学会賞受賞論文要約

(業績賞・研究)

農薬の標的分子同定と薬剤抵抗性機構に関する計算科学的研究

番 場 伸 一*

三井化学アグロ株式会社 研究開発本部

(2021年5月24日受理)

はじめに

食の保全に向けて農薬は必要不可欠な役割を果たしている。農薬を適切に利用することで作物を害虫、病害、雑草から守り、効率的に農作物を生産することができる。しかし、抵抗性種の発生により農薬の効果が低下する危険性は避けられない。抵抗性には作用点での変異や代謝亢進など様々な発現機構が知られている。農薬の作用機構や抵抗性の発現機構の研究は、遺伝学、生化学などの分野に重要な情報を提供している。逆に、これらの情報に基づいた基礎研究を活用することで抵抗性発現の抑制や農作物への影響を最小限に抑える抵抗性管理戦略を検討することができる。そのため、農薬メーカーにおいて作用機構や抵抗性の発現機構に関する研究が重要になっている。

分子生物学や構造生物学の進歩に伴い、計算科学は、分子設計だけではなく、作用機構や抵抗性発現機構の解明においても重要な役割を担うことが期待される。本稿では、プロフラニリド (図1A) を含むメタジアミド系殺虫剤とジノテフラン (図1B) に絞って作用機構と抵抗性発現機構に関する計算科学の活用例を紹介する。

1. メタジアミドのGABA受容体への相互作用

1.1. メタジアミドの作用部位

プロフラニリドは、三井化学アグロ(株)により発見された独自のメタジアミド構造を有する新規殺虫剤であり、チョウ目、コウチュウ目などの様々な害虫に対し高い殺虫効果を示す。メタジアミド構造を有する化合物 (メタジアミド化合物) を処理した害虫は、フィプロニルやシクロジエン系殺虫剤を処理した害虫と同様に興奮性症状を示す。フィプロニルやシクロジエン系殺虫剤はGABA受容体に作用することが知られており、殺虫剤抵抗性対策委員会 (IRAC) では、「グループ2:

GABA作動性塩化物イオンチャネルブロッカー」に分類されている。メタジアミド化合物は、ハスモンヨトウに対して殺虫効果とGABA受容体阻害活性の両方でフィプロニルより高い効果を示した。また、誘導体間の比較から殺虫効果とGABA受容体阻害活性に高い正の相関を見出し、メタジアミド化合物の致死作用点がGABA受容体であることがわかった。

キイロショウジョウバエのGABA受容体モデルを作成し、メタジアミド化合物の作用部位を推定した。フィプロニルなど既存GABA受容体アンタゴニストは、膜貫通領域のイオン流路に結合することが知られている。一方、メタジアミド化合物は、イオン流路とは異なる第3膜貫通領域に位置する336番目のグリシン残基 (G336) 周辺のユニット間ポケットに結合する可能性が計算モデルから示唆された。膜電位感受性色素を用いた膜電位アッセイでは、フィプロニルの阻害活性はA2'N変異、A2'S-T6'V変異で喪失したが、メタジアミド化合物はこれら変異による影響を殆ど受けなかった。一方、G336M変異は既存GABA受容体アンタゴニストの阻害活性に殆ど影響を与えないが、メタジアミド化合物の阻害活性を喪失させた。以上、計算解析及び膜電位アッセイの両方から、メタジアミド化合物の作用部位が既存GABA受容体アンタゴニストと異なることが示唆された。

1.2. 既存アンタゴニストとの交差抵抗性

GABA受容体2'位アラニン残基の変異により既存GABA受容体アンタゴニストへの抵抗性を獲得した害虫が問題に

図1. プロフラニリド (A), ジノテフラン (B) の構造。

* 〒297-0017 千葉県茂原市東郷1144

E-mail: shinichi.banba@mitsuichemicals.com

© 日本農薬学会

なっている。メタジアミド化合物は既存GABA受容体アンタゴニストと異なる部位に作用すると予想されるため、これら抵抗性種への効果が期待される。実際に、2'位変異を有する抵抗性種に対してフィプロニルやディルドリンの殺虫効果が低下するのに対して、プロフラニリドは高い殺虫効果を維持した。これら作用性や抵抗性の解析結果から、プロフラニリドはIRACにて、「グループ30: GABA作動性塩化物イオンチャネルアロステリックモジュレーター」に分類された。

1.3. 哺乳類との作用点での選択性

メタジアミド化合物は哺乳類のGABA_A受容体及びグリシン受容体に対して効果が低く、哺乳類に比べて昆虫のGABA受容体に高い選択性を示した。ヒト $\beta 3$ GABA受容体、ヒト $\alpha 1$ グリシン受容体に対してメタジアミド化合物は殆ど阻害活性を示さないが、G336に該当するアミノ酸をグリシン残基に変異させたヒト $\beta 3$ GABA及び $\alpha 1$ グリシン受容体に対しては阻害効果を示した。ヒト $\beta 3$ GABA受容体の立体モデルと比較すると、G336に該当する部位はサブユニット間ポケットの入口に位置しており、野生型では該当部位がメチオニン残基のため側鎖との立体反発でメタジアミド化合物がポケットに結合できないが、グリシンに変異することで結合できることが分かった。以上、膜電位アッセイと計算解析から、昆虫及び哺乳類の受容体において、このグリシン残基がメタジアミド化合物の活性に重要であることが分かった。昆虫ではこのグリシン残基が多くの種で保存されているため、広い昆虫種で効果を示すことが期待される。一方、哺乳類の主要なGABA受容体では該当するアミノ酸がグリシン残基ではないため、メタジアミド化合物は哺乳類と作用点で選択性が生じていると考えられる。

2. イミダクロプリド抵抗性種へのジノテフランの交差抵抗性

2.1. イミダクロプリド抵抗性種の先行研究

イミダクロプリド (IMI) は、カメムシ目、コウチュウ目、ハエ目など世界的に重要な害虫に高い効果を示すが、過剰な使用のため一部の害虫にて抵抗性の発達が問題になっている。IMI抵抗性の発現機構として、モモアカアブラムシのCYP6CY3、トビイロウンカのCYP6ER1、タバココナジラミのCYP6CM1などcytochrome P450 (CYP) の過剰発現が知られている。これらIMI抵抗性害虫は一部のネオニコチノイドと交差抵抗性を示すが、ジノテフラン (DTF) はIMI抵抗性害虫に対しても高い効果を維持していることが多く報告されている。

2.2. イミダクロプリド抵抗性要因のCYPへの親和性

タバココナジラミ CYP6CM1、トビイロウンカ CYP6ER1 の立体モデルでの検討から、ヘム周辺の反応部位は疎水性が高いことがわかった。IMIに比べてDTFは親水性が高く、

これらCYPへの親和性が低いことが計算解析から予想された。実際に、タバココナジラミのCYP6CM1での競合阻害試験から、IMIに比べてDTFはCYP6CM1に対して親和性が低いことが確認された。

2.3. IMI抵抗性要因のCYPでの代謝試験

IMI抵抗性要因のCYP6CY3, CYP6CM1, CYP6ER1にて、ネオニコチノイドの代謝試験を検討した。3種類すべてのCYPでIMIが分解されるのに対して、DTFは分解されないことがわかった。また、水・オクタノールの分配係数であるLogPを比較すると親水性の高いDTFやニテンピラムが分解されにくい傾向を示した。以上の結果から、親水性の高いDTFはIMI抵抗性の要因となっているCYPで代謝されにくいいため、IMI抵抗性害虫にも高い殺虫効果を示すことがわかった。ただし、IMI以外のネオニコチノイドで淘汰されたCYP6ER1の過剰発現に起因した抵抗性トビイロウンカでは、DTFを含むほぼすべてのネオニコチノイドに対して交差抵抗性を示す例が近年報告されている。CYP6ER1には多くの変異体が知られていて、変異箇所によって各ネオニコチノイドの分解性が大きく異なるため、DTFの抵抗性要因となるCYP6ER1変異体が生じる危険性が考えられる。そのため、今後、圃場での感受性検定と併せて、どの変異体がそれぞれのネオニコチノイドの抵抗性要因になるかを把握していく必要がある。

おわりに

本稿では、計算科学と*in vitro*試験を合わせて、メタジアミドが既存殺虫剤とは異なる部位に作用し、第3膜貫通領域に存在するグリシン残基が哺乳類との選択性に重要であることを示した。また、IMI抵抗性の要因になっているCYPに対するDTFの親和性が低く、DTFがCYPで代謝されないことがIMI抵抗性種に交差しない原因であることを明らかにした。現在、実験、計算科学ともに技術革新が進んでいる。今後、作用機構や抵抗性の発現機構に対して、これら高度化した技術を活用して、より詳細で正確な情報を提供することで食の保全に貢献したいと考えている。

本研究は多くの方々のご指導・ご支援があって初めてできた成果です。多大なご助言とご協力をいただいた諸先生及び共同研究者に、厚く御礼いたします。また、新規作用性を有する化合物の開発が、本研究の基礎に有ります。開発に携わった方々に厚く御礼申し上げます。

略歴

番場伸一 (ばんば しんいち)

生年月日: 1968年5月3日

最終学歴: 早稲田大学院理工学研究科応用化学専攻

研究テーマ: 新規農薬開発, 計算科学

趣味: 釣り, 旅行