

研究種目：基盤研究 (B)

研究期間：2006～2009

課題番号：18370031

研究課題名 (和文) 昆虫サイトカインレセプターの構造と細胞内情報伝達系因子の解析

研究課題名 (英文) Analysis of GBP receptor structure and GBP signal transduction in hemocytes

研究代表者

早川 洋一 (佐賀大学)

佐賀大学・農学部・教授

研究者番号：50164926

研究成果の概要 (和文)：昆虫サイトカイン Growth-blocking peptide (GBP) は血球細胞の一種プラズマ細胞を活性化し、血球凝集塊形成反応や異物表面への付着を誘起する。アワヨトウ GBP の構造—活性相関については様々な変異体 GBP を用いて詳細な解析がなされているが、GBP によるプラズマ細胞活性化の情報伝達経路についてはほとんど分かっていない。本研究によって、私達は血球細胞の GBP 受容体の性質を明らかにすると共に、分子量 77 kDa の新規 GBP 受容体アダプタータンパク質を発見した。P77 cDNA をクローニングし、一次構造を決定した結果、細胞膜を一回貫通する膜タンパク質であることが予想された。さらに、モチーフ検索により、その細胞内領域には SH2/SH3 ドメイン結合モチーフや immunoreceptor tyrosine-based activation motif (ITAM) 様ドメインが存在することが明らかになった。これら同定されたドメインは、いずれも哺乳類の免疫関連受容体の多数のアダプター因子内に報告されているものである点は興味深い。P77 は GBP と直接結合能力を持たないが、GBP 刺激によって血球の細胞内領域チロシン残基は速やかにリン酸化される。P77 のチロシン残基リン酸化は、血球細胞を *Enterobacter cloacae* や *Micrococcus luteus* といった細菌で刺激した場合にも観察されるが、こうした病原微生物刺激によるプラズマ細胞の P77 チロシンリン酸化は、血球から放出された GBP 前駆体が同時に分泌されるプロテアーゼによってプロセシングされて生じた活性型 GBP によって誘起されるものであることを実証した。さらに、GBP によって刺激されたプラズマ細胞ではインテグリン B1 鎖のチロシンリン酸化が確認されたが、このチロシンリン酸化は P77 の RNAi によって顕著に抑制され、さらに、プラズマ細胞の突起伸長活性化反応も阻害された。また、こうした RNAi によって P77 発現が抑制されたアワヨトウ幼虫では、グラム陰性菌 *Serratia marcescens* に対する感受性が顕著に上昇した。以上のような一連の研究結果より、プラズマ細胞の GBP 細胞内情報伝達には GBP 受容体アダプタータンパク質 P77 が必須であり、P77 を介するインテグリン分子のチロシンリン酸化が GBP によるプラズマ細胞活性化に不可欠であることが証明できた。

研究成果の概要 (英文) : Growth-blocking peptide (GBP) is an insect cytokine that stimulates a class of immune cells called plasmacytes to adhere to each other and a foreign surface. Although structure-activity studies have been extensively performed in GBP and its mutants of Lepidoptera *Pseudaletia separata*, the signaling pathway of GBP-dependent activation of plasmacytes remains unknown. We identified a novel adaptor protein (P77) with a molecular mass of 77 kDa containing SH2/SH3 domain binding motifs and an immunoreceptor tyrosine-based activation motif (ITAM)-like domain in the cytoplasmic region of the C-terminus. Although P77 did not have the capacity for direct binding with GBP, its cytoplasmic tyrosine residues were specifically phosphorylated within seconds after addition of GBP to a plasmacyte suspension. Tyrosine phosphorylation of P77 was also observed when hemocytes were incubated with *Enterobacter cloacae* or *Micrococcus luteus*, but this phosphorylation was found to be induced by GBP released from hemocytes

stimulated by the pathogens. We further detected tyrosine phosphorylation of the integrin  $\beta$  subunit in plasmatocytes stimulated by GBP. Double-stranded RNAs targeting *P77* not only decreased GBP-dependent tyrosine phosphorylation of the integrin  $\beta$  subunit, but also abolished the GBP-induced spreading of plasmatocytes on foreign surfaces. *P77* RNAi larvae also showed significantly higher mortality than control larvae following infection with *Serratia marcescens*, thus indicating that P77 is essential for GBP to mediate a normal innate cellular immunity in insects. These results demonstrated that GBP signaling in plasmatocytes requires the adaptor protein P77 and that active P77-assisted tyrosine phosphorylation of integrins is critical for the activation of plasmatocytes.

交付決定額

(金額単位：円)

|          | 直接経費       | 間接経費      | 合計         |
|----------|------------|-----------|------------|
| 平成 18 年度 | 4,800,000  | 0         | 4,800,000  |
| 平成 19 年度 | 3,800,000  | 1,140,000 | 4,940,000  |
| 平成 20 年度 | 3,300,000  | 990,000   | 4,290,000  |
| 平成 21 年度 | 3,100,000  | 930,000   | 4,030,000  |
| 年度       |            |           |            |
| 総計       | 15,000,000 | 3,060,000 | 18,060,000 |

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：基礎生物学・動物生理・行動

キーワード：昆虫、growth-blocking peptide、サイトカイン、GBP 受容体アダプター、血球細胞、インテグリン、シグナル伝達。

### 1. 研究開始当初の背景

寄生バチ (カリヤコムバチ) によって寄生された宿主アワヨトウ幼虫は、幼虫発育が遅れ、蛹への変態が阻害される。Growth-blocking peptide (GBP) は、その名称が示す通り、アワヨトウ幼虫発育を遅延させる生理活性を有するペプチドであり、寄生バチによって寄生され、その幼虫発育が著しく遅れたアワヨトウ幼虫血液から単離・構造決定された (Yoichi Hayakawa, J. Biol. Chem., 265, 10813-10816 (1990))。GBP は、アミノ酸 25 残基からなるペプチドであるが、その後、アメリカの 4 つの研究グループによって他の鱗翅目昆虫 (ガやチョウの仲間) からそのホモログが相次いで同定された。ただ、それらは発育阻害活性因子としてではなく、麻痺誘起や血球活性化といった異なる生理活性作用を示すペプチドとしての報告であった。2000 年、私達はこれらの報告された類似ペプチドが、発育阻害や血球活性化といった多機能性を併せ持つ同族ペプチドファミリーメンバーであることを証明し、GBP 及び同族のペプチドが (ペプチドレベルで) 昆虫において同定された初めてのサイトカインファミリーとなった (Strand, Hayakawa, Clark, J. Insect Physiol., 46, 817-824

(2000))。以下に、最近の GBP 研究の概要を解説しつつ、本研究の目的を説明する。

### 2. 研究の目的

インターロイキンや上皮成長因子 (EGF) を皮きりに、哺乳類ではこれまで数多くのサイトカインが発見され、さらに、それらのレセプタータンパク質や遺伝子も多種類単離されてきた。対照的に、昆虫においてはごく最近まで昆虫固有のサイトカインの報告は皆無であった。上述のように、私達が 1990 年に発見した昆虫の幼虫発育阻害活性をもつ生理活性ペプチド (Growth-blocking peptide, 以下 GBP と略称) が多機能性を示す昆虫サイトカインであることが最近明らかになった。その生理活性は、発育阻害活性のほか、細胞増殖活性、血球活性化作用、幼虫麻痺活性、心筋収縮活性、さらに、初期発生過程での頭部形態形成と、これまで各種生物で報告されてきたサイトカインに類を見ないほど多岐に渡っている。

また、GBP の特筆すべき特徴はそのサイズにあり、アミノ酸 25 残基と動物サイトカインの中でも最小のものと言える。さらに、私

達は、これまで鱗翅目昆虫（ガやチョウの仲間）からしか報告がなかった GBP 様ペプチドがショウジョウバエ、カ、甲虫といった種々の異目種昆虫にも広く存在することを最近明らかにした。したがって、GBP 様低分子サイトカインは昆虫類全般に存在し、昆虫における初期形態形成や様々な生理機能発現や維持に関与する基本的な生理活性因子である可能性が高まった。

これまでの GBP 構造-活性相関解析の結果、その細胞増殖活性と血球活性化作用発現に必須の最小一次構造は異なることが明らかになった。すなわち、細胞増殖活性に必要な最小構造は N 末端から 2-23 番目までの 22 残基ペプチドであるのに対し、血球活性化は 1-21 番目までの 21 残基ペプチドが必須最小構造となる。すなわち、この結果は GBP の多機能性がそのレセプターの多様性に起因するものと解釈できる。GBP 自体、非常に単純な構造であるにも関わらず、多彩な生理機能を発揮するこの昆虫サイトカインの活性発現分子機構を明らかにすることが、本研究の最終目標である。そのため、本研究では、下記のようにレセプターの同定と構造解析を通して、GBP 活性発現における細胞内情報伝達経路のアウトラインを明らかにする。具体的に、本研究では以下のような研究目標を設定し、期間内にこれらを達成する。

- 1) 血球細胞の GBP レセプターの存在の証明と性質を明らかにすると共に、単離してその一次及び立体構造を決定する。さらに、レセプタータンパク質内の GBP 結合領域を同定しその構造を明らかにする。同様の手法を用いて昆虫培養細胞 High Five (あるいは Sf9) から GBP レセプターを単離、構造決定し、GBP 結合領域の構造を明らかにすることによって血球細胞 GBP レセプター構造との差異を明確にする。
- 2) アミノ酸配列を決定したレセプターの立体構造、さらに、GBP 結合時のレセプターと GBP 自体の立体構造変化を明らかにする。
- 3) GBP 活性発現に関わる細胞内情報伝達因子を明らかにするために、GBP-GBP レセプター複合体と親和性を持つ細胞質内共役タンパク質（情報伝達因子候補）を同定し、それらの一次構造の決定を目指す。

### 3. 研究の方法

本研究では、GBP の血球細胞活性化に着目し、実験材料にはアワヨトウ幼虫を用いた。こうした実験材料と対象の細胞の選択は以下のような理由による。まず、アワヨトウ幼虫は比較的大型の昆虫であり、終齢幼虫の体重は約 1 グラムに達する。その為、生化学的

な研究解析も十分に行えるだけの血球細胞を調製することも可能だからである。さらに、アワヨトウ幼虫の血球細胞は、至適条件で実験を遂行すれば、単離後、培養液中で比較的長時間（数 10 分-1 時間程度）安定に保存・観察する事も可能であることを、種々の予備実験により確認できた。

解析に用いたアワヨトウ幼虫は、蛾や蝶の仲間（鱗翅目昆虫）で、その形態の違いからおおよそ 4 種類の血球細胞に区別できる一顆粒細胞、プラズマ細胞、エノシトイド、小球細胞。この内、顆粒細胞とプラズマ細胞が全体の約 7 割以上を占める免疫活性の高い血球細胞である。アワヨトウ終齢幼虫から単離した血球細胞を 96 穴プラスチックプレートに撒き、数 nM 以上の GBP を添加すると、特に、プラズマ細胞が顕著な活性化を示し、突起の伸長もしくは細胞同士の凝集塊形成反応が起る（活性化による形態変化の差は、主に、アッセイに用いるプラスチックプレートの異物性の差異に因るところが大きく、異物性が高いと前者、低いと後者の反応が観察される）。このことから、プラズマ細胞表面には GBP 受容体が存在することが予想されるが、更に、分子レベルでの GBP 受容体に関する予備実験を進めた。

まず、血球細胞における GBP 受容体の生化学的性質を明らかにする為に、放射能ラベルした GBP を用い、レセプター結合実験を行った。具体的には、<sup>125</sup>I-GBP を調製し、この放射活性リガンドと非標識 GBP を用いて血球細胞（プラズマ細胞と顆粒細胞）に対するレセプター結合競争阻害実験を行うことによって、GBP レセプターの結合性を調べた。その結果、血球細胞に対しては、1-3 nM という解離定数値を示すことが明らかになった。また、比較の為に、これまで、GBP による細胞増殖効果が確認されている各種培養細胞（ヒトケラチノサイト、昆虫 Sf9 細胞、High Five 細胞）も実験に供した。解析の結果、培養細胞ケラチノサイト、Sf9、High Five に対する解離定数は、いずれも 0.1-0.3 nM と高親和性を示すことを確認した。すなわち、このことから、血球細胞表面の GBP 受容体は、こうした培養細胞と比較した場合、一桁低い中親和性とも言える結合親和性を有することが明らかになった。また、High Five 細胞には、上述の高親和性結合受容体の他に、解離定数が 13.7 nM という低親和性結合受容体が存在することも分かった。以上の生化学的 GBP 受容体分析によって、プラズマ細胞や顆粒細胞といった血球細胞には、解離定数値が 1-3 nM という中親和性の GBP 受容体が存在すること

が明らかになった。さらに、詳しいラジオレセプター解析の結果、両血球細胞の表面には、おおよそ約 10,000-15,000sites/cell という数の GBP 結合部位 (受容体) が存在する事が明らかになった。

こうして血球細胞 GBP 受容体の生化学的性質が明らかになった時点で、私達は、GBP 刺激の細胞内情報伝達系路を探る簡単な予備実験を行った。それは、GBP による血球活性化へのチロシン残基リン酸化の関与の可能性を検証するものであった。すなわち、血球細胞をチロシンリン酸化酵素阻害剤 genistein で処理した後に、GBP で刺激した場合、GBP による血球活性化は誘起されるかどうか、を確かめた。結果は明瞭で、GBP によるプラズマ細胞の活性化は顕著に抑制された。すなわち、この実験結果より、私達は GBP による GBP 受容体の活性化は、チロシンリン酸化を利用して細胞内情報伝達を行っているものと解釈した。さらに、この解釈の正当性を検証すべく、GBP で血球細胞を刺激した後、経時的に細胞膜タンパク質のチロシンリン酸化の程度を Western blotting によって分析した。その結果、GBP 刺激直後にリン酸化され、数分間そのリン酸化レベルが上昇した後、徐々に低下する分子量約 77kDa の細胞膜タンパク質の同定に成功した。このタンパク質を P77 と命名し、その後は、このタンパク質の単離と構造決定に集中した。

#### 4. 研究成果

予備実験による種々の知見に基づき、私達は、GBP によるチロシン残基リン酸化を指標に、GBP のプラズマ細胞活性化に関与すると予想される分子量約 77kDa の細胞膜タンパク質の単離を試みた。約 1,500 匹のアワヨトウ終齢幼虫の血球細胞を出発材料とし、GBP 刺激によるチロシンリン酸化反応を指標に精製を進め、最終的に、目的の細胞膜タンパク質の単離に成功した。当初の予想通り、分子量約 77kDa の精製糖タンパク質は、trypsin 分解後、*de novo* シーケンスによって一部のペプチドアミノ酸配列を得た。得られたアミノ酸配列を基に、プライマーを作成し PCR を繰り返して、その cDNA のクローニングを行った。得られた cDNA の構造解析の結果、この新規タンパク質 P77 は、1 カ所の膜貫通ドメインを有する細胞膜タンパク質であり、細胞質領域には、特にプロリン残基が豊富に含まれ、SH2/SH3 ドメイン結合モチーフが存在する。さらに興味深いことに、哺乳類の免疫関連受容体の多数のアダプター因子内に報告されている ITAM モチーフ (immunoreceptor

tyrosine-based activation motif) 様配列が存在することも確認した。すなわち、今回、同定した新規細胞膜タンパク質 P77 は、GBP によるチロシンリン酸化刺激をこうしたモチーフを介して細胞内の他の情報伝達因子に伝える因子と考えられる。P77 が GBP との直接結合能を有するかについて検証した。まず、P77 をアフリカミドリザル腎臓由来 COS7 細胞で強制発現し、この細胞を用いて <sup>125</sup>I-GBP の結合量を測定した。その結果、P77 を強制発現する前後で <sup>125</sup>I-GBP の結合量に有意な差は検出できなかった。すなわち、P77 自体には GBP との直接結合能はない、という結論に達した。

次に、アワヨトウ幼虫に P77 dsRNA を注射し、P77 の遺伝子発現を抑制する RNAi 実験を行った。その結果、コントロール幼虫 (EGFP dsRNA を注射) に比べ、約 50% の発現量に低下させることができた。この P77 RNAi 幼虫から血球細胞を調製し、GBP によって刺激したところ有意に活性化能が低下していることが分かった。また、本研究により、GBP 刺激による血球の活性化は、P77 のチロシンリン酸化のみならず、インテグリン B1 のチロシンリン酸化をも誘起することが確認でき、P77 とインテグリン B1 鎖との相互作用が推測されるに至った。なぜならば、P77 の細胞内領域に同定された ITAM モチーフは、哺乳類細胞においてインテグリン B 鎖との相互作用が報告されているからである。この可能性を検証するため、P77 RNAi 幼虫におけるインテグリン B1 の遺伝子発現を測定したところ、有意に発現量は低下し、しかも、その血球の GBP 依存的チロシンリン酸化能も顕著に低下していることが明らかになった。

最後に、P77 の昆虫体内における自然免疫活性への貢献度を調べる目的で、P77 RNAi 幼虫にグラム陰性菌である *Serratia marcescens* を注射した。その結果、やはり、コントロール幼虫 (EGFP dsRNA を注射) に比べ、その死亡率が有意に高まることを確認した。

以上の一連の研究結果より、次のような結論を導くことができる (図 1 参照)。今回、発見した新規糖タンパク質 P77 は昆虫の血球細胞 (特に、プラズマ細胞) に存在する細胞膜一回貫通の膜タンパク質であり、昆虫サイトカイン GBP 刺激によって、その細胞内領域のチロシン残基がリン酸化される。このリン酸化は (恐らく) 近傍の ITAM モチーフや SH2/SH3 ドメイン結合モチーフへのインテグリン分子やアクチン分子の結合を促し、プラズマ細胞の細胞骨格を変化させることによって、異物表面への粘着性を増強させる。さら

に、GBP 刺激の細胞内情報伝達系にとって、この P77 の存在は必須であり、これを欠くことによってプラズマ細胞の活性化は失い、結果的に、病原微生物に対する抵抗性も低下する。前述のように、P77 は GBP に対する直接結合能は有していないものの、他の未同定膜タンパク質とともに複合体を形成することによって GBP 受容体として機能している可能性も現時点では否定できない。

本研究でその存在と構造・性質が明らかになった新規 GBP 受容体アダプタータンパク質 P77 は、昆虫の細胞性自然免疫系にとって非常に重要な細胞内情報伝達因子と言える。今後、更に詳細な研究を進めなければならない。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 11 件) すべて査読有り

1. Umetsu, Y., Aizawa, T., Muto, K., Yamamoto, H., Kamiya, M., Kumaki, Y., Demura, M., Hayakawa, Y. and Kawano, K. (2009) The C-terminal elongation of Growth-blocking peptide enhances its biological activity and micelle binding affinity. *J. Biol. Chem.*, 284, 29625-29634.
2. Nakatogawa, S., Oda, Y., Kamiya, M., Kamijima, T., Aizawa, T., Clark, K.D., Kawano, K., Strand, R.M. and Hayakawa, Y. (2009) A novel peptide mediates aggregation and migration of hemocytes from an insect. *Curr. Biol.* 19, 779-785.
3. Ryuda, M., Tsuzuki, S., Tanimura, T., Tojo, S. and Hayakawa, Y. (2008) A gene involved in the food preferences of larval *Drosophila melanogaster*. *J. Insect Physiol.* 54, 1440-1445.
4. Tojo, S., Hayakawa, Y., Phaophon P. (2008) Strains in the common cutworm, *Spodoptera litura* (Lepidoptera: Noctuidae) with differing host ranges. 43. 491-496 (2008)
5. Ryuda, M., Nakayama, H. and Hayakawa, Y. (2008) A novel gene associated with intraspecific predation in *Spodoptera litura* larvae. *Appl. Entomol. Zool.* 43, 563-568 (2008)
6. Ryuda, M., Shimada, K., Koyanagi, R., Azumi, K., Tanimura, T. and Hayakawa, Y. (2008) Analysis of hunger-driven gene expression in *Drosophila melanogaster* larval central nervous system. *Zool. Sci.* 25. 746-752
7. Ninomiya, Y., Kurakake, M., Oda, Y., Tsuzuki, S. and Hayakawa, Y. (2008) Insect cytokine growth-blocking peptide signaling cascades regulate two separate groups of target genes. *FEBS J.* 275, 894-902.
8. Ninomiya, Y. and Hayakawa, Y. (2007) Insect cytokine, growth-blocking peptide, is a primary regulator of melanin-synthesis enzymes in armyworm larval cuticle. *FEBS J.*, 274, 1768-1777.
9. Hayakawa, Y. (2006) Insect cytokine

growth-blocking peptide (GBP) regulates insect development. *Appl. Entomol. Zool.* 41, 545-554.

10. Watanabe, S., Tada, M., Aizawa, T., Yoshida, M., Sugaya, T., Taguchi, M., Kouno, T., Nakamura, T., Mizuguchi, M., Demura, M., Hayakawa, Y. and Kawano, K. (2006) N-Terminal Mutational Analysis of the Interaction Between Growth-Blocking Peptide (GBP) and Receptor of Insect Immune Cells. *Protein & Peptide Letters*, 13, 815-822.
11. Ninomiya, Y., Tanaka, K. and Hayakawa, Y. (2006) Mechanisms of black and white stripe pattern formation in the cuticles of insect larvae. *J. Insect Physiol.* 52, 638-645.

[学会発表] (計 8 件)

- 1) 降幡駿介、早川洋一、寄生蜂の毒液が宿主シヨウジョウバエに及ぼす致死作用、日本応用動物昆虫学会. 2010. 3, 26 千葉
- 2) 早川洋一、新規サイトカインの構造と生理機能、日本生化学会. 2009. 10. 28 神戸
- 3) 早川洋一、昆虫サイトカインの構造と生理機能、日本農芸化学会. 2009. 3. 28 福岡
- 4) 早川洋一、Insect cytokine regulating innate immune defences. 生物物理学会. 2008. 12. 20 福岡
- 5) 松本均、早川洋一、細菌感染による P77 のリン酸化、日本動物学会 2008. 9. 28 福岡
- 6) 田崎彩子、早川洋一、コクヌストモドキの擬死行動誘発に関連する遺伝子解析、日本動物学会. 2008. 9. 28 福岡
- 7) 龍田勝輔、早川洋一、キイロシヨウジョウバエの食性・摂食行動に関わる CG33071 遺伝子の解析、日本動物学会. 2008. 9. 28 福岡
- 8) 龍田勝輔、早川洋一、昆虫の食性決定に関与する遺伝子の解析、日本応用動物昆虫学会. 2007. 3. 28 広島

[その他]

ホームページ等

<http://extwww.cc.saga-u.ac.jp/~hayakayo/FRAME/index.html>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

早川 洋一 (HAYAKAWA YOICHI)  
佐賀大学・農学部・教授  
研究者番号：50164926

### (2) 研究分担者

相沢 智康 (AIZAWA TOMOYASU)  
北海道大学大学院・理学研究科・准教授  
研究者番号：40333596

< 1 >

