

新 制

農

772

殺虫剤イミダクロプリドおよび関連化合物の
構造活性相関と昆虫神経に対する選択的作用

1998 年

岡 澤 敦 司

殺虫剤イミダクロプリドおよび関連化合物の
構造活性相関と昆虫神経に対する選択的作用

1998 年

岡 澤 敦 司

目次

	頁
緒論	1
第1章 イミダクロプリドと関連化合物のイェバエ頭部膜画分 に対する結合活性	5
1-1 緒言	5
1-2 実験方法	5
1-2-1 供試化合物	5
1-2-2 nAChR 粗画分の調整法	7
1-2-3 受容体結合実験	9
1-2-4 結合活性の定量化	10
1-3 結果	10
1-4 考察	12
第2章 三次元定量的構造活性相関を用いたイミダクロプリド 関連化合物の結合活性の予測	14
2-1 緒言	14
2-2 実験方法	16
2-2-1 供試化合物および活性値	16
2-2-2 分子モデルの構築	16
2-2-3 重ね合わせ	19
2-2-4 CoMFA による相関	21
2-3 結果	21
2-3-1 イミダクロプリド関連化合物の結合様式の予 測	21
2-3-2 ニテンピラム化合物の結合活性の予測	27

2-3-3	イミダゾリジン環の第3位の窒素原子情に様々な置換基を導入した化合物の解析	31
2-4	考察	31
第3章	イミダクロプリドおよび関連化合物の殺虫活性および神経活性と結合活性の関係	34
3-1	緒言	34
3-2	実験方法	34
3-2-1	供試化合物	35
3-2-2	供試昆虫	35
3-2-3	殺虫試験	35
3-2-4	神経活性の測定	36
3-2-5	疎水性パラメータの測定	37
3-3	結果	37
3-3-1	殺虫活性	37
3-3-2	自発性放電頻度に与える影響	40
3-4	考察	42
第4章	シビレイ発電器官およびラット膜画分に対するイミダクロプリドおよび関連化合物の結合活性	45
4-1	緒言	45
4-2	実験方法	46
4-2-1	供試化合物	46
4-2-2	供試動物	46
4-2-3	nAChR 画分の調整法	47
4-2-4	受容体結合実験	49
4-3	結果	49
4-4	考察	52

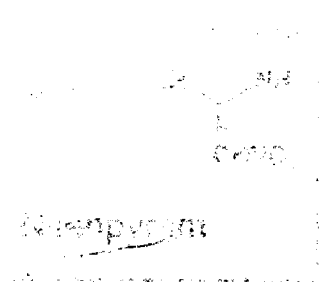
第5章 総括 54

謝辞 58

発表論文 60

関係論文 60

引用文献 61



緒論

農薬が環境汚染源の筆頭として槍玉に挙げられて久しいが、それは作用機構の不理解や誤った使用法に基づくものであり、十分にその機構を理解し、“処方箋”を守って使用すれば、医薬と同様に人類に多大なる恩恵をもたらすものである。無農薬や省農薬といった方法、またウイルスを用いた生物農薬や、殺虫性タンパク質をコードする遺伝子を持った組換え農作物などの使用法も確立されつつあるが、依然深刻な食糧不足を抱える地域には穀物の増産は緊急を要する課題である。そのためには農薬の使用はさけて通れない道である。

農薬が様々な問題を抱えることになった原因の一つに、限られた種類の農薬を長期間にわたり使用し続けたことがあげられる。これはすなわち、ピレスロイド剤、カーバメート剤、有機リン剤の類である。しかし、近年になってようやくそういった問題点を打破すべく、新規作用機構を持ち、さらに環境に対しても安全性の高い農薬の開発を、各企業及び研究機関で行い始めた。その中で、

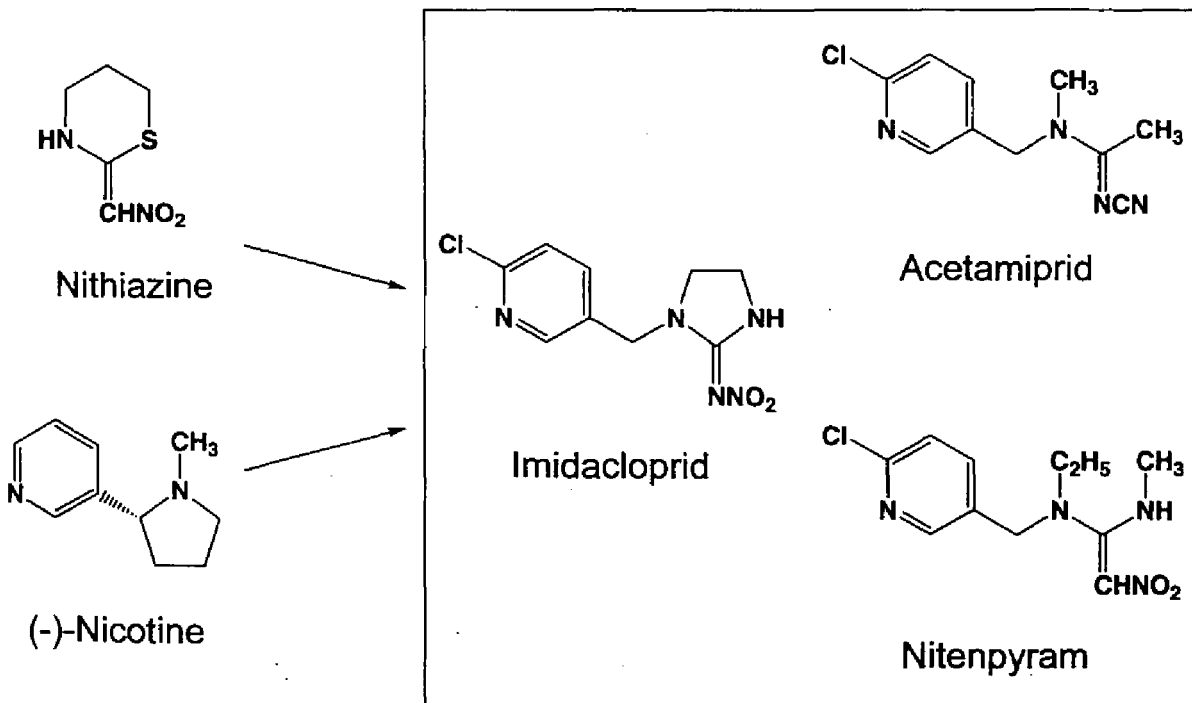


Fig. 1. Development of chloronicotinyl insecticides.

本研究での対象である，昆虫の神経に対してのみ特異的に作用するクロロニコチニル系，もしくはネオニコチノイド系殺虫剤と呼ばれる一連の化合物や，昆虫の脱皮，変態を攪乱する昆虫生育阻害剤などの新規殺虫剤が開発され，実際に使用されるにいたった．しかし，これら新規殺虫剤もその作用機構が医薬等に比べて十分に検討されてきたとはいいがたく，これらの殺虫剤の詳細な作用機構の解明が待たれるところである．

クロロニコチニル化合物の開発 (Fig. 1.) は，1978年，Soloway 等によって窒素の α 位に nitromethylene 基を導入した含窒素複素環化合物が殺虫活性を持つことが発見された¹⁾ことに端を発する．この nitromethylene 基を有する複素環化合物の中で，もっとも殺虫性に優れた化合物， tetrahydro-2-(nitromethylene)-2H-1,3-thiazine (nithiazin) (Fig. 1.) はオオタバコガの幼虫に対して，有機リン剤である parathion の17倍の活性を示した¹⁾．また，これらの化合物は，ほ乳類，鳥類，魚類に対して毒性が低く，また光によって速やかに分解することから環境に対しても安全であり，農薬としての使用が可能であることが示された²⁾．しかし，その分解性が逆に仇となり，実際には農場での使用に耐えうるものではなかった．1986年に Harris 等は，この化合物の窒素原子に formyl 基を導入する事によって，光に対する安定性が増し，かつ殺虫活性が保持されることを発見した³⁾．その後，この部位への様々な置換基の導入が試みられたが，その中でも 6-Cl-3-pyridylmethyl 基を導入した化合物が非常に高い殺虫活性を持つことが見いだされた⁴⁾．この化合物は，作用点と構造が (-)-nicotine (Fig. 1.) と類似しているが，その移行性に関して (-)-nicotine より優れているため高殺虫活性を発揮するものと推論された⁵⁾．また，nitromethylene 基を nitroimino 基へ改変することによって，殺虫活性は同程度でさらに圃場での安定性を増した化合物を得た⁶⁾．この化合物が，現在アドマイヤーとして上市されている imidacloprid (Fig. 1.) である．また，興味深いことに 6-Cl-3-pyridylmethyl 基を有する化合物は，imidazolidine 環を開環してもなお殺虫活性を維持することが明らかになり^{7,8)}，acetamiprid や nitenpyramといった非環式化合物も開発され，現在上市されてい

る (Fig. 1). その間、これらのクロロニコチル化合物の作用点についての研究もおこなわれ、放射性リガンドを用いた結合実験と、昆虫の神経標本を用いた電気生理学的な実験によって、これらの化合物が昆虫の中樞神経中のニコチン性アセチルコリン受容体 (nicotinic acetylcholine receptor; nAChR) に、アゴニストとして作用することが明らかにされた⁹⁾¹¹⁾. 富沢等は、これらの pyridine 環をもつクロロニコチル化合物と、同じ作用点で殺虫活性を示す天然化合物である (-)-nicotine との構造の類似性に注目し、これらの化合物の殺虫活性および昆虫頭部膜画分に対する結合活性と構造の関係を定性的に研究した⁵⁾¹²⁾. 山本等はこれらの結果をもとに、これらの化合物の昆虫選択毒性を化合物の静電的な性質を用いて説明しようとして試みている¹³⁾. また、Liu 等は [³H] 標識した化合物を合成し、その標識化合物の昆虫頭部膜画分に対する結合活性を様々な条件下で測定することによってその薬理的性質を検証した¹⁴⁾¹⁶⁾. また最近、これらの化合物を用いたアフィニティーカラム¹⁷⁾およびフォトアフィニティー化合物を設計し¹⁸⁾、昆虫の nAChR の単離精製及び結合部位の同定を試みている.

本研究では、種々の構造を持つ化合物の様々な動物由来の nAChR に対する結合活性を測定し、その構造と活性の関係を解析することによって imidacloprid および関連化合物の昆虫の nAChR に対する選択性を考察することを目的とした. まず、第 1 章では、imidacloprid および関連化合物のイエバエの頭部由来の nAChR に対する結合活性を測定し、構造との関係を考察した. またさらに第 2 章では、結合活性値と構造の関係を三次元定量的構造活性相関 (three dimensional quantitative structure-activity relationship; 3D-QSAR) の一手法である Comparative Molecular Field Analysis (CoMFA) 法¹⁹⁾を用いて解析し、imidacloprid の活性コンフォメーションと受容体との結合様式を予測した. 第 3 章では、これらの化合物のワモンゴキブリに対する殺虫活性および神経活性を測定し、両活性値とイエバエの nAChR に対する結合活性値との関係を定量的に解析した. 第 4 章では、シビレエイの発電器官およびラットの脳を用いて、これらの化合物の nAChR に対する結合活性をイエバエのものと同様にして求め、活性値を

動物種間で比較することによって、その選択性に関して考察した。

第 1 章 イミダクロプリドと関連化合物のイエバエ頭部膜画分に対する結合活性

1-1 緒言

Imidacloprid とその関連化合物は昆虫の中樞神経中の nAChR に作用し、その神経伝達を攪乱することによって昆虫を死に至らしめる。このことは昆虫の中樞神経標本を用いた電気生理学的実験^{11),20)}、および受容体粗画分を用いた結合実験によりあきらかにされている^{12),14)-16),21)}。Imidacloprid は元来、殺虫性複素環化合物をリード化合物として合成展開されてきた経緯を持つが、その作用点での類似性において (-)-nicotine 様の構造を導入されるに至った²²⁾。さらに、この (-)-nicotine との類似性に着目し、pyridine 環部分を持ちリード化合物の基本構造である複素環部分を開環した化合物でも十分な殺虫活性を持つことが明らかになり^{7),8)}、現在、圃場でも使用されている。これらの開環した化合物も imidacloprid と同様の作用を示すことが明らかになっている。しかし、もとのリード化合物とこれら開環した化合物の作用機構の関係について、未だはっきりとした見解は得られていない。

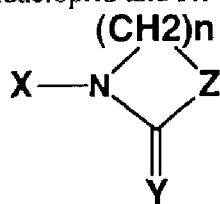
この章では、これら imidacloprid の関連化合物のイエバエ頭部膜画分に対する結合活性を測定し、その構造と活性の関係を定性的に考察する。

1-2 実験方法

1-2-1 供試化合物

本章で用いた化合物を Table 1-1 および Table 1-2 に示した。化合物 1-3, 8-17, 31-36 は日本バイエルアグロケム社により恵与された。化合物 4-7 は第 5 章に述べる方法によって合成された。化合物 18-30 は岐阜大学の利部教授によって恵与された。化合物 37-48 は武田薬品工業社によって恵与された。化

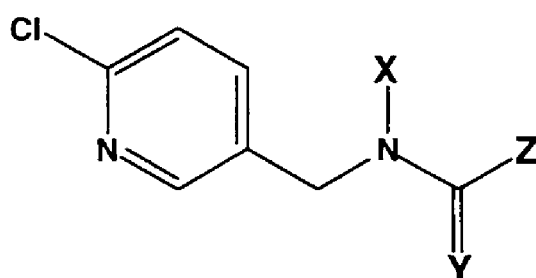
Table 1-1 Imidacloprid and Related Compounds

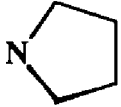


No.	X	Y	Z	n
1	3-Pyridylmethyl	CHNO ₂	NH	2
2	6-Cl-3-pyridylmethyl	CHNO ₂	NH	2
3	6-Me-3-pyridylmethyl	CHNO ₂	NH	2
4	6-MeO-3-pyridylmethyl	CHNO ₂	NH	2
5	6-MeS-3-pyridylmethyl	CHNO ₂	NH	2
6	6-EtO-3-pyridylmethyl	CHNO ₂	NH	2
7	6-BuO-3-pyridylmethyl	CHNO ₂	NH	2
8	6-Cl-3-pyridyl	CHNO ₂	NH	2
9	2-(6-Cl-3-pyridyl)ethyl	CHNO ₂	NH	2
10	2-Pyridymethyl	CHNO ₂	NH	2
11	4-Pyridymethyl	CHNO ₂	NH	2
12	Benzyl	CHNO ₂	NH	2
13	4-Cl-benzyl	CHNO ₂	NH	2
14	5-(2-Cl-thiazolyl)methyl	CHNO ₂	NH	2
15	3-Pyridylmethyl	NNO ₂	NH	2
16 ^a	6-Cl-3-pyridylmethyl	NNO ₂	NH	2
17	6-Cl-3-pyridylmethyl	NNO ₂	NMe	2
18	6-Cl-3-pyridylmethyl	NNO ₂	NEt	2
19	6-Cl-3-pyridylmethyl	NNO ₂	NPr	2
20	6-Cl-3-pyridylmethyl	NNO ₂	N(<i>i</i> -Pr)	2
21	6-Cl-3-pyridylmethyl	NNO ₂	NBu	2
22	6-Cl-3-pyridylmethyl	NNO ₂	N(<i>i</i> -Bu)	2
23	6-Cl-3-pyridylmethyl	NNO ₂	N(<i>s</i> -Bu)	2
24	6-Cl-3-pyridylmethyl	NNO ₂	N(cyclopropylmethyl)	2
25	6-Cl-3-pyridylmethyl	NNO ₂	NAm	2
26	6-Cl-3-pyridylmethyl	NNO ₂	N(<i>i</i> -Am)	2
27	6-Cl-3-pyridylmethyl	NNO ₂	NHex	2
28	6-Cl-3-pyridylmethyl	NNO ₂	N(Allyl)	2
29	6-Cl-3-pyridylmethyl	NNO ₂	N(Propargyl)	2
30	6-Cl-3-pyridylmethyl	NNO ₂	N(Benzyl)	2
31	6-Cl-3-pyridylmethyl	NCN	NH	2
32	6-Cl-3-pyridylmethyl	CHCN	NH	2
33	6-Cl-3-pyridylmethyl	CHNO ₂	CH ₂	2
34	6-Cl-3-pyridylmethyl	CHNO ₂	O	2
35	6-Cl-3-pyridylmethyl	CHNO ₂	S	2
36	6-Cl-3-pyridylmethyl	CHNO ₂	NH	3

^a Imidacloprid.

Table 1-2 Nitenpyram and Related Compounds



No.	X	Y	Z
37	H	CHNO ₂	NH ₂
38	H	CHNO ₂	NHN(CH ₃) ₂
39	Me	CHNO ₂	NHMe
40	Me	CHNO ₂	NHEt
41 ^a	Et	CHNO ₂	NHMe
42	Et	CHNO ₂	NHEt
43	Et	CHNO ₂	N(CH ₂ CH ₃) ₂
44	Et	CHNO ₂	NH(cyclopropyl)
45	Et	CHNO ₂	
46	CH ₂ CH ₂ F	CHNO ₂	NH ₂
47	Pr	CHNO ₂	NH ₂
48	<i>i</i> -Pr	CHNO ₂	NHMe
49 ^b	Me	NCN	Me

^a Nitenpyram.

^b Acetamiprid.

化合物 49 は日本曹達株式会社によって恵与された。(3-[¹²⁵I]iodotyrosyl⁶⁴)α-bungarotoxin ([¹²⁵I]α-BGTX: 74 TBq/mol) は Amersham 社より購入した。その他の化合物は特に示さない限り和光純薬工業社、ナカライテスク社、Aldrich 社より購入した。

1-2-2 nAChR 粗画分の調整法

イエバエ (*Musca domestica* L.) の頭部膜画分を Liu 等の方法に従って調整した¹⁴⁾ (Fig. 1-1). イエバエの頭部を液体窒素にて凍結し, マイヤー中で激しく振盪することによって頭部を胴体部よりわけ, ふるいにて頭部のみを得た. 頭部 (1 mg) を 0.32 M sucrose, 0.1 mM EDTA を含む 100 mM リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.4) 中で Polytron によって摩砕した (30 秒 × 3, それぞれの摩砕の間 60 秒静置). 摩砕物を 3 層のガーゼによって濾過し, 残渣をのぞいた. 濾液を 700 g で 10 分間遠心し, 続いてその上澄み液を 125,000 g で 60 分間遠心した. 沈殿物を 0.1 % の Triton X-100 と 50 mM の NaCl を含む 10 mM リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.4) に懸濁し, これを nAChR 粗画分として用いた. 保存に際しては -80°C で凍結し, 2 週間以内に使用した. タンパク質濃度は Pierce

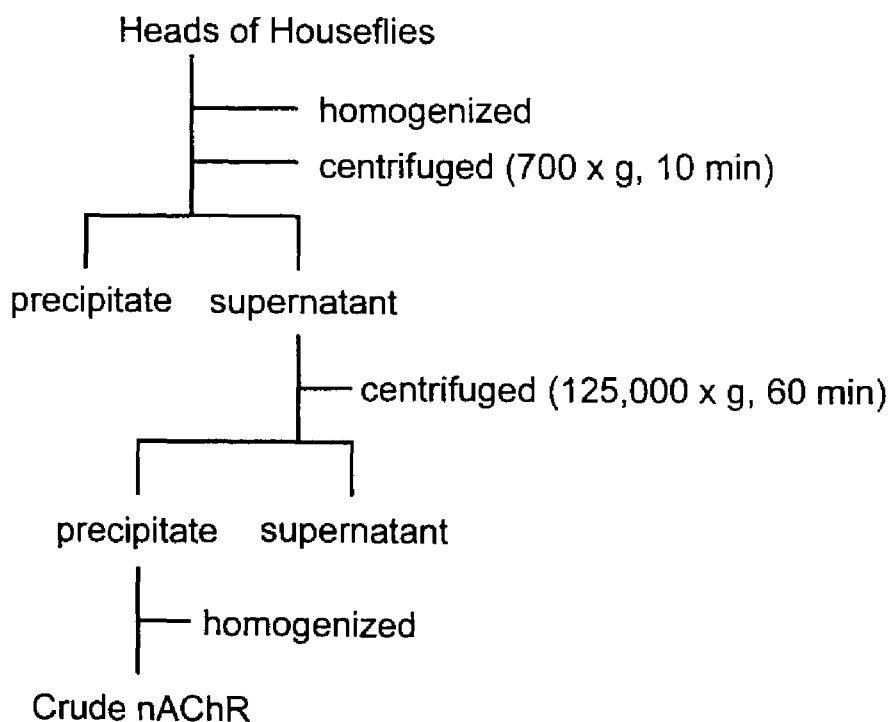


Fig. 1-1. Preparation of nAChR from Housefly.

社の BCA protein assay reagent を用いて行った。以上の操作はすべて 4℃ で行った。

1-2-3 受容体結合実験

nAChR 粗画分 (約 250 μg protein) を [^{125}I] α -BGTX (0.2 nM) と供試化合物と共に 96 穴のプレート上、緩衝液 (10 mM リン酸ナトリウム, 50 mM NaCl, 0.1 % Triton X-100, pH 7.4 ; 200 μl) 中にて 25℃ で 60 分間インキュベートした。反応液を Unifilter GF/B (PACKARD) ですばやく濾過し, Triton X-100 を除いた上記緩衝液で 3 回, メタノールで 1 回洗浄した。フィルターを乾燥させてから放射活性を TOPCOUNT (PACKARD) にて測定した。測定の際にはシン

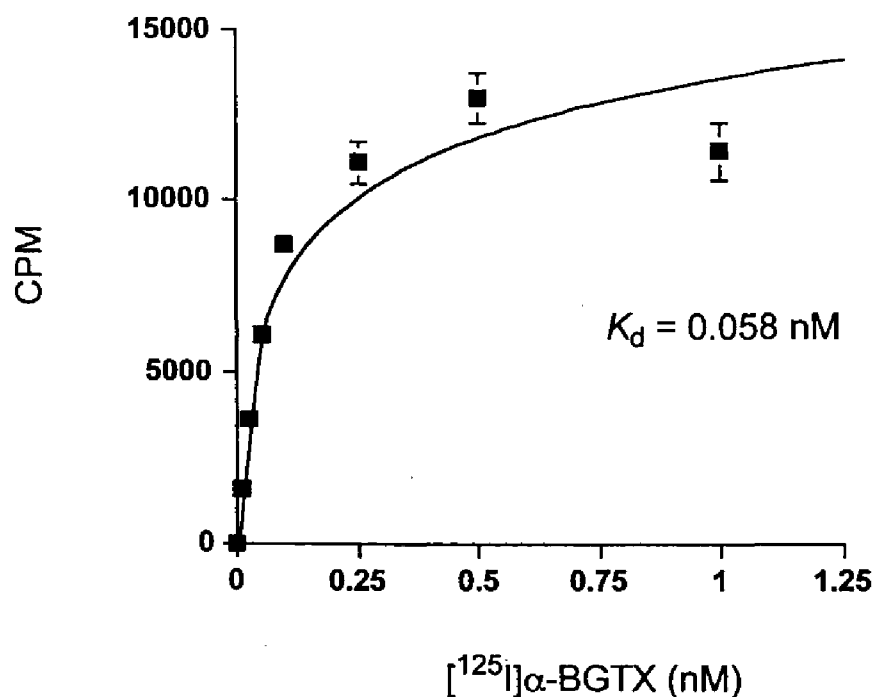


Fig. 1-2. Saturation curve of [^{125}I] α -BGTX binding to nAChR from housefly.

チレーションカクテル, Microscinti-O (PACKARD) を 30 μ l 加えた. Unifilter は非特異的結合を防ぐためにあらかじめ 0.1 % の polyethyleneimine に浸漬しておいた²³⁾. 特異的結合は全体のカウントより 10 μ M の α -BGTX を加えて行った値を差し引いて求めた. また, [¹²⁵I] α -BGTX の量を様々に変化させることによって, 受容体に対する飽和曲線を得た (Fig. 1-2.).

1-2-4 結合活性の定量化

各化合物の [¹²⁵I] α -BGTX の受容体に対する結合を 50 % 阻害する濃度, IC₅₀ 値は PRISM (Graphpad Software) を用いて, 非線形回帰分析によって求めた. 結合活性の指標としては以下の式を用いて K_i 値を求め, その逆対数值 log(1/K_i) として求めた²⁴⁾.

$$K_i = IC_{50} / (1 + [L] / K_d) \quad [1-1]$$

上記の式で, [L] は加えた放射性リガンドの濃度, K_d は放射性リガンドの解離定数を示す. 本実験では飽和曲線より PRISM を用いた解析によって, K_d = 0.058 nM という値を得た. また [L] = 0.2 nM になるように [¹²⁵I]- α BGTX を加えた.

1-3 結果

各化合物の結合活性値を Table 1-3 に示した. nitromethylene 基を有する imidazolidine 化合物は, pyridine 環の 6 位にかさ高いalkoxyl 基を導入すると 30-200 倍の活性の低下が見られた (4, 6, 7). また, Cl- 基 (2), Me- 基 (3) の導入は活性に大きな影響を与えなかったが, MeS- 基を導入した場合には活性が消失した (5). また, pyridine 環と imidazolidine 環との間の架橋部分の長さを変化させると活性は約 500 分の 1 に低下した (7, 8). 3-Pyridyl 基を 2- (10) または 4- pyridyl 基 (11) へと変換した場合には活性はそれぞれ 1/500, 1/1000 に低下した. Pyridine 環を benzene 環へと変換した場合には活性は

Table 1-3 Binding Activity of Test Compounds

Compound	log (1/K _i)	Compound	log (1/K _i)
1	7.30	26	4.70
2	7.49	27	3.94
3	6.72	28	4.00
4	5.77	29	4.40
5	^a	30	4.40
6	4.99	31	5.09
7	4.20	32	5.11
8	4.47	33	7.11
9	4.71	34	6.40
10	4.84	35	7.00
11	3.14	36	7.70
12	5.49	37	3.71
13	5.30	38	3.57
14	6.97	39	5.48
15	5.35	40	3.39
16	6.00	41	5.17
17	3.83	42	3.46
18	3.96	43	3.27
19	4.35	44	3.62
20	3.70	45	3.24
21	4.46	46	6.24
22	4.51	47	5.96
23	4.77	48	4.14
24	4.15	49	5.31
25	4.46		

^a Not determined.

1/100 に低下した (1 vs 12, 2 vs 13). Pyridine 環を 5-(2-Cl-thiazolyl)methyl 基 (14) へと変換した場合には大きな活性の変化は見られなかった. Nitroimino 基を有する化合物は, nitromethylene 基を有する化合物に比べて約 1/50 の活性を示した (1 vs 15, 2 vs 16). Nitroimino 基を有する化合物の imidazolidine 環の 3

位の窒素原子上への置換基の導入は、置換基の大小に関わらず活性を 1/20-1/200 に低下させた (17~30). Nitro 基を cyano 基へと変換すると活性は約 1/10 に低下した (2 vs 32, 16 vs 31). Imidazolidine 環の 3 位の窒素原子を炭素原子 (33), 硫黄原子 (35) へと変換した場合には活性の変化は見られなかったが、酸素原子 (34) へと変換すると活性は 1/10 に低下した. また, imidazolidine 環を 1,3-tetrahydrodiazine 環 (36) へと変換しても活性の変化は見られなかった. また, imidazolidine 環を開環した構造を持つ, nitenpyram 関連化合物における結合活性は複素環化合物のもの比べると全体的に低い傾向を示した (37~49). Table 1-2 における, X 部位が無置換の化合物 (37, 38) の活性は低かった. しかしアルキル側鎖を持つ化合物ではその長さを変換しても大きな活性の変化は見られなかった (39 vs 41, 48)(40 vs 42). また, Z 部位へのかさ高い置換基の導入は活性を大きく低下させた (38, 43~45). Acetamiprid (49) の結合活性は, imidacloprid (16) の 1/5, nitenpyram (41) と同程度であった.

1-4 考察

結合活性と構造の関係より以下の点が明らかとなった. まず, pyridine 環の 6 位への Cl- 基および Me- 基の導入は活性を変化させなかったが, alkoxy 基の alkyl 部分を長くしていくと活性が低下したことから, 受容体側のこの部位にはある程度の立体的制約があることが推測された. MeS- 基を導入した場合に活性の消失がみられたがこの原因は不明である. また, pyridine 環の窒素原子と imidazolidine 環 1 位の窒素原子の間の結合数が活性に非常に影響を与えることが明らかになった. この結合数は (-)-nicotine の窒素原子間のもものと一致していた. しかし, pyridine 環を benzen 環へと置換した場合にもある程度の活性は保持され, pyridine 環が必須であるというわけではないことが明らかとなった. Imidazolidine 環 3 位への置換基の導入は活性を大幅に低下させ, この部位に厳

しい立体的制約があることが推測された。しかし、この部位の窒素原子は活性発現には必須でないことが明らかとなった。Nitromethylene 基を有する化合物が最も高活性であり、ついで nitroimino 基を有する化合物、cyano 基を有する化合物の順で活性の低下が見られたことから、この部位もなんらかの機構で活性に影響を与えていることが明らかとなった。この置換基の性質から、おそらく静電的な相互作用を介して活性に影響を与えていることが推測された。また、imidazolidine 環を開環した構造を持つ nitenpyram 誘導体、および acetamiprid の結合活性値が小さい傾向を示したことから、imidazolidine 環は結合活性に適したコンフォメーションを固定化していることが推測された。また、Table 1-2 における X の部位の周辺は比較的立体的制約が少なく、受容体側にも開いた空間があることが予測された。また、無置換の化合物では活性が低下したことから、この領域に疎水性相互作用部位が存在する可能性を示した。さらに imidacloprid 関連化合物と同様に、Z 部位の周辺には厳しい立体的制約があることが明らかとなった (Fig. 1-3.)。

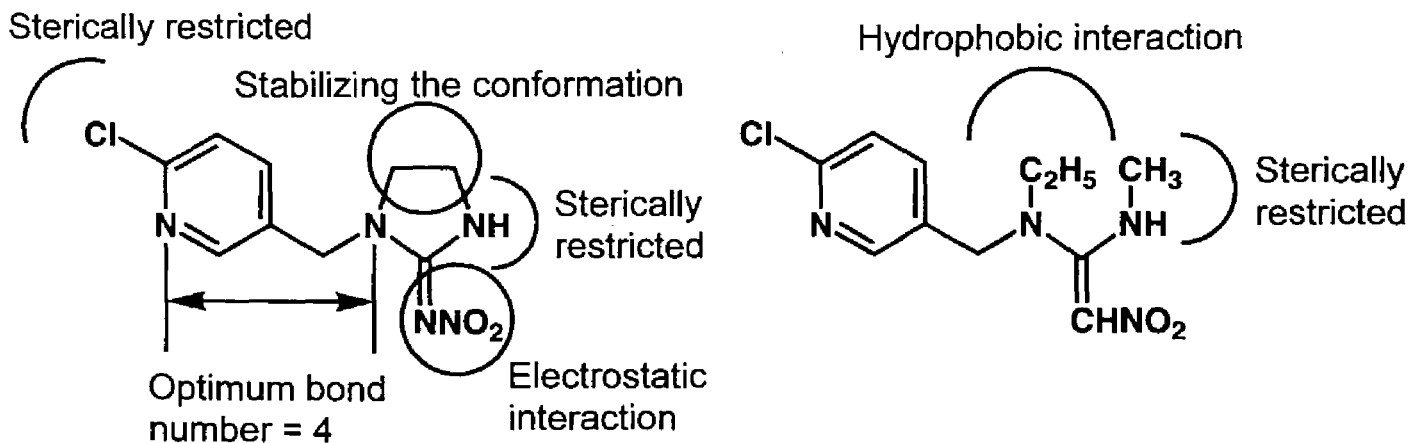


Fig. 1-3. Relationships between structures of the compounds and the binding sites.

第 2 章 三次元定量的構造活性相関を用いたイミダクロプリド関連化合物の結合様式の予測

2-1 緒言

天然より単離された (-)-nicotine をはじめとする nAChR アゴニストの構造に関する研究と, imidacloprid の定性的な構造活性相関および X 線結晶構造解析に基づく研究より, これまでに imidacloprid の結合様式に関する二つの仮説が提唱されている. 山本らは pyridine 環上の窒素原子と imidazolidine 環 1 位

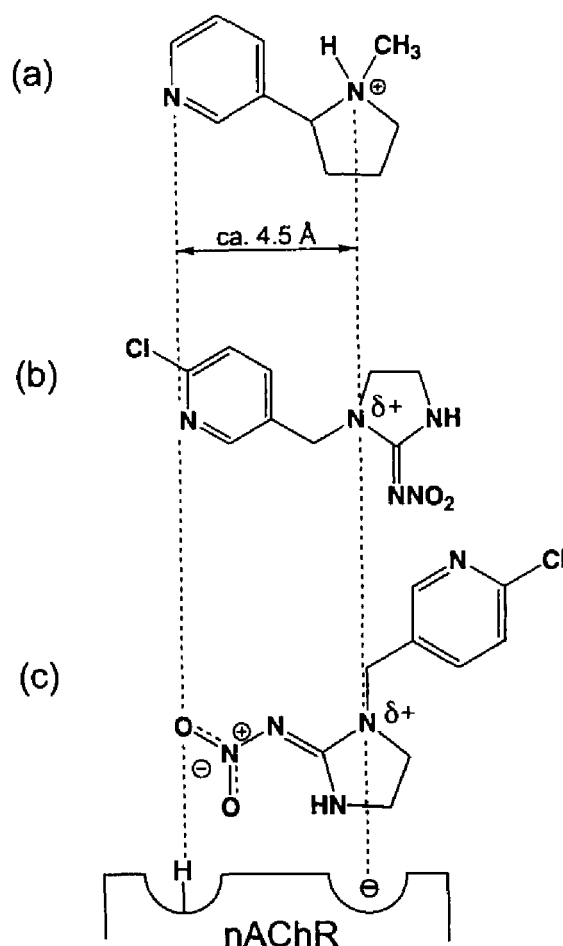


Fig. 2-1. Binding model of (-)-nicotine (a) and imidacloprid [(b) proposed by Yamamoto *et al.* and (c) by Kagabu] with nAChR.

の窒素原子が、それぞれ受容体の水素供与部位および負電荷を持つ部位と相互作用するというモデルを示した。この二窒素間の距離は (-)-nicotine の二窒素間の距離に非常に近いものであった (約 4.5 Å)¹³⁾ (Fig. 2-1. (a), (b)). これに対し、利部は imidazolidine 環 1 位の窒素原子と nitro 基の酸素原子が受容体との相互作用にかかわっている可能性を示した²⁵⁾(Fig. 2-1. (c)).

この章ではこれらの化合物の結合活性に必要な構造を探るとともに、これまでに提唱されている仮説を検証することを目的として、第 1 章で測定した各化合物のイェバエ頭部膜画分に対する結合活性を CoMFA 法を用いて解析した。

CoMFA 法は 1988 年に Cramer らによって開発された三次元定量的構造活性相関の一手法である¹⁹⁾。この方法では、ある活性を示す化合物群の周りに仮想的な領域を設定し、その領域中の格子点をプローブとして化合物との立体的、静電的相互作用エネルギーを計算する。これらのエネルギーパラメータを用いて、活性の変化を Partial Least Squares (PLS) 法²⁶⁾を用いて統計解析し、この結果より、化合物の立体的、静電的に有利、あるいは不利な領域を三次元的にグラフィック表示できる。ここで得られた領域によって、それぞれの化合物と受容体との相互作用をある程度予測することが可能になる。この手法は本研究のように薬物受容体が膜タンパク質でその立体構造が決定されていない場合に、その相互作用を予測し、ドラッグデザインに利用するという目的で利用される場合が多い^{27),28)}。

本研究で行った解析では、imidacloprid の X 線結晶構造解析によって知られていた、二種の立体構造²⁹⁾の他に、それぞれの pyridine 環に関する 180° 回転異性体をもとにした 4 シリーズについて解析を行うことによって、これらの化合物が nAChR との結合する際のコンフォメーションを予測した。重ね合わせに関しては、結合様式の予測に基く二種類の方法を適用することによってこれらの仮説を検証した。その際には、天然由来の nAChR アゴニストである (-)-anabasine (50), (-)-nicotine (51), cytisine (52) (Fig. 2-2.) をともに解析することによって、得られた結果をさらに検討した。予測された結果に基づいて、さらに

imidazolidine 環構造を持たない nitenpyram 関連化合物および acetamiprid (49) を加えて解析し、それぞれの置換基が活性に与える影響に関して考察した。

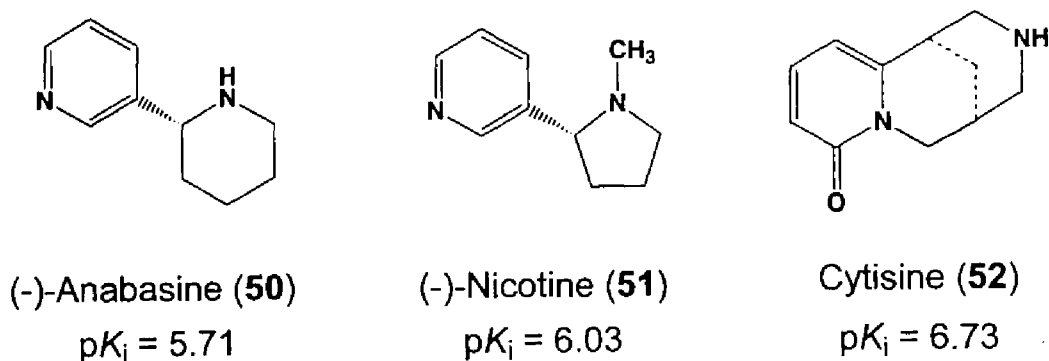


Fig. 2-2. Structures of nAChR agonists from natural products.

2-2 実験方法

2-2-1 供試化合物および活性値

供試した化合物は第 1 章と同じ物を用いた (Table 1-1, 1-2). また、解析の際の活性値として第 1 章で求めた結合活性値 (Table 1-3) を用いた。また、三種類の天然由来の nAChR アゴニスト、(50, 51, 52) の活性値 (Fig.2-2.) は富沢等および山本によって得られた結合活性値^{12),13)}, $\log(1/K_i)_T$ との相関式によって得た。

$$\log(1/K_i) = 1.037(\pm 0.144) \log(1/K_i)_T - 0.192(\pm 0.846) \quad [2-1]$$

$$n = 19 \text{ (化合物 1~3, 8~17, 31~36)}, s = 0.352, r = 0.965, F(1,17) = 232.1$$

この式および以下の式において n は化合物数, s は標準偏差, r は相関係数, F は観測値と計算値の変動の分散比を表す。また、括弧内の数字は 95% 信頼限界幅を表す。

2-2-2 分子モデルの構築

ワークステーションは Silicon Graphics 社の O2 を用いた。モデル化に際しては Tripos 社の SYBYL ver.6.2 をソフトウェアとして用いた。分子モデルの構築の際の初期構造として imidacloprid の X 線結晶構造解析のデータを用いた²⁹⁾。この結晶中には 2 種類の異なった構造を持つ分子が存在していたので、それぞれを構築した。このモデルより半経験的分子軌道法 PM3 法³⁰⁾を用いて imidacloprid の安定コンフォメーションを求めた (Fig. 2-3. Imi-I, Imi-II)。Imi-I および Imi-II の pyridine 環に関する 180° 回転異性体も Imi-I, -II と同様に安定なコンフォーマーであることが明らかになったので、さらにこの構造をもとに PM3 法を用いて安定コンフォメーションを計算し、この構造をそれぞれ Imi-III, -IV (Fig. 2-3.) として用いた。また、これらのコンフォーマーと以下で述べるすべてのモデルの各原子の電荷は半経験的分子軌道法 AM1 法³¹⁾を用いて求めた。

他の化合物はこれら四種 (Imi-I~IV) の imidacloprid のコンフォメーションをもとに構築した。化合物 1~14, 33~36 に関して imidacloprid の nitroimino 部

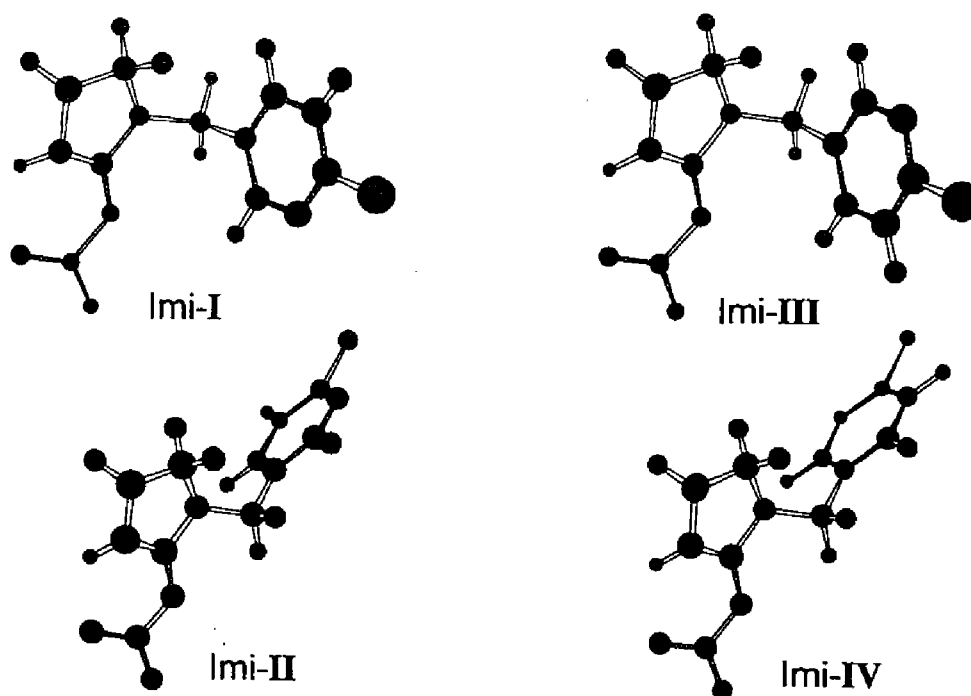


Fig. 2-3. Stable conformations of imidacloprid.

位を nitromethylene 基へと変換した。また化合物 31, 32 に関しては、その部位をそれぞれ cyanoimino, cyanomethylene 基へと変換した。化合物 1, 3~7, 15 に関して, pyridine 環の 6 位の Cl-原子をそれぞれ対応する置換基へと変換した。化合物 8 と 9 に関して、二つの複素環を架橋する methylene 基の長さが異なっていたので、この部位のそれぞれの二面角を 0° から 360° まで 30° 刻みで回転させ、すべての場合のエネルギーを計算し、最も安定であると考えられたコンフォメーションを用いた。化合物 11~14 に関して, imidacloprid の 6-Cl-3-pyridyl 基をそれぞれ対応する置換基へと変換した。化合物 17~30 に対して imidazolidine 環の 3 位の窒素原子上にそれぞれ対応する置換基を導入した。化合物 33~35 に関しては, imidazolidine 環の 3 位の窒素原子をそれぞれ対応する原子へと変換した。化合物 36 の 2-nitromethylene-1,3-perhydrodiazine 部位は部分的な平面構造を得るために cyclohexene をもとに以下の手順で構築した。まず, cyclohexene の 1 位と 3 位の炭素原子を窒素原子に置き換え, nitromethylene基を 2 位の炭素原子上へと導入した。さらに, 6-Cl-3-pyridylmethyl 基を 1 位の窒素原子上へと導入することにより化合物 36 を得た。また, 化合物 2 の imidazolidine 環の 4 位と 5 位の炭素原子間の結合を切り離し, 水素原子を結合させることによって化合物 39 を得た。化合物 37, 38, 40~49 は化合物 39 の X, Y, Z (Table 1-2) をそれぞれに対応する置換基へと変換することによって得た。上記によって構築したコンフォーマーは AM1 法によって安定化され解析に用いられた。(-)-Nicotine (51)³²⁾と cytosine (52)³³⁾の初期構造は Cambridge Crystallographic Database により得た。また, (-)-anabasine (50) の初期構造は (-)-nicotine (51) の結晶構造より構築した。これら三種の化合物はそのアミン構造の pK_a 値を考慮すると生体内でプロトネーションされているものと考えられたので、それぞれの窒素原子に水素を結合させた。この際, (-)-nicotine (51) では R 体と S 体が出るので、それぞれを構築し解析に用いた。これらの構造は PM3 法によって安定化された (Fig. 2-4.)。

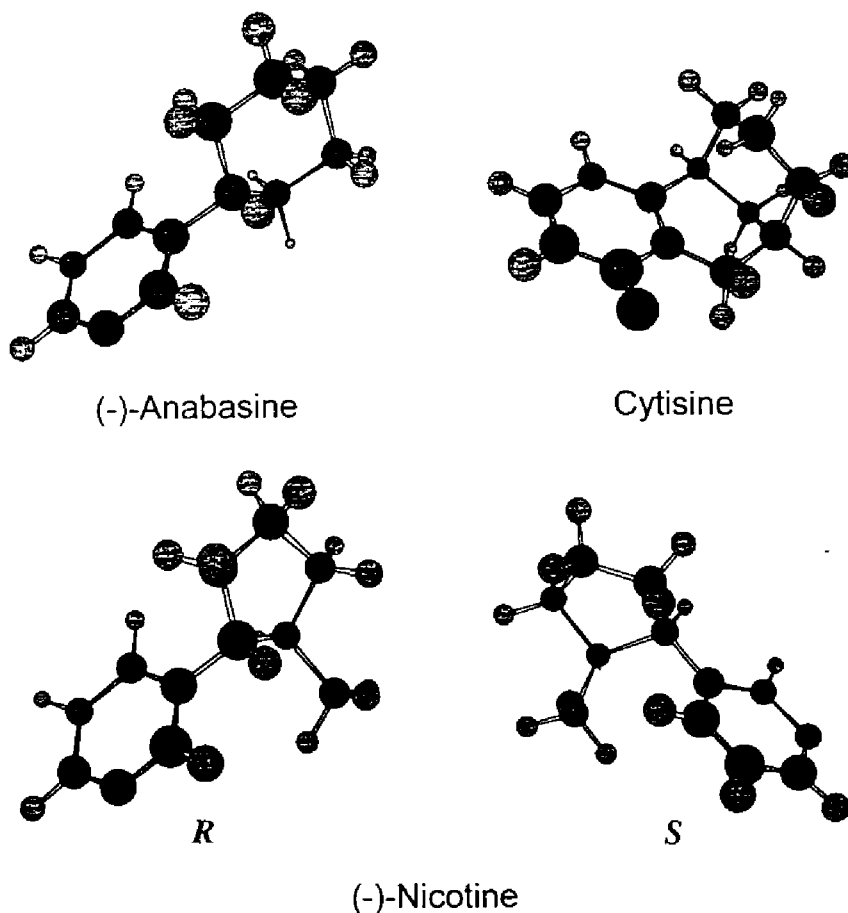


Fig. 2-4. Stable conformations of natural nAChR agonists in their protonated forms.

2-2-3 重ね合わせ

それぞれの安定コンフォーマーを結合の際の活性コンフォーマーと仮定し、重ね合わせを行った。Imidacloprid の活性コンフォメーション (Fig. 2-3.) を他の化合物を重ね合わせる際の基準として選んだ。化合物 1~3, 8~17, 31~36 に関しては、その結合様式を検証するために二通りの重ね合わせ法を用いた。重ね合わせ法 A (SP-A) は山本等の結合モデル¹³⁾(Fig. 2-1. (b)) をもとに行った。すなわち、pyridine 環の窒素原子、imidazolidine 環 1 位の窒素原子とこれに隣接する二つの炭素原子を重ね合わせた (Fig. 2-5. (a))。重ね合わせ法 B (SP-B) は利部のモデル (Fig. 2-1. (c)) に従った²⁵⁾。すなわち、imidazolidine 環 1 位の窒素原子とこの原子からの距離が 4.6 Å の nitro 基の酸素原子およびその間の二

つの炭素原子を重ね合わせに用いた (Fig. 2-5. (b)). Nitro 基を持たない化合物 31, 32 に関しては酸素原子の代わりに cyano 基の窒素原子を用いた. また, 化合物 50~52 に関しては Fig. 2-6. に示した原子を用いてそれぞれの重ね合わせを行った. 以上の解析より 2-3-1 で示すように SP-A が最も有意な式を導いたので, その他の化合物については SP-A のみを用いて重ね合わせを行った.

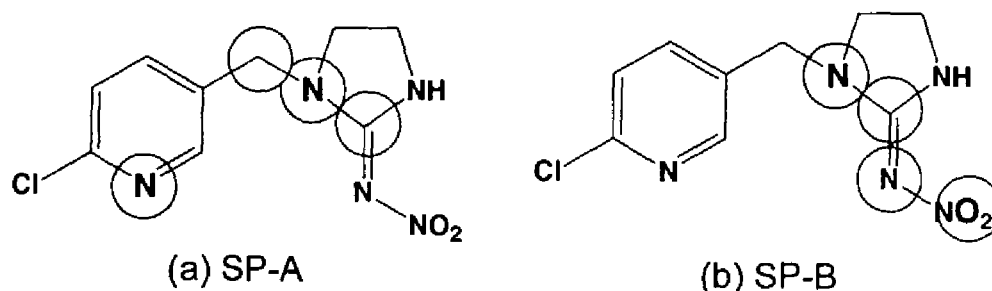


Fig. 2-5. Superposed atoms.

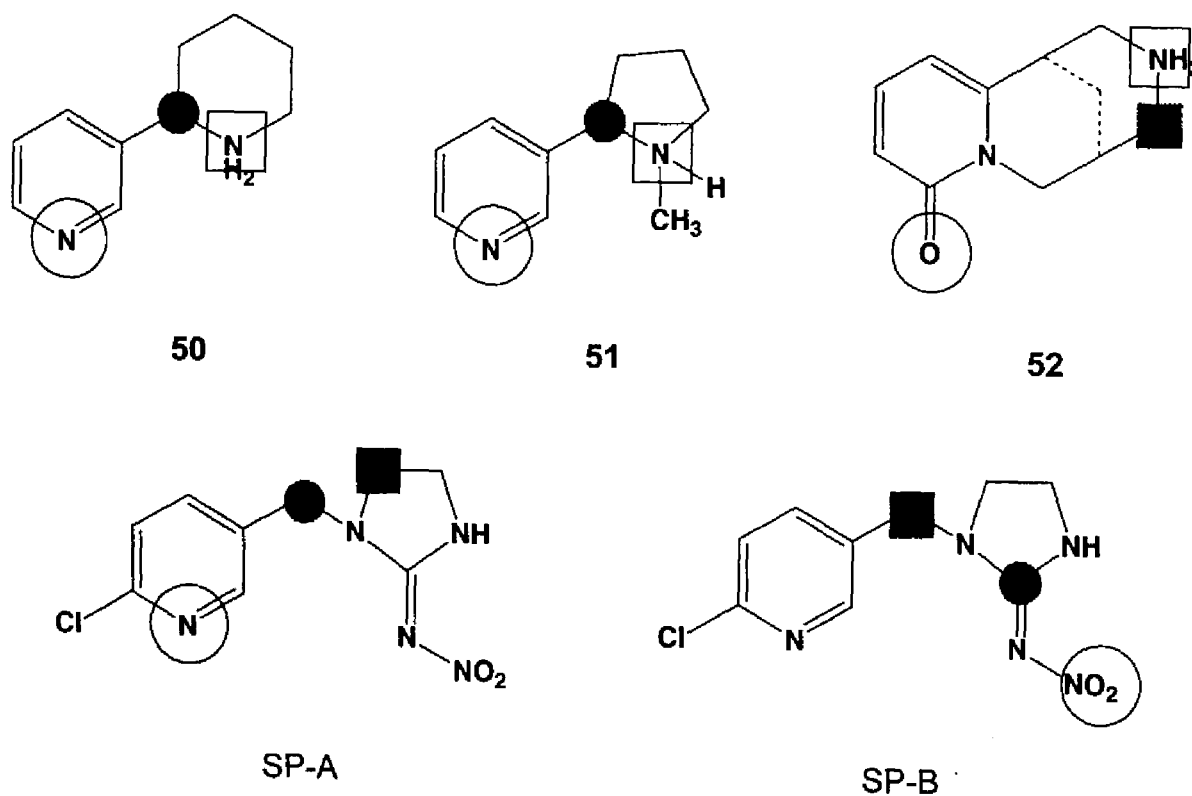


Fig. 2-6. Superposition of natural nAChR agonists on imidacloprid.

2-2-4 CoMFA による相関

解析は SYBYL 中の “Advanced CoMFA” モジュールを用いて行った。化合物 1~3, 8~17, 31~36, 50~52 を用いた解析の場合には $18 \text{ \AA} \times 24 \text{ \AA} \times 21 \text{ \AA}$ ($X = -9 \sim 9$, $Y = -12 \sim 12$, $Z = -10 \sim 11$) の空間に 1.5 \AA 間隔でおいた格子点中にそれぞれの活性コンフォーマーを置き、各格子と各原子の相互作用エネルギーを計算した。静電相互作用エネルギーを計算する場合には各格子状にプローブとして $+1.0$ の電荷を、また立体的相互作用エネルギーを計算する場合には sp^3 軌道を持つ炭素原子を置いた。得られたデータのマトリクスより PLS 法を用いて潜在変数 (component) の抽出、解析を行った。Leave-one-out による交互確認法 (cross-validation) から、最適な component の数を決定した。Cross-validated $r^2 = q^2 > 0.3$ なら最適 component 数で解析を行って相関式を得た。相関式によって、活性にとって有利あるいは不利な立体的、静電的領域を三次元グラフィック表示した。また、すべての化合物を用いた場合には、 $21 \text{ \AA} \times 33 \text{ \AA} \times 27 \text{ \AA}$ ($X = -11 \sim 10$, $Y = -18 \sim 15$, $Z = -15 \sim 12$) の空間を用いた。

2-3 結果

2-3-1 イミダクロプリド関連化合物の結合様式の予測

CoMFA の結果を Table 2-1 に示す。これらの式において、 CN は潜在変数の数、 s_{press} は leave-one-out による交互確認法によって得られた標準偏差、 RC_{steric} 、 RC_{electro} はそれぞれ立体相互作用と静電相互作用が結合活性に影響を与える際の寄与率を示す。

最初に 19 個 (1~3, 8~17, 31~36) の化合物を用いて、式 [2-2]~[2-9] を得た。これらの中で、[2-3] 式が [2-8] 式を除く他のどの式よりも小さな CN を持つにも関わらず、もっとも高い q^2 値を持った。これらの式で、有意とは考えられない [2-4] 式を除いて、活性に影響を及ぼす立体的相互作用と静電的相

Table 2-1 Correlation Equations from CoMFA for the Binding Activity of Test Compounds
 $\log(1/K_i) = A + [\text{CoMFA field terms}]$

Super- position	Confor- mation	A	CN	n	s	r ²	Cross-validated		RC _{steric}	RC _{electro}	eqn no.
							s _{press}	q ²			
SP-A	Imi-I	1.65	4	19	0.261	0.969	1.012	0.536	49.5	50.5	[2-2]
A	II	3.80	3	19	0.451	0.901	0.857	0.643	37.9	62.1	[2-3]
A	III	^a	4	19	^a	^a	1.317	0.213	^a	^a	[2-4]
A	IV	2.64	4	19	0.221	0.978	10.86	0.464	45.3	54.7	[2-5]
B	I	2.69	4	19	0.443	0.909	1.108	0.430	48.7	51.3	[2-6]
B	II	4.24	4	19	0.350	0.948	1.120	0.431	57.4	42.6	[2-7]
B	III	4.07	3	19	0.594	0.828	1.071	0.442	52.9	47.1	[2-8]
B	IV	4.41	4	19	0.423	0.919	1.130	0.420	53.8	46.2	[2-9]

^a Not calculated.

Table 2-2 Correlation Equations from CoMFA Including Natural nAChR Agonists

$$\log(1/K_i) = A + [\text{CoMFA field terms}]$$

Super- position	Confor- mation	chirality ^a	A	CN	n	s	r ²	Cross-validated				eqn no.
								s _{press}	q ²	RC _{steric}	RC _{electro}	
SP-A	Imi-I	R	2.25	5	22	0.260	0.966	1.064	0.429	41.2	58.8	[2-10]
A	II	R	3.90	4	22	0.396	0.916	0.884	0.581	33.0	67.0	[2-11]
A	IV	R	3.64	5	22	0.224	0.975	1.051	0.445	42.8	57.2	[2-12]
B	I	R	3.97	4	22	0.622	0.788	1.103	0.430	51.7	48.3	[2-13]
B	II	R	4.46	5	22	0.394	0.922	1.176	0.303	49.4	50.6	[2-14]
B	III	R	4.21	4	22	0.590	0.814	1.111	0.339	47.4	52.6	[2-15]
B	IV	R	4.99	5	22	0.404	0.918	1.282	0.172	48.7	51.3	[2-16]
A	I	S	2.22	5	22	0.256	0.967	1.052	0.442	38.8	61.2	[2-17]
A	II	S	3.93	4	22	0.398	0.915	0.862	0.602	35.4	64.6	[2-18]
A	IV	S	3.73	5	22	0.220	0.976	1.047	0.448	42.5	57.5	[2-20]
B	I	S	4.00	4	22	0.620	0.789	1.095	0.342	52.3	47.7	[2-21]
B	II	S	^b	5	22	^b	^b	1.180	0.298	^b	^b	[2-22]
B	III	S	4.26	4	22	0.595	0.810	1.106	0.345	50.3	49.7	[2-23]
B	IV	S	^b	5	22	^b	^b	1.273	0.183	^b	^b	[2-24]

^a Chirality of the protonated (-)-nicotine (**51**).

^b Not calculated.

以上で得られた CoMFA の結果をさらに検証するために、50~52 の化合物を加えて同様に解析を行ったところ、式 [2-10]~[2-24] を得た (Table 2-2)。これらの式の中で [2-3] に対応する [2-11], [2-18] が最も高い q^2 値を示した。化合物 51 の R 体は S 体に比べて、約 4 kcal/mol エネルギー的に安定であり、また得られた相関式および活性に影響を表す領域は両コンフォーマー間でほとんど差がなかった。[2-11] 式によって得られた $\log(1/K_i)$ 値を Table 2-3 に示した。

Table 2-3 Comparison of Observed and Calculated Binding Activity According to Equation [2-11]

No.	$\log(1/K_i)$		
	Obsd.	Calcd.	Δ
1	7.30	6.89	0.41
2	7.49	7.03	0.46
3	6.72	6.90	-0.18
8	4.47	4.18	0.29
9	4.71	4.97	-0.26
10	4.84	5.34	-0.50
11	3.14	2.96	0.18
12	5.49	6.46	-0.97
13	5.30	5.48	-0.18
14	6.97	6.84	0.13
15	5.35	5.50	-0.15
16 ^a	6.00	5.56	0.44
17	3.83	4.12	-0.39
31	5.09	4.48	0.61
32	5.11	5.42	-0.31
33	7.11	6.99	0.12
34	6.40	6.34	0.06
35	7.00	7.01	-0.01
36	7.70	7.60	0.10
50	5.71	5.77	-0.06
51	6.03	6.01	0.02
52	6.73	6.63	0.10

^a Imidacloprid.

Fig. 2-7. は [2-11] によって得られた, 活性に対して影響を及ぼす立体的な領域および静電的な領域と imidacloprid の重ね合わせの図を示している. Fig. 2-7. (a) の緑の領域は, この部位に化合物の置換基が存在していると活性に有利に働く領域, また, 黄色の領域はこの部位に化合物の置換基が存在すると活性に不利に働く領域を示している. また, Fig. 2-7. (b) の赤の領域は, この位置に化合物側に負電荷があると結合活性に有利に働く領域, 青の領域は, この位置に化合物側に正電荷があると活性に有利に働く領域を示す.

立体的また静電的に影響を及ぼす領域はともに imidacloprid の nitro 基から imidazolidine 部位にかけてよく現れている. 立体的に有利に働く領域が nitro 基を含む平面に対して片側に, 不利に働く領域が逆側に現れている. 負電荷が有利に働く領域は nitro 基の酸素原子の周り, 正電荷が有利に働く領域は imidazolidine 環の 2 位の炭素原子から nitro 基の窒素原子の周りにかけて現れている.

Fig. 2-7. (a) ではまた, pyridine 環の窒素原子の周りに立体的禁制領域が現れており, これはこの部位を benzene 環へ置換した際に水素原子がこの領域へと入ってしまうために結合活性が低下することに対応しているものと考えられる (化合物 1, 2 vs 12, 14).

Imidacloprid の nitroimino 部位を nitromethylene へと置換した化合物 2 は imidacloprid に比べて約 30 倍高い結合活性を持つが, これは化合物 2 の $=C<$ 部の結合角と imidacloprid の $=N-$ 部の結合角のわずかな違いに起因するものと思われる (Fig. 2-8. (a)). すなわちこの違いによって化合物 2 の nitro 基が, 結合活性に立体的に有利に働く領域により近づいている. 同様に化合物 36 の nitro 基はこの立体的に有利な領域に最も近づいており, この化合物の高い結合活性を説明できる (Fig. 2-8. (a)). Imidacloprid と化合物 2 の nitro 基を cyano 基に置換した化合物 31 と 32 はもとの化合物に比べ低い結合活性を持つが, これは cyano 基の N 原子の負電荷 (-0.07) が nitro 基の負電荷 (-0.3, -0.4) に比べて弱く, 静電的相互作用部位との相互作用が弱いためであると思われる.

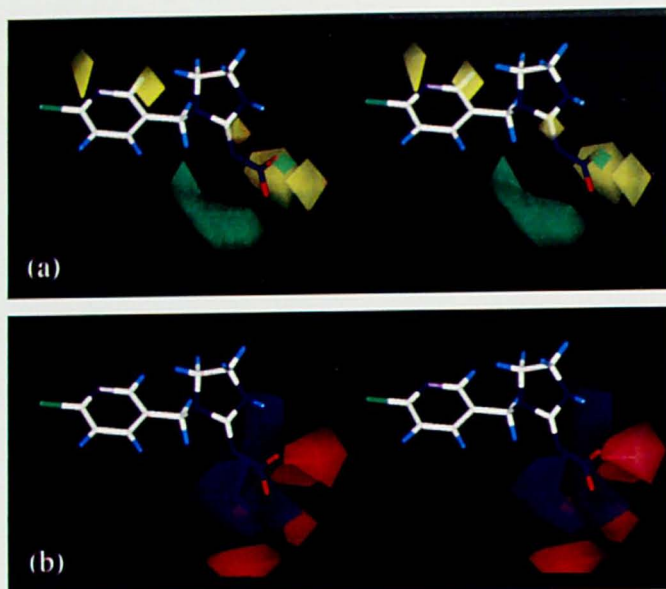


Fig. 2-7. Stereoviews of contour diagrams of the steric (a) and electrostatic (b) fields with imidacloprid (**16**) according to equation [2-11].

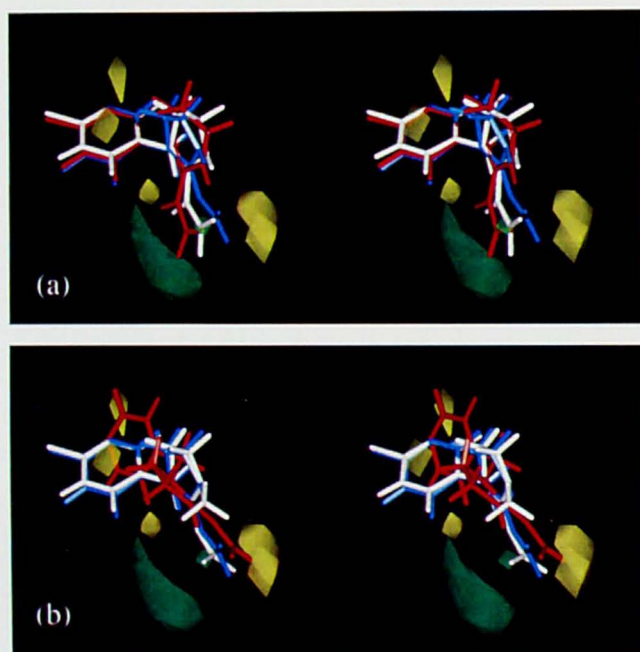


Fig. 2-8. Stereoviews of contour diagrams of the steric fields according to equation [2-11]. (a), with imidacloprid (**16**) (light blue), compound **2** (white) and compound **36** (red). (b), with imidacloprid (**16**) (light blue), compound **11** (red) and compound **17** (white).

また、化合物 32 は安定性が悪く、このこともこの化合物の低活性に寄与していると思われる。

化合物 11 と 17 は最も低い結合活性を示した。化合物 11 と imidacloprid を重ねる際に、化合物11 の pyridine 環の 4 位の窒素と imidacloprid の 3 位の窒素を最も近くなるように行った。この結果、化合物 11 の nitro 基の酸素原子が立体的禁制領域に侵入しており、この化合物の低活性を説明することが出来る (Fig. 2-8. (b)). 化合物 17 では imidazolidine 環の 3 位の窒素原子に Me-基を導入したため立体的障害による nitro 基の歪みが見られた。これにより nitro 基が立体的禁制領域に入ってしまうことで活性の低下を説明できる (Fig. 2-8. (b)). 化合物 34 の 1,3-oxazolidine 環もまた歪んだ nitro 基を有するためこの nitro 基が立体的禁制領域に入ってしまう、この化合物の低い結合活性を説明することが出来る。一方、化合物 34, 35 は化合物 2 と同様のコンフォメーションを示し、また活性も同程度であった。

2-3-2 ニテンピラム関連化合物の結合活性の予測

2-3-1 で解析した imidacloprid 関連化合物に加え、複素環が開環した構造を持つ nitenpyrum の関連化合物 (化合物 37~48) および acetamiprid (化合物 49) を加えた解析を行ったところ以下の式を得た。なお、コンフォーマーと重ね合わせ法に関しては 2-3-1 で最も有意な相関を示した Imi-II と SP-A を用いた。

$$\log(1/K_i) = 3.27 + [\text{CoMFA steric terms}] + \text{CoMFA} [\text{electrostatic terms}]$$

$$CN = 5, \quad n = 38, \quad s = 0.375, \quad r^2 = 0.932, \quad s_{\text{press}} = 0.950, \quad q^2 = 0.563, \quad RC_{\text{steric}} = 43.2, \\ RC_{\text{electro}} = 56.8 \quad [2-26]$$

[2-26] によって得られた予測値を Table 2-4 に示す。また、[2-26] 式によって得られた、結合活性に影響を及ぼす領域を Fig. 2-9. に示す。淡青色の化合物が imidacloprid, 白色の化合物が nitenpyrum の活性コンフォーマーを示している。環状の imidacloprid 関連化合物の場合と同様に imidacloprid の imidazolidine 環から nitro 基にわたる部分に立体的、あるいは静電的に活性に影響を与える領

Table 2-4 Comparison of Observed and Calculated Binding Activity According to Equation [2-26].

No.	log (1/K _i)		Δ
	Obsd.	Calcd.	
1	7.30	6.79	0.51
2	7.49	7.02	0.47
3	6.72	6.68	0.04
4	5.77	5.62	0.15
6	4.99	4.89	0.10
7	4.20	4.00	0.20
8	4.47	4.41	0.06
9	4.71	4.71	0.00
10	4.84	4.90	-0.06
11	3.14	3.43	-0.29
12	5.49	6.37	-0.88
13	5.30	5.58	-0.28
14	6.97	6.99	-0.02
15	5.35	5.74	-0.39
16 ^a	6.00	5.59	-0.44
17	3.83	4.05	-0.22
31	5.09	4.87	0.22
32	5.11	5.55	-0.44
33	7.11	6.89	0.22
34	6.40	6.30	0.10
35	7.00	6.98	0.02
36	7.70	7.79	-0.09
37	3.71	4.36	-0.65
38	3.57	3.51	0.06
39	5.48	4.58	0.90
40	3.39	3.37	0.02
41 ^b	5.17	5.16	0.01
42	3.46	3.99	-0.53
43	3.27	3.10	0.17

次ページへ続く

44	3.62	3.41	0.21
45	3.24	2.92	0.32
46	6.24	5.97	0.27
47	5.96	6.38	-0.42
48	4.14	4.29	-0.15
49 ^c	5.31	5.38	-0.07
50	5.71	5.83	-0.12
51	6.03	6.37	-0.34
52	6.73	6.25	0.48

^a Imidacloprid.

^b Nitenpyram.

^c Acetamiprid.

域が示されている。Fig. 2-9. (a) は非環状化合物である nitenpyram 関連化合物を加えた解析によって得られる立体的に活性に影響を与える領域であるが、Fig. 2-7. (a) との比較において新たな領域が現れている。この領域のうち nitenpyram の ethyl 基の周りに立体的に有利な領域が現れており、これは非環状構造の化合物群中での nitenpyram の高い活性を説明する。また imidacloprid の imidazolidine 環を 6 員環へと変換した化合物 36 の高い活性も説明できる。また imidazolidine 環を含む平面を挟むような形で立体的に不利な領域が現れており、これは Table 1-2 における Z 部位にかさ高い置換基が導入された場合の低い結合活性を説明する。Fig 2-9. (b) は静電的に影響を与える領域を示す。これは Fig. 2-7. (b) の領域とほぼ同じ場所に現れている。Nitenpyram の nitro 基は imidacloprid の nitro 基に比べて負電荷が有利な領域から離れており、逆に正電荷が有利な領域へ侵入している。このことはこれらの非環状の化合物が環状の化合物に比べて低活性であることを説明する。

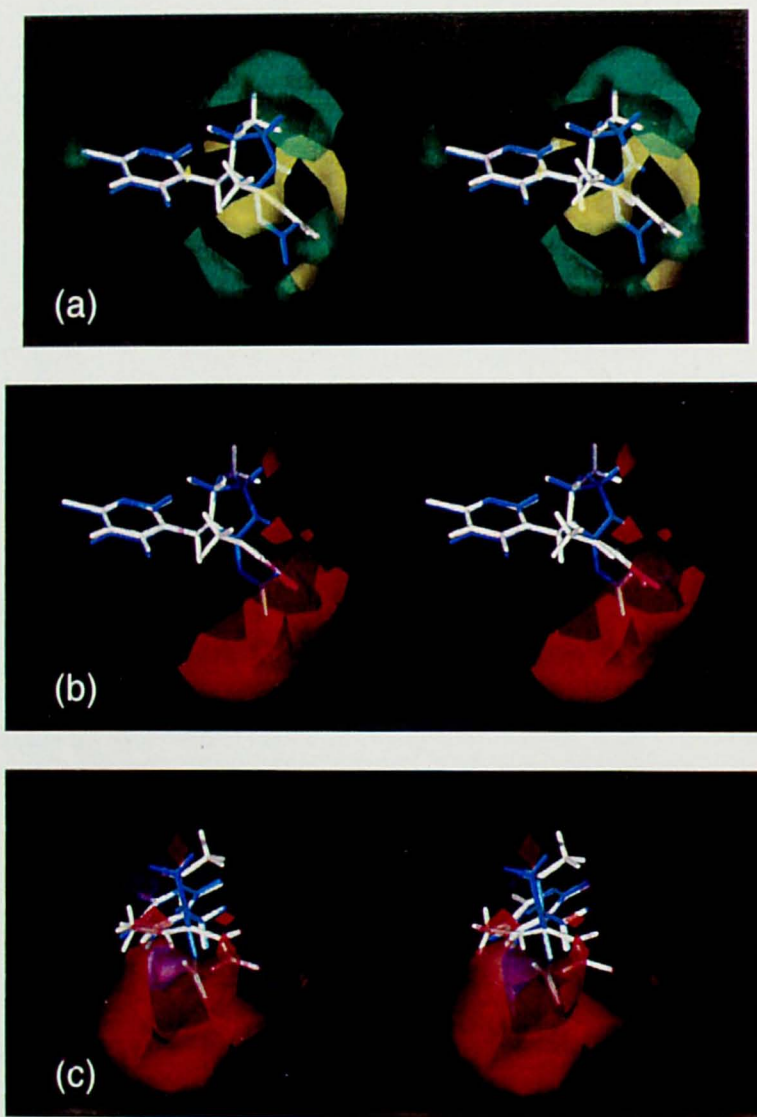


Fig. 2-9. Stereoviews of contour diagrams of the steric (a) and electrostatic (b, c) fields with imidacloprid (16) (light blue) and nitenpyram (41) (white) according to equation [2-26].

2-3-3 イミダゾリジン環の 3 位の窒素原子上に様々な置換基を導入した化合物の解析

Imidacloprid の imidazolidine 環 3 位の窒素原子上にさまざまな置換基を導入した化合物 (16~30) に関して、同様に Imi-II のコンフォーマーと SP-A の重ね合わせ方を用いて CoMFA を行った。まず leave-one-out 法を用いて PLS を行ったが、有意な結果は得られなかった。 ($n = 13$, $s_{press} = 0.451$, $q^2 = -0.507$, $CN = 3$)

尚、上記のすべての解析において疎水性パラメーター $\log P$ 項の導入は式を改善しなかった。

2-4 考察

CoMFA の結果、Imi-II のコンフォーマーを用いて SP-A の重ね合わせ法で重ね合わせを行ったときに、最も高い予測力でそれぞれの化合物の結合活性を予測、説明できることが示された。このことによって、Imi-II が imidacloprid の活性コンフォーマーであることが示唆された。この結果は pyridine 環の窒素原子がイェバエの nAChR の水素結合供与部位と相互作用をするという、山本らの仮説¹³⁾を支持した。CoMFA によって得られた活性に影響を与える領域の分布から、imidacloprid の imidazolidine 環から nitro 基にわたる部位は受容体の立体的、静電的相互作用部位に囲まれていることが示唆された。このことよりこれらの化合物が受容体と結合する際には nitro 基が静電的にも立体的にも重要であることが示された。つまり、pyridine 環の窒素原子と imidazolidine 環の 1 位の窒素原子で受容体に結合した場合の nitro 基の位置が受容体複合体の安定性に影響を与えることが示唆された。

非環状構造の nitenpyram 関連化合物のコンフォメーションは imidacloprid 関連化合物のコンフォメーションとかなり異なることが示された。しかし、imidacloprid 関連化合物と同時に解析しても活性を予測できることから、これら

の化合物が imidacloprid と同様な様式で受容体と相互作用していることが示された。この場合に、Table 1-2 における Y 部位にある程度の大きさを持った置換基があると活性に有利に働くことが明らかになった。このことは受容体に疎水相互作用部位が存在することを示唆する。この作用によって nitenpyram はその nitro 基が静電的に不利な部位にあるにもかかわらず、高い結合活性を示すと考えられる。

Pyridine 環の窒素原子が nAChR と水素結合を介して相互作用をする仮説をもとにしたにもかかわらず、CoMFA の結果からは pyridine 環の周囲の情報に関してわずかしが得られなかった。これは Agarwal 等によって指摘されているように、CoMFA で得られる領域は化合物間の構造の変化が活性に反映されている領域だけなので、かならずしも薬理学的に重要な構造のを反映するわけではないことを示す³⁴⁾。

式 [2-11] によって、nitro 基を持っていない化合物であるにもかかわらず、三種の天然由来の nAChR アゴニスト (50~52) の活性を予測することが出来た。これは、imidacloprid 関連化合物が (-)-nicotine などのアゴニストと同一の部位に同じ様式で作用していることを強く示唆する。すなわち、imidacloprid の部分的正電荷を帯びていると考えられる imidazolidine 環の 1 位の窒素原子が、nicotine 様化合物のカチオンと同様に作用していると理解できる。また (-)-nicotine がプロトネーションしてカチオンになった場合には S 体と R 体が出るが、CoMFA の結果がどちらの異性体を用いた場合でも同様な結果を導いたことより、両光学異性体が活性体として作用できることが示唆された。

Imidacloprid の imidazolidine 環の 3 位に様々な置換基を導入した化合物について、CoMFA による有意な結果は得られなかった。この理由は明らかではないが、その他の化合物を用いた解析結果より、imidazolidine 環の 3 位の周辺には厳しい立体的制約があることが明らかになっている。この立体的制約によりこれらの化合物の一部が他の化合物とは異なる様式で受容体に結合している可能性がある。しかし、これを検証するには今回の研究方法とは異なった手法を

用いる必要があるものと思われる。

CoMFA で得られた知見を Fig. 2-10. に模式的に示す。

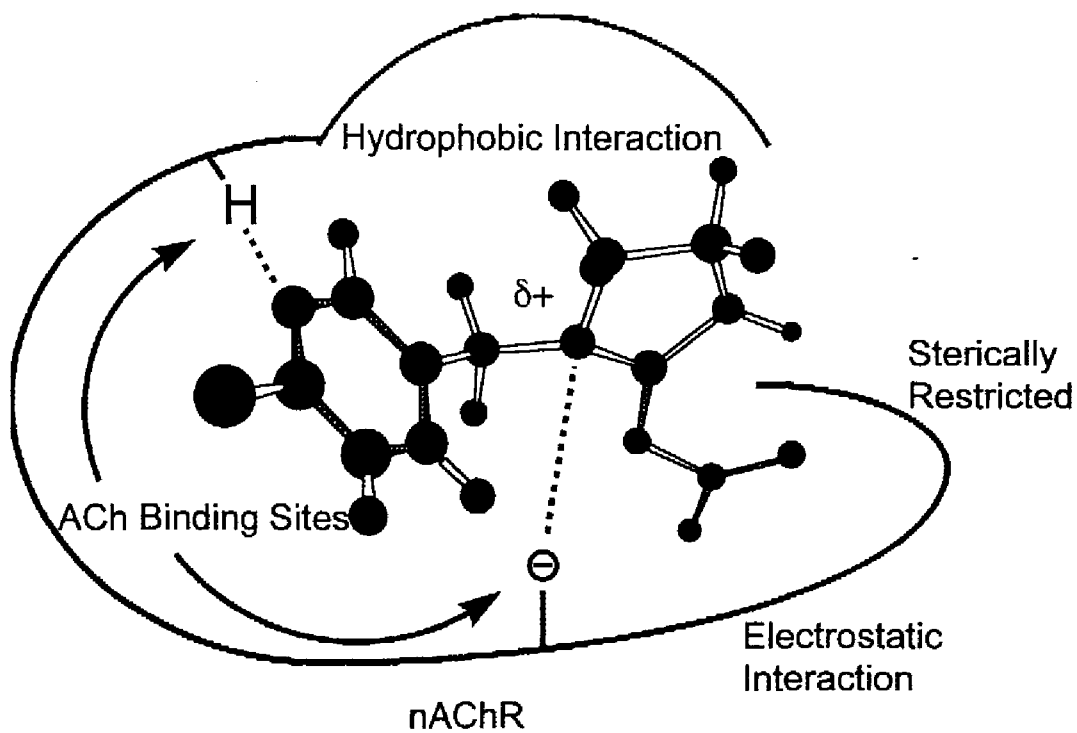


Fig. 2-10. Predicted binding model of imidacloprid.

第 3 章 イミダクロプリドおよび関連化合物の殺虫活性および神経活性と結合活性の関係

3-1 緒言

ニトロメチレン系化合物が発見された当時、これらの化合物を接触投薬、あるいは経口投薬された昆虫を詳しく観察することによって、これらの化合物が昆虫の中樞神経に作用しているということが予測された⁹⁾。さらにワモンゴキブリの神経標本や培養細胞を用いることによって、いくつかの化合物はこれらの神経中の nAChR に作用することが電気生理学的に示された⁹⁾⁻¹¹⁾。また、これら一連の化合物の昆虫の頭部膜画分に対する結合活性も精力的に測定されている^{5),12),14),15)}。これらの化合物の結合活性と、殺虫活性⁵⁾やノックダウン活性の間に正の相関があることも示されている¹⁵⁾。

殺虫剤の殺虫活性を評価する際には、それらの化合物の昆虫表皮に対する浸透性や昆虫体内での移行性、また代謝過程、作用部位への結合親和性等、様々な要因を考慮に入れる必要がある。本章では imidacloprid および関連化合物の *in vivo* の活性と *in vitro* の活性の関係を、先に述べた様々な要因を念頭に置いて考察した。殺虫活性はワモンゴキブリを用いて注射法によって行った。この際、表皮に対する浸透性という要因を省くために皮下注射を用いた。また、代謝阻害剤を用いて化合物に対する代謝を最小限に抑えることを試みた。またアゴニスト活性を測定するために神経活性を求めた。神経活性はワモンゴキブリの摘出神経標本を用いて自発性放電 (spontaneous discharge; SD) をある一定の頻度まで上昇させる化合物の濃度として求めた。これらの活性間およびこれらの活性と第一章で求めた結合活性との間の関係を各化合物の疎水性を考慮に入れて定量的に解析した。

3-2 実験方法

3-2-1 供試化合物

供試化合物として 1~3, 8~17, 31~36 の 19 化合物を用いた (Table 1-1). 代謝阻害剤として用いた propargyl propyl benzenephosphonate (NIA16388; NIA) は以前当研究室で合成されたのものを用いた. 酸化代謝阻害剤として用いた piperonyl butoxide (PB) は和光純薬工業株式会社より購入した.

3-2-2 供試昆虫

殺虫活性および神経活性の測定にはワモンゴキブリ (*Periplaneta americana* L.) 雄成虫を用いた. 殺虫活性の測定に用いたワモンゴキブリはラット用の飼料と水により 24 ± 1 °C, 相対湿度 60 ± 5 %, 10 L - 14 D という条件下で当研究室において飼育された. また, 神経活性の測定に用いたワモンゴキブリはアース製薬株式会社によって恵与された.

3-2-3 殺虫試験³⁵⁾

羽化後 1~3 ヶ月経たワモンゴキブリを用いた. 各化合物の methanol 溶液を log スケールで 0.1 ずつ変化するような容量 (1 ~ 10 μ l) にてワモンゴキブリの腹部に皮下注射した. 供試化合物の昆虫体内での代謝を防ぐ場合には, 共力剤, PB (50 μ g), NIA (50 μ g), PB (50 μ g) + NIA (50 μ g) の methanol 溶液 1 μ l を供試化合物を注射する一時間前に同様に注射した. 各化合物の各薬量に対し, 三匹の昆虫を用いた. 注射後, 20 ± 1 °C のインキュベータに静置し, 24 時間後の症状を観察した. 三匹の内二匹が死ぬ最小の薬量を最小致死薬量 (minimum lethal dose; MLD) として求めた. この際, 麻痺して背を下にした状態から快復できない昆虫も死んでいるものとして数えた. Methanol のみもしくは使用した量の共力剤のみの注射はワモンゴキブリに対して毒性を示さなかった. MLD の逆対数値を殺虫活性の指標として求めた. それぞれの活性値は少なくとも二回の

データの平均値として求めた。標準誤差は 0.2 以内であった。

3-2-4 神経活性の測定

ワモンゴキブリの腹部中央神経索を、腹部第 4 神経節の尾毛側と尾毛神経の末端で切断、摘出し生理的塩類溶液 (210.4 mM NaCl, 2.9 mM KCl, 1.8 mM Na_2HPO_4 , 1.8 mM CaCl_2 , 0.2 mM KH_2PO_4) に浸漬した。神経標本に付着した脂肪等を実体顕微鏡下にて切除し、第 5 神経節の先の 2 本の神経索をピンセットで分離した。分離した神経索のうち的一本を、先端を細くし、あらかじめ生理的塩類溶液で満たしたガラス管に吸引固定し、Fig. 3-1. の様に生理的塩類溶液で満たしたチャンバー内にセットした。誘起された SD はガラス管内に固定した銀線 (記録電極) とガラス管の外側に設置した銀線 (不関電極) の間の電位差の変化をパルスとして観測した。SD はオシロスコープ (日本光電製 VC-8 型) で観察するとともに、12 mV 以上のパルスをパルスカウンター (日本光電製 MET-1100 型) で頻度として計測した。SD の累積頻度を 30 秒間ごとに連続的に計測し、そのカウント数をチャートレコーダー上に記録した。実際の解

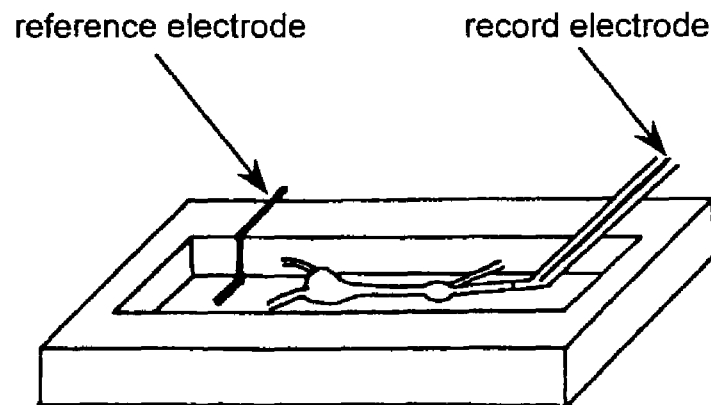


Fig. 3-1. Scheme of electrodes and a chamber for measurement of neurophysiological activity.

析に当たっては、一秒あたりの頻度 (Hz) に変換したものをを用いた。なおこの測定は 23 ± 1 °C で行った。

3-2-5 疎水性パラメータの測定

まず、化合物の水溶液中での安定性を測定した。それぞれの化合物の緩衝溶液 (+2% v/v ethanol, 3.0×10^{-5} M) を 23 ± 1 °C で 5 時間放置した後、UV の吸光度を測定した。化合物 32 と 34 を除くすべての化合物の λ_{\max} の吸光度はその時間内においては変化が見られなかった。Table 3-1 における標準化合物との比較より、供試化合物の λ_{\max} の吸光は imidazolidine 環および相当する複素環の N(N)C= に起因するものと考えられた。ゆえにこの波長での UV 吸収度の測定が化合物の安定性を評価する際に妥当なものであると考えられた。

以上の実験で不安定であった二つを除いた化合物に関して、水 / *n*-octanol 系の分配係数 *P* の対数值 $\log P$ を疎水性の指標としてフラスコ振盪法により求めた。あらかじめ *n*-octanol で飽和させた蒸留水 (4 ml) をもちいて各化合物の水溶液を $2\sim 4 \times 10^{-4}$ M になるように調製した。この水溶液にあらかじめ蒸留水で飽和させた *n*-octanol を 20 ml 加え、 23 ± 1 °C で 30 分間激しく振盪した。遠心分離後、*n*-octanol 層を除き、水溶液中の化合物濃度を分光学的に求めた。*n*-Octanol 層の濃度は最初の水溶液濃度と振盪後の水溶液の差により求めた。*P* 値を各層の濃度より求め、求めた各化合物の $\log P$ 値を Table 3-1 に示した。

3-3 結果

3-3-1 殺虫活性

得られた $\log(1/MLD)$ 値を Table 3-2 に示した。高濃度の薬剤を注射した場合、昆虫は数分以内にけいれんを起こした。しかし、この症状は持続せず、薬量に応じて死亡もしくは症状の回復を見せた。共力剤である PB および NIA は化

Table 3-1 Range of pH Not Affecting the UV Spectrum and Physical Properties of Imidacloprid and Related Compounds

No.	pH ^a	λ_{\max} (nm)	ϵ_{\max}	logP
1	0.12 - 10.06	322	2.43×10^4	-1.02
2	4.91 - 10.74	322	2.40×10^4	-0.19
3	6.09 - 9.15	322	2.35×10^4	-0.59
8	5.20 - 9.13	330	2.72×10^4	-0.23
9	5.00 - 9.15	320	2.11×10^4	-0.23
10	5.12 - 10.40	322	2.41×10^4	-0.87
11	5.12 - 10.08	322	2.34×10^4	-1.05
12	3.67 - 10.61	320	2.43×10^4	0.33
13	3.66 - 10.86	322	2.49×10^4	0.99
14	5.18 - 9.15	322	2.42×10^4	-0.04
15	1.37 - 10.48	268	2.00×10^4	-0.19
16	5.00 - 9.10	270	2.25×10^4	0.59
17	1.24 - 10.63	254	1.43×10^4	0.26
31	6.06 - 9.12	258	4.90×10^3	0.77
32	^b			^d
33	1.32 - 9.13	354	3.39×10^4	0.68
34	^c			^d
35	4.65 - 9.13	356	2.82×10^4	0.65
36	5.12 - 11.28	314	2.51×10^4	-0.62
3-Picoline		262	3.43×10^3	
<i>p</i> -Chlorotoluene		266	1.78×10^2	
Toluene		260	1.59×10^2	

^a UV spectra were not pH-dependent in the indicated range. Absorbance at λ_{\max} did not change for up to 5 hr incubation.

^b The compound decomposed to around 82 % by 5 hr at pH 7.0.

^c The compound decomposed to around 95 % by 3.5 hr at pH 7.1.

^d Not determined.

化合物の殺虫活性を増大させた。これら二共力剤の比較に置いて、NIAの方がPBよりもその効果は優れていた(Table 3-2)。この二共力剤を同時に用いた場合は、NIA単独で用いた場合に比べて、わずかながらその効果が上昇した。

Table 3-2 Insecticidal, Neurophysiological and Binding Activities of Test Compounds

No.	log(1/MLD)				Obs.	Calcd. ^a	log(1/EC)	log(1/K _i)	
	Alone	+ PB	+ NIA	+ (PB + NIA)					
				Obs.					Calcd. ^a
1	<6.13	6.23	7.09	7.19	7.93	4.54	7.30		
2	9.10	9.55	10.00	10.25	10.16	5.65	7.49		
3	7.88	8.99	9.39	9.59	9.13	4.94	6.72		
8	8.71	9.35	10.26	10.35	10.55	6.10	4.47		
9	<i>b</i>	<i>b</i>	<i>b</i>	8.16	8.73	4.12	4.71		
10	6.50	7.20	7.29	7.69	7.50	3.70	4.84		
11	<6.30	6.81	7.38	7.68	7.44	4.09	3.14		
12	7.08	8.28	8.59	8.68	9.16	4.66	5.49		
13	8.04	8.94	9.34	9.64	9.37	6.04	5.30		
14	<i>b</i>	<i>b</i>	<i>b</i>	10.27	9.92	5.35	6.97		
15	<6.29	<6.29	<6.29	<6.29	9.38	4.80	5.35		
16 ^c	8.47	9.57	9.97	10.17	10.37	6.30	6.00		
17	8.36	8.96	8.56	8.74	8.48	3.86	3.83		
31	<i>b</i>	<i>b</i>	<i>b</i>	9.37	9.64	5.82	5.09		
32	<i>b</i>	<i>b</i>	<i>b</i>	7.99	<i>d</i>	5.34	5.11		
33	9.18	9.98	10.38	10.38	10.19	6.25	7.11		
34	<i>b</i>	<i>b</i>	<i>b</i>	9.00	<i>d</i>	5.22	6.40		
35	9.25	10.25	10.25	10.25	10.39	6.42	7.00		
36	<i>b</i>	<i>b</i>	<i>b</i>	9.68	9.13	4.99	7.70		

^a From equation [3-2].

^b Not measured.

^c Imidacloprid.

^d Not calculated.

Imidacloprid (16) は最も殺虫活性の高い化合物に属したが、pyridine 環の 6 位に Cl-基を持たない化合物 15 は共力剤を用いた場合にも活性を示さなかった。

Nitromethyleneimidazolidine 構造を持つ化合物 (1~3, 8~14) の中で、3-pyridyl 構造を持つ化合物 1 は、phenyl 基を持つ化合物 12 に比べて活性が低かった。

この pyridine 環の 6 位に Cl-基を導入した化合物 2 は化合物 1 に比べて 1000 倍の活性の上昇が見られた。しかし, phenyl 基の 4 位への Cl-基の導入は 10 倍の活性の上昇しかもたらさなかった (13)。Pyridine 環 6 位への Me-基の導入も Cl-基の場合と同様に活性の上昇をもたらした (3)。複素環を架橋する methylene 基を削除した化合物 8 に関して, 大きな活性の変化は見られなかったが, 逆に methylene 鎖を 1 から 2 へと伸ばした化合物 9 では活性の低下が見られた。無置換の pyridine 環を持つ化合物の活性間には大きな変化が見られなかった (1, 10, 11)。Thiazole 環を有する化合物 14 は化合物 2 と同程度の活性を示した。

Nitroimino 構造を持つ imidacloprid (16) の活性は対応する nitromethylene 化合物 2 と同程度の活性を示した。しかし, 化合物 16 から Cl-基を除いた化合物 15 ではほとんど殺虫活性を示さなかった。また化合物 16 の imidazolidine 環の 3 位の窒素原子上に Me-基を導入した化合物 17 は 16 よりも低い活性を示した。Nitromethylene 基のかわりに cyanoimino (31), あるいは cyanomethylene (32) 基を導入した化合物では化合物 2 に比べて低い活性を示した。化合物 32 の低い活性は, おそらくこの化合物が不安定であることに起因するものと思われる。Imidazolidine 環の構造を変化させた化合物 (33~36) ではそれほど活性の変化が見られなかったが, 化合物 34 の低い活性はこの化合物が不安定であることに起因するものと思われる。

3-3-2 自発性放電頻度を与える影響

神経標本の自発性放電に対する供試化合物の効果は, 以前にニトロメチレン化合物に関して報告されたように二相性を示した⁹⁾。神経標本に対する薬剤処理によって, 短時間で著しい SD の増加が見られた。場合によっては反復興奮が数秒間観察された。この後, 神経電位はコントロールと同程度あるいはそれ以下にまで鎮静化した。Fig. 3-2. は imidacloprid (16) を用いたときの SD の測定

結果を示す。それぞれのピークは 30 秒間でのスパイクの積算数を示す。同じ濃度の薬液を投与した場合でも、神経標本によって最大頻度に到達するまでに要する時間は異なっていた。チャート中には不連続的な高い頻度を示すピークが見られたがこれを無視すると、供試化合物によって引き起こされる最大頻度は化合物の濃度に依存していた。ゆえに、最大頻度と薬液を投与する前の定常状態の頻度の差を N_{max} として化合物の興奮活性の指標とした。Fig. 3-3. は化合物 16 の濃度と N_{max} の関係を表し、それぞれの対数をとった場合にこれが直線関係になった。 N_{max} を 100 Hz にまで上昇させる化合物の濃度を $\log(1/EC)$ として求めた。求めた $\log(1/EC)$ 値を Table 3-2 に示す。

$\log(1/EC)$ 値は化合物 16, 35 のものが最も高く、化合物 10 のものが最低であった。3-Pyridylmethyl 部位の pyridine 環の 6 位に Cl-基を導入した化合物

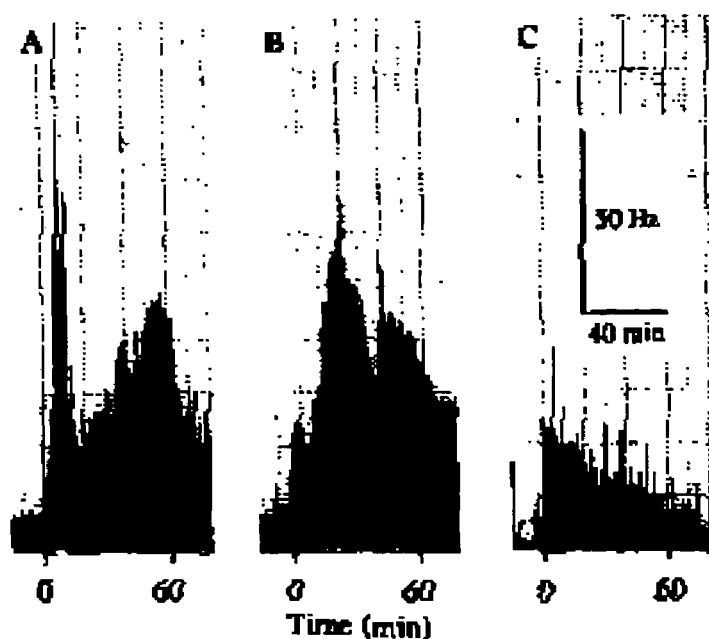


Fig. 3-2. Chart records showing the effect of imidacloprid (16) on SD. Nerve preparations were immersed at Time 0 in saline solutions containing compound 16 at 1.35×10^{-6} M (A), 5.38×10^{-7} M (B), and 1.35×10^{-7} M (C).

(1 vs 2, 15 vs 16) では活性の上昇が見られ, これは phenyl 基を持つ化合物に置いても同様であった (12 vs 13). Phenyl 基を持つ化合物は 3-pyridyl 基を持つ化合物よりもわずかに活性が高かった (1, 2 vs 12, 13). 無置換の pyridine 環を持つ化合物 (1, 10, 11) では 3-pyridyl 体 (1) が最も高い活性を示した.

Imidacloprid (16) の imidazolidine 環の 3 位に Me-基を導入した化合物 17 の活性は 16 に比べて非常に低かった. Cyanoimino 基 (31), cyanomethylene (32) 基を有する化合物は nitromethylene 基を有する化合物 2 と同程度の活性を示した. 化合物 2 の imidazolidine 環の 3 位の窒素を炭素 (33) や硫黄 (35) に変換した化合物はもとの化合物 2 と同程度の活性を保持したが, 酸素に変換した化合物 34 は少し活性が低下した.

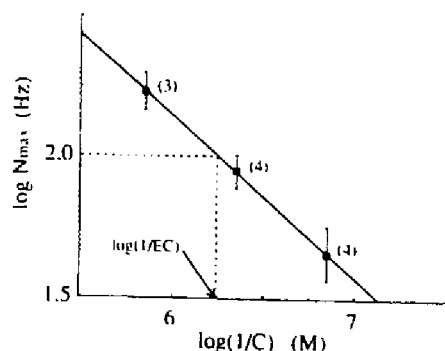


Fig. 3-3. Dose-response relationship of imidacloprid (16) for the increase in SD. Integers in parentheses are the number of determinations. Vertical line shows the standard deviation.

3-4 考察

共力剤である PB の投与による殺虫活性の上昇は, 供試化合物の酸化的代謝の阻害によるものと考えられる. 酸化され得る部位としては Reed らに指摘さ

れているように、nitromethylene あるいはそれに相当する部位であると考えられる。NIA はピレスロイド剤の殺虫試験の場合のエステル加水分解代謝の阻害剤であるが、この場合の共力効果の原因は明らかでない。しかし、ラットの肝臓中での *N*-methylation を阻害するという報告があるので、これらの化合物中の窒素原子に関する代謝に関係している可能性が考えられる。

3-Pyridyl 基の 6 位に Cl-基を導入した際の急激な殺虫活性の上昇の原因として、Cl-基がこの部位の代謝を防いでいることが考えられる。富沢等は nicotine のバクテリアによる代謝過程に基づいてこの仮説を提唱している⁹⁾。これはこの部位に Me-基を導入した化合物も同様に高い殺虫活性を示すことから推測される。

SD の頻度が上昇した後の鎮静化は、供試化合物が神経標本に対して阻害的に働いているか、もしくは神経標本が脱感作状態になっていることを示す。この抑制的な効果も殺虫活性になんらかの影響を及ぼすと考えられるが、本実験法ではこの効果を評価できなかった。しかし、今回用いた供試化合物では神経活性が高いほど殺虫活性が高くなる傾向が見られたため、殺虫活性値および $\log P$ 値が得られなかった化合物 15, 32, 34 を除いて、殺虫活性値と神経活性値の相関を定量的に求めると以下の式が得られた。

$$\log(1/MLD) = 4.217(\pm 1.900) + 0.973(\pm 0.362) \log(1/EC) \quad [3-1]$$

$n = 16$ (1~3, 8~14, 16, 17, 31, 33, 35, 36), $s = 0.612$, $r = 0.839$, $F(1,14) = 33.3$

この式にさらに $(\log P)^2$ 項を導入すると、式は改善され以下の式が得られた。

$$\log(1/MLD) = 5.024(\pm 1.347) + 0.916(\pm 0.246) \log(1/EC) - 1.206(\pm 0.611)(\log P)^2 \quad [3-2]$$

$n = 16$ (1~3, 8~14, 16, 17, 31, 33, 35, 36), $s = 0.411$, $r = 0.936$, $F(2,13) = 46.2$

$\log P$ 項の導入は式 [3-2] を改善しなかった。[3-2] 式より神経活性が同程度の化合物では殺虫活性が疎水性に対して、 $\log P$ 値の 0 付近が最大になるよう

なパラボラ型に分布することが明らかとなった。[3-2] 式によって計算された $\log(1/MLD)$ 値を Table 3-2 に示した。化合物 15 が予測値よりも大幅に小さいことの原因は明らかではない。 $(\log P)^2$ 項はおそらく、昆虫体内での輸送の要因を反映しているものと考えられる。

さらに、第 1 章で求めた nAChR に対する結合活性値との相関を両活性値について検討したところ以下の式を得た。

$$\log(1/MLD) = 6.399(\pm 1.730) + 0.531(\pm 0.272) \log(1/K_i) + 1.131(\pm 0.512) \log P - 1.035(\pm 0.947) (\log P)^2 \quad [3-3]$$

$n = 14$ (1~3, 9, 10, 12~14, 16, 17, 31, 33, 35, 36), $s = 0.524$, $r = 0.897$, $F(3,10) = 13.749$

$$\log(1/EC) = 2.061(\pm 0.955) + 0.505(\pm 0.155) \log(1/K_i) + 1.190(\pm 0.293) \log P \quad [3-4]$$

$n = 15$ (1~3, 9, 10, 12~17, 31, 33, 35, 36), $s = 0.310$, $r = 0.948$, $F(2,12) = 52.9$

化合物 8 と 11 はその予測値と実測値が大きく異なったために [3-3], [3-4] には含めなかった。これら二化合物の活性値をこれらの式で説明出来ない理由として、これらの化合物が他の化合物とは異なる様式で神経活性を発現させている可能性が挙げられる。

[3-3] より化合物の結合活性が高いほど殺虫活性が高くなっていることがわかる。また $\log P$ 値には殺虫活性を最大にする最適値があり、その値が約 0.5 であることがわかる。これは生体内での膜の透過の過程および体液中での溶解度等のバランスがとれている化合物が最も高い殺虫活性を発揮することを表している。また、[3-4] より化合物の結合活性と疎水性が高いほど神経活性が高くなることがわかる。 $\log P$ 項の係数が約 1 であることより、この項は神経膜の透過性を表していることを示す。これらの結果から化合物が nAChR に結合することによって神経を興奮させ、その作用によって昆虫を死に至らしめることが定量的に示された。

第 4 章 シビレエイ発電器官およびラット脳膜画分に対するイミダクロプリドおよび関連化合物の結合活性

4-1 緒言

ニコチン性アセチルコリン受容体 (nAChR) は、この受容体を多量に含むシビレエイ (*Torpedo californica*) から適度な特異的親和性を持ったヘビ毒 (Cobrotoxin) を用いて、最初に単離精製された受容体タンパク質である。このタンパク質は 5 つのサブユニット ($\alpha_2\beta\gamma\delta$) からなる膜貫通型タンパク質で、2 分子のアセチルコリン (ACh) の結合によって開閉するイオンチャネルを形成している。シビレエイの nAChR の一次構造の決定によって、これに相同性を持つ受容体タンパク質がウシやヒト等の様々な動物から見つげられた^{36),37)}。nAChR はその存在部位により、神経筋接合型と中枢神経型に分けられ、その薬剤に対する感受性も異なっている。特に中枢神経型にはさらに複数のサブタイプが存在し、そのサブユニットの組み合わせによって非常に多種の受容体が存在していると考えられる。

ACh やそのアゴニストおよび α -bungarotoxin 等の一部のアンタゴニストが nAChR の α サブユニットに結合するという事は、放射性リガンドや、photoaffinity プローブ³⁸⁾⁻⁴²⁾を用いた実験によって示されている。その結合部位と推定されているドメインのアミノ酸配列はその種類を問わず保存されており、種々のアゴニストもこのドメインに結合すると考えられている。その部分配列を持つペプチドを用いた結合実験も数多く行われている⁴³⁾⁻⁴⁶⁾。

昆虫の nAChR に関してもショウジョウバエ等の遺伝子解析によって、 α サブユニットをコードしていると予測される 2 種類の cDNA が同定されている⁴⁷⁾⁻⁵⁰⁾。この cDNA に対応するアミノ酸配列でも ACh のバインディングドメインは他の動物のものと高い相同性を示している。従って、imidacloprid および関連化合物が昆虫の nAChR に高い親和性を持って結合するならば、他の動物種

の nAChR にも結合する可能性がある。現在までに, imidacloprid の昆虫に対する選択性に関していくつかの報告がなされている。ラットの筋接合型の nAChR を発現させた細胞に対して, imidacloprid はアゴニスト活性を示さなかった⁵¹⁾。また, シビレエイの発電器官由来の nAChR に対する結合活性も測定されており, その活性は非常に低かった⁵²⁾。さらに, [³H](-)nicotine を用いたラットの中樞神経型 nAChR に対する結合活性の測定がなされており, imidacloprid はこの受容体に対する親和性が非常に低いことが示されている¹⁴⁾が, [¹²⁵I]α-BGTX 感受性の中樞神経型 nAChR (α7-9 subunit) に対する結合活性はいまだ報告されていない。本章では, この受容体に対する結合活性を測定しイエバエのそれと比較した。

4-2 実験方法

4-2-1 供試化合物

シビレエイ (*Torpedo californica*) の nAChR に対する結合については, 化合物 1, 2, 9~13, 15, 16 を用いた (Table 1-1)。ラットの nAChR に対する結合については, 化合物 1~17, 31~49 を用いた (Table 1-1, 1-2)。(3-[¹²⁵I]iodotyrosyl⁶⁴)α-bungarotoxin ([¹²⁵I]α-BGTX: 74 TBq/mol) は Amersham 社より購入した。その他の化合物は特に示さない限り和光純薬工業社, ナカライテスク社, Aldrich 社より購入した。

4-2-2 供試動物

カリフォルニア産シビレエイ (*Torpedo californica*) の発電器官は, Pacific Biomarine 社より購入した。Wister 系のラット雄 (20 g) は清水実験材料 (株) より購入した。

4-2-3 nAChR 画分の調整法

以下の実験は、0~4 °C の条件下で行った。

シビレイの発電器官膜画分を Sattelle 等の方法に従って調製した (Fig. 4-1.)¹⁰⁾。まず、-80 °C で凍結保存した発電器官をはさみで細かく切断した。切断片を電動ミキサーで、緩衝液 (10 mM Tris-HCl pH 7.4, 5 mM EDTA, 50 mM NaCl, 2 mM *N*-ethylmaleimido, 0.02 % NaN₃, 1 mM PMSF, 50 units/ml Trasylol) を組織重量に対し等量加えて粉砕した。得られた粉砕物を 3 層のガーゼで濾過した。この濾液を 3,000 × g で 10 分間、遠心分離した。上清をさらに 105,000 × g で 60 分間、遠心分離した後、上清を除き、得られた沈殿物を緩衝液 (10 mM Na₂HPO₄-HCl pH 7.4, 154 mM NaCl, 1 mM EDTA, 0.1 % PMSF, 0.02 % NaN₃) に

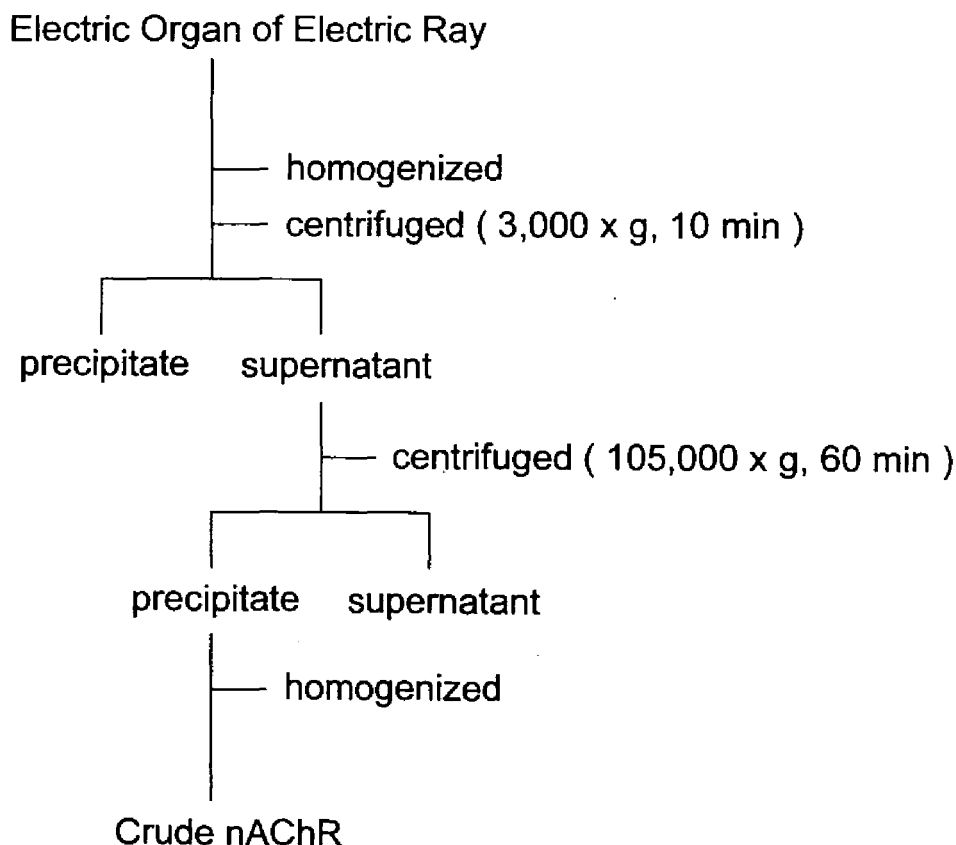


Fig. 4-1. Preparation of nAChR from Electric Ray

懸濁し，テフロン製ホモジナイザーを用いて均質化した．BCA Protein Assay Reagent (PIERCE) を用いてタンパク質量を定量し，適当な濃度 (ca. 45 μ g protein/ml) に希釈し，結合実験に用いた．

ラットからの nAChR の調製は Rapier 等の方法に従った (Fig. 4-2.)⁵³⁾．まず，ラットの頭部を切断し，脳を摘出した．これに緩衝液 (0.32 M sucrose, 1 mM EDTA, 0.1 mM PMSF, 0.1 % NaN₃) を 10 % w/v になるように加えホモジナイザーにて摩砕した．この懸濁液を 1,000 x g にて 10 分間遠心分離した．上清を分画し，沈殿物に 0.32 M sucrose 溶液を 5 ml/g original wet weight になるように加え，再度懸濁し 1,000 x g にて 10 分間遠心分離した．これらの上清画

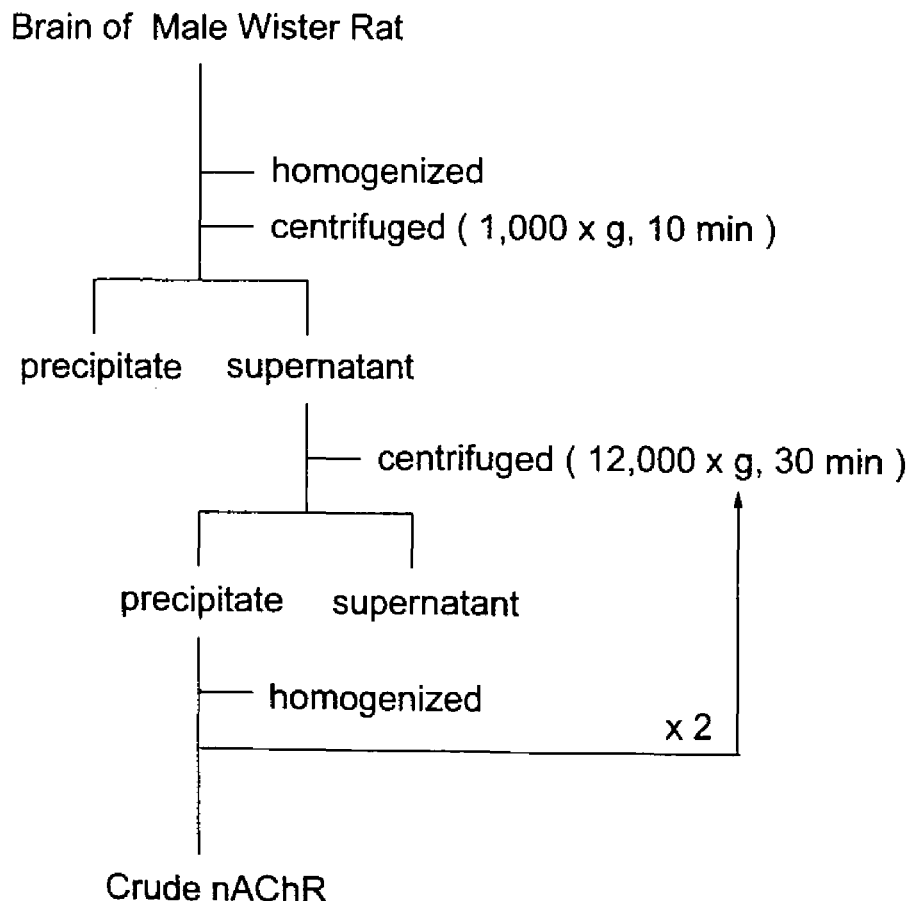


Fig. 4-2. Preparation of nAChR from Rat

分をまとめて、 $12,000 \times g$ にて 30 分間遠心分離した。この沈殿物を緩衝液 (50 mM potassium phosphate pH 7.4, 1 mM EDTA, 0.1 mM PMSF, 0.1 % NaN_3) に懸濁した (2.5 ml/g original wet weight)。同様に遠心分離、懸濁を 2 回繰り返すことによって洗浄を行った。BCA Protein Assay Reagent を用いてタンパク質を定量し、適当な濃度 (1 mg protein/ml) に希釈し、結合実験に用いた。

4-2-4 受容体結合実験

シビレエイもしくはラットの nAChR 粗画分 (それぞれ ca. 250 ng protein, 5 μg protein) を [^{125}I] α -BGTX (それぞれ 1 nM, 0.5 nM) と供試化合物と共に 96 穴のプレート上、緩衝液 (それぞれ (10 mM sodium phosphate pH 7.4, 154 mM NaCl, 1 mM EDTA, 0.1 mM PMSF, 0.02% NaN_3), (50 mM potassium phosphate pH 7.4, 1 mM EDTA, 0.1 mM PMSF, 0.1 % NaN_3) 200 μl 中にて 25°C で 60 分間インキュベートした。反応液を Unifilter GF/B (PACKARD) ですばやく濾過し、上記緩衝液で 3 回、メタノールで 1 回洗浄した。フィルターを乾燥させてから放射活性を TOPCOUNT (PACKARD) にて測定した。測定の際にはシンチレーションカクテル、Microscinti-O (PACKARD) を 30 μl 加えた。Unifilter は非特異的結合を防ぐためにあらかじめ 0.1 % の polyethyleneimine に浸漬しておいた²³⁾。特異的結合は全体のカウントより 10 μM の α -BGTX を加えて行った値を差し引いて求めた。膜画分に対する [^{125}I] α -BGTX の結合量を 50 % 阻害する化合物濃度 IC_{50} を求め、その逆対数值 $\log(1/\text{IC}_{50})$ を結合活性の指標とした。また、ラットの結合実験に関しては [1-1] 式より K_i 値を計算し、 $\log(1/K_i)$ 値を活性の指標とした。なお、ラットの nAChR 膜画分に対する [^{125}I] α -BGTX の K_d (= 0.69 nM) 値は飽和曲線を非線形回帰分析することにより求めた。

4-3 結果

Table 4-1 Binding Activities of Test Compounds

No.	log(1/IC ₅₀)		log(1/K _i)	
	electric ray	housefly	rat	housefly
1	2.92	6.67	3.47	7.30
2	2.76	6.84	4.15	7.49
3	<i>d</i>	<i>e</i>	3.07	6.72
4	<i>d</i>	<i>e</i>	<i>f</i>	5.77
5	<i>d</i>	<i>e</i>	2.55	<i>f</i>
6	<i>d</i>	<i>e</i>	2.56	4.99
7	<i>d</i>	<i>e</i>	<i>f</i>	4.20
8	<i>d</i>	<i>e</i>	<i>f</i>	4.47
9	<2.77	4.06	3.25	4.71
10	<2.77	4.19	<i>f</i>	4.84
11	3.91	2.49	<i>f</i>	3.14
12	2.37	4.84	<i>f</i>	5.49
13	2.45	4.65	3.08	5.30
14	<i>d</i>	<i>e</i>	4.24	6.97
15	2.28	4.71	<i>f</i>	5.35
16 ^a	2.77	5.35	4.08	6.00
17	<i>d</i>	<i>e</i>	2.42	3.83
31	<i>d</i>	<i>e</i>	<i>f</i>	5.09
32	<i>d</i>	<i>e</i>	2.49	5.11
33	<i>d</i>	<i>e</i>	3.00	7.11
34	<i>d</i>	<i>e</i>	2.91	6.40
35	<i>d</i>	<i>e</i>	2.92	7.00
36	<i>d</i>	<i>e</i>	3.02	7.70
37	<i>d</i>	<i>e</i>	2.42	3.71
38	<i>d</i>	<i>e</i>	<i>f</i>	3.57
39	<i>d</i>	<i>e</i>	2.75	5.48
40	<i>d</i>	<i>e</i>	<i>f</i>	2.29
41 ^b	<i>d</i>	<i>e</i>	<i>f</i>	5.17
42	<i>d</i>	<i>e</i>	<i>f</i>	3.46
43	<i>d</i>	<i>e</i>	2.45	3.27
44	<i>d</i>	<i>e</i>	2.45	3.62
45	<i>d</i>	<i>e</i>	<i>f</i>	3.24
46	<i>d</i>	<i>e</i>	2.85	6.24
47	<i>d</i>	<i>e</i>	3.99	5.96

次ページに続く

48	<i>d</i>	<i>e</i>	2.97	4.14
49 ^c	<i>d</i>	<i>e</i>	2.75	5.31

^a Imidacloprid.

^b Nitenpyram.

^c Acetamiprid.

^d Not determined.

^e Not shown.

^f No binding activity was observed.

各供試動物に対して得られた, $\log(1/IC_{50})$, $\log(1/K_i)$ 値を Table 4-1 に示した. シビレイおよびラットの nAChR に対する結合活性値は, イエバエの nAChR に対する結合活性値と比較すると 1/10~1/1000 程度であった. シビレイの結合活性値は供試化合物間においてほとんど差がなかったが, 化合物 11 は他の化合物に比べて約 10 倍高い活性を示した (Fig. 4-3. (a)).

ラットの pK_i 値は 2.4~4.3 で, イエバエの活性値が 3.2~7.7 の値を示した

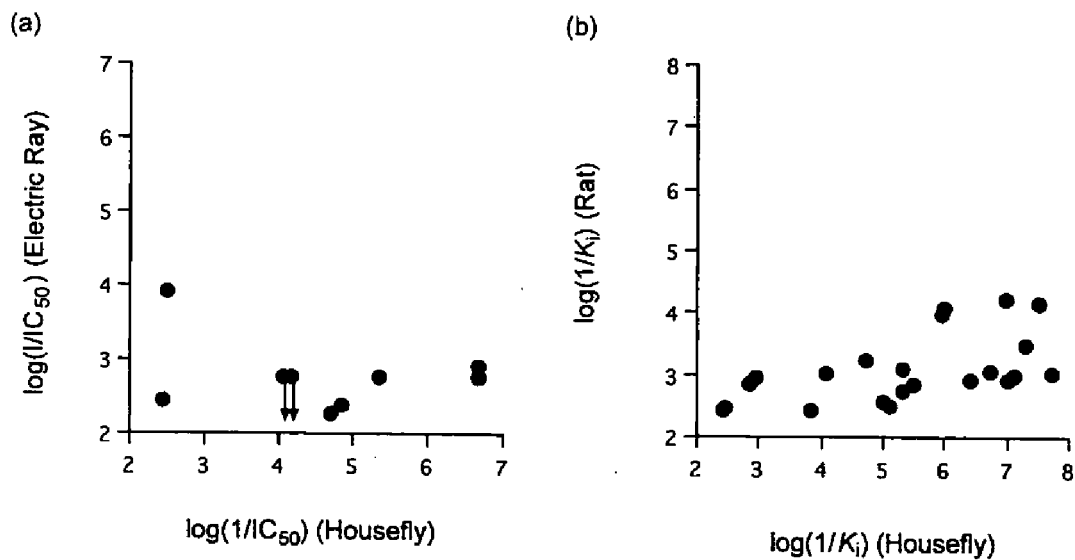


Fig. 4-3. Comparison between binding activities of test compounds to nAChR from (a) housefly and electric ray and (b) housefly and rat.

ことと比較して活性値間の差が少なかった。しかし、イエバエの nAChR に対する結合活性が高い化合物がラットの nAChR に対しても高い結合活性を示す傾向のあることが明らかとなった (Fig. 4-3. (b)).

4-4 考察

本実験では、ほ乳類の神経筋接合部位の nAChR のモデルとしてシビレエイの発電器官由来の nAChR を、また中枢神経中の nAChR のモデルとしてラットの脳由来の nAChR を用いた。また競合実験の際のリガンドとしては神経筋接合部位および中枢神経中の $\alpha 7-9$ のサブユニットに選択的に結合する [125 I] α -BGTX を用いた。Imidacloprid および関連化合物が昆虫の nAChR に特異的に作用する理由として、その体内での移行性が深く関わっていることが示唆されているが、本研究および [3 H]($-$)-nicotine を用いた中枢神経中の他の α サブユニットに対する結合阻害実験より、イミダクロプリドおよび関連化合物が昆虫の受容体の ACh 結合部位に特異的に結合することが示された。

シビレエイとイエバエの nAChR に対する供試化合物の結合活性を比較すると、imidacloprid の関連化合物がシビレエイの nAChR にほとんど結合しないことが示唆される。しかし、4-pyridylmethyl 体 (11) はイエバエよりもむしろシビレエイの nAChR に対して特異性があるように思われる。これらの nAChR 間で ACh 結合部位は高度に保存されているはずであるが、imidacloprid の関連化合物群においても選択性の差異が見られることは興味深い。シビレエイの発電器官由来の nAChR の構造解析は現在も盛んに行われているが、いまだ原子レベルでの立体構造は明らかにされておらず、この構造が明らかになった時点でこれらの選択性が説明できるものと思われる。しかし、本研究で得られた情報は、神経筋接合部位に対してのみ特異的に作用するリガンドの設計に関しても有益であると考えられる。

ラットとイエバエの nAChR の結合活性値がある程度，正の相関性を示したことから imidacloprid 関連化合物がこれらの受容体に対して同じように結合していることが示唆される。しかし，その結合活性はやはりイエバエに対してのみ非常に高いものであったので，イエバエの受容体にこれらの化合物と強く相互作用できる部位があるものと考えられる。ショウジョウバエの cDNA より推定される nAChR のアミノ酸配列においては，その ACh 結合部位と推定される部分の近傍に他の動物には見られない配列が見られるが，この部位と imidacloprid が特異的に作用している可能性が考えられる (Fig. 4-4.)。しかし，この配列はあくまでも cDNA によるものであるため転写後，様々な修飾を受けている可能性もあり，昆虫の nAChR タンパク質の精製・構造決定が待たれるところである。

Electric Ray	<u>W T Y D G</u> - - T K V - S <u>I</u> - - S P E S <u>D</u> - - - - - R P <u>D L</u> S T F M E <u>S G E W</u> V M K D Y R G W K H W V Y <u>Y</u> T <u>C C P D T P Y L D</u>
Rat α 9 subunit	- <u>W T Y N G</u> - - N Q V - D <u>I</u> - - F N A L <u>D</u> - - - - - S G <u>D L</u> S D F I E D <u>V E W E</u> V H G M P A V K N V I S <u>Y G C C S</u> - <u>E P Y P D</u>
Fruitfly ALS-1	- <u>W T Y D G Y M V D L R H L K Q T A D S D</u> N - I E V G I <u>D L Q D</u> Y Y I <u>S V E W D I M R V P A V R N E K F Y S C C</u> - <u>E E P Y L D</u>
Fruitfly ALS-2	- <u>W T Y D G D Q I D L K H I S Q K N D K D N K V E I G I D L R E</u> Y Y P <u>S V E W D I L G V P A E R H E K Y Y P C C</u> - <u>A E P Y P D</u>

Fig. 4-4. Amino acid sequences of predicted binding domain in nAChR α -subunits.

第 5 章 総括

Imidacloprid およびその関連化合物のイエバエの nAChR に対する結合活性を測定し、三次元定量的構造活性相関の一手法である CoMFA 法を用いて解析することによって、その結合活性の際のコンフォメーションと結合様式を予測した。その結果、これらの化合物が受容体と結合する際には、pyridine 環の窒素原子が nAChR の水素供与部位と水素結合を形成し、imidazolidine 環 1 位の部分的に正電荷を帯びた窒素原子が nAChR の負電荷を有するアミノ酸残基と静電的な相互作用をすると予測できた。また、活性コンフォメーションは考察した 4 種のコンフォメーションのうちの 1 つに近いものと考えられる。このコンフォメーションは nAChR の代表的なアゴニストである (-)-nicotine の安定コンフォメーションと、特に上述した 2 窒素間の構造において、類似していた。これよりイミダクロプリドおよびその関連化合物が イエバエの nAChR に対して (-)-nicotine と同様の結合作用でアゴニストとして働くことが強く推測された。

これらの化合物がアゴニストとしての作用によって殺虫活性を発現させていることを確かめるために、殺虫活性、昆虫神経に対するアゴニスト活性、および nAChR に対する結合活性の相関を定量的に解析した。殺虫活性の測定の際には、昆虫体内での化合物の動態を考慮して、代謝阻害剤の使用および疎水性パラメータ $\log P$ の測定を行った。その結果、 $\log P$ を考慮に入れるとこれらの活性間には良好な正の相関が認められた。すなわち結合活性が高いほど神経アゴニスト活性および殺虫活性が上昇した。また、疎水性が高いほど神経活性が高いことが明らかになった。これは、化合物が神経膜へ透過しやすいほど結合活性が上昇することを示している。また、殺虫活性に関しては、最適 $\log P$ 値 (約 0.5) が存在した。この $\log P$ 値は昆虫体内での輸送の過程を示していると考えられる。つまり適度な水溶性と生体膜への移行性のバランスがうまくとれている化合物において高い殺虫活性が発現していると理解される。以上の結果より、

in vivo での活性と *in vitro* の活性がその挙動を考慮に入れて関係づけられ、この化合物の nAChR アゴニストとしての性質によって殺虫活性が発現していることが確認された。

代謝阻害剤を共力剤として用いた場合に殺虫活性が上昇したことからこれらの化合物が昆虫体内で何らかの代謝を受けていることが明らかとなった。共力剤として用いた PB は酸化代謝阻害剤であるので P450 による化合物の酸化を防いでいるものと考えられる。NIA はピレスロイドのエステル加水分解阻害剤であるが、ラット中では *N*-Me 部位の脱メチル化反応の阻害剤としての役割も指摘されているので、imidacloprid の imidazolidine 環中の窒素原子の周辺における代謝を阻害している可能性がある。

nAChR は人も含めて、神経を持つ動物中に広く存在する受容体タンパク質である。Imidacloprid およびその関連化合物が昆虫に対してのみその効果を発揮する理由は、他の動物と昆虫の生体内での代謝能の違いなのか、受容体の構造の違いによる結合性の差異によるものなのかは明らかでなかった。今回、神経筋接合部位の受容体としてシビレイの発電器官由来の nAChR、また中枢神経中の α -BGTX 結合性の受容体としてラットの脳由来の nAChR を用いた結合実験を行った。結果、これらの動物由来の受容体に対する結合活性は 1/100 ~ 1/1000 の値を示し、imidacloprid および関連化合物が昆虫の nAChR に特異的に結合することが明らかになった。特にシビレイの発電器官由来の nAChR に対する結合活性と、イエバエ頭部由来の nAChR に対する結合活性を比べた場合には、その活性間の相関は全く見られず、これらの化合物がシビレイの受容体に対して結合能が低いだけでなく、異なる様式で結合している可能性が示された。また、ラットの脳由来の nAChR に対する結合活性はイエバエの nAChR に対する結合活性とある程度正の相関性を示したが、その活性値はやはり 1/1000 であった。従ってラットとイエバエの nAChR に対しては、imidacloprid および関連化合物が同じ様な作用で結合しているが、イエバエの受容体にのみこの結合を強固にするような要因が働いていると考えられる。

(-)-Nicotine がこれらの受容体と結合能を有し、また CoMFA 解析において imidacloprid の pyridine 環および imidazolidine 環の 1 位によく重なりを見せたことから、この構造の周辺の受容体側の構造はよく保存されていると考えられる。CoMFA 解析においてその構造がイェバエの結合に大きく影響を与える領域は nitro 基から imidazolidine 環の周りにかけて現れていた。すなわち、昆虫の受容体にはこの nitro 基と強く相互作用をする領域が受容体側に存在していると考えられる。しかし、ほ乳類の受容体にはその領域が存在しないために、(-)-nicotine の結合部位と作用できてもその結合活性が非常に低くなるものと考えられる。実際に nAChR の ACh の結合部位と推定されている部分のアミノ酸配列を比較してみると昆虫にのみ存在する部分がある。この領域には電荷を有するアミノ酸がいくつか存在しているので、imidacloprid の nitro 基と静電的に相互作用することが可能である。実際にこの仮説を検証するためには、受容体と imidacloprid の複合体の X 線結晶回折や、遺伝子操作によってアミノ酸を置換した受容体を用いた結合実験、あるいはフォトアフィニティープローブをもちいた結合部位の同定、受容体の部分ペプチドを用いた結合実験等を今後、行っていく必要があると思われる。

現在、環境ホルモン等に代表される新たな環境汚染物質がマスコミをにぎわせ、社会の環境保全に対する関心も高まっている。過去に農薬が環境汚染の筆頭として糾弾されていたのには理由があると思われる。緒論にも述べたように、それは作用点や作用機構の不理解であり、不適切な使用法である。現在の新規農薬に関してもその安全性は十分に確かめられているとはいえ、その安全性は何に起因しているのかを完全に説明できている農薬はそれほど多くないように思える。特に殺虫剤の多くは神経作用性であるが、その作用点が膜タンパク質であることから、タンパクとの相互作用が十分に解明されていない。しかし、真に安全な農薬を開発するためにはその作用点での挙動が原子レベルで解明されなくてはならない。今回用いた CoMFA 法による解析はこの挙動を直接的に明らかにすることは出来ないが、分子の形を三次元的にとらえ、ある程度周囲

の環境による活性の変動を説明することが出来るので、受容体での相互作用を考察する上での貴重な知見を与えるツールとしての使用が可能である。今後、これらの方法と分子生物学的手法、あるいはタンパク質工学的な手法を組み合わせ、農薬だけではなく様々な低分子化合物と受容体タンパク質の相互作用が明らかになると考えられる。また、これらのツールを用いて、より安全な薬剤の設計が行われることが期待できる。

謝辞

本研究を行うにあたり、最後まで懇切なるご指導、適切なるご助言を賜りました上野民夫教授（京都大学大学院農学研究科）に心より感謝いたします。また、本研究を行うきっかけを与えて頂き、また、お忙しい身であるにもかかわらず、論文作成の際の推敲を何度もしていただいた西村勁一郎教授（大阪府立大学先端科学研究所）に深く感謝いたします。本研究に際し、常に冷静なるご助言と励ましの言葉を頂きました宮川恒助教授（京都大学大学院農学研究科）に感謝いたします。CoMFAを行うにあたり終始ご指導を頂き、また、有益なご助言を賜りました赤松美紀助教授（京都大学大学院農学研究科）に深謝いたします。実験の際の様々な技術に関して、熱心なご指導を賜りました中川好秋博士（京都大学大学院農学研究科）に深く感謝いたします。

大阪大学へ移動した後も、本論文の完成まで数々の便宜を図って頂き、また、常に激励の言葉を賜りました小林昭雄教授（大阪大学大学院工学研究科）に心より感謝いたします。また、日頃より貴重なご助言と励ましの言葉を頂きました福崎英一郎助教授、梶山慎一郎先生（大阪大学大学院工学研究科）に深く感謝いたします。

本研究に用いた化合物を提供していただいた、日本バイエルアグロケム（株）の上山博士、日本曹達（株）の中山章博士、武田薬品工業（株）の采女英樹博士、岐阜大学の利部伸三教授、また、ワモンゴキブリを提供していただいたアース製薬（株）に厚く御礼申し上げます。

本研究は京都大学大学院農学研究科生物調節化学研究室にて行われました。その間、化合物の合成に関してご指導を頂きました神田泰彦氏（現塩野義製薬（株））、受容体結合実験に関して一からご指導を頂きました大岡朗氏（宇部興産（株））に深く感謝いたします。また、ともに研究を進めてきた西脇寿氏、伊藤彰啓氏、西村果倫嬢、David Takeda 氏に感謝の意を表します。

本研究での、放射性同位元素の使用に関していろいろとご便宜を図って頂い

た栗原紀夫名誉教授をはじめとする京都大学放射性同位元素センターのみなさまに感謝いたします。

入学以来、常に励まし合い充実した研究室生活を与えてくれた宮下正弘、山口博志、両氏に感謝いたします。また、日頃より支援していただいた京都大学における同期の諸氏、京都大学生物調節化学研究室ならびに大阪大学細胞工学研究室の諸先輩方、研究員の方々、大学院および学部の学生諸氏、事務の方々に感謝の意を表します。

発表論文

1. Okazawa A., Akamatsu, M., Ohoka, A., Nishiwaki, H., Cho, W.-J., Nakagawa, Y., Nishimura, K. & Ueno, T., Prediction of the binding mode of imidacloprid and related compounds to house-fly head acetylcholine receptors using three-dimensional QSAR analysis, *Pestic. Sci.*, in press.
2. Okazawa A., Akamatsu, M., Nishiwaki, H., Cho, W.-J., Nakagawa, Y., Miyagawa, H., Nishimura K. & Ueno, T., Three-dimensional quantitative structure-activity relationship analysis of chloronicotinyl insecticides, in preparation.
3. Okazawa A., Nishiwaki, H., Nakagawa, Y., Miyagawa, H., Nishimura K. & Ueno, T., Selective binding of imidacloprid and related compounds to house-fly head acetylcholine receptors comparing with rat receptors, in preparation.

関係論文

1. Nishimura, K., Kanda, Y., Okazawa A. & Ueno, T., Relationship between insecticidal and neurophysiological activities of imidacloprid and related compounds, *Pestic. Biochem. Physiol.*, **50** (1994) 51-9.

引用文献

- 1) Soloway, S. B., Henry, A. C., Kollmeyer, W. D., Padgett, W. M., Powell J. E., Roman, S. A., Tieman, C. H., Corey, R. A. & Horne, C. A., In *Pesticide and venom neurotoxicology*, ed. D. L. Shankland, R. M. Hollingworth & T. Smyth, Plenum, New York, 1978, pp. 153-8.
- 2) Soloway, S. B., Henry, A. C., Kollmeyer, W. D., Padgett, W. M., Powell, J. E., Roman, S. A., Tieman, C. H., Corey, R. A. & Horne, C. A., In *Advances in pesticide science, part 2*, ed. H. Geissbüler, G. T. Brooks & P. C. Kearney. Pergamon Press, Oxford, 1979, pp. 206-17.
- 3) Harris, M., Price, R. N., Robinson, J. & May, T. E., In *British crop protection conference - pests and disease*, **1**, 1986, pp. 115-22.
- 4) Kagabu, S., Moriya, K., Shibuya, K., Hattori, Y., Tsuboi, S. & Shiokawa, K., *Biosci. Biotech. Biochem.*, **56** (1992) 362-363.
- 5) Tomizawa, M. & Yamamoto, I., *J. Pestic. Sci.*, **18** (1993) 91-8.
- 6) Moriya, K., Shibuya, K., Hattori, Y., Tsuboi, S., Shiokawa, K. & Kagabu, S., *Biosci. Biotech. Biochem.*, **56** (1992) 364-5.
- 7) Minamida, I., Iwanaga, K., Tabuchi, T., Uneme, H., Dantsuji, H. & Okauchi, T., *J. Pestic. Sci.*, **18** (1993) 31-40.
- 8) Minamida, I. Iwanaga, K., Tabuchi, T., Aoki, I., Fusaka, T., Ishizuka, H. & Okauchi, T., *J. Pestic. Sci.*, **18** (1993) 41-8.
- 9) Schroeder, M. E. & Flattum, R. F., *Pestic. Biochem. Physiol.*, **22** (1984) 148-60.
- 10) Sattelle, D. B., Buckingham, S. D., Wafford, K. A., Sherby, S. M., Bakry, N. M., Eldefrawi, A. T., Eldefrawi, M. E. & May, T. E., *Proc. R. Soc. Lond.*, **B 237** (1989) 501-14.

- 11) Bai, D., Lummis, S. C. R., Leicht, W., Breer, H. & Sattelle, D. B., *Pestic. Sci.*, **33** (1991) 197-204.
- 12) Tomizawa, M. & Yamamoto, I., *J. Pestic. Sci.*, **17** (1992) 231-6.
- 13) Yamamoto, I., Yabuta, G., Tomizawa, M., Saito, T., Miyamoto, T. & Kagabu, S., *J. Pestic. Sci.*, **20** (1995).
- 14) Liu, M.-Y. & Casida, J. E., *Pestic. Biochem. Physiol.*, **46** (1993) 40-46.
- 15) Liu, M.-Y., Lanford, J. & Casida, J. E., *Pestic. Biochem. Physiol.*, **46** (1993) 200-6.
- 16) Liu, M.-Y., Latli, B. & Casida, J. E., *Pestic. Biochem. Physiol.*, **50** (1994) 171-82.
- 17) Tomizawa, M., Latli, B. & Casida, J. E., *J. Neurochem.*, **67** (1996) 1669-76.
- 18) Latli, B., Tomizawa, M. & Casida, J. E., *Bioconjugate Chem.*, **8** (1996) 7-14.
- 19) Cramer, R. D., III, Patterson, D. E. & Bunce, J. D., *J. Am. Chem. Soc.*, **110** (1988) 5959-67.
- 20) Sone, S., Nagata, K., Tsuboi, S. & Shono, T., *J. Pestic. Sci.*, **19** (1994) 69-72.
- 21) Liu, M.-Y., Latli, B. & Casida, J. E., *Pestic. Biochem. Physiol.*, **52** (1995) 170-81.
- 22) Leicht, W., *Pflanzenschutz-Nachrichten Bayer*, **49** (1996) 71-84.
- 23) Bruns, R. F., Lawson-Wendling, K. & Pugsley, T. A., *Anal. Biochem.*, **132** (1983) 74-81.
- 24) Cheng, Y.-C. & Prusoff, W. H., *Biochem. Pharmacol.*, **22** (1973) 3099-108.

- 25) Kagabu, S., *J. Pestic. Sci.*, **21** (1996) 237-9.
- 26) Lindberg, W. & Persson, J.-A., *Anal. Chem.*, **55** (1983) 643-8.
- 27) Akamatsu, M., Nishimura, K., Osabe, H., Ueno, T. & Fujita, T., *Pestic. Biochem. Physiol.*, **48** (1994) 15-30.
- 28) Akamatsu, M., Ozoe, Y., Ueno, T., Fujita, T., Mochida, K., Nakamura, T. & Matsumura, F., *Pestic. Sci.*, **48** (1997) 319-32.
- 29) Born, L., *Pflanzenschutz-Nachrichten Bayer*, **44** (1991) 137-44.
- 30) Stewart, J. J. P., *J. Comput. Chem.*, **10** (1989) 209-20.
- 31) Dewar, M. J. S., Zoebisch, E. G., Healy, E. F. & Stewart, J. J. P., *J. Am. Chem. Soc.*, **107** (1985) 3902-9.
- 32) Barlow, R. B., Howard, J. A. K. & Johnson, O., *Acta Cryst.*, **C42** (1986) 853-6.
- 33) Madcagni, P., Christodoulou, M. & Gibbons, W. A., *J. Chem. Soc. Perkin Trans. II* (1987) 1159-65.
- 34) Agarwal, A., Pearson, P. P., Taylor, E. W., Li, H. B., Dahlgren, T., Herslöf, M., Yang, Y., Lambert, G., Nelson, D. L., Regan, J. W. & Martin, A. R., *J. Med. Chem.*, **36** (1993) 4006-14.
- 35) Nakagawa, S., Okajima, N., Kitahara, T., Nishimura, K., Fujita, T. & Nakajima, M., *Pestic. Biochem. Physiol.*, **17** (1982) 243-58.
- 36) Noda, M., Furutani, Y., Takahashi, H., Toyosato, M., Tanabe, T., Shimizu, S., Kikuyotani, S., Kayano, T., Hirose, T., Inayama, S. & Numa, S., *Nature*, **305** (1983) 818-23.
- 37) Mishima, M., Takai, T., Imoto, K., Noda, M., Takahashi, T., Numa, S.,

- Methfessel, C. & Sakmann, B., *Nature* **321** (1986) 406-11.
- 38) Langenbuch-Cachat, J., Bon, C., Mulle, C., Goeldner, M., Hirth, C., & Changeux, J.-P., *Biochemistry*, **27** (1988) 2337-45.
- 39) Dennis, M., Giraudat, J., Kotzyba-Hibert, F., Goeldner, M., Hirth, C. Chang, J.-Y., Lazure, C., Chétien, M. & Changeux, J.-P., *Biochemistry*, **27** (1988) 2346-57.
- 40) Galzi, J.-L., Revah, F., Bouet, F., Ménez, A., Goeldner, M., Hirth, C. & Changeux, J.-P., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **88** (1991) 5051-5.
- 41) Kao, P. N., Dwork, A. J., Kaldany, R.-R. J., Silver, M. L., Wideman, J., Stein, S. & Karlin, A., *J. Biol. Chem.*, **259** (1984) 11662-5.
- 42) Czajkowski, C. & Karlin, A., *J. Biol. Chem.*, **266** (1991) 22603-12.
- 43) Wilson, P. T. & Lentz, T. L., *Biochemistry*, **27** (1988) 6667-74.
- 44) McLane, K. E., Wu, X., Schoepfer, R., Lindstrom, J. M. & Conti-Tronconi, B. M., *J. Biol. Chem.*, **266** (1991) 15230-9.
- 45) Tzartos, S. J. & Remoundos, M. S., *J. Biol. Chem.*, **265** (1990) 21462-7.
- 46) Mulac-Jericevic, B. & Atassi, M. Z., *FEBS Lett.*, **199** (1986) 68-74.
- 47) Bossy, B., Ballivet, M. & Spierer, P., *EMBO J.*, **7** (1988) 611-8.
- 48) Sawruk, E., Udri, C., Betz, H. & Schmitt, B., *FEBS Lett.*, **273** (1990) 177-81.
- 49) Jonas, P., Baumann, A., Merz, B. & Gundelfinger, E. D., *FEBS Lett.*, **269** (1990) 264-8.
- 50) Marshall, J., Buckingham, S. D., Shingai, R., Lunt, G. G., Goosey, M. W., Darlison, M. G., Sattelle, D. B. & Barnard, E. A., *EMBO J.*, **9** (1990) 4391-8.
- 51) Methfessel, C., *Pflanzenschutz-Nachrichten Bayer*, **45** (1992) 369-80.

- 52) Tomizawa, M., Otsuka, H., Miyamoto, T. & Yamamoto, I., *J. Pestic. Sci.*, **20** (1995) 49-56.
- 53) Rapier, C., Lunt, G. G. & Wonnacott, S., *J. Neurochem.*, **54** (1990) 937-45,