

令和元年5月31日現在

機関番号：17401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K07414

研究課題名(和文) 環境保全型農薬として期待される精油とその標的受容体の昆虫種間比較薬理解析

研究課題名(英文) Comparative pharmacology of essential oils as eco-friendly insecticidal compounds on insect octopamine and tyramine receptors

研究代表者

太田 広人(Ohta, Hiroto)

熊本大学・大学院先端科学研究部(工)・特任准教授

研究者番号：60450334

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：現在の害虫防除の分野では、総合的病害虫管理(IPM)の観点から、環境負荷の小さな殺虫剤の開発が求められている。我々は、従来までの合成化合物ではなく、環境保全型の農薬として期待される精油に着目し、昆虫オクトパミン・チラミン受容体に対する影響を調べてきた。その結果、オクトパミン受容体にはあまり作用しないが、チラミン受容体に対して、精油のチモールやカルバクロールが特異な作用(アロステリック様作用)を示すことを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

総合的病害虫管理(IPM)の観点から、人畜安全性はもちろん、ミツバチなどの有益昆虫にも無害で、環境にも影響を与えない農薬開発が強く求められている。本研究の成果は、環境保全型の農薬として期待される精油の新しい作用機構を提案している。この作用機構を利用すれば、従来の合成化合物ではなく、天然由来成分である精油による、安心・安全な殺虫剤・制御剤を開発できる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：We examined the effects of essential oils as eco-friendly insecticidal compounds, as opposed to conventional synthetic compounds, on insect octopamine and tyramine receptors. Test essential oils hardly acted on octopamine receptors, but thymol and carvacrol showed a peculiar action (allosteric-like action) on tyramine receptors.

研究分野：農薬科学

キーワード：昆虫 農薬 カイコ ミツバチ オクトパミン チラミン 受容体 精油

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

世界的な人口増加とさらなる食料需要が避けられない中、安定的かつ効率的な作物生産を持続的に行ううえで、農薬は欠かすことができない。現在の害虫防除の分野では、総合的病害虫管理 (IPM) の観点から、環境負荷の小さな殺虫剤の開発が求められている。人畜安全性はもちろん、ミツバチなどの有益昆虫にも無害で、環境にも影響を与えない農薬開発が必要不可欠となっている。この状況を踏まえ、我々は環境保全型の新しい農薬開発に向けて、従来までの合成化合物ではなく、殺虫作用や忌避作用を持つ天然由来成分の精油に着目した。

一般に殺虫剤は、ある特定の標的タンパク質に作用し、殺虫活性を発現する。その一つに、GPCR (G タンパク質共役型受容体) の一種 “生体アミン受容体” がある。昆虫の中樞神経系に存在するオクトパミン (OA) やチラミン (TA) などの生体アミン (図 1) が細胞膜に存在する OA 受容体 (OAR) 及び TA 受容体 (TAR) に結合すると、細胞内メッセンジャー分子である cAMP の上昇または抑制、カルシウム ( $\text{Ca}^{2+}$ ) の濃度上昇などが生じ、様々な生理機能が調節される。最近の研究で、OAR/TAR への精油の直接的作用が殺虫活性を引き起こすことが分かってきた。このことは、必ずしも合成化合物を用いる必要はなく、天然に豊富に存在する安全性の高い精油で、害虫を十分防除できることを意味している。そこで、OAR/TAR を標的とする天然由来成分の精油を農薬に応用できれば、ミツバチなどの有益昆虫や環境に影響を与えない、環境保全型の害虫防除が可能になると考えた。

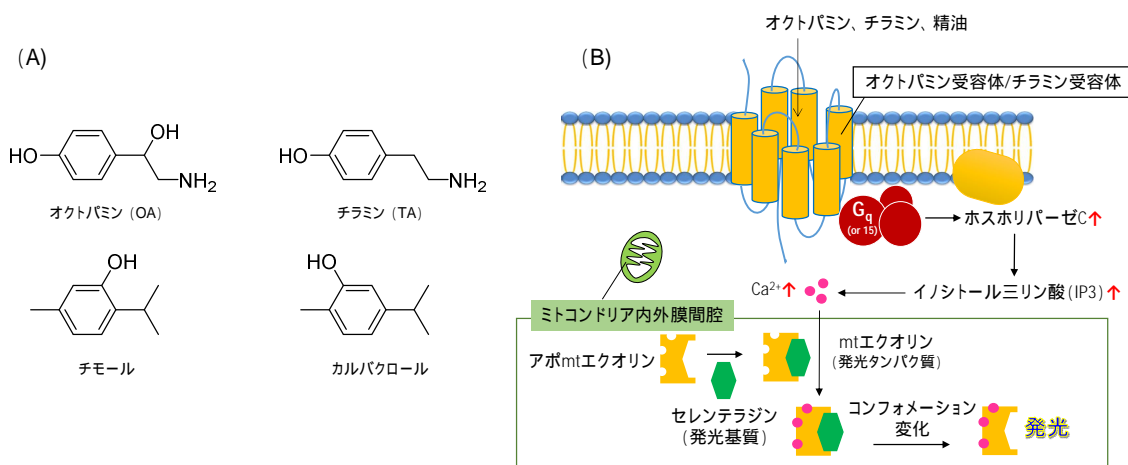


図 1. (A) 生体アミン (オクトパミンとチラミン) 及び精油 (チモールとカルバクロール) の構造、(B) エクオリンアッセイの原理

### 2. 研究の目的

本研究では、“有益昆虫のミツバチには作用せず、害虫種にのみ作用する精油”を同定し、環境保全型の新しい害虫防除剤の開発を目指して、殺虫性精油の標的受容体と考えられる OAR/TAR を、ミツバチを含むいくつかの昆虫種からクローニングし、これら受容体に対する殺虫性精油の作用性を評価・比較することを目的とした。

### 3. 研究の方法

4 種類の昆虫 (チョウ目害虫モデルのカイコ、甲虫目害虫のコクヌストモドキ、半翅目害虫のウンカ、益虫ミツバチ) から OAR/TAR をクローニングすることを計画した。これら 4 種類の昆虫から、すでに同定済みの OAR/TAR 遺伝子は除き、未同定の当該遺伝子のクローニングを進めた。クローニングした受容体に対する精油のアゴニスト・アンタゴニスト作用の評価には、エクオリン (AEQ) アッセイと呼ばれる細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  をモニターするアッセイ法 (図 1) を用いた。

培養細胞 HEK-293 にそれぞれの受容体とアポ mtAEQ( AEQ の  $Ca^{2+}$  応答性を高めるために作製したミトコンドリア移行型 AEQ ) を一過的に共発現させた後、発光基質のセレンテラジンを処理した。その細胞懸濁液を精油溶液に添加し、直後 30 秒間の発光量を測定した。TAR の AEQ アッセイでは、細胞内在の G タンパク質では発光量の増加が微弱だったため、G 15 を共発現させ、発光を測定した。

#### 4 . 研究成果

##### (1) 研究の主な成果

###### OAR/TAR 遺伝子のクローニング

カイコの OAR/TAR 遺伝子はクローニングが完了していたので、コクヌストモドキとミツバチの当該遺伝子のクローニングを行い、全長を明らかにした。ウンカについては、共同研究者のサポートのもと、全長を解読できた。

###### OAR の機能的発現と精油の評価

クローニングした OAR/TAR のうち、まずは OAR について、培養細胞での発現を試みた。その結果、カイコ、コクヌストモドキ、ミツバチについては HEK-293 細胞での機能的発現に成功した。ウンカについては、秘密保持の関係から、解析を中断した。機能的発現に成功した 3 種類の OAR のうち、カイコとミツバチの OAR を用いて、10 種類の精油( thymol、L-carvone、carvacrol、*p*-cymene、 $\alpha$ -terpineol、eugenol、*trans*-anethol、cinnamic alcohol、geraniol、2-phenylethyl propionate ) のアゴニスト作用及びアンタゴニスト作用を AEQ アッセイで調べた。その結果、いずれの OAR に対しても、ほとんど活性を示さなかった。

###### TAR の機能的発現と精油の評価

次いで、ウンカを除く 3 種類の昆虫 TAR について、培養細胞での機能的発現を試みた。その結果、いずれの TAR も HEK-293 で機能的に発現させることができた。この 3 種の TAR に対して、上記 10 種類の精油のアゴニスト作用を評価した。その結果、コクヌストモドキの TAR に対してアゴニスト作用を示す精油はなかったが、カイコとミツバチの TAR に関しては、僅かではあるが thymol と carvacrol がアゴニスト作用を示した。この 2 つの TAR に絞って、アンタゴニスト作用を調べたところ、TA のアゴニスト作用を阻害する通常のアンタゴニスト作用は見られず、逆に、TA の作用を増強させる効果が thymol と carvacrol ( 図 1 ) でのみ観察され、活性の順位は thymol > carvacrol であった。この作用は、カイコ TAR とミツバチ TAR いずれの受容体でも見られたが、カイコ TAR に対しての方が増強の程度は大きく、TA のアゴニスト作用を最大約 2 倍増加させた ( 図 2 )。

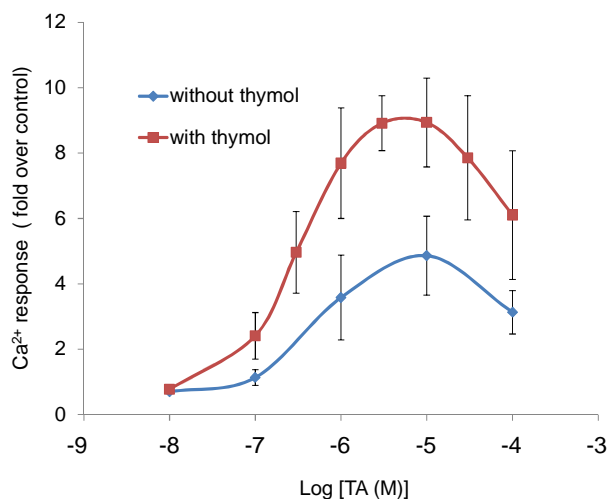


図 2. カイコチラミン受容体に対する精油 thymol の増強作用

OAR にはクロルジメホルム ( CDM ) やアミトラズといったアミジン系殺虫剤・殺ダニ剤がアゴニストとして作用することが知られている。TAR にもこれら薬剤が作用するかもしれないと考え、アミジン系化合物 4 種類 ( CDM と脱メチル代謝物 DMCDM、アミトラズと代謝物 BTS27271 )

と OAR アゴニスト 3 種類 (OA、シネフリン、NC-5) について、カイコ TAR での AEQ アッセイを行った。アゴニスト実験では、OA、シネフリン、NC-5 には僅かなアゴニスト作用が見られたが、それ以外の化合物にはアゴニスト作用は全くなかった。アンタゴニストまたは TA の作用を増強させる効果を調べる実験では、CDM と DMCDM は濃度依存的なアンタゴニスト作用を示し、アミトラスとシネフリンには、thymol には及ばないものの、濃度依存的な増強作用が見られた。

## (2) 得られた成果の国内外における位置づけとインパクト

今回得られた TAR を介した精油のアゴニスト増強作用の詳細なメカニズムは不明であるが、我々は、TAR のアロステリック部位に thymol や carbacrol が結合し、オルソステリック部位に結合した TA のアゴニスト作用を増強させたのではないかと考えている (図 3)。カイコ TAR の方がミツバチ TAR よりも増強作用が大きかったのは、それぞれのアロステリック部位の僅かな構造の違いによるのかもしれない。TAR のアロステリック部位に関する知見は無く、広く昆虫の GPCR 研究を見渡しても、アロステリック部位の研究はほとんど進んでいない。今回の成果は、昆虫 TAR、ひいては GPCR のアロステリック部位の解明に大きく役立つと期待される。文献を調査すると、ダニの TAR に対してアミトラス代謝物が似た増強作用を示しており (Gross et al., 2015)、今回我々が発見した精油の増強作用と同じメカニズムに思われる。殺虫剤・殺ダニ剤の新しい標的タンパク質として TAR とこの薬理作用は注目に値する。

thymol, carbacrol, アミトラス, シネフリン

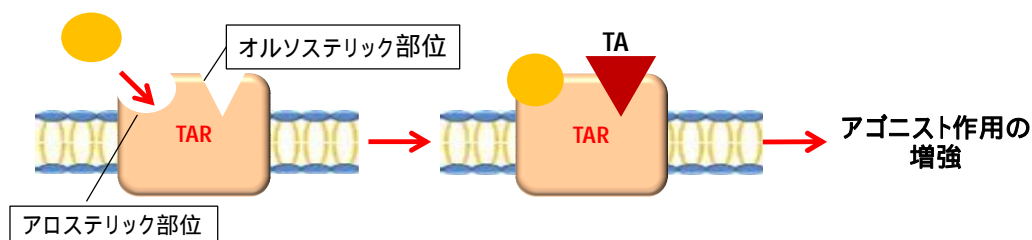


図 3. チラミン受容体 (TAR) のアロステリック部位を介したアゴニスト増強作用

## (3) 今後の展望

今後は、TAR のアロステリック部位の存在を立証するために、thymol や carbacrol で見られた増強作用のメカニズムを明らかにしていく。また、さらに多くの精油をスクリーニングしたり、他の害虫種 TAR に対する作用性も調べることで、上述の“有益昆虫のミツバチには作用せず、害虫種にのみ作用する精油”の同定、ひいては精油をベースにした環境保全型の新しい害虫防除剤の開発へと繋げていきたい。

## (4) 予期しなかった新たな知見

昆虫の OAR と TAR には複数のサブタイプが存在するため、複数の昆虫種からすべての OAR/TAR サブタイプをクローニングするには時間がかかる。そこで本研究では、OAR と TAR からそれぞれ代表的なサブタイプを 1 つ選び、クローニングを開始した。クローニング実験を進める中で、昆虫ゲノム上には、未知の OAR サブタイプがまだ存在していることに気づいた。その新規 OAR の遺伝子をショウジョウバエとカイコからクローニングすることができた。ショウジョウバエの方は、培養細胞での機能的発現と基礎的な薬理解析まで進めることができた。この新規 OAR に対する精油の応答性も今後調べていく必要がある。今回得られた精油のアゴニスト増強作用は、当初、全く予想しなかった結果である。一般に知られるアゴニスト作用やアンタゴニスト作用とは明らかに異なる薬理作用であるため、詳細なメカニズムを今後明らかにしていく。

今回の研究では、OAR/TAR に対する精油の評価系として、AEQ アッセイが大いに役立った。このアッセイ系は、OAR/TAR のみならず、他の GPCR の機能解析にも適用できるのではないかと考え、生体アミン受容体の一種ドーパミン受容体や hTAAR1 (human Trace Amine-Associated Receptor 1)、ペプチドホルモン受容体の一種 ETH (Ecdysis Triggering Hormone) 受容体や、Elevenin 受容体の解析にも使用してみた。その結果、高感度でそれら受容体の Ca<sup>2+</sup>応答を検出することができ、幅広い昆虫 GPCR の機能解析や化合物スクリーニングに利用できることが分かった。

今回は、OAR/TAR に対する精油の作用性に絞った研究課題であったが、実際の昆虫(カイコ)に対して、生体アミンや精油がどのような作用を引き起こすのかについては、詳しいデータを持っていなかった。そこで、カイコに生体アミンや精油を投与する実験も行った。その結果、OA や一部の精油には、行動異常、筋収縮異常、心臓(背脈管)の拍動上昇、致死などが認められ、カイコ幼虫個体に対する影響についての基礎データを得ることができた。

本研究では、簡便な AEQ アッセイを活かして、OAR/TAR に対する精油や化合物の評価を行った。しかし、スループット能力が低く、より多くの精油や化合物を評価するためには、別のアッセイ系を導入するとともに、計算化学によって、実際にアッセイをしなくても、活性のある精油や化合物を予測するシステムを構築する必要が出てきた。そこで、レポーターアッセイの一種 CRE-SEAP アッセイと量子計算化学的手法を融合した新しいスクリーニング系の構築を進めた。その結果、昆虫の生体アミン受容体にもこの方法が適用できることが分かった。

OAR/TAR に精油が全く作用しない可能性も、計画の段階で想定していた。そこで、共同研究者の協力のもと、有機合成により、類縁アナログを合成し、OAR を中心とした構造活性相関も並行して進めた。その結果、OAR のアゴニスト結合部位に関する新たな構造情報を得ることができた。

## 5. 主な発表論文等

### 〔雑誌論文〕(計4件)

Uchiyama, H., Maehara, S., Ohta, H., Seki, T., Tanaka, Y. Elevenin regulates the body color through a G protein-coupled receptor NIA42 in the brown planthopper *Nilaparvata lugens*. *Gen. Comp. Endocrinol.*, **258**, 33-38 (2018). 査読有, DOI: 10.1016/j.ygcen.2017.07.017.

Ohta, H., Mitsumasu, K., Yaginuma, T., Tanaka, Y., Asaoka, K. Functional characterization of dopamine and neuropeptide G protein-coupled receptors from the silkworm *Bombyx mori* by aequorin bioluminescence-based calcium assay. *ACS Symposium Series*, **1265**, 109-126 (2017). 査読有, DOI: 10.1021/bk-2017-1265.ch006.

Ohta, H., Takebe, Y., Murakami, Y., Takahama, Y., Morimura, S. Tyramine and *p*-phenylethylamine, from fermented food products, as agonists for the human trace amine-associated receptor 1 (hTAAR1) in the stomach. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **81**(5), 1002-1006 (2017). 査読有, DOI: 10.1080/09168451.2016.1274640.

Kita, T., Hayashi, T., Ohtani, T., Takao, H., Takasu, H., Liu, G., Ohta, H., Ozoe, F., Ozoe, Y. Amitraz and its metabolite differentially activate  $\alpha$ - and  $\beta$ -adrenergic-like octopamine receptors. *Pest. Manag. Sci.*, **73**(5), 984-990 (2017).

査読有, DOI: 10.1002/ps.4412.

〔学会発表〕(計 43 件)

○高松 亮太, 崎田 遼, 太田 広人 カイコチラミン受容体 BmTAR1 に対する精油のアロステリック様作用とアミジン系化合物のアンタゴニスト作用, 日本農薬学会第 44 回大会, 2019 年.

崎田 遼, ○太田 広人 オクトパミン受容体及びチラミン受容体に対する殺虫性精油の作用性, 日本農薬学会第 43 回大会, 2018 年.

〔図書〕(計 1 件)

太田 広人 カイコの実験単(「実験 24 薬剤投与によるカイコの背脈管の観察」を執筆), 株式会社エヌ・ティー・エス, 2019 年発行, 303 ページ(執筆部分 pp.210-214).

〔その他〕

太田 広人 動き出した熊本の新しい養蚕業と研究の紹介. *BIO九州*, 第 224 号, 3-8 (2019). 査読無, <http://k-baiteku.sakura.ne.jp/bio-kyushu/bio-kyushu.html>.

太田 広人 環境保全型農薬として期待される精油の昆虫種間比較薬理解析. *アグリバイオ*, 2(10), 41-43 (2018). 査読無, [http://hokuryukan-ns.co.jp/cms/book\\_category/x01/](http://hokuryukan-ns.co.jp/cms/book_category/x01/).

太田 広人 環境保全型農薬として期待される精油の昆虫種間比較薬理解析. *昆虫と自然*, 2018年5月号, 33-34. 査読無, [http://hokuryukan-ns.co.jp/cms/book\\_category/x07/](http://hokuryukan-ns.co.jp/cms/book_category/x07/). 崇城大学研究業績データベース, <http://rsrch.ofc.sojo-u.ac.jp/sjuhp/KgApp?kyoinId=yndegbooggy>.

研究応援プロジェクトリサーチア カイコ研究が次世代産業の基盤をつくる, <https://r.lne.st/2016/06/08/ohata-hiroto/>.

熊本県次世代ベンチャー創出支援コンソーシアム 次世代ベンチャーコンテスト熊本テックプラングランプリ最終選考会 JT 賞(アグリ関連物質の迅速スクリーニングと多岐製品開発への応用), 2016 年 7 月.

## 6. 研究組織

### (1) 研究分担者

なし

### (2) 研究協力者

研究協力者氏名: 田中 良明

ローマ字氏名:( TANAKA, yoshiaki )

研究協力者氏名: 杉本 学

ローマ字氏名:( Sugimoto, manabu )

研究協力者氏名: 大島 賢治

ローマ字氏名:( Oshima, kenji )

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。