (2005).
- 31) S. Oh, T. Kozaki, T. Tomita and Y. Kono: *Appl. Entomol. Zool.* **42**, 367–373 (2007).
- 32) T. Nabeshima, T. Kozaki, T. Tomita and Y. Kono: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **307**, 15–22 (2003).
- 33) Y. Anazawa, T. Tomita, Y. Aiki, T. Kozaki and Y. Kono: *Insect Biochem. Mol. Biol.* **33**, 509–514 (2003).
- 34) A. Muterio, M. Pralavorio, J. Bride and D. Fournier: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**, 5922–5926 (1994).
- 35) T. Kozaki, T. Shono, T. Tomita and Y. Kono: *Insect Biochem. Mol. Biol.* **31**, 991–997 (2001).
- 36) T. Kozaki, T. Shono, T. Tomita and Y. Kono: *Appl. Entomol. Zool.* **36**, 377–380 (2001).
- 37) T. Kozaki, T. Tomita, K. Taniai, M. Yamakawa and Y. Kono: *Appl. Entomol. Zool.* **37**, 213–218 (2002).
- 38) M. Weill, G. Lutfalla, K. Mogensen, F. Chandre, A. Berthomieu, C. Berticat, N. Pasteur, A. Philips, P. Fort and M. Raymond: *Nature* **423**, 136–137 (2003).
- 39) F. Nardi, B. Barazzuoli, S. Ciolfi, A. Carapelli, R. Dallai and F. Frati: *Insect. Mol. Biol.* **18**, 45–54 (2009).
- 40) M. Weill, P. Fort, A. Berthomieu, M. Pierre Dubois, N. Pasteur and M. Raymond: *Proc. R. Soc. Lond. B* **269**, 2007–2016 (2002).
- 41) H. Mizuno, S. Oh, O. Komagata, S. Kasai, H. Honda, Y. Kono and T. Tomita: *Appl. Entomol. Zool.* **42**, 643–650 (2007).
- 42) J. Kim, C. Jung, Y. Koh and S. Lee: *Insect Mol. Biol.* **15**, 513–522 (2006).
- 43) Y. Kono and T. Tomita: *Pest. Biochem. Physiol.* **85**, 123–132 (2006).
- 44) H. Alout, P. Labbe, A. Berthomieu, N. Pasteur and M. Weill: *Insect Biochem. Mol. Biol.* **39**, 884–891 (2009).
- 45) R. Ravelli, M. Raves, Z. Ren, D. Bourgeois, M. Roth, J. Kroon, I. Silman and J. Sussman: *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **54 (Pt 6 Pt 2)**, 359–366 (1998).
- 46) T. Kozaki, B. A. Kimmelblatt, R. L. Hamm and J. G. Scott: *Arch. Insect Biochem. Physiol.* **67**, 130–138 (2008).