

令和 3 年 5 月 31 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18H02143

研究課題名(和文) 網羅的エクジステロイド分析によるカイコ胚期のエクジステロイド生合成機構の解明

研究課題名(英文) Elucidation of ecdysteroidogenesis during embryonic development of the silkworm by comprehensive ecdysteroid analysis.

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) 13,500,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、カイコ胚発生期でみられる貯蔵型エクジステロイドの量的変動と各生合成酵素を定量的に解析し、カイコで認められる卵休眠の内分泌系による制御メカニズムを明らかにすることを旨とした。申請期間中では、エクジステロイドの貯蔵型であるリン酸化抱合体のLC-MS/MSを用いた定量系を確立し、エクジステロイドの生合成酵素および代謝酵素の胚発生期の発現変動解析および胚発生期での機能解析を行った。これらから、活性型エクジソンの産生メカニズムには、胚発生期には貯蔵型エクジステロイドからつくられる経路と、コレステロールから生合成される経路の二つの経路が異なるタイミングで作用していることが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究で着目したリン酸抱合体エクジステロイドに関する研究は、園部教授らの退官とともに途絶えた経緯がある。リン酸抱合体が胚発生期に重要だと分かっているにもかかわらず、リン酸抱合体を定量的に扱えないのが研究開始当初の状況であった。しかし、LC-MS/MSによるリン酸抱合体の定量系を確立したため、未解決であった胚発生・胚休眠でのリン酸抱合体の役割にアプローチすることが可能になった。また、休眠における20E生合成停止機構に関する研究はほとんど進んでいなかったが、胚発生期に異なる2つの20Eの産生経路が分かったことから、休眠の分子メカニズムを解明する上で世界に一步リードした成果が得られたと考えている。

研究成果の概要(英文)：In the current study, we analyzed the quantitative fluctuations of the storage form of ecdysteroids and the transcriptional alteration of various biosynthetic enzymes during the embryogenesis of the silkworm *Bombyx mori*. We aimed basically to elucidate the molecular mechanisms of endocrine regulation for the diapause in insects. We have successfully progressed two significant issues; (1) establishment of a quantitative method of the phosphorylated conjugates of ecdysteroid, a storage type of ecdysteroid using LC-MS/MS, and (2) analyses of transcriptional changes of ecdysteroid biosynthetic enzymes and metabolic enzymes throughout embryogenesis. Together, data have indicated that two distinctive 20E biosynthetic pathways, from the storage form of ecdysteroid and a biosynthetic pathway from cholesterol, could eventually produce the three differently timed 20E peaks during embryogenesis.

研究分野：分子認識化学

キーワード：昆虫 胚発生 エクジステロイド LC-MS/MS リン酸化エクジステロイド

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

エクジステロイドは、昆虫のステロイドホルモンであり、脱皮・変態のみならず、胚発生を進行させるために重要である。活性型エクジソン (20E) の生合成は、2 経路あることが知られている。一つ目は、母性由来のエクジステロイドの生合成経路であり、主に 22 位の水酸基がリン酸化されている貯蔵型のエクジステロイドから、脱リン酸化酵素(EPPase)で脱リン酸化することにより作られる胚発生前でみられる経路である。もう一つは、通常の幼虫期で認められている 20E の生合成であり、複数の酵素によりコレステロールからエクジソン、さらに 20E に変換される。

カイコは季節応答として計画的に胚期で発生を停止する「休眠」が認められる。休眠に入ると、卵中では 20E が検出されなくなる。これまで、カイコの休眠卵では EPPase の活性が低いことから、カイコの胚では貯蔵型 20E が脱リン酸化されることによって 20E が生合成されると考えられてきた。実際に、胚中の 20E 量は胚発生の経過とともに変動し、その変動によって胚発育が進行すると考えられているため、20E 生合成に依存して胚発育が進行すると示唆されていた。一方で、カイコの胚発生においてコレステロールから 20E に変換されるエクジソン生合成の主経路が働くか否かは不明であった。この主経路の生合成酵素の機能解析を行う過程で、エクジステロイド生合成酵素(CYP307A1)のノックアウト(KO)システムを作製したところ、胚発生中期で発生が停止することは研究開始前に既に見出していた。また、通常の休眠胚は発生初期で発生が停止する時期と、CYP307A1 の KO システムの発育停止期とは異なっていることも見出していた。これらのことから、カイコ胚期では差時的に貯蔵型エクジステロイドの脱リン酸化の経路と主経路とを使い分けるメカニズムがあるという仮説を立てた。このような異なるタイミングで 2 つの 20E 産生経路を詳細に研究した例はなく、胚期における各経路の活性化時期や活性化を制御するシステムはほとんど不明なままであった。

2. 研究の目的

本研究課題では、カイコを用いて胚発生に伴う貯蔵型エクジソンであるエクジソンリン酸抱合体を含めたエクジステロイド類の動態を定量的および定性的に網羅的な解析をすることを目的とした。このことにより、胚発生段階が時間的に正確に進行するために必要と考えられる、2 つの異なる 20E 生合成経路『20E 生合成 Dual system』がどのように制御しているかを解明するため分子機構の基盤を作る。

3. 研究の方法

- (1) エクジステロイドおよび各種ステロール類の網羅的分析
申請者が確立した LC-MS/MS (MRM) を用いた網羅的ステロール化合物分析法にて行った。
- (2) エクジステロイドリン酸抱合体の同定と分析法の確立
カイコの胚発生初期段階の卵中からエクジステロイドリン酸抱合体を抽出し、陰イオン交換カラムを用いた HPLC により精製した。
- (3) 各種酵素の発現解析
カイコ卵の各胚発生段階の RNA を抽出し定量的 PCR にてエクジステロイドの生合成酵素遺伝子および貯蔵型エクジステロイドの代謝生合成酵素遺伝子の発現量を分析した。
- (4) RNA 干渉法による生合成遺伝子のノックダウン調製
標的遺伝子をコードした二本鎖 RNA を調製し、胚発生初期段階のカイコの卵にマイクロインジェクションした。定量的 PCR にて発現量の低下を確認した。
- (5) 胚発生段階の観察
卵をチオニン染色することにより胚形態を顕微鏡下で観察した。

4. 研究成果

本申請研究は、カイコの胚発生期で認められている貯蔵型および活性型のエクジステロイドの量的な変動とその変動を担う各種酵素群の消長を定量的に解析することを目指した。申請期間中の成果としては大きく 2 つに分類される。すなわち、(1) エクジステロイドの貯蔵型であるリン酸抱合体の定量系の確立、と(2) エクジステロイドの生合成酵素および代謝酵素の胚発生期の変動解析およびその機能解析、である。それぞれを以下に記す。

(1) エクジステロイドの貯蔵型であるリン酸抱合体の定量分析系の確立

(1) - (定量系の確立);

まず、リン酸抱合体のエクジステロイドの標品が入手できなかったため、天然から得られるエクジステロイドリン酸抱合体を LC-MS/MS にて同定することを試みた。その結果、カイコ胚発生時の卵抽出物中からアルカリフォスファターゼ処理後に 20E が検出されるようになった。このステロイド分析結果から、エクジステロイドのリン酸抱合体を LC-MS/MS にて間接的に同定することができた。さらに、直接的な LC-MS/MS による定量系を構築することを試みた。しかし、標準品が購入できないため、カイコ卵より標準品を入手することとした。粗抽出後、数段階の陰イオン交換カラムを用いた HPLC にて精製し、リン酸抱合体の標準品を得ることができた。これを用いて各種条件検討を行った。

その結果、LC-MS/MS 分析では、エクジステロイドリン酸抱合体の分子質量の計算値と一致するイオンピーク ($[M-H]^-$) が検出できた。そのイオンピークをプリカーサーイオンとして、さらに MS/MS によりプロダクトイオンを検出した結果、リン酸基に由来する質量電荷比 78.8 (HPO_3^-)、97.0 ($H_3PO_4^-$) のイオンが検出されたため、これらをもとに MRM で検出する条件を検討すれば、さらに簡便にリン酸抱合体エクジステロイドが定量できると期待される。

(1) - (エクジステロイドリン酸抱合体の胚発生前期の量的な変動解析);

上述の (1) - の解析法の前半で用いたアルカリフォスファターゼを使った定量系により、カイコの胚発生前期の卵中のエクジステロイドを定量分析結果から判断すると、胚発生前初期にリン酸抱合体が脱リン酸化されていることが分かった。また、カイコ非休眠卵を産卵直後から 96 時間後まで 6 時間毎にサンプリングし、エクジステロイド量を分析したところ、活性型エクジステロイドである 20E の量は産卵直後、産卵 42-54 時間後、産卵 78-96 時間後の 3 つの時期で高い値を示した。また、20E リン酸抱合体の量は産卵 24 時間後から減少した。

(1) - (考察);

これまでの研究によると、エクジステロイド生合成酵素の欠損変異体では胚発生前中期から後期にかけて発生が停止することが分かっている。このことと、本研究でのリン酸抱合体の量的な変動解析結果から、カイコでは胚発生前初期では貯蔵型のエクジステロイドが脱リン酸化に依存し 20E が産生され、胚発生前中期から後期にかけては胚自身が発現した生合成酵素群を用いてコレステロールを出発材料としてエクジステロイドが生合成されることが考えられた。すなわち、胚発生で利用されるエクジステロイド、特に活性型エクジソンである 20E は、胚発生前期の各段階で 20E の生合成経路を使い分けて産生されることが分かった。

(2) カイコ胚発生前期の各種エクジステロイド生合成酵素の発現変動解析

(2) - (各種生合成酵素遺伝子の定量的変動解析);

胚発生前期における 7 種類のエクジステロイド生合成酵素遺伝子 (コレステロールから 20E までの生合成酵素遺伝子) およびエクジステロイド脱リン酸化酵素 (EPPase) 遺伝子の発現変動を経時的に定量的 PCR で解析した。その結果、EPPase は産卵後 24 時間から 48 時間までの特定の期間で発現量が増加した。一方、エクジステロイドの各生合成酵素は一部を除いて産卵後 48 時間以降で高い発現量となった。(1) の成果をもとに作成した胚発生前期のエクジステロイド量の変動のマスタータイムテーブル (産卵後 96 時間まで) と、各種遺伝子の発現量と、チオニン染色による胚発生段階の形態観察とを照らし合わせたところ、20E の産生経路は、EPPase 依存的なものとエクジステロイド生合成の主経路の 2 つの経路が用いられていることが確認できた。

(2) - (エクジステロイド活性化時期の特定);

産卵後 24 時間毎のカイコ非休眠卵破砕液を酵素液として、コレステロールから 20E までのエクジステロイド生合成経路の中間体 (ケトジオール又はエクジソン) の変換を検討した。酵素反応による生成物 (ケトトリオール又は 20E) を LC-MS/MS により定量した結果、生合成酵素 (Phantom 又は Shade) の酵素活性は、産卵 24 時間後には認められなかったが、48 から 72 時間後には上昇することが観察された。

(2) - (RNA 干渉法を用いたエクジステロイド脱リン酸化酵素 (EPPase) 遺伝子のノックダウンによる影響);

EPPase の胚発生前期の機能解析をするため、CRISPR/Cas9 により EPPase のノックアウト系統カイコの作出を試みたが、系統樹立には至らなかった。そこで、RNA 干渉法により遺伝子ノックダウンを試みた。二本鎖 RNA を産卵直後の非休眠卵に注入することにより EPPase をノックダウンしたところ、卵中の 20E 含有量が減少した。また、EPPase のノックダウンによって産卵後およそ 30 時間で認められる胚発生イベントの遅延が認められた。さらに、エクジステロイド生合成酵素 (Shade) をノックダウンしたところ、産卵後 78 時間前後で胚発生の遅延が起こった。

(2) - (考察);

カイコの胚発生過程における EPPase とエクジステロイド生合成酵素の遺伝子発現変動の定量的な解析結果と、EPPase と Shade のノックダウンにより発生遅延が生じた結果は、EPPase が産卵後 30 時間までの胚発生初期に活性化することや、後期にはエクジステロイドの生合成遺伝子が活性化する(1)の成果と整合性が取れる。また、胚発生期において 20E レベルが三つのピークとして認められる現象は、これらの酵素によるものであることを間接的に示すことができた。さらに、形態形成の観察から、カイコ胚発生初期では、20E を介して、へら形期から上唇突起発生期の胚発生を促進すると考えられた。

(3) 総合的な考察

本申請研究により、エクジステロイドのリン酸抱合体の定量的な解析ができるようになった。また、母性由来の 20E とコレステロールから生合成される 20E の二つの経路が異なるタイミングで活性化され、正常な胚発生が進行することが分かった。また、この胚発生期に認められる 20E の生合成の Dual system のうち、休眠の制御には、EPPase による 20E の量的な制御が重要であることが再確認できた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Takeshima Mika, Ogihara Mari H., Kataoka Hiroshi	4. 巻 20
2. 論文標題 Sterol Characteristics in Silkworm Brain and Various Tissues Characterized by Precise Sterol Profiling Using LC-MS/MS	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 4840 ~ 4840
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms20194840	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 Fujinaga Daiki, Gu Junjie, Kawahara Hajime, Ogihara Mari H., Kojima Ikumi, Takeshima Mika, Kataoka Hiroshi	4. 巻 127
2. 論文標題 Twenty-hydroxyecdysone produced by dephosphorylation and ecdysteroidogenesis regulates early embryonic development in the silkworm, <i>Bombyx mori</i>	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Insect Biochemistry and Molecular Biology	6. 最初と最後の頁 103491 ~ 103491
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ibmb.2020.103491	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 -

〔学会発表〕 計0件

〔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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------