

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 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：2013～2015

課題番号：25450076

研究課題名(和文)シトクロムP450新規発現法による殺虫剤解毒代謝反応の解明

研究課題名(英文) Analysis of the insecticide detoxification of insecticide resistance by the cytochrome P450 new expression method

研究代表者

駒形 修 (Komagata, Osamu)

国立感染症研究所・その他部局等・研究員

研究者番号：20435712

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：強力なピレスロイド抵抗性系統であるネッタイエカ(*Culex pipiens quinquefasciatus*)のシトクロムP450をバキュロウイルスを用いたウイルスディスプレイ法での発現を試みた。シトクロムP450の配列はクローニングが困難であったが、最終的に、ウイルス作成用のプラスミドを作成した。バキュロウイルスにトランスフェクションして発現させたものの、十分な発現量が得られなかった。必要量を発現のためには、今後の更なる研究が必要であった。

研究成果の概要(英文)：P450s are important detoxication enzymes in insecticide resistance. The P450s are proteins of the superfamily. Each insect has many P450 isozymes. However, the functions of each P450 were still not clear. The P450s from a high pyrethroid resistant strain of the southern house mosquito (*Culex pipiens quinquefasciatus*) was attempted to be expressed by the baculovirus display system for in vitro assay. The P450 coding cDNA was synthesized by the reverse transcription from mosquito's total RNA. The virus for expression was created although it was hard to make the constructions from P450 and P450 reductase cDNA. The vectors were transfected into insect cells. Expressed P450 was harvested from the envelope of budded virus after cell culturing with the virus; however, the yield was not adequate. In this case, optimization of expression is deemed as a future task.

研究分野：衛生害虫

キーワード：殺虫剤抵抗性

1. 研究開始当初の背景

シトクロム P450 モノオキシゲナーゼ (以下, P450) は, 微生物から哺乳類まで広範な生物に存在する酸化酵素である。P450 は多様な役割を担っている。その一つは殺虫剤を含む外来毒物質の解毒代謝を触媒することである。多様な反応を触媒できるのは, 分子種の数が多く (例えば昆虫では個体あたり約 100 種) また各分子種の基質特異性が低いからであると考えられている。害虫の殺虫剤抵抗性に P450 による解毒代謝の役割が大きいことについては既に多くの報告がある。しかし, 具体的に約 100 種ある P450 分子種の中でどの分子種が, どのような反応で殺虫剤を解毒しているか, 未だ詳細は不明である。申請者は, これまでに, どの P450 分子種が殺虫剤の解毒代謝に関与しているかを明らかにしてきた。申請者が材料として用いているネッタイエカは世界的に広く分布する疾病媒介蚊であり, プレスロイド系殺虫剤は, その防除に大きな役割を果たしている。サウジアラビアで採集されたネッタイエカ JPal-per 系統の幼虫は, 実験室内における淘汰を経て, プレスロイド系殺虫剤ペルメトリンに対して 2500 倍の抵抗性 (室内感受性系統比) を示した。そして, 生物検定及び粗酵素による *in vitro* 代謝実験により, 主な抵抗性機構が P450 による解毒であることを示した。更に, 申請者は 62 種の P450 遺伝子配列を新規にクローニングし (当時はゲノムプロジェクトの結果公表前であった), それを基にマイクロアレイを設計した。P450 発現量を解析した結果, 複数の P450 遺伝子が抵抗性系統のみで過剰発現していることを明らかにした。過剰発現が最も大きかった P450 遺伝子 Cyp9m10 に着目し, 構造遺伝子とその周辺領域に含まれる過剰発現の原因となり得る遺伝的変異, さらにプレスロイド系殺虫剤抵抗性との遺伝学的連関について明らかにした。申請者がネッタイエカから見出した CYP9M10 を始めとする P450 分子種は, これまでの実験結果から殺虫剤抵抗性への関与は強く示唆されているが, 具体的な解毒代謝反応については未知のままである。本研究の目的は, CYP9M10 をはじめとする分子種が触媒するペルメトリン解毒代謝反応を明らかにし, それを克服する手段を供することである。

2. 研究の目的

P450 に関する *in vitro* 代謝試験を難しくしている要因が 2 つある。1 つは P450 の酵素標品を準備することが難しいこと, 2 つめは酵素標品から持ち込まれる生体成分により代謝物の同定が困難であることである。P450 は存在量の少ない非可溶性の膜タンパク質であり, また変性しやすい不安定な

タンパクである。特に昆虫のように小さな生物から単一の P450 分子種を生化学的手法により完全精製することは困難である。それで (昆虫に限らずヒトを含む哺乳動物等でも) P450 の薬物代謝の研究では, 大腸菌, 酵母, 培養細胞等で発現させたものを用いるのが一般的である。しかし, 全ての分子種を安定して発現できる系は存在しない。生体から精製する場合も, 発現させる場合も代謝物の同定が困難であるのは, 酵素標品に含まれる膜画分の何らかの成分を利用して, P450 の代謝産物がすぐに別のものに代謝されることが要因である。これらの問題を解決するために, 本研究ではウイルスディスプレイ法を試みる。この方法はバキュロウイルスを用いてタンパクを発現させるが, 従来法のように宿主細胞上の発現タンパクを回収するのではなく, 発芽型ウイルスのエンベロープに発現したタンパクを回収する。発芽型ウイルスは回収が容易であり, 膜タンパク質を機能的にかつ大量に調整できる。既存の他の膜タンパク発現系では, 生体膜ごとタンパクを回収するために膜上に存在しているタンパク等が同時に回収されてしまう。ウイルスディスプレイ法で回収されるエンベロープ上には, 発現させたタンパクと gp64 という感染に必要な糖タンパクの 2 種のみが発現している。更に遺伝子改変により gp64 が発現しないようにすることも可能である。不要な生体成分の持ち込みが最小限ですむ反応系が構築可能であり, 代謝物の同定が容易となる。この方法による P450 の発現例は未だないが, G タンパク等の複雑な構造をもった膜タンパクの発現に実績がある。また P450 が反応を触媒するためには補酵素を必要とする。この方法では複数のウイルスに感染させることで共発現が可能である。発現させた P450 を用いてプレスロイド系殺虫剤ペルメトリン代謝を確認し, その解毒代謝反応を明らかにする。また, 構築した代謝系を用いて, この反応を特異的に阻害する物質を探索する。新規殺虫剤の開発は年々困難になってきており既存の殺虫剤を有効活用することが求められている。そこで, P450 の解毒代謝の亢進による殺虫剤抵抗性を克服するために P450 阻害剤が配合された殺虫剤が既に市販されている。しかし, 既存の P450 阻害剤のほとんどは P450 を分子種に関わらず無差別に阻害する。P450 はヒトを含めた非標的生物にも広範に存在することから, P450 の代謝系に影響を与えるような成分が含有されることは安全性へのリスクが高い。本研究では, 殺虫剤の有効成分の共力剤となるような新規阻害剤の開発につなげることを最終的な目標とする。そのためにハイスループットスクリーニングに応用が可能なような扱いやすい *in vitro* 代謝試験系を構築することを目標とした。

3. 研究の方法

目的とする P450 分子種の遺伝子をクローニングし、トランスファーベクターを構築する。上記の組換えトランスファーベクターをウイルスと混合した後、宿主として用いる Sf9 培養細胞に移入する。組換えトランスファーベクターとウイルスゲノム DNA との間に相同組み換えを起こさせ、組み換えウイルスを作成する。組換えバキュロウイルスを、宿主 (Sf9 培養細胞) に感染させる。浜窪ら (2003) の方法に従い培養上清から細胞外発芽ウイルスを超遠心などの分離操作によって回収することにより、ウイルスエンベロープ上に発現した P450 を回収する。なお、P450 はその活性を示すためには膜タンパク質である補酵素 (シトクロム P450 還元酵素、シトクロム b5) が必要となる。そのため、同様の方法で作成した 2 種類の補酵素の組換えバキュロウイルスを共感染させる。P450 の発現の確認は大村・佐藤 (1964) の原報に基づき CO 差スペクトルを測定することにより行う。補酵素の活性は生化学的な方法で測定する。大量培養に向けて、発現条件を最適化する。最適化された培養条件で大量培養をおこない大量の酵素標品を得る。最終的に各試験をアイソトープで標識された化合物を使わず確認できる程度のスケールで実施できるスケールを目指す。P450 の基質特異性は広いが、すべての分子種において共通の基質というものはなく、分子種ごとに異なっている。殺虫剤を基質として活性を測定するのは、アイソトープを用いるか、質量分析計のような高額機器を用いる等が必要であり、簡易試験には向かない。そこで、発現させた P450 の基質となるもので、吸光や蛍光で簡易的に測定が可能な基質を探索する。また、十分量の P450 が確保できた場合、¹⁴C で標識したピレスロイド系殺虫剤を代謝されることにより代謝活性を測る。

4. 研究成果

ネッタイエカ (*Culex pipiens quinquefasciatus*) JPal-per 系統の幼虫はピレスロイド系殺虫剤に対して強力な抵抗性系統である。実験室内における淘汰を経て、ピレスロイド系殺虫剤ペルメトリンに対して 2500 倍の抵抗性 (室内感受性系統比) を示している。殺虫剤の抵抗性をもたらす原因はいくつか考えられるが、その中で主要なものは殺虫剤の作用点の変異と解毒代謝である。これまでの成果から解毒代謝に関与する酵素はシトクロム P450 であり、この JPal-per 系統において複数の P450 分子種の関与が示唆されている。P450 遺伝子は個体あたり約 100 種類存在するといわれているが、その中から発現する対象を Cyp9m10 の他、Cyp4H34、Cyp6Z10 の三つとした。発現用バキュロウイルス作成の最初の段階として、これらの遺伝子を配列を JPal-per 系統の幼虫から抽出した RNA を逆転写して cDNA を合成した後、PCR

を行い大腸菌プラスミドに導入することによりクローニングを試みた。シトクロム P450 をコードする配列は約 1500bp で特別長いものではないが、挿入は難航した。通常使用している TOPO イソメラーゼを利用した TA クローニング法では形質転換効率が低いもしくはプラスミドへの導入方向が逆にしかなかった等のため形質転換体が効率良く作成できなかった。そこで、Type II 制限酵素を利用する FASTR (fully automated single-tube recombination) および Gibson assembly 法を用いて導入の効率化を図った。かなりの試行が必要であったが、結果的にクローニングに成功した。引き続き、発現ベクターの構築およびウイルスの作成と発現実験を行った。標的としているシトクロム P450 は、単体では作用せず補酵素として P450 レダクターゼが必要となる。ネッタイエカから Total RNA を抽出し、逆転写酵素により cDNA を合成した。これを配列確認用のプラスミドに挿入し、大腸菌によるクローニングの後、常法により塩基配列の確認を行い、正常なアミノ酸をコードしているものを選抜した。クローニングしたシトクロム P450 の分子種およびシトクロム P450 レダクターゼを発現バキュロウイルス作成用のプラスミドベクター

(Invitrogen 社 (現 Thermo Fisher Scientific 社) pFastBac Dual) に Gibson Assembly 法を用いて挿入した。プラスミドを大腸菌 DH5 を用いてクローニング後、挿入した配列が確認されたコロニーを選抜して液体培養し、ウイルス作成用のプラスミドを得た。このプラスミドを発現用ウイルス作成用の大腸菌菌株である DH10Bac に形質転換した後、挿入した配列を含む bacmid DNA を PCR により確認した。Bacmid DNA が確認されたコロニーを液体培養した後、The PureLink HiPure Plasmid DNA Miniprep Kit を用いて、bacmid DNA を精製した。10% FBS を含む Grace 培地で培養した Sf9 細胞に、作成した bacmid DNA をトランスフェクション試薬

(Cellfectin) と共に加え、形質転換した後、72 時間培養した。培養液を 1000xg の遠心で分画し、その上清を 100,000xg で遠心して沈殿を回収し細胞外発芽バキュロウイルスを得た。沈殿を 0.5% tween20 / PBS 溶液懸濁した後、超音波処理を行った後、100,000xg で遠心して、沈殿を Tris-HCl 緩衝液に懸濁し酵素標品とした。酵素標品の CO 差スペクトルを確認したが、活性体に見られる 450nm の吸収極大および失活した酵素に見られる 420nm 共にはっきりと確認できなかった。これは更に効率を高めて大量に発現させることが必要であることを示しており、今後の発現条件および酵素標品の回収法の更なる検討が必要である。

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 件)

〔学会発表〕(計 件)

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕
出願状況(計 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 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

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

(2) 研究分担者

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

(3) 連携研究者

()

研究者番号：