

昆虫ホルモン、エクジソンの構造活性相関と無公害殺虫剤の開発研究

Studies on the structure-activity relationship of ecdysteroids for development of non-toxic insecticides

- 代表研究者 金沢大学理学部教授 大滝 哲也
Prof., Dept. of Biology, Faculty of Sci., Kanazawa Univ.
Tetsuya Ohtaki
- 協同研究者 東京工業大学理学部教授 池川 信夫
Prof., Dept. of Chemistry, Faculty of Sci., Tokyo Inst. of Technology
Nobuo Ikekawa
- 富山医科大学医学部助教授 上村 清
Assoc. Prof., School of Med., Toyama Med. & Pharm. Univ.,
Kiyoshi Kamimura
- 金沢大学理学部研究科 石川 雄治
Graduate Student, Faculty of Sci., Kanazawa Univ.
Yuji Ishikawa
- 金沢大学理学部研究科 桜井 一志
Graduate Student, Faculty of Sci., Kanazawa Univ.
Kazushi Sakurai

Insect molting hormone, ecdysteroids, have a potent morphogenetic activities. If these hormones are applied at particular stage of insect development, larvae can not perform normal metamorphosis or ecdysis that finally results in their death. Among ecdysteroids tested, a plant origin ecdysteroid, Ponasterone A, was the most potent and its 50% LC was 0.1 ppm against *Culex* 1st instar larvae.

To study structure-activity relationship we isolated ecdysteroid receptor protein from the imaginal disc of *Bombyx mori*. Molecular weight of the receptor protein purified with an affinity chromatogram and SDS electrophoresis was 27 kD and 60 kD and dissociation constants of these two receptors against Ponasterone A were 4.3 and 4.1 nM, respectively. Active type of ecdysteroid in insect body, 20-hydroxyecdysone, bound to the receptor at higher concentration than that of Ponasterone A. Released hormone from sectory gland, ecdysone, bound weakly to the receptor. We will try to find a promising ecdysteroid for new type of non-toxic insecticide using isolated and purified receptor.

本研究の目的は、エクジソンとその類似体（あわせてエクジステロイドという）(図1)の昆虫体内での変態ホルモン活性を、昆虫自体に投与した場合の形態変化の観察と、エクジソンの受容体を分離し、それに対する結合能を測定して求め、それらの化学構造と活性の間にある相関を調べて、より活性の高い物質を開発する基礎データを提供

することにある。

エクジソン自体は、昆虫が分泌する本来のホルモンであるため、ホルモンの不十分な時期に、かなり大量に投与しないと、異常な形態形成をおこさず、致死効果も期待できない。しかし、植物起源のエクジソン類似体の中には、ハエの囲蛹殻形成や翅原基の蛹分化などの生物検定で、エクジソン

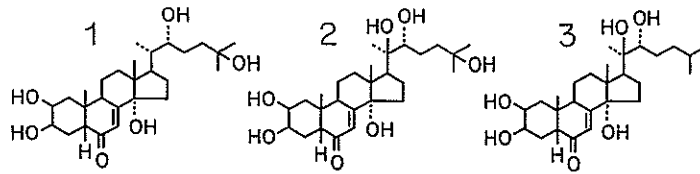


図1. この実験にもちいたエクジステロイド。
1: エクジソン; 2: 20-ヒドロキシエクジソン; 3: ポナステロン A

より活性の高いものが見ついている。そのうち、ポナステロン A は最も活性が高かったので、アカイエカ幼虫の飼育水に入れて脱皮や変態を観察したところ、3~4 令幼虫では何の効果も認められなかったが、1 令幼虫が2 令に脱皮するときは、0.1 ppm の濃度で 50%致死率が得られた。しかし、それ以外のエクジステロイドについては、確定的なデータが得られず、活性-構造相関は求められなかった。しかし、この結果は、もう1桁活性の高いものが発見されれば、十分実用性のあるものが得られるので、たいへん勇気づけられた。

次いで、構造活性相関をより正確に把握するため、エクジソン受容体を分離し、エクジステロイドとの結合能を比較する研究を行なった。

はじめ、エクジソン受容体がどのような材料から、いつごろ抽出したらよいかを検討した。その結果、商業的に安価に、また大量に入手できるカイコを材料に、ほかのタンパクの少ない成虫原基から取ることにした。後に述べるように、タンパク当たりの受容体の量は、終令期間中大きな変化が見られなかったので、原基がとくに大型になる蛹化3日前のものから採取した。本実験で用いた翅原基数は 10,000 を越える。以下に実験の方法を述べる。

1) エクジソン受容体の分離 翅原基をダウンズホモジェナイザーで、TM バッファー中でホモジェナイズし、遠心して核と細胞質分画に分離し、それぞれタンパク量と DNA 量を定量した。一方、蔗糖密度勾配法、アフィニティークロマトグラフィー、SDS 電気泳動などを用いてホモジェネイトからエクジソン受容体の単離、精製を行なった。

表1. エクジソン受容体タンパクの結合能

	細胞質分画	核分画
解離恒数 (nM)	4.08	4.31
結合部位数	49.2	341.5
分布 (%)	12.7	87.3

2) エクジソン受容体の結合活性 結合活性や特異性はラジオリセプターアッセイによった。まず、放射性ポナステロンをサンプルに加えて結合させ、次いで非放射性ポナステロンまたは他のエクジステロイドを加えて、遊離した放射性ポナステロンを除去し、結合状態の放射活性を測ることによって、解離恒数を求めたり、特異性を比較した。また、熱処理や2価金属イオンの影響、阻害剤の効果の検討などをも行なった。

その結果、カイコ翅原基中に存在するエクジソン受容体は、分子量約 27,000 と 60,000 のものの2種類あることがわかった。ポナステロンに対する解離恒数は双方とも 4 nM で、これまで報告されているショウジョウバエのものによく似ている。核分画に 87%、細胞質分画に 13%得られており、細胞当たり合計約 400 分子あると考えられる。これらの結果は表 1 に示した。この結合タンパクは、熱に弱く 85°C10 分の加熱で失活する。SH 基阻害剤でも活性が低下するが、哺乳動物のステロイドホルモン受容体は、アラキドン酸で強く阻害されるのに、エクジソン受容体は全く阻害されない。これは、エクジソンが哺乳動物のステロイドホルモンより極性が高く、極性の低いものとは競合しないためと考えられる。一方この受容体は、エクジステロイドのうち、最も極性の低いポナステロンに対して高い結合を示し、極性の比較的高い 20-ヒドロキシエクジソンが次ぎ、その

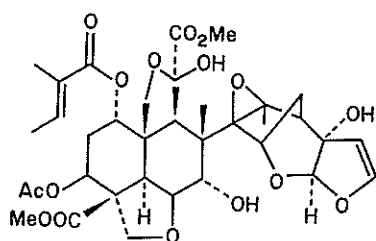


図2. アザディラクチンの化学構造.

中間の極性を持つエクジソンとはあまり結合しないという結果が得られており、単に極性のみではその結合性を比較することはできない。

翅原基中のエクジソン受容体量の成長に伴う変動を調べたところ、むしろ終令幼虫になってからしだいに低下する傾向がみられた。ただ、摂食を止めて繭を紡ぐとき、一時的に増加する。したがって、ホルモンが有効に作用する時期にのみ存在するわけでないことがわかった。

現在、さらに大量に分離し、電気泳動や高速液体クロマトグラフィで精製しており、一定量の精製に成功すれば、アミノ酸配列分析機にかけて、一部のアミノ酸配列を明らかにし、遺伝子解析を行なう計画で、これによって多量のエクジソン受容体タンパクを得て、分子構造とホルモンとの物理化学的關係を明らかにし、もっとも強く受容体と結合する物質を理論的に求めたいと考えている。ポナステロンが天然のホルモンより約10倍結合性が高いだけで、かなりの殺虫効果が見られるので、より結合性の高い物質が発見されれば、十分実用に供することができると考えている。

次に、この研究プロジェクトを実施中、インドセンダンから抽出され、高い殺虫効果を示すアザディラクチンが入手できた。この物質は昆虫の変態を抑制するので、抗エクジソン作用があるといわれ、植物起源の生理活性物質のうち殺虫剤に利用できるものとして注目されている。なお、この研究の第1段階が終了して、その結果を発表した直後に、アメリカの有機化学者によってその化学構造が決定されたが、図2のようにたいへん複雑な化合物で、合成はむずかしく、現在では実用とは直接結びつかないが、この分野の研究者にはた

いへん興味ある物質で世界的に研究されており、この物質をテーマに国際シンポジウムも開かれている。これまでに、我々の行なった実験結果を要約すると、次のようになる。

実験動物は商業品種のカイコで、5令幼虫を用いた。アザディラクチンの摂食忌避効果を調べるために、0日令から6日令まで毎日体重g当たり、1 μ gと2 μ gを与えた。対照には、溶剤のみの10%イソプロパノール10 μ lを注射した。どの個体も1回のみ注射を受けた。1ケース20匹に注射したので、この実験に420匹を用いた。日ごとの体重の変化を記録したところ、2 μ gを与えた方は、忌避作用による食物摂取量の低下から体重の増加がわずかで、しだいに対照との体の大きさに差が見られるようになった。しかし、1 μ gでは、対照と比べて大きな差はなかった。しかし、1 μ g与えた場合でも、正常な蛹化を示すものは1匹もなかった。このことは、アザディラクチンの変態抑制作用が摂食量の低下による栄養不足によるものでないことを示している。そこで、6日令の幼虫を頭胸部結紮と前胸・中胸間結紮し、その後半部にアザディラクチン1 μ gと2 μ gを注射した。その結果、頭胸部結紮では、後半部がいずれの場合も蛹化し、アザディラクチンは、エクジソンの分泌もその作用も阻止するものでないことがわかった。したがって、この物質は脳からの前胸腺刺激ホルモン(PTTH)の分泌を抑制するか、PTTHの前胸腺に対する刺激作用を阻害する可能性が高いことを意味している。次いで、前胸腺をPTTHとアザディラクチンを含んだ培養液で培養し、エクジソンの分泌量を測定した。この実験で、アザディラクチンは前胸腺に対してなんらの影響を与えないことがわかった。

結論として、この植物起源の化合物は、これまで報告されているようなエクジソン結合体に関係する物質ではなく、むしろ昆虫の中樞神経に作用して、PTTHの分泌を抑制するものと考えられる。前にも述べたように、構造が複雑で合成がむずかしい。化学構造と作用がもっと明らかにされて、もっと容易に合成できる、殺虫剤として実用性のある化合物が開発できることを期待したい。