

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 25 日現在

機関番号：22604

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24580081

研究課題名(和文)キノノイソメラーゼが触媒する昆虫外骨格の硬化反応

研究課題名(英文)Cuticle hardening reactions mediated by quinone isomerase

研究代表者

朝野 維起 (Asano, Tsunaki)

首都大学東京・理工学研究科・助教

研究者番号：40347266

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：昆虫の外骨格は、キチン及びキチン結合性タンパク質を主成分とするマトリクスである。脱皮に伴って外骨格が硬化する際に、カテコールアミン類がラッカーゼによる酸化される反応を経るとされている。その結果生じるキノン、およびキノンが異性化されて生じるキノンメチドは反応性が高く、周囲の成分と共有結合的に架橋構造をつくる事で、外骨格が硬くなると考えられている。本研究は、キノンメチド生成に関わるキノノイソメラーゼの単離を目的とした。家蚕蛹外骨格の抽出物を出発材料に、各種クロマトグラフィーによる分離操作を行った結果、キノノイソメラーゼ活性を示す因子をほぼ単離した。

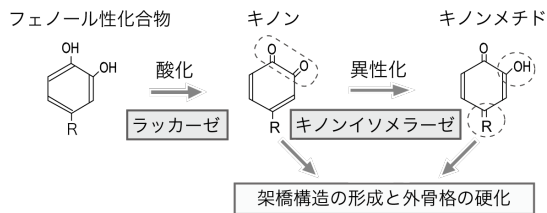
研究成果の概要(英文)：Insect cuticle is a matrix mainly composed of chitin fiber and chitin binding proteins. The cuticle is sclerotized through oxidation reactions of catechol amines. Catechol amines are oxidized to quinones, and then isomerized to quinone methides. Both quinones and quinone methides are highly reactive to mediate cross-linkages of cuticular components. For detection of the isomerase activity, the conversion of N-acetyl-dopamine quinone (NADA quinone) to NADA quinone methide was monitored. From the pupal cuticles of the silkworm, *Bombyx mori*, an active fraction was extracted. Through column chromatographies, a fraction with isomerase activity was obtained, but the characters are different from those of enzymes that were reported previously in other species.

研究分野：昆虫生化学・遺伝学

キーワード：昆虫外骨格

1. 研究開始当初の背景

昆虫の外骨格はキチン繊維及びキチン結合性タンパク質からなるマトリクスである。外骨格が硬化する際に、カテコールアミン類を含むフェノール性化合物の酸化反応が重要である。昆虫外骨格内には N-アセチルドーパミン (NADA) や N-β-アラニルドーパミン (NBAD) などが存在し、これらがラッカーゼによって酸化されてできたキノン類が外骨格成分間の架橋に関わるとされる。また、キノン類がキノンイソメラーゼによって異性化されてキノンメチドになる反応も重要だとされる (下図)。



しかしながら、キノンメチドの生成反応を触媒する酵素の存在は、古くから報告されていたものの、これを実際に精製してアミノ酸配列決定、また遺伝子の同定を行った研究はない。1980年代後半、90年代初期に、精製に関する報告はあったが、以後この酵素についての研究報告はほぼない状況である。また、キノンイソメラーゼ活性の存在下で、どのような架橋構造が形成されるのかについても、明確には示されていない。現時点で、この反応を触媒する酵素の第一候補とされている「キノンイソメラーゼ」が、どの程度昆虫外骨格硬化に関与するのかについては、殆ど不明な状況である (Andersen, 2010)。

2. 研究の目的

本研究は、ラッカーゼによってカテコールアミン類が酸化されて生じたキノン類がさらに異性化される反応を触媒する因子に着目する。キノン類は異性化されキノンメチドと呼ばれる物質になり、その後様々な反応を経て外骨格硬化の完了へと到達するとされる。本研究は、キノンイソメラーゼを精製し、そのアミノ酸配列等を明らかにする事を目的とする。また、キノンイソメラーゼによって生じる物質が、外骨格硬化に与える影響等について明らかにする事である。

3. 研究の方法

(1) キノンイソメラーゼの精製には家蚕蛹の試料を用いた。これは、研究代表者がラッカーゼ系による外骨格硬化のモデルとして、これまで使用し続けてきた事による。活性の検出は、NADA をカワラタケ (*Trametes versicolor*) 由来のラッカーゼで酸化させて得られる NADA キノンを基質とし、さらにキノンイソメラーゼによって生成されるキノンメチドを検出した。ただし、キノンメチドはその高い反応性により水分子とすぐ反応し

て N-acetyl-epinephrine: NANE へと変換される。よって、実際は NANE (及びその酸化物) を検出することとなる。家蚕蛹化後数時間の個体から、弱酸性バッファーを用いる事により目的の活性を抽出した。精製にはイオン交換カラム、ゲル濾過カラムを用いた。

(2) 外骨格特有に存在するカテコールアミン基質として NADA および NBAD 合成を行った。文献を参考に、有機化学者からの指導を受けながら行った。これらを用いて、試験管内で外骨格タンパク質の架橋を試みた。

(3) タバコスズメガ蛹から得られるラッカーゼはキノン生成に伴って、キノンメチドも生成すると報告されていた (Thomas et al., 1989)。本研究において、タバコスズメガラッカーゼの解析については、生体からの得た試料及び組替えタンパク質を用いた。生体の試料については前蛹および脱皮直後の蛹を使用して、タンパク質抽出、その後の精製を行った。組み替えタンパク質については、代表者が所属する研究室で通常用いられているバキュロウイルスの系を利用した。

4. 研究成果

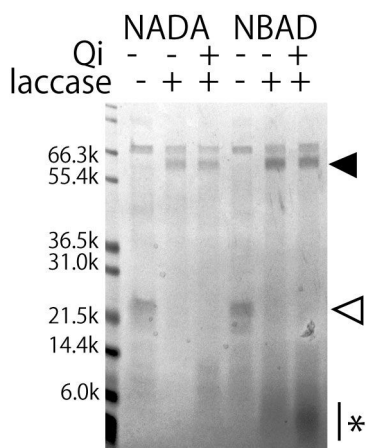
(1) キノンイソメラーゼの精製

家蚕 (*Bombyx mori*) 蛹の外骨格からバッファーによる抽出後、各種イオン交換カラムを経た後に、ゲル濾過カラムクロマトグラフィーを行いキノンイソメラーゼ活性のある画分が得られた。最終段階として、RP-HPLC による精製を試みた結果、収率は低かったものの活性を示す画分の回収にまで至った。SDS-PAGE で確認したところ、分子量約 7k に相当する移動度にややブロードなシグナルを示した。この大きさは、これまで報告されてきた 2 種類のキノンイソメラーゼの分子量: a) *Hyalophora cecropia* の幼虫外骨格から単離されたもの (~65k)、および b) *Sarcophaga bullata* の血液から単離されたもの (~45k) とは大きく異なる。当初想定していた因子とは相当違った特性を持つ分子であると考えられる。例えば、酵素として機能するよりは、反応系にあるラッカーゼに働きかける事で、キノンメチド産生活性を引き出すなどの作用機構を有するのかもしれない。

(2) NADA、NBAD の合成とその利用

合成した NADA および NBAD と、キノンイソメラーゼ活性を示す画分を用いて、外骨格タンパク質の架橋反応を試みた。ここではモデルタンパク質として、ショウジョウバエの囲蛹殻タンパク質を大腸菌の系で合成したのを用いた結果を示す。モデルタンパク質自体は 25k 程度の移動度を示すが (下図、◀)、基質とラッカーゼの存在下では、どちらの基質を用いた場合も、60k 程度の移動度 (◀) にシフトした。おそらく、架橋されることで

2量体が形成されたものと思われる。通常、この種の実験では、反応液中のタンパク質がランダムに多量体を形成し、ラダー状の泳動パターンを示す事が多い。この多価の架橋形成が、構造解析を複雑にする要因にもなり得る。しかし、本実験系では一本のシフトバンドが観察されるのみである。モデルタンパク質一分子あたり、一カ所の配列モチーフ、あるいはアミノ酸残基等が、特異的架橋形成に供されているのではないかと考えている。



図中の Qi はキノノイソメラーゼをしめすが、キノノイソメラーゼ活性画分の存在下でも、タンパク質の泳動パターンに顕著な変化はない。しかし、NBAD が基質の場合、図中に * で示した低分子領域に見られるスミア状のシグナルが、キノノイソメラーゼ画分を加えることで増強することが観察された。これは、反応系で生じるキノンやキノンメチド等が重合したものかも知れない。実際の外骨格内ではキチン等を含む様々な外骨格成分の架橋に用いられるべきものが、反応の相手がないことから凝集している可能性が考えられる。また、NBAD を用いた場合、若干ではあるが、キノノイソメラーゼ画分を混合した場合に見られるシフトバンドの移動度が小さい。これは、家蚕蛹外骨格由来のキチン結合性タンパク質を用いた実験でも観察される現象である。何らかの架橋構造の違いを反映しているものと思われる。

(3) タバコスズメガラッカーゼの性状

タバコスズメガラッカーゼの性状については、アメリカの研究者との共同研究として進めている。少なくとも、研究代表者がこれまでに進めてきた家蚕ラッカーゼの研究で得られた知見（成長段階における活性調節・ラッカーゼ分子の活性化）について、タバコスズメガラッカーゼからも同様な結果が得られている。ただし、キノノイソメラーゼ活性画分と混合すると、キノンメチド生成量が圧倒的に高くなったことから、生体内におけるキノンメチド生成には、今回の研究で得られた画分に含まれる因子の存在が重要である可能性が高い。

近年、様々な生物のゲノム情報が容易に利用できるようになった。節足動物に属する4つの分類群（昆虫、甲殻類、軟脚類と多足類）のゲノムも、本研究期間中に解読例がそろった。注目すべき点は、昆虫外骨格形成に必須のラッカーゼ遺伝子（正式には laccase2: ラッカーゼ2）が、昆虫にしか見つからない事である。ここで、昆虫進化の歴史について考察した。昆虫が誕生・繁栄する過程で、陸上への進出が大きな出来事だったと考えられる。昆虫は、陸上に進出した最も初期の動物のひとつだと言う説もあるが、これは昆虫の祖先が陸上にあるまだ手つかずのニッチをいち早く占有し、現在に至る陸上環境における優勢を決定づけた要因とも考えられる。実は、昆虫の陸上進出に際し、ラッカーゼ系による外骨格形成のしくみが、大変重要だった可能性を考えている。昆虫は甲殻類と近縁なため、甲殻類との比較で論じると、両者の大きな違いの一つとして外骨格を硬くするしくみが挙げられる。甲殻類はカルシウムイオンの沈着によって外骨格を硬くする。海水と比較してカルシウムイオンの補給が制限される陸上環境において、現生の陸上甲殻類は脱皮前の古い外骨格のカルシウムを再吸収したり、抜け殻を食べたりするなど、カルシウム維持にかかる手間が大きい。一方、昆虫はカルシウムではなくカテコールアミンの酸化反応を利用した外骨格成分間の架橋形成による硬化を行う。そのため、カルシウム確保にとらわれず、自由に陸上の奥深くへと進出できたのではないかと考えられる。また、カルシウムを利用しない事で、軽くて丈夫な外骨格を容易に進化させられた可能性も考えられる（これは、後になって空へ進出した際に大きな寄与をした可能性がある）。このように、昆虫が陸上環境における圧倒的優位をかちとった過程で、ラッカーゼ系の貢献は小さくないと考えている。

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4件)

Tsunaki Asano, Masato Taoka, Yoshio

Yamaguchi, Craig Everroad, Yosuke Seto

Takashi Shinkawa, Yoshio Yamauchi, Toshiaki

Isobe, Masaharu Kamo, Naoyuki Chosa

“Re-examination of a α -chymotrypsin-solubilized laccase in the pupal cuticle of the silkworm, *Bombyx mori*: insights into the regulation system for laccase activation during the ecdysis process” *Insect Biochem and Mol Biol*, 55, 61-69 (2014), doi:

10.1016/j.ibmb.2014.10.004. 査読あり

Ryoko Maesaki, Ryosuke Satoh, Masato Taoka, Teppei Kanaba, Tsunaki Asano, Chiharu Fujita, Toshinobu Fujiwara, Yutaka Ito, Toshiaki Isobe, Toshio Hakoshima, Katsumi Maenaka, Masaki Mishima “Efficient and cost effective production of active-form human PKB using silkworm larvae.” Scientific Reports, 4-6016 (2014), doi:10.1038/srep06016, 査読あり

(総説) 朝野 維起 “昆虫外骨格内に存在するメラニン合成酵素” 比較生理生化学 vol. 30, 106-114 (2013), 査読あり
doi:10.3330/hikakuseiriseika.30.106, 査読あり

Tsunaki Asano, Masato Taoka, Takashi Shinkawa, Yoshio Yamauchi, Toshiaki Isobe, Dan Sato “Identification of a cuticle protein with unique repeated motifs in the silkworm, *Bombyx mori*.” Insect Biochemistry and Molecular Biology, 43, p344-351 (2013), doi: 10.1016/j.ibmb.2013.01.001, 査読あり

〔学会発表〕(計 11 件)

朝野維起, 相澤研介, 相垣敏郎外骨格形成の仕組みと昆虫の進化. 応用動物昆虫学会. 第59回年次大会. 3月. 山形大学. 山形 (2015)

朝野維起, 相澤研介 (2014) ラッカーゼ前駆体の種間比較. 日本動物学会. 第85回大会. 9月. 東北大学. 仙台 (2014)

相澤研介, 相垣敏郎, 朝野維起 キイロシヨウジウバエラッカーゼの機能解析. 日本動物学会. 第85回大会. 9月. 東北大学. 仙台 (2014)

Tsunaki Asano, Masato Taoka, Takashi Shinkawa, Yoshio Yamauchi, Toshiaki Isobe and Dan Satoh “A cuticle protein with unique motifs in the silkworm, *Bombyx mori*.” 7th international symposium of Molecular Insect Science. 6月. アムステルダム. オランダ (2014)

Tsunaki Asano “Construction of insect cuticle through oxidation reactions of phenolic compounds by laccase system.” Annual meeting of Korean

Society of Applied Biological Chemistry. 6月. 釜山. 韓国 (2014)

朝野 維起 “昆虫脱皮時のラッカーゼ活性調節” 日本動物学会 第 84 回大会. 9 月. 岡山大学. 岡山. (2013)

相澤 研介, 相垣 敏郎, 朝野 維起 “昆虫外骨格形成に必須な遺伝 laccase2 の機能解析” 日本動物学会. 第 84回大会. 9月. 岡山大学. 岡山 (2013)

Sho Inami, Tsunaki Asano, and Takaomi Sakai “Neuropeptide-expressing neurons contribute to apterous-dependent long-term courtship memory” in *Drosophila*. JSCP2013 (日本比較生理生化学会 第 35 回) 7月. 兵庫県立大学. 姫路 (2013)

朝野 維起 “「生体防御」における外骨格の役割” 応用動物昆虫学会第57回大会.小集会・第 35 回) 3月. 日本大学. 藤沢 (2013)

Tsunaki Asano, “Immune inducible factors in the cuticle of the silkworm, *Bombyx mori*”, In Physiology Session 2 “Immunology”, International Congress of Entomology. 8月. 大邱. 韓国 (2012)

Tsunaki Asano “Laccase activation in ecdysis process”, In Symposium “Insect Cuticle”. International Congress of Entomology. 8 月. 大邱. 韓国 (2012)

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

朝野 維起 (Asano Tsunaki)
首都大学東京・理工学研究科・助教
研究者番号: 40347266