

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 17 日現在

機関番号：33902

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2016

課題番号：26660266

研究課題名(和文)新規PTTH受容体の精製と構造決定

研究課題名(英文)Purification and identification of a novel PTTH receptor in Bombyx mori

研究代表者

溝口 明 (Mizoguchi, Akira)

愛知学院大学・教養部・教授

研究者番号：60183109

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：カイコガ前胸腺の細胞膜上に存在しPTTHに結合するタンパク質をウエスタンブロットイングにより検出した。PTTHとこのタンパク質の複合体の分子質量は約120kDaで、他の組織からは検出されない。この膜タンパク質(受容体と仮称)を精製するため、His-tag付きPTTHと前胸腺を反応させたのち、PTTHと受容体を架橋し、これを界面活性剤により可溶化した。このPTTH-受容体複合体はHis-tagタンパク質精製用磁気ビーズを用いて精製できたが、精製度が不十分で、質量分析による構造決定には至らなかった。もう一段階のアフィニティー精製法として免疫沈降法を試したが、複合体を回収することはできなかった。

研究成果の概要(英文)：A putative PTTH receptor on the plasma membrane of the silkworm prothoracic glands (PGs) was detected by Western blotting. The conjugate of this protein with PTTH had Mr of 120kDa and was not detected in any tissues other than the PGs. To purify this protein, the PGs were incubated with His-tagged PTTH, and the PTTH and receptor were linked to each other with a cross-linker, followed by solubilization with detergent. The resultant conjugate was successfully affinity-purified using magnetic beads for His-tag isolation, although the purity was still insufficient for sequence analysis. We tried to use immunoprecipitation for further purifying the PTTH-receptor conjugate without success.

研究分野：昆虫内分泌学

キーワード：昆虫 前胸腺刺激ホルモン 受容体 カイコガ

1. 研究開始当初の背景

完全変態昆虫の終令幼虫は一定サイズに成長すると摂食を停止し、一連の行動的・生理的・形態的变化を経て蛹へと脱皮・変態する。この過程が前胸腺から分泌される脱皮ホルモン(通称エクジソン)により調節されることはよく知られているが、前胸腺の分泌活性レベルを調節するしくみは十分には理解されていない。従来、前胸腺の分泌活性は脳が分泌する前胸腺刺激ホルモン(PPTH)により調節されると考えられてきた。報告者らは2001年にカイコガの血中PPTH濃度の測定に成功しており(Mizoguchi et al., *Insect Biochem. Mol. Biol.* 31,349-358, 2001)、その結果によれば、終令幼虫の血中PPTHの変動パターンは、特に吐糸期以降は血中エクジソン濃度のパターンによく一致し、このことはPPTHが前胸腺の主な調節因子であることをよく裏付けている。しかし、吐糸開始期以前では両ホルモンの濃度変化は一致せず、この時期にはPPTH刺激が受容体レベルで調節されている可能性が示唆された。最近、ショウジョウバエにおいて、PPTH受容体としてTorsoが同定され、そのカイコガホモログもクローニングされた(Kim et al., *Science* 326, 1403-1405, 2009)。しかし奇妙なことに、カイコガTorso遺伝子の発現は、予想に反し、前胸腺活性が低い終令初期に高く、吐糸開始後は低いというパターンを示した。こうしたことから、カイコガにはTorso以外にも別のPPTH受容体が存在する可能性が示唆された。この可能性を支持する証拠は他にもある。例えば、1)ショウジョウバエでは変態のPPTH依存性は低く、PPTH欠失系統でも時期が遅れるものの変態は起きることから、ハエ目昆虫とチョウ目昆虫とはPPTHの作用に違いがある、2)チョウ目昆虫では、PPTHが前胸腺を刺激する際にcAMPがセカンドメッセンジャーとして働くことが知られるが、チロシンキナーゼ型受容体である

Torsoの下流でcAMPが働くとの証拠はない、3)チョウ目昆虫のPPTHの前胸腺に対する作用には、前胸腺の発達を促進する長期的作用と、前胸腺を刺激してPPTHを分泌させる短期的作用の二つがある、などである。こうしたことから、TorsoがPPTH受容体(の一つ)であるとしても、他にも受容体があると想定してその精製を試みることには十分に意義があると考えられた。また、近年の精製技術の進歩と構造決定技術の進歩を考えれば、比較的少量の出発材料から新規PPTH受容体を精製し同定することも十分に可能であると考えられた。

2. 研究の目的

本研究では、カイコガ前胸腺から新規PPTH受容体を精製・単離し、その構造を決定することを目的とした。さらに、受容体遺伝子の発現解析を通して、前胸腺活性調節のPPTH受容体レベルでの調節の実態を理解すること、新規のPPTH機能を探索することを目標とした。

3. 研究の方法

受容体タンパク質の精製と構造決定の基本戦略は以下の通りである。

まず、PPTHに結合する受容体候補タンパク質(以後、受容体と略)をPPTHと結合した状態で化学架橋し、このPPTH-受容体複合体をPPTH抗体により検出する方法を確立する。次に、PPTH受容体がかつとも多く発現する時期の前胸腺の細胞膜からPPTH-受容体複合体を溶出し、これを2段階のアフィニティー精製により精製する方法を開発する。精製法が確立したら、大量の前胸腺を出発材料として受容体を精製し、それをトリプシン消化したのち、質量分析によりペプチド断片のアミノ酸配列を決定する。最後に、この配列をもとにカイコガタンパク質データベースを検索し、受容体を同定する。

その具体的研究方法を以下に記す。

(1) PTH 受容体の検出法の確立

PTH 受容体を精製するためには、それを高感度で検出する方法が必要である。前胸腺細胞膜上に存在する受容体と PTH を反応させたのち、結合した両者を化学架橋剤を使って共有結合させた。次に前胸腺を可溶化し、PTH 抗体を用いたウエスタンブロッティングにより PTH-受容体結合物を検出した。PTH と反応させた前胸腺では存在するが PTH と反応させない前胸腺では存在しない免疫反応性のバンドが検出されれば、それが目的のタンパク質である。ウエスタンブロッティングに供する前胸腺の数は 1 回当たり 10 個体分 (10 対) とした。

(2) 精製出発材料の検討

受容体を効率よく精製するためには、精製の出発材料の選定が大きな鍵となる。そこで、さまざまな発育段階のカイコガ終齢幼虫から前胸腺を摘出して 1) で確立された方法を使って受容体を検出し、その発現量が最も多い時期を特定した。また、前胸腺以外の組織で PTH 受容体が発現している可能性もあるため、他の組織についても同様の実験を行い、受容体の検出を試みた。

(3) 精製法の確立

PTH 受容体は細胞膜上に存在するため、PTH-受容体複合体は界面活性剤を使って可溶化しなければならない。しかし、可溶化剤は PTH-受容体複合体の精製に干渉するため、その種類の選択と濃度等の条件は精製の成功を左右する非常に重要な要素である。本研究では数種類の界面活性剤について、その利用可能性を検討した。

可溶化した PTH-受容体複合体の精製は 2 種類のアフィニティー精製法を組み合わせで行うこととした。使用した (試みた) アフィニティー精製法は、PTH 抗体を使った精製、His-tag 付き PTH を使った精製、ビオチン標識 PTH を使った精製の 3 種類である。いずれの場合も、それぞれのプロ

ープを特異的に結合する磁気ビーズ (ダイナビーズ) を使用して目的物の分離を行った。抗体を使った精製では、PTH 抗体と protein G 結合ビーズの組み合わせ、ビオチン標識した PTH 抗体とストレプトアビジン結合ビーズの組み合わせ、PTH 抗体を直接結合させたビーズのいずれかを使用した。His-tag 付き PTH を使った精製では、His-tag タンパク質精製用ビーズを、ビオチン標識 PTH を使った精製ではストレプトアビジン結合ビーズを使用した。磁気ビーズに結合したタンパク質は専用のマグネットを使って溶液から分離した。

(4) 新規 PTH 受容体の同定 (計画)

PTH 受容体の精製法が確立すれば、以下の方法で新規 PTH 受容体を同定する。数千個の前胸腺を使って PTH-受容体複合体を精製し、構造解析を行う。構造決定は、精製物のトリプシン消化物の質量分析による。得られた配列をもとにカイコガのタンパク質データベースから目的とする受容体タンパク質を探索する。候補が見つければ cDNA をクローニングし全構造を決定する。次に、候補 cDNA を培養細胞に導入して発現させ、PTH との結合を細胞内シグナル (カルシウムイオン、cAMP など) の発生を指標として検出する。PTH との機能的結合が確認されれば、発現させたタンパク質は PTH 受容体である可能性が高い。本研究では予備実験として、部分精製物を使って構造決定を試みた。

4. 研究成果

(1) PTH 受容体の検出

血中エクジソン濃度がピークに達する吐糸開始後 2 日の前胸腺では PTH 受容体が確実に発現していると考えられたため、この時期の前胸腺を 10 個体から採取し、PTH (20 ng) と 4 で 1 時間インキュベートした。PBS で洗浄後、タンパク質架橋剤の Dimethyl Adipimidate Dihydrochloride (DMA) と室温で 30 分間反応させたのち、前

胸腺を TBS で洗浄した。次に、ガラスホモジナイザーを使ってこの前胸腺を緩やかにホモジナイズし、8000 xg で5分間遠心して細胞膜画分を分離した。最後にこの細胞膜画分を SDS-PAGE 用のサンプルバッファーで可溶化し、SDS-PAGE の後、ウエスタンブロッティングを行った。PTTH-受容体複合体の検出には抗 PTTH マウスモノクローナル抗体 (3E5)、HRP 標識抗マウス IgG 抗体、ECL prime、および X 線フィルムを使用した。その結果、PTTH 依存的に出現する分子質量約 120kDa のバンドが検出された。1 次抗体には 3E5 抗体の他、マウスモノクローナル抗体 2 種、ウサギポリクローナル抗体 2 種も試用したが、3E5 抗体により最良の結果が得られた。

(2) 受容体発現の組織特異性と時期特異性

PTTH は前胸腺を刺激することから前胸腺に受容体が存在することは確かであるが、このことは PTTH 受容体が他の組織でも発現している可能性を排除しない。もし、前胸腺よりも大きく集めやすい組織が PTTH 受容体を発現していれば、受容体精製の出発材料としては好ましい。そこで、様々な組織を使って、上記 1) と同じ方法で受容体の探索を行った。調べた組織は、脳、胸部神経節、唾液腺、マルピーギ管、小腸、脂肪体である。その結果、PTTH 依存的に出現する約 120kDa のバンドは前胸腺以外には検出されないことがわかった。また、前胸腺に受容体が最大レベルで発現する時期を探るため、終齢幼虫の 0 日目から蛹化直後までの幼虫から毎日前胸腺を採取し、前記の方法で PTTH-受容体複合体の検出を行った。その結果、約 120kDa のバンドは吐糸開始後 1 日までは検出されず、血中 PTTH 濃度が上昇する吐糸 2 日目以降にほぼ同じレベルで検出された。以上の結果に基づき、精製の出発材料は吐糸開始後 2 日の前胸腺と定めた。

(3) PTTH-受容体複合体の精製法の検討

受容体の精製法の検討は主に細胞膜からの可溶化法と可溶化した受容体の回収法 (アフィニティー精製法) について行った。可溶化に使用する界面活性剤の検討に当たっては、まず、可溶化後の溶液から PTTH-受容体複合体を回収する方法を少なくとも一つ確立しておく必要がある。そこで、PTTH の代わりに His-tag 付き PTTH を使用し、His-tag PTTH-受容体複合体を His-tag タンパク質精製用磁気ビーズを使って抽出する方法を考案した。His-tag 付き PTTH の作製は分担者の片岡博士に依頼した。界面活性剤としては RIPA buffer、1% Triton X-100、1% CHAPS、市販の膜タンパク質抽出キットなどを試用した。その結果、1% Triton X-100 で可溶化した場合にのみ、磁気ビーズを使った精製で約 120kDa のタンパク質が回収されることがわかった。そこで、使用する界面活性剤は Triton X-100 とし、精製法の一つは His-tag タンパク質精製用磁気ビーズによる精製とした。しかし、同法による精製では目的物以外のタンパク質の混入が多いことが知られていることから、少なくとも更に一段階のアフィニティー精製が必要であると考えられた。そこで、抗 PTTH 抗体による免疫沈降、抗 PTTH 抗体と protein-G 結合磁気ビーズの組み合わせによる精製、抗 PTTH 抗体を結合させた磁気ビーズによる精製などを試した。しかし、いずれの場合も 120kDa のタンパク質を回収することはできなかった。おそらく、既存の PTTH 抗体は、PTTH と受容体が結合すると PTTH に結合できなくなるものと推定される。ウエスタンブロッティングにおいて 3E5 抗体が 120kDa のタンパク質を認識できるのは、SDS による変性のためであると考えられる。そこで、His-tag PTTH をビオチン標識し、これとストレプトアビジン結合磁気ビーズの組み合わせによる精製も試みた。しかし、この方法でも目的のタンパク質は回収できなかった。ビオチン標識 His-tag

PTTH がストレプトアビジン結合磁気ビーズを使って回収できることは確認されているので、ビオチン標識により PTTH と受容体の結合が阻害される可能性、PTTH と受容体の結合によりビオチン標識が埋没する可能性などが考えられる。抗体やビオチンを使ったアフィニティー精製がうまくいかない原因としては界面活性剤が精製に干渉している可能性もあるため、精製時に試料溶液を希釈して界面活性剤濃度を下げる試みも行ったが効果はなかった。今後は、他の精製手段を検討する必要がある。

(4) His-tag 精製物の構造決定の試み

1000 個の前胸腺を出発材料とし、His-tag 精製した標品を使って質量分析による構造決定を試みた。この実験では磁気ビーズの代わりに Ni-NTA アガロースビーズを使用した。ビーズに結合したタンパク質をイミダゾールを使って溶出し、溶出物の SDS-PAGE を行った。ゲルを蛍光染色し、目的サイズのバンドを含むゲルを切り出してトリプシン消化し、消化物を質量分析装置にかけた。質量分析で得られたペプチド配列を 2 種のカイコタンパク質データベースと照合した。その結果、5 種のタンパク質が候補として同定され、2 種が膜貫通領域をもっていた。しかし、ホルモン受容体に該当しそうなものはなく、また、PTTH の配列も含まれていなかった。よって、His-tag 精製されたタンパク質中には構造決定に必要な量の受容体が含まれていないと結論した。

(5) ヨトウガの発育、休眠に伴う内分泌的变化の研究

生体物質の精製の成功が出発材料の選択に左右されることはよくあることである。長年にわたるカイコガ PTTH 受容体の精製の試みにもかかわらず成功に至っていない原因の一つは、カイコガ前胸腺が精製の出発材料として適していないことにあるのかもしれない。そこで、同じチョウ目昆虫であるヨ

トウガを利用する可能性を探った。その一環として、ヨトウガにおける PTTH とエクジソンの分泌動態、前胸腺の活性変動、Torso 遺伝子の発現動態等を詳細に調べた。その結果、ヨトウガにおける PTTH による前胸腺支配の実態が明らかになり、蛹休眠のホルモン調節機構の詳細も明らかになった。PTTH 抗体も数種類が得られたことから、将来は PTTH 受容体の精製にこれらの抗体も利用したいと考えている。

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 10 件)

Yamada, N., Mizoguchi, A. (2017) Endocrine changes during diapause development in the cabbage army moth *Mamestra brassicae*. *Physiological Entomology*, in press. (査読あり)

Yamada, N., Kataoka, H., Mizoguchi, A. (2017) Myosuppression is involved in the regulation of pupal diapause in the cabbage army moth *Mamestra brassicae*. *Scientific Reports* 7, 41651. DOI: 10.1038/srep41651 (査読あり)

Ogihara, M., Ikeda, H., Yamada, N., Hikiba, J., Nakaoka, T., Fujimoto, Y., Suzuki, Y., Saito, K., Mizoguchi, A., Kataoka, H. (2017) Identification of ecdysteroidogenic enzyme genes and their expression during pupal diapause in the cabbage armyworm *Mamestra brassicae*. *Insect molecular Science*, 26(3), 286-297. (査読あり)

Yamada, N., Okamoto, N., Kataoka, H., Mizoguchi, A. (2016) Endocrine Mechanisms Regulating Post-Diapause Development in the Cabbage Armyworm, *Mamestra brassicae*. *PLoS One* 11(1):e0146619. Doi:10.1371/journal.pone.0146619. (査読あり)

Mizoguchi, A., Kamimura, M., Kiuchi, M., Kataoka, H. (2015) Positive feedback regulation of prothoracicotropic hormone secretion by ecdysteroid - A mechanism that determines the

timing of metamorphosis. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 58, 39-45. (査読あり)

〔学会発表〕(計4件)

山田信人、溝口明

ヨトウガ蛹休眠の休眠覚醒後の成虫発生を制御する内分泌機構

日本動物学会第86回大会、朱鷺メッセ(新潟県新潟市)、2015年9月17日

藤永大輝、溝口明

カイコガ生殖器原基の成長発達のホルモン調節機構

日本動物学会第86回大会、朱鷺メッセ(新潟県新潟市)、2015年9月17日

山田信人、溝口明

ヨトウガ蛹休眠の休眠覚醒を制御する内分泌機構

日本動物学会第85回大会、東北大学(宮城県仙台市)、2014年9月11日

藤永大輝、河村祐亮、溝口明

カイコガ生殖器原基の成長発達のホルモン調節機構

日本動物学会第85回大会、東北大学(宮城県仙台市)、2014年9月11日

〔図書〕(計1件)

Mizoguchi, A. (2015) Allatostropin; Allatostatin-A; Allatostatin-C. *In:* (Eds. Takei, Y., Ando, H., Tsutsui, K) *Handbook of Hormones: Comparative Endocrinology for Basic and Clinical Research*. Elsevier. pp. 385-386, 412-413, 414-415.

〔産業財産権〕

出願状況(計 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

取得状況(計 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年月日:

国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

溝口 明 (MIZOGUCHI, Akira)

愛知学院大学・教養部・教授

研究者番号: 60183109

(2) 研究分担者

片岡宏誌 (KATAOKA, Hiroshi)

東京大学・新領域創成科学研究科・教授

研究者番号: 60202008

(3) 連携研究者

()

研究者番号:

(4) 研究協力者

()