

氏 名	みな 水 口 ち え か 智 江 可
学位(専攻分野)	博 士 (農 学)
学 位 記 番 号	農 博 第 1331 号
学位授与の日付	平 成 15 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	昆虫脱皮ホルモンアゴニストの受容体との相互作用

論文調査委員 (主 査) 教 授 宮 川 恒 教 授 桑 原 保 正 教 授 西 岡 孝 明

論 文 内 容 の 要 旨

N-*tert*-Butyl-*N*, *N'*-dibenzoylhydrazine とその誘導体は、昆虫の脱皮ホルモン (20-hydroxyecdysone) のアゴニストであり、昆虫に投与すると早熟脱皮を誘導して死に至らしめる。この一連の化合物は、昆虫に特有の生理現象である脱皮を阻害することから、昆虫以外の生物には害を及ぼさない安全な殺虫剤として実用化されている。これまでに様々な構造の脱皮ホルモンアゴニスト類縁体が合成され、それらの構造と殺虫活性および脱皮ホルモン活性との関係が詳細に研究されてきた。その結果、活性発現にとって重要な化合物の物理化学的因子が明らかになったが、化合物と脱皮ホルモン受容体との直接の相互作用はいまだに解析されておらず、受容体結合に影響を及ぼす構造要因に関する知見は得られていない。

昆虫の脱皮ホルモン受容体は、核内受容体である EcR (ecdysone receptor) と USP (ultraspiracle) のヘテロ二量体で、すでに数種類の昆虫で cDNA の塩基配列が報告されている。内分泌された脱皮ホルモンが EcR/USP 二量体に結合すると、これらの複合体が他の遺伝子の upstream に存在する脱皮ホルモン応答配列 (ecdysone response element; EcRE) と呼ばれる領域に結合し、転写調節因子として機能すると考えられている。

本研究では、脱皮ホルモンアゴニストの受容体結合活性を定量的に評価できる実験系を確立し、これらの化合物の作用機構に関する分子レベルでの知見を得ることを目的とした。対象昆虫としては、これまでに構造活性相関の知見が蓄積されている鱗翅目昆虫ニカメイガ (*Chilo suppressalis*) を用いることにした。本論文の主な内容は以下の通りである。

- ① Degenerate primer を用いた RT-PCR および RACE 法により、ニカメイガ EcR の cDNA クローニングを行った。その結果、EcR-A および EcR-B1 アイソフォームのホモログが単離された。最終齢期間におけるニカメイガ表皮を用いたノーザン解析の結果、EcR の mRNA は最終齢の蛹化直前の時期に特に強く発現しており、その発現パターンは二つのアイソフォームの間で微妙に異なっていることが明らかになった。
- ② ①と同様の手法で、ニカメイガ USP の cDNA クローニングを行った。その結果、USP-2 アイソフォームのホモログを単離することができた。ニカメイガ表皮を用いたノーザン解析の結果、USP の mRNA の発現は、最終齢期間においてほぼ一定であることがわかった。
- ③ クローニングされた cDNA の塩基配列をもとにして、ウサギ網状赤血球ライセートを用いた *in vitro* 転写／翻訳系により、ニカメイガ EcR, USP (CsEcR, CsUSP) タンパク質の発現を行った。³⁵S で標識したアミノ酸を取り込ませてタンパク質発現を行い、SDS-PAGE で分析したところ、効率よくタンパク質の生成したことが確認できた。また、非放射性的のアミノ酸で合成した CsEcR および CsUSP タンパク質の DNA との結合能を調べるために、脱皮ホルモン応答配列 (EcRE) である hsp27 および Pal1 をプローブとしたゲルシフトアッセイを行った。その結果、単独の CsEcR および CsUSP に対してはいずれもプローブの結合が見いだされなかったが、両者の混合物に対してはプローブが結合したことから、EcR と USP が複合体を形成して脱皮ホルモン応答配列に結合することが確認された。
- ④ *In vitro* 転写／翻訳系で発現させた CsEcR および CsUSP タンパク質と、ステロイド型脱皮ホルモン類の一つである

ponasterone A (PoA) との結合実験を行った。CsEcR 単独に対しては $[^3\text{H}]\text{PoA}$ の特異的な結合がわずかに検出され、CsUSP 単独に対しては特異的結合が見いだされなかった。両者を混合したものに対しては、 $[^3\text{H}]\text{PoA}$ の特異的結合が大幅に増加した。PoA の平衡解離定数 K_d を測定したところ、CsEcR 単独に対してよりも CsEcR+CsUSP に対する方が小さく、親和性の高いことが示された。これらのことから、リガンドが結合するのは USP ではなく EcR であるが、USP が EcR へ結合することによって、受容体—リガンド間の親和性がさらに増大することが示唆された。

- ⑤ In vitro 転写／翻訳系で発現させた脱皮ホルモン受容体 (CsEcR および CsUSP タンパク質の混合物) に対する脱皮ホルモンアゴニストの受容体結合活性を、 $[^3\text{H}]\text{PoA}$ との競合により測定した。各化合物について作成した濃度応答曲線から 50% 阻害濃度 $[\text{IC}_{50}(\text{M})]$ を求め、その逆対数値 (pIC_{50}) を結合活性の指標として評価した。供試化合物としては、ステロイド骨格を有する種々の脱皮ホルモン類と、非ステロイド型脱皮ホルモンアゴニスト (dibenzoylhydrazine 誘導体) を用いた。本研究で測定された一連の化合物の受容体結合活性値 (pIC_{50}) は、ニカメイガ幼虫に対する殺虫活性値 (pLD_{50}) および培養表皮系における脱皮ホルモン活性値 (pEC_{50}) とそれぞれ高い相関を示した。以上のことから、受容体—リガンド間の結合が強いほど殺虫活性や脱皮ホルモン活性の高くなることが、定量的に示された。

論文審査の結果の要旨

昆虫脱皮ホルモンの非ステロイド型アゴニストは、昆虫に特有の生理現象である脱皮を阻害することによって作用する薬剤であり、安全性の高い殺虫剤として広く利用されている。しかし、本薬剤と脱皮ホルモン受容体との直接の相互作用については、これまで明らかにされておらず、活性発現に関わる構造要因についても知見が得られていなかった。本論文は、非ステロイド型脱皮ホルモンアゴニストの作用について、分子レベルでの知見を得ることを目的としたものである。その評価すべき点は以下の通りである。

- (1) 鱗翅目昆虫ニカメイガ (*Chilo suppressalis*) を供試昆虫として用い、脱皮ホルモン受容体を構成する二つのタンパク質 (EcR, USP) の cDNA 塩基配列を決定した。ノーザン解析により、ニカメイガ組織中での EcR, および USP の mRNA 発現量をそれぞれ調べ、血リンパ液中の脱皮ホルモン濃度との関連性について考察した。EcR, USP の cDNA クローニングはこれまでに、ショウジョウバエを初めとするわずかに十数種類の昆虫で行われたに過ぎず、ほとんどの昆虫ではこれらの塩基配列が不明のままである。本論文においては、新たにニカメイガの EcR, USP の cDNA 塩基配列を決定できた。この情報は今後、他の昆虫において EcR, USP の cDNA クローニングを行う際に有効となる。
- (2) クローニングされた cDNA の塩基配列をもとにして、ウサギ網状赤血球ライセートを用いた in vitro 転写／翻訳系によって、ニカメイガ EcR, USP タンパク質の発現、および機能解析を行った。目標とするタンパク質を効率よく生成させることに成功し、また脱皮ホルモン応答配列を含む二本鎖 DNA をプローブとしたゲルシフトアッセイにおいて、EcR と USP が複合体を形成して DNA と相互作用することを確認した。
- (3) 上記のように調製したニカメイガ EcR および USP タンパク質と放射性リガンドを用いて結合実験を行い、EcR/USP 複合体に対して、脱皮ホルモン様活性化合物が高い親和性で結合することを見いだした。また、この EcR/USP 複合体を用いて、脱皮ホルモンアゴニストの受容体結合活性を定量的に評価できる実験系を確立し、一連の化合物の受容体結合活性を測定した。その結果、非ステロイド型脱皮ホルモンアゴニストの受容体結合活性値 (pIC_{50}) と、ニカメイガ幼虫に対する殺虫活性値 (pLD_{50}) および培養表皮系における脱皮ホルモン活性値 (pEC_{50}) との間に高い相関関係が存在することを見だし、受容体—リガンド間の結合が強いほど殺虫活性や脱皮ホルモン活性の高くなることを定量的に示した。以上のように本論文は、鱗翅目昆虫ニカメイガの脱皮ホルモン受容体の構造および機能を明らかにすると共に、殺虫剤として開発されている脱皮ホルモンアゴニストの受容体結合活性を定量的に評価したものであり、昆虫生理学、昆虫分子生物学、生物有機化学、および農薬化学の発展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15年2月18日、論文並び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にあるものと認めた。