

氏名(本籍)	葛西真治(岐阜県)		
学位の種類	博士(農学)		
学位記番号	博甲第1,802号		
学位授与年月日	平成10年3月23日		
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当		
審査研究科	農学研究科		
学位論文題目	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		
主査	筑波大学教授	農学博士	正野俊夫
副査	筑波大学教授	農学博士	臼井健二
副査	筑波大学併任教授	農学博士	濱弘司
	(農業環境技術研究所)		
副査	蚕糸・昆虫農業技術研究所室長		
		理学博士	山川稔
副査	筑波大学助教授	農学博士	本田洋

### 論文の内容の要旨

ネッタイエカは熱帯、亜熱帯に棲息し、フィラリアを媒介する重要な衛生害虫である。多くの農業害虫と同様に本種を含む衛生害虫においても殺虫剤に抵抗性を示すものが出現し、防除の大きな障害となっている。これらの抵抗性害虫の防除を成功させるためには抵抗性の機構を解明することが重要である。本研究ではピレスロイド系殺虫剤の一種、パーメスリンに2,500倍という高い抵抗性を示すネッタイエカ(JPal-per系統)幼虫を材料に、その抵抗性機構の解明を試みた。

まず、殺虫試験を行うことで各種ピレスロイド剤に対するJPal-per系統の抵抗性スペクトルを調査した。JPal-per系統はパーメスリンをはじめとして、3-フェノキシベンジル基を有するタイプIのピレスロイド剤に2,500~4,000倍の高い抵抗性を示した。次に解毒酵素の抵抗性への関与を検討する目的で、酵素阻害剤の共力効果を調べた。P450酸化酵素阻害剤のPBO(piperonyl butoxide)とPTPE(2-propynyl 2,3,6-tri-chlorophenyl ether)をパーメスリンとともに幼虫に処理すると、抵抗性比が2,500倍から43倍と15倍へ著しく減少した。エステラーゼ阻害剤のDEF(S, S, S-tributyl phosphorotrithioate)は顕著な共力効果を示さなかった。またJPal-per系統の幼虫体内のチトクロムP450量が感受性系統と比較して約3倍多かった。これらのことから本系統のパーメスリン抵抗性にはチトクロムP450酸化酵素による解毒代謝が深く関与していると推察された。

そこで放射性同位体で標識したパーメスリンを用いた*in vitro*代謝試験によりP450酸化酵素の抵抗性への関与を検討したところ、全虫体より得た酵素液からは、P450酸化酵素による代謝は認められなかった。その原因は幼虫体内に存在する酸化酵素阻害物質によるものと考えられた。そこで幼虫を内容物を取り除いた中腸組織と中腸以外の組織に分け、それぞれより調整した酵素画分を用いることによりP450酸化酵素の活性測定が可能になった。その結果JPal-per系統の酸化酵素では感受性系統と比較して中腸で5倍、中腸以外の組織で20倍高いパーメスリン代謝活性が認められた。さらにその活性は上記の酸化酵素阻害剤によって強く阻害された。以上のことからJPal-per系統のパーメスリン抵抗性にチトクロムP450酸化酵素が主要な役割を担っていると結論した。

また、JPal-per 系統やピレスロイド剤と作用部位を同じくする DDT に交差抵抗性を示し、DDT に対する感受性は酸化酵素阻害剤や DDT 脱塩素酵素阻害剤の存在下でも増大することはなかった。したがってピレスロイド剤と DDT の共通の作用部位であるナトリウムチャンネルの殺虫剤に対する感受性の低下、いわゆる *kdr* 因子が補助的な要因として働いていることが示唆された。

さらに JPal-per 系統の主要な抵抗性機構であるチトクロム P 450 の機能を遺伝子工学的に解明するために、パーメスリン抵抗性に関与するチトクロム P 450 cDNA のクローニングを試みた。幼虫中腸由来の cDNA を鋳型として RT-PCR (reverse transcription polymerase chain reaction) を行い、増幅された PCR 産物を解析した結果、7 種類の P 450 アイソフォームの部分配列が明らかになった。さらに cDNA ライブラリーのスクリーニングによって CYP 6 E 1, CYP 6 F 1 という 2 種類の P 450 cDNA の完全鎖長配列を明らかにした。これらはカの P 450 についての最初の完全鎖長配列の解明である。また、CYP 6 F 1 遺伝子が JPal-per 系統で過剰発現していることがノーザンブロット法により確かめられたため、CYP 6 F 1 が本系統のパーメスリン解毒に関与している可能性が高いと推察された。さらに CYP 6 F 1 プローブを用いたゲノミックサザンブロット法の結果、系統間でゲノム構造に変異があることも明らかになった。

### 審 査 の 結 果 の 要 旨

本研究は、重要な衛生害虫であるネッタイエカ幼虫のピレスロイド剤パーメスリンに対する抵抗性の機構を解明する目的で行われた。パーメスリンに 2,500 倍の抵抗性を示す JPal-per 系ネッタイエカ幼虫に P 450 酸化酵素阻害剤 PBO, PTPe をパーメスリンと共に処理したところ抵抗性のレベルは著しく低下し、P 450 酸化酵素の活性増大が抵抗性の要因として働いていることが示唆された。中腸内容物を除去することで P 450 酸化酵素の活性測定を可能にし、*in vitro* において JPal-per 系の P 450 酸化酵素によるパーメスリンの代謝活性が高いことを示し、この酵素の抵抗性機構への関与を明らかにした。カ幼虫での P 450 酸化酵素の活性測定はその重要性が指摘されながらも報告例がなく、今回それに成功したことは高く評価できる。

更に、パーメスリン抵抗性に関与するチトクロム P 450 の cDNA のクローニングを試み、CYP 6 E 1 ならびに CYP 6 F 1 という 2 種類の P 450 cDNA の完全鎖長配列を明らかにするとともに、ノーザンブロット法により CYP 6 F 1 遺伝子が抵抗性の JPal-per 系で過剰発現していることを示し、CYP 6 F 1 がパーメスリン抵抗性に関与していることを示唆した。これらのことと、CYP 6 E 1 ならびに CYP 6 F 1 がカで初めて完全鎖長配列が判明したチトクロム P 450 であることは注目に値する。

以上、カ幼虫における P 450 酸化酵素の活性測定に成功し、それによりネッタイエカのパーメスリン抵抗性の機構として P 450 酸化酵素によるパーメスリンの解毒が重要な働きをしていることを示し、更に、カから新しいチトクロム CYP 6 E 1, CYP 6 F 1 の完全鎖長配列を決定したことは、基礎、応用の両面から高く評価される。

よって、著者は博士（農学）の学位を受けるに十分な資格を有するものと認める。