



Molecular characterization of cockroach vitellogenins and vitellogenin receptor mechanisms

Tufail, Muhammad

(Degree)

博士 (学術)

(Date of Degree)

2003-03-31

(Date of Publication)

2007-10-16

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲2760

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1002760>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



【 188 】

氏名・(本籍) Muhammad Tufail (パキスタン)
博士の専攻分野の名称 博士(学術)
学位記番号 博い第428号
学位授与の要件 学位規則第4条第1項該当
学位授与の日付 平成15年3月31日

【 学位論文題目 】

Molecular characterization of cockroach vitellogenins
and vitellogenin receptor mechanisms
(ゴキブリのビテロジェニンとビテロジェニン受容体機構の
分子生物学的特徴)

審査委員

主査 教授 竹田 真木生
教授 深見 泰夫
教授 大石 隆生

Molecular characterization of cockroach vitellogenins and vitellogenin receptor mechanisms

Abstract

(Muhammad Tufail, page 1)

Vitellogenins (Vgs) are precursors of the major egg yolk protein, vitellins (Vns), in many oviparous animals. Vg of most insect species is synthesized in the fat body cells, in tissue-, sex- and stage-specific manners, secreted into the hemolymph and then ultimately taken up by the developing oocytes via receptor-mediated endocytosis. During these processes Vgs and Vns are modified through cleavage, glycosylation, lipidation, and phosphorylation. After incorporation into the eggs, Vns represent a major component of egg yolk proteins and serve as storage proteins to provide a source of amino acids, carbohydrates, lipids, and phosphates to the developing embryo.

It was proposed that the Vgs genes or the product can be used as a molecular marker to indicate the phylogenetic relationships based on the amino acid sequences. Also, Vg genes and/or cDNAs serve as an excellent model systems for studying the molecular basis of gene regulation because of their sex-, tissue-, and hormone- mediated developmental specificity.

In the present study, we have characterized the molecular structures of three Vg molecules, two (Vg1 and Vg2) being that of the American cockroach, *Periplaneta americana* (Tufail et al., 2000 and Tufail et al., 2001), and one being that of the Madeira cockroach, *Leucophaea maderae* (Tufail and Takeda, 2002). We also show the use of Vg cDNAs as probes in Northern blot analyses to assess the tissue- and sex-specificity of the Vg gene expression in both the cockroach species. The Vg cDNA probe was also used to investigate the stage specific expression of Vg gene in the female fat body cells of *P. americana*. The expression of Vg gene was first detected by Northern blot analysis in the fat body cells of 2-days-old adult females, and the hemolymph Vgs were first detected by Western blot analysis in 4-days-old adult females. These results demonstrate that the Vg cDNA clone will be a sensitive probe to study the hormonal regulation on Vg gene expression.

The deduced amino acid sequences of three Vg molecules investigated in the present study were confidently aligned among each other and among the other known insect Vgs and a molecular phylogenetic tree constructed was in agreement with that constructed based on the ribosomal DNA sequences and that constructed previously based on the morphological characteristics. The present results thus conclude that the Vgs can be used as a molecular marker to indicate the phylogenetic relationships. We also demonstrate, on molecular basis, the processing patterns of cloned Vg molecules from both the cockroach species.

Moreover, we have also cloned and sequenced another Vg cDNA of *L. maderae* which has stretches of amino acid sequences different from the one reported previously (Tufail and Takeda, 2002). The complete nucleotide sequence of this Vg (which we named as Vgb for comparison) consists of 5915 bp which encodes a deduced amino acid sequence of 1911 amino acid residues (including a putative signal peptide sequence) in a single open reading frame. The comparison of base sequences of both *L. maderae* Vgs revealed that the difference was due to mutations (addition/deletion or addition of a base (s) at one position followed by deletion of a base (s) at another position and vice versa) in the base sequence of

(Muhammad Tufail, page 2)

Vgb (the other Vg) which made its amino acid sequence different from the one reported previously (Tufail and Takeda, 2002). The both *L. maderae* Vgs were, however, showing 96% similarity in the protein primary structure.

Moreover, we also report for the similarity in Vn antigenicity among 10 selected cockroach species, belonging to two superfamilies, using the anti-*P. americana* Vn- antisera. The results demonstrate that the Vn antigenicities are at least very similar within the members of the same superfamily.

Vg receptors (VgRs), are of vital importance to all oviparous animals because they transport Vg into oocytes, a key step for egg development and a prerequisite for reproduction. VgRs are localized in coated pits on the surface of growth competent oocytes which bind the yolk protein precursor and carry it into cells by receptor mediated endocytosis. Once sequestered by growing oocytes, the Vg is sent to yolk bodies, where it is processed for storage and thus providing the main nutritional reserves necessary for embryo development.

The insect oocyte provides an excellent model system for studying receptor-mediated endocytosis because of the high intensity of protein uptake. This system could also be a promising target for the pest control. For example, interruption of the receptor-ligand interaction would block egg production, and the knowledge can be exploited for the safer pest control strategies. To manipulate this system/strategy the basic information required is a thorough understanding of structures, interactions, regulation and expression of the proteins involved (both the ligand and the receptor).

We have recently characterized the molecular structures of two Vg molecules, the ligands, from the American cockroach, *P. americana* (Tufail et al., 2000 and 2001). We now report the cDNA cloning and structural analysis of their counterpart, the receptor, from this cockroach species, and describe that the VgR we cloned is a new LDLR family member having only 6 repeats in the second ligand-binding domain. This novel insect VgR consists of 1709 amino acid residues and shares a significant homology with other LDLR family members and particularly with Vg/Yp receptors reported from the mosquito and *Drosophila*. The cytoplasmic tail of *P. americana* VgR contains a leucine-isoleucine internalization signal, the motif that seems to be common in insect VgRs/YPRs (di-leucine in *Drosophila* YPR), unlike the tight-turn-tyrosine motif (NPXY) of other members of LDLR gene family. The phylogenetic (neighbour-joining) analysis shows that the mosquito VgR and YPR of *Drosophila* are more closely related than with the cockroach VgR.

During cloning of VgR, We also found a cDNA clone encoding receptor tyrosine kinase (RTK) from the previtellogenic ovaries of *P. americana*. The complete cDNA for RTK was of 4128 residues which encoded a deduced amino acid sequence of 1294 residues including 22 residues for the putative signal peptide. The entire deduced amino acid sequence was aligned confidently with other members of the RTK family of receptors. We are, however, not clear about the role of RTK in the previtellogenic ovary at the moment. One possibility is that RTK, like other family members, may be involved in cell proliferation, especially follicle cells in the developing ovary.

氏名	Muhammad Tufail		
論文題目	Molecular characterization of cockroach vitellogenins and vitellogenin receptor mechanisms (ゴキブリのビテロジェニン及びビテロジェニン受容体機構の分子生物学的特徴)		
審査委員	区分	職名	氏名
	主査	教授	竹田 真木生
	副査	教授	深見 泰夫
	副査	教授	大石 陸生
	副査		
要 旨			
<p>ビテロゲニンは卵黄蛋白質（ビテリン）の前駆体として昆虫では脂肪体で作られ、cleavage等の修飾を受けた後、血中に放出され、卵細胞に取り込まれた後、さらに様々な修飾をうける。この蛋白質の合成とその後のプロセスは、雌特異的で且つホルモン制御下に行われるので、これまでに多くの研究者の注目を集めてきた。本実験ではゴキブリの系を用いたが、この系では生理学的にはこれまで多くのデータが蓄積されているが、遺伝子のクローニングに基づく構造解析はこれまでなされてこなかった。また、不完全変態種の昆虫のビテロゲニンの構造も余り調べられてこなかった。そこで、本研究はゴキブリの1種ワモンゴキブリ (the American cockroach, <i>Periplaneta americana</i>) を用いビテロゲニン遺伝子のクローニングから始め、ゴキブリのビテロゲニンの構造的な特徴と、系統的な関係そして、ビテロゲニンの取り込みの調節機構の解明のために受容体のクローニングをおこなった。</p> <p>本論文は6章からなり、第1章は現在までの研究の到達点を明らかにした、レビューである。</p> <p>第2章はワモンゴキブリのビテロゲニンのクローニングで、脂肪体からcDNAライブラリーを構築し、この遺伝子の中からcDNAを得た。この遺伝子は1896アミノ酸をコードするORFを持つ5854bp長のもので、こら迄明らかにされたビテロゲニンの構造と共通の構造を持ち、卵黄の170kDa ビテリンのN-末端のアミノ酸配列を含んでいた。ノーザン分析やウェスタン分析もこの蛋白質とそのメッセージが雌の脂肪体でだけ発現していることを示した。手に入る9種のゴキブリのビテリンでこのビテロゲニンとの相同性を比較した結果、ゴキブリのうちでは上科レベルで、より共通性が高かった。尚、本章の内容は独立の論文 (Cloning of vitellogenin cDNA of the American cockroach, <i>Periplaneta americana</i> and its structural and expression analyses) として Archives for Insect Biochemistry and Physiology 45:37-46, (2000) に発表された。</p> <p>第3章はビテリンの泳動パターンと作成したペプチド抗体の交叉性から、第2のビテロゲニン遺伝子の存在が疑われ、これをクローニングした結果について述べている。1876アミノ酸を含むORFをもつ5826bp長のもので、ビテロゲニンとビテリンのSDS電気泳動バンドのN-末端のアミノ酸構造の解析から、ゴキブリ卵黄蛋白質は2つの遺伝子から作られる2つのビテロゲニンからそれぞれ2段階の cleavage をうけて形成されることが明らかになった。尚、この部分は独立の論文として (Molecular evidence for two vitellogenin genes and processing of vitellogenins in the American cockroach, <i>Periplaneta americana</i>. Archives for Insect Biochemistry and Physiology 48: 72-80, 2001) 発表された。</p>			

氏名	Muhammad Tufail
<p>第4章では、本種のビテロゲニンと免疫的に交叉性を示した <i>Leucophaea maderae</i> のビテロゲニン遺伝子のクローニングの結果を述べている。今回はゴキブリで得られたこれまでの配列を参考にしてPCRによってクローニングに成功した。本種ではビテロゲニンは脂肪体と卵細胞で3回の cleavage をうけて成熟することが判った。ワモンゴキブリのビテロゲニンとの共通の構造もみつかった。これらのデータからゴキブリの系統関係を他の分子データのそれと比べた結果、ビテロゲニン分子の構造はよく系統関係を反映していると結論づけられた。この結果は独立の論文として (Vitellogenin of the cockroach, <i>Leucophaea maderae</i>. Insect Biochemistry and Molecular Biology 32: 1469-1476, 2002) 発表された。尚、本種でもフレームシフトを含む、別の遺伝子が存在することを強く示唆するデータを得た。</p> <p>第5章は論文としては未発表であるが、ワモンゴキブリ卵巣からビテロジェニン受容体と もう一つ receptor tyrosine kinase (RTK) を得た。本章はこの構造について述べている。ビテロゲニン受容体としては昆虫ではショウジョウバエとネッタイシマカのものに次ぐものである。不完全変態昆虫としては勿論はじめてである。この受容体は2種の双翅目 (ハエ・カ) のもの (VgR/YPR) やほ乳類の LDLR (low density lipoprotein receptor) と比較的高い相同性を有していたが、ユニークな点も持っていた。それは、2つのリガンド結合部のEGF様のユニットの反復数である。通常5回と8回であるが6回反復型のものはまだ見つかっていない。ビテロゲニンの複雑な生成過程に対応してどの様に受容体が機能するか、またこのRTKの役割についても極めて興味深いところであるが、本論文はこうした機能解析のための重要な構造的情報を明らかにした。</p> <p>最後の第6章は要約である。尚、本論文提出後に不完全変態昆虫のビテロゲニンの合成・成熟機構についての総説を依頼され、提出したことを付記する (Tufail, M., M. Takeda, F. Giorgi and A. Raikhel Biosynthesis and processing of vitellogenins. <i>Progress in Vitellogenins, Part B.</i>).</p> <p>本研究は、ゴキブリのビテロゲニンとその受容体の構造について分子的特徴を明らかにした。それによって、昆虫の生殖生理機構の解明に貢献した価値ある学問的集積であると認める。よって、学位申請者 Muhammad Tufail は博士 (学術) の学位を得る資格があると認めるものである。</p>	