

平成 30 年 6 月 8 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H04611

研究課題名(和文) プロスタグランジンは新たな昆虫成長制御因子となるか？

研究課題名(英文) Does prostaglandin become the insect growth control factor?

研究代表者

山本 幸治 (Yamamoto, Koji)

九州大学・農学研究院・助教

研究者番号：00346834

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究課題では、昆虫プロスタグランジン(PG)の役割を解明する。申請者はすでに昆虫由来PGE合成酵素(PGES)の全体構造と機能について終了しているが、新たに昆虫由来PGD合成酵素(PGDS)を発見した。本研究課題では、PGESのノックアウト昆虫を作製し、PGDSの構造と機能解析を通して昆虫PGの役割を明らかにする。PGES遺伝子をゲノム編集TALENによりノックアウトした。ノックアウト個体中のPGは質量分析装置により検出されなかった。この結果は、PGESのノックインによるものと推察された。PGDSの全体構造を解析したところ、8個のアミノ酸残基がPGDS活性に重要であることが示された。

研究成果の概要(英文)： Knowledge on role and synthesis of prostaglandins (PGs) in insect are limited. PGE synthase (PGES) and PGD synthase (PGDS) were already identified, and three-dimensional structure of PGES was determined.

In this study, we examined physiological role of PG by using genome-editing, TALEN, and X-ray analysis. In knock-out mutant of PGES, PG was not present by using mass-spectrometry. Since we were interested in composition of the active sites in PGDS, we determined crystal structure of PGDS. Based on the PGDS structure and site-directed mutagenesis, we identified the amino acid residues (Tyr8, Lue14, Trp39, Lys43, Gln50, Val51, Gln63, and Ser64) involved in catalytic function.

研究分野：応用昆虫

キーワード：プロスタグランジン プロスタグランジン合成酵素

1. 研究開始当初の背景

哺乳類のプロスタグランジン (PG) は、その構造をもとに A から J 群まで分類されている。申請者は、昆虫由来の PGD 合成酵素 (PGDS) ならびに PGE 合成酵素 (PGES) を同定し、PGES の構造と機能解析を行っている。昆虫における PG の代謝・合成に関する研究は少ない。両酵素の生理機能について調べることは、昆虫 PG 合成への理解へとつながる。

2. 研究の目的

本研究において、PGDS の基質反応様式、阻害機構そして立体構造解析など構造機能相関を調査する。さらには、PGES のノックアウトカイコを作製し、本酵素の役割について調査する。以下にあげる項目を本研究の主たる目的とする。

(1) PGDS を結晶化し、PGDS の立体構造を決定する。基質結合に重要なアミノ酸残基を同定する。

(2) PGDS の基質反応様式を調べるとともに、部位特異的アミノ酸置換法により活性発現に重要なアミノ酸残基について調べる。

(3) ゲノム編集技術を用いて PGES のノックアウトカイコを作製して、カイコ体内における PGES ならびに PGE の挙動を調査する。

3. 研究の方法

本課題の研究方法を以下に述べる。

(1) PGDS の構造解析

結晶化は、sitting-drop 蒸気拡散法により行った。PGDS 単独、グルタチオン-PGDS そして基質-PGDS 複合体の結晶化条件を検索した。得られた結晶を用いて、SPring8 (シンクロトロン放射光施設) において X 線回折データを収集した。分子置換法により位相を決定し、全体構造を解析した。

(2) PGDS の機能解析

PGD 合成活性は、 $[^{14}\text{C}]$ PGH を基質とし薄層クロマトグラフィーにより測定した。PGDS の基質特異性、すなわち PGD の分解・代謝に与える影響を調査し、酵素反応速度論的に解析した。また、部位特異的アミノ酸置換法により PGDS 変異体を作製し、アミノ酸変異が基質類の分解・代謝に与える影響を検討した。

(3) PGES ノックアウトカイコの作製

ゲノム編集技術 TALEN により、PGES ノックアウトカイコを作製する。本ノックアウト

カイコを用いて、カイコの形態学的変化を観察するとともに、PGES ならびに PGE の体内動態について解析することを目的とした。

4. 研究成果

(1) PGDS の構造解析

大腸菌を用いた組換え PGDS 作製法を確立した。PGDS 組換えタンパク質を陰イオン交換クロマトグラフィーそしてゲル濾過クロマトグラフィーを用いて電気泳動的に均一に精製する方法を構築した。精製 PGDS を用いて活性を測定したところ、本酵素はグルタチオン (GSH) 存在下にて PGH から PGD を合成する反応を触媒した。一方、PGH から PGE ならびに PGF の合成は認められなかった。

グルタチオン-PGDS 複合体結晶を取得し、分解能 2.2 オングストロームの回折強度データを得た。PGDS はホモダイマーを形成していた。各モノマーは、9 本のアルファヘリックスならびに 4 本のベータストランドより構成されていた。グルタチオン結合サイトを詳細に分析したところ、Tyr8, Leu14, Trp39, Lys43, Gln50, Val51, Gln63, Ser64 により本サイトは構成されていることが明らかとなった。

PGDS 単独、そして基質-PGDS 複合体の結晶はまだ得られていない。そこで、共結晶そしてソーキング法を用いて複合体結晶作製を試みたが、当該結晶を得ることはできなかった。

(2) PGDS の機能解析

上記のアミノ酸残基をそれぞれ部位特異的アミノ酸置換法により Ala に変異した。各酵素変異体が大腸菌にて発現し、精製した。活性に与える影響を検討した結果、これらの残基は、グルタチオンが結合した際に生じるプロトンリレーに関与していることが示唆された。

既知の GST 構造との重ね合わせにより、新たに 4 アミノ酸残基が基質結合部位として PGDS 構造中に高く保存されていることを見出した。

(3) PGES ノックアウトカイコの作製

PGES 遺伝子を標的としてゲノム編集技術 TALEN により、PGES 遺伝子ノックアウトカイコ作製に成功した。質量分析計を用いて、このノックアウトカイコ個体中において PG を検出することはできなかった。これは、PGES 遺伝子のノックアウトによるものと推察された。

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 13 件)

- (1) Hirowatari A, Chen Z, Mita K, Yamamoto K, Enzymatic characterization of two epsilon-class glutathione S-transferases of *Spodoptera litura*, Archives of Insect Biochemistry & Physiology, e21443, 2017 (査読あり)
- (2) Cheng T, Wu J, Wu Y, Chilukuri R, Huang L, Yamamoto K, Mita K (31 名を省略, 研究代表者は 6 番目), Wide distribution of a major East Asian noctuid pest explained by genomic adaptation to polyphagy and insecticides. Nature Ecology & Evolution, 1 (11), 1747-1756, 2017 (査読あり)
- (3) Yamamoto K, Higashiura A, Suzuki M., Aritake K, Urade Y, Nakagawa A, Molecular structure of a prostaglandin D synthase requiring glutathione from the brown planthopper, *Nilaparvata lugens*. Biochem Biophys Res Comm, 492, 166-171, 2017 (査読あり)
- (4) Yamamoto K, Ozakiya Y, Uno T, Localization of an aldo-keto reductase (AKR2E4) in the silkworm *Bombyx mori* (Lepidoptera: Bombycidae). J Insect Sci, 17 (5), 1-3, 2017 (査読あり)
- (5) Yamamoto K, Nagaoka S, Identification and localization of a novel ecdysone oxidase in the silkworm, *Bombyx mori*. J Insect Biotechnol Sericol, 86 (2), 49-53, 2017 (査読あり)
- (6) Tsubota T, Tomita S, Uchino K, Kimoto M, Takiya S, Kajiwara H, Yamazaki T, Sezutsu H, A Hox gene, Antennapedia, regulates expression of multiple major silk protein genes in the silkworm *Bombyx mori*. J Biol Chem, 291(13), 7087-7096, 2016 (査読あり)
- (7) Hirowatari A, Nagaoka S, Yamada N, Yamamoto K, Identifying a sigma class glutathione Stransferase 2 from the silkworm *Bombyx mori*. J Insect Biotechnol Sericol, 86 (1), 1-7, 2016 (査読あり)
- (8) Yamamoto K, Hirowatari A, Shiotsuki T, Yamada N, Biochemical characterization of an unclassified glutathione S-transferase of *Plutella xylostella*, J Pestic Sci, 41(4), 145-151, 2016 (査読あり)
- (9) Yamamoto K, Yamada N, Identification of a diazinon-metabolizing glutathione transferase in the silkworm, *Bombyx mori*. Sci Rep, 6, 30073, 2016 (査読あり)
- (10) Miyazaki N, Higashiura A, Higashiura T, Akita F, Hibino H, Omura T, Nakagawa A, Iwasaki K, Electron microscopic imaging revealed the flexible filamentous structure of the cell attachment protein P2 of Rice dwarf virus located around the icosahedral fivefold axes. J Biochem, 159(2), 181-190, 2016 (査読あり)
- (11) Yamamoto K, Higashiura A, Suzuki M, Shiotsuki T, Sugahara R, Fujii T, Nakagawa A, Structural characterization of an aldo-keto reductase (AKR2E5) from the silkworm *Bombyx mori*. Biochem Biophys Res Comm, 474, 104-110, 2015 (査読あり)
- (12) Yamamoto K, Higashiura A, Hossain MDT, Yamada N, Shiotsuki T, Nakagawa A, Structural characterization of the catalytic site of a *Nilaparvata lugens* delta-class glutathione transferase. Arch Biochem Biophys, 566C, 36-42, 2015 (査読あり)
- (13) Yamamoto K, Liu MC, Identification and characterization of a different type of cytosolic sulfotransferase of the silkworm, *Bombyx mori*. J Insect Biotechnol Sericol, 84 (3), 63-68, 2015(査読あり)

[学会発表] (計 9 件)

- (1) Haque M, Hirowatari A, Furuya S, Yamamoto K, Identification and characterization of the 5, 10- Methylene- tetrahydrofolate

dehydrogenase from silkworm (*Bombyx mori*),
2017 AFELISA, 2017 年 11 月 7 日, 福岡

(2) 山本幸治, 広渡愛子, 東浦彰史, 中川淳史,
セリン・グリシン合成に關与するカイコ・
5,10-メチレンテトラヒドロ葉酸デヒドロゲ
ナーゼの構造と機能, 平成 29 年度蚕糸・昆虫
機能利用学術講演会, 2017 年 3 月 21 日, つく
ば

(3) Yamamoto K, Function and crystal structure
of a *Bombyx mori* Omega-class glutathione
transferase, 2016 International Congress of
Entomology, 2016 年 9 月 25 日, フロリダ (ア
メリカ)

(4) Yamamoto K, Higashiura A, Suzuki M,
Nakagawa A, Identification, characterization, and
crystal structure of catalytic mechanism of
Bombyx mori prostaglandin E synthase, The
Fifth International Conference on Cofactors &
Active Enzyme Molecule 2016, 2016 年 9 月 5 日,
富山

(5) 山本幸治, 山田直隆, diazinon を代謝する
カイコ・グルタチオン転移酵素の機能解析,
第 41 回日本農薬学会, 2016 年 3 月 17 日, 松
江

(6) 山本幸治, 山田 直隆, カイコ由来
unclassified グルタチオン転移酵素 2 の機能解
析, 平成 28 年度蚕糸・昆虫機能利用学術講演
会, 2016 年 3 月 16 日, 京都

(7) Yamamoto K, 昆虫フェロモンを代謝する
アルドケト還元酵素の X 線結晶構造解析, 第
39 回 蛋白質と酵素の構造と機能に関する九
州シンポジウム, 2015 年 9 月 10 日, 別府

(8) 山本幸治, 鈴木守, 東浦彰史, 中川敦史,
カイコ由来 omega-class グルタチオン転移酵
素の X 線結晶構造解析, 生化学会九州支部,
2015 年 5 月 16 日, 福岡

(9) Yamamoto K, Wilson DK, Crystal structure
of an aldo-keto reductase with
3-dehydroecdysone reductase activity from the
silkworm, *Bombyx mori*, The 4th Asia-Pacific

Congress of Sericulture and Insect Biotechnology,
2015 年 4 月 24 日, Pusan (Korea)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

名称 :
発明者 :
権利者 :
種類 :
番号 :
出願年月日 :
国内外の別 :

○取得状況 (計 0 件)

名称 :
発明者 :
権利者 :
種類 :
番号 :
取得年月日 :
国内外の別 :

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山本 幸治 (YAMAMOTO, Kohji)
九州大学・大学院農学研究院・助教
研究者番号 : 00346834

(2) 研究分担者

坪田 拓也 (TSUBOTA, Takuya)
国立研究開発法人農業食品産業技術総
合研究機構・生物機能利用研究部門・主
任研究員
研究者番号 : 00612772

有竹 浩介 (ARITAKE, Kosuke)
第一薬科大学・薬学部・教授
研究者番号 : 70390804

東浦 彰史 (HIGASHIURA, Akifumi)
広島大学・医歯薬保健学研究科・助教
研究者番号 : 90598129

(3) 連携研究者
該当ありません

(4) 研究協力者
該当ありません