

令和元年6月5日現在

機関番号：22604

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K07796

研究課題名(和文) 昆虫外骨格中でおきるToll経路を介した新規情報伝達

研究課題名(英文) Toll-mediated signal transduction in insect cuticle

研究代表者

朝野 維起 (Asano, Tsunaki)

首都大学東京・理学研究科・助教

研究者番号：40347266

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：昆虫の外骨格はキチンやキチン結合性タンパク質を主な成分とするマトリクスである。昆虫の外骨格中に存在するセリンプロテアーゼ前駆体が活性化され、外骨格成分を分解する事によって遊離する分子が、外骨格の傷などの状況を体内に知らせるためのシグナルになるのではないかと仮説を検証中である。プロテアーゼの活性化を人工的に制御するためのin-vitro系を開発した他に、それを利用してプロテアーゼによって分解された断片がどのような変化を生体内に与えるのかを調べるためのシステム開発につながる知見が得られた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまで、体外からの異物に対する応答反応として、Toll経路やImd経路などが盛んに研究されてきた。これに加えて、内在性の因子によって活性化するシグナル系が傷などの物理的変化の認識に関わるものとして注目されている。本研究は外骨格という位置情報を内包したシグナル分子の生成に関する新しい仮説を検証しようとするものである。シグナルを受け取った細胞内の反応に関わる分子経路など、広く保存されている可能性も考えられる。そのため、我々人間にも通じる仕組みの発見に寄与するのではないかと考えられる。

研究成果の概要(英文)：Insect cuticle is a matrix composed of chitin fiber and chitin-binding proteins. A serine protease in the cuticular matrix is present as an inactive precursor, but is activated by stimuli like injury or invasion of pathogens. Inside the cuticle, the activated protease degrades specifically a cuticular component, and the fragments can be signal molecules to send signals that epithelial barrier is broken and the substances outside can go into body cavity. The main purpose of this study is to reveal the biological meanings of this phenomenon. The in-vitro system to control activation of the protease has been established, which can contribute to the further analyses of this potential signaling mechanisms in insect cuticle.

研究分野：昆虫生化学・遺伝学

キーワード：昆虫外骨格 免疫

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

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。外骨格は骨格として力学的に体の形状や運動を支える以外に、皮膚として体内の恒常性維持にはたらいており、水分の蒸発を防ぐ他に病原体など異物の侵入も防いでいる。外骨格の最外層にはワックス層があり、その下は水分を含むため生化学的な反応が盛んに生じている場所と言える。外骨格にはカビやバクテリアを認識する「異物認識」の機構や、抗菌物質を必要な時に蓄積する仕組みなどが存在する。これ以外にも、外骨格の傷害部位に病原が存在するとフェノール酸化酵素前駆体が活性化されることによって生じるメラニン合成や、外骨格を裏打ちする表皮細胞中でフェノール酸化酵素の基質合成系の活性化などが生じることが知られている。

昆虫の生体防御反応が進行する際に活性化される、一群のセリンプロテアーゼによって構成されるカスケード反応が様々な昆虫種で調べられている。これに関連し、カイコガに存在するセリンプロテアーゼの一種が活性を持たない前駆体のかたちで合成され、病原の存在下で活性化されるといった系が存在することが知られている。これは、自然免疫分野でよく知られている Toll 経路の中間に位置する因子で、この分子の活性化は昆虫の免疫応答に重要な役割を果たすプロセスだと考えられている。

2. 研究の目的

予備的な実験により、もともとはカイコガ血液から単離されていたプロテアーゼの前駆体が外骨格に高濃度に存在することや、活性化後のプロテアーゼが外骨格特有に存在するタンパク質を特異的に分解することが見出された。しかしながら、このセリンプロテアーゼが外骨格においてどのような機能を有するのかについて今まで研究されておらず、この現象はこれまでに報告がない全く新しい生物学的プロセスの発見につながる可能性が考えられた。カイコガやショウジョウバエなどを用いて、この現象が示す生物学的意義について明らかにすることが本研究の主たる目的である。このプロテアーゼによって断片化されるタンパク質は表皮特有の分子であることから、その分解物が傷口などから体腔内に入ってしまった場合に、「表皮が破れた」といった物理的傷害を伝えるシグナルになる可能性などが想定される。また、現在外骨格に関して調べられている種々の分子経路が、本研究で対象とする経路と様々に絡み合っている可能性を検証する必要もある。外骨格は節足動物である昆虫にとって欠かせない存在であり、外骨格の「ありよう」が昆虫の生き様に与える大きな影響は研究を進めるうえで重要な視点である。外骨格が担う「防御」的機能の広義な発揮という観点から、当該セリンプロテアーゼの系に加え、外骨格機能及び生理学全般に対する研究の進展が、本研究が対象とする生物学的プロセスの深い理解につながる。

3. 研究の方法

カイコガから得た cDNA を元にバキュロウイルスで合成した組み替えセリンプロテアーゼ (以下 SP とする) の前駆体を調製し、そこにカイコガ血液由来の体液成分及び酵母由来の成分であるザイモサン等を用いて活性化する。これは現在、SP を特異的に活性化するカスケード上流の酵素が同定されていないことから行われる措置である。この際、SP 前駆体が限定加水分解を受けることが知られている。活性型 SP をカイコガ幼虫外骨格から抽出したタンパク質混合液に加えると、低分子領域のキチン結合性タンパク質の一種が特異的に分解されることが観察される。この分解によって生じるペプチド断片が何らかの機能を有する可能性が考えられる。ペプチド断片の混合物などを血球に添加したりカイコガに注射したりした際の反応を調べる他、この遺伝子のノックアウトなども試みる。ショウジョウバエを用いた解析としては、当該プロテアーゼ遺伝子のノックダウンもしくは欠損変異体の作成及び解析の他に、後述する変異導入 SP とそれを人工的に活性化するプロテアーゼを組み合わせて導入することなどを試みる。また、Gal4-UAS システムを利用して外骨格タンパク質の断片を人為的に発現させるなどすることで、極力個体には触れずに、純粋にペプチド断片の存在が与える影響について調べることが可能になるのではないかとと思われる。

4. 研究成果

カイコガ由来の SP 前駆体が活性化される際に切断される部位に、哺乳動物で解析がなされている特異性の高いセリンプロテアーゼ (以下 TSP) が認識する配列を導入した。その結果、組み替え SP 前駆体を活性化する際に、TSP を用いることによってカイコガ由来の成分及び免疫反応を強力に誘導してしまう微生物成分などを使用する必要がなくなった。ここで得られた改変 SP を用いた外骨格成分の分解パターンが、元の SP に類似していることも確認できた。すなわち、カイコガ幼虫から得た外骨格タンパク質の中で特異的に分解さ

れる分子が、改変 SP 及び変異なし SP を用いた場合で同様だった。この系を利用することによって、病原に由来する微量な細胞壁成分の混入を極力抑えて、SP によって断片化されたペプチドのみの影響を観察しやすくなったと言える。また、このシステムはショウジョウバエなどでプロテアーゼを発現しつつ人工的に活性化する際にも有効と言える。通常、SP を活性化した状態で発現する目的で切断後切り離される部分を最初から除いた状態で発現することが行われる。この場合、前駆体全体を合成したものとフォールディング過程が異なることからコンホメーションが変わる可能性がある。そのため、酵素活性（基質特異性）などに大きく影響する可能性が考えられるが、これも最小限に抑えられる。カイコガにおいて SP のロックアウト系統確立には至っていないが、ショウジョウバエでは SP のコード領域を欠く変異体系統及びペプチド断片を発現するための系統は確立できており、これらを用いて蛍光ラベルした血球細胞の挙動などについて観察が可能となっている。ショウジョウバエ系統に関してタンパク質レベルでの発現を確認する必要性はあるものの、さしあたりカイコガの系でペプチド断片を病原体成分の影響を限りなく減じた状態で注入した際の血球細胞・脂肪体などの組織で生じる遺伝子発現プロファイル変化の取得が可能になったのではないかとと言える。また、外骨格硬化に関わる遺伝子の配列を利用して表皮特有の新規 GAL4 ドライバーの作出にも成功したことから、表皮組織近傍に限定して様々な遺伝子を発現・発現抑制することが可能となり、外骨格や表皮に起きる現象をかなり特異的に解析できるようになったのは大きい。当初想定していた低分子量外骨格タンパク質以外にも、SP で分解される可能性のある中程度分子量（50~60k）のタンパク質の存在もあることから、人工的に活性型 SP をショウジョウバエ体内で生じさせる系を用いて、SP 活性化の影響をもれなく観察できると言える。本研究が対象としているのは新しい生物学的プロセスであり、例えば外骨格タンパク質断片に対するレセプターの同定など、今後大きく研究が進展すると期待できるが、そのための基礎的部分は確立されたと言える。病原由来に加えて内因性因子に対する防御機構として、PAMPS、DAMPs 系の新しい知見につながればと考えている。

外骨格による生体防御反応の一つにメラニン合成が知られているが、この系で重要となるセリンプロテアーゼの一つであるフェノール酸化酵素前駆体活性化酵素のアミノ酸配列やドメイン構造は SP に極めて類似しており、メラニン合成系と Toll 経路とのクロストークなどもすでに報告されている。また、傷害・感染時に発現の上昇が見られる TH や DDC、ebony などの遺伝子は、メラニン合成に加えて外骨格の硬化に関わる基質の合成に重要である。傷害部位の外骨格が再硬化される可能性の是非はともかく、これらの遺伝子産物が生成する基質類の酸化についてはフェノール酸化酵素の他に、同じく含銅タンパク質であるラッカーゼの関与も考えられる。ちなみに、外骨格硬化に際してフェノール酸化酵素やラッカーゼに酸化され得る基質である NBAD は抗菌作用があることが知られている。NBAD は、元々は抗菌性の物質、あるいは芳香環構造による紫外線吸収など、表皮組織において恒常性維持に機能する分子として発達してきた可能性があるが、この基質がのちに外骨格の硬化に転用されるようになってきたとする仮説も立て得る。このような考えを含む形で、抗菌ペプチド合成に関わる Toll 経路の因子、異物認識分子、メラニン合成及び表層にある脂質なども加えつつ、表皮・外骨格の防御的役割の全体像に関する最新理解を総説としてまとめた。これに連動し、NBAD 等のカテコール類を利用した外骨格形成機構の進化が昆虫の進化に与えた影響について全くの新仮説を立てた。外骨格機能の充実は外敵・病原からの防御を含めて昆虫の生存や生息域拡大に大きく貢献してきたと考えられる。現在昆虫が独自に有している外骨格形成の分子機構は陸上環境への適応的進化だと考えているが、これについてメラニン合成といった免疫反応に関わる因子についての記述を含む総説を著して、それが昆虫分野の著名な英文査読誌に掲載受理された。その他、昆虫の表皮組織に関する英文書籍において、代表者が属する昆虫外骨格の生化学分野における幅広い最新知見を総説としてまとめた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計4件)

- 1、(総説・査読あり)Asano, T., Seto, Y., Hashimoto, K and Kurushima, H. (2019) Mini-review an insect specific system for terrestrialization: laccase-mediated cuticle formation. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 108: 61-70.
- 2、(総説)朝野維起(2017)「昆虫の陸上適応と昆虫独自の外骨格形成システム、及び応用へのヒント」月刊アグリバイオ 1(14)、86-89

- 3、(原著論文・査読あり) X. Quan, Y. Sato-Miyata, M. Tsuda, K. Muramatsu, T. Asano, S. Takeo, T. Aigaki. (2017) Deficiency of succinyl-CoA synthetase subunit delays development, impairs locomotor activity and reduces survival under starvation in *Drosophila*. *Biochem Biophys Res. Commun.* 483, 566-571.
- 4、(総説 朝野 維起(2015)「昆虫外骨格の生体防御」, *昆虫バイオテック*, 84(3), 181-194, 2015-12, 日本蚕糸学会

〔学会発表〕(計 6 件)

- 1、朝野維起(2018)「昆虫の飛翔にかかわる外骨格構造」日本応用昆虫動物学会第62回年次大会、3月、鹿児島
- 2、朝野維起(2018)「昆虫外骨格による広義の防御」日本応用昆虫動物学会第62回年次大会、小集会「昆虫免疫夜話(第4回)」3月、鹿児島
- 3、Asano Tsunaki (2016) Impact on laccase-mediated cuticle formation on evolution of insects. Joint event of 22nd International Congress of Zoology and 87th Meeting of Zoological Society of Japan, 11月、沖縄
- 4、朝野維起(2016)「ラッカーゼによる外骨格硬化」昆虫ワークショップ 2016、9月、箱根
- 5、朝野維起、相澤研介(2015)ラッカーゼ2遺伝子が昆虫進化に与えた影響およびラッカーゼ2の遺伝子構造、昆虫ポストゲノム研究会、10月、深浦
- 6、Asano Tsunaki (2015) Contribution of laccase2 system to differentiation from Crustacea to Insecta. 9月、ドレスデン

〔図書〕(計 2 件)

- 1、朝野 維起, 高橋 大輔(2019)「実験 27. カイコ体液のフェノール酸化酵素」 in *カイコの実験単(生物の科学, 遺伝別冊 No.23) エヌティーエス*
- 2、(著書・当該章のみ) Y. Arakane, M.-Y. Noh, T. Asano, K.J. Kramer. (2016) "Tyrosine Metabolism for Insect Cuticle Pigmentation and Sclerotization" in "Extracellular Composite Matrices in Arthropods", Springer, ISBN-10: 331940738

〔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

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。