

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：34521

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K14720

研究課題名(和文) 昆虫前胸腺刺激ホルモンレセプターによるリガンド認識の分子基盤の構築

研究課題名(英文) Establishment of molecular basis on ligand recognition by the insect prothoracicotropic hormone receptor

研究代表者

齋藤 一樹 (SAITO, Kazuki)

姫路獨協大学・薬学部・教授

研究者番号：10192585

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：昆虫前胸腺刺激ホルモンPTTHのレセプターTorsoは、チロシンキナーゼ型レセプターである。本研究では、カイコガTorsoが、リガンド刺激の有無にかかわらず、膜貫通領域にある分子間ジスルフィド結合を介して二量化していることを見出した。膜貫通領域に存在するすべてのシステイン残基をフェニルアラニンに置換すると、Torsoは、リガンド刺激に関係なく細胞膜上で会合して二量体を形成し自己リン酸化を引き起こすが、下流のERKのリン酸化を誘導することはできないことがわかった。今後、PTTHによるTorsoの活性化機序を解明するためには、レセプター機能の維持に必須のこの分子間結合の役割を無視できないだろう。

研究成果の概要(英文)：Insect prothoracicotropic hormone (PTTH) receptor, Torso, is a member of the receptor-tyrosine-kinase family. In this study, we detected ligand-independent dimerization of silkworm Torso, and found that the receptor molecules in the dimer were linked by intermolecular disulfide bridges in the transmembrane region. When all of the cysteines in the region were replaced with phenylalanines, non-covalent dimerization of the mutant was detected using a cross-linking reagent, both with and without ligand stimulation. This non-covalent dimerization caused apparent receptor autophosphorylation independently of the ligand stimulation, but did not promote the ERK phosphorylation in the downstream signaling pathway. The intermolecular disulfide bridges in the transmembrane region may play a key role in an activation process of the receptor, Torso.

研究分野：分子認識化学

キーワード：前胸腺刺激ホルモン(PTTH) Torso チロシンキナーゼ型レセプター ジスルフィド架橋によるレセプター二量化 カイコガ 自己リン酸化 下流ERKリン酸化の促進

1. 研究開始当初の背景

昆虫の前胸腺刺激ホルモン (prothoracicotropic hormone; **PTTH**) は、前胸腺と呼ばれる器官に作用してそこで生合成される脱皮ホルモンの産生量を調節することにより、昆虫の脱皮・変態を制御している。1922年にはすでに PTTH 様活性を持つ物質の存在が指摘されていたが、PTTH の実体がジスルフィド結合によりホモ二量体構造を持つペプチドであることが明らかにされたのは 1990 年代になってからのことであった [Ishibashi *et al.*, *Biochemistry*, **33**, 5912–5919 (1994)] (図 1)。

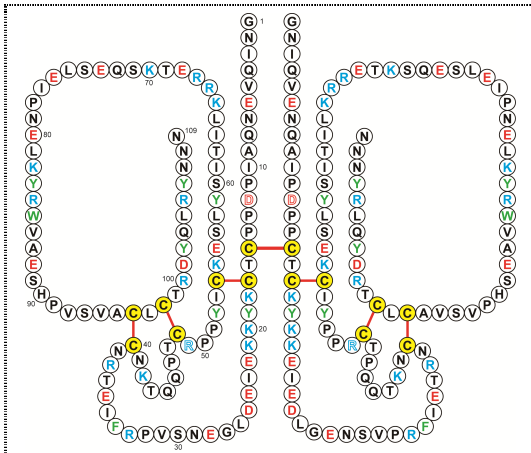


図 1. カイコガ PTTH の化学構造の模式図

また、PTTH が前胸腺でどのような標的分子に作用して活性を発現しているのかについても長い間明らかにされてこなかった。PTTH の化学構造の解明から 15 年以上もの年月が経ってからやっと、PTTH がショウジョウバエ遺伝学で「Torso」と呼ばれるチロシンキナーゼ型レセプター (receptor tyrosine kinase; RTK) に作用し、その結果、細胞内情報伝達経路の下流にある細胞外シグナル制御キナーゼ (extracellular signal-regulated kinase; ERK) などのリン酸化を引き起こすことが示された [Rewitz *et al.*, *Science*, **326**, 1403–1405 (2009)]。その後も分子レベルでの PTTH 研究が立ち後れが続いたが、それには、大腸菌を用いて発現しても、分子内に 7 本ものジスルフィド結合を持つ PTTH の収率は非常に低く、わずしか調製することができないという現実的な障害があったからである。そこで、私は、本研究を開始するにあたり、まず、PTTH のように多くのジスルフィド結合を有するタンパク質を効率よく発現できる発現系を探索した。その結果、分泌系を備えたブレヴィバチルス菌を利用することにより、カイコガ PTTH を大量に調製することに成功した。

ここに来てやっと、レセプター Torso による昆虫ホルモン PTTH の認識機序について、分子レベルで議論できる研究環境が整ってきたと言える。

2. 研究の目的

昆虫の脱皮・変態を制御するいくつかのホルモンの中で、脱皮ホルモンに関してはエクジソン ecdysone という共通のステロイド化合物が用いられているのに対して、エクジソン自体の産生を制御するペプチドホルモン PTTH は昆虫種によってアミノ酸配列の類似性が低く、作用標的の昆虫種特異性も非常に高い。例えば、脳抽出物を用いた実験では、同じ鱗翅目昆虫であっても、カイコガ *Bombyx mori* の PTTH はエリサン *Samia cynthia ricini* やタバコスズメガ *Manduca sexta* の蛹化は促進しない [Nagata *et al.*, *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **1040**, 38–52 (2005)]。したがって、Torso は、昆虫種ごとに異なる PTTH の構造を厳格に区別して認識しているものと考えられる。

私は、長年、Torso と同じ一本鎖タイプの RTK である上皮成長因子 (epidermal growth factor; EGF) のレセプターの研究を続けてきた。しかし、ヒト EGF レセプターの細胞外領域が約 620 残基のアミノ酸から成るのに対して、カイコガ Torso の細胞外領域は約 350 残基しかない。これに対して、リガンドの方は、ヒト EGF が 53 残基であるのに対してカイコガ PTTH は 109 残基のペプチド鎖がホモ二量体構造を取り、計 218 残基にもなる。はたしてどのように「大きなリガンド PTTH」を「レセプター Torso の短い細胞外領域」が認識しているのだろうか。そこで、本研究では、いまだ明らかにされていない Torso による PTTH の分子認識機序の研究基盤を構築することを研究の目的とした。

3. 研究の方法

カイコガ PTTH 刺激に伴うカイコガ Torso およびその変異体の状態変化を観測するために、ショウジョウバエ S2 培養細胞における一過的な発現系を用いた。S2 細胞に発現させる Torso の C 端には FLAG タグを付加し、抗 FLAG 抗体を用いたウエスタン・ブロットによって Torso の挙動を簡便に追跡できるようにした。あらかじめ、このような培養細胞レベルの実験系であっても、カイコガ PTTH の刺激に依存して、カイコガ Torso が自己リン酸化されることや下流の ERK のリン酸化が引き起こされることを確認しておいた。

また、本研究でリガンドとして用いたカイコガ PTTH は、ブレヴィバチルス菌を利用して、C 端に His₆ タグを付加したりコンビナント・タンパク質を培地に分泌発現させたものを精製して用いた。この His₆ タグ付き PTTH は、G0 期のカイコガから抽出した前胸腺に対して、過去に大腸菌を用いて調製したタグのないカイコガ PTTH と同等以上のエクジソン放出活性を示した。C 端に His₆ タグが付加していてもリガンドとしての性能になら問題は無いことが確認された。

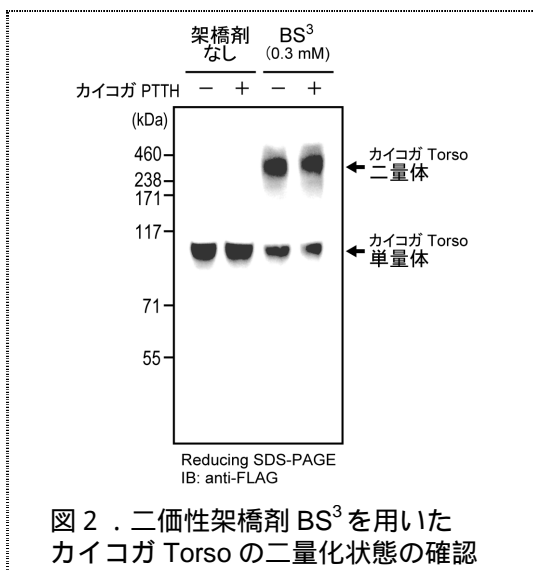
4. 研究成果

(1) リガンド PTH の刺激の有無によるレセプター-Torso の状態変化の追跡

カイコガ Torso は、カイコガ PTH で刺激する前から細胞膜上で二量化している【新規 RTK 構造の発見】

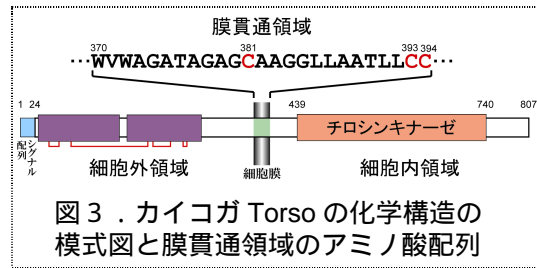
カイコガ Torso は、そのアミノ酸配列から、当初、ヒト EGF レセプターなどと同じように、化学的には一本のペプチド鎖から構成されているものと考えられていた。したがって、Torso も EGF レセプターと同様に、リガンドが結合することで細胞外領域が二量体を形成し、細胞外領域の二量化が細胞内領域での自己リン酸化を引き起こすものと考えられた。

そこで、まず、常法にしたがって、脂質膜非透過性の二価性架橋剤 BS³ を用いて、カイコガ PTH による刺激の有無で S2 培養細胞に発現させたカイコガ Torso の会合状態がどのように変化するのかを確認してみた(図 2)。すると、驚いたことに、Torso は、PTH で刺激しなくても細胞膜上で二量体を形成していることが明らかになった。 $\alpha_2\beta_2$ 四量体を形成しているインスリンレセプターのように、もともと複数鎖から成る RTK がリガンド刺激前から多量体を形成している例はあるものの、一本鎖タイプの RTK がリガンド刺激前から二量体を形成しているのは、このカイコガ Torso が初めての例である。



カイコガ Torso の二量化は、膜貫通領域に存在する分子間ジスルフィド結合によるものである【めずらしい膜貫通領域における分子間ジスルフィド結合】

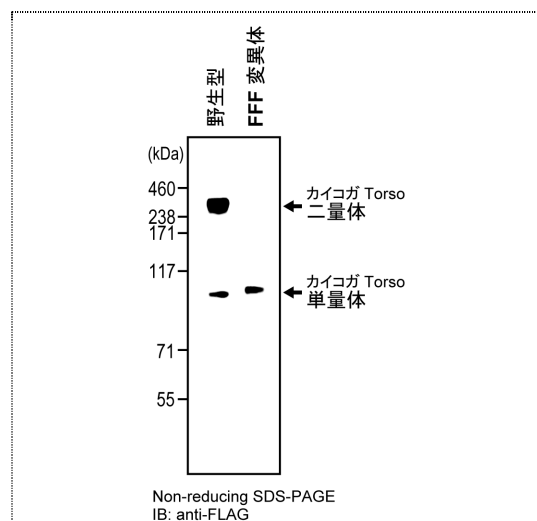
で、カイコガ Torso が、リガンド刺激がなくても二量体を形成していることが明らかになったので、どのような仕組みで Torso の二量体が形成されているのかを調べた。非還



元の SDS-PAGE で泳動すると、架橋剤で処理しなくても二量体のバンドが観測されたことから、カイコガ Torso は、2 つのレセプター分子が分子間ジスルフィド結合によって架橋されているのではないかと考えられた。

そこで、カイコガ Torso の様々な短鎖変異体を作製し、どの部分を削ると非還元 SDS-PAGE で二量体が観測できなくなるのかを詳細に調べたところ、膜貫通領域を失うと Torso が二量体を形成しなくなることを突き止めた。実際に、カイコガ Torso には、膜貫通領域に 3 つのシステイン残基 (Cys³⁸¹, Cys³⁹³, Cys³⁹⁴) が存在するので(図 3)。この 3 つのシステイン残基をすべてフェニルアラニンに置換した“FFF 変異体”の会合状態を確認したところ、確かに非還元 SDS-PAGE 上で二量体のバンドが観測されなくなった(図 4)。

3 つのシステイン残基のうち、どの残基に実際に分子間結合が架かっているのかは特定できていないが、膜貫通領域に分子間ジスルフィド結合が存在していることは事実である。細胞内領域にチロシンキナーゼを持たないニューロトロフィンレセプター p75^{NTR} が膜貫通領域の分子間ジスルフィド結合で二量化されていることは知られているが[Vilar *et al.*, *Neuron*, 62, 72-83 (2009)], 細胞内にチロシンキナーゼを持つ RTK では、これまで膜貫通領域に分子間ジスルフィド結合が存在しているという例は報告されていない。RTK としては、非常にめずらしい構造である。

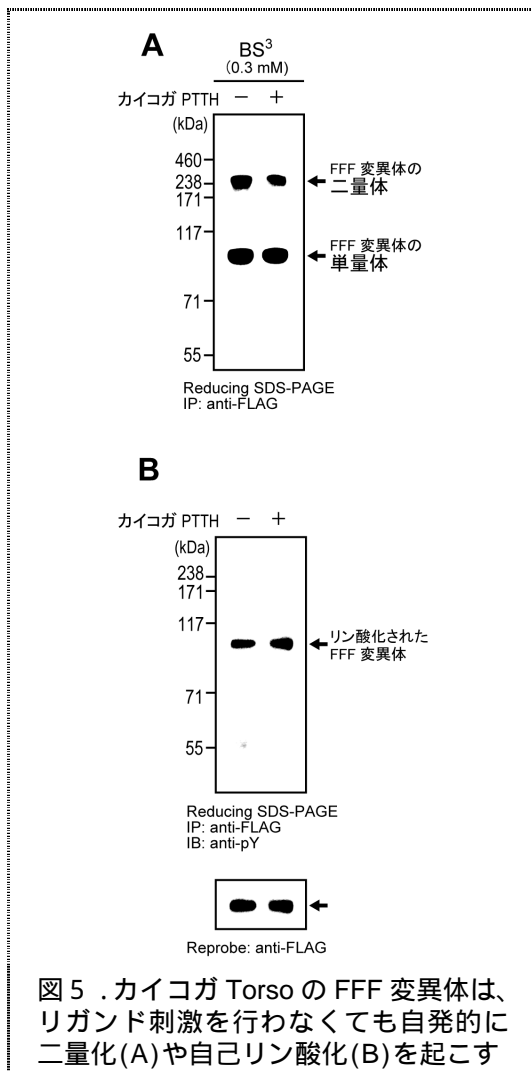


(2) 膜貫通領域に存在する分子間ジスルフィド結合の役割

では、カイコガ Torso の膜貫通領域に存在する分子間ジスルフィド結合は、レセプターの活性発現においてどのような役割を演じているのだろうか。そこで、“FFF 変異体”を利用して、カイコガ Torso が分子間ジスルフィド結合を失ったときにレセプターとしての機能にどのような変化が生じるのかを調べてみた。

分子間ジスルフィド結合が失われると、リガンド刺激を行わなくても Torso は自発的に二量化し自己リン酸化が起こってしまう

あらかじめ分子間ジスルフィド結合で二量化しているカイコガ Torso のような RTK は、分子間結合がなくなると一本鎖タイプの EGF レセプターのようにリガンド刺激に応じた二量体形成や自己リン酸化が観測されるようになるのだろうか。そこで、図 1 と同様に、架橋剤 BS³ を用いて、カイコガ PTTH 刺激の有無によって FFF 変異体の会合状態がどのように変化するかを調べてみた (図 5 A)。すると、カイコガ Torso は、分子間ジスルフィ



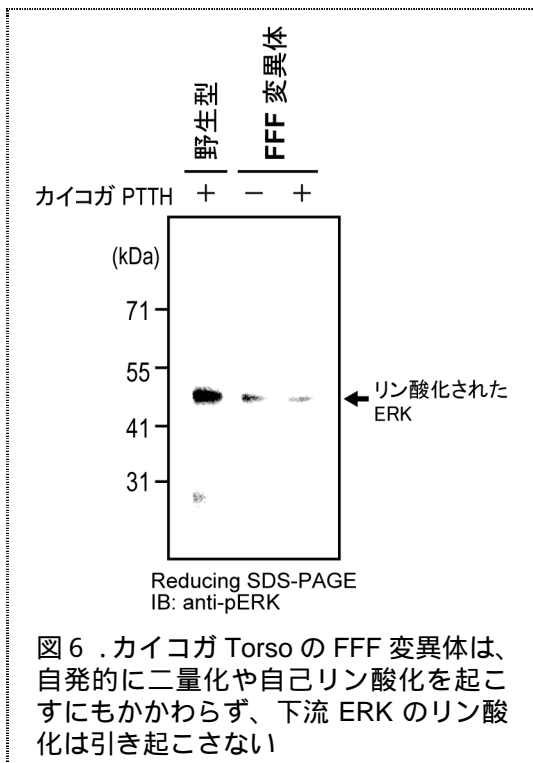
ド結合を失っても分子間結合が架かっていたように、PTTH 刺激の有無にかかわらず細胞膜上で二量体を形成していることが明らかになった。分子間ジスルフィド結合という強制的に Torso 分子を二量化させている化学的要因を取り除いても、Torso は分子自体の性質として、自発的に会合して二量体を形成していることが明らかになった。

次に、カイコガ Torso の FFF 変異体が自発的に二量体を形成しているならば、その結果として自己リン酸化も起こっているのではないかと考え、FFF 変異体の自己リン酸化状態についても調べてみた (図 5 B)。確かに、FFF 変異体では、PTTH 刺激の有無にかかわらず自己リン酸化が起こっていることが観測された。PTTH 刺激によらない自発的な二量化であっても、FFF 変異体は自己リン酸化を引き起こされていることがわかった。

分子間ジスルフィド結合が失われて二量化・自己リン酸化が起こっても、カイコガ Torso の変異体は細胞内情報伝達経路の下流を活性化できる訳ではない

一本鎖タイプの EGF レセプターでは、細胞外領域の一部を削ってしまうと自発的に活性化してしまい、レセプターが発現している培養細胞の増殖が促進されることが知られている [Khazaie *et al.*, *EMBO J.*, 7, 3061-3071 (1988)]. これは、EGF レセプターの場合、比較的大きな細胞外領域が互いに立体障害となってレセプター分子同士が近づき合うのを抑え、二量化に対する抑制的制御がかかっているため、細胞外領域の一部を削ると二分子が接近して自発的な二量化や自己リン酸化が起こり、レセプターが活性化してしまうためと考えられている。小さな細胞外領域しか持たないカイコガ Torso の場合、このような細胞が領域の立体障害の代わりに分子間ジスルフィド結合が、レセプター分子同士の接近を抑えているのだろう。

カイコガ Torso の FFF 変異体を発現させた S2 培養細胞では、特に増殖速度等に変化はなかった。そこで、Torso 活性化の指標として用いられている、下流 ERK のリン酸化状態を調べてみた (図 6)。すると、カイコガ Torso の FFF 変異体では自発的な活性化どころか、PTTH 刺激を行っても野生型に比べて非常に低いレベルの ERK のリン酸化しか観測できなかった。カイコガ Torso は、膜貫通領域にある分子間ジスルフィド結合を取り除くと、リガンド刺激なしに二量化して自己リン酸化を引き起こされるものの、ERK を含む下流の細胞内情報伝達経路は活性化されない。野生型 Torso の自己リン酸化部位と FFF 変異体の自己リン酸化部位とを比較してみないと正確なことはわからないが、おそらく FFF 変異体の自発的な自己リン酸化では、下流の ERK 等の活性化を誘導するチロシンとは別の残基がリン酸化されているものと考えられる。



(3) まとめ

本研究では、カイコガ Torso が一本鎖タイプ様の RTK でありながら、PTTH 刺激前から、膜貫通領域にある分子間ジスルフィド結合によって二量化していることが明らかになった。これは、これまでは例がない新規の RTK 構造である。

ここまでの結果を考え合わせると、膜貫通領域にある分子間ジスルフィド結合は、Torso を二量化させてより大きな細胞外領域を作り出すことにより大きなリガンド PTTH を受容できるようにするとともに、2 つの Torso 分子を正常な相対配置に保つことにより、リガンド刺激とは無関係な無秩序なレセプターの二量化や自己リン酸化を抑えているものと考えられる。

様々な脂質膜非透過性の二価性架橋剤を用いた予備的な実験では、カイコガ Torso の野生型と FFF 変異体とでは、架橋剤に対する感受性が異なることが明らかになっている。このことは、膜貫通領域の分子間結合の有無で、細胞外領域の構造が明らかに異なっていることを示している。膜貫通領域の分子間ジスルフィド結合が 2 つの Torso 分子を正常な相対配置に保つことによって、リガンド PTTH を認識する細胞外領域の構造までも正常に保つ役割を担っている可能性が高い。今後、表面プラズモン共鳴や NMR を用いた解析を行い、実際に、野生型 Torso と FFF 変異体との間でリガンド認識に差がないかどうかを検証しようと計画している。

なお、本研究の研究期間の終わり頃になって、米国ハーバード大学医学大学院の研究チ

ームから、カイコガ Torso の細胞外領域の一部とリガンド PTTH との複合体の結晶構造 (PDB: 5AOQ) が発表された [Jenni *et al.*, *Mol. Cell*, **60**, 941–952 (2015)]。しかし、彼らが構造解析に用いた細胞外領域には例の分子間ジスルフィド結合が欠落している。彼らが明らかにした構造は、生理的に意味がない FFF 変異体との複合体の構造のようなものなのかもしれない。

今後、私も、X 線結晶構造解析やクライオ電子顕微鏡解析などを駆使して、本挑戦的萌芽研究の成果を、分子間ジスルフィド結合を含む Torso 全長とリガンド PTTH との複合体の構造解析へと発展させていきたいと考えている。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 (計 5 件)

Yusuke Yamashita, Tadafumi Konogami, Yiwen Yang, Tamari Hoshikawa, Masatoshi Iga, [Hiroshi Kataoka](#), [Kazuki Saito](#)*: Secretory expression of cabbage armyworm prothoracicotrophic hormone in *Brevibacillus choshinensis*. *Peptide Science* 2015, 179–180 (2016). [査読有]

Tadafumi Konogami, Yiwen Yang, Mari H. Ogihara, Juri Hikiba, [Hiroshi Kataoka](#), [Kazuki Saito](#)*: The silkworm prothoracicotrophic hormone receptor, Torso, has a unique disulfide-bond-linked structure required for its ligand-dependent functions. *Peptide Science* 2015, 37–38 (2016). [査読有]

Tadafumi Konogami, Yiwen Yang, Mari H. Ogihara, Juri Hikiba, [Hiroshi Kataoka](#)*, [Kazuki Saito](#)*: Ligand-dependent responses of the silkworm prothoracicotrophic hormone receptor, Torso, are maintained by unusual intermolecular disulfide bridges in the transmembrane region. *Scientific Reports*, **6**, 22437 (2016). [査読有]

DOI: 10.1038/srep22437

Tadafumi Konogami, Yiwen Yang, Mari H. Ogihara, Juri Hikiba, [Hiroshi Kataoka](#), [Kazuki Saito](#)*: Role of the disulfide bridges in the transmembrane region of the insect prothoracicotrophic-hormone receptor, Torso. *Protein Science*, **24**, Special Issue 1, 59 (2015). [査読無]

DOI: 10.1002/pro.2823

[Kazuki Saito](#)*, Tadafumi Konogami, Yiwen Yang, Yusuke Yamashita, Masatoshi Iga, Tamari Hoshikawa, [Hiroshi Kataoka](#): Preparation of insect prothoracicotrophic hormone with complicated disulfide-bond structure, by the heterologous expression in *Brevibacillus choshinensis*. *Protein Science*, **24**, Special Issue 1, 58 (2015). [査読無]

DOI: 10.1002/pro.2823

〔学会発表〕（計 8 件）

山下雄佑, 此上祥史, 荻原麻理, 齋藤一樹, 片岡宏誌: 「活性型ヨトウガリコンビナント PTH の調製」, 平成 29 年度蚕糸・昆虫機能利用学術講演会（日本蚕糸学会第 87 回大会, 2017 年 3 月 22 日, 農林水産技術会議事務局筑波産学連携支援センター（茨城県つくば市）

Tadafumi Konogami, Hiroshi Kataoka, Kazuki Saito: Torso, an insect prothoracicotropic hormone receptor, possessing a very unique dimeric structure as a receptor tyrosine kinase. The 16th Akabori Conference: Japanese-German Symposium on Peptide Science, 2016 年 5 月 25 日, 六甲山ホテル（兵庫県神戸市）

此上祥史, 山下雄佑, 楊易文, 片岡宏誌, 齋藤一樹: 「ブレバチルス菌を用いたカイコガ前胸腺刺激ホルモンの大量調製法の確立」, 日本農芸化学会 2016 年度大会, 2016 年 3 月 29 日, 札幌コンベンションセンター（北海道札幌市）

Yusuke Yamashita, Tadafumi Konogami, Tamari Hoshikawa, Mari H. Ogihara, Kazuki Saito, Hiroshi Kataoka: Preparation of cabbage armyworm prothoracicotropic hormone in a soluble bioactive form, using secretory expression system of *Brevibacillus choshinensis*. 1st Joint Symposium on Integrated Biosciences between Zhejiang University and The University of Tokyo, 2016 年 3 月 16 日, Zijingang Campus, Zhejiang University, 杭州（中国）

山下雄佑, 此上祥史, 楊易文, 星川珠莉, 伊賀正年, 片岡宏誌, 齋藤一樹: 「ヨトウガ前胸腺刺激ホルモンのブレバチルス菌による分泌発現」, 第 52 回ペプチド討論会, 2015 年 11 月 17 日, 平塚市中央公民館（神奈川県平塚市）

此上祥史, 楊易文, 荻原麻理, 引場樹里, 片岡宏誌, 齋藤一樹: 「カイコガ前胸腺刺激ホルモンのレセプター Torso は、リガンド依存的な機能に必要な特有のジスルフィド架橋構造を有する」, 第 52 回ペプチド討論会, 2015 年 11 月 16 日, 平塚市中央公民館（神奈川県平塚市）

Tadafumi Konogami, Yiwen Yang, Mari H. Ogihara, Juri Hikiba, Hiroshi Kataoka, Kazuki Saito: Role of the disulfide bridges in the transmembrane region of the insect prothoracicotropic-hormone receptor, Torso. The 29th Annual Symposium of the Protein Society, 2015 年 7 月 22 日, Fira de Barcelona–Montjuïc, バルセロナ（スペイン）

Kazuki Saito, Tadafumi Konogami, Yiwen Yang, Yusuke Yamashita, Masatoshi Iga, Tamari Hoshikawa, Hiroshi Kataoka: Preparation of insect prothoracicotropic

hormone with complicated disulfide-bond structure, by the heterologous expression in *Brevibacillus choshinensis*. The 29th Annual Symposium of the Protein Society, 2015 年 7 月 22 日, Fira de Barcelona–Montjuïc, バルセロナ（スペイン）

〔図書〕（計 1 件）

Tadafumi Konogami, Kazuki Saito, Hiroshi Kataoka: Prothoracicotropic Hormone. (Chapter 55), *Handbook of Hormones: Comparative Endocrinology for Basic and Clinical Research*, eds. Yoshio Takei, Hironori Ando, Kazuyoshi Tsutsui, pp. 407–409, Academic Press, 2015.
DOI: 10.1016/B978-0-12-801028-0.00055-6

〔その他〕

ホームページ等

http://www.himeji-du.ac.jp/faculty/dp_pharm/pharm/bioanalysis/achievements/publications_saito.html

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

齋藤 一樹 (SAITO, Kazuki)
姫路獨協大学・薬学部・教授
研究者番号：10192585

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

片岡 宏誌 (KATAOKA, Hiroshi)
東京大学・大学院新領域創成科学研究科・教授
研究者番号：60202008

(4) 研究協力者

此上 祥史 (KONOGAMI, Tadafumi)
山下 雄佑 (YAMASHITA, Yusuke)