

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 4月23日現在

機関番号：13301

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2009～2011

課題番号：21380035

研究課題名（和文）遺伝子発現を介さないエクジソンの分子作用機構

研究課題名（英文）Molecular mechanism of non-genomic action of ecdysone

研究代表者

桜井 勝（SAKURAI SHO）

金沢大学・副学長

研究者番号：80143874

研究成果の概要（和文）：エクジソンは核受容体に結合し遺伝子発現を調節することにより、その作用を示すとされてきた。一方、核受容体を介さないであろう作用も知られており、この作用から細胞膜に組み込まれた膜受容体の存在が示唆されてきた。カイコガを用いた薬理学的実験結果から、この膜受容体はGタンパク質共役受容体の一であることが示唆され、その下流には、小胞体から放出されるCa²⁺をセカンドメッセンジャーとして、カスパーゼ系を活性化し、細胞死に至ることが示された。また、エクジソンによるカイコガ絹糸腺細胞死は、絹糸腺内に存在するグルコースオキシダーゼにより生成する過酸化水素の調節下にあることを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：Although it is generally accepted that ecdysone exerts its effects through binding with nuclear ecdysone receptor, other receptor on plasma membrane acts as a ecdysone receptor (mEcR) that mediates ecdysone action without gene expression (non-genomic action). mEcR is suggested pharmacologically to be G protein-coupled receptor (GPCR). The activated GPCR activates the signal transduction pathway, which culminates caspase 3-like protease activation and induces cell death. In addition, we showed that ecdysone action against cell death was regulated non-endocrinologically. Anterior silk glands contain glucose oxidase that mediates production of hydrogen peroxide (H₂O₂), and H₂O₂ suppresses the ecdysone action, i. e., progression of cell death.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	5,900,000	1,770,000	7,670,000
2010 年度	4,500,000	1,350,000	5,850,000
2011 年度	3,800,000	1,140,000	4,940,000
年度			
年度			
総計	14,200,000	4,260,000	18,460,000

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, カイコガ, 絹糸腺, 細胞死, グルコース, オキシダーゼ, 膜受容体

1. 研究開始当初の背景

吐糸期にあるカイコガ終齢幼虫の前部絹

糸腺は、20-ヒドロキシエクジソン (20E) により細胞死が誘導される。20Eの分子作用は、核受容体との結合から始まり、初期応答遺伝

子の発現を介してその作用を示す (genomic 作用)。ショウジョウバエの唾液腺は 20E に応答して細胞死を起こし、これまでこの細胞死を利用して 20E の genomic 作用が明らかにされ、数種の初期遺伝子の階層的発現調節が知られている。この初期遺伝子の下流には、death gene と呼ばれる細胞死の誘導に垂直的に関わる後期遺伝子が存在している。細胞死の最終段階では、核と DNA を断片化する酵素の活性化に関わるカスパーゼ 3 が活性化される。カイコガ前部絹糸腺の 20E 誘導性細胞死においても、ショウジョウバエの唾液腺の細胞死とほぼ同一の 20E による genomic 作用による初期遺伝子応答がみられる。一方、研究代表者の研究室では、これまでの 20E の分子作用の研究から、20E は一連のシグナル伝達系を活性化することにより、genomic 作用と相まって、前部絹糸腺の細胞死を完了させることを明らかにしてきた。したがって、20E の作用を理解するには non-genomic な視点が不可欠であり、これ無くしては、20E 作用の全体像は見えないといえる。

20E 作用のうち、genomic 作用は 18 時間以内に完了するが、non-genomic 作用は 72 時間にわたり作動し、この間シグナル伝達系が順次活性化され、細胞死の完了に必要な因子の活性化が完了する。また、吐糸期前日までの前部絹糸腺は細胞死抑制因子を分泌し、早期の細胞死を抑制している。このことから、研究代表者らは 20E による前部絹糸腺の細胞死が、20E のみならず前部絹糸腺自らが分泌する因子により調節されていることを示唆してきた。

このような背景のもとに、genomic と non-genomic 作用の統合の上に 20E に対する細胞応答を理解するという、新しい視点からの研究を着想するに至った。

2. 研究の目的

本研究の目的は、昆虫にとどまらず広く脊椎動物のステロイドホルモンの分子作用の理解を深めるため、genomic と non-genomic 作用の統合の上に細胞応答を理解することにある。

カイコガ前部絹糸腺は、20E により genomic と non-genomic の両方の経路で細胞死が進行し、かつ、*in vitro* でその全過程を追うことが出来る稀有な系である。加えて、前部絹糸腺自らが分泌する因子の作用により細胞死が調節されている。

これまで、細胞死のみならず、昆虫の変態に際して 20E により誘導される細胞増殖や形

体分化などにおいても、20E の non-genomic 作用があるものと予想されている。すなわち、本研究は昆虫の種々の組織での 20E 作用の分子機構を理解する上で、新たな視点を与えるものであり、加えて、前部絹糸腺での 20E 作用の分子機構の解明は、単に昆虫にとどまらず、グルココルチコイドのようなステロイドホルモン作動性細胞死の理解や、ひいては他のステロイドホルモン作用の分子機構に新たな世界を開くものと期待される。

3. 研究の方法

(1) 20E 膜受容体 (mEcR)

膜不透過性のステロイドホルモン誘導体として、20E の 25 位 OH にかえて 26 位が OH であるイノコステロンを使用した。さらに、イノコステロンの 26 位にアルブミンを結合した標品を調製し、活性測定に用いた。

G タンパク質共役受容体 (GPCR) の保存配列に着目したプライマーのデザインや作成は通常の方法により、PCR 法ははじめすべての分子生物学的手法は汎用されている方法を用いた。

(2) 細胞死抑制因子

細胞死抑制因子を精製・単離するため、前部絹糸腺組織および絹糸腺培養上清を出発材料とし、2つのアプローチをとった。1つは抑制因子が低分子物質であることを予想したアプローチで、硫安沈殿、メタノール抽出の通常の生化学方法により粗抽出した。粗抽出物より、さらに HPCL にて精製した。精製物は、マススペクトラム、NMR 等の通常の低分子構造決定の方法を用いて構造を決定した。

他方、細胞死抑制活性をもつタンパク性の物質の精製・単離には、培養上清を用い、熱処理、ゲルろ過クロマトグラフィー、30kDa 限外濾過、Mono Q カラム、Superdex 200 によるゲル濾過を用いた。これらはすべて通常の分離方法により行った。SDS-PAGE (6%) も汎用されている方法を用いた。MALDI-TOF MS 分析は、金沢大学学際科学実験センターに委託し解析した。

細胞死阻害活性は前部絹糸腺の 20E 誘導性細胞死のスコアリングシステムの阻害活性により、GOD の活性測定と活性染色は、 σ -dianisidine の酸化反応により行った。生化学的、分子生物学的手法は定法を用いた。

(3) シグナル伝達系に関わる因子

阻害剤による薬理学的実験は、薬理学実験で汎用される方法により、昆虫細胞に対して毒性を与えない濃度で行った。前部絹糸腺の培養は、グレース昆虫培養液を用いて、研究代表者が確立した論文発表済みの方法により行った。

4. 研究成果

(1) 20E 膜受容体

イノコステロンは 20E と同等の生理活性を有する。イノコステロンを標準標品として、膜不透過性のステロイドホルモン誘導体であるイノコステロン-アルブミン抱合体の活性を調べたところ、genomic 作用は示さないが、non-genomic 作用を示した。しかし、この標品は極めて水難溶性で、定量的研究には使いにくいので、Alexa 488 のような分子量の比較的大きな蛍光色素をイノコステロンに結合し、水溶性ではあるが膜不透過性のエクジステロイド誘導体の開発が必要と判断された。現在、この誘導体の合成には至っていない。

GPCR に共役する $G\alpha$ サブユニットの阻害剤を用いて予備実験を行ったところ、mEcR は GPCR であることが示唆された。また、小胞体 IP3 受容体阻害剤、phospholipase C 阻害剤は、いずれも 20E の non-genomic 作用を阻害したことから、mEcR は GPCR であると予想できた。これらの情報を手がかりとして、GPCR の保存配列に着目しプライマーを作成し、逆転写 PCR 法による mEcR の遺伝子クローニングを試みたが単離には至っていない。

(2) 細胞死抑制因子

カイコガ幼虫前部絹糸腺は、吐糸期前日までの前部絹糸腺は細胞死抑制因子を分泌し、早期の細胞死を抑制している。この抑制因子の精製を行い、同定することに成功した。5 齢摂食期の前部絹糸腺を培養した培養液を回収し、これを培養上清として用い、20E を加えて V7 幼虫の前部絹糸腺を培養すると、V7 の前部絹糸腺の予定細胞死は起こらなかった。そこで、この予定細胞死抑制因子の特性を調べるために培養上清に熱処理、タンパク質分解酵素処理、有機溶媒処理を行ったところタンパク性の物質と非タンパク性の物質の両者が細胞死抑制活性をもつことが示唆された。

このうち、細胞死抑制活性をもつ非タンパク性の物質の単離・精製には至らなかったため、次にタンパク性の物質に着目し、特性を

調べた。この物質は 60°C の熱処理、タンパク質分解酵素であるトリプシンやプロテイナーゼ K による処理、30% メタノール処理で活性を失い、ゲルろ過クロマトグラフィーによる推定分子量では約 440kDa~669kDa を示した。そこで、30kDa 限外濾過、Mono Q カラム、Superdex 200 によるゲル濾過後、6% SDS-PAGE により約 80kDa のバンドを得、MALDI-TOF MS 分析を行った。得られた配列は、グルコース酸化酵素のアミノ酸配列と部分的に一致した。

次に、コウジカビ GOD 標品と GOD の基質であるグルコースを除いた培養液を用いた実験などから、細胞死抑制因子は GOD であり、GOD の反応産物である過酸化水素が直接細胞死を抑制していることを示した。しかし、大量発現系によりカイコガ・GOD 標品を得、予定細胞死の抑制活性を検討するには至らなかった。

GOD の変態時における生理学的意義を探るため、絹糸腺や繭での GOD の活性染色を行った。結果、GOD が吐糸期に絹糸と共に前部絹糸腺より繭の表層に吐き捨てられることを明らかにした (図 1)。



図 1. GOD は吐糸期に絹糸と共に前部絹糸腺より繭の表層に吐き捨てられることが示された。

このことは、前部絹糸腺において、抑制因子である GOD を喪失し、体内エクジステロイド濃度が上昇することにより細胞死が進行し、絹糸腺の崩壊が生じることが示唆された。これまで吐糸のための単なる管と考えられていた前部絹糸腺が GOD を保持することで細胞死を自己制御している可能性、吐糸行動が環境適応のために繭を作るだけではなく、前部絹糸腺という幼虫特異的組織を予定細胞死により速やかに崩壊・除去するためにも重要な行動である可能性が示された (図 2)。この研究成果は、論文掲載雑誌 (FEBS Journal) で高く評価され、表紙に絹糸腺や繭での GOD の活性染色結果が掲載された。

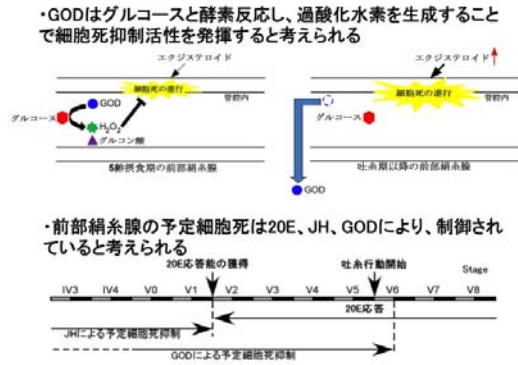


図2. 前部絹糸腺では、細胞死抑制因子であるGODを喪失し、体内エクジステロイド濃度が上昇することにより細胞死が進行し、絹糸腺の崩壊が生じる。

このように本研究は、当初想定しなかった因子の同定に進んだが、最終年度は、この因子の影響を排除した培養環境下で、前部絹糸腺の20E応答能を再検討し、予定細胞死のコミットメントを誘導する機構について再検証した。すなわち、蛹コミットメントにおける幼若ホルモンの関与の有無について検証した。結果、*in vitro*で培養した5齢2日幼虫、4齢3日にアラタ体を摘出した幼虫の前部絹糸腺の細胞死は進行せず、5齢2日以前の予定細胞死進行は幼若ホルモンにより抑制されていることが示唆された。

以上より、細胞死抑制因子の活性が低い時期の前部絹糸腺は幼若ホルモンにより抑制され、死のコミットメントも蛹コミットメント同様、幼若ホルモンにより制御されていることが明らかとなった。

(3) シグナル伝達系に関わる因子

mEcRはGPCRである可能性が強く示唆されていたので、GPCR下流のシグナル伝達系にありうる基本的な因子の阻害剤を用いて、関与する因子を薬理学的方法で予測した結果、以下(図2)のシグナル伝達系の存在を示唆した。

これらの結果から、前部絹糸腺の細胞死における20Eの分子作用は、genomic作用、non-genomic作用、それに自己分泌因子による20Eの作用の抑制という、少なくとも3つの異なる系から構成されて初めて細胞死が進行することが示唆された。さらに、種々のアゴニストやアンタゴニストを用いてのnon-genomicな作用に関わる因子の探索結果から、non-genomicな作用は、genomicな作用に少なからず影響を与えることも示され、相互作

用の帰結として細胞死が誘導される事も示された。

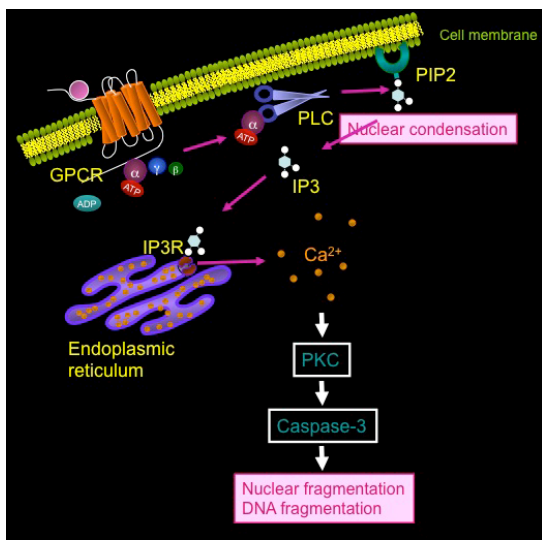


図2. 膜受容体を解したシグナル伝達系。PKC: protein kinase C, PLC: phospholipase C, α :G protein α subunit, $\beta\gamma$:G protein $\beta\gamma$ subunit, cAMP: cyclic AMP, PIP2: phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate, IP3: Inositol trisphosphate, IP3R: IP3 receptor, Nuclear condensation: 核凝縮, Nuclear fragmentation: 核断片化, DNA fragmentation: DNA断片化。

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6件)

- ① Kaneko, Y., Yasanga, T., Suzuki, M., Sakurai, S., Larval fat body cells die during the early pupal stage in the frame of metamorphosis remodeling in *Bombyx mori*. Journal of Insect Physiology, 57(2011), 1715-1722, 査読有
- ② Suzuki, T., Sakurai, S., Iwami, M., Steroidal regulation of hydrolyzing activity of the dietary carbohydrates in the silkworm, *Bombyx mori*, Journal of Insect Physiology, 57(2011), 1282-1289, 査読有
- ③ Matsui, H., Kakei, M., Iwami, M., Sakurai, S., Glucose oxidase prevents programmed cell death of the silkworm anterior silk gland through hydrogen peroxide production, FEBS Journal, 278(2011), 776-785, 査読有
- ④ Iga, M., Manaboon, M., Matsui, H., Sakurai, S., Ca^{2+} -PKC-caspase 3-like

protease pathway mediates DNA and nuclear fragmentation in ecdysteroid-induced programmed cell death, *Molecular and Cellular Endocrinology*, 321(2010), 146-151, 査読有

- ⑤ Suzuki, T., Sakurai, S., Iwami, M., Physiological requirements for 20-hydroxyecdysone-induced rectal sac distention in the pupa of the silkworm, *Bombyx mori*, *Journal of Insect Physiology*, 56(2010), 673-677, 査読有
- ⑥ Manaboon, M., Iga, M., Iwami, M., Sakurai, S., Intercellular mobilization of Ca^{2+} by the insect steroid hormone 20-hydroxyecdysone during programmed cell death in the silkworm anterior silk glands. *Journal of Insect Physiology*, 55(2009), 122-128, 査読有

[学会発表] (計7件)

- ① 鈴木匠, 桜井勝, 岩見雅史, エクジステロイドによる糖分解酵素活性の制御, 日本分子生物学会第11回春季シンポジウム, 2011年5月26日, 石川県立音楽堂(石川県)
- ② 松井洋人, 掛井基徳, 桜井勝, 岩見雅史, Glucose oxidase は *in vitro* におけるカイコガ前部絹糸腺の予定細胞死を抑制する, 日本分子生物学会第33回年会, 2010年12月9日, 神戸国際会議場(兵庫県)
- ③ 松井洋人, 掛井基徳, 桜井勝, 岩見雅史, カイコガ幼虫前部絹糸腺に存在する予定細胞死抑制因子の実体, 日本動物学会第81回大会, 2010年9月25日, 東京大学教養部(東京都)
- ④ Matsui, H., Kakei, M., Iwami, M., Sakurai, S., Control of the timing of 20E-induced programmed cell death by a protein factor in *Bombyx* anterior silk gland, 18th International Ecdysone Workshop, 2010年7月21日, Biology Center, Czech Academy of Sciences (Czech)
- ⑤ Iga, M., Manaboon, M., Sakurai, S., Intracellular signaling of an insect steroid hormone, 20-hydroxyecdysone, in the silkworm, *Bombyx mori*, The 6th Intercongress Symposium of the Asia and Oceania Society for Comparative Endocrinology, 2010年1月20日, Massey University (New Zealand)
- ⑥ 松井洋人, 掛井基徳, 桜井勝, 岩見雅史, カイコガ幼虫前部絹糸腺の予定細胞死を抑制するタンパク性物質の性質と精製,

日本分子生物学会第32回年会, 2009年12月9日, パシフィコ横浜(神奈川県)

- ⑦ 松井洋人, 掛井基徳, 桜井勝, 岩見雅史, カイコガ幼虫前部絹糸腺の予定細胞死を抑制するタンパク性因子の性質, 日本動物学会第80回大会, 2009年9月19日, グランシップ(静岡県)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

桜井 勝 (SAKURAI SHO)
金沢大学・副学長
研究者番号: 80143874

(2) 研究分担者

岩見 雅史 (IWAMI MASAFUMI)
金沢大学・自然システム学系・教授
研究者番号: 40193768

(3) 連携研究者

藤本 善徳 (FUJIMOTO YOSHINORI)
東京工業大学・理工学研究科・教授
研究者番号: 50173472