

マイクロアレイを用いたフタトゲチマダニにおける 殺ダニ剤応答遺伝子の探索

八田岳士¹⁾, 松林 誠²⁾, 辻 尚利^{1)*}

Microarray analysis of acaricide-inducible gene expression in the hard tick, *Haemaphysalis longicornis*

Takeshi HATTA¹⁾, Makoto MATSUBAYASHI²⁾ & Naotoshi TSUJI^{1)*}

背景と目的

これまでに人類は効率の良い乳や肉等の畜産物生産を実現し、マダニの吸血寄生やマダニ媒介性疾患から家畜を守るために様々な殺ダニ剤を開発し、使用してきた。一方でマダニもまた抵抗性を獲得し発達させることで適応し、当該地域において種の絶滅を免れてきた経緯がある¹⁾。

ハエをはじめとする衛生昆虫においては、飼育が容易であることや遺伝子情報が豊富であることから、殺虫剤抵抗性の形質獲得に関わる殺虫剤作用点の感受性の低下や解毒酵素による無毒化などの分子機構が明らかになりつつある¹⁾。しかし、マダニの飼育が簡便ではないこと、世代交代に時間がかかることや、遺伝子情報が不十分であるなど不利な点の多いマダニでは、殺ダニ剤抵抗性形質獲得のメカニズムについてほとんど解っていない。

一方で、近年の分子生物学の発展により、殺虫剤解毒・代謝に関わる遺伝子プローブを搭載した蚊用の「detox chip」と称されるマイクロアレイが開発され^{2) 3)}、既に野外採集株や実験室株における殺虫剤抵抗性獲得の分子メカニズムの解明に成功している^{4) 5)}。そのため、マダニ版 detox chip の開発は殺ダニ剤抵抗性の分子メカニズムの解明にとって有用であると考えられる。

そこで本研究は、予備調査として、殺ダニ剤に感作されたマダニにおいて遺伝子の発現量に変化があるか、特に解毒・代謝に関与する遺伝子3種（Glutathione S-transferases : GSTs, Cytochrome P450s : CYPs, Esterases : ESTs）に着目し検証することを目的とした。

試験方法

(1) 本研究では、当研究室にて継代維持しているフタトゲチマダニ *Haemaphysalis longicornis* 単為生殖系岡山株を供試した。殺ダニ剤の効力試験法の一つである濾紙接触法では、幼ダニや若ダニの発育ステージであるダニが用いられるが⁶⁾、後述するマイクロアレイに供試するRNA量を確保することから、本研究では若ダニを用いた。
(2) 市販 Flumethrin 製剤（溶液 100 ml 中 Flumethrin 1.00 g 含有）を用い、以下の要領にて若ダニに薬剤を感作させた。① Flumethrin 含有量が 50, 16.7, 5.56, 1.85, 0.62 $\mu\text{g/ml}$ となるよう流動パラフィンにて殺ダニ剤を希釈し、ワットマン濾紙（5 cm \times 10 cm）に 2 ml 塗布した。一方、陰性対照区である 0 μg （コントロール）条件では流動パラフィンのみを塗布した。塗布した濾紙に若ダニ 15 匹を挟み込み、四辺をホッチキスにて封印した。その後 25 $^{\circ}\text{C}$ 、恒暗条件下で 48 時間インキュベートした。同様の試験を 3 回繰り返して生存した個体を -80 $^{\circ}\text{C}$ にて使

-
- 1) 農研機構 動物衛生研究所 人獣感染症研究チーム
（現：動物衛生研究所 細菌・寄生虫研究領域）
2) 農研機構 動物衛生研究所 細菌・寄生虫病研究チーム
（現：動物衛生研究所 細菌・寄生虫研究領域）

- 1) Research team for Zoonotic Diseases, National Institute of Animal Health (present: Bacterial and Parasitic Disease Research Division, National Institute of Animal Health)
2) Research team for Bacterial/Parasitic Diseases (present: Bacterial and Parasitic Disease Research Division, National Institute of Animal Health)

* Corresponding author: Naotoshi TSUJI

Research team for Zoonotic Diseases, National Institute of Animal Health (present: Bacterial and Parasitic Research Division, National Institute of Animal Health)
3-1-5 Kannondai, Tsukuba, Ibaraki 305-0856 JAPAN
Tel: 029-838-7749
Fax: 029-838-7749
E-mail: tsujin@affrc.go.jp

用時まで保存した。

(3) 発現遺伝子の解析：上記試験結果をもとに Bliss のプロビット変換法を適用して対数薬量（濃度）-プロビット死虫率回帰直線を計算⁷⁾し、亜致死量に相当する LD25 の濃度を計算した。LD25 付近の濃度条件で感作した若ダニの凍結サンプルについて、液体窒素を用いて凍結粉砕後 RNA を抽出し、フタトゲチマダニ完全長 cDNA ライブラリーの 5'EST 配列データベース情報を基に設計した cDNA マイクロアレイへ供試した。感作条件と非感作条件での遺伝子発現量の比較を行った。

成績概要

(1) 薬剤感作試験の結果、Frumethrin 製剤に対する感作条件と致死率の関係は以下の通りであった。50 $\mu\text{g}/\text{ml}$: 97.8 \pm 3.8 %, 16.7 $\mu\text{g}/\text{ml}$: 91.1 \pm 10.2 %, 5.56 $\mu\text{g}/\text{ml}$: 73.3 \pm 6.7 %, 1.85 $\mu\text{g}/\text{ml}$: 31.1 \pm 3.8 %, 0.62 $\mu\text{g}/\text{ml}$: 2.2 \pm 3.8 %, 0 $\mu\text{g}/\text{ml}$: 0.0 %。

(2) 上記試験の結果、LD25 = 1.652 \pm 0.04 $\mu\text{g}/\text{ml}$ であったことから、1.85 $\mu\text{g}/\text{ml}$ を適用した若ダニサンプルをテスト区として用い、マイクロアレイによる遺伝子発現比較解析を行った。その結果、コントロールと比較し、感作群において 2 あるいは 0.5 倍以上の転写量の変動を認めた遺伝子が、アレイに搭載した 10,259 個のプロープの約 10.3% に当たる 1,059 個確認された。転写量が 2 倍以上増大した遺伝子は 638 個あり、0.5 倍以下に減少した遺伝子は 421 個あった (図 1A)。

(3) 今回構築したマイクロアレイには、解毒・代謝に関連する遺伝子のファミリーが 3 種（合計 38 個）のプロープを搭載することができた (HIGST family : 22 個, HICYP family : 11 個, HIEST family : 5 個)。このうち、2 倍以上増加した遺伝子は 1 個 (HIGST-Contig1556)、0.5 倍以下に減少した遺伝子は 4 個 (HICYP-S02086B-09_C05, HICYP-S02086B-24_F15, HICYP-S02142-18_L17, HIEST-S02142-10_A15) であった (図 1B)。アレイ結果において 2 倍以上発現量が上昇した HIGST-Contig1556 について、RT-PCR による発現確認をしたところ薬剤感作によって発現が強く誘導されることがわかった (図 2)。

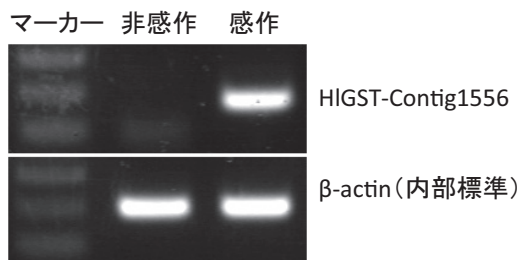


図 2. RT-PCR による HIGST-11 の発現変化の解析 (上段) HIGST-Contig1556 特異的プライマーにて検出したバンド。(下段) アクチン特異的プライマーにより検出したバンド (内部標準)。HIGST-Contig1556 は、殺ダニ剤の感作によって mRNA の転写量が増大した。一方、下段のアクチンの転写量に変化はない。

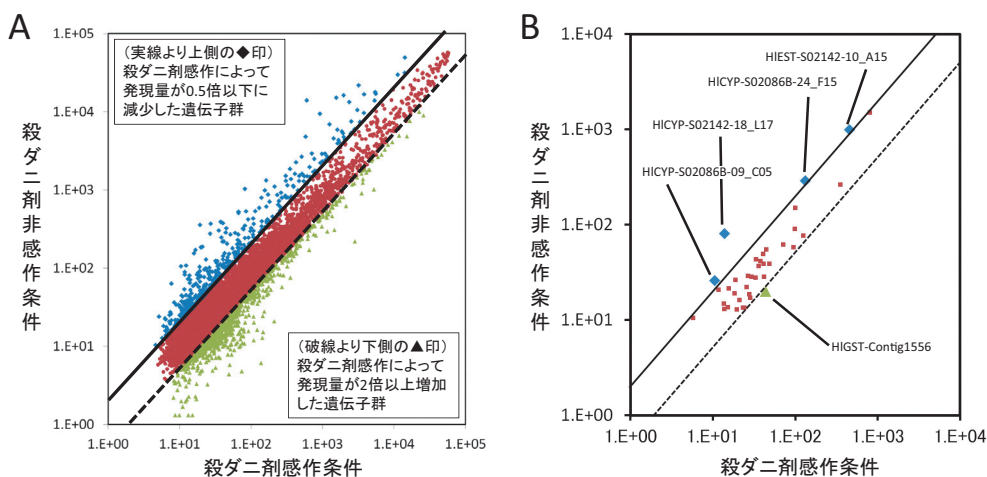


図 1. マイクロアレイ結果のシグナル散布図

両図ともに X 軸は殺ダニ剤感作条件でのプロープごとのシグナル対数値、Y 軸は非感作条件でのシグナル対数値を示す。図中の実線 (破線) は、感作条件におけるシグナル値が非感作条件と比し 0.5 倍以下 (2 倍以上) の変動が認められたプロープの境界線である。(A) 全遺伝子プロープのシグナル値散布図、(B) 解毒・代謝酵素関連遺伝子 38 種類のみ抽出した散布図。GST : Glutathione S-transferase, CYP : Cytochrome P450, EST : Esterase。

考 察

本研究によって、殺ダニ剤に感作されたフタトゲチマダニの遺伝子発現量が増加することをマイクロアレイ解析によって明らかにすることができた。また、特に薬剤の解毒代謝に関連する代表的な遺伝子ファミリーである Cytochrome P450 (CYP), Glutathione S-transferase (GST), Carboxylesterase (CE) については、HIGST-Contig1556 のみではあるが、転写量が増加することを確認した。

CYP や CE は解毒代謝の第 1 段階反応を担っており、薬剤の酸化やエステル分解を行うほか、内在性ホルモンの代謝にも関与している⁷⁾。これらの遺伝子については、転写活性の増加 (CYPs) や構造遺伝子の増幅 (CE) により転写量が増加した結果、酵素量の増加が起これ、解毒活性が高まった例がキイロシヨウジョウバエ⁸⁾ やモモアカアブラムシ⁹⁾ において報告されている。GST は、主に解毒代謝の第 2 段階反応における還元型グルタチオン (GSH) 抱合の触媒を行っており、ピレスロイドに感作されたチャイロコメノゴミムシダマシにおいて転写活性が増加することが報告されている¹⁰⁾。

本研究においても殺ダニ剤感作に伴う HIGST-Contig1556 の発現量増加が確認されており、Flumethrin 製剤の解毒代謝が本酵素によって行われていることが示唆されるが、その他の HIGST 遺伝子ホモログ 21 種の転写活性については薬剤感作後の転写量変動を認めなかった。同様に HICYP や CE を含む HIGST についても、薬剤感作後の発現量の変動がないばかりか、減少に転じているものもあった。CYP, CE, GST の 3 種類の遺伝子は、個体内において分子多様性があり、器官や細胞内における局在の違いや基質が異なるなどの差異が存在する⁶⁾。そのため、Flumethrin 製剤の解毒代謝系に参画しないものも含まれているかもしれないが、薬剤感作後のサンプリング時間が早ければ今回観察したものとは異なるトランスクリプトーム状態である可能性も示唆されるので、サンプリングの条件に検討を加える必要がある。

今後の課題

本研究で採用したサンプリング条件では、予想に反し CYP や EST の発現量が増加していなかった。上述したように殺ダニ剤感作後のサンプリング時間、例えば 24 時間後などのサンプルで同様の実験を行い継続的な発現動態を観察する必要がある。

また、今回着目した解毒代謝に関わる酵素の遺伝子セット以外で、例えばマダニの蛋白質分解酵素の一つで

あるレグマイン遺伝子の発現量が、薬剤感作後に上昇するという結果を得た。同様の現象が薬剤感作されたガンビアハマダラカ¹¹⁾ やオウシマダニ¹²⁾ においても確認されているが、未だその原因については明らかではない。本酵素はカテプシン系プロテアーゼ前駆体を活性型に賦活する¹³⁾ ことから、薬剤感作によって攪乱された細胞内蛋白質の代謝回転を間接的に正常化する役割を担っていることが示唆される。このように解毒代謝系に属さないが、薬剤感作によって転写量が増加する遺伝子セットには、セル・ホメオスタシスにとって重要な役割を担うものが含まれることが予想され、将来的なマダニ版 detox chip の開発のためにもさらに検討を加える必要がある。

謝 辞

本研究は平成 22 ~ 23 年度動物衛生研究所重点強化研究課題として実施した。

引用文献

- 1) George, J.E., Pound, J.M. & Davey, R.B.: Acaricides for controlling ticks on cattle and the problem of acaricide resistance. In: TICKS Biology, Diseases and Control (Bowman, A. & Nuttall, P. eds.), 1st ed. 408-423, Cambridge University Press, Cambridge, UK (2008).
- 2) David, J.P., Strode, C., Vontas, J., et al.: The *Anopheles gambiae* detoxification chip: a highly specific microarray to study metabolic-based insecticide resistance in malaria vectors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 102, 4080-4084 (2005).
- 3) Strode, C., Wondji, C.S., David, J.P., et al.: Genomic analysis of detoxification genes in the mosquito *Aedes aegypti*. *Insect. Biochem. Mol. Biol.* 38, 113-123 (2008).
- 4) Müller, P., Donnelly, M.J., & Ranson, H.: Transcription profiling of a recently colonised pyrethroid resistant *Anopheles gambiae* strain from Ghana. *BMC Genomics.* 8, 36 (2007).
- 5) Müller, P., Warr, E., Stevenson, B.J., et al.: Field-caught permethrin-resistant *Anopheles gambiae* overexpress CYP6P3, a P450 that metabolises pyrethroids. *PLoS Genet.* 4, e1000286 (2008).
- 6) 今井壯一, 神谷正男, 平詔 亨, 他編: 獣医寄生虫検査マニュアル, 初版. 文英堂出版株式会社, 東京 (1997).

- 7) 神村 学, 日本典秀, 葛西真治, 他編: 分子昆虫学 – ポストゲノムの昆虫学 –, 初版. 共立出版, 東京 (2009).
- 8) Daborn, P.J., Yen, J.L., Bogwitz, M.R., et al.: A single p450 allele associated with insecticide resistance in *Drosophila*. *Science*. 297, 2253-2256 (2002).
- 9) Field, L.M., Devonshire, A.L. & Forde, B.G.: Molecular evidence that insecticide resistance in peach-potato aphids (*Myzus persicae* Sulz.) results from amplification of an esterase gene. *Biochem. J.* 251, 309-312 (1988).
- 10) Kostaropoulos, I., Papadopoulos, A.I., Metaxakis, A., et al.: Glutathione S-transferase in the defence against pyrethroids in insects. *Insect. Biochem. Mol. Biol.* 31, 313-319 (2001).
- 11) Vontas, J., Blass, C., Koutsos, A.C., et al.: Gene expression in insecticide resistant and susceptible *Anopheles gambiae* strains constitutively or after insecticide exposure. *Insect. Mol. Biol.* 14, 509-521 (2005).
- 12) Saldivar, L., Guerrero, F.D., Miller, R.J., et al.: Microarray analysis of acaricide-inducible gene expression in the southern cattle tick, *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. *Insect Mol. Biol.* 17, 597-606 (2008).
- 13) Sojka, D., Hajdusek, O., Dvorák, J., et al.: IrAE: an asparaginyln endopeptidase (legumain) in the gut of the hard tick *Ixodes ricinus*. *Int. J. Parasitol.* 37, 713-724 (2007).