

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 9 月 30 日現在

機関番号：14501

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25660044

研究課題名(和文)新規殺ダニ剤の特異的ターゲットからの逆毒物学的探索法

研究課題名(英文)Reverse toxicological search for new miticides from species specific target sites.

研究代表者

竹田 真木生(Takeda, Makio)

神戸大学・(連合)農学研究科(研究院)・教授

研究者番号：20171647

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：ナミハダニのGABA受容体のクローニングの結果、昆虫類で保存された第二膜貫通領域の置換が明らかになった。本種に対する非拮抗型GABAアンタゴニストの毒性は昆虫やマダニのそれと大きく異なる。そこで、この受容体のセグメントを昆虫型のもので置換した時、構造的な特異性が非拮抗型GABAアンタゴニストの感受性とどう関連するかをキメラコンストラクトにて解析した。その結果、ダニ類の構造感受性相関は昆虫やマダニのものとは異なり、複数の作用点、特にCys-loop領域の重要性を明らかにした。一方、当初は単一の作用点を想定していたため、化合物のスクリーニングが困難となり、有力な候補は得られなかった。

研究成果の概要(英文)：Cloning of GABA receptor from the two spotted spider mite (TSSM), Tetranychus urticae revealed a substitution of a critical amino acid at the second transmembrane domain of a GABA receptor, RDL that is conserved in insects. TSSM GABA receptor has a unique spectrum in action of mitocides and non-competitive GABA agonists from ticks and insects. We made a chimera construct to narrow down the critical structure to establish effective screening for specific miticides, employing two electrode voltage clamp method. The result however indicated that not only the second trans-membrane domain but multiple other sites are sensitive to these compounds, especially Cys-loop region, which complicated the strategy of effective screen system for specific miticidal compounds contrary to our original expectation.

研究分野：昆虫生理生化学・分子生物学

キーワード：GABA受容体 リン抵抗性 殺ダニ剤 フィプロニル 神経伝達物質 塩化物イオンチャンネル ナミハダニ RDL受容体 ディルド

1. 研究開始当初の背景

我々は、ナミハダニ特異的な颯田に活性を示す、bifenazate の mode of action を解析するうち、この殺ダニ剤の作用点の一つで特異性を決めるのに GABA 受容体の第二膜貫通領域が重要であるという結論に行きついた。それでダニ類にはこの部分の構造に変異があることを逆手に、この部分の反応を特異的に制御する薬剤は昆虫には抵抗性となるため特異的な殺ダニ剤となりうるという確信にいたった。この部分は4回膜貫通領域を持つ Chloride ion channel の一部をなし、このイオンの挙動を追うことで新しい殺ダニ剤のスクリーニングが可能ではないかと考えた。そこで大塚化学のバックアップによって新しい殺ダニ剤のスクリーニングを企てた。化学的防除は容易性、即効性において優れている。しかしながら過剰な化学的防除への依存は、環境の破壊、健康被害、生物多様性の喪失という大きな弊害を生んだ。また、殺虫剤の使用は天敵相の破壊を起し、害虫のリサージェンスを起すことも判った。化学的な防除を行う時には、害虫を特異的に攻撃する薬剤が求められる。近年、医薬品の開発にはヒトゲノム情報を利用し、薬剤の標的となる薬剤受容体をツールとして用いた創薬、ゲノム創薬の概念が注目されているが、この概念は種特異的な殺虫剤の開発にも重要で、種特異的なターゲットを獲得すれば、そこからこれだけを攻撃する薬剤の開発を進める道がある。これが着想点である。

2. 研究の目的

GABAR は DL、FIP などの殺虫剤の標的であり、受容体を構成するサブユニットとしては DL 抵抗性系統から単離された RDL (resistant to dieldrin) が知られている。キイロショウジョウバエ RDL (DmRDL) の第二膜貫通領域 (M2) の 301 番目の残基は野生型においてはアラニンであるが抵抗性系統ではセリンないしはグリシンを保有していることが分かっており(図 1)、この構造が DL、FIP、ピクロトキシニンなどの非競合的阻害剤 (NCA) に対する抵抗性の理由となっている。昆虫の RDL の M2 付近の構造及び抵抗性系統における上述残基のセリンないしはグリシンへの置換現象は種間で高度に保存されており、NCA(非競合的拮抗剤)型の農薬に対する感受性はこの部分で決定している考え方が支配的である (French-Constant et al., 2004)。

我々はナミハダニ RDL (TuRDL) の分子クローニングを行った (DDBJ 登録番号; AB567686)。本種は主要な天敵が同じダニ目であり、種特異的な農薬の必要性が高い。一方で昆虫、吸血性ダニ; マダニを含めた節足動物の防除に広く用いられる FIP が例外的に効果を及ぼさないため、特殊な受容体の保持が疑われた。事実、TuRDL は M2 付近の構造に特殊性を有しており、上述残基に例を見ないヒスチジンを保有していた。アフリカツメガエル卵母細胞でこの受容体

を発現し、チャンネルの特性を二電極膜電位固定 (TEVC) 法により確かめた。その結果、TuRDL は NCA が全く作用せず、ナミハダニの FIP に対する特殊な抵抗性はその受容体の特殊性にあることが示された。構造 - 機能相関性検索の結果より、NCA に対する非感受性は上述のヒスチジン残基に加え、同じく M2 領域に存在するイソロイシンが寄与していることが明らかになった。RDL の M2 以外の領域が NCA 型の農薬に対して抵抗性を誘導しているという報告はほとんどないが、オナジショウジョウバエ FIP 耐性系統の RDL が M2 に加え第三膜貫通領域 (M3) に変異があるという報告がある。そこで、M2-M3 に農薬感受性残基を導入したキメラ RDL の解析を行ったが、薬理特異性を及ぼす領域は M2-M3 以外の部位にも存在することが分かった。TuRDL と DmRDL のキメラ RDL を作製して薬剤感受性決定部位の検索を行った結果、M2 から遠く離れた第一細胞外領域に TuRDL の薬剤抵抗性を誘導する領域が存在することが分かった。

3. 研究の方法

(1) TuRDL の M2 領域の NCA に対する薬剤特異性責任部位は特定してされている。TuRDL の第一細胞外領域のうち cys-loop よりも上流領域にもう一つの責任部位が存在することが分かっているが、本領域は約 190 アミノ酸の長さがある。引き続き NCA 感受性の昆虫 RDL とのキメラ及び部位特

異的変異体を作成していき、感受性決定部位を TEVC 法にて特定する。

(2) GABAR の第一細胞外領域はアゴニストや GABA エンハンサーが結合する領域であると判明した。このカテゴリーの薬剤にはイベルメクチンやミルベメクチンなどのアバメクチン誘導体などが存在し、殺虫剤及び殺寄生虫薬として使用されている。また、ナミハダニ特異的に殺ダニ活性を持つ農薬、ピフェナゼートは TuRDL に対してエンハンサーとしての活性が認められた (投稿中)。そこで、(1) で求められた NCA に対する親和性決定領域とアゴニストとの親和性がどのように関連しているかを野生型、変異型及び各種キメラ RDL を用いて解析していくことでアゴニストと受容体の結合機序の解析を記述事項の中の番号はチャート内の番号と一致している。行う。また、ナミハダニ特異的に殺ダニ活性を持つ農薬、ピフェナゼートは TuRDL に対してエンハンサーとしての活性が認められた (投稿準備中)。そこで、(1) で求められた NCA に対する親和性決定領域とアゴニストとの親和性がどのように関連しているかを野生型、変異型及び各種キメラ RDL を用いて解析していくことでアゴニストと受容体の結合機序の解析を行う。

(3) 我々は喘息、結膜炎、鼻炎のアレルゲンとして代表的なコナヒョウヒダニ及びヤケヒョウヒダニの 2 種のチリダニの RDL の部分配列を得た。その結果、この 2 種のチリダニは同一の M2 構造を保持しており、

ショウジョウバエ RDL の 301 番目の残基に相当するアミノ酸はアラニン、セリン、グリシン或いはヒスチジンでもなくグルタミンであった。チリダニ RDL が NCA に対して感受性が非感受性かを検証するために RACE 法にて 5' 末端、3' 末端の配列を明らかにしたのち TEVC 法にてその薬理作用を解析する。

(4) ダニ目の生物の中には我々にとって重要な種が数多く存在する。そのうち吸血性のダニ；マダニの仲間はデータベースの整備や RDL の薬理解析が進んでおり、昆虫 RDL と類似した特性を持っていることが分かっている (Zheng et al., 2003)。ツメダニ (アレルギー性皮膚炎の原因になる)、フシダニ及びホコリダニ (農作物を食害する)、ヒゼンダニ (疥癬の原因となる)、コナダニ (貯穀・食品害虫) 及びミツバチヘギタダニ (ミツバチの大害虫) 等はマダニ、ハダニ、及びチリダニ以外の重要な駆除対象になる。一方でカブリダニ (ハダニに対する生物農薬及び土着天敵)、ササラダニ (土壌中で植物遺体、腐植の分解者として重要な位置を占める) 等は薬剤による駆除は避ける必要のある生物である。しかしながらこれらの種の RDL の構造及び薬理特性は一切不明である。ダニ目の RDL は分類群間あるいは生息環境間での差異が疑われているためにダニ目の RDL の総合的な解析は必要かつ有用であると考えられる。

これらすべての生物に対して RNA を精製して cDNA を作製し、分子クローニング

を行うことはダニのサンプル採集の点から現実的ではない。そこで、ダニの生体或いは新鮮な凍結試料が手に入らないものに関してはダニのエタノール浸漬標本からゲノム DNA を調製して PCR により対象領域を増幅して配列を確認する。具体的には、M2 領域と(1)で明らかになった第一細胞外領域のうち薬剤感受性責任部位の二つの領域に対して遺伝子型の解析を行う。(3)で明らかにしたチリダニ RDL の配列をもとに、ダニ目で保存性の高い配列からプライマーを組み、ゲノミック PCR を行い、配列を特定する。我々はナミハダニ RDL のオープン・リーディング・フレームに相当するゲノム DNA の配列解析は終了しているために、プライマーを設計する際に対象領域にイントロンを含まないように設計することが可能である。遺伝子型の解析により非吸血性のダニの NCA に対する薬理応答の多様性と、分類上或いは生息環境間での相関関連を推定する。薬理機能に重要な領域に特殊性がみられた際は、cDNA からの RDL の分子クローニング或いは我々が保持している昆虫、或いはダニ RDL とのキメラ RDL を作製して薬理機能を確認する。(5) (1)-(4)で得られた結果を総合して最終的にダニ目の RDL の多様性を基にした総合的な創薬及びスクリーニングに至る。具体的にはさまざまな化合物を *Tu*RDL、チリダニ RDL、昆虫 RDL、各種変異体 RDL 及びキメラ RDL に対して実際に NCA としての作用があるかを検証していくことで駆

除標的特異的に作用する NCA 型の農薬のリード化合物を TEVC 法でスクリーニングを行う事で検出する。(2)で行った TuRDL に GABA アゴニスト及びエンハンサーに対する薬理特異性が認められた場合もこれらの薬剤を修飾することで種特異的な農薬を作製し、実際に受容体に対する薬理作用を検証し、スクリーニングシステムの構築を行う。

4. 研究成果

ナミハダニの GABA 受容体のクローニングを行った結果、昆虫類で保存された第二膜貫通領域の置換が明らかになった。ダニ類の有機塩素系殺虫剤に対する感受性は昆虫のそれとかなり異なるため、ナミハダニの受容体のセグメントを昆虫型のものと置換した時、構造的な特異性が有機塩素系殺虫剤やフィプロニルの感受性とどう相関するかをキメラコンストラクトを用いて解析した。その結果、ダニ類の構造-感受性相関は昆虫のものとは異なり、複数の作用点、特に Cys-loop 領域の重要性を明らかにした。当初、単一の作用点を想定していたため、化合物のスクリーニングがむつかしくなり、こちらの方面では良い成果が得られなかった。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

Hiragaki S., Kobayashi, T., Suzuki, T., Ochiai N., Tufail, M.Canlas., L.J., Hayashi,

N., Dekeyser, M., Matsuda, K., Takeda, M. Aunique gamma-amino butyric acid (GABA) (resistant to dieldrin; RDL) from the two spotted-spider mite, *Tetranychus urticae* that confers functional specificity. (Submitted to Insect Biochemistry and Molecular Biology)

〔雑誌論文〕(計 件)

〔学会発表〕(計 件)

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

取得状況(計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

取得年月日：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者 竹田 真木生

(TAKEDA, Makio)

神戸大学大学院農学研究科・教授

研究者番号：20171647

(2)研究分担者

()

研究者番号：

(3)連携研究者

()

研究者番号：