

昆虫神经肽研究进展

徐卫华

(中国科学技术大学生物系, 合肥 230026)

摘要 近年来鉴定了化学结构的昆虫神经肽数目呈快速上升趋势, 家蚕滞育激素和性信息素合成激活肽被分离纯化. 三种近年出现的研究方法对寻找新型昆虫神经肽起到重要作用, 已经成功地鉴定了数个新型神经肽. 昆虫神经肽 cDNA 或基因组 DNA 克隆显示了新的结构信息和神经肽间的相互关系.

关键词 滞育激素, 性信息素合成激活肽, 新途径, 基因克隆, 昆虫

昆虫神经肽作用于昆虫生长发育、蜕皮变态、滞育、代谢、生殖等每一个发育过程. 如果不清楚这些神经肽的结构特征, 便无法理解昆虫的生命活动. 80 年代以前仅 Proctolin (内脏肌肉收缩活性肽类) 和 adipokinetic hormone (AKH, 脂动激素) 的结构被解析出来, 而且这两个肽均为 10 个氨基酸以内的短肽分子. 进入 80 年代, 尤其是 80 年代后半期至今, 一系列重要昆虫神经肽被分离、纯化, 氨基酸一级结构被确定. 如促前胸腺激素 (prothoracicotropic hormone, PTTH)、滞育激素 (diapause hormone, DH)、羽化激素 (eclosion hormone, EH)、性信息素合成激活肽 (pheromonebiosynthesis activating neuropeptide, PBAN) 等. 一些昆虫神经肽已有专文论述^[1], 本文介绍几个重要的、近年才清楚的神经肽, 同时就研究新型昆虫神经肽的实验方法和有关神经肽基因克隆的进展作一些评述.

1 近年查明结构的昆虫神经肽

归纳近年来报道的神经肽结构, 如表 1 所示.

这些神经肽中, DH 和 PBAN 是最重要的二个神经肽, 具有独特生理学功能. 对它们的结构和功能已经研究了许多年.

DH 最早由 Hasegawa (1951 年) 和 Fukuda (1951 年) 分别独立发现, 是控制家蚕 (*Bombyx mori*) 胚胎滞育的激素, 它由食

道下神经节 (subesophageal ganglion, SG) 的神经分泌细胞分泌. Hasegawa 等 (1980 年) 用二氯甲烷/甲醇从家蚕成虫头部分离出两种具有生物学活性的滞育激素, 但没有得到任何有关多肽分子结构的信息. Imai 等^[2] (1991 年) 改变了实验条件, 以家蚕蛹的 SG 为材料, 用水法抽提结合反相高效液相色谱, 纯化出 500 ng DH, 发现 DH 是由 24 个氨基酸组成的多肽, C 端酰胺化. 人工合成的 DH 显示出和天然的活性相当, 证实了测定结果的正确性. 最初不能确定 DH 的第 19 位是什么氨基酸, 最初推定为半胱氨酸. 但后来的 DH cDNA 结构表明第 19 位是色氨酸^[3]. 第 19 位无论是半胱氨酸还是色氨酸, 生物学活性无差别.

大多数昆虫种是雌性成虫产生和释放性信息素 (sex pheromone) 来吸引雄性成虫达到交配, 以完成产卵、继代. 昆虫的性行为通常限定在一天的某个时期, 多数是在暗光周期. Riddiford 等 (1971 年) 提出神经内分泌控制性信息素的产生和释放, 并且根据一些研究结果推论, 环境条件诱导脑, 然后由脑刺激心侧体 (corpora cardiaca) 的中部细胞分泌某种激素到血液中, 引发雌成虫分泌性信息素^[4]. 该因子后来被定名为性信息素合成激活肽 (PBAN)^[5], 相继在许多虫种中发现 PBAN, 而且有趣的是雄性成虫体内也存在 PBAN.

收稿日期: 1996-04-28, 修回日期: 1996-09-02

表 1 近年查明的昆虫神经肽

神经肽(昆虫种)	氨基酸序列
脂肽激素(椎头螳螂)	PQVNFTPNW-NH ₂
促咽侧体肽(烟草天蛾)	GFKNVEMMTARGF-NH ₂
抑咽侧体肽(烟草天蛾)	QVRFRCYFNPISCF
促前胸腺激素(家蚕)	GNIQVENQAIPDPCTCKYKKEIEDLGENSEVPRFIETRNCNKTQQPTCRP PYICKESLYSITILKRRETKSQESLEIPMELKYRWVAESHVSVACLCTRDYQLRYNN
羽化激素(家蚕)	SPAIISSYDAMEICIENCAQCKKMFGPWFEGLCAESCIKARGKDIPECESFASISPFLNK-OH
(烟草天蛾)	NPAIATGYDPMEICIENCAQCKKMLGAWFEGPLCAESCIKFKGKLIPECEDFASIAFLNKL-OH
滞育激素(家蚕)	TDMKDESDRGAHSERGAFCFGFRL-NH ₂
性信息素合成激活肽(家蚕)	LSEDMPATPADQEMYQPDPEEMESRTRYFSPRL
(玉米夜蛾)	LSDDMPATPADQEMYRQDPEQIDSRTKYFSPRL
飞蝗促肌肽 III(飞蝗)	RQQPFVPRL-NH ₂
IV(飞蝗)	RLHQNGMPFSPRL-NH ₂
促信息素肽(粘虫)	KLSYDDKVFEFVEFTPRL-NH ₂
飞蝗热激肽(飞蝗)	PQDSGDGWPPQPFVPRL-NH ₂
利尿激素(飞蝗)	MGMGPSLSIVNPMDVLRQRLIELARRRLRDAEEQIKANDDFLQQF-NH ₂
(家蟋蟀)	TGAQSLIVAPLDVLRQRLMELNRRRNRELQGSRIQQNRQLLTSF-NH ₂
(烟草天蛾)	SFSVNPAVDILQHRYMEKVAQNRRNFLNRV-NH ₂
高血海藻糖肽(埃及地鳖)	PQITFTPNW-NH ₂
飞蝗速激肽 III(飞蝗)	APQAGFYGVR-NH ₂
IV(飞蝗)	APSLGFHGV-NH ₂
胰岛素类肽(飞蝗)	GVFDECCRKSCSISELQTYCG (A chain) SGAPQPVARYCGEKLSNALKLVCRGNNTMF (B chain)
神经激肽(飞蝗)	NPISRSCEGANCVVDLTRCEYGDVTDFGGRKVCAGPGDKCGGP YELHGKCGVGMDCRCGLCSGCSLHNLQCFEFEGGLPSSC
促卵巢生长肽(飞蝗)	YYEAPPDGRHLLLQPAPAAPAVAPASPASWPHQRRQALDEFAA AAAAAADAPFQDEEDGGRR

1989 年美国的 Raina 和日本的 Suzuki 二个研究小组分别以玉米夜蛾 (*Helicoverpa zea*) 和家蚕为材料, 纯化出 PBAN, 并确定其结构^[6,7] (表 1). 家蚕有 PBAN I 和 PBAN II 两种类型, 差别是 PBAN II 比 PBAN I 在 N 端多了一个精氨酸. 家蚕 PBAN I 和玉米夜蛾 PBAN 均为 33 个氨基酸组成的肽, C 端酰胺化. 两者同源率达 82%.

总共发现了 100 多种昆虫神经肽, 这些肽根据功能或结构序列的相似性大约分为 20 组 (或家族). FXPRL 家族是近年才出现的一个神经肽家族, 它把多肽 C 端具有 FXPRL (苯

丙-X-脯-精-亮氨酸) 序列的归为一类, 这类中具有代表性的神经肽是 DH、PBAN. 分析 DH、PBAN 的结构与功能的相关性, 发现 FXPRL 是多肽的活性中心, 改变或缺少一个氨基酸, 生物学活性大为降低. 反之, N 端减少或改变多个氨基酸, 生物学活性虽有下降, 但下降很少^[8,9]. 除了 DH 和 PBAN, 东亚飞蝗 (*L. migratoria*) 的 mvotrokinin 和 dvrokinin (均为内脏肌肉收缩活性肽)、粘虫 (*Pseudaletia separata*) 的 melanization and redish colouration hormone (MRCH, 体表着色激素) 均属 FXPRL 神经肽家族.

2 研究新型神经肽的几种方法

根据各生理和发育阶段的独特现象, 分离纯化相应的神经肽是至今为止的主要方法. 近些年人们开始尝试寻找新型昆虫神经肽的新途径.

Hoffman 等 (1991 年) 用脊椎动物的神经肽或激素作为抗体, 从蝗虫 (*Locusta*) 心侧体纯化出胰岛素类肽 (insulin-related peptide)、Neuroperisins 等多种神经肽^[10]. 这种方法是利用脊椎动物和无脊椎动物神经肽间的相似性来分离昆虫新型神经肽. 但这种方法有二种不利因素, 一是了解这些新型神经肽的功能相当困难; 二是只能精制出特定组织中含量很多的神经肽.

Song 等^[11] (1992 年) 采用相当独特的方法来寻找新型神经肽. 他们以家蝇 (*Musca domestica*) 头部神经分泌细胞的抽出物作为抗原, 再通过免疫得到单克隆抗体. 用单克隆抗体筛选新型神经肽, 筛选的方法有酶标免疫分析 ELISA (enzyme linked immunosorbent assay) 或蛋白质印迹 (Western blot) 分析或免疫组织化学法 (immunohistochemistry). 例如用一种抗体检测出心侧体后侧神经分泌细胞中有某种多肽存在后, 用蛋白质印迹分析确定该多肽的分子质量为 56 ku. 该多肽出现在某个特定时期的神经组织和周期性出现在血液中. 进一步的研究发现该多肽和鞣化激素 (bursicon) 非常相似, 而鞣化激素至今仍未被分离, 结构特征也不知道. 所以这个单克隆抗体也许可以作为抗鞣化激素的抗体, 在不久的将来完成鞣化激素的分离精制. 这条途径似乎不太可能被人们接受作为寻找新型神经肽的方法, 因为它需要知道许多生理学数据才能选择多克隆抗体中的一个单克隆抗体. 但是这种方法启发了人们的思维, 今后若加以改进, 或许可以用来寻找新型昆虫神经肽.

随着生物技术的飞速发展, 用分子生物学方法寻找新型神经肽成为近年倍受注目的方法. 利用不同昆虫种间某种神经肽的相似性,

以已知的神经肽的核苷酸序列作为引物或探针, 克隆未知的神经肽基因. 方法大致有二种:

a. 间接法: 羽化激素是诱导成虫羽化的激素, 家蚕和烟草天蛾 (*Manduca sexta*) 的羽化激素基因序列已查明, 两者的氨基酸同源率达 80%^[12, 13]. 所以推定果蝇 (*Drosophila*) 也有结构相似的羽化激素. Horodyski 等^[14] 以烟草天蛾的羽化激素 cDNA 为探针, 筛选果蝇的基因库, 最终成功地克隆了果蝇的羽化激素基因, 分子结构和烟草天蛾中的也非常相似, 氨基酸同源率达 67%, 而且将果蝇羽化激素基因定位在 90B1-2 染色体位置上, 用免疫组织化学定位羽化激素 mRNA 出现在脑腹中部的一对神经细胞.

b. 直接法: 以已知的某个基因的序列为参考, 合成二个引物用 PCR (polymerase chain reaction) 方法扩增某个未知基因, 然后进行克隆、测序. 这种方法在克隆未知相关基因方面广为应用, 但在神经肽方面未见报道. Xu 等 (1994 年, 未发表) 以家蚕 DH 基因作为参照, 合成二个特异性引物作 PCR 扩增野蚕 (*Bombyx mandarina*) 的 DH 基因, 完成了基因克隆. 这种方法的优点是快速克隆, 不需要构建 cDNA 或基因库. 缺点是设计 PCR 引物 (primers) 非常困难, 引物设计的好坏是决定未知基因能否扩增出来的关键. 再是 PCR 法克隆到的仅是未知基因的一部分, 这个问题目前已经通过 RACE (rapid amplification of cDNA ends) 方法克隆完整基因而加以解决或以扩增的 PCR 产物作探针去筛选基因库完成基因全序列的确定.

3 昆虫神经肽基因的克隆

进入 90 年代, 运用重组 DNA 技术, 克隆昆虫神经肽 cDNA 或基因组 DNA 已成为普遍使用的实验方法. 如烟草天蛾的羽化激素和利尿激素, 家蚕的羽化激素、DH、PTTH 和 PBAN, 玉米夜蛾的 PBAN, 蓖麻蚕 (*Samia cynthia ricini*) 的胰岛素类肽, 果蝇的 FMRF

神经肽等. 基因克隆不仅解决了蛋白质不易测序的难题, 而且从中发现了有关神经肽的新信息. 如 PTTH 是控制变态的重要激素, 但它在生物体内含量极微, 分子较大, 多年来没能完成多肽分子全结构的解析. 通过 PTTH cDNA 的克隆, 彻底解决了分子全序列的分析^[15]. 再如前面所提及性信息素由雌性成虫分泌, 吸引雄性成虫. 性信息素的合成是由 PBAN 控制的. 可是发现雄性成虫体内也有 PBAN, 这个问题在 PBAN 基因克隆完成前一直是个谜. Sato (1992 年)、Xu (1995 年) 在完成滞育激

素 cDNA 和基因克隆时, 首先纠正了蛋白质测序时第 19 位氨基酸的归属问题, 同时又发现了 DH、PBAN 和另外三个肽都是由一个基因编码的有趣现象, 故改称其为 DH-PBAN 基因^[16,17]. 这个基因在基因组内是单拷贝, 转录后除去 5 个内含子, 形成一个前体 mRNA. 翻译形成一个前体多肽, 在体内蛋白水解酶的作用下, 释放出 DH、PBAN 和另外三个 FX-PRL 家族神经肽 SGNP- α 、 β 和 γ , 因为这五个肽的 C 端均为蛋白水解酶的强烈识别位点. 如图 1 所示.

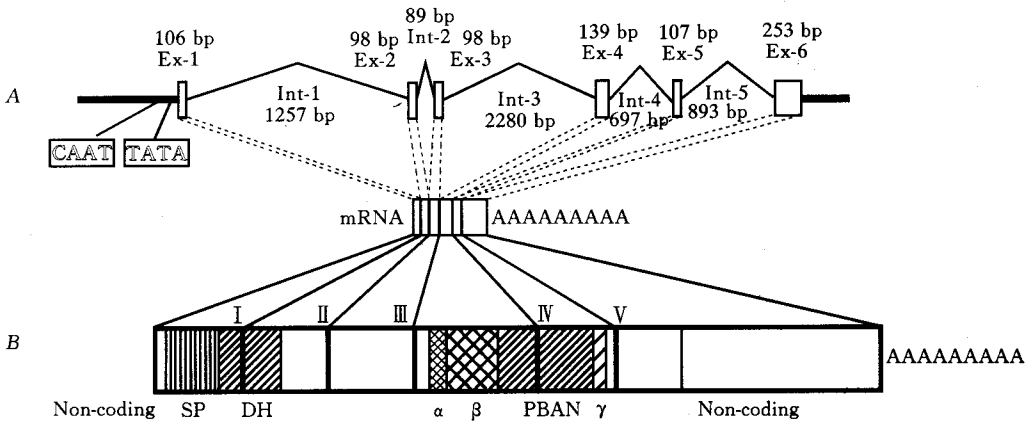


图 1 DH-PBAN mRNA 的转录、加工过程

A: DH-PBAN (diapause hormone-pheromone biosynthesis activating neuropeptide) 基因由 5 个内含子和 6 个外显子组成, 全长约 6 kb. 在启动子部位有典型的 CAAT 盒和 TATA 盒. Ex (exon): 外显子; Int (intron): 内含子. B: DH-PBAN 基因转录后, 除去内含子形成成熟的 mRNA 分子. 在 mRNA 前后两端是非编码 (non-coding) 区域, 信号肽 (SP: signal peptide) 序列紧接 5' 端非编码区. 滞育激素 (DH)、性信息素合成激活肽 (PBAN) 及 SGNP (subesophageal ganglion neuropeptide) α 、 β 、 γ 三个 FX-PRL 家族神经肽被编码其中. I ~ V: 示内含子数.

DH 和 PBAN 这两个功能完全不同的神经肽竟然编码在一个基因中, 这在昆虫界是首次发现. DH-PBAN 前体 mRNA 和前体多肽又是研究 DNA 的拼接 (splicing)、蛋白多肽的加工 (processing) 机理的极好材料. 因为 PBAN 和其他几个多肽共同编码在一个基因里面, 当其他基因产物合成时, PBAN 作为副产品 (也许 PBAN 还具有其他未知功能) 出现在雄性昆虫体内, 它并不诱导性信息素的合成. 不仅如此, Xu 等^[18]还发现了控制 DH-PBAN 基因

表达的二种模式: 温度控制的和依赖于发育时期的基因表达. 家蚕胚胎发育期用高温 (25℃) 和低温 (15℃) 保育的对比研究, 发现 DH 神经肽是受到高温冲击后诱导产生的, 这和近年来研究热点之一的热休克蛋白 (heat shock protein, HSP) 的产生十分相似, 只不过所用温度果蝇的 37℃ 与家蚕的 25℃ 不同而已. DH 是否是一种热休克蛋白? 十分耐人寻味, 作者等人正在深入研究之中.

致谢 承蒙中国科学院动物所翟启慧教授审阅, 指正有关神经肽、昆虫种名的中文译名, 特此致谢。

参 考 文 献

- 1 翟启慧. 昆虫分子生物学的一些进展——性别决定、生殖及激素. 昆虫学报, 1993, **36**: 113~ 125
- 2 Imai K, Konno T, Nakazawa Y *et al.* Isolation and structure of diapause hormone of the silkworm, *Bombyx mori*. Proc Japan Acad (Seri B), 1991, **67**: 98~ 101
- 3 Sato Y, Nakazawa Y, Menjo N *et al.* A new diapause hormone molecule of the silkworm, *Bombyx mori*. Proc Japan Acad (Seri B), 1992, **68**: 75~ 79
- 4 Riddiford L M, Williams C M. Role of corpora cardiaca in the behavior of saturniid moths. Biol Bull, 1971, **140**: 1~ 6
- 5 Raina A K, Klun J A. Brain factor control of the sex pheromone production in the female corn earworm moth. Science, 1984, **225**: 531~ 533
- 6 Raina A K, Jaffe H, Kempe, T G *et al.* Identification of a neuroendocrine hormone that regulates sex pheromone production in female moths. Science, 1989, **244**: 796~ 797
- 7 Kawano T, Kataoka H, Nagasawa H *et al.* cDNA cloning and sequence determination of the pheromone biosynthesis activating neuropeptide of the silkworm, *Bombyx mori*. Biochem Biophys Res Commun, 1992, **189**: 221~ 226
- 8 Nagasawa H, Kuniyoshi H, Arima R *et al.* Structure and activity of *Bombyx* PBAN. Arch Insect Biochem Phys, 1994, **25**: 261~ 270
- 9 Suwan S, Isobe M, Yamashita O *et al.* Silkworm diapause hormone, structure-activity relationships indispensable role of C-terminal amide. Insect Biochem Molec Biol, 1994, **24**: 1001~ 1007
- 10 Hetru C, Li K W, Bulet P. Isolation and structural characterization of an insulin-related molecule, a predominant neuropeptide from *Locusta migratoria*. Eur J Biochem, 1991, **201**: 495~ 499
- 11 Song Q, Ma M. A monoclonal antibody to a 56 kd neurosecretory polypeptide from the posterior lateral neurosecretory cells of the housefly, *Musca domestica*. Insect Biochem Molec Biol, 1992, **22**: 149~ 157
- 12 Horodyski F M, Riddiford L M, Truman J W. Isolation and expression of the eclosion hormone gene from the tobacco hornworm, *Manduca sexta*. Proc Natl Acad Sci USA, 1989, **86**: 8123~ 8127
- 13 Kamito T, Tanaka H, Sato B *et al.* Nucleotide sequence of cDNA for the eclosion hormone of the silkworm, *Bombyx mori*, and the expression in a brain. Biochem Biophys Res Commun, 1992, **182**: 541~ 549
- 14 Horodyski F M, Ewer J, Riddiford L M *et al.* Isolation, characterization and expression of the eclosion hormone gene of *Drosophila melanogaster*. Eur J Biochem, 1993, **215**: 221~ 228
- 15 Kawakami A, Kataoka H, Oka T *et al.* Molecular cloning of the *Bombyx mori* prothoracicotropic hormone. Science, 1990, **247**: 1333~ 1335
- 16 Sato Y, Nakazawa Y, Menjo N *et al.* Precursor polypeptide for multiple neuropeptide 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, 1993, **90**: 3251~ 3255
- 17 Xu W-H, Sato Y, Ikeda M *et al.* Molecular characterization of the gene encoding the DH-PBAN of the silkworm, *Bombyx mori* and its distribution in some insects. Biochim Biophys Acta, 1995, **1261**: 83~ 89
- 18 Xu W-H, Sato Y, Ikeda M *et al.* Stage-dependent and temperature-controlled expression of the gene encoding the precursor protein of DH-PBAN in the silkworm, *Bombyx mori*. J Biol Chem, 1995, **270**: 3804~ 3808

Advances in Insect Neuropeptides. XU Weihua (The Department of Biology, University of Science and Technology of China, Hefei 230026, China).

Abstract The number of insect neuropeptides identified chemically grows rapidly and many important neuropeptides have already been characterized. After multi-year efforts, diapause hormone and pheromone biosynthesis activating neuropeptide have recently been isolated and sequenced, respectively. New approaches to search for new insect neuropeptides have been carried out by some groups of workers, which have succeeded in identifying several unique peptides. Cloning of cDNA or genomic DNA for insect neuropeptides showed new information about structure and function. It was found that two functionally distinct neuropeptides, *Bombyx* diapause hormone and pheromone biosynthesis activating neuropeptide, are encoded in a single gene.

Key words diapause hormone, pheromone biosynthesis activating neuropeptide, new approaches, DNA cloning, insect