

学 位 論 文 題 名

Studies on the insecticidal mechanism of
a metalloprotease-like insecticide

(殺虫タンパク質とその殺虫メカニズムに関する研究)

学位論文内容の要旨

寄生バチは、宿主体内で十分に成長し終り体外へ脱出する前に宿主を殺してしまうことはない。しかし、自然界において宿主が細菌やカビ、ウイルスなどに感染していた場合には寄生者も宿主と共に死亡していることはしばしば観察される。

本研究では、腸内バクテリアの一種である *Serratia marcescens* とポリドナウイルス（アワヨトウ幼虫を宿主とする寄生バチ、カリヤコマユバチの共生ウイルス）の二重感染によって宿主アワヨトウの死亡率が上昇する原因を特定するとともにその個体死のメカニズムを明らかにすることを目的とした。死亡の原因物質を同定するために、二重感染によって瀕死状態にあるアワヨトウ幼虫の体液を集め、健康な幼虫に注射した。その結果、死亡率が約90%にも達したことから殺虫活性は体液に存在することが明らかになった。この殺虫活性を持つ体液から殺虫因子精製を行い、この殺虫因子の単離に成功した。精製した殺虫因子は分子量 57kDa のタンパク質であることが判明し、その殺虫活性は50%致死量 (LD₅₀) が 13pmol/larva と非常に強力なものであることが分った。さらにこの殺虫タンパク質の性状を知るために1次構造解析を行った。その結果、殺虫タンパク質はメタロプロテアーゼの保存領域を含み、相同性解析の結果から *S. marcescens* の分泌するメタロプロテアーゼ様タンパク質であることが示唆された。次に、この殺虫タンパク質の殺虫機構を明らかにするために、殺虫タンパク質を注射したアワヨトウ体内の変化を調べた。顕著な変化が生じたのは血中ドーパミン濃度で、BSA を注射した対照群と比較して十数倍高いドーパミンが検出された。さらに、脳内のドーパミンにおいても濃度上昇が観察された。血液のドーパミンは表皮由来であり、このドーパミンの放出は昆虫サイトカインである GBP(Growth-Blocking Peptide)によって調節されること

が明らかになった。また、血中 GBP 濃度上昇は殺虫タンパク質による脂肪体内の proGBP プロセッシング酵素活性上昇によってもたらされるものと結論付けた。また、脳内ドーパミンの濃度上昇は、³H-Dopamine による取り込み実験によって血中ドーパミンが脳内へ流入するために起きるものと結論付けた。このような変化は脳に何らかの障害が生じた為に起こるものと考え、脳を透過型電子顕微鏡を用いて観察を行った。脳はその外側にある基底膜の厚さが薄く、基底膜の密度も小さくなっていた。さらに、脳内の神経細胞においてアポトーシス像が多数観察された。

本研究の結果、メタロプロテアーゼ様殺虫タンパク質を注射されたアワヨトウ幼虫では、血中ドーパミンさらに脳内ドーパミン濃度の上昇が起こり、この脳内ドーパミンの高濃度状態がもたらす神経細胞のアポトーシスが死亡の決定的要因と結論付けた。また、血中ドーパミン上昇には、昆虫サイトカインである GBP の寄与が明らかになり、昆虫の細菌感染に対する新規な反応経路であることを示している。このことは昆虫病理や昆虫の生体防御機構を考慮する上で重要な知見であると考えられる。

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

Studies on the insecticidal mechanism of a metalloprotease-like insecticide

(殺虫タンパク質とその殺虫メカニズムに関する研究)

寄生バチは、宿主体内で十分に成長し終り体外へ脱出する前に宿主を殺してしまうことはない。しかし、自然界において宿主が細菌やカビ、ウイルスなどに感染していた場合には寄生者も宿主と共に高い死亡率を示すことは生態学的観察から良く知られている事実である。

本研究は、腸内バクテリアの一種である *Serratia marcescens* とポリドナウイルス（アワヨトウ幼虫を宿主とする寄生バチ、カリヤコマユバチの共生ウイルス）の二重感染によって宿主アワヨトウの死亡率が上昇する原因を特定するとともにその個体死のメカニズムを明らかにすることを目的に進められた。死亡の原因物質を同定するために、二重感染によって瀕死状態にあるアワヨトウ幼虫の体液を集め、健康な幼虫に注射した。その結果、死亡率が約90%にも達したことから殺虫活性は体液に存在することが明らかになった。この殺虫活性を持つ体液から殺虫因子精製を行い、この殺虫因子の単離に成功した。精製した殺虫因子は分子量 57kDa のタンパク質であることが判明し、その殺虫活性は 50%致死量 (LD₅₀) が 13pmol/larva と非常に強力なものであることが分った。さらにこの殺虫タンパク質の性状を知るために1次構造解析を行った。その結果、殺虫タンパク質はメタロプロテアーゼの保存領域を含み、相同性解析の結果から *S. marcescens* の分泌するメタロプロテアーゼ様タンパク質であることが示唆された。

次に、この殺虫タンパク質の殺虫機構を明らかにするために、殺虫タンパク質を注射したアワヨトウ体内の変化を調べた。その結果、血中ドーパミン濃度が、BSAを注射した対照群と比較して十数倍も上昇することが明らかになった。

さらに、脳内のドーパミンにおいても濃度上昇が観察された。血液のドーパミンは表皮由来であり、このドーパミンの放出は昆虫サイトカインである GBP(Growth-Blocking Peptide)によって調節されることを証明した。また、血中 GBP 濃度上昇は殺虫タンパク質による脂肪体内の proGBP プロセッシング酵素活性上昇によってもたらされるものと結論付けた。さらに、脳内ドーパミンの濃度上昇は、 ^3H -Dopamine による取り込み実験によって血中ドーパミンが脳内へ流入するために起きるものと結論付けた。このような変化は脳に何らかの障害が生じた為に起こるものと考え、脳を透過型電子顕微鏡を用いて観察を行った。その結果、殺虫タンパク質を注射後 1 2 時間の脳ではその表層にある基底膜の厚みとマトリックス密度の減少やグリア細胞層の脱落が観察され、血液から脳へのドーパミン流入を裏付ける結果を得た。さらに、注射後 20 時間の脳内の神経細胞において明らかなアポトーシス像が多数観察された。

以上の研究結果は、バクテリアとポリドナウイルス 2 重感染によって誘導されたメタロプロテアーゼ様殺虫タンパク質による殺虫過程を一通り分子レベルで説明し得るものとなった。すなわち、殺虫タンパク質を注射されたアワヨトウ幼虫では、血中ドーパミンさらに脳内ドーパミン濃度の上昇が起こり、この脳内ドーパミンの高濃度状態がもたらす神経細胞のアポトーシスが個体死の決定的要因と考えられる。また、血中ドーパミン上昇への昆虫サイトカイン・GBP の寄与が明らかになり、昆虫の細菌感染に対する新規な反応経路であることが示された。以上の新知見は、全部で 4 章から構成される申請論文にまとめられている。

審査員一同は、これらの研究成果を高く評価し、大学院課程における取得単位なども併せ、申請者が博士（地球環境科学）の学位を受けるに十分な資質を有するものと判定した。