

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 17 日現在

機関番号：12102

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2013～2015

課題番号：25712010

研究課題名(和文) コレステロール動態調節に関わる新規遺伝子noppera-boの機能解明

研究課題名(英文) Functional analysis of noppera-bo, the novel gene regulating cholesterol transport and metabolism

研究代表者

丹羽 隆介 (NIWA, Ryusuke)

筑波大学・生命環境系・准教授

研究者番号：60507945

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 10,800,000円

研究成果の概要(和文)：申請者は、ステロイドホルモン生合成に関わる新規分子Noppera-boの機能解明を目指した。ショウジョウバエとカイコガを用いた機能欠損個体の表現型解析から、Noppera-boがステロイドホルモン生合成器官でのコレステロールの挙動調節に関わることを示した。さらに、Noppera-bo組換えタンパク質と酵素活性検出用蛍光プローブ、低分子化合物ライブラリーを組み合わせたスクリーニング系を利用して、Noppera-boがある種のステロイドと結合することによって酵素活性を変化させることを見出した。この結果は、Noppera-boの内在性基質は何らかのステロイド類であることを示唆する重要な成果である。

研究成果の概要(英文)：This study is toward understanding a functional role of Noppera-bo, the novel protein that is required for steroid hormone biosynthesis. Based on our phenotypic analyses using noppera-bo loss-of function mutants of the fruit fly *Drosophila melanogaster* and the silkworm *Bombyx mori*, we have found that noppera-bo plays an indispensable role in regulating the behavior of cholesterol in steroidogenic organs. To investigate which molecules can affect Noppera-bo enzymatic activity, we have developed a high through-put screen system with the recombinant Noppera-bo protein, the fluorescent probe to monitor the enzymatic activity and chemical compound library. We have found that some steroids directly bind to Noppera-bo protein and display significant inhibitory effects on Noppera-bo enzymatic activity. These important results imply that an endogenous substrate for Noppera-bo should be a kind of steroids, including sterols.

研究分野：発生遺伝学、昆虫生理学

キーワード：遺伝学 昆虫 生理学 発生・分化 コレステロール グルタチオンS-転移酵素

1. 研究開始当初の背景

多細胞生物において、コレステロールは細胞膜の成分として、またステロイドホルモンの原材料として必須である。その代謝調節の破綻はヒトにおいても様々な疾患の原因となることは広く知られている。よって、生体内におけるコレステロール動態調節機構に関わる遺伝子を発掘してその生体内機能を解明することは、基礎生物学的にも医学的にも重要な課題である。

コレステロールは、ヒトを含む脊椎動物のみならず、昆虫においても生命活動の維持に欠かすことができない。昆虫においてコレステロールは、発生の進行(胚発生、脱皮、変態、羽化、卵形成)に必須の役割を果たすステロイドホルモン「エクジステロイド」の原材料として必須である。昆虫は、自身の体内でコレステロールを新たに合成することは出来ないため、餌の中から取り込む。生体内に取り込まれたコレステロールは、エクジステロイド産生器官である前胸腺や卵巣に体液を介して運ばれた後、複数段階の特異的な触媒反応を経て、エクジステロイドへと変換される。

申請者でこれまで、ショウジョウバエ *Drosophila melanogaster* を主材料として、未解明のままであったエクジステロイド生合成関連遺伝子の多くを同定し、世界的に先駆的な業績を挙げてきた。そして申請者は本研究開始当初、「*noppera-bo*」と命名した新規のエクジステロイド生合成関連遺伝子に注目した。*noppera-bo* はグルタチオン S-転移酵素 (GST) の 1 種をコードしている。研究開始時点での申請者の予備的結果から、前胸腺でのエクジステロイド生合成経路の中でコレステロールの挙動の調節に関与することが示唆されていた。しかし、なぜ *noppera-bo* が細胞内でどのようにコレステロールに関与するのかは不明であった。また、コレステロール動態調節に GST のような代謝酵素が関与することは、あらゆる生物において一切の報告がない状態であった。従って申請者は、*noppera-bo* の分子機能の解明は、コレステロール動態調節の全く新しいメカニズムを明らかにすることに繋がると考えた。

2. 研究の目的

本研究は、*Noppera-bo* の機能を分子遺伝学的、生理学的、そして生化学的に追究し、生体内でのコレステロールの挙動を調節する新しいメカニズムに迫ることを目的とした。

3. 研究の方法

主に以下の 2 つの手法を用いた研究を実施した。

(1) *noppera-bo* 機能低下個体の表現型解析と変異体を利用した基質探索アプローチ:

研究の開始時点で申請者はすでにショウジョウバエ *noppera-bo* 機能欠損系統を作出していたが、その詳細な表現型解析は完了していなかった。そこで、発育における影響を発生時間に沿って詳細に記載した。また、前胸腺でのステロイド類の量を精査するため、蛍光コレステロールを用いた組織染色法や質量分析計を用いたステロイド類の定量分析を実施した。

一方、研究の過程で、前胸腺由来の大量の生体サンプル入手の必要性を認識したことから、ショウジョウバエのような小型の昆虫だけでなく、比較的巨大的な前胸腺を持つカイコガにも着目し、分子遺伝学的解析を実施した。ゲノム編集技術 (TALEN 法) を用いた変異体の分離、および引きつづいて幼虫発育における影響および前胸腺でのステロイド類の量を検討した。

次いで、正常個体および *noppera-bo* 機能欠損個体を用意し、それぞれの細胞抽出液に対してグルタチオンを特異的に認識する市販の抗体を用いて免疫沈降を行い、グルタチオン化状態に変化を示すタンパク質性基質の同定を試みた。

(2) 精製組換え *Noppera-bo* タンパク質を用いた生化学的な基質探索アプローチ

大腸菌で調製した組換え *Noppera-bo* タンパク質と 3,4-DNADCF という高感度酵素活性検出プローブを利用し、ハイスループット化に対応した *Noppera-bo* の酵素活性検出系を確立した。この検出系に低分子化合物ライブラリーを供することで、*Noppera-bo* 活性を阻害する低分子化合物を同定した。阻害化合物が得られた場合、その化学構造を元に、*Noppera-bo* がどのような分子と相互作用するのかを検討することが可能になり、ひいては内在性基質の理解の足がかりになると着想した。

4. 研究成果

(1) ショウジョウバエ *noppera-bo* は前胸腺でのコレステロールの挙動の調節を通じてエクジステロイド生合成を正に調節する (雑誌論文):

ショウジョウバエにおいて *noppera-bo* の機能が完全に欠損した個体においては、胚発生の進行が途中で停止し、胚表皮に形成される体節構造が消失した。この表現型は、エクジステロイド欠乏ショウジョウバエの典型的な表現型であった。さらに申請者は、*noppera-bo* 機能低下個体では前胸腺において異常なコレステロールの蓄積が生じていることを、質量分析によるステロイド量の定量および蛍光コレステロールを用いた顕微鏡観察から明らかにした。研究開始時点で得ていたデータと合わせた一連の結果から、

Noppera-bo は前胸腺(エクジステロイド産生器官)においてコレステロールの細胞内挙動の調節を介してエクジステロイド生合成を正に制御することが示された。

(2) カイコガ *noppera-bo* も前胸腺でのコレステロールの挙動の調節を通じてエクジステロイド生合成を正に調節する(雑誌論文):

ショウジョウバエ以外の昆虫における *noppera-bo* オートログの重要性を検討するため、また巨大な前胸腺を利用した将来的な生化学・生理学的研究の前準備として、カイコガ *noppera-bo* ノックアウト個体を作成した。カイコガにおいてもエクジステロイド依存的な発生異常が観察された。また、ショウジョウバエと同様に前胸腺でのステロイド類の蓄積異常が認められた。ただし、ショウジョウバエではコレステロールが蓄積していたのに対して、カイコガではその代謝物である 7-デヒドロコレステロールが蓄積しており、昆虫種によって *Noppera-bo* の機能に若干の差異が認められた。

(3) *noppera-bo* 機能欠損個体を用いた基質探索の試み

これらのショウジョウバエおよびカイコガの機能欠損個体においては、正常個体と比べて *Noppera-bo* によって触媒される基質の挙動に異常があると予想される。*Noppera-bo* が GST という酵素であることを考えると、変異個体では基質のグルタチオン化状態に異常があると考えられた。そこで、*noppera-bo* の基質がタンパク質であるという仮定の元に、これらの変異個体においてグルタチオン化状態が変化するタンパク質の同定を試みたが、残念ながら本研究期間中に有意な成果を得ることはできなかった。

(4) *Noppera-bo* 組換えタンパク質と低分子化合物ライブラリーを組み合わせた *Noppera-bo* 相互作用分子の同定(雑誌論文および投稿準備中)

上述(3)のアプローチが難航したために、別の戦略として、*Noppera-bo* の生化学および構造生物学的な研究に従事した。*Noppera-bo* 組換えタンパク質と、GST 酵素活性を高感度で検出できる蛍光プローブを利用することで、*Noppera-bo* の酵素活性をハイスループットに簡便に追尾する試験管内反応系の確立に成功した。

この検出系を用いて酵素活性阻害化合物を同定することで、*Noppera-bo* と相互作用する分子の特徴の抽出を目指した。そこで、東京大学創薬機構の所有する 9,600 種類の低分子化合物ライブラリーを入手し、*Noppera-bo* 活性を阻害する低分子化合物の同定を行った。その結果、哺乳類女性ホルモンであるエストラジオールが、試験管内反応系において *Noppera-bo* の酵素活性を強く阻

害することを見出した。また、エストラジオールが *Noppera-bo* と物理的に直接結合すること、そして構造的にも *Noppera-bo* の特定のタンパク質部位と特異的な相互作用をすることを確認した。

申請者は、エストラジオールがステロイドであることを踏まえて、多様なステロイド類の *Noppera-bo* への阻害活性を検討した。その結果、ステロイド類の一部、特にエクジステロイド生合成経路に位置するステロイド類や中間化合物の一部が、*Noppera-bo* の酵素活性を強力に阻害することを発見した。また、これらのステロイド類が *Noppera-bo* と物理的に直接結合すること、そして構造的にも *Noppera-bo* の特定のタンパク質部位と特異的な相互作用をすることを確認した。

以上の結果は、ステロイド類が *Noppera-bo* の阻害活性を持つことを示すと共に、昆虫発生時の *Noppera-bo* の内在性基質は何らかのステロイド/ステロイド類であることを示唆する重要な成果である。

(5) その他の研究活動(雑誌論文) *Noppera-bo* に関する研究成果を含む総説論文を 4 本執筆した。

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 7 件)

丹羽隆介. 昆虫エクジステロイド生合成に関わる酵素群と昆虫成長制御剤の開発. *化学と生物*. 査読有. Vol. 54 (2016). 印刷中.

http://www.jsbba.or.jp/pub/journal_kasei/kasei_contents/

Yuko S. Niwa, Ryusuke Niwa. Transcriptional regulation of insect steroid hormone biosynthesis and its role in controlling timing of molting and metamorphosis. *Develop Growth & Differentiation*. 査読有. 58:94-105 (2016).

DOI: 10.1111/dgd.12248

Outa Uryu, Tomotsune Ameku, Ryusuke Niwa. Recent progress in understanding the role of ecdysteroids in adult insects: Germline development and circadian clock in the fruit fly *Drosophila melanogaster*. *Zoological Letters*. 査読有. 1:32 (2015). DOI:10.1186/s40851-015-0031-2

Yuuta Fujikawa, Fumika Morisaki, Asami Ogura, Kana Morohashi, Sora Enya, Ryusuke Niwa, Shinji Goto, Hirotatsu Kojima, Takayoshi Okabe, Tetsuo Nagano, Hideshi

Inoue. A practical fluorogenic substrate for high-throughput screening of glutathione S-transferase inhibitors. *Chemical Communications*. 査読有. 51:11459-11462 (2015). DOI:10.1039/c5cc02067k

Sora Enya, Takaaki Daimon, Fumihiko Igarashi, Hiroshi Kataoka, Miwa Uchibori, Hideki Sezutsu, Tetsuro Shinoda, Ryusuke Niwa. The silkworm glutathione S-transferase gene *noppera-bo* is required for ecdysteroid biosynthesis and larval development. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*. 査読有. 61:1-7 (2015). DOI:10.1016/j.ibmb.2015.04.001

Sora Enya, Tomotsune Ameku, Fumihiko Igarashi, Masatoshi Iga, Hiroshi Kataoka, Tetsuro Shinoda, Ryusuke Niwa. A Halloween gene *noppera-bo* encodes a glutathione S-transferase essential for ecdysteroid biosynthesis via regulating the behaviour of cholesterol in *Drosophila*. *Scientific Reports*. 査読有. 4:6586 (2014). DOI:10.1038/srep06586

Ryusuke Niwa, Yuko S. Niwa. Enzymes for ecdysteroid biosynthesis: Their biological functions in insects and beyond. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*. 査読有. 78:1283-1292 (2014). DOI:10.1080/09168451.2014.942250

〔学会発表〕(計 10 件)

平野陽太、藤井裕紀、塩谷天、伊賀正年、五十嵐史彦、片岡宏誌、岡嶋孝治、丹羽隆介. 母性由来ステロールはショウジョウバエ卵膜のバリア機能に必須である. 日本昆虫学会第76回大会・第60回日本応用動物昆虫学会大会合同大会. 2016年3月26日. 大阪府立大学中百舌鳥キャンパス(大阪府堺市).

丹羽隆介. *Noppera-bo* のケミカルバイオロジー～大規模化合物ライブラリーを活用した昆虫ステロイドホルモン生合成研究の試み～. 第264回発生研セミナー. 2016年2月9日. 熊本大学発生医学研究所(熊本県熊本市).

丹羽隆介. A power of nutrient(s) transferred from mother to her offspring: Lessons from *Drosophila* study on the behavior sterols. BMB2015(第38回日本分子生物学会年会・第88回日本生化学会大会合同大会). 2015年12月3日. 神戸市国際会議場(兵庫県神戸市).

Kana Morohashi, Asami Ogura, Yota Hirano, Sora Enya, Hirotsu Kojima, Takayoshi Okabe, Tetsuro Nagano, Hideshi Inoue, Yuuta Fujikawa, Ryusuke Niwa. 昆虫ステロイドホルモン生合成制御因子 *Noppera-bo* に対する阻害剤のハイスループットスクリーニング. BMB2015(第38回日本分子生物学会年会・第88回日本生化学会大会合同大会). 2015年12月1日. 神戸市国際会議場(兵庫県神戸市).

丹羽隆介. 脱皮ホルモン生合成のケミカルバイオロジー(の試み). 平成27年度蚕糸・昆虫機能利用学術講演会(日本蚕糸学会第85回大会). 2015年9月26日. 北海道大学農学部(北海道札幌市).

丹羽隆介. 昆虫変態の研究は創農薬の夢を見るか?. 日本動物学会第86回新潟大会. 2015年9月18日. 朱鷺メッセ(新潟県新潟市).

丹羽隆介. コレステロール動態調節を介した昆虫ステロイドホルモン生合成の制御機構～新規酵素 *Noppera-bo* の同定とその創農薬ターゲットとしての可能性～. 弘前大学農学生命科学部第6回研究推進セミナー. 2014年9月9日. 弘前大学農学生命科学部(青森県弘前市).

平野陽太、塩谷天、丹羽隆介. ショウジョウバエの母親から伝搬されるステロール類が子の発生に与える影響. 第58回日本応用動物昆虫学会. 2014年3月27～28日. 高知大学朝倉キャンパス(高知県高知市).

丹羽隆介、天久朝恒、平野陽太、塩谷天、五十嵐史彦、伊賀正年、片岡宏誌. 「母性因子」再考: ショウジョウバエの母から子へと伝えられる栄養の力. 第85回日本遺伝学会. 2013年9月19日. 慶応義塾大学日吉キャンパス(神奈川県横浜市).

Sora Enya, Yuko Shimada-Niwa, Fumihiko Igarashi, Masatoshi Iga, Hiroshi Kataoka, Ryusuke Niwa. A novel Halloween gene *noppera-bo* encodes a glutathione S-transferase essential for ecdysteroid biosynthesis in the prothoracic gland. International Insect Hormone (19th Ecdysone) Workshop. 2013年7月25日. University of Minnesota(米国ミネソタ州ミネアポリス).

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕
ホームページ等
<http://niwa-lab.org/>

6．研究組織

(1)研究代表者

丹羽 隆介 (NIWA, Ryusuke)
筑波大学・生命環境系・准教授
研究者番号：60507945

(2)研究分担者 なし

(3)連携研究者 なし