

特集：ゲノム創農薬

ゲノム創農薬のターゲットとしての 昆虫ホルモン受容体

日本化薬株式会社精密化学品開発研究所 **ます** **い** **あき** **お**
榎 **井** **昭** **夫**

はじめに

農作物に被害を与える害虫は、農業始まって以来の課題であり、世界共通の課題である。今日でも、農作物の減収の最大要因であり、特に熱帯、亜熱帯、温帯南部地域では害虫による被害は顕著である。1980年代に入ってIPM（総合的有害生物管理）が世界的に採用されているが、IPMにおいて化学合成殺虫剤は必須であり、重要なツールである。

今日まで、多くの農薬研究者の努力により多種多様な殺虫剤が開発されてきた。新しい化学構造や作用機作をもつ殺虫剤が開発されてきたにもかかわらず、常に、さらに新しい化学構造や作用機作の殺虫剤が求められ、開発を続けていく必要がある。より高い安全が求められるからであり、その背景には科学の進歩により、殺虫剤などの化学物質に関する新しい情報が提供されると、しばしばそれは化学物質にとって負の要因となり、その結果、その殺虫剤は使用制限を受けたり、時に禁止となり、新しい代替剤へと移行していく。その移行は、ヒト、環境、非標的生物などにより優しい方向であり、より高活性であり、より低薬量での使用を可能にする方向である。殺虫剤については、害虫の抵抗性もまた、新しい殺虫剤に移行する要因である。こうして、常に、新しい作用機作をもつ新しい化学構造の殺虫剤が求められている。

農薬の探索から開発、上市、販売に至るまでには、最初に基本となるリード化合物を発見する必要がある。リード化合物を基に、多くの化合物を合成、評価し最適化合物、つまり開発化合物を決定する。新規殺虫剤開発で最も不確かな要因はリード化合物の発見であり、この発見には極めて幸運であれば1年、実際には10年、時には20年を要してきている。化合物のランダム合成とランダム評価という探索の方法であり、いつ発見できるか

誰も予測が不可能であり、セレンディピティをひたすら信じて農薬研究者は取り組んできた。結果的には、化合物を20万点合成して1点を上市できるといわれている。

今日、農薬企業がおかれている厳しい経営環境の中で、こうした従来型の農薬の探索研究を継続していくことは難しくなり、一方で新規のリード化合物が枯渇してきている状況である。探索研究にも新しい方法を作り出していく必要性に迫られている。昆虫ゲノムの利用は、殺虫剤の探索研究の新しい方法といえる。ここでは、筆者らが取り組んできた昆虫ゲノムの利用による殺虫剤の探索、特に昆虫の脱皮・変態に関与する昆虫ホルモン受容体を殺虫剤探索のターゲットとする事例やゲノム創農薬について解説していく。

I クロマフェノジドの作用機作解明の 取り組み

クロマフェノジドは、ベンゾイルヒドラジン系の化合物であり、日本化薬(株)と三共(株)との共同研究から生まれ、1998年に農薬登録を得て、上市されている。昆虫に対して脱皮ホルモン様の活性をもち、鱗翅目害虫に特異的に殺虫作用をもつ。ヒト、環境、非標的生物に対しての安全性が高く、低薬量であり、IPMに適合した新規の殺虫剤である。

研究開発の中で課題となったのは、害虫が死亡に至る作用機作の解明である。欧米では、殺虫剤に限らず農薬の新規登録に当たってはその作用機作の説明が必須である。

クロマフェノジドの場合、殺虫試験の観察からは明らかに昆虫の脱皮を誘導し、その前兆である頭蓋剝離が見られる。しかしながら、こうした観察データだけでは、本殺虫剤の作用機作を納得できる説明に至らない。昆虫生理学的な解明が必要であった。

昆虫の脱皮・変態、特に脱皮は、脳のアラタ体から放出される幼若ホルモンと前胸線から放出される脱皮ホルモン、つまりエクダイソンの2種のホルモンバランスによって引き起こされる。昆虫の幼虫が脱皮した直後、エクダイソンは急速に代謝され減少するが、次の脱皮の前には再び分泌される。こうしてエクダイソンが増加すれば、幼虫は脱皮の準備を始め、その最初の前兆として頭

Insect Hormone Receptor as a Target Molecule for Development of Insecticides Based on Genome Information. By Akio MASUI

(キーワード：ゲノム創農薬、クロマフェノジド、エクダイソン受容体、HR 3、レポーター遺伝子アッセイ)

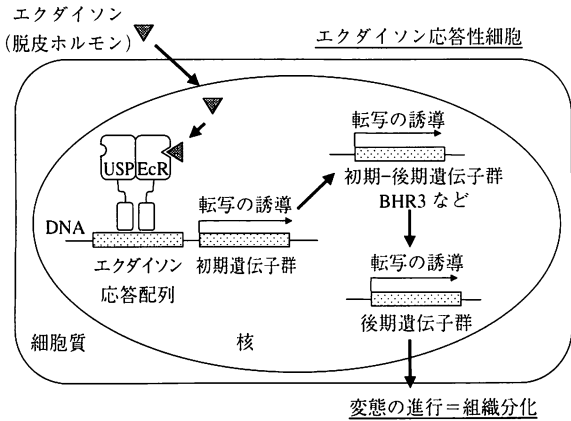


図-1 脱皮・変態に関わる遺伝子群

蓋剝離の現象が観察される。

この現象を分子レベルで見ると、脱皮・変態時に放出されたエクダイソンが細胞の中に取り込まれ、核内のエクダイソン受容体 (EcR)-Ultraspiracle タンパク (USP) 複合体と結合し、DNA 上にあるエクダイソン応答配列部と結合して、その下流にある脱皮・変態に関与する遺伝子群の転写を、次々に誘導し、最終的には幼虫の脱皮・変態を誘導する (図-1)。

II 核内エクダイソン受容体を用いた実験系

この実験系は、すでに Sf9 などの昆虫細胞を用いて完成されている。エクダイソン応答配列の下流にルシフェラーゼ遺伝子を組み込んだレポータープラスミドを核内に導入した Sf9 細胞を用いた場合、エクダイソンが核内に入り、EcR-USP 複合体と結合し、エクダイソン応答配列 (3 xEcRE) 遺伝子と結合すると、下流のルシフェラーゼ遺伝子 (*luc*⁺) の転写が誘導される。*luc*⁺ の転写が起こると最終的にルシフェラーゼが合成され細胞内に蓄積される。このルシフェラーゼにルシフェリンを反応させると発光現象が起こり、この発光の強さを測定することにより、エクダイソンと EcR の親和性、および応答配列 (3 xEcRE) との結合を測定することができる。いわゆるレポータージーンアッセイと呼ばれる実験系である (図-2)。

具体的な実験の手順は、あらかじめ培養しておいた Sf9 (ヨトウムシの一種である *Spodoptera flugiperda*) 細胞を 96 穴のプレートの穴 (ウェル) 中に分注し、24 時間培養した後、別に合成しておいたレポータープラスミドをウェルに分注し、さらに 24 時間培養を続け核内にプラスミドを導入させる。導入の方法はいくつか開発されているが、ここではリポフェクション法でよく、

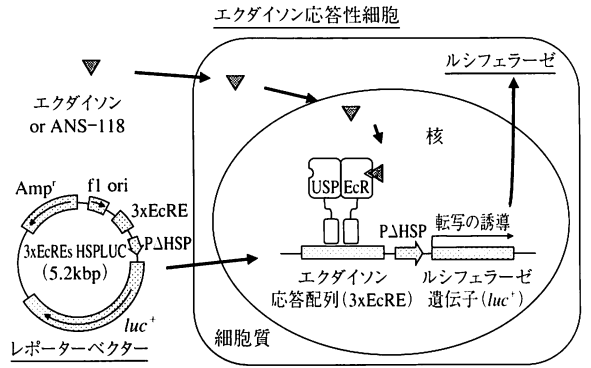


図-2 エクダイソン受容体を用いたレポータージーンアッセイ

核内への導入後に所定濃度のエクダイソン、例えばポナステロン A を加え、さらに培養を継続する。培養 24 時間後にウェル中の細胞を破壊し、合成されているルシフェラーゼをウェル中に分散させ、基質であるルシフェリンを加え、発光の強弱を測定する。ポナステロン A に換えて、合成化合物を用いれば、エクダイソンアゴニストとしての活性を評価することができる。

前出のエクダイソン様活性を示す化合物であるクロマフェノジドの実験結果 (図-3) ではポナステロン A、クロマフェノジドの両化合物ともに 10 nM 濃度以上に有意にルシフェラーゼ活性が上がり、かつ濃度依存反応が見られている。

現在までに、いくつかの昆虫種のエクダイソン受容体 (EcR) がクローニングされている。鱗翅目昆虫ではカイコに加え、タバコスズメガ (*Manduca sexta*)、ハマキガ (*Choristoneura fumiferana*)、オオタバコガ (*Heliothis virescens*) など、双翅目昆虫では、ショウジョウバエ (*Drosophila melanogaster*)、キンバエ (*Lucilia cuprina*)、ユスリカの一種 *Chironomus tentans*、ネッタシマカ (*Aedes aegypti*) など、甲虫目では、ワタミゾウムシ (*Antonomus grandis*)、コメノゴミムシ (*Tenebrio molitor*)、ダニ目のマダニ (*Amblyoma Americana*) である。いまだクローニングされていない半翅目昆虫の EcR が見つければ、害虫と称されるほぼすべての昆虫目の EcR が揃うことになり、エクダイソンアゴニスト活性に関する *in vitro* アッセイ系ができ上がり、合成化合物の評価を実施し、広いスペクトルを有する新規のリード化合物の発見に寄与できる。

III 初期-後期遺伝子 HR3 を用いた実験系

前述のように、エクダイソンは EcR-USP 複合体と

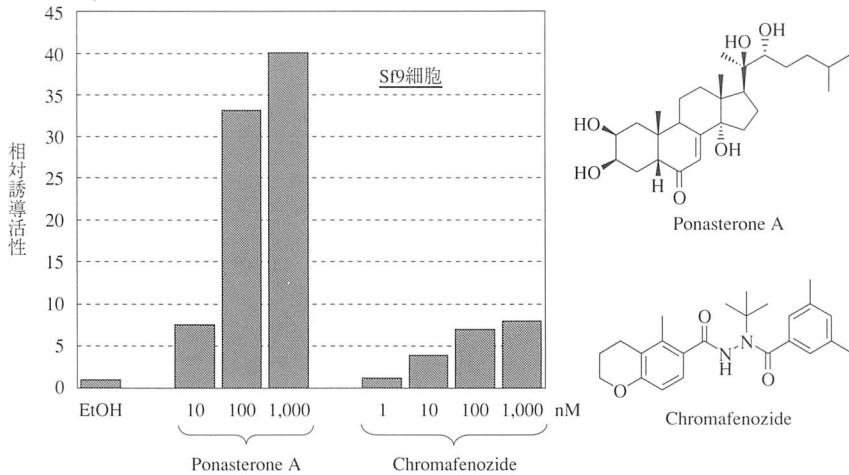


図-3 ルシフェラーゼの誘導活性

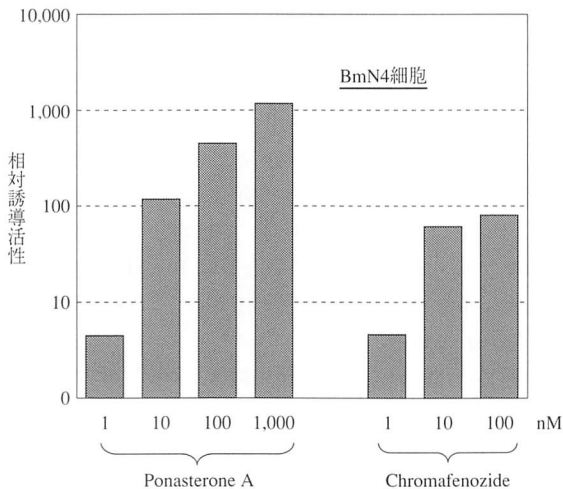


図-4 BHR 3 の誘導活性

結合し、応答配列の下流の遺伝子群の発現を誘導していく。こうして脱皮・変態に関連する遺伝子群がカスケード的に誘導され、最終的に幼虫は脱皮・変態に至る。こうした遺伝子群の中で、カスケードの中間で誘導される遺伝子として、初期-後期遺伝子の一つでありエクダイソンとの応答がよいHR3という遺伝子が知られている。カイコのHR3遺伝子(BHR3)はすでにクローニングされているので、この遺伝子を用いるエクダイソンアゴニストの評価系を簡単に紹介したい。

大筋の実験系は、前述のレポーター遺伝子アッセイと同様であるが、標的遺伝子であるBHR3より転写されるmRNA量を測定する点異なる。このmRNA発現量はエクダイソン分泌量とよい相関を示し、その発現量を測定することでエクダイソン量を、そして化合物なら

ばエクダイソンアゴニストとしての活性の程度を測定できる。mRNA発現量は定量PCRにより測定できる。すなわち、RNAを抽出して、逆転写反応でcDNAを合成し、このcDNAを鋳型としてPCRにて増幅する際に、SYBR Greenなどの蛍光色素を用いれば、蛍光の強弱をPCRのサイクルごとに測定することができる。

こうして得られたポナステロンAとクロマフェノジドの事例(図-4)では、両化合物とも10 nMにて有意にBHR3の誘導活性が高まり、濃度依存的に増加していることから、両化合物は脱皮・変態に関与する初期-後期遺伝子であるHR3遺伝子を誘導したと考えられる。

IV 昆虫ゲノムを用いる殺虫活性評価の可能性

昆虫のゲノム情報を用いる、いわゆる『ゲノム創農薬』とは、カイコなど昆虫のゲノム解析から得られるゲノム配列、ESTライブラリー、完全長cDNAライブラリーなどのゲノム情報を利用して、遺伝子発現解析や*in silico*解析を行い、農薬のターゲットとなる候補遺伝子を探し出す。これらの遺伝子を用いてスクリーニング法を構築し、合成化合物、時に微生物代謝産物、植物抽出物などのスクリーニングを行い、特定の作用機作をもつリード化合物を発見する方法である(図-5, 6)。リード化合物発見後、さらに化学構造の改変を行い環境での安定性、安全性など、実用場面で満足を得られる化学構造に変換して開発候補化合物となる。

遺伝子発現解析には、現在、すでにゲノム解析が進んでいるカイコのゲノム情報から約6,000個のESTをチップ上にのせたマイクロアレイを用いる方法がある。それぞれ作用機作の判明している殺虫剤、例えば神経伝達

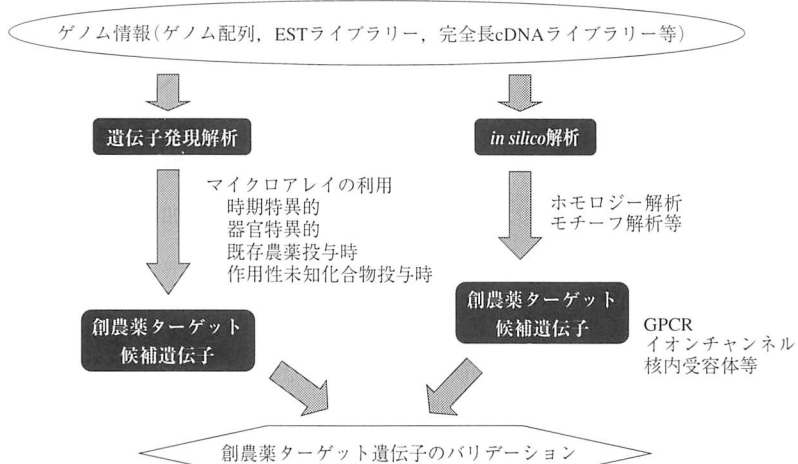


図-5 ゲノム創農薬の考え方-1

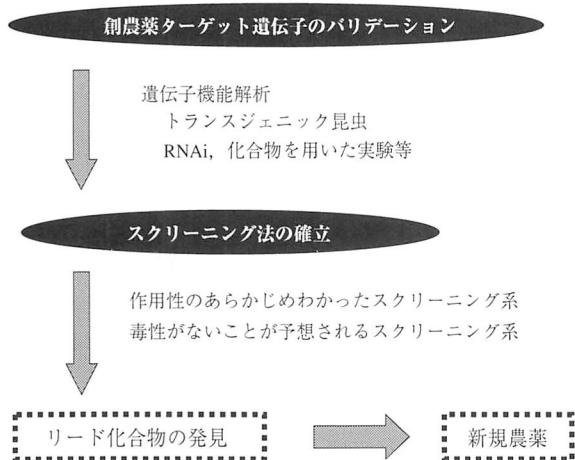


図-6 ゲノム創農薬の考え方-2

系の阻害作用である有機リン系、カーバメート系、ピレスロイド系、ネライストキシン系、ニトロメチレン系など、昆虫成育阻害作用であるベンゾイルウレア系、フェニルヒドラジン系など、さらに殺虫剤としては未利用ではあるが作用機作の判明しているキスカル酸やイボテン酸などを投与したとき、無投与の場合と比較して約6,000種の遺伝子の発現の変化をていねいに解析すれば、新たな未利用である創農薬ターゲット遺伝子が見つ

かる可能性が高い。

In silico 解析とは、ゲノム情報をコンピューターで解析、例えばホモロジー解析やモチーフ解析などを行って創農薬のターゲット候補遺伝子を見つけ出す方法である。

得られた創農薬ターゲット候補遺伝子はバリデーションを経て、化合物のスクリーニング系として用いることができる。この系は、すでに作用機作の判明しているスクリーニング系であり、昆虫に特異的な作用機作を選択すれば、ヒトをはじめ動物や植物などに毒性がないか、あるいは極めて低いと予想されるスクリーニング系である。このようなスクリーニング系を用いることにより、これまでのセレンディピティに賭けていたスクリーニング法に比べリード化合物の発見を容易に合目的にでき、新規農薬の開発につながっていくと期待大である。

参 考 文 献

- 1) TANAKA, K. et al. (2001) : Chromafenozide : A Novel Lepidopteran Insect Control Agent. Annu. Rep. Sankyo Res Labs. 52: 1~49.
- 2) 榎井昭夫ら (2001) : エクジステロイド活性物質に応答する *In vitro* 系の開発とクロマフェノジドの評価, 第6回農林害虫防除研究会大会講演要旨, p. 51~52.
- 3) TOYA, T. et al. (2000) : Development of reporter gene assay for molting hormone activities and evaluation of a novel insect control agent chromafenozide. Japan Pesticide Science Society 25th Annual Meeting Abstract, p. 60.