

平成 30 年 6 月 4 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(A) (一般)

研究期間：2013～2016

課題番号：25252023

研究課題名(和文) 昆虫ステロイドホルモン産生器官におけるステロイド取り込み・輸送の時空間的制御機構

研究課題名(英文) Spatio-temporal regulatory mechanisms of steroid uptake and transport in insect steroid hormone producing organs.

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) 35,700,000円

研究成果の概要(和文)：昆虫ステロイドホルモン産生器官である前胸腺では、前駆物質であるコレステロールおよび7-デヒドロコレステロールが発育に伴い増加することがLC-MS/MS分析の結果分かった。また、ステロイド類の多変量解析の結果を他の組織と比較したところ、前胸腺は他の組織とは異なるステロイド特性を持つことが示された。さらに、ステロイド輸送タンパク質であるリポフォリンおよび抱合コレステロールの局在解析からも前胸腺に特有なステロイド取り込み機構があることが支持された。さらに、前胸腺においてリポフォリンからのステロイド取り込みに関わる分子と思われるスカベンジャーレセプターをひとつ同定することができた。

研究成果の概要(英文)：LC-MS/MS analyses showed that cholesterol and 7-dehydrocholesterol increased with developmental growth in the prothoracic glands where the insect steroid hormone, ecdysone, was produced. The results of multivariate analysis of steroids compared with other tissues showed that the prothoracic glands have different steroid profiling from other tissues. Furthermore, the localization analyses of lipophorin, a steroid transport lipoprotein, and cholesterol also supported the existence of a steroid uptake mechanism unique to the prothoracic glands. We also could identify one scavenger receptor which might be a molecule involved in steroid uptake from lipophorin in the prothoracic glands.

研究分野：分子認識化学

キーワード：ステロイド コレステロール 前胸腺 カイコ

1. 研究開始当初の背景

我々はこれまで、昆虫の脱皮・変態の内分泌制御機構の解明を目指して、ステロイドホルモンである脱皮ホルモン(エクジソン)合成・分泌器官である前胸腺に注目し、エクジソン生合成を促進する前胸腺刺激ホルモン(PTTH)をはじめとする神経ペプチド類の同定や、エクジソン生合成酵素ならびに生合成経路を世界に先駆けて明らかにしてきた。その研究過程で、前胸腺細胞におけるステロイドの取り込みもエクジソンの生合成・分泌に極めて重要であることが分かってきた。

昆虫はステロイド骨格を合成するスクアレン環化酵素を欠くため、エクジソンの原料となるステロイドは全て食餌中のステロイドに由来する。そのため、脱皮や変態に十分なエクジソンを合成するためには、前もって食餌から吸収したステロイドを前胸腺へ輸送し、効率的に取り込み貯蔵しておく必要がある。しかしながら、食餌由来のステロイドの輸送に血液中のリポフォリン(Lp)と呼ばれるリポタンパク質(哺乳類のLDLに相当)が関わることは分かっているものの、リポフォリンが前胸腺細胞でどのような分子に受容され、さらにどのような機構でステロイドが取り込まれているのか、またどのような状態で貯蔵されているのか不明な点が多かった。これまで、Lpの受容体として一回膜貫通型の受容体であるリポフォリン受容体(LpR)が同定され、LpがLpRと複合体を作った後、インターナリゼーションによって細胞に取り込まれるとのモデルが提唱されていた。しかしながら、LpRノックアウトショウジョウバエが正常に発育・生存できることからこのモデルだけでは説明できない、別のステロイド取り込み機構が昆虫細胞には存在することが示唆されていた。

2. 研究の目的

本研究では、エクジソン合成のために大量のステロイドの取り込みが必要であると考えられる前胸腺に注目し、食餌から吸収したステロイドがいかなる機構で、前胸腺に取り込まれ、輸送、貯蔵されるのかを物質レベルで解明することを目的とした。そのために、(1)前胸腺に含まれるステロイド類の発育に伴う変動、(2)標識ステロイドを用いた取り込み機構の解析、(3)取り込みに関わるLpR以外のリポフォリン受容体の解明、の3点を中心に研究を進め、ステロイドホルモン産生細胞へのステロイドの取り込み・輸送・貯蔵機構について新たな知見を得ることを目指した。

3. 研究の方法

以下、研究成果の項目に合わせて研究の方法を記載する。

(1)前胸腺に含まれるステロイド類の発育に伴う変動

ステロイド類の定量には LC-MS/MS を用

いた。分析条件等は、植物ステロールについては F. Igarashi et al. *Anal. Biochem.*, 419, 123-132 (2011)、エクジステロイド類については J. Hikiba et al. *J. Chromatography B*, 915-916, 52-56 (2013) に従った。カイコは終齢の5齢0日から蛹化(5齢10日目)までを用い、前胸腺とともに、脳、中腸、脂肪体(肝臓に相当)、マルピーギ管(腎臓に相当)を対象に経時的なステロイド量の変化を LC-MS/MS を用いて解析した。また、得られたデータは多変量解析(主成分分析)および組織・血液中のステロイド総和に占めるコレステロールの割合(コレステロールインデックス)を算出し、それぞれの組織のステロイド特性を可視化した。

(2)標識ステロイドを用いた取り込み機構の解析

F. Igarashiet al. *Steroids*, 134, 110-116 (2018) に記載した通りであるが、以下簡潔に方法を記載する。

5 齢のカイコから血液を採取し、超遠心を用いてリポフォリンを調整した。得られたリポフォリンは蛍光物質(Alexa546)を用いてラベル化し、標識リポフォリン(Alexa546-リポフォリン)を調整した。また、リポフォリンに標識コレステロールを抱合させるため、リポフォリン溶液に 22-NBD-コレステロールもしくは重水素ラベルで標識した cholesterol-25,26,26,26,27,27,27-d7 (コレステロール-d7)を添加して異なる温度、振盪条件でインキュベートし、標識コレステロールを含むリポフォリンを得る条件を検討した。超遠心を用いて回収したリポフォリンに標識コレステロールが含まれるか否かは、LC-MS/MS を用いて確認した。

リポフォリンおよびコレステロールの局在解析には、Alexa546-リポフォリンに 22-NBD-コレステロールを抱合させたものを用いた。5 齢のカイコから得た前胸腺、脳、脂肪体およびマルピーギ管を標識コレステロールの存在下で培養し、細胞内への取り込みの様子を共焦点顕微鏡を用いて観察した。また、リポフォリン由来のコレステロールがエクジソン生合成に利用されるか否かを検証するために、コレステロール-d7 を含むリポフォリンを用い、リポフォリン存在下で前胸腺を培養後、培地、および組織に含まれる標識コレステロール、エクジソン生合成中間体およびエクジソンを LC-MS/MS により測定した。

また、エクジソン生合成を正に制御する前胸腺刺激ホルモン(PTTH)を標識リポフォリンとともに添加し、コレステロールの取り込みおよびエクジソン生合成活性への影響を解析した。

(3)取り込みに関わる LpR 以外のリポフォリン受容体の探索

5 齢 8 日目のカイコ組織(脳、前胸腺、脂

肪体、マルピーギ管を含む主要な組織)からcDNAを合成し、PCR法を用いて各組織におけるスカベンジャー受容体(SR-B1)遺伝子群の発現を解析した。発育に伴う遺伝子発現量の変動については、5歳4日目と5歳8日目の脳および前胸腺での遺伝子発現量を比較した。

また、コレステロールの取り込み活性の検証には、カイコ卵巣由来のBmN細胞を用いた。SR-B1₁₂を発現させたBmN細胞に、カイコ体液から精製したリポフォリンを添加して培養し、細胞内および培地中のコレステロール量をLC-MS/MSで定量することでコレステロールの取り込み活性を評価した。

4. 研究成果

(1) 前胸腺に含まれるステロイド類の発育に伴う変動

前胸腺に存在するコレステロールをはじめとするステロイド類の発育に伴う変動をLC-MS/MSで定量分析した。その結果、終齢である5齢期においてコレステロールの増加は発育に伴って徐々に増加していた。また、エクジソン生合成の中間体と考えられている7-デヒドロコレステロール(7dC)もエクジソン生合成に先立ち緩やかに上昇し、蛹脱皮後も上昇を続けることが明らかとなった。

一方、血液中にはコレステロールが高濃度で存在し、さらに少量ではあるが様々な植物ステロイドも含まれていた。これらの植物ステロイド濃度は摂食期よりも摂食を停止する終齢期後半に濃度が増加していた。前胸腺の対照組織として用いた脂肪体やマルピーギ管などの組織では血液中のコレステロール量および植物ステロールの増加のタイミングが血液中の濃度上昇と同じタイミングであり、血液中の濃度上昇に伴い取り込み量が増加すると考えられる。ところが、前胸腺では血液中のステロイド濃度の変動とは異なっていた。また、前胸腺内のコレステロール量は他の組織より常に高いことも明らかになった。したがって、前胸腺には組織特有のコレステロール取り込み機構が存在すると考えられる。

また、すべての組織におけるステロイド類について、主成分分析を行って組織間のステロイド特性を解析した。上記のように、コレステロールおよび植物ステロール量は発育に伴って変動するものの、ステロイドの質的なバランスは脳を除いては発育時期による違いが少なく、組織のステロイド特性は組織ごとに異なっていることが明らかになった。また、脳については、摂食期間と摂食終了後(ワンダリング期以降)でステロイド組成が異なることも明らかになった。一方、コレステロールインデックス(コレステロール量/測定ステロイド量の総和)を用いて、組織と血液のステロイドバランスを比較したところ、脂肪体およびマルピーギ管は血液とのコレステロールインデックスに有意差がなく、

一方で前胸腺および脳は血液よりも有意に高いコレステロールインデックスを示した。したがって、前胸腺(および脳)はリポフォリンからのステロイド取り込み活性が高く、特にコレステロールを選択的に取り込み貯蔵すると考えられる。

また、興味深いことに血液中からは前胸腺で生合成されるエクジソンと20-ヒドロキシエクジソンの他に、エクジソンの中間体である7-デヒドロコレステロール(7dC)が検出された。また、7dCの血液中濃度はエクジソン生合成期である吐糸期に上昇していた。このことから、前胸腺で7dCがコレステロールから合成され、血液中に分泌されていると考えられる。7dCが血液中に存在することを見いだしたのは本研究が初めてであり、7dCがエクジソンの生合成中間体以外の機能があることを示唆するもので、今後血液中の7dCの機能解析を進める予定である。

(2) 標識ステロイドを用いた取り込み機構の解析

リポフォリンを介した前胸腺へのコレステロールの取り込み機構を解析するために、タンパク質をAlex546で蛍光標識したリポフォリンならびに蛍光標識したコレステロール(22-NBD-コレステロール)を抱合させた標識リポフォリンを作製するための条件検討を行った。その結果、リポフォリンを低温(4°C)で静置する条件下において、タンパク質ならびにコレステロールをそれぞれ別の蛍光標識したリポフォリンの作製に成功した。

これらの標識化合物を用いて、前胸腺での取り込みを観察したところ、NBD-コレステロールのシグナルは細胞内に幅広く観察されたのに対して、Alex546-リポフォリンのシグナルは前胸腺の細胞膜や細胞間隙に強く観察された。一方、対照組織として用いた脳では両方のシグナルが細胞内で強く、脂肪体ではNBD-コレステロールのシグナルは細胞内ではほとんど観察されず、Alex546-リポフォリンのシグナルは細胞膜近くで観察された。マルピーギ管では両シグナルともほとんど観察されなかった。これらの結果は、リポフォリンに含まれるコレステロールの取り込み機構が各組織で異なることを示している。これは、(1)で述べた、各組織のステロイド量を主成分分析で解析した結果とも一致する。前胸腺でのコレステロール取り込みは、リポフォリンが受容体に結合後、インターナリゼーションにより受容体とともに細胞内に取り込まれると一般的に考えられていたが、別の機構が存在することを想定する必要があることを示している。

また、前胸腺に取り込まれたコレステロールが実際にエクジソン生合成に利用されるか否かについて、重水素でラベルしたコレステロール(コレステロール-d7)を抱合したリポフォリンを用いてコレステロールの代謝

を LC-MS/MS を用いて解析した。その結果、培養液から 7-デヒドロコレステロール-d7 およびエクジソン-d6 が検出された。エクジソン-d6 は、エクジソン生合成時の酵素反応によって 25 位の重水素がヒドロキシ化することで生じたと考えられる。さらに、エクジソン-d6 の産生量は前胸腺刺激ホルモン (PTTH) 添加によって増加した。これらの結果からリポフォリンに抱合されたコレステロールは前胸腺へ取り込まれ、エクジソン生合成に利用されることがわかった。この結果からも標識ステロイドを抱合させたりポフォリンが生理的に作用することを確認することができた。また、前胸腺のエクジソン生合成を促進する PTTH が生合成のみならず、原料であるステロイドの取り込みも促進する作用があることは興味深い。PTTH の生理作用 (前胸腺におけるシグナル伝達経路を含む) を調べる上で重要な知見になると思われる。

(3) ステロイド取り込みに関わる LpR 以外のリポフォリン受容体の探索

リポフォリンを介したステロイド取り込みに必要な因子の再探索を行った。スカベンジャー受容体 (SR-B1) がリポフォリンの受容体となり得る可能性からスカベンジャー受容体の探索を試みた。項目 (1) の結果から、脳および前胸腺でコレステロールの要求量が高く、効率の良い取り込み機構があると考えられたため、両組織で発現がみられる SR-B1 を探索した結果、15 種あるカイコ SR-B1 のうち、3 および 12 が脳・前胸腺で発現していることを見いだした。両受容体ともに摂食期よりも終齢期後半に発現量が高くエクジステロイド生合成能の増加と一致するため、コレステロール取り込みに必要な受容体である可能性が高い。そこで、昆虫培養細胞系を用いたコレステロール取り込み活性を検証したところ、12 にコレステロールの取り込みを促進する傾向があることがわかった。今後、さらに詳細な検討を行っていく予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 4 件)

F. Igarashi, M. H. Ogihara, M. Iga and H. Kataoka. Cholesterol internalization and metabolism in insect prothoracic gland, a steroidogenic organ, via lipoproteins. *Steroids*, 査読有, 134, 110-116 (2018). doi: 10.1016/j.steroids.2018.01.012.

T. Nakaoka, M. Iga, T. Yamada, I. Koujima, M. Takeshima, X. Zhou, Y. Suzuki, M. H. Ogiwara and H. Kataoka. Deep sequencing of the prothoracic gland transcriptome reveals new player in insect ecdysteroidogenesis. *PLoS ONE*, 査読有, 12, e0172951 (2017). doi:

10.1371/journal.pone.0172951.

S. Enya, T. Daimon, F. Igarashi, H. Kataoka, M. Uchibori, H. Sezutsu, T. Shinoda and R. Niwa. *noppera-bo* encodes the glutathione S-transferase GSTe7 that is involved in ecdysteroid biosynthesis in the silkworm *Bombyx mori*. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 査読有, 61, 1-7 (2015). doi: 10.1016/j.ibmb.2015.04.001.

S. Enya, T. Ameku, F. Igarashi, M. Iga, H. Kataoka, T. Shinoda and R. Niwa. Halloween gene *noppera-bo* encodes a glutathione S-transferase essential for ecdysteroid biosynthesis via regulating the behaviour of cholesterol in *Drosophila*. *Sci. Rep.*, 査読有, 4, e6586 (2014). doi: 10.1038/srep06586.

〔学会発表〕(計 4 件)

竹島実加・荻原麻理・片岡宏誌「昆虫におけるステロイドバランス維持システムの解明」(ポスター発表)、2017 年度生命科学系学会合同年次大会、2017 年 12 月 5 日-9 日、神戸ポートアイランド(兵庫県神戸市)

竹島実加・山下雄佑・荻原麻理・片岡宏誌「エクジステロイド生合成組織へのコレステロール供給機構の解明」(ポスター発表)、第 61 回日本応用動物昆虫学会大会、2017 年 3 月 27 日-29 日、東京農工大学小金井キャンパス(東京都小金井市)

荻原麻理・竹島実加・Taylor, DeMar, 片岡宏誌「マダニのステロイドホルモン産生組織におけるコレステロール取り込み機構の解明」第 76 回日本昆虫学会、第 60 回日本応用動物昆虫学会合同大会、2016 年 3 月 26 日-9 日、大阪府立大学(大阪府堺市)

竹島実加・荻原麻理・片岡宏誌「カイコ *Bombyx mori* におけるリポタンパク質受容体を介したコレステロール取り込みに関わる分子の探索」第 76 回日本昆虫学会、第 60 回日本応用動物昆虫学会合同大会、2016 年 3 月 26 日-9 日、大阪府立大学(大阪府堺市)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計 0 件)

○取得状況(計 0 件)

〔その他〕 ホームページ等

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

(4)研究協力者
荻原 麻理 (OGIHARA, Mari)
学術振興会 RPD 特別研究員