

ネッタイシマカのピレスロイド代謝抵抗性に関する量的形質座位解析

研究分担者 富田 隆史（国立感染症研究所・昆虫医科学部・室長）
研究協力者 小川 浩平（国立感染症研究所・昆虫医科学部・研究員）
駒形 修（国立感染症研究所・昆虫医科学部・研究員）
糸川 健太郎（国立感染症研究所・昆虫医科学部・流動研究員）
葛西 真治（国立感染症研究所・昆虫医科学部・主任研究官）
澤邊 京子（国立感染症研究所・昆虫医科学部・部長）

研究要旨

ネッタイシマカ抵抗性系統(SP 系統)は、ナトリウムチャンネルに 2 箇所の点突然変異を持ち、ペルメトリンによる 10 世代の室内淘汰により感受性系統(SMK 系統)と比べ 1647 倍の抵抗性比を示す。SP 系統の抵抗性比は、PBO による解毒酵素シトクロム P450 の阻害により 33 倍にまで減少することから、同系統の殺虫剤抵抗性には、作用点変異に加えて解毒酵素の関与が疑われる。そこで SP 系統のペルメトリン抵抗性に関与する原因遺伝子を解明するために、量的形質遺伝子座(QTL)解析を行った。QTL 解析のために、殺虫剤感受性 SMK 系統と SP 系統の識別が可能なマイクロサテライト、SNPs、および DNA 配列挿入/欠失を利用した 33 座位の分子マーカーを開発した。SMK♂×SP♀の交配に基づく F2 雌成虫 96 個体に対して ¹⁴C 標識されたペルメトリンの局所施用を行い、個体毎に排泄されたペルメトリン量を測定するとともに、33 座位の遺伝子型を決定した。F2 の排泄量とマーカー型を基にした QTL 解析の結果、第 1 および第 3 染色体に排泄量増大に関与する QTL の存在が明らかになった。排泄量への関与が特に大きかった第 1 染色体上の QTL 近傍には、少なくとも 8 つの P450 遺伝子が存在した。これらの内で SP 系統でのみ発現している CYP6AA5v2 は、SP 系統の代謝抵抗性要因の最有力候補として挙げられる。

A. 研究目的

ハエや蚊などの畜産・衛生害虫対策において、殺虫剤抵抗性の発達は害虫防除の妨げとなる。ことに、媒介蚊の防除に強く依存しているデング熱などの蚊媒介性疾病対策の有効性は、殺虫剤抵抗性の発達に大きく左右される。このため、殺虫剤抵抗性の原因変異を特定することは、野外個体群の抵抗性発達の監視や防除対策において公衆衛生学上にも重要な意義がある。

熱帯地域を中心として発生するデング熱は世界規模へと拡大しており、現在では全世界の 40%の人々がデング熱のリスクにさらされていることなどから、世界保健機関

(WHO) は「世界保健デー2014」のテーマとして【節足動物が媒介する感染症】に焦点をあてた。日本においては、2013 年 9 月に日本を旅行したドイツ人がデング熱を発症しており、さらに 2014 年には、160 人のデング熱国内感染患者が確認された。

シンガポールで採集に由来するネッタイシマカのピレスロイド抵抗性系統(SP 系統)は、ペルメトリンによる 10 世代の室内淘汰により、感受性系統(SMK 系統)と比べ 1647 倍のピレスロイド抵抗性を表す。SP 蚊に解毒酵素 P450 の阻害剤である PBO を共力剤として用いた場合、SP 系統の抵抗性比は 33 倍にまで減少することから、SP 系統の殺虫

剤抵抗性には解毒酵素の関与が疑われている。そこで本研究では、SP 系統の代謝抵抗性に関与する原因遺伝子の解明を試みた。

B. 研究方法

1. QTL 解析

1) 供試虫

本研究で用いたネッタイシマカ感受性系統(SMK 系統)は、2009 年に住友化学(株)より分与された。SMK 系統はアメリカで採集され、その後少なくとも 20 年以上は薬剤による淘汰は受けていない系統である。一方、2009 年にシンガポールで採集された SP 系統は、ペルメトリンによる 10 世代にわたる選抜の結果、SMK 系統に対して抵抗性比 1647 倍を示した。また SP 系統は、ピレスロイド系殺虫剤の作用点である電位依存性ナトリウムチャンネルに 2 つの点突然変異を持つことが明らかにされている。

2) 交配

QTL 解析には、SMK♂と F1♀(SMK♂ x SP♀)を交配した BC1 系統と F1(SMK♂ x SP♀)どうしを交配した F2 系統を用いた。実験には、この作出した両系統の羽化 4 日後の雌成虫を用いた。

3) 薬剤試験

1) 生/死による形質判定

1 頭の BC1 雌成虫に対して 5 ng のペルメトリンを局所施用した。処理した雌成虫は、300 ml の三角フラスコに入れ、ネットケージに移した。処理 1.5 時間後に三角フラスコを脱出し、ケージ内を飛翔していた個体を「抵抗性」、24 時間後にケージ内を飛翔していた個体を「回復」、三角フラスコ内で死亡していた個体を「死亡」と判断し、各形質にそれぞれ 2, 1, 0 のスコアを割り当てた。この試験は 162 個体の雌成虫を用いて行い、そのうちの 112 個体を QTL 解析に利用した。

2) ペルメトリン代謝量による形質判定

1 頭の F2 雌成虫に対して ^{14}C 標識されたペルメトリンを 0.88 ng (600 dpm)を局所施用した。処理した雌成虫は、個別にバイアルに移した。18 時間後、各雌成虫は 1.5 ml チューブに移し、100 μl メタノール溶液中でホモジネート後、その残渣を新しいバイアルに移した。各バイアルに 3 ml の液体シンチレーションカクテルを加えて、排泄物または成虫体内の ^{14}C を測定し、個体毎の排泄率を求めた。この試験は 96 個体の雌成虫を用いて行った。

4) 遺伝子型判別

BC1 雌成虫および F2 雌成虫の遺伝子型判別は、開発した多型的なマイクロサテライトや SNPs、挿入/欠失を利用した遺伝子マーカーを用いた。BC1 および F2 で用いたマーカー数はそれぞれ、28, 33 であった。

5) データ解析

BC1 および F2 ごとの連鎖地図作製や QTL 解析には、統計ソフト R のパッケージ R/qtl を用いて行った。

2. QTL 近傍シトクロム P450 の解析

1) 塩基配列の決定

CYP6AA5 の遺伝子コード領域全長の塩基配列の決定には、各系統の未交尾雌成虫の虫体から MagExtractor-Genome-(TOYOBO)を用いて抽出した gDNA および ISOGEN (NIPPON GENE) を用いて抽出した total RNA を逆転写した cDNA を鋳型として用いた。PCR のためのプライマーは、Vectorbase に登録されているネッタイシマカ Liverpool 系統の CYP6AA5 (AAEL012492) の配列から設計した。PCR 産物は ExoSAP-IT (Affymetrix) で一本鎖 DNA や dNTP を除去した後に、ダイレクトシーケンスを行った。

2) CYP6AA5 の定量 PCR

CYP6AA5 の定量 PCR は、各系統の 8 個

体の未交尾雌成虫の虫体から ISOGEN (NIPPON GENE) を用いて抽出した total RNA を逆転写した cDNA を鋳型として用いた。定量 PCR のためのプライマーは、事前に決定した塩基配列を基に設計した。また相対定量のためのハウスキーピング遺伝子には、Ribosomal protein S3 (RPS3) を用いた。定量 PCR は SsoFast- EvaGreen-Supermix (Bio-Rad) を用いて行い、Ct 法により各系統の CYP6AA5 の相対発現量を比較した。

C. 研究結果

1. QTL 解析

1) 生/死を形質とした解析

QTL 解析の結果、第 1 および第 3 染色体に QTL の存在が明らかになった(図 1)。第 3 染色体上の QTL 近傍のマーカー 186a は、特に個体の生/死に関与が高かった。また第 1 染色体上の QTL 近傍のマーカーは 125b であった。

2) 代謝量を形質とした解析

QTL 解析の結果、第 1 および第 3 染色体に QTL の存在が明らかになった(図 2)。第 1 染色体上の QTL 近傍のマーカー 125b は、特にペルメトリン代謝量に関与が高かった。また第 3 染色体上の QTL 近傍のマーカーは 702 であった。

125b の遺伝子型が感受性ホモ(AA)、ヘテロ(AB)、抵抗性ホモ(BB)を持つ個体の排泄率±標準誤差はそれぞれ、 0.321 ± 0.064 、 0.425 ± 0.010 、 0.607 ± 0.017 であった(図 3)。

2. QTL 近傍シトクロム P450 の解析

SP 系統と SMK 系統の CYP6AA5 の完全長コード配列(1515 bp)を比較したところ、全配列が両系統で一致していた。しかし SP 系統には、CYP6AA5 が遺伝子重複したと思われる CYP6AA5v2 を持つことが判明した。以後、両系統が同じ配列を持つものを CYP6AA5v1、SP 系統のみが持つものを CYP6AA5v2 とした。v1 と v2 の間では、1515 bp 中 31 箇所の塩基置換があり、相同性は

97.95 %であった。またアミノ酸配列では、504 bp 中 9 箇所のアミノ酸置換があり、相同性は 98.21 %であった。さらに両系統が持つ v1 の発現量を比較したところ Ct 値は 0.4 であった。

D. 考察

本研究に用いた SP 系統は、ピレスロイド系殺虫剤の作用点である電位依存性ナトリウムチャンネル (VGSC) に S989P-V1014 の二重アミノ酸置換変異が存在することが明らかにされている (Kasai *et al.*, 2014)。ネッタイシマカにおけるこの変異遺伝子のピレスロイド抵抗性に関する優性の度合いは不明であったが、多くの昆虫種の VGSC で最も多く確認されピレスロイド感受性低下の原因変異として知られる L1014F の優性の度合いに関しては、劣性または半優性とする諸説があるものの、少なくとも半優性を上回る優性の効果はないと考えられていた。そのため、生/死を形質として QTL 解析を行うにあたっては、感受性系統で F1 の戻し交配を行った BC1 子孫を用いれば、この作用点変異の影響が可能な限り排除され、代謝抵抗性の原因遺伝子が明確になると予め考えられた。しかしながら、生/死の形質に最も関与が高かった第 3 染色体の QTL の近傍には、電位依存性ナトリウムチャンネルをコードしている遺伝子が存在しており、おそらく作用点変異は、感受性と抵抗性のヘテロ接合体であっても殺虫剤抵抗性に関与していると思われる。

形質としてペルメトリン代謝量を利用することにより、QTL 解析において作用点変異の影響を完全に取り除くことができた。その結果、生/死を形質として QTL 解析を行ったときに確認された第 1 染色体上の QTL のペルメトリン代謝に対する関与がより明確になった。このため、第 1 染色体の QTL 近傍にあるシトクロム P450 が SP 系統のペルメトリン代謝を増大させていると考えられる。

現在のところ、ネッタイシマカのシトクロム P450 遺伝子数は 169 個がデータベースに登録されており、そのうち本研究で明らかとなった第 1 染色体上の QTL 近傍に存在するシトクロム P450 は、CYP6BB2、CYP6CC1、CYP18A1、CYP306A1、CYP6AA5、CYP6BZ1、CYP6P12、CYP4H29 の 8 個であった。Kasai *et al.* (2014) は、本研究で用いた SP 系統と SMK 系統間でマイクロアレイによるシトクロム P450 を対象とした発現解析を行っている。そのデータに今回の QTL 近傍に存在する P450 を照合したところ、CYP6AA5 の発現量が SP 系統において 2.39 倍高いことが明らかとなった。

本研究では、SP 系統と SMK 系統間で塩基配列と発現量が等しい CYP6AA5v1 と SP 系統でのみ発現している CYP6AA5v2 の存在が明らかとなった。QTL 解析を行った F2 個体を用いて、この v2 に対するジェノタイプングを行った結果、確かにこの v2 も第 1 染色体上の QTL 近傍に存在していることが判明した。

QTL 解析では解析に用いた形質に関連する遺伝子が染色体のどこに存在するのかということまでしか明らかにすることができない。このため、形質に関連する候補遺伝子を対象とした逆遺伝学的な研究による表現型での検証が行われることにより、初めて形質に結びつく遺伝子が同定される。そこで、今回の研究により明らかにされた QTL 近傍のシトクロム P450 遺伝子をターゲットとして、ゲノム編集技術に基づき SP 系統から作出されるノックアウト個体を用いて逆遺伝学的な解析を行いペルメトリン代謝に関連する遺伝子を明らかにすることが、今後の研究課題となる。

E. 結論

QTL 解析によって、SP 系統におけるペルメトリンの代謝量増大に関連する遺伝子は、第 1 染色体上にあることが示された。候補となるシトクロム P450 遺伝子は 8 個存在し

ており、その内 CYP6AA5v2 は SP 系統でのみ発現しており、最有力候補として挙げられる。

F. 健康危険情報

現時点で特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

Hirata K., Komagata O., Itokawa K., Yamamoto A., Tomita T., Kasai S. 2014. A single crossing-over event in voltage-sensitive Na⁺ channel genes may cause critical failure of dengue mosquito control by insecticides. *PLoS neglected tropical diseases* 8, e3085.

2. 学会発表

小川浩平, 糸川健太郎, 駒形修, 葛西真治, 富田隆史. ネッタイシマカペルメトリン抵抗性に関連する量的形質遺伝子座の探索. 第 58 回日本応用動物昆虫学会大会, 2014 年 3 月, 高知市

小川浩平, 糸川健太郎, 駒形修, 葛西真治, 富田隆史. ネッタイシマカのペルメトリン解毒代謝酵素に関する QTL 解析. 第 67 回日本衛生動物学会大会, 2015 年 3 月, 金沢市

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許情報

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

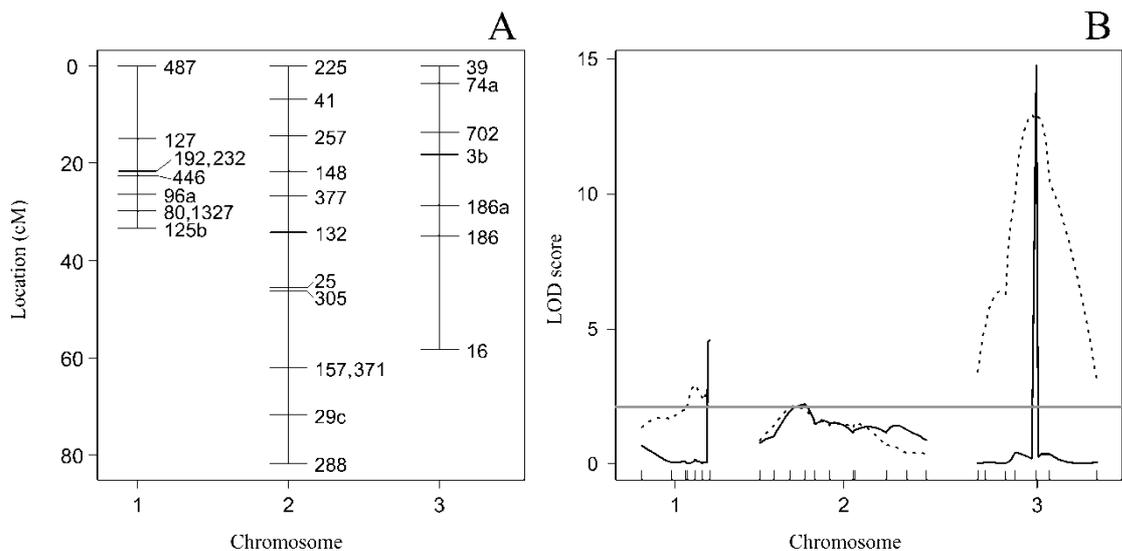


図1 BC1系統を用いた連鎖地図(A)とQTL解析結果(B). 区間マッピング(点線), 複合区間マッピング(黒線), 1%有意水準(グレー).

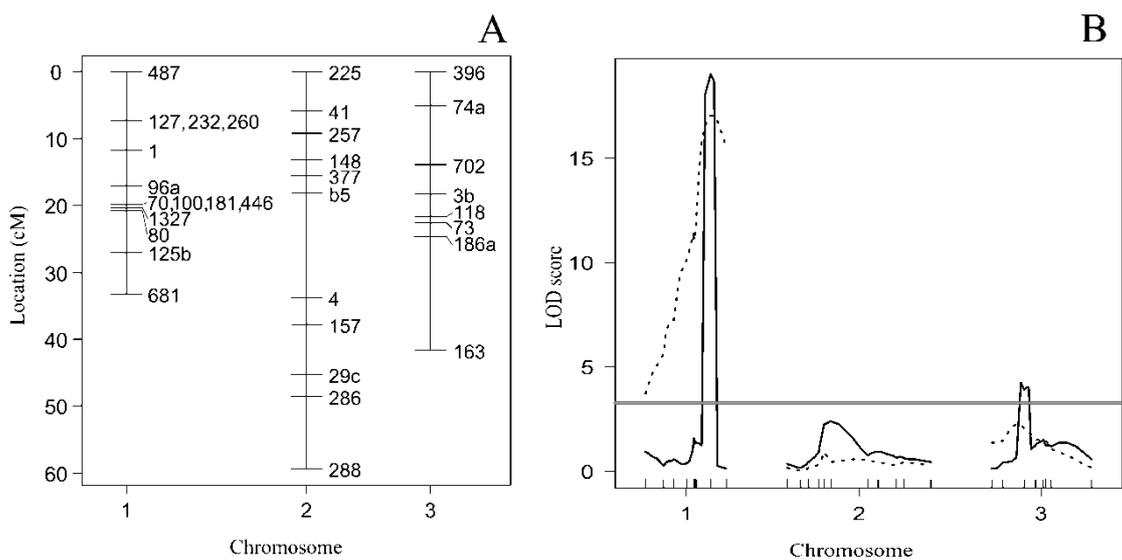


図2 F2系統を用いた連鎖地図(A)とQTL解析結果(B). 区間マッピング(点線), 複合区間マッピング(黒線), 1%有意水準(グレー).

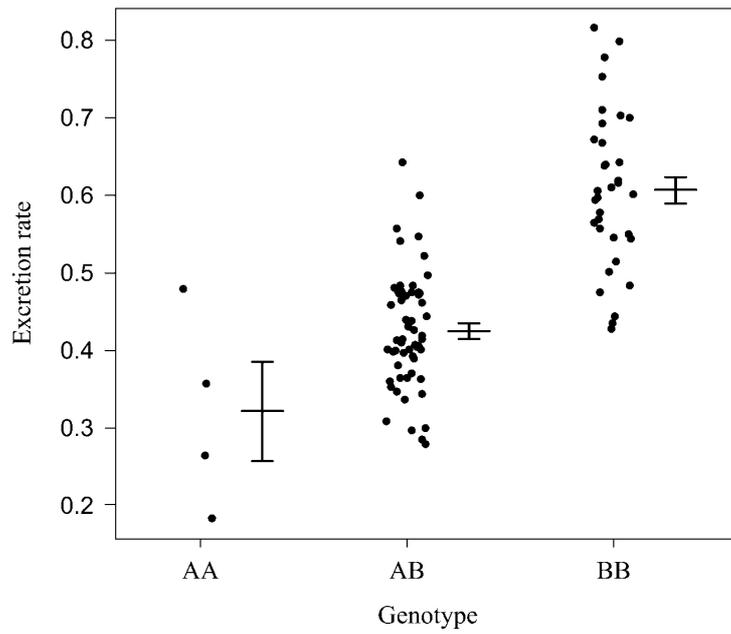


図3 F2 雌成虫における Contig125b の遺伝子型とペルメトリン排泄率．感受性ホモ (AA)，ヘテロ (AB)，抵抗性ホモ (BB)．図中の実線は，平均と標準誤差を示す．