

論文の内容の要旨

応用生命化学 専攻
平成 21 年度博士課程 進学
氏 名 永井 千晶
指導教員名 長澤 寛道

論文題目

クルマエビにおける甲殻類血糖上昇ホルモンの機能解析および受容体の同定

エビやカニなどが属する甲殻類では、眼柄に主要な神経内分泌系である X 器官 - サイナス腺系が存在する。この内分泌系で産生される甲殻類血糖上昇ホルモン (CHH) 族ペプチドは、甲殻類で主要なペプチドホルモンファミリーを形成する神経ペプチドである。このファミリーの分子は、一次構造上の高い相同性を示し、 α -helix に富む類似した立体構造を有している。CHH 族ペプチドは節足動物で広く保存されたペプチドホルモンファミリーであり、甲殻類では、CHH のほかに、脱皮抑制ホルモン (MIH)、卵黄形成抑制ホルモン (VIH)、大顎器官抑制ホルモン (MOIH) が、また、昆虫では、イオン輸送ペプチド (ITP) および ITP-like (ITPL) が知られている。

CHH 族ペプチドでは、一個体のなかに、遺伝子重複により多様化したペプチドが複数存在し、それらの生物活性も多様で重複していることが多い。甲殻類十脚目に属するクルマエビ *Marsupenaeus japonicus* の場合、6 種類の CHH 族ペプチド (Pej-SGP-I~III、-V~VII) が CHH 活性および VIH 活性、Pej-SGP-IV が MIH 活性を有し、Pej-SGP-V および VI はさらに MIH 活性も示す。また、CHH とされているペプチドは血糖上昇活性を有するが、糖代謝¹⁾のほかにも、脂質代謝、脱皮、生殖、ストレス応答など、多様な生体制御を担っていることが知られている。このような CHH 族ペプチドの「構造類似性」と「多機能性」から、各ペプチドの生理機能やそれによる生体制御の実態を理解することが困難であるのが現状である。それゆえ、CHH 族ペプチドによる生体制御の全容を理解するためには、まず、各 CHH

族ペプチドが生体内でどのように識別されているかを明らかにする必要がある。ホルモンの識別には受容体が重要な役割を担うことから、本研究では、クルマエビを用いて、CHH による血糖上昇機構を明らかにすることを目的とし、CHH 受容体の組織分布や生化学的性質を解析し、さらにその同定を目指した。

第1章 CHH のセカンドメッセンジャーおよび CHH 族ペプチドの標的組織の同定

クルマエビにおける CHH の細胞内シグナル伝達のセカンドメッセンジャーを同定するため、CHH による標的組織の細胞内 cAMP、cGMP、および IP₃ レベルの変動を調べた。CHH の主要な標的組織と考えられている肝臓について、CHH の産生部位である眼柄の切除、および、*ex vivo* での組換え Pej-SGP-VII (rCHH)²⁾ の曝露による影響を解析した。その結果、CHH の細胞内シグナル伝達のセカンドメッセンジャーとして cGMP が同定された³⁾。非代謝性 cGMP アナログを注射した個体では、CHH と同様の血糖上昇作用が認められたことから、CHH の血糖上昇活性は、cGMP を介していることが示された。細胞内 cGMP レベルを指標とした生物検定から、rCHH は、解析したいずれの組織に対しても作用した。CHH と同様に、クルマエビで MIH として機能する Pej-SGP-IV、および、眼柄以外でも発現する機能未知の CHH 族ペプチド、Pej-MIH-B もまた、標的組織の細胞内 cGMP レベルを上昇させた。これらの結果から、クルマエビの CHH 族ペプチドには、その細胞内シグナル伝達に cGMP が関与しているという共通点が見出された⁴⁾。

第2章 CHH 受容体の生化学的解析

クルマエビにおける CHH 受容体の生化学的性質および組織分布についての知見を得るため、放射性ヨウ素で標識した rCHH (¹²⁵I-rCHH) を用いた *in vitro* での結合実験、化学架橋実験、および、*in vivo* でのトレーサー実験を行った。¹²⁵I-rCHH は解析したいずれの組織の膜画分に対しても特異的に結合した。トレーサー実験でも、同様に、いずれの組織においても ¹²⁵I-rCHH の結合が認められた。¹²⁵I-rCHH の結合量が比較的多かった肝臓、心臓、腹部筋肉、後腸、および卵巣の膜画分を用いたスクヤッチャード解析から、¹²⁵I-rCHH とその受容体とは 1:1 で結合し、 $K_d = 0.86 \sim 3.6 \times 10^{-9}$ M、 $B_{max} = 138 \sim 915$ fmol/mg protein であることが示された。また、化学架橋実験から、これら 6 つの組織には、rCHH と特異的に結合する約 34~62 kDa の膜タンパク質の存在が示され、そのうち、約 48 kDa のタンパク質は各組織で共通して認められた。¹²⁵I-rCHH の結合量に対する眼柄切除の影響を調べたところ、切除から 0~14 日の間で肝臓、心臓、および卵巣の膜画分に対する ¹²⁵I-rCHH の結合量が変動し、特に、肝臓では、性差なく、¹²⁵I-rCHH の結合量が眼柄切除 7 日後まで単調に増加した。

第3章 発現クローニング法による CHH 受容体の同定の試み

クルマエビにおける CHH 受容体を同定するため、肝臓由来の cDNA ライブラリーを複製し、発現クローニング法による CHH 受容体の cDNA クローニングを試みた。一過的または安定にライブラリーを発現させた哺乳類細胞に対し、放射性ヨウ素、ビオチン、または蛍

光色素で標識した rCHH を結合させ、その結合を指標に Pej-SGP-VII 受容体をコードするクローンをスクリーニングした。シブセレクション法では、既知の配列と相同性を示さない、膜タンパク質をコードするクローンが得られた。そのタンパク質を一過的に発現させた HEK293T 細胞の膜画分に対し、¹²⁵I-rCHH は特異的に結合した。しかし、本実験では、生体内で Pej-SGP-VII に対する受容体として機能する分子とは断定できなかった。一方、一過的または安定にライブラリーを発現させた細胞を用いた濃縮法では、Pej-SGP-VII 受容体と考えられるクローンをはじめ、特定のクローンの濃縮は認められなかった。

第4章 カイコにおけるオーファン GPCRs (BNGRs) からの CHH 族ペプチド受容体のスクリーニング

鱗翅目昆虫であるカイコ *Bombyx mori* には、ITP および ITPL (ITPs) の2種類の CHH 族ペプチドが存在する。近年、ゲノム配列の *in silico* 解析から、神経ペプチドの受容体として機能するクラス A および B の GPCRs (BNGRs) が網羅的解析によって明らかにされた。そこで、この BNGRs の中に ITP や ITPL に対する受容体が存在するかどうかを検討した。

Calcium flux assay により、大腸菌発現系で調製した組換え ITP、ITPL (rITPa、rITPL) に対する BNGRs の応答を解析したところ、クラス A に属する BNGR-A2 および A34 が rITPa に、また、BNGR-A24 が rITPL に応答することが見出され、その応答の EC₅₀ は $1.1\sim 2.6 \times 10^{-8}$ M であった。また、これら3つの BNGRs のうち、BNGR-A2 および A24 はクルマエビの CHH 族ペプチド (Pej-SGP-VII、Pej-SGP-IV) にも応答した。さらに、BNGR-A24 は他の種で既知のタキキニン受容体 (TKR) と高い相同性を有しており、カイコの5種類の TKs (TK1~TK5) にも EC₅₀ = $0.3\sim 7.1 \times 10^{-9}$ M で応答した。

次に、ITPs に応答した BNGRs が生体内で ITPs や TKs の受容体として機能する可能性を検討した。蛍光標識した rITPs または TK4 と BNGRs を発現させた CHO 細胞との結合実験では、Calcium flux assay で応答が認められたリガンド-受容体の組合せのみで結合が認められた。カイコ卵巣由来 BmN 細胞では、rITPs の曝露により細胞内 cGMP レベルが上昇した。そこで、5齢2日目のカイコにおいて、rITPs による細胞内 cGMP レベルの変動を指標として、それらの標的組織を同定した。また、RT-PCR により、ITPs の標的組織では、3つの BNGRs が発現していることが示された。また、前腸、中腸、および後腸では、24時間の絶食により ITPL への応答が認められるようになったが、それと対応するように、BNGRs の発現レベルが上昇する傾向が見出された。一方、rITPs に応答した BmN 細胞の細胞内 cGMP レベルの上昇に対する、BNGRs の過剰発現およびノックダウンの影響を解析した。その結果、rITPL に対する BmN 細胞の応答シグナルは BNGR-A24 を介していることが示された。以上から、カイコでは、BNGR-A2 および A34 が ITP 受容体として、BNGR-A24 が ITPL および TKs の受容体として機能することが明らかとなった。

BNGR-A24 に対する rITPL と TKs の結合が競争するかを調べるため、最も高い EC₅₀ で作用する TK4、および、多くの種の TKR に対しアンタゴニスト作用を示す substance P アナログ、spantide I を添加し、rITPL と BNGR-A24 との結合に対する影響を解析した。その結果、

TK4 や spantide I により、rITPL の BNGR-A24 への結合や、それによる BNGR-A24 の活性化が阻害されたことから、ITPL は TKs と競争することが示された。

第5章 クルマエビにおけるカイコ BNGRs に対する相同分子のスクリーニング

カイコにおける CHH 族ペプチドの受容体として BNGR-A2、-A24、および-A34 を同定したことから、これらの BNGRs に対する相同分子をクルマエビから探索することにより、クルマエビで CHH 族ペプチドの受容体として機能する GPCRs の同定を試みた。

クルマエビの肝臓、えら、Y 器官、または卵巣由来の cDNA ライブラリーから、BNGR-A2、-A24、および-A34 の塩基配列に相当する標識 DNA プローブを用いて、それらの BNGRs の相同分子をコードするクローンをスクリーニングした。その結果、えら由来の cDNA ライブラリーから、BNGR-A24 に対する DNA プローブを用いて、他の種の Frizzled-7 と高い相同性を有するタンパク質をコードする cDNA の部分配列が見出された。その cDNA 断片と用いた DNA プローブの塩基配列との同一性は 48% であった。しかし、Frizzled-7 は BNGR-A24 とは異なるクラスの GPCR であることから、CHH 族ペプチドの受容体ではないと考えられた。そのほかには GPCR をコードすると考えられる cDNA は得られておらず、未だクルマエビの CHH 族ペプチド受容体の同定には至っていない。

本研究では、CHH 族ペプチドでは最初の例として、カイコの ITPs 受容体として機能する BNGR-A2、-A24 および-A34 の 3 つの GPCRs を同定した。これらの受容体がクルマエビの CHH 族ペプチドに応答したこと、および、節足動物では CHH 族ペプチドが普遍的に存在することから、ITPs 受容体と類似の GPCRs が節足動物に普遍的に存在し、CHH 族ペプチドの受容体として機能していると推察される。また、第3章から、GPCR 以外の CHH 族ペプチドの受容体の存在が示唆されたことから、CHH 族ペプチドの多機能性を反映するように、その受容体も多様性に富んでいることが予想される。本研究の成果は、CHH 族ペプチドによる生体制御の理解に大きく貢献するだけでなく、CHH 族ペプチドをモデルとした、リガンド-受容体の分子進化に対する洞察への大きな一歩をもたらすことが期待される。

【参考文献】

- 1) Chiaki Nagai, Shinji Nagata, Hiromichi Nagasawa. *Gen Comp Endocrinol* **172**: 293-304, 2011.
- 2) Chiaki Nagai, Hideaki Asazuma, Shinji Nagata, Hiromichi Nagasawa. *Peptides* **30**: 507-517, 2009.
- 3) Chiaki Nagai, Hideaki Asazuma, Shinji Nagata, Hiromichi Nagasawa. *Ann NY Acad Sci* **1163**: 478-480, 2009.
- 4) 永井 千晶, 馬橋 (浅妻) 英章, 永田 晋治, 長澤 寛道. 「脱皮・変態の生物学—昆虫と甲殻類のホルモン作用の謎を追う」第 19 章, 園部 治之・長澤 寛道編, 東海大学出版会, 2011 年.