

学 位 論 文 題 名

Studies on the growth-blocking peptide
that regulates insect development

(昆虫の発育を制御する発育阻害ペプチド (GBP) に関する研究)

学位論文内容の要旨

発育阻害ペプチド (growth - blocking peptide : GBP) は、カリヤコマユバチ (*Cotesia kariyai*) に寄生されたアワヨトウ (*Pseudaletia separata*) 幼虫の血液から単離・精製されたアミノ酸 25 残基からなる生理活性ペプチドである。約 10 pmol - 20 pmol の GBP を終齢初期幼虫に注射すると、顕著な体重増加の抑制及び 2 - 5 日間の蛹化遅延が観察される。当初から、この GBPこそコマユバチの寄生による鱗翅目幼虫の発育阻害現象の主因であろうと予想されていた。

本研究では、GBP と宿主昆虫との発育阻害現象の関係を明確にする為に、血中 GBP 濃度の正確な定量を試みた。このために、抗 GBP モノクローナル抗体を作成し、数 pmol の GBP を定量できる ELISA 法によるアッセイ系を確立した。このアッセイ系を用いて、カリヤコマユバチに寄生されたアワヨトウ幼虫における血中 GBP 濃度の変化を追った。その結果、未寄生幼虫では、終齢幼虫脱皮以降急速に血中 GBP 濃度は減少し、終齢 2 日目には 10 pmol/ml 以下まで減少してしまうのに対し、寄生された幼虫では、寄生後 10 時間以内に未寄生コントロール幼虫のそれに比べ約 4-5 倍のレベルにまで上昇することが明らかになった。ただ、このように高まった血中 GBP は、その高濃度を維持するのではなく、徐々に低下し、4 日後に再び上昇するという特徴的な濃度変化を示すことが判明した。寄生に伴って表れる特徴的な血中 GBP 濃度の変化は、飼育温度を 25°C から 10°C に移す低温処理に伴う発育阻害時にも観察された。従って、血中 GBP 濃度上昇による幼虫発育阻害という現象は、寄生バチによる寄生という特殊な生理的環境下でのみ観察されるものではなく、もっと広範な環境ストレス状況下での発育遅延時に共通する生理的変化と結論づけることができた。

上記のような、寄生や低温処理による血中 GBP 濃度の調節機構を明らかにするために、アワヨトウ GBP の cDNA を解析した。クローニングした cDNA の塩基配列から、GBP はまず前駆体タンパク質として合成されることが明らかになった。また、この GBP cDNA をプローブに用いて行ったノーザンブロット解析によって、

GBpmRNA は脳-神経節及び脂肪体で合成されていることを確認した。さらに、血中 GBP は主に脂肪体から分泌されることも分かった。また、寄生、低温処理することによって、脂肪体内の GBP mRNA の発現量に変化はなかった。そこで、脂肪体内の GBP 前駆体の濃度を定量するために、抗 GBP 前駆体ポリクローナル抗体を作成し、脂肪体内の GBP 前駆体濃度を ELISA 法により測定した。その結果、血中 GBP 濃度変化と同じく特徴的な濃度変化を示し、その挙動はそれぞれ一日早くずれていた。以上の結果から、血中 GBP 濃度の変化は、GBP mRNA の転写後の段階、もしくは GBP 前駆体合成段階で調節されていると考えられる。

これまでに、GBP のアミノ酸配列と非常によく類似したペプチドが、数種類の鱗翅目昆虫の幼虫から見つかっており、麻痺ペプチド、細胞刺激ペプチドとして報告されている。このことから、GBP は鱗翅目昆虫に広く存在している多機能性の生理活性ペプチドであることが推測される。また、GBP のアミノ酸配列は、ヒトの上皮成長因子 (EGF) のドメイン構造と類似していた。これらのことから、GBP は、その濃度に依存して細胞増殖活性を持つのではないかと考えた。そこで、ヒト上皮細胞、及び昆虫由来の培養細胞である *Sf9* 細胞を用いて、GBP の細胞増殖活性を測定した。その結果、GBP はヒト上皮細胞に対しては EGF とほぼ同等の、*Sf9* 細胞に対しては EGF よりも高い細胞増殖活性を示した。また、GBP の EGF レセプターに対する親和性を検討するために、¹²⁵I で標識した EGF を用い、ヒト上皮細胞、*Sf9* 細胞に対してコンペティティブバインディングアッセイを行った。その結果、GBP は、ヒト上皮細胞に対して EGF ほどの強い親和性を示さなかったが、*Sf9* 細胞に対しては、EGF とほぼ同等の低い親和性を示した。これらのことから、GBP は昆虫体内に存在するサイトカイン様ペプチドだと考えられる。

抗 GBP モノクローナル抗体を用いて、卵内の GBP 濃度を測定した結果、GBP はアワヨトウの卵内にも存在し、その濃度は産卵後 3 日目まで上昇を続け、孵化直前の 4 日目には若干の減少がみられた。細胞増殖活性をもつ GBP は、卵の発生過程においても重要な役割をはたしている可能性がある。

最初、GBP は、カリヤコマユバチに寄生されたアワヨトウ幼虫の体液中から、幼虫の発育を阻害する活性を持ったペプチドとして発見された。しかし本研究により、GBP は未寄生幼虫にも存在しており、寄生だけでなく、より広範なストレスによってもその濃度が上昇することから、このペプチドはストレス応答システムの初期に活発に合成されて、幼虫の発育を抑制的に調節していることが明らかになった。ストレスを受けると、血中の GBP は脂肪体内でまず前駆体タンパク質として合成され、プロテアーゼによって切断を受けることにより、血中に分泌される。その調節は、mRNA の転写の段階ではなく、mRNA の転写後の段階、もしくは GBP 前駆体合成段

階で調節されることが分かった。さらに、GBP は当初の幼虫の発育を阻害する機能だけでなく、濃度に依存して細胞の増殖を促進する活性も持っていることを示した。これまでに数種類の鱗翅目昆虫から、GBP 様ペプチドが単離されており、その機能も多様であることから、このペプチドは、鱗翅目昆虫において広く存在する多機能性のサイトカインである可能性が高い。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 芦 田 正 明
副 査 教 授 高 木 信 夫
副 査 助 教 授 瀧 谷 重 治
副 査 助 教 授 早 川 洋 一

学 位 論 文 題 名

Studies on the growth-blocking peptide that regulates insect development

(昆虫の発育を制御する発育阻害ペプチド (GBP) に関する研究)

内部寄生バチ・カリヤコマユバチによって寄生された宿主アワヨトウ幼虫は、幼虫から蛹への変態が阻害される。この寄生バチの寄生によって発育阻害を受けた宿主アワヨトウ幼虫血液から単離・精製された生理活性物質が、アミノ酸 25 残基からなる発育阻害ペプチド (Growth-blocking peptide, GBP) である。数 10 pmol の精製 GBP を未寄生の健康なアワヨトウ終齢初期幼虫に注射すると、体重の増加は鈍り、蛹への変態も数日間遅れる。その後の研究で、GBP は未寄生アワヨトウ幼虫にも存在し、特に、終齢以前の若齢期幼虫血液中には比較的高濃度存在しているらしいことが明らかになった。これらの実験事実に基づき、申請者らは、GBP が昆虫の発育を調節する一種のホルモン様ペプチドではないかという作業仮説を立てた。本研究は、この作業仮説を実証すべく、GBP の昆虫体内における正確な濃度変動の把握、GBPcDNA の分析、さらに、GBP の生理作用の解析をおこなった。

第 1 章では、化学合成 GBP を用いて抗 GBP モノクローナル抗体を調製し、これを用いて先ず未寄生アワヨトウ 5 齢、6 齢 (終齢) 幼虫血液中 GBP 濃度の定量を行った。その結果、5 齢脱皮日(L5D0)が約 40 pmol/ml と最も高い GBP 濃度であり、その後、終齢脱皮前後に一度上昇するものの幼虫発育を通して徐々に減少して行くことが明らかになった。一方、終齢脱皮日(L6D0)に寄生された幼虫血中 GBP 濃度は、寄生後一日以内に未寄生幼虫に比べ約 4 倍のレベルにまで上昇することが分かった。その後、その高 GBP レベルは、一度減少し、再び上昇して寄生後 6 日目にピークに達した。これらの血中 GBP 濃度の正確な定量によって、“血中 GBP が昆虫幼虫発育を調節する重要なファクターである”という上記の作業仮説を間接的ながらも証明することができた。

第 2 章では、GBPcDNA の解析を行った。先ず、寄生された宿主アワヨトウ幼虫

から mRNA を単離し、その cDNA を合成した。次に、これを鋳型に PCR を行って得られた GBPcDNA 断片をプローブに用いて GBPcDNA の単離に成功した。単離した GBPcDNA の塩基配列解析の結果、GBP は、pre-pro-peptide として合成されることを明らかにした。さらに、この cDNA をプローブに用いて行ったノーザンブロット解析によって、GBP が主に脳-神経節と脂肪体の 2 つの組織で合成されることが分かった。興味深いことに、両組織の GBPmRNA サイズは、前者が約 2.1 kb、後者が約 900 b と明らかに異なっており、組織特異的転写調節様式をとっていることが分かった。また、寄生後時間を追って調製した脂肪体 RNA を用いノーザンブロット解析を行った結果、GBPmRNA 濃度は寄生によって変化しないことが明らかになった。したがって、寄生に伴って観察される血中 GBP 濃度の増加は、GBP 遺伝子発現における転写後レベルでの活性化によるものであろうことが予想できた。事実、寄生によって脂肪体 GBP 前駆体タンパク質濃度は上昇しており、寄生によって少なくとも翻訳レベルでの活性化が誘起されることが証明できた。

第 3 章では、アワヨトウの他にもう 2 種類鱗翅目昆虫の GBPcDNA の構造解析を行ってその類似性を比較した。その結果、GBP をコードする領域では約 80%以上の類似性があること、さらに、そのドメイン構造がやや哺乳類の上皮成長因子 (epidermal growth factor, EGF)の一部に似ていることが明らかになった。ヒトケラチノサイト細胞及び昆虫 SF9 細胞を用いてその成長速度に対する GBP の影響を調べた結果、GBP は、明らかに EGF 様細胞成長因子活性を示すことを確認することができた。したがって、GBP は、昆虫で始めて発見された細胞成長ペプチドと言える。

以上の結果は、GBP の昆虫発育調節ホルモン様作用、及び、細胞成長因子活性を実験的に証明したものであり、昆虫生理学における重要な業績と位置付けられる。

審査員一同は、これらの成果を高く評価し、また申請者は研究者として誠実かつ熱心であると考え、大学院課程における研鑽や単位取得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格を有するものと判定した。