

令和 6 年 6 月 19 日現在

機関番号：82111

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2023

課題番号：20K06063

研究課題名（和文）害虫選択的な幼若ホルモン拮抗阻害剤の創製と実用化に向けた研究

研究課題名（英文）Development of pest-selective juvenile hormone antagonists

研究代表者

古田 賢次郎 (Kenjiro, Furuta)

国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構・生物機能利用研究部門・主任研究員

研究者番号：00575532

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：幼若ホルモン（JH）は昆虫の正常な成長に必要であることから、その機能を制御するJH受容体は新たな昆虫成育制御剤の標的として注目されている。本研究はJH受容体の機能を特異的に阻害するJHアンタゴニストの開発を目的として研究を行った。これまでカイコに対して高いJHアンタゴニスト活性を示すことが報告されているEMBPをリード化合物として農業害虫に選択的に作用する化合物の探索を行った。ヨトウガのJH受容体を標的としたin silicoスクリーニング解析の結果、新たに見出されたEMBOPはシロイチモジヨトウに対して選択的な成長阻害活性を示すことが明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

JHアンタゴニストは、既存の農薬とは異なる作用機序を有しているため、農薬に対して抵抗性を示す農業害虫に対しても効果ある。また、JHは昆虫にしか存在しないためJHアンタゴニストはヒトに対する有毒性が低いと考えられることから、環境低負荷型の農薬として農薬のリスク低減につながる。今回見出された化合物は、農業害虫に対して高い選択性を示しており、今後新たな昆虫成育制御剤のリード化合物として更なる研究の進展が期待できる。

研究成果の概要（英文）： Juvenile hormone (JH) is required for normal insect growth, and the JH receptor, which regulates the function of JH, is a potential target for insect growth regulators. In this study, we aimed to develop JH antagonists that specifically inhibit the function of JH receptors.

EMBP, which has been reported to exhibit high JH antagonist activity against silkworms, was used as a lead compound in the search for compounds that selectively act on insect pests. The results of in silico screening analysis using the JH receptor of *Spodoptera frugiperda*, the newly identified EMBOP shows selective growth-inhibitory activity against *Spodoptera exigua*.

研究分野：農薬化学

キーワード：幼若ホルモン アンタゴニスト

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

幼若ホルモン (Juvenile hormone; JH) は、脱皮・変態のほか、生殖腺成熟、休眠などさまざまな生理調節機能に關する重要な昆虫ホルモンである。近年の JH 研究において特に注目すべき成果として、JH 受容体である Methoprene-tolerant (Met) が同定されたことが挙げられる。Met は、JH に高い親和性を示すだけでなく¹⁾、JH 初期応答遺伝子である Krüppel homolog 1 (Kr-h1) の発現を制御していることが報告されている²⁾。また、RNA 干渉によって Met の発現が抑制されたコクヌストモドキにおいて、JH の作用不全である早熟変態が誘導されたことから³⁾、Met が昆虫の正常な成育に重要な役割を果たしていることが明らかになった。そのため、Met の機能を制御することで、JH が關する昆虫の生存に必須な生理調節機能を攪乱できることから、Met は昆虫成育制御剤の新たな標的分子として注目されている。

メソプレンの JH と同じ生物活性を示す JH 作用薬は、コクヌストモドキの Met に直接結合することが報告されている⁴⁾。しかし、JH 作用薬は蛹への変態を抑制する作用があるため、幼虫が主な加害ステージであるチョウ目害虫に対しては防除効果が期待できない。そのため、より優れた防除手段として、Met に結合し、JH の作用を直接抑制する JH 拮抗阻害剤が必要である。これまでに、カナクキノキ果実に含まれる成分が、ネッタイシマカの Met を用いたレポーター遺伝子アッセイにおいて、JH 拮抗阻害活性を示すだけでなく、高薬量において卵巣の成熟抑制作用を示すことが報告されている。しかし、JH 拮抗阻害剤の報告は非常に少ないうえに、いずれの化合物も生物活性は低いため、実用化には至っていない。

2. 研究の目的

我々はこれまでに、JH 拮抗阻害剤の創製および、その作用機構についての研究を行っており、カイコ由来の JH 応答配列を用いたレポーター遺伝子アッセイ⁵⁾において、EMBP が高い JH 拮抗阻害活性 ($IC_{50} = 3.1 \text{ nM}$) を示すことを見出している (Fig. 1)。また、EMBP はカイコ幼虫に対して非常に高い早熟変態誘導活性 ($ED_{50} = 6.2 \text{ ng/larva}$) を示したことから、EMBP が *in vitro* および *in vivo* 両方で優れた生理活性を示す JH 拮抗阻害剤ことが明らかにしている。そこで本研究では、EMBP をリード化合物として、JH 拮抗阻害剤の実用的な利用を目指して、農業害虫に選択的に作用する薬剤を合理的な方法で創製することを目的としている。

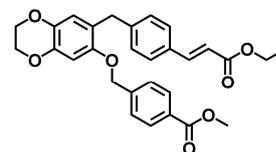


Fig. 1. EMBP の構造

3. 研究の方法

本研究では以下の実験を行った。

1) ドッキングシミュレーションによる害虫の Met に結合する JH 拮抗阻害剤の探索

Met のタンパク質立体構造はこれまで明らかになっていないため、計算科学ソフトウェア MOE を用いてホモロジーモデリングを行った。カイコの Met および、チョウ目農業害虫で既に Met のアミノ酸配列が明らかになっているツマジロクサヨトウの Met に着目し、鋳型として Circadian locomotor output cycles protein kaput を用いた。ホモロジーモデリングの結果、得られた構造予測モデルを用いて、EMBP および様々な EMBP 誘導体とのドッキングシミュレーションを MOE を用いて行った。

2) *in silico* 解析の結果に基づいた新規 JH 拮抗阻害剤の合成および生物活性

ドッキングシミュレーションの結果により得られた構造活性相関に基づいて、新規 EMBP 誘導体の合成を行った。また、その生物活性をカイコ幼虫に対する早熟変態誘導活性試験およびシロイチモジヨトウ幼虫に対する成長阻害試験を用いて評価した。

4. 研究成果

まず、カイコ Met における EMBP の結合部位を明らかにするために、レポーター遺伝子アッセイにおける EMBP の阻害様式の検討を行った。3 nM の EMBP と様々な濃度の JH I を用いて競合阻害試験を行ったところ、Fig. 2 に示される結果が得られた。JH 単独処理すると 0.3nM で応答が見られ、10 nM で最大応答を示したのに対して、EMBP を同時に処理すると最大応答は変わらないが、JH 単独の場合と比較してグラフが右側にシフトした。これは NY52 が競合的阻害剤として作用しており、EMBP がカイコ Met において JH と同じ結合部位に結合していることが示唆された。

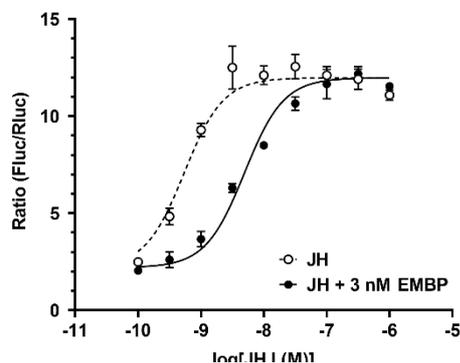


Fig. 2. EMBP の阻害様式

そこで、ホモロジーモデリングにより得られたカイコ Met の構造予測モデルを用いて、EMBP のドッキングシミュレーションを行った。その結果、EMBP においてカイコにおいて早熟変態誘導活性に重要な 2 つのエステル部位が、カイコ Met のアミノ酸残基と水素結合を介して相互作用していることが示唆された (Fig. 3)。それに対して、EMBP の 1,4-ベンゾジオキサン環やリンカー部分のメチレン基については、Met との相互作用に与える影響が小さかった。次に、ツマジロクサヨトウ Met のホモロジーモデルを用いて、同様にドッキングシミュレーションを行った。カイコとツマジロクサヨトウにおいて、Met の JH 結合部位におけるアミノ酸残基は保存性が高く、相互作用する部位もカイコ Met と大きな違いは認められなかった。しかし、ツマジロクサヨトウ Met の結合部位の大きさがカイコと比較して若干小さいことから、ツマジロクサヨトウにおいては、EMBP をより立体的に小さな構造にすることが重要であると考えられた。

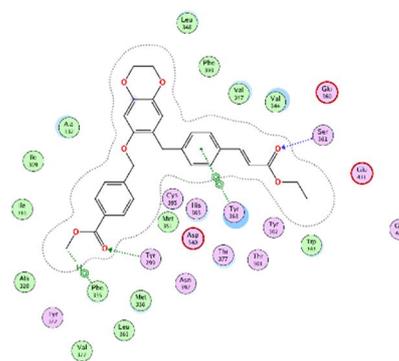
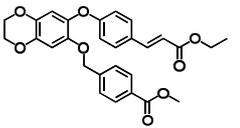
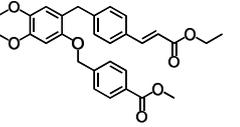


Fig. 3. カイコ Met と EMBP の相互作用

そこで、*in silico* 解析の結果に基づき、EMBP において Met との相互作用に重要でなく、構造改変が容易なメチレン基に着目し、水素原子がなく、より立体的に小さい酸素原子を導入した EMBOP を新たにデザインし、合成を行った。また、1,4-ベンゾジオキサン環 7 位のベンジルオキシ基を様々なアルキルオキシ基に改変した EMBOP 誘導体もあわせて合成した。

EMBOP 誘導体のカイコ 3 齢幼虫に対する早熟変態誘導活性を調べたところ EMBOP および EMBOP 誘導体は、全く生物活性を示さなかった。また、カイコ培養細胞を用いたレポーター遺伝子アッセイにおける JH アンタゴニスト活性を調べたところ、EMBOP の IC₅₀ は 176 nM と EMBP (IC₅₀=3.1 nM) と比べて 50 分の 1 と活性が大幅に減少した。このことから、EMBOP はカイコに対しては *in vivo* および *in vitro* においても生物活性をほとんど示さないことが明らかになった。次に、EMBOP と EMBP をツマジロクサヨトウと同じヨトウガの農業害虫であるシロイチモジヨトウの終齢幼虫に処理し、成長に与える影響を観察した (Table 1)。EMBOP を処理した幼虫では、高薬量では過剰脱皮や脱皮不全が起きたことから、シロイチモジヨトウにおいては、EMBOP は JH アンタゴニストではなく、JH アゴニストとして作用する可能性が示唆された。一方、EMBOP を処理した幼虫では、EMBOP とは異なり、変態不全が起き、致死活性を示した。このことから、シロイチモジヨトウに対しては EMBOP は EMBP とは異なる作用機構を有している可能性が示唆された。

Table 1. シロイチモジヨトウ終齢幼虫に対する生物活性

| | 供試化合物 | 処理量 ($\mu\text{g}/\text{頭}$) | 処理数 (頭) | 過剰脱皮 (頭) | 脱皮不全 (頭) | 変態不全 (頭) | 蛹 (頭) |
|-------|---|-----------------------------------|------------|-------------|-------------|-------------|----------|
| EMBOP |  | 0.1 | 20 | 0 | 0 | 13 | 7 |
| | | 1 | 20 | 0 | 0 | 20 | 0 |
| EMBOP |  | 0.1 | 20 | 4 | 16 | 0 | 0 |
| | | 1 | 10 | 4 | 6 | 0 | 0 |

以上の結果から、JH アンタゴニストである EMBP をリード化合物として、*in silico* 解析に基づいて新たに見出された EMBOP は、農業害虫であるシロイチモジヨトウに対して選択的に作用することが明らかになった。EMBOP は害虫選択的な JH アンタゴニストとして利用できる可能性があり、今後更なる研究の発展が期待できる。

引用文献

- 1) Miura K, Oda M, Makita S and Chinzei Y, FEBS J 272:1169-1178 (2005)
- 2) Minakuchi C, Zhou X and Riddiford LM, Mech Dev 125(1-2):91-105 (2008)
- 3) Konopova B and Jindra M, Proc Natl Acad Sci USA 104(25):10488-10493 (2007)
- 4) Charles JP, Iwema T, Epa VC, Takaki K, Rynes J and Jindra M, Proc Natl Acad Sci USA 108(52):21128-21133 (2011)
- 5) Kayukawa T, Furuta K, Nagamine K, Shinoda T, Yonesu K and Okabe T, Sci Rep 10(1):18413 (2020).

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

| | |
|---|---------------------|
| 1. 著者名 Kayukawa Takumi, Furuta Kenjiro, Nagamine Keisuke, Shinoda Tetsuro, Yonesu Kiyooki, Okabe Takayoshi | 4. 巻 10 |
| 2. 論文標題 Identification of a juvenile-hormone signaling inhibitor via high-throughput screening of a chemical library | 5. 発行年 2020年 |
| 3. 雑誌名 Scientific Reports | 6. 最初と最後の頁 18413 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-020-75386-x | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である） | 国際共著 - |

| | |
|---|---------------------------|
| 1. 著者名 Furuta Kenjiro, Yamada Naoko, Kayukawa Takumi | 4. 巻 79 |
| 2. 論文標題 Synthesis of 1,4 benzodioxan derivatives and the evaluation of their biological activity as a novel juvenile hormone signaling inhibitor | 5. 発行年 2023年 |
| 3. 雑誌名 Pest Management Science | 6. 最初と最後の頁 5341 ~ 5348 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/ps.7744 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 - |

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

| |
|--|
| 1. 発表者名 古田賢次郎, 山田 直子, 粥川 琢己 |
| 2. 発表標題 幼若ホルモンアンタゴニストNY52 誘導体の合成と薬理学的特性 |
| 3. 学会等名 日本農薬学会第46回大会 |
| 4. 発表年 2021年 |

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計0件

〔取得〕 計1件

| | | |
|---------------------------------|--------------|---------------|
| 産業財産権の名称 幼若ホルモンシグナル阻害剤 | 発明者 古田賢次郎 | 権利者 同左 |
| 産業財産権の種類、番号 特許、特願2021-046116 | 取得年 2024年 | 国内・外国の別 国内 |

〔その他〕

幼若ホルモンの働きを抑える薬剤探索法の開発と新たな昆虫成長制御剤の候補となる化合物の発見
https://www.naro.go.jp/publicity_report/press/laboratory/nias/137143.html

6. 研究組織

| | 氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号) | 所属研究機関・部局・職 (機関番号) | 備考 |
|--|---------------------------|-----------------------|----|
|--|---------------------------|-----------------------|----|

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

| 共同研究相手国 | 相手方研究機関 |
|---------|---------|
|---------|---------|