

殺虫剤抵抗性蚊におけるシトクロムP450遺伝子の過剰発現

誌名	Journal of pesticide science
ISSN	1348589X
著者名	富田,隆史 糸川,健太郎 駒形,修 葛西,真治
発行元	日本農薬学会
巻/号	35巻4号
掲載ページ	p. 562-568
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



殺虫剤抵抗性蚊におけるシトクロム P450 遺伝子の過剰発現

富田隆史^{†,*}, 糸川健太郎^{††}, 駒形 修[†], 葛西真治[†]

[†] 国立感染症研究所昆虫医科学部

^{††} 千葉大学大学院融合科学研究科

(平成 22 年 7 月 23 日受理)

Keywords: *Culex quinquefasciatus*, insecticide resistance, pyrethroid, cytochrome P450, gene duplication, *cis*-acting mutation.

はじめに

昆虫に殺虫剤抵抗性をもたらす主な要因は、殺虫剤作用点の感受性低下と殺虫剤代謝の亢進である。シトクロム P450 モノオキシゲナーゼ (P450), カルボキシエステラーゼ, およびグルタチオン転移酵素は、代謝性の殺虫剤抵抗性に関わる酵素群として最も頻繁に研究対象となっている。作用点の殺虫剤低感受性は、点突然変異に基づく作用点タンパク質の構造変化により生じているのに対し、殺虫剤代謝酵素の活性増大は、ほとんどの場合、酵素遺伝子の転写調節系の変異に基づく過剰発現または酵素遺伝子の遺伝子増幅 (遺伝子コピー数の増大) により生じている。各酵素群は多重遺伝子族を形成し、1つの分子種が幅広い基質の触媒活性を示すとともに、異なる分子種の間で触媒活性が共通することが多い。そのため、抵抗性昆虫において過剰発現していることを手掛かりにし、抵抗性に関わる酵素分子種を特定する研究が数多く進められている。

昆虫の P450 は、殺虫剤や植物毒素を含む様々な脂溶性の外來性物質と昆虫生理活性物質の代謝を行う。殺虫剤代謝において P450 は、水酸化反応を基本として、脱アルキル化、脱硫黄化、エポキシ化、脱ハロゲン化などの反応を通じ、基質に酸素原子を付加し、脂溶性の高い殺虫剤を対外に排出されやすい水溶性に変換する役割を担う。冒頭に述べた 3つの酵素群の中でもとりわけ、P450 による代謝は、BT 剤のようなタンパク質毒素を有効成分とする殺虫剤を除き、昆虫成長抑制剤 (IGR) を含む広範な殺虫剤群に対する抵抗性に関わっている¹⁾。

昆虫種のゲノムに含まれる P450 遺伝子の数は、現在までにわがっている最も少ないもので、コロモジラミ (*Pedicu-*

lus humanus) の 37, 次いでセイヨウミツバチ (*Apis mellifera*) の 46 であるが、蚊種では、マラリア媒介蚊として最も重要なハマダラカ *Anopheles gambiae* で 106 (以上文献²⁾), デング熱媒介蚊のネッタイシマカで 160³⁾ と数が多い。ネッタイイエカ (*Culex quinquefasciatus*) ゲノムプロジェクトのドラフト (Genebuild CpipJ1.2)⁴⁾ に基づく description search によると、本種では 198 の P450 遺伝子がリストされている。

タンパク質配列の相同性に基づき、個々の P450 には、族 (family) を最も上位とするコード名が与えられているが、昆虫種の P450 は、さらに上位のクラン (哺乳類 P450 の族番号に重なる) に基づく大きなグループ分けをし、4つのクランとして概観すると、機能の分化について理解がすすむ。哺乳類の Cyp3 族に相同性の高い Cyp3 クランは、外來毒物質の代謝に多く関わっているとみられている。過剰発現により殺虫剤抵抗性の寄与 (または関連) が知られている分子種には Cyp6, Cyp9, Cyp12, Cyp321 などの族に属する P450 分子種が数多く含まれている (Table 1)。Cyp3 クランと機能が明らかにされた分子種の少ない Cyp4 クランは、それぞれ、昆虫種の中で大きな群を形成するが、進化速度が速いため、同じ昆虫目でも属の異なる昆虫種間では、P450 分子種にオーソログな関係を割り出すことが、一部の例外 (Cyp4aa1) を除き、困難である場合が多い。これらの 2つのクランに対し、生理活性物質の生合成と代謝を担うことが明らかにされている分子種を含む Cyp2 クランとミトコンドリア・クランでは、配列が比較的よく保存されている。幼若ホルモン合成を担う Cyp15, エクジソン代謝を担う Cyp18, エクジソン生合成を担う Cyp306, Cyp307 (以上 Cyp2 クラン), エクジソン生合成を担う Cyp302, Cyp314, Cyp315 (以上ミトコンドリア・クラン) などを含む 9つの分子種に関しては、隔たった昆虫種の間でも 1対1のオーソログ関係が成り立っている^{5,6)}。

* 〒 162-8640 東京都新宿区戸山 1-23-1

E-mail: tomita@nih.go.jp

© Pesticide Science Society of Japan

Table 1. Insecticide resistance-associated cytochrome P450 genes overexpression

P450 genes	Insecticide resistance	Insecticide metabolism ^{a)}	Overexpression-attributable mutations	Ref. #
<i>Musca domestica</i>				
<i>Cyp6a1</i>	diazinon	diazinon, aldrin, heptachlor	(<i>trans</i> -acting)	31, 32
<i>Cyp6a5v2</i>	permethrin			33
<i>Cyp6d1</i>	permethrin	deltamethrin ^{b)}	(<i>cis</i> - & <i>trans</i> -acting)	34, 35
<i>Cyp6d3</i>	permethrin			36
<i>Drosophila melanogaster</i>				
<i>Cyp6a2</i>	DDT		(<i>trans</i> -acting)	37
<i>Cyp6a8</i>	DDT		(<i>trans</i> -acting)	37
<i>Cyp6g1</i>	DDT	DDT, methoxychlor, imidachloprid	TE-insertion	38–40
<i>Cyp12d1</i>	DDT		(<i>cis</i> -acting)	41
<i>Anopheles gambiae</i>				
<i>Cyp6z1</i>	pyrethroids			42
<i>Cyp6z2</i>	pyrethroids			43
<i>Cyp6p3</i>	pyrethroids	permethrin, deltamethrin		44
<i>Anopheles funestus</i>				
<i>Cyp6p4</i>	pyrethroids			45
<i>Cyp6p9</i>	pyrethroids			46
<i>Aedes aegypti</i>				
<i>Cyp9j32</i>	pyrethroids			3
<i>Culex quinquefasciatus</i>				
<i>Cyp9m10</i>	pyrethroids with phenoxybenzyl moiety	permethrin	(<i>cis</i> -acting)	18
<i>Helicoverpa armigera</i>				
<i>Cyp9a12</i>	pyrethroids	esfenvalerate		47
<i>Cyp9a14</i>	pyrethroids	esfenvalerate		47
<i>Helicoverpa zea</i>				
<i>Cyp321a1</i>				48
<i>Plutella xylostella</i>				
<i>Cyp6bg1</i>	permethrin	permethrin ^{c)}		8
<i>Lygus lineolaris</i>				
<i>Cyp6x1</i>	permethrin			49
<i>Bemisia tabaci</i>				
<i>Cyp6cm1</i>	imidacloprid			50
<i>Blattella germanica</i>				
<i>Cyp4g19</i>	permethrin, deltamethrin			51

^{a)} Exemplified by heterologous expression unless otherwise noted. ^{b)} Exemplified by immunological inhibition assay. ^{c)} Exemplified by RNA interference.

殺虫剤抵抗性系統で過剰発現を示す P450 分子種の一部については、特定の殺虫剤代謝性が実験的に示されているもの、あるいは、過剰発現の遺伝学的特性が明らかにされているものがある (Table 1)。最近ではゲノムプロジェクトの成果を利用し、1つの昆虫種がもつ全 P450 遺伝子を対象

にして、殺虫剤抵抗性系統における過剰発現をマイクロアレイ法により網羅的に解析する研究例が増えてきた。そうした過剰発現を示す P450 分子種の殺虫剤代謝能は、多くの場合、異種細胞発現により確かめられているが、ショウジョウバエ *Cyp6g*¹⁷⁾ とコナガ *Cyp6bg*¹⁸⁾ のように、RNAi の

発現またはインジェクションなど RNA 干渉に基づく手法により直接的に殺虫剤抵抗性への寄与を確かめた研究もある。過剰発現の原因となっている突然変異のシス/トランス作用性を遺伝学的に確かめた研究はいくつかあるが、遺伝子配列の変異として明らかにした研究は、未だにショウジョウバエ *Cyp6g1* の例に限られており、その過剰発現は遺伝子転写調節領域に挿入された転移因子により引き起こされている⁹⁾。

1. ピレスロイド抵抗性ネッタイエカで過剰発現する P450 遺伝子

ネッタイエカは、バンクロフト糸状虫とウエストナイル・ウイルスなどを媒介する重要な媒介蚊で、世界の熱帯地域に分布する。米国、キューバ、ベトナムにおいてネッタイエカ集団にピレスロイド抵抗性が生じていることを確認した報告がある¹⁰⁻¹²⁾。本稿では、ピレスロイド抵抗性ネッタイエカ幼虫で非常に高い過剰発現を示す 1 つの P450 遺伝子 *Cyp9m10* について、その発現産物がピレスロイド代謝性を有すること、過剰発現をもたらす変異がシス作用性を示すこと、および、抵抗性系統蚊の *Cyp9m10* コード領域とその隣接領域にトランスポゾン挿入と遺伝子重複という特異的な構造変化を生じており、これらの構造変化がピレスロイド抵抗性機構として働いている可能性について述べる。

ピレスロイド抵抗性のネッタイエカ JPal-per 系統は、サウジアラビアでの 1981 年の採集に由来し、室内で 20 世代にわたり幼虫をペルメトリンで選抜して確立された¹³⁾。JPal-per 幼虫は、殺虫剤感受性の Ogasawara (OGS) 系統と比べ、ペルメトリンに対し 2500 倍の抵抗性を示すとともに¹⁴⁾、共通してフェノキシベンジル基をもつフェノトリン、エトフェンプロックスに対しても同レベルの高い交差抵抗性を示す¹⁵⁾。JPal-per 幼虫は DDT に対しても 300 倍の抵抗性を示すが、有機リン系とカルバメート系の殺虫剤に対しては、10 倍を下回る感受性の低下しか示さなかった。JPal-per の幼虫期のペルメトリン抵抗性は、P450 の阻害剤であるピペロニルブトキシド (PBO) を併用する殺虫試験において著しく低下した。また、CO 差スペクトルに基づく P450 タンパク質の定量を行うと、JPal-per 4 齢幼虫は OGS 系統の 2.6 倍の P450 を保有しており、さらに、¹⁴C 標識ペルメトリンを用いた *in vitro* 代謝試験を行うと、JPal-per 幼虫は OGS よりも高いペルメトリン代謝活性を示した。これらの結果から、JPal-per 系統のペルメトリン抵抗性機構には P450 解毒代謝の亢進が含まれることが示されている¹⁴⁾。

JPal-per のピレスロイド抵抗性機構には、P450 の他にも、作用点である電位感受性ナトリウムチャンネル (VSSC) の感受性低下 (イエバエ *Musca domestica* の座位番号で表して L1014F アミノ酸置換突然変異に起因する) が含まれてい

る。幼虫期に現れる高いピレスロイド抵抗性は、成虫では著しく低下しており、ペルメトリンの局所施用による比較で成虫は 16 倍の抵抗性比にとどまる (葛西, 未発表)。成虫では VSSC の感受性低下のみを主な抵抗性機構として有しているものとみなされる。

著者らがネッタイエカ P450 cDNA のスクリーニングを始めた 2005 年当時は、本種のゲノムプロジェクトは始まったばかりで、その成果は利用できず、本種および本種と亜種 (または同胞種) の関係にあるアカイエカ種群 (*Culex pipiens* complex) ではわずかな P450 遺伝子配列しか登録されていなかった^{16,17)}。そこで、双翅目昆虫 P450 の各族で比較的配列がよく保存されているシトクロム P450 還元酵素結合領域、ヘム結合領域、およびその他の領域に対応する縮重プライマーを設計し、合わせて 10 対のプライマーセットを使い、cDNA の増幅と配列のスクリーニングを行った。1200 個の cDNA クローンをスクリーニングした結果、11 の既知 P450 配列を含む 57 の異なる遺伝子に由来するとみなされる P450 配列が同定された¹⁸⁾。

このスクリーニングでは得られなかった既知 P450 遺伝子の情報も加え、62 個の P450 cDNA 配列をマイクロアレイ・プローブの設計に利用し、JPal-per 系統幼虫で感受性系統 OGS に比べて過剰発現する P450 遺伝子をマイクロアレイ法により解析した。JPal-per 系統で有意に過剰発現する P450 遺伝子は 3 つあり、*Cyp9m10*、*Cyp4h34*、*Cyp6z10* であった。これら遺伝子の発現量比 (mRNA 量比) を OGS と対比して、より定量に信頼性のおける定量 PCR 法により求めたところ、それぞれ、264 倍、8.3 倍、3.9 倍であった。JPal-per 幼虫における *Cyp9m10* の mRNA 量は、同系統のハウスキーピング遺伝子の 1 つであるリボゾームタンパク質 (ribosomal protein subunit 3) と対比させても約 60% レベルの発現があることから、本系統幼虫において絶対発現量についても著しく高いといえる。*Cyp9m10* と *Cyp4h34* は、JPal-per の幼虫期、中でも終齢幼虫において発現量が最も高いが、蛹期と雌雄それぞれの成虫では発現量が著しく低下している¹⁸⁾。このことは、JPal-per 成虫がペルメトリンにわずかな抵抗性しか示さないことと矛盾しない¹⁹⁾。

2. *Cyp9m10* 遺伝子座とピレスロイド抵抗性の連鎖

Cyp9m10 の遺伝子座がピレスロイド抵抗性に強く連鎖していることは、2 通りの交配実験により確かめている。1 つは、JPal-per 系統と OGS 系統の間にできた *F1* を OGS で戻し交配することにより得られた *BC1* 子孫において、「JPal-per 系統に由来する *Cyp9m10* 遺伝子重複ハプロタイプの有無」と「抵抗性型と感受性型の表現形を隔てるペルメトリンの識別濃度 (0.015 ppm) における生死」の関連を調べることであった²⁰⁾。

2 つ目の方法は、主要な抵抗性要因を残したまま JPal-per

の遺伝的背景を殺虫剤感受性系統由来のものに置き換えた派生系統を作出し、その遺伝的構成を確かめることであった。JPal-per を殺虫剤感受性系統 SLAB と 14 世代にわたり戻し交配し、世代ごとに幼虫を 0.02 ppm のペルメトリンで選抜し、ペルメトリンの濃度を上げて 8 世代さらに内系交配と殺虫剤選抜を行ない、コンジュニック系統となる ISOP450 確立した¹⁹⁾。ISOP450 幼虫は、ペルメトリンに関し 1300 倍の抵抗性を示したが、JPal-per と同レベルの *Cyp9m10* 遺伝子の過剰発現を生じており、JPal-per 由来の *Cyp9m10* 対立遺伝子が固定されていた。一方で、もともと JPal-per にあった *kdr* 突然変異遺伝子と *Cyp4h34* の過剰発現が失われていた²¹⁾。

3. *Cyp9m10* の殺虫剤代謝性

Cyp9m10 の殺虫剤代謝性を確かめるため、昆虫培養細胞で誘導発現させた *Cyp9m10* を使い、ペルメトリンの代謝性を試験した。まず、*Cyp9m10* cDNA を挿入した組換え体 pMT-DEST48 (Invitrogen) プラスミドを作出し、これをショウジョウバエ細胞 S2 に導入し、導入遺伝子を安定的に保有する細胞株を得た (駒形, 未発表)。次に、このプラスミド・システムで利用可能な硫酸銅を使った誘導により、*Cyp9m10* を大量に発現させ、回収したマイクロソーム画分に¹⁴C 標識ペルメトリンを加え、代謝物を二次元薄層クロマトグラフィーで展開した。その結果、ペルメトリンのフェノキシベンジル基の 6 位の炭素が水酸化された可能性の高い代謝産物 (6HO-permethrin) が得られている (葛西, 未発表)。幼虫の中腸に含まれる P450 を直接使った *in vitro* ペルメトリン代謝実験においても、同等な移動度を示す代謝産物が殺虫剤感受性の OGS 系統に比べて JPal-per 系統で過剰に現れることが確認されており¹⁴⁾、異種細胞発現系を用いた結果と合致した。

4. *Cyp9m10* 過剰発現に働くシス作用性変異

JPal-per 幼虫で最も顕著に過剰発現した *Cyp9m10* に焦点をあて、過剰発現の遺伝学的特性と近隣のゲノム配列に生じている構造変化を調べた²⁰⁾。JPal-per と OGS の交雑で得た *F1* 幼虫を使い、両親に由来する 2 つの *Cyp9m10* 対立遺伝子 (それぞれ、*Cyp9m10^{JPP}* と *Cyp9m10^{OGS}*) の発現量比を対立遺伝子特異的定量 PCR 法に基づいて測定したところ、*Cyp9m10^{JPP}* 対立遺伝子に関する cDNA 量は、*Cyp9m10^{OGS}* の 240 倍であった。この値は、先に述べた 2 つの親系統のそれぞれで測定した *Cyp9m10* の発現量に基づく発現量比 (JPal-per/OGS) の値 (約 260 倍) とほぼ等しかったことから、過剰発現をもたらしている遺伝的変異は、シス作用性を示し、JPal-per 蚊の *Cyp9m10* 遺伝子座の近傍に存在することが予想された。一方、同じ *F1* を使って、ゲノム中の遺伝子量についても同様な方法により定量を行った

ところ、*Cyp9m10^{JPP}* 対立遺伝子の遺伝子量は *Cyp9m10^{OGS}* の 2.3 倍を示し、JPal-per 系統において *Cyp9m10* 遺伝子が倍加していると予想された。

Cyp9m10 の配列をプローブとしてサザンブロッティングを行ったところ、JPal-per のゲノムからは *Bgl*II による消化で 2 種類の長さの断片が確認された。これらの 2 つの断片はどちらも *Cyp9m10* とその上流配列を含んでいたが、興味深いことに上流約 1 kb の位置から両者の配列は全く異なっていた。ネットアイエカでは現在ゲノムプロジェクトが進行中であるが、公開されているドラフト配列と照合したところ、JPal-per から得られた 2 種類の *Cyp9m10* の上流配列 (−1 kb 以遠) の配列のうち、一方は本来 *Cyp9m10* の約 100 kb 下流に存在している配列であることが分かった。

この照合結果から、JPal-per 系統で遺伝子重複を生じている 2 つの *Cyp9m10* 遺伝子の構成は、それぞれの遺伝子が約 100 kb の増幅単位に含まれ、同じ向きに並んでいるという 1 つのモデルによって矛盾なく表される (Fig. 1)。これら重複遺伝子の間では一致して、転写開始点から 160 塩基上流に 670 塩基長の挿入があった。この挿入配列は、ORF を含まず、末端に逆向きに配された相同性が不完全な 24 bp の繰り返し配列をもち、さらにその両端には、標的配列の重複 (TSD: target site duplication) と考えられる TA が隣接している。この特徴をもつ配列は、ネットアイエカのゲノム中に高コピーで散在しており、MITE (miniature inverted transposable element) に属する転移因子の一種であると考えられる。我々はこの配列を *CuRE1* と名付けた。

以上に述べたように、*Cyp9m10* の高発現は転写調節領域に起きた何らかのシス作用性変異が原因であり、また、遺伝子量の倍加も多少の効果を与えていると考えられる。転写開始点間近の上流に起きた *CuRE1* の挿入が過剰発現において何らかの影響を及ぼしたかどうかについては、今後の実験的証明が待たれる。

5. 今後の研究課題

ごく最近、遺伝子重複を生じていないが、構造遺伝子とその上流域 (約 3 kb) に関して、*CuRE1* 挿入部位とその配列を含めて、JPal-per 系統が保有する *Cyp9m10* 重複遺伝子的一方 (*Cyp9m10^{JPP}*) にほぼ完全に一致するハプロタイプ (Fig. 1) が JHB-NIID-B 系統から見つかった (糸川, 未発表)。JHB-NIID-B 由来の *Cyp9m10* は OGS 由来の同遺伝子と比較して、それらの *F1* 幼虫で測定した場合、約 40 倍の過剰発現を示したことから、*CuRE1* 配列の挿入が過剰発現に関するシス作用性変異の 1 つである可能性が高まった。これに関連して、興味深い問題が新たに浮上した。それは、JPal-per では遺伝子量が倍化していることを考慮して、JHB-NIID-B 由来の *Cyp9m10* に示された 40 倍の過剰発現を単純に 2 倍したとしても、JPal-per 系統が示す *Cyp9m10* の約 260

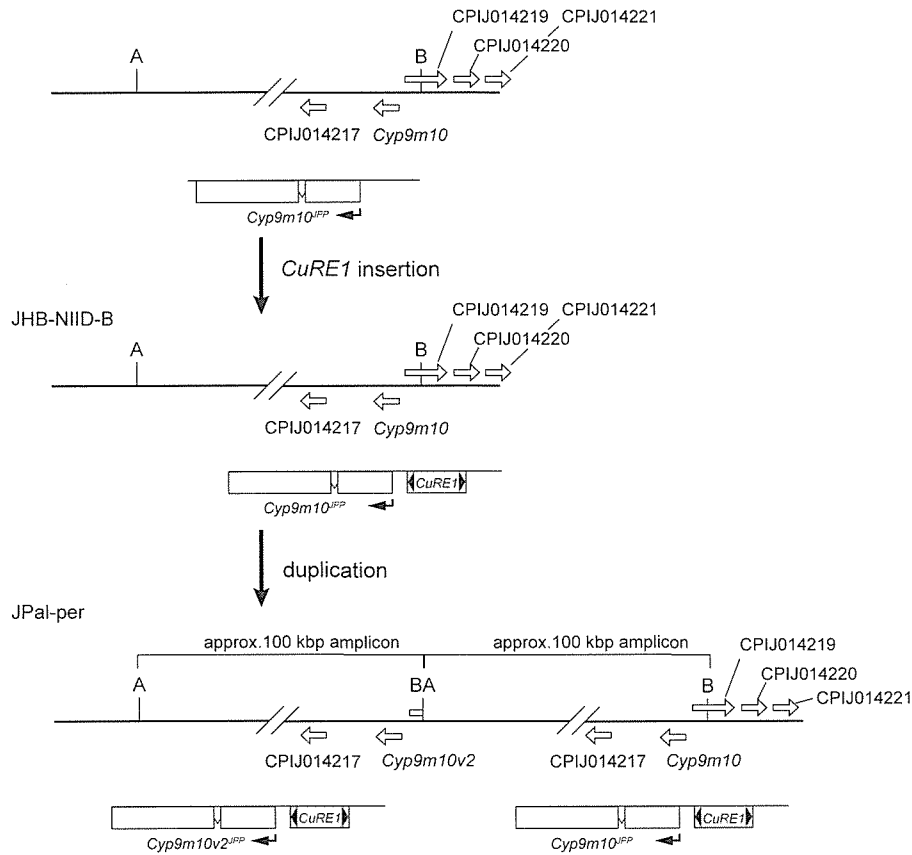


Fig. 1. A model of *Cyp9m10* haplotype evolution by transposon insertion and subsequent gene duplication. Doglegs and outline arrows show the direction of *Cyp9m10* gene and other genes, respectively.

倍の過剰発現に届かないことである。すなわち、遺伝子重複に伴い、*Cyp9m10* 構造遺伝子近隣の配列が変化したことにより、遺伝子の発現調節に変更が生じている可能性がある。しかしながら、重複によりできた JPal-per の 2 つの *Cyp9m10* 構造遺伝子は、配列が完全に一致するため、それぞれの転写物の配列では区別できない。そのため、遺伝子発現制御の分化を確かめるには、従来の方法によっては困難であるが、それぞれの遺伝子領域に対する RNA ポリメラーゼの結合性を指標にして転写調節変異を *in vivo* で解析する手法 (haploChip 法)²²⁾ が 1 つのアプローチとなる。

遺伝子重複後に長い年月が経つことにより、配列がかなり異なってきているカイコ (*Bombyx mori*) の *Cyp9A19-22* クラスターの遺伝子の間では、組織特異的発現性が異なっているという報告がある²³⁾。また、タバコスズメガ (*Manduca sexta*) の *Cyp9a4* と *Cyp9a5* の間では、異なる薬剤誘導性を示すという報告もある²⁴⁾。これらの研究例にも示されるように、小進化の過程でネッタイエカ (*Cyp9m10*) 遺伝子座に生じた *CuRE1* 挿入と遺伝子重複の各ステップが遺伝子発現の組織特異性にどのように影響を及ぼしたかを調べることは、殺虫剤抵抗性の発現と絡んで、今後、重要な研究課題になると考える。

JPal-per 系統はサウジアラビアに由来するが、構造遺伝子と *CuRE1* 挿入を含めた上流域の配列がこの系統と一致する *Cyp9m10* の遺伝子重複ハプロタイプは、ケニヤとシンガポールからも発見されており、これらのハプロタイプとピレスロイド抵抗性には個体レベルで明確な相関があった。また、JHB-NIID-B 系統に見出された *CuRE1* 挿入をもつ遺伝子重複のないハプロタイプはさらに多くの東南アジアの国々で見ついている (糸川, 未発表)。JPal-per 系統における *Cyp9m10* の過剰発現は、幼虫期にしか生じないこと、言い換えると、成虫のピレスロイド抵抗性には役立ちそうもないことを述べてきた。ピレスロイド系殺虫剤の多くは、エトフェンプロックスなどの少数の例外を除き、魚毒性の問題から水系で発生する害虫の防除にはあまり利用されてこなかった。どのような化学的防除の影響を受けてこれらの *Cyp9m10* ハプロタイプがネッタイエカ集団に広まったのかに興味深い。今後さらにこれらのハプロタイプの頻度分布を調査すると共に、*Cyp9m10* の示す他の殺虫剤に関する代謝性も明らかにする必要があるといえる。

6. おわりに

害虫種の集団で殺虫剤抵抗性の発達を監視するには、従

来, 殺虫試験により薬剤の半数致死濃度 LC_{50} (または半数致死薬量 LD_{50} , 半数ノックダウン時間 $KT50$) を推定したり, より簡易に識別濃度 (または識別薬量, 識別処理時間) における生残率を求めたりする方法がとられてきた。殺虫剤抵抗性の主要な生化学的機構とその原因となる突然変異が解明されていれば, そのような変異を対象とした分子ジェノタイピングにより, 抵抗性の監視が容易になる。殺虫剤作用点であるアセチルコリンエステラーゼや VSSC に関しては, 殺虫剤感受性低下の原因となる点突然変異が多くの害虫種で同定されている^{25,26)}。たとえそれらの作用点遺伝子の配列が未知の害虫種であっても, タンパク質配列の高い相同性を利用して比較的容易に対象種における cDNA 配列を新たに決定することで抵抗性の原因となる点突然変異が明らかにされてきた。作用点の感受性低下を分子ジェノタイピングによりモニターすることは, すでに実用的な手段となっている。

殺虫剤解毒代謝の亢進については, エステラーゼの活性増大であれば, 生化学的に呈色反応を行うこと, あるいはその遺伝的原因が遺伝子増幅であることが解明されているモモアカアブラムシ (*Myzus persicae*)²⁷⁾ やアカイエカ種群蚊²⁸⁾ においては, 分子ジェノタイピングを行うことにより検査が可能となっている。しかしながら, 最も広範な殺虫剤群の解毒代謝に関わる P450 については, 抵抗性発達監視の目的で過剰発現をしている分子種を生化学的に検出することは今のところ極めて困難である。キイロショウジョウバエの *Cyp6g1*²⁹⁾ とイエバエの *Cyp6d1*³⁰⁾ については, 抵抗性 (または特定 P450 分子種の過剰発現) を DNA 配列の変異に基づいて分子ジェノタイピングすることが可能になっている。著者らが研究対象とした *Cyp9m10* の過剰発現が厳密にピレスロイド抵抗性の要因であることを示すには, 今後の実証が必要であるが, 少なくとも, 過剰発現性と不可分の関係にある *Cyp9m10* 遺伝子重複ハプロタイプを標的にして分子ジェノタイピングを行うことは可能になっている。

疾病媒介昆虫については, 現在, ネットアイエカを含む 3 属の蚊種とコロモジラミでゲノムプロジェクトの成果が利用可能になっている (ドラフト段階も含む)⁴⁾。これらの昆虫種では, 抵抗性に寄与する分子種の特定とそのような分子種が関わる抵抗性の検出に向けて, P450 に限らず, 全解毒代謝酵素遺伝子を対象として, 主にマイクロアレイ法による網羅的な解析が進行中である (Table 1 の引用文献参照)。

殺虫剤抵抗性に関わる P450 分子種を特定することは, そのような分子種を対象にして選択毒性の高い P450 酵素の阻害剤や P450 遺伝子の転写調節を攪乱させる核内受容体結合性化合物を開発することにも役立つ。また, このアイデアは, 解毒代謝を担う P450 分子種に限らず, エクジソンなど昆虫生理活性物質の生合成と代謝を担い昆虫種間で相同

性が高い P450 分子種に対しても同様に当てはまる。

引用文献

- 1) R. Feyereisen: "Comprehensive Molecular Insect Science - Biochemistry and Molecular Biology. Vol. 4", L. I. Gilbert ed. Elsevier, Oxford, pp. 1–77, 2005.
- 2) S. H. Lee, J. S. Kang, J. S. Min, K. S. Yoon, J. P. Strycharz, R. Johnson, O. Mittapalli, V. M. Margam, W. Sun, H.-M. Li, J. Xie, J. P. Wu, E. F. Kirkness, M. R. Berenbaum, B. R. Pittendrigh and C. J. M.: *Insect Mol. Biol.* doi: 10.1111/j.1365-2583.2010.01024.x (2010).
- 3) C. Strode, C. S. Wondji, J. P. David, N. J. Hawkes, N. Lumjuan, D. R. Nelson, D. R. Drane, S. H. Karunaratne, J. Hemingway, W. C. Black IV and H. Ranson: *Insect Biochem. Mol. Biol.* **38**, 113–123 (2008).
- 4) http://www.vectorbase.org/Culex_quinquefasciatus/Info/Index 2010年7月20日閲覧。
- 5) R. Feyereisen: *Biochem. Soc. Trans.* **34**, 1252–1255 (2006).
- 6) 篠田徹郎: "P450 の分子生物学 第2版", 大村恒雄, 石村 巽, 藤井義明 編. 講談社, 東京, pp. 208–216, 2009.
- 7) C. McCart and R. H. Ffrench-Constant: *Pest Manag. Sci.* **64**, 639–645 (2008).
- 8) M. A. Bautista, T. Miyata, K. Miura and T. Tanaka: *Insect Biochem. Mol. Biol.* **39**, 38–46 (2009).
- 9) H. Chung, M. R. Bogwitz, C. McCart, A. Andrianopoulos, R. H. Ffrench-Constant, P. Batterham and P. J. Daborn: *Genetics* **175**, 1071–1077 (2007).
- 10) T. Li, Q. Lan and N. Liu: *J. Med. Entomol.* **46**, 1430–1435 (2009).
- 11) H. Kawada, Y. Higa, Y. T. Nguyen, S. H. Tran, H. T. Nguyen and M. Takagi: *PLoS Negl. Trop. Dis.* **3**, 391 (2009).
- 12) M. Rodriguez, E. Ortiz, J. Bisset, J. Hemingway and E. Saledo: *Med. Vet. Entomol.* **7**, 117–121 (1993).
- 13) A. Amin and J. Hemingway: *Bull. Entomol. Res.* **79**, 361–366 (2009).
- 14) S. Kasai, I. S. Weerasinghe and T. Shono: *Arch. Insect Biochem. Physiol.* **37**, 47–56 (1998).
- 15) I. S. Weerasinghe, S. Kasai and T. Shono: *Pestic. Sci.* **26**, 158–161 (2001).
- 16) S. Kasai, T. Shono and M. Yamakawa: *Insect Mol. Biol.* **7**, 185–191 (1998).
- 17) S. Kasai, I. Weerasinghe, T. Shono and M. Yamakawa: *Insect Biochem. Mol. Biol.* **30**, 163–171 (2000).
- 18) O. Komagata, S. Kasai and T. Tomita: *Insect Biochem. Mol. Biol.* (2010).
- 19) M. C. Hardstone, C. Leichter, L. C. Harrington, S. Kasai, T. Tomita and J. G. Scott: *Pestic. Biochem. Physiol.* **89**, 175–184 (2007).
- 20) K. Itokawa, O. Komagata, S. Kasai, Y. Okamura, M. Masada and T. Tomita: *Insect Biochem. Mol. Biol.* **40**, 631–640 (2010).
- 21) M. Hardstone, O. Komagata, S. Kasai, T. Tomita and J. Scott: *Insect Mol. Biol.* doi: 10.1111/j.1365-2583.2010.01030.x (2010).
- 22) J. Knight, B. Keating, K. Rockett and D. Kwiatkowski: *Nature Genet.* **33**, 469–475 (2003).
- 23) J. Ai, Q. Yu, T. Cheng, F. Dai, X. Zhang, Y. Zhu and Z. Xiang: *Mol. Biol. Reports* **37**, 1657–1664 (2010).

- 24) J. Stevens, M. Snyder, J. Koener and R. Feyereisen: *Insect Biochem. Mol. Biol.* **30**, 559–568 (2000).
- 25) Y. Kono and T. Tomita: *Pestic. Biochem. Physiol.* **85**, 123–132 (2006).
- 26) T. Davies, L. Field, P. Usherwood and M. Williamson: *Insect Mol. Biol.* **16**, 361–375 (2007).
- 27) L. Field and S. Foster: *Pest. Manag. Sci.* **58**, 889–894 (2002).
- 28) F. Villani, G. White, C. Curtis and S. Miles: *Bull. Entomol. Res.* **73**, 153–170 (2009).
- 29) J. Schmidt, R. Good, B. Appleton, J. Sherrard, G. Raymant, M. Bogwitz, J. Martin, P. Daborn, M. Goddard and P. Batterham: *PLoS Genet.* **6**, e1000998 (2010).
- 30) F. Rinkevich, R. Hamm, C. Geden and J. Scott: *Insect Biochem. Mol. Biol.* **37**, 550–558 (2007).
- 31) M. B. Murataliev, V. M. Guзов, F. A. Walker and R. Feyereisen: *Insect Biochem. Mol. Biol.* **38**, 1008–1015 (2008).
- 32) C. Sabourault, V. M. Guзов, J. F. Koener, C. Claudianos, F. W. Plapp, Jr. and R. Feyereisen: *Insect. Mol. Biol.* **10**, 609–618 (2001).
- 33) F. Zhu and N. Liu: *Arch. Insect Biochem. Physiol.* **67**, 107–119 (2008).
- 34) N. Liu and J. G. Scott: *Biochem. Genet.* **34**, 133–148 (1996).
- 35) G. D. Wheelock and J. G. Scott: *J. Exp. Zool.* **264**, 153–158 (1992).
- 36) S. Kasai and J. G. Scott: *Insect Biochem. Mol. Biol.* **32**, 1–8 (2001).
- 37) S. Maitra, S. M. Dombrowski, M. Basu, O. Raustol, L. C. Waters and R. Ganguly: *Gene* **248**, 147–156 (2000).
- 38) N. Jousseen, D. G. Heckel, M. Haas, I. Schuphan and B. Schmidt: *Pest. Manag. Sci.* **64**, 65–73 (2008).
- 39) N. Jousseen, I. Schuphan and B. Schmidt: *Chem. Biodivers.* **7**, 722–735 (2010).
- 40) P. J. Daborn, J. L. Yen, M. R. Bogwitz, G. Le Goff, E. Feil, S. Jeffers, N. Tijet, T. Perry, D. Heckel, P. Batterham, R. Feyereisen, T. G. Wilson and R. H. ffrench-Constant: *Science* **297**, 2253–2256 (2002).
- 41) R. A. Festucci-Buselli, A. S. Carvalho-Dias, M. de Oliveira-Andrade, C. Caixeta-Nunes, H. M. Li, J. J. Stuart, W. Muir, M. E. Scharf and B. R. Pittendrigh: *Insect Mol. Biol.* **14**, 69–77 (2005).
- 42) T. L. Chiu, Z. Wen, S. G. Rupasinghe and M. A. Schuler: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **105**, 8855–8860 (2008).
- 43) L. A. McLaughlin, U. Niazi, J. Bibby, J. P. David, J. Vontas, J. Hemingway, H. Ranson, M. J. Sutcliffe and M. J. Paine: *Insect Mol. Biol.* **17**, 125–135 (2008).
- 44) P. Muller, E. Warr, B. J. Stevenson, P. M. Pignatelli, J. C. Morgan, A. Steven, A. E. Yawson, S. N. Mitchell, H. Ranson, J. Hemingway, M. J. I. Paine and M. J. Donnelly: *PLoS Genet.* **4**, (2008).
- 45) C. S. Wondji, H. Irving, J. Morgan, N. F. Lobo, F. H. Collins, R. H. Hunt, M. Coetzee, J. Hemingway and H. Ranson: *Genome Res.* **19**, 452–459 (2009).
- 46) D. A. Ameny, R. Naguran, T. C. Lo, H. Ranson, B. L. Spillings, O. R. Wood, B. D. Brooke, M. Coetzee and L. L. Koekemoer: *Insect Mol. Biol.* **17**, 19–25 (2008).
- 47) Y. Yang, L. Yue, S. Chen and Y. Wu: *Pestic. Biochem. Physiol.* **92**, 101–105 (2008).
- 48) M. Sasabe, Z. Wen, M. R. Berenbaum and M. A. Schuler: *Gene* **338**, 163–175 (2004).
- 49) Y. C. Zhu and G. L. Snodgrass: *Insect Mol. Biol.* **12**, 39–49 (2003).
- 50) I. Karunker, J. Benting, B. Lueke, T. Ponge, R. Nauen, E. Roditakis, J. Vontas, K. Gorman, I. Denholm and S. Morin: *Insect Biochem. Mol. Biol.* **38**, 634–644 (2008).
- 51) J. W. Pridgeon, L. Zhang and N. Liu: *Gene* **314**, 157–163 (2003).

略歴

富田 隆史 (とみた たかし)

生年月日：1956年5月16日

最終学歴：1985年3月 九州大学大学院理学研究科博士課程
単位取得退学，理学博士

研究テーマ：殺虫剤抵抗性機構

趣味：ピアノ

糸川 健太郎 (いとかわ けんたろう)

生年月日：1983年7月3日

最終学歴：2008年千葉大学大学院自然科学研究科博士前期課程
修了

研究テーマ：殺虫剤抵抗性の分子生物学

趣味：写真，山歩き

駒形 修 (こまがた おさむ)

生年月日：1971年10月1日

最終学歴：千葉大学大学院自然科学研究科博士後期課程単位
取得退学，博士(学術)

研究テーマ：衛生害虫の殺虫剤抵抗性

葛西 真治 (かさい しんじ)

生年月日：1970年4月2日

最終学歴：1998年3月 筑波大学大学院農学研究科博士課程
修了

研究テーマ：衛生害虫の防除法と殺虫剤抵抗性機構

趣味：昆虫写真