

特集：次世代農業への挑戦—抵抗性機構の解明と環境調和型殺虫剤の開発—

昆虫リアノジン受容体をターゲットとする 新たな殺虫剤の開発

日本農業株式会社総合研究所 まさき 木 隆 男

はじめに

農業の作用分子はその選択性や安全性を決定する要因の一つであり、作用分子を明らかにすることで、抵抗性回避や化学構造の最適化につながる、有用な知見を得ることが期待される。しかし、通常の農業は、系統的な化学合成と個体レベルでのスクリーニングから創出されるため、開発初期段階において、その作用機構を詳細に把握することは困難なケースが多い。フルベンジアミド(図-1)は従来の探索手法により見いだされた新規殺虫剤であるが、開発初期段階から作用機構の解明に向けた研究が進められ、その結果、農業としては初めてリアノジン感受性カルシウム放出チャネル(リアノジン受容体, RyR)が標的分子として同定された(EBBINGHAUS-KINTSCHER et al., 2006; MASAKI et al., 2006)。リアノジン受容体が殺虫剤の標的分子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、リアノジンを含有する豆科植物根抽出物が農業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。以下にフルベンジアミドの作用機構を例として細胞内Ca²⁺動態のかく乱による殺虫作用について概説する。

I 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、脱糞等の特徴的な症状を示す(図-2, A)。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(図-2, B)。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、摂食行動をはじ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。

II Ca²⁺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Ca²⁺制御因子、Ca²⁺ポンプが化合物により特異的に亢進することを見いだした(MASAKI et al., 2006)。Ca²⁺ポンプは小胞体膜上に存在し、細胞質から小胞体にCa²⁺を汲み上げる働きを担う。このCa²⁺輸送はATPの加水分解と共役していることから、Ca²⁺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、Ca²⁺ポンプ活性を知ることが可能である。図-3に示すように、フルベンジ

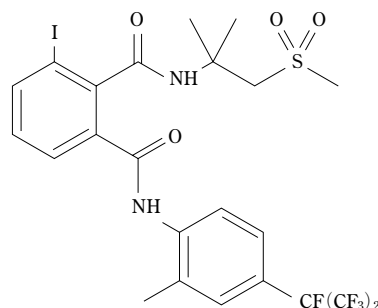


図-1 フルベンジアミドの化学構造

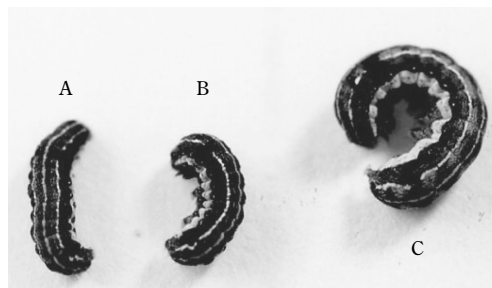


図-2 ハスモンヨトウにおける作用症状 (TOHNISHI et al., 2005 より一部改変)

A: 0.24 μg のフルベンジアミド, B: 2.4 μg のリアノジンを注射, C: 溶媒のみを注射し 24 時間後の作用症状を示す。

Development of Novel Insecticide Targeting Insect Ryanodine Receptor. By Takao MASAKI

(キーワード: フルベンジアミド, リアノジン受容体, カルシウムポンプ)

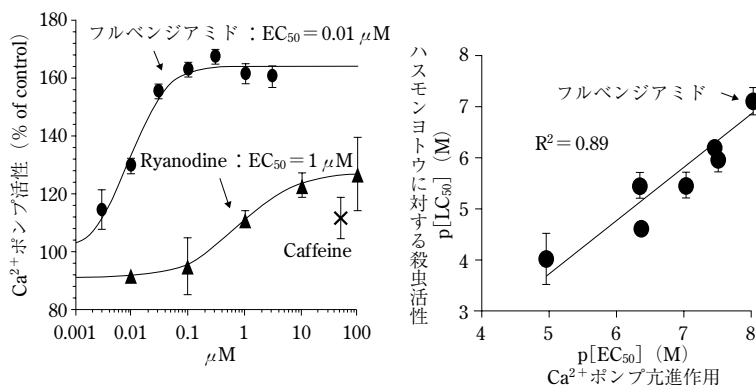


図-3 昆虫骨格筋カルシウム充進活性と殺虫活性との関連 (MASAKI et al., 2006 ; 2009 より一部改変)

アミドは Ca^{2+} ポンプ活性を明らかに充進し、その EC_{50} 値は 10 nM であった。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、本化合物の特徴を示すものと考えられた。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+} ポンプ充進活性における EC_{50} 値と殺虫活性における LC_{50} 値との関連を検証した結果、極めて良好な相関性を示した (図-3)。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。また、フルベンジアミドによる Ca^{2+} ポンプ充進活性は、カルシウムイオノフォアの添加や Ca^{2+} 緩衝液による系内の Ca^{2+} 濃度の均一化により消失することから、 Ca^{2+} ポンプへの直接的な作用ではなく、細胞内カルシウム動態の変化を介した影響であることが示唆された。

III 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 (図-4)。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。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

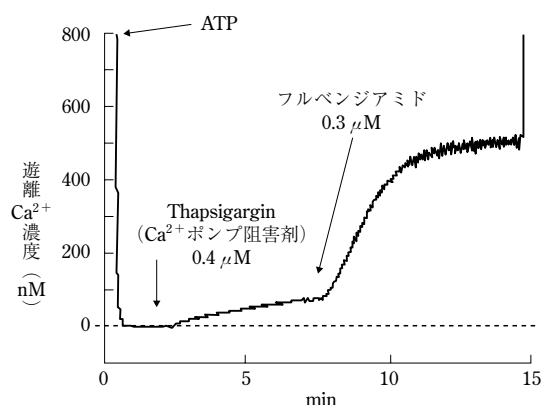


図-4 昆虫骨格筋膜画分からのカルシウム放出 (MASAKI et al., 2006 より一部改変)

Ca^{2+} は 1 mM の ATP を添加することにより小胞内に取り込ませた。遊離 Ca^{2+} は 3 mM Mg^{2+} の存在下でモニターした。

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。

IV 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。この手法は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を利用しており、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、フルベンジアミドが 300 nM 以上の濃度であれば、 Ca^{2+} の影響を受けることはない (EBBINGHAUS-KINTSCHER et al., 2006)。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口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 (Kd) は 7 nM であった。これは、 Ca^{2+} ポンプ亢進作用における EC₅₀ 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 IC₅₀ 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はじめ、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。フルベンジアミド作用機構の概要を図-5 に示した。

V 昆虫リアノジン受容体 (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Ca²⁺放出は筋収縮の引き金として作用する。RyRの活性は主に膜電位およびCa²⁺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。また、数多くの外因性作用分子が報告されており、特に本研究において用いた³H-リアノジンは、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。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、LEMBERG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た(LEMBERG and CASIDA, 1994)。さらにSCOTT-WARDらは脂質平面膜法によるチャ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(SCOTT-WARD et al., 2001)。昆虫RyRのクローニングはまず、ショウジョウバエで成功し、その後、*Heliothis*-RyRの部分的なクローニング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が報告され、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

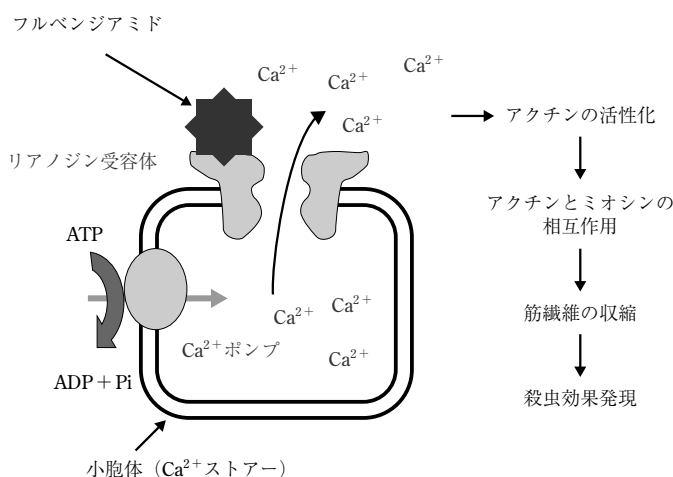


図-5 フルベンジアミドの作用機構概略

表-1 非標的生物に対する影響

一般名	種	試験方法	EC ₅₀ (mg/l)
テントウムシ類	<i>Harmonia axyridis</i>	浸漬法	> 200
	<i>Coccinella septempunctata</i>	浸漬法	> 200
寄生蜂類	<i>Encarsia formosa</i>	Dry film	> 400
	<i>Aphidius colemani</i>	Dry film	> 400
	<i>Cotesia glomerata</i>	Dry film	> 100
捕食性ダニ類	<i>Amblyseius cucumeris</i>	直接散布	> 200
	<i>Phytoseiulus persimilis</i>	直接散布	> 200
蜘蛛類	<i>Pardosa pseudoannulata</i>	浸漬法	> 100
	<i>Misumenops tricuspidatus</i>	浸漬法	> 200

TOHNISHI et al., 2005 より一部改変.

前進が期待される。

VI 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。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。さらには、昆虫以外

の非標的生物への安全性についても確認されている(表-1)。

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、リアノジンはいずれの分子種に対しても同等の作用を示す。これは、リアノジン高親和性結合ドメインがこれらの RyR 分子種のいずれにも存在するため、このドメインは昆虫、線虫等幅広い動物種での保存が確認されている。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。ちなみに、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、Ca²⁺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。また、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、フルベンジアミド結合部位とは異なる、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。

お わ り に

本研究の結果、フルベンジアミドは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。

引 用 文 献

- 1) EBBINGHAUS-KINTSCHER, U. et al. (2006): Cell Calcium **39**: 21 ~ 33.
- 2) LEMBERG, E. and J. CASIDA (1994): Pestic. Biochem. Physiol. **48**: 145 ~ 152.
- 3) MASAKI, T. et al. (2006): J. Mol. Pharmacol. **69**: 1733 ~ 1739.
- 4) ——— et al. (2009): J. Pestic. Sci. **34**: 37 ~ 42.
- 5) SCOTT-WARD, T. et al. (2001): J. Membr. Biol. **179**: 127 ~ 141.
- 6) TOHNISHI, M. et al. (2005): J. Pestic. Sci. **30**: 354 ~ 360.