

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 21 日現在

機関番号：82603

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23590501

研究課題名(和文) チクングニア熱媒介蚊対策に資する殺虫剤抵抗性分子機構の研究

研究課題名(英文) Studies on the mechanisms of insecticide resistance in chikungunya mosquito vectors

研究代表者

葛西 真治 (Kasai, Shinji)

国立感染症研究所・昆虫医科学部・主任研究官

研究者番号：80332360

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 0円

研究成果の概要(和文)：チクングニア熱媒介蚊対策に必要な科学的情報を蓄積するために、ネッタイシマカのピレスロイド抵抗性機構を明らかにすることを目的とした。研究は作用点Vsscの変異、皮膚透過性の低下、解毒酵素による代謝、の3つの側面よりアプローチした。その結果、SP系統の抵抗性の主要因として、Vsscのアミノ酸変異に起因した薬剤感受性低下とシトクロムP450酸化酵素系による解毒活性増大が関与していることを明らかにした。また、異種細胞発現系を用いた代謝試験によって、CYP9M6およびCYP6BB2の2つのP450分子種が抵抗性に関与していることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：In order to construct more appropriate strategies for controlling mosquito vectors to reduce the risk of Chikungunya fever, we studied on the mechanisms of pyrethroid-insecticide resistance of *Aedes aegypti*. We focused on (1) Altered target site sensitivity, (2) Reduced penetration of insecticide, and (3) Enhanced metabolic activity, to elucidate the mechanism of the resistance. We found that reduced sensitivity of target site (Vssc) due to amino acid substitutions conferred resistance. Enhanced activity of pyrethroid metabolism by cytochrome P450s was also one of the major factors of the resistance. Further, we identified that both CYP9M6 and CYP6BB2 were capable of metabolizing permethrin and are over produced in SP strain.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・寄生虫学(含衛生動物学)

キーワード：チクングニア ネッタイシマカ ヒトスジシマカ ピレスロイド ペルメトリン 殺虫剤抵抗性 シトクロムP450 kdr

1. 研究開始当初の背景

チクングニア熱はチクングニアウイルスによってもたらされる蚊媒介性の感染症で、ヒトスジシマカやネッタイシマカによって媒介される。インド洋周辺諸島で 2005 年から 2006 年に起こった大流行時には数百名の患者が発生した。この病原ウイルスは非常に感染力が強く、リユニオン島では 2005 年の流行時に島の住人の 3 分の 1 に当たる 266,000 名が罹患したとされる。ヒトスジシマカは日本国内においても青森県以南の全土において広く分布することから、本感染症の国内流行の危険性が近年指摘されている。これらの疾病媒介蚊を効率よく防除するためには殺虫剤の散布が必須となるが、一方で長年の殺虫剤使用によって抵抗性が発達し、防除が困難になることが危惧されている。ネッタイシマカはゲノムプロジェクトによって全遺伝子配列が解明されており、抵抗性機構の解明に有益な遺伝子情報が一般公開されている。私達は 2009 年にシンガポール国内で採集されたピレスロイド剤抵抗性のネッタイシマカ集団を入手した。本集団の抵抗性機構を解明することはまた、近縁種ヒトスジシマカの抵抗性機構解明にも結びつき、チクングニア熱媒介蚊の効率的防除法確立に貢献すると考え、研究を推進した。

2. 研究の目的

ネッタイシマカは世界中の熱帯・亜熱帯地域に生息するヤブカ族の仲間の昆虫で、チクングニア熱の他にもデング熱や黄熱の病原ウイルスを媒介する。私達は 2009 年にシンガポールで採集されたピレスロイド系殺虫剤抵抗性ネッタイシマカ集団を入手し、室内で 10 世代にわたって殺虫剤淘汰した結果、抵抗性比 1650 倍という強い抵抗性系統 (SP) を確立することに成功した。これまでの研究成果として、この抵抗性にはピレスロイド剤の作用点ナトリウムチャンネルのタンパク構造の変化に伴う薬剤感受性低下と解毒酵素シトクロム P450 酸化酵素の活性増大が深く関与していることが分かっている。本プロジェクトにおいては、SP 系統の抵抗性機構を (1) 作用点の感受性低下、(2) 皮膚透過性の低下、(3) 解毒酵素の活性化、の 3 つのアプローチにより解析し、ネッタイシマカのピレスロイド剤抵抗性メカニズムを包括的に解明することを目的とした。

3. 研究の方法

ネッタイシマカ系統

殺虫剤感受性系統として、SMK 系統を用いた。本系統は 20 年以上殺虫剤に触れることなく室内飼育されている。ピレスロイド剤抵抗性系統として、SP 系統を用いた。本系統は成虫をペルメトリンで 10 世代淘汰することによって確立した。ペルメトリンに対する抵抗性レベルは LD50 値の SMK 系統との比で 1650 倍である。

ナトリウムチャンネル遺伝子型の解析

ペルメトリン淘汰の過程で冷凍保存しておいたオス成虫より REDEExtract-N-Amp Tissue PCR Kit (シグマ・アルドリッチ) を用いて DNA を抽出した。ピレスロイド剤抵抗性害虫から広く見つかった L1014F 変異に加え、抵抗性のネッタイシマカやヒトスジシマカから見つかった 5 つのアミノ酸変異 (S989P、I1011M または V、V1016G または I、F1534C、D1763Y) をターゲットにして行った (詳細は Kasai et al., Jpn. J. Infect. Dis. 64, 217-221. に記載)。

皮膚透過性試験およびインビボ代謝試験

600 dpm (0.88 ng) の ^{14}C 標識ペルメトリンをメス成虫胸部背面に処理し、一頭ずつ 6 ml のシンチレーションバイアルに隔離した (図 1)。0.75、1.5、3、6、12、24、48 時間後に成虫をエーテル麻酔により取り出し、メタノールリンスをすることで体表に残ったペルメトリン量を測定した。リンス後の成虫をシンチレーションカクテルとともに磨砕し、体内に残った放射性同位体を定量した。また、バイアルにシンチレーションカクテルを加え、攪拌後に放射性同位体を測定することで排泄されたペルメトリン代謝物量を測定した。

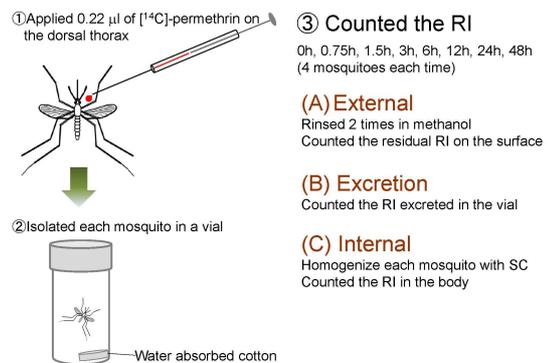


図 1 RI 標識ペルメトリンを用いた皮膚透過性およびインビボ代謝試験

マイクロアレイ解析

メス成虫 (3 日齢) より全 RNA を抽出 (ISOGEN、ニッポンジーン) し、DNase 処理後、アジレントのプロトコールに従い、cRNA を合成した。ゲノムプロジェクトの情報をもとにデザインしたマイクロアレイに cRNA を 1 晩反応させ、常法に従い洗浄後、マイクロアレイスキャナー (アジレント) によって蛍光 (Cy-3) 強度を測定した。

リアルタイム PCR による遺伝子発現量の検証

マイクロアレイ解析に用いた RNA より常法に従い cDNA を合成し、リアルタイム PCR の鋳型とした。マイクロアレイ解析で SP 系統で過剰発現が認められた 6 種の P450 遺伝

子 (CYP6BB2、CYP6Z7、CYP6Z8、CYP9M4、CYP9M5、CYP9M6) について予め SP、SMK 両系統の遺伝子配列を解析し、保存領域からプライマーをデザインした。内部標準遺伝子として RPS3 を用いた。リアルタイム PCR 用のプライマーを用いて行った場合の増幅効率はいずれも 0.998 以上であることを確認した。技術的な繰り返しを 3 回、生物学的繰り返しを 4 回行った。

異種細胞系での P450 タンパクの発現とペルメトリン代謝試験

CYP9M6 と CYP6BB2 の cDNA 全長を pPSC8 ベクターに挿入し、バキュロウイルス AcNPV へ相同組換えを利用して挿入した。またシトクロム P450 レダクターゼ遺伝子とシトクロム b₅ 遺伝子を pFastBac1 ベクターに挿入後、DH10Bac コンピテントセルを形質転換した。バキュロウイルスおよびリコンビナントバキュミドは培養細胞 Sf9 に共感染させ、28 度でインキュベートした。24 時間後にヘミンを加え、さらに 48 時間インキュベートした。細胞を 3000xg 遠心分離にて回収し、リン酸バッファー中、超音波破碎した後、4、10000xg で 15 分遠心分離した。さらに上清を 100,000xg で 1 時間超遠心分離し、沈殿をリン酸バッファーに再懸濁して酵素液とした。酵素液にリン酸バッファー、NADPH、¹⁴C 標識ペルメトリンを加え、25 度で 1 時間インキュベートした。反応液に硫酸アンモニウムと塩酸を加え反応を停止した後、エーテルでペルメトリンおよびその代謝物を抽出した。抽出物を薄層クロマトグラフィーにて展開し (トルエン : 酢酸エチル = 6 : 1)、BAS2500 (富士フィルム) にて定量解析した。

4. 研究成果

ナトリウムチャンネル遺伝子型の検出

ペルメトリン淘汰に伴うナトリウムチャンネル遺伝子型の割合の推移を解析した (表 1)。SMK 系統は 24 個体すべてが感受性タイプであった。淘汰前の SP 集団では、V1016G のハプロタイプと F1534C を持つハプロタイプが混在し、感受性ハプロタイプを持つ個体は認められなかった。V1016G の割合は 43.8% であった。1 度目の淘汰の結果、V1016G の割合は 79.2% に上昇し、2 度目の淘汰後には 100% に達した。V1016G と F1534C はともに抵抗性に関与し、V1016G がわずかにより低感受性型であることが電気生理学的な研究から明らかになっているが今回の解析はそれを裏付けるものとなった。

表 1 ペルメトリン淘汰に伴うナトリウムチャンネル遺伝子型頻度の推移

Amino acid #		Percentage of genotype (%)				
1016	1534	SPS ₀ (n=48)	SPS ₁ (n=48)	SPS ₂ (n=24)	SPS ₁₀ (n=24)	SMK (n=24)
V/V	F/F	0	0	0	0	100
V/V	C/C	30	2	0	0	0
V/G	C/F	54	38	0	0	0
G/G	F/F	17	60	100	100	0

皮膚透過性

ペルメトリンの皮膚残渣量を経時的に測定することで、系統間における薬剤皮膚透過性を比較した (図 2)。両系統とも、皮膚表面上に残渣するペルメトリン量は経時的に減少し、処理 2 - 4 時間後には 50% 以上が体内に透過した。しかし、その速度は系統間で有意な違いが認められなかったことから、皮膚透過性の低下は SP 系統のペルメトリン抵抗性には関与していないことが示された。

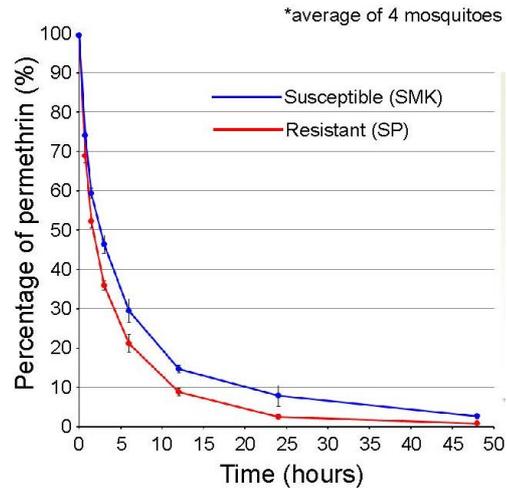


図 2 ペルメトリン皮膚残渣試験

インビボ代謝試験

メス成虫に処理したペルメトリンの排泄量を経時的に定量した (図 3)。感受性系統では処理 24 時間後に 30% 程度が排泄されたのに対し、SP 系統では 80% 以上が排泄された。また、抵抗性系統に予めシトクロム P450 の阻害剤 (PB) を処理した個体では、ペルメトリンの排泄が著しく阻害された。以上のことから、SP 系統は体内に取り込んだペルメトリンを体外に素早く排泄することで、抵抗性を獲得していることが明らかになった。また、その代謝にはシトクロム P450 が深く関与していることも示唆された。

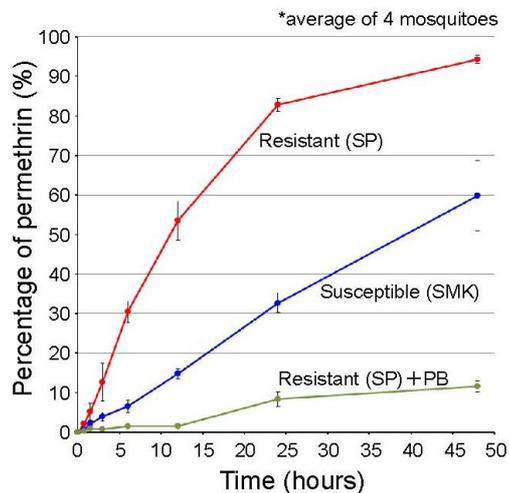


図 3 ペルメトリン排泄量の推移

マイクロアレイ解析

マイクロアレイ解析の結果(P450 遺伝子のみ)を図4に示した。オス、メス、幼虫の解析で共通に SP 系統で高発現が認められ、なおかつ高い P 値が認められた 6 種の P450 分子種(CYP6BB2、CYP6Z7、CYP6Z8、CYP9M4、CYP9M5、CYP9M6)に着目してリアルタイム PCR による発現量の検証を行った。

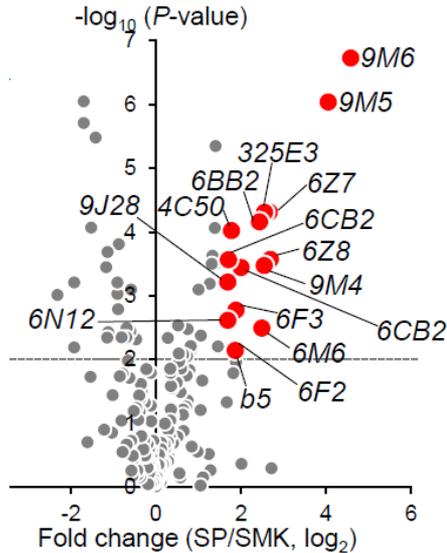


図4 マイクロアレイによるシトクロム P450 遺伝子の発現量の比較(メス)

リアルタイム PCR による遺伝子発現量の検証

マイクロアレイ解析で SP 系統において高発現が認められた 6 種 P450 遺伝子について、リアルタイム PCR による検証を行った(図5)。解析した 6 遺伝子はいずれも SP 系統で多く発現しており、マイクロアレイの解析の精度の高さが確認された。中でも CYP9M6 はメス、オス、幼虫で SMK 系統よりもそれぞれ 23 倍、33 倍、28 倍高発現しており、発現量も高かった。また、CYP6BB2 は SP 系統で 3~5.8 倍過剰発現していたが、発現量が高かったことから、CYP9M6 と CYP6BB2 の 2 分子種が抵抗性に関与している可能性が高いと考えられた。

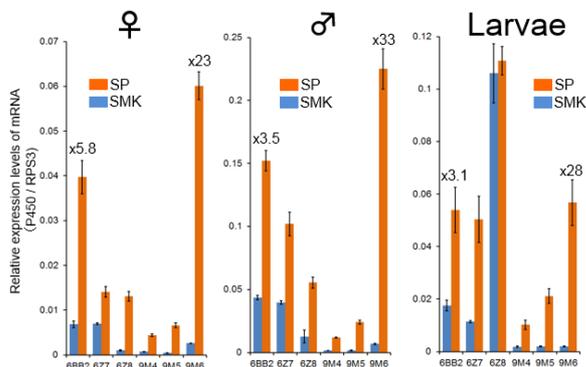


図5 リアルタイム PCR による遺伝子発現量の検証

異種細胞発現系での P450 タンパクの発現とベルメトリン代謝試験

培養細胞 Sf9 に発現させた CYP9M6 および CYP6BB2 のインビトロ代謝試験の結果を図6に示す。いずれの分子種もベルメトリンを 4'HO-permethrin に代謝することが判明した。また、これ以外にも対照区では認められなかった代謝物(未同定)の存在が確認された。

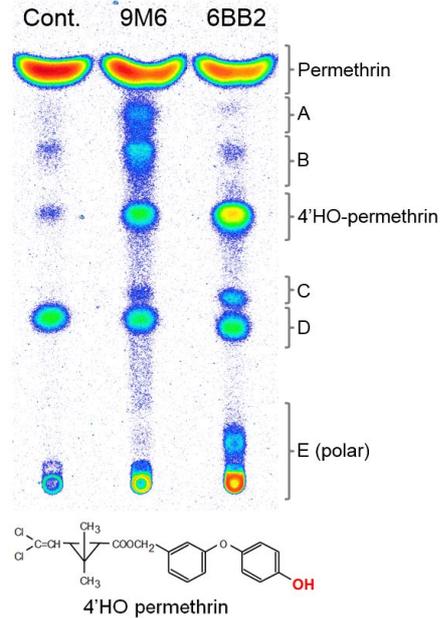


図6 Sf9 細胞に発現させた 2 種 P450 によるベルメトリンのインビトロ代謝

本研究では、SP 系統のベルメトリン抵抗性にピレスロイド剤の作用点ナトリウムチャネルのアミノ酸変異(V1016G)およびシトクロム P450 の過剰発現に伴う解毒活性の増大が関与していることが明らかになった。CYP9M6 と CYP6BB2 は実際にベルメトリンの代謝が認められ、抵抗性に関与していることが示された。しかし、マイクロアレイ解析ではこの他にも複数の P450 分子種の過剰発現が認められ、その中にはピレスロイド剤の代謝が確認されているものも含まれることから、抵抗性は単独の解毒酵素分子種にもたらされるのではなく、複数の分子種の複合的な貢献によってもたらされていると考えられる。また、データとしては示していないが、それぞれの遺伝子の過剰発現はシスもしくはトランスの単独のファクターに制御されているのではなく、複数のファクターが複雑に関与した結果もたらされている可能性が高く、単一の遺伝子のある一部の変異を指標としてジェノタイピングを行うことで、抵抗性レベルを予測するということが容易では無いということが推察された。今後は、今回明らかになった複数の抵抗性因子の抵抗性への貢献度を定量的に解析する手法の確立が求められる。

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2件)

Shinji Kasai, Osamu Komagata, Kentaro Itokawa, Toshio Shono, Lee Ching Ng, Mutsuo Kobayashi, and Takashi Tomita (2014) Mechanisms of pyrethroid resistance in the dengue mosquito vector, *Aedes aegypti*: target site insensitivity, penetration, and metabolism. PLoS Neglected Diseases 8, e2948.

Endang Pujiyati, Hitoshi Kawada, Tshihiko Sunahara, Shinji Kasai and Noboru Minakawa (2014) Pyrethroid resistance status of *Aedes albopictus* (Skuse) collected in Nagasaki City, Japan. Japanese Journal of Environmental Entomology and Zoology 24, 143-153.

〔学会発表〕(計8件)

Endang Pujiyati, Toshihiko Sunahara, Hitoshi Kawada, Emiko Kawashima, Shinji Kasai and Noboru Minakawa Resistance status of *Aedes albopictus* in Nagasaki. 第61回日本衛生動物学会南日本支部大会 2011年11月、宮崎市民プラザ

川島恵美子、砂原俊彦、Endang Pujiyati、比嘉由紀子、二見恭子、葛西真治、川田均、皆川昇 ヒトスジシマカのナトリウムチャンネル遺伝子におけるイントロン配列の解析 第64回日本衛生動物学会大会 2012年3月、信州大学

葛西真治、駒形修、糸川健太郎、小林睦生、冨田隆史 ネットアイシマカ成虫のピレスロイド剤抵抗性機構(2): *in vivo* 代謝試験 第64回日本衛生動物学会大会 2012年3月、信州大学

Endang Pujiyati, Toshihiko Sunahara, Hitoshi Kawada, Emiko Kawashima, Shinji Kasai, Noboru Minakawa Insecticide resistance status of *Aedes albopictus* in Japan 第64回日本衛生動物学会大会 2012年3月、信州大学

葛西真治、駒形修、糸川健太郎、小林睦生、冨田隆史 ネットアイシマカのピレスロイド剤抵抗性機構(3) マイクロアレイおよび連関解析 第64回日本衛生動物学会東日本支部大会 2012年10月、川崎市

葛西真治、駒形修、糸川健太郎、小林睦生、冨田隆史 デング熱媒介蚊のピレスロイド剤抵抗性機構 日本農薬学会第38回大会 2013年4月、つくば市

平田晃一、駒形修、糸川健太郎、山本敦司、

冨田隆史、葛西真治 ネットアイシマカ電位依存性ナトリウムチャンネルの変異とピレスロイド感受性 日本農薬学会第39回大会、2014年3月、京都大学

小川浩平、糸川健太郎、駒形修、葛西真治、冨田隆史 ネットアイシマカのペルメトリン抵抗性に関する量的形質遺伝子座の探索 第58回日本応用動物昆虫学会大会、2014年3月、高知大学

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕
○出願状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者
葛西真治(国立感染症研究所昆虫医科学部)
研究者番号：80332360

(2)研究分担者
冨田隆史(国立感染症研究所昆虫医科学部)
研究者番号：20180169

駒形修(国立感染症研究所昆虫医科学部)
研究者番号：20435712