

第1章 緒言

殺虫剤は、農業害虫および衛生害虫の駆除を目的として用いられる化学物質であり、特に食料の確保および昆虫媒介性の疾病への対策のなど、今日では人類の生存に欠かせないものとなっている。化学的防除の歴史は古く、日本では鯨油の注油駆除法、ペルシャでは除虫菊、タバコ粉が17世紀頃には用いられていた(松本ら, 1995)。19世紀になり砒素化合物による害虫防除法が考え出され、これが最初の合成化学殺虫剤となった。20世紀になると有機化学合成技術の発展と共に、合成化学殺虫剤は飛躍的な進展を遂げた。初期に登場した有機塩素系殺虫剤である DDT やシクロジエン系殺虫剤は、開発当時害虫防除の面では画期的な化合物であり、特に DDT はマラリア媒介蚊駆除に大きく貢献した。しかし、その後環境中への長期残留性や他の生物に対する毒性等が大きな問題となった。さらに、殺虫剤を繰り返し使用することによって、害虫がその殺虫剤に対して抵抗力を発達させる薬剤抵抗性も問題となった(浜, 1992)。これらの問題を解決すべく、化合物の構造改変や新規作用機構を持つ化合物の探索が続けられ、今日までに多くの殺虫剤が開発されてきた。

殺虫剤は昆虫の生理機能を攪乱することで昆虫を死に至らしめる。その作用点は、昆虫特有のホルモン系、生物に共通性の高い神経系、ミトコンドリアの呼吸酵素系などがある。中でも神経系に作用する殺虫剤は、主要な位置を占めてきた。有機リン系殺虫剤およびカーバメート剤は、神経伝達物質のアセチルコリンを分解するアセチルコリンエステラーゼの働きを阻害し、神経終末におけるアセチルコリンの過剰な蓄積により異常興奮を起こす。DDT およびピレスロイド系殺虫剤は電位依存性ナトリウムチャンネルに作用し、不活性化を遅延することで活動電位を異常発生させる。シクロジエン系殺虫剤や γ -HCH (γ -BCH、リンデン) は抑制性シナプス伝達をつかさどる $GABA_A$ レセプターチャンネル複合体に作用する (Woodward et al., 1992; Nagata and Narahashi, 1994; Tokutomi et al., 1994; Nagata and Narahashi, 1995)。近年開発されたクロルニコチニル系殺虫剤は、ニコチン性アセチルコリンレセプターに直接作用する (Nagata et al., 1998)。

以上のように、神経系に作用するといわれる殺虫剤の多くはイオンチャネルを作用点としている。

イオンチャネルとは細胞膜上に存在している膜貫通型のタンパクで、神経系における情報伝達機構に重要な役割を担っている。イオンチャネルの立体構造上の最大の特徴は、中央にイオンが通過するための孔 (pore) が形成されることで、この孔を通過してイオンが細胞膜内外を移動することにより、細胞膜電位が変化する。この細胞膜電位変化が神経系における情報伝達の仕組みであり、前述の殺虫剤はこのイオンチャネルの正常な生理作用を阻害することにより、神経における情報伝達を攪乱し、昆虫を死に至らしめる。

GABA_A レセプターチャネル複合体 (以下 GABA_A レセプター) は神経系の抑制性シナプス伝達に参与するイオンチャネルであり、各種薬剤の作用点として注目されている。神経伝達物質である γ -アミノ酪酸 (GABA) が神経細胞の終末からシナプス間隙に放出されると、後膜に存在する GABA 認識部位に GABA が結合し、チャネルが開く。陰イオンである Cl⁻ が細胞内に流入するため、抑制性シナプス後電位が発生し神経膜の脱分極を抑える。

GABA_A レセプターはイオンチャネルとレセプターが一体となった様式のイオンチャネルであり、5 つのサブユニットが集合して Cl⁻ を透過させるチャネルを中央に形成している (Fig. 1)。各サブユニットは 4 つの細胞膜貫通 α -ヘリックス構造 (M1~M4) と、M3 と M4 をつなぐ細胞内ループを形成している (Barnard et al., 1987; Bureau and Olsen, 1993; Fritschy et al., 1992; Olsen and Tobin, 1990)。

GABA_A レセプターには複数の薬剤作用点の存在が知られている。シクロジエン系化合物や γ -HCH (Bloomquist and Soderlund, 1985; Bloomquist et al., 1986)、ベンゾジアゼピン (Bormann, 1991)、バルビツール酸 (Bormann, 1988; Inomata et al., 1988; Study and Barker, 1981)、アルコール (Marszalec et al., 1994, Nishio and Narahashi, 1990)、全身麻酔薬 (Nakahiro et al., 1989; Yeh et al., 1991)、ステロイド系薬剤 (Harrison and Simmonds, 1984)、Zn²⁺ (Narahashi, 1996; Ma and Narahashi 1993)、各種天然毒としてピクロトキシニン (Constanti, 1978; Olsen et al., 1978;

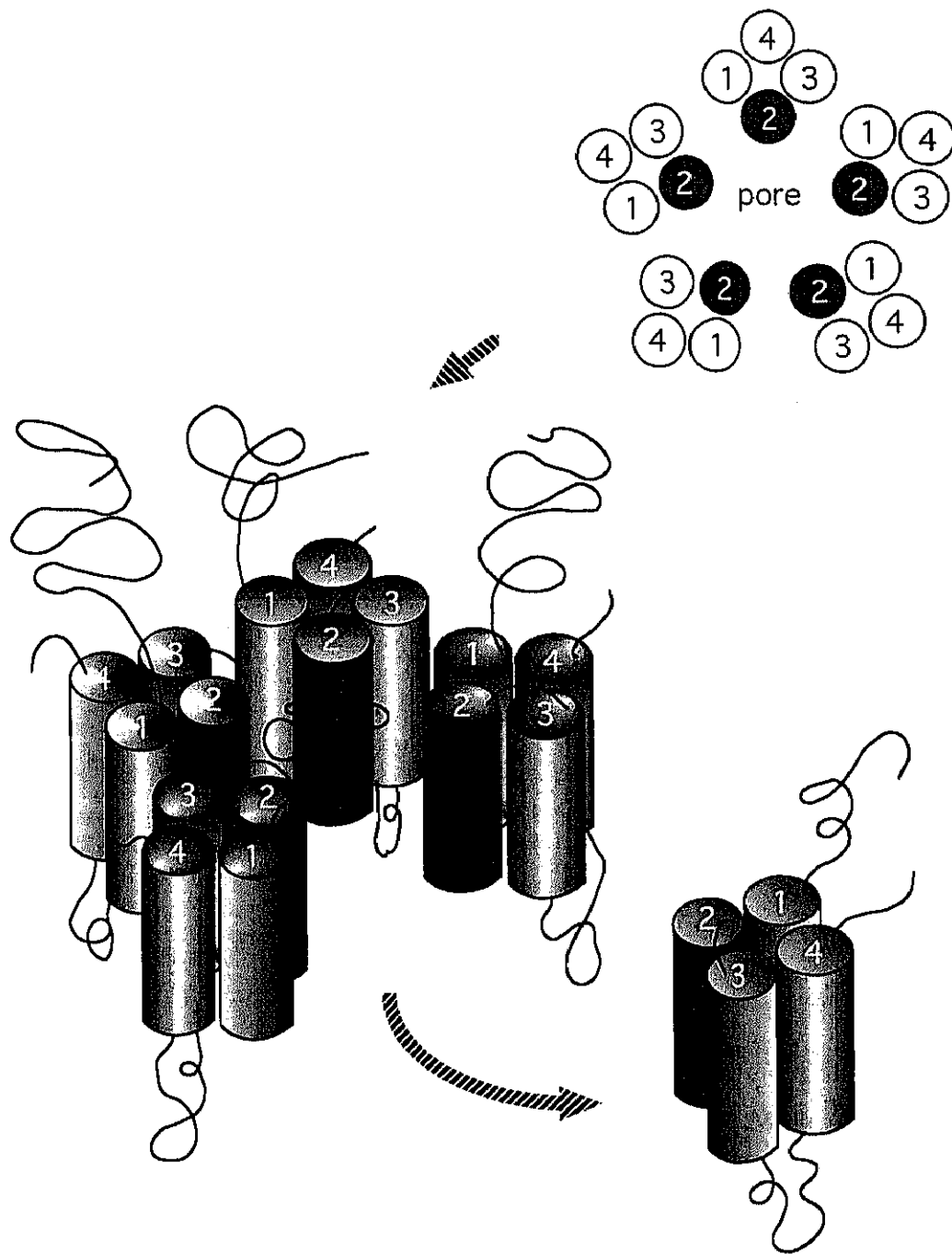


Fig. 1. A model of the structure of the GABA_A receptor chloride channel complex. The ligand-gated ion channel is thought to be pentameric, composed of members from the five subunits. Each subunit has four membrane-spanning domains (cylinders numbered 1-4), one or more of which contribute to the wall of the ion channel. The second transmembrane domain is thought to be part of the channel pore. The naturally occurring oligomers are composed of some of the α , β , γ and δ polypeptides, but the exact subunit composition is not known at this time (From Olsen and Tobin, 1990).

Smart and Constanti, 1982; Takeuchi and Takeuchi, 1969)、ピキュクリン (Olsen and Snowman, 1983)、アニサチン (Kudo et al., 1981) 等が作用する。GABA の作用を非競合的に阻害するピクロトキシニン¹は GABA_A レセプター上に独自の結合部位、ピクロトキシニン結合部位を持ちこれまで多くの研究が行われてきた。殺虫剤の作用点として重要なのが、このピクロトキシニン結合部位である。

ピクロトキシニン結合部位に作用する薬剤は、GABA_A レセプターに対して抑制的に作用する (Smart and Constanti, 1982; Woodward et al., 1992)。ピクロトキシニンの作用機構は電気生理学的研究から、開チャネルにおいて促進されることが示され (Inoue and Akaike, 1988; Dillon et al., 1995)、結合部位はチャネル孔の内壁に存在することが予測された。近年発達してきた分子生物学的手法を用いた研究からも、ピクロトキシニン結合部位はチャネル内壁を形成している膜貫通 M2 領域に位置することが明らかにされた (Gurley et al., 1995; Xu et al., 1995)。これらの結果から、ピクロトキシニンの作用機構は、薬剤がチャネル孔の内壁に存在する結合部位に結合することによって、イオンの透過を物理的に阻害する「オープンチャネルブロック」を起こすことだと考えられた。一方この考え方とは異なり、ピクロトキシニンはチャネル内壁に結合するが、その抑制機構は「オープンチャネルブロック」ではなく、チャネルの開閉機構に影響を与えて GABA の作用を阻害し、チャネルが閉じた状態で安定化することであると考える考えもある (Newland and Cull-Candy, 1992; Dillon et al., 1995)。

先にも述べたように、シクロジエン系殺虫剤および γ -HCH は GABA_A レセプターのピクロトキシニン結合部位に作用する。初期に行われた電気生理学的研究により、シクロジエン系殺虫剤および γ -HCH は神経系に異常興奮を起こすことが示され、これらの殺虫剤はシナプス前膜からの興奮性神経伝達物質の異常放出を起こすと考えられていた (Yamasaki and Ishii, 1954, 1958)。これは、当時は GABA が神経系における抑制性伝達物質であるという考えが、まだ仮説の段階であったためである。抑制性シナプスにおける GABA_A レセプターの存在、および同イオンチャネルがこれらの殺虫剤の作用点として明らかとなったのは、70 年代の終わりから 80 年代に入ってからである。これら殺虫剤の作用点解明

の最初のきっかけとなったのは、抵抗性昆虫を使った生物検定試験という個体レベルでの現象からであった。ディルドリン抵抗性昆虫がピクロトキシニンに対して交差抵抗性を示し、ディルドリンの作用部位はピクロトキシニンと同一である可能性が示唆された (Matsumura and Ghiasuddin, 1983)。続いて、ピクロトキシニン結合部位に作用する化合物を用いた結合実験が行われた。ディルドリンと放射能標識体、 $[^3\text{H}]$ dihydropicrotoxinin および $[^{35}\text{S}]$ TBPS ($[^{35}\text{S}]$ t-butyl-bicyclophosphorothionate) の昆虫および哺乳類の神経膜画分への結合阻害実験の結果から、ディルドリンはピクロトキシニン結合部位に結合すると考えられた (Lawrence and Casida, 1984)。パッチクランプ法を用いた電気生理学的解析からも、ディルドリンがピクロトキシニンと同様に GABA_A レセプターに対して抑制的に作用しピクロトキシニンと相互作用を示したが、ピクロトキシニンとは異なる作用性も持ち合わせていた (Woodward et al., 1992; Nagata and Narahashi, 1994; Tokutomi et al., 1994; Nagata and Narahashi, 1995)。

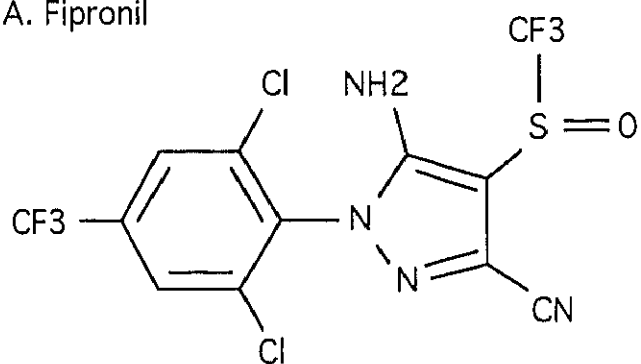
これまでのパッチクランプ法を用いた研究は、全てホールセル法が用いられている。ホールセル法とは単一の細胞の細胞膜に存在する無数のイオンチャネルを通過する電流を、同時に測定する方法である。個々のイオンチャネルは確率的に開閉を繰り返すが、ホールセル法の利点は、それら個々のイオンチャネル全体の動きを同時測定するため、イオンチャネルの動態を明らかにできることである。したがって薬剤の作用がイオンチャネルの動態をどのように改変するのかを知るためには適した方法である。しかし、イオンチャネルに対する薬剤の作用機構の完全な解明を行うためには、単一のイオンチャネルに対する作用を調べる必要がある。単一チャネルレベルでの実験から得られる知見は、薬剤によるイオンチャネルのコンダクタンス (単位伝導度) 変化、チャネルの開閉確率あるいは開閉頻度の変化などである。これらの単一イオンチャネル解析から得られた情報は、薬剤のイオンチャネルにおける作用様式がどのようなものであるかを解明するための重要な基礎データになる。

シクロジエン系および γ -HCH などの作用機構解明において、シングルチャネル法を適用した研究はほとんど行われていない。ノイズ解析法を使ったディ

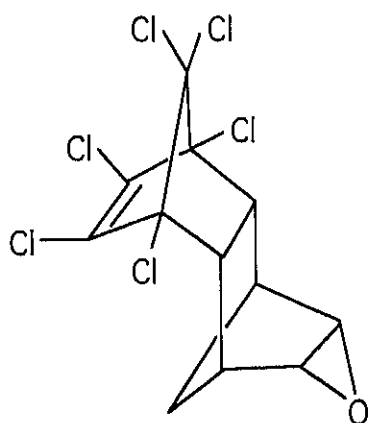
ルドリンの作用機構に関する研究が過去に報告されているが (Bermudez et al., 1991)、ノイズ解析法は単一チャンネルで起きている現象を複数のチャンネルについて総括的に記録し、電流記録上に現れてくる電流雑音を解析する方法である。従って、ディルドリンのシングルチャンネル電流に対する作用機構に関しては不明な点が多く残されている。また本研究で注目したフィプロニル、アニサチンについてもシングルチャンネル法を適用した研究は行われていない。

フィプロニル (Fig. 2A) は近年開発されたフェニルピラゾール系殺虫剤であり、従来の殺虫剤に抵抗性が発達した害虫に対しても効果を示し現在広く使用されている (Moffat, 1993)。生化学的手法により、フィプロニルは GABA 誘導性 Cl⁻ イオンの神経顆粒への取り込みを阻害すること、さらにフィプロニルによって [³H]EBOB ([³H]4'-ethynyl-4-n-propylbicycloorthobenzoate) の結合が阻害されることが示された (Cole et al., 1993, 1995)。また、フィプロニルによる GABA 誘導性イオン電流の抑制が示された (Millar et al., 1994; Buckingham et al., 1994)。これらのことからフィプロニルが GABA_A レセプターに対して抑制的に作用することが明らかとなり、その作用点はピクロトキシン結合部位であると考えられた。さらに薬剤抵抗性研究の面からフィプロニルとディルドリンとの関連が注目された。ディルドリン抵抗性 GABA レセプター (Rdl-GABA レセプター) を発現させたアフリカツメガエル卵母細胞でフィプロニルの作用を検討した結果、フィプロニルによる電流抑制は感受性レセプターに対する作用と比べて弱かった (Hosie et al., 1995)。このことからフィプロニルとディルドリンは、ピクロトキシン結合部位で作用点を共有していると考えられた。これに対して Wolff and Wingate (1998) はキイロショウジョウバエとタバコガの一種である *Heliothis virescens* (tabacco budworm) のディルドリン抵抗性と感受性の GABA レセプターを発現させたアフリカツメガエル卵母細胞を用いた電気生理学的研究から、フィプロニルとディルドリンの結合部位は異なると考えた。またマウス脳における [³H]EBOB の結合阻害度を調べた研究においても、フィプロニルによる [³H]EBOB の結合阻害度は低かった (Kamijima and Casida, 2000)。これらの報告から、フィプロニルとディルドリンの結合部位は異なることが示唆された。

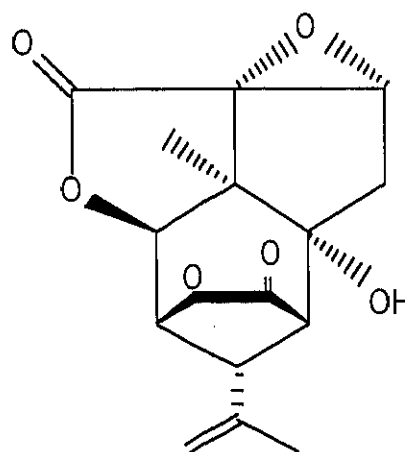
A. Fipronil



B. Dieldrin



C. Picrotoxinin



D. Anisatin

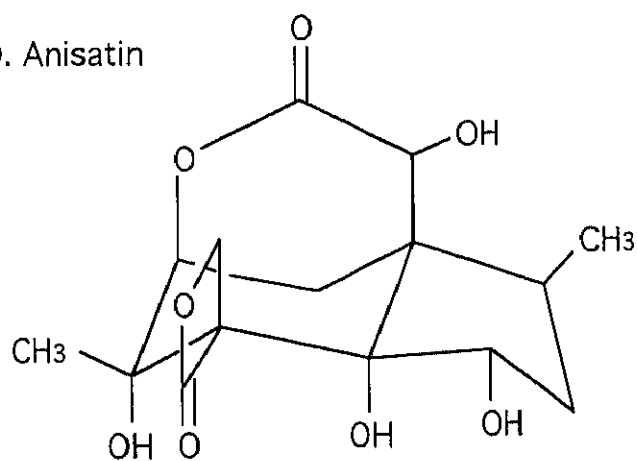


Fig. 2. Chemical structures of fipronil (A), dieldrin (B), picrotoxinin (C), and anisatin (D).

これらの研究において検討しなければならないこととして、電気生理学的手法には緻密さが要求されることである。特に GABA_A レセプターのような伝達物質感受性のイオンチャネルでは、実験上 GABA 処理速度がチャネルの動態よりも早くなくてはならない。この点、アフリカツメガエルの卵母細胞を用いた場合には速やかな外液処理を行うことができず、脱感作の影響を受けイオン電流が歪む問題がある。また、特定のレセプターを発現する系としてアフリカツメガエルの卵母細胞は簡便ではあるが、同時に内在性のサブユニットの影響など未知な問題があることが知られている (Cooper and Millar, 1997; Lewis et al., 1997; Sivilotti et al., 1997; Sthhmer and Parekh, 1995)。過去の研究における相反する結論は、それら実験上の問題点から生じた可能性は否定できない。

本研究においてはラットの DRG ニューロンを実験に用いたが、細胞の大きさは 50 ミクロン以下であり、アフリカツメガエル卵母細胞と比較して外液交換に関する問題点ははるかに少ない。また、GABA_A レセプターに作用する代表的な薬剤に関しての詳細な研究がすでに報告されており、本研究において得られた知見と比較することができる。さらにシングルチャネル法の適用が可能な細胞であり、本研究を遂行する上でもっとも適した神経細胞と考えられる。昆虫と哺乳類間で薬剤に対する感受性の違いがイオンチャネルレベルで起こっている可能性は否定できないが、ピクロトキシン結合部位に作用する薬剤についてはサブユニットの違いはそれほど大きな感受性の差にならないとの報告もある (Olsen and Tobin, 1990)。

GABA_A レセプターの機能を抑制する化合物の研究がこれまで数多く行われてきた。その中核となっているのが、ピクロトキシン (ピクロトキシニン) に関する研究である。しかし構造的にもピクロトキシニンと大きく異なる化合物が、ピクロトキシニンの結合部位に対する結合を阻害することが知られている。TBPS と EBOB はその例であり、ピクロトキシン結合部位に関する研究に利用されてきた (Cole and Casida, 1992; Squires et al., 1983)。

殺虫剤の作用機構をイオンチャネルに対する作用面から研究する上での困難さとして、殺虫剤の持つ物理化学的性質がイオンチャネルの機能に間接的に影

響することがある。その影響がその化合物の作用機構として、本質的なものなのか否かを明らかにすることが、作用機構の理解には必要となる。殺虫剤の場合は、作用点への作用に加えて、ある程度の環境中における残留性と分解性、昆虫皮膚への浸透性、標的害虫への選択性などの性質が重要であり、これらの性質が付加されている。これらの性質に基づく構造改変の結果、作用点に対する結合活性や、他の化合物との相互作用に影響を及ぼし、本質的なイオンチャネルに対する作用様式を解明しにくくする場合がある。その点、天然由来の毒物のなかには、それ自身では殺虫剤として必要な性質は持たないが、イオンチャネルに対する本質的な作用を研究する上で適したものが多い。

薬剤の神経系に対する作用機構を解明する手段として、標識イオンの細胞膜小胞への取り込み阻害実験、および放射性標識リガンドの特異的結合の解析等の生化学的手法、あるいは神経細胞に薬物を処理して応答を調べる電気生理学的手法も使われてきた。しかし生化学的手法を用いた場合、薬剤を処理してからレセプターとの反応を測定するまでに数分間を要するため、処理速度が実際に薬剤がチャネルに作用する時間経過に比較するとかなり遅く、ミリ秒単位の速い時間規模で起きている薬剤の、レセプターに対する作用の変化を測定することは困難である。

また、近年発達してきた分子生物学的手法を使った薬剤の作用点探索も、盛んに行われている。例えば、一つのアミノ酸を他のアミノ酸に置換すると薬剤の作用性が変化することから、分子レベルで薬剤結合部位を特定することが可能となった。しかし、分子レベルで薬剤の作用点が類推されたとしても、機能タンパク質であるイオンチャネルを立体的な視点からとらえようとする場合、一部のアミノ酸の変化が全体の機能にどのように影響しているのかを類推することは困難である。

一方、電気生理学的手法では、薬剤がレセプターに作用する過程をリアルタイムで測定するため、チャネルで起きている変化を瞬時にとらえることができ、薬剤・イオンチャネル間の相互作用を解析する上で適した手段といえる。同手法には、細胞外電極法、細胞内電極法、およびパッチクランプ法があり、記録

法としては電位変化を測定する電流固定法と、電流を測定する電位固定法がある。特にパッチクランプ法は単一チャンネルにおける応答をとらえることが可能な画期的な方法として、1976年にNeherとSakmannにより発表された。以後、ギガ・シール法の開発により、個々のチャンネル電流をより正確に記録できるように改良が加えられ、微小な細胞全体からの電流を記録することが可能なwhole-cell法も発達した(Hamill et al., 1981)。イオンチャンネルを作用点とする薬剤の作用機構の研究にパッチクランプ法を適用することは、ミリ秒単位で変化するイオンチャンネルと薬剤との相互作用解析に最も有効といえる。さらにイオンチャンネルを構成している特定のアミノ酸が、どのような機能を持っているのか明らかにする場合についても、電気生理学的手法は非常に有効である。

本研究では、特にGABA_Aレセプターに対して抑制的に作用する化合物に注目し、新規殺虫剤であるフィプロニル、フィプロニルと結合部位を共有している可能性が示唆されているディルドリン、さらに、植物由来の天然毒アニサチンの作用機構をイオンチャンネルレベルで解明することを目的に、パッチクランプ法を用いて研究を行った。そしてこれら化合物と、これまでに多くの知見が得られているピクロトキシニンとの作用を比較検討し、これら化合物の作用機構解明を試みた。