

学 位 論 文 題 名

ドーパミンによる昆虫の変態、及び発育の調節に関する研究

学位論文内容の要旨

内部寄生蜂は、寄生によって宿主昆虫の成長に著しい影響を及ぼす。時には、宿主の発育を早めることもあるが、多くの場合、寄生によって宿主の発育は遅れ、最終的には、全ての宿主が殺されてしまう。寄生蜂が捕食寄生者として分類される由縁である。こうした寄生蜂による宿主昆虫の発育制御に関しては、特に、宿主として鱗翅目幼虫を用い、過去約20年間活発に生理・生化学的研究がなされてきた。

最近、早川は、カリヤコマユバチによって寄生された宿主アワヨトウ幼虫血清からJHE活性を *in vivo* で抑制する生理活性ペプチドを発見し、単離・構造決定を行った。この発育阻害ペプチド (Growth-blocking peptide, GBP) と命名された生理活性ペプチドは、注射によってアワヨトウは勿論、他の鱗翅目幼虫の発育をも阻害することが明らかになっている (Hayakawa and Yasuhara, 1995)。しかしながら、GBP活性発現の分子機構については、全く明らかになっていない。そこで、第1章、第1節では、このGBPの作用機序を調べた。ゴキブリにおいて、生体アミンが神経ペプチドの分泌を促す例が報告されていたので、我々は、まず、アワヨトウ幼虫血中生体アミンに着目し、寄生による影響を調べた。その結果、血中、及び神経節ドーパミン濃度が寄生によって有意に高まること、さらに、この上昇は、GBPの血中濃度の上昇に起因することが明らかになった。また、ドーパミン及びドーパミンのアゴニストを未寄生幼虫に注射すると、顕著な幼虫発育阻害が観察された。これらの結果から、寄生によって高められた血中のGBPは、血中及び神経節のドーパミン濃度を上昇させ、幼虫の神経内分泌系に作用することによって、幼虫から蛹への正常な変態を阻止することが明らかになった。このように寄生による蛹化の阻害にはドーパミンが重要な役割を果たしているという結論に至ったが、ドーパミンの合成部位や分泌機構は全く明らかになっていない。

第2節では、この血中ドーパミンの合成部位及び合成のキーエンザイムの同定を試みた。その結果、外皮中のドーパ脱炭酸化酵素 (DDC) が寄生によって顕著に活性上昇することが確認できた。さらに、この外皮DDC活性上昇に伴うドーパミン合成の増加、さらに、合成量増加に伴う血中への分泌が血中ドーパミン濃度上昇を誘起することを証明した。従って、血中ドーパミンは、主に外皮から分泌され、外皮中のDDCが合成のキーエンザイムとなっていると結論した。また、第3節では、この寄生による外皮DDC活性の上昇が遺伝子発現レベルでの変化によるものかを確認した。寄生された幼虫と未寄生の幼虫の外皮DDC mRNAの発現量を比較したところ、酵素活性同様に、寄生された幼虫の外皮の方がDDCの転写活性が高いことが示された。さらに、このDDC遺伝子発現上昇は、GBPによって誘起されることを、*in vivo* 及び *in vitro* で証明した。従って、寄生による宿

主幼虫の血中ドーパミン濃度上昇は、以下のように説明される。寄生によって高められた血中GBPが、外皮DDC遺伝子の転写活性を上げることによって酵素活性上昇を誘導し、外皮のドーパミン濃度を上昇させる。そして、分泌を促すことによってドーパミンの血中濃度が高められる。以上、第1章での研究によって、寄生蜂による寄生に伴う昆虫の発育阻害は、GBP-ドーパミン系の関与によるものであることを明らかにした。この事実を踏まえ、第2章では、GBP-ドーパミン系の生理機能をより一般化させるべく、昆虫の発育停止とこの系の関係を休眠という現象について検証した。この研究には、蛹休眠性を持ち、しかも、アワヨトウと近縁種であるヨトウガを用いた。

蛹休眠調節に関する内分泌学的研究は、古くから詳しくなされてきた。それらの研究から、蛹休眠は脳-前胸腺系の不活性化により誘導され、活性化により覚醒するということが明らかになっている。しかし、濃度や日長時間といった外部環境と休眠誘導を結び付けるキーサブスタンスは？という問いには全く答えられない。

そこで、第2章では、GBP-ドーパミン系が休眠誘導に関与しているのではないかという仮説を立て、それを確かめた。蛹休眠をすることで知られるヨトウガを用い、各組織中のドーパミン濃度を休眠と非休眠を運命づけられた前蛹・蛹で比較したところ、調べた全ての組織（血液・外皮・脳・神経節）中で休眠昆虫の方が数倍高いことがわかった。さらに、外皮のDDC活性は、寄生された場合と同様に、休眠に運命付けられた場合にも上昇する。そして、この活性上昇はDDC遺伝子の転写活性上昇によるものであることが明らかになった。従って、このDDC活性上昇が外皮及び血中ドーパミン濃度上昇を誘導していることになる。また、終齢幼虫期にL-DOPAを給餌し蛹体内各組織（特に血中及び中枢神経細胞内）におけるドーパミン濃度を人為的に高めることによって、22°Cの長日条件下において蛹休眠誘導に成功した。勿論、同じ長日条件で通常の人工飼料を与えたコントロール蛹は、全て非休眠になった。これらの結果は、前述したGBP-ドーパミン系の昆虫休眠誘導への直接の関与を強く示唆する結果である。

従って、これら一連の研究は、GBP-ドーパミン系が、昆虫生活環においてしばしば観察される短期・長期の発育停止を調節する主要因子であるという作業仮説を実証した結果と位置付けられる。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 芦 田 正 明
副 査 教 授 木 村 正 人
副 査 助 教 授 早 川 洋 一

学 位 論 文 題 名

ドーパミンによる昆虫の変態、及び発育の調節に関する研究

内部寄生蜂は、寄生によって宿主昆虫の正常な発育を阻害する。カリヤコマユバチによって寄生された宿主アワヨトウ幼虫は、幼虫から蛹への変態が阻害される。この寄生バチの寄生によって、発育阻害を受けた宿主アワヨトウ幼虫血液から単離・精製された生理活性物質が、発育阻害ペプチド(growth-blocking peptide, GBP)である。数10pmolの精製GBPを健康な未寄生アワヨトウ終齢幼虫に注射すると、体重の増加は鈍り、蛹への変態も数日間遅れる。本研究は、こうしたGBPの発育阻害活性発現の分子機構について解析を行い、昆虫発育調節におけるGBPの生理的意義を種々の角度から実証している。

第1章、第1節では、このGBPの作用機序を調べた結果について論じている。まず、アワヨトウ幼虫血中生体アミンに着目し、寄生による影響を調べた。その結果、血中、及び神経節ドーパミン濃度が寄生によって有意に高まること、さらに、この上昇は、GBPの血中濃度の上昇に起因することを明らかにした。また、ドーパミン及びドーパミンのアゴニストの未寄生幼虫への注射実験から、ドーパミンによる顕著な幼虫発育阻害を観察している。これらの結果から、GBPによる宿主幼虫発育阻害現象は、GBPによって高められた血中ドーパミンが、幼虫の神経内分泌系に作用することによって、宿主幼虫の正常な発育を阻害すると結論づけている。

第2節では、この血中ドーパミンの合成部位及び合成のキーエンザイムの同定を試みている。その結果、外皮中のドーパ脱炭酸化酵素(DDC)が寄生によって顕著に活性上昇することを明らかにした。さらに、この外皮DDC活性上昇に伴うドーパミン合成の増加、さらに、合成量増加に伴う血中への分泌が血中ドーパミン濃度上昇を誘起することを証明した。従って、血中ドーパミンは、外皮中のDDCがキーエンザイムとなって合成され、外皮から主に分泌されていると結論した。

また、第3節では、この寄生による外皮DDC活性の上昇が遺伝子転写レベルでの変化によるものかを確かめている。まず、寄生された幼虫と未寄生の幼虫の外皮DDC mRNA発現量を比較し、寄生された幼虫の外皮の方が、酵素活性同様にDDC転写活性が高いことを示した。さらに、このDDC遺伝子発現上昇は、GBPによって誘起されることを、*in vivo*及び*in vitro*で証明した。また、GBPによるDDC転写活性上昇の機構には、Ca²⁺を介した情報伝達系が関与している可能性を示している。以上、第1章での研究によって、寄生蜂による寄生に伴う昆虫の発育阻害は、GBP・ドーパミン系の関与によるものであることを明らかにした。

第2章では、GBP・ドーパミン系と休眠誘導との関わりについて検証している。未寄生幼虫の発育に伴う血中ドーパミン濃度変化の測定から、そのピークが各脱皮直

前の“眠”の時期に同調していることを発見した。眠は、新しい表皮を合成する時期であり、この時期の激しい活動は個体自体に危険な状態も招きかねない。従って、この時期の昆虫は一般に、静止状態を保つことが知られている。そこで、眠を一種の発育停止期間と考え、寄生による宿主発育阻害同様、GBP-ドーパミン系が眠の状態を誘導しているものと推論した。この仮説をさらに一般化させるべく、GBP-ドーパミン系の“休眠”誘導への関与の可能性を検討した。この研究には、蛹休眠性を持ち、しかも、アワヨトウと近縁種であるヨトウガを用いている。

蛹休眠調節に関する内分泌学的研究は、古くから詳しくなされてきた。それらの研究から、蛹休眠は脳-前胸腺系の不活性化により誘導され、活性化により覚醒するということが明らかになっている。しかし、温度や日長時間といった外部環境と休眠誘導を結び付けるキーサブスタンスについては、全く分かっていなかった。

そこで、まず、ドーパミンが休眠誘導に関与しているのではないかという仮説を立て、それを確かめている。各組織中のドーパミン濃度を休眠と非休眠を運命づけた前蛹・蛹で比較したところ、調べた全ての組織（血液・外皮・脳・神経節）中で休眠昆虫の方が数倍高いことを示した。さらに、外皮ドーパミン合成のキーエンザイムであるDDCの活性は、休眠に運命づけた場合に上昇する。そして、この活性上昇はDDC遺伝子の転写活性上昇によるものであることを明らかにした。

また、休眠を運命づけることによって、ヨトウガの各組織内で高まることが明らかになったドーパミンが、直接休眠誘導に関与し得るかどうかを確かめている。まず、蛹体内各組織（特に中枢神経内）におけるドーパミン濃度を人為的に高めることを試みた。様々な方法を試した結果、終齢幼虫期におけるL-DOPA給飼が、最も確実に各組織中のドーパミン濃度を高められることを示した。さらに、それらL-DOPAを給飼したヨトウガの70%が22℃の長日条件下において休眠状態になることを示した。勿論、同じ長日条件で通常の人工飼料を与えたコントロール蛹は、全て非休眠であった。これらの結果から、前述したGBP-ドーパミン系が、昆虫休眠誘導に直接関与していることを明らかにした。

以上の結果より、GBP-ドーパミン系が、昆虫生活環においてしばしば観察される短期・長期の発育停止を調節する主要因子であるという作業仮説を実証できたと結論づけている。特に、昆虫において、ドーパミンの生理作用に関する研究は著しく遅れており、今後のより詳細な分子レベルでの解析が、昆虫神経内分泌学に新しい1ページを開くことが大いに期待される。

審査員一同は、これらの成果を高く評価し、また申請者は研究者として誠実かつ熱心であると考え、大学院課程における研鑽や単位取得なども併せ申請者が博士（地球環境科学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。