

氏名(本籍)	いけ だ とも こ 池 田 朋 子 (東 京 都)		
学位の種類	博 士 (農 学)		
学位記番号	博 甲 第 2519 号		
学位授与年月日	平成 13 年 3 月 23 日		
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当		
審査研究科	農学研究科		
学位論文題目	GABA _A レセプターチャネル複合体に作用する数種化合物のイオン電流抑制機構		
主査	筑波大学教授	農学博士	河 野 義 明
副査	筑波大学教授	農学博士	柿 蔭 眞
副査	筑波大学助教授	農学博士	本 田 洋
副査	筑波大学教授	農学博士	臼 井 健 二
副査	理化学研究所研究員	農学博士	永 田 啓 一

論 文 の 内 容 の 要 旨

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、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。その作用点はいくつか知られているが、中でも神経系を作用点とする殺虫剤は、主要な位置を占めてきた。本研究で特に注目したGABA_Aレセプターチャネル複合体(GABA_Aレセプター)は神経系の抑制性シナプス伝達に関与するイオンチャネルであり、各種薬剤の作用点としても知られている。

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、1)新規殺虫剤であるフィプロニルの作用機構、2)フィプロニルと作用点を共有している可能性が示唆されているシクロジエン系殺虫剤ディルドリンの作用機構、3)植物由来の天然毒アニサチンの作用機構、をイオンチャ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。これらの化合物に関して、これまでに多く知見が得られているピクロトキシニンとの作用機構の比較、またピクロトキシニンとの相互作用についても検討し作用機構解明を試みた。イオン電流測定にはラットの抹消系神経細胞である dorsal root ganglion neuron (DRG ニューロン)を用い、ホールセルおよびシングルチャネルパッチクランプ法によりGABA誘導性のイオン電流を測定した。

フィプロニルの作用機構を検討した結果、フィプロニルはGABA誘導性イオン電流を可逆的に抑制し、静止状態のチャネル(GABA処理をしない状態で主にチャネルは閉じている)においても抑制作用を示した。静止状態のチャネルと活性化チャネル(GABA処理によりチャネルは開閉を繰り返している状態)におけるIC₅₀値は、互いに類似した値であったことから、チャネルの活性化はフィプロニルの結合部位に対する親和性には影響を与えないことが判明した。一方、フィプロニルの結合部位に対する結合と解離はチャネルの活性化により促進させることが示され、この結果は、過去に報告されたピクロトキシニンの作用性と類似していた。シングルチャネルイオン電流に対するフィプロニルの作用を検討した結果、フィプロニルはチャネルの開頻度を低下させることが判明した。さらにフィプロニルの結合部位を探索する実験として、静止状態のチャ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。しかし、過去にピクロトキシニンの結合部位はGABA_Aレセプター上に2カ所存在することが示唆され、一つはピクロトキシニンに対して高親和性結合部位で、もう一方は低親和性結合部位である。静止状態のチャネルにおいてフィプロニルと

ピクロトキシニンが異なる部位に結合する可能性が示された原因として、フィプロニルは高い親和性結合部位に作用し、ピクロトキシニンは低親和性結合部位に作用したためであると考察した。

次に、シングルチャンネルイオン電流に対するディルドリンとピクロトキシニンの作用を検討した結果、両化合物は閉時間を延長したことから、チャンネルの開頻度を低下させることが判明した。

シキミに含まれている有毒成分アニサチンの作用機構を検討した結果、アニサチンはGABA誘導性イオン電流を抑制し、アニサチンが抑制作用を示すにはチャンネルの活性化が必要であった。シングルチャンネルイオン電流を解析した結果、アニサチンはチャンネルの閉時間を延長させたことから、チャンネルの開頻度を減少させることが明らかとなった。さらに、活性化チャンネルにおけるアニサチンとピクロトキシニンの間の相互作用を2つのモデルを用いて検討した結果、ピクロトキシニンが低濃度のとき、アニサチンはピクロトキシニンとは異なる部位に作用し、高濃度のときは同一部位に作用することが示された。ピクロトキシニンが低濃度のときと高濃度のときで、両化合物の相互作用が異なった原因として、アニサチンはピクロトキシニン高親和性結合部位に作用するが、ピクロトキシニンは低濃度の時は低親和性結合部位に作用し、高濃度の時は高親和性結合部位に作用するためであると考えられる。これらのことから、アニサチンとピクロトキシニンはピクロトキシニン高親和性結合部位で互いに競合することが示唆された。

以上、本研究の結果から、フィプロニル、ディルドリン、ピクロトキシニン、およびアニサチンはチャンネルの開頻度を低下させることによりイオン電流を抑制することが判明し、チャンネルを閉じた状態で安定化させるという共通した作用機構を持つことが明らかとなった。また結合部井に関しては、アニサチンはピクロトキシニンの高親和性結合部位に作用することが示唆され、フィプロニルに関してはその抑制機構がピクロトキシニンの高親和性結合部位に対するものと極めて類似していたことから、同部位に結合する可能性が示唆された。

審 査 の 結 果 の 要 旨

本研究の目的はGABA作動性神経に作用すると言われている新規フェニルピラゾール系殺虫剤フィプロニル及びシキミの有毒成分アニサチンの作用機構の詳細を電気生理学的に解明することである。これまで、昆虫のGABA作動性神経に作用する殺虫剤としてシクロジエン系化合物やBHCが知られ、また、GABA_Aレセプターチャンネル複合体（GABAレセプター）に抑制的に作用する標準的薬剤としてピクロトキシニンが存在することから、このような化合物との比較をしながら研究が進められている。最近、これらの化合物の作用点、すなわち、GABAレセプターにおける作用については電気生理学的、分子生物学的、物理化学的アプローチによる研究が行われている。その中心課題はそれぞれの化合物がGABAレセプターのどの位置に結合してどのような作用を発現するかである。この研究で用いられたパッチクランプ法は単一細胞または単一レセプターを対象として、膜内外の電位を固定してGABAによって起きる電流に対する化合物の影響を測定し、解析する方法である。そのため、高度の技術熟練を要する手法であり、この方法での上記薬剤の研究例は殆どない。

アニサチンはチャンネルが活性化した状態にのみ作用するのに比べ、フィプロニルはチャンネルの活性、不活性に関係なく作用し、また、フィプロニルはピクロトキシニンと競合せずに作用することが明らかとなり、GABAレセプターに作用する殺虫剤の作用部位に関する知見を整理して理解することができた。また、これらの薬剤の一時的作用が、チャンネルの開頻度を低下させることにあることも明らかになった。このようにGABA作動性神経に作用する殺虫剤の作用機構を単一レセプターレベルで解明にした点が評価される。

よって、著者は博士（農学）の学位を受けるに十分な資格を有するものと認める。