

アセチルコリンエステラーゼの 感受性低下による殺虫剤抵抗性

筑波大学農林学系 こうの よし あき
河 野 義 明

I 殺虫剤の作用点としての

アセチルコリンエステラーゼ (AChE)

昆虫の中枢神経系に存在するコリン作動性神経は多種類の殺虫剤の作用点である。この神経の興奮伝導を担うナトリウムイオンチャンネルはピレスロイド剤や DDT の作用点であり、神経細胞間の興奮伝達が行われるシナプスにおいては後膜に存在するアセチルコリン (ACh) 受容体と ACh 加水分解酵素であるアセチルコリンエステラーゼ (AChE) がそれぞれクロロニコチンル剤と有機リン剤、カーバメート剤の作用点である。シナプス前膜から放出された神経伝達物質 ACh はシナプス後膜の ACh 受容体に結合して膜の興奮を引き起こす。AChE はこの時に余分な ACh を分解して神経伝達を正常に終結させる重要な酵素であり (図-1)、昆虫では、約 150 KDa の 2 量体タンパクとして存在し、グリコリピドアンカーを介して細胞膜に付着している。有機リン、カーバメートは作用点である AChE の基質結合部位に ACh と競合的に結合して ACh 分解機能を阻害する。その結果、シナプス部位で異常興奮が起こり、続いて神経は麻痺し、昆虫は死亡する。

殺虫剤抵抗性の原因には大きく二とおりある。一つは薬剤が昆虫体内に浸透しにくくなったり、解毒されたりして作用点に到達しにくくなることであり、もう一方は、作用点自体が変化して薬剤と結合しにくくなることである。ここでは、後者の例として有機リン剤、カーバメート剤抵抗性に伴う AChE 薬剤感受性低下の機構について述べる。

II AChE 薬剤感受性低下による抵抗性

有機リン剤に対する抵抗性はハダニで 1950 年代から報告されており、我が国でもやや遅れてミカンハダニなどで報告された。そして、1964 年にはナミハダニの有機リン剤抵抗性要因として AChE の薬剤感受性低下が示された (SMISSEY, 1964; VOSS and MATSUMURA, 1964)。

AChE の感受性低下をメチルパラオクソンに対する I_{50} 値により比較すると抵抗性ナミハダニ AChE は感受性の 1/1,000 である。さらに、この抵抗性 AChE の ACh 分解性は感受性のその 3/5 になり、パラオクソンのアルキル基を置換した化合物 (methyl-butyl) の阻害結果から酵素の加水分解に直接関与する部分に変化が起きているのではないかと推察された (VOSS and MATSUMURA, 1965)。

昆虫ではツマグロヨコバイのカーバメート剤抵抗性に伴って起きる AChE 薬剤感受性低下が報告され (IWATA and HAMA, 1972)、感受性低下 AChE の性質が詳しく研究された。この AChE はプロボクスルに最も感受性を低下させており、その程度は I_{50} 値の比較で感受性系統の 1/115 で、カルバリル、バツサ等にも約 1/50 であった。ハダニの場合と同様に活性中心の構造変化が推測されたが、興味深いのは、感受性低下 AChE は n-プロピル型のカーバメートやプロパホススルホキシド、ダイアゾクソン等の一部の有機リン化合物に対してはかえっ

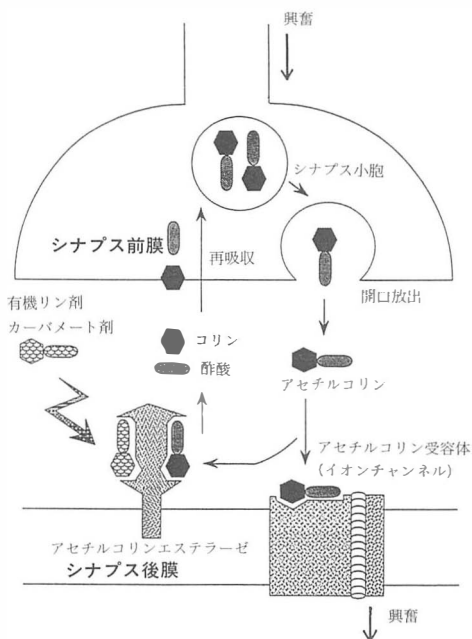


図-1 コリン作動性神経シナプスにおけるアセチルコリン (ACh) の働きと有機リン剤、カーバメート剤の作用を示す模式図 (MAMIYA et al., 1997)

Insensitive Acetylcholinesterase in Insecticide Resistance.
By: Yoshiaki Kono

(キーワード: 殺虫剤抵抗性, 感受性低下アセチルコリンエステラーゼ, 分子機構)

て感受性が高まることである (HAMA, 1980)。

1990 年前後から東北、関東地方で報告されているイネドロオイムシのカーバメート剤、有機リン剤に対する抵抗性も AChE の感受性低下に起因している (昆野・土門, 1998)。

このような AChE の薬剤感受性低下による抵抗性は現在約 30 種の昆虫で知られており (FOURNIER and MUTERO, 1994), 主な例を表-1 に示す。天敵として利用されるカブリダニの抵抗性については、殺虫剤抵抗性という性質から薬剤との同時利用により防除に貢献したとされている (AMBER and OVERMEER, 1988)。

我々の研究は日本脳炎媒介蚊コガタアカイエカの殺虫剤抵抗性に端を発している。1982 年に富山県で採集されたコガタアカイエカ (富山系統) (上村・丸山, 1983) は非常に高い有機リン剤抵抗性を示し、その AChE はほとんどの有機リン化合物に対して感受性を低下させていた (渡辺ら, 1991, TAKAHASHI and YASUTOMI, 1987, MAMIYA et al, 1997)。しかも、この抵抗性は速やかに日

本全国に広がった (YASUTOMI and TAKAHASHI, 1987)。富山系統と感受性台湾系統の AChE の各種薬剤に対する感受性を I_{50} で比較すると図-2 のようになる。富山系統 AChE の感受性はほとんどの有機リン化合物に対して 1/1,000 以下であり、カーバメート化合物に対しては約 1/100 であった。有機リンやカーバメートは酵素タンパクの活性中心にある ACh 結合部位 (図-3) に ACh と同じようにはまり込み、リン酸基やカルバモイル基が加水分解部分から離れなくなり、酵素活性を阻害すると考えられている。このように、酵素活性部位と阻害化合物との立体構造によって阻害活性が規定されるとすると、感受性低下 AChE ではこの部分に立体的変化が生じていることになる。実際、酵素阻害の機構が有機リン化合物などと異なり、基質結合部分と厳密に結合せずに阻害活性を示す化合物、tacrine や ambenonium は両系統の AChE に対して同程度の阻害活性を示す (図-2)。また、富山系統の AChE には感受性系統の AChE で見られる至適 pH, 至適基質濃度が顕著ではなくなり、基質特異

表-1 薬剤抵抗性に関するアセチルコリンエステラーゼ (AChE) 感受性低下の主な例

種	阻害剤	感受性比 (Ki または I_{50} の比)	文献
半翅目			
ワタアブラムシ <i>Aphis gossypii</i> **	paraoxon	14	SUN et al. (1987)
モモアカアブラムシ <i>Myzus persicae</i> **	pyrimicarb	49	鍋島, 未発表
ツマグロヨコバイ <i>Nephotettix cincticeps</i> **	propoxur	115	IWATA and HAMA (1972)
タバコナジラミ <i>Bemisia tabaci</i>	propoxur	2,500	DITTRICH et al. (1990)
鞘翅目			
コロラドハムシ <i>Leptinotarsa decemlineata</i> *	azinphosmethyl-oxon	16	ZHU and CLARK (1995)
イネドロオイムシ <i>Oulema oryzae</i> **	propoxur	50,000	昆野・土門 (1998)
鱗翅目			
コナガ <i>Plutella xylostella</i> **	paraoxon	127	TANG and ZHOU (1992)
ハスモンヨトウ近縁種 <i>Spodoptera littoralis</i>	m-paraoxon	12	ZAAZOU et al. (1973)
双翅目			
アカイエカ <i>Culex pipiens</i> *	propoxur	200,000	RAYMOND et al. (1986)
コガタアカイエカ <i>Culex tritaeniorhynchus</i> **	paraoxon	1,500	TAKAHASHI and YASUTOMI (1987)
ショウジョウバエ <i>Drosophila melanogaster</i> *	malaoxon	2	MORTON and HOLWERDA (1985)
イエバエ <i>Musca domestica</i> **	rabon	38	TRIPATHI and O'BRIEN (1973)
ダニ目前気門亜目			
ナミハダニ <i>Tetranychus urticae</i> **	paraoxon	600	SMISSAERT (1964)
カンザワハダニ <i>Tetranychus kanzawai</i>	malaoxon	1,000	KUWAHARA (1982)
ダニ目後気門亜目			
オウシマダニ <i>Boophilus microplus</i> *	diazinon	85	ROUSTON et al. (1967)
ダニ目中気門亜目			
カブリダニの一種 <i>Amblyseius potentillae</i>	paraoxon	311	AMBER and OVERMEER (1988)

*, **: AChE 遺伝子のクローニングがなされた種, **: 著者らのグループがクローニングした種。

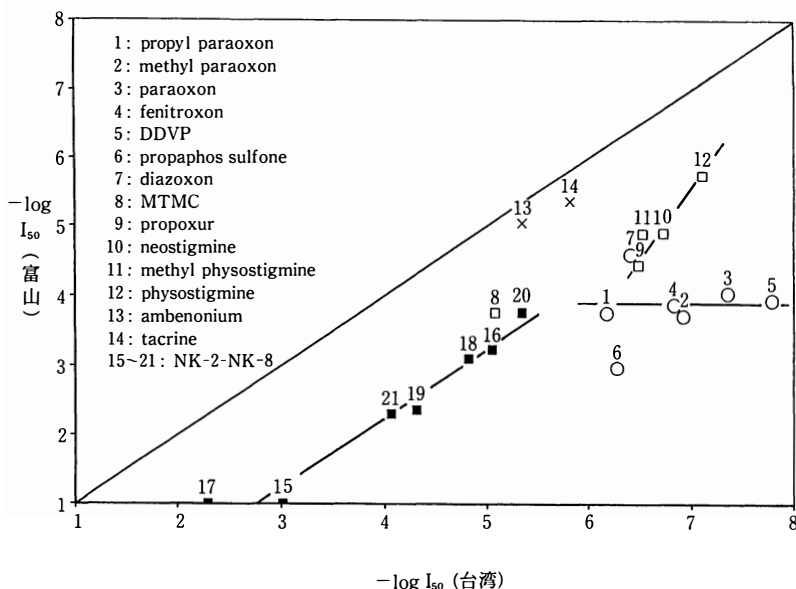


図-2 各種阻害剤のコガタアカイエカ抵抗性(富山)および感受性(台湾)系統のアセチルコリンエステラーゼ(AChE)に対する阻害活性(MAMIYA et al., 1998)

性がAChに局限し、アセチルチオコリン、プロピオニルチオコリンと分子の長さが長くなるにつれ急激に活性が落ちることも判明している(表-2)。さらに、アルキル基を置換した一連の阻害剤3-alkylsulfonphenyl methanesulfonateに対する両系統AChEの感受性についての構造-活性の相関から、コリン結合部分に対応するアルキル基の長さは感受性低下に影響しないと考えられ、富山系統のAChEの構造変化は基質結合部位の中でも加水分解部分で起きており、コリン結合部分には変化がないと結論される(図-2, NK-2~NK-8)。

III AChEの遺伝子と構造

前述のような結果をAChEのタンパク構造から明ら

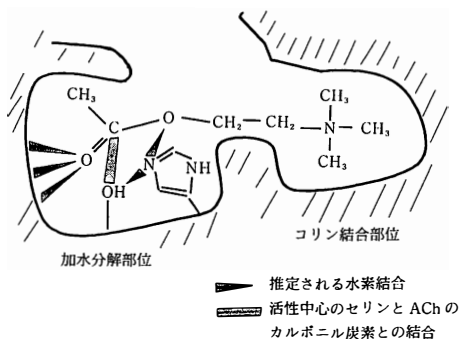


図-3 AChE 活性中心でのAChの結合を示す模式図

かにするために、その遺伝子のクローニングを開始した。他種動物の既知AChEアミノ酸配列の保存領域をもとに作られた縮重プライマーを用いてゲノムDNAをクローニングし、その一部分を特異的プライマーとしたPCRによりコガタアカイエカAChE遺伝子が得られた。さらに3'および5' RACE (rapid amplification of cDNA ends) により、1899残基のAChEタンパク質前駆体翻訳領域(ORF)を含む2298塩基のcDNA配列が決定された。このタンパク質のアミノ酸配列の類似性は、ネッタイシマカ(ANTHONY et al., 1995)、ハマダラカ的一种 *Anopheles stephensi* (HALL and MALCOM, 1991)、

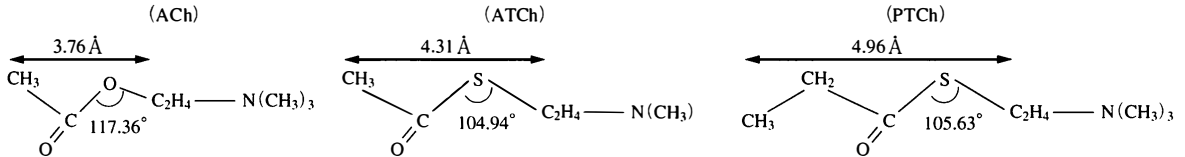
キロシヨウジョウバエ (HALL and ASPERIE, 1986)、コロラドハムシ (ZHU and CLARK, 1995) のAChEに対して、それぞれ、96%、94%、81%、77%であった。この配列には(1)成熟タンパク質には含まれないN-末端のシグナルペプチド、(2)glycosyl phosphatidyl inositol anchorと置換する高度に疎水的なC-末端ペプチド、(3)サブユニット内のジスルフィド結合に関わる六つのCys、(4)ダイマー形成に関わるC-末端近傍の一つのCys、および、(5)プロトンリレー機構に含まれるcatalytic triadを形成するSer、GluおよびHis (SUSSMAN et al., 1991)、といったAChE共通配列が含まれる(図-4)。

得られたコガタアカイエカのAChE cDNAをバキュウウィルスーカイコ培養細胞系で発現させたところ、生産物に高いACh分解活性を確認した。この活性はフェニトロオクソン、エゼリンによって阻害されるので、発現産物はAChEであると考えられる。

次に、コガタアカイエカ富山系統と感受性台湾系統とのAChE塩基配列を明らかにし、それから読みとったアミノ酸配列を比較した結果は意外にも両系統間に相違が全く認められなかった(日堂ら、未発表)。念を押すために両系統のAChE遺伝子(塩基配列には若干の違いが見られた)を上述の発現系で発現させたが、やはり、産生されたAChEの薬剤感受性には違いが見られなかった(小林ら、未発表)。

表-2 大きさの異なる基質に対する抵抗性(富山)と感受性(台湾)系統のアセチルコリンエステラーゼ(AChE)の分解活性(Km値)の比較

系 統	基 質		
	アセチルコリン (ACh)	アセチルチオコリン (ATCh)	プロピオニルチオコリン (PTCh)
富 山	4.68×10^{-5}	6.79×10^{-4}	8.08×10^{-3}
台 湾	7.19×10^{-5}	1.18×10^{-4}	1.04×10^{-3}
富山/台湾	0.65	5.75	7.77



矢印で示す2炭素間の距離と酸素または硫黄分子の位置での角度を図示。

MSSISMXXV GILLCIAVISFVYGIFDRLVVQTSSGPIRGRS 40
 N末端 (1)
 TMVQGRREYVHYFNGVPEFAKPEVDGLRFQKPEFAEPWHGVLD 80
 ATRLPPS IQEYRYEYFPFGFAGEEMWNPNTNVSEDLXLNI 120
 (3) (3)
 WVP TKTRLRHGRGLNFGNNDYFQDDDDFQRQBQSKGGLAM 160
 LVMIYGGGFMSTLIDVYNAEILAAVGNVYVASMQRYVYG 200
 AFGEFFYLAPYLNREEEAPGNVGLWDQALAIRWLKENAKA 240
 FGGDPDLITLFGESAGGS SVSLHLLSPATRGLSHRGILQS 280
 (5)
 GTLNAPFMSHMTAEKALSVAESLIDQCNNVTLLKDSFGSY 320
 (3)
 MNBMNRNVDAKTISVQQWNSYSGILGFPSAFTIDGVFMTAD 360
 (3)
 PMTMLREANLEGIDILVGSNRDGGTYFLLYDFIDYFEKDA 400
 (5)
 ATSLPRDKFLEIMNTIFSKASEPEREAIIFQYTGWESGND 440
 GYQNQQQVGRAYGDFHFFIPPTNEFALGLTDRGASVHXYXF 480
 (3)
 THRTSTSLWGEWYMGVLRGDEVEYIFGQPMNATLQYRQRER 520
 (5)
 DLSRRMVLVSSEFARSGNPALGEHWPPLYTKENPIYFIFN 560
 AEGEDDLRGEKYGRGPHATSBAFWNDFLPLRLAWSIPPKP 600
 (3)
 SNMLDQISAASVRYVDKFVVTVLTVLIVLRLF 633
 (4) C末端

図-4 コガタアカイエカ AChE のアミノ酸一次配列

(1)~(5)は本文中に対応する番号で示したアミノ酸またはアミノ酸配列。下点線部分は昆虫の AChE において保存されている配列を示す。

IV AChE 感受性低下の分子機構

キイロショウジョウバエの AChE はこの昆虫の遺伝学的知識の集積を背景に 649 残基の AChE タンパク質前駆体をコードする ORF が決定されている (HALL and SPIERE, 1986)。

MUTERO ら (1994) は、このハエの有機リン剤などに感受性を低下させた AChE で見つかった 4 か所のアミノ酸置換を in vitro mutagenesis により感受性系統の AChE cDNA 組換え体に導入し、アフリカツメガエル卵母細胞系で発現させた。抵抗性系統において置換を生

じていたアミノ酸座位は、感受性系統の Canton S では Phe 115, Ile 199, Gly 303, Phe 368 (本文中でのアミノ酸番号はキイロショウジョウバエ AChE のものを用いた) に相当し、これらに対応する導入したアミノ酸置換は、それぞれ Ser, Val, Ala, Tyr であった。3 残基置換について可能な置換の組み合わせをもつ AChE はアミノ酸置換の相乗効果により感受性が低下したが、中でも V 199+A 303+Y 368 の組み合わせをもつものはパラオクソンに対する感受性が約 1/80 に低下した。この結果から MUTERO ら (1994) は、自然集団にすでに存在する比較的弱いレベルの抵抗性をもたらし遺伝子が遺伝的組換えにより集積し、殺虫剤の淘汰により定着して抵抗性の機構となりうることを示した。

東京湾廃棄物埋立処分場由来の薬剤抵抗性イエバエの AChE 遺伝子を解析した結果は、アミノ酸置換による AChE 感受性低下を裏付け、しかも、2 個のアミノ酸 (Gly 303, Phe 368) についてはキイロショウジョウバエで明らかにされた部分と相同の部位で置換していた。さらに、n-プロピル型有機リン剤抵抗性に特徴的アミノ酸置換も明らかにされた (KOZAKI et al., in press)。これまで、殺虫剤作用点感受性低下の研究はシクロジェンの作用点である GABA 受容体、ピレスロイドの作用点ナトリウムイオンチャネルについても行われており、感受性低下に関わる一つまたは二つのアミノ酸置換は昆虫の種を越えて見つかった。このような現象は、特殊な機能を備えたタンパク質では薬剤感受性を低下させるためのアミノ酸置換が限られた部位でしか起こり得ないことを示している。

さて、AChE 感受性低下にはイエバエ、ショウジョウバエに見られた構造アミノ酸の置換によるものと、コガタアカイエカでのアミノ酸置換を伴わないものの二とお

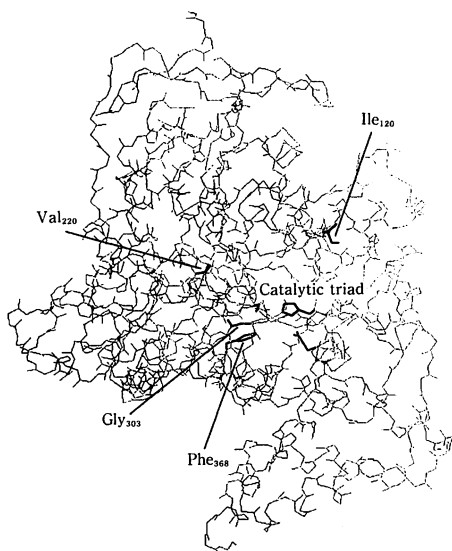


図-5 キイロショウジョウバエ AChE のアミノ酸立体配置 (Catalytic triad の3アミノ酸を濃い線で表示し、左からセリン、ヒスチジン、グルタミン酸) とイエバエ AChE の感受性低下に関与すると考えられるアミノ酸 (番号とともに表示した4アミノ酸)。データベース MMDB と PDB によって作成した

りの分子機構が存在するように思われる。日本で知られている AChE 感受性低下により殺虫剤抵抗性を示す害虫のうち、現在までに明らかになったツマグロヨコバイ (Tomita et al., 2000)、ワタアブラムシ (土田ら、未発表)、モモアカアブラムシ (鍋島ら、未発表)、イネドロオイムシ (富田ら、未発表) においては AChE 感受性低下に伴ったアミノ酸置換は検出されていない。このことから、AChE 遺伝子翻訳後に何らかの修飾が働いて構造が変化すると考えられる。しかし、アカイエカで研究を続けているフランスのグループは同じようにアミノ酸置換の見つからないこの蚊の AChE 感受性低下を AChE 遺伝子が複数存在するという解釈によって説明しようとしている (Bouquet et al., 1998)。例外的に、線虫、*Caenorhabditis elegans* に複数の AChE 遺伝子の存在が知られているが、哺乳動物から昆虫まで、AChE 遺

伝子は1ゲノムに1個ということになっており、このような点を考慮すると多くの昆虫種に複数の AChE 遺伝子が存在するというのも考えにくい。

最近、コガタアカイエカにおいて染色体上の分子マーカーを用いた連鎖群解析が行われ、AChE 遺伝子と感受性低下を決める遺伝子が異なる染色体上に存在することが明らかになった (Mori et al., 2001)。この結果は AChE 遺伝子が1個しか存在しないことを示すとともに、修飾因子による AChE の感受性低下を支持した。

V 今後の研究

AChE には他のタンパク質と同様、糖鎖結合やリン酸結合が起こると考えられ、実際、人間やシビレエイ *Torpedo carifornica* の AChE ではリン酸化によって基質分解性が変化することが報告されており (Grifman et al., 1997)、遺伝子翻訳後の修飾による AChE の性質の変化が十分起こりうると考えられる。

一方、AChE の活性中心の存在する窪みの入り口付近には基質と結合する部位が存在すると考えられており、その部分に親和性のある化合物が結合するとアロステリックにこの酵素の性質を変化させるという報告もある (Marcel et al., 2000)。

アミノ酸置換のない AChE の感受性低下は、これまで知られている殺虫剤作用点の薬剤感受性低下の分子機構とは異なる機構として興味深いばかりでなく、一般のタンパク質三次元構造構築の問題と結びつくものであり、今後の研究が期待される。

引用文献

- 1) FOURNIER, D. and A. MUTERO (1994) : Comp. Biochem. Physiol. 108 C, 19~31.
- 2) MAMIYA, A. et al. (1997) : Appl. Entomol. Zool. 32: 37~44.
- 3) ——— et al. (1998) : ibid. 33: 315~319.
- 4) MARCEL, V. et al. (2000) : J. Biol. Chem. 275: 11603~11609.
- 5) MORI, A. et al. (2001) : Insect Molec. Biol. 10: 197~204.
- 6) TOMITA, T. et al. (2000) : Insect Biochem. Mol. Biol. 30: 325~333.