

(2007) *Genes Dev.*, 21, 3123–3134.

岡村 勝友, Eric C. Lai
(Memorial Sloan-Kettering Cancer Center)

Diversity and complexity of Dicer dependent small RNA networks in animals

Katsutomo Okamura and Eric C. Lai (Memorial Sloan-Kettering Cancer Center, 1013 Rockefeller Research Laboratories, 430 E67th street, New York, NY 10065)

鱗翅目昆虫の生体異物代謝と抵抗性の分子機構

1. はじめに

農作物を害する鱗翅目昆虫ハスモンヨトウならびにコナガについては、農薬に対する抵抗性が顕在化しているのは周知の通りである。これら害虫制御を目的とした化学農薬の使用は、農業生産の拡大において大きな成果をあげた。一方で、農薬抵抗性昆虫の出現、農薬の残留性そしてヒトへの影響等を考慮し、慎重に行わなければならない。昆虫における農薬抵抗性は、農薬に対する代謝能力を増加させることにより発展してきた。その主要因として、(1) 農薬を代謝する酵素遺伝子の発現量増加、(2) 遺伝子内変異による基質分解能力の変化ならびに増加、(3) 遺伝子増幅の3項目があげられる¹⁾。これらの生化学的機構を詳細に理解することは、害虫の農薬代謝そして抵抗性獲得機構の理解へと繋がる。農作物を食害する農業害虫の多くは鱗翅目昆虫に属しているが、その農薬制御に関する分子生物学的研究は、ショウジョウバエ (*Drosophila melanogaster*) ならびにイエバエ (*Musca domestica*) などの双翅目昆虫類に比較して、非常に少ない。本稿では、昆虫の農薬代謝に関する最近の知見を著者らの鱗翅目昆虫における解析結果を含めて紹介する。

2. 農薬を代謝する酵素遺伝子の発現量比較

農薬剤の代謝による解毒は、第I相反応と第II相反応に分類される。第I相反応は水酸化を介した生体外異物の解毒代謝であるのに対し、第II相反応ではグルタチオン抱合や硫酸抱合等により解毒が行われる。シトクロム P450 (CYP) は、第I相反応における主要な酵素である。薬剤の曝露により CYP が誘導されることは、魚類、両生類、

ほ乳類の幅広い生物種で報告されている¹⁾。ピレスロイド剤に対して抵抗性を有するイエカおよびイエバエも、CYP を過剰生産することで解毒能を強化している¹⁾。筆者は、鱗翅目昆虫のモデル動物であるカイコ (*Bombyx mori*) において、有機リン剤ならびピレスロイド剤に抵抗性を有する系統をそれぞれ LD₅₀ 値を調べることにより見いだしている²⁾。この抵抗性系統と感受性系統を比較した場合、グルタチオン転移酵素 (GST) の過剰発現が抵抗性系統中で認められた。GST は、第II相反応において重要な役割を持ち、農薬を含む生体外異物に還元グルタチオンを抱合させ、異物の体外への排出を促進する。GST アミノ酸配列の相同性に基づいて、多くの生物種では数種の GST クラスが知られている³⁾。ハエやカ等の双翅目昆虫類では、6種類の GST クラス (delta, epsilon, sigma, theta, omega, zeta) が報告されており、基質特異性の異なる複数のアイソザイムが存在することが分かっている⁴⁾。筆者は、カイコより delta (bmGSTD), sigma (bmGSTS), omega (bmGSTO) および zeta (bmGSTZ) の4種類の GST そして他の鱗翅目昆虫類より4種類の GST を同定している⁵⁻⁹⁾。有機リン剤に対するカイコ抵抗性系統では bmGSTO が、ピレスロイド剤に対するカイコ抵抗性系統では bmGSTZ の高発現が確認された²⁾。GST 過剰発現と抵抗性の関連性については、ショウジョウバエ、ガンビエハマダラカ (*Anopheles gambiae*) ならびにネッタイシマカ (*Aedes aegypti*) の DDT 抵抗性系統中で確認され、GST を過剰発現することにより DDT に対する抵抗性を獲得していることが示されている¹⁾。

3. GST のアミノ酸配列の違いによる基質特異性の変化

ショウジョウバエの DDT 抵抗性系統中でみつまっている CYP 6A2 では、その配列中のアミノ酸変異が発見されており、この変異が抵抗性に関与していることが示唆されている¹⁾。カイコ CYP の変異と農薬抵抗性の関連についてはまだ具体例は報告されていない。一方、筆者は鱗翅目昆虫 GST の数残基変異が農薬代謝に及ぼす影響について検討した⁸⁾。カイコ bmGSTS とアメリカシロヒトリ (*Hyphantria cunea*, hcGST2) のアミノ酸配列を決定したところ、両者のアミノ酸配列における相同性は 87% であり、特に bmGSTS の N 末端領域 Ala-13 から Asp-31 領域においては相違が大きかった。またこの領域中に存在する基質認識サイトの残基数が hcGST の場合 5 個であるのに対し、bmGSTS は 3 個であった。hcGST と bmGSTS の基質特異性について比較を行ったところ、1-chloro-2,4-dinitrobenzene

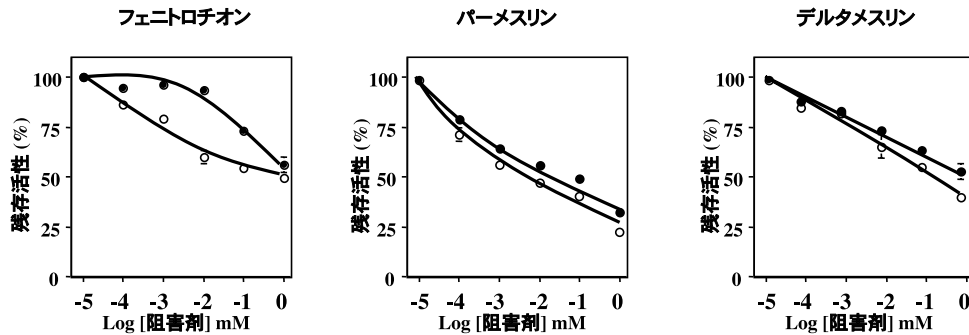


図1 競合阻害試験

フェニトロチオン、パーメスリン、デルタメスリンに対する hcGST2(○)ならびに bmGSTs(●)の親和性を競合阻害試験により調べる。

表1 各基質に対するミカエリス定数の比較

Enzyme	(CDNB)			(4-HNE)		
	K_m	V_{max}	V_{max}/K_m	K_m	V_{max}	V_{max}/K_m
bmGSTO	0.67	0.040	0.060	0.0060	0.031	5.2
bmGSTS	1.6	4.8	3.0	2.1	5.4	2.6
bmGSTD	0.48	5.3	11	0.14	4.8	34
hcGST1	0.76	3.41	4.49	1.11	2.10	1.89
hcGST2	0.41	7.0	17	0.53	0.90	1.7
cmGST	0.29	4.3	15	0.015	0.53	35
scGST	11.2	2.11	0.19	0.15	5.3	35

CDNB: 1-chloro-2,4-dinitrobenzene, 4-HNE: 4-hydroxynonenal, bm: *Bombyx mori*, cm: *Cnaphalocrosis medinalis*, hc: *Hyphantria cunea*, sc: *Samia Cynthia pryeri*. K_m ならびに V_{max} は, mM と $\mu\text{mol}/\text{mg}/\text{min}$ を使用して表記する。

ならびに 4-hydroxynonenal に対する親和性は, bmGSTS よりも hcGST の方が高いことが明らかとなった (表1)。また, 有機リン剤 (フェニトロチオン) に対する親和性も bmGSTS よりも hcGST の方が高く, これらの結果は両 GST における基質認識に関与するアミノ酸残基数の差が親和性の違いに影響を与えているものと考えられる (図1)。アメリカシロヒトリ GST とカイコ GST との比較解析を行い, アミノ酸残基の違いが基質特異性すなわち農薬に対する作用スペクトルの違いを決定することを見いだしたことは非常に意義深い。鱗翅目害虫であるアメリカシロヒトリは, 街路樹や並木に被害を及ぼす重要農業害虫である。さらに多種類の農薬を用いて, GST の基質特異性の観点から特定害虫に対する選択性が高く, 他の生物種には影響のない優れた新規農薬の開発に向けて基盤研究の展開を進めている。

4. 遺伝子増幅

遺伝子増幅は, 生物の環境変化などによって, ある特定の遺伝子が増幅する現象である。有機リン剤抵抗性のイエバエの場合は, 抵抗性系統中に delta クラス GST の遺伝子増幅が報告されている⁹⁾。さらには, トビイロウンカの場合もピレスロイド剤抵抗性と delta クラス GST 遺伝子増幅の関連性が確認されている¹⁰⁾。カイコをはじめとする鱗翅目昆虫については, 遺伝子増幅の報告例はまだない。近年, 日本と中国それぞれが進めてきたカイコゲノム解読データが統合され, 精度の高いカイコゲノムシーケンスが得られている¹¹⁾。カイコゲノム中に存在する遺伝子増幅については今後明らかになることが予測される。

5. おわりに

害虫防除の化学農薬使用においては, 環境問題, 特に人体への影響等が懸念されている。カイコは農業害虫の多くを占める鱗翅目昆虫の良好なモデル昆虫であり, カイコに関する研究成果は鱗翅目昆虫の生命活動を明らかにし, 農薬抵抗性や害虫駆除など応用面への展開が期待される。

生体外異物の解毒に関与する解毒酵素反応系には CYP や GST をはじめとして, アセチル転移酵素, フラビン含有モノオキシゲナーゼ, そして硫酸転移酵素など種々の酵素が知られている。これらの解毒酵素は, さまざまな生物において広く分布しており, CYP や GST と同様にアミノ酸配列の相同性に基づいて, クラスに分類されている。このような分子多様性を有する解毒酵素群はオミックス解析技術を用いることにより, 一度に多数の解毒酵素遺伝子 (タンパク質) 発現を定量することが可能である。これまでカイコ成長過程において変動するタンパク質あるいは微

生物に対する防御タンパク質をプロテオーム解析にて同定してきた¹²⁻¹⁵⁾。その過程で確立した実験系を用い、解毒酵素群の異なる発現機構について現在解析中である。解毒酵素の発現機構や基質特異性の差異という観点から農薬を新たに検討することにより、少量で目的害虫に効果があり人体に影響が少ない農薬の開発が可能となる。

謝辞

本稿で紹介した研究成果は文部科学省科学研究費補助金ならびに平成20年度九州大学教育研究プログラム・研究拠点形成プロジェクトの援助により得られたものである。

- 1) Li, X., Schuler, M.A., & Berenbaum, M.R. (2007) *Annu. Rev. Entomol.*, **52**, 231-253.
- 2) Yamamoto, K., Nagaoka, S., Banno, Y., & Aso, Y. (2009) *Comp. Biochem. Physiol.*, **149**, 461-467.
- 3) Awasthi, Y.C., Ansari, G.A., & Awasthi, S. (2005) *Methods Enzymol.*, **401**, 379-407.
- 4) Ranson, H. & Hemingway, J. (2005) *Methods Enzymol.*, **401**, 226-241.
- 5) Yamamoto, K., Zhang, P.B., Miake, F., Kashige, N., Aso, Y., Banno, Y., & Fujii, H. (2005) *Comp. Biochem. Physiol.*, **141 B**, 340-346.
- 6) Yamamoto, K., Zhang, P.B., Banno, Y., & Fujii, H. (2006) *J. Appl. Entomol.*, **130**, 515-522.
- 7) Yamamoto, K., Miake, F., & Aso, Y. (2007) *J. Appl. Entomol.*, **131**, 466-471.
- 8) Yamamoto, K., Fujii, H., Aso, Y., Banno, Y., & Koga, K. (2007) *Biosci. Biotech. Biochem.*, **71**, 553-560.
- 9) Yamamoto, K., Miake, F., Aso, Y., & Teshiba, S. (2008) *J. Appl. Entomol.*, **133**, 278-283.
- 10) Vontas, J.D., Small, G.J., Nikou, D.C., Ranson, H., & Hemingway, J. (2002) *Biochem. J.*, **362**, 329-337.
- 11) 三田和英 (2009) 生化学, **81**, 353-360.
- 12) Zhang, P., Yamamoto, K., Aso, Y., Banno, Y., Sakano, D., Wang, Y., & Fujii, H. (2005) *Biosci. Biotech. Biochem.*, **69**, 2086-2093.
- 13) Wang, Y., Zhang, P., Fujii, H., Banno, Y., Yamamoto, K., & Aso, Y. (2004) *Biosci. Biotech. Biochem.*, **68**, 1821-1823.
- 14) Zhang, P., Aso, Y., Yamamoto, K., Banno, Y., Wang, Y., Tsuchida, K., Kawaguchi, Y., & Fujii, H. (2006) *Proteomics*, **6**, 2586-2599.
- 15) Zhang, P., Aso, Y., Jikuya, H., Kusakabe, T., Lee, J., Kawaguchi, Y., Yamamoto, K., Banno, Y., & Fujii, H. (2007) *J. Research Proteomics*, **6**, 2295-2303.

山本 幸治

(九州大学大学院農学研究院遺伝子資源工学部門)

Detoxification enzymes of the lepidopteran insects
Kohji Yamamoto (Faculty of Agriculture, Kyushu University Graduate School, 6-10-1 Hakozaki, Higashi-ku, Fukuoka 812-8581, Japan)

細菌セラミダーゼの生理機能と高次構造の解明

1. はじめに

生体膜は脂質二重膜によって構成されているがその主な構成成分はグリセロ型のリン脂質とスフィンゴ脂質(スフィンゴリエリンやスフィンゴ糖脂質)である。これまでの研究により、細胞膜の外層に存在するスフィンゴ脂質は細胞接着に重要な役割を果たしていることや、これら脂質が形成する脂質マイクロドメインが細胞内外のシグナル伝達に関与していることが明らかになっている。また、スフィンゴリエリンがスフィンゴリエリナーゼによって分解されて生じたセラミド、セラミドがセラミダーゼによって分解されて生じたスフィンゴシンにアポトーシス誘導能があることや、スフィンゴシンのリン酸化物であるスフィンゴシン-1リン酸に細胞分裂促進作用があることが分かっており、スフィンゴ脂質とその代謝酵素の重要性が指摘されている。また、細胞表面に存在するスフィンゴ糖脂質は、病原細菌(病原性大腸菌や淋菌など)や細菌毒素(コレラ毒素やペロ毒素など)のレセプターになっており、その構造や存在様式に注目が集まっている。一方、多くの病原細菌が分泌するスフィンゴリエリナーゼやホスホリパーゼA₂は溶血活性を示す外毒素としても知られている。

2. 細菌セラミダーゼの発見

生体膜を構成する糖鎖や脂質の構造と機能を解明する上で、それらに特異的に作用する酵素が研究の発展に大きく貢献してきた。我々はこれまでに、スフィンゴ(糖)脂質の研究に役立つ新規な酵素を開発してきたが、その過程でアトピー性皮膚炎患者の表皮からスフィンゴミリナーゼ等を生産する細菌と共に、セラミダーゼを分泌する緑膿菌を発見した¹⁾。セラミダーゼは1960年代の始めにイスラエルの Shimon Gatt により、ラット脳の抽出液からその活性が見いだされ部分精製されていたが、その分子本体は長い間不明であった²⁾。その後、米国の Moser らによって、ファーバー病という重篤な遺伝病の原因遺伝子がリソソームでセラミドの代謝を担っている酸性セラミダーゼであることが報告された³⁾。しかし、その精製と遺伝子クローニングが行われたのは1990年代の中頃になってからである^{4,5)}。我々が緑膿菌セラミダーゼを発見した当時(1990