

論文の内容の要旨

論文題目

カイコ前胸腺におけるステロール量の発育変動ならびに取り込み関連因子の探索

氏 名 竹島 実加

<序論>

昆虫は哺乳類とは異なり、アセチル CoA からコレステロールを新規に合成できないため、食餌由来のステロール類を利用している。植食性昆虫は、餌に含まれる β -シトステロールなどの植物ステロールを腸管でコレステロールに変換する。コレステロールはその後、昆虫のリポタンパク質であるリポフォリン (Lp) に結合して血液中を循環し、それぞれの組織へ輸送される。組織に取り込まれたコレステロールは細胞膜の成分やシグナル分子として働き、組織が機能を果たすために利用される。特に、ステロイドホルモン生合成組織である前胸腺では、コレステロールは脱皮ホルモンであるエクジソンの原料として利用される。エクジソンは昆虫で唯一のステロイドホルモンとして脱皮・変態を制御するため、昆虫の発育に必須のホルモンである。前胸腺におけるコレステロールの取り込み不全はエクジソンの欠乏による発育遅延や致死を引き起こす。このことから、前胸腺におけるコレステロール取り込みは昆虫にとって生存に必要不可欠である。昆虫の組織は Lp 受容体 (LpR) を介したエンドサイトーシスによりコレステロールを取り込む。これは組織間で共通の機構だと考えられてきた。一方で、先行研究からカイコでは組織ごとに細胞内の Lp とコレステロールの局在が異なることが明らかとなり、これは組織ごとにステロールの取り込み・維持機構が異なることを示唆した。本研究ではカイコ主要組織の含有ステロールの種類や量を精密に測定し、組織間で比較することで、前胸腺に特有のステロール含有量の変動や組成を明らかにすることを目的とした。

<結果および考察>

1. カイコ前胸腺のステロール組成の発育変動と組織間比較

前胸腺のステロール組成を明らかにするため、LC-MS/MS を用いてカイコ終齢幼虫の前胸腺のステロール組成（ステロールの種類および量）を測定した。LC-MS/MS の測定では β -シトステロール、カンペステロール、スチグマステロール（以上餌由来のステロール）、デスモステロール（コレステロールの前駆体）、コレステロール、エルゴステロールおよび7-デヒドロコレステロール（7dC: エクジソン生合成中間体）の7種のステロールを測定した。また、血液についても測定し、上記7種のステロールに加えてエクジソンおよび20-ヒドロキシエクジソン（20E）を測定した。定量の際の内部標準としてはコレステロール-3,4- $^{13}\text{C}_2$ を用いた。

1 対当たりの前胸腺中のステロール量を LC-MS/MS で分析した結果、前胸腺からはコレステロールと 7dC が検出された。また、餌中の植物ステロールのうち β -シトステロールおよびカンペステロールが検出され、スチグマステロールは検出されなかった。1 対当たりの前胸腺のコレステロール量は終齢 4 日目から上昇し始め、蛹脱皮後まで上昇を続けた。前胸腺中の 7dC 含有量も終齢 4 日目から上昇した。7dC は血液中からも検出され、その濃度は、ワンダリング期に上昇した。7dC は前胸腺で生合成されて血液中に分泌されたと考えられる。また、エクジソンおよび 20E は組織中には含まれず血液中でのみ検出され、その濃度は終齢後半から増加した。前胸腺 1 対当たりのコレステロール量は終齢 4 日目から上昇したことから、前胸腺ではエクジソン生合成に向けてコレステロール量の取り込み量が増加したと考えられる。一方、前胸腺中の β -シトステロールおよびカンペステロール量はコレステロールおよび 7dC 量と異なる変動を示していたことから、前胸腺ではステロールごとに取り込みや維持機構が異なる可能性が考えられた。

前胸腺と血液及び他の組織のステロール量の発育変動を比較するため、中腸、脂肪体、脳、マルピーギ管のステロールを LC-MS/MS で測定した。組織間のステロール組成の特徴を明らかにするため、各組織のタンパク質当たりのステロール含有量を変数として主成分分析を行った。各組織はスコアプロット上で組織ごとに集団を形成したことから、各組織のステロール組成が明確に異なり、組織ごとにステロール組成を特徴づけるステロールも異なることが明らかになった。前胸腺は他の組織とは離れた位置にプロットされていたため、前胸腺は他の組織とは大きく異なるステロール組成であることが示された。また、ローディングプロットからは、前胸腺のステロール組成の特徴はコレステロールと 7dC が存在する点にあることが明らかになった。さらに、コレステロールとその他のステロールの比率について、組織中に含まれるステロールの総量のうち、コレステロールが占める割合を算出して比較

したところ、前胸腺は脂肪体、中腸、およびマルピーギ管と比べるとコレステロールの含有率が高い組織であることが明らかになった。

発育に伴って組織中のステロール組成も変化すると予想したが、前胸腺はスコアプロット上で密集しており、発育ステージによらずステロール組成が一定であることが明らかになった。中腸および脂肪体もスコアプロット上でそれぞれ同様の位置にプロットされていたことから、前胸腺、中腸および脂肪体は発育ステージによらずそれぞれの組織ごとにステロール組成を維持すると考えられた。一方で、脳とマルピーギ管は発育時期によりステロール組成が変化することが明らかになった。特に、脳は終齢前半と摂食を停止する終齢後半で組成が異なり、終齢後半に植物ステロール量が増加することによると考えられた。これらの結果から、カイコの各組織は組織特有のステロールの組成を持ち、組織ごとにステロール特異的な取り込み、代謝、排出機構が存在することが考えられた。

2. カイコ前胸腺におけるステロール取り込み関連因子の探索

Lp からステロール類を取り込むためには Lp の受容体が必要であり、これまでに LpR (Lipoprotein Receptor) が知られている。しかし LpR はカイコの様々な組織に広く発現しているため、組織特有のステロール取り込みに関わる可能性は低い。一方で、カイコ絹糸腺でカロテノイド色素の選択的取り込みを担う分子として、Scavenger Receptor class B type1 (SR-B1) が報告された。カロテノイドはコレステロールと共に Lp によって輸送されるため、Lp からのステロールの取り込みにも SR-B1 が関わる可能性があると考えた。カイコゲノム上から、15 遺伝子が SR-B1 をコードすることが明らかにされているが、前胸腺で発現している *sr-b1* は特定されていない。カイコ前胸腺で発現している *sr-b1* を探索したところ、前胸腺において発現している 2 遺伝子を見出した。これらの 2 遺伝子の機能解析をショウジョウバエ胚由来の S2 細胞を用いて行った。いずれの遺伝子を発現させた細胞中のコレステロール量もネガティブコントロールと比較して増加せず、これら SR-B1 はコレステロールの取り込みには関与しないことが明らかとなった。その一方で、SR-B1 が β -シトステロールおよびカンペステロールの取り込みを促進することを明らかにした。この分子はスチグマステロールの取り込みは促進しなかった。前胸腺中からはスチグマステロールが検出されず、 β -シトステロールおよびカンペステロールが検出されていることから、この分子が前胸腺においてスチグマステロールを除く植物ステロールの取り込みに関わることを示唆される。今後異なる昆虫由来の細胞を用いた機能解析も行い、SR-B1 が植物ステロールの取り込みに関わることを慎重に調べる必要があると考えている。

<総括>

LC-MS/MS 及び主成分分析の結果から、前胸腺のステロール組成の特徴として、前胸腺はコレステロールと 7dC、少量の植物ステロールを含むことが明らかになった。前胸腺ではエクジソン生合成に先行して前胸腺中のコレステロール量が増加すること、前胸腺は他の組織と比較してコレステロールが豊富な組織であることも明らかになった。これらの結果から前胸腺ではステロールごとに取り込み・維持機構は独立している可能性が考えられた。

本研究ではステロール特異的な取り込みを担う分子として **SR-B1** に着目し、前胸腺における **SR-B1** の探索と機能解析を行った。培養細胞を用いた **SR-B1** の機能解析の結果からは、前胸腺で発現を確認した **SR-B1** 分子はコレステロールの取り込みに関与しないことが明らかになった。一方で、これらの **SR-B1** が植物ステロールの取り込みに関わることを明らかにした。組織内のステロール量の維持には、ステロールの取り込み、代謝、排出それぞれの機構の関与が考えられるが、前胸腺においては植物ステロールの排出を担う分子（ABC トランスポーター）の発現がみられないことが報告されている。また、コレステロール生合成の中間体であるデスモステロールの定量結果から、前胸腺が植物ステロールを盛んに代謝するとは考えにくい。前述のとおり、前胸腺では特定の植物ステロールを取り込む分子が発見された。以上のことから、前胸腺では **LpR** を介したステロール取り込みの他に、**SR-B1** を介した植物ステロール特異的なステロール取り込み機構が働き、前胸腺特有のステロール組成を維持していると考えられた。本研究では前胸腺はコレステロール量が多い組織であることを明らかにしたが、コレステロールを選択的に取り込む分子は同定できていないため、今後前胸腺特異的に働くコレステロール取り込み分子を探索する必要がある。また、脳では終齢前半と後半でステロール組成が大きく変化したことから、脳では発育に伴ってステロールの取り込みや排出機構が異なる可能性を示した。発育に伴ってステロールの取り込みを変化させる鍵分子を明らかにし、前胸腺とも比較することで、脳特異的、組織特異的なステロール取り込み機構を明らかにしたい。