

平成 22 年 5 月 25 日現在

研究種目：若手研究（スタートアップ）

研究期間：2008 ～ 2009

課題番号：20880018

研究課題名（和文） クサカゲロウが有する麻痺活性物質に関する研究

研究課題名（英文） Paralytic substances of green lacewings

研究代表者

西脇 寿 (NISHIWAKI HISASHI)

愛媛大学・農学部・助教

研究者番号：30508784

研究成果の概要（和文）：生物農薬としての開発が期待されているニッポンクサカゲロウから昆虫特異的に作用する麻痺活性成分を単離し、その構造を明らかにすることを目指した。ニッポンクサカゲロウから採取したはき戻し液を前処理した後に精製を試み、活性成分が含まれている画分を回収した。そして、目的とするタンパク質由来のバンドを切りだしたものをトリプシンによりゲル内消化し、得られたペプチドを質量分析装置により分析した。

研究成果の概要（英文）：Using various column chromatographies, a fraction containing paralytic substances was recovered from the regurgitate of a Neuropteran insect, *Chrysoperla nipponensis*. And target bands in the SDS PAGE gel were digested to identify their amino acid sequences.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,340,000	402,000	1,742,000
2009 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,540,000	762,000	3,302,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農芸化学・生物生産化学・生物有機化学

キーワード：生物活性物質，ニッポンクサカゲロウ，麻痺活性物質

1. 研究開始当初の背景

世界中には数多くの肉食性昆虫が生息している。一般的にアリゾゴクとして知られている吸汁性肉食昆虫であるクロコウスバカゲロウの幼虫は、捕食の際に大顎をえさ昆虫に突き刺して、消化酵素を含む吐き戻し液を注入することにより体外消化を行っている。これまでに、この幼虫の吐き戻し液から即効的に昆虫を麻痺させるタンパク質とともにいくつかの昆虫病原性細菌ならびにそれら細菌が生産する殺虫性タンパク質を単離し、それらの作用機構を明らかにしてきた。このような現象がウスバカゲロウだけに限定されるはずはない。ウスバカゲロウと同じ脈翅目に属する昆虫であるクサカゲロウが麻痺活性成分を有する可能性もあるが、それは定かではなかった。

2. 研究の目的

本研究では、肉食性昆虫の中でもクサカゲロウ科に属する昆虫に着目し、この幼虫の吐き戻し液にも殺虫活性が認められるか検討した。そして、その毒液から即効性の麻痺活性物質を単離精製することを目的とした。さらに、特定した活性本体の構造を解明するとともに、生物有機化学的手法を用いて、活性発現機構や構造活性相関を明らかにし、昆虫、共生微生物のどちらがその毒素を生産するのか知見を得て、昆虫生理学的な知見を得ることを目指した。

3. 研究の方法

(1) 対象昆虫としてニッポンクサカゲロウ (*Chrysoperla nipponensis*) を用いることとし、餌であるエンドウヒゲナガアブラムシ (*Acyrtosiphon pisum*) とともに大量飼育を試みた。次に、ニッポンクサカゲロウの幼虫から得られた吐き戻し液がどの程度の濃度まで殺虫活性を示すのか調査した。その際、炭酸ガスにより麻酔したイエバエ (*Musca domestica*) オス成虫にさまざまな濃度の溶液を注射投与し、経時変化を調べた。だ液中のタンパク質濃度は、標準物質として牛血清アルブミンを使用し Bradford 法により求めた。

(2) 日本に生息するクロコウスバカゲロウ (*Myrmeleon bore* Tjeder, 1941) の毒は 170 kDa 程の大きなタンパク質で ALMB-toxin (Ant lion *Myrmeleon bore*-toxin) と命名されている。ニッポンクサカゲロウの毒素を精

製するに当たり、まずはじめに *C. nipponensis* 幼虫のだ液に麻痺活性成分として ALMB-toxin が含まれているのか Western blotting により検証した。SDS PAGE によって分離したタンパク質をホライズブロットを用いて polyvinilyden difluoride (PVDF) 膜に blotting した。その後、ALMB-toxin 特異的マウス IgG 抗体を用いて ALMB-toxin を標識し、さらにこの抗体に対してアルカリフォスファターゼを結合させたマウス IgG 特異的ヤギ抗体で標識した後、この PVDF 膜に染色液 (Western blue stabilized substrate for alkaline phosphatase) を投入して染色した。コントロールとしてウスバカゲロウの吐き戻し液をクサカゲロウと同様の手法で回収し、分析した。

(3) 回収した吐き戻し液から各種クロマトグラフィーを用いて精製することを試みた。精製する際には高速液体クロマトグラフィー (HPLC: AKTA prime) を使用し、イオン交換カラム、ゲル濾過カラム、疎水性カラムを使用した。

4. 研究成果

(1) 高知大学農学部荒川良先生からご恵いただいた卵を孵化させ、飼育を試みた。餌としてスジコナマダラメイガの卵とエンドウヒゲナガアブラムシを用いて継代飼育できる環境を整え、いつでもクサカゲロウ幼虫を手にする状態となった。また、殺虫試験用の昆虫としてイエバエを飼育した。東京農業大学農学部宮本徹先生から恵いただいた蛹から継代飼育をおこなった。

ニッポンクサカゲロウから回収した吐き戻し液の原液を注射したイエバエ雄成虫は麻酔状態から回復することがなく、そのまま死に至る症状が観察された。この溶液を緩衝液で段階希釈してみたところ、40倍希釈したものにも麻痺活性が認められることが明らかとなった。(図1) しかも、注射投与6時間後でもその効果は持続した。

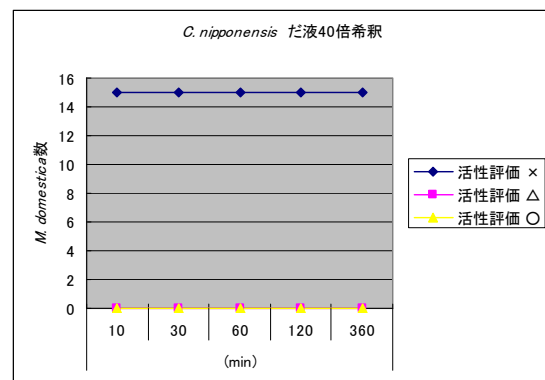


図1 40倍希釈液の殺虫活性経時変化

- ×：無反応状態
- △：痙攣麻痺
- ：通常状態

さらに濃度を希釈したところ、少し回復する個体が認められるようになった。(図2)

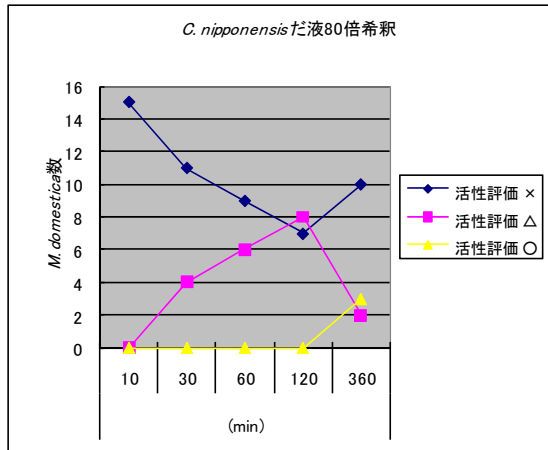


図2 40倍希釈液の殺虫活性経時変化

クロコウスバカゲロウの毒素よりは殺虫活性が低いものの、ニッポンクサカゲロウの吐き戻し液も麻痺活性を示すことが明らかになり、なんらかの有効成分が含まれていることが強く示唆された。

(2) SDS-PAGE 上では両種とも 170 kDa 付近にバンドが存在することが認められた。しかし、抗 ALMB 抗体を用いて western blotting をおこなった結果、PVDF 膜上でウスバカゲロウのだ液中に含まれている 170 kDa 付近の ALMB-toxin が染色された。一方、*C. nipponensis* では確認できなかった。(図3)



図3 左)SDS PAGE クマシー染色後の 170 kDa 付近のバンド 右) PVDF 膜に blotting した後、抗 ALMB toxin 抗体を用いて抗体染色したもの。どちらも左のレーンがウスバカゲロウの吐き戻し液、右レーンがニッポンクサカゲロウの吐き戻し液

これら抗体染色の結果から、*C. nipponensis* 幼虫は ALMB-toxin を有していないことが明らかとなった。

(3) 飼育したクサカゲロウから採取したはき戻し液を前処理した後、各種クロマトグラフィーに供して活性画分を回収した。

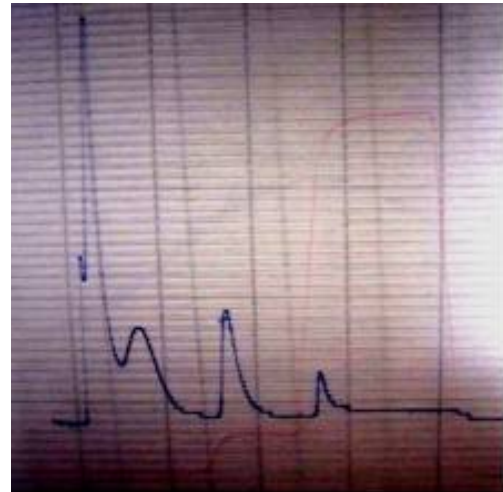


図4 イオン交換クロマトグラフィーのチャート

イオン交換カラム (図4)、ゲル濾過カラム (図5) などを使用し、イエバエに対して麻痺活性を示すかどうかを指標にして各フラクションにわけた。得られた活性画分を注射投与したイエバエは麻痺状態から回復することがなく、そのまま死に至ることを確認することができた。そして、回収した活性画分に含まれている殺虫成分と推測されるタンパク質由来のバンドを切りだし、トリプシンによりゲル内消化を試みた。そして、得られたペプチドを LC-MS で分析することにより、このタンパク質の一次構造を解析した。

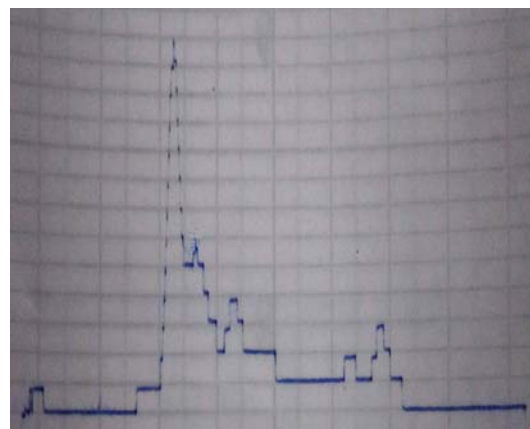


図5 ゲルろ過クロマトグラフィーのチャート

本研究では全配列の解明にまでは至ることができなかった。しかし、得られたアミノ酸の部分構造をもとに、この毒素のアミノ酸配列をコードする遺伝子を解明することで、最終的に全一次構造を明らかにすることができると考えられる。これら本研究の成果は、

将来的に安全な昆虫制御剤の開発へとつながることが期待される点で重要なものと考えられる。

肉食、草食を問わなければ、吸汁型の口器を持つ昆虫には、不完全変態では総翅目や半翅目、完全変態では脈翅目の幼虫、そして双翅目などが挙げられる。これらのうち、総翅目や半翅目、双翅目に関しては、農作物のウイルス病や人体に悪影響を及ぼす病原菌や原虫を媒介する。そのため、農業上・衛生上の問題として詳細に研究が行われている。これらの目に対し、肉食の吸汁型昆虫は多くのものが麻痺活性物質を持っていると考えられているものの、ほとんど研究が進んでいない。現在われわれは他の肉食性昆虫に対しても研究を展開しており、将来的に本研究を基盤として新たな生理活性物質が見つかることを期待される。

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1件)

① Kawaguchi Y, Yamauchi S, Masuda K, Nishiwaki H, et al. Antimicrobial activity of stereoisomers of butane-type lignans. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*. 査読有, 73, 1806-1810, 2009

[学会発表] (計3件)

- ① 長岡ひかる, 西脇寿, 山内聡, 首藤義博, 不斉中心を有するイミダクロプリド類縁体の殺虫活性と共力剤の影響, 日本農芸化学会, 平成22年3月28日, 東京大学
- ② 井門卓也, 西脇寿, 首藤義博, サビニンとその類縁体の合成と生理活性, 日本農芸化学会中四国支部第26回講演会, 平成22年1月23日, 愛媛大学
- ③ 佐々木絵美, 奈須俊二, 上久保亮太, 芳賀靖, 西脇寿, 首藤義博, シアノバクテリア誘導体のPSII阻害活性, 日本農芸化学会中四国支部2009年度合同沖縄大会, 平成21年10月31日, 琉球大学

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

○取得状況 (計0件)

[その他]

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

西脇 寿 (NISHIWAKI HISASHI)

愛媛大学・農学部・助教

研究者番号: 30508784