

日本農薬学会
農薬科学研究成果報告書
(令和 5 年度研究奨励金交付課題)

研究課題

薬剤抵抗性発達に関わる解毒分解酵素の網羅的探索と機能解析

筆頭研究者氏名 浅野 美和

所属 国立研究開発法人農業・食品産業総合研究機構生物機能利用研究部門

共同研究者名 (所属)

上樂 明也 (国立研究開発法人農業・食品産業総合研究機構生物機能利用研究部門)

研究成果 (目的・方法・成果の順に概要を記載してください)

【目的】

薬剤抵抗性発達の一因として、解毒分解酵素の高発現およびアミノ酸変異に伴う薬剤代謝活性の増大が挙げられるが、既存の RNA-seq 解析手法では、抵抗性に関わる解毒分解酵素の特定、その発現上昇機構の解明は非常に困難であった。チャの害虫であるチャノコカクモンハマキは、ゲノム上に解毒分解酵素であるシトクロム P450 (CYP) 遺伝子を多数持ち、特に薬剤抵抗性の報告例のある CYP6、CYP9 を含む CYP3 clan の遺伝子数が多い(表 1)。ジアシルヒドラジン系昆虫成長制御剤であるテブフェノジド剤(Teb)、ジアミド系殺虫剤であるフルベンジアミド剤(Flu)に対して、複数の解毒分解酵素(CYP、カルボキシルエステラーゼ)が発現上昇することから、本種はこれらの酵素の発現増大による薬剤抵抗性が発達しやすい種と考えられる。そこで本研究では、本種を対象に、RNA-seq による各薬剤処理後の時系列発現データを取得し、発現上昇する解毒分解酵素と転写因子等の発現制御因子を網羅的に比較、探索し、特に薬剤処理後に発現上昇する CYP (抵抗性関連候補)と抵抗性関連 CYP の発現制御に関わる転写因子群候補を特定することを目的とした。

表1. チャノコカクモンハマキとカイコのCYP遺伝子数 (CYP clan 毎)

CYP clan	CYP subfamilies	<i>Adoxophyes honmai</i>	<i>Bombyx mori</i>
CYP2	CYP15, CYP18, CYP303-307	8	7
CYP3	CYP6, CYP9 CYP332, CYP337-338 CYP354, CYP365	111	30
CYP4	CYP4, CYP340-341, CYP366-367, CYP405	43	35
Mito	CYP49, CYP301-302, CYP314-315, CYP339	14	11
Total		176	83

【方法】

チャノコカクモンハマキの薬剤抵抗性系統を、人工飼料浸漬法を用いて、各薬剤(Teb 5000 倍希釈、2 回、または Flu 10000 倍希釈、1 回)で選抜した。各選抜系統の 4 齢幼虫を、人工飼料浸漬法を用いて、Teb 5000 倍希釈または Flu 4000 倍希釈で薬剤処理し、経時的(0h、3h、6h、9h、12h、24h)に RNA 抽出し、Illumina NovaSeq 6000 (150bp ペアエンド)により時系列 RNA-seq データを取得した。薬剤非処理時の解析データとして、既報(Uchibori-Asano et al. (2019) *Scientific Reports*)の両剤(Teb, Flu)抵抗性系統 1 系統と感受性系統 2 系統の発現量データを用いた。発現変動遺伝子解析は iDEGES/edgeR 法を用い、主な発現上昇 CYP (抵抗性関連候補)を探索した。共発現遺伝子ネットワーク

解析は、既報(Chang et al. (2019) PNAS)の共発現遺伝子ネットワーク(TO-GCN)の構築を行い、主な抵抗性関連 CYP の発現制御に関わる転写因子群候補を探索した。

【成果】

RNA-seq による時系列発現解析の結果、両剤抵抗性系統では、薬剤非処理時に CYP9A 4 遺伝子が感受性系統に対して顕著に発現上昇・高発現した。この 4 遺伝子は、Flu 選抜系統では同様に高発現し、Flu 処理後(3h または 9h 以降)に更に発現上昇したが、Teb 選抜系統では発現量は低く、Teb 処理後に発現はほぼ変化しなかった(図 1)。

次に、CYP6 に着目したところ、CYP6 3 遺伝子の発現量は、両剤抵抗性系統の薬剤非処理時では感受性系統以下であったが、Flu 選抜系統では Flu 処理後(9h 後以降)に顕著に上昇した。一方、Teb 選抜系統では Teb 処理後に発現が顕著に下降した(図 2)。これらの結果から、CYP9A 4 遺伝子と CYP6 3 遺伝子は Flu 処理により顕著な高発現が誘導される可能性が示唆され、Flu 抵抗性に関与する可能性が考えられた。

次に、Flu 処理後に特異的な時系列発現パターンを示した転写因子群を検出して TO-GCN を構築し、抵抗性関連候補の CYP9A/CYP6 のいずれかと有意に共発現する転写因子群(発現制御関連候補)を探索した結果、43 の転写因子群を検出した(図 3 の赤ノード)。

これらのうち、CYP9A 3 遺伝子(CYP9A-2~4)および CYP6 3 遺伝子と発現相関が高い転写因子として、bZIP (basic leucine zipper) ファミリーである bZIP-1 と bZIP-2、Nuclear receptor (NR) ファミリーである NR-1 と NR-2 を検出した。これらの転写因子は、TGF- β 、MAPK 制御経路に関わる一部の転写因子とも共発現しており、これらのシグナル伝達経路が発現制御に関与する可能性も推察された。一方、これらと発現パターンが異なる CYP9A-1 遺伝子と発現相関が高い転写因子として、RNA ポリメラーゼ遺伝子ファミリーである RP-A と RP-B、Bromodomain (BRD) 保有遺伝子である BRD-1~BRD-4 を検出した。BRD 保有遺伝子はヒストンアセチル化に関連することから、CYP9A-1 の高発現には、ヒストンアセチル化による発現制御経路が関与している可能性が考えられた。以上から、本種の Flu 抵抗性に関わる可能性がある各 CYP の発現上昇には、異なる 2 つ以上の発現制御経路が関与している可能性が示唆された。

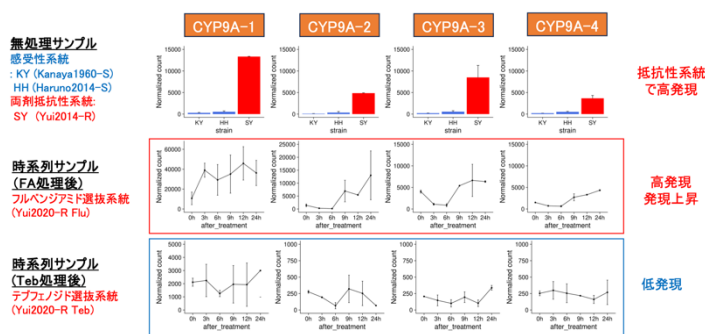


図1. 各系統でのCYP9A 4遺伝子の発現パターン

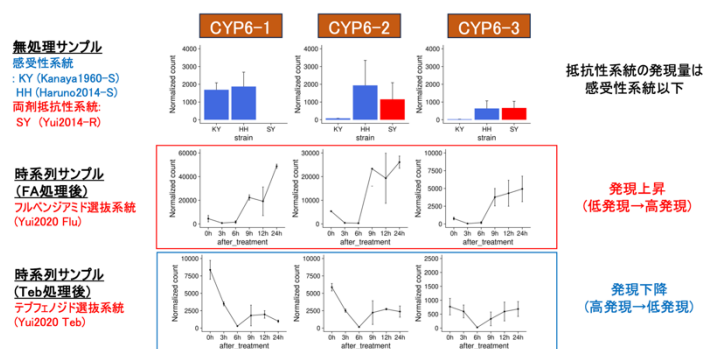


図2. 各系統でのCYP6 3遺伝子の発現パターン

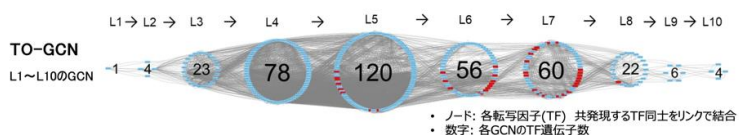


図3. 共発現遺伝子ネットワーク解析によるCYP発現制御因子の探索