

蚕休眠ホルモンの化学

—精製・単離・構造決定を中心とした研究の流れ—

今井 邦雄

三重大大学生物資源学部

Chemical studies on diapause hormone

Kunio IMAI

Faculty of Bioresources, Mie University, Tsu, Mie 514-8507, Japan

Abstract

Diapause hormone is one of the most important insect hormones which induces egg diapause of the silkworm. The existence of the hormone was discovered in 1951. Although the research to clarify its structure was persevered eagerly, the efforts were not rewarded for an extremely long period. Finally, the hormone was isolated in 1990 and the structure was determined to be a 24-amino acid peptide amide in 1991. This review article deals with the history of the research to isolate and to determine the structure of the hormone and with further chemical studies on diapause hormone of the silkworm.

Key Words: diapause hormone • silkworm • insect hormone • peptide hormone

緒言

カイコは我々の衣服に使用する絹を生産する昆虫であるため、古くから飼育されている。事実、中国の殷時代の甲骨文字には蚕、桑などの文字が確認されており、おそらく今から3000年から4000年前より飼育されていたのではないかと考えられている。日本でも少なくとも弥生時代中期にはカイコ飼育が行われていたと考えられている。歴史が下って、明治後期から昭和初期前後になると、我が国の蚕産業は隆盛をきわめ、当時の最大の輸出品目は絹であったといわれているほどである。また、日本国内各地の地名に、蚕飼（茨城県）、絹島（栃木県）、

桑名（三重県）、扶桑（愛知県）など、「蚕」「絹」「桑」の文字を含むものが多く、養蚕がいかに我が国の各地に広がっていたかを物語っている。また、蚕に感謝する心からか、蚕や桑の文字を含む神社も多い¹⁾。余談ではあるが、著者らも、京都に出かける際には「蚕の社（蚕神社）」に詣でるよう、心がけている。

さて、上に述べたように我が国では、蚕飼育が盛んであったことから、蚕の成育過程での脱皮や変態などの劇的な変化を伴う諸生命現象はよく知られていた。現在では、これらの諸現象がいずれも、ホルモンによって統御されていることが明らかにされている。脱皮・変態は幼若ホルモンと脱皮ホルモンによって統御されており、これら

平成10年6月1日受理

三重大大学生物資源学部農産物利用学, 〒514-8507 三重県津市上浜町1515, imai@bio.mie-u.ac.jp

両ホルモンはさらに上位統御器官である脳から分泌されるホルモンによって統御されている²⁻⁴⁾。

これらの各ホルモンの研究はそれぞれに大変長い歴史と興味深いドラマを数多く含んでいる。それらの詳細は、それらを研究してきた研究者自身の手で、興味深くまとめられ公表されている^{5,6,7)}。

今回の小論では蚕に卵休眠を引き起こす休眠ホルモンの化学的研究とその周辺の研究に絞り、研究上の紆余曲折、研究ドラマを紹介したい。

休眠ホルモンの紹介と初期の研究史

現在地球上には、多種多様な昆虫（一説によると100万種以上と言われている）が、南から北まで、あらゆる所に生息している。彼らは「飛翔」のような高度な移動能力を獲得し、空間的に不適環境を克服するすべを手に入れ、あるいは、「休眠」や「休止」などの経時的不適環境克服能力を手に入れることにより、自らに好ましくない環境をのりこえて、生存域拡大を達成している。つまり、本小論の主題である休眠は、生物が不適な環境を克服する一手段として獲得したものといえる。また、別の見方をすれば、休眠は同種生物の成育時期を一致させることにより、交尾の可能性をふやし、種族維持と発展に貢献しているともいえる。

昆虫は様々な生育段階で休眠する。毒蛾の一種 (*Euproctis phaeorrhoea*)、ナシヒメシンクイガ、ニカメイガ、アワノメイガなどは幼虫で、ヤガの一種 (*Heliothis armigera*)、ヨトウガやセクロビア蚕は蛹期に、ウリハムシ、クロカメムシやコロラドハムシ等は成虫で休眠する。これらの昆虫の休眠では、幼若形質を維持させる幼若ホルモンや脱皮を促す脱皮ホルモン（エクジソン）などのホルモンが関与するとされている²⁾。これらに対し、蚕の休眠は、卵期にひきおこされる。言うまでもないが、卵は未分化状態であるため、ホルモン分泌器官を持っていない。では、蚕の卵休眠はいかにして引き起こされるのであろうか。この謎に対する解答は、長年の研究の末に、1951年に、長谷川（名古屋大学教授、故人）によってもたらされた^{8,9)}。また、ほぼ同時に福田らも、長谷川と類似の結論をえている¹⁰⁾。

彼らの結論を述べる前に、蚕の生活環を眺めておきたい。図1に蚕の生活環を示した。卵から孵化した幼虫は、脱皮ホルモン（図中にMで示した）と幼若ホルモン

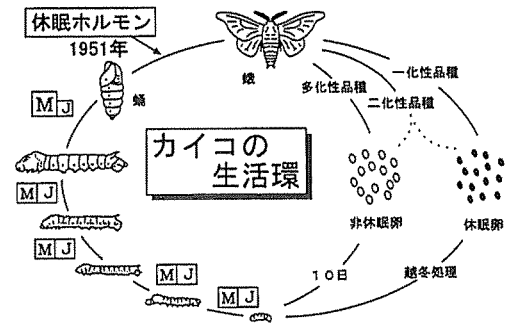


図1 蚕の生活環

（図中にJで示した）の統御のもとに、幼虫脱皮を繰り返し、五令幼虫となる。次に脱皮すると蛹となり、もう一度変態脱皮して蛾となり、交尾後、卵を産む。産まれた卵は休眠卵となったり、非休眠卵となったりするが、そのいずれとなるかは、品種により遺伝的に運命づけられている。

蚕は、その休眠性により、一化性、二化性および多化性の品種に分類されている。一化性品種の場合には、産まれてきた卵は、環境の如何を問わず、休眠卵となるよう運命づけられている。休眠卵は発育が拘束されており、そのままいくらおいても、成長することはなく、従って、孵化することもない。一旦休眠した蚕の卵を覚醒させ、成長を再開させるためには、低温（越冬）処理等の特別な処理が必要となる。この二つの点、つまり、休眠するか否かは遺伝的に運命づけられているという点と、休眠からの覚醒には特定の処理が必要であるという点で、「休眠」は冬眠などの「休止」と画然と区別されている。この品種は、一世代を全うすると次の世代は必ず休眠し、冬を経験しないと次の生活環に入ることができない。従って、一年に一代を全うするのみであり、一化性と呼ばれている。

上に述べた必ず休眠する一化性品種に対し、我が国でよく飼育されている二化性品種の休眠性は、母蛾が卵であった時期の環境要因に支配されており、興味深い。すなわち、卵を低温短日条件で維持して孵化（低温暗催青）させると、この卵から孵化・成長した母蛾は非休眠卵を産下するようになり、逆に、高温長日条件で維持した卵から孵化（高温明催青）・成長させた母蛾は休眠卵を産下するようになる。低温短日が冬の条件であり、この時期に孵化した幼虫が成長して産下した卵が孵化する頃に

は、春から初夏となっており、食草である桑が茂っている時期となり、逆に、高温長日条件は夏を意味し、この時期に孵化成長した母蛾が産下した卵が孵化する頃は秋から初冬になり、桑葉が枯れてしまっていると考えると、休眠現象は自らの子孫の将来を予察する実に見事な適応現象であると見ることができよう。

これら休眠する品種に対し、通常の飼育では全く休眠することがない品種も存在する。それは多化性と呼ばれる品種であり、南方系とされている。南の地方ではおそらく、カイコが食草としている桑が、一年中茂っており、餌に困ることがないのであろうと考えると、この現象も合目的的に実に都合よく解釈できる。

さて、「休眠」という先程述べた興味深い生命現象の誘起メカニズムが、前述の謎であったわけであるが、これに対し、故長谷川教授らが解答を与えたのである。すなわち、彼は実験形態学的手法をもちい、母蛾が蛹であった時期の食道下神経節が分泌する一種のペプチドである休眠ホルモンが、卵の休眠を誘起することを明らかにしたのである。この発見が、分泌組織の未分化な卵がホルモン制御により休眠するという、一見矛盾するような興味深い現象の発現メカニズムを明らかにしたわけである。

休眠ホルモンの発見は、このホルモンが、興味深く、かつ、種保存にとってきわめて重要な生命現象を引き起

こす物質であることから、多数の研究者の注目をあつめ、活性物質本体の究明を目指す新たな研究を開始する引き金となった。後藤（名古屋大学教授、故人）らはこのホルモンの発見者である長谷川と協力し、休眠ホルモンの追跡を開始し、精力的かつ執拗に研究を続けた¹¹⁻²⁰⁾。この過程で彼らは、雄の蚕蛾頭部に非常に強い休眠誘導活性をもつ物質が存在し、メタノール-塩化メチレン混液で効率よく抽出されることを見いだした。また、彼らは得た活性画分が、この混合溶媒と1-ブタノールのみに可溶であり、水に対しては実質的に不溶であることを明らかにした。ペプチドと目されていたにもかかわらず、このふがわりな溶解性のため、一般に用いられているペプチドの精製法は休眠ホルモンの精製には適用できず、彼らはメタノール-塩化メチレン混液を用いるサイズ排除クロマトグラフィーを主要な武器として精製を進めた。その結果、活性物質をかなり高純度まで精製することができたとした。また、抽出法を改良することにより、活性物質には少なくとも二種類あることを見だし、DH-A および B と命名し¹¹⁻¹⁹⁾、それぞれ、分子量 3300 と 2200 とした(図 2)¹⁹⁾。この精製過程で活性物質の性質が調べられ、酸、光や温度に対し、著しく不安定であるとされた。この不安定さと、もともとの存在量の微量さの故か、一年あたり百ないし二百万頭の蛾頭部を集め、7

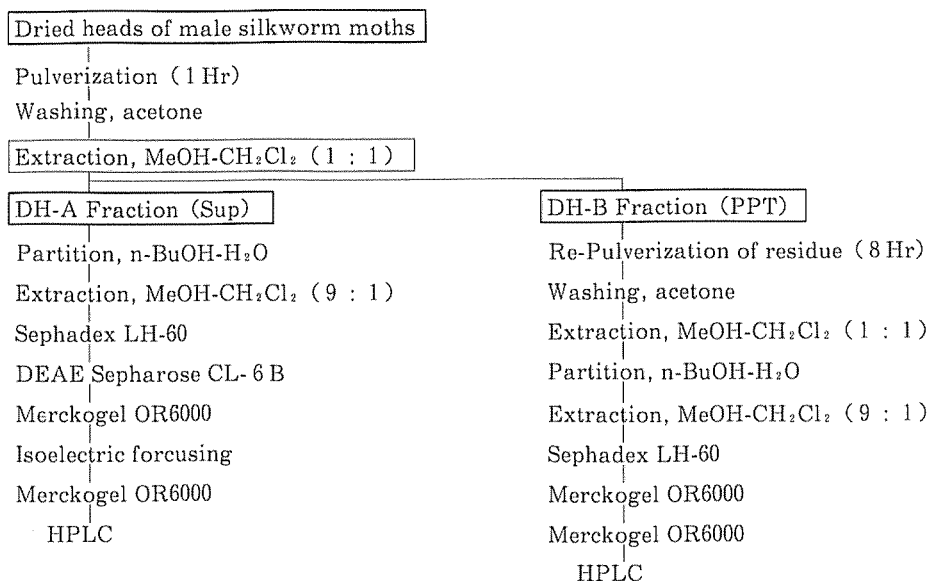


図 2 雄蚕蛾乾燥頭部からDH-AおよびDH-Bの抽出精製

代の研究者が世代交代を経ながら、25年にわたって執拗に研究を続けたのにもかかわらず、活性物質の単離、構造決定には至らなかった。

この時期とほぼ同じころに、同ホルモン（休眠因子と呼んだグループもあった）の抽出単離を目指したグループもあったが¹⁶⁾、その後、いずれのグループからも精製あるいは単離したという報告は提出されなくなってしまった。

大量の材料からの抽出と精製の試み

過去7代の研究者が営々として作り上げた、効率のよい有機溶媒抽出法や、高速液体クロマトグラフ（HPLC）が導入されていない時代に、中圧ポンプと長さ4mのガラスカラムをあやつり有機溶媒系サイズ排除クロマトグラフィーを繰り返す精製法は芸術的で美しく、ほぼ完璧な精製スキームのように思われ（図2のHPLC、等電点電気泳動精製以前の部分）、あと少しで、活性物質を単離構造決定できるであろうと、誰もが期待していた。事実、その当時得られていた最終精製試料は、ひどく着色してはいたが、サイズ排除クロマトグラフ的に単一ピークを与え、必ずしも純粋ではないかもしれないが、きわめてそれに近いと思われていた^{16, 18, 19)}。ところが、この高純度（と思われていた）試料は、得られている量があまりにも少なく、さらなる精製に耐えられるか否か危ういと思われていた。この頃、この研究に参加した筆者はその後の精製にも耐えられる量の試料を集めようと、一千万頭の雄蛾（10トン以上になる）から頭部を集めた。正確を期すために言えば、多くのカイコ頭部を集めるにあたっては、以前と同じく、腐敗防止の目的で、蚕蛾を一旦80℃で乾燥した後に、収集した。つまり、雄蚕蛾乾燥頭部が材料とされたわけである。この材料から、過去に確立されている手法にのっとり、ほぼ一年がかりで、活性物質が有機溶媒抽出された。これにより、DH-AとBと思われる二種の強い活性物質が得られ、過去の研究の正当性が証明された。その後の精製も基本的にはそれまでに開発されている手法に従ってなされた。得られた試料は、過去の報告通り、有機溶媒に可溶であり、実質的に水に不溶である。さて、得られた活性画分をこれ以降のように精製していくかが重大な問題となった。ちょうど、その当時、高速液体クロマトグラフィー（HPLC）が物質精製に使われ始めていた。また、等電点電気泳動などの新精製手法も開発され

つつあった。これらが、手当たり次第に試みられた。中でもHPLCは一般の物質精製の切り札として登場し、この時点では、発展途上であったため、新しいHPLC用充填剤や、分離技法が次々に開発されつつあった。そこで、開発されるやいなや、たちどころにそれらが導入され、得られている活性物質の精製に使用できないか、調べられた。

ところが、これらの手法も実際に休眠ホルモン活性物質の精製に適用すると、その精製がとんでもなく困難であることが明らかとなってきた。実際に、HPLCカラムに活性画分が注入されると、ほとんどの場合、活性が回収されないのである。どうも失活するか、あるいはカラム充填剤に異常吸着してしまうらしい。条件によっては、少し活性を回収できることもあるが、その場合も活性が幅広い溶出画分に分散してしまい、全く精製が進まないということである。いつも、そして、完全に活性が消失してしまうのであれば、話は簡単である。この手法をやめるか、あるいは、活性物質の精製をあきらめればよいのである。困るのは、ほとんど分離しないとはいうものの、時々、活性を回収できるとなると、かすかな可能性に一縷の望みを託し、来る日も来る日も、HPLC精製条件の検討が続けられることである。このかすかな可能性を捕まえたものだけが、大きな発見発明を達成するのであろうが、この研究の場合は、12年にわたるこの努力も報われることなく水泡に帰し、この戦略による休眠ホルモン単離は不成功のまま、研究の中断を余儀なくされることとなった。

この時期に、興味深い現象を見だしつつある研究グループがあった。小倉らである。彼らは蚕の休眠ホルモン分泌器官である蛹食道下神経節をアワヨトウ虫に移植すると体色の赤化黒化が起こること、逆に体色が赤化黒化したアワヨトウの蛹食道下神経節を多化性蚕に移植すると休眠卵を産下させる休眠ホルモン作用を示すことを見だし、休眠ホルモンとこのアワヨトウ体色赤化黒化物質（MRCH）とが同一物質である可能性を示唆した。しかし、この物質の精製を進めた小倉らと共同した東大グループ^{21, 22)}と休眠ホルモンの精製をしていた著者らのグループ²³⁾は、それぞれ独立して、両活性物質が別の物質であることを証明した。東大グループはさらに精製を進め、最終的に、MRCHの単離、構造決定に成功した²³⁾。後に、このMRCHは蚕のフェロモン生合成活

性化神経ペプチド (PBAN) と同一物質であることが明らかにされた²⁰⁾。後に述べるように、この後およそ10年を経て明らかになることだが、このペプチドホルモンは休眠ホルモンをコードする m-RNA 上に同時にコードされていた。

材料の変更

上記のようにほとんど研究が進展しないまま、12年の時が流れ去ったが、この間およびそれ以降は、いずれの研究グループからも、休眠ホルモンの化学的研究についての報告は見られず、進展状況はおろか、研究が実施されているかどうか不明であった。著者らのグループもこれほどまでに研究が進展しないとすると、精製戦略を、根本から変更せざるを得なくなっていた。そこで、それまでの材料からの精製が一時休止され、生の蛹の食道下神経節が出発材料として採用されることになった。一年間で十万頭の食道下神経節が集められ、その後、3年間で三十万頭分をこえる材料が集められた。

集められた材料は、酵素分解から保護するため、エタノールにつけて、使用時まで -20°C で保存された。抽出(図3)にあたっては、当然のごとく、雄蝨頭部の材料の場合に唯一最良の溶媒とされていた、メタノール-塩化メチレン混液が抽出溶媒として採用された。この抽出物が乾固後、生物検定された結果、この抽出物には活性が全くないことが判明した。この結果は、異常である。最良の材料を出発物質として、最良の抽出溶媒で抽出しているにもかかわらず、活性が得られないとはどうい

ことなのであろうか。どのような理由であるにせよ、活性が得られないことには、ことが始まらないことから、ペプチドをよく抽出できるとされていた80%エタノールや50%2-プロパノールでも抽出された。これらの抽出物には確かに少し活性が回収できるものの、精製を進めるのには全く不十分な程度であった。最終的に、材料の粉末残渣は水で、煮沸された。この煮汁に活性などあろうはずはないと思われたが、念のため、この煮汁の生物活性が調べられたところ、なんとこの抽出物に強烈な活性が認められた。つまり、蛾の頭から由来する活性物質と、食道下神経節由来の活性物質とは、物理化学的性質が全く異なっていたのである。

これを境に、情勢は一変した。過去の研究で、休眠ホルモンは、ペプチドであるにもかかわらず有機溶媒に可溶、水に不溶と目されていたが、上に述べた発見は、蛹食道下神経節由来の休眠ホルモンが水溶性であることをあきらかにした。つまり、ペプチドがペプチドらしい性質を示したことから、これを契機に、その後の精製に対する展望が急激に、そして大きく開かれることとなった。

休眠ホルモンの精製

さて、次の問題は、いかにしてこの活性画分を精製するかである。このための手法として、高度な分離を期待できる、高速液体クロマトグラフィーが選択された。カラムとしては、開発されて間もないオクタデシル-4PWが選ばれた。全試料がこのカラムに注入された。

溶出に、水-2-プロパノール間のグラジエント法が採用された。標的活性物質はグラジエントプログラムに仕組んだ13%有機溶媒のイソクラティック条件で溶出した。

今度は、この活性画分の精製である。この目的に、全く同じ条件を適用しても、精製を進めることにはなりにくい。そこで、酸性条件での精製が試験された。その結果、活性はほとんどピークの認められないところに回収された。そこで、残る全試料がこの方法で精製されたところ、図4のクロマトグラムが得られた。多数のピークの内、鋭い形状の R_t 50分のピークのみが強い活性を示したことからこのピークが休眠ホルモンそのものであり、初めて休眠ホルモンが単離できたことが明らかとなった。

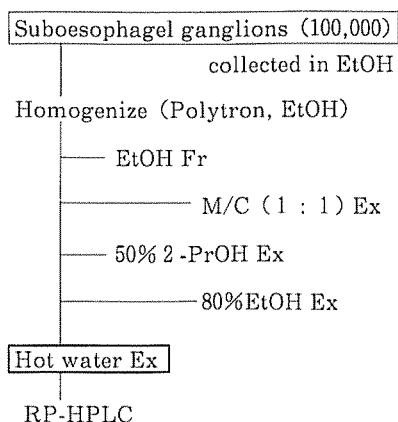


図3 蛹食道下神経節から休眠ホルモンの抽出

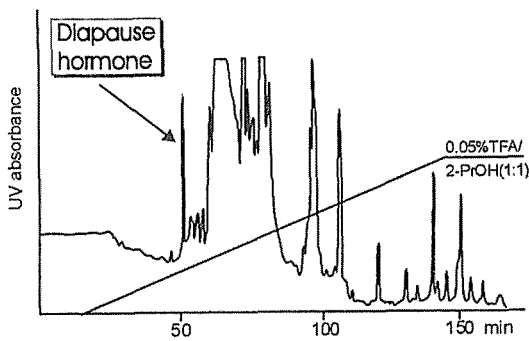


図4 休眠ホルモンの最終精製高速液体クロマトグラム
休眠ホルモンの構造解析から化学合成へ

単離できた試料の十分の一を用いてアミノ酸配列解析された結果、図5(直接解析1)に示すように、櫛の歯抜け状態ながら、ごく一部の配列が明らかになった。アミノ酸の検出感度からの計算で、入手できた試料は10 μg に満たない量であることが明らかにされた。10万頭のカイコ蛹食道下神経節から出発して、10 μg が得られたということである。得られている物質が標的休眠ホルモンそのものであるかどうか確証はないが、とりあえず、全構造解析が行われた。まず、得られている試料の三分の一がエンドプロテイナーゼ Glu-C で処理された。得られた断片ペプチド配列解析の結果、15番目の Arg から24番目の Leu までのアミノ酸配列が、2つのアミノ酸をのぞいて、明らかとなった。次に、全配列の直接解析が行われた。これには残る試料の半量が使用された。その結果、第19位のアミノ酸をのぞいて、他の全配列が明らかとなった(図5直接解析2)。なお、検出できなかった19位のアミノ酸は配列解析時に分解消失しやすいシステインとアサインされた。

アミノ酸配列が明らかになったことから次の問題は、

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
	Thr	Asp	Met	Lys	Asp	Glu	Ser	Asp	Arg	Gly	Ala	His
直接解析1												
酵素断片												
直接解析2												
	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
	Ser	Glu	Arg	Gly	Ala	Leu	Cys	Phe	Gly	Pro	Arg	Leu-NH ₂
直接解析1												
酵素断片												
直接解析2												

図5 休眠ホルモンの構造解析と一次構造

この構造が本当に休眠ホルモンの構造として正しいものであるかどうかに移った。そこでこの構造を持つペプチドを化学合成し、実際に同じ物理化学的性状や生物活性を示すかどうかを検討された。つまり、単離された試料も100%純粋と言うことはあり得ず、検出感度以下の量しか含まれていない物質がホルモン自身である可能性は否定できないのである。また、アミノ酸配列解析で24アミノ酸からなる構造が見えたからと言っても、24番目のアミノ酸がC末端であり、それ以上続く配列がないかどうかは不明である。化学合成に当たっては、当然のごとく、C末端遊離カルボン酸型が作成されることになった。特別に深いわけはなかったが、C末端アミド型のペプチドも調製された。両ペプチドの生物活性が測定されたところ、C末端カルボン酸型ペプチドは全く不活性であり、C末端アミド型のペプチドが、天然試料と同じ強い活性であることが明らかにされた。これが化学合成試料がN4蚕に世界で初めて休眠を誘起した瞬間、つまり、休眠ホルモンの構造決定が完成した瞬間、であった²⁵⁾。休眠ホルモンが発見されてからちょうど40年の年月が過ぎ去っていた。

後になって、C末端カルボン酸型試料はアミド型試料の一万倍の投与でも活性が見いだされず、完全に不活性であることが証明されている。分子量3000弱の中型分子の中で、たった一つの窒素原子を、酸素原子で置き換えただけで、完全に不活性になってしまうとは、実に驚くべきことである(分子量にして1違うだけである)。

その後、抗体を用いる生物検定や、機能解析を経て、休眠ホルモンの構造が確立された²⁶⁻²⁸⁾。この休眠ホルモン分子は Bom DH-I と命名された²⁵⁾。

前駆体タンパク質とFXPR_L-NH₂族ペプチドアミド

このようにして休眠ホルモンの構造が24個のアミノ酸からなるペプチドアミドであることが明らかになったことから、問題は、前駆体タンパク質の構造に移行した。休眠ホルモンをコードするm-RNAの解読の結果、図6に示したように、前駆体タンパク質の構造が明らかにされた^{29,30)}。休眠ホルモンは、この中で、シグナルペプチド(図中アンダーライン)の直後にコードされている(図中で棒で囲んだ)。コードされている休眠ホルモンのC末端には、Gly-Lys-Arg配列が続いており、休眠ホルモン分子がアミド化されていることを示唆した。化学



図6 m-RNA解析で明らかとなった休眠ホルモン生合成前駆体蛋白質の一次構造

的構造解析と m-RNA 解析の唯一の違いは休眠ホルモンの19位のCysがTrpとしてコードされていたことであるが、現時点ではその理由は明らかにされていない。その後、食道下神経節からの再抽出がなされた結果、19位がTrpの休眠ホルモンが単離されており、19-Trp型がカイコ体内にも存在することが確認されている。また、化学合成試料は、両者ともに類似の強い休眠誘導活性を示すことが明らかにされている。両者はそれぞれ Bom DH-I [19-Cys] および Bom DH-I [19-Trp] と呼ばれることとなった。

この前駆体タンパク質配列を注意して見ると、興味深い事実がわかる。すなわち、これには休眠ホルモン以外に、一時期休眠ホルモンと同一物質かと考えられた MRCH、すなわちカイコの性フェロモン生合成活性化神経ペプチド (PBAN、図中で陰付きで示した)、もコードされていたのである。つまり、この前駆体蛋白質は二種のきわめて重要な昆虫ホルモンを含んでいたのである。おもしろいことに、休眠ホルモンと PBAN³¹⁾ はアミノ酸配列に、全体としての類似性は認められないが、そのC末端のアミノ酸5残基の配列は、酷似している。前者はFGPRL-NH₂であり、後者はFSPRL-NH₂である。C末端から4番目のアミノ酸 (GlyとSer) が異なるのみである。さらにおもしろいことに、前駆体タンパク質構造は、類似のC末端ペプチド配列を持つ、ペプチドアミドを3種類もコードしていた。(図中で二重のアンダーライン)。これらのペプチドにはいずれもGR/K (R) 配列が連結しており (図中で三重のアンダーライン)、それらがアミド化されていることがわかる。それらは後に、 α -、 β -および γ -食道下神経節

ペプチド (SGNP) と命名されることになるが、全くの機能未知な新ペプチドであった。しかし、類似のC末端ペプチドアミド配列を持つペプチド^{25, 31, 32, 33)} (図7) は、いずれも、昆虫体内で重要な役割を担っていることから、今回休眠ホルモン m-RNA 中にコードされていることが見つけれられたSGNP類も、昆虫体内で重要な役割を担っていることは、想像に難くない。そこで、SGNP類が、単にm-RNA上にコードされているだけでなく、実際に食道下神経節中にペプチドアミドとして存在しているのか否かが調べられた。

その当時の食道下神経節抽出物およびその部分精製品の数千画分のHPLC的挙動が、化学合成SGNP類のそれと比較検討された。その結果、エタノール抽出物に由来する一つの画分が α -、と γ -SGNPを含むことが明らかにされた。未だに、 β -SGNPの存在は確認されていないが、 α -、 γ -SGNPが存在すること、および、PBANはすでにとられていることから、前駆体タンパク質上でのこれらペプチドの並びから考えて、 β -SGNPも食道下神経節中にペプチドとして生成していることは間違いないといえよう³⁰⁾。

さて、これら新規ペプチドアミドの機能はどのようなものであろうか。この疑問解明に向け、これらペプチドアミドの休眠ホルモン活性が調べられたが、弱い活性があるのみで、休眠ホルモンには遠く及ばない程度の活性であったため、これら新規ペプチドが休眠に直接的に関与している可能性は薄く、その厳密な生理的役割の解明は今後の解明に期待せざるを得ない。

Bom DH-I [19-W]	TDMKDES DRGAHSER GALW FG PRL-NH ₂
Bom PBAN	RLSEDMPATPADQEM YQPDPPEEMESRTRY FSPRL-NH ₂
Heliotis PBAN	LSDDMPATPADEEM YREDPEEIDSRTKY FSPRL-NH ₂
Locusta Myotropin-I	GAVPAAQ FSPRL-NH ₂
Locusta Myotropin-II	EGD FTPRL-NH ₂
Locusta Pyrokinin	Δ EDSGDGW PQQP FVPRL-NH ₂
Leuco Pyrokinin	ETS FTPRL-NH ₂
Bom α -SGNP	II FTPKL-NH ₂
Bom β -SGNP	SVAKPQTHESLE FIPRL-NH ₂
Bom γ -SGNP	TMS FSPRL-NH ₂

図7 休眠ホルモンと類似C末端ペプチド配列 (FXPRL-NH₂)を持つ昆虫ホルモン類

再び蛾の頭

このようにして、休眠ホルモンの構造が明らかにされ、これをコードする m-RNA も解読された。では、当初材料とされていた雄蚕蛾頭部に存在する有機溶媒に可溶性、強い休眠誘導能を持つ、活性物質はどのようなものなのであろうか。この解明に向けて、再び雄蚕蛾頭部が集められ、メタノール-塩化メチレン混液で抽出された。ついで、休眠ホルモン活性を指標として、抽出物が新規開発の手法で精製された結果、一つのペプチドが単離された。このペプチドはメタノール-塩化メチレン混液という有機溶媒に可溶という特異な性質をもっていた。その構造を明らかにするために、まず、直接アミノ酸配列解析された結果、1 残基目から 40 残基目までのアミノ酸配列が、一部をのぞいて、明らかにされた(図8参照)。酵素分解を組み合わせて、全配列解析が実施された結果 1-56 残基のアミノ酸配列と、9 アミノ酸からなる、一つの断片ペプチドの配列が確認された(図中 60-68 に相当する)³⁹。しかし、両者のつながりと、それ以降の配列については化学的手法では解明されなかった。

この残りの部分は、m-RNA 解析により解明された³⁵)。前駆体タンパクの全配列を図8に示す。これによれば、位置づけ不明の9 残基からなる断片ペプチドは、本ペプチド中の C 末端そのものであり、1-56 残基と3 アミノ酸残基を挟んで結ばれていたことがわかる。従って、化学的手法でこのペプチド中の95%の構造が明らかにされ、残る3 アミノ酸残基の位置づけと並び具合が m-RNA 解析で明らかにされたことになる。つまり、両技術の連携が一つのペ

プチドの全配列を明らかにした例といえよう。

この前駆体タンパク構造はシグナルペプチド部分を含んでおり(図中枠で囲んだ)、このペプチドが分泌性であることを示すと同時に、配列の末端が終止コドンで終わっていることから、このペプチドが他の何らかのタンパク質の断片ではなく、専門に生合成されるものであることを物語る。

さて、このペプチドの構造を詳細に見ると、4 種のアミノ酸が異常に多いことが判る。Val (21), Ala (17), Pro (11) と His (8) である。これらたった4 種のアミノ酸の合計は、このペプチド中で8割をこえる。この数値の異常さは等しい確率でアミノ酸が存在するならば1 アミノ酸あたり5%, 4 アミノ酸で20%となることから考えると明らかであろう。そこで、このペプチドは、構成アミノ酸の多い順に頭文字をとって VAP ペプチドと命名された(このペプチドに名前を付ける時点では、1-56 残基までのアミノ酸配列しかわかっておらず、この部分構造の中では Val, Ala, Pro の含量が約8割であったため、VAP と命名された)。VAP ペプチド中の極性官能基を持つアミノ酸は、Thr (2), His (8), Lys (1) および Arg (1) のみであり、酸性アミノ酸は全く含まれておらず、親油性側鎖を持つアミノ酸がきわめて多い。この事実が VAP ペプチドの有機溶媒可溶性という特異な性質をもたらすのであろう。さらに、VAP ペプチドの中には繰り返し配列がきわめて多く(図中にアンダーラインで示した)、中には8 アミノ酸からなる繰り返し配列が存在する点でも、このペプチドは特異である。親油性のみならず、この繰り返し配列の多さも、VAP ペプチドの構造を特徴づけるものである。

VAP ペプチドの活性

VAP ペプチドの生物活性をここで議論する。もともと、このペプチドの精製の際の生物検定で VAP ペプチドの休眠誘導能が休眠ホルモン自身に比べて非常に弱くことが明らかにされていた。およそ千分の一程度の活性であった。この弱い活性の原因を探るために、VAP ペプチドの1-20 までの配列をもとに断片ペプチド誘導体(VAP-map)が調製され、多化性カイコに投与された。しかし、この物質は全く休眠誘導能を示さなかった。そこで次に、合成休眠ホルモンと VAP-map の同時投与の実験が行われた。その結果、VAP-map は休眠ホル

-16-15-14-13-12-11-10 -9 -8 -7 -6 -5 -4 -3 -2 -1																				
M F K L T V I F A I I A V A Q A																				
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	
G	V	I	A	P	V	V	P	V	A	H	P	V	V	A	H	T	A	V	V	

21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	
H	P	V	P	L	V	R	A	A	H	V	V	H	T	A	P	V	V	A	A	

41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	
A	P	V	V	A	A	P	V	V	A	A	A	P	I	V	P	I	V	K	H	

61	62	63	64	65	66	67	68													
A	P	I	I	A	V	H	H	*												

図8 VAPペプチドとその生合成前駆体蛋白質の一次構造

モンの活性を10倍程度増強することが明らかとなった。つまり、VAP-mapは休眠ホルモンの活性を増強するという特異な能力を持っていることが明らかにされた。一方、最近になって、大腸菌へのVAPペプチドの遺伝子導入によって調製したVAPペプチドも活性を示さないことが明らかとなった。そこで、VAP-mapの時と同じように休眠ホルモンとの同時投与実験が行われた結果、ホルモンの活性の著しい増強が明らかにされた³⁵⁾。

では、このペプチドのDH活性増強能はいかにしてもたらされるのであろうか。この疑問に対し、VAP-mapやVAPペプチド自身が、DHを生体内分解から保護したのではないかという仮説にもとづき、はじめにDHの酵素分解経路が調べられ、ついでこれに対するVAP-mapの影響が調べられた。

雄蚕蛾乾燥頭部が材料とされていた当時、休眠ホルモン活性物質はトリプシンによって著しく速やかに分解し、失活するとされ、これが、休眠ホルモンがペプチド性であることの証拠の一つであるとされていた。そのころの研究によると、実験書に示されている標準的な条件で(S/E=50-100, 25°C)反応させると、瞬時に活性がなくなる(30秒後にはすでに完全に失活している)とされている。このあまりにも速い酵素反応が本当かどうか、また、物質として異なると思われる蛹食道下神経節由来の休眠ホルモンの場合にも、同様の速いトリプシン分解があり得るのか否かの検討から始められた。実際に休眠ホルモンが上述の実験条件で処理され、経時変化の追跡が試みられたが、反応を開始するべく、基質と酵素を混合した直後の反応混合物のHPLC分析で、すでに、基質が全く消失してしまっているということが明らかにされた。次に、S/E比が1000とされたが、やはり、基質は瞬時にして消失するため、この反応を水浴で冷却しながら行くと、やっと反応経過を追跡可能となり、基質が90分の後に消失することが明らかにされた。この条件の反応では、はじめに、休眠ホルモンの23残基目のArgが切断され、ついで、15残基目のArgで切断されることが示された。この反応のうち、第一段目の23残基目のArgの切断は、休眠ホルモンのC末端構造が活性発現に重要であるという事実(休眠ホルモンのC末端カルボン酸型が全く不活性であると言うことや、次節で述べる事実から明らかとなっている)に照らすと、休眠ホルモンの失活を意味する。すなわち、トリプシン

処理は休眠ホルモンの瞬時的失活をもたらすのであり、過去の雄蚕蛾頭部活性物質についての報告とよく符合することが明らかにされた。

次に、この分解反応の系に、VAP-mapが添加された。その結果、0.25等量の投与でも効果はみられるが、投与量を2当量とすると、休眠ホルモンの分解はかなり防がれ、半減期が倍以上に(VAP-mapなしの時90分で消失する基質が、300分の後にも基質が10%ほど残存するようになる)延びることが示された。その後の検討で、この酵素反応の妨害は、どうも、酵素の阻害ではなく、基質の保護によるらしいことが暗示されつつあるものの、その機構など詳細は不明のまま残されている。

休眠誘起能を指標にしつつ直接的休眠誘導能を持たないこのようなペプチドが単離できた理由は、明らかでないが、検定カイク中に存在するであろう微量の休眠ホルモンの活性をVAPペプチドが増強したためではないかと推測されている。

休眠ホルモンの活性発現最小単位の発見と活性発現に寄与する部分構造

前に述べたように、休眠ホルモンは24個のアミノ酸からなるペプチドアミドである。この構造と全体として類似するタンパク質の存在は知られていない。しかし、そのC末端ペントペプチド配列はフェロモン生合成に関与するPBAN³¹⁾や筋肉の収縮に関与するミオトロピン³²⁾、ピロキニン³³⁾などと酷似している(図7)。さらに、すでに述べたように、休眠ホルモンをコードしているm-RNA上には、このペントペプチドアミド配列と類似の配列を持つ、新ペプチドアミドがコードされていた。これらのペプチドアミドについて、休眠誘導活性が調べられたところ、前に述べたように弱いながらも、いずれも活性を持つことが明らかにされている。また、休眠ホルモンのN末端から順次アミノ酸を欠落させた断片が調製され、生物検定された結果、ペントペプチドアミドまでは活性があることが示された^{36,37)}。では、このペントペプチドアミド構造(表中の構造を参照)のうちのどの部分が、どのように活性発現に機能しているのであろうか。この疑問に対する答えを求めて、化学合成により種々の休眠ホルモン断片、その類縁体や誘導体(表)が調製され活性が調べられた³⁸⁾結果、以下の事実が明らかにされた。

表 休眠ホルモンC末端ペプチド類縁体の活性
(5頭のN4蚕が参加した休眠卵数の平均値で示した)

entry	Dose(ug/pupa)	100	50	25	10	5	1	0.5
1	FGPRL-NH ₂	82.9	73.7	51.9	25.8	24.7	11.8	5.5
2	FSPRL-NH ₂	-	49.8	45.6	15.8	14.5	5.9	4.6
3	FVPRL-NH ₂	-	70.7	58.6	34.7	31	3.4	2.1
4	FIPRL-NH ₂	-	44.7	38.7	19.9	20	1.7	1.9
5	FGPRL-OMe	0	0	0	0	0	-	-
6	FIPRL-OMe	0	0	0	0	0	-	-
7	FIPRL-COOH	0	0	0	0	0	-	-
8	FGPRL-NHMe	0	0	0	0	0	-	-
9	FGPRL-N(Me) ₂	0	0	0	0	0	-	-
10	FGPRL-NH(n-Bu)	0	0	0	0	0	-	-

(-: not tested)

1) C末端に存在するアミド構造はきわめて重要であり、わずかな構造上の変換も活性を失わせてしまう(表 entry 1の結果を5-10の結果と比較、アミドからメチルアミドへの変換でさえも活性を消失させる)、2) C末端から数えて4番目のGlyは他のアミノ酸で置き換えてもペプチドアミドの活性は実質的に変化しない(表 entry 1-4)、3) アミノ酸を順次欠落させた、より短鎖のペプチドアミドの活性を調べた結果、活性は弱くなるがトリペプチドアミドでも活性を持つ(図9)などである。これ以上短鎖のペプチドアミドやロイシナミドはさすがに完全に不活性である。従って、活性発現最小構造はトリペプチドアミド、PRL-NH₂であることが証明された。

さて、活性発現最小単位、トリペプチドアミドの活性はペプチドアミドの活性と比べて約20分の1程度であるが、この活性強度の違いはトリペプチドアミドとしたために欠落したアミノ酸(PheとGly)に由来することは間違いない。ペプチドアミドにおいて、Glyを他のアミノ酸で置き換えても、活性強度に変化がなかったことと(表 entry 1-4)、テトラペプチドアミドはトリペプチドアミドの活性よりも弱かったことから(図9)、このGlyが活性増強に直接関与している可能性は薄く、残るPheのベンゼン環が活性の違いに関与しているものと考えられた。そこで図10に示した各誘導体が調製され、それらの活性がペプチドアミドと比較された。これら誘導体調製にあたっては、ベン

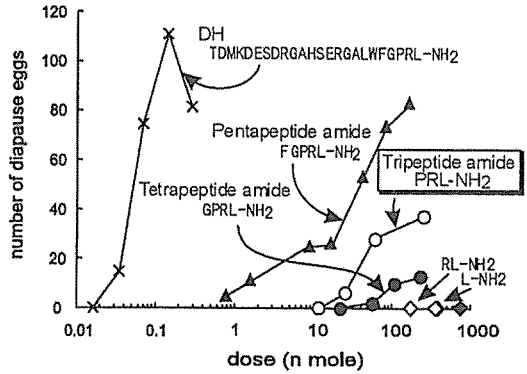


図9 休眠ホルモンC末端短鎖ペプチドアミドの休眠誘導能

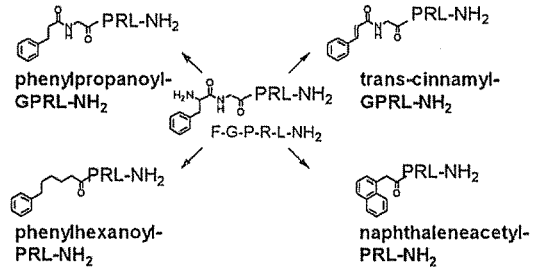


図10 休眠ホルモンC末端トリおよびテトラペプチドアミドの誘導体

ゼン環がペプチドアミドのPheのそれと同じ様な位置にくるように設計された。つまり、活性発現最小単位であるトリペプチドアミドから7個の結合を通してベンゼン環が位置するようにされた。生物検定の結果、いずれの誘導体もペプチドアミドとほぼ同等の活性まで回復する事が明らかにされた。つまり、この結果より、ペプチドアミドのPheのベンゼン環は、活性発現最小単位であるトリペプチドアミド、PRL-NH₂の活性を増強することが証明された。

最近、Nachman³⁹⁾は、休眠ホルモンと類似のC末端構造を持つミオトロピンのテトラペプチド誘導体について興味深い事実を認めている。カルボラン誘導体がきわめて強いPBAN活性を示したというのである。彼らは、この活性の強化はおそらくカルボラン部分の親油性に起因するのであろうとしている。今回の短鎖ペプチ

ド誘導体の場合も、ベンゼン環の導入により増大した親油性が、リセプターとの親和性を増強したのではないかと考えられ、その証明を目指した研究が続けられている。

おわりに

このように蚕の休眠ホルモンは1951年に発見され、その後40年の苦闘の末に単離構造決定された。その間には数多くの想像を絶する物語が含まれている。残念ながら、その詳細を記すことはほとんどできなかった。お許しいただきたい。

さて、著者らが休眠ホルモンというペプチドホルモンを追跡していたのと時期を同じくして、他の研究グループも昆虫の重要なペプチドホルモンを追跡中であった。たとえば、東京大学の鈴木らは、本文中で述べたように、MRCH、ボンピキシン、前胸腺刺激ホルモン(PTTH)、PBANや羽化ホルモン(EH)などを大変な苦労のもとに精製しつつあった^{6,7)}。これらの苦労が実を結び始めるのが、1980年代後半から1990年代前半の頃である。その後、これら昆虫のホルモンという“物質”の解明は、その物質の構造、性質を明らかにし、遺伝的統御機構解析に道を開いたことは疑いないが、そればかりでなく、化学合成やバイオテクノロジー手法を用いる合成により、研究上必要な試料の大量供給を可能として次世代の昆虫生理学の発展の礎を作ってきたとおもう。おそらくこれからも、物質の化学とバイオテクノロジーが、車の両輪となって、知的、物質的、技術的基盤として機能し、様々な生命現象の発現機構が、分子の、あるいは化学の言葉であかされていくものと期待する。

謝 辞

本稿執筆の機会をお与えくださいました柏村先生はじめ紀要編集委員の先生方に感謝いたします。

雄蚕蛾頭部材料についての精製法を、長期にわたる努力の末に開発され、その成果並びに研究テーマを引き継ぐことをお許しいただいた名古屋大学の恩師故後藤俊夫教授と磯部稔教授に敬意を表するとともに、感謝する。また、休眠ホルモンの研究は名古屋大学農学部の故長谷川金策教授および山下興亜教授らとの、長期にわたる密接な共同開発であることを記し、ここに感謝の念を表したい。

三重大学において、本研究を続けることを快くお認め

いただいた、小宮孝志教授に感謝する。当研究室の勝崎裕隆先生には最近の研究で使用している機器分析でお世話になっている。あわせて、感謝する。著者らのグループの蚕休眠ホルモンの化学的研究の後半の大部分は三重大学の学生諸君と一緒に悩み、苦労しつつ進めてきた。彼らはいずれも大変に優秀な学生、院生たちであった。彼らの忍耐強さと研究熱心さに敬意を表するとともに、彼らの献身に心から感謝する。

ペプチドの構造解析では野菜茶業試験場の平井、永田両先生および、本学遺伝子実験施設の菊田先生にお世話になった。また、ペプチド合成では基礎生物学研究所の服部様、水谷様、西村先生を始め、多くの方々にお世話になった。お礼申し上げる。

材料であるカイコはカネボウシルクエレガンス様や三重県農業技術センター様よりご分与いただいている。また、研究遂行のための資金的援助は科学研究費や東海学術奨励会から頂戴した。これらの援助なしで本研究遂行は全く不可能であった。深謝する。

ここにはお名前を載せられなかったけれども、20年を越える本研究遂行の過程では、大変多くの方々のお世話になった。彼らの協力がなければ、研究を維持して行くことはできなかったであろう。この場を借りて、この研究を支えてくださったすべての方々に、心よりありがとうございましたと申し上げる。

最後に、読み苦しい拙文に最後までおつきあいくださいました皆様に、御礼申し上げて、コンピューターの電源を落とすことにする。

ありがとうございました。

和 文 要 約

休眠ホルモンは最も重要な昆虫ホルモンの一つであり、蚕に卵休眠を誘起する。このホルモンの存在は1951年に見いだされた。このホルモンの構造を明らかにするための研究が、熱心に続けられたが、その努力は長期にわたって報われることはなかった。最終的には1990年にこのホルモンが単離され、1991年に、24個のアミノ酸からなるペプチドアミド構造であることが、決定された。この総説ではこのホルモンの単離と構造決定の研究史を扱うとともに、その後の蚕休眠ホルモンの化学的研究についても扱う。

引用文献

- 1) 一般的読み物として「シルクのはなし」小林勝利, 鳥山國士 編著 技報堂出版, 1993年.
- 2) 「昆虫生理・生化学」池庄司敏明, 山下興亜, 櫻井宏紀, 山本大輔, 正野俊夫 著 朝倉書店 1992年 など.
- 3) A. KAWAKAMI, H. KATAOKA, T. OKA, A. MIZOGUCHI, M. KIMURA-KAWAKAMI, T. ADACHI, M. IWAMI, H. NAGASAWA, A. SUZUKI, H. ISHIZAKI. Molecular cloning of the *Bombyx mori* prothoracicotropic hormone. *Science*, 247: 1333-1335 (1990) and the references cited therein.
- 4) G. E. PRATT, D. E. FARNSWORTH, K. F. FOK, N. R. SIEGEL, A. L. McCORMAC, J. SHABANOWITZ, D. F. HUNT, and R. FEYEREISEN. Identity of a second type of allatostatin from cockroach brains: An octadecapeptide amide with a tyrosine-rich address sequence. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88: 9458-9462 (1991).
- 5) G. M. HOLMAN, R. J. NACHMAN, M. S. WRIGHT. *Insect Neuropeptides*. *Annu. Rev. Entomol.*, 35: 201-217 (1990).
- 6) 鈴木昭憲. 昆虫脳神経ペプチドの構造と活性・有機合成化学, 50: 545-553 (1992).
- 7) 片岡宏誌, 鈴木昭憲, 石崎宏矩. 昆虫の脱皮変態にかかわる脳神経ペプチド, 蛋白質核酸酵素, 37: 27-35 (1992).
- 8) K. HASEGAWA. Studies on the voltinism in the silkworm, *Bombyx mori* L., with special reference to the organs concerning determination of voltinism (a preliminary note). *Proc. Japan Acad.* 27: 667-671 (1951).
- 9) K. HASEGAWA. Diapause hormone of the silkworm, *Bombyx mori*. *Nature*, 179: 1300 (1957).
- 10) S. FUKUDA. The production of the diapause eggs by transplanting the suboesophageal ganglion in the silkworm. *Proc. Japan Acad.* 27: 672-677 (1951).
- 11) K. HASEGAWA, M. ISOBE and T. GOTO. Highly purified diapause hormone from the silkworm. *Naturwidss.* 59: 364-365 (1972).
- 12) M. ISOBE, K. HASEGAWA, and T. GOTO. Chemistry of the silkworm diapause hormone: Isolation of the diapause hormone from the silkworm, *Bombyx mori*. *J. Insect Physiol.* 19: 1221-1239 (1973).
- 13) M. ISOBE, K. HASEGAWA, and T. GOTO. The chemistry of the silkworm diapause hormone. III. Further characterization of the silkworm diapause hormone. *A. J. Insect Physiol.* 21: 1917-20 (1975).
- 14) M. ISOBE, K. HASEGAWA, I. KUBOTA and T. GOTO. Chemistry of the silkworm diapause hormone. Part V. Diapause hormone B, its selective extraction and isolation from the silkworm, *Bombyx mori*. *Agric. Biol. Chem.*, 40: 1189-99 (1976).
- 15) I. KUBOTA, M. ISOBE, T. GOTO, and K. HASEGAWA. Molecular size of diapause hormone of the silkworm *Bombyx mori*. *Naturforsch.*, 31c: 132-134 (1976).
- 16) 昆虫の生理と化学. 日高敏隆, 高橋正三, 磯江幸彦, 中西香爾 編 喜多見書房 51-62, (1979).
- 17) I. KUBOTA, M. ISOBE, K. IMAI, T. GOTO, O. YAMASHITA and K. HASEGAWA. The chemistry of the silkworm diapause hormone VI. characterization of the silkworm diapause hormone B. *Agric. Biol. Chem.*, 43: 1075-1078 (1979).
- 18) 磯部 稔, 後藤俊夫. 蚕の休眠ホルモン 現代化学, 69: 12-18 (1976).
- 19) M. ISOBE and T. GOTO. "Diapause Hormone" in "Neurohormonal Techniques in Insects", 216-243 (1980), New York, Springer-Verlag Ed. Thomas A. Miller.
- 20) O. YAMASHITA, M. ISOBE, K. IMAI, N. KONDO and T. GOTO. Serum albumin as an effective carrier for diapause hormone of the silkworm *Bombyx mori* L., *Appl. Entomol. Zool.* 15: 90-95 (1980).
- 21) S. MATSUMOTO, A. ISOGAI, and A. SUZUKI. Purification and characterization of melanization and reddish coloration hormone (MRCH) in lepidopteran insects, *Progress in Clinical and Biological Research*, 256: 437-451 (1988).
- 22) S. MATSUMOTO, A. ISOGAI, and A. SUZUKI. N-terminal amino acid sequence of an insect neurohormone, melanization and reddish coloration hormone (MRCH): heterogeneity and sequence homology with human insulin-like growth factor II, *FEBS Lett.*, 189: 115-118 (1985).

- 23) K. IMAI, N. KONDO, M. ISOBE, T. GOTO, and O. YAMASHITA. The neurohormones from the suboesophageal ganglion of *Bombyx mori*: separation of melanization-and reddish coloration hormone from diapause hormone, 日本蚕糸学会誌 51: 111-125 (1982).
- 24) A. KITAMURA, H. NAGASAWA, H. KATAOKA, T. INOUE, S. MATSUMOTO, T. ANDO, A. SUZUKI. Amino acid sequence of Pheromone-biosynthesis-activating neuropeptide (PBAN) of the silkworm, *Bombyx mori*, Biochem. Biophys. Res. Commun., 163: 520-526 (1989).
- 25) K. IMAI, N. KONNO, Y. NAKAZAWA, T. KOMIYA, M. ISOBE, K. KOGA, T. GOTO, T. YAGIMUMA, K. SAKAKIBARA, K. HASEGAWA and O. YAMASHITA. Isolation and structure of diapause hormone of the silkworm, *Bombyx mori*. Proc. Japan. Acad., 67 SerB: 98-101 (1991).
- 26) M. IKEDA, Z-H. SU, H. SAITO, K. IMAI, Y. SATO, M. ISOBE, and O. YAMASHITA. 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 (1993).
- 27) K. SHIOMI, Y. ISHIDA, Y. SATO, H. SAITO, K. IMAI, M. ISOBE, and O. YAMASHITA. Induction of non-diapause eggs by injection of anti-diapause hormone rabbit serum into the diapause type of the silkworm, *Bombyx mori*. J. Insect Physiol., 39: 889-895 (1994).
- 28) Z-H. SU, M. IKEDA, Y. SATO, H. SAITO, K. IMAI, M. ISOBE, and O. YAMASHITA. Molecular characterization of ovary trehalase of the silkworm, *Bombyx mori* and its transcriptional activation by diapause hormone. Biochim. Biophys. Acta, 1281: 366-374 (1994).
- 29) Y. SATO, Y. NAKAZAWA, N. MENJYO, K. IMAI, T. KOMIYA, H. SAITO, M. SHIN, M. IKEDA, K. SAKAKIBARA, M. ISOBE and O. YAMASHITA. A new diapause hormone molecule of the silkworm, *Bombyx mori*. Proc. Japan. Acad., 68 SerB: 75-79 (1992).
- 30) Y. SATO, M. OGUCHI, N. MENJYO, K. IMAI, H. SAITO, M. IKEDA, M. ISOBE and O. YAMASHITA. 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 (1993).
- 31) H. NAGASAWA, H. KUNIYOSHI, R. ARIMA, T. KUWANO, T. ANDO, and A. SUZUKI. Structure and activity of *Bombyx* PBAN. Arch. Insect Biochem. Physiol., 25: 261 (1994) and the references cited therein.
- 32) L. SCHOOF, G. M. HOLMAN, T. K. HAYES, R. J. NACHMAN, J. P. KOCHANSKY, and A. DELOOFS. Isolation, Identification and synthesis of locust myotropin III and IV, two additional neuropeptides of *Locusta migratoria*: members of the locustamyotropin peptide family. Insect Biochem. Mol. Biol., 22: 447-452(1992).
- 33) R. J. NACHMAN, G. M. HOLMAN, and B. J. COOK. Active fragments and analogs of the insect neuropeptide leucopyrokinin: structure-function studies. Biochem. Biophys. Res. Commun., 137: 936-942 (1986).
- 34) K. IMAI, K. SUGIURA, T. KOMIYA, and O. YAMASHITA. Isolation and partial structure of a unique lipophilic peptide, VAP peptide from the heads of male silkworm moths. Biosci. Biotechnol. Biochem., 60: 355-357 (1996).
- 35) K. SHIOMI, Y. SATO, K. IMAI, and O. YAMASHITA. Insect Biochem. Mol. Biol., A hydrophobic peptide (VAP-peptide) of the silkworm, *Bombyx mori*: Structure, expression and an enhancing function of diapause hormone activity. accepted for publication.
- 36) H. SAITO, Y. TAKEUCHI, R. TAKEDA, Y. HAYASHI, K. WATANABE, M. SHIN, K. IMAI, M. ISOBE, and O. YAMASHITA. The Core and complementary sequence responsible for biological activity of the diapause hormone of the silkworm, *Bombyx mori*. Peptides, 15: 1173-1178 (1994).
- 37) S. SUWAN, M. ISOBE, O. YAMASHITA, H. MINAKATA and K. IMAI. Silkworm diapause hormone, structure-activity relationships indispensable role of C-terminal amide. Insect Biochem. Molec. Biol., 24: 1001-1007 (1994).
- 38) K. IMAI, T. NOMURA, H. KATSUZAKI, T. KOMIYA, and O. YAMASHITA. The minimum structure of

diapause hormone required for biological activity, *Biosci. Biotech. Biochem.*62: 1875-1879 (1998).

- 39) R. J. NACHMAN, P. E. TEAL, P. A. RADEL, G. M. HOLMAN, R. L. ABERNATHY. Potent pheromotropic/myotropic activity of a carbonyl pseudotetrapeptide analogue of the insect pyrokinin/PBAN neuropeptide family administered via injection or topical application. *Peptides*, 17: 747-752 (1996).