

論文審査の結果の要旨

申請者氏名 諸岡 信克

植食性昆虫の周期的な摂食行動は、環境などの外来性の要因だけでなく、体内の栄養状態などの内因性の要因により構築されている。この周期的な摂食行動は、体液中の様々な因子によって調節されていると考えられている。近年、カイコ(*Bombyx mori*)の幼虫体液から、摂食行動のモチベーションを上昇させる 62 残基のペプチド性因子(Hemolymph major anionic peptide: HemaP)が同定された、これをカイコ幼虫に注射すると、食餌量の増加と活発な探餌行動が観察される。体液中の HemaP 濃度は、カイコ幼虫の周期的な摂食行動に先行して増加し、食餌により減少する。データベース検索から、相同性は低いものの 4 種の鱗翅目昆虫で HemaP 様分子の存在が見出されたが、カイコ以外での生理活性は確認されていない。本論文は序論とそれに続く 3 章からなる。

まず、序論において、上記の背景を述べた後、第 1 章では HemaP の構造活性相関について述べている。カイコと同じ大型鱗翅目昆虫であるエビガラスズメ(*Agrius convolvuli*)から、2 種類のカイコ HemaP 様分子 (p6692 と p6894) を単離した。両ペプチドの一次構造を決定した結果、両ペプチドは同一のアミノ酸配列を有し、カイコ HemaP と 32%の相同性を有していた。分子質量の違いは、p6894 の 5 残基目に付加した 1 残基の α -GalNAc によることを、付加糖の蛍光誘導体の HPLC 分析、およびレクチンとの親和性による解析から明らかにした。CD スペクトルを測定した結果、p6692 と p6894 は、カイコ HemaP と類似した α -ヘリックスに富む二次構造を有することが分かった。そこで、p6692 と p6894 を、エビガラスズメ HemaP (A-HemaP)と命名した。p6692 と p6894、および大腸菌発現組換え体はエビガラスズメ幼虫に対して同程度の生理活性を示したことから、A-HemaP は、摂食行動調節活性があり、HemaP による制御システムが鱗翅目昆虫種間で保存されていると推測された。

カイコ HemaP と A-HemaP (p6692)には交差活性が認められなかった。そこで、N 末端および C 末端を部分欠損した 16 種類の HemaP を調製し、生物検定に供した結果、10 残基目から 30 残基目のアミノ酸配列を含む部分欠損 HemaP にのみ生理活性が観察されたため、この領域をコア領域とした。コア領域のアミノ酸配列は、種間の相同性が低いため、HemaP の種特異性に貢献していると考え、カイコ HemaP と A-HemaP のコア領域を交換したキメラ HemaP を調製した。キメラ HemaP を、カイコおよびエビガラスズメ幼虫に注射した結果、同種のコア領域を有するキメラ HemaP を投与された群でのみ生理活性が認められたことから、活性の種特異性は、コア領域のアミノ酸配列によることが示された。カイコ HemaP は、ゲルろ過クロマトグラフィーにおいて、二量体を形成していることが示唆された。

第2章では、カイコの組織培養を用いて HemaP の分泌調節機構を解析した。HemaP の脂肪体からの分泌は、培養時間の長さに係らず、培地中の HemaP 量は一定であった。培地の半分量を経時的に交換しながら脂肪体の組織培養を行った結果、培地中の HemaP 濃度は、ほぼ一定に保たれていたことから、脂肪体は HemaP の分泌と再吸収を自律的に調節していることが示唆された。

体液中の HemaP 濃度は、カイコ 5 齢の摂食期を通じてほぼ一定に保たれていた。体液中の HemaP 濃度が生育段階を通じての変動を調べた結果、HemaP 濃度はカイコの脱皮変態の時期と一致して変動した。real-time PCR により、この変動は HemaP の転写レベルの変動であることが示された。以上の結果から、体液中の HemaP 濃度は、摂食行動を調節する小さい短期的変動と、脱皮変態のタイミングと同調した大きい長期的変動があることがわかった。

第3章では、HemaP 結合タンパク質の精製および機能解析を行った。体液中のカイコ HemaP の挙動を、密度勾配遠心およびゲルろ過クロマトグラフィーで解析した結果、HemaP 結合タンパク質の存在が示唆された。カイコ幼虫の体液を HemaP アフィニティーカラムに供した結果、約 30 kDa のタンパク質が特異的に HemaP と結合することが分かった。N 末端アミノ酸配列解析の結果、このタンパク質は、機能未知の 30K タンパク質の 1 つ、30K6G1 であった。大腸菌発現組換え 30K6G1 (r30K6G1) を、HemaP アフィニティーカラムに供した結果、r30K6G1 と rHemaP の結合が認められた。次に、カイコ幼虫に r30K6G1 を注射した結果、摂食関連行動の長さが減少した。また、16 時間絶食させて、摂食行動のモチベーションを上げたカイコ幼虫に rHemaP と r30K6G1 の混合液を注射した結果、r30K6G1 と rHemaP の混合液は、rHemaP 注射で惹起される摂食行動開始時間を早める活性を抑制した。以上の結果から、30K6G1 はカイコ HemaP と複合体を形成し、カイコ幼虫の HemaP 感受性を低下させている可能性が示唆された。

以上、本論文は、昆虫の体液中に存在するペプチド HemaP の構造と摂食行動における機能を初めて解明したもので、学術上貢献するところが少なくない。よって、審査委員一同は本論文が博士（農学）の価値あるものと認めた。