

トレハラーゼ阻害剤の害虫制御への利用

国立予防衛生研究所昆虫医科学部 こうのよしあき
河野 義明

はじめに

筆者らは、特異的で高活性のトレハラーゼ阻害剤であるバリドキシルアミン A (VAA, 2) を昆虫に処理してトレハロース (1) の利用を妨げたときに起きる異常について研究している。そしてこれまでいくつかの致命的影響が昆虫に出ることを明らかにしてきた。VAA のグルコシドであるバリダマイシン A (3) はイネ紋枯病の防

除剤として長年使われ、その安全性のデータも多い。トレハロースは人間を含む哺乳動物には存在せず、これらに対するトレハラーゼ阻害剤の影響は小さいと考えられる。これらのことから、トレハラーゼ阻害化合物を昆虫に特異的に作用する害虫制御剤として利用できるのではないかと考えている。

ここでは、トレハロース、トレハラーゼについて言及しつつ、トレハラーゼ阻害剤の実際の作用とその利用に

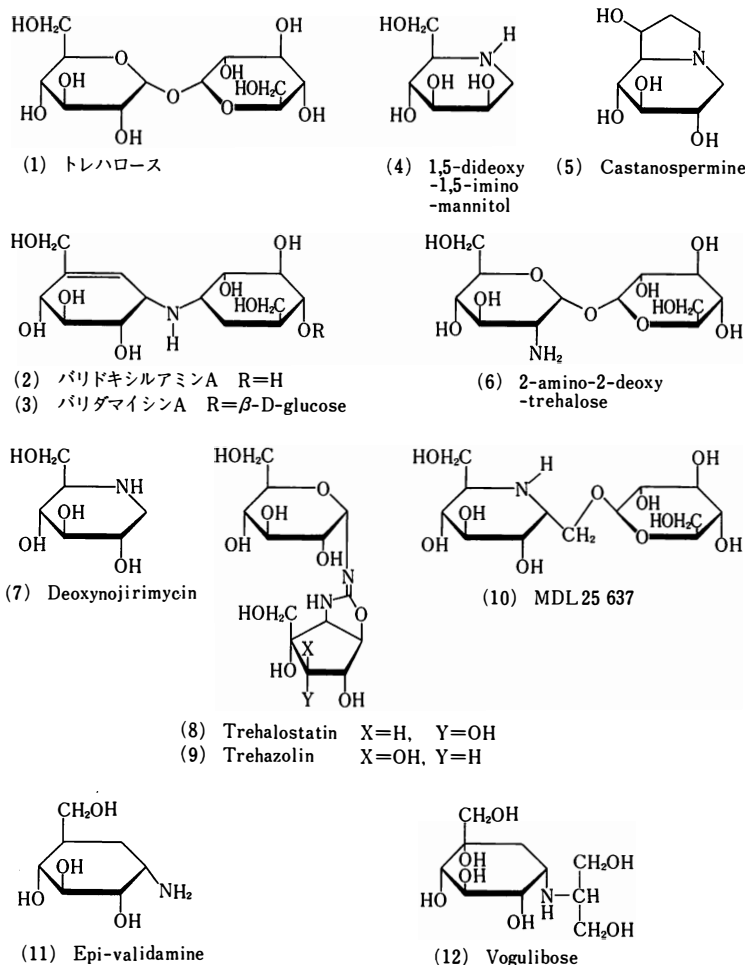


図-1 主な化合物の化学構造

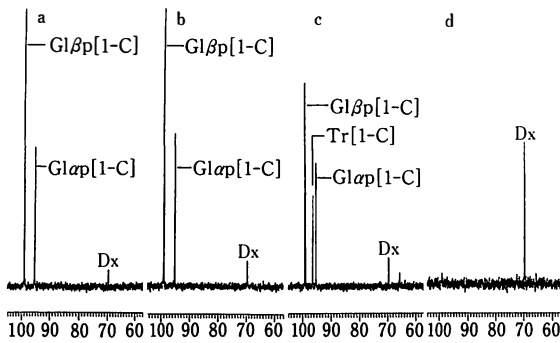


図-2 ワモンゴキブリ脂肪体によるトレハロースの合成
14 mM の $[1-^{13}\text{C}]$ -グルコースを含む Locke 液 (a) 1 ml に雌成虫 1 頭分の脂肪体 (c), 中腸 (b) を入れ、 25°C で 3 時間培養した後、培養液を ^{13}C -NMR で分析した。d は培養後の脂肪体のホモジェネート (1 頭分/1 ml) の上清、DXN は 10 mM ジオキサン (標準物質)。

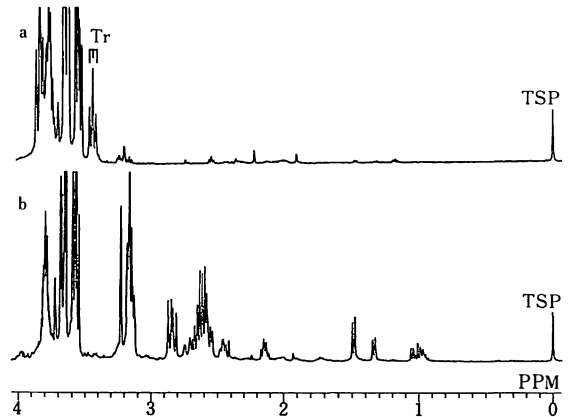


図-3 センチニクバエ幼虫 (b) と成虫 (a) の体液の ^1H -NMR スペクトル

a には 3.45 ppm にトレハロースの $[6-^{13}\text{C}]$ プロトンのトリプレットシグナル (Tr) が検出されるが、b には検出されない。

際しての問題点について述べる。

I トレハロース

トレハロース (D-glucosyl D-glucoside) はショ糖の 5~6 割の甘味を有する二糖類である。トレハロースの glucosyl 基はピラノース型のみで、化学合成によれば α , α 体, α , β 体, β , β 体を作れるが、自然界では α , α 体 (α -D-glucopyranosyl α -D-glucopyranoside) のみが広く存在する。トレハロースは藻類、細菌、真菌 (マッシュルウム、シイタケなどキノコに多く含まれる)、線虫や昆虫を含む無脊椎動物、シダ類および一部の高等植物から分離されている (ELBEIN, 1974)。哺乳動物にはトレハロースの合成、分解に関与する酵素は存在するが、この糖そのものの存在は確認されていない。微生物ではトレハロースは貯蔵エネルギー源としての役割をもつが、昆虫の体液中に高濃度に存在するものも同様な役割を果たしている。ポプラハバチの越冬蛹はその 5~7% に当たる重量のトレハロースを含有し、 -40°C の冷凍にも耐える (ASAHINA and TANNO, 1964)。ワラジムシでは越冬期にトレハロースの含量が高まる (TANAKA and UDAGAWA, 1993)。一方、酵母のトレハロース含量の高い株はストレス耐性を有する (特許, 引用文献 26)。このように、トレハロースの存在は不適環境下での生物の生存にも寄与していると考えられる。実際、トレハロースはタンパク、核酸などの生体高分子の安定性を乾燥下でも保つ働きがあり、この場合、トレハロースは水と入れ替わって、水的作用を代替すると考えられている。食物中の炭水化物が消化されてできる単糖類の主成分

であるグルコースは、昆虫体内に吸収されると、直ちに脂肪体でトレハロースに合成され体液中に放出される。図-2 はワモンゴキブリ脂肪体のトレハロース合成能を *in vitro* で見たものである。天然には ^{12}C の百分の一程度しか存在しない ^{13}C でラベルした $[1-^{13}\text{C}]$ グルコースを培養液に加え、脂肪体を入れて 3 時間後に培養液を ^{13}C -NMR で分析すると、 $[1,1-^{13}\text{C}]$ トレハロースが検出され、この組織でトレハロースが合成されることがわかる。中腸組織にはこの働きはない。また、組織ホモジェネート中にラベルされた糖が検出されないことから、どの組織にもトレハロース、グルコースは蓄積されないことも知られる。

筆者らは昆虫を含む節足動物の体液成分を NMR で分析しているが、WYATT (1967) および ELBEIN (1974) がおのおの 30 余种昆虫におけるトレハロースの存在を挙げている以外に、分析した 30 余种の昆虫すべての体液中にこの糖を認めた。ただ、ハエの幼虫 (センチニクバエ, イエバエ, オオクロバエ) にはトレハロースが検出されない (図-3)。昆虫以外では、ダニ (コナダニ, カズキダニ, *Amblyomma*), クモ (ジョロウグモ, ハエトリグモ), エビ (アメリカザリガニ, クルマエビ) およびダンゴムシの体液からはトレハロースは検出されず、ブタカイチュウからは高濃度検出された。このように、昆虫が節足動物の中でも特にトレハロースと密接に関係があり、エネルギーを使ってまで、グルコースをトレハロースに変えて蓄え、利用に当たっては、再びグルコースに戻すような系を維持していることは非常に興味深い。

II トレハラーゼ

トレハラーゼは、トレハロースを2分子のグルコースに加水分解する酵素である。この酵素は哺乳動物の小腸や腎臓などにも存在し、小腸上皮細胞刷子縁膜に存在するものは食物中のトレハロースの分解に働いているが、他の器官に存在するものの機能は明らかではない。体液中のトレハロースを利用する昆虫では、ほとんどの組織にトレハラーゼが存在する (WYATT, 1967)。昆虫の消化管からは可溶型のトレハラーゼが得られるが、飛翔筋からはミトコンドリアやマイクロソームの膜に結合したトレハラーゼが得られる。唾腺や生殖付属腺には多量の可溶型トレハラーゼが存在する例が多く、卵巣やマルピギー管では膜結合型が存在する。このように昆虫には2種類のトレハラーゼが存在し、種によっては酵素学的性質にも違いが見られる場合もある。しかし、キイロショウジョウバエの遺伝学的解析によると、両トレハラーゼは同一遺伝子によって支配されることが示されている (OLIVER et al., 1978)。最近、カイコの中腸の可溶型トレハラーゼ、および卵巣の膜結合型トレハラーゼの遺伝子配列が明らかになり (Su et al., 1993, 1994)、同一性および、1個体1遺伝子座が確認された。昆虫トレハラーゼのアミノ酸配列は大腸菌、酵母やネズミのものとかかなりの相同性を保っている (Su et al., 1993; TAKIGUCHI et al., 1992)。

III トレハラーゼ阻害剤

家畜が特別な野草を食べて異常を起こす原因が糖分解酵素阻害化合物である例が多く知られている。そのようなマメ科植物から分離された化合物である1,5-dideoxy-1, 5-imino-D-mannitol(4), castanospermine(5)や2-amino-2-deoxy-trehalose(6)は、トレハラーゼを含む糖分解酵素を阻害する作用を持ち、高濃度で昆虫に致死作用を示す。また、*Streptomyces*, *Bacillus*などの生産物である, nojirimycin, deoxynojirimycin(7)もトレハラーゼ阻害活性をもつ (FELLOWS, 1986)。しかし、これらの化合物はトレハラーゼに対する特異性は低く、他の糖分解酵素をも強く阻害する。

Streptomyces の1種から分離されたバリダマイシンAは1970年からイネ紋枯病の防除剤として使用されてきたが、1987年にその作用機作がそのもののアグリコンであるVAAのトレハラーゼ阻害作用に基づくものであることが示された (ASANO et al., 1987)。VAAは構造がトレハロースとよく似ており、強力で特異性の高い阻害剤である。昆虫、酵母、哺乳動物のトレハラーゼに対す

表-1 VAAの注射による昆虫組織トレハラーゼの阻害

昆虫種	发育段階	組織	薬量 μg/虫	測定時 注射後	阻害%
ワモンゴキブリ	雄成虫	飛翔筋	5	1日	70.7
			5	7日	77.4
			5	14日	48.9
			50	14日	93.1
			50	14日	93.1
	雌成虫	卵巣	5	1日	97.4
			5	7日	95.3
			5	14日	68.5
			50	14日	93.1
			50	14日	93.1
トノサマバツタ	雄成虫	飛翔筋	50	7日	86.4
ヨトウガ	6齢幼虫	中腸	10	1日	90.0
カイコ	蛹	卵巣	10	3時間	100.0

るVAAの I_{50} 値は 10^{-8} - 10^{-9} Mのレベルであるが、他の糖分解酵素である、 α -および β -グルコシダーゼ、セルラーゼ、ペクチナーゼ、キチナーゼ、 α -アミラーゼにはほとんど阻害活性を示さない (ASANO et al., 1987)。最近、特異性、阻害活性ともにVAAに匹敵する化合物、trehalostatin (8, NAKAYAMA et al., 1991)とtrehalozin (9, ANDO et al., 1991)がそれぞれ*Amycolatopsis*と*Micromonospora*の培養液から分離され、両者が異性体の関係にあることが判明した (OGAWA et al., 1992)。

合成化合物としては、MDL-25637(10)が知られている (SALLEH and HONEK, 1990)。この化合物やVAAのようなトレハロースと構造が類似した含窒素疑似糖は、一般的には酵素に対して拮抗的阻害を示すが、酵素と阻害剤の共存する時間の経過に伴って'slow binding inhibition'と呼ぶ、不可逆的結合が進行することも指摘されている (SALLEH and HONEK, 1990)。

IV VAAの昆虫に及ぼす影響

1 飛翔に及ぼす影響

ゴキブリやクロキンバエの飛翔にはトレハロースがエネルギー源となるが、長距離飛翔するバツタや鱗翅目成虫では、飛び初めのみトレハロースが使われ、その後脂肪がエネルギー源となる。どちらのタイプの昆虫においても、VAAの注射により各組織のトレハラーゼが阻害され (表-1)、体液中のトレハロース濃度が極端に高まる (表-2)。ワモンゴキブリ雄成虫から選り出したよく飛ぶ個体は、胸背板を固定し前方から風を当てると約15分連続飛翔する。この間に体液トレハロースは飛翔のために消費され濃度は平常値の1/3に低下する (表-3)。このようなよく飛ぶ個体でもVAA (50 μg/虫) を

表-2 VAA 注射による体液トレハロース濃度の上昇

昆虫種	発育段階	薬量 $\mu\text{g}/\text{虫}$	トレハロース濃度	
			平常値	注射1日後
ワモンゴキブリ	雄成虫	5	37.5	84.7
	雌成虫	5	21.2	49.8
トノサマバッタ	雄成虫	50	83.9	202.3
ヨトウガ	6 齢 2 日幼虫	10	21.6	35.8
カイコ	5 齢 2 日幼虫	5	10.5	21.7
イエバエ	雄成虫	2.5	52.1	136.0
オオクロバエ	雄成虫	5	64.5	237.2
センチニクバエ	雄成虫	2	18.1	59.9
ミツバチ	働き蜂	5	60.4	182.2

表-3 よく飛ぶワモンゴキブリ雄成虫の飛翔と体液トレハロース濃度に及ぼす VAA の影響

処 理	体液トレハロース濃度 (mM)	飛翔時間 (分)
無処理	未飛翔	—
	飛翔直後	15.3
VAA 注射1日後	未飛翔	—
	飛翔直後	1.5
各処理 3 頭の平均値		

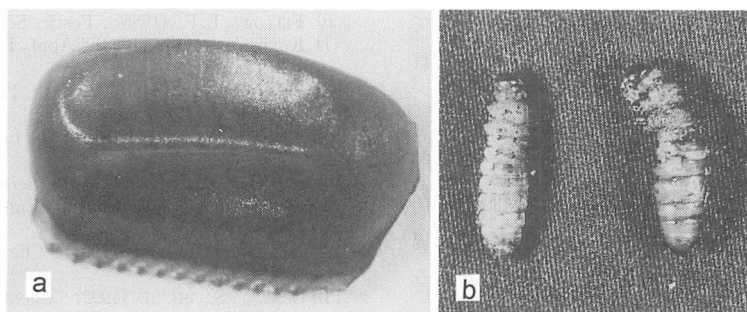


図-4 (a) VAA 処理ワモンゴキブリから産まれたへこみのある卵鞘。(b) VAA 処理によるヨトウガの脱皮時の異常。前蛹状態で死亡する個体(左)と蛹化不全で死亡する個体(右)。

注射し1日経つと、2分以上飛び続けることができなくなる(表-3, KONO et al., 1994 b)。しかし、トノサマバッタでは、VAA 注射による飛翔筋トレハラーゼの阻害、体液トレハロース濃度の上昇は起こるものの、飛翔は影響を受けない。これまで、トレハロースから脂肪への飛翔エネルギー源の転換は飛翔初期のトレハロース消費による体液トレハロース濃度低下が原因となっておりと考えられていたが、この実験結果はトレハロース濃度が高くても、その代謝が妨げられると体液脂肪濃度も高まり、飛翔筋での脂肪代謝が始動すると考えたほうがよいことを示している。

イエバエ、センチニクバエ成虫は VAA 処理により活動全般が抑制されるが、オオクロバエの飛翔を含めた活動は VAA の影響を受けない。この種は夏期にかなりの距離を飛翔し山地へ移動するため、脂肪をそのエネルギー源として利用すると推測される(TAKAHASHI et al., 1995)。

2 生殖への影響

VAA の1回の注射でワモンゴキブリ雌の卵巣トレハラーゼは2週間以上にわたって阻害される(表-1)。注

射1週間前後に産まれる卵鞘は着色、硬化が不完全で(図-4 a)、そこから幼虫はほとんどふ化しない。その後は、卵巣の卵の発育が抑制され、卵鞘も産まれなくなる(KONO et al., 1996)。VAA による産卵抑制はトノサマバッタでも観察されている。

カイコの休眠卵産生蛹では、発育中の卵表面のトレハラーゼが休眠ホルモンの遺伝子転写増強作用により多数発現し、より多量の体液トレハロースをグルコースに分解しつつ取り込み、グリコーゲンとして卵内に蓄積する。このために、卵は産卵された後休眠に入る(YAMASHITA and HASEGAWA, 1985)。蛹への適当量の VAA 処理はこの過程を抑制し、休眠卵から非休眠卵への転換を起こす(TAKEDA et al., 1988)。さらに、VAA によって雌の膠着腺のトレハラーゼが阻害され(姚ら, 1991)、卵を固定する膠着物質が生産されず、いわゆるバラ種状態となる(竹田ら, 1990)。

3 鱗翅目幼虫に対する致死作用

ヨトウガ終齢前期幼虫に VAA ($1-10 \mu\text{g}/\text{虫}$) を注射すると、1日後には筋肉の弛緩や背脈管拍動数の減少が観察されるが、発育には顕著な影響は認められない。し

かし、その後、前蛹から蛹に変態するときに異常が起き、脱肛やいろいろな程度の蛹化不全 (図-4 b) が原因で虫は死亡する (KONO et al., 1994 a; 1995)。VAA 処理による同様な異常による死亡はカイコ (KONO et al., 1993)、ハスモンヨトウ (ASANO et al., 1991) においても観察される。WYATT (1967) は中腸トレハラーゼの役割として、中腸壁を通してトレハロースが体外に流出するのを抑える働きを推測している。トレハラーゼ阻害剤により中腸トレハラーゼを阻害することは、ここにも致命的影響を現すと考えられた。しかし、実験結果は否定的で、中腸トレハラーゼが阻害されても腸管内にトレハロースは漏れ出てこなかった。二糖類はもともと消化管壁を通過できない化合物であって、トレハロースとして糖を体液中に蓄える一つの理由となっていると考えられる。

V トレハラーゼ阻害剤の利用

前項で述べたように、VAA はトレハラーゼ阻害作用によって昆虫に様々な影響を及ぼす。特に、変態時の異常、生殖の阻害、飛翔の抑制を対象とすれば、トレハラーゼ阻害化合物を害虫制御に利用できると考えられる。これまで各種昆虫に対して VAA の効果を調べてきたが、一般的処理によって有効な種は半翅目の一部に見られた。しかし、ヨトウガ幼虫、チカイエカ幼虫、ゴキブリを使った試験からは、経口、経皮投与による VAA の効力は十分ではなかった。表皮透過性を付与するために、アシル基、アリル基、スルフォニル基を VAA に導入したが、いまだ満足のいく化合物には到達していない。

バリドキシルアミン A の分解物の一つである epi-validamine (11) もトレハラーゼ阻害作用を備えた化合物である。このような化合物をリード化合物とし、これに化学的修飾を加え、 α -グルコシダーゼ阻害活性が強く、消化管での炭水化物の分解を抑えて血糖の急激な上昇を抑制する医薬 (vogulibose, 12) もつくられている。害虫制御剤としての開発もこのあたりから考え直す

のも一方法であろう。少しずつではあるがトレハロースの特異的阻害剤の種類も増えており、その中から有望な化合物が見つかることも期待できる。トレハラーゼ阻害剤が害虫制御に利用されるまでには、関係分野の成果などを取り入れた一層の研究が必要である。

引 用 文 献

- 1) ANDO, O. et al. (1991): J. Antibiotics 44: 1165~1168.
- 2) ASAHINA, E. and K. TANNO (1964): Nature 204: 1222.
- 3) ASANO, N. et al. (1987): J. Antibiotics 40: 526~532.
- 4) ——— et al. (1991): J. Antibiotics 44: 1417~1421.
- 5) ELBEIN, A. D. (1974): Carbohydr. Chem. 30: 227~254.
- 6) FELLOWS, L. F. (1986): Pestic. Sci. 17: 602~606.
- 7) KONO, Y. et al. (1993): Appl. Entomol. Zool. 28: 379~386.
- 8) ——— et al. (1994 a): J. Pesticide Sci. 19: 39~41.
- 9) ——— et al. (1994 b): J. Insect Physiol. 40: 455~461.
- 10) ——— et al. (1995): J. Pesticide Sci. 20: 83~91.
- 11) ——— et al. (1996): Appl. Entomol. Zool. 31: 印刷中
- 12) NAKAYAMA, T. et al. (1991): Chem. Commun. 1991: 919~921.
- 13) OGAWA, S. et al. (1992): Chem. Commun. 1992: 886~888.
- 14) OLIVER, M. J. et al. (1978): Biochem. Genet. 16: 927~940.
- 15) SALLEH, H. M. and J. F. HONEK (1990): FEBS Letter 162: 359~362.
- 16) SU, Z. -H. et al. (1993): Biochem. Biophys. Acta 1173: 217~224.
- 17) ——— et al. (1994): Biochem. Biophys. Acta 1218: 366~374.
- 18) TAKAHASHI, M. et al. (1995): Appl. Entomol. Zool. 30: 231~239.
- 19) TAKEDA, S. et al. (1988): Entomol. exp. appl. 46: 291~294.
- 20) 竹田敏ら (1990): 日雑誌 59: 360~365.
- 21) TAKIGUCHI, M. et al. (1992): Biochem. J. 288: 19~22.
- 22) TANAKA, K. and T. UDAGAWA (1993): J. Comp. Physiol. B 163: 439~444.
- 23) WYATT, G. R. (1967): Adv. Insect Physiol. 4: 287~360.
- 24) YAMASHITA, O. and K. HASEGAWA (1985): 'Comprehensive Insect Physiology Biochemistry and Pharmacology' 1, 408~434.
- 25) 姚 祥ら (1991): 日雑誌 60: 296~301.
- 26) 特許: 開 05-292986 (051109): 出 05-23960 (050212).