

山梨県若手研究者奨励事業 研究成果報告書

所属機関 名古屋大学大学院 理学研究科
職名・氏名 研究員・山田 早人

1 研究テーマ

カイコ休眠操作分子の創製と応用

2 研究の目的

世界の食糧問題は人類の未来を左右する重要課題であり、課題解決のためには農作物の増産に加えて害虫防除による農作物の損失低減が必要不可欠となる。しかし、殺虫活性化合物を有効成分とする従来の農薬では農薬抵抗性害虫の出現とのいたちごっこが続いており、殺虫活性化合物に依存しない新規農薬の開発が望まれている。

作物害虫をはじめとする多くの昆虫は、酷暑や厳寒などの不良環境を乗り越える生存戦略として“休眠”と呼ばれる発育停止現象を誘導する。そこで、昆虫の休眠を操作できる分子を創製すれば、休眠を阻害して不良環境へ暴露させたり、活動期の昆虫を強制的に休眠させたりする新規農薬の開発につながると考えられた。また、昆虫本来の生命現象である休眠を操作する農薬ならば農薬抵抗性害虫が出現しないため、持続可能な害虫防除が可能となる。以上のことから、本研究では昆虫の休眠操作分子を創製し、それを新規農薬開発へと応用展開することを目的とした。

3 研究の方法

本研究ではカイコを研究材料に用いた。カイコは休眠研究が最も進んでおり、作物害虫の多くを占めるチョウ目昆虫のモデル生物であるため理想的な研究材料といえる。カイコは胚発生初期に細胞分裂を停止して休眠する。カイコの胚休眠では、母蛾（親世代）の胚期の温度条件により次世代卵の休眠性が決定される(図 1)。これまでに、母蛹の発育卵巢への休眠ホルモン作用が休眠誘導の基点となること、休眠ホルモンシグナル下流で PND および PND-2 が休眠誘導に機能すること、PND は休眠ホルモン作用時にのみ発現量が増加することが明らかになっていた^[1,2,3](図 2)。近年、申請者は PND と PND-2 が独立に働くのではなく、リガンド-受容体ペアとして休眠誘導シグナルの発動に機

能することを明らかにした(図3)。そこで、本研究では PND と PND-2 のリガンド-受容体相互作用を標的として機能する化合物 (カイコ休眠操作分子) を探索し、その詳細な機能解析を進めた。

- [1] Yamashita *et al.* (1996) *J. Insect Physiol.* 42:669–679. [2] Shiomi *et al.* (2015) *Sci. Rep.* 5:15566.
 [3] 城所ら, (2010) 日本蚕糸学会第 80 回大会

Based on Sato *et al.* *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2014, 111, E1249–55.

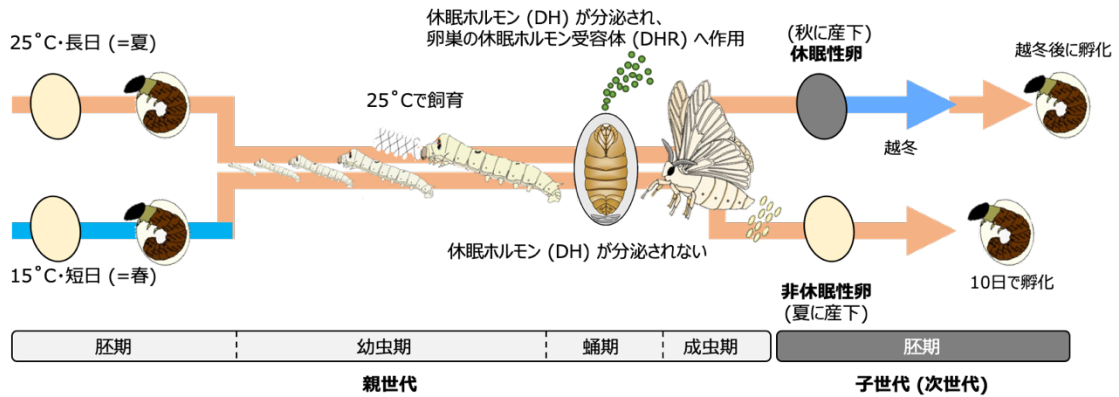


図1. カイコのライフサイクルと胚休眠の誘導

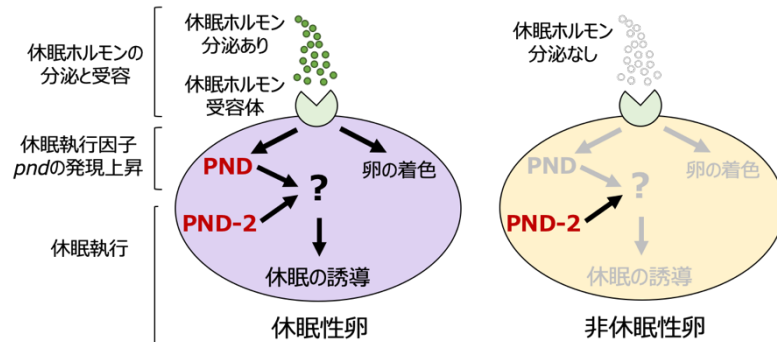


図2. カイコ休眠執行因子 *pnd* と *pnd-2* による休眠誘導

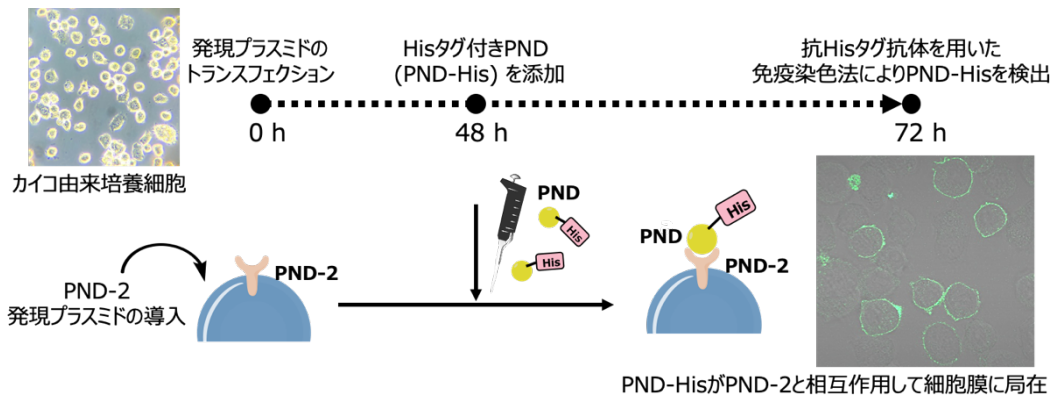


図3. PNDとPND-2はリガンド-受容体ペアとして相互作用する

4 研究の成果

(1) カイコ休眠操作分子候補シアニジンの発見

当初の計画では、免疫染色解析と化合物ライブラリーを用いたカイコ由来培養細胞における *in vitro* スクリーニングを実施し、カイコ休眠操作分子を探索する予定であった。しかし、PND と PND-2 がそれぞれ哺乳類の IL-17 とその受容体 IL-17R の構造相同体であること、フラボノイドの 1 種であるシアニジンが IL-17/IL-17R シグナル拮抗剤として機能することから^[4]、シアニジンがカイコ休眠操作分子候補であるという仮説を立てた。

そこで、PND-2 を過剰発現させたカイコ由来培養細胞へ His タグ付き PND タンパク質 (His-PND) をシアニジンと共に添加し、His タグ抗体を用いた免疫染色解析を行った (図 4)。その結果、対照区である DMSO 添加では His-PND は細胞膜上に局在したが、シアニジン添加では His-PND の細胞膜上での局在が消失した。このことは、シアニジンが PND/PND-2 相互作用を阻害することを示唆しており、シアニジンがカイコ休眠操作分子候補であるという仮説が実証された。

[4] Liu *et al.*, (2016) *Sci. Rep.* 6:30859.

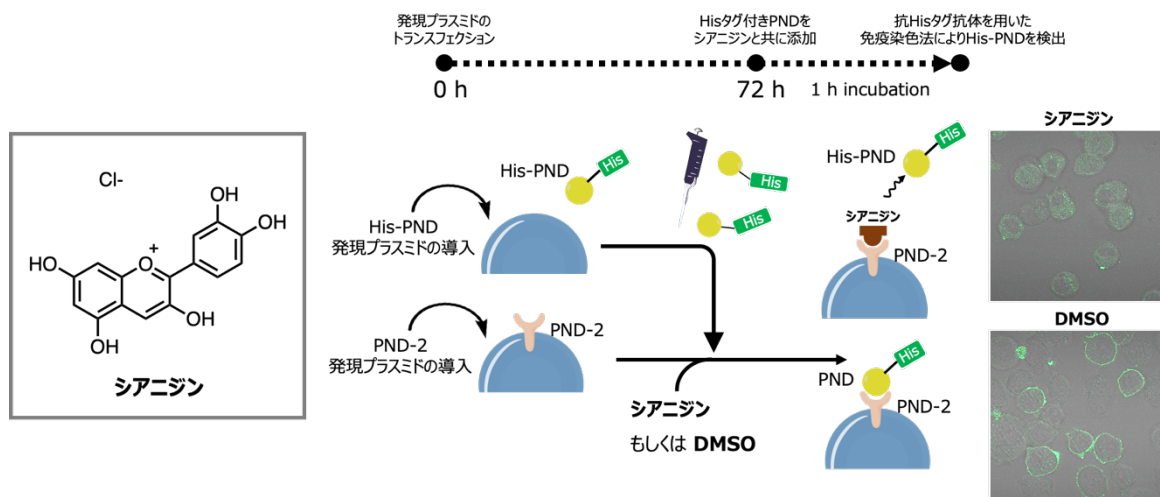


図4. シアニジンはPND/PND-2相互作用を阻害する

(2) シアニジンの構造活性相関 (Structure-activity relationships; SAR)

シアニジンの構造活性相関を明らかにするため、3 種のシアニジン誘導体 (ペオニジン、ルテオリニジン、デルフィニジン) を用いて PND/PND-2 相互作用に対する阻害活性を (1)と同様の方法で調べた。その結果、ペオニジンは阻害活性が消失し、ルテオリニジンは阻害活性が維持され、デルフィニジンは阻害活性が増強された (図 5)。このことは、シアニジンの 3'位のヒドロキシ基が阻害活性に必須であること、3 位のヒドロキシ基は阻害活性に不要であること、5'位へのヒドロキシ基の付加が阻害活性の増強に関わることを示唆しており、デルフィニジンがシアニジンよりも活性の高いカイコ休眠操作分子として機能すると考えられた。

