

氏名	よしなが なおこ 吉永直子
学位(専攻分野)	博士(農学)
学位記番号	農博第1631号
学位授与の日付	平成19年3月23日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
研究科・専攻	農学研究科応用生命科学専攻
学位論文題目	鱗翅目幼虫における volicitin 類の生合成と機能解析

論文調査委員 (主査) 教授 西田律夫 教授 西岡孝明 教授 宮川恒

論文内容の要旨

Volicitin は17位が水酸化されたリノレン酸とグルタミンの縮合物であり、植物に抵抗性を誘導する因子として、鱗翅目幼虫の唾液中から単離・同定された物質である。トウモロコシやタバコの植物体を volicitin で処理すると、セスキテルペンやインドール等の揮発成分が *de novo* 合成され、幼虫の天敵である寄生蜂はこの揮発成分を利用して、寄主を発見することが知られている。幼虫は、自分の生存に不利に働く volicitin をなぜ保有しているのか、幼虫に対するその存在意義については全く明らかにされていない。そこで本研究では、幼虫唾液から同定された一連の volicitin 類縁体、すなわち脂肪酸とグルタミンの縮合物 (Fatty acid-Amino acid Amides, FAAs) に着目し、幼虫における FAAs の生合成経路を明らかにするとともに、同物質群の生理的機能を解明した。主な研究内容は、以下の通りである。

1. Volicitin 類の生合成・代謝メカニズム

日本産ヤガ科ハスモンヨトウ、アワヨトウ、オオタバコガおよびスズメガ科エビガラスズメの幼虫から、volicitin や *N*-linolenoyl-L-glutamine およびそれらのリノール酸類縁体の合計4種のFAAsを同定した。また、ハスモンヨトウ幼虫腸管を取り出し、リノレン酸およびグルタミンとインキュベートすると、volicitin の生合成が確認できた。この縮合活性は中腸組織のミクロソーム画分に認められ、グルタミンに対する基質特異性も確認できた。これらの結果から、FAAs は幼虫の中腸組織により酵素的に生合成されると結論した。また、放射性ラベル体FAAsを用いた実験から、腸管内ではFAAsの分解反応も認められ、一度生合成されたFAAsはそのまま糞に排泄されずに脂肪酸・グルタミンとして血中に再吸収されることが判明した。

2. Volicitin 類の生理機能

FAAs ではグルタミンが特異的に取り込まれることから、グルタミン代謝に注目した。¹⁵Nラベル体アンモニウムイオンを添加した人工飼料をハスモンヨトウに与えた後、虫体の *in vivo* ¹⁵N-NMR を測定したところ、ラベル体窒素はFAAsのグルタミンγ位に特異的に導入された。ラベル体FAAsをGC-MSやLC-MSで分析したところ、ラベル化率は20%であった。これらの結果、幼虫体内の老廃物であるアンモニウムイオンが glutamine synthase によってグルタミン酸に取り込まれグルタミンとなり、このグルタミンがFAAsに縮合されていることを明らかにした。また、グルタミン酸とアンモニウムイオンを添加した人工飼料を調製し、これにリノレン酸を加えた場合と加えない場合とで、幼虫による窒素の吸収率をCNアナライザーで分析した。その結果、リノレン酸を与えた場合の方が、窒素吸収率が高かった。これは、リノレン酸がFAAsの生成を介して、グルタミン酸やアンモニアの吸収に寄与する結果であると考察した。以上の結果、FAAsは幼虫自身の窒素代謝の効率化に関わる重要な代謝中間体と結論した。

3. Volicitin 類縁体の多様性と種間比較

FAAs の生合成系や代謝系が窒素代謝と関連していることから、FAAs がどのような昆虫に存在しているのかを調べた。そこで、鱗翅目だけではなく、直翅目や半翅目の昆虫も含め、その腸管内容物をLC-MSで分析した結果、ヤガ科とスズメ

ガ科に加えてシャチホコガ科, ヤママユガ科, ドクガ科, メイガ科, キバガ科に属する幼虫が FAAs を保有することを明らかにした。また, 直翅目昆虫エンマコオロギ成虫からも FAAs を検出し, その分布が広範囲の昆虫にわたることが示唆された。

4. Volicitin 類縁体のエリシター活性

Volicitin をはじめとする各種類縁体を合成し, トウモロコシに対する揮発成分放出活性を比較した。その結果, 17位が水酸化された volicitin は *N*-linolenoyl-L-glutamine に比べて, エリシター活性は3倍以上強かった。しかしながら, 17*R*-体, 17*S*-体ともに活性があり, 17位の立体化学はエリシター活性に影響しなかった。また, アミノ酸部分をグルタミンから他のアミノ酸に変えたところ, いずれも活性は消失し, FAAs のグルタミン部分は植物の応答性に関しても極めて特異的に作用することが判明した。

論文審査の結果の要旨

Volicitin およびその類縁体 (Fatty acid-Amino acid Amides, FAAs) は, 植物-植食者-寄生者を巡る三者系の生物間相互作用において, 植物に抵抗性を誘導する昆虫由来のエリシターとして注目されてきた。しかし, 幼虫自身における volicitin の生理的機能についてはほとんど研究されておらず, 幼虫の腸内共生微生物が volicitin の生合成に関与するとの報告だけであった。本研究では, FAAs の幼虫生体内における存在意義に注目し, 中腸組織における縮合反応を *in vitro* 実験によって証明する一方, volicitin を中心とする FAAs の生理的機能を種々の観点から明らかにしている。本論文の評価すべき点は以下の通りである。

1) 日本産のヤガ科, スズメガ科の4種から, volicitin 類縁体を同定した。いずれも, リノレン酸およびリノール酸のグルタミン縮合物であった。

2) ヤガ科ハスモンヨトウ腸管を用い, *in vitro* における volicitin の生合成を世界で初めて明らかにした。同時に, *in vivo* と, 腸管のミクロソーム画分を用いた *in vitro* で, 縮合活性におけるグルタミンの特異性を明らかにした。すなわち従来知られていた共生微生物ではなく, 幼虫自身が FAAs を生合成していると結論した。

3) 腸管内で生合成された FAAs は糞中にはほとんど排泄されず, 脂肪酸およびグルタミンとして腸管から選択的に再吸収され, 大部分の脂肪酸は脂肪体へと運搬されることを, ラジオアイソトープを用いたトレーサー実験により明らかにした。

4) 幼虫体内の老廃物であるアンモニウムイオンが glutamine synthase によってグルタミン酸に取り込まれグルタミンとなり, このグルタミンが FAAs に縮合されていることを実証した。同時に, FAAs は幼虫自身の窒素代謝の効率化に関わる重要な代謝中間体であることを明らかにした。

5) FAAs はヤガ科, スズメガ科のほか, シャチホコガ科, ヤママユガ科, ドクガ科, メイガ科, キバガ科に属する鱗翅目幼虫だけでなく, 直翅目のエンマコオロギ成虫にも存在することを明らかにした。

6) 種々の volicitin 類縁体を合成し, トウモロコシに対する揮発成分放出活性を比較すると, グルタミン部分を他のアミノ酸に置換した縮合物では, エリシター活性が消失した。植物の応答性においても FAAs のグルタミンの部分構造が重要であることを明らかにした。

以上のように本論文は, volicitin をはじめとする脂肪酸-グルタミン縮合物の生合成および代謝過程の解析から, それらの化合物の鱗翅目幼虫における機能を解明するとともに, 昆虫における同物質群の分布, エリシター活性発現のための化学的特性を明らかにしたものであり, 化学生態学, 昆虫生理学, 生物有機化学に寄与するところが大きい。

よって, 本論文は博士(農学)の学位論文として価値あるものと認める。

なお, 平成19年2月13日, 論文並びにそれに関連した分野にわたり試問した結果, 博士(農学)の学位を授与される学力が十分あるものと認めた。