

機関番号：82112

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2007～2009

課題番号：19580059

研究課題名（和文） 昆虫の卵形成制御に関するタンパク質分解酵素の性状及び活性調節機構の解明

研究課題名（英文） Regulatory mechanisms of insect ovary-development: proteases involved in oosorption and JHSB3, a new juvenile hormone controlling oosorption in *Plautia stali*.

研究代表者 小滝 豊美 (KOTAKI TOYOMI)

独立行政法人農業生物資源研究所 制御剤標的遺伝子研究ユニット 主任研究員

研究者番号：20391550

研究成果の概要（和文）：

チャバネアオカメムシにおいて絶食によって誘起される卵吸収の生化学的なメカニズムを解明するため、卵吸収に伴うタンパク質分解に与るプロテアーゼ遺伝子のクローニングおよびプロテアーゼ活性の検出法の開発を行った。また、卵吸収の制御に重要な幼若ホルモン（JH）の構造を明らかにするためアラタ体生産物の分析と不斉合成法とを利用して、本種における JH が新規化合物であることを見出した。

研究成果の概要（英文）：

To elucidate biochemical mechanisms of oosorption in a stink bug, *Plautia stali*, genes encoding proteases responsible for protein degradation in oosorption were cloned, and a method to detect protease activity was established. Chemical analysis of the product of corpora allata and asymmetric synthesis methods revealed a new structure of juvenile hormone in this insect, which played an important role in egg production and oosorption.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2008年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2009年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：昆虫生理学

科研費の分科・細目：農学・応用昆虫学

キーワード：チャバネアオカメムシ、幼若ホルモン、システインプロテアーゼ、卵巣発育

1. 研究開始当初の背景

生殖に好適な環境条件下に置かれた昆虫の体内では、卵形成過程はあたかも自律的に進行するかに見えるが、実際にはその過程は環境条件に応じて巧みに制御されている。ある個体が餌不足や交尾できない等の事態に直面すると、それまでとは異なった経路をたどり、違った結末へ向けて進行する場合がある。卵吸収は、その典型的な例である。このようにして誘起される卵吸収は、その個体自身の生殖や子孫の生存にとって不適な環境

に置かれたとき、無駄に産卵せず、将来の生殖にむけて資源を節約するための適応的な反応であると考えられる（Bell and Bohm, 1975）。また、昆虫の中には卵形成と卵吸収が同時に起こり、最終的な生産卵数が両者のバランスで決定される種もまれではない。このような種では、卵吸収自体が通常の卵形成過程に組み込まれていると考えられる。つまり、卵吸収も「卵母細胞の発育をこれ以上進行させない」という卵形成制御の一局面として捉えるべき現象と考えられる。ところが、

卵巣発育や卵黄の蓄積に関しての生理・生化学的な知見の豊富さは対照的に、卵吸収に関する生理・生化学的な研究にはあまり関心が払われておらず、卵吸収に伴って卵巣内でどのような変化が起きるのか、その変化を誘起する要因は何かといった解析は十分には行われていない。特に卵吸収に関する先行研究は、たとえば、光学顕微鏡や電子顕微鏡による形態的变化の観察 (Lusis, 1963; Kurihara, 1985 等) や、卵吸収に関連する生化学的变化の追跡 (Bell, 1971 等) のように 80 年代半ば以前に行われたものが大半で、近年の新しい分析技術を活用した解析はほとんどなされていない。したがって昆虫における卵形成過程の制御機構を十全に解明するためには、卵吸収に関する知見のさらなる蓄積が必要である。

筆者はカメムシ類を対象に成虫休眠に関する研究を行ってきた。この過程で、本来卵巣を発育させる環境条件下で卵吸収を起こしている個体をまれに見いだすことがあり、上述の背景をふまえ、卵吸収に関する研究を開始した。そしてこれまでに、絶食条件下に置かれることによって誘起される卵吸収に伴い、卵母細胞内に既に蓄積されていた卵黄タンパク質等は分解された後卵巣外へと放出されること (Kotaki, 2003)、並びにタンパク質は主にろ胞細胞内で分解されること (Kotaki, 2005) を明らかにした。さらに、プロテアーゼ阻害剤に対する反応等からタンパク質分解にはシステインプロテアーゼ型の酵素が関与していることを示唆した (Kotaki, 2005)。しかし、酵素タンパク質そのものはまだ単離されていない。また、国内外の研究においても、卵吸収に関するプロテアーゼの活性の変化を測定した結果が報告されている (Uchida et al., 2001) が、卵吸収に関するプロテアーゼの単離・精製は行われていない。このような酵素が、卵吸収の誘起とともに遺伝子の発現が誘導されることによって新たに生合成されるのか、あるいは既に生合成され蓄積された酵素の前駆体が活性化されるのかも明らかでない。さらに、どのような生理的要因の変化が酵素の生合成あるいは活性化をもたらすのかも未知である。

昆虫における卵巣発育には幼若ホルモン (JH) が促進的に作用することはすでに明らかにされている。卵吸収は卵巣が退化する過程なので、その誘導には体液中の JH 濃度の変動が関与していることが予測される。JH の分子構造は既に知られている (Kotaki, 1993; 1996)。しかし、カメムシ類では既知の JH とは異なる分子が JH として作用していることが示されているが、その構造は解明されていない。

2. 研究の目的

上述の背景やこれまでの研究成果に基づき、卵吸収に関与するプロテアーゼの由来とその活性化機構に関して以下のような作業仮説が想定できる。即ち、「卵吸収に関与するタンパク質分解酵素は、本来胚子発育と共に活性化して胚子が要求するアミノ酸を卵黄を分解することにより供給するために存在するものであって、不活性な状態で卵母細胞内に蓄積されている。しかし、卵吸収の誘起に伴い、ろ胞細胞内に取り込まれ活性化されて、ピテロジェニン等の分解に与る。」本研究の目的は、上の作業仮説を検証し、さらに、このような変化をもたらす内分泌的な要因が JH であるかどうかを明らかにすることである。さらに、チャバネアオカメムシにおける JH の構造を解明することを試みた。

3. 研究の方法

茨城県常総市内で採集されたチャバネアオカメムシ成虫に由来する室内飼育系統の成虫を実験に用いた。供試虫は、羽化後速やかに生殖を開始する 25°C、長日条件 (LD 16:8 h) 下で、生ピーナツおよび乾燥大豆を食餌として与えて飼育した。羽化後 3 日目からメス成虫を絶食条件下に置くことによって卵吸収を誘導した。

発育途上の卵巣から抽出した mRNA をもとに cDNA ライブラリをつくり既知のカテプシン L 配列をもとに設計したプライマーを用いて RACE 法によって、カテプシン L 様のシステインプロテアーゼをコードすると予測される遺伝子配列を決定した。この配列情報をもとに、10 個から 15 個のアミノ酸からなる部分配列ペプチドを合成し、ウサギまたはマウスに注射してこれらのプロテアーゼに対する抗血清を作成した。卵巣の抽出物を用いたウェスタンブロッティング法によって、期待する抗体が産生されているかどうか確認した。

卵巣や卵に含まれるプロテアーゼ活性を検出するため、ゼラチンを含むポリアクリルアミドゲルを用いたザイモグラフィ法を開発した。その手順は、研究成果に示す。

卵吸収の誘導における幼若ホルモン (JH) の役割を解明するため、JH を生産する内分泌器官であるアラタ体 (CA) の摘出や脳とアラタ体とをつなぐ神経の切断を行った。

チャバネアオカメムシにおける JH の構造を決定するため、培養系内で CA を培養し、培地のヘキササン抽出物を GC-MS、LS-MS 等を用いて分析した。分析結果に基づき、予想される構造の化合物 (4 つの立体異性体) を E,E-ファルネソールを出発物質とし、シャープレス不斉エポキシ化反応、シャープレス不斉ジヒドロキシル化反応を含む 5 段階の反応によって、不斉合成した。得られた

光学的に純粋な4つの異性体のうちどれがアラタ体生産物と一致するか、生物検定およびキラルカラムを装着したGC-MSによって判定し、チャバネアオカメムシにおけるJHの構造を確定した。

構造が確定されたJH (JHSB₃) およびその立体異性体のチャバネアオカメムシメス成虫に対するJH活性(卵巣発育促進活性)を検定した。羽化後4日目のメス成虫からアラタ体を摘出し、その直後ヘキサソールに溶解したサンプルを塗布した。処理4日後に解剖して卵巣内の卵母細胞の直径を測定した。さらに、JHSB₃が絶食条件下に置いたメス成虫において卵吸収の誘導を阻止する活性を示すかどうか調査した。

4. 研究成果

(1) プロテアーゼの特性

既知のカテプシンL配列をもとに設計したプライマーを用いて、卵巣cDNAライブラリからカテプシンLと相同性の高い4つの遺伝子をクローニングした。これらは、相同性検索結果に基づきカテプシンL様酵素をコードするもの(AB306512、AB306513)、26.26kDaプロテアーゼ様(AB306514)、およびカテプシンF様(AB306515)として、データベースに登録した。さらに、これら遺伝子がコードするタンパク質を認識する抗体を作成するため、抗原性が高いと予測されたアミノ酸部分配列を合成し、ウサギまたはマウスに注射して抗血清を作成した。得られた血清によって、卵巣などに存在するプロテアーゼタンパク質が検出可能かどうか、ウェスタンブロッティング法によって検討した。しかし、検出感度はそれほど高くなく、血清が分析に十分な特異性を有すると判断することはできなかった。今後、反応条件や検出法の改良によって、これらの抗血清を利用することが可能になるかも知れない。

次に、中性ゲルによるプロテアーゼ活性検出法=ザイモグラフィ法を確立した。予備実験により、卵巣中のプロテアーゼはアルカリ性の環境下では失活することが明らかになっていたため、中性ゲルを用いる電気泳動法を適用し、ゲル作成時に、アクリルアミド溶液に0.2%のゼラチンを加えた。卵巣および卵の抽出物を、熱処理を省略した中性ゲルSDS-PAGE法によって電気泳動した。通電終了後ゲルを1.5%Triton-X溶液に1時間漬けさらに、0.1M酢酸緩衝液(pH 4.0)内で室温・一晩静置し、酵素反応を行わせた。その後、ゲルに含まれるゼラチンをCBBで染色した。ゼラチンがプロテアーゼによって分解された部位は、ゼラチンが含まれないため青色の背景に無色のバンドとして可視化される。このようにしてプロテアーゼ活性を検出したところ、卵巣抽出物からは、卵黄蓄積

中、卵吸収中に関わりなくおよそ37kDaを示す活性が検出された。卵抽出物にも同様の活性が観察されたが、卵のふ化直前には、活性バンドの移動度が高くなった(図1)。

卵巣の状態に関係なく活性が検出されたことから、卵吸収の誘導に伴い全く新たな酵素が生産される可能性は積極的には支持されない(移動度が同じ酵素が新生されてる可能性は否定できない)。一方、受精卵内では胚子発育に伴い、おそらく部分分解によって、酵素タンパク質のサイズが変化し、酵素が活性化されると考えられる。したがって、卵吸収と胚子発育とは、プロテアーゼの活性化機構が異なるのであろうと推定される。クローニングされた4つの遺伝子とザイモグラフィで見出されたプロテアーゼ活性の対応は今後の課題である。

(2) 卵吸収誘導におけるJHの役割とその構造決定

卵吸収の誘導におけるJHの役割を明らかにするため、長日条件下で摂食しているメス成虫からCAを摘出し、その2日後に卵巣の状態を確認した。この処理を行った19個体中16個体で卵吸収が誘導された。これに対して、傷をつけた対照区では11個体中5個体で卵吸収が誘導された。脳とCAとを結ぶ神経を切断した場合には、9個体全ての卵巣が卵形成をそのまま継続させた。また、神経を切断した後、絶食条件下に置いても卵吸収の誘導は認められなかった。

絶食条件下に移した個体にCAを移植し、3日後に観察すると、9個体中7個体では絶

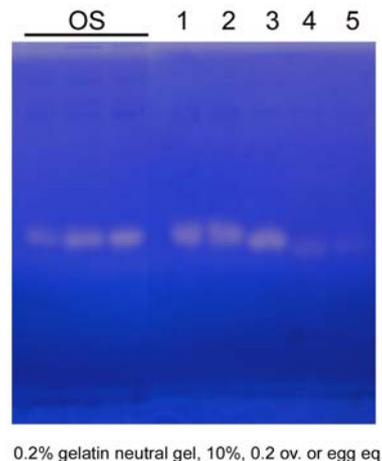


図1. ゼラチン含有中性ポリアクリルアミドゲルによるプロテアーゼ活性の検出。卵巣または卵の抽出物を試料とした。電気泳動後、酸性条件下に静置して反応させた。プロテアーゼ活性は白く抜けた部分として検出される。OSは、卵吸収中の卵巣抽出物、数字は用いた卵の産下後の日数を示す。

食条件下でも卵巣発育が認められた。CA 神経を切断した 5 個体の全て、卵巣発育が継続されていた。一方、対照区では 9 個体中 6 個体で卵吸収が認められた。これらの結果は、CA で作られる JH の欠如が卵吸収を誘導する要因として重要であることを示唆している。また、絶食が直接 CA に作用して JH 生産を停止させるのではなく、脳からの神経支配によって JH 生合成が抑制されることが示唆された。しかし、チャバネアオカメムシにおいて JH の構造はまだ明らかでなく、JH が卵吸収の誘導に関与するかどうか、合成されたホルモンによって検証することができない。そこで次に、アラタ体の生産物を分析し、その構造の解明を試みた。まず、アラタ体生産物を高分解能質量分析し、得られた $[M+H]^+$ の値から、その組成式を $C_{16}H_{26}O_4$ と推定した。これまでに既知の情報とこの式から推測される構造を持つ化合物を含む混合物を、グラニルアセトンを出発物質とする 2 段階の反応で合成した。この混合物は、理論的に 32 個の化合物を含むと考えられる。この混合物をキラルカラムを用いる HPLC で 21 個の画分に分離した。それぞれの画分の JH 活性を生物検定によって検定し、活性の高い画分 2 つを特定した。それらに含まれる化合物の構造を NMR によって推定した。どちらに含まれるものも、methyl 2,3:10,11-bisepoxyfarnesoate の立体異性体と推定された。この化合物には 4 つの立体異性体が存在する (図 2)。しかし、立体異性体同士は NMR で区別することができなかった。そこでこれらの立体異性体を不斉合成し、4 つのどれと天然物が一致するかを検討した。先のキラルカラムによる分離で得られた JH 活性の高い 2 画分と同じ溶出時間を示すのは、1 および 2 の立体異性体であった。これら 2 つのうちどちらが CA 生産物と一致するかを、キラルカラムを装着した GC-MS で検討した。その結果、CA 産物と異性体 1 とは同じ保持時間に検出され、両者のマススペクトルはよく一致していることが示された。両者を同時に GC に注入し分析すると、これらは単一のピークとして検出された。したがって、チャバネアオカメムシにおける CA 生産物、つまり JH は異性体 1 と確定することができた。この分子を構造の特徴から Juveniel Hormone III Skipped Bisepoxide (JHSB3) と名付け

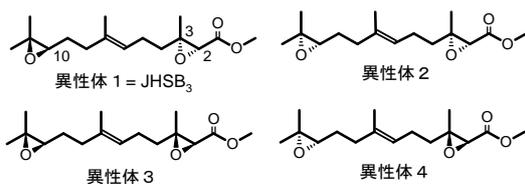


図 2. JHSB₃ とその異性体

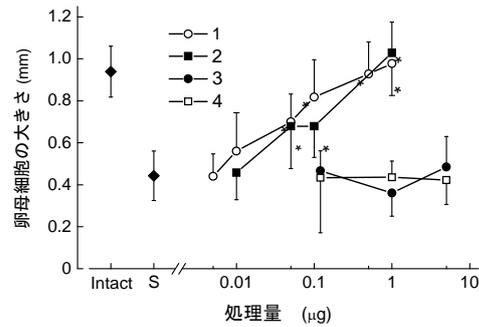


図 3. JHSB₃ (1) とその異性体 (2-4) のアラタ体を摘出したメス成虫に対する効果。横軸の Intact および S は、それぞれアラタ体を摘出していない無処理区およびへキサンのみを処理した対照区を表す。* は対照区の卵母細胞の直径との間に統計的に有意な差 ($P < 0.05$, Steel の検定法) があることを示す。

た。

JHSB₃ およびその立体異性体の CA を除去したメス成虫に対する効果を調べた (図 3)。溶媒のみを塗布した対照区では、CA 除去によって、卵巣の発育が強く抑制され、発育中の卵母細胞に卵吸収が誘導されたのに対して、異性体 1=JHSB₃ または異性体 2 の処理には、卵巣発育を継続・促進する効果が認められた。異性体 3 または異性体 4 の処理には顕著な効果が認められなかった。

次に、羽化後 3 日目のメス成虫に JHSB₃ を塗布した後絶食条件に移したところ、絶食条件下であるにもかかわらず卵吸収せずに卵巣発育を継続させる効果が認められた。これらの結果は、JHSB₃ 処理には卵巣発育を促進する効果があることを示し、JH 濃度の低下が卵吸収を誘導することを裏付けるものである。

(3) 総括

チャバネアオカメムシにおける JH が新規化合物 JHSB₃ であることを見出した。本種メス成虫を絶食条件下おくと、体液中の JHSB₃ 濃度が低下することによって卵吸収が誘導される。脳が「絶食」を感受すると、神経支配を通じてアラタ体での JH 生産を抑制すると考えられた。卵吸収に関与するプロテアーゼは、卵に含まれ胚子発育に関与するものと同様である可能性が高いが、その活性化機構は両者で異なるものと推定された。

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2件)

1. Biological activities of juvenile hormone III skipped bisepoxide in last instar nymphs and adults of a stink bug, *Plautia stali*. Kotaki, T., Shinada, T., Kaihara, K., Ohfune, Y. and Numata, H. (2011) *Journal of Insect Physiology* 57: 147-152. 査読有り
2. Structure determination of a new juvenile hormone in a heteropteran insect. Kotaki, T., Shinada, T., Kaihara, K., Ohfune, Y. and Numata, H. (2009) *Orgainc Letters* 11: 5234-5237. 査読有り

[学会発表] (計6件)

1. 小滝豊美. JHSB₃ のホルモンとしての生物学的機能の検証. 日本応用動物昆虫学会. 2010/3/28 千葉
2. 品田哲郎・小滝豊美. カメムシ由来の新規幼若ホルモンの構造決定. 天然物有機化学検討会 2009/9/30 福岡
3. Kotaki, T. A novel juvenile hormone isolated from a heteropteran insect, *Plautia stali*. International Congress of Comparative Endocrinology. 2009/6/23 Hong Kong.
4. 小滝豊美. カメムシ類から得られた新規幼若ホルモンの構造決定. 日本応用動物昆虫学会 2009/3/29 北海道
5. Kotaki, T. Heteropteran juveniel hormone unveiled: a novel type of juvenile hormone identified in a stink bug, *Plautia stali*. International Congress of Entomology. 2008/7/7 South Africa.
6. 小滝豊美. カメムシ類における卵吸収とその調節機構: アラタ体摘出による卵吸収の誘導. 日本昆虫学会 2007/9/17 神戸.

[図書] (計1件)

1. 小滝豊美、東海大学出版会. 耐性の昆虫学 (編 田中誠二・小滝豊美・田中一裕) (2008) pp.427 第17章 絶食が誘導するチャバネアオカメムシの卵吸収 (pp. 200-210)

[産業財産権]

○出願状況 (計1件)

名称: 光学活性化合物およびその製造方法、ならびに昆虫制御剤

発明者: 小滝豊美・大船泰史・品田哲郎・沼田英治

権利者: 農業生物資源研究所・大阪市立大学

種類: 特許権

番号: 特願 2008-17636

出願年月日: 2008/7/4

国内外の別: 国内

[その他]

農業生物資源研究所平成 21 年度主要成果.
カメムシ類の新規幼若ホルモン (JHSB₃) の同定.
<http://www.nias.affrc.go.jp/seika/nias/h21/nias02108.htm>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小滝 豊美 (Kotaki Toyomi)

農業生物資源研究所・制御剤標的遺伝子研究ユニット・主任研究員

研究者番号: 20391550

研究協力者

品田哲郎 (Shinada Tetsuro)

大阪市立大学・大学院理学研究科・准教授
研究者番号: 30271513

大船泰史 (Ohfune Yasufumi)

大阪市立大学・大学院理学研究科・教授
研究者番号: 20142078

沼田英治 (Numata Hideharu)

京都大学・大学院理学研究科・教授
研究者番号: 70172749