学会賞受賞論文

(奨励賞)

イオンチャネルを標的とする殺虫性化合物の電気生理学的研究

池田 朋子*

筑波大学農林学系

ノースウェスタン大学医学部分子薬理および生化学学科

(平成 14 年 5 月 20 日受理)

Electrophysiological Study of the Mechanism of Action of Insecticides Activity on Ion Channels

Tomoko IKEDA*

*Institute of Agriculture and Forestry, University of Tsukuba, Tsukuba 305-8572, Japan
Department of Molecular Pharmacology and Biological Chemistry, Northwestern University Medical School,
Chicago, IL 60611, U.S.A.*

Key words: GABA receptor, nACh receptor, fipronil, picrotoxinin, anisatin, patch clamp, ion channel.

はじめに

イオンチャネルは細胞膜上に存在している膜貫通型のタンパクで、神経系における情報伝達機構に重要な役割を担っている。イオンチャネルの中央には孔(pore)が形成されており、イオンがこの孔を通して移動することにより、細胞膜電位が変化する。神経軸索上の活動電位は、Na⁺チャネルおよびK⁺チャネルの開閉により伝達され、シナプス間隙においては、神経伝達物質のGABAやアセチルコリン等が前膜から放出され後膜に存在するレセプターに結合することによりチャネルが開閉し刺激が伝達される。

今日までに開発された殺虫剤の中には、これらイオンチャネルを作用点とするものが多くある。本研究では特にGABA_Aレセプターチャネル複合体(GABA_Aレセプター)およびニコチン性アセチルコリン受容体(nAChレセプター)に作用する殺虫剤および天然化合物に注目した。

GABA_Aレセプターは陰イオンであるCl⁻透過型のイオンチャネルであり、抑制性神経伝達を引き起こす。一方、

nAChレセプターは主にNa⁺、Ca²⁺等の陽イオンを選択的に透過し、興奮性神経伝達に参与するイオンチャネルである。いずれのレセプターも5つのサブユニットが集合して中央にイオンを透過させる穴を形成している。

薬剤の神経系に対する作用機構を解明する手段として、標識イオンの細胞内への取り込み測定実験、放射性標識リガンドの特異的結合の解析、および神経細胞に薬物を処理して応答を調べる電気生理学的手法がある。電気生理学的手法では、薬剤の作用により引き起こされるチャネル機能変化を電流の変化としてとらえる。チャネル機能変化はミリ秒単位で起きることが多いので、電気生理学的手法は薬剤・イオンチャネル間の相互作用を解析する上で最も適した手段といえる。本研究で用いた電気生理学的手法のパッチクランプ法は、単一チャネルにおける応答をとらえることが可能な手段として1976年にNeherとSakmannにより開発された¹⁾。これは以前に開発された電位固定法の一つの変形で、膜電位の変化に伴う電流を測定することによりチャネル機能を解析するものである。ホールセル法およびシングルチャネル法があり、ホールセル法では単一細胞上に存在している全てのチャネルを通過するイオン電流の総和を測定する。シングルチャネル法は単一チャネルを通

* To whom correspondence should be addressed to this author.

E-mail: t-ikeda@northwestern.edu

過するイオン電流を測定する方法で、個々のイオンチャネルの電流伝導度（コンダクタンス）の変化、開時間および閉時間の変化が測定できる。

本研究では、GABA_A レセプターに対し抑制的に作用する化合物に注目し、フェニルピラゾール系殺虫剤フィプロニル、有機塩素系殺虫剤ディルドリン、さらに、植物由来の天然毒アニサチンの作用機構をパッチクランプ法を用いて解明した。そしてこれまでに多くの知見が得られているピクロトキシニンの作用と比較し、結合部位についても検討した。また、nACh レセプターに作用する殺虫剤、カルタップ、およびネオニコチノイド系殺虫剤ニテンピラムの作用機構をシングルチャネル法を用いて検討した。

フィプロニルの GABA_A レセプターに対する作用

GABA 誘導性イオン電流に対するフィプロニルの作用を、ホールセルパッチクランプ法で調べた。神経標本として、ラット脊椎に存在する背根神経節細胞（dorsal root ganglion neuron; DRG ニューロン）を一次培養して用いた。イオン電流は細胞膜電位を -60 mV に固定し $300 \mu\text{M}$ の GABA を 10 msec, 1 分間隔で繰り返し処理して誘導した (Fig. 1A)。GABA 処理によりチャネルが開き、Cl⁻ の細胞外流出に伴う内向きイオン電流が発生した。Fig. 1B に電流ピーク値の経時変化を示す。フィプロニル $1 \mu\text{M}$ を外液に溶解して細胞に処理すると、電流は次第に抑制されコン

Fig. 1. Suppression of GABA-induced currents by fipronil in a rat DRG neuron.

(A) Current records in response to 10 msec applications of $300 \mu\text{M}$ GABA before (a), during (b) and after (c) application of $1 \mu\text{M}$ fipronil in the bath. (B) Time course of changes in peak current amplitude before, during and after application of $1 \mu\text{M}$ fipronil. Letters a to c correspond to those in A.

ロールの $66.1 \pm 8.1\%$ となった。外液からフィプロニルを除くとイオン電流は回復したことから、フィプロニルによる電流抑制は可逆的であることが判明した²⁾。

ある種のチャネル内部に作用する化合物ではチャネルの活性化によりその作用が変化することが知られている。従って、チャネルの活性化とフィプロニルの作用について検討した。ここで活性化チャネルとは GABA 処理により開閉を繰り返しているチャネルを、静止チャネルとは閉じた状態のチャネルを示す。フィプロニルの静止チャネルに対する作用を検討するため、GABA 処理を中断してフィプロニルを前処理し抑制の有無を調べた。フィプロニル前処理後 15 分経過したイオン電流はコントロールの $68.4 \pm 9.3\%$ であった²⁾。このことからフィプロニルによる電流抑制は静止状態のチャネルにおいても同様に観察されることが示された。

さらにフィプロニルの作用を静止チャネルと活性化チャネルにおいて比較した。Fig. 2 はフィプロニルと静止チャネルおよび活性化状態のチャネルとの相互作用を表した模式図である。R は静止チャネル、G は GABA 分子、R*G は GABA が結合したことにより活性化されたチャネル、RF はフィプロニルが作用した静止チャネル、R*GF はフィプロニルが作用した活性化チャネルを示す。k₊₁ および k₋₁ はそれぞれ静止チャネルにおける薬剤の結合速度および解離速度を表す。k'₊₁ および k'₋₁ はそれぞれ活性化チャネルにおける薬剤の結合速度および解離速度を表す。

静止チャネルにおけるフィプロニルの作用を調べるために、 1 , 3 , 10 , および $30 \mu\text{M}$ のフィプロニルを単独で外液に処理し、抑制を測る目的で $300 \mu\text{M}$ の GABA を 10 秒間隔で 10 msec 処理した。電流はフィプロニル処理時間と濃度依存的に抑制された。結合速度と解離速度を求めるために、電流のピーク値の変化をフィプロニル処理時間に対してプロットし、一次の指数関数曲線で近似した (Fig. 3A)。時定数 (τ) の値は 1 , 3 , 10 および $30 \mu\text{M}$ のフィプロニルを処理したときそれぞれ、 74.9 ± 13.9 , 45.0 ± 4.5 , 34.9 ± 1.4 , および 27.4 ± 0.68 sec であった。結合速度 (k₊₁) と解離速度 (k₋₁)

Fig. 2. Fipronil interaction with both the resting and activated GABA_A receptors.

R, resting receptor; G, GABA; R*G, the receptor bound and activated by GABA; F, fipronil; RF, the fipronil-bound resting receptor; R*GF, the fipronil-bound activated receptor; k₊₁ and k₋₁, drug association and dissociation rates, respectively, without GABA; and k'₊₁ and k'₋₁, drug association and dissociation rates, respectively, with GABA.

をモデルに従った等式 $1/\tau = k_{+1}[F] + k_{-1}$ より求めるため、 τ の逆数をフィプロニル濃度でプロットした結果、 k_{+1} は $673 \pm 220 \text{ M}^{-1} \text{ sec}^{-1}$ 、 k_{-1} は $0.018 \pm 0.0035 \text{ sec}^{-1}$ の値が求められた (Fig. 3B)。

次に活性化チャンネルにおけるフィプロニルの電流抑制を検討するため、1, 3, 10 および $30 \mu\text{M}$ のフィプロニルと $30 \mu\text{M}$ の GABA を 30 秒間同時処理した (Fig. 4A)。イオン電流の下降相は処理時間および処理濃度依存的に強く現れた。電流の下降相を一次の指数関数曲線で近似し、 τ 値はそれぞれ、 11.09 ± 3.66 , 10.10 ± 3.83 , 7.16 ± 0.71 , 5.48 ± 1.19 , および $3.38 \pm 0.69 \text{ sec}$ であった。 k'_{+1} と k'_{-1} をモデルに従った等式 $1/\tau = k'_{+1}[F] + k'_{-1}$ より求めるため、 τ の逆数をフィプロニル濃度でプロットした結果、 k'_{+1} は $6600 \pm 380 \text{ M}^{-1}$

sec^{-1} 、 k'_{-1} は $0.11 \pm 0.0054 \text{ sec}^{-1}$ であった (Fig. 4B)。不活性チャンネルにおける場合と比較すると、GABA によるチャンネル活性化により、フィプロニルの結合速度は 9.8 倍、解離速度は 6.2 倍に増加したことがわかる。

さらに定常状態での作用を比較するため、静止チャンネルおよび活性化チャンネルにおけるフィプロニルの薬量作用曲線から半抑制濃度を測定した結果、静止チャンネルでは $1.66 \pm 0.18 \mu\text{M}$ 、活性化チャンネルでは $1.61 \pm 0.14 \mu\text{M}$ となった。互いの値は近似していたことから、フィプロニルの定常状態での抑制は、チャンネルの開閉に関わらず一定の値を示すことが判明した。

以上のことから、フィプロニルは静止チャンネルにも作用

Fig. 3 Kinetics of fipronil suppression of the resting GABA receptor in a rat DRG neuron.

Decreases in currents induced by various concentrations of fipronil during bath application are plotted as a function of incubation period. GABA pulses ($300 \mu\text{M}$, 10 msec) were applied every 10 sec to monitor the change in current amplitude. (A) Time course of decrease in peak current amplitude by bath application of fipronil at 1, 3, 10, and $30 \mu\text{M}$ for 100–150 sec. Changes in current amplitude relative to the first current amplitude are plotted as a function of incubation period for each fipronil concentration, and the plots are fitted with a single exponential function. (B) The reciprocal of the time constants obtained from a single exponential fitting is plotted as a function of fipronil concentration. The solid line represents the relation $1/\tau = k_{+1}[F] + k_{-1}$. The fit was less satisfactory since the correlation coefficient was 0.89 with a degree of freedom of 2. The association and dissociation rates for fipronil interacting with the resting receptor are calculated to be $k_{+1} = 673 \pm 220 \text{ M}^{-1} \text{ sec}^{-1}$ and $k_{-1} = 0.018 \pm 0.0035 \text{ sec}^{-1}$, respectively.

Fig. 4 Effects of fipronil at various concentrations on the decay phase of currents induced by long applications of GABA in a rat DRG neuron.

(A) GABA $30 \mu\text{M}$ was applied for 30 sec to induce currents, and was co-applied with various concentrations of fipronil. The decay phase of currents was fitted with a single exponential function to obtain time constants. (B) The reciprocal of the time constants ($1/\tau$) plotted as a function of fipronil concentration. Data points are best fitted to the solid line according to the equation $1/\tau = k'_{+1}[F] + k'_{-1}$. The correlation coefficient of 0.995 gives a significant level of $P < 0.05$. $k'_{+1} = 6600 \pm 380 \text{ M}^{-1} \text{ sec}^{-1}$; $k'_{-1} = 0.11 \pm 0.0054 \text{ sec}^{-1}$.

するが、チャネルの活性化に伴いフィプロニルの抑制と抑制からの回復は促進することが判明した。しかし、定常状態における抑制に関しては、チャネルの活性化に伴う変化は認められなかった。チャネルの活性化に伴いフィプロニルによる抑制と抑制からの回復が促進された現象はピクロトキシニンにおいても報告されている⁹⁾。フィプロニルの結合部位がピクロトキシニンと同様にチャネル内面であるとする、チャネル開口に伴いフィプロニルの結合部位への接近が容易になったと考えると説明がつく。

アニサチンの GABA_A レセプターに対する作用

アニサチンはモクレン科に属する *Illicium anisatum* (シキミ) に含有される有毒成分である⁴⁻⁶⁾。アニサチンの作用に関する研究は生化学的および電気生理学的手法を用いて行われ、アニサチンは GABA の作用を阻害する化合物であると報告された⁷⁻⁹⁾。しかしこれまでにアニサチンに関するイオンチャネルレベルでの研究は行われていない。ここではラット DRG ニューロンを用いてアニサチンの GABA_A レセプターにおける作用機構をホールセルパッチクランプ法を用いて検討した。

Fig. 5 はアニサチンの GABA 誘導性電流に対する抑制を示している。A は測定したイオン電流の図で、B にその時の経時変化を示した。細胞の膜電位を -60 mV に固定して

Fig. 5 Suppression of GABA-induced currents by co-application of anisatin and GABA in a rat DRG neuron. (A) Current records in response to 5 sec application of $30 \mu\text{M}$ GABA with and without anisatin. GABA alone (solid bar); co-application of GABA and anisatin (broken bar). (B) Time course of changes in peak current amplitude by repeated applications of GABA alone and co-application of GABA and anisatin (solid line). The peak amplitude of current gradually decreased during repeated co-applications. No recovery was observed after washing with anisatin-free solution.

$30 \mu\text{M}$ の GABA を 5 sec 処理すると、内向き電流が発生した。GABA のみを処理したコントロールと比較して、 $1 \mu\text{M}$ のアニサチンを GABA と同時処理するとイオン電流は抑制され、アニサチンを除いても抑制から回復しなかった。このことからアニサチンによる抑制は不可逆的であることが判明した¹⁰⁾。

さらに、アニサチンの静止チャネルに対する作用を検討した。 $1 \mu\text{M}$ のアニサチンを前処理し、その直後に GABA 処理により誘導された電流を測定した。アニサチン処理前後で電流の大きさに有意差は認められなかったことから、アニサチンが作用を示すためには、GABA によるチャネルの活性化が必要であることが判明した¹⁰⁾。

各種化合物の GABA 誘導性シングルチャネルイオン電流に対する作用

殺虫剤のイオンチャネルに対する作用を検討する上で、シングルチャネル法を適用した例は少ない。各種化合物の詳細な作用機構を検討するため、シングルチャネルパッチクランプ法を用いて単一チャネルに対する作用を比較した。膜電位を -60 mV に固定したアウトサイドアウトのパッチ膜に、 $10 \mu\text{M}$ の GABA を外液に処理すると、内向きのシングルチャネル電流が発生した (Fig. 6)。A はコントロールで GABA を単独で処理した時に観察されたもの、B, C, D, E はそれぞれ $10 \mu\text{M}$ フィプロニル、 $1 \mu\text{M}$ アニサチン、 $0.1 \mu\text{M}$ ディルドリン、 $0.4 \mu\text{M}$ ピクロトキシニンを $10 \mu\text{M}$ の GABA と同時処理した結果得られた電流である。シングルチャネル電流は単独の開閉あるいはバーストを形成した状態で観察された。GABA_A レセプターのコンダクタンスは少なくとも 4 つの段階が知られており、それらは 26 pS のメインコンダクタンス、 11 および 19 pS のサブコンダクタンス、 44 pS のスーパコンダクタンスである¹¹⁾。本研

Fig. 6 Single-channel currents induced by application of $10 \mu\text{M}$ GABA (A) and co-application of $10 \mu\text{M}$ GABA and $10 \mu\text{M}$ fipronil (B), $1 \mu\text{M}$ anisatin (C), $0.1 \mu\text{M}$ dieldrin (D), or $0.4 \mu\text{M}$ picrotoxinin (E) to outside-out membrane patches isolated from rat DRG neurons. Membrane potential was held at -60 mV.

Table 1 Summary of Modulation of GABA-induced single-channel and whole-cell currents by chemicals.

	Open time	Closed time	Open probability	Whole-cell current	
Fipronil	↓	↑↑	↓↓	↓↓	
Anisatin	NO	↑↑	↓↓	↓↓	
Dieldrin	↓↓	↑↑	↓↓	↓↓	
Picrotosinin	NO	↑↑	↓↓	↓↓	
					Increase ↑ Decrease ↓ No change NO

究においてはサブコンダクタンスはまれにしか観察されなかったもので、26 pS のメインコンダクタンスのみを解析した。GABA のみを処理した場合、メインコンダクタンスは 27.2 ± 4.3 pS であった。GABA とフィプロニル、アニサチン、ディルドリン、および、ピクロトキシニンと同時に処理したときのメインコンダクタンスはそれぞれ、 26.1 ± 4.1 pS, 26.0 pS, 25.9 ± 1.5 pS, および、 26.7 ± 1.3 pS で、各種化合物処理によりチャンネルのコンダクタンスの大きさは変化せず、サブコンダクタンスの発生頻度も GABA 単独処理の場合と同様に極めて低かったことから、各種化合物はチャンネルのコンダクタンスを変化させる作用はないことが判明した^{10,12)}。

さらに、チャンネルの開時間および閉時間について解析した結果を Table 1 にまとめた。各種化合物は共通してチャンネルの平均閉時間を延長した^{10,12)}。従って、これらの化合物は共通してチャンネルの開頻度を低下させ、チャンネルを閉じた状態で安定化させる作用があると言える。さらに、ディルドリンおよびフィプロニルはチャンネル平均開時間を減少させる作用もあり、これらのシングルチャンネルパラメータ変化がホールセルイオン電流抑制機構であると考えられる。

結 合 部 位

GABA_A レセプターにはいくつかの薬剤作用点が存在する。GABA の作用を非競合的に阻害するピクロトキシニンは GABA_A レセプター上に結合部位を持ち GABA の作用を阻害する多くの化合物が同部位に結合すると報告されている¹³⁾。ディルドリンはピクロトキシニンと結合部位を共有すると言われており^{14,15)}、フィプロニルの結合部位に関しても、ピクロトキシニンやディルドリンと同一であるという報告がある^{16,17)}。また、アニサチンの結合部位を電気生理学的に検証した例は報告されていない。

1. フィプロニルとピクロトキシニンとの間の相互作用

フィプロニルの結合部位を検証するため、フィプロニルとピクロトキシニンとの間の相互作用を2つのモデルを用いて検討した (Fig. 7)²⁾。1 site model ではピクロトキシニンとフィプロニルは同一部位に結合し、2 site model では

Fig. 7 One-site model and two-site model for interactions of fipronil (F) and picrotoxinin (P) with the GABA_A receptor (R).

RF, fipronil-bound receptor; RP, picrotoxinin-bound receptor; RPF, picrotoxinin- and fipronil-bound receptor; K_F and K_P , the equilibrium dissociation constants for fipronil and picrotoxinin binding, respectively.

フィプロニルとピクロトキシニンは独自の部位に結合すると仮定する。従って、1 site model では、フィプロニルおよびピクロトキシニンの抑制は結合部位にピクロトキシニンまたはフィプロニルが結合した RP と RF の和で表される (eq. 1)。2 site model においては、フィプロニルとピクロトキシニンはそれぞれ独自の結合部位を持つことから、両化合物による抑制は、ピクロトキシニンまたはフィプロニルが結合した RP, RF, さらにピクロトキシニンおよびフィプロニルが結合した RPF の和で表される (eq. 2)。

$$RP + RF = R_T ([P]/K_P + [F]/K_F) / (1 + [P]/K_P + [F]/K_F) \quad (\text{eq. 1})$$

$$RP + RF + RPF = R_T ([P]/K_P + [F]/K_F + [P][F]/K_P K_F) / (1 + [P]/K_P + [F]/K_F + [P][F]/K_P K_F) \quad (\text{eq. 2})$$

R_T は測定している細胞の膜上に存在する全 GABA_A レセプターを、 $[P]$ と $[F]$ はピクロトキシニンとフィプロニルの濃度を示す。 K_F および K_P 値としてフィプロニルおよびピクロトキシニンの IC_{50} 値を用いた。

フィプロニルとピクロトキシニンの相互作用を各種濃度のフィプロニルとピクロトキシニンを同時処理し、得られた濃度依存曲線を 1 site model から得られた等式 (eq. 1)、2 site model から得られた等式 (eq. 2) を用いて解析した (Fig. 8)。破線は 1 site model から得られた等式による曲線を示し、実線は 2 site model から得られた等式による曲線を示している。実験値は 2 site model から得られた理論曲線に近かったことからフィプロニルとピクロトキシニンは異なる部位に結合する可能性が示された。

2. アニサチンとピクロトキシニンとの間の相互作用

GABA_A レセプターにおけるアニサチンの結合部位を検討するため、アニサチンとピクロトキシニンとの間の相互作用を調べた。アニサチンおよびピクロトキシニンは共に GABA_A レセプターに作用し、GABA 誘導性イオン電流を抑制する化合物である。アニサチンとピクロトキシニンが同一の結合部位に作用する可能性を検討するため、両化合

Fig. 8 The effect of picrotoxinin on fipronil suppression of GABA-induced currents in rat DRG neurons.

Dose-response relationships for fipronil suppression of GABA-induced currents were determined in the presence of 1 μM (A) and 3 μM (B) picrotoxinin. Picrotoxinin at 1 μM caused $34.0 \pm 9.7\%$ block of the current ($n=4$) (A) and at 3 μM caused $51.8 \pm 2.1\%$ block ($n=4$) (B). Dose-response relationships in the presence of picrotoxinin were fitted by two equations described in the text. Dotted line depicts the fit of data with a logistic eq. 1 (one-site model). Solid line depicts the fit of data with a logistic eq. 2 (two-site model). The K_P and K_F values were set to 1.60 and 1.66 μM , respectively.

物を同時に処理した場合とピクロトキシニン単独処理の場合とで薬量作用曲線を比較した。Fig. 9 にアニサチン 1 μM 存在下 (○), またはアニサチンが存在しない状態でのピクロトキシニンの薬量作用曲線 (●) を示している。アニサチンおよびピクロトキシニンが存在しない状態でのイオン電流の大きさを 100% としてそれぞれの電流の大きさを標準化した。ピクロトキシニンは GABA 誘導性イオン電流を濃度依存的に抑制し、 IC_{50} 値は $0.42 \pm 0.04 \mu\text{M}$ であった¹⁰⁾。アニサチン 1 μM を加えてピクロトキシニンの作用を測定した結果、ピクロトキシニンの濃度が低い場合はアニサチンはイオン電流を約 50% 抑制した。しかし、ピクロトキシニンが高濃度の場合、アニサチンによる作用はほとんどみられず、ピクロトキシニン単独の場合と同等の抑制度を示した。このことから、アニサチンはピクロトキシニンと相互作用を示し、アニサチンとピクロトキシニンは結合部位を共有していることが示唆された。

以上の結果から、ピクロトキシニンとアニサチンは同一部位に結合するが、フィプロニルは異なる部位に結合する可能性が示された。しかし、過去の報告ではフィプロニルはピクロトキシニンと同一部位に作用することが示されて

Fig. 9 The effect of 1 μM anisatin on picrotoxinin suppression of 30 μM GABA-induced currents in rat DRG neurons. Picrotoxinin suppressed GABA-induced currents in a concentration-dependent manner with an EC_{50} estimated to be $0.42 \pm 0.04 \mu\text{M}$ and Hill coefficient 0.89 ± 0.05 (●, $n=5$). Co-application of picrotoxinin and anisatin suppressed GABA-induced currents in a concentration-dependent manner (○, $n=5$).

いる^{16,17)}。これら相反する結論について考察したい。近年ピクロトキシニンの結合部位が GABA_A レセプター上に複数存在する可能性が報告されている^{18,19)}。フィプロニルが一方のピクロトキシニン結合部位のみに作用し、他方の結合部位に作用しないと仮定した場合、両化合物は相互作用を示さないという結果が得られるのではないかと考えられる。なぜならば電気生理学的手法では化合物の相互作用を直接化合物の結合としてとらえるのではなく、化合物の結合の結果引き起こされる電流の変化としてとらえるためである。さらにフィプロニルとピクロトキシニンは別の部位に結合するという報告もあり^{20,21)}、これらの化合物の結合部位に関する問題は今後も検討する余地がある。

カルタップおよびニテンピラムの nACh レセプターに対する作用

ラット褐色細胞腫由来 PC12 培養細胞の nACh レセプターに対するカルタップの作用をシングルチャネル法を用いて検討した。シングルチャネル電流はセルアタッチ法により測定し、電流伝導、開時間、閉時間および、バースト持続時間について解析した。カルタップ処理により ACh 誘導性イオン電流の開時間およびバースト持続時間は濃度依存的に減少した²²⁾。また、電流伝導度は変化しなかったことから、カルタップの nACh レセプター抑制機構は主に開時間の減少であることが判明した。

同様にニテンピラムの作用を検討した。ニテンピラム単独処理により複数のコンダクタンスを持つシングルチャネル電流を発生させたことから、ニテンピラムは ACh レセプターに対してアゴニストとして作用していることが示された²³⁾。ニテンピラムを ACh と同時に処理したところ、メインコンダクタンス電流の発生頻度は減少し、サブコンダ

クタンズ電流の発生頻度は増加した。また、ニテンピラムはチャンネル開頻度を低下させた。以上のことから、ニテンピラムは単独ではアゴニストとして、ACh存在下ではアンタゴニストとして作用することが明かとなった。

おわりに

シングルチャンネル電流を解析した結果、フィプロニル、アニサチン、ディルドリン、およびピクロトキシニンにGABA誘導性イオン電流をチャンネルの開確率を減少させて抑制することが判明した。このことから、これら化合物の作用は類似していると考えられる。フィプロニルとピクロトキシニンは相互作用を示さなかったことから、異なる部位に結合する可能性が示された。しかし先にも述べたように、本研究の結果は電気生理学的手法を用いて得られたこと、過去の報告による複数のピクロトキシニン結合部位存在の可能性、さらにフィプロニルはピクロトキシニン結合部位に作用しないことを示唆する研究結果が報告されていることも考え合わせると、結合部位に関してはさらに検討する必要があると考えられる。

本研究では殺虫剤フィプロニル、天然毒アニサチン、従来型の殺虫剤ディルドリンの作用機構を検討し、これまでに多くの知見が得られているピクロトキシニンと比較した。イオンチャンネルを作用点とする殺虫剤の中にも、作用点におけるアミノ酸変化が抵抗性発達の原因となった例があり、ディルドリンに対する抵抗性機構はこの代表的な例と言える。フィプロニルはディルドリン抵抗性害虫に対しても殺虫効果を示す²⁴⁾。本研究では作用機構が未知である天然有毒成分アニサチンについて、イオンチャンネルレベルで作用機構を解明した。これは、新たな作用機構の有用化合物を探索する可能性を持ち、殺虫剤を含めた様々な化合物とフィプロニルの作用機構を比較することは、抵抗性害虫に対しても有効な殺虫剤開発の基礎研究として位置づけられる。

近年では分子生物学的手法を使った薬剤の作用点探索も盛んに行われている。例えば、イオンチャンネルの特定のアミノ酸を他のアミノ酸に置換すると薬剤の作用性が変化することから、分子レベルで薬剤の作用に関与している部位を推察することが可能となった。しかし、機能タンパクであるイオンチャンネルを立体的かつ動的な視点からとらえようとする場合、一部のアミノ酸の変化が全体の機能にどのように影響しているのかを解析することは未だ困難な問題である。パッチクランプ法を用いた研究においては、薬剤の作用により引き起こされるチャンネル機能変化を経時的に解析することが可能であり、動的なチャンネル変化をとらえられるという点において将来的にも期待される。

謝 辞

本研究を行うにあたり、筑波大学教授、河野義明博士、助教授、本田洋助博士、助教授、戒能洋一助博士、Demar Taylor 博士には、日頃から多大な御支援と御指導を賜りました。正野俊夫博士には筑波大学教授在職中様々な面で御支援と御指導を頂きました。厚くお礼申し上げます。また、本研究を行うにあたり終始御指導、御鞭撻を賜りました、ノースウエスタン大学医学部、橋橋敏夫教授に心からお礼申し上げます。ノースウエスタン大学医学部、永田啓一博士には、研究を進めていく上での確なご指導を賜りました。ノースウエスタン大学医学部教授、Jay Z. Yeh 博士、同研究員 William Marszalec 博士、Xilong Zhao 博士には、ノースウエスタン大学留学中、様々な面で御助言、御指導を頂きました。島根大学生物資源科学部、尾添嘉久教授には、研究を進めるにあたり多くの御助言頂き心から感謝申し上げます。学位論文審査を進めるに当たり御指導頂きました、筑波大学農林学系、柿眞篤教授、応用生物化学系、白井健二教授に御礼申し上げます。

引用文献

- 1) E. Neher and B. Sakmann: *Nature* **260**, 799-802 (1976).
- 2) T. Ikeda, X. Zhao, K. Nagata, Y. Kono, T. Shono, J. Z. Yeh and T. Narahashi: *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **296**, 914-921 (2001).
- 3) G. H. Dillon, W. B. Im, D. B. Carter and D. D. McKinley: *Br. J. Pharmacol.* **115**, 539-545 (1995).
- 4) I. Kouno, N. Baba, M. Hashimoto, N. Kawano, M. Takahashi, H. Kaneto, C.-S. Yang and S. Sato: *Chem. Pharm. Bull.* **37**, 2448-2451 (1989).
- 5) J. F. Lane, W. T. Koch, N. S. Leeds and G. Gorin: *J. Amer. Chem. Soc.* **74**, 3211-3215 (1952).
- 6) T. Ikeda, K. Nagata, H. Honda, T. Shono and T. Narahashi: *Pestic. Sci.* **52**, 337-342 (1998).
- 7) D. R. Curtis, J. Davies, C. J. A. Game, G. A. R. Johnston and R. M. McCulloch: *Brain Res.* **63**, 419-423 (1973).
- 8) Y. Kudo, J. Oka and K. Yamada: *Neurosci. Lett.* **25**, 83-88 (1981).
- 9) H. Shinozaki, M. Ishida and Y. Kudo: *Brain Res.* **222**, 401-405 (1981).
- 10) T. Ikeda, Y. Ozoe, E. Okuyama, K. Nagata, H. Honda, T. Shono and T. Narahashi: *Br. J. Pharmacol.* **127**, 1567-1576 (1999).
- 11) R. L. Macdonald and R. E. Twyman: "Ion Channels 3," ed. by T. Narahashi, Plenum Press, New York, pp. 315-343, 1992.
- 12) T. Ikeda, K. Nagata, T. Shono and T. Narahashi: *NeuroReport* **9**, 3189-3195 (1998).
- 13) L. M. Cole and J. E. Casida: *Pestic. Biochem. Physiol.* **44**, 1-8 (1992).
- 14) L. J. Lawrence and J. E. Casida: *Life Sci.* **35**, 171-178 (1984).
- 15) K. Nagata and T. Narahashi: *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **269**, 164-171 (1994).
- 16) L. M. Cole, R. T. Roush and J. E. Casida: *Life Sci.* **56**, 757-765 (1995).
- 17) A. M. Hosie, H. A. Baylis, S. D. Buckingham and D. B. Sattelle: *Br. J. Pharmacol.* **115**, 909-912 (1995).
- 18) T.-B. Li and R. A. Pearce: *Soc. Neurosci. Abstr.* **26**, 236.8 (2000).
- 19) K.-W. Yoon, D. F. Covey and S. M. Rothman: *J. Physiol. (Lond.)* **464**, 423-439 (1993).

- 20) M. A. Wolff and V. P. M. Wingate: *Invert. Neurosci.* **3**, 305–315 (1998).
- 21) M. Kamijima and J. E. Casida: *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **163**, 188–194 (2000).
- 22) K. Nagata, T. Ikeda, E. Aoyama and T. Shono: *J. Pesticide Sci.* **23**, 40–43 (1998).
- 23) K. Nagata, E. Aoyama, T. Ikeda and T. Shono: *J. Pesticide Sci.* **24**, 143–148 (1999).
- 24) A. S. Moffat: *Science* **261**, 550–551 (1993).

Society Awards 2002

(on high prospectiveness)

Electrophysiological Study of the Mechanism of Action of Insecticides Activity on Ion Channels

INTRODUCTION

Ion channels in the membrane play a very important role in nerve excitation and synaptic transmission. The nerve action potential is generated as a result of opening and closing of Na^+ and K^+ channels. When an action potential arrives at the nerve terminal, neurotransmitters such as γ -aminobutyric acid (GABA), acetylcholine (ACh), and glutamate, are released from the presynaptic terminal, which in turn activate the respective postsynaptic receptor-channel. Many insecticides are known to act on receptors and channels. The GABA_A receptor-channel is anion permeable, especially Cl^- , and causes inhibition of synaptic transmission. On the other hand, the nicotinic acetylcholine receptor (nAChR) is cation permeable, and causes excitatory synaptic transmission. Both types of receptors comprise five subunits which form a channel at the center.

Several methods are available for the study of the mechanism of action of chemicals on the nervous system: by measuring fluxes of radio labeled ions; by measuring radioligand binding; and by recording ionic currents with electrophysiological methods. The interactions of chemicals with ion channels can be measured most efficiently by electrophysiological methods, as most ion channel functions occur within milliseconds. One of the most powerful electrophysiological methods is patch clamp developed in 1976 as a variation of the voltage clamp method. Patch clamp allows us to measure the channel activity of the entire cell membrane (whole-cell patch clamp) or the activity of single channels (single-channel patch clamp).

This study is focused on the chemicals that inhibit GABA receptors including the phenylpyrazole insecticide fipronil, the cyclodiene insecticide dieldrin, and

natural toxins anisatin and picrotoxinin, and is aimed at elucidating their mechanism of action on the GABA_A receptor using patch clamp techniques. This study also covers the mechanism of action of cartap and nitenpyram on nAChRs.

EFFECT OF FIPRONIL ON GABA_A RECEPTOR

Fipronil is the first phenylpyrazole insecticide introduced for pest control. It is effective against some insects that have become resistant to the existing insecticides. In order to elucidate the mechanism of fipronil action, whole-cell patch clamp experiments were performed using rat dorsal root ganglion neurons in primary culture. The suppression of the GABA_A receptor by bath application of $1 \mu\text{M}$ fipronil was assessed by a brief (10 msec) application of $300 \mu\text{M}$ GABA. The peak current amplitude gradually decreased to $66.1 \pm 8.1\%$ of the control, and a complete recovery of currents was observed after washout with fipronil-free solution. To examine whether fipronil inhibition of GABA-induced currents requires the opening of channels, experiments were carried out by pre-application of fipronil without GABA applications. The first test current amplitude after 15 min pre-application of fipronil in the bath was reduced to $68.4 \pm 9.3\%$ of control. Thus, the suppression of GABA-induced current by fipronil does not require the opening of channels.

A simple model was proposed for fipronil interactions with the GABA_A receptor in both resting and activated states. According to this model, the time constant (τ) for the onset of block is equal to $1/(k_{+1}[\text{F}] + k_{-1})$, where $[\text{F}]$ is the fipronil concentration, k_{+1} and k_{-1} are drug association and dissociation rates, respectively. Fipronil suppression on the resting GABA_A receptor was monitored by 10 msec test pulses of GABA. In order to

obtain k_{+1} and k_{-1} , the change in peak current amplitude was plotted as a function of fipronil incubation period, and the plots were fitted with a single exponential function. The τ values were 74.9 ± 13.9 , 45.0 ± 4.5 , 34.9 ± 1.4 , and 27.4 ± 0.68 sec in the presence of 1, 3, 10, and 30 μM fipronil, respectively. The plot of $1/\tau$ vs fipronil concentration yielded a k_{+1} of $673 \pm 220 \text{ M}^{-1}\text{sec}^{-1}$, a k_{-1} of $0.018 \pm 0.0035 \text{ sec}^{-1}$. To examine the fipronil block of the activated GABA_A receptor, various concentrations of fipronil were co-applied with GABA. In order to obtain k'_{+1} and k'_{-1} , current decay was fitted with a single exponential function. The τ values were 11.09 ± 3.66 , 10.10 ± 3.83 , 7.16 ± 0.71 , 5.48 ± 1.19 , and 3.38 ± 0.69 sec in the presence of fipronil at 0, 1, 3, 10, and 30 μM , respectively. The plot of $1/\tau$ vs fipronil concentration was fitted with the equation of a linear regression. I obtained a value of $6600 \pm 380 \text{ M}^{-1}\text{sec}^{-1}$ for k'_{+1} , and $0.11 \pm 0.0054 \text{ sec}^{-1}$ for k'_{-1} for fipronil block of the activated receptor. It is concluded that although fipronil suppresses GABA induced currents without channel activation, channel opening facilitates fipronil binding to and unbinding from the receptor.

THE EFFECT OF ANISATIN ON GABA_A RECEPTOR

Anisatin, a toxic, insecticidally active component of Sikimi plant, is known to act on the GABA system. In order to elucidate the mechanism of anisatin interaction with the GABA system, whole-cell patch clamp experiments were performed with rat dorsal root ganglion neurons in primary culture. The currents induced by 30 μM GABA were suppressed when 1 μM anisatin was co-applied. The peak current amplitude gradually decreased to 58.3% of the control during repeated co-applications. No recovery of currents was observed after washout with anisatin-free solution. To examine whether anisatin inhibition of GABA-induced currents requires the GABA-induced opening of channels, experiments were carried out by pre-application of anisatin without GABA application. Pre-application of 1 μM anisatin alone for 60 sec had no effect on GABA-induced currents. The results indicate that the anisatin-induced suppression of GABA-induced currents requires conformational changes associated with the opening of channels.

THE EFFECTS OF CHEMICALS ON GABA-INDUCED SINGLE-CHANNEL CURRENTS

To elucidate the more detailed mechanisms of fipronil, anisatin, dieldrin and picrotoxinin interaction with the GABA_A receptor, single-channel patch clamp experiments were performed using rat dorsal root ganglion neurons. Single-channel currents were recorded using the outside-out membrane patch configuration. When 10 μM GABA was applied to the bath, inward single-

channel currents occurred at a holding potential of -60 mV . The main conductance of currents induced by 10 μM GABA was estimated to be $27.2 \pm 4.3 \text{ pS}$. In order to examine modulation of fipronil, anisatin, dieldrin, and picrotoxinin on GABA-induced single-channel currents, 10 μM GABA was co-applied with 10 μM fipronil, 1 μM anisatin, 0.1 μM dieldrin, or 0.4 μM picrotoxinin. The main conductances in the presence of 10 μM GABA plus fipronil, anisatin, dieldrin, and picrotoxinin were estimated to be 26.1 ± 4.1 , 26.0 , 25.9 ± 1.5 , and $26.7 \pm 1.3 \text{ pS}$, respectively. These values were almost the same as that in the presence of 10 μM GABA alone. Thus, these chemicals do not affect the single-channel main conductance. Fipronil, anisatin, dieldrin, and picrotoxinin prolonged the mean closed time, resulting in the reduction of the frequency of channel openings in a similar manner. Thus, these chemicals have a common mechanism to suppress the GABA-induced whole-cell currents. In addition, fipronil and dieldrin slightly decreased the mean open time. This effect also contributed in part to the suppression of GABA-induced whole-cell currents.

SITE OF ACTION OF FIPRONIL AND ANISATIN

Two models for fipronil and picrotoxinin interactions at the GABA_A receptor are proposed, one-site model and two-site model. In one-site model, fipronil and picrotoxinin compete with each other for the same binding site. For two-site model, fipronil and picrotoxinin have their own binding sites, and they can independently bind to the respective binding site to inhibit GABA-induced current. The dose-dependent suppression of GABA-induced current by fipronil in the presence of picrotoxinin was analyzed by two equations, one for one-site model (eq. 1) and the other for two-site model (eq. 2):

$$\text{RP} + \text{RF} = R_T \left(\frac{[\text{P}]/K_P + [\text{F}]/K_F}{1 + [\text{P}]/K_P + [\text{F}]/K_F} \right) \quad (\text{eq. 1})$$

$$\text{RP} + \text{RF} + \text{RPF} = R_T \left(\frac{[\text{P}]/K_P + [\text{F}]/K_F + [\text{P}][\text{F}]/K_P K_F}{1 + [\text{P}]/K_P + [\text{F}]/K_F + [\text{P}][\text{F}]/K_P K_F} \right) \quad (\text{eq. 2})$$

In order to determine the site of action of fipronil on the GABA_A receptor, competition experiments were performed using picrotoxinin. Picrotoxinin at 1 or 3 μM was applied to the bath solution together with various concentrations of fipronil. Dose-response relationships for fipronil suppression of GABA-induced currents with picrotoxinin are fitted by the above two equations 1 and 2. The dotted line depicts the fit of data with a logistic eq. 1 (one-site model), and the solid line depicts the fit of data with a logistic eq. 2 (two-site model). It is clear that two-site model gives better fitting to the data than one-site model. It is concluded that fipronil and picrotoxinin do not share a common binding site. Previous report suggests that fipronil and picrotoxinin share the same binding site on GABA receptor. This discrep-

ancy remains to be solved.

In order to determine the site of action of anisatin, competition experiments were performed using picrotoxinin. When low concentrations of picrotoxinin (0.03–0.3 μM) were co-applied with 1 μM anisatin, GABA-induced currents were suppressed to about 50% of the level achieved in the presence of picrotoxinin alone. However, when picrotoxinin concentration was high (3–10 μM), the suppressive effect was similar to that achieved by the co-application of picrotoxinin and 1 μM anisatin. Thus, it is concluded that anisatin and picrotoxinin share a common binding site on the GABA receptor-channel complex.

CARTAP AND NITENPYRAM MODULATION OF THE NICOTINIC ACETYLCHOLINE RECEPTOR-CHANNEL OF CLONAL RAT PC12 CELLS

Cartap and nitenpyram are known to act on the nAChR. Effects of cartap and nitenpyram on the neuronal nAChR of clonal rat phaeochromocytoma (PC 12) cells were studied using the single-channel patch clamp method. When cartap was co-applied with ACh, single-channel openings were shortened and occurred in bursts

separated by brief closures or gaps. The current amplitudes in the presence of cartap were virtually identical to those of currents induced by ACh only. The mean open time and burst duration were significantly decreased in the presence of cartap in a dose-dependent manner. These changes of single-channel kinetics result in a significant decrease in total charge carried through the open nAChR channels explaining the suppressive effect of cartap on nAChRs.

Nitenpyram itself induced single-channel currents mediated by the nAChR. Co-application of ACh and nitenpyram opened the channels exhibiting two conductance states. The proportion of main conductance levels was decreased and that of subconductance levels was increased in the presence of nitenpyram. The open time and closed time distributions, but not for the burst duration, for the main conductance state currents with co-application of ACh and nitenpyram were similar to those of ACh-induced current. These changes of single-channel kinetics result in a decrease in probability of openings of main conductance state currents explaining the effects of nitenpyram on the neuronal nAChR.