

平成 21 年 3 月 31 日現在

研究種目：若手研究（スタートアップ）
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19870027
 研究課題名（和文） カイコ卵巣—卵系のエクジステロイド代謝に関する研究

研究課題名（英文）

研究代表者

伊藤 洋一 (ITOU YOUICHI)
 甲南大学・知的情報通信研究所・研究員
 研究者番号：70449867

研究成果の概要： 昆虫において胚発生時に卵巣由来のエクジステロイドが重要な役割を果たす。本研究はこの機構で働くエクジステロイドリン酸化・脱リン酸化酵素の解析を目的として行われた。その結果、カイコ卵巣におけるエクジステロイド合成酵素（シトクロム P450 酵素）およびリン酸化酵素の発現を明らかにし、エクジステロイドリン酸化・脱リン酸化酵素の立体構造、作用機構を予測した。成果は雑誌論文 5 件、学会発表 5 件により発表した。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,320,000	0	1,320,000
2008 年度	1,310,000	393,000	1,703,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,630,000	393,000	3,023,000

研究分野：比較内分泌

科研費の分科・細目：基礎生物学・形態・構造

キーワード：(1)カイコ (2)エクジステロイド (3)卵巣 (4)胚発生 (5)シトクロム P450
 (6)休眠 (7) X 線結晶構造解析 (8)レーザーマイクロダイセクション

1. 研究開始当初の背景

研究代表者の所属する甲南大学理工学部園部研究室ではカイコを材料として、(1)主要な脱皮ホルモンである 20-ヒドロキシエクジソン (20E) が胚発生の進行に必要であり、20E の欠損は胚発生の停止を導く (Makka et al., Arch. Insect Biochem. Physiol. 51, 111-20, 2002)、(2)20E は、卵巣由来のエクジステロイドリン酸抱合体の EPPase による脱リン酸化と卵でのエクジステロイドの de novo 合成により供給される、(3)胚発生時に

エクジステロイド脱リン酸化酵素 (EPPase) により脱リン酸化された場合は、非休眠卵として胚が発育するが、休眠卵では EPPase の発現が見られず発生は停止することを明らかにし (Yamada and Sonobe, J. Biol. Chem. 278, 26365-73, 2003)、(4)世界に先駆けエクジステロイドリン酸化酵素 (EcKinase)、EPPase をそれぞれ卵巣、卵から精製し、その遺伝子もクローニングした (Yamada and Sonobe, J. Biol. Chem. 278, 26365-73 2003, Sonobe et al, J. Biol. Chem. 281, 29513-29524, 2006)。また (5)de novo 合成

系の最終段階であるエクジソンから 20E への変換を触媒するエクジソン 20-水酸化酵素 (E200Hase) もクローニングが完了した (Accession No.: AB236417)。

以上のように、初期発生時のエクジステロイド代謝についてかなり解析が進んでいた。しかし (1) 卵巣発育期のいつ、どこでエクジステロイドが合成され、リン酸抱合化されるか、(2) 低温による休眠覚醒時のエクジステロイドの上昇のメカニズムに関してはまだ研究は進んでいない。私はこれらの問題を説明することを目的として研究を計画した。

2. 研究の目的

胚発生にエクジステロイドが関与することはショウジョウバエとカイコで最も良く研究されている。特にカイコはショウジョウバエではみられない胚休眠の調節を研究するには最適な材料である。本研究は、胚休眠の調節因子であるエクジステロイドの卵巣での合成と、胚休眠の覚醒に関連したエクジステロイドの上昇のメカニズムに関して解析する。またさらに、エクジステロイドのリン酸化・脱リン酸化がカイコ以外の脱皮動物 (Ecdysozoa: 節足動物、線形動物、緩歩動物など脱皮を伴う成長をする動物、Aguinaldo et al., *Nature* 387, 489-493, 1997) に適用できるかどうかを検証する事を計画した。具体的な研究テーマは以下の通りである。

(1) エクジステロイドリン酸抱合体蓄積機構の解析

カイコの卵巣は蛹期に発育する。発育中にエクジステロイドを合成し、リン酸化して蓄積すると考えられている。コレステロールから 20E の生合成を触媒する酵素群のうち、エクジソンから 20E への変換を触媒する E200Hase は園部研究室でクローニングを行った。また、EcKinase を卵巣から精製し、その遺伝子もクローニングした。卵巣内の卵母細胞は栄養細胞と共に 1 層の卵包皮膜細胞に囲まれている。卵巣のどこで、またどの発育段階でエクジステロイドの生合成とリン酸化を触媒する酵素が発現しているかを組織化学的に解析する。また発育中の卵巣の EcKinase の mRNA 発現量の定量的な解析を行う。

(2) 休眠覚醒時の EPPase および 20E de novo 合成系酵素の発現解析

エクジステロイドリン酸抱合体は卵巣で蓄積された後、卵に移行し、非休眠卵で胚発生時に脱リン酸化され胚発生を誘導する。一方、休眠卵では EPPase の発現が見られない。

休眠卵の低温による休眠覚醒時の EPPase の発現に関しては十分解析が進んでいない。休眠覚醒時のエクジステロイドの役割を明らかにするため、休眠卵を低温に置き、EPPase の発現を経時的に解析する。さらに、脱リン酸化の他に de novo 合成系が 20E の供給に重要であることが示唆されている。1 と同様に、20E の生合成系の律速酵素である E200Hase の発現およびその前段階の 3 種の酵素の低温処理による休眠覚醒時の発現を経時的に解析する。

(3) カイコ以外の脱皮動物の EcKinase の探索

EPPase、EcKinase は園部研究室で初めて単離精製され cDNA 配列が決定された酵素であり、カイコ以外の脱皮動物ではまだ同定されていない。私は、EPPase がヒスチジンホスファターゼスーパーファミリーに属し、ホスフォグリセレートムターゼとの構造が類似していること、またショウジョウバエ、線虫、ヒトにまで一部配列が類似する遺伝子が存在することを見いだした (伊藤洋一、比較内分泌学ニュース、122、17-23、2006)。同様に EcKinase は線虫コリンキナーゼと構造の類似性があることがわかった (Sonobe et al, *J. Biol. Chem.* 281, 29513-29524, 2006)。また、EcKinase と相同性のある機能不明の遺伝子がショウジョウバエや線虫に存在する。これら EcKinase と相同性を有する遺伝子を培養細胞に発現させ、エクジステロイドリン酸化活性を有するかを確認する。これによりステロイドのリン酸化がどの程度、生物種を越え存在するのかを明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 卵巣におけるエクジステロイドリン酸抱合体蓄積機構の解析

カイコの卵巣は約 400 個の卵母細胞を含んでおり、1 個の卵母細胞は 7 個の栄養細胞と 1 層の卵包皮膜細胞を備えており、蛹期に発育する。カイコ卵巣での EcKinase の発現時期と発現部位の特定を免疫染色により EcKinase タンパク質の検出、また逆転写 PCR とレーザーマイクロダイセクションを組み合わせる mRNA の検出を行った。また、発達に伴う mRNA 発現量の変動を Northern Blot により解析した。同時にコレステロールから 20E への生合成経路のうち、園部研究室で cDNA クローニングされた E200Hase をはじめ、既に明らかになっているシトクロム P450 酵素の mRNA の卵巣での発現時期、発現部位を EcKinase と同様に逆転写 PCR とレーザーマイクロダイセクションを組み合わせる mRNA の検出を行った。

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 5 件)

(1) Sonobe H, Ito Y. Phosphoconjugation and dephosphorylation reactions of steroid hormone in insects. *Molecular and Cellular Endocrinology*, in press. 査読有

(2) Ito Y, Sonobe H. The role of ecdysteroid 22-Kinase in the accumulation of ecdysteroids in ovary of silkworm *Bombyx mori*. *Annals of the New York Academy of Sciences*, in press. 査読有

(3) Ito Y, Yasuda A, Sonobe H. Synthesis and phosphorylation of ecdysteroids during ovarian development in the silkworm, *Bombyx mori*. *Zoological Science*, 2008. **25**: 721-727. 査読有

(4) 園部 治之、伊藤 洋一、「ステロイドホルモンの新しい活性調節系：エクジステロイドのリン酸化・脱リン酸化反応とその生理的意義」、*比較内分泌学*、2008、**34**: 54-69、査読無

(5) Maeda S, Nakashima A, Yamada R, Hara N, Fujimoto Y, Ito Y, Sonobe H. Molecular cloning of ecdysone 20-hydroxylase and expression pattern of the enzyme during embryonic development of silkworm *Bombyx mori*. *Comparative Biochemistry and Physiology. Part B*, 2008. **149**: 507-516. 査読有

[学会発表] (計 5 件)

(1) 伊藤 洋一、「カイコ卵巣におけるエクジステロイド合成およびリン酸化酵素の発現」、第33回日本比較内分泌学会大会、2008年12月6日、広島大学

(2) 伊藤 洋一、「カイコのエクジステロイドリン酸ホスファターゼの立体構造と反応機構の予測」、日本動物学会第79回大会、2008年9月5日、福岡大学

(3) Sonobe H, The role of ecdysteroid 22-Kinase in the accumulation of ecdysteroids in ovary of silkworm *Bombyx mori*. 24th Conference of European

Comparative Endocrinologists. Sep, 3, 2008. University of Genoa.

(4) Sonobe H, Molecular cloning of ecdysone 20-hydroxylase and expression pattern of the enzyme during embryonic development of silkworm *Bombyx mori*. The Sixth Congress of the Asia and Oceania Society for Comparative Endocrinology. Dec, 12, 2007. North Bengal University

(5) 伊藤 洋一、「発育中のカイコ卵巣のエクジステロイドリン酸化および合成酵素の発現解析」、日本動物学会第78回大会、2007年9月22日、弘前大学

6. 研究組織

(1) 研究代表者

伊藤 洋一

(甲南大学・知的情報通信研究所・研究員、70449867)

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者