

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 16 日現在

機関番号：82112

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2013

課題番号：23658054

研究課題名(和文) 昆虫の薬剤排出機構と新規殺虫剤抵抗性機構の解明

研究課題名(英文) Toward a new drug resistance mechanism by excretion in insects

研究代表者

野田 博明(Noda, Hiroaki)

独立行政法人農業生物資源研究所・昆虫微生物機能研究ユニット・研究専門員

研究者番号：40343991

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円、(間接経費) 900,000円

研究成果の概要(和文)： 昆虫の薬物排泄に係わるトランスポーターを探索する。哺乳類や細菌に薬剤を投与すると、特定のABCトランスポーターによって薬剤が排泄され、薬剤効果が低下する現象が知られている。昆虫において、そのようなトランスポーターの働きを明らかにし、殺虫剤抵抗性との関係を調べる。

トビイロウンカを対象に、薬剤排泄に係わる可能性のあるABCトランスポーター遺伝子を2つクローニングした。また、各種殺虫剤処理により発現量が上昇するABCトランスポーター遺伝子1つを明らかにした。これらの遺伝子を培養細胞株で恒常発現させ、薬物の毒性試験により、その遺伝子機能を明らかにする。遺伝子機能実験は、報告時点で継続中である。

研究成果の概要(英文)： Multidrug resistance proteins (ABC transporters) are well known in mammals and bacteria. In insects, multidrug resistance proteins are not well characterized, although these proteins may be related to insecticide resistance in insect pests. ABC transporters that are involved in drug excretion were explored based on sequence similarity, and two candidate genes were cloned. An ABC transporter gene, whose expression was up-regulated upon the insecticide treatment, was also found by microarray analyses. These three ABC transporter genes were introduced into insect cell line (Sf9) and cytotoxicity assay is performing to know whether these genes work for drug excretion.

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農学・応用昆虫学

キーワード：ABC トランスポーター トビイロウンカ 殺虫剤抵抗性 薬剤耐性

1. 研究開始当初の背景

害虫に対する化学的防除法での大きな課題は、薬剤防除における殺虫剤抵抗性である。その対策には、殺虫剤抵抗性の機構が十分に解明されている必要がある。昆虫における殺虫剤の抵抗性の機構として、二つの大きな機構が考えられている。一つは、殺虫剤の作用点(標的分子)の変異であり、遺伝子レベルでの配列変異が原因である(1番目の抵抗性機構)。もう一つは、薬剤が体内で分解・排出されてしまうことである(2番目の抵抗性機構)。皮膚の透過性も関係するといわれているが、数十倍、数百倍の抵抗性は、上記の二つの機構のどちらか、あるいは両方によってもたらされると考えられている。

1番目の抵抗性の機構は、標的分子の遺伝子塩基配列変異を調べることによって、近年大きく研究が進展した。しかし、2番目の機構は、1970年代頃には盛んに研究されたものの、大きな進展があるとは言い難い状況である。殺虫剤の解毒には、カルボキシエステラーゼ、グルタチオントランスフェラーゼ、P450酵素群などが作用するとされているが、実際には抵抗性のレベルとこれら酵素との関係は十分把握できていない場合も多い。

現在最も使われているネオニコチノイド系薬剤においても、抵抗性害虫の出現が報告されるようになってきており、その抵抗性の機構解明が課題となっている。トビイロウンカの場合、2005年頃から感受性の低下が認められ、100倍以上の抵抗性個体群がみついている(松村ら)。P450酵素が抵抗性に関係しているのではないかという報告があるが、その他の薬物解毒に関わる機構があるかもしれないとも思われている。

節足動物ではほとんど研究されていないが、細菌から哺乳類まで広く知られているABCトランスポーターによる多剤耐性機構が昆虫で存在するかどうかを明らかにして、これによって殺虫剤抵抗性が引き起こされる可能性を検証する必要がある。

2. 研究の目的

昆虫の殺虫剤抵抗性に関する新規の機構を発見・解明することを目的とする。イネ害虫であるトビイロウンカを対象に、ABC(ATP-binding cassette)トランスポーター遺伝子を網羅的に解析し、薬物排出に係わるトランスポーターを探索する。哺乳類や細菌などでは、特定のABCトランスポーターの働きによって投与薬剤の効果が低下する現象が知られており、多剤耐性と呼ばれている。害虫の殺虫剤抵抗性発達の機構についてはこのような現象は明確には知られていない。トランスポーターによる新規の殺虫剤抵抗性機構の存在を想定して、トランスポーター遺伝子の探索とその機能解析を行い、殺虫剤抵抗性対策に資する。

3. 研究の方法

これまでのカイコのABCトランスポーター解析、トビイロウンカの糖トランスポーター解析の経験をもとに、EST(expressed sequence tag)解析、RNA-Seq解析、ゲノム配列解析のデータを利用して、トビイロウンカのABCトランスポーターを網羅的に解析し、多剤耐性ABCトランスポーターの候補遺伝子を見つけ出す。この遺伝子を培養細胞(昆虫細胞)に発現させ、細胞に薬剤耐性を付与することにより、その遺伝子の薬物排出機能を明らかにする。

トビイロウンカのABCトランスポーターの解析をすすめるために、カイコのBT抵抗性に係わるABCトランスポーター配列と、同じカメムシ目のエンドウヒゲナガアブラムシで、薬剤多剤耐性のABCトランスポーター配列に似ていると考えられている配列をクエリーにして、トビイロウンカのゲノム配列およびRNA-Seq解析配列から候補となるABCトランスポーター遺伝子をブラスト検索により選抜した。得られた遺伝子断片から各種PCRにより、cDNA全長配列を決定した。

また、トビイロウンカのマイクロアレイを利用して、各種殺虫剤を処理したトビイロウンカで発現量が変化する遺伝子を調査し、そのなかから、遺伝子発現量が共通して上昇するABCトランスポーターを特定した。そして、同様にその全長cDNA配列を決定した。用いた殺虫剤は11種で、神経系に働くものを選び出した。これは、施用量をLD₅₀値をもとに決定したが、LD₅₀値の測定が一定の条件でできると考えられる即効性の薬剤を選んだためである。マイクロマニプレーターを用いてアセトン希釈したLD₅₀に相当する薬剤量を処理して4時間後にウンカからtotal RNAを抽出した。薬剤処理して4時間で発現量変化を示す遺伝子をマイクロアレイ(#36481, 4 x 44K Agilent array)で解析を行った。Gene Springを用いて各解析ごとに発現量変化のあるアレイ上のプローブを抽出した。各殺虫剤処理間での共通する遺伝子を探索するには、発現量変化のあったプローブ名を、Ruby scriptを作り、相互に比較検討しすることによって行った。

これらの遺伝子を昆虫細胞発現ベクターである、pIZ/V5-Hisに導入し、Sf9細胞で発現させた。また、Stable cell lineを得るために、ゼオシンで選抜した。これらの細胞を用いて細胞毒性試験をすべく、CellTiter 96® Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay(Promega)を用いて実験条件を整えた。

4. 研究成果

(1) トビイロウンカのABCトランスポーター遺伝子配列の決定

多細胞生物にはABCトランスポーター遺伝子が多数存在し、配列も良く似ている。そこで、これらの中から薬剤排出を担っていると考えられるABCトランスポーターを選び

出す必要がある。

そこで、すでにほ乳類などで多剤薬剤耐性として知られている遺伝子に高い相同性を示すと考えられているエンドウヒゲナガアブラムシの配列をもとに、プラストにより幾つかのトビロウカの ABC トランスポーター遺伝子断片を得た。それらを PCR でつなぎ合わせ、その配列に最も良く似ていると考えられるトビロウカの ABC トランスポーター遺伝子配列 1,522 アミノ酸 (NL_ABC1 遺伝子) を得た。

一方、カイコの Bt 剤抵抗性に係わる遺伝子配列を明らかにしており、その配列に最もよく似た ABC トランスポーター配列を、同様にトビロウカから選び出し、同様に遺伝子配列全長 1,396 アミノ酸 (NL_ABC2 遺伝子) を明らかにした。これらの遺伝子は、ABC ドメインを二つずつ持ち、それぞれ Waker A, Waker B, C-motif を有していた。また、12 箇所の膜貫通領域が推定された。

(2) トビロウカに対する各種殺虫剤の処理と遺伝子発現の網羅的解析

薬剤耐性に係わる因子は、薬剤の処理によって遺伝子発現量が上昇したりする可能性が考えられた。実際にどのような遺伝子が発現量変化を示すのかを明らかにするために、次の 11 種類の殺虫剤をマイクロマンプレーターで処理した。有機リン剤 (フェントロチオン MEP, フェントエート PAP)、カーバメート剤 (カルバリル NAC, フェノブカルブ BPMC)、ピレスロイド剤 (エトフェンプロックス EP, ペルメトリン PM)、ネライストキシン剤 (ネライストキシン蓂酸塩 NT, チオシクラム TC)、ネオニコチノイド剤 (アセタミプリド AAP, イミダクロプリド IMI)、フェニルピラゾール剤 (フィプロニル FIP) の 11 種で、各作用性ごとに 2 種類ずつ選んだ。フェニルピラゾール剤は 1 種類とした。

薬剤処理を 3 反復し、各薬剤の反復ごとにそれぞれ一色法でマイクロアレイ解析を行った。アセトン処理のコントロールと比べて、有意に発現量が増加した遺伝子プローブと低下した遺伝子プローブを抽出した。処理薬剤 10 剤以上で共通して発現量が増加した遺伝子が 10 個、9 剤で共通して発現量が低下した遺伝子が 3 個見つかった。また、幾つかの殺虫剤処理により、発現量が増加した遺伝子のなかに、ABC トランスポーターが見つかった (図 1)。この遺伝子の発現量を各殺虫剤処理で調べて見たところどの処理でも上昇しており、特に、有機リン剤 2 種、NAC, NT で有意な上昇が見られた (図 2)。

そこで、この ABC トランスポーター遺伝子 (NL_ABC3) についても、全長 cDNA 配列を解析し、1,313 アミノ酸をコードしていること、Waker A, Waker B, C-motif などのモチーフを有していること、そして 12 箇所の膜貫通領域が存在することを確認した。この遺伝子は、殺虫剤によって発現が誘導される

と考えられ、殺虫剤の排出などにかかわっている可能性が考えられた。

ProbeName	Fold change	NCBI Blastx description	e-value
BPH009711	3.43	PREDICTED: similar to lipid storage droplets surface-binding protein 1 [Tribolium castaneum]	1.00E-23
BPH063958	3.36	NADH dehydrogenase subunit 5 [Taenia crassiceps]	2.4
BPH008993	2.62	GK10354 [Drosophila willistoni] gb EDW72195.1 GK10354 [Drosophila willistoni]	0.076
BPH015551	2.53	hypothetical protein Abu_0673 [Arcobacter butzleri RM4018]	0.012
BPH050579	2.52	PREDICTED: multidrug resistance protein 1-like [Acyrtosiphon pisum]	2.00E-08
BPH059607	2.46	hypothetical protein CRE_04257 [Caenorhabditis remanei]	2.00E-16
BPH058752	2.44	hypothetical protein DICPUDRAFT_98030 [Dictyostelium purpureum]	0.015
BPH015933	2.43	PREDICTED: multidrug resistance protein 3-like isoform 1 [Acyrtosiphon pisum]	0
BPH017495	2.37	PREDICTED: multidrug resistance protein 3-like isoform 2 [Acyrtosiphon pisum]	7.00E-29
BPH035049	2.36	hypothetical protein DAPPUDRAFT_299826 [Daphnia pulex]	1.00E-10
BPH004032	2.34	putative transcription antiterminator [Clostridium difficile QCD-66c26]	5.4

図 1 . 有機リン剤のフェントエート (PAP) 処理により発現量が上昇した上位の遺伝子。Fold change は上昇の倍数を表す。赤字は ABC トランスポーター遺伝子。

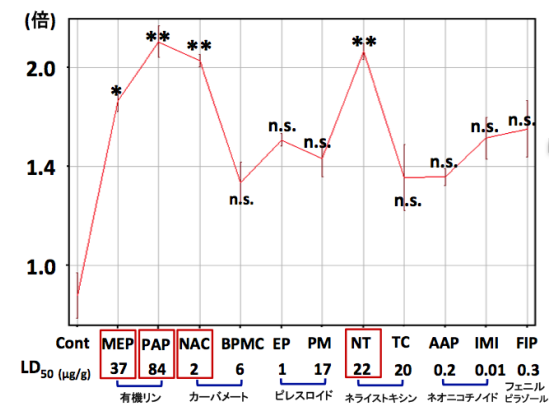


図 2 . 11 種の薬剤処理 (LD₅₀ 薬量で 4 時間) による ABC トランスポーター遺伝子の発現量の上昇。星印は統計的に有意 (* 5%と ** 1%) な上昇を示す。

(3) 3 種 ABC トランスポーター遺伝子の細胞株での発現

トビロウカから、薬剤排泄に係わる可能性のある 3 種の ABC トランスポーター遺伝子の配列を得た。これらが、実際薬物を細胞外に排泄する能力を有するかどうかを明らかにするために、Sf9 細胞での発現を試みた。3 種遺伝子の全長配列を pIZ/V5-His ベクターに組み込み、細胞に導入し、さらに抗生物質 Zeocin で、遺伝子が染色体に取り込まれた細胞を選抜した。2 回試みたが、うまく細胞を選抜できなかったため、現在もう一度試みている。また、染色体に確実に取り込ませるために、トランスポゾンベクターである piggyback に組み込んでいる。組み込んだ後は、細胞毒性のある殺虫剤を処理し、ABC トランスポーター遺伝子を組み込んだ細胞で、耐性が高まることを証明する。この細胞での

発現のステップで時間を費やし、この成果報告書作成時にはまだ毒物の排泄の証明までは至っていない。早急に、ABC トランスポーター遺伝子が染色体に組み込まれた細胞を作製し、毒性試験をおこない、これらの遺伝子が殺虫剤の排泄に働いているかどうかを明らかにする。

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 3件)

Atsumi S, Miyamoto K, Yamamoto K, Narukawa J, Kawai S, Sezutsu H, Kobayashi I, Uchino K, Tamura T, Mita K, Kadono-Okuda K, Wada S, Kanda K, Goldsmith MR, Noda H (2012) A single amino acid mutation in an ABC transporter gene causes resistance to Bt toxin Cry1Ab in the silkworm, *Bombyx mori*. PNAS E1591-E1598.
Jouraku A, Yamamoto K, Kuwazaki S, Urio M, Suetsugu Y, Narukawa J, Miyamoto K, Kurita K, Kanamori H, Katayose Y, Matsumoto T, Noda H (2013) KONAGabase: a genomic and transcriptomic database for the diamondback moth, *Plutella xylostella*. BMC Genomics 14: 464.
Tomizawa M, Noda H (2013) High mortality caused by high dose of dsRNA in the green rice leafhopper *Nephotettix cincticeps* (Hemiptera: Cicadellidae). Appl. Entomol. Zool. 48: 553-559.

[学会発表](計 14件)

野田博明・旭美穂・小泉蓉子・真田幸代・松村正哉・松田一彦・中平国光(2011) ビイロウンカの nAChR 遺伝子の単離と機能的発現. 農林害虫防除研究会、2011年6月9-10日、山口市
野田博明(2011) イネの最大の害虫ウンカ:研究の歴史と現状、そして今後. NIAS シンポジウム「ウンカ防除の現状と展望」(招待講演)2011年9月9日 秋葉原コンベンションセンター
野田博明・中村有希・河合佐和子・末次克行・古崎利紀・篠田徹郎・山本公子・真田幸代・松村正哉・中平国光・尾添嘉久(2012) トビイロウンカのイミダクロプリド抵抗性機構の現状:P450 酵素遺伝子の高発現. 日本農薬学会第37回大会、2012年3月14-16日、岡山大学
Noda H (2012) Molecular and genomics approach against planthopper problems. Seminar in Zhejiang University(招待講演)、2012年3月20日、中国浙江大学昆虫科学院

中村有希・末次克行・古崎利紀・篠田徹郎・真田幸代・松村正哉・山本公子・野田博明(2012) 殺虫剤処理により発現変動するトビイロウンカ遺伝子のマイクロアレイ解析. 第56回日本応用動物昆虫学会、2012年3月27-29日、近畿大学
篠田徹郎・粥川琢巳・岡田千恵子・田中良明・大門高明・末次克行・山本公子・野田博明(2012) RNAiによるトビイロウンカの新規殺虫剤標的遺伝子の探索. 第56回日本応用動物昆虫学会、2012年3月27-29日、近畿大学
Suetsugu Y, Daimon T, Jouraku A, Kobayashi T, Nakamura Y, Kuwazaki S, Tanaka Y, Tanaka H, Shiotsuki T, Shinoda T, Yamamoto K, Noda H (2012) Progress in genome sequencing of the brown planthopper, *Nilaparvata lugens*. Arthropod Genomics 2012, 2012年5月30日-6月2日, Kansas City, アメリカ合衆国
Noda H, Nakamura Y, Kawai S, Koizumi Y, Suetsugu Y, Kozaki T, Daimon T, Shinoda T, Yamamoto K, Sanada S, Matsumura M, Nakahira K, Ozoe Y (2012) Imidacloprid resistance in the brown planthopper: Genes for nAChR subunits and P450 enzymes. XXIV International Congress of Entomology(招待講演), 2012年8月19日-8月28日, Daegu, 韓国
野田博明(2012) 虫の薬剤防除における課題:ゲノム科学からのアプローチ. 日本学術会議 公開シンポジウム「植物保護におけるゲノム科学の利用」(招待講演)、2012年11月13日、日本学術会議講堂
Noda H (2012) Planthopper genomics for alleviating its outbreak and critical damage to rice. International Symposium on Rice Functional Genomics(招待講演), 2012年11月26日-11月29日, Chiang Mai, タイ
Noda H (2012) Genomic studies of rice planthoppers for insecticide resistance management. NARO International Symposium 2012 "New insight into insecticide resistance of rice planthoppers and the insect-borne viruses"(招待講演), 2012年12月6日-12月7日, 福岡国際会議場
河合佐和子・小泉蓉子・野田博明(2012) トビイロウンカのニコチン性アセチルコリン受容体(nAChR)遺伝子の識別と発現解析. 第57回日本応用動物昆虫学会、2013年3月27日-3月29日、日本大学藤沢キャンパス
野田博明(2012) 殺虫剤抵抗性の機構と抵抗性マネジメント. 第57回日本応用動物昆虫学会(招待講演)、2013年3月27日-3月29日、日本大学藤沢キャンパス

野田博明・中村有希・末次克行・山本公
子・中平国光 (2013) 各種殺虫剤処理間での
トビイロウンカ発現遺伝子変化の比較.
第 58 回日本応用動物昆虫学会、2014 年 3
月 26-28 日、高知大学

6 . 研究組織

(1)研究代表者

野田 博明 (NODA HIROAKI)
農業生物資源研究所・昆虫科学研究領域・
研究専門員
研究者番号：40343991

(2)研究分担者

松本 由紀子 (MATSUMOTO YUKIKO)
農業生物資源研究所・昆虫科学研究領域・
主任研究員
研究者番号：80414944