昆虫脳神経ペプチドの構造と活性

鈴木 昭 憲*

Structures and Activities of Insect Brain-neuropeptides

Akinori Suzuki*

Numbers of events in the insect's life cycle are under the control of brain-neuropeptides. This review concerned with recent progress about chemical and biological studies on several brain-neuropeptides, such as prothoracicotrophic hormone, eclosion hormone, pheromone biosynthesis activating neuropeptide, adipokinetic hormone and also insulin-related peptides, bombyxins, in *Bombyx mori*.

Key words : *Bombyx mori* ; Brain-neuropeptides ; Prothoracicotrophic hormone ; Eclosion hormone ; Pheromone biosynthesis activating neuropeptide ; Adipokinetic hormone ; Insulin-related peptides ; Amino acid sequence ; Biological activity .

はじめに

昆虫の生活史を特徴づけているものは、脱皮・変態の現象である。この劇的な過程は、古くから人々の注目を集め、特にその機構解明は多くの生物学者の主要な研究対象となった。1922年、ポーランドの Kopec は、マイマイガを用いて、幼虫から蛹への変態が、脳から分泌されるホルモン様の「物質」によって誘導されることを示唆した。これは脊椎動物、無脊椎動物を通じて、脳が神経中枢としてばかりでなく、内分泌器官としての機能をあわせ持つことを示した最初の報告である。その後、多年にわたる生物学者の努力を通じて、幼虫が蛹をへて成虫に変態する完全変態の昆虫において、その脱皮・変態現象が、脳、前胸腺およびアラタ体による内分泌支配を受けているという事実が確認された。

即ち、脳の神経分泌細胞で合成され、体液中に分泌される前胸腺刺激ホルモン(prothoracicotrophic hormone)の刺激により、前胸腺はエクジソン(ecdysone, 脱皮ホルモン)を分泌する。他方、アラタ体からは幼若ホルモン(juvenile hormone)が分泌される。そして、昆虫の脱皮・変態は、エクジソンと幼若ホルモンとの相互関係によっ

て制御されている。幼虫期においてアラタ体の活性が強く、幼若ホルモンが十分に存在する条件下で、前胸腺からエクジソンが分泌されると、幼虫は脱皮して、より大きな幼虫へと成長していく(幼虫脱皮)。さらに幼虫の成長が進んで、アラタ体の活性が低下したときにエクジソンが分泌されると、幼虫から蛹へ(蛹化)、そして蛹から蛾へ(成虫化)と脱皮、変態が続いていく。このようなことから、エクジソンの分泌を促す前胸腺刺激ホルモンは、昆虫の脱皮・変態現象において中枢的な機能を果たしていると考えられるようになった。

上記の3種のホルモンのうち、エクジソンは、1953年までに、ドイツの Butenandt, Karlson らにより、わが国から輸入した大量のカイコ蛹を材料に単離、結晶化された。そして、その構造は、1965年、Hoppe と Huber がX線結晶解析法によって決定した。さらに、変態に関与するもう一つのホルモンである幼若ホルモンは、1967年、米国の Röller らにより、セクロピアカイコを材料にはじめて単離、構造決定された。

これに対して、脱皮・変態現象において中枢的な役割を果たしている前胸腺刺激ホルモンの単離は、それが水溶性のタンパク性の物質であり、しかも生体内における含量が極微であるために、精製は遅々として進まなかった。即ち、1958年、小林らは、脳の摘出により変態が抑制されたカイコ蛹(除脳休眠蛹)に、カイコ蛹の脳の粗抽出物を注射すると、変態が誘導されて成虫化することを報告した¹⁾。それとほとんど同じころ、市川・石崎は、

* 東京大学農学部農芸化学教室 ()

* Department of Agricultural Chemistry, Faculty of Agriculture, The University of Tokyo ()

カイコ蛹の脳の粗抽出物がエリカイコの除脳休眠蛹を成虫化させ得ること²⁾, そして活性の本体がタンパク性の物質であることを報告した³⁾。これらの研究は, 昆虫の脳内に存在し, 前胸腺を刺激して変態を誘導する前胸腺刺激ホルモン(当時は, 脳ホルモンと総称されていた)を, 抽出・単離しようとする先駆的試みであった。

著者らは, 1970年頃より, 故市川教授の研究を継承した石崎博士(現名古屋大学教授)らと新たな共同研究グループを組織し, 我が国において比較的に入手が容易なカイコ蛾を材料にして, 昆虫前胸腺刺激ホルモンの単離・構造決定に向け共同研究を開始した。著者らは, 小林らや市川らが10万個以上のカイコ蛹の脳を用いながら前胸腺刺激ホルモンの単離にいたらなかったそれまでの経緯を考慮^{4,5)}し, そして, カイコ蛾頭部にも前胸腺刺激ホルモンが含まれていることが確認されていたことから, 蚕種製造の現場で, 不要になった大量のオスのカイコ蛾を入手し, その頭部から目的物を抽出することを考えた。幸い, 群馬県蚕種協同組合(前橋市)の協力で, 毎年100万個単位のオスのカイコ蛾頭部が入手可能となった。そして, 長期にわたる試行錯誤を通じて, 1987年, ようやく目的とするカイコ前胸腺刺激ホルモンを単離することに成功し⁶⁾, つづいて1990年, その一次構造を決定することができた^{7,8)}。

なお, 著者らは, カイコ前胸腺刺激ホルモンの精製を進める過程で大量に採取したカイコ蛾頭部から, さまざまな生理活性脳神経ペプチドを単離・構造決定した。それらのうちには, インスリン族ペプチドとしてのボンビキシン, 羽化ホルモン, 性フェロモン生合成活性化神経ペプチド, ヨトウガ幼虫体色黒化物質, 脂質動員ホルモンがある。前胸腺刺激ホルモンを含め, これらの生理活性ペプチド類のカイコ体内における含量は, いずれも0.4-0.01ピコモルと極微量であり, 本研究の材料に使われたカイコの数, 実に3千万匹以上の多さに達している。

以下に, 著者らの研究の概要を紹介したい。

1. カイコ前胸腺刺激ホルモンに関する研究

1.1. カイコ前胸腺刺激ホルモンの精製・単離と生物活性

前胸腺刺激ホルモンの生物活性は, カイコ蛾の除脳蛹を用いて生物検定することができる。しかし, 通常の品種のカイコでは, 蛹化が行われる以前に, 脳から前胸腺刺激ホルモンが分泌され, 蛹の前胸腺は既に活性化されている。従って, このような蛹においては, 脳を除去しても成虫化を阻止することができない。ところが, 小林らは, 1958年, 蛹化後に脳から前胸腺刺激ホルモ

Bombyx adult heads (500,000; ca 3.8 kg)

- ↓
1. Acetone powder
2. 80% EtOH washing
3. 2% NaCl extraction
4. Heat treatment
5. 80% saturated $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$
6. Fractional precipitation with 35-55% acetone
7. Sephadex G-50
8. DEAE-Sephadex (stepwise elution)
9. CM-Sephadex (gradient elution)
10. Octyl-Sephadex (gradient elution)
11. Sephadex G-75
12. Develosil C_8 prep. HPLC ($\text{TFA}/\text{CH}_3\text{CN}$)
13. Hi-Pore RP-304 HPLC ($\text{TFA}/\text{CH}_3\text{CN}$)
14. Hi-Pore RP-304 HPLC ($\text{HFBA}/\text{CH}_3\text{CN}$)
15. TSKgel SP-5 PW HPLC (AcONa)
16. Hi-Pore RP-304 HPLC ($\text{HFBA}/\text{CH}_3\text{CN}$)

↓
Bombyx prothoracicotrophic hormone
(5.4 μg)

Fig.1 Isolation of *Bombyx* prothoracicotrophic hormone.

ンを分泌するカイコ交雑種(J 122×C 115)を見出し, その蛹化直後に除脳することによって成虫化を抑制した除脳休眠蛹を用いる生物検定法を案出した¹⁾。著者らは, この検定法を一部改良して, カイコ前胸腺刺激ホルモンの精製・単離に応用することとし, その際, 1個の除脳休眠蛹を成虫化するのに要する最少量のホルモン量を1単位と定めた⁹⁾。

活性成分の単離にあたって, 著者らは, あらかじめ製氷工場の冷凍庫で大量のカイコ蛾を凍結させ, それらを随時取りだし, カミソリで頭部を切り落して頭部を採取し抽出材料とした。これらのカイコ蛾頭部からの活性本体の単離は困難を極めたが, 1987年, 16段階の精製過程により, 前胸腺刺激ホルモンを単離することに成功した⁶⁾。その収量は, 50万個のカイコ蛾頭部について5.4 μg であった。

ここに, 単離された活性成分は, 0.1 ng/単位の活性を示し, 表1に示すとおり, 2%食塩水抽出物から, 約500万倍の精製がなされたことになる。また, 得られた活性成分は, 除脳休眠蛹の成虫化に対してばかりでなく, 除脳により幼虫脱皮が抑制されたカイコ幼虫に, 0.4 ngを注射した場合にも脱皮を引き起こすことが確認された。さらに, 蛹化直後のカイコ蛹から摘出した前胸腺を器官培養し, この活性成分を0.17 ng/50 μl の濃度になるよう培地中に加えると, 前胸腺から分泌されるエクジソンの量が2~10倍に増加した。注目すべきことに, ここに得られたホルモンは, カイコに対してのみ前胸腺刺激ホルモン活性を示し, 他の昆虫に対しては活性を示さなかった。この事実, 昆虫の前胸腺刺激ホルモンが,

Table 1 Results of purification of *Bombyx* prothoracicotropic hormone.

Steps	Weight (mg)	Total activity (unit $\times 10^3$)	Specific activity (ng/unit)	Yield (%)
<i>Bombyx</i> heads	3.8×10^6			
3. NaCl extract	8.5×10^5	1500	5.7×10^5	100
11. G-75	100	1000	16	67
14. Hi-Pore	1.4	500	2.8	33
15. TSK-gel	0.2	450	0.4	30
16. Hi-Pore	0.0054	50	0.1	3.3

高い種特異性を持っている可能性を示唆するものであろう。

1.2. カイコ前胸腺刺激ホルモンのアミノ酸配列分析

1.2.1. 化学的手法によるアミノ酸配列分析 単離されたカイコ前胸腺刺激ホルモンの分子量は、ゲルろ過の結果から約 22 k ダルトン、さらに SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動の結果からは約 29 k ダルトンと推定された。また、このホルモンは、各種タンパク質水解酵素処理およびジチオスレイトールによる還元によって失活することから、ジスルフィド結合を有するペプチドであると推定された。気相式シーケンサーによるアミノ酸配列分析の結果から、グリシンをアミノ末端とする 13 残基の末端アミノ酸配列が明らかになったが、50 万個の頭部から単離された試料では、それ以上、構造解析を行うことが不可能であった。そこで、さらに大量のカイコ頭部を出発材料としてホルモンを単離し、アミノ酸配列分析を行うこととした。そして、300 万個のカイコ蛾頭部に対して、上記の精製法を適用し、約 250 μ g の活性分画を得た。次いで、この活性分画について、アミノ末端配列分析、アミノ酸分析および酵素分解フラグメントに対する高速液体クロマトグラフィーによるペプチドマッピングを行った。その結果、単離された前胸腺刺激ホルモンは、アミノ末端およびカルボキシル末端の長さが僅かに異なる複数の分子種を含むものの、その基本的アミノ酸配列は同一であることが示された。そこで、この単離分画を、リジルエンドペプチダーゼ、キモトリプシン、および V8 プロテアーゼで消化し、得られたペプチドフラグメントを分離してアミノ酸配列分析を行い、41 残基目を除き 104 残基目までのアミノ酸配列を決定した⁸⁾。しかし、300 万個という多量のカイコ蛾頭部を材料として用いたにもかかわらず、105 残基以降の配列について分析を進めることは、試料の量から不可能であった。

1.2.2. 遺伝子解析によるアミノ酸配列決定 かくして、著者らは、これ以上のアミノ酸配列分析を、化学的

手法によって行うことを断念し、遺伝子解析によることとした。

即ち、カイコ前胸腺刺激ホルモンのアミノ末端 15 残基のペプチドに対するポリクローナル抗体を調製し、次に、カイコ 5 令幼虫の脳から mRNA を分離し、ファージベクターである λ -gt 11 を用いて発現ライブラリーを作製した。そして、このライブラリーから、その発現産物が上記の抗体と反応する cDNA を単離した。塩基配列分析の結果から、この cDNA は、前述のアミノ酸配列分析により明らかにされた 104 残基のアミノ酸配列を完全に含み、従って、カイコ前胸腺刺激ホルモンそのものをコードしていることが確認された。この cDNA は、アミノ酸 224 個からなるプレプロ体(分子量 26,027)をコードしており、アミノ末端から、アミノ酸 29 個のシグナルペプチド、p2K(アミノ酸 21 個)、p6K(アミノ酸 57 個)、前胸腺刺激ホルモン(アミノ酸 109 個)がコードされている。そして、p2K および p6K は、いずれも 2 個あるいは 3 個の塩基性アミノ酸ではさまれ、翻訳後にタンパク質分解酵素により切断、分離されるものと思われる。

さらに、遺伝子解析を通じて、41 残基目のアミノ酸はアスパラギンであることが明らかとなり、前述の化学的手法によるアミノ酸配列分析において、41 残基目のアミノ酸が検出できなかった事実と相まって、そこに糖鎖が結合している可能性が明らかとなった。なお、この cDNA を大腸菌に組み込んで発現させた生成物は、カイコから単離された前胸腺刺激ホルモンと同様の生物活性を示し、単離された cDNA がカイコ前胸腺刺激ホルモンの遺伝子に対応するものであることが確認された。ここに前述のアミノ酸配列分析で決定出来なかった 41 残基目および 105 残基目から 109 残基目までのアミノ酸配列が明らかとなった⁷⁾。

1.2.3. カイコ前胸腺刺激ホルモンの全一次構造 前述したように、カイコ前胸腺刺激ホルモンの分子量は、粗抽出物のゲルろ過における活性の溶出位置から推定して

*
[GNIQVENQAIPDPCTCKYKKEIEDLGENSVPRFIETRNCKTQQPTC-
RPPYICKESLYSITILKRRRETKSQESLEIPNELKYRWVAESHPVSVAC-
LCTRDYQLRYNN] × 2

asterisk : the site of probable glycosylation

Fig. 2 Primary structure of *Bombyx* prothoracicotropic hormone.

約 22,000, また, 単離された前胸腺刺激ホルモンの SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動から約 30,000 と推定された。しかし, これらの値は前胸腺刺激ホルモンが 109 残基のアミノ酸から構成されていると考えた場合の分子量よりかなり大きい。そこで, カイコ前胸腺刺激ホルモンの分子量について再検討を行った。即ち, カイコ幼虫の脳の抽出物について非還元および還元条件下で SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動を行い, Western ブロッティングで検出すると, 非還元条件下では, 主要なバンドが分子量約 30,000 に相当する位置に認められるが, 還元条件では, このバンドが消失し, 代わって 16,000~17,000 の位置に複数のバンドが出現した。

これらの結果, および還元アルキル化した前胸腺刺激ホルモンのアミノ酸配列およびアミノ酸組成から, このホルモンは, アミノ末端およびカルボキシル末端の長さに若干の差異があるものの, 基本的には同一のアミノ酸配列を持つ 2 個の同一サブユニットがジスルフィド結合を介して架橋したホモ 2 量体構造を有していることが明らかとなった⁸⁾。

1.3. カイコ前胸腺刺激ホルモンに対するモノクローナル抗体を用いた組織化学 著者らは, カイコ前胸腺刺激ホルモンのアミノ末端 15 残基からなるペプチドを化学合成して, ウシ血清アルブミン(BSA)と結合させた後, これを抗原とするモノクローナル抗体を作製した。ここに得られた抗体は, 抗原として用いたアミノ末端ペプチドばかりでなく, カイコ前胸腺刺激ホルモンをも認識することが確認されたので, この抗体を用いて, カイコ幼虫の脳の切片を免疫染色した。その結果, 脳側方の 2 対の神経分泌細胞が特異的に染まり, 前胸腺刺激ホルモンが, これら 2 対の細胞で合成されることが確認された。さらに, 脳内を走る軸索, アラタ体, さらに, 脳-側心体間の軸索にも, 明確に前胸腺刺激ホルモンの存在を認めた¹⁰⁾。諸星らは, コバルト浸透法により, 脳ホルモンがアラタ体から分泌されることを認めていたが¹¹⁾, 上記の事実は, それを前胸腺刺激ホルモンについて実体的に確認するものとなったのである。なお, ³⁵S で標識したカイコ前胸腺刺激ホルモンの antisense-RNA をプローブとする *in situ* ハイブリダイゼーションによっても, さきに前胸腺刺激ホルモンの存在が示された脳側方の 2

対の神経分泌細胞にのみ, 対応する mRNA が検出された⁷⁾。

以上の事実および前述した脳抽出物に対する SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動の結果から, カイコ前胸腺刺激ホルモンは, 脳側方の 2 対の神経分泌細胞において, プレプロ体として転写, 翻訳され, さらにプロセッシングをうけて 2 量体の形で生合成されていることが明らかとなった。

2. カイコ脳内に含まれるインスリン族ペプチド, ボンビキシンに関する研究

2.1. エリカイコ前胸腺刺激活性成分としてのボンビキシンの単離・構造解析および生物活性 カイコの脳の抽出物中には, カイコ除脳体眠蛹およびエリカイコ除脳体眠蛹に対して前胸腺刺激活性を示す成分が存在することが知られていたが, それらの活性が同一の成分によるものかどうかは明らかでなかった。著者らは, カイコ前胸腺刺激ホルモンを追跡する過程で, それがエリカイコ除脳体眠蛹に対して活性を示す成分とは, まったく異なるものであることを見出した¹²⁾。即ち, カイコ幼虫と蛹の脳の抽出物をゲルろ過したところ, カイコに対して活性を示す分画は分子量 22,000 の位置に, エリカイコに活性を示す分画は分子量 4,400 の位置に溶出された。そして両者は, 相互に交差活性を示さないこと, カイコ脳内における両者の存在量がカイコの成育時期によって異なることなどから, 二つの活性成分がまったく別種の分子であることが明らかとなった。

著者らは, 後者を 14 段階の精製過程を経て, 1982 年に, 単離することに成功し¹³⁾, それをボンビキシン(bombyxin)と命名した¹⁴⁾。この精製過程で, 生物検定にはエリカイコ除脳体眠蛹を用い, 検定蛹の 50% に活性を示す活性の最少量を 1 単位と定義した。この精製過程で得られたボンビキシン分画は, 数種の分子種から構成されていることが明らかになったが, それらのうちの 5 種, ボンビキシン-I~V を単離した。それぞれの収量は, 100 万個の頭部より 50~200 μg で, おおの 0.1~0.4 ng で 1 単位の活性を示すことが確認された。

詳細なアミノ酸配列分析は, まずボンビキシン-II について行った¹⁵⁾。ボンビキシン-II を還元アルキル化し

I-V (ca 100 μ g, each)

さらに、著者らは、ボンビキシン-I のA鎖アミノ末端(1-10 残基)に相当するペプチドを合成してBSA と結

H-Gly-Ile-Val-Glu-Gln-Cys-Cys-Thr-Ser-Ile-Cys-Ser-Leu-Tyr-Glu-Leu-Glu-Asn-Tyr-Cys-Asn-OH
 H-Phe-Val-Asn-Gln-His-Leu-Cys-Gly-Ser-His-Leu-Val-Glu-Ala-Leu-Tyr-Leu-Val-Cys-
 Gly-Glu-Arq-Gly-Phe-Phe-Tyr-Thr-Pro-Lys-Thr-OH

(A chain) (B chain)

GVVDECCIQPCTLDVLATYC <QEANVAHHYCGRHLANTLADLCWDTSV

S-Acm S-Bu' S-Acm SH

↓

GVVDECCIQPCTLDVLATYC

S-Acm S-S-Pyr

↓

GVVDECCIQPCTLDVLATYC

S-Acm S-Acm

<QEANVAHHYCGRHLANTLADLCWDTSV

↓

GVVDECCIQPCTLDVLATYC

<QEANVAHHYCGRHLANTLADLCWDTSV

Fig. 5 Chemical synthesis of bombyxin-IV

合させ、この抗原に対するモノクローナル抗体を作製して、それに反応する物質の存在をカイコ幼虫について検索した。その結果、脳内の数対の細胞およびアラタ体内にボンビキシン様物質が存在していることが確認された¹⁴⁾。ただし、カイコの前胸腺に不活性なボンビキシンが何故にカイコの体内に存在しているのか、さらに、カイコ体内において、それがどのような機能を果たしているのかといった問題については、今後の検討を待たなければならない。

2.2. ボンビキシンとインスリンとの相同性 ボンビキシンの一次構造の著しい特徴は、それがインスリンやリラキシンなど脊椎動物体内に存在するインスリン族ペプチドと、高い相同性を有することである。即ち、インスリンとの相同性は、A鎖で50%以上、B鎖で30%以上で、全体としては40%近い。特に、ボンビキシンの6個のシステイン残基の相対的な位置関係は、インスリン族ペプチドのそれと完全に一致している。

また、分子の三次構造を考えるうえで重要なグリシンや疎水性コアを構成するアミノ酸残基が、インスリンとボンビキシンとで一致していることも、両者が基本的に同様な三次構造を有することを示唆している。ロンドン大学のBlundell教授らの協力を得て描いたコンピュータ・グラフィクスによると、ボンビキシンとインスリンにおいて、 α -ヘリックスを中心とする疎水性コアは相同であるが、分子表面の構造が異なっていることがわかる¹⁸⁾。このことは、インスリンがエリカイコ除脳体眠蛹に対して前胸腺刺激ホルモン活性を示さず、他方、ボンビキシンがイムノアッセイでインスリン抗体と反応しないという事実を説明する一つの論拠となり得るかもしれない。

2.3. ボンビキシンの遺伝子解析 著者らは、ボンビキシンのアミノ酸配列に基づく合成オリゴヌクレオチドをプローブとして遺伝子解析を行い、ボンビキシンをコードしている2個のcDNAと30個以上のゲノム遺伝子の構造を明らかにすることに成功した。それらの構造は、シグナルペプチドに始まり、B鎖-Cペプチド-A鎖からなる各ドメインで構成されるプレプロ体をコードしていることが示された。Cペプチドの両端には、2個の塩基性アミノ酸が存在し、翻訳後、その位置でプロセッシング酵素により切断され、ボンビキシンを生ずることを示唆している。このように、遺伝子のレベルからもボンビキシンが、インスリン族に属するペプチドであることが明らかとなった¹⁹⁾。

なお、著者らは、これらの遺伝子を用い、カイコの脳について *in situ* ハイブリダイゼーションを行った結果、

先述の実験で免疫組織化学的に染色された脳内神経分泌細胞と同じ細胞のみが染色され、ボンビキシンがこれらの細胞内で生合成されていることがさらに確認された²⁰⁾。

また、エリカイコ幼虫のゲノムライブラリーについて、ボンビキシンのcDNAをプローブとしてボンビキシン様のペプチドをコードしている遺伝子を検索し、ライブラリー中に、その存在を確認している。しかしながら、ボンビキシン様のペプチドをエリカイコから単離することは、エリカイコの大量飼育が困難なため、現在のところ成功していない。

以上に述べたように、ボンビキシンは、無脊椎動物から単離され、構造決定された世界で最初のインスリン族ペプチドである。このことは、インスリン族ペプチドが、脊椎動物と無脊椎動物とが分化する以前に既に存在していたところの起源の極めて古いペプチドであることを示唆するものであり、インスリン族ペプチドの分子進化を考える上からも注目される。

3. カイコ脳神経系に含まれるその他の脳神経生理活性ペプチドに関する研究

昆虫の脳は、その内分泌機能を通じて、変態や脱皮のみでなく、代謝や行動など多くの生理的過程を制御していることが知られている。しかし、それらの諸現象を発現する活性物質の化学的実体は、バッタの脂質動員ホルモンを除いて、これまでほとんど明らかにされていなかった。著者らは、前胸腺刺激ホルモンの精製・単離を進める一方で、カイコを材料に、これまでに存在が示唆されていた羽化ホルモン、性フェロモン生合成活性化神経ペプチド、脂質動員ホルモンなどについて、化学的な立場から研究を行い、それらの化学構造を明らかにした。以下に、おもな研究の概要を記述する。

3.1. カイコ羽化ホルモン 昆虫の蛹体内で成虫への分化が完成後、蛹が脱皮して成虫(蛾)が出現することを「羽化」という。この羽化現象が、羽化ホルモンにより引き起こされることは、1970年代のはじめ、米国のTrumanらにより明らかにされていた²¹⁾。1977年に入って、諸星らはカイコの羽化ホルモンが、カイコの蛹や蛾の頭部のアセトン粉末から2%食塩水によって抽出されることを見出した²²⁾。著者らは、諸星らの実験結果に注目し、東京農工大学の普後らと協力して、カイコ羽化ホルモンの単離・構造決定に向けて研究を開始した。

予備実験において、羽化直前の蛹の頭部に含まれる羽化ホルモンの活性は、成虫のそれに比して数倍であったことから、羽化ホルモンの抽出材料としては、羽化直前の蛹の頭部を用いた。そして、18段階の精製過程により、

約 80 万個の蛹の頭部から、4 分子種の羽化ホルモン、EH-I~IV、合計約 40 μ g を単離することに成功した²³⁾。ここに単離された羽化ホルモンは、それぞれ約 0.2 ng で活性を示した。なお、カイコ成虫頭部からも、ほぼ同様の精製過程を経て、羽化ホルモンを単離することができた。

カイコ羽化ホルモンのアミノ酸配列については、その酵素分解物のアミノ酸配列分析により、カルボキシル末端の構造を除いて 61 残基の配列が明らかになり、さらに遺伝子解析の結果等を総合して、62 残基からなるこの活性ペプチドの全アミノ酸配列が決定された²³⁾。

ついで、遺伝子組換え技術により、大腸菌を用いてこのホルモンを大量合成し、得られた羽化ホルモンを材料として、このペプチドに含まれる 3 対のジスルフィド結合の様式を明らかにし²⁴⁾、最終的にカイコ羽化ホルモンの全一次構造を決定した。

カイコ羽化ホルモンが、脳の中央部の神経分泌細胞で作られていることは、脳中央部の抽出物の生物活性を調

Fig. 6 Primary structure of *Bombyx* eclosion hormone. EH-I, 3-61; EH-II, 1-61; EH-III, 3-62; EH-IV, 1-62.

べることで推定されていたが、著者らは、羽化ホルモンのカルボキシル末端に対応する合成ペプチドを抗原として、羽化ホルモンと反応するモノクローナル抗体を作成し、それを用いた免疫組織化学によって、このホルモンが脳内の数個の神経分泌細胞において生合成されていることを確認した²⁵⁾。

3.2. カイコ性フェロモン生合成活性化神経ペプチド
ある種の鱗翅目昆虫においては、性フェロモン(性誘引

物質)の生合成を促進する神経ペプチドの存在が示され、性フェロモン生合成活性化神経ペプチド(pheromone biosynthesis activating neuropeptide; PBAN と略称)とよばれている²⁶⁾。例えば、羽化 2 時間後に、メスのカイコ蛾の頭部を切除すると、フェロモン腺における性フェロモン、即ちボンピコール(bombykol)の生合成が停止する。この蛾をさらに一昼夜放置すると、フェロモン腺にはボンピコールがほとんど存在しなくなる。そこで、カイコ蛾の頭部の抽出物を注射すると、除頭蛾におけるボンピコールの生合成が再開される。従って、3 時間後にフェロモン腺を切りとり、その分泌腺を溶媒で抽出して得られるボンピコールの量を高速液体クロマトグラフィーで分析すれば、カイコ蛾の性フェロモン生合成活性化神経ペプチドの活性を生物検定することが可能である。

著者らは、ボンピコールの生合成過程を研究している東京農工大の安藤らと、カイコの PBAN の単離、構造決定を目指して協同研究を行った。まず、メス、オスの区別無しに、カイコ蛾の頭部に、性フェロモン生合成を活性化する成分が存在することを確認し、オスのカイコ蛾の頭部を材料にして性フェロモン生合成活性化神経ペプチドの抽出を試みた。その精製過程で、抽出物を過酸化水素で酸化すると活性が著しく高められることを発見した。そして、これらの結果を基礎に検討を重ね、最終的に、カイコ蛾頭部から、性フェロモン(ボンピコール)の生合成を促進する 2 種のペプチド(カイコ PBAN-I および II)を、酸化物の形で単離し、そのアミノ酸配列を決定するとともに、両者およびその酸化物の化学合成にも成功した²⁷⁾。

上述したように、カイコ性フェロモン生合成活性化神経ペプチドを単離する過程で、それを過酸化水素で処理すると活性が著しく高くなること(約 100 倍)が見出されたが、それは、このペプチドに含まれる 3 個のメチオニン残基の硫黄原子がスルフォキシド(=SO)に酸化されるためであることが確認された。このように、生理活性ペプチドにおいて、メチオニン残基の酸化が活性を高

PBAN-I: LSEDMPATPADQEMYQPDPEEMESRTRYFSPRL-NH₂
PBAN-II: RLSEDMPATPADQEMYQPDPEEMESRTRYFSPRL-NH₂

Fig. 7 Amino acid sequence of *Bombyx* pheromone biosynthesis activating neuropeptides.

めた例はこれまでに知られておらず、極めて興味深い事実である。なお、著者らは、カイコ蛾頭部から抽出された、性フェロモン生合成活性化ペプチドの一部は、過酸化水素で酸化する以前に、すでに酸化物の形で存在し

ていることも確認している。

また、ペプチド鎖の部分と活性との相関関係を検討する過程で、カルボキシル末端の5残基からなるペプチド部分およびアミド構造(-FSPRL-NH₂)の部分、活性発現に最も重要な役割を果たしていることも明らかになった。

ところで、アワヨトウの幼虫では、低密度で飼育すると体色が淡く、高密度で飼育すると体色が著しく黒化するという「相変異」を示す²⁸⁾。この、体色黒化現象は頭部に含まれる体色黒化ホルモン(melanization and reddish coloration hormone)によって引き起こされ、しかも、同様の活性を有するペプチドがカイコの脳および食道下神経節にも存在していることが知られていたが、それが上述のカイコのPBANと同一物質であることが証明された²⁹⁾。このペプチドは、アワヨトウばかりでなくヨトウガ類一般の幼虫の体色を黒化する活性を有するとともに、メスのヨトウ蛾の性フェロモン生合成をも活性化する。即ち、同一の生理活性ペプチドが、同種の生物において、幼虫に対しては体色変化、成虫に対しては性フェロモン合成といった、まったく異なる生物活性を有するという注目すべき事実が明らかにされたのである。

最近、バッタやゴキブリ等で筋収縮にかかわる1種のニューロトランスミッターが各種単離、構造決定されているが³⁰⁾、それらのあるものはそのカルボキシル末端の構造がPBANのそれと相同であり、しかも相互に交差活性を示すことが明らかになった³¹⁾。さらに、名古屋大

Bombyx PBAN-1 :
Locustamyotropin-1 :
Bombyx diapause hormone :

Fig. 8 Insect neuropeptides possessing homologous carboxyl termini with *Bombyx* PBAN.

学の山下らにより単離構造決定されたカイコ休眠ホルモン³²⁾のカルボキシル末端の構造もPBANのそれと類似している。これらの事実、昆虫の体内に-FXPRL-NH₂という共通のカルボキシル末端を有する神経ペプチドのスーパーファミリーの存在を示唆するものであろう。

3.3. カイコ脂質動員ホルモン ある種のバッタは、絶食したまま、数十キロの距離をつづけて飛翔できるといふ。1965年、オランダのBeenakersは、トノサマバッタを飛翔させると、体内の脂肪体から血液中への脂質、即ちジグリセリドの放出量が何倍にも増加することを発

見した³³⁾。その後、バッタの側心体が発分泌するホルモンが、この脂質増加を誘起するということが明らかにされ、脂質動員ホルモン(adipokinetic hormone)と命名された。1976年、英国のStoneらは、サバクバッタおよびワタ

pGlu : pyroglutamyl

Fig. 9 Structure of *Manduca* and *Bombyx* adipokinetic hormone.

リバッタの側心体から、このホルモンを単離し、その構造を決定した³⁴⁾。

ところで、カイコ蛾は、羽化後、まったく摂餌することなく、産卵し、死んでいく。このことから、カイコ蛾の生存中の活動エネルギーは、その脂肪体に蓄えられた脂質から供給されていることが示唆され、カイコ蛾においても脂質動員ホルモンの存在が推定されていた。1992年、著者らは、断頭することにより血中の脂質濃度が低下したカイコ蛾に、頭部の抽出物を注射すると脂質濃度が回復することを確認し、そのことを指標にカイコ蛾頭部より、脂質動員ホルモンを単離し、そのアミノ酸配列を明らかにした³⁵⁾が、その構造は、タバコスズメガのそれと完全に同一であった。

おわりに

著者らの研究は、生物学の研究室と化学の研究室が長期にわたり緊密な共同研究を展開してきた点に特色がある。また、大量のカイコを材料として用いた点で、このような研究は、養蚕という産業的・文化的に伝統ある我が国において、はじめて可能になったものといえよう。

ところで、最近、微量ペプチドの単離・構造解析技術や遺伝子組換え技術等を用いることにより、必ずしも大量の昆虫を抽出材料とすることなく、生体内含量の少ない昆虫生理活性脳神経ペプチド類を単離・構造決定することが可能である。即ち、タバコスズメガにおけるアラタ体の活性を制御するペプチド^{36,37)}が明らかにされたのははじめ、各種の昆虫脳神経ペプチドの構造が続々と明らかにされつつある。また、それらペプチドに対する受容体の構造も近い将来明らかにされるであろう。このような研究を通じて、近い将来に昆虫の内分泌学も、その面目を一新するものと期待される。おわりに終始変わらず御指導賜った東京大学名誉教授田村三郎先生に感謝いたします。

(平成4年2月17日受理)

文 献

- 1) M. Kobayashi, J. Kirimura, *Nature*, **181**, 1217 (1958)
- 2) M. Ichikawa, H. Ishizaki, *ibid.*, **191**, 933 (1961)
- 3) M. Ichikawa, H. Ishizaki, *ibid.*, **198**, 308 (1963)
- 4) H. Ishizaki, M. Ichikawa, *Biol. Bull.*, **133**, 355 (1967)
- 5) M. Yamazaki, M. Kobayashi, *J. Insect Physiol.*, **15**, 1981 (1969)
- 6) H. Kataoka, H. Nagasawa, A. Isogai, S. Tamura, A. Mizoguchi, Y. Fujiwara, C. Suzuki, H. Ishizaki, A. Suzuki, *Agric. Biol. Chem.*, **51**, 1067 (1987)
- 7) A. Kawakami, H. Kataoka, T. Oka, A. Mizoguchi, M. Kimura-Kawakami, T. Adachi, M. Iwami, H. Nagasawa, A. Suzuki, H. Ishizaki, *Science*, **247**, 1333 (1990)
- 8) H. Kataoka, H. Nagasawa, A. Isogai, H. Ishizaki, A. Suzuki, *Agric. Biol. Chem.*, **55**, 783 (1991)
- 9) H. Ishizaki, A. Suzuki, I. Moriya, A. Mizoguchi, M. Fujishita, H. O'oka, H. Kataoka, A. Isogai, H. Nagasawa, A. Suzuki, *Develop. Growth Differ.*, **25**, 585 (1983)
- 10) A. Mizoguchi, T. Oka, H. Kataoka, H. Nagasawa, A. Suzuki, H. Ishizaki, *ibid.*, **32**, 591 (1990)
- 11) S. Morohoshi, T. Oshiki, I. Kikuchi, *Proc. Japan Acad.*, **53**, 199 (1977)
- 12) H. Ishizaki, A. Mizoguchi, M. Fujishita, A. Suzuki, I. Moriya, H. O'oka, H. Kataoka, A. Isogai, H. Nagasawa, S. Tamura, A. Suzuki, *Develop. Growth Differ.*, **25**, 593 (1983)
- 13) A. Suzuki, H. Nagasawa, H. Kataoka, Y. Hori, A. Isogai, S. Tamura, F. Guo, F. Zhong, H. Ishizaki, M. Fujishita, A. Mizoguchi, *Agric. Biol. Chem.*, **46**, 1107 (1982)
- 14) A. Mizoguchi, H. Ishizaki, H. Nagasawa, H. Kataoka, A. Isogai, S. Tamura, A. Suzuki, H. Ishizaki, *Mol. Cell Endocrinol.*, **51**, 227 (1987)
- 15) H. Nagasawa, H. Kataoka, A. Isogai, S. Tamura, A. Suzuki, A. Mizoguchi, Y. Fujishita, A. Suzuki, S. Y. Takahashi, H. Ishizaki, *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, **83**, 5840 (1986)
- 16) K. Maruyama, H. Hietter, H. Nagasawa, A. Isogai, S. Tamura, A. Suzuki, H. Ishizaki, *Agric. Biol. Chem.*, **52**, 3035 (1988)
- 17) K. Maruyama, K. Nagata, M. Tanaka, H. Nagasawa, A. Isogai, H. Ishizaki, A. Suzuki, *J. Protein Chem.*, **11**, 1 (1992)
- 18) H. Jhoti, A.N. McLeod, T.L. Blundell, H. Ishizaki, H. Nagasawa, A. Suzuki, *FEBS Lett.*, **219**, 419 (1987)
- 19) M. Iwami, A. Kawakami, H. Ishizaki, S.Y. Takahashi, T. Adachi, Y. Suzuki, H. Nagasawa, A. Suzuki, *Develop. Growth Differ.*, **31**, 31 (1989)
- 20) T. Adachi, S. Takiya, Y. Suzuki, M. Iwami, A. Kawakami, S.Y. Takahashi, H. Ishizaki, H. Nagasawa, A. Suzuki, *J. Biol. Chem.*, **264**, 7681 (1989)
- 21) J.W. Truman, L.M. Riddiford, *Science*, **167**, 1624 (1970)
- 22) S. Morohoshi, H. Fugo, *Proc. Japan Acad.*, **51**, 75 (1977)
- 23) T. Kono, H. Nagasawa, A. Isogai, H. Fugo, A. Suzuki, *Insect Biochem.*, **21**, 185 (1991)
- 24) T. Kono, H. Nagasawa, H. Kataoka, A. Isogai, H. Fugo, A. Suzuki, *FEBS Lett.*, **263**, 358 (1990)
- 25) T. Kono, A. Mizoguchi, H. Nagasawa, H. Ishizaki, H. Fugo, A. Suzuki, *Zool. Science*, **7**, 47 (1990)
- 26) A.K. Raina, J.A. Klun, *Science*, **225**, 531 (1989)
- 27) A. Kitamura, H. Nagasawa, H. Kataoka, T. Inoue, T. Ando, A. Suzuki, *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **163**, 520 (1989)
- 28) S. Iwao, *Mem. Coll. Agric. Kyoto Univ.*, **84**, 1 (1962)
- 29) S. Matsumoto, A. Kitamura, H. Nagasawa, H. Kataoka, C. Orikawa, T. Mitsui, A. Suzuki, *J. Insect Physiol.*, **36**, 427 (1990)
- 30) R.J. Nachman, G.M. Holman, "Insect neuropeptides; Chemistry, Biology and Action," ed. by J.J. Menn, T.J. Kelly, E.P. Masler, American Chemical Society, Washington D.C., 1991, 194
- 31) H. Kuniyoshi, H. Nagasawa, T. Ando, A. Suzuki, R.J. Nachman, G.M. Holman, *Biosci. Biotech. Biochem.*, **56**, 167 (1992)
- 32) K. Imai, T. Konno, Y. Nakazawa, T. Komiya, M. Isobe, K. Koga, T. Goto, T. Yaginuma, K. Sakakibara, K. Hasegawa, O. Yamashita, *Proc. Japan Acad.*, **67**, 98 (1991)
- 33) A.M.T. Beenackers, *J. Insect Physiol.*, **11**, 879 (1965)
- 34) J.V. Stone, W. Mordue, K.E. Batley, H.R. Morris, *Nature*, **263**, 207 (1976)
- 35) J. Ishibashi, H. Kataoka, H. Nagasawa, A. Isogai, A. Suzuki, *Biosci. Biotech. Biochem.*, **56**, 66 (1992)
- 36) H. Kataoka, A. Toschi, J.P. Li, R.L. Carney, D.A. Schooley, S.J. Kramer, *Science*, **243**, 1481 (1989)
- 37) S.J. Kramer, A. Toschi, C.A. Miller, H. Kataoka, G.B. Quistad, J.P. Li, R.L. Carney, D.A. Schooley, *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, **88**, 9458 (1991)