

氏名(国籍)	お 吳 <sup>すん</sup> <sup>ふよつぶ</sup> 承 協 (韓 国)		
学位の種類	博 士 (農 学)		
学位記番号	博 甲 第 4698 号		
学位授与年月日	平成 20 年 3 月 25 日		
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当		
審査研究科	生命環境科学研究科		
学位論文題目	各種動物のアセチルコリンエステラーゼの構造置換が酵素特性へ及ぼす影響		
主 査	筑波大学教授	農学博士	本 田 洋
副 査	筑波大学教授 (連携大学院)	理学博士	山 川 稔
副 査	筑波大学准教授	農学博士	戒 能 洋 一
副 査	筑波大学教授	農学博士	松 本 宏

### 論 文 の 内 容 の 要 旨

化学農薬に大きく依存してきた生物資源生産をとりまく環境は今や大きく変わりつつあり、害虫防除・管理においても、安全性や環境負荷等への問題から、様々な手段を複合的に使用する総合的防除 (IPM) が受け入れられつつある。一方、増加する人口を養う食料生産を可能にするためには、化学農薬の役割は決して小さくはない。しかし、その継続的使用は、抵抗性の発達や非標的生物への影響が大きな問題となり、使用や新たな薬剤の創出がますます困難になっている。このような状況の中で、有機リン剤やカーバメート剤に対する害虫の剤抵抗性の発達には、作用点であるアセチルコリンエステラーゼ (AChE) の感受性低下が関わっている。この感受性低下が AChE の立体構造の構造アミノ酸の変異に起因することが示唆されているが、その説明は断片的で直接的な証明に乏しい。また、非標的生物にみられる殺虫剤感受性の違いと作用点である AChE の構造特性との関係も知見が少ない。

本研究では AChE の薬剤感受性低下に対するアミノ酸置換の重要性を検証するために、殺虫剤抵抗性昆虫で見出されるアミノ酸置換をもつ p-Ace の cDNA をバキュロウイルス-昆虫培養細胞系で発現させ、発現産物である AChE の酵素特性を調べて感受性低下におけるアミノ酸置換の効果を明らかにした。また、殺虫剤感受性が異なる非標的生物の各種動物の AChE の構造上の違いの有無とそれが AChE の生化学的特性や阻害剤に対する感受性にどのように関係するのかを検討した。

薬剤感受性が低下したコガタアカイエカの p-Ace におけるアミノ酸置換 (Phe455Trp) を導入した AChE 遺伝子を培養細胞系で発現させたところ、その産物の置換体は無置換体に比較して分子構造の大きい人工基質に対して親和性の急激な低下を示した。阻害剤であるカーバメート剤に対する置換体の感受性低下は薬剤のメチル基の数の増加につれて大きくなった。また、Gly245Ser や Ala326Ser など 5 つのアミノ酸置換をもつ p-Ace の cDNA を培養系で発現させ、酵素の薬剤感受性を調べた結果、全ての置換体は無置換体に比較して人工基質に対して親和性の低下が認められた。さらに、これらの置換をもつ p-Ace は無置換体と比較して、特定薬剤に対する感受性が低くなったことから、総合的にアシルポケットの構造アミノ酸の置換が感受性低下に大きく関わることを証明した。

AChE の生化学的特性と阻害剤に対する感受性を各種動物の間で比較した。オオミジンコとイエバエの AChE は電気ウナギ、コイ、メダカ、ヒト、ウシの AChE に比べて基質である ATCh, PTCh に対する親和性が高く、前 2 者の AChE はアシル基構造が大きい有機リン剤により強く阻害されることから、脊椎動物 AChE は無脊椎動物の AChE のアシルポケットサイズが小さいと考えられた。一方、オオミジンコの AChE 前駆体 cDNA の塩基配列を同定し、他の動物のそれと比較した結果、オオミジンコではアロマティックゴージを形成する 2 ケ所のアミノ酸が異なるとともに、アシルポケット付近の配列はシビレエイやヒトの AChE よりもヒトの BChE の塩基配列と類似していた。

## 審 査 の 結 果 の 要 旨

アセチルコリンエステラーゼ (AChE) は動物に共通する神経伝達物質分解酵素であり、殺虫剤の作用点でもある。多くの害虫ではこの標的酵素の阻害剤である殺虫剤に対する感受性の低下が AChE をコードする遺伝子の点突然変異による構造アミノ酸の置換に原因すると考えられており、これを分子生物学的手法により具体的に証明することは、害虫における殺虫剤抵抗性発達の機構を解明する上で極めて重要である。本研究では AChE の基質受容部位であるアシルポケットやアロマティックゴージを形成する構造アミノ酸に着目して、それらの置換がどのように酵素特性と薬剤感受性に影響するのかを分子生物学的手法と酵素学的手法により明らかにした。また、非標的動物における薬剤感受性の違いもその作用点における構造アミノ酸の違いに起因することを哺乳類や魚類などの生物の AChE の酵素特性試験から明らかにした。

これらの知見は、新規殺虫剤の分子デザインにおいて、薬剤の感受性を決定する作用点の立体構造を反映させることで、より選択毒性と安全性の高い殺虫剤や抵抗性害虫に対応できる殺虫剤の創出を可能にするなど、害虫防除・管理や環境生物管理に大きな貢献をなると考えられる。

よって、著者は博士 (農学) の学位を受けるに十分な資格を有するものと認める。