

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 5 月 21 日現在

機関番号：34419

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K21507

研究課題名(和文) ネオニコチノイドの毒性発現を制御するニコチン性アセチルコリン受容体の構造因子探索

研究課題名(英文) Elucidation of the molecular determinants of neonicotinoid toxicity

研究代表者

伊原 誠 (IHARA, Makoto)

近畿大学・農学部・准教授

研究者番号：30466031

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：ネオニコチノイド系殺虫剤は、世界中で広く使用されている農業・園芸用殺虫剤であり、近年その毒性に注目が集まっている。本研究では、ネオニコチノイドの毒性発現を制御するニコチン性アセチルコリン受容体(nAChR)の構造因子を探索するために、nAChRのモデルタンパク質、アセチルコリン結合タンパク質を用いたX線結晶構造解析およびホモロジーモデリング法を用いて、ネオニコチノイドとnAChRの相互作用に重要な構造因子を探索した。その結果、昆虫のnAChR α サブユニット上に存在する、Loop領域のうちD、G、E領域のアミノ酸残基がネオニコチノイドとの相互作用に有利な構造を形成することを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Neonicotinoids are widely used for crop protection and veterinary use worldwide. Recently the adverse effects of neonicotinoids have been focused, and some of them were banned from EU. In order to elucidate the molecular mechanism of such adverse effects of neonicotinoids, X-ray crystallography of acetylcholine binding protein, a surrogate protein of ligand binding domain of nicotinic acetylcholine receptors, has been employed and the X-ray crystal structures of AChBP-neonicotinoids complexes were solved. Using those structures, homology models were built and evaluated their interactions. These results suggested that LOOPs D, E and G cooperatively form neonicotinoid-favored environment in insect nAChRs. Physiological evaluation confirmed that even single mutation at the Loop D, E and G strikingly weakened the neonicotinoid actions on insect nAChRs. These results suggest the adverse effects of neonicotinoids might be controlled through structure guided approaches.

研究分野：農薬科学

キーワード：ネオニコチノイド 殺虫剤 ニコチン性アセチルコリン受容体 アセチルコリン結合タンパク質 イミダクロプリド チアクロプリド nAChR

1. 研究開始当初の背景

合成殺虫剤ネオニコチノイドは、昆虫のニコチン性アセチルコリン受容体(nAChR)を分子標的とする。ネオニコチノイドが標的とする nAChR は、「虫」だけでなく「ヒト」や「魚」「鳥」を初めとする脊椎動物に普遍的に存在する神経伝達物質受容体であるにもかかわらず、ネオニコチノイドは脊椎動物にはほとんど毒性を示さずに優れた殺虫効果を示すため、現在では有機リン剤・ピレスロイド等の合成農薬とともに、世界中で最も多く使用されてきた。2000 年代初頭から、ネオニコチノイドの選択毒性が生じる仕組みとして、無脊椎動物と脊椎動物間の nAChR の一次構造の違い、ホモロジーモデル解析、各種生化学・生理学実験によってネオニコチノイド-nAChR 間相互作用の違いが要因であると指摘されてきた。

筆者らは、この指摘を踏まえて、昆虫の nAChR に共通してみられる塩基性アミノ酸残基を導入したモデルタンパク質(アセチルコリン結合タンパク質)を作成し結晶構造解析を行い、すでに提唱されていた塩基性アミノ酸残基に加えて、これまで注目されることのなかった LoopG 領域に存在する塩基性アミノ酸残基を新奇構造因子として見出しその重要性を提起したが(図 1)、これは古典的な nAChR リガンド結合モデルでは合理的に説明することができなかった。

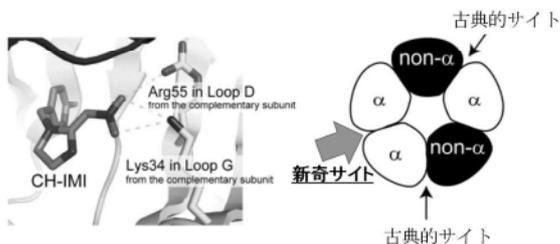


図 1. Neonicotinoid 結合部位の結晶構造(左)と nAChR の模式図(右); 幅広い nAChR 結晶構造(左)から存在が示唆された、新規ネオニコチノイド結合サイト

2. 研究の目的

このような背景を踏まえて、昆虫のニコチン性アセチルコリン受容体において、図 1 で示した様なネオニコチノイド結合部位が α サブユニット間境界に存在するのかどうか、そして昆虫の nAChR において当該サイトがネオニコチノイド感受性に関与しているのかどうかを明らかにすることを目的に、モデルタンパク質であるアセチルコリン結合タンパク質を用いた結晶構造解析とアフリカツメガエルの卵母細胞に発現させた nAChR に対するネオニコチノイドの相互作用解析に基づいた関連研究を実施した。

3. 研究の方法

(1) アセチルコリン結合タンパク質(AChBP)とリガンド複合体の結晶化と X 線結晶構造解析:

ニコチン性アセチルコリン受容体(nAChR)のリガンド結合ドメインのモデルタンパク質である AChBP はメタノール資化性酵母 *Pichia pastoris* を用いて分泌タンパク質として培養中の培地中に分泌させ、イオン交換カラムクロマトグラフィーとゲルろ過カラムクロマトグラフィーによって高度に精製した。この過程において、EndoH を用いて脱糖鎖処理した。

リガンドと AChBP 共結晶化は sitting drop 法を用いて、PEG とクエン酸塩を主成分とする結晶化剤存在下 0.5-1mM のリガンドと 0.2-0.3 mM の AChBP を 20°C で 1-3 週間インキュベートすることで行った。

(2) アフリカツメガエルの卵母細胞に発現させた nAChR を用いた電気生理学的解析:

解析に用いた nAChR は、アフリカツメガエルの卵母細胞に目的の受容体を構成する nAChR サブユニットをコードする cRNA をマイクロインジェクションすることで機能発現させた。この際に、図 1(右パネル)に示す様に α サブユニットが過剰に含まれる受容体を構成させるためには、インジェクションする cRNA の α サブユニット/non- α サブユニット比を 5 とし、逆に α - α サブユニットが隣り合わない様に受容体を構成させるためには、 α サブユニット/non- α サブユニット比を 1/5 とした。このようにして調製した nAChR に対するネオニコチノイドの作用は電気生理学的研究手法の一つ、二電極膜電位固定法によって測定した。

(3) ホモロジーモデリング:

AChBP と nAChR リガンド複合体の X 線結晶構造解析の結果を、昆虫の nAChR に拡張するためには、Modeller および Gromacs によるホモロジーモデリングおよび分子動力学計算を行った。

4. 研究成果

(1) アセチルコリン結合タンパク質(AChBP)とニコチン性アセチルコリン受容体(nAChR)標的の X 線結晶構造解析:

4 種のネオニコチノイドおよび関連化合物と nAChR のサロゲートタンパク質であるアセチルコリン結合タンパク質(AChBP)との共結晶を作成し X 線結晶構造解析を行った。野生型と昆虫の nAChR を模倣する変位を導入した変異型 AChBP を用いたところ、全ての組み合わせで棒状の結晶を得ることに成功した。

それらは BL26B1 を用いて X 線回折実験を行い、2.0-2.6Å 分解能で回折データを収集し、分子置換法および硫黄原子の短波長異常散乱法により位相を決定した。硫黄原子の異常散乱データは、ダイレクトディテクターを用い、ファインスライス法により 1.75Å の X 線波長で回折実験を行うことで精度よく取得することができた。

位相決定、構造精密化を行ったところ予想されたリガンド結合ポケットにリガンドが結合していることが示唆される電子密度を確認することができたが、分解能による制限からリガンド結合状態を一義的に決定することは困難であった。そこで、位相決定を目的に取得した異常散乱データを用いて、異常散乱差フーリエマップを計算し、リガンド中の硫黄原子の位置を決定することで(図2)、最終的には良好な FreeR で構造の精密化を行うことができた。



図2. 硫黄原子からの異常散乱データを用いて計算した硫黄原子の異常散乱差フーリエマップ。(紫) 2Fo-Fc マップ。(白)異常散乱差フーリエマップ: 図左下の白色マップがリガンドの硫黄原子; その他の白色マップはメチオンおよびシステイン残基上の硫黄原子

(2) アフリカツメガエルの卵母細胞に発現させた nAChR を用いた電気生理学的解析に基づく構造-機能相関 :

ショウジョウバエの nAChR Da1 サブユニットとヒヨコ $\beta 2$ サブユニットからなるハイブリッド nAChR をアフリカツメガエルの卵母細胞に発現させ、アセチルコリンおよびネオニコチノイドの作用を測定した。この際に、図1に示す様な新奇サイトがネオニコチノイドの相互作用に関わっているかどうかを明らかにするために、 α サブユニット過剰型の nAChR と β サブユニット過剰型の nAChR を機能発現させ、さらにホモロジーモデリング・分子動力学計算によって Loop G 領域の塩基性アミノ酸残基と静電的に相互作用していることが示された、Loop D および Loop E 領域のアミノ酸残基を、脊椎動物で保存されているアミノ酸残基に置換したショウジョウバエ Da1 サブユニットを作成し、ネオニコチノイドの作用を評価した。

その結果、図3に示す Lys140, Glu78, Arg57 を脊椎動物型アミノ酸への置換はネオニコチノイドの作用を選択的に低下させたことから、Loop D のグルタミン酸残基を中心に Loop E および Loop G のリジン、アルギニンが静電的に引き寄せられた環境 (Loop D-E-G トライアングル構造) が、ネオニコチノイド

が相互作用するために必要な環境を形成していると強く示唆された。

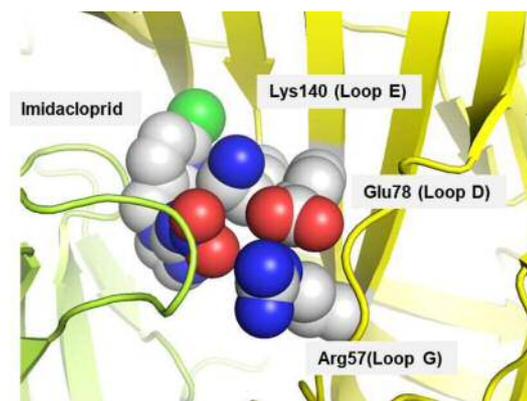


図3. ネオニコチノイドとの相互作用に重要な Da1 サブユニットの Loop D-E-G 上のアミノ酸残基相互作用

本研究成果は、ネオニコチノイドの選択毒性の分子機構に新たな知見を投じただけでなく、nAChR を標的とする新たな薬剤を分子設計する際の基盤情報としての側面をもつと考えられる。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 3 件)

- ① Hikida, M., Shimada, S., Kurata, R., Shigetou, S., Ihara, M., Sattelle, D. B., and Matsuda, K. (2018) Combined effects of mutations in loop C and the loop D-E-G triangle on neonicotinoid interactions with *Drosophila* Da1 /chicken $\beta 2$ hybrid nAChRs. *Pesticide Biochemistry and Physiology*
DOI: 10.1016/j.pestbp.2018.03.008
印刷中：査読あり
- ② Ihara, M., Hikida, M., Matsushita, H., Yamanaka, K., Kishimoto, Y., Kubo, K., Watanabe, S., Sakamoto, M., Matsui, K., Yamaguchi, A., Okuhara, D., Furutani, S., Sattelle, D. B., and Matsuda, K. (2017) Loops D, E and G in the *Drosophila* Da1 subunit contribute to high neonicotinoid sensitivity of Da1 -chicken $\beta 2$ nicotinic acetylcholine receptor. *Br J Pharmacol*
DOI: 10.1111/bph.13914
印刷中：査読あり
- ③ Ihara, M., Buckingham, S. D., Matsuda, K., and Sattelle, D. B. (2017) Modes of Action, Resistance and Toxicity of Insecticides Targeting Nicotinic Acetylcholine Receptors. *Curr Med Chem* 24, 2925-2934
DOI: 10.2174/0929867324666170206142019
査読あり

[学会発表] (計 5 件)

- ① 疋田 麻衣: ショウジョウバエニコチン性アセチルコリン受容体 $D\alpha 1$ サブユニットの YXCC モチーフ構造とネオニコチノイド感受性, 日本農芸化学会 2018 年度大会(2018)
- ② 疋田 麻衣: 昆虫-脊椎動物ハイブリッド型ニコチン性アセチルコリン受容体に対するネオニコチノイドのアゴニスト活性に対する loop D-E-G トライアングルと loop C の寄与, 日本農芸化学会関西支部大会(2017)
- ③ 伊原 誠: 殺線虫活性を示す糸状菌代謝物パラヘルクアミドの活性発現機構の構造生物学的理解, 日本農芸化学会関西支部大会(2017)
- ④ 伊原 誠: *C. elegans* の筋肉型および神経型ニコチン性アセチルコリン受容体に対する Paraherquamide A の阻害活性発現機構, 日本農芸化学会 2017 年度大会(2017)
- ⑤ 疋田 麻衣: ショウジョウバエ $D\alpha 1$ -ヒヨコ $\beta 2$ ニコチン性アセチルコリン受容体のネオニコチノイド感受性に対する $D\alpha 1$ サブユニットの 3 loop の寄与, 日本農芸化学会 2017 年度大会(2017)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

伊原 誠(IHARA, Makoto)
近畿大学・農学部・准教授
研究者番号: 30466031

(2) 研究協力者

疋田 麻衣(HIKIDA, Mai)
福田 芳恵(YUKUTA, Yoshie)