

日本農薬学会
農薬科学研究成果報告書
(令和 6 年度研究奨励金交付課題)

研究課題

カイコ初齢幼虫を用いた微生物二次代謝産物からの殺虫剤シード化合物の創製

筆頭研究者氏名 浅見 行弘

所属 北里大学大村智記念研究所

共同研究者名 (所属)

君嶋 葵 (北里大学大村智記念研究所・講師)

近藤 直純 (日本学術振興会特別研究員 PD)

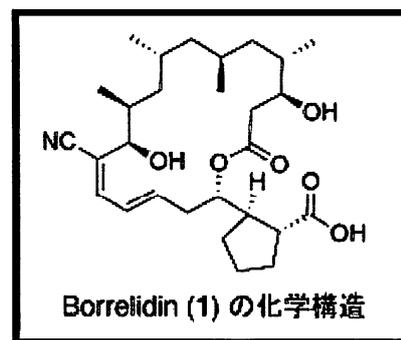
研究成果 (目的・方法・成果の順に概要を記載してください)

【研究の目的】

農業害虫として知られるコナガやヨトウガ類等のガ類害虫の殺虫剤耐性化は深刻な問題である。この対応として、異なる殺虫剤のローテーションが有効であるため、異なる骨格や作用機序の新規殺虫剤開発が求められている。我々は、上記のガ類害虫に対して殺虫活性を示す天然物の探索と、その作用機序の解明を目的とした研究を行ってきた。具体的には、殺虫剤感受性の高いガ類

昆虫であるカイコに着目し、カイコ初齢幼虫を用いた *in vivo* 殺虫活性評価系を開発した。この試験系を用い、北里大学大村智記念研究所が保有する大村天然化合物ライブラリーから、カイコに対する殺虫活性物質をスクリーニングした結果、カイコ初齢幼虫に対して $ED_{100}=3$ ppm、ガ類害虫ハスモンヨトウに対しても潜在的な殺虫活性を示す天然化合物 borrelidin (1)を見出した(*ACS Agric. Sci. Technol.* 2023, 3, 278-286.)。Borrelidin(1)は、Threonyl-tRNA 合成酵素(ThrRS)を標的としてタンパク質合成を阻害することで生物活性を示す(*Nat. Commun.* 2015, 6, 6402.)。しかし、昆虫に対して同様の作用機序によって殺虫活性を示すか否かは、これまで実験的に証明されていない。また、同酵素を標的とした殺虫剤は現在までに開発されていない。そこで、1の殺虫活性の向上と非特異的な毒性の低減を目的とした誘導化研究によって、天然物と同等の殺虫活性を示しながらもヒト細胞毒性を低減した誘導体を発見し、報告してきた(*ACS Agric. Sci. Technol.* 2023, 3, 648-656.)。

このような背景を踏まえ、本研究では、新規作用機序を有する殺虫活性物質として1に着目し、作用機序の同定を目的とした実験を行った。加えて、我々の先行研究で天然物と同等の殺虫活性を示した誘導体について、浜本・関水らが報告したカイコ 5 齢幼虫を用いた毒性試験系(*Comp. Biochem.*



Physiol. C Toxicol. Pharmacol. 2009, 149, 334-339.)を利用し、より詳細な *in vivo* 毒性試験を実施した。

【研究の方法と成果】

1. ガ類昆虫細胞に対する細胞毒性とタンパク質合成阻害活性の測定：天然物 1 による ThrRS を介したタンパク質合成阻害と殺虫活性の関係を明らかにするため、1 のガ類昆虫細胞 Sf-9 株に対する細胞毒性およびタンパク質合成阻害活性を評価した。結果、天然物 1 はいずれの *in vitro* 評価においても IC_{50} =約 10-20 nM の高い阻害活性を示したことから、1 の殺虫活性はタンパク質合成阻害に起因しており、ThrRS 阻害に関連する可能性が推察された。また、1 を基準として誘導体の生物活性を比較したところ、先行研究において殺虫活性が 1 よりも弱かった誘導体 2 及び 4 は、同じく *in vitro* においても類似した活性を示した。一方、1 と同等のカイコ殺虫活性を示した誘導体 3 と 5 の *in vitro* における活性は約 10 から 20 分の一と著しく低かった。これらの誘導体における *in vitro* と *in vivo* の結果の矛盾について考察するために、項目 5 において詳細な毒性試験を実施した。
2. アミノ酸添加が borrelidin の殺虫活性に与える影響の評価：天然物 1 の標的が ThrRS であるならば、基質の一つである threonine を添加することで 1 のカイコ殺虫活性は減弱すると予想される。カイコ初齢幼虫に対し致死濃度の 1 と共にアミノ酸 20 種をそれぞれ添加した餌を与え、摂取 7 日後の幼虫の平均体重を測定することで、各アミノ酸が 1 の殺虫活性に与える影響を調査した。カイコ初齢幼虫に対して致死濃度の 1 に加えて threonine を添加した場合、threonine の濃度依存的にカイコの平均体重が増加した。一方、他のアミノ酸群ではこのような体重増加は認められなかった。加えて、1 の未添加群に各アミノ酸を添加した場合、カイコの成長に顕著な差は認められなかった。これらの結果から、期待通り 1 の標的が昆虫の ThrRS である仮説が支持された。
3. Borrelidin プロブの作製とブルダウンアッセイ：天然物 1 のビオチン化誘導体を合成し、avidin ビーズに抱合させた borrelidin プロブを作製した。加えて、バキュロウイルス発現系を利用してカイコ由来の ThrRS を過剰発現させた Sf-9 細胞株より細胞溶解液を調製し、ブルダウンアッセイにより 1 と ThrRS との物理的な相互作用の有無を検証した。この結果、borrelidin プロブの抽出液において約 75kDa 付近に 2 本のバンドが認められ、MALDI-TOF/MS 解析の結果、共に ThrRS と同定された。また、後述する酵素活性試験によって①が不活性体、②が活性体であることが分かった。この結果から、1 と ThrRS は物理的な相互作用を示すことが証明された。
4. ThrRS 阻害活性の測定：バキュロウイルス発現系を利用して得たカイコ ThrRS と、遊離ピロリン酸の生成を指標とした ThrRS 活性試験系を用いて、天然物及び誘導体のカイコ ThrRS 阻害活性を測定した。その結果、1 は確かにカイコ ThrRS 阻害活性を示した。一方で、項目 1 の結果と同様に誘導体 3 及び 5 は 1 に比べて低い阻害活性を示し、優れたカイコ殺虫活性とは乖離した値となった。この結果から、誘導体 3 及び 5 は酵素阻害活性において 1 に劣るものの、薬物動態特性で勝るために強い殺虫活性を示すのではないかと考え、項目 5 の検証を行った。
5. カイコ 5 齢幼虫を用いた毒性試験：天然物 1 及び誘導体 3 について、カイコ 5 齢幼虫を用いた血管内投与及び腹腔内投与による毒性試験を行った。結果、1 及び 3 は共に 40 µg/g 投与群において投与 4 日後に 50%の個体が死亡した。したがって、3 のカイコ殺虫活性は確かに 1 と等しく、酵素阻害活性との乖離から優れた薬物動態を示す可能性が高いと推察された。

本研究では、ガ類殺虫活性物質として潜在性を有する 1 に注目し、殺虫剤標的として新しい ThrRS 阻害活性を示すことを証明した。加えて、誘導体 3 が 1 に勝る昆虫内薬物動態特性を有する実験的示唆を得た。