

氏名(本籍)	こざきとしのり 古崎利紀(愛知県)		
学位の種類	博士(農学)		
学位記番号	博甲第2789号		
学位授与年月日	平成14年3月25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	イエバエにおけるアセチルコリンエステラーゼ薬剤感受性低下の分子機構解明		
主査	筑波大学教授	農学博士	河野 義明
副査	筑波大学併任教授	理学博士	山川 稔 (農業生物資源研究所)
副査	筑波大学助教授	農学博士	本田 洋
副査	筑波大学教授	農学博士	松本 宏

論文の内容の要旨

アセチルコリンエステラーゼ (AChE) はコリン作動性シナプスにおいて神経伝達物質であるアセチルコリン (ACh) を加水分解して興奮の伝達を終了させる。有機リン剤とカーバメート剤はAChと競合的にAChEに結合して酵素活性を阻害するために、薬剤を処理された昆虫はシナプスにおける正常な興奮伝達が行われず死に至る。有機リン剤に抵抗性を発達させた昆虫の中には有機リン剤による阻害を受けにくい低感受性のAChEを持つものがある。イエバエ, *Muscadomestica*, も殺虫剤抵抗性の系統において有機リン剤に低感受性のAChEが確認されており、このAChEの感受性の差がイエバエにおける有機リン剤抵抗性の発達の一因であると考えられている。本研究ではAChEの薬剤感受性低下について、イエバエのAChE構造遺伝子の解析を行って、その分子機構を明らかにした。

まず、最初に、他種のAChEで保存されている領域に縮重プライマーを作製し、cDNA (complementary DNA, 相補DNA) からPCR (polymerase chain reaction, ポリメラーゼ連鎖反応) でイエバエのAChEをコードするDNA断片を増幅した。このDNA断片の塩基配列をもとにRACE (rapid amplification of cDNA end) を繰り返し、AChE前駆体の翻訳領域を含む2726bpの塩基配列を解読した。この塩基配列から推定されるイエバエのAChE前駆体は693アミノ酸残基からなり、成熟体になる過程で翻訳後修飾を受ける部位や、酵素の構造保持と活性に関与する部位は保存されていた。

次に、イエバエの系統間でAChE cDNA塩基配列の比較を行った。各系統の間で多数のSNP (single nucleotide polymorphism, 一塩基多型) が存在し、それに伴うアミノ酸置換や欠失も存在することが分かった。特に殺虫剤感受性の系統と抵抗性の系統で比較した場合、342番目と407番目のアミノ酸残基に置換がみられた。さらに、殺虫剤抵抗性の系統でみられたアミノ酸の置換とAChEの薬剤に対する感受性の関係を調べるために、AChEの遺伝子がヘテロ (heterozygosis) であるCT系統とYBOL系統の個体を用いて、個体ごとにAChEの有機リン剤 (フェニトロオクソン) に対する感受性とcDNAの配列を調べた。その結果、342番目と407番目のアミノ酸置換をもつ個体でのみフェニトロオクソンに対するAChEの感受性が低下していた。この置換による感受性の低下は、バキューウウイルス・Sf-9 (*Spodoptera frugiperda* 由来の細胞) 遺伝子発現系を用いてイエバエのAChEを発現することによって確認できた。

最後にcDNAの塩基配列を利用して、AChE遺伝子の連鎖群解析を行った。既に他の研究でAChEを低感受性化する要因は第2染色体の形質に連鎖して遺伝することが分かっている。AChE遺伝子がホモ(homozygosis)であったLPR系統とSRS系統の個体に常染色体それぞれに劣性の可視突然変異マーカーを持つaabys系統の個体を交配して調べたところ、戻し交配世代の形質から、AChEの構造遺伝子は第2染色体に存在することが示された。この結果から、AChEの感受性を低下させる要因とAChEの構造遺伝子が同一である可能性が高いと考えられた。

本研究で明らかにしたイエバエのAChEに見られるアミノ酸残基の置換は、X線構造解析で立体構造が分かっているキイロショウジョウバエのAChEにあてはまると、いずれも活性部位に近いところに位置していた。この部位に置換を持つAChEではフェニトロオクソンに対する感受性が低下することから、アミノ酸残基の置換による活性中心の形状変化が基質や有機リン剤と酵素の親和性を変え、AChEの薬剤感受低下をもたらしたと考えられる。

審 査 の 結 果 の 要 旨

本研究は、人間生活に密着して生息し、人の消化器系感染症病原体を媒介するイエバエにおける有機リン殺虫剤抵抗性要因となっているアセチルコリンエステラーゼ(AChE)の薬剤感受性低下機構を分子生物学的に明らかにすることを目的に行われている。殺虫剤抵抗性に関して、これまでに世界で約30種の昆虫においてAChEの薬剤感受性低下についての報告がある。そのうちキイロショウジョウバエ、ネッタイシマカなどでAChEの薬剤感受性低下の分子機構が研究されており、AChE構造蛋白中のアミノ酸置換による感受性低下が示されている。また、最近ではAChE構造蛋白のアミノ酸配列に違いのない薬剤感受性低下が存在することも示唆されており、どのような機構によって薬剤感受性低下が起こるかは種ごとに明らかにしなければならない。イエバエでは有機リン剤抵抗性系統が確立されているため、これらと感受性系統を比較することで研究が進められている。他種のAChE遺伝子で保存されている領域に縮重プライマーを作成し、cDNAを鋳型にPCR法によってイエバエAChEの一部をコードするcDNA断片を増幅することから始めRACE法等によってAChE前駆体の翻訳領域を含む2726bpの塩基配列が明らかになった。この塩基配列が明らかにAChE構造蛋白をコードすることを確かめた後、塩基配列を抵抗性、感受性系統間で比較して多くの塩基置換の存在が確認された。本研究での特徴の一つは、1個体においてAChEの薬剤感受性と塩基配列とを明らかにし、個体間で比較できる手法を確立していることである。この手法によって有機リン剤感受性低下には必ず342と407番目のアミノ酸置換があることが示された。これがキイロショウジョウバエでのアミノ酸置換と相同な位置であることも興味深い。さらに、この点についてはcDNAをバキュロウイルス遺伝子に組み込み、ハスモンヨトウ近似種由来の培養細胞内で発現することによって確認されている。また、上記の手法によってAChE遺伝子の連鎖群解析を行い、この遺伝子が第2染色体に存在することを示した。すでに知られていたAChEの有機リン剤感受性低下要因は第2染色体にあるという結果と考えあわせ、アミノ酸置換がイエバエAChEの薬剤感受性低下の要因であることがさらに支持された。以上の一連の成果はそれ自体高く評価されるとともに、今後抵抗性対策のためのモニタリングや新規薬剤創製のために役立ち、さらに、遺伝子発現によって得られる各種のAChEはバイオセンサー構築の素材としても利用可能である。

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。