

特集：昆虫ホルモン研究の現状と問題点〔4〕

幼若ホルモンの活性発現機構に関する最近の研究動向

農林水産省蚕糸・昆虫農業技術研究所 ^{しお}塩 ^{つき}月 ^{たか}孝 ^{ひろ}博

はじめに

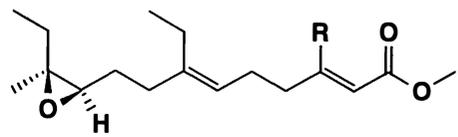
昆虫内分泌学は、昆虫生理学のなかでも最も歴史のある分野の一つで多岐にわたる研究が行われてきた。しかし未解明部分も多く、特に昆虫の脱皮・変態については、低分子の幼若ホルモン (JH) とエクダイソンの発育時期に応じた適度な濃度バランスによって惹起されることが示されているものの、その機構の詳細や制御系など十分には明らかにされていない。昆虫ホルモン全般に関しては、NIJHOUT (1994) の成書を参照していただきたい。エクダイソンは構造がステロイド骨格であることから、研究手法を同じくする哺乳動物のステロイドホルモン研究と協調して進んでいる。一方、JH は昆虫に特異である、ガラスやプラスチック等の器具に吸着しやすい、酵素による分解を受けやすい、などの理由で研究が遅れている。脱皮・変態に加えて生殖、休眠、相変異、階級分化などの JH の持つ様々な生理作用については別の機会に譲り、ここでは JH の活性発現機構に絞って、生合成、分解、レセプターの三つに関する最近の研究動向をとらえてみたい。

I JH の生合成

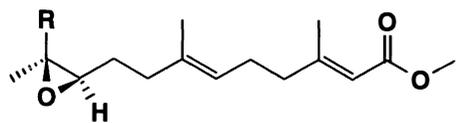
JH は、エポキシセスキテルペノイドのメチルエステルで、昆虫からは JH 0~III と 4-メチル JH I, JH III ビスエポキシドの 6 種が単離されている (図-1)。他のテルペノイドと同様にメバロン酸経路によって生合成され、側鎖がメチル基のものはメバロン酸、エチル基のものはホモメバロン酸由来である。このユニットが三つ重合しカルボン酸に変換され、さらに S-アデノシルメチオニンのメチル基転移酵素によりメチルエステルとなる。最後に炭素 10 位と 11 位間の二重結合に酸素添加酵素によりエポキシ環が生成し JH が完成する (SCHOOLEY and BAKER, 1985)。この最後の過程はチトクローム P-450 によるもので、イミダゾール系化合物で阻害されることが分かった (PRATT et al., 1990)。さらに、1-isobutyl-5-(3-benzyloxyphenyl) imidazole のアジリジン誘導体を設計・合成し、これを光アフィニティーリガンドとして、

JH のエポキシ化に関与する P-450 の精製を試みた最近の研究もある (ANDERSON et al., 1994)。害虫制御の観点に立つと、動植物に普遍的なメバロン酸経路における阻害よりもこの例のように JH 生合成経路の終点に近い部分を阻害する物質のほうが、昆虫に対する選択性や種特異性などの観点から優れた昆虫生育制御剤になり得ると考えられる。

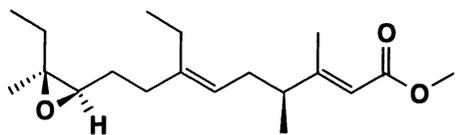
生合成はアラタ体で行われ、アラトトロピン (促進)、アラトスタチン (抑制) などのペプチドホルモンと神経系によって制御されている。また、ペプチドホルモンの他にオクトパミン等の生体アミンが *in vitro* でのアラタ体における JH 合成に影響を与えることも報告されている。例えばバッタ *Locusta migratoria* (LAFON-C AZAL and BAEHR, 1988) とゴキブリ *Diploptera punctata* (THOMPSON et al., 1990) のアラタ体を用いた研究では、オ



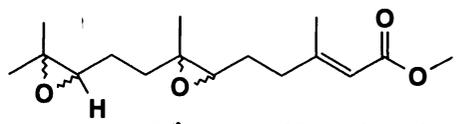
JH 0 (R=Et), JH I (R=Me)



JH II (R=Et), JH III (R=Me)



4-メチル JH I



JH III ビスエポキシド

図-1 昆虫由来の幼若ホルモン (JH) の構造

Recent Researches on Mechanisms of Juvenile Hormone.

By Takahiro SHIOTSUKI

クトパミンがサイクリック AMP 濃度の上昇を誘導し、この濃度上昇と JH 分泌量との間に前者では正、後者では負の相関があるとされている。ミツバチ (*Apis mellifera*) のアラタ体では、オクトパミンが JH 合成を促進する例が示されている (RACHINSKY, 1994; KAATZ et al., 1994)。一方で、コオログ *Gryllus bimaculatus* のアラタ体における JH 合成をオクトパミンが阻害し、その阻害様式はアラトスタチンの場合と異なるという報告もあり (WOODRING and HOFFMAN, 1994)、成長の時期によってもアミン類の作用は異なるようである。ペプチドホルモンとの相互作用など、*in vivo* での制御の実際についての解明は今後の課題である。

II JH の分解

情報が伝えられた後のホルモンは速やかに分解されなければならない。特に昆虫の脱皮変態過程では、伝達される情報が短時間の内に大きく変化するので、生成とともに分解も精確に制御されていると考えられる。JH の分解には、エポキシドヒドラーゼとエステラーゼの二つの酵素が関与している (HAMMOCK, 1985)。

エポキシドヒドラーゼは、PRESTWICH等のグループによる近年の研究成果が目覚ましい (東原, 1994)。エポキシドヒドラーゼの JH 分解活性は、エステラーゼのものに比べると小さいため、これまであまり重要視されなかった。しかし、JH 結合タンパク存在下でエステラーゼにより分解された JH 酸をさらに JH 酸のジオール体へ変換することに関与していることが明らかとなった。これ

は、JH 酸が前述のメチル基転移酵素の働きで活性な JH に戻るのを防ぎ、不可逆的に分解しているものと推測されている。彼らは、JH のメチルエステル部分をジアゾケトンに変換したトリチウムラベルの光アフィニティーリガンド (図-2) を合成した (PRESTWICH, 1987)。生理的条件下で、このリガンドをサンプルとともにインキュベートし、UV を照射すると JH に高い親和性を持つタンパクのみが共有結合的に放射標識されるものである。この方法を用いて、タバコスズメガ *Manduca sexta* の卵よりエポキシドヒドラーゼが単離された (TOUHARA et al., 1993 a)。さらに同様の方法により、タバコスズメガ終齢幼虫から血液性の JH 結合タンパクも単離・クローニングされている (TOUHARA et al., 1993 b)。

一方、JH エステラーゼは、哺乳動物のカルボキシルエステラーゼと合わせて、HAMMOCK等のグループにより、有機化学、生化学、分子生物学といった様々な角度から研究されている (塩月, 1995)。まず、タバコガの一種 *Heliothis virescens* の JH エステラーゼをコードする cDNA の配列が決定され、バキュロウイルスをベクターとする発現系が確立された (HAMMOCK et al., 1990)。続いて、本酵素の部位特異的塩基置換により、セリンプロテアーゼの活性部位に存在する触媒官能基系(セリン-ヒスチジン-アスパラギン酸)に相同する官能基系 [セリン (201)-ヒスチジン (446)-グルタミン酸 (332)] の存在が示唆された (WARD et al., 1992)。同時に、放射標識 JHIII の代わりに簡便に酵素活性測定を行うため、比色定量の可能な代替基質の開発 [Mc CUTCHEN et al., 1993, 図-3 (a)] や、遷移状態アナログの阻害剤構造 [図-3 (b)] をリガンドとしたアフィニティークロマトグラフィーによる酵素の精製が行われている [ABDEL-AAL and HAMMOCK, 1986; SHIOTSUKI et al., 1994, 図-3 (c)]。もし、JH エステラーゼを昆虫の幼虫期に投与すると、体内の JH を分解することで抗 JH 活性を持つと考えられた。しかし、タバコスズメガに JH エステラーゼを注射投与しても、囲心細胞に吸収され、速やかに分解されることが分かった (ICHINOSE, 1992)。外来タンパクは、表面に存在する PEST 配列と呼ばれるプロリン (P)、グルタミン酸 (E)、セリン (S)、スレオニン (T) に富む部分のグルタミン酸がユビキチンによる分解を受けると考えられている。そこで、この標的になると考えられる二つのグルタミン酸を部位特異的塩基置換によりそれぞれリシンに変換した変異体を作出し、生体安定性を改良した (HAMMOCK et al., 1993)。このように昆虫でのみ特異的に活性を示すタンパクを、バキュロウイルスに組み込んだ微生物農業への期待は大きい。しかし、組換えウイル

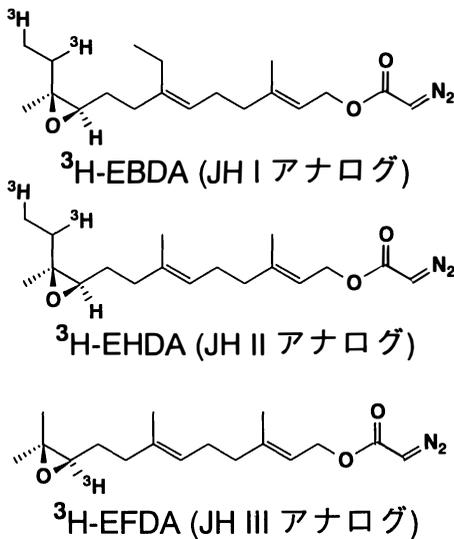


図-2 JH 結合タンパクやレセプター研究のための光アフィニティーリガンドの構造

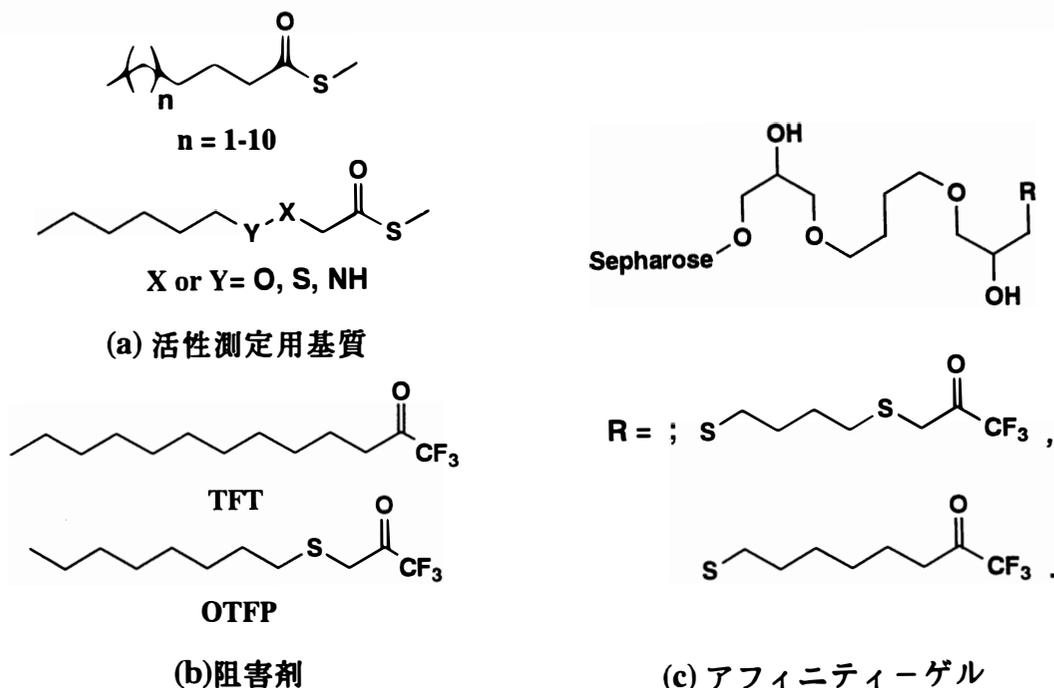


図-3 JH エステラーゼ研究のための (a) 活性測定用基質, (b) 阻害剤, (c) アフィニティーゲルの構造

スを野外に放出することに対する社会的不安が残っており、その実用化までには時間がかかりそうである。

III JH レセプター

JH が生理作用を示すためには、血液中に分泌されたホルモンが運搬され、標的細胞のレセプターに結合する必要がある。この情報伝達が引き金となって昆虫の脱皮・変態などにかかわる特定の遺伝子発現が制御されるのである。したがって、JH の生理活性発現機構を解明する上でこのレセプターは重要な研究対象である。JH レセプター研究は、PRESTWICH, HAMMOCK, RIDDIFORD らのバックグラウンドの異なる研究者による規模の大きな共同研究で進展した (RIDDIFORD, 1994; 東原, 1994)。まず、前述の光アフィニティーリガンドを用いて、種々の昆虫のレセプターが検索された。そのなかで、タバコスズメガ表皮細胞の核内から JH レセプターと考えられる 29kD のタンパクの存在が示された (PALLI et al., 1990)。続いて、これが単離・精製され、さらに、このタンパクをコードする cDNA の配列決定、クローニングが行われた (PALLI et al., 1994)。得られたタンパクは JH I, II に高い親和性を示したが、ステロイドレセプターにみられるような DNA 結合領域と相同性の高い領域を持っていない

などの特徴を持っており、新しいタイプのレセプターであることが示唆されている。

JH はテルペノイド、すなわち、脂質の一種であるので、細胞膜を透過・移行すると考えられるが、ショウジョウバエ *Drosophila melanogaster* の雄の生殖腺附属腺の細胞 (YAMAMOTO et al., 1988) や、サシガメ *Rhodnius prolixus* の濾胞細胞 (SEVALA and DAVEY, 1989) の表面にホスファチジルイノシトールを構成因子として含むセカンドメッセンジャー系を活性化するレセプターの存在も示唆されている。情報が伝えられる器官や時期により、機能しているレセプター分子も異なることが考えられ、個々の性質や役割を検討することで JH の持つ多様性が明らかになるであろう。

おわりに

JH に関連した研究を行う上で大きな障害となっている原因の一つに、JH タイター測定が容易でないことが挙げられる。現在、タバコスズメガの幼虫体色変化を指標とした生物検定法、JH のエポキシドを重水素ラベルメタノールで誘導後に GC-MS で分析する機器分析法、JH のエポキシド、あるいはエステル部分を利用して得られる抗体を用いたラジオイムノアッセイ法の三つが

主に用いられている。しかし、血液中に脂質が高濃度に存在する鱗翅目昆虫などでは、JH とそれら脂質との分離が困難であり、精製の過程が長くなる。結合タンパクから遊離した JH は、広く存在する非特異的エステラーゼにより分解され、加えて微量の JH は精製の際に用いるガラス器具等に吸着しやすいため、取り扱いがたいへん厄介である。前に述べたように、JH に高い親和性を持つ JH 結合タンパクやレセプターがクローニングされているので、筆者らはそれらの特異的親和性を応用して簡便な JH の精製法と、分子認識による定量法の検討を行っている。

昆虫の脱皮・変態のみならず、昆虫生理に広くかかわる JH の研究は、近年進歩のめざましい生化学・分子生物学の研究手法が取り入れられ、ずいぶん進展した。しかし、基本的な作用発現や制御の機構はまだ十分には解明されておらず、これからの研究に期待がかけられている。

引 用 文 献

- 1) ABDEL-AAL, Y. A. I. and B. D. HAMMOCK (1986) : Science 233 : 1073~1076.
- 2) ANDERSEN, J. F. et al. (1994) : Abstr. 207 th Am. Chem. Soc. Natl. Meeting, San Diego, AGRO-47.
- 3) GOODMAN, W. G. and E. S. CHANG (1985) : Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry, and Pharmacology (KERKUT G. A. and GILBERT L. I. eds.), vol. 7, pp. 491~510.
- 4) HAMMOCK, B. D. (1985) : Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry, and Pharmacology (KERKUT G. A. and L. I. GILBERT eds.), vol. 7, pp. 431~472.
- 5) ——— et al. (1990) : Nature 344 : 458~461.
- 6) ——— et al. (1993) : Arch. Insect Biochem. Physiol. 22 : 315~344.
- 7) ICHINOSE, R. et al. (1992) : Insect Biochem. Mol. Biol. 22 : 893~904.
- 8) KAATZ, H. et al. (1994) : J. Insect Physiol. 40 : 865~872.
- 9) LAFON-CAZAL, M. and J. C. BAEHR (1988) : Experientia 44 : 895~896.
- 10) MCGCHEN, B. F. et al. (1993) : Arch. Biochem. Biophys. 307 : 231~241.
- 11) NIJHOUT, H. F. (1994) : Insect Hormones, Princeton University Press, Princeton.
- 12) PALLI, S. R. et al. (1990) : Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87 : 796~800.
- 13) ——— et al. (1994) : Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91 : 6191~6195.
- 14) PRATT, G. E. et al. (1990) : Pestic. Biochem. Physiol. 38 : 223~230.
- 15) PRESTWICH, G. D. (1987) : Science 237 : 999~1006.
- 16) RACHINSKY, A. (1994) : J. Insect Physiol. 40 : 549~554.
- 17) RIDDIFORD, L. M. (1994) : Adv. Insect Physiol. 24 : 213~274.
- 18) SCHOOLEY, D. A. and F. C. BAKER (1985) : Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry, and Pharmacology (KERKUT G. A. and L. I. GILBERT eds.), vol. 7, pp. 363~389.
- 19) SEVALA, V. L. and K. G. DAVEY (1989) : Experientia 45 : 355~356.
- 20) 塩月孝博 (1995) : 日本農薬学会誌 20 (in press).
- 21) SHIOTSUKI, T. et al. (1994) : Protein Express. Purif., 5 : 296~306.
- 22) THOMPSON, C. S. et al. (1990) : J. Comp. Physiol. B 160 : 241~249.
- 23) TOUHARA, K. and G. D. Prestwich (1993 a) : J. Biol. Chem. 268 : 19604~19609
- 24) ——— et al. (1993 b) : Biochemistry 32 : 2068~2075.
- 25) 東原和成 (1994) : 化学と生物 32 (1) : 13~22.
- 26) WARD, V. K. et al. (1992) : Int. J. Biochem. 24 : 1933~1941.
- 27) WOODRING, J. and K. H. HOFFMAN (1994) : J. Insect Physiol. 40 : 797~802.
- 28) YAMAMOTO, K. et al. (1988) : Science 239 : 916~919.

人 事 消 息

(3月1日付)

加藤邦彦氏 (国際農林水産業研究センター環境資源部主任研究官) は農業生物資源研究所遺伝資源第一部長に
美濃部侑三氏 (生物研遺伝資源第一部長) は農業生物資源研究所分子育種部長に
大内 昭氏 (中国農試生産環境部長) は農業環境技術研究所環境生物部長に
宮崎昌久氏 (蚕昆研生産技術部虫害研究室長) は農業環境技術研究所環境生物部昆虫管理科長に
眞弓洋一氏 (東北農試地域基盤研究部長) は農業環境技術研究所資材動態部長に
河部 暹氏 (蚕昆研生体情報部長) は東北農業試験場地域基盤研究部長に
日比野啓行氏 (農研センター病害虫防除部ウイルス病防除研究室長) は中国農業試験場生産環境部長に
飯塚隆治氏 (四国農試企画連絡室企画科長) は四国農業試験場生産環境部長に
井上 齊氏 (四国農試生産環境部長) は蚕糸・昆虫農業

技術研究所昆虫機能研究官に

志賀正和氏 (農環研環境生物部昆虫管理科長) は蚕糸・昆虫農業技術研究所生体情報部長に
横内囃生氏 (農林水産技術会議事務局研究管理官) は農林水産技術会議事務局研究開発課長に
吉野嶺一氏 (農環研環境生物部長) は退職
越野正義氏 (農環研資材動態部長) は退職
高宮邦夫氏 (蚕昆研昆虫機能研究官) は退職
宮下清貴氏 (農環研環境生物部主任研究官 (微生物管理科土壤微生物利用研究室)) は農業環境技術研究所環境生物部微生物管理科土壤微生物利用研究室長に
木村龍介氏 (農環研環境生物部微生物管理科土壤微生物利用研究室長) は農業環境技術研究所資材動態部肥料動態科廃棄物利用研究室長に
佐藤 威氏 (蚕昆研生産技術部蚕病害研究室長) は果樹試験場保護部天敵微生物研究室長に
古田要二氏 (蚕昆研生産技術部主任研究官 (蚕栄養生理研究室)) は蚕糸・昆虫農業技術研究所生産技術部蚕病害研究室長に