学会賞受賞論文

(業績賞)

イミダゾール系化合物の合成と生物活性に関する研究

桑 野 栄 一

九州大学農学部農芸化学科

Studies on the Synthesis and Biological Activity of
Imidazole Compounds

Eiichi KUWANO

Department of Agricultural Chemistry, Kyushu University, Hakozaki, Fukuoka 812, Japan

はじめに

新しい生理活性物質の開発にはまず、その手がかりとなるリード化合物をいかにして見出すかがもっとも重要なポイントになる。まったく新しいリード化合物の発見というものはこれまで、天然物の探索によるか、あるいは合成化合物の無差別スクリーニングによりなされた場合がほとんどであり、リード化合物を発見するいわゆるリードジェネレーションの合理的な方法について、さまざまな観点からのアプローチ・模索が現在試みられている。これまでに蓄積されてきた生化学的知見を基に分子設計を試みる生合理的アプローチは有効な方法の一つであり、酵素や受容体の構造および機能が解明されるにつれて、それらに基づいた薬物の分子設計が行なわれている。一方では、新しい生理活性物質がさきに発見されたことにより、それが作用する酵素あるいは受容体の構造や機能が解明された例も多く、新しい生理活性物質は薬としてだけでなく、分子プローブとして生命現象の解明には不可欠なものとなっている。

本研究は生合理的アプローチの一つとして、すでにチトクローム P450 阻害活性が知られているイミダゾール化合物を利用し、主として昆虫成育制御物質の分子設計を行なったものである。その結果得られた新規イミダゾール化合物の生物活性、すなわち、幼若ホルモン生成阻害、抗脱皮ホルモン活性、殺虫活性、休眠制御活性、植物白化作用等について概説する。

幼若ホルモン (JH) 生成阻害剤の分子設計

昆虫の脱皮と変態は、脳、アラタ体、前胸腺からそれぞれ分泌される前胸腺刺激ホルモン、幼若ホルモン (JH)、脱

皮ホルモンなどにより誘導、制御されている。とくに、JH は脱皮、変態のほか、休眠、生殖腺刺激作用、フェロモンの生合成等種々の生理作用に関与していることから、抗 JH 活性物質は昆虫生命現象の解明に役立つばかりでなく、新しい昆虫成育制御剤として有望である¹⁾。そこでまず、JH 生合成阻害剤の分子設計を試みた。

JH はアラタ体でメバロン酸、あるいはホモメバロン酸を経由するテルペノイド生合成経路によって合成される。この経路の前半はステロイド類等種々の生体物質の生合成経路と共通しており、この部分の阻害剤は選択性に乏しいと考えられる。JH 生合成経路の後半部分たとえば JH III の場合、farnesoic acid のメチルエステル化とエポキシ化であり、この経路は哺乳動物にはないことから、この段階の阻害剤は特異性の高いものが期待できる (Fig. 1)。また、アラタ体培養系に farnesoic acid を添加すると JH III の合成が著しく増加することから、O-methyl transferase と methyl farnesoate 10, 11-epoxidase (MFE) の活性が高いことが明らかにされている²⁾。ゴキブリやバッタのアラタ体ミクロゾーム画分に存在する MFE は NADPH および酸素を必要とし、一酸化炭素、ピペロニルブトキシドさらにある種のイミダゾール化合物によって阻害されることから、チトクローム P450 であることが示唆されている³⁾。

P450 は一般に一原子酸素添加酵素であり、その生理的役割と基質特異性から、二つに大別できる。一つはさまざまな外来性低分子化合物の酸化的代謝を担っている P450 で、このような P450 分子種は多数存在しており、基質特異性は非常に幅広い。もう一つはステロイドホルモン、ビタミン、胆汁酸、トロノキサン等重要な生体内物質の生合成および不活性化などに関与している P450 分子種で、そ

Fig. 1 JH III biosynthetic pathway.

これらの基質特異性は高いことが明らかにされている。JH 生合成経路の MFE は当然、基質特異性が高いことが予想される。

一方、薬物代謝に関与する P450 の阻害剤として、1-置換あるいは 4-置換イミダゾール類が Wilkinson らによって精力的に調べられており、殺虫剤に対して共力作用を示すことが報告されている⁴⁾。また、その阻害作用は P450 の活性中心であるヘム鉄にイミダゾール環 3 位の sp² 窒素が配位することで起こることが明らかにされている⁵⁾。

以上の知見を基に MFE の阻害剤の分子設計を行なった。すなわち、P450 阻害活性発現部位としてイミダゾールを使用し、これに酵素の活性中心付近にある疎水性部位との親和性を高めるため、基質である methyl farnesoate と類似した構造を導入することを考えた。すでに数多くの JH 類縁体が発見されており、それらの構造を参考にして、ゲラニール基、フェノキシフェニル基、ベンジルオキシフェニル基あるいはそれらの類似骨格をイミダゾール環に導入した化合物を合成した⁶⁻⁹⁾。

幼若ホルモン生合成阻害活性

ゴキブリのアラタ体培養系に [methyl-¹⁴C]methionine を添加し、生成する ¹⁴C でラベルされた JH III を定量する *in vitro* JH III 生合成系を使用し、種々のイミダゾール化合物の阻害活性を検討した^{10,11)}。代表的な化合物の JH III 生合成阻害活性と培地中に蓄積してくる methyl farnesoate (MF) の量を Table 1 に示した。化合物が MF から JH III へのエポキシ化を阻害すれば、MF が培地中に多量に蓄積してくるはずである。一般に、1-置換 5-(3-ベンジルオキシフェニル)イミダゾールが顕著な阻害活性を示し、1 位の置

Table 1 Inhibition of JH synthesis and accumulation of methyl farnesoate (MF) by 1, 5-disubstituted imidazoles in corpora allata of the cockroach, *Diploptera punctata*.

Compound	IC ₅₀ (nM)	Highest MF accumulation (pmol/pair)
TH-20	35	68
TH-27	36	166
LN-32	57	89
TH-32	64	138
TH-58	115	188
KK-51	2100	nd
TH-68	2320	4
KK-42	3500	39

nd : none detected.

換基として、ベンジル、メチル、エチル、イソプロピル (TH-20)、イソブチル (TH-27) 基等の場合に強い活性がみられ、*n*-ブチル、ネオペンチル基では低下した。とくに、TH-27 に強い JH III 生合成阻害活性と MF の多量蓄積が認められ、この場合、MF の前駆体である farnesoic acid を添加しても阻害活性にまったく影響はなかった。さらに、アラタ体ホモジネート中の MFE に対する阻害活性を methyl(2*Z*, 6*E*)farnesoate を基質として調べた結果、TH-27 の IC₅₀ 値は 7.4 nM と強い阻害を示した。一方、1-citronellyl-5-(2-ethoxyphenyl)imidazole (KK-51) の JH 生合成阻害活性は TH-27 より弱い、MF をまったく蓄積させないことから、MF 以前の生合成経路を抑制していると考えられ、これをリードとして、新たな JH 生合成阻害剤の開発が期待できる。

Feyereisen らは MFE に対して強い阻害活性を示した TH-27 のトリチウムラベルおよびベンゾフェノン基を導入した化合物 (TH-27-BP) を使用し、光アフィニティラベル法により、アラタ体ホモジネート中から MFE と思われ

るタンパク質 (約 55 kDa) の単離に成功している¹²⁾。

早熟変態誘起活性と抗脱皮ホルモン活性

カイコ 4 齢幼虫からアラタ体を摘出すると、幼虫は 5 齢に脱皮せず早熟的に蛹化する。抗 JH 活性物質の明確な生物検定法として、化合物を終齢の一つ前の幼虫に処理して、アラタ体を摘出した場合と同様な早熟変態が誘導されるかどうかを調べる方法が知られている¹⁾。そこで、JH 生合成阻害剤として分子設計した種々のイミダゾール化合物を、カイコ 4 齢幼虫に局所施用して早熟変態誘起活性を検討した。その結果、Table 2 に示すようにさまざまな 1,5-二置換イミダゾール類に活性が認められた^{13~19)}。1 位の置換基として、ベンジル、イソブチル、ネオペンチル基等がとくに強い活性を示し、また、ゲラニルやシトロネリル基等 JH 様テルペン鎖のほか、*n*-オクチル基にも強い活性が認められた。この生物検定法では KK-42 がもっとも強い活性を示し、3 齢に対しても早熟変態を誘導した (Fig. 2)。前述の TH-27 のカイコに対する早熟変態誘起活性は KK-42 の 1/100 以下であり、カイコに対する早熟変態誘起活性とゴキブリのアラタ体を用いた *in vitro* JH III 生合成阻害活性とはまったく相関が認められなかった。これについては昆虫種によって利用する JH の種類が異なる (カイコ幼虫では

Table 2 Induction of precocious metamorphosis in the 4th instar larvae of the silkworm by 1,5-disubstituted imidazoles.

	Compound	ED ₅₀ (μg/larva)
	KK-42	0.6
TH-68		1.1
KK-80		1.7
KK-110		1.9
TH-67		2.1
TH-58		2.3
KK-135		2.5
TH-77		3.4
MM-11		3.5
MM-19		5.0

Fig. 2 Effect of KK-42 on 3rd- and 4th-instar larvae of *Bombyx mori*.

(5th) Normal pupae and adult, (4th) precocious pupae and adult induced by treating 4th-instar larvae, (3rd) precocious pupae and adult induced by treating 3rd-instar larvae.

JH I と JH II で、ゴキブリでは JH III) など昆虫間の生理的相違が考えられたが、以下に述べるように KK-42 の作用と JH とはほとんど関係なかった。

アラタ体摘出で生じる早熟変態 (抗 JH 活性) と KK-42 の早熟変態誘起活性を 4 齢カイコを用いて詳細に比較検討した結果、前者では 4 齢のごく初期に処理した場合のみ効果があるのに対し、後者では 4 齢中期に処理してもその効果が認められた。また、KK-42 処理後数日間以上、幼虫体液中には脱皮ホルモンが検出されず、4 齢期間が大幅に延長することがわかった²⁰⁾。脱皮ホルモンの分泌遅れにより、キチナーゼとグルコサミナーゼの発現時期も遅れた²¹⁾。さらに、蛹化直後に KK-42 を処理すると、蛹体液中の脱皮ホルモン量が減少し羽化が著しく遅延したが、この症状は 20-hydroxyecdysone を注射すると完全に回復した²²⁾。以上のことから、KK-42 が脱皮ホルモンの分泌を特異的に阻害していることが明らかとなった。

脱皮ホルモン合成能が高い 5 齢幼虫 7 日目の培養前胸腺を用いた実験で、KK-42 は 100 nM で脱皮ホルモンの合成を 90% 以上阻害し、I₅₀ 値は約 1 nM ときわめて強い活性を示した²³⁾。また、KK-42 はバッタの培養前胸腺においても脱皮ホルモンの生合成を阻害し、前胸腺を KK-42 を含まない培地に移すと、ホルモン合成能が回復した^{24, 25)}。これらのことから、KK-42 は前胸腺での脱皮ホルモンの生合成を阻害することが明確となった。

そこで、早熟変態誘起活性を示す種々の 1,5-二置換イミダゾール化合物について、脱皮ホルモンとの関連を検討し

た。その結果、Table 2 に示した化合物の早熟変態誘起活性は 20-hydroxyecdysone を摂食させるか、あるいは脱皮ホルモンアゴニストであるテプフェノチドを微量局所施用することにより完全に打ち消されることがわかった^{26, 27)}。これは上記 1, 5-二置換イミダゾールが幼虫体液中の脱皮ホルモン量を抑制（恐らく、KK-42 と同様に脱皮ホルモン生合成を阻害）することによって早熟変態を誘導していることを示している。

早熟変態はアラタ体摘出など JH の欠乏によって起こることはすでに知られているが、脱皮ホルモン作用が一時的に抑制されることによって誘導されることが明らかとなった。最近、1, 5-二置換イミダゾールだけでなく、1-置換イミダゾールにも早熟変態誘起活性があることを見出した²⁸⁾。これまでに脱皮ホルモンの有効な阻害剤はなく、これらの化合物は内分泌制御機構解明に貢献できると思われる。

昆虫はステロイド骨格を生合成できないため、脱皮ホルモンを食餌中の β -sitosterol や stigmasterol などの植物性ステロイド類から合成している (Fig. 3)。Cholesterol から 20-hydroxyecdysone への生合成過程では数種の P450 が関与していることが知られており、Table 2 の化合物はこの酸化過程を阻害している可能性が高い。Rees らは卵巣における脱皮ホルモン生合成経路において、KK-42 がエクダイソン 22 位の水酸化を阻害することを指摘している²⁹⁾。

20-Hydroxyecdysone は ecdysone より脱皮ホルモン活性が強いことから、従来、脱皮ホルモンの本体であろうと考えられていたが、最近、両者間で異なった生理作用が見出されており、それぞれの生理的役割が違ふことが推察されている³⁰⁾。Ecdysone から 20-hydroxyecdysone への酸化は脂肪体に存在する ecdysone 20-monooxygenase (P450) によって触媒される。Darvas らはニクバエ幼虫脂肪体のミクロゾーム画分に存在する 20-monooxygenase を 1, 5-二置換イミダゾールが阻害することを認めている (Table 3)³¹⁾。この

Fig. 3 Ecdysteroid biosynthetic pathway.

なかで KK-110 はニクバエに対して早熟変態を誘起した³²⁾。1, 5-二置換イミダゾール化合物を利用して、脱皮ホルモンの生合成経路に關与する P450 分子種それぞれについて特異的阻害剤の分子設計が可能と思われる。

殺虫活性

前述のように、種々の 1, 5-二置換イミダゾールがカイコに対して脱皮ホルモンの分泌を抑え早熟変態を誘導した。この場合、化合物を 4 齡初期に多量局所施用しても 4 齡期間が少々延長するだけで、早熟蛹化が誘導された。しかし、5 齡幼虫後半に処理した場合、蛹化が起きず幼虫のまま死亡したり、幼虫-蛹の中間体が生じた³³⁾。脱皮ホルモンを抑制すれば当然脱皮あるいは変態が攪乱されることから、新しい成育制御物質として期待できる。そこで、カメムシの一種 *Oncopeltus fasciatus* の幼虫に対して生物検定を行なった³⁴⁾。これは抗 JH 活性物質であるプレコセン類の発見で使用された昆虫であり、イミダゾール化合物は当初、JH 生合成阻害剤として分子設計されたことから、抗 JH 活性も同時に検討する目的があった。この検定法はシャーレに化合物を塗布し、若齡幼虫を放つ方法で、幼虫は成育期間中化合物に曝されることになる。

その結果、*O. fasciatus* 幼虫に対して、プレコセン様の早熟変態誘起活性を示すイミダゾール化合物を見出すことが

Table 3 Inhibition of microsomal ecdysone 20-monooxygenase of fat body of *Neobellieria bullata* wandering stage larvae by imidazoles.

Compound	I ₅₀ (μ M)
KK-110	0.2
KK-135	1.2
KK-42	1.9

Table 4 Insecticidal activity of 1, 5-disubstituted imidazoles against the milkweed bug, *Oncopeltus fasciatus*, and the brown rice planthopper, *Nilaparvata lugens*.

Compound	Mortality (%)			
	<i>O. fasciatus</i> ^{a)} (μ g/dish)		<i>N. lugens</i> ^{b)} (ppm)	
	50	10	50	5
KK-42	0	0	—	—
TH-68	35	0	B	—
KK-80	40	35	A	D
TH-67	100	100	A	—
TH-58	100	100	A	B
TH-27	100	25	A	—
TH-32	100	100	B	B
TH-20	100	45	A	D

a) 3rd instar larvae.

b) 3rd instar larvae. Mortality: A, 100%; B, 99-90%; C, 89-80%; D, 79-50%; —, 49-0%.

できなかった。しかし、Table 4に示すように、殺虫活性が認められた。とくに、化合物 TH-32 および TH-58 等 1-イソブチルイミダゾール類が強い活性を示した。これらの化合物を 3 齢幼虫に処理した場合、速効的致死効果、発育の遅れ等はまったくみられず、脱皮時のみに異常が認められ、脱皮不能あるいは脱皮直後の致死作用であった。また、5 齢幼虫に処理した場合、古い表皮が脱げず成虫への変態が阻止された。これらの症状は脱皮ホルモン阻害によるものと考えられる。しかし、KK-42 は *O. fasciatus* 幼虫に対して高薬量でも活性を示さず、1,5-二置換イミダゾールのカイコに対する早熟変態誘起活性と *O. fasciatus* 幼虫に対する殺虫活性との間では、相関関係はまったく認められなかった。

O. fasciatus に殺虫活性を示したことから、同じ半翅目であるトビイロウンカ幼虫に対して検討したところ、ある程度の殺虫活性が認められた (Table 4)。この場合、*O. fasciatus* の場合と同様、脱皮阻害による殺虫効果であり、構造と活性の関係も同じ傾向がみられた。これらの殺虫活性物質については現在も検討中である。

休眠制御作用

昆虫は、卵、幼虫、蛹、そして成虫とさまざまな発育ステージで休眠する。カイコと同様その繭糸が織物に利用されている天蚕 (*Antheraea yamamai*) は卵期で休眠越冬する。この休眠はカイコ卵の場合と異なり、すでに卵殻中に幼虫の体が形成されている前幼虫態休眠である。従来、この休眠覚醒には 60 日以上冷蔵が必要であり、これ以外の方法では休眠を破ることができなかった。岩手大学の鈴木らはこの前幼虫態休眠を KK-42 によって覚醒できることを発見し、KK-42 を用いた天蚕の人工孵化法を確立している³⁵⁻³⁷⁾。

構造と休眠覚醒活性の関係を Table 5 に示した³⁸⁾。卵に化合物 20 μg を塗布して 25°C に保存した場合の活性を示しており、無処理ではまったく休眠覚醒は起きなかった。一般に、カイコに対して早熟変態誘起活性が高い化合物が高い休眠覚醒率を示し、処理後 20 日以内に孵化を誘導した。また、卵殻を取り除いて KK-42 を処理すると 0.05 μg で休眠を破ることができた。

この休眠覚醒前後において、脱皮ホルモン量の変動がないこと、また、メソプレンや JHI を処理しても休眠に影響を与えないことなどから、休眠制御には脱皮ホルモンと JH が関与していないことが確認されている。鈴木らはこの前幼虫態休眠制御機構には二種類の新しいペプチドホルモン、すなわち、発育を抑えて休眠状態を保つ抑制因子と休眠を破る成熟因子が存在することを明らかにしている³⁹⁻⁴¹⁾。

また、天蚕と同様に前幼虫態休眠を行なう森林害虫マイ

Table 5 Effects of imidazoles on the termination of diapause in eggs of the silkmoth, *Antheraea yamamai*.

Compound	Hatchability (%)	Average days required for hatching (day $\pm$ S. D.)
KK-42	92.0	14.0 $\pm$ 4.3
KK-135	89.5	15.9 $\pm$ 4.3
KK-110	86.7	15.5 $\pm$ 5.7
KK-80	86.7	15.3 $\pm$ 3.0
KK-80	85.0	9.2 $\pm$ 2.0
85.0	11.1 $\pm$ 2.3
	40.0	28.3 $\pm$ 2.1
	10.0	27.0

マイガに対しても、KK-42 は覚醒作用を示したことから、上記イミダゾール化合物は前幼虫態で休眠する昆虫に対して普遍的に覚醒作用を示すものと思われる⁴²⁾。

P450 阻害性イミダゾール化合物が休眠覚醒作用を有することは非常に興味深い。休眠中は酸素消費量が極端に低下している状態である。分子状酸素を利用して基質に 1 原子の酸素を添加する P450 が休眠制御に関与している可能性も考えられる。イミダゾール化合物の休眠覚醒作用に端を発して、前幼虫態休眠機構の解明が進められている。

一方、カイコは胚発育の初期に休眠に入る。カイコ野生品種「大造」は卵の時期の環境により休眠性が決定される。暗黒下低温で孵化させた場合、成長した雌の蛾は交尾後非休眠卵を産む。逆に、光照射下高温で孵化させた場合、蛹時期に休眠ホルモンが分泌され、成虫は休眠卵を産む。以上のように、このカイコでは卵の時期の環境情報が蛹まで維持され、ホルモン制御系へ伝達されていることが知られている。最近、この休眠卵を産むよう運命づけられている大造カイコの 5 齢幼虫に KK-42 を処理すると、非休眠卵を産む蛾が出現することを発見した。5 齢脱皮後 48 時間に処理した場合にもっとも効果的であった⁴³⁾。現在、さらに有効な化合物を検索中であり、休眠性を完全に変換できるような活性物質を開発できれば、環境因子の情報受容、維持そしてホルモン制御系の作動といった休眠に関する情報伝達機構の解明に貢献できると思われる。

殺虫共力作用

種々の 1-置換および 4-置換イミダゾールが薬物代謝に関与する P450 を阻害し、カーバメイト系殺虫剤に対して

共力作用を示すことが報告されている⁴⁾。そこで、数種の1,5-二置換イミダゾール化合物について感受性イエバエを用いて、ピレスロイド系殺虫剤ペルメトリンに対する共力効果を検討したところ、KK-42, TH-27, LN-32等1,5-二置換イミダゾール類にはほとんど共力作用は認められなかった。この共力作用を指標として合成探索した結果、1-(4-octyloxyphenyl)imidazole (KW-10) および 1-(4-benzyloxyphenyl)imidazole (AT-1) にピペロニルブトキシドと同等の活性があることがわかった。化合物 AT-1 のベンジル基ベンゼン環上にフッ素や塩素原子を導入すると活性は低下した(渡辺・桑野:未発表)。

植物白化作用

筆者らが1,5-二置換イミダゾール化合物の昆虫成育制御作用について検討していた頃、植物生長調節剤として、ジベレリン生合成経路のP450を阻害するアゾール系化合物が精力的に研究されていた。そこで、レタスやイネの実生試験により、1,5-二置換イミダゾール化合物の植物生長調節作用を調べた⁴⁴⁾。数種の化合物に下胚軸の伸長抑制活性が認められたものの、当時開発されていた paclobutrazol に比べるときわめて弱いものであった。しかし、1-butyl-5-phenylimidazole や 1-butyl-5-(4-methoxyphenyl)imidazole 等が顕著な幼根伸長促進作用を示し、0.1 ppm でも無処理区の1.5倍以上根を伸長させることがわかった⁴⁵⁾。

これらの生物検定中、イミダゾール化合物に白化作用があることを見出した⁴⁶⁻⁴⁸⁾。構造と活性の関係を検討した結果、次のことが明らかとなった。(1) 1位と5位の置換基が必須であること。(2) 1位の置換基ではエチルとプロピル基のみが高い活性を示す。(3) 5位の置換基として、4-クロロフェニル基、4-(3-メチルベンジル)フェニル基、フェネチル基、スチリル基等がよいこと。代表的化合物 5-[4-(3-methylbenzyl)phenyl]-1-propylimidazole (NY-39) と 5-(4-chlorophenyl)-1-propylimidazole (NY-70) は葉中のクロロフィル含量とともにカロチノイド含量を顕著に減少させ、β-カロチン生合成中間体であるフィトエンを無処理区に比べ5~15倍ほど蓄積させた。このことは他のカロチノイド生合成阻害剤と同様、フィトエン脱水素酵素の阻害と考えられるが、NY-39 と NY-70 処理ではフィトエン蓄積量が異なり、他の作用機構も考えられる。1,5-二置換イミダゾール化合物のみが白化作用を示したことから、ある種のP450を阻害している可能性も否定できない。

NY-39

NY-70

おわりに

チトクローム P450 阻害活性が知られているイミダゾール化合物を利用して分子設計を行ない、新規昆虫成育制御剤開発のためのリード化合物として、また、昆虫の変態および休眠制御機構解明のための有力な分子プローブとして、幼若ホルモン生合成阻害剤、脱皮ホルモン生合成阻害剤、脱皮阻害剤、休眠制御物質等を提供することができた。これらの作用機構において、すべて P450 が関与しているかどうか現在のところわからないが、1,5-二置換イミダゾール誘導体であることから、その可能性は高いと考えられる。P450 はきわめて多彩で重要な反応を担っており、それらをターゲットとして新しい薬剤が開発されつつある。今後、それぞれの P450 分子種の基質認識部位の構造が明らかにされることにより、特異的阻害剤の開発がさらに進むものと思われる。より合理的な分子設計による新しい生理活性物質の開発を期待したい。

本研究の遂行にあたり、終始ご指導、ご鞭撻を賜った九州大学名誉教授江藤守総先生、同名誉教授谷口栄二先生に心から感謝の意を表します。研究者の道へ導いていただきました元九州大学教授前川一之先生に深く感謝致します。本研究は優れた昆虫生化学者との共同研究によって行なわれたものであり、とくに、岩手大学鈴木幸一教授、名古屋大学山下興亜教授、アリゾナ大学 Feyereisen 教授に心から感謝致しますとともに、栄誉を分かち合いたいと思います。また、ご協力いただいた関係者に謝意を表します。最後に引用文献中に記載させていただいた協力者をはじめ、九州大学農学部農芸化学科農薬化学講座の皆さまに心からお礼申し上げます。

引用文献

- 1) G. B. Staal: *Ann. Rev. Entomol.* **31**, 391 (1986)
- 2) D. A. Schooley & F. D. Baker: "Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry and Pharmacology," ed. by G. A. Kerkut & L. I. Gilbert, Pergamon Press, Oxford, pp. 363-389, 1985
- 3) B. D. Hammock & S. M. Mumby: *Pestic. Biochem. Physiol.* **9**, 39 (1978)
- 4) C. F. Wilkinson, K. Hetnarski & L. J. Hicks: *Pestic. Biochem. Physiol.* **4**, 299 (1974)
- 5) P. R. Ortiz de Montellano & N. O. Reich: "Cytochrome P-450," ed. by P. R. Ortiz de Montellano, Plenum Press, New York, pp. 273-314, 1986
- 6) E. Kuwano, R. Takeya & M. Eto: *Agric. Biol. Chem.* **47**, 921 (1983)
- 7) E. Kuwano, R. Takeya & M. Eto: *Agric. Biol. Chem.* **48**, 3115 (1984)

- 8) E. Kuwano, R. Takeya & M. Eto : *Agric. Biol. Chem.* **49**, 483 (1985)
- 9) E. Kuwano, T. Hisano & M. Eto : *Agric. Biol. Chem.* **55**, 2999 (1991)
- 10) G. E. Pratt, E. Kuwano, D. E. Farnsworth & R. Feyer-eisen : *Pestic. Biochem. Physiol.* **38**, 223 (1990)
- 11) G. C. Unnithan, J. F. Andersen, T. Hisano, E. Kuwano & R. Feyer-eisen : *Pestic. Sci.* **43**, 13 (1995)
- 12) J. F. Andersen, M. Ceruso, G. C. Unnithan, E. Kuwano, G. D. Prestwich & R. Feyer-eisen : *Insect Biochem. Mol. Biol.* **25**, 713 (1995)
- 13) S. Asano, E. Kuwano & M. Eto : *Appl. Entomol. Zool.* **19**, 212 (1984)
- 14) S. Asano, E. Kuwano & M. Eto : *J. Pesticide Sci.* **9**, 503 (1984)
- 15) S. Asano, E. Kuwano & M. Eto : *Appl. Entomol. Zool.* **21**, 63 (1986)
- 16) S. Asano, E. Kuwano & M. Eto : *Appl. Entomol. Zool.* **21**, 305 (1986)
- 17) S. Asano, E. Kuwano & M. Eto : *Appl. Entomol. Zool.* **22**, 424 (1987)
- 18) E. Kuwano, M. Kikuchi & M. Eto : *Agric. Biol. Chem.* **52**, 1619 (1988)
- 19) E. Kuwano, M. Kikuchi & M. Eto : *J. Fac. Agric. Kyushu Univ.* **35**, 35 (1990)
- 20) K. Kadono-Okuda, E. Kuwano, M. Eto & O. Yamashita : *Dev. Growth & Differ.* **29**, 527 (1987)
- 21) D. Koga, T. Funakoshi, H. Fujimoto, E. Kuwano, M. Eto & A. Ide : *Insect Biochem.* **21**, 277 (1991)
- 22) K. Kadono-Okuda, E. Kuwano, M. Eto & O. Yamashita : *Appl. Entomol. Zool.* **22**, 370 (1987)
- 23) O. Yamashita, K. Kadono-Okuda, E. Kuwano & M. Eto : *Agric. Biol. Chem.* **51**, 2295 (1987)
- 24) J.-P. Roussel, M. Kiuchi, H. Akai & E. Kuwano : *C.R. Acad. Sci. Paris, Serie III*, **305**, 141 (1987)
- 25) J. P. Roussel, K. Mojtahe-Zadeh, R. Lanet, E. Kuwano & H. Akai : *Arch. Int. Physiol. Biochem.* **97**, 511 (1989)
- 26) E. Kuwano, T. Hisano, M. Sonoda & M. Eto : *Biosci. Biotech. Biochem.* **58**, 1309 (1994)
- 27) M. Sonoda, E. Kuwano & E. Taniguchi : *J. Pesticide Sci.* **20**, 325 (1995)
- 28) K. Shimazu, M. Shimizu, K. Suzuki & E. Kuwano : *J. Pesticide Sci.* **21**, 337 (1996)
- 29) T. D. Jarvis, F. G. P. Earley & H. H. Rees : *Pestic. Biochem. Physiol.* **48**, 153 (1994)
- 30) Y. Tanaka & S. Takeda : *Naturwissenschaften* **80**, 131 (1993)
- 31) B. Darvas, H. H. Rees, N. Hoggard, M. H. Tag El-Din, E. Kuwano, I. Belai & T. Timar : *Pestic. Sci.* **36**, 135 (1992)
- 32) B. Darvas, E. Kuwano, M. Eto, M. H. Tag El-Din & T. Timar : *Agric. Biol. Chem.* **54**, 3045 (1990)
- 33) E. Kuwano & M. Eto : *Agric. Biol. Chem.* **50**, 2919 (1986)
- 34) E. Kuwano, T. Hisano, M. Eto, K. Suzuki, G. C. Unnithan & W. S. Bowers : *Pestic. Sci.* **34**, 263 (1992)
- 35) 談恩 智・鈴木幸一・桑野栄一・阿部信治・栗原守久 : *日蚕雑* **55**, 305 (1986)
- 36) K. Suzuki, T. Fujisawa, M. Kurihara, S. Abe & E. Kuwano : *Wild Silkmoth* '88, 79 (1989)
- 37) 鈴木幸一・桑野栄一 : *化学と生物* **32**, 221 (1994)
- 38) E. Kuwano, T. Fujisawa, K. Suzuki & M. Eto : *Agric. Biol. Chem.* **55**, 1185 (1991)
- 39) K. Suzuki, T. Minagawa, T. Kumagai, S. Naya, Y. Endo, M. Osanai & E. Kuwano : *J. Insect Physiol.* **36**, 855 (1990)
- 40) K. Suzuki, S. Naya, T. Kumagai, T. Minagawa, T. Fujisawa & E. Kuwano : *Wild Silkmoth* '89-'90, 73 (1991)
- 41) K. Suzuki, T. Kumagai, S. Naya & E. Kuwano : *Int. J. Wild Silkmoth & Silk* **1**, 60 (1994)
- 42) K. Suzuki, T. Nakakura, T. Yanbe, M. Kurihara & E. Kuwano : *J. Insect Physiol.* **39**, 107 (1993)
- 43) C. Wu, K. Suzuki & E. Kuwano : *Biosci. Biotech. Biochem.* **60**, 1201 (1996)
- 44) M. Kikuchi, E. Kuwano & M. Eto : *J. Fac. Agric. Kyushu Univ.* **34**, 397 (1990)
- 45) M. Kikuchi, E. Kuwano, Y. Nakashima & M. Eto : *J. Fac. Agric. Kyushu Univ.* **36**, 83 (1991)
- 46) M. Kikuchi, E. Kuwano, Y. Nakashima & M. Eto : *Biosci. Biotech. Biochem.* **56**, 161 (1992)
- 47) N. Yamada, E. Kuwano, M. Kikuchi & M. Eto : *Biosci. Biotech. Biochem.* **56**, 1943 (1992)
- 48) N. Yamada, E. Kuwano & M. Eto : *Z. Naturforsch.* **48c**, 301 (1993)

Society Awards 1997

(on prominent achievement)

Studies on the Synthesis and Biological Activity of Imidazole Compounds

In insects, the growth and development are known to be controlled by at least three major types of hormones,

namely the prothoracicotrophic hormone (PTTH), the ecdysteroids and the juvenile hormones (JH). PTTH

secreted from the brain stimulates the prothoracic gland to synthesize and secrete ecdysteroids which initiate the molting. When the amounts of JH secreted from the corpora allata which is also regulated by the brain is high in the larval stage, a larval-larval molt is induced, whereas secretion of ecdysteroids in the presence of a reduced or absent titer of JH results in a larval-pupal or larval-adult molt, namely metamorphosis. Disturbing the normal hormone balance causes crucial disorder in the growth and development of insects. Insect growth regulators, whose mode of action are related to molting, metamorphosis, and diapause characteristic to the life cycle of insects, are thought to have fewer harmful effects on non-target species. In this article, the design, various insect growth regulating activities, and structure-activity relationships of a novel series of imidazole compounds are presented.

DESIGN OF INHIBITORS OF JH BIOSYNTHESIS

Since JH is involved in many physiological functions in insects such as metamorphosis, reproductive and embryogenic events, diapause, and behavior, compounds with anti-JH activity offer a prospective method for selective insect control as well as an effective tool in studies of insect physiology. An attempt was made to find out anti-JH agents that interfere with JH biosynthesis which is sesquiterpenoid formation *via* mevalonate or homomevalonate in the corpora allata. The last two enzymatic steps in JH biosynthesis are *O*-methyl transferase and epoxidase, which are the most insect-specific enzymatic processes. Blocking these steps is much preferable with regard to selective toxicity. The epoxidase is a microsomal cytochrome P450 linked enzyme, therefore, the prototype of this class of inhibitor, imidazole derivatives, was designed on the basis of a capacity to bind preferentially a heme iron atom of P450 active site. A number of substituted imidazoles with a JH-like skeleton such as a geranyl, phenoxyphenyl or benzyloxyphenyl group, were synthesized and tested as inhibitors of JH biosynthesis.

Various 1-alkyl-5-(3-benzyloxyphenyl)imidazoles inhibited *in vitro* JH III biosynthesis in isolated corpora allata from the cockroach, *Diploptera punctata*, and caused a significant accumulation of methyl farnesoate, suggesting an inhibition of methyl farnesoate epoxidase. These imidazoles were highly potent, with IC_{50} values of less than 100 nM. A radiolabeled and photoactivatable benzophenone group was introduced into 5-(3-benzyloxyphenyl)-1-isobutylimidazole (TH-27), one of the best inhibitor, to label the hydrophobic substrate binding site of methyl farnesoate epoxidase. This compound selectively labeled a protein of *ca.* 55 kDa in corpora allata of the cockroach.

PRECOCIOUS METAMORPHOSIS-INDUCING ACTIVITY AND ANTI-ECDYSTEROID ACTIVITY

A large number of 1, 5-disubstituted imidazoles were evaluated against *Bombyx mori* larvae for their activity to induce precocious metamorphosis which is recognized as a JH-deficiency symptom. Representative compounds showing marked activity, 1-benzyl-5-[(*E*)-2, 6-dimethyl-1, 5-heptadienyl]imidazole (KK-42), 5-(2-ethoxyphenyl)-1-neopentylimidazole (KK-110), 5-(3-allyloxyphenyl)-1-isobutylimidazole (TH-58) and 5-(2-allyloxyphenyl)-1-isobutylimidazole (TH-68) have been found out. No correlation was observed between the ability of these imidazoles to cause precocious metamorphosis in *B. mori* and the degree of inhibition of JH synthesis *in vitro* in *D. punctata*. KK-42 was most active in *B. mori*, but showed low activity in inhibition of JH synthesis in *D. punctata*. TH-27 was the best inhibitor of JH synthesis in *D. punctata* but 45-fold less active than KK-42 in *B. mori*.

Precocious pupation can be induced by allatectomy at the time of the third ecdysis. There was a quite difference in critical times between allatectomy and KK-42 treatment for induction of precocious pupation in the silkworm. KK-42 also delayed significantly the pigmentation of compounds eyes and adult emergence when applied to the newly ecdysed pupae of the silkworm. These results suggested that KK-42 caused temporary inhibition of ecdysteroid secretion rather than JH secretion. In fact, KK-42 was found to inhibit ecdysteroid synthesis *in vitro* in the prothoracic glands of *B. mori* and its I_{50} value was approximately 1 nM. When KK-42 was applied to the 4th instar larvae of the silkworm, ecdysteroid titers in the hemolymph were remarkably reduced and remained at a trace level for at least 6 days, but begin to increase thereafter.

The activity of 1, 5-disubstituted imidazoles to cause precocious pupation was completely counteracted by the simultaneous application of tebufenozide (RH-5992), a non-steroidal ecdysteroid agonist as well as by the dietary administration of 20-hydroxyecdysone. This fact also indicates that these imidazoles temporarily depressed the ecdysteroid titer in the larval hemolymph to induce precocious pupation. Although the precise mode of action of imidazoles including KK-42 is still unknown, cytochrome P450 monooxygenases involved in the ecdysteroid biosynthesis pathways from phytosteroids in insects might be the most possible target. KK-110 has been found to inhibit P450-dependent microsomal ecdysone 20-monooxygenase of fat bodies in the fleshfly larvae.

INSECTICIDAL ACTIVITY

None of 1, 5-disubstituted imidazoles induced pre-co-

cious pupation in the large milkweed bug, *Oncopeltus fasciatus*, but several compounds showed delayed toxicity; the treated nymphs died during or immediately after the molt. Among the compounds tested, the 1-isobutyl analogs such as 1-isobutyl-5-(3-phenoxyphenyl)-imidazole (TH-32) and TH-58 showed high activity, whereas KK-42 did not cause any molting abnormalities even at high doses. When TH-32 and TH-58 were applied to the newly molted 5th instars at 500 $\mu\text{g}/\text{dish}$, all treated nymphs were unable to shed their larval exuviae and failed to ecdyse to adults. There was a lack of correlation between the ability of 1,5-disubstituted imidazoles to cause precocious metamorphosis in *B. mori* and delayed toxicity in *O. fasciatus*. TH-32 and TH-58 also showed considerably high insecticidal activity against the larvae of the brown rice planthopper, *Nilaparvata lugens*.

REGULATION OF DIAPAUSE

Diapause of insects is known to occur in various developmental stages such as egg, larva, pupa or adult, and is controlled by central endocrine system. The silkworm, *Antheraea yamamai*, and the gypsy moth, *Lymantria dispar japonica*, enter diapause at a late stage of embryonic development, just after the formation of pharate first-instar larvae. It had not been found possible to break this diapause by artificial means other than by chilling the eggs for a few months. Suzuki *et al.* have recently found that KK-42 and a number of imidazoles completely terminated the diapause of the silkworm and gypsy moth. In this case neither JH nor ecdysteroid was

involved in diapause termination. A new endocrine mechanism responsible for the regulation of the diapause of pharate first-instar larvae, the presence of a repressive factor and a maturation factor, is suggested.

The injection of KK-42 into fifth instar larvae of the silkworm (Daizo strain), which had been destined to produce diapause eggs, induced the moths to lay non-diapause eggs. The critical period for KK-42 injection in the induction of non-diapause eggs was 24 to 72 hr after the fourth ecdysis. KK-42 may disturb some chemical messages for diapause induction that are stored during the larval stages, which are transduced from the environmental signals received during the embryonic stages.

BLEACHING ACTIVITY

1-Ethyl- and 1-propyl-5-substituted imidazoles have been found to cause distinct chlorosis of lettuce seedlings. Both substituents at the 1- and 5-position of the imidazole ring were indispensable for this activity. Of the series of compounds tested, 5-(4-chlorophenyl)-1-propylimidazole and 5-[4-(3-methylbenzyl)phenyl]-1-propylimidazole showed the highest activity. These compounds markedly reduced β -carotene content as well as chlorophyll in plants. Inhibition of β -carotene formation was accompanied by an accumulation of some amounts of phytoene, a precursor of β -carotene. Since only 1,5-disubstituted imidazoles showed bleaching activity, it is reasonable to postulate that these imidazoles may inhibit a P450 system involving chlorophyll formation or carotenoid biosynthesis.