

機関番号：14501

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20580053

研究課題名（和文） 昆虫の脳に存在する低分子量 GTP 結合蛋白質の機能特性

研究課題名（英文） Characteristics of small GTP binding protein in insect brain

研究代表者 宇野 知秀 (UNO TOMOHIDE)
神戸大学・農学研究科・准教授

研究者番号：80240852

研究成果の概要（和文）：昆虫は、その微小な脳のなかの特定の細胞で神経ペプチドホルモン、時計関連遺伝子などを合成している。これらの神経ペプチドや時計関連蛋白質は、温度や光などの刺激を受けて、脳の特定の細胞で合成される。そして最終的には、昆虫特異的な現象である羽化、休眠、変態を引き起こす。本研究では、これら神経ペプチドや生物時計関連蛋白質の合成・分泌機構の解明を最終的な目標として、蛋白質の細胞内輸送に関与する低分子量 GTP 結合蛋白質の一種である rab に焦点を合わせて研究を行った。

研究成果の概要（英文）：Insect synthesizes neuropeptides and clock-related proteins in the specific cell of small brain. These proteins are synthesized upon stimulation of light and temperature. Finally these proteins cause diapause, eclosion and metamorphosis. To elucidate mechanism of synthesis and secretion of these proteins in the brain, we clarified functional roles of Rab proteins; the small GTPase family to play essential roles in various aspects of membrane traffic; in the brain of *Bombyx mori*.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2009年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2010年度	600,000	180,000	780,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農学・応用昆虫学

キーワード：養蚕・蚕糸

1. 研究開始当初の背景

低分子量 GTP 結合蛋白質である Rab は、主にペプチドや蛋白質の細胞内輸送、分泌に関与する。

(1) 我々は、昆虫の変態を引き起こす神経ペプチドである Prothoracicotropic

hormone (PTTH) の脳から体液中への分泌機構に着目し、研究を行ってきた。その結果、PTTH の脳から体液中の分泌には、GTP 結合蛋白質と PKC によるリン酸化が関与することを明らかにした。

次に、昆虫の rab に対する抗体と昆虫の rab の発現蛋白質を用いた生化学的解析により、以下のことを解明した。

- ① 低分子量 GTP 結合蛋白質である rab 蛋白質がリン酸化されること、
- ② カイコの PKC により、カイコの rab8 がリン酸化されること
- ③ カイコの脳抽出物の中に、rab8 と特異的に結合する 3 つの蛋白質が存在することを明らかにした。

以上、rab とリン酸化は密接に関係しているが、昆虫の脳内でリン酸化された rab 分子の機能は不明である。

(2) 一方、昆虫は、過酷な環境にさらされると、休眠を行う。休眠は、神経細胞中での G 蛋白質を含むシグナル伝達を経て、ペプチドが分泌され、制御される。また、昆虫には、動物にはない新規の rab が存在した。このような新規の G 蛋白質は、動物にはない昆虫特異的な生理現象である休眠や変態を制御すると考えられる。

2. 研究の目的

昆虫の脳内に存在する低分子量 GTP 結合蛋白質の機能を解明するために、本研究では、(1)低分子量 G 蛋白質の rab8 のリン酸化と (2)新規の GTP 結合蛋白質の機能解析にターゲットを絞り、研究を行う。

3. 研究の方法

本研究では、(1)カイコ脳 rab 蛋白質のリン酸化の役割を明らかにするために、リン酸化された rab8 蛋白質の機能解析(リン酸化された rab8 蛋白質の機能解析)をおこなう。まず、大腸菌で発現した rab 蛋白質を精製後、プロテインキナーゼによりリン酸化を行う。蛋白質のリン酸化部位を質量分析と遺伝子工学的手法を用いて決定する。

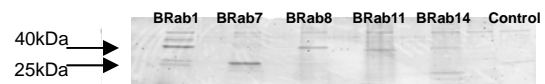
- (2) 昆虫特異的な現象である休眠、変態

に関連した新規の低分子量 GTP 結合蛋白質の機能を解明する(新規低分子量 GTP 結合蛋白質の解析)。具体的にはカイコの cDNA より分離された 2 つの新規 rab (BRabN1 と BRabN2) を大腸菌で発現させ、その GTP/GDP 結合活性と GTPase 活性を測定する。また、これらの蛋白質に対する抗体を作成し、蚕のどの器官で発現しているかを決定する。

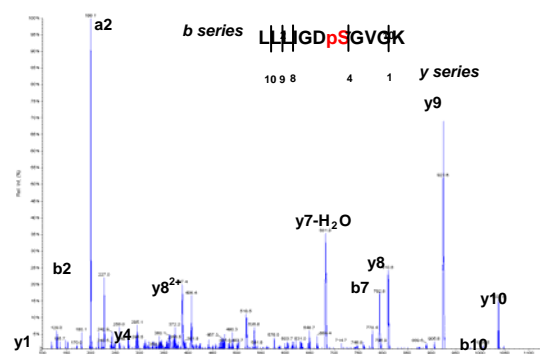
4. 研究成果

- (1) リン酸化された rab8 蛋白質の機能解析

Bombyx mori の 5 種の rab (rab1, 7, 8, 11 and 14) を大腸菌で発現させた後、各種アフィニティークロマトグラフィーにより精製した。これらの rab タンパク質を、in vitro で Protein kinase C(PKC)によりリン酸化したところ、PKCによりすべての rab はリン酸化された。



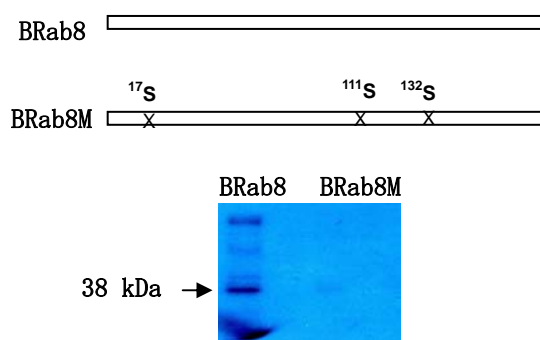
BRab1 を PKC によりリン酸化した後、質量分析によりリン酸化されたアミノ酸を決定した。その結果、rab1 の 17 番目のセリンがリン酸化されることがわかった。



次に、点変異技術により、rab8 の 17 番目、111 番目、132 番目のセリンをアラニンに置換した変異体(BRab8M)を作成後、PKC に

よりリン酸化した。その結果、BRab8MはPKCによりリン酸化されなかった。この結果、新たにリン酸化された部位として111番目のセリンを明らかにした。

これらの結果により、rab蛋白質はリン酸化により制御されることが示唆される。今後、in vivoでrab8がリン酸化されているかを、免疫沈降や脳中に存在するrab8の質量分析などの技術を用いて解析する。



(2) 新規低分子量GTP結合蛋白質の解析

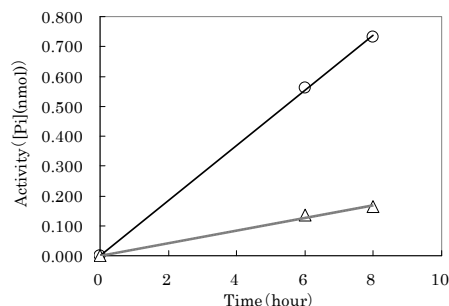
昆虫に特異的なrab蛋白質を大腸菌で発現させた後、精製した。

BRabタンパク質を、 $[^{35}\text{S}]$ -GTP γ Sあるいは、 $[^3\text{H}]$ -GDP反応液に加えて反応させることで、結合活性を測定し、解離定数(Kd: dissociation constant)を算出した。その結果、BRabN1の解離定数は $0.226 \times 10^{-6}\text{M}$ 、BRabN2の解離定数は $0.379 \times 10^{-6}\text{M}$ と算出でき、GST-BRabN2と比較して、GST-BRabN1は $[^{35}\text{S}]$ -GTP γ Sに強い親和性を示した。BRabN1の解離定数は $0.087 \times 10^{-6}\text{M}$ 、BRabN2の解離定数は $0.546 \times 10^{-6}\text{M}$ と算出でき、GST-BRabN2と比較して、GST-BRabN1は $[^3\text{H}]$ -GDPに強い親和性を示した。

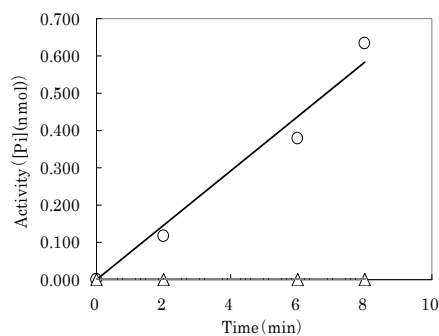
	Kd ($\times 10^{-6}$ M)	
	GTP γ S	GDP
BRabN1	0.226	0.087
BRabN2	0.379	0.546

BRabタンパク質を用いて、GTPase活性を測定した。その結果、1molのBRabN1(○)は1分間に154molのGTPを加水分解し、1molのBRabN2(△)は1分間に35molのGTPを加水分解しました。

以上の結果、機能未知のBRabN1、BRabN2タンパク質は、GTP結合タンパク質としての機能を有していた。



BRabタンパク質を用いて、ATPase活性を測定した。その結果、BRabN1(○)はATPase活性を持ち、BRabN2(△)はATPase活性を持たないことがわかった。



次に、BRabN1、BRabN2が、カイコのどの組織で発現しているかを抗体を作成し、調べた。まず、BRabN1、BRabN2に対するモノクローナル抗体を作製した。

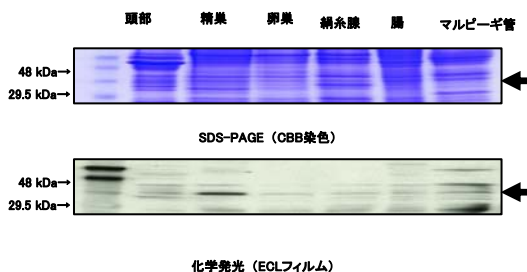
それぞれのモノクローナル抗体を、大腸菌で発現、精製したBRab1、7、8、14、N1、N2、以上6種のBRabタンパク質を用いたイムノブロッティングに供した。

その結果、抗BRabN1モノクローナル抗体

では、推測される分子量約 48,000 の位置に、抗 BRabN2 モノクローナル抗体では、推測される分子量約 50,000 の位置にバンドが検出され、BRabN1、BRabN2 を特異的に認識するモノクローナル抗体が得られた。



作製した抗 BRabN1 モノクローナル抗体を、カイコの組織から抽出したタンパク質を用いたイムノブロッティングに供した。その結果、頭部、精巣、卵巣、絹糸腺、中腸、マルピーギ管の抽出タンパク質で、分子量約 30,000 の位置に BRabN1 と推測されるバンドが確認できた。特に、精巣では、他の組織に比べ顕著なバンドが確認できた。



今後、この抗体を用いて、組織染色することにより、rab の組織内局在性を明らかにする。また、免疫沈降や GST-pull down などの技術を用いて rab と相互作用する蛋白質の解明を行う。

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 5 件)

- 1 Uno, T., Hata, K., Hiragaki, S., Isoyama, Y., Trang, L. T. D., Uno, Y., Kanamaru, K., Yamagata, H., Nakamura, M., Takagi, M., Takeda, M. Small GTPases of the Rab family in the

brain of *Bombyx mori* Histochemistry and Cell Biology 査読有 134: 615-622, 2010

- 2 Uno, T., Moriwaki, T., Isoyama, Y., Uno, Y., Kanamaru, K., Yamagata, H., Nakamura, M., Takagi, M. Rab14 from *Bombyx mori* (Lepidoptera: Bombycidae) shows ATPase activity. Biology Letters 査読有 6: 379-381, 2010.

- 3 Uno, T., Itoh, O., Miyamoto, T., Kubo, M., Kanamaru, K., Yamagata, H., Yasufuku, Y., Imaishi, H. Ferulic acid production in the brewing of rice wine (sake). 査読有 Journal of the Institute of Brewing. 115: 116-121, 2009.

- 4 Uno, T., Hata, K., Trang, L. T. D., Hiragaki, S., Nakada, T., Nakamura, M., Yamagata, H., Kanamaru, K., Takeda, M., Matsubara, M. Phosphorylation of small GTPases, Rab proteins from *Bombyx mori* (Lepidoptera: Bombycidae). 査読有 European Journal of Entomology. 106: 499-506, 2009.

- 5 Uno, T., Moriwaki, T., Nakamura, M., Matsubara, M., Yamagata, H., Kanamaru, K., Takagi, M. Biochemical characterization of Rab proteins from *Bombyx mori* 査読有 Archives of Insect Biochemistry and Physiology, 70: 77-89, 2009.

[学会発表] (計 3 件)

- 1 磯山侑里・畑圭祐・Le Thi Trang・平垣進・山形裕士・金丸研吾・竹田真木夫・宇野知秀 カイコ脳を用いたGTP結合タンパク質 (Rab) の免疫組織化学的解析. 日本蚕糸学会 第 80 回大会 2010 年 4 月 4 日 信州大学

- 2 畑圭祐、Le Thi Dieu Trang、森脇翼、山形裕士、金丸研吾、竹田真木夫、宇野知秀 カイコ脳に存在する低分子量GTP結合タンパク質 (rab) の機能解析第 79 回大会 2009 年 3 月 22 日 東京農工大学

- 3 Hata, K., Trang, L. T. D., Moriwaki, T., Nakada, T., Hiragaki, S., Takagi, M., Kanamaru, K., Yamagata, H., Takeda, M., Uno, T. Rab GTPase, small GTP binding proteins, from the brain of Bombyx

mori. Asia-pacific congress of
Sericulture and Insect Biotechnology
2008 (APSERI 2008) 2008年3月
名古屋大学

[その他]

科学研究費の社会普及事業
[ひらめきときめきサイエンス]

1 昆虫の蛋白質を見てみよう-昆虫を用いた
生化学実験

平成23年9月24日実施予定

2 昆虫を見てみよう-カイコの解剖と生化学
実験；平成22年9月25日実施

3 昆虫の脳の解明-小さな脳にある不思議な
力-平成21年7月25日実施

6. 研究組織

(1) 研究代表者

宇野 知秀 (UNO TOMOHIDE)

神戸大学・農学研究科・准教授

研究者番号：80240852