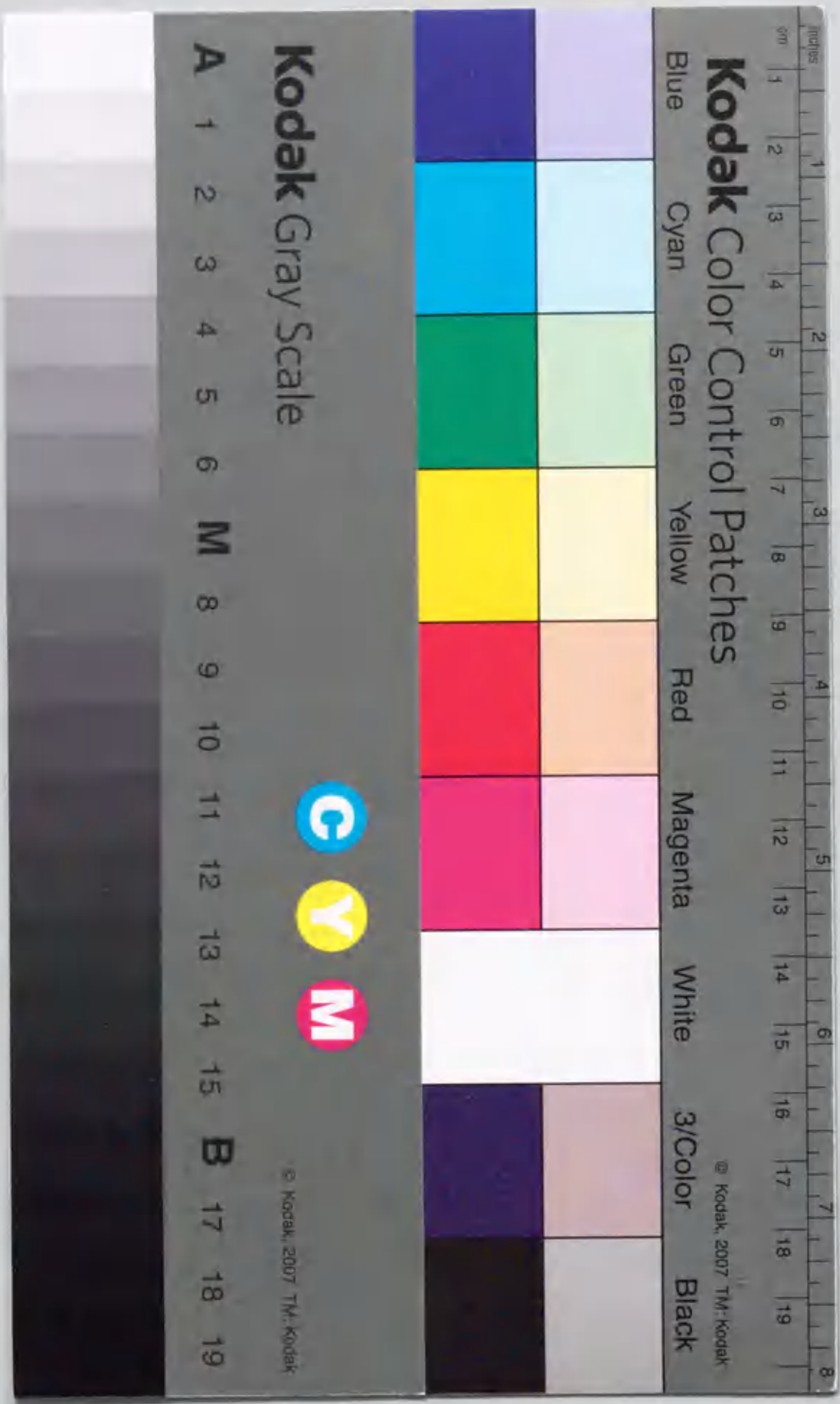


カイコにおける新規疎水性ペプチド
(VAP-peptide)の構造および
生理機能に関する研究

塩見 邦博



博士論文

報告番号 甲 第 3898 号

カイコにおける新規疎水性ペプチド
(VAP-peptide) の構造および
生理機能に関する研究

名古屋大学大学院生命農学研究科農学専攻

塩見邦博

1998年2月

目次

	頁
第1章 緒論	1
謝辞	6
第2章 VAP-ペプチドの構造および休眠ホルモン活性増強作用	7
材料と方法	9
実験結果	13
1. cDNA クローニングおよび塩基配列とアミノ酸配列の決定	13
2. VAP-ペプチド発現ベクターの構築およびVAP-ペプチドの生産	17
3. 休眠ホルモン活性に及ぼすVAP-ペプチドの作用	20
考察	23
摘要	26
第3章 VAP-ペプチド遺伝子の発現およびタンパク蓄積の発育変動および組織、細胞局在性	27
材料と方法	29
実験結果	33
1. VAP-ペプチド遺伝子の発現ならびにVAP-ペプチド蓄積の概観	33
2. VAP-ペプチド mRNA の組織局在性	40
3. VAP-ペプチド遺伝子の発現細胞の同定	39
4. 翅におけるVAP-ペプチド遺伝子の時期特異的発現	43
5. 蛹-成虫発育期におけるVAP-ペプチドの蓄積	43
6. VAP-ペプチドのクチクラ層での局在	47
7. キチンクロマトグラフィーにおけるVAP-ペプチドの挙動	47
考察	49
摘要	52

第4章 VAP-ペプチド遺伝子の構造と転写調節要因	53
材料と方法	55
実験結果	61
1. VAP-ペプチド遺伝子の構造	61
2. シスエレメントおよび転写調節因子の推定	66
3. Bm FTZ-F1 のクローニング	66
4. 酵母・ワンハイブリッドシステムによる転写調節活性の検討	70
考察	73
摘要	77

第5章 総合考察	79
----------	----

引用文献	84
------	----

第 1 章 緒論

昆虫は地球環境に最もよく適応し、発達した生物群の一つである。それは、同定された種の数に 100 万種にも及び、またある推計によると地球上の全昆虫個体の総体重がヒトの総体重の 15 倍にも達するとされていることから理解される。このような昆虫の繁栄は生態学的、形態学的な特殊化に加えて、生理・生化学的な機能の特殊化にも当然よっている。

一つは変態を生活史の中に積極的に取り込み、幼虫と成虫の生活の場と食性を変えることによって発育段階の異なる個体間の競合を避け、個体数を増加させていることである。昆虫は変態過程で新たな遺伝子を逐次発現し、新しい機能を獲得している。この代表的な例は表皮や生殖器官の構成成分の生合成系の創出である (Riddiford and Truman, 1978; Sridhara, 1981)。

もう一つは、休眠と呼ばれる特異的な生理 - 代謝系を発達させ、個体レベルでは不良な生育環境に対して積極的に適応する能力、種においては生殖機会の斉一化による種の維持および遺伝子の長期保存の能力を獲得したことである。休眠にみられる特異代謝系は、一般的には多価アルコールの高濃度の蓄積や特異タンパクの生合成などによって発現されている (Storey and Storey, 1983; Denlinger, 1985; Yamashita and Hasegawa, 1985)。これら 2 つの変態、休眠機構はいずれも生息環境の変化を情報にして神経内分泌系で生産分泌されるホルモンによって支配されている (山下, 1978, 1993)。従って昆虫にみられる特異的な生理機構の研究は、変態や休眠に伴って新たに発現される形質の同定と、そのホルモンによる調節機構を中心として進められてきた。

昆虫の変態や休眠を調節する神経ペプチドホルモンの化学に関する研究は 1950 年代の後半から始められている。脳から分泌され、前胸腺を活性化してエ

クジソンの分泌を促すホルモン、前胸腺刺激ホルモン (prothoracico-tropic hormone; PTTH) は 1963 年に初めて生体外に取り出された神経ペプチドホルモンである (Ichikawa and Ishizaki, 1963 ; Ishizaki and Ichikawa, 1967) 。 PTTH の本格的な精製は 1970 年以後、鈴木昭憲と石崎宏矩との協同研究によって進められた (Ishizaki and Suzuki, 1980) 。ここではカイコ成虫の頭部を材料として、16 段階の水溶性溶媒による抽出と精製操作によって純品の PTTH が得られている (Nagasawa *et al.*, 1990) 。純品の化学的な分析によって、104 個のアミノ酸配列が決定された (Kataoka *et al.*, 1991) 。 PTTH の cDNA のクローニングと構造解析が進められ、カイコの PTTH は 109 個のアミノ酸から成るペプチドであると最終的に決定された (Kawakami *et al.*, 1990) 。

一方、カイコの卵休眠を誘導する休眠ホルモン (diapause hormone; DH) は 1957 年に長谷川によって初めて生体外に取り出された (Hasegawa, 1957) 。この実験では、DH はカイコ蛹の脳-食道下神経節連合体からメタノール/クロロホルム (1:1) の混液に抽出されている。その後 DH の抽出材料としてカイコ雄成虫の頭部が用いられるようになった。DH 活性は数 100 万個の頭部から有機溶媒 (メタノール/クロロホルム混液) により抽出されブタノール/水分配によってブタノール層に回収された。この画分を各種のオープンカラムクロマトグラフィーによって分離することにより、高純度の DH が 2 種類得られた (Isobe and Goto, 1980) 。しかし、この精製段階ではまだ多数の爽雑物が混在しており、単離には至らなかった。1986 年以後は DH の単離と構造決定の方法が変更された。つまり DH 活性の抽出は、カイコ蛹から解剖摘出した食道下神経節から熱水で行われ、DH の分離は高速液体カラムクロマトグラフィーで進められた (Imai *et al.*, 1991; 山下, 1993) 。この新規な精製法によって 1991 年に DH は単離され、構造が決定された (Imai *et al.*, 1991; Sato *et al.*, 1992) 。化学的な研究によって決定された構造は、cDNA の構造解析によって確認された (Sato *et al.*, 1993) 。

PTTH および DH に加えて、ボンビキシシ (bombyxin)、フェロモン生合成活性化神経ペプチド (PBAN)、羽化ホルモン (EH)、脂肪動員ホルモン (AKH) もカイコ成虫の頭部から精製単離されている (Suzuki *et al.*, 1982; Kitamura *et al.*, 1989; Kono *et al.*, 1991; Ishibashi *et al.*, 1992)。これらのホルモンは全てカイコの成虫頭部から水溶媒で抽出され、各種のカラムクロマトグラフィーによって分離され、化学分解法によりアミノ酸配列も決定されている。これらの結果と比較し、DH 活性が雄成虫の頭部の有機溶媒分画に回収されたことは極めて特異的な現象である。この場合に用いた雄成虫の頭部が、あらかじめ 80 °C で乾燥されていたことは、他のホルモン抽出のための出発材料の前処理条件とは異なっているが、有機溶媒に抽出される分画に DH 活性の本体が回収されたことは、すでに構造決定されている DH とは異なる分子種の存在の可能性を示すものであった。

そこで、今井邦雄と山下興亜らは協同して、カイコの雄成虫頭部から有機溶媒可溶の DH 活性物質の精製を再開した。ここで用いたカイコの雄成虫頭部は交尾後ただちに冷蔵された個体から調製され、以前の実験におけるような 80 °C 乾燥処理はしていないものであった。DH 活性物質はすでに 1980 年代の前半に確立していた方法 (Imai *et al.*, 1982) に従って抽出された。本抽出方法では DH 活性は 2 つの画分に回収された。1 つはメタノール / ジクロロメタン (1 : 1) 混液分画であり、もう 1 つは 50 % イソプロパノール可溶分画であった。後者の分画はその後の精製によって、すでに構造決定されている DH に相当するものであった。メタノール / ジクロロメタン分画の DH 活性物質はブタノール / 水分配によってブタノール層に回収された点も以前の結果と同じである。この分画を高速カラムクロマトグラフィーによって分離したところ、DH 活性は大きく 2 つの画分に分離した。生物活性の比較的弱い画分はほぼ単一のピークとして回収された。このピーク画分のアミノ酸配列を化学的に分析した。その結果、以下のような N 末端

から 55 個のアミノ酸配列が決定された (Imai *et al.*, 1996)。

Gly-Val-Ile-Ala-Pro-Val-Val-Pro-Val-Ala-His-Pro-Val-Val-Ala-His- Thr-
Ala-Val-Val-His-Pro-Val-Pro-Leu-Val-Arg-Ala-Ala-His-Val-Val- His-
Thr-Ala-Pro-Val-Val-Ala-Ala-Ala-Pro-Val-Val-Ala-Ala-Pro-Val- Val-Ala-
Ala-Ala-Pro-Ile-Val-

このアミノ酸配列は部分配列であるが、得られた範囲においても極めて特異的なアミノ酸組成と配列をしていた。つまりバリン (Val)、アラニン (Ala) およびプロリン (Pro) が全アミノ酸数の 78 % 以上を占めており、しかも Ala-Pro-Val-Val のテトラペプチド配列が繰り返して存在していた。本ペプチドはそのアミノ酸組成の特徴から VAP-ペプチドと仮称された。アミノ酸配列の相同性検索により VAP-ペプチドのアミノ酸配列と相似の配列をもつタンパクは現在までに知られていない。しかしながら、Val、Ala、および Pro に富むタンパクとして、キイロショウジョウバエ (*Drosophila melanogaster*) の光受容細胞に存在するカルシウム結合タンパク (calphotin) (Ballinger *et al.*, 1993; Martin *et al.*, 1993)、ワタリバッタ (*Locusta migratoria*) 及びキイロショウジョウバエのクチクラタンパク (Andersen *et al.*, 1995; Qiu and Hardin, 1995) が知られている。しかし、アミノ酸配列上の相似性は、先述のように、分子の一部領域にみられるもので、全領域での相似性は極めて少ない。したがって VAP-ペプチドがこれらのタンパクと類似した生物機能を果たしていると推定することは困難である。

VAP-ペプチドはカイコの休眠卵誘導活性 (DH 活性) を指標にして発見され同定された新規なペプチドである (Imai *et al.*, 1996)。しかし VAP-ペプチドが第 2 の休眠ホルモン分子であると結論することは早計である。この精製 VAP-ペプチドの比活性がすでに決定されている DH に比較して 1/100 以下であるこ

とは、この精製 VAP-ペプチド標品に少量 (1/100) 以下の DH が爽雑していた可能性もあるからである。また VAP-ペプチドの特異的な構造は VAP-ペプチドが未知の生理機能を果たしていることを反映していることを推察させる。

本研究は VAP-ペプチドの生理機能を明らかにすることを目的にして進められた。本論文の第 2 章においては、VAP-ペプチドの分子特性を知るために cDNA をクローニングし、塩基配列および全アミノ酸構造を決定した。また大腸菌の発現ベクターにより大量に生産した VAP-ペプチドをカイコ蛹に投与して、DH の休眠卵誘導活性に及ぼす影響を検討し、本ペプチドは DH の協力剤となることを明らかにした。第 3 章では、VAP-ペプチド mRNA およびタンパクの発育変動と組織および細胞局在性を調査することにより、内在性 VAP-ペプチドの生体内での機能の推定を試み、VAP-ペプチドは成虫の運動機能を保証するために外骨格に機械的強靭さを与える構造強化タンパクであると考察した。第 4 章では、VAP-ペプチド遺伝子の発現調節機構を解明することを目的に、まず VAP-ペプチド遺伝子の構造を決定し、この遺伝子の調節領域の構造から転写調節因子の 1 つを推定した。これらの結果をもとにして、第 5 章でカイコにおける VAP-ペプチドの生理機能を総合的に考察した。

謝辞

本研究を遂行するにあたって終始変わらぬご指導と、ご鞭撻を賜りました名古屋大学農学部山下興亜教授に厚くお礼申し上げます。また、多くのご教示とご助言をいただきました名古屋大学農学部小林迪弘教授、柳沼利信助教授、池田素子博士、新美輝幸博士、ならびに、元名古屋大学 RIC 助手であり現在岩手大学農学部の佐藤行洋助教授、三重大学生物資源学部今井邦雄助教授に深く感謝申し上げます。さらに実験の過程で良き相談相手としてご協力いただきました研究室の皆様と、今までの学生生活を支えてくれた両親と友人達に深く感謝いたします。

第2章 VAP-ペプチドの構造 および休眠ホルモン活性増強作用

緒論で述べたように、VAP-ペプチドは弱いながらも休眠卵誘導活性を持つペプチドとして、カイコ雄成虫頭部から有機溶媒により新たに抽出精製され、部分アミノ酸配列が化学的に決定されたペプチドである (Imai *et al.*, 1996)。本ペプチドは、10種類という限られたアミノ酸で構成されており、しかもそのうちバリン (Val)、アラニン (Ala)、プロリン (Pro) が全アミノ酸数の78%を占める非常に疎水性の高いペプチドであり、また、アミノ酸の多くが繰り返し配列として配置されていた。Val、Ala、Proに富むタンパクとしてキイロショウジョウバエの光受容細胞に存在するカルシウム結合タンパクの一種である calphotin (Ballinger *et al.*, 1993; Martin *et al.*, 1993) やワタリバッタやキイロショウジョウバエのクチクラタンパク (Andersen *et al.*, 1995; Qiu and Hardin, 1995) などが知られている。しかしアミノ酸配列の相同性は低く、本ペプチドがこれらのタンパクの類縁体とは考えられない。また本アミノ酸配列と相同性を示すタンパクは既知のタンパクからも認められなかった。したがって、VAP-ペプチドは、カイコの胚休眠の誘導に関わる新規のペプチドと考えられた。

そこでまず、VAP-ペプチドの cDNA をクローニングし、その塩基配列及びアミノ酸配列を決定することによって、VAP-ペプチドの全構造を決定した。次に、VAP-ペプチドの生理機能を推定することを試みた。カイコ頭部から抽出精製できる VAP-ペプチド量は限られているので、大腸菌の発現ベクターを利用し、組換え体 VAP-ペプチド (recombinant VAP-ペプチド; rVAP-ペプチド) を大量に生産した。この rVAP-ペプチドを用い、VAP-ペプチドの休眠卵誘導活性なら

英和辞典の活用と英語学習

英語学習において辞典は非常に重要な役割を果たしている。辞典を効果的に活用することで、単語の意味だけでなく、その文脈や用法も学ぶことができる。辞典には、単語の発音、語源、類義語、対義語、例文などが掲載されている。辞典を上手に使うことで、英語の理解が深まり、表現力も向上する。

辞典の活用にはいくつかのポイントがある。まず、辞典を開く際には、単語の綴りを正確に確認することである。綴りがわからなければ、辞典で探すことができない。また、辞典で見た単語は、実際に使ってみることが大切である。例文を参考に、自分が使えるように練習しよう。

辞典は、英語学習の良友である。辞典を上手に活用することで、英語の学習が楽しくなる。辞典を上手に使うことで、英語の理解が深まり、表現力も向上する。

びに DH との相互作用について検討した。

本研究では、辞典の活用と英語学習の関係について検討した。辞典を上手に活用することで、英語の理解が深まり、表現力も向上する。辞典は、英語学習の良友である。辞典を上手に活用することで、英語の学習が楽しくなる。

辞典の活用にはいくつかのポイントがある。まず、辞典を開く際には、単語の綴りを正確に確認することである。綴りがわからなければ、辞典で探すことができない。また、辞典で見た単語は、実際に使ってみることが大切である。例文を参考に、自分が使えるように練習しよう。

辞典は、英語学習の良友である。辞典を上手に活用することで、英語の理解が深まり、表現力も向上する。辞典を上手に活用することで、英語の学習が楽しくなる。

材料と方法

1. 実験動物

カイコ (*Bombyx mori*) の 2 化性品種である大造および多化性の N4 を用いた。大造では休眠卵産生能 (休眠性) を与えるため胚発生期を 25 °C、全明で保護した (Yamashita and Yaginuma, 1991)。幼虫は 1 齢から 4 齢までを人工飼料 (シルクメイト、日本農産工業) で飼育し、5 齢は桑葉で飼育した。蛹および成虫は 25 °C で保護した。幼虫および蛹は脱皮後 1 時間以内に集め、その後の発育を斉一化した。

2. VAP-ペプチド cDNA のクローニングおよび塩基配列の決定

RT-PCR: 全 RNA は 酸性グアニジン法 (Chomzynski and Sacchi, 1987) により羽化直後の成虫雄頭部から抽出した。ポリアデニル化 (poly(A)⁺) RNA は、Oligotex-dT30 (Roche) により調製し、RT-PCR および 5' および 3' RACE のテンプレートとして用いた。1 本鎖 cDNA は、oligo(dT)₁₂₋₁₈ (Pharmacia) をプライマーに用い、Superscript reverse transcriptase (BRL) により合成した。PCR 反応は、常法 (Saiki *et al.*, 1985) によって行い、ここでは、Imai *et al.* (1996) により既に決定された VAP-ペプチドの部分アミノ酸配列をもとに合成したプライマーを用いた。つまりセンスプライマーとして

5'-AT(T/C/A)GCICCGTIGTICCGTIGCICA(T/C)CC-3' (①: in Fig. 2)

アンチセンスプライマーとして

5'-ATIGGIGCIGCIGCIACIACIGGIGCIGC-3' (②: in Fig. 2) を用いた。反応条件は、初めの 5 サイクルを変性 ; 94 °C / 1 分間、アニーリング ; 55 °C / 45 秒間、伸長 ; 72 °C / 1 分間の条件で行い、その後の 25 サイクルを変性 ; 91 °C / 1 分間、アニーリング ; 55 °C / 45 秒間、伸長 ; 72 °C / 1 分間の条件下で行った。

5' and 3' RACE: 5' RACE は、Niimi *et al.* (1996) の方法に従って行った。

1 本鎖 cDNA は poly(A)⁺ RNA をテンプレートに、22-mer の VAP-ペプチド特異的オリゴヌクレオチド、

5'-CGCACTAGTGGGACCGGGTGGGA-3' (③ in Fig. 2)

をプライマーに用い合成した。合成後、過剰量のプライマーは SUPRECTM-02 (Takara) による膜フィルターにより除去した。1 本鎖 cDNA は、3' 末端に dC を付加するため、まず 70℃ で 10 分間の処理で変性し、氷中で急冷した。その後、25 mM Tris 緩衝液 (pH 8.3)、37.5 mM KCl、1.5 mM MgCl₂ および 0.1 mM dCTP を含む 10 単位の terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT) で 5 分間、37℃ で処理した。5' RACE は、dC を添付した cDNA をテンプレートに 1 μM の VAP-ペプチド特異的プライマー

5'-CCACGGCCGTGTGAGCCACGAC-3' (④ in Fig. 2)、0.1 μM の dG-付加した T7 プライマー (Niimi *et al.*, 1996) を用いて PCR を行った。PCR 反応後、反応液の一部を分取し、プライマー ④ 及び 1 μM の T7 プライマー

5'-TAATACGACTCACTATAGGG-3'

を用いて再度 PCR を行った。反応条件は、RT-PCR と同様である。

3' RACE は、dT-付加 T7 プライマー

5'-T15-TAATACGACTCACTATAGGG-3' を用い 1 本鎖 cDNA を合成した (Frohman *et al.*, 1988)。PCR 反応は、1 μM の VAP-ペプチド特異的プライマー

5'-GTCGTGGCTCACACGGCCGTGG-3' (⑤ in Fig. 2) と 1 μM dT-付加 T7 プライマーを用い RT-PCR と同様の条件下で行った。ただし、15 サイクルの PCR 反応を行った後、SUPRECTM-02 を用いてプライマーを除去し、1 μM の VAP-ペプチド特異的プライマー

5'-TCCACCCGGTCCCCTAGTGCG-3' (⑥ in Fig. 1) と 1 μM の T7 プライマー

を用い再度 PCR を行った。

PCR 産物は、3% Nusieve (3:1) アガロースゲル電気泳動により精製して、ダイレクトシーケンシング用のテンプレートとするか、またはサブクローニングのインサートとして用いた。

サザンブロット分析: RT-PCR 産物は、3 % Nusieve (3:1) アガロース電気泳動で分離した後、常法に従い Hybond-N⁺ 膜 (Amersham) に転写した。転写膜は、[α -³²P] dCTP で末端標識されたオリゴヌクレオチドプローブ、5'-GCIGCICA(T/C)GTIGTICA(T/C)ACIGCICC-3' (⑦ in Fig. 2) でハイブリダイゼーションを行った。Sambrook *et al.* (1989) の方法に従い転写膜を洗浄し、放射活性を image analyzer (BAS 2000, Fuji Photo Film) で測定した。

塩基配列の決定: ゲル精製した PCR 産物を、Bluescript KS (+) プラスミド (Stratagene) の *EcoRV* サイトに導入し、クローニングした。陽性クローンを色選抜し、ABI シークエンシングキット (Applied Biosystems) を用いた dideoxynucleotide chain-termination 法 (Sanger *et al.*, 1977) により塩基配列を決定した。得られた塩基配列は、Gene bank data base を用いて相同性検索を行った。

3. 大腸菌の発現ベクターを用いた VAP-ペプチドの大量生産

成熟型の VAP-ペプチドをコードする 207 bp の DNA 断片を RT-PCR 法を用いて増幅した。リバースプライマーの末端には、*HindIII* 認識配列を付加した。PCR 産物は、シーケンスを確認した後、*HindIII* で消化し、発現ベクターである pMAL-c2 発現ベクター (NEB) に常法に従い *XmnI* - *HindIII* サイトに挿入した。組換え体プラスミドは、*Escherichia coli* TB 1 (NEB) に導入し、タンパク発現は、isopropyl-B-D-thiogalactopyranoside (IPTG) で誘導した。発現した VAP-ペプチドとマルトース結合タンパク (maltose binding protein; MBP) の

融合タンパクは、凍結融解、リゾチーム処理、超音波処理およびアミロースカラム (NEB) を用いたアフィニティークロマトグラフィーにより抽出、精製し、得られた精製融合タンパクは、6M 塩酸グアニジンにより変性し、透析した後、Factor Xa endoprotease (NEB) を用いて VAP-ペプチドと MBP とに切断した。断片ペプチドをブタノール / 水分配することにより、VAP-ペプチドをブタノール層に回収した。

ブタノール抽出物は、TSK-GEL octadecyl 4PW カラム を用いた逆相 HPLC (RP-HPLC) で精製した (Imai *et al.*, 1996)。その結果、3本の主要なピークを得た。各々のピークを TSK GEL G2000SW column (Tosoh) を用いた high performance size-exclusion chromatography (HP-SEC) で再分離した。これらのペプチドの N 末端アミノ酸配列は、PSQ-1 sequencer (Shimadzu) を用いて決定した。C 末端アミノ酸配列は、ペプチドを C-lysl-endopeptidase で消化した後 RP-HPLC で分離した後、決定した。

4. VAP-ペプチドの休眠卵誘導活性の生物検定

種々の濃度の rVAP-ペプチドを多化性系統 (非休眠性) の N4 の蛹化 3.5 日の雌に注射した。一部の実験区においては、rVAP-ペプチドおよび rVAP-ペプチド断片を化学的に合成した休眠ホルモン (DH) (Imai *et al.*, 1991; Saito *et al.*, 1994) と混合して注射した。注射した個体は、25℃ で保護し、成虫羽化後 3 時間以上交尾して産卵させた。休眠卵誘導活性は、非休眠卵が孵化した後、休眠卵数と非休眠卵数を求め、その休眠卵の割合から判定した (Yamashita and Hasegawa, 1985; Imai *et al.*, 1991)。

実験結果

1. cDNA クローニングおよび塩基配列とアミノ酸配列の決定

Imai *et al.* (1996) により既に決定された VAP-ペプチドの部分アミノ酸配列をもとに合成したプライマーを用いて RT-PCR を行い、120 bp の PCR 産物を得た。この PCR 産物はサザンハイブリダイゼーションの結果、プローブ⑦とハイブリダイズした (Fig. 1)。そこでこの PCR 産物をシーケンシングした結果、推定されるアミノ酸配列はカイコ成虫頭部から単離されたペプチドの配列の一部と一致した (Imai *et al.*, 1996)。このことは、得られた PCR 産物が VAP-ペプチド cDNA の一部であることを示している。cDNA の全長をクローニングするため、得られた PCR 産物の塩基配列をもとに 4 本のプライマーを合成し 5' および 3' RACE を行った。5' RACE により、235 bp の PCR 産物を得、3' RACE により 240 bp の PCR 産物を得た。得られた塩基配列および推定されるアミノ酸配列を Fig. 2 に示した。本 cDNA は 366 ヌクレオチドで構成され、そのうち 252 bp で翻訳領域、63 bp で 5' 非翻訳領域、そして 51 bp で 3' 非翻訳領域が構成されていた。poly(A)⁺ tail 付加認識配列は、326-331 と 330-335 の 2 カ所に認められた。推定された 84 残基から成るアミノ酸配列は、精製された VAP-ペプチドのエドマン分解によって決定された Gly-17 から Val-71 までの配列と完全に一致した。シグナル配列切断部位は、Ala-16 と Gly-17 の間であると予測され (Von Heijne, 1986)、N 末端の 16 アミノ酸残基はシグナルペプチドとして放出されると考えられた。精製された VAP-ペプチドの N 末端は Gly であることから、成熟型 VAP-ペプチドは、Gly-17 から His-84 までの 68 個のアミノ酸残基によって構成されていると考えられた。

VAP-ペプチドは、Val、Ala、Pro、His および Ile に富んでおり、全アミノ酸残基の 84.52 % を占めていた (Fig. 3)。また疎水性領域解析によって、分子

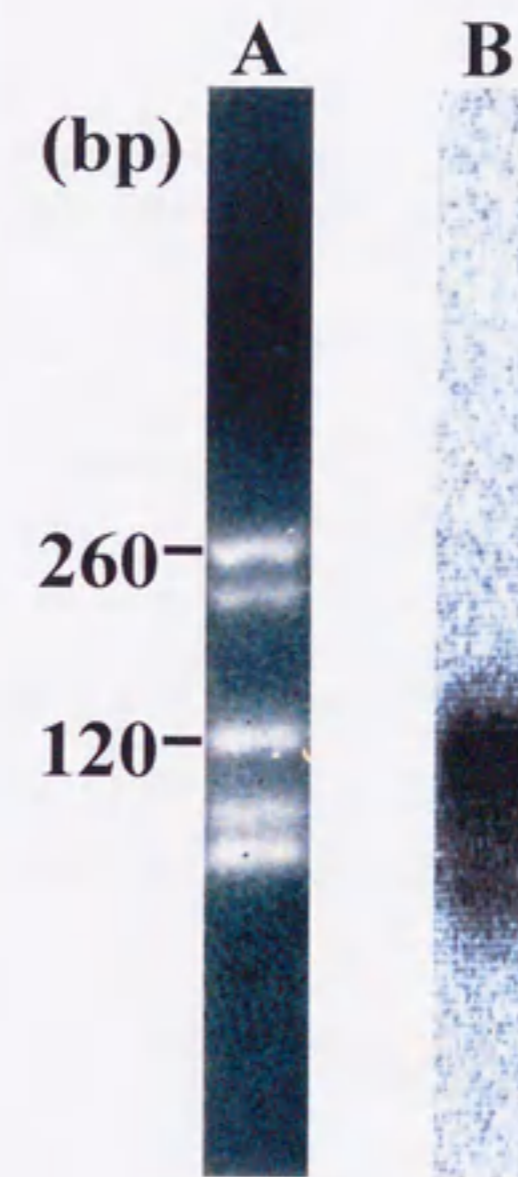


FIGURE 1. Analysis of RT-PCR products by agarose gel electrophoresis (A) and Southern blot hybridization (B).


```

+1 AAAAAACACAGCACTTAGCTCATCGGCAGAACACATCTAGTTTGTATTGAAAGACCGCAA 63
   ATG TTC AAG TTG ACA GTA ATT TTC GCT ATT ATC GCT GTG GCC CAA GCG 111
+1 M F K L T V I F A I I A V A Q A 16

   GGC GTC ATA GCC CCA GTG GTG CCT GTA GCA CAC CCC GTC GTG GCT CAC 159
   G V I A P V V P V A H P V V A H 32
   ACG GCC GTG GTC CAC CCG GTC CCA CTA GTG CGC GCT GCC CAC GTG GTT 207
   T A V V H P V P L V R A A H V V 48
   CAC ACC GCC CCA GTG GTT GCC GCT GCC CCA GTG GTC GCC GCT CCG GTG 255
   H T A P V V A A A P V V A A P V 64
   GTG GCT GCG GCT CCT ATC GTG CCG ATA GTT AAA CAT GCG CCA ATT ATC 303
   V A A A P I V P I V K H A P I I 80
   GCT GTC CAT CAT TAA TTGTAGAAATAAATAAATATATTTTTAAAAAAAAAAAAAAAA 361
   A V H H * 84
   AAAAA 366

```

FIGURE 2. Nucleotide and deduced amino acid sequence of cDNA encoding the VAP-peptide. Arrows with arabic number in circles correspond to sequences which were used for preparation of primers and probes for RT-PCR and RACE. The presumed polyadenylation signal sequence is shown by underline. The signal sequence is shown by blue letters.

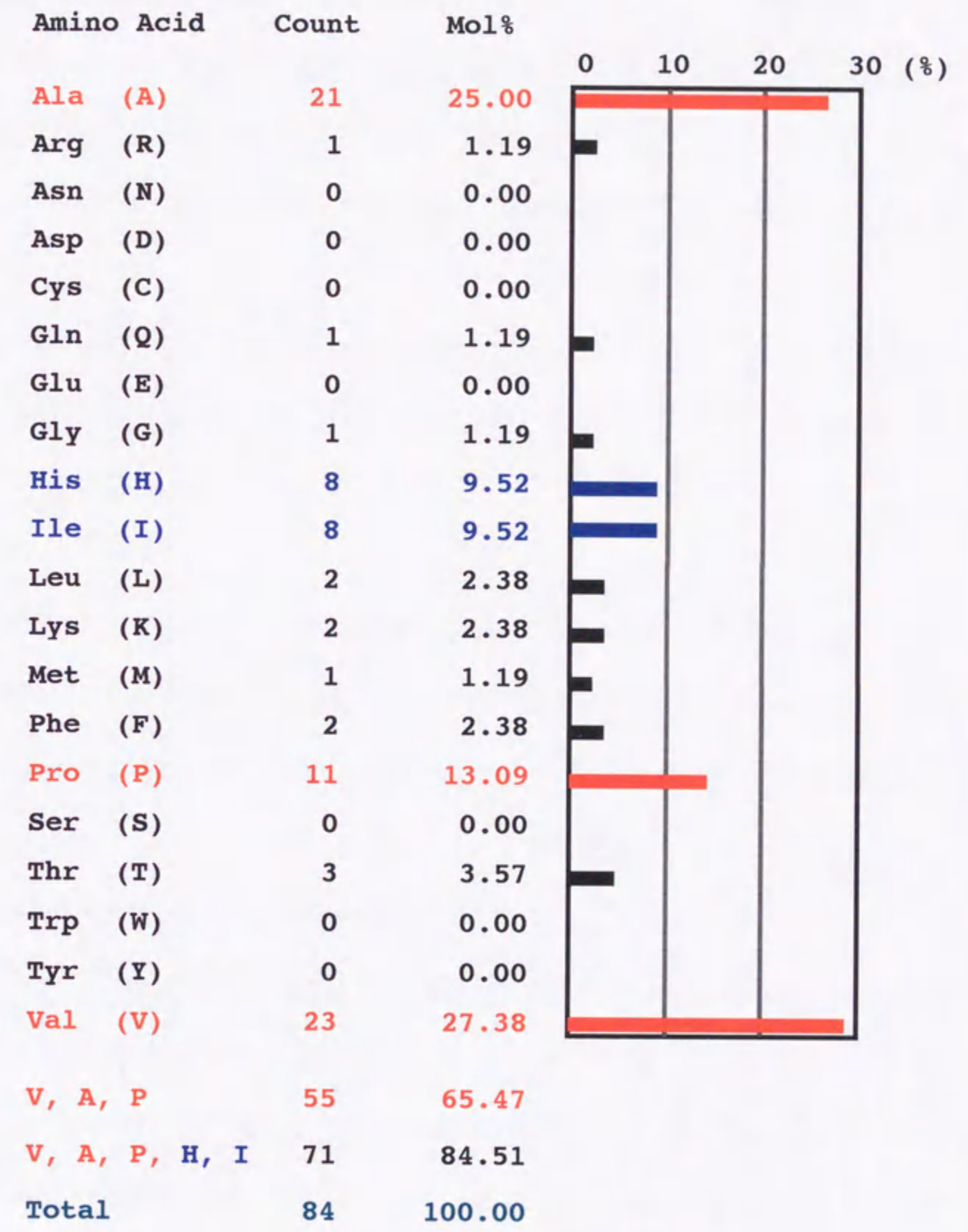


FIGURE 3. Amino acid composition of VAP-peptide and the relative abundance.

全体にわたり疎水性領域が分布していることが明らかとなった (Fig. 4A)。等電点は、pH 11.67 と推定され、高いアルカリ性を持つことが分かった (Fig. 4B)。アミノ酸配列中には、多くの繰り返し配列が存在し、トリペプチド単位として PVV、VAA、AAP、VAH、HPV、HTA 及び VVH、テトラペプチド単位として APVV 及び PVVA、そしてオクタペプチド単位として APVVAAAP が存在していた。これらの繰り返し配列は、C 末端の 15 残基を除いて分子全体に存在していた。

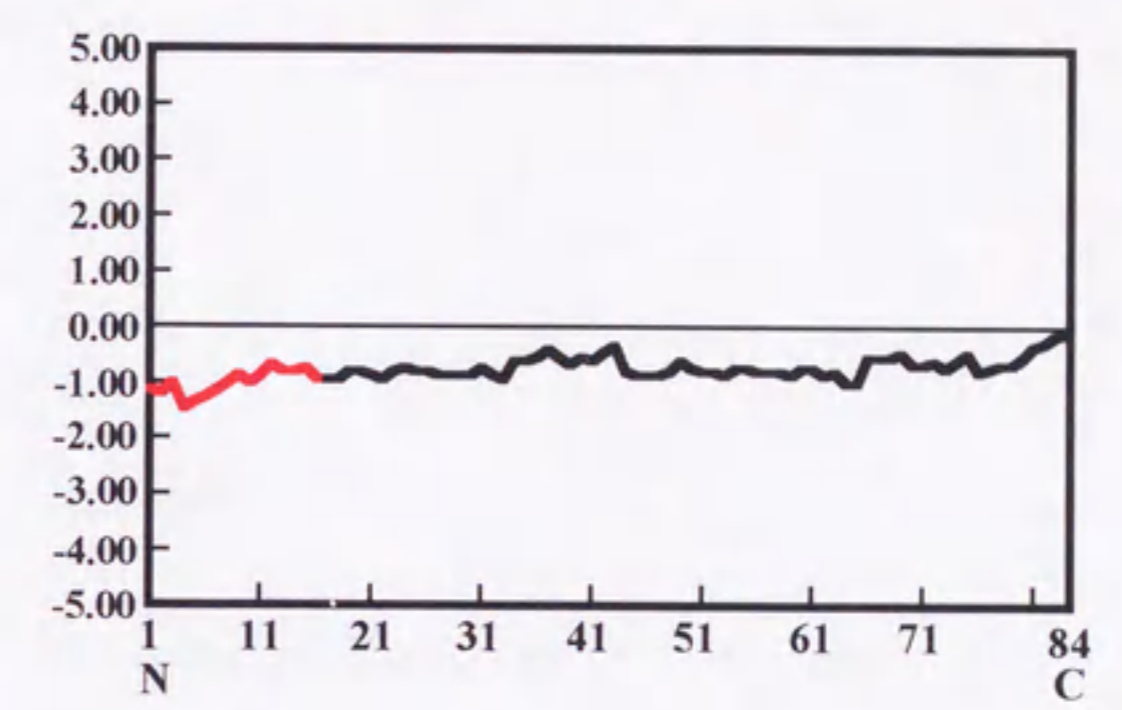
Gene Bank data base の分析の結果、分子全体にわたり高い相同性を持つタンパクは見つからなかった。この結果により、VAP-ペプチドは全く新規のペプチドであると結論された。

2. VAP-ペプチド発現ベクターの構築および VAP-ペプチドの生産

VAP-ペプチドと MBP の融合タンパクを大腸菌の発現ベクターを用いて発現させ、VAP-ペプチドを含む抽出物をブタノール分配により得た。この抽出物を逆相 HPLC 分析した結果、3本の主要なピークが認められた。各々のピークを HP-SEC で再分離した結果、保持時間 27分 (Rt 27 ペプチド)、30分 (Rt 30 ペプチド) ならびに 33分 (Rt 33 ペプチド) の単一なペプチドとして回収された。これらのペプチドの N 末端アミノ酸配列は、Rt 27 ペプチドおよび Rt 33 ペプチドが成熟型 VAP-ペプチドと一致し、Rt 30 ペプチドでは Ala-Ala-His-Val-Val であった。C 末端アミノ酸配列は、Rt 27 ペプチドの 9 アミノ酸残基が成熟型 VAP-ペプチドと一致した。天然物の溶出時間が Rt 27 であり、Rt 27 ペプチドと一致することから Rt 27 ペプチドは成熟型 VAP-ペプチドと同定された (Fig. 5)。また、Rt 30 ペプチドは、成熟型 VAP-ペプチドの 28 位の Ala から C 末端の His までの 41 残基からなる成熟型 VAP-ペプチドの断片ペプチドであると分かった (VAP-ペプチド₂₈₋₆₈)。そして、Rt 33 ペプチドは成熟型 VAP-ペプチドの N 末

The left page of the document contains several paragraphs of text, which are mostly illegible due to blurring. The text appears to be a continuation of a scientific or technical report, likely related to the characterization of VAP-peptide discussed on the right page.

A



B

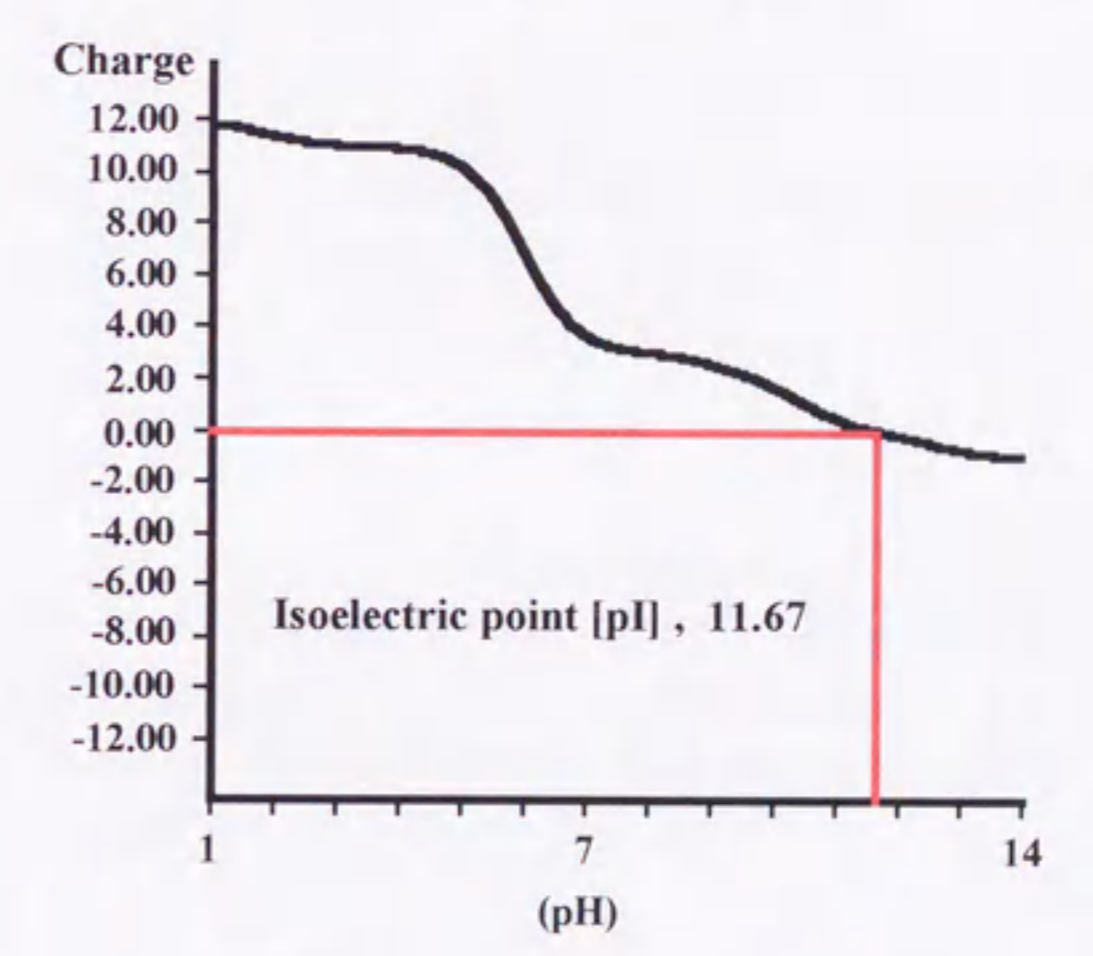
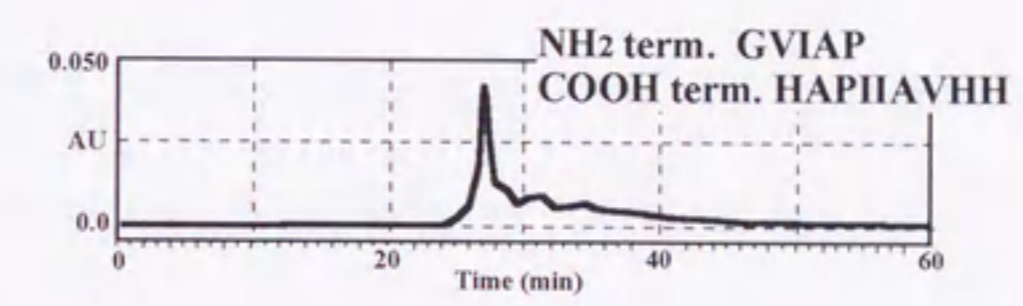


FIGURE 4. Characterization of VAP-peptide. (A) Hydropathy plot of the VAP-peptide. Hydropathy was calculated according to Hopp and Woods using the DNAsis software (Hitachi). The signal sequence is shown by red color line. N and C indicates the NH₂ terminal and COOH terminal of VAP-peptide, respectively. Positive values represent hydrophilic regions. (B) Isoelectric point determination.

A



B

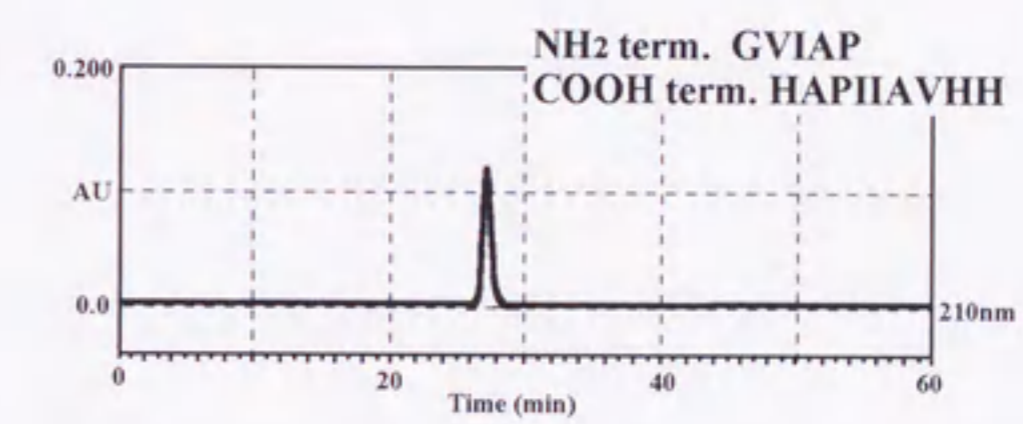


FIGURE 5. The analytical HP-SEC profile of the natural VAP-peptide and the recombinant VAP-peptide (Rt 27 peptide). The purified natural VAP-peptide (A) and the recombinant VAP-peptide (B) separated by the RP-HPLC were analyzed by an HP-SEC. The amino acid sequences of NH₂ and COOH terminal of these VAP-peptides were added.

端 27 残基からなる断片ペプチドであると分かった (VAP-ペプチド₁₋₂₇)。つまりこの断片ペプチドは、成熟型 VAP-ペプチドの 27 位の Arg で切断された分解産物であった。

3. 休眠ホルモン活性に及ぼす VAP-ペプチドの作用

VAP-ペプチドは、カイコの雄成虫頭部の有機溶媒抽出物から休眠卵誘導活性を指標にして精製されて同定された (Imai *et al.*, 1996)。VAP-ペプチドが休眠卵誘導活性を有するか否かを調査するために、rVAP-ペプチドを N4 の蛹化 3.5 日に注射した。その結果、1 頭当たり 10 nmol の注射においても休眠卵は認められなかった (Fig. 6)。合成 DH の休眠卵誘導活性の ED₅₀ 値は、約 20 pmol/蛹であり、10 nmol はその約 500 倍にあたる (Ikeda *et al.*, 1993; Saito *et al.*, 1994)。このことは、VAP-ペプチドがペプチドホルモンとして休眠卵誘導をもたらす内分泌系に関与している可能性を否定した。

しかし、VAP-ペプチドは休眠卵誘導活性を持つペプチドとして単離されたものである (Imai *et al.*, 1996)。この事実は、VAP-ペプチドが休眠ホルモンとの相互作用を通して休眠卵誘導に間接的に作用している可能性を示唆している。この可能性を検討するために、種々の濃度の VAP-ペプチドと DH とを混合して注射する実験を行った (Fig. 6A)。まず対照実験区として DH のみを注射した場合、最大活性 (最大休眠卵率) は 100 pmol/蛹の投与量で約 60 % の休眠卵を示した。ED₅₀ 値は、40 pmol/蛹であり、作用閾値 (threshold dose value, TD 値) は 16 pmol/蛹であった。これらの結果は、Ikeda *et al.* (1993) ならびに Saito *et al.* (1994) の結果を確認した。次に VAP-ペプチドを DH に対しモル数で 32 倍量を DH に混合して注射した場合、最大活性は有意に上昇しなかったが、ED₅₀ 値は、2.24 pmol/蛹となり、DH 単独の場合に比べて 1 / 10 以下に減少した。同様に TD 値は、0.35 pmol/蛹となり DH 単独に比べて 1 / 50 以下に減少した。

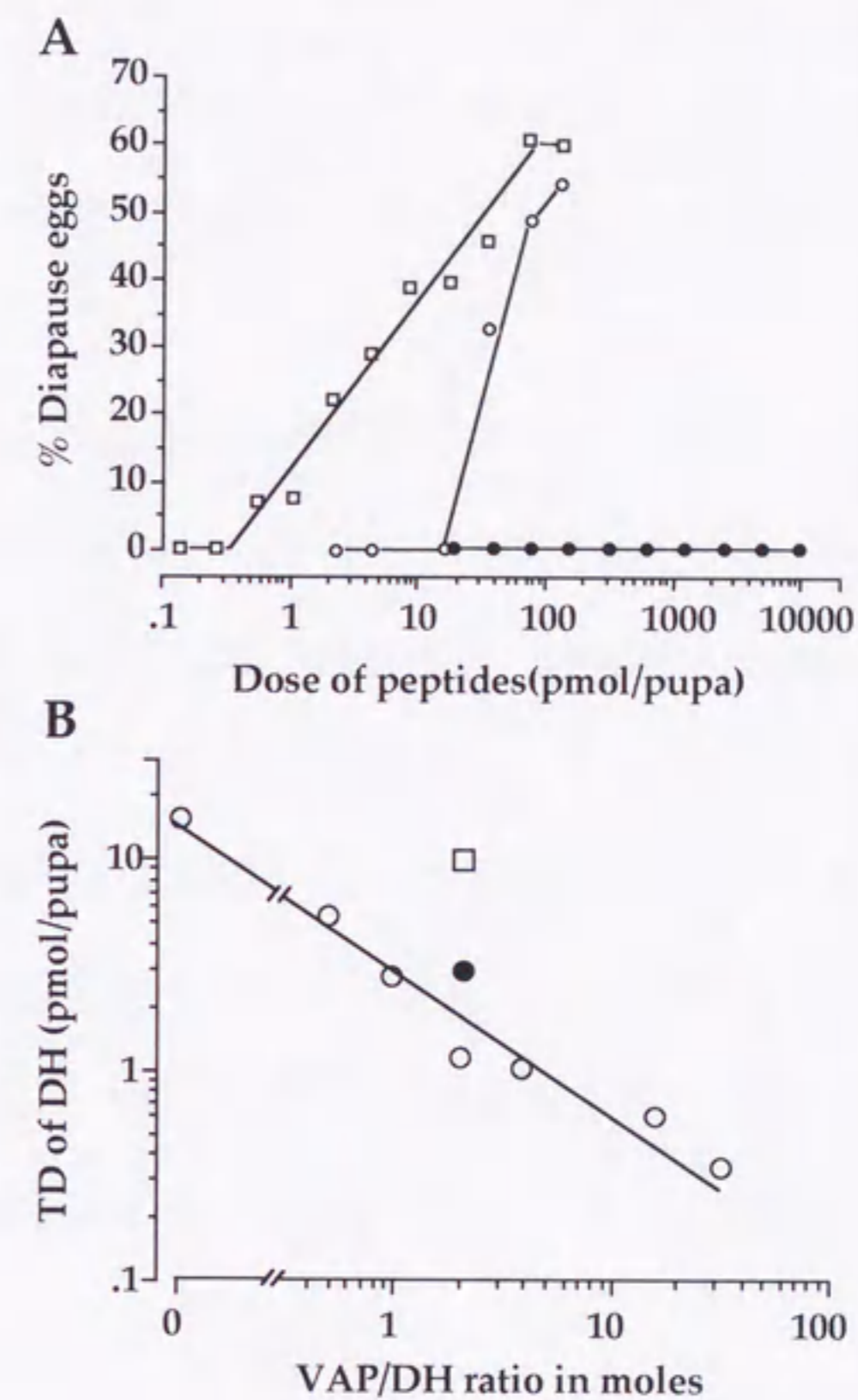


FIGURE 6. Effect of VAP-peptide on diapause egg inducing activity. A; The recombinant VAP-peptide (●) and the synthetic DH (○) were separately injected at the dose ranges indicated to determine diapause inducing activity. Since no biological activity was observed in VAP-peptide, the VAP-peptide mixed with DH at a molar ratio of 32 to 1 (□) was injected. Each point represents mean from 9 animals. B; A regression line obtained from a TD values as a function of molar ratios of VAP-peptide and DH in the mixture (○). The mixture of VAP-peptide1-27 (●) or VAP-peptide28-68 (□) with DH at a molar ratio of 2 : 1 was also included. Each point represents means from two separate experiments.

さらに、DH と VAP-ペプチドを種々のモル比で混合して注射した。投与した混合液のモル比と、得られた用量-作用曲線から算出された TD 値の関係を Fig. 6B. に示した。両者の間には直線的な相関があり、DH に対する VAP-ペプチドの混合割合が高くなるに伴い TD 値は減少した。以上の結果から、VAP-ペプチドは、DH の休眠卵誘導活性を増強する協力剤としての機能があるペプチドと結論した。

rVAP-ペプチドの精製過程で得られた 2 種類の VAP-ペプチド断片 (VAP-ペプチド₂₈₋₆₈ および VAP-ペプチド₁₋₂₇) についても同様に DH と混合して投与し、DH 活性増強作用を示す VAP-ペプチドの活性部位を検索した。VAP-ペプチド断片を DH に対してモル比で 2 倍量混合して投与したところ (Fig. 6B)、VAP-ペプチド₂₈₋₆₈ は DH 活性に影響を与えず、ED₅₀ 値 および TD 値は DH 単独注射の値に近似していた。しかし、VAP-ペプチド₁₋₂₇ の場合には ED₅₀ 値と TD 値は明らかに減少し、VAP-ペプチドで得られた、減少値に匹敵していた。この結果から、VAP-ペプチドの活性部位は VAP-ペプチドの N 末端側に存在することが示唆された。

考察

VAP-ペプチドをコードする cDNA のクローニングおよびシーケンシングを行い、VAP-ペプチド cDNA は 84 個のアミノ酸残基から成る前駆体タンパクをコードしている事を明らかにした。そして前駆体タンパクの N 末端 16 アミノ酸残基から成るシグナルペプチドが切断遊離されて、68 アミノ酸残基から成る成熟型 VAP-ペプチドが生成されると考えられた (Fig. 2)。VAP-ペプチド前駆体は、10 種類のアミノ酸で構成される 8.4 kDa のペプチドであり、Val、Ala、Pro、His および Ile が、全アミノ酸の 84.51 % を占める極めて疎水性の高いペプチドであった (Figs. 2, 3)。

VAP-ペプチドは、カイコ成虫雄頭部から休眠卵誘導活性を指標に精製されたことから、DH の類縁体である可能性が考えられた。DH は 24 個のアミノ酸で構成されるペプチドであり、C 末端の 5 個のアミノ酸から成るペプチドアミド (FGPRL-NH₂) を生物活性中心構造としてもっている (Saito *et al.*, 1994; Yamashita, 1996)。しかし、VAP-ペプチドは、DH の C 末端に見られる活性中心構造はおろか、DH 分子全体に対する相同配列も全く認められなかった。この結果から、VAP-ペプチドは DH の構造類縁体ではないと結論された。

Drosophila の calphotin や数種のクチクラタンパクは、Ala、Pro および Val に富む。calphotin は Pro に富む領域を介してカルシウムイオンと結合し、細胞内の情報伝達に関与することが知られている (Ballinger *et al.*, 1993; Martin *et al.*, 1993)。クチクラタンパクの Ala-Ala-Pro-Val 繰り返し配列は、ポリペプチド鎖の折り畳みに関与していると考えられている (Andersen *et al.*, 1995)。VAP-ペプチドはこれらタンパクに対しても相同配列を持たない。このことは、VAP-ペプチドが構造および生理機能において全く新規なペプチドであることを示している。

それでは何故 VAP-ペプチドは休眠卵誘導活性を持つタンパクとして精製されたのだろうか。この疑問に答えるため 2 つの可能性を検討した。第 1 番目は、VAP-ペプチド自身が DH と異なる機構で休眠卵誘導活性を保持している可能性である。第 2 番目は、VAP-ペプチドの抽出および精製過程で DH が混入した可能性である。第 1 番目の可能性は、VAP-ペプチドを単独で注射して休眠卵誘導活性を調査することにより、第 2 番目は、VAP-ペプチドと DH を混合して注射して休眠卵誘導活性を調査することにより検討した。VAP-ペプチドの単独注射では、10 nmole/蛹という極端に高い量によっても全く休眠卵は誘導されなかった。このことは、VAP-ペプチドの精製過程で見られた休眠卵誘導活性は、VAP-ペプチド自身に由来するものではなく、DH あるいはその類縁体との相互作用の結果によるものであることを推定させた。VAP-ペプチドは、DH と混合して注射することによって、確かに DH 活性の ED₅₀ 値と TD 値を低下させ、DH 活性増強作用を示した (Fig. 6)。この結果から、精製過程の VAP-ペプチド標品に微量に混入していた DH が VAP-ペプチドと相互作用することにより、休眠卵誘導活性を発現したものと推定された。しかし、精製 VAP-ペプチド標品においては、HPLC での溶出パターンやペプチドのアミノ酸配列決定の結果からは、明らかな不純物の混入は確認できなかった (Imai *et al.*, 1996)。

もし VAP-ペプチドが DH へ結合することにより、血中での DH の分解を抑えているならば、VAP-ペプチドを混合して注射することにより DH の最大活性は上昇するはずである。本研究において、最大活性が変化しなかったことは、VAP-ペプチドの作用は、血中における DH の保護ではなく、他の機構を介して行われていると推測させる。一般的に、ホルモン作用における ED₅₀ 値および TD 値の低下は、ホルモンの受容体タンパクへの親和性が上昇した結果と考えられている (Hruby, 1984)。実際、数種のホルモンにおいては、その立体構造の改造や構造修飾をすることによってキャリアタンパクや受容体タンパクへの結合親和性

が大きく変化する事が知られている (Saito *et al.*, 1994)。これらの事実から、VAP-ペプチドは、DH の受容体との相互作用を介して増強作用を発現するものと考えられた。DH 作用に対する VAP-ペプチドの増強作用は、1:1 のモル比で飽和せず、VAP-ペプチドの比率を 1 以上に増すことによって、さらに上昇した (Fig. 6)。このことから両分子間の相互作用は、DH 1 分子に複数の VAP-ペプチドが直接的あるいは間接的に結合することによって発現されていると推測した。

VAP-ペプチドの DH 活性増強作用は、VAP-ペプチドの N 末端の 27 アミノ酸残基から成る断片ペプチドで認められた (Fig. 6B)。このことは、VAP-ペプチドの DH 活性増強作用が VAP-ペプチドの部分構造によるものであることを示しており、この部分構造と類似した構造を持つタンパクによっても DH 活性増強作用が引き起こされる可能性を示唆している。しかし、本研究においては、DH 受容体に対する VAP-ペプチドの結合特性に関する知見は得られていない。

いずれにせよ、本結果は、昆虫において初めて、神経ペプチドの生物活性を修飾する生体由来のペプチドの存在を証明したものである。VAP-ペプチドが生体内において、この作用を発現しているか否かは不明であるが、たとえ実験的な投与条件でのみの作用であるとしても、VAP-ペプチドやその断片ペプチドは、卵休眠誘導剤としての DH の強力な協力剤としての利用が考えられる。

摘要

1. VAP-ペプチドをコードする cDNA のクローニングおよびシーケンシングを行った。その結果、VAP-ペプチド cDNA は 84 個のアミノ酸残基から成る前駆体タンパクをコードし、68 アミノ酸残基から成る成熟型 VAP-ペプチドを生成すると考えられた。VAP-ペプチド前駆体は、10 種類のアミノ酸で構成され、Val、Ala、Pro、His および Ile が全アミノ酸の 84.51% を占める極めて疎水性の高いペプチドであった。分子全体にわたり高い相同性を持つタンパクは認められないことから、VAP-ペプチドは全く新規のペプチドであることが分かった。

2. 大腸菌の発現ベクターを用いて VAP-ペプチドを大量に生産し、VAP-ペプチドが休眠卵誘導活性を有するか否かを調査した。VAP-ペプチドを単独で注射した場合、休眠卵は認められず、精製過程に見られた休眠卵誘導活性は VAP-ペプチド自身に由来するものではない事が分かった。種々の混合比で VAP-ペプチドと DH とを混合して注射した場合、DH の最大活性は有意に上昇しなかったが、ED₅₀ 値および TD 値は減少した。以上の結果から、VAP-ペプチドは、DH の休眠卵誘導活性を増強する協力剤としての作用を持つペプチドであることが分かった。2 種類の VAP-ペプチド断片についても同様に DH と混合して注射し、DH 活性増強作用を示す VAP-ペプチドの活性部位を検索した結果、VAP-ペプチドの活性部位は N 末端側に存在することが分かった。

第3章 VAP-ペプチド遺伝子の 発現およびタンパク蓄積の 発育変動および組織、細胞局在性

第2章において、VAP-ペプチドはカイコにおいて発見された新規のペプチドであり、DHの協力剤としての機能を持つことを明らかにした。しかしこのVAP-ペプチドのDH活性増強作用が、VAP-ペプチドの本来の生理機能であるか否かについては未検討の課題として残された。そこで本章では、VAP-ペプチドの生体内での機能を確定することを目的に研究を行った。

化学的に同定された新規なタンパクの生理学的な機能は、構造の類縁関係や、そのタンパクが抽出された生物材料等から推定されるのが一般的である。しかしVAP-ペプチドは成虫の頭部という複雑な生物材料に由来し、しかも既知のタンパクとの間に一次構造の相同性が認められないので、これらの情報からVAP-ペプチドの生理機能を推定することはできない。したがってVAP-ペプチドの生体内での合成、蓄積あるいは消失といった動態を昆虫個体の既知の生物学的な機能や現象と対比して推定することが、VAP-ペプチドの生理機能を解明するための第一歩となると考えられる。

そこで本章では、VAP-ペプチド遺伝子の発現様式をノーザンブロット法と*in situ*ハイブリダイゼーション法で、VAP-ペプチドの蓄積様式をウエスタンブロット法で調査した。その際、頭部における遺伝子発現様式、および各体躯と血中におけるタンパク蓄積様式を調査することにより、生体内においてVAP-ペプチドがDH活性増強作用を発現する可能性を検討した。また、遺伝子発現様式およびタンパク蓄積様式を詳細に調査することにより内在性VAP-ペプチドの生理

機能を推定した。VAP-ペプチド遺伝子は、成虫羽化時に硬化した外骨格が発達した器官および組織の真皮細胞で発現し、その発現産物は、クチクラ層へ分泌されて、そこで蓄積されることが分かった。このことから、VAP-ペプチドは、成虫の運動機能を保証するために外骨格に物理的強靭さを与える構造強化ペプチドであると推測された。

材料と方法

1. 実験動物

休眠性の大造を用い、前章と同様の条件で飼育した。

2. 組織の調製

各種組織、器官を発育経過を追って調製した。頭部は、1 齢幼虫孵化当日から成虫羽化 4 日後まで毎日集めた。一部の実験では、5 齢脱皮の 24 時間前から脱皮後 48 時間まで 4 時間おきに集めた。翅と胸部の皮膚は、蛹化当日から成虫 2 日まで毎日集めた。成虫においては、頭部、胸部および腹部から Fig. 9 に示した各組織、器官を採集した。また、羽化当日の成虫の胸部から集めた皮膚を、濾紙上で擦り付けピンセットを用いて丁寧に真皮細胞層を取り除き、外皮(クチクラ層)を残し、外皮標品とした。羽化当日の成虫の血液も採集した。

3. ノーザンプロット分析

組織の磨砕物を酸性グアニジン法 (Chomzynski and Sacchi, 1987) で処理し、全 RNA を抽出した。全 RNA は 6% ホルムアルデヒドを含む 1.2% アガロースゲルで電気泳動を行い、Hybond-N⁺ 膜 (Amersham) に転写した。ハイブリダイゼーション用のプローブには、VAP-ペプチド cDNA の ORF 領域をコードする 255 bp の PCR 産物をランダムプライム DNA ラベリングキット (Boehringer Mannheim) によって [α -³²P] dCTP を標識したものをを用いた。ハイブリダイゼーションは、ハイブリダイゼーション溶液 (5x SSC、5x デンハルト試薬、0.1% SDS、100 μ g/ml サケ精子 DNA) 中で、68 $^{\circ}$ C で一晩行った。膜の洗浄は、0.1% SDS を含む 0.2 x SSC で 62 $^{\circ}$ C で 10 分間、3 回繰り返し行った。放射活性は、イメージングアナライザー (BAS 2000、Fuji Photo Film) で可視化して測定した。

測定結果は、すべて羽化当日の雄頭部に回収された放射活性を 100 % とした相対値で表した。

4. In situ ハイブリダイゼーション

Sato *et al.* (1994) の方法に準じて行った。ハイブリダイゼーション用のプローブは、ディゴキシゲニン (DIG) - 標識の dUTP (Boehringer Mannheim) の存在下で VAP-ペプチド cDNA の ORF 領域 255 bp を PCR により増幅したものをを用いた (Emanuel, 1991)。

目的とする組織は、0.75 % NaCl 中で摘出し、所定の固定液 (3.7% ホルムアルデヒド、2.5% グルタルアルデヒド、100 mM Hepes (pH 6.9)、2 mM MgSO₄、1 mM EGTA) を用いて 12 - 14 時間固定し、ME (90% メタノール、50 mM EGTA) に移した。その後、エタノール系列で脱水し、レモゾール (和光純薬) で透徹し、パラフィンで包埋した。8 μm 厚の連続切片を作製し、レモゾール及びエタノール系列により脱パラフィンし、再水和化した後、プロテアーゼ K を用いて脱タンパク処理した。再び 4 % パラホルムアルデヒドで固定した後、PBT で洗浄し、ハイブリダイゼーション液 (HS 液 ; 5x SSC、50% ホルムアミド、2% Boehringer ブロッキング試薬、100 mg/ml *Escherichia coli* tRNA、100 mg/ml サケ精子 DNA) 中で DIG - 標識プローブにより 45 °C で一晩ハイブリダイゼーションを進めた。37 °C の HS 液および PBT でプローブを洗い落とし、2 % BSA を含む PBT (B-PBT) で 2 時間ブロッキング反応を行った。その後、2000 倍に希釈したアルカリホスファターゼ標識抗 DIG ヤギ Fab 断片 (Boehringer Mannheim) を 4 °C で一晩反応させた後、切片を PBT で洗浄した。ハイブリダイゼーションしたシグナルは NBT および BCIP (Boehringer Mannheim) を用い発色した。なお対照プローブとして、pBluescript KS (+) プラスミド (Stratagene) のマルチクローニングサイトを PCR によって増幅した 197 bp の DNA 断片を使

用した。

5. ウェスタンブロット分析

VAP-ペプチドの粗抽出：まず、組織を、 -20°C に冷却した約 20 倍量のアセトンで磨砕した。得られたアセトン粉末を 200 mM NaCl、1 mM EDTA 及び 100 μM 4-amidinophenyl benzoate 塩酸塩を含む 10 mM トリス緩衝液 (pH 7.5) で洗浄し、水溶性タンパクを除いた。得られた抽出残渣を 8 M 尿素 (pH 7.5) で処理し、VAP-ペプチドを抽出した。この抽出液を n-ブタノールと分配し、VAP-ペプチドを n-ブタノール層に回収した。n-ブタノール層を凍結乾燥し、ウェスタンブロット分析のための VAP-ペプチドの粗抽出液とした。血液においては、5 倍量の 8 M 尿素 (pH 7.5) で処理し、処理液を等量の n-ブタノールと分配し n-ブタノール層を回収した。この n-ブタノール層を凍結乾燥し、ウェスタンブロット分析を行った。

抗 VAP-ペプチド抗体の作製：VAP-ペプチドの N 末端 20 アミノ酸残基を 4 分子のリジンに架橋した多抗原ペプチド (multiple antigenic peptide: MAP) (Posnett *et al.*, 1988; Tam, 1988) を化学的に合成した (Imai *et al.*, 1996)。この抗原ペプチドをウサギに免疫し抗血清を得、抗 VAP-ペプチド血清として用いた。

ウェスタンブロッティング：ペプチドは、トリシン SDS-PAGE (Schagger and von Jagow, 1987) により分離した。電気泳動後、PVDF 膜 (Immobilon-P, Millipore) に転写した。膜は 2% スキムミルクを含む PBT でブロッキングし、3000 倍に希釈した抗 VAP-ペプチド血清で一晩反応させた。反応後、膜を PBT で洗浄し、3000 倍に希釈したパーオキシダーゼ標識抗ウサギ IgG ヤギ血清で 2 時間反応させた。発色反応は、コニカイムノステイン HRP 1000 キット (Konica) を用いて行った。

6. キチンアフィニティークロマトグラフィー

Nakato *et al.* (1990) の方法を適用した。キチン (和光純薬) を酸とアルカリで順次洗浄し、カラム (10 mm x 10 mm) に詰めた。rVAP-ペプチドとしては、前章により調製したものをを用いた。1 μg の rVAP-ペプチドを、TBS で平衡化したカラムに繰り返し添加し、吸着したタンパクを TBS と 8 M 尿素で溶出した。溶出されたフラクション (500 μl) は、TBS で透析した後、ウエスタンブロット分析に供用した。

実験結果

1. VAP-ペプチド遺伝子の発現ならびに VAP-ペプチド蓄積の概観

VAP-ペプチドは雄成虫頭部から精製されたので、まず雄成虫頭部から抽出した RNA のノーザンプロット分析を試みた。放射能標識した VAP-ペプチド cDNA をプローブとして用いた場合、1本の陽性バンドが 0.6 kb 付近に検出された (Fig. 7)。この長さは cDNA から推定される値にほぼ一致していたので、このバンドが VAP-ペプチド mRNA のものであると考えられた。VAP-ペプチド遺伝子の発現時期を調査するため、後胚発生期を通して頭部から全 RNA を抽出し、ノーザンプロット法によって分析した (Fig. 8)。雌雄ともに蛹 - 成虫発育期中期までは主要な陽性シグナルは検出されなかった。VAP-ペプチド mRNA 濃度は、幼虫 - 蛹脱皮後 5 日から急激に上昇し、成虫羽化の前日に最大値に達した。その後雌雄とも急激に低下した。

羽化当日の成虫の各体躯における VAP-ペプチド mRNA 濃度を頭部、胸部、腹部に腑分けして比較した (Fig. 9)。雄成虫体において、最も強い陽性反応は胸部に見られ、その濃度は頭部の 4 倍に達していた。一方、腹部において VAP-ペプチド mRNA の濃度は、検出限界をわずかに上回るものであった。また、雌においても同様の結果が得られた。

後胚発生期を通しての VAP-ペプチド mRNA 濃度の変動を概観すると、VAP-ペプチドは成虫羽化前日および当日に集中的に蓄積されると結論される。しかし、詳細に検討すると 4 齢および 5 齢脱皮期においても若干の蓄積が観察された (Fig. 8)。この蓄積を確認するために、5 齢脱皮の 24 時間前から脱皮後 48 時間までの幼虫頭部を 4 時間間隔で集め、ノーザンプロット分析を行った (Fig. 10)。VAP-ペプチド mRNA 濃度は、脱皮 4 時間前から急激に上昇し、5 齢脱皮時にピークを示し、その mRNA 濃度は成虫羽化当日の頭部に相当していた。

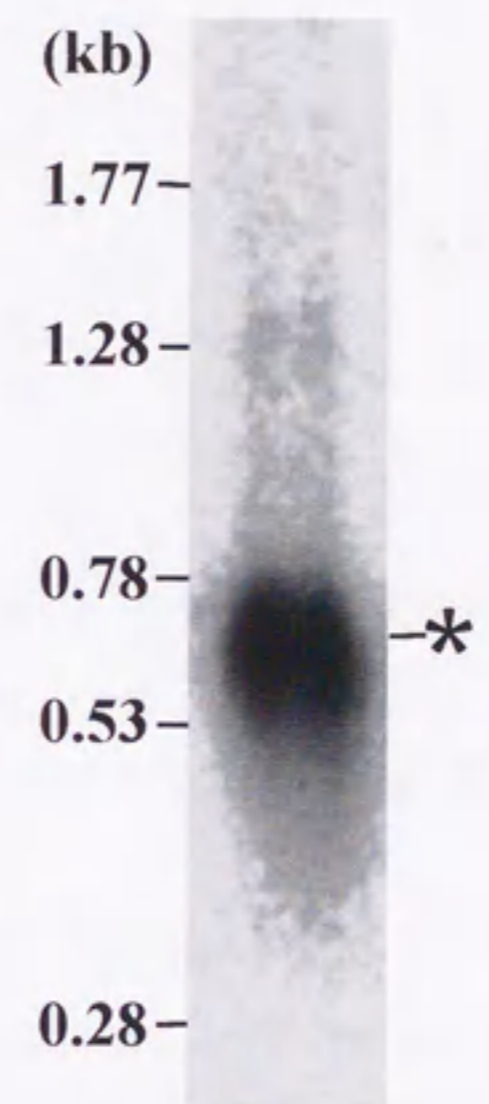


FIGURE 7. Northern blot analysis of the VAP-peptide mRNA isolated from day 0 male adult head. A positive signal was detected at 0.6kb (*).

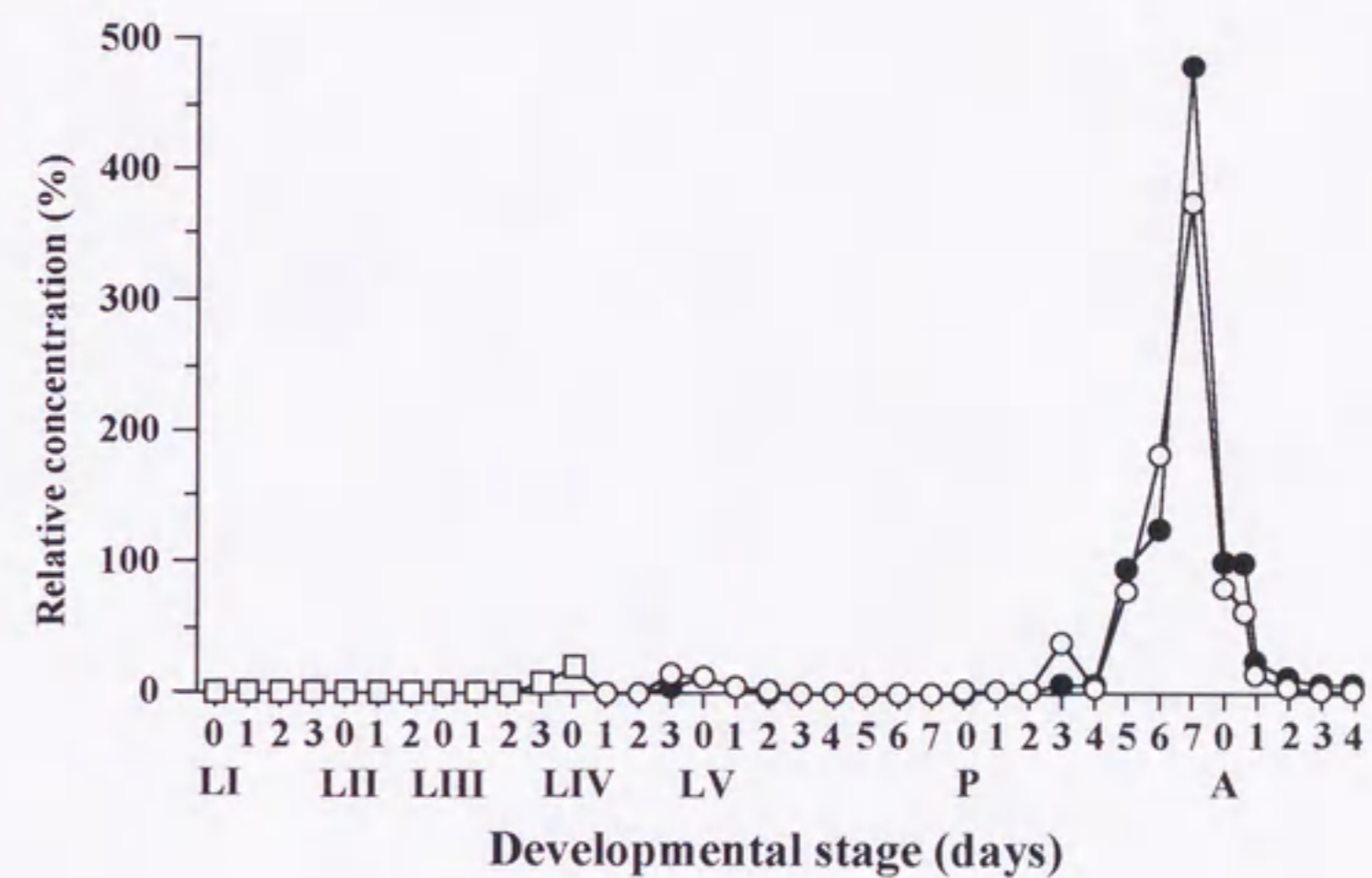


FIGURE 8. Changes in VAP-peptide mRNA concentration in the head throughout the post-embryonic development. Total RNA (20 μ g) prepared from heads at various stages was subjected to northern blot analysis, and then radioactivity of the band corresponding to VAP-peptide mRNA was quantified. Until the end of third larval instar, heads were collected as mixture of both sexes (\square), and from the fourth larval instar male heads (\bullet) and female heads (\circ) were separately collected. VAP-peptide mRNA concentration was expressed as percentages to that of day 0 male adult heads (100%). LI, LII, LIII, LIV, LV, P and A represent first, second, third, fourth and fifth larval instar, pupal-adult development, and adult stage, respectively. Each point represents means of two separate experiments.

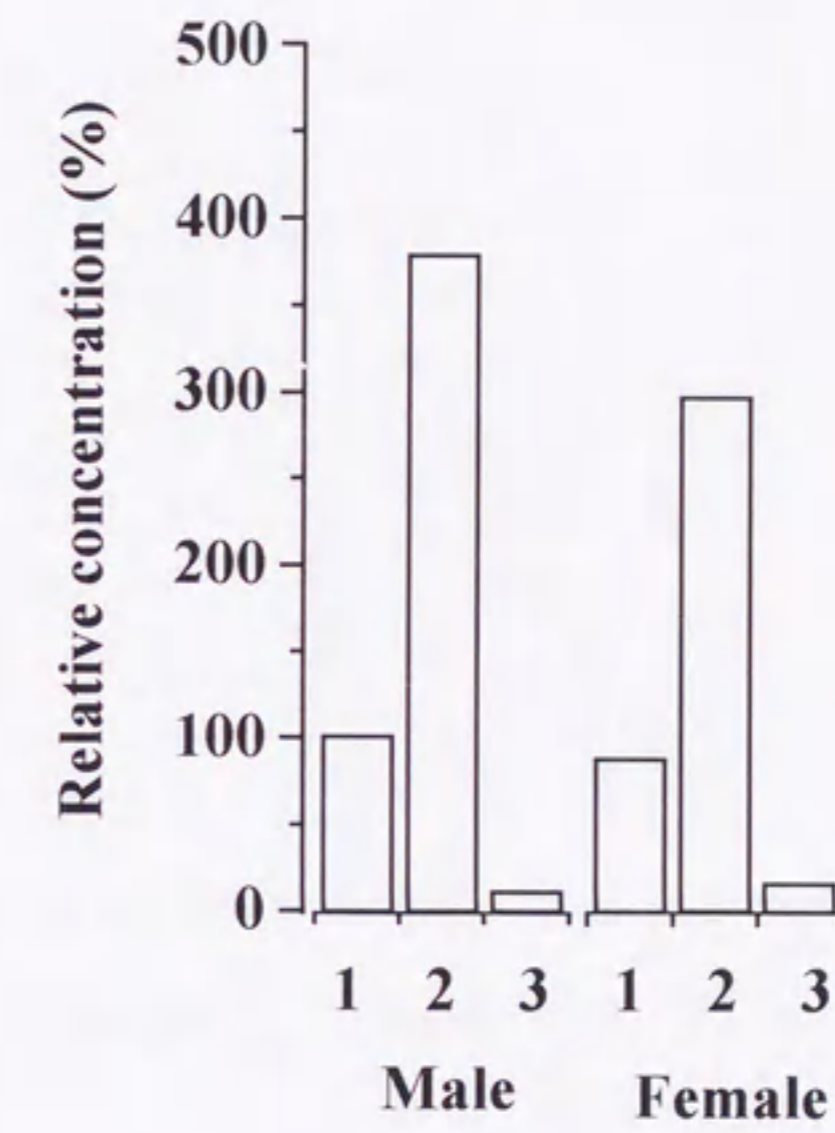


FIGURE 9. Distribution of VAP-peptide mRNA in the adult. Distribution in the head (1), the thorax (2) and the abdomen (3). Northern blot analysis was performed as in Fig. 7, and the results are shown as percentages to the VAP-peptide mRNA concentration of the day 0 male adult heads (100%). The value represents means of two separate experiments.

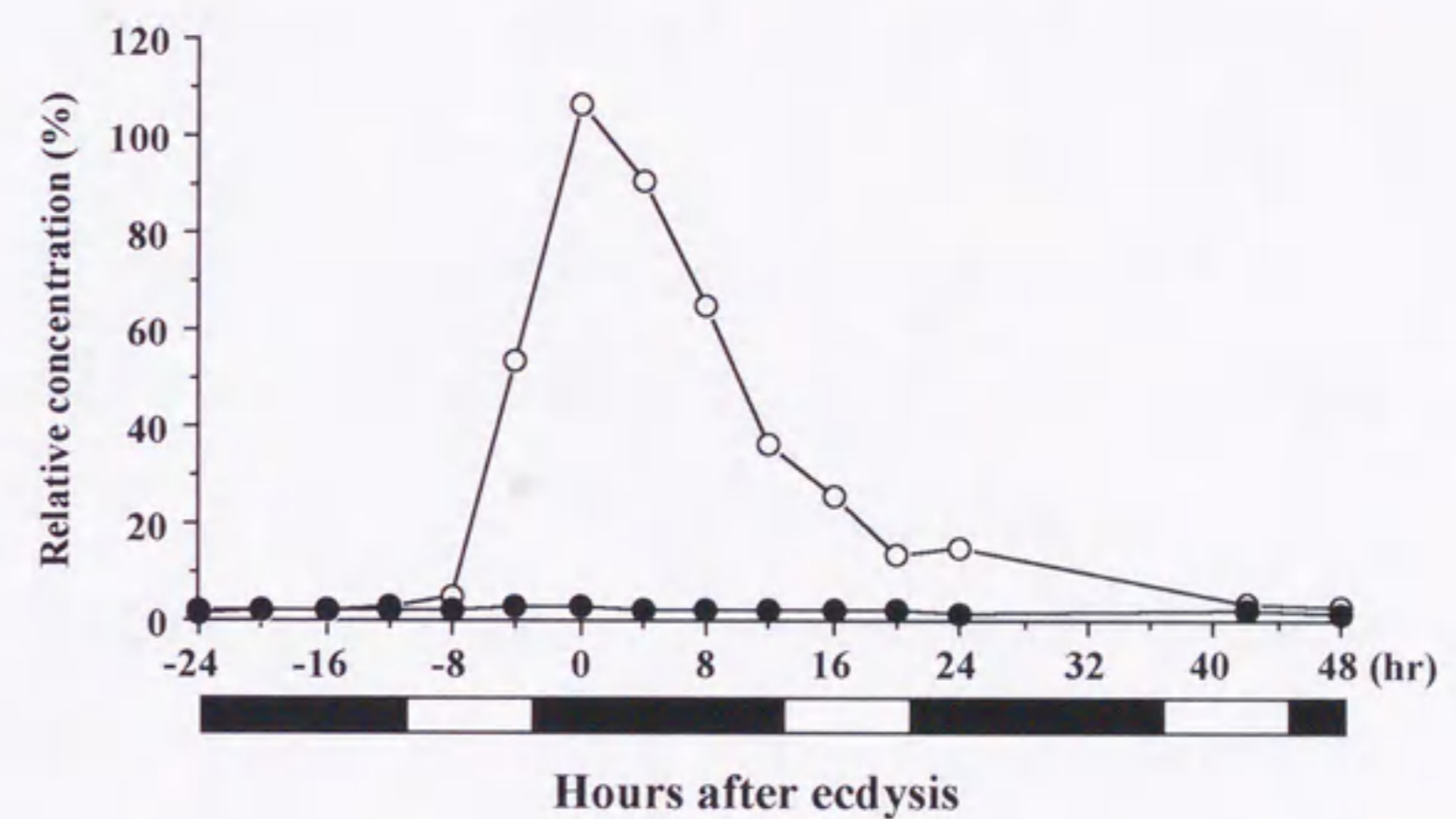


FIGURE 10. Changes in VAP-peptide mRNA concentration in the head during the fourth and the fifth larval instar. Total RNA(20 μ g) prepared from the head (○) and the remaining body (●) from -24 to 48 hr after the fifth instar ecdysis was subjected to northern blot analysis, and then radioactivity of the band corresponding to VAP-peptide mRNA was quantified. VAP-peptide mRNA concentration was expressed as percentages to that of day 0 male adult heads (100%). Each point represents means of two separate experiments. Open box and closed box indicate the photophase and scotophase, respectively. 0 hr, time of larval ecdysis.

その後 mRNA 濃度は脱皮後 24 時間までに速やかに減少した。また頭部以外の体
躯においては、有意な mRNA の蓄積は認められなかった (Fig. 10)。

頭部、胸部および腹部における VAP-ペプチドの蓄積状態を調査するた
めに、ウエスタンブロット分析を行った。本実験条件下では、マーカ―として用い
た rVAP-ペプチド (0.25 μ g/lane) は、6.7 kDa 付近に明確なバンドとして泳動
された (Fig. 11)。この VAP-ペプチドの 6.7 kDa のバンドは、頭部および胸部
の抽出物からも明確な 1 本のバンドとして検出された。単位組織重量当たりのバ
ンドの染色度は、胸部に比べ頭部で高かった。腹部の抽出物は、陽性バンドを
与えなかった。

また、血液においても同様に VAP-ペプチドを抽出してウエスタンブロッ
ト分析を試みた。成虫当日の血液 20 ml からの抽出物中には、分子量約 30 kDa
と 20 kDa の 2 本の陽性バンドが検出された (結果省略)。それぞれのタンパクの
N 末端アミノ酸配列を決定したところ、30 kDa のタンパクの配列は、
NH₂-ADSDVPNDILEEQLYNSVVV であり、カイコの血中 30 K タンパク
(19G1) (Sakai *et al.*, 1988) と同定された。20 kDa のタンパクの N 末端アミノ
酸配列は、NH₂-DAPDFFKDIEHHTKEF であり、未同定の新規のタンパクであ
ることが分かった。しかし、VAP-ペプチドに相当する陽性バンドは検出されな
かった (結果省略)。本実験条件下では、rVAP-ペプチドの検出限界が 30 ng であ
ることから成虫当日の VAP-ペプチドの血中濃度は 225 pM 以下であると推定さ
れた。

以上のノーザンブロットおよびウエスタンブロット分析は、VAP-ペプチド
遺伝子は成虫の頭部および胸部と脱皮期の幼虫頭部で優先的に発現し、その遺伝
子産物である VAP-ペプチドは成虫の頭部および胸部と脱皮期の幼虫頭部で蓄積
し、機能するペプチドであることを推察させた。また、血中においては VAP-ペ
プチドが検出されなかったことも、VAP-ペプチドがカイコの胚休眠誘導の内分
泌

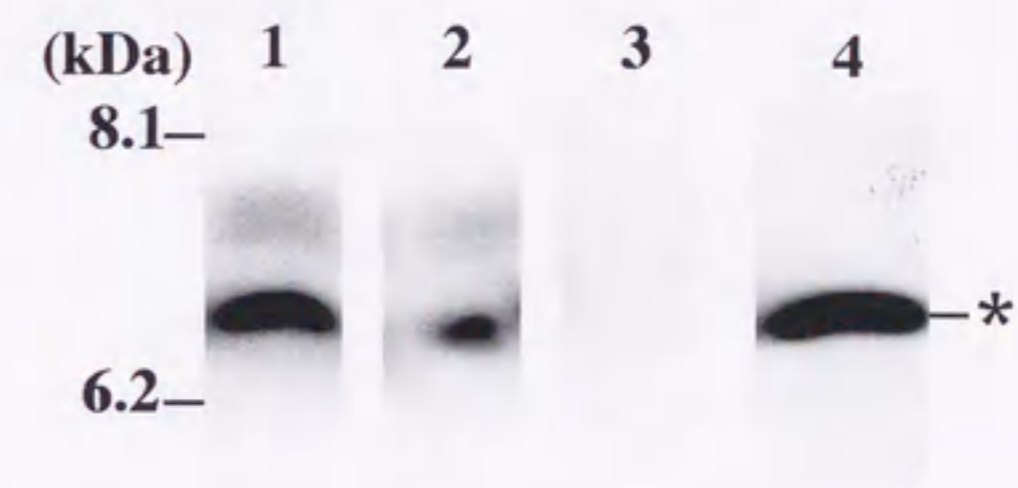


FIGURE 11. Body part distribution of VAP-peptide in the newly emerged adult. VAP-peptide was extracted from the head (1), the thorax (2) and the abdomen (3) of day 0 male adults by 8 M urea and n-BuOH as described in Materials and Methods and analysed by western blot analysis using an anti-VAP-peptide serum. The extract from 10 mg fresh weight was applied to a lane. The recombinant VAP-peptide(0.25 μ g/lane) was run as a reference protein (lane; 4). Number at the left represents molecular mass in kDa which was determined by the marker peptides. VAP-peptide is shown by asterisk.

機構に携わるペプチドである可能性が低いことを示唆している。

2. VAP-ペプチド mRNA の組織局在性

VAP-ペプチド遺伝子を発現している成虫組織を決定するため、様々な組織を腑分けしノーザンブロット分析を行った (Fig. 12)。頭部においては、VAP-ペプチド mRNA 濃度は、触覚、複眼および筋肉を含む皮膚において有意に認められ、しかもその相対濃度はほぼ同程度であった。脳-食道下神経節連合体では、頭部全体の半分量程度しか検出されなかった。次に胸部全体では、頭部全体の4倍以上の濃度で mRNA が蓄積していた。胸部の組織についてみると、翅が一番多く mRNA を蓄積しており、頭部全体の約 13 倍量に相当しており、胸部全体に対しても 3 倍以上に達した。高い蓄積は、皮膚および脚でも見られ、筋肉や気管では低い蓄積であった。腹部全体については、頭部全体の 5 分の 1 程度の蓄積であったが、交尾器および皮膚には有意の蓄積が見られ、それぞれ胸部の皮膚ならびに頭部の触覚での蓄積量に相当していた。しかし腹部の主要な器官、組織にはほとんど VAP-ペプチド mRNA は認められなかった。

3. VAP-ペプチド遺伝子の発現細胞の同定

in situ ハイブリダイゼーション法を用いて翅および胸部の皮膚で VAP-ペプチド遺伝子を発現している細胞の同定を試みた (Fig. 13)。蛹化 6 日の長翅を横断切片にし、VAP-ペプチド mRNA を DIG でラベルした VAP-ペプチド cDNA とハイブリダイズして検出した (Fig. 13)。陽性シグナルは、翅において真皮細胞から発達した翅脈細胞に選択的に観察された (Figs. 13A, B)。対照プローブでは、翅のいずれの細胞も染まらなかった (Fig. 13C)。また翅脈における染色は、短翅でも観察された (結果省略)。

蛹化 6 日の胸部の皮膚の真皮細胞も強く一様に染色され、その染色度合い

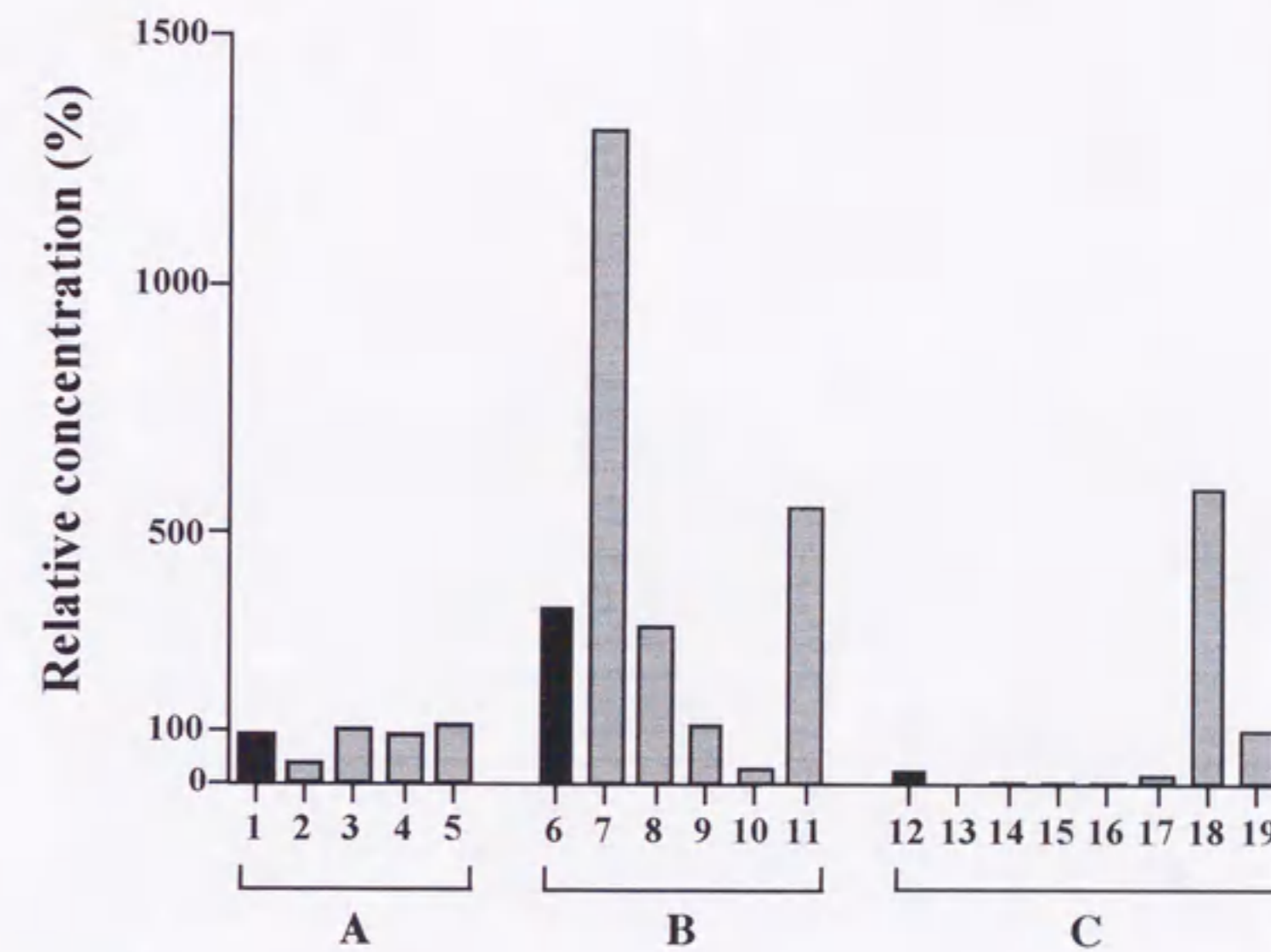


FIGURE 12. Tissue distribution of VAP-peptide mRNA in the adult. From the head (A), the thorax (B) and the abdomen (C), various tissues and organs were prepared. From the head, the whole head (1), the brain-suboesophageal ganglion complex (2), the antenna (3), the compound eyes (4), and the mixture of integument and muscle (5) were collected. From the thorax, the whole thorax (6), the wing (7), the leg (8), the muscle (9), the trachea (10), and the integument (11) were collected. From the abdomen, the whole abdomen (12), the fat body (13), the Malpighian tubule (14), the testis (15), the midgut (16), the hindgut (17), the copulatory organ (18) and the integument (19) were collected. Total RNA (20 μ g) was subjected to northern blot analysis, and radioactivity hybridized to VAP-peptide mRNA was measured. The results are shown as percentages of the VAP-peptide mRNA concentration to the day 0 whole heads (100%). The value represents means of two separate experiments.

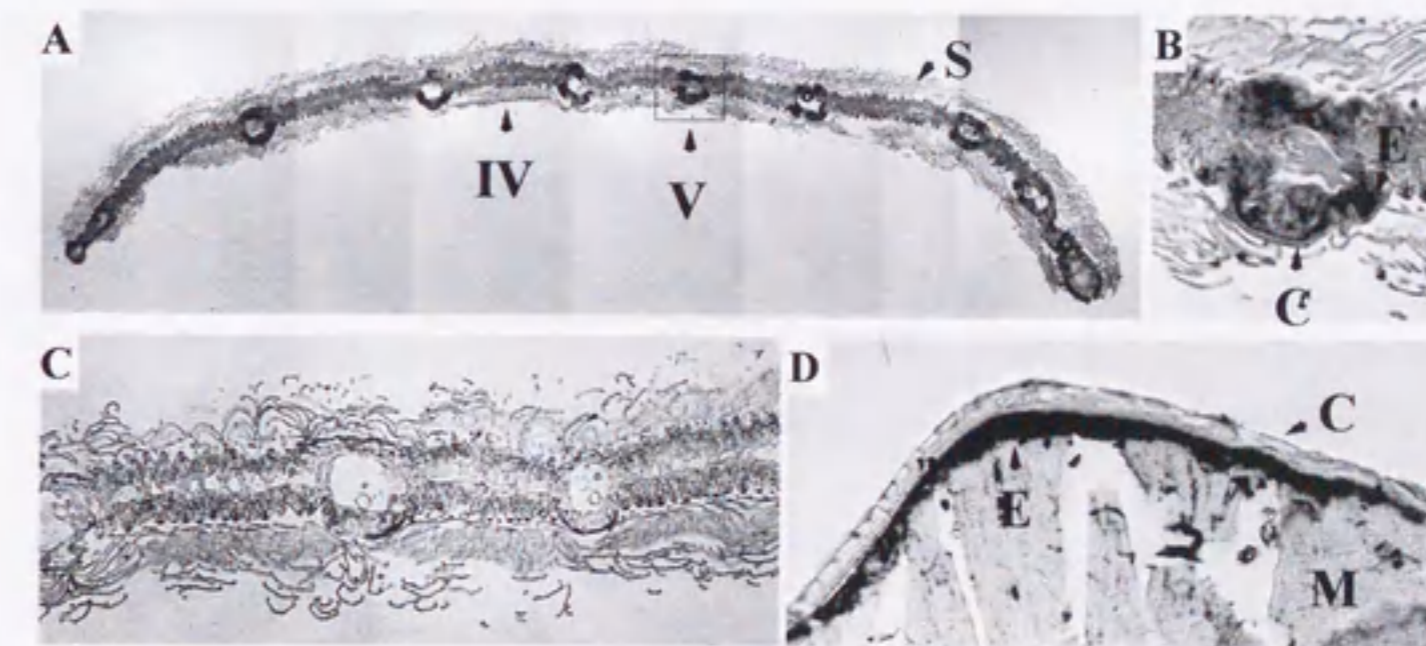


FIGURE 13. Cellular localization of the VAP-peptide mRNA in the wing and thoracic integument of pharate adults. The wing (A to C) and the thoracic integument (D) were processed for the *in situ* hybridization. (A), the whole wing (dorsal on the upper, anterior on the right); (B), enlargement of vein region (open square on A); (C), control staining with pBluescript (KS+); (D), the thoracic integument. V, vein; IV, intervein; C, cuticle layer; S, scales; E, epidermal cells; M, muscle.

は、翅で得られたものより濃かった (Fig. 13D)。しかし真皮細胞における細胞特異的な発現は認められなかった。クチクラ層および筋肉細胞においては染色は観察されなかった。

4. 翅における VAP-ペプチド遺伝子の時期特異的発現

カイコの翅は、蛹 - 成虫発育の中期の終わりに鱗毛およびクチクラ層の形成をほぼ完了し、その後、羽化時に伸長することが知られている (Kawasaki *et al.*, 1986)。VAP-ペプチド遺伝子の発現時期と翅の発育段階を関連づけるため、蛹 - 成虫発育期における VAP-ペプチド mRNA 濃度の相対量を測定した (Fig. 14)。幼虫 - 蛹脱皮後 5 日までは明らかなシグナルは認められず、mRNA 濃度は 6 日から著しく上昇し、成虫羽化時にピークに達し、その後速やかに減少した (Fig. 14)。この結果は、先述の頭部における mRNA の発育変動パターンと類似するものであった。また胸部の皮膚においても同様のパターンが得られた (結果省略)。

5. 蛹 - 成虫発育期における VAP-ペプチドの蓄積

蛹 - 成虫発育期の翅における VAP-ペプチドの蓄積量をウエスタンブロット法で調査した (Fig. 15)。蛹化 7 日に初めて 6.7 kDa の位置に陽性バンドが検出され、その染色度は、成虫羽化当日に最大となり、その後速やかに減少した。この結果は、VAP-ペプチド mRNA の濃度変化と一致していた。

つぎに、成虫羽化当日における VAP-ペプチドの組織分布を調査した (Fig. 16A)。多く蓄積が観察された組織は、頭部全体、胸部全体そして翅であり、触覚と胸部の皮膚、交尾器においても蓄積が観察された。腹部全体、脂肪体および腹部の皮膚では認められなかった。この VAP-ペプチドの組織分布は、VAP-ペプチド mRNA の組織分布と一致していた。

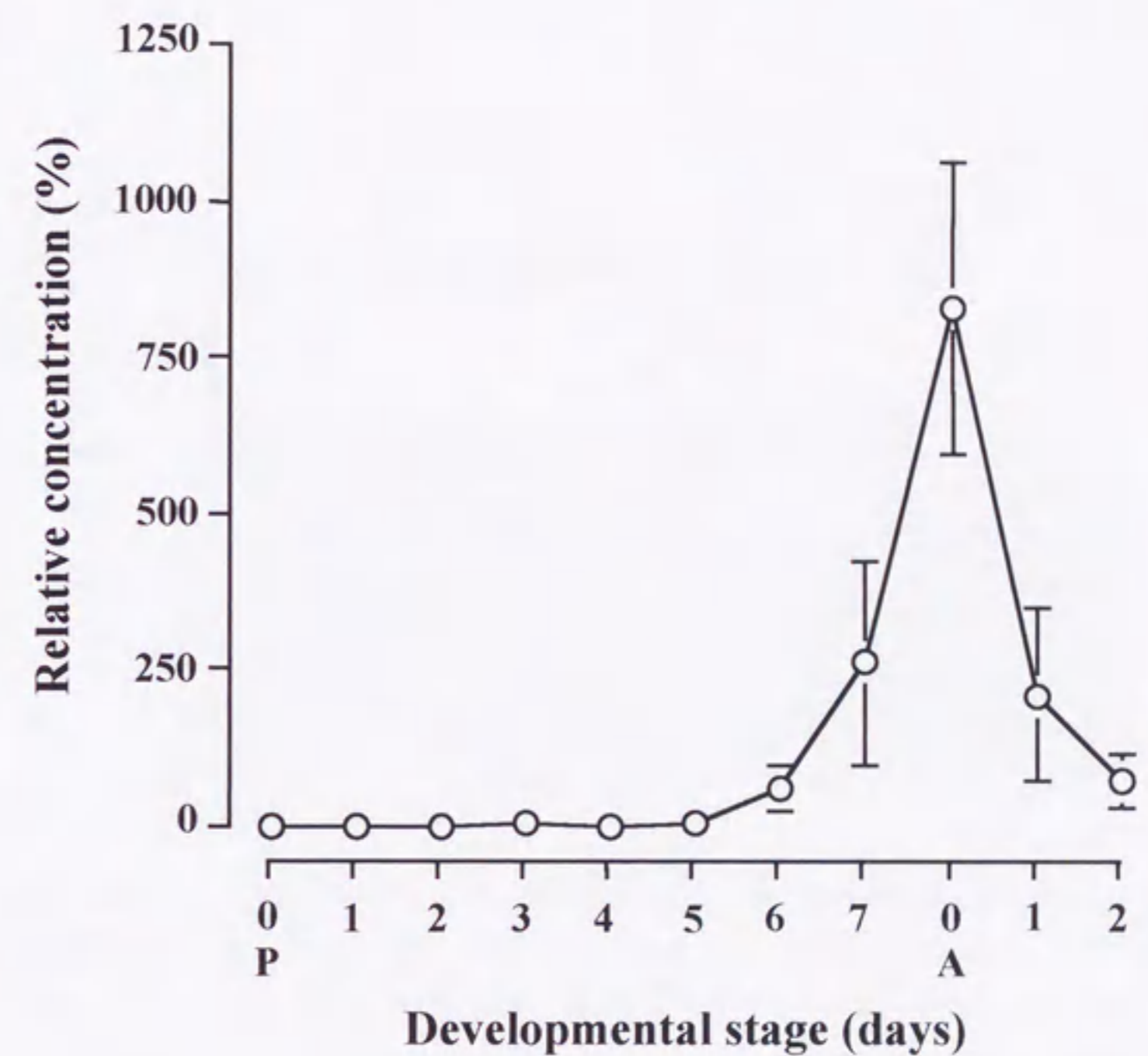


FIGURE 14. Changes in VAP-peptide mRNA concentration in the wing throughout the pupal-adult development. Total RNA (20 μ g) was subjected to northern blot analysis, and then radioactivity was measured. VAP-peptide mRNA concentration is expressed as percentages to that of day 0 male adult heads (100%). P and A represent the day of pupal ecdysis and adult eclosion, respectively. Each point represents means of four separate experiments with S. D.

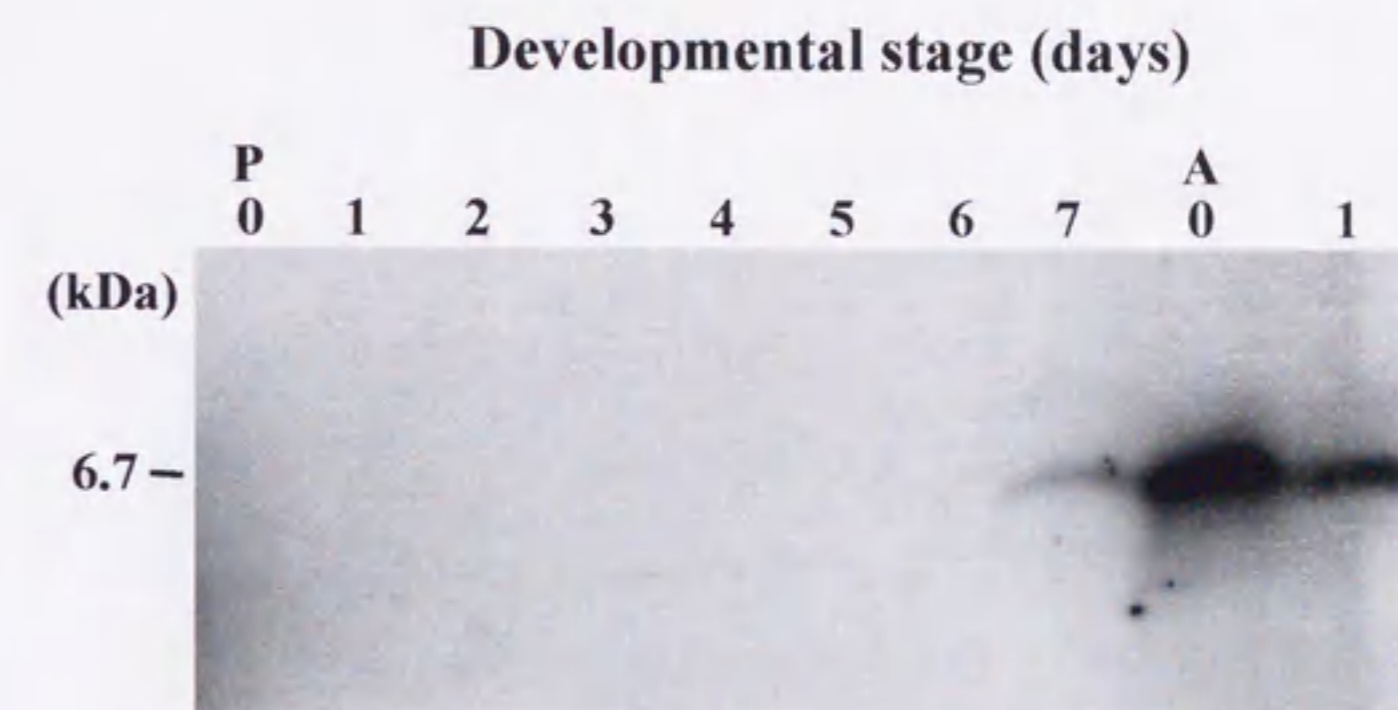


FIGURE 15. Profile of VAP-peptide accumulation in the wing during the pupal-adult development. The VAP-peptide was extracted by 8 M urea and n-butanol and extracts from 20 mg fresh weight of tissues were applied to a lane. VAP-peptide was analysed by western blot analysis using an anti-VAP-peptide serum. P and A represent the day of pupal ecdysis and adult eclosion, respectively. Number at the left, VAP-peptide molecular mass in kDa.

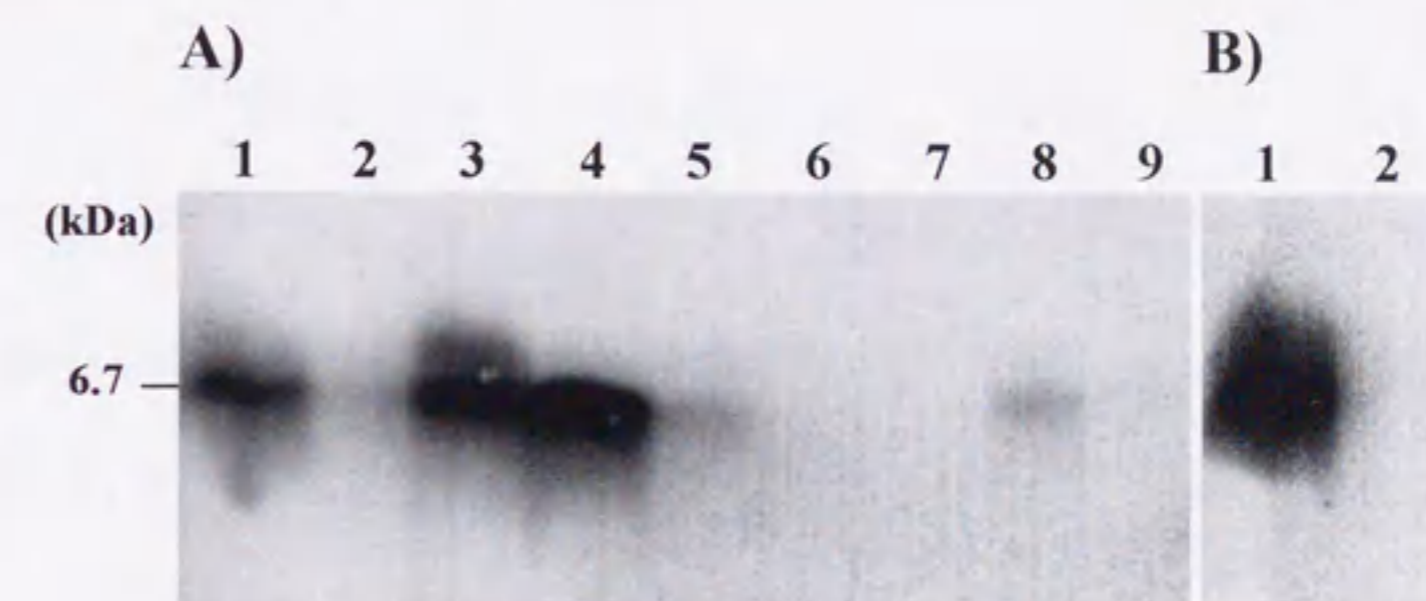


FIGURE 16. Tissue distribution of VAP-peptide in the adult analysed by a western blot. (A), VAP-peptide was extracted from the whole head (1), the antenna (2), the whole thorax (3), the wing (4), the thoracic integument (5), the whole abdomen (6), the fat body (7), the copulatory organ (8) and the abdominal integument (9) of day 0 male adults. (B), the cuticle layer (1) and the epidermal layers scraped from cuticle layers (2). The extract from 20 mg fresh weight of tissues was applied to a lane. Number at the left, VAP-peptide molecular mass in kDa.

6. VAP-ペプチドのクチクラ層での局在

真皮細胞で合成された VAP-ペプチドが細胞外のクチクラ層に分泌されるか否か調査するために、胸部の皮膚のクチクラ層から VAP-ペプチドを抽出することを試みた。一般的に、免疫組織化学的手法がタンパクの細胞内局在性を決定する有効な手段ではあるが、VAP-ペプチドは疎水性が高く脱水および脱パラフィンの過程で容易に有機溶媒中に溶出してしまう可能性がある。そのため一般的な免疫組織化学的手法は、VAP-ペプチドの蓄積組織の同定には使用できない。そこで、胸部の皮膚のクチクラ層を集め、ウエスタンブロット分析を行った。その結果、クチクラ層の抽出物中に VAP-ペプチドに相当する 6.7 kDa の免疫陽性バンドが検出された (Fig. 16B)。クチクラ層から除いた真皮細胞には陽性シグナルは観察できなかった。このように VAP-ペプチドは、胸部の皮膚においてはクチクラ層に分泌されることが分かった。しかし、クチクラ層内での局在性は不明である。

7. キチンクロマトグラフィーにおける VAP-ペプチドの挙動

プロクチクラに存在するタンパクの多くは、キチンと結合し、クチクラ層の高次構造を構築することが知られている (Andersen *et al.*, 1995)。VAP-ペプチドがクチクラ層に局在していたことから、VAP-ペプチドもキチンに対して化学的な親和性を有することが予測される。この点に関する情報を得るために、キチンカラムクロマトグラフィーにおける VAP-ペプチドの挙動を調査した (Fig. 17)。VAP-ペプチドはキチンカラムに吸着された。そして吸着された VAP-ペプチドは 8 M 尿素によって、カラムから溶脱された。この結果は、VAP-ペプチドはキチンと結合する性質を有することを示唆した。

考察

VAP-ペプチドは、カイコの成虫頭部より単離された新規な疎水性ペプチドであり、DH と混合して注射することにより DH 活性を増強する作用をもつ(第2章)が、内在性の VAP-ペプチドが実際にこの作用を有しているか否かは不明であった。本章では、まず内在性の VAP-ペプチドに、DH に対する協力作用があるか否かについて検討した。その結果、VAP-ペプチドは、成虫期の限られた組織に局在し、血中には VAP-ペプチド遺伝子の発現が最大である成虫羽化時でさえ 225 pM 以下の濃度でしか存在しないことが分かった。この血中濃度は、成虫頭部及び胸部に蓄積している VAP-ペプチド濃度に比べて、明らかに低く、生体内の VAP-ペプチドは、DH の協力剤としての卵休眠誘導系とは異なる系で機能を果たしていると考えられた。

そこで VAP-ペプチドの生体内機能を明らかにする目的で様々な時期の様々な組織について、VAP-ペプチド遺伝子の発現の状況をノーザンブロットおよび *in situ* ハイブリダイゼーション分析によって調査した。その結果、VAP-ペプチド遺伝子は、成虫羽化時に主に翅および胸部の皮膚の真皮細胞で発現することが分かった。

翅における遺伝子発現は、翅脈細胞に限定されていた。成虫体の翅の分化と形成は、一連の生化学的および細胞学的変化を通して進行することが知られている(Kawasaki *et al.*, 1986)。翅原基は幼虫 5 齢期までに、真皮細胞が分裂増殖して、単一の袋状の形態を成し、幼虫 5 齢期の後半には、翅原基への気管枝の進入及び翅原基の表皮組織の外側への外転と蛹クチクラの分泌が起こる。蛹 - 成虫発育期の初期では、有糸分裂を導くための DNA および RNA の合成と翅の最終的な形と細胞学的形状を決定するための細胞分化が行われる。次の段階として、蛹 - 成虫発育期中期には、旺盛なタンパク合成とそれに伴う翅の細胞容量の増大

が起こり、その後、成虫クチクラの沈着と鱗毛の形成が起こる。翅形成の最終段階は、カイコにおいては蛹-成虫発育期の最後の2-3日であり、この時、細胞数の減少とそれに伴う部分的な組織崩壊が起こり成虫の翅は完成される (Kawasaki *et al.*, 1986)。VAP-ペプチド遺伝子の発現と産生されたVAP-ペプチドの蓄積は、この最終段階で開始される (Figs. 14, 15)。このことから、VAP-ペプチドの合成は、翅の分化と発達の全過程を通して必要とされるものではなく、翅の機能的な「仕上げ」(terminal differentiation)のための最終段階に必要とされるものと考えられる。昆虫の翅は、気管や感覚神経や血液の通路になる翅脈を縦横に張り巡らし、運動機能を保証している。そしてこの翅脈は、肥厚した管状の硬化(hardening)したクチクラが分布することによって機械的に強靱になっている。*in situ*ハイブリダイゼーションの結果は、翅脈を形成する真皮細胞のみがVAP-ペプチド遺伝子発現を選択的に発現していることを示した。このことから、VAP-ペプチドは翅構造に物理的強靱さを与える構造強化ペプチドとして合成、蓄積されていると推測される。

成虫体の胸部の外骨格は、翅、飛翔筋や脚の付着部を提供している硬組織である。したがって、胸部の皮膚は飛翔や歩行を支持する機械的な強靱さを増加させるために特別に分化した機構を発達させている。成虫の胸部の皮膚におけるVAP-ペプチド遺伝子の高い発現と発現産物の高い蓄積は、胸部の皮膚においても、VAP-ペプチドが、翅脈において推測された機能を持つことが推測される。また、翅および胸部の皮膚以外でVAP-ペプチド遺伝子を発現している組織は触覚、複眼、脚、交尾器および幼虫の頭部であり、これらの器官は、翅脈及び胸部の皮膚と同じく、いずれも硬化した外骨格が発達している。一般的にクチクラ層の硬化は、クチクラ層中に分泌されたカテコールアミン及びドーパミンの酸化反応を介したクチクラタンパクの架橋、重合ならびにキチンとの相互作用により引き起こされる sclerotization と呼ばれる過程 (Schaefer *et al.*, 1987; Andersen *et al.*

1995) と、疎水性のタンパクが脱水作用を通してクチクラタンパク内の自由水を排除する過程 (Hillerton and Vincent, 1983) により引き起こされることが言われている。VAP-ペプチドが sclerotization の過程に関与するか否かは不明であるが、本結果から、VAP-ペプチドはキチンとの相互作用を通してクチクラ層の物理的あるいは構造的な特殊化をもたらすことが推測され、また、VAP-ペプチドの疎水性の高い性質は、VAP-ペプチドがクチクラタンパク内の脱水作用に関与している可能性も推測された。これらのことより、VAP-ペプチドは外骨格に物理的強靭さを与えるペプチドであり、おそらくクチクラ層の硬化反応に関与していると考えられる。また、VAP-ペプチドは、器官の生理的「仕上げ」のために重要な役割を担うペプチドだと考えられ、成虫分化の最終段階を解析するためのマーカー遺伝子として有効であると考えられる。

摘要

1. 本章では、VAP-ペプチドの生体内での機能を確定することを目的に研究を行った。まず内在性のVAP-ペプチドに関してもDHに対する協力作用があるか否かについて検討した。その結果、VAP-ペプチドは、成虫期の限られた組織に局在し、また蛹-成虫発育期の血中には225 pM以下の濃度でしか存在しないことが分かった。このことから、VAP-ペプチドが生体内でDHの協力剤として作用しているとは考えられず、内在性VAP-ペプチドはDHによる胚休眠誘導系とは異なる系で生体機能を果たしていると考えられた。

2. 遺伝子発現様式およびタンパク蓄積様式を詳細に調査することにより内在性VAP-ペプチドの生理機能を推定した。VAP-ペプチド遺伝子は、成虫羽化時に主に翅および胸部といった、いずれも硬化した外骨格が発達する器官および組織の真皮細胞で発現し、その発現産物は、クチクラ層へ分泌、蓄積されることが分かった。このことから、VAP-ペプチドは、外骨格の物理的強靭さを与える生物素材として機能していると推測された。

第4章 VAP-ペプチド遺伝子の 構造と転写調節要因

前章の結果から、VAP-ペプチドは、成虫器官の生理的「仕上げ」のために重要な役割を担うペプチドであり、キチンや他のクチクラタンパクとの物理化学的相互作用を通して成虫外骨格の硬化 (hardening) に関与し、外骨格に機械的強靱さを与えるペプチドである可能性が示唆された。この VAP-ペプチドの機能は、遺伝子の時期特異的および組織、細胞特異的な発現様相から推定したものである。

そこで本章では、VAP-ペプチド遺伝子の構造と発現調節機構を明らかにすることを目的に研究を行った。すなわち、まず VAP-ペプチド遺伝子の構造を解析し、つぎに VAP-ペプチド遺伝子上流域において、既知の転写調節因子との結合部位を検索することによって転写調節因子の一つを推定した。つまり、ステロイドホルモンレセプタースーパーファミリーの1つである BmFTZ-F1 が VAP-ペプチド遺伝子の転写調節因子として機能しているという可能性を示した。このカイコの FTZ-F1 遺伝子は、後胚発生期においては血中エクジステロイド濃度の減少によって発現が誘導されるとされている (Sun *et al.*, 1994)。キイロショウジョウバエの FTZ-F1 遺伝子では、エクジステロイドによりその発現が抑制される機構が明らかにされている (Ueda *et al.*, 1990; Thummel, 1997)。成虫への変態は、エクジステロイド濃度の激的な変化によって引き起こされ、血中のエクジステロイド濃度の上昇は、種々の成虫器官の分化とそれに続く発育を開始、持続するための必須の要因となっている (Fristrom and Fristrom, 1993; Kadono-Okuda *et al.*, 1987; Kawasaki *et al.*, 1986)。そして、蛹-成虫発育中期以降の急激なエクジステロイド濃度の減少は、成虫形質の完成に必要である

(Schwartz and Truman, 1983)。VAP-ペプチド遺伝子の発現は、種々の器官で成虫羽化直前もしくは、成虫羽化時に誘導されることを前章で示した。この時期には、血中エクジステロイド濃度は、痕跡的なレベルに落ち込み、羽化時まで決して上昇することは決してない (Kadono-Okuda *et al.*, 1987, Kawasaki *et al.*, 1986)。カイコにおける蛹 - 成虫発育期の後半の BmFTZ-F1 mRNA の発現は脂肪体から抽出された RNA で検出されており (Sun *et al.*, 1994)、また、キイロシヨウジョウバエにおいて FTZ-F1 の標的遺伝子として知られている EDG 84A (Apple and Fristrom, 1991; Murata *et al.*, 1996) のカイコの相同体遺伝子が蛹 - 成虫発育の後半に発現している (塩見, 1995)。そこで、翅における蛹 - 成虫発育期の BmFTZ-F1 遺伝子の発現パターンを調査し、この cDNA をクローニングした。その後、酵母ワンハイブリッドシステムにより、BmFTZ-F1 による VAP-ペプチド遺伝子の発現調節能を調査した。これらの結果を基に VAP-ペプチド遺伝子の発現調節機構について考察した。

材料と方法

1. 実験動物

休眠性の大造を用い、前章と同様の条件で飼育した。

2. ゲノミックサザンブロット分析

ゲノム DNA は、Sato and Yamashita (1991) の方法に準じて行った。5 齢幼虫の絹糸腺 5 倍量の核抽出緩衝液 (40mM Tris-HCl, pH 8.0, 5 mM MgCl₂, 25 % シュクロース, 12.5 % グリセロール, 3 mM ジチオスレイトール) 中で 2 mm² 程度の細片になるまでハサミで切り刻んだ。2,000 g で 5 分間遠心後、沈殿を DNA 抽出緩衝液 (20 mM Tris-HCl, pH 8.0, 100 mM EDTA, 0.5 % SDS, 1 mg/ml RNase) とともに磨碎し、37 °C で 1 時間保温した。その後、プロテイナーゼ K を最終濃度が 200 µg/ml になるように加え、50 °C で 3 時間保温した。DNA をフェノール抽出し、1 mM EDTA を含む 10 mM Tris-HCl (pH 8.0) に一晚透析した。この DNA を種々の制限酵素で消化し、0.8 % アガロースゲルで電気泳動した後、Hybond-N⁺ 膜へ転写した。ハイブリダイゼーションは、ノーザンブロットと同様の方法によって行った。

3. 塩基配列の決定

カイコの脂肪体 DNA で作製した λEMBL 3 ゲノミックライブラリーを東京大学の藤原博士より贈与いただいた。³²P-dCTP で標識した VAP-ペプチドの ORF をコードする cDNA をプローブに用い、ラムダファージ (55 x 10⁴ pfu) をスクリーニングした。ハイブリダイゼーションは、ノーザンブロットと同様の方法によって行った。陽性反応を示したファージの DNA を Manfioletti and Schneider (1988) の方法により抽出し、種々の制限酵素で消化し、ゲル精製した

DNA断片をpBluescript KS (+) にサブクローニングした。サブクローニングしたDNAの塩基配列は、dideoxy chain-termination 法 (Sanger *et al.*, 1977) で決定した。サブクローニングしたDNAに含まれていない遺伝子配列は、ラムダDNAを直接シーケンシングすることによって決定した。塩基配列の編集と同一性検索はFASTA およびTFSEARCH (転写因子結合部位解析) を用いた。

4. 蛹 - 成虫発育期の翅における *BmFTZ-F1* のクローニング

RT-PCR法を用いてクローニングした。蛹化0日から成虫羽化2日後までの翅から全RNAを酸性グアニジン法 (Chomzynski and Sacchi, 1987) により抽出した。1本鎖cDNAは、全RNAをテンプレートとして、oligo(dT)₁₂₋₁₈ (Pharmacia) をプライマーに用いて Superscript reverse transcriptase (BRL) により合成した。得られた1本鎖DNAをRNase Hで処理し、RNAによるPCR反応の効率低下を防いだ。PCR反応は、常法に従い (Saiki *et al.*, 1985)、LA *taq* (TAKARA) を用い、VAP-ペプチドcDNAのクローニングと同様の反応条件で行った。プライマーは、Sun *et al.* (1994) により既に決定された *BmFTZ-F1* cDNAの塩基配列を基に合成した。つまりセンスプライマーとして、開始コドンATGのAを含み5'末端に *Bam* HI 認識配列を付加した、

5'-CGCGCGGATCCTCGTCAGATTATTCGTGTATAA-3' を用い、

アンチセンスプライマーとして、終始コドンTAGの下流3塩基目から27塩基までを含み5'末端に *Bam* HI 認識配列を付加した、

5'-CGCGCGGATCCAAGCTAGTAACTAAAATAATT-3' を用いた。

PCR産物は、1% Seakem GTG を用いたアガロースゲル電気泳動を行い、その後、常法に従い Hybond-N⁺ 膜 (Amersham) に転写した。サザンブロット分析のためのプローブDNAとして、国立遺伝研究所の上田均博士から贈与いただいた *BmFTZ-F1* cDNAの1部をpBluescriptにサブクローンしたDNA

(BmCR8) を *EcoRI* と *XmnI* で消化して得た 379 bp の DNA 断片をアガロースゲルにより精製したものをを用いた。この DNA 断片を ^{32}P で標識し、ノーザンブロットと同様の方法でハイブリダイゼーションを行い、放射活性を image analyzer (BAS 2000, Fuji Photo Film) で測定した。陽性反応の得られたバンドをゲルから精製し、*BamHI* で消化した後、前述の通り、pBluescript の *BamHI* サイトにサブクローニングし、塩基配列を決定した。得られた塩基配列は、前述の FASTA を用い相同性検索を行った。

5. 酵母ワンハイブリッドシステム

酵母 : *Saccharomyces cerevisiae* の JM749 (*MATa/MAT α* , *ura3-52/ura3-52*, *trp1- Δ 101/trp1- Δ 101*, *lys2-801/lys2-801*, *leu2- Δ 1/leu2- Δ 1*, *his3- Δ 200/his3- Δ 200*) を選抜実験のための宿主細胞として用いた。

培地 : YPD およびトリプトファン、ウラシル及びヒスチジン欠損の合成培地を Rose *et al.* (1990) の方法により調製した。培養温度は、30 °C とした。

アクティベータープラスミドの構築 : アクティベータープラスミドには、大腸菌と酵母のシャトルベクターである pBM258T を用いた。このプラスミドは、*GALI* プロモーターを含んでおり、このプロモーターはグルコースにより抑制され、ガラクトースにより誘導されるため、この下流に DNA 結合タンパクの cDNA を挿入することにより、培地にガラクトースが含まれる場合のみに目的の DNA 結合タンパク合成を誘導することが可能となる。また、このベクターには、ウラシル欠損培地での生育を可能にするプラスミドの選択マーカーとして *URA3* が挿入されている (新美 他, 1997)。

DNA 結合タンパクとして用いる BmFTZ-F1 cDNA は上記の通りクローニングし、pBluescript にサブクローニングした。インサートを *BamHI* を用い切り出し、ゲル精製し、pBM258T の *BamHI* サイトに挿入した。シーケンシング

グにより、正しい向きに挿入されたプラスミドを選抜した。

ORF 全長を含む BmFTZ-F1 cDNA を以下の方法でクローニングした。サブクローニングされた BmFTZ-F1 の N 末端領域をコードする BmCR8 クローンおよび C 末端領域をコードする BmCT5 クローンを上田博士より贈与いただき、まず BmCR8 クローンをテンプレートに用い、開始コドン ATG の A を含み、5' 末端に *Bam* HI 認識配列を付加した、

5'-CGCGCGGATCCTCGTCAGATTATTCGTGTATAA-3' をセンスプライマーとして、5' 末端に *Hpa*I 認識配列を付加した

5'-CGCGTTAACCGCGCAGAGTCTGAACGGCGA-3' をアンチセンスプライマーとして PCR をおこない約 600 bp の ORF の N 末端側をコードする cDNA 断片を得た。つぎに、BmCT5 クローンをテンプレートに用い、5' 末端に *Ecl*136II 認識配列を付加した、

5'-CGCGAGCTCTAGGGGACGGTGGATTAGTCC-3' をセンスプライマーとし、アンチセンスプライマーとして、終始コドン TAG の下流 3 塩基目から 27 塩基までを含み 5' 末端に *Bam* HI 認識配列を付加した、

5'-CGCGCGGATCCAAGCTAGTAACTAAAATAATT-3' を用いて PCR を行い約 1330 bp の ORF の C 末端側をコードする cDNA 断片を得た。それぞれの DNA 断片を *Bam*HI で消化し、pBluescript (*Eco*RV-*Bam*HI) に挿入した (それぞれ pBS-CR8 および pBS-CT5 とした)。シーケンスを確認した後、pBS-CT5 は、*Ecl*136II および *Xba*I で消化し、インサートを切り出し、*Hpa*I および *Xba*I で消化した pBS-CR8 に挿入した。シーケンシングを行い、ORF 全長を含む BmFTZ-F1 cDNA がクローニングできたことを確認した。この cDNA を *Bam*HI で消化し、ゲル精製し、pBM258T の *Bam*HI サイトに挿入した。シーケンシングにより、正しい向きに挿入されたプラスミドを選抜した。

レポータープラスミドの構築：レポータープラスミドとしては、大腸菌と

酵母のシャトルベクターである pHR307a を用いた。このプラスミドは、ヒスチジン欠損培地での生育を可能にする選択マーカーとして *HIS3* が標的 DNA 配列挿入部位の下流に挿入されており、標的配列が活性化されることによりヒスチジン欠損培地での生育を可能にする。また、トリプトファン欠損培地での生育を可能にするプラスミドの選択マーカーとして *TRP3* が挿入されている (新美 他, 1997)。

そこで標的 DNA 配列として、VAP-ペプチド遺伝子配列 (#31 および #80) の 5' 上流域約 500 bp (#31 においては、-29 から -545 まで、#80 においては、-29 から -543 まで) (Fig. 20) を、5' 末端に *EcoRI* 認識配列を付加したプライマーを用い、PCR によりクローニングした (#31-0.5k および #80-0.5k)。また、#30 クローンにおいては、5' 上流域約 800 bp (-29 から -896 まで) についてもクローニングした (#31-0.8k)。それぞれの DNA 断片を *EcoRI* で消化後、pBluescript に挿入しシーケンスを確認した。その後、*EcoRI* でインサートを切り出し、ゲル精製したものを pHR307a に挿入した。シーケンシングにより、正しい向きに挿入されたプラスミドを選抜した。

バインディングアッセイ：上記の 2 種のプラスミドを持つ酵母においては、ガラクトースによって DNA 結合タンパク質が誘導され、このタンパク質が標的となる DNA の配列に結合することによって *HIS3* が発現し、ヒスチジンが欠損した選択培地上で酵母が生育可能となる。つまり、トランスフォームした酵母が選択培地上で生育できるかどうかによって、DNA 結合タンパク質が標的配列に結合するかどうかを判定できる (新美 他, 1997)。

そこで、酵母 JM749 にリチウム酢酸を用いてアクチベータープラスミドとレポータープラスミドをコトランスフォーメーションした (Ito *et al.*, 1983)。この細胞をウラシルとトリプトファンを欠損した合成寒天培地に撒き両プラスミド

を持つ形質転換体を選抜した。次に、ガラクトースを含みウラシル、トリプトファン及びヒスチジンを欠損した培地にレプリカを作製し、30℃で培養し、酵母の生育状況から結合能を判定した。対照区として、インサートを挿入していないプラスミドを導入したものと、グルコースを含む欠損培地にレプリカを作製したものを作製し、酵母由来の転写調節因子による擬陽性を検定した。

実験結果

1. VAP-ペプチド遺伝子の構造

放射能標識した VAP-ペプチド cDNA をプローブに用い、ゲノミックサザンブロット分析を行った。4 種類の制限酵素 (*Bam*HI, *Eco*RI, *Hind*III, *Sal*I) で切断した場合、すべて単一の陽性バンドが得られた (Fig. 18)。したがって、VAP-ペプチド遺伝子は、1 ハプロイドゲノム当たり 1 コピー存在すると結論された。

上記のプローブを用い、ゲノミックライブラリーのスクリーニングを繰り返し、最終的に 3 個の陽性クローンを得た。それぞれが鎖長の違うインサートを含んでいた。各クローンを制限酵素で消化し、サザンブロット分析を行い、陽性反応を示した DNA 断片をサブクローニングし、塩基配列を決定した。2 個のクローンは同じ塩基配列を示した。残りの 1 個のクローンは、その非転写領域の塩基配列が異なっていた。この結果は、2 種類の VAP-ペプチド遺伝子が存在することを示し、ゲノミックサザンブロットの結果とは矛盾することになる。この違いの主な理由は分析に用いたカイコの品種の違いに由来する遺伝的な多型の結果であると考えられる。なぜなら、ゲノミックサザンブロット分析には原種である大造から得られた DNA が用いられ、ゲノミックライブラリーには、交雑種 (東海 × 朝日) が用いられたからである。すなわち、VAP-ペプチド遺伝子は、1 ハプロイドゲノム当たり 1 コピー存在するのであるが、品種間で特に非転写領域においては変異が生じている可能性が高いと判断される。

Fig. 19 に単離した 2 種類のクローン (#31, #80) の遺伝子地図を示した。塩基配列およびアミノ酸配列は、Fig. 20A, B に示した。VAP-ペプチド遺伝子は、2 つのエクソンとそれを中断する 1 つのイントロンより成っていた。2 つのクローンのエクソン領域の塩基配列は同一であった。このことは、2 種類の遺伝子は同じ VAP-ペプチドを産出することを示している。また、先に決定された cDNA の

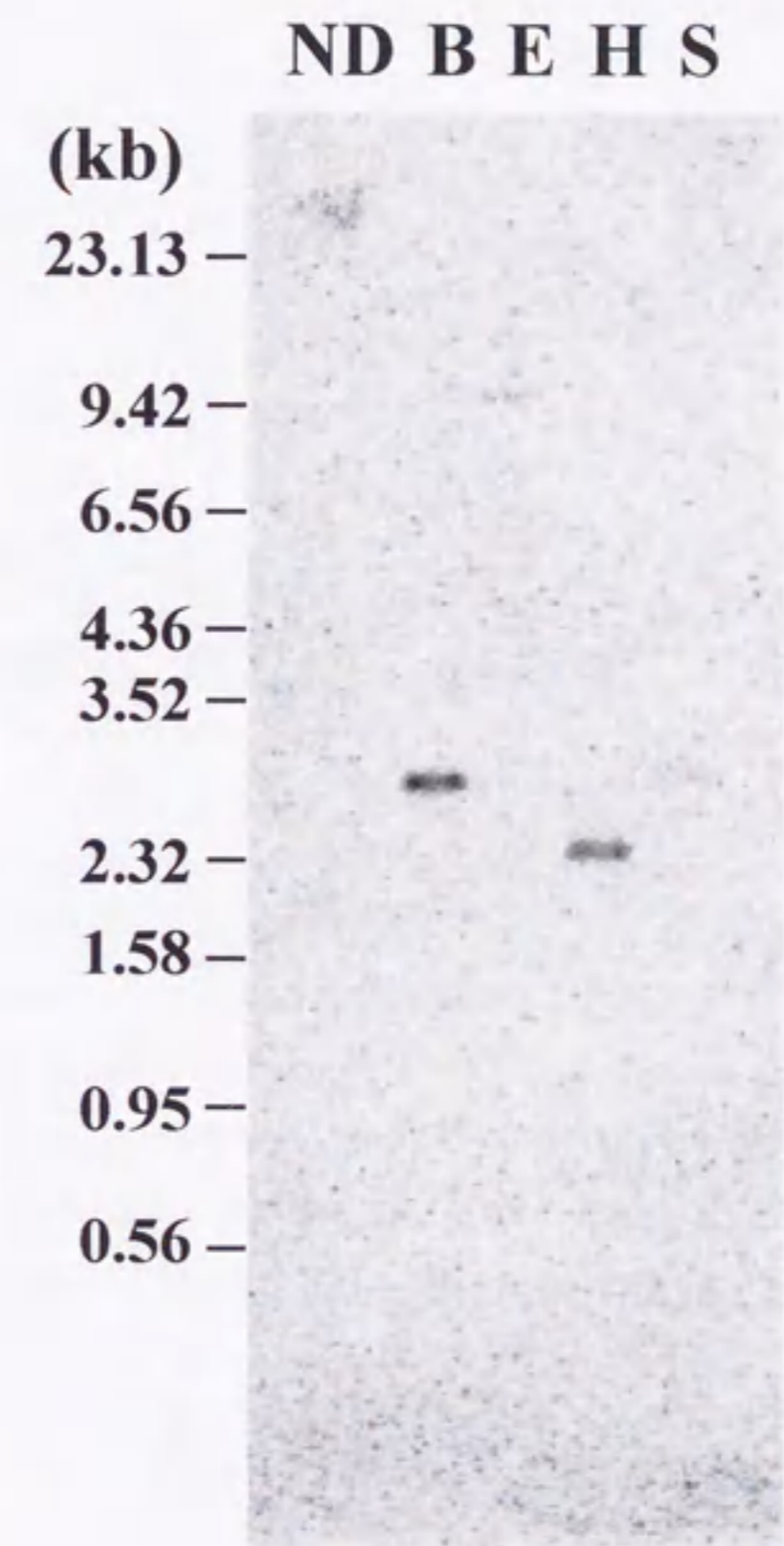


FIGURE 18. Genomic Southern blot analysis of VAP-peptide gene. 10 μ g *Bombyx* genomic DNA was digested with *Bam*HI (B), *Eco*RI (E), *Hind*III (H) and *Sal*I (S) and then hybridized with VAP-peptide cDNA as a probe. ND indicates the non-digested DNA. Molecular weight standards are shown at the left side.



FIGURE 19. Physical maps of the VAP-peptide gene. Two types of VAP-peptide gene (#31, #80) are represented. The transcription start site determined by 5' RACE (see Fig. 2) is indicated by +1. The exon is represented by closed box. The one intron, 5' and 3' regions of VAP-peptide gene are represented by open boxes. More than 95 % sequence matched to each other is represented by shadow boxes. TATA motifs are indicated by arrows. The putative BmFTZ-F1 binding sites are indicated by ∇ , \diamond and \blacktriangledown (see Fig. 21).

A)

-1868 tccaggtagctctattgttctcctaatactctgctgctgcgagatgacaattaagatatcaaaaactttctgtcataaattaccaaa -1779
-1778 ctttaaaaatttcataacttttttgagtatccacaaaaaaacagggcactttaattactgatatcttttttaactaaggagaataag -1689
-1688 aatthaagataaaatagatttccactgatgacatctgttttcoactaacctaaaggaagcgaagcttatctgcgagagcgaattt -1599
-1598 gctatctaatttacgacggggctttcattaacgaagagcttttctactgaccgaaagttaatatgattgattgtcaaaaataaaagac -1509
-1508 aatgtactttgagattgcaacgtatcgagaattgtgatgtgaaacgaatattgaattatcaaaactactactctatttggagagat -1419
-1418 gataagctctcgtcaaaccaagggcagctggctcgaatctctcaaaagttttggatgocattggcaaccattgggtttactatgccagg -1329
-1328 tgggaaaaactttattcctaactcaactgaaactttatgtatcatttaaaaaatcgcttaaaactaatttaggtagacgatgagattgtc -1239
-1238 ttgcacatcatgataatgttttaattatgagctattaaaaatgggggttaaaataggaaaaatgaagcaaatgttcgtaattatagg -1149
-1148 tatattcaaatgtttcataatcagctctattttttatggaaatgaaatcgatgacatctttctgctctcaattttcagagcggaa -1059
-1058 gttaatcaaggagcgtttgtgattttctgtaattactgtgcaaaatgacagactaatttctcctaaagcatttagtcttaagg -969
-968 atcaaaattatttgcctcttaagaccgcattttctcctcaataaacaaggctaagtaactctcagttctaacacctttgtatagtt -879
-878 ttataatagtagtattttatacgtagatgtatttagtctttaccattatcgactaatctacagtcacatggctcagtgtagtgc -789
-788 agatcaaatccattttgtgtgagcagcaatatttttaaatattttttgctattgacgggtgaacgggttttagagctgttcaatgtc -699
-698 tgtgtagacatcaaaatggatgocgtcacccaccttggatagaggttagaccttttagctcatcaagtttagtagaataagctattt -609
-608 aagaatatacaacacagactttactgggtgtaggaccactttgtgagtcacgcgggtgggtaccgccaccctgcctatttctgccgtgag -519
-518 cagtaatcgctttcgggttgaaggggtggggcagccgttgaactatacgtgagaccttaaaactttgtatctcagtggtggcggcattt -429
-428 acatgtatgtatgggatccagtaaccaatcaaccaggtggcgtgtgagctcaccatataagcaataaaaaaaagattccc -339
-338 acctataaatgtctcgggtgcatcattatttccacccaaggtttcaaataccgcttttcaaaagcagggcgtgagctgtctcca -249
-248 ttgtacccttcaagactttttgtagtctgattacatgacgagaatataccgcagtgctatttataaatttgaattctgctac -159
-158 gaaagctcattaaaaacacactttgaagtttacattaaataaaaaccacaacaggtatgacgccttcaagtaacatttattgcaaac -69
-68 tagatttatgaacaacagattcaacctagaccaggtctatataaggactagatctagaatgcgctcATAAACACAGCAGCTTAGCTC 21
22 ATCGGCAGAACACATCTAGTTTGTATTTGAAAGACCACAAATGTTCAAGTTGTAAGTCTTATTGAAAGTTGGCTCTCATATCCA 111
1 M F K L 4
112 agttgttagataaagtactcctaataattcatttaatttcgaactttttttactataaattatgagaaattacattcgaatttcaaat 201
202 tatataacttaataactttgtatatactcgtataataactcataataataaaaagtaagtttttttgcctgggtgctgggtttag 291
292 atattagccttttttaattgtcgggtggctgacgactatgcgacacagtgataaattagtggtcaccgctcgtcagaaatcagcatt 381
382 gccagaaacagccagcagattactggtagtaagaccctctgtgagtcgacgggttagtaccaccgccccgctatttctgcctgaa 471
472 gcagtaatgcgtctcgggttgaaggggtggggcagccgttgtgactatactgagatcttaaggtgtataggtgtataaggtgagatctta 561
562 agatctatactcaaggtgtggtggcgcatttactgttagatgtctatgggctccagtaaccacttaacaccaggtggggtgtgagctog 651
652 tccacacatcgaacataaaaagaaataaaaaagccgctgacaaacaaacattattatgcagacatcgccatttaataaattgtg 741
742 caaatttcaagcctctgaaagtgtcaagcttgggaaaattatgttgaagattacattatgtacatacagccctagctgatgaacgog 831
832 ttttaaaaataattgttccctatacgtttatctatatacacaactcctcagctcaatcacaataaggtgaaacttagtacaaggtg 921
922 ctattggcactcaaaaaaggtgtgtgctataataaagaaatctcagatgttcttatacaattgtcagctggcctgctctggcct 1011
1012 tgcctactcccatgagcagctgtaaccactgacgttcaggagagctcctatgctcgtctatctacgggtgtaataaaaaaagtcacagcta 1101
1102 agcgtaacagatttctagtttgaataaatacatttatacttagtattgttattttttgtggaaaaagaataatcggagctct 1191
1192 gccaatcaaatgttctgtaaaacttctgccaatcactcgaattgcccatttaataaattgttctctcaataaaaaagattttaaagt 1281
1282 tttattgcttcaaaatacaaaacttaagaatacactcgttttttaagataatcttaaatgaacattgtacttactcctgattttttattca 1371
1372 tttcttttttataattttttatgtttaaagcattaaattagataatctattttttatcattctatttagtcataggttagggcga 1461
1462 gcttggccatagctttacagacactaaaacgctcgaagaagctgctatatacaaaatcacaactgtactgtagaacgcatgactcttca 1551
1552 ctttctgcttccactttcagacctgaaccatggtagctttgcaagcaaaattgccaaatcgatcagcagaaagtaaaatgaacaacaaatc 1641
1642 ttttcaaaatcagtgataattcaagtttaaatcaacttaattcaacttaattcaactttttatggccagttttgtttgttcacagACA 1731
5 T 5
1732 GTAATTTTCGCTATTATCGCTGTGGCCCAAGCGGGCTCATAGCCAGTGGTCCCTGTAGCACACCCCGTGGTCCACACCCGCGTG 1821
6 V I F A I I A V A Q A G V I A P V V P V A H P V V A H T A V 35
1822 GTCCACCCGGTCCACTAGTGCAGCTGCCACGTTGTCACACGCCAGTGGTTCGCGCTGCCCGTGGTCCAGTGGTCCGCGCTCCGGTGGTG 1911
36 V H P V P L V R A A H V V H T A P V V A A A P V V A A P V V 65
1912 GCTGCGGCTCCTATCGTCCGATAGTTAAACATGCGCCAAATATCGCTGTCATCATTAATTGTAGAAATAAATAAATATATTTTatgt 2001
66 A A A P I V P I V K H A P I I A V H H * 84
2002 tttttatttctgtgaactcaacgtcccaacaaataacataataactactaactgaaataaaaagataatgagaagatcatct 2091
2092 caaccttaaccttaacctcgaacctcaacctcaaatcgaacctcaaccttagagtagtctttccattgaacacacgacacaaaacaagatc 2181
2182 atagattagagaaccttagaactgttcaaaagctttaaagtgtaaagtttcatatcgaacgactcttagtctgactctctgttctgggtg 2271
2272 cggaaacattcttattccatattaccagaaacgctatatttattattttgtacagattgatacagcagcagcagggctcaattgtg 2361
2362 tctataacaactctcctgtcggctgtttctgacgcgaagcattcagcatccgggtccgaagataagggaaaaataactactata 2451
2452 attaattccgttaactagaccgttaataagactgcatagccactgagttctcaccggatctctcagtggtgoggtttccggctcogg 2541
2542 tgataaattctggaagcactgctcttctgaaggtcaggtttctctgtcttttagtattacctttgtatgcagacggggagacagtc 2631
2632 cacctgatggtagtggtaacgtcggcctgagctcagtaaatgccaggggcatacccaaacggctgctaccgtaatactactgttagc 2721
2722 atcaactcgggttgaagccgtgagctcacctatagtttaaggtgaaactgaaatagcctctcaaggctattagcttaggtacggaaaaat 2811
2812 tataa 2816

B)

```

-1053 tttattctaattcaattgaacttatgtctcattcttaagatcgcttaaacataataggtagacgacgagatgtcttcgcatcatatgata -964
-963 atgttaaatatttgagctattaataattgggttttaaataggaataatggaacaaatgttcgtaattataggtatattcaaatgttca -874
-873 tatattoagctctatTTTTTatgaaatgaaatgtcgatacattttctctctcaatttccgagcgcgaagttaatacaagggaagt -784
-783 tgaagatttattctgtaatttactgtgcaaaagatgacagactaatttctctcaaaagttagtagacttaaggatcaaaatattctgccc -694
-693 ttgaaggccgcattttctctctcaataaacaaggctaaagtacttccagttcaaacacctttgtatagttttatataatagttatagtt -604
-603 attcatagtagaagtagtttagctttacattattcgactaacctacagctccatattggtcaatgttagtaacagatcagatcccatttg -514
-513 tgtgaggcagccatatttatttaattttttatgctattgacgggtgaaacaggttccagagctgttcaatgtctgctgtagccatagac -424
-423 atcacaaatggatgocgctcaccaccttgagatagaagctagacctccaggtcatcaagtttagggaggatggctatttaagaaaaatca -334
-333 caacagactcccacctctaaaggtgcccgggtgacattcacataaattccacccaaggtctcaaaattaccgcttttccataaagcaggccgcg -244
-243 agcttgctccattgtacgctattcaagagctttttgatagtttgattacatgacaggaatatccaccgagatcatctgcccacgaaa -154
-153 gctcattaaaacacacttggaagttcacattaaataaaagccgcaacacagagatagacgacctcaagtaacatttattgcagaactagat -64
-63 ttatgaacaacaggttcaacctagaccaggtctatataaggactagatctagtagcgcctgTATAACACAACACTTAGCTCATCGG 26
27 CAGAACACATCTAGTTTGTATTGAAAGACCGCAAAATGTTCAAGTTGtaagctttatttgaagttggcctcttcatatctagctg 116
1 MFKL 1
117 ttagattagttactctaataattcattaatttcgaatcttttttactataaaatattgagaataaccattcgaattcaaatattatata 206
207 acttaactctgtatataactcgttaataactcgttaataataaaaagtaagtttttaaactgggtcttggtttgtagtag 296
297 ctttttttaattgccacgttgctgacgaccatacagatccacatgataattagtggtcaccgctcgtcatagaaatcagcattgccagag 386
387 acagccactgacaaacaacaacattattatgacagatcggctatttaataaattgtgcaaattttcaaggcgtctgaaaggtcgaagct 476
477 tgggaaaattatgtgaaaattacgctacgtaacaaggcctagctgatgaagcgttttaaaaatgaatgtttccttatacgtttat 566
567 cttatatacatagcttccotaaagctattcattacattaaagatgaaactagtagaggtgctattggcactcaataaaggtgttctccta 656
657 ataataagaaaatacagatttccatatacaattgttataatcagcttgccttgacattgcttactcccatgacagctgaaccactga 746
747 tgttcaggagagctcctatgctcgtctatctacgggtgtaataaaaagtcacaactaagcgttaaccagatttctattgtttogaaaataa 836
837 tacatattatctagtagtgaattttttgttgaaagaataatccggagctcggcaatcaaatgttcgtaaaatctgtccaaa 926
927 tcaactcgaattgccatttaataaattgttctcaataaaaagatttaaaagttttattgcttcaatacaaaacttaagaatacata 1016
1017 gttcttttaagataaatttaaatgaacattgtagctgggtcaattttctattatatttcttttaagctattgcatagcttctatogtg 1106
1107 ggccttgagcacagcactgaatcaagaaatccgtaacgaaataaactgacacccccactacgctactatgtagctcgcgtttaaca 1196
1197 cattcacagcttgcgctggtgtatgtgtgcttctgtaataagcgcggcgtgacgtcgcactgcatgagcactcaataaagctc 1286
1287 gcccactctctctcaccgctctagcttatgagtgtagagggacaggttaattgtcttttgtaattgtaataaaaatagcgggtc 1376
1377 taatttttattattgttcaatataaatttatttcttaattgttaattgtaattgtaataaagttgattaaaaatgctttgcaatgcttaaac 1466
1467 ggcagccccagtgccacacgtctttttataattttttatattgtaaaaactgaaattagataatctattttttatcattctatttg 1556
1557 taagtcattaggtattgcaaatgttaaatctacactggtggcaggaactcttgtagtccgacgggttaggaaccaccacctgtctgtt 1646
1647 ttgocgctgaaagcgttaattgcgtttcggctcgaaggggtgggtagccgttgaactatacctgagaccttagaacttatctcagaggt 1736
1737 ggggtggcatttcaactgtagatgtctatgggctccagtaaccacttaacatcaggtgggctgagcctcagaccaccatgtaagctat 1826
1827 aaaaaaaaaatgttgcacaatcggctccgaggtcgtaaaacaacaacaacaatcttccacaatcacagtgataatttcaagtttaaatctc 1916
1917 aagtaaatcattccatttattgcccagttttgttggtaacagACAGTAATTTTCGCTATTATCGCTGTGGCCCAAGCGGGCGTCA 2006
5 TVIFAIIAVAQAGVI 19
2007 TAGCCCCAGTGGTGCCTGTAGCACACCCCGTGGCTCACACCGCGTGGTCCACCCGGTCCACTAGTGCOCGCTGCCACGCTGGTTC 2096
20 APVVVPVAHPVVVAHTAVVHPVPLVRAHV V 49
2097 ACACGGCCAGTGGTGCCTGTAGCACACCCCGTGGCTCACACCGCGTGGTCCACCCGGTCCACTAGTGCOCGCTGCCACGCTGGTTC 2186
50 TAPVVVAAPVVVAAPVVVAAPVVVAAPVPIVPIVKHAPI 79
2187 TTATCGCTGTCCATCATTAATTGTAGAAATAAATAAATATATTTTattgtttttattattctgtgaactaacgtcccaacaataat 2276
80 IAVHH* 84
2277 acatataattactgaaataaaaagataatgaggagatcattcacccttaaccttaacctcagactcaacctcaaatctctacctcaacc 2366
2367 ttagagtactctcattgaaacacgacacaaaacaagattatattagagaaccttagaactgttcaaaagctttaaagtgtaaggt 2456
2457 ttcatacgaacgactctagttcgcattctctatcgggtgacggaacattattatttcaatattaccatgaaaccgttatattgatt 2546
2547 attttttctgtatacacgagcaccaggtcaattgtgctgataaacaactctcctgtccgctgtttctgacgcaagcattcattgcat 2636
2637 cccgggttcgaagataagggaaaaataaactataaataaactcctgtaacagccttaataaagactgcatagcccactgagttct 2726
2727 caaccgactctctcagtaggtcgcgtttccgggtccgggtgtagattctgtgaaagcactgctctgtgagggcaggtgttagcatcactcc 2816
2817 ggtttgagccccgtgagctcactattagttagggttactgaaatagcctctcaaggctattagcttaggtagggaaaaaagaaagat 2906
2907 tgcatacaaaagtagcactctcctagcgtttagtttaaatgacacccagtaataatttccggctcagatagagggcaagcgcgctgggc 2996
2997 aaaaaccagccaaatggtagatctggttaaggaaggtggttagtgtagctgtaccagcggctccatgccaccatgatcgaacacag 3086
3087 tggagagcgtcacatattgacgcgactcctcagcattgagagacgatgaa 3137

```

FIGURE 20. Structure of the VAP-peptide gene. The nucleotide sequences of two VAP-peptide genes and the deduced amino acid sequences are shown in A(#31) and B(#80). The transcription start site determined by 5' RACE (see Fig. 2) is indicated by +1 and open box. Nucleotides on the 5' region upstream the transcription start site are indicated by negative numbers. The exon sequences are shown in upper-case letters, and the intron sequences in lower-case letters. Sequences similar to the TATA motifs are underlined in bold letters. The putative BmFTZ-F1 binding sites are represented by closed box.

塩基配列とは2個の塩基を除いてすべて一致していた(+3, AがT; +162, GがC)。推定されるアミノ酸配列は、cDNAのものとしてすべて一致した。イントロン-エクソン連結部の保存配列(Mount, 1982)は、各々のクローンで完全に保存されていた。イントロンの長さは、クローン間で異なっており、#31では1652 bpであり、#80では1887 bpであった。また、イントロン内には、Bm1の配列(Adams *et al.*, 1986)およびBmX(Wilson *et al.*, 1988)の配列が確認された。卵殻タンパク(Kravariti *et al.*, 1995)、フィブロイン(Kikuchi *et al.*, 1992)、休眠ホルモン(Xu *et al.*, 1995)、30 k タンパク(Mori *et al.*, 1991)のそれぞれの遺伝子のイントロン配列とも高い相同性を示す領域が存在した。両遺伝子の5'上流域の同位置(-22から-28まで)には、基本転写にかかわるTATAボックスが存在した。なお、真核生物の多くの遺伝子に通常見られるCCAAT配列は見つからなかった。

2. シスエレメントおよび転写調節因子の推定

TFSEARCHによって種々の転写調節因子の候補を得た。それらのうちBmFTZ-F1の結合配列つまりシスエレメントが#31および#80の両遺伝子に確認された(Fig. 21)。#31においては、3カ所確認され、それぞれ-292から-300まで、-639から-647まで、および-659から-667までの領域であった。#80においても3カ所確認され、それぞれ-276から-284まで、-375から-383まで、および-396から-404までであった。すべてのエレメントは、両遺伝子間で保存されている領域に含まれていた(Fig. 19)。

3. BmFTZ-F1のクローニング

RT-PCRにより得られたPCR産物をBmFTZ-F1 cDNAをプローブにし

#31
 -667 **CCACCTTGA** -659 (▽)
 -647 **AGACCTTTA** -639 (◇)
 -300 **CCAAGCTTT** -292 (▼)

#80
 -404 **CCACCTTGA** -396 (▽)
 -383 **AGACCTTCA** -375 (◇)
 -285 **CCAAGCTCT** -276 (▼)

BmFTZ-F1 binding sequence

5' **TCAAGCCCA** 3'
 C T G

FIGURE 21. Putative BmFTZ-F1 binding sequence in 5' upstream regions of VAP-peptide gene. The identical nucleotides to the BmFTZ-F1 binding sequence (Ueda et al., 1991) are open bold letter. Marks in parenthesis correspond to those of Fig. 19.

たサザンハイブリダイゼーションにより分析した結果、主に3本の陽性バンドを検出した (Fig. 22)。1つめは、約0.9 kbpのバンドであり、蛹化1日に強く検出され (P1-0.9k)、2つめは、約0.8 kbpのバンドで蛹化7日に強く検出され (P7-0.8k)、3つめは、約0.3 kbpのバンドで蛹化7日に強く検出された (P7-0.3k)。これらの BmFTZ-F1 陽性クローンの鎖長は、上田らによりカイコ5齢幼虫絹糸腺から得られた BmFTZ-F1 (1.5 kbp) とは異なっていた (Sun *et al.*, 1994)。

それぞれのクローンの塩基配列を決定した結果、いずれのクローンもすべて BmFTZ-F1 の塩基配列を含んでいたが構造的に種々の違いがみられた (Fig. 23)。一般的にステロイドホルモンレセプターは共通のドメイン構造を持っており、A から F の領域に分けられる。N 末端側から転写活性化ドメイン (A/B 領域)、つぎに2個の Zn フィンガーモチーフ (Cys₂-Cys₂ タイプ) を持つ DNA 結合領域がある (C 領域)。C 末端領域にリガンド結合領域があり (E 領域)、2量体形成ドメインもリガンド結合領域にあるとされている (Evans, 1988)。FTZ-F1 および BmFTZ-F1 も同様の構造を持っており (Lavorgna, 1993; Sun *et al.*, 1994) (Fig. 23)、さらに Zn フィンガーの C 末端に続く約30 アミノ酸の領域は FTZ-F1 と BmFTZ-F1 とでよく保存されており、FTZ-F1 ボックスと呼ばれ、この領域が Zn フィンガーとともに塩基特異的な DNA 結合にかかわるとされている (Ueda *et al.*, 1992)。ステロイドホルモンレセプタースーパーファミリーに属する因子は、ホモあるいはヘテロダイマーで DNA に結合するのに対し、FTZ-F1 および BmFTZ-F1 はモノマーで標的 DNA 配列に強く結合する。このユニークな結合様式に FTZ-F1 ボックスが関わっているとされている (Ueda *et al.*, 1992)。今回得られたクローンのうち、P1-0.9 k クローンは、転写活性化ドメインの A/B 領域の途中までと、フレームシフトした E、F 領域が結合されていた。P7-0.8 k クローンは A/B および FTZ-F1 ボックスを含む完全長の DNA 結合領

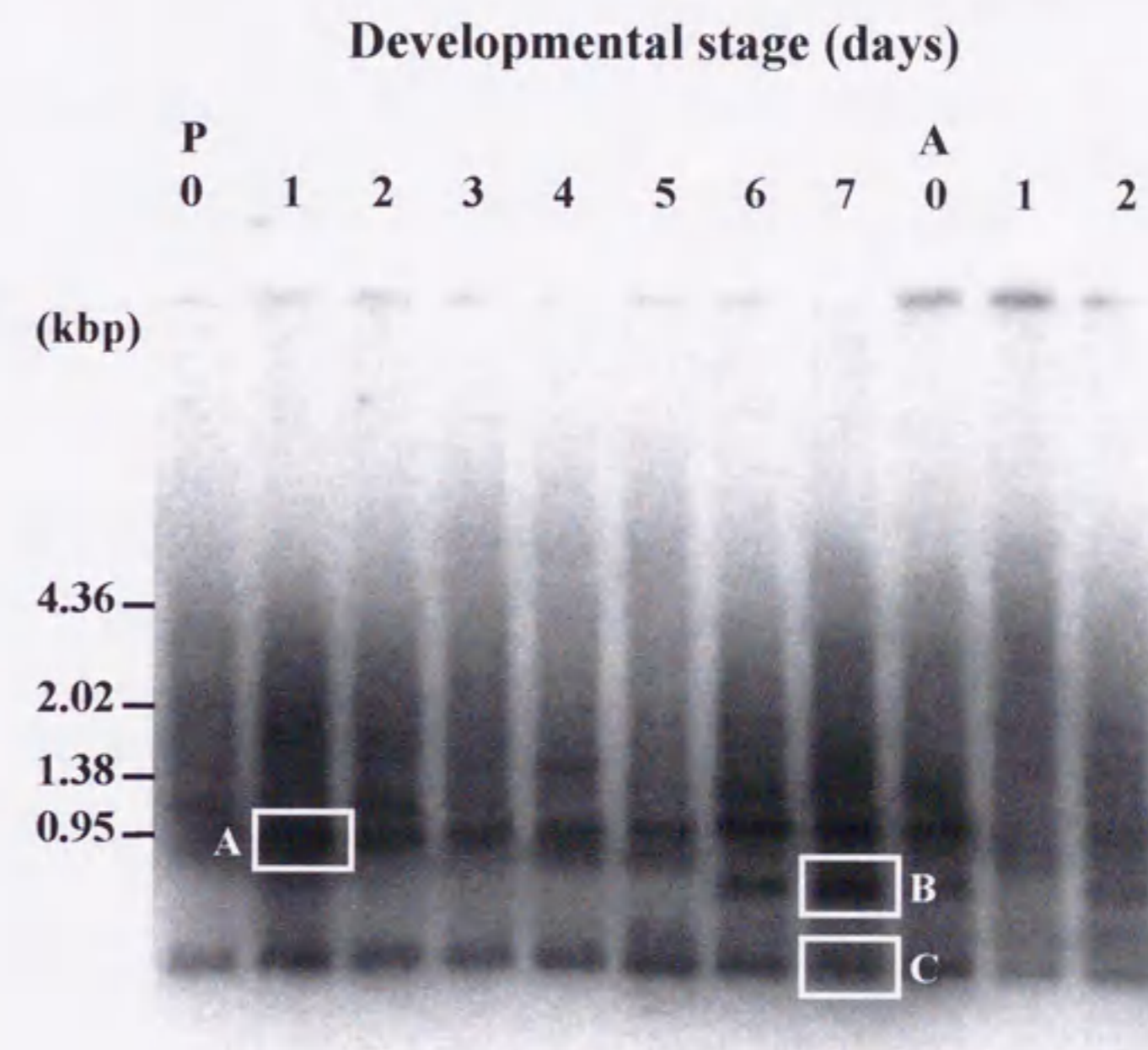


Fig. 22. Cloning of BmFTZ-F1 isoforms in the wing during the pupal-adult development. Total RNA (5 μ g) prepared from the wing during the pupal-adult development was subjected to RT-PCR, and the Southern blot analysis was performed by using the fragment of BmCR8 (Sun *et al.*, 1994) as a probe. Three open boxes indicate the hybridized bands. A; P1-0.9k, B; P7-0.8k, C; P7-0.3k .

域である C 領域を持っていた。P7-0.3 k クローンは、A/B 領域の途中までを持っており、その発現産物は、P1-0.9 k と同じアミノ酸をコードすると予測された (Fig. 23)。

今回単離した BmFTZ-F1 相同 (アイソフォーム) クローンの蛹 - 成虫発育期における翅組織中の mRNA 量の変化を Fig. 22 の結果を基に定量化した (Fig. 24)。その結果、P1-0.9k mRNA 量は 1 日齢と 7 日齢にピークを示す双山型の消長を示した。P7-0.8k mRNA および P7-0.3k mRNA も同様に、蛹 - 成虫発育期に双山型の消長を示したが、ピークの高さは、後半の 7 日齢で高く 1 日齢の約 2 倍に達していた。

この消長パターンを理解するために、この期間の血中のエクジステロイド濃度の変動 (Kadono-Okuda *et al.*, 1987) ならびに VAP-ペプチド mRNA 量の変動を取り上げた (Fig. 24)。この図から 2 つの点が指摘される。一つはエクジステロイドが低濃度期あるは欠損時期に BmFTZ-F1 アイソフォームの mRNA の蓄積が起こること。もう一つは、BmFTZ-F1 mRNA 量の増加に伴い VAP-ペプチド mRNA が蓄積されることである。この意味付けは考察に譲る。

4. 酵母ワン-ハイブリッドシステムによる転写調節活性の検討

アクティベータープラスミドの、pBM258T に P1-0.9 k、P7-0.8 k、P7-0.3 k および BmFTZ-F1 cDNA 全長を挿入したベクターを作製した。レポータープラスミドの、pHR307a に #31-0.5、#80-0.5、#31-0.8 を挿入したベクターを作製した。酵母 (JM 749) にアクティベータープラスミドとレポータープラスミドをそれぞれ 1 種類ずつコトランスフォーメーションしたのち欠損培地上で成育状況を観察した。その結果すべての組み合わせのベクターにおいて生育が観察されたものはなかった。

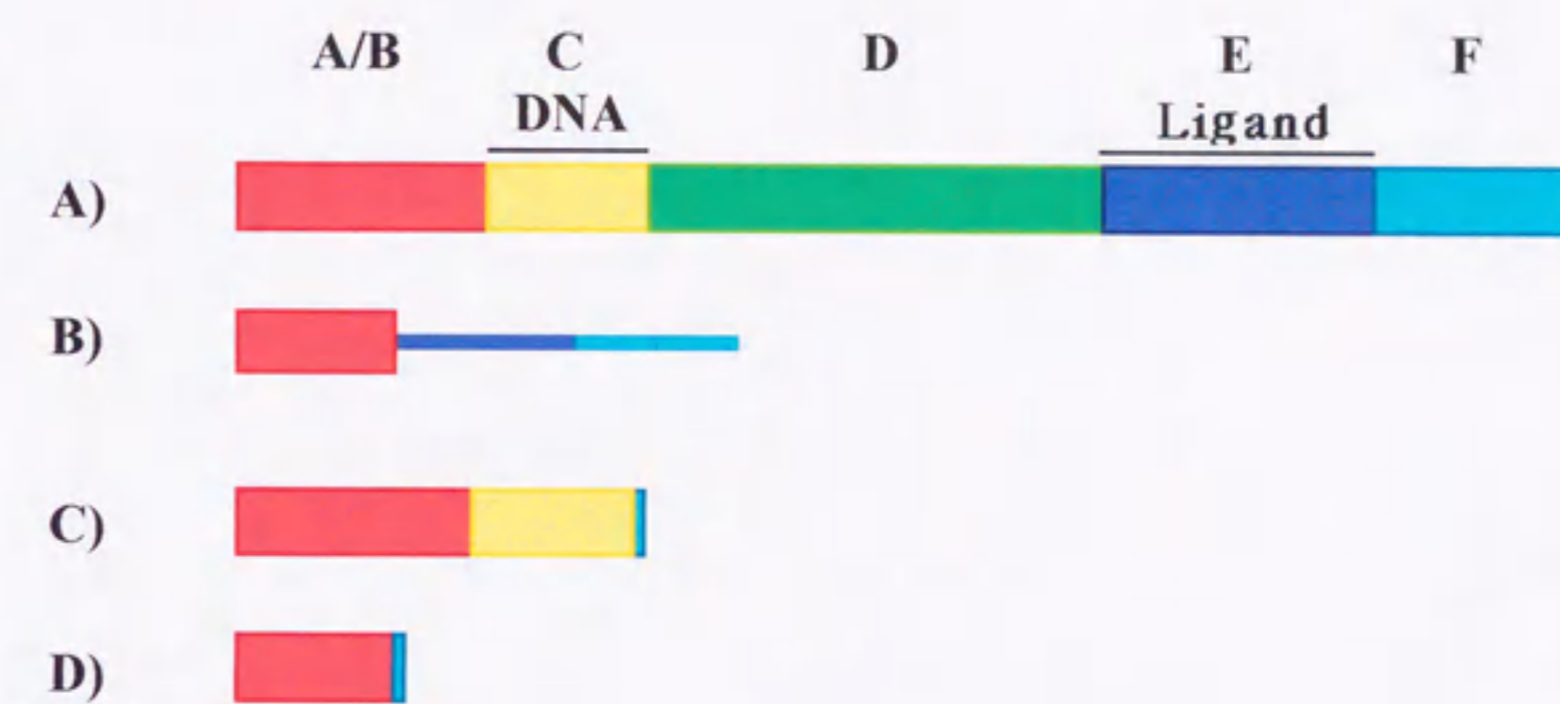


FIGURE 23. Structure of BmFTZ-F1 isoforms. A, BmFTZ-F1 (Sun *et al.*, 1994). B, P1-0.9k. C, P7-0.8k. D, P7-0.3k.

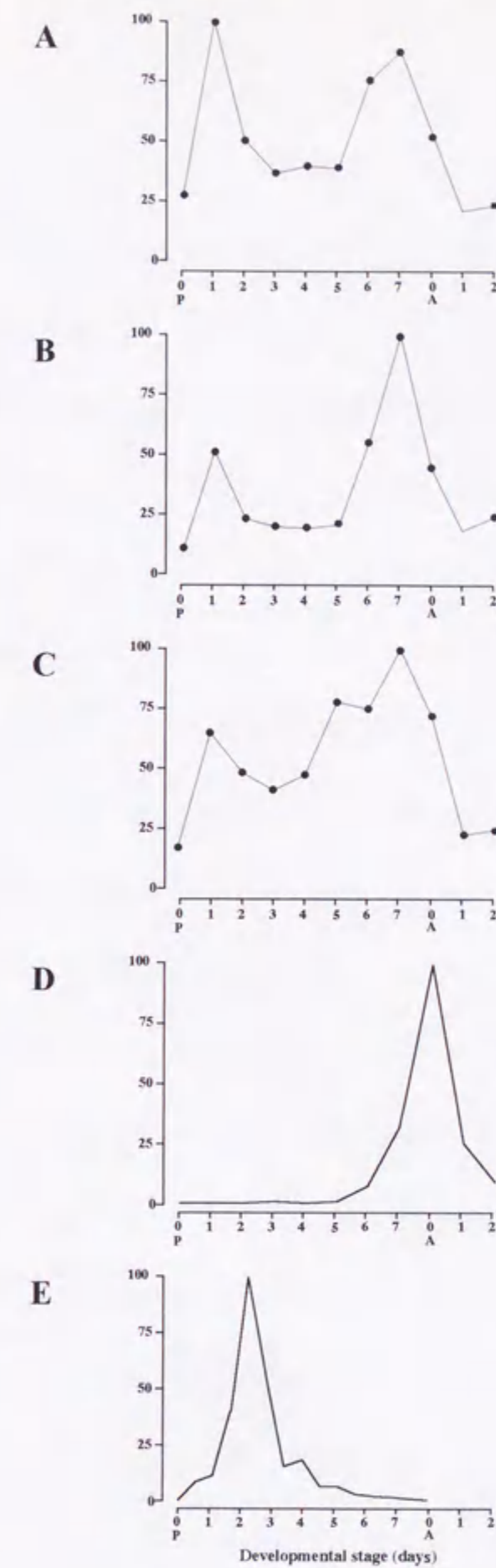


FIGURE 24. Changes in mRNA concentrations of BmFTZ-F1 isoforms in the wing during the pupal-adult development. Total RNA (20 μ g) prepared from the wing during the pupal-adult development was subjected to RT-PCR, and then Southern blot analysis was performed using the fragment of BmCR8 (Sun *et al.*, 1994). Radioactivity of the band corresponding to P1-0.9k (A), P7-0.8k (B) and P7-0.3k (C) was quantified. BmFTZ-F1 isoform mRNA concentration is expressed as percentages to that of maximum amount of the radioactivity on each isoform (100%). VAP-peptide mRNA concentration in the wing throughout pupal-adult development are adapted from the Fig. 14 (D). Hemolymph ecdysone titer is based on Kadono-Okuda *et al.*, 1987 (E). P and A represent the day of pupal ecdysis and adult eclosion, respectively. Each point represents means of two separate experiments.

考察

VAP-ペプチド遺伝子のクローニングとシーケンシングの結果、イントロン配列の異なる少なくとも2つの遺伝子が存在する事が分かった。両遺伝子は、エクソン領域の配列には差はなく、5'上流域の同位置に基本転写因子としてのTBPの認識結合配列であるTATAボックスをもっており、しかも転写開始点の位置が一致していた。このことから、両遺伝子は同じ転写産物を与え、しかも同一の転写制御下にあるものと考えられる。

エクソンの塩基配列はcDNAの配列と99%以上の相同性を示したことから、ここで得られた遺伝子はVAP-ペプチドの産生に与っているVAP-ペプチド遺伝子であると結論される。しかし本実験の範囲において、イントロン構成の異なるVAP-ペプチド遺伝子配列が認められた。このことは、VAP-ペプチド遺伝子の変異性を示すものであり、遺伝的多型の存在を意味している。この多型は本遺伝子の染色体上での配列を決める上でも有効に活用できる。

VAP-ペプチド遺伝子の5'上流域の配列は、両遺伝子間で保存されていた(Fig. 19)。BmFTZ-F1の認識結合配列に類似の配列も同位置に存在していた。これらの配列は、最適の結合配列ではないものの、*in vitro*においてBmFTZ-F1と結合する事が証明されている(Ueda *et al.*, 1991)。本実験によって、3種類のBmFTZ-F1アイソフォームと考えられるcDNAをクローニングした。これらのクローンの構造は、上田らによって絹糸腺から得られたクローンの構造(Sun *et al.*, 1994)とは異なっていた。蛹-成虫発育期の翅において絹糸腺型のBmFTZ-F1が存在するか否かを結論するには更なる調査が必要である。

これらのアイソフォームの蛹-成虫発育期における発現パターンを調査したところ、蛹化1日と蛹化7日にピークを示した(Fig. 24)。この発現は、血中エクジステロイド濃度の変動に対応している。この図では明らかではないが、蛹

化1日のピークは、吐糸期から蛹化に必要なエクジステロイドピークの減少 (Kiguchi and Agui, 1981) に、蛹化7日にみられるピークは成虫化に要求されるエクジステロイドピークの減少に対応している。すでに BmFTZ-F1 遺伝子の発現は血中のエクジステロイド濃度が減少することが引き金となって誘導されることが分かっている (Sun *et al.*, 1994)。cDNA の構造は異なっているが、今回得たアイソフォームの発現も同様のエクダイソン制御下にあると推測される。

ステロイドホルモンレセプタースーパーファミリーにおいては、種々のアイソフォームが存在し、それぞれが異なった機能を分担していることが知られている (Kastner *et al.*, 1990; Roman *et al.*, 1991)。昆虫のエクダイソン受容体にも種々のアイソフォームが知られ、それぞれが組織特異的あるいは時期特異的に発現して、脱皮や変態に必要な組織や細胞の分化の調節を行っている (Huet *et al.*, 1995; Talbot *et al.*, 1993; Truman *et al.*, 1994)。FTZ-F1 においても N 末端の構造を異にするアイソフォームが単離され、その発現時期特異性の違いから early 型と late 型とに分類されている。これらのアイソフォームはいずれも N 末端の A / B 領域を異にしているものであり、C 末端領域は変わらない。しかし今回得られた BmFTZ-F1 のアイソフォームは (P1-0.9k, P1-0.3k および P6-0.8k) は N 末端領域はほぼ保存されているが、C 末端領域が大きく異なっている。C 末端のリガンド結合部位を欠いたアイソフォームは、*Drosophila* の DHR 39 で知られている (Ayer *et al.*, 1993)。DHR 39 は FTZ-F1 β とも呼ばれ、FTZ-F1 と共通のシスエレメントに結合し、FTZ-F1 による標的遺伝子の活性化を競合的に抑制することが知られている。またリガンド結合領域の一部を欠いた DHR 39 のアイソフォームは、シスエレメントへの結合は起こるものの、FTZ-F1 の持つ転写調節作用に競合的な抑制力は持たないとされている (Ayer *et al.*, 1993)。このことは、今回同定された P6-0.8k アイソフォームは、DNA 結合領域は保持しているため、VAP-ペプチド遺伝子上流域に結合する能力は有するが、転写の活

性化には関わっていないことを推察させた。また、先述の通り、FTZ-F1 および BmFTZ-F1 はモノマーで標的 DNA 配列に強く結合することは、2 量体形成領域と考えられているリガンド結合領域を必要としていない可能性を推測させる。early 型の FTZ-F1 の 2 量体形成分子として、体節形成に関わるペアルール遺伝子の一つであり、early 型の FTZ-F1 の標的遺伝子である *fushi tarazu (ftz)* 遺伝子がコードするホメオドメインタンパク (Ftz) 自身が機能することが明らかになっている (Guichet *et al.*, 1997)。しかし、late 型の FTZ-F1 に関しては、結合する 2 量体結合分子及びリガンドの同定は成されておらず、orphan receptor として分類されている (Lavorgna, 1993)。もし P7-0.8k に VAP-ペプチド遺伝子の転写調節能があれば、BmFTZ-F1 はリガンドも 2 量体形成分子も必要とせず、エクダイソン濃度の減少に伴うステロイドレセプターファミリーのタンパク発現及びそれに伴う標的遺伝子の転写活性化カスケード (Lam *et al.*, 1997; Thummel, 1997) だけで VAP-ペプチド遺伝子の発現調節機構を説明できるかも知れない。

今回クローニングされたアイソフォームおよび BmFTZ-F1 が VAP-ペプチド遺伝子の転写を活性化する可能性はあるのであろうか。このことを調査するために酵母ワンハイブリッドシステムによる検討を行った。結果はすべて否定的であった。このことは、アイソフォームおよび Bm FTZ-F1 が、VAP-ペプチドの認識結合配列に結合できないか、結合はするが活性化までには及ばないか、あるいは、酵母内では機能できないかの 3 つの可能性を示唆している。つまりコファクターのような転写調節因子が他に存在する可能性が考えられた。転写の特異性は、特異的エンハンサーという主役の他に、基本転写因子群、および DNA 非結合性因子が協調的に働くことにより達成される (田村, 1995)。上田らにより発見された MBF 1 (multi protein bridging factor 1) は、BmFTZ-F1 と TBP の双方に結合するメディエーターであり、MBF 2 は、MBF 1 と TFIIA の b サブユニットと直接結合するメディエーターである。BmFTZ-F1 の転写活性化はこの MBF

1 及び MBF 2 を介して行われていることが示唆されている (Li *et al.*, 1994)。

VAP-ペプチド遺伝子の転写活性化に関してもアクチベーターあるいはメディエーターの様な DNA 非結合性因子が関与していることが考えられる。

以上のように今回 VAP-ペプチド遺伝子の時期特異的転写活性化機構を明らかにするための予備的な調査を行ってきた。BmFTZ-F1 に集中して研究を展開したが、今回得られた結果から、VAP-ペプチド遺伝子が、BmFTZ-F1 あるいはそのアイソフォームの有無による単純な系ではなく、これらの因子を含む高次の調節系によって転写調節を受けている可能性は高いと考えられる。

摘要

1. VAP-ペプチド遺伝子の構造を決定した。VAP-ペプチド遺伝子は、1 ハプロイドゲノム当たり1 コピー存在するが、品種間で変異が生じており、2 種類の遺伝子を得た。いずれのクローンも2 つのエクソンとそれを中断する1 つのイントロンより成っており、エクソン領域の塩基配列は同一であった。推定されるアミノ酸配列は、cDNA のものと一致した。両遺伝子の5' 上流域の同位置に、基本転写にかかわる TATA ボックスが存在した。真核生物の遺伝子に通常見られる CCAAT 配列は見つからなかった。

2. シスエレメントおよび転写調節因子の推定を行った結果、BmFTZ-F1 のシスエレメントが両遺伝子に存在していた。すべてのエレメントは、両遺伝子間の保存領域に含まれていた。

3. 蛹 - 成虫発育期の翅における Bm FTZ-F1 のクローニングを行った。C 末端構造の違う BmFTZ-F1 相同体 (アイソフォーム) と考えられる 3 種類の cDNA を得た。蛹 - 成虫発育期における遺伝子発現パターンを調査したところ、血中エクダイソン濃度の変動に対応して、すべてのアイソフォームが蛹化1 日と蛹化7 日にピークを示した。よって、今回得たアイソフォームも BmFTZ-F1 と同様のエクダイソンの制御下にあると考えられた。

4. 酵母ワンハイブリッドシステムにより、今回クローニングされたアイソフォームと Bm FTZ-F1 による VAP-ペプチド遺伝子の転写を活性化する可能性を検討した。結果はすべて否定的であった。このことは、アイソフォームおよび Bm FTZ-F1 が、VAP-ペプチドのシスエレメントに結合できないか、結合はするが活

性化までには及ばないか、または、酵母内では機能しないかのいずれかを示しており、他の転写調節因子が VAP-ペプチド遺伝子の発現に関与していることを示唆するものであった。

第 5 章 総合考察

本研究は、VAP-ペプチドの構造と機能を解明する目的で進められ、2つの結論を得た。1つは外来 (exogenous) VAP-ペプチドは DH の強力な協力剤となることであり、もう1つは、内在性 (endogenous) VAP-ペプチドは特定の成虫組織の機能発現をもたらす構造タンパクとして同定されたことである。この2つの機能は全く異なった機構によって発現されているに違いないが、その基本は VAP-ペプチドの構造と反応性にあることは事実である。

DH に対する活性増強作用は VAP-ペプチド分子と DH 分子間の相互作用によるものである。この点は、VAP-ペプチドと DH との混合物はトリプシン分解に対してより耐性になること (Imai *et al.*, 1996)、及び両分子の混合比によってその生物活性が異なること (Fig. 6) から推察される。VAP-ペプチドの DH との反応性に関わる領域は VAP-ペプチドの N 末端側のペプチドにあること (Fig. 6) は判明したが、反応機序については未解決のままである。そして VAP-ペプチドと DH との複合体がどのような機作で DH 反応の ED_{50} や TD 値を低下させるのかについても不明であるが、その作用発現は DH の生体内での安定性の増強つまり DH の分解の阻害ではなく、DH の受容体等への結合親和性の増強にあることは確かなことである。DH の受容体が同定されていない現在、この点についてさらに詳細な分子機構を推察することはできないが、VAP-ペプチドはホルモン分子とその受容体の親和性を解明する上で重要なモデル分子となろう。

本研究では VAP-ペプチドの作用を DH のみを対象にして検討してきた。DH は FXPRL アミド族に属する神経ペプチドであり、この族にはフェロモン生合成活性化神経ペプチド (PBAN) (Kitamura *et al.*, 1989) や内蔵筋収縮神経ペプチド (myotropic pyrokinin) (Nachman *et al.*, 1986) が含まれている。これらの

神経ペプチドホルモンの活性発現のための基本構造 (core structure) は FXPRL アミドであり、この構造が受容体結合領域である (Saito *et al.*, 1994; Nachman *et al.*, 1993)。したがって VAP-ペプチドは、これらの神経ペプチドホルモンに対しても協力剤として機能する可能性は十分考えられ、この可能性の解明は早急に実施されるべき課題である。

1976 年は昆虫内分泌学研究史上で 1 つの分岐点にあたる年である。それはワタリバツタから脂肪動員ホルモン (Adipokinetic hormone) が単離されて、全構造が決定され (Stone, 1976)、昆虫ペプチドホルモンが分子として明らかにされた年だからである。これ以来多くの昆虫ペプチドホルモンが単離されて、構造決定され、現在では 100 種に近い分子種が明らかになっている (Yamashita, 1996)。これらの研究によって明らかにされた重要な知見は、(1) 1 つの内分分泌現象すなわち 1 つの生理現象を調節するホルモン分子種は 1 種類ではなく、複数存在すること、(2) ホルモン分子の基本構造は維持されながらも、昆虫種によって分子構造が異なること、(3) 1 種のホルモン分子が複数の生理現象の調節に関与することである。このことは、生理現象とホルモン分子との間に厳密な対応関係を求めることができないことを示し、ホルモン研究が新たな段階に進みつつあることを予測させる。

このような昆虫ホルモンの化学研究の流れの中で、ホルモン活性を増強する生体由来のペプチド (VAP-ペプチド) が発見された。VAP-ペプチドは、生体内においては、DH 活性増強作用を持つ可能性が低い (第 3 章) が、この発見は生体内において機能する未知の DH 活性増強作用分子が存在する概念をもたらし、未知の DH 活性増強作用分子の同定により、ホルモン分子による生体制御機構のより高次の構造・構成を解明する糸口が得られる可能性があると考えられる。

近年、医学分野にみられるドラッグデリバリーシステムに代表されるように、標的器官でホルモン分子を最も望ましい形で作用させるため、ホルモンの協

力剤の開発やホルモンの化学修飾によってホルモン分子の指向を高める、いわゆるターゲティングの研究が盛んに行われている(橋田, 1995)。ホルモン分子の標的が、受容体や酵素など細胞の内外に存在する分子の場合、ターゲティングでは、血中での動態制御に加えて、受容体への親和性、細胞膜の透過過程などが問題となる。そのため従来のホルモン保護剤に代表されるキャリアタンパクによる受動的ターゲティングではなく、標的器官等への特異的な認識機構に基づいた抗体やホルモンなどをキャリアーに利用する能動的ターゲティングが行われている。この様なホルモン剤の研究の動向を考えると、VAP-ペプチドまたは、未知のDH活性増強作用分子は昆虫における能動的ターゲティング分子として、より効果的なホルモントーゲティング分子の設計を可能にするものと期待される。

一方、内在性のVAP-ペプチドは、成虫の限られた組織の真皮細胞で合成され、成虫の運動機能を保証するための構造強化ペプチドとしてクチクラ層に蓄積して成虫外骨格の硬化に関わっていることが推測された(第3章)。クチクラ層の硬化は、第3章で述べたとおり、sclerotizationの過程とクチクラタンパク自身による脱水作用による過程によって引き起こされると考えられている。

sclerotizationの反応は蛹及び成虫のほとんどすべての器官のクチクラで起こり、その程度はカテコールアミンやドーパミン等の供給量に依存し、クチクラ層内に供給されたカテコールアミンやドーパミンがクチクラタンパクと架橋重合し、クチクラ内の自由水を排除することにより引き起こされる。昆虫のクチクラタンパクに関する研究も活発に進められており、各種の昆虫種から多くのタンパクが分離されその全構造ならびに部分構造が解明されつつある(Andersen *et al.*, 1995)。カテコールアミンと共有結合しているクチクラタンパクも単離され、部分構造が明らかになっており(Okot-Kotber *et al.*, 1996)、チロシン及びヒスチジン残基がカテコールアミンとの共有結合に関わっているとされている

(Schaefer *et al.*, 1987)。しかし、これらの硬化やクチクラ形成の機構に直接携わ

るとされるクチクラタンパクの生体内での動態に関する研究はあまり成されていない。本論文の第3章で提案したVAP-ペプチドの機能は、タンパクの構造や反応特性に基づいて結論されたものではなく、VAP-ペプチドがいつのどの組織で合成され、蓄積されているかという生物学的な現象を基にして推定されたものである。つまり状況証拠による仮説の提案であり、与えられた仮説や問題の解決の過程での提案ではない。しかし、特定のタンパクの有無が組織や器官の性質を第一義的に決めることは、細胞、組織、器官の分化、形成の常道であり、VAP-ペプチドが特定の成虫器官の性質を決めることに決定的な役割を果たしている可能性は大いにある。したがって、本研究の成果は、昆虫のクチクラ形成過程を分子レベルで解析するための一つの新しい視点を提案したことになり、今後のこの分野の研究を加速させる動機となるものと確信している。

一連のVAP-ペプチド研究を通して得られた注目すべき事項についてさらに考察をつけ加えるならば、それは、VAP-ペプチド遺伝子発現は成虫羽化直前にみられたこと、そしてVAP-ペプチドは成虫に個有の組織、器官に局在していたこと(第3章)である。カイコを含め多くの昆虫で変態や脱皮を中心とした発育生物学的研究は活発に進められ、ホルモンによる発育制御機構の解析も大きく進展している(Gilbert *et al.*, 1996)。これらの研究ではそれぞれの系での初発反応に関与するタンパクあるいは遺伝子が主として取り扱われ、分化や発育の方向を決める機構の解明が主流を成している。たとえば代表的な変態研究として翅の形成が挙げられる(Fristrom and Fristrom, 1993)。これまでの多くの業績は翅原基細胞の増殖、分化、および形態形成に関わる遺伝子の発現やタンパクの生合成に関するものであり(French and Daniels, 1994; North and French, 1994)、翅が翅としての飛翔力を獲得する過程で必要とされる事項、例えば計画的な細胞死による翅重量の減量、翅型の完成など(Fristrom *et al.*, 1993; Takayama and Yoshida, 1997)の機構恵備に関わる事項は等閑視されてきた。このような発生生

物学の状況に対し、本論文で明らかにした VAP-ペプチドの発育動態ならびに組織局在状況は、VAP-ペプチドの遺伝子あるいはタンパクが成虫としての機能分化の完遂を分子レベルで検討するための一つのマーカー分子となりうることを示したものである。VAP-ペプチドの発見は変態の最終過程である「仕上げ」の機構をに研究する糸口を与えたことになる。第4章ではこの変態の最終過程を支配する調節系についての検討を開始した。そしてエクジステロイドという変態開始のホルモン分子が消失することが、変態完了の必須の情報になっているということ考察した。エクジステロイドの欠損はエクジステロイドの作用の欠損ではなく、新しい機構の出現のための情報であるように、変態の開始時にすべての変態プログラムが発動されるのではなく、変態の過程に対応して各種の分子や機構が差次的に発現されていること、このことを本 VAP-ペプチドの研究によってより確かなものになるものと考えられる。

本論文は VAP-ペプチドという非常にユニークなタンパクを対象にして研究をした結果をまとめたものである。このユニークさ故に、ユニークな推察や提案が可能となった。ここで提起した課題をいかに実証するかが問題であるが、提案の大胆さを考えれば勇気ある挑戦が望まれるであろう。

引用文献

- Adams D. S., Eickbuch T. H., Herrera R. J. and Lizardi P. M. (1986) A highly reiterated family of transcribed oligo (A)-terminated, interspersed DNA elements in the genome of *Bombyx mori*. *J. Mol. Biol.* 187, 465-478.
- Andersen S. O., Hojrup P. and Roepstorff P. (1995) Insect cuticular proteins. *Insect Biochem. Molec. Biol.* 25, 153-176.
- Apple R. T. and Fristrom J. W. (1991) 20-Hydroxyecdysone is required for, and negatively regulates transcription of *Drosophila* pupal cuticle protein genes. *Dev. Biol.* 146, 569-582 .
- Ayer S., Walker N., Mosammaparast M., Nelson J. P., Shilo B.-Z. and Benyajati C. (1993) Activation and repression of *Drosophila* alcohol dehydrogenase distal transcription by two steroid hormone receptor superfamily members binding to a common response element. *Nucleic Acids Res.* 21, 1619-1627.
- Ballinger D. G., Xue N. and Harshman K. D. (1993) A *Drosophila* photoreceptor cell-specific protein, Calphotin, binds calcium and contains a leucine zipper. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 90, 1536-1540.
- Chomzynski P. and Sacchi N. (1987) Single step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* 162, 156-159.
- Denlinger D. L. (1985) Hormonal control of diapause. In *Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry and Pharmacology* (Eds Kerkut G. A.

- and Gilbert L. I.), 8, pp. 353-412. Pergamon Press, Oxford.
- Emanuel J. R. (1991) Simple and efficient system for synthesis of nonradioactive nucleic acid hybridization probes using PCR. *Nucleic Acids Res.* 19, 2790.
- Evans R. M. (1988) The steroid and thyroid hormone receptors superfamily. *Science* 240, 889-895.
- French V. and Daniels G. (1994) The beginning and the end of insect limbs. *Curr. Biol.* 4, 34-37.
- Fristrom D. and Fristrom J. W. (1993) The metamorphic development of the adult epidermis. In *The Development of Drosophila* (Eds. A. Martinas-Arias and M. Bates,). pp. 843-897. Cold Spring Harbor Press, New York.
- Fristrom D., Wilcox M. and Fristrom J. (1993) The distribution of PS integrins, laminin A and F-actin during key stages in *Drosophila* wing development. *Development.* 117, 509-523.
- Frohman M. A., Dush M. K. and Martin G. R. (1988) Rapid production of full-length cDNAs from rare transcripts: Amplification using a single gene-specific oligonucleotide primer. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 85, 8998-9002.
- Gilbert L. I., Rybczynski R. and Tobe S. S. (1996) Endocrine cascade in insect metamorphosis. In *Metamorphosis, Postembryonic reprogramming of gene expression in amphibian and insect cells* (Eds Gilbert L. I., TATA J. R. and Atkinson B. G.), pp. 60-98. Academic Press, San Diego.
- Guichet A., Copeland J. W. R., Erdelyi M., Hlousek D., Zavorszky P., Ho J.,

- Brown S., Percival-Smith A., Krause H. M. and Ephrussi A. (1997) The nuclear receptor homologue Ftz-F1 and the homeodomain protein Ftz are mutually dependent cofactors. *Nature* 385, 548-552.
- 橋田充 (1995) ドラッグデリバリーシステム - 創薬と治療への新たなる挑戦 - 。 pp. 39-66. 新バイオサイエンスシリーズ。化学同人。京都。
- Hasegawa K. (1957) The diapause hormone of the silkworm, *Bombyx mori*. *Nature* 179, 1300-1301.
- Hillerton J. E. and Vincent J. F. V. (1983) Consideration of the importance of hydrophobic interactions in stabilizing insect cuticle. *Int. J. Biol. Macromol.* 5, 163-166.
- Hruby V. J. (1984) Design on peptide superagonists and antagonists, conformational and dynamic consideration. In *Conformationally directed drug design* (Eds Vida J. A. and Gordon M.). pp. 9-27. American Chemical Society, Washington DC.
- Huet F., Ruiz C. and Richards G. (1995) Sequential gene activation by ecdysone in *Drosophila melanogaster*: the hierarchical equivalence of early and early late genes. *Development* 121, 1195-1204.
- Ichikawa M. and Ishizaki H. (1963) Protein nature of the brain hormone of insects. *Nature* 198, 308-309.
- Ikeda M., Su Z.-H., Saito H., Imai K., Sato Y., Isobe M. and Yamashita O. (1993) Induction of embryonic diapause and stimulation of ovary trehalase activity in the silkworm, *Bombyx mori*, by synthetic diapause hormone. *J. Insect Physiol.* 39, 889-895.
- Imai K., Kondo N., Isobe M., Goto T., Yamashita O. and Hasegawa K. (1982) The neurohormones from the suboesophageal ganglion of *Bombyx*

mori: Separation of melanization and reddish-coloration hormone from diapause hormone. *J. Seric. Sci. Jpn.* 51, 111-125.

Imai K., Konno T., Nakazawa Y., Komiya T., Isobe M., Koga K., Goto T., Yaginuma T., Sakakibara K., Hasegawa K. and Yamashita, O. (1991) Isolation and structure of diapause hormone of the silkworm, *Bombyx mori*. *Proc. Jap. Acad.* 67B, 98-101.

Imai K., Sugiura K., Komiya T. and Yamashita, O. (1996) Isolation and partial structure of a unique lipophilic peptide, VAP peptide, from the heads of male silkworm moths. *Biosci. Biotech. Biochem.* 60, 355-357.

Ishibashi J., Kataoka H., Nagasawa H., Isogai A. and Suzuki A. (1992) Isolation and identification of adipokinetic hormone of the silkworm, *Bombyx mori*. *Biosci. Biotech. Biochem.* 56, 66-70.

Ishizaki H. and Ichikawa M. (1967) Purification of the brain hormone of the silkworm, *Bombyx mori*. *Biol. Bull.* 133, 355-368.

Ishizaki H. and Suzuki A. (1980) Prothoracicotropic Hormone. In *Neurohormonal Techniques in Insects*. (ed. T. A. Miller) pp. 244-276. Springer-Verlag, New York.

Isobe M. and Goto T. (1980) Diapause hormone. In *Neurohormonal Techniques in Insects*. (ed. T. A. Miller) pp.217-243. Springer-verlag, New York.

Ito H., Fukuda Y., Murata K. and Kimura A. (1983) Transformation of intact yeast cells treated with alkali cations. *J. Bacteriol.* 153, 163-168.

Kadono-Okuda K., Kuwano E., Eto M. and Yamashita O. (1987) Anti-ecdysteroid action of some imidazole derivatives on pupal-adult

development of the silkworm, *Bombyx mori* (Lepidoptera: Bombycidae). *Appl. Ent. Zool.* 22, 370-379.

Kastner Ph., Krust A., Mendelsohn C., Garnier J. M., Zelent A., Leroy P., Staub A. and Chambon P. (1990) Murine isoforms of retinoic acid receptor γ with specific patterns of expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 87, 2700-2704.

Kataoka H., Nagasawa H., Isogai A., Ishizaki H. and Suzuki A. (1991) Prothoracicotropic hormone of the silkworm, *Bombyx mori*: Amino acid sequence and dimeric structure. *Agric. Biol. Chem.* 55, 73-86.

Kawakami A., Kataoka H., Ota T., Mizoguchi A., Kimura-Kawakami M., Adachi T., Iwami M., Nagasawa H., Suzuki A. and Ishizaki H. (1990) Molecular cloning of the *Bombyx mori* prothoracicotropic hormone. *Science* 247, 1333-1335.

Kawasaki H., Kiguchi K., Agui N. and Iwashita Y. (1986) Ecdysteroid titer and wing development during the pupal-adult transformation of *Bombyx mori*. *Zool. Sci.* 3, 301-308.

Kiguchi K. and Agui N. (1981) Ecdysteroid levels and developmental events during larval moulting in the silkworm, *Bombyx mori*. *J. Insect Physiol.* 27, 805-812.

Kikuchi Y., Mori K., Suzuki S., Yamaguchi K. and Mizuno S. (1992) Structure of the *Bombyx mori* fibroin light-chain-encoding gene: upstream sequence elements common to the light and heavy chain. *Gene* 110, 151-158.

Kitamura A., Nagasawa H., Kataoka H., Inoue T., Matsumoto S., Ando T. and Suzuki A. (1989) Amino acid sequence of pheromone-

- biosynthesis-activating neuropeptide (PBAN) of the silkworm, *Bombyx mori*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 163, 520-526.
- Kono T., Nagasawa H., Isogai A., Fugo H. and Suzuki A. (1991) Isolation and complete amino acid sequences of eclosion hormones of the silkworm, *Bombyx mori*. *Insect Biochem.* 21, 185-195.
- Kravariti L., Lecanidou R. and Rodakis G. C. (1995) Sequence analysis of a small early chorion gene subfamily interspersed within the late gene locus in *Bombyx mori*. *J. Mol. Evol.* 41, 24-33.
- Lam G. T., Jiang C. and Thummel C. S. (1997) Coordination of larval and prepupal gene expression by the DHR3 orphan receptor during *Drosophila* metamorphosis. *Development* 124, 1757-1769.
- Lavorgna G., Karim F. D., Thummel C. S. and Wu C. (1993) Potential role for a FTZ-F1 steroid receptor superfamily member in the control of *Drosophila* metamorphosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 90, 3004-3008.
- Li F.-Q., Ueda H. and Hirose S. (1994) Mediators of activation of fushi tarazu gene transcription by BmFTZ-F1. *Mol. Cell. Biol.* 14, 3013-3021.
- Manfioletti G. and Schneider C. (1988) A new and fast method for preparing high quality lambda DNA suitable for sequencing. *Nucleic Acids Res.* 16, 2873-2884.
- Martin J. H., Benzer S., Rudnicka M. and Miller C. A. (1993) Calphotin: a *Drosophila* photoreceptor cell calcium-binding protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 90, 1531-1535.
- Mori S., Izumi S. and Tomino S. (1991) Complete nucleotide sequences of

major plasma protein genes of *Bombyx mori*. *Biochim. Biophys. Acta.* 1090, 129-132.

Mount S. M. (1982) A catalogue of splice function sequences. *Nucleic Acids Res.* 10, 459-472.

Murata T., Kageyama Y., Hirose S. and Ueda H. (1996) Regulation of the *EDG84A* gene by FTZ-F1 during metamorphosis in *Drosophila melanogaster*. *Mol. Cell. Biol.* 16, 6509-6515.

Nachman R. J., Holman G. M. and Cook B. J. (1986) Active fragments and analogs of the insect neuropeptide leucopyrokinin: Structure-function studies. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 137, 936-942.

Nachman R. J., Holman G. M., Schoofs L. and Yamashita O. (1993) Silkmoth diapause induction activity of myotropic pyrokinin (FXPRLamide) insect neuropeptides. *Peptides.* 14, 1043-1048.

Nagasawa H., Kataoka H. and Suzuki A. (1990) Chemistry of *Bombyx* prothoracicotropic hormone and bombyxin. In *Molting and Metamorphosis*. (eds. E. Ohnishi and H. Ishizaki), pp. 33-48. Springer-Verlag, Berlin.

Nakato H., Toriyama M., Izumi S. and Tomino S. (1990) Structure and expression of mRNA for a pupal cuticle protein of the silkworm, *Bombyx mori*. *Insect Biochem.* 20, 667-678.

Niimi T., Yamashita O. and Yaginuma T. (1996) Structure of the *Bombyx* sorbitol dehydrogenase gene: A possible alternative use of the promoter. *Insect Molec. Biol.* 5, 269-280.

新美輝幸、塩見邦博、片桐伸悦、清宮麻希子 (1997) テクニカルノート

- Yeast one-hybrid system - 。日本内分泌学会ニュース。85, 18-23。

North G. and French V. (1994) Patterns upon patterns. *Curr. Biol.* 4, 611-614.

Okot-Kotber B. M., Morgan T. D., Hopkins T. L. and Kramer K. J. (1996) Catecholamine-containing proteins from the pharate pupal cuticle of the tobacco hornworm, *Manduca sexta*. *Insect Biochem. Molec. Biol.* 26, 475-484.

Posnett D. N., McGrath H. and Tam J. P. (1988) A novel method for producing anti-peptide antibodies. *J. Biol. Chem.* 263, 1719-1725.

Qiu J. and Hardin P. E. (1995) Temporal and spatial expression of an adult cuticle protein gene from *Drosophila* suggests that its protein product may impart some specialized cuticle function. *Dev. Biol.* 167, 416-425.

Riddiford L. M. and Truman J. W. (1978) Biochemistry of insect hormones and insect growth regulators. In *Biochemistry of Insects* (Edited by Rocksteins M.), pp. 307-357. Academic Press, New York.

Roman C., Cohn L. and Calame K (1991) A Dominant negative form of transcription activator mTFE3 created by differential splicing. *Science* 254, 94-97.

Rose M. D., Winston F. and Hieter P. (1990) *Methods in Yeast Genetics: A Laboratory Course Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.

Saiki R. K., Scharf S., Faloona F., Mullis K. B., Horn G. T., Erlich H. A. and Arnheim N. (1985) Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science*. 230, 1350-1354.

- Saito H., Takeuchi Y., Takeda R., Hayashi Y., Watanabe K., Shin M., Imai K., Isobe M. and Yamashita O. (1994) The core and complementary sequence responsible for biological activity of the diapause hormone of the silkworm, *Bombyx mori*. *Peptides* 15, 1173-1178.
- Sakai N., Mori S., Izumi S., Haino-Fukushima K., Ogura T., Maekawa H. and Tomino S. (1988) Structures and expression of mRNAs coding for major plasma proteins of *Bombyx mori*. *Biochim. Biophys. Acta.* 949, 224-232.
- Sambrook J., Fritsch E. F. and Maniatis T. (1989) *Molecular cloning: A laboratory manual*, 2nd edn. pp. 11.45-11.57. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Sanger F., Nicklin S. and Coulson A. R. (1977) DNA sequencing with chain terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74, 5463-5467.
- Sato Y. and Yamashita O. (1991) Structure and expression of a gene coding for egg-specific protein in the silkworm, *Bombyx mori*. *Insect Biochem.* 21, 495-505.
- Sato Y., Nakazawa Y., Menjo N., Imai K., Komiya T., Saito H., Shin M., Ikeda M., Sakakibara K., Isobe M. and Yamashita O. (1992) A new diapause hormone molecule of the silkworm, *Bombyx mori*. *Proc. Jap. Acad.* 68B, 75-79.
- Sato Y., Oguchi M., Menjo N., Imai K., Saito H., Ikeda M., Isobe M. and Yamashita O. (1993) Precursor polyprotein for multiple neuropeptides secreted from the suboesophageal ganglion of the silkworm, *Bombyx*

mori: Characterization of the cDNA encoding the diapause hormone precursor and identification of additional peptides. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 90, 3251-3255.

Sato Y., Ikeda M. and Yamashita O. (1994) Neurosecretory cells expressing the gene for common precursor for diapause hormone and pheromone biosynthesis-activating neuropeptide in the suboesophageal ganglion of the silkworm, *Bombyx mori*. *Gen. Comp. Endocrinol.* 96, 27-36.

Schaefer J., Kramer K. J., Garbow J. R., Jacob G. S., Stejskal E. O., Hopkins T. L. and Speirs R. D. (1987) Aromatic cross-links in insect cuticle: detection by solid-state ^{13}C and ^{15}N NMR. *Science* 235, 1200-1204.

Schagger H. and Von Jagow G. (1987) Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Analyt. Biochem.* 166, 368-379.

Schwartz L. M. and Truman J. W. (1983) Hormonal control of rates of metamorphic development in the tobacco hornworm, *Manduca sexta*. *Dev. Biol.* 99, 103-114.

塩見邦博 (1995) カイコにおける新規ペプチド (VAP) の組織局在性及び動態ならびにその調節に関する研究。名古屋大学 修士論文 (農学)。第 1688 号。

Sridhara S. (1981) Macromolecular changes during insect metamorphosis. In *Metamorphosis a Problem in Developmental Biology* (Eds Gilbert L. I. and Frieden E.), 2nd edn, pp. 177-216. Plenum Press, New York.

Stone J. V., Mordue W., Batley K. E. and Morris H. R. (1976) Structure of locust adipokinetic hormone, a neurohormone that regulates lipid utilization during flight. *Nature* 263, 207-211.

Storey K. B. and Storey J. M. (1983) Biochemistry of freeze tolerance in terrestrial insects. *Trends Biochem. Sci.* 8, 242-245.

Sun G.-C., Hirose S. and Ueda H. (1994) Intermittent expression of BmFTZ-F1, a member of the nuclear hormone receptor superfamily during development of the silkworm *Bombyx mori*. *Dev. Biol.* 162, 426-437.

Suzuki A., Nagasawa H., Kataoka H., Hori Y., Isogai A., Tamura S., Guo F., Zhong X., Ishizaki H., Fujishita M. and Mizoguchi A. (1982) Isolation and characterization of prothoracicotropic hormone from silkworm, *Bombyx mori*. *Agric. Biol. Chem.* 46, 1107-1109.

Takayama E. and Yoshida A. (1997) Color pattern formation on the wing of the butterfly *Pieris rapae*. 1. Cautery induced alteration of scale color and delay of arrangement formation. *Develop. Growth Differ.* 39, 23-31.

Talbot W. S., Swyryd E. A. and Hogness D. S. (1993) *Drosophila* tissues with different metamorphic responses to ecdysone express different ecdysone receptor isoforms. *Cell* 73, 1323-1337.

Tam J. P. (1988) Synthetic peptide vaccine design: Synthesis and properties of a high-density multiple antigenic peptide system. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 85, 5409-5413.

田村隆明 (1995) 転写制御のメカニズム。実験医学バイオサイエンス。BS-18。pp. 143-144。羊土社。東京。

Thummel C. S. (1997) Dueling orphans- interacting nuclear receptors coordinate *Drosophila* metamorphosis. *BioEssays.* 19, 669-672.

Truman J. W., Talbot W. S., Fahrbach S. E. and Hogness D. S. (1994)

Ecdysone receptor expression in the CNS correlates with stage-specific responses to ecdysteroids during *Drosophila* and *Manduca* development. *Development* 120, 219-234.

Ueda H., Sonoda S., Brown J. L., Scott M. P. and Wu C. (1990) A sequence-specific DNA-binding protein that activates *fushi tarazu* segmentation gene expression. *Gene. Dev.* 4, 624-635.

Ueda H. and Hirose S. (1991) Defining the sequence recognized with BmFTZ-F1, a sequence specific DNA binding factor in the silkworm, *Bombyx mori*, as revealed by direct sequencing of bound oligonucleotides and gel mobility shift competition analysis. *Nucl. Acids Res.* 19, 3689-3693.

Ueda H., Sun G.-C., Murata T. and Hirose S. (1992) A novel-DNA binding motif abuts the zinc finger domain of insect nuclear hormone receptor FTZ-F1 and mouse embryonal long terminal repeat-binding protein. *Mol. Cell. Biol.* 12, 5667-5672.

Wilson E. T., Condliffe D. P. and Sprague K. U. (1988) Transcriptional properties of BmX, a moderately repetitive silkworm gene that is an RNA polymerase III template. *Mol. Cell. Biol.* 8, 624-631.

Von Heijne G. (1986) A new method for predicting signal sequence cleavage sites. *Nucl. Acids Res.* 14, 4683-4690.

Xu W.-H., Sato Y., Ikeda M. and Yamashita O. (1995) Molecular characterization of the gene encoding the precursor protein of diapause hormone and pheromone biosynthesis activating neuropeptide (DH-PBAN) of the silkworm, *Bombyx mori* and its distribution in some insects. *Biochem. Biophys. Acta* 1261, 83-89.

山下興亜 (1978) 昆虫の一生とホルモン—変態・休眠のホルモン支配—。化学と生物。16, 616-625。

山下興亜 (1993) カイコの卵休眠と休眠ホルモン。昆虫の季節適応と休眠。(竹田真木生、田中誠二編) pp. 338-347、文一総合出版、東京。

Yamashita O. (1996) Diapause hormone of the silkworm, *Bombyx mori*: Structure, gene expression and function. *J. Insect Physiol.* 42, 669-679.

Yamashita O. and Hasegawa K. (1985) Embryonic diapause. In *Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry and Pharmacology* (Eds Kerkut G. A. and Gilbert L. I.), 1, pp. 407-434. Pergamon press, Oxford.

Yamashita O. and Yaginuma T. (1991) Silkworm eggs at low temperatures: Implication for sericulture. In *Insects at Low Temperature* (Eds Lee, Jr. R. E. and Denlinger D. L.), pp. 424-445. Chapman and Hall, New York.

報文目録

1. Shiomi K., Sato Y., Imai K. and Yamashita O.

A hydrophobic peptide (VAP-peptide) of the silkworm, *Bombyx mori*:
Structure, expression and an enhancing function of diapause hormone
activity

Insect Biochem. Mol. Biol. (in press)

2. Shiomi K., Niimi T., Sato Y., Imai K. and Yamashita O.

A hydrophobic peptide (VAP-peptide) of the silkworm, *Bombyx mori*:
A unique role for adult activity proposed from the gene expression and
production at the terminal phase of metamorphosis

Insect Biochem. Mol. Biol. (submitted).