

「研究テーマ名」 昆虫の神経ペプチド分泌に関与する蛋白質の機能解析

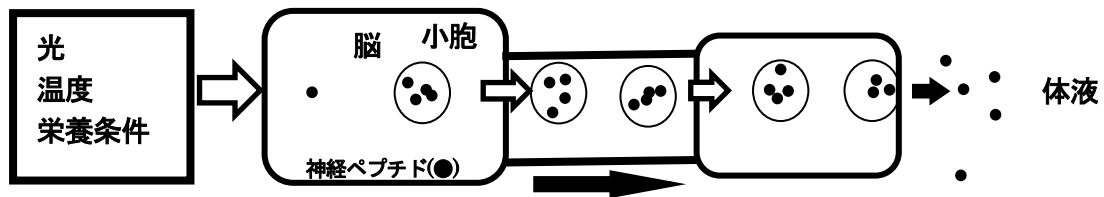
神戸大学農学研究科

宇野 知秀

1 研究の背景と目的

昆虫は、変態、羽化、休眠、成長、摂食など様々な生理現象を引き起こす。これらの生理現象は、脳などに存在する特異的な神経細胞で合成される神経ペプチドにより主に引き起こされる。

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対応し、主に脳で合成された後、神経ペプチドを含む小胞が形成され、軸索の中を小胞輸送し、アラタ体や側心体などの末端の神経分泌器官から分泌される（下図参照）。これらの神経ペプチドは、ペプチドごとに特定の神経細胞で合成された後、軸索を経て様々な箇所で分泌される。昆虫の神経ペプチドは、50種以上存在するが、（1）神経ペプチドを含む小胞の輸送・体液中への分泌を引き起こす蛋白質と（2）小胞輸送や分泌を制御する蛋白質は、殆どわかってない。



本研究では、神経ペプチドの輸送、分泌の分子的な機構を明らかにすることを目的にする。特に、多様な神経ペプチドを含む小胞の細胞膜への融合・分泌を引き起こす昆虫に共通な分子装置を明らかにする。更に、細胞内での神経ペプチド輸送・分泌・分解において、制御的な役割を果たす Rab の機能を明らかにする事を目的とする

2 研究方法・研究内容

本研究では、神経ペプチドの輸送、分泌の分子的な機構を明らかにするために以下の3つの点に集中し研究を行った（下図参照）

- ①昆虫の神経ペプチド分泌を直接行う蛋白質を明らかにする：
- ②昆虫インシュリン(bombyxin)の分泌を制御する Rab を明らかにする：
- ③昆虫の Rab と相互作用する Effector 分子の単離

① 昆虫の神経ペプチド分泌を直接行う蛋白質を明らかにする：

SNARE (SNAP receptor)は、小胞の様々な膜への融合を直接引き起こす蛋白質である。SNARE には、t-SNARE と v-SNARE の2種の分子が存在し、それらが異なる膜に存在し、互いが結合することにより膜の融合・その中に含まれる神経ペプチドなどの分子の分泌が引き起こされる（下図参照）。

そこで、SNARE 蛋白質の内 t-SNARE である SNAP25 と Syntaxin1A の2種の cDNA をカイコ脳から分離し、大腸菌で蛋白質を発現し、カラムクロマトグラフィーにより精製後、発現蛋白質を用いてウサギとラットで抗体を作成した。

次に、抗体を用いた免疫組織化学的解析により、SNARE が脳の中の神経ペプチドを分泌する神経細胞に局在するかを検討した。用いた組織は、カイコの脳の切片とアラタ体の切片を用い、蛍光2重染色により同じ神経細胞に局在するかを検討した。

この際、脳に存在する昆虫インシュリンである Bombyxin と変態を引き起こす前胸腺刺激ホルモン(PTTH)を合成・分泌する神経細胞に、焦点を合わせた。

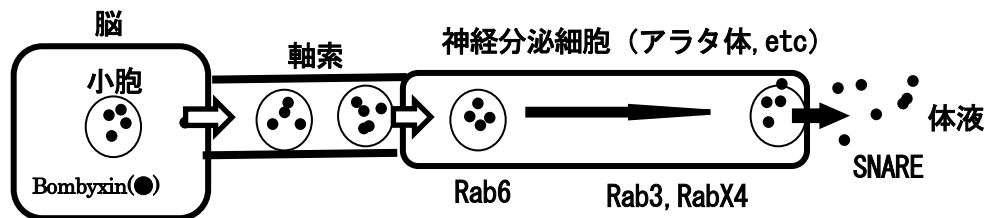
②昆虫インシュリン(bombyxin)の分泌を制御する Rab を明らかにする：

Rab は、小胞の輸送や小胞膜に含まれる蛋白質やペプチドの分泌を制御する一群の低分子量 GTP 結合蛋白質である。Rab は、昆虫では約 30 種類存在し、膜輸送の様々な段階を制御することが知られている。

今までの免疫組織化学的解析により、Rab は、昆虫の脳の特定の神経細胞にのみ局在した。神経ペプチドも同じように特定の神経細胞にだけ局在を示す。そこで、セロトニンなどの神経伝達物質や各種神経ペプチドと Rab の局在性を比較検討したところ、Rab と同じ局在性を示す神経ペプチドには、Bombyxin と羽化ホルモンが存在した。

カイコの脳の中に存在する Bombyxin を合成する神経細胞には、Rab1, Rab3, Rab6, Rab7, Rab14, RabX4 が局在していた。そして、最終的に Bombyxin を体液中へと分泌する器官であるアラタ体に局在する Rab として Rab3, Rab6, RabX4 が存在した (下図参照)。

そこで、さらに新たに 3 種類の Rab (Rab21, Rab26, Rab39) の cDNA をカイコ脳から分離し大腸菌で蛋白質を発現し、カラムクロマトグラフィーにより精製後、発現蛋白質を用いてウサギとラットで抗体を作成した。これらの抗体を用いた免疫組織化学的解析を行うことにより、Bombyxin の分泌に関与する Rab を特定する。



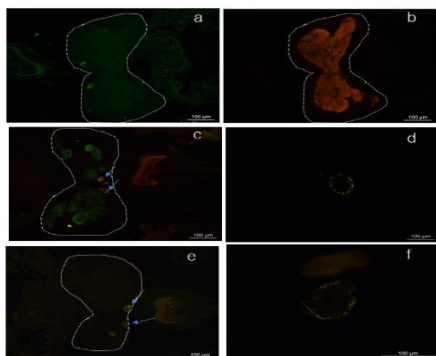
③昆虫の Rab と相互作用する Effector 分子の単離

Rab は、不活性型である GDP 結合型と活性型である GTP 結合型で存在する。活性型は様々な Effector 蛋白質と結合し、膜輸送において、その機能を果たす。そこで、相互作用する蛋白質をスクリーニングする方法である酵母 Two hybrid system を用いて、活性型の Rab と相互作用する Effector 蛋白質を見つけ出す。

3 研究成果

① 昆虫の神経ペプチド分泌を直接行う蛋白質を明らかにする：

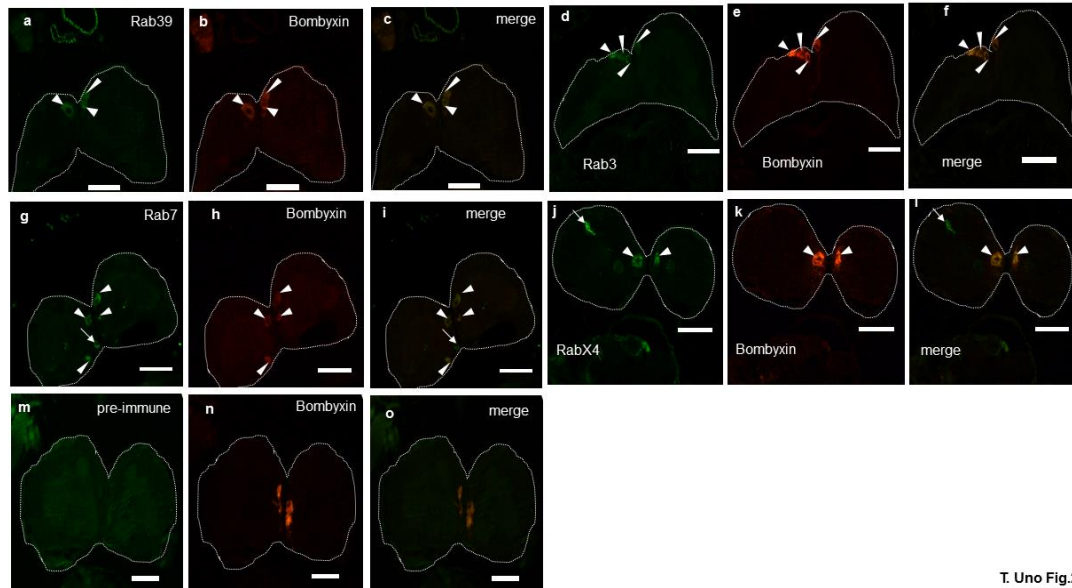
SNAP25 は、脳の中心付近が広く染色された (Fig. 1b)。Syntaxin 1A は、脳の中心部分に存在する複数の神経細胞が染色された (Fig. 1a)。Bombyxin の染色箇所は、SNAP25 では部分的に一致し (Fig. 1c, 1d)、Syntaxin1A については、局在性が一致した (Fig. 1e, f)。一方、PTTH の染色箇所は全く一致しなかった。このことから、Syntaxin1A と SNAP25 は Bombyxin の分泌に関与すると考えられる。今後 v-SNARE である synaptobrevin や VAMP2 などの抗体を作成し、小胞の膜への融合が、どの SNARE により引き起こされるかを明らかにする。以上の内容は、日本蚕糸学会第 89 回大会 (平成 31 年 3 月 21 日) で発表した。



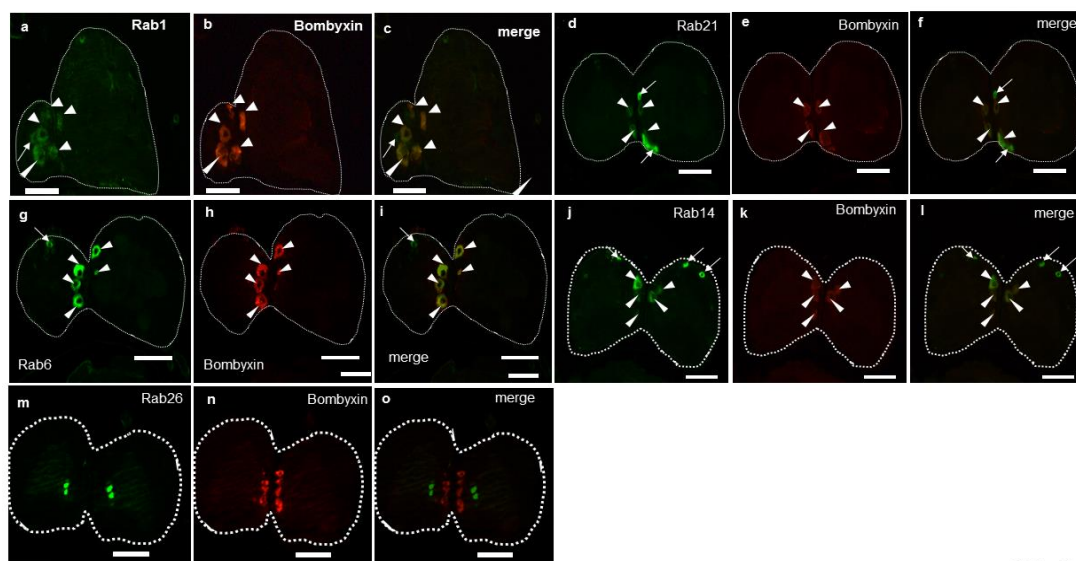
T. Uno Figure 1

② 昆虫インシュリン(bombyxin)の分泌を制御する Rab を明らかにする：

脳の組織切片を用いた蛍光2重染色により、Rab39, Rab3, Rab7, RabX4, Rab6, Rab14 は、ボンビキシンと同じ局在性を示した。(Figs. 2 and 3, arrowheads). Rab1 と Rab21 の局在性は完全には一致しなかった (Fig. 3c and f, arrow), Rab26 は Bombyxin と全く局在しなかった (Fig. 3o).

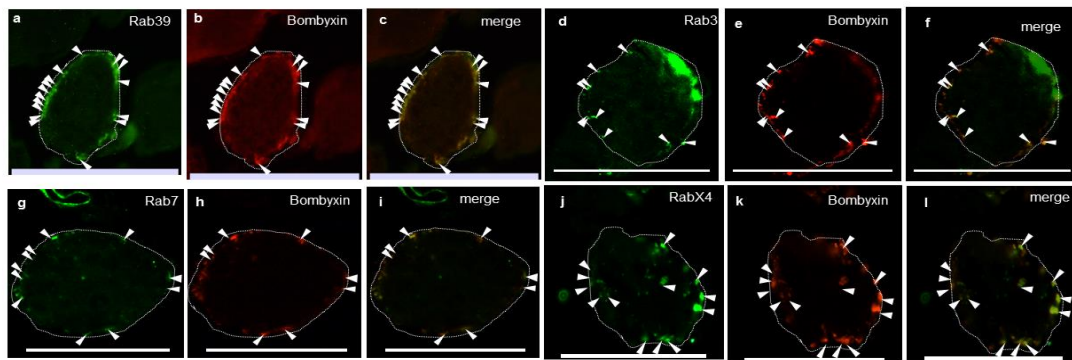


T. Uno Fig.2

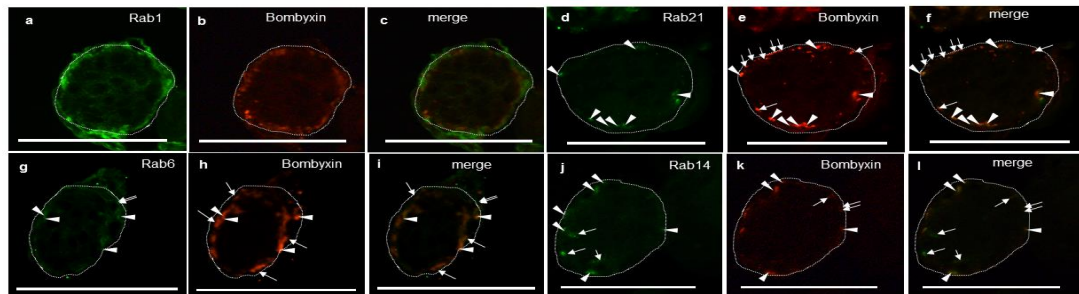


T. Uno Fig.3

次にアラタ体での局在性を検討したところ、Rab39, Rab3, Rab7, RabX4 は、bombyxin と同じ細胞に局在した (Fig. 4c, f, i and l; arrowheads)。一方、Rab6, Rab14, Rab21 は部分的に局在した (Fig. 5f, i and l)。Rab1 は、同じ局在性を示さなかった (Fig. 5c)。以上の結果より Rab39, Rab3, Rab7, RabX4 が、アラタ体から体液中への bombyxin の分泌を制御すると考えられた。



T. Uno Fig.4



T. Uno Fig.5

③昆虫の Rab と相互作用する Effector 分子の単離

約 200 匹のカイコ脳から分離した mRNA から、酵母 Two hybrid system に用いる cDNA ライブラリーを作成した。カイコの RabX4 に対してスクリーニングを行ったところ、特異的に RabX4 と相互作用するクローンを得ることができた。現在、この分子に対する抗体を作成するために、大腸菌でタンパク質を発現させている。

更に RabX4 以外の Rab に対してもスクリーニングを行っている。また、このクローン以外の新しい Effector を得るために新規のライブラリーを作成する予定である。

4 生活や産業への貢献および波及効果

昆虫の膜融合蛋白質である SNARE が、カイコの脳を中心部に広く発現することから、この蛋白質は、昆虫の行動を司るうえで記憶などの重要な機能を果たすと考えられる。この蛋白質の機能を様々な化学物質により抑制することにより、新規の農薬の開発につながる。

血糖値を下げるホルモンであるインシュリンの脳での機能が最近注目をあびている。脳でのインシュリン分泌に関わる Rab や SNARE の機能を明らかにすることにより、脳でのインシュリンの分泌機構に新たな知見を加えることができる。

Rab は、オートファジー、受精、癌、アルツハイマー病、パーキンソン病など様々な生理現象や疾病に膜輸送を通じて関与する。本研究で得られた Rab の新規の機能解明が、これらの現象や疾病にどのように Rab が関わるかを分子レベルで明らかにすることができる。