様　式　Ｃ－１９、Ｆ－１９、Ｚ－１９　（共通）

科研費
KAKENHI

科学研究費助成事業　　研究成果報告書

平成 ２６ 年　 ５ 月 ２２ 日現在

機関番号：１４３０１
研究種目：研究活動スタート支援
研究期間：2012～2013
課題番号：２４８９００９１
研究課題名（和文）ジアミド型化合物における生物種特異的リアノジン受容体活性化機構の解明

研究課題名（英文）Mechanism of activation of ryanodine receptor by diamide insecticide

研究代表者
黒川　竜紀（Kurokawa, Tatsuki）

京都大学・工学（系）研究科（研究院）・助教

研究者番号：４０５２７７０１
交付決定額（研究期間全体）：（直接経費）　2,300,000円、（間接経費）　690,000円

研究成果の概要（和文）：ジアミド型化合物フルベンジアミドは、リアノジン受容体(RyR)を標的とし、チョウ目昆虫のみに選択的に高い殺虫活性を示す農薬である。しかし、チョウ目RyRに対するフルベンジアミドの高い選択性における分子・構造生物学的基盤は未解明である。本研究では、フルベンジアミドにおけるチョウ目（カイコ）昆虫RyR選択的結合機構の解明を目的とし、以下の項目について明らかにした。（１）ケミカルバイオロジー的手法を用いた結合部位の特定（２）カルシウムイメージングによるカイコRyRとフルベンジアミド非感受性RyRとのキメラによる結合部位の確認

研究成果の概要（英文）：Flubendiamide shows selective insecticidal activity against lepidopterous insects. The ryanodine receptor (RyR) Ca2+ release channel is a primary target of flubendiamide. However, the molecular mechanisms underlying the species-specific action of flubendiamide are unclear. To identify the flubendiamide-binding region within RyR, we used new affinity probe and LC/MS/MS analysis. The results suggest that the flubendiamide response of RyR requires the diversity region 1. Our findings provide important information for understanding the species-selective effects of flubendiamide.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・生理学一般

キーワード：リアノジン受容体　昆虫　農薬

１．研究開始当初の背景

現在、世界的な食糧不足が懸念されている。食糧の確保は人類にとって重要な課題であり、食糧確保のための安定した農作物の生産が必要である。化学農薬は方法が簡単であることや、コストの面からも非常にすぐれている一方、健康や環境に対する影響や、抵抗性を持つ害虫の発達など大きな問題も持っている。従って安全に農薬を使用するために、病害虫のみを標的に殺虫活性を示し、かつヒトを含む他生物種や自然環境への影響を最小限に留める新たな農薬の開発が望まれている。

農薬が標的とする作用分子として、以前はアセチルコリンエステラーゼや電位依存型ナトリウムチャネルが主に利用されていた。これらの分子をターゲットとする農薬は一般に選択性に乏しく、標的害虫以外に対しても強い毒性を示すものが多く含まれていた。現在は、ネオニコチノイド系と呼ばれるニコチン性アセチルコリン受容体を標的とした農薬が広く使用されている。これらの化合物は標的害虫の受容体に選択的な親和性を示し、哺乳類には比較的毒性が低いといわれている。しかし、近年ミツバチへの影響（女王蜂の減少や帰巣能力を失うなど）が報告されており、昆虫種間の選択性は低いことが問題になっている。

近年、日本農薬（株）により開発されたジアミド型化合物フルベンジアミドは、リアノジン受容体（RyR）を標的とし、ハンスモンヨトウやコナガなどのチョウ目昆虫に非常に高い殺虫活性を示す一方、チョウ目害虫の天敵となる昆虫やクモへの殺虫効果は極めて弱いことが示されている（Tohnishi et al: *J Pestic Sci* (2005) 30:354-360; Masaki et al: *Mol Pharmacol* (2006) 69:1733-1739）。RyR は小胞体膜に存在し、小胞体からの Ca^{2+} 放出を担う Ca^{2+}チャネルである。主な生理機能としては、筋収縮の際に必要な Ca^{2+}濃度上昇を担うことが知られている。RyR は約 5,000 アミノ酸残基からなるタンパク質であり、さらにこれが 4 量体を形成することにより、小胞体膜上に巨大な Ca^{2+}放出チャネルを形成する。RyR は膜タンパク質であるが、ほとんどが細胞質に面した可溶性部分であり、この部分にはチャネル機能を調節する部位が局在している。RyR の構造情報は、低分解能の全体構造（Samsó et al: *Nature Struct Mol Biol* (2005) 12:539-544; Serysheva et al: *Proc Natl Acad Sci USA* (2008) 105, 9610-9615）もしくは、N 末端側 500 アミノ酸残基程度の高分解能の構造決定（Tung et al: *Nature* (2010) 468:585-589）のみであり、RyR の大部分の領域では高解像度の詳細な構造解析はまだなされていない。

本申請者が所属する研究室では、フルベンジアミドが RyR を活性化させ、細胞内 Ca^{2+}濃度の上昇を介した筋肉収縮の持続によりチョウ目昆虫（カイコ）選択的に殺虫活性を示すことを証明した（Kato et al: *Biochemistry* (2009) 48:10342-10352）。しかし、チョウ目 RyR に対するフルベンジアミド殺虫剤の高い選択性の分子・構造生物学的基盤は未解明である。申請者は、これまでイオンチャネルなど膜蛋白質分子の構造と機能に興味を持ち研究を行ってきた。従って、このフルベンジアミドによるチョウ目選択的結合機構について、RyR 一分子一アミノ酸残基レベルでの解明をしたいと考えた。

２．研究の目的

本研究では、フルベンジアミドにおけるチョウ目（カイコ）昆虫 RyR 選択的結合機構の解明を目的とし、以下の項目について明らかにする。

(1)ケミカルバイオロジー的手法を用いた結合部位の特定

(2)カイコ RyR（sRyR）とフルベンジアミド非感受性 RyR とのキメラによる結合部位の確認

(3)カルシウムイメージングとアラニンスキャニングによる結合に重要なアミノ酸残基の同定

(4)フルベンジアミド結合部位周辺タンパク質の結晶化

３．研究の方法

リガンドの結合部位を調べる方法は、大きく分けて 2 種類考えられる。まず、１つ目はアラニンスキャニングなど遺伝子点変異実験である。これは、機能に関わるアミノ酸残基を同定することが出来るが、どの部分のアミノ酸残基に変異を入れるかの選択が難しい。特に、本実験対象分子である RyR は巨大なタンパク質であることから、すべての位置に変異を入れることは得策ではない。2 つ目は、リガンド誘導体を用いたアフィニティーラベルである。分解能は変異実験に劣るが、おおまかな結合部位の同定には優れている。本研究では、この２つの手法両方を使い、チョウ目（カイコ）昆虫 RyR におけるフルベンジアミドの結合部位を同定する。全体の流れは、まずアフィニティーラベルで大まかな結合部位を同定後、同定された結合領域内でアラニンスキャニングを行い、結合に関わるアミノ酸残基を同定する予定である。

４．研究成果

(1)ケミカルバイオロジー的手法を用いた結合部位の特定

フルベンジアミド骨格をリガンドとした新規アフィニティーラベル化剤を合成した。まず、合成したラベル化剤がフルベンジアミド同様のリガンド結合能を有しているかを調べた。ヒト胎児腎細胞 HEK293 細胞に sRyR を一過的に発現させ、Ca^{2+} 指示薬である Fura-2 を導入し、ラベル化剤がフルベンジアミド同様に sRyR に作用し小胞体からの Ca^{2+} 放出を惹起するかを調べた。その結果、ラベル化剤を作用させることで細胞内 Ca^{2+}濃度の

有意な上昇が確認できたことから、新規ラベル化剤がフルベンジアミドと同様のリガンド結合能を有することが示された。
ラベル化剤の結合部位を同定するために、質量分析計による解析を行った。HEK293 細胞に発現させた sRyR をラベル化し、トリプシンで消化後ペプチド断片としたのちに LC-MS/MS により解析した。その結果、sRyR 由来と思われるペプチドフラグメントを再現性良く検出することに成功した。検出された領域は、生物種間でアミノ酸の保存性が低い DR1 領域付近であることより、フルベンジアミドの結合部位として DR1 領域が候補となった。

(2)カイコ RyR（sRyR）とフルベンジアミド非感受性 RyR とのキメラによる結合部位の確認
ラベル化の実験により、生物種間でアミノ酸配列の保存性が低い DR1 領域がフルベンジアミドの結合ならびに種選択性の分子基盤となっていることが予想された。そこで、分子生物学的手法を用いて sRyR の DR1 領域をフルベンジアミド非感受性 RyR の DR1 領域に置換したキメラ遺伝子を作製した。このキメラ遺伝子を培養細胞に導入し、フルベンジアミド感受性の検討を行うと、キメラ体の応答は sRyR に比べ有意に減弱した。この結果からも、フルベンジアミド結合部位として DR1 領域が重要であることが示唆された。今後は、さらに領域を限定し、詳細な結合部位の同定を行いたい。

(3)カルシウムイメージングとアラニンスキャニングによる結合に重要なアミノ酸残基の同定
これまでの研究で、フルベンジアミド結合部位として DR1 領域が候補となっているが、この領域は約 250 アミノ酸残基ほどあり、アラニンスキャニングを行うためには、範囲が広すぎるため、この実験はまだ行われていない。今後は、(2)の実験で範囲を限定した後、アラニンスキャニングを行いたい。

(4)フルベンジアミド結合部位周辺タンパク質の結晶化
DR1 領域にフルベンジアミド作用点があることが示唆された。そこで、DR1 領域とフルベンジアミドの共結晶を目指すため、まず DR1 領域の発現を試みた。PCR を用いて DR1 領域をコードする DNA を増幅し、GST tag をコードする領域を持つ大腸菌発現用プラスミドを構築した。培養条件を検討した結果、大腸菌による大量発現に成功した。また、アフィニティークロマトグラフィー、陰イオンクロマトグラフィーおよびゲルろ過カラムにより、sRyR の DR1 領域の精製タンパク質を得ることが出来た。しかし、様々な条件でこのタンパク質の結晶化を試みているが、まだ結晶は得られていない。今後は、DR1 領域内で様々な長さのコンストラクトを作製、精製・結晶化条件の検討などを行い、DR1 領域の結晶化を目指す。

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７件）すべて査読有

① Takeshita K, Sakata S, Yamashita E, Fujiwara Y, Kawanabe A, Kurokawa T, Okochi Y, Matsuda M, Narita H, Okamura Y, Nakagawa A. X-ray crystal structure of voltage-gated proton channel. ***Nature Struct. Mol. Biol.*** 21, 352-357 (2014). doi: 10.1038/nsmb.2783.

②Fujiwara Y, Kurokawa T, Okamura Y. Long alpha helices projecting from the membrane as the dimer interface in the voltage-gated H^+ channel. ***J. Gen. Physiol.*** 143, 377-386 (2014). doi: 10.1085/jgp.201311082

③Kurokawa T, Okamura Y. Mapping of sites facing aqueous environment of voltage-gated proton channel at resting state: A study with PEGylation protection. ***Biochim. Biophys. Acta*** 1838, 382-387 (2014). doi: 10.1016/j.bbamem.2013.10.001.

④Yamaguchi S, Kurokawa T, Taira I, Aoki N, Sakata S, Okamura Y, Homma KJ. Potential Role of Voltage-Sensing Phosphatases in Regulation of Cell Structure Through the Production of $PI(3,4)P_2$. ***J. Cell. Physiol.*** 229, 422-433 (2014). doi: 10.1002/jcp.24463

⑤Fujiwara Y, Kurokawa T, Takeshita K, Nakagawa A, Larsson HP, Okamura Y. Gating of the Designed Trimeric/Tetrameric Voltage-Gated H^+ Channel. ***J Physiol.*** 591:627-640 (2013). doi: 10.1113/jphysiol.2012.243006.

⑥ Kurokawa T, Takasuga S, Sakata S, Yamaguchi S, Horie S, Homma KJ, Sasaki T, Okamuka Y, 3′ Phosphatase activity toward phosphatidylinositol 3,4-bisphosphate [$PI(3,4)P_2$] by voltage-sensing phosphatase (VSP). ***Proc. Natl. Acad. Sci. USA*** 109, 10089-10094 (2012). doi: 10.1073/pnas.1203799109

⑦Fujiwara Y, Kurokawa T, Takeshita K, Kobayashi M, Okochi Y, Nakagawa A, Okamura Y. The cytoplasmic Coiled-Coil Mediates cooperative gating temperature sensitivity in the voltage-gated H^+ channel Hv1. ***Nature Commun.*** 3, 816 (2012). doi: 10.1038/ncomms1823.

〔学会発表〕（計７件）

①橋本勇人、黒川竜紀、清中茂樹、金井保、跡見晴幸、森泰生、超好熱性アーキアにおけるタングステンの取り込み機構および生理的役割、日本化学会第 94 春季年会、名古屋、2014 年 3 月

②黒川竜紀、岡村康司、電位依存性プロトンチャネルにおける閉状態のトポロジー解析、第 91 回日本生理学会大会、鹿児島大学、2014 年 3 月 16 日

③木村祐、犬飼佳代、坂田和之、森恵美子、黒川竜紀、清中茂樹、森泰生、新規ラベル化剤を用いた Flubendiamide 分子基盤の解明、日本農薬学会第３９回大会、京都、2014 年 3 月

④橋本勇人、黒川竜紀、清中茂樹、金井保、跡見晴幸、森泰生、超好熱性アーキアにおけるタングステン獲得機構及び生理的機能の解明、第 86 回日本生化学会大会、横浜、2013 年 9 月

⑤黒川竜紀、高須賀俊輔、坂田宗平、山口真二、堀江重郎、本間光一、佐々木雄彦、岡村康司、電位感受性ホスファターゼ VSP は膜電位に応じて基質特異性を変化させる、第 90 回日本生理学会大会、東京、2013 年 3 月 28 日

⑥犬飼佳代、坂田和之、森恵美子、黒川竜紀、木村祐、清中茂樹、森泰生、フルベンジアミド低感受性コナガに関する研究：リアノジン受容体の変異による感受性の低下、日本農薬学会第 38 回大会、筑波、2013 年 3 月 15 日

⑦黒川竜紀、高須賀俊輔、坂田宗平、山口真二、堀江重郎、本間光一、佐々木雄彦、岡村康司、電位依存性ホスファターゼ VSP における PI(3,4)P_2 に対する 3 位の脱リン酸化活性、第 85 回日本生化学会大会、福岡、2012 年 12 月 15 日

〔その他〕

研究室ホームページ

http://www.sbchem.kyoto-u.ac.jp/mori-lab/index.html

６．研究組織

(1)研究代表者

黒川　竜紀（KUROKAWA, Tatsuki）

京都大学・大学院工学研究科・助教

研究者番号：405277041