

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年4月1日現在

機関番号：34419

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2009～2011

課題番号：21310147

研究課題名（和文） マクロライド系リガンドによる持続的な抑制性グルタミン酸受容体  
活性化現象の構造基盤研究課題名（英文） Molecular mechanism of persisting activation of glutamate-gated  
chloride channels by macrolide compounds

研究代表者

松田 一彦（MATSUDA KAZUHIKO）

近畿大学・農学部・教授

研究者番号：00199796

研究成果の概要（和文）：イベルメクチン（IVM）やミルベマイシン（MLM）等のマクロライド系化合物による抑制性グルタミン酸受容体（GluCl）の活性化機構解明するため、化合物の結合部位の解明に有用な光反応性試薬を開発した。また、カイコ GluCl の結晶化に必須の大量発現方法を確立した。さらに捻転胃虫 GluCl に対する MLM-A<sub>4</sub> の活性発現に重要なアミノ酸を同定し、本化合物の結合部位が2か所存在する可能性を見出した。

研究成果の概要（英文）：This study was aimed at elucidating the mechanism of action of macrolide compounds ivermectin (IVM) and milbemycin (MLM) on glutamate gated chloride ion channels (GluCl). Several photoaffinity probes were synthesized and confirmed to be capable of inhibiting [<sup>3</sup>H]MLM-A<sub>4</sub> binding to nematode and insect GluCl at nano molar concentrations. Meanwhile, silkworm GluCl (BmGluCl) structural features that influence the receptor amount were identified and a method to overexpress them in Sf9 cells was established. Further, some amino acids critical for the actions of MLM-A<sub>4</sub> on a nematode GluCl were identified and two possible MLM-A<sub>4</sub> binding sites in the receptor were proposed.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	6,300,000	1,890,000	8,190,000
2010年度	4,300,000	1,290,000	5,590,000
2011年度	3,500,000	1,050,000	4,550,000
総計	14,100,000	4,230,000	18,330,000

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：生物分子科学

キーワード：マクロライド、イベルメクチン、ミルベマイシン、抑制性グルタミン酸受容体、光親和性プローブ、大量発現、バインディングアッセイ、パッチクランプ

## 1. 研究開始当初の背景

マクロライド骨格をもつアベルメクチン（AVM）とその類縁体イベルメクチン（IVM）およびミルベマイシン（MLM）は優れた駆虫および殺虫活性を発揮し、天然制御剤として世界中で実用されている。これらのマクロライド

系化合物は、リガンド作動性イオンチャネルに属する抑制性グルタミン酸受容体（GluCl）を選択的かつ持続的に活性化することで、対象生物の抑制性神経伝達を過度に促進し、致死を引き起こす。GluCl は線虫や昆虫などの無脊椎動物に特有であることから、本マクロ

ライド系化合物はヒトに対する安全性に優れている。こうしたAVMやIVMのGluCl作用機構については良く知られているが、これらの化合物がGluClのどこに結合するのか、またその結合によってなぜGluClが持続的に活性化されるのか、理解されていなかった。そのため、マクロライド系化合物の構造最適化や、さらに受容体の構造基盤に基づいた大胆な新規GluCl作用性駆虫剤や殺虫剤の設計・開発ができないのが現状であった。こうした背景をもとに本研究を企画するに至った。

## 2. 研究の目的

本研究では、昆虫および線虫のGluClに対するマクロライド系化合物の持続的活性化作用の謎を、多岐にわたるアプローチによって解き明かすことを目標に定めた。すなわち、

- (1) IVMの光反応性誘導体を創製する一方、
- (2) 単独のサブユニットで発現可能な昆虫GluClの大量発現条件を確立し、光親和性標識実験や結晶化への道筋をつける。また、(3) 部位特異的変異実験によってマクロライド系化合物の活性化作用に重要な役割を果たすアミノ酸を同定するとともに、
- (4) GluCl-IVM複合体のX線結晶構造の決定あるいはそのモデリングによって、マクロライド系化合物によるGluClの活性化機構の構造基盤を解明することを目的とした。

## 3. 研究の方法

### (1) 光親和性プローブの合成と活性

光反応性のIVMを以下のルートで合成した。すなわち、IVMの糖鎖を酸加水分解によって除き、次いで一定の長さのメチレン側鎖を挟んで、光反応性のアジドあるいはトリフルオロメチルジアジリン基をもつ芳香環を結合させることを計画した(図1)。

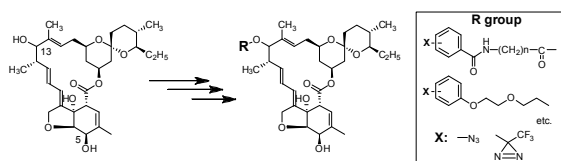


図1 光反応性プローブの合成計画

GluClに対する光親和性プローブの活性は、binding assayにより評価した。すなわち、捻転胃虫由来のGluCl(HcGluCl $\alpha$ 3B)およびカイコ由来のGluCl(BmGluCl)のexon 3cアイソフォームをCOS-1細胞に発現させ、それぞれの受容体への<sup>3</sup>H IVMの特異的結合を50%阻害する化合物の半数阻害活性IC<sub>50</sub>を求めた。

(2) 結晶化と光親和性標識に向けてのGluClの大量発現

(2)-① カイコGluCl(BmGluCl)の発現量を規定する構造因子の解明

カイコP-50系統の終令幼虫の脳と胸部第3神経節を摘出し、RNAを抽出した。これをもとにGeneRacerキット(Life Technologies)を用いて5'および3'末端の遺伝子配列を確定し、全長の遺伝子配列をPCRで増幅した後、pcDNA3.1(+ )ベクターにクローニングした。得られたcDNAクローンの中からランダムに50個選抜し、その塩基配列を決定した。次いで、そのcDNAを鋳型としてcRNAを*in vitro*で合成し、アフリカツメガエル卵母細胞にマイクロインジェクションすることによって、BmGluClのアイソフォームを機能的に発現させた。BmGluClのIVMに対する活性化により誘起される塩素イオン電流は、二極膜電位固定法によって電気生理学的に測定した。

### (2)-② 昆虫細胞でのBmGluClの大量発現

BmGluClの大量発現条件の検討には、細胞として昆虫細胞Sf9細胞を、ベクターとしてpIB/V5-Hisベクターを用いた。BmGluClのcDNAをGatewayシステムによってpIB/V5-Hisベクターにクローニングし、Hisタグの抗体検出によって受容体の発現を確認した。

(3) マクロライド系化合物との相互作用に寄与するGluClのアミノ酸の同定

捻転胃虫*H. contortus*のHco-AVR-14B受容体に焦点を絞り、これをCOS-1細胞に発現させた。そして野生型と任意のアミノ酸置換(変異と以後記す)を有するHco-AVR-14B GluClに対する<sup>3</sup>H MLM-A<sub>4</sub>特異的結合を測定するとともに、MLM-A<sub>4</sub>による塩素チャネルの活性化をホールセルパッチクランプ法によって電気生理学的に測定した。

### (4) GluCl-MLM-A<sub>4</sub>複合体のモデリング

Hco-AVR-14B受容体とMLM-A<sub>4</sub>とがつくる複合体モデルはモデリングソフトMOEを用いて構築した。すなわち、リガンド作動性イオンチャネルの結晶構造データベースをもとに本受容体をモデルし、MLM-A<sub>4</sub>をドッキングさせた。候補モデルのうち最もエネルギーが低いものを選抜し、MMFF94xによって構造最適化した。

## 4. 研究成果

### (1) 光親和性プローブの合成と活性評価

光反応性官能基としてアジド基をもつIVM誘導体を数種合成した(図2)。合成した化合物はnMオーダーという低濃度でHco-AVR-14B GluClおよびBmGluCl(exon 3cアイソフォーム)に対する<sup>3</sup>H IVMの特異的結合を阻害した。このことから、本研究で合成した光親和性プローブ類は、GluClの標識実験に使用可能であると考えられた。

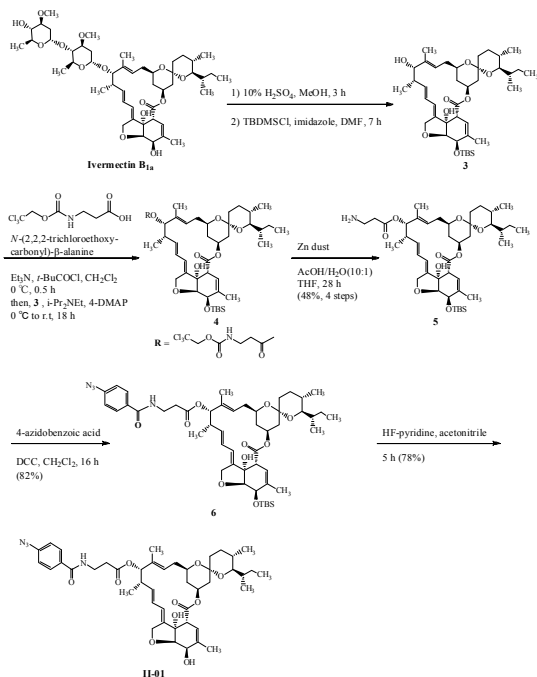


図2 光反応性プローブの合成

(2) 結晶化と光親和性標識に向けての GluCl の大量発現

(2)-① カイコ GluCl (BmGluCl) の発現量を規定する構造因子の解明

BmGluCl の cDNA をクローニングし、シーケンシングした結果、遺伝子は計 11 個の exon からなり、exon 3 での選択的スプライシングによって a、b、c および欠損タイプの計 4 種のアイソフォームが、exon 9 での欠損によって完全タイプと欠損タイプの計 2 種のアイソフォームが生じることが明らかとなった。さらに遺伝子 3' 末端での選択的スプライシングによって数種のアイソフォームが生じることも見出した。

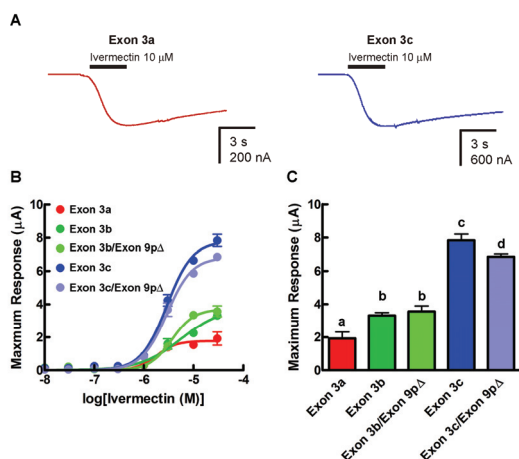


図3 BmGluCl アイソフォームに対する IVM の活性化作用の比較

アフリカツメガエル卵母細胞で発現させた GluCl アイソフォームの IVM に対する応答を測定した結果、アイソフォーム間の構造の違いは、リガンドに対する感受性ではなく細胞での発現量に影響し、exon 3c タイプのアイソフォームが最も多量に発現することが明らかとなった (図3)。

(2)-② 昆虫細胞での BmGluCl の大量発現

(2)-① で得られた成果をもとに、BmGluCl のアイソフォームのうち 3c タイプを選抜し、pIB/V5-His ベクターを用いて Sf9 細胞で発現させた。種々発現条件について検討した結果、血清を含有する培地で培養したとき、受容体は膜画分で、かつ SDS-PAGE で明確に認識可能なレベルで発現可能であることが明らかとなった。

(3) マクロライド系化合物との相互作用に寄与する GluCl のアミノ酸の同定

IVM に抵抗性を示す線虫、昆虫、ハダニで見出された GluCl のアミノ酸変異を参考にして捻転胃虫の Hco-AVR-14B 受容体に相同の変異を導入した。そして野生型および当該変異をもつ Hco-AVR-14B 受容体に対する  $[^3\text{H}]$ MLM-A<sub>4</sub> の結合親和性および MLM-A<sub>4</sub> による塩素イオン電流誘起活性を測定した結果、Leu256、Pro316 および Gly329 の変異により  $[^3\text{H}]$ MLM-A<sub>4</sub> の親和性が顕著に低下し (図4)、L256F および P316S 変異によって MLM-A<sub>4</sub> の塩素イオン電流誘起活性がそれぞれ 37 倍および 100 倍低下した (図5)。

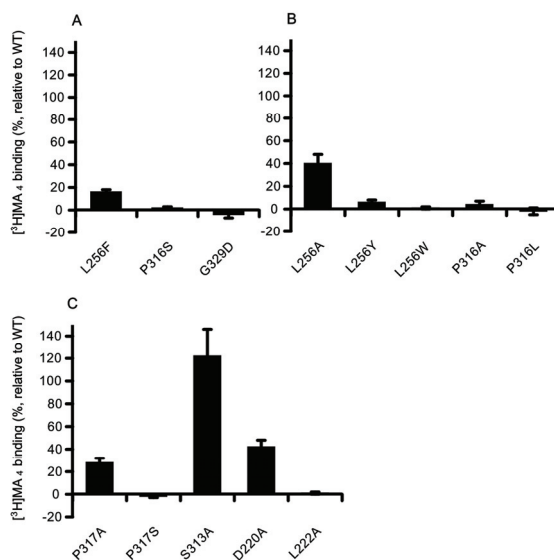


図4 Hco-AVR-14B 受容体のアミノ酸変異により生じる  $[^3\text{H}]$ MLM-A<sub>4</sub> の結合活性の変動

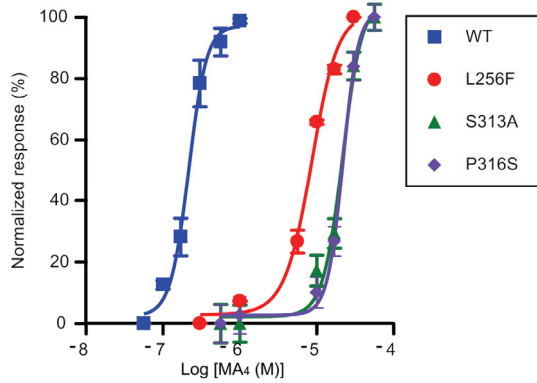


図5 Hco-AVR-14B 受容体のアミノ酸変異により生じる MLM-A<sub>4</sub> のイオンチャネル活性化作用の変動

以上の結果から、Leu256 が存在する N 末端の  $\beta$ 10 鎖、Pro316 が存在する第2 膜貫通領域と第3 膜貫通領域とを結ぶリンカーおよび Gly329 が存在する第3 膜貫通領域が Hco-AVR-14B 受容体とマクロライド系化合物との相互作用において重要な役割を果たしていることが判明した。

#### (4) GluCl-マクロライド複合体のモデリング

研究項目 (3) で得られた成果を参考にして Hco-AVR-14B 受容体と MLM-A<sub>4</sub> とがつくる複合体モデルを構築した。その結果、一つの結合部位として細胞外ドメインと膜貫通領域の境目 (E site) に結合する可能性が認められた。E site は細胞の  $\beta$ 1- $\beta$ 2、cys および  $\beta$ 8- $\beta$ 9 loop と第2 および第3 膜貫通領域を結ぶリンカーに囲まれている。これらの loop は、GluCl が属するリガンド作動性イオンチャネルに共通の、アゴニスト結合からチャネル開口への共役に寄与すると言われている (図6)。

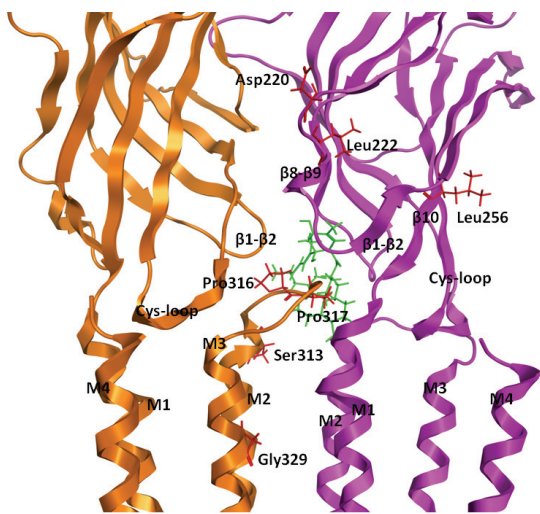


図6 Hco-AVR-14B 受容体と MLM-A<sub>4</sub> がつくる複合体モデル (E site での結合)

E site 結合タイプのモデルが正しければ、 $\beta$ 8- $\beta$ 9 loop に存在する Asp220 や Leu222 のアミノ酸置換も Hco-AVR-14B 受容体に対する MLM-A<sub>4</sub> の活性に影響するはずである。実際、D220A 変異や L222A 変異は Hco-AVR-14B 受容体に対する [<sup>3</sup>H]MLM-A<sub>4</sub> の結合を顕著に低下させたことから、E site に対して MLM が相互作用する可能性が支持された。

しかしドッキングシミュレーションは、Hco-AVR-14B 受容体の膜貫通領域 (M site) に対する MLM-A<sub>4</sub> の結合の可能性も示した (図7)。このモデルは P316A および P317A による [<sup>3</sup>H]MLM-A<sub>4</sub> 結合活性の低下のみならず、G329D 変異による [<sup>3</sup>H]MLM-A<sub>4</sub> 結合活性の低下も説明可能である。膜貫通領域との相互作用は、持続的なイオンチャネルの開閉現象と矛盾しない。今後、GluCl-MLM-A<sub>4</sub> 複合体の結晶構造を解明することで、E site と M site のいずれに MLM が選択的に結合するのか、あるいはモデルによる予測通り、どちらの部位にも結合するのか、検討する必要がある。

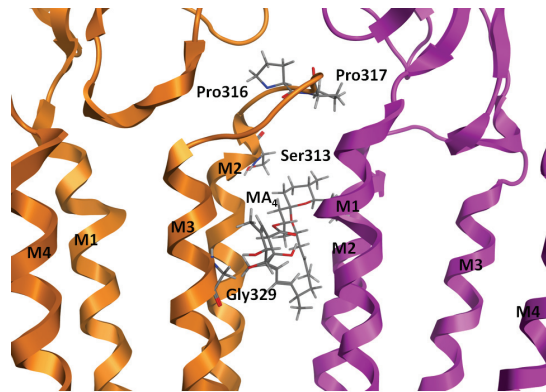


図6 Hco-AVR-14B 受容体と MLM-A<sub>4</sub> がつくる複合体モデル (M site での結合)

#### 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1件)

山口真央、澤嘉弘、松田一彦、尾添富美代、尾添嘉久、Amino acid residues of both the extracellular and transmembrane domains influence binding of the antiparasitic agent milbemycin A<sub>4</sub> to *Haemonchus contortus* AVR-14B glutamate-gated chloride channels、Biochemical Biophysical Research Communications、査読有、Vol.419、2012、562-566、DOI: 10.1016/j.bbrc.2012.02.062.

〔学会発表〕(計 12 件)

- ① 古谷章悟、山口武則、神橋貴彦、赤松美紀、入江貴裕、尾添嘉久、松田一彦、細胞膜での抑制性グルタミン酸受容体の発現量に影響する因子、日本農芸化学会 2012 年度大会、2012 年 3 月 23 日、京都
- ② 古谷章悟、山口武則、神橋貴彦、入江貴裕、尾添嘉久、松田一彦、カイク抑制性グルタミン酸受容体:多様なアイソフォーム間の特性比較、日本農薬学会第 37 回大会、2012 年 3 月 15 日、岡山
- ③ 古谷章悟、山口武則、神橋貴彦、入江貴裕、尾添嘉久、松田一彦、一遺伝子から生じるカイク抑制性グルタミン酸受容体の構造と薬理学特性の多様性、日本農芸化学会 2011 年度関西・中部支部合同大会、2011 年 10 月 2 日、京都
- ④ 古谷章悟、山口武則、尾添嘉久、松本由記子、野田弘昭、松田一彦、カイク抑制性グルタミン酸受容体のバリエーションと GABA 受容体の発現調節、日本農芸化学会 2011 年度大会、京都(東日本大震災のため開催中止)
- ⑤ 佐々木健介、山口真央、尾添富美代、松田一彦、尾添嘉久、グルタミン酸作動性 Cl<sup>-</sup>チャンネルにおけるマクロライド系内部寄生線虫防除剤の結合部位の解析、日本農芸化学会 2011 年度大会、京都(東日本大震災のため開催中止)
- ⑥ 布施利紀、池田泉、松田一彦、尾添嘉久、光親和性イベルメクチン誘導体の合成とグルタミン酸作動性クロロイオンチャンネルにおける親和性、日本農芸化学会 2011 年度大会、京都(東日本大震災のため開催中止)
- ⑦ 古谷章悟、赤松美紀、松田一彦、Structural factors of insect glutamate-gated chloride channels influencing the channel activating action of ivermectin、12<sup>th</sup> International Congress of Pesticide Chemistry、2010 年 7 月 5 日、オーストラリア・メルボルン
- ⑧ 池田泉、布施利紀、松田一彦、尾添嘉久、光親和性イベルメクチン誘導体の合成と抑制性グルタミン酸受容体に対する結合活性、日本農薬学会第 35 回大会、2010 年 5 月 29 日、札幌
- ⑨ 喜多知、尾添富美代、東政明、尾添嘉久、イエバエのグルタミン酸作動性クロロイオンチャンネルの遺伝子および免疫組織化学的解析、日本農薬学会第 35 回大会、2010 年 5 月 29 日、札幌
- ⑩ 山口真央、尾添富美代、澤嘉弘、尾添嘉久、グルタミン酸開口型クロライドチャンネルにおけるミルベマイシン結合部位の同定、日本農薬学会第 35 回大会、2010 年 5 月 29 日、札幌

- ⑪ 古谷章悟、赤松美紀、松田一彦、抑制性グルタミン酸受容体の構造多様性とイベルメクチン感受性、日本農薬学会第 35 回大会、2010 年 5 月 29 日、札幌
- ⑫ 古谷章悟、山浦圭、松田一彦、イベルメクチンの活性発現に対する抑制性グルタミン酸受容体のスプライスバリエーションの影響、日本農芸化学会 2010 年度大会、2010 年 3 月 28 日、東京

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

松田 一彦 (MATSUDA KAZUHIKO)  
近畿大学・農学部・教授  
研究者番号：00199796

### (2) 研究分担者

尾添 嘉久 (OZOE YOSHIHISA)  
島根大学・生物資源科学部・教授  
研究者番号：80112118

### (3) 研究分担者

岡島 俊英 (OKAJIMA TOSHIHIDE)  
大阪大学・産業科学研究所・准教授  
研究者番号：10247968

### (4) 連携研究者

山下 敦子 (YAMASHITA ATSUKO)  
独立行政法人理化学研究所・播磨研究所・  
分子シグナリング研究チーム・チームリー  
ダー  
研究者番号：10321738