

日本農薬学会
農薬科学研究成果報告書
(令和元年度研究奨励金交付課題)

研究課題

害虫選択的な幼若ホルモン拮抗阻害剤の合成探索とその作用機構の解析

筆頭研究者氏名 古田 賢次郎

所属 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 昆虫制御研究領域

共同研究者名(所属)

塩月 孝博(島根大学生物資源科学部生命工学科・教授)

研究成果(目的・方法・成果の順に概要を記載してください)

【目的】

農業生産現場で問題化している薬剤抵抗性害虫の防除のため、新しい作用機序を有し、かつ選択性の高い薬剤が求められている。幼若ホルモン(JH)受容体である Methoprene-tolerant (Met) は、脱皮・変態や生殖腺成熟など昆虫の成育に必須な生理調節機構を制御していることから、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。これまでに、*in vitro* および *in vivo* スクリーニングにより、モデル昆虫であるカイコに対して JH 拮抗阻害活性を示す合成化合物 ethyl 4-(7-benzyloxy-1,4-benzodioxan-6-yl)methylbenzoate (NY-04) を見出している。そこで、これまでの成果をより発展させ、害虫に高活性で選択的な JH 拮抗阻害剤の創製を目指して研究を行った。

【方法】

1) JH 拮抗阻害剤の合成探索

NY-04 誘導体の合成を行い、構造と活性の関係を検討した。具体的には NY-04 の 1,4-ベンゾジオキサン環の構造改変、*p*-エトキシカルボニル基の構造改変および、ベンジルオキシ基への置換基の導入を行った。合成した NY04 誘導体の生物活性は、カイコ幼虫に対する早熟変態誘導活性試験および、JH 応答配列を用いたレポータージーンアッセイで評価した。また、チョウ目害虫であるハスモンヨトウを用いた殺虫活性試験により評価することで、害虫にのみ選択的に作用する NY04 誘導体のスクリーニングを行った。

2) JH 拮抗阻害剤が脱皮・変態におけるシグナル伝達機構に与える影響の解析

カイコにおいて、JH 拮抗阻害剤が脱皮・変態に関連する遺伝子の発現量に与える影響を既報の方法によって調べた。各成育段階の幼虫に阻害剤を処理し、一定時間ごとに表皮から

total RNA を抽出した後、逆転写によって得られた cDNA を用いて、リアルタイム PCR による定量を行い、JH 応答遺伝子 *Krüppelle homolog 1* (*Kr-h1*) や脱皮ホルモン応答遺伝子 *Broad-Complex* (*BRC*) の発現量の変化を明らかにする。また、LC-MS による JH 定量法により、体液中の JH 濃度変化を調べた。

【結果】

1) JH 拮抗阻害剤の合成探索

早熟変態誘導活性試験において、NY04 における構造と生理活性の関係を検討したところ、以下のことが明らかになった。

- 1,4-ベンゾジオキサン環を環構造を有さないジメトキシベンゼン環や、酸素原子を持たないテトラヒドロナフタレン環に改変すると、活性が消失した。また、クロマン環やメチレンジオキシベンゼン環に改変しても活性は低下した。
- ベンジルオキシ基のオルト位およびメタ位にメチル基を導入すると、活性が大幅に減少したのに対して、パラ位では活性が向上した。また、パラ位に様々な置換基を導入したところ、メトキシカルボニル基において最も高い活性を示した。
- 安息香酸エステル部分をケイ皮酸エステルに構造改変すると、活性が大幅に向上した。

これらの構造活性相関に基づいて、新たに合成された ethyl (*E*)-4-[[7-(4-methoxycarbonyl benzyloxy)-1,4-benzodioxan-6-yl]methyl]cinnamate (NY52) は、早熟変態誘導活性試験において、NY04 よりも高い抗 JH 活性 ($ED_{50}=6.2$ ng/larva) を示した。また、NY52 の JH 拮抗阻害活性をレポーター遺伝子アッセイにより評価したところ、NY04 よりも有意に JHI の応答を阻害 ($IC_{50}=3.1$ nM) し、その阻害様式は競合阻害であった。このことから、NY52 が *in vivo* および *in vitro* において NY04 よりも高い生理活性を示す JH アンタゴニストであることが示された。そこで、NY52 および NY04 の害虫に対する生物活性を調べるために、それぞれのアセトン溶液をハスモンヨトウ幼虫にそれぞれ処理し、成長に与える影響を観察した。しかし、ハスモンヨトウに対しては、大きな影響は認められなかった。現在、コナガなど別の昆虫を用いて生物活性試験を行っている。

2) JH 拮抗阻害剤が脱皮・変態におけるシグナル伝達機構に与える影響の解析

カイコにおける JH 応答遺伝子である *BmKr-h1 α* および *BmKr-h1 β* および、脱皮ホルモン応答遺伝子である *BmBRC* に着目し、これらの発現に NY52 が与える影響をリアルタイム PCR により調べた。その結果、NY52 をカイコ 3 齢幼虫に処理すると、24 時間以内に *BmKr-h1 α* および *BmKr-h1 β* の発現量が急激に減少したのに対して、*BmBRC* の発現には全く影響を与えないことが明らかになった。また、NY52 を処理したカイコ体液中の JH 濃度を測定したところ、JHI 濃度が大幅に減少することが明らかになった。このことから、NY52 は JH シグナルを抑制することで、体液中の JH 濃度の低下を引き起こし、早熟変態を誘導する可能性が示唆された。

NY52 は、JH アンタゴニストのリード化合物として優れた活性を有していることから、研究をさらに進展させることで、農薬としての利用が期待できる。