

昆虫の脱皮と変態を制御する抗幼若ホルモン活性物質の作用機構

古田 賢次郎

幼若ホルモン（JH）は脱皮・変態だけでなく、胚発生、生殖腺成熟、休眠やカースト分化など昆虫の成育において重要な役割を果たすことが知られている。そのため、JHの作用を阻害する抗JH活性物質は、昆虫の成育を特異的に制御することができる昆虫成育制御剤としての利用が期待されている。近年、JH受容体や生合成酵素などに関する知見が数多く報告されており、抗JH活性物質を開発するための技術基盤が整っているが、抗JH活性物質自体の報告はあまり多くない。そこで本稿では、これまでに報告されている抗JH活性物質とその作用機構に関して紹介したい。

1. はじめに

幼若ホルモン（juvenile hormone：JH）は、昆虫をはじめとする節足動物に存在し、セスキテルペノイド骨格を有するユニークな疎水性ホルモンである。JHの構造は、昆虫種によって若干異なり、これまでに10種程度のJHが同定されている（図1）。JHは脳の付属器官であるアラタ体で生合成および分泌され、各器官に輸送された後、全身のさまざまな部位で生理作用を示す。

幼虫期では、JHは脱皮ホルモンであるエクジステロイ

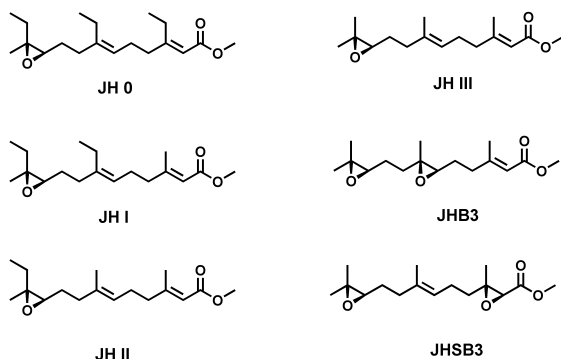


図1 主なJHの構造

島根大学生物資源科学部生命工学科（〒690-8504 島根県松江市西川津町1060）

The mechanism of action of anti-juvenile hormone agents
Kenjiro Furuta (Department of Life Science and Biotechnology, Faculty of Life and Environmental Science, Shimane University, 1060 Nishikawatsucho, Matsue, Shimane 690-8504, Japan)

ドと協奏的に作用することで、脱皮と変態を制御していることが知られている¹⁾。若齢幼虫のように昆虫体内にJHが存在する条件下で脱皮ホルモンが分泌されると、幼虫から幼虫への脱皮が起きる。それに対して、終齢幼虫ではJHの生合成が停止するため、体内からJHが消失する。このときに脱皮ホルモンが分泌されると、幼虫から蛹さらには成虫への変態が引き起こされる。すなわち、JHには変態を抑制し、幼虫形質のままであろうとする現状維持（*status quo*）作用がある。また成虫期には、JHは単独で作用することで、脂肪体での卵黄形成タンパク質の合成と分泌による生殖腺の成熟作用や、性フェロモンの合成に関与しており、その他にも胚発生、休眠やシロアリなどの社会性昆虫におけるカースト分化など、卵から成虫までの各成育段階において多岐にわたる生理調節機構に関与している。

そのため、JHは古くから昆虫成育制御剤（insect growth regulators：IGRs）のターゲット分子として研究が行われ、これまでにメソプレンやピリプロキシフェンなどのいくつかのJHアナログが開発されている（図2）。これらJHアナログは、*in vivo*においてJHと同じ生理作用を示し、JHよりも高い活性を示すことからすでに実用化されている²⁾。また、JHは昆虫体内で容易に分解されるが、JHアナログは比較的安定であるため、JHの代替物質として研究においてもよく利用されている。それに対して、JHの作用を阻害することができる抗JH活性物質に関する報告は少ない。その理由として、長年JH受容体をはじめとするJHのシグナル伝達機構やJH生合成に関して不明な点が多かったことがあげられる。

しかし、近年の研究により Methoprene-tolerant (Met) と

2. JH 生合成阻害剤

1) プレコセン

プレコセンは Bowers らによって、オオカッコウアザミから単離された抗 JH 活性物質である (図 4)。プレコセンは、JH 生合成器官であるアラタ体に対して細胞毒性を示すことで、JH の生合成と分泌を阻害することが知られており、カメムシである *Oncopeltus fasciatus* など一部の不完全変態昆虫に処理することで早熟変態を引き起こす⁹⁾。プレコセン自体には細胞毒性はないが、クロメン環上にある 3,4 位の二重結合が昆虫体内で酸化されることでエポキシド体となり、これがアラタ体中のタンパク質や核酸をアルキル化することで、細胞毒性を示すことが知られている。

2) JH 生合成酵素阻害剤

フルオロメバロン酸 (fluoromevalonate: FMeV) やコンパクチンは、古くから知られている JH 生合成酵素阻害剤である⁹⁾。これらは哺乳動物におけるコレステロール合成阻害剤として開発された化合物であり、ヒドロキシメチルグルタリル CoA レダクターゼ (HMG-CoA レダクターゼ) に対して阻害活性を示すが、昆虫に対しても同様の活性を示していると考えられる。また、3,3-dichloro-2-pentenyl hexanoate (DPH) にも JH 生合成阻害活性があることが報告されており、その阻害活性は後期経路の中間体であるファルネセン酸の投与で打ち消されたことから、前期経路の生合成酵素を阻害している。しかし、JH の前期生合成経路は、前述のようにメバロン酸経路と共通であるため、これらの化合物は JH の生合成だけを特異的に抑制することができないだけでなく、哺乳動物も同じ酵素を持っているため、選択性の面で問題がある。

それに対して、桑野らにより合成された TH-27 をはじめとする 1,5-二置換イミダゾール類は、後期生合成酵素の阻害活性を有していることが示唆されている¹⁰⁾。TH-27 をゴキブリ (*Diploptera punctata*) の成虫の胸部に塗布したところ、アラタ体において JH 前駆体であるファルネセン酸メチルエステルの蓄積が確認されたことから、TH-27

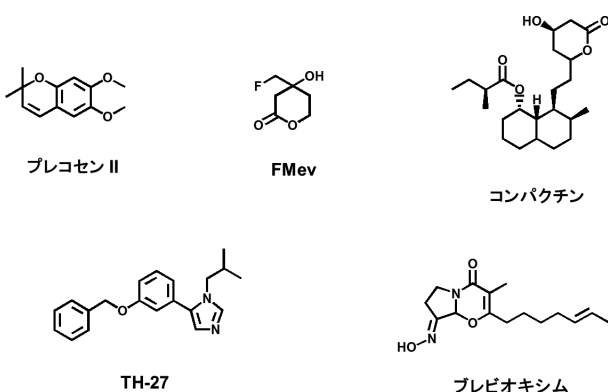


図 4 JH 生合成阻害剤の構造

は JH エポキシダーゼを阻害していると考えられている。また、微生物 (*Penicillium brevicompactum*) から単離されたプレビオキシムは、トノサマバッタ (*Locusta migratoria*) の JH 生合成を阻害し、早熟変態を誘導する¹¹⁾。プレビオキシムを処理したアラタ体にファルネソールやファルネシル酸を加えても JH の生合成が回復しなかったことから、プレビオキシムは最終段階の反応であるエポキシ化もしくはメチル化反応を阻害していると考えられている。

3. JH アンタゴニスト

1) ETB とその誘導体

JH アンタゴニストに関しては報告例が非常に少なく、これまでに ethyl 4-[2-(*tert*-butylcarbonyloxy)butoxy]benzoate (ETB) が唯一、JH アンタゴニスト活性を示すことが報告されている化合物である (図 5)。ETB は、カイコ (*Bombyx mori*) およびタバコスズメガ (*Manduca sexta*) の幼虫に対して、低薬量処理時には、早熟変態誘導活性を示すのに対して、高薬量では逆に JH 活性を示すことから、部分 JH アンタゴニストとして作用すると考えられている¹²⁾。しかし、ETB の生物活性は非常に弱いため、分子レベルでの詳細な作用機構に関してはいまだ明らかになっていない。

そこで、桑野らによって ETB をリード化合物として、より強い生物活性を示す新規化合物の探索が行われた。その結果、カイコ 3 齢幼虫に対して ETB よりも強い早熟変態誘導活性を示す ethyl 4-(2-benzylbutyloxy) benzoate (KF-13) が新たに見いだされた¹³⁾。KF-13 の抗 JH 活性は、JH アゴニストであるメソプレレンによって完全に打ち消されたのに対して、脱皮ホルモンである 20-ヒドロキシエクダイソン (20-E) では打ち消されなかったことから、KF-13 は JH の作用を阻害することで、早熟変態を誘導することが確認された。

その後、著者らを中心としてさまざまな KF-13 誘導体が合成され、構造と活性の関係が検討された結果、1) バラ位のエステル構造が抗 JH 活性に必須であること、2) アルキル側鎖は *n*-ブチル基もしくはイソブチル基が最適であることが明らかになった。さらに、KF-13 の光学活性体の生物活性をそれぞれ調べたところ、*S* 体 (KF-13S) が低薬量処理において *R* 体よりも高い抗 JH 活性を示したことから、*S* 体が活性の本体であることが判明した。しかし、その活性は高薬量処理時では逆に低下し、*R* 体よりも低い活性しか示さなかった。

また、アラタ体を外科的に摘出したカイコ 4 齢幼虫に対する KF-13 の JH 活性も検討された。通常、アラタ体を摘

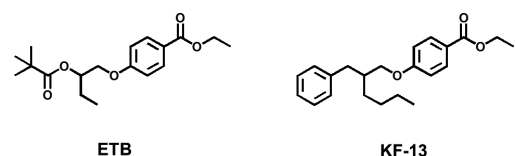


図 5 JH アンタゴニストの構造

出した幼虫では、アラタ体での生合成が行われなくなるために、体内のJHが消失し、5齢幼虫を経ることなく早熟変態が起きる。しかし、このカイコにKF-13Sを1 μ g処理したところ、すべて5齢幼虫へ脱皮した。一方、R体では40 μ g処理しても早熟変態は完全に打ち消されなかった¹⁴⁾。このことから、KF-13Sは抗JH活性とJH活性両方を有しており、高用量で抗JH活性が低下するのは、KF-13S自身のJH活性により抗JH活性が抑制されるためであると考えられる。これらのことから、KF-13SはETBと同様に部分アンタゴニストとして作用していることが示唆された。

さらに、カイコ3齢幼虫にKF-13Sを1 μ g処理した後、経時的に体液を採取し、体液に含まれるJH I濃度を液体クロマトグラフィー/質量分析計(LC-MS)で測定した。その結果、KF-13Sを処理した後24時間以内にカイコの体液中からJH Iが消失し、その後早熟変態が起きるまでJH Iはまったく検出されなかった(論文未発表データ)。金見らは、アラタ体の組織培養系を用いてKF-13Sのアラタ体に対する影響を調べ、KF-13Sがアラタ体におけるJH生合成を阻害していることを報告している¹⁵⁾。また、アラタ体におけるJH生合成酵素の発現量を調べたところ、KF-13S処理を行うことでHMG-CoAシンターゼ、HMG-CoAレダクターゼやJHAMTなどいくつかのJH生合成酵素の発現が抑制されることが明らかになった。

2) クロメン誘導体

以前の研究から、タバコスズメガの黒色突然変異幼虫を用いたJH活性のスクリーニング系において、レチノイン酸アナログが非常に弱いながらも活性を示すことが知られている¹⁶⁾。レチノイン酸は、JHと同じテルペノイドであり、JHとの構造類似性も有していることから、著者はレチノイン酸アナログを基本骨格とした新規抗JH活性物質の探索を行った。JHにおいて生理活性の発現に必要なエポキシ環とエステル構造に着目し、レチノイン酸の六員環部分に対応する1,2,3,4-テトラヒドロ-1,1,4,4-テトラメチルナフタレン環をクロメン環に変換することで酸素原子の導入と環の立体的な大きさの低減を図った。さらに、カルボキシ基をETBと同様にエチルエステルとした(図6)。合成したクロメン誘導体の活性をカイコに対する早熟変態誘導試験を評価したところ、ethyl 4-[(6-methoxy-2,2-dimethyl-2H-chromen-7-yl)methoxy]benzoate (KF-38)において、非常に強い早熟変態誘導活性が認められ、その活性

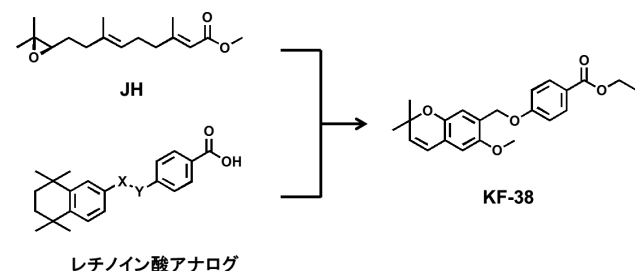


図6 KF-38の分子デザイン

はKF-13Sとは異なり、濃度依存的に上昇した¹⁷⁾。また、アラタ体を摘出した4齢カイコ幼虫に対してKF-38を1 μ g処理したところ、一部が5齢幼虫に脱皮するのみであり、KF-13Sよりも弱いJH活性しか示さなかった。

そこで、KF-38をリード化合物として構造改変を行ったところ、クロメン環の6位に置換基を有していないものや、メトキシ基のアルキル鎖を伸張した誘導体では、抗JH活性は大幅に減少したことから、クロメン環6位のメトキシ基は、抗JH活性の発現に重要な役割を果たしていることが判明した。また、エトキシカルボニル基の位置をパラ位からメタ位に変えたり、カルボキシ基や*n*-プロピルカルボニル基などに変えると活性が大きく減少もしくは消失したことから、KF-13Sと同様にパラ位のエステル構造が活性には必要であった。

KF-38を処理したカイコ体液中のJH IをLC-MSで定量したところ、JH Iの消失が確認された。KF-38は2,2-ジメチルクロメン環を持ち、同じ環構造を有するJH生合成阻害剤であるプレコセンと同様の作用機序を有している可能性が考えられた。そこで、KF-38のクロメン環を構造改変し、生物活性に与える影響を検討した。その結果、2,2-ジメチルクロマン環およびベンゾジオキサン環では、活性の低下が若干みられたものの、抗JH活性が維持されたのに対して、イソクロマンやテトラリン環では活性が大きく低下した。このことから、KF-38の抗JH活性には、プレコセンにおいて活性の発現に必要なクロマン環の二重結合ではなく、酸素原子の位置が重要であることが明らかになり、KF-38はプレコセンとは異なる作用機構を有していることが示唆された。

農業生物資源研究所の粥川と篠田らは、供試化合物の*in vitro*におけるJH活性を測定することができるJH応答配列を用いたレポーター遺伝子アッセイ系を構築している(特許出願2008-12677)。このアッセイ系を用いて、JHアナログであるメソプレンとKF-38を同時に処理したところ、メソプレンによる応答がKF-38により抑制されることが確認された(論文未発表データ)。また、KF-38単独処理では弱いながらJH活性が確認されたことから、KF-38もETBと同様にJH部分アンタゴニストとして作用していると考えられる。

4. おわりに

近年のJHの作用や生合成に関する詳細が次々と明らかになり、さらにこれらの知見を基に優れた抗JH活性物質を開発する技術基盤が整っているのに対して、抗JH活性物質の開発は現状あまり大きく進展していないのが現状である。JH生合成阻害剤に関しては、初期生合成酵素の阻害剤はいくつか知られているが、JH生合成のキー酵素であるJHエポキシダーゼやJHAMTに対する阻害剤は、あまり報告されていない。また、JHアンタゴニストに関してもETBをはじめとして部分アンタゴニストは報告され

ているが、完全アンタゴニスト活性を示す化合物は見つかっていない。今回紹介した化合物は、実用化を目指すにはまだまだ活性が低く、選択性などにも問題を残している。しかし、JH 自体は IGRs のターゲット分子として優れていることは疑う余地がなく、今後これらの化合物をリード化合物として優れた抗 JH 活性物質が開発されることを期待したい。

文 献

- Gilbert, L.I., Granger, N.A., & Roe, R.M. (2000) *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 30, 617–644.
- Staal, G.B. (1975) *Annu. Rev. Entomol.*, 20, 417–460.
- Miura, K., Oda, M., Makita, S., & Chinzei, Y. (2005) *FEBS J.*, 272, 1169–1178.
- Konopova, B. & Jindra, M. (2007) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 104, 10488–10493.
- Minakuchi, C., Namiki, T., & Shinoda, T. (2009) *Dev. Bio.*, 325, 341–350.
- Kayukawa, T., Minakuchi, C., Namiki, T., Togawa, T., Yoshiyama, M., Kamimura, M., Mita, K., Imanishi, S., Kiuchi, M., Ishikawa, Y., & Shinoda, T. (2012) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 109, 11729–11734.
- Daimon, T., Kozaki, T., Niwa, R., Kobayashi, I., Furuta, K., Namiki, T., Uchino, K., Banno, Y., Katsuma, S., Tamura, T., Mita, K., Sezutsu, H., Nakayama, M., Itoyama, K., Shimada, T., & Shinoda, T. (2012) *PLoS Genet.*, 8, e1002486.
- Shinoda, T. & Itoyama, K. (2003) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 100, 11986–11991.
- Quistad, G.B., Cerf, D.C., Schooley, D.A., & Staal, G.B. (1981) *Nature*, 289, 176–177.
- Unnithan, G.C., Andersen, J.F., Hisano, T., Kuwano, E., & Feyereisen, R. (1995) *Pestic. Sci.*, 43, 13–19.
- Moya, P., Castillo, M., Primo-Yúfera, E., Couillaud, F., Martínez-Máñez, R., Garcerá, M.D., Miranda, M.A., Primo, J., & Martínez-Pardo, R. (1997) *J. Org. Chem.*, 62, 8544–8545.
- Riddiford, L.M., Roseland, C.R., Thalberg, S., & Curtis, A.T. (1983) *J. Insect Physiol.*, 29, 281–286.
- Furuta, K., Ashibe, K., Shirahashi, H., Fujita, N., Yamashita, H., Yamada, N., & Kuwano, E. (2007) *J. Pestic. Sci.*, 32, 99–105.
- Fujita, N., Furuta, K., Ashibe, K., Yoshida, S., Yamada, N., Shiotsuki, T., Kiuchi, M., & Kuwano, E. (2008) *J. Pestic. Sci.*, 33, 383–386.
- Kaneko, Y., Furuta, K., Kuwano, E., & Hiruma, K. (2011) *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 41, 788–794.
- Palli, S.R., Riddiford, L.M., & Hiruma, K. (1991) *Insect Biochem.*, 21, 7–15.
- Furuta, K., Fujita, N., Ibushi, T., Shiotsuki, T., Yamada, N., & Kuwano, E. (2010) *J. Pestic. Sci.*, 35, 405–411.

著者寸描

●古田賢次郎 (ふるた けんじろう)

島根大学生物資源科学部生命工学科助教。博士 (農学)。

■略歴 2009年九州大学大学院生物資源科学府博士後期課程修了後、10年より現職。

■研究テーマ 新規幼若ホルモンアンタゴニストの探索とその作用機序の解明。今までにない新しい作用を示す薬剤を見つけることに興味があります。

■趣味 ドライブ、温泉巡り。