

論文内容の要旨

論文題目：昆虫の脱皮・変態を制御する神経ペプチドに関する研究

山中 直岐

【序論】

昆虫の脱皮・変態は内分泌系によって巧妙に支配されているが、ここで中心的な役割を果たすのが、前胸腺と呼ばれるホルモン腺である。脳が分泌するペプチドホルモンである前胸腺刺激ホルモン (PTTH) に刺激された前胸腺は、ステロイドホルモンであるエクジソンを分泌する。このエクジソンが昆虫体内の各組織に作用することで、脱皮・変態が直接誘導される。

しかし一方で、PTTH 以外の前胸腺調節因子の存在を示唆する知見が、これまでに数多く報告されている。脱皮・変態の統御機構を明らかにする上で、こうした未知の因子を同定し、それらがエクジソン分泌を制御する分子機構の詳細を解析することは不可欠である。

そこで本研究では、鱗翅目昆虫であるカイコの前胸腺に作用して脱皮・変態を支配する新たな因子を同定し、それらが昆虫の成長を制御する機構を解明することを目的とした。

【結果】

1. 新規前胸腺抑制因子 BMS の同定

我々はまず、エクジソン分泌促進の際にセカンドメッセンジャーとしてはたらく cAMP に着目し、前胸腺培養系と HPLC による cAMP 定量系とを組み合わせた検定法 (cAMP 法) を考案した。

この cAMP 法を前胸腺調節活性の検定系としてカイコ脳約 1 万 2 千個を出発材料に精製を行ったところ、1 つの画分に強い前胸腺抑制活性を見出し、4 段階の HPLC によってこの活性物質の単離に成功した。

質量分析による解析の結果、単離された物質は myosuppressin と呼ばれるペプチドに共通するアミノ酸配列を有していたため、これをカイコ myosuppressin (BMS) と命名した。in situ ハイブリダイゼーションと免疫染色による解析の結果、BMS は脳の 2 対の神経分泌細胞で産生され、脳に付随する内分泌器官から体液中に分泌されるホルモンであることが示唆された。

また、前胸腺培養系での機能解析の結果からは、BMS が cAMP 蓄積のみならず前胸腺からのエクジソン分泌も抑制すること、その抑制作用は既に知られていた前胸腺抑制因子である前胸腺抑制ペプチド (PTSP) よりも強く、PTTH や PTSP とは異なる経路で前胸腺に作用すること、がそれぞれ確認された。

2. BMS 受容体の同定

BMS が PTTH や PTSP とは異なる経路で前胸腺に作用することが示されたことから、前胸腺には BMS 特異的な受容体が発現しているものと予測された。そこで、我々が作成した前胸腺 cDNA ライブラリーから構築された EST データベースを利用し、BMS 受容体 (BMSR) を同定することに成功した。発現解析の結果、*BMSR* は予想通り前胸腺において強く発現していた。また HEK293 培養細胞を用いた発現系により、BMSR が高い特異性で BMS を受容することを明らかにした。

3. 新規前胸腺抑制機構の発見

myosuppressin は FMRFamide-related peptide (FaRP) と呼ばれる、C 末側に共通配列を有するペプチドファミリーに属している。BMSR の機能解析の過程で、カイコと同じ鱗翅目昆虫であるタバコスズメガ (*Manduca sexta*) 由来の他の FaRP が、この受容体を弱く活性化することが分かったため、BMS 以外のカイコ内在性 FaRP が、BMSR を介して前胸腺を抑制している可能性が考えられた。そこで次に、FaRP を高感度に認識する ELISA 系を構築して BMS 以外のカイコ FaRP の精製を試み、新規 FaRP の単離・同定に成功した。

質量分析による解析の結果、精製した FaRP は FMRFamide と呼ばれるペプチドに相同性があり、ゲノム情報から同定した遺伝子 (*Bommo-FMRFamide*; *BRFa*) はさらに 3 つの FaRP をコードしていた。これら 4 種類のペプチドは予想通り BMSR を μM レベルで活性化し、前胸腺培養系でもエクジソン分泌抑制作用をもつことが確認された。

uM レベルという高濃度での抑制活性は、BRFa が体液を介してではなく、神経投射などによって局所的な高濃度で前胸腺に作用していることを予想させた。そこで *BRFa* の発現パターンを確認すると、中枢神経系特異的に、特に前胸腺に近接する胸部神経節において高い発現が見られた。そこでさらに *in situ* ハイブリダイゼーションと免疫染色により、胸部神経節の神経分泌細胞が BRFa ペプチドを産生し、軸策を直接前胸腺に投射していることを確認した。また、この前胸腺上の軸策を摘出して TOF-MS 測定用プレートに乗せ、レーザーを直接照射して TOF-MS を測定すること (Direct MS) に成功し、遺伝子配列から予測した 4 種類の BRFa ペプチド全てが前胸腺表面に運ばれていることを明らかにした。

この前胸腺投射 BRFa 神経の生理作用をさらに検証するため、電気生理学的な手法を用いて、5 齢幼虫の成長過程における神経発火頻度の変化と、体液中のエクジソン濃度変動との関連を調べた。その結果、前胸腺のはたらきが抑制されている 5 齢前半には BRFa 神経は頻繁に発火しているのに対して、前胸腺が活性化する 5 齢終盤には、BRFa 神経の発火が抑制されていることが確認できた。このように、前胸腺投射 BRFa 神経は PTH などのホルモンと協調しながら、抑制性のシグナルを伝達することで前胸腺のはたらきを調節しているものと考えられる。

4. G タンパク質共役型神経ペプチド受容体の網羅的同定とその発現解析

ここまでの研究では、前胸腺に強く発現していた BMSR の機能解析が、新規前胸腺抑制機構の発見につながる重要なポイントになった。このことから、何らかの方法で前胸腺に高発現している神経ペプチド受容体を網羅的に同定できれば、それらの機能を詳細に解析することで、前胸腺に作用する神経ペプチド群の全体像がつかめるのではないかと、という着想を得た。

そこで、カイコゲノムのドラフトシーケンスを利用して、既に知られていた 40 種類のキイロシヨウジョウバエ G タンパク質共役型神経ペプチド受容体 (神経ペプチド GPCR) のカイコホモログ (BNPR) を網羅的に同定する戦略を立てた。これにより、139 個のゲノム断片から、既に知られていた 8 種類の受容体に加えて、新たに 40 種類の BNPR (BNPR-A1~A35, BNPR-B1~B4) を同定することに成功した。

次にこれら計 48 種類の受容体について、12 組織、2 ステージで定量 RT-PCR 法を用いた発現解析を行ったところ、既知の受容体の発現パターンはいずれも過去の報告と良く一致していた。そこで、さらにこの発現解析結果の妥当性を検証するため、既知の神経ペプチドの未知の受容体を、BNPR の発現パターンから推定できるかを検証することにした。

allatotropin および allatostatin は、幼若ホルモン (JH) 産生器官であるアラタ体に作用し、その JH 合成活性を刺激および抑制するペプチドである。側心体・アラタ体複合体に高い発現が

見られた 6 種類の BNPR (BNPR-A1, A6-a, A10, A11, A16, B3) について、HEK293 培養細胞を用いた発現系でそのリガンドとなるペプチドを解析したところ、BNPR-A1 および A16 が、それぞれ allatostatin、allatotropin を特異的に認識することが示された。こうした結果から、今回の発現解析の結果を基に、前胸腺などの器官に作用するペプチドを探索することの妥当性が確認できた。

5. 前胸腺に発現する BNPR-B4 の解析

組織別発現解析の結果から、5 齢幼虫への脱皮直前の時期に前胸腺で高い発現を示す受容体、BNPR-B4 が同定された。そこで、前胸腺における BNPR-B4 の発現量の変動パターンをさらに詳細に解析した結果、この受容体は各幼虫期の脱皮直前に、極めて一過的に前胸腺に発現することが明らかになった。この時期の前胸腺は脱皮を誘導するエクジソンを大量に分泌した後の不活性化過程にある。そこで、エクジソン分泌前の 4 齢 2 日目の前胸腺を用いて、エクジソンによる BNPR-B4 の発現誘導機構を検証した。その結果、BNPR-B4 は一定時間エクジソンにさらした後に、エクジソンを培地から除いた時にのみ一過的に発現が誘導されることが分かった。この結果は、BNPR-B4 が体液中のエクジソンピーク後のネガティブフィードバックの過程において、前胸腺で何らかの役割を果たしていることを示唆している。

【結論】

本研究では、新たな生物検定系を用いて精製・単離した新規前胸腺抑制因子 BMS の機能解析を足掛かりに、その受容体の同定、さらに同じ受容体に作用する BRFa の同定と機能解析という流れで、昆虫の脱皮・変態統御機構の解析を進めてきた。また、その過程で得られた着想を基にカイコ神経ペプチド GPCR の網羅的同定を行い、未知の前胸腺制御因子のさらなる存在を示唆する知見を得た。これまで PTTH という刺激性のホルモンによる活性調節のみが専ら研究されてきた脱皮・変態統御機構において、抑制因子の存在、さらに神経投射による制御機構の存在を明確に示した意義は大きく、今後はこうした抑制機構を作動させる要因の解明が重要になってくると考えられる。また、BNPR の発現解析の結果は、前胸腺に限らず脱皮・変態に関与する他の多くの組織においても、未だ同定されていない制御因子が数多く存在することを示唆している。前胸腺に発現する BNPR-B4 のリガンド同定に加え、こうした未知の因子を同定し、その詳細な機能解析を進めることで、昆虫の脱皮・変態という複雑かつ魅力的な現象の全容に迫ることができるものと確信する。