

## 幼若ホルモン(JH)アゴニストおよびアンタゴニストを用いた化学的アプローチによる JH 受容体の同定

古田賢次郎

## 目 的

幼若ホルモン (JH) は、昆虫において脱皮・変態のほか、生殖腺刺激、休眠、カースト分化などさまざまな生理調節機能に深く関与する重要なホルモンである (図 1)。これまでに、JH の光親和性標識プローブを用いたフォトアフィニティー法による JH 標的タンパク質の探索が行われてきた。その結果、JH 代謝酵素 (Touhara K. et al., *J. Biol. Chem.*, 1993) などが同定されている。しかし、JH は生体内で容易に分解されることや、疎水性が高くタンパク質への非特異的な吸着が多いなどの理由から、JH 受容体は未だに同定されておらず、その詳細な作用機構は明らかになっていない。

そこで本研究では、JH の受容体を同定することを目的として、JH アゴニストであるピリプロキシフェンを用いたアフィニティークロマトグラフィーによって、JH 特異的に結合するタンパク質の同定を試みた。本手法は、アフィニティークロマトグラフィーにおいて優れた物理化学的性質を示すナノ磁性微粒子である FG ビーズが開発されたことによって初めて実施可能となったものである。

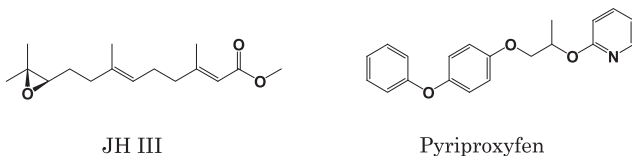


図 1 JH およびピリプロキシフェンの構造式

## 方 法

まず、ピリプロキシフェンを FG ビーズへ固定化するために必要なアミノ基を導入した誘導体を合成した。続いて、ピリプロキシフェン誘導体と FG ビーズを DMF に懸濁後、炭酸カリウムを加えて 60℃ で 24 時間反応させ、アフィニティービーズを作成した (図 2)。

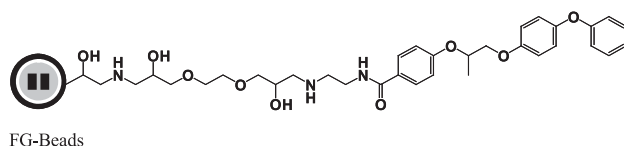


図 2 アフィニティービーズの構造

試料の調整は、カイコ (Shunrei x Shogetsu) 20 匹を用いて筋肉および脂肪体を含む表皮から塩月らが報告した方法 (Shiotsuki et al., *J. Pestic. Sci.*, 2004) に従って可溶化タンパク質を抽出した。1.0mg/ml に希釈した可溶化タンパク質溶液 200 $\mu$ l とアフィニティービーズ 0.5mg を 4℃ で攪拌しながら、4 時間結合反応を行った後、磁気分離を行って上清を廃棄した。その後、さらに 3 回 100mM KCl 緩衝液を加えて磁気分離を行い、結合しなかったタンパク質を除去した。最後に、1M KCl 緩衝液を加えてタンパク質を塩溶出させた後、溶出タンパク質サンプルを SDS-PAGE で分離し、銀染色で染色した。

## 結 果

銀染色によって、45kDa および 50kDa 付近に 2 種類のピリプロキシフェン誘導体に特異的な結合タンパク質が検出することができた。しかし、これらは極微量であったため、飛行時間型質量分析 (MALDI-TOF-MASS) によるタンパク質の同定には至らなかった。

## 考 察

今回得られたタンパク質は、新規昆虫成育制御剤の標的分子となりうるものであり、早期にこれらのタンパク質を同定する必要がある。また、これらはピリプロキシフェン誘導体に特異的なタンパク質であり、JH に対して特異的に結合するかは不明である。そのため、アフィニティークロマトグラフィーにおいて JH と拮抗するか検証する必要がある。

## 引用文献

- Shiotsuki T., Kuwano E., (2004) Detection of proteins with a high affinity for imidazole insect growth regulator, KK-42. *J. Pestic. Sci.*, 29 : 121-123.
- Touhara K., Prestwich G.D., (1993) Juvenile hormone epoxide hydrolase: photoaffinity labeling, purification, and characterization from tobacco hornworm eggs. *J. Biol. Chem.*, 268 : 604-609.