

特集：ゲノム創農薬

# 昆虫ゲノム研究と殺虫剤開発への利用

農業生物資源研究所 **野** **田** **博** **明**  
 日本化薬(株)精密品化学開発研究所 **加** **藤** **康** **仁**

## はじめに

生物のゲノム研究の成果は、医療のあり方などを通して、我々の生活に密接に関わりつつある。ゲノムの研究は、一般にはある生物のもつ遺伝子セット全体あるいは一部を読み取ることと理解されているが、それ以上に幅広い内容と大きな発展性を秘めている。昆虫のゲノム研究も、ショウジョウバエに始まり、重要な衛生害虫、農業害虫において研究が進められており、その成果を産業に役立たせようとする動きが活発化している。昆虫類の遺伝子情報が自由に入手できるようになれば、それらを利用して新しい農薬開発に利用することができる。ここでは、ゲノム研究の現状を簡単に紹介し、ゲノムや遺伝子の情報がどのように農薬開発に利用できるかを紹介したい。

## I 農薬開発と農薬使用における問題点

これまでに、多くの優れた殺虫剤が開発されてきているが、現在、殺虫剤および殺虫剤開発研究が抱えている問題点を指摘したい。一番目に、殺虫剤となる開発化合物の発見創出確率が低下してきていることである。以前は、1~2万化合物をスクリーニングすれば、殺虫活性を示す開発化合物を発見できるといわれていた。しかし、近年では5~10万化合物あるいは20万化合物をスクリーニングする必要があるといわれている。これまでに多くの化合物について検討され、開発化合物の発見確率は、今後ますます下がると考えられる。二番目に、開発された殺虫剤の作用機構が不明なものがあることである。生物活性によってリード化合物を見つけ、開発化合物へ合成展開していくわけであるが、新規の薬剤では、どうして昆虫が致死に至るかを明確に説明できない殺虫剤もある。安全性や薬剤抵抗性の観点からは、作用機構を早く明らかにすることが望まれる。三番目に、殺虫剤の作用部位の種類は限られており、多様な標的が知られ

ているわけではない。このことは、上記の開発化合物発見確率の低下とも関連があり、また、後述の薬剤抵抗性/交差抵抗性の発達にもかかわってくる。四番目に、薬剤抵抗性の発達である。これは、外部からストレスを与えて、害虫個体群の密度を押さえ込むという殺虫剤の特徴からして、避けて通れない問題である。五番目には、殺虫剤の人畜毒性があげられる。殺虫剤を含め農薬は人畜や環境に対して極めて厳しい安全基準が求められており、標的動物への十分な特異性を確保されているが、今後、より一層安全性の高い農薬の開発が望まれている。

## II ゲノム創農薬とは

これらの問題点に対して、「ゲノム創農薬」は大きな可能性を秘めていると考えられる。ここで論議しているゲノム創農薬とは、遺伝子やゲノム情報を利用した農薬開発を指しており、かなり広い範囲を包含している。その最大の特徴は、標的分子を設定して、その阻害剤(場合によっては活性促進剤)を見つけて、農薬へと開発していくことであり、従来の生物活性スクリーニングによるリード化合物探索に比べ、より感度の高い探索方法であるともいえる。従来は、ランダムにスクリーニングすることによって、殺虫活性のあるものを探し出し、それを合成展開・最適化している。全く新規な化合物の場合、その作用機構は不明な場合が多い。一方、ゲノム創農薬では、標的分子の阻害がその作用機構であり、その標的分子を *in vitro* でアッセイする系を構築し、多くの化合物を効率的にスクリーニングする。したがって、ハイスループットスクリーニング (HTS) が可能となる。HTSを開発しているベンチャー企業は1日に100万化合物スクリーニングを目標に試験方法の構築を進めている。また、昆虫体を用いたスクリーニングではよい結果が得られないものでも、より高感度である *in vitro* の系では、阻害活性が見つかるものもあると思われる。それらの化合物の特徴を抽出し、*in vitro* と *in vivo* での違いを明らかにし、化合物の合成に有益な情報をもたらすことも考えられる。さらに、何よりも重要なことは、新しい殺虫剤の標的を開拓できることである。これまでに

Development of New Insecticides Based on Insect Genomic Information. By Hiroaki NODA and Yasuhito KATO

(キーワード: 昆虫ゲノム, 農薬開発, ゲノム創農薬, 標的分子, アッセイ系)

知られている殺虫剤の標的はかなり限られており、遺伝子発現パターンの解析やゲノム情報を利用することにより、新規の標的を今後見つけだしていくことができると思われる。また、標的を選定する段階で、どのような農薬を開発するかをイメージすることができる。多くの可能性をもっているゲノム創農薬であるが、初期投資と遺伝子ゲノム情報が必要である。前者に関しては、特別なHTSを利用しなければ、分子生物学的な実験設備と *in vitro* アッセイ系の準備を整えるだけで、農薬スクリーニングに取りかかることができよう。後者に関しては、多大の費用と労力がかかるが、昆虫ゲノム情報が整備されてきて、比較的利用しやすい体制ができつつある。

### III 昆虫ゲノム研究の現状

ゲノム全体の情報を自由に利用できる昆虫種は、現在のところショウジョウバエ (*Drosophila melanogaster*) とハマダラカ (*Anopheles gambiae*) の2種である。ショウジョウバエは2000年にセレーラ・ジェノミックス社とカリフォルニア大学などが中心となって、全ゲノムが公開された (ADAMS et al., 2000)。ゲノムサイズは137 Mbpで、14,000個の遺伝子が同定された。これは、動物ゲノムとしては、はじめてショットガンシーケンスによって解読されたもので、ヒトゲノム解読に大きな影響を与えた。次いで、ハマダラカ (*Anopheles gambiae*) の全ゲノムが2002年秋に公表された (Holt et al., 2002)。その間に、タバコガの一種 *Heliothis virescens* でゲノムが解読されたと報道があった。製薬メーカーであるバイエルと Exelixis という会社が共同で立ち上げたベンチャー企業である Genoptera (<http://www.genoptera.com>) によって、解読が行われたものであるが、データは公表されていない。この *H. virescens* のゲノム解読は、農薬開発に利用するために行われたもので、バイエルがそのゲノム情報を利用した創薬を行っているといわれている。その他に、ミツバチ (*Apis mellifera*)、ネッタイシマカ (*Aedes aegypti*) などの全ゲノム解析が進められている。

我が国では、カイコ (*Bombix mori*) のゲノム解読が農業生物資源研究所を中心に進んでいる。カイコのゲノムサイズは530 Mbpであり、比較的大きなサイズである。また、反復配列やトランスポゾンなどが多く含まれていることが知られており、ショウジョウバエなどに比べて困難な解読作業になると思われる。これまで、BACライブラリーをつなぐ作業が行われてきており、正確にシーケンスするための下準備が行われてきている。さらに、2002年度末からショットガンシーケンス

が開始され、全ゲノム解読が加速されている。

一方、全ゲノム解析ではなく、発現している遺伝子を解析する cDNA 解析、特にその一部だけを多くの遺伝子について解読する EST 解析は、多くの昆虫で行われている。EST 配列を多く蓄積して、データベース化しておくことによって、欲しい遺伝子の断片を手に入れ、それをもとに全体の遺伝子をクローニングすることができる。これは、非常に便利で、自分で cDNA ライブラリーを作ったり、特別な PCR を行わなくても、必要な遺伝子情報の一部が手に入る。また、解析に使われた cDNA は、マイクロアレーにも使用されている。全ゲノムが解読されているショウジョウバエやハマダラカの EST が最も多く解析されているが、これは、ゲノムを解読しただけでは、実際に体内で働いている遺伝子やタンパク質を十分理解することはできず、メッセンジャー RNA の配列解読も重要であることを意味している。特に、最近では完全長 cDNA の配列が多くの生物で解読されており、カイコやトビイロウンカでも完全長

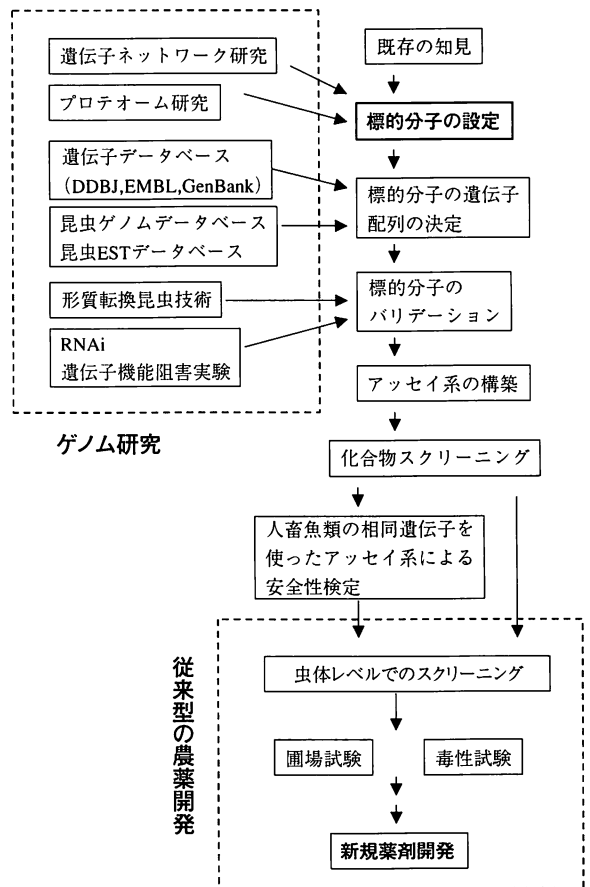


図-1 ゲノム情報に基づいた農薬開発の流れの例

cDNA 解析が行われている。

では、これらのゲノム情報や遺伝子情報が、農薬開発にどのように使われる可能性があるかを考え、現在考えられているゲノム創農薬へのアプローチの一端を具体的に紹介したい (図-1)。

#### IV 昆虫の標的分子を設定する

まず、開発したい農薬について、そのアウトラインを明らかにする。これまでの農薬開発と同様に、市場の需要や企業の販売戦略などから、商品としての薬剤のコンセプトを作る。例えば、ダニ剤なのか、土壌害虫なのか、どのような効果を期待するのか、遅効性でもよいかから天敵に配慮するのか、あるいは、即効性でなくてはいけないのか、などである。必ずしもこのコンセプトがなくてもよいが、ある程度農薬開発の方向性を決めておくことが可能である。そして、対象害虫の標的遺伝子をクローニングする。標的遺伝子を何にするか、何が有望な標的かについては、まだ、ほとんど情報が蓄積されていない。これまでの既存の殺虫剤の標的分子は、有効な標的であるが、既に多くの殺虫剤が開発されており、他社製品との競合や薬剤耐性の出現などを考えると、できればそれ以外の標的を設定して、新しい殺虫剤を開発したい。ここでは、仮想的に標的分子を設定して、その分子の働きを阻害する殺虫剤開発をシミュレートしてみる。一例として、昆虫の生理上重要な働きをしている酵素の働きを阻害する殺虫剤の開発を考えてみたい。重要な代謝を司る酵素や、脱皮変態にかかわる酵素、あるいは、神経系やミトコンドリアで働く酵素等が考えられる。

#### V 標的分子の遺伝子情報の入手

対象となる酵素の遺伝子情報を、対象としたい害虫もしくは近縁の害虫の EST データベースから探し出す。あるいは、公共の遺伝子データベース (DDBJ, EMBL, GenBank) に登録されているものの中から検索する。対象昆虫の遺伝子に関する情報がない場合は、ショウジョウバエやハマダラカのデータベース (FlyBase, <http://flybase.bio.indiana.edu/>; AnoBase, <http://skonops.imbb.forth.gr/AnoBase/>) に、目的の遺伝子があれば、その配列情報をもとに、目的の害虫から遺伝子をクローニングすることも可能である。プライマーを設計して、PCR で対象とする遺伝子を増幅するには、上記の2種の昆虫の配列情報だけでは不十分で、カイコ (SilkBase, <http://www.ab.a.u-tokyo.ac.jp/silkbase/>) やその他の昆虫の配列情報 (公共のデータベースを利用する) を加味して、プライマーを設計する必要がある。

目的の遺伝子の部分配列情報が入手できたら、その cDNA の全長の配列を明らかにする。部分配列から遺伝子の上流と下流の配列を解読して、タンパク質に翻訳される部分 (オープン・リーディング・フレーム, ORF) を明らかにする。

#### VI 標的分子のバリデーション

対象となる分子の遺伝子を入手できた段階で、この分子が本当に標的として適しているかどうかを判断する必要がある。既に、その分子が殺虫剤の標的として利用できることがわかっている場合は、このバリデーションは不要であるが、新規の標的の場合、今後多くの費用と時間を費やして開発することになるので、この標的分子の働きを止めたら、確実に害虫の防除ができることを確認しておく必要がある。例えば、この遺伝子をノックアウトした昆虫を作って (ノックアウト昆虫作製は容易ではないが) その影響を見たり、RNAi によりその遺伝子の働きを阻害したりして、その分子の働きを止めたときの影響を調査する必要がある。このバリデーションの手法の開発が現在の課題で、ショウジョウバエの形質転換、線虫の RNAi 等が比較的研究が進んでおり、それらを利用することも考えられる。しかし、なるべく、対象の害虫に近い昆虫でバリデーションを行う必要があり、害虫類への遺伝子導入 (トランスポゾンやウイルスの利用) (HANDLER, 2001; ATKINSON, 2002) と、RNAi 技術の進展が望まれる。その他に、対象となる標的ごとに、適切なバリデーション手法を開発して、確認することが望ましい。

#### VII 化合物のアッセイ系の開発とスクリーニング

標的分子の働きを阻害すれば害虫に大きなダメージを与えることが確認できたら、いよいよその阻害剤を探索することになる。ここでは酵素を想定しているので、*in vitro* で酵素活性を指標に阻害効果を測ることにする。酵素遺伝子の ORF から、大腸菌、バキュロウイルス、無細胞翻訳系などを利用して、タンパク質を発現させる。タンパク質に糖鎖がつく必要がある場合は、バキュロウイルスで発現させるのがよいと思われる。そして、作られた酵素を精製して、96 ウェルのプレート内に分注して、その酵素の基質を入れ、化合物を加えて阻害活性をウェルごとに測る。酵素遺伝子の ORF をプラスミドにつなぎ、細胞内で発現させて、細胞を使った酵素阻害アッセイ系を作ることもできる。細胞を利用したアッセイ系と無細胞のアッセイ系では、化合物の阻害効果も

異なってくる可能性があり、その違いが何に起因するのか、また、化合物の構造がどのように細胞系/無細胞系とかかわってくるのかなど、今後の研究課題となろう。さらに、このアッセイ系をハイスループットスクリーニング (HTS) に仕立て上げることも考えられる。

ここで、重要なことは、多くの新規の化合物をスクリーニングすることも必要であるが、これまでの多くの保有化合物ライブラリーを *in vitro* のアッセイ系でその阻害効果を調査することから、多くの情報が得られると期待できる。既に、殺虫剤としては、開発してしまったグループの化合物や開発を断念したグループの化合物も、対象となる標的に対して、純粋な阻害効果から見て構造と活性との関係に新たな知見をもたらすことも期待できる。

さらにコンピュータケミストリーを利用して、対象となる酵素に対する阻害剤の鋳型を作成し、新たな分子の設計が可能となる。このためには、その酵素または類似のタンパク質の高次構造がわかっている必要があり、阻害剤との結合の様子をコンピュータで解析する必要がある。この分野も急速に発展しており、将来有用な情報を提供してくれるようになると考えられる。

## VIII 害虫を用いたスクリーニング

*In vitro* のアッセイ系で、有効な化合物が選抜されてきた段階で、次のステップとして、細胞レベル、個体レベルでのスクリーニングにもっていく場合と、人畜毒性の検定などを *in vitro* で調査する場合など、状況に応じて異なると思われる。例えば、この酵素がほ乳類にもある場合、昆虫のもつ酵素には強く阻害し、ほ乳類の酵素には阻害効果が見られない化合物が望ましい。ほ乳類の酵素について同様の *in vitro* アッセイを行う場合は、より阻害効果の低いものを選択するようになる。

たとえ、*in vitro* で効果が高くても、虫体を用いると効果が低い場合もあり、これまで行われてきている虫体を用いたスクリーニングでの効果試験は必須である。また、効果のある化合物をまず、*in vitro* アッセイで見つけたし、その後の化合物の合成と展開をどの段階で、そしてどのアッセイ系を組み合わせで行うかは、これまでの経験が重要と思われる。*In vitro* で見つけた化合物は、これまでの虫体スクリーニングで見つかった高次のリード化合物とは異なり、初期段階の候補化合物と考えた方がよい。これまでの、虫体スクリーニングでは、見落としてきた有用な化合物を再発見できることを期待したい。

## IX マイクロアレイ/プロテオームと新規標的探索

上記のシミュレーションでは、既に薬剤標的分子として知られているものを対象にその阻害化合物をアッセイする系を構築することを考えたが、さらに我々が気付かない有望な標的分子も存在すると思われる。昆虫体内で殺虫剤が作用したときにどのように発現する遺伝子に変化するのか、あるいは、遺伝子のネットワークがどのようになっているのかを解き明かし、昆虫の代謝や生理でキーとなる分子を解明していくことも重要である。筆者らは、マイクロアレイを用いて、既存の殺虫剤が昆虫の遺伝子発現にどのような影響を与えるのか、発現しているタンパク質がどのように変わるのかを調査している。これらの研究過程で、興味ある遺伝子やタンパク質が見つかることを期待している。

## X 薬剤抵抗性とゲノム/遺伝子情報

昆虫のゲノムや遺伝子の情報は、殺虫剤抵抗性の機構解明にも貢献している。薬剤抵抗性は一般に、標的分子に変異をもつ個体群の発達あるいは殺虫剤を代謝する能力の高い個体群が発達することによってもたらされると考えられる (河野・富田, 1995)。ピレスロイド剤抵抗性個体群では、ナトリウムイオンチャネルの遺伝子の、有機リン剤ではコリンエステラーゼ遺伝子のアミノ酸変異が起こっていることが多くの虫で知られている (Lee and Soderlund, 2001; Vontas et al., 2002)。標的分子の変異は、遺伝子の塩基配列を解読することによって明らかになる。また、有機リン剤やカーバメート剤抵抗性個体群では、カルボキシル・エステラーゼなどの代謝酵素がゲノム内で増幅していることも報告されている (Small and Hemingway, 2000)。今後、害虫の遺伝子解析が進み、個体群ごとに簡便にその遺伝子変異などを測定できる手法の開発も望まれる。

## おわりに

ゲノム情報を利用して農薬開発を行おうとする試みは、まだ確立された手法ではないが、既に研究は始まっており、今後試行錯誤を経て、農薬開発の将来に大きく影響していくと思われる。そのためには、研究基盤となるゲノムデータベースの充実やバリデーショナル手法の発展などが必要である。ゲノム創農薬は、これまでの開発手法と対立するものではなく、より合理的に効率的に、そしてより安全性が高い新規の農薬開発に寄与するもの

と考えられる。

本文をまとめるに当たり、貴重な意見をたまわった、日産化学工業(株)生物化学研究所の中平国光氏にお礼申し上げます。

#### 引用文献

- 1) ADAMS, M. D. et al. (2000): Science 287: 2185~2195.  
2) ATKINSON, P. W. (2002): Insect Biochem. Mol. Biol. 32:

- 1237~1242.  
3) HANDLER, A. M. (2001): ibid. 31: 111~128.  
4) HOLT, R. A. et al. (2002): Science 298: 129~149.  
5) 河野義明・富田隆史 (1995): 応動昆 39: 193~211.  
6) LEE, S. H. and D. M. SODERLUND (2001): Insect Biochem. Mol. Biol. 31: 19~29.  
7) SMALL, G. J. and J. HEMINGWAY (2000): Insect Mol. Biol. 9: 647~653.  
8) VONTAS, J. G. et al. (2002): ibid. 11: 329~336.

#### 書評

日本農業害虫大事典  
梅谷献二・岡田利承 編  
A5版, 1,203ページ 本体50,000円+税  
全国農村教育協会 (2003年5月8日) 発行

“日本農業害虫大事典”は最近刊行された“昆虫学大事典”と並び、昭和の昆虫学の集大成であり、平成の昆虫学の出発点となるものである。農業害虫を包括的に写真と解説を組み合わせて、実用的であり、防除の入口を指示するに要を得た事典である。一方インターネットによる曖昧な知識の氾濫をいかにして整理するかが今後の大きな課題とされる時、著者を明確に示した資料の価値は決して失われることはない。膨大な原稿の収集・編集

に当たられた方々に感謝したい。材料を提供された方々の日頃の精進の結果は今後農業保護を学ぶ学生にとっても大きな指針になるものである。農業環境の激変から今後写真撮影の可能性が少ないもの、発生地域の限られた害虫まで網羅した貴重な資料である。やむを得ないことではあるが、作物ごとの解説であるため、重複した記事が多いが、そこは写真を適切に変えたり、特異現象を記載するなどの工夫が各所にみられる。通読する性質の事典ではないが、その重量感には圧倒される。今後インターネットの発達によってこの種の出版は絶後のものとなる。 “日本農業害虫大事典”を出発点としてインターネット上に動画を使った農業昆虫サイトの実現することを期待するものである。

(高木一夫)

### 登録が失効した農薬 (15.6.1~6.30)

掲載は、種類名、登録番号：商品名 (製造業者又は輸入業者) 登録失効年月日。

#### 「殺虫剤」

- NAC 粉剤  
11011: 三明デナボン粉剤2 (三明ケミカル(株)) 2003/6/5
- DMTP 水和剤  
12161: 日農スプラサイド水和剤 (日本農薬(株)) 2003/6/5
- イソキサチオン・NAC 粉剤  
15114: カルホスナック粉剤 25 DL (三共アグロ(株)) 2003/6/24
- ヘキシチアゾクス・マシン油乳剤  
17882: ニッソランオイル乳剤 (日本曹達(株)) 2003/6/26
- BT 水和剤  
18743: 日農ダイポール水和剤 (日本農薬(株)) 2003/6/22
- エトフェンプロックス・テオジカルブ水和剤  
18749: ローヌ・プーランドタピラー水和剤 (バイエルクロップサイエンス(株)) 2003/6/22
- テルベンズロン水和剤  
19475: ヤシマノーモルトフロアブル (八洲化学工業(株)) 2003/6/11
- ジメトエート粒剤  
6353: ホクコージメトエート粒剤 (北興化学工業(株)) 2003/6/25

#### 「殺菌剤」

- ストレプトマイシン液剤  
13790: アグリマイシン-20 液剤 (ファイザー製薬(株)) 2003/6/25

#### 「殺虫殺菌剤」

- エトフェンプロックス・PAP・フサライド・フルトラニル粉剤  
17868: 日農モンカットラブサイドイネメイト粉剤 DL (日本農薬(株)) 2003/6/20
- フィプロニル・プロベナゾール粒剤  
20999: バイエルビルダープリンズ粒剤 (BASF アグロ(株)) 2003/6/5
- フィプロニル・アゾキシストロピン粒剤  
21002: バイエルアミスタープリンズ粒剤 (BASF アグロ(株)) 2003/6/5
- フィプロニル・イソプロチオラン・ピロキロン粒剤  
21003: バイエルピカピカ粒剤 (BASF アグロ(株)) 2003/6/5
- フィプロニル・イソプロチオラン粒剤  
21006: バイエルフジワンプリンズ粒剤 (BASF アグロ(株)) 2003/6/5

#### 「除草剤」

- ジメタメトリン・ピリプチカルブ・プレチラクロール・ペンシルフロメチル水和剤  
20390: ポテーレフロアブル (シンジェンタ ジャパン(株)) 2003/6/2
- ジメタメトリン・ピリプチカルブ・プレチラクロール・ペンシルフロメチル水和剤  
20391: ポテーレLフロアブル (シンジェンタ ジャパン(株)) 2003/6/2