

平成 29 年 6 月 13 日現在

機関番号：15201

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26292031

研究課題名(和文)創薬ターゲットとしてのリガンド作動性陰イオンチャンネルに関する研究

研究課題名(英文)Studies on ligand-gated anion channels as targets for novel agrochemicals

研究代表者

尾添 嘉久(Ozoe, Yoshihisa)

島根大学・生物資源科学部・教授

研究者番号：80112118

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 11,300,000円

研究成果の概要(和文)：地球規模での安定した食料生産は重要な課題である。農薬は、農作物を病害虫から保護するための必須な農業資材であり、食料生産に大きな貢献している。本研究では、昆虫や線虫の体内に存在するリガンド作動性陰イオンチャンネルの機能と性質を調べ、安全な有害生物防除剤の作用点としてのこのチャンネルの可能性を検証する研究を行った。その結果、新規作用機構解明、薬剤創製に導く新規化合物の発見、新規標的イオンチャンネルの同定・解析などを行うことができた。

研究成果の概要(英文)：Stable production of food is an important subject on a global scale. Agrochemicals are agricultural materials essential for crop protection and make a substantial contribution to crop production. In this study, the function and characteristics of ligand-gated anion channels of insects and nematodes were examined to provide insights into their potentiality as the site of action of pest control chemicals. This study led to the identification of novel action mechanisms and the discovery of novel lead compounds and ion channels.

研究分野：生物制御化学

キーワード：イオンチャンネル 創薬ターゲット

1. 研究開始当初の背景

地球規模での急激な人口増加や気候変動による病害虫の大発生などが予測されるなか、農作物を保護し、安定した食料生産に資する農業薬剤の役割はますます大きくなる。昆虫や線虫のリガンド作動性陰イオンチャネル (LGAC) は生物制御剤の極めて重要なターゲットであり、そのなかには薬剤の選択性に関わる無脊椎動物に特有なチャネルも含まれている [1]。しかし、薬物作用点としての昆虫 LGAC の理解は不十分であり、線虫の LGAC については薬理学的な研究自体が皆無に等しい。

2. 研究の目的

本研究では、以下の研究に焦点を当て、次世代の植物保護手段の創出への道を切り拓く。(1) 昆虫からクローニングした LGAC 遺伝子とその変異型をアフリカツメガエル卵母細胞等に発現させて、種々リガンドに対する応答を調べ、作用点の解析を行う。(2) 農作物に甚大な被害をもたらすネコブセンチュウに発現する LGAC 遺伝子の解析を行い、遺伝子発現を抑制したときに見られる表現型に基づいて有望 LGAC を選抜した後、創薬ターゲットとしての可能性を検証する。

3. 研究の方法

(1) チャネル遺伝子のクローニング

土壌自活線虫 *C. elegans* あるいはショウジョウバエ *Drosophila* のチャネル遺伝子を参考にプライマーを設計した。カイコ (*Bombyx mori*)、イエバエ (*Musca domestica*) あるいはサツマイモネコブセンチュウ (*Meloidogyne incognita*) から RNA を調製し、RT-PCR に供して部分配列を得た。ついで、新規チャネルの全長 cDNA を常法により獲得した。

(2) チャネルの機能解析

これまでにあるいは本研究でクローニングした LGAC cDNA から cRNA を調製し、アフリカツメガエル卵母細胞にインジェクションしてチャネルを発現させた。アゴニストあるいはアクティベーターを作用させたときに発現チャネルを通過するクロルイオン電流を 2 電極膜電位固定法により記録し、薬剤による阻害を試験した。また、チャネル遺伝子発現細胞への [³H]イベルメクチンの結合実験も行った。さらに、カイコのキノコ体から単離したニューロンにパッチクランプ法を適用して解析した。

(3) ネコブセンチュウチャネル遺伝子の発現

抑制

C. elegans のモノアミン作動性クロルイオンチャネル LGC-40、-53、および-55 のアミノ酸配列を用いて、寄生性線虫データベース (WormBase ParaSite) に登録されているサツマイモネコブセンチュウのゲノム配列 (予想エキソン/イントロン) を BLAST 検索により精査した。得られた塩基配列に基づいてプライマーを設計して RT-PCR を行い、open reading frame (ORF) をカバーする cDNA を得た。その cDNA *lgc-40*、*-53*、および *-55* を鋳型として 2 本鎖 RNA (dsRNA) を合成し、浸漬 RNA 干渉 (RNAi) を実施した。

4. 研究成果

(1) GABACI 競合的アンタゴニストの創製

昆虫の γ -アミノ酪酸 (GABA) 作動性クロルイオンチャネル (GABACI) の細胞外ドメインに存在するアゴニスト結合部位は新規制御剤作用点として有望である。この部位に作用して阻害作用を示す 2 つのタイプの競合的アンタゴニスト候補化合物を合成し、3 種昆虫からクローニングした GABACI に対する活性を評価した。その結果、高活性類縁体創製のリードとなる化合物を得た。この結果については 4 報の論文に詳述した (雑誌論文 6、7、12、13 ほか学会発表多数)。

(2) 新規 GABACI 非競合的アンタゴニストの作用解析

昆虫 GABACI のチャネル内部に結合する非競合的アンタゴニストとして第一世代の塩素系殺虫剤 (BHC など) や第二世代のフェニルピラゾール系殺虫剤 (フィプロニルなど) が知られている。これまでに、イソキサゾリンやベンズアミド系制御剤が、これらのアンタゴニストとは違う GABACI 内の部位に作用することを報告した [2, 3]。本研究ではさらに、イソキサゾリン外部寄生虫薬・フルラネルがグルタミン酸作動性クロルイオンチャネル (GluCl) に対して低活性である原因アミノ酸残基の同定を行い、LGAC 作用点に関する新たな知見を得た (学会発表 2 など)。

(3) 塩素系殺虫剤の GABACI に対する作用

数多くの BHC 類縁体の構造と GABACI に対する作用との関係について検討し、 γ -BHC だけが特別に高活性なアンタゴニストであることを明らかにした。また、GABACI Rdl サブユニットの第 2 膜貫通領域の変異による親和性の低下の影響が塩素系殺虫剤アルドリン/ディルドリンとそれらの立体異性体であるエンドリン/イソドリンでは違いがあることを明らかにし、第一世代のアンタゴニスト結合機構に関する重要な知見を得た (学会発表

1 など)

(4) 糸状菌が産生する新規 LGAC リガンドの 同定と解析

糸状菌が産生する殺虫性化合物 2 種の作用機構を調べた。

Penicillium simplicissimum AK-40 株が産生する殺虫性物質オカラミンは、昆虫の GluCl を選択的に活性化し、中毒症状をもたらす。Pre-mRNA の選択的スプライシングによりカイコガで生じる GluCl のバリエーション 3b と 3c 間でオカラミン B の作用を比較した。その結果、これらのバリエーションの間ではオカラミン B の活性化作用の程度に差がないことを明らかにした。

さらに、両バリエーションを HEK-293 細胞に発現させ、その膜画分に対するイベルメクチンの特異的結合に及ぼすオカラミン B の影響について調べた。本化合物は、 $[^3\text{H}]$ イベルメクチンの見かけの解離定数 (K_d) にはほとんど影響を与えず、最大結合量 (B_{max}) を有意に低下させた。この結果は、殺虫・殺線虫活性をもつイベルメクチンの結合部位とは違う結合部位がカイコ GluCl に存在することを示している。これらの知見は雑誌論文 1、10、および 11 にて詳述し、学会発表も多数行った。

Talaromyces sp. Y0-2 株が産生するクロドリマニン A はカイコ GABAC1 のアンタゴニストとして働き、その作用が昆虫 GABAC1 選択的であることを明らかにした。類縁体の中で、クロドリマニン B の阻害活性が最も高く、 IC_{50} 値は 1.66 nM であった。本化合物は、ヒトの GABAC1 に対しては約 1000 低活性であり、ヒトに対しては低毒性であることが推察された。GABA 濃度応答曲線の解析から、本化合物は非競合的阻害剤であることが分かり、さらに第一、第二世代の非競合アンタゴニストとは異なる部位に作用すると推察された。この知見は雑誌論文 9 などで報告した。

(5) イベルメクチンのリガンド作動性クロロイオンチャンネルに対する作用解析

GluCl と GABAC1 に対するイベルメクチンの作用を電気生理学的手法で精査した。イベルメクチンは両チャンネルに対して電流活性化、低濃度アゴニスト誘起電流増強、高濃度アゴニスト誘起電流阻害の 3 作用を示すことを明らかにした。3 作用のいずれにおいても GABAC1 より GluCl の感受性が高く、GluCl が一次作用点と考えられた。第 3 膜貫通領域の保存性アミノ酸残基グリシンの置換は 3 作用に対して減弱あるいは消失をもたらしたことから、いずれの作用もサブユニット境界面への作用によって惹起されると推察された。この結果は雑誌論文 4 や国内外の学会で報告した。

一方、GluCl のサブユニット境界面に存在する作用点を探索するために、光反応性イベ

ルメクチンを合成した(学術雑誌 8)。高機能を有するこのプローブを用いて種々の条件で GluCl の光親和性標識実験を行ったが、標識は成功しなかった。しかし、新たなプローブ設計に関する考察を行うことができた。

(6) pH 感受性クロロイオンチャンネルの機能解析

解析が遅れている昆虫チャンネルの中に pH 感受性クロロイオンチャンネルがある。カイコガのコード遺伝子をクローニングし、これをアフリカツメガエル卵細胞に発現させ、機能解析した。A バリエーションについて解析した結果、pH が上昇するにつれてクロロイオン電流が増加し、最大応答の 50% をもたらす水素イオン濃度は pH 7.5 であった。惹起された電流は nM オーダーのイベルメクチンによって抑制された。このことから、本チャンネルは新ターゲットとして注目される。結果は雑誌論文 5 などで発表した。

(7) ヒスタミン作動性クロロイオンチャンネルの機能解析

イエバエからヒスタミン作動性クロロイオンチャンネルサブユニット cDNA (Mdhc1A と Mdhc1B) をクローニングし、機能解析、薬理的解析を行った。Mdhc1B チャンネルは、既存の薬剤に対する感受性は低かったが、ヒスタミン以外でも GABA や他のモノアミン類などによって活性化あるいは阻害される極めて特徴的な性質を有していた。これらの結果は、雑誌論文 2 や学会発表 3 などで発表した。

(8) ネコブセンチュウ GABAC1 のクローニングと機能解析

サツマイモネコブセンチュウから GABAC1 サブユニット UNC-49B の全長 cDNA をクローニングした。ネコブセンチュウ GABAC1 を機能解析するため、全長 UNC-49B に加えて、UNC-49C の部分 cDNA も得た。さらに、アフリカツメガエル卵母細胞に単独で発現させた UNC-49B の機能解析を行った。その結果、GABA 応答が nM オーダーの既存薬剤フィプロニルやピクロトキシニンによって阻害されることが明らかになり、国内外の学会で発表した(学会発表 7 および 8)。今後は、UNC-49B/49C ヘテロチャンネルの解析が必要である。

(9) ネコブセンチュウのモノアミン作動性クロロイオンチャンネルの解析

サツマイモネコブセンチュウの LGC-40、-53、および -55 はそれぞれ 599、543、および 632 アミノ酸残基から成ると予想され、*C. elegans* オルソログとの類似性はそれぞれ 92.8%、94.7%、および 96.8% であった。NJ 法を用いて分子系統樹を作成したところ、線虫

類のモノアミンチャンネルは系統樹的に近い位置にあったものの、植物寄生性であるサツマイモネコブセンチュウのモノアミンチャンネルは他の動物と離れた位置にあり、種特異的な創農薬開発の標的となり得ることが示唆された。

さらに、サツマイモネコブセンチュウの感染性幼虫に対して浸漬 RNAi を行い、根への感染実験を行ったところ、*Igc-53* RNAi 処理による mRNA 量の低下が根への侵入抑制をもたらした。この結果は、LGC-53 の創農薬ターゲットとしての可能性を示唆している。

< 研究の総括 >

本研究では、将来的な持続的食料生産に資するため、昆虫や線虫のリガンド作動性陰イオンチャンネルに焦点を当て、生物制御剤のターゲットとなるか検証した。その結果、次世代創農薬に必要な上市可能な薬剤の新たな作用機構解明、今後開発可能なリード化合物の発見、新規ターゲットチャンネルの同定・解析など多くの新たな知見が明らかにされた。今後、これらの知見が安全な有害生物防除剤の実用に向けて生かされることを期待される。

< 引用文献 >

- Y. Ozoe, γ -Aminobutyrate- and glutamate-gated chloride channels as targets of insecticides, *Adv. Insect Physiol.*, 44, 2013, 211-286
- Y. Ozoe et al., Insecticidal 3-benzamido-*N*-phenylbenzamides specifically bind with high affinity to a novel allosteric site in housefly GABA receptors, *Pestic. Biochem. Physiol.*, 107, 2013, 285-292
- Y. Ozoe et al., The antiparasitic isoxazoline A1443 is a potent blocker of insect ligand-gated chloride channels, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 391, 2010, 744-749

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)

[雑誌論文](計 13 件)

- S. Furutani, M. Ihara, K. Matsuda (7 名, 7 番目), Okaramine insecticidal alkaloids show similar activity on both exon 3c and exon 3b variants of glutamate-gated chloride channels of the larval silkworm, *Bombyx mori*, *Neurotoxicology*, 査読有, 60, 2017, 240-244
DOI: 10.1016/j.neuro.2016.05.002
- T. Kita, T. Irie, Y. Ozoe (5名, 5番目),

Pharmacological characterization of histamine-gated chloride channels from the housefly *Musca domestica*, *Neurotoxicology*, 査読有, 60, 2017, 245-253

DOI: 10.1016/j.neuro.2016.04.019

尾添嘉久, 有害生物防除ターゲットとしてのイオンチャンネルとGPCR, *農薬誌*, 査読有, 42, 2017, 55-62

DOI: 10.1584/jpestics.W17-18

T. Fuse, T. Kita, Y. Ozoe (5名, 5番目), Electrophysiological characterization of ivermectin triple actions on *Musca* chloride channels gated by L-glutamic acid and γ -aminobutyric acid, *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 査読有, 77, 2016, 78-86

DOI: 10.1016/j.ibmb.2016.08.005

Y. Nakatani, S. Furutani, K. Matsuda (4 名, 4 番目), Ivermectin modulation of pH-sensitive chloride channels in the silkworm larvae of *Bombyx mori*, *Pestic. Biochem. Physiol.*, 査読有, 126, 2016, 1-5

DOI: 10.1016/j.pestbp.2015.08.004

G. Liu, B. Frølund, Y. Ozoe (4名, 4番目), Differential interactions of 5-(4-piperidyl)-3-isoxazolol

analogues with insect γ -aminobutyric acid receptors leading to functional selectivity, *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 査読有, 66, 2015, 64-71

DOI: 10.1016/j.ibmb.2015.10.002

G. Liu, F. Ozoe, Y. Ozoe (4名, 4番目), 4,5-Substituted 3-isoxazolols with insecticidal activity act as competitive antagonists of housefly GABA receptors, *J. Agric. Food Chem.*, 査読有, 63, 2015, 6304-6312

DOI: 10.1021/acs.jafc.5b01843

T. Fuse, I. Ikeda, Y. Ozoe (8名, 8番目), Synthesis of photoreactive ivermectin B_{1a} derivatives and their actions on *Haemonchus* and *Bombyx* glutamate-gated chloride channels, *Pestic. Biochem. Physiol.*, 査読有, 120, 2015, 82-90

DOI: 10.1016/j.pestbp.2014.10.017

Y. Xu, S. Furutani, K. Matsuda (8名, 8番目), Meroterpenoid chrodrimanins are selective and potent blockers of insect GABA-gated chloride channels, *PLoS One*, 査読有, 10, 2015, e0122629

DOI: 10.1371/journal.pone.0122629

S. Furutani, M. Ihara, K. Matsuda (7 名, 7 番目), Exon 3 splicing and mutagenesis identify residues influencing cell surface density of heterologously-expressed silkworm (*Bombyx mori*) glutamate-gated chloride

channels, Mol. Pharmacol., 査読有, 86, 2014, 686-895

DOI: 10.1124/mol.114.095869

S. Furutani, Y. Nakatani, K. Matsuda (7名, 7番目), GluCl a target of indole alkaloid okaramines: a 25 year enigma solved, Sci. Rep., 査読有, 4, 2014, 6190
DOI: 10.1038/srep06190

G. Liu, K. Furuta, Y. Ozoe (5名, 5番目), Competitive antagonism of insect GABA receptors by 4-substituted 5-(4-piperidyl)-3-isothiazolols, Bioorg. Med. Chem., 査読有, 22, 2014, 4637-4645

DOI: 10.1016/j.bmc.2014.07.021

M.M. Rahman, G. Liu, Y. Ozoe (5名, 5番目), Synthesis of 1,3-di- and 1,3,4-trisubstituted 1,6-dihydro-6-iminopyridazines as competitive antagonists of insect GABA receptors, J. Pestic. Sci., 査読有, 39, 2014, 133-143

DOI: 10.1584/jpestics.D14-052

[学会発表](計 53 件)

高市成美, 松田一彦, 尾添嘉久, 田中啓司, ターゲットに変異をもつDieldrin 抵抗性昆虫に対する環状塩素系殺虫剤の作用, 日本農芸化学会2017年度大会, 2017年3月20日, 京都女子大学(京都府・京都市)
中田侑之介, 旭美穂, 尾添嘉久(5名, 5番目), グルタミン酸作動性塩素イオンチャネルのフルラネルとイベルメクチンに対する感受性を決定づけるアミノ酸残基, 日本農薬学会第42回大会, 2017年3月8日, 愛媛大学(愛媛県・松山市)

Y. Ozoe, Molecular and functional characterization of histamine-gated chloride channels from the housefly, *Musca domestica*, XXV International Congress of Entomology, Sep. 30, 2016, Orlando (USA)

K. Matsuda, Insect ligand-gated ion channels as targets for insecticides, 252nd ACS National Meeting, Aug. 23, 2016, Philadelphia (USA)

Y. Ozoe, Ligand-gated chloride channels and phenolamine GPCRs as important targets of pest control chemicals, 252nd ACS National Meeting, Aug. 22, 2016, Philadelphia (USA)

尾添嘉久, 有害生物防除ターゲットとしてのイオンチャネルとGPCR, 日本農薬学会第41回大会, 2016年3月18日, 島根大学(島根県・松江市)

Y. Ozoe, K. Nomura, T. Kita (4名, 1番目), Molecular pharmacology of homomeric UNC-49B channels from southern root-knot nematodes, 250th ACS

National Meeting, Aug. 16, 2015, Boston (USA)

野村和希, 喜多知, 河野強 (7名, 3番目), 尾添嘉久 (7名, 7番目), サツマイモネコブセンチュウGABA受容体(Mi-UNC-49B)のリガンド応答, 日本農薬学会第40回大会, 2015年3月20日, 玉川大学(東京都・町田市)

K. Matsuda, Probing insect LGICs using selective ligands, 13th IUPAC International Congress of Pesticide Chemistry at 248th ACS National Meeting, Aug. 13, 2014, San Francisco (USA)

Y. Ozoe, GABA-gated chloride channel: Multiple target sites of insecticidal action, 13th IUPAC International Congress of Pesticide Chemistry at 248th ACS National Meeting, Aug. 12, 2014, San Francisco (USA)

Y. Ozoe, Pharmacological and physiological roles of insect ligand-gated chloride channels, 13th IUPAC International Congress of Pesticide Chemistry at 248th ACS National Meeting, August 10, 2014, San Francisco (USA)

[図書](計 1 件)

Y. Ozoe (Contributed Chapter: 8名, 1番目), F. Ozoe, T. Kita, American Chemical Society, Discovery and Synthesis of Crop Protection Products, 2015, pp. 467 (pp. 431-446)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

尾添 嘉久 (OZOE, Yoshihisa)
島根大学・生物資源科学部・教授
研究者番号: 80112118

(2) 研究分担者

河野 強 (KAWANO, Tsuyoshi)
鳥取大学・農学部・教授
研究者番号: 50270567

(3) 研究分担者

松田 一彦 (MATSUDA, Kazuhiko)
近畿大学・農学部・教授
研究者番号: 00199796