ネオニコチノイドの選択毒性の分子基盤[#]松 田 一 彦^{*}

近畿大学農学部農芸化学科

(平成 14 年 8 月 7 日受理)

Molecular Basis of Selective Toxicity of Neonicotinoids

Kazuhiko MATSUDA

*Department of Agricultural Chemistry, Faculty of Agriculture, Kinki University, 3327-204 Nakamachi, Nara 631-8505, Japan***Key words:** neonicotinoid, imidacloprid, nicotinic acetylcholine receptor, selective toxicity, two-electrode voltage-clamp, *Xenopus laevis* oocyte.

1. は じ め に

ネオニコチノイドと総称されるイミダクロプリドおよび関連殺虫剤 (図 1) は、殺虫活性、選択毒性および植物中での浸透移行性に優れ、既存の殺虫剤に対して抵抗性を示す昆虫に対しても卓効を示すことから、今や世界中で多用されている。かつて本殺虫剤群は、芳香環部分の構造に基づいてクロロニコチニル系殺虫剤とも呼ばれていたが、現在ではその定義に当てはまらない化合物が数多く見られる (図 1)。ネオニコチノイドは、昆虫のニコチン性アセチルコリン受容体 (nAChR) に対して選択的にアゴニストとして作用することにより、殺虫活性を発揮する。このことに興味を抱いた筆者は、ネオニコチノイドの選択性をもたらし分子機構についてこれまで研究してきた¹⁾。その結果、昆虫の nAChR に対するネオニコチノイドの選択性は、化合物の物理化学的性質と受容体の構造をつき合わせることににより、論理的に説明することができることがわかった。

2. ネオニコチノイドの構造と選択毒性

これまでに実用化されたネオニコチノイドは、活性発現および選択毒性に重要な役割を果たす部分構造として、ニトロイミン、ニトロメチレンあるいはシアノイミン構造のいずれかを持つ。これらの電子求引性官能基に隣接する 3 級窒素原子 (図 1) は電子不足の状態となり、nAChR と相

互作用するときにアセチルコリンの 4 級窒素原子に対応する役割を果たすと言われている²⁾。ところが、真空中でイミダクロプリドのイミダゾリジン部の電荷を半経験的分子軌道法により計算すると、イミダクロプリドの 3 級窒素原子の電荷が極めて小さく見積もられるため、受容体との相互作用における 3 級窒素原子の役割を疑問視する意見もある³⁾。筆者らは、ニトロ基やシアノ基の水素結合と分子全体の溶媒和を考慮し、半経験的分子軌道法である AMSOL プログラムを用いてイミダクロプリドのイミダゾリジン部の電荷を計算した。その結果、ニトロ基をアンモニウムと水素結合させて計算することにより、イミダクロプリドのイミダゾリジン部の窒素原子が正電荷を持つことを見出した¹⁾。しかもその正電荷は、イミダゾリジン環全体に広く分布し、1 位の窒素原子よりも 3 位の窒素原子にやや偏っていた。これらの結果から、ネオニコチノイドが昆虫の nAChR と相互作用するとき、ニトロ基やシアノ基が静電的な力により受容体の塩基性アミノ酸残基に接近し、ついでそれらと水素結合することによりイミダゾリジン部は 2 つの窒素原子を中心にして正電荷を帯び、受容体に強固に結合するのではないかと推定された。

3. ニコチン性アセチルコリン受容体の構造と
ネオニコチノイド感受性

—ヘテロ型受容体を用いた解析—

nAChR は、2 つの α サブユニットと 3 つの non- α サブユニットから成る糖蛋白質であり、中央にカチオンを選択的に通すイオンチャネルを持つ (図 2)^{1,4-7)}。しかし、例外

[#]第 27 回大会シンポジウムの講演者による解説。^{*}〒631-8505 奈良市中町 3327-204

E-mail: kmatsuda@nara.kindai.ac.jp

図1 ネオニコチノイドおよび関連化合物

図2 ニコチン性アセチルコリン受容体の構造の模式図

A. 受容体を横から見た図; B. 受容体を上から見た図. ニコチン性アセチルコリン受容体 (nAChR) の多くは, 2つの α -サブユニットと3つの non- α -サブユニットから成るヘテロ 5 量体構造 (Heteromer) を持つが, 受容体の中には α サブユニットだけから成る (Homomer) ももある (A, B). アゴニストおよびアンタゴニストとの相互作用に関与する“リガンド結合部位”は, loop A~loop F と呼ばれ, α -サブユニットと non- α -サブユニットの境界領域に局在する (B). アゴニストの結合に重要な役割を果たしていると言われているアミノ酸残基を, アルファベット一文字で表記した. 本図は, Elsevier Science の許可を得て, 文献 1 (版権の発生: 2001 年) の図 3 を改変して作成した.

的に $\alpha 7 \sim \alpha 9$ サブユニットは, 単独でホモ 5 量体型 nAChR をつくる⁸⁻¹⁰⁾. アセチルコリンが α サブユニットと non- α サブユニットの境界に結合すると, イオンチャネルが開く. アセチルコリンとの相互作用に関与する領域は, α サブユニットおよび non- α サブユニットの N 末端から第一膜貫通部位までの間に局在し, loop A~loop F と呼ばれている^{1,5,6)}. これらのうち, loop A~loop C は α サブユニット上に, loop D~loop F は non- α サブユニット上に存在する (図 2).

イミダクロプリドは nAChR に対してアゴニストとして作用することから, アセチルコリンと結合部位を共有する. よって, α サブユニットおよび non- α サブユニットは, 程度

の差はあれども, ともに昆虫の nAChR に対するイミダクロプリドの選択性に寄与すると推測された. 筆者は, ショウジョウバエ nAChR の α サブユニットがヒヨコの $\beta 2$ (non- α) サブユニットとハイブリッド受容体をつくることを利用して¹¹⁾, ハイブリッド受容体と $\alpha 4 \beta 2$ 受容体のイミダクロプリド感受性を電気生理学的手法により比較した. その結果, ハイブリッド受容体の方が $\alpha 4 \beta 2$ 受容体よりもはるかに高いイミダクロプリド感受性を示すことを見出し, 昆虫の nAChR に対するネオニコチノイドの高い親和性に α サブユニットが深く関与することを明らかにした¹²⁾.

4. ニコチン性アセチルコリン受容体の構造と ネオニコチノイド感受性 —ホモ5量体型受容体を用いた解析—

$\alpha 7$ サブユニットは単独で nAChR をつくることから⁸⁾, α サブユニットでありながら loop D~loop F を有する. この中で, loop F はアセチルコリンの 4 級窒素原子と静電的に相互作用すると言われており, ネガティブサブサイトとも呼ばれている⁴⁾. イミダクロプリドのイミダゾリジン部の窒素原子は, ニトロ基が水素結合しない限り中性に近い. 一方, アセチルコリンの窒素原子は常に正電荷を有する. さらにアセチルコリンは, 負電荷を有するニトロ基を持たない. このような分子中の電荷分布の差は, nAChR の loop F との相互作用に影響すると予想されたため, loop F に変異を有する $\alpha 7$ nAChR を数種つくり, ネオニコチノイドおよびアセチルコリンをはじめとする天然アゴニストに対する変異体の応答を, 野生型受容体の応答と比較した¹³⁾. $\alpha 7$ nAChR の loop F に G189D (Gly $\rightarrow$ Asp) あるいは G189E (Gly $\rightarrow$ Glu) 変異を導入すると, 受容体のネオニコチノイド感受性は顕著に低下するのに対して, G189N (Gly $\rightarrow$ Asn) あるいは G189Q (Gly $\rightarrow$ Gln) 変異を導入しても受容体の殺虫剤感受性はほとんど変化しなかった (図 3). 一方これらの 4 種の変異は, アセチルコリンのみならずイミダクロプリドの脱ニトロ体に対する受容体の応答にもほとんど影響をおよぼさなかったことから, G189D および G189E 変異による $\alpha 7$ nAChR のネオニコチノイド感受性の低下は, 負電荷を持つアスパラギン酸残基あるいはグルタミン酸残基とネオニコチノイドの負電荷を持つニトロ基との静電的な反発によるものと推定された. すなわち, ネオニコチノイドが nAChR に結合するとき, nAChR の loop F がネオニコチノイドのニトロ基の近傍に位置することが示唆された¹³⁾. しかし, この知見だけでは昆虫の nAChR に対するネオニコチノイドの選択性を説明するこ

図3 野生型および loop F に変異を有する $\alpha 7$ ニコチン性アセチルコリン受容体のアセチルコリン (ACh) およびイミダクロプリド (IMI) に対する最大応答の比較. 本図は, Elsevier Science (文献 1 の図 3, 著作権の発生: 2001 年) および Nature Publishing Group (文献 13 の図 2 および図 3, 著作権の発生: 2000 年) の許可を得て作成した.

とができなかった.

5. アセチルコリン結合蛋白質の 3 次元構造と ネオニコチノイド結合部位

上記の問題を解決する方法について考えていたとき, 軟体動物の一種である *Lymnaea stagnalis* からアセチルコリン結合蛋白質 (AChBP) が発見され¹⁴⁾, その結晶構造も合わせて解明された¹⁵⁾. AChBP は, グリア細胞からコリン作動性シナプスに放出され, アセチルコリンと結合することによりシナプスにおけるアセチルコリン濃度の上昇を抑制する. AChBP は膜貫通構造を持たない水溶性蛋白質であるが, $\alpha 7$ nAChR の N 末端から第一膜貫通部位までのアミノ酸配列, すなわちアゴニスト結合部位である loop A~loop F を全て保有し, $\alpha 7$ nAChR と同様にホモ 5 量体を形成する¹⁴⁾. 筆者は, $\alpha 7$ nAChR を実験材料として用いていたことに幸運を感じながら AChBP の結晶構造を参照したところ, $\alpha 7$ nAChR の G189 に対応する AChBP のアミノ酸残基 Y164 が, アゴニスト結合部位に面していることを見出した. これまで, loop F では 2 種の酸性アミノ酸残基がアゴニストとの静電的相互作用に関与すると言われていたが⁴⁾, それらはカルシウムイオンとの結合に関与するとの説もあり (AChBP の結晶構造ではカルシウムイオンと配位結合していた)⁵⁾, アゴニストの結合に直接関与するアミノ酸残基は未確定であった. そのアミノ酸残基の位置を, 筆者らは AChBP の結晶構造の解明以前に確定していたのである.

これまで進めてきた研究が的外れではないことに意を強くして, AChBP の結晶構造をさらに詳しく調べた. $\alpha 7$ nAChR の G189 がイミダクロプリドのニトロ基の近傍に位置することが正しいとすると, AChBP の Y164 近傍に存在するアミノ酸残基に対応する $\alpha 7$ nAChR 上のアミノ酸残基も, イミダクロプリドのニトロ基との相互作用に関与するかもしれない. そこまで考えたとき, AChBP の結晶構造において Y164 の近傍に存在するアミノ酸残基 Gln55 に目が止まった. このアミノ酸残基に対応する $\alpha 7$ nAChR のアミノ酸残基もグルタミン残基 (Gln79) であり, loop D に位置する. これを酸性アミノ酸あるいは塩基性アミノ酸残基に置換すると, $\alpha 7$ nAChR のネオニコチノイド感受性は激変すると予想された. 果たして, この予想は正しいか¹⁶⁾.

$\alpha 7$ nAChR の Gln79 をグルタミン酸残基に置換すると (Q79E 変異), 受容体のネオニコチノイド感受性は顕著に抑制された. これは, グルタミン酸残基のカルボキシレートとネオニコチノイドのニトロ基が静電的に反発したためと考えると説明することができる. 一方, グルタミン残基をリジン残基 (Q79K) あるいはアルギニン残基 (Q79R) に置換すると, 受容体のネオニコチノイド感受性は有意に

増大した。これは、正電荷を持つ塩基性残基とネオニコチノイドのニトロ基が静電的に引きあったためと考えると矛盾が無い。さらに Q79K および Q79R による $\alpha 7$ nAChR のネオニコチノイド感受性の増大には、塩基性残基とネオニコチノイドのニトロ基間における水素結合の形成も関与している可能性があると考えられた¹⁶⁾。いずれにせよ、 $\alpha 7$ nAChR のネオニコチノイドの感受性が N 末端に近い loop D に存在する Gln79 の塩基性アミノ酸残基の変化により顕著に増大することは、実験事実として間違いない。このことをふまえて、これまでに昆虫から見出された nAChR の non- α サブユニットについて、 $\alpha 7$ nAChR の Gln79 に対応するアミノ酸残基を調べたところ、大部分のサブユニットが塩基性アミノ酸残基を持つことを見出した。これらのアミノ酸残基は、昆虫の nAChR に対するネオニコチノイドの強い作用に関与するアミノ酸残基のひとつであり、他のアミノ酸残基に変異すると、受容体のネオニコチノイド感受性が顕著に低下すると予測された¹⁶⁾。

6. お わ り に

以上述べてきたように、筆者らは、昆虫の nAChR に対するネオニコチノイドの選択的アゴニスト作用に対して受容体の α および non- α サブユニットがいずれも深く関与することを、他に先駆けて明らかにしてきた。とくに、non- α サブユニットの役割については、それがネオニコチノイドの最も特徴的な構造であるニトロ基との相互作用の場である可能性が高いことをはじめて解明したことは、大きな意義があると思われる。

最近 AChBP の結晶構造をベースにして、nAChR のアゴニスト結合部位のモデルが提出された¹⁷⁻¹⁹⁾。これらのモデルで、筆者らの研究成果が説明できるのかどうか検討する必要がある。ネオニコチノイド系殺虫剤の選択毒性の機構に関する研究とはいえ、深く掘り下げていくと普遍性のある問題にたどり着くかもしれない。

引 用 文 献

- 1) K. Matsuda, S. D. Buckingham, D. Kleier, J. J. Rauh, M. Grauso and D. B. Sattelle: *Trends Pharmacol. Sci.* **22**, 573-580 (2001).
- 2) I. Yamamoto, G. Yabuta, M. Tomizawa, T. Saito, T. Miyamoto and S. Kagabu: *J. Pesticide Sci.* **20**, 33-40 (1995).
- 3) M. Tomizawa, D. L. Lee and J. E. Casida: *J. Agric. Food Chem.* **48**, 6016-6024 (2000).
- 4) A. Karlin and M. H. Akabas: *Neuron* **15**, 1231-1244 (1995).
- 5) J. P. Corringer, N. Le Novère and J. P. Changeux: *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **40**, 431-458 (2000).
- 6) V. Itier and D. Bertrand: *FEBS Lett.* **504**, 118-125 (2001).
- 7) A. Karlin: *Nature Rev. Neurosci.* **3**, 102-114 (2002).
- 8) S. Couturier, D. Bertrand, J.-M. Matter, M.-C. Hernandez, S. Bertrand, N. Millar, S. Valera, T. Barkas and M. Ballivet: *Neuron* **5**, 847-856 (1990).
- 9) V. Gerzanich, R. Anand and J. Lindstrom: *Mol. Pharmacol.* **45**, 212-220 (1994).
- 10) A. B. Elgoyhen, D. S. Johnson, J. Boulter, D. E. Vetter and S. Heinemann: *Cell* **79**, 705-715 (1994).
- 11) D. Bertrand, M. Ballivet, M. Gomez, S. Bertrand, B. Phannavong and E. D. Gundelfinger: *Eur. J. Neurosci.* **6**, 869-875 (1994).
- 12) K. Matsuda, S. D. Buckingham, J. C. Freeman, M. D. Squire, H. A. Baylis and D. B. Sattelle: *Br. J. Pharmacol.* **128**, 518-524 (1998).
- 13) K. Matsuda, M. Shimomura, Y. Kondo, M. Ihara, K. Hashigami, N. Yoshida, V. Raymond, N. P. Mongan, J. C. Freeman, K. Komai and D. B. Sattelle: *Br. J. Pharmacol.* **130**, 981-986 (2000).
- 14) A. B. Smit, N. I. Syed, D. Schaap, J. van Minnen, J. Klumperman, K. S. Kits, H. Lodder, R. C. van der Schors, R. van Elk, B. Sorgedragier, K. Brejc, T. K. Sixma and W. P. M. Geraerts: *Nature* **411**, 261-268 (2001).
- 15) K. Brejc, W. J. van Dijk, R. V. Klaassen, M. Schuurmans, J. van der Oost, A. B. Smit and T. K. Sixma: *Nature* **411**, 269-276 (2001).
- 16) M. Shimomura, H. Okuda, K. Matsuda, K. Komai, M. Akamatsu and D. B. Sattelle: *Br. J. Pharmacol.* **137**, 162-169 (2002).
- 17) N. Le Novère, T. Grutter and J. P. Changeux: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **99**, 3210-3215 (2002).
- 18) C. Fruchart-Gaillard, B. Gilquin, S. Antil-Delbeke, N. Le Novère, T. Tamiya, P. J. Corringer, J. P. Changeux, A. Menez and D. Servent: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **99**, 3216-3221 (2002).
- 19) M. Schapira, R. Abagyan and M. Totrov: *BMC Struct. Biol.* **2**, 1 (2002).