



昆虫の神経イオンチャンネルと除虫菊によるピレスリン合成の 制御に関する化学生物学的研究

近畿大学農学部 松田 一彦

はじめに

昆虫は人類の誕生以前から地球上で生き続けてきた生物であり、その存在自体には全く罪がない。しかし、一部の昆虫は農業による持続的な食料供給を脅かし、人類と対峙している。また、蚊をはじめとする吸血昆虫は感染症をもたらし、人命を奪い続けている。このような昆虫の脅威を環境に対する影響を最小限に抑制しながら選択的に制御することは、人類にとって最も重要な課題の一つである。この課題を達成すべく、除虫菊が生産する神経活性物質ピレスリンの生合成とその制御機構、微生物が生産する殺虫活性物質の生合成と標的受容体の解明、および合成殺虫剤の選択毒性の分子機構と標的受容体再構築技術について「化学」と「生物」の境界領域で研究してきた。

1. 除虫菊が生産する神経活性物質ピレスリンの生合成酵素の解明と揮発性シグナルによる調節

昆虫制御の分子機構を植物から学ぶため、除虫菊が生産する天然殺虫剤ピレスリンの生合成とその調節について研究した。ピレスリンは膜電位依存性ナトリウムチャンネルを開いた状態に拘束し昆虫の神経伝達機構を攪乱する。ピレスリンをもとに開発された合成ピレスロイドは広く害虫防除に使用され、構造活性相関、作用機構、安全性を中心に詳しく研究された。一方、ピレスリンについては古くから知られていたにもかかわらず、化学構造や合成法を除いて、ほとんど研究されていなかった。除虫菊は自身を昆虫の攻撃から守るためピレスリンをつくる。その機構を解明することにより昆虫制御の原理に到達できると考え、ピレスリンの生合成とその制御機構の研究に着手した。

ピレスリンは2種の酸部（第一菊酸および第二菊酸）と3種のアルコール部（ピレスロロン、シネロロン、ジャスモロン）がエステル化されることでつくり、子房と葉に蓄積される。標識実験により、第一菊酸は非メバロン酸経路（MEP経路）で生合成され、ピレスロロンはオキシリピン経路で生合成されることが明らかとなった（図1）。その後の研究で、ピレスリンのアルコール部と植物ホルモンであるジャスモン酸は α -リノレン酸から12-オキソ-フィトジエン酸まで同じ経路で構築され、それ以降は異なる経路で生合成されることが解明された。

ピレスリンのアルコール部とジャスモン酸の生合成に共通する上流からは、「緑の香り」と総称される短鎖アルデヒド・アルコール類が α -リノレン酸の過酸化化物から生成する（図1）。武居三吉と畑中顯和により緑茶の香気成分として発見された緑の香りはGreen Leaf Volatilesと呼ばれ、今や植物普遍的な揮発性シグナル分子として認知されている。植物は昆虫により食害されると揮発性シグナルを放出し、隣接する植物に危険を知らせる。このとき緑の香りは植物の会話の言語として頻繁に使用される。そこで傷を受けた除虫菊の会話を解析したところ、

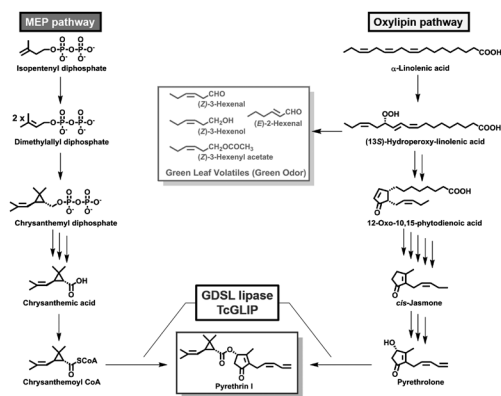


図1. ピレスリン生合成と揮発性シグナル緑の香り

緑の香りと(E)- β -ファルネセンが主言語として使われていた。これらは傷害ついた除虫菊の幼苗の葉から放出されたときと同じブレンド比で、しかも同程度の濃度で処理したときのみ、未被害の幼苗でピレスリン生合成を促進した。これは、植物が言語を組み合わせて会話することを示した最初の例となった。

ピレスリン生合成の最後でMEP経路とオキシリピン経路が合流する（図1）。この反応を触媒する酵素を解明することこそピレスリン生合成研究において最も重要な課題と考え、標準を定めた。本酵素はアシル基転移酵素と予想したが、絞りこみが困難であった。しかも本酵素の同定に遺伝学的手法を使うことができなかった。そこで除虫菊の蕾からピレスリン合成活性をもつ酵素を精製し、その遺伝子をクローン化したところ、全く予想に反して当該遺伝子はGDSLリパーゼをコードしていた。TcGLIPと命名した本酵素は、酸部とアルコール部の不斉炭素の絶対配置を厳密に認識し、その発現量は除虫菊の各部位でのピレスリン蓄積量と良い相関を示したことから、対昆虫防御における鍵因子の一つとして働いていることが明らかとなった。

2. 植物-微生物-昆虫間相互作用を駆動する昆虫制御物質の標的解明と間接誘導防衛機構の提唱

微生物の培地として教科書に掲載されているものを使えば、無難な結果が得られる。しかし、常識にとらわれない林英雄は、オカラで糸状菌*Penicillium simplicissimum* AK-40株を培養することにより、殺虫活性を示すオカラミンを発見した。その自由な発想に触発され、オカラミンの標的解明に挑戦した。

オカラミンは投与後短時間内に殺虫活性を発揮する。標的は神経イオンチャンネルではないかと推定し、パッチクランプ法を採用してオカラミンの作用機構を調べた。昆虫神経細胞に神経伝達物質を連続してするとイオンチャンネルの応答が減衰するrundown現象を解決し、オカラミンをカイコガ神経細胞に処理

した。すると、内向きのイオン電流が観測された。この電流は塩素イオン電流であったことから、オカラミンは塩素チャンネルに作用すると推定された。カイコガ幼虫の神経細胞で発現する塩素チャンネル類をアフリカツメガエルの卵母細胞で発現させ、オカラミンを処理すると、グルタミン酸作動性塩素チャンネル (GluCl) のみ活性化された。本活性と殺虫活性が相関したことから、オカラミンの主な標的は GluCl であることが判明した。本物質は他の塩素チャンネルには微弱な作用しか示さず、GluCl は昆虫や線虫などの無脊椎生物の神経系にのみ存在することから、昆虫に対する選択性が極めて高いことがわかった (図2)。

その一方で、*P. simplicissimum* AK-40株がオカラ培地で著量オカラミンを生産する分子機構を探るために、遺伝子破壊実験により7遺伝子からなるオカラミン生合成遺伝子クラスターを同定し、GluClの活性化に必須の構造因子を解明した (図2)。

林英雄はオカラ培地を用いてオカラミン以外にも数多くの昆虫活性物質を見つけていた。その中からアスペルパラリンとクロドリマニンを選びパッチクランプ法で作用機構を調べたところ、前者はニコチン性アセチルコリン受容体 (nAChR) を、後者は γ -アミノ酪酸受容体 (GABAR) をナノモル濃度で阻害した。これらの神経受容体はヒトの神経系にも存在する。故に、両物質は非選択的な毒なのかと思いきや、そうではなかった。アスペルパラリンとクロドリマニンは昆虫の nAChR や GABAR に対して阻害作用を示す濃度より百倍以上高い濃度で処理しなければ、脊椎動物の当該受容体類を阻害しなかった。

これらの成果をもとに、植物は根圏で共生微生物に防御物質を生産させる「間接誘導防御機構」を提唱した。それが真なら、植物根圏からオカラミンなどの物質が昆虫や線虫を制御可能な濃度で検出されなければならない。このようなことが実際にあるのかと想像していたとき、予想外にもヘアリーベッチを栽培した後、ダイズを栽培した土壌の中からオカラミンが殺虫活性を示すくらい高い濃度で検出され、自身の仮説が証明された。

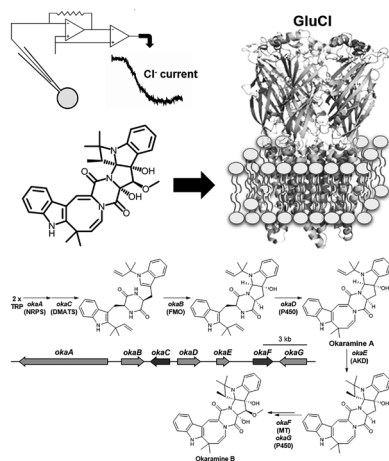


図2. オカラミンの標的 GluCl と生合成

3. 合成昆虫制御剤の選択毒性発現機構の解明と標的受容体の再構築における難問の解決

殺虫剤ネオニコチノイドは昆虫の nAChR に対して選択的に作用する。本剤がもつニトロ基やシアノ基と昆虫の nAChR に特有の塩基性アミノ酸との静電的相互作用によりこのような選

択性が生じると予測し、当該相互作用の場の一つが loop D であることを解明した。また、アセチルコリン結合タンパク質との共結晶の X線結晶構造をもとに、隣接する α サブユニット間に本剤が結合する際 loop E と loop G の塩基性アミノ酸とも相互作用することを見出した。これらの概念は、一部あるいは全てが脊椎動物に由来するサブユニットをもつ nAChR を使用して得られていたため、全サブユニットが昆虫に由来する nAChR を用いて確認する必要があった。だが、ショウジョウバエの nAChR 遺伝子が単離されてから 30 年以上経過しても、誰一人として昆虫の nAChR の再構築に成功していなかった。そこでこの難問に挑んだ結果、昆虫の nAChR の再構築に必須の補助因子を突きとめ (図3)、ネオニコチノイドの活性発現に loop D に存在する塩基性アミノ酸との相互作用が重要な役割を担っていることを証明した。そして、本剤がハナバチ類の nAChR を極めて低い濃度で阻害することを先駆けて示した。

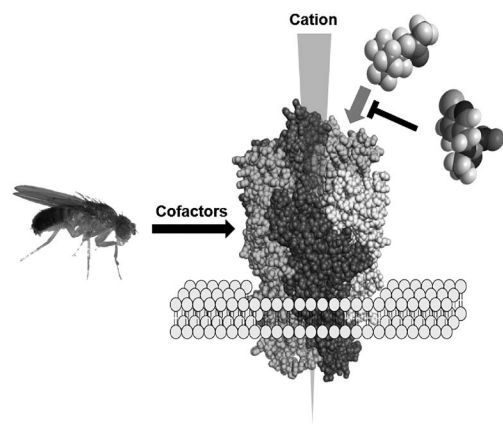


図3. 昆虫の nAChR の再構築とネオニコチノイドの作用

おわりに

今人類は、新型コロナウイルス感染症と戦っている。かつての感染症がそうであったように、いずれこの問題も人類の英知により終息するであろう。次に待ち受けているのは地球温暖化に伴い勢いを増す昆虫の脅威である。ここに記した「窮微暢遠」に徹して行われた研究の下には「昆虫の高選択的制御」という哲学が流れている。奇しくもこれらの研究は開始から四半世紀の時を経て結実した。本成果を發展させることにより、農作物に被害をもたらす害虫や感染症を媒介する吸血昆虫を制御し、昆虫と共栄する 22 世紀への道が開けると期待される。

謝辞 学生時代、基礎を築いていただいた藤田稔夫先生 (京都大学・故人) と西村勁一郎先生 (大阪府立大学) に厚く御礼申し上げます。近畿大学では濱田昌之先生から自由な研究環境と御指導を、植物化学の研究では畑中顯和先生 (山口大学) から御指導と御激励を賜りました。神経イオンチャンネルの研究では David Sattelle 教授 (University College London) から、糸状菌の二次代謝物質の研究では林英雄先生 (大阪府立大学) と長田裕之先生 (理化学研究所) から御教示をいただきました。多くの成果は近畿大学の先生方、大学院生、学部生に加えて、他大学や研究所の先生方、企業の研究員の方々と研究により成し遂げられました。この場を借りて心より御礼申し上げます。