

特集：殺虫剤作用機構の新展開〔1〕

殺虫剤の作用点としてのニコチン性アセチルコリン レセプターチャネル

——パッチクランプ法による最近の知見——

筑波大学農林学系 ^{なが}永 ^た田 ^{けい}啓 ^{いち}一

はじめに

自然科学における新しい知見は、様々な研究手法の進歩とともに得られてきた。もちろん研究者のオリジナルな発想や現象に対する洞察力も、同等かそれ以上に重要なのは言うまでもないが、自然現象の裏にある共通原理を明らかにするうえで、新しいアプローチの方法が重要な役割を示した例は数知れない。分子生物学を大きく進めたPCR法もその一例だろう。薬物の作用メカニズムの研究、ここでは本稿のテーマである、神経系のイオンチャネルをターゲットとする殺虫剤において、電気生理学的手法の進歩、特に電位固定法（voltage clamp）と、その単一細胞への適用を可能にしたパッチクランプ法（patch clamp）の発明は、神経作用薬剤の作用メカニズムを明らかにするうえで果たした功績は計り知れない。

膜電位固定法が発明されるまで、神経の電気的な活動は、多くのイオン電流が流れた結果現れる、複雑な電位変化としてしか記録できなかった。COLE (1949) によって発明された電位固定法が、複雑な神経の電気的反応を起こしている特定イオン電流を分離して測定し、神経興奮時に起こる特定のイオンに対する神経膜の伝導度（conductance）の変化を測定することを可能にしたのである。HODGKIN and HUXLEY (1952) は、この技術を用いて神経興奮現象を非線形連立微分方程式で表し、1963年にノーベル賞を受賞した。このころDDTが電位依存性ナトリウムチャネルの不活性化過程に作用することが明らかにされたが（NARAHASHI and HASS, 1967）、これも膜電位固定法を適用したおかげである。

膜電位固定法は神経細胞内に電極を挿入しなければならないという制約から、ヤリイカの巨大軸索など限られた神経標本にしか適用することができなかった。パッチクランプ法がその制約を取り除いた。パッチクランプ法

はNEHER and SAKMANN (1976) によって考案されたもので、小さな細胞に電極を挿入することなしに電位固定を行うことが可能になった。さらに細胞膜断片にも適用することができたことから、個々のイオンチャネルを通過する微妙なイオン電流の測定が可能になった。1991年にNEHER and SAKMANNはこの功績でノーベル賞を受賞している。

パッチクランプ法を用いた様々な神経作用物質のイオンチャネルに対する作用メカニズムの研究が1980年台前半ころから広く行われ、神経薬理・生理・毒物学の分野で多くの重要な知見が得られた。現在、パッチクランプ法は分子生物学的手法や免疫学的手法と組み合わせられることにより、イオンチャネルの構造と機能に関する研究に有力な手段として広く用いられている。

神経作用性殺虫剤の作用メカニズムの解明についても、パッチクランプ法の適用によって大きな進歩があった。DDT、ピレスロイド、シクロジエン系、カーバメート系、ニトロメチレン系殺虫剤のそれぞれの殺虫剤のイオンチャネルに対する作用について、新しい知見が得られつつある。

本稿では、特にアセチルコリンエステラーゼ阻害剤として知られる有機リンおよびカーバメート剤、それにカルタップの神経性ニコチン性アセチルコリンレセプターチャネルに対する作用について、パッチクランプ法を用いることで得られた最近の新しい知見について、筆者らの研究を中心に紹介したい。

I 殺虫剤の作用点としてのイオンチャネル

昆虫や哺乳類などの高等な生物で、神経系は生体内における情報の受容と伝達を担うという重要な役割を果たしている。神経系には中枢神経と末梢神経系があり、それぞれ無数の神経細胞によって構成されている。神経細胞は電気的反応を行う興奮膜を持ち、電気的反応を通じて情報伝達を行う。細胞膜内外のイオン濃度差が膜電位を起こし、イオン選択性を持った膜タンパク質であるイオンチャネルが開くことでイオン電流が発生し、その結果、神経細胞の膜電位が変化する。これが活動電位、シ

Nicotinic Acetylcholine Receptor-channels as the Target of Insecticides. By Keiichi NAGATA

（キーワード：殺虫剤、イオンチャネル、カルタップ、パッチクランプ、アセチルコリンレセプター）

ナブス後電位などの神経系における電氣的反応を起こすもととなっている。

イオンチャンネルは基本的には二つのタイプがある。一つは膜電位の変化を感受して開閉する電位依存性チャンネルであり、もう一つは伝達物質がレセプターに結合してチャンネルが開閉する伝達物質感受性チャンネルである。前者には活動電位の発生に関与するナトリウムチャンネル、カリウムチャンネルなどがあり、後者はレセプターとイオンチャンネルが複合体を形成しており、アセチルコリンレセプターチャンネル、GABA レセプターチャンネルなどがその例である。これら以外にも数多くの種類のイオンチャンネルが存在し、それらが正常に機能することによって神経系は活動し、生体は生命を維持することができる。

イオンチャンネルが薬物などに影響を受けて正常に機能しなくなることは、生体の生命維持に直接影響を及ぼし、場合によっては致命的なものになる。例えば興奮性の神経伝達物質であるアセチルコリンを受容して神経膜を脱分極させるニコチン性アセチルコリンレセプターチ

ャネルが薬物によって阻害されると、アセチルコリンが存在しても神経膜は脱分極できないため情報伝達は行われず、結果として神経系全体が抑制される。逆に薬物によってアセチルコリンレセプターチャンネルが活性化されれば、情報が伝達されてきていないにもかかわらず、膜電位は脱分極を起こし、神経系は異常興奮を起こす。ここに面白い例がある。最近筆者らはエタノールが神経性ニコチン性アセチルコリンレセプターチャンネルに強く作用していることを発見した (NAGATA et al., 1996)。神経性ニコチン性アセチルコリンレセプターチャンネルは中枢神経系に存在し、記憶、痴呆症などにかかわると考えられており、最近最も注目されているイオンチャンネルの一つである。エタノールは、タバコの作用点でもあるニコチン性アセチルコリンレセプターチャンネルのアセチルコリンに対する感受性を上昇させる。感受性が増加すると初めはイオンチャンネルは活性化されるが、じきに脱感作が促進され、イオンチャンネルは不活性化することになる。これらのことで我々が酒を飲むと陽気になること、

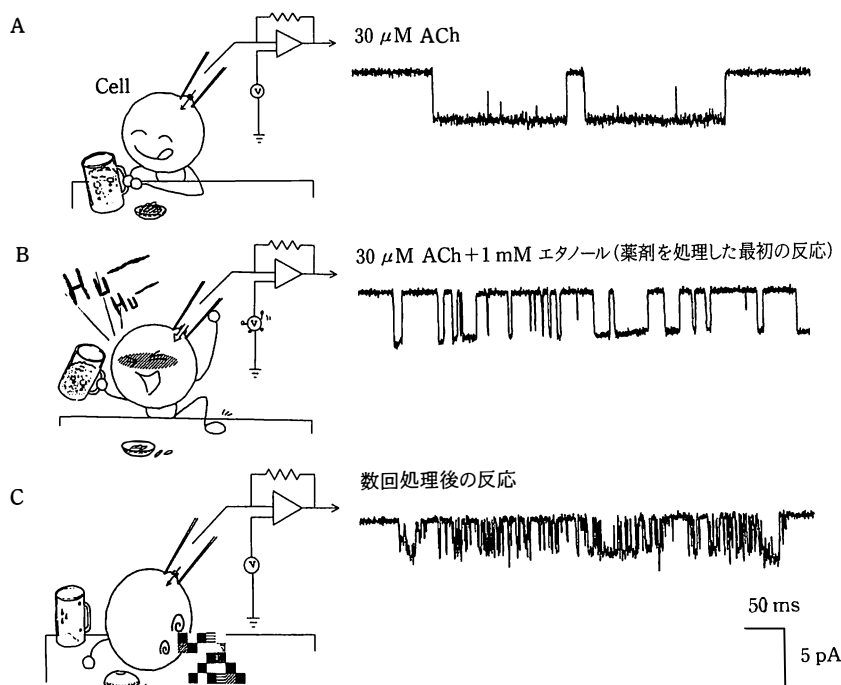


図-1 エタノールの神経性ニコチン性アセチルコリンレセプターチャンネルに対する作用。シングルチャンネル電流はアウトサイドアウトパッチクランプ法によって記録した (イラスト: 木村貴好, 筑波大学農林学系)。

A: 30 μM のアセチルコリンによって発生するシングルチャンネル電流。比較的長い間チャンネルは開いている。B: エタノール 1 mM をアセチルコリンと同時投与した場合の最初のシングルチャンネル電流。開いている時間 (open time) は減少し、頻度は増加する。C: 繰り返し投与すると open time はさらに減少し、バースト (burst) を起こす。

タバコに手を出してしまうこと、飲み過ぎると酩酊すること、記憶が曖昧になることなどをイオンチャネルレベルで説明することができる(図-1)。本稿は殺虫剤の作用メカニズムの話が中心なので、エタノールについては詳しくここでは説明しないが、イオンチャネルに対する薬剤の作用を直接研究することによって、薬剤が生体に対して複雑に作用するメカニズムが明らかになる一つの例になるだろう。

現在広く用いられている、あるいは用いられていた主要な殺虫剤には DDT およびピレスロイド系、シクロジエン系およびリンデン、有機リンおよびカーバメート系、そしてニトロメチレン系がある。それらは神経系のイオンチャネルに作用するか、または、アセチルコリンエステラーゼを作用点としている。殺虫剤の作用点となっている主要なイオンチャネルは電位依存性ナトリウムチャネル、GABA レセプターチャネル、アセチルコリンレセプターチャネルの3種類である。それ以外の、例えば電位依存性カルシウムチャネルなどが重要な作用点となっている可能性も否定はできないが、今のところそれらは二次的な作用点である可能性が高い。これまでの多くの作用メカニズムに関する研究から明らかとされてきたイオンチャネルに作用する殺虫剤は、(1)ピレスロイド系殺虫剤および DDT の電位依存性ナトリウムチャネルに対する作用、(2)ディルドリン、リンデンなどの有機塩素系殺虫剤の GABA(A)レセプターチャネルに対する作用、(3)イミダクロプリドに代表されるニトロメチレン系殺虫剤、ネライストキシンとその類縁体であるカルタップなどのニコチン性アセチルコリンレセプターチャネルである。主要な殺虫剤はすべてイオンチャネルに作用しているといえる。それではもう一つの主要な殺虫剤である、有機リン系およびカーバメート剤はどうか。

II 有機リンおよびカーバメート剤

有機リンおよびカーバメート剤は、アセチルコリンエステラーゼを強く阻害する作用を持っており、それがこれら殺虫剤の重要な作用メカニズムである。このことを簡単に説明したい。様々なレセプターチャネルがあるが、ここではニコチン性アセチルコリンレセプターチャネルについて述べる。神経細胞同士はシナプスを介し、伝達物質といわれる物質を用いて、化学的に情報伝達を行っている。情報を送り出す側の神経細胞のシナプス前膜から、伝達物質であるアセチルコリンが放出される。放出されたアセチルコリンは、情報を受ける側の神経細胞のシナプスにある細胞膜であるシナプス後膜のアセチルコリンレセプターに結合する。するとこのアセチルコリンレセプターチャネルのイオンチャネルが開き、ナトリウムイオン、カリウムイオン、カルシウムイオンが通過し、イオン電流が発生する。イオン電流が発生することによって神経膜の膜電位が変化し、これによって情報が伝達される。この過程は一次伝達と言われる。細胞内に流入したカルシウムイオンによって二次伝達と言われる過程が活性化することも解明されつつある(CASTRO and ALBUQUERQUE, 1995)。シナプス間隙に放出されたアセチルコリンは、アセチルコリンエステラーゼによってコリンと酢酸に分解される。この酵素の作用によって、シナプスにおいてアセチルコリンが蓄積することなく、すみやかにシナプス間隙より消失し、正常に情報伝達が行われる。ここでアセチルコリンエステラーゼが有機リン剤やカーバメート剤によって阻害されると、シナプス間隙に放出されたアセチルコリンの分解が阻害されるため、アセチルコリンの蓄積が起り、情報を受ける側のアセチルコリンレセプターチャネルは持続的に活性化されて、神経細胞には異常興奮が起こる(ARIENS et al., 1969; FENICHEL et al., 1974)。有機リン剤やカーバメート剤を処理した昆虫が痙攣などの興奮的な症状を示すことは以上のように説明される。

異常興奮を起こした神経系は続いて伝導阻害を起こすが、これについては殺虫剤が神経系全体に対して興奮的に働くため、アセチルコリンの放出を促進し、アセチルコリンの枯渇を招くためであると考えられている。伝導阻害が起こる別の説明として、アセチルコリンレセプターチャネルの脱感作がある。伝達物質によって開くチャネルは伝達物質が持続的に存在した場合、その濃度および時間に依存して伝達物質に対する感受性が低下して、チャネルが開かなくなることが知られており、それは脱感作といわれている。脱感作したイオンチャネルは、伝達物質があっても開きにくくなるのである。脱感作のメカニズムはまだ不明な点が多いが、アゴニスト自己阻害という現象がそれを説明するかもしれない(ARIAS, 1996)。神経伝達物質は、そのレセプターチャネルを活性化するとともに同じレセプターチャネルを阻害する。おそらくこれらのメカニズムの一つあるいは複数が関与して、伝導阻害が起きると考えられる。

カーバメート剤および有機リン剤の作用メカニズムとしてのアセチルコリンエステラーゼ阻害の重要性は、多くの研究者による詳細な研究によって明らかにされてきた。それに加えて、これらアセチルコリンエステラーゼ阻害剤に関して、興味深い現象も記載されてきた。例えば、生物に対する毒性とアセチルコリンエステラーゼ阻

害作用が逆転する (CHAMBERS et al., 1990)。非常に殺虫活性の高い、有機リン剤のアセチルコリンエステラーゼ阻害力が殺虫活性の高さを説明できるほどではない例がある (BEDFORD et al., 1989)。カーバメート剤には有機リン剤中毒を回復させる作用がある (ALBUQUERQUE et al., 1988; ARACAVA et al., 1987)。エタノールを投与したラットには有機リン剤の毒性が大きく低下する (O'SHAUGHNESSY and SULTATOS, 1995)。これらを説明するのに多くの仮説が考えられるが、その可能性の一つとして、アセチルコリンエステラーゼ阻害剤には別の作用メカニズムが存在していることが考えられる。事実、カーバメートおよび有機リン剤がアセチルコリンレセプターチャンネルに対して直接作用するとの報告があり (KUBA et al., 1973; RAO et al., 1987; BEUKEL et al., 1996)、筆者らはパッチクランプ法によってその詳細な作用メカニズムを検討した (NAGATA et al., in press)。カーバメート剤であるネオスチグミンとカルバリルは、神経性ニコチン性アセチルコリンレセプターチャンネルのアセチルコリンによって発生したイオン電流を低濃度で増大し、続いて抑制した。シングルチャンネル法によって個々のシングルイオン電流の開閉時間、開閉頻度、コンダクタンス (電流の通りやすさのパラメータ) などの各パラメータを調べたところ、これらカーバメート剤はアセチルコリンレセプターチャンネルに対してオープンチャンネルブロッカーとして作用していることが示唆された。その作用濃度はこれらの薬剤がアセチルコリンエステラーゼを阻害する濃度と同等かそれ以下であり、もう一つの作用メカニズムであることが強く示された。これらの事実はアセチルコリンエステラーゼ阻害剤として知られているグループの殺虫剤に関する作用メカニズムのみならず、抵抗性メカニズムの面からも興味深い。

III カ ル タ ッ プ

カルタップは、イソメ (*Lumbrineris brevicirra*) の持つ天然毒成分であるネライストキシンを構造改変して開発された殺虫剤である。中毒症状は麻痺作用を持つことで特徴づけられる。初期の電気生理学的手法によってネライストキシンはシナプス伝達を阻害することが示され、有機リン剤やカーバメート剤、DDT やピレスロイド系殺虫剤とは異なった作用メカニズムを持っていると考えられた (SAKAI, 1964; DEGUCHI et al., 1971)。その後、電気生理学的手法および生化学的手法による研究により、シナプス後膜に存在するニコチン性アセチルコリンレセプターチャンネルが作用点であることが示唆された (SAKAI, 1966, 1967)。先に述べたように、通常は伝達物

質であるアセチルコリンはシナプス前膜より放出され、それがシナプス後膜にあるアセチルコリンレセプターに結合してイオンチャンネルは活性化されて、情報は伝達される。そこにネライストキシンが存在するとアセチルコリンレセプターチャンネルがなんらかの作用を受けて、活性化することができず、神経細胞間での情報伝達が阻害される。

ワモンゴキブリ神経系を用いた電気生理学的実験などから、ネライストキシンやカルタップがアセチルコリンレセプターチャンネルに対して低濃度では抑制的 (アンタゴニスティック) に作用し、高濃度では興奮的 (アゴニスティック) に作用することが報告された (ELDEFRAWI et al., 1980)。また、生化学的結合実験によって、高濃度のネライストキシンはアセチルコリンレセプターに特異的に結合する α ブンガロトキシンの結合を抑制することが示された (SATTELLE et al., 1985)。殺虫剤がアセチルコリンのアセチルコリンレセプターへの結合を阻害するのだとすれば、シナプス伝達遮断のメカニズムとしての説明はできるのだが、問題は α ブンガロトキシン結合に対する阻害濃度が電気生理学的実験において作用が観察される濃度よりもかなり高かった。

筆者らはこれらの報告されている知見を踏まえて、神経性ニコチン性アセチルコリンレセプターチャンネルに対するカルタップの作用をパッチクランプ法によって検討した。その結果、カルタップはアセチルコリンによって発生するイオン電流を濃度依存的に抑制した。しかし、かなり高濃度にしてもカルタップ自身がアセチルコリンレセプターチャンネルを活性化することはなかった。シングルチャンネル法によって 1 個のイオンチャンネルを通過するイオン電流に対する作用を調べたところ、シングルイオン電流の開閉時間は大きく減少したが、コンダクタンスは変化せず、カルタップが典型的なイオンチャンネルのオープンチャンネルブロッカーであることが示された。

筆者らは、カルタップと同じイオンチャンネルに作用するニトロメチレン系殺虫剤についても同様なシングルチャンネル法による検討を行っている。カルタップとニトロメチレン系イミダクロプリドはどちらも神経性ニコチン性アセチルコリンレセプターチャンネルに対して抑制的に作用するが、シングルチャンネルレベルで検討したところ、この二つの殺虫剤は全く異なった作用メカニズムを持つことが明らかになった。イミダクロプリドでは、シングルチャンネル電流のコンダクタンスの減少が見られ、開閉確率も変化するなど、部分アゴニストとして作用しているのであろうと考えられた (NAGATA et al., 1996)。パッチクランプ法の結果から、ニコチン性アセチルコリ

ンレセプターにおけるカルタップの作用部位はアセチルコリン結合部位ではなく、おそらくチャネルの内側にあり、イオンチャネルが開くことでカルタップはそれ自身の作用点に結合し、イオン電流を遮断すると考えられる。イミダクロプリドではその作用部位はアセチルコリン結合部位と考えられ、部分アゴニストとしてそれ自身がイオン電流を発生させ、神経系に異常興奮を発生させる。部分アゴニストであることによって、アセチルコリンと結合した場合に抑制的に作用することが説明できる。また過剰なアゴニストの存在はイオンチャネルを脱感作させるため、初め興奮的に作用したのち、抑制的に作用するメカニズムを説明することができる。

お わ り に

神経系には様々なイオンチャネルが存在するが、進化的にはごく限られた種類のイオンチャネルが起源であると考えられている。異なったイオンチャネル間において分子間の相溶性が高いため、ある薬剤が一次作用点として考えられているイオンチャネルとはまた別の異なったイオンチャネルに対しても作用する例は多くある。これまで作用部位が薬剤における一次作用点であるのか、あるいは二次作用点であるのか考える場合に、濃度を指標にした感受性を中心に据えてきた。しかしながら低濃度で作用を受ける作用点が、果たしてその薬剤の作用メカニズムにとって最も重要な作用点であるとは限らないかもしれない。あるいはイオンチャネルのある部位に非常に特異的に結合したとしても、イオンチャネルの機能が変化させられるとは限らない。薬剤の作用メカニズムを解明するためには、神経系およびイオンチャネルの機能に対する薬剤の作用の面からも検討しなければならないと考えられる。そのときにパッチクランプ法は有力な手段の一つとして用いることができるだろう。有機リンおよびカーバメート剤がイオンチャネルに直接作用してお

り、それがこれらの殺虫剤の作用メカニズムにおいて二次的なものではなく、抵抗性のメカニズムにもなっているかもしれないという仮説をこれから検証したいと考えている。

参 考 文 献

- 1) ALBUQUERQUE, E. X. et al. (1988) : Brazilian J. Med. Bio. Res. 21: 1173-1196.
- 2) ARACAVA, Y. et al. (1987) : Ann. N. Y. Acad. Sci. 505: 226-255.
- 3) ARIAS, H. R. (1996) : J. Neurosci. Res. 44: 97-105.
- 4) ARIENS, A. T. et al. (1969) : Experientia 25: 57-59.
- 5) BEDFORD, C. D. et al. (1989) : J. Med. Chem. 32: 493-503.
- 6) BEUKEL, I. et al. (1996) : ATLA 24: 191-199.
- 7) CASTRO, N. G. and E. X. ALBUQUERQUE (1995) : Biophys. J. 68: 516-524.
- 8) CHAMBERS, J. E. et al. (1990) : Pestic. Biochem. Physiol. 36: 308-315.
- 9) COLE, K. S. (1949) : Arch. Sci. Physiol. 3: 253-258.
- 10) DEGUCHI, T. et al. (1971) : Pestic. Biochem. Physiol. 1: 196-204.
- 11) ELDEFRAWI, A. T. et al. (1980) : Mol. Pharmacol. 17: 172-179.
- 12) FENICHEL, G. M. et al. (1974) : Neurology 24: 41-45.
- 13) HODGKIN, A. L. and A. F. HUXLEY (1952) : J. Physiol. 116: 449-472.
- 14) KUBA, K. et al. (1973) : Science 181: 853-856.
- 15) NAGATA, K. et al. (1996) : NeuroReport 7: 1025-1028.
- 16) ——— et al. (1996) : Neurosci. Lett. 189-193.
- 17) ——— et al. (1997) : Brain Res. in press.
- 18) NARAHASHI, T. and H. G. HASS (1967) : Science 157: 1438-1440.
- 19) NEHER, E. and B. SAKMANN (1976) : Nature 260: 779-802.
- 20) O'SHAUGHNESSY, J. A. and L. G. SULTATOS (1995) : Biochem. Pharmacol. 50: 1925-1932.
- 21) RAO, K. S. et al. (1987) : J. Pharmacol. Exp. Ther. 240: 337-344.
- 22) SAKAI, M. (1964) : Jpn. J. Appl. Entomol. Zool. 8: 324-333.
- 23) ——— (1996) : Appl. Entomol. Zool. 1: 73-82.
- 24) ——— (1967) : Botyu-Kagaku 32: 21-33.
- 25) SATTELLE, D. B. et al. (1985) : J. Exp. Biol. 118: 37-52.