

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 4 年 6 月 10 日現在

機関番号：12101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K06044

研究課題名(和文)ハスモンヨトウ由来培養細胞における薬剤代謝のミニマム・エッセシャルの同定

研究課題名(英文) Identification of Minimal Essentials of insecticide resistance in cultured cell lines in *Spodoptera litura*

研究代表者

菊田 真吾 (Kikuta, Shingo)

茨城大学・農学部・准教授

研究者番号：90718686

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、ハスモンヨトウ由来培養細胞数株を用いて、薬剤耐性に関わる遺伝子を総ざらいに明らかにすることが目的である。細胞間比較トランスクリプトームで解毒分解に関わる候補遺伝子を得た。次にこれら遺伝子の介在を評価するため、トランスフェクション試薬による遺伝子導入系を構築した。一過発現系による薬剤耐性付与を検証することで、ピリダリル耐性への寄与を実証することを目的とした。導入した候補3遺伝子によりピリダリル耐性向上に寄与したと考えられる。次に、これら候補遺伝子の詳細な絞り込みを行った。ピリダリル耐性には、CYPXXXとGSTYYY(遺伝子名は伏せる)が発現することで、耐性が高まることを見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

薬剤抵抗性において、薬剤の標的分子の変異だけでは抵抗性が説明できない。抵抗性の昆虫個体を用いた解析では、その他の代謝系の変異や活性の解析には、遺伝子数が多く、また、それらの発現する場所や時期も様々であり、生存につながるために必要とされる遺伝子の同定は困難である。本課題では、生体を反映し単純化された培養細胞を用いることで、抵抗性に関わる遺伝子を総ざらいに明らかにした。同定された遺伝子は、他の薬剤での抵抗性発達への関与や転写レベル測定に基づくバイオマーカー開発に展開することができる。

研究成果の概要(英文)：This study is to identify CYP, GST, and ABC transporter genes related to insecticide resistance in the cultured cell lines. I obtained the candidate genes against pyridalyl using the comparative mRNA transcriptome analyses. The purpose of this study was to verify the pyridalyl resistance conferred by the transient expression system. Three candidate genes introduced into the transfection reagents were considered to have contributed to the improvement of pyridaril resistance. I found that the expression of CYPXXX and GSTYYY (gene names will not be disclosed) enhanced pyridaril resistance.

研究分野：植物保護科学

キーワード：培養細胞 ピリダリル

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

薬剤抵抗性において、薬剤の標的分子の変異だけでは抵抗性が説明できない。抵抗性の昆虫個体を用いた解析では、その他の代謝系の変異や活性の解析には、遺伝子数が多く、また、それらの発現する場所や時期も様々であり、生存につながるために必要とされる遺伝子の同定は困難である。本課題では、生体を反映し単純化された培養細胞を用いることで、抵抗性に関わる遺伝子を総ざらいに明らかにする。

### 2. 研究の目的

チョウ目昆虫ハスモンヨトウ幼虫は、広食性で植物の地上部を食害する。これまでに化学農薬を用いた防除が遂行されてきたが、薬剤代謝に関与する遺伝子により、薬剤に対する抵抗性が発達した昆虫が出現している。これまでの一遺伝子による活性では、抵抗性の付与に十分な説明ができない。また、薬剤代謝の遺伝子の発現場所や時期は多様であり、生存に必要な最小限の遺伝子の実体は未解明である。本課題では、昆虫生体を反映し、単純化されたハスモンヨトウ由来培養細胞の薬剤感受性株と耐性株の遺伝的背景を比較し、抵抗性を付与できる因子すべてを同定することを目的とする。

### 3. 研究の方法

#### <ハスモンヨトウ由来培養細胞の薬剤感受性評価>

ハスモンヨトウ由来培養細胞は、血球由来 SI25 細胞、胚子由来 SI45 細胞、脂肪体由来 SI63 細胞の 3 株系統を用いた。薬剤化合物は、フルベンジアミド、ピリダリル、クロルフェナピル、トルフェンピラドを用いた。これら細胞と化合物を組み合わせ、薬剤感受性を評価した。定法である死細胞計測に用いられる LDH 活性による吸光測定を行ったが、これら細胞では計測が困難であったため、トリパンブルー染色による細胞の生死判定を行い、半数致死濃度を算出した。研究開始当初フルベンジアミドを用いた薬剤耐性を評価する予定であったが、本研究で供した全ての細胞株において高い薬剤耐性を示したことから、細胞内に薬剤作用点があるとされている農薬化合物を新たに加えて、薬剤耐性株を選抜した。

#### <ハスモンヨトウ由来培養細胞への遺伝子発現系の構築>

ハスモンヨトウ培養細胞株を用いた一過的な遺伝子発現系がなかったため、その構築から行った。本培養細胞はチョウ目昆虫由来であるため、既存の pIEx4 ベクターでの発現が可能であった。遺伝子導入系構築には、EGFP を導入したプラスミドベクターを用いた。エレクトロポレーション法とトランスフェクション試薬による遺伝子導入を検討した。

#### <ハスモンヨトウ由来培養細胞株間における比較トランスクリプトーム>

ハスモンヨトウ培養細胞株間の mRNA 発現を調査した。解毒分解関連酵素遺伝子の発現量 FPKM をヒートマップで示した。

#### <薬剤耐性付与に関わる解毒分解酵素遺伝子の同定>

SI63 細胞において遺伝子発現が高い遺伝子を得た。複数の候補遺伝子を pIEx4 EGFP ベクターに組換え、ピリダリル添加時における細胞の生死をトリパンブルー染色で評価した。

### 4. 研究成果

#### <ハスモンヨトウ由来培養細胞の薬剤感受性評価>

SI45 はどの化合物に対しても感受性が高かった。一方で、SI63 細胞は、SI45 に比べ、100 倍以上の感受性差がみられた。たとえば、フルベンジアミドでは、昆虫が致死する 10  $\mu$ M レベルでは、細胞死に至らず、最も感受性が高い SI25 細胞でも 80  $\mu$ M の添加で致死した。SI63 細胞では、300  $\mu$ M フルベンジアミドでも致死がほとんどみられなかったことから、SI63 細胞は薬剤耐性が高いと考えられた。また、フルベンジアミド標的受容体 RYR の配列において、抵抗性コナガでみられたようなアミノ酸変異はみられなかったことから、SI63 細胞の薬剤耐性は、解毒酵素によるものであると考えられた。研究開始前の予備実験においてフルベンジアミドに対する薬剤耐性株を選抜していたが、SI63 細胞においてフルベンジアミドが高濃度であったため耐性株の獲得に至らなかった。このことからトランスクリプトームによる比較発現解析が困難となる可能性が高いと判断した。本研究では、ピリダリルに対する薬剤耐性細胞株 SI63-R を得た。

#### <ハスモンヨトウ由来培養細胞への遺伝子発現系の構築>

SI63 細胞のピリダリル感受性細胞株に一過的な遺伝子導入・発現を行った。昆虫培養細胞に導入実績があるエレクトロポレーション装置の設定を詳細に検討したが、ハスモンヨトウ培養細胞が電圧に対して極めて弱く、いずれのパラメーターでも高い導入効率条件を見出すことができなかった。電圧は 50V-125V、パルス間隔 50 ms 固定、パルス幅 0.5-2 ms など 30 条件程度

を検討したが、最も高い遺伝子導入効率は16%で細胞生存率は5%であり、本研究では遺伝子導入に至らなかった。次にトランスフェクション試薬を用いた遺伝子発現系を検討したところ、TransIT-insect および TransIT-2020 で50%以上の遺伝子導入効率を得た(図1)。細胞生存率は90%以上であったことから、本トランスフェクション系を用いて、薬剤耐性の付与の実験を行った。

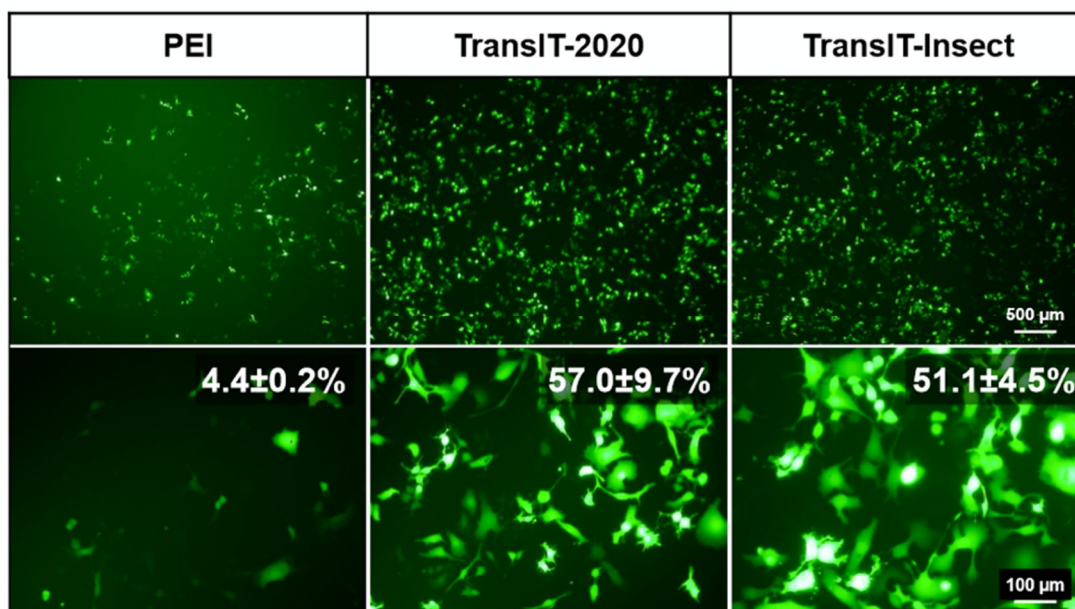


図1 SI63細胞への遺伝子導入

EGFPをマーカー遺伝子として用いた。PEIを用いてSI63細胞(1×10<sup>6</sup>個)にトランスフェクションを行った。PEIの添加量を5μgとし、プラスミドDNAの添加量を0, 2, 4μgに設定した。試薬添加3日後に、細胞のGFP蛍光について観察した。遺伝子導入効率は顕微鏡の可視領域あたりで算出し、平均±S.D.で示した。

### <ハスモンヨトウ由来培養細胞株間における比較トランスクリプトーム>

ハスモンヨトウ由来解毒分解酵素遺伝子CYP遺伝子やGST, ABCトランスポーター遺伝子等をグループ化し、培養細胞株3系統3反復の発現量を示した(図2)。論文投稿準備中であるため、詳細は伏せるが、ピリダリル耐性が高いSI63細胞において発現量が高い遺伝子を選抜した。次に、ピリダリル耐性SI63-R細胞区と発現量を比較することで、候補遺伝子を絞り込んだ。細胞間比較トランスクリプトームでは、薬剤排出トランスポーターの発現は認められなかった。本耐性は、薬剤排出の可能性は極めて低いと考えられた。次に解毒分解に関わる候補遺伝子を得て、CYPXX(遺伝子名は伏せる)とGSTXXX, GSTYYYが候補として挙げられた。

次にトランスフェクション試薬によるSI63細胞への遺伝子発現を行い、ピリダリル添加時における薬剤耐性を評価した。候補遺伝子群3つおよびトランスフェクションマーカーとしてGFP遺伝子をコードするオールインワンベクターを作製し、培養細胞に一過的に遺伝子を発現させ、GFP蛍光を示す発現細胞におけるピリダリル添加時の細胞生死を評価した。その結果、ピリダリル耐性の向上が認められたため、導入した候補遺伝子3遺伝子によりピリダリル耐性向上に寄与したと考えられる。次に、これら候補遺伝子の詳細な絞り込みを行った。3遺伝子のオールインワンベクターを元に、6種類の発現ベクターを作製し、これまで通りに一過性発現と薬剤耐性評価を行った。その結果、ピリダリル耐性には、CYPXXXとGSTYYYが発現することで、耐性が高まることを見出した。今後は、ピリダリルの修飾部位などの詳細な生化学的解析が必要である。本課題の目的であった薬剤耐性に関わる遺伝子群の網羅的同定には



図2 細胞間遺伝子発現

生化学的解析が必要である。本課題の目的であった薬剤耐性に関わる遺伝子群の網羅的同定には

至ったと言える.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------