ミニレビュー

ケミカルバイオロジー研究法による殺虫剤の分子設計と毒理学[#]

富澤 元 博*

東京農業大学生命科学部分子生命化学科

(2016年11月14日受理)

Molecular design and toxicology of insecticides facilitated by chemical biology approaches

Motohiro TOMIZAWA

Department of Chemistry, Faculty of Life Sciences, Tokyo University of Agriculture, Tokyo 156–8502, Japan

Keywords: cannabinoid receptor, nicotinic acetylcholine receptor, nicotinic and organophosphate insecticides, fatty acid amide hydrolase.

はじめに

有機化学, 生命科学, そして分析技術の進歩により本当の意味でのケミストリーとバイオロジーの融合が可能となり, 近年, ケミカルバイオロジーと呼ばれる分野が動き出した。ケミカルバイオロジーは, ケミカル・アトミックなスケールで生命現象を理解するという目的において, ケミストリーの論理や研究戦略を積極的に応用するというものである。とくに小分子有機化合物 (広義の薬物) を分子プローブとして用いることで, リガンドと標的タンパク質との三次元相互作用が定義でき, そして薬物結合表面の立体構造から合理的なドッキングデザインが可能となる。一方, 未同定の薬物ターゲットを釣り上げるために薬物構造を基盤とした分子プローブを用いることで薬物による生体影響発現メカニズムの解明にも貢献することができる。本稿では, 著者の研究グループから発表された二つの話題, すなわち, 新奇ファルマコフォアを

有するニコチン性殺虫剤のデザインと有機リン酸エステル化合物による雄性生殖毒性ターゲットの同定について紹介いたします。なお, 研究背景についての情報は本稿に引用した原著文献をご参照いただきたい。

1. ニコチン性殺虫剤のデザイン

1.1. ニコチン性アセチルコリン受容体薬物結合表面の定義

ニコチンやエビバチジンのようなニコチン性のアルカロイドならびにネオニコチノイド系殺虫剤の作用点であるニコチン性アセチルコリン受容体は, 神経伝達物質作動性イオンチャンネルであり, 即動的な興奮性の神経伝達を媒介する。本受容体は, 五つのサブユニットから構成され, 神経シナプス膜を貫通している。細胞外に突き出た部分にはアセチルコリンやニコチン性化合物の結合ポケットがあり, 膜貫通部分の内側はイオンチャンネルをなす。アセチルコリンやニコチンの結合ポケットは α -サブユニット [(+) 鎖] と非 α -サブユニット [(-) 鎖] の境界領域に存在する。サブユニット境界領域にある薬物結合ポケットは, アミノ酸配列のうえで非連続的な6箇所のループと呼ばれるアミノ酸数個分程度からなる特定部位が空間的にポケットの内壁を作る。すなわち, α -サブユニット [(+) 鎖] 側のループA, B, Cと, 非 α -

[#] 第41回大会シンポジウムを取りまとめた解説。

* 〒156-8502 東京都世田谷区桜丘1-1-1

E-mail: mt204882@nodai.ac.jp

© 日本農薬学会

サブユニット [(-) 鎖] 側にあるループD, E, Fとが薬物分子との相互作用に直接関与する。ニコチン受容体のタンパク質構造は、シビレエイ電気器官由来受容体の低温電子顕微鏡観察によって可視化されていた。この方法ではタンパク質の機能構造変化などマクロな動きを捉えるには十分な解像度を持つが、低分子有機化合物と結合部位のアミノ酸との相互作用を定義するには不十分である。その後、ヨーロッパモノアラガイやアメフラシなどのような軟体動物の神経伝達系において、シナプスのアセチルコリン濃度を調節する水溶性タンパク質としてアセチルコリン結合タンパク質が発見され、その結晶構造が解明された。このアセチルコリン結合タンパク質は、ニコチン受容体のように5量体構造をとっているが、イオンチャンネルを持たない。ちょうど受容体のアセチルコリン結合ポケットがある細胞外領域だけを切り取ったような構造をしている。また、受容体のようにニコチン性リガンドの結合ポケットはサブユニット境界領域にあり、6つのループおよび鍵となるアミノ酸も保存されている。以上のことから、これまで詳しい解析ができなかったニコチン性化合物の結合ポケットでの相互作用を定義することが可能になった。

一般的に薬物の結合機序にアプローチする場合、任意のアミノ酸またはアミノ酸群(キメラ)の変異による薬効変化を比較する方法が最も容易である。しかし薬物結合ポケットは複雑な三次元構造を形成するために、その薬効変化が変異に直接帰属可能か、または結合表面の間接的構造変化によるものなのか判断が難しい。そこで我々は、以下の3つのアプローチから得られるデータを総合することにより精緻な解析が可能になると考えて、ニコチン性アルカロイド型リガンドおよびネオニコチノイドの結合部位相互作用を定義することにした¹⁻⁵⁾。第一は、高解像度で結果が得られる薬物とアセチルコリン結合タンパク質との共結晶構造の解析である(ただし結晶化後の状態を観ているため生理的条件下での相互作用を反映しない場合もある)。その結果、上述の薬物相互作用に関して鍵になるアミノ酸のジオメトリーや薬物結合によるタンパク質のコンフォメーション変化、水分子の会合を捉えることができた⁴⁾。第二は、アセチルコリン結合タンパク質のニコチン性リガンド型プローブによる光親和性標識法である。このケミカルアプローチは、水溶液中での実験が可能であり、薬物の標識位置を質量分析法等で同定できる。そして標識位置の同定を通じてニコチン性リガンドの結合部位相互作用の三次元イメージのマッピングに成功した。本光親和性標識法は薬物分子を結合部位内に直接固定化する方法であるが、一方ではアミノ酸と光活性化により発生した化学種との反応性バイアス(反応しやすさ)がかかる場合がある¹⁻³⁾。そこで第三として、同定した標識位置近傍のアミノ酸を個々に光活性化した化学種と反応性の高いアミノ酸に変異(スキヤニング)させて、プローブによる標識位置がシフトするか否かをチェックした。その結果、反応性の高いアミノ酸がどの位置にあっても標識されるわけではなく、特

異的な位置・方向でプローブの標識化が起こっている、すなわち、薬物の特異的な相互作用を反映していることを確かめた⁵⁾。

1.2. ニコチン受容体タンパク質構造をガイドとした化合物のデザイン

ネオニコチノイドが結合部位にドッキングした状態の受容体の三次元構造情報が得られたことで、新奇なファルマコフォアをもつリガンドのデザインが容易になる(図1-1)。このコンセプトを例証する目的でいくつかの化合物をデザインした⁶⁻¹¹⁾。アセチルコリン結合タンパク質の情報を基盤にして樹立された昆虫ニコチン受容体のアゴニスト結合ポケットの立体構造をイメージすると、ネオニコチノイドのニトロまたはシアノイミンは、サブユニット境界にある結合ポケットの α -サブユニット側のループC部分と主に相互作用する。興味深いことに、部分陰性荷電が集まるニトロ/シアノ先端酸素または窒素原子から非 α -サブユニット側のループDの方向に4-6 Å程度のニッチ(くぼみ)が存在する。さらにその空間の終点には水素供与体であるアルギニンがある(図1-2)。そこで、このギャップを埋めることができ、さらに水素結合可能な窒素原子をもった新奇ファルマコフォアとして、ピラジノイルイミンを導入したリガンドを合成したところ、イミダクロプリドやチアクロプリドよりも高い結合親和性を示し、高い殺虫効果を呈した(図1-4)。さらに、ループCおよびDエリアのアミノ酸と多角的に水素結合や疎水性結合を形成させるため、トリフルオロアセチルイミンおよびフッ素以外のハロゲン原子を入れたハロアセチルイミン型の化合物をデザインした(図1-5)。これらの化合物は受容体への親和性が高いが、ハロゲンが導入されていないアセチルイミン体では親和性が落ちる。また驚くべきことに、ハロアセチルイミン体は分子の疎水性が増大しており、比較的親水性の高いイミダクロプリドやチアクロプリドでは認められない昆虫への顕著な接触毒性を呈した。一方、昆虫受容体の β -サブユニット側のループDアルギニン部分がトレオニンに置き換わっている脊椎動物の $\alpha 4 \beta 2$ 受容体に対して、上述のピラジノイルイミンおよびトリフルオロアセチルイミン化合物の親和性は予想通り低く、マウスへの毒性も低いことがわかった。興味深いことに、昆虫 α -サブユニットと脊椎動物 $\beta 2$ -サブユニットからなるハイブリッド受容体に対して、これらアシルイミン化合物の親和性は低い。一方、昆虫 α -サブユニット側のループCと主に相互作用するニトロイミン/シアノイミンをもつネオニコチノイドのハイブリッド受容体への結合親和性は高い。すなわち、これらの新奇ファルマコフォアを導入することにより、昆虫受容体 β -サブユニット上のループDアミノ酸との間に選択的な相互作用をつくることができたと考えられる^{6,7,11)}。

さらに上述のアシルイミンをアリールオキシカルボニルイミンに改変(カルボニル部分の次に回転可能なエーテル結合を介して芳香環をつけたもの)することで(図1-6)、ルー

図1. ニコチン性アセチルコリン受容体の三次元構造をガイドとしたドラッグデザイン。昆虫ニコチン受容体モデル（モモアカアブラムシ $\alpha 2\beta 1$ 境界領域）は、昆虫受容体サロゲートであるアメフラシのアセチルコリン結合タンパク質の結晶構造を鋳型として樹立された（PDB 3C79）。昆虫受容体のサブユニット構成は不明であるが、アゴニスト結合ポケット内壁を構成する主要アミノ酸は脊椎動物、昆虫、アセチルコリン結合タンパク質の間ではほとんど同じか機能的役割が同じものである。1) イミダクロプリドが結合部位に結合した様子を示す。図中のAからFは薬物結合ポケットの内壁で薬物と直接コンタクトするアミノ酸のある領域。2) イミダクロプリドのニトロ酸素からループDアルギニン（R81）に向かって存在するニッチ（くぼみ）。3) イミダクロプリドのニトロ酸素からループF方向に広がる空間。4) ピラジノール部分はループDトリプトファン（W79）やアルギニンと相互作用し、5) トリフルオロアセチル部分はループC（V225やC226）およびDアミノ酸と主に相互作用する。6) 3-メチルフェノキシカルボニル型化合物のフェニル環とループDトリプトファンのインドール環とはface-to-edgeスタッキングする。7) ループF空間にも相互作用するフランジメチレンリンカーを持つビスイミダクロプリドのフラン部分は、ループA, C, Dの三つの芳香族アミノ酸（Y118, Y224, W79）からなる疎水性ポケットに収容される。

プDトリプトファン芳香環との π -スタッキング（ π - π 相互作用）をある程度自由に起こさせることが可能になるとの仮説を検証した。最も高い親和性を示したものは、3-メチル置換フェノキシカルボニルイミンであった。実際、ベンゼン環に電子供与性基があるものでは親和性が上がり、電子吸引性基があるものでは薬効が下がるという結果となり、ベンゼン環内の電子密度が高い方がトリプトファンの π -電子系とスタックしやすいことがわかる。しかしながら、アリールオキシカ

ルボニルイミン型化合物は、受容体への親和性が十分に高くても加水分解を受けやすいため殺虫活性はむしろ低かった⁹⁾。

イミダクロプリドが受容体に結合した構造モデルにおいて、ニトロ酸素の下方、すなわちループF方向にはさらに6–8 Å程度の深さの空間が存在する（図1-3）。そこでループF方向にアンカーとして作用する置換基をもつ化合物のデザインに取り組んだ。最初にイミダクロプリド2分子をヘキサメチレンリンカーで連結したビス体がループF部分にコンタ

クトすることで比較的高い受容体相互作用を示すとの結果を得た⁸⁾。ところが、ヘキサメチレンリンカーの役割は、単に2分子のイミダクロプリドを連結しているだけであることから、リンカー部分にも受容体サイドと相互作用することができる構造部分に改変する必要があると考えた。本ビス体が結合したとき、リンカー部分の近傍にはループA, C, D由来の三つの芳香族アミノ酸が向かい合うような空間配置をとることから、この三つの芳香環からできる疎水性ポケットと相互作用できるリンカーとしてフランジメチレン部分をもつ化合物をデザインした(図1-7)。予想通り、本化合物はビスイミダクロプリドシリーズの中で最も受容体への親和性が高く、殺虫活性も比較的高かった¹⁰⁾。

2. 有機リン殺虫剤による雄性生殖毒性ターゲット

有機リン酸エステル殺虫剤(OP)は、農業生産に加え、森林保護(松枯れ対策として空中散布)や衛生環境維持(屋内外の消毒)などのために世界中で最も汎用されている。例えば、東日本大震災の被災地ではハエや蚊が爆発的に発生し、OP剤が防疫活動に不可欠であった。このようにOP剤に頼らざるをえない状況が農業生産以外のところでは生じている。したがって小児から大人まで日常生活を通じて様々な経路からの曝露が想定される。OP剤による急性神経毒性についての理解は十分であるが、近年、致死・中毒の顕れる用量より低いレベルで持続的に曝露された場合に起こる健康影響について危惧されている。OP化合物は、急性神経毒性の標的であるアセチルコリンエステラーゼだけでなく、多様なセリン加水分解酵素にも潜在的に作用しうることから、OP剤やOP化合物曝露による急性神経毒性以外のターゲットの探索研究を行うことは重要である。このような加水分解酵素には、リパーゼなどのように脂質代謝に関与するものが多く、OPは脂質ホメオスタシスを攪乱する可能性が高いと言える。また脂質は性ホルモンの原料でもあることから、OPによる脂質恒常性の攪乱と生殖器影響の関係も注目される。ヒトの雄性生殖系はOP剤の二次ターゲットの一つであると考えられており、多くの疫学研究により環境要因(生活・職業など)によるOP剤と雄性生殖毒性、とくに精子毒性との関連が示唆されていた。また殺虫剤散布作業者に有意な精子運動性の低下が見られることやOP剤を投与したラットでも、精子運動性の低下や精子奇形率の上昇が見られることが報告されている。以上のことを総合すると、OP剤曝露による精子毒性は、OP活性体が雄生殖器内の特異的なリパーゼ類(または複数のターゲット)をブロックし、脂質代謝系を攪乱させることで起こるという仮説が成り立つ。そこで我々のグループでは、ケミカルバイオロジーアプローチによりマウスやラットの雄性生殖器官中の潜在的なOP化合物ターゲットの探索に取り組んだ¹²⁻¹⁴⁾。

アルキルフルオロフォスホリデート化合物はリン酸化能力が高いことから、そのアルキル部分にスペーサーを介して

蛍光発色基を導入したOPケミカルプローブを用いることにより、対象とする器官や組織中のOP化合物がリン酸化しうるセリン加水分解酵素のほとんどを網羅的に検出することができ、そこでまずマウス精巣プロテオームとOP活性体(オキソン)を反応させ、OP化合物に特定のターゲットとのリン酸化反応を起こさせる。次いで上述のOPケミカルプローブを反応させて、電気泳動後、OPケミカルプローブによる標識パターンを観察する。供試したOP化合物は既に特定のターゲットと反応していることからOPケミカルプローブは、そのターゲッ

図2. フェニトロチオン(FNT)のマウスまたはラット精巣由来セリン加水分解酵素プロテオームへの影響とFNT曝露による精子毒性発現機序仮説。マウス(左上)でのOPプローブによる標識結果は電気泳動ゲル全体(20-200kDa)を示している。ラット(右上)では、FAAH(63kDa)付近のみを抽出したOPプローブ標識イメージとFAAH抗体で検出した発現レベルを示している。FNT投与レベルのC, L, Hは、それぞれ対照群、低用量群、高用量群を表す。AEAはアナンダミド、CB1Rは1型カンナビノイド受容体の略称。

トを標識できない。したがって、OPケミカルプローブによる標識が消失した部分こそがOP化合物の潜在的ターゲットとなる。この原理に基づきフェニトロキシソンのマウス精巣プロテオーム中のターゲットをインビトロで探索したところ、脂肪酸アミド加水分解酵素 (FAAH) がヒットした。ちなみにFAAHは内因性のカンナビノイド受容体 (Gタンパク質共役型受容体でマリファナのターゲットとして知られる) アゴニストの一つであるアナンダミドを加水分解する酵素である。次にマウスにフェニトロキシオンを10日間経口投与した後、OPケミカルプローブによる精巣プロテオームの標識化を行ったところ、用量依存的にFAAHだけが消失することが判明した (図2)。さらに、FAAH酵素活性を精巣および成熟した精子が蓄えられる精巣上体尾部で測定し、用量依存的な活性低下を認めた¹³⁾。このことから、その他の坑コリンエステラーゼとして、ジクロルボス、パラオキシソン、ダイアジノンオキシソン、クロルピリフォスオキシソン、カルバリル、プロポキスル、カルボフランによるインビトロ精巣由来FAAH阻害試験を行ったところ、OP化合物ではFAAHを強く阻害したが、カーバメート化合物ではほとんど影響がなかった。クロルピリフォスオキシソンは、FAAHのほかにもモノアシルグリセロールリパーゼにも作用することがわかった¹²⁾。以上のことから、雄性生殖器官内におけるOP化合物の主な潜在的ターゲットは、FAAHであるとの結論に達した。

次のステップとして、OP剤曝露による精子毒性がFAAH阻害と関連するか検討した。精子の成熟までには9週を要することからラットに9週間にわたってフェニトロキシオンを経口投与した (週あたり4日間投与)。その後、精巣上体尾部から得た精子の数、運動性、正常精子数、未成熟精子数、奇形 (頭部や尾部のないもの) 精子数などのパラメーターを調べ、併せて精巣プロテオームのOPケミカルプローブ標識パターン観察、FAAH活性測定、FAAHが加水分解すべき内因性基質であるアナンダミド量を定量した。その結果、精子毒性パラメーターとFAAH阻害活性との間に有意な相関性を認めた。さらにアナンダミド濃度は投与したフェニトロキシオンの用量依存的に増加傾向にあることがわかった。OPケミカルプローブの精巣プロテオーム標識では、FAAH部分の標識が用量依存的に消失しているが、FAAHの発現量はコントロールと比べ変化がないことが判明した¹⁴⁾。以上の実験から、OP化合物が雄性生殖器官内のFAAHを阻害し、内因性基質であるアナンダミドレベルが上昇することがOP化合物曝露による精子毒性のトリガー機序であるとの斬新な仮説を提唱した (図2)。したがって、アナンダミドはカンナビノイド受容体の内因性アゴニストであることから、アナンダミドがカンナビノイド受容体シグナル伝達系を過亢進することで、精子の成熟に関与するセルトリ細胞などがアポトーシスすることで精子の未成熟や奇形などに繋がり、また精子細胞上でもカンナビノイド受容体シグナルへの影響が起るため運動性が低下するのではないかと考えられる。

おわりに

本稿ではケミカルバイオロジー研究法による二つの事例を紹介させていただいたが、このようなアプローチは薬物ターゲット分子の同定や薬物の作用表面での結合メカニズムを定義するためのツールとして大変有用である。今後もますますケミストリーの考え方を基盤とする生命科学研究が発展していくのではないと思われる。最後に本稿に紹介させていただいた仕事内容の共同研究者であるカルフォルニア大学バークレー校のJohn E. Casida先生とKathleen A. Durkin先生、岐阜大学の利部伸三先生、名古屋市立大学の上島通浩先生と伊藤由起先生に感謝いたします。

引用文献

- 1) M. Tomizawa, D. Maltby, K. F. Medzihradszky, N. Zhang, K. A. Durkin, J. Presley, T. T. Talley, P. Taylor, A. L. Burlingame and J. E. Casida: *Biochemistry* **46**, 8798–8806 (2007).
- 2) M. Tomizawa, T. T. Talley, D. Maltby, K. A. Durkin, K. F. Medzihradszky, A. L. Burlingame, P. Taylor and J. E. Casida: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **104**, 9075–9080 (2007).
- 3) M. Tomizawa, D. Maltby, T. T. Talley, K. A. Durkin, K. F. Medzihradszky, A. L. Burlingame, P. Taylor and J. E. Casida: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **105**, 1728–1732 (2008).
- 4) T. T. Talley, M. Harel, R. E. Hibbs, Z. Radić, M. Tomizawa, J. E. Casida and P. Taylor: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **105**, 7606–7611 (2008).
- 5) M. Tomizawa, T. T. Talley, J. F. Park, D. Maltby, K. F. Medzihradszky, K. A. Durkin, J. M. Cornejo-Bravo, A. L. Burlingame, J. E. Casida and P. Taylor: *J. Med. Chem.* **52**, 3735–3741 (2009).
- 6) M. Tomizawa, S. Kagabu, I. Ohno, K. A. Durkin and J. E. Casida: *J. Med. Chem.* **51**, 4213–4218 (2008).
- 7) I. Ohno, M. Tomizawa, K. A. Durkin, Y. Naruse, J. E. Casida and S. Kagabu: *Chem. Res. Toxicol.* **22**, 476–482 (2009).
- 8) I. Ohno, M. Tomizawa, K. A. Durkin, J. E. Casida and S. Kagabu: *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **19**, 3449–3452 (2009).
- 9) I. Ohno, M. Tomizawa, N. Miyazu, G. Kushibiki, K. Noda, Y. Hasebe, K. A. Durkin, T. Miyake and S. Kagabu: *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **20**, 5933–5935 (2010).
- 10) S. Kagabu, I. Ohno, M. Tomizawa, K. A. Durkin, R. Matsuura, D. Uchiyama, N. Nagae and S. Kumazawa: *J. Agric. Food Chem.* **58**, 11832–11836 (2010).
- 11) M. Tomizawa, K. A. Durkin, I. Ohno, K. Nagura, M. Manabe, S. Kumazawa and S. Kagabu: *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **21**, 3583–3586 (2011).
- 12) Y. Noro, M. Tomizawa, Y. Ito, H. Suzuki, K. Abe and M. Kamijima: *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **23**, 5434–5436 (2013).
- 13) H. Suzuki, M. Tomizawa, Y. Ito, K. Abe, Y. Noro and M. Kamijima: *J. Agric. Food Chem.* **61**, 9961–9965 (2013).
- 14) Y. Ito, M. Tomizawa, H. Suzuki, A. Okamura, K. Ohtani, M. Nunome, Y. Noro, D. Wang, T. Nakajima and M. Kamijima: *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **279**, 331–337 (2014).