

平成 30 年 5 月 12 日現在

機関番号：14501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2017

課題番号：26450468

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(rab)の機能解析

研究課題名(英文) Functional analysis of small GTP binding protein (Rab) in the insect brain

研究代表者

宇野 知秀 (UNO, TOMOHIDE)

神戸大学・農学研究科・教授

研究者番号：80240852

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：昆虫の神経ペプチド分泌機構におけるRabの機能を明らかにするために、複数のRabに焦点を合わせて、主に免疫組織化学的手法を用いて、次のことを本研究では明らかにした。(1) 昆虫特異的なRabの内、RabX4がカイコの脳と神経分泌組織であるアラタ体の特定の細胞に局在した。(2) 昆虫特異的なRabであるRabX6が精巣の外皮とオスの脳に特異的に局在した。dsRNAiによるRabX6のノックダウンは、精巣の成長を阻害した(3) アラタ体と脳で機能するRabと昆虫のinsulin-like peptideであるボンピキンの共局在性を明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Rab proteins are small monomeric GTPases/GTP-binding proteins and form the largest branch of Ras super-family. RabX4 and RabX6 are an insect-specific Rab proteins that have no close homolog in vertebrates. RabX4-like immunohistochemical reactivity (RabX4-ir) was restricted to neurons of the pars intercerebralis and dorsolateral protocerebrum in the brain. Corpus allatum is a neuronal organ to secrete neuropeptides synthesized in the brain into the hemolymph. In corpus allatum, RabX4-ir was co-localized with the Rab6-ir. RabX6-like immunohistochemical reactivity (RabX6-ir) was identified at the face of the testis, not in the spermatogonia, and was specifically detected at a pair of tritocerebral cells of the male brain. Furthermore, RNA interference of RabX6 was shown to decrease testicular growth. Double staining analysis of Rabs and insulin-like peptide, bombyxin indicate that 4 Rabs-ir are overlapped with bombyxin-ir in the brain and corpus allatum of *Bombyx mori*.

研究分野：昆虫生化学

キーワード：Bombyx mori rab insect brain histochemistry bombyxin

1. 研究開始当初の背景

昆虫の脳に存在する神経ペプチドは、昆虫の成長、変態や羽化などの現象を直接引き起こすホルモンである。昆虫の神経ペプチドは、温度、栄養条件、日照などの様々な環境変化に応じて、脳で合成され、軸索を経て、アラタ体や前額神経節と呼ばれる神経器官を経て体液中へと分泌される。しかし、神経ペプチドの分泌を制御する特定の蛋白質分子や分泌機構については殆どわかってない。

我々は神経ペプチドの内(1)昆虫のインシュリン様ペプチドである bombyxin(2)昆虫の羽化を直接引き起こす羽化ホルモン(3)変態を引き起こす PTH の 3 種の神経ペプチドに着目した。複数の Rab に対する抗体を作成し、免疫組織化学的解析を行うことにより、カイコの脳内でこれら 3 つの神経ペプチドを合成する細胞に低分子量 GTP 結合蛋白質である Rab が複数種局在することを明らかにした。Rab は、細胞内で peptide、やタンパク質を含む小胞の細胞内での輸送や分泌を制御する。Rab は *Drosophila* で 42 種存在し、昆虫では脳や胚の形成、中腸の再形成、シナプス小胞の分泌、受精などに関与する。

更に我々は 3 つの Rab(Rab7, Rab27, RabX4)の機能を明らかにした(1)カイコを飢餓状態にすると脳内の Rab7 の量が増加した(2)カイコ脳の神経ペプチド合成細胞には少なくとも Rab1, 7, 8, 11, 14 が存在する。Rab27 は、これらの Rab とは異なる神経細胞に存在した。(3)Rab には、昆虫にしかない新規の Rab(RabX1-6)が存在するが、それらの機能は、わかってない。このうち RabX4 は、カイコの神経細胞にだけ特異的に存在した。また、大腸菌で発現した RabX6 は、GDP/GTP 交換活性、GTPase 活性を示し、精巢特異的に存在した。

2. 研究の目的

昆虫の神経ペプチド分泌機構における Rab の機能を明らかにするために、昆虫特異的な Rab を含む複数の Rab(Rab3, Rab27,

Rab6, RabX4, RabX6)に焦点を合わせて、次のことを本研究では明らかにする。

(1) 昆虫特異的 Rab の内、カイコの神経細胞に存在する RabX4 の機能を明らかにする。

(2) 精巢特異的に存在する昆虫特異的な Rab である RabX6 の機能を解明する。

(3) 昆虫の神経ペプチドを分泌する神経分泌組織であるアラタ体と脳で機能する Rab と神経ペプチドであるボンビキシンの局在性を免疫組織化学的手法により明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 大腸菌での GST 融合蛋白質の発現と精製：発現ベクターで形質転換した大腸菌を、37 で数時間培養した。25 で 30 分放置後、IPTG を加え、25 で一晩培養した。4、3,000 x g で 10 分遠心した。菌体を超音波破碎した後、遠心分離し、その上清を GST-Accept に供し、4 で 2 時間インキュベートした。樹脂を洗浄後、Elution buffer で溶出した。

(2) カイコ組織抽出液を用いたイムノブロットティング：カイコ 5 齢幼虫 0~7 日目及びガットパーシ後の組織を摘出し、0.1 mL の氷冷した Extraction Buffer 中でホモジナイズした後、4、10,000 x g で 10 分間遠心し、上清を組織抽出物とした。組織抽出物のタンパク質量を測定して、1 レーン当たり 10 -30 μg ずつ SDS-PAGE に供した。電気泳動後、PVDF 膜へ組織抽出物を転写した。次に室温で 30 分間ブロッキングを行った。TBST で 5 分間 3 回ずつ洗浄後、Antibody dilution buffer で適切な濃度に希釈した抗血清に浸し、1 次抗体反応を 4 で一晩行った。そして、PVDF 膜を TBST で 5 分間 3 回ずつ洗浄後、Antibody dilution buffer で適切な濃度に希釈した抗体に PVDF 膜を室温で 1 時間処理した。PVDF 膜を TBST で 5 分間 3 回ずつ洗浄後、DAB 溶液に浸し発色した。

(3) カイコ頭部及び脳の組織切片を用いた免疫組織染色；5 齢幼虫 1~3 日目のカイコの頭部及び脳を Bouin's solution に 4 で一晩漬

け込んだ。14日間、70%エタノールで20分間の洗浄を毎日2回ずつ行った。次に70%エタノール溶液で20分間2回、96%エタノール溶液で20分間2回、無水エタノールで20分間転倒混和後4で一晚静置した。キシレンに30分間漬けた後、溶解させたパラフィンに2~3日漬けた。その後、マイクロトームで、厚さ8 μ mのカイコ頭部組織切片を作製した。組織切片を、キシレン、100%、96%、70%エタノール、滅菌水の順に漬けた。続いて、TBSTで5分間平衡化を行った後、Blocking Bufferを200 μ L供し、室温で30分間ブロッキングした。続いて、希釈したマウス1次抗体とウサギ1次抗体の混合溶液を200 μ L供し、4で一晚インキュベートした。続いて、TBSTで10分間3回洗浄し、200倍に希釈したCFTM555Dyeヤギ抗ラットIgG[H+L]抗体及びCFTM488ADyeヤギ抗ウサギIgG[H+L]抗体の混合溶液を200 μ L供し、室温で1時間インキュベートした。再びTBSTで10分間3回洗浄後、組織切片を蛍光顕微鏡で観察した。CFTM555Dye goat ヤギ抗マウスIgG[H+L]抗体の場合、530-550nmの励起光を照射し波長575nmで蛍光を観察した。CFTM488A goat ヤギ抗ウサギIgG[H+L]抗体の場合、460-490nmの励起光を照射し波長510nmで蛍光を観察した

4. 研究成果

(1) 昆虫特異的BRabX4の機能解析

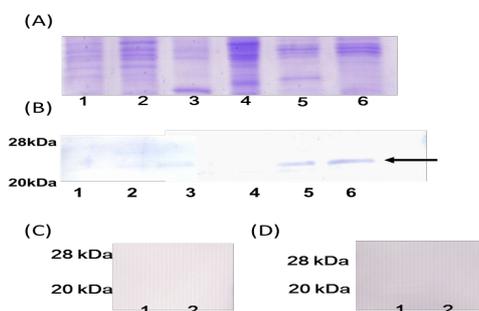
ウサギ anti-BRabX4 抗体を用いた組み換えタンパク質のイムノプロットティング

BRabX4 を GST の融合タンパクとして大腸菌で発現後、GST-Accept により精製した。ウサギ anti-BRabX4 抗体が抗原を特異的に認識するかどうか確認するためにイムノプロットティングを行った結果、バンドが検出された。

カイコ5齢幼虫から6つの組織(卵巣、精巣、中腸、マルピーギ管、食道下神経節、脳 lane 1-6)を分離し、タンパク質を抽出後

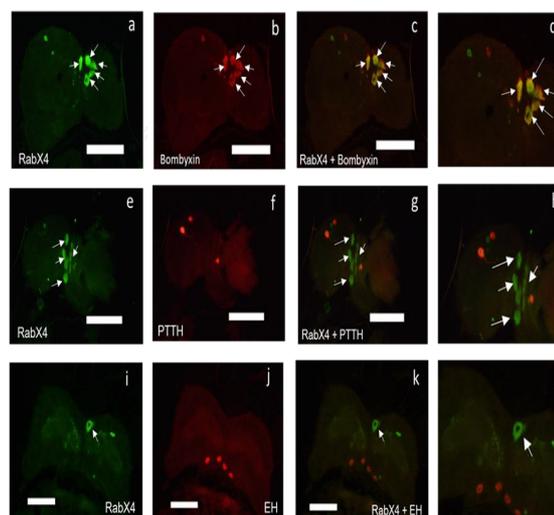
SDS-PAGEを行った後CBB Stain Oneで染色した(A)。また、各組織でウサギ anti-BRabX4 抗体を用いてイムノプロットティングを行った。その結果、24kDa付近で脳及び食道下神経節でBRab特異的なバンドが検出された(B, lane 5,6)。

コントロール実験として、(c)免疫前の血清を1次抗体として、(D)抗体1 μ Lに対して抗原(組み換えタンパク質1 μ g)を混合した吸収抗体を1次抗体として用い、脳及び食道下神経節から抽出したタンパク質に対してイムノプロットティングを行った。その結果、検出されたバンドは消失した。



蛍光2重染色によるBombyxinとBRabX4の局在性

ウサギ anti-BRabX4 抗体及びマウス anti-Bombyxin 抗体を用いた蛍光2重染色を行ったところ、BRabX4はBombyxin合成細胞と同じ細胞に局在した(a-d)。マウス anti-PTTH、anti-EH 抗体を用いた蛍光2重染色を行った所、PTTHとEHは合成細胞内になかった(e-l)。



アラタ体においても RabX4 は Bombyxin を含む小胞と同じ所に局在した(a-d)が PTTH と EH はなかった。

蛍光 2 重染色による前額神経球における BRabX4 の局在性検討

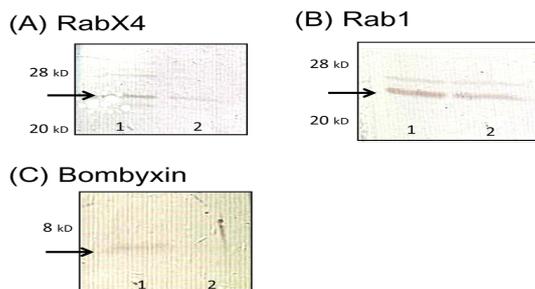
1) BRabX4 と BRab6 の局在性検討

ウサギ anti-RabX4 抗体、マウス anti-Rab6 抗体による蛍光 2 重染色の結果、BRab6 とは異なる細胞で BRabX4 は局在した(a-c)。

2) BRabX4 と Allatotropin の局在性検討

ウサギ anti-RabX4 抗体とマウス anti-Allatotropin 抗体による蛍光二重染色の結果、Allatotropin とは異なる細胞に BRabX4 は局在した。

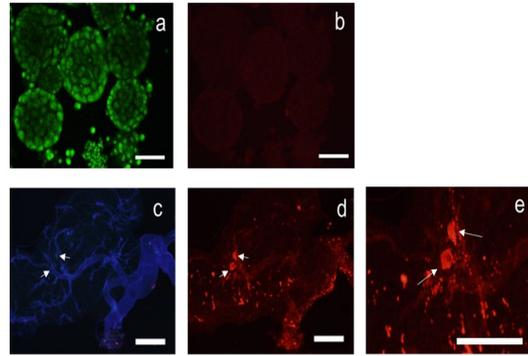
RNAi を用いた BRabX4 のノックダウン
dsRNA-RabX4 を 250 ng インジェクションしたカイコの脳抽出物とコントロール (TE buffer) をインジェクションした脳抽出物を 7 µg ずつ SDS-PAGE に供し、Anti-RabX4 抗体を用いて検出した結果、コントロールと比較して RNAi を行った方で、BRabX4 が減少した(A)。次に Anti-Rab1 抗体を使用したところ、BRab1 もわずかに減少した(B)。次に脳内の Bombyxin の量を Anti-Bombyxin 抗体を用いて検出した結果、RNAi を行った方で、Bombyxin が減少した(C)。



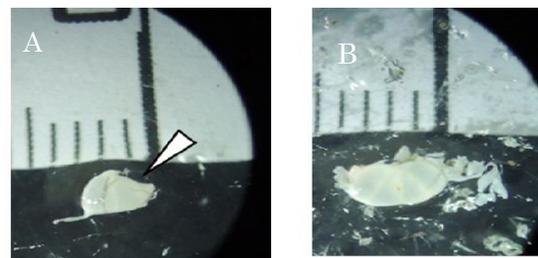
(2) 精巣特異的 BRabX6 の機能解析

蛍光染色による精巣での BRabX6 の局在性：カイコ幼虫の精原細胞と外皮に対しウサギ anti-Rab7 抗体、マウス anti-RabX6 抗体を用いた蛍光 2 重染色を行った所、BRab7 は精原細胞に局在した(a)が、BRabX6 は精原細胞内にはなかった(b)。精巣外皮内の複数の

細胞において BRabX6 が局在した(d-e)。



カイコ 5 齢幼虫に対する RNAi による BRabX6 のノックダウン；5 齢 0 日目のカイコ幼虫に対して dsRNA-RabX6 をインジェクションすることにより BRabX6 のノックダウンを行った。その結果、コントロールの精巣(B)と比べて RNAi を行った精巣は、全長そのものに大きな違いはないものの、全体的に痩せていて精巣上皮も薄くなった(A)



カイコ脳内における RabX6 の局在性

RabX6 の脳内での局在性を検討したところ、オスの脳特異的に RabX6 が存在することが分かった。以上の結果は、昆虫特異的な Rab の機能を明らかにした新規の研究である。

(3) 蛍光 2 重染色による Bombyxin と Rab の局在性；

カイコ脳内における Rab の局在性

免疫組織染色により Bombyxin の合成細胞においてどの BRab が Bombyxin と共局在するかを調べた。その結果、Bombyxin 合成細胞が染まる BRab には、主に 3 パターンの発現様式があることがわかった。

1、Bombyxin 合成細胞とその付近の細胞が染まるパターン。このパターンにあてはまったのは BRab1 と BRab21 であった。ウサギ

anti-BRab1抗体とラットanti-BRab21抗体を用いた蛍光2重染色を行ったところ、BRab1とBRab21のBombyxin合成細胞以外の脳間部の細胞が存在した。

2. Bombyxin合成細胞と脳側方部の細胞が染まるパターン

このパターンはBRab6、BRab14、BRabX4であった。ポンピキン合成細胞以外の側方部の細胞が存在した。

3. Bombyxin合成細胞のみが染まるパターン

このパターンはRab3とBRab39であった。

アラタ体におけるBombyxinとRabの局在性;免疫組織染色により、RabとBombyxinのアラタ体での局在率を調べた結果、3パターンの発現様式があることがわかった。

1. アラタ体に存在しない、またはアラタ体におけるBombyxin分泌小胞と殆ど重ならないもの: このパターンはBRab1、BRabX6であった。なお、BRabX6は脳内において雌雄で局在の差があったため雌雄両方において調べた。

2. Bombyxin分泌小胞での共局在率が20%~50%のもの。このパターンはBRab6、BRab14とBRab21であった。

3. Bombyxin分泌小胞での共局在率が50%以上のもの。このパターンはBRab3、BRab7、BRab39、RabX4であった。

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7件)

Tomohide Uno, Yusuke Ozakiya, Masayuki Furutani, Katsuhiko Sakamoto, Yuichi Uno, Hideyuki Kajiwara, Kengo Kanamaru, Akira Mizoguchi Functional characterization of insect-specific RabX6 of *Bombyx mori* Histochemistry and cell physiology 査読有印刷中

Tomohide Uno, Masayuki Furutani, Katsuhiko Sakamoto, Yuichi Uno, Kengo Kanamaru, Akira Mizoguchi, Susumu Hiragaki, Makio Takeda

Localization and functional analysis of the insect-specific RabX4 in the brain of *Bombyx mori* Archives of insect biochemistry and physiology 査読有 96(1); . doi:

10.1002/arch.21404, 2017

Tomohide Uno, Ryosuke Nakano, Kengo Kanamaru, Shinji Takenaka, Yuichi Uno and Hiromasa Imaishi Metabolism of 7-ethoxycoumarin, flavanone and steroids by cytochrome P450 2C9 variants 査読有 38, 486-493, 2017

Tomohide Uno, Takeshi Yanase, Hiromasa Imaishi; Functional characterization of CYP52G3 from *Aspergillus oryzae* and its application for bioconversion and synthesis of hydroxyl flavanone and steroids. Biotechnology and Applied Biochemistry 査読有 64 ; 385-391, 2017

Tomohide Uno, Masayuki Furutani, Chihiro Watanabe, Katsuhiko Sakamoto, Yuichi Uno, Kengo Kanamaru, Hiroshi Yamagata, Akira Mizoguchi, Makio Takeda Rab proteins in the brain and corpus allatum of *Bombyx mori* Histochemistry and cell physiology 査読有 146; 59-69, 2016

Tomohide Uno, Chihiro Izumi, Shinji Takenaka, Takeshi Yanase, Hiromasa Imaishi, Kengo Kanamaru, Hiroshi Yamagata, Yoshio Kaminishi, Takao Itakura, Functional Characterization of CYP1A9 and CYP1C1 from *Anguilla japonica* Environmental Toxicology and Pharmacology 査読有 40; 360-368, 2015

Tomohide Uno, Chikako Ogura, Chihiro Izumi, Masahiko Nakamura Takeshi Yanase, Hiroshi Yamazaki, Hitoshi Ashida, Kengo Kanamaru, Hiroshi Yamagata, Hiromasa Imaishi, Point mutation of Cytochrome P450 2A6 (a polymorphic variant CYP2A6.25) confers new substrate specificity towards flavonoids. Biopharmaceutics & Drug Disposition

査読有 36: 552-563 ,2015

〔学会発表〕(計 6 件)

宇野 知秀・尾崎屋 悠祐・金丸 研吾、
昆虫の低分子量 GTP 結合蛋白質 Rab の機能
解析、日本応用動物学会、2018.3.26、鹿児
島大学(鹿児島県)

尾崎屋 悠祐・金丸 研吾 宇野知秀、カイ
コ脳及びアラタ体における Rab と Bombyxin
に関する免疫組織化学的解析、日本蚕糸学会、
2018.3.20、名古屋大学(愛知県)

宇野 知秀、昆虫の脳に存在する蛋白質に
ついて、西日本応用動物昆虫研究会・日本昆
虫学会中国支部合同例会(招待講演)、
2017.10.13、神戸大学(兵庫県)

古谷 昌之・渡辺 千尋・金丸 研 吾・山形
祐士・竹 田 真木生・坂本 克 彦・宇野 知秀
免疫組織染色法を用いたカイコ低分子量GTP
結合蛋白質(Rab)の機能解析、日本応用動物
学会、2016.3.29、大阪府立大学(大阪府)

渡辺 千尋・古谷 昌之・尾崎屋 悠祐・金丸
研 吾・山形 祐士・竹 田 真木生・坂本 克
彦・宇野 知秀、免疫組織化学的染色法を用い
たカイコ脳における低分子量GTP結合蛋白質
(Rab)の機能解析、日本蚕糸学会、2016.3.16、
京都工芸繊維大学(京都府)

尾崎屋 悠祐・古谷 昌之・渡辺 千尋・金丸
研 吾・山形 祐士・竹 田 真木生・坂本 克
彦・宇野 知秀、昆虫に特異的な低分子量GTP
結合蛋白質(Rab)の機能解析、日本蚕糸
学会、2016.3.16、京都工芸繊維大学(京都府)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等

なし

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・教授

研究者番号：66443905

(2)研究分担者 なし

(3)連携研究者 なし

(4)研究協力者 なし