

日本農薬学会
農薬科学研究成果報告書
(令和 2 年度研究奨励金交付課題)

研究課題

昆虫チラミン受容体に対する殺虫性精油のアロステリック様作用に関する研究

筆頭研究者氏名 太田 広人

所属 崇城大学 生物生命学部 応用微生物工学科

共同研究者名 (所属)

高松 亮太 (熊本大学大学院 自然科学教育部)

吉川 琢磨 (崇城大学 生物生命学部 応用微生物工学科)

塩見 邦博 (信州大学 繊維学部 応用生物科学科)

研究成果 (目的・方法・成果の順に概要を記載してください)

【研究の目的】

2006年頃からの CCD (蜂群崩壊症候群) や、近年、魚類等の水生生物や渡り鳥の減少も、ネオニコチノイド系農薬が原因であるという報道を度々見るようになった。このような情勢の中、人畜安全性は勿論、ミツバチ等の有益昆虫にも無害で、環境にも影響を与えない農薬開発が求められている。我々は、従来までの合成化合物ではなく、天然由来のエコフレンドリーな精油に着目し、その作用機構を調べてきた。その結果、殺虫性精油のチモールやカルバクロール (図 1) が、昆虫生体アミン受容体の一種“チラミン受容体 (TAR)” に対して、チラミン (TA) のアゴニスト作用を増強する (アロステリック様作用) という興味深い結果を得た (日本農薬学会 2018, 2019 発表)。TAR は無脊椎動物に特異的であるため、害虫防除の新しい標的として注目できる (尾添・太田, 日本農薬学会誌 **29**, 267-271, 2004)。

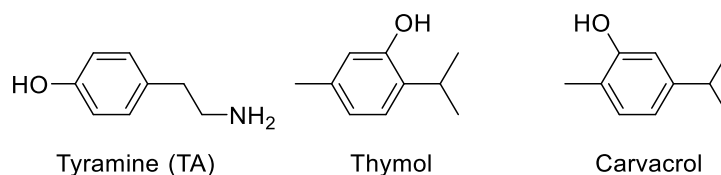


図 1 チラミンと殺虫性精油 (チモール及びカルバクロール) の構造

本課題では当初、①さらに強力な精油の探索、②受容体アロステリック部位の特定、③昆虫 (カイコ) に対する殺虫活性の増強確認、④受容体ノックアウト (KO) カイコに対する殺虫活性の消失確認、以上 4 つの実験項目を実施し、精油の新しい作用機構の解明と殺虫活性との関係性を明らかにすることを計画していた。しかしコロナの影響により、令和 2 年度前半は研究活動がほぼ停止した。そのため、計画を見直し、①は供試精油数を絞り、②は受容体サブタイプごとでのアロステリック様作用の比較に、③は精油 4 種の殺虫活性比較にそれぞれ変更、④はゲノム編集による KO カイコ作出のためのカイコ卵への薬液インジェクション装置をセットアップ後、卵への注入予備実験を進めるところまでを計画した。以下、変更後の計画に沿って、成果を報告する。

【研究の方法】

- ① **さらに強力な精油の探索**：HEK-293 細胞にカイコ TAR1 (BmTAR1) とミトコンドリア移行型アポエクオリン、さらに Ga15 を一過的に共発現させた。その細胞にセレンテラジンを 4 時間処理し、細胞懸濁液を調製した。TA (10 μM) と各精油の混合溶液に細胞懸濁液を添加し、直後 30 秒間の発光量を測定した。精油は Thymol と Carvacrol の他、Piperonyl Alcohol, (+)-Pulegone, Vanillyl alcohol, 4-Isopropyl-3-methylphenol, Vanillin, (-)-Menthol, 1,4-Cineole, Isoeugenol, (±)-Limonene の計 9 種類のアロステリック様作用を調べた。
- ② **受容体サブタイプごとのアロステリック様作用の比較**：これまでカイコ BmTAR1 に対する精油のアロステリック様作用を見てきたが、昆虫には異なる TAR サブタイプが存在する (Ohta and Ozoe, 2014)。そこで、カイコの異なる TAR サブタイプ BmTAR2 (Huang et al., 2009) に対して、精油 Thymol 及び Carvacrol が、同様のアロステリック様作用を示すかどうかをエクオリンアッセイで調べた。
- ③ **昆虫 (カイコ) に対する精油 4 種の殺虫活性比較**：精油 (Thymol, Carvacrol, *p*-Cymene, L-Carvone) の 1~10% (w/v) アセトン溶液を調製し、その溶液をカイコ 3 齢幼虫の腹側胸脚付近に 10 μL ずつ塗布し、48h までの殺虫活性を調べた。
- ④ **ゲノム編集による KO カイコ作出に向けた装置セットアップと予備実験**：カイコのゲノム編集技術 (CRISPR-Cas9) 実験を進めるために、薬液インジェクターとマニピュレーター、さらに xy ステージを手持ちの実体顕微鏡に接続した。この装置を用いて、カイコ卵への注入予備実験を行った。

【研究の成果】

- ① BmTAR1 に対する上記精油 9 種類のアロステリック様作用を調べた結果、高濃度で僅かに作用を示すものはあったが、Thymol や Carvacrol を超えるものは見つからなかった。

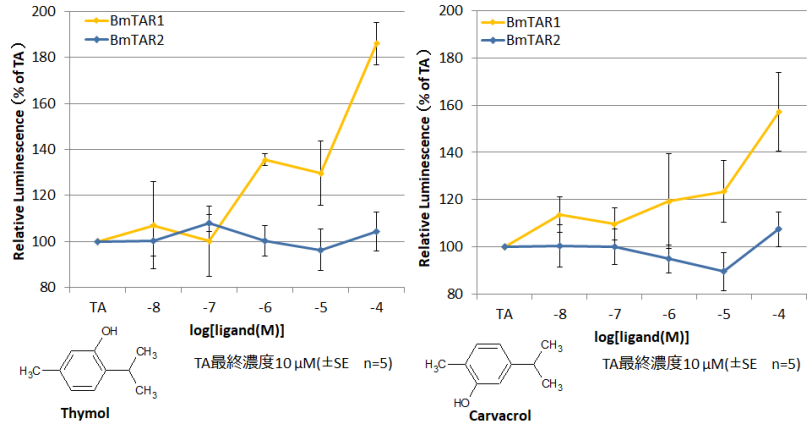


図 2 TAR サブタイプ間での精油のアロステリック作用の比較

- ② Thymol と Carvacrol について、BmTAR2 に対するアロステリック様作用の有無を調べた。その結果、BmTAR1 で見られたようなアロステリック様作用は BmTAR2 では見られず (図 2)、精油の TAR に対するアロステリック様作用はサブタイプ特異的であることが分かった。

- ③ カイコに対する精油 4 種の殺虫活性を比較した。*p*-Cymene は 10% 溶液の塗布でも殺虫活性はほとんどなかった。残り 3 精油についての濃度-殺虫活性を比較した結果、Thymol > Carvacrol > L-Carvone (>> *p*-Cymene) の順となった (図 3)。この精油の殺虫活性順位

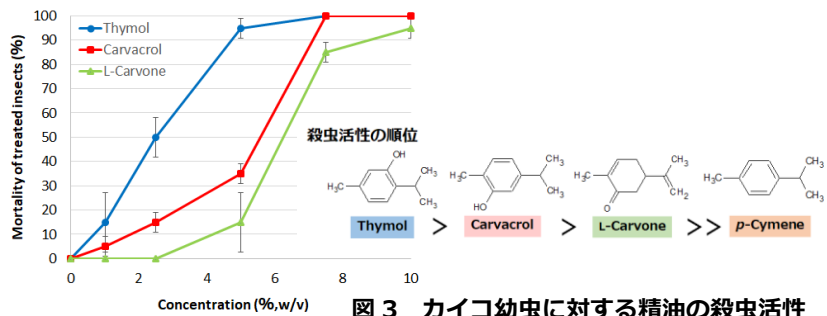


図 3 カイコ幼虫に対する精油の殺虫活性

- ④ カイコ卵への薬液の注入予備実験を行った。その結果、多数の卵に対して連続的に注入できる装置をセットアップできた。ただし、カイコ卵の個体差による注入誤差が生じることも分かり、現在、卵をセットするステージの改良を行っている。

今後は、BmTAR1 のアロステリック部位の構造情報を得ること、また KO カイコでの実験により、アロステリック様作用と殺虫活性との関係、生理的な意義にまで迫っていきたい。