

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 19 日現在

機関番号：15201

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26870380

研究課題名(和文) 昆虫の脱皮変態を制御する幼若ホルモン拮抗阻害剤の創製とその作用発現機構の解明

研究課題名(英文) Development of Juvenile Hormone Antagonist Controlling Insect Metamorphosis and Elucidation of the Mechanism of its Action

研究代表者

古田 賢次郎 (FURUTA, Kenjiro)

島根大学・生物資源科学部・助教

研究者番号：00575532

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：幼若ホルモンは昆虫の脱皮変態など様々な生理調節機構を制御する昆虫ホルモンであり、その受容体であるMethoprene-tolerant (Met) は、新しい昆虫成育制御剤の標的分子として注目されている。本研究では、Metに直接結合することで、その機能を抑制するJHアンタゴニストの創製を目的として研究を行った。

様々な化合物を有機合成し、その生理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、カイコMetタンパク質に対する結合活性を調べた結果、JHアンタゴニスト候補化合物NY04を新たに見出した。

研究成果の概要(英文)：Juvenile hormone is an insect hormone that regulates various physiological mechanisms such as molting and metamorphosis. Therefore, its receptor Methoprene-tolerant (Met) is attracting attention as a target molecule for new insect growth regulators. In this study, we have studied for the purpose of developing a JH antagonist that suppresses function of Met by directly binding.

We synthesized various compounds by organic synthesis and examined their biological activities by precocious metamorphosis-inducing activity test against silkworm larva and the binding test to Met protein of the silkworm. As a result, we found compound NY04 as a novel JH antagonist.

研究分野：生物有機化学

キーワード：幼若ホルモン Methoprene-tolerant アンタゴニスト

1. 研究開始当初の背景

幼若ホルモン (JH) は、昆虫において脱皮・変態のほか、生殖腺刺激、休眠やカースト分化などさまざまな生理調節機能に与える重要なホルモンであり、近年、JH 受容体として Met と呼ばれるタンパク質が新たに同定された¹⁾。Met は、JH 初期応答遺伝子である *Krüppelle homolog 1 (Kr-h1)* の発現を JH 依存的に制御していることが報告されている²⁾。また、コクヌストモドキにおいて Met の発現を RNA 干渉によって抑制すると、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 が昆虫の成長において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 は昆虫成育制御剤の新たな標的分子と注目されている。

これまでにメソプレンなどの JH と同じ生理活性を示す JH アゴニストは Met に直接結合することが報告されているのに対して、JH の作用を特異的に抑制する JH アンタゴニストは、ほとんど報告例がない。これまでに ETB がその生物活性様式から唯一、JH 部分アンタゴニストではないかと報告されているのみであるが、Met へ直接結合するかに関しては不明である。

報告者は、JH を標的とした昆虫成育制御剤の創製および、その作用機構について研究を行っている。これまでに、農業生物資源研究所の粥川らが開発したカイコ由来の JH 応答配列を用いたレポーター遺伝子アッセイにおいて、methyl 4-{1-(7-benzyloxy-1,4-benzodioxan-6-yl)ethenyl}benzoate (MM-17) が JH 拮抗阻害活性を示すことを見いだしている (Fig. 1)。さらに MM-17 は、カイコ幼虫に対して弱いながら早熟変態誘導活性を示したことから、JH アンタゴニスト候補化合物として非常に有望である。

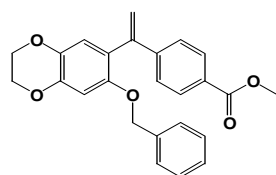


Fig. 1 MM-17 の構造

2. 研究の目的

本研究では、1) JH 拮抗阻害剤の創製および、2) JH 拮抗阻害剤が JH のシグナル伝達機構に与える影響の解明を目的としている。そのため、以下のことを明らかにする。

(1) 様々な MM-17 誘導体の合成を行い、それらを *in vivo* における抗 JH 活性試験である早熟変態誘導活性試験および、*in vitro* における JH アンタゴニスト活性試験であるレポーター遺伝子アッセイに試することで構造と生理活性との関係を明らかにし、さらに高活性な JH 拮抗阻害剤を創製する。

(2) カイコ Met (BmMet1) を用いた受容体結合試験法を確立し、MM-17 誘導体の BmMet1 に対する結合活性を明らかにする。

(3) 開発した JH 拮抗阻害剤をカイコ幼虫に処理し、JH 初期応答遺伝子である Kr-h1 の定量 PCR を行うことで、JH 拮抗阻害剤が JH のシグナル伝達機構に与える影響を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) MM-17 をリード化合物として、1,4-ベンゾジオキサン環部分、メトキシカルボニル基および、ベンゾジオキサン環 7 位への様々なアルキルオキシ基の導入などを行った。合成した化合物の *in vivo* における活性は、3 齢脱皮後 24 時間経過したカイコ幼虫の胸部背面に供試化合物を処理した後、早熟変態が誘導されたカイコの割合によって評価した。また、*in vitro* における活性は、前述のカイコ由来の JH 応答配列を用いたレポーター遺伝子アッセイによって評価した。

(2) コクヌストモドキ Met (TcMet) を用いて行われた Dextran-Coated Charcoal (DCC) アッセイによる受容体結合試験を参考に¹⁾、BmMet1 の *in vitro* 結合試験法の確立を試みた。BmMet1 もしくは BmMet2 遺伝子を組み込んだ発現用プラスミドを無細胞発現系である Transcription/Translation (TNT) System (プロメガ社) を用いて発現させた後、各濃度の [³H]-JH III を加えて、競合結合反応を行った。その後、DCC を加えて未結合の [³H]-JH III を吸着させ遠心して除去し、上清に含まれる [³H]-JH III の放射活性を液体シンチレーションカウンターで測定し全結合率を求める。また、[³H]-JH III の 100 倍濃度の cold JH III を加えて同様の実験を行い、非特異的結合率を求め、全結合量から非特異的結合量を除することで得られる特異的結合量から解離定数 (K_d) を算出した。リガンド結合試験では、10 nM [³H]-JH III と様々な濃度の化合物を用いて競合結合反応を行った。

(3) MM-17 誘導体 1 μ g を含むアセトン溶液をカイコ 3 齢 1 日目のカイコ幼虫の胸部背面に塗布してから 24 時間後に表皮から total RNA を抽出し、逆転写反応により cDNA を合成した。これを鋳型としてリアルタイム PCR を行い、内部標準である *ribosomal protein 49 (BmRp49)* の発現量から *BmKr-h1* の mRNA レベルでの相対発現量を求めた。

4. 研究成果

(1) MM-17 の 1,4-ベンゾジオキサン環の構造改変を行い、その抗 JH 活性をカイコ幼虫に対する早熟変態誘導活性試験を用いて調べたところ、酸素原子が 1 つしかないクロマン環に改変すると、抗 JH 活性を大幅に減少し、

酸素原子を有さないテトラリン環では活性が消失した。また、環構造を有さないジメトキシベンゼン環でも活性が認められなかったことから、1,4-ベンゾジオキサン環の環構造および2つの酸素原子がどちらも活性に必要であることが示唆された。

次に、MM-17 のメトキシカルボニル基を様々なアルキル基を有するエステルに構造改変したところ、エトキシカルボニル基で最も高い活性が認められ、分枝アルキル基や長鎖アルキル基では活性が減少した。また、エトキシカルボニル基をメタ位に移動させると抗 JH 活性が消失したことから、エトキシカルボニル基の位置はパラ位が必須であることが明らかになった。また、エステル構造をカーバメート構造に改変したり、エチレン基を導入して伸長しても高い活性が見られた。このから、末端にエステル構造があることが必要であり、ベンゼン環との間にさまざまな構造を導入することが可能であることが示唆された。

また、MM-17 のビニリデン基をカルボニル基に改変すると、活性が消失したのに対して、メチレン基にすると大幅に活性が向上した。しかし、メチレン基をアミノ基に構造改変すると活性は低下し、メチレン基を除去したピフェニル体では活性が完全に消失した。

そこで、高い抗 JH 活性を示したエトキシカルボニル基およびメチレン基に固定し、ベンゾジオキサン環7位に様々な置換基を導入した MM-17 誘導体を合成した。その結果、パラ位にメチル基を導入しても活性は保持されたのに対して、オルト位やメタ位にメチル基を有する誘導体では活性がほぼ消失した。また、メチル基と同様に電子供与性基であるメトキシ基にすると活性が若干低下したものの、活性が保持されたのに対して、電子吸引性基であるクロロ基やトルフルオロメチル基に変換すると活性が大幅に減少した。

以上の構造活性相関に基づいて合成された ethyl 4-(7-benzyloxy-1,4-benzodioxan-6-yl) methylbenzoate (NY-04) は、カイコ幼虫に対して非常に高い早熟変態誘導活性 ($ED_{50} = 41$ ng/larva) を示すことが確認された (Fig. 2)。また、レポーター遺伝子アッセイにより NY04 の JH アンタゴニスト活性を評価したところ、*in vitro* においても高い JH アンタゴニスト活性 ($IC_{50} = 123$ nM) を示すことが明らかになった。

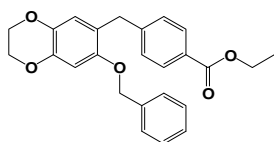


Fig. 2 NY-04 の構造

(2) BmMet1 の受容体結合試験では、これまでに報告されている TcMet を用いた JH 結合試

験法¹⁾を用いても、 $[^3H]$ -JH III の特異的結合は認められなかった。そこで様々な条件検討を行った結果、DCC 懸濁液に 1 mg/ml BSA を添加することで JH が BmMet1 に対して特異的に結合することを見出した。また、昆虫培養細胞由来の発現系を用いた場合よりもウサギ網状赤血球由来の発現系で Met を発現させた方が、高い特異的結合量が得られた。そこで様々な濃度の $[^3H]$ -JH III を用いて BmMet1 との結合試験を行ったところ、BmMet1 が JH に対して濃度依存的に結合することが確認でき、その際の K_d 値は 13.7 nM であり、最大結合量 B_{max} は 110 fmol であった。このことから、BmMet1 が JH 受容体として機能している可能性が示唆された。カイコに存在する主な JH は JH I であるが、BmMet1 は JH III に対しても高い親和性を示すことが明らかになった。

さらに、メソプレンの結合阻害活性を調べたところ、メソプレンの濃度が上昇するにつれて $[^3H]$ -JH III の結合量が低下し、その IC_{50} 値は 90.7 nM であった。以上の結果から、メソプレンが BmMet1 に特異的に結合することが確認された。また、NY04 を用いて同様の試験を行ったところ、100 nM において高い結合阻害活性を示すことが確認されたことから、NY04 が BmMet1 に直接結合する可能性が示唆された。

(3) NY-04 処理してから 24 時間後の *BmKr-h1* 発現量は、NY-04 無処理の場合と比較して有意に低下した (Fig. 3)。このことから、*in vivo* においても NY04 が JH のシグナル伝達を抑制していることが明らかになり、JH アンタゴニストとして作用している可能性が示された。

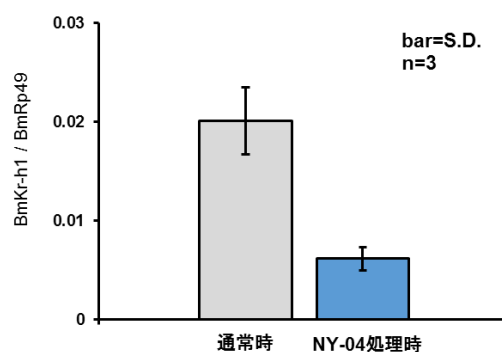


Fig. 3 NY-04 が BmKr-h1 の発現量に与える影響

以上の結果から、今回新たに合成された NY04 は、*in vivo* および *in vitro* のどちらにおいても高い活性を示す優れた JH アンタゴニストであることが示された。現在、更に高活性な NY-04 誘導体の探索および、NY-04 の作用機構の解明に向けて研究を推進している。

<引用文献>

- 1) J. P. Charles, T. Iwema, V. C. Epa, K. Takaki, J. Rynes and M. Jindra, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 108, 21128-21133 (2011).
- 2) C. Minakuchi, T. Namiki and T. Shinoda, *Dev. Biol.*, 325, 341-350 (2009).
- 3) B. Konopova and M. Jindra, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 104, 10488-10493 (2007).

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2件)

Anti-juvenile hormone activity of ethyl 4-[(7-substituted 1,4-benzodioxan-6-yl)methyl]benzoates and their effect on the juvenile hormone titer in the hemolymph of the silkworm, *Bombyx mori*, Yamada N., Maeda K., Masumoto M., Inagaki Y., Furuta K., *J. Pestic. Sci.*, 41: 38-43 (2016)
DOI:

<http://doi.org/10.1584/jpestics.D15-072>

昆虫の脱皮と変態を制御する抗幼若ホルモン活性物質の作用機構, 古田賢次郎, *生化学*, 77: 988-991 (2014)

URL:

<http://www.jbsoc.or.jp/seika/wp-content/uploads/2015/06/86-05-09.pdf>

[学会発表](計4件)

山田直子, 江角環称, 安道俊彦, 古田賢次郎, カイコ幼若ホルモン受容体の *in vitro* 結合試験法の開発, 日本農薬学会第42回大会, 2017年3月7日(愛媛県・松山市)愛媛大学

山岸聖, 前田慶, 山田直子, 粥川琢巳, 篠田徹郎, 古田賢次郎, 1,4-ベンゾジオキサン環を有する JH アンタゴニストの生物活性と体液中の JH I 濃度を与える影響, 日本農薬学会第41回大会, 2016年3月19日(島根県・松江市)島根大学

山田直子, 粥川琢巳, 前田慶, 篠田徹郎, 古田賢次郎, 1,4-ベンゾジオキサン環を有する幼若ホルモンアンタゴニストの合成探索, 日本農薬学会第40回大会, 2015年3月20日(東京都・町田市)玉川大学

新規幼若ホルモンアンタゴニストの合成探索, 前田慶, 粥川琢巳, 舩本将明, 篠田徹郎, 古田賢次郎, 日本農薬学会第39回大会, 2014年3月15日(京都府・京都市)京都大学

[図書](計0件)

[産業財産権]

出願状況(計0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

取得状況(計0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
取得年月日:
国内外の別:

[その他]
ホームページ等
特記事項なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

古田 賢次郎 (FURUTA, Kenjiro)
島根大学・生物資源科学部 助教
研究者番号: 00575532

(2) 研究分担者

()

研究者番号:

(3) 連携研究者

()

研究者番号:

(4) 研究協力者

()