

学会賞受賞論文

(奨励賞)

細胞内カルシウム動態のかく乱を特徴とする殺虫作用機構の研究

正 木 隆 男 *

日本農薬株式会社

(平成 20 年 5 月 20 日受理)

Keywords: flubendiamide, ryanodine receptor, insecticide, Ca^{2+} pump.

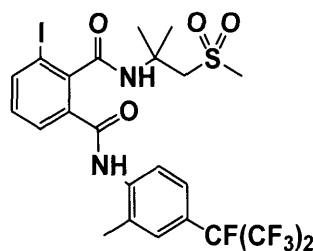
はじめに

細胞が発現する多くの機能は細胞内 Ca^{2+} により調節され、これを可能とするため、定常状態の細胞内 Ca^{2+} を低濃度に保つ仕組みが存在する。 Ca^{2+} の恒常性を維持するこの仕組みは、 Ca^{2+} を選択的に透過する Ca^{2+} チャネルや Ca^{2+} を輸送する Ca^{2+} ポンプなど、多様な制御因子により支えられ、これら因子が機能的に連関することにより達成される。こうした、生理的な重要性から細胞内 Ca^{2+} 動態をかく乱する化合物が農薬、特に殺虫剤となる可能性は既に複数の研究者により指摘されてきたが¹⁻³⁾、リアノジンを含有する豆科植物根抽出物が農薬として利用された例 (Ryania, 1997 年 EPA 登録失効) を除けば、今日までその具体例はなかった。フルベンジアミド (Fig. 1) は日本農薬株により独自に創出され、鱗翅目昆虫に対して高い防除活性を有する新規殺虫化合物である⁴⁾。本研究の結果、フルベンジアミドは小胞体膜上に存在する細胞内 Ca^{2+} 制御因子であるリアノジン受容体 (リアノジン感受性 Ca^{2+} 放出チャネル, RyR) を特異

的に活性化することにより殺虫効果を発現することが明らかとなった^{5,6)}。以下、フルベンジアミドの作用機構を例に Ca^{2+} 動態のかく乱による殺虫作用について概説する。

1. フルベンジアミドの作用症状

フルベンジアミドを処理した昆虫は、虫体の持続的な体収縮や嘔吐、脱糞などの特徴的な症状を示す (Fig. 2)⁴⁾。同様の症状は RyR の特異的な機能修飾物質であるリアノジンを処理したハスモンヨトウにおいても観察された。フルベンジアミドを処理されたハスモンヨトウは、この時点ではまだ生きており、刺激に対する応答も観察されるが、摂食行動を始めとする統制された行動は不可能である。このような症状は既存の殺虫剤によるものとは明らかに異なるもので、化合物の特異的な作用を反映したものと考えられた⁴⁾。また、これらの症状は持続的な筋肉の収縮によるものであると考えられた。



Flubendiamide

Fig. 1. Chemical structure of flubendiamide.

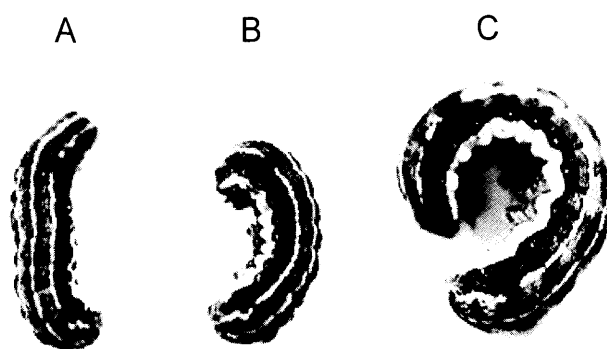


Fig. 2. Symptoms of sixth-instar larvae of *Spodoptera litura* observed 24 hr after injection. A: 0.24 μg flubendiamide, B: 2.4 μg Ryanodine, C: control.

* 〒 586-0094 大阪府河内長野市小山田町 345

E-mail: masaki-takao@nichino.co.jp

© Pesticide Science Society of Japan

2. Ca^{2+} ポンプの特異的亢進作用

さらにフルベンジアミドの作用を解明するため、種々の作用点に対する影響について検討していく過程において、筋肉収縮を支配する細胞内 Ca^{2+} 制御因子、 Ca^{2+} ポンプが化合物により特異的に亢進することを見出した。 Ca^{2+} ポンプは小胞体膜上に存在し、細胞質から小胞体に Ca^{2+} を汲み上げる働きを担う。この Ca^{2+} 輸送は ATP の加水分解と共役していることから、 Ca^{2+} 依存的な ATP の加水分解の結果生成する無機リン酸量を測定することにより、 Ca^{2+} ポンプ活性を知ることが可能である。Fig. 3 に示す様に、フルベンジアミドは Ca^{2+} ポンプ活性を明らかに亢進し、その EC_{50} 値は 10 nM であった⁶⁾。一方でハスモンヨトウ中枢神経系細胞外電位や、アセチルコリンエステラーゼ活性には影響を示さなかった。また、同様の作用は他の RyR 機能修飾物質であるリアノジンやカフェインでも認められたが、これらに比較しフルベンジアミドの作用は明らかに顕著であり、本化合物の特異性を示すものと考えられた⁶⁾。さらにフルベンジアミドおよびその類縁化合物を用い、 Ca^{2+} ポンプ亢進活性における EC_{50} 値と殺虫活性における LC_{50} 値の相関性について検証した結果、極めて良好な相関性を示した。これらの結果から、本化合物は細胞内 Ca^{2+} 動態に対し特異的な影響を及ぼすことにより、殺虫活性を発現することが示唆された。

3. 細胞内カルシウムへの影響

定常状態の細胞内 Ca^{2+} は細胞内小器官である小胞体内に

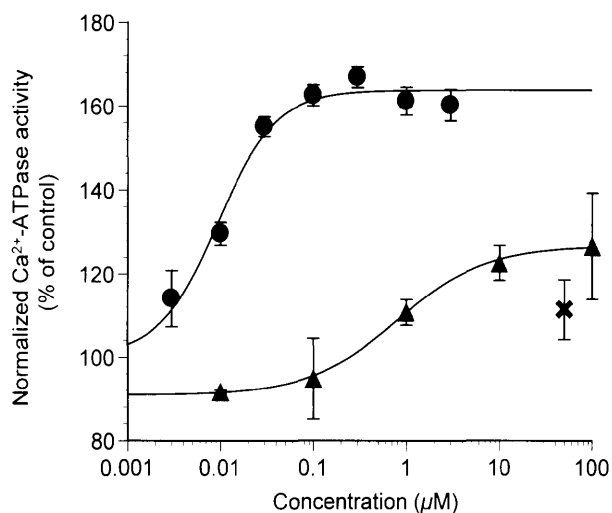


Fig. 3. Effect of flubendiamide (●), ryanodine (▲) and caffeine (×) on Ca^{2+} -ATPase activity of the membrane preparation. Assays were performed in Ca^{2+} -ATPase assay solution containing 50 μM free Ca^{2+} . Activity was determined by Pi production over 20 min at 25°C. Data represent the mean $\pm$ S.D. of quadruplicate samples. The ordinate axis shows ATPase activity in the presence of flubendiamide normalized to control activity.

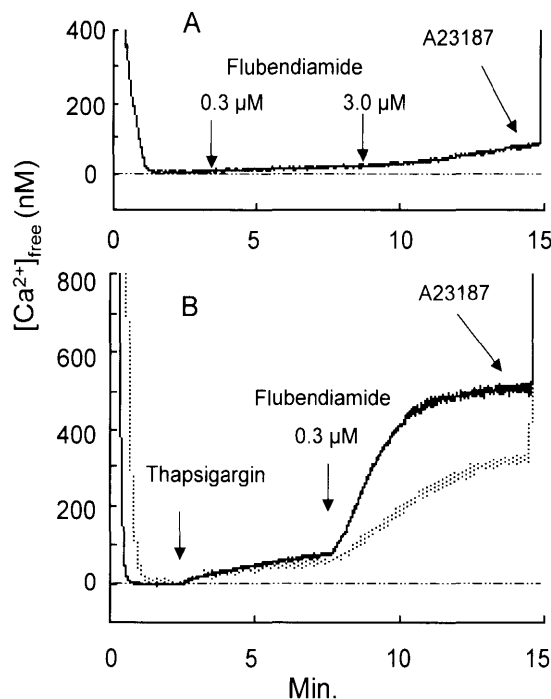


Fig. 4. Calcium release from the insect membrane preparation induced by flubendiamide. To load calcium into the vesicles, 1 mM ATP was added at time 0. A, outervesicular Ca^{2+} was monitored in the presence of 3 mM Mg^{2+} . Flubendiamide was added after calcium sequestration was completed. Residual Ca^{2+} in the vesicles was released by the addition of 2 μM A23187. B, outervesicular Ca^{2+} was monitored in the presence of 3 mM (solid line) or 10 mM (dashed line) Mg^{2+} . After calcium sequestration had been completed, the Ca^{2+} pump was inhibited by the addition of 0.4 μM thapsigargin; thereafter, flubendiamide was added. Residual Ca^{2+} in the vesicles was released by 2 μM A23187.

蓄えられ、細胞の活性化に伴う Ca^{2+} 放出チャネルの開閉により細胞質へと放出される。まず、化合物による小胞体からの Ca^{2+} 放出過程への影響について検討するため、ハスモンヨトウ骨格筋膜画分（小胞体画分）を用いた Ca^{2+} 放出実験を実施した⁶⁾。図 4 に示す様に、筋組織より調製した小胞体膜に Ca^{2+} ポンプ活性を利用して Ca^{2+} を能動的に取り込ませた後、フルベンジアミドを処理した結果、顕著な Ca^{2+} 放出作用が確認された⁶⁾。この結果は、本化合物が小胞体からの Ca^{2+} の放出に介在する Ca^{2+} 放出チャネル、リアノジン受容体を活性化することを示唆した。しかし、この実験ではフルベンジアミドによる Ca^{2+} 放出を観察するには、 Ca^{2+} の取り込みが完了した後に、 Ca^{2+} ポンプの阻害剤であるタプシガルギンの処理が必要であった⁶⁾。この結果はフルベンジアミドにより活性化された RyR を介して Ca^{2+} が放出されることにより、同時に Ca^{2+} ポンプ活性が亢進し再び小胞内へ汲み上げられていることを示唆した (Fig. 4, Fig. 5)。

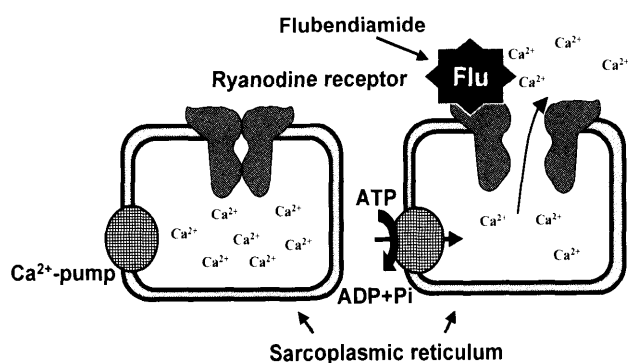


Fig. 5. Schematic illustration of RyR-mediated stimulation of Ca^{2+} -pump activity by flubendiamide.

4. リアノジン受容体との分子間相互作用

Ca^{2+} 放出チャネルである RyR がこうした特徴的な作用症状や異常な Ca^{2+} 放出に関与するとすれば、フルベンジアミドの結合によりリアノジン受容体分子のコンフォメーションに何らかの変化が生じるはずである。 ^3H -リアノジンをを用いた結合アッセイはコンフォメーション変化を直接捉える生化学的手法として、簡便かつ有効である。これは、受容体上のリアノジン結合部位がチャネルのポア領域に位置するために、チャネルの開閉状態がリアノジンの結合親和性に変化をもたらすいわゆるアロステリック効果に基づいた手法である。例えば、 Ca^{2+} や ATP による RyR の活性化により、ハスモンヨトウより調製した膜画分に対する ^3H -リアノジンの結合は明らかに増加する一方、EGTA の存在下で系内の Ca^{2+} イオンを除くと、結合はほぼ完全に消失する。このような ^3H -リアノジンの結合はフルベンジアミドにより増加し (Fig. 6), 300 nM 以上の濃度であれば、 Ca^{2+} の影響を受けない⁵⁾。すなわち、フルベンジアミドはリアノジン受容体コンフォメーションを開閉状態へシフトさ

せることにより、 Ca^{2+} の放出を誘起することが明らかとなった。

さらに、フルベンジアミドと RyR との特異的な相互作用の詳細を明らかにするための手法として、 ^3H -フルベンジアミドを用いたリガンド結合アッセイ法を確立し、ハスモンヨトウ幼虫骨格筋膜画分に対する特異的結合の検出を試みると同時に、結合の薬理学的特徴について検討した。 ^3H -フルベンジアミドはハスモンヨトウ骨格筋膜画分に対し特異的に結合し、その結合は一種類であり、解離定数 (K_d) は 7 nM であった。これは、 Ca^{2+} ポンプ亢進作用における EC_{50} 値とほぼ一致した。さらにフルベンジアミドの結合は、他の類縁化合物により競合的に阻害を受け、その IC_{50} 値から推定された類縁化合物のフルベンジアミド結合部位への親和性は殺虫活性と高い相関性を示した。これらの結果は、フルベンジアミド結合部位への結合親和性が、本化合物の本質的な生理活性を規定していることを示すものと考えられる。 ^3H -フルベンジアミドの結合はリアノジンを始め、cADP-ribose、カフェイン、ATP、ルテニウムレッドといった既知の RyR 機能修飾物質による阻害を受けることはなく、フルベンジアミド特有の結合部位が昆虫 RyR 上に存在するものと考えられた。

5. リアノジン受容体 (RyR)

RyR の生理的な役割は発現する組織により異なり、例えば筋組織においては、RyR を介した Ca^{2+} 放出は筋収縮の導引として作用する。RyR の活性は主に膜電位および Ca^{2+} 濃度により制御され、これら以外にもアクセサリータンパク (カルモジュリン、FKBP、カルシニューリン、PKA)、ATP、cADP-リボース、活性チオール基の酸化還元等による機能修飾が知られている⁷⁾。また、数多くの外因性作用分子が報告されており、とくに本研究において用いた ^3H -ryanodine

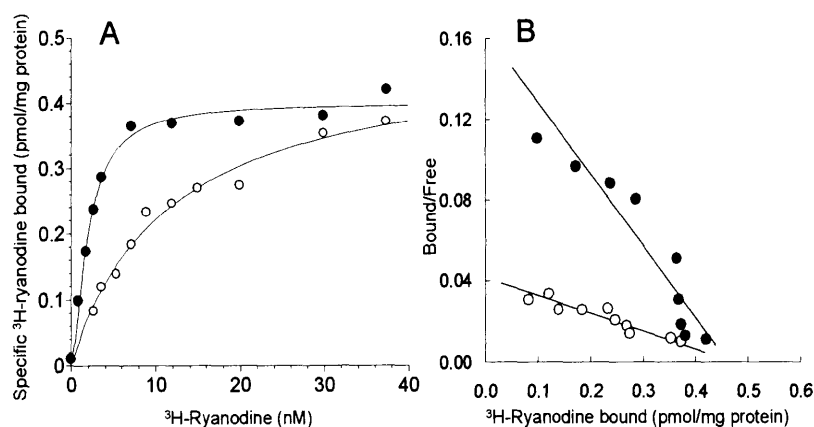


Fig. 6. Effect of flubendiamide on [^3H]-ryanodine binding to the insect membrane preparation. Saturation kinetics (A) and Scatchard transformation (B) of ^3H -ryanodine binding in the presence (●: K_d , 3.1 ± 0.1 nM, $B_{\max}$, 0.54 ± 0.057 pmol/mg protein) and the absence (○: K_d , 15 ± 0.06 nM, $B_{\max}$, 0.47 ± 0.06 pmol/mg protein) of flubendiamide (1 μM). Binding was equilibrated in binding solution containing 1 mM calcium. Results are expressed as the means of three preparations.

は, RyR 機能修飾物質の作用を解析するための結合アッセイにおけるリガンドとして重要な役割を果たした⁷⁾. この結合アッセイは殺虫剤の標的となる昆虫由来の分子種に対しても応用され, Casida らは ³H-リアノジンの特異的結合が, イエバエやゴキブリなどの昆虫にも存在することを明らかにし⁸⁾, さらに Scott-Ward らは脂質平面膜法によるチャンネル活性の測定により, 鱗翅目昆虫 RyR の基本的な機能を検証し, カフェインに対する非感受性など, 昆虫 RyR 特有の薬理学的特長を明らかにした⁹⁾. 昆虫 RyR のクローニングは先ず, ショウジョウバエで成功し¹⁰⁾, その後, *Heliothis*-RyR の部分的なクローニング³⁾ が報告されていたが, 最近まで鱗翅目昆虫 RyR の機能的な発現には至っていなかった. 近年, カイコ RyR 全長のクローニングと機能的発現の報告がなされ, 今後の分子生物学的な手法を用いたフルベンジアミド殺虫機構解明の飛躍的な前進が期待される¹¹⁾.

6. 選択的作用

RyR の開口状態への固定は昆虫と同様に哺乳類においても極めて重篤な影響を示すと考えられる. これはリアノジンを哺乳動物に投与することにより, 極めて強い急性毒性を示し, 拘縮や嘔吐, 脱糞など昆虫とよく一致した症状が観察されることから明らかである¹²⁾. 一方, フルベンジアミドの場合, 哺乳動物への投与による急性毒性はこれまで認められていない. 哺乳類には骨格筋型 (Type-1), 心筋型 (Type-2), 脳型 (Type-3) の極めて相同性の高い3分子種の存在が知られており, リアノジンは何れの分子種に対しても同等の作用を示す⁶⁾. これは, リアノジン高親和性結合ドメインがこれらの RyR 分子種に保存されているため, このドメインは昆虫, 線虫など幅広い動物種での存在が確認されている. 一方, フルベンジアミドの正確な結合部位については現在のところ明らかではないが, フルベンジアミドをリガンドとして用いた結合アッセイの結果からは, フルベンジアミド結合部位は少なくとも哺乳類 RyR-1 には存在しないようである. すなわち, フルベンジアミドに選択的に親和性を示す特有の結合部位が, 作用における選択性に関与しているものと考えられる. 因みに, 鱗翅目昆虫である *Heliothis* 由来の RyR と哺乳類 RyR (Type-1, Type-2, Type-3) との相同性は 47.9~50.1% であり, 基本的なドメイン構造は保持されているものの, Ca^{2+} 高親和性結合部位が, 欠落しているなどの相違が確認されている²⁾. RyR は 500 kDa を超えるサブユニットが4量体をなす巨大分子であり, その分子上には種々の機能修飾部位が存在することから, フルベンジアミドの結合部位を確定することは選択的作用を理解する上で重要と思われる. さらに, フルベンジアミドとは異なる, 潜在的な殺虫剤標的部位の存在の可能性も残されている.

7. 今後の展望

本研究の結果, フルベンジアミドが昆虫リアノジン受容体を選択的に活性化することにより殺虫作用を示すことが明らかとなった. これらの知見は, フルベンジアミドが RyR を標的分子とする新たな作用機構を有する殺虫剤であることを示すと同時に, RyR が特定の害虫種に対する高度な選択性と哺乳類に対する安全性を兼ね備えた殺虫剤の有効な標的分子となることを示す証左と考えられる. 他の昆虫類における RyR の構造解析が進めば, アッセイ技術との組み合わせにより, 鱗翅目以外の害虫種を選択的に防除する新たな選択性殺虫剤の創出にも繋がるものと期待される. さらに, 本化合物の昆虫 RyR への結合は極めて低濃度 (ナノモルレベル) から観察され, RyR のプローブとしては特筆すべき親和性を示すことから, 今後, 結合部位の三次元構造決定や機能解析を通じ, RyR における新たな活性調節機構の解明など基礎科学分野での貢献も期待される.

謝 辞

本研究の一部は, Bayer CropScience AG および, 京都大学工学部森研究室との共同研究として実施された. 本研究成果に多大な貢献をなした, 京都大学工学部, 泰生教授, 清中茂樹博士, 加藤健太氏および Bayer CropScience AG, Dr. Ulrich Ebbinghaus-Kintscher, Dr. Peter Lümnen らに心より感謝の意を表する. また, 本研究において終始, ご指導, ご鞭撻を頂いた日本農薬総合研究所の諸氏に厚く御礼申し上げます.

引用文献

- 1) E. Lehmborg and J. E. Casida: *Pestic. Biochem. Physiol.* **48**, 145-152 (1994).
- 2) E. Puente, M. Suner, A. D. Evans, A. R. McCaffery and J. D. Windass: *Insect Biochem. Mol. Biol.* **30**, 335-347 (2000).
- 3) A. Waterhouse, I. Pessah, A. Francini and J. E. Casida: *J. Med. Chem.* **30**, 710-716 (1987).
- 4) M. Tohnishi, H. Nakao, T. Furuya, A. Seo, H. Kodama, K. Tsubata, S. Fujioka, H. Kodama, T. Hirooka and T. Nishimatsu: *J. Pestic. Sci.* **30**, 354-360 (2005).
- 5) U. Ebbinghaus-Kintscher, P. Lümnen, N. Lobitz, T. Schulte, C. Funke, R. Fischer, T. Masaki, N. Yasokawa and M. Tohnishi: *Cell Calcium* **39**, 21-33 (2006).
- 6) T. Masaki, N. Yasokawa, M. Tohnishi, T. Nishimatsu, K. Tsubata, K. Inoue, K. Motoba and T. Hirooka: *Mol. Pharmacol.* **65**, 1733-1739 (2006).
- 7) M. Fill and J. A. Copello: *Physiol. Rev.* **82**, 893-922 (2002).
- 8) I. N. Pessah, A. L. Waterhouse and J. E. Casida: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **128**, 449-456 (1985).
- 9) T. S. Scott-Ward, S. J. Dunbar, J. D. Windass and A. J. Williams: *J. Membr. Biol.* **179**, 127-141 (2001).
- 10) H. Takeshima, M. Nishi, N. Iwabe, T. Miyata, T. Hosoya, I. Masai and Y. Hotta: *FEBS Lett.* **337**, 81-87 (1994).

- 11) K. Kato, S. Kiyonaka, E. Mori, T. Masaki, N. Yasokawa, H. Hamaguchi, Y. Mori: *J. Pharmacol. Sci* **100**, Suppl. 1, 181 (2006).

略 歴

正木隆男

生年月日：昭和 42 年 7 月 3 日

最終学歴：東京農工大学農学研究科修士課程卒

研究テーマ：殺虫剤作用機構研究，農薬開発研究

趣味：登山，スキー