

農学研究院若手支援事業成果報告書

平成 20 年 12 月 12 日

支援対象研究分野：新農学生命科学

研究課題名：特異的農薬の創製を目的とした昆虫農薬代謝メタボロミクス

支援期間：平成 19 年 10 月～平成 20 年 9 月

所属部門・研究分野： 遺伝子資源工学部門・昆虫遺伝子資源学分野
バイオアーキテクチャーセンター代謝システムデザイン分野

研究代表者氏名： 山本幸治
辻 幸子

研究の背景と目的

昆虫の農薬制御に関する研究例は、イエバエならびに蚊等の双翅目昆虫を用いて盛んに行われてきたが、鱗翅目昆虫における農薬代謝機構ならびに作用機構に関する分子生物学的な知見は少ない。本研究において、鱗翅目昆虫であるカイコを対象として、近年急速に進展しているメタボロミクス技術を利用し、その農薬代謝・作用機構を明らかにする。カイコ変異体間において農薬感受性に差異が見られることは古くから知られていた。しかしこのような差異を代謝物の観点から検討した例はほとんどない。そこで、これらカイコ農薬耐性ならびに感受性変異体を対象とし、両変異体間の農薬メタボロームプロファイルを比較検討して、その要因を特徴づける代謝物質を見つけることを本研究の目的とする。遺伝子資源工学部門・昆虫遺伝子資源学分野の特徴は、世界最大のカイコ突然変異体を体系的に整備、維持していることである。その中には、他では見られない保存変異体も多数含まれる。これらの一連の研究をメタボローム研究に取り組んでいる九州大学バイオアーキテクチャーセンターの技術を用いて推進したいと考えている。

研究成果の概要（活動内容、成果）

① 農薬感受性検定（山本担当）

鱗翅目害虫駆除に頻用されている有機リン剤（フェニトロチオン、ダイアジノン）ならびにピレスロイド剤（パーメスリン、デルタメスリン）を購入した注射器ならびに注射針を用いて数種のカイコ変異体に投与し、その LD₅₀ 値を測定することにより感受性差を検定した。その結果、フェニトロチオン、ダイアジノン、パーメスリンそしてデルタメスリンに対する LD₅₀ 値は、カイコ変異体間においてそれぞれ 20 倍の差が観察された。また、6 種のカイコ変異体に対して農薬を投与し、その後の体液ならびに脂肪組織を採取し、凍結保存した。体液調製は、アミコンウルトラを用いた。採取した組織は、以下

の実験「農薬メタボライトの質量分析」と「カイコ代謝物解析」に使用する。

② 農薬解毒酵素の機能ならびに発現解析（山本担当）

グルタチオン転移酵素(GST)は代表的な第二相解毒酵素であり、生体外異物ならびに内因性求核化合物(脂質過酸化物質等)に還元グルタチオン(GSH)を抱合し、体外への排出を促進する。これまでに我々は、カイコよりデルタ(GSTD)、シグマ(GSTS)、オメガ(GSTO)、ゼータクラス(GSTZ)に属する4種GSTを同定している。それぞれの組換え酵素を大腸菌にて作製し、電気泳動的に均一に精製した後、特異的抗体を作製するとともに機能解析を行った。その結果、精製酵素は、上記4種の農薬に対して親和性を有することが競合阻害アッセイ法により分かった。また、GST mRNAの発現はノーザン解析により、GSTタンパク質量は、抗GST抗体を用いた免疫染色法により調べた。その結果、GST mRNAならびにタンパク質ともに幼虫期の脂肪組織に局在していることが明らかとなった。上記「① 農薬感受性検定」で調べたカイコ農薬耐性変異体の脂肪組織中におけるGSTタンパク質量は、感受性変異体に比較して高い発現量が認められた。以上の結果より、カイコGSTはフェニトロチオン、ダイアジノン、パーメスリンそしてデルタメスリンに対する耐性に関与していることが示唆された。

③ 農薬メタボライトの質量分析（辻担当）

①で採取・凍結保存したカイコ体液を、有機溶媒沈殿にて除タンパク処理し、凍結乾燥後に再溶解することで質量分析用サンプルとした。質量分析にはLCMS-IT-TOF（島津製作所）を用いた。分析カラムには、Luna C8(2)とZIC-HILICの2種類を用い、ポジティブおよびネガティブの両モードにてデータ採取を行った。

④ カイコ代謝物解析（辻担当）

③で得たLCMSデータをメタボローム解析用ソフトウェア「Phenomenome Profiler™ AM⁺」（Phenomenome Discoveries Inc.）にて解析に供した。「Phenomenome Profiler™ AM⁺」は質量分析装置から得られた膨大なデータを統計手法を用いて解析するソフトウェアである。PCA（主成分分析）解析の結果、同じ農薬を同量投与した場合、同系統のカイコにおいても、投与しない場合および投与後の時間によって代謝物プロファイリングに明らかな差が認められることが示唆された（図1）。また、投与農薬の量を変えた場合の一定時間後の代謝物プロファイリングにも差があることが示された（図2）。また、同量の農薬を投与し、一定時間経過した後の体液代謝物にも、カイコ系統間で明らかな差があることが示唆された（図3）。このような、投与量・投与後時間・系統などで認められる代謝物プロファイリングの差異の原因となっている代謝物を探索したところ、いくつかの候補代謝物イオンが見つかった。これら代謝物のうち、興味深いものについては今後同定を行っていく予定である。

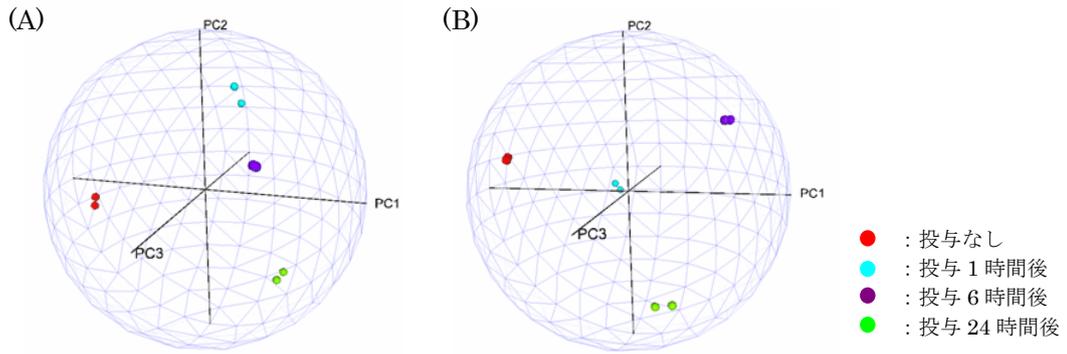


図 1 カイコ p50 系統にフェニトロチオン一定量投与したときの投与後時間による代謝物データの PCA 解析結果
(A: ZIC-HILIC/ Positive mode, B: ZIC-HILIC/ Negative mode)

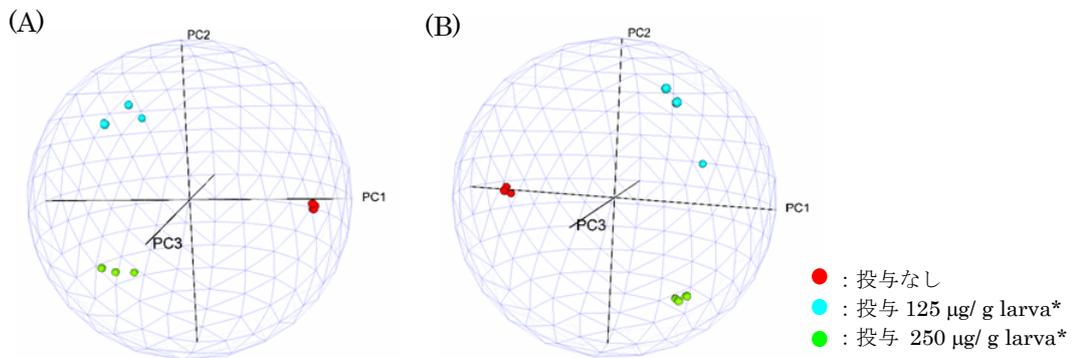


図 2 カイコ p50 系統にダイアジノン投与したときの投与量による代謝物データの PCA 解析結果
(A: ZIC-HILIC/ Positive mode, B: ZIC-HILIC/ Negative mode) (larva*: カイコ幼虫)

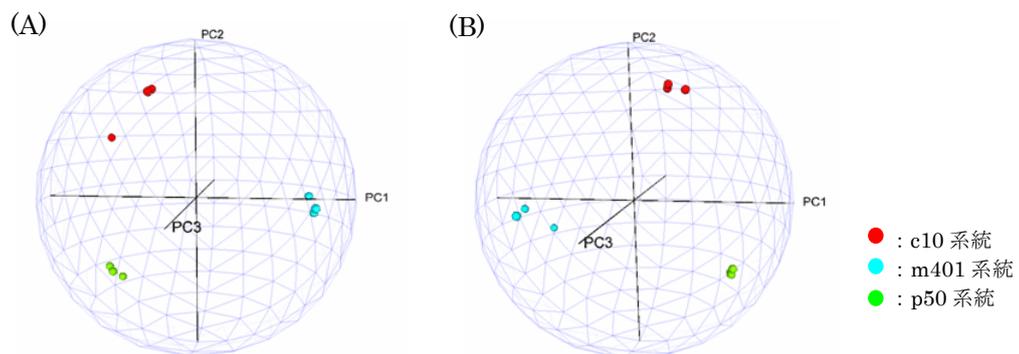


図 3 異なるカイコ系統に一定量ダイアジノン投与、一定時間経過後の代謝物データの PCA 解析結果
(A: ZIC-HILIC/ Positive mode, B: ZIC-HILIC/ Negative mode)