

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 22 日現在

機関番号：82603

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2016

課題番号：25460525

研究課題名(和文) 新規遺伝子ノックアウト技術に基づく疾病媒介蚊の殺虫剤抵抗性機構の解明

研究課題名(英文) Study on the mechanisms involved in insecticide resistance of vector mosquitoes by genome editing technology

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・室長

研究者番号：20180169

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：ネッタイイエカ集団のピレスロイド抵抗性は過剰発現性のCYP9M10ハプロタイプと強く連鎖していることが遺伝学的研究により示されてきた。本研究では、CYP9M10転写上昇の原因となる転写調節領域の点突然変異をレポーターアッセイにより解明した。また、ピレスロイド抵抗性系統から作出したCYP9M10ノックアウト蚊を使い、CYP9M10が幼虫期のペルメトリン代謝抵抗性の責任分子であることを証明した。

研究成果の概要(英文)：Genetic studies have revealed that pyrethroid resistance of *Culex quinquefasciatus* is strongly associated with overexpressing CYP9M10 haplotypes. In this study, we demonstrated that a point mutation in the core promoter region of CYP9M10 is attributable to the elevated transcription. Moreover, bioassays using CYP9M10-knocked out mosquitoes derived from a pyrethroid resistant strain proved the primary responsibility of CYP9M10 for metabolic resistance to permethrin in larval stages.

研究分野：昆虫毒物学，衛生動物学，遺伝学

キーワード：殺虫剤抵抗性 シトクロムP450 遺伝子重複 遺伝子過剰発現 シス作用性変異 遺伝子ノックアウト
ネッタイイエカ

1. 研究開始当初の背景

疾病媒介蚊の防除には、即効性と人畜毒性の低さから、ピレスロイド系殺虫剤が多用されてきたが、殺虫剤抵抗性の発達が防除対策における重大な問題となっている。ピレスロイド抵抗性のおもな機構には、作用点分子の感受性低下と解毒酵素の活性亢進がある。ピレスロイド系化合物の一次代謝を担う分子は、脂溶性物質を基質として酸素原子付加を基本とする反応を行うシトクロム P450

(P450 と略) である。P450 は多重遺伝子族を形成しており、1つの昆虫種のゲノムに 100 前後の遺伝子が存在する。昆虫ホルモンの代謝など特定の基質触媒性をもつ十数種の P450 分子は、昆虫種を超えてオーソログスな関係が保存されているが、これらを除く分子では、分子進化速度が大きく、基質触媒性活性が互いに重なり合っていたり、基質特異性が未知なものがほとんどである。

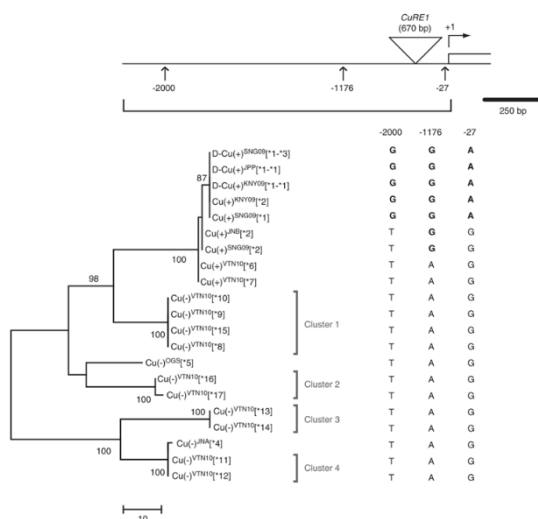


図 1. *CYP9M10* 上流域の配列に基づく最大節約系統樹。上部は解析の対象とした領域を示す。Cu(+) と D-Cu(+)ハプロタイプにある 3 つの多形的座位を右部に示す。

ネッタイイエカは、熱帯地域に世界的に分布し、リンパ系フィラリア症を媒介する蚊である。ネッタイイエカのゲノムには約 170 の P450 遺伝子が存在するが、その中から本種のピレスロイド代謝抵抗性の責任分子となっている P450 分子種を特定し、その構造遺伝子の内/外に生じている抵抗性の原因変異を解明することを最終的な目標として、本研究に先立ち、本研究グループは次のような研究成果を明らかにしてきた。

サウジアラビアでの 1981 年の採集に由来する JPP 系統は、幼虫期に強いピレスロイド抵抗性を示す系統である。JPP 系統幼虫の網羅的な転写産物量の解析に基づき、殺虫剤感受性系統に比べて過剰発現を示す 3 種の P450 が示された¹。このうち、もっとも大きな過剰発現性を示した *CYP9M10* 遺伝子座がペルメトリン抵抗性に遺伝学的に強く連鎖す

ることが示された^{2,3}。また、別の研究グループにより、*CYP9M10* はペルメトリン代謝性を有することも示されている⁴。

JPP 系統では上流域にトランスポゾン *CuRE1* の挿入を受けた *CYP9M10* 構造遺伝子が縦列重複しているが(D-Cu(+) type)、その他の系統からは、*CuRE1* 挿入を有しかつ過剰発現性も示す遺伝子が単一コピーのみ存在するハプロタイプも存在する(Cu(+) type)^{3,5}。*CYP9M10* 構造遺伝子の上流域約 2 kb の範囲の DNA 配列に基づくハプロタイプには多様性があり(図 1)、最高の過剰発現性を示す D-Cu(+) type に至るまでの *CYP9M10* ハプロタイプの進化の系譜には、遺伝子発現量の増進に及ぼす突然変異の斬新的な蓄積があることが推測されていた⁵。

2. 研究の目的

本研究課題では、(1) 多様な *CYP9M10* ハプロタイプのうち、遺伝子発現量の増進に大きく係る領域とそこに含まれるシス作用性変異を解明すること、(2) *CYP9M10* がピレスロイド代謝抵抗性の責任遺伝子であることを逆遺伝学的に最終的に実証すること、の 2 つを目的とした。

3. 研究の方法

(1) *CYP9M10* に過剰発現をもたらすシス作用性変異の解明⁶

JPP 系統 *CYP9M10v1* 遺伝子コピーの転写開始点(+1)を含む約 2.2 kb (nts -2118 to +76) の配列(D-Cu(+) type)、それに相同な JNB 系統(Cu(+) type)と JNA (Cu(-) type; *CuRE1* 挿入なし)の配列、ならびにこれらの配列に欠失または塩基置換を導入して改変した配列を pGL3-GG に挿入したプラスミドを構築し、コガタアカイエカの培養細胞 NIID-CTR に形質移入し、dual-luciferase reporter assay を行った。

(2) ピレスロイド代謝抵抗性の責任遺伝子の逆遺伝学的解明⁷

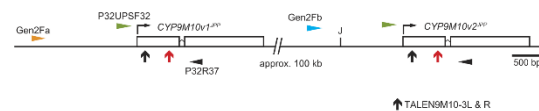


図 2. TALEN と CRISPR/Cas9 の標的部。J は縦列重複により形成された継ぎ目を示す。横向き矢印は直接塩基配列解析のための PCR 増幅と SNIperase 解析に使用したプライマーを示す。

JPP 系統の卵に対し、TALEN 法または CRISPR/Cas9 法に基づくマイクロインジェクションを行い、*CYP9M10* の N 末端近位に変異を誘発し(図 2)、1つの変異イベントに由来するフレームシフト変異をもつ遺伝子型を選抜し、最終的に遺伝子重複を生じている *CYP9M10* 遺伝子コピーの一部またはすべてをノックアウト(KO)したホモ接合体系統を作

出した (図3)。JPP 系統の *CYP9M10* ハプロタイプを構成する *CYP9M10v1* と *CYP9M10v2* は mRNA 配列により識別することはできないが、転写開始点より上流の配列の違いを利用して、v1 と v2 のコピーを特異的に PCR 増幅できることに基づき、誘発変異がいずれのタイプに生じたものか判別した (図2)。

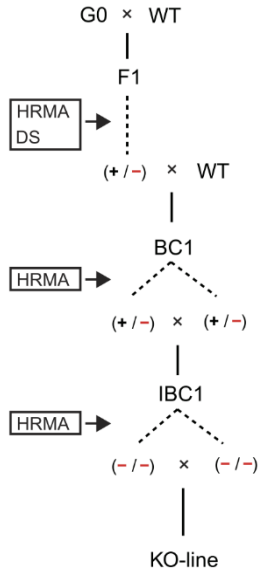


図3. 交配と遺伝型選抜の方法. WT は JPP の原系統, 囲み内の HRMA は高解像度融解解析, DS は直接塩基配列決定によるジェノタイピング法を示す。

4. 研究成果

(1) *CYP9M10* に過剰発現をもたらすシス作用性変異の解明⁶

表1. レポーター・アッセイに用いたプラスミド挿入配列の由来と変異

Plasmid	Origin	Position			
		-2000	-1176	<i>CuRE1</i>	-27
JNA	JNA strain	T	A	-	G
RL (resistant-low)	JNB strain	T	G	+	G
RH (resistant-high)	JPP strain (<i>CYP9M10v1</i>)	G	G	+	A

レポーター・アッセイにより、虫体内での *CYP9M10* の転写レベルが、それぞれ、高度と中程度に高い JPP 系統と JNB 系統³ に由来する RL と RH プラスミドのプロモーター活性を殺虫剤感受性系統 JNA 由来のプロモーターの活性と比較した結果、虫体内における転写レベルを反映した RH>RL>JNA のプロモーター活性が示された (表1, 図4)。RH と RL に共通する JNA との相違点の1つは *CuRE1* トランスポゾン配列の挿入である (表1)。RH 配列から *CuRE1* を取り除いた RH^{-Δ*CuRE1*} プロモーターの活性は RH より増大した (図4) ことから、過剰転写型ハプロタイプに共通して見られる *CuRE1* 挿入 (D-Cu(+)) と Cu(+); 図1) は、転写レベルの増進に貢献し

ていないと考えられる。

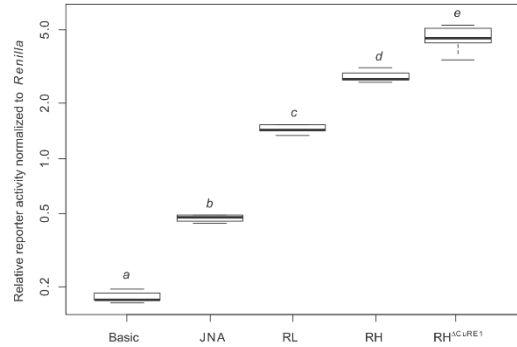


図4. 異なる *CYP9M10* 上流域配列のプロモーター活性。

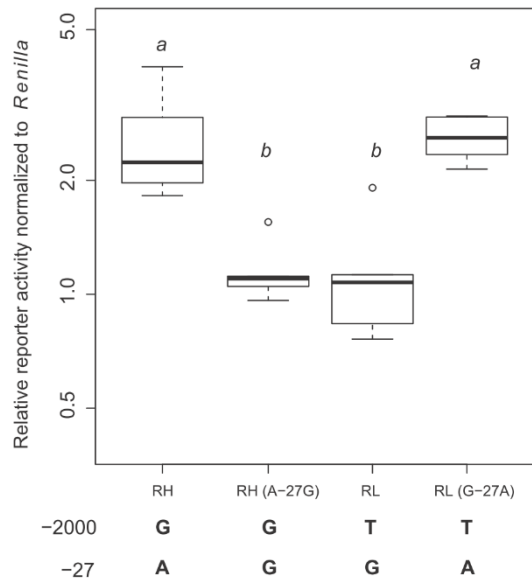


図5. プロモーター活性に及ぼす G-27A 変異の効果。

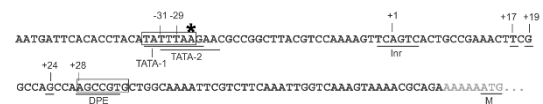


図6. 抵抗性型 *CYP9M10* の転写開始座付近の配列と潜在的なプロモーター・エレメント. アスタリスクは塩基座位-27を示す。

RH を RL と比べた際の T-2000G と G-27A の2つの塩基置換のうち、プロモーター活性を変更する置換を調べるために、おのおののプロモーターの-27位を改変し、RH(A-27G) と RL(G-27A)の2つのプラスミドを加え、4つのプロモーター活性を比較した結果、G-27A が過剰発現の一つの原因変異であることを明らかにした (図5)。JPP 系統の *CYP9M10v1* には A-27 を含み部分的に重なる2通りの TATA-box 様配列が存在しており (図6)、RH より TATTTAA (nts -33 to -27) を欠失させたプラスミドでは+1位から開始する転写物が得られなくなったことから (図なし)、-27位またはその近傍の配列が転写調節に重要な役割をもつことが理解できた。

本研究で確かめられた G-27A 変異は、これまでに調べられた Cu(+)₁ハプロタイプの一部とすべての D-Cu(+)₁ハプロタイプに存在し(図 1)、D-Cu(+)₁は少なくともアジア、中東、アフリカに分布している⁵。転写活性増大をもたらすシス作用性の G-27A 変異をもつ単一コピーの *CYP9M10* ハプロタイプから、遺伝子重複によりさらに過剰発現性を増したハプロタイプが生じ、殺虫剤選抜により集団中に広まっていったものと考えられる。

(2) ピレスロイド代謝抵抗性の責任遺伝子の逆遺伝学的解明⁷

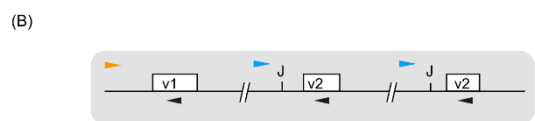
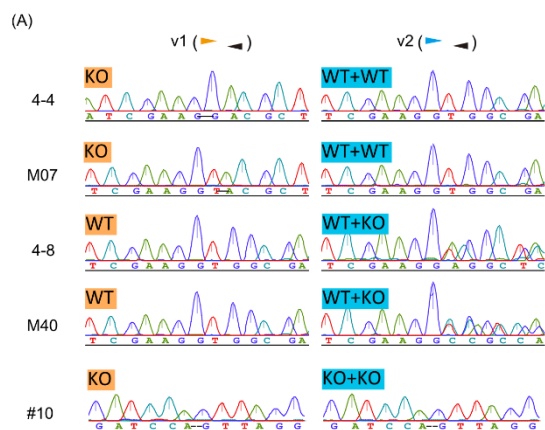


図 7. KO 変異が固定された各系統の個体に示される *CYP9M10* 塩基配列の電気泳動フェログラム(A)と JPP 系統で推定されるハプロタイプの構成(B)。横向き矢印の各色は図 3 で示した PCR 増幅用プライマーに一致する。

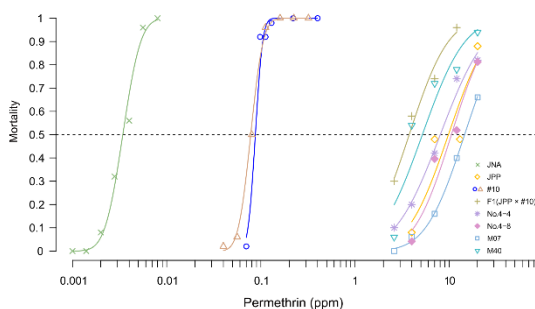


図 8. ペルメトリン感受性。系統名のもつハプロタイプについては本文参照のこと。

CYP9M10v1 または *CYP9M10v2* のうちの一方のコピーを KO した 4 つの系統(4-4, M07, 4-8, M40)、ならびに、すべてのコピーを KO した系統#10 を作出した(図 7A)。本研究開始前には、JPP 系統における v2 遺伝子のコピー数は 1 つと推定していたが、2 つの系統(4-8, M40)の個体には常に v2 遺伝子の KO 型と野生型(W)の配列が併存するため、変異導入元の JPP 系統の蚊には、2 つの v2 遺伝子のコピーが存在することがわかった(図 7A,

B)。
#10 系統の終齢幼虫のペルメトリン感受性は変異導入の元になった JPP 系統に比べ、110 倍と顕著な低下が認められたことから(図 8)、ペルメトリン抵抗性の責任遺伝子であることが実証された。#10 系統のペルメトリン感受性は、殺虫剤感受性の JNA 系統に比べると、なお 20 倍の抵抗性レベルを示すが(図 8)、そのおもな要因は JPP 系統に由来するピレスロイド作用点の低感受性変異と考えることができる。

JPP 系統の二倍体細胞がもつ *CYP9M10* 遺伝子量は 6 であるが、v1 または v2 コピーを 1 つ欠損していると考えられるその他の KO 系統における同遺伝子量は 4、JPP と #10 の F1 における同遺伝子量は 3 といえる。これらの系統間の殺虫剤感受性の比較から、JPP 系統がもつ過剰発現性の *CYP9M10* の遺伝子量が 3 になるまでの減少では、ペルメトリン抵抗性は 3 倍未満とわずかな低下に留まった(図 8)。本研究では遺伝子量が 1 や 2 となる遺伝子型の殺虫剤感受性レベルを示すことはできなかったが、以上の結果から、そのような少数の過剰発現性の *CYP9M10* 遺伝子をもつ遺伝子型は、遺伝子あたりの殺虫剤抵抗性を増進させる効果は大きいものと推測される。

<引用文献>

1. Komagata O, et al: *Insect Biochem Mol Biol* 40:146-52, 2010
2. Hardstone M, et al: *Insect Molecular Biology* 19:717-726, 2010
3. Itokawa K, et al: *Insect Biochem Mol Biol* 40:631-40, 2010
4. Wilding CS, et al: *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 42:699-707, 2012
5. Itokawa K, et al: *Heredity (Edinb)*, 2013
6. Itokawa K, et al: *Insect Biochem Mol Biol* 66:96-102, 2015
7. Itokawa K, et al: *Sci Rep* 6:24652, 2016

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)

- 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. doi: 10.1038/srep24652. 査読有
- ② Itokawa K, Komagata O, Kasai S, Tomita T. A single nucleotide change in a core promoter is involved in the progressive overexpression of the duplicated *CYP9M10* haplotype lineage in *Culex quinquefasciatus*. *Insect Biochem Mol Biol*. 2015;66:96-102. doi: 10.1016/j.ibmb.2015.10.006. 査読有

〔学会発表〕（計 5 件）

① 糸川健太郎, 小川浩平, 駒形修, 冨田隆史, ゲノム編集による殺虫剤解毒酵素遺伝子のノックアウト, 第 59 回日本応用動物昆虫学会大会, 2015 年 03 月 26 日～28 日, 山形大学小白川キャンパス（山形市）.

② Kentaro Itokawa, Osamu Komagata, Kohei Ogawa, Shinji Kasai, Takashi Tomita, Knocking out a detoxification enzyme gene responsible for insecticide resistance in the Southern house mosquito, 第 38 回日本分子生物学会例会 2015 年 12 月 01 日～04 日, 神戸ポートアイランド（神戸市）.

③ 糸川健太郎, 駒形修, 葛西真治, 小川浩平, 冨田隆史, ゲノム編集技術による殺虫剤抵抗性と解毒酵素遺伝子過剰発現の因果関係の検証, 第 68 回日本衛生動物学会大会, 2016 年 04 月 15 日～17 日, 栃木県総合文化センター（宇都宮市）.

④ Kentaro Itokawa, Osamu Komagata, Kohei Ogawa, Shinji Kasai, Takashi Tomita, Targeting a detoxification enzyme gene using two genome editing technologies to test causality for insecticide resistance, XXV International Congress of Entomology, 2016 年 09 月 25 日～30 日, Orland (USA).

⑤ Kentaro Itokawa, Kohei Ogawa, Shinji Kasai, Osamu Komagata, Takashi Tomita, Studying gene functions in mosquitos using genome editing technology, Workshop on Cooperation Studies for Zika Virus between Japan and Brazil, 2016 年 07 月 12 日, 国立感染症研究所戸山庁舎（東京都）.

〔その他〕

国立感染症研究所昆虫医科学部

<https://www.niid.go.jp/niid/ja/froment.html>

6. 研究組織

(1)研究代表者

冨田 隆史 (TOMITA, Takashi)

国立感染症研究所・昆虫医科学部・室長

研究者番号：20180169

(2)研究分担者

駒形 修 (KOMAGATA, Osamu)

国立感染症研究所・昆虫医科学部・主任研究官

研究者番号：20435712

(3)研究協力者

糸川 健太郎 (ITOKAWA, Kentaro)

国立感染症研究所・昆虫医科学部・流動研究員

日本医療開発機構・リサーチレジデント

研究者番号：70769992