

平成21年 3月31日現在

研究種目：基盤研究 (A)
 研究期間：2005～2008
 課題番号：17208007
 研究課題名 (和文) 昆虫幼若ホルモン(JH)の特異的阻害剤の開発とそれらを利用した
 JH作用機構の解明
 研究課題名 (英文) Development of specific inhibitors of juvenile hormone (JH)
 and their application for elucidation of mechanism of JH action
 研究代表者
 桑野 榮一 (KUWANO EIICHI)
 九州大学・大学院農学研究院・教授
 研究者番号：00108672

研究成果の概要：昆虫の各成育段階において多様な生理作用を示す幼若ホルモン(JH)の作用機構の解明に役立つ分子プローブとして、また、新規昆虫成育制御剤のリード化合物となりうる数種の JH 特異的阻害剤を分子設計・創製した。阻害剤の構造は、活性発現に共通な必須部位と、それ以外のアルキル鎖、芳香環あるいは複素環から成り立っており多様であった。これらはカイコ幼虫に対して、体液中の JH 濃度を顕著に低下させたことから、その作用機構はアラタ体における JH 生合成阻害と考えられる。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
17年度	10,900,000	3,270,000	14,170,000
18年度	6,100,000	1,830,000	7,930,000
19年度	5,300,000	1,590,000	6,890,000
20年度	5,300,000	1,590,000	6,890,000
年度			
総計	27,600,000	8,280,000	35,880,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農学・応用昆虫学

キーワード：幼若ホルモン、抗幼若ホルモン、カイコ、早熟変態、成育制御剤

1. 研究開始当初の背景

昆虫の脱皮・変態においては、形態的、生理的に急激な変化が生じており、これらの調節機構に関わるホルモン作用の分子レベルでの解明は、内分泌および代謝生理学上重要な課題である。特に、テルペノイド系ホルモンである幼若ホルモン(JH)は脱皮・変態のほか、生殖腺刺激、卵発育、休眠、フェロモン生合成、相変異、階級分化等多くの生理調節機構に関与することが知られているが、JH類似のホルモンが哺乳類に見当たらないことや、JHレセプターが未だに単離・同定さ

れていないことなどから、JHの作用発現および調節機構について分子レベルでの解明は著しく遅れている状況にあった。

2. 研究の目的

(1) 多様な生理作用を示す JH の作用機構の解明に資するため、未だ開発されていない JH の特異的阻害剤として、拮抗阻害剤と生合成阻害剤を創製する。

(2) 拮抗阻害剤を利用した生物有機化学的手法により、脳、前胸腺、脂肪体、卵巣、表皮等各器官における阻害剤ならびに JH 作用

部位の特定を行うとともに、JH レセプターの単離と構造解析を試みる。

(3) JH 生合成経路において、アラタ体特異的なメチル基転移酵素およびエポキシダーゼのそれぞれの阻害剤を分子設計・合成探索する。

(4) 以上の JH 特異的阻害剤の卵、幼虫、蛹、成虫に対する作用特性を調べ、各生育ステージにおける JH の生理機能を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 当初見いだした抗 JH 活性物質 ethyl 4-(2-benzylhexyloxy)benzoate (KF-13) をリード化合物として、最適化合物を得るため、ベンジル基ならびにブチル基の変換およびベンゼン環上への置換基導入を行った。

(2) KF-13 が抗 JH 活性とともに JH 活性を示したことから、両活性の分離を図るため、KF-13 の立体構造を一部固定化した含窒素複素環化合物を合成した。

(3) JH レセプター候補タンパク質が哺乳類のレチノイン酸 X レセプターホモログであることから、レチノイン酸アゴニストの構造に基づいて、新規抗 JH 活性物質の分子設計を行った。

(4) 合成化合物の *in vivo* 抗 JH 活性検定としてカイコ 3 齢幼虫に対する早熟変態誘導率を調べた。

(5) カイコ 4 齢幼虫のアラタ体摘出法により化合物の JH 活性を検定した。

(6) JH 生合成経路の鍵酵素である JH 酸メチル基転移酵素(JHAMT)とエポキシダーゼの特異的阻害剤のスクリーニングを、それぞれ大腸菌で大量調製したカイコの JHAMT および Sf9 細胞で発現させたカイコエポキシダーゼを使用して行った。

(7) 改良 LC-MS 法により、抗 JH 活性物質処理後のカイコ体液中の JH I 濃度を定量した。

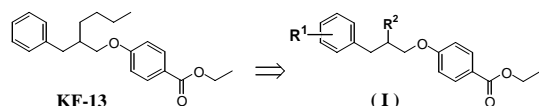
(8) 変態制御に関わる JH エステラーゼ活性に及ぼす抗 JH 活性物質の影響を調べた。

(9) KF-13 および JH アゴニストであるメソプレンの部分構造をリガンドとしたアフィニティ用担体を調製し、4 齢幼虫体液を用いてそれぞれのリガンドに結合するタンパク質の探索を行った。

4. 研究成果

(1) KF-13 誘導体(I)の構造と早熟変態誘導(抗 JH)活性を検討した結果、以下のことを明らかにした。

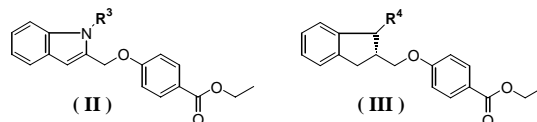
①側鎖アルキル部位(R²)として *n*-ブチル基と *n*-ペンチル基が最適であった。



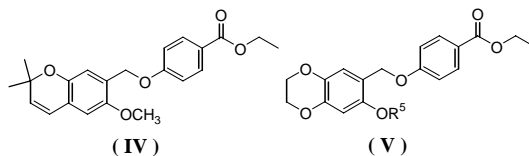
②R²を *n*-ブチル基に固定して、ベンゼン環上の置換基(R¹)と活性の関係を検討した結果、オルト位にメチル基、塩素原子、フッ素原子を、また、パラ位にメトキシ基を導入した場合、KF-13 より強い活性を示した。

③KF-13 より強い抗 JH 活性を示した化合物はいずれも KF-13 と同様に JH 活性があり、二面性を有するユニークな活性物質であった。また、早熟変態誘導活性が強い化合物は JH 活性も強く、両活性は比例していた。

(2) KF-13 の立体構造を一部固定化した含窒素複素環化合物の中で、インドール(II)およびインドリン(III)誘導体に抗 JH 活性があることを見いだした。インドール誘導体では、R³が *n*-ブチルおよびベンジル基の場合、強い抗 JH 活性を示したが、いずれも JH 活性を有していた。一方、インドリン誘導体(R⁴ = *n*-ブチル)は JH 活性を示さなかったが、抗 JH 活性は KF-13 より低下した



(3) レチノイン酸アゴニストの構造から分子設計し、抗 JH 活性を示す新規骨格としてクロメン誘導体(IV)を見いだした。化合物 IV は KF-13 誘導体と異なり、薬量依存的に抗 JH 活性を示したが、JH 活性も有していた。



化合物 IV の発見に基づき、含酸素ヘテロ環構造と活性の関係を詳細に検討した結果、以下のことを明らかにした。

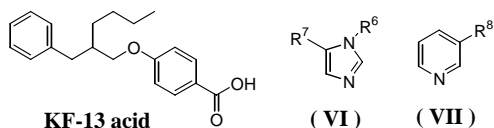
①側鎖ジメチル基とクロメン環二重結合は活性発現に必須でない。

②ベンゾジオキササン誘導体(V)が化合物 IV と同等あるいはそれ以上の活性を示す。

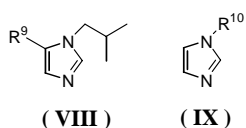
③ベンゾジオキササン環 1 位の酸素原子と 6 位のアルキルオキシ基の存在が高活性発現に必須である。

④6 位の置換基として、ベンジルオキシ基が高い活性を示し、4-メトキシベンジル基や 4-クロロベンジル基などにも同等の活性が認められる。

(4) JH 生合成経路の JHAMT に対して 4-(2-benzylhexyloxy)benzoic acid (KF-13 acid) が阻害活性を示し、S 体、R 体いずれも 0.1 mM で 80%以上の阻害率であった。一方、カイコに対して早熟変態を誘導する 1,5-二置換イミダゾール類(VI)、3-置換ピリジン類(VII)および KF-13 とその誘導体には阻害活性は認められなかった。



(5) JH 生合成経路のエポキシダーゼ阻害剤のスクリーニングの結果、1,5-二置換イミダゾール化合物の中で、1-イソブチル-5-置換イミダゾール類(VIII)が強い阻害活性を示すことを見いだした。その他のシトクロム P450 阻害性の1-置換イミダゾール類(IX)や3-置換ピリジン類(VII)は弱い活性であった。in vitro エポキシダーゼ阻害活性と in vivo 早熟変態誘導活性には良好な相関関係は認められなかった。



(6) KF-13 と化合物 IV をそれぞれカイコ 3 齢幼虫に局所施用した場合、体液中の JH I が 24 時間以内に消失した後、早熟変態が誘導される 4 齢後半まで全く検出されなかった。JH I の分泌が完全に抑制されていたことより、KF-13 と化合物 IV の作用機構は JH 作用部位における拮抗阻害ではなく、JH 生合成の抑制であることが示唆された。

(7) KF-13 をカイコ 3 齢幼虫に局所施用した場合、5 齢(終齢)幼虫でのみ分泌される JH エステラーゼ(JHE)が、4 齢幼虫体液中に発現されており、KF-13 の早熟変態誘導機構に JHE が関与していることを明らかにした。

(8) KF-13 とメソプレンの部分構造をリガンドとしたアフィニティークロマトグラフィを行い、カイコ 4 齢幼虫体液中より KF-13 に特異的に結合するタンパク質として、hemolymph protein の一種と apolipoprotein III を同定した。前者は機能未知であり、後者は脂質輸送タンパク質 lipoprotein への取り込みを補助する因子として知られており、KF-13 はこれらと特異的に結合して、標的器官に運ばれていることが示唆された。

(9) 以上、当初見いだした KF-13 から展開して新規抗 JH 活性物質として、①KF-13 タイプの置換ベンジルブチルオキシ誘導体(I)、②インドール(II)およびインドリン環(III)などの含窒素ヘテロ環化合物、③クロメン(IV)およびベンゾジオキサソ(Ⅴ)などの含酸素ヘテロ環化合物を創製した。これらの化合物は共通して活性発現に必須であるエトキシカルボニルフェノキシ基を有しているが、その他の部分構造は異なっている。これまで数種類の抗 JH 活性物質が発見されているが、それらの構造とは異にしており新しいタイプの抗 JH 活性物質である。これらの抗 JH 活性

物質のうち、KF-13 と化合物 IV は JH 生合成を抑制していると考えられ、作用部位を特定することにより、JH 調節機構の解明が進展すると思われる。また、化合物 I、II、III、IV が抗 JH 活性とともに顕著な JH 活性を有することを明らかにした。これらの構造は従来の JH アナログとは異なっており、新規な JH リガンドとして、JH レセプター部位探索のための分子プローブとして期待できる。さらに、多様な構造をもつ抗 JH 活性物質を見いだしたことにより、今後、害虫に対して選択的に抗 JH 活性を示す化合物の合成探索が容易となり、新規昆虫成育制御剤の開発が可能になると思われる。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 9 件)

- ① Kenjiro Furuta, Shuhei Yoshida, Norihiro Fujita, Naotaka Yamada and Eiichi Kuwano, Ethyl 4-[(1-substituted indol-2-yl)methoxy]benzoates and indoline derivatives: Anti-juvenile hormone and juvenile hormone activities. *J. Pestic. Sci.*, **34**, in press (2009), 査読有
- ② Shuhei Yoshida, Kenjiro Furuta, Kiyoshi Ashibe, Norihiro Fujita, Seiji Nishikawa, Naotaka Yamada and Eiichi Kuwano, Ethyl 4-[2-(Substituted Benzyl)hexyloxy]benzoates: Anti-Juvenile Hormone Agents with Juvenile Hormone Activity. *J. Fac. Agr., Kyushu Univ.*, **54**, 185-190 (2009), 査読無
- ③ Shuhei Yoshida, Kenjiro Furuta, Hiromitsu Shirahashi, Kiyoshi Ashibe, Norihiro Fujita, Naotaka Yamada and Eiichi Kuwano, Synthesis and Structure-Activity Relationship of a New Series of Anti-Juvenile Hormone Agents: Alkyl 4-(2-Benzylhexyloxy)benzoates and Ethyl 4-Substituted Benzoates. *J. Fac. Agr., Kyushu Univ.*, **54**, 179-184 (2009), 査読無
- ④ Norihiro Fujita, Kenjiro Furuta, Kiyoshi Ashibe, Shuhei Yoshida, Naotaka Yamada, Takahiro Shiotsuki, Makoto Kiuchi and Eiichi Kuwano, Juvenile hormone activity of optically active ethyl 4-(2-benzylalkyloxy)benzoates inducing precocious metamorphosis. *J. Pestic. Sci.*, **33**, 383-386 (2008), 査読有
- ⑤ Norihiro Fujita, Kiyoshi Ashibe, Naotaka Yamada, Takahiro Shiotsuki, Makoto

- Kiuchi and Eiichi Kuwano, Juvenile hormone activity of ethyl 4-(2-aryloxyhexyloxy)benzoates with precocious metamorphosis-inducing activity. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **71**, 2333-2334 (2007), 査読有
- ⑥ Kenjiro Furuta, Kiyo Ashibe, Hiromitsu Shirahashi, Norihiro Fujita, Haruna Yamashita, Naotaka Yamada and Eiichi Kuwano, Synthesis and anti-juvenile hormone activity of ethyl 4-(2-benzylalkyloxy)benzoates and their enantiomers. *J. Pestic. Scil*, **32**, 99-105 (2007), 査読有
- ⑦ Kenjiro Furuta, Hiromitsu Shirahashi, Kiyo Ashibe, Haruna Yamashita, Seiji Nishikawa, Norihiro Fujita, Naotaka Yamada and Eiichi Kuwano, Synthesis and anti-juvenile hormone activity of alkyl 4-(2-phenoxyalkyloxy)benzoates and related compounds. *J. Fac. Agr., Kyushu Univ.*, **51**, 303-308 (2006), 査読無
- ⑧ Kenjiro Furuta, Hiromitsu Shirahashi, Haruna Yamashita, Kiyo Ashibe and Eiichi Kuwano, Synthesis and anti-juvenile hormone activity of ethyl 4-(2-aryloxyhexyloxy)benzoates. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **70**, 746-748 (2006), 査読有
- ⑨ Norihiro Fujita, Kenjiro Furuta, Hiromitsu Shirahashi, Soonsung Hong, Takahiro Shiotsuki and Eiichi Kuwano, Synthesis and anti-juvenile hormone activity of ethyl 4-[2-(6-methyl-3-pyridyloxy)alkyloxy]benzoates. *J. Pestic. Sci.*, **30**, 192-198 (2005), 査読有
- larvae. 9th International Conference on Juvenile Hormones, Aug. 10, 2007, Yorkshire Museum Gardens, York U.K.
- ⑥ K. Furuta, Novel anti-juvenile hormone agents: Structure-activity relationship of ethyl 4-(2-substituted benzylalkyloxy)benzoates. 9th International Conference on Juvenile Hormones, Aug. 10, 2007, Yorkshire Museum Gardens, York U.K.
- ⑦ T. Shiotsuki, Optimization of LC-MS analysis for JH concentration in larval hemolymph of silkworm, *Bombyx mori*. 9th International Conference on Juvenile Hormones, Aug. 10, 2007, Yorkshire Museum Gardens, York U.K.
- ⑧ 藤田雄大、新規抗幼若ホルモン活性物質 ethyl 4-(2-benzylheptyloxy)benzoate (KA-1)の作用特性、第51回日本応用動物昆虫学会大会、平成19年3月29日、広島
- ⑨ 西川誠志、4-(2-置換ベンジルアルキルオキシ)ベンゾエート類の抗幼若ホルモン活性、日本農芸化学会2007年度大会、平成19年3月25日、東京
- ⑩ N. Fujita, Characterization of ethyl 4-(2-substituted alkyloxy)benzoates with precocious metamorphosis-inducing activity. 11th IUPAC International Congress of Pesticide Chemistry, Aug. 8, 2006, Kobe.
- ⑪ K. Ashibe, Synthesis and anti-juvenile hormone activity of optically active ethyl 4-(2-benzylalkyloxy)benzoates. 11th IUPAC International Congress of Pesticide Chemistry, Aug. 9, 2006, Kobe.

[学会発表] (計26件)

- ① 中村美穂、1,4-benzodioxan環を有する抗JH活性物質の創製、日本農芸化学会2009年度大会、平成21年3月29日、福岡
- ② 古田賢次郎、chromene環を有する新規抗幼若ホルモン活性物質の合成とKF-38の体液中のJH濃度に与える影響、日本農薬学会第34回大会、平成21年3月19日、東京
- ③ 古田賢次郎、chromene環を有する新規昆虫成育制御物質の合成探索と生理活性、日本農薬学会第33回大会、平成20年3月30日、奈良
- ④ 吉田周平、新規幼若ホルモン阻害物質の分子設計および合成探索、日本農芸化学会2008年度大会、平成20年3月27日、名古屋
- ⑤ N. Fujita, Action of a novel anti-juvenile hormone agent, KF-13, in *Bombyx mori*

6. 研究組織

- (1) 研究代表者
桑野 榮一 (Kuwano Eiichi)
九州大学・大学院農学研究院・教授
研究者番号：00108672
- (2) 連携研究者
塩月 孝博 (Shiotsuki Takahiro)
農業生物資源研究所・主任研究員
研究者番号：80355734
篠田 徹郎 (Shinoda Tetsuro)
農業生物資源研究所・主任研究員
研究者番号：10355620