

令和 6 年 9 月 11 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21H02129

研究課題名(和文) 昆虫の脱皮変態を支えるステロイド化合物の構造変化に関わる酵素と制御因子の探索

研究課題名(英文) Search for enzymes and regulators involved in structural changes in steroid compounds that support insect molting and metamorphosis

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,400,000円

研究成果の概要(和文)：昆虫の正常な成長・生育には、正しいタイミングでの脱皮・変態がステロイドホルモンであるエクジソンで制御されている必要がある。本研究では、昆虫のステロール化合物の体内動態に着目しその制御メカニズムおよび科学的分析より、以下の主な成果が得られた。(1)エクジステロイドの材料となるコレステロールは、植食性昆虫種では植物ステロールからコレステロールに変換するが、これまでの既知の経路以外の新規経路を見出した。(2)昆虫の体内での、ステロイド化合物の構造変化は鱗翅目昆虫と直翅目昆虫とで異なる。(3)フタホシコオロギを用いて生理活性ペプチド因子群を統合的に見出し解析の基盤を構築した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

昆虫の中でも植物を宿主とする、いわゆる植食性昆虫は、体内で植物に含まれている植物ステロールをコレステロールに酵素的に変換している。これまで、主にカイコやタバコスズメガで研究されていたこの変換経路は、一般的な昆虫においてメインの変換経路ではない可能性が考えられる成果を得た。このことは、教科書などに記載されている変換経路ではない経路を改めて解析する必要があることを意味している。また、この発見は世界に先駆けて見いだされたことであり、今後さらに発展できる研究領域となった。

研究成果の概要(英文)：Insect normal growth and development are regulated by precisely timed molting and metamorphosis via steroid hormone, ecdysone. In this project, the following three results were obtained.

(1) Cholesterol, a precursor for ecdysteroids, is converted from phytosterols in plant-feeder insects, through a novel pathway other than the previously proposed pathway. (2) The chemical conversion pathway from phytosterol to cholesterol in insects differ between lepidopteran and orthopteran species. (3) We identified a repertoire of bioactive peptidyl factors in the crickets.

研究分野：分子認識化学

キーワード：昆虫 コレステロール 植物ステロール エクジソン 脱皮 ペプチドホルモン

1. 研究開始当初の背景

昆虫が正確なタイミングで脱皮変態を繰り返し成長するのは、温度や日長の環境因子や体内の栄養状態などの内的要因の情報に応答し、正しいタイミングで分泌されている脳神経系のホルモン類が制御しているためである。この昆虫の脱皮変態は、古典的に3つのホルモンが重要とされている。すなわち、「脳ホルモン」(前胸腺刺激ホルモン:PTTH)、「脱皮ホルモン(エクジソン)」、「幼若ホルモン」の3つが主要なホルモンとして脱皮変態を制御している。このうち、ステロイドホルモンであるエクジソンは、脱皮変態の直接的な引き金となる。

一方、エクジソンは前胸腺内でコレステロールから酵素的に生合成される。原料のコレステロールは、昆虫を含めた節足動物においては *de novo* で生合成できないため、餌や共生生物などから獲得する必要がある。興味深いことに、カイコなどの植物を宿主とする昆虫は、すなわち植食性昆虫は、餌からステロール化合物として、コレステロールとは化学構造の異なる植物ステロールを取り込む。そのため、植食性昆虫は、腸管において、植物ステロールからコレステロールに酵素的に変換することで、エクジソンの原料であるコレステロールを調達している。

上述の通り、昆虫の脱皮変態はエクジソンの生合成・分泌・代謝が体液中にタイミングよく調節されていなくてはならない現象である。本申請研究期間までに、申請者のグループでは、エクジソンの生合成経路に関わる一連の酵素をカイコおよびショウジョウバエを用いて同定してきた。しかし、コレステロールを調達するための植物ステロールからコレステロールに変換するための代謝酵素や、脱皮直後に認められるエクジソンの血中濃度の急降下や、エクジソンが血中濃度を低い状態で維持するための代謝酵素は見出されておらず不明なままであった。

2. 研究の目的

昆虫の脱皮変態を制御するエクジソンは、脱皮するタイミングで一過的に血中濃度が上昇する。その際、エクジソンがパルス的に血中濃度を上昇させるためには、脱皮直前において前胸腺内でエクジソンの材料であるコレステロールが安定供給されなくてはならない。また、エクジソンの生合成・分泌が活性化し、脱皮が進行した後は、エクジソンを化学構造的な修飾するような代謝経路が働くことでエクジソンの血中濃度を低下させることで、エクジソンを不活性化させる必要がある。

そこで、本申請研究では、昆虫体内のステロイド化合物の構造変換に着目した。特に、エクジソンの血中濃度上昇に伴う体内のステロイド化合物を網羅的に同定し、さらにはその変換酵素を同定することとした。さらに、エクジソンの体内動態に関わる調節因子も同定することで、昆虫の脱皮変態の調節機構の全容を明らかにすることを目指す。実際には、本申請研究ではモデル昆虫のカイコ *Bombyx mori* あるいは不完全変態昆虫であるフタホシコオロギ *Gryllus bimaculatus* を用いて主に以下の3点について取り組むこととした。

(1) カイコは植食性昆虫であり、コオロギは雑食性昆虫であるため、餌由来の植物ステロールからコレステロールに変換する能力を有していると考えられる。それらの昆虫種における植物ステロールからコレステロールへの変換酵素を腸管から精製単離構造決定する。

(2) 脱皮時(直後)に血中のエクジソン濃度を急激に減少させる現象に関わる、エクジソン誘導体あるいは代謝酵素を同定する。

(3) 脱皮変態に関わるペプチド性因子を、エクジソン濃度の変動、あるいはPTTH産生量の変動に着目し同定する。また、全ペプチド性因子の微量定量系を確立し、脱皮変態時における全ホルモンの内生量や分泌量を定量測定し、脱皮変態の内分泌支配を統合的に解析する。

3. 研究の方法

本申請研究の目的(1)~(3)に合わせて、具体的な研究方法を以下に記した。

(1) 酵素などの精製単離構造決定

(1-1) 植物ステロールからコレステロールへの変換酵素: 先行研究では、植物ステロールからコレステロールへは4段階の酵素群により変換されることが示唆されているものの、その実体は分かっていない。先行研究および予備的な実験結果から、いずれの酵素活性も、ミクロソーム画分で認められていたため、出発材料は、植物ステロールを変換する組織である中腸のミクロソーム画分を出発材料として精製する。精製の指標となる活性測定には、植物ステロールの β -シトステロールの安定同位体を基質として試料とインキュベート後にGCMSあるいはLC-MSMSを用いて検定する。

(1-2) 植物ステロールからコレステロールへの経路の中間体を明らかにするため、代謝経路の最終段階を担うDHCR24の阻害剤であるAzacosterolを投与したり、NADPHなどのコファクターの除去したりすることにより、植物ステロールからコレステロールへの代謝中間体を得る。分析には上述の通り、LC-MSMSやGCMSなどを用いる。

(2) エクジソン代謝関連ステロイド化合物：

(2-1) エクジソン代謝関連ステロイド化合物：脱皮前後のカイコ体内のステロール画分を回収し、上述と同様に分析する。なお、代謝後のエクジソンはリン酸抱合体である可能性もあるため、トレース実験も同時に行い比較分析を行う。脱皮変態前後でのステロイド化合物を精製単離し、それらの構造を網羅的に明らかにする。これまでに LC-MSMS を用いたステロイド化合物を分析してきた経験上、ステロイド化合物由来のフラグメントイオンのパターンなどの知識の蓄積がある。これを駆使して、網羅的にステロイド化合物の同定を行う。

(3) 脱皮変態に関わるペプチド性因子の同定など

カイコをはじめとする昆虫種のゲノムおよびトランスクリプトーム解析で得られた全ペプチド性因子 43 種をフタホシコオロギでも同定する。また、同定したペプチド性因子を化学合成、あるいは大腸菌発現系で調製する。

4. 研究成果

(1) カイコを用いた先行研究により、植物ステロールからコレステロールへの変換に関する酵素が腸管に存在することが示された。この変換経路は 4 段階で構成されていたが、そのうち最終段階を担う DHCR24 は、フタホシコオロギの腸管でも発現していることが明らかになった。さらに、DHCR24 には 2 つのサブタイプがあり、そのうち DHCR24-1 がデスモステロールからコレステロールへの変換を担うことが明らかになった。これは、カイコの DHCR24 およびフタホシコオロギの DHCR24 を HEK293 細胞に発現させて確認した。また、開示されている多様な昆虫種のデータベースを探索した結果、DHCR24 は多くの昆虫種で保存されており、DHCR24 の有無が食性と関連すると示唆されていた先行研究での提案は否定されることが分かった。

一方、フタホシコオロギにおいても、DHCR24 には 2 種類のサブタイプあることを同定した。これらの酵素の発現と活性は腸管で確認されたが、ともにノックダウン実験では致命的な影響や生育への影響は認められなかった。また、同位体標識デスモステロールおよび同位体標識シトステロール(植物ステロールの一種)を用いた研究により、コレステロールへの変換経路を検討したが、新規な変換中間体は見いだされなかった。さらに、DHCR24 のノックダウンではデスモステロールが検出されたが、他のステロール化合物は見いだされなかった。そのほかの成果から、フタホシコオロギでは植物ステロールからコレステロールへの変換は、1 段階での酵素変換あるいは律速段階が最初の段階であることが予想された。このことは、植物ステロールからコレステロールへの変換経路がこれまで明らかになっていた 4 段階の酵素的変換だけではないことを意味している。

(2)(1) のような結果を受けて、フタホシコオロギにおける腸管のマイクロソーム画分で植物ステロールからコレステロールへの変換が予想された。カイコの経時的な各成長段階のステロール成分分析にならひ、フタホシコオロギでもエクジステロイドの類縁化合物を経時的に分析を試みたが、前胸腺に相当する体内器官の摘出が非常に困難であったため、再現よく分析することができなかった。また、先行研究で活性型前駆体であると考えられている 3-デヒドロエクジソンも検出することができなかった。

(3) 脱皮変態を調節する因子の同定；カイコでのアナロジーを用いて解析するため、ここではフタホシコオロギを用いて行った。まず、脳神経系のペプチド性因子(ペプチドホルモンおよび生理活性ペプチド)を網羅的に明らかにした。同様に、各ペプチド性因子の受容体も同定した。

一方、脱皮ホルモンであるエクジステロイド類を修飾する酵素群として、P450 遺伝子があるが、フタホシコオロギのトランスクリプトームおよびゲノム配列から、134 種存在することが明らかとなった。このうち、いわゆる Hal loween 遺伝子をコードしていると考えられるものも同定することができた。ペプチド性因子を化学合成したのち、投与後に脱皮変態に影響を与えるものをフタホシコオロギにて探索したが、いくつかのペプチド性因子がカイコと同様に同定することができた。

一方、ステロールの組成分析を合わせ、体内からステロール化合物を網羅的に同定することを試みた。その結果、植物ステロールとコレステロールが主成分として同定できただけでなく、様々な昆虫種で分析することで、植物ステロールの組成比によって食性が推定できる可能性を見出した。このことは、当初の研究目的とは異なるものの、今後当該分野で重要かつ有益な上等となることが考えられた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Takeshima Mika, Ogihara Mari H., Kataoka Hiroshi	4. 巻 184
2. 論文標題 Characterization and functional analysis of BmSR-B1 for phytosterol uptake	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Steroids	6. 最初と最後の頁 109039 ~ 109039
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.steroids.2022.109039	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Zhu Zhen, Tsuchimoto Maho, Nagata Shinji	4. 巻 13
2. 論文標題 CCHamide-2 Signaling Regulates Food Intake and Metabolism in Gryllus bimaculatus	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Insects	6. 最初と最後の頁 324 ~ 324
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/insects13040324	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Seike Hitomi, Nagata Shinji	4. 巻 86
2. 論文標題 Different transcriptional levels of Corazonin, Elevenin, and PDF according to the body color of the two-spotted cricket, Gryllus bimaculatus	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry	6. 最初と最後の頁 23 ~ 30
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/bbb/zbab183	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 NAGATA Shinji, SEIKE Hitomi	4. 巻 22
2. 論文標題 Fatty Acid-derived Chemicals in Insects; Biosynthetic Pathways and Functions	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Oleoscience	6. 最初と最後の頁 165 ~ 171
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.5650/oleoscience.22.165	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Mack Yin Shan Isa, Dehari Masatoshi, Morooka Nobukatsu, Nagata Shinji	4. 巻 12
2. 論文標題 Identification and Characterization of 24-Dehydrocholesterol Reductase (DHCR24) in the Two-Spotted Cricket, <i>Gryllus bimaculatus</i>	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Insects	6. 最初と最後の頁 782 ~ 782
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/insects12090782	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 NAGATA Shinji, SEIKE Hitomi	4. 巻 38
2. 論文標題 Fundamental knowledge of endocrine control of feeding behavior in insects	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Hikaku seiri seikagaku(Comparative Physiology and Biochemistry)	6. 最初と最後の頁 31 ~ 37
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3330/hikakuseiriseika.38.31	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Mochizuki Takako, Sakamoto Mika, Tanizawa Yasuhiro, Seike Hitomi, Zhu Zhen, Zhou Yi Jun, Fukumura Keisuke, Nagata Shinji, Nakamura Yasukazu	4. 巻 14
2. 論文標題 Best Practices for Comprehensive Annotation of Neuropeptides of <i>Gryllus bimaculatus</i>	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Insects	6. 最初と最後の頁 121
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/insects14020121	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計14件(うち招待講演 3件/うち国際学会 0件)

1. 発表者名 望月孝子、坂本美佳、清家瞳、祝貞、Zhu Yijun、永田晋治、中村保一
2. 発表標題 フタホシコオロギ <i>Gryllus bimaculatus</i> の神経ペプチドと受容体の包括的アノテーションの事例紹介
3. 学会等名 日本分子生物学会2022年度大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 清家 瞳、永田 晋治
2. 発表標題 フタホシコオロギの体色変化を制御するペプチドホルモンの探索
3. 学会等名 日本分子生物学会2022年度大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 祝 貞、永田 晋治
2. 発表標題 Allatotropin regulates reproduction behaviors by controlling the physiology of the male accessory gland of the twospotted crickets, <i>Gryllus bimaculatus</i>
3. 学会等名 日本分子生物学会2022年度大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 清家 瞳、永田 晋治
2. 発表標題 フタホシコオロギにおいて肉食性餌として認識される化合物の探索
3. 学会等名 日本農芸化学会2023年度大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 宮原 佐季、清家 瞳、永田 晋治
2. 発表標題 フタホシコオロギにおける免疫応答に關与するphenoloxidaseの同定
3. 学会等名 日本農芸化学会2023年度大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 南波 竜政、永里 鴻多、永田 晋治
2. 発表標題 昆虫種一斉分析によるステロール組成比と食性の関連性
3. 学会等名 日本農芸化学会2023年度大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 祝 真、永田 晋治
2. 発表標題 Maintenance of the precise male reproductive cycle through two neuropeptide signalings in a polygamous insect
3. 学会等名 日本比較内分泌学会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 清家 瞳、塚本 悠介、永田 晋治
2. 発表標題 フタホシコオロギにおけるインスリン様ペプチドの作用機構
3. 学会等名 日本比較内分泌学会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 永田 晋治
2. 発表標題 昆虫の食性とステロール化合物の獲得戦略
3. 学会等名 日本農芸化学会2024年度大会（招待講演）
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 清家 瞳、永田 晋治
2. 発表標題 フタホシコオロギにおける成育環境に適応した摂食行動の調節機構
3. 学会等名 日本農芸化学会2024年度大会（招待講演）
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 永田晋治、清家瞳、柏原涉、鈴木道生
2. 発表標題 Evolutionary conserved mandibular exoskeleton structures in chewing insects
3. 学会等名 13rd International Congress of Vertebrate Morphology（招待講演）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 清家 瞳、永田 晋治
2. 発表標題 動物性餌としてのコオロギに認識される化合物の精製
3. 学会等名 日本農芸化学会2024年度大会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 祝 貞、永田 晋治
2. 発表標題 コオロギにおける交尾直後の交尾拒否反応のsNPFによる調節機構
3. 学会等名 日本農芸化学会2024年度大会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 寺坂 優里、永田晋治
2. 発表標題 フタホシコオロギのELOVLの同定と機能解析
3. 学会等名 日本農芸化学会2024年度大会
4. 発表年 2024年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	永田 晋治 (Nagata Shinji) (40345179)	東京大学・大学院新領域創成科学研究科・教授 (12601)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------