

平成 28 年 6 月 6 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25450070

研究課題名(和文) 脱皮ホルモン受容体-リガンド相互作用の分子機構解明に向けた乾湿統合アプローチ

研究課題名(英文) Dry and wet approach for the disclosure of the interaction between ecdysone receptor and ligand molecule

研究代表者

中川 好秋 (NAKAGAWA, Yoshiaki)

京都大学・(連合)農学研究科(研究院)・准教授

研究者番号：80155689

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：様々な脱皮ホルモン様活性化化合物の合成を行い、脱皮ホルモン受容体結合親和性を定量的に評価した。イミダゾール類に関しては、イミダゾール環上のアルキル置換基(CH<sub>3</sub>, Et, iPr)の効果について調べた。イミダゾチアジアゾール類に関しては、置換基の効果を定量的構造活性相関(QSAR)の手法を使って解析し、活性上昇にとって重要な物理化学的性質を明らかにした。テトラヒドロキノリンについては、2つのエナンチオマーに分割して、絶対構造を明らかにして、活性の違いを調べた。テントウムシとタバココナジラミの脱皮ホルモン受容体EcRをin vitroで合成し、受容体-リガンド結合実験を行った。

研究成果の概要(英文)：Molting hormone agonists with varied basic structures, such as diacylhydrazine, imidazole, imidazothiadiazole, tetrahydroquinoline, were chemically synthesized and their binding affinity to varied ecdysone receptors (EcRs) was quantitatively measured. Effect of the alkyl substituents of the imidazole ring on the binding affinity against *Spodoptera furugiperda* EcR was studied. With respect to imidazothiadiazole analogs, the substituent effects were quantitatively analyzed using QSAR. Racemic cis-form of a tetrahydroquinoline analog was separated into two enantiomers and their absolute configurations were determined. The binding affinity of these two enantiomers was evaluated against *Aedes albopictus*. Amino acid sequences of EcRs of two ladybug species and a sweet potato whitefly were deduced using cDNA cloning. Ligand-receptor binding assay was performed using these in vitro translated EcR and USP.

研究分野：生物調節化学，農薬化学

キーワード：ecdysone ponasterone A ecdysone receptor diacylhydrazine 20-hydroxyecdysone imidazole tetrahydroquinoline Bemisia tabaci

### 1. 研究開始当初の背景

昆虫には、われわれほ乳類にはない脱皮・変態という特異的な生理現象があって、この過程を攪乱する化合物は Insect growth disruptor (IGD)と呼ばれている。IGD は昆虫に特異的に作用することから、安全性の高い殺虫剤として注目されていて、これまでに、衛生害虫防除、農業用の殺虫剤として実用化に至っている化合物もある。ほとんどの昆虫およびその他の節足動物の脱皮は、ステロイドホルモンである 20-hydroxyecdysone (20E) によって制御されているが、20E とは構造的に大きく異なる非ステロイド型の化合物にも脱皮ホルモン様活性をもつものがある。その中のひとつである、diacylhydrazine (DAH) 類は、脱皮ホルモン様活性に加えて強い殺虫効果を示すことから農業用殺虫剤として実用されている。ところが、DAH 類は 20E とは違って、昆虫の中でもチョウ目に対してのみ選択毒性を示し、ハエ目、半翅目、コウチュウ目などの害虫にはほとんど活性を示さない。

これまでに脱皮に関する研究は精力的に行われ、分子レベルでの研究が進んでいる。すなわち、昆虫においては、核内受容体である ecdysone receptor (EcR) と ultraspiracle (USP) がヘテロ二量体を形成して DNA の特定の配列である脱皮ホルモン応答配列 (Ecdysone response element, EcRE) に結合することが明らかにされている。昆虫の成長に伴い、脱皮ホルモンが分泌され体液中の濃度が高くなると 20E と EcR 複合体が形成され、EcR に結合していた corepressor が離れて coactivator が結合し、下流遺伝子が活性化される。その結果として、脱皮に関連した様々な転写因子が作られる。20E や DAH をはじめとした EcR のリガンド分子は EcR のリガンド結合領域 (LBD) に結合して、EcR のコンフォメーション変化を引き起こすが、20E と DAH 類では EcR への結合様式は異なるものの、同じ作用を示すことが分かっている。DAH と 20E の受容体への結合様式の違いは、チョウ目昆虫のタバコガにおいて X 線結晶構造解析によって明らかにされているが、他の昆虫目では不明な点が多く残っている。

DAH 類以外に、非ステロイド型脱皮ホルモン様化合物として、DAH 類とは基本構造の異なるオキサジアゾリン (ODZ) 類、アシルアミノケトン (AAK) 類、イミダゾール (IMD) 類、イミダゾチアジアゾール (ITD) 類、テトラヒドロキノリン (THQ) 類が報告されている。これら DAH 類以外の非ステロイド型脱皮ホルモンアゴニストの中で、IMD 類に関しては EcR への結合様式が X 線結晶構造解析によって明らかにされていて、DAH 類と同じ結合部位に結合していることが報告されているが、他の化合物に関しては不明な点が多い。研究代表者らはこれまでに、様々な脱皮ホルモン様活性化化合物を合成し、受容体の遺伝子

クローニングも行って受容体タンパク質の調製も行ってきた。さらに、受容体-リガンド相互作用様式をコンピューターを用いて詳細に調べている。研究代表者らがやっているこれら脱皮ホルモン類の構造活性相関解析は世界的にも高いレベルにあって、2012 年の国際昆虫学会、2014 年の国際農薬化学会議で招待講演を行っている。

### 2. 研究の目的

本研究では DAH 類に加えて、それとは基本骨格が異なる IMD 類、ITD 類、THQ 類の構造活性相関に着目した。これらの置換誘導体を合成し、異なる脱皮ホルモン受容体に対する結合親和性を評価して、種間選択性発現の原因を明らかにすることを目的とした。脱皮ホルモン受容体としては、これまで代表者が用いてきたチョウ目昆虫由来のものに加えて、タバココナジラミ、テントウムシの脱皮ホルモン受容体を加えた。タバココナジラミ *Bemisia tabaci* は農業重要害虫の一つで、すでに EcR の LBD の立体構造は明らかにされているものの、全長の配列が発表されていない。研究代表者らは、これまでに数種の昆虫の EcR 遺伝子のクローニングと受容体タンパク質の *in vitro* での調製を行って、受容体-リガンド結合実験を実施した。様々な昆虫種に関して、受容体結合親和性に対する構造活性相関情報を得ている。本研究では、新たに、タバココナジラミの EcR (BtEcR) のタンパク質発現系を構築しリガンド結合実験を行うことを目的の一つとした。タバココナジラミは従来の殺虫剤に対して薬剤抵抗性が出現していること、ウイルスを媒介するなど、難防除重要害虫の一つに数えられている。またテントウムシには、植食性 (害虫) と肉食性 (益虫) が存在するが、これら食性の違うテントウムシの EcR の違いについても考察することにした。

### 3. 研究の方法

様々な構造をもった化合物を化学合成し、構造変化に伴う活性の変化を調べ、受容体-リガンド相互作用の情報を得る。活性評価には、昆虫培養細胞をそのまま用いるか、*in vitro* で調製した各種昆虫の EcR を用いる。1) 培養細胞を [<sup>3</sup>H]ponasterone A ([<sup>3</sup>H]PonA) と薬剤を含む培地で 1 時間培養し、ガラスフィルターでろ過して細胞に取り込まれる放射能を測定し、取り込みに対する濃度応答曲線より 50% 阻害濃度 (IC<sub>50</sub>, M) を求めて、その逆対数 pIC<sub>50</sub> を活性の指標とした。2) EcR または USP の cDNA をタンパク質発現用プラスミドに組み込み、一定時間インキュベートして、EcR および USP を合成した。これら EcR、USP を [<sup>3</sup>H]PonA とともに 90 分間インキュベートしたのちガラスフィルターでろ過して、ガラスフィルターに吸着された放射能を測定した。濃度応答曲線から、PonA の受容体への結合 50% 阻害濃度 (IC<sub>50</sub>, M) を決定し、その逆対

数値  $pIC_{50}$  値をリガンド-受容体結合親和性の指標とした。

EcR, USP の遺伝子クローニングは定法に従い, まず TRIZOL を用いて RNA の抽出を行ったのち, cDNA に変換しておこなった。昆虫材料として, タバココナジラミ (*Bemisia tabaci*), ナミテントウ (*Harmonia axyridis*), ニジュウヤホシテントウ (*Epilachna vigintioctopunctata*) を用いた。

#### 4. 研究成果

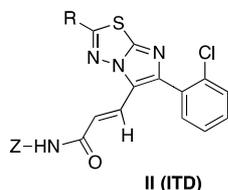
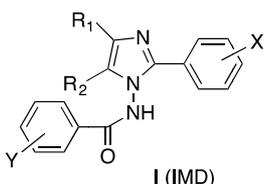
(1) イミダゾール系化合物 (I: IMD) の構造活性相関。

イミダゾール類 (I) については X を 2-Cl, 3,5-(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>

に, Y を 4-Et あるいは 2-CH<sub>3</sub>, 3,4-(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O) に固定し, Imidazole 環上の置換基 (R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub>) を H, CH<sub>3</sub>, Et, iPr と変化させた IMD 類縁体の合成を行った。まず, R<sub>1</sub> と R<sub>2</sub> を CH<sub>3</sub>, Y を 4-Et に固定し, X の置換基を 2-Cl と 3,5-(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub> で置換したところ, Sf9 細胞に対する活性は 3,5-(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub> 体では弱く, IC<sub>50</sub> 値を得られなかった。しかし, X を 2-Cl で置換することにより, 活性は大きく上昇し  $pIC_{50}$  値 (6.35) を得ることができた。しかし, この値は DAH 類の中で高い活性を示し, 殺虫剤として実用されている tebufenozide ( $pIC_{50}$ =8.81) に比べて 1/200 程度の活性強度にすぎなかった。この化合物は DAH 類と似通った結合部位に結合していることが結晶構造解析の結果明らかにされている。従って, R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub> に関しては大きな置換基が許容されると考えられ R<sub>1</sub> を Et, iPr と変化させたところ活性にわずかに上昇が認められた。一方, R<sub>2</sub> を CH<sub>3</sub> から iPr に置換すると活性が約 10 倍に上昇した。最も活性の高かった化合物 (R<sub>1</sub>=CH<sub>3</sub>, R<sub>2</sub>=iPr) に関して, ヒトスジシマカやコロラドハムシの細胞に対する活性を調べたが, どちらに対してもそれほど高い活性は得られなかった。さらに, Y 部分を殺虫剤として実用されている chromafenozide 型 [2-CH<sub>3</sub>, 3,4-(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)] に置換すると, tebufenozide 型 (Y=4Et) に比べて, さらに活性が上昇した。

(2) イミダゾチアジアゾール類の構造活性相関 (*Pest. Biochem. Physiol.*, **120**, 2015, 40-50.)

イミダゾチアジアゾール系化合物 (II: ITD) に関しては, まず, R を CF<sub>3</sub> に固定し Z を種々変化した化合物を合成した Z の置換基を iPr, cycPr, cycBu, cycHex phenyl, etc. と変化させたところ, iPr 体が最も高い活性を示した。また, NH の H をアルキル基などで置換すると活性は消失した。また, アクリル部の 2 重結合を飽和すると活性は劇的に低下した



Z を iPr 基に固定し, R に様々な置換基 (H, CH<sub>3</sub>, CF<sub>3</sub>, CF<sub>2</sub>CF<sub>3</sub>, CF<sub>2</sub>CF<sub>2</sub>CF<sub>3</sub>, SCH<sub>3</sub>, SOCH<sub>3</sub>, SO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>) を導入した化合物の合成を行い, チョウ目昆虫の培養細胞である sf9 に対して  $pIC_{50}$  を定量的に求めた。合成した化合物の中で, CF<sub>2</sub>CF<sub>2</sub>CF<sub>3</sub> を持つ化合物が最も高い活性を示し, Ponasterone A (PonA) の 2 倍であった。またこの化合物はハスモンヨトウに対して顕著な殺虫活性を示した。活性が得られた ITD 類の受容体結合親和性に対する構造活性相関の結果をまとめると図 1 のようになる。

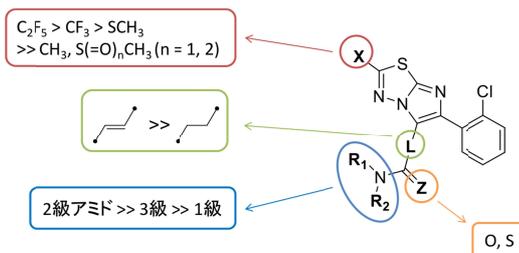


図 1. ITD 類の構造活性相関の要約 (*PBP*, **120**, 2015, 40-50, Fig. 3)

8 個の化合物に対して置換基パラメータを用いて定量的構造活性相関 (QSAR) 解析を行ったところ, 下記の結果が得られた。

$$pIC_{50} = 1.52 \Delta ClogP + 3.92 F + 4.87$$

(n=8, s=0.349, r=0.985)

この式において, ClogP は分子の疎水性を表すパラメータで, これらは Leo & Hansch によって開発された ClogP プログラムを用いて計算されたものである。ΔClogP は無置換体との差を表している。すなわち置換基の疎水性に対応する値である。F は誘起的な電子求引性を表す電子的パラメータである。n は解析に用いた化合物数, s は標準偏差, r は相関係数を表している。この式から明らかにように, 置換基の疎水性と誘起的電子求引性が高いほど, 受容体に対する結合親和性の高くなることわかる。

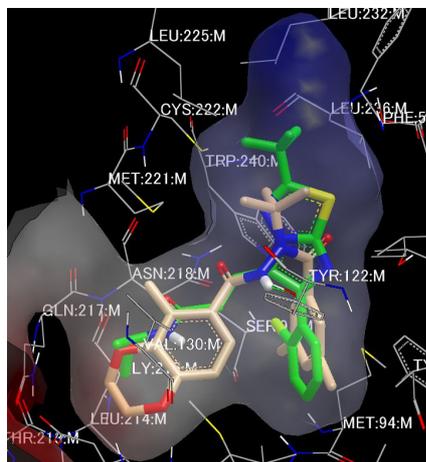


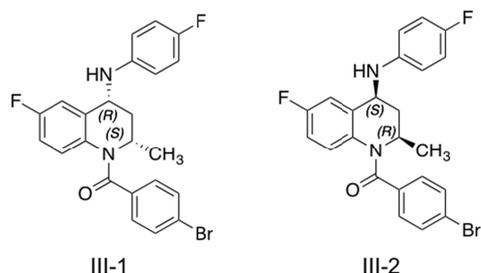
図 2. sfEcR への ITD 類のドッキング (*PBP*, **120**, 2015, 40-50, Fig. 4)

立体構造が明らかにされているタバコガ (*Heliothis virescens*) の EcR のリガンド結合領域(LBD)をもとにして、シロイチモジヨトウ (*Spodoptera frugiperda*) の EcR (sfEcR) の LBD の立体構造を構築した。SfEcR-LBD に対して、IMD をドッキングしたところ、図 2 のドッキングモデルが得られた。橙色の骨格は、HvEcR-LBD に結合した DAH 系化合物の一つである BY106830 で、緑色で示した化合物が、ドッキングさせた ITD 系化合物(R=CF<sub>3</sub>, Z=iPr)である。このモデルから明らかなように、置換基 CF<sub>3</sub> の周りには空間的な余裕があり、さらに CF<sub>3</sub> 置換基の周辺の受容体の表面が正の電荷を帯びていて、この部位に CF<sub>2</sub>CF<sub>2</sub>CF<sub>3</sub> 置換基が好ましいことが説明できた。

(3)テトラヒドロキノリン(THQ)類の構造活性相関 (*Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **24**, 2014, 1715-1718)

THQ 類はハエ目、特に蚊に対して高い脱皮ホルモン活性を示すが、チョウ目昆虫に対する活性はそれほど高くないことが知られている。また、この化合物には不斉炭素が 2 つ存在して、cis 体のみが活性を示すことが報告されていた(Holmwood & Schindler, 2009)。しかし、cis 体にも(2*S*,3*R*)体と(2*R*,3*S*)体の 2 種類のエナンチオマーが存在しているにもかかわらず、これらの区別はされていなかった。本研究ではこの点を明らかにすることを目的として、化合物の合成および、エナンチオマーの分離、絶対配置の決定を行うこと。さらにエナンチオマー間での活性差をしらべるとを目的とした。

まず 2,4 位の幾何異性を cis に固定した化合物 (X<sub>1</sub>=X<sub>2</sub>=CH<sub>3</sub>, or F, Y<sub>3</sub>=CH<sub>3</sub>, Cl, Br) のラセミ混合物(について活性を調べたところ、X<sub>1</sub>, X<sub>2</sub> の置換基としては F 原子、Y<sub>3</sub>としては Br 原子が最も高い活性を与えた。そこで、まずこの THQ 誘導体 (X<sub>1</sub>=X<sub>2</sub>=F, Y<sub>3</sub>=Br) の cis 体を合成し、キラル HPLC を用いて 2 つのエナンチオマーを分離した。さらに、それぞれの絶対構造を X 線結晶構造解析によって、2*S*,3*R* (III-1) 2*R*,4*S*(III-2)と決定した。また、それぞれのエナンチオマーの旋光度を測定したところ、+443°(III-1)、-441°(III-2)であっ



た。

図 3 . THQ 類の構造と絶対配置

キラル分割した (III-1) と(III-2) の受容体結合親和性を、ヒトスジシマカ (*Aedes albopictus*) 由来の細胞(NIAS-AeA12)を用いて測定したところ、(III-2; 2*R*,3*S*)は(III-1; 2*S*,3*R*)に比べ 36 倍高い活性を示した。また、アカイエカに対する殺幼虫活性試験においても、III-2 が III-1 に比べて 56 倍高い活性を示した。

(4)脱皮ホルモン受容体遺伝子クローニング  
テントウムシ (*J. Pestic. Sci.*, **39**, 2014, 76-84.)

農業害虫である植食性のテントウムシであるナミテントウ (*Harmonia axyridis*) とアブラムシを補食する肉食性のテントウムシ (益虫) であるニジュウヤホシテントウ (*Epilachna vigintioctopunctata*) から RNA を抽出し、脱皮ホルモン受容体 (EcR) およびそのパートナータンパク Ultraspiracle (USP) 遺伝子の cDNA クローニングを行った。それぞれの EcR, USP のアミノ酸配列を決定したところ、テントウムシと同じコウチュウ目に属する他の昆虫種であるコロラドハムシやコクヌストモドキなどの EcR, USP と高い相同性を示した。特に EcR-LBD の相同性は 86-92%であった。

ナミテントウの EcR (HaEcR) と USP (HaUSP)、ニジュウヤホシテントウの EcR (EvEcR) と USP (EvUSP) をコードする遺伝子をタンパク質発現用プラスミドに組み込んで、ウサギ網状赤血球ライセートを用いて *in vitro* で EcR と USP を調製した。*In vitro* で調製したナミテントウの脱皮ホルモン受容体 (HaEcR/HaUSP) とニジュウヤホシテントウの脱皮ホルモン受容体 (EvEcR/EvUSP) を用いて、脱皮ホルモン様活性化合物の活性の評価を行った。その結果、ステロイド化合物である PonA に関しては、他の昆虫種の EcR/USP に対する結合親和性と同程度の高い親和性 (HaEcR/HaUSP IC<sub>50</sub>=5.6 nM ; EvEcR/EvUSP IC<sub>50</sub>=4.0 nM) を示した。

非ステロイド型脱皮ホルモンアゴニストで DAH 類に属する tebufenozide や RH-5849 について、それぞれの脱皮ホルモン受容体に対する活性を評価したところ、ナミテントウに対しては、どちらも IC<sub>50</sub> 値は 10 μM 程度で、PonA の親和性に比べると非常に低く 1/2000 ~ 1/3000 であった。ニジュウヤホシテントウに対しては IC<sub>50</sub> を求めることはできなかった (IC<sub>50</sub> = >250 μM)。タンパク質分子モデリングの手法を用いて HaEcR-LBD と EvEcR-LBD の立体構造を構築し、tebufenozide のドッキングシミュレーションを行ったところ、HaEcR と EvEcR の間で若干の違いが認められた。

タバココナジラミ

タバココナジラムの cDNA クローニングで得られた BtEcR の推定アミノ酸配列は(530 aa) は、他の半翅目昆虫の EcR の配列と高い相同性を示した。BtEcR-LBD の配列は、他の半翅目、コウチュウ目、直翅目昆虫の EcR-LBD の配列と高い相同性(79-81%)を示した。BtEcR の cDNA をタンパク質発現用プラスミドに組み込み、ウサギ網状赤血球ライセートを用いて *in vitro* で EcR を調製した。BtEcR においても cDNA cloning は困難であったが βtUSP に関しても、従来の方法では、USP の配列を決定することはできなかった。そこで、ショウジョウバエの USP(DmUSP)を複合体パートナーに用いて、受容体結合実験を行った。BtEcR/DmUSP に対する PonA の受容体結合親和性を求めたところ、IC<sub>50</sub> 値は 4.5 nM であった。この値は、他の昆虫で得られている PonA の IC<sub>50</sub> 値(5種の昆虫の EcR に対する IC<sub>50</sub> の平均値: 5.9 nM)に近い値であった。この BtEcR/DmEcR を用いて、様々な非ステロイド型脱皮ホルモンアゴニストである DAH 類、ITD 類、IMD 類の活性を調べたが、全く活性を示さなかった。

#### 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5件)

① Yokoi T, Minami S, Nakagawa Y, Miyagawa H. Structure-activity relationship of imidazothiadiazole analogs for the binding to the ecdysone receptor of insect cells. *Pest. Biochem. Physiol.*, 120, 2015, 40-50  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.pestbp.2014.12.008>

Morishita C, Minakuchi C, Yokoi T, Takimoto S, Hosoda A, Akamatsu M, Tamura H, Nakagawa Y. cDNA cloning of ecdysone receptor (EcR) and ultraspiracle (USP) from *Harmonia axyridis* and *Epilachna vigintioctopunctata* and the evaluation of the binding affinity of ecdysone agonists to the *in vitro* translated EcR/USP heterodimer. *J. Pestic. Sci.*, 39, 2014, 76-84.

<https://www.jstage.jst.go.jp/article/jpestics/DOI:10.1584/jpestics.D13-074>

Kitamura S, Harada T, Hiramatsu H, Shimizu R, Miyagawa H, Nakagawa Y. Structural requirement and stereospecificity of tetrahydroquinolines as potent ecdysone agonists. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 24, 2014, 1715-1718.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.bmcl.2014.02.043>

Kanaoka S, Kimura Y, Fujikawa M, Nakagawa Y, Ueda K, Akamatsu M. Substrate recognition by P-glycoprotein efflux transporters: Structure-ATPase activity relationship of diverse chemicals and

agrochemicals. *J. Pestic. Sci.*, 38, 2013, 112-122.

<https://www.jstage.jst.go.jp/article/jpestics/DOI:10.1584/jpestics.D13-022>

Morou E, Emmanouel L, Pavlidi N, Zotti M, Iatrou K, Nakagawa Y, Smagghe G, Vontas J, Swevers L. A New Dibenzoylhydrazine with Insecticidal Activity against Anopheles Mosquito Larvae. *Pest Manag. Sci.*, 69, 827-833 (2013)

<http://wileyonlinelibrary.com/DOI:10.1002/ps.3441>

[学会発表](計18件)

[その他]

ホームページ等

<http://www.seicho.kais.kyoto-u.ac.jp/>

#### 6. 研究組織

##### (1)研究代表者

中川 好秋 (NAKAGAWA, Yoshiaki)  
京都大学・大学院農学研究科・准教授  
研究者番号: 80155689

##### (2)研究分担者

なし

##### (3)連携研究者

水口 智江可 (MINAKUCHI, Chieka)  
名古屋大学・大学院生命農学研究科・助教  
研究者番号: 90509134