

# チャバネアオカメムシにおける幼若ホルモン (JHSB<sub>3</sub>) の構造決定と害虫管理への応用の可能性

農業生物資源研究所 小 滝 豊 美  
 大阪市立大学大学院 品 田 哲 郎

## はじめに

最近筆者らは果樹害虫であるチャバネアオカメムシ, *Plautia stali* の幼若ホルモン (JH) の構造解明に成功し, Juvenile Hormone III Skipped Bisepoxide (JHSB<sub>3</sub>) と名付けた (KOTAKI et al., 2009)。本稿では, JH 研究におけるカメムシ類の位置づけと, この新規 JH の解明に至る経緯を紹介し, 今後の害虫管理への応用の可能性について考察してみたい。

## I JH 研究とカメムシ類

JH は, 昆虫の脱皮・変態と生殖を司る重要なホルモンの一つである。変態を抑制し, 生殖を刺激するという JH の生理作用は, 古く 1930 年代に南米産の吸血性のオオサシガメ, *Rhodnius prolixus* を用いた実験で明らかにされた (WIGGLESWORTH, 1934; 1936)。しかし, このときには, アラタ体という内分泌器官から放出される液性の要因として見いだされたに過ぎず, セクロピアサンにおいて JH の化学構造 (Cecropia JH, 現在の JH I) が初めて解明されるまでにはそれから 30 年あまりの時間を要した (RÖLLER et al., 1967)。いくつかのホモログがその後見いだされ (図-1), 分類群によって構造の異なる JH が存在することはよく知られるようになった。WIGGLESWORTH の研究以来, カメムシ類を実験の対象にして多くの JH 研究が展開されてきた。例えば, 抗 JH 活性物質, プレコセン (BOWERS et al., 1976) やホシカメムシの仲間にも JH 活性を発揮するペーパーファクター (SLÁMA and WILLIAMS, 1965; BOWERS et al., 1966) 等はカメムシを使って発見されてきた物質である。また, 休眠や長距離移動の内分泌制御機構の研究にカメムシ類が使われてきた。この間, オオサシガメで JH の同定が試みられてきたが, 成功に至らなかった (私信)。いくつかの種では, JH I や JH III, 後者の前駆体であるファルネセ

ン酸メチルの存在ないし生産が報告されたが (FELDLAUFER et al., 1982; BOWERS et al., 1983; NUMATA et al., 1992), それらがホルモンとして機能していることを十分には検証できていなかった。一方, ナガカメムシの 1 種, *Oncopeltus fasciatus* からはその当時既知であった JH も検出できないという報告がなされた (BAKER et al., 1988)。その後, チャバネアオカメムシなどのアラタ体が培養系内で既知の JH とは異なる物質を主に生産し (KOTAKI, 1993), その未同定のアラタ体生産物に JH 活性 (変態抑制活性) があることが明らかになった (KOTAKI, 1996)。しかし, この時点では筆者らを含めていずれの研究グループもカメムシ目昆虫の JH を決定するには至らなかった。

## II JHSB<sub>3</sub> の構造決定

1996 年当時までに筆者らがかかっていたアラタ体生産物に関する物質的な証拠は, メチオニンに由来するメチル基がその物質に取り込まれることおよび, 培養系に JH III の前駆体であるファルネソールやファルネセン酸を加えると, 生産量が増加することであった (KOTAKI, 1996)。これらは, その生産物が既知の JH と同様に, メチルエステルであること, および JH III と共通の骨格を有することを示す。筆者らはこの結果を出発点に, 構造の解明を目指し共同研究を開始した。まず調べたのは, アラタ体が作る生産物の分子量である。チャバネアオカメムシ成虫のアラタ体生産物を高分解能質量分析にかけて得られた, 生産物の陽イオン付加体の  $m/z$  値, 283.1885 から生産物の組成式を C<sub>16</sub>H<sub>26</sub>O<sub>4</sub> と推定した。この組成は高等なハエ目昆虫から見いだされた JHB<sub>3</sub> (6,7; 10,11-ビスエポキシファルネセン酸メチル) と同一であった。過去の薄層クロマトグラフィーの結果からアラタ体生産物の R<sub>f</sub> 値は, JHB<sub>3</sub> のそれと「同じではないが近い」ことがわかってきた。そのような R<sub>f</sub> 値を与えるものとして 2,3; 10,11-または, 2,3; 6,7-ビスエポキシ体の可能性が想定された。そこで, これらビスエポキシ体の異性体を含む混合物を合成して, 混合物の中にアラタ体生産物と同じものがあるかガスクロマトグラフィー—質量分析計 (GC-MS) で分析した。その結果,

JHSB<sub>3</sub>, a Novel Juvenile Hormone Determined in the Brown-Winged Green Bug, *Plautia stali* and its Possibilities to Develop Control Agents for the Pest Management. By Toyomi KOTAKI and Tetsuro SHINADA

(キーワード: 果樹カメムシ, 変態, 生殖, 昆虫成長制御剤)

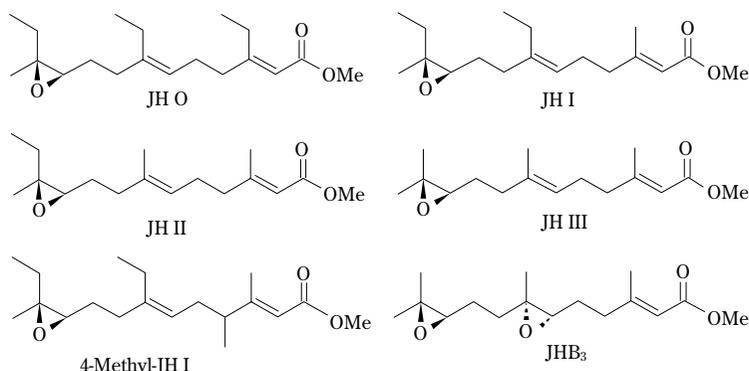


図-1 既知の JH

アラタ体生産物と同じ保持時間に、同一のマススペクトルを与えるものが混合物の中に含まれていた。また、この混合物には、比較的強い JH 活性が認められた。この結果を基に、混合物から高い JH 活性を持つ分子を捜し出すことにした。そのためには立体異性体を分離する必要があった。キラルカラムを装着した液体クロマトグラフィー (キラル HPLC) を用いれば、混合物が分離できることがわかり、理論上 32 個の化合物からなる混合物を 21 画分に分離できた。各画分の JH 活性の検定によって、高い活性を示す 2 画分が見いだされた。これらを核磁気共鳴 (NMR) を用いて、構造解析したところ、いずれも 2,3; 10,11-ビスエポキシ体という分析結果を得た。しかし、ビスエポキシド構造を持つ分子には四つの立体異性体が存在し (図-2)、NMR 解析だけでは四つの可能性を二つに絞ることができなかった。そこで、四つの立体異性体を立体選択的に合成 (不斉合成) し、その中からアラタ体生産物と一致する分子を探索した。キラル HPLC で四つの異性体を分析したところ、それらはすべて異なる保持時間を示し、そのうちの二つのピークの保持時間が高い JH 活性を持つビスエポキシドのそれらと一致した。二つの有望な候補分子を見いだすことができたので、アラタ体生産物との一致を検討した。ここではキラルカラムを装着した GC-MS が最終的な微量分析に威力を発揮した。アラタ体生産物は保持時間 46 分に検出され、それと同じ時間には異性体 1 が検出された。両者のマススペクトルはよく一致し、さらに両者を混合分析すると、これら二つは一つのピークとして検出された。このことからアラタ体生産物の構造は異性体 1 であると結論づけられた。この化合物はこれまでに報告のない新規なもので、その構造上の特徴すなわち、JH III と同じ骨格を有し、2, 3 位および 10, 11 位の二つのエポキシドが 6, 7 位の 2 重結合を飛び越して存在

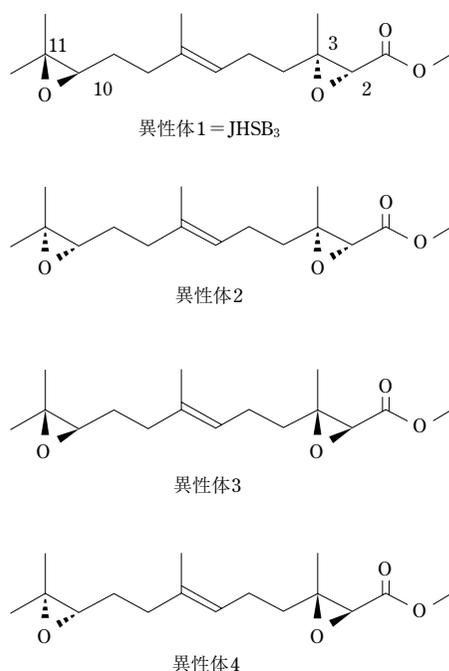


図-2 JHSB<sub>3</sub> とその異性体

分子の骨格をつくる炭素原子を平面上に置くと、二つの炭素と一つの酸素から構成される環状構造 (エポキシド) は、その平面上側に向く場合 (くさび形で示す) と下側に向く場合 (破断線で示す) の二つの可能性があり、それらは立体異性体として区別される。2, 3 位および 10, 11 位にエポキシドを持つ JHSB<sub>3</sub> (とその立体異性体の) 場合、それぞれのエポキシドについて、上向きと下向きとがあり得るので、合計四つの立体異性体が存在する。

することから、Juvenile Hormone III Skipped Bisepoxide (JHSB<sub>3</sub>) と名付けた。

### III JHSB<sub>3</sub>のチャバネアオカメムシにおける JH としての機能の検証

古典的なホルモンの定義は「1, 特定の器官でつくられ, 2, 血流で離れた場所に運ばれて, 3, 標的器官に作用して特定の応答を引き起こす物質」とされている。定義に含まれる3要件に関して, これまでの研究との関係を整理してみよう。まず, JHSB<sub>3</sub>は成虫のアラタ体の培養系内での生産物として構造決定されたので, 要件1は既に満たしている。また, 構造決定の過程で JH 活性のある画分を検索したので, 標的器官での特定の応答を引き起こす, すなわち, JH としての生物活性を有している, 要件3をも満たしているといえる。ただし, 成虫のアラタ体を培養して得た生産物の構造を決めたのに, その過程では幼虫に対する変態抑制作用を検定したので, 成虫に対して効果を発揮することは証明されていない, という批判を免れない。さらに, 要件2はまだ満たされていない。そこで, JHSB<sub>3</sub>の生物学的な機能を検証するため二つの実験を行った (KOTAKI et al., 2011)。

#### 1 JHSB<sub>3</sub>とその立体異性体の生物活性

JHSB<sub>3</sub>とその立体異性体の幼虫および成虫に対する生物活性を評価した。幼虫に対する変態抑制作用は, 検定する物質を塗布した終齢幼虫が脱皮した後の, 前翅と小盾板の長さを測定することによって検出した。これらの部位は, 幼虫から成虫へと変態することに伴って長く伸

びる部位である (口絵)。成虫に対する効果は, アラタ体を摘出したメス成虫に対して試料を塗布し, 一定期間後に卵巣内の卵母細胞の大きさを測定して評価した。

JHSB<sub>3</sub>は終齢幼虫に対して強い変態抑制効果を示すとともに (図-3), アラタ体を除去したメス成虫に対しても卵母細胞を发育させる効果を示した (図-4)。また, アラタ体を摘出したオス成虫に対する処理は外胚葉性付属腺の发育を促進した。さらに, JHSB<sub>3</sub>を休眠している成虫に処理すると卵巣や外胚葉性付属腺の发育が誘導され, 休眠を打破する作用が認められた。生殖器官の发育刺激や成虫休眠の打破は JH の成虫に対する主要な作用である。これらのことから, JHSB<sub>3</sub>は幼虫に対しても成虫に対しても JH としての生物活性を有することが裏付けられ, ホルモンの定義の要件3を幼虫, 成虫いずれのステージにおいても満たしていることが示された。

幼虫およびアラタ体を除去したメス成虫に対する塗布実験によって, 構造決定の過程で JH 活性が認められたもう一つの立体異性体, 異性体2にも JHSB<sub>3</sub>とほぼ同程度の変態抑制活性および生殖腺刺激活性があることが明らかになった。これに対して, ほかの二つの立体異性体や JH III は, 同等な変態抑制活性を示すのにおよそ1,000倍の処理量を要した。また, メス成虫に対してこれらの異性体は, 試験した用量範囲では卵母細胞发育を促進する効果が認められなかった。JH 活性の強弱は2, 3位のエポキシドの立体配置によって決まり, 10, 11位

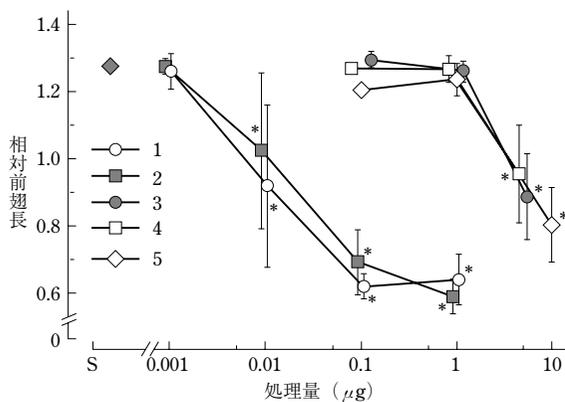


図-3 JHSB<sub>3</sub> (1)とその異性体 (2~4) および JH III (5) のチャバネアオカメムシ終齢幼虫に対する効果  
チャバネアオカメムシ終齢幼虫にヘキサソに溶解したサンプルを塗布し, 次の脱皮の後, 前翅長の前胸背板幅に対する相対長を測定した。値が小さいほど幼虫的な形質であることを示す。\*はヘキサソのみを塗布した対照区 (横軸の S) の前翅長との間に統計的に有意な差 ( $P < 0.05$ , Steel の検定法) があることを示す。 (KOTAKI et al., 2011 より改変)

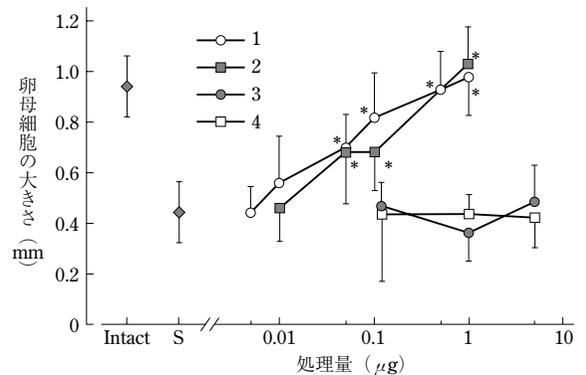


図-4 JHSB<sub>3</sub> (1)とその異性体 (2~4) のアラタ体を摘出したチャバネアオカメムシメス成虫に対する効果  
羽化後4日目のメス成虫からアラタ体を摘出し, その直後ヘキサソに溶解したサンプルを塗布した。処理4日後に解剖して卵巣内の卵母細胞の直径を測定した。横軸の Intact および S は, それぞれアラタ体を摘出していない無処理区およびヘキサソのみを処理した対照区を表す。\*は対照区の卵母細胞の直径との間に統計的に有意な差 ( $P < 0.05$ , Steel の検定法) があることを示す。 (KOTAKI et al., 2011 より改変)

のエポキシドの立体配置は活性に大きな影響は及ぼさないように見える。一方、カイコガでは 10, 11 位のエポキシドの立体配置によって活性が大きく異なることが知られている (SAKURAI et al., 1990)。カイコガでは活性の発現に重要な 10, 11 位の立体配置が、チャバネアオカメムシではなぜあまり重要でないか、また、立体異性体間の活性の差は何を反映しているのかは、JH をリード化合物とする昆虫制御剤開発には非常に重要な情報であり、今後解明を進めなければならない課題である。

## 2 体液からの JHSB<sub>3</sub> の検出

次に、ホルモンの定義の要件 2, 「血流で離れた場所に運ばれて」を検証する。そのためには血液、開放血管系を持つ昆虫における用語では、血リンパ=体液によって運ばれている最中の JH を検出すればよい。そこで、卵巣を発育させた、つまり、JH の体液中の濃度が高いと予想されるメス成虫から体液を集め、有機溶媒で抽

出・精製したのち GC-MS で分析したところ、合成した JHSB<sub>3</sub> 標準品の保持時間と同じ 16.2 分に、同一パターンのマススペクトルを示すピークが観察された (図-5)。さらに、JH 濃度が低いと予想される休眠個体の体液から 16.2 分のピークは検出されなかった。すなわち、予想される JH 濃度変動と一致する濃度の差異が検出され、JH が誘起する生理作用と体液からの検出量の間の相関をも示したといえる。

これらの結果は JHSB<sub>3</sub> がチャバネアオカメムシにおいて JH としての生物学的な機能を果たしていることを明確に示すものである。これら一連の実験によって、少なくともチャバネアオカメムシでは、JHSB<sub>3</sub> という新規な構造を持った分子が JH として機能していることが明らかになった。ホシカメムシ・キンカメムシを含む数種のカメムシのアラタ体もチャバネアオカメムシと同じかよく似た物質を合成していることがすでに示されている

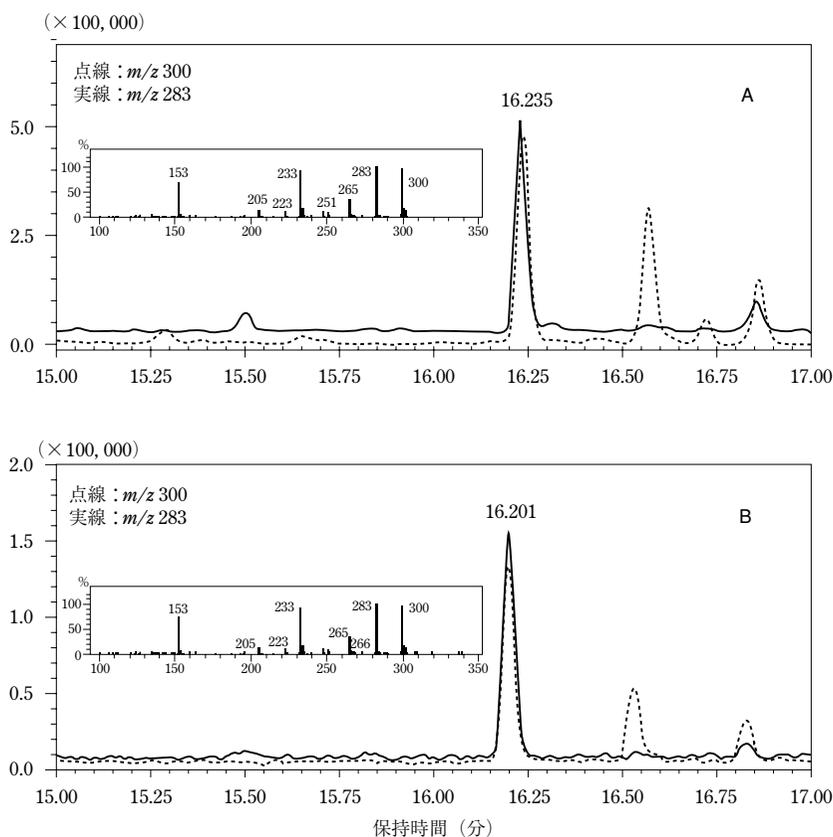


図-5 JHSB<sub>3</sub> の分析

チャバネアオカメムシメス成虫の体液の抽出物 (A) および JHSB<sub>3</sub> の合成品 (B) を GC-MS で分析した。縦軸は  $m/z$  300 および  $m/z$  283 の検出強度を示す。A および B にはめ込みの図は 16.2 分に検出されたピークのマススペクトルである。(KOTAKI et al., 2011 より改変)

ので (KOTAKI, 1993; HODKOVA et al., 1996; MIYAWAKI et al., 2006), これらの種でも JHSB<sub>3</sub> が JH として機能している可能性が高い。JHSB<sub>3</sub> がカメムシ類あるいはウンカ・ヨコバイ類を含むカメムシ目に普遍的に存在するかどうかは、応用的にも重要な今後の課題である。

#### IV JHSB<sub>3</sub> の害虫管理への応用の可能性

JH は昆虫に特有なホルモンなので、従来の農業に代わる、昆虫特異的で他の生物に影響の少ない「第3世代の農業」になる可能性は、JH の構造が初めて解明されるとほぼ同時に指摘されていた (WILLIAMS, 1967)。また、ホルモン活性に基づくものなので、抵抗性が発達しにくいと考えられた。JHSB<sub>3</sub> はチャバネアオカメムシに、あるいはカメムシ類に特有なホルモンとして見いだされたので、この構造を基にカメムシ類選択的な昆虫成長制御剤ないし殺虫剤の開発が期待される。実際、JHSB<sub>3</sub> のチョウ目幼虫に対する活性は JH I などよりはるかに弱いものである (未発表)。その一方、チョウ目を含む多くの昆虫に対して強力な効果を示す JH アナログであるメソプレンは、チャバネアオカメムシに対してほとんど効果を示さない (KOTAKI, 1996)。このように種間で JH や JH アナログに対する感受性が大きく異なるので、JHSB<sub>3</sub> 構造を基にカメムシ選択性を持つ JH アナログや制御剤の作出が期待される。

JHSB<sub>3</sub> は、二つのエポキシドを有するセスキテルペノイドのメチルエステルである。エポキシドは比較的不安定な構造で、特に酸性条件下や光で分解されやすく、エステル結合はエステラーゼのターゲットである。したがって、JHSB<sub>3</sub> 構造を基に、より活性が高く安定で、合成の容易な化合物を作るポイントとして、エポキシドを安定な構造に置換すること、エステラーゼによって分解されにくい構造を導入すること、さらに構造を単純にすること等が考えられる。筆者らは現在、より高活性な分子を見いだすべく合成と活性評価を進めている。

既に述べたように、カメムシ科やホシカメムシ科、キンカメムシ科に属する種では JHSB<sub>3</sub> が存在する可能性が高い。一方、ホシカメムシ科の一種、*Pyrrhocoris apterus* に対してのみ強力な JH 活性を示す物質が、北米で製造されている新聞紙から発見され、ペーパーファク

ターと名付けられた (SLÁMA and WILLIAMS, 1965; BOWERS et al., 1966)。なぜこの物質が、ホシカメムシに対してのみ効果を示すのか、理由は明らかにされていない。しかし、どのカメムシも同じ分子をホルモンとして共有しているのならば、ペーパーファクターの作用性の違いは標的器官に到達する前の分解過程か、標的器官での感受性に求めるのが最もありそうな説明だろう。科間でも種間でも、分解過程や感受性に差があるのであれば、それに基づく選択性制御剤開発の可能性がある。

#### おわりに

カメムシの仲間の JH は長い間謎とされてきた。チャバネアオカメムシにおいて新規な JH が見いだされたことから、今後このホルモンの生合成や代謝・分解に関与する酵素および標的器官に存在する受容体等、JHSB<sub>3</sub> に特化した酵素や受容体の特性解明が期待される。これらはタンパク質なので、分子生物学的なアプローチが極めて有効に使えるであろう。そうすれば、同じホルモン分子に対する反応が、なぜ種や科によって違うかという疑問もいずれ解明されるに違いない。JHSB<sub>3</sub> がカメムシ目昆虫の中でどの程度普遍的に存在するか、別の新たな JH はもうないのか、等の疑問も今後解明していかねばならない。こうした基礎的な知見の蓄積を続けることが、カメムシ類選択的な制御剤を開発する近道であろう。

#### 引用文献

- 1) BAKER, F. C. et al. (1988): *Insect Biochem.* **18**: 453 ~ 462.
- 2) BOWERS, W. S. et al. (1966): *Science* **154**: 1020 ~ 1021.
- 3) ——— et al. (1976): *ibid.* **193**: 542 ~ 547.
- 4) ——— et al. (1983): *J. Exp. Zool.* **228**: 555 ~ 559.
- 5) FELDLAUFER, M. F. et al. (1982): *ibid.* **223**: 295 ~ 298.
- 6) HODKOVA, M. et al. (1996): *Eur. J. Entomol.* **93**: 535 ~ 543.
- 7) KOTAKI, T. (1993): *Appl. Entomol. Zool.* **28**: 242 ~ 245.
- 8) ——— (1996): *J. Insect Physiol.* **42**: 279 ~ 286.
- 9) ——— et al. (2009): *Org. Lett.* **11**: 5234 ~ 5237.
- 10) ——— et al. (2011): *J. Insect Physiol.* **57**: 147 ~ 152.
- 11) MIYAWAKI, R. et al. (2006): *Formosan Entomol.* **26**: 1 ~ 10.
- 12) NUMATA, H. et al. (1992): *Experientia* **48**: 606 ~ 610.
- 13) RÖLLER, H. et al. (1967): *Ang. Chem. Int. Ed.* **6**: 179 ~ 180.
- 14) SAKURAI, S. et al. (1990): *Experientia* **46**: 220 ~ 221.
- 15) SLÁMA, K. and C. M. WILLIAMS (1965): *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* **54**: 411 ~ 414.
- 16) WIGGLESWORTH, V. B. (1934): *Quart. J. Micr. Sci.* **77**: 191 ~ 222.
- 17) ——— (1936): *ibid.* **79**: 91 ~ 121.
- 18) WILLIAMS, C. M. (1967): *Sci. Amer.* **217**: 13 ~ 17.