殺虫剤抵抗性の分子機構

河野義明・富田隆史

国立予防衛生研究所昆虫医科学部

Molecular Mechanisms of Insecticide Resistance. Yoshiaki KONO and Takashi TOMITA (Department of Medical Entomology, The National Institute of Health, Toyama 1-23-1, Shinjuku-ku, Tokyo 162, Japan). *Jpn. J. Appl. Entomol. Zool.* **39**: 193-211 (1995)

はじめに

殺虫剤が昆虫体内に浸透し、体液の流れに乗って作用点に到るまでには何段階もの障壁がある。まず、昆虫体内への浸透には表皮、消化管壁、気管壁の薬剤透過性に関与する。単一遺伝子が透過性を支配して抵抗性に関与する例はイエバエで知られているが(60)、この分野の詳しい研究は少ない。殺虫剤が体内を循環する間には、組織やタンパク質分子への吸着と酵素による化学変化(代謝)を受けるが、一般的には、作用点に到達する分子数が減少する方向への変化であるため解毒過程と考えられる。しかし、殺虫剤によっては昆虫体内でより活性の強い物質に変えられること(活性化)が、作用発現の必須条件であるものもある。有機リン剤には脂肪体、中腸(80)や神経組織(69)で酸化活性化されるものが多い。解毒や活性化に働く酵素にはチトクロム P450、グルタチオン S-トランスフェラーゼやカルボキシエステラーゼがよく知られており、ここではこの3種の酵素を扱う。これらは、餌に含まれたりして体内に取り込まれた化学的異物を分解、排泄するために、昆虫に本来的に備わったものである。これらの酵素の殺虫剤に対する作用の強化が殺虫剤抵抗性発達の基本要因である。分子レベルから見て、強化の方法には、該当酵素タンパク質をコードする遺伝子の数が増加して酵素がより多く生産されるもの(遺伝子増幅)、遺伝子転写活性の上昇により酵素がより多く生産されるもの、および、酵素が薬剤をより効率的に分解するように構造変化するものの3種類が知られている。

現在使われている殺虫剤の作用点のおもなものは9種類あるが、ここでは抵抗性機構が比較的良好に研究されている γ -BHC やシクロジエン化合物の作用点である抑制性神経の γ -アミノ酪酸受容体(GABA)、DDT、ピレスロイドの作用点である神経の Na^+ チャンネル、および、

有機リン剤、カーバメートの作用点であるアセチルコリンエステラーゼ(AChE)の3種類を取り上げる。有機リン剤、カーバメート剤抵抗性ツマグロヨコバイで明らかにされた、AChEの分子変化による薬剤感受性低下(56)の解明以後、作用点の薬剤感受性低下の事例が次々と報告されるようになった。殺虫剤の淘汰圧の高まりにつれて、解毒機構による抵抗性に作用点の薬剤感受性低下による抵抗性が加わって、より高度の抵抗性が発達したように見受けられる。

それぞれの抵抗性機構が分子レベルですべてが説明されるまでには至っていないのが現状であるが、今後の展開を期してこれまでの研究状況をまとめた。

1. 殺虫剤抵抗性機構に含まれる P450 遺伝子の発現と調節

ミクロソームのチトクロム P450 依存性モノオキシゲナーゼ系は、薬物、殺虫剤、植物中の毒成分などの外来毒物の解毒や、ホルモン、脂肪酸、ステロイドなどの生体化合物の代謝に重要な働きをする。この系の中で、チトクロム P450 は基質に結合し、NADPH より NADPH 依存性チトクロム還元酵素を介して伝達された電子を使って最終的にオキシダーゼの働きをする。生体内に入るおびただしい数の外来毒物を酸化する P450 モノオキシゲナーゼの働きは、存在するチトクロム P450 の種類の多さによってまかなわれているが、その多くが互いに重なり合う基質特異性をもっている。P450 遺伝子は P450 遺伝子スーパーファミリーとして 220 以上の遺伝子配列が登録されており、これらはタンパク質配列の相同性により 36 の遺伝子ファミリーに分類されている(97)。P450 は数例を除いて C-末端の近くに FXXGXXXCXG の保存されたアミノ酸配列をもち、この配列はヘム結合領域に含まれている。

多くの重要な害虫種で、P450 モノオキシゲナーゼが

関わって、有機塩素剤、カーバメート剤、有機リン剤、ピレスロイド剤、昆虫生長制御剤など、多岐にわたる殺虫剤に対する抵抗性が発達している(143, 101, 126)ことから、抵抗性に関わるチトクロム P450 の発現の量または触媒能の質に変化をもたらした機構の解明は重要である(101, 126, 92)。これまで、単離した P450 を *in vitro* の実験系で再構成し、P450 分子種と殺虫剤抵抗性との関わりについて論じられることは少なかったが、最近、いくつかの抵抗性系統において P450 の遺伝子とタンパク質の構造が明らかにされ、抵抗性系統での遺伝子発現が詳しく調べられるようになり、再構成実験も可能になった。

イエバエの CYP6A1

昆虫で P450 の配列が最初に明らかにされたのはイエバエ, *Musca domestica* の CYP6A1 である(30)。複数の殺虫剤(DDT, カーバメート剤, 有機リン剤)に抵抗性を示すイエバエ系統をダイアジノンで選抜して得た R-Diazinon (Rutgers) 系統において、P450 の誘導剤であるフェノバルビタールで処理した成虫の腹部より多量に発現したミクロソーム P450 をとり、その粗精製物を用いて抗体を作った。これを使って、同じくフェノバルビタール処理をしたハエから作った cDNA ライブラリーをスクリーニングし、ひとつの cDNA クローンが得られ、これが 509 残基からなる P450 (CYP6A1) をコードしていることが示された(30)。

R-Diazinon 系統と感受性系統 *sbo* の両系統で、CYP6A1 遺伝子は卵と蛹ではほとんど発現せず、幼虫期に特に強く発現する。また、両系統においてフェノバルビタール処理により著しく CYP6A1 の mRNA が増加することが確認された。R-Diazinon 系統では対照とした *sbo* 系統に比べて mRNA のレベルは 10 倍程度に達したが、ゲノム DNA の解析によると CYP6A1 遺伝子は増幅していないため、転写調節の変更により mRNA のレベルが上昇したと考えられる(12)。CYP6A1 の推定上のアミノ酸配列は R-Diazinon と *sbo* 系統との間で違いがなかった(17)。

R-Diazinon 系統と劣性可視突然変異を各常染色体にもつ殺虫剤感受性系統を用いた連鎖群解析に PCR (polymerase chain reaction)-RFLP (restriction fragment length polymorphism) を適用して、CYP6A1 構造遺伝子が第 5 染色体上に存在することが示された(17)。一方、幼虫期および成虫期に CYP6A1 の mRNA のレベルを高める遺伝的因子は第 2 染色体に位置しており、優性に働くことが明らかになった(12)。この P450 遺伝子座とは離れ

た部位(トランス)の遺伝因子によって P450 の発現が調節されるという知見は解毒酵素が関連した殺虫剤抵抗性機構の研究において重要な意味をもっている。

同系統由来のゲノムクローンも解析され、CYP6A1 遺伝子を含む 3.9 kb の配列が決定された。この配列から明らかになった興味深い点は、予想される転写開始点上流の 110 b 以内で、プロモーター配列 TATA box に近い上流に 2 つの barbie box が見つかったことである(17)。同著者らにより、キイロショウジョウバエ, *Drosophila melanogaster* の CYP6A2 遺伝子の転写開始点上流域にも同様な配列の存在が指摘された。Barbie box は *Bacillus megaterium* 菌の P450_{BM-3} 遺伝子の転写調節領域で最初に見つかった、15 塩基からなる ATCAAAAGC-TGGAGG をコンセンサス配列とする配列である(59)。*B.m.* 菌では、barbie box を含む転写調節領域にリプレッサー(おそらく Bm3R1 タンパク質)が結合すると転写を抑え、フェノバルビタールやその類縁化合物の存在下でこのリプレッサーが解放されることが確かめられている(128, 129)。また、フェノバルビタールによる転写の誘導がおきるラット P-450b, P-450e 遺伝子上流にもこの配列が存在し、フェノバルビタール処理により barbie box を含む DNA 配列への転写因子の結合が促進されたと報告されている(112)。

イエバエでは、NADPH 依存性チトクロム P450 還元酵素の cDNA クローンは発現ライブラリーから得られている(16)。オープンリーディングフレームは 671 残基の P450 還元酵素をコードし、この構造遺伝子は第 3 染色体に位置する。この遺伝子は mRNA レベルからみて蛹期の低下を除き、各发育段階で一貫して発現しており、R-Diazinon と *sbo* 系統の間にもその発現レベルに違いは認められなかった(66)。このように、1 つの昆虫種には多数の P450 分子種が存在するが、P450 還元酵素の分子種は限られていると考えられ(Scott, 私信)、もし、抵抗性のハエにおいてこのような P450 還元酵素遺伝子の発現が増大すると、多様なモノオキシゲナーゼの活性を同時に増大させることにつながり、生体にとって有害であると考えられる。ANDERSON ら(3)は CYP6A1 遺伝子とイエバエの P450 還元酵素遺伝子をそれぞれ大腸菌の中で発現させ、精製したそれぞれのタンパク質を用いて P450 モノオキシゲナーゼ再構成系を作り、CYP6A1 の触媒活性を調べた。この再構成系はシクロジエン殺虫剤のアルドリノとヘプタクロルのエポキシ化を触媒したが、イエバエのミクロソームで見られる有機リン化合物などの解毒に関連した O-/N-脱アルキ

ル化はほとんど行わなかった。CYP6A1 の抗体と R-Diazinon 系統ハエのミクロソームを用いて免疫阻害実験をした結果でも、ヘプタクロルのエポキシ化は 65% 以上阻害されたが、7-methoxy-4-methylcoumarin の O-脱アルキル化はほとんど阻害されなかった。これらの結果から、CYP6A1 はイエバエのシクロジエン代謝に関わる主要な P450 であると結論される (3)。

イエバエの CYP6D1

イエバエからはピレスロイド抵抗性に関与する別の P450 (CYP6D1) の配列も明らかにされている。イエバエの複合抵抗性を示す系統をピレスロイド剤のパーマスリンで選抜した LPR 系統は、phenoxybenzylalcohol 基をもつピレスロイドに対して強い抵抗性 (パーマスリンに対する抵抗性比は 6000 倍) を示す (127)。LPR 系統の CYP6D1 タンパク質の発現量は殺虫剤感受性系統に比べて約 40 倍と推定されている (150)。また、CYP6D1 に対する特異的抗体を用いた免疫阻害実験により、LPR 系統のハエのミクロソーム中では殺虫剤感受性系統に比べてデルタメスリン代謝活性が増大していることが確かめられている (151)。CYP6D1 タンパク質の発現は殺虫剤抵抗性、感受性に関わらず、発育の過程で制御されており、成虫腹部にのみ顕著に発現する (151)。精製した CYP6D1 タンパク質から得られたいくつかのポリペプチドの配列をもとにして、PCR とその応用法である RACE (rapid amplification of cDNA ends) を行い、516 残基からなる CYP6D1 をコードする cDNA 配列が決定された (140)。CYP6D1 では、初めに述べたヘム結合領域内に高度に保存されている 4 つのアミノ酸配列のうち、C-末端側の Gly が Ala に置換されていた。LPR 系統成虫の CYP6D1 の mRNA レベルは感受性系統に比べ 10 倍高く、CYP6D1 タンパク質量の増大と同程度だった。LPR 系統では CYP6D1 の遺伝子増幅は起きていないので、mRNA 量レベルの増大は遺伝子転写過程の変化によりもたらされたものと考えられる (Tomita et al., 投稿中)。また、CYP6D1 の mRNA は感受性系統ではフェノバルビタールにより誘導を受けるが、LPR 系統では誘導を受けず常に過剰発現している (Scott, 私信)。LPR 系統および、感受性 3 系統、aabys, CS, ISK の間で CYP6D1 タンパク質のアミノ酸配列が比較され、11 のアミノ酸置換が検出された。そのうち 7 つの座位のアミノ酸は、感受性系統では共通し、LPR 系統でのみ異なっていた。これら 7 つのアミノ酸座位は CYP6 ファミリータンパク質の中で配列アミノ酸の変化に富んだ 2 つの領域にあり、そのうちの少なくとも一方は基質結合

領域に含まれていると考えられる (140)。このため、これらのアミノ酸置換が LPR 系統の CYP6D1 酵素の触媒活性の質的な変化をもたらしている可能性もある。CYP6D1 の構造遺伝子は第 1 染色体上にあることが allele-specific PCR により明らかにされた (74)。しかし、LPR 系統のモノオキシゲナーゼ系を介するピレスロイド抵抗性に連鎖する染色体 1, 2, 3 および 5 のうちで (127)、第 1 染色体の抵抗性への寄与は小さく (Scott, 私信)、先にのべた CYP6A1 の場合と同様に、CYP6D1 遺伝子の発現もトランスに作用する遺伝的因子の調節を受けていると考えられる (Liu et al., 投稿中)。定量的実験の容易な mRNA のレベルを指標にして、LPR 系統の持つ調節因子の連鎖群解析が現在行われている。

ここで、有機リン剤にもっとも高い抵抗性を示す複合抵抗性の R-Diazinon 系統において、ダイアジノン代謝には関係のないシクロジエン代謝活性の高い CYP6A1 が、なぜ主要な P450 タンパク質として、フェノバルビタールによって誘導されたかについて考えてみたい。すでに述べたように、CYP6A1 構造遺伝子は第 5 染色体上にあり、その発現を調節する遺伝的因子は第 2 染色体上にある (12)。また、モノオキシゲナーゼ系を介するカーバメートと有機リン剤に対するイエバエの抵抗性は最も頻繁に染色体 2 または 5 に連鎖することが知られている (143)。複数の P450 遺伝子の転写を同時に調節する 1 つの遺伝的因子が第 2 染色体上にあり、この調節因子の突然変異体がイエバエ集団に保有されていると仮定する。このような集団を有機リン剤で選抜すると、有機リン剤の代謝を特異的に触媒する P450 の発現レベルをより高める調節因子の変異体が選抜されることになる。有機リン剤を本来触媒しないシクロジエン代謝に関わるような P450 分子種の発現も同時に高まることになる (108)。同様に、フェノバルビタール処理による誘導は、本来のミクロソーム分画に含まれる P450 分子種の構成比を非遺伝的に変えている可能性がある。抵抗性系統からその抵抗性要因となる P450 を探索する場合には、主要な P450 タンパク質が必ずしも、その抵抗性に関与する酵素ではないという理由が理解される。

キイロショウジョウバエの P450

キイロショウジョウバエからは殺虫剤抵抗性機構に含まれる CYP6A2 の配列が得られている。特異的抗体を用いたウェスタンブロットにより、成虫の CYP6A2 タンパク質は、DDT 抵抗性の Hikone-R 系統 (マラチオンに対しては 10 倍) と複合抵抗性 91-R 系統 (DDT に対して ≥ 70 倍; マラチオンに対して約 100 倍) では、殺

虫剤感受性系統の Oregon-R や 91-C の 10~20 倍生産されていることが示された (132)。同抗体を用いて 91-R 系統の成虫に由来する cDNA ライブラリーをスクリーニングして、507 のアミノ酸をコードする CYP6A2 の cDNA 配列が決定された (148)。91-R 系統の成虫の CYP6A2 mRNA レベルは 91-C 系統の 20~30 倍に達しており、91-R と 91-C 系統間で CYP6A2 mRNA の長さも異なっていた。両系統の CYP6A2 遺伝子のゲノムクローンを比較したところ、91-C 系統の CYP6A2 遺伝子は 3'-非翻訳領域に 91-R にはない約 500 塩基の挿入をもっており、これは 17.6 とよばれるトランスポーザブルエレメントに存在する long terminal repeat (LTR) であった (71)。5 つのポリアデニレーションシグナルをもつ 513-bp の LTR の両端には、2 つの ATAT 繰り返し配列が隣接し、その一方は 91-R にはない配列である。この LTR の特徴と位置から、WATERS ら (148) は LTR が CYP6A2 遺伝子発現の調節に関わり、LTR がはざれると mRNA の転写後の安定性が増し、mRNA レベルの上昇をもたらすと説明した。DELPUCH ら (19) はキロショウジョウバエの 26 系統を用い、CYP6A2 遺伝子への LTR の挿入と DDT 抵抗性レベルの相関を調べ、これらの間に相関がないという結果を得て、WATERS らの仮説を支持しなかった。しかし、CYP6A2 が DDT 抵抗性の主要因であるという実験的根拠がないため、CYP6A2 mRNA (あるいはタンパク質) 量の測定を欠いた DELPUCH らの実験が WATERS らの仮説を正しくテストしたものとはいえない。

特異的抗体をもちいた定量により、Hikone-R と 91-R 系統の CYP6A2 タンパク質発現の調節に関わる遺伝的因子の連鎖群解析がなされ、両系統にも第 2 染色体と第 3 染色体上に顕著な調節効果をもつ因子が存在することが明らかになった (149, 132)。CYP6A2 の構造遺伝子はマッピングされていないので、調節因子が構造遺伝子に密接に連鎖しているものかどうかは不明であるが、少なくとも 1 つ、トランスに働くと考えられる。

殺虫剤抵抗性には直接関わりはないが、寄主の柑橘植物に含まれるフラノクマリン系毒素、キサントトキシンを代謝するアゲハチョウの 1 種、*Papilio polyxenes* の P450 遺伝子 (CYP6B1) の構造も明らかにされている (18)。これまでに配列の明らかになった昆虫の P450 は CYP4 または CYP6 のファミリーに分類され、ここで述べた外来毒物の解毒に関わる 4 つの P450 は、昆虫由来のものだけからなる CYP6 ファミリーに分類されている。CYP6A1 と CYP6A2 タンパク質とらの間のアミノ酸の相

同性 (47%) を除くと、これらの相同性は 25%~32% の間にあり低いといえる (140)。CYP6D1 遺伝子はタンパク質コード領域に 3 つのイントロンをもち (140)、2 番目と 3 番目のイントロンは CYP6A1 遺伝子と CYP6B1 遺伝子がそれぞれ 1 つもつイントロン挿入位置と一致している (17, 110)。また、これらのイントロンは他の CYP ファミリーの遺伝子にみられるどの挿入位置とも異なっている。一方、キロショウジョウバエの CYP6A2 遺伝子はイントロンをもたない (148)。このようなことから異なる基質特性を示すイエバエと *P. polyxenes* の P450 遺伝子も共通の P450 遺伝子から進化したものといえる。

2. グルタチオン S-トランスフェラーゼ (GST)

殺虫剤抵抗性に関連した GST の働きは有機リン剤抵抗性 (84, 4, 117) や有機塩素剤抵抗性 (116, 136, 16) で知られている。GST の関与する殺虫剤抵抗性では GST 活性が高まっているのが一般的であるが、ハマダラカ的一种、*Anopheles gambiae* の DDT 抵抗性やヤガ的一种、*Spodoptera littoralis* のピレスロイド抵抗性のように GST の速度定数が明らかに異なる例 (111, 72) もある。GST は分子種が複数あるために、どの分子種が真の抵抗性要因となっているかを証明する必要がある。昆虫における GST 遺伝子構造の解明はやはりキロショウジョウバエで最初に行なわれた (142, 5)。このハエからは分子量が 23.4 kDa (DmGST1)、28.5 kDa (DmGST2) および 35 kDa (DmGST3) の 3 種類のサブユニットが分離され、DmGST1 および DmGST2 をコードする DNA 配列が決定され、それぞれ 209 および 249 アミノ酸からなることが明らかにされた。GST はその基質として 1-chloro-2,4-dinitrobenzene (CDNB) と 1, 2-dichloro-4-nitrobenzene (DCNB) を使うと種分けできる場合が多く、DmGST1 は CDNB のみを分解する酵素である。

イエバエの有機リン剤抵抗性系統 Cornell R では GST が多量に生産され (102)、複数のアイソザイムが存在し、それらの遺伝子は第 2 染色体上にあり (85, 108)、近接して並んでいると考えられている (15)。Cornell R 系統からは GST1 (28kDa) と GST2 (32kDa) の分子量の異なる 2 種の酵素が分離精製されている (47)。GST1 は CDNB のみを分解し、GST2 は主に DCNB を分解する。GST1 の DNA 配列は 2 つのグループにより異なる方法で決定されている。一方は、DmGST2 の DNA 断片をプローブにして cDNA ライブラリーをスクリー

ニングすることにより (147), 他方は, DmGST1 に対する抗体を使ったスクリーニングにより (47), GST がともに 208 アミノ酸から成り, DmGST1 と 84% のアミノ酸配列の相同性をもった構造が明らかにされた。得られた cDNA をもとに大腸菌で発現させた結果, CDNB のみを分解する GST1 が生産された (47)。Cornell R 系統には GST1, GST2 とともに多量に存在するが, GST1 遺伝子の増幅を示す結果はなく, mRNA の量が多量にあることから, mRNA 転写段階での調節が起きていると考えられる (47)。ところが, Cornell R 系統をテトラクロロピンホスでさらに選抜して抵抗性を高めた Cornell HR 系統を用いて, GST 活性との関連を調べたところ, GST1 との相関はなく, GST2 との相関が高いことが判明した (147)。GST2 遺伝子については増幅の可能性も示されているため (147), 今後, 抵抗性イエバエ GST の mRNA レベルの上昇がどのように調節されているかを解明する必要がある。

DDT によって選抜され, 野外集団より 4 倍以上高い GST 活性を持ったネットアイシマカ, *Aedes aegypti* の系統でも, 分子量が 25.9 kDa (GST1a), 26.8 kDa (GST1b), 28.8 kDa (GST2) の 3 種類のサブユニットが分離, 精製され, 部分的なアミノ酸配列も決められている (51)。この系統では GST1a と GST2 の活性が上昇しており, それぞれが発現する組織には違いが認められる。

3. カルボキシルエステラーゼ (CE) 遺伝子の DNA 増幅による殺虫剤抵抗性

DNA 増幅とは, 細胞ゲノム内の特定遺伝子を含む DNA 配列のコピー数が増加する現象で, 薬剤で選択された細胞株が特定遺伝子の発現亢進を獲得する機構としてはもっとも主要なものである。薬剤の種類にもよるが, ほ乳類細胞株の薬剤耐性の機構としては, DNA 増幅によるもの (出現頻度: $10^{-4} \sim 10^{-6}$ / 遺伝子 / 細胞) は, アミノ酸変異 (10^{-7} 以下) や転写活性の上昇 (もっとも頻度が低い) によるものに比べて圧倒的に多い (119)。DNA 増幅は, 細胞毒物質に対するほ乳類の培養細胞, がん細胞 (130), *Leishmania* (52), *Plasmodium* (41), 重金属に対する酵母や植物 (40), 除草剤に対するアルファルファ (27), 極低温に対する魚 (125), などの耐性機構にみられる。殺虫剤抵抗性に関連して DNA 増幅が実験的に検証されたのは, モモアカアブラムシ, *Myzus persicae* (37) とアカイエカ群 (87) の CE 遺伝子のみであるが, 他の昆虫種においても同様な例が見いだされるであろう。ここでは, これら 2 種の昆虫で DNA 増幅によ

り過剰発現した CE がもたらす殺虫剤抵抗性について取り上げる。

モモアカアブラムシの CE

ナフチルエステルの加水分解を指標にして測られた CE 活性の増大は, 殺虫剤抵抗性と結びつくことが多いが, 毒物学的にはその CE が殺虫剤を加水分解している証明にはならない。モモアカアブラムシでは, いくつかのエステラーゼの中のたった 1 つのアイソザイム, E4 (およびこのアロザイムである FE4) の活性が殺虫剤抵抗性のレベルと明瞭に関連づけられる (7, 20)。この酵素は, 有機リンとカーバメートのリン酸基またはカルバミル基を酵素活性部位へ不可逆的に結合し (sequestering), これらの殺虫剤に対する解毒要素となる。E4 はマラオクソン, プチルカーバメート, パラオクソン, などの限られた殺虫剤に対しては, この順に強い加水分解活性も示し, パーメスリンの (1S) trans 体も分解する (20, 24)。

単為生殖相を利用して野外系統からクローン化された, 1 つの感受性系統と 6 つの抵抗性系統について, パラオクソン抵抗性レベルと E4 のパラオクソン加水分解活性との関係が調べられ, 高い相関が認められた (23)。興味深いことに, 用いた 7 つの系統ではパラオクソン加水分解活性が (したがって抵抗性レベルも) 2^i ($i = 0 \sim 6$) で増加していた。E4 の示す酵素動力学的パラメータは, 系統の抵抗性レベルによらずほぼ一定であり, 酵素タンパク質の発現量の変異により一連の酵素活性と抵抗性レベルの上昇がもたらされたことも明らかになった (20, 23)。もっとも強い 64 倍の抵抗性比を示す系統では, E4 のタンパク質量は全虫体タンパク質の 1% に相当した (22)。仮に E4 のタンパク質量が倍々に増えるような遺伝的変異がおこっているとすると, それは, CE の構造遺伝子の転写活性を変更するような変異ではなく, 構造遺伝子のコピー数の増大すること以外には説明しにくいと考えられた (23)。

抵抗性に関係し, かつ E4 に非常に類似した性質を示す FE4 があり, 1 つの抵抗性クローンの中では E4 と FE4 のどちらかが過剰発現している (25)。2 つの酵素は電気泳動により区別がつき, 分子量にわずかな違いがあり, また基質特異性にもわずかな違いがある (24, 21)。EF4 は正常核型から発現し, E4 は多型的な A1, 3 転座をともなう核型から発現する (8)。DEVONSHIRE と SAWICKI (23) により調べられた幾何級数的な CE の活性の変化を示すクローン (2^i 倍の CE 活性を示すクローン V_i) では, V_0 (感受性), V_1 , V_2 , V_3 が正常核型をもち, より抵抗性

の V_4 , V_5 , V_6 は転座をもっている。この区分けには例外もあり (25, 133), 後述する遺伝子増幅をおこなっていても転写産物の量が相対的に少ない感受性クローン個体 (revertant) も存在する。

E4 遺伝子は、抵抗性クローンではその転写産物が感受性クローンに比べて過剰に発現することを利用して、クローニングが行われた (37)。まず、密度勾配遠心により分画された V_6 (原著では R3) クローン由来の poly (A)⁺RNA が、無細胞翻訳系で翻訳され、特異抗体によって E4 mRNA を最も多く含む分画が検出された。次に、この mRNA 分画をもとに、cDNA ライブラリーが作られ、differential hybridization 法によって、 V_6 の poly (A)⁺RNA には強くハイブリダイズするが、 V_0 の poly (A)⁺RNA にはほとんどハイブリダイズしない E4 cDNA 組換え体がスクリーニングされ、これが E4 をコードすることが確かめられた (37)。モモアカアブラムシの各クローンにおける E4 遺伝子の増幅の度合いは、エステラーゼ活性、抵抗性レベルと相関した。E4 cDNA は 552 残基のタンパク質をコードし、セリンエステラーゼに特徴的な活性セリン部位 (GHSAGAAS) が含まれている。E4 タンパク質は、昆虫と脊椎動物の AChE、は乳類の CE、ショウジョウバエの Est-6、*Heliothis* の JHE、あとでふれる *Culex* の CE B1 と高い相同性を示し (39), EF4 の cDNA 配列は E4 のコード領域の配列に 99% 一致した。また、EF4 cDNA では E4 終止コドンにあたるコドンで 1 個の塩基置換が生じたため、さらに 12 残基の配列を C-末端にもち (39)、この違いが 2 つのアロザイムの分子量の差をもたらしing と考えられる (21)。

すでに確立した殺虫剤抵抗性クローンを維持する過程で、殺虫剤による選抜をやめると抵抗性レベルが下がったり、サブクローン間で抵抗性レベルにばらつきが生じる現象は、DEVONSHIRE らの一連の研究の当初から知られていた (123, 33)。もっとも高いレベルの抵抗性クローン V_6 (原著では R₃)、 V_6 より殺虫剤選抜の中断により派生し E4 のタンパク質量と抵抗性のレベルが低下した RevA (revertant)、RcvA を殺虫剤で再び選抜し抵抗性を部分的に取り戻した RevAd の 3 クローンをを用いて、E4 cDNA をプローブとして、E4 遺伝子と mRNA の量が測定された。E4 mRNA 量は各クローンの E4 タンパク質量に比例して発現していたが、E4 遺伝子量については RevA は V_6 とほとんど変わっていないと推定された。また RevA は、 V_6 クローンがはじめにもっていた A1.3 染色体転座も保有していた。この結果は、 V_6 に含まれていた増幅した E4 遺伝子のコピー数は変わらな

いまま、RcvA を派生する過程 (あるいは RevA から RevAd を派生する過程) で転写活性を低下させる (あるいは上昇させる) 遺伝的変異が生じたことを示す。さらに、増幅した遺伝子の不活性化が構造遺伝子 DNA の脱メチル化に密接に関わっていることが、CpG のメチル化に対する感受性が異なる 2 つのアイソシゾマー制限酵素を用いて示された (38)。温室で発生するモモアカアブラムシのコロニーには、従来の特異的抗体を用いた抵抗性のモニターでは見過ごされがちだった RevA クローンのような revertant の頻度が高いことが、遺伝子プローブと特異的抗体による E4 DNA と E4 タンパク質の定量により明らかにされた。殺虫剤散布中断ののち抵抗性レベルが低くなった自然集団でも、このような revertant が残っていれば、殺虫剤の散布の再開とともに容易に抵抗性レベルが上がる可能性を示唆する (38)。

アカイエカ群 (*Culex pipiens complex*) の CE

アカイエカ群では、A と B の 2 つのグループに分けられた CE アイソザイムの一方または両方が過剰発現することが殺虫剤抵抗性の要因になっている。各グループ内ではアロザイムの関係にあると考えられている酵素が存在する。アカイエカ群は、汎世界的に分布するが、遺伝的隔離がおこっておらず、形態的特徴による分類が容易ではない 4 つの亜種、*C. p. pipiens*、ネッタイエカ (*C. p. quinquefasciatus*)、アカイエカ (*C. p. pallens*)、およびチカイエカ (*C. p. molestus*) を含むため、殺虫剤抵抗性に関連した CE アイソザイムの互いの関係がわかりにくい面があった。現在では、基質である α - と β -naphthylacetate (NA) に対する分解特異性により便宜的に分類されている。CE A と B はそれぞれ 60 kDa ポリペプチドのホモダイマーと 67 kDa のモノマーであり (45)、それぞれに対する特異的抗体は他の CE と交差反応しない (86)。また、CE B アイソザイムの遺伝子配列の解析により、CE B の各アイソザイムに対応する遺伝子は互いに高い同一性を示すことも明らかになっている (86, 146)。

ナフチルエステルに対する活性の上昇が殺虫剤抵抗性の要因になっていることがアカイエカ群で最初に認識されたのは 1970 年であった (153)。この虫のクロルピリフォス抵抗性の要因として CE B が、ついで CE A も関与していることが明らかになった (104, 106)。CE A と B の 2 つの遺伝子座は同じ染色体上にあり、密接に連鎖する。2 つの CE グループが関与した抵抗性系統を解析するうちに、強い抵抗性系統に特徴的な遺伝子のハプロタイプが存在することもわかってきた。フランスの *C. p. pipiens* 集団にみられる抵抗性には、初め高活性

の CE A1 が優勢であったが、現在、フランス南部では高活性の A2 と B2 をもつハプロタイプが優勢になっている (77)。カリフォルニアのネッタイエカ集団では 1970 年代には高活性の B1 が優勢であったが (105), 1980 年代の半ばには高活性の A2 と B2 をもつハプロタイプの頻度が高くなり、現在では野外集団の 90% のカがこれらの 2 つのハプロタイプのいずれかをもっている (113)。アフリカとアジアのネッタイエカからも高活性の A2 と B2 をもつハプロタイプが見つかった (77, 67, 64)。免疫学的定量法により、抵抗性系統の成虫における CE タンパク質量が感受性系統と比較され、カリフォルニアのネッタイエカ Tem-R 系統は 500 倍の CE B1 をもち、これは全虫体タンパク質の 6~12% に相当すること、および、フランスの *C. p. pipiens* S54 系統は 70 倍の CE A1 をもち、1~3% に相当することが示された (86)。

高活性 CE A と B をもつ抵抗性ネッタイエカ沖縄系統では、CE B (原著では EII) は幼虫の各組織に分布するが、CE A (原著では EIII) は幼虫の体液以外に分布する (67)。CE B のナフチルエステル分解活性は、オクソン型の有機リン化合物 (フェントロオクソン, ダイアゾクソン) により強く阻害されるが、カーバメート (カーバリル, メトルカーブ) による阻害は CE A に比べて弱い。CE B と CE A の 2 つの共力剤, Triphenyl phosphate (TPP) と IBP に対する感受性も、それぞれ, TPP > IBP, IBP > TPP という相反する感受性の大小関係が示された (67)。この関係はネッタイエカ小笠原系統の CE A (67) と抵抗性のチカイエカ新宿系統の CE B (68) でも成り立つ。ネッタイエカ沖縄系統はフェントロチオンに対しては約 10 倍の抵抗性レベルを示すが、マラオクソンに対しては、約 700 倍の抵抗性を示す (154)。CE A と B はともにマラチオンに対する加水分解活性を示すが (82, 83), どちらの CE もフェントロオクソンに対しては加水分解能力をもたない。フェントロチオンなどに対しては CE は sequestering により抵抗性発現に寄与していると考えられる (67)。

ネッタイエカ Tem-R 系統の CE B1 遺伝子は、前述のモモアカアブラムシの遺伝子の場合と本質的に同じ方法でクローニングされ、540 残基のセリンエステラーゼをコードする cDNA 配列が明らかにされた (88)。この cDNA をプローブに用いて B1 遺伝子を含む DNA アンプリコン (増幅単位) の制限酵素部位が調べられた結果、約 25 kb の配列が B1 構造遺伝子とともに必ず増幅していることがわかった。精母細胞を用いた染色体 *in situ* hy-

bridization (ISH) からは、増幅した CE 遺伝子は 1 つの染色体上に集中して分布していることが示された (95)。CE B 遺伝子が増幅しているチカイエカ新宿系統の唾腺染色体を ISH 法で観察すると、30 コピー以上あると推定される CE 遺伝子は、一様な染色性を示す拡張された染色体領域 (ECR) に入っていた (141)。CE B 遺伝子の増幅は精子、幼虫、蛹、成虫の段階で確かめられている (113)。CE B1 と B2 の遺伝子増幅によりそれぞれ有機リン剤抵抗性となった Tem-R と ScLax 系統を用いて、その抵抗性の安定性が殺虫剤選抜のない条件のもとで調べられた (115)。ホモ接合の状態から開始すると、60 世代を経た後も、増幅した遺伝子のコピー数も殺虫剤抵抗性レベルも安定していた。RAYMOND ら (114) は世界各地に分布している A2 B2 ハプロタイプをもつ抵抗性系統について、CE B cDNA プローブを使い、B 遺伝子を含むアンプリコンの制限酵素サイトを約 20 kb の長さにわたり解析した結果、用いた 7 系統の制限酵素マップが完全に一致した。このことから、彼らは、CE B2 遺伝子の増幅の起源は 1 つに限られ、それが有機リン剤の選択とカ移動により汎世界的に広まったと結論した。

今後の課題は殺虫剤抵抗性に伴う遺伝子増幅がどのようにして起き、それがどのように安定的に後世代に遺伝してゆくかの解明にあると考えられる。

4. シクロジエン抵抗性と GABA 受容体の感受性低下

シクロジエン化合物と γ -BHC は先進国においては現在使われていないが、第 2 次世界大戦後の害虫防除に DDT とともに広く使用されたために、これらの殺虫剤に対する抵抗性の報告は非常に多い。シクロジエン化合物と γ -BHC との間には交差抵抗性が見られる例が多いが、KADOUS ら (61) はデイルドリン抵抗性チャバネゴキブリが GABA 作動性イオンチャンネルに痙攣誘起剤として作用するピクロトキシニン (PTX) に対して交差抵抗性を示すことを明らかにした。その後、他の昆虫のシクロジエン抵抗性においても同様な交差関係が確認され (135), ワモンゴキブリ (*Periplaneta americana*) 脳の神経終末分画に対する PTX とヘプタクロル・エポキシサイドとの拮抗的結合性が示され、これらの化合物が GABA 受容体に作用すると結論された (79)。

哺乳動物の脳に存在する GABA 作動性ニューロンには Cl^- チャンネルと共役している受容体 (GABA_A) と GTP 結合タンパク質と共役している受容体 (GABA_B) の 2 種が知られている。 GABA_A には GABA 結合部位、

ベンゾジアゼピン結合部位, PTX 結合部位が別々に存在し, アンタゴニストとして bicuculline が知られている。GABA_A 受容体は一般に, 各 4 カ所の膜貫通部位をもつ 2 種のサブユニット (α , β) が 2 つずつ結合して形成されている。ウシでは α サブユニットが 429 アミノ酸から, β サブユニットが 449 アミノ酸からなり, N-glucosylation site が α サブユニットに 2 カ所, β サブユニットに 3 カ所, Cys-Cys 結合が各 1 カ所存在する(124)。

殺虫剤抵抗性昆虫における GABA 受容体に関する分子レベルの研究の大部分は米国の FRENCH-CONSTANT ら(36)によって進められた。メリーランド州の果樹園等から採集したキロショウジョウバエの野外集団をディルドリンで選抜して, 感受性 Oregon R 系統の 4,000 倍も強いディルドリン抵抗性系統を得た(31)。この抵抗性は他のシクロジエン殺虫剤および PTX に交差抵抗性を示し, 第 3 染色体左腕にある単一の不完全優性遺伝子(*Rdl*)によって発現する(35)。この系統の幼虫の GABA ニューロンはディルドリンおよび PTX に対する感受性が明らかに低下していた(10)。脊椎動物の GABA_A 受容体との相同性を仮定して *Rdl* 遺伝子をクローニングする試みに失敗していたために, 遺伝学的研究の進んだショウジョウバエにのみに適用できるような手法を用いてクローニングされた。すなわち, *Rdl* の厳密な遺伝子座は第 3 染色体左腕 66F で, *Df* (3L) 29A6 の欠失部位と重なっていることを確認し, chromosomal walking によって, この部分 200 kb を取り, コスミッドベクター中にクローニングした(34)。さらに, 遺伝子型 R/- が R/R と同様に発現し, R/S とは適当な薬量を設定すれば判別できることを利用して, S/S 雄に γ 線を照射し, R/R 雌と交配して得た次世代の中に *Rdl* 部分に変異を起こして R/- となっている個体を選抜し, この部分に逆位を生じている 2 個体を得た。先に得た 200 kb の制限酵素分解断片をプローブにして, 新しく得られた変異 DNA のサザンブロットを行って, γ 線による切断部位が cosmid 6 にクローニングされた 40 kbp DNA 中にその遺伝子が存在することを決定した。この 40 kb DNA の *Eco* RI 分解断片 (10 kb) をプローブにして, 胚 DNA ライブラリーをスクリーニングして得られたものの中で最も長い挿入 DNA を取り出した。この DNA は 606 個のアミノ酸をコードしており, GABA 受容体に共通した構造である疎水性のシグナル配列と 4 カ所の膜貫通部位 (M1~M4) を含んでおり, GABA 受容体サブユニットをコードしているものと結論された。しかし, 脊椎動物の

GABA_A 受容体のどのサブユニットの塩基配列とも相同性は 30% 以下であり, 新しい型のサブユニットであろうと推定された。このゲノム DNA は多くのイントロンを含んでいるが, 最初の 6 つのエクソン/イントロン配列の継ぎ目部分の塩基配列は GABA_A 受容体と同様に保存されているが, 7 番目は GABA_A では M2 配列中にあるが, ショウジョウバエでは M3 配列中にある。さらに, M4 直前の継ぎ目部分の配列は GABA_A との相同性より, ニコチン型 ACh 受容体の配列に高い相同性を示した(32)。

感受性の受容体サブユニットの mRNA をアフリカツメガエルの卵母細胞中で発現させると, 明らかに GABA 作動性のイオンチャンネルが形成され, 機能も正常に近いことから, ショウジョウバエの GABA 受容体が 1 種類のサブユニットから構成されていると推定される。ただ, このものは bicuculline に対しては反応しない(34)。抵抗性の受容体サブユニットのアミノ酸配列は感受性のものと比べ 2 つのアミノ酸が変化しているのみで, ディルドリン抵抗性 14 系統のショウジョウバエで調べた結果, 302 番目のアミノ酸アラニン (Ala302) がセリン (Ser) に置換することが抵抗性獲得の原因であると考えられた(34)。そこで, 感受性系統の cDNA の Ala302 を site directed mutation によって Ser に換え, 対応する mRNA をアフリカツメガエル卵母細胞で発現させた。発現した受容体はディルドリンおよび PTX に対する感受性が約 1/100 に低下していた。この 302 番アミノ酸周辺は M2 内の保存領域で, ニコチン型 ACh 受容体においては inner polar site と呼ばれるイオンチャンネル内側部分である(34)。このような構造変化は明らかにシクロジエン化合物との親和性を低下させるが, この他にも受容体の脱感作を低下させることから, シクロジエンが結合した状態にあってもチャンネルブロック作用が不安定になると推測され, これも抵抗性の要因として考えられる(155)。

キロショウジョウバエのアミノ酸配列に基づく PCR によって, 他の昆虫の M2 部分の DNA 配列を調べたところ, キロショウジョウバエの 292~307 アミノ酸はオナジショウジョウバエ (*D. simulans*), ワモンゴキブリ, イエバエ, コクヌストモドキ (*Triborium castaneum*) (138), および, ネットアイシマカ (139) においても殆ど保存されており, さらに驚くことには, それぞれの種のシクロジエン抵抗性系統では, Ala302 が Ser に置き換わっていた (*D. simulans* では Gly に換わっているものもあった)。このことは, この部分のアミノ酸配列が GABA 受

第1図 Na⁺チャンネルタンパク質にみられる繰り返し構造

容体のイオンチャンネルには不可欠のものであり、それを保持しながら、シクロジエン殺虫剤などに対する感受性を低下させるためには、Ala302の変異しか有り得ないことを示唆している。逆に考えれば、シクロジエン抵抗性昆虫のこの部分に作用する薬剤の開発は有効な抵抗性対策の1つになると言うことであろう。

5. 電位依存性 Na イオンチャンネルの構造とノックダウン抵抗性 (*kdr*) の機構

kdr はイエバエのピレスロイド抵抗性において明らかにされた抵抗性の様式で (11), ピレスロイド間および DDT に交差抵抗性を示し、これらの殺虫剤に対する神経感受性低下によって起こることが知られている。イエバエの *kdr* は第 3 染色体に存在する劣性遺伝子によって支配される形質である (144, 122, 81)。同様な神経感受性低下によるピレスロイド剤抵抗性はネッタイエカ (100), *Spodoptera littoralis* (48), ハマダラカの 1 種, *Anopheles stephensi*, (120), ヤガの 1 種, *Heliothis virescens*, (98), コナガ, *Plutella xylostella*, (57), チャバネゴキブリ, *Blattella germanica*, (145), キロシヨウジョウバエ (9) といった種で報告されている。最近、デンマークのイエバエで見い出され *super-kdr* と名付けられた, *kdr* よりさらに高い抵抗性形質も *kdr* の対立遺伝子により支配されている (29)。その詳しい電気生理学的研究によると、神経索の Na⁺チャンネルのピレスロイド感受性の低下程度は *kdr* と *super-kdr* 間で違いがなく、神経筋接合部シナプスの Na⁺チャンネルの II 型ピレスロイドであるデルタメスリンに対する感受性が *super-kdr* においてのみに低下している (107)。

ピレスロイドの電位依存性 Na⁺チャンネルに対する作用をパッチクランプ法によってニューロブラストーマ培養細胞の単一のチャンネルの電気的変化として記録すると、脱分極と電位の高さは影響されず、チャンネルの開いた状態が異常に延長し、チャンネルの不活性化機構に

異常が起きていると推測される (96)。その際、イオン選択性やチャンネルゲート障壁への影響はなく、ピレスロイドの結合部位はテトロドトキシンの結合部位 (ゲート内部) やグラヤノトキシンの結合部位 (チャンネル内部) とは別の部位であると考えられる。ピレスロイドのもつ疎水性から、神経膜に埋もれているゲート閉鎖の駆動部と考えられる (96)。さらに、ピレスロイドの異性体による作用の違いから、その結合部は少なくとも 2 つ存在し、負のアロステリック効果を示す結合部位の存在も示唆されている (96)。

一方、生化学的研究から、ピレスロイドが極めて低濃度で神経索や神経膜由来の Ca⁺⁺-カルモデュリン依存性プロテinkinase ぜや Ca⁺⁺ 依存性リン酸化を阻害することが報告されており (28), Na⁺チャンネルのキナーゼにピレスロイドが作用する可能性を示している (103)。その他、ピレスロイドが Na⁺および Ca⁺⁺ 依存性 ATPase を阻害するとの報告などもある (103)。

電気ウナギの発電器官やヒヨコの心筋の電位依存性 Na⁺チャンネルは一般に 260 kDa の糖ポリペプチド (α -サブユニット) によって形成されているが、ラットの脳やウサギの骨格筋では 2 つの β -サブユニット (36, 33 kDa) が付加している。しかし、イオンチャンネルの機能は α -サブユニットのみでも発揮される。その分子構造は電気ウナギの発電器官のイオンチャンネルタンパク質で初めて明らかにされた (99)。精製した 250 kDa タンパク質の一部のアミノ酸配列をもとに作ったオリゴヌクレオチドをプローブにして、あらかじめ精製タンパク質の抗体でスクリーニングして得た cDNA クローンの中から一種を選び、7,230 b の塩基配列を決定した。チャンネルタンパク質は 1,820 アミノ酸からなり、第 1 図のように相同性の高い 4 つのリピート (I~IV) で形成されている。各リピートは脂質膜を貫通する疎水性アミノ酸配列をもつ 6 つのセグメント (s1~s6) で形成され、対応するセグメントのアミノ酸配列の相同性が高く、性

質も共通している。s1, s2, s3 は α -ヘリックス構造をとると両極性を示し, s4 では2残基おきに+電荷を持ったアミノ酸が6個配置され, その間を疎水性アミノ酸が2つずつ埋めるという特殊な配列をしている。s5, s6 は疎水性が非常に高く, 両端に電荷をもっている。合計24本の膜貫通構造は集合して, 最狭部が $3 \times 5 \text{ \AA}$ と計算されるイオンチャンネルを形成する(99)。これまでに明らかにされた電位依存性 Na^+ チャンネルの分子構造は基本的には皆これと同様である。チャンネル活性化にはs4が働くと考えられている。すなわち, 螺旋状に並んだアミノ酸構造は, その中の2つおきに並んだ+アミノ酸の電荷によって周囲と電氣的につり合っているが, 膜の脱分極が起きると構造中の+電荷が細胞外側へ1つ移動し, 螺旋は約60度ずれる。4つのs4すべてがこのように変化するとイオンチャンネルが開く(13)。

s5-s6 リンカー部分には2個の+アミノ酸を含む保存箇所があり, ここはゲート周囲の膜内に入り込んでいる部分で, テトロドトキシンの結合部で, イオン選択性に関与すると考えられる。また, III-IV リンカーは細胞内にあって, +電荷をもつアミノ酸に富み, 配列の保存性が非常に高く, この部分を抗体で塞ぐとチャンネル不活性化が影響を受けることから, 不活性化ゲートの主要部分だと考えられる。さらに, I-II リンカーは細胞内にあり, Ser 残基をもつことからリン酸化を受ける部分と推測されている(94)。

昆虫においては, キイロショウジョウバエの Na^+ チャンネル遺伝子(*DSCI*)が最初に明らかにされた(121)。電気ウナギの Na^+ チャンネル cDNA をプローブとして, α -サブユニットの DNA 配列が決定され, 脊椎動物と同様にそれぞれ300アミノ酸で構成される4つの相同なリピートは膜貫通性の6セグメントから成ることが示された。ショウジョウバエに特徴的なのは, ゲノム DNA では10カ所にイントロンを含んでいることである。しかし, 上述したs5-s6, s4, III-IV リンカー部分のアミノ酸配列は保存度が高く, 脊椎動物のチャンネルで推定された機能がショウジョウバエでも保持されていると考えられる(121)。この遺伝子は第2染色体右腕60D-Eの位置にあり, 温度感受性麻痺突然変異 *Sei* 遺伝子の位置60A-Bと非常に近接している(121)。*Sei* と同じく, キイロショウジョウバエの高温麻痺突然変異 *para* はX染色体上にある遺伝子で, Na^+ チャンネルをコードしている。この遺伝子の DNA 配列も決定され, 約60 kb の中に26のイントロンを挟む45 kb の配列が明らかにされた(76)。*DSCI* と同じように, すべての保

存領域をもっているが, *DSCI* とのアミノ酸配列の相同性は高くなく, むしろラット脳の Na^+ チャンネル遺伝子とのほうが高い(76)。

キイロショウジョウバエの殺虫剤感受性系統 Tubingen を DDT で選抜して得た抵抗性系統(TDDT)では, *DSCI* によりコードされる Na^+ チャンネルのIIIs5-s6 リンカー部分の保存アミノ酸配列の Asp1172 が Asn に変化していることが示された(2)。しかし, TDDTの抵抗性レベルが感受性系統に比べ2倍に過ぎないこと, および, 比較した部分はテトロドトキシンの結合部と考えられている部分でありピレスロイドの結合部位とは明らかに異なる所であることから, この部位の変化が *kdr* をもたらす分子変化であるとは結論できない。

para 遺伝子の DNA 断片をプローブにしてイエバエ殺虫剤感受性系統 Cooper の IVs3 より下流の2,070 bp から成る cDNA の一部がクローニングされ, 428 アミノ酸をコードした部分と非翻訳部分の塩基配列が明らかにされた。アミノ酸配列では *para* と99%の相同性をもっていた(152)。Cooper, *kdr*, および *super-kdr* 系統のゲノム DNA を制限酵素 *Eco* RI で分解して, RFLP 解析すると, 3系統の Na^+ チャンネル遺伝子を区別することができた。Cooper と *kdr* または *super-kdr* との F_1 に *kdr* または *super-kdr* を戻し交配して得られたハエに DDT の識別濃度を処理し, 生存個体と死亡個体の RFLP を調べた結果, *kdr* と Na^+ チャンネル遺伝子との密接な連鎖が認められた。この結果は, *kdr* が Na^+ チャンネルに起因する表現型であることを示す有力な根拠である(152)。イエバエ感受性系統 NAIDM から *Is*5-s6 部分の4.4 kbp にわたる *para* と相同なゲノム DNA 配列が明らかにされた(65)。この部分を NAIDM と *kdr* 系統538 ge とで比較すると, エクソン部分では3カ所であミノ酸置換が検出された。その上流域のイントロンでは異なる *Xba*I 制限酵素部位があった。この上流域イントロンの RFLP と *kdr* との連鎖関係が, NAIDM と538 ge の F_1 の戻し交配子孫を用いて解析された結果, やはり, *kdr* 抵抗性と Na^+ チャンネルの一体性が示唆された(65)。*kdr* が Na^+ チャンネル遺伝子に生じた突然変異によるものである根拠として, *kdr* 遺伝子座と *para* 相同性 Na^+ チャンネル遺伝子座の密接した連鎖が *Heliothis virescens* (137) およびチャバネゴキブリ(26)でも, 同様な実験により示されている。

以上のように, *kdr* がどのような分子の変化によって発現しているかについては実験的にはほとんど明らかに

なっていないのが現状である。

6. 殺虫剤低感受性のアセチルコリンエステラーゼ (AChE)

AChE は、昆虫の中樞神経系と脊椎動物の神経-筋接合部位のコリン作動性シナプスにおいて神経伝達物質のアセチルコリン (ACh) を加水分解し、ACh の作用を終結させる重要な酵素である。AChE はショウジョウバエ成虫では脳ニューロパイル表層と胸部神経節に存在する (53)。アイソザイムを含む多様な分子フォームが現れる脊椎動物のコリンエステラーゼ (ChE, AChE と Butyryl ChE との総称) と異なり (78), 昆虫では、約 150 kDa の 2 量体の AChE フォームがおもに発現し (73), グリコリピドアンカーを介して細胞膜に付着している (49, 46, 58)。有機リン剤やカーバメート剤は ACh と競合的に AChE に結合してその活性を阻害し、昆虫を死に至らしめる。数多くの昆虫種とダニ種で、殺虫剤に感受性を低下させた AChE により抵抗性がもたらされた例が報告されている (42)。酵素の殺虫剤感受性を低下させたり変更する遺伝的変異を明らかにすることが、AChE を対象とした抵抗性機構の研究のおもなテーマとなる。アミノ酸置換と殺虫剤感受性との関わりが詳しく調べられているキロショウジョウバエの AChE について取り上げる。

ゲノムに含まれる AChE 遺伝子量に応じて発現する AChE 活性が段階的に異なることを前提にして、小さな欠失をもつ一連の染色体を用いてつくったキロショウジョウバエの部分的異数体 (segmental aneuploidy) を解析し、AChE の遺伝子座 (*Ace* 遺伝子座) を含む第 3 染色体の 1 つの領域を決定した (53)。ついで、この領域を Chromosomal walking によりクローニングし (6), 一連の染色体の欠失部分を DNA 上にマップすること (deletion mapping) により、*Ace* 遺伝子座の位置を 40 kb 以内の特定の DNA 配列の上に決定した (50)。さらに *Ace* cDNA クローンの解析から、*Ace* は AChE の構造遺伝子を構成することが確認され、649 残基の AChE タンパク質前駆体をコードするオープンリーディングフレームが決定された (55)。cDNA 配列から推定されるショウジョウバエの AChE は、シビレイなど脊椎動物の ChE と高い相同性を示す (55)。ChE 様ドメインをもつ酵素の間で高度に保存されたアミノ酸配列のうち、電荷リレー機構に含まれる Asp/His/Scr からなる catalytic triad (118) を構成する可能性がある残基は、ショウジョウバエの AChE においては、Scr 276, His 518, および Asp 475 (あるいは

Asp 130, Asp 248) に相当する (70)。昆虫の AChE 前駆体に挿入的に含まれる特徴的な配列は約 30 残基からなる親水性ペプチド (Arg148-Pro180) である (55)。ショウジョウバエの AChE では、75 kDa 前駆体から生じた 16 kDa と 55 kDa のポリペプチドが非共有的に結合してできたサブユニットをもつことが、脊椎動物の ChE に比べて特徴的である (44)。完全長の AChE 前駆体をコードする cDNA あるいは疎水性ペプチドをコードする 3' 末端を欠いた cDNA の組換え体からは、アフリカツメガエル卵母細胞と *Spodoptera* 細胞株 Sf9 の中で基質分解活性を損なわないダイマー酵素が発現する。後者の DNA 組換え体からのみ分泌型酵素が顕著に発現するが、前者の場合は酵素は分泌されず、Sf9 をもちいた発現系では、細胞表面にグリコリピドアンカーを介して酵素が付着していることが示された。 (47, 14)。これらの細胞発現系に *in vitro* mutagenesis による組換え体 DNA を導入することなどにより、翻訳後の修飾過程にはさらに、前駆体の N-末端シグナルペプチドの切除、148~180 位の親水性配列内の分解、および 55 kDa ポリペプチドに含まれる Cys 615 を介したジスルフィド結合による 150 kDa ホモダイマー形成が含まれることが明らかになった。しかし、これらの翻訳後の修飾過程のどれもが AChE 活性 (もしくは基質との親和性) にほとんど影響をあたえないことも示された (43, 89, 14)。イエバエの AChE でも 2 つのペプチドからなるサブユニットをとること (131) と、*Anopheles stephensi* AChE cDNA でもショウジョウバエと同じ位置に親水的なポリペプチドをコードする塩基配列が含まれることがわかっており (54)、昆虫に共通した AChE の翻訳後の修飾が生じていることが示されている。

ChE の活性部位はエステラーゼ作用部位と陰イオン部位からなる (93)。エステラーゼ部位は活性 Scr をもち、電荷リレー機構に含まれると考えられている。陰イオン部位には、ACh 分子 4 級アンモニウムイオンと静電相互作用を介して ACh をひきつける解離のカルボン酸 (アミノ酸残基) を含むと考えられている部位と、タンパク質立体構造の外縁部がある (1,75)。MUTERO ら (91) は、キロショウジョウバエ AChE の Tyr 109 が脊椎動物 ChE の Asp に対応し、ヒト Butyryl ChE (BuChE) のこの Asp 座位が陰イオン部位に含まれる可能性のあることから (62), Tyr109 座位でのアミノ酸置換が酵素活性におよぼす効果を、*in vitro* mutagenesis とアフリカツメガエル卵母細胞発現系により調べた。その結果、Tyr109 を Asp, Gly, Lys に置換すると、有機リン剤と

カーバメート剤に対する感受性が置換の種類によって変わり、この座位が潜在的に殺虫剤抵抗性に結びつくことを示唆した。しかし、キロショウジョウバエの抵抗性系統からはこの座位に置換をもたらすような突然変異体はまだ同定されていない。

MUETROら(90)は、AChEの殺虫剤感受性をわずかに低下させるような個々のアミノ酸置換の集積効果により特定の殺虫剤に対して著しく感受性を低下した酵素が生まれる可能性を検討した。彼らは、抵抗性を示す複数のキロショウジョウバエ系統の中から、有機リン剤あるいはカーバメート剤に対する感受性が低下したAChEが発現している系統(109)を選び、それらの系統のもつAChEアミノ酸置換を*in vitro* mutagenesisにより系統的に感受性系統のAce cDNA組換え体を導入し、アフリカツメガエル卵母細胞系で一連の組換えタンパク質を発現させた。4つの抵抗性系統から判明した置換を生じていたアミノ酸座位は、感受性系統のCanton SではPhe 115, Ile 199, Gly 303, Phe 368に相当し、これらに対応する導入したアミノ酸置換は、それぞれ、Ser, Val, Ala, Tyrであった。4残基すべてを置換する組換えタンパク質を除く、すべての可能な置換の組み合わせをもつタンパク質を用いて、有機リン剤のパラオクソン、マラオクソン、カーバメート剤のカーバリル、プロボクスルに対する感受性が測定された。その結果、それぞれの殺虫剤に対してアミノ酸置換の相乗効果による酵素の感受性の顕著な低下がみられた。もっとも顕著な例として、パラオクソンに対する感受性は、3つのアミノ酸を置換してできた1つの組換えタンパク質、V199+A303+Y368、では約1/80倍に低下しているのに対し、それに含まれる置換を個別にもつ3つの組換えタンパク質では、感受性の低下がほとんどないもの(V199), 1/4(A303), 1/6倍(Y368)に低下していた。この結果にもとづき、MUETROら(90)は、自然集団にすでに存在する比較的弱いレベルの抵抗性をもたらす対立遺伝子間でおきる遺伝的組換えが、新しい殺虫剤に昆虫が急速に適応してゆくための機構となりうることを示した。

以上にのべたように、AChEの殺虫剤感受性低下の分子レベルの研究はおもにキロショウジョウバエを用いて行われてきたが、これらの一連の研究における難点は、研究の出発材料とした系統のAChEが示す殺虫剤感受性低下のレベルがあまり大きくないことである(109)。AChEの感受性低下が著しい抵抗性をもたらした例は、害虫種から報告されている。有機リン剤とカーバメート抵抗性のツマグロヨコバイRmc系統の抵抗性要

因として、AChEの薬剤感受性低下が明らかにされ、AChE分子構造の変化が示唆された(56)。Rmc系統AChEは感受性系統のAChEに比べ、マラオクソンとフェントロオクソンに対する感受性が1/10程度に、カーバメートに対する感受性は数分の1から1/100に低下しているが、ダイアゾクソンに対する感受性は5倍上がっており、負の交差抵抗性の要因にもなっている。また、酵素に対する反応性も変化しており、アセチルチオコリンあるいはプロピオニルチオコリンを基質とした場合、Rcm系統のAChEでは最適濃度をもたず、濃度の上昇に比例して活性が上がる。有機リン剤抵抗性のコガタアカイエカ富山系統ではAChEのパラオクソン感受性が感受性系統に比べ1/1,000に低下するとともに、アセチルチオコリンに対する分解活性も1/3に低下している(134)。現在、この遺伝子配列の解析がおこなわれている(原田ら、未発表)。これらの例は、酵素の活性部位に質的な変化が生じたことを暗示している。AChEに本質的な殺虫剤感受性低下をもたらしている突然変異体を殺虫剤散布のターゲットとなっている個々の害虫種の野外集団から得て解析することが、今後の研究の進展に重要であると思われる。

おわりに

殺虫剤抵抗性の分子機構の解明により、抵抗性対策にどれほど貢献できるかという疑問は、われわれの誰もが抱いていた。しかし、研究の進展と蓄積につれて、その疑問への解答例も着実に増えていると思われる。

第1は抵抗性発達状態の調査への利用である。受容体の構造が変化した抵抗性では、抵抗性の要因となる突然変異(あるいはそれに対して完全な連鎖不平衡を示す制限酵素部位)の検出がLCR(ligase chain reaction)やPCRの応用により可能になり、個体の遺伝子型の分別も正確に行える(31, 36)。遺伝子増幅による場合には、その酵素の抗体によるタンパク質の定量と遺伝子プローブによる遺伝子量の定量を併用することで、抵抗性個体のみならず、いわゆるrevertant個体をも検出することができる(38)。

第2は薬剤受容体が抵抗性型へ変異する場合に、方向性のある事例の発見である。GABA受容体の変異を示す数種昆虫の殺虫剤抵抗性系統で、タンパク質の同じアラインメント位置で同一のアミノ酸置換がおきていることが証明された(36)。受容体が本来の機能を維持しながら、抵抗性型へ変異するには、選択幅が非常に狭いため方向性が出ると考えられ、他の例の発見も期待され

る。このような抵抗性では、特定の変異型受容体に特異的に作用する薬剤の開発が可能と考えられる。

第3はコンピューター・グラフィクスによる薬剤のデザインに道が開けることである。抵抗性に関与する酵素や受容体のアミノ酸配列が明らかになり、他の生物のものととの相同性などが明らかになれば具体性ができると考えられる。

ここでは酵素や受容体の構造の変化、数の変化を述べたが、本来、薬剤の作用機作はその化学構造と作用点の相互作用を解明しなければならない。残念ながらそこまでは至っていないのが現状であろう。ツマグロヨコバイの抵抗性に関して、抵抗性と感受性の AChE に対する 6-alkylthio-2-pyridyl metansulfonate の活性の構造相関の報告もある (63)。このような観点からのデータの集積も相まって真の抵抗性の分子機構が論じられると考える。

引用文献

- ALDRIDGE, W.N. and E. REINER (1969) Acetylcholinesterase, two types of inhibition by an organophosphorus compound: one the formation of phosphorylated enzyme and the other analogous to inhibitor by substrate. *Biochem. J.* **115**: 147-162.
- AMICHOT, M., C. CASTELLA, A. CUANY, J.B. BERGE and D. PAURON (1992) Target modification as a molecular mechanism of pyrethroid resistance in *Drosophila melanogaster*. *Pestic. Biochem. Physiol.* **44**: 183-190.
- ANDERSON, J.F., J.G. UTERMÖHLEN and R. FEYEREISEN (1994) Expression of house fly CYP6A1 and NADPH-cytochrome P450 reductase in *Escherichia coli* and reconstitution of an insecticide-metabolizing P450 system. *Biochemistry* **33**: 2171-2177.
- BALABASKARAN, S., S.S. CHUEN and S. MUNIANDY (1989) Glutathione S-transferase from diamondback moth. *Insect Biochem.* **19**: 435-443.
- BEALL, C., C. FYRBERG, S. SONG and E. FYRBERG (1992) Isolation of a *Drosophila* gene encoding glutathione S-transferase. *Biochem. Genet.* **30**: 517-527.
- BENDER, W., P. SPIERER and D.S. HOGNESS (1983) Chromosomal walking and jumping to isolate DNA from the Ace and rosy loci and the bithorax complex in *Drosophila melanogaster*. *J. Mol. Biol.* **168**: 17-23.
- BERANEK, A.P. (1974) Esterase variation and organophosphate resistance in populations of *Aphis fabae* and *Myzus persicae*. *Entomol. Exp. Appl.* **17**: 129-142.
- BLACKMAN, R.L., H. TAKADA and K. KAWAKAMI (1978) Chromosomal rearrangement involved in the insecticide resistance of *Myzus persicae*. *Nature* **271**: 450-452.
- BLOOMQUIST, J.R., D.M. SODERLUND and D.C. KNIPPLE (1989) Knockdown resistance to DDT and pyrethroid insecticides in the naps mutant of *Drosophila melanogaster* is correlated with reduced neuronal sensitivity. *Archs. Insect Biochem. Physiol.* **10**: 293-302.
- BLOOMQUIST, J.R., R.T. ROUSH and FRENCH-CONSTANT, R.H. (1991) Excitation of central neurons by dieldrin and picrotoxinin in susceptible and resistant *Drosophila melanogaster* (Meigen). *Pestic. Sci.* **32**: 463-469.
- BUSVINE, J.R. (1951) Mechanism of resistance to insecticide in houseflies. *Nature* **168**: 193-195.
- CARINO, F.A., J.F. KOENER, F.W. PLAPP Jr. and FEYEREISEN (1994) Constitutive overexpression of cytochrome P450 gene CYP6A1 in a house fly strain with metabolic resistance to insecticides. *Insect Biochem. Mol. Biol.* **24**: 411-418.
- CATTERALL, W.A. (1986) Molecular properties of voltage-sensitive sodium channels. *Ann. Rev. Biochem.* **55**: 953-985.
- CHAAIBI, H., D. FOURNIER, Y. FEDON, J.P. BOSSY, M. RAVALLEG, G. DEVAUCHELLE and M. CERUTTI (1994) Biochemical characterization of *Drosophila melanogaster* acetylcholinesterase expressed by recombinant baculoviruses. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **203**: 734-742.
- CLARK, A.G. and N.A. SHAMAAN (1984) Evidence that DDT-dehydrogenase from the housefly is a glutathione S-transferase. *Pestic. Biochem. Physiol.* **22**: 249-261.
- CLARK, A.G., N.A. SHAMAAN, M.D. SINCLAIR and W.C. DAUTERMAN (1986) Insecticide metabolism by multiple glutathione S-transferases in two strains of the house fly, *Musca domestica* (L.). *Pestic. Biochem. Physiol.* **25**: 169-175.
- COHEN, M.B., J.F. KOENER and R. FEYEREISEN (1994) Structure and chromosomal localization of CYP6A1, a cytochrome P450-encoding gene from the house fly. *Gene* **146**: 267-272.
- COHEN, M.B., M.A. SCHULER and M.R. BERENBAUM (1992) A host-inducible cytochrome P-450 from a host-specific caterpillar: molecular cloning and evolution. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**: 10920-10924.
- DELPUECH, J.-M., C.F. AQUADRO and R.T. ROUSH (1993) Non-involvement of the long terminal repeat of transposable element 17.6 in insecticide resistance in *Drosophila*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**: 5643-5647.
- DEVONSHIRE, A.L. (1977) The properties of a carboxylesterase from the peach potato aphid, *Myzus persicae* (Sulz.) and its role in conferring insecticide resistance. *Biochem. J.* **167**: 675-683.
- DEVONSHIRE, A.L. (1989) Insecticide resistance in *Myzus persicae*: from field to gene and back again. *Pestic. Sci.* **26**: 375-382.
- DEVONSHIRE, A.L. and L.M. FIELD (1991) Gene amplification

- and insecticide resistance. *Ann. Rev. Entomol.* **36**: 1–23.
- 23) DEVONSHIRE, A.L. and R.M. SAWICKI (1979) Insecticide-resistant *Myzus persicae* as an example of evolution by gene duplication. *Nature* **280**: 140–141.
 - 24) DEVONSHIRE, A.L. and G.D. MOORES (1982) A carboxylesterase with broad substrate specificity causes organophosphorus, carbamate and pyrethroid resistance in peach-potato aphids. *Pestic. Biochem. Physiol.* **18**: 235–246.
 - 25) DEVONSHIRE, A.L., G.D. MOORES and C. CHANG (1983) The biochemistry of insecticide resistance in the peach-potato aphid, *Myzus persicae*. In: *IUPAC Pesticide Chemistry, Human Welfare and the Environment*. (J. MIYAMOTO, P.C. KEARNEY, S. MATSUNAKA, D.H. HUTSON and S.D. MURPHY eds.) New York, USA: Pergamon, pp. 191–196.
 - 26) DONG, K. and J.G. SCOTT (1994) Linkage of kdr-type resistance and the para-homologous sodium channel gene in German cockroaches. *Insect Biochem. Molec. Biol.* **24**: 647–654.
 - 27) DONN, G., E. TISCHER, J.A. SMITH and H.M. GOODMAN (1984) Herbicide resistant alfalfa cell: an example of gene amplification in plant. *J. Mol. Appl. Genet.* **2**: 621–635.
 - 28) EVANS, E. and F. MATSUMURA (1991) Stimulation of protein phosphorylation in intact rat brain synaptosomes by a pyrethroid insecticide, deltamethrin. *Pestic. Biochem. Physiol.* **39**: 182–195.
 - 29) FARNHAM, A.W., A.W.A. BROWN, R.M. SAWICKI, I. DENHPLM and J.C. WHITE (1987) Characterization of the structure-activity relationship of kdr and two variants of super kdr to pyrethroids in the housefly. *Pestic. Sci.* **19**: 209–202.
 - 30) FEYEREISEN, R., J.F. KOENER, D.E. FARNSWORTH and D.W. NEBERT (1989) Isolation and sequence of cDNA encoding a cytochrome P-450 from an insecticide resistant strain of the house fly, *Musca domestica*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**: 1465–1469.
 - 31) FFRENCH-CONSTANT, R.H. and R.T. ROUSH (1991) Gene mapping and cross-resistance in cyclodiene insecticide-resistant *Drosophila melanogaster* (Mg.). *Genet. Res. Camb.* **57**: 17–21.
 - 32) FFRENCH-CONSTANT, R.H. and T. ROCHELEAU (1992) *Drosophila* cyclodiene resistance gene shows conserved genomic organization with vertebrate-aminobutyric acid A receptors. *J. Neurochem.* **59**: 1562–1565.
 - 33) FFRENCH-CONSTANT, R.H., D.L. DEVONSHIRE and R.P. WHITE (1988) Spontaneous loss and reselection of resistance in extremely resistant *Myzus persicae* (SULZER). *Pestic. Biochem. Physiol.* **30**: 1–10.
 - 34) FFRENCH-CONSTANT, R.H., D.P. MORTLOCK, C.D. SHAFFER, R.J. MACINTYRE and R.T. ROUSH (1991) Molecular cloning and transformation of cyclodiene resistance in *Drosophila*: an invertebrate GABA_A receptor locus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**: 7209–7213.
 - 35) FFRENCH-CONSTANT, R.H., R.T. ROUSH, D. MORTLOCK and G.P. DIVELY (1990) Isolation of dieldrin resistance from field populations of *Drosophila melanogaster*. *J. Econ. Entomol.* **83**: 1733–1737.
 - 36) FFRENCH-CONSTANT, R.H. (1994) The molecular and population genetics of cyclodiene insecticide resistance. *Insect Biochem. Molec. Biol.* **24**: 335–345.
 - 37) FIELD, L.M. A.L. DEVONSHIRE and G. FORDE (1988) Molecular evidence that insecticide resistance in peach-potato aphids (*Myzus persicae* Sulz.) results from amplification of an esterase gene. *Biochem. J.* **251**: 309–312.
 - 38) FIELD, L.M., A.L. DEVONSHIRE, R.H. FFRENCH-CONSTANT and B.G. FORDE (1989) Changes in DNA methylation are associated with loss of insecticide resistance in the peach-potato aphid, *Myzus persicae* (Sulz.). *FEBS Letts.* **243**: 323–327.
 - 39) FIELD, L.M., M.S. WILLIAMSON, G.D. MOORES and A.L. DEVONSHIRE (1993) Cloning and analysis of the esterase genes conferring insecticide resistance in the peach-potato aphid, *Myzus persicae* (SULZER). *Biochem. J.* **294**: 569–574.
 - 40) FOGEL, S. and J.W. WELCH (1982) Tandem gene amplification mediates copper resistance in yeast. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **79**: 5342–5346.
 - 41) FOOTE, S.J., J.K. THOMPSON, A.F. COWMAN and D.J. KEMP (1989) Amplification of the multidrug resistance gene in some chloroquine-resistant isolates of *P. falciparum*. *Cell* **57**: 921–930.
 - 42) FOURNIER, D. and A. MUETRO (1994) Modification of acetylcholinesterase as a mechanism of resistance to insecticides. *Comp. Biochem. Physiol.* **108C**: 19–31.
 - 43) FOURNIER, D., A. MUETRO and D. RUNGGER (1992) *Drosophila* acetylcholinesterase, expression of a functional precursor in *Xenopus* oocytes. *Eur. J. Biochem.* **203**: 513–519.
 - 44) FOURNIER, D., J.B. BERGE, M.L. CARDOS DE ALEIDA and C. BORDIER (1988) Acetylcholinesterase from *Musca domestica* and *Drosophila melanogaster* brain are linked to endogenous phospholipase. *J. Neurochem.* **50**: 1158–1163.
 - 45) FOURNIER, D., J.M. BRIDE, C. MOUCHES, M. RAYMOND, M. MAGNIN, J.-M. BERGE, N. PASTEUR and G.P. GEORGHIOU (1987) Biochemical characterization of the esterase A1 and B1 associated with organophosphate resistance in the *Culex pipiens* L. complex. *Pestic. Biochem. Physiol.* **27**: 211–217.
 - 46) FOURNIER, D., J.M. BRIDE, F. KARCH and J.B. BERGE (1988) Acetylcholinesterase from *Drosophila melanogaster*: identification of two subunits encoded by the same gene. *FEBS Letts.* **238**: 333–337.
 - 47) FOURNIER, D., J.M. BRIDE, M. POIRIE, J.-B. BERGE and F.W.

- PLAPP JR. (1992) Insect glutathione S-transferases, Biochemical characteristics of the major forms from houseflies susceptible and resistant to insecticides. *J. Biol. Chem.* **267**: 1840–1845.
- 48) GAMMON, D.W. (1980) Pyrethroid resistance in a strain of *Spodoptera littoralis* is correlated with decreased sensitivity of CNS *in vitro*. *Pestic. Biochem. Physiol.* **13**: 53–62.
- 49) GANGLEY, A.L., M. FORTE and T.L. ROSENBERRY (1987) Isolation and characterization of acetylcholinesterase from *Drosophila*. *J. Biol. Chem.* **262**: 13290–13298.
- 50) GAUSZ, J., L.M.C. HALL, A. SPIERER and P. SPIERER (1986) Molecular genetics of the rosy-Ace region of *Drosophila melanogaster*. *Genetics* **112**: 65–78.
- 51) GRANET, D.F., E.C. DIETZE and B.C. HAMMOCK (1991) Glutathione S-transferase isozymes in *Aedes aegypti*: Purification, characterization, and isozyme-specific regulation. *Insect Biochem.* **21**: 421–433.
- 52) GRAVEY, E.P. and J.K. SANTI (1986) Stable amplified DNA in drug-resistant *Leishmania* exists as extrachromosomal circles. *Science* **233**: 535–540.
- 53) HALL, J.C. and D.R. KANKEL (1976) Genetics of acetylcholinesterase in *Drosophila melanogaster*. *Genetics* **83**: 517–533.
- 54) HALL, L.M. and C.A. MALCOM (1991) The acetylcholinesterase gene of *Anopheles stephensi*. *Cell. Mol. Neurobiol.* **11**: 131–141.
- 55) HALL, L.M.C. and P. SPIERE (1986) The Ace locus of *Drosophila melanogaster*: structure gene for acetylcholinesterase with an unusual 5' leader. *EMBO J.* **5**: 2949–2954.
- 56) HAMA, H., T. IWATA, T. MIYATA and T. SAITO (1980) Some properties of acetylcholinesterase partially purified from susceptible and resistant green rice leafhoppers, *Nephotettix cincticeps* UHLER. *Appl. Entomol. Zool.* **15**: 249–261.
- 57) HAMA, H., Y. SATO and Y. KONO (1987) Decreased sensitivity of central nerve to fenvalerate in the pyrethroid-resistant diamondback moth, *Plutella xylostella* Linne. *Appl. Entomol. Zool.* **22**: 176–180.
- 58) HASS, R., T.C. MARSHALL and T.L. ROSENBERRY (1988) *Drosophila* acetylcholinesterase: demonstration of a glycoinositol phospholipid anchor and an endogenous proteolytic cleavage. *Biochemistry* **27**: 6453–6457.
- 59) HE, J.-S. and A.J. FULCO (1991) A barbiturate-regulated protein binding to a common sequence in the cytochrome P450 gene of rodents and bacteria. *J. Biol. Chem.* **266**: 7864–7869.
- 60) HOYER, R.F. and F.W. PLAPP (1968) Insecticide resistance in the housefly: identification of a gene that confers resistance to organotin insecticide and acts as an intensifier of parathion resistance. *J. Econ. Entomol.* **61**: 1269–1276.
- 61) KADOUS, A.A., S.M. GHIASUDDIN, F. MATSUMURA, J.G. SCOTT and K. TANAKA (1983) Difference in the picrotoxinin receptor between the cyclodiene-resistant and susceptible strains of the German cockroach. *Pestic. Biochem. Physiol.* **19**: 157–166.
- 62) KALOW, W. and R.O. DAVIS (1958) The activity of various esterase inhibitors towards atypical human serum cholinesterase. *Biochem. Pharmacol.* **1**: 183–192.
- 63) KATO, S., M. KOBAYASHI, A. MASUI and S. ISHIDA (1990) Relationships between insecticidal activity of 6-alkylthio 2-pyridyl methansulfonates and acetylcholinesterase inhibition of their sulfone derivatives against *Nephotettix cincticeps*. *J. Pestic. Sci.* **15**: 63–69.
- 64) KETTERMAN, A., S.H.P. PARAKRAMA KARUNARATNE, K.G. INDRANANDA JAYAWARDENA and J. HEMINGWAY (1993) Qualitative differences between populations of *Culex quinquefasciatus* in both the esterase A2 and B2 which are involved in insecticide resistance. *Pestic. Biochem. Physiol.* **47**: 142–148.
- 65) KNIPPLE, D.C., K.E. DOYLE, P.A. MARSELLA-HERRICK and D.M. SODERLUND (1994) Tight genetic linkage between the kdr insecticide resistance trait and a voltage-sensitive sodium channel gene in the house fly. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**: 2483–2487.
- 66) KOENER, J.F., F.A. CARINO and R. FEYEREISEN (1993) The cDNA and deduced protein sequence of house fly NADPH-cytochrome P450 reductase. *Insect. Biochem. Molec. Biol.* **23**: 439–447.
- 67) KONO, Y. and T. TOMITA (1992) Characterization of highly active carboxylesterase in insecticide-resistant *Culex pipiens quinquefasciatus*. *Jpn. J. Sanit. Zool.* **43**: 297–305.
- 68) KONO, Y. and T. TOMITA (1993) A role of highly active carboxylesterase in an organophosphorus insecticide resistant strain of *Culex pipiens molestus*. *Jpn. J. Sanit. Zool.* **44**: 15–21.
- 69) KONO, Y. and Y. SATO and Y. OKADA (1983) Activation of an O-ethyl S-n-propyl phosphorothiolate, TIA-230, in the central nerve of *Spodoptera* larvae. *Pestic. Biochem. Physiol.* **20**: 225–231.
- 70) KREJCI, F., N. DURAL, A. CHATONNET, P. VIMCES and J. MASSOULIE (1991) Cholinesterase-like domains in enzymes and structural proteins: functional and evolutionary relationships and identification of a catalytic essential aspartic acid. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**: 6647–6651.
- 71) KUGUMIYA, W., H. IKENAGA and K. SAIGO (1983) Close relationship between the long terminal repeats of avian leukosis-sarcoma virus and copia-like movable genetic elements of *Drosophila*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **80**: 3193–3197.
- 72) LAGADIC, L., A. GUANY, J.-B. BERGE and M. ECHIAUBARD (1993) Purification and partial characterization of glutathione S-transferase from insecticide-resistant and lindene-induced susceptible *Spodoptera littoralis* larvae. *Insect Biochem. Molec. Biol.* **23**: 467–474.
- 73) LENOIR-ROUSEAUX, J.J. (1985) Les arthropodes possèdent une

- membrane forme moléculaire majoritaire d'acétylcholinestérase. *C. R. Soc. Biol.* **179**: 741–747.
- 74) LIU, N., T. TOMITA and J.G. SCOTT (1994) Allele-specific PCR reveals that CYP6D1 is on chromosome 1 in the housefly, *Musca domestica*. *Experientia*. **51**: 164–167.
 - 75) LOCKRIDGE, O. and B.N. LA DU (1978) Comparison of atypical and usual human serum cholinesterase. *J. Biol. Chem.* **253**: 361–366.
 - 76) LOUGHNEY, K., R. KREBER and B. GANETZKY (1989) Molecular analysis of the para locus, a sodium channel gene in *Drosophila*. *Cell* **58**: 1143–1154.
 - 77) MAGNIN, M., E. MARBOUTIN and N. PASTEUR (1988) Insecticide resistance in *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) in West Africa. *J. Med. Entomol.* **25**: 99–104.
 - 78) MASSOULIE, J. and S. BON (1982) The molecular forms of cholinesterase and acetylcholinesterase in vertebrates. *Ann. Rev. Neurosci.* **5**: 57–106.
 - 79) MATSUMURA, F. and S.M. GHIASSUDINE (1983) Evidence for similarities between cyclodiene type insecticides and picrotoxinin in their action mechanisms. *J. Environ. Sci. Hlth. B* **18**: 1–14.
 - 80) METCALF, R.L. and R.B. MARCH (1953) Further studies on the mode of action of organic thionophosphate insecticides. *Ann. Entomol. Soc. Amer.* **46**: 63–68.
 - 81) MILLER, T.A., J.M. KENNEDY and C. COLLINS (1979) CNS insensitivity to pyrethroids in the resistant *kdr* strain of houseflies. *Pestic. Biochem. Physiol.* **12**: 224–230.
 - 82) MIYATA, T., T. SAITO and K. YASUTOMI (1984a) Degradation of ¹⁴C-malathion in vitro by *Culex pipiens quinquefasciatus* strains resistant and susceptible to malathion. *Jpn. J. Sanit. Zool.* **35**: 103–107.
 - 83) MIYATA, T., T. SAITO and K. YASUTOMI (1984b) High malathion degradation in malathion resistant *Culex pipiens quinquefasciatus*. *Jpn. J. Sanit. Zool.* **35**: 103–107.
 - 84) MOTOYAMA, N. and W.C. DAUTERMAN (1980) Glutathione S-transferase. Their role in the metabolism of organophosphorus insecticides. *Rev. Biochem. Toxicol.* **2**: 49–69.
 - 85) MOTOYAMA, N., W.C. DAUTERMAN and F.W. PLAPP (1977) Genetic studies on glutathione-dependent reactions in resistant strains of the housefly, *Musca domestica* L. *Pestic. Biochem. Physiol.* **7**: 443–450.
 - 86) MOUCHES, C., M. MAGNIN, J.-M. BERGE, MONIQUE de SILVESTRI, V. BEYSSAT, N. PASTEUR and G.P. GEORGHIOU (1987) Overexpression of detoxifying esterases in organophosphate resistance in the *Culex pipiens* L. complex. *Pestic. Biochem. Physiol.* **27**: 211–217.
 - 87) MOUCHES, C., N. PASTEUR, J.B. BERGE, O. HYRIEN, M. RAYMOND, B. ROBERT DE SAINT VINCENT, MONIQUE DE SILVESTRI and G.P. GEORGHIOU (1986) Amplification of an esterase gene is responsible for insecticide resistance in a California *Culex* mosquito. *Science* **233**: 778–780.
 - 88) MOUCHES, C., Y. PAUPLIN, M. AGARWAL, L. LEMIEUX, M. HERZOG, M. ABADON, V. BEYSSAT-ARNAOUTY, O. HYRIEN, B. ROBERT DE SAINT VINCENT, G.P. GEORGHIOU and N. PASTEUR (1990) Characterisation of amplification core and esterase B1 gene responsible for insecticide resistance in *Culex*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**: 2574–2578.
 - 89) MUETRO, A. and D. FOURNIER (1992) Post-transcriptional modifications of *Drosophila* acetylcholinesterase, in vitro mutagenesis and expression in *Xenopus* oocytes. *J. Biol. Chem.* **267**: 1695–1700.
 - 90) MUETRO, A., M. PRALAVORIO, J.-M. BRIDE and D. FOURNIER (1994) Resistance-associated point mutations in insecticide-insensitive acetylcholinesterase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**: 5922–5926.
 - 91) MUETRO, A., M. PRALAVORIO, V. SIMEON and D. FOURNIER (1992) Catalytic properties of cholinesterases: importance of tyrosin 109 in *Drosophila* protein. *Neuroreport* **3**: 39–42.
 - 92) MULLIN, C.J. and J.G. SCOTT (1992) Biochemical basis for insecticide resistance classification and comparisons. In: *Molecular Basis of Insecticide Resistance Diversity among Insects* (C.J. MULLIN and J.G. SCOTT eds.), Washington D.C., USA: Amer. Chem. Soc., pp. 1–13.
 - 93) NACHMANSON, D. and I.B. WILSON (1951) The enzymic hydrolysis and synthesis of acetylcholine. *Adv. Enzymol.* **12**: 259–339.
 - 94) 中山 仁 (1990) Na⁺ チャンネル. 蛋白質・核酸・酵素 **35**: 774–783.
 - 95) NANCE, E., D. HEYSE, J. BRITTON-DAVIAN and N. PASTEUR (1990) Chromosomal characterization of the amplified esterase B1 gene in organophosphate-resistant *Culex pipiens quinquefasciatus* SAY (Diptera, culicidae). *Genome* **33**: 148–152.
 - 96) NARAHASHI, T. (1988) Molecular and cellular approaches to neurotoxicology: past, present and future. In: *Neurotox '88* (ed G.G. LUNT) Excerpta Medica, Amsterdam, pp. 269–288.
 - 97) NELSON, D.R., T. KAMATAKI, D.J. WAXMAN, F.P. GUERGERICH, R.W. ESTABROOK, R. FEYEREUSEN, P.J. GONZALEZ, M.J. COON, I.C. GUNSALUS, O. GOTOH, K. OKUDA and D.W. NEBERT (1993) The P450 superfamily: update on new sequences, gene mapping, accession numbers, early trivial names of enzymes, and nomenclature. *DNA Cell Biol.* **12**: 1–51.
 - 98) NICHOLSON, R.A. and T.A. MILLER (1985) Multifactorial resistance to transpermethrin in field-collected strains of tobacco budworm *Heliothis virescens* F. *Pestic. Sci.* **16**: 561–570.

- 99) NODA, M., S. SHIMIZU, T. TANABE, T. TAKAI, T. KAYANO, T. IKEDA, H. TAKAHASHI, H. NAKAYAMA, Y. KANAOKA, N. MINAMIMOTO, K. KANAGAWA, H. MATSUO, M.A. RAFTERY, T. HIROSE, S. INAYAMA, H. HAYASIDA, T. MIYATA and S. NUMA (1984) Primary structure of *Electrophorus electricus* sodium channel deduced from cDNA sequence. *Nature* **312**: 121-127.
- 100) OMER, S.M., G.P. GEORGHIOU and S.N. IRVING (1980) DDT/pyrethroid resistance inter-relationships in *Anopheles stephensi*. *Mosquito News* **40**: 200-209.
- 101) OPPENOOTH, F.J. (1985) Biochemistry and genetics of insecticide resistance. In: *Comprehensive insect physiology, Biochemistry and Pharmacology* (G.A. KERKUT and L.I. GILBERT eds.), Oxford, UK: Pergamon, Vol. 12, pp. 731-774.
- 102) OPPENOOTH, F.J., H.R. SMISSAERT, W. WELLING, L.J.T. VAN DER PAS and K.Y. HITMAN (1977) Insensitive acetylcholinesterase, high glutathione S-transferase and hydrolytic activity as resistance factors in a tetrachlorvinphos-resistant strain of house fly. *Pestic. Biochem. Physiol.* **7**: 34-47.
- 103) OSBORNE, M.P. and D.R. PEPPER (1993) Mechanisms of kdr and super kdr resistance. In: *Molecular Mechanisms of Insecticide Resistance*. (ed. C.M. MULLIN and J.G. SCOTT), American Chemical Society, Washington DC, pp. 71-89.
- 104) PASTEUR, N. and G. SINEGRE (1975) Esterase polymorphism and sensitivity to dursban organophosphorus insecticide in *Culex pipiens pipiens* populations. *Biochem. Genet.* **13**: 789-803.
- 105) PASTEUR, N., G.P. GEORGHIOU and A. ISEKI (1984) Variation in organophosphate resistance and esterase activity in *Culex quinquefasciatus* SAY from California. *Genet. Sel. Evol.* **16**: 271-284.
- 106) PASTEUR, N., A. ISEKI and G.P. GEORGHIOU (1981) Genetics and biochemical studies of the housefly active esterases A and B associated with organophosphate resistance in mosquitoes of the *Culex pipiens* complex. *Biochem. Genet.* **19**: 909-919.
- 107) PEPPER, D.R. and M.P. OSBORNE (1993) Electrophysiological identification of site-insensitive mechanisms in knockdown-resistant strains (*kdr*, *super kdr*) of the housefly larva. *Pestic. Sci.* **39**: 279-286.
- 108) PLAPP, F.W. Jr. (1984) The genetic basis of insecticide resistance in the house fly: evidence that a single gene locus play a major role in metabolic resistance to insecticide. *Pest. Biochem. Physiol.* **22**: 194-201.
- 109) PRALAVORIO, M. and D. FOURNIER (1992) *Drosophila* acetylcholinesterase: characterization of different mutants resistant to insecticides. *Biochem. Genet.* **30**: 77-83.
- 110) PRAPAIPONG, H., M.R. BERENBAUM and M.A. SCHULER (1994) Transcriptional regulation of the *Papilio polyxenes* CYP6B1 gene. *Nucleic. Aci. Res.* **22**: 3210-3217.
- 111) PRAPANTHADARA, L., J. HEMINGWAY and A. KETTERMAN (1993) Partial purification and characterization of glutathione S-transferase involved in DDT resistance from the mosquito *Anopheles gambiae*. *Pestic. Biochem. Physiol.* **47**: 119-133.
- 112) RANGARAJAN, P.N. and G. PANDMANABAN (1989) Regulation of cytochrome P-450b/e gene expression by an heme-abd phenobarbitone-modulated transcription factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**: 3963-3967.
- 113) RAYMOND, M. and N. PASTEUR (1989) The amplification of B1 esterase gene in the mosquito *Culex pipiens* is present in gametes. *Nucleic. Acid. Res.* **17**: 711.
- 114) RAYMOND, M., A. CALLAGHAN, P. FORTE and N. PASTEUR (1991) Worldwide migration of amplified insecticide resistance genes in mosquitoes. *Nature* **350**: 151-153.
- 115) RAYMOND, M., E. POULIN, V. BOIROUX, E. DUPONT and N. PASTEUR (1993) Stability of insecticide resistance due to amplification of esterase gene in *Culex pipiens*. *Heredity* **70**: 301-307.
- 116) REED, W.T. and A.J. FORGASH (1970) Metabolism of lindane to organic-soluble products by houseflies. *J. Agric. Chem.* **18**: 475-481.
- 117) REIDY, G.F., H.A. ROSE, S. VISETSON and M. MURRAY (1990) Increased glutathione S-transferase activity and glutathione content in an insecticide-resistant strain of *Tribolium castaneum*. *Pestic. Biochem. Physiol.* **36**: 269-276.
- 118) ROSENBERRY, T.L. (1975) Acetylcholinesterase. *Adv. Enzymol.* **43**: 103-218.
- 119) 齊藤 泉 (1991) DNA 増幅とゲノムの流動性. 細胞工学 **10** (S1): 94-102.
- 120) SALGADO, V.L., S.N. IRVING and T.A. MILLER (1983) Depolarization of motor nerve terminals by pyrethroids in susceptible and kdr-resistant house flies. *Pestic. Biochem. Physiol.* **20**: 100-114.
- 121) SALKOFF, L., A. BUTLER, A. WEI, N. SCAVARDA, K. GIFFER, C. IFUNE, K. GOODMAN and G. MANDEL (1987) Genomic organization and deduced amino acid sequence of a putative sodium channel gene in *Drosophila*. *Science* **237**: 744-749.
- 122) SAWICKI, R.M. (1978) Unusual response of DDT-resistant houseflies to carbinol analogues of DDT. *Nature* **275**: 443-444.
- 123) SAWICKI, R.M., A.L. DEVONSHIRE, R.W. PAYNE and S.M. PETZING (1980) Stability of insecticide resistance in the peach-potato aphid, *Myzus persicae* (SULZER). *Pestic. Sci.* **11**: 33-42.
- 124) SCHOFIELD, P.R., M.G. DARLISON, N. FUJITA, D.R. BURT, F.A. STEPHENSON, H. RODRIGUEZ, L.M. RHEE, J. RAMACHANDRAN, V. REALE, T.A. GLENCORSE, P.H. SEEBURG and E.A. BARNARD (1987) Sequence and functional expression of the GABA_A receptor shows a ligand-gated receptor super family. *Nature*

- 328: 221-227.
- 125) SCOTT, G.K., G.L. HEW and P.L. DAVIS (1985) Antifreeze protein genes are tandemly linked and clustered in the genome of the winter flounder. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **82**: 2613-2617.
 - 126) SCOTT, J.G. (1991) Insecticide resistance in insects. In: *Handbook of Pest Management* (D. PIMENTEL ed.), Boca Raton, Florida, USA: CRC Press, Vol. 2, pp. 663-677.
 - 127) SCOTT, J.G. and G.P. GEORGHIOU (1986) Mechanisms responsible for high levels of permethrin resistance in the house fly. *Pestic. Sci.* **17**: 195-206.
 - 128) SHAW, G.-C. and A.J. FULCO (1992) Barbiturate-mediated regulation of expression of the cytochrome P450_{BM-3} genes of *Bacillus megaterium* by Bm3R1 protein. *J. Biol. Chem.* **267**: 5515-5526.
 - 129) SHAW, G.-C. and A.J. FULCO (1993) Inhibition by barbiturates of the binding of Bm3R1 repressor to its operator site on the barbiturate-inducible cytochrome P450_{BM-3} gene of *Bacillus megaterium*. *J. Biol. Chem.* **268**: 2997-3004.
 - 130) STARK, G.R. and G.M. WAHL (1984) Gene amplification. *Ann. Rev. Biochem.* **53**: 447-491.
 - 131) STEEL, R.W. and B.N. SMALLMAN (1976) Acetylcholinesterase of the housefly head and affinity purification and subunit composition. *Biochem. Biophys. Acta.* **445**: 147-157.
 - 132) SUNDETH, S.S., S.J. KENNEL and L.C. WATERS (1989) Monoclonal antibodies to resistance-related forms of cytochrome P450 in *Drosophila melanogaster*. *Pestic. Biochem. Physiol.* **33**: 176-188.
 - 133) TAKADA, H. (1979) Esterase variation in Japanese populations of *Myzus persicae* (SULZER) (Homoptera: Aphididae), with specific reference to resistance to organophosphorus insecticides. *Appl. Entomol. Zool.* **14**: 245-255.
 - 134) TAKAHASHI, M. and K. YASUTOMI (1987) Insecticidal resistance of *Culex tritaeniorhynchus* (Diptera: Culicidae) in Japan: genetics and mechanisms of resistance to organophosphorus insecticides. *J. Med. Entomol.* **24**: 595-603.
 - 135) TANAKA, K., J.G. SCOTT and F. MATSUMURA (1984) Picrotoxinin receptor in the central nervous system of the American cockroach: Its role in the action of cyclodiene-type insecticides. *Pestic. Biochem. Physiol.* **22**: 117-127.
 - 136) TANAKA, K., M. NAKAJIMA and N. KURIHARA (1981) The mechanism of resistance to lindane and hexadeutrated lindane in the third Yumenoshima strain of house fly. *Pestic. Biochem. Physiol.* **16**: 149-157.
 - 137) TAYLOR, M.F.J., D.G. HECKEL, T.M. BROWN, M.E. KREITMAN and B. BLACK (1993) Linkage of pyrethroid insecticide resistance to sodium channel locus in the tobacco budworm. *Insect Biochem. Molec. Biol.* **23**: 763-775.
 - 138) THOMPSON, M., F. SHOTKOSKI and FRENCH-CONSTANT (1993a) Cloning and sequencing of the cyclodiene insecticide resistance gene from the yellow fever mosquito *Aedes aegypti*. *FEBS Lett.* **325**: 187-190.
 - 139) THOMPSON, M., J.C. STEICHEN and FRENCH-CONSTANT (1993b) Conservation of cyclodiene insecticide resistance associated mutations in insects. *Insect Molec. Biol.* **2**: 149-154.
 - 140) TOMITA, T. and J.G. SCOTT (1995) cDNA and deduced protein sequence of CYP6D1: the putative gene for a cytochrome P450 responsible for pyrethroid resistance in house fly. *Insect Biochem. Mol. Biol.* **25**: 275-283.
 - 141) TOMITA, T., T. SHIMADA and Y. KONO (1993) Amplified carboxylesterase-B gene responsible for insecticide resistance in *Culex pipiens molestus*. In: *Pesticides Environment: Molecular Biological Approach* (T. MITSUI, F. MATSUMURA and Y. YAMAMOTO eds.), Tokyo, Japan: Pestic. Sci. Soc. Jpn., pp. 123-133.
 - 142) TOUNG, Y.-P., T.-S. HSIEH and C.-P.D. TU (1990) *Drosophila* glutathione S-transferase 1-1 shows a region of sequence homology with the maize glutathione S-transferase III. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**: 31-35.
 - 143) TSUKAMOTO, M. (1983) Methods of genetic analysis of insecticide resistance. In: *Pest Resistance to Pesticides* (G.P. GEORGHIOU and T. SAITO eds.), New York, USA: Plenum, pp. 71-98.
 - 144) TSUKAMOTO, M., T. NARAHASHI and T. YAMASAKI (1965) Genetic control of low nerve sensitivity to DDT in insect resistant houseflies. *Botyu-Kagaku* **31**: 1-14.
 - 145) UMEDA, K., T. YANO and M. HIRANO (1988) Pyrethroid-resistance mechanism in German cockroach, *Blattella germanica*. *Appl. Entomol. Zool.* **23**: 373-380.
 - 146) VAUGHAN, A., M. RODRIGUEZ and J. HEMINGWAY (1995) The independent gene amplification of electrophoretically indistinguishable B esterases from the insecticide-resistant monquito *Culex quinquefasciatus*. *Biochem. J.* **305**: 651-658.
 - 147) WANG, J.-Y., S. McCOMMAS and M. SYVANEN (1991) Molecular cloning of a glutathione S-transferase overproduced in an insecticide-resistant strain of the housefly. *Mol. Gen. Genet.* **227**: 260-266.
 - 148) WATERS, L.C., A.C. ZELHOF, B.J. SHAW and L.-Y. CHANG (1992) Possible involvement of the long terminal repeat of transposable element 17.6 in regulating expression of an insecticide resistance-associated P450 gene in *Drosophila*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**: 4855-4859.
 - 149) WATERS, L.C. and C.E. NIX (1988) Regulation of insecticide resistance-related cytochrome P-450 expression in *Drosophila melanogaster*. *Pestic. Biochem. Physiol.* **30**: 214-227.
 - 150) WHELOCK, G.D. and J.G. SCOTT (1990) Immunological de-

- tection of cytochrome P450 from insecticide resistant and susceptible house flies (*Musca domestica*). *Pestic. Biochem. Physiol.* **38**: 130-139.
- 151) WHEELLOCK, G.D. and J.G. SCOTT (1992) The role of cytochrome P450_{br} in deltamethrin metabolism by pyrethroid resistant and susceptible strains of houseflies. *Pestic. Biochem. Physiol.* **43**: 67-77.
- 152) WILLIAMSON, M.S., I. DENHOLM, C.A. BELL and A.L. DEVONSHIRE (1993) Knockdown resistance (kdr) to DDT and pyrethroid insecticides maps to a sodium channel gene locus in the housefly. *Mol. Gen. Genet.* **240**: 17-22.
- 153) YASUTOMI, K. (1970) Studies on organophosphate-resistance and esterase activity in the mosquitoes of the *Culex pipiens* group. *Jpn. J. Sanit. Zool.* **21**: 41-45.
- 154) YASUTOMI, K. (1983) Role of detoxication esterases in insecticide resistance. In: *Pest Resistance to Pesticides* (eds, GEORGHIOU, G.P. and SAITO, T.) Plenum Press, New York and London, pp. 249-263.
- 155) ZANG, H.-G., FFRENCH-CONSTANT and M.B. JACKSON (1994) A unique amino acid of the *Drosophila* GABA receptor influences drug sensitivity by two mechanisms. *J. Physiol.* in press.
-