

解説
読物企画

昆虫における第2のアセチルコリンエステラーゼの存在と薬剤抵抗性

河野 義明*

筑波大学農林学系

(平成 15 年 11 月 20 日受理)

Keywords: second type of acetylcholinesterase, insecticide resistance mechanism, amino acid substitution.

はじめに

殺虫剤抵抗性には多くの要因が存在するが、大きく二つに分類することができる。一つは殺虫剤が処理されてから作用点に到達するまでの過程でその量を減少させるもので、これに関与する要因には殺虫剤に対する忌避行動¹⁾、昆虫表皮の薬剤浸透性低下、薬剤解毒酵素活性の増強および、薬剤と結合するタンパク質などの増加などが知られている。もう一つは、薬剤の作用点自体が変化して薬剤に対する感受性を低下させるものである。最近の分子生物学的研究手法の進歩に伴い、比較的扱いやすい解毒機構と薬剤感受性低下機構については遺伝子レベルの研究が進んでいる。

解毒機構に関しては、酸化解毒酵素であるシトクロム P450 活性の増強や抱合解毒酵素であるグルタチオン S-トランスフェラーゼ活性増強がそれら遺伝子の転写活性上昇によることや、加水分解酵素であるカルボキシエステラーゼ活性増強が遺伝子増幅によることが明らかにされている²⁾。

作用点の薬剤感受性低下に関しては、GABA 受容体のシクロジェン殺虫剤感受性低下の原因として酵素構成アミノ酸の置換が最初に明らかにされた。多くのキロショウジョウバエのシクロジェン抵抗性系統では GABA 受容体遺伝子の 302 番アラニンがセリン (S302A) に変化しており、この置換のみで薬剤感受性が明らかに低下する³⁾。さらに、他の昆虫のシクロジェン抵抗性系統でも同様な位置のアラニンがセリンに置換していることも明らかにされた。このことは、受容体の機能を保持し、かつ、薬剤感受性低

下につながるアミノ酸変異がきわめて限られた位置でしか起きないことを示唆している。作用点構造のアミノ酸置換による薬剤感受性低下はピレスロイド抵抗性昆虫、いわゆる *kdr* 系統における作用点 Na⁺ チャンネルにおいても示されている^{4,5)}。

ここで紹介するアセチルコリンエステラーゼ (AChE) についても、薬剤感受性低下の原因として酵素蛋白のアミノ酸置換が明らかになりつつあるが、最近まで昆虫の AChE が 1 ゲノム 1 構造遺伝子座と考えられていたことによって解釈の難しい研究結果も多かった。これはゲノム解析の終了したキロショウジョウバエの AChE が 1 ゲノム 1 構造遺伝子座であり、昆虫の AChE の分子生物学的研究がそれを基礎に進められてきたいささかによる。しかし、第 2 の AChE 遺伝子の存在がいくつかの昆虫種で確認されたことから、この酵素においても薬剤感受性低下が AChE 構造アミノ酸の置換によってもたらされることが確認されるようになった。このような経緯なども含め、われわれの研究を中心に現状を述べる。

1. 有機リン剤、カーバメート剤の作用点 AChE

AChE は有機リン剤、カーバメート剤の作用点である。コリン作動性神経の軸索上を伝わってきた電氣的興奮はシナプス前膜から神経伝達物質アセチルコリン (ACh) を放出させ、それがシナプス後膜の ACh 受容体に結合して膜の興奮を引き起こすことによって細胞間で刺激が伝達される。AChE はこのときに余分な ACh を速やかに分解して神経伝達を正常に終結させる酵素である。昆虫では約 150 kDa の 2 量体蛋白として存在し、グリコリピドアンカーを介して細胞膜に付着している。多くの動物の AChE アミノ

* 〒305-8572 つくば市天王台 1-1-1

E-mail: ykono@sakura.cc.tsukuba.ac.jp

MSSISMVXGILLCIAVISPVYGFIDRLVVQTSSGPIGRS 40
 TMVQGREVHVFNQVFPFAKPPVDGLRFQKPVPAEPWHGVLD 80
 ATRLPPSC¹IQERYEYFPGFAGEEMWNPNTNVSEDC¹LYLNI 120
 WVPTKTRLRHGRGLNFGNNDYFQDDDDFQRQHQSKGGLAM 160
 LVWYIGGGFMSGTSTLDVYNAEILAAGNVIVASMOYRVG 200
 AFGFFYLAPYLNREEEAPGNVGLWDQALAIRWLKENAKA 240
 FGGDPDLITLFGES^oAGGSSVSLHLLSPATRGLSHRGILQS 280
 GTLNAPW^pSHMTAEKALSVAESLIDDCNCNVTLTKDSPGSV 320
 MNCMRNVDAKTISVQQWNSYSGILGFP^pSAPTIDGVFMTAD 360
 PMTMLREANLEGIDILVGSNRD^gGTFFLLYDFIDYFEKDA 400
 ATSLPRDKFLEIMNTIF^pSKASEPEREAIIFQYTGWESGND 440
 GYQNQQQVGRAVGDHFFIC³PTNEFALGLTDRGASVHYIYF 480
 THRTSTSLWGEWMGVLE^gGDEVEYIFGQPMNATLQYRQER 520
 DLSRRMVLVSEFARSGNPALEGEHWPLYTKENPIYFIFN 560
 AEGEDDLRGEKYGRGPHATS^dCAFWNDFLPLRLAWSIPPKP 600
 SCNMLDQISAASVRYVDFKVVTVTLVLIVLRLF 633

図1. コガタアカイエカ AChE1 のアミノ酸配列。下線：シグナルペプチド，1,2,3,d を付した C：分子内システイン結合 3 組と分子間結合のシステイン，[S], [E], [D]：catalytic triad，a を付したアミノ酸：choline binding site にあってコリンと結合するアミノ酸，o を付したアミノ酸：oxyanion hole を形成するアミノ酸，p を付したアミノ酸：acyl pocket を形成するアミノ酸，p：T. californica AChE では Val である，p：T. californica AChE では Phe である，g を付したアミノ酸：ゴージ内を裏打ちする芳香族アミノ酸。

酸配列の比較およびシビレエイ *Torpedo californica* AChE 結晶構造の X 線解析によって AChE 共通の構造が明らかになり⁶⁾，キイロショウジョウバエ AChE についても同様な解析が行われ⁷⁾，脊椎動物と昆虫との共通点，相違点が明らかにされた。図1はコガタアカイエカ AChE1 の 633 残基からなるアミノ酸配列を示している。活性中心にあるプロトンリレー機構に関与する Ser, Glu, His のいわゆる catalytic triad と呼ばれる 3 アミノ酸，ACh のアルコキシ基と疎水結合する acyl pocket (Trp, Phe, Phe, Phe)，アシル基二重結合酸素と水素結合する oxyanion hole (Gly, Gly, Ala)，および ACh のコリン部分と結合する anionic substrate binding site と呼ばれる部位の Trp が，構造タンパクの保存アミノ酸配列として挙げられる。さらに，サブユニット内の 3 組のジスルフィド結合に関わる 6 つの Cys とダイマー形成に関与する C-末端近傍の Cys，および活性中心の存在するゴージと呼ばれる窪みを裏打ちする 10 個の芳香族アミノ酸 (acyl pocket にあるものも含める) も保存されている。これらのアミノ酸を活性中心の構造に入れて模式的に示したのが図2である。ゴージ入り口近くに peripheral anionic binding site と呼ばれる，アロステリック効果に関係する基質との結合部位の存在も考えられている。また，コリン結合部位はイオン間の結合と考えられてきたが，むしろ疎水性部位への吸着と考えたほうがよいようで

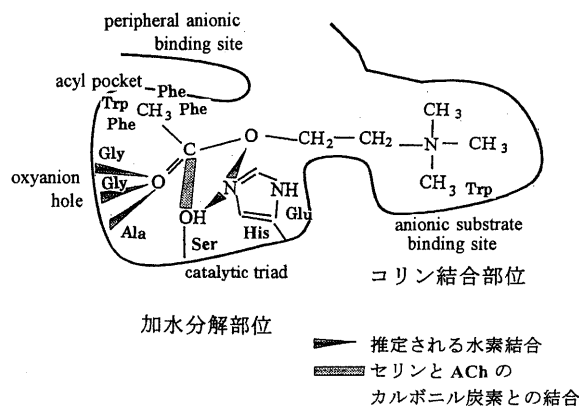


図2. AChE 活性中心の模式図。

ある。シビレエイ AChE acyl pocket の芳香族アミノ酸については，コガタアカイエカ AChE1 Leu344 (図1, p) の相同位置が Phe に，Phe457 (図1, p) が Val に代わっており，この部位の Phe の数は変わらない。

2. 有機リン，カーバメート抵抗性と AChE の薬剤感受性低下

有機リン，カーバメート化合物は作用点である AChE の基質結合部位に ACh と競合的かつ不可逆的に結合して ACh 分解機能を阻害する。その結果，シナプス部位で異常興奮が起こり，続いて神経は麻痺し，昆虫は死亡する。

有機リン剤に対する抵抗性はハダニで 1950 年代から報告されており，わが国でも 1950 年代末から 1960 年代前半にかけてミカンハダニなどで報告された。そして，1964 年にはナミハダニの有機リン剤抵抗性要因として AChE の薬剤感受性低下が示された^{8,9)}。この AChE の感受性低下を methyl paraoxon の I_{50} 値により比較すると抵抗性ナミハダニ AChE は感受性の 1/1000 であった。さらに，この抵抗性 AChE の ACh 分解活性は感受性のものの 3/5 に低下することと，paraoxon の alkyl 基置換体 (methyl-butyl) の阻害の変化から酵素の加水分解部位に変化が起きているのではないかと推察された¹⁰⁾。

昆虫では最初にツマグロヨコバイのカーバメート剤抵抗性に伴って起きる AChE 薬剤感受性低下が研究された。この AChE は propoxur に最も感受性を低下させており (I_{50} 値の比較で感受性系統の 1/115)，薬剤感受性低下に伴い ACh に対する至適濃度が認められなくなり，相対的に butyrylcholine 分解性が高まるなど酵素の性質も変化した¹⁰⁾。興味深いのは，感受性低下 AChE は *n*-propyl 型のカーバメートや propaphos sulfoxide, diazoxon 等の一部の有機リン化合物に対してはかえって感受性が高まることである。

今日までに有機リン，カーバメート殺虫剤抵抗性要因となる AChE の薬剤感受性低下の例は昆虫，ダニにおいて

表 1. 昆虫・ダニの薬剤抵抗性に関与するアセチルコリンエステラーゼ (AChE) の感受性低下

種	阻害剤	感受性比 (I_{50} または k_i^{***} の比)
半翅目		
ワタアブラムシ <i>Aphis gossypii</i> **	pyrimicarb	14
モモアカアブラムシ <i>Myzus persicae</i> **	propoxur	49
ムギミドリアブラムシ <i>Schizaphis graminum</i> *	paraoxon	2.1***
ツマグロヨコバイ <i>Nephotettix cincticeps</i> **	propoxur	115
タバココナジラミ <i>Bemisia tabaci</i>	propoxur	2,500
カスミカメムシの一種 <i>Lygus hesperus</i>	paraoxon	34
鞘翅目		
コロラドハムシ <i>Leptinotarsa decemlineata</i> *	azinphosmethyl-oxon	16***
イネドロオイムシ <i>Oulema oryzae</i> **	propoxur	50,000
鱗翅目		
コナガ <i>Plutella xylostella</i> **	methomy	30
ハスモンヨトウ近縁種 <i>Spodoptera littoralis</i>	m-paraoxon	12
ツメクサガの同属種 <i>Heliothis virescens</i>	m-paraoxon	22
双翅目		
アカイエカ <i>Culex pipiens</i> *	propoxur	30,000
コガタアカイエカ <i>Culex tritaeniorhynchus</i> **	paraoxon	1,500
ショウジョウバエ <i>Drosophila melanogaster</i> *	malaoxon	2
ヒツジキンバエ <i>Lucilia cuprina</i> *	diazoxon	1.5***
ミバエの一種 <i>Bactocera oleae</i> *	ometoate	16***
イエバエ <i>Musca domestica</i> **	rabon	38
ダニ目前気門亜目		
ナミハダニ <i>Tetranychus urticae</i> **	paraoxon	500
カンザワハダニ <i>Tetranychus kanzawai</i> **	malaoxon	1,000
ダニ目後気門亜目		
オウシマダニ <i>Boophilus microplus</i> *	diazinon	85
ダニ目中気門亜目		
カブリダニの一種 <i>Amblyseius potentillae</i>	paraoxon	311***

主に文献12) によった。* AChE 遺伝子のクローニングがなされた種。 ** 著者らのグループがクローニングした種。

30 種以上知られており、その主な例を表 1 に示した¹²⁾。この中には、われわれが AChE のクローニングを行っている 9 種の昆虫、ハダニが含まれる。1990 年前後から東北、関東地方で報告されているイネドロオイムシのカーバメート剤、有機リン剤に対する抵抗性も AChE の感受性低下に起因していることが明らかにされている¹³⁾。

1982 年に富山県で採集された富山系統コガタアカイエカの AChE はほとんどの有機リン化合物に対して感受性を低下させている^{14,15)}。富山系統 AChE の各種薬剤に対する感受性を感受性台湾系統と I_{50} で比較すると図 3 のようになる。富山系統 AChE の感受性はほとんどの有機リン化合物に対して 1/1000 以下であり、カーバメート化合物に対しては約 1/100 である。有機リンやカーバメートは AChE の活性中心に ACh と同じようにはまり込んで酵素活性を阻害するので、感受性低下 AChE ではこの部分に立体的変化が生じていると考えられる。実際、基質結合部分にきっちりとはまり込んで阻害活性を示す化合物ではない tacrine や ambenonium は両系統の AChE に対して同程度の阻害活性を示す (図 3)。また、富山系統の AChE には感受性系統の AChE で見られる至適 pH, 至適基質濃度が顕著ではなくなり、ACh に対する基質特異性がより高くなり、

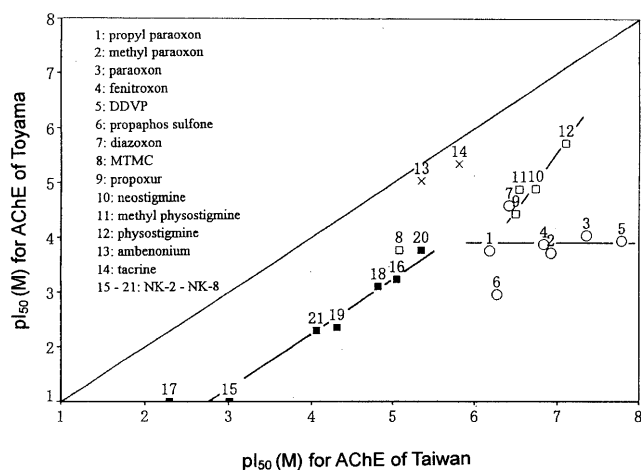
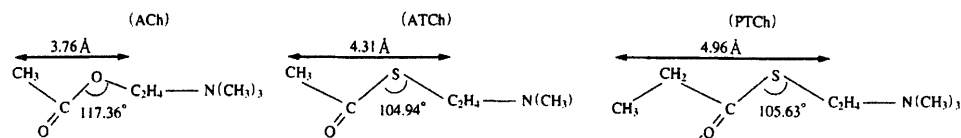


図 3. コガタアカイエカ感受性 (台湾) と抵抗性系統 (富山) の AChE に対する各種薬剤の阻害活性 (pI_{50} (M) で表示)。○: 有機リン化合物, □: カーバメート, ■: alkylsulfonyl-phenyl methanesulfonate 化合物 (15~21 は図 4 の NK-2~NK-8 に対応), ×: その他の化合物。

acetylthiocholine (ATCh), propionylthiocholine (PTCh) と分子の長さが長くなるにつれ急激に加水分解活性が落ちることも判明している (表 2)¹⁵⁾。さらに、両系統 AChE に

表 2. コガタアカイエカ富山系統（抵抗性）と台湾系統（感受性）AChE の 3 種基質に対する分解性 (K_m 値で表示)

	基 質		
	Acetylcholine (ACh)	Acetylthiocholine (ATCh)	Propionylthiocholine (PTCh)
Toyama	4.68×10^{-5}	6.79×10^{-4}	8.08×10^{-3}
Taiwan	7.19×10^{-5}	1.18×10^{-4}	1.01×10^{-3}
Toyama/Taiwan	0.65	5.75	7.77



各基質の矢印で示す 2 炭素間の距離と酸素または硫黄原子の位置での角度を表示。

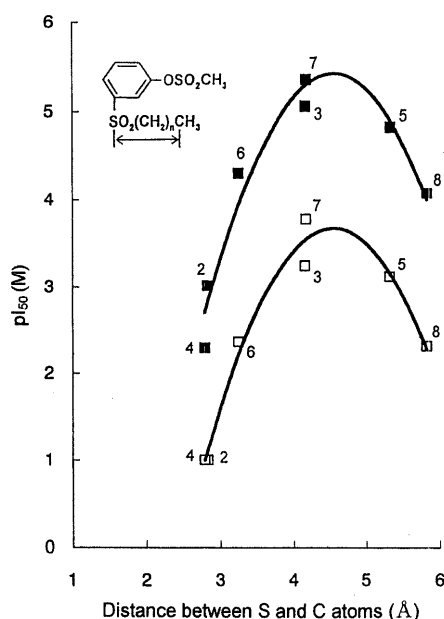


図 4. コガタアカイエカ富山系統 (□) と台湾系統 (■) AChE の alkylsulfonate 基の硫黄原子と末端炭素原子の距離である。各点に付した数字 2~8 は NK-2~NK-8 に対応し、それらの置換アルキル基は NK-2 から順に ethyl, *n*-propyl, *iso*-propyl, *n*-butyl, *sec*-butyl, *iso*-butyl, *n*-pentyl である。距離と阻害活性の間には富山で $Y = -0.86(X - 4.55)^2 + 3.66$, 台湾で $Y = -0.88(X - 4.55)^2 + 5.41$ のような関係がみられる。

対する alkyl 基を置換した一連の阻害剤 3-alkylsulfonate 基の構造-活性相関から、コリン結合部分に対応するアルキル基の長さは感受性低下に影響しないと考えられ、富山系統 AChE の構造変化は基質結合部位の中でも加水分解部分で起きていると結論される (図 4)¹⁶⁾。

3. AChE1 型の遺伝子と薬剤感受性低下

昆虫 AChE の分子生物学的研究はキイロショウジョウバエ AChE 遺伝子 (*ace*)¹⁷⁾ をモデルに発展したことを踏まえ、ここではこの昆虫の *ace* とオルソログスな AChE を 1 型 (AChE1) と呼び、最近明らかにされつつある *ace* とパラログスなものを 2 型 (AChE2) と呼ぶことにする (フランス人研究者らはカのアChE に対して逆の呼び方をしているが、ここでは混乱を避けるため彼らの研究を紹介する際にも上述の記述法による)。Mutero ら¹⁸⁾ は、有機リン剤感受性を低下させた *ace* で見つかった 4 カ所のアミノ酸置換すなわち F115S, I199V, G303A, F368Y (A 数字 B は「数字」番目のアミノ酸 A がアミノ酸 B に置換したことを表す) を *in vitro* mutagenesis により感受性系統の *ace* cDNA に導入してアフリカツメガエル卵母細胞系で発現させた。3 残基置換の可能な組み合わせをもつ 4 種 *ace* はアミノ酸置換の相乗効果により感受性が低下したが、中でも V199+A303+Y368 の組み合わせをもつものは paraoxon 感受性が約 1/80 に低下した。この結果から Mutero ら¹⁸⁾ は、自然集団にすでに存在する比較的弱いレベルの抵抗性をもたらす遺伝子が遺伝的組換えにより集積し、殺虫剤の淘汰により定着して抵抗性の機構となったと推定している。

東京湾廃棄物埋立処分場由来の薬剤抵抗性イエバエ AChE cDNA を解析した結果では、四つのアミノ酸置換 (I162M, V260L, G342A, F407Y) が見つかり、そのうち二つ (G342A, F407Y) はキイロショウジョウバエで明らかにされた G303A, F368Y と相同のアミノ酸の置換であった。V260L の置換は *n*-propyl 型有機リン剤抵抗性に特徴的であり、さらに、この抵抗性の AChE には G342V の置換も加わっていることが明らかにされた¹⁹⁾。三つの置換 (I162M, G342A, F407Y) を含んだ cDNA をバキュロウイルスに組み込み、昆虫培養細胞で発現した AChE は感受性と比べ fenitroxon 感受性が 1/22 に低下していた²⁰⁾。

ミバエ *Bactrocera oleae* においても *ace* オルソロガス AChE における感受性低下に関連したアミノ酸置換 G488S が見つかった²¹⁾。

ところが、コガタアカイエカから *ace* オルソロガスな AChE1 cDNA を富山系統と感受性台湾系統からクローニングし、それから読みとれるアミノ酸配列を比較した結果は意外にも両系統間に相違がまったく認められなかった(未発表)。念を押すために両系統の AChE1 cDNA (塩基配列には若干の違いがみられた)をバキュロウィルス-昆虫培養細胞系で発現したが、やはり、産生された AChE の薬剤感受性には違いがみられなかった(未発表)。そこで、日本で知られている AChE 感受性低下により殺虫剤抵抗性を示す害虫、ツマグロヨコバイ²²⁾、ワタアブラムシ(未発表)、モモアカアブラムシ²³⁾、イネドロオイムシ(未発表)、コナガ²⁴⁾を材料にして *ace* オルソロガスな AChE1 cDNA をクローニングし、感受性系統と抵抗性系統との間で比較したが AChE 感受性低下に伴ったアミノ酸置換は検出されなかった。ナミハダニ²⁵⁾、カンザワハダニ(未発表)については結論を保留している。アカイエカにおいても AChE1 のアミノ酸配列には薬剤感受性低下に伴う置換は認められていない²⁶⁾。コガタアカイエカにおいては染色体上の分子マーカーを用いた RFLP により AChE1 と抵抗性要因とを連鎖群解析したところ、AChE1 遺伝子は第1染色体上に、感受性低下を決める遺伝子は第2染色体上に存在することが確認され、AChE1 構造遺伝子は薬剤感受性に直接は関与しないという結論が得られた²⁷⁾。

4. AChE2 型の発見

これまで述べたことから、AChE 感受性低下機構には①イエバエ、キイロショウジョウバエ等にみられる *ace* およびそのオルソロガス AChE 構造アミノ酸の置換によるものと、②コガタアカイエカや他の多くの昆虫種での AChE1 構造タンパクにアミノ酸置換を伴わないもの、の2通りあることが明らかになった。アミノ酸置換を伴わない AChE の感受性低下を説明するには、AChE 遺伝子翻訳後に働く修飾による酵素の立体構造変化が考えられる。しかし、マダニ *Boophilus microplus*²⁸⁾ や線虫 *Caenorhabditis elegans*²⁹⁾ ではそれぞれ2および4種類の AChE 遺伝子の存在が知られており、昆虫においても第2の AChE 遺伝子の存在とそれに薬剤感受性低下の原因を求める考えも可能である。機構解明の第一歩は、2002年に *ace* オルソロガスな AChE とは相同性が低い AChE がムギミドリアブラムシ³⁰⁾ とマラリア媒介蚊 *Anopheles gambiae*³¹⁾ において発見されたことであった。前者においては薬剤感受性低下に伴う AChE2 でのアミノ酸置換は検出されていない。後者の研究は二つの AChE 遺伝子の存在を主張していたフランス研究者の手によるもので、翌年アカイエカにおいて薬剤感受

性低下に関与すると考えられる AChE2 構造アミノ酸の置換が報告された³²⁾。われわれも AChE2 cDNA の degenerate primer を設計し、モモアカアブラムシ²³⁾、コガタアカイエカ⁷⁾、ツマグロヨコバイ³³⁾ において2型 cDNA のクローニングに成功した。図5にコガタアカイエカとモモアカアブラムシ AChE2 のアミノ酸配列をコガタアカイエカ AChE1、キイロショウジョウバエ *ace*、シビレエイ AChE と並べて示した。AChE2 のアミノ酸構造中にも先に述べた AChE を特徴づけるすべての保存領域が確認されるが、アミノ酸配列の相同性を AChE1 と AChE2 の間でみるとコガタアカイエカでは58%であり、ハマダラカ *An. gambiae*、モモアカアブラムシにおいても1型と2型との間の相同性はそれぞれ59%、55%である。これらの値は同じ型の AChE の昆虫間(モモアカアブラムシ、コガタアカイエカ、*An. gambiae*)での相同性(1型で78~98%、および2型で80~96%)と比べ低く、明らかに異なる型として分類すべきものである。これまで昆虫、ダニにおいて明らかにされている AChE アミノ酸配列に基づいて作成した系統関係は図6のようになり、二つの型が異なる系統に分かれることがはっきりとわかる。

5. AChE2 における薬剤感受性の原因となるアミノ酸置換

コガタアカイエカにおいて AChE2 cDNA 配列に基づいて RFLP による連鎖群解析を行った結果、この遺伝子がすでに解析されていた AChE 薬剤感受性低下因子の第2染色体上の位置にきわめて近接して存在することが判明し、両者は同一のものである可能性が高まった。これにより AChE2 がこの昆虫の薬剤感受性低下の原因であることが示された(図7)³³⁾。

An. gambiae の薬剤感受性低下 AChE2 では119番のグリシンがセリンに置換(G119S)している³²⁾。このグリシンは AChE 活性中心の oxyanion hole に位置し、セリンへの置換が薬剤との親和性を低下させていると考えられる。実際に G119S を置換するように設計した AChE2 cDNA をキイロショウジョウバエ培養細胞で発現して、その酵素の薬剤感受性を試験すると抵抗性系統の AChE と同様の感受性低下がみられている³²⁾。

モモアカアブラムシ AChE2 では S431F の置換が pyrimicarb 感受性低下系統で起きている。このセリンの位置は活性中心の acyl pocket 部分の一つの Phe と相同位置にあり(図2)、置換により Phe になる。この部分の大きさに関していえば、モモアカアブラムシ AChE は他の昆虫の AChE より大きかったものが同じ大きさになったと理解される²³⁾。このアミノ酸置換に伴い静電的環境の変化も起こると考えられるが、acyl pocket の大きさの変化は、モモアカアブラムシの薬剤感受性低下がジメチルカーバメー

myzpe-acche2	-----MDQWLLWFSYLVASTYGLSLRHARHQSVDGPTAEELIPEQILIEDTHVFRQALDMFAQEPEYTEKRNLN	71
cultr-acche2	MRPLQAMEIRGLITRLLGPCHLRHLILCSLGLYSILVQSVHCRHHDIGSSAAHOLGSKYSQSSSLSSSSQSSSLAEATLNKDSGHGDSVRIVDAELGT	100
cultr-acche1	-----	
drome-acche	-----MAISCRQSRVLP	12
torca-acche	-----	
1		
myzpe-acche2	HRRRSEFSGNQDNDFESSGETYSAYKSDPLVIHTNKGKIRGITQAASGKLVDAWLGIYAKKPGDLRFRHPRPDRWDNTNPETLNCTTPPNTCVQ	171
cultr-acche2	LEREHIHSTTTTRRRGLTRRESNSDSDSDPLVITTDKGGIRGTTLEAPSGKKVDAMWGIYAPQPLGLRFRHPRPAERWS-----GVLNATKPPNSCVQ	195
cultr-acche1	---MSSISMVVGILLCIAVISPVYGIIDRLVVGTSSTGPIRGRSTM-VQGREVHVFNVPFAKPPVDGLRFQKPVPAEPWHG-----VLDATRLPPSCIQ	90
drome-acche	MSLPLPLTIPPLVLVLSLHSGVCGVIDRLVVGTSSTGPIRGRSTM-VQGREVHVYTGIPYAKPPVEDLRFKPVPAEPWHG-----VLDATGLSATCVQ	106
torca-acche	-----DDHSELLVNTKSGKVMGRTP-VLSSHISAFGLGIPFAEPPVGNMFRFRPEPKKPSWG-----VWNASTYPNNCQ	69
* * * * *		
a 1 00		
myzpe-acche2	IFDTLFGDFPGATMWNPNPVSSEDCLYINVVVP---KPRP-----QN-----AAVMVWIFGGGFYSGSATLDIYDPKVLV	238
cultr-acche2	IVDTVFGDFPGATMWNPNPLSEDCLYINVVAP---RPRP-----KN-----AAVMLWIFGGGFYSGSATLDVYDHRTLA	262
cultr-acche1	ERYEYFPGFAGEEMWNPNNTNVEDCLYINWVPTKRLRHGRGLNFGNDY---FQDDDDFOR---QHSGKGLAMLVWYIGGGFMSGTSLDLYNAEILA	185
drome-acche	ERYEYFPGFSGEEIWNPNNTNVEDCLYINWVAPAKARLRHGRGANGGEHPNGKQADTHLHNHGNPQNTNGLPILWYIGGGFMTGSATLDIYNADIMA	206
torca-acche	YVEQFPGFSGSEMWNPNRMSDCLYINWVP---SPRP-----KS-----TTVMVWYIGGGFYSGSATLDVYNGKYLA	136
* * * * *		
to		
myzpe-acche2	SEENVILVSMQYRVASLGFLFYD-----TEDVPGNAGLFDQLMALQWVHENIKLFGGNPNVTLFGESAGAVSVSLHLLSPLSRNLFNQAIMESGSST	331
cultr-acche2	SEENVIVVSLQYRVASLGFLFYD-----G-TPEAPNAGLFDQNLALRWVRDNIHRFGDPSRVTLFGESAGAVSVSLHLLSALSRDLFQRAILQSGSPT	355
cultr-acche1	AVGNVIVASMQYRVAGFGFFLAPYLN---GREEEAPGNVGLWDQALAIRWKENAKAFGGDPDLITLFGESAGGSSVSLHLLSPATRGLSHRGLQSGTLN	284
drome-acche	AVGNVIVASFOYRVAGFGFLHAPEMPSEFAEEAPGNVGLWDQALAIRWLDNAHAFGGNPEWMTLFGESAGSSVNAQLMSPVTRGLVKGMMQSGTMMN	306
torca-acche	YTEENVLVSLSYRVAGFGFLALHG-----SQEAPGNVGLLDQRMALQWVHDNIHFGGDPKTYITFGESAGGASVGMHILSPGSRDLFRRAILQSGSPN	230
* * * * *		
p 2 2 p		
myzpe-acche2	APWAILSREESYSRGLRLARAMGC-PDDRN-EIHKTVECLRKANSSTMVKEWD---HVAICFFFPVVPVVDGAFLDDYQKSLSTNNFKKTNILMGSNSE	426
cultr-acche2	APWALSREEAATRLRLAEAVNC-PHDAT-KLSEAVECLRTKDPNELVDNEWG---TLGICEFFFPVVPVVDGAFLDETQPSRLASGRFKKTEILTSNGTE	450
cultr-acche1	APWSHMTAEKALSVAESLIDDCNCNVTLKDSGSGVMCMRNVDAKTISVQWNSYS---GILGFPSAPTIDGVFMTADPMTMLREANLEGLIDLVGSNRD	382
drome-acche	APWSHMTSEKAVEIGKALINDCNCNASMLKTNPAHVMSCHMSVDAKTISVQWNSYS---GILSFPAPTIDGAFLPADPMTLMKTADLKDYDILMGNVRD	404
torca-acche	CPWASVSVAEGRRRAVELGRNLNC---NLN-SDEELIHCLREKKPOELIDVENVLPFDSIFRFSFVPVVDGEFFPTSLSEMLNSGNFKKTQILLGVNKD	326
* * * * *		
t p p 3 t		
myzpe-acche2	EGYYSIFYLLTELKKEENVVVSRENFVKAIGQLNPNADAAVKSAIEFEYTDWFSNDPEKNRNALDKMVGQDYQFTGNVNEFAHKYALTGNVVMYFFKH	526
cultr-acche2	EGYYSIFYLLTELLRKEEGVTVSREEFLQAVRELNPVYNGAARQAIFVEYTDWIEPDNPNNSRDALDKMVGQDYHFTGNVNEFAQRYAEEGNVVMYLYTH	550
cultr-acche1	EGTYFLLYDFIDYFEKDAATSLPRDKFLEIMNTIFSKASEPEREAIIFQYTGWESGNDGYQNGQVGRVAGDHFFICPTNEFALGLTDGASVHYHYFTH	482
drome-acche	EGTYFLLYDFIDYFDKDDATSLPRDKYLEIMNINFGKATQAEREAIIFQYTSWE-GNPGYQNGQVIGRAVDHFFTCPTNEYAQAALERGASVHYHYFTH	503
torca-acche	EGSFLLYGAQGFSGKDE-SKISREDFMSGKLSVPHANDLGLDAVTLQYTDWMDNNGIKNRDGLDDIVGDHNVICPLMHFVNKYTKFGNGTYLYFFNH	425
* * * * *		
myzpe-acche2	RSLNNPWPKWTGVMHGDEISYVFGDPLNPNKRYEIEELSKMMRYWTNFAKTGNPSKTFEGSWVTPKWVHTAYGKEFLTLDNTNTS-----GVGP	620
cultr-acche2	RSKGNPWPRWTGVMHGDEINYYVGEPLNAALGYQDEKDFSRKIMRYWSNFAKTGNPNPS-PPNADLPEWPKHTAHGRHYLEGLNTSFV-----GRGP	643
cultr-acche1	RTSTSLWGEWMGVLHGDEYIFGQPMNATLOQRORRDLSSRMVLSVSEFARSGNPALE-----GEHWPLYTKENPIFYIFNAEGEDDLRGEKYGRGP	576
drome-acche	RTSTSLWGEWMGVLHGDEIEYFFGQPLNNSLQYRPVERELGKRLMSAVIEFAKTGNPAQD-----GEEWPNFSKEDPVYIFSTDD-----KIEKLARGP	593
torca-acche	RASNLVWPWVGVIHGYEIEFVFGPLPLVKELNTYAEAEALSRRIMHYWATFAKTGNPNP-----HSQESKWPLFTTKEQKIFDLNTEPMKVHQR-----L	516
* * * * *		
3 d		
myzpe-acche2	RLEQCAFWKYVPDLM-AISKMSKSKN---CTTISGGTKTYMIELSLWTIVMTTAVLML-----	676
cultr-acche2	RLRQCAFWKYLPQLV-AATSNLQVTPAPSPCESSTSYRSSTLLIVTLLVIRFKI-----	701
cultr-acche1	MATSCAFWNDPLRLR-AWSIPPKPS-----CNMLDQISAASRYVDKVVTVLTVLIVLRLF---	633
drome-acche	LAARCSFWNDYLPKVR-SWAGT-----CDGDSGSASISPRLLQLGIAALYICAAALRTKRVF	649
torca-acche	RVQMCVFWNQFLPKLLNATA-----CDGELSSSGTSSSKGIIFYVLFSILYLIIF-----	565
* * * * *		

図5. コガタアカイエカ, モモアカアブラムシの AChE2 およびコガタアカイエカ AChE1, キイロショウジョウバエ *ace*, *T. californica* AChE のアミノ酸配列. 下部の * は 5 種 AChE に保存されたアミノ酸を示す. 1,2,3,d を付した C: 分子内システイン結合 3 組と分子間結合のシステイン, t: catalytic triad, a: choline binding site にあってコリンと結合するアミノ酸, o: oxyanion hole を形成するアミノ酸, p: acyl pocket を形成するアミノ酸.

トである pyrimicarb にのみ起こり, モノメチルカーバメート carbaryl などには感受性低下を示さず, 有機リン剤 dichlorvos などに対してはかえって感受性が増すことをよく説明する. さらに, コガタアカイエカ AChE2 では上述のモモアカアブラムシでみられたアミノ酸置換と相同位置

において F455W の置換が認められた³³⁾. アミノ酸分子の大きさはさらに大きくなる方向に変化しており, acyl pocket の大きさが小さくなる. これはコガタアカイエカ抵抗性系統の AChE が立体構造において基質 ACh により特化し, ACh よりわずかに大きい ATCh に対し極端に分解

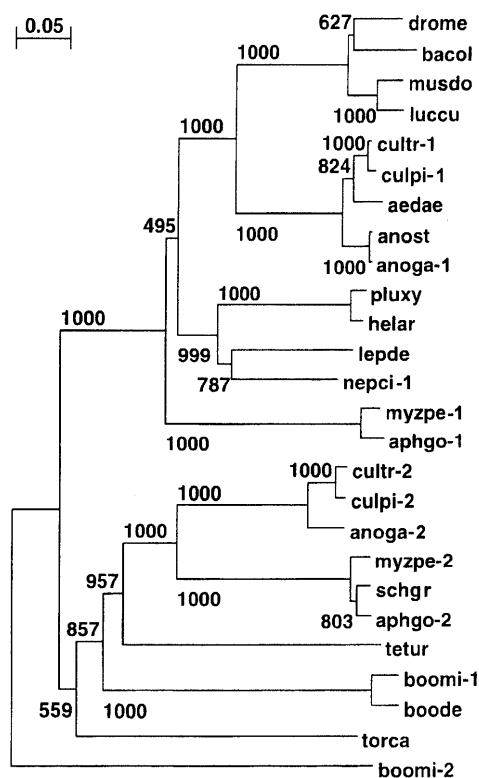


図6. アミノ酸配列に基づいて作成した昆虫・ダニ AChE の系統樹. ウシオマダニ *B. microplus* AChE2 を外群とし, *T. californica* AChE の 1-535 アミノ酸に対応する部分によって系統樹を作成した. 各枝上の数字は局所ブートストラップ確率を示し, スケールは進化尺度 (substitutions/site) を示す. Drome: *Drosophila melanogaster*; bacol: *Bactrocera oleae*; musdo: *Musca domestica*; luccu: *Lucilia cuprina*; cultr: *Culex tritaeniorhynchus*; culpi: *Cx. pipiens*; aetae: *Aedes aegypti*; anost: *Anopheles stephensi*; anoga: *An. gambiae*; pluxy: *Plutella xylostella*; helar: *Helicoverpa armigera*; lepde: *Leptinotarsa decemlineata*; nepci: *Nephrotettix cincticeps*; myzpe: *Myzus persicae*; aphgo: *Aphis gossypii*; schgr: *Schizaphis graminum*; tetur: *Tetranychus urticae*; boomi: *Boophilus microplus*; boode: *B. decoloratus*; torca: *Torpedo californica*.

活性を低下させ, 同時にほとんどの有機リン剤, カーバメート剤に対して顕著な感受性低下を起こしていることと符合する.

AChE の特徴として最適基質濃度の存在が挙げられるが, これは peripheral anionic binding site に基質が結合することによるアロステリック効果で酵素活性が抑制されるためと理解されている. コガタアカイエカ AChE2 におけるアミノ酸置換はこの効果をも消失させており, 1 アミノ酸置換がこのようにところにも影響することが知られる.

一連の薬剤感受性低下機構解明の最終的な詰めとして, cDNA の発現による各種 AChE の生産と, それらの薬剤感受性の確認が必要であり, 現在これにとりかかっている.

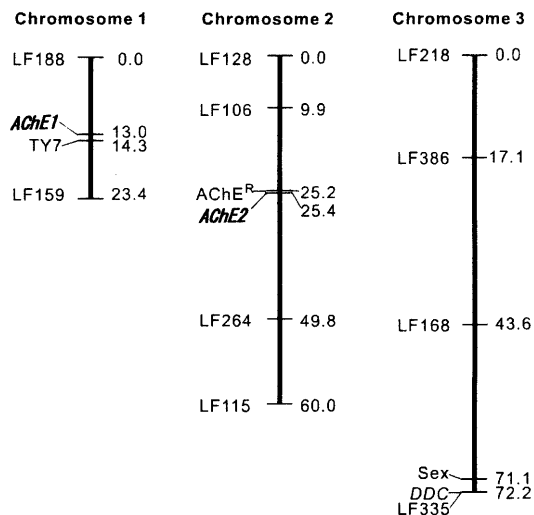


図7. 分子マーカーを用いた RFLP によるコガタアカイエカ AChE1, AChE2 および AChE 感受性低下要因 (AChE^R) の連鎖群解析結果. 数字は各染色体上の相対的位置を表す.

6. 今後の研究

以上述べたように, この 2, 3 年の研究成果により AChE の薬剤感受性低下の分子機構も構造タンパク中の特定アミノ酸の置換にあることがほぼ明らかになった. このような機構の理解は感受性低下作用点に作用を示す薬剤の設計に役立つと同時に, 近年盛んになっている AChE を使ったバイオセンサーの構築に新たな素材を提供できると考えられる. 同時に, 新たな生物学的疑問も生まれてくる. 一つは, ハエ類では AChE 遺伝子が 1 ゲノム 1 構造遺伝子座であるのに対し, なぜ他の多くの昆虫では二つの型の AChE が存在するのかという疑問である. それに関連して, 有機リン剤などの作用点である神経シナプスでは両種 AChE がともに発現しているのか, ハエ以外の昆虫では 1 型 AChE はどのような機能をもつのかなどの疑問が次々と浮かぶ. 今後, このような疑問の解明に研究が進展してゆくとと思われる.

引用文献

- 1) J. Silverman: *Entomol. Exp. Appl.* **76**, 7-14 (1995).
- 2) 河野義明, 富田隆史: 応動昆 **39**, 193-211 (1995).
- 3) R. H. ffrench-Constant, D. P. Mortlock, C. D. Shaffer, R. J. MacIntyre and R. T. Roush: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**, 7209-7213 (1991).
- 4) M. Miyazaki, K. Ohya, D. Dunlap and F. Matsumura: *Mol. Gen. Genet.* **252**, 61-68 (1996).
- 5) M. S. Williamson, D. Martinez-Torres, C. A. Hick and A. L. Devonshire: *Mol. Gen. Genet.* **252**, 51-60 (1996).
- 6) J. L. Sussman, M. Harel, F. Frolov, C. Oefner, A. Goldman, L. Taker and I. Silman: *Science* **253**, 872-879 (1991).
- 7) M. Harel, G. Kryger, T. L. Rosenberry, W. D. Mallender, T. Lewis, R. J. Fletcher, J. M. Guss, I. Silman and J. L. Sussman:

- Protein Sci.* **9**, 1063-1072 (2000).
- 8) H. R. Smissaert: *Science* **143**, 129-131 (1964).
 - 9) G. Voss and F. Matsumura: *Nature* **202**, 319-320 (1964).
 - 10) G. Voss and F. Matsumura: *Can. J. Biochem.* **43**, 63-71 (1965).
 - 11) 浜 弘司: 農技研報告 **C34**, 74-138 (1989).
 - 12) D. Fournier and A. Muterio: *Comp. Biochem. Physiol.* **108C**, 19-31 (1994).
 - 13) 昆野安彦, 土門 清: 応動昆 **42**, 30-32 (1998).
 - 14) M. Takahashi and K. Yasutomi: *J. Med. Entomol.* **24**, 595-603 (1987).
 - 15) A. Mamiya, Y. Ishikawa and Y. Kono: *Appl. Entomol. Zool.* **32**, 37-44 (1997).
 - 16) A. Mamiya, Y. Ishikawa, A. Matsui and Y. Kono: *Appl. Entomol. Zool.* **33**, 315-319 (1998).
 - 17) L. M. Hall and P. Spiere: *EMBO J.* **5**, 2949-2954 (1986).
 - 18) A. Muterio, M. Pralavorio, J. M. Bride and D. Fournier: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**, 5922-5926 (1994).
 - 19) T. Kozaki, T. Shono, T. Tomita and Y. Kono: *Insect Biochem. Mol. Biol.* **31**, 991-997 (2001).
 - 20) T. Kozaki, T. Shono, T. Tomita and Y. Kono: *Appl. Entomol. Zool.* **36**, 377-380 (2001).
 - 21) J. G. Vontas, M. J. Hajazi, N. J. Hawkes, N. Cosmidis, M. Loukas and J. Hemingway: *Insect Mol. Biol.* **11**, 329-336 (2002).
 - 22) T. Tomita, O. Hidoh and Y. Kono: *Insect Biochem. Mol. Biol.* **30**, 325-333 (2000).
 - 23) T. Nabeshima, T. Kozaki, T. Tomita and Y. Kono: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **307**, 15-22 (2003).
 - 24) X. Y. Ni, T. Tomita, S. Kasai and Y. Kono: *Appl. Entomol. Zool.* **38**, 49-56 (2003).
 - 25) Y. Anazawa, T. Tomita, Y. Aiki, T. Kozaki and Y. Kono: *Insect Biochem. Mol. Biol.* **33**, 509-514 (2003).
 - 26) C. A. Malcom, D. Bourguet, A. Ascolillo, S. J. Rooker, C. F. Garvey, L. M. C. Hall, N. Pasteur and N. Raymond: *Insect Mol. Biol.* **7**, 1-14 (1998).
 - 27) A. Mori, T. Tomita, O. Hidoh, Y. Kono and D. W. Severson: *Insect Mol. Biol.* **10**, 197-203 (2001).
 - 28) R. Hernandez, H. He, A. C. Chen, G. W. Ivie, J. E. George, and G. G. Wagner: *J. Med. Entomol.* **36**, 764-770 (1999).
 - 29) M. Grauso, E. Culetto, D. Combes, Y. Fedon, J. Toutant and M. Aepagauss: *FEBS Lett.* **424**, 279-284 (1998).
 - 30) J. R. Gao, S. Kambhampati and K. Y. Zhu: *Insect Biochem. Mol. Biol.* **32**, 765-775 (2002).
 - 31) R. A. Holt *et al.*: *Science* **298**, 129-149 (2002).
 - 32) M. Weill, G. Lutfalla, K. Mogensen, F. Chandre, A. Berthomieu, C. Berticat, N. Pasteur, A. Philips, P. Fort and M. Reymond: *Nature* **423**, 136-137 (2003).
 - 33) T. Nabeshima, A. Mori, T. Kozaki, Y. Iwata, O. Hidoh, S. Harada, S. Kasai, D. W. Severson, Y. Kono and T. Tomita: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **313**, 794-801 (2004).

略 歴

河野義明

生年月日：1942年6月1日

最終学歴等：東京大学大学院農学系研究科（1971年3月）
修了。武田薬品工業（株），国立感染症研究所を経て現職。

研究テーマ：殺虫剤抵抗性機構