

研究種目：若手研究 (B)  
 研究期間：2007～2008  
 課題番号：19770123  
 研究課題名 (和文) 多機能サイトカイン GBP の生体防御における役割の分子レベルでの解明  
 研究課題名 (英文) Elucidation of molecular mechanisms of a multifunctional cytokine GBP in host defense.  
 研究代表者  
 相沢 智康 (AIZAWA TOMOYASU)  
 北海道大学・大学院先端生命科学研究院・准教授  
 研究者番号：40333596

研究成果の概要：チョウやガの仲間である鱗翅目昆虫、アワヨトウから発見された多機能サイトカイン GBP は、血球の活性化などの生体防御や幼虫の成長に関連して重要な役割を担っていると推定されるが、その分子レベルでの作用機構については未知の点が多く残されている。GBP の各種変異体を調整し、その立体構造と活性の関係について検討を行うことで、昆虫の寄生に伴う成長抑制や、創傷や感染と関連した血球の働き等に関して興味深い成果を得ることに成功した。

## 交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,000,000	0	2,000,000
2008年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	390,000	3,690,000

研究分野：蛋白質科学

科研費の分科・細目：生物物理学

キーワード：構造生物学

## 1. 研究開始当初の背景

昆虫を代表とする無脊椎動物は、脊椎動物が有する抗体産生系による適応免疫機構を有していないため自然免疫を中心とした生体防御機構を進化させている。血球細胞についても、脊椎動物とは大きく異なった構成をしており、たとえば鱗翅目昆虫の場合、プラズマ細胞や顆粒細胞が免疫細胞として生体防御を担っている。サイトカインによる血球分化、活性化機構の研究が進んでいる脊椎動物

と比較すると、無脊椎動物では、これらの血球の分化、異物認識、活性化機構には未知の点が多い。

growth-blocking peptide (GBP) は、イネなどに対する害虫として知られるアワヨトウの幼虫より初めて発見された多機能サイトカインであり、各種の血球細胞の活性化や止血に関与している他、幼虫の成長の制御にも深く関連している。昆虫ではまだサイトカインがあまり同定されていないことや、GBP は

わずか 20 数残基からなるサイトカインであるにもかかわらず、多機能性を有することなどから、極めて興味深い研究対象といえる。最近の研究で、カイコをはじめとする他の鱗翅目昆虫からも GBP のホモログが広く発見されているが、受容体との相互作用や、活性調節に関しては未知の点が多い。

## 2. 研究の目的

本研究では、代表者が精力的に研究を進めてきた多機能サイトカイン GBP と関連の種々の分子により誘導・調整される血球活性化や、寄生に伴う成長制御に関連する分子機構に焦点を当て、その分子レベルでのメカニズムの解明を目指した。鱗翅目昆虫の生体防御機構を担うサイトカインの作用のメカニズムを、分子レベルで明らかにすることが、本研究の大きな目的である。

## 3. 研究の方法

遺伝子組換えにより調整した GBP 分子およびその変異体を用いることで、各種の活性測定及び溶液 NMR 法による立体構造解析を進めた。溶液 NMR 法による立体構造解析においては、遺伝子組換えにより試料を調整しているメリットを生かして、安定同位体ラベル試料を調整し解析を進めた。

また、昆虫等の無脊椎動物由来の各種自然免疫関連ペプチドの立体構造解析を進め、アワヨトウ外皮から発見され、血球細胞に対して走化性を誘導するサイトカイン hemocyte chemotactic peptide (HCP) についても、その立体構造解析をおこなった。

## 4. 研究成果

GBP は、当初、寄生蜂の一種であるカリヤコマユバチに寄生されたアワヨトウ幼虫の血中から、寄生に伴うアワヨトウ幼虫の成長抑制に関連する因子として同定された。寄生されたアワヨトウ幼虫では、血中の GBP 濃度が高濃度に維持され、これにより成長抑制がおこり、寄生蜂の宿主外への脱出に有利に働くと考えられている。興味深いことに、アワヨトウの遺伝子にコードされる GBP は全長 23 残基長であるにもかかわらず、血中から単離された GBP は、25 残基長であった。これは、カリヤコマユバチの寄生に伴って感染するポリドナウイルスの影響で終止コドンが Tyr に翻訳される影響によると考えられ、これにより全 28 残基長のペプチドが合成されると予想されていた (表 1)。しかし、GBP の 28 残基長へ伸長が、寄生に伴う成長抑制活性においてどのような役割を担っているかについては明らかではなかった。

1-23 GBP	MDIQ GQVQ YVRFQ DGRNK LKVF
1-25 GBP	MDIQ GQVQ YVRFQ DGRNK LKVFQ
1-28 GBP	MDIQ GQVQ YVRFQ DGRNK LKVFQ LK

表 1 各変異型 GBP の一次配列

そこでまず、遺伝子組換えによる GBP の発現系を利用して、23 残基型(1-23 GBP)、25 残基型(1-25 GBP)、28 残基型(1-28 GBP)の各種 GBP を調整し、各ペプチドの血中での分解の特性について検討した。アワヨトウの血液を採取し、血球を取り除いた血清に対して、各ペプチドを加えて、時間経過による分解について逆相 HPLC を用いて分析した。その結果、1-23 GBP や寄生されたアワヨトウ幼虫の血中で発見された 1-25 GBP は血中のプロテアーゼによる分解を受けにくいのに対して、1-28 GBP は速やかに分解され、1-25 GBP となることが明らかになった (図 1)。

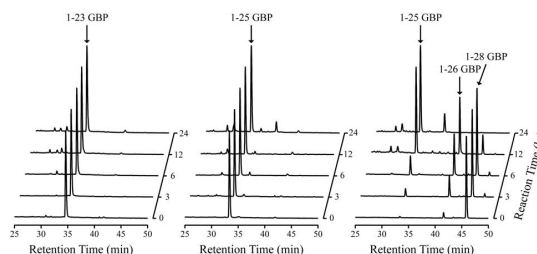


図 1 各変異型 GBP の血中での分解の分析

次に各変異型 GBP をアワヨトウ幼虫に対して注射し、その体重増加を測定することで、その成長抑制活性についての検討を行った。この結果、1-28 GBP が最も強い成長抑制活性を示すのに対して、1-25 GBP はそれより弱く、1-23 GBP はさらに弱い活性であることが明らかになった (図 2)。このことは、1-28 GBP が速やかに血中で分解され、1-25 GBP となる分解実験の結果と一見すると矛盾する。

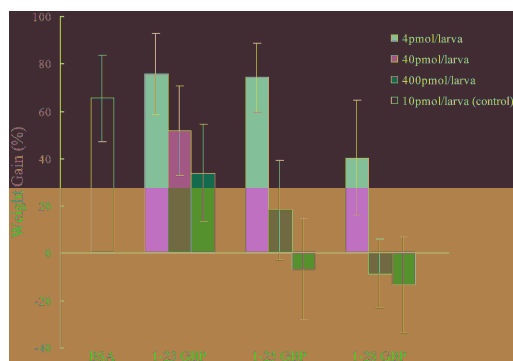


図 2 各変異型 GBP の成長抑制活性の比較

そこで各ペプチドについてさらに詳細な検討を行うために、各ペプチドの溶液 NMR 法による立体構造解析を行った (図 3)。立体構造解析の結果、1-23 GBP から伸長した 2 残基 (Tyr-Gln) 及び 5 残基 (Tyr-Gln-Leu-Ile-Thr) 部分は、水中では収束した構造を持たないことが明らかになった。

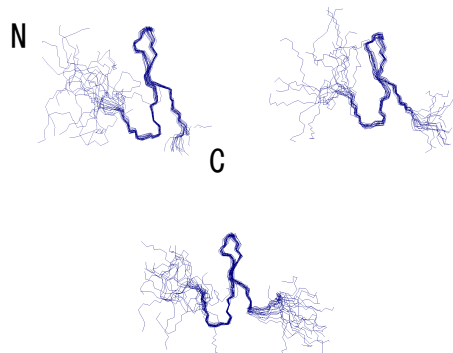


図 3 1-23 GBP (左上)、1-25 GBP (右上)、1-28 GBP (下)の水溶液中での立体構造重ね合わせ図

これらの立体解析の結果は、1-28 GBP の C 末端部位が溶液中で速やかに分解を受けることと一致している。そこで、1-28 GBP が強い成長抑制活性を有するメカニズムとして、何らかの生体分子との相互作用が関与している可能性があるとして仮説を立て、その検証を行った。予備的検討の結果、1-23 GBP や 1-25 GBP と比較して 1-28 GBP が各種の膜モデル物質と強く相互作用することが明らかになった。そこで、細胞膜等との相互作用が GBP の生体内での高活性化の要因となる可能性について、検討を行うことにした。

図 4 は 1-28 GBP の水中及び脂質膜モデルとして用いられる dodecylphosphocholine (DPC) ミセル中の NMR スペクトルとそのケミカルシフトの差を示している。この図は、1-28 GBP はその伸長した C 末端残基で DPC ミセルと相互作用して、ケミカルシフトに変化が生じている可能性があることを示している。そこで、1-28 GBP のミセル中での立体構造についてさらに解析を行ったところ、水溶液中では収束した構造を持たなかった C 末端残基が、ミセル中ではヘリックスを形成することが明らかになった (図 5)。さらに、重水素交換や、スピンラベル試薬である 5-doxyl stearic acid を用いてミセルとの相互作用部位の解析を進めた結果、伸長した C 末端部位の残基に加えて、 $\beta$ -シートを形成するコア領域に存在する Ala9 付近の残基もミセルとの相互作用に関係していることが明らかになった (図 6)。

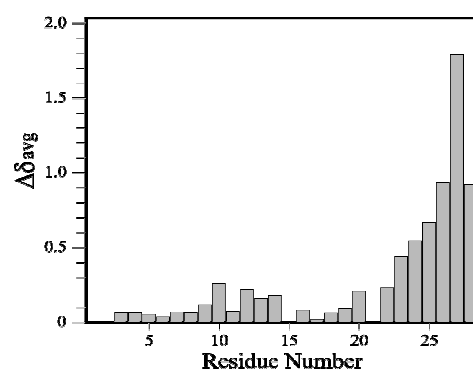
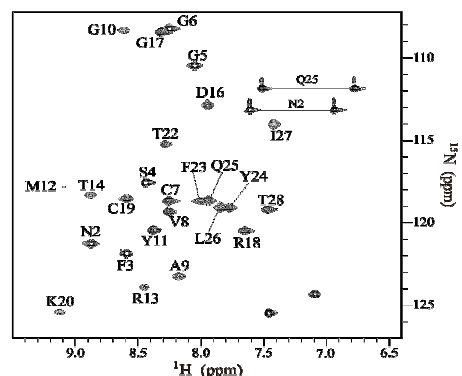
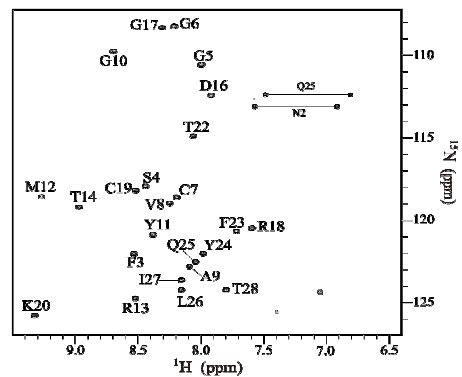


図 4 水中(上)及びDPC ミセル中(中)の1-28 GBP の NMR スペクトル、及びそのケミカルシフトの差(下)

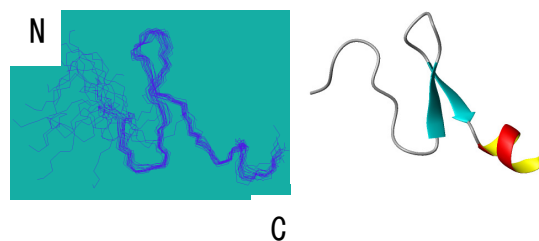


図 5 DPC ミセル中での 1-28 GBP の立体構造重ね合わせ図 (左)とリボンモデル(右)

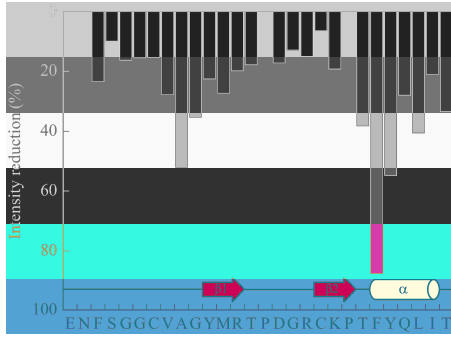


図 6 スピラブル実験によるミセル相互作用部位の同定

これらの結果をまとめると 1-28 GBP はその伸長した C 末端の残基がヘリックス構造を形成することにより、Phe23、Tyr24、Leu26、Ile27 などからなる疎水性面を形成し、コア領域に存在する Val18、Ala9、Tyr11 などの疎水性残基を加えた面で生体膜と相互作用すると予想される(図 7)。この相互作用により、1-28 GBP は血中でのプロテアーゼによる速やかな分解から逃れて、長時間に渡り高い血中濃度を維持することで、高い成長抑制活性を示す可能性が示唆された。血中に放出された 1-28 GBP は分解を受けるため、単離精製される GBP は大部分が 1-25 型となっていると予想される。また、過去の研究から、GBP 結合タンパク質 p48 (GBPBP) がスカベンジャーとして働くことで、血中の GBP が除去されると考えられているが、1-28 GBP は生体膜への結合により、この分子によるクリアランスを回避している可能性も示唆された。

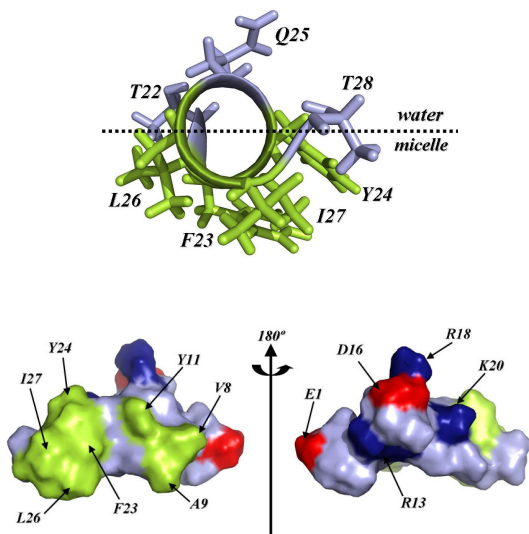


図 7 1-28GBP の膜相互作用残基のモデル図

さらに GBP の有する血球細胞に対する刺激性と類似した活性をもつペプチドとして、アワヨトウ表皮より新規に単離されたサイトカインである HCP について、その立体構造解析を行った。HCP は GBP と同様に血球細胞を活性化し凝集を促進する活性をもつだけではなく、顆粒細胞の走化性を誘導するケモカイン様の活性も有することが明らかになった。HCP はアワヨトウ表皮の内クチクラに蓄積されており、創傷に伴って放出され血球の走化を促すと考えられる。

HCP と GBP は一次構造や前駆体の構造も全く異なるが(表 2)、立体構造解析の結果から、HCP も 2 本の逆平行  $\beta$ -シートからなるコア構造と、収束しない N 末端及び C 末端残基を持ち、2 つのペプチドは類似したコンフォメーションを有することが明らかになった(図 8)。HCP は新規に同定されたペプチドであり、その活性に重要な残基等についての知見は未だ多くはないが、GBP とその類縁のペプチドについては過去の知見から活性に重要な残基が明らかになっており、HCP ではそのほとんどが保存されていない。このため、HCP と GBP の立体構造上の相同性が持つ意味は明らかではなく、今後の研究課題といえる。

HCP	SVQILRCPDGMQMLRSGQCVATTEPPFPDPSY
GBP	ENFSGGCVAGYMRTPDGRCKPTFYQ

表 2 HCP と GBP の一次配列の比較

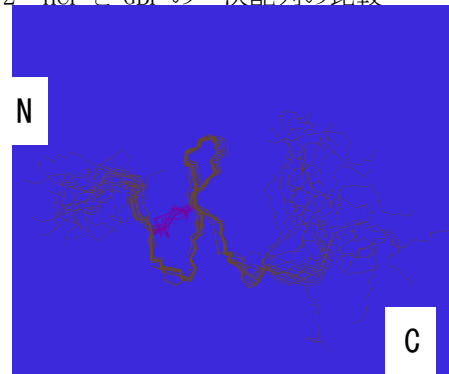


図 8 HCP の立体構造重ね合わせ図

## 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 4 件)

- ① S. Nakatogawa, Y. Oda, M. Kamiya, T. Kamijima, T. Aizawa, K. D. Clark, M. Demura, K. Kawano, M. R. Strand and Y. Hayakawa, A novel peptide mediates aggregation and migration of hemocytes

from an insect, Curr. Biol. in press, 査読あり

- ② T. Kouno, M. Mizuguchi, H. Tanaka, P. Yang, Y. Mori, H. Shinoda, K. Unoki, T. Aizawa, M. Demura, K. Suzuki, and K. Kawano, The structure of a novel insect peptide explains its Ca<sup>2+</sup> channel blocking and antifungal activities, Biochemistry, 46, 13733-13741, 2007, 査読あり
- ③ N. Fujitani, T. Kouno, T. Nakahara, K. Takaya, T. Osaki, S. Kawabata, M. Mizuguchi, T. Aizawa, M. Demura, S. Nishimura, and K. Kawano, The solution structure of horseshoe crab antimicrobial peptide tachystatin B with an inhibitory cystine-knot motif, J. Pept. Sci., 13, 269-279, 2007, 査読あり
- ④ S. Saito, T. Aizawa, K. Kawaguchi, T. Yamaki, D. Matsumoto, M. Kamiya, Y. Kumaki, M. Mizuguchi, S. Takiya, M. Demura, and K. Kawano, Structural approach to a novel tandem repeat DNA-binding domain, STPR, by CD and NMR, Biochemistry, 46, 1703-1713, 2007, 査読あり

[学会発表] (計3件)

- ① 梅津喜崇, 相沢智康, 武藤香織, 山本宏子, 神谷昌克, 熊木康裕, 水口峰之, 出村誠, 早川洋一, 河野敬一, 昆虫由来成長阻害因子 Growth-blocking peptide (GBP) の寄生による C 末端残基伸長が生体膜相互作用

と活性に与える影響, 第 31 回日本分子生物学会年会・第 81 回日本生化学会大会, 2008.12.9 - 12, 神戸ポートアイランド

- ② 梅津喜崇, 相沢智康, 武藤香織, 山本宏子, 神谷昌克, 熊木康裕, 水口峰之, 出村誠, 早川洋一, 河野敬一, 成長阻害因子 GBP の C 末端残基伸長が構造と活性に与える影響, 第 44 回ペプチド討論会, 2007.11.7-9, 富山国際会議場
- ③ 梅津喜崇, 相沢智康, 武藤香織, 山本宏子, 神谷昌克, 熊木康裕, 水口峰之, 出村誠, 早川洋一, 河野敬一, 成長阻害因子 growth-blocking peptide (GBP) の C 末端残基伸長部分による生体膜相互作用が立体構造と活性に与える影響, 第 7 回日本蛋白質科学会年会, 2007.5.24-26, 仙台国際センター

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

相沢 智康 (AIZAWA TOMOYASU)

北海道大学・大学院先端生命科学研究院・准教授

研究者番号 : 40333596

### (2) 研究分担者

なし

### (3) 連携研究者

なし