

厚生労働科学研究委託費（新興・再興感染症に対する革新的医薬品等開発推進研究事業）
分担研究報告書

デング熱媒介蚊に対するピレスロイド系殺虫剤効力の評価に関する研究

分担研究者 富田 隆史 国立感染症研究所昆虫医科学部室長
協力研究者 駒形 修 国立感染症研究所昆虫医科学部研究員
小川 浩平 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

研究要旨

デング熱媒介蚊のネッタイシマカの成虫防除対策として、ピレスロイド系殺虫剤の散布が行われてきた結果、ピレスロイド抵抗性がネッタイシマカ集団に発達し、殺虫剤による防除の有効性が低下した地域が生じている。ピレスロイド抵抗性の要因としては、作用点である電位依存性ナトリウムチャンネル(VGSC)に生じた複数のアミノ酸置換変異による感受性低下が関与することが示されている。ピレスロイド系殺虫剤の有効性を簡易に調査することを目的として、アジアと中南米でピレスロイド感受性低下の主要因であることが明らかにされている VGSC の 5 つのアミノ酸座位に生じているアミノ酸置換変異を標的とし、Universal QProbe 法に基づくジェノタイピングを行う方法を検討した。その結果、標的座位のジェノタイピングを統一的行うための基本的試験条件を決定し、変異の存在により生じうる各遺伝子型の融解温度曲線プロファイルを得た。

A. 研究目的

デングウイルス感染症は、蚊により媒介される疾病で、主要な媒介蚊であるネッタイシマカが生息する熱帯・亜熱帯地域でも発生する。全世界で年間約 1 億人がデング熱を、また 25 万人がデング出血熱を発症している。本感染症に対しては、現在、実用的なワクチンや抗ウイルス薬がないため、媒介蚊発生源の物理的管理や媒介蚊の殺虫剤による駆除がおもな疾病対策となっている。ピレスロイド系殺虫剤は世界的に媒介蚊成虫の駆除に多用されてきたが、ピレスロイド抵抗性の発達によりネッタイシマカに対する殺虫剤の有効性が低下することが、媒介蚊防除における重大な問題となっている。

電位依存性ナトリウムチャンネル(voltage gated sodium channel; VGSC)は、神経細胞で発現し、活動電位の発生と終結に中心的な役割を果たし、DDT とピレスロ

イド系殺虫剤の作用点となっているタンパク質である。ピレスロイド抵抗性のおもな要因として、VGSC の構造変化による殺虫剤感受性低下があり、ネッタイシマカにおいても殺虫剤感受性低下に関連する複数の VGSC 変異が示されている。ネッタイシマカの VGSC をベースに人工的に構成した多重アミノ酸置換変異の中には、個々の変異から想定される感受性低下を上回る効果をもつ組み合わせがあることが電気生理学的研究で明らかにされているが、ごく最近になって、実験的に重度な感受性低下をもたらすと予想された多重変異ハプロタイプ（例えば S989P-V1016G-F1534C 三重突然変異）がミャンマーの自然集団で実際に出現していることが確認されている。殺虫剤感受性低下の要因となるネッタイシマカの VGSC 変異の分布には地域性のある場合があり、現在までに、I1011M/V と V1016V は中南米においてのみ、S989P は東南アジア

アにおいてのみ，V1016G-D1763Y 二重変異は台湾においてのみ報告されている変異である。一方，V1016G と F1534C は，それぞれ，中南米と東南アジアに共通に分布する変異である。今後，より大きな感受性低下をもたらす変異遺伝子の新生（または多重変異遺伝子の遺伝的組換えによる派生）とそれらの分布拡大が懸念される現況がある。

本研究は，ネッタイシマカ集団におけるピレスロイド抵抗性発達の監視に役立てることを目的とし，作用点感受性低下の主要因となる複数の変異を対象として統一された方法により包括的に分子検出を可能にする方法を開発することを目標とした。今年度は，Universal QProbe 法に基づき，VGSC のピレスロイド感受性低下に関連する 5 つの主要なアミノ酸座位(S989, I1011, V1016, F1534, D1763)で知られている合わせて 7 つの変異（図 1）を分子ジェノタイピングする基本方法を決めた。

B．研究方法

蚊系統：ネッタイシマカの SMK 系統は，米国での採集に由来する殺虫剤感受性系統で，住友化学工業(株)において約 20 年間維持され，2009 年に国立感染症研究所に譲渡されたものである。

組換え体プラスミド：SMK 蚊由来の VGSC 遺伝子の 3 つの断片（S989, I1011, および V1016 座位を含む 634 塩基長，F1534 座位を含む 827 塩基長，D1763 を含む 552 塩基長）（図 2）を pCR4Blunt-TOPO (Invitrogen)に挿入した pS1, pS2, pS3 を得て，これらのプラスミドを標的アミノ酸座位に関する野生型の標準 DNA 鋳型として PCR に用いた。これらのプラスミド DNA をベースにして，PrimeStar Max Mutagenesis Kit (TaKaRa)を使用して標的アミノ酸座位に殺虫剤抵抗性に関連するアミノ酸置換変異を導入した。pS1 をベースにして P989, V1011, M1011, I1016, G1016 の 5

つの変異を導入したプラスミドが，それぞれ，pS1-P989, pS1-V1011, pS1-V1011M, pS1-I1016I, pS1-G1016 であり，pS2 をベースにして C1534 変異を導入したプラスミドが pS2-C1534 であり，pS3 をベースにして Y1763 変異を導入したプラスミドが pS3-Y1763 である（表 1）。これら 7 つの変異型配列をそれぞれもつプラスミドを変異型の標準 DNA 鋳型として PCR に用いた。

DNA 抽出：SMK 雄成虫 1 頭からゲノム DNA をアルカリ抽出法により 80 μ L の容量に抽出し，その後水で 5 倍に希釈した希釈液を PCR に用いた。

PCR：25 μ L 容量中に，1X KOD FX Buffer (TOYOBO), KOD FX DNA polymerase (TOYOBO) 0.5U, dNTP 各 0.4 μ M, 高濃度フォワード（またはリバース）プライマー 1 μ L, 低濃度リバース（またはフォワード）プライマー 0.2 μ M, 希釈ゲノム DNA 溶解液（または 50 pmol/ μ L プラスミド DNA 溶液）1 μ L を加えて PCR 溶液組成とし，サーマルサイクラ - (Verti, ABI)上で 98 10", 55 30", 68 30"の温度サイクリングを 50 回繰り返す，非対称 PCR を行った。各標的座位を含む DNA 断片の増幅に用いたプライマーと DNA 鋳型の組み合わせ，およびプライマー配列については，表 1 と図 2 に示してある。

融解曲線解析：Universal QProbe 法（図 3）を適用して，PCR 溶液に加えた野生型配列をもつ Joint Probe (JP)と野生型または変異型の PCR 産物の間に形成される二重鎖に固有な融解温度を融解曲線解析により求め，標的部位の変異の有無との対応関係を調べた。ここに，JP に必要な設計条件は，5'側に標的部位特異的な配列をもたせ，その標的部位特異的な配列の最も 3'側にあたる塩基が "C" となっていることである。JP の 3'末端側の UQP 特異的 DNA は，Universal QProbe (UQP)との間で修飾塩基を介して強固な相補対を形成する。遊離の UQP および JP と相補対を形成した UQP は，励起光

の照射により蛍光を発するが、JP の標的部
位特異的 DNA が標的 DNA と相補対を形
成した場合、UQP の 3'末端に結合した蛍光
物質は、JP の"C"の相補対にあたる標的
DNA 中の"G"の作用により、消光する。こ
の原理を応用して、JP と標的 DNA の間に
形成される相補鎖が加温により熱変性する
過程が、UQP の消光から発光への遷移と
して検出される。本研究で用いた UQP は、
UQProbe-G (J-Bio21 Center)で、これと 3'
側で相補対を形成する各標的部特異的な
JP は、受託合成(Genosys)により得た。各
JP の標的部特異的配列と PCR 産物との
組み合わせについては、それぞれ、図 2 と
表 1 に示されている。融解曲線解析には、
PikoReal サーマルサイクラー(Thermo)を使
い、9.2 ul PCR 産物に対して 1x KOD FX
Buffer 濃度となるように調整した 2.5 uM JP
と 2.5 uM UQP を各 0.4 uL (終濃度は 0.1
uM) ずつ加えた溶液を試料とし、95 1'
37 1'、次いで 37 から 95 まで 0.2 /秒
サイクルで加熱し、cybergreen 用励起 - 蛍
光検出フィルターセットで蛍光検出した。
温度 - 蛍光量 応答のプロファイルは
PikoReal Software 2.2 の High Resolution
Melting (HRM)プログラムの出力により示
した。

(倫理面への配慮)
該当しない。

C . 研究結果

非対称 PCR の条件検討：5 種類のプライ
マーセットをそれぞれ用いる非対称 PCR
(表 1) では、JP の相補鎖となる標的
DNA 鎖が過剰生成される最適なプライ
マー比を検討するために、JP と逆方向とな
る高濃度 PCR プライマーは 1 uM に固定し、
JP と同方向となるもう一方の低濃度 PCR
プライマーを 0.3 uM, 0.2 uM, 0.12 uM, 0.06
uM と変えて試した結果、電気泳動像によ
り確認される過剰生成された ssDNA の量
および融解曲線解析における温度 - 蛍光量

応答の明瞭さにおいて、低濃度 PCR プライ
マーが 0.2 uM の場合 (プライマー対の
モル比は 5:1) が概ね良好であることを確
認した (図示なし)。

野生型と変異型の標的 DNA の識別：5 つ
の標的座位に関する合わせて 5 つの野生型
と 7 つの変異型のプラスミドを PCR 鋳型
DNA として用いた場合、高解像度融解曲
線(HRM)解析による温度 - 蛍光量 応答のプ
ロファイルに基づいて、野生型と変異型の
間で異なる融解温度を明瞭に示すことがで
きた (図 4 の 1B, 2B, 3B, 4B, 5B のそれぞ
れから 1C, 2D, 3D, 4C, 5C まで)。しかし
ながら、I1011 座位の 2 つの変異である
V1011 と M1011 (図 4 の 2C と 2D) は同
等な融解温度を示し、両変異の間で相互
を識別することはできなかった。

次に、各標的座位に関する野生型プラス
ミドと変異型プラスミドをそれぞれ DNA
鋳型とする 2 つの PCR 産物のそれぞれを
等量加えて、ヘテロ接合体を DNA 鋳型と
する場合を模した HRM 解析を行ったとこ
ろ、野生型と変異型をそれぞれ単独の
DNA 鋳型とした場合とは異なり、野生型
と混合型の融解温度の両方が示されるプ
ロファイルが得られた (図 4 の 1E, 2E, 2F, 3E,
3F, 4E, 5E)。ただし、S989 座位に関する
野生型プラスミド鋳型の PCR 産物と変異
型(P989)鋳型の PCR 産物の混合試料では、
P989 の融解温度ピークが明瞭に示すこ
とができなかった (図 4 の 1E)。

最後に、5 つの標的座位が全て野生型で
ある SMK 系統蚊より抽出したゲノム DNA
を PCR の DNA 鋳型とする融解曲線解析を
行った結果、各プロファイルは、野生型プ
ラスミドを PCR の DNA 鋳型として用いた
場合のプロファイルとほぼ同等であった
(図 4 の 1A, 2A, 3A, 4A, 5A)。

以上の結果から、プラスミド DNA を標
準配列として用いて設定されたジェノタイ
ピング条件とその結果として得られた融解
曲線プロファイルは、蚊から抽出した

DNA を鋳型とする実際の解析にそのまま適用できる可能性があることが示された。

D．考察

本研究は、ネッタイシマカの VGSC 遺伝子の 1 つの標的座位に野生型のほかに 1 つまたは 2 つの変異型が存在する場合に、それらによって生じる全ての野生型と変異型のホモ接合体と変異型を対象としてジェノタイピングが可能になる試験法を開発することを目標としている。今年度の研究結果では、同座位に生じた異なる変異型の融解温度がほぼ同一で、野生型に完全に適合する JP を用いては識別不能な結果が 1 例生じた。この問題に対処するためには、変異型（2 つの変異型が存在する場合はそれぞれの変異型）に完全に適合する JP 含む解析試料を新たに追加することで、容易に解決できると考える。また、ヘテロ接合体に期待される 2 つの異なる融解温度のうち、低温側（変異型）の融解温度が不明瞭であった結果が 1 例生じた。この問題の場合には、非対称 PCR により生成された ssDNA 量に対してプローブ量が不足しているためと考えられ、プローブ量を増やすか、もしくはプライマー量を減らす調整を図ることで解決できる可能性がある。

今年度の研究では、sybergreen 用の励起 - 蛍光検出フィルターに適した UQP-G とそれに特異的に結合する JP-G のみを用いたが、他のフィルターに適した蛍光を発する UPQ-Y とそれに特異的に結合する JP-Y を一方の変異型標的に完全に適合する JP として設計し、野生型標的に完全に適合する JP-G と 1 つの反応液中でマルチプレックスに融解温度を解析すれば、ジェノタイピングに必要な試料数を増やすことなく、精度の高い検出が可能になると考えられる。今後は、これらの改良点を加えて、実用的なジェノタイピングが可能ない試験系を完成させたい。

E．結論

i) Universal QProbe 法に基づいて野生型標的配列と完全な相補対を形成する Joint Probe を用いてジェノタイピングを行うことにより、ピレスロイド系殺虫剤の感受性低下に関連するネッタイシマカの VGSC の 5 つのアミノ酸座位に生じている合わせて 7 つのアミノ酸置換変異を野生型から明瞭に識別することを可能にした。

ii) Universal QProbe 法に基づいて標的座位の変異で派生する全ての遺伝子型を完全に識別するためには、今後さらに、一部の反応液の組成を微調整し、オプション解析を追加する必要がある。

F．研究危険情報

なし

G．研究発表

1. 論文発表：なし
2. 学会発表：なし

H．知的財産の出願・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

表 1. Universal Qprobe 法による電位依存性ナトリウムチャンネルのアミノ酸置換変異のジェノタイプングにおける標的座位, Joint Probe, PCR プライマー, および DNA 鋳型の組成

Target site		S989	I1011	V1016	F1534	D1763
Joint probe		JPR1	JPF12	JPF4	JPF6	JPF7
Primer pair	Low conc.	R28	F24	F29	F8	F21
	High conc.	F27	R20	R20	R26	R23
Template 1	gDNA	SMK_5	SMK_5	SMK_5	SMK_5	SMK_5
	Genotype	S989/S989	I1011/I1011	V1016/V1016	F1534/F1534	D1763/D1763
	Panel of HRM curve*	1A	2A	3A	4A	5A
Template 2	Plasmid DNA	pS1	pS1	pS1	pS2	pS3
	Variation	S989	I1011	V1016	F1534	D1763
	Panel of HRM curve*	1B	2B	3B	4B	5B
Template 3	Plasmid DNA	pS1-P989	pS1-V1011	pS1-I1016	pS2-F1534	pS3-Y1763
	Variation	P988	V1011	I1016	C1534	Y1763
	Panel of HRM curve*	1C	2C	3C	4C	5C
Template 4	Plasmid DNA	-	pS1-M1011	pS1-G1016	-	-
	Variation	-	M1011	G1016	-	-
	Panel of HRM curve*	-	2D	3D	-	-
PCR solution mix 1	Plasmid DNA	pS1 + pS1-P989	pS1 + pS1-V1011	pS1 + pS1-I1016	pS2 + pS2-C1534	pS3 + pS3-Y1763
	Variation	S989 + P989	I1011+V1011	V1016+I1016	F1534+C1534	D1763+Y1763
	Panel of HRM curve*	1E	2E	3E	4E	5E
PCR solution mix 2	Plasmid DNA	-	pS1 + pS1-M1011	pS1 + pS1-G1016	-	-
	Variation	-	I1011+M1011	V1016+G1016	-	-
	Panel of HRM curve*	-	2F	3F	-	-

非対称 PCR に用いたプラスミド DNA 鋳型を含む VGSC 配列, 非対称 PCR に用いたプライマー配列, Joint Qprobe の標的部位特異的配列, および標的アミノ酸座位においてアミノ酸置換をもたらす SNPs については, 図 2 に示されている。
* 融解曲線解析で得た高解像度融解点 (HRM) を表している図 4 のパネル番号。

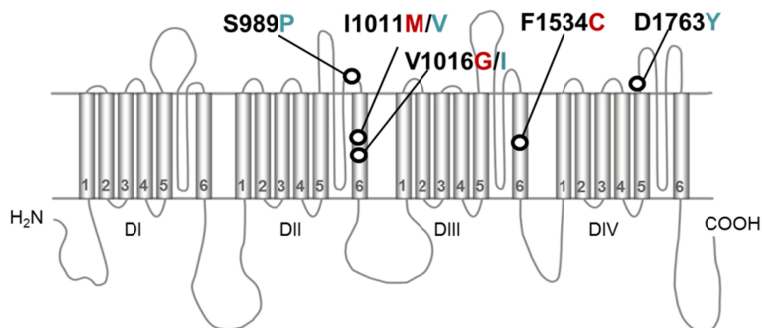


図 1. プレスロイド抵抗性に関連するネッタイシマカの電位依存性ナトリウムチャンネルに生じている主要な変異
赤字: アフリカツメガエル卵で発現させた変異体を電気生理学的に解析した結果, 単独でプレスロイド感受性低下を表すことが実証されている変異; 青字: 電気生理学的に効果が未検証であるか, もしくは単独ではプレスロイド感受性低下を表さない変異。



図 2. Universal QP 法によるジェノタイピングの対象とした nettaiシマカの電位依存性ナトリウムチャンネル(VGSC)のアミノ酸置換変異, 標的座位特異的 Joint Probe 配列, PCR プライマー配列
 ジェノタイピングの対象とした 5 つのアミノ酸座位は, 野生型 (殺虫剤感受性型) の SMK 系統のゲノム DNA 配列の上
 示されている。表示した各 DNA 配列の範囲は, 組替え体プラスミドに挿入されている VGSC 配列である。非対称
 PCR に用いたプライマーは黒色矢印で, 標的座位とその変異は橙色カギ括弧で, Joint Probe の標的座位特異的 DNA 配
 列は橙色横棒で, エクソン配列は青色網掛けで, それぞれ示されている。A: S989, I1011, V1016 を含む配列; B: F1534
 を含む配列; C: D1763 を含む配列。

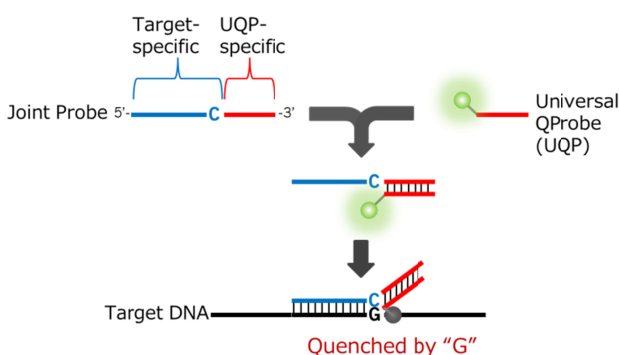


図 3. Universal Qprobe 法による特異的 DNA 配列検出の原理
 Joint Probe (JP)は「標的配列相補的でその最も 3'側が “C”となる
 オリゴヌクレオチド部分」と「Universal QProbe 配列相補的
 で修飾塩基を配したオリゴヌクレオチド部分」から成る。
 Universal QProbe (UQP)は, 遊離した状態, あるいは標的に結
 合していない Joint Probe と相補対を形成した状態では, 励起
 により蛍光を発するが, UQP と JPJoint Probe の間の相補対形
 成体が標的 DNA に結合した状態では, Joint Probe 標的的特異的
 部分の 3'端の”C”と相補対を形成した標的 DNA”G”の作用に
 より, 蛍光物質は消光する。

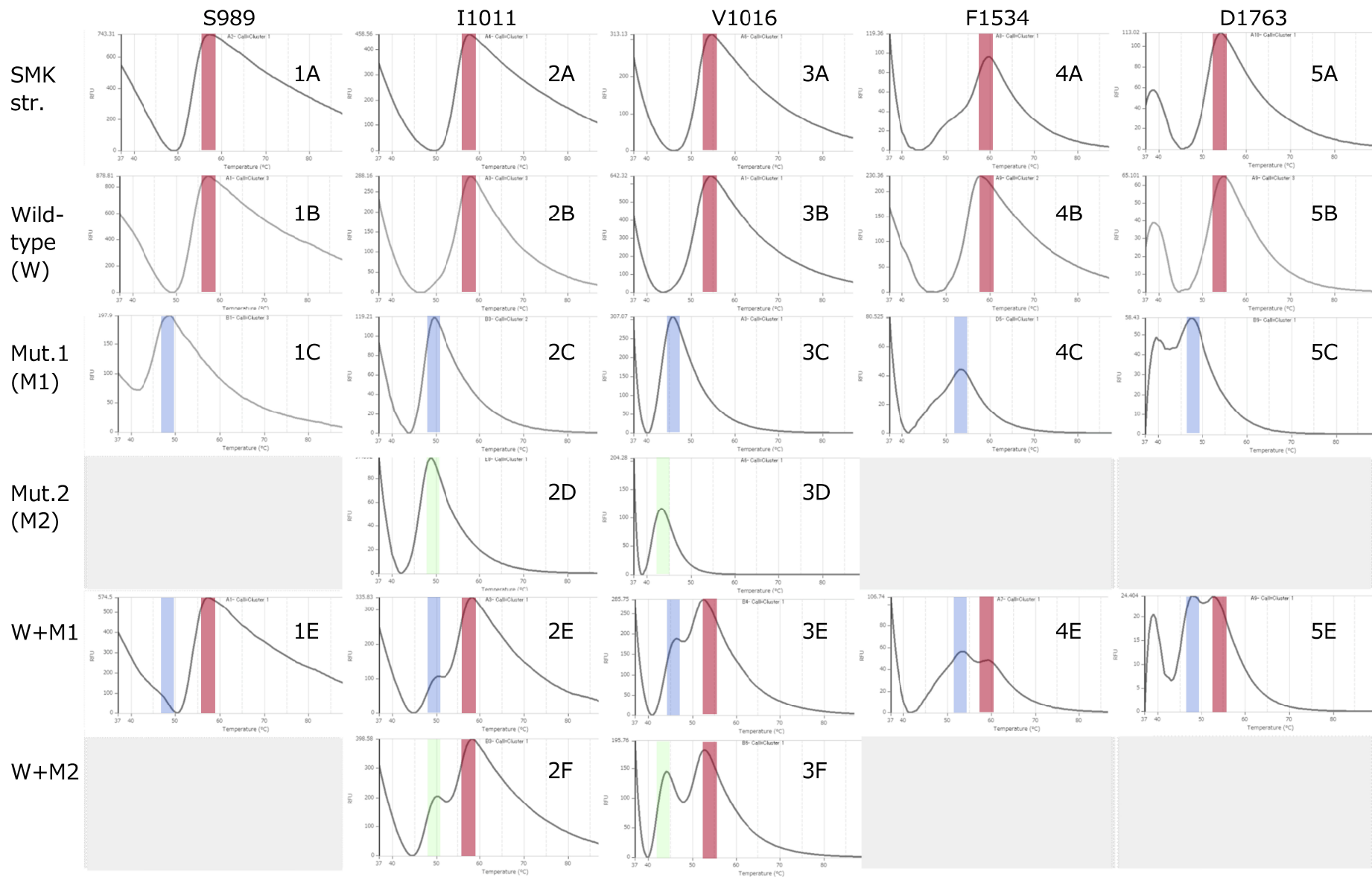


図4. ネットイシマカの電位依存性ナトリウムチャンネルにおける標的部位の変異を表している Universal QProbe 法に基づく融解温度曲線
 各パネルの融解曲線は、原データの数値微分に基づく高解像度融解曲線 (HRM) で表されている。各パネルの試験に用いた PCR プライマー, DNA 鋳型, および Joint QProbe の組み合わせについては, 表1 に示されている。