学位論文審査結果の報告書

氏　　名　　平田　晃一

生年月日　　昭和・平成５９年　６月　１５日

本籍（国籍）　　奈良県

学位の種類　　博　　士　（　農　　学　）

学位記番号　　第　２３０　号

学位授与の条件　　学位規程第５条該当
（博士の学位）

論文題目　Studies on the mode of action of neurotoxic insecticides and insecticide resistance
（神経作用性殺虫剤の作用機構と抵抗性に関する研究）

学位論文受理日　　平成２９年１２月　５日

学位論文審査終了日　　平成３０年　２月２０日

審査委員

（主　査）　松田　一彦

（副主査）　板倉　修司

（副主査）　上嶋　繁

（副　査）　　㊞

（指導教員）　松田一彦

論 文 内 容 の 要 旨

2050年までに地球人口はおよそ97億に達すると言われているが、耕作可能な土地の面積はほんのわずかに増えるだけで、この人口増加に耐えうる食料生産は至難である。多くの大衆は合成農薬はある種の毒と見なし、嫌悪する傾向にあるが、地球人口の増加に応じて持続的に食糧を生産するには、農薬による作物保護はどうしても必要である。現在、作用機構が異なる20以上の殺虫剤が作物保護に使用されているが、抵抗性が発達し、使用が困難になりつつある殺虫剤がいくつか存在する。加えてヒトあるいは環境生物に対する毒性のために使用が見直されている殺虫剤もある。こうした現状の中で、学位請求者は、膜電位依存性ナトリウムチャネル（Voltage sensitive sodium channel, Vssc）を標的とするピレスロイドと、ニコチン性アセチルコリン受容体（Nicotinic acetylcholine receptor, nAChR）を標的とするネオニコチノイドの作用機構と抵抗性発達の機構について研究した。

ネッタイシマカ（*Aedes aegypti*）はデング熱を媒介する。東南アジアではネッタイシマカを駆除するためにピレスロイドが使用されてきたが、抵抗性の発達が顕在化し、対応が求められている。学位請求者はピレスロイド感受性および抵抗性のネッタイシマカのVsscのアミノ酸配列を比較し、抵抗性系統のネッタイシマカのVsscで3つのアミノ酸変異S989P、V1016G およびF1534Cが生じていることを見出した。これらの変異がピレスロイド感受性に影響するのか明らかにするために、野生型および変異をもつネッタイシマカVsscをアフリカツメガエル卵母細胞に発現させ、二電極膜電位固定法を用いてパーメスリン感受性を電気生理学的に比較した。S989P+V1016G変異とF1534C変異をもつVsscは感受性系統のVsscに比べてそれぞれ100および25倍パーメスリンが低下した。これら3つの変異を合わせたところ 150倍パーメスリンが低下したことから、将来3重変異をもつネッタイシマカでのピレスロイド抵抗性が深刻化すると推定された。

ワタアブラムシ（*Aphis gossypii*）でのネオニコチノイド抵抗性系統（串間系）が宮崎県で発見された。その原因を探るため、学位請求者は酸化代謝阻害剤PBO存在下でワタアブラムシに対するネオニコチノイドの活性を測定するとともに、nAChR遺伝子の変異を調べた。興味深いことに抵抗性系統のワタアブラムシはイミダクロプリドのようにニトロ基をもつネオニコチノイドに対してはっきりと抵抗性を示したが、アセタミプリドのようにシアノ基をもつネオニコチノイドに対しては感受性を維持した。当該抵抗性系統のnAChR遺伝子を調査したところ、β1サブユニットのloop DにR81T変異が生じていることを見出した。当該変異の逆変異T81R変異を導入することでDα2-ヒヨコβ2ハイブリッドnAChRは野生型のnAChRよりイミダクロプリドに対して高感受性となったことからR81T変異はネオニコチノイド抵抗性の原因の一つであることが示唆された。

ワタアブラムシのnAChRサブユニットをアフリカツメガエル卵母細胞に発現させたところnAChRを形成しなかったものの、ヒヨコβ2サブユニットと共発現させることでワタアブラムシのα1サブユニットは機能的にnAChRを形成した。そこで、T77R+E79V変異をもつヒヨコβ2サブユニットとα1サブユニットを共発現させたところ、この変異によりイミダクロプリド感受性は有意に変化したものの、シアノ基をもつネオニコチノイドやスルホキサフロルも感受性は変化しなかった。

串間系ワタアブラムシでの代謝関連遺伝子を次世代シークエンシングで調査したところ、CYP6CY22 (c21228) とCYP6CY13 (c21368) の顕著な遺伝子発現の亢進が認められた。この現象が、ネオニコチノイド抵抗性と関連するのか明らかにするため、当該酵素を昆虫細胞で発現する技術を確立した。両酵素を発現させた昆虫細胞にネオニコチノイドあるいはスルホキサフロルを処理し、一定時間後にネオニコチノイドの構造変化をLCMSで定性的且つ定量的に調査した結果、当該酸化酵素はネオニコチノイドを顕著に代謝分解したことから、ネオニコチノイド抵抗性に関与することがわかった。一方、当該酵素はスルホキサフロルは代謝しないことから、本殺虫剤は同系統の抵抗性ワタアブラムシの防除に有効であることが明らかとなった。

論文審査結果の要旨

神経作用性殺虫剤はしばしば抵抗性の問題に遭遇するとともに、神経系が動物と昆虫で共有するため生じる選択毒性の問題にぶつかる。これらの問題は、研究手法が発達した現代科学では以前に増して迅速かつ精緻に解決できる。しかし、それでもその解決が難しいのは抵抗性の理由が単一の原因によらないためである。本研究では、ピレスロイドとネオニコチノイドに焦点を絞り、抵抗性発達とその原因に密接に関わる作用機構について解析し、高い成果を上げている。

デング熱は東南アジアをはじめとして猛威を振るい続けている。本感染症を媒介するのがネッタイシマカ（*Aedes aegypti*）である。ネッタイシマカの防除にこれまでピレスロイドが継続的に使用された結果、今では高度に抵抗性が発達している。ピレスロイドは昆虫の膜電位損性ナトリウムチャネル（Vssc）を開いた状態に保持し、活動電位の連続的発生（反復興奮）が活動電位そのものをブロックする。学位請求者は、パーメスリン感受性および抵抗性のネッタイシマカからVssc遺伝子を単離し、これをアフリカツメガエル卵母細胞で発現させ、その機能を膜電位固定法で比較検討した。その結果、抵抗性系統のVsscで2重アミノ酸変異S989P+V1016G あるいは単一アミノ酸変異F1534Cが生じていることを見出した。パーメスリンによる不活性過程の遅延をもとにこれらのアミノ酸変異の影響を調べ、S989P+V1016Gは100倍、F1534C変異は25倍程度パーメスリン感受性を低下させることを突き止めた。この成果をもとに2重アミノ酸変異をもつ系統と単一アミノ酸変異が交配することでさらにパーメスリン感受性が低下すると予測した。この予測は、当該地域でのネッタイシマカ対策に生かされるものと期待される。

ネオニコチノイドは昆虫のニコチン性アセチルコリン受容体(nAChR)のオルトステリック部位に結合し、アゴニストあるいはアンタゴニスト活性を発揮することで殺虫効果を示す。ワタアブラムシの防除にネオニコチノイドは使用されているが、宮崎県で本剤に抵抗性を示す串間系がみつかった。その原因を探るため、本系統のnAChR遺伝子の変異の有無について調査したところ、β1サブユニットのloop DでR81T変異が生じていることを突き止めた。従来ネオニコチノイド抵抗性の原因のほとんどすべてが代謝の亢進であったことから、この発見は貴重である。実際、この変異に関わるアミノ酸変異を導入した組換えnAChRをアフリカツメガエルで発現させ、イミダクロプリドを処理すると、当該アミノ酸変異により本受容体の感受性が有意に変化したことから、抵抗性との関わりが裏付けられている。興味深いことに、この変異はネオニコチノイドの中でもシアノ基をもつチアクロプリドやアセタミプリドや、ネオニコチノイドと作用機構が類似し且つシアノ基をもつスルホキサフロルは当該アミノ酸変異をもつnAChRに対して感受性系統と同等の活性を示したことから、これらの殺虫剤は串間系ワタアブラムシの防除に有効であることが証明されたことは高く評価される。

串間系ワタアブラムシの抵抗性がニコチン性アセチルコリン受容体の変異だけにとどまっていないと看破した学位請求者は、P450系等の酸化酵素に焦点を絞り、次世代シークエンシング技術を駆使して原因候補を調査した。その結果、CYP6CY22 (c21228) とCYP6CY13 (c21368)の遺伝子が串間系のワタアブラムシで有意に亢進していることを見出した。従来昆虫のP450酵素を異所発現させることは困難とされていた。しかし学位請求者は独自に普遍的なP450酵素の発現技術を開発し、これらの酵素が確かにネオニコチノイドを分解することを実証した。さらにスルホキサフロルは当該酵素で分解されないことも見出した。この成果は、ネオニコチノイド抵抗性ワタアブラムシの防除にスルホキサフロルの使用が有効であることを示しており、重要である。

よって、本論文は博士（農学）の学位論文として価値あるものと認める。なお、審査にあたっては、論文に関する専攻内審査および公聴会など所定の手続きを経たうえ、平成30年2月20日、農学研究科教授会において、論文の価値ならびに博士の学位を授与される学力が十分であると認められた。