



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	Investigation of mechanisms of rodenticide-resistance using a closed colony of rodenticide-resistant black rats (<i>Rattus rattus</i>) from Tokyo [an abstract of dissertation and a summary of dissertation review]
Author(s)	武田, 一貴
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(獣医学)
Dissertation Number	甲第14111号
Issue Date	2020-03-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/78549
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/
Type	doctoral thesis
File Information	Kazuki_TAKEDA_abstract.pdf, 論文内容の要旨



学位論文内容の要旨
Abstract of the dissertation

博士の専攻分野の名称：博士（獣医学）

氏名： 武 田 一 貴

Name

学位論文題名
The title of the doctoral dissertation

東京由来殺鼠剤抵抗性クマネズミ (*Rattus rattus*) クローズドコロニーを用いた
殺鼠剤抵抗性獲得機序の解明
Investigation of mechanisms of rodenticide-resistance using a closed colony of
rodenticide-resistant black rats (*Rattus rattus*) from Tokyo

第一章 序論

野生齧歯類は農作物の食害等経済被害を生じる他、20 種以上の人獣共通感染症を媒介し公衆衛生上の被害も与える。さらに、外来動物として離島等の生態系を攪乱する事も報告されている。このため、野生齧歯類の殺鼠剤による駆除は時に不可欠である。殺鼠剤としてはワルファリン等の抗血液凝固系殺鼠剤が広く用いられている。しかしながら、これに抵抗性を示す個体群が世界各地に出現し駆除が難航している。この解決には抵抗性メカニズムの解明が求められる。そこで、本研究では東京で捕獲された殺鼠剤抵抗性クマネズミのクローズドコロニーを用い、代表的な抗血液凝固系殺鼠剤であるワルファリンへの応答を多角的に解析する事で抵抗性メカニズムの包括的な解明を試みた。

第二章 標的分子 (VKOR) の解析

ワルファリンはビタミン K エポキシド還元酵素 (VKOR) を阻害し、ビタミン K 依存性血液凝固因子を枯渇させ出血毒性を示す。従来、世界各地の抵抗性齧歯類では VKOR の結合ポケット内にアミノ酸変異が生じると抵抗性が生じる事が示唆されている。一方、東京の抵抗性ラットで多数確認されている変異パターンである Leu76Pro 変異は結合ポケットや活性残基から離れた位置にあり、どのように抵抗性に寄与するかは不明であった。そこで、本変異が VKOR の VKO 還元活性やワルファリン感受性に与える影響を *in vitro* 酵素速度論的手法や *in silico* での結合性シミュレーションで解析した。

ワルファリンに対する 50%阻害濃度を比較すると Leu76Pro 変異を有する抵抗性群の VKOR では、感受性群（野生型）に比べ 37.5 倍有意に高い値を示していた。一方、VKOR 活性のミカエリス・メンテンプロットを取ると、抵抗性群と感受性群では基質との親和性の指標となる K_m 値では有意差は認められなかったが、生理的な基質濃度での酵素活性の指標となる V_{max}/K_m 値では抵抗性群の方が 16.5 倍有意に低い値を示した。つまり Leu76Pro 変異は結合ポケットから離れた ER ループ構造上にあるにも拘らず、ワルファリンに対し顕著な抵抗性を生じさせるが、VKOR の VKO 還元活性も低下させる事が判明した。

Leu76Pro 変異 VKOR の立体構造とワルファリン/VKO の結合性をドッキングシミュレーションで評価した。抵抗性群はワルファリンとの結合性が低下していたが VKO とは感受性群と同

等の結合性を示した。そこで、メカニズム解明のために分子動力学シミュレーションを実施した。抵抗性群はワルファリンへの最も強力な結合サイトとされる Phe55 とワルファリンとの距離が遠くなり、親和性が低下していた。Leu76Pro はループ構造で Phe55 と接続していることから、本変異により間接的に Phe55 とワルファリンの親和性が低下し抵抗性を得ていると考えられる。一方、VKO に対しては抵抗性群、感受性群共に高い親和性を示した。*In vitro* 試験でも VKO との親和性の指標となる K_m 値に有意差がなかったことから本変異は VKO との結合性に影響を与えない事が示唆された。一方、活性残基の Cys135 と VKO との親和性が低下しており、これが低活性の一因である可能性がある。

第三章 体内動態 (ADME) の解析

本章では抵抗性群にワルファリンを単回経口/静脈内投与し、その応答を薬物動態学/薬力学的に解析した。また、*in situ* 肝灌流試験を行う事で生理的に近い環境での肝代謝能を測定した。薬力学的解析の結果、ワルファリンの 10 mg/kg 単回投与では抵抗性群の血液凝固時間は有意に延長せず薬効が発現し辛い事が示唆された。また、薬物動態学的解析では抵抗性群では血漿からの排泄能(クリアランス)が高くワルファリンを迅速に体外へ排泄している事が判明した。また、ワルファリンの代謝産物である水酸化ワルファリンの動態は、抵抗性群では感受性群と最高濃度到達時間が有意に早いという特徴を示し、高排泄能の原因がワルファリンの高代謝能である事を示唆する結果が得られた。

ワルファリンは主に肝臓中で薬物代謝酵素シトクロム P450 (P450) により 5 つの水酸化体に代謝される。そこで、肝代謝能を精査するために *in situ* 肝灌流試験を実施した。実際に抵抗性群は 5 つ全ての水酸化ワルファリンで有意に 5~8 倍程度高い生成量を示し、ワルファリンの高い肝代謝能を有している事が明らかとなった。一方、ワルファリン代謝を担う P450 のタンパク質発現量はウェスタンブロット法で比較すると、感受性群に比べ 1.2~1.3 倍と軽微な変化に留まった。以上から、本抵抗性群では殺鼠剤標的分子 VKOR に変異を有しているのに加え高代謝能も有している事が判明した。

第四章 高代謝能の原因の同定

本章ではワルファリンの水酸化反応を担うシトクロム P450 と、その活性に必要な電子伝達系を精査し高代謝能の原因を探索した。まず本抵抗性群の肝臓から抽出したミクロソーム画分を用いた P450 の酵素速度論的解析を行った。興味深い事に、5 つある水酸化体に対する応答で軽度な活性上昇を示す物と感受性群と同等か低い活性を示す物とに分かれ、第三章の *in situ* 肝灌流試験と一致しない結果となった。そこで、本 *in vitro* 試験系で再現できなかった生体内の要素として、P450 の反応に不可欠なニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリン酸 (NADPH) を介した電子伝達反応に着目した。試験系を改変し S9 画分を用いた内因性 NADPH 産生能依存性の P450 ワルファリン代謝活性試験を行ったところ、抵抗性群は全ての水酸化体で感受性群より有意に高い代謝能を示し、高代謝能の原因が代謝を直接担う P450 自体の変異ではなく、その上流の NADPH 産生能の活性化である事が示唆された。

次に、肝臓中での NADPH 産生を担う主要な経路であるペントースリン酸経路を解析した所、実際に抵抗性群が有意に高い NADPH 産生活性を示した。また、NADPH を介した全ての P450 の還元反応を担うシトクロム P450 還元酵素も内因性の NADPH 産生能依存性に活性が上昇していた。一方、ペントースリン酸経路中で NADPH 産生を担う律速酵素のグルコース 6 リン酸脱水素酵素 (G6PD)、その下流の 6 ホスホグルコン酸デヒドロゲナーゼの遺伝子配列・タンパク質発現量には変化は認められなかった。G6PD は種々の翻訳後修飾により活性の調節を受ける

事が明らかになりつつあり、抵抗性群での高活性の原因もこれら G6PD の翻訳後修飾の変化である可能性がある。

第五章 総括

本抵抗性群を用いた解析により抵抗性の原因として従来から提唱されてきた VKOR の結合ポケット内の変異に加えて、ポケット外の変異が抵抗性獲得に寄与する事を実証した他、NADPH 産生の向上とそれに伴う P450 による殺鼠剤代謝能の賦活化という新しい抵抗性獲得機序が明らかとなった。本研究で示された新規抵抗性獲得機序は世界各地で確認されている殺鼠剤抵抗性齧歯類のメカニズムの更なる理解や新規殺鼠剤の開発への応用に対して有用な知見だと考えられる。