

論文の内容の要旨

論文題目

「植物ステロールの脱アルキル化に関わる昆虫のDHCR24様タンパク質の機能解析」

氏名 藤盛 春奈

序論

ステロール化合物は、細胞膜の構成成分やステロイドホルモンの前駆体となるため、多くの生物に必須な化合物である。哺乳類などの脊椎動物はコレステロールを *de novo* 生合成できるが、昆虫類を含む節足動物は *de novo* 生合成できない。そのため昆虫はステロール化合物を食餌や共生菌などの外部に依存する。餌からステロール化合物を取り込む昆虫種は、餌中にコレステロールが含まれると正常に生育する。しか

し、餌中に含まれるステロール化合物が、コレステロールとは構造が異なる植物ステロールのみでも正常に生育する昆虫種もいる。ステロール源が植物ステロールのみで生育する種は、他の生物種には認められない独自の経路で、植物ステロールを体内でコレステロールに変換するとされる。この植物ステロールからコレステロールへの変換経路は、昆虫が植物を餌として生きるには必須な経路であり、昆虫の食性に関連すると考えられてきた(図 1-A)。しかし、植物ステロールからコレステロールへの変換が昆虫の食性に関連するかどうかは、多くの生理学的知見から示唆されているに留まり、不明のままである。

そこで本博士論文研究では、植物ステロールからコレステロールへの変換経路の最終反応である、デスモステロールからコレステロールへの還元反応に着目し、昆虫の食性に関連するか明らかにすることを目指した。植物ステロールからコレステロールへの変換は、主に鱗翅目昆虫の幼虫を用いた先行研究より 4 段階の酵素反応であると推定されているが、反応を担う酵素群は同定されていない(図 1-B)。デスモステロールからコレステロールへの還元反応についてのみ、脊椎動物など他の生物種でも認められ、デスモステロール

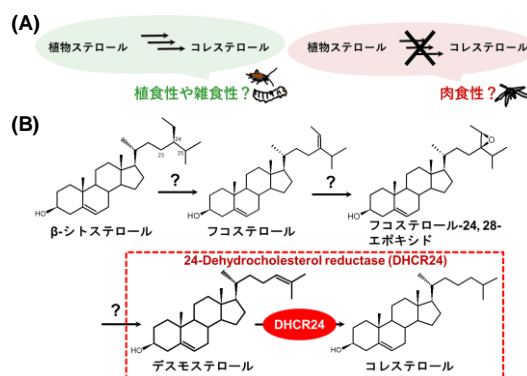


図 1. 昆虫における植物ステロールからコレステロールへの変換経路。(A) 植物ステロールからコレステロールへの変換と昆虫の食性。植物ステロールをコレステロールへ変換できると植食性や雑食性、できなければコレステロールが豊富な動物性の餌を摂食する肉食性になるとされる。(B) β -シトステロールからコレステロールへの推定変換経路。 β -シトステロールは代表的な植物ステロールの 1 種である。変換の最後のデスモステロールの還元反応は、DHCR24 が担うと推定されている。

の 24 位を還元する DHCR24 が担うことが報告されている(図 1-B)。昆虫で DHCR24 が機能しているか報告例がなかったため、まずは鱗翅目昆虫であるカイコ *Bombyx mori* において DHCR24 を同定し、発現動態や機能する組織などを明らかにした。また安定同位体標識の基質を用いた DHCR24 活性の評価系を確立し、同定したカイコの DHCR24 が DHCR24 活性を示すか調べた。さらに、実際に様々な昆虫種において DHCR24 活性があるかを調べ、食性との関連性を調べた。

第 1 章 植食性昆虫のカイコ *Bombyx mori* における DHCR24 の機能解析

第 1 章では、カイコにおける DHCR24 を同定した。ヒト DHCR24 (HsDHCR24) のアミノ酸配列を元に、GenBank データベースから二つの DHCR24 様アミノ酸配列を得た。HsDHCR24 に対し相同性が高い順に BmDHCR24-1、BmDHCR24-2 と名付けた。RT-PCR 法にてカイコ終齢幼虫における組織別発現を調べると、中腸での発現が強かった(図 2-A)。先行研究では、タバコスズメガ幼虫の中腸由来のミクロソーム画分においてデスモステロールからコレステロールへの変換が見出されているため、この BmDHCR24 の細胞内局在を調べた。その結果、BmDHCR24-1 と -2 は主に小胞体に局在した(図 2-B)。以上より、ともに DHCR24 活

性を担う分子であると考えられた。次に、安定同位体基質を用いた DHCR24 活性の評価系を確立した。さらに、BmDHCR24-1 および -2 の触媒能を調べるため DHCR24 活性の評価を行った。BmDHCR24-1 または -2 を過剰発現させた HEK293 細胞からミクロソームを含む画分を調製し、DHCR24 活性を測定した。その結果、BmDHCR24-1 に DHCR24 活性が認められた。また、BmDHCR24-1 の至適酵素反応条件を調べると、補酵素として NADPH を要求し、また pH 7.0 および 37°C で触媒能が最大になることがわかった。一方、BmDHCR24-2 ではいずれの条件下でも顕著な酵素反応は認められなかった。これら

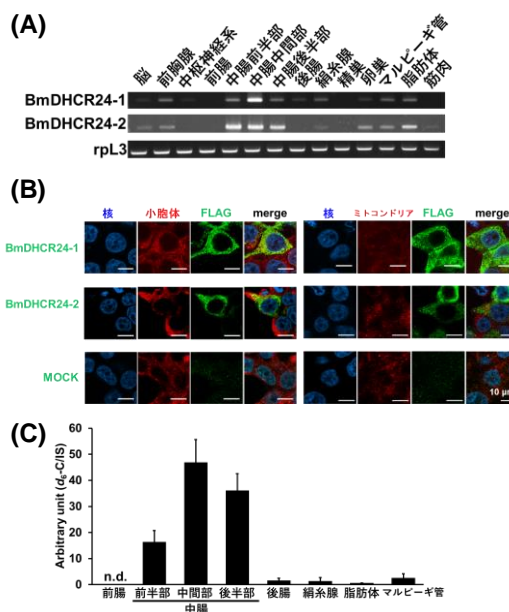


図 2. カイコ DHCR24 の局在解析および DHCR24 活性の測定結果。(a) BmDHCR24-1 および BmDHCR24-2 の組織別発現解析結果。カイコ終齢幼虫の cDNA をテンプレートにした。いずれも ORF 領域に特異的なプライマーを用いた。(b) BmDHCR24-1 と 24-2 の細胞内局在。FLAG タグ配列を融合させたタンパク質発現用プラスミドを作製し、HEK293 細胞に一過的に過剰発現させ、間接免疫蛍光法にて検出し共焦点顕微鏡で観察した。青は核、赤はオルガネラマーカ、緑は FLAG タグが融合した BmDHCR24 タンパク質。白いバーはスケールバーで 10 μ m を示す。(c) カイコ生体組織を用いた DHCR24 の活性測定。カイコ終齢幼虫の各組織において DHCR24 活性を測定した。グラフの縦軸は、GC-MS で検出された酵素反応産物のピーク面積を内部標準物質のピーク面積で補正した値。n.d. は酵素反応産物が検出されなかったことを示す。(mean+SEM, n=3)

の結果より、カイコの生体内で DHCR24 として機能するのは BmDHCR24-1 であると考えられた。さらに、カイコの終齢幼虫から組織を摘出し、DHCR24 活性を有する組織を調べた。その結果、中腸の中間部での活性が最も強かった(図 2-C)。以上より、カイコ終齢幼虫では、コレステロールは主に中腸で産生されることが明らかとなった。

第 2 章 昆虫の DHCR24 活性に着目した植物ステロールからコレステロールへの変換能と食性の関連の検討

第 2 章では、植物ステロールからコレステロールへの変換と昆虫の食性の関連性を調べるため、様々な昆虫種において DHCR24 活性を測定した。まずは、各昆虫種のどの組織を用いて DHCR24 活性を測定するか検討した。具体的には、直翅目昆虫であるフタホシコオロギ *Gryllus bimaculatus* の DHCR24 活性を組織別に測定し、DHCR24 活性が強い組織を調べた。その結果、フタホシコオロギでは中腸における DHCR24 活性が最も強かった。このことは、カイコの DHCR24 の組織別解析の結果と同様であった。異なる目に属する 2 種の昆虫種で、ともに中腸での DHCR24 活性が強かったことから、昆虫における植物ステロールからコレステロールへの変換の場は主に腸管であると考え、本章では各昆虫種の腸管における DHCR24 活性を測定することにした。

次に、野外で合計 68 種の昆虫種を採集し、腸管を摘出して DHCR24 活性を測定した。その結果、肉食性の昆虫種では DHCR24 活性が認められず、DHCR24 を必要としないと考えられた。さらに、GenBank データベースに登録された肉食性の昆虫種のトランスクリプトーム情報などでは DHCR24 をコードする塩基配列は見出されなかった。また、DHCR24 活性が認められたのは、直翅目、甲虫目、鱗翅目、膜翅目の計 16 種で、植食性や雑食性であった。これらの昆虫種は、餌から取り込んだ植物ステロールをコレステロールに変換していると考えられた。しかし予想に反し、植食性や雑食性の昆虫種の半数以上で DHCR24 活性が認められなかった。なかでもカイコ成虫では、BmDHCR24-1 が発現していたが DHCR24 活性が認められず、生育ステージの変化に伴い DHCR24 活性が抑制される可能性も見出された。

さらに、DHCR24 の分子進化と昆虫の食性との関連性を検討することを試みた。DHCR24 の分子進化を検討する手掛かりとして、まずは DHCR24 活性に重要な領域を特定することにした。実際には、DHCR24 活性をもつ BmDHCR24-1 のアミノ酸配列の一部を BmDHCR24-2 に組み換えたキメラタンパク質を作製し、DHCR24 活性が低下する領域を探索した。キメラタンパク質は、DHCR24 分子を 3 つの領域に分け組み換えた。すなわ

ち、FAD 結合領域と小胞体膜局在に重要なアミノ酸配列を含む N 末端側の領域を 1 つ目、BmDHCR24-2 に特徴的な 5 アミノ酸残基が挿入されている領域を 2 つ目、HsDHCR24 で基質との結合に重要なアミノ酸残基が集中する C 末端側の領域を 3 つ目とした。目的領域を組み換えたタンパク質を発現させるためのプラスミドを作製し、HEK293 細胞に形質導入してマイクロソーム画分を調製し、DHCR24 活性を評価した。形質導入したキメラタンパク質の発現を、抗 FLAG 抗体を用いた Western Blot 法によって確認すると、目的位置のバンドが薄く、キメラタンパク質が BmDHCR24-1 と同程度に得られなかった。そのため DHCR24 活性の測定ではいずれのキメラタンパク質でも BmDHCR24-1 と比較して DHCR24 活性が低下した。これらの結果より、本章では、DHCR24 活性に重要な領域の特定には至らなかった。

総括

本博士論文では、植物ステロールからコレステロールへの変換と昆虫の食性との関連性を、DHCR24 に着目して明らかにすることを目指した。そのために、カイコにおける DHCR24 を同定し、酵素の特性を明らかにした。カイコ終齢幼虫では、主に中腸でコレステロールが産生され、小胞体に局在する BmDHCR24-1 が寄与していると考えられた。DHCR24 活性を示さなかった BmDHCR24-2 については、他の昆虫種にも BmDHCR24-2 と相同性の高い配列が見出され、他の酵素分子として機能するか、今後検討する必要がある。さらに、DHCR24 活性と昆虫の食性との関連を調べた結果、肉食性の昆虫種では DHCR24 が機能していないことがわかった。植食性と雑食性の昆虫種では、予想に反して半数以上で DHCR24 活性が認められなかった。そのため植物ステロールからコレステロールへの変換に必要とされる DHCR24 活性が、植食性の昆虫種で必須であるか検討する必要があった。DHCR24 活性がない要因を推測するのは困難であったが、例えば、カイコ成虫では、腸管で BmDHCR24-1 が発現していたにもかかわらず DHCR24 活性が認められなかった。このことから、生育ステージに伴い DHCR24 が転写後に活性調節され、コレステロールの産生量に変化しているかもしれない。以上のように、植食性の昆虫種について、DHCR24 活性が必須であるかどうかは、生育ステージに関わる可能性が考えられた。また、昆虫の祖先は肉食性を主な食性とする甲殻類とされており、昆虫種の進化、多様化の過程で植食性の昆虫種の出現は比較的新しいことから、DHCR24 の分子進化と昆虫の食性は関連していると考えられる。しかし、本博士論文では DHCR24 を分子レベルで進化的な考察をするには至らなかった。