

· 原创性分子靶标与绿色农药分子设计 ·

绿色杀虫剂分子靶标研究的难点与挑战

陈威¹ 陈琦¹ 尉迟之光² 杨青^{1*}

1. 中国农业科学院植物保护研究所/植物病虫害生物学国家重点实验室,北京 100193

2. 天津大学药物科学与技术学院,天津 300072

[摘要] 绿色杀虫剂是保证国家粮食安全的战略性物资。随着全球农业的绿色化和可持续化的发展进程,靶标导向并且对人畜和非靶标生物安全的新农药创制已成为该领域研究的必然趋势和制高点,其核心基础是农药分子靶标的创新。一方面,全球超过80%杀虫剂是基于4个晶体结构明确的分子靶标设计的,这一局面导致极高的害虫抗药性;另一方面,分子生物学功能验证技术揭示出大量害虫生长发育所必需的关键基因,如何利用这些资源开发创新的分子靶标是我们面临的挑战。在靶标研究中,获得原子水平的靶标结构信息以及靶标分子与活性小分子之间的相互作用信息是难点。在此背景下,我国有必要尽快建立针对害虫特有而人畜没有的分子靶标挖掘与利用的技术体系,推进安全高效绿色杀虫剂的原始创新。

[关键词] 杀虫剂;分子靶标;昆虫生长调节剂;几丁质;鱼尼丁受体

杀虫剂是一种施用对象为昆虫的农药,常用于农业、医药、工业及居家环境,是治理虫害的主要手段。从农耕时代的最早期,人类就开始使用杀虫剂来保护农作物免受害虫的损害。早期的杀虫剂应用是喷洒硫、砷、汞、铅等有毒化学物质在农作物上以杀死害虫。在17世纪,人们从烟草中提炼出尼古丁作为杀虫剂使用。19世纪引进了两种更天然的农药,除虫菊和鱼藤酮。到20世纪,DDT的发现开创了有机合成杀虫剂的先河,随后杀虫剂的种类和用量都大幅增加,令农业产量大升,是农业生产力上升的主要因素之一^[1]。随着人口的稳定增长(预计到2050年将达到90亿)和可用耕地面积不足,杀虫剂的使用还将进一步增加。

但是,随着杀虫剂使用的增加,越来越多的问题也暴露出来。一些传统农药如DDT、氯丹和艾氏剂等有机合成农药结构稳定,难以被降解而在环境中积累,严重地改变生态系统^[2]。大部分农药包括有机磷和氨基甲酸酯等对人体有害。新一代新烟碱类杀虫剂可比丁、吡虫啉和噻虫嗪因对蜜蜂具有高毒性在2018年被欧盟禁止在户外使用^[3]。此外,害虫对已有杀虫剂抗性的不断增强、农药监管环境日益



杨青 中国农业科学院植物保护研究所研究员,博士生导师。长期从事绿色农药分子靶标研究,针对病原菌、有害昆虫等均以几丁质作为结构成分的特点,运用结构生物学和化学生物学等方法系统研究这些生物的几丁质合成、降解以及修饰的关键酶,开发新的、人/畜安全的农药分子靶标以及农化产品。先后主持国家杰出青年科学基金项目、国家自然科学基金重点项目和国家重点研发计划项目子课题等。



陈威 中国农业科学院植物保护研究所博士后。主要从事几丁质酶的结构及其抑制剂筛选与抑制机理研究。报道了昆虫II分支几丁质酶的晶体结构,推测出昆虫表皮几丁质降解的酶系统。基于结构进行虚拟筛选,获得了多种具有高效性、选择性的几丁质酶小分子抑制剂,并揭示了它们的抑制机理。主持国家自然科学基金青年基金和中国博士后科学基金各1项。

严格以及市场需求的增长,使得杀虫剂必须进行转变。从杀生、低效、高毒、广泛性、高污染、高抗性的传统杀虫剂向调控、高效、无公害、选择性、环境友好、低抗性的绿色杀虫剂转变。随着“到2020年农

收稿日期:2020-03-27;修回日期:2020-04-20

* 通信作者,Email:qingyang@dlut.edu.cn

药使用量和化肥使用量零增长行动方案”的推进,绿色杀虫剂的创制刻不容缓。

农药创制是人类改造自然的过程。农业化学研究的传统方法是从各种化学起始物,衍生出大量的先导化合物,然后直接在整个生物体上测试所有化合物,通过设计—合成—测试—分析循环的不同轮次来进行优化,最终获得理想的杀虫剂^[1-4]。然而,随着合成的化合物数量和研发成本的增加,基于分子靶标使用体外分析的方法变得越来越普遍^[5]。无论是改良或是创新农药,分子靶标都是关键。一方面,通过研究害虫的独特生理过程,发现新的绿色分子靶标用于创制新型杀虫剂。另一方面,害虫对杀虫剂产生抗药性也可以通过研究其分子作用靶标来阐明其抗药性产生的机理,改良杀虫剂。本文以近年来已开展的原创性杀虫剂分子靶标研究的成果为依托,在已有的杀虫剂分子靶标研究基础上,对杀虫剂分子靶标研究的现状、难点和挑战以及原创性靶标的研究进展进行梳理和概述,并对未来研究方向提出建议。

1 杀虫剂分子靶标研究的现状、难点和挑战

1.1 杀虫剂分子靶标研究的现状

根据杀虫剂抗药性工作委员会(IRAC)对杀虫剂作用模式的分类,目前的杀虫剂的作用模式超过 30 种,包括作用于神经系统、呼吸系统、生长变态系统等^[6]。但是,目前全球杀虫剂销售总量的 85% 都是作用于昆虫的神经—肌肉系统,调控生长发育的杀虫剂仅占总销量的 9%,而破坏呼吸系统靶标的杀虫剂仅占 4%^[6,7]。因为神经系统的微小干扰会很快放大,所以昆虫神经系统已经并且仍然是主要的新型杀虫剂的靶标。因此目前全球超过 80% 杀虫剂是基于以下 4 个晶体结构明确的神经系统分子靶标设计的,分别是乙酰胆碱受体^[8]、乙酰胆碱酯酶^[9]、GABA 门控氯离子通道^[10]和压控钠离子通道^[11]。乙酰胆碱受体是昆虫中枢神经系统中主要神经递质乙酰胆碱的受体,针对烟碱乙酰胆碱受体(nAChR)通道的竞争性调节剂新烟碱类杀虫剂占据了 27% 的市场份额,其可以与 nAChR 上的乙酰胆碱位点结合导致昆虫神经过度兴奋而死亡^[12,13],它还是尼古丁、磺胺嘧啶、丁烯内酯、三氟嘧啶、刺孢菌素以及神经毒素类似物等农药分子的靶标^[14]。乙酰胆碱酯酶是有机磷类和氨基甲酸酯类农药的分子靶标,其活性被抑制可造成神经递质乙酰胆碱积累而影响神经突触的正常传导,从而导致昆虫死

亡^[15]。GABA 是昆虫主要的抑制性神经递质,GABA 门控氯离子通道是环二烯类有机氯、苯基吡啶类化合物、偏二酰胺和异恶唑啉类化合物的分子靶标^[16]。压控钠离子通道参与了昆虫沿神经轴突的动作电位传播,该通道被过度打开或关闭会造成昆虫神经系统过度兴奋或瘫痪。DDT、拟除虫菊酯类化合物和茚虫威等农药的作用靶点是压控钠离子通道^[17]。

1.2 目前存在的问题和挑战

一方面,如上所述,目前全球超过 80% 杀虫剂是靶向 4 个晶体结构明确的神经系统分子靶标。作用于这些靶标的杀虫剂虽然杀虫效果优异,然而这些靶标的同源蛋白质在其他非脊椎动物和脊椎动物的神经信号传导过程中也具有关键功能,因此具有难以被忽视的安全隐患和环境风险。此外,单一靶标农药的长期大规模使用是引发害虫抗性的主要原因之一,虽然通过轮用、混用等抗性管理手段可以在一定程度上延迟杀虫剂抗性的发展,但是随着使用时间的延长和使用量的增加,害虫抗药性的问题仍然愈演愈烈,最终会导致没有可用的农药^[6]。因此,亟需开发新型绿色分子靶标。

另一方面,基因组测序技术和分子生物学功能验证技术的进步揭示出大量害虫生长发育所必需的关键基因,如何利用这些资源开发创新的分子靶标是我们面临的挑战。以医药分子靶标为例,2000 年 Celera 公司完成了人类基因组的首个草图,人们预计药物靶标池中理论上包括 600 种小分子药物靶标、1 800 多种蛋白质治疗的药物靶标,以及 2 100 种基因治疗和 siRNA 治疗的药物靶标,然而实际上目前能应用的靶标数目不超过 300 个^[18,19]。因此,如何从已有的大量信息中挖掘出对人类安全、环境生态友好、高选择性且作用模式新颖、代谢途径清晰的杀虫剂分子靶标也是一个需要解决的难题。在这一问题上,可以借鉴医药行业靶标创新和优化的过程^[1]。

此外,缺乏原子水平的靶标结构信息以及靶标分子与活性小分子之间的相互作用信息也是制约新靶标研究的关键因素^[20,21]。首先,靶标的结构对基于结构的新先导化合物的设计和筛选至关重要。其次,活性小分子与农药靶标的结合是其发挥功能的分子基础,农药靶标结构为阐明小分子与靶标的作用机制提供了核心结构基础。再次,基于原子尺度的靶标结构差异性,对农药结构进行改造优化,是提高农药安全性的可行办法。最后,害虫抗药性一般

源于其靶标蛋白上关键位点的突变,影响了活性小分子的结合,对靶标结构信息的深入探究也有助于开发能克服害虫抗药性的新型杀虫剂。

因此,我国有必要尽快建立分子靶标挖掘与利用的技术体系,推进安全高效的绿色杀虫剂的原始创新。

2 原创性靶标的研究进展

2.1 昆虫几丁质代谢关键蛋白

几丁质是构成昆虫表皮以及中肠围食膜的主要组分,为防止昆虫脱水以及病原体的侵染提供物理屏障。由于几丁质不存在于人、哺乳动物和高等植物中,因此从20世纪70年代开始,几丁质代谢相关的蛋白就被认为是设计绿色杀虫剂的理想分子靶标。实际上,目前占据杀虫剂市场3%的苯甲酰脲类农药就是通过干扰昆虫几丁质合成发挥作用的^[6],但是目前也已经有部分害虫对其产生了抗性^[22, 23],因此研究者们也在开发靶向昆虫几丁质代谢中其他关键蛋白的新型绿色杀虫剂。

通过对重要农业害虫亚洲玉米螟(*Ostrinia furnacalis*)蜕皮前后转录组及蛋白组数据分析,以及家蚕(*Bombyx mori*)蜕皮液蛋白组数据分析^[24, 25],研究者发现了在几丁质合成及降解过程中的6个关键酶,包括3个参与表皮几丁质降解的几丁质酶*OfChtI*、*OfChtII*、*OfChi-h*,2个参与几丁质修饰的脱乙酰基酶*BmCDA1*、*BmCDA8*,以及参与几丁质合成的几丁质酶*OfChtIII*(图1)。对它们的理化性质、生理功能和三维结构进行了系统研究,为

新型绿色杀虫剂创制提供了具有潜力的新靶标。

2.1.1 新靶标的结构

(1) 表皮几丁质降解酶:*OfChtI*、*OfChtII*、*OfChi-h*

几丁质酶是参与几丁质降解的一类酶。最近,对于鳞翅目昆虫亚洲玉米螟蜕皮至关重要的三个几丁质酶(*OfChtI*、*OfChtII*和*OfChi-h*)的晶体结构得到了解析^[26-28]。结构分析发现它们的催化域整体结构具有很高的相似性,通常都包含一个核心区域和一个插入域。其中,核心区域由8个 α 螺旋和8个 β 折叠构成,形成一种折叠桶结构。核心区域含有四个保守的基序,催化三联体DxDxE位于 β_4 和 α_4 之间的第二个保守基序。插入域形成了底物结合裂缝的一面墙,使得底物结合裂缝变深。此外,不同的几丁质酶还具有一些与其功能相关的独特的结构特征。*OfChtI*含有一条长且两端开放的底物结合裂缝,十个芳香族残基沿着底物结合裂缝对称分布于催化中心两侧,用于结合底物的糖基。此外,在底物结合裂缝的末端,有四个芳香族残基形成一个疏水平面,对这些氨基酸进行定点突变和组合突变证明了这个独特的疏水平面可以增加酶与几丁质结合的亲和力^[26]。*OfChi-h*是昆虫通过基因水平转移获得的几丁质酶,它的结构与其细菌同源物相似,是一种典型的进程性几丁质外切酶。*OfChi-h*含有一条长而不对称的底物结合裂缝,其非还原端含有13个芳香族残基而还原端只有两个。此外,底物结合裂缝一侧存在一段独特序列,形成了两个额外的

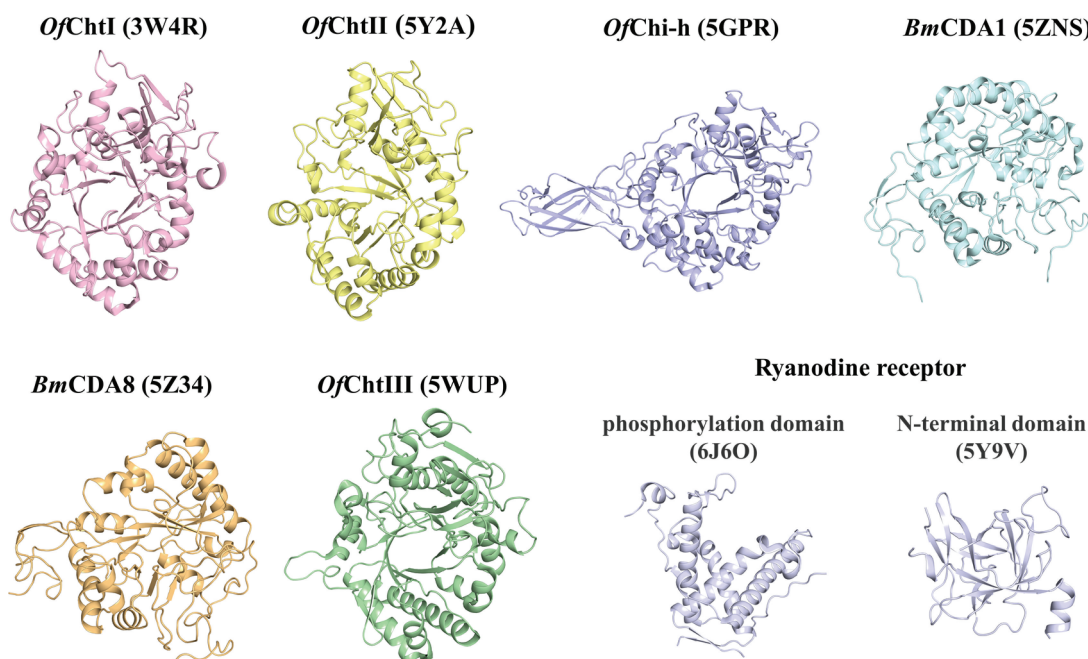


图1 原创分子靶标的结构(括号内为蛋白的PDB登录号)

α 螺旋, 使得底物结合裂缝更深更窄^[27]。OfChtII 具有多个催化域和几丁质结合模块, 其催化域的表面存在着一条长且深的底物结合裂缝, 表现出几丁质内切酶的结构特征。虽然芳香族残基在 OfChtII 催化中心两侧的分布也是不对称的, 但是酶与底物之间的相互作用主要集中在 -2 至 +2 亚位点之间。在底物结合裂缝以外 OfChtI 缺乏有利于底物结合的结构元件, 但是其众多的几丁质结合模块提供了额外的高亲和力^[28]。不同的结构特征使得三个几丁质酶在蜕皮过程中发挥着不同的作用, OfChtII 作为第一个发挥功能的内切酶, 可以将几丁质纤维的表面烧蚀, 将结晶几丁质打碎成小片, 从而增加了后续表达的 OfChtI 和 OfChi-h 与底物接触的机会。OfChtI 作为内切几丁质酶, 随机结合于底物上但倾向于从非还原端开始水解几丁质链。OfChi-h 是一种具有进程性的外切几丁质酶, 能将几丁质链从其还原端开始水解。此外, 利用高速原子力显微镜观察到 OfChi-h 能形成大的蛋白质颗粒, 以快速降解底物。同时 OfChi-h 对经 OfChtI/OfChtII 预处理后的底物的水解效率和进程性显著提升。因此, 三个几丁质酶必须协同作用才能实现表皮几丁质快速高效的降解。

(2) 参与几丁质修饰的脱乙酰基酶: *BmCDA1*、*BmCDA8*

几丁质脱乙酰基酶(CDA)是一种几丁质胞外修饰酶, 能催化几丁质的乙酰基团离去形成壳聚糖。这种修饰可能有助于壳聚糖与特异性的蛋白质结合, 使得不同组织的几丁质基质具有不同的生物力学性质, 包括硬度、厚度和柔韧性等。CDA 在昆虫蜕皮过程中发挥重要作用, 干扰其表达会使昆虫蜕皮障碍而导致死亡^[29]。同时, 一些 CDA 可能参与构成围食膜的结构及调节围食膜的通透性, 抑制这类 CDA 可能会破坏围食膜的防御功能, 从而使昆虫受到外源病原菌或毒素的入侵^[30]。因此, 昆虫 CDA 也被认为是新型杀虫剂开发的潜在靶标。最近, 有研究者解析了来源于家蚕的两个 CDA 的结构, 分别是参与表皮几丁质修饰的 *BmCDA1* 和参与中肠围食膜几丁质修饰的 *BmCDA8*^[31]。与细菌和真菌来源的 CDA 结构对比分析发现, 昆虫来源的 CDA 具有独特的结构特征。*BmCDA8* 具有两个特有的结构元件: (β/α)₇ 折叠桶上的 loop 插入区和 C 端 loop 区, 它们参与构成底物结合裂缝的两端, 形成一种独特的长底物结合裂缝结构。*BmCDA1* 的底物结合裂缝也存在其独特的结构: 一是 +2 位点的突变阻

碍了酶与底物产生相互作用; 二是 *BmCDA1* 的底物结合裂缝相对更为开放, 并缺少疏水氨基酸残基。这些特有的结构使得开发选择性的活性小分子特异性靶向昆虫 CDA 成为可能。

(3) 参与几丁质合成的几丁质酶: OfChtIII

OfChtIII 具有两个催化域, 它们具有很高的序列一致性(56%)和结构相似性(RMSD=0.88 Å)。两个催化域都含有一条短而浅的底物结合裂缝。与其他几丁质酶相比, OfChtIII 缺少了增加底物结合裂缝深度的两个结构片段。这些结构特征使得 OfChtIII 只对单链的几丁质底物有活性, 而不能水解高聚的几丁质底物。此外, OfChtIII 与几丁质合酶 OfChsA 共定位于细胞膜上。因此, OfChtIII 可能参与了几丁质合成过程而不是几丁质降解^[32]。

2.1.2 靶向几丁质代谢的活性小分子

目前对于活性小分子的研究主要集中在几丁质酶抑制剂的开发上。鉴于昆虫几丁质酶在蜕皮、几丁质合成等方面起着关键作用, 抑制几丁质酶活性的小分子可以干扰昆虫的正常生理活动而作为杀虫剂开发的先导。在过去的几十年里, 人们已经发现了一系列几丁质酶抑制剂, 其中一些已经被证实具有生物活性(表 1)^[33-36]。

(1) 糖基骨架的抑制剂

由于昆虫几丁质酶采取底物辅助的催化机制, 因此, 模拟底物结构或反应中间体的糖基骨架的小分子可以作为昆虫几丁质酶的抑制剂。壳寡糖(GlcNs)作为底物类似物对昆虫几丁质酶如 OfChtI、OfChtII 和 OfChi-h 都表现出良好的抑制效果, 其抑制活性与寡糖链的长度相关^[27, 37, 38]。注射壳寡糖混合物后会导致亚洲玉米螟蜕皮受阻而死亡。酶与抑制剂的复合物晶体如 OfChtI/(GlcN)₅ 和 OfChi-h/(GlcN)₇ 表明, 抑制剂的结合模式与底物类似, 主要通过糖环与蛋白的芳香族残基的疏水堆积作用。另外一种底物类似物 TMG-(GlcNAc)₄ 不仅能在体外抑制 OfChi-h 的活性, 也能影响亚洲玉米螟幼虫的变态发育^[27]。Allosamidin 是一个从放线菌的菌丝中分离的天然假三糖, 是报道最早、研究最多的几丁质酶抑制剂^[39]。它对不同物种来源的几丁质酶都表现出抑制活性, 而且它能够通过抑制蜕皮表现出杀虫活性, 尤其是对鳞翅目幼虫^[34]。Allosamidin 与几丁质酶的复合物晶体揭示了其模拟反应中间体沿着底物结合裂缝占据 -3 至 -1 的亚位点^[40]。Allosamizoline 基团深入到 -1 亚位点的活性口袋中, 与蛋白形成多种分子间的相互作用;

表1 靶向昆虫几丁质酶的活性小分子

活性小分子	分子靶标	生物活性	参考文献
(GlcN) _n	亚洲玉米螟几丁质酶 <i>OfChtI</i> 、 <i>OfChtII</i> 、 <i>OfChi-h</i>	幼虫蜕皮受阻,死亡率增加	[27, 37, 38]
TMG-(GlcNAc) ₄	亚洲玉米螟几丁质酶 <i>OfChi-h</i>	影响幼虫的变态发育	[27]
Allosamidin	包括家蚕、桃蚜、埃及伊蚊在内的多种昆虫的几丁质酶	造成生长发育和蜕皮受阻,增加死亡率,影响围食膜通透性和生育能力	[34]
FPS-1	斜纹夜蛾几丁质酶	抑制生长	[34]
DP2S	桃蚜、马铃薯长管蚜几丁质酶	幼虫生长受抑制,死亡率增加,生育能力降低	[34]
GlcNAc(β1,4)Glc	桃蚜几丁质酶	增加死亡率	[41]
Phlegmacin B ₁	亚洲玉米螟几丁质酶 <i>OfChi-h</i>	抑制幼虫蜕皮,死亡率上升	[42]
Berberine	亚洲玉米螟几丁质酶 <i>OfChtI</i>	抑制幼虫的生长发育,死亡率增加	[43]
SBVS compounds	亚洲玉米螟几丁质酶 <i>OfChtI</i>	—	[44-46]
DP、PT、NI	亚洲玉米螟几丁质酶 <i>OfChtII</i> 、 <i>OfChi-h</i>	导致幼虫发育和化蛹的缺陷,死亡率增加	[38, 47]
Argifin, Argadin	包括美洲大蠊在内的多种生物的几丁质酶	幼虫生长发育受阻,死亡率增加	[34]
Psammaphin A	包括果蝇、桃蚜、小菜蛾在内的多种昆虫的几丁质酶	抑制幼虫的生长发育,死亡率增加,影响生育能力	[34]

两个 *N*-acetyl-D-allosamine 基团通过疏水堆积和氢键占据了一2和一3的亚位点。其他糖基骨架的抑制剂还包括^[34];FPS-1是一种水溶性的天然多糖,对斜纹夜蛾(*Prodenia litura*)几丁质酶表现出高效的抑制活性。DP2S是一种人工合成的二糖,对蚜虫有毒害作用,会导致幼虫死亡,生育能力下降。GlcNAc(β1,4)Glc虽然在体外对几丁质酶的抑制活性不高,但是具有很强的杀蚜虫活性^[41]。

(2)非糖基骨架的抑制剂

Phlegmacin B₁是一种微生物的次生代谢物,能高效的抑制 *OfChi-h* 的活性($K_i = 0.84 \mu\text{M}$),而且注射和饲喂实验均证明了 Phlegmacin B₁ 具有杀虫效果,能抑制亚洲玉米螟幼虫蜕皮^[42]。分子对接和动力学研究表明,Phlegmacin B₁ 通过疏水作用和氢键结合于底物结合裂缝-3至+1位点。一个 preanthraquinone 基团被 Trp268和Trp532夹在中间,另一个 preanthraquinone 基团结合在 Trp160、Ile200、Thr269和Leu270形成的小疏水口袋中。

小檗碱 Berberine 是一种来源于植物的天然产物,具有多种药用和农业用途。最近发现小檗碱及其衍生物可以抑制包括 *OfChtI* 在内的多种糖基水解酶,而且可以通过抑制亚洲玉米螟幼虫的生长发育表现出杀虫活性^[43]。分子对接发现小檗碱主要

通过与保守的色氨酸残基形成 $\pi-\pi$ 堆积结合在几丁质酶的底物结合裂缝中。

针对 *OfChtI* 进行基于结构的虚拟筛选(SBVS)及活性测定,从400多万化合物中筛选出17个具有新骨架结构的几丁质酶抑制剂^[44]。这些化合物可以分为两大类:FQ(furo[2,3-b]quinoline-2-carboxamide)系列能特异性抑制 *OfChtI* 的活性,而TP(5,6,7,8-tetrahydrothieno[2,3-b][1,6]-naphthyridin-6-ium-2-carboxamide)系列对不同来源的几丁质酶具有广泛的抑制活性。其中活性最高的化合物是FQ3,对 *OfChtI* 的 IC_{50} 值 $6.4 \mu\text{M}$ 。分子对接表明这些抑制剂能同时占据底物结合裂缝的还原端和非还原端,主要结合在一2至+2亚位点之间。另外一种通过SBVS发现的几丁质酶抑制剂新骨架是2-amino-6-methyl-4,5,6,7-tetrahydrobenzo-[b]thiophene-3-carboxylic acid ethyl ester^[45]。基于该骨架合成开发了一系列抑制剂。其中活性最好的衍生物对 *OfChtI* 的 K_i 为 $1.5 \mu\text{M}$ 。分子对接表明,它们主要通过与芳香残基的疏水堆积作用占据了底物结合裂缝的一1到一3亚位点。进一步优化获得了一个活性更高的化合物,对 *OfChtI* 的 K_i 达到了 $0.71 \mu\text{M}$,对接发现抑制剂6位的非极性基团巨大的空间位阻增强了化合物与周围

氨基酸残基的相互作用,从而提高了抑制活性^[46]。

以 *OfChtII* 为靶点筛选发现了三种高效的抑制剂,分别是二吡啶-嘧啶衍生物(DP)、嘧啶-噻诺吡啶衍生物(PT)和萘酰亚胺衍生物(NI)^[38]。尽管这几个抑制剂的骨架结构各不相同,但活性测定和复合物晶体结构发现它们具有相似的抑制活性和结合模式。这三个抑制剂都含有一个大的疏水基团和一个小的疏水基团,大疏水基团与 +1/+2 亚位点的保守色氨酸形成 $\pi-\pi$ 疏水堆积作用,而小疏水基团深入位于 -1 亚位点的疏水口袋。这些抑制剂也表现出了一定的杀虫活性,将它们注射入亚洲玉米螟体内会导致幼虫发育和化蛹的缺陷。此外,化合物 DP 对 *OfChi-h* 也有较强的抑制作用,基于该骨架结构筛选得到了一系列的衍生物^[47]。其中活性最好的化合物对 *OfChi-h* 的 K_i 达到了 9 nM,这是目前为止活性最高的昆虫几丁质酶抑制剂。该化合物与 *OfChi-h* 的复合物晶体结构表明,双吡啶-嘧啶基团结合在底物结合裂缝的 +1 和 +2 亚位点,夹在两个保守的色氨酸中间。3-吡啶甲基羧酰胺基团朝 -1 亚位点延伸靠近催化残基,1-四氢咪喃基团与酶形成两个氢键,进一步稳定了抑制剂的结合。

多肽骨架的化合物能模拟糖基-蛋白质的相互作用从而抑制几丁质酶的活性^[34]。Argifin 和 argadin 是其中两个具有代表性的小分子,它们是从真菌中提取的环戊肽天然产物,对不同来源的几丁质酶有广泛的抑制活性,而且对美洲大蠊 (*Periplaneta americana*) 表现出一定的杀虫效果。Psammaphin A 是一种来源于斐济海绵的溴化酪氨酸天然产物,它是一种非竞争性的几丁质酶抑制剂,具有抗真菌和杀虫活性。

此外,还有许多化合物也被报道能抑制其他生物来源的几丁质酶的活性,但是这些化合物对昆虫几丁质酶的抑制活性和体内生物活性尚未见报道。同时,针对其他几丁质代谢蛋白的活性小分子也在开发中。

2.2 昆虫鱼尼丁受体

以昆虫鱼尼丁受体为靶标的双酰胺类杀虫剂是近年来开发出的针对鳞翅目和鞘翅目害虫的高效、低毒新型绿色杀虫剂^[48]。目前已有 5 种双酰胺类杀虫剂上市,包括拜耳公司的氟苯虫酰胺、杜邦公司的氯虫苯甲酰胺、先正达公司的溴氰虫酰胺、沈阳化工研究院的四氯虫酰胺和日本石原产业公司的环溴虫酰胺,每年总销量超过 20 亿美元,是目前最为绿色环保的杀虫剂之一。双酰胺通过激活鱼尼丁受体

造成钙离子的持续释放,引起昆虫肌肉瘫痪从而达到杀虫效果。鱼尼丁受体作为杀虫剂靶标的突出优势是因其靶标和非靶标物种之间的显著差异而产生的杀虫剂高选择性。昆虫鱼尼丁受体和类鱼尼丁受体的同源性约在 40% 左右。双酰胺与昆虫鱼尼丁受体结合的 K_d 为 5~50 nM,比与哺乳动物的结合 K_d 低 300~2 000 倍,同时双酰胺对蜜蜂等非靶标生物也相对安全。不过,靶向鱼尼丁受体的杀虫剂的主要问题是害虫靶标抗性突变的快速多点产生和抗性种群的广泛蔓延。目前在小菜蛾 (*Plutella xylostella*)、甜菜夜蛾 (*Asparagus caterpillar*)、草地贪夜蛾 (*Spodoptera frugiperda*)、番茄潜叶蛾 (*Tuta absoluta*) 及二化螟 (*Chilo suppressalis*) 等农业害虫都发现带有鱼尼丁受体突变的抗性种群,导致用药量加大。

鱼尼丁受体分子量超过 2.2 MDa,单体由约 20 个功能域组成。前期发现的抗性突变多位于跨膜区,由此推测双酰胺的结合位点也位于通道跨膜区。然而多个非跨膜区的功能域在通道开关门控调节中都起到了关键作用,可作为新的潜在杀虫剂作用靶点。近年来研究者们解析了多个昆虫鱼尼丁受体高分辨率晶体结构,包括小菜蛾鱼尼丁受体 N 端功能域^[49]、磷酸化功能域^[50]、SPRY2 功能域晶体结构^[51](图 1)以及蜜蜂的 N 端功能域晶体结构,在分子水平揭示了昆虫鱼尼丁受体门控及受细胞内信号调节的分子机制。通过对比害虫与其他非靶标物种鱼尼丁受体的结构差异,发现了若干具有显著害虫特异性结构特征,且在通道开关调控中起重要作用的位点,可作为新的作用靶点开发选择性杀虫剂^[52-54]。结合鱼尼丁受体结构和计算机建模,揭示了昆虫鱼尼丁受体受多个小分子调节剂及双酰胺调控的分子机制及抗性产生的分子模型^[55]。靶向功能鱼尼丁受体的新的杀虫剂候选化合物也在开发中。近期,研究者利用冷冻电子显微镜技术解析了鱼尼丁受体与双酰胺类杀虫剂的复合物结构,杀虫剂结合口袋的局部分辨率达到 3.2 Å(未发表),清晰揭示了双酰胺的结合位点和作用方式,为下一步双酰胺类杀虫剂改造优化提供了理论依据和结构模板。

3 政策建议

绿色杀虫剂原创分子靶标意义重大,已经成为保证国家粮食安全的战略性物资。然而原创分子靶标的研究过程也存在着很多难点和挑战,例如需要

获得靶标的晶体结构,如何在不同害虫的同源靶标间找到高效靶点,以及如何兼顾杀虫剂的绿色和高效等。基于近年来已开展的原创性杀虫剂分子靶标研究的成果,我们对今后推进安全高效的绿色杀虫剂的原始创新提供几点建议:(1) 靶标原始创新时要关注害虫独特代谢通路。目前市场上杀虫剂针对的靶标如乙酰胆碱受体等在各种动植物体内广泛分布,它们虽然起效快,但对非靶标生物有毒性。而实际上昆虫含有许多特有的生理过程,包括蜕皮、化蛹等,这些独特代谢通路中的关键蛋白在非靶标生物中缺乏同源类似物,因此可能是绿色杀虫剂开发的潜在靶标。目前大部分农业害虫属于鳞翅目和鞘翅目昆虫,我们尤其要关注这些昆虫中独有的关键蛋白。(2) 推进靶标的结构解析。目前杀虫剂种类繁多,但是占据市场 80% 以上的都是靶向于 4 个已知结构的蛋白,许多杀虫剂的靶标缺乏原子尺度的信息,限制了对其进一步开发和优化的空间。因此,需要大力推进对已有靶标和潜在靶标的结构生物学研究,这不仅有利于新型杀虫剂的创制,也有助于改善抗性风险。(3) 推进害虫特有生理过程多靶标杀虫剂设计。过去的几十年,不管是医药还是农药设计,都追求药物分子要作用于单一靶点。然而随着科学研究的发展,人们发现这种基于单一靶点的方法并不总会保证成功,而且会很快产生抗药性。靶向不同机制多种农药的混合使用、轮换使用是目前应对农药抗性的主要方法,然而这也意味着多重环境风险的叠加。因此,靶向多个不同分子靶标的单一农药小分子不仅可以在满足低抗药性风险的同时不增加安全隐患,其生物活性也较单靶标药物显著提高。例如针对杀线剂 closantel 及其衍生物的研究表明,同时靶向线虫几丁质酶和具有质子载体功能的双功能化合物较单一功能化合物具有更好的杀虫效果和更低的抗性风险。因此,多靶标杀虫剂,尤其是靶向于害虫特有生理过程的多靶标杀虫剂,能兼顾绿色和高效的特征,应成为未来绿色杀虫剂开发的重要方向之一。

参 考 文 献

- [1] Lamberth C, Jeanmart S, Luksch T, et al. Current challenges and trends in the discovery of agrochemicals. *Science*, 2013, 341(6147): 742—746.
- [2] Rathore HS, Nollet LML. *Pesticides: evaluation of environmental pollution*. CRC Press, 2012.
- [3] Manjon C, Troczka BJ, Zaworra M, et al. Unravelling the molecular determinants of bee sensitivity to neonicotinoid insecticides. *Current Biology*, 2018, 28(7): 1137—1143.
- [4] Sparks TC. *Insecticide discovery: an evaluation and analysis*. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 2013, 107(1): 8—17.
- [5] Smith S. Combinatorial chemistry in the development of new crop protection products. *Pesticide Outlook*, 2003, 14(1): 21—26.
- [6] Sparks TC, Nauen R. IRAC: Mode of action classification and insecticide resistance management. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 2015, 121(SD): 122—128.
- [7] Casida JE, Durkin KA. Neuroactive insecticides: targets, selectivity, resistance, and secondary effects. *Annual Review of Entomology*, 2013, 58: 99—117.
- [8] Bourne Y, Radic Z, Araoz R, et al. Structural determinants in phycotoxins and AChBP conferring high affinity binding and nicotinic AChR antagonism. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2010, 107(13): 6076—6081.
- [9] Dvir H, Silman I, Harel M, et al. Acetylcholinesterase: from 3D structure to function. *Chemico-Biological Interactions*, 2010, 187(1-3)(SI): 10—22.
- [10] Planamente S, Vigouroux A, Mondy S, et al. A conserved mechanism of GABA binding and antagonism is revealed by structure-function analysis of the periplasmic binding protein Atu2422 in *Agrobacterium tumefaciens*. *Journal of Biological Chemistry*, 2010, 285(39): 30294—30303.
- [11] Alam A, Jiang YX. Structural analysis of ion selectivity in the NaK channel. *Nature Structural & Molecular Biology*, 2009, 16(1): 35—41.
- [12] Jeschke P, Nauen R, Schindler M, et al. Overview of the status and global strategy for neonicotinoids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2011, 59(7)(SI): 2897—2908.
- [13] Taillebois E, Cartereau A, Jones AK, et al. Neonicotinoid insecticides mode of action on insect nicotinic acetylcholine receptors using binding studies. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 2018, 151(SD): 59—66.
- [14] Cordova D, Benner EA, Schroeder ME, et al. Mode of action of triflumezopyrim: A novel mesoionic insecticide which inhibits the nicotinic acetylcholine receptor. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 2016, 74: 32—41.
- [15] Thapa S, Lv M, Xu H. Acetylcholinesterase: A primary target for drugs and insecticides. *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry*, 2017, 17(17): 1665—1676.
- [16] Buckingham SD, Ihara M, Sattelle DB, et al. Mechanisms of action, resistance and toxicity of insecticides targeting GABA receptors. *Current Medicinal Chemistry*, 2017, 24(27): 2935—2945.
- [17] Zhorov BS, Dong K. Elucidation of pyrethroid and DDT receptor sites in the voltage-gated sodium channel. *Neurotoxicology*, 2017, 60(SD): 171—177.
- [18] Overington JP, Al-Lazikani B, Hopkins AL. How many drug targets are there? *Nature Reviews Drug Discovery*, 2006, 5(12): 993—996.
- [19] Zheng CJ, Han LY, Yap CW, et al. Progress and problems in the exploration of therapeutic targets. *Drug Discovery Today*, 2006, 11(9-10): 412—420.

- [20] Anderson AC. The process of structure-based drug design. *Chemistry & Biology*, 2003, 10(9): 787—797.
- [21] Kuntz ID. Structure-based strategies for drug design and discovery. *Science*, 1992, 257(5073): 1078—1082.
- [22] Van Leeuwen T, Demaeght P, Osborne EJ, et al. Population bulk segregant mapping uncovers resistance mutations and the mode of action of a chitin synthesis inhibitor in arthropods. *Proceeding of National Academy of Sciences of the United States America*, 2012, 109(12): 4407—4412.
- [23] Douris V, Steinbach D, Panteleri R, et al. Resistance mutation conserved between insects and mites unravels the benzoylurea insecticide mode of action on chitin biosynthesis. *Proceeding of National Academy of Sciences of The United States America*, 2016, 113(51): 14692—14697.
- [24] Qu MB, Ma L, Chen P, et al. Proteomic analysis of insect molting fluid with a focus on enzymes involved in chitin degradation. *Journal of Proteome Research*, 2014, 13(6): 2931—2940.
- [25] Liu L, Qu M, Yang J, et al. The physiological differentiation along the midgut of *Bombyx mori*-inspirations from proteomics and gene expression patterns of the secreted proteins in the ectoperitrophic space. *Insect Molecular Biology*, 2018, 27(2): 247—259.
- [26] Chen L, Liu T, Zhou Y, et al. Structural characteristics of an insect group I chitinase, an enzyme indispensable to moulting. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, 2014, 70(4): 932—942.
- [27] Liu T, Chen L, Zhou Y, et al. Structure, catalysis, and inhibition of *OfChi-h*, the lepidoptera-exclusive insect chitinase. *Journal of Biological Chemistry*, 2017, 292(6): 2080—2088.
- [28] Chen W, Qu MB, Zhou Y, et al. Structural analysis of group II chitinase (ChtII) catalysis completes the puzzle of chitin hydrolysis in insects. *Journal of Biological Chemistry*, 2018, 293(8): 2652—2660.
- [29] Quan GX, Ladd T, Duan J, et al. Characterization of a spruce budworm chitin deacetylase gene: stage- and tissue-specific expression, and inhibition using RNA interference. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 2013, 43(8): 683—691.
- [30] Jakubowska AK, Caccia S, Gordon KH, et al. Downregulation of a chitin deacetylase-like protein in response to baculovirus infection and its application for improving baculovirus infectivity. *Journal of Virology*, 2010, 84(5): 2547—2555.
- [31] Liu L, Zhou Y, Qu MB, et al. Structural and biochemical insights into the catalytic mechanisms of two insect chitin deacetylases of the carbohydrate esterase 4 family. *Journal of Biological Chemistry*, 2019, 294(15): 5774—5783.
- [32] Liu T, Zhu WX, Wang J, et al. The deduced role of a chitinase containing two nonsynergistic catalytic domains. *Acta Crystallographica Section D-Structural Biology*, 2018, 74: 30—40.
- [33] Andersen OA, Dixon MJ, Eggleston IM, et al. Natural product family 18 chitinase inhibitors. *Natural Product Reports*, 2005, 22(5): 563—579.
- [34] Saguez J, Vincent C, Giordanengo P. Chitinase inhibitors and chitin mimetics for crop protection. *Pest Technology*, 2008, 2: 81—86.
- [35] Liu T, Chen L, Ma Q, et al. Structural insights into chitinolytic enzymes and inhibition mechanisms of selective inhibitors. *Current Pharmaceutical Design*, 2013, 20(5): 754—770.
- [36] Tetreau G, Wang P. Chitinous structures as potential targets for insect pest control. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 2019, 1142: 273—292.
- [37] Chen L, Zhou Y, Qu MB, et al. Fully deacetylated chitooligosaccharides act as efficient glycoside hydrolase family 18 chitinase inhibitors. *Journal of Biological Chemistry*, 2014, 289(25): 17932—17940.
- [38] Chen W, Zhou Y, Yang Q. Structural dissection reveals a general mechanistic principle for group II chitinase (ChtII) inhibition. *Journal of Biological Chemistry*, 2019, 294(24): 9358—9364.
- [39] Sakuda S, Isogai A, Matsumoto S, et al. The structure of allosamidin, a novel insect chitinase inhibitor, produced by *Streptomyces* Sp. *Tetrahedron Letters*, 1986, 27(22): 2475—2478.
- [40] Liu T, Guo XG, Bu YF, et al. Structural and biochemical insights into an insect gut-specific chitinase with antifungal activity. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 2020, 119: 103326.
- [41] Dussouy C, Bultel L, Saguez J, et al. Strong aphicidal activity of GlcNAc ($\beta 1 \rightarrow 4$) Glc disaccharides: synthesis, physiological effects, and chitinase inhibition. *Chemistry—A European Journal*, 2012, 18(32): 10021—10028.
- [42] Chen L, Liu T, Duan YW, et al. Microbial secondary metabolite, phlegmacin B1, as a novel inhibitor of insect chitinolytic enzymes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2017, 65(19): 3851—3857.
- [43] Duan YW, Liu T, Zhou Y, et al. Glycoside hydrolase family 18 and 20 enzymes are novel targets of the traditional medicine berberine. *Journal of Biological Chemistry*, 2018, 293(4): 15429—15438.
- [44] Jiang X, Kumar A, Liu T, et al. A novel scaffold for developing specific or broad-spectrum chitinase inhibitors. *Journal of Chemical Information and Modeling*, 2016, 56(12): 2413—2420.
- [45] Dong YW, Jiang X, Liu T, et al. Structure-based virtual screening, compound synthesis, and bioassay for the design of chitinase inhibitors. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2018, 66(13): 3351—3357.
- [46] Dong YW, Hu S, Jiang X, et al. Pocket-based lead optimization strategy for the design and synthesis of chitinase inhibitors. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2019, 67(13): 3575—3582.

- [47] Jiang X, Kumar A, Motomura Y, et al. A series of compounds bearing a dipyrro-pyrimidine scaffold acting as novel human and insect pest chitinases inhibitors. *Journal of Medicinal Chemistry*, 2020, 63(3): 987–1001.
- [48] Sun ZQ, Xu H. Ryanodine receptors for drugs and insecticides: an overview. *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry*, 2019, 19(1): 22–33.
- [49] Lin LY, Liu C, Qin J, et al. Crystal structure of ryanodine receptor N-terminal domain from *Plutella xylostella* reveals two potential species-specific insecticide-targeting sites. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 2018, 92: 73–83.
- [50] Xu T, Yuchi ZG. Crystal structure of diamondback moth ryanodine receptor Repeat34 domain reveals insect-specific phosphorylation sites. *BMC Biology*, 2019, 17(1): 77.
- [51] Zhou YY, Ma D, Lin LY, et al. Crystal structure of the ryanodine receptor SPRY2 domain from the diamondback moth provides insights into the development of novel insecticides. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2020, 68(6): 1731–1740.
- [52] Yuchi ZG, Yuen SM, Lau K, et al. Crystal structures of ryanodine receptor SPRY1 and tandem-repeat domains reveal a critical FKBP12 binding determinant. *Nature Communications*, 2015, 6: 7947.
- [53] Yuchi Z, Lau K, Van Petegem F. Disease mutations in the ryanodine receptor central region: crystal structures of a phosphorylation hot spot domain. *Structure*, 2012, 20(7): 1201–1211.
- [54] Kimlicka L, Tung CC, Carlsson AC, et al. The cardiac ryanodine receptor N-terminal region contains an anion binding site that is targeted by disease mutations. *Structure*, 2013, 21(8): 1440–1449.
- [55] Lin LY, Hao ZY, Cao P, et al. Homology modeling and docking study of diamondback moth ryanodine receptor reveals the mechanisms for channel activation, insecticide binding and resistance. *Pest Management Science*, 2020, 76(4): 1291–1303.

Challenges and Future Directions for Greener Insecticide Molecular Targets

Chen Wei¹ Chen Qi¹ Yuchi Zhiguang² Yang Qing^{1*}

1. *State Key Laboratory for Biology of Plant Diseases and Insect Pests/Institute of Plant Protection, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100193*

2. *School of Pharmaceutical Science and Technology, Tianjin University, Tianjin 300072*

Abstract Green insecticides ensure plant protection and thus food supply for a nation in a view of national strategies. To meet the global demands for greener and more sustainable agriculture, developing target-selective insecticides, namely human-and other non-target organism-safe insecticides, has become an inevitable trend and a hot topic. It is highly dependent on novel and greener molecular targets. On the one hand, more than 80% of insecticides are designed based on crystal structures of only four molecular targets, leading to extremely high resistance of pests. On the other hand, rapid progress in biotechnologies such as genome-sequencing and functional verification offers a number of gene candidates, which are crucial for growth and development of pests, for developing novel molecular targets. However, the challenge we are facing is how to make use of these resources to obtain innovative molecular targets. The difficulty in obtaining the atomic-level structural information of target candidates and the interactions between bioactive molecules and molecular targets is another issue. In the latest decades, it is urgent for China to establish a system for green molecular targets' mining and exploiting, promoting the leading role of China in green insecticides innovation and the industry relevant.

Keywords insecticide; molecular target; insect growth regulator; chitin; ryanodine receptor

(责任编辑 张强 吴妹)

* Corresponding Author, Email: qingyang@dlut.edu.cn