

1-4 遺伝子診断による抵抗性遺伝子検出の概要

はじめに

害虫の殺虫剤感受性検定には、生物検定法が広く用いられているが、近年、新たな手法として遺伝子診断法が注目されている。遺伝子診断法の開発には、抵抗性発達の分子メカニズムの解明が前提となる。主たるメカニズムは生理生化学的要因、とりわけ解毒代謝活性の増大あるいは作用点の薬剤感受性の低下であるとされているが、近年、様々な害虫種において殺虫剤抵抗性の発達要因となる遺伝的変異が突き止められている。遺伝子診断法は、各種殺虫剤の作用点あるいは解毒代謝酵素の遺伝子コード領域で生じた一塩基多型 (SNP) 部位など、感受性系統と抵抗性系統とで遺伝的組成が異なる部位をターゲットとして開発される。ここでは、遺伝子診断における共通技術を示すと共に、遺伝子診断として用いられる手法の実例、およびその長所と短所について述べる。

1-4-1 遺伝子診断における共通技術

1 DNA 抽出・精製法

DNA の抽出・精製法には、溶液からタンパク質を取り除き、核酸 (DNA や RNA) を抽出するフェノール・クロロホルム法など様々な手法がある。また、昆虫類の DNA 抽出に適したキットが様々な製品として市販されており、そのマニュアルに従えば特に熟練した技術を必要とせず、純度の高い DNA を抽出・精製することができる (例えば、DNeasy Blood and Tissue kit (キアゲン社))。

一方、薬剤抵抗性遺伝子診断では、純度は低くなったとしても、コストがかからず、簡便かつ迅速に DNA を抽出する手法が有効である。虫体を溶液中ですり潰して加熱するだけの工程で DNA を粗抽出できる試薬が市販されており、本プロジェクトにおいても活用されている (例えば、Prepman Ultra Reagent (ライフテクノロジー社))。また、より安価な方法として、核酸を用いた生化学実験でよく用いられる TE 緩衝液 (Tris-HCl と EDTA の混合液) のみで DNA を粗抽出することもできる。

2 電気泳動

アガロース (寒天) あるいはアクリルアミドを使用したゲルに PCR 産物を注入、通電し、核酸をその大きさに応じて分離する手法。ゲル中では分子量の小さなものほど流れやすいことから、分子量の差が泳動距離の差となって現れる。次節で述べる対立遺伝子特異的 PCR、PCR-RFLP 法、マルチプレックス PCR 法などで使用する。一方、リアルタイム PCR 法や量的シーケンス法は電気泳動を必要としない技術である。

3 PCR 産物の染色および観察

電気泳動を終えたゲルは、臭化エチジウム溶液あるいは Gel Red (Biotium 社) などの核酸染色試薬を TAE 緩衝液 (TE および酢酸からなる試薬)、または TBE 緩衝液 (TE およびホウ酸からなる試薬) で希釈した溶液中に浸漬し、DNA を染色する。核酸染色試薬をあらかじめゲルや電気泳動槽内のバッファーに添加し、電気泳動と同時に染色することもできる。染色を終えたゲルは、紫外線 (UV) 照射装置で紫外線を照射し、蛍光発色した PCR 産物を観察・撮影する。

1-4-2 遺伝子診断に用いられる手法

1 対立遺伝子特異的 PCR

対立遺伝子特異的 PCR は、PASA 法とも呼ばれ、抵抗性対立遺伝子に特異的な PCR プライマーを設計して、抵抗性、感受性両対立遺伝子に適合する共通プライマーとの PCR により、増幅産物が得られるか否かで診断する手法である。遺伝子診断の基本的な手法であり、開発も比較的容易であるが、この手法を応用したマルチプレックス PCR 法の形で用いられることが多い。

2 PCR-RFLP 法

RFLP は制限酵素断片長多型 (Restriction Fragment Length Polymorphism) の略であり、特定の短い塩基配列を認識して DNA を切断する制限酵素によって切断された DNA の断片長が示す多型、あるいはそれを検出する手法を意味する。PCR-RFLP 法とは、PCR で増幅した DNA 断片を制限酵素で消化し、生じる断片長のパターンから比較対象を分類する手法である。

この手法の長所は、条件設定に手間取ることが無く、再現性に優れることである。また、2 倍体の生物であれば、抵抗性遺伝子をホモ接合体で保有するか、ヘテロ接合体で保有するかを判別することも容易である。一方、短所は検出しようとする多型部位が市販の制限酵素の認識配列に一致することが条件となるため、適当な酵素がなければ適用できないこと、PCR 増幅工程に制限酵素処理工程が加わるため、時間が余計にかかること等である。

この手法は、チャノコカクモンハマキの IGR 剤抵抗性遺伝子診断 (2-2 節)、トビイロウンカのイミダクロプリド抵抗性遺伝子診断 (2-6 節) で用いられている。

3 マルチプレックス PCR 法

マルチプレックス PCR とは、複数の異なる PCR 反応を同一チューブ内で行い、目的とする複数の DNA 断片を特異的に増幅する手法である。通常の PCR が 1 対のプライマーセットで行われるのに対し、マルチプレックス PCR では 2 対以上のプライマーセットが用いられる。

この手法の長所は、一度の PCR で診断結果を得ることができ、PCR-RFLP 法

に比べ、短時間での診断が可能となること、複数の領域を同時に増幅可能であることから、サンプルからの DNA 抽出の成否も同時に検証することも可能であること等である。一方短所は、判別法の開発段階において、目的通りのバンドパターンを得るための PCR 条件の最適化が困難な場合があることである。

この手法は、コナガのジアミド抵抗性遺伝子診断 (2-1 節)、ワタアブラムシのネオニコチノイド剤抵抗性遺伝子診断 (2-3 節)、ネギアザミウマの合成ピレスロイド剤抵抗性遺伝子診断 (2-4 節) で用いられている。

4 リアルタイム PCR 法

リアルタイム PCR とは、蛍光物質を利用し、PCR 反応によって増幅された DNA の量を即時的に測定しながら行う PCR のことである。定量的な解析だけでなく、一塩基多型 (SNPs) を検出する定性的な解析もできる。蛍光検出方法には、蛍光標識プローブを用いる方法とインターカレーターを用いる方法の 2 通りがある。蛍光標識プローブを用いる方法には多くの種類があるが、TaqMan プローブ法が最も一般的であり、特異的な 20 塩基対かそれ以下の短い配列の DNA (オリゴヌクレオチド) に蛍光色素を結合させたプローブを用いる。一方、インターカレーター法は 2 本鎖 DNA に結合する色素 (主に SYBR Green I) を PCR 反応液に混ぜ、ポリメラーゼによって合成された 2 本鎖 DNA を検出する方法である。

この手法の長所は、電気泳動を必要としないことから時間の短縮が図れること、コンタミネーションのリスクが低いこと、集団単位での抵抗性対立遺伝子頻度解析が可能なことなどが挙げられる。一方短所として、専用の機器類を必要とすることが挙げられるが、近年その普及は進みつつある。

この手法は、ハダニのエトキサゾール抵抗性遺伝子診断 (2-5 節) で用いられている。

5 量的シーケンス法

量的シーケンシング (Quantitative Sequencing: QS) 法は、一塩基多型部位におけるシーケンスシグナルのピーク比をもとに抵抗性対立遺伝子の割合を求め、抵抗性の程度を推定する方法である。集団単位で抽出した DNA の一塩基多型部位を含む領域を PCR 増幅し、DNA シーケンサーを用いて解析する。

この手法の長所は、集団中に含まれる抵抗性遺伝子の割合を把握することができるため、個体単位ではなく集団単位での解析が可能になることにある。一方短所は、解析に時間を要すること、抵抗性対立遺伝子頻度が低い場合の検出感度が高くないこと等があるが、高頻度の値を閾値に設定した解析には支障はない。

6 次世代シーケンサーによる大規模遺伝子診断法

PCR 法による薬剤抵抗性遺伝子の判別は、実施が容易であるという大きな利点があるが、一度に一つの遺伝子のみが診断可能という制限がある。このため、

複数の薬剤の抵抗性を診断する場合には対象薬剤の数だけ診断を繰り返す必要があり、大量個体の迅速な診断が難しい（薬剤抵抗性が複数の遺伝子変異に起因する場合には変異の数に応じて更に診断回数が増える）。本プロジェクトでは、この問題を解決するための次世代遺伝子診断手法として、次世代シーケンサーを活用した大規模遺伝子診断法の開発に取り組んでいる。この手法の長所は、大量の害虫個体（数百個体以上）を対象に、既知の複数の薬剤抵抗性に関するすべての遺伝子変異の有無を個体単位で診断可能であり、かつ、短期間（数日程度）で実施可能であることにある。これは、次世代シーケンサーにより、大量個体を対象に PCR 法による数千回分以上の遺伝子診断に相当する規模の塩基配列を一度にまとめて解読することで実現される（図 1）。これにより、将来的に、各地の害虫集団における各薬剤の抵抗性診断をより迅速かつ高精度で実施することが可能となる見込みである。一方、短所は、次世代シーケンサーおよびバイオインフォマティクス解析用コンピュータを必要とするため、診断を実施可能な施設が限定されるという点である。このため、この手法は、これらの設備を備えた解析センター等における一箇所集中的な診断の実施といった形での利用形態が想定される。

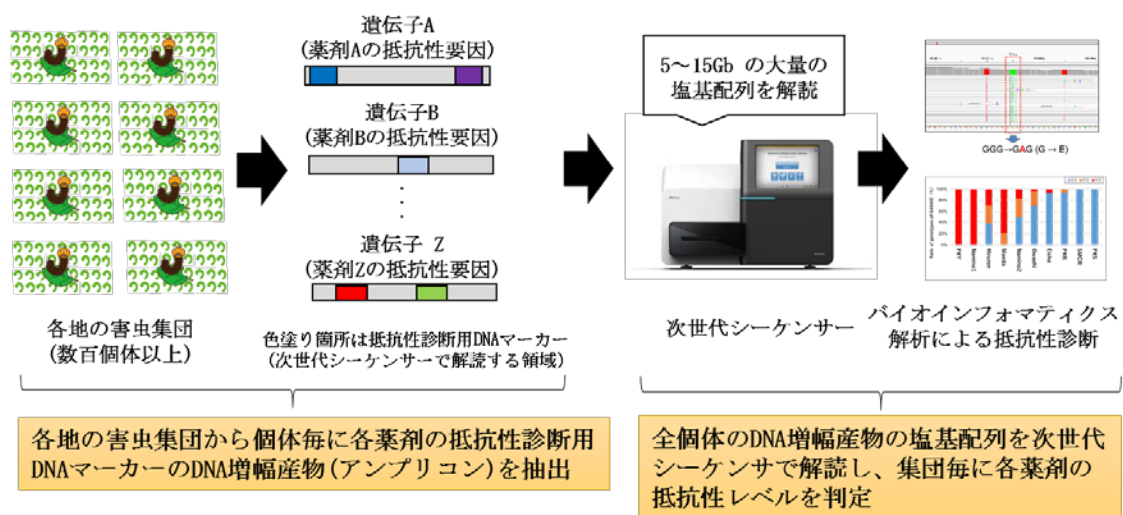


図 1 次世代シーケンサーを用いたマルチプレックスアンプリコンシーケンシング法による大規模遺伝子診断法の概要。

1-4-3 遺伝子診断の利点と問題点

殺虫剤抵抗性の遺伝子診断には以下のような長所がある。

- 1 遺伝子診断では薬液による溺死や虫の栄養状態など、薬剤の殺虫効果以外の死亡要因を考慮する必要がなく、抵抗性個体（遺伝子）の割合を正確に測定

することが可能である。また、生物検定法では一定数の健全な個体を必要とするため、場合により野外採集虫の短期間の飼育、増殖が必要となる。これは個体群の遺伝的構成の変化を導き、感受性程度が変動する可能性がある。これに対し、遺伝子診断では採集時点の感受性程度が反映される。

- 2 遺伝子診断は死亡虫でも解析できるため、採集虫を液浸標本等で輸送・保存することも可能であるなど、サンプリングおよび取り扱いが容易である。また、発消長調査用のフェロモントラップ（粘着板）や黄色水盤等による捕捉虫等でも診断することができる。
- 3 個体ごとに複数の殺虫剤抵抗性を評価することが可能であり、複合抵抗性の発達を個体レベルで把握することも可能である。

一方、遺伝子診断の短所としては、以下のような点が挙げられる。

- 1 作用点抵抗性は、殺虫剤グループごとに抵抗性の分子メカニズムが異なる。したがって、診断法を開発するためには各々の抵抗性メカニズムを解明し、それぞれについて遺伝的変異の存在を明らかにする必要がある。
- 2 一般に、シトクロム P450 などの解毒代謝活性増大に起因する殺虫剤抵抗性の遺伝子診断法の開発は困難である。
- 3 抵抗性の発達が作用点抵抗性と解毒代謝活性の増大等との複合要因により生じている場合、単一の遺伝子診断では野外個体群の感受性程度を正確に診断できない可能性がある。

本プロジェクトにおける薬剤抵抗性管理のためのガイドライン案で使用する遺伝子診断法は、これらの制約を考慮に入れ、状況に応じて最適な診断技術が選択されている。より詳細な技術情報は中山（1996）などの書籍を参照されたい。

（執筆：土田聡 上樂明也）

文献

中山広樹（1996）バイオ実験イラストレイテッド 3 本当にふえる PCR（目で見える実験ノートシリーズ）秀潤社 201p