

令和 2 年 7 月 10 日現在

機関番号：82603

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2019

課題番号：16K08767

研究課題名(和文) デング熱媒介蚊の殺虫剤代謝抵抗性機構に含まれる分子種と原因変異の逆遺伝学的解明

研究課題名(英文) Reverse genetics study on the molecular species and mutations involved in metabolic insecticide resistance of the dengue vector mosquito

研究代表者

富田 隆史 (Tomita, Takashi)

国立感染症研究所・昆虫医科学部・主任研究官

研究者番号：20180169

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：ピレスロイド抵抗性のネッタイシマカSPS系統の蚊において、第1染色体q腕にベルメトリン高排泄性因子が遺伝学的にマップされた。その近傍に存在する脂溶性物質の一次代謝を担うシトクロムP450 (CYP) 遺伝子のクラスターの中から、SPSが殺虫剤感受性系統に比べて高い転写量比を示す2つの遺伝子を選んでノックアウト(KO)体を作成し、遺伝子KOのベルメトリン排泄性低下に及ぼす効果を確認したところ、CYP6BB2がピレスロイド代謝抵抗性機構に含まれる分子種であることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ネッタイシマカは熱帯地域に広く分布するデング熱の媒介蚊であるが、その防除に多用されているピレスロイド系殺虫剤に対する抵抗性の発達が世界的に問題となっている。殺虫剤抵抗性機構に含まれる遺伝子の構造や発現制御の変異を明らかにすると、それらの有無を指標として殺虫剤効力の評価が容易になり、有効な媒介蚊の防除対策に役立つ。本研究はピレスロイド作用点変異に比べて解明が遅れている代謝抵抗性に関わる解毒酵素の分子種を明らかにした。

研究成果の概要(英文)：A genetic factor for high permethrin excretion in the pyrethroid resistance strain SPS was mapped in chromosomal region 1q42 where there is a gene cluster of cytochrome P450 (CYP) that generally functions in primary metabolism of lipophilic substances. Two CYP loci that exhibiting higher transcription ratios in SPS compared to an insecticide susceptible strain were targeted for gene knock out (KO) and the effect of each KO gene was evaluated by the decrease in permethrin metabolite excretion. This study exhibited the involvement of CYP6BB2 in the mechanisms of pyrethroid metabolic resistance.

研究分野：昆虫毒物学

キーワード：殺虫剤抵抗性 シトクロムP450 ゲノム編集 CRISPR/Cas9 遺伝子ノックアウト ネッタイシマカ

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

シンガポールで採集されたネッタイシマカのピレスロイド抵抗性系統 SPS は、ペルメトリンによる 10 世代の室内淘汰により、殺虫剤感受性系統 SMK と比べて 1647 倍のピレスロイド抵抗性を発達させていた。解毒酵素 P450 の阻害剤である PBO を共力剤として用いた場合、SPS の抵抗性比は 33 倍にまで減少することから、SPS の殺虫剤抵抗性には解毒酵素、とりわけ、殺虫剤も含む脂溶性物質の一次代謝を担うシトクロム P450 (CYP) の関与が疑われた<sup>1)</sup>。本種には 150 余りの CYP 遺伝子が存在するが、昆虫ホルモンなどの代謝を担う一部の分子種を除き、その役割が未解明なままであった。

SPS 蚊は、ピレスロイド抵抗性機構として低感受性の作用点変異を併せもつことが知られている<sup>1)</sup>。ピレスロイド化合物の一種であるペルメトリンについて排泄率を測定したところ、SPS は SMK に比べて有意に高い排泄性を示した (図 1)。そこで、ペルメトリンの高排泄性因子のマッピングに基づけば、作用点変異の効果を避けて代謝抵抗性機構に基づく遺伝学的要因をクローズアップ可能なことに着目し、ペルメトリンの高排泄性因子を QTL (量的形質遺伝子座) 解析した。その結果、QTL は第 1 染色体 q 腕上の CYP6AA5、CYP6P12、ほか 3 つの CYP 遺伝子の含まれる領域のもと近傍にマップされた (図 2)。本研究開始前年の連鎖地図に基づく、さらに数センチ・モルガン(cM)離れた動原体側 (CYP6BB2 と CYP6CC1) とテロメア側 (1 つの CYP 遺伝子) の領域を含めると合わせて 9 つの CYP 遺伝子がリストされた。これらの内、マイクロアレイ解析により代謝酵素遺伝子の SPS の系統間転写レベル比 (SPS 対 SMK) で 2 倍以上の高発現を示した遺伝子は CYP6AA5 (2.4 倍) と CYP6BB2 (6.0 倍) であった (表 1)。

SPS 蚊における CYP6AA5 遺伝子は遺伝子重複しており、1 つは SMK 蚊にけるコード配列と同一な CYP6AA5v1、他方は SPS 蚊のみに存在する CYP6AA5v2 (コード配列内に 31 塩基座位と 9 アミノ酸座位に相違) であった。一方、CYP6BB2 のコード配列には両系統に相違はなかった。

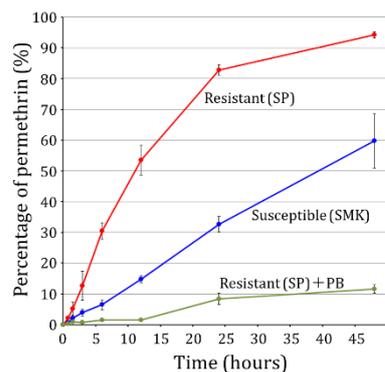


図 1. ペルメトリン排泄率の時間経過

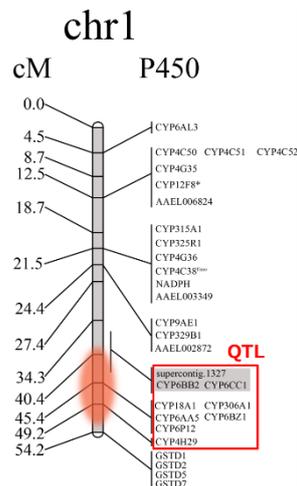


図 2. ペルメトリン高排泄因子の QTL.

表 1. マイクロアレイ解析に基づく転写レベルの比較.

Cytochrome P450	Signal intensity		R/S
	SP	SMK	
<b>CYP6BB2</b>	<b>61.62</b>	<b>10.27</b>	<b>6.00</b>
CYP6CC1	0.01	0.01	0.72
CYP18A1	0.11	0.07	1.53
CYP306A1	0.10	0.17	0.62
<b>CYP6AA5</b>	<b>16.97</b>	<b>7.09</b>	<b>2.39</b>
CYP6BZ1	0.22	0.22	1.01
CYP6P12 <sup>AAEL012491</sup>	0.30	0.32	0.93
CYP6P12 <sup>AAEL014891</sup>	0.23	0.25	0.92
CYP4H29	2.72	2.33	1.17

2015 年までにペルメトリン高排泄因子の QTL 近傍に存在すると推定された CYP 遺伝子.

### 2. 研究の目的

ネッタイシマカは熱帯地域に広く分布するデング熱の媒介蚊である。成虫の防除に多用されているピレスロイド系殺虫剤に対する抵抗性の発達により、本種の防除が困難になっている地域が数多く存在する<sup>2)</sup>。本種に対する殺虫剤の有効性が殺虫試験に基づく感受性だけでなく殺虫剤抵抗性個体に存在する遺伝子の構造や発現に関わる変異に基づいて評価できるようになれば、より効果的な化学的防除の選択が可能になると期待される。

本研究では、代表的なピレスロイド系化合物の 1 つであるペルメトリンを用い、この代謝抵抗性に関わる一次代謝酵素の分子種を明らかにすることを目的とした。

### 3. 研究の方法

(1) ゲノム編集: CRISPR/Cas9 法に基づき、ネッタイシマカ SPS 系統の受精卵に対して、CYP6AA5v2 または CYP6BB2 に特異的な標的配列に対合する gRNA をもつ sgRNA、並びに Cas9 mRNA をマイクロインジェクションした。操作の詳細はネッタイシマカ受精卵に対するマイクロインジェクションを行った糸川の方法<sup>3)</sup>に従った。

(2) KO 体の判定と交配: 幼虫全虫体または成虫後脚より抽出したゲノム DNA を使い、ゲノム編集の標的配列周辺配列を PCR 増幅し、遺伝子に生じた変異の存在とその接合性は融解曲線解析により、また、挿入/欠失変異を生じていた配列はダイレクト・シーケンシングにより決定した。

CYP6AA5v2： 処理卵より羽化した1頭の雌(G0)を未処理の SPS 雄と交配して継代ラインを作った。1つのラインのG1は調べたすべての個体が2通りのタイプ(58 bp 欠失と2 bp 欠失)のKO 変異のいずれかをヘテロ接合の状態でもつ雄を複数頭の未処理の SPS 雌と交配し、次世代(G2)以降はマス交配を継続してラインを維持するとともに、ペルメトリン排泄試験に供した。

CYP6BB2： 処理卵より羽化した1頭の雌(G0)を未処理の SPS 雄と交配して継代ラインを作った。G1ではKO 変異をヘテロ接合でもつ雄を複数頭の未処理の SPS 雌と交配した。G2では同一のKO 変異をヘテロ接合でもつ雌雄を選別してマス交配し、次世代(G3)以降はマス交配を継続してラインを維持するとともに、ペルメトリン排泄試験に供した。

(3) ペルメトリン排泄量測定： 葛西の方法<sup>1)</sup>に従い、雌成虫の胸背板に0.88 ngの<sup>14</sup>C-permethrinを局所施用し、処理蚊をシンチレーション・バイアル内に留置し、10時間(CYP6BB2v2のKO体)または24時間後に(CYP6BB2v2のKO体)バイアル付着物と虫体残留物のそれぞれの放射線量を測定し、排泄率 [= 排泄量 / (排泄量 + 体内量)] を求めた。

(4) 遺伝子重複構造の解析： SMK系統の幼虫よりゲノムDNAを抽出し、ナノポアデバイス(Oxford Nanopore Technology)によりDNAシーケンシングを行い、その解読結果をLiverpool系統の1q42染色体領域に含まれるCYP遺伝子クラスターのゲノム配列に対比してHarrPlot解析を行った。

#### 4. 研究成果

(1) CYP6AA5v2のKO効果： 505個のアミノ酸残基を本来コードするCYP6AA5v2から、58塩基欠失と2塩基欠失に基づくフレームシフト変異により、それぞれ、コード残基数が129残基と141残基に減じたKOラインに関して、G2世代における+/+とKO/KOの遺伝子型のペルメトリン排泄率を比較したが、KO体の排泄率に有意な低下は認められなかった(図3)。

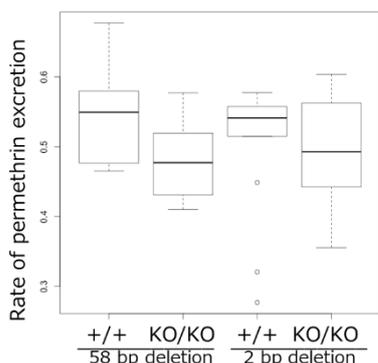


図3. KOラインにおけるCYP6AA5v2遺伝子型によるペルメトリン排泄率。

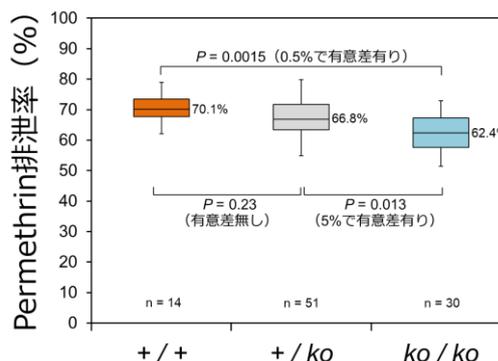


図4. KOラインにおけるCYP6BB2遺伝子型によるペルメトリン排泄率。

(2) CYP6BB2のKO効果： 507個のアミノ酸残基を本来コードするCYP6BB2に、1塩基挿入に基づくフレームシフト変異によりコード残基数が106に減じたKOラインを使い、G3世代世代におけるKO 変異座位に関する3つの遺伝子型の間でペルメトリン排泄率を比較した(図4)。KOホモ接合体には、KO/+と+/+のそれぞれに対して有意な排泄率の低下が認められた。しかしながら、KOラインにおけるKO/KO蚊と+/+蚊のペルメトリン局所施用処理後24時間の排泄率の比(62%/70%)(図4)を同様な処理によるSMK蚊とSPS原系統の排泄率の比(33%/82%)(図1)と比較すると、SPS蚊におけるCYP6BB2のKO効果は限定的であり、他にも高排泄性因子が存在する可能性が残されている。

(3) 1q42染色体領域のCYP遺伝子クラスター： 本研究課題開始後の2018年に更新された本種のLiverpool系統蚊に由来するゲノムDBの情報に基づいて、CYP6AA5遺伝子座近隣に座する遺伝子構成を再検討した。それ以前にはペルメトリン高排泄性因子のもっとも近傍にあると推定していたCYP6AA5とCYP6P12の遺伝子座位(その他3つのCYP遺伝子座位も伴う)は、当時のそれよりセンチモルガン(cM)単位のオーダーで離れていると推定されていたCYP6BB2とCYP6CC1の遺伝子座位と共に、Liverpool蚊では1つのCYP遺伝子クラスターとして1q42染色体領域に存在することが示された(図5)。このクラスターの中にはゲノムDB更新により初めて存在が確認された未命名のCYP遺伝子であるAAEL026582が含まれる。

本研究で材料としているSPS蚊とSMK蚊におけるAAEL026582遺伝子の構造を解析したところ、殺虫剤感受性のSMK蚊では隣接しているAAEL026582とCYP6AA5の遺伝子は、SPS蚊ではこれら2種のCYP遺伝子の繋がりを1つの単位として、順向きに縦列して重複していることが示された(図6)。SPS雌成虫におけるCYP6BB2、AAEL026582、CYP6AA5のmRNAレベルをSMKと定量

PCR により比較したところ、系統間比 (SPS/SMK) は、CYP6BB2 についての 6.6 倍に次いで、AAEL026582 についての 3.4 倍の SPS 蚊における高い発現性が示された (図 7)。SPS 系統のもつ重複した AAEL026582 遺伝子のコード配列にはただ 1 つの塩基置換変異あり、S101 (AGC) であるコード配列 (v1) は SMK と同一で、他方 (v2) は N101 をコードしていた。SPS 蚊の 1q42 領域に他にもペルメトリン高排泄性因子が存在する可能性を試すには、AAEL026582 遺伝子発現におけるの量的／質的変異をさらに検討してゆく必要がある。

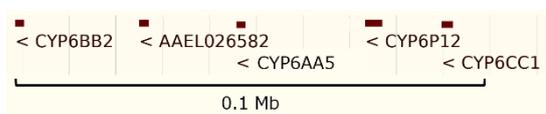


図 5. Liverpool 系統蚊の染色体領域 1q42 に存在する CYP6AA5 遺伝子を含む CYP 遺伝子クラスター。

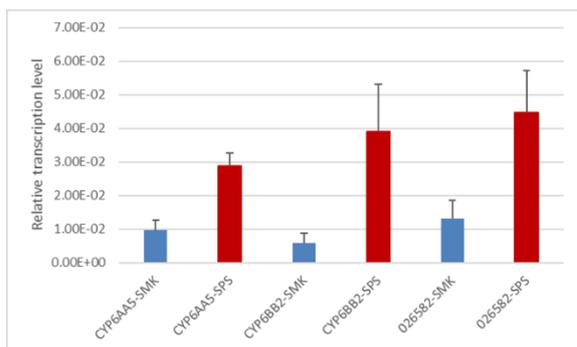


図 7. ピレスロイド抵抗性系統と感受性系統の雌成虫における 3 種 CYP 遺伝子の転写レベルの比較。

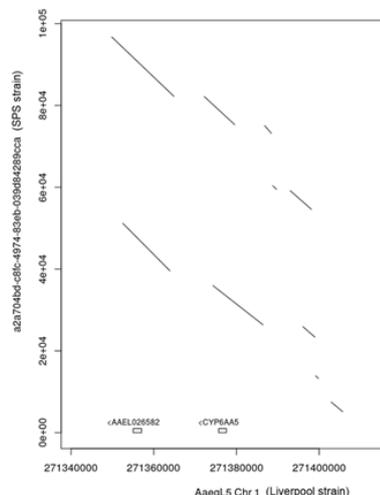


図 6. SPS 系統蚊における CYP6AA5-AAEL026582 を含む遺伝子重複の構造

#### <引用文献>

- 1) Itokawa K, Komagata O, Kasai S, Ogawa K, Tomita T. Testing the causality between CYP9M10 and pyrethroid resistance using the TALEN and CRISPR/Cas9 technologies. *Scientific reports*. 2016;6:24652
- 2) Smith LB, Kasai S, Scott JG. Pyrethroid resistance in *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus*: Important mosquito vectors of human diseases. *Pestic Biochem Physiol*. 2016;133:1-12.
- 3) Kasai S, Komagata O, Itokawa K, Shono T, Ng LC, Kobayashi M, et al. Mechanisms of pyrethroid resistance in the dengue mosquito vector, *Aedes aegypti*: target site insensitivity, penetration, and metabolism. *PLoS neglected tropical diseases*. 2014;8(6):e2948.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 糸川健太郎, 葛西真二, 駒形修, 富田隆史
2. 発表標題 “次世代”の殺虫剤抵抗性研究
3. 学会等名 グローバルヘルス合同大会2017（招待講演）
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 葛西真治, 小川浩平, 糸川健太郎, 駒形 修, 富田隆史
2. 発表標題 ネッタイシマカのピレスロイド剤抵抗性機構（4）解毒酵素遺伝子のノックアウト
3. 学会等名 第68回日本衛生動物学会大会
4. 発表年 2016年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

国立感染症研究所昆虫医科学部 <a href="https://www.niid.go.jp/niid/ja/from-ent.html">https://www.niid.go.jp/niid/ja/from-ent.html</a>
---

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
研究分担者	葛西 真治  (Kasai Shinji)  (80332360)	国立感染症研究所・昆虫医科学部・部長    (82603)	

## 6. 研究組織（つづき）

	氏名 (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担者	駒形 修  (Komagata Osamu)  (20435712)	国立感染症研究所・昆虫医科学部・主任研究官    (82603)	
研究 協力者	小川 浩平  (Ogawa Kohei)		
研究 協力者	糸川 健太郎  (Itokawa Kentaro)  (70769992)	国立感染症研究所・病原体ゲノム解析研究センター・主任研究官    (82603)	