

## 【序論】

昆虫は環境に適応するため様々な生存戦略を獲得してきた。昆虫の中には休眠により成長を停止させ、生存に不利な環境を克服するものがある。農業害虫として有名なヨトウガ (*Mamestra brassicae*) は蛹休眠によって冬の過酷な環境を乗り越え繁殖する。近年、ヨトウガの蛹休眠が前胸腺刺激ホルモン (PTTH) の減少によって引き起こされると示された。PTTH は脱皮・変態を上流で制御するペプチドホルモンであり、前胸腺に作用してエクジソンの合成・分泌を誘導する。PTTH が休眠・非休眠の切り替えを制御する機構を詳細に調べるためには、活性のあるヨトウガ PTTH (*MbPTTH*) が必要である。しかし、天然から PTTH を精製するには数百万頭のヨトウガを必要とするため困難である。また、既に確立されている、カイコのリコンビナント PTTH と同じ調製方法を用いて、リコンビナント *MbPTTH* の作製が試みられてきたが、活性をもつ *MbPTTH* は未だ得られていない。そこで本研究では、大腸菌で調製したリコンビナント PTTH を、分子内で3対、分子間で1対のジスルフィド結合を架橋したホモ二量体となるようにリフォールディングさせ、活性をもった *MbPTTH* を得ることを目指した。

## 【結果と考察】

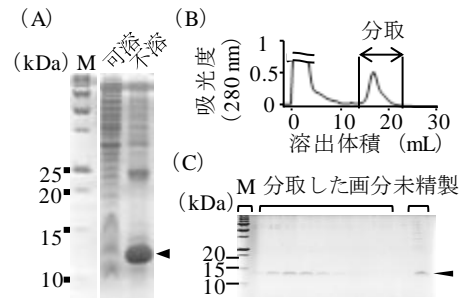
*MbPTTH* の大量発現と精製・リフォールディング

*MbPTTH* の C 末端に His-Tag が付加するように塩基配列をデザインした。その塩基配列を pHTK ベクターに挿入したプラスミドを調製後、大腸菌 BL21 株を形質転換してリコンビナント *MbPTTH* を発現させた (図 1A)。発現させた大部分の *MbPTTH* は、封入体として不溶性画分に回収された。また、この *MbPTTH* は活性をもたないため、変性後、希釈法を用いてリフォールディングした。実際

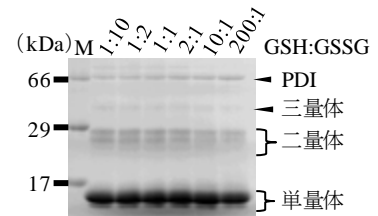
には、不溶性画分を変性剤と還元剤を含む緩衝液で可溶化後、Ni-Sepharose カラムに供して His-Tag によるアフィニティー精製をし、大腸菌由来の大部分のタンパク質を除去した (図 2B, C)。次に、ゲルろ過により溶液中の還元剤を除き、様々な比率の還元型・酸化型グルタチオン (GSH:GSSG) を含む緩衝液で、10 倍に希釈して、変性剤の濃度を下げることで、*MbPTTH* のリフォールディングを誘導した。リフォールディング後の *MbPTTH* は、限外ろ過により除塩・濃縮した。

リフォールディング条件の違いによる *MbPTTH* の比較

PTTH は二量体で活性を持つ。そこで、ジスルフィド結合の組み換えを促進する Protein Disulfide-isomerase (PDI) を添加しながら様々な条件でリフォールディングした *MbPTTH* の非還元 SDS-PAGE を行い、二量体の形成量を比較した。結果、二量体に相当するバンドが単一ではなく、3 本見られた (図 2)。これは、ジスルフィド結合の架橋様式違いが原因と考えられた。バンドの濃さを画像解析で比較すると、上の 2 本のバンドは、酸化条件ほど濃く、一番下のバンドは GSH:GSSG=1:1 の条件で最も濃いとわかった。また、三量体の形成も見られた。

図1. *MbPTTH* の発現と精製

(A) 発現した *MbPTTH* の SDS-PAGE (CBB 染色)。 (B) *MbPTTH* を His-Trap カラムで精製し、吸光度 280 nm を測定した。 (C) 分画部分と未精製の SDS-PAGE (CBB 染色)。矢尻が *MbPTTH*

図2. 異なる条件でリフォールディングした *MbPTTH* の比較  
様々な酸化還元条件下で24時間リフォールディングした *MbPTTH* の非還元 SDS-PAGE (CBB 染色)。

ところで、*MbPTTH* は7つのシステイン残基を有しており、ジスルフィド結合の架橋様式の違いで二量体の形成が影響されると予想できる。そこで、LC と ESI-MS を用いて、ジスルフィド結合が検出できるかを検討した。まずは、リフォールディング処理前後の *MbPTTH* を比較することで、架橋されたジスルフィド結合が検出できるか検証した。*MbPTTH* をトリプシンで断片化後、LC に供して得られたクロマトグラムのピーク部分を分取し、ESI-MS でそのピークに含まれるペプチド断片を同定した。結果、変性状態の *MbPTTH* では、システイン残基を含む断片と含まない断片の両方のピークを同定できた (図3 実線)。一方、リフォールディングした *MbPTTH* では、トリプシン消化による断片のピークは検出されず、保持時間 50 分付近に *MbPTTH* と思われるピークが検出された (図3 破線)。システイン残基を含まない断片のピークが検出されていないことから、リフォールディング後の *MbPTTH* の立体構造上、トリプシン処理が不十分になったとも考えられる。

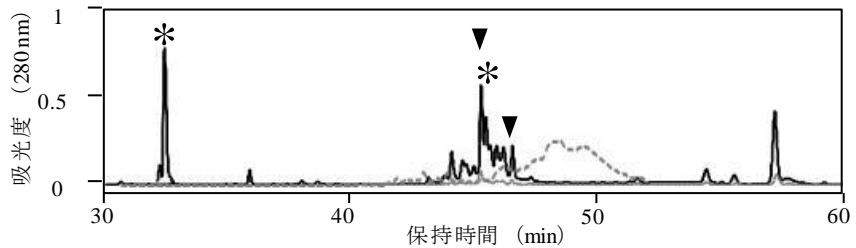


図3. トリプシン処理したPTTHのLCクロマトグラム  
変性状態 (実線) とリフォールディングした (破線) PTTHをLCに供して、吸光度280 nmを測定した。ESI-MSでピークに相当するPTTH断片を同定した。システイン残基を持つ断片のピーク (▼) とシステイン残基を持たない断片のピーク (\*) が見られた。

### *MbPTTH* の生物活性検定

PTTH は前胸腺に作用してエクジソンの分泌を促す。そこで、得られた *MbPTTH* の生理活性を評価するため、様々な酸化還元条件下でリフォールディングした *MbPTTH* を添加した培地でヨトウガ前胸腺を培養し、培地へのエクジソンの分泌量を分析した。結果、GSH:GSSG=200:1 でリフォールディングした *MbPTTH* には、前胸腺刺激活性が認められ、脳 2 個相当の脳抽出物と同程度のエクジソン分泌が認められた (図 4A, B)。しかし、-20°Cで1週間保存した同じサンプルで、再度活性検定を行ったところ、活性が見られなかった (図 4C)。これは、リフォールディング後の PTTH の保存状況が不適切なためと考えられる。

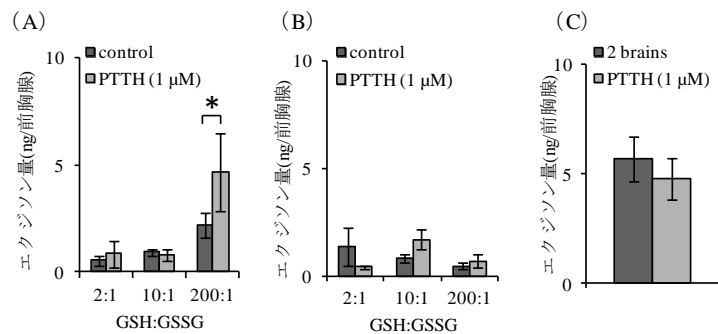


図4. リフォールディングPTTHの前胸腺刺激活性  
(A) 異なる酸化還元条件下でリフォールディングしたPTTHの活性検証。  
(B) 200:1でリフォールディングしたPTTHと脳抽出物との比較。  
(C) 1週間-20°C保存したサンプルについて (A) と同じ実験を行った。  
(mean±SEM; n=3, \*: p<0.05, t-test)

### 【結論】

大腸菌による *MbPTTH* の大量発現と精製に成功した。リフォールディングした *MbPTTH* の、ジスルフィド結合の架橋様式を分析する方法に関しては、更に検討が必要であると考えられた。生物活性に関しては、GSH:GSSG=200:1 でリフォールディングした *MbPTTH* に、顕著な前胸腺刺激活性が見られた。しかし、安定した生理活性を得るには、試料の保存条件などを検討する必要がある。今後、作製した *MbPTTH* を用いて休眠蛹への注射実験を行うことにより、ヨトウガ蛹休眠における PTTH の役割が明らかになると考えられる。それによって、ヨトウガ蛹休眠の、内分泌シグナルを介した複雑な休眠制御機構の一端が、分子レベルで明らかになることが期待される。