

令和 4 年 6 月 22 日現在

機関番号：82111

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2021

課題番号：20K15533

研究課題名（和文）脱皮ホルモン不活性化関連遺伝子の機能解析と農薬スクリーニング系開発

研究課題名（英文）Functional analysis of genes related to molting hormone inactivation and development of insecticide screening system

研究代表者

内堀 美和 (Uchibori, Miwa)

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：80724856

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,100,000 円

研究成果の概要（和文）：チョウ目昆虫における脱皮ホルモンの不活性化制御機構の解明とその不活性化を攪乱する新たな昆虫成長制御剤のスクリーニング系開発を目的として研究を行った。カイコのP450遺伝子の一種であるCYP18A1をゲノム編集によりノックアウトした結果、胚発生の途中で致死したことからCYP18A1がチョウ目昆虫において脱皮ホルモンの不活性化に関わっており、正常な胚発生の進行に必須であることが示唆された。カイコのCYP18A1およびCytochrome P450 Reductaseを大腸菌に形質転換して発現させ、In vitroでの20E代謝活性を調査したが、CYP18A1の20Eの代謝は認められなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年、農業害虫の防除には、環境に安全性が高く、標的害虫が限定される昆虫成長制御剤が多用される傾向がある。しかし、チョウ目昆虫の本剤における抵抗性発達は著しく、新規作用点を標的とした薬剤開発の重要性が示唆されている。本研究では、P450の一種であるCYP18A1がチョウ目昆虫の20E不活性化経路に関わり、ノックアウトすることで成長を阻害することが明らかとなった。このことから、チョウ目昆虫のCYP18A1を新規の標的とした薬剤開発の可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：The purpose of this study was to elucidate the mechanism of regulation of molting hormone inactivation in lepidopteran insects and to develop a screening system for a new insect growth regulator that disturbs the inactivation. First, CYP18A1, a type of P450 gene in *Bombyx mori*, was knocked out by genome editing. As a result, the knockout silk moth died during embryogenesis. This result suggests that CYP18A1 is involved in the inactivation of molting hormone in lepidopteran insects and is essential for the progression of normal embryonic development. Next, the expression vector containing CYP18A1 and Cytochrome P450 Reductase was transformed into *Escherichia coli* to express each protein. The 20-hydroxyecdysone (20E) metabolic activity of CYP18A1 was investigated in vitro, but no metabolic activity was observed.

研究分野：応用昆虫学

キーワード：P450 TALEN 脱皮ホルモン不活性化経路

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

昆虫の脱皮、変態のタイミングは昆虫ホルモンの生合成、不活性化に伴う血中濃度や分泌時期が決定している。特に、脱皮ホルモンは胚発生、幼虫脱皮などの重要な生理活性を担うことから、脱皮ホルモン類縁体等の昆虫成長制御剤が普及している。しかし、複数の農業害虫で本剤に対する抵抗性発達が報告されており、新規作用点を標的とした薬剤開発の重要性が示唆されている。

キイロショウジョウバエでは、脱皮ホルモンの不活性化の一過程として、20-hydroxyecdysone (20E)の26位水酸化がP450の一種であるCYP18A1によって触媒されることが報告されている[Guittard et al., 2011]。一方、チョウ目昆虫のカイコではキイロショウジョウバエのホモログとしてCYP18A1とCYP18B1の2遺伝子がChromosome 10に座乗している[Ai et al., 2011]。CYP18A1は20Eによって発現誘導されるが、その機能は未知であり[Li et al., 2014]、現在までにチョウ目昆虫におけるCYP18A1およびCYP18B1の逆遺伝学的手法による機能解析は行われていない。キイロショウジョウバエで報告されている知見から、チョウ目昆虫においても脱皮ホルモンの不活性化にCYP18A1かCYP18B1のどちらかが関わり、新たな昆虫成長制御剤のターゲットになるのではないかと考え、以下の実験を実施した。

2. 研究の目的

本研究は、これまでにない新たな作用機構を持つ制御剤を開発するため、未知の脱皮ホルモンの不活性化経路に着目し、チョウ目昆虫を対象に脱皮ホルモンの不活性化制御機構の解明とその不活性化機構を攪乱する新たな昆虫成長制御剤のスクリーニング系の開発を目的とした。

3. 研究の方法

(1)ゲノム編集によるCYP18A1の機能解析

CYP18A1およびCYP18B1のexon 1領域を特異的に認識するようにTranscription activator-like effector nuclease (TALEN)を設計し、Golden Gate法により構築した。それぞれpBlueTALベクターに形質転換し、転写して得られたmRNAをカイコのpnd w-1系統にインジェクションした。インジェクションしたカイコを親系統と戻し交配し、次世代(G₁)を得た。G₁を兄妹交配し、次世代(G₂)を得た。G₁の遺伝子多型をgDNAのシーケンスにより決定し、2塩基欠失した変異型のCYP18A1遺伝子あるいはCYP18B1遺伝子を持つ系統を得た。それぞれG₂以降は、兄妹交配により維持し、人工飼料を用いて一頭体ずつ飼育し、発育日数や胚発生について調査した。各個体の遺伝子型は、発育調査後、gDNAのシーケンスにより決定した。

(2)CYP18A1の代謝活性試験

カイコのpnd w-1系統のcDNAを精製し、CYP18A1およびCytochrome P450 Reductase (CPR)の親水性領域をPCR増幅し、pET28aベクター(Novagen)、pET21aベクター(Novagen)にクローニングした。大腸菌OverExpress C41(DE3)に形質転換し、LB培地(グルコース、抗生物質(アンピシリンまたはカナマイシン))を用いて、37°C、16時間、前培養を行った後、TB培地(抗生物質(アンピシリンまたはカナマイシン)、CYP18A1の培養時は5-アミノレブリン酸、チアミン、クエン酸鉄を含む)を用いて37°C、2時間培養した。1M IPTGを添加し、25°Cで48時間培養した。培養した菌体はxTractor Buffer (Clontech)およびCapturem His-Tagged Purification Maxiprep Kit (TaKaRa)を用いて抽出、粗精製し、SDS-PAGEで目的の大きさのバンドを確認した。

50 mM リン酸バッファー(pH7.5)に粗精製したCYP18A1およびCPR、NADPH Regeneration System (Promega)、20Eを入れて、35°C、1時間反応させた。メタノールを入れて反応を停止し、上清の一部をLC/MSで分析した。

4. 研究成果

(1)ゲノム編集によるCYP18A1の機能解析

ゲノム編集により、変異型(2塩基欠失)の *CYP18A1* 遺伝子を持つノックアウトカイコ、変異型(2塩基欠失)の *CYP18B1* 遺伝子を持つノックアウトカイコをそれぞれ得た。変異型の *CYP18B1* 遺伝子を持つ個体は、親系統のカイコと比較して、幼虫期、前蛹期、蛹期の発育日数は同じであり、妊孕性も正常であった。一方、変異型の *CYP18A1* 遺伝子を持つ個体は、全て胚発生の途中で致死した。

CYP18A1 遺伝子の変異型($\Delta 2$)と正常型(wt)をヘテロに持つ個体同士を交配させ、卵の発育を調査した結果、点青期に致死する個体は、全て変異型の *CYP18A1* 遺伝子を持つ個体であった(Fig. 1)。また、点青期で致死した *CYP18A1* ノックアウト個体を解剖した結果、頭部のクチクラの硬化が不完全であることが確認された。

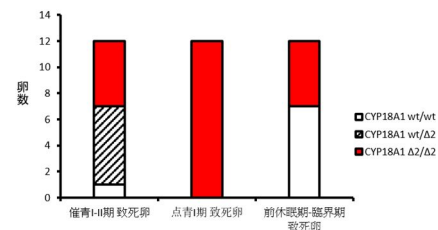


Fig. 1 致死卵の遺伝子型と卵数

(2) *CYP18A1* の代謝活性試験

カイコの *CYP18A1* と CPR を大腸菌を用いて発現させ、可溶性画分を SDS-PAGE を用いて解析した結果、それぞれ目的の分子量のタンパク質を得た(Fig. 2)。今回、発現させた両タンパク質は疎水性タンパク質であったが、膜貫通領域を除く領域を発現させることで、可溶化に成功した。粗精製した *CYP18A1* と CPR を 20E とともに反応させて、その代謝活性を調査したが、20E の代謝産物である 20,26-dihydroxyecdysone および 20-hydroxyecdysonic acid のピークが検出されず、*CYP18A1* の 20E 代謝活性は確認できなかった。

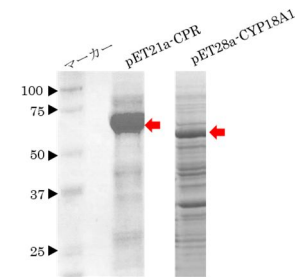


Fig. 2 各プラスミドを形質転換した大腸菌の可溶性画分のSDS-PAGE解析

以上の結果より、チョウ目昆虫において *CYP18A1* が正常な胚発生の進行に必須であり、その機能を阻害することで胚致死が誘導されることが示唆された。今回、技術的な難しさから、20E 代謝活性を持つ *CYP18A1* の発現、精製ができなかった。この技術的課題は、精製するタグ、発現する可溶性領域や可溶性領域のN末端側の配列を変えることで解決できる可能性がある。今後、*CYP18A1* を標的とすることで、その機能を阻害し、チョウ目昆虫の孵化を阻害する効果を持つ薬剤の探索が期待される。

[引用文献]

- Ai J, Zhu Y, Duan J, Yu Q, Zhang G, Wan F, Xiang ZH. (2011) Genome-wide analysis of cytochrome P450 monooxygenase genes in the silkworm, *Bombyx mori*. *Gene* 480:42-50.
- Guittard E, Blais C, Maria A, Parvy JP, Pasricha S, Lumb C, Lafont R, Daborn PJ, Dauphin-Villemant C. (2011) *CYP18A1*, a key enzyme of *Drosophila* steroid hormone inactivation, is essential for metamorphosis. *Dev Biol.* 349:35-45.
- Li Z, Ge X, Ling L, Zeng B, Xu J, Aslam AFM, You L, Palli SR, Huang Y, Tan A. (2014) *CYP18A1* regulates tissue-specific steroid hormone inactivation in *Bombyx mori*. *IBMB* 54:33-41.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔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
---------	---------