

氏 名	お 倉 岳 彦
学位(専攻分野)	博 士 (農 学)
学 位 記 番 号	農 博 第 1707 号
学位授与の日付	平 成 20 年 3 月 24 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	脱皮ホルモンアゴニストの受容体との相互作用に関する研究

論文調査委員 (主 査) 教 授 宮 川 恒 教 授 西 田 律 夫 教 授 植 田 和 光

論 文 内 容 の 要 旨

昆虫の成育過程に特有の代謝や調節機構を阻害する昆虫成育制御剤は、他の生物や環境に対して安全性の高い農業害虫防除剤となることが期待される。昆虫生育制御剤の代表的なものとしては、脱皮ホルモンである 20-hydroxyecdysone (20E) のアゴニストとして働く diacylhydrazine 類 (DAH) が挙げられる。DAH は 20E の核内受容体タンパク質である ecdysone receptor (EcR) と ultraspiracle (USP) のヘテロ二量体 (EcR/USP) と結合することによって、脱皮ホルモン応答性の種々遺伝子の転写を活性化させる。その結果昆虫は未成熟脱皮を引きおこし、死に至る。これまでの鱗翅目昆虫を用いた研究から、DAH の毒性発現は主として受容体との相互作用の強さによって決定されることが示されている。しかし一方で、DAH の作用は昆虫によって異なり、鱗翅目昆虫では強い殺虫活性が見られるのに対して、鞘翅目など一部の昆虫に対しては活性が劣ることも見出されている。このような脱皮ホルモンアゴニストが示す作用の選択性は、脱皮ホルモンを介した昆虫の変態・成長過程が共通のものであるという観点から見るときわめて興味深い、それがどのようなメカニズムによるものかは明らかになっていない。本論文は、DAH の昆虫間作用選択性の発現機構解明を目的として、DAH と脱皮ホルモン受容体との相互作用を分子レベルで検討し、その結果をまとめたものである。主な内容は以下のように要約される。

1. DAH の Sf-9 培養細胞受容体結合に関する定量的構造活性相関

鱗翅目昆虫 *Spodoptera frugiperda* 由来の Sf-9 培養細胞を用いて、種々の DAH の脱皮ホルモン受容体結合親和性を測定し、定量的構造活性相関解析の手法を用いて、親和性に影響を与える DAH の物理化学的性質を調べた。その結果、DAH に含まれる 2 つのベンゼン環のうち、*t*-butyl 基から遠い方の 4 位置換基の疎水性や電子供与性が高いほど受容体への結合に有利であり、一方、同置換基が立体的に嵩高いほど結合に不利であることが明らかになった。これまでの昆虫個体レベルにおける DAH の定量的構造活性相関研究では、置換基の電子的性質の関与は示されておらず、DAH の作用機構を考える上で、受容体レベルでの試験を行う重要性が改めて確認された。

2. コロラドハムシ脱皮ホルモン受容体に対する脱皮ホルモンアゴニストの結合親和性

これまでの研究により、DAH の殺虫活性は鱗翅目昆虫であるニカメイガと鞘翅目昆虫であるコロラドハムシ (*Leptinotarsa decemlineata*) で大きく異なることが示されている。またニカメイガでは、DAH の脱皮ホルモン受容体に対する結合親和性の強さが殺虫活性の強さを決定することが明らかにされている。そこで、コロラドハムシの脱皮ホルモン受容体に対する DAH の結合親和性を調べ、ニカメイガの場合との比較を試みた。まずコロラドハムシの EcR および USP (それぞれ LdEcR および LdUSP) の cDNA をクローニングし、その塩基配列を決定した。次いで、それらの遺伝子を *in vitro* で転写/翻訳して、LdEcR/LdUSP 受容体タンパク質を調製し、受容体に対する DAH の結合親和性を測定したところ、各化合物のコロラドハムシ受容体に対する親和性とニカメイガの受容体に対する親和性との間に相関関係は見られず、両昆虫間での殺虫活性の選択性は受容体との相互作用のレベルで生じていることが明らかになった。さらに、DAH のコロラドハムシ受容体に対する結合親和性は、殺虫活性とも相関しないことが示され、殺虫活性の強さには、受容体との相互作用以

外の要因が大きな影響を与えていることが示された。

3. コロラドハムシ培養細胞 BCIRL-Lepd-SL1 を用いたレポータージーンアッセイ

DAHのコロラドハムシに対する殺虫活性と受容体結合親和性との間に相関関係が見られなかったことから、DAHの受容体結合親和性と、結合によって引き起こされる遺伝子転写活性化の強さとの関係を調べた。コロラドハムシ培養細胞 BCIRL-Lepd-SL1 に、脱皮ホルモン応答配列 EcRE の下流にルシフェラーゼ遺伝子を組み込んだレポータージーンを導入し、DAHによるルシフェラーゼ遺伝子の転写活性化能を測定したところ、転写活性化能は受容体結合親和性と必ずしも相関しなかった。さらに、転写活性化能とコロラドハムシに対する殺虫活性との間にも相関は見られなかった。この結果から、DAHの鞘翅目昆虫コロラドハムシに対する殺虫活性の発現様式は鱗翅目昆虫ニカメイガの場合と大きく異なっており、コロラドハムシでは、脱皮ホルモン受容体との結合や脱皮ホルモン応答遺伝子の転写活性化以外に殺虫活性に影響を与える重要な要因が存在することが示された。

論文審査の結果の要旨

Diacylhydrazine類 (DAH) については、これまでに主として鱗翅目昆虫を用いた作用機構の研究がおこなわれ、受容体との複合体の結晶構造などを含めある程度の知見が分子レベルで得られている。しかし、DAHの作用で特に注目される昆虫種間選択性の発現機構については多くが未解明である。本論文は、DAHの受容体との分子レベルでの相互作用を詳細に検討し、DAHの作用選択性発現機構について考察したものであり、評価すべき点は以下の通りである。

1. 鱗翅目昆虫 *Spodoptera frugiperda* 由来の Sf-9 培養細胞を用いて DAH の受容体結合親和性を測定し、定量的構造活性相関解析により受容体との結合にとって DAH の置換基の疎水性、電子供与性、立体的な大きさが重大な影響を持つことを示した。この結果は殺虫活性のような個体レベルでの定量的構造活性相関の結果と異なっており、DAHの分子レベルにおける作用機構の詳細を明らかにする上で、受容体レベルの研究が重要であることを示した。

2. cDNA クローニングにより、鞘翅目昆虫コロラドハムシの脱皮ホルモン受容体である LdEcR と LdUSP のアミノ酸配列を明らかにし、つづいて *in vitro* 転写/翻訳系を用いて LdEcR/LdUSP 受容体タンパク質を調製した。さらにこのタンパク質を用いて DAH の受容体結合親和性を測定し、DAHのコロラドハムシと鱗翅目昆虫ニカメイガの間での作用選択性が、受容体との相互作用のレベルで生じていることを示した。また、コロラドハムシに対する DAH の殺虫活性の強さが受容体結合親和性の強さとは相関しないことから、殺虫活性の発現には、受容体との相互作用以外のより重要な要因が関与していることを示した。

3. 鞘翅目昆虫培養細胞における脱皮ホルモン活性化化合物のレポータージーンアッセイ系を、コロラドハムシ由来の細胞を用いて初めて構築した。また、構築したアッセイ系で DAH の脱皮ホルモン応答遺伝子の転写活性化能を測定した結果、コロラドハムシにおける DAH の転写活性化能は、受容体結合親和性、殺虫活性のどちらとも相関しないことを見出し、ホルモンアゴニストと受容体との相互作用およびそれに続くホルモン応答性遺伝子の転写以外に、殺虫活性に大きく影響するプロセスが存在することを示した

以上のように本論文は、昆虫脱皮ホルモンアゴニストである DAH の受容体との相互作用を分子レベルで評価し、これまで知見のなかった鞘翅目昆虫コロラドハムシ受容体に対する DAH の結合親和性および結合がもたらすホルモン応答性遺伝子の転写活性化能を定量的に表すことに成功した。この成果は昆虫成育制御剤の作用選択性発現機構に関する新しいモデルの考案につながるもので、生物有機化学、昆虫生理学ならびに農薬化学に対する寄与が大きい。

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20年2月12日、論文なら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。