

【結果と考察】

1. カイコ FXPRL アミドペプチド受容体の機能解析

まず、同定された 2 種類の相同遺伝子が、それぞれ FXPRLaP の受容体をコードしているのかわかるようにするため、ヘテロな発現系での受容体の再構成を試みた。ニューロメジン U 受容体は 7 回膜貫通型の G タンパク質共役型受容体 (GPCR) であり、今回解析をおこなった 2 種類の相同遺伝子の予想アミノ酸配列も、同様に 7 つの予想膜貫通領域を有していた。そこで、発現系には GPCR の再構成実験が数多く報告されている、アフリカツメガエル卵母細胞発現系を用いた。

カイコ蛹の卵巣からクローニングされた遺伝子、カイコ休眠ホルモン受容体遺伝子 (以下 *BmDHR*) を発現したアフリカツメガエル卵母細胞では、カイコ FXPRLaP のひとつである休眠ホルモン (DH) の投与によって、卵母細胞内在性の $G\alpha_q$ サブユニットとホスホリパーゼ C (PLC) の活性化に伴う Ca^{2+} 依存性 Cl^- チャネルの活性化が観察された。また、他のカイコ FXPRLaP にも応答を示すものの、DH に対する親和性が最も高かった。

カイコガのフェロモン腺からクローニングされたカイコ PBAN 受容体遺伝子 (以下 *BmPBANR*) は、既に共同研究者らにより、昆虫由来培養細胞 Sf9 の発現系で、カイコ FXPRLaP であるフェロモン生合成活性化神経ペプチド (PBAN) の受容体として機能することが報告されていた。今回おこなったアフリカツメガエル卵母細胞発現系においても、*BmPBANR* 発現卵母細胞の PBAN に対する応答が Ca^{2+} 依存性 Cl^- チャネルの活性化によって確認された。さらに、*BmPBANR* は *BmDHR* とは異なり、カイコ FXPRLaP を広く認識することができる受容体であることが明らかになった。

次に、それぞれの受容体の発現パターンを解析することによって、カイコ FXPRLaP の未知の生理機能の解明を試みた。これまで知られているカイコ FXPRLaP の生理機能は蛹期と成虫期におけるものであり、幼虫期における機能は明らかにされていない。そこで、カイコ幼虫の主要な組織における *BmDHR*、*BmPBANR* の発現パターンを解析した。その結果、*BmDHR*、*BmPBANR* とも幼虫の組織における発現が認められ、カイコ FXPRLaP が新規の機能を有していることを示唆する結果となった。

2. カイコ FXPRL アミドペプチドの前胸腺刺激活性の解析

次に、受容体を発現している組織の中から、前胸腺における *BmDHR* の発現に着目し、さらに解析を進めることにした。前胸腺は、昆虫の脱皮・変態に必須のステロイドホルモンであるエクジソンの産生器官であり、前胸腺刺激ホルモン (PTTH) による正の制御を受けることが知られて

いるが、これまでの知見から PTH 以外にも正の前胸腺調節因子が存在することが示唆されていた。さらに、PTH は前胸腺細胞内の PLC を活性化し、エクジソン生合成を促進していることが示唆されていたことから、FXPRLaP が PLC と共役した GPCR である BmDHR を介して正の前胸腺調節因子として機能することが期待された。

まず、終齢幼虫 0 日目から蛹期 0 日目までの各発育ステージにおける BmDHR の発現を解析したところ、終齢後期からの BmDHR の発現量の増加が認められた。そこで、BmDHR が強く発現している終齢後期とほとんど発現していない終齢中期の前胸腺をそれぞれ DH 存在下で培養したところ、終齢後期の前胸腺でのみ DH によるエクジソン生合成の促進が確認された。また、BmDHR への親和性と同様に、カイコ FXPRLaP の中では DH の前胸腺刺激活性が最も強かった。これらの結果は、FXPRLaP によるエクジソン生合成の促進が、BmDHR を介していることを強く示唆するものである。

さらに、DH の投与によって、前胸腺細胞内 Ca^{2+} 濃度の上昇や cAMP の蓄積といった、エクジソン生合成促進に必要とされる細胞内セカンドメッセンジャーの変化も観察された。

以上の結果から、カイコ終齢後期の前胸腺では FXPRLaP によるエクジソン生合成の促進が起こっていることが示唆された。作用強度の大きさから、特に DH が前胸腺刺激因子として生理的に機能している可能性が高いと考えられる。

3. 新規カイコ FXPRL アミドペプチド遺伝子 BmCAPA の解析

過去の知見から、DH-PBAN 遺伝子の発現が確認されている食道下神経節だけではなく、カイコ中枢神経系のそれ以外の神経節においても FXPRLaP が存在することが示唆されていた。そこで、新たなカイコ FXPRLaP 遺伝子の同定を試みた。

全ゲノム情報が解読されているショウジョウバエでは *capability* と *hugin* の 2 種類の FXPRLaP 遺伝子が明らかとなっているが、カイコではどちらの相同遺伝子もこれまで同定されていなかった。未知の FXPRLaP の実体がこれらの相同遺伝子である可能性を考え、近年公開されたカイコゲノムのドラフトシーケンスデータベースを用い、ショウジョウバエ FXPRLaP 遺伝子の相同遺伝子を探索した。その結果、ショウジョウバエ *capability* の相同領域を有するゲノム断片配列が同定された。この相同領域から RACE 法によって全長 cDNA を決定し、カイコの新規 FXPRLaP (Bmpyrokinin; BmPK と命名) をコードしていると推定されるカイコ *capability* 遺伝子の配列 (BmCAPA-A) を得た。この遺伝子には FXPRLaP をコードしないタイプのスプライシングバリエーション (BmCAPA-B) が存在していたため、BmCAPA-A のみを検出できるプライマーを用い

てカイコの中樞神経系での発現を解析した。その結果、食道下神経節に加え、脳、腹部神経節における *BmCAPA-A* の発現が明らかになった。さらに免疫組織化学により *BmPK* の発現細胞を解析したところ、これらの神経節の神経分泌細胞が染色された。また、同時に神経ペプチドの分泌器官での染色も観察されたことから、*BmPK* がホルモンとして末梢の標的器官に作用していることが示唆された。

次に、*BmPK* の配列を基に作成した合成ペプチドを用い、*BmDHR*、*BmPBANR* に対する親和性をアフリカツメガエル卵母細胞発現系で解析した。その結果、*BmPK* は *BmPBANR* に対してほとんど親和性を示さないのに対して、*BmDHR* に対しては *DH* とほぼ同様の親和性を示すことが明らかとなった。さらに、この *BmDHR* への親和性から予想されるように、*BmPK* は *DH* と同程度の前胸腺刺激活性を示した。これらの結果から、カイコ終齢後期の前胸腺に対し、*BmPK* も体液を介したエクジソン生合成の制御をおこなっている可能性が示唆された。

【結論】

2種類のカイコ *FXPRLaP* 受容体、*BmDHR* と *BmPBANR* の解析をおこない、ともに *Gαq* 共役型 *GPCR* であること、またそれぞれのリガンド特異性が異なることを明らかにした。さらに、各受容体の幼虫組織における発現パターンから、カイコ幼虫の終齢後期の前胸腺では *BmDHR* が発現しており、この時期の前胸腺では *FXPRLaP* の受容による *BmDHR* の活性化に伴い、エクジソン生合成が促進されることが明らかとなった。カイコ *FXPRLaP* の前胸腺刺激活性の比較から、特に *BmDHR* に対して強い親和性を示す *DH* と *BmPK* が、エクジソン生合成を促進するホルモンとして終齢後期の生体内で機能している可能性が示唆された。これまでの多くの知見により、*PTTH* 以外にも正の前胸腺調節因子が存在することが指摘されてきた。本研究はカイコにそのような因子が存在することを、受容体を含めて分子レベルで明確に示した初めての報告である。

FXPRLaP は幅広い昆虫種で保存されたペプチドファミリーであるにも関わらず、明らかにされている作用はそれぞれの種に特異的なものが多く、共通した機能は明らかになっていない。今回の知見は、昆虫の共通の生理現象である脱皮・変態への *FXPRLaP* の関与を示唆するものであり、種を越えた *FXPRLaP* の機能の解明につながるものとして期待される。