

第 6 章 総合考察

現在、殺虫剤は害虫駆除を目的として世界中で使用されており、新規殺虫剤の開発も盛んに行われている。殺虫剤開発が要求される社会的背景には 2 つの側面が考えられ、一つには殺虫剤の人体に対する安全性や残留毒性等、環境に配慮した観点である。我が国の殺虫剤をはじめとした農薬に対する安全性の基準は国際的に見ても厳しく、過去に安全面で問題のあった殺虫剤は、現在では使用が禁止されている。そのためこれらに代わる環境に影響が少ない新規殺虫剤が望まれる。

もう一方の側面として、抵抗性害虫の発達があげられる。今日では殺虫剤は人類の生活にとって不可欠なものであるが、抵抗性害虫の発達のためその効果が失われる事例が近年急激に増えており、害虫管理の点で難しい問題となっている。殺虫剤抵抗性とは、殺虫剤をくり返し使用することにより、害虫が殺虫剤に対し抵抗性を発達させ効力を失う現象であり、一度抵抗性が発達すると、その薬剤は殺虫剤としての価値を失い、これに代替する新しい作用機構を持った殺虫剤が望まれる。

本研究で特に注目した GABA_A レセプターは、神経系の抑制性シナプス伝達に関与し、殺虫剤の作用点としても重要なイオンチャネルである。ピクロトキシニン は GABA_A レセプター上にピクロトキシニン結合部位とよばれる独自の結合部位を持ち、同結合部位はチャネル孔の内壁に存在することから (Gurley et al., 1995; Xu et al., 1995)、ピクロトキシニン結合部位に作用する化合物の作用機構はオープンチャネルブロッカーである可能性がある。

ディルドリンが GABA レセプター上のどの位置に結合するのか、というアミノ酸レベルでの直接的な証拠は、近年発達した分子生物学的手法を使った研究から解明された (French-Constant et al., 1991)。ディルドリンおよびピクロトキシニンに対して抵抗性を示すショウジョウバエ系統から GABA レセプター遺伝子、Rdl を同定し、抵抗性系統と感受性系統でアミノ酸配列を比較した結果、抵抗性系統の GABA レセプターでは 302 番目のアミノ酸がアラニンからセリン

に置換されていることが明らかになった。さらに Rdl 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、薬剤に対する感受性を調べた結果、抵抗性 Rdl レセプターを発現させた細胞では、ピクロトキシニン、ディルドリンによる電流抑制作用は感受性レセプターを発現させた細胞に比べ弱かった (French-Constant et al., 1993)。キイロショウジョウバエ GABA レセプターにおける 302 番目のアミノ酸は、ラット $\alpha 1$ サブユニットの 257 番目アミノ酸に相当するという報告もあり (Xu et al., 1995)、ピクロトキシニンとディルドリンが作用するアミノ酸の位置は同一である可能性が示唆された。

さらに、フィプロニルの作用と結合部位について、ディルドリン等 GABA レセプターに作用する殺虫剤との共通性について研究が行われ、ディルドリン抵抗性の Rdl レセプターは、殺虫剤フィプロニルに対しても低感受性を示すことが報告された (Cole et al., 1995; Hosie et al., 1995)。これらの報告から、フィプロニルはピクロトキシニンやディルドリンと同一の結合部位に作用することが示され、さらに結合部位はチャネルの内面であることが示唆された。

ピクロトキシニン、ディルドリンおよびフィプロニルは、チャネル内面に結合することが、ミュータントレセプター等を使った実験から示された。チャネル内面に結合する場合、化合物のイオン電流抑制機構はチャネル孔をふさぐ様式の抑制機構である、オープンチャネルブロッカーの可能性も考えられる。そこで、フィプロニル、ディルドリン、ピクロトキシニン、およびアニサチンのオープンチャネルブロッカーである可能性について検討した。オープンチャネルブロッカーによる抑制機構は、細胞内外の電位変化に影響されて電位依存性を示す。アニサチンは電位依存性を示さず (Fig. 27)、ピクロトキシニンについても、その作用は電位依存性を示さないことが報告されている (Newland and Cull-Candy 1992)。

さらに、シングルチャネルイオン電流の解析結果から検討すると、オープンチャネルブロッカーは開いたチャネルに侵入し、物理的にイオンの通過を妨害する。オープンチャネルブロッカーによるこの現象はシングルチャネルイオン電流を測定した場合、開時間の減少とバースト持続時間の延長として観察され

る (Twyman et al., 1992)。フィプロニル、ディルドリン、ピクロトキシニン、およびアニサチンの、シングルチャネルイオン電流に対する作用は、バースト持続時間を延長しなかったことから、これらの化合物がオープンチャネルブロッカーである可能性は低い。従って、これら化合物の電流抑制機構はオープンチャネルブロック以外の別の機構であることが示唆された。

シングルチャネルイオン電流を解析して得られた、それぞれの化合物の作用機構で共通した点は、閉時間を延長してチャネルの開頻度を低下させるという現象である。このことから、これら化合物のイオン電流抑制機構は、化合物がチャネルに結合するとチャネルの開閉機構に影響を与え、チャネルが開くことを阻害し閉じた状態で安定化させることであると考えた。

ピクロトキシニンの GABA 誘導性イオン電流抑制は、GABA の処理頻度に依存して促進した (Dillon et al., 1995; Yoon et al. 1993)。ディルドリンによる抑制においてもチャネルの開口が抑制を促進した (Nagata and Narahashi, 1994)。3 章でフィプロニルの作用とチャネルの活性化を検討した結果、チャネルの活性化に伴いフィプロニルによる抑制と抑制からの回復が促進された。これらの現象は結合部位がチャネル内面であることから考察すると、チャネル開口によりチャネル内面に結合する化合物にとって、結合部位への接近が容易になったためであると考えた。

一方定常状態でのフィプロニルによる電流抑制度 (IC_{50} 値) は、活性化チャネルと静止状態のチャネルとの間で大きな差は認められなかった。 IC_{50} 値は化合物の結合部位に対する親和性を示す指標となることから、フィプロニルの結合部位に対する親和性は、活性化チャネルおよび不活性状態のチャネルいずれにおいても、同程度であることが示された。一方、ピクロトキシニンの親和性は、チャネルの活性化により高くなった (Dillon et al., 1995)。この現象は、活性化に伴うチャネルの構造変化により、ピクロトキシニンの親和性が高くなったためと考えられる。フィプロニルにおいては、活性化に伴うチャネルの構造変化により親和性は変化しなかったことから、フィプロニルのチャネル活性化と結合部位に対する親和性の関係は、ピクロトキシニンとは異なることが判明した。

アニサチンはピクロトキシニンと相互作用を示したことから、ピクロトキシニン結合部位に作用することが示された。しかし、アニサチンの場合、フィプロニルやピクロトキシニンとは異なり、前処理による抑制作用を示さなかった。このことは、アニサチンが作用を示すためにはチャンネルの活性化が必要であることを意味する。チャンネルの活性化とは、チャンネルの開口とそれに伴うチャンネルタンパク質の立体構造変化であることから、これらの過程がアニサチンの作用発現に重要であるといえる。他の化合物は静止状態のチャンネルに対しても作用を示したことから、アニサチンのみ閉チャンネルに作用しないと考えるよりはむしろ、チャンネルタンパク質の立体構造変化がアニサチンの結合部位に対する結合を促進すると解釈できる。つまり、チャンネル活性化に伴うチャンネルの立体構造変化により、アニサチンの結合部位に対する親和性が高くなったと考えられる。

前述したが、チャンネル活性化によりピクロトキシニンの親和性は高くなり (Dillon et al., 1995)、フィプロニルにおいては親和性は変化しなかった。従って、両化合物の、チャンネルの立体構造変化と親和性との関係はそれぞれ異なることが判明した。

これまでに、ピクロトキシニン結合部位に作用するといわれている化合物は多数報告されており、ディルドリン、フィプロニル、アニサチン等もこれら化合物の一つである。これら化合物は少なくとも 20 グループ程が報告されており、分子構造は大きく異なる例もある (尾添, 1996)。例えば、二環式オルト安息香酸エステル類 (EBOB) とディルドリンの間には、構造的に見て大きな隔たりがある。EBOB とディルドリン等のシクロジエン系殺虫剤の構造を融合させた化合物を合成し、3 次元定量的構造活性相関解析を行ったところ、両化合物は同一部位に結合するが、相互作用を示すアミノ酸残基が異なることが示唆され、分子構造上異なる化合物が同一部位に結合する可能性を示した (Akamatsu et al., 1997)。本研究で用いたフィプロニル、ディルドリン、アニサチン、およびピクロトキシニンは、分子構造は大きく異なるが同一部位に結合する可能性は高い。

3 章において、静止状態のチャンネルにおけるフィプロニルとピクロトキシニンの相互作用を検討した結果、両化合物は異なる部位に結合することが示された。この原因として、両化合物が異なる 2 カ所のピクロトキシニン結合部位にそれぞれ作用したためであると考えた。また、5 章でアニサチンとピクロトキシニンの相互作用を検討した結果、両化合物は同一部位に結合する可能性が示唆され、アニサチンとピクロトキシニンの競合結合部位はピクロトキシニンの深部結合部位であることが示唆された。また、フィプロニルの作用は、ピクロトキシニンの深部結合部位に対する作用と類似していたことから、結合部位はピクロトキシニンの深部結合部位である可能性が高い。キイロショウジョウバエのディルドリン低感受性 GABA レセプターにおける、アニサチンの作用を検討した研究は報告されていないが、ディルドリン低感受性 GABA レセプターはピクロトキシニンやフィプロニルに対しても低感受性を示すことから、アニサチンが同レセプターにおいてどのような作用を示すか興味深い。

本章の冒頭で触れたが、新規殺虫剤開発の意義として、従来の殺虫剤に対して抵抗性の発達した害虫の管理が挙げられる。抵抗性発達の生理・生化学的機構は様々で、薬剤の皮膚透過性の低下、代謝酵素の増大、さらに作用点における低感受性がある。イオンチャンネルを作用点とする殺虫剤の中にも、作用点における変化が抵抗性発達の原因となった例があり、ディルドリンに対する抵抗性機構はこの代表的な例とも言える。新規殺虫剤フィプロニルは、従来型の殺虫剤であるディルドリン抵抗性害虫に対しても殺虫効果を示す (Scott and Wen, 1997)。この様な新規殺虫剤の作用機構を明らかにし、殺虫剤を含め様々な化合物との作用機構と比較することは、抵抗性害虫に対しても有効な殺虫剤開発の基礎研究として位置づけられる。作用機構が未知であるアニサチン等の天然有毒成分について、イオンチャンネルレベルでそれらの作用機構を解明することは、新たな作用機構を持つ有用な化合物の探索にとって不可欠である。

これまでの殺虫剤の開発では、多数の化合物 (合成および天然化合物など) から、殺虫剤として可能性のあるものを探索するスクリーニング法が主流であり、このスクリーニング系で発見された生理活性化合物から、リード化合物を見い

だし、さらに化合物の体内動態などを考慮したリード最適化を行い開発候補品を見いだす。このリード化合物の最適化による最終候補品の選定段階においては、化合物の部分的な分子構造改変が主流であり、作用点であるタンパク側の構造情報を加味した手法の検討が必要と考えられる。

将来的な開発手段として、薬剤の活性を作用点レベルで予測する「創薬的開発」の試みが考えられている。近年飛躍的に進歩した、各種分析技術により、酵素やイオンチャネルなど多くの薬剤標的タンパク質の 3 次元構造が明らかになりつつある。そして、これら標的タンパク質と相互作用を示す化合物の立体構造の重ね合わせによるドラッグデザインが、可能であると考えられる (加藤, 2000)。現在このアプローチが困難な理由は、タンパク質と化合物との相互作用に関する知見が不十分なことで、化合物が結合したときに起こるタンパク質の立体構造変化が正確に評価される段階には達していないことがあげられる。一方、イオンチャネルの研究で用いられる電気生理学的手法のパッチクランプ法は、個々のイオンチャネルのイオン透過性動態を解析することにより、化合物と相互作用を有するチャネルの立体構造変化を知ることが可能である。今後、パッチクランプ法を中心とした電気生理学的研究と、タンパク工学的研究の統合により、作用点レベルでの新薬開発の可能性が広がっていくと予想される。本研究において取り上げた、チャネルと化合物との相互作用に関する機能面での研究は、チャネルの構造と機能の相関解明を通じて、新薬開発に貢献する基礎研究の一つとして位置づけられる。