

論文審査の結果の要旨および担当者

報告番号	※	第	号
------	---	---	---

氏 名 ONGSIRIMONGKOL Paratthakorn

論文題目 Studies on the role of cuticular function-related genes in insecticide resistance mechanism in red flour beetles, *Tribolium castaneum*.

(昆虫体内への殺虫剤の侵入抑制における表皮クチクラ関連遺伝子の機能解析)

論文審査担当者

主 査 名古屋大学准教授 水口智江可

委 員 名古屋大学教授 池田素子

委 員 名古屋大学教授 山本直之

委 員 名古屋大学助教 浜島りな

委 員 名古屋大学教授 村瀬 潤

論文審査の結果の要旨

世界において「飢餓をゼロに」という SDGs の開発目標が掲げられる中、害虫による農作物への被害を軽減することは喫緊の課題である。害虫の防除する上で最も効果的な手段は、殺虫剤の利用である。しかし、同じ殺虫剤を使い続けるとその殺虫剤が効きにくくなった殺虫剤抵抗性個体群が出現し、防除が困難になる。このような殺虫剤抵抗性の問題解決や新規害虫防除技術の確立のためには、殺虫剤が昆虫体内へ侵入して殺虫活性を発現する機構を詳しく解明するという基礎研究が求められている。本研究ではこのうち、昆虫の体表において殺虫剤の体内侵入が抑制される機構に着目した。

昆虫は外骨格により体が保護されており、その主要構成成分はクチクラである。クチクラの主成分は、*N*-アセチルグルコサミンのポリマーであるキチンと、複数種のクチクラタンパク質である。このうちキチンは皮膚細胞において、キチン合成酵素 (chitin synthase 1, CHS1) の働きにより UDP-*N*-アセチルグルコサミンがポリマー化されて合成される。クチクラは強固であるものの伸縮性に乏しいため、大きく成長してゆくためには古い表皮を脱ぎ捨て、より表面積の広い新しい表皮に包まれる必要がある。このように古い表皮を脱ぎ捨てて新しい表皮へに置き換わる現象が、いわゆる脱皮である。脱皮直後の昆虫の表皮は色が薄く柔らかいが、時間の経過と共に着色し、かつ硬くなる。これは、脱皮後のクチクラにおいてタンニンゲ (硬化と色素沈着) が進行するためであり、キチンとクチクラタンパク質との間で架橋が形成され、メラニン合成経路により合成されたメラニン類が色素として沈着する。

昆虫の表皮クチクラは、外部からの病原菌や化学物質に対する防御機能を有するのではないかと考えられてきた。コウチュウ目のコクヌストモドキ *Tribolium castaneum* を用いた先行研究により、クチクラタンパク質は昆虫病原糸状菌に対する防御において必須であることが示されたが、殺虫剤に対する防御機能については調べられていなかった。そこで本研究では、コクヌストモドキ成虫に殺虫剤を局所投与した際に、クチクラが殺虫剤の体内への侵入を抑制する防御機能を有するかどうか調べることにした。本研究では、①クチクラを構成するクチクラタンパク質、②クチクラのキチン合成を触媒するキチン合成酵素、③クチクラのタンニンゲに関わる酵素、を機能解析の対象とした。これらの因子に関して、二本鎖 RNA を微量注入する RNA 干渉 (RNAi) 法を実施して、遺伝子のノックダウンを実施した。次に、神経伝達を阻害することが知られるネオニコチノイド系殺虫剤を局所投与し、殺虫効果の現れる速さを確認することによって、殺虫剤の体内への侵入抑制機能について評価を行った。

論文審査の結果の要旨

本論文の第 2 章では、ココヌストモドキ成虫の主要なクチクラタンパク質 (*CPR4*, *CPR18*, *CPR27*) をノックダウンした個体に対して、殺虫剤を局所投与する実験を行った。クチクラタンパク質遺伝子をノックダウンした個体のパラフィン切片を作成してクチクラの状態を観察したところ、通常の個体よりもクチクラが薄くなり、クチクラ層の構造に乱れが見られた。このような個体に殺虫剤を局所投与した結果、通常よりも速く殺虫効果が現れた。一方、クチクラの成分であるキチンの生合成酵素 *CHS1* をノックダウンした場合、クチクラ層の構造に乱れは見られたものの、殺虫剤の効果の現れ方には顕著な影響が見られなかった。

本論文の第 3 章では、クチクラのタンニングに関わる *tyrosine hydroxylase (TH)*, *dopa decarboxylase (DDC)*, *laccase 2 (Lac2)* をノックダウンした個体に、殺虫剤を局所投与する実験を行った。これらは *tyrosine* を初発物質とするメラニン形成経路に関わる酵素群であり、このうち *TH* は *tyrosine* から *3,4-dihydroxyphenylalanine (DOPA)* への水酸化反応を、*DDC* は *DOPA* から *dopamine* への脱炭酸反応をそれぞれ触媒する。次に *DOPA* や *dopamine* はさらに酸化反応を受けて、メラニン形成と硬化が進行するが、その酸化反応は *Lac2* により触媒される。ココヌストモドキ成虫において *TH*, *DDC*, および *Lac2* をノックダウンした場合、クチクラ層の構造に乱れは見られたものの、殺虫剤の効果の現れ方には顕著な影響が見られなかった。

このように本研究では、ココヌストモドキ成虫の主要なクチクラタンパク質 (*CPR4*, *CPR18*, *CPR27*) がクチクラの構成因子として必須であり、殺虫剤の体内への侵入を抑制する上で重要な防御機能を担うことが示された。本研究で調べた他の因子については、殺虫剤の侵入抑制への関与を示唆するような結果は得られなかったものの、遺伝子ノックダウンの効率が低かったために侵入抑制効果が低かったという可能性も排除できないことから、今後は実験条件を変更してさらに検討する必要があると考えられる。また、本研究で用いた以外にも多様な殺虫剤を投与することで、クチクラにより体内侵入抑制を受けやすいような殺虫剤の物理化学的性質について考察を進める予定である。これらの研究を通して、クチクラが殺虫剤の体内への侵入を抑制する防御機能について理解が深まり、殺虫剤抵抗性の問題解決や新規害虫防除技術の確立に大きく貢献することが期待される。

このように本研究は、応用昆虫学および植物保護学の分野において高度の学術的価値を有し、当該分野に関する学術研究に大きく貢献した。したがって学位審査委員会は、本論文が博士（農学）の学位を授与するに十分な価値を有するものと認め、博士論文として合格と判定した。