

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年5月27日現在

機関番号：15201

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22580120

研究課題名（和文）昆虫の抑制性神経伝達物質レセプターの比較薬理学的研究

研究課題名（英文）Comparative pharmacological studies on insect inhibitory neurotransmitter receptors

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

研究成果の概要（和文）：昆虫神経系で抑制性シナプス伝達を担うレセプターは農業薬剤の重要なターゲットである。本研究では、抑制性グルタミン酸レセプター（iGluR）の組織局在、機能および薬理学的性質を多方面から調べ、薬物作用点としての重要性を γ -アミノ酪酸レセプター（GABAR）と比較した。その結果、GABARの方がiGluRより薬剤ターゲットとしては重要であると考えられた。

研究成果の概要（英文）：Receptors that play an inhibitory synaptic transmission in insect nervous systems are an important target for agrochemicals. In the present study, the significance of inhibitory glutamate receptors (iGluRs) as an agrochemical target was examined by comparing their tissue distribution, function, and pharmacological properties with those of γ -aminobutyric acid receptors (GABARs) from a variety of viewpoints. The results indicated that GABARs have more potential than iGluRs.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2011年度	900,000	270,000	1,170,000
2012年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農芸化学・生物生産化学・生物有機化学

キーワード：グルタミン酸、GABA、レセプター、昆虫、神経伝達物質、薬理学

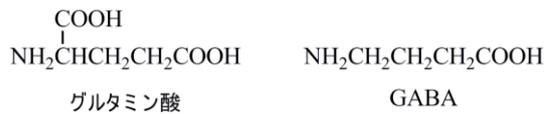
1. 研究開始当初の背景

(1) γ -アミノ酪酸（GABA）とグルタミン酸

神経伝達物質は、神経細胞の終末から細胞外に放出され、隣接する神経細胞に情報を伝達する役割を担っている。脊椎動物では、GABAとグルタミン酸はそれぞれ中枢神経系における抑制性と興奮性の代表的神経伝達物質として知られており、記憶や学習との関

連で医学分野ではよく研究されている。また、これらのアミノ酸のレセプターは精神安定剤などのターゲットでもあり、薬学分野でもよく研究されている。一方、昆虫などの無脊椎動物では、GABAは脊椎動物と同じく抑制性神経伝達物質としての機能をもっているが、グルタミン酸は、興奮性神経伝達物質としてだけでなく、抑制性神経伝達物質としても機能する。無脊椎動物において、グルタミン酸の興奮性と抑制性の両方の機能を可能にし

ているのは、レセプターの構造の違いである。



(2) GABA レセプター (GABAR) と抑制性グルタミン酸レセプター (iGluR)

GABAR と iGluR は、4 回膜貫通構造をもつサブユニットが 5 個集合して、中央にチャネルを形成する別々のタンパク質複合体である。チャネルは、アゴニスト (作動薬) である GABA あるいはグルタミン酸の結合により開口して、細胞内に塩素イオンを流入させる。この陰イオンの流入により、神経細胞内は静止時の負電圧が高まり、興奮性神経伝達物質による正電圧方向へのシフトを抑える。

(3) 殺虫剤の作用点としての昆虫の GABAR と iGluR

GABAR は、塩素系殺虫剤やフィプロニル殺虫剤のターゲットである。これらの薬剤は、チャネル開口を阻害するブロッカー (非競合的拮抗薬) である。一方、iGluR には駆虫薬アベルメクチンが作用し、チャネルの持続的開口によって殺線虫活性が発現するとされている。

(4) これまでの研究と本研究との関連性

GABAR 作用性殺虫剤と考えられていたフィプロニルが GABAR と iGluR の両方に同程度に作用するという研究結果が、ゴキブリ単離神経細胞を使った実験結果に基づいて報告された。GABAR と iGluR は、先に述べたとおり、構造が似ているために、レセプター間での薬剤の交差反応は大いに可能性があり、iGluR が GABAR と同様に農業薬剤の重要なターゲットになるか否か明確にすることが必要である。

2. 研究の目的

GABAR と iGluR の農業薬剤に対する薬理的な重要性を解明するために、主に二つのアプローチを行った。一つは、単離したレセプターを使い、個々のレセプターの機能解析を行うことである。両レセプターには一つの遺伝子から複数のサブユニットタンパク質を生じるスプライスバリエントが存在するので、これらのバリエントの薬理的性質を調べた。二つ目は、生理学的重要性についての

知見を得るために、両レセプターの昆虫体内での局在を明らかにした。たとえレセプターが薬剤に対する強い反応性を示しても、生理学的に重要な役割を担っていないならば、殺虫剤ターゲットとしての重要性は低くなる。

3. 研究の方法

(1) iGluR 遺伝子の解析

イエバエの GABAR サブユニット遺伝子と iGluR サブユニット遺伝子について、これまでスプライスバリエントや RNA 編集については着目しなかった。しかし、これらがレセプター機能や薬理学的特性に影響を及ぼすことが考えられる。そこで、iGluR サブユニットの cDNA およびゲノムの再解析を行い、バリエントをクローニングした。GABAR サブユニットについても同様に行った。また、抑制性神経伝達を担うヒスタミンレセプター (HAR) 遺伝子も 2 種単離し、解析した。

(2) 定量 PCR による GABAR サブユニットと iGluR サブユニットの発現解析

定量 PCR によりイエバエの各発育段階 (胚、幼虫、蛹、成虫) とオス成虫各組織における両レセプターサブユニット mRNA の発現解析を行った。mRNA 発現量がレセプター機能を反映しているか確認するため、イエバエ膜タンパク質への放射性標識 GABAR プローブ [³H]EBOB と iGluR プローブ [³H]ミルベマイシンの特異的結合も調べた。

(3) GABAR と iGluR の機能解析

2 電極電圧固定法 (TEVC) を用いてバリエントの機能解析を行った。クローニングした両レセプター遺伝子から cRNA を調製し、アフリカツメガエル卵母細胞にマイクロインジェクションし、1~3 日間インキュベーションした後、アゴニストを投与して、誘起される電流から EC₅₀ 値などを求めた。GABAR をアロステリックに阻害する非競合的拮抗薬 (チャネルブロッカー) が iGluR に交差反応するか TEVC 解析した。

(4) GABAR と iGluR の免疫組織化学解析

両レセプターに対するポリクロナール抗体を作製し、イエバエ成虫の頭部・胸部・脚切片の免疫組織化学解析を行った。

(5) 単離神経細胞に発現する GABAR と iGluR の薬理的解析

ワモンゴキブリ腹部神経節から単離した神経細胞を使い、GABAとグルタミン酸によって誘起される内向き電流をホールセルパッチクランプ法で測定し、その電流を阻害する薬剤の活性測定を行った。

4. 研究成果

(1) イエバエ由来の抑制性神経伝達物質レセプターをコードする遺伝子の解析

イエバエのGABARサブユニット遺伝子とiGluRサブユニット遺伝子のスプライスバリエーションやRNA編集を解明した。両レセプターサブユニットに数種のバリエーションが存在し、これが多様なレセプター機能や薬理学的特性を発現すると推察された。GABAレセプターサブユニットのエクソン3と6にそれぞれ2種のバリエーション(a, bとc, d)が存在するので、機能解析のためにacとbdの組み合わせをもつサブユニット遺伝子をクローニングした。また、iGluRサブユニットにもエクソン3に3種のバリエーション(A, B, C)が存在することを明らかにし、それらをクローニングした。さらに、iGluRでは4カ所のRNA編集部位の存在も明らかにした。また、抑制性ヒスタミンレセプター(HAR)のサブユニット遺伝子2種もクローニングした。

(2) mRNAおよびレセプタータンパク質のイエバエ組織および発育段階における発現解析

定量PCRにより、イエバエの発育段階(胚、幼虫、蛹、成虫)とオス成虫組織における両レセプターサブユニットmRNAの発現解析を行った。その結果、両遺伝子は成虫頭部で顕著に高い発現を示した。次いで、両レセプターに特異的に結合する放射性標識 ^3H EBOBと ^3H ミルベマイシンの結合を調べたところ、結合量とmRNA発現レベルとの間に相関が見られた。

iGluRサブユニットにはエクソン3のスプライスバリエーション3A、3B、および3Cが存在することから、イエバエ成虫組織におけるバリエーション遺伝子の発現量を調べた結果、3Aと3Bは主に頭部において発現しており、3Cは頭部だけでなく、脚、腹部などの末梢組織においても顕著な発現が見られた。

(3) 免疫組織化学による発現解析

GABARおよびiGluRサブユニットのC末端ペプチドに対するポリクロナール抗体を作製した。iGluR抗体は、ウェスタンブロットイングにおいてイエバエ頭部膜画分のサブ

ユニットタンパク質を認識した。免疫組織化学実験では、iGluR様免疫反応性は視覚葉において、GABAR様免疫反応性はキノコ体等の中枢神経系に見られ、両レセプターの局在の違いが認められた。抹消組織におけるiGluRの発現は特異抗体を用いた免疫組織化学でも一致した結果が得られた。

(4) 機能解析

アフリカツメガエル卵母細胞にiGluRバリエーションをホモマーとして発現させ、TEVC解析を行ったところ、グルタミン酸に対する EC_{50} 値と最大応答電流(I_{max})にはバリエーション間で大きな差はみられなかった。しかし、ウェスタンブロットイングおよびiGluRプローブ ^3H イベルメクチン B_{1a} 結合試験によって、各バリエーションの卵母細胞における発現量には差があることがわかった。その結果、チャンネル単位の I_{max} は3Aと3Bが大きく、3Cは小さいということが推察された。エクソン3の変化は、チャンネルのグルタミン酸に対する感受性ではなく、透過電流量に影響を及ぼすことが示唆された。3種バリエーションを4種類の組み合わせでヘテロマーとして発現させた場合も、アゴニスト応答に大きな違いは見られなかった。しかし、この結果は異種発現させた時の結果であり、今後、ネイティブ細胞での解析が必要となる。

(5) 薬理的解析

高活性GABARブロッカーであるピクロトキシニンと同様の活性をもつ既存殺虫剤フィプロニルのiGluRホモマーとヘテロマーに対する活性をTEVCにより調べたところ、iGluRは高感受性ではなく、しかもバリエーションCを含むとさらに低感受性になることが明らかになった。従って、これらの殺虫性アントゴニストのターゲットはiGluRではなく、GABARであると考えられた。フィプロニルがネイティブiGluRに対して高活性を示すという他研究者の報告があり、この点についてはiGluRの翻訳後修飾等も考慮に入れ、今後、検討を要する。

HARサブユニット2種をホモマーとして卵母細胞に発現させて、GABARおよびiGluRに作用する代表的化合物の活性を調べた。その結果、HAR1を発現させた場合、GABAを初めとする様々な化合物に対して感受性を示したが、いずれ化合物の活性も弱く、薬理的性質は他の抑制性レセプターとは異なることが分かった。

ワモンゴキブリ神経節細胞に発現するネイティブGABARとiGluRに対する殺虫性化合物PS-14の活性を調べた。その結果PS-14は、iGluRよりもGABARに対して約8倍強いブロッ

カー活性を示した。ラット脳GABARは210倍低感受性であった。また、アシルイミノピリダジンGABA類縁体を合成し、GABARとiGluRに対する活性を調べたところ、GABARに対する選択的拮抗薬であることがわかった。これらの結果から、GABARをターゲットとする創薬の可能性が示唆された。

また、イソチアゾロール誘導体を合成して、3種昆虫のGABARに対する拮抗薬活性を調べた。昆虫GABARに対して高活性を示す競合的拮抗薬はこれまでに報告例はないが、今回合成した誘導体は比較的高い活性を示したので、今後、構造展開をしていく中からGABARに対する競合的拮抗薬が創製できるものと期待された。

(6) 総括

3種の抑制性神経伝達物質レセプターの薬理的性質を比較した。特に、iGluRに関する知見が乏しいので、これについてはバリエーションを単離して、機能解析、組織局在などについて多方面から検討したが、現段階では、農業薬剤のターゲットとしてはGABARには劣るという結果が得られた。

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)

[雑誌論文] (計3件)

- ① Yoshihisa Ozoe, γ -Aminobutyrate- and glutamate-gated chloride channels as targets of insecticides, *Advances in Insect Physiology*, 査読有, 44, 211-286, 2013, DOI:10.1016/B978-0-12-394389-7.00004-1
- ② Yuki Akiyoshi, Xiu-Lian Ju, Shogo Furutani, Kazuhiko Matsuda, Yoshihisa Ozoe, Electrophysiological evidence for 4-isobutyl-3-isopropylbicyclophosphorothionate as a selective blocker of insect GABA-gated chloride channels, *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, 査読有, 23, 3373-3376, 2013, DOI:10.1016/j.bmcl.2013.03.085
- ③ Mohammad Mostafizur Rahman, Yuki Akiyoshi, Shogo Furutani, Kazuhiko Matsuda, Kenjiro Furuta, Izumi Ikeda, Yoshihisa Ozoe, Competitive antagonism of insect GABA receptors by iminopyridazine derivatives of GABA, *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 査読有, 20, 5957-5964, 2012, DOI:10.1016/j.bmc.2012.07.049

[学会発表] (計12件)

- ① 野村和希, 入江貴裕, 喜多知, 尾添富美代, 尾添嘉久, イエバエ由来ヒスタミン作動性塩素イオンチャネルのアゴニストおよびアンタゴニストに対する応答, 日本農薬学会第38回大会, 2013年3月15日, 筑波大学(つくば市)
- ② Genyan Liu, Tomo Kita, Kazuki Nomura, Fumiyo Ozoe, Kenjiro Furuta, Izumi Ikeda, Yoshihisa Ozoe, 4-Substituted 5-(4-piperidyl)-3-isothiazolols as competitive antagonists of insect GABA receptors, 日本農薬学会第38回大会, 2013年3月15日, 筑波大学(つくば市)
- ③ Genyan Liu, Kenjiro Furuta, Izumi Ikeda, Yoshihisa Ozoe, Synthesis of isothiazolol antagonists that act on insect GABA receptors, 日本農芸化学会中四国支部大会(第34回講演会), 2012年9月21日, 山口大学(宇部市)
- ④ Toshinori Fuse, Izumi Ikeda, Mao Yamaguchi, Kazuhiko Matsuda, Yoshihisa Ozoe, Synthesis of photo-reactive derivatives of ivermectin, 5th Pan Pacific Conference on Pesticide Science, September 16-19, 2012, Beijing, China.
- ⑤ Yoshihisa Ozoe, γ -Aminobutyric acid receptors: multiple potential sites for insecticidal actions, 5th Pan Pacific Conference on Pesticide Science, September 16-19, 2012, Beijing, China.
- ⑥ Tomo Kita, Masaaki Azuma, Fumiyo Ozoe, Yoshihisa Ozoe, Differential localization of splice variants of a glutamate-gated chloride channel subunit in the housefly, XXIV International Congress of Entomology, August 19-25, 2012, Daegu, Korea.
- ⑦ Yoshihisa Ozoe, Ligand-gated chloride channels: important sites for developing novel insecticides, XXIV International Congress of Entomology, August 19-25, 2012, Daegu, Korea.
- ⑧ 秋吉優季, 古谷章吾, 松田一彦, 尾添嘉久, ワモンゴキブリおよびラット神経細胞に発現するGABAおよびグルタミン酸作動性クロロイオンチャネルに対する二環式リン酸エステルの選択的作用, 日本農薬学会第37回大会, 2012年3月15日, 岡山大学(岡山市)
- ⑨ 喜多知, 尾添富美代, 東政明, 尾添嘉久, スプライスバリエーションによって異なるイエバエ成虫グルタミン酸作動性クロロイオンチャネルの局在と機能, 日本農薬学会第37回大会, 2012年3月15日,

- 岡山大学（岡山市）
- ⑩ Mohammad Mostafizur Rahman, Yuki Akiyoshi, Shogo Furutani, Kazuhiko Matsuda, Kenjiro Furuta, Yoshihisa Ozoe, Synthesis of 4-(6-imino-3-aryl/heteroarylpyridazin-1-yl)butanoic acids and their antagonist activity toward insect GABA receptors, 日本農薬学会第 37 回大会, 2012 年 3 月 15 日, 岡山大学（岡山市）
- ⑪ 秋吉優季, Mohammad Mostafizur Rahman, 古谷章吾, 松田一彦, 古田賢次郎, 尾添嘉久, ワモンゴキブリ単離ニューロンに発現するリガンド作動性陰イオンチャネルのパッチクランプ解析, 平成 23 年度日本農芸化学会西日本支部・中四国支部合同大会, 2011 年 9 月 17 日, 宮崎大学（宮崎市）
- ⑫ 喜多 知, 尾添富美代, 東 政明, 尾添嘉久, グルタミン酸作動性クロロイオンチャネルのイェバエ胸部神経系における局在解析, 日本農芸化学会 2011 年度大会, 2011 年 3 月 5 日（東日本大震災のため大会開催中止, 要旨集発行, 発表は成立）

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