

パーメスリン抵抗性ネットワークイイニカの
抵抗性機構に関する研究

1997

葛西真治

①

パーメスリン抵抗性ネッタイエカの
抵抗性機構に関する研究

筑波大学大学院
農学研究科
農林学専攻

葛西真治

目次

第1章 緒言	1
第2章 殺虫剤感受性、共力効果及び遺伝的特性	7
第1節 ピレスロイド剤及び各種殺虫剤に対する感受性	
材料及び方法	8
結果	10
考察	16
第2節 酵素阻害剤の共力効果	
材料及び方法	17
結果	20
考察	30
第3節 ピレスロイド剤抵抗性の遺伝的特性	
材料及び方法	31
結果	32
考察	32
第3章 Permethrin 抵抗性と解毒酵素	36
第1節 カルボキシエステラーゼの活性及びアイソザイムパターン	
材料及び方法	38
結果	39
考察	42
第2節 チトクロム P450 酸化酵素系の定量及び体内分布	
材料及び方法	44
結果	45
考察	45
第4章 Permethrin の <i>in vitro</i> 代謝	51
第1節 内在性代謝阻害物質の存在	
材料及び方法	53
結果	54
考察	57
第2節 代謝活性と温度の関係	
材料及び方法	59
結果	59
考察	61
第3節 Permethrin の <i>in vitro</i> 代謝	
材料及び方法	62
結果	62
考察	66

第4節	Permethrin 代謝の共力剤による阻害	
	材料及び方法	68
	結果	68
	考察	70
第5章	チトクロム P450 の遺伝子解析	72
第1節	チトクロム P450 (CYP6E1) cDNA のクローニングと構造解析	
	材料及び方法	74
	結果	82
	考察	88
第2節	その他の6族 P450 のクローニングと構造解析	
	材料及び方法	91
	結果	93
	考察	100
第3節	CYP6F1 の遺伝子発現とゲノム解析	
	材料及び方法	106
	結果	108
	考察	111
第6章	総合考察	113
	摘要	118
	謝辞	120
	引用文献	121

第1章 緒言

カは吸血にともなっていていろいろな病気を人、家畜、あるいは自然界の動物に感染させる媒介昆虫として広く知られている。病原体はウイルス、原虫、線虫などに属し、代表的な人間の病気は、マラリア、フィラリア、デング熱、日本脳炎、黄熱病である。マラリアはハマダラカ (*Anopheles*) 亜科に属するカにより原虫が運ばれ、日本脳炎はコガタアカイエカ (*Culex tritaeniorhynchus*)、シナハマダラカ (*Anopheles sinensis*) によりウイルスが伝播される。黄熱病はネッタイシマカ (*Aedes aegypti*) により病原体が媒介され、象皮病ともいわれる糸状虫症 (フィラリア) はネッタイイエカ (*Culex quinquefasciatus*)、アカイエカ (*Culex pipiens pallens*)、トウゴウヤブカ (*Aedes togoi*) によって糸状虫が媒介される。これらの疾病感染を防ぐためには媒介昆虫であるカの防除が不可欠であり、その主要な防除手段が殺虫剤の散布である。しかし、他の農業害虫と同様にこれらカの仲間をはじめとする多くの衛生昆虫が殺虫剤に抵抗性を示し、防除が困難になっている。

近年開発されたいわゆる第二世代合成ピレスロイド剤は、光分解を受け易かったそれまでのピレスロイド剤の欠点を克服し、しかも殺虫力が著しく強いため単位面積当たりの散布薬量が少なくすむという利点を持っている。一方で環境中への残留性が低く、人畜毒性も非常に低いため理想的な殺虫剤といわれてきた。しかし、その理想的な殺虫剤もこれまでの歴史の例にもれず、抵抗性を発達させた害虫が世界中で発見されている。ピレスロイド剤をはじめとする多数の殺虫剤が実用上の価値を失い、害虫防除上深刻な問題に直面するであろうということはすでに1980年代に正野によって指摘され (正野, 1984)、現在まさにそれが現実となりつつある。かつてピレスロイド剤は魚毒性の高さから水田や河川などカ幼虫の棲息地帯では使用されなかった。それゆえピレスロイド剤に抵抗性を発達させたカは野外では多く確認されていない。しかし有機リン剤やカーバメート剤の効力低下、そして低魚毒性ピレスロイド剤の開発により、水域におけるピレスロイド剤の使用頻度が高まりつつあることから、カ幼虫がピレスロイド剤に抵抗性を発達させることは容易に想像される。

本研究に用いたネッタイイエカ (双翅目、カ科、イエカ属) は、世界中の熱帯及び亜熱帯に棲息し、日本では奄美大島以南の琉球列島や小笠原諸島に分布する。ピレスロイド剤抵抗性系統は、1981年にサウジアラビアで採集された個体群 (JPal

系)を、permethrin により室内で淘汰されてできた系統 (JPal-per 系)である (Amin and Hemingway, 1989)。採集時の JPal 系統の permethrin 抵抗性レベルは僅か 1.8 倍であり、12 世代の permethrin 淘汰により抵抗性比は 1,546 倍へと増大したが、その抵抗性機構については未だに明らかにされていない。本系統の抵抗性機構を解明することは、衛生害虫に限らず農業害虫の殺虫剤抵抗性発達を回避する上でも重要な意味を持つものと考えられる。

近年発見される抵抗性害虫の抵抗性機構の解明が困難なのは、その要因が単一ではなく、複数の要因が関与していることに起因するものと思われる。一般にピレスロイド剤に対する昆虫の主要な抵抗性機構として、次の 3 つが挙げられる。

まず第 1 は、神経感受性の低下によるものである。ピレスロイド剤や有機塩素系殺虫剤の DDT は、神経軸索の興奮膜を標的部位とし、興奮伝導時に一度開いたナトリウムチャンネルの閉口を抑制することで神経の反復興奮を引き起こし、昆虫を死に至らしめる。ところが、ある種の抵抗性昆虫では神経軸索の薬剤感受性が低下して、殺虫剤の効果を軽減させる。この薬剤感受性軽減因子は *kdr* (*knock down resistance*) 因子と呼ばれ、イエバエ (*Musca domestica*) から最初に見つかった (Busvine, 1951)。イエバエの *kdr* 因子は第 3 染色体に存在する劣性遺伝子によって支配される形質である。最近、デンマークのイエバエで見いだされ、*super-kdr* と名付けられた、*kdr* よりさらに高い抵抗性形質も *kdr* の対立遺伝子により支配されている (Farnham *et al.*, 1987)。これらの因子は単一で高い抵抗性を示し、この因子をもつ昆虫はピレスロイド剤と共通の標的器官を持つ DDT に交差抵抗性を示す。

合成ピレスロイド剤は中毒症状、作用機構などの相違から 2 つのタイプに分類され、化学構造上からはアルコール部分に α -cyano-3-phenoxybenzyl 基を持つかないかでタイプ II、タイプ I と称される。一般に *kdr*、*super-kdr* 型の抵抗性昆虫ではこれらのタイプに関わらず全てのピレスロイド剤に交差抵抗性を示すとされている (Shono, 1985)。これまでイエバエ以外からも *Spodoptera littoralis* (Gammon, 1980)、ヤガの一種、*Heliothis virescens* (Nicholson and Miller, 1985)、コナガ、*Plutella xylostella* (Hama *et al.*, 1987)、チャバネゴキブリ、*Blattella germanica* (Umeda *et al.*, 1988)、キイロショウジョウバエ、*Drosophila melanogaster* (Bloomquist *et al.*, 1989) で同様な神経感受性低下によるピレスロイド剤抵抗性が認められ、カの仲間からも報告がある (Omer *et al.*, 1980; Salgado

et al., 1983; Umeda *et al.*, 1990)。 *kdr*に関する遺伝子解析もイエバエ、ゴキブリを中心に進められており、ナトリウムチャンネルタンパクのアミノ酸レベルでの置換が神経感受性の低下に関与していることが確認されている (Dong and Scott, 1994; Miyazaki *et al.*, 1996; Williamson *et al.*, 1996)。

ピレスロイド剤抵抗性に関わる第2の要因として、解毒酵素による代謝活性の増大が挙げられる。主なものとしては、ピレスロイド剤中に存在するエステル基を加水分解するカルボキシルエステラーゼと、酸化酵素の一種であるチトクロム P450 酸化酵素系による代謝が知られている。エステラーゼと殺虫剤抵抗性の関係は古くから知られており、特に有機リン系殺虫剤の代謝酵素として抵抗性との密接な関わり合いが指摘され、研究が進められてきた。チトクロム P450 酸化酵素系は昆虫に限らず地球上のほとんどの生物体内で存在が確認される酵素系で、各種ステロイドホルモン、胆汁酸、脂肪酸といった生体物質の合成、分解反応の他に、薬物や体内に取り込まれた環境汚染物質など外来性異物の酸化的解毒に必須の役割を果たしていることが哺乳動物を中心に明らかにされている。ピレスロイド剤に限らず、有機リン剤、カーバメート剤、有機塩素系殺虫剤、昆虫成長制御剤など様々な殺虫剤の解毒に関与し、多くの昆虫で P450 酸化酵素系による解毒活性の増大が抵抗性の要因になっていることが示されている (Casida, 1970; Tsukamoto, 1983; Wilkinson, 1983; Oppenoorth, 1985; Brattsten *et al.*, 1986; Scott, 1991; Zhang *et al.*, 1998)。また、解毒として働くだけでなく、多くの有機リン剤では活性化に関与し、毒性を増大させることが知られている。Pyrethrin I や allethrin のような第2級アルコールのピレスロイド剤は、昆虫及び温血動物体内で加水分解を受け難く、主としてチトクロム P450 酸化酵素系により菊酸部分のイソブテニル基が水酸化され、不活性化される。

ピレスロイド剤抵抗性に関わる第3の要因として、殺虫剤の皮膚透過性の低下が挙げられる。殺虫剤は皮膚、気門、口などを通して体内に侵入するが、大部分は皮膚から経皮的に侵入し、その透過性の低下が抵抗性の一要因となることがある。昆虫の皮膚はキチン質を主構成要素とすることから、薬物の透過性も哺乳動物のそれとは異なると考えられる。哺乳動物と昆虫の殺虫剤に対する選択毒性はこの皮膚透過性の違いにあるとも言われている。逆に昆虫側としては、殺虫剤を透過しにくい皮膚をもつことで毒性からの回避が可能となる。ヤガ科の一種、*Heliothis virescens* に処理した cypermethrin の 50% が体内に吸収されるのに、感受性系統で 11 時間、抵抗性系統で 30 時間を要したことから、殺虫剤の皮膚透過性の低下が抵抗性の一

要因であることを指摘された例がある (Little *et al.*, 1989)。

各種薬剤の淘汰により顕在化した抵抗性昆虫では単一の抵抗性機構によることはむしろ少なく、上述した機構のうち複数を利用しているのが一般的である。しかし、*kdr*、*super-kdr* 型の抵抗性を有する昆虫の中にはそれだけでピレスロイド剤に高度の抵抗性を示すような場合もあり、各抵抗性要因の抵抗性比に關与する程度は昆虫の種類によって、また系統、厳密に言えば個体間でさえ異なる場合がある。

本研究においては解毒酵素阻害剤の共力効果、解毒酵素の定量、代謝試験を行うことで JPal-per 系統の permethrin 抵抗性機構の解明を試みた。その結果、ピレスロイド剤の標的部位である神経ナトリウムチャンネルの感受性低下をもたらす *kdr* 因子の存在とともに、チトクロム P450 酸化酵素系による解毒活性の増大が主要な機構として働いていることが明らかにされた。従って次の段階として、チトクロム P450 遺伝子のクローニングを行うことで、殺虫剤抵抗性機構を分子レベルで解析することを試みた。

解毒酵素についての分子レベルでの研究はカルボキシルエステラーゼ、グルタチオン S-トランスフェラーゼ (GST) を中心に盛んに行われている。カルボキシルエステラーゼについては主にモモアカアブラムシ (*Myzus persicae*)、アカイエカ群 (*Culex*) の殺虫剤抵抗性系統を材料に研究が進んでいる。モモアカアブラムシでは、いくつかのエステラーゼアイソザイムの中のたった一つのアイソザイム E4 (及びこのアロザイムである FE4) の活性が殺虫剤抵抗性のレベルと明瞭に關連づけられ、これらの酵素タンパク量の増大が解毒活性に關わっていることが示されている (Devonshire, 1977; Field *et al.*, 1989a, 1993, 1994; Field and Devonshire, 1997)。また、それは構造遺伝子のコピー数の増大によりもたらされていること、そして遺伝子発現がゲノムのメチル化によって制御されていることなどが明らかにされている (Field *et al.*, 1989b, 1996; Devonshire and Field, 1991)。アカイエカ群では A と B の 2 つのグループに分けられたアイソザイムの一方、または両方が過剰発現することが殺虫剤抵抗性の要因になっており、アブラムシ同様に構造遺伝子を含むアンプリコン (増幅単位) のコピー数の増加によりもたらされた現象であることが確認されている (Mouches *et al.*, 1986)。GST はエステラーゼ同様、解毒酵素として殺虫剤抵抗性に重要な働きを示し、様々な有機リン剤、有機塩素剤抵抗性害虫で活性の増大が認められる酵素である (Motoyama and Dauterman, 1980; Balabaskaran *et al.*, 1989; Reidy *et al.*, 1990; Reed and Forgash, 1970; Tanaka *et al.*, 1981)。アミノ酸の相同性や基

質特異性より、タイプ I と II に分類され、殺虫剤抵抗性には主にタイプ I GST が関与しているとされている (Fournier *et al.*, 1992)。キイロショウジョウバエ (*Drosophila melanogaster*) から昆虫で初めての GST 遺伝子がクローニングされ (Toung *et al.*, 1990)、その遺伝子断片をプローブにイエバエからも GST 遺伝子がクローニングされた (Fournier *et al.*, 1992)。GST のアミノ酸配列に関する情報が増えるに従いその保存領域 (Wilce *et al.*, 1995) が明らかにされ、それからデザインされたプライマーを用いてハマダラカ (*Anopheles gambiae*) よりタイプ I GST がクローニングされている (Ranson *et al.*, 1997a)。クローニングされたカルボキシルエステラーゼや GST は構造解析され、すでにバキュロウイルス発現系や大腸菌を用いてタンパクを発現させ、その酵素機能に関する情報が蓄積しつつある (Newcomb *et al.*, 1997; Ranson *et al.*, 1997b)。一方、チトクロム P450 についての分子レベルでの研究は殺虫剤抵抗性に関与するこれらの酵素の中では最も遅れている分野といえる。それはチトクロム P450 タンパクの精製が困難であったことが密接に関係し、その理由として大きく 3 つの要因が考えられる。

第 1 にチトクロム P450 が膜タンパクであることが挙げられる。P450 にはリン脂質膜内の脂肪酸炭化水素鎖と相互作用する疎水性側鎖をもったアミノ酸からなる配列が存在し、こうしたタンパク質を膜から取り出すには疎水結合で膜に係留している脂質を界面活性剤で除き、可溶化する必要がある。しかし可溶化され、精製されたチトクロム P450 を用いて酵素活性を測定する場合に、リン脂質二重層膜表面の正しい側に結合していない膜タンパクは正常な触媒機能を示すことができない。従って、一度精製された P450 アイソフォーム (分子種) を基質を使って酵素活性を測定する際には再び膜タンパクとしての環境を人工的に整える必要がある。

第 2 の理由としてチトクロム P450 が、基質を酸化する際には電子が 2 個必要であるため、チトクロム P450 還元酵素やチトクロム b_5 などの電子供与酵素系の存在が必須であることが挙げられる。そのため、単離、精製された P450 の酵素活性を調べる際には P450 同様に精製されたこれらの電子供与体を人工的に添加する必要がある。先に述べた二つの解毒酵素 (カルボキシルエステラーゼ、GST) はともに分泌タンパクで精製の際に可溶化の必要がない上に、単独で触媒活性を示すため再構成系の構築が比較的容易である。

さらに、第 3 の要因として、ほとんどの生物体内には多数の P450 アイソフォームが存在し、それぞれが構造的に非常に類似しているため、単独に単離、精製する

ことが困難なことが挙げられる。これらの理由によりチトクロム P450 の分子レベルでの解析は他の酵素に比べ遅れてきた。しかし、哺乳動物を中心に P450 の精製に関する研究が進み、再構成系の構築法などが確立されることにより昆虫からも徐々に P450 遺伝子のクローニングがされるようになった。昆虫からは 1989 年にイエバエ (*Musca domestica*) で初めて P450 のクローニングがされて以来 (Feyereisen *et al.*, 1989)、現在までに 5 種類の昆虫より P450 タンパクが精製され、遺伝子の構造解析がなされた (Bradfield *et al.*, 1991; Cohen *et al.*, 1992; Waters *et al.*, 1992; Tomita and Scott, 1995; Bassett *et al.*, 1997)。

昆虫の P450 に関する知見が深まるに連れて、既知の P450 アミノ酸配列の保存領域を用いて、タンパクを精製することなく遺伝子をクローニングすることが可能になってきた。その結果、1997 年現在 10 種類の昆虫から約 60 種の P450 遺伝子 (部分配列を含む) が報告されるまでになった。その中には殺虫剤抵抗性と関連づけられた報告も数例含まれる (Feyereisen *et al.*, 1989; Waters *et al.*, 1992; Scott *et al.*, 1994; Wang and Hobbs, 1995; Tomita and Scott., 1995)。しかし、その中で実際に殺虫剤解毒活性が確かめられているのは僅か一例にすぎない (Tomita and Scott, 1995)。CYP6D1 と名付けられた唯一の殺虫剤解毒性 P450 はピレスロイド剤抵抗性イエバエ、LPR 系統より単離され、特異的抗体が deltamethrin 代謝を阻害することで抵抗性に関与することが確かめられた (Wheelock and Scott, 1992)。CYP6D1 が単離、精製されやすかった一つの理由にこのタンパクが LPR 系統成虫内に存在する P450 全体の約 8 割を占めていた事が挙げられる (Scott and Lee, 1993a)。しかし、抵抗性系統の体内で最も多く発現しているアイソフォームが必ずしも抵抗性に関与しているとは限らず、有機リン剤抵抗性イエバエ Rutgers より精製された CYP6A1 は、CYP6D1 同様に体内で最も多く発現していることから精製されたにも関わらず、実際には有機リン剤を代謝しない。このように数ある P450 より目的のアイソフォームを単離することは容易ではなく、それゆえ抵抗性に関与する P450 の分子レベルでの解析も現在のところ発展途上にあるといえる。

本研究では RT-PCR の手法を用いて、最終的にピレスロイド剤抵抗性ネッタイイエカより抵抗性に関与するチトクロム P450 の遺伝子をクローニング、構造解析することで、解毒酵素と抵抗性の関わりを遺伝子レベルで解明し、抵抗性の回避につながる新たな知見を得ることを目的として行った。

第2章 殺虫剤感受性、共力効果及び遺伝的特性

1981年にイギリス、熱帯病研究所のグループはサウジアラビアにて殺虫剤抵抗性ネッタイエカ (JPal 系統) を採集し、有機リン剤、ピレスロイド剤及び DDT によって淘汰を重ね、おのこの殺虫剤に対する抵抗性系統を確立した (Amin and Peiris, 1990)。すでに有機リン剤淘汰系統についてはカルボキシエステラーゼによる解毒活性の増大が、DDT 淘汰系統については転移酵素によるグルタチオン抱合が抵抗性の主要因であることが報告されている (Amin and Hemingway, 1989; Amin and Peiris, 1990)。一方 JPal 系統はピレスロイド剤の一種、permethrin による淘汰を 12 世代重ねた結果、感受性系統と比べて 1,546 倍という高い抵抗性を示したが、その抵抗性機構については現在までほとんど明らかにされていない (Amin and Hemingway, 1989)。

本章ではまず permethrin で淘汰された JPal 系統 (JPal-per 系統) の抵抗性メカニズムを解明するために、ピレスロイド剤及びピレスロイド剤と作用部位を同じくする DDT、そして作用機構の異なる各種殺虫剤に対する感受性を調べた (第1節)。さらに共力剤 (解毒酵素阻害剤) を処理することによる殺虫剤感受性の変化を調べることで、抵抗性に対する解毒酵素の関わりを検討した (第2節)。第3節では、抵抗性と感受性両系統を交配し、得られた F1 世代の permethrin、cypermethrin 及び DDT に対する感受性を調べることで抵抗性の遺伝様式を検討した。

第1節 ピレスロイド剤及び各種殺虫剤に対する感受性

JPal-per 系統の抵抗性スペクトルを調べる目的で、ピレスロイド剤、有機塩素剤及び作用機構の異なる各種殺虫剤を用いて殺虫試験を行った。

材料及び方法

1. 供試昆虫

ピレスロイド剤感受性及び抵抗性ネッタイエカ (*Culex quinquefasciatus* Say) として以下の2系統を用いた。

①感受性系統

この系統は 1968 年に小笠原父島にて採集されたもので、国立予防衛生研究所 (現在の国立感染症研究所) より譲り受け、筑波大学で継代飼育された。採集されてから実験に用いるまで殺虫剤に触れることなく飼育された。

②抵抗性系統 (JPal-per 系統)

1992 年に住友化学工業 (株) より譲り受けた。この系統は 1981 年に、イギリス熱帯病研究所の J. Hemingway (現ウェールズ大学) がサウジアラビア、Jeddah 大学内の Palestine Street (21° 30' N, 39° 10' E)にて採集した個体群 (JPal 系) を研究室内で permethrin により 60-75%の致死濃度にて 12 世代淘汰されたものであり、JPal 系統の 4 齢幼虫の permethrin 抵抗性は 1.8 倍であったと報告されている (Amin and Hemingway, 1989)。

両系統とも飼育は 27±1℃、湿度 60%、明期 16 時間、暗期 8 時間の飼育室にて行った。幼虫は汲み置き水道水を入れたバット (縦 35×横 27×深さ 6 cm) の中で 300~400 頭ずつ飼育し、ラット、ハムスター用の MF 飼料 (オリエンタル酵母 (株)) を粉末にして与えた。成虫は 30×20×20 cmの網ケージで約 500 頭ずつ飼育し、10%砂糖水を与えた。雌成虫の吸血にはマウスを用いた。

2. 供試薬剤

殺虫試験には以下の殺虫剤の原体を用いた (括弧内は純度及び購入先を示す)。

ピレスロイド系殺虫剤；

permethrin (91.2%、住友化学), ethofenprox (96.0%、三井東圧), phenothrin (94.0%、住友化学), resmethrin (94.1%、住友化学), furamethrin (88.0%、住友化学), bifenthrin (90.4%、FMC), allethrin (91.1%、住友化学), tetramethrin (94.6%、住友化学), cyfluthrin (88.4%、日本バイエルアグロケム), deltamethrin (99.9%、Uclaf), cypermethrin (94.5%、住友化学), cyphenothrin (94.3%、住友化学), fenvalerate (94.9%、住友化学)

有機塩素系殺虫剤；

p, p'-DDT (>90%、日本曹達)

有機リン系殺虫剤；

fenitrothion (99.9%、住友化学), profenofos (95.0%、Ciba Geigy), parathion (>90%、日本バイエルアグロケム)

カーバメート系殺虫剤；

carbaryl (95.0%、日本バイエルアグロケム)

昆虫成長制御剤；

pyriproxyfen (0.5% 水溶性製剤、住友化学)

3. 殺虫試験

殺虫試験は WHO が示した標準検定法 (WHO, 1981) に従い浸漬法にて行い、殺虫剤感受性レベルは LC_{50} 値で示した。Pyriproxyfen は水溶性製剤を用いたため、そのまま蒸留水で希釈して実験に用いた。また、DDT はアセトンに、それ以外の殺虫剤はエタノールに溶解してアセトンもしくはエタノール原液とし、実験に用いた。プラスチックカップ (直径 7.5 cm、高さ 4.0 cm) に 49.5 ml の蒸留水を入れ、この中に両系統 4 齢初期の幼虫を 20-30 頭ずつ投入し、最終濃度の 100 倍の濃度の殺虫剤原液 0.5 ml を加えて全量を 50 ml とした。この場合アセトンもしくはエタノール量は全体の 1% に当たるが、この条件では幼虫に対する毒性はないことを先に確認した。対照試験区にはアセトンもしくはエタノールのみを加えた。各試験区とも 3 回以上の繰り返しを行った。薬剤投与後 $27 \pm 1^\circ\text{C}$ の恒温室に 24 時間放置し、死虫数を数えた。試験中に蛹化したものはデータから省いた。シャーレの底に沈み浮上できない個体は死とみなした。また、pyriproxyfen については羽化阻害率を死虫率として計算した。各濃度ごとに死虫率を算出し、対照区の死虫率をもとに補正しプロビット変換した後、対数濃度との間の回帰直線から LC_{50} 値を求めた (Finney, 1971)。

結果

Permethrin とその他各種ピレスロイド剤に対する感受性、抵抗性系統の死虫率薬量回帰直線を Fig. 1 と Fig. 2 に、また、各種ピレスロイド剤に対する両系統の LC_{50} 値及び LC_{50} 値より計算した抵抗性比を Table 1 に示した。JPal-per 系統の permethrin に対する抵抗性比は 2,500 倍であり、これは Amin らが報告した抵抗性比、1,546 倍に近似な値であった (Amin and Hemingway, 1989)。JPal-per 系統は実験に用いた 13 種のピレスロイド剤すべてに対して抵抗性を示したが、抵抗性比は 5.6~4,160 倍と大きな開きが認められた。ピレスロイド剤はその化学構造中に α -シアノ基を含むか否かによってタイプ I、タイプ II の 2 種類に分類される。JPal-per 系統は 13 種類のピレスロイド剤のうち ethofenprox、permethrin、phenothrin そして resmethrin の 4 種に対して高い抵抗性比を示した (抵抗性比はそれぞれ 4,160、2,500、2,430、1,306 倍) が、これらはすべて α -シアノ基を持たないタイプ I に属する (Fig. 3)。さらにそのうち ethofenprox、permethrin、phenothrin の 3 種については構造中のアルコール部位に 3-phenoxybenzyl 基を有している。一方、これとは対称的に 5 種類のタイプ II のピレスロイド剤に対する抵抗性比は 39~59 倍と、一様に中間的なレベルであった。また、3-phenoxybenzyl 基も α -シアノ基も持たないその他のピレスロイド剤 (resmethrin、furamethrin、allethrin、tetramethrin、bifenthrin) については resmethrin 以外で比較的抵抗性のレベルが低かった (5.6~63 倍)。Permethrin と cypermethrin、phenothrin と cyphenothrin は α 位のシアノ基の有無以外は構造上同じ化合物であるが、JPal-per 系統の感受性は permethrin、phenothrin に対して著しく低下している (Fig. 2)。感受性低下にシアノ基の存在が大きく関与しているといえる。

ピレスロイド剤以外の殺虫剤—有機塩素系、有機リン系、カーバメート系殺虫剤及び昆虫成長制御剤に対する LC_{50} 値及び抵抗性比を Table 2 に示した。DDT はピレスロイド剤同様神経軸索のナトリウムチャンネルを標的部位とするが、JPal-per 系統はこの DDT に対して 300 倍の抵抗性を示した。3 種の有機リン剤及びカーバメート系殺虫剤 carbaryl に対しては 4.6~6.4 倍の抵抗性を示し、昆虫成長制御剤である幼若ホルモン様物質の pyriproxyfen に対する抵抗性比は 1.8 倍であった。fenitrothion に対する抵抗性比は 5.0 倍であったが、JPal 系統 (JPal-per 系統が permethrin により淘汰される前の系統) の fenitrothion に対する抵抗性比は 4 倍であったことが報告がされてお

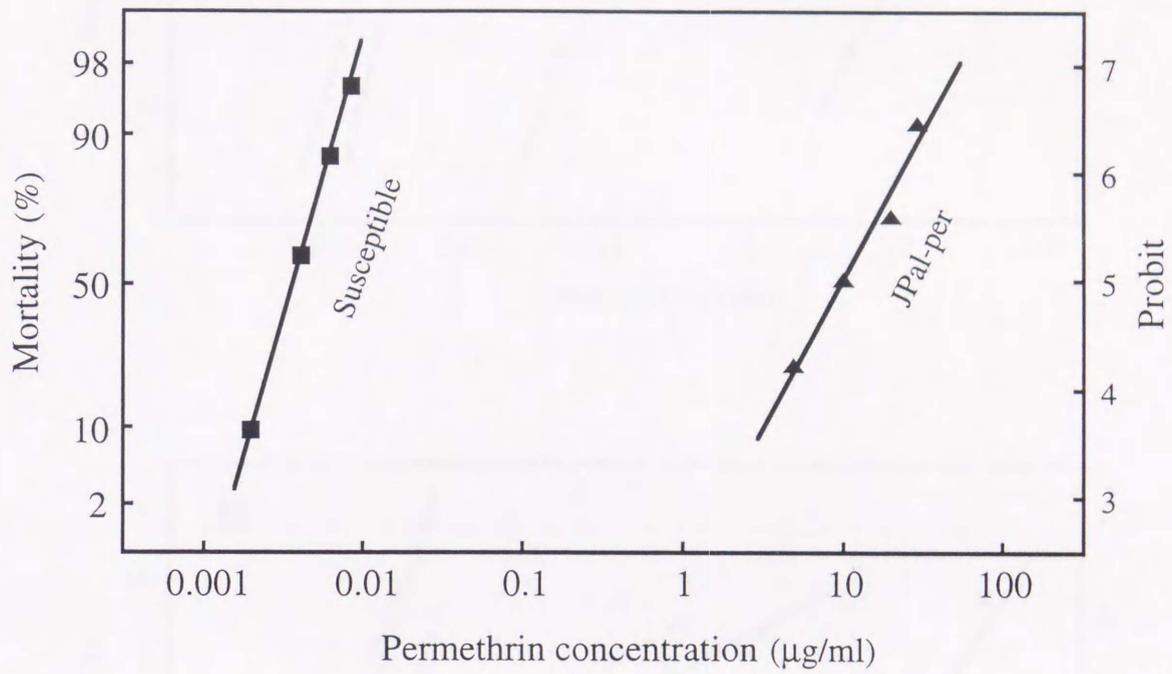


Fig. 1. Susceptibility to permethrin in the susceptible and the resistant JPal-per larvae of *Culex quinquefasciatus*.

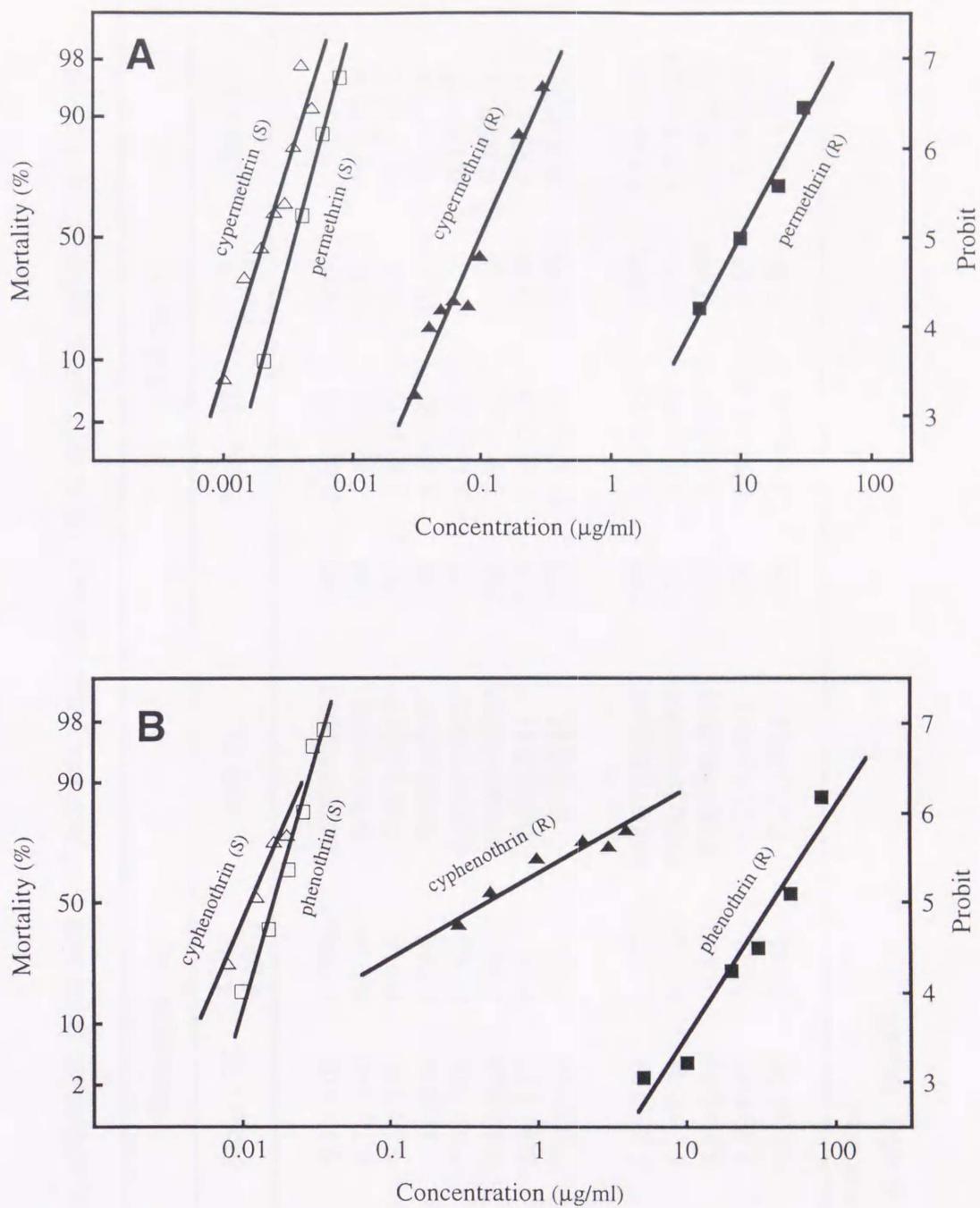


Fig. 2. Comparison of susceptibility to pyrethroids with and without α -cyano group in the susceptible (S) and resistant JPAl-per (R) larvae of *Culex quinquefasciatus*. (A; permethrin and cypermethrin, B; phenothrin and cyphenothrin)

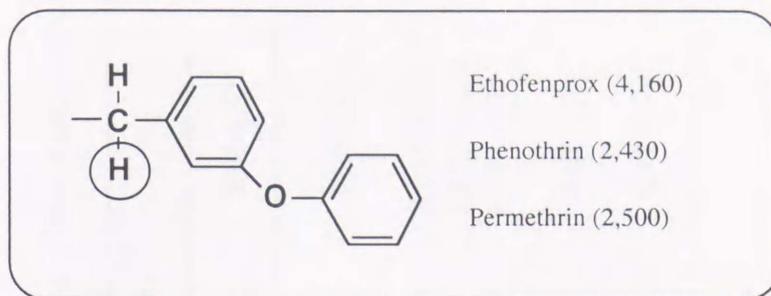
Table 1. Toxicities of pyrethroids with and without α -cyano radicals on *Culex quinquefasciatus* larvae

Insecticide	Susceptible (S)				JPal-per (R)				RR ^b
	n ^a	Slope \pm SE	LC ₅₀ (μ g/ml)	95% CL	n	Slope \pm SE	LC ₅₀ (μ g/ml)	95% CL	
(without α -cyano radical)									
Permethrin	287	5.3 \pm 0.02	0.0040	0.0030-0.0040	290	2.6 \pm 0.33	10.0	8.4-12	2,500
Ethofenprox	439	6.7 \pm 0.40	0.017	0.016-0.018	284	4.4 \pm 0.41	70.8	64.3-76.8	4,160
Phenothrin	416	5.6 \pm 0.37	0.016	0.015-0.017	257	2.8 \pm 0.33	38.8	33.6-44.7	2,430
Resmethrin	590	7.4 \pm 0.64	0.044	0.042-0.046	500	4.2 \pm 0.83	57.5	46.9-69.6	1,306
Furamethrin	386	7.9 \pm 1.00	0.0024	0.0023-0.0026	325	4.1 \pm 1.20	0.15	0.12-0.18	63
Bifenthrin	592	3.8 \pm 0.29	0.0050	0.0047-0.0055	266	3.3 \pm 0.41	0.18	0.16-0.21	36
Allethrin	323	10.4 \pm 1.17	0.10	0.096-0.11	318	8.6 \pm 2.04	0.86	0.72-1.05	8.6
Tetramethrin	342	5.6 \pm 0.61	0.13	0.10-0.15	379	11.4 \pm 1.46	0.73	0.70-0.77	5.6
(with α -cyano radical)									
Cyfluthrin	595	3.5 \pm 0.23	0.00085	0.00078-0.00093	542	3.8 \pm 0.35	0.050	0.046-0.054	59
Deltamethrin	755	4.7 \pm 0.41	0.00041	0.00039-0.00044	521	3.4 \pm 0.28	0.023	0.021-0.026	56
Cypermethrin	561	4.3 \pm 0.47	0.0021	0.0019-0.0024	286	3.3 \pm 0.27	0.099	0.088-0.11	47
Cyphenothrin	239	3.8 \pm 0.48	0.011	0.010-0.013	406	0.94 \pm 0.10	0.45	0.34-0.68	41
Fenvalerate	749	5.0 \pm 0.29	0.038	0.036-0.041	286	1.1 \pm 0.16	1.49	1.14-2.35	40

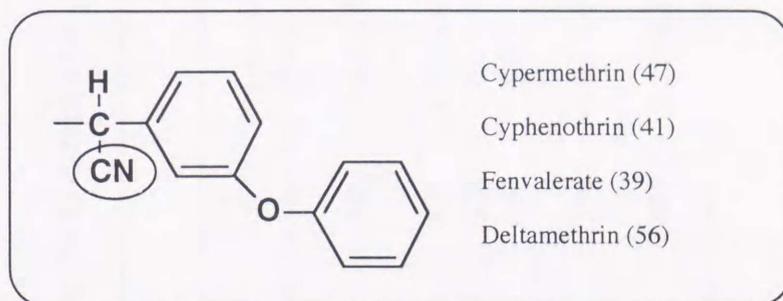
^a Total number of larvae used.

^b Resistance ratio = LC₅₀(R) / LC₅₀(S).

Group I . Phenoxy benzyl without α -cyano radical



Group II . Phenoxy benzyl with α -cyano radical



Group III . Without phenoxy benzyl radical

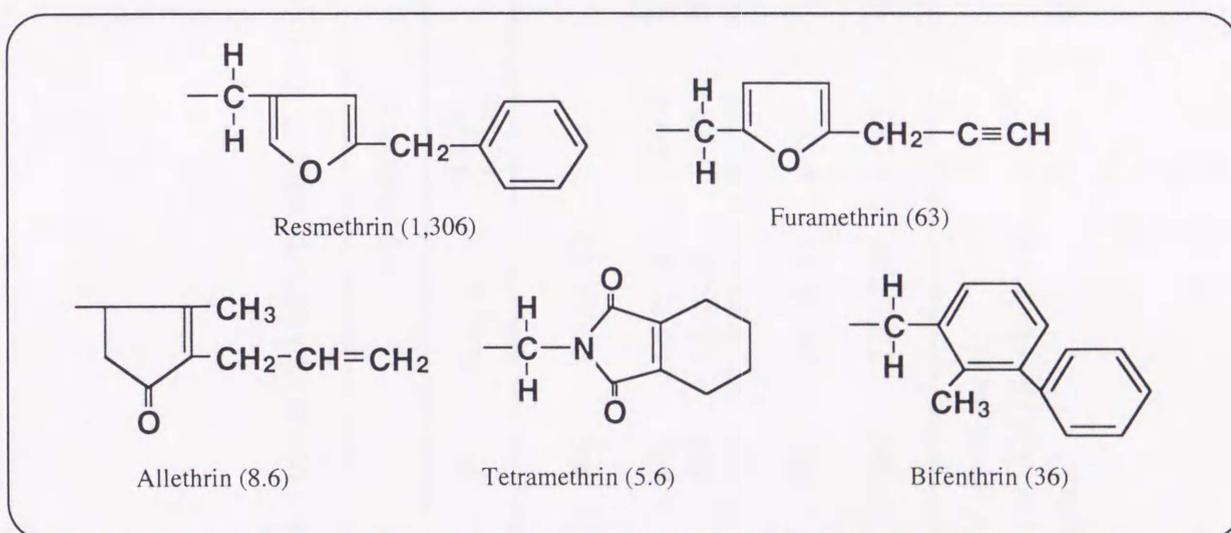


Fig. 3. Chemical structure of alcohol moiety of pyrethroids. Resistance ratios are indicated in parenthesis. Pyrethroids lacking an α -cyano group but having a phenoxybenzyl group in their chemical structure showed the highest resistance ratios.

Table 2. Toxicities of various insecticides to the susceptible and the resistant JPal-per larvae of *Culex quinquefasciatus*

Insecticide	Susceptible (S)				JPal-per (R)				RR ^b
	n ^a	Slope ± SE	LC ₅₀ (µg/ml)	95% CL	n	Slope ± SE	LC ₅₀ (µg/ml)	95% CL	
Organochloride									
DDT	504	4.2 ± 0.40	0.42	0.39-0.45	343	3.8 ± 0.81	124	94.0-159	300
Organophosphate									
Fenitrothion	389	11.5 ± 1.4	0.0048	0.0043-0.0054	575	7.3 ± 1.4	0.024	0.021-0.031	5.0
Profenofos	474	8.8 ± 2.0	0.0054	0.0048-0.0061	318	7.8 ± 0.22	0.026	0.025-0.028	4.8
Parathion	425	12.5 ± 0.66	0.0028	0.0026-0.0029	264	7.1 ± 2.2	0.013	0.011-0.019	4.6
Carbamate									
Carbaryl	632	3.5 ± 0.53	0.20	0.15-0.26	394	6.5 ± 0.97	1.27	1.09-1.53	6.4
IGR									
Pyriproxyfen	890	2.0 ± 0.28	0.083 ^c	0.063-0.12	895	2.7 ± 0.30	0.15 ^c	0.12-0.19	1.8

^a Total number of larvae used.

^b Resistance ratio = LC₅₀ (R) / LC₅₀ (S).

^c Expressed as ng/ml.

り (Hemingway *et al.*, 1990)、permethrin 淘汰によりピレスロイド剤に対する抵抗性は高められたが、有機リン剤抵抗性は高められなかったことがうかがえる。

考察

JPal-per 系統は実験に用いた 13 種類のピレスロイド剤すべてに対し抵抗性を示した。しかし、抵抗性比に 5.6 倍から 4,160 倍までの開きが認められた。これらのピレスロイド剤をアルコール部分の化学構造に着目して 3 つのグループに分類すると、抵抗性比との間にある相関が認められた。すなわち、 α -シアノ基を持たず、3-phenoxybenzyl 基を有するグループ I に対しては 2,400 倍以上の高い抵抗性を、 α -シアノ基と 3-phenoxybenzyl 基をともに有するグループ II に対しては 40~60 倍の一律中間的な抵抗性を、そして α -シアノ基も 3-phenoxybenzyl 基も持たないグループ III に対しては resmethrin を除いて比較的低い抵抗性を示した。特に α -シアノ基の有無による抵抗性レベルの違いは顕著であり、グループ I に対する抵抗性レベルの増大は α -シアノ基の有無に起因していることは明らかである。

過去の抵抗性研究より考察すると、この現象を説明する要因として主に 2 つの可能性が挙げられる。第 1 は殺虫剤代謝酵素の基質特異性によるものの可能性である。Halliday and Georghiou (1985) はイエバエにおいて α -シアノ基を有するタイプ I ピレスロイド剤は加水分解酵素の一種、カルボキシルエステラーゼによる解毒分解を受けにくいことを報告している。また、3-phenoxybenzyl 基はチトクロム P450 酸化酵素の第一の標的となることが知られていることから (Shono *et al.*, 1979)、JPal-per 系統のピレスロイド剤感受性の違いはチトクロム P450 酸化酵素の基質特異性によりもたらされている可能性が考えられる。第 2 の可能性として、ピレスロイド剤の標的部位である神経軸索の感受性低下、すなわち knock down resistance (*kdr*) 因子の関与が挙げられる。Amin and Hemingway (1989) は JPal-per 系統成虫を用いた電気生理学的実験により、本系統のピレスロイド剤抵抗性に *kdr* 因子は関与していないと示唆した。しかし、Amin らが実験に用いたのはタイプ II ピレスロイドの cyhalothrin である。本系統がタイプ I ピレスロイド剤に特異的な神経感受性の低下をもたらす *kdr* 因子を有している事も考えられる。さらに JPal-per 系統はピレスロイド剤と標的部位を同じくする DDT に対しても 300 倍という高い抵抗性を示した (Table 2)。これは *kdr* 因子

を獲得した害虫に特有な現象である (Plapp and Hoyer, 1967; Farnham, 1973, 1977; DeVries and Georghiou, 1980; Priester and Georghiou, 1980; Omer *et al.*, 1980; Scott and Matsumura, 1981)。

緒言でも述べたように JPal-per 系統はもともと野外で採集した JPal 系統を permethrin で淘汰して得られた個体群である。JPal 系統の permethrin 抵抗性はわずか 1.8 倍であったことから (Amin and Hemingway, 1989)、12 世代淘汰の過程で permethrin 抵抗性の因子を持っていた個体のみが生き残ったと言える。そして、permethrin 抵抗性因子は全てのピレスロイド剤に一樣に対抗できる手段ではなく、その傾向は化学構造により 3 つのグループに分類された。JPal-per 系統の回帰直線において一部のピレスロイド剤 (cyphenothrin, fenvalerate) に対する傾斜が小さくなるという現象が認められた。このことは、JPal-per 系統の cyphenothrin, fenvalerate に対する抵抗性要因が遺伝的に均一ではないことを意味し、またそれは permethrin による淘汰の過程では均一化され難かったものであると考えられる。すなわちそれらの抵抗性要因は permethrin 抵抗性には深く関与しないもので、同じピレスロイド剤の中でも複数の共有し難い抵抗性要因が存在していることを想像させる。

第 2 節 酵素阻害剤の共力効果

ピレスロイド剤抵抗性機構の一つである解毒酵素の関わりを調べる目的で各種酵素阻害剤を用いて permethrin 殺虫試験を行った。また、第 1 節で高い抵抗性が認められた DDT と、有機リン剤 fenitrothion に対する共力剤の影響についても調べた。

材料及び方法

1. 供試薬剤

殺虫剤は permethrin、*p,p'*-DDT、fenitrothion を用いた。また、共力剤として以下の薬剤を用いた (各共力剤の化学構造は Fig. 4 に示した)。

酸化酵素 (チトクロム P450 酸化酵素) 阻害剤 ;

PBO (piperonyl butoxide) (和光純薬工業 (株))

PTPE (2-propynyl 2,3,6-trichlorophenyl ether)

エステルアゼ阻害剤；

DEF (*S,S,S*-tributyl phosphorotrithioate)

脱塩酸酵素阻害剤；

DMC (1,1-bis (*p*-chlorophenyl) ethanol)

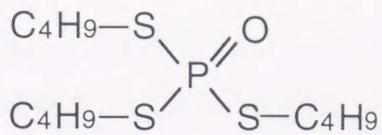
PTPE と DEF は日本バイエル（株）より、また DMC は日本曹達（株）より提供された。

2. 殺虫試験

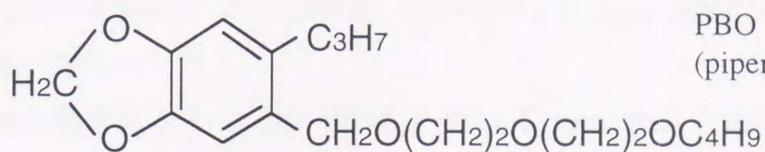
基本的な方法、条件は第1節に準じて行った。ただし殺虫剤、共力剤の溶媒濃度が1%を越えないように全体量を100 mlとし、溶媒によって最終濃度の1,000倍に調整した殺虫剤及び共力剤をそれぞれ100 µlずつ加えて行った。共力剤はすべてエタノールに溶解して用いた。共力剤を処理する方法は研究者によって異なることがあり、そのひとつとして共力剤をあらかじめ殺虫剤原液に加えて殺虫剤、共力剤を同時に希釈していく方法がある。しかしこの方法は殺虫剤濃度に従って共力剤の濃度も変化し、酵素阻害効果が一定でなくなる恐れがある。また、共力剤自身にも毒性があり、殺虫剤濃度が高くなれば共力剤自身の毒性も高くなり、これが死虫率に影響を及ぼす可能性が生じる。従って本実験では殺虫剤の濃度に関わらず一定濃度の共力剤を処理することでどの殺虫剤濃度においても幼虫体内の解毒酵素阻害度を一定にした。また、殺虫剤抵抗性系統である JPal-per 系統は体内に侵入した共力剤を速やかに解毒し、酵素阻害効果を軽減させる可能性が考えられたため、あらかじめ両系統の幼虫に対し、処理後24時間以内に毒性を示さない最高濃度を検討した。その結果、感受性 (S)、JPal-per 両系統に対する各共力剤の最高濃度は以下に示す通りになった。

PBO	S 系統	0.5 µg/ml	JPal-per 系統	5.0 µg/ml
PTPE	S 系統	1.0 µg/ml	JPal-per 系統	4.0 µg/ml
DEF	S 系統	1.0 µg/ml	JPal-per 系統	1.0 µg/ml
DMC	S 系統	1.0 µg/ml	JPal-per 系統	1.0 µg/ml

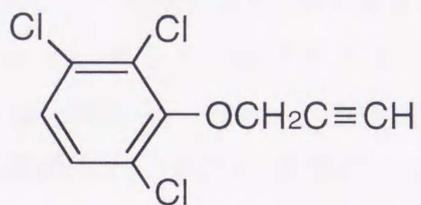
各共力剤の最高濃度で permethrin、DDT 及び fenitrothion 毒性に対する各共力剤の効果を測定した。なお、permethrin 毒性に対する共力試験についてのみ、これに加えて PBO (0.5、1.0 µg/ml)、PTPE (1.0 µg/ml) を JPal-per 系統に対して処理した。



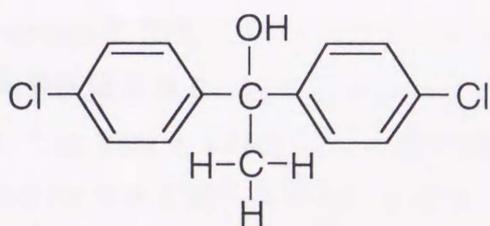
DEF
(*S,S,S*-tributyl phosphorotrithioate)



PBO
(piperonyl butoxide)



PTPE
(2-propynyl 2,3,6-trichlorophenyl ether)



DMC
(1,1-bis (*p*-chlorophenyl) ethanol)

Fig. 4. Chemical structure of synergists.

結果

Permethrin に対する DEF の共力効果を Fig. 5、Table 3 に示した。対照区と比較して DEF 処理時の死虫率薬量回帰直線は両系統で共に低濃度側へ移行し、カルボキシエステラーゼが permethrin 毒性に対抗する手段として働いていることが示唆された。しかし LC_{50} 値の変化の度合いは両系統で大きな差がなく、抵抗性比は無処理時に 1,650 倍、処理時に 1,260 倍であった。このことはカルボキシエステラーゼが両系統において解毒に多少は関与しているが、JPal-per 系統の抵抗性の主要因ではないことを示唆していた。

酸化酵素阻害剤 (PBO、PTPE) を用いて permethrin 殺虫試験を行った結果は PBO については Fig. 6 と Table 4 に、PTPE については Fig. 7 と Table 5 に示した。JPal-per 系統の死虫率薬量回帰直線は PBO の濃度が 0.5、1.0、5.0 $\mu\text{g/ml}$ と高くなるに連れて permethrin の低濃度側へ移行し、permethrin に対する感受性が高まった。無処理時に 2,500 倍あった抵抗性比も PBO 濃度が増大するに従って 550、180、43 倍へと減少した (Table 4)。もう一つのチトクロム P450 酸化酵素阻害である PTPE (Casida, 1970; Fellig *et al.*, 1970; Brown *et al.*, 1996; Zhang *et al.*, 1997) についても PBO 同様に高い共力効果が認められ、PTPE 濃度が 1.0、4.0 $\mu\text{g/ml}$ と高くなるにつれて回帰直線は permethrin の低濃度側へ移行し (Fig. 7)、抵抗性比は共力剤の最高濃度時に 15 倍であった (Table 5)。これらのことはチトクロム P450 酸化酵素が JPal-per 系統の permethrin 抵抗性に深く関与していることを示唆した。

Permethrin に加えて DDT と fenitrothion の毒性に対する共力剤の効果も調べた。死虫率薬量回帰直線を Fig. 8 と Fig. 9 に、 LC_{50} 値と抵抗性比を Table 6 に示した。DDT については PBO と PTPE、そして脱塩酸酵素阻害剤の DMC を処理したが、いずれも抵抗性比を大きく減少させることはなく、解毒酵素は DDT 抵抗性には関与していないと考えられた。Fenitrothion に対する抵抗性比もカルボキシエステラーゼ阻害剤の DEF 処理下で減少することはなかった。しかし DEF を処理した場合、両系統で LC_{50} 値が無処理時より 4~7 倍減少しており、抵抗性への関与は小さいものの、fenitrothion に対する一つの防御手段としてカルボキシエステラーゼによる解毒が関与していることが考えられた。

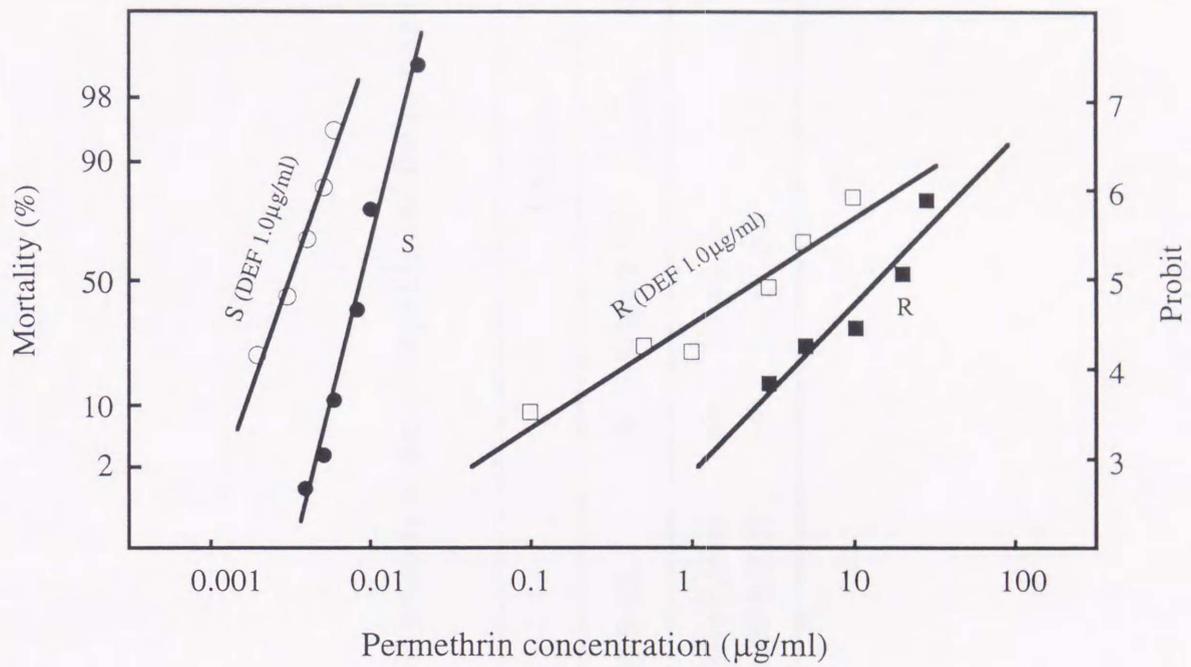


Fig. 5. Synergistic effects of DEF on permethrin toxicity to the susceptible (S) and the resistant JPAl-per (R) larvae of *Culex quinquefasciatus*.

Table 3. Synergistic effects of DEF on permethrin toxicity to the susceptible and the resistant JPal-per larvae of *Culex quinquefasciatus*

Treatment	Susceptible (S)				JPal-per				RR ^b
	n ^a	Slope ± SE	LC ₅₀ (µg/ml)	95% CL	n	Slope ± SE	LC ₅₀ (µg/ml)	95% CL	
Permethrin	674	8.1 ± 0.43	0.0085	0.0082-0.0088	506	1.9 ± 0.30	14	9.0-20	1,650
+DEF (1.0mg/ml)	767	5.0 ± 0.43	0.0031	0.0030-0.0033	540	1.0 ± 0.098	3.9	3.0-5.1	1,260

^a Total number of larvae used.

^b Resistance ratio = LC₅₀ (JPal-per) / LC₅₀ (S).

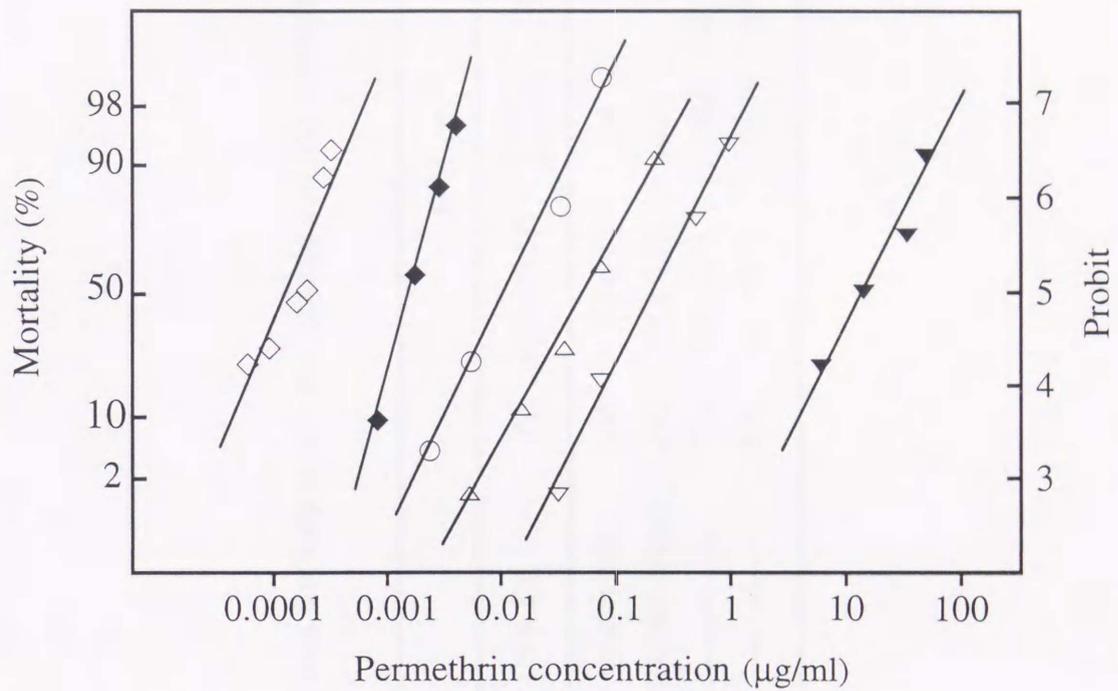


Fig. 6. Dosage-mortality regression lines for permethrin alone and with PBO against susceptible (S) and resistant JPal-per larvae of *Culex quinquefasciatus*. (◆) S permethrin only, (◇) S +PBO 0.5µg/ml, (▼) JPal-per permethrin only, (▽) JPal-per +PBO 0.5µg/ml, (△) JPal-per +PBO 1.0µg/ml, (○) JPal-per +PBO 5.0µg/ml.

Table 4. Synergistic effects of PBO on permethrin toxicity to the susceptible and the resistant JPal-per larvae of *Culex quinquefasciatus*

Treatment	Susceptible (S)				JPal-per				RR ^b
	n ^a	Slope ± SE	LC ₅₀ (µg/ml)	95% CL	n	Slope ± SE	LC ₅₀ (µg/ml)	95% CL	
Permethrin	287	5.3 ± 0.02	0.0040	0.0030-0.0040	290	2.6 ± 0.33	10.0	8.4-12	2,500
+PBO (0.5 µg/ml)	404	3.2 ± 0.72	0.00044	0.00024-0.00065	295	2.6 ± 0.19	0.24	0.20-0.30	550
+PBO (1.0 µg/ml)	—	—	—	—	333	2.7 ± 0.13	0.079	0.065-0.096	180 ^c
+PBO (5.0 µg/ml)	—	—	—	—	508	3.2 ± 0.11	0.019	0.017-0.023	43 ^c

^a Total number of larvae used.

^b Resistance ratio = LC₅₀ (JPal-per) / LC₅₀ (S).

^c LC₅₀ (JPal-per) / LC₅₀ (S + PBO 0.5 µg/ml).

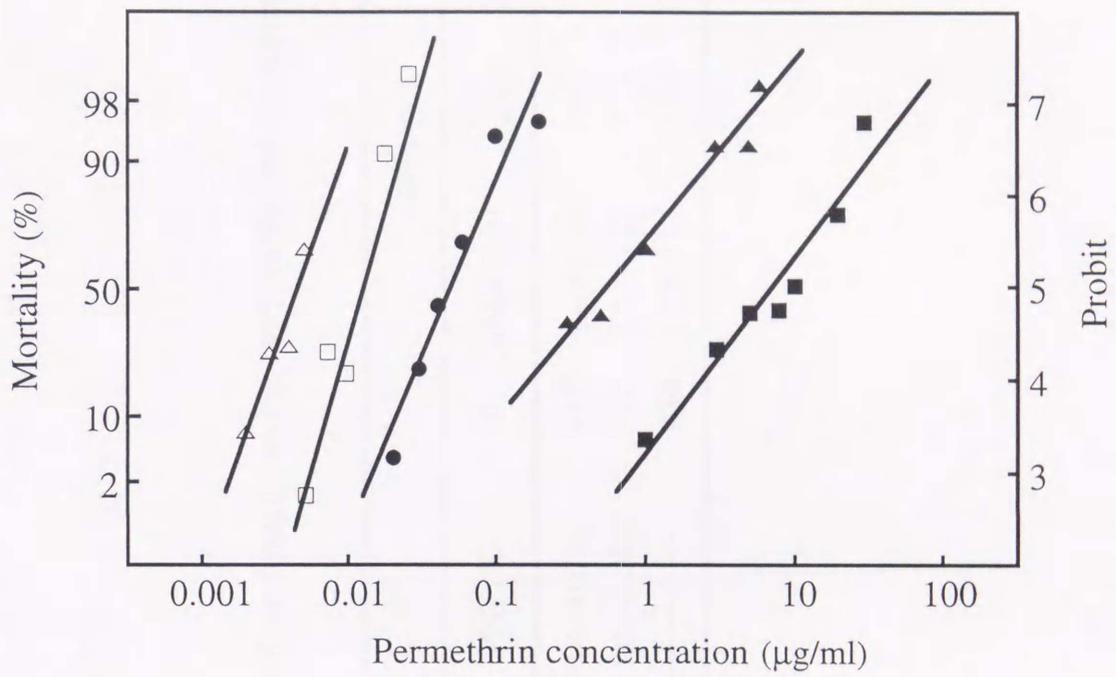


Fig. 7. Dosage-mortality regression lines for permethrin alone and with PTPE against susceptible (S) and resistant JPAl-per larvae of *Culex quinquefasciatus*. (□) S permethrin only, (△) S +PTPE 1.0µg/ml, (■) JPAl-per permethrin only, (▲) JPAl-per +PTPE 1.0µg/ml, (●) JPAl-per +PTPE 4.0 µg/ml.

Table 5. Synergistic effects of PTPE on permethrin toxicity to the susceptible and the resistant JPal-per larvae of *Culex quinquefasciatus*

Treatment	Susceptible (S)				JPal-per				RR ^b
	n ^a	Slope ± SE	LC ₅₀ (µg/ml)	95% CL	n	Slope ± SE	LC ₅₀ (µg/ml)	95% CL	
Permethrin	339	5.8 ± 0.48	0.012	0.010-0.016	535	2.0 ± 0.23	7.6	5.7-10.0	633
+PTPE (1.0 µg/ml)	258	4.6 ± 1.1	0.0046	0.0031-0.0051	397	1.7 ± 0.18	0.55	0.45-0.70	120
+PTPE (4.0 µg/ml)	—	—	—	—	420	3.2 ± 0.17	0.071	0.064-0.080	15 ^c

^a Total number of larvae used.

^b Resistance ratio = LC₅₀ (JPal-per) / LC₅₀ (S).

^c LC₅₀ (JPal-per) / LC₅₀ (S +PTPE 1.0 µg/ml).

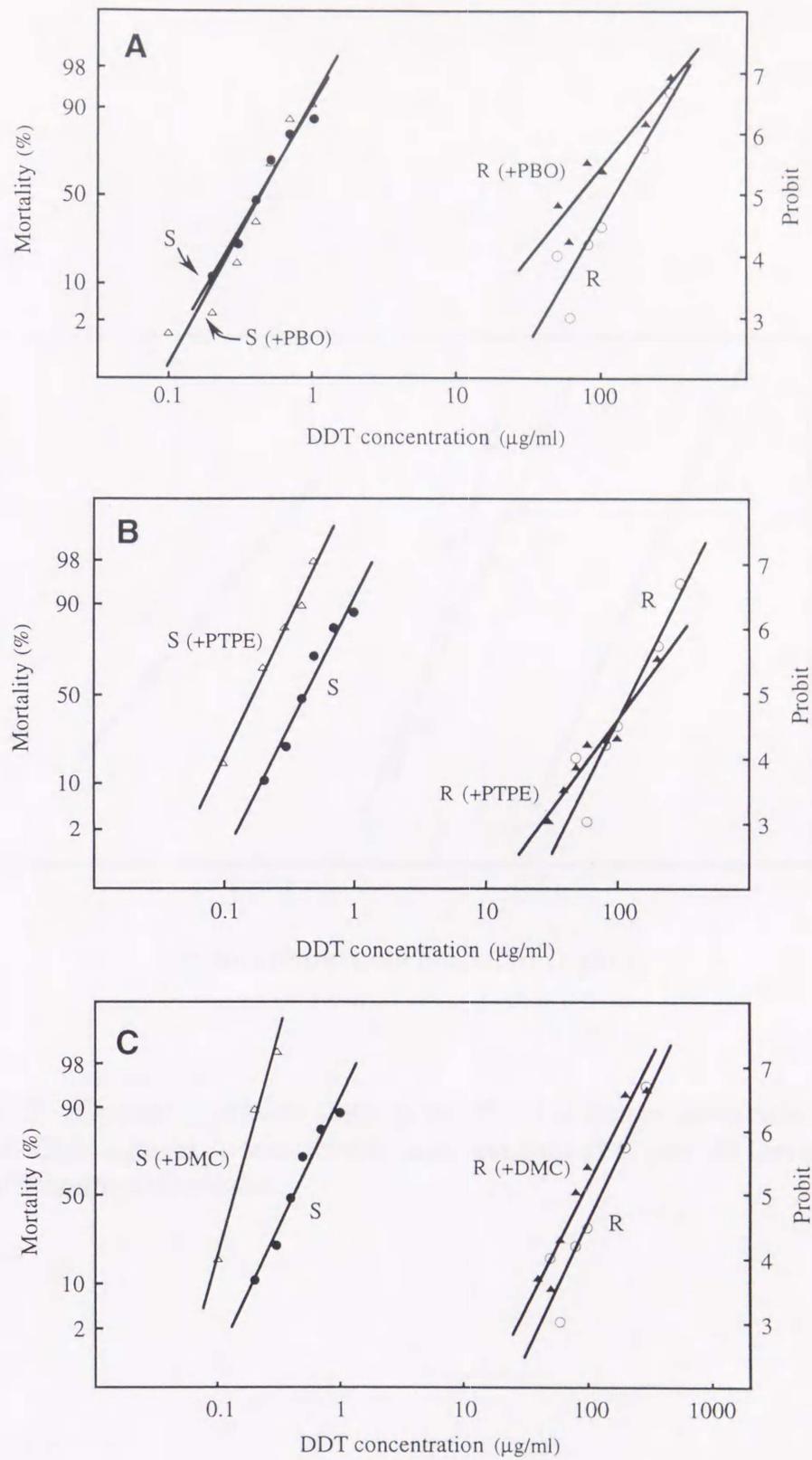


Fig. 8. Dosage-mortality regression lines for DDT alone and with synergists against susceptible(S) and resistant JPAl-per (R) larvae of *Culex quinquefasciatus*. (A; with PBO, B; with PTPE, C; with DMC)

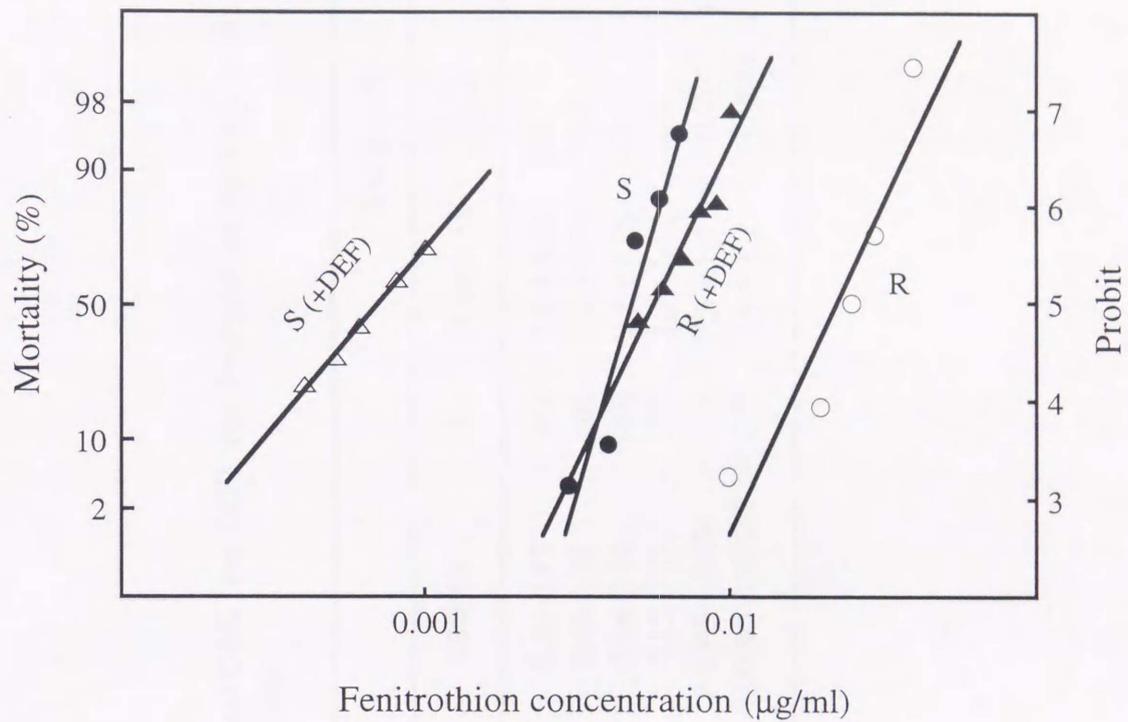


Fig. 9. Dosage-mortality regression lines for fenitrothion alone and with DEF against susceptible(S) and resistant JPAl-per(R) larvae of *Culex quinquefasciatus*.

Table 6. Synergistic effects of PBO, PTPE and DMC on DDT and fenitrothion toxicity to the susceptible and the resistant JPal-per larvae of *Culex quinquefasciatus*

Insecticide	Susceptible (S)				JPal-per (R)				RR ^b
	n ^a	Slope ± SE	LC ₅₀ (µg/ml)	95% CL	n	Slope ± SE	LC ₅₀ (µg/ml)	95% CL	
DDT	504	4.2 ± 0.40	0.42	0.39-0.45	343	3.8 ± 0.81	124	94.0-159	300
DDT +PBO ^c	585	5.1 ± 0.60	0.44	0.39-0.50	390	2.9 ± 0.52	70.5	55.4-103	160
DDT +PTPE ^d	514	4.2 ± 0.29	0.17	0.16-0.19	869	2.8 ± 0.28	141	122-158	830
DDT +DMC (1.0µg/ml)	438	7.4 ± 0.67	0.14	0.13-0.15	573	3.9 ± 0.42	86.9	79.7-94.7	620
Fenitrothion	389	11.5 ± 1.4	0.0048	0.0043-0.0054	575	7.3 ± 1.4	0.024	0.021-0.031	5.0
Fenitrothion +DEF	416	3.7 ± 0.09	0.0007	0.00063-0.00076	757	5.9 ± 1.0	0.0056	0.0052-0.0065	8.0

^aTotal number of larvae used.

^bResistance ratio = LC₅₀ (R) / LC₅₀ (S).

^cTreated 4.0 µg/ml to R, 1.0 µg/ml to S strain.

^dTreated 5.0 µg/ml to R, 0.5 µg/ml to S strain.

考察

PBO や PTPE を処理することで JPal-per 系統の permethrin に対する抵抗性比が大きく減少したことはチトクロム P450 酸化酵素が本系統の permethrin 抵抗性に主要な役割を担っていることを示唆するものである。また、ある種の抵抗性害虫においては PBO もしくは PTPE のどちらかしか共力効果をもたらさない場合があるが (Brown *et al.*, 1996; Zhang *et al.*, 1997)、本系統においては permethrin の毒性が 2 種類の共力剤によって高められた。また、共力剤の毒性を示さない最高濃度を処理してもなお 15~43 倍の抵抗性比が認められたため、チトクロム P450 酸化酵素系以外の抵抗性因子の存在が示唆された。

PBO、PTPE や脱塩酸酵素阻害剤の DMC が DDT の毒性に殆ど影響を及ぼさなかったことは、JPal-per 系統の DDT 抵抗性には解毒酵素以外の抵抗性因子が関与していることを示唆する。ピレスロイド剤と DDT に交差抵抗性をもたらす因子として知られている *kdr* タイプの抵抗性機構が働いている可能性が高い (Farnham, 1977)。ピレスロイド剤や DDT には昆虫に仰転落下 (ノックダウン) させる作用があるが、*kdr* タイプの抵抗性を発達させた昆虫神経ではこの作用が遅延される (Oppenoorth and Welling, 1976; Plapp, 1976)。これまでにイエバエ (*Musca domestica*)、チャバネゴキブリ (*Blattella germanica*)をはじめとしてさまざまな昆虫で神経感受性低下による抵抗性の例が報告されている (Shono, 1985)。JPal-per 系統成虫腹部神経索の permethrin に対する感受性が、感受性系統の 10 倍低いことが確かめられており (梅田、私信)、本系統の幼虫が成虫同様に *kdr* 因子を持っている可能性は高い。*kdr* タイプのイエバエ、ネッタイシマカ (*Aedes aegypti*)、コナガ (*Plutella xylostella*)では α -シアノ基の有無に関わらず全てのピレスロイド剤に対して一様に抵抗性を示す事が知られている (Sawicki, 1978; DeVries and Georghiou, 1980; Priester and Georghiou, 1980; Liu *et al.*, 1981)。ところが JPal-per 系統は、実験に用いた全てのピレスロイド剤に抵抗性を示したが、その抵抗性比は 5.6~4,160 倍とかなりの開きがあった (第 1 節)。このことは本系統の *kdr* 因子が一部のピレスロイド剤に特異的に感受性低下をもたらす、これまでにないタイプのものである可能性を示唆する。第 1 節の考察でも述べたように、Amin and Hemingway (1989)は電気生理学実験により JPal-per 系統のピレスロイド剤抵抗性に *kdr* 因子は関与していないと考察した。しかしながら彼女らが用いたのはタイプ II に属する cyhalothrin であり、もし JPal-per 系統がタイプ I のピレスロイド剤に

特異的神経感受性低下をもたらす因子であったならばこの結果は本系統が *kdr* 因子を有さないことの証拠とはならない。また、タイプⅡのピレスロイド剤はタイプⅠとは標的部位が異なる事を示唆した Casida *et al.* (1983)の結果もこのことを強く裏付けている。

第3節 ピレスロイド剤抵抗性の遺伝的特性

これまでに *kdr* 因子は遺伝的に劣性であるとされている (Shono, 1985)。ネッタイエカにおいても *kdr* タイプの系統は不完全劣性であるとの報告がある (Halliday and Georghiou, 1985)。したがって本節では JPal-per 系統と感受性系統の F_1 世代について抵抗性遺伝子の優性度判定を行うことで、ピレスロイド剤抵抗性と *kdr* 因子の関わりについて検討した。

材料及び方法

1. 両系統の交配及び供試薬剤

感受性系統の未交尾雌と JPal-per 系統の雄を各々約 100 頭を同一ケージへ入れて交配させ、 F_1 世代を得た。 F_1 の 4 齢幼虫を用いて permethrin、cypermethrin、DDT に対する感受性を調べた。

殺虫試験は第1節の方法に準じて行った。

2. 優性度判定

優性度 (D)の算出法は Falconer の公式 (Falconer, 1964)による Stone 法 (Stone, 1968)に従った (以下に示す通り)。

$$D = (2X_2 - X_1 - X_3) / (X_1 - X_3)$$

X_1 、 X_2 、 X_3 はそれぞれ抵抗性系統 (JPal-per)、 F_1 交雑系統、感受性系統の LC_{50} 値を示す。

結果

JPal-per、 F_1 及び感受性系統の permethrin、cypermethrin、DDT に対する死虫率葉量回帰直線を Fig. 10 に、 F_1 世代の抵抗性比及び優性度を Table 7 に示した。Permethrin、cypermethrin、DDT に対する優性度はそれぞれ 0.012、0.333、-0.041 で permethrin と cypermethrin には不完全優性を、DDT には不完全劣性を示した。また F_1 世代の回帰直線の傾きは JPal-per 系統、感受性系統のそれと比較して大きな違いは認められなかった。

考察

本章第 1、2 節では JPal-per 系統のピレスロイド抵抗性には *kdr* 因子による神経感受性の低下とチトクロム P450 酸化酵素による解毒代謝が関与していることが示唆された。そこで本節では *kdr* 因子の抵抗性への関わりをさらに深く追究する目的で両系統の F_1 世代を用いて優性度判定を行った。イエバエ (*Musca domestica*) やチャバネゴキブリ (*Blattella germanica*) の *kdr* 因子は遺伝的に劣性であることが知られているが (Shono, 1985)、JPal-per 系統の DDT に対する遺伝様式は不完全劣性であった。このことから本系統が *kdr* 因子を抵抗性機構として備えている可能性がさらに高められたと言える。そして -0.041 という劣性度は *kdr* 型イエバエほどは高くなく、極めて中間的な遺伝形質であるとも言える。DDT に対して不完全劣性であったのに対し JPal-per 系統の permethrin や cypermethrin に対する抵抗性因子は不完全優性を示した。このことから permethrin や cypermethrin 抵抗性には *kdr* 因子以外の要因も関与しているのに対し DDT 抵抗性に関しては *kdr* が抵抗性の唯一の要因であると推測される。それは permethrin の毒性が PBO や PTPE などの P450 酸化酵素阻害剤によって増大した一方、DDT に対して解毒酵素阻害剤が共力効果を示さなかった事からも裏付けられる。また、前節までに抵抗性への関与が示唆されたチトクロム P450 酸化酵素の遺伝様式が優性である可能性を示した。さらに permethrin と cypermethrin の間でも優性度に差が認められた (優性度はそれぞれ 0.012 と 0.333)。Cypermethrin に対する優性度が permethrin よりも高かったことは permethrin 抵抗性には cypermethrin 抵抗性に関わる因子に加えて劣性の抵抗性因子が関与している、もしくは cypermethrin 抵抗性に

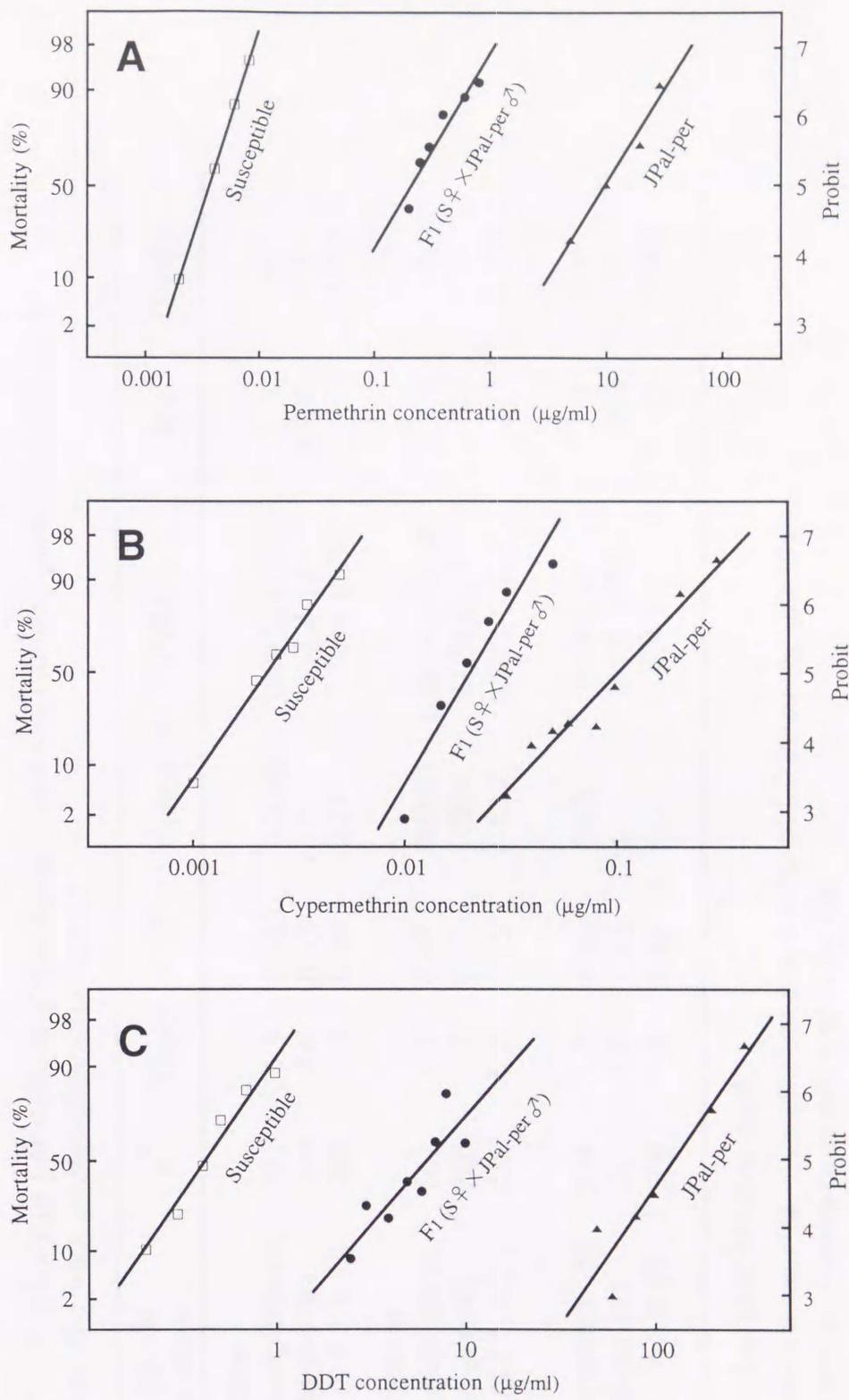


Fig. 10. Resistance levels to permethrin, cypermethrin and DDT to the susceptible, resistant JPal-per and their F1 progenies of *Culex quinquefasciatus* larvae. (A; permethrin, B; cypermethrin, C; DDT)

Table 7. Toxicity of permethrin, cypermethrin and DDT to the parental and their F₁ progenies of *Culex quinquefasciatus* larvae

Insecticide & strain	n ^a	Slope	±SE	LC ₅₀ (µg/ml)	95%CL	RR ^b	D value ^c
Permethrin							
Susceptible (S)	287	5.3	0.020	0.0040	0.0030-0.0040	1	—
JPal-per (R)	290	2.6	0.33	10.0	8.4-12	2,500	—
F ₁ (S ♀ × R ♂)	465	3.0	0.40	0.21	0.19-0.25	53	0.012
Cypermethrin							
Susceptible (S)	561	4.3	0.47	0.0021	0.0019-0.0024	1	—
JPal-per (R)	286	3.3	0.27	0.099	0.088-0.11	47	—
F ₁ (S ♀ × R ♂)	436	5.2	0.85	0.019	0.017-0.023	9.1	0.333
DDT							
Susceptible (S)	504	4.2	0.40	0.42	0.39-0.45	1	—
JPal-per (R)	343	3.8	0.81	124	94.0-159	298	—
F ₁ (S ♀ × R ♂)	509	3.0	0.68	6.4	4.9-7.7	15	-0.041

^a Total number of larvae used.

^b Resistant ratio was calculated based on a value of 1.0 for susceptible strain.

^c Degree of dominance as indicated in the text.

permethrin 抵抗性に関わる因子以外の優性の抵抗性因子が関与していることを示唆する。つまり、前節で仮定されたように本系統が持つであろう *kdr* 因子は特定のピレスロイド剤にのみ神経感受性低下をもたらしている可能性が高い。

第3章 Permethrin 抵抗性と解毒酵素

皮膚を浸透して昆虫体内へ侵入した殺虫剤が標的器官へ到達する前に待ち受ける次の障壁が、解毒酵素である。解毒に働く酵素にはカルボキシエステラーゼ、チトクロム P450 酸化酵素系、グルタチオン S-トランスフェラーゼなどがよく知られており、これらの酵素は餌に含まれたりして体内に取り込まれた化学的異物を分解、解毒するために昆虫が持っているものと考えられる。これらの酵素の殺虫剤に対する作用の強化が殺虫剤抵抗性発達の基本要因である。強化の手段としては該当酵素タンパク質をコードする遺伝子数の増加もしくは転写活性の上昇により酵素をより多く生産するもの、及び薬剤をより効率的に分解するように酵素の形態が変化するのが挙げられる。カルボキシエステラーゼと殺虫剤抵抗性との関わりは古くから指摘され、エステラーゼ活性の増大により抵抗性を発達させた例は数多くの昆虫で報告されている (Yasutomi, 1983)。また、モモアカアブラムシ (*Myzus persicae*)、ワタアブラムシ (*Aphis gossypii*)、ネッタイエカ (*Culex quinquefasciatus*) を中心に殺虫剤抵抗性に関わるエステラーゼ遺伝子の分子生物学的研究も進み、分子レベルで抵抗性とエステラーゼの関係が徐々に明らかにされている (Mouches *et al.*, 1990; Raymond *et al.*, 1991; Field and Devonshire, 1992; Karunaratne *et al.*, 1995; Vaughan and Hemingway, 1995; Vaughan *et al.*, 1997)。

そこで本章第1節では比色法により両系統のカルボキシエステラーゼ活性を測定し、ポリアクリルアミド電気泳動法によりエステラーゼのアイソザイムパターンを調べた。また、前章までに JP_{al}-per 系統の permethrin 抵抗性にチトクロム P450 酸化酵素系が関与していることが示唆されたためにチトクロム P450 酸化酵素系の定量を試みた。

チトクロム P450 酸化酵素系は各種ステロイドホルモン、胆汁酸、脂肪酸といった生体物質の合成、分解反応の他に、薬物や体内に取り込まれた環境汚染物質など外来性異物の酸化解毒に重要な役割を果たしていることが哺乳類を中心に明らかにされ、昆虫においてもホルモンやフェロモンの生合成、ピレスロイド剤をはじめとする殺虫剤など外来性毒物の解毒代謝に深く関与していることが示されてきた (Casida, 1970; Tsukamoto, 1983; Wilkinson, 1983; Oppenoorth, 1985; Brattsten *et al.*, 1986; Scott, 1991)。Permethrin 抵抗性イエバエ(抵抗性比は 1,450 倍)のチトクロム P450 量が

感受性系統の 2.5 倍であったという事例 (Scott and Georghiou, 1985; Lee and Scott, 1989)から、JPal-per 系統においてもチトクロム P450 量の増大がピレスロイド剤抵抗性に関与している可能性が考えられる。よって、第 2 節においてはチトクロム P450 酸化酵素とこの酸化酵素系の構成要素であるチトクロム b_5 を定量し、両系統間で比較することで permethrin 抵抗性への関与を検討した。

第1節 カルボキシルエステラーゼの活性及びアイソザイムパターン

本節では比色法によりカルボキシルエステラーゼ活性を測定し、電気泳動法によってアイソザイムパターンを感受性、抵抗性系統間で比較した。

材料及び方法

1. 供試薬剤

α -および β -naphthyl acetate、 α -および β -naphthol、fast violet BB salt、fast blue RR salt、Tris は Sigma 社より購入した。Sodium dodecyl sulfate、シヨ糖、Triton X-100、Coomassie brilliant blue、牛血清は和光純薬（株）より購入した。

2. 比色法によるエステラーゼ活性の測定

エステラーゼ活性測定法は Asperen (1962)が行った Gomori (1953)の改良法を用いた。基質として α -および β -naphthyl acetate を用いた。ネッタイエカ両系統の4齢幼虫5頭を0.01M Tris-HCl 緩衝液 (pH 8.0) 20ml 中で磨碎し、4°C、10,000 g で15分間遠心分離の後、上清3mlを緩衝液47mlで希釈して酵素液とした。

0.03 M の naphthyl acetate 0.02ml、酵素液 1.0 ml そして緩衝液 1.8ml を含む 3 ml の反応液を 30°C の恒温振とう下でインキュベートし、発色剤である 1.0 % の fast violet BB salt と酵素阻害剤である 5.0 % の sodium dodecyl sulfate を 2 : 5 の割合で混合した溶液を 1.0 ml 加えて酵素活性を阻害し、代謝産物である naphthol を発色させた。反応は 0 分から 20 分まで 10 分おきに 3 回反復行い、それぞれの反応液に阻害・発色剤を加えてから発色が安定する 20 分後に分光光度計 (Shimazu UV-160A、島津製作所) を使用して吸光度を測定した。基質が分解して生成された α -および β -naphthol と発色剤の反応物は α -naphthol で 600 nm、 β -naphthol で 550 nm に吸収極大を持つため、基質が α -naphthyl acetate の場合は 600 nm で、 β -naphthyl acetate の場合は 550 nm で測定した。酵素活性は酵素液の入っていない対照区によって非酵素的分解量を補正し、時間 - 酵素活性の回帰曲線から α -および β -naphthol の分解量を定量した。活性量は、幼虫一頭当たりが 1 分間に分解した naphthyl acetate のモル数 ($\mu\text{mol} / \text{min} / \text{larva}$) と、タンパク 1mg 当たりが 1 分間で分解した naphthyl acetate のモル数 ($\mu\text{mol} / \text{min} / \text{mg protein}$) で表示した。

3. ポリアクリルアミドゲル電気泳動法

ポリアクリルアミドゲル電気泳動法は昆虫実験法（一瀬ら、1980）に従った。ネットアイエカ 4 齢幼虫を両系統より 2 頭ずつ試料用緩衝液（40% ショ糖液 : 0.5% Triton X-100 = 4 : 1）200 μ l とともにガラス製の tefuron homogenizer を用いて磨砕した後、4 $^{\circ}$ C、3,000 rpm で 15 分間遠心分離した上清を酵素液とした。アクリルアミドゲルは濃縮用ゲルに 4.0% を、分離用ゲルに 7.5% を用いた。泳動は各レーンに 10 μ l のサンプルを投入した後、4 $^{\circ}$ C、50 mA で 90 分間行った。泳動後は基質（0.1 M α -naphthyl acetate）2 ml の入った EST 緩衝液（0.1 M $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 、0.02 M Na_2HPO_4 ）50 ml 中、37 $^{\circ}$ C で 5 分間インキュベート後、発色剤（EST 緩衝液に fast blue RR salt を 0.2% に溶解した後濾過）を加えてさらに 15 分間インキュベートし、発色させた。

4. タンパク質の定量

タンパク質の定量は Bradford (1976) の方法に従い、coomassie brilliant blue を用いて行った。タンパク質 - 吸光度標準回帰曲線を得るために、牛血清を標準タンパク質として用いた。

結果

両系統におけるエステラーゼ活性を Table 8 に示した。JPal-per 系統では基質 naphthyl acetate が α 型 β 型に関わらずエステラーゼ活性の増大が認められた。基質が α -naphthyl acetate の場合、幼虫一頭当たりの活性量では感受性系統の 5.3 倍、タンパク質当たりの活性量は 5.2 倍高い値を示した。基質が β -naphthyl acetate の場合も JPal-per 系統でそれぞれ 5.7 倍、5.6 倍活性が高かった。

電気泳動法によるエステラーゼパターンを Fig. 11 に示した。個体間変異を見るために各レーン 2 頭ずつ酵素液を調製したが、系統内での著しい変異は認められなかった。感受性系統ではほぼ等間隔に 6、7 本のバンドが確認でき、naphthyl acetate を分解するアイソザイムが複数存在していることがうかがえるが、特に活性の強いアイソザイムは確認されなかった。一方 JPal-per 系統では分子量の違う 2 本のバンドが確認され、どちらも感受性系統との比較において著しく活性が強かった。しかもこれらのアイソザイムは感受性系統では特に活性が強いわけではなく、特に JPal-per

Table 8 . Carboxylesterase activities in the susceptible and the resistant JPal-per strains of *Culex quinquefasciatus* larvae

Substrate	$\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg} \pm \text{SE}$			$\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg} \pm \text{SE}$		
	Susceptible	JPal-per	Ratio	Susceptible	JPal-per	Ratio
α -naphthyl acetate	0.052 ± 0.001	0.274 ± 0.002	5.3	0.439 ± 0.009	2.30 ± 0.01	5.2
β -naphthyl acetate	0.035 ± 0.003	0.200 ± 0.007	5.7	0.300 ± 0.027	1.68 ± 0.06	5.6

All values are mean \pm SE of three replicates.

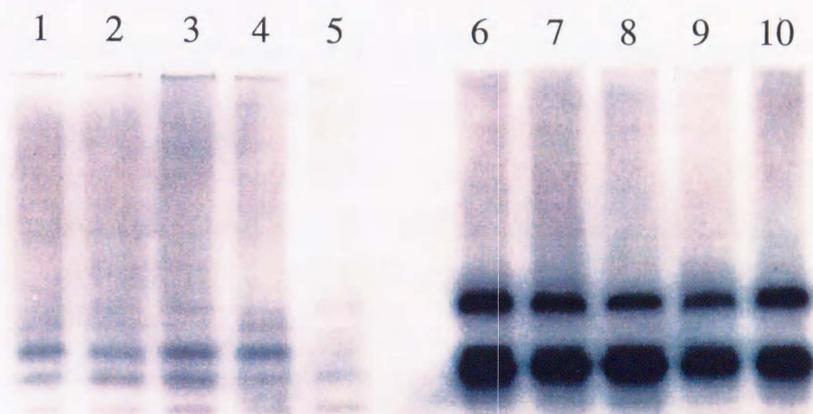


Fig. 11. Polyacrylamide gel electrophoresis patterns of carboxyl esterases in the susceptible and resistant JPAl-per larvae of *Culex quinquefasciatus* larvae. Carboxylesterase patterns were stained using α -naphthyl acetate as a substrate. All samples were prepared from individual larvae. (lane 1-5; susceptible strain, lane 6-10; JPAl-per strain)

の 2 本のバンドの内、分子量の小さいアイソザイムは感受性系統では確認できなかった。

考察

JPal-per 系統は感受性系統と比較してエステラーゼ活性が約 5 倍高く、両系統の活性の違いはおもに 2 つのアイソザイムの活性増大によりもたらされていることが電気泳動法により明らかにされた。ナフチルエステルに対する活性の上昇が殺虫剤抵抗性の要因になっていることがアカイエカ群で最初に確認されたのは 1970 年である (Yasutomi, 1970)。殺虫剤抵抗性に関与したエステラーゼアイソザイムは基質である α -と β -naphthyl acetate に対する分解特異性により便宜的に分類され、CE A、CE B と呼ばれるが、2 つのエステラーゼグループが関与した抵抗性系統を解析するうちに、強い抵抗性系統に特徴的な遺伝子のハプロタイプが存在することも分かってきた。カリフォルニアのネッタイエカ集団では 1970 年代には高活性の B1 が優性であったが (Pasteur *et al.*, 1984)、1980 年代の半ばには高活性の A2 と B2 をもつハプロタイプの頻度が高くなり、現在では野外集団の 90% のカがこれらの 2 つのハプロタイプのいずれかを持っている (Raymond and Pasteur, 1989)。アフリカとアジアのネッタイエカからも高活性の A2 と B2 をもつハプロタイプが見つまっている。JPal-per 系統の持つ活性の高い 2 つのアイソザイムは JPal-per 系統が pemethrin で淘汰される前の JPal 系統が有機リン剤で淘汰された系統で認められるエステラーゼ A2、B2 ではないかと考えられる (Amin and Peiris, 1990)。カリフォルニアのネッタイエカ Tem-R 系統は感受性系統の 500 倍の CE B1 をもち、これは全虫体タンパク質の 6~12% に相当するが (Mouches *et al.*, 1987)、それから比較すると JPal-per 系統の 5 倍という活性比から予想されるエステラーゼの抵抗性への貢献度は低いと言えるかもしれない。

第 2 章、第 2 節において JPal-per 系統はエステラーゼ阻害剤の DEF により抵抗性比が有為に減少しなかったことから permethrin 抵抗性へのエステラーゼの関与は小さいと考えられた。さらに fenitrothion に対しても DEF は共力効果をもたらさなかったことから、fenitrothion 抵抗性にも活性増大したエステラーゼは関与していないと考えられる。しかし、Hemingway *et al.* (1990) によれば JPal 系統の F_1 世代の fenitrothion に対する抵抗性比は本研究の結果同様に 4 倍であったが、同じ有機リン剤の

chlorpyrifos に対して 53 倍もの抵抗性を示している。このことは野外で JPal 系統が chlorpyrifos もしくはその他の有機リン剤散布により淘汰を受け、エステラーゼ活性の強い個体が生き残った結果ある種の有機リン剤にのみ特異的に抵抗性を発達させた、つまり、JPal-per 系統の持つ高活性型エステラーゼはすべての有機リン剤に対応できる抵抗性手段ではなく、基質特異性の高い酵素である可能性がある。このことは Peiris and Hemingway (1990)の報告によっても裏付けられる。すなわち彼らはスリランカで採集された有機リン剤抵抗性ネッタイエカ Pel RR 系統を temephos で 13 世代淘汰した結果、 β -naphthyl acetate 分解活性が淘汰以前の 5 倍に増大し、temephos 抵抗性も 3 倍から 29 倍へと増大したが、permethrin 抵抗性は淘汰前の 2.8 倍から 0.75 倍へとむしろ減少したことを報告している。さらに Pel RR 系統は実験に用いた 8 種の有機リン剤に一様に抵抗性が高まったわけではなく、fenitrothion を初めとする 5 種類の有機リン剤に対しては抵抗性比の有為な増大は認められなかった。これらの事実からも JPal-per 系統で活性増大した 2 つのアイソザイムは permethrin により室内淘汰される以前に既に JPal 系統が保有していた遺伝的形質であり、それが現在に至るまで体内で維持されてはいるもののピレスロイド剤抵抗性に貢献するものではないと考察される。

モモアカアブラムシ (*Myzus persicae*)などのエステラーゼでは殺虫剤による選抜をやめると抵抗性レベルが下がり、これがエステラーゼタンパク量の減少に起因していることが知られている (Sawicki *et al.*, 1980; French-Constant *et al.*, 1988)。最近ではエステラーゼ量の減少が増幅したエステラーゼ遺伝子の転写活性の低下により引き起こされ、それが構造遺伝子 DNA のメチル化に密接に関わっていることまで示されている (Field *et al.*, 1989b)。Permethrin による淘汰をやめて 30 世代近く経過した JPal-per 系統のエステラーゼ活性が感受性系統の 5 倍以上維持されていることは、ネッタイエカのエステラーゼ遺伝子の発現機構がモモアカアブラムシとは異なっていることを示唆している。

第2節 チトクロム P450 酸化酵素系の定量及び体内分布

第2章では酸化酵素阻害剤が JPal-per 系統の permethrin に対する感受性を著しく増大させた。したがって本節ではチトクロム P450 酸化酵素系の構成要素であるチトクロム P450 とチトクロム b_5 の定量を行い、系統間で比較した。

材料及び方法

1. 供試薬剤

p-amidinophenyl)-methanesulfonyl fluoride hydrochloride (*p*-APMSF)、 dithiothreitol (DTT), 1mM 1-phenyl-2-thiourea (PTU)は和光純薬(株)より購入した。EDTA は Sigma 社より購入した。また、sodium dithionite は日本バイエル(株)より供与された。

2. ミクロゾームの調製

供試昆虫は第2章、第1節に準じた。ネッタイエカ4齢幼虫より中腸を抜き取り、中腸とそれ以外の組織に分けた。1試験区につき約500頭分の中腸、それ以外の組織を2-3mlの0.1Mリン酸ナトリウム緩衝液(pH7.5, 1mMEDTA, 1mM *p*-APMSF, 0.1mM DTT, 1mM PTU (エタノールに溶解)を含む) (Ronis *et al.*, 1988)とともに磨砕した。磨砕液はガラスウールで濾過した後、10,000×gで15分間遠心分離し、上清をさらに100,000×gで1時間超遠心分離した。超遠心分離後の沈殿物(ミクロゾーム画分)は、6mlの0.1Mリン酸ナトリウム緩衝液(pH7.5, 1mMEDTA, 0.1mM DTT, 1mM *p*-APMSF含む)に懸濁し、酵素液とした。すべての作業は4℃氷冷下で行い、酵素液は実験当日に調製した。

3. チトクロム P450、 b_5 の定量

チトクロム P450 及び b_5 の定量法は Omura and Sato (1964)の方法に従った。チトクロム b_5 定量のためにテストサンプルに還元剤である sodium dithionite を少量加えて攪拌した後、分光光度計 (Shimadzu UV-160A、島津製作所) にて 400-500 nm における対照サンプルとの差スペクトルを得た。この後、チトクロム P450 定量のため、対照サンプルに sodium dithionite を加えて攪拌後、テストサンプルに一酸化炭素を約 30

秒間ゆっくりと通気し、同様に 400-500 nm 間の差スペクトルを得た。チトクロム b_5 の濃度は差スペクトルの λ_{\max} 値 (ほぼ 425 nm) と 413 nm との吸光度差より吸光係数 185 / cm / mM を用いて算出した。チトクロム P450 の濃度は差スペクトルの λ_{\max} 値 (ほぼ 450 nm) と 490 nm との吸光度差より吸光係数 91 / cm / mM を用いて算出した (Ronis *et al.*, 1988)。

結果

チトクロム P450、 b_5 の差スペクトル及び定量結果を Fig. 12、Fig. 13、Table 9 に示した。チトクロム P450 についてはタンパクが変性し、不活性型になったとき生じる 420 nm のピークが認められず、幼虫が保有する P450 タンパク量をほぼ完全な状態で定量できたものと推定される。チトクロム P450 含量は中腸において感受性系統で 0.53 nmol/mg protein、JPal-per 系統で 1.44 nmol/mg protein で、JPal-per 系統で 2.72 倍高く、中腸以外の組織においては感受性系統で 0.015 nmol/mg protein、JPal-per 系統で 0.042 nmol/mg protein で、JPal-per 系統で 2.80 倍高かった。また、タンパク当たりの含量は中腸で高く、Table 9 より換算すると両系統共に 30 倍以上高い密度で存在していることになる。

チトクロム b_5 についても同様に JPal-per 系統で高い含量が認められ、その比は中腸で 1.68 倍、それ以外の組織で 1.27 倍であった。また、タンパク当たりの密度も中腸で高く、その比は両系統とも 20 倍以上であった。

考察

チトクロム P450 の含量は中腸、それ以外の組織で共に JPal-per 系統において 2.7 倍以上高かった。このことは permethrin に 6,000 倍の抵抗性を示すイエバエ (*Musca domestica*)、LPR 系統の P450 含量が感受性系統の 2.52 倍であったことに一致する (Lee and Scott, 1989)。また、これにともなって P450 が基質を酸化する際に電子を供与するとされるチトクロム b_5 の含量も高くなっており、P450 分子数の増大により電子の需要が増大したことによるのではないかと推測される。第 2 章、第 3 節で酸化

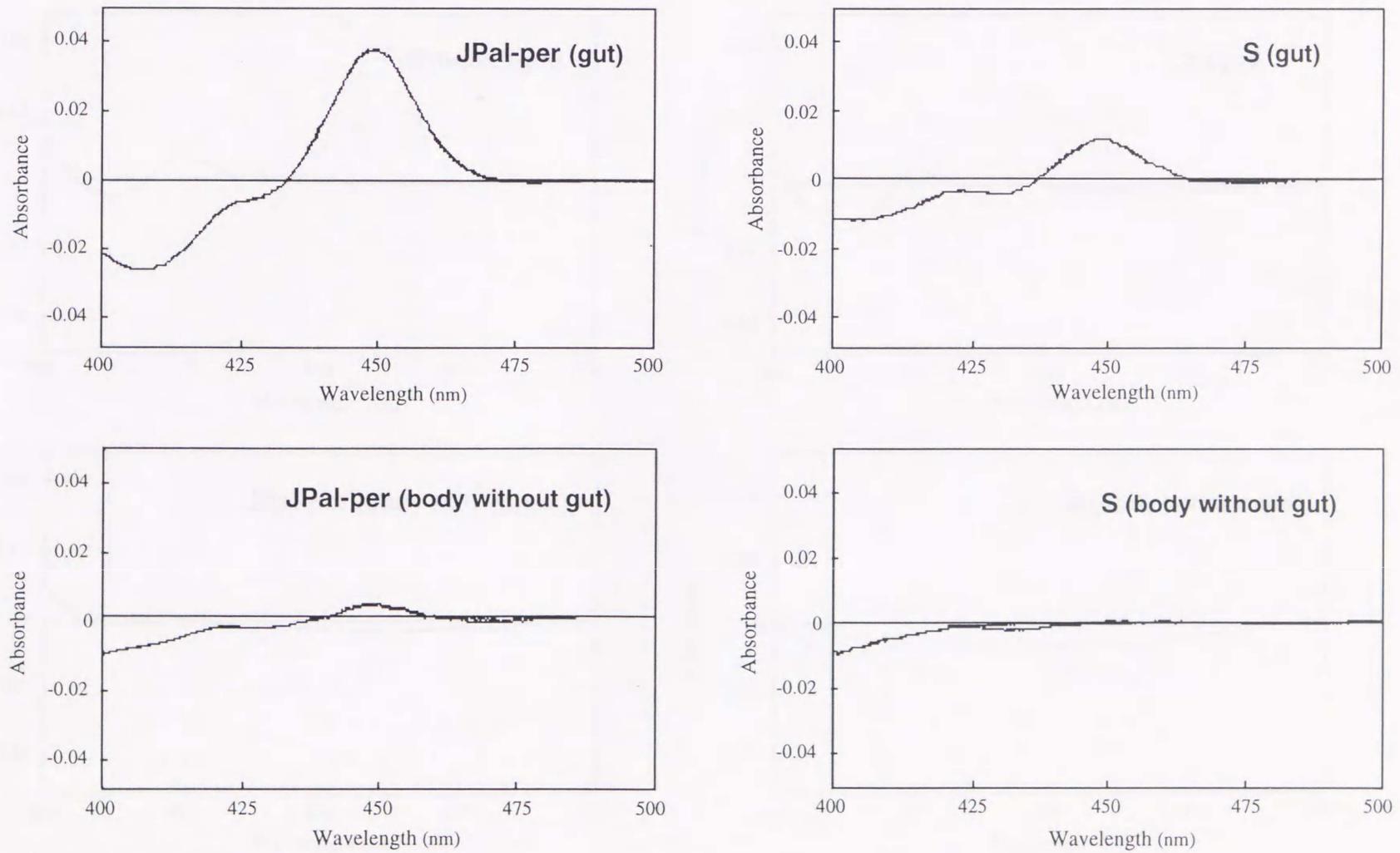


Fig. 12. Reduced carbon monoxide difference spectrum of cytochrome P450 from susceptible (S) and resistant JPal-per larvae of *Culex quinquefasciatus*.

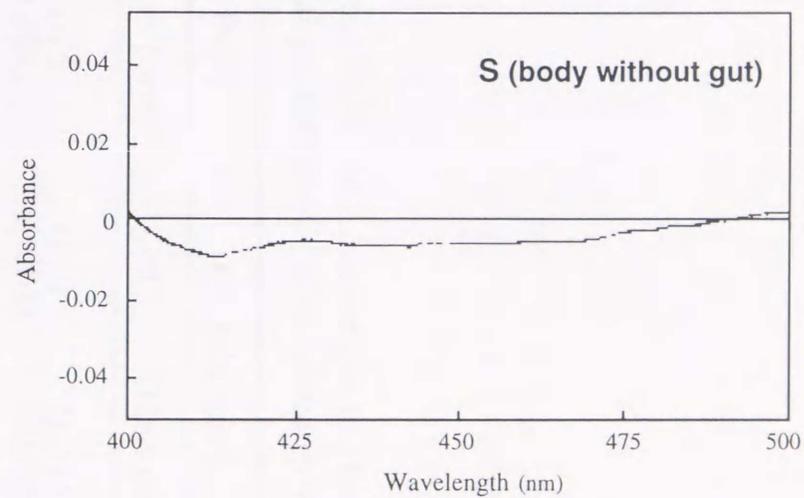
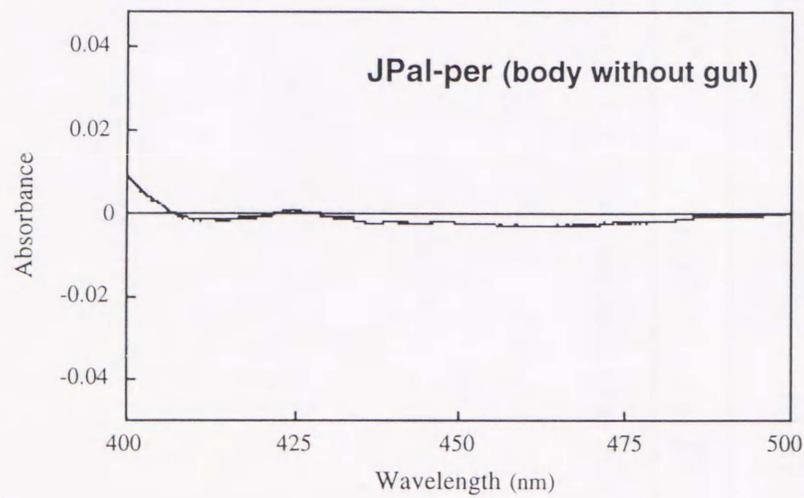
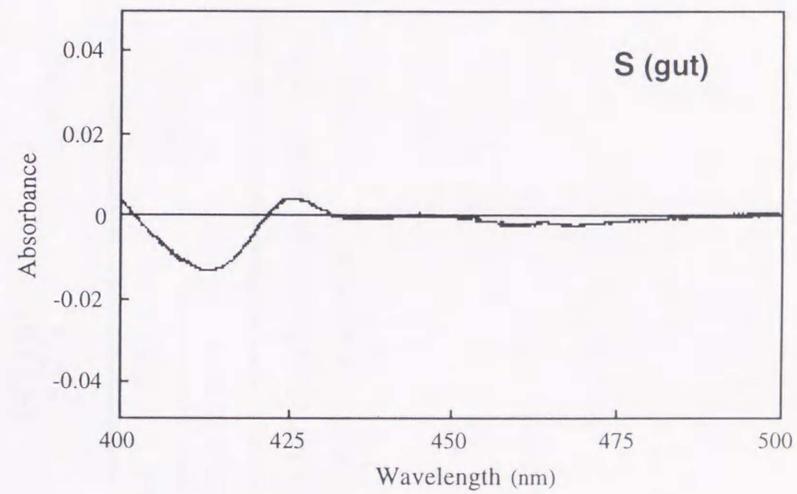
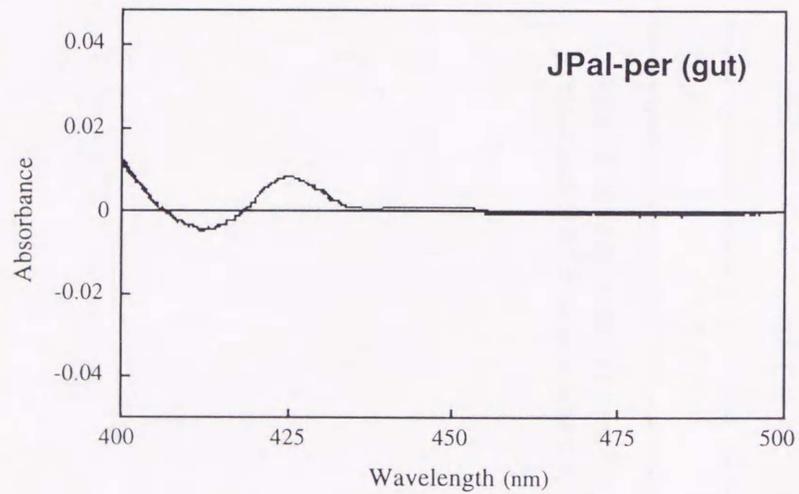


Fig. 13. Spectra of cytochrome b_5 from susceptible (S) and resistant JPAl-per larvae of *Culex quinquefasciatus*.

Table 9. Contents of cytochrome P450 and b₅ in the gut and the other body parts of susceptible and JPal-per larvae of *Culex quinquefasciatus*

Strain	Cytochrome P450		Cytochrome b ₅	
	Gut	Other parts	Gut	Other parts
Susceptible	0.53 ^a (0.026)	0.015 (0.004)	0.31 (0.003)	0.015 (0.004)
JPal-per	1.44 (0.17)	0.042 (0.007)	0.52 (0.093)	0.019 (0.009)
Ratio	2.72	2.80	1.68	1.27

^a Results are expressed as nmol/mg protein. All values are mean of at least three replicates (\pm SE in parentheses).

酵素阻害剤が permethrin 毒性に多大なる共力効果をもたらしたこと、そして本章で JPal-per 系統のチトクロム P450 及び b_5 含量が感受性より高かったことから本系統の permethrin 抵抗性にはチトクロム P450 による解毒が深く関与している可能性がさらに高くなった。

Table 9 をもとに幼虫一頭当たりの P450 含量を計算し、中腸に占める割合を算出した (Table 10)。両系統で有意な差は認められなかったものの、チトクロム P450、 b_5 ともに中腸に約 80% が集中していた。これまでカの幼虫の P450 を定量した報告例はないが、同じ解毒酵素の一種であるカルボキシエステラーゼ活性がカ幼虫の中腸で最も高かったという報告に一致する (Whyard *et al.*, 1994)。ピレスロイド剤抵抗性イエバエ、LPR 系統成虫の P450 は脂肪体に最も多く分布し、全 P450 量の 36-38% を占める。次いで生殖器系 (32-39%)、中腸 (14-19%) の順に多い (Scott and Lee, 1993b)。カ幼虫で 8 割以上の P450 が中腸に分布しているのは、本種幼虫が水棲で、絶えず口器より水を吸入、排出しているため体外より有毒な異物が中腸内へ侵入する可能性が高く、生体防御機構として解毒酵素が中腸に多く存在するものと考察される。

チトクロム P450 は多様なアイソフォーム (分子種) より成る酵素群の総称である。既にイエバエにおいては 8 種類のアイソフォームの存在が確認されている (Feyereisen *et al.*, 1989; Cohen and Feyereisen, 1995; Tomita and Scott, 1995)。CO 差スペクトルによる定量法では、ミクロゾームタンパクに存在する複数種類の総含量が算出されるのみで、ネットイエカが何種類のアイソフォームをもち、そのうちのいずれが JPal-per 系統で過剰に発現しているのか知ることはできない。したがって、さらに個々のアイソフォームについて、特にピレスロイド剤代謝に関与するものの発現量を求めることで 2.7 倍の内訳を明らかにする必要があると考えられた。

Table 10. Distribution of cytochrome P450 and b₅ in the larval gut and the other body parts of *Culex quinquefasciatus* larvae

Tissue	Cytochrome P450		Cytochrome b ₅	
	Susceptible	JPal-per	Susceptible	JPal-per
Gut	87.9%	84.5%	81.0%	75.0%
Other body parts	12.1%	15.5%	19.0%	25.0%

第4章 Permethrin の *in vitro* 代謝

殺虫剤抵抗性機構の中で解毒酵素の代謝活性の増大は標的器官の薬剤感受性低下と共に最も重要であり、これに関して多くの研究がなされている。抵抗性に解毒酵素が関与しているか否かを検討する方法としては、目的とする酵素の活性阻害剤を殺虫剤とともに処理し、その共力効果を確認するのが一般的である。しかし、ほとんどの共力剤はそれ自体が毒性を有することから、共力効果により解毒酵素の関与を判定することが困難な場合がある。それゆえ解毒酵素と抵抗性とのかかわりを殺虫剤代謝試験により直接的に調べる手段がより確実と言える。代謝活性を測定する方法としては比色法により非放射性化合物を基質として分光光学的に測定する場合や、放射性同位元素標識化合物を基質として代謝産物をクロマトグラフィー等により定性、定量する場合がある。比色法は手法が簡便である反面、実際の基質とは異なる疑似的化合物の代謝活性を測定する機会が多く、得られた結果が殺虫剤の代謝活性をそのまま反映しないこともある。一方、後者は実際に殺虫剤を基質として活性を測定するため、生体内で起こっている現象をより現実的に評価できる方法といえる。

ピレスロイド剤の代謝に関する研究は古くからなされており、解毒にエステラーゼやチトクロム P450 酸化酵素が重要な働きをしていることは *in vivo* における代謝試験で明らかにされている (Casida *et al.*, 1975; Miyamoto, 1976)。それはエステラーゼ阻害剤の TEPP (tetraethyl pyrophosphate) がエステル基の加水分解を阻害することやチトクロム P450 酸化酵素系の補酵素である NADPH の存在下でのみ酸化的代謝がなされることから確認された (Soderlund and Casida, 1977a,b)。またそのような阻害剤や補酵素に関する研究の進歩により加水分解酵素であるエステラーゼと酸化酵素であるチトクロム P450 酸化酵素系の働きを個々に調べることも可能になった。

天然ピレスリンの誘導体として合成された第一世代合成ピレスロイド剤 (allethrin, dimethrin, resmethrin, tetramethrin など) はイソブテニル置換基のメチル基が水酸化され易く (Elliott *et al.*, 1972)、また光分解を受けやすいという欠点から用途は家庭用、防疫用に限られ、農業用としては使用されなかった。その後、酸化的に不安定なイソブテニル基をジハロビニル基に、またアルコール部分をフェノキシベンジル基に置換した、殺虫剤としての活性の高い化合物が開発された (Elliott, 1977; Itaya *et al.*, 1977;

Ruzo and Casida, 1977)。Permethrin を含めたこれらの殺虫剤がいわゆる第二世代合成ピレスロイド剤である。ところが解毒酵素の攻撃を受けにくく、光分解に安定で、さらに非常に強い殺虫力を持つことから理想的な殺虫剤といわれたこれらの新規ピレスロイド剤もそれまでの殺虫剤の例に漏れず抵抗性を示す昆虫が出現することとなった (Keiding, 1976; Ruscoe, 1977)。これら抵抗性害虫の出現にともないピレスロイド剤の代謝試験も詳細に行われ、昆虫の permethrin 代謝経路は Shono *et al.* (1978, 1979)によってワモンゴキブリ (*Periplaneta americana* L.)、イエバエ (*Musca domestica* L.)、イラクサギンウワバ (*Trichoplusia ni* Hubner)を用いて明らかにされた。

前章までに、チトクロム P450 酸化酵素の阻害剤が強く共力効果を示したこと、そして JPal-per 系統のチトクロム P450 量が感受性系統の 2.7 倍であったことから、JPal-per 系統の permethrin 抵抗性にチトクロム P450 酸化酵素による解毒が関与していることが示唆された。したがって本章では放射性同位体で標識された permethrin を用い、*in vitro* の代謝試験を行うことでそれらの関係を直接的に証明することを試みた。

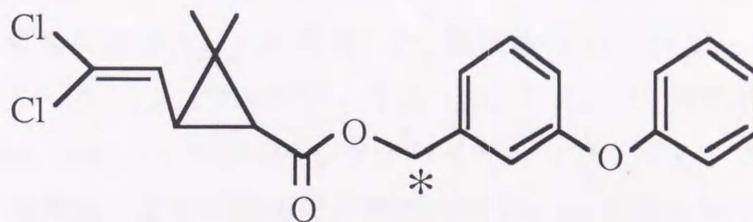
第1節 内在性代謝阻害物質の存在

JPal-per 系統の4齢幼虫より酵素を調製し、*in vitro* 代謝試験を試みたが、酸化酵素由来の代謝活性は認められなかった。そこで本節では幼虫体内に存在すると考えられた代謝阻害物質について検討した。

材料及び方法

1. 供試薬剤

代謝試験に用いた permethrin の化学構造、標識部位及び放射活性量を以下に示す。



[1RS, *trans*] Permethrin

MW = 391

Specific Activity = 57 m Ci / m mol

(* は標識部位を示す)

¹⁴C permethrin は実験前に TLC (thin layer chromatography) プレート (silica gel 60 F254, 20×20 cm, 0.5 mm) にて展開し、ゲルを回収、ベンゼンにて抽出した後、窒素気流にて蒸発乾固し、精製した。精製後の permethrin はメタノールにて 11,000 dpm/μl (183 Bq/μl) の濃度に溶解し、実験に用いた。標準代謝物として用いた 4'-hydroxy-3-phenoxy-benzyl 3-(2, 2-dichlorovinyl)-2, 2-dimethylcyclopropane carboxylate (4'-HO-permethrin)、3-phenoxy-benzyl alcohol (PB alcohol)、3-phenoxy-benzyl acid (PB acid) は住友化学工業 (株) より提供された。

2. *In vitro* 代謝試験

実験には JPal-per 系統の 4 齢幼虫を用いた。*In vitro* の permethrin 代謝試験は Shono らの方法 (1979) を改良して行った。マイクロゾームの調製は第 3 章、第 2 節の方法に準じた。0.8 ml リン酸ナトリウム緩衝液 (0.1 M)、1.0 ml ミクロゾーム (50 頭分)、10 μ l [14 C] permethrin (110,000 dpm、0.34 μ g) を 10 ml ガラス試験管 (PYREX、岩城硝子) 中で混合し、25°C の恒温槽で 5 分間プレインキュベートした。0.2 ml の β -NADPH (10 mM) を添加することで反応を開始し、25°C で振とう下 2 時間インキュベートした後、0.2 ml の 1 N HCl と 1.0 g の $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ を加えることで反応を終了した。反応物は 4 ml のジエチルエーテルで 3 回抽出し、0.5 g の無水 Na_2SO_4 で -20°C 下、一晚脱水した。抽出物は窒素気流により乾燥後、メタノールにて 10,000 dpm / 10 μ l の濃度に調製した。標識化合物の回収率はこの条件下でほぼ 90% 以上であった。メタノールに溶解した抽出物は 10 μ l を TLC プレート (silica gel 60 F254、20 \times 20 cm、厚さ 0.25 mm、Melck 社製) にスポットし、TEM 展開溶媒 (トルエン : 酢酸エチル : メタノール = 15 : 5 : 1) にて非標識代謝物とともに展開した。展開後の TLC プレートは BAS-III フジイメージングプレート (フジフォトフィルム (株)) にて 12 時間感光後、各代謝物の放射活性を Bas 2000 バイオイメージアナライザー (フジフォトフィルム (株)) にて測定した。非標識の標準代謝物は共展開の後 254 nm の紫外線下で観察し、その R_f 値より代謝物の同定を行った。なお、予備試験において全虫体より調製したマイクロゾームからは酸化酵素由来の代謝活性がほとんど認められなかったため、中腸から内容物を取り除いた組織より調製した酵素液についても同様に試験を行った。さらに、中腸内容物 50 頭分を 0.1 M リン酸ナトリウム緩衝液中で磨碎し、10,000 \times g で遠心分離した上清を中腸以外の組織由来の酵素液に加えた場合についても同様にを行った。すべての実験は 3 回反復して行い、平均値をデータ解析に用いた。

結果

JPal-per 系統の全虫体、中腸及び中腸以外の組織のマイクロゾームによる permethrin の代謝率と、各代謝物の回収放射活性に占める割合 (%)、そして中腸内容物の代謝活性に及ぼす影響を Fig. 14、Table 11 に示した。全虫体由来の酵素液における代謝率は 8.3% であり、2 時間のインキュベートで permethrin はほとんど代謝されなかつ

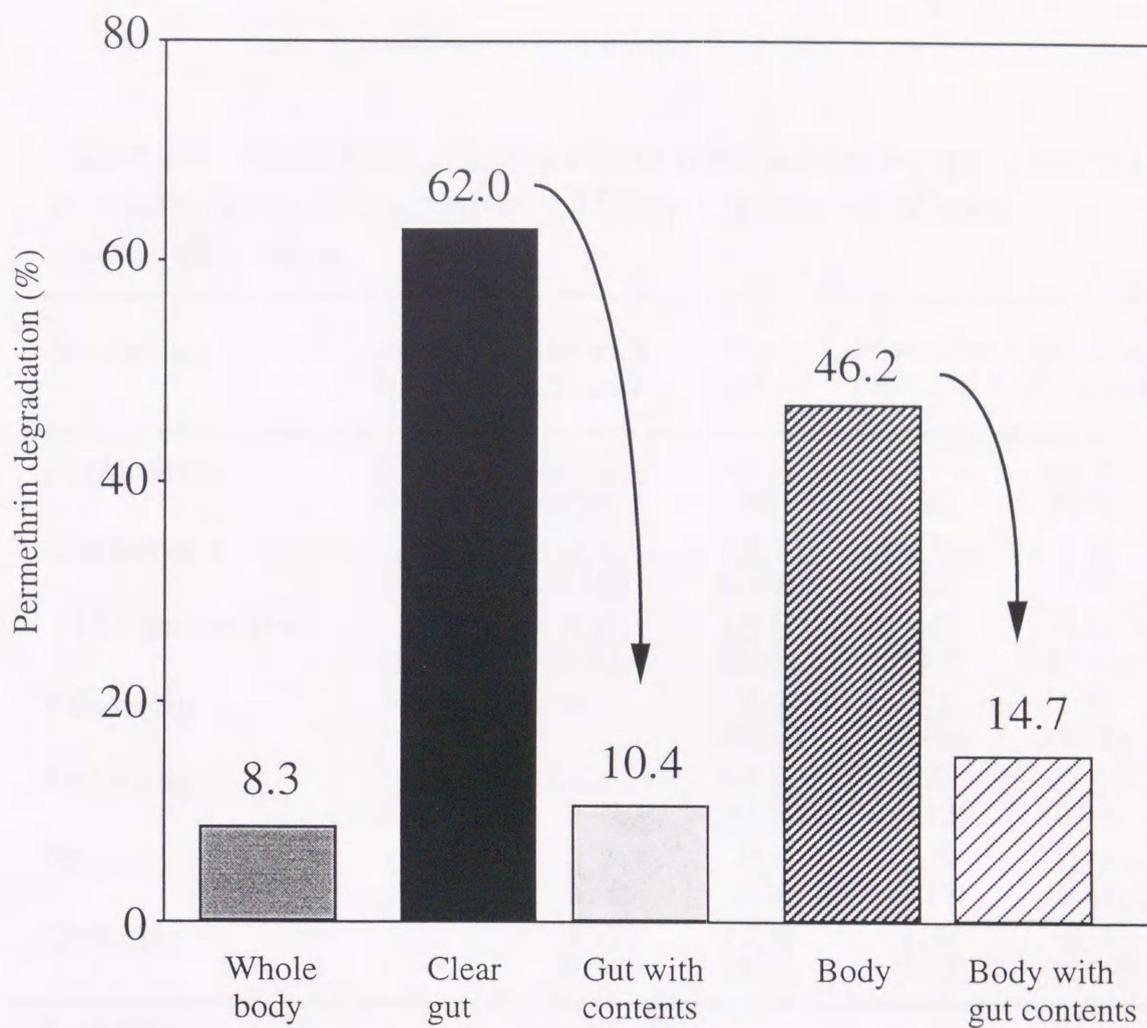


Fig. 14. Effects of gut contents on *in vitro* permethrin metabolism. All tests were done using JPal-per larvae under the presence of NADPH.

Table 11. Inhibition of permethrin metabolism by gut contents in microsomes of the resistant JPal-per larvae of *Culex quinquefasciatus*

Metabolite	Whole body	Gut with contents	Clear gut	Other body parts	Other body parts with gut contents
Permethrin	91.7 (0.20)	89.6 (0.26)	38.0 (1.66)	53.8 (0.55)	85.3 (0.27)
Unknown 1	5.4 (0.15)	2.1 (0.09)	12.2 (0.30)	19.8 (0.15)	7.3 (0.09)
4'HO-permethrin	1.4 (0.06)	4.0 (0.43)	15.9 (0.45)	13.0 (0.25)	4.3 (0.12)
PB-alcohol	—	—	3.3 (0.03)	2.3 (0.00)	1.0 (0.03)
Unknown 2	1.1 (0.03)	—	2.8 (0.06)	1.7 (0.12)	0.5 (0.03)
PB-acid	0.4 (0.03)	2.7 (0.17)	8.9 (0.20)	2.5 (0.15)	0.9 (0.23)
Origin	—	1.6 (0.09)	18.9 (0.80)	6.9 (1.02)	0.7 (0.09)
% of total metabolites	8.3	10.4	62.0	46.2	14.7

Results are expressed as a percentage of the recovered dose. All values are mean of triplicated experiments (\pm SE in parentheses).

た。次に幼虫を中腸とそれ以外の組織に分け、さらに中腸の内容物を取り除いたものと取り除かなかったものからそれぞれ酵素液を調製して実験を行ったところ、内容物を含んだ中腸では代謝率が 10.4%であったのに対し、内容物を取り除いた中腸では 62.0%であった。これにより代謝酵素の活性を阻害していた物質が中腸の内容物中に存在していることが推測された。次に中腸より取り出した内容物を緩衝液中で磨碎し、遠心分画で得られた上清を、中腸以外の組織より調製したマイクロゾームへ添加して活性を測定したところ、無添加条件で 46.2%の代謝活性であったのに対し、添加下で 14.7%に減少した。このことから、中腸内容物中に代謝酵素活性阻害物質が存在することが明らかにされた (Fig. 14)。また、代謝物の種類とその割合は、permethrin の 3-phenoxybenzyl 基の 4' 位置が水酸化された 4' HO-permethrin が、内容物を取り除いた中腸で 15.9%であったのに対し、全虫体、内容物入りの中腸ではそれぞれ 1.4、4.0%と有意に少なかった。また、この傾向は中腸以外の組織と、それに中腸内容物抽出液を添加した場合においても認められ、4' HO-permethrin の割合はそれぞれ 13.0、4.3%であった (Table 11)。水酸化は酸化酵素チトクロム P450 に特有な反応であるため、中腸内容物が阻害していた酵素はチトクロム P450 酸化酵素であることが明らかになった。

考察

第 1 節で述べたように、カ幼虫を材料にした薬物の *in vitro* 代謝試験の報告は現在まで一報あるのみである (Shrivastava *et al.*, 1970)。この中で彼らはカーバメート剤抵抗性 *Culex pipiens fatigans* (アカイエカ群の一種)において propoxur の hydroxy-及び *N*-demethyl 代謝物への代謝活性が感受性系統よりも高かったことを報告している。共力剤を用いた殺虫試験により、カのピレスロイド剤抵抗性にチトクロム P450 酸化酵素系が関与していることを示唆した報告は古くから存在している (Priester and Georghiou, 1978; Kumar *et al.*, 1991)。しかし、数多くの昆虫種でピレスロイド剤がチトクロム P450 酸化酵素系により代謝されることが示されているにもかかわらず、カに関するピレスロイド剤代謝の報告はない。このような事実はカを用いた代謝試験が何らかの理由により困難であったことを推測させる。今回、幼虫を中腸とそれ以外の組織にわけ、さらに中腸より内容物を取り除くことで permethrin 代謝活性の測定

が可能になった。中腸内の阻害物質の存在がカのチトクロム P450 に関する研究をこれまで阻んできたものと思われる。またこの知見は今後カの殺虫剤抵抗性機構に関する研究はもとより、抵抗性以外の内生ホルモン、フェロモンの生合成のようなチトクロム P450 酸化酵素が関わっているとされる研究分野にも貢献しうると推察される。

昆虫の全虫体より酵素液を調製したとき発生する内在性物質が *in vitro* 代謝を阻害することは古くから指摘されていた(Wilkinson and Brattsten 1972; Brattsten and Wilkinson 1973)。チトクロム P450 酸化酵素系の構成因子であるチトクロム P450 還元酵素の活性がある種のプロテアーゼに阻害されること(Krieger and Wilkinson, 1970; Orrenius *et al.*, 1971; Krieger and Lee, 1973)、還元酵素は阻害せず P450 自身を阻害する物質が中腸内に存在すること (Valles and Yu, 1996)、目の色素中に含まれる物質 (キサントマチン) が基質酸化の際に必要な電子の受け渡しを阻害すること(Schonbrod and Terriere, 1972; Wilson and Hodgson, 1972) (本研究においては頭部磨砕液に含まれる目の色素は酸化酵素を阻害しないことを確かめている。データ未掲載)、さらに中腸より抽出された核酸 (RNA)がマイクロゾームの酸化を阻害することが報告されている (Gilbert and Wilkinson, 1975) (本研究では RNA の存在下でも代謝活性が認められたため、この可能性はない)。しかしカ幼虫における阻害物質の構造、阻害機構及びその本来の機能に関しては今のところ不明である。

カ幼虫において唯一の報告である、カーバメート剤代謝試験 (Shrivastava *et al.*, 1970)で幼虫全体から調製したマイクロゾーム画分より酸化的代謝物が得られた実験においても中腸内容物を取り除けばさらに大きな差が得られた可能性がある。哺乳動物、昆虫体内には数多くのチトクロム P450 アイソフォームが存在していることが知られており、それぞれに基質特異性があるとされている (Nelson *et al.*, 1993; Cohen and Feyereisen, 1995; Dunkov *et al.*, 1996)。カーバメート剤とピレスロイド剤の酸化的代謝が同一の P450 アイソフォームによるものではないとしたら、カーバメート剤代謝に関与するチトクロム P450 酸化酵素は中腸内容物により代謝阻害を受けなかったため、代謝試験が可能になったとも考えられる。

第2節 代謝活性と温度の関係

通常昆虫の *in vitro* 代謝試験は 30°C 恒温下で行われるが、カ幼虫における *in vitro* 代謝試験の唯一の報告 (Shrivastava *et al.*, 1971) では、チトクロム P450 酸化酵素系の活性は 30°C よりも 25°C で高かったとある。したがって本節では代謝試験を最適な温度条件下で行うために、permethrin 代謝活性と温度の関係について検討した。

材料及び方法

材料はすべて JPal-per 系統の 4 齢幼虫を用いた。代謝試験の方法は第 1 節に準じた。ただし、代謝反応は 25°、30° 及び 37°C で行った。すべての温度条件には同じ酵素液を用いた。ミクロゾーム画分は中腸以外の組織より調製し、100,000×g 上清画分は中腸より調製した。ミクロゾーム画分の反応には NADPH を添加した。なお、上清画分、ミクロゾーム画分共に一試験区当たり 50 頭当量の酵素液を用いた。実験は 3 回反復で行った。

結果

各画分の permethrin 代謝率と温度との関係を Table 12 に示した。ミクロゾーム画分では、反応温度が 25°、30°、37°C と上昇するに従い代謝率が 46.2、29.0、8.3% と減少し、25°C で最も代謝活性が高かった。この傾向は各代謝物すべてにおいて認められ、特にチトクロム P450 酸化酵素系によって代謝される 4'HO-permethrin は 25°C で 13.0% を占めていたのに対し 37°C では Bas 2000 バイオイメージアナライザーによって検出できないほど微量、もしくは全く生産されなかった。これに対し上清画分においては反応温度が 25°、30°、37°C と上昇するにしたがって総代謝率が 24.6、33.1、38.2% と増大し、代謝活性は 37°C で最も高かった。また、上清画分の代謝物のほとんどは、permethrin のエステル基が加水分解されて生じる PB alcohol とその二次的代謝によって生じる PB acid であった。

Table 12. Relationship between incubation temperature and permethrin metabolism in *Culex quinquefasciatus* larvae

Metabolite	Other body parts (microsome) +NADPH			Gut (supernatant)		
	25°C	30°C	37°C	25°C	30°C	37°C
Permethrin	53.8 ^a (0.55)	71.0 (0.64)	91.7 (0.10)	75.4 (0.15)	66.9 (0.52)	61.8 (0.95)
Unknown 1	19.8 (0.15)	15.4 (0.13)	4.8 (0.09)	—	—	—
4'HO-Permethrin	13.0 (0.25)	8.5 (0.26)	—	—	—	—
PB-alcohol	2.3 (0.00)	1.2 (0.06)	5.7 (0.07)	20.0 (0.12)	26.9 (1.25)	13.2 (0.09)
Unknown 2	1.7 (0.12)	0.4 (0.09)	—	—	—	—
PB acid	2.5 (0.15)	1.3 (0.28)	1.7 (0.00)	4.1 (0.07)	6.2 (0.86)	24.2 (0.97)
Origin	6.9 (1.02)	2.2 (0.41)	1.1 (0.09)	0.5 (0.12)	—	0.8 (0.10)
Total metabolites	46.2	29.0	8.3	24.6	33.1	38.2

^a Resultus are expressed as a percentage of the recovered dose. All values are mean of triplicated experiments (\pm SE in parentheses).

考察

本章では第 3 節以降で代謝試験を行う上での最適反応温度の検討を行った。一般的には代謝反応は哺乳動物で 37°C、昆虫では 30°C で行うのが通常である。しかし、反応温度を 25°、30°、37°C で行ったところ、ミクロゾームによる酸化的代謝は 25°C で最も高かった。これはカ幼虫ミクロゾームの代謝に関する由一の報告例である *Culex* 属のカーバメート代謝試験の結果と一致した (Shrivastava *et al.*, 1971)。この結果は本種幼虫が棲息する熱帯、亜熱帯の水温がおおよそ 25°C であることに関係があるものと考察される。標準代謝物と一致しなかった代謝物 Unknown 1 は 25°C で最も多く検出されたことから 4' HO-permethrin 同様にチトクロム P450 酸化酵素による代謝産物であると推定された。

チトクロム P450 酸化酵素の活性が 25°C で最も高かったのに対し、上清画分では 37°C で最も代謝率が高かった。上清画分には補酵素 NADPH を添加しておらず、得られた代謝物が permethrin のエステル基が加水分解されることによって生じる PB alcohol と PB acid であったことから、これらの代謝物はエステラーゼの代謝産物であろう。PB acid の割合が 37°C で 24.2% を占め、その他の反応条件に比べて最も高い値を示したが、これは PB alcohol から PB acid への代謝が 37°C で高かったものと考察される。温度の影響がチトクロム P450 酸化酵素とエステラーゼで違いが認められた理由は不明である。

第 3 節 Permethrin の *in vitro* 代謝

前節までの実験で代謝活性を適切に測定する条件が整えられたため、本節では実際にミクロゾーム、上清画分の permethrin 代謝活性を測定し、系統間で比較することで JPal-per 系統の permethrin 抵抗性に対するチトクロム P450 酸化酵素系の関わりを検討した。

材料及び方法

供試昆虫は第2章、第1節に準じた。*In vitro* 代謝試験は第1、2節の方法に準じて行った。ただし、反応温度は第2節の結果より、25℃とした。また、本章では permethrin 抵抗性と代謝の関わりを調べる目的により、JPal-per、感受性両系統から酵素液を調製し、実験に用いた。第1節において中腸内容物中に酸化的代謝を阻害する物質の存在が示唆されたため、すべての中腸からは内容物を取り除いて酵素液を調製した。

結果

中腸マイクロゾーム画分における代謝産物の TLC の結果を Fig. 15 に示した。チトクロム P450 酸化酵素系の補酵素である NADPH 無添加の条件では permethrin がほとんど代謝されていないのに対し、NADPH 存在下では両系統で酸化的代謝物が検出された。さらに、代謝物の割合は抵抗性 JPal-per 系統で高い傾向が認められた。この結果をもとにそれぞれの代謝物を定量し、全放射活性に対する割合をまとめたのが Table 13 である。NADPH 非存在下では中腸、それ以外の組織で両系統ともに代謝率は6.0%以下であった。それに対し、NADPH 存在下では抵抗性系統の中腸で62.0%、それ以外の組織で46.2%と高い permethrin 代謝活性が認められた。それに対し、感受性系統における代謝率は中腸で12.1%、それ以外の組織ではわずかに2.3%であり、系統間で大きな違いが認められた。NADPH 存在下における系統間の代謝率の比は中腸で5.1倍、中腸以外の組織で20倍であり、特に JPal-per 系統では中腸以外のマイクロゾーム画分における代謝活性に著しい増大が認められた。また、NADPH 非存在下条件で確認されなかった PB alcohol が JPal-per 系統における NADPH 存在下で確認された。

上清画分における代謝を Table 14 に示した。上清画分では中腸が高い代謝活性を示し、代謝率は感受性、JPal-per 系統でそれぞれ19.0、24.6%であった。しかし、中腸以外の組織における代謝率は両系統ともに4%以下であった。主要な代謝物は PB alcohol と PB acid で、これらの代謝物はエステラーゼにより加水分解された結果生じたものであると考えられる。

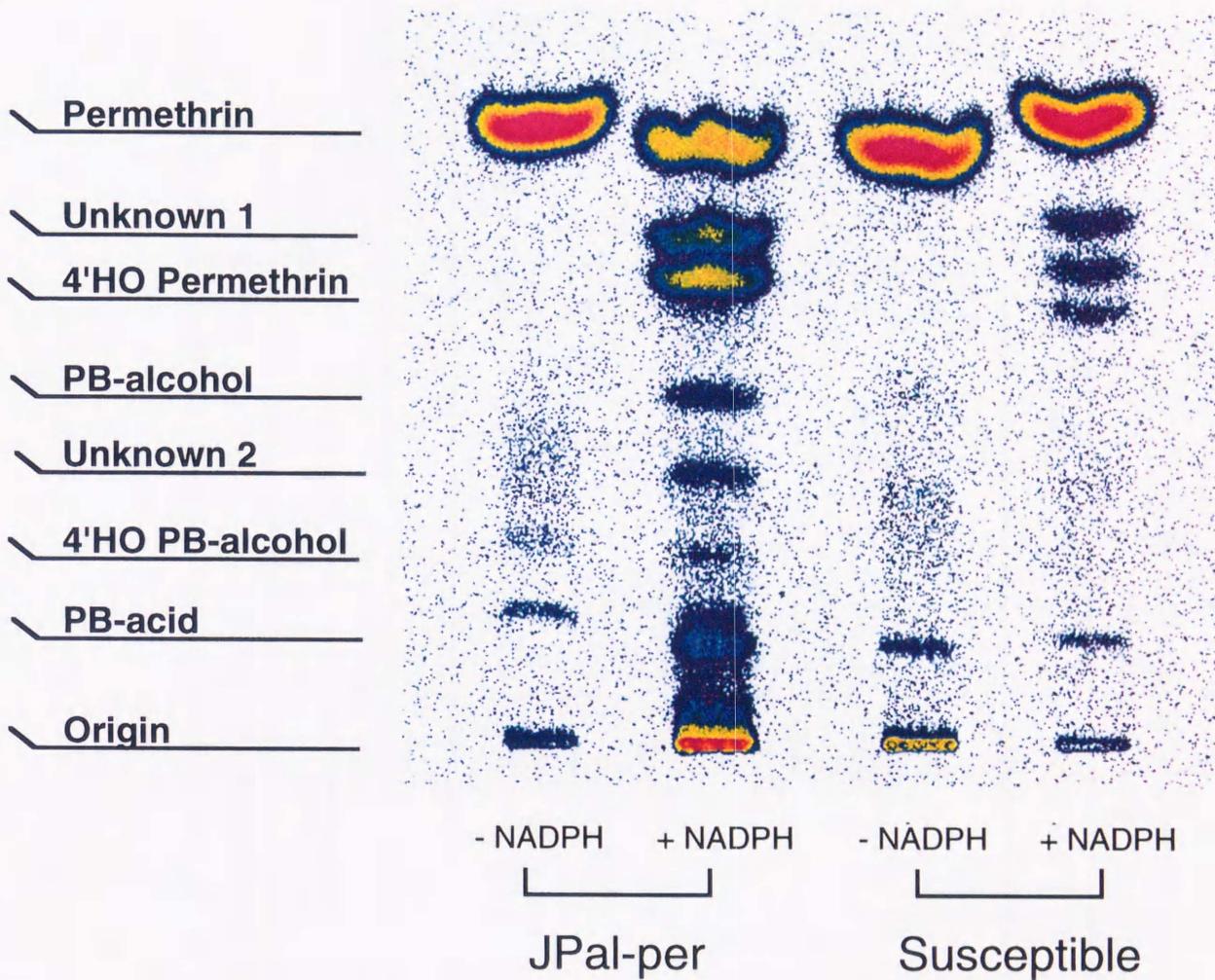


Fig. 15. Thin layer chromatography of permethrin metabolited by gut microsomal fractions.

Table 13. Metabolism of ^{14}C -permethrin by microsomal fractions of the susceptible and the resistant JPal-per *Culex quinquefasciatus* larvae

Metabolite	Susceptible				JPal-per			
	Gut		Other body parts		Gut		Other body parts	
	NADPH	-	+	-	+	-	+	-
Permethrin	98.1 (0.35)	87.9 (0.58)	99.1 (0.03)	97.7 (0.12)	94.0 (0.94)	38.0 (1.66)	98.7 (0.13)	53.8 (0.55)
Unknown 1	—	3.5 (0.20)	—	—	—	12.2 (0.30)	—	19.8 (0.15)
4'HO-Permethrin	—	4.9 (0.06)	—	1.8 (0.09)	—	15.9 (0.45)	—	13.0 (0.25)
PB alcohol	—	—	—	—	—	3.3 (0.03)	—	2.3 (0.00)
Unknown 2	—	—	—	—	—	2.8 (0.06)	—	1.7 (0.12)
PB acid	1.2 (0.15)	1.7 (0.33)	0.9 (0.03)	0.5 (0.06)	2.9 (0.46)	8.9 (0.20)	—	2.5 (0.15)
Origin	0.7 (0.20)	2.0 (0.43)	—	—	3.1 (0.52)	18.9 (0.80)	1.3 (0.13)	6.9 (1.02)
% of total metabolites	1.9	12.1	0.9	2.3	8.9	62.0	1.3	46.2

Results are expressed as a percentage of the recovered dose.

All values are mean of triplicated experiments (\pm SE in parentheses).

Table 14. Metabolism of ¹⁴C-permethrin by supernatant fractions of the susceptible and resistant JPal-per *Culex quinquefasciatus* larvae

Metabolite	Susceptible		JPal-per	
	Gut	Other body parts	Gut	Other body parts
Permethrin	81.0 (0.90)	98.9 (0.06)	75.4 (0.15)	96.3 (0.12)
Unknown 1	—	—	—	—
4' HO-Permethrin	—	—	—	—
PB alcohol	2.9 (0.23)	0.3 (0.03)	20.0 (0.12)	1.3 (0.22)
Unknown 2	—	—	—	—
PB acid	16.1 (0.66)	0.8 (0.00)	4.1 (0.07)	1.4 (0.22)
Origin	—	—	0.5 (0.12)	1.0 (0.18)
% of total metabolites	19.0	1.1	24.6	3.7

Results are expressed as a percentage of recovered radioactivity. All values are mean of triplicated experiments (\pm SE in parentheses).

考察

NADPH 非存在下でカ幼虫のミクロゾーム画分にほとんど permethrin 代謝活性が認められなかったことは、本種幼虫のミクロゾーム画分にカルボキシエステラーゼがほとんど存在しないことを意味する。このことはミクロゾーム中にもエステラーゼ活性が認められるイエバエ(*Musca domestica*)の例とは異なる (Shono *et al.*, 1979)。また、unknown 1 や origin で認められる代謝物の大部分は NADPH 依存性であることから、これらもチトクロム P450 酸化酵素由来の代謝物であると考えられる。また、このことは、第 2 節においてこれらの代謝物の割合と反応温度に逆相関が認められたことによりチトクロム P450 酸化酵素由来の代謝物であろうという推測を支持する。

中腸以外の組織における代謝活性に系統間で 20 倍もの差が認められたことは、JPal-per 系統が皮膚から浸入した殺虫剤が標的器官の神経軸索へ到達する前に速やかに解毒する機構を備えていることを意味する。代謝物の内訳をみると、感受性系統で unknown 1 は検出限度以下、4'HO-permethrin は 1.8%であったのに対し JPal-per 系統ではそれぞれ 19.8、13.0%生成されており、本系統では permethrin からこれらの物質への酸化が主要な代謝経路となっていることが推察される。また、主要なチトクロム P450 酸化酵素由来の unknown 1、4'HO-permethrin、origin 上の代謝物は感受性系統との比が必ずしも一定ではないことから、それぞれは同一のチトクロム P450 アイソフォームにより生成されたものではないことが示唆された。すなわち、本種幼虫においても他の昆虫同様に複数のアイソフォームが存在している可能性が高いと思われる (Cohen and Feyereisen, 1995; Dunkov *et al.*, 1996)。NADPH が添加されることで PB alcohol や PB acid の量が増加したことは、これらの代謝物がエステラーゼのみならず、チトクロム P450 酸化酵素系によっても生成されることを示唆している。

第 2 章、第 2 節の permethrin 殺虫試験でエステラーゼ阻害剤の DEF を処理した時抵抗性比が 1,650 倍から 1,260 倍へと減少し、エステラーゼが僅かながら抵抗性に関与していることが示唆されたが (Table 3)、実際に上清画分において抵抗性系統でやや高い代謝活性が認められたため、エステラーゼが主要な代謝酵素ではないものの抵抗性の要因として多少の働きをしていることが示された。しかし、24.6%の代謝率は決して少ないとは言えない。殺虫試験に用いた permethrin は異性体比(*trans* : *cis*)が 45 : 55 の混合物であるのに対して本実験に用いた ¹⁴C-permethrin は *trans* 体である。

一般に *trans* 体は *cis* 体に比べてエステラーゼにより加水分解されやすいとされることから (Shono *et al.*, 1978; Ishaaya and Casida, 1981)、*trans* 体と *cis* 体の混合物である permethrin 製剤ではエステラーゼにより代謝される割合はさらに低いと予想される。

第3章、第2節ではチトクロム P450 やチトクロム b_5 の 80% 以上は中腸に存在することが明らかにされたが (Table 10)、上清画分の加水分解活性も中腸でそれ以外の組織の 7~19 倍活性が高かったことより、エステラーゼについてもその大部分が中腸に分布していることが明らかとなった。このことは、同じイエカに属する *Culex tarsalis* の malathion 抵抗性系統の malathion 加水分解活性が中腸で最も高かったことに一致する (Whyard *et al.*, 1994)。カ幼虫において異物が外部から侵入する可能性が最も高いのは中腸であり、ここに解毒酵素を備えておくことは幼虫の生存にとって最も重要なことであると推定される。また、ミクロゾーム画分において、感受性系統中腸の代謝活性はそれ以外の組織の約 6 倍高く、チトクロム P450 やチトクロム b_5 の体内分布の結果をよく反映していたが、JPal-per 系統における代謝率は中腸で 62.0%、それ以外の組織で 46.2% あり、感受性系統ほどの組織特異性は認められなかった。このことは中腸以外の組織には代謝能が高く、質的に変化した分子種が存在している可能性が考えられる。今後、複数存在すると思われる P450 アイソフォームから permethrin 代謝活性をもつアイソフォームを単離、精製し、その構造を系統間で比較することが必要と考えられた。

イエバエ、ワモンゴキブリ、イラクサギンウワバの代謝では 4' 位置が最も水酸化されやすく、ついで *trans* 位、6 位の順に高い (Shono *et al.*, 1978)。ネッタイエカにおいても 4' 位が主要な標的部位となっており、これに次ぐ unknown 1 は *trans*-HO-permethrin もしくは 6 HO-permethrin である可能性が高い。緒言でも述べたように、permethrin を初めとする第二世代合成ピレスロイド剤は、第一世代合成ピレスロイド剤が酸化されやすいという欠点を克服するためにイソブテニル基のメチル基をハロゲンに置換して開発された殺虫剤である。ところが本章でも明らかにされたように JPal-per 系統は菊酸部分の代わりにアルコール部分を水酸化の標的にして permethrin を代謝する能力を発達させたといえる。

第4節 Permethrin 代謝の共力剤による阻害

第3節では JPal-per 系統のミクロゾーム画分において NADPH 依存性の著しい permethrin 代謝活性が認められた。得られた代謝物がチトクロム P450 酸化酵素の働きによるものであることを再確認するために、第2章の殺虫試験において共力効果が認められた酸化酵素阻害剤を用いて代謝阻害試験を行った。

材料及び方法

材料にはすべて JPal-per 系統4齢幼虫中腸を用いた。代謝試験の方法は第3節に従った。阻害剤として用いた共力剤は、中腸ミクロゾーム画分にはチトクロム P450 酸化酵素系の阻害剤である PBO と PTPE、エステラーゼ阻害剤の paraoxon (>90%、日本バイエルアグロケム) を用いた。中腸上清画分には paraoxon と、同じくエステラーゼ阻害剤の DEF を添加した。共力剤は酵素を含む反応液とともに5分間プレインキュベートした後、基質である permethrin を加えることで反応を開始した。各共力剤はすべてエタノールに溶かし 10 μ l を添加し、最終濃度が paraoxon で 0.01 mM、それ以外は 0.1 mM となるように添加した。

結果

ミクロゾーム、上清画分の permethrin 代謝に及ぼす各阻害剤の影響を Table 15 に示した。ミクロゾーム画分においては対照区の代謝率が 62.0%であったのに対し、酸化酵素阻害剤の PBO や PTPE 添加下ではそれぞれ 9.7、5.4%と大きく減少した。エステラーゼ阻害剤として用いた paraoxon 添加条件での代謝率は 45.5%で、僅かに代謝阻害の傾向が認められた。各代謝物について見てみると、PBO、PTPE はミクロゾーム画分で得られた代謝物の割合を 90%程度減少させたが、unknown 1 についてのみ PBO よる阻害度は 45%にとどまった。

一方、上清画分においてはエステラーゼ阻害剤の DEF、paraoxon とともに permethrin 代謝を大きく阻害し、無添加条件で 24.6%あった代謝率はそれぞれ 3.0、2.2%に減

Table 15. Effect of synergists on ^{14}C -permethrin metabolism in JPal-per strain of *Culex quinquefasciatus* larvae

Metabolite	Gut (microsome) +NADPH				Gut (supernatant)		
	Control	PBO	PTPE	Paraoxon	Control	DEF	Paraoxon
Permethrin	38.0 (1.66)	90.3 (0.74)	94.6 (0.87)	54.5 (0.42)	75.4 (0.15)	97.0 (0.12)	97.8 (0.12)
Unknown 1	12.2 (0.30)	5.5 (0.49)	0.7 (0.06)	13.3 (0.18)	—	—	—
4' HO-Permethrin	15.9 (0.45)	1.2 (0.12)	—	7.6 (0.09)	—	—	—
PB alcohol	3.3 (0.03)	—	—	2.0 (0.07)	20.0 (0.12)	0.4 (0.00)	0.3 (0.03)
Unknown 2	2.8 (0.06)	—	—	2.6 (0.00)	—	—	—
PB acid	8.9 (0.20)	2.1 (0.13)	2.0 (0.03)	5.7 (0.41)	4.1 (0.07)	2.6 (0.10)	1.9 (0.10)
Origin	18.9 (0.80)	0.9 (0.07)	2.7 (0.95)	14.3 (0.26)	0.5 (0.12)	—	—
% of total metabolites	62.0	9.7	5.4	45.5	24.6	3.0	2.2

Results are expressed as a percentage of radioactivity.

All values are mean of triplicated experiments (\pm SE in parentheses).

少した。特に阻害度が高かった代謝物は PB alcohol で、共力剤無添加時の 20.0% が DEF、paraoxon 添加時にそれぞれ 0.4、0.3% へと大きく減少した。

考察

本節では、共力剤の代謝阻害度を調べることで、各代謝物がどの酵素に由来するかを検討した。Unknown 1、4'HO-permethrin、及び origin 上の代謝物は PBO、PTPE によって大きく割合が減少したことから、第 3 節までに示唆されたようにこれらはチトクロム P450 酸化酵素系による代謝産物であることが明らかになった。また、PB alcohol、PB acid の割合も同様に減少したことから、permethrin のエステル基はエステラーゼのみならず、チトクロム P450 によっても代謝されることが示された (Fig. 16)。溶媒で展開されず origin 上に残った代謝物は、その極性の高さからチトクロム P450 酸化酵素系により酸化的代謝をされた一次代謝物に糖やグルタチオンが抱合した二次的代謝物である可能性が高い。PBO が 4'HO-permethrin や origin 上代謝物への反応を 90% 以上阻害したのに対し、unknown 1 への阻害度が 45% にとどまったことは、permethrin 酸化に関わる P450 アイソフォームが少なくとも 2 種類以上存在していることを示唆する。イエバエ (*Musca domestica*) 幼虫における幼若ホルモン様殺虫剤、pyriproxyfen の解毒代謝にもチトクロム P450 酸化酵素系が関与していることが Zhang *et al.* (1998) によって示されているが、JPal-per 系統幼虫は pyriproxyfen に全く抵抗性を示さない (Table 2)。このことは、permethrin と pyriproxyfen の解毒にはともにチトクロム P450 が関与するが、それぞれに関わるアイソフォームは同一ではなく、おのおの別の基質特異性を有していることを示唆する。

以上のことから、JPal-per 系統の permethrin 抵抗性にはチトクロム P450 酸化酵素系を中心とする解毒活性の増大が大きく関与しているものと結論される。

第5章 チトクロム P450 の遺伝子解析

チトクロム P450 酸化酵素系は各種ステロイドホルモン、胆汁酸、脂肪酸といった生体物質の合成、分解反応の他に、薬物や体内に取り込まれた環境汚染物質など外来性異物の酸化的解毒に必須の役割を果たしていることが哺乳類を中心に明らかにされてきた。P450 は mixed function oxidase と呼ばれ、その酸化酵素としての機能の多様性から、非常に基質特異性の低い酵素系であるとされてきた。しかし最近では生体内に入った様々な異物の酸化は体内に存在する P450 の種類の多さによってまかなわれており、その多くが互いに重なり合う基質特異性を持っていると考えられている。前章までに酸化酵素阻害剤が permethrin 殺虫試験で強い共力効果が認められたこと、チトクロム P450 量が JPal-per 系統の幼虫体内で感受性系統の 2.7 倍多く存在していたこと、代謝試験で NADPH 依存性の強い代謝活性が認められたことから、JPal-per 系統の permethrin 抵抗性にもチトクロム P450 の活性増大が深く関与していることが明らかにされた (Kasai *et al.*, 1998a)。そして本研究の最終目標はピレスロイド剤抵抗性に関わる P450 アイソフォームを単離、精製し、その機能を詳細に調査することである。ところが先にも述べたように生物体内にはほとんどの場合複数種のアイソフォームが存在し、それぞれが構造的に類似しているため、単一のタンパクを精製することは困難であると考えられた。さらにチトクロム P450 は膜タンパクであるため、酵素活性を測定するためには可溶化された精製タンパクが小胞体膜に結合した環境を整える必要があること、そしてチトクロム P450 が基質を酸化するのにチトクロム P450 還元酵素やチトクロム b_5 といった電子共与酵素系の存在が必須であることなどから、これらの条件が整った再構成系の構築が非常に困難とされている。これらの理由により、本研究では既に報告された昆虫 P450 のアミノ酸保存領域を参考にプライマーをデザインし、RT-PCR (Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction) の技法を用いることで P450 cDNA のクローニングを試みた。

P450 遺伝子は P450 遺伝子スーパーファミリーとして 220 以上の遺伝子配列が登録されており、これらはタンパク質配列の相同性により 36 のサブファミリーに分類されている (Nelson *et al.*, 1993)。現在のところ昆虫からは 4 族、6 族及び 9 族に属する P450 サブファミリーが報告されており、4 種類の殺虫剤抵抗性昆虫からチ

トクロム P450 遺伝子がクローニングされている (Feyereisen *et al.*, 1989; Waters *et al.*, 1992; Scott *et al.*, 1994; Tomita and Scott, 1995; Wang and Hobbs, 1995)。しかしながら実際に殺虫剤抵抗性との関わりを直接的証拠により結びつけられたアイソフォームは Tomita and Scott (1995)が報告した CYP6D1 のみである。彼らはピレスロイド剤抵抗性イエバエ (*Musca domestica*) LPR 系統より精製した CYP6D1 タンパクより特異的抗体を作製し、これが *in vitro* で deltamethrin 代謝を阻害したことから CYP6D1 がピレスロイド剤抵抗性に深く関与していることを明らかにした (Tomita and Scott, 1995)。CYP6D1 の他にも有機リン剤抵抗性イエバエよりクローニングされた CYP6A1 (Feyereisen *et al.*, 1989)、DDT、malathion 抵抗性キイロショウジョウバエ (*Drosophila melanogaster*)よりクローニングされた CYP6A2 (Waters *et al.*, 1992)、そして *Helicoverpa armigera* よりクローニングされた permethrin 誘導性の CYP6B2 (Wang and Hobbs, 1995)はすべて 6 族 P450 に属することより、今回目的とするアイソフォームは 6 族に属している可能性が最も高いと考えられた。したがってこれら 6 族 P450 のアミノ酸配列の保存領域を参考にプライマーをデザインし、ネッタイエカのチトクロム P450 cDNA のクローニングを行い、さらにその発現量を系統間で比較することで permethrin 抵抗性に関与するチトクロム P450 の分子生物学的同定を試みた。

第1節 チトクロム P450 (CYP6E1) cDNA のクローニングと構造解析

チトクロム P450 の遺伝子解析の足がかりとして、昆虫チトクロム P450 のアミノ酸配列を参考にプライマーをデザインし、RT-PCR を行った。増幅された PCR 産物をプローブとして完全鎖長の構造を明らかにした。

材料及び方法

1. Poly (A)⁺ RNA の精製

供試昆虫は第2章、第1節に準ずる。JPal-per 系統4齢幼虫50頭より中腸(内容物は除去)を採集し、QuickPrep Micro mRNA Purification Kit (Pharmacia 社製)を用いて poly (A)⁺ RNA を精製した。中腸を kit 添付の extraction buffer 0.3 ml とともにガラスホモジナイザーを用いて磨碎した。磨碎液に ellution buffer 0.6 ml を加えて攪拌し、これを試料とした。Oligo(dT)-cellulose 0.5 ml を 15,000 × g で1分間遠心し、沈殿した oligo(dT)-cellulose を試料とともに3分間攪拌した。10,000 × g で10秒間遠心分離後、得られた沈殿を high salt buffer 0.5 ml に懸濁して5回洗浄した。さらに low salt buffer 0.5 ml にて2回洗浄し、遠心分離後の沈殿物を 0.2 ml の low salt buffer に懸濁し、MicroSpin column に充填した。12,000 × g で5秒間遠心分離後、沈殿物を 0.25 ml の low salt buffer で3回洗浄した。最後に 65°C の ellution buffer 0.1 ml にて2回懸濁、遠心分離を行い poly(A)⁺ RNA を溶出した。

2. cDNA の合成

cDNA 合成は cDNA Synthesis Kit (Pharmacia 社製)を用いて行った。精製した poly (A)⁺ RNA 5 μg 相当量をエタノール沈殿により濃縮後、20 μl の diethyl pyrocarbonate 処理済みの蒸留水に溶解した。65°C で10分間加熱処理を行った後、氷冷し、cDNA 合成の鋳型として用いた。変成済みの poly (A)⁺ RNA を cloned murine reverse transcriptase、oligo(dT)₁₂₋₁₈ プライマーを含む first-strand reaction mixes (kit)、1 μl DTT 溶液とともに攪拌し、37°C で1時間インキュベートした。この混合液に、さらに大腸菌 RNase H と大腸菌 DNA polymerase I を含む second-strand reaction mixes (kit)を加えて、12°C で30分間、つづいて 22°C

で1時間インキュベートした。第二鎖の合成終了後、1 μ l の Klenow fragment を加え、37°Cで 30 分インキュベートすることで末端を平滑化した。試料と等量の TE 緩衝液 (10 mM Tris-HCl, pH 8.0, 1 mM EDTA)飽和フェノール:クロロホルム (1:1) を用いて攪拌後、1,500 g で 10 分間遠心分離し、タンパクを除去した。上清を ligation buffer (66 mM Tris-HCl, pH 7.6, 10 mM MgCl₂, 1 mM spermidine, 15 mM DTT, 0.2 mg/ml BSA)を用いて平衡化した Sephacryl S-400 spun column (kit)の樹脂に染み入ませ、400×g で 2 分間の遠心分離を行うことにより、約 500 塩基対 (base pairs, bp)以上の cDNA を溶出した。

3. RT-PCR 法

合成した cDNA を鋳型として、RT-PCR を行った。これまでに報告された昆虫 6 族 P450 のアミノ酸配列で、保存性の高い 4 つの領域 (NO.1-4)を選択し、15 種類のプライマーをデザインした (Fig. 17)。塩基配列の組合せ数が多くなれば、そのプライマーが対象とする配列が多くなることにつながり、プライマーが鋳型にミスアニールする確立が高くなる。また、T_m 値が低すぎたり GC 含量に偏りがあっても同様にプライマーの特異性が下がる。これらの理由により塩基配列の組み合わせ、T_m 値、GC 含量 (%)より最終的に 2 つのプライマーを選択した。実際に PCR に用いたプライマーの配列及び標的アミノ酸配列は以下の通りである。

Forward primer: (NO.1-a)

アミノ酸配列: (N') ET (T/L) RKYP (C')

塩基配列: 5'- GA(A/G)AC(A/G/T/C)(A/C/T)(T/C)(A/G/T/C)(A/C
G(A/G/T/C)AA(A/G)TA(T/C)CC -3'

Reverse primer: (NO.3-a)

アミノ酸配列: (N') PFG (A/D/E) GP (C')

塩基配列: 5'- GG(A/G/T/C)CC(A/G/T/C)(T/G)C(A/G/T/C)CC-
(A/G)AA -3'

それぞれのプライマーには 5'末端側に制限酵素 *Eco* RI サイト(CGGAATTC)を付加し、Applied Biosystem 381A DNA Synthesizer を使用してフォスフォアミダイド法により合成した。

PCR 反応 (50 μ l)には Promega 社製の Taq DNA polymelase (2.5unit)及び反応 buffer (最終濃度 10 mM Tris-HCl, pH9.0, 50 mM KCl, 0.1% Triton X-100) を

	NO. 1	NO. 2	NO. 3	NO. 4
CYP6A1	362	ETLRKYP-----FD PERF-----	LGFGDGPRNCIGMRFG	451
CYP6A2	368	ETLRLYT-----FD PERF-----	LPFGDGPRNCIGMRFG	456
CYP6A3	362	ETLRLYP-----YENPEEF-----	LPFGDGPRSCIGMRFG	450
CYP6A4	368	ETLRFYP-----YAE PERF-----	LPFGDGPRNCIGLRFG	456
CYP6A5	370	ETLRIYP-----FR PSRF-----	LPFGDGPRNCIGMRFG	458
CYP6B1	358	ETLRKYP-----FD PERF-----	LPFSAGPRNCLGMRFA	446
CYP6B2	363	ETLRMYS-----FN PERF-----	LPFGLGQRNCIGMRFG	451
CYP6C1	354	ETLRKYP-----FR PERF-----	LPFGAGPRICIAERFG	443
CYP6D1	377	ETTRKYP-----YR PERF-----	MPFGEGPRHCIAQRMG	464
		ETLRKYP	FR PERF	LPFGDGPRNCIGMRFG
		T	YD	M A A
				E



Nucleotide sequences deduced from the amino acid sequences

NO. 1		Combination (Tm, GC%)
a. ET (T/L) RKYP	5'- GA (A/G) ACN (A/C/T) (T/C) N (A/C) GNAA (A/G) TA (T/C) CC -3'	6,144 (50°C, 25.0%)
b. ETTRKYP	5'- GA (A/G) ACNACN (A/C) GNAA (A/G) TA (T/C) CC -3'	1,024 (52°C, 30.0%)
c. ETLRKYP	5'- GA (A/G) ACN (T/C) TN (A/C) GNAA (A/G) TA (T/C) CC -3'	2,048 (50°C, 25.0%)
NO. 2		
a. (F/Y) (R/D) PERF	5'- T (A/T) (T/C) (A/G/C) (G/A) NCCNGA (A/G) (A/C) GNNTT -3'	6,144 (42°C, 23.5%)
b. F (D/R) PERF	5'- TT (T/C) (A/G/C) (G/A) NCCNGA (A/G) (A/C) GNNTT -3'	3,072 (42°C, 23.5%)
c. FR PERF	5'- TT (T/C) (A/C) GNCCNGA (A/G) (A/C) GNNTT -3'	1,024 (44°C, 29.4%)
d. FD PERF	5'- TT (T/C) GA (T/C) CCNGA (A/G) (A/C) GNNTT -3'	256 (44°C, 29.4%)
e. YR PERF	5'- TA (T/C) (A/C) GNCCNGA (A/G) (A/C) GNNTT -3'	1,024 (44°C, 29.4%)
f. YD PERF	5'- TA (T/C) GA (T/C) CCNGA (A/G) (A/C) GNNTT -3'	256 (44°C, 29.4%)
NO. 3		
a. PFG (A/D/E) GP	5'- CCNT (T/C) GGNG (A/C) NGGNCC -3'	1,024 (52°C, 52.9%)
b. PFGEGP	5'- CCNTT (T/C) GGNGA (A/G) GGNCC -3'	256 (52°C, 52.9%)
c. PFGDGP	5'- CCNTT (T/C) GGNGA (T/C) GGNCC -3'	256 (52°C, 52.9%)
d. PFGAGP	5'- CCNTT (T/C) GGNGCNGGNCC -3'	512 (52°C, 52.9%)
NO. 4		
a. NCIGMRFG	5'- AA (T/C) TG (C/T) AT (T/C/A) GGNATG (A/C) GNNTT (T/C) GG -3'	768 (62°C, 34.8%)
b. CIGMRFG	5'- TG (C/T) AT (T/C/A) GGNATG (A/C) GNNTT (T/C) GG -3'	384 (56°C, 40.0%)

(N = A/G/T/C)

Fig. 17. Conserved region of CYP6 amino acid sequences and design of degenerate primers. CYP6A1 (Feyereisen *et al.*, 1989), CYP6A3, CYP6A4, CYP6A5, CYP6C1 (Cohen and Feyereisen, 1995) and CYP6D1 (Tomita and Scott, 1995) were isolated from a housefly, *Musca domestica* and, CYP6A2 (Waters *et al.*, 1992) from a fruit fly, *Drosophila melanogaster* and, CYP6B1 (Cohen *et al.*, 1992) from a black swallowtail butterfly, *Papilio polyxenes* and, CYP6B2 (Wang and Hobbs, 1995) from a cotton bollworm, *Helicoverpa armigera*.

用いて行い、2.5 mM MgCl₂、10 mM dNTPs、cDNA 140 ng、1 nmol プライマーとともに反応させた。PCR 反応はサーマルサイクラー (PC-700、Astec 社製) にて行った。94°C、1 分で二本鎖 DNA を変性後、94°C (30 秒)、45°C (30 秒)、72°C (60 秒) を 30 サイクル行い、最後に 72°C (5 分間) の伸長反応を行った。反応後のサンプルは 10 μ l を 2 μ l の 10 \times loading solution (40% glycerine, 0.25% bromophenol blue) とともに 4% 低融点アガロース (NuSieve GTG、FMC 社製) ゲルにて電気泳動 (50 mV、40 分間) し、エチジウムブロマイドにて染色後 UV 照射下で PCR 産物の有無を確認した。その結果、予想される長さ (約 250 bp) のバンドが確認されたため、残りの反応液を用いて PCR 産物のクローニングを試みた。

4. PCR 産物のクローニング

PCR 産物をエタノール沈殿にて濃縮後、44 μ l の蒸留水に溶解した。5 μ l の 10 \times buffer (One-Phor-All buffer PLUS、Pharmacia) と 1 μ l の制限酵素 *Eco* RI (50 unit、Pharmacia) を加え、37°C で 1 時間インキュベートした。*Eco* RI 消化した PCR 産物を 4% 低融点アガロースゲルにて電気泳動し、エチジウムブロマイドで染色後、UV 照射下で 250 bp 付近のバンドを切り出した。切り出したゲルより Sephaglass BandPrep Kit (Pharmacia) を用いて PCR 産物を抽出後、20 μ l の TE buffer に溶解し、ベクタープラスミドに組込んだ。ベクタープラスミド pUC118 (20 ng/ μ l) は *Eco* RI でクローニングサイトを切断した後 bacterial alkaline phosphatase (和光純薬 (株) 社製) 処理により末端を脱リン酸化し、自己連結を防止した。PCR 産物 (1 μ l)、ベクター (1 μ l) 溶液を Takara 社製の DNA ligation kit Ver. 2、solution I (2 μ l) と混和し、14°C で 2 時間インキュベートした。連結後の DNA 溶液を大腸菌 JM109 competent cell (Takara) 20 μ l に形質転換した。DNA と混合した competent cell を氷上にて 30 分間放置した後 42°C で 1 分間加熱処理を行った。続いて 80 ml の SOC 培地 (2% Bacto-tryptone、0.5% Bacto-yeast extract、0.05% NaCl、0.9% glucose) 中で 37°C 30 分間培養した。予め 10 mg の isopropylthio- β -D-galactoside (IPTG) と 1 mg の 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactoside (X-Gal) を染込ませた LB 寒天培地 (1.5% Bacto-agar、1% Bacto-tryptone、0.5% Bacto-yeast extract、1% NaCl、50 μ g/ml のアンピシリンを含む) に、形質転換処理を行った大腸菌を播き、37°C で一晚培養した。

5. プラスミド精製

PCR 産物を含むプラスミドにより形質転換された大腸菌をカラーセレクションによって選抜した。3 ml の 2×YT 液体培地 (50 mg/ml のアンピシリンを含む) 中で一晩培養した大腸菌から以下の方法で精製したプラスミドを鋳型に塩基配列解析を行った。大腸菌からプラスミドを精製する方法はアルカリ法 (Ish-Horowitz and Burke, 1981) を用いて行った。まず大腸菌をマイクロチューブに移し、4℃、12,000 g にて 30 秒間遠心分離し、集菌した。大腸菌を 100 μl の Sol I (25 mM Tris-HCl, pH 8.0、50 mM glucose、10 mM EDTA, pH 8.0) に懸濁後、200 μl の Sol II (0.2 N NaOH、1% SDS) を加えて攪拌し、10 分間氷冷した。次に 150 μl の Sol III (3 M CH₃COOK、pH 4.8) を加え激しく攪拌後、さらに 15 分間氷冷した。生じた沈殿を遠心分離によって除去し、上清に 10 μg の RNase を加え 37℃ 1 時間インキュベートした。つぎにフェノール抽出、エタノール沈殿により回収した核酸を 100 μl の TE buffer に溶解し、60 μl の PEG 溶液 (20% polyethylene glycol 6000、2.5 M NaCl) を加え氷上 1 時間放置した。1,5000 g の遠心分離により得られた沈殿を 70% エタノールで 2 回洗浄し、10 μl の TE buffer に溶解した。

6. PCR 産物の塩基配列解析

塩基配列解析は Dye Terminator Cycle Sequencing FS Ready Reaction Kit (Applied Biosystems) を用いて dideoxynucleotide chain termination 法 (Sanger and Coulson, 1975) により行った。反応液 10 μl あたり 4 μl の reaction mixture (kit)、10 pmol のユニバーサルプライマー (M13 (-21)、M13 RV)、350 ng のプラスミドを含む。伸長反応はサーマルサイクラー (Gene Amp PCR System 2400、Perkin Elmer 社製) を用いて行い、96℃ 10 秒、50℃ 5 秒、60℃ 4 分を 25 サイクル行った。伸長鎖はエタノール沈殿後、4 μl の loading solution (3% blue dextran、50 mM EDTA からなる dye solution と、脱イオン化ホルムアミドを 1:5 で混合したもの) に溶解し、2 分間の煮沸処理後、氷冷し電気泳動した。電気泳動には 50% 尿素、1×TBE (90 mM Tris-HCl, pH 8.0、90 mM boric acid、25 mM EDTA) を含む 6% ポリアクリルアミドゲルを用い、DNA sequencer (ABI 373A) を用いて 40V 定電圧の条件で行った。泳動 buffer には 1×TBE buffer を用いた。得られた塩基配列データの編集、解析、及び相同性検索はコンピューターソフト、GENETYX Ver. 8.0 (Software Development) を用いて行った。その結果、解析を行った cDNA クロ

ーンの塩基配列より予想されたアミノ酸配列は CYP6 族に相同性が高く、チトクロム P450 の部分配列であることが明らかとなった。したがって解析に用いた PCR 産物を *CYP6-1* と命名し、完全鎖長を得るための、cDNA ライブラリーのスクリーニングにプローブとして用いることにした。

7. cDNA ライブラリーの作製

2. で合成した cDNA に、*Eco* RI/*Not* I adaptor を T4 DNA ligase を用いて連結し、末端を T4 polynucleotide kinase による処理でリン酸化した。リン酸化反応液に、上記フェノール：クロロホルムを等量加えて攪拌し、1,500 g 10 分間の遠心分離を行って、cDNA を水層に抽出した。さらに Sephacryl S-400 spun column を用いて、連結されなかった adaptor を除去した。このカラムの溶出液中の cDNA 100 ng と入ファージベクター (*Lambda* gt 10/*Eco* RI/CIAP-Treated Vector Kit、Stratagene) 1 μ g をエタノール沈殿にて濃縮後、9 μ l の ligation buffer に溶解した。さらに 10 倍希釈した ATP solution 1 μ l (kit)、1 μ l の T4 DNA Ligase (kit) を加え攪拌後、12°C で一晩インキュベートした。ファージ DNA の *in vitro* パッケージングには GigaPack II Packaging Extract (Stratagene) を用いた。ライゲーション反応液 1 μ l を packaging extract に加え、すばやく攪拌後、22°C で 2 時間インキュベートした。その後 500 μ l の SM buffer (50 mM Tris-HCl buffer, pH 7.5、0.1M NaCl、8 mM MgSO₄、0.01% gelatin)、20 μ l クロロホルムを加え攪拌し、4°C で保存した。この条件で作製した cDNA ライブラリーのタイターは 3.9×10^6 pfu/ml であった。

8. プローブの作製

塩基配列解析によってチトクロム P450 cDNA の部分配列であると考えられた *CYP6-1* を鋳型としてプローブを合成した。プローブを標識する方法は PCR の反応液中に DIG-conjugated dUTP (Boehringer Mannheim) を加え、PCR 産物中に DIG (digoxigenin) を取り込ませることによって行った。DIG システムは digoxigenin という抗体を核酸に標識し、抗体を用いてその抗体に標識した酵素の発光反応で核酸を検出する方法である。PCR 法は基本的に本節の 3. に準じて行ったが、dNTPs の代わりに dNTP 標識ミックス (1 mM dATP、1 mM dCTP、1 mM dGTP、0.65 mM dTTP、0.35 mM DIG-11-dUTP) を用い、*CYP6-1* をインサート

として含むプラスミド pUC118 100 ng を鋳型とした。また、PCR 反応のアニーリング温度を 42°C とした。PCR 反応後の反応液はエタノール沈殿により核酸を精製後、TE buffer に溶解し、プローブとして用いた。

9. cDNA ライブラリーのスクリーニング

cDNA ライブラリー 3.9×10^5 個分のファージを、宿主大腸菌 100 μ l (NM514、0.4% maltose 含む LB 培地で一晩培養後、集菌し 2/5 量 10 mM $MgSO_4$ に懸濁) とともに 37°C 15 分間インキュベートし、50°C の 0.7% 寒天 LB 培地 4 ml に攪拌して、1.5% 寒天 LB 培地に重層した。37°C で 12 時間培養後 4°C で約 1 時間冷却し、培地上に現われたプラークをナイロンメンブレン (Gene Screen Plus、NEN) に転写した。この後メンブレンをろ紙に染込ませたアルカリ変性液 (1.5 M NaCl、0.5 N NaOH) 上で 2 分間変性後、同様に中和液 (0.5 M Tris-HCl, pH 7.5、1.5 M NaCl) で中和し、最後に $2 \times$ SSC (0.3 M NaCl、0.03 M クエン酸ナトリウム) で表面に付着したゲルを洗い落とした。Prehybridization solution ($5 \times$ SSC、2 % blocking reagent (Boehringer Mannheim)、0.1% N-laurylsarcosine、50% formamide、7% SDS) 中にて 40°C 3 時間以上プレハイブリダイゼーションを行った。プローブを 5 分間の煮沸により変性後、氷冷し、最終濃度 25 ng/ml になるよう加え、ハイブリダイゼーション (40°C、一晩) を行った。 $2 \times$ SSC、0.1% SDS、室温で 15 分間洗浄後、さらに $0.2 \times$ SSC、0.1% SDS、65°C で 20 分間、2 回の洗浄を行った。Boehringer 社の手順に従い発光処理を行った後、化学発光用フィルム (Hyperfilm ECL、Amersham) に感光させた。以上の操作により、 3.9×10^5 個の組換え体から 3 個の陽性クローンが得られた。

10. ファージ DNA の精製及び塩基配列解析

プラーク純化を 4 回繰り返して得られた陽性ファージを SM buffer に懸濁し、約 10^5 個のファージを大腸菌 NM514 に吸着させた後 4 ml の 0.7% 寒天 LB 培地と混合してシャーレに固めた 1.5% 寒天 LB 培地の表面に重層した。37°C で一晩インキュベートし、全面溶菌を確認後、4 ml の SM buffer と 100 μ l のクロロホルムを加えて 4°C、一晩振とうした。ファージ抽出液からのファージ DNA の精製は QIAGEN Lambda Midi Kit (Qiagen) を用いて行った。ファージ抽出液 20 ml を $3,500 \times g$ 、10 分間、2 回の遠心分離により大腸菌の破片を除去した。遠心分離で

得られた上清に 60 μ l の buffer L1 (100 mM Tris-HCl, pH 7.5, 300 mM NaCl, 10 mM EDTA, 0.2 mg/ml BSA, 20 mg/ml RNase A, 6 mg/ml DNase I)を加え、37°C、30 分間インキュベートすることで大腸菌由来の染色体 DNA や RNA を分解した。次に 4 ml の氷冷した buffer L2 (30% PEG, 3M NaCl)を加え、氷上 30 分間インキュベートによりファージを沈殿させた。12,000 \times g、10 分間の遠心分離によりファージを回収し、2 ml の buffer L3 (100 mM Tris-HCl, pH 7.5, 100 mM NaCl, 25 mM EDTA)に再懸濁し、さらに buffer L4 (4% SDS)を 2 ml 加え、70°C、15 分間インキュベートすることで、ファージ殻タンパクを破壊、DNase、RNase を失活させた。氷冷後、2 ml の buffer L5 (3M CH₃COOK)を加えて攪拌し、4°Cにおいて 15,000 \times g、30 分間遠心分離した。上清をさらに 15,000 \times g で 10 分間遠心分離することより沈殿を除去した。4 ml の平衡 buffer (50 mM MOPS, pH 7.0, 750 mM NaCl, 15% ethanol, 0.15% Triton X-100)で平衡化したカラム (Quiagen-tip 100)に遠心分離後の上清を通した後、洗浄用 buffer (50 mM MOPS, pH 7.0, 1 M NaCl, 15% ethanol) 10 ml にて 2 回洗浄した。最後に溶出 buffer (50 mM Tris-HCl, pH 8.5, 1.25 M NaCl, 15% ethanol)を 5 ml 通すことでファージ DNA を回収した。溶出後の DNA はイソプロパノール沈殿により精製した。ファージ DNA から *Eco*RI 処理によってインサートを切り出し、1%アガロースで電気泳動をしてサイズを確認後、ゲルを切り出して DNA フラグメントを精製し、プラスミド pUC118 にサブクローニングした。得られたリコンビナントプラスミドを大腸菌 JM109 に形質転換し、本節の 5.で述べた方法でプラスミドを精製した。塩基配列の同定は本節の 6.と同様にダイデオキシターミネーション法で行い、ユニバーサルプライマーによって読みとった配列に基づいて合成プライマーを作製し、さらに先を解析する手法を用いた。

11. RT-PCR 法による CYP6E1 遺伝子の発現解析

cDNA ライブラリーのスクリーニングにより得られた P450 (CYP6E1)の発現を RT-PCR 法により解析した。Permethrin 感受性、抵抗性 (JPal-per) 両系統中腸より cDNA を合成し、140 ng を鋳型として用いた。塩基配列解析に用いたシーケンズプライマー P1F、P2R (Table 16, Fig. 20)を用いて PCR を行った。基本的な方法は本節の 3.に準じた。PCR 反応は 94°C で 2 分反応後、94°C (30 秒)、50°C (30 秒)、72°C (60 秒) を 25 もしくは 35 サイクル行い、最後に 72°C (5

分間)の伸長反応を行った。インターナルマーカ―として、ハマダラカ (*Anopheles gambiae*) (Salazar *et al.*, 1994)、カイコ (*Bombyx mori*) (Mounier *et al.*, 1987)、キイロショウジョウバエ (*Drosophila melanogaster*) (accession no. K00667, K00668, K00669)のアクチンの保存領域よりデザインしたプローブ (act F: 5'-AGCAGGAGATGGCCACC-3', act R: 5'-TCCACATCTGCTGGAAGG-3')を用いてアクチン遺伝子を増幅した。

結果

既知の昆虫 6 族 P450 の保存領域をもとにプライマーをデザインし、JPal-per 系統 中腸の mRNA より合成した cDNA を鋳型として PCR を行ったところ、予想される長さ (プライマー部分を含めて約 250 bp)の産物が得られた。従ってこの産物をプラスミド pUC118 へサブクローニングし、塩基配列の解析を行った (Fig. 18)。塩基配列より予想される 67 個のアミノ酸配列は殺虫剤抵抗性昆虫からクローニングされた 4 種の 6 族チトクロム P450 に相同性が高く、他の P450 で共通な PERF 配列も確認された (Fig. 19)。従ってこの PCR 産物は JPal-per 系統の幼虫体内に存在するチトクロム P450 の部分配列であると考え、このクローンを *CYP6-1* と名付けた。

次にこの遺伝子の全長をクローニングする目的で JPal-per 系統中腸より cDNA ライブラリーを作製し、*CYP6-1* をプローブとしてスクリーニングを行った。その結果 3.9×10^5 個の組換えファージより、3 個の陽性クローンを得た。これらのうち約 1.6 kbp のインサートが含まれていた 2 つのクローンについて塩基配列解析を行った (Table 16、Fig. 20)。その結果、2 つのクローンは全く同じ配列を有しており、長い方のクローンは 499 個のアミノ酸 (推定分子量 57.5 KDa)をコードする全長 1,566 bp の cDNA であり、3'下流域にはポリ(A)付加シグナルが認められた (Fig. 21)。塩基配列より予想されるアミノ酸配列は *CYP6-1* に 100%一致していたが、二つの塩基で変異が認められた (1,149 番目と 1,224 番目の A が *CYP6-1* ではそれぞれ G と T に置換)。予想されるアミノ酸配列は 6 族 P450 に相同性が高かったため、既知の昆虫 6 族 P450 (*CYP6A1*、*CYP6B2*、*CYP6D1*)との比較を行った (Fig. 22)。

10 20 30 40 50 60
 CCGGTAGCAAATCTCTTCCGGGAGATCACAAAGAATTACAAGGTTCCAGAAACGGACATC
 P V A N L F R E I T K N Y K V P E T D I

 70 80 90 100 110 120
 ACCCTGGAGAAGGGGTACCGAGTAGTGATCCCAGTATACGGAATCCATCACGACCCGGAT
 T L E K G Y R V V I P V Y G I H H D P D

 130 140 150 160 170 180
 ATCTACCCCAACCCAGAGGTCTTCAACCCTGAACGATTTCATCCCGGAAGTGTCAACCAAT
 I Y P N P E V F N P E R F I P E L S T N

 190 200
 CGTCATCCAATGGCCTACCTG
 R H P M A Y L

Fig. 18. Nucleotide sequence and deduced amino acid sequence of a PCR product, CYP6-1.

CYP6-1	1	PVANLFR	EITKNYKVP	-ETDITL	LEKGYRVV	IPVYGI	HHDP	39
CYP6A1 (<i>Musca</i>)	370	VGSALTR	QTLNDYV	VPHNPKY	VLPKGT	LVFIPV	LGTHYD	40
CYP6A2 (<i>Drosophila</i>)	376	LVPHLER	KALNDYV	VPGHEKL	VIEKGT	QVVIIP	PACAYHR	40
CYP6B2 (<i>Helicoverpa</i>)	370	IVEPLQR	KAIRDYK	LP-GTDV	VIEKDT	VVLISPR	GTHYD	39
CYP6D1 (<i>Musca</i>)	387	GLPFLNR	KCTQDFQ	VVP-DTKL	TIPKET	GIIISLL	GIHRDP	39

CYP6-1	40	DIYPNPE	VFNPERFI	PELSTNR	HPMAYL	67
CYP6A1 (<i>Musca</i>)	41	ELYPNPE	EEFDPERF	SPEMVK	QRDSVDW	437
CYP6A2 (<i>Drosophila</i>)	41	DLYPNP	ETFDPERF	SPEKVA	ARESVEWL	443
CYP6B2 (<i>Helicoverpa</i>)	40	KYYDNP	KQFNPERF	FAEEVG	KRHPCAYL	436
CYP6D1 (<i>Musca</i>)	40	QYFPQPE	DYRPERFA	DESKDY	-DPAAYM	452

Fig. 19. Comparison of amino acid sequence of CYP6-1 to those of other insect CYP6 subfamilies. CYP6A1 (Feyereisen *et al.*, 1989) and CYP6D1 (Tomita and Scott, 1995) are derived from *M. domestica* and, CYP6A2 (Waters *et al.*, 1992) is from *D. melanogaster* and, CYP6B2 (Wang and Hobbs, 1995) is from *H. armigera*, respectively. Conserved amino acids are highlighted.

Table 16. Oligonucleotide primers used for the sequence analysis of *CYP6E1* cDNA

M13 (-21)	5' -TGTAACGACGGCCATT-3'
M13 RV	5' -CAGGAAACAGCTATGAC-3'
P1F	5' -CGGTGGAATCTACTCGT-3'
P1R	5' -ACGAGTAGATTCCACCG-3'
P2F	5' -TGCATCGGAGAGCGATT-3'
P2R	5' -AATCGCTCTCCGATGCA-3'
P3F	5' -TAATGAGAGGGACGACC-3'
P3R	5' -GGTCGTCCCTCTCATTA-3'
P4F	5' -ATCGCGGTTTGCAATGG-3'
P4R	5' -CCATTGCAAACCGCGAT-3'
P5R	5' -TCTTTCTGGCCCTCTCCT-3'
P6F	5' -TACGAGCTGGCACTGAA-3'

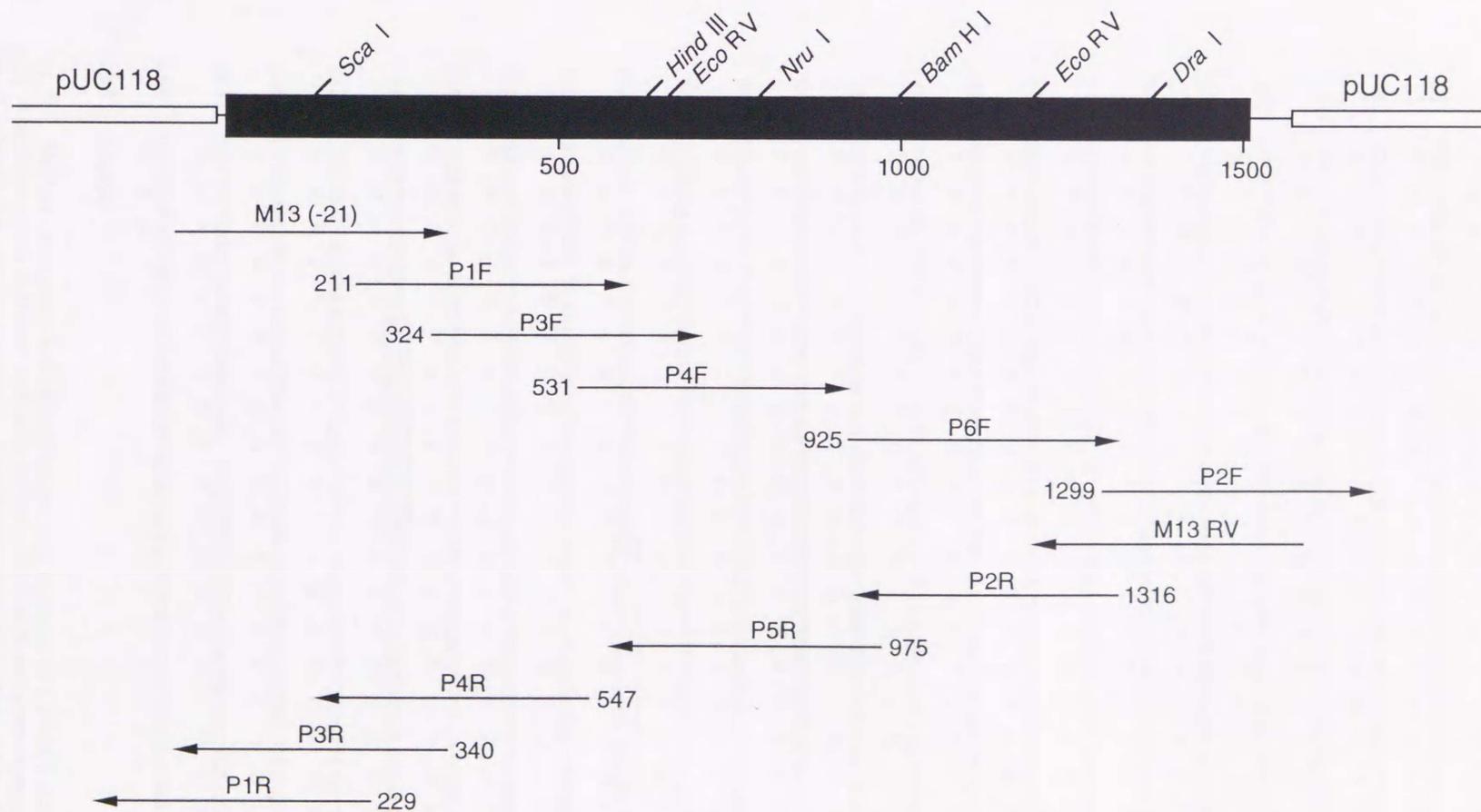


Fig. 20. Sequencing strategy and restriction map of *CYP6E1* cDNA. Numbers indicate the sequence positions of synthesized oligonucleotide primers.

1 GAACTCGACAAGATGCTGCTCTACCTCGTAACGATCGTGACCTGGTTGGTCTACGTCCTGG 60
M L L Y L V T I V T W L V Y V W

61 ATCAAGCGACGGTATTCCTACTGGAAGGATCGTGGCGTTCCATCTCTGAGAGTCTCCTTC 120
I K R R Y S Y W K D R G V P S L R V S F

121 CCAGCTGGAAATCTCCAGGGAATCGGCCACCGTACCTGGGACTCATCATGCAGGATTTG 180
P A G N L Q G I G H R H L G L I M Q D L

181 TACGGCAAGTTGAAAGGCTCTGGGGCCAAGTTGGTGAATCTACTCGTTCTCAAGCCG 240
Y G K L K G S G A K F G G I Y S F L K P

241 ATGGTCATGGTGCTGGATCTGGACTTTGCCAAGGACGTGCTGGTGAGGGAGTTTCAGTAC 300
M V M V L D L D F A K D V L V R E F Q Y

301 TTTACGATCGTGGCATGTACTATAATGAGAGGGACGCCCGTTGTCCGCACATCTCGTC 360
F H D R G M Y Y N E R D D P L S A H L V

361 AGCTTGGGAAGGTGATAAGTGGGAAGGCTTGGAGGACGAAGCTGACGCCGACGTTTACCTCC 420
S L E G D K W K S L R T K L T P T F T S

421 GGAAGATGAAGATGATGTTTGGCAGGATTGAGGAGTTGTGATCGGTTAGAGGGTTGC 480
G K M K M M F G T I E E V V D R L E G C

481 ATCAGGGTTAGGGTGAATCTGGTGAATGCATCGAGATCAGGGATATTATATCGCGGTTT 540
I R V R V E S G E C I E I R D I I S R F

541 GCAATGGACGTTATTGGGAGTTGTGCCTTTGGGTTGGACTGTAACAGTTTGGTATTGTGCG 600
A M D V I G S C A F G L D C N S L V L S

601 GACCCTCCGTTCTGGAAGATGAGCCTGAAAGCTTCTACTAGCAGAAACTTCAATCTCTTG 660
D P P F W K M S L K A S T S T K L Q F L

661 ATATCACTTTTGTGCTACAACCTATCGGAAGTTTCCAACCAATCGGAATCTGCGTCTTA 720
I S L F A T T Y R K F S N Q I G I C V L

721 CCAAACGATGTGAGTGATTTCTACCTTGGAGCGGTTCTGTGATACGATCAAGTTTGGATG 780
P N D V S D F Y L G A V R D T I K F R M

781 GACAACCAAGCGTCGCGAAAGGACTTATGGATCTGTGATCAAGCTGGAGGATAACTTT 840
D N Q A S R K D F M D L L I K L E D N F

841 ACGTTCAACGAGATCGTTCGCGAAGCCTTCGTGTTCTTCCAGGCTGGTACGAAACCTCT 900
T F N E I A A Q A F V F F Q A G Y E T S

901 TCAATTACGATGACCTTCTGCCTGTACGAGCTGGCACTGAATCAGGAACCTCAGGAGAGG 960
S I T M T F C L Y E L A L N Q E L Q E R

961 GCCAGAAAGAGCGTGGAGGATGTTCTGAAGAGGCACGGATCCTTCAGCTATGAAACCATT 1020
A R K S V E D V L K R H G S F S Y E T I

1021 CAGGACATGGAGTTCTCAACTGTTGTGTCAAAGAAACGCTTCGCAAGTATCCACCGGTA 1080
Q D M E F L N C C V K E T L R K Y P P V

1081 GCAAATCTCTTCCGGGAGATCACAAGAATTACAAGTTCCAGAAACGGACATCACCCCTG 1140
A N L F R E I T K N Y K V P E T D I T L

1141 GAGAAGGATACCGAGTAGTGATCCAGTATACGGAATCCATCACGACCCGGATATCTAC 1200
E K G Y R V V I P V Y G I H H D P D I Y

1201 CCCAACCCAGAGTCTTCAACCCAGAACGATTCATCCGGAACGTCAACCAATCGTCAT 1260
P N P E V F N P E R F I P E L S T N R H

1261 CCAATGGCCTACCTG**CCCTTCGGAGAAGGACC**CCGAACCTGCATCGGAGAGCGATTCGCC 1320
P M A Y L P F G E G P R T C I G E R F A

1321 CTAATGGAGACCAAAAATTGGCCTCAGTCGTTTGTCTACAAAAGTTTCGCTTTAAACTAGCA 1380
L M E T K I G L S R L L Q K F R F K L A

1381 CCTCAAACCTCCACAAGAATTGAGCTTAACAAAACCGCGTATTCCTATCTATTCAAGGT 1440
P Q T S T R I E L N K T G V F L S I Q G

1441 AATCTCTGGATGAAGGTTAAAAAACCTGTCATAACCTCACCGTTGTCAGTGAACCTGCC 1500
N L W M K V K K T C H N L T V V T E P A

1501 GCAGAAAATTAAattttcataaca**ataaaaa**aagagcgctcctcggtgtcgccaaactggt 1560
A E N *

1561 ataaaa 1566

Fig. 21. Nucleotide sequence and deduced amino acid sequence of *CYP6E1* cDNA clone. A poly A addition signal is shown with bold letters. Nucleotide sequence expressed with capital letters indicates the open reading frame. Star denotes translation stop codon. Boxes indicate the positions of primer used for amplifying the PCR products. Deduced amino acids are shown with single capitals under the nucleotide sequence.

CYP6E1	1:	M -----LLYLVTIVTWLVVWIKRRYSYWKDRGVPVSLRVSFPAGN-LQGIGHR-HLGLIM	53
CYP6A1	1:	M DFGSFLLYALGVLASLALYFVRWNFGYWKRRGIPHEEPHLMGN-VKGLRSKYHIGEII	59
CYP6B2	1:	M WIFYFPAVISVLIVTL-YFYFTRTFNYWKKRNVRGPEPVVFFGNLKDSALRKKNMGVVM	59
CYP6D1	1:	M --LLL-LLL-IVVTTL-YIFAKLHYTKWERLGFESDKATIPLGSMKVFHKERPPGLVM	55
CYP6E1	54:	QDLYGKLGSGAKF GGI YSFLK PM VMVLDLDFAKDVLVRE FQYFHDRG MYNERDDPLSA	113
CYP6A1	60:	ADY YR KFKGSGP-F AGI FLGHK PA AVVLDKELRKRVL IKDFSNFANRGLY NEKDDPLTG	118
CYP6B2	60:	EEL YN MF--PEEK VI GIYRMT SP CLLV RD LEVIKHIM IKDFE V FS DRGLEF-SK-EGLGQ	115
CYP6D1	56:	SDI Y DK---CHEK VVGI YLF FK PALL V RD A ELARQIL T DF NSF HDRGLVDEKNDPMSA	112
CYP6E1	114:	HLVSLEGDK W KS L R T KL T P T F T SG K M K MMF--GTIEEVVDRLEGCI R VR V ESGECIEIRD	171
CYP6A1	119:	HL V MEG E K W RS L R T KL S P T F T AG K M K YM--YNTVLEVGQRLL E VM E K L EV S SELD M RD	176
CYP6B2	116:	N L FHAD G DT W R T LR N R F T P I F T S G L K N MFY L M N E G AD N FID H VS-KECEKH-QE F E I HT	173
CYP6D1	113:	N L F V ME G Q S W R T L R M K L A P S F S S G L K G M F ETVDDVADKLINHLNERLKGQ T H V LE I KS	172
CYP6E1	172:	IISRFAMDV I G S CA F GLDCNSLVLS D PP F W K MS L K A ST S T K L Q F L IS L F A T T Y R K F SN Q I	231
CYP6A1	177:	ILARFNTDV I G S VA F GI E CNSLRN P HDR F LAMGRKSIEVPR H NAL I MA F IDS F PE L SR K L	236
CYP6B2	174:	LLQ T Y T M S T I SS C A F GV S Y D T I SD K L D T L A I V D K I I S E P S Y A I E L D-MM-YP G LL-P K L-	229
CYP6D1	173:	IL T Y A VD I I G S V I F GL E IDS F TH P DN E FR V LS D RL F N P KK S T M L E R I R N L S T F M C P P LA	232
CYP6E1	232:	G-ICVL-PNDV S D F -YLGAVRDT I K F R M D N Q A S R K D ---F-M D L-----L--- I K----	271
CYP6A1	237:	G-MRVL-PEDV H Q F -FMSS I K E T V D Y RE K NN I R R N D ---F-L D L-----V L -D-L K -- N N	280
CYP6B2	230:	N-LSIF-PSV V H K F-FK N L V NT I V T Q R NG K PS G R N D F M D L I L E L R Q M GE I T--SN K Y G NN	284
CYP6D1	233:	K L LS R L G A K D P I T Y R L R D I V K R T I E F R E E K G V V R K D L L Q L F I Q L R N T G K I S D D N D K L W H D	292
CYP6E1	272:	----L-E-DN F T F NE I A A Q A F V F F Q A G Y ET S S I T M T F C L Y E L A L N Q E L Q ER A R K S V - E -D	323
CYP6A1	281:	P E S-ISK L G L T F N E L A A Q V F V F L G G F ET S S S T M G F A L Y E L A Q N Q L Q D R L REE V N E --	337
CYP6B2	285:	M-ST L E- I T E - S V-M C A-Q A F V F Y I A G Y ET S A T T M A Y L T Y Q L A L N P D I Q N K L I A E I D E A I	339
CYP6D1	293:	VE S T A EN L K A M S I D M I A S N S F L F Y I A G S E T T A A T T S F T I Y E L A M Y E I L K K A Q S E V D E C L	352
CYP6E1	324:	V L - K --RH G S F S Y ET I Q D ME F L N CC V K E T L R K Y P P V AN L F R E I T K N Y K V P-ETD I T L E K G	379
CYP6A1	338:	V F D Q F-KED N I S Y D AL M N I P Y L D Q V L N E T L R K Y P V G S A L T R Q T L N D Y V V P H N P K Y V L P K G	396
CYP6B2	340:	K A NG----G K V T Y D T V K D M K Y L N K V F D E T L R M Y S I V E P L Q R K A I R D Y K L P -G T D V V I E K D	394
CYP6D1	353:	Q R H G L K P Q G R L T Y E A I Q D M K Y L D L C V M E T T R K Y P G L P F L N R K CT Q D F Q V P-D T K L T I P K E	411
CYP6E1	380:	Y R V V I P V Y G I H H D P D I Y P N P E V F N P E R F I P E L S T N R H P M A Y L P F G E G P R T C I G E R F A L M E	439
CYP6A1	397:	T L V F I P V L G I H Y D P E L Y P N P E E F D P E R F S P E M V K Q R D S V D W L G F G D G P R N C I G M R F G K M Q	456
CYP6B2	395:	T V V L I S P R G I H Y D P K Y D N P K Q F N P E R F A E V G K R H P C A Y L P F G L G Q R N C I G M R F G R L Q	454
CYP6D1	412:	T G I I S L L G I H R D P Q Y F P Q P E D Y R P E R F A D E -SK D Y D P A A Y M P F G E G P R H C I A Q R M G V I N	470
CYP6E1	440:	T K I G L S R L L Q K F R F K L A P Q T S T R I E L N K T G V F L S I Q G N L W M K V K T C H N L T V V T E P A A E N	499
CYP6A1	457:	S R L G L A L V I R H F R F T V C S R T D I P M Q I N P E S L A W T P K N N L Y L N V Q A I R K K I K	507
CYP6B2	455:	S L L C I T K L L S K F R L E P S K N T D R N L Q V E P Y R F I I G P K G G I R L N I V P R K D V S	504
CYP6D1	471:	S K V A L A K I L A N F N I Q M P R Q E V E F K F H S A P-V L V P V N G L N V G L S K R W	516

Fig. 22. Comparison of amino acid sequence of CYP6E1 to those of three cytochrome P450s from insects. CYP6A1 (Feyereisen et al., 1989) and CYP6D1 (Tomita and Scott, 1995) isolated from a housefly, *Musca domestica* and CYP6B2 (Wang and Hobbs, 1995) from a cotton bollworm, *Helicoverpa armigera*. Conserved amino acids are expressed with bold letters. Gaps are introduced to maximize the homology.

CYP6A1 はイエバエ (*Musca domestica*)よりクローニングされ、シクロジエン系殺虫剤を代謝することが確かめられている (Feyereisen *et al.*, 1989; Andersen *et al.*, 1994)。CYP6B2 は鱗翅目昆虫 (*Helicoverpa armigera*)より、CYP6D1 はイエバエよりクローニングされ、ともに殺虫剤抵抗性に関与するとされている (Wang and Hobbs, 1995; Tomita and Scott, 1995)。これらの 6 族 P450 に対する相同性はそれぞれ 42.2、31.8、35.0%であった。また、配列間で共通に認められる疎水性膜結合領域 (アミノ酸第 2-17 番目) や、還元酵素結合領域 (第 341-351 番目と第 399-407 番目)、さらにヘム鉄結合領域 (第 423-436 番目)が、今回クローニングされた cDNA より予想されるアミノ酸配列でもよく保存されていた。従って、今回クローニングされた cDNA はチトクロム P450 をコードする遺伝子であることが判明した。このチトクロム P450 は国際 P450 命名委員会 (Nelson *et al.*, 1993)に委託し、CYP6E1 と命名された (Kasai *et al.*, 1998b)。本クローンはカより全長をクローニングされた由一の P450 cDNA である。

つぎに両系統の中腸由来の mRNA より合成した cDNA を鋳型として、RT-PCR を行った (Fig. 23)。140 ng の鋳型を用いて PCR 反応を行い、35 サイクル後に両系統より目的とする長さ (約 1,100 bp)の産物が確認された。従って、CYP6E1 は JPal-per 系統に特異的なアイソフォームではなく、少なくとも今回用いた小笠原産の感受性系統幼虫体内でも発現している P450 種であることが明らかとなった。

考察

前章までに JPal-per 系統中腸に占めるチトクロム P450 量は全体の 80%で、しかも P450 由来の permethrin 代謝活性も中腸で最も高かったため、本章では中腸由来の cDNA ライブラリーから、チトクロム P450 cDNA のスクリーニングを行った。その結果、499 個のアミノ酸をコードする 1,566 bp の cDNA がクローニングされた。そして、この遺伝子から予想されるアミノ酸配列はチトクロム P450 の特徴をいくつか兼ね備えていることから、新規チトクロム P450 (CYP6E1)であることが判明した。これまでカの仲間ではハマダラカ (*Anopheles albimanus*)から 4 族 P450 14 種の部分配列が報告されている (Scott *et al.*, 1994)。CYP6E1 は P450 に特徴的な機能ドメインを有しているが、4 族 P450 に特徴的な

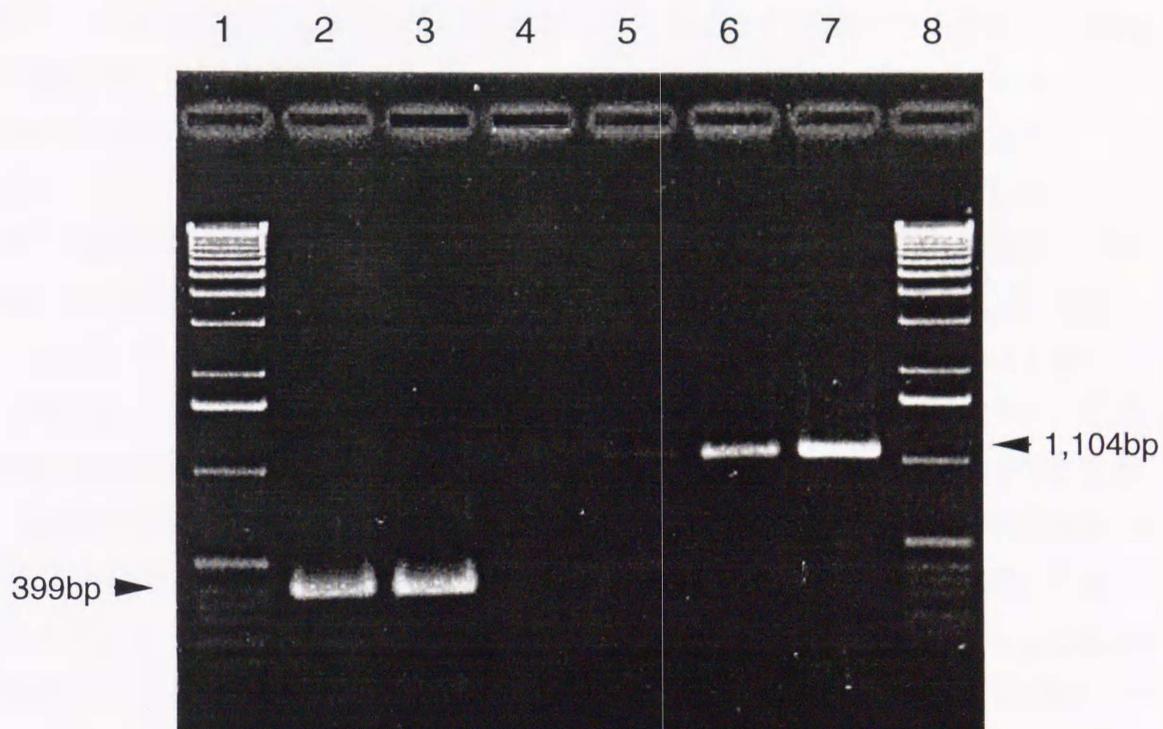


Fig. 23. Analysis of gene expression of CYP6E1. cDNA samples synthesized with mRNA isolated from susceptible (lanes 2, 4 and 6) or resistant JPal-per larvae (lanes 3, 5 and 7) were used for PCR. CYP6E1 specific primers were used for the gene expression (lanes 2-7). Twenty five (lanes 4 and 5) and 35 cycles (lanes 2, 3, 6 and 7) of PCR were carried out. As a control, actin gene expression was also analyzed using specific primers (lanes 2 and 3). Lanes 1 and 8 show molecular size markers (1kb ladder, Gibco). An arrowhead indicates the position of PCR products for CYP6E1 (1,104bp).

EVDTFMFEGHDTT 配列 (Bradfield *et al.*, 1991)を持たないことから、ハマダラカの 4 族 P450 とは異なるグループに分類される。

CYP6E1 は permethrin 抵抗性の JPal-per 系統より同定されたチトクロム P450 である。これが JPal-per 系統固有のタンパクであるのかを確かめるために、両系統中腸より調整した cDNA を鋳型とし、*CYP6E1* に特異的なプライマーを用いて RT-PCR を行った。35 サイクル後の反応液中に予想された長さの産物が認められたことより、このチトクロム P450 は感受性系統の中腸においても発現していることが示唆された。また、インターナルマーカールとして増幅したアクチン遺伝子が両系統ではほぼ同量発現していたのに対し、*CYP6E1* 遺伝子の増幅量は 25、35 両サイクルにおいて JPal-per 系統で高い傾向が認められた。したがって *CYP6E1* 遺伝子は JPal-per 系統で感受性系統より多く発現している可能性がある。しかし PCR 法は反応液中に存在する数少ない遺伝子を人工的に増幅させる手法であることから、遺伝子の発現量を正確に反映しない場合があり、実際には mRNA 発現量をノーザンブロッティング法により調査する必要があると考えられた。前述したようにチトクロム P450 は生物体内に数多くのアイソフォームが存在していることが知られている (Nelson *et al.*, 1993)。従って、本節で同定された *CYP6E1* が permethrin 抵抗性に関与しているのかどうかはこの時点では明らかでない。今後 PCR で増幅されたその他のアイソフォームについてもクローニングし、代謝機能を個々に調査することで permethrin 解毒性 P450 が特定されると思われる。

第 2 節 その他の 6 族 P450 のクローニングと構造解析

一般に一つの生物種内には複数のチトクロム P450 のアイソフォームが存在することが知られている。本節では *CYP6E1* 以外の P450 アイソフォームをクローニング、構造解析し、本種がもつ P450 の多様性、遺伝子発現量を感受性、抵抗性系統で比較することにより、permethrin 解毒性アイソフォームの同定への足がかりとした。

材料及び方法

1. アイソフォームのクローニング及び構造解析

供試昆虫は前節に準ずる。第1節において degenerate primer を用いて増幅した約 250 bp の PCR 産物をプラスミド pUC118 へサブクローニングし、大腸菌 JM109 へ形質転換し LB 寒天培地上にコロニーを形成させた。感受性系統中腸由来の cDNA についても同様に行い、JPal-per 系統からは 29 個の、感受性系統からは 35 個のコロニーを無作為に選抜し、それぞれを 3 ml LB 培地で一晚培養後、プラスミドを精製した。第1節、6.の方法に従いインサート DNA の塩基配列を解析し、アイソフォームの種類と割合を算出した。その結果、両系統ともに CYP6-2 と名付けられたアイソフォームが全体の約 60% を占めていたため、この遺伝子の完全鎖長のクローニングを試みた。スクリーニング及び塩基配列解析は第1節の方法に準じた。JPal-per 系統中腸由来の cDNA ライブラリーを DIG ラベルした CYP6-2 遺伝子をプローブとしてスクリーニングした後、3 回のプラーク純化を経て約 1.6 kbp のインサートをプラスミド pUC118 へサブクローニングした。M13 (-21)、M13 RV ユニバーサルプライマーによって解読した配列を基に合成プライマーを作製し、さらに先の配列を解析した。

2. ノーザンブロットイング

① RNA の精製

両系統の 4 齢幼虫約 100 頭から、中腸を摘出し、すばやく液体窒素中に保存した。total RNA の精製は、ISOGEN (ニッポンジーン) を用いて行った。中腸を 0.8 ml の ISOGEN とともにガラスホモジナイザーを用いて磨碎し、室温で 5 分間放置後 0.2 ml のクロロホルムを加え 30 秒間激しく攪拌し、氷上 5 分間インキュベートした。12,000×g で 15 分間、4℃にて遠心分離して得られた上清を再び遠心分離して組織より分離した。フェノール:クロロホルム抽出を 2 回行うことにより上清中に混入したタンパクを除去し、0.8 ml のイソプロパノールを加えて 30 分間放置後 4℃にて 12,000×g、15 分間遠心分離し、RNA を沈殿させた。さらに沈殿物を 1 ml の 70% エタノールで洗浄後、DEPC 処理水 50 µl に溶解した。溶液の RNA 濃度は OD_{260nm} の吸光度測定及び電気泳動後に検出される 28S リボゾーム RNA 量により算出し、系統間での RNA 濃度を一定にした。抽出後の RNA は -20℃で

保存した。

② RNA の電気泳動

Total RNA 6 μg を含む溶液 5.5 μl を変成溶液 ($\times 10$ MOPS buffer (0.4 M MOPS, pH 7.0, 0.1 M CH_3COONa , 0.01 M EDTA): 12.3 M ホルムアルデヒド : ホルムアミド = 5 : 9 : 25) 19.5 μl と混合し、75°C で 15 分間インキュベートした。氷上で急冷した後、5 μl の loading buffer (1 mM EDTA, pH 8.0, 0.25% bromo phenol blue, 50% glycerol) を加えて試料とした。試料は、1 \times MOPS 当量、ホルムアルデヒド (最終 2.2 M) を含む 1% アガロースゲル中で泳動した。電気泳動は 1 \times MOPS を泳動緩衝液として 20V、約 12 時間行った。電気泳動後のゲルはエチジウムブロマイドにより染色し、28S リボゾーム RNA を撮影後、DEPC 処理水にてホルムアルデヒドを除去し、20 \times SSC 溶液にて 45 分間浸透した。

③ ナイロンメンブレンへの転写

ナイロンメンブレンへの転写はキャピラリー法 (Thomas, 1980, 1983) を用いて行った。ゲルと同じサイズに切った Gene Screen Plus ナイロンメンブレンを 20 \times SSC に浸し、ゲルに密着させ、20 \times SSC を媒体として、ゲル中の RNA をメンブレンに転写した。

④ プロブの調製及びハイブリダイゼーション

ノーザンブロットティングのプロブには degenerate primer (第 1 節) を使って両系統中腸由来の cDNA より増幅した約 250bp の PCR 産物を用いた。標識は第 1 節の方法に準じ、PCR 反応液中に DIG conjugated dUTP を加え、PCR 反応中に dTTP と置換させることにより行った。プレハイブリダイゼーション済みのメンブレンと共に 50%ホルムアミドを含むハイブリダイゼーション溶液中にて、40°C で一晩インキュベートした。cDNA ライブラリーのスクリーニングの場合と同様に洗浄後、Boehringer 社のプロトコールに従い発光処理を行い化学発光用フィルムに感光させた。現像処理後のフィルムは Adobe photoshopTM LE (Adobe) によって画像を取り込み、NIH Image ver. 1.55 により相対発光強度を測定した。

結果

両系統の幼虫体内に存在する P450 アイソフォームの数、割合を検討する目的で、degenerate primer により増幅された PCR 産物をプラスミドベクターへサブクローニングし、感受性系統より 35 個、抵抗性系統より 29 個について構造解析を行った。その結果、感受性系統からは 4 種類の、JPal-per 系統からは 7 種類のアイソフォームの存在が確認された (Table 17)。これらのうち *CYP6E1* と *CYP6F1* (国際命名委員会により命名) の塩基配列にそれぞれ一つずつ系統間変異をもつクローンが認められたが、アミノ酸レベルでの変異は確認されなかった (Fig. 24, 25)。種間の相同性は塩基レベルで 51%~88%、アミノ酸レベルで 25%~79%であった (Table 18)。

個々のアイソフォームの PCR 産物中に占める割合を Table 19 に示した。感受性系統からは *CYP6E1*、*CYP6F1*、*CYP6-3*、*CYP6-4*、の 4 種のアイソフォームが確認され、JPal-per 系統からは感受性系統で確認された 4 種に加え、全部で 7 種のアイソフォーム (*CYP6E1*、*CYP6F1*、*CYP6-3*、*CYP6-4*、*CYP6-5*、*CYP6-6*、*CYP6-7*) が確認された。両系統ともに *CYP6F1* の割合が最も高く、全体の約 60% を占めていたことから、*CYP6F1* は殺虫剤抵抗性に限らずネッタイエカ幼虫体内で何らかの重要な位置にあるアイソフォームであると考えられた (Table 19)。

PCR により増幅された産物をプローブとして行ったノーザンブロットィングの結果を Fig. 26 に示した。インターナルマーカであるリボゾーム RNA 量が両系統で等しいのに対し、得られた P450 のシグナルは JPal-per 系統で強かった。NIH Image アナライザーにより定量した結果、今回増幅した P450 の mRNA 量は抵抗性系統である JPal-per 系中腸において感受性系統の約 2.3 倍多く発現していた。この数値を JPal-per 系統の各アイソフォームの割合に掛けた値と、感受性系統の各アイソフォームの割合との比は、そのまま発現量の比に反映されることが考えられ、算出した (Table 19)。その結果 *CYP6-3* と *CYP6E1* ではそれぞれ 1.2 倍と 1.4 倍となり、系統間で大きな差がなかったのに対し、*CYP6F1* と *CYP6-4* では JPal-per 系統でそれぞれ 2.4 倍と 8.2 倍多く発現していると予想された。これらのことから、*CYP6F1* はネッタイエカ幼虫において主要なアイソフォームであり、しかも JPal-per 系統で過剰発現していることが予想された。従って次に *CYP6F1* cDNA

Table 17. *CYP6* gene fragments cloned by PCR from the gut of permethrin-susceptible (S) and -resistant (R) JPal-per larvae of *C. quinquefasciatus*

Gene name	Strain	Nucleotide ^a changes	Amino acid ^a changes	DDBJ Accession No.
<i>CYP6E1</i>	S, R	1	0	AB001323
<i>CYP6F1</i>	S, R	1	0	AB001324
<i>CYP6-3</i>	S, R	0	0	-
<i>CYP6-4</i>	S, R	0	0	-
<i>CYP6-5</i>	R	-	-	-
<i>CYP6-6</i>	R	-	-	-
<i>CYP6-7</i>	R	-	-	-

^a Nucleotide or amino acid changes between susceptible and resistant strains.

A CYP6-2

1 GCAGTTCCGTTCTCTGAACCGTGAGTGTCTAAGGATTACAAAATCCCCGGAACAGACACC 60
 A V P F L N R E C S K D Y K I P G T D T

61 ACCATCGAGAAAGGAACATCGTTAGTCATTCAGTCTCGGACTACACCGGATCCCGAT 120
 T I E K G T S L V I P V L G L H R D P D

121 CACTACCCGGAACCGGACAGGTTTCATTCGGAACGGTTCAGCAACTTTGAAGATATTTCC 180
 H Y P E P D R F I P E R F S N F E D I S

181 ACCAAACCGTATCTT 194
 T K P Y L

B CYP6-3

1 GGATTGCCAATCCTCAACCGGGAGTGCACCCAGGACTTCCAGGTGCCACAGTCAAAGGTG 60
 G L P I L N R E C T Q D F Q V P Q S K V

61 GTCATCAAGAAGGAACGCAGATCATCATTCGGATCTCTGCCTACGGCATGGACGAGCGA 120
 V I K K G T Q I I I P I S A Y G M D E R

121 TACTTCCCTGATCCGGACAGCTACATCCCGGAGCGGTTCTTCGAGGAAGCAAGAACTAC 180
 Y F P D P D S Y I P E R F F E E S K N Y

181 GACGACAATGCGTACCAG 198
 D D N A Y Q

C CYP6-4

1 CCGGTTGACTATCTGATGCGTTCGATCCAAGACTACCTACAACCACATTCAGACGGAACG 60
 P V D Y L M R R S K T T Y N H I P D G T

61 CTGTTTCATAGTTCCAACGTACGCGCTGCACCACGATCCTGACCACTATCCCGAGCCGGAA 120
 L F I V P T Y A L H H D P D H Y P E P E

121 AAGTTTGTATCCAGAGCGATTTGCACCGAGCGGATCCGCAAAAGACATCCCTACAGTTT 180
 K F D P E R F A P S A I R K R H P Y S F

181 CTA 183
 L

D CYP6-5

1 GGATTGCCAATCCTCAACCGGGAGTGCACCCAGGACTTCCAGGTGCCACAGTCAAAGGTG 60
 G L P I L N R E C T Q D F Q V P Q S K V

61 GTCATCAAGAAGGAACGCAGATCATCATTCGGATCTCTGCCTACGGCATGGACGAGCGA 120
 V I K K G T Q I I I P I S A Y G M D E R

121 TACTTCCCTGATCCGGACAGGTTTCATTCGGAACGGTTCAGCAACTTTGAAGATATTTCC 180
 Y F P D P D R F I P E R F S N F E D I S

181 ACCAAACCGTATCTT 196
 T K P Y L

E CYP6-6

1 CCACTGGACAATACGTTCCGAACGAATGAAGTGGATTACGTAATACCTGGTACAAATTAC 60
 P L D N T F R T N E V D Y V I P G T N Y

61 ACCATTCAGCTGGTACGTTTCGTCAGATTCCGATCTACGCCATCCAACGGGATCCGGAT 120
 T I P A G T F V Q I P I Y A I Q R D P D

121 AACTTCCCGAACCGGACAAGTTCGACCCAGACCGATTTCCTCCCGGAAGCCGTGAAAAGT 180
 N F P E P D K F D P D R F L P E A V K S

181 CGTCACCCGTACGCGTACATA 201
 R H P Y A Y I

F CYP6-7

1 TCCGTGGACTTTCTGATGAGGACGTCCAACAGCGATTTCCCGTTCCCAACAGCGACCTC 60
 S V D F L M R T S N S D F P V P N S D L

61 ACGATCCCAAGGGCACCTTCCTGATAGTACCAACCTACGCGCCGACGACGATCCCGAC 120
 T I P K G T F L I V P T Y A P Q H D P D

121 CACTACCCGGATCCGGACCGGTTTCGATCCGGAGCGTTTCAACGAAACCAACCGGCAAGC 180
 H Y P D P D R F D P E R F N E T N R A S

181 CGCCACCCGTTTCGTGTATCTG 201
 R H P F V Y L

Fig. 24. Nucleotide sequences and deduced amino acid sequences of PCR products, CYP6-2, CYP6-3, CYP6-4, CYP6-5, CYP6-6 and CYP6-7.

CYP6E1	1	PVANLFR	EITKNYKVP	ETDITL	EKGYRV	VIPV	GIHHD	PD	IYPN	PEVFN	PERF	IPEL	STNR	HPMAYL	67									
CYP6F1	1	AVPFLN	RECSKDY	KIPG	TDTT	EKGT	SLVI	PVL	GLHR	DP	DHY	PEP	DR	FIPERF	-SNF-EDISTKPYL	65								
CYP6-3	1	GLPILN	RECTQ	DFQV	PQSK	VVIK	KGTQ	II	LI	PI	SAYG	MDER	YFP	DP	DSYI	PERFF	EESKNYDDNAYQ-	66						
CYP6-4	1	PVDYLM	RRSKTTY	---	N-H--	IP	DG	TL	FIV	PT	YAL	HH	DP	DHY	PE	PEK	FD	PERF	APS	AIRK	RHPYSFL	61		
CYP6-5	1	GLPILN	RECTQ	DFQV	PQSK	VVIK	KGTQ	II	LI	PI	SAYG	MDER	YFP	DP	DR	FIPER	-FSNF	FEDISTKPYL-	65					
CYP6-6	1	PLDNT	FRTNE	VDY	VIPG	TNYT	IP	ACT	FVQ	IPI	YAI	QR	DP	DNF	PEP	DK	FD	DR	FL	PE	AVK	SRHPYAYI	67	
CYP6-7	1	SVDFL	MRTS	NSD	FV	PNS	DLT	IP	KG	TFL	I	V	PT	YAP	QH	DP	DHY	PD	DR	F	PER	FNET	NRASRHPFVYL	67

Fig. 25. Comparison of the amino acid sequence deduced from the sequence of the cloned CYP6 PCR products.

Table 18. Percentage identity of the nucleotide and deduced amino acid sequences of the *CYP6* genes

	CYP6E1	CYP6F1	CYP6-3	CYP6-4	CYP6-5	CYP6-6	CYP6-7
CYP6E1	—	47.8	32.8	43.3	31.3	44.8	41.8
CYP6F1	60.9	—	37.3	40.3	55.4	41.8	44.8
CYP6-3	58.1	60.2	—	25.0	78.8	34.3	37.3
CYP6-4	52.0	54.7	51.7	—	28.4	43.3	50.8
CYP6-5	56.9	71.6	87.4	51.2	—	34.3	43.3
CYP6-6	59.1	59.3	55.0	57.9	54.1	—	46.3
CYP6-7	53.7	56.2	52.5	63.6	53.4	55.5	—

Note. Figures in upper right (shadowed) and lower left columns are % identity of the deduced amino acid sequence and nucleotide sequence, respectively.

Table 19. Expression of the *CYP6* genes in permethrin-susceptible and -resistant JPal-per larvae of *C. quinquefasciatus*

Gene name	Susceptible		JPal-per			%R × 2.3 / %S
	n ^a	%S	n ^a	%R	%R × 2.3	
<i>CYP6F1</i>	20	57.1	17	58.6	134.8	2.4
<i>CYP6-3</i>	12	34.3	5	17.2	39.6	1.2
<i>CYP6-4</i>	1	2.9	3	10.3	23.7	8.2
<i>CYP6E1</i>	2	5.7	1	3.4	7.9	1.4
<i>CYP6-5</i>	0	0	1	3.4	7.9	-
<i>CYP6-6</i>	0	0	1	3.4	7.9	-
<i>CYP6-7</i>	0	0	1	3.4	7.9	-
Total	35	100.0	29	99.7	229.7	-

^aNumber of cDNA clones identified.

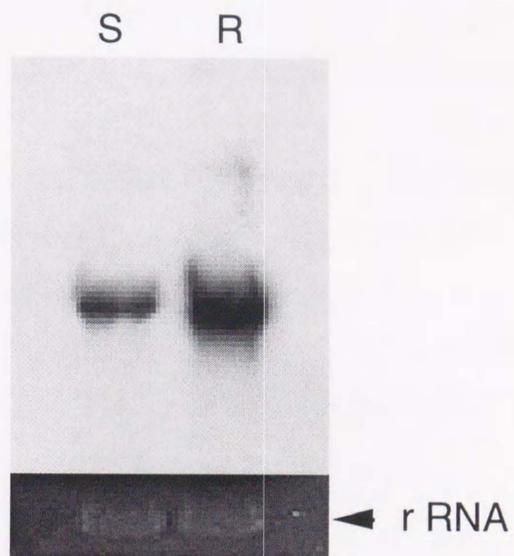


Fig. 26. Northern blot analysis of total RNA isolated from guts of permethrin-susceptible (S) and -resistant JPal-per (R) larvae of *C. quinquefasciatus*. Mixed probes (250bps) were used.

の完全鎖長のスクリーニングと構造解析を試みた。

cDNA ライブラリーのスクリーニングの結果、 6.2×10^4 個の組換え体ファージより、11 個の陽性クローンを得た。これらのうち約 1.6 kbp のインサートについてサブクローニングし、ユニバーサルプライマーによって解読した配列を基に合成プライマーを作製し、完全鎖長の配列を解析した (Table 20, Fig. 27)。その結果、508 個のアミノ酸翻訳領域を含む 1,597 bp の cDNA 全長が明らかとなった (Fig. 28)。CYP6F1 と名付けられたこのアイソフォームはチトクロム P450 に特徴的な領域をいくつか含んでおり、疎水性膜結合領域 (3-20 番目)、還元酵素結合領域 (362-371、416-427 番目)、ヘム鉄結合領域 (441-450 番目) は他のチトクロム P450 と同様によく保存されていた (Fig. 29)。また、系統学的に見ると CYP6F1 は CYP6E1 とともに他の 6 族 P450 に近縁で、特にイエバエより単離された CYP6C 亜族に最も近いグループであるが、既知の亜族に分類されるものではなかった (Fig. 30)。

考察

現在までのところ、殺虫剤抵抗性昆虫よりクローニングされ、その遺伝子発現について報告されたアイソフォームはイエバエで 2 種 (CYP6A1、CYP6D1)、キロショウジョウバエで 1 種 (CYP6A2) ある (Carino *et al.*, 1994; Tomita *et al.*, 1995; Waters *et al.*, 1992)。そして、これらをコードする遺伝子はいずれも抵抗性系統で過剰発現しており、その結果タンパク質量の過剰生産が生じ、基質となる殺虫剤の解毒活性の増大につながっていると推測されている。また、これらのアイソフォームでは遺伝子そのものの増幅は認められず、発現因子により制御された現象であるとされている (Taylor and Feyereisen, 1996)。構造遺伝子の質的な変異がチトクロム P450 の解毒活性の増大をもたらしている現象はまだ直接的証拠により確認されていないことから、JPal-per 系統における P450 酸化酵素系の活性増大も遺伝子発現量の違いによりもたらされている可能性が高いと思われる。第 3 章において JPal-per 系統のチトクロム P450 量が感受性系統の 2.7 倍であったこともこの可能性を強く示唆するものである。

アイソフォームの多様性から考えて、もし一部のアイソフォームのみが

Table 20. Oligonucleotide primers used for the sequence analysis of *CYP6F1* cDNA

M13 (-21)	5' -TGTAACGACGGCCATT-3'
M13 RV	5' -CAGGAAACAGCTATGAC-3'
Q1F	5' -CAATGCTGGTGGTCAAC-3'
Q2F	5' -CAGTTCCGTTCCCTGAAC-3'
Q3R	5' -CCTTAGAACACTCACGG-3'
Q5R	5' -CCCCAAACGGAAGATAC-3'
Q6F	5' -CATGGGACATCGAAGTG-3'
Q6R	5' -CACTTCGATGTCCCATC-3'
Q7R	5' -AAATCACGCACAAGCAC-3'
Q9R	5' -ACGTTTCGCCACGTGATC-3'
Q10F	5' -CGGTTGGATTCCGGAATC-3'
Q11F	5' -ATTCCAGTCCTCGGACTA-3'

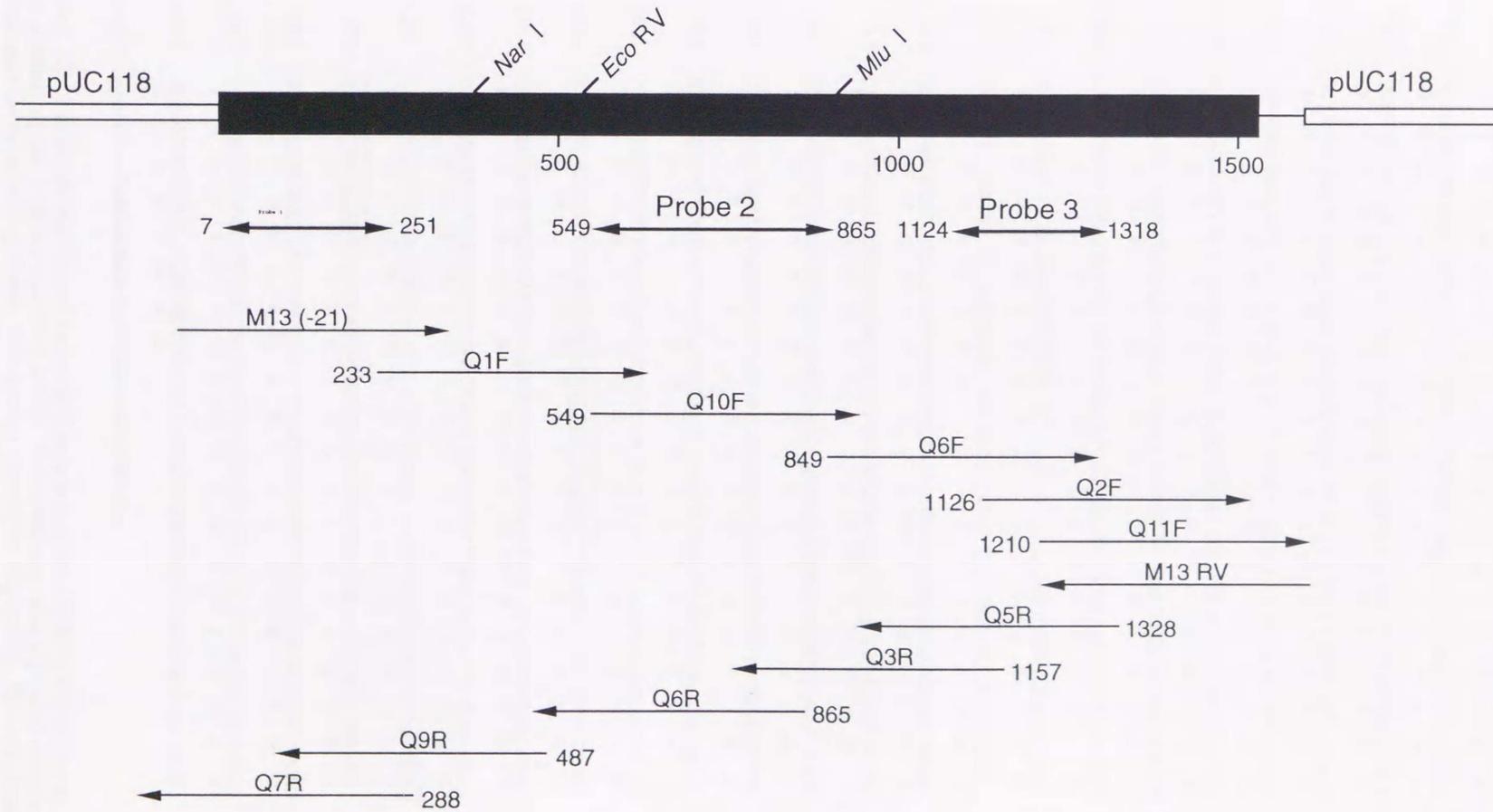


Fig. 27. Sequencing strategy and restriction map of *CYP6F1* cDNA. Numbers indicate the sequence positions of synthesized oligonucleotide primers. Probe 1, 2 and 3 were used for Northern or Southern blotting.

1	AAATGTTTGGCGTGGATAATCTGCGCTGCGGCAGCAGTTCGCGTGGTGTACTTCCTGATCGT	60
	M F A W I I C A A A A V P L V Y F L I V	
61	GTACCAGTTCAGCTACTGGAAACGTCGTGGGATCACACAACCTCACTCCATCAITCCCATT	120
	Y Q F S Y W K R R G I T Q L T P S F P F	
121	TGGAGATCTTGGACCGTTCCTTTCGGCAACGGTCCAGCCTCGGAGTGGTCTACGCCGATGT	180
	G D L G P F F R Q R S S L G V V Y A D V	
181	GTACCGGCTGTGCAAGCGCTACCCCTTTGTGGGGATCTACCTTTCTTGGGCCAATGCT	240
	Y R L C K R L P F V G I Y L S L R P M L	
241	GGTGGTCAACGACCCGAGTTGATTAAAAATGTGCTTGTGCGTGATTTTGACCCTTTCA	300
	V V N D P E L I K N V L V R D F D H F H	
301	CGATCGTGGACTGTACGTGAACGAGGAGAAGGCCACTCAGTGGGCATTTGTTTGGCACT	360
	D R G L Y V N E E K D P L S G H L F A L	
361	CGTGGCGAACAGTGGCGCCATCATCGGTCCAAGCTAACGCCAACGTTACCTCGGGAAG	420
	G G E Q W R H H R S K L T P T F T S G R	
421	GTTGAAGGAGATGTTACGAACTTGGTCCAAATTGGGCGTGTCTCCAAGATCAGTGGC	480
	L K E M F T N L V Q I G R V L Q D H V A	
481	GAAACGTGCTGGGAGGACATCGAAATTCGGGACGTGATGGCGCGGTACACTACCGATAT	540
	K R A G E D I E I R D V M A R Y T T D I	
541	CATGTCATCGGTTGGATTTCGGAATCGAAAATGACTCCATCAACGAAAAGGGCAACATTTT	600
	I A S V G F G I E N D S I N E K G N I F	
601	CAGGAAATGGGAACGAAGTGTCTCTCCTGATCTTAAGACGATACCTTCGATTGACGAG	660
	R E M G T K V F S P D L K T I L R L T S	
661	CACATTTTCACTCAAAGCTGAACGCACTGTTTGGATTCAAATTTATCGCACAGGAGAT	720
	T F F T P K L N A L F G F K F I A Q E I	
721	TGAAGACTTCATCATGAACGTTGTACGTGAAACCCTGGAGTACAGAGAAAGCAACAAGT	780
	E D F I M N V V R E T L E Y R E S N K V	
781	CGTCCGGAAGGATATGATGCAGCTGCTCATGCAGCTACGTAACCTCCGGAACGGTTTCGAT	840
	V R K D M M Q L L M Q L R N S G T V S I	
841	CGACGATCGATGGGACATCGAAGTGTCAACCAACAAGAAAAGCTGTCCCTGGAACAAGT	900
	D D R W D I E V S T N K K K L S L E Q V	
901	CACAGCACACGCGTTCGTATTTCTTCATAGCAGCATACGAAACATCATCGACCACCATTTT	960
	T A H A F V F F I A A Y E T S S T T I S	
961	GTTCTGCTTGTTCGAACTGGCACGCAATCCGGAGATTCAAAGAAAAGTCAACAAGAAAT	1020
	F C L F E L A R N P E I Q K K V Q Q E I	
1021	TGACCAAGTTCTCGCAAGCCACAACGGCGAAATCACCTACGACAACATCAACGAAATGAA	1080
	D Q V L A S H N G E I T Y D N I N E M K	
1081	ATACCTCGAAAACGTCATCGA CGAAACGCTCCGAAAGTATC CGGCAGTTCGGTTCCTGAA	1140
	Y L E N C I D E T L R K Y P A V P F L N	
1141	CCGTGAGTGTCTAAGGATTACAAAATCCCCGGAACAGACACCACCATCGAGAAAGGAAC	1200
	R E C S K D Y K I P G T D T T I E K G T	
1201	ATCGTTAGTCATTCCAGTCCCTCGGACTACACCGCGATCCCGATCACTACCCGGAACCGGA	1260
	S L V I P V L G L H R D P D H Y P E P D	
1261	CAGGTTCAATCCGGAACGGTTCAGCAACTTTGAAGATATTTCCACCAAACCGTATCT TCC	1320
	R F I P E R F S N F E D I S T K P Y L P	
1321	CTTTGGGGCAGGAC CTCGCAACTGTATTGGACTGAGATTGGGCAAGCTGCAAACAAGGC	1380
	F G A G P R N C I G L R L G K L Q T K A	
1381	GGGACTGGTGTATGATGTCTCAAGTTTAAACGTGCGGCTTGCTGATGAAACTTACGCCAG	1440
	G L V M M L S K F N V R L A D E T Y A S	
1441	CAAAGAGCTAGCGCTCGATGCGCGAAGTGTGGTTCTAATGCCGGTTGGAGGTATTAAGGT	1500
	K E L A L D A R S V V L M P V G G I K V	
1501	GTCGATTTTCGGAACGGAGGGCTTCGTAAtacaattgaagtgactcgtaataataactt	1560
	S I S E R R A S *	
1561	aaatatcataataaatgataactaaataaactattta	1597

Fig. 28. Nucleotide and deduced amino acid sequence of the *CYP6F1* cDNA clone. A poly A addition signal is shown with bold letters. Nucleotide sequence expressed with capital letters indicates the open reading frame. Star denotes translation stop codon. Boxes indicate the positions of primer used for amplifying the PCR products. Deduced amino acids are shown with single capitals under the nucleotide sequence.

CYP6E1	1	M----	LLYLVTIVT-WLVYVWIKRRYSYWKDRGVPSLRVSFPAGNL-QG-IGHR-HLGLI	52
CYP6F1	1	M----	FAWIICAAAPLVVYFLVYQESYWKRRGITQLTFSFPFGDL-GPFFRQRSSLCVV	56
CYP6A1	1	MDFGSFLLYALGVL-ASLALYFVRWNEGYWKRRGI PHEEPHLVMGNVK--GLRSKYHIGEI	58	
CYP6B2	1	M-WIFYFPAVISVLIVLILYFYFTR-TFNYYKKRNVRGPEEVVFFGNLKDSALRKK-NMGVV	58	
CYP6D1	1	M-----	LLLLLIVVTLTYIFAKLHYTK-W-ERLGFESDKATIPLGSMKAVFHKERPFGLV	54
CYP6E1	53	MODLYGKLGSGAKFGGIYSFLKPMVMVLDLDFAKDVLVREFQYFHDRGMYNERDDPLSA	113	
CYP6F1	57	YADVY-RL-CKRLPFVGIYLSLRPMLVNDPELIKNVLRDFDHFHDRGLYVNEEKDPLSG	115	
CYP6A1	59	IADYVRKF-KGSGPEAGIFLGHKPAAVVLDKELRKRVLKDFSNFANRGLYNEKDDPLTG	118	
CYP6B2	59	MEELYNMF-PEEKVI-GIYRMTSPCLLVRDLEVIKHIMIKDFEVESDRGLEFS-KEG-LGQ	115	
CYP6D1	55	MSDIY--DK-CHEKVVGIYLFKPAALVRDAELARQILTTDFNSFHDRGLYVDEKNDPMSA	112	
CYP6E1	114	HLVSLGCDKMSLRKLTPTFTSGKMKM--FGTIEEVDRLEGCI RVRVESGECIEIRDI	172	
CYP6F1	116	HLEALCGEQWRHRSKLTPTFTSGRLKEM--FTNLVQIGRVLQDHV-AK-RAGEDIEIRDV	172	
CYP6A1	119	HLVMVEGKWRSLRKLSPFTTACKMKM--YNTVLEVGQRLLLEVMEKLEVSSELDMRDI	177	
CYP6B2	116	NLFHADGDTWRTLRNRFTPTFTSGKMKM--FYLMEGADNFIDHVSKECEKHQEFIEHTL	174	
CYP6D1	113	NLFVMEGQSWRTLRLMKLAPSFSSGKLGKMFETVDDVAAKLLNHLNERLKDQSHVLEIKSI	173	
CYP6E1	173	ISRFAMDVIGSCAFGLDCNSLVSDPPFWKMSLK-ASTTKLQFLISLFATTY-RKFSNQI	231	
CYP6F1	173	MARYTTDIIASVGFCEIENDSINEKGNIREMGTK-V-FSPDLKTIILRLTSTFTPKINALF	231	
CYP6A1	178	LARFNTDVIGSVAFGIECNSLRNPHDRFLAMGRK--SIEVPRHNALIMAFIDSFPELSRKL	236	
CYP6B2	175	LQTYTMTSTISSCAFVSVDYDTSKLDLDT-LATVDK--IISEPSY-AIELDMM--YEGLLPKL	229	
CYP6D1	174	LTTYAVDIIGSVIFGLEIDSFTHPDNEFRVLSDRLFNPKKSTMLQRFRNLSNFCIPPLAKL	234	
CYP6E1	232	GICVLENDVSDF-YLGAVRDTIKFRMDNQASRKEDEMDLLIKL-----ED--NF---	276	
CYP6F1	232	GFKFIAQEIIEDE-IMNVVRETLEYRESNKVVRKDMQLMQLRNSGTVS--IDDRWDIEVS	289	
CYP6A1	237	GMRVLEPDVHOF-FMSSIKETVDYREKNINRRNDELDELVDLKNPE---SISKLG-GL-	290	
CYP6B2	230	NLSIFPSVVHKE-FKNLVNTIVTQRNGKPSGRNDEMILLBLRQMGIEI---TSNKYGNMS	286	
CYP6D1	235	LSRLGAKDPITYRLRDIVKRTIEFREKGVVRKLLQLFICLRNTGKISDDNDKLWHDVES	295	
CYP6E1	277	T----FN-E--IAA-QAFVVFQAGYETSSITMTFCLYELA--LNQELQ--ERARKSVEDVL	325	
CYP6F1	290	INKKLSLE-QVTA-HAFVVFIAAYETSSITISFCLFELA--RNPEIQ--KKVQOEIDQVL	344	
CYP6A1	291	IFN--E-----LAA-QVVFVFLGGFETSSSTMGFALYELA--QNQLQ-DRLREEVNEVFD	340	
CYP6B2	287	ILEITESV---MCA-QAFVVFYIAGYETGATIMAYLTYCLA--LNPDIQ-NKLAIEIDEAIK	340	
CYP6D1	296	IAENLKAMSIDMIASNSLIFYTAGSETTAATTSEFTIYELAMYPEILKKAQSEVDECLQRHG	356	
CYP6E1	326	KRH-GSFSYETIQDMEFLNCCVKEITLRKYPVANLFRREITKNYKVP-EITDITLEKGYRVVI	384	
CYP6F1	345	ASHNGEITIDNINEMKYLENCIDETLRKYPVAVPFLNRECSKDYKIP-GTDTTIEKGTSLVI	404	
CYP6A1	341	QFKEDNISYDALMNIPLYDQVLNETLRKYEVGSAITRQTLNDYVVPHNPKYVLPKGTLVFI	401	
CYP6B2	341	A-NGGKVTYDITVKDMKYLNKVFDETLRMYSIVEPLQRKAI RDKLP-GTDVVIEKDTVVLI	399	
CYP6D1	357	LKPOGRLTYEAIQDMKYL DLCVMETTRKYVGLPFLNRKCTODFQVED-TKLTIPKETGIII	416	
CYP6E1	385	FVYGIHHPDIIYPNPEVFNPERFIPELSTNRHPMAYLFCGEGPRCTICERFALMETRIGLS	445	
CYP6F1	405	FVLGLHRDPDHYPEPDRFIPERF-SNF-EDISTKPYLFCGAGFRNCTIGLRLGKLOTKAGLV	463	
CYP6A1	402	FVLGIHYDPELYENPEEEDPERFSPKQVORDSVDWLGFCGFRNCTIGMREGMKQSRGLIA	462	
CYP6B2	400	SPRGIHMDPKYDNPKEQENPERFFAEVGVKRRHPCAYLFPGLGQRNCTIGMREGRLQSLLCIT	460	
CYP6D1	417	SLLCIHRDPQYFEPQEDYRPERF-ADESKDYDPAAYMFCGEGPRHCTACRMGVINSKVALA	476	
CYP6E1	446	RLLOKFRFKLAPQTSRIELNKTGVFLSIQGNLWMKVKKCHNLTVVTEPAEEN	499	
CYP6F1	464	MMLSKFNVRLADETYASKELA-LDA-RSV-V-L-MPV-GG-IKVS-ISERRAS	508	
CYP6A1	463	LVIIRHFRFTVCSRTDI PMQINPESLAWTPKNNLYLVNQAI-RKKIK	507	
CYP6B2	461	KLLSKFRLEPSKNTDRNLQVEPYRFIIGPKGGIRLNIVP--RKDVS	504	
CYP6D1	477	KILANFNIQPMRQEVFKFHSAPVLPVNGLVNGLSKRW	516	

Fig. 29. Comparison of amino acid sequence of *Culex* P450s (CYP6E1, CYP6F1) to those of three cytochrome P450s from insects. CYP6A1 (Feyereisen *et al.*, 1989) and CYP6D1 (Tomita and Scott, 1995) isolated from a house fly, *Musca domestica* and CYP6B2 (Wang and Hobbs, 1995) from a cotton bollworm, *Helicoverpa armigera*. Conserved amino acids are highlighted.

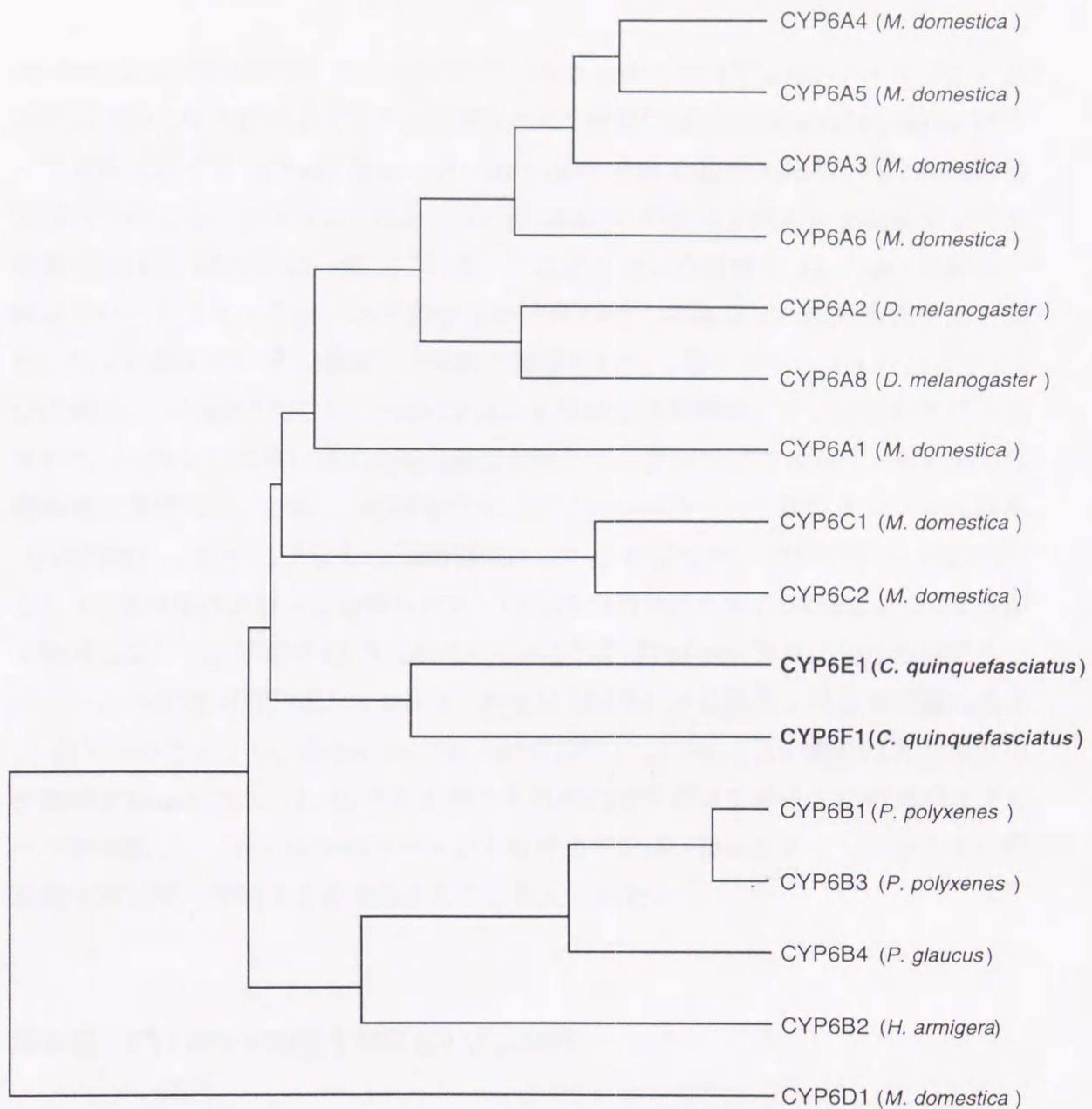


Fig. 30. Dendrogram of cytochrome P450s from insect CYP6 families. Phylogenetic relationship of *Culex* P450s (CYP6E1, CYP6F1) to 14 cytochrome P450s isolated from insects were analyzed by computer-aided methods. Accession numbers of amino acid sequences of insect cytochrome P450s were the following; CYP6A1 (M25367), CYP6A2 (S51248), CYP6A3 (U09231), CYP6A4 (U09232), CYP6A5 (U09343), CYP6A6 (U09344), CYP6A8 (L46859), CYP6B1 (Z29624), CYP6B2 (U18085), CYP6B3 (U25819), CYP6B4 (U47059), CYP6C1 (U09233), CYP6C2 (U09345) and CYP6D1 (U15168).

permethrin 解毒に関与しているならば、P450 全体での 2.7 倍は、アイソフォーム単位の比較ではそれ以上であると予想される。今回用いた degenerate primer によって増幅される 6 族 P450 全体では、JPal-per 系統で感受性系統の約 2.3 倍多く発現していることが明らかとなった (Fig. 26)。この値は上記の全 P450 タンパク質量の系統比 (2.7 倍) に一致している。この 2.3 という数値を JPal-per 系統より確認された各アイソフォームの割合に掛け合わせて理論的な系統間の発現比を算出した (Talbe 19)。その結果、両系統で確認された 4 種のアイソフォームの中で、CYP6F1 と CYP6-4 についてのみ JPal-per 系統で過剰発現している可能性が示唆された。このように算出された発現量比はサンプル数が十分ではなく、あくまでも理論値に過ぎない。しかし、cDNA ライブラリーから拾われた陽性クローンの確率 (CYP6E1 は 3.9×10^5 より 3 個の陽性クローンが得られ、CYP6F1 は 6.2×10^4 より 11 個の陽性クローンが得られた) からは、CYP6F1 が CYP6E1 より 23 倍多く発現していると予想され、Table 19 に示された JPal-per 系統における両アイソフォームの割合 (CYP6E1: 3.4%、CYP6F1: 58.6%) から算出される発現量の比は 17 倍であることから、Table 19 に示された各アイソフォームの割合はある程度の信頼性があると考えられる。今後実際にそれぞれのアイソフォームに特異的なプローブを作製し、ノーザンブロットィングを行うことで、個々のアイソフォームの発現量を系統間で比較する必要があると考えられた。

第 3 節 CYP6F1 の遺伝子発現とゲノム解析

前節までに、本種幼虫体内には少なくとも 7 種類のチトクロム P450 アイソフォームが存在し、それらのうち CYP6F1 の遺伝子が JPal-per 系統で過剰発現している可能性が示唆された。したがって本節においては CYP6F1 に特異的なプローブを用いてノーザンブロットィングを行うことで遺伝子発現量を、ゲノミックサザンブロットィングによって染色体 DNA の構造を系統間で比較した。

材料及び方法

1. ノーザンブロットィング

供試昆虫は前節に準ずる。第 2 節でクローニングされた *CYP6F1* の部分配列 (*CYP6-2*) をプローブとしてノーザンブロットィングを行った。方法は前節に準じて行った。また、中腸とともに、中腸以外の組織からも RNA を抽出し、中腸からは 3 μ g の、それ以外の組織からは 10 μ g の RNA を用いて *CYP6F1* 遺伝子の発現量を系統間で比較した。

2. サザンブロットィング

① ゲノム DNA の抽出

ゲノム DNA の抽出法は Blin and Stafford (1976) の方法を改良して行った。4 齢幼虫より中腸及び頭部を取り除いた組織約 500 頭分を液体窒素中、乳鉢を用いて磨砕した。磨砕した組織を digestion buffer (10 mM Tris-HCl, pH 8.0, 0.1 M NaCl, 25 mM EDTA (pH 8.0), 0.5 % SDS, 0.2 mg/ml protenase K) 10 ml に加え、50°C で 3 時間インキュベートした。この液にフェノール抽出、フェノール・クロロホルム抽出、クロロホルム抽出をそれぞれ 2 回ずつ施した後、エタノール沈殿により得られた DNA を 5 ml の TE に溶解した。さらに 50 μ l の RNase (10 mg/ml) を加えて 37°C、1 時間インキュベートした後 250 μ l の SDS (10 %), 50 μ l の protenase K (10 mg/ml) を加え、37°C で 2 時間インキュベートした。エタノール沈殿後、5 ml の TE に溶解し、OD₂₆₀ の吸光度測定及び電気泳動的に DNA 濃度を測定し、系統間での DNA 濃度を一定にした。

② ゲノム DNA の制限酵素処理

両系統より精製したゲノム DNA 30 μ g をエタノール沈殿により回収後、440 μ l の蒸留水に溶解した。50 μ l の $\times 10$ reaction buffer H (ニッポンジーン) と 10 μ l の制限酵素 *Eco* RI (10 unit/ μ l) もしくは *Eco* RV (12 unit/ μ l) を加え、37°C でインキュベートした。3 時間後さらに 10 μ l の制限酵素を加えて一晩インキュベートし、DNA 断片をエタノール沈殿により回収した。20 μ l の TE に攪拌した後 3 ml の loading dye を加え、電気泳動に用いた。

③ プローブの合成

サザンブロットィングには 3 種類のプローブを用いた。*CYP6F1* cDNA を鋳型として PCR 法により合成し、cDNA ライブラリーのスクリーニング時に用いたプローブ合成同様に DIG-conjugated dUTP を用いて標識した。Probe 1 (244bp, 5' 上流より 7-251 番)、Probe 2 (316bp, 549-865 番) は *Eco* RI 消化した DNA の

ハイブリダイゼーションに、Probe 3 (195bp, Fig. 24 参照) は *Eco* RV 消化した DNA のハイブリダイゼーションに用いた (Fig. 27 参照)。

④ 電気泳動、メンブレンへの転写及びハイブリダイゼーション

1%アガロースゲル (TE に溶解) にサンプルを投与し、20 mA で約 10 時間電気泳動した。サンプルと共に DIG-DNA marker II (λ Hind III 相当, Boehringer) を 2 μ l 泳動した。電気泳動終了後、ゲルをエチジウムブロマイドにより染色し、写真撮影を行った。0.25 N HCl 中で 10 分間浸すことで高分子 DNA を断片化した後、ゲルを蒸留水で 3 回洗い、さらに 0.4 N NaOH 中にて 20 分間振とうすることで 2 本鎖 DNA を変性した。0.4 N NaOH を媒体としてノーザンブロッティングの時と同様にキャピラリー法で DNA をナイロンメンブレンに転写した。転写後のメンブレンは 2 \times SSC で 10 分間洗浄後、プレハイブリダイゼーションを行った。プレハイブリダイゼーション及びハイブリダイゼーションは cDNA ライブラリーのスクリーニング時と同様の方法で行った。ただし、ともに反応温度は 50 $^{\circ}$ C で行った。

結果

CYP6F1 をプローブとして行ったノーザンブロッティングの結果を Fig. 31 に示した。中腸における *CYP6F1* mRNA は JPal-per 系統で過剰発現しており、Image analyzer による定量的結果、感受性系統との比は約 2.4 倍であった。一方、中腸以外の組織からは 10 μ g (中腸の 3 倍以上) の RNA を用いたにも関わらず、今回の条件下では mRNA の発現が全く確認されなかった。このことから、*CYP6F1* は JPal-per 系統で過剰発現し、中腸で特異的に発現していることが示唆された。

ゲノミックサザンブロッティングの結果を Fig. 32 に示した。ゲノム遺伝子を *Eco* RI で消化し、*CYP6F1* の部分配列 probe 1 をプローブとしてハイブリダイズさせた場合、感受性系統からは約 5.7 kbp のバンドが、JPal-per 系統からは 5.3 kbp と 9.0 kbp の 2 本のバンドが検出された (Fig. 32 A)。次に、より 3'側より合成したプローブを用いて同様な実験を行った。その結果、JPal-per 系統において 5.7 kbp のバンドが検出されず、9.0 kbp のバンドのみが現れた (Fig. 32 A)。また、*CYP6F1* cDNA 中に存在する *Eco* RV 消化したゲノムに対しては、両系統で 1 本

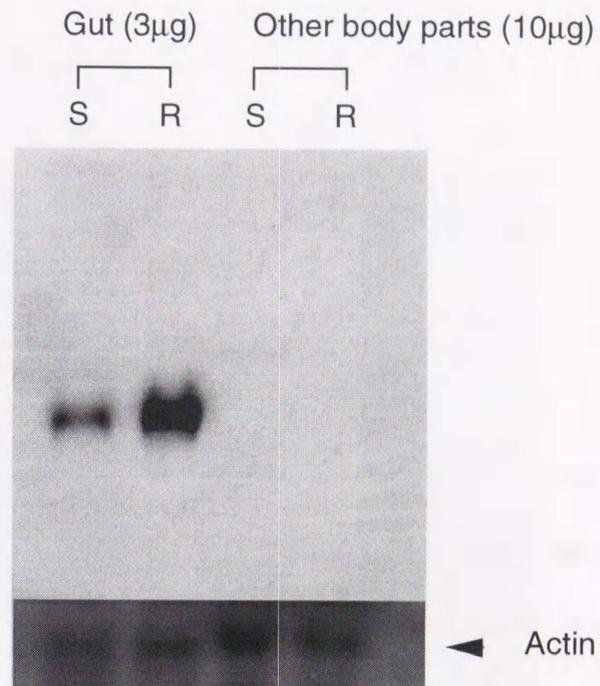


Fig. 31. Northern blot analysis of total RNA isolated from gut and fat body of permethrin-susceptible (S) and -resistant (R) JP_{al}-per larvae of *C. quinquefasciatus*. Partial sequence of *CYP6F1* (*CYP6-2*) was used as a probe. The amount of total RNA was indicated in parenthesis.

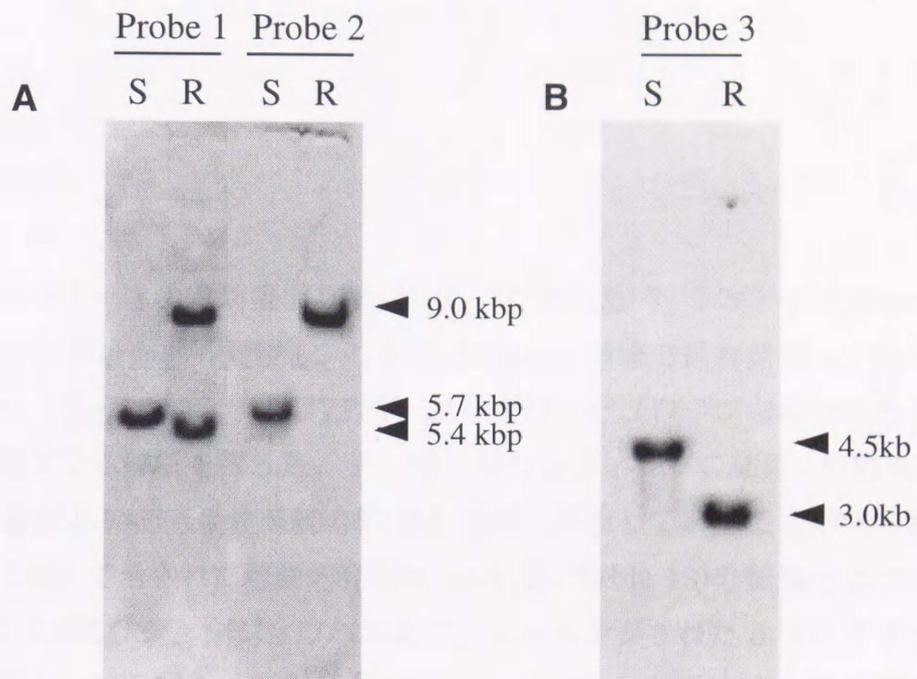


Fig. 32. Southern blot analysis with genomic DNA isolated from the susceptible (S) and the JPal-per (R) larvae of *C. quinquefasciatus* using CYP6F1 cDNA fragments as probes. Genomic DNA was digested by *Eco* RI (**A**) or *Eco* RV (**B**).

ずつのバンドが確認されたが、断片長に違いが見られ、感受性系統では約 4.5 kbp、JPal-per 系統では約 3.0 kbp であった (Fig. 32 B)。以上のことから、JPal-per 系統の転写領域内 (7-251 bp 内)にはイントロンが存在している可能性が高いこと、そして系統間で *CYP6F1* 領域付近のゲノム構造に変異があることが明らかとなった。

考察

前節ではネッタイエカ幼虫よりクローニングされた 7 つのアイソフォームのうち、*CYP6F1* が最も多く発現し、しかも JPal-per 系統で過剰発現していることが推測された。従って本節では *CYP6F1* より合成したプローブを用いてその遺伝子発現、及びゲノム解析を行った。ノーザンブロットティングの結果、*CYP6F1* は JPal-per 系統において感受性系統の約 2.4 倍多く発現していることが明らかとなった。これは前節で示された理論的発現比 (2.4 倍、Table 19)の結果をよく反映している。イエバエ及びショウジョウバエよりクローニングされた 3 つのアイソフォーム (*CYP6A1*、*CYP6A2*、*CYP6D1*)は、すべてが殺虫剤抵抗性系統で過剰発現することが知られている。*CYP6F1* の酵素機能は明らかにはなっていないが、このアイソフォームが permethrin 代謝機能を有しているならばタンパク量の増大が抵抗性を導いている可能性は高い。「過剰発現 = 抵抗性に関与」という結論は必ずしも正しいとは言えない。しかし、体内に存在するすべてのアイソフォームが過剰発現するという事は、ホルモン合成など内在性物質の重大な生理現象に関わる P450 量のバランスが崩れることにつながり、それは個体の生存に大きく影響するであろう。このようなことから、JPal-per 系統幼虫が多くのアイソフォームの発現量を無意味に増大させるということは考え難く、*CYP6F1* が抵抗性に関わっている可能性は高いと言える。今後、クローニングされたその他のアイソフォームについて遺伝子発現量を解析することで更なる知見が得られるものと考えられる。

Eco RI 消化したゲノム断片に対するサザンブロットティングで、JPal-per 系統において 2 本のバンドが検出された。この結果の説明として 2 つの原因が考えられた。1 つめはイントロンの存在である。第 2 節で行った *CYP6F1* cDNA の構造解析で probe 1 中には *Eco* RI 配列が存在しないことが確かめられている。にもかか

わらず JPal-per 系統で 2 本のバンドが検出されたことは probe 1 中にイントロンが存在し、さらにそのイントロン中に含まれる *Eco* RI 配列が切断されることで probe 1 にハイブリダイズする断片が 2 本になったのではないかと予想される。2 つめに考えられる原因として *CYP6F1* の遺伝子増幅が挙げられる。JPal-per 系統の遺伝子中に *CYP6F1* が 2 コピー存在し、それぞれの間に *Eco* RI 配列が存在すれば、バンドが 2 本になり得る。この仮説を確かめるべく、プローブを 3'側より合成し、同様に実験を行った。今度は JPal-per 系統における 2 本のバンドのうち 5.7 kbp の断片が消失した。このことから、先に起こった現象は遺伝子増幅によるものではなく、probe 1 中にイントロンが存在することにより起きたものである可能性が高いことが示唆された。しかし、系統間で消化断片の長さに違いが認められ、その現象は *Eco* RV で消化したときの系統間の違いにも現れた。*CYP6F1* の位置する領域付近でのゲノム構造が系統間で異なっていることは明らかであるが、これが単なる種の地理的変異によるものなのか、遺伝子発現に関わり抵抗性の要因となっているのかは不明である。今後実際に *CYP6F1* 付近のゲノム配列を解析することでこれらの疑問を解決する新知見が得られるものと考えられる。

第6章 総合考察

これまでピレスロイド剤は魚毒性の高さから水田や河川などの水域で使用されることはなかった。それゆえピレスロイド剤抵抗性の力が野外で確認された例もほとんどない。しかし、有機リン剤やカーバメート剤の効力低下、そして低魚毒性ピレスロイド剤の開発などの理由により、今後水田に用いられるピレスロイド剤の頻度は増大すると予想される。必然的に力のピレスロイド剤に対する抵抗性の発達は危惧され、力の防除をピレスロイド剤に大きく依存しているわが国で将来大きな問題となる可能性も指摘されている（正野、1984）。すでに日本のコガタアカイエカ (*Culex tritaeniorhynchus*)がピレスロイド剤に抵抗性を発達させていることが報告されている（Yasutomi and Takahashi, 1987）。そこで今回室内淘汰によって確立された強度のピレスロイド剤抵抗性ネッタイエカについて抵抗性機構の解明を行った。

サウジアラビア産ネッタイエカ、JPal-per 系統について、permethrin 抵抗性機構を調べた結果、チトクロム P450 酸化酵素系による解毒活性の増大が抵抗性発達の主要因であり、*kdr* 因子による神経感受性の低下が補助的な機構として関わっていることが明らかになった。チトクロム P450 酸化酵素系の働きが抵抗性の主要因であることを、酸化酵素阻害剤の共力効果やチトクロム P450 の定量結果のみならず、permethrin の *in vitro* 代謝試験により実証した事は本研究の最大の成果といえる。なぜなら、*Helicoverpa armigera* において酸化酵素阻害剤 PBO が著しい共力効果をもたらしたにも関わらず、permethrin 代謝活性に感受性系統との間で有為な差が認められなかった例（Kennaugh *et al.*, 1993）や、permethrin 抵抗性チャバネゴキブリにおいてチトクロム P450 量が感受性系統の 2.6 倍であるにも関わらず NADPH 依存性の代謝活性に差が認められなかったという例（Mahmood *et al.*, 1993）が存在すること、そして何よりも現在までにカ幼虫においてピレスロイド剤がチトクロム P450 酸化酵素系によって解毒代謝されることを直接的証拠によって結びつけた報告例が全くなかったからである。

ネッタイエカ幼虫ミクロゾームを用いた代謝活性の測定が可能になった最大の理由は幼虫中腸より内容物を取り除いたところにある。推測ではあるが、上述した 2 種の昆虫においても、酵素調製時に混入した阻害物質の影響により代謝活性が

適切に測定されていなかった可能性が考えられる。昆虫体内におけるチトクロム P450 酸化酵素系の働きは、外来性異物の解毒と共に、内在性のホルモンやフェロモンの生合成と多岐にわたる。その意味において本研究で用いた手法は殺虫剤抵抗性におけるチトクロム P450 酸化酵素系の機能解明のみならず、力に関する生理学的研究分野の進展にも貢献しうる有効な手段であると思われる。

JPal-per 系統の permethrin 抵抗性の主要因であるチトクロム P450 の cDNA のクローニング、構造解析、及びその発現について解析を行った。その結果、2 種類の cDNA (*CYP6E1*, *CYP6F1*) の完全鎖長及び 5 種類のアイソフォームの部分配列を明らかにした。さらに、これらのうち *CYP6F1* 遺伝子は抵抗性系統で過剰に発現していることが判明した。このことから、JPal-per 系統の抵抗性については特定のアイソフォーム遺伝子の過剰発現によって permethrin 解毒活性が増大している可能性が考えられた。今後の課題としては *CYP6F1* が実際に permethrin 解毒の能力を有しているかという疑問を明らかにすることと共に *CYP6F1* 遺伝子の過剰な発現機構の解明にある。すでに哺乳動物においては、クローニングされた P450 遺伝子をバキュロウィルスを通して SF9、SF21 細胞や COS1 細胞といった培養細胞中で発現させ、同遺伝子でコードされたタンパク質の機能を調べる方法が確立されており (Lahde *et al.*, 1993; Patten and Koch, 1995; Biagini and Celier, 1996)、このような手法を用いることにより *CYP6F1* の機能も明らかにできるであろう。

チトクロム P450 の発現制御機構についても哺乳動物を中心に盛んに行われており、現在この分野において世界的に最も注目されているテーマである。P450 遺伝子の発現制御機構で有名なものとしては barbie box の存在が挙げられる。Barbie box は、構造遺伝子上流域に存在する特定の配列のことで、この領域にリプレッサータンパクが結合すると転写が抑制され、フェノバルビタールやペントバルビタールといったバルビタール系薬物の存在下でこのリプレッサーが解放されることが知られている (Shaw and Fulco, 1992, 1993; Liang *et al.*, 1995)。Barbie box は *Bacillus megaterium* 菌の P450_{BM-3} 遺伝子の転写調節領域で見つかった配列であるが、フェノバルビタール処理により誘導がおきるラット P450 の遺伝子上流にも存在し、フェノバルビタール処理により barbie box を含む DNA 配列への転写因子の結合が促進されたという報告がある (Rangarajan and Pandmanaban, 1989)。さらに、いくつかの昆虫 P450 についてはフェノバルビタールの処理によ

って P450 遺伝子の発現が誘導されることが確認されており (Feyereisen *et al.*, 1995; Brun *et al.*, 1996; Liu and Scott, 1997)、上述した *CYP6A1*、*CYP6A2* 遺伝子の上流域には barbie box の存在が確認されている (Feyereisen *et al.*, 1995)。このことは、昆虫のチトクロム P450 においてもリプレッサータンパクによる発現抑制が起きていることを示している。

イエバエよりクローニングされた *CYP6D1* は、これまでに報告された唯一のピレスロイド剤解毒性アイソフォームであるが、構造遺伝子は第 1 染色体に存在していることが知られている (Liu *et al.*, 1995)。そして、ピレスロイド剤抵抗性の LPR 系統では常時 *CYP6D1* が過剰発現しており、それが第 2 染色体上の発現制御因子によって制御されていることが劣性可視突然変異体を用いた連鎖群解析により明らかにされている (Liu and Scott, 1997)。第 2 染色体由来の発現制御機構はフェノバルビタールによる誘導機構に非常に類似していることから、第 2 染色体由来の因子はリプレッサータンパクと同等な働きを持つものであることが予想される。さらに、感受性系統の構造遺伝子はフェノバルビタールによって過剰な転写促進を受けないこと、第 2 染色体のみが感受性系統由来の突然変異体においても *CYP6D1* 遺伝子の過剰な発現が認められないことから、LPR 系統の持つこれら 2 つの遺伝子はこの系統に特有なものであることが示された (Liu and Scott, 1997)。また、*CYP6D1* 遺伝子は CS、aabys、ISK 系統といったピレスロイド剤感受性系統の体内にも存在するが、発現量が微量であるために抵抗性の要因とはなっていない (Tomita *et al.*, 1995)。

野外における殺虫剤淘汰の原理とは、殺虫剤が暴露された個体群の中でそれに対する抵抗性遺伝子をもった個体のみが選抜され、数を増すことであると考えられている。この場合の抵抗性遺伝子とは解毒酵素に関して言えば、単にアミノ酸置換に伴って活性増大した酵素タンパクをコードする構造遺伝子であるという考えが一般的であった。しかし、上述のイエバエで示されたような現象より考察すれば、昆虫の殺虫剤に対する抵抗性発達の柔軟性は、単に抵抗性系統がもつ構造遺伝子の多様性のみによってもたらされるのではなく、淘汰圧をかける殺虫剤に応じて解毒酵素遺伝子の発現量を増大させる遺伝子発現制御因子の適応性によるものが大きいのではないかと考えられる。*CYP6F1* 遺伝子の過剰発現が LPR 系統のように構造遺伝子以外の因子によって制御されているか否かは現段階では不明である。そしてイエバエのように劣性可視突然変異系統が確立されていないネッタイエカでそ

れを検討するのは困難である。しかしイエバエ同様な遺伝子の発現制御機構が明らかにされ、1つの生物個体内に数あるチトクロム P450 アイソフォームとの相関が示されれば、今後の殺虫剤抵抗性機構の解明に大きな進展をもたらすだけでなく、新たな昆虫特異的作用部位を標的とするような新規殺虫剤の開発につながるものと思われる。

カは疾病媒介昆虫として重要害虫でありながら、これまでチトクロム P450 の分子生物学的研究としては、ハマダラカで一例あるのみである (Scott and Feyereisen, 1994)。それはカの殺虫剤抵抗性機構の上でチトクロム P450 の重要性が見いだされなかったことにも起因すると言える。しかし今後チトクロム P450 酸化酵素系の活性増大に強く依存した抵抗性個体群は世界各地で出現することが予想され、その分子機構解明の重要性も増すものと思われる。1980年代後半より、酸化酵素阻害剤の共力効果から P450 の活性増大をピレスロイド抵抗性と結び付けた文献が徐々に紹介されていることもそれを強く示唆する (Malcolm, 1988; Kumar *et al.*, 1991)。その意味において、今回ネッタイエカの抵抗性研究に関して遺伝子レベルで機構解明の糸口を見出したことは本研究の成果の一つとして挙げる事ができる。

抵抗性に関する分子生物学的研究はその歴史がまだ浅く、現段階では応用面への貢献度は決して高いとは言えない。しかし、さらに詳細な研究が進めば、天敵生物や有用昆虫への抵抗性遺伝子の導入、微小昆虫の抵抗性機構の解明、フィールドでの抵抗性遺伝子の検出、作用点と薬剤の分子レベルでの相互作用解明による新規殺虫剤の開発など、将来は応用面への利用の可能性のあるものと思われる。近年、生物的防除法の一環として各種の寄生性、捕食性天敵昆虫の有用性が見いだされ、欧州では野菜や花卉栽培施設の害虫防除に天敵生物が農薬同様に使用されている。しかし薬剤に大きく依存しているわが国の農作物の栽培体系の中では、こうした生物的防除資材は薬剤による影響を受けやすく農薬との併用が難しいため実用化が遅れている (浜、1992)。今後、薬剤抵抗性遺伝子を天敵生物に導入した抵抗性系統が育成されれば薬剤-生物複合的防除法の確立も可能になるとと思われる。すでに植物の分野では哺乳動物のチトクロム P450 と酵母のチトクロム P450 還元酵素の融合遺伝子をタバコに導入することで除草剤耐性品種の育成に成功している (Shiota *et al.*, 1994, 1996)。

今後、発現制御機構を含めた抵抗性機構に関して分子レベルにまで細部に渡って

研究が行われれば、害虫防除を含めた農業生産に大きな貢献をするものと思われる。

摘要

本研究ではピレスロイド剤抵抗性ネッタイエカ JPal-per 系統を用いて permethrin 抵抗性に関する研究を行い、以下の事柄が明らかとなった。

1. JPal-per 系統は実験に用いたピレスロイド剤すべてに対し抵抗性を示したが、抵抗性比は 5.6~4,160 倍とかなりの開きが認められた。
2. ピレスロイド剤抵抗性レベルと化学構造には相関が認められ、3-phenoxybenzyl 基を持つタイプ I ピレスロイド剤に対する抵抗性比が最も大きかった。しかし、 α -cyano 3-phenoxybenzyl 基を持つタイプ II ピレスロイド剤に対する抵抗性レベルの極端な増大は認められなかった。
3. JPal-per 系統は DDT に対して交差抵抗性 (300 倍) を示し、この抵抗性には解毒酵素が関与していないことから、抵抗性には *kdr* 因子が関与していることが示唆された。
4. Permethrin 殺虫試験において、酸化酵素阻害剤が大きな共力効果を示したが、カルボキシエステラーゼ阻害剤の添加による抵抗性比の有意な減少は認められなかった。
5. JPal-per 系統の naphthyl acetate に対する加水分解活性は感受性系統の約 5 倍であり、それは主にエステラーゼ A2、B2 の活性増大によりもたらされていることを明らかにした。
6. JPal-per 系統幼虫体内では、チトクロム P450 及びチトクロム b₅ が感受性系統の約 2.7 倍多く発現していることを明らかにした。
7. ネッタイエカ幼虫のチトクロム P450 は約 80% が中腸内に分布していることを明らかにした。

8. ネットアイエカ幼虫の中腸内容物にはチトクロム P450 酸化酵素系の阻害作用があり、これを取り除くことで *in vitro* 代謝試験が可能になることを明らかにした。
9. JPal-per 系統の中腸及びそれ以外の組織ミクロゾーム分画における NADPH 依存性 permethrin 代謝活性は、感受性系統と比較してそれぞれ 5 倍及び 20 倍高かった。
10. JPal-per 系統のカルボキシルエステラーゼによる permethrin 代謝活性は感受性系統の約 1.3 倍であったことから、エステラーゼによる解毒は抵抗性の主要因ではないことを明らかにした。
11. ミクロゾーム分画における permethrin 代謝は酸化酵素阻害剤の存在下で著しく阻害されたことより、この分画での代謝はチトクロム P450 酸化酵素系に由来していることが示唆され、この酵素系の活性増大が permethrin 抵抗性の主要因であることを明らかにした。
12. ネットアイエカ幼虫より 2 つの新規チトクロム P450 (CYP6E1、CYP6F1) の完全鎖長 cDNA がクローニング、構造解析された。これらはカより全長をクローニングされた初めての例である。
13. CYP6E1、6F1 以外に 5 つの 6 族 P450 アイソフォームの部分配列がクローニングされ、構造解析された。
14. クローニングされた 7 つの P450 アイソフォームの発現量を両系統で比較したところ、CYP6F1 が JPal-per 系統で過剰発現していることを明らかにした。
15. CYP6F1 をプローブとして行ったゲノミックサザンブロットィングより、この遺伝子が位置する領域の系統間における変異が認められた。

謝辞

本研究を行うにあたり、終始的確なご指導、ご鞭撻を賜りました筑波大学農林学系応用動物研究室 正野俊夫教授に御礼申し上げます。また同教室 本田 洋 助教授、戒能洋一講師、外国人教師 D. Taylor 博士、永田啓一講師には日頃から多大なご指導を賜りましたことに対して御礼申し上げます。本研究における遺伝子解析は農林水産省 蚕糸・昆虫農業技術研究所にて行ったものであり、生体防御研究室室長 山川 稔博士には研究遂行にあたり懇篤なるご指示、ご教示賜り謹んで謝意を表します。本論文のとりまとめにあたり有益なご助言と校閲の労を賜りました筑波大学応用生物化学系 臼井健二教授、農林水産省 農業環境技術研究所 浜 弘司博士に深く感謝いたします。代謝試験において多大なるご助力をいただきましたスリランカ昆虫医科学研究所 I.S. Weerashinghe 博士に深く感謝いたします。本研究を進めていく過程でご助言賜りましたアメリカ Cornell 大学教授 J.G. Scott 博士、国立感染症研究所 河野義明博士、富田 隆博士、日本バイエルアグロケム 曾根信三郎氏に御礼申し上げます。住友化学工業株式会社及び元国立予防衛生研究所 主藤千枝子女史、岩淵けい子博士には供試昆虫を、丸山 宏氏には力の飼育方法について有益な助言を賜り御礼申し上げます。農林水産省 蚕糸・昆虫農業技術研究所 生体防御研究室室員 谷合幹代子博士、石橋 純博士、松尾由紀子女史、楊峻博士、坂中寿子博士、田中博光博士、中澤 裕博士、朝岡 愛女史、勾坂 晶女史、古川誠一氏、安井理子女史、そして竹田 敏博士、新川 徹博士をはじめとする同研究所の皆さまには最適な実験手法をご伝授いただき、本研究経過に対し労を惜しみなくご討論して頂いたばかりでなく、精神的なご助力、ご協力を賜り深甚の敬意を表します。最後になりましたが本研究は李 時雨博士、荒野多門氏、A. Banaag 氏、杉野浩二郎氏、岩永佳久氏をはじめとする先輩、後輩諸氏、及び張力氏をはじめとする筑波大学農林学系応用動物研究室の皆さまによるご理解、ご協力があったからこそ遂行することが出来ました。ここに厚く御礼申し上げます。

引用文献

- Amin, A.M. and J. Hemingway (1989) Preliminary investigation of the mechanisms of DDT and pyrethroid resistance in *Culex quinquefasciatus* Say (Diptera: Culicidae) from Saudi Arabia. *Bull. Ent. Res.* **79**:361-366.
- Amin, A.M. and H.T.R. Peiris (1990) Detection and selection of organophosphate and carbamate resistance in *Culex quinquefasciatus* from Saudi Arabia. *Med. Vet. Entomol.* **4**:269-273.
- Andersen, J.F., J.G.Utermohlen and R. Feyereisen (1994) Expression of house fly CYP6A1 and NADPH-cytochrome P450 reductase in *Escherichia coli* and reconstitution of an insecticide-metabolizing P450 system. *Biochemistry* **33**:2171-2177.
- Asperen, K. van (1962) A study of housefly esterases by means of a sensitive colorimetric method. *J. Insect Physiol.* **8**:401-416.
- Balabaskaran, S., S.S. Chuen and S. Muniandy (1989) Glutathione S-transferase from diamondback moth. *Insect Biochem.* **19**:435-443.
- Bassett, M.H., J.L. McCarthy, M.R. Waterman and T.J. Sliter (1997) Sequence and developmental expression of Cyp18, a member of a new cytochrome P450 family from *Drosophila*. *Mol. Cell. Endocrinol.* **131**:39-49.
- Biagini, C. and C. Celier (1996) cDNA-directed expression of two allelic variants of cytochrome P450 2C11 using COS1 and SF21 insect cells. *Arch. Biochem. Biophys.* **326**:298-305.
- Blin, N. and D.W. Stafford (1976) A general method for isolation of high molecular weight DNA from eukaryotes. *Nucleic Acids Res.* **3**:2303-2308.
- Bloomquist, J.R., D.M. Soderlund and D.C. Knipple (1989) Knockdown resistance to DDT and pyrethroid insecticides in the naps mutant of *Drosophila melanogaster* is correlated with reduced neuronal sensitivity. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* **10**:293-302.
- Bradfield, J., Y.-H. Lee and L.L. Keeley (1991) Cytochrome P450 family 4 in a cockroach: Molecular cloning and regulation by hypertrehalosemic hormone. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **88**:4558-4562.

- Bradford, M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**:248-254.
- Brattsten, L.B. and C.F. Wilkinson (1973) A microsomal enzyme inhibitor in the gut contents of the house cricket (*Acheta domestica*). *Comp. Biochem. Physiol.* **45B**:59-70.
- Brattsten, L.B., C.W. Holyoke, J.R. Leeper and K.F. Raffa (1986) Insecticide resistance: Challenge to pest management and basic research. *Science* **231**:1255-1260.
- Brown, T.M., P.K. Bryson and G.T. Payne (1996) Synergism by propynyl aryl ethers in permethrin-resistant tobacco budworm larvae, *Heliothis virescens*. *Pestic. Sci.* **43**:323-331.
- Brun, A., A. Cuany, T. L. Mouel, J. Berge and M. Amichot (1996) Inducibility of the *Drosophila melanogaster* cytochrome P450 gene, *CYP6A2*, by phenobarbital in insecticide susceptible or resistant strains. *Insect Biochem. Molec. Biol.* **26**:697-703.
- Busvine, J.R. (1951) Mechanism of resistance to insecticide in houseflies. *Nature* **168**:193-195.
- Carino, F.A., J.F. Koener, F.W. Plapp Jr. and R. Feyereisen (1994) Constitutive overexpression of the cytochrome P450 gene *CYP6A1* in a house fly strain with metabolic resistance to insecticides. *Insect Biochem. Molec. Biol.* **24**:411-418.
- Casida, J.E. (1970) Mixed-function oxidase involvement in the biochemistry of insecticide synergists. *J. Agric. Food Chem.* **18**:753-772.
- Casida, J.E., K. Ueda, L.C. Gaughan, L.T. Jao and D.M. Soderlund (1975) Structure-biodegradability relationships in pyrethroid insecticides. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* **3**:491-500.
- Casida, J.E., D.W. Gammon, A.H. Glickman and L.J. Lawrence (1983) Mechanisms of selective action of pyrethroid insecticides. *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **23**:413-438.
- Cohen, M.B., M.A. Schuler and M.R. Berenbaum (1992) A host-inducible cytochrome P450 from a host-specific caterpillar: Molecular cloning and evolution. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**:10920-10924.
- Cohen, M.B. and R. Feyereisen (1995) A cluster of cytochrome P450 genes of

- the CYP6 family in the house fly. *DNA Cell Biol.* **14**:73-82.
- Devonshire, A.L. (1977) The properties of a carboxylesterase from the peach-potato aphid, *Myzus persicae* (Sulz.), and its role in conferring insecticide resistance. *Biochem. J.* **167**:675-683.
- Devonshire, A.L. and L.M. Field (1991) Gene amplification and insecticide resistance. *Annu. Rev. Entomol.* **36**:1-23.
- DeVries, D.H. and G.P. Georgioui (1980) A wide spectrum of resistance to pyrethroid insecticides in *Musca domestica*. *Experientia* **36**:226-227.
- Dong, K. and J.G. Scott (1994) Linkage of *kdr*-type resistance and the *para*-homologous sodium channel gene in German cockroaches (*Blattella germanica*). *Insect Biochem. Molec. Biol.* **24**:647-654.
- Dunkov, B.C., R. Rodriguez-Arnaiz B. Pittendrigh, R.H. French-Constant and R. Feyereisen (1996) Cytochrome P450 gene clusters in *Drosophila melanogaster*. *Mol. Gen. Genet.* **251**:290-297.
- Elliott, M., N.F. Janes, E.C. Kimmel and J.E. Casida (1972) Metabolic fate of pyrethrin I, pyrethrin II, and allethrin administered orally to rats. *J. Agric. Food Chem.* **20**:300-313.
- Elliott, M. (1977) Synthetic pyrethroids. *ACS Symp. Ser.* **42**:1-28.
- Falconer, D.S. (1964) Introduction to Quantitative Genetics. The Ronald Press Company, New York, p.365.
- Farnham, A.M. (1973) Genetics of resistance of pyrethroid-selected house flies, *Musca domestica* L. *Pestic. Sci.* **4**:513-520.
- Farnham, A.M. (1977) Genetics of resistance of houseflies (*Musca domestica* L.) to pyrethroids. I. Knock-down resistance. *Pestic. Sci.* **8**:631-636.
- Farnham, A.M., A.W.A. Brown, R.M. Sawicki, I. Denholm and J.C. White (1987) Characterization of the structure-activity relationship of *kdr* and two variants of super *kdr* to pyrethroids in the housefly. *Pestic. Sci.* **19**:209-202.
- Fellig, J., J.R. Barnes, A.I. Rachlin, J.P. O'Brien and A. Fogella (1970) Substituted phenyl 2-propynyl ethers as carbamate synergists. *J. Agric. Food Chem.* **18**:78-80.
- Feyereisen, R., J.F. Koener, D.E. Farnsworth and D.W. Nebert (1989) Isolation and sequence of cDNA encoding a cytochrome P-450 from an insecticide-resistant strain of the house fly, *Musca domestica*.

- Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**:1465-1469.
- Feyereisen, R., J.F. Andersen, F.A. Carino, M.B. Cohen and J.F. Koener (1995) Cytochrome P450 in the house fly: Structure, catalytic activity and regulation of expression of *CYP6A1* in an insecticide-resistant strain. *Pestic. Sci.* **43**:233-239.
- French-Constant, R.H., D.L. Devonshire and R.P. White (1988) Spontaneous loss and reselection of resistance in extremely resistant *Myzus persicae* (Sulzer). *Pestic. Biochem. Physiol.* **30**:1-10.
- Field, L.M., A.L. Devonshire and B.G. Forde (1989a) Molecular evidence that insecticide resistance in peach-potato aphids (*Myzus persicae* Sulz.) results from amplification of an esterase gene. *Biochem. J.* **251**:309-312.
- Field, L.M., A.L. Devonshire, R.H. French-Constant and B.G. Forde (1989b) Changes in DNA methylation are associated with loss of insecticide resistance in the peach-potato aphid, *Myzus persicae* (Sulz.). *FEBS Letts.* **243**:323-327.
- Field, L.M. and A.L. Devonshire (1992) Esterase genes conferring insecticide resistance in Aphids. In: Molecular Mechanisms of Insecticide Resistance (Mullin C.A. and J.G. Scott eds.), Washington, D.C., American Chemical Society, pp 209-217.
- Field, L.M., M.S. Williamson, G.D. Moores and A.L. Devonshire (1993) Cloning and analysis of the esterase genes conferring insecticide resistance in the peach-potato aphid, *Myzus persicae*. *Biochem. J.* **294**:569-574.
- Field, L.M., N. Javed, M.F. Stribley and A.L. Devonshire (1994) The peach-potato aphid *Myzus persicae* and the tobacco aphid *Myzus nicotianae* have the same esterase-based mechanism of insecticide resistance. *Insect Mol. Biol.* **3**:143-148.
- Field, L.M., S.E. Crick and A.L. Devonshire (1996) Polymerase chain reaction-based identification of insecticide resistance genes and DNA methylation in the aphid *Myzus persicae* (Sulzer). *Insect Mol. Biol.* **5**:197-202.
- Field, L.M. and A.L. Devonshire (1997) Structure and organization of amplicons containing the E4 esterase genes responsible for insecticide resistance in the aphid *Myzus persicae* (Sulzer). *Biochem. J.* **322**:867-

871.

- Finney, D.J. (1971) Probit analysis, 3rd ed. Cambridge, Cambridge University Press.
- Fournier, D., J.M. Bride, M. Poirie, J.-B. Berge and F.W. Plapp Jr. (1992) Insect glutathione S-transferases. *J. Biol. Chem.* **267**:1840-1845.
- Gammon, D.W. (1980) Pyrethroid resistance in a strain of *Spodoptera littoralis* is correlated with decreased sensitivity of CNS *in vitro*. *Pestic. Biochem. Physiol.* **13**:53-62.
- Gilbert, M.D. and C.F. Wilkinson (1975) An inhibition of microsomal oxidation from gut tissues of the honey bee (*Apis mellifera*). *Comp. Biochem. Physiol.* **50B**:613-619.
- Gomori G. (1953) Human esterases. *J. Lab. Clin. Med.* **42**:445-453.
- Halliday, W.R. and G.P. Georghiou (1985) Cross resistance and dominance relationships of pyrethroids in a permethrin-selected strain of *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae). *J. Econ. Entomol.* **78**:1227-1232.
- Hama, H., Y. Sato and Y. Kono (1987) Decreased sensitivity of central nerve to fenvalerate in the pyrethroid-resistant diamondback moth, *Plutella xylostella* Linne. *Appl. Entomol. Zool.* **22**:176-180.
- 浜 弘司 (1992) 害虫はなぜ農薬に強くなるか 農文協、p.p.27.
- Hemingway, J., A. Callaghan and A.M. Amin (1990) Mechanisms of organophosphate and carbamate resistance in *Culex quinquefasciatus* from Saudi Arabia. *Med. Vet. Entomol.* **4**:275-282.
- 一瀬太良、石原廉、松本義明、大羽滋、岡田益吉、斉藤哲夫、吉武成美 (1980) 昆虫実験法、材料・実習編 学会出版センター pp. 187-193.
- Ishaaya, I. and J.E. Casida (1981) Pyrethroid esterase(s) may contribute to natural pyrethroid tolerance of larvae of the common green lacewing. *Environ. Entomol.* **10**:681-684.
- Ish-Horowicz, D. and J.F. Burke (1981) Rapid and efficient cosmid cloning. *Nucl. Acids. Res.* **9**:2989-2998.
- Itaya, N., T. Matsumoto, N. Ohno, T. Matsunami, F. Fujita and H. Yoshida (1977) Recent progress in syntheses of the new and most potent pyrethroids. *ACS Symp. Ser.* **42**:45-54.
- Karunaratne, S.H., J. Hemingway, K.G. Jayawardena, V. Dassanayaka and A. Vaughan (1995) Kinetic and molecular differences in the amplified and

- non-amplified esterases from insecticide-resistant and susceptible *Culex quinquefasciatus* mosquitoes. *J. Biol. Chem.* **270** :31124-31128.
- Kasai, S., I.S. Weerasinghe and T. Shono (1998a) P450 monooxygenases are an important mechanism of permethrin resistance in *Culex quinquefasciatus* Say larvae. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* **37** :47-56.
- Kasai, S., T. Shono and M. Yamakawa (1998b) Molecular cloning and nucleotide sequence of a cytochrome P450 cDNA from a pyrethroid resistant mosquito, *Culex quinquefasciatus* Say. *Insect Mol. Biol.* (in press)
- Keiding, J. (1976) Development of resistance to pyrethroids in field populations of Danish houseflies. *Pestic. Sci.* **7**:283-291.
- Kennaugh, L., D. Pearce, J.C. Daly and A.A. Hobbs (1993) A piperonyl butoxide synergizable resistance to permethrin in *Helicoverpa armigera* which is not due to increased detoxification by cytochrome P450. *Pestic. Biochem. Physiol.* **45** :234-241.
- Krieger, R.I. and C.F. Wilkinson (1970) An endogenous inhibitor of microsomal mixed-function oxidases in homogenates of the southern armyworm (*Prodenia eridania*). *Biochem. J.* **116** :781-789.
- Krieger, R.I. and P.W. Lee (1973) Properties of the aldrin epoxidase system in the gut and fat body of a caddishfly larva. *J. Econ. Entomol.* **66** :1-6.
- Kumar, S., A. Thomas and M.K.K. Pillai (1991) Involvement of monooxygenases as a major mechanism of deltamethrin-resistance in larvae of three species of mosquitoes. *Ind. J. Exp. Biol.* **29** :379-384.
- Lahde, M., H. Raunio, O. Pelkonen, M. Krp and C. Oker-Blom (1993) Expression of human placental cytochrome P450 aromatase (CYP19) cDNA in insect cells using a luciferase based baculovirus vector. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **197** :1511-1517.
- Lee, S.S.T. and J.G. Scott (1989) Microsomal cytochrome P450 monooxygenases in the house fly (*Musca domestica* L.): Biochemical changes associated with pyrethroid resistance and phenobarbital induction. *Pestic. Biochem. Physiol.* **35** :1-10.
- Liang, Q., J.-S. He and A.J. Fulco (1995) The role of barbie box sequences as *cis*-acting elements involved in the barbiturate-mediated induction of cytochromes P450_{BM-1} and P450_{BM-3} in *Bacillus megaterium*. *J. Biol.*

Chem. **270** :4438-4450.

- Little, E.J., A.R. McCaffery, C.H. Walker and T. Parker (1989) Evidence for an enhanced metabolism of cypermethrin by an monooxygenase in a pyrethroid-resistant strain of the tobacco budworm (*Heliothis virescens* F.). *Pestic. Biochem. Physiol.* **34** :58-68.
- Liu, M.Y., Y.J. Tzeng and C.N. Sun (1981) Diamondback moth resistance to several synthetic pyrethroids. *J. Econ. Entomol.* **74** :393-396.
- Liu, N., T. Tomita and J.G. Scott (1995) Allele-specific PCR reveals that CYP6D1 is on chromosome 1 in the house fly, *Musca domestica*. *Experientia* **51** :164-167.
- Liu, N. and J.G. Scott (1997) Phenobarbital induction of CYP6D1 is due to a *trans* acting factor on autosome 2 in house flies, *Musca domestica*. *Insect Mol. Biol.* **6** :77-81.
- Mahmood, T., E. Funaki, H. Yano, Y. Kasai and N. Motoyama (1993) *In vitro* studies on the mechanism of pyrethroid resistance in the German cockroach. *J. Pestic. Sci.* **18** :253-261.
- Malcolm, C.A. (1988) Reduced susceptibility to permethrin and its relationship to DDT resistance in larvae of *Anopheles stephensi*. *Med. Vet. Entomol.* **2** :37-46.
- Miyamoto, J. (1976) Degradation, metabolism and toxicity of synthetic pyrethroids. *Environ. Health Perspect.* **14** :15-28.
- Miyazaki, M., K. Ohyama, D.Y. Dunlap and F. Matsumura (1996) Cloning and sequencing of the *para*-type sodium channel gene from susceptible and *kdr*-resistant German cockroaches (*Blattella germanica*) and house fly (*Musca domestica*). *Mol. Gen. Genet.* **252** :61-68.
- Motoyama, N. and W.C. Dauterman (1980) Glutathione S-transferase. Their role in the metabolism of organophosphorus insecticides. *Rev. Biochem. Toxicol.* **2** :49-69.
- Mouches, C., N. Pasteur, J.B. Berge, O. Hyrien, M. Raymond, B. R. St. Vincent, M. Silvestri and G.P. Georghiou (1986) Amplification of an esterase gene is responsible for insecticide resistance in a California *Culex* mosquito. *Science* **233** :778-780.
- Mouches, C., M. Magnin, J.-M. Berge, Monique de Silvestri, V. Beyssat, N. Pasteur and G.P. Georghiou (1987) Overexpression of detoxifying

- esterases in organophosphate resistance in the *Culex pipiens* L. complex. *Pestic. Biochem. Physiol.* **27**:211-217.
- Mouches, C., Y. Pauplin, M. Agarmal, L. Lemieux, M. Herzog, M. Abadon, V. Beyssat-Arnaouty, O. Hyrien, B. Bobert de Saint Vincent, G.P. Georghiou and N. Pasteur (1990) Characterization of amplification core and esterase B1 gene responsible for insecticide resistance in *Culex*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**:2574-2578.
- Mounier, N., J. Gaillard and J.C. Prudhomme (1987) Nucleotide sequence of the coding region of two actin genes in *Bombyx mori*. *Nucl. Acid. Res.* **15**:2781.
- Nelson, D.R., T. Kamataki, D.J. Waxman, F.P. Guengerich, R.W. Estabrook, R. Feyereisen, F.J. Gonzalez, M.J. Coon, I.C. Gunsalus, O. Gotoh, K. Okuda and D.W. Nebert (1993) The P450 superfamily: Update on new sequences, gene mapping, accession numbers, early trivial names of enzymes, and nomenclature. *DNA Cell Biol.* **12**:1-51.
- Newcomb, R.D., P.M. Campbell, R.J. Russell and J.G. Oakeshott (1997) cDNA cloning, baculovirus-expression and kinetic properties of the esterase, E3, involved in organophosphorus resistance in *Lucilia cuprina*. *Insect Biochem. Molec. Biol.* **27**:15-25.
- Nicholson, R.A. and T.A. Miller (1985) Multifactorial resistance to *trans*-permethrin in field-collected strains of tobacco budworm *Heliothis virescens* F. *Pestic. Sci.* **16**:561-570.
- Omer, S.M., G.P. Georghiou and S.N. Irving (1980) DDT/ pyrethroid resistance inter-relationships in *Anopheles stephensi*. *Mosq. News.* **40**:200-209.
- Omura, T. and R. Sato (1964) The carbon monoxide-binding pigment of liver microsomes II: Solubilization, purification and properties. *J. Biol. Chem.* **239**:2379-2384.
- Oppenoorth, F.J. and W. Welling (1976) Biochemistry and physiology of resistance. In: *Insecticide Biochemistry and Physiology* (Wilkinson, C.F. ed.), Plenum Press, New York, p.507.
- Oppenoorth, F.J. (1985) Biochemistry and genetics of insecticide resistance. In: *Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry and Pharmacology* (Kerkut, G.A. and L.I. Gilbert eds.), Oxford, Pergamon, vol 12, pp 731-774.

- Orrenius, S., M. Berggren, P. Moldeus and R.I. Krieger (1971) Mechanism of inhibition of microsomal mixed-function oxidation by the gut-contents inhibitor of the southern armyworm (*Prodenia eridania*). *Biochem. J.* **124**:427-430.
- Pasteur, N., G.P. Georghiou and A. Iseki (1984) Variation in organophosphate resistance and esterase activity in *Culex quinquefasciatus* Say from California. *Genet. Sel. Evol.* **16**:271-284.
- Patten, C.J. and P. Koch (1995) Baculovirus expression of human P450 2E1 and cytochrome b₅: Spectral and catalytic properties and effect of b₅ on the stoichiometry of P450 2E1-catalyzed reactions. *Arch. Biochem. Biophys.* **317**:504-513.
- Peiris, H.T.R. and J. Hemingway (1990) Temephos resistance and the associated cross-resistance spectrum in a strain of *Culex quinquefasciatus* Say (Diptera: Culicidae) from Peliyagoda, Sri Lanka. *Bull. Entomol. Res.* **80**:49-55.
- Plapp, F.W. and R.F. Hoyer (1967) Insecticide resistance in the house fly: Resistance spectra and preliminary genetics of resistance in eight strains. *J. Econ. Entomol.* **60**:768-774.
- Plapp, F.W. (1976) Biochemical genetics of insecticide resistance. *Ann. Rev. Entomol.* **21**:179-197.
- Priester, T.M. and G.P. Georghiou (1978) Induction of high resistance to permethrin in *Culex pipiens quinquefasciatus*. *J. Econ. Entomol.* **71**:197-200.
- Priester T.M. and G.P. Georghiou (1980) Cross-resistance spectrum in pyrethroid-resistant *Culex quinquefasciatus*. *Pestic. Sci.* **11**:617-624.
- Rangarajan, P.N. and G. Pandmanaban (1989) Regulation of cytochrome P450b/e gene expression by an heme-abd phenobarbitone-modulated transcription factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**:3963-3967.
- Ranson, H., A.J. Cornel, D. Fournier, A. Vaughan, F.H. Collins and J. Hemingway (1997a) Cloning and localization of a glutathione S-transferase class I gene from *Anopheles gambiae*. *J. Biol. Chem.* **272**:5464-5468.
- Ranson, H., L. Prapanthadara and J. Hemingway (1997b) Cloning and characterization of two glutathione S-transferases from a DDT-

- resistant strain of *Anopheles gambiae*. *Biochem. J.* **324**:97-102.
- Raymond, M. and N. Pasteur (1989) The amplification of B1 esterase gene in the mosquito *Culex pipiens* is present in gametes. *Nucleic Acid Res.* **17**:7116.
- Raymond, M., A. Callaghan, P. Fort and N. Pasteur (1991) Worldwide migration of amplified insecticide resistance genes in mosquitoes. *Nature* **350**:151-153.
- Reed, W.T. and A.J. Forgash (1970) Metabolism of lindane to organic-soluble products by houseflies. *J. Agric. Chem.* **18**:475-481.
- Reidy, G.F., H.A. Rose, S. Visetson and M. Murray (1990) Increased glutathione S-transferase activity and glutathione content in an insecticide-resistant strain of *Tribolium castaneum*. *Pestic. Biochem. Physiol.* **36**:269-276.
- Ronis, M.J.J., E. Hodgson and W.C. Dauterman (1988) Characterization of multiple forms of cytochrome P450 from an insecticide resistant strain of house fly (*Musca domestica*). *Pestic Biochem. Physiol.* **32**:74-90.
- Ruscoe, C.N.E. (1977) The new NRDC pyrethroids as agricultural insecticides. *Pestic. Sci.* **8**:236-242.
- Ruzo, L.O. and J.E. Casida (1977) Metabolism and toxicology of pyrethroids with dihalovinyl substituents. *Environ. Health Perspect.* **21**:285-292.
- Salazar, C.E., D.M. Hamm, D.M. Wesson, C.B. Beard, V. Kumar and F.H. Collins (1994) A cytoskeletal actin gene in the mosquito, *Anopheles gambiae*. *Insect Mol. Biol.* **3**:1-13.
- Salgado, V.L., S.N. Irving and T.A. Miller (1983) Depolarization of motor nerve terminals by pyrethroids in susceptible and *kdr*-resistant house flies. *Pestic Biochem. Physiol.* **20**:100-114.
- Sanger, F. and A.R. Coulson (1975) A rapid method for determining sequences in DNA by primed synthesis with DNA polymerase. *J. Mol. Biol.* **94**:441-448.
- Sawicki, R.M. (1978) Unusual response of DDT-resistant houseflies to carbinol analogues of DDT. *Nature* **275**:443-444.
- Sawicki, R.M., A.L. Devonshire, R.W. Payne and S.M. Petzing (1980) Stability of insecticide resistance in the peach-potato aphid, *Myzus persicae* (Sulzer). *Pestic. Sci.* **11**:33-42.

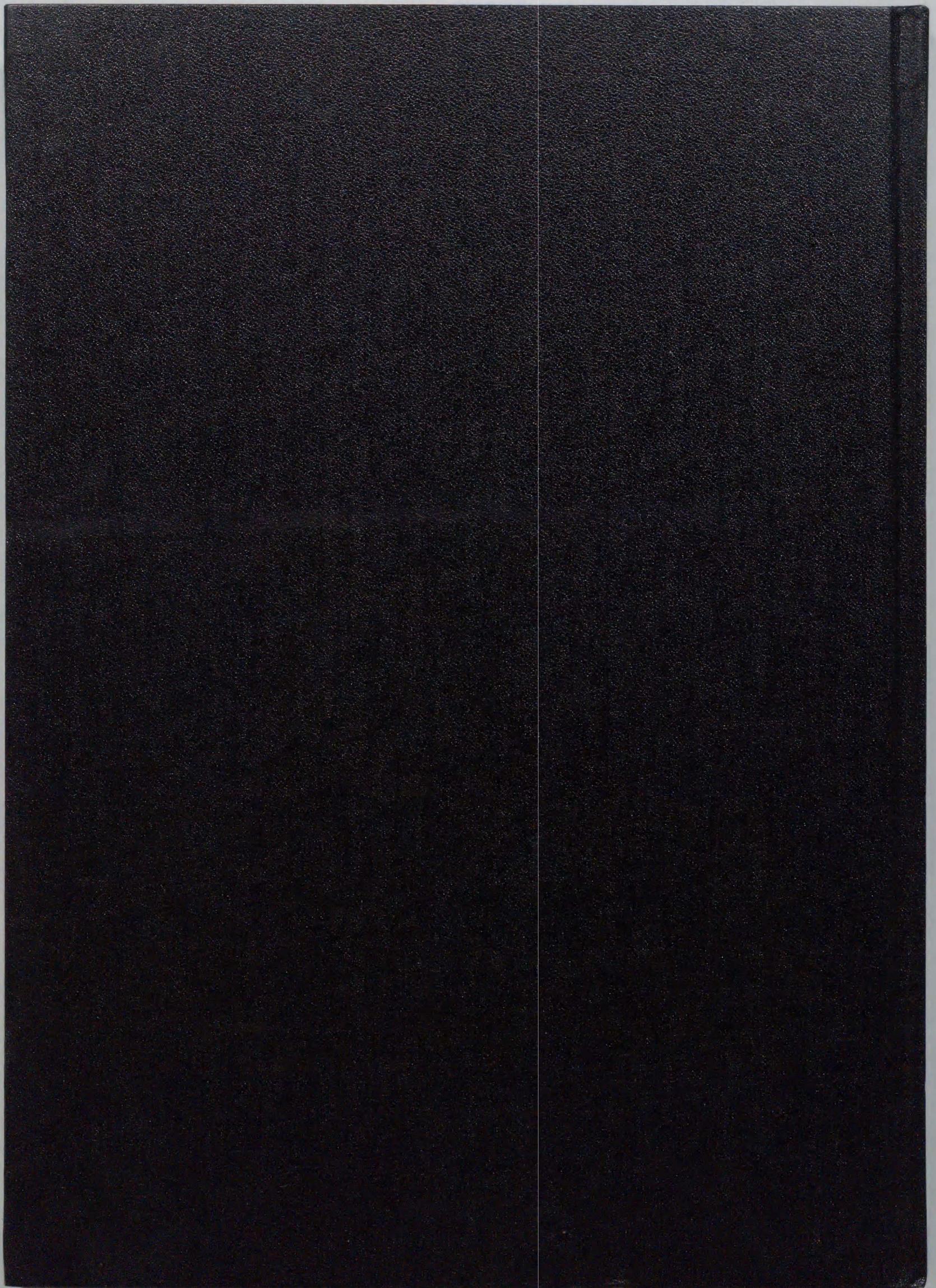
- Scott, J.G. and F. Matsumura (1981) Characteristics of a DDT-induced case of cross resistance to permethrin in *Blattella germanica*. *Pestic. Biochem. Physiol.* **16**:21-27.
- Scott, J.G. and G.P. Georghiou (1985) Rapid development of high-level permethrin resistance in a field-collected strain of the house fly (Diptera: Muscidae) under laboratory selection. *J. Econ. Entomol.* **78**:316-319.
- Scott, J.G. (1991) Insecticide resistance in insects. In: Hand Book of Pest Management (Pimentel, D. ed.), Boca Raton, Florida, CRC Press, vol. 2, pp 663-677.
- Scott, J.G. and S.S.T. Lee (1993a) Purification and characterization of a cytochrome P-450 from insecticide susceptible and resistant strains of housefly, *Musca domestica* L., before and after phenobarbital exposure. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* **24**:1-19.
- Scott, J.G. and S.S.T. Lee (1993b) Tissue distribution of microsomal cytochrome P-450 monooxygenases and their inducibility by phenobarbital in the insecticide resistant LPR strain of house fly, *Musca domestica* L. *Insect Biochem. Mol. Biol.* **23**:729-738.
- Scott, J.A., F.K. Collins and R. Feyereisen (1994) Diversity of cytochrome P450 genes in the mosquito, *Anopheles albimanus*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **205**:1452-1459.
- Schonbrod, R.D. and L.C. Terriere (1972) Inhibition of housefly microsomal oxidase by the eye pigment, xanthommatin. *Pestic. Biochem. Physiol.* **1**:409-417.
- Shaw, G.-C. and A.J. Fulco (1992) Barbiturate-mediated regulation of expression of the cytochrome P450_{BM-3} genes of *Bacillus megaterium* by Bm3R1 protein. *J. Biol. Chem.* **267**:5515-5526.
- Shaw, G.-C. and A.J. Fulco (1993) Inhibition by barbiturates of the binding of Bm3R1 repressor to its operator site on the barbiturate-inducible cytochrome P450_{BM-3} gene of *Bacillus megaterium*. *J. Biol. Chem.* **268**:2997-3004.
- Shiota, N., A. Nagasawa, T. Sakaki, Y. Yabusaki and H. Ohkawa (1994) Herbicide-resistant tobacco plants expressing the fused enzyme between rat cytochrome P450 1A1 (CYP1A1) and yeast NADPH-

- cytochrome P450 oxidoreductase. *Plant Physiol.* **106**:17-23.
- Shiota, N., H. Inui and H. Ohkawa (1996) Metabolism of the herbicide chlortoluron in transgenic tobacco plants expressing the fused enzyme between rat cytochrome P450 1A1 and yeast NADPH-cytochrome P450 oxidoreductase. *Pestic. Biochem. Physiol.* **54**:190-198.
- Shono, T., T. Unai and J.E. Casida (1978) Metabolism of permethrin isomers in American cockroach adults, house fly adults, and cabbage looper larvae. *Pestic. Biochem. Physiol.* **9**:96-106.
- Shono, T., K. Osawa and G.P. Georghiou (1979) Metabolism of *trans*- and *cis*-permethrin, *trans*- and *cis*-cypermethrin, and decamethrin by microsomal enzymes. *J. Agric. Food Chem.* **27**:316-325.
- 正野俊夫 (1984) 合成ピレスロイド系殺虫剤と抵抗性問題 *J. UOEH* (産業医科大学雑誌) **6**:423-432.
- Shono, T. (1985) Pyrethroid resistance: Importance of the *kdr*-type mechanism. *J. Pestic. Sci.* **10**:141-146.
- Shrivastava, S.P., G.P. Georghiou, R.L. Metcalf and T.R. Fukuto (1970) Carbamate resistance in mosquitos: The metabolism of propoxur by susceptible and resistant larvae of *Culex pipiens fatigans*. *Bull. WHO* **42**:931-942.
- Shrivastava, S.P., G.P. Georghiou and T.R. Fukuto (1971) Metabolism of *N*-methylcarbamate insecticides by mosquito larval enzyme system requiring NADPH₂. *Ent. Exp. Appl.* **14**:333-348.
- Soderlund, D.M. and J.E. Casida (1977a) Substrate specificity of mouse-liver microsomal enzymes in pyrethroid metabolism. *ACS Symp. Ser.* **42**:162-172.
- Soderlund, D.M. and J.E. Casida (1977b) Stereospecificity of pyrethroid metabolism in mammals. *ACS Symp. Ser.* **42**:173-185.
- Stone, B.F. (1968) A formula for determining degree of dominance in cases of monofactorial resistance to chemicals. *Bull. WHO* **22**:587-590.
- Tanaka, K., M. Nakajima and N. Kurihara (1981) The mechanism of resistance to lindane and hexadeuterated lindane in the third Yumenoshima strain of house fly. *Pestic. Biochem. Physiol.* **16**:149-157.
- Taylor, M. and R. Feyereisen (1996) Molecular biology and evolution of resistance to toxicants. *Mol. Biol. Evol.* **13**:719-734.

- Thomas, P.S. (1980) Hybridization of denatured RNA and small DNA fragments transferred to nitrocellulose. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **77**:5201-5205.
- Thomas, P.S. (1983) Hybridization of denatured RNA transferred or dotted to nitrocellulose paper. *Methods Enzymol.* **100**:255-266.
- Tomita, T. and J.G. Scott (1995) cDNA and deduced protein sequence of CYP6D1: The putative gene for a cytochrome P450 responsible for pyrethroid resistance in house fly. *Insect Biochem. Molec. Biol.* **25**:275-283.
- Tomita, T., N. Liu, F.F. Smith, P. Sridhar and J.G. Scott (1995) Molecular mechanisms involved in increased expression of a cytochrome P450 responsible for pyrethroid resistance in the housefly, *Musca domestica*. *Insect Mol. Biol.* **4**:135-140.
- Toung, Y.P., T.S. Hsieh and C.P. Tu (1990) *Drosophila* glutathione S-transferase 1-1 shares a region of sequence homology with the maize glutathione S-transferase III. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**:31-35.
- Tsukamoto, M. (1983) Methods of genetic analysis of insecticide resistance. In: Pest resistance to pesticides (Georghiou, G.P. and T. Saito eds.), Plenum Press, New York and London, pp 71-98.
- Umeda, K., T. Yano and M. Hirano (1988) Pyrethroid-resistance mechanism in German cockroach, *Blattella germanica*. *Appl. Entomol. Zool.* **23**:373-380.
- Umeda, K., T. Shono, M. Hirano and M. Takahashi (1990) Reduced nerve sensitivity as a resistant mechanism to a pyrethroid in *Culex tritaeniorhynchus* from Okinawa. *J. Pestic. Sci.* **15**:599-601.
- Valles, S.M. and S.J. Yu (1996) Tissue localization, induction, and developmental expression of cytochrome P450 monooxygenases in the German cockroach. *Pestic. Biochem. Physiol.* **54**:31-39.
- Vaughan, A. and J. Hemingway (1995) Mosquito carboxylesterase Est alpha 2(1) (A2). Cloning and sequence of the full-length cDNA for a major insecticide resistance gene worldwide in the mosquito *Culex quinquefasciatus*. *J. Biol. Chem.* **270**:17044-17049.
- Vaughan, A., N. Hawkes and J. Hemingway (1997) Co-amplification explains linkage disequilibrium of two mosquito esterase genes in insecticide-

- resistant *Culex quinquefasciatus*. *Biochem. J.* **325** :359-365.
- Wang, X.-P. and A.A. Hobbs (1995) Isolation and sequence analysis of a cDNA clone for a pyrethroid inducible cytochrome P450 from *Helicoverpa armigera*. *Insect Biochem. Molec. Biol.* **25** :1001-1009.
- Waters, L.C., A.C. Zelhof, B.J. Shaw and L.-Y. Ch'ang (1992) Possible involvement of the long terminal repeat of transposable element 17.6 in regulating expression of an insecticide resistance-associated P450 gene in *Drosophila*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89** :4855-4859.
- Wheelock, G.D. and J.G. Scott (1992) The role of cytochrome P450_{lpr} in deltamethrin metabolism by pyrethroid resistant and susceptible strains of house flies. *Pestic. Biochem. Physiol.* **43** :67-77.
- WHO (1981) Instructions for determining the susceptibility or resistance of mosquito larvae to insecticides. Unpublished document WHO/VBC/81. 807, World Organization, Geneva.
- Whyard, S., A.E.R. Downe and V.K. Walker (1994) Isolation of an esterase conferring insecticide resistance in the mosquito *Culex tarsalis*. *Insect Biochem. Molec. Biol.* **24** :819-827.
- Wilce, M.C.J., P.G. Board, S.C. Feil and M.W. Parker (1995) Crystal structure of a theta-class glutathione transferase. *EMBO J.* **14** :2133-2143.
- Wilkinson, C.F. and L.B. Brattsten (1972) Microsomal drug metabolizing enzymes in insects. *Drug Metabol. Rev.* **1** :153-228.
- Wilkinson, C.E. (1983) Role of mixed function oxidases in insecticide pest resistance. In: Pest Resistance to Pesticides (Georghiou, G.P. and T. Saito eds.), Plenum Press, New York and London, pp 175-228.
- Williamson, M.S., D. Martinez-Torres, C.A. Hick and A.L. Devonshire (1996) Identification of mutations in the housefly *para*-type sodium channel gene associated with knockdown resistance (*kdr*) to pyrethroid insecticides. *Mol. Gen. Genet.* **252** :51-60.
- Wilson, T.G. and E. Hodgson (1972) Mechanism of microsomal mixed-function oxidase inhibitor from the housefly *Musca domestica* L. *Pestic. Biochem. Physiol.* **2** :64-71.
- Yasutomi, K. (1970) Studies on organophosphate-resistance and esterase activity in the mosquitoes of the *Culex pipiens* group. *Jpn. J. Sanit. Zool.* **21** :41-45.

- Yasutomi, K. (1983) Role of detoxication esterases in insecticide resistance. In: Pest Resistance to Pesticides (Georghiou, G. P. and T. Saito eds.), Plenum Press, New York and London, pp 249-263.
- Yasutomi, K. and M. Takahashi (1987) Insecticidal resistance of *Culex tritaeniorhynchus* (Diptera: Culicidae) in Japan: A country-wide survey of resistance to insecticides. *J. Med Entomol.* **24**:604-608.
- Zhang, L., K. Harada and T. Shono (1997) Genetic analysis of pyriproxyfen resistance in the housefly, *Musca domestica* L.. *Appl. Entomol. Zool.* **32**:217-226.
- Zhang, L., S. Kasai and T. Shono (1998) *In vitro* metabolism of pyriproxyfen by microsomes from susceptible and resistant housefly larvae. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* (in press)



Inches 1 2 3 4 5 6 7 8
cm 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19

Kodak Color Control Patches

© Kodak, 2007 TM: Kodak



Kodak Gray Scale



© Kodak, 2007 TM: Kodak

A 1 2 3 4 5 6 **M** 8 9 10 11 12 13 14 15 **B** 17 18 19

