

ショウジョウバエのニコチン性アセチルコリン受容体のネオニコチノイド感受性に関する研究

清家 和樹 (筑波大学 生物学類)

指導教員：丹羽 隆介 (筑波大学 生存ダイナミクス研究センター)

背景・目的

ネオニコチノイドはクロロニコチニル系殺虫剤の総称である。その昆虫殺虫活性の高さから、ネオニコチノイドは現代社会で最も使用されている殺虫剤の1つである。しかし近年になり、ネオニコチノイドはミツバチの大量死の原因と考えられるようになり、その使用の是非が世界的な問題になっている。それゆえ、ネオニコチノイドの適切な使用を検討する上で、その作用機序を正確に理解することは極めて重要な科学的課題である。

ネオニコチノイドは、ニコチン性アセチルコリン受容体 (nAChR) のアゴニストとして作用する。この農薬を摂取した昆虫は nAChR にネオニコチノイドが結合し続けることにより、神経が活性化し続けるため死に至ると考えられている。より具体的には、ネオニコチノイドは、nAChR を形成するサブユニットである nAChR α 1 に物理的に結合して、チャネルとしての機能を活性化することが報告されている¹。また、nAChR α 1 機能欠損ショウジョウバエの幼虫は、ネオニコチノイドに対する耐性を示す²。これらの結果は、nAChR α 1 がネオニコチノイドの生体内における主要な標的であることを示唆する。

しかし一方で、所属研究室において近年、キイロショウジョウバエ *Drosophila melanogaster* (以下、「ハエ」と略す) の nAChR α 1 機能欠損体のネオニコチノイドに対する耐性は、幼虫では認められるが成虫においては観察されないという予備的結果が得られた (吉成祐人ら、未発表)。そこで本研究では、この nAChR α 1 機能欠損個体と対照群個体に対してネオニコチノイドを摂取させた際の蛹化および成虫運動性を調べることで、ネオニコチノイドの作用における nAChR の意義について検討した。

方法

(1) ネオニコチノイド存在下でのハエ幼虫の蛹化率の検討

キイロショウジョウバエの系統は、標準的な酵母・コーンミール・寒天エサで飼育・維持した。nAChR α 1 機能欠損株として、所属研究室の吉成祐人氏によって樹立された系統 (未発表) を用いた。また本研究では、ネオニコチノイドとしてイミダクロプリド (CAS 138261-41-3 ; 近畿大学の松田一彦先生より分与) を用いた。

未交尾のハエ成虫のメスとオスを交尾させ、24 時間の間グレーププレートの上に産卵させた。孵化した第一齢虫を取り、2g のエサと 0 ppm, 1 ppm, 2ppm, 4 ppm, 10ppm イミダクロプリド溶液を混ぜて入れた小さなバイアルに 1 バイアル 20 匹ずつ幼虫を入れた。エサが乾燥しないように配慮した上で 25 °C 条件下でハエを飼育し、蛹化したハエの数を数えた。

(2) ネオニコチノイドのない条件下でのハエ成虫の運動性の測定

羽化後 5 日から 7 日間の間 25°C 条件下でオスとメスに分けて飼育した。CO₂ でハエに麻酔をして眠らせ、空バイアルに 10 匹ずつに分けて移した。バイアル内でハエが麻酔から完全に覚めてから、バイアルを叩いてハエを底面に落とし、その後バイアルの壁面を登っていく様子を 15 秒間ビデオカメラで撮影した。

(3) ネオニコチノイド滴下条件下でのハエの運動性の測定

前節(2)と同じバイアルに 1%寒天+5%スクロース溶液 1.5 ml を入れて固めた。終濃度が 0.1 mM になるように調製したイミダクロプリド溶液を 50 μ l 入れて、水分を飛ばすため 1 晩置いた。各バイアルに成虫を 10 匹ずつ入れて、バイアルに移してから 0 分、30 分、60 分、180 分後にバイアルを叩いて底面に落とし、その後バイアルを登るハエの動きを 15 秒間ビデオカメラで撮影した。

(4) ハエの運動性の解析

前節(2)および(3)の実験で得たデータを 2 つの観点から解析した。

i) バイアルの底面もしくは寒天溶液の上部から 7 cm のところに境界線を引き、その境界線に到達した個体数を解析した。

ii) ハエがバイアルの壁面にくっついて登ろうとしている個体数を解析した。

これらの 2 つの項目の解析にあたっては、バイアルを叩いてすべてのハエが底面に落ちたタイミングを 0 秒として、15 秒後の時点での当該個体数を数えた。

結果・考察

幼虫の蛹化実験から、対照群個体では 1ppm でもネオニコチノイドが存在すればほぼ全ての幼虫が蛹化しないのに対し、nAChR α 1 機能欠損個体では 10 ppm のネオニコチノイド存在下であっても蛹化した個体が見られた。このことから、先行研究²と同様、nAChR α 1 機能欠損幼虫はネオニコチノイドに対して耐性を持つことが示唆された。

成虫の運動性の実験では、nAChR α 1 機能欠損個体の運動性は、対照群個体と比べて有意に落ちていた。さらに、ネオニコチノイド存在下での運動機能は nAChR α 1 機能欠損個体と対照群において同様に運動性が低下しており、成虫では幼虫ほどの顕著なネオニコチノイドに対する耐性を認めなかった。以上の結果は、ネオニコチノイドが昆虫の成長段階によって作用する機構が変化している可能性をはじめて提示するものである。

今回の研究や先行研究¹では nAChR α 1 機能を完全に欠損した個体を用いたため、これらの変異株には nAChR α 1 が生体内にまったく存在しない。一方で、近畿大学の松田一彦教授らの研究から、ネオニコチノイドが結合するのに重要な nAChR α 1 のアミノ酸残基が幾つか同定されている³。今後、完全機能欠損個体ではなく、nAChR α 1 のネオニコチノド相互作用アミノ酸に変異を持つハエ系統を用いて、ネオニコチノイドの作用に対する nAChR α 1 の成虫における必要性より詳細に調べる実験を計画している。

参考文献

1. Ihara, et al. (2003) *Neuropharmacology* 45, 133-144
2. Somers et al. (2017) *Genetics* 205, 263-271
3. Ihara et al. (2008) *Invert. Neurosci.* 8, 71-81