

平成 22 年 12 月 31 日現在

研究種目：基盤研究 (B)
 研究期間：2007～2009
 課題番号：19380034
 研究課題名 (和文) エクジソン生合成酵素類の同定ならびに神経ペプチドによる発現調節

研究課題名 (英文) Identification of ecdysteroidogenic enzymes and regulation of their gene expressions by neuropeptides.

研究代表者

片岡 宏誌 (KATAOKA HIROSHI)
 東京大学・大学院新領域創成科学研究科・教授
 研究者番号：60202008

研究成果の概要 (和文)：

昆虫の成長過程において重要な脱皮・変態現象の制御機構を明らかにする目的で、脱皮ホルモン (エクジソン) の生合成酵素の同定ならびに生合成を調節する神経ペプチドおよびその受容体の同定を行った。その結果、新たに 1 つの生合成酵素候補、2 つの神経ペプチド、1 つの神経ペプチド受容体を明らかにした。さらに、それぞれの生合成酵素遺伝子の発現が異なる神経ペプチドによって正または負の調節を受けていることを明らかにした。

研究成果の概要 (英文)：

To elucidate the mechanism of molting and metamorphosis in insect's growth process, we tried to identify the biosynthetic enzymes of the molting hormone, ecdysone, the neuropeptides which controlled biosynthetic rate of ecdysone and their receptor. As a result, one candidate of biosynthetic enzyme, two neuropeptides and one neuropeptide receptor were identified. In addition, it was found that each enzyme gene expression was positively or negatively controlled by different neuropeptides.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	7,900,000	2,370,000	10,270,000
2008 年度	4,100,000	1,230,000	5,330,000
2009 年度	3,800,000	1,140,000	4,940,000
年度			
年度			
総計	15,800,000	4,740,000	20,540,000

研究分野：昆虫内分泌学

科研費の分科・細目：農学・応用昆虫学

キーワード：エクジソン、ステロイド、昆虫、神経ペプチド、シトクローム P450、生合成

1. 研究開始当初の背景

昆虫はその成長の過程で変態を行うことにより、高い摂食能力をもつ幼虫期と、長距離移動や生殖に適した成虫期を明確に分けることにより、効率的な生存戦略をもち繁栄を図っている。また、幼虫期においては、摂食により成長する時期と、さらなる成長が可能な外骨格（表皮）を形成する脱皮期を繰り返すことにより、それぞれの種に適した大きさまで成長することを可能にしている。つまり、体内外の環境情報をもとに脱皮・変態の時期が厳密に制御されることによって、昆虫の正常な成長が可能になると考えられる。我々は、昆虫の脱皮・変態の内分泌制御機構の解明を目指して、主にカイコを用いて研究を進めてきた。なかでも、脱皮・変態制御において中枢的な働きを担う、脱皮ホルモン（エクジソン）分泌器官である前胸腺に注目し、エクジソン生合成および分泌を調節する神経ペプチド類の同定を精力的に進め、分泌を促進する前胸腺刺激ホルモン（PTTH）を 1986 年に世界に先駆けて単離・構造決定することに成功した。また、PTTH とは逆に前胸腺のエクジソン生合成を抑制する前胸腺抑制ペプチド（PTSP）、ミオサプレッシン、FMRF アミド関連ペプチドを最近次々と単離・構造決定した。特に、FMRF アミド関連ペプチドは、これまで考えられていた内分泌的な機構とは異なり、神経投射を介して直接前胸腺へ運ばれエクジソン分泌を抑制していることが分かり、前胸腺のエクジソン分泌調節機構に新たな視点を与えるものとして注目されている。また、これら抑制因子は、単独で前胸腺

のエクジソン分泌を抑制するだけではなく、PTTH による分泌促進活性をほぼ完全に抑えることも分かってきた。これらの結果から、前胸腺におけるエクジソン生合成は、従来から考えられていた PTTH による正の制御のみならず、他の神経ペプチド類による負の制御が重要であること、さらに、複数の神経ペプチドによって多重に調節を受けることで、エクジソン分泌が厳密にコントロールされ、脱皮・変態の時期が決定されていることを示している。

一方、神経ペプチドによるエクジソン分泌調節とともに、エクジソン生合成酵素の解明は古くから興味をもたれていた。しかしながら前胸腺が極めて小さな器官であるためにその分子の実体については長い間不明であった。ところが、2002 年以降、ショウジョウバエの突然変異系統（ハロウィンミュータントと総称される）の原因遺伝子の解析から、Gilbert と O'Conner らのグループによって、エクジソン生合成を担う最終 3 段階の生合成酵素（いずれもシトクローム P450 モノオキシゲナーゼ、CYP と略す）が明らかにされた。一方、我々の研究グループでは、カイコを材料に、エクジソン生合成器官である前胸腺に特異的に、かつエクジソン生合成が盛んな時期に発現が上昇する遺伝子の探索をカイコを用いて進めてきた。その結果、ほぼ同時期に、同じエクジソン生合成の最終 3 段階の CYP 類を明らかにした。また、これら 3 種類の CYP 以外にも、前胸腺で特異的に発現している *neverland* と命名した電子伝達系に関わる新規遺伝子の同定に成功している。*neverland* RNAi 個体の脱皮不全は、エクジソンや 7-

デヒドロコステロールを摂食させることによって回復されることから、Neverland はコステロールから 7-デヒドロエクジソンへの変換を担う生合成酵素である可能性が高いと予想している。また、前胸腺の短期培養系を用いた実験から最終 3 段階の生合成酵素のうち、CYP302A1 (*disembodied*) の発現のみ PTHH によって誘導されることが明らかになったことから、PTHH をはじめとする神経ペプチド類によって特定のエクジソン生合成酵素遺伝子の発現が制御されることにより、エクジソン分泌量が時期特異的に厳密に調節されていることが予想される。

2. 研究の目的

これまで得られた研究成果や知見を基盤に、昆虫の個体発育において重要な脱皮・変態のタイミング (エクジソン分泌) を制御している内分泌機構の解明に迫るために、本研究では以下の 4 点に焦点を絞り、研究を行った。

- (1) 未だ明らかとなっていない 3 種類のエクジソン生合成酵素候補 (Neverland ならびに 2 種類の CYP) の基質決定。
- (2) 新規エクジソン生合成酵素の同定およびエクジソン生合成経路の解明。
- (3) 新規神経ペプチドおよびその受容体の同定。
- (4) 神経ペプチドによる生合成酵素遺伝子類の発現調節機構の解明。

本研究を遂行することで、哺乳類のステロイドホルモン研究にも大きなインパクトを与える新しいメカニズムの発見にも繋がることを期待した。

3. 研究の方法

- (1) エクジステロイド類の LC-MS および

LC-MS/MS 微量同定・定量法の確立

前胸腺内のエクジステロイドを同定し、定量するために、ステロイドを誘導体化後 LC-MS (イオン化に ESI 法) を用いて、また、誘導体化を行わず LC-MS/MS (イオン化に APCI 法) を用いて分析法の開発・改良を行った。

(2) Neverland の基質決定

生合成酵素と考えられる Neverland がコステロールから 7-デヒドロコステロールへの変換を担うこと酵素であるか否かを明らかにするため、Neverland 遺伝子を導入したショウジョウバエ S2 培養細胞を用いた変換実験および上記誘導体化後の LC-MS 分析法により解析した。

(3) 新規生合成酵素遺伝子の探索と同定

カイコ前胸腺 EST データベースの中から新規シトクローム P450 を見だし、組織別、時期別発現解析を行った。また、この P450 遺伝子をショウジョウバエ S2 培養細胞に導入し、変換実験および LC-MS により解析した。

(4) 新規神経ペプチドおよび受容体の同定

前胸腺刺激活性ならびに抑制活性のあるペプチドの探索を主に合成ペプチドを用いて行った。

一方、ショウジョウバエ神経ペプチド受容体と考えられている GPCR の配列をもとに、カイコ神経ペプチド GPCR 受容体をゲノム情報から探索した。

また、前胸腺抑制ペプチド (PTSP) 受容体の探索を行った。

(5) 神経ペプチド類によるエクジソン生合成酵素の発現調節

エクジソン生合成酵素である 4 種類のシトクローム P450 (spook, phantom, disembodied, shadow) について、前胸腺刺激ホルモン (PTHH)、RF アミド関連ペプチドによる転

写調節を定量 PCR で調べた。

(6) ヨトウガエクジソン生合成酵素のクローニング

エクジソン生合成と休眠の関係を明らかにするため、エクジソン生合成酵素である 4 種類のシトクローム P450 (spook、phantom、disembodied、shadow) と Neverland について、ヨトウガからの遺伝子クローニングを試みた。

4 . 研究成果

(1) エクジステロイド類の LC-MS/MS 微量同定・定量法の確立

エクジソン生合成のコレステロールからエクジソンまでのエクジステロイド類について LC-MS/MS を用いた微量分析・定量系の確立を目指した。まず、ステロイド類をコレステロールオキシダーゼによる酸化、引き続き Girard P ヒドラゾン誘導体化を行い、ESI イオン化法を用いた LC-MS 分析法を試みた。その結果、コレステロールならびに 7-デヒドロコレステロールについては定量的に誘導体が得られ、次に述べる Neverland がコレステロールから-デヒドロコレステロールへの変換を担うことを示すことができた。しかし、他のステロイドについては誘導体化が定量的にいかないなど定量解析には不向きであることが明らかとなった。そこで、新たに導入された Q-TRAP 型 LC-MS/MS 装置を用いてステロイド類をそのまま APCI イオン化法を用いて分析することを試みた。その結果、コレステロールからエクジソンまで全ての合成中間体を定量的に分析できることが分かった。さらに、前胸腺からの抽出法についても様々な条件を検討し、最終的に酢酸エチル：水の比率を 4:1 にすることでほぼ定量的に抽出できることが分かった。この抽出法ならびに LC-MS/MS (APCI 法) を用いて前胸腺に含まれるステロイド類を分析したとこ

ろ、主要ステロイドはコレステロールと 7-デヒドロコレステロールであり、7-デヒドロコレステロールの量は前胸腺あたり発育に伴った変動がほとんどないことが分かった。このことは前胸腺に 7-デヒドロコレステロールを積極的に蓄積する機構があることを示唆しており、今後研究を進める予定である。

(2) Neverland の基質決定

生合成酵素と考えられる Neverland が担う触媒段階を生化学的に明らかにするため、ショウジョウバエ S2 培養細胞に Neverland 遺伝子を導入し、培地中にコレステロールなどの基質を加え、変換実験を行った。分析には(1)で確立した LC-MS (ESI 法) を用いた。その結果、カイコおよびショウジョウバエのいずれの Neverland もコレステロールから 7-デヒドロコレステロールへの変換を担うことが明らかになった。

(3) 新規生合成酵素候補遺伝子の探索と同定

EST データベースから新たに見いだした生合成酵素と考えられるシトクローム P450 (クローン名 : fprWP21_E15) のカイコにおける発現解析を行い、他の生合成酵素と同様に前胸腺特異的、かつエクジソン生合成の高い時期に発現量が高まることを見いだした。この P450 遺伝子をショウジョウバエ S2 培養細胞に導入し、様々なエクジステロイド化合物の変換実験および LC-MS により分析したが、今のところ基質分子を見いだすには至っていない。また、同様に CYP307a1 (Spook) を S2 培養細胞に導入し、様々なエクジステロイド化合物の変換実験を行ったが、基質候補を決定することはできなかった。

一方、次世代シーケンサーを用いて脳と比較して前胸腺に高発現している生合成候補遺伝子の探索を行った。その結果、新たに 3 種類のシトクローム P450 遺伝子を同定した。

これらのシトクローム P450 がエクジソン生合成酵素であるかどうかについて研究を継続している。

(4) 新規神経ペプチドおよび受容体の同定

休眠ホルモン受容体 (G タンパク質共役受容体) のカイコ組織別発現解析を行っている過程で前胸腺に高発現していることを見いだした。そこで、休眠ホルモンをはじめとする FXPRL アミドペプチドの前胸腺のエクジステロイド合成に対する影響を調べた。その結果、休眠ホルモンをはじめ FXPRL アミドペプチドが 5 齢後期の前胸腺に対してエクジソン分泌促進活性があることを見いだした。また、前胸腺刺激活性をもつ神経ペプチドとしてオルコキニンと同定した。さらにオルコキニンが神経軸索を介して前胸腺に直接輸送されていることを見いだした(雑誌論文 8)。

さらに、前胸腺のエクジソン生合成を抑制する前胸腺抑制ペプチド受容体がこれまで Sex peptide 受容体と考えられていた GPCR であることを明らかにした。

一方、前胸腺に発現している神経ペプチド受容体を網羅的に明らかにすることを目的に、ショウジョウバエの神経ペプチド受容体と考えられている GPCR の配列をもとに、カイコ神経ペプチド GPCR 受容体をゲノム情報から探索した。さらに 5'-および 3'-RACE により全長を決定するとともに、組織別 (12 組織) および時期別 (5 齢摂食期および 5 齢眠期) の発現解析を定量 PCR で行った。その結果、47 種類の GPCR の全長配列を決定するとともに、その発現組織を同定した。これらのうち多くの受容体はいずれもオーファン受容体であり、今後リガンドの同定など機能解析を進めていく予定である。

(5) エクジソン生合成酵素である 4 種類のシトクローム P450 (spook、phantom、disembodied、shadow) について、前胸腺刺激

ホルモン (PTTH)、RF アミド関連ペプチドによる転写調節を調べたところ、PTTH によって disembodied の転写が強く、spook および phantom の発現が弱く促進されることが明らかになった。一方、エクジソン分泌を抑制する RF アミド関連ペプチドを添加することで phantom の発現が強く、spook と disembodied が弱く抑制された。また、PTTH によって促進された phantom 遺伝子の発現促進は、RF アミド関連ペプチドによってほぼ完全に押さえられた。このことから神経ペプチドによるエクジソン生合成調節は、様々なステップの生合成酵素遺伝子が複数の神経ペプチドによって発現調節されることによることが示された。

(6) ヨトウガエクジソン生合成酵素のクローニング

エクジソン生合成と休眠の関係を明らかにするため、エクジソン生合成酵素である 4 種類のシトクローム P450 (spook、phantom、disembodied、shadow) と Neverland について、ヨトウガからの遺伝子クローニングを試みた。その結果、それぞれの部分配列を得ることに成功した。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

(雑誌論文) (計 8 件)

1. N. Yamanaka, L. Roller, D. Zitnan, H. Satake, A. Mizoguchi, H. Kataoka, Y. Tanaka. *Bombyx orckinins are brain-gut peptides involved in the neuronal regulation of ecdysteroidogenesis. J. Comp. Neurology*, **519**, 238-246 (2011).
2. N. Yamanaka, Y-J. Hua, L. Roller, I. Spalovska-Valachova, A. Mizoguchi, H. Kataoka and Y. Tanaka. *Bombyx prothoracicostatic peptides activate the sex peptide receptor to regulate ecdysteroid biosynthesis. Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **107**, 2060-2065 (2010).
3. T. Namiki, R. Niwa, A. Higuchi, T.

Yoshiyama, K. Mita and H. Kataoka. A basic-HLH transcription factor *HLH54F* is highly expressed in prothoracic gland in the silkworm *Bombyx mori* and the fruit fly *Drosophila melanogaster*. *Biosci. Biochem. Biochem.*, **73**, 762-765 (2009).

4. N. Yamanaka, S. Yamamoto, D. Zitnan, K. Watanabe, T. Kawada, H. Satake, Y. Kaneko, K. Hiruma, Y. Tanaka, T. Shinoda and H. Kataoka. Neuropeptide receptor transcriptome reveals unidentified neuroendocrine pathway. *PLoS ONE*, **3**, e3048, 1-12 (2008).

5. L. Roller, N. Yamanaka, K. Watanabe, I. Daubnerova, D. Zitnan, H. Kataoka and Y. Tanaka. The unique evolution of neuropeptide genes in the silkworm *Bombyx mori*. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, **38**, 1147-1157 (2008).

6. The International Silkworm Genome Consortium. The genome of a lepidopteran model insect, the silkworm *Bombyx mori*. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, **38**, 1036-1045 (2008).

7. K. Watanabe, J. J. Hull, T. Niimi, K. Imai, S. Matsumoto, T. Yaginuma and H. Kataoka. FXPRL-amide peptides induce ecdysteroidogenesis through a G-protein coupled receptor expressed in the prothoracic gland of *Bombyx mori*. *Mol. Cell. Endocrinol.*, **273**, 51-58 (2007).

8. N. Yamanaka, N. Honda, N. Osato, R. Niwa, A. Mizoguchi and H. Kataoka. Differential regulation of Ecdysteroidogenic P450 gene expression in the silkworm, *Bombyx mori*. *Biosci. Biochem. Biochem.*, **71**, 2808-2814 (2007).

〔学会発表〕(計7件)

1. 山田哲也、中岡貴義、藤本善徳、片岡宏誌 . ショウジョウバエ MAPR ファミリー CG9066 とエクジソン生合成酵素との相互作用 . 2010 年度日本農芸化学会、2010 年 3 月 30 日、東京 .

2. H. Kataoka, T. Matsuya, T. Sakudoh, N. Yamanaka, Y. Fujimoto and R. Niwa. Cytochrome P450s involved in biosynthesis of ecdysteroids in insects; Regulation of gene expression by neuropeptides. International Conference on Cytochrome P450, June 21-25, 2009 Nago, Okinawa.

3. T. Yoshiyama, K. Hada, S. Enya, Y. Sasakura, K. Shiomi, H. Kataoka and R. Niwa.

Neverland, an evolutionarily conserved Rieske-type family of proteins, is essential for steroid hormone biosynthesis and regulating cholesterol metabolism during development. 日本発生物学会第 42 回大会. 2009 年 5 月 28 日. 新潟 .

4. 片岡宏誌 . 前胸腺におけるエクジソン生合成と神経ペプチド類による調節 . 2009 年度日本農芸化学会大会、2009 年 3 月 29 日、福岡 .

5. 松谷武嗣、丹羽隆介、葛西真治、富田隆史、三田和英、片岡宏誌 . 昆虫前胸腺におけるエクジソン生合成酵素遺伝子の探索 . 2009 年度日本農芸化学会大会、2009 年 3 月 29 日、福岡 .

6. R. Niwa, T. Yoshiyama, H. Kataoka, F. Zhou, C. Li and F. J. Slack. Control of developmental timing in Ecdysozoan: Studies on insect ecdysteroidogenesis and *C. elegans* heterochronic genes. HHMI Janelia Farm Meeting: Molecular Mechanisms of Developmental timing, May 4 2008, Verginia, USA.

7. T. Yoshiyama, R. Niwa and H. Kataoka. Neverland, a conserved Rieske-type family of proteins essential for ecdysone synthesis and cholesterol metabolism in the prothoracic gland. 49th *Drosophila* Research Conference, April 2-6 2008, San Diego, USA.

〔図書〕(計1件)

1. 片岡宏誌、シリーズ 21 世紀の動物科学 「内分泌と生命現象」 昆虫の内分泌学 . 培風館 . 116-136 (2007).

〔その他〕

ホームページ等

<http://park.itc.u-tokyo.ac.jp/molecular-recognition/index.html>

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

片岡 宏誌 (KATAOKA HIROSHI)
東京大学・大学院新領域創成科学研究科・教授
研究者番号 : 60202008

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし