

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 16 日現在

機関番号：82112

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24580087

研究課題名(和文)セミ類における幼若ホルモンの解明：ウンカ・ヨコバイ類の特異的制御剤開発を目指して

研究課題名(英文) Structure determination of juvenile hormone in cicadas-an attempt to develop insecticides specific to planthoppers and leafhoppers

研究代表者

小滝 豊美 (KOTAKI, Toyomi)

独立行政法人農業生物資源研究所・昆虫成長制御研究ユニット・上級研究員

研究者番号：20391550

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究の目的はイネの害虫であるウンカ・ヨコバイに近縁なセミ類における幼若ホルモン(JH)の構造を解明することである。セミからJHを生産する内分泌器官、アラタ体(CA)を取り出して、培養し培地中に放出された生産物を分析した。その結果、当初想定した物質と異なる構造を有する物質が生産されていることが明らかになったが、構造を決定には至らなかった。次に、セミ類におけるJH活性検定法を検討し、CA摘出とサンプルの注射を組み合わせる方法の利用可能性を見出した。

研究成果の概要(英文)：The purpose of the present study is to elucidate the structure of juvenile hormone (JH) in cicadas, which belongs to the suborder, Auchenorrhyncha. Planthoppers and leafhoppers also belong to this suborder, and many species of these groups are known as serious pests attacking rice plant. The corpora allata (CA) were taken out from cicada adults and incubated in vitro. The products of CA were extracted from incubation medium and subjected to chemical analysis. The results indicated that the structure of CA products was different from the one anticipated at the beginning of the study, but the attempt to determine the structure was unsuccessful. Several methods were examined to select a suitable way to test JH activity in cicadas, and CA extirpation followed by JH injection was expected to be useful for JH assay.

研究分野：昆虫生理・生化学

キーワード：幼若ホルモン カメムシ目 頸吻群 卵巣発育 アラタ体

1. 研究開始当初の背景

幼若ホルモン (JH) は昆虫の変態や生殖を司る主要なホルモンの一つである。このホルモンの化学構造は 1967 年に初めて決定された。その後いくつかのホモログがあることが明らかにされ、さらに、最近報告者らは、果樹の重要害虫であるチャバネアオカメムシに特有な JHSB₃ を見いだした (Kotaki et al, 2009)。

セミ類は、カメムシ目 (半翅目) 顎吻亜目に属している。顎吻亜目には、ウンカ類、ヨコバイ類というイネなどに甚大な被害を及ぼす重要害虫が含まれている。我が国でイネの被害をもたらすウンカ類の多くは中国大陸や東南アジアから飛来することは古くから知られている。近年これらの地域で殺虫剤による防除が普及したため、殺虫剤抵抗性を獲得した個体が出現し、そうした個体が日本に飛来するようになった。そのため、これらの害虫の防除が一層困難になっている。また、最近セジロウンカによって中国からイネの新規ウイルス病が我が国に持ち込まれたことが明らかになった (松村, 2011)。この例に見られるように、ウンカ・ヨコバイ類はこれからも害虫として重要な地位を占めることは間違いなく、その防除技術開発は我が国の応用昆虫学において大きな課題である。

JH を害虫防除に利用しうることはすでに 1960 年代から指摘され、殺虫剤等として JH 活性を持つ化合物が市販されている。ある昆虫群に特異的な JH が存在するならば、その構造特性に基づき当該の昆虫群に効果を有する制御剤が得られるだろう。筆者らは、特異的制御剤開発の試みをカメムシ類を対象に行い、天然物に近い活性を有する化合物を見いだした (Kaiharu et al. 2012)。

ウンカ類、ヨコバイ類を含む顎吻亜目でも同様な発想で特異的な制御剤開発が可能であろう。しかし、顎吻亜目に属する昆虫の多くは微小なのでその虫体から JH を抽出・精製して分析することは困難だと思われる。そこで、予備実験としてとりわけ巨大な顎吻亜目昆虫であるセミ類成虫から JH を生産する内分泌器官、アラタ体 (CA) を抽出・培養して、その生産物を分析した。その結果、チャバネアオカメムシで見いだされた JHSB₃ とも、その他の既知の JH と異なる物質をセミ類の CA が生産していることを示唆する結果を得た。

2. 研究の目的

本研究の目的は、セミ類の CA 生産物の構造を明らかにし、それが JH としての生物活性を有するか検定して、セミ類に特異的な JH を解明することである。

3. 研究の方法

(1) アラタ体生産物の分析

アブラゼミ成虫は茨城県つくば市および

常総市で 2012 年~2014 年の 8 月中旬~9 月上旬にかけて採集した。大阪市内で 2012 年~2014 年の 8 月上旬にクマゼミ成虫を採集した。採集した成虫から CA を抽出し、その CA を 5・6 個まとめて、50 μ L の MEM を入れたガラス容器に移し、30 $^{\circ}$ C で 6 時間~8 時間培養した。この培養時間中に CA が培地中に放出生産物をヘキサソールによって抽出し、適宜濃縮して CA 生産物とした。

CA 生産物は ODS カラムまたは光学異性体を分離することが可能なキラルカラムを装着した LC/MS、HP 1100 または Bruker micrOTOF-QII を用いて分析した。

(2) JH 活性の検定

卵巣の細胞細胞の間隙を観察するため、メス成虫から取り出した卵巣小管を、0.6% の Evans Blue を含む生理的塩類溶液に浸漬した。その状態でカバーガラスを静かに載せ、顕微鏡下で隙間の有無を観察した。

クマゼミのピテロジェニン遺伝子を既知のピテロジェニン遺伝子との相同性に基づきクローニングした (Accession number, AB671274)。

野外で羽化直前の終齢幼虫を採集し、サクラまたはイヌシデの枝にかけた網袋内で飼育して日齢の明らかなメス成虫を確保した。これらの個体の脂肪体から mRNA を抽出し、ノーザンブロッティング法を用いてピテロジェニン遺伝子の発現の有無を調べた。

日齢の明らかなメス成虫を解剖し、卵巣発育を、卵母細胞への卵黄の蓄積の程度に基づいて 5 段階に分類し評価した。

雌成虫の頭-胸間の環節間膜にあけた穴からから CA を抽出し、その後の卵巣発育を観察した。

(3) JH 候補物質の合成

セミアラタ体の生産物として想定される構造をもった JH 候補物質 A および B を JHSB₃ の合成法 (Kotaki et al, 2009) と同様な方法で、立体特異的に合成した。

4. 研究成果

(1) CA 生産物の分析

アブラゼミ雌成虫の CA 生産物をキラルカラムを装着した LC/MS を用いて分析した (図 1)。

図中の各プロットは上から順に、JHSB₃、R-JH III、候補物質 A および B に特徴的な m/z 値における CA 生産物の検出強度である。 m/z 305 および m/z 289 に検出されたピークの溶出時間はそれぞれ JHSB₃ および R-JH III の溶出時間に一致し、これらが CA 生産物に含まれていると考えられた。合成された候補物質 A および B を同様に分析したところ、溶出時間はいずれも 13 分前後であったので、CA 生産物の分析においてそれぞれに相当する m/z 値で観察されたピークの溶出時間は候補物質 A および B のそれらとは異なることが

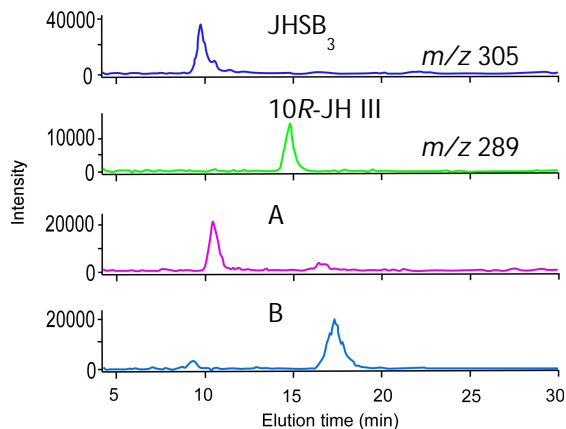


図1．アブラゼミアラタ体生産物の LC/MS による分析．

示された。しかし、高分解能 MS による組成式の推定値は、候補物質 A および B のそれと同じであったので、候補物質の異性体であると推測された。

(2) JH 活性の検定法の検討

卵巣のろ胞細胞の隙間を観察する方法がセミ類における JH 活性検定法として適用可能か検討した。この方法は、JH 存在下でろ胞細胞が収縮し細胞間の隙間が拡大する反応に基づく (Davey and Huebner, 1974)。アブラゼミス成虫から卵巣を取り出し、卵母細胞を取り囲むろ胞細胞の隙間を観察した。卵黄蓄積期のろ胞 (卵母細胞と周囲のろ胞細胞) では隙間が認められたのに対して、卵黄の取り込みをやめて、卵殻を形成するステージでは、ろ胞細胞間の隙間は観察されなかった (図2)。卵黄蓄積期のろ胞を *in vitro* で数時

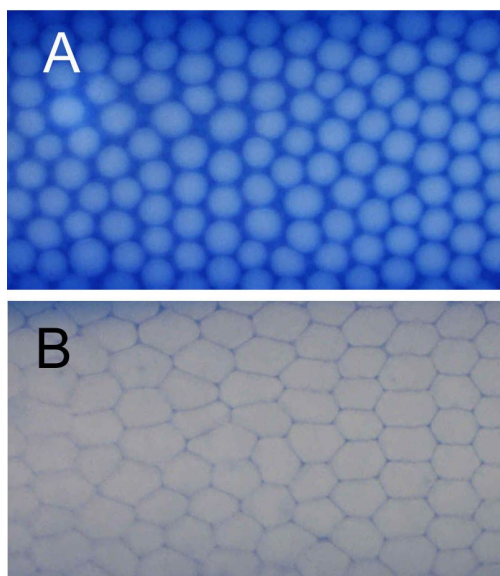


図2．ろ胞細胞の隙間の観察．A：卵黄蓄積期のろ胞細胞．細胞間の隙間は Evans blue を含む生理的塩類溶液が入り込んで、青色に染色される．B：卵殻形成期のろ胞細胞．隙間が消失して、細胞の輪郭のみが線状に青く染色されている．

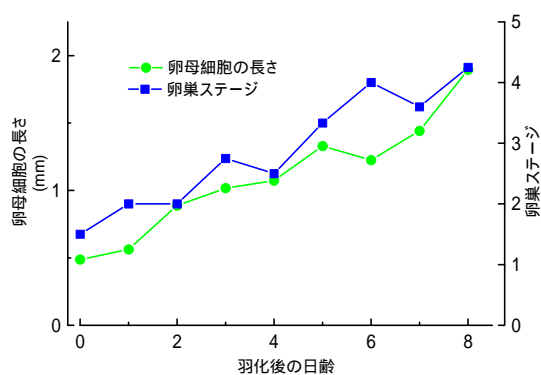


図3．アブラゼミの卵巣発育．末端の最も発育した卵母細胞の長さの平均 (●) および卵巣発育ステージの平均 (■) を示す．

間培養した場合、ろ胞細胞間の隙間が消失し、培地に JH を加えることによって隙間が維持される事例が観察された。しかし、この反応は再現性に乏しかったため、セミにおける JH 活性検定法としての利用は困難と判断した。多くの昆虫で成虫の脂肪体におけるピテロジェニン生合成は JH によって誘導される (Raikhel et al., 2005)。そこで、セミ類の脂肪体におけるピテロジェニン遺伝子の発現パターンを調べた。羽化直前の幼虫および羽化直後の成虫の脂肪体でも、わずかながらピテロジェニン遺伝子の発現が認められた。羽化後2日目には、明瞭な遺伝子発現が認められ、それ以降急速に発現量が増大した。

当初、少なくとも羽化直後にはまだピテロジェニン遺伝子は発現しないと想定したが、想定より早期に遺伝子発現が誘導されることが示された。

卵巣発育 (卵母細胞への卵黄の蓄積) を観察した結果 (図3) では、末端の卵母細胞に卵黄の蓄積が認められる発育ステージ1およびもう一つ前の卵母細胞にも卵黄が蓄積しているステージ2の個体が羽化直後から観察されたことから、遺伝子発現ばかりでなくピテロジェニンの生合成も羽化前から開始されていると考えられた。従って、脂肪体におけるピテロジェニン遺伝子発現の誘導に着目する JH 活性検定法の利用は困難と考えられた。その一方、羽化後急速に卵巣が発達するので、卵黄蓄積過程には JH が関与する可能性は否定できないと思われた。そこで、羽化の翌朝 CA を摘出し、その後6日間野外で袋掛飼育した個体の卵巣発育を調査した (図4)。その結果、傷をつけた対照区では5個体中4個体の卵巣が発育したのに対して、CA 摘出区ではいずれの個体も卵巣発育が抑制されていることが示された。

羽化の翌朝サラダ油で希釈した候補物質 A をアブラゼミス成虫に 1 μ g または 10 μ g 注射し、その3日後に解剖して卵巣を観察したところ、サラダ油のみを注射した区に比べて、候補物質を注射した区では処理量の応じて

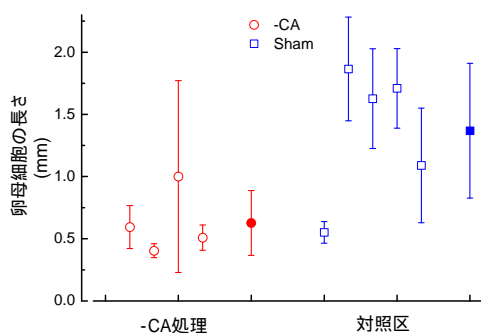


図4. アブラゼミの卵巣発育に対する CA 抽出の効果. 羽化の翌朝成虫から CA を抽出し、7 日後に解剖して卵母細胞の長さを測定した。頭-胸間の環節間膜に傷をつけたものを対照区とした。白抜きのシンボルは個体毎の平均値を示し、(赤)は処理区の、(青)は対照区の平均を示す。

卵巣発育が促進される傾向が観察された。

これらの結果から、CA を抽出し卵巣発育を強く抑制した上で、検定する物質を注射することによって、その物質の JH 活性を評価することができるかと推測された。

セミ類における JH は、本研究開始時に想定されたものとは異なる構造を持つことが示されたが、構造の決定には至らなかった。本報告で候補物質 A および B と呼んだものの異性体を系統的に合成し、それらを CA 生産物と比較する等の方法で構造を決定することが今後の課題として残された。構造が決定された CA 生産物が JH 活性を有するかどうかの検定は、メス成虫から CA を抽出し、さらに検定する物質を注射した後卵巣発育に対する促進効果があるか調べることによって可能であると考えられた。より簡便な JH 活性検定法が望ましいが、その確立は今後の課題である。

< 引用文献 >

Kotaki, T., Shinada, T., Kaihara, K., Ohfune, Y. and Numata, H. Structure determination of a new juvenile hormone from a Heteropteran insect. *Organic Letters* Vol. 11 2009 pp. 5234-5237.

Kaihara, K., Kotaki, T., Numata, H., Ohfune, Y. and Shinada, T. Structure-activity relationship of novel juvenile hormone, JHSB₃, isolated from the stink bug, *Plautia stali*. *Tetrahedron* Vol. 68, 2012 pp. 106-113.

Davey, K. G. and Huebner, E. The response of the follicle cells of *Rhodnius prolixus* to juvenile hormone and antigonadotropin in vitro. *Can. J. Zool.* Vol. 52 1974 pp. 1407-1412.

Raikhel, A. S., Brown, M. R. and Belles, X. Hormonal control of reproductive processes In: *Comprehensive Molecular Insect Science* Vol.3 2005 pp. 433-491.

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 件)

〔学会発表〕(計 4 件)

Kotaki, T., 2014 JHSB₃, the juvenile hormone specific to stink bugs. 10th International Conference of Juvenile Hormone.

Matsumoto K, Shiga S., 2014 Inhibitory factors of juvenile hormone biosynthesis in the blown-winged green bug, *Plautia stali*. 10th International Conference of Juvenile Hormone

小滝豊美, 向井歩, 松本圭司, 志賀向子. 2015 アブラゼミおよびクマゼミの卵巣発育. 日本応用動物昆虫学会第 59 回大会

安藤祐美, 真鍋敦, 品田哲郎, 大船泰史. 2013 鎖状テルペン側鎖置換型 JHSB₃ アナログの合成. 日本化学会第 93 春季年会

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕
○出願状況 (計 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 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：

出願年月日：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

小滝豊美 (KOTAKI, Toyomi)
農業生物資源研究所・昆虫成長制御研究ユニット

上級研究員
研究者番号：20391550

(2)研究分担者

品田哲郎 (SHINADA, Tetsuro)
大阪市立大学・理学(系)研究科
教授
研究者番号：30271513

志賀向子 (SHIGA, Sakiko)
大阪市立大学・理学(系)研究科
教授
研究者番号：90254383

(3)連携研究者

()

研究者番号：