

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年 6月 5日現在

機関番号：13901
 研究種目：挑戦的萌芽研究
 研究期間：2011 ～ 2012
 課題番号：23658287
 研究課題名（和文）昆虫特異的シアル酸の発見と代謝経路の解明
 研究課題名（英文）Discovery of the insect-type sialic acid and its metabolic pathway
 研究代表者
 北島 健 (KITAJIMA KEN)
 名古屋大学・生物機能開発利用研究センター・教授
 研究者番号：80192558

研究成果の概要（和文）：

脊椎動物において共通にみられる通常のシアル酸は、実は昆虫には存在せず、むしろ昆虫型シアル酸というべきユニークな構造単位が存在するのではないかという仮説をたて、その検証に取り組んだ。ショウジョウバエの他、コクヌストモドキとガに着目して、昆虫型シアル酸の精製、構造解析、存在分布、代謝経路の解明をおこなった。その結果、昆虫型シアル酸というべき構造の存在が示された。この構造は、本研究で調べた昆虫すべてに共通に存在した。一方、シアル酸代謝酵素遺伝子はすべての昆虫に存在するわけではないこと、また存在する種でも、通常のシアル酸に対する活性は消失する傾向にあることがわかった。今後、これらの代謝酵素が昆虫型シアル酸を基質とするかどうかの調査が急務であるが、以上のことから、昆虫には、通常のシアル酸ではなく昆虫型シアル酸が存在するという仮説がほぼ検証された。

研究成果の概要（英文）：

The objective of this study is to demonstrate the hypothesis that insects do not contain usual sialic acids (Sia) that are commonly found in vertebrates, but “insect-type Sia”, which is unique to insects. Using *Drosophilla melanogaster* (fruit fly), *Tribolium castaneum* (red flour beetle), several moth species, purification and analyses of structure, occurrence, and metabolic pathways of the insect-type Sia were performed. We could identify the insect-type Sia that was present in all the insects tested in this study. For metabolic aspects, all insects do not contain metabolic enzymes known for the common Sia, and even in such insects that were shown to contain the metabolic enzymes, the enzymes seemed to lose their activities. It would be an urgent subject, however, to see if the insect enzymes can utilize the insect-type Sia in near future. Taken together, our hypothesis that insects contain the insect-type Sia, but not the common Sia has been successfully verified.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：境界農学・応用分子細胞生物学

キーワード：糖、糖鎖、昆虫、進化、バイオテクノロジー、シアル酸、代謝

1. 研究開始当初の背景

シアル酸は、カルボン酸をもつ9炭糖の総称名であり、5位の置換基の違いで*N*-アセチルノイラミン酸 (Neu5Ac)、*N*-グリコリルノイラミン酸 (Neu5Gc)、デアミノノイラミン酸 (KDN)の3大分子種がある。また、水酸基のアセチル化、硫酸化などにより50以上の分子種があり他の単糖にはない超多様性をもつ。その存在は脊椎動物を含む棘皮動物以上の後口動物においては明白であるが、前口動物の昆虫におけるシアル酸の存在には大きな謎がある。すなわち、遺伝子上ではシアル酸生合成に関わる酵素群がほぼ完全に備わっているものの、典型的シアル酸は殆ど検出されない事実である。その最も有力な理由は、既知のシアル酸とは異なる昆虫型シアル酸があるということであり、その検証が待たれている。

脊椎動物以外の生物種におけるシアル酸に関する知見は乏しい。近年、チンパンジーと比較してヒトにはシアル酸の一分子種 Neu5Gc の生合成系が無く、そのことがヒトに固有な生命現象に重要であるとの報告が注目されている(Varki et al., *Nature*, 2010)。しかし、生物界全体を見渡す進化とシアル酸に関する系統的な研究はない。昆虫のシアル酸研究も限定的であり(Panin et al., *Glycoconj. J.*, 2009)、まさに今取り組むべき課題である。

我々は、系統的に進化とシアル酸の構造と機能の研究を推進している。これまでに植物に微量に存在するとの報告 (*Nature Biotechnol.*, 2003)について、我々はそれ以外にも植物型シアル酸の存在を提唱している。昆虫での存在検証については、すでにショウジョウバエやそれ以外の昆虫種について研究を進めている。その過程で、昆虫型シアル酸の存在を示唆するデータが得られ、本研究を立案するに至った。我々は新規シアル酸 KDN の発見と、その生合成経路の解明を行った実績をもち、実現の可能性は高い

2. 研究の目的

本研究は昆虫型シアル酸の存在証明を目的としている。昆虫は地球上の動物の中で最も多様な生物種からなると言われている。モデル昆虫のショウジョウバエにおいては糖転移酵素研究を中心に若干の研究例があるため、本研究では、新規性と糖鎖工学的および農業的有用性を見地から、害虫昆虫の鞘翅目コクヌストモドキと鱗翅目に属する数種に着目する。具体的には、以下の4つの項目を遂行する。

- (1)昆虫型シアル酸の検出とその精製
- (2)昆虫型シアル酸の構造決定

- (3)昆虫型シアル酸の存在分布の調査
- (4)昆虫型シアル酸の代謝経路の解明

3. 研究の方法

(1)昆虫型シアル酸の検出とその精製

シアル酸は炭素9個からなる2-ケト-3-デオキシノノン酸の総称であり、炭素3個のピルビン酸と炭素6個のヘキソース誘導体(例えば、マンノース、*N*-アセチルマンノサミン)が縮合する構造をもっている。この化学構造の特徴から、シアル酸に特異的な蛍光標識

(DMB化)を行って高速液体クロマトグラフィー-HPLCによって微量で分離同定することが可能である。しかし、この蛍光試薬と反応する化合物は生体内に多数存在するため、検出の特異性は高くない。そこで別の検出法としてシアル酸に特異的な酵素を利用することとした。昆虫にはシアル酸アルドラーゼ(シアル酸をピルビン酸とヘキソース誘導体に分解する酵素; SPLと省略)が普遍的に存在することから、この酵素によって昆虫シアル酸は分解されると考えられる。そこで昆虫SPLをクローニングし、その組換え体酵素を用いてコクヌストモドキ成体のホモジェネートの加水分解物の中に、SPL感受性代謝物を探索した。その結果、通常シアル酸とは異なるシアル酸誘導体と思われる成分が比較的少量に検出された。昆虫細胞特有の新規シアル酸誘導体であると推定されるため、この新規シアル酸誘導体を、シリカゲル・薄層クロマトグラフィー、イオン交換・ゲル濾過クロマトグラフィーを用いて、均一成分になるまで精製した。

(2) 昆虫型シアル酸の構造決定

(1)で精製した候補分子の構造決定を行う。構造決定はガスクロマトグラフィー分析、メチル化分析、質量分析などの化学的方法を用いた。また、昆虫型シアル酸が糖鎖にどのように組み込まれているのかを調べるために、昆虫型シアル酸を含む糖タンパク質糖鎖と糖脂質を調製して、残基の結合様式を調べた。また、そのグリコシドの酸、アルカリ、温度に対する化学的性質、シアリダーゼへの感受性、既知のレクチンとの反応性を調べた。

(3)昆虫型シアル酸の存在分布の調査

種々の昆虫から糖タンパク質および糖脂質画分を調製し、加水分解後の単糖混合物からガスクロマトグラフィー-質量分析によって存在を調査した。細胞として、ショウジョウバエ由来S2細胞、*Spodoptera frugiperda* 由来Sf9細胞、*Bombyx mori* 由来BmN-4細胞、*Trichoplusia ni* 由来Tn368細胞、*Spilosoma imparilis* 由来FRI-SpIm細胞、*Lymantria dispar* 由来Ld652Y細胞、*Spodoptera littoralis* 由来

CLS-79細胞、*Spodoptera exigua*由来Se301細胞、*Spodoptera litura* 由来TUAT-SpLi221細胞を用いた。

(4) 昆虫型シアル酸の代謝経路の解明

コクヌストモドキの遺伝子にコードされているシアル酸生合成と分解に関わる酵素群をPCR法によってクローニングした。その組換え体酵素を調製し、その各酵素について、速度論的解析を行って、通常のシアル酸と比較して昆虫型シアル酸が良い基質となるかどうかを調べた。

昆虫細胞レベルおよび個体レベルでの研究を行った。細胞レベルにおいては、昆虫型シアル酸の代謝に関わる酵素のノックダウンをsiRNA法によって行い、その表現系を形態学および代謝的に調べた。個体レベルでは、RNA干渉が使える個体としてコクヌストモドキを用い、昆虫型シアル酸の代謝に関わる酵素について、siRNA技術を用いて発現抑制を行い、その生存や発生過程に及ぼす効果を調べた。

4. 研究成果

(1) 昆虫型シアル酸の検出とその精製

まず、シアル酸の存在を蛍光標識 (DMB化)/HPLCとシアル酸を特異的に分解するシアル酸アルドラーゼ (SPL) を組み合わせて、高い精度で同定する方法 (SPL/DMB法) を確立した。次に、コクヌストモドキ成体のホモジェネートの加水分解物の中に、SPL感受性代謝物を探索したところ、昆虫型シアル酸と思われる幾つかの成分が検出された。加水分解物から均一成分になるまで精製をイオン交換クロマトグラフィー、ゲルクロマトグラフィーによって行った結果、昆虫型シアル酸候補分子の濃縮画分が得られ、さらに薄層クロマトグラフィーによって精製することができた。

(2) 昆虫型シアル酸の構造決定

(1)で数グラムのコクヌストモドキ成体から得られたサンプルをGLCおよびGC/MS、LC/MSで解析した結果、8炭糖酸であるKdoを含む化合物であることが判明した。ただ、単純なKdoではなかった。成虫50グラムから調製して調べた結果、昆虫型シアル酸は、Kdoのペントースが結合した構造をもつことが示唆された。さらに大量調製法を確立する必要がある。

(3) 昆虫型シアル酸の存在分布の調査

加水分解後の単糖混合物のSPL/DMB化法によって、昆虫型シアル酸候補分子の存在を調査したところ、コクヌストモドキの他にも、ミツバチ、ショウジョウバエなどにも検出され、昆虫に普遍的であった。

(4) 昆虫型シアル酸の代謝経路の解明

コクヌストモドキのシアル酸生合成に関わる酵素のホモログ群のクローニングについては、シアル酸アルドラーゼ (SPL)、CMP-シアル酸合成酵素 (CSS)、シアル酸9-リン酸合成酵素 (SPS) クローニングに成功した。同時に、ショウジョウバエ、ユスリガについても、クローニングを行った。SPLについては、ショウジョウバエにおける存在は認めることができず、シアル酸生合成に関わる酵素をもつ昆虫であっても、種によって違いがあることがわかった。また、その組換え体酵素を用いて、酵素の性質を明らかにした。その結果、昆虫は哺乳類におけるシアル酸前駆体のN-アセチルマンノサミンには作用せず、マンノースあるいはアラビノースのような中性糖を基質にすることが判明した。昆虫型シアル酸の特徴を示唆する重要な性質が解明された。SPSについては、その活性に影響をもつアミノ酸残基の変異が見出され、そのために通常のシアル酸は合成できない性質をもつことがわかった。昆虫型シアル酸の特徴を示唆する興味深い事実が明らかになった。CSSについては、*in vitro*での活性が検出されないだけでなく、CSS欠損培養細胞のシアル酸発現の復活現象で判定する*in vivo*活性においても活性が認められなかった。以上の結果から、昆虫のシアル酸生合成酵素は、通常のシアル酸を基質にすることができない性質をもつことがわかった。今後の興味深い課題は、(2)で決定した昆虫型シアル酸が基質になるかどうかである。

さらに、コクヌストモドキを用いて、SPS、CMP-シアル酸合成酵素、シアル酸転移酵素のRNA干渉実験を幼虫期について行った。予備的な段階ではあるが、明白な異常は観察されなかった。本研究によって昆虫特異的なシアル酸が実態としてあることが判明した。しかし、その生物学的機能については、手法の開発を含めて今後の課題である。

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)

[学会発表] (計3件)

- ① 北島健、藤田明子、小林隆史、呉迪、Garenaux Estelle、濱口香代、郷慎司、佐藤ちひろ。昆虫細胞におけるシアル酸代謝の特徴について; 日本農芸化学会 2012年度京都大会; 2012年3月22-26日; 京都女子大学、京都 (京都府)
- ② Ken Kitajima. New features on biosynthesis and degradation of free sialic acids. Kiel University Department of Chemistry Seminar (organized by Professor Thisbe Lindhorst); June 4, 2012; Christian Abrecht University,

Kiel, Germany

- ③ Ken Kitajima, Chihiro Sato. A polysialyl-transferase SNP in a schizophrenic patient brings about the production of polysialic acids showing impaired binding and signaling of BDNF and FGF2. 8th International Symposium on Glycosyl transferases; June 5-9, 2012, Hannover, Germany

6. 研究組織

(1) 研究代表者

北島 健 (KITAJIMA KEN)

名古屋大学・生物機能開発利用研究センター・教授

研究者番号：80192558

(2) 研究分担者

佐藤 ちひろ (SATO CHIHIRO)

名古屋大学・生物機能開発利用研究センター・准教授

研究者番号：10343211