

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年06月21日現在

機関番号：82603  
 研究種目：基盤研究(C)  
 研究期間：2010～2012  
 課題番号：22580064  
 研究課題名（和文） 殺虫剤抵抗性分子検出に向けての昆虫シトクロムP450過剰発現変異の研究  
 研究課題名（英文） Studies on the overexpression of insect cytochrome P450s for the molecular identification of insecticide resistance  
 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

## 研究成果の概要（和文）：

ピレスロイド系殺虫剤抵抗性に関連して幼虫と成虫のそれぞれで遺伝的に過剰発現するネッタイイエカのシトクロム P450 遺伝子を特定した。CYP9M10 遺伝子のシス作用性変異による過剰発現は、少なくとも幼虫期において本種で世界的にピレスロイド代謝抵抗性の原因となることを明らかにし、過剰発現性を示す CYP9M10 遺伝子ハプロタイプの分子検出法を確立した。

## 研究成果の概要（英文）：

Cytochrome P450 genes genetically overexpressing and associated with each of larval and adult pyrethroid resistance in *Culex quinquefasciatus* were studied. We demonstrated that the overexpression of CYP9M10 due to cis-acting mutations is globally addressed to at least larval metabolic resistance to pyrethroids in this species and established a molecular genotyping method for identifying overexpressing CYP9M10 haplotypes.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,600,000	0	1,600,000
2011年度	1,200,000	0	1,200,000
2012年度	600,000	0	600,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	0	3,400,000

## 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：害虫管理・生物的防除

## 1. 研究開始当初の背景

シトクロム P450（以下 P450 と略）は、水酸化反応を基本として酸素原子を広範な脂溶性物質に付加する酸化酵素（モノオキシゲナーゼ）である。昆虫種の P450 は、ホルモン、フェロモン等の生理活性物質の代謝、植物毒素や殺虫剤等の外来毒物質の代謝を担い、昆虫種のゲノムには P450 遺伝子座が 100 前後あるとされている。生理活性物質を代謝

し進化的に保存されている一部の P450 を除き、個々の P450 分子の代謝性と生理的機能はほとんど解明されておらず、殺虫剤代謝性、殺虫剤抵抗性への寄与、ならびに抵抗性の原因となる P450 遺伝子の転写調節／構造に係わる変異が揃って明らかにされた例は、キイロショウジョウバエの *Cyp6g1* (Daborn et al., 2002) など少数に限られている。

ネッタイイエカを含むアカイエカ種群蚊

は、住環境で発生し、世界的に分布し、ウエストナイル熱とフィラリア症の媒介蚊として重要な蚊種ある。先行研究(KAKEN#19580062)では、ネッタイエカ幼虫を殺虫剤で選抜することにより確立したピレスロイド抵抗性の系統において、シス作用性変異に基づく過剰発現により、幼虫期にピレスロイド代謝抵抗性の原因となる一つの *CYP9M10* 遺伝子ハプロタイプが同定された。また、*CYP9M10* によるピレスロイド系殺虫剤の代謝活性も確認されている(Wilding et al., 2012)。完全変態昆虫では、幼虫期と成虫期とで酵素遺伝子の発現性が異なる場合があることが知られており、それぞれの发育ステージごとに殺虫剤代謝抵抗性機構に含まれる分子を解明する必要があるが、ネッタイエカの成虫期にピレスロイド代謝抵抗性に関連付けられる分子種は未知であった。

## 2. 研究の目的

ネッタイエカの自然集団における幼虫と成虫のそれぞれの代謝抵抗性機構に普遍的に含まれる P450 分子を解明する目的で、過剰発現性により着目された P450 につき、抵抗性への寄与の大きさ、抵抗性の原因となる変異、およびその地理的分布を明らかにする。代謝抵抗性の分子検出が可能になれば、すでに実用化に達している殺虫剤作用点変異の検出と併せることにより、コストを要する殺虫試験の代替法として、殺虫剤感受性の評価を抵抗性の原因となる変異を対象とする分子ジェノタイピングで行えるようになる。

## 3. 研究の方法

(1) 蚊:ネッタイエカの KNY09, SNG09, および VTN10 は、それぞれ、ケニヤ 2009 年採集の約 100 頭の幼虫より始まる、シンガポール 2009 年採集の 4~5 頭より始まる、およびベトナム 2010 年採集の約 100 頭より始まる、それぞれ室内飼育コロニーである。ほかに長期飼育中のネッタイエカ 4 系統を使った。これらの由来、ペルメトリン感受性、および *CYP9M10* ハプロタイプに関する情報は表 1 に示す。

表 1. 使用したネッタイエカのコロニーと系統

Colony or strain	Locality	Year of collection	Description
KNY09	Nairobi, Kenya	2009	High resistance to permethrin ( $IC_{50} = 6 \mu\text{g/ml}$ ).
SNG09	Ang Mo Kio, Singapore	2009	High resistance to permethrin ( $IC_{50} = 50 \mu\text{g/ml}$ ).
VTN10	Hanoi, Vietnam	2010	Moderate resistance to permethrin ( $IC_{50} = 10 \mu\text{g/ml}$ ).
JPHae (JPH)	Jeddah, Saudi Arabia	1981	High resistance to permethrin ( $IC_{50} = 10 \mu\text{g/ml}$ ). Fixed with D-Cu(-) haplotype <sup>1</sup> .
JHB-NHD-A (JNA)	Johannesburg, South Africa	2001	Susceptible to permethrin ( $IC_{50} = 0.0040 \mu\text{g/ml}$ ). Fixed with C(-) haplotype <sup>2</sup> .
JHB-NHD-B (JNB)	Johannesburg, South Africa	2001	Subdivided from the JHB strain <sup>2</sup> .
Ogasawara (OGS)	Ogasawara, Japan	1968	Moderate resistance to permethrin ( $IC_{50} = 0.014 \mu\text{g/ml}$ ). Fixed with C(+)-haplotype <sup>3</sup> . Susceptible to permethrin ( $IC_{50} = 0.0040 \mu\text{g/ml}$ ). Fixed with C(-)-haplotype with disruptive frame-shift mutation <sup>4</sup> .

(2) *CYP9M10* ハプロタイプの記述法: *CYP9M10* 遺伝子のハプロタイプは次の 4 つの項目を順に並べて表す。

①遺伝子重複の有無—②*CuRE1* 挿入の有無

—③コロニー名—④コード配列に基づくアレル番号

ここに、①"D-"記号付加/記号なしは、縦列重複した遺伝子座の有/無、②"Cu(+)"/"Cu(-)"は、転写開始点近傍における約 0.6 kb の MITE 様転移因子配列 *CuRE1* の挿入の有/無、④約 1.6 kb のコード配列で区別されるアレルの番号 (遺伝子重複ありの場合は"—"で区切り、個々の遺伝子のアレルを併記)、である。例えば、SNG09 コロニーに含まれ、*CuRE1* 挿入をそれぞれ転写開始上流にもつアレル 1 とアレル 3 が並列する場合は、"D-Cu(+)<sup>SNG09</sup>[\*1-\*3]"と表す。

(3) *F1* 幼虫の殺虫試験と *CYP9M10* のジェノタイピング: KNY09, SNG09, および VTN10 コロニーと OGS 系統の間の *F1* (それぞれ、KNY09-*F1*, SNG09-*F1*, および VTN10-*F1*) を使い、脱皮後 24 日以内の 4 齢幼虫に対し、50 ml 水溶液中にペルメトリンを含むエタノール溶液が 1% となる浸漬処理を行い、24 時間後の生死を観察した。*F1* 幼虫の *CuRE1* 挿入および *CYP9M10* 遺伝子座の重複に関する遺伝子型判別は、それぞれ、挿入部位を PCR ターゲットとして含む"Genotyping PCR I"および遺伝子重複単位の縦列する継ぎ目部位特異的な"Genotyping PCR II"により行った (図 1)。

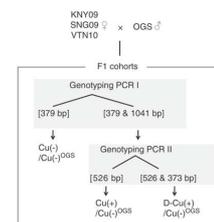


図 1. OGS 系統との交配による *F1* に対する *CYP9M10* ジェノタイピングの方法

(4) *F1* 幼虫の *CYP9M10* 遺伝子に関する配列決定と転写量測定: 上記(5)と同様な交配による *F1* を対象とし、各個体から DNA と RNA の両方を抽出した。*F1* における親コロニー由来の *CYP9M10* アレルの配列決定のためには、KNY09, SNG09, VTN10 コロニー由来配列に特異的であるが、OGS 由来配列に排他的に働くプライマーセットを用いた対立遺伝子特異的 PCR を行い、その PCR 産物を鋳型として *CYP9M10* アレルの配列を決定した。*F1* における OGS 系統由来のアレルに対比した親コロニー由来の *CYP9M10* アレルの発現量 (rASE) を求めるために、対立遺伝子特異的定量 RT-PCR を行った。

(5) 成虫の殺虫試験と殺虫剤選抜: KNY09 コロニーの未交尾成虫に対しペルメトリンのアセトン溶液を局所施用し、24 時間後に *LD50* を超える薬量で生残した雌雄を交配し、次世代の親となるよう選抜した。選抜は 11

世代を行った。

(6) マイクロアレイ解析：殺虫剤感受性の Ogasawara (OGS) 系統と 11 世代のペルメトリン選抜後に得た KNY09\_S10 系統の未吸血雌を RNA ソースとして使った。Vectorbase に登録されている本種蚊のゲノムプロジェクトの成果を利用し、各タンパク質コード遺伝子の cDNA 配列に基づくオリゴヌクレオチドを網羅的にアレイチップに搭載した。マイクロアレイ解析には Agilent 社のアレイチップと試薬を使い、その詳細は本種蚊の幼虫を対象としてマイクロアレイ解析を行った先行研究(Komagata et al., 2010)に従った。

#### 4. 研究成果

(1) 幼虫期に過剰発現する *CYP9M10* 遺伝子ハプロタイプのピレスロイド抵抗性への寄与と分布：

① 長期継代系統における *CYP9M10* 遺伝子のハプロタイプ、幼虫の発現レベル、および幼虫のペルメトリン感受性：OGS, JNA, JNB, JPP の 4 つの系統を使って、*CYP9M10* 遺伝子のハプロタイプ、幼虫期の発現レベルおよびのペルメトリン感受性の関係を調べた。殺虫剤感受性系統の OGS と JNA では *CYP9M10* 遺伝子座は重複しておらず(Cu(-))、ペルメトリン抵抗性を示す JNB 系統では *CYP9M10* の転写開始点上流に約 670 bp の *CuRE1* トランスポゾン挿入があり(Cu(+))、ペルメトリン抵抗性を示す JPP 系統では Cu(+ )と同様な *CuRE1* 挿入をもつ *CYP9M10* 遺伝子座の単位が約 100 kb 離れて重複していた(D-Cu(+))。これらの構成の比較に基づき、Cu(-) → Cu(+ ) → D-Cu(+ )の順にハプロタイプが派生したことが示された(図 2A)。ここに、JPP 系統のもつ *CYP9M10* 構造遺伝子と *CuRE1* 挿入を含む約 3 kb の重複配列は完全に一致していた。D-Cu(+ )と Cu(+ )ハプロタイプは Cu(-)に比べて 10 倍を上まわる過剰発現を生じているが、D-Cu(+ )ハプロタイプの発現は Cu(+ )ハプロタイプに含まれる *CYP9M10* 遺伝子座の単なる倍加だけでは説明できない(それを上まわる)過剰発現レベルを表していた(図 2B)。

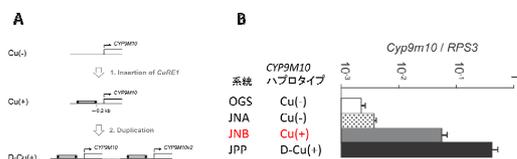


図 2. 継代系統に確認された *CYP9M10* 遺伝子の構造変異と発現量の関係

JPP に含まれる D-Cu(+ )では何らかの転写調節に係る変異が遺伝子重複の前に生じていた可能性が指摘できる。なお、Cu(+ )と D-Cu(+ )両タイプの過剰性はシス作用性変異に基づくこと、ならびに、*CYP9M10* 遺伝子座

が幼虫期のペルメトリン抵抗性に寄与する度合いが、

$$\text{Cu(-)}^{\text{OGS}} = \text{Cu(-)}^{\text{JNA}} < \text{Cu(+)}^{\text{JNB}} < \text{D-Cu(+)}^{\text{JPP}}$$

の順であることを、前者は OGS と JPP または JNB の間の交配に基づく *F1* を使い対立遺伝子特異的定量 RT-PCR 測定し、後者は *F1* を OGS で戻し交配した *BC1* を使い遺伝子型ごとの殺虫剤感受性を観察し、明らかにした(図表省略)。

② 室内コロニーにおける *CYP9M10* 遺伝子のハプロタイプ、幼虫の発現レベル、および幼虫のペルメトリン感受性：ケニヤ、シンガポール、ベトナムより採集し、殺虫剤による選抜は行なっていない 3 つの室内コロニーをそれぞれ OGS と交配した *F1* 集団である KNY09-F1, SNG09-F1, および VTN10-F1 を使い、*CYP9M10* に関する遺伝子型と殺虫剤感受性を調べた。それぞれの手段における *CYP9M10* の遺伝子重複と *CuRE1* 挿入の有無により分けられる 3 つのハプロタイプ群の頻度に関しては、KNY09-F1 と SNG09-F1 の集団においては Cu(-) < Cu(+ ) < D-Cu(+ ) の順で、VTN10-F1 集団では D-Cu(+ )は同定されず、Cu(-) < Cu(+ )であった(図 3A)。これらの *F1* 集団を通じて、ハプロタイプ群によるペルメトリン抵抗性への寄与は、Cu(-) < Cu(+ ) < D-Cu(+ )の順であった(図 3B)。

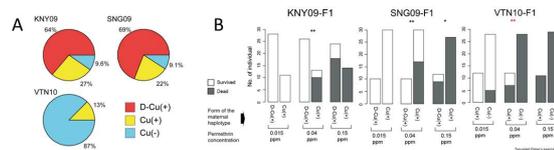


図 3. 3 つの室内コロニーにおける *CYP9M10* 遺伝子のハプロタイプ群の頻度とペルメトリン抵抗性への関連

③ *CYP9M10* 各ハプロタイプの相対発現量と系統的關係：*CYP9M10* の転写開始点上流 1.5 kb の塩基配列によりハプロタイプ間の系統關係を解析したところ、最も過剰発現性を示す D-Cu(+ )群における発現量の偏差は小さかった。中程度の過剰発現性を示す Cu(+ )群の発現量の偏差は、Cu(-)群に比べて小さく、系統的には Cu(-)群とは離れて、D-Cu(+ )群に非常に近かった(図 4)。この結果は、遺伝子重複の前に複数のシス作用性変異が単一起源の Cu(+ )タイプに複数回生じていたことを示唆する(図 5)。Cu(+ )または D-Cu(+ )タイプは、現在、少なくともアフリカ、中東、アジアの広範な地域に分布し、優勢なハプロタイプ群として存在していることが確認された。殺虫剤による選抜を受けて比較的短期間に適応的に進化したこれらのハプロタイプが従前から存在していた多様なハプロタイプに置き換わりつつ地理的分布を拡大しつつある過程を反映するものと推察される。

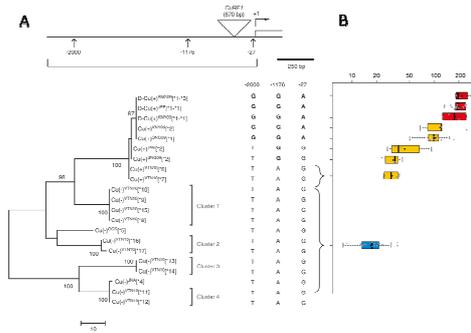


図4. CYP9M10 遺伝子の各ハプロタイプの相対発現量と系統関係

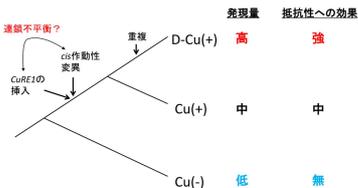


図5. CYP9M10 遺伝子ハプロタイプ群における変異蓄積の過程ならびに発現量と抵抗性への関連

(2) 成虫の選抜により確立したペルメトリン抵抗性コロニーにおける P450 遺伝子の過剰発現：

①成虫の殺虫剤感受性：ケニア由来の KNY09 コロニーの成虫をペルメトリンで 11 世代にわたり選抜したところ、選抜 10 世代後のコロニー(KNY09\_S10)は、選抜開始前のコロニー(KNY09\_S0)に比べてペルメトリンに対する感受性が約 9 倍低下し、また OGS 系統に比べて 258 倍の抵抗性比 (RR50 値) を示した (図 6 と表 2)。KNY09\_S10 は、P450 の

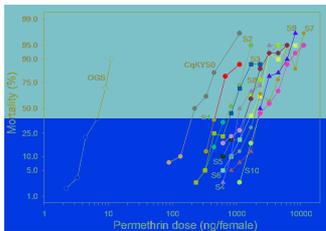


図6. ネットアイエカ成虫に対する殺虫剤選抜による雌成虫のペルメトリン感受性の推移

表 2. 殺虫剤抵抗性系統の雌成虫が示すペルメトリン感受性

Insecticide	Population	n	Slope	LD <sub>50</sub> (ng♀)	95% CI	RR <sub>50</sub> <sup>1</sup>	SR <sub>50</sub> <sup>2</sup>	CR <sub>50</sub> <sup>3</sup>
Permethrin	OGS	360	5.0±0.46	6.9	6.4-7.5	1	-	-
	KNY09_S0	240	3.4±0.30	253	221-290	36.7	-	-
	KNY09_S10	280	7.2±0.81	1760	1530-1990	255	-	-
Permethrin + PBO	OGS	400	3.2±0.25	0.24	0.22-0.26	1	23.8	-
	KNY09_S0	320	2.6±0.28	15.8	11.5-21.1	65.9	18.2	0.98
	KNY09_S10	280	6.8±0.78	15.9	14.1-17.7	65.3	112	3.86

PBO, ピペロニルブトキシド。OGS, 殺虫剤感受性系統。KNY09\_S10, ケニア由来室内飼育コロニーのペルメトリン選抜 10 世代目。\*1, \*2, および \*3 は、それぞれ、抵抗性比, 共力比 (P450 の阻害に基づく感受性の増大), および補正された共力比 (抵抗性比にしろめる P450 の寄与)。

阻害剤である piperonylbutoxide (PBO) の殺虫

剤との併用における共力比 (SR50 値) により、ペルメトリンに対する感受性が 112 倍低下したが、殺虫剤感受性の OGS 系統に対する感受性の低下を相殺した後の共力効果、すなわち P450 の解毒代謝亢進によりもたらされたとみなされる抵抗性の増大は 3.89 倍 (CSR50 値) であった。

②成虫で過剰発現する遺伝子：マイクロアレイ解析に含まれる 199 の P450 遺伝子の発現量を比較したところ、KNY09\_S10 の転写量が OGS に比べて 8 倍以上であった P450 遺伝子は、CYP9M12 (126 倍), CYP9M10 (16.9 倍), CYP6Z 亜族クラスタに存在する CPIJ019586 (9.5 倍) であった (図 7)。

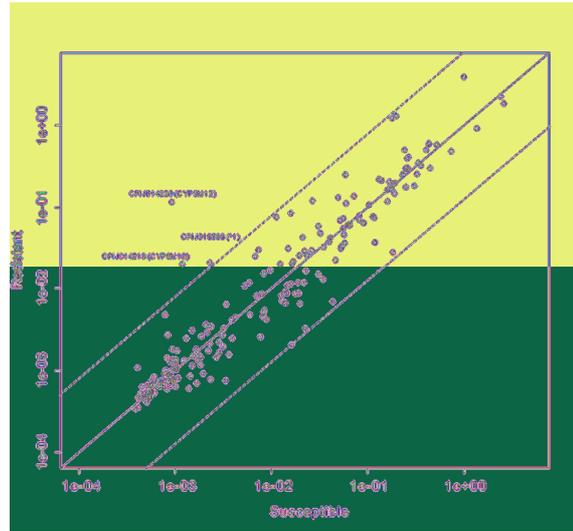


図7. マイクロアレイ解析により表されるシトクロム P450 遺伝子の相対的転写レベル

対角線より上と下の破線は、それぞれ、KNY09\_S10 コロニーにおける転写レベルが OGS 系統に比べて 8 倍と 1/8 倍であることを表す。CPIJ で始まるコード名は VectorBase (<https://www.vectorbase.org/>) による遺伝子コード名を表す。  
\*1, CYP6Z14 座位に隣接する命名のない CYP 遺伝子。

KNY09\_S10 で 2 倍以上 8 倍未満の発現量比を示しその過剰発現が有意な CYP 名未称の P450 遺伝子が 2 つあった。殺虫剤解毒分子として認識されているその他のタンパク質コード遺伝子うち、glucosyl/glucuronosyl transferase, と glutathione S-transferase の各遺伝子 (それぞれ CPIJ000039 と CPIJ002675) に 8 倍以上の過剰発現 (それぞれ、68.3 倍と 12.4 倍) していた。これらの遺伝子が成虫選抜により確立した KNY09\_S10 コロニーで、成虫に表れるペルメトリン抵抗性の要因として働いている可能性が示された。しかしながら、このコロニーでは二つの理由により、着目した 2 つの CYP9M 亜族遺伝子の過剰発現 (すなわち殺虫剤感受性系統の同遺伝子の発現量と比べた転写量比) は成虫におけるペルメトリン抵抗性には大きく貢献していない可能性が指摘できる。一つの理由は、(2)の①項

で述べたように、KNY09\_S10の表す抵抗性比のうちP450が係わるとみなされる割合が小さいことである。二つ目は、CYP9M10とCYP9M12が殺虫剤感受性のOGS系統の成虫において発現量のもっとも少ないP450遺伝子のクラスに相当することである(図7)。同様な傾向がD-Cu(+)のハプロタイプをもつJPP系統にもうかがわれる。それは、CYP9M10とCYP9M12の遺伝子が殺虫剤感受性系統の(偽遺伝子化していない)正常遺伝子に比べて幼虫期と成虫期を通じて過剰発現するJPP系統においても、成虫のペルメトリン代謝抵抗性が顕著でないこと、これら2つのCYP9M亜族遺伝子の虫体あたりの発現量が成虫期に激減することである(図表省略)。

#### 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)

- ① Itokawa, K., Komagata, O., Kasai, S., Kawada, H., Mwatele, C., Dida, G., Njenga, S., Mwandawiro, C., Tomita, T., 2013. Global spread and genetic variants of the two CYP9M10 haplotype forms associated with insecticide resistance in *Culex quinquefasciatus* Say. *Heredity*. (査読有)  
doi:10.1038/hdy.2013.40
- ② Itokawa, K., Komagata, O., Kasai, S., Masada, M., Tomita, T., 2011. Cis-acting mutation and duplication: history of molecular evolution in a P450 haplotype responsible for insecticide resistance in *Culex quinquefasciatus*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 41, 503-512. (査読有)  
doi:10.1016/j.ibmb.2011.04.002
- ③ 富田隆史, 糸川健太郎, 駒形修, 葛西真治, 2010. 殺虫剤抵抗性蚊におけるシトクロムP450遺伝子の過剰発現. *日本農薬学会誌* 35, 562-568. (査読有)  
doi:10.1584/jpestics.W10-45

[学会発表] (計5件)

- ① 富田隆史, 2013. 害虫の殺虫剤抵抗性機構, 第155回日本獣医学会学術集会/日本比較薬理・毒性学会 企画シンポジウム「薬剤耐性の分子メカニズム」, 東京大学駒場キャンパス.
- ② Itokawa, K., Komagata, O., Kawada, H., Tomita, T., 2012. Spread of overexpressing CYP9M10 (cytochrome P450) haplotypes in southern house mosquito and its possible implication for vector control, 24th International Conference of Entomology, Daegu, Korea.
- ③ Itokawa, K., Komagata, O., Kasai, S., Tomita,

T., 2012. Genetic variability of *Culex Cyp9m10* and insecticide susceptibility, 11th International Symposium on Cytochrome P450 Biodiversity and Biotechnology, Torino, Italy.

- ④ 糸川健太郎, 駒形修, 葛西真治, 川田均, 富田隆史, 2012. 殺虫剤抵抗性 CYP9M10 ハプロタイプの分子進化と拡散, 第56回日本応用動物昆虫学会大会, 近畿大学奈良キャンパス.
- ⑤ 糸川健太郎, 駒形修, 葛西真治, 川田均, 岡村佳香, 政田正弘, 富田隆史, 2011. ネットアイエカ CYP9M10 遺伝子の分子進化とピレスロイド抵抗性, 第55回日本応用動物昆虫学会大会, (大会中止により講演要旨集上発表).

[その他]

ホームページ等

<http://www0.nih.go.jp/niid/entomology/index.html>

#### 6. 研究組織

##### (1)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

##### (2)研究分担者

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

##### (3)連携研究者

駒形 修 (KOMAGATA OSAMU)  
国立感染症研究所・昆虫医科学部・研究員  
研究者番号: 20435712  
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  
研究者番号: (なし)