

ミニレビュー

新規殺虫剤 flubendiamide における昆虫選択的生物活性の分子基盤[#]

清中茂樹, 加藤賢太, 森 泰生*

京都大学大学院工学研究科合成・生物化学専攻

(平成 22 年 11 月 22 日受理)

Keywords: Flubendiamide, Benzenedicarboxamide, Ryanodine receptor, Ca^{2+} .

細胞内のカルシウムイオン (Ca^{2+}) 濃度の厳密な制御は, Ca^{2+} の最も重要な基盤である. 静止状態では, 細胞内 Ca^{2+} 濃度は数十 nM と, 細胞外の Ca^{2+} 濃度が 1~2 mM であるのに比して圧倒的に低濃度に保たれる. 細胞に様々な刺激が加わると, それに応答して細胞内 Ca^{2+} 濃度が数百 nM 程度に増加し, 筋収縮, 細胞分化, 分泌, 増殖, 細胞死など様々な生理応答が引き起こされる. 細胞内の Ca^{2+} は, 主として細胞外からの流入と細胞内 Ca^{2+} ストアである小胞体からの放出との 2 つの経路より供給される. Ca^{2+} 流入および Ca^{2+} 放出を担う分子が Ca^{2+} チャンネルである. Ca^{2+} チャンネルは, その機能異常が重篤な疾患につながることから, 抗不整脈薬や降圧剤など多くの関連医薬品の創薬が行われ, 臨床応用が進められてきた. ところが, 病害虫を防除する農薬への応用に関しては, 細胞内 Ca^{2+} の恒常性を選択的に攪乱する駆除薬は, これまでほとんど知られていなかった.

Ryanodine 受容体 (RyR) は小胞体膜に存在し, 小胞体からの Ca^{2+} 放出を担う Ca^{2+} チャンネルである (図 1). 主な生理機能としては, 筋収縮の際に必要な Ca^{2+} 濃度上昇を担うことが知られている. 哺乳動物では骨格筋型 (RyR1), 心筋型 (RyR2), 脳型 (RyR3) の 3 つのサブタイプが存在するのに対して, 昆虫では 1 つのサブタイプしか存在しない. RyR のアゴニストである ryanodine を含有する豆科植物根抽出物が殺虫剤 (Ryania, 1997 年 EPA 登録失効) として利用されたことから, RyR の農薬標的としての潜在性が長年示されてきたが, 具体化はされなかった. 最近になり, 昆虫の筋収縮を引き起こすことで殺虫作用を示す flubendiamide (商品名 Phoenix, 図 1) が日本農薬株式会社により開発された. Phthalic acid diamide 構造を有する flubendiamide は, 昆虫の RyR を高選択的に活性化することが示された¹⁾.

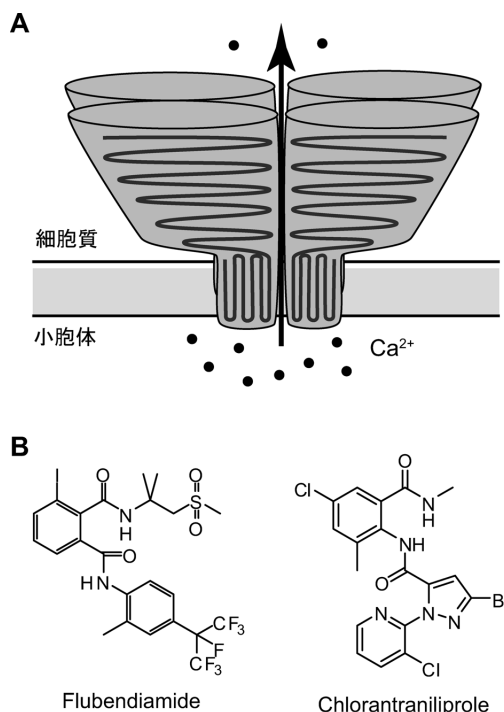


図 1. (A) Ryanodine 受容体のモデル図 (B) Flubendiamide と Chlorantraniliprole の構造.

デュポン社も, その後, anthranilic diamide 構造を有する chlorantraniliprole (商品名 Rynaxypyr) が類似した殺虫作用を示すことを報告した²⁾. 本小論では, 筆者らが行った flubendiamide を中心に, これらの 2 種類の benzenedicarboxamide 誘導体の RyR に対する作用および作用メカニズムについて概説する.

1. Flubendiamide の作用メカニズム

Flubendiamide は, チョウ目昆虫を中心に選択的かつ速効的な防虫効果を示す¹⁾. Flubendiamide を処置した昆虫は, 虫体の持続的な体収縮, 嘔吐, 脱糞等, 既存の殺虫剤とは

[#] 第 35 回大会シンポジウムをとりまとめた解説

* 〒 615-8510 京都市西京区京都大学桂

E-mail: mori@sbchem.kyoto-u.ac.jp

© Pesticide Science Society of Japan

明らかに異なる特徴的な症状を示す。これらの症状は化合物処理直後から現れ、摂食行動などの統制された行動が直ちに不可能となる。同様の症状はRyRのアゴニストとして知られるryanodineを虫体に注射することによって再現されたことから、このような症状はRyRの異常な活性化が誘起する特有の症状と推定された。また、単離したハスモンヨトウ消化管の収縮実験により、flubendiamideにより誘起される症状が持続的な筋収縮によるものであることも判明した。³H-flubendiamideとハスモンヨトウ幼虫骨格筋膜画分とを用いた結合実験の結果から、筋膜画分に対するflubendiamideの結合解離定数が7nMという極めて高い親和性を示した³⁾。その結合はryanodineと協同的に起こることから、RyRに対するflubendiamideの作用が支持された。興味深いことに、哺乳動物由来の膜画分に対しては、flubendiamideのこのような結合は見られなかった。哺乳動物個体への投与においても急性毒性は認められていないことから、農薬としての安全性が確認されている。

2. Flubendiamideの種選択性

筆者らは、flubendiamideの各種RyRに対する選択性、および作用メカニズムを詳細に検討するために、チョウ目RyRの人工発現系の構築を行った。チョウ目昆虫のRyR遺伝子は明らかにされていなかったため、チョウ目モデル昆虫であるカイコからryanodine受容体(silkworm RyR: sRyR)の遺伝子クローニングを行い、5084アミノ酸から構成される遺伝子配列を明らかにした。得られたsRyR遺伝子は、これまでに報告されていた昆虫種であるショウジョウバエ由来のものと比較して79%の相同性を有しており、動物種(ウサギ)由来のものと比較して45~47%の相同性であった。哺乳動物細胞株であるHEK293細胞にsRyRを一過的に発現させたところ、小胞体における発現を確認できた。また、RyRのアゴニストとして知られるcaffeineの処置により細胞内Ca²⁺濃度上昇が惹起された。このことは、昆虫種由来のタンパク質や脂質を含まないHEK293細胞においてもsRyRが機能的に発現することを意味する。Flubendiamideが哺乳動物には作用しないことを考慮すると、哺乳動物由来のHEK293細胞を用いたこの組み換え発現系は、flubendiamideのsRyRに対する直接的な効果を検討するのに格好なシステムと言える。

HEK293細胞に発現させたsRyRに対するflubendiamideの効果は、小胞体から放出されたCa²⁺を蛍光性指示薬であるFura2を用いたCa²⁺イメージング法により検討した(図2)。10nM以上のflubendiamideの処置によりsRyRは活性化し、50%有効濃度(EC₅₀)値は17nMであった。この値は、前述したチョウ目昆虫の膜画分を用いたflubendiamideの結合実験から得られた解離定数に匹敵する。一方、sRyRを発現させていないHEK293細胞、ウサギ心臓由来のRyR2

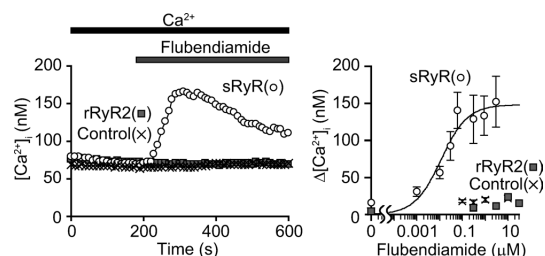


図2. 各種RyRを強制発現させたHEK293細胞のflubendiamideに対する応答。

(rRyR2)を発現させた細胞においては、このような応答は見られず、flubendiamideの昆虫種RyRに対する選択的な作用を確認できた。小胞体内Ca²⁺の蛍光性指示薬であるMag-fura-2を用いてflubendiamideの作用を評価したところ、sRyRを介した小胞体からのCa²⁺放出をflubendiamideが惹起することが支持された。

引き続き、flubendiamideのsRyRに対する結合が直接的なものかどうかを評価するために、光標識部位を有するflubendiamide誘導体(flubendiamide photo-probe: Flubendiamide-PP)を作成し、光アフィニティーラベル化を行った。光照射によりFlubendiamide-PPがsRyRに取り込まれ、またflubendiamideを共存させることでその取り込みが阻害された。flubendiamideがsRyRに直接結合すると考えられる。

3. Flubendiamideの結合部位の同定

sRyRに対するflubendiamideの結合部位を同定するために、sRyR欠失変異体を作成してFlubendiamide-PPとの結合を評価した(図3)。sRyR欠失変異体は、人工二分子膜においてチャネル機能が確認されているRyR1欠失変異体の配列情報^{4,5)}を基にして設計した。HEK293細胞におけるsRyR変異体の発現量は、野生型のsRyR(WT)とほぼ同様であったが、Flubendiamide-PPを用いて欠失変異体に対する光アフィニティーラベル化を行ったところ、細胞質側のほぼ全域を欠損させた(Δ183-4110)変異体を含むすべての欠失変異体においてFlubendiamide-PPの結合が確認された。一方、sRyRの膜貫通領域(4084-5084アミノ酸残基)をrRyR2の膜貫通領域(3936-4968残基)に置換した変異体

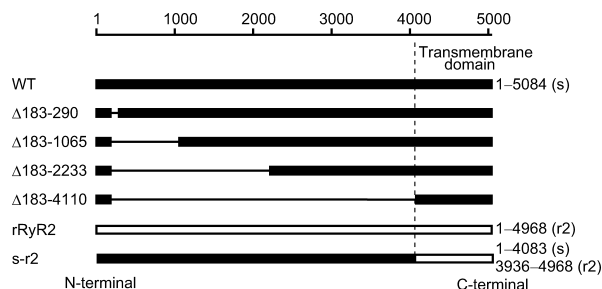


図3. sRyR変異体の模式図。

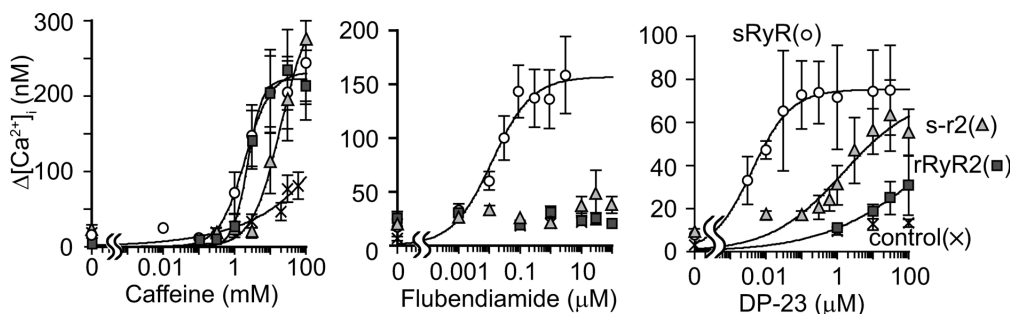


図4. 各種 RyR および RyR 変異体を発現させた HEK293 細胞に対する, caffeine, flubendiamide, DP-23 の応答.

(s-r2) は, 光アフィニティーラベル化において Flubendiamide-PP を取り込まなかった. これらの結果から, flubendiamide は RyR の膜貫通領域に結合することが示された.

4. Flubendiamide による活性化には N 末端と C 末端の膜貫通領域が必要

上記の sRyR 欠失変異体に対する flubendiamide による応答は Ca^{2+} イメージング法を用いて評価した. $\Delta 183-1065$, $\Delta 183-2233$, $\Delta 183-4110$ 変異体を発現させた HEK293 細胞では, caffeine と flubendiamide の両者に対する応答が減弱し, caffeine 依存性なチャネル機能が失われていた. 一方, $\Delta 183-290$ 変異体を発現させた細胞では, flubendiamide に対する応答が失われていたものの, caffeine に対する応答は保持されていた. これらの結果から, N 末端の 183-290 残基が flubendiamide による sRyR の活性化に必要であることが示唆された. 膜貫通領域の置換変異体である s-r2 を発現させた細胞は, caffeine に対して sRyR と同様に応答したにも関わらず, flubendiamide に対する応答は大幅に減弱した. すなわち, sRyR の膜貫通領域も flubendiamide によるチャネルの活性化に不可欠である (図4). ところで, ヒトにおいては, RyR1 は悪性高熱症や中心コア病の原因遺伝子と知られ, N 末端領域 (35-614), 中心領域 (2129-2458), C 末端領域 (3916-4942) において変異が多く見つかった. 興味深いことに flubendiamide による活性化に不可欠な sRyR の N 末端および C 末端領域は, 上記のヒト RyR1 の変異多発領域に含まれる. このことから, flubendiamide による sRyR の活性化においては, 生理機能に不可欠な N 末端および C 末端の両者を必要とする.

Chlorantraniliprole 類似体である DP-23 は flubendiamide と同様に昆虫種 RyR を活性化し, 動物由来の RyR に対して 300 倍程度の選択性を有する⁶⁾. Flubendiamide と同様に, DP-23 も s-r2 や rRyR-2 よりも sRyR を高選択的に活性化した (図4). すなわち, DP-23 も, チョウ目 RyR に対する高い親和性のためには膜貫通領域が重要であることが示唆された. 一方, flubendiamide とは異なり, DP-23 は 0.01-30 μM という比較的低濃度においても s-r2 変異体を活

性化した. このことは, DP-23 より flubendiamide の方が, sRyR に特異的な膜貫通領域のアミノ酸配列に対する依存性が高いことを意味し, それがチョウ目に対する選択性の高さを引き出していると考えられる.

5. おわりに

本研究の結果, flubendiamide を中心とする benzenedicarboxamide 誘導体の RyR に対する作用および作用メカニズムが明らかになった⁷⁾. 今後は, タンパク質三次元構造上の詳細な作用メカニズムの解明が望まれる.

Ca^{2+} チャネル作用薬という観点からいえば, これらの benzenedicarboxamide 誘導体は新しい Ca^{2+} チャネル作用薬群として位置づけられる. 筆者らは, 最近, pyrazole 構造を有する Pyr3 が動物細胞の形質膜に発現する Ca^{2+} チャネルである TRPC3 チャネルを選択的に阻害することを見出した⁸⁾. 興味深いことに, Pyr3 は, benzenedicarboxamide 構造と pyrazole 構造を有するという点で, DP-23 と共通である. 構造的に類似性を有するこれらの化合物が, Ca^{2+} チャネルという同様のタンパク質群を標的にしている点を考慮すると, これらの化合物群は, Ca^{2+} チャネル作用薬としての新たな基本骨格になりえる可能性を秘めている.

謝 辞

本研究の一部は, 日本農薬株式会社の正木隆男氏, 八十川伯朗氏, 遠西正範氏らとの共同研究として実施された. 多大な貢献に心より感謝の意を表する.

引用文献

- 1) 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).
- 2) G. P. Lahm, T. M. Stevenson, T. P. Selby, J. H. Freudenberger, D. Cordova, L. Flexner, C. A. Bellin, C. M. Dubas, B. K. Smith, K. A. Hughes, J. G. Hollingshaus, C. E. Clark and E. A. Benner: *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **17**, 6274-6279 (2007).
- 3) U. Ebbinghaus-Kintscher, P. Luemmen, N. Lobitz, T. Schulte, C. Funke, R. Fischer, T. Masaki, N. Yasokawa and M. Tohnishi: *Cell Calcium* **39**, 21-33 (2006).

- 4) M. B. Bhat, J. Zhao, H. Takeshima and J. Ma: *Biphas. J.* **73**, 1329–1336 (1997).
- 5) H. Masumiya, R. Wang, J. Zhang, B. Xiao and S. R. W. Chen: *J. Biol. Chem.* **278**, 3786–3792 (2003).
- 6) G. P. Lahm, T. P. Selby, J. H. Freudenberger, T. M. Stevenson, B. J. Myers, G. Seburyamo, B. K. Smith, L. Flexner, C. E. Clark and D. Cordova: *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **15**, 4898–4906 (2005).
- 7) K. Kato, S. Kiyonaka, Y. Sawaguchi, M. Tohnishi, T. Masaki, N. Yasokawa, Y. Mizuno, E. Mori, K. Inoue, I. Hamachi, H. Takeshima and Y. Mori: *Biochemistry* **48**, 10342–10352 (2009).
- 8) S. Kiyonaka, K. Kato, M. Nishida, K. Mio, T. Numaga, Y. Sawaguchi, T. Yoshida, W. Wakamori, E. Mori, T. Numata, M. Ishii, H. Takemoto, A. Ojida, K. Watanabe, A. Uemura, H. Kurose, T. Morii, T. Kobayashi, Y. Sato, C. Sato, I. Hamachi and Y. Mori: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **106**, 5400–5405 (2009).

略 歴

清中茂樹

1975 年 5 月 20 日生まれ

最終学歴：九州大学大学院工学府（工学博士）

研究テーマ：Ca²⁺ チャネルのケミカルバイオロジー

趣味：寝る前の読書

森 泰生

1960 年 3 月 5 日生まれ

最終学歴：京都大学大学院医学研究科（医学博士）

研究テーマ：生体の環境への感応と適応

趣味：鹿の観察