

論文の内容の要旨

論文題目

完全変態昆虫における ecdysteroid 情報伝達に関する研究
— 細胞表面受容体を介した新規 ecdysteroid 情報伝達経路の検索 —

氏 名 平 郁子

ecdysteroid は、昆虫の脱皮や変態を促進する昆虫のステロイドホルモンの総称で、変態のほか性ホルモンとしての働きや胚発生への関与が知られている。また細胞レベルでも、様々な細胞応答を誘導する。

ところが、その作用の多様性にもかかわらず、ecdysteroid の受容体として現在までに同定されている分子種は ecdysone receptor (EcR) のみである。EcR は核内受容体スーパーファミリーに属し、ecdysteroid 存在下で遺伝子の転写を直接制御して細胞応答を誘導する。この EcR には複数のアイソタイプが存在するが、それだけでは ecdysteroid の生理活性の多様性を説明することができない。

私は修士課程において、完全変態昆虫であるセンチクバエ最終齢幼虫の中樞神経系に ecdysteroid の活性本体である 20-hydroxyecdysone (20-HE) を終濃度 1 μ M となるように与えると、神経芽細胞の増殖と一部の幼虫神経細胞の細胞死を同時に誘導し、最終的に中樞神経系の形態変化を引き起こす事を明らかにした。これらの変化は変態初期に見られる変化をほぼ再現しており、この系を使えば ecdysteroid の活性を分子レベルで解析できることが期待された。

この培養系を用い、中枢神経系に 20-HE のパルス刺激を与える実験を行ったところ、培養 2 日目以降に現れる中枢神経系の形態変化が、わずか 10 分間の 20-HE 作用時間で誘導されることがわかった。さらに、当教室においてはセンチクバエを用いた実験によって、特定の蛋白質のリン酸化や、貯蔵蛋白質の取り込み促進が、蛋白質合成を阻害した状態でも 20-HE に依存しておこることが見出されている。これらの現象は、遺伝子の転写調節を必要としない ecdysteroid 細胞内情報伝達経路の存在を示唆している。そこで私は博士課程において、ecdysteroid に細胞表面受容体による新しい細胞内情報伝達経路が存在するという仮説を立てて研究を進めてきた。以下にその成果を述べる。

第一章 20-HE による蛋白質チロシンリン酸化の変動の解析

ecdysteroid に細胞表面受容体を介した細胞内情報伝達経路が存在するならば、20-HE 刺激後短時間で何らかの情報伝達分子の変化が見られると予想される。そこで私は中枢神経系を 20-HE で短時間刺激したときの蛋白質チロシンリン酸化の変動を解析した。

その結果、わずか 10 分間の 20-HE 処理によって複数の蛋白質のチロシンリン酸化あるいは脱リン酸化がおこることが明らかとなった。20-HE 刺激後短時間でこのような変化が見られたことから、EcR による遺伝子の発現調節を介さずに直接チロシンリン酸化を変化させるような ecdysteroid 情報伝達経路が幼虫中枢神経系に存在すると考えられる。

第二章 ecdysteroid 細胞表面受容体候補分子の単離

センチクバエ中枢神経系には遺伝子発現の調節を必要としない ecdysteroid 情報伝達経路が存在することが示唆されたが、これを材料に受容体蛋白質の精製・単離を進めるのは困難であると予想された。そこで、他の生物のステロイド結合蛋白質などとの相同性から、ecdysteroid 細胞表面受容体候補分子の遺伝子の単離を試みた。

ここで注目したのは brassinosteroid と progesterone である。Brassinosteroid は多様な機能を有する植物のステロイドホルモンで、現在までに、その情報伝達に関与し受容体様蛋白質をコードする遺伝子として BRI1 が単離されている。一方、progesterone では核内受容体以外に細胞膜貫通型の結合蛋白質 progesterone binding protein (PBP) が精製・単離されている。PBP は一次構造上核内受容体と相同性がないにもかかわらず、progesterone との結合活性がある。これらの相同体が昆虫にあれば、同じステロイドである ecdysteroid の受容体になりうるのでは

ないかと考えた。

これらと相同性の高いものをデータベース上で検索したところ、BRI1 については有意な相同性を持つ昆虫の遺伝子は見つからなかったが、PBP では高い相同性をもつショウジョウバエの遺伝子断片が見つかった。その配列を元にスクリーニングを行った結果、248 アミノ酸からなる open reading frame (ORF) を有する cDNA クローンが複数得られた。この ORF の予想アミノ酸配列と哺乳類 PBP のアミノ酸配列を比較したところ、全長にわたって約 40% の相同性を示した。昆虫と哺乳類の間で高い相同性を保っていることから、この遺伝子の産物はステロイドに結合する可能性があると考え、この分子を *Drosophila putative steroid membrane binding protein* (dpSMBP) と命名した。また、予想アミノ酸配列中に膜貫通領域と考えられる疎水性に富む領域が存在したことから、dpSMBP は膜貫通蛋白質であることが予想された。

次に単離した dpSMBP 遺伝子が蛋白質として発現するかを確認するために、dpSMBP の予想アミノ酸配列中の部分ペプチドを抗原とする抗体を調製し、イムノプロットにより dpSMBP 蛋白質の発生過程における発現解析を行った。その結果、予想分子量にバンドが検出されたのは胚と蛹（特に初期蛹）であった。この発現パターンは ecdysteroid のピークと一致しており、この蛋白質が ecdysteroid と何らかの関わりをもつことを示唆している。

第三章 強制発現細胞を用いた dpSMBP 蛋白質の性状・機能解析

dpSMBP 蛋白質が ecdysteroid の受容体として機能するかを検討するため、dpSMBP 遺伝子強制発現細胞を用いて dpSMBP 蛋白質の性状および機能を解析した。

まず、dpSMBP 蛋白質が細胞表面に存在するか否かを知る目的で、この蛋白質の細胞内におけるソーティングを解析した。強制発現細胞から細胞膜を含むミクロソーム画分と細胞質画分を調製してイムノプロットを行ったところ、dpSMBP 蛋白質はミクロソーム画分に分配された。さらに、蛍光免疫染色を行ったところ、抗 dpSMBP 抗体を用いた場合には、透過処理の有無に関わらず dpSMBP 強制発現細胞群のなかで 10~20% の陽性細胞が検出された。このとき、細胞質にソーティングされる β -galactosidase (β -gal) を発現させた細胞に対し抗 β -gal 抗体を反応させた時には、透過処理した細胞でのみ陽性細胞が検出されたことから、dpSMBP 蛋白質は細胞表面にソーティングされることが示された。

次に、dpSMBP 蛋白質と ecdysteroid が結合するかを検討する目的で、 ^3H ラベルされ

た ecdysone に対する結合をミクロソーム画分で検討した。その結果、dpSMBP 強制発現細胞のミクロソーム画分は、 β -gal 強制発現細胞のものと比較して約 1.5 倍の ^3H -ecdysone を保持できることがわかった。さらに、 ^3H -ecdysone の 1000 倍量の非標識 ecdysone を添加して同様の実験を行ったところ、dpSMBP 強制発現細胞ミクロソーム画分に保持される ^3H -ecdysone 量が減少したことから、dpSMBP 蛋白質は ecdysone 特異的な結合能を持つことが示唆された。

さらに dpSMBP 蛋白質が ecdysteroid の細胞内情報伝達に関与しているかを、蛋白質のチロシンリン酸化の変動を指標に解析した結果、dpSMBP 強制発現細胞と β -gal 強制発現細胞を比較してバンド強度の変動に違いのあるものが複数あった。そのなかでも、分子量約 18kDa の蛋白質は、dpSMBP 強制発現細胞群で、20-HE 添加後 2 分で一過的にリン酸化が強く亢進することがわかった。このことは、dpSMBP 蛋白質が ecdysteroid の細胞内情報伝達に関与する可能性を示している。

まとめ

本研究において私は、センチクバエ幼虫中枢神経系において短時間の 20-HE 処理によって複数の蛋白質のチロシンリン酸化が変動することを見いだした。またショウジョウバエにおいて ecdysteroid 細胞表面受容体の候補分子として dpSMBP 遺伝子を単離した。さらにこの遺伝子の強制発現細胞を用いて dpSMBP 蛋白質が細胞表面に存在することを示し、ecdysone 結合能を有し、20-HE による蛋白質チロシンリン酸化の変動に関与する可能性を示した。

従来 ecdysteroid は、EcR を介して特異的な遺伝子の発現を直接制御することが分かっていたが、本研究により dpSMBP が関与する新しい ecdysteroid 情報伝達経路の存在が示唆された。今後、この情報伝達経路の解析により、ecdysteroid を含むステロイドホルモンの多様な生理活性発現のメカニズムが明らかになることが期待される。