

Formosan Entomologist

Journal Homepage: entsocjournal.yabee.com.tw

## 東方果實蠅血管收縮素轉化酶同源基因選殖及轉錄表現

許家銘、陳美娥\*

國立中興大學昆蟲學系 402 台中市南區興大路 145 號

\* 通訊作者 email: meirchen@dragon.nchu.edu.tw

收件日期:2019年1月11日 接受日期:2019年8月1日 線上刊登日期:2019年8月30日

## 摘 要

本研究選殖東方果實蠅 (Bactrocera dorsalis) 血管收縮素轉化酶 (angiotensin-converting enzyme, ACE) cDNA (BdACE) (GenBank accession no. MH795420) 全長序列 2081 bp,其中 包含 1848 bp 之開放讀架,轉譯一個 615 個胺基酸之蛋白。BdACE 胺基酸序列包含與鋅離子接 合使酵素具有活性之胺基酸:甘胺酸 (glycine)、精胺酸 (arginine) 及谷胺酸 (glutamine),分別 位於胺基酸序列序號 374、378 及 399 的位置。利用即時定量聚合酶連鎖反應測試 BdACE 於各發 育時期表現量,結果顯示 BdACE 於幼蟲時期表現量從一齡幼蟲至三齡末期呈上升趨勢,且在三齡 末期為顯著最高。於蛹期階段,表現量在第一日齡蛹為顯著最高,其餘日齡則未有顯著差異。於成 蟲時期,雄蟲 BdACE 於脂肪體之表現量,在羽化後第零日齡表現量為顯著最高,於第一日齡至第 十日齡則無顯著差異。雌蟲 BdACE 於脂肪體表現量,在第零日齡到第十日齡間皆無顯著差異。上 述結果顯示,BdACE 在發育轉換時期表現量上升,推論和發育及變態有所關連。進一步以反轉錄 聚合酶連鎖反應偵測 BdACE 於成蟲各組織之表現,結果顯示 BdACE 表現於脂肪體及腦,推測參 與修飾脂肪體蛋白及神經胜肽。

關鍵詞:東方果實蠅、血管收縮素轉化酶、脂肪體、腦、發育。

## 前 言

血管收縮素轉化酶 (angiotensin-converting enzyme, ACE) 為雙基胜肽酶 (dipeptidyl peptidase),需與鋅離子接合才具有活性。哺乳動物 具有兩種 ACE 異構物,分別為 somatic ACE (sACE)及 testicular ACE (tACE)。sACE 能夠將 血管收縮素 I 之 C 端的組胺酸 (histidine)及白胺 酸 (leucine)水解,形成血管收缩素 II 來提升血壓。 除此之外,也可水解緩激肽 (bradykinin)使之失去 活性,來平衡血壓。因此,sACE 在哺乳動物之血壓 調控扮演重要的角色 (Skeggs et al., 1954; Gonzalez-Villalobos et al., 2013)。而 tACE 和繁殖 相關,小鼠的實驗顯示公鼠精巢缺乏 tACE 則無法 使母鼠成功受孕 (Krege et al., 1995)。因無脊椎動 物不具血管系統,血管收縮素轉化酶一直被認為是 哺乳動物專一的酵素。直到 1994年,於家蠅 (Musca domestica) 及果蠅 (Drosophila melanogaster) 發 現血管收縮素轉化酶的同源基因後 (Lamango and Isaac, 1994; Cornell et al., 1995),才開啟昆蟲血 管收縮素轉化酶的研究。

昆蟲 ACE 與哺乳動物之 ACE 一樣為鋅金屬肽



圖一 東方果實蠅血管收縮素轉化酶 cDNA 選殖的片段之組合。三個片段組合得到全長 2,081 bp 之 cDNA 包含一長 1,848 bp 之開放讀架。

Fig. 1. Assembly of cDNA fragments of the angiotensin-converting enzyme cloned in *Bactrocera dorsalis*. The full length of the cDNA sequence is 2,081 bp, which includes an open reading frame of 1,848 bp.

酶 (zinc metallopeptidase) 能夠啟動或不活化許 多胜肽而調節不同的生理功能,包括發育、免疫、消 化及繁殖等 (Wijffels et al., 1996; Ekbote et al., 1999; 2003a; Dani et al., 2003; Macours et al., 2003)。果蛹 ACE (簡稱 AnCE) 突變會造成幼蟲及 蛹的死亡,且於變態期間其 AnCE 於成蟲盤之表現 受到蜕皮激素的誘導而上升,這些結果鏈結 AnCE 與發育之關係 (Tatei et al., 1995; Siviter et al., 2002)。沙漠飛蝗 (Locust migratoria) 在接受細菌 脂多醣 (lipopolysaccride) 刺激後,血球細胞内的 ACE 表現量增加,可能與抗菌胜肽的修飾活化有關 (Macours et al., 2003)。沙漠飛蝗中腸的內分泌細 胞表現 ACE, 指向其參與腸道荷爾蒙的生成 (Isaac et al., 1998a)。斯氏瘧蚊 (Anopheles stephensi) 之 脂肪體於血餐後會大量表現 ACE, 並釋放至血體液 中,最後累積於卵巢(Ekbote et al., 1999);添加 ACE 抑制劑於血餐中則減少此雌蚊之產卵量 (Ekbote et al., 2003b) •

東方果實蠅脂肪體在成蟲初羽化時以幼蟲形式 存在,其含量會隨著時間逐漸下降,而成蟲形式脂肪 體含量則逐漸上升(Zuo et al., 2013);並發現其幼 蟲形式脂肪體具 ACE transcripts(unpublished data)。為了解 ACE 於東方果實蠅成蟲體內脂肪體 的表現情形以推論其功能,本研究選殖東方果實蠅 ACE (BdACE) cDNA 全長,以及利用即時定量聚 合酶連鎖反應(real-time quantitative PCR, qPCR)分析BdACE 於東方果實蠅各發育時期轉錄 情形,並利用反轉錄聚合酶連鎖反應(reverse transcription-PCR, RT-PCR)偵測其於各組織之 表現。

## 材料與方法

#### 一、試驗昆蟲之飼育

東方果實蠅飼育於光暗周期比為 12:12 小時之 28℃(±1℃)恆溫空間。幼蟲飼料以酵母粉 140g、 糖 240g、麥皮 480g、苯甲酸鈉 5g、鹽酸 20 ml 以及水 1800 ml 混合而成 (Chiu, 1978);成蟲飼養 於 30×30×30立方公分之紗網籠並提供含水海棉 以及飼料(糖、酵母粉、蛋白腖,比例為 3:1:1)。

#### 二、血管收縮素轉化酶 cDNA 選殖及序列分析

本研究室既有之東方果實蠅血管收縮素轉化酶 cDNA 部分序列 668 bp 已包含 3'端未轉錄區域 (untraslated region)。因此,根據此片段設計專一 性引子(表一),配合 GeneRacer<sup>®</sup> Kit (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)的引子進行兩次 5'端快速擴 增法 (rapid amplification of cDNA ends, RACE) 以獲得 BdACE cDNA 全長(圖一)。

實驗步驟簡述如下。使用 GeneRacer<sup>®</sup> Kit with SuperScript<sup>®</sup> III RT (Invitrogen) 試劑組將東方果 實蠅成蟲第 0、1 日齡幼蟲脂肪體之總量 RNA 1 µg 合成 cDNA。利用專一性引子對 ACE first 01 (表 一)及 GeneRacer<sup>TM</sup> 5' primer 加以上述 cDNA 為 模板進行第一次聚合酶連鎖反應,反應過程為第一 階段:94℃ 3 分鐘,第二階段:94℃ 30 秒、56℃ 30 秒、72℃ 1 分鐘,反應 35 循環;第三階段:72 ℃ 10 分鐘。以此 PCR 產物為模板,再以專一性引

Primer name	Primer sequence
ACE first 01 (reverse)	AATTCCAGCCTATTTTGACTTTTGATTCACGG
ACE nested 03 (reverse)	CCAAGGCTTTGAAGAACCCAAAGACATC
ACE nested 04 (forward)	TACCATTTTTACCGCTCGTTTTGTGAGGAG
ACE first 05 (reverse)	CTGACAAAATTATGGCTTCCCCTACTGG
ACE nested 07 (reverse)	CGGCTCTACAATCTCCATTTTCAGCACTC
ACE full length 02 (reverse)	GTAAACCAAAAGTGCCATTTCTTCCTCAA
	ACTTAAAGG
ACE full length 03 (forward)	GTACGAATCCGAGCGCAGTGATTGAC
18s rRNA forward	CTTAGTTCGTGGAGTGATTTGTCTG
18s rRNA reverse	CCAACAGGTACGACTCCACTTATATAAAC
*GAPDH forward	GATGACCACTGTACATGCAACCACTG
GAPDH reverse	GGTCAGCTTGCCGTTCAATTCAGG
Actin forward	CCACCAGACATGACAATGTTGGCA
Actin reverse	AAGCCAATCGTGAGAAGATGACCC

表一 本研究所使用之專一性引子序列 Table 1. Sequences of specific primers used in this study

\*GAPDH: Glyceraldehyde-3-phosphated dehydrogenase

子對 ACE nested 03 (表一) 及 GeneRacer<sup>™</sup> 5' nested primer 進行巢式聚合酶連鎖反應。反應過 程為第一階段:94℃3分鐘,第二階段:94℃30 秒、59℃ 30 秒、72℃ 1 分鐘,反應 35 循環;第 三階段:72℃ 10 分鐘。使用 QIAquick<sup>®</sup> Gel Extraction Kit (Qiagen, Valencia, CA, USA), 並 依照操作手冊進行 PCR 預計產物 DNA(904 bp)回 收 , 並 將 其 選 殖 入 pCR<sup>®</sup>Ⅱ-TOPO<sup>®</sup> 載 體 (Invitrogen), 進一步以 ABI3730 系統 (Applied Biosystems, Waltham, MS, USA) 全自動 DNA 毛 細管電泳,取得序列(源資國際生物科技股份有限 公司,台北,台灣)。根據上述 904 bp 序列設計引子 ACE first 05 及 ACE nested 07(表一及圖一)分別 搭配 GeneRacer<sup>™</sup> 5' primer 及 GeneRacer<sup>™</sup> 5' nested primer 擴增 5' 片段,第一次 PCR 及巢式 PCR 的反應過程與上述相同。將 PCR 產物 (1114 bp) 如上述方法選殖及定序。

為避免組合上的錯誤,設計一對包含整個開放 讀架的專一性引子 ACE full length 02 及 ACE full length 03 (表一)進行 PCR,以期得到全長於一條 DNA上而確保其正確性。反應過程為第一階段:94 ℃ 3 分鐘,第二階段:94℃ 30 秒、60℃ 30 秒、 72℃ 2 分鐘,反應 35 循環;第三階段:72℃ 10 分 鐘。將 PCR 產物 (1946 bp)如上述方法選殖及定 序。

以美國全國生物技術信息中心資料庫 (National Center for Biotechnology Information, NCBI) (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/) 之保守區 域資料庫 (conserved domain database) (http:// www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi) (Marchler-Bauer *et al.*, 2017) 進行保守區域分析。 利用 SignalP4.1 Server (http://www.cbs.dtu.dk/ sevices/SignalP/) (Petersen *et al.*, 2011) 預測訊號 胜肽 (signal peptide)。以 NetNGlyc 1.0 server (http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc/) 預 測 N-glycosylation 的位點。利用 TMHMM 2.0 Server (http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM 2.0) 預測穿膜區域。利用 CLUSTALW (http:// embnet.vital-it.ch/software/ClustalW.html) 比對 共六種果實蠅科昆蟲的 ACE 胺基酸序列。

#### 三、BdACE mRNA 表現之偵測

#### (一) 以 qPCR 偵測於不同發育時期之表現

以一齡、二齡、三齡早期、三齡末期幼蟲、第 0~8 日齡蛹及第 0~10 日齡兩性成蟲體內脂肪體之 cDNA(皆以 1µg總量 RNA 合成)為模板,加上專 一性引子對 ACE nested 03 及 ACE nested 04(表 一),使用 iQ<sup>TM</sup> SYBR<sup>®</sup>Green Supermix(Bio-Rad, USA)試劑進行 qPCR。樣品置 iCycler<sup>TM</sup> Thermal Cycler(Bio-Rad, USA),反應週期為,階段一:95 ℃反應 3 分鐘;階段二:95℃反應 10 秒鐘、60℃反 應 30 秒並即時測定螢光值,共反應 40 個週期;階 段三:95℃反應 1 分鐘;階段四:55℃反應 1 分鐘; 階段五:至 55℃開始每週期結束偵測一次螢光值並 於下個週期增加 0.5℃,每週期 30 秒反應 81 個週 期(此階段為熔點曲線分析,用來確定 PCR 產物是 否為單一 DNA 片段)。在幼蟲及成蟲試驗,以 glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)(表一)為 reference gene,反應週期與 上述相同;在蛹的試驗則以 18s ribosomal RNA(表 一)為 reference gene,反應週期與上述相同,但階 段二的黏合溫度為 62℃。

上述實驗進行三次生物性重複,每生物性重複 皆取 CT 值利用公式 2<sup>·ΔΔCT</sup> 進行運算,得到相對表 現量。各生長發育時期表現量以 ANOVA 分析,將 信賴區間定為 95%,並依照 Tukey 事後檢定以檢測 是否具有顯著差異,P 值小於 0.05 視為具有顯著差 異。

(二)以 RT-PCR 偵測於不同成蟲組織之表現

以第 5 日齡雌成蟲的腦、前腸、中腸、後腸、 飛行肌肉、馬氏管、脂肪體及卵巢之 cDNA(皆以 1 µg 總量 RNA 合成) 作為模板,專一性引子對 ACE full length 02 及 ACE full length 03 (表一) 進行 RT-PCR,反應過程與前述相同。另以東方果實蠅 actin (表一)為 internal control,反應過程為第一 階段:94℃ 3 分鐘,第二階段:94℃ 30 秒、56℃ 30 秒、72℃ 30 秒,反應 35 循環;第三階段:72 ℃ 10 分鐘。RT-PCR 產物以 DNA 膠體電泳偵測。

#### 結 果

#### 一、BdACE cDNA 選殖、定序及結構分析

所選殖三個片段組合後的 BdACE cDNA (GenBank accession no. MH795420) 長度 2,081 bp,其中包含開放讀架 (open reading frame) 1,848 bp 可轉譯出含有 615 個胺基酸之蛋白 (圖 一)。將胺基酸序列以 NCBI 的保守區域資料庫進行 比對,結果顯示為 Gluzincin superfamily 中 peptidase M2 family 的一員。胺基酸序列位置第 374 之甘胺酸 (glycine, G)、378 之精胺酸 (arginine, R) 及 399 之谷胺酸 (Glutamate, E) 為 鋅離子接合位;胺基酸序列第 492~496 位置之 ESAID 為作用位 (active site)。利用 SignalP 4.0 預測,顯示 N 端起始 22 個胺基酸為訊號肽;利用 TMHMM 2.0 Server 預測,顯示 BdACE 無穿膜 區,為一分泌蛋白。四個 N-glycosylation 的位置為 序號 169,462,565 及 575 之胺基酸 (圖二)。

BdACE 與其他果實蠅科昆蟲 ACE 比對結果顯 示與茄實蠅 (*B. latifrons*; XP\_018788852) 類源關 係最相近,具 97%的相同度(identity),與橄欖果實
蠅 (B. oleae; XP\_014099744)則具 94%的相同度, 而與瓜實蠅 (Zeugodacus cucurbitae; XP\_011194566)、地中海果實蠅 (Ceratitis capitata; XP\_004526319)及雪梅果實蠅 (Rhagoletis zephyria; XP\_017467196, snowberry fruit fly)的相同度則分別為 91、82及 79% (圖二)。

#### 二、BdACE 於各發育時期之表現

利用 qPCR 偵測到 BdACE 於幼蟲、蛹,及雌 雄蟲脂肪組織皆有表現 (圖三)。BdACE 在幼蟲時 期,從一齡到三齡皆有轉錄表現,隨著齡期,表現量 呈現上升趨勢,且於三齡幼蟲末期,表現量為顯著最 高(圖三A)。BdACE 於蛹期皆有表現,且化蛹後第 一日齡表現量顯著高於其他日齡,第二日齡至第八 日齡,以及第零日齡間則無顯著差異(圖三 B)。雄 蟲羽化後,BdACE 表現量於第零日齡之幼蟲脂肪體 表現量為顯著最高,於第一日齡至第十日齡之脂肪 組織則無顯著差異(圖三 C)。雌蟲羽化後,BdACE 表現量在第三日齡有較高的趨勢,隨後漸漸下降,至 第五日齡後則表現量趨於平緩,但第零日齡至第十 日齡皆無顯著差異(圖三 D)。

#### 三、BdACE 於成蟲各組織之表現

以 RT-PCR 偵測 BdACE 於雌成蟲各組織的表現,結果顯示在腦及脂肪體的表現量較多,而在飛行肌肉、前腸、中腸、後腸、馬氏管及卵巢則偵測不到(圖四)。

### 討 論

血管收縮素轉化酶 (ACE)為 Gluzincin superfamily中 peptidase M2 family的一員,此 家族的特性為需與鋅離子結合才具有活性,其作用 位保守區域胺基酸序列為 HEXXH 及 EXXXD (Macours and Hens, 2004; Harrison and Acharya, 2014)。沙漠飛蝗、果蠅、豌豆蚜 (Acyrthosiphon pisum)、東方臂蠅 (Haematobia irritans exigua)、棉花夜蛾 (Spodoptera littoralis) 及家蠶 (Bombyx mori)的 ACE 皆具有 HEXXH 及 EXXXD 兩個保守區域 (Cornell et al., 1995; Wijffels et al., 1996; Macours et al., 2003; Lemeire et al., 2008; Wang et al., 2015)。然而, 在東方果實蠅、茄實蠅、橄欖果實蠅、地中海果實蠅、 雪梅果實蠅及瓜實蠅則只具 EXXXD 而缺乏



- 圖二 六種果實蠅科昆蟲血管收縮素轉化酶胺基酸序列比對及分析。Bd:東方果實蠅、BI:茄實蠅、Bo:橄欖果實蠅、 Cc:地中海果實蠅、Rz:雪梅果實蠅、Zc:瓜實蠅。完全相同之胺基酸以黑底白字表示;垂直箭頭標示信號胜肽切 割位;N-糖基化位點以菱形上標;Zn 離子結合位點以星號上標;保守區域 EXXXD 由水平箭頭上標。
- Fig. 2. Alignment of amino acid sequences of angiotensin-converting enzyme from six tephritid insects. Bd: Bactrocera dorsalis; Bl: B. latifrons; Bo: B. oleae; Cc: Ceratitis capitata; Rz: Rhagoletis zephyria; Zc: Zeugodacus cucurbitae. Identical residues are presented as white text on a black background. The cleavage side of the putative signal peptide is indicated by a vertical arrow. Predicted N-glycosylation sites and Zn ion binding sites are indicated by a closed diamonds and asterisks, respectively, above the residues. The conserved domain EXXXD is indicated by a horizontal double arrow above the residues.



- 圖三 東方果實蠅各發育時期 BdACE 之轉錄表現。(A)幼蟲時期:一齡、二齡、三齡早期及三齡末期;(B)蛹期:化蛹後 0~8 日齡;(C)雄蟲脂肪體:羽化後 0~10 日齡;(D)雌蟲脂肪體:羽化後 0~10 日齡。統計分析為透過 ANOVA, 再進行 Tukey 多重比較以判別各個平均值間的差異。相同的字母表示無顯著差異(P > 0.05)。
- Fig. 3. Transcriptional profiles of BdACE determined by qPCR during development. (A) larval stage: first, second, early third, and late third instar; (B) pupal stage: 0-8 days after pupation; (C) adult male fat body, and (D) adult female fat body: 0-10 days after eclosion. Statistical analyses: to identify the difference between individual means, analysis of variance followed by a Tukey multiple comparison test were performed. The same letters indicate no significant difference (*P* > 0.05).

HEXXH 保守區域序列(圖二),此結果說明 EXXXD 可能為較主要的作用位。類似的情形發生 於哺乳動物 ACE, sACE 胺基酸序列具有一個穿膜 區,膜外區的 N 端和 C 端各具有一個保守區域 HEXXH。tACE 和 sACE 結構相似,但膜外區僅具 一個與 sACE C 端 HEXXH 相同的作用位 (Harrison and Acharya, 2014)。sACE 及 tACE 皆 具活性,各執行其生理功能(Ehlers *et al.*, 1989)。 上述的昆蟲 ACE 為分泌蛋白與哺乳動物 ACE 為膜 蛋白不同,不論為膜蛋白或分泌蛋白,並不影響酵素 活性(Harrison and Acharya, 2014)。昆蟲亦有膜 蛋白形式的 ACE,其功能為分解神經傳遞物質使其 失去活性 (Isaac *et al.*, 2002)。

東方果實蠅血管收縮素轉化酶於幼蟲、蛹及成 蟲各發育時期皆有表現(圖三)。在幼蟲時期表現量 隨齡期增加而增加的情形與在褐飛蝨 (*Nilaparvata lugens*)相似(Sun *et al.*, 2018)。 *BdACE* 尤以在幼蟲三齡末期表現量大量上升,而在 化蛹後的第25至48小時,也為顯著最高,此ACE 表現情形與在棉花夜蛾相似,且棉花夜蛾ACE蛋白 活性於第六齡幼蟲末期(wandering phase)比起 六齡早期上升5倍,至化蛹初期又上升1.6倍並維



- 圖四 東方果實蠅雌成蟲 *BdACE* 轉錄表現的組織專一性。M:100 bp 核酸標記; Br:腦; FM:飛行肌肉; FG:前腸; MG:中腸; HG:後腸; Mt:馬氏管; Ov:卵巢; FB:脂肪體; NC:無模板的對照組。*ACE* 1944 bp, *actin* 600 bp (internal control)。
- Fig. 4. Tissue-specific expression of *BdACE* in *B. dorsalis* female adults. M:100 bp DNA marker; Br: brain; FM: flight muscle; FG: foregut; MG: midgut; HG: hindgut; Mt: Malpighian tubules; OV: ovary; FB: fat body; NC: negative control without template. Size: *ACE*, 1944 bp; *actin*, 600 bp (internal control).

持,羽化後則下降 (Lemeire et al., 2008)。果蠅 AnCE 蛋白活性於幼蟲第一日齡至第二日齡上升 後,第三日齡並無再上升;至蛹期階段,於化蛹後第 50 小時蛋白活性上升至最高,羽化後則下降 (Siviter et al., 2002)。上述結果顯示,於發育轉換 時期,血管收縮素轉化酶的表現量及活性呈現上升 的趨勢,其可能參與變態的過程。BdACE 於雄蟲第 零日齡(羽化後未滿24小時)脂肪組織表現量顯著 上升 (圖三 C), 但同樣的表現情形並未發生於雌蟲 (圖三 D)。此時成蟲的脂肪組織皆為幼蟲形式脂肪 體,成蟲體內的幼蟲形式脂肪體會隨著生長而逐漸 被成蟲形式脂肪體取代 (Zou et al., 2013)。東方果 實蠅成蟲形式脂肪體的基因表現情形在雌、雄蟲不 盡相同 (Zuo and Chen, 2014), 同樣的情形發生於 幼蟲形式脂肪體 (unpublished data), BdACE 可 能即為一例。而 BdACE 於雄蟲幼蟲形式脂肪體的 功能是否與成蟲後續生長或繁殖有關,則需進一步 研究證明。

昆蟲 ACE 在不同的物種的組織分布皆不相同, 其活性功能亦不同(Isaac et al., 1998a)。BdACE 表現於東方果實蠅雌蟲的腦及脂肪體(圖四),脂肪 體主要的功能之一為合成、分泌蛋白至血體腔中執 行生理功能(Kanost et al., 1990),ACE 可能為其 中之一。又碳水化合物代謝(Keeley, 1985)、脂質代 謝(Arrese and Soulages, 2010)及胺基酸代謝 (Kishimoto et al., 1999)皆發生於脂肪體,ACE 可 能參與這些合成分解作用。在褐飛蝨,ACE 高度表 現於卵巢及脂肪體,此可能與其產卵量調節有關 (Sun et al., 2018);但在東方果實蠅卵巢並未偵測 到 ACE 表現。在棉花夜蛾幼蟲腦、脂肪體、消化道 及血球偵測到 ACE 的表現(Lemeire et al., 2008); 沙漠飛蝗 ACE 表現於腦、中腸、卵巢、精巢、脂肪 體及血球細胞(Macours et al., 2003),上述表現情 形說明 ACE 於棉花夜蛾及沙漠飛蝗執行廣泛的生 理功能。而沙漠飛蝗 ACE 在脂肪體的表現量最低, 在腦則有中度表現(Macours et al., 2003)。

沙漠飛蝗 ACE 與神經胜肽 locustamyotropin 同時存在大腦神經分泌細胞,且體外測試顯示 ACE 能水解locustamyotropinC端的胺基酸Lys-Arg及 Arg-Arg,這些結果說明 ACE 可能參與活化激素元 (prohormone) 使其成為具作用之激素 (Isaac et al., 1998b)。在肉蠅 (Neobellieria bullata)、馬德 拉蜚蠊 (Leucophaea maderae)、家蠶及甘藍夜蛾 (Mamestra brassica) 的大腦神經分泌細胞也都能 偵測到 ACE,可能參與激素元的活化;而在鱗翅目 家蠶及甘藍夜蛾神經分泌細胞也偵測到 FXPRLamide , pheromone biosynthesis activating neuropeptide (PBAN) 及滯育激素 (diapause hormone) 皆屬於 FXPRL-amide family。ACE 和 FXPRL-amide 同時存在神經分泌細胞說明 ACE 與 此神經胜肽激素元結構修飾有關 (Schoofs et al., 1998)。東方果實蠅的大腦表現 ACE, 是否與神經胜 肽共同表現於同一神經分泌細胞,將需進一步實驗 證明。由於 ACE 具有上述廣泛的生理作用,因此抑 制 ACE 活性能干擾神經內分泌系統並對生長,發育 和繁殖產生不利影響 (Ekbote et al., 2003b; Vercruysse et al., 2004; Hasan et al., 2017) •

本研究選殖東方果實蠅 ACE, 並根據其於生長

發育時期及組織的轉錄表現推測其功能。從 BdACE 於三齡幼蟲末期大量表現推論其與變態化蛹有關, 未來可利用 dsRNA 默化 BdACE 於幼蟲之表現, 再觀察其化蛹率以證實之。若在默化 BdACE 後其 化蛹成功率降低,則未來鑑定此酶的結構將可用於 設計東方果實蠅 ACE 選擇性抑制劑,或可做為新型 殺蟲劑之開發。再者, BdACE 表現於腦,未來可藉 由免疫組織化學方法檢測 BdACE 與神經胜肽共同 存在於腦,以說明 BdACE 與神經胜肽的合成相關。

## 引用文獻

- Arrese EL, Soulages JL. 2010. Insect fat body: energy, metabolism, and regulation. Annu Rev Entomol 55: 207-225.
- Chiu HT. 1978. Studies on the improvement of mass rearing for oriental fruit flies. Plant Prot Bull 20: 87-92. (in Chinese)
- Cornell MJ, Williams TA, Samango NS, Coates
  D, Corvol P, Soubrier F, Hoheisel J, Lehrach
  H, Isaac RE. 1995. Cloning and expression of an evolutionary conserved single-domain angiotensin converting enzyme from *Drosophila melanogaster*. J Biol Chem 270: 13613-13619.
- Dani MP, Richards EH, Isaac RE, Edwards JP. 2003. Anti-bacterial and proteolytic activity in venom from the endoparasitic wasp *Pimpla hypochondriaca* (Hymenoptera: Ichneumoidae). J Insect Physiol 49: 945-954.
- Ehlers MR, Fox EA, Strydom DJ, Riordan JF. 1989. Molecular cloning of human testicular angiotensin-converting enzyme: the testis isozyme is identical to the C-terminal half of endothelial angiotensin-converting enzyme. Proc Natl Acad Sci USA 86: 7741-7745.
- **Ekbote U, Coates D, Isaac RE.** 1999. A mosquito (Anopheles stephensi) angiotensin Iconverting enzyme (ACE) is induced by a blood meal and accumulates in the developing ovary. FEBS letters 455: 219-222.
- **Ekbote UV, Weaver RJ, Isaac RE.** 2003a. Angiotensin I-converting enzyme (ACE) activity of the tomato moth, *Lacanobia*

*oleracea*: changes in levels of activity during development and after copulation suggest roles during metamorphosis and reproduction. Insect Biochem Mol Biol 33: 989-998.

- Ekbote U, Looker M, Isaac RE. 2003b. ACE inhibitors reduce fecundity in the mosquito, *Anopheles stephensi*. Comparative Biochem Physiol B 134: 593-598.
- Gonzalez-Villalobos RA, Shen XZ, Bernstein EA, Janjulia T, Taylor B, Giani JF, Blackwell W-LB, Shan KH, Shi PD, Fuchs S, Bernstein KE. 2013. Rediscovering ACE: novel insights into the many roles of the angiotensin-converting enzyme. J Mol Med (Berl) 91: 1143-1154.
- Harrison C, Acharya KR. 2014. ACE for all- a molecular perspective. J Cell Commun Signal 8: 195-210.
- Hasan Z-ÍA, Williams H, Ismail NM, Othman H, Cozier GE, Acharya KR, Isaac RE. 2017. The toxicity of angiotensin converting enzyme inhibitors to larvae of the disease vectors Aedes aegypti and Anopheles gambiae. Sci Rep 7: 45409. Available from: doi: 10.1038/srep45409.
- Isaac RE, Coates D, Williams TA, Schoofs L.
  1998a. Insect angiotensin-converting enzyme: comparative biochemistry and evolution. pp.
  357-378. In: Coast GM, Webster SG (eds), Recent Advances in Arthropod Entocrinology. Society of Experimental Biology, Seminar Series 65 (Part IV). Cambridge University Press, Cambridge.
- Isaac RE, Schoofs L, Williams TA, Veelaert D, Sajid M, Corvol P, Coates D. 1998b. A novel peptide-processing activity of insect peptidyl-dipeptidase A (angiotensin Iconverting enzyme): the hydrolysis of lysylarginine and arginyl-arginine from the Cterminus of an insect prohormone peptide. Biochem J 330: 61-65.
- Isaac RE, Parkin ET, Keen JN, Rassel DR, Siviter RJ, Shirras AD. 2002. Inactivation of a tachykinin-related peptide: identification of four neuropeptide-degrading enzymes in

neuronal membranes of insects from four different orders. Peptides 23: 725-733.

- Kanost MR, Kawooya JK, Law JH, Ryan RO, Vanheusden MC, Ziegler R. 1990. Insect haemolymph proteins. Adv Insect Physiol 22: 299-396
- Keeley, LL. 1985. Physiology and biochemistry of the fat body. pp.211-248. In: Kerkut GA, Gilbert LI (eds). Comprehesive insect Biochemistry and Pharmacology. vol. 3. Pergamon, Oxford.
- Kishimoto A, Nakato H, Izumi S, Tomino S. 1999. Biosynthesis of major plasma proteins in the primary culture of fat body cells from the silkworm, *Bombyx mori*. Cell Tiss 297: 329-335.
- Krege JH, John SWM, Langenbach LL, Hodgin JB, Hagaman JR, Bachman ES, Jennette JC, O'Brien DA, Smithies O. 1995. Male and female difference in fertility and blood pressure in ACE-deficient mice. Natrue 375: 146-148.
- Lamango NS, Isaac RE. 1994. Identification and properties of a peptidyl dipeptidase in the housefly, *Musca domestica*, that resembles mammalian angiotensin-converting enzyme. Biochem J 299: 651-657.
- Lemeire L, Vanholme B, Leeuwen TV, Camp JV, Smagghe G. 2008. Angiotensin-converting enzyme in *Spodoptera littoralis*: Molecular characterization, expression and activity profile during development. Insect Biochem Mol Biol 38: 166-175.
- Macours N, Hens K. 2004. Zinc-metalloproteases in insects: ACE and ECE. Insect Biochem Mol Biol 34: 501-510.
- Macours N, Hens K, Francis, DeLoof A, Huybrechts R. 2003. Molecular evidence for the expression of angiotensin converting enzyme in hemocytes of *Locusta migratoria*: stimulation by bacterial lipopolysaccharide challenge. J Insect Physiol 49: 739-746.
- Marchler-Bauer A, et al. 2017. CDD/SPARCLE: functional classification of proteins via subfamily domain architectures. Nucleic

Acids Res 45(D1): D200-D203.

- Petersen TN, Brunak S, von Heijne G, Nielsen H. 2011. SignalP 4.0: discriminating signal peptides from transmembrane regions. Nat Methods 8: 785-786.
- Siviter RJ, Taylor CA, Cottam DM, Denton A, Dani MP, Milner MJ, Shirras AD, Isaac RE. 2002. Ance, a *Drosophila* angiotensinconverting enzyme homologue, is expressed in imaginal cells during metamorphosis and is regulated by the steroid, 20hydroxyecdysone. Biochemical J 367: 187-193.
- Skeggs LT, March WH, Kahn JR, Shumway NP. 1954. The existence of two forms of hypertension. J Exp Med 100: 275-282.
- Schoofs L, Veelaert D, De Loof A, Huybrechts R, Isaac E. 1998. Immunocytochemical distribution of angiotensin I-converting enzyme-like immunoreactivity in the brain and testis of insects. Brain Res 785: 215-227.
- Sun Z, Shi Q, Xu C, Wang R, Wang H, Song Y, Zeng R. 2018. Regulation of NIE74A on vitellogenin may be mediated by angiotensin converting enzyme through a fecundity-related SNP in brown planthopper, Nilaparvata lugens. Comp Biochem Physiol A 225: 26-32.
- Tatei K, Cai H, Ip YT, Levine M. 1995. Race: a *Drosophila* homolog of the angiotensinconverting enzyme. Mech Dev 51: 157-168.
- Vercruysse L, Gelman D, Raes E, Hooghe B, Vermeirssen V, Van Camp J, Smagghe G. 2004. The angiotensin converting enzyme inhibitor captopril reduces oviposition and ecdysteroid levels in Lepidoptera. Arch Insect Biochem Physiol 57: 123-132.
- Wang W, Luo L, Lu H, Chen S, Kang L, Cui F. 2015. Angiotensin-converting enzymes modulate aphid-plant interactions. Sci Rep 5: 8885. Available from doi: 10.1038/ srep08885.
- Wijffels G, Fitzgerald C, Gough J, Riding G, Elvin C, Kemp D, Willadsen P. 1996. Cloning and characterization of angiotensin-

converting enzyme from the dipteran species, *Haematobia irritans exigua*, and its expression in the maturing male reproductive system. Euro J Biochem 237: 414-423.

Zou Y-H, Chen M-E. 2014. Differential gene expression in male and female fat body in

the oriental fruit fly, *Bactrocera dorsalis*. Arch Insect Biochem Physiol 85: 48-59.

Zou Y-H, Lu K-H, Chen M-E. 2013. Characteristics and gene expression of fat body in adult oriental fruit fly, *Bactrocera dorsalis*. Formosan Entomol 33: 91-106. (in Chinese)

# cDNA Cloning and Transcriptional Expression of Angiotensin-Converting Enzyme Ortholog in *Bactrocera dorsalis*

## Chia-Ming Hsu, Mei-Er Chen\*

Department of Entomology, National Chung Hsing University, 145 Xingda Rd., South Dist., Taichung City 402 Taiwan

\* Corresponding email: meirchen@dragon.nchu.edu.tw

Received: 11 January 2019 Accepted: 1 August 2019 Available online: 30 August 2019

## ABSTRACT

In this study, an angiotensin-converting enzyme cDNA of the Bactrocera dorsalis (BdACE) was cloned. The full length sequence of BdACE was 2,081 bp which included a 1,848-bp open reading frame that translated into a 615-amino acid protein. Three amino acids, namely glycine<sup>375</sup>, arginine<sup>379</sup>, and glutamate<sup>400</sup>, are responsible for binding to Zn ion to activate angiotensin-converting enzyme (ACE). Real-time quantitative polymerase chain reaction (PCR) was conducted to detect relative mRNA expression of BdACE in different developmental stages. In the larval stage, the relative mRNA expression of BdACE increased with age; especially in the late third instar, the expression was significantly high. In the pupal stage, the BdACE relative transcriptional profile of BdACE was as follows: 1-day-old pupae had significantly high level of expression, and no significant difference was noted in the expression among 0- and 2- to 8-day-old pupae. In male fat body, the relative transcriptional expression of BdACE after eclosion was significantly high, but no significant difference was observed among 1- to 10-day-old males. In female fat body, no significant difference was noted among 0- to 10-day-old females. The developmental transcriptional profiles of *BdACE* suggested that BdACE may be involved in development and metamorphosis because high expression levels were observed in the transition period. To detect the transcriptional expression of BdACE in different tissues, reverse transcription-PCR was used. The results revealed that *BdACE* was expressed in fat body and brain. This suggested that BdACE palyed a possible role in processing of fat body proteins and neuropeptides.

Key words: Bactrocera dorsalis, angiotensin-converting enzyme, fat body, brain, development