

## 論文の内容の要旨

応用生命化学専攻  
平成 20 年度博士課程進学  
氏 名 諸岡 信克  
指導教員名 長澤 寛道

### 論文題目

鱗翅目昆虫の摂食モチベーション調節ペプチド(HemaP)の  
構造および機能に関する研究

植食性昆虫の周期的な摂食行動は、環境などの外来性の要因だけでなく、体内の栄養状態などの内因性の要因により構築されている。この周期的な摂食行動は、体液中の様々な因子によって調節されていると考えられている。近年、カイコ(*Bombyx mori*)の幼虫体液から、摂食行動のモチベーションを上昇させる 62 残基のペプチド性因子(Hemolymph major anionic peptide: HemaP)が同定された<sup>1)</sup>。カイコ幼虫に HemaP を注射すると、食餌量の増加と活発な探餌行動が観察される。体液中の HemaP 濃度は、カイコ幼虫の周期的な摂食行動に先行して増加し、食餌により減少する。このように、HemaP は、カイコ幼虫の摂食行動の周期性を調節する。データベース検索によって、相同性は低いものの 4 種の鱗翅目昆虫で HemaP 様分子の存在が見出された。しかし、カイコ以外での生理活性は、確認されていない。HemaP は、 $\alpha$ -ヘリックスに富む二次構造を有するという特徴を持つ。他種の HemaP 様分子も、 $\alpha$ -ヘリックスに富むことが予想されているため、HemaP の特徴的構造が機能発現に重要な働きをしていると考えられる。本博士論文では、先ず HemaP の活性が他の昆虫で保存されているか確認し、その後、比較生物学的な見地から、HemaP の構造活性相関を検討し、さらに、HemaP 分泌調節と体液中の

他の因子との相互作用を明らかにすることによって、新規摂食行動調節ペプチドである HemaP の機能解明を目指した。

## 第 1 章 HemaP の構造活性相関の解析

カイコと同じ大型鱗翅目昆虫であるエビガラスズメ (*Agrius convolvuli*) から、2 種類のカイコ HemaP 様分子を単離した。それぞれの分子質量から、p6692 と p6894 と命名した。p6692 と p6894 の一次構造を決定した結果、両ペプチドは同一のアミノ酸配列を有し、カイコ HemaP と 32% の相同性を有していた。分子質量の違いは、p6894 の 5 残基目に付加した 1 残基の  $\alpha$ -GalNAc によることを、付加糖の蛍光誘導体の HPLC 分析、およびレクチンとの親和性による解析から明らかにした (図 1)。CD スペクトルを測定した結果、p6692 と p6894 は、カイコ HemaP と類似した  $\alpha$ -ヘリックスに富む二次構造を有することが分かった (図 2)。そこで、p6692 と p6894 は、エビガラスズメ HemaP (A-HemaP) であると命名した。p6692 と p6894、および大腸菌発現組換え体をエビガラスズメ幼虫に皮下注射し、2 時間行動を観察した結果、3 種類のペプチド投与群において、同程度の生理活性が認められた。すなわち、A-HemaP は、カイコ HemaP と同様の摂食行動調節活性があり、HemaP による制御システムが鱗翅目昆虫種間で保存されていると推測された。また、A-HemaP の糖の有無は、二次構造と活性には影響しなかった。

カイコ HemaP と A-HemaP (p6692) に交差活性が認められなかったことから、HemaP 分子内には活性に重要な領域があると予想された。そこで、カイコ HemaP を用いた構造と活性の関係を調べた。まず、N 末端および C 末端を部分欠損した 16 種類の HemaP を調製した。それぞれを生物検定に供した結果、10 残基目から 30 残基目のアミノ酸配列を含む部分欠損 HemaP に生理活性が観察されたため、この領域をコア領域とした。コア領域のみのペプチド (hmp<sub>10-30</sub>) には生理活性がないことから、カイコ HemaP の活性発現には、コア領域とその片側あるいは両側に数残基のアミノ酸残基が必要であることが分かった。コア領域は、カイコ HemaP 中に、3 箇所存在する推定  $\alpha$ -ヘリックス領域のうち、N 末端側の  $\alpha$ -ヘリックス領域とほぼ一致したため、次に  $\alpha$ -ヘリックス領域の重要性を検証した。 $\alpha$ -ヘリックスを安定化する TFE (2,2,2-trifluoroethanol) を用いて、カイコ HemaP の CD スペクトルを測定した。その結果、TFE 濃度が高いほど HemaP の  $\alpha$ -ヘリックス含有量が増加した。これは、HemaP が、 $\alpha$ -ヘリックスを形成しやすい分子であることを意味する。水中での CD スペクトル分析では、コア領域に数残基伸張させたペプチドの  $\alpha$ -ヘリックス含有量が、コア領域を含まないペプチドより高かった。

コア領域のアミノ酸配列は、種間の相同性が低いため、HemaP の種特異性に貢献していると考えた。そこで、カイコ HemaP と A-HemaP のコア領域を交換したキメラ HemaP を調製した。キメラ HemaP を、カイコおよびエビガラスズメ幼虫

注射した結果、同種のコア領域を有するキメラ HemaP を投与された群でのみ生理活性が認められた。以上の結果から、HemaP の活性発現にはコア領域が重要であり、種特異性は、コア領域のアミノ酸配列によることが示された。

カイコ HemaP は、ゲルろ過クロマトグラフィーにおいて、二量体に相当する時間に溶出した。既に調製した各部分欠損 HemaP の溶出時間を解析した結果、コア領域を含むペプチドが二量体に相当する時間に溶出した。また、hmp10-30 は、カイコ HemaP のコア領域を有するキメラ HemaP とヘテロ二量体に相当する時間に溶出したが、異種のキメラ HemaP とは、二量体に相当する時間に溶出されなかった。このことは、コア領域が、HemaP の種特異的な二量体形成に重要であることを示唆している。

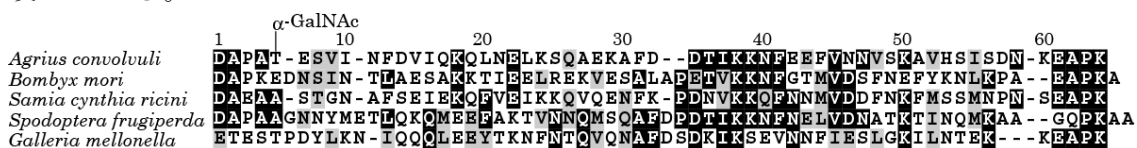


図 1：鱗翅目昆虫の HemaP 相同分子のアミノ酸配列のアライメント

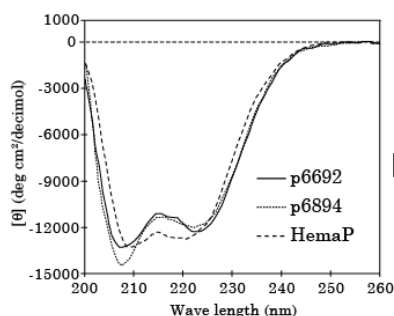


図 2：カイコ HemaP と A-HemaP の CD スペクトル

## 第 2 章 カイコ組織培養を用いた HemaP の分泌調節機構の解析

絶食時に分泌された HemaP は、摂食後に再脂肪体に吸収されることから、HemaP の濃度変動は、摂食状態に応じた脂肪体と体液間の HemaP の移動で作られると考えられている<sup>1)</sup>。この分泌制御の仕組みを明らかにするため、組織培養したカイコ幼虫の脂肪体から培地中に分泌される HemaP 量を分析した。その結果、培養時間の長さに係らず、培地中の HemaP 量は一定であったため、培地中の栄養状態に変化がなければ HemaP 濃度は一定に保たれると考えた。培地の半分量を経時的に交換しながら脂肪体の組織培養を行った結果、培地中の HemaP 濃度は、周期的に変動している可能性が示された。よって、栄養状態の変化とは無関係に、脂肪体は HemaP の分泌と再吸収を自律的に調節している可能性が示唆された。

体液中の HemaP 濃度は、カイコ 5 齢の摂食期を通じてほぼ一定に保たれていた。カイコの生活環では、摂食行動を行わない時期があるので、体液中の HemaP 濃度が生育段階を通じて変動をするかどうかを、抗 HemaP 抗血清を用いた ELISA 法で定量した。その結果、体液中の HemaP 濃度は、カイコの脱皮変態の時期と一致して変動した。real-time PCR により、この変動は HemaP の転写レベルの変動で

あることが示された。HemaP の転写レベルが、JH やエクジステロイドにより制御されているか、現在解析中である。以上の結果から、体液中の HemaP 濃度は、摂食行動を調節する小さい短期的変動と、脱皮変態のタイミングと同調した大きい長期的変動があることが明らかになった。

### 第 3 章 HemaP 結合タンパク質の精製および機能解析

体液中のカイコ HemaP の挙動を、密度勾配遠心およびゲルろ過クロマトグラフィーで解析した結果、HemaP 結合タンパク質の存在が示唆された。カイコ幼虫の体液を HemaP アフィニティーカラムに供した結果、約 30 kDa のタンパク質が特異的に HemaP と結合することが分かった。N 末端アミノ酸配列解析の結果、このタンパク質は、機能未知の 30K タンパク質の 1 つ、30K6G1 であった。大腸菌発現組換え 30K6G1 (r30K6G1) を、HemaP アフィニティーカラムに供した結果、r30K6G1 と rHemaP の結合が認められた。次に、カイコ幼虫に r30K6G1 を注射した結果、摂食関連行動の長さが減少した。また、16 時間絶食させて、摂食行動のモチベーションを上げたカイコ幼虫に rHemaP と r30K6G1 の混合液を注射した結果、r30K6G1 と rHemaP の混合液は、rHemaP 注射で惹起される摂食行動開始時間を早める活性<sup>2)</sup>を顕著に抑制した。以上の結果から、30K6G1 はカイコ HemaP と複合体を形成し、カイコ幼虫の HemaP 感受性を低下させている可能性が示唆された。

### 総括

本研究から、HemaP は脂肪体からの分泌と再吸収によって、体液中の HemaP 濃度の変動を作り出し、その結果、摂食行動の周期性が作り出されるものと考えられる。HemaP は、活性に必須なコア領域のアミノ酸配列によって種特異的な活性発現を示すが、HemaP による摂食行動の調節機構は、鱗翅目昆虫で保存されていることが推定された。HemaP の濃度変動と食道下神経節のドーパミン量には負の相関関係が見られることから<sup>1)</sup>、HemaP の濃度変動を神経系が感知する機構を明らかにすることによって、HemaP の摂食行動における役割を明らかにすることが出来ると考えられる。また、脂肪体による HemaP の分泌と吸収を調節する、体液中の因子を同定する必要がある。これらを解明することによって、体液中の因子 (HemaP) を介した摂食周期調節機構を解明できるものとする。

### 参考文献

1. Nagata, S., Morooka, N., Asaoka, K., Nagasawa, H., (submitted)
2. Nagata, S., Morooka, N., Matsumoto, S., Nagasawa, H., (2009) *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1163, 481-483.