

特集：ゲノム情報を利用した環境に優しい昆虫制御技術に関するアセス調査

# DNA マイクロアレイの昆虫学研究への 利用の現状と展望

農業生物資源研究所 <sup>かみ</sup>神 <sup>むら</sup>村 <sup>まなぶ</sup>学  
岡山大学大学院 <sup>うえ</sup>上 <sup>だ</sup>田 <sup>ひとし</sup>均

## はじめに

DNA マイクロアレイとは、スライドガラスやシリコン基板上に数百から数 10 万種類の cDNA (RNA の逆鎖になる 1 本鎖 DNA) またはオリゴ DNA (数十塩基の短い 1 本鎖 DNA) を高密度に整列、固定したものである。様々な形で生物学研究に用いられているが、最も一般的な使用例は、異なる時期や組織、異なる系統、または各種の処理を行う前後に mRNA を抽出し、蛍光物質で標識した cDNA または RNA を作成してハイブリダイズさせ、蛍光強度を測定することにより、個々の mRNA の相対量を調べるといふものである (野島, 2006)。これにより、非常に多数の遺伝子の発現を網羅的に解析することができる。DNA マイクロアレイは 1995 年に初めて報告された比較的新しい技術であるが (SHENA et al., 1995)、価格が昔に比べると低下してきたこともあり、近年は多数の生物で利用されるようになった。本稿では、昆虫学分野での DNA マイクロアレイの使用の現状を俯瞰し、昆虫制御技術開発への利用の展望について考察する。

## I 医学分野での DNA マイクロアレイ 利用の現状

昆虫学への利用について述べる前に、産業利用の最先端をいく医学分野での利用の現状について簡単にふれる。2006 年 7 月現在、米国 National Center for Biotechnology Information (NCBI, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) にある文献データベース Pubmed で DNA microarray および human という用語で文献検索すると、12,000 件ほど論文がヒットする。そして、同時に cancer を検索項目に加えると 5,000 件ほどの論文がヒットすることから、DNA マイクロアレイがヒトの癌の研究に非常に多く用いられていることがわかる。事実、DNA マイクロアレイの歴史はわずか 10 年ほどである

が、この間に何百件もの大規模実験が行われ、癌における包括的・定量的な遺伝子発現プロファイルが得られており、分類済みの癌については遺伝子発現パターンを見ることにより容易に識別できるようになっている (RHODES and CHINNAIYAN, 2005)。このように、癌の遺伝学的個性判断に DNA マイクロアレイは大きな役割を果たしており、治療方針の決定、治療効果や副作用の予測システム構築など、臨床面での実用化も目前にある (RHODES and CHINNAIYAN, 2005)。癌研究以外では、疾病の原因遺伝子の同定や創薬研究に DNA マイクロアレイが用いられており、いくつもの成功例が報告されている。

## II ショウジョウバエを使った研究例

昆虫に対する DNA マイクロアレイの利用例は、医学研究に比べると圧倒的に数が少ない (表-1)。そのほとんどがキイロショウジョウバエを使ったものであり、なかでも、特定の遺伝子の機能を調べるため、目的の遺伝子の変異株個体と正常な個体、あるいは、目的の遺伝子を強制発現させた個体と正常な個体とを比べて遺伝子発現プロファイルがどのように変わるかを解析したものが多し。このような解析が多く行われている背景として、キイロショウジョウバエを用いた発生のメカニズムの解析、あるいは遺伝子機能の解析が非常によく進んでいること、また、発生の研究が進んでいる割に特定の遺伝子によってコントロールされる遺伝子を効率よく見つける系が今までなかったことが考えられる。そして、これらの多くの解析例では、特定の遺伝子でコントロールされる遺伝子が次々と同定されており、この手法の有効性および信頼性が確認されている。また、少数ではあるが、野生株での発生過程における遺伝子発現パターンの違い、組織による発現パターンの違いを調べた結果が発表されている。現時点では昆虫制御技術開発への応用例はないが、DNA マイクロアレイを用いた解析の中から、本目的のために参考になる殺虫剤抵抗性ショウジョウバエの原因遺伝子同定に関する研究成果が報告されているので以下に概要を述べる。

Application of DNA Microarray to Entomological Research.  
By Manabu KAMIMURA and Hitoshi UEDA

(キーワード: DNA マイクロアレイ, 昆虫, 殺虫剤, 害虫)

DABORN et al. (2002) は、野外で単離された 2 系統の

表-1 昆虫に対して DNA マイクロアレイを用いた研究例 (NCBI の PubMed で文献検索を行った (2006 年 7 月))

目	種名	学名	論文数	主な研究テーマ
ゴキブリ目	チャバネゴキブリ	<i>Blattella germanica</i>	1	殺虫剤抵抗性
シロアリ目	シロアリの一種	<i>Reticulitermes flavipes</i>	2	カースト分化
半翅目	エンドウヒゲナガアブラムシ	<i>Acyrtosiphon pisum</i>	1	共生微生物
アザミウマ目	ミカンキイロアザミウマ	<i>Frankliniella occidentalis</i>	1	植物ウイルス伝搬
膜翅目	セイヨウミツバチ	<i>Apis mellifera</i>	12	カースト分化, 脳機能
	アリの一種	<i>Camponotus festinatus</i>	1	変態
甲虫目	ヨツモンマメゾウムシ	<i>Callosobruchus maculatus</i>	1	害虫防除
	ハムシの一種	<i>Diabrotica undecimpunctata</i>	1	害虫防除
鱗翅目	カイコ	<i>Bombyx mori</i>	5	脱皮ホルモンの合成と作用
双翅目	キイロシヨウジョウバエ	<i>Drosophila melanogaster</i>	160	遺伝子機能, 発生, 免疫, 性差, 進化, ストレス
	オナジシヨウジョウバエ	<i>Drosophila simulans</i>	7	種分化
	ガンビアハマダラカ	<i>Anopheles gambiae</i>	11	マラリア伝搬, 吸血
	ネッタイシマカ	<i>Aedes aegypti</i>	4	マラリア伝搬
	ツェツツバエ	<i>Glossina morsitans</i>	1	免疫

DDT 抵抗性キイロシヨウジョウバエでの遺伝子発現プロファイル DNA マイクロアレイを用いて解析し, チトクローム P450 の一種である Cyp6g1 遺伝子の過剰発現を検出することに成功した。さらにこのことを確かめるため, トランスジェニック系統を作成して Cyp6g1 を強制発現させ, この強制発現によって DDT 抵抗性を得ることを確認している。また, この一つの遺伝子の過剰発現により, DDT だけでなく各種の殺虫剤に対する抵抗性も生じることを示した。

同じグループの解析である Le Goff et al. (2003) によると, 野外で単離した DDT 抵抗性系統を研究室内で再度 DDT により選抜し, さらに 10 倍の抵抗性を示す系統を得た。そして, DNA マイクロアレイによる解析で, この系統では Cyp6g1 に加えて, 異なる P450 分子の Cyp12d1 の発現量が上昇し, これによって抵抗性が加わった可能性があることを示した。一方, Cyp6g1 を遺伝的組換え手法を用いて野生型に復帰させた後に研究室内で DDT 抵抗性を選抜した系統では, Cyp6g1 と同じ P450 ファミリーに属す Cyp6a8 の発現量が上昇し, この遺伝子発現の上昇によって抵抗性が生じている可能性があることを示した。さらに, 近縁種のオナジシヨウジョウバエの DDT 抵抗性系統のサンプルについても, キイロシヨウジョウバエの DNA マイクロアレイを用いて解析し, Cyp6g1 遺伝子と解毒酵素の一種であるグルタチオン転移酵素の遺伝子の発現がともに約 2 倍に上昇していることを示した。

また, Pedra et al. (2004) は, キイロシヨウジョウバエの DDT 抵抗性系統での全遺伝子の発現プロファイルを DNA マイクロアレイを用いて解析し, 複数の P450

をはじめ, 多くの遺伝子の発現レベルが上昇していることを明らかにし, これらの複数の遺伝子の発現上昇が DDT 抵抗性をもたらしている可能性を示した。

以上三つの論文では, いずれの場合も DDT 抵抗性になった原因が遺伝子の発現量の増加で説明されており, 現時点で DNA マイクロアレイは, その検出に最も適した手段と考えられる。このように, DNA マイクロアレイによる遺伝子発現プロファイルの解析は, 新たな昆虫制御剤を開発するうえで重要な情報をもたらすものと予想される。

### III ショウジョウバエ以外の昆虫を使った研究例

ショウジョウバエ以外の昆虫からは, DNA マイクロアレイを使った研究論文が 40 件ほど報告されている (表-1)。中でも, ゲノム解析が行われているミツバチとカイコの 2 種の有用昆虫およびガンビアハマダラカとネッタイシマカの 2 種のカからの報告例が多い。これらの種を使った研究例を簡単に紹介する。

#### 1 セイヨウミツバチ

キイロシヨウジョウバエ以外の昆虫では, 最も初期にマイクロアレイを使った解析結果が報告された。使用目的は, 脳で特異的に発現する遺伝子の探索, 働き蜂の労働の種類・期間と遺伝子発現パターンとの関係の解析などで, 主に社会性や階級分化に関係する遺伝子の探索に用いられている。国内では, 東京大学の久保健雄博士のグループが精力的に研究を行っている (TAKEUCHI et al., 2002 など)。

## 2 カイコ

日本から発表された論文がほとんどである (Niwa et al., 2004 など)。使用目的は、幼虫の翅原基で脱皮ホルモンによって発現が誘導される遺伝子の探索、幼虫の前胸腺 (脱皮ホルモンの分泌器官) で特異的に発現する遺伝子の探索、蛹化過程の翅原基での遺伝子発現パターンの解析などで、脱皮ホルモンの合成やその作用機構に関係する論文が多い。

## 3 カ類

ガンビアハマダラカはマリアアの、ネッタイシマカは Dengue 熱の媒介昆虫として世界的に非常に重要な衛生害虫である。使用目的は、病原生物を媒介しない系統と通常系統との間の遺伝子発現の比較、殺虫剤抵抗性系統と感受性系統との間の遺伝子発現の比較、メス成虫が吸血した後に発現が誘導される遺伝子の探索などで、伝染病媒介のメカニズム解析や防除を目的とした研究が多い。

ほか、数種の衛生害虫、農業害虫、貯穀害虫、社会性昆虫から DNA マイクロアレイを用いた研究が報告されているが、数は少ない (表-1)。

## IV 昆虫制御法開発への利用の展望

今まで報告されている殺虫剤抵抗性の原因の多くはチトクローム P450 などの特定の遺伝子の過剰発現で説明されている。転写制御領域へのトランスポゾンの挿入により遺伝子発現レベルが上昇する例があるように、タンパクの機能の向上を誘導する変異よりも、遺伝子発現レベルを変化させる変異のほうが容易に生じると考えられるためである。このことから、現存する殺虫剤抵抗性昆虫で、DNA マイクロアレイを用いてどの遺伝子の発現が変化しているかを知ることは、新たな昆虫制御剤を開発する際の重要な資料となると考えられる。

また、新規昆虫制御剤に対して抵抗性が発生した場合、原因が遺伝子の発現量の違いである場合には、DNA マイクロアレイは特に素早くその原因を突き止める有効な手法となることは間違いない。代替薬剤の選択などの短期的な対応と、新たな昆虫制御剤の開発などの長期的対応の両方で適切な方向性を見いだす重要な情報を与えるだろう。また、DNA マイクロアレイはゲノム情報が明らかな生物種のみで使用できると考えがちであるが、前述のようにキロショウジョウバエのアレイをオナジショウジョウバエの解析に利用できているので、ゲノム

情報が明らかではない種についても近縁種でマイクロアレイ解析が行われていれば同じアレイをそのまま利用できる可能性がある。加えて、DNA マイクロアレイ解析は進化しつつある手法であり、ゲノム上の点変異を検出するに利用できるようになるると予想されている (Gershon, 2005)。そうなれば、殺虫剤抵抗性の原因をさらに素早く見つけることができるようになるだろう。

ショウジョウバエ以外では、ガンビアハマダラカとネッタイシマカという重要伝染病を媒介する 2 種のカで活発に DNA マイクロアレイを用いて研究が行われている。これらの研究によりカ類の繁殖や病原微生物の媒介の鍵となる遺伝子が見つければ、その機能阻害を目的とした化合物の高速スクリーニング系の構築も可能になり、新たな昆虫制御剤の開発に結びつくことが期待できる。

また、カイコなどを利用したホルモン類の作用機構研究が、新規の成長制御剤の開発に結びつくことも期待できる。昆虫の 2 大脂溶性ホルモンである脱皮ホルモンと幼若ホルモンは広範囲の生理現象を制御しているが、ともに昆虫を含む節足動物に特異的なホルモンであり、ほ乳類や植物にはほとんど影響を与えない。その点では、これらのホルモン活性をもつ成長制御剤は、まさに環境にやさしい昆虫制御剤の典型である。

## おわりに

DNA マイクロアレイは、解析装置が高価 (数百万円以上) であり解析にも比較的多額の費用がかかる (数万円以上/アレイ) もの、得られる情報は膨大であり、他の手法を用いた場合のコストと労力を考えると画期的に安価で効率の良い手法ということが出来る。今後は、様々な虫を使った様々な研究に広く使われるようになるだろう。そのような研究により、新たな昆虫制御技術が開発されることが期待される。

## 引用文献

- 1) DABORN, P. J. et al. (2002): *Science* **297**: 2253 ~ 2256.
- 2) GERSHON, D. (2005): *Nature* **437**: 1195 ~ 1198.
- 3) LE GOFF, G. et al. (2003): *Insect Biochem. Mol. Biol.* **33**: 701 ~ 708.
- 4) NIWA, R. et al. (2004): *J. Biol. Chem.* **279**: 35942 ~ 35949.
- 5) 野島 博 (2006): DNA チップとリアルタイム PCR, 講談社サイエンティフィック, 東京, 194 pp.
- 6) PEDRA, J. H. et al. (2004): *PNAS*. **101**: 7034 ~ 7039.
- 7) RHODES, D. R. and A. M. CHINNAIYAN (2005): *Nat. Genet.* **37**: S31 ~ S37.
- 8) SHENA, M. (1995): *Science* **270**: 467 ~ 470.
- 9) TAKEUCHI, H. et al. (2002): *FEBS Lett.* **27**: 230 ~ 234.