

特集：昆虫ホルモン研究の現状と問題点〔2〕

神経ペプチドホルモンの研究の現状

 東京大学農学部応用生命工学専攻 ^{かた}片 ^{おか}岡 ^{ひろ}宏 ^し誌

はじめに

昆虫の内分泌、特に神経ペプチドホルモンの研究はいわゆる実験形態学的研究を中心に発展してきたが、ここ4、5年の間に他の研究分野同様、分子レベルでの研究へと大きく変化した。10年前には抽出、精製すらままならなかった神経ペプチドホルモンの多くが、今ではその遺伝子構造までも明らかになっている。本解説では最近特に研究が進んだ前胸腺刺激ホルモン (PTTH) に焦点を当て、我々の研究を中心にこれまでの研究を振り返りながら昆虫神経ペプチドホルモンの研究の現在の問題点や将来の展望について述べたいと思う。

I 前胸腺刺激ホルモン研究の歴史と現状

PTTH の発見は昆虫ホルモンのうちでも最も古く、1922年にポーランド人の KOPECKI が終齢幼虫が蛹になるために脳から液性の因子が分泌されていることを示唆したことに始まる。その後、WILLIAMS (1947) によってこの脳からの液性因子が前胸腺に作用し、脱皮ホルモンの分泌を促進することで脱皮・変態を誘導すること、つまり、前胸腺の活性化ホルモンであることが証明された。さらに、1960年代には石崎ら及び他の研究者によって PTTH がタンパク性の物質であることが明らかとなった。その後、数多くの研究者によって PTTH の精製が試みられたが、いずれの研究者も単離には至らず、1980年になってもその化学構造は不明のままであった。こうしたなか、筆者の所属している鈴木研究室では1970年頃より名古屋大学の石崎と共同でカイコからの PTTH の精製を開始した。我々が PTTH の精製を行うにあたってカイコを選んだ最大の理由は大量の材料の確保が可能であることが挙げられる。カイコの場合養蚕業を背景として大量飼育系が確立されており、何十万、何百万頭のスケールで抽出材料としての確保が可能である。PTTH の脳内の含量はきわめて微量であると考えられたため構造を明らかにするためには材料の確保は最大の問題であった。一方、生物検定法としては石崎が開発したエリ蚕除脳休眠蛹 (蛹となった直後に脳を摘出し、人工的に休眠

状態にした蛹) の成虫化を指標とした。今考えるとなぜ抽出材料と同じカイコを用いた生物検定法を使わなかったのか不思議に思われるが、PTTH のような昆虫にとって基本的なホルモンは同じ鱗翅目間で特異性はないと考えていたためである。事実、脳の移植や脳抽出物の注射といった実験形態学的な実験では、カイコの脳はカイコ及びエリ蚕両方の除脳蛹の成虫化を引き起こす活性があることが確かめられていた。約10年間の努力の結果、1982年にエリ蚕除脳蛹に対して PTTH 活性を示す物質が世界に先駆けて単離された (SUZUKI et al., 1982)。しかしながら、この物質はエリ蚕除脳蛹の成虫化や、培養系でエリ蚕前胸腺からのエクジソン分泌を促進するものの、カイコ除脳蛹やカイコ除脳幼虫に対しては PTTH 活性を持たないことが明らかになった。

さらに、カイコ脳抽出物中にカイコ除脳蛹に対して PTTH 活性を示す物質が存在している、この物質の分子量や等電点は既に単離したエリ蚕除脳蛹に対して PTTH 活性を持つ物質とは明らかに異なっていることが明らかとなってきた。そこで、再びカイコ本来の PTTH と考えられる物質の単離を目指して、カイコ除脳蛹を用いた生物検定法によりカイコ頭部からの精製を進めた。その結果、1987年に単離に成功し、その部分配列を明らかにすることができた (KATAOKA et al., 1987)。さらに、部分アミノ酸配列決定後、抗体の作製、その抗体を用いた産生細胞の同定、また、抗体を用いた cDNA のクローニングへと研究を進める一方、さらに大量の材料から単離した PTTH のペプチド側からの解析も進め、これまでに以下のことが明らかになっている (KAWAKAMI et al., 1990, MIZOGUCHI et al., 1990, KATAOKA et al., 1991, ADACHI-YAMADA et al., 1994)。(1) PTTH は脳の側方部2対の神経分泌細胞で産生され、中央部で反対側の脳半球に入る軸索を經由して、反対側のアラタ体から分泌される。(2) PTTH は224残基のペプチドとして翻訳された後、N末端部分に存在するシグナルペプチドおよび二つのペプチド部分がプロセッシングを受け除去された109残基のペプチドである。(3) PTTH は109残基の同一なペプチド (PTTH サブユニット) 2本がジスルフィド結合で架橋したダイマー構造をとっている。(4) 41残基目のアスパラギンには糖鎖が付加している。(5)

PTTH 遺伝子は五つのエクソンから成り、ハプロイドゲノム当たり1コピーである。などである。

ところで、PTTH はカイコの脳1個あたり1 ng 足らずしか存在しておらず、化学的及び生化学的研究を行うための十分量の PTTH を確保することは困難であった。そこで、PTTH を遺伝子工学を用いて大量に合成することを試みた。当初、PTTH が糖ペプチドであることから昆虫培養細胞を用いたバキュロウイルスを用いた発現系や酵母による発現系も考えたが、簡便さ、効率の良さなどを考えて、まず、大腸菌による発現を試みた。その結果、培養液 1 l の菌体から 10 mg の発現 PTTH を得ることができるようになった。発現 PTTH のカイコ除脳蛹に対する活性は 0.6 ng/ユニットであり、天然物に比べ活性は約 1/2 であった。このことは PTTH の糖鎖が活性発現に必ずしも必要でないことを示している。ところで、天然 PTTH はジスルフィド結合で架橋したダイマー構造を有しているが、発現 PTTH についても SDS-PAGE 及びイオンスプレ-MS により、ダイマー構造を有していることが確かめられた。また、MS の値より発現 PTTH が C 末端のアスパラギンまでの 109 残基の完全なペプチドであることも明らかになった。そこで、この発現 PTTH を用いてジスルフィド結合の架橋様式を明らかにし、ジスルフィド結合による PTTH のダイマー構造を確定することを計画した。まず、ペプチド鎖間のジスルフィド結合のみを選択的に還元することを試みた。いくつかの条件を検討した結果、還元剤として *n*-ブチルホスフィンをアルキル化剤、4-ビニルピリジンとともに作用させることで PTTH のペプチド鎖間のジスルフィド結合のみを選択的に還元ピリジルエチル化することが可能となった。この処理により PTTH の分子量は SDS-PAGE で約半分になり、しかも 15 残基目のシステインのみが還元アルキル化していることが明らかとなった。このことから PTTH は 15 残基目のシステイ

ン残基間のジスルフィド結合でダイマー構造を形成していると結論した。また、ペプチド鎖内のジスルフィド結合については部分還元によって得られたモノマー型 PTTH を酵素処理によって断片化し、得られたジスルフィド結合を持つペプチドの解析を行うことによって決定した。このようにして得られたジスルフィド結合を含めた PTTH の一次構造を図-1 に示す (ISHIBASHI et al., 1994)。

一方、エリ蚕に対して PTTH 活性を持つ物質についてもこれまでに以下のことが明らかになっている (NAGASAWA et al., 1986, MIZOGUCHI et al., 1987)。(1) A, B 2本のペプチド鎖から成り、その間を架橋しているジスルフィド結合の結合位置を含め、哺乳類のインスリンと高い相同性を示す。(2) 脳の中央部 4 対の神経分泌細胞で合成され、反対側のアラタ体から分泌される。(3) カイコのゲノム中に少なくとも 30 コピー以上の遺伝子がクラスターを形成して存在し、それぞれの遺伝子がコードするアミノ酸配列は少しずつ異なっている。また、哺乳類のインスリン族ペプチドに存在するイントロンは存在しない。などである。また、このペプチドは現在カイコの学名である *Bombyx* からボンビキシン (bombyxin) と呼ばれている。

ところで、エリ蚕自身の本来の PTTH はボンビキシンなのだろうか。ボンビキシンはカイコの脳に含まれるペプチドであるが、同じ分子がエリ蚕の脳にも含まれていて PTTH 活性を示すのだろうか。そのことを明らかにするため、カイコからボンビキシン遺伝子が単離された後、この遺伝子をプローブとしてエリ蚕からボンビキシン様遺伝子のクローニングを試みたところ、数種類の遺伝子をクローニングすることができた。いずれのペプチドもカイコのボンビキシン分子とはかなり異なるアミノ酸配列を持っていたが、その基本構造はカイコボンビキシンと同じであった。また、そのアミノ酸配列からこれらは大きく二つのファミリーに分けることができ、その塩基配列から予想される各ファミリーに属する二つのペプチドを合成したところ、エリ蚕除脳蛹に対していずれもカイコボンビキシンの百分の一程度の活性を示した。この結果はエリ蚕の脳内に存在するボンビキシン様ペプチドがエリ蚕に対して PTTH 活性を持つことを示しているが、同時に活性を示す最小量がエリ蚕の脳内含有量よりも多いことも意味していた。一方、カイコ PTTH 様遺伝子についてもエリ蚕からクローニングすることを試み、最近その遺伝子をクローニングすることに成功した。そのアミノ酸配列はカイコのものと比較すると、前駆体構造や立体構造を維持するために重要なシ

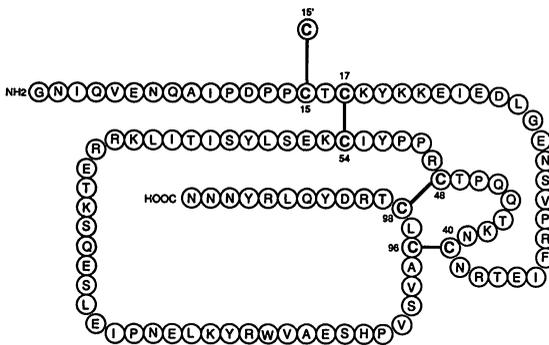


図-1 カイコ前胸腺刺激ホルモンの全一次構造

ステイン残基の位置などは保存されていたが、PTTH 部分のアミノ酸配列の相同性は約 50%であった。このペプチドの PTTH 活性を調べる目的で、大腸菌を用いた発現系によりこのペプチドを合成したところ、カイコ PTTH がカイコ除脳蛹に対して活性を示すのとほぼ同程度の濃度でこの物質がエリ蚕除脳蛹に対して活性を示した。以上の結果からエリ蚕本来の PTTH はボンピキシン様ペプチドではなく、カイコ PTTH 様物質であると考えている。しかしながら、なぜボンピキシンやエリ蚕ボンピキシン様ペプチドがエリ蚕除脳蛹に対して PTTH 様活性を示すのか、実際に生理的に機能しているのかは依然として不明のままである。また、カイコ体内でのボンピキシンの機能についてはまだ明らかになっていない。

ところで最近、アメリカの BOLLENBACHERらにより、タバコスズメガの PTTH の単離とその部分配列が報告された (GRAY et al., 1993)。彼らはまず、タバコスズメガの脳から PTTH を部分精製し、この部分精製 PTTH に対するモノクローナル抗体を作製した。次に、作製したモノクローナル抗体を用いたイムノアフィニティー精製により脳から PTTH を精製し、SDS-PAGE、ニトロセルロースへのプロットング後、配列分析を行ったが、N 末端がブロックされていたために配列が読めなかった。そこで、膜にプロットングした PTTH をそのままトリプシンで消化し、生じたフラグメントペプチドを HPLC で分取後、配列分析を行った。その結果、三つのフラグメントペプチドの配列が明らかとなったが、いずれもカイコ PTTH とは相同性を有していなかった。しかし、この三つのフラグメントのうち一つは哺乳類のレチノイド結合タンパク質と高い相同性を有していた。

また、彼らはカイコ PTTH と相同性のある遺伝子をタバコスズメガのなかに見つける目的でカイコ PTTH 遺伝子の配列から予想されるプライマーを合成し、ゲノム DNA を用いて PCR による増幅を試みた。その結果、311 bp の PCR 産物が得られ、その塩基配列はカイコの cDNA と比べると途中 2 塩基のみが異なっているだけであった。さらに PTTH を分泌している神経分泌細胞から調製した cDNA を用いて、同様に PCR による増幅を試みたところ、同じ塩基配列を持った 311 bp の PCR 産物が得られた。これらの結果、およびタバコスズメガ PTTH は等電点電気泳動で酸性の画分に生物活性が見いだされるのに対し、カイコ PTTH は塩基性物質であることなどから、彼らはタバコスズメガ脳 (正確には PTTH 産生神経分泌細胞中) にはカイコ PTTH と高い相同性があるペプチドも存在するが、タバコスズメ

ガ PTTH はこのペプチドとは別のレチノイド結合タンパク質と相同性を持つ酸性のペプチドであると結論している (GRAY et al., 1994)。この結果は、我々のこれまでの結果と矛盾しており、その原因がどこにあるかはっきりとしたことは言えないが、いくつかの点で、彼らの実験結果に疑問が残る。先に述べたようにエリ蚕の PTTH 遺伝子はカイコのものと相同性は約 50%程度であった。また、最近別の鱗翅目昆虫からの PTTH 遺伝子のクローニングを試みているが、いずれもカイコ PTTH と 90%以上の相同性を有するものは見いだされていない。さらに、最近明らかになったカイコ PTTH のゲノム遺伝子は五つのエクソンからなり、彼らが PCR で増幅したゲノム DNA 中には少なくとも二つのイントロンが存在しているはずである。したがって、ゲノム DNA を鋳型とした場合は 311 bp よりかなり大きな PCR 産物が得られるはずである。確かに、カイコとタバコスズメガではその遺伝子の構造 (イントロンの部位) が異なっている可能性はあるが、塩基配列が 99%一致しているにもかかわらず、イントロンの部位が全く違うというのは奇妙である。この問題について明確な回答を得るためにも、もう少し他の昆虫の PTTH 遺伝子の構造を明らかにしておく必要があると思われる。

II 神経ペプチドホルモン研究の問題点と展望

これまで我々の研究を中心に PTTH 研究の歴史と現状について概説したが、残された紙面を使って、他のペプチドホルモンのことも含めて、現在の神経ペプチドホルモン研究の問題点及び将来の展望について述べたいと思う。

まず、生物検定法であるが、PTTH をはじめ多くの神経ペプチドホルモンの精製に *in vivo*、つまり個体全体を用いた生物検定法が使われてきた。この検定法はあるペプチドホルモンが個体レベルでの現象を引き起こす作用があることを見るには良いが、予想している標的器官以外に作用し、同じ現象を引き起こしている場合もありえる。例えば除脳蛹による PTTH の生物検定法ではエクジソン様の作用を持つ物質も PTTH として見いだされる可能性がある。一方、BOLLENBACHERらによる前胸腺の培養系を用いた PTTH の生物検定法やアラタ体の培養系を用いたアラトトロピンやアラトスタチンなどの生物検定法のように、*in vitro* の生物検定法も最近多く使われるようになってきた。この検定系では標的器官やその作用が一義的に決められることになるが、個体レベルでの現象には関係のない物質を検出する可能性もある。事実、これまで見いだされてきたアラタ体での幼若ホルモ

ンの生合成を調節しているアラトトロピン, アラトスタチンの多くは個体に注射した場合はその作用が見いだされないものが多い。したがって, *in vivo* 及び *in vitro* どちらかの生物検定系を用いて単離されたペプチドホルモンは単離後, 別の検定系でその生物活性を調べる必要があると思われる。我々は PTTH を単離後, 除脳幼虫の幼虫脱皮誘導活性や培養系での前胸腺からのエクジソン分泌促進活性など除脳蛹以外の生物検定法を用いて, カイコ PTTH がすべての検定法で PTTH 活性を持つことを確かめた。

また, 新たな神経ペプチドホルモンの構造を明らかにする場合, まず, 精製が必要となるが, 筆者が PTTH を精製していた当時に比べると, その分析技術は格段に進歩した。また, アミノ酸の部分配列から遺伝子をクローニングする分子生物学的手法もかなり一般的となった。そのため, 精製において最も手間と時間のかかる生物検定を最小限にし, 部分配列を明らかにすることに重点を置いて, 材料は頭部より脳を, もし可能であれば, その一部を集めることを考えたほうが効率良く研究が進められると思われる。PTTH の場合, その構造決定に数百万頭の頭部を用いたが, もしこれから精製を開始するのであれば, 1万頭の脳を実体顕微鏡下で集め, その脳から精製を始めたほうが, 最終的には早いと思われる。その成功例として, 山下らによる休眠ホルモンの単離と構造決定が挙げられる。

ところで, 昆虫は200万種とも推定されているにもかかわらず, PTTH をはじめ多くの神経ペプチドの構造がある特定の昆虫種のものしか決定されていない。その原因は神経ペプチドホルモンの生体内での含量が, 極微量であり, その精製には大量の材料が必要であることが挙げられる。そのため, これまでの神経ペプチドホルモンの研究には大量飼育可能なカイコなどの昆虫に限られていた。しかし, 現在では遺伝子の相同性を利用して, 比較的簡単にしかも少量の材料で他の昆虫の相同遺伝子をクローニングすることができるようになった。今後はこのような手法を用いて様々な昆虫から神経ペプチドホルモンの構造が明らかになるものと思われる。しかし, 遺伝子がクローニングできたとしても, それは単なる相同

遺伝子であり, 最終的には化学合成, 遺伝子工学的手法を用いて合成し, ペプチドホルモンとしての活性をきちんと確認しておく必要があると思われる。

今後の課題としては受容体の問題が考えられる。これまで神経ペプチドホルモンの研究はどちらかといえば構造の解明に主眼がおかれてきたが, 今後は神経ペプチドホルモンの機能を分子レベルで解析することが必要であると思われる。そのためには受容体の同定は避けては通れない課題である。例えば, PTTH の場合を考えると, 脱皮ホルモンのエクジソンの場合どんな時期の虫に対しても脱皮を誘導することができるが, PTTH の場合はある限られた時期(本来の PTTH 放出時期の直前)でないと作用を示さない。このことは受容体側で PTTH の作用を調節している機構が存在していることを示唆していると思われる。また, PTTH の作用としてはエクジソンの分泌を促進することであるが, 実際にエクジソン合成のどの段階をどのように調節しているのか受容体以降のシグナル伝達を考える上でも受容体の同定は必須である。

あまり, まとまりのない文章になってしまったが, PTTH をはじめとする昆虫神経ペプチドホルモンの研究はその化学構造や遺伝子構造が明らかになったことで, 次のステップに踏み出す時期にきている。今後, 少しでも多くの研究者がこの分野の研究に興味を持ってもらえれば幸いである。

引用文献

- 1) ADACHI-YAMADA, T. et al. (1994): Eur. J. Biochem. 220: 633~643.
- 2) GRAY, R. S. et al. (1993): Peptides 14: 531~541.
- 3) ——— et al. (1994): ibid. 15: 777~782.
- 4) ISHIBASHI, J. et al. (1994): Biochemistry 33: 5912~5919.
- 5) KATAOKA, H. et al. (1987): Agric. Biol. Chem. 51: 1067~1076.
- 6) ——— H. et al. (1991): ibid. 55: 73~86.
- 7) KAWAKAMI, A. et al. (1990): Science 247: 1333~1335.
- 8) MIZOGUCHI, A. et al. (1987): Mol. Cell. Endocrinol. 51: 227~235.
- 9) ——— A. et al. (1990): Develop. Growth & Differ. 32: 591~598.
- 10) NAGASAWA, H. et al. (1986): Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83: 5840~5843.
- 11) SUZUKI, A. et al. (1982): Agric. Biol. Chem. 46: 1107~1109.