

殺虫剤抵抗性の機構： 特に作用点の薬剤感受性低下の分子機構

筑波大学大学院生命環境科学研究科 河野義明*

はじめに

殺虫剤抵抗性の発達は、殺虫剤による選択圧が高いほど速くなる。昆虫集団内では抵抗性要因となる遺伝子突然変異が起きては消えているが、殺虫剤散布は感受性個体を除去して、突然変異により抵抗性となった個体の生存と増殖を助長する。すなわち、広い範囲で薬剤散布をくまなく行うことこそ、感受性遺伝子をもつ個体を速やかに減少させて抵抗性発達を促すという裏腹な結果を生む。抵抗性発達を遅らせるためには、いかにして集団内で感受性遺伝子をもつ個体の割合を高く保っておくかが課題になる。また、感受性または抵抗性遺伝子が発現した個体の環境適応性は、淘汰要因である薬剤散布が止んだときの集団内の感受性回復に影響する。殺虫剤抵抗性の分子機構解明は、このような抵抗性発達や感受性回復を考える際の重要な情報となる。

抵抗性の原因には、殺虫剤の表皮透過性低下や解毒活性の増強と殺虫剤の作用点そのものの薬剤感受性低下が挙げられる。薬剤の解毒代謝酵素は、主に表-1に示すシトクローム P450 (CYP), カルボキシルエステラーゼ (CE), グルタチオン転移酵素 (GST) である。各酵素は1個体に多くの基質特異性を異にする分子種が存在し(例えば、ゲノム研究が進んだキイロシヨウジョウバエでは90種のCYP遺伝子が確認されている), 抵抗性系統では殺虫剤の解毒に関与する分子種が増加する。その増加機構は、CEでは遺伝子増幅により遺伝子の数が増して多量の酵素が生産されるが、CYPやGSTでは遺伝子から転写される mRNA が増加して酵素が増産される。どの酵素の場合でも、酵素の代謝能を高める方向への変異も報告されている(河野・富田, 1995)。一般に酵素遺伝子の上流には転写活性を調節する領域があるが、抵抗性に関わる解毒酵素では、酵素遺伝子が乗っているのとは異なる染色体上の因子が転写活性を高めている例が多く、その機構は未解明である。ここでは、分子生物学的研究が進んでいる殺虫剤作用点の変異による薬剤感受

性低下の機構を取り上げる。

作用点の薬剤感受性低下機構に関しては、キイロシヨウジョウバエのシクロジエン感受性低下の原因として GABA 受容体構成タンパクの 302 番アミノ酸アラニンからセリンへの置換が最初に明らかにされた (FRENCH-CONSTANT, 1991)。他の昆虫のシクロジエン抵抗性でも同じアミノ酸置換が認められ、昆虫種を超えた機構の存在が示された。その後、アセチルコリンエステラーゼ (AChE) (河野, 2004; FOURNIER, 2005; KONO and TOMITA, 2006) やナトリウムイオンチャネル (Na チャネル) (GOLDIN, 2003; SODERLUND and KNIPPLE, 2003) における構成タンパク中のアミノ酸置換による薬剤感受性低下機構の解明が進み、つい最近ではネオニコチノイドの作用点である ACh 受容体においても、アゴニスト結合部分のアミノ酸置換によるイミダクロプリド感受性低下が初めて報告された (Liu et al., 2005)。

I AChE 活性中心のアミノ酸置換と 薬剤感受性低下

コリン作動性神経シナプスでは、シナプス前膜から神経伝達物質アセチルコリン (ACh) が放出され、シナプス後膜の ACh 受容体に結合して膜の興奮を引き起こして神経伝達が行われる。シナプス後膜上に存在する AChE は、このときに余分な ACh を分解して神経伝達を正常に終結させる。有機リン剤、カーバメート剤は AChE を ACh と競合的かつ不可逆的に阻害し、余分の

表-1 殺虫剤解毒酵素の作用と活性増強機構

酵素	作用	増強機構
シトクローム P450	水酸化, 脱アルキル, エステルの開裂, 脱硫的酸化, エポキシ化, イオウの酸化	DNA → mRNA 転写活性上昇による酵素量の増加
カルボキシルエステラーゼ	有機リン化合物・カーバメート・ピレスロイドのエステル部分の加水分解, これら化合物との結合 (sequestering)	遺伝子増幅による酵素量の増加
グルタチオン転移酵素	親油性化合物の O-アルキル・O-アリルの脱アルキル・脱アリル	DNA → mRNA 転写活性上昇による酵素量の増加

各酵素について代謝効率の良い酵素への変異の報告がある。

Molecular Mechanisms of Target Insensitivity to Insecticides.

By Yoshiaki KONO

(キーワード: 薬剤感受性低下, アセチルコリンエステラーゼ, Na チャネル, アミノ酸置換)

* 現所属: 明治大学農学研究科

AChが残るためにシナプスでの異常興奮が起こり、神経機能の停止の後昆虫は死亡する。図-1は、AChEの活性中心にAChが結合している模式図である(図-2も参照)。ここにはAChEに共通して保存されているアミノ酸として、加水分解時に基質との電荷受け渡しをする、いわゆるカタリティックトライアドと呼ばれる

3アミノ酸(Ser, Glu, His)と、基質の配位に働くAChのアルコキシ基と疎水結合するアシルポケット形成アミノ酸(Trp, Phe, Phe, Phe)、アシル基二重結合酸素と水素結合するオキシアニオンホール形成アミノ酸(Gly, Gly, Ala)およびコリン部分と結合するアミノ酸Trpが描かれている。

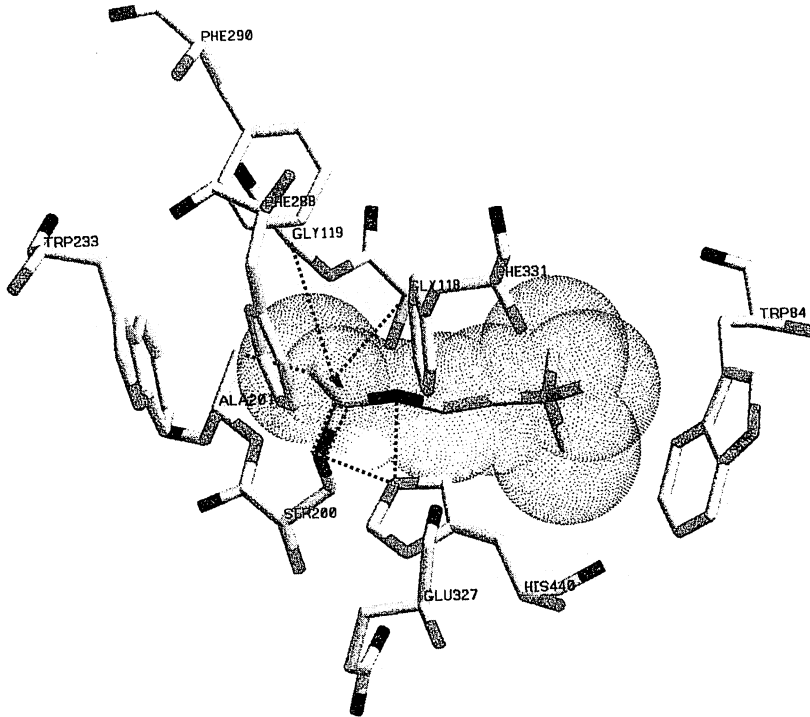


図-1 AChEの活性中心の模式図
基質AChと活性中心を形成するアミノ酸の配置を示す。

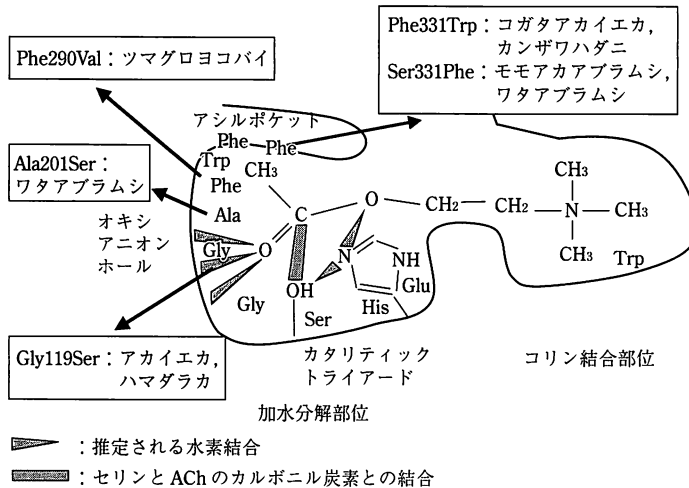


図-2 AChE活性中心における薬剤感受性低下に関わるアミノ酸置換

表-2 pAChE 活性中心のアミノ酸置換と薬剤感受性低下

アミノ酸置換	昆虫種	殺虫剤	感受性低下程度
オキシアニオンホール			
Gly119Ser	アカイエカ ^{a)} ハマダラカ <i>An. gambiae</i> ^{b)}	プロポクスル	30,000
	ハマダラカ <i>An. albimanus</i> ^{b)}	プロポクスル	1,500
Ala201Ser	ワタアブラムシ ^{c)}	オメトエート	150
アシルポケット			
Phe290Val	ツマグロヨコバイ ^{d)}	プロポクスル	115
Phe331Trp	コガタアカイエカ ^{e)} カンザワハダニ ^{f)}	フェニトロオクソン フェントエートオクソン	2,000 1,000
Phe331Cys	ナミハダニ ^{g)}	ジクロルボス	1,000
Ser331Phe	ワタアブラムシ ^{h)} モモアカアブラムシ ⁱ⁾	ピリミカーブ ピリミカーブ	650 100
その他の部位			
Gly227Ala	コナガ ^{j)}	プロチオホス	26

^{a)} WEILL, M. et al. (2003), ^{b)} WEILL, M. et al. (2004), ^{c)} TODA, S. et al. (2004), ^{d)} TERADA, M. (unpublished), ^{e)} NABESHIMA, T. et al. (2004), ^{f)} ARI, Y. et al. (2005), ^{g)} ANAZAWA, Y. et al. (2003), ^{h)} TODA, S. et al. (2004), ⁱ⁾ NABESHIMA, T. et al. (2003), ^{j)} BAEK, J. H. et al. (2005). (文献6)参照

キロシヨウジョウバエ AChE 遺伝子 (*Ace*) は1ゲノムに1種しかなく、抵抗性系統では AChE 構造タンパクの4箇所のアミノ酸置換, Phe78Ser, Ile129Val, Gly227Ala, Phe290Tyr (A--B は--番目アミノ酸 A のアミノ酸 B への置換を表し, 数字はシビレエイ *Torpedo californica* の AChE アミノ酸配列に準じている) が見つかっており, 十分な薬剤感受性低下には3箇所以上の置換が必要だとされている。東京湾埋立地由来の薬剤抵抗性イエバエでも *Ace* と相同な AChE (*o-Ace*, *Ace* オルソログス AChE) に四つのアミノ酸置換 (Ilu83Met, Val150Leu, Gly227Ala, Phe290Tyr) が見つかり, 二つはキロシヨウジョウバエで見られたものと同じアミノ酸置換であった。*O-Ace* はどの昆虫にも存在するが, ハエ類以外の昆虫の *o-Ace* からは感受性低下に伴うアミノ酸置換は発見されなかった。2002年になって *Ace* と相同性の低い第2の AChE (*p-Ace*, *Ace* パラログス AChE) がムギミドリアブラムシとマラリア媒介蚊 *Anopheles gambiae* で発見され, 翌年アカイエカの *p-Ace* において薬剤感受性低下に関与するアミノ酸置換が報告された。筆者らも直ちにモモアカアブラムシ, コガタアカイエカ, ツマグロヨコバイ, ワタアブラムシ, ナミハダニ, カンザワハダニの *p-Ace* の構造を明らかにし, 抵抗性系統において薬剤感受性低下に関わるアミノ酸置換を発見した。図-2と表-2にそれらをまとめた。

ハマダラカ *An. gambiae* の薬剤感受性低下は *p-Ace* の119番 Gly が Ser に置換 (Gly119Ser) している。この Gly は AChE 活性中心のオキシアニオンホール形成

表-3 アミノ酸置換による AChE 薬剤感受性の変化

	Iso (M)				
	Fenitroxon	Diclorvos	Carbaryl	Pirimicarb	Propaphos sulfone
331F	4.9×10 ⁻⁷	2.6×10 ⁻⁷	1.6×10 ⁻⁷	3.2×10 ⁻⁵	2.3×10 ⁻⁶
119S	1.7×10 ⁻⁵ 35.1	1.1×10 ⁻⁶ 3.9	5.3×10 ⁻⁴ 3,328.0	5.7×10 ⁻² 1,807.8	
331W	2.7×10 ⁻³ 5,487.0	2.7×10 ⁻³ 10,134.1	3.4×10 ⁻⁵ 211.0	1.3×10 ⁻¹ 4,205.6	
331S	4.2×10 ⁻⁷ 0.9	4.5×10 ⁻⁶ 17.0	2.0×10 ⁻⁶ 12.7	3.8×10 ⁻⁷ 0.01	
290V	9.0×10 ⁻⁷ 1.8	7.0×10 ⁻⁶ 26.6	1.1×10 ⁻⁵ 69.7	8.3×10 ⁻⁴ 2.0	7.4×10 ⁻⁷ 0.3

* Iso (M) : アミノ酸置換された AChE の活性を 50% 阻害する各薬剤のモル濃度。

下段の数字は各薬剤について 331F の値に対する倍率。

アミノ酸であり, Ser への置換が活性中心の形を変形して薬剤との親和性を低下させると考えられる。実際に Gly119Ser 置換を起こすように設計した *p-Ace* の cDNA をキロシヨウジョウバエ培養細胞で発現して, その酵素の薬剤感受性を試験すると抵抗性系統の AChE で見られたのと同様にプロポクスル感受性が1万分の1以下に低下した。筆者らも各昆虫で明らかにされたアミノ酸置換をコガタアカイエカの *p-Ace* で起きるように, その cDNA に変異を組み込みバキュロウイルス-昆虫培養細胞系で発現し, 得られたリコンビナント AChE の薬

剤感受性低下の様相を調べた(表-3)。

上述のハマダラカで明らかにされた Gly119Ser を導入したコガタアカイエカの *p-Ace* (119S) では、プロボクスルと同じメチルカーバメートであるカルバリルに対してやはり 1/3,000 以下に感受性が低下したが、有機リン剤であるフェントロオクソン、ジクロルポスに対する感受性低下は強くない。

富山県の水田由来コガタアカイエカ(富山系統)の AChE は特に有機リン化合物に対して感受性を低下させており、I₅₀ で感受性系統と比較すると、ほとんどの有機リン化合物に対して薬剤感受性は 1/1,000 以下で、カーバメート化合物に対しては約 1/100 である。この系統の *p-Ace* ではアシルポケットを形成する Phe331 が Trp に置換している。この置換を導入したりコンビナント *p-Ace* (331W) では、表-3 に見るとおり、フェントロオクソン、ジクロルポスに対する感受性はそれぞれ 1/5,000、1/10,000 に低下し、カルバリルに対する低下は 1/211 で抵抗性系統における AChE の性質をよく説明する。ハエ類以外のほとんどの昆虫では *o-Ace* と *p-Ace* の 2 種類の AChE が発現しており、これまで抵抗性系統 AChE の薬剤感受性として報告された値はそれらの混合物を対象に測定されたことになる。しかし、発現した *p-Ace* のみについて測定した値と大きな違いが見られない。その理由は、*o-Ace* の昆虫での発現割合が *p-Ace* の数分の 1 以下であることと、どの昆虫でも *o-Ace* の薬剤感受性が高いことだと考えられる。

モモアカアブラムシとワタアブラムシの *p-Ace* では他の昆虫と違い、アシルポケットを形成する 331 番アミノ酸は Phe ではなく Ser である。ところが、両種のピリミカーブ抵抗性系統では共通して *p-Ace* に Ser331Phe の置換が起きて、他の昆虫と同じアミノ酸になっている。このアミノ酸の置換は、アシルポケットの大きさについて見ると他の昆虫より大きかったものを同じ大きさに変化させたことになる。実際、331Ser の置換を導入したりコンビナント *p-Ace* (331S) のピリミカーブ感受性は、331F に比べ 100 倍高い。同時にジクロルポス、カルバリルに対しては感受性が逆に 1/10 以下に低下している。これらの結果はアブラムシ類が特異的にピリミカーブに感受性が高く、Ser331Phe の置換がピリミカーブのような分子の大きなジメチルカーバメートにのみ薬剤感受性低下をもたらす、モノメチルカーバメートや有機リン剤にはかえって感受性を増す場合があることをよく説明する。

ツマグロヨコバイのカーバメート剤抵抗性中河原系統では AChE がプロボクスルに最も感受性を低下させ (I₅₀ 値の比較で感受性系統の 1/115)、基質特異性も変化

することが報告されている。興味深いのは、感受性低下 AChE は *S-propyl* 型のカーバメートやプロバホススルホン、ダイアゾクソン等の一部の有機リン化合物には逆に感受性が高まる逆交差抵抗性現象である。中河原系統では *p-Ace* アシルポケットのアミノ酸に Phe290Val の置換が見つかった。この置換を導入したりコンビナント *p-Ace* (290V) は明らかにカルバリルに最も感受性を低下させ、プロバホススルホンに対しては感受性を高め、逆交差抵抗性をこのアミノ酸置換により説明できる。すなわち、この置換はアシルポケットの大きさを拡大して、モノメチルカーバメートなど比較的置換基の小さい阻害化合物は活性中心に配位するとき隙間が生じ酵素との親和性が下がると考えられる。

アミノ酸置換は酵素活性中心の大きさを変化させる以外にも基質、阻害剤との静電的結合に影響すると考えられるが、以上のように、それぞれの感受性低下 *p-Ace* の酵素特性を活性中心の空間的変化のみから説明できることは、抵抗性害虫に対する薬剤の選択、新規薬剤の設計に示唆を与えると思われる。

II Na チャネルの変異とピレスロイド感受性低下

イエバエのノックダウン抵抗性 (*kdr*) および、*super-kdr* (*kdr* の対立遺伝子により支配される *kdr* よりさらに高い抵抗性)として知られてきたピレスロイド抵抗性は、1996年に二つのグループによってイエバエとチャバネゴキブリの *para* 型 Na チャネル(キイロショウジョウバエの高温麻痺突然変異 *para* の要因として同定された電位依存性 Na チャネル)の cDNA 全塩基配列が決定され、その中に *kdr*, *super-kdr* をもたらすアミノ酸置換(図-2, Leu1014Phe, Met918Thr, Na チャネルのアミノ酸番号はキイロショウジョウバエの番号で表す)の存在が示された。電位依存性 Na チャネルは基本的には 260 KDa の糖ポリペプチド (α -サブユニット、分子量の小さい β -サブユニットを伴うものもある)で形成されている。 α -サブユニットは図-3 に示す相同性の高い四つのリピート (I~IV) で形成され、各リピートは脂質膜貫通性 α ヘリックス構造をもつ六つのセグメント (S1~S6) で構成される。対応するセグメントのアミノ酸配列の相同性は高く、性質も共通している。合計 24 本の膜貫通構造は集合して、最狭部が 3 × 5 Å のイオンチャネルを形成する。S5, S6 は疎水性が非常に高く、両端に電荷をもつことからチャネルを囲む部分で、S6 はゲート形成部分と考えられる。Ile-Phe-Met-Thr 配列を含む III-IV リンカーと III, IV の S4-S5 リンカーは一緒になって初期ゲート不活性化に関与し、ゲート周

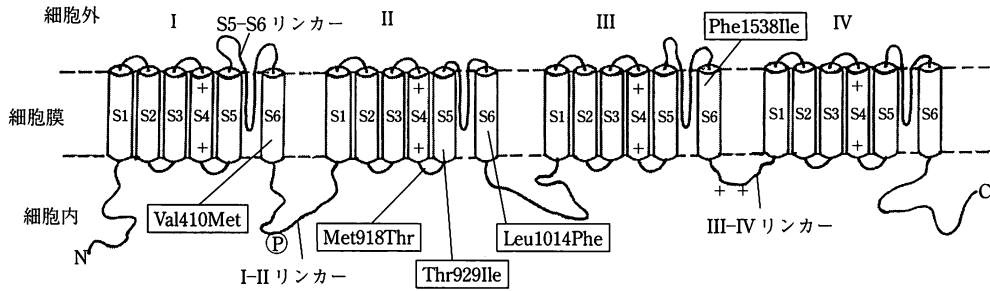


図-3 Naチャンネルタンパクの構造と *kdr* に関するアミノ酸置換

囲の膜内に入り込んでいる II と IV の S5-S6 リンカーは、遅いゲート不活性化に関与すると考えられる。S4 には 2 残基おきに + 電荷をもつ 6 個のアミノ酸が配置されるという特殊な構造から、電位依存的にゲートが開く機構に関与すると考えられる。ピレスロイドの Na チャンネルに対する作用は脱分極と電位の高さには影響せず、チャンネルの開いた状態が異常に延長することから、ゲートの不活性化機構に異常が起きていると推測される。

神経感受性低下によるピレスロイド抵抗性はハマダラカ *An. gambiae*、アカイエカ、ヤガ *Heliothis virescens*、サシバエ *Hematobia irritans*、コナガ、コロラドハムシ、モモアカアブラムシ、タバココナジラミ、ヒトジラミ、ウシオマダニ、キロシヨウジョウバエ、オオタバコガで報告されており、Leu1014Phe または Leu1014Ser、Leu1014His のアミノ酸置換が上記のうち *An. gambiae* からモモアカアブラムシまでの昆虫で明らかにされ、タバココナジラミと *H. irritans* ではそれぞれ Met918Val と Met918Thr が明らかにされている。その他明らかに薬剤感受性を低下させるアミノ酸置換として I-S6 の Val410Met (*H. virescens*)、II-S5 の Thr929Ile (ヒトジラミ)、III-S6 の Phe1538Ile (ウシオマダニ) が報告されている。また、各種昆虫の *kdr* 系統から見つかっているが、感受性低下への関与が確認されていないアミノ酸置換も S6 や S4-S5 リンカーに位置するものが多い。このように *kdr* の原因となるアミノ酸置換が Na チャンネルのゲート形成またはゲート開閉に関与する部分に集中することはそこがピレスロイドの作用部位であることを強く示唆しているが、いまだ確証が得られていない。

III フィットネスコストと抵抗性対策

一般的に解毒酵素の増強により薬剤抵抗性となった個体は、酵素タンパクの増産にコストを掛けている。抵抗性モモアカアブラムシの遺伝子増幅によって増産される CE は全タンパク質の 1% にもなり、感受性個体に比べ多大のコストを掛けていることは疑いない。この虫では

薬剤による淘汰を止めて飼育するとリバータントと呼ばれる増幅した遺伝子が発現しない変異個体の出現も知られており、コストの大きさがうかがえる。このように明らかにコストを掛けて薬剤抵抗性を維持している場合には、殺虫剤散布を中止した環境では感受性個体の適応性が勝り、集団内での薬剤感受性の回復が期待される。タンパクを多量に生産する必要のないアミノ酸置換による薬剤作用点の感受性低下についても適応コストについての考察が行われている。作用点の薬剤感受性低下の原因となるアミノ酸置換が多くの場合種を超えて保存されている重要なアミノ酸に起きることは、その変異が通常環境においてはマイナスに働くことを示唆している。AChE 薬剤感受性低下では活性中心の基質位置調整に関与するアミノ酸に変異が起こるため、機能は保持されるものの基質分解活性が変化する。Gly119Ser の置換をもつアカイエカの *p-Ace* では明らかに ACh 分解性が低下する。この基質分解性の低下が交尾行動や捕食者からの逃避行動にマイナスに働くとの興味深い報告がある。このように薬剤感受性が低下した作用点があたらず環境適応性の変化を知ることができれば、抵抗性の発達や感受性の回復の難易が推定でき、抵抗性対策に大いに役立つと考えられる。抵抗性分子機構解明は、害虫集団の抵抗性発達状態を遺伝子型の検出により正確にモニターすることも抵抗性対策には有益である。

引用文献

- 1) FFRENCH-CONSTANT, R. H. et al. (1991): Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88: 7209 ~ 7213.
- 2) FOURNIER, D. (2005): Chemico-Biological Interaction 157 ~ 158: 257 ~ 261.
- 3) GOLDIN, A. L. (2003): Current Opinion in Neurobiology 13: 284 ~ 290.
- 4) 河野義明・富田隆史 (1995): 応動昆 39: 193 ~ 211.
- 5) ——— (2004): 農業学会誌 29: 60 ~ 67.
- 6) KONO, Y. and T. TOMITA: Pestic. Biochem. Physiol. (印刷中として公開).
- 7) LIU, Z. et al. (2005): Proc. Natl. Acad. Sci. USA 102: 8420 ~ 8425.
- 8) SODERLUND, D. M. and D. C. KNIPPLE (2003): Insect Biochem. Mol. Biol. 33: 563 ~ 577.