

昆虫神経ホルモンレセプターの解析

Molecular analysis of insect neurohormone receptors

代表研究者 理化学研究所先任研究員 松本正吾
Senior Research Scientist,
Institute of Physical & Chemical Research (RIKEN)
Shogo MATSUMOTO

共同研究者 東京農業大学教授 満井喬
Professor, Tokyo University of Agriculture
Takashi MITSUI

日本学術振興会特別研究員 小澤理香
Research Fellow of the Japan Society for the promotion
Science, Rika OZAWA

理化学研究所研究員 永峰俊弘
Research Scientist, RIKEN
Toshihiro NAGAMINE

We have prepared several probes for the receptors of insect neurohormones having an FXPRLamide sequence at the C-terminus. Among the probes we prepared, radioactive probes bound to the receptors of melanization and reddish coloration hormone (MRCH) or pheromone biosynthesis activating neuropeptide (PBAN). However, they were useless for the purification of the receptors because of high non-specific binding. By contrast, a non-radioactive probe, which was introduced three functional sites (avidin binding, covalent bonding and receptor binding sites), effectively bound to the PBAN receptor. Using this probe we have detected the PBAN receptor by chemiluminescence reaction and have purified it by electrophoresis. We have also established a cell-free system to produce the silkworm sex pheromone. By using this system, we have analyzed the molecular mechanism underlying the signal transduction of PBAN action. It has been suggested that PBAN receptor opens cell membrane Ca^{+} channel and the influx of Ca^{+} activates acyl CoA reductase through phosphoprotein phosphatase, resulting in stimulation of the final step of the pheromone biosynthetic pathway.

研究目的

進化の上から見て無脊椎動物の最上部に位置する昆虫は、その多様な生命現象を裏打ちする高度に発達、且つ、統合された脳神経系を備えている。そして、この脳神経

系を介した情報伝達系は、昆虫の基本的な生命維持活動はもとより、かつては”本能”として捉えられ、高等脊椎動物における記憶や学習能力にも匹敵しうる昆虫の様々な合目的な行動、あるいは環境に対する昆虫

の卓越した適応能力を支える上で重要な役割を担っている。

その中で、鱗翅目昆虫の食道下神経節はフェロモン生合成活性化神経ペプチド (PBAN)、体色黒化赤化ホルモン (MRCH)、休眠ホルモンという3種の異なる生理機能を持つ神経ホルモンを生産するが、これらの神経ホルモンはいずれもC末端に Phe-Xaa-Pro-Arg-LeuNH₂ (FXPRLアミド) という共通したアミノ酸配列を持つ。この特異なペプチド配列はゴキブリやバッタのミオトロピック神経ペプチドにも存在し、いずれの活性発現に対しても必要なアクティブサイトであることが我々の研究から明らかとなった。

本研究の最終目的はFXPRLアミド配列を持つ神経ペプチドの機能的多様性に着目し、これまでに例のない昆虫の神経ペプチドを標的とし、しかも、機能的に多様性を持つ新しいタイプの昆虫制御剤をデザインすることであるが、その基礎となる活性発現の機構を分子レベルから明らかにするために、神経ペプチド受容体およびシグナル伝達の機構を解析することを当面の目的とする。

研究経過および成果

神経ホルモン受容体の精製

FXPRLアミド配列を持つ昆虫神経ホルモンの受容体を解析するために、プローブとなるリガンドの調製を行った。トリチウムおよびヨウ素を用いた放射性プローブはMRCH、PBAN受容体と結合はしたものの非特異的な結合が多く、以降の解析が不可能であった。そこで、新たにPBANのC末端ペプチドTKYFSPRLアミドを出発物としてN末端にアビジン結合部位、リジン残基に架橋部位、C末端に受容体結合部位を持つ multi-functional な非放射性的FXPRLアミド受容体プローブをデザインし、合成した (図1)。このプローブは元の生物活性を保持しており、カイコフェロモン腺から可溶化したPBAN受容体と共有結合で架橋することにより安定なリガンド-受容体複合

体を形成し、アビジン-パーオキシダーゼによるルミノールの酸化で発するケミルミネッセンスによりPBAN受容体を感度良く検出することができた。この方法を用い、PBAN受容体を電気泳動により精製した。

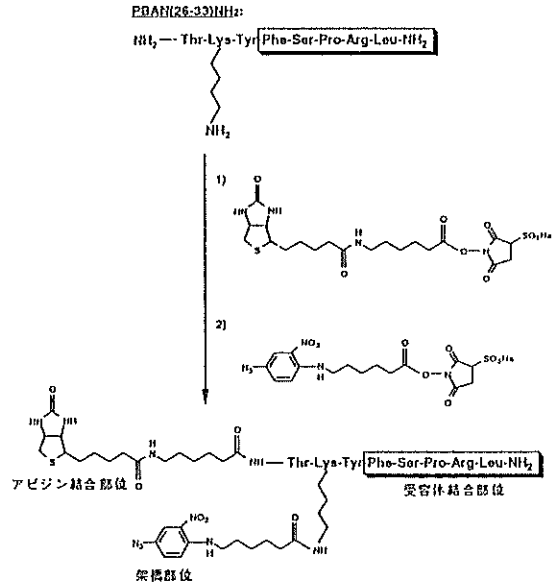


図1. 昆虫神経ホルモンレセプターに対するプローブの調製

ホルモンの受容体との結合に伴って引き起こされるシグナル伝達の解析

カイコPBANは食道下神経節に由来するペプチドホルモンであり、フェロモン腺(PG)に直接作用して性フェロモン(ボンピコール)の生合成を促す。したがって、PBANによる指令はすべてフェロモン腺で処理され、一連のボンピコール生合成系が進行する。このPBAN-PGという単純な系は高等生物におけるホルモン情報伝達系を理解するうえで単純かつ有効なシステムを提供する。そこで、ペプチドホルモン情報伝達の流れを機能性タンパクによる受け渡しとして明確に捉えるためにPG培養系を用い、機能性タンパク質阻害剤および活性化剤の影響を検討した。その結果、A23187、イオノマイシン(カルシウムイオノフォア)は単独でボンピコールの生合成を促したが、フォルスコリン(アデニレートシクラーゼ活性化

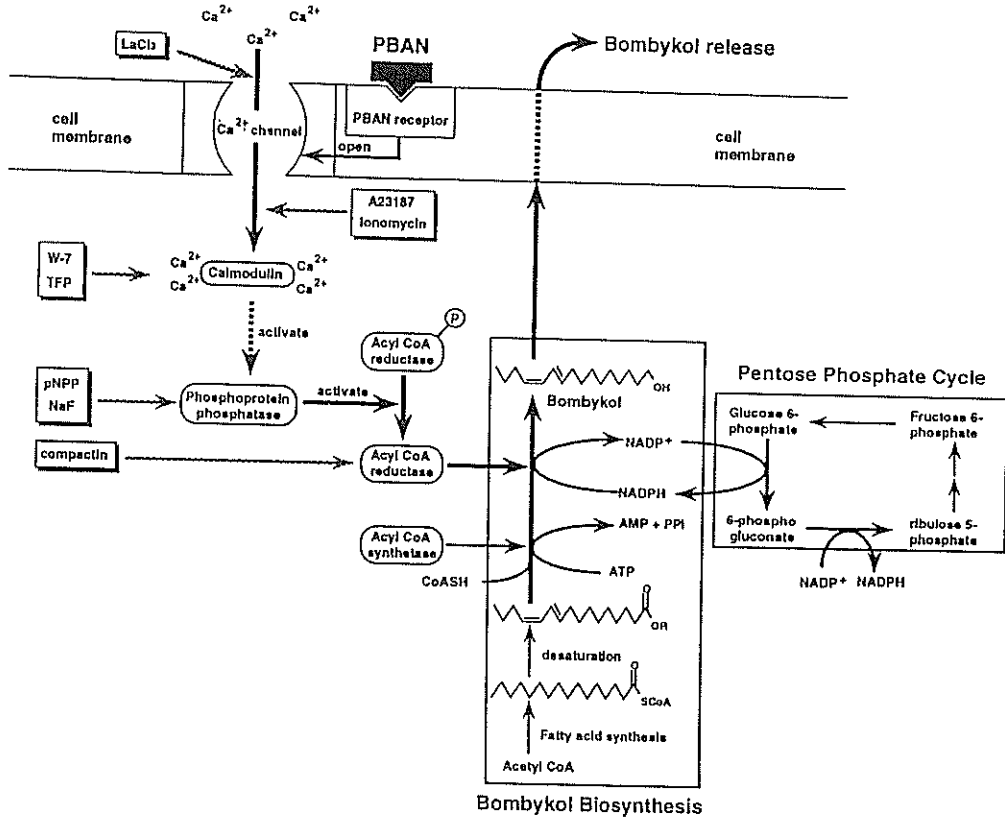


図2. ボンビコール生合成におけるPBANによるシグナル伝達の流れ

剤) PMA (C キナーゼ活性化剤) サイクリックヌクレオチド類は無効であった。また、LaCl₃ (カルシウムチャンネルブロッカー)、W-7、TFP (カルモジュリン阻害剤) pNPP、NaF (ホスファターゼ阻害剤) はフェロモントロピック活性を持つ合成ペプチドによるボンビコールの生合成を阻害したがホスホリパーゼC 阻害剤や各種キナーゼ阻害剤は無効であった。これらの結果から、PBANによる外部シグナルは膜表面レセプターに伝えられた後、細胞外カルシウムイオンの細胞内流入、カルモジュリン、ホスホプロテインホスファターゼを介した細胞内シグナル伝達によりボンビコール生合成系に伝えられることが示唆された。

一方、カイコにおいてPBANはボンビコ

ール生合成の最終段階であるアシル基の還元過程を調節する。この過程にはアシルCoAシンセターゼとアシルCoAレダクターゼが関与すると考えられるため、パルミチン酸およびパルミトイルCoAを基質としてフェロモン腺内の両酵素の性質を調べた。まず、上記フェロモン腺の培養系を用いパルミトイルCoAの取り込みおよびセチルアルコールへの変換を調べたところ、PBAN存在下ではパルミトイルCoAのセチルアルコールへの変換が認められたのに対し、PBAN非存在下ではこの変換が起こらず、PBANによるボンビコール生合成の調節はアシルCoAレダクターゼの関与する過程でなされることが示された。また、フェロモン腺ホモジネートを用い、パルミトイル

CoA、パルミチン酸のセチルアルコールへの変換を検討した結果、アシルCoAシンターゼはCoA、ATPを、レダクターゼはNADPHを必要とすることがわかった。さらに、アシルCoAレダクターゼはコンパクチン(HMGC_oAレダクターゼ阻害剤)により特異的に阻害され、コンパクチンは上記フェロモン腺の培養系においてボンピコールの生合成を阻害した。なお、フェロモン生合成阻害剤のうち、W-7、TFPはアシルCoAレダクターゼ活性を阻害したため、PBANのシグナル伝達におけるカルモジュリンの関与については検討を要することが示された。

さらに、ボンピコール生合成系のうちアシル基の還元過程をパルミチン酸およびパルミトイルCoAを用いて検討した結果、この過程にはCoA、ATP、NADPHが必要であることがわかった。一方、PBANはこの過程のうちアシルCoAレダクターゼの関与する過程を調節することが示され、この過程こそがボンピコール生合成の律速段階であることが示唆された。そこで、フェロモン腺ホモジネートを用い、セルフリー系でのボンピコールの生産を試みた。その結果、フェロモン腺ホモジネートをCoA、ATP、NADPHとともにインキュベートしたところボンピコールの新生が認められ、さらに、この反応系にヘキサンを添加し二層で反応させることにより新生ボンピコールを系外に移行することで効率的にボンピコールを生産することが可能となった。

以上の結果より、フェロモン生合成におけるPBANの細胞内シグナル伝達は図2のように進行することが示唆された。

今後の課題と発展

昆虫神経ホルモン受容体に対するプローブの調製は多くの試行錯誤を伴うものであった。しかし、神経ホルモンのアミノ酸配列の特徴に着目し、multi-functionalな非放射

性のFXPRLアミド受容体プローブを独自にデザインすることにより、PBAN受容体の精製がはじめて可能となった。本プローブを用いることによりシグナル伝達の初発段階における分子機序が今後明らかになるものと思われる。一方、ホルモンの受容体との結合に伴って引き起こされるシグナル伝達の分子機構は本研究により大筋で明らかとなった(図2)。今回おこなった有機溶媒であるヘキサンを用いたセルフリー系でのボンピコール生産系の確立は全くオリジナルなものであるが、ヘキサン層が生体における脂質二重層膜に代替すると考えられることから、このセルフリー系の確立はフェロモンのみならずステロール等の生物全般に共通した細胞内での脂質輸送の機構解明に道を拓くものと考えられる。

発表論文

Matsumoto S., Ozawa R., Nagamine T., Kim G-H., Uchiumi K., Shono T., and Mitsui T.: "Intracellular transduction in the regulation of pheromone biosynthesis of the silkworm, *Bombyx mori*: Suggested involvement of calmodulin and phosphoprotein phosphatase", *Biosci. Biotech. Biochem.* 59, 560-562 (1995).

Ozawa R., Matsumoto S., Kim G-H., Uchiumi K., Kurihara M., Shono T., and Mitsui T.: "Intracellular signal transduction of PBAN action in lepidopteran insects: Inhibition of sex pheromone production by compactin, an HMG CoA reductase inhibitor", *Regul. Pept.* in press (1995).

Matsumoto S., Ozawa R., Uchiumi K., Kurihara M., and Mitsui T.: "Intracellular signal transduction of PBAN action in the common cutworm, *Spodoptera litura*: Effects of Pharmacological Agents on Sex Pheromone Production In Vitro", *Insect Biochem. Molec. Biol.* in press (1995).