

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 29 日現在

機関番号：17401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2015

課題番号：24780113

研究課題名(和文) 昆虫の摂食行動を支配する生体アミン受容体の網羅的薬理解析と創農薬への展開

研究課題名(英文) Comprehensive pharmacology of biogenic amine receptors controlling insect feeding behavior for development of new pesticides

研究代表者

太田 広人(Ohta, Hiroto)

熊本大学・自然科学研究科・助教

研究者番号：60450334

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：新規の昆虫摂食行動制御剤の開発に向け、カイコの摂食行動を支配する生体アミン受容体の単離同定と摂食を制御できるリガンドの探索を行った。クローニングの結果、新規ドーパミン受容体BmDopR4を含む、計14種類の受容体遺伝子の単離、うち9種類の機能同定に成功した。リガンド探索の結果、ドーパミン受容体BmDopR2に作用するアンタゴニストがカイコの摂食行動を制御するうえで有効であることが分かった。

研究成果の概要(英文)：For development of new insect feeding behavior-regulators, we performed cloning and identification of silkworm biogenic amine receptors and screening of ligands that can regulate the feeding behavior. As the result of cloning, fourteen genes for the amine receptors were isolated. Among them, nine receptors were characterized functionally. Ligand screening revealed that the dopamine receptor BmDopR2 antagonists effectively regulated silkworm feeding behavior.

研究分野：農薬科学

キーワード：昆虫 摂食行動 生体アミン 受容体 農薬 カイコ GPCR 制御剤

## 1. 研究開始当初の背景

昆虫の摂食行動には、生体アミンと呼ばれる生理活性アミンとその受容体が深く関わっている。生体アミン受容体をターゲットとする新しい昆虫摂食行動制御剤の開発に向け、申請者はこれまでに、摂食行動制御に関わる受容体としてオクトパミン(OA)受容体を2種類(BmOAR1、BmOAR2)、ドーパミン(DA)受容体を3種類(BmDopR1、BmDopR2、BmDopR3)、チラミン(TA)受容体を2種類、合計7種の受容体の単離同定に成功している。それぞれの受容体を培養細胞に発現させることで特異的な化合物もいくつか同定してきた。例えば、フルペンチキソールやクロルプロマジンといったアンタゴニストがBmDopR2に対して特異的に作用することや麦角アルカロイド誘導体の一種プロモクリプチンがBmDopR3に対して高いアゴニスト活性をもつことが分かった。フルペンチキソールとクロルプロマジンをカイコに注射すると摂食行動が抑制され、プロモクリプチンを注射すると逆に亢進されることも分かった。古くから摂食行動を阻害する殺虫剤として知られるデメチルクロルジメホルムはBmOAR1とBmOAR2いずれにもアゴニストとして強く作用することも明らかにしてきた。

以上のとおり、昆虫の摂食行動を制御する生体アミン受容体の性質や種類がある程度明らかになり、各受容体に特異的に作用する化合物と摂食行動に及ぼす影響についても少しずつ分かってきた。しかし近年のカイコのゲノム解読によって、生体アミン受容体は約20種存在することが明らかとなり(Fan *et al.*, 2010)、申請者がこれまでに単離同定してきた生体アミン受容体はまだ一部で、生体アミン受容体による昆虫摂食行動の制御機構はもっと複雑であることが分かってきた。未同定の受容体がまだ数多く存在することで、同定してきた化合物の特異性についても再検討する必要性が出てきた。

## 2. 研究の目的

そこで本研究では、昆虫摂食行動を高度に制御できる標的受容体を特定するために、昆虫生体アミン受容体約20種をクローニングすること、さらには、各受容体特異的なリガンドを同定し、新規摂食行動制御剤の開発へと展開するための基盤を確立することを目的とした。

## 3. 研究の方法

### (1) 生体アミン受容体の単離同定

カイコゲノムデータベースから未同定の生体アミン受容体遺伝子の塩基配列を抽出した。各配列からプライマーを設計し、脳のcDNAライブラリーから目的受容体遺伝子をPCRで単離した。適宜RACE法で末端領域を解読し全長を明らかにした。その全長をTベクターに挿入し保存した後、発現ベクターpcDNA3に再クローニングした。このベクター

を培養細胞HEK-293にトランスフェクションし、受容体発現細胞を作製した。受容体の発現や機能を確認するために、パインディングアッセイ、cAMPアッセイ、エクオリンCa<sup>2+</sup>アッセイ、CRE-SEAPレポーターアッセイを行った。

### (2) 受容体の特異的なリガンドの探索及びリガンド結合部位の同定

クローニングした生体アミン受容体の特異的に作用するリガンドを探索するために、CRE-SEAPレポーターアッセイによるリガンドスクリーニングを実施した。本研究では、BmOAR1とBmDopR2に絞ったスクリーニングを実施した。BmOAR1とBmDopR2は分子系統的に近い関係にあることにも注目し、リガンド結合部位の構造の違いを理解するために、膜貫通領域TM7の変異実験も行った。

### (3) 特異的なリガンドの注射実験

受容体特異的なアゴニストおよびアンタゴニストをカイコ5齢幼虫に注射投与し、その後1時間の摂食量を調べた。

## 4. 研究成果

### (1) 生体アミン受容体の単離同定

これまでに単離同定していたものも合わせて、生体アミン受容体の遺伝子として、合計14種類(OA受容体3種類BmOAR1-3、TA受容体2種類BmTAR1-2、DA受容体5種類BmDopR1-4及びBmEcDopR、セロトニン(5-HT)受容体2種類Bm5HTR2-3、オーファンアミン受容体2種類)を単離できた。注目すべきは、2種類のcAMP抑制型(D2-like)DA受容体BmDopR3及び4がクローニングできた点である。このタイプの受容体は昆虫では1種類しか報告がなかったため、昆虫生理学上、非常に興味深い発見である。

機能同定実験の結果、BmOAR1はcAMP亢進とCa<sup>2+</sup>増加、BmOAR2はcAMP亢進、BmOAR3は偽遺伝子、BmTAR1はcAMP抑制、BmTAR2はCa<sup>2+</sup>増加、BmDopR1はcAMP亢進、BmDopR2はcAMP亢進とCa<sup>2+</sup>増加、BmDopR3はcAMP抑制、BmDopR4はGNA15(Ca増加を引き起こすGタンパク質サブユニット遺伝子の一種)共存下でCa<sup>2+</sup>増加を確認することができた。BmEcDopRはcAMPアッセイで機能同定を試みたが、DAやそれ以外のアミンに反応しなかったため、解析を中断した。Bm5HTR2はcAMP抑制を確認できた。Bm5HTR3及び2種類のオーファン受容体は発現ベクターの構築が難航したため、以降の解析を断念した。

### (2) 受容体の特異的なリガンドの探索及びリガンド結合部位の同定

過去の行動実験の結果から、カイコの摂食行動は、特にOA、DA、5-HTによって制御されていることが分かっていた。そこで、これらアミンの受容体に対するリガンド探索を進めるために、スクリーニング系を検討した。その結果、cAMP亢進型の受容体BmOAR1とBmDopR2のCRE-SEAPレポーターアッセイの構

築に成功した。そこで、この2種類の受容体に絞った特異的リガンドの探索を実施した。BmOAR1とBmDopR2のTM7の変異実験の結果も合わせて、以下にまとめる。

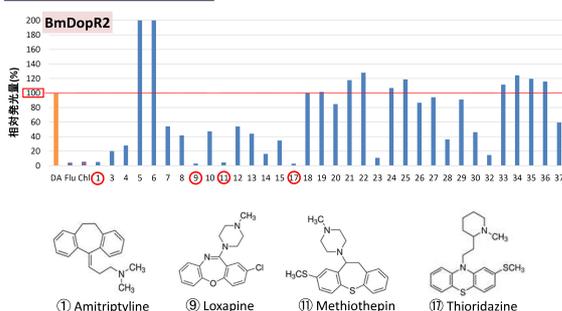
#### OA受容体BmOAR1のリガンド探索

CRE-SEAPアッセイによる網羅的薬理解析を実施した結果、OAよりも強いアゴニストとして、クロニジンやチアゾリン化合物などがヒットした。この情報をもとに、リガンドの構造改変を進めた結果、さらに1オーダーほど高い活性のイミダゾリン化合物を創製することができた。アンタゴニストスクリーニングも実施した結果、いくつかの高活性アンタゴニストを見出すことができた。

#### DA受容体BmDopR2のリガンド探索

CRE-SEAPアッセイによるアンタゴニストスクリーニングを進めた。その結果、既知のアンタゴニストであるフルペンチキソールやクロルプロマジンと同等もしくはそれ以上の活性を有する化合物として、アミトリプチリン、メチオテピン、ロキサピン、チオリダジンがヒットした(図1)。詳細な薬理解析の結果、これら4化合物は、ヒトD1 DA受容体に対しては約1オーダー低い活性であり、BmDopR2に対してある程度選択的に作用する

アンタゴニストスクリーニング



ことも分かった。

図1 カイコDA受容体BmDopR2に対するアンタゴニストスクリーニングの結果と高活性化合物の構造

#### BmOAR1とBmDopR2のリガンド結合部位の同定

BmOAR1のTM7変異実験の結果、OAはPhe431よりもPhe427と強く相互作用していることが予想された。クロニジンは、OAとは逆にPhe431と強く相互作用していると予想された。両アゴニストは、TM7を介して異なる配向性で結合していると考えられた。BmDopR2の相同アミノ酸についても同様の実験を行った。その結果、BmDopR2のAsn393はアゴニストの結合に関与しないが、Thr397はDAのベンゼン環p位の水酸基と相互作用することが示唆された。以上の結果から、両受容体ともに、TM7のアミノ酸残基がアゴニスト結合部位として働いていることが示された。

#### 特異的リガンドの注射実験

今回、BmDopR2の薬理解析が大きく進展したので、同受容体のCRE-SEAPアッセイでヒットした4つのアンタゴニストの注射実験を行った。その結果、メチオテピンに強い摂食抑制作用があることが分かった。また、新規受容体BmDopR4のクローニングを受けて、D2-like DA受容体アゴニストの一種ベルゴリドの注射実験も行った。その結果、メチオテピンとは逆に、摂食が亢進された。その他、OA受容体及び5-HT受容体のアンタゴニストのミアンセリンなどに摂食抑制作用があること、TA受容体関連化合物は摂食に影響しないことなども分かった。

以上の研究成果から、昆虫摂食行動にはOA、DA、5-HTの受容体が関与し、新規摂食行動制御剤のターゲットとして期待できることが分かった。中でもBmDopR2に作用するアンタゴニストは、カイコの摂食行動を大きく低下させることから、本受容体を標的とする新規制御剤の開発が進むことが期待される。

#### <引用文献>

Fan Y. *et al.* (2014) The G protein-coupled receptors in the silkworm, *Bombyx mori*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* **40**, 581-591.

#### 5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計3件)

太田 広人 (2015) 日本学術会議公開シンポジウム「昆虫における刺激の受容とその反応」 *日本農薬学会誌*, **40**, 97-100.

DOI: <http://doi.org/10.1584/jpestics.W14-23>

Ohta, H., Ozoe, Y. (2014) Molecular signalling, pharmacology, and physiology of octopamine and tyramine receptors as potential insect pest control target. *Adv. Insect Physiol.* **46**, 73-166.

DOI: 10.1016/B978-0-12-417010-0.00002-1

Ohta, H., Oshiumi, H., Hayashi, N., Imai, T., Ozoe, Y., Morimura, S., Kida, K. (2012) A secreted placental alkaline phosphatase-based reporter assay system for screening of compounds acting at an octopamine receptor stably expressed in a mammalian cell line. *Biosci. Biotech. Biochem.* **76**, 209-211.

DOI: 10.1271/bbb.110690

[学会発表](計25件)

Ohta, H. The roles of biogenic amine G protein-coupled receptors in insect feeding behavior. The 2016

International Congress of Entomology  
Symposium: Molecular Pharmacology and  
Physiology of Membrane Transport and  
Signaling Processes, Orland, Florida,  
USA, September 25-30, 2016.

崎田遼, 野田啓太, 山本龍之介, 大島  
賢治, 尾添嘉久, 森村茂, 新留琢郎,  
太田広人 カイコオクトパミン受容体  
BmOAR1 の分子薬理的解析 日本農薬  
学会第41回大会 2016年3月19日 島  
根大学松江キャンパス(島根県松江市)  
白根聡, 菅野暉子, 前原志穂里, 朝岡  
潔, 光増可奈子, 柳沼利信, 森村茂,  
新留琢郎, 太田広人 カイコのドーパ  
ミン受容体薬理解析 - そこから見えて  
きた同昆虫の摂食障害/パーキンソン病  
モデルとしての可能性 - 第3回熊本大  
学医工連携フォーラム - 生命化学・自然  
科学分野の連携 - 2015年12月14日  
熊本大学薬学部(熊本県熊本市)

菅野暉子, 崎田遼, 平野汐奈, 野田啓  
太, 尾添嘉久, 光増可奈子, 柳沼利信,  
朝岡潔, 平島明法, 森村茂, 新留琢郎,  
太田広人 カイコ生体アミン受容体  
BmOAR1 と BmDopR2 の比較分子薬理解析  
第37回生体膜と薬物の相互作用シンポ  
ジウム 2015年11月20日 熊本大学薬  
学部(熊本県熊本市)

崎田遼, 菅野暉子, 尾添嘉久, 朝岡潔,  
田中 良明, 森村茂, 新留琢郎, 太田広  
人 エクオリンカルシウムアッセイを  
利用したカイコオクトパミン受容体  
BmOAR1 の薬理解析 日本農芸化学会  
2015年度中四国・西日本支部合同大会  
2015年9月18日 愛媛大学農学部(愛  
媛県松山市)

太田広人, 菅野暉子, 崎田遼, 平野汐奈,  
野田啓太, 尾添嘉久, 光増可奈子, 柳沼  
利信, 朝岡潔, 平島明法, 森村茂, 新留  
琢郎 カイコ生体アミン受容体 BmOAR1  
と BmDopR2 の機能及び薬理的性質の比  
較 日本農芸化学会 2015年度中四国・  
西日本支部合同大会 2015年9月18日  
愛媛大学農学部(愛媛県松山市)

太田広人, 菅野暉子, 光増可奈子, 柳沼  
利信, 朝岡潔, 林直孝, 今井哲弥, 森村  
茂, 新留琢郎 摂食行動調節に関わるカ  
イコドーパミン受容体 BmDopR2 のアンタ  
ゴニストスクリーニングと *in vivo* 活性  
評価 日本農薬学会第40回大会 2015  
年3月19日 玉川大学農学部(東京都  
町田市)

〔産業財産権〕

出願状況(計1件)

名称: ドーパミン受容体作用物質のスクリー  
ニング方法

発明者: 林直孝, 太田広人, 菅野暉子

権利者: 同上

種類: 特許

番号: 特願 2014-184801 号

出願年月日: 平成 26 年 9 月 11 日

国内外の別: 国内

〔その他〕

ホームページ

熊本大学工学部物質生命化学科

<http://www.chem.kumamoto-u.ac.jp/>

熊本大学工学部物質生命化学科新留研究室

<http://niidome.la.coocan.jp/lab/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

太田 広人(OHTA, Hiroto)

熊本大学・大学院自然科学研究科・助教

研究者番号: 60450334