

平成 21 年 4 月 1 日現在

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2007 ～ 2008

課題番号：19780042

研究課題名（和文） 鱗翅目昆虫の農薬耐性獲得の分子基盤

研究課題名（英文） Molecular mechanism of resistance to insecticide in lepidopteran

研究代表者

山本 幸治 (Kohji Yamamoto)

九州大学・大学院農学研究院・助教

研究者番号：00346834

研究成果の概要：

カイコ(*Bombyx mori*)を対象として、生体外異物の解毒代謝に関与する解毒酵素群について研究をすすめている。代表的第二相解毒酵素であるグルタチオン転移酵素(GST)は、生体外異物ならびに内因性の求核化合物に還元グルタチオンを抱合し、体外への排出を促進する。GST は遺伝子ファミリー(class)を形成しており、複数のアイソザイムが存在することが分かっている。本研究では、基質特異性の異なる5種のカイコ GST アイソザイムを同定した。

交付額

(金額単位:円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,100,000	0	1,100,000
2008 年度	2,000,000	600,000	2,600,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,100,000	600,000	3,700,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農学・応用昆虫

キーワード：環境、酵素、昆虫、プロテオーム、農薬、

1. 研究開始当初の背景

農薬耐性害虫の出現が大きな社会的問題となっている。その農作物被害は日本のみならず世界各地において多数みられる。その解決には、昆虫の農薬代謝ならびに農薬耐性を獲得する機構の理解が必要である。農業害虫の多くは鱗翅目昆虫に属するが、鱗翅目昆虫の農薬代謝に関する分子生物学的研究の例は、ハエや蚊などの双翅目昆虫類に比べて少ない。鱗翅目昆虫のモデルであるカイコ(*Bombyx mori*)を対

象とし、農薬代謝に関わる解毒酵素の分子レベルでの特徴、特に基質特異性ならびに発現機構について解析することは、身近に存在する害虫の解毒機構を知る上で貴重な見聞となり、有効性の高い農薬の開発の基礎として極めて重要である。

2. 研究の目的

本研究では、カイコ生体内での GST の動態を

解析する。以下にあげる項目が本研究の目的である。

(1)カイコゲノム中に存在するGST遺伝子ファミリーを同定する。

(2)同定したGSTの組換えタンパク質を作製し、その代謝機構について比較する。すなわち、GSTの遺伝子多型に基づくアミノ酸配列の違いが外来異物の代謝に及ぼす影響について調査する。

(3)それら酵素の誘導機構については遺伝子レベルではノーザン解析を、そしてタンパク質レベルではウエスタン解析を用いて検索する。

3. 研究の方法

本課題の研究方法を以下に述べる。

(1)カイコ GST 遺伝子ファミリーの同定
KAIKOBLAST

(<http://kaikoblast.dna.affrc.go.jp/>) により、カイコゲノム中に存在する GST ホモログを検索した。その結果をもとに GST をクローニングし、塩基配列を決定した。

(2)カイコ GST の組織局在性

カイコ幼虫より主要な 5 組織である脂肪組織、絹糸腺、中腸、精巣そして卵巣を摘出し、Total RNA ならびに粗抽出液を調製した。GST mRNA の組織局在性は、ノーザン解析にて、タンパク質レベルにおいてはウエスタン解析を用いて調べた。

(3)カイコ GST の基質特異性

カイコ GST の組換え酵素を作製した。これらの精製標品を用い、基質特異性を反応速度論的に解析した。

(4)カイコ GST の誘導

ノーザン解析のプローブは GST の ORF 部分をもとに作製した。各 GST に対する特異的抗体を利用し、ウエスタン解析によりカイコ GST タンパク質の誘導について調べた。

4. 研究成果

得られた研究成果は以下の通りである。

(1)カイコ GST 遺伝子ファミリーの同定

カイコゲノム中に 5 種類の GST を見いだした。それぞれの GST をクローニングし、配列決定した。BLAST Search ならびに系統学的解析により、それぞれ delta (bmGSTD)、epsilon (bmGSTE)、

sigma (bmGSTS)、omega (bmGSTO)そして zeta class (bmGSTZ)に属することが分かった。

(2)カイコ GST の組織局在性

ノーザン解析により組織局在性について調査した結果、これら GST の mRNA は 5 齢幼虫の組織中に広く分布していることが分かった。一方、特異抗体を用いたウエスタン解析の結果、それぞれの GST タンパク質は脂肪組織中においてのみ発現していることが明らかとなった。

(3)カイコ GST の基質特異性

bmGSTD、bmGSTS、bmGSTO については生体外異物 1,2-ジクロロ-4-ニトロベンゼン (CDNB)および内因性の脂質過酸化物質 4 ヒドロキシノネナル (4HNE) に対してグルタチオン (GSH) 転移活性を有していた。bmGSTZ に関しては、CDNB ならびに 4HNE に対して転移活性は検出されなかったため、各種基質を用いてその特異性を網羅的に解析した。その結果、塩素化合物の一種であるジクロロ酢酸への GSH 転移活性そして脱塩素化反応を触媒していることが明らかとなった。

(4)カイコ GST の誘導

塩素化合物をカイコ幼虫に塗布したところ、脂肪組織中に bmGSTZ タンパク質が過剰に発現することがウエスタン解析により認められた。以上のことより、bmGSTZ は塩素化合物の解毒に関与することが示唆された。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 8 件)

(1) Kohji Yamamoto, Hiroshi Fujii, Yoichi Aso, Yutaka Banno, Katsumi Koga
Expression and characterization of a sigma-class glutathione S-transferase of the fall webworm, *Hyphantria cunea*.
Biosci. Biotechnol. Biochem., **71**, 553-560 (2007)
(査読あり)

(2) Kohji Yamamoto, Pingbo Zhang, Yutaka Banno, Kazuhiro Nishikawa, Akifumi Nishisaka, and Kei Tamura
Comparative analysis of cuticle proteins of the silkworm by two dimensional electrophoresis.
Sericologia, **47**, 53-58 (2007)
(査読あり)

(3) 山本幸治

鱗翅目昆虫の解毒酵素、グルタチオン転移

酵素の機能比較から見えるもの。
化学と生物, **45 (11)**, 749-751 (2007)
(査読なし)

- (4) Kohji Yamamoto, Satoshi Teshiba and Yoichi Aso

Identification of glutathione S-transferase of the rice leaffolder moth, *Cnaphalocrocis medinalis* (Lepidoptera: Pyralidae): Comparison of its properties of glutathione S-transferases from other lepidopteran insects GST.

Pesticide Biochem. Physiol., **95**, 125-128 (2008)

(査読あり)

- (5) Kohji Yamamoto, Sumiharu Nagaoka, Yutaka Banno and Yoichi Aso

Biochemical properties of an omega-class glutathione S-transferase of the silkworm, *Bombyx mori*

Comp. Biochem. Physiol., **149C**, 461-467 (2009)

(査読あり)

- (6) Kohji Yamamoto, Fumio Miake and Yoichi Aso

Characterization of glutathione S-transferase of the saturniid moth, *Samia cynthia pryeri* (Lepidoptera: Saturniidae).

J. Appl. Entomol., **133**, 278-283 (2008)

(査読あり)

- (7) 山本幸治・手柴智史・紙谷聡志・伴野 豊・麻生陽一

コブノメイガにおけるグルタチオン転移酵素活性の検出。

Entomotech, **32**, 63-65 (2009)

(査読あり)

- (8) Kohji Yamamoto, Yuichi Shigeoka, Yoichi Aso, Yutaka Banno, Makoto Kimura, and Takashi Nakashima

Molecular and biochemical characterization of a zeta-class glutathione S-transferase of the silkworm.

Pesticide Biochem. Physiol., (2009) (in press)

(査読あり)

[学会発表] (計 9 件)

- (1) 山本幸治・手柴智史・伴野 豊・麻生陽一
シンジュサン中腸のグルタチオン転移酵素。
平成 21 年度蚕糸・昆虫機能利用学術講演会、
2008 年 3 月 21 日、名古屋

- (2) 山本幸治・長岡純治・重岡佑一・麻生陽一

*Bombyx mori*由来グルタチオン転移酵素(オメガクラス)の機能解析。

2008年度日本農芸化学会、2008年3月28日、
名古屋

- (3) 山本幸治・長岡純治・麻生陽一

Bombyx mori 新規グルタチオン転移酵素の
同定ならびに機能解析。

2007年度日本農芸化学会中四国・西日本支
部合同大会、2007年9月15日、山口

- (4) 山本幸治・手柴智史・佐藤 光・伴野 豊・
麻生陽一

コブノメイガ由来グルタチオン転移酵素の精
製ならびにその諸性質。

日本蚕糸学会第73回関西支部・第63回九州
支部合同大会、2007年11月9日、京都

- (5) Koji Yamamoto, Pingbo Zhang, Yutaka Banno

Expression and Characterization of a Sigma-Class Glutathione S-Transferase of the Fall Webworm, *Hyphantria cunea*.

The 21th Protein Society, 2007 年 7 月 24 日、
Boston

- (6) 山本幸治・伴野 豊・麻生陽一

鱗翅目昆虫グルタチオン転移酵素群の機能
解析。

日本生化学会、2008 年 12 月 6 日、神戸

- (7) 山本幸治・重岡佑一・伴野 豊・麻生陽一
デハログナーゼ活性を有するカイコ・グルタチ
オン転移酵素。

日本農芸化学会西日本支部会、2008 年 9 月
20 日、長崎

- (8) 山本幸治・一瀬博文・伴野 豊・麻生陽一

カイコ・シトクロム P450 の構造解析、発現系
の構築ならびに基質の探索。

平成 21 年度蚕糸・昆虫機能利用学術講演会、
2009 年 3 月 21 日、東京

- (9) 山本幸治・米田一成・大島敏久・麻生陽一
カイコ由来オメガクラス・グルタチオン転移酵
素の発現ならびに機能解析。

日本農芸化学会、2009 年 3 月 29 日、福岡

[その他]

ホームページ等

(1)カイクプロテオームデータベース
<http://rcshigen.lab.nig.ac.jp/ISPD/ISPDU10JSP>

(2)研究成果データベース
<http://hyoka.ofc.kyushu-u.ac.jp/search/details/K001650/index.html>

6. 研究組織

(1)研究代表者

山本 幸治 (Kohji Yamamoto)
九州大学・大学院農学研究院・助教
研究者番号:00346834

(2)研究分担者

該当ありません。

(3)連携研究者

該当ありません。