

論文の内容の要旨

応用生命化学専攻

平成 17 年度 博士課程進学

氏 名 浅妻 英章

指導教員名 長澤 寛道

論文題目 甲殻類における脱皮抑制ホルモンの作用機構に関する研究

エビ、カニ等に代表される甲殻類は、眼柄を切除すると、体色が変化し、脱皮が誘導され、卵巣が急速に成熟し、血糖値が低下する。これらの多様な生理変化が生じるのは、眼柄内で産生される様々なペプチドホルモンが、眼柄切除により失われるためである。眼柄内で産生されている主要なペプチドホルモンは、甲殻類血糖上昇ホルモン (CHH) である。眼柄内では CHH の他に、脱皮抑制ホルモン (MIH)、卵黄形成抑制ホルモン (VIH) なども産生されており、これらは類似した一次構造を有することから、CHH 族ペプチドと呼ばれている。CHH 族ペプチドは、互いに構造上の類似性を示すにも関わらず、異なる活性を示す。

CHH 族ペプチドは、精製法が確立されていることから、これまでに数多くの甲殻類から単離、同定されてきた。しかし、CHH 族ペプチドの受容体は未だにひとつも同定されていない。また、受容体から下流の細胞内シグナル伝達経路に関する報告は、いくつかあるものの、種間で異なる結果が得られている。さらに血糖上昇、脱皮抑制等の活性を担う、シグナルに応答する分子は同定されていない。以上の点を明らかにするには、既に活性型組換え体の大量調製法が確立されている、クルマエビ (*Marsupenaeus japonicus*) の MIH を CHH 族ペプチドの代表例として用いることが、非常に有利であると考えた。

MIH は、脱皮ホルモン産生器官である Y 器官に作用し、脱皮ホルモンであるエクジステロイドの生合成または分泌を抑制する。甲殻類の脱皮は、昆虫の脱皮と同様にエクジステロイドによって制御されており、脱皮前に血中エクジステロイド濃度が上昇することによって脱皮が誘導される。本研究は MIH の脱皮抑制機構の解明を目的とし、クルマエビを用いて、MIH 受容体遺伝子のクローニングを

試み（第1章）、Y 器官細胞内のシグナル伝達経路の解析（第2章）、Y 器官細胞内で機能する脱皮制御因子のクローニングおよび発現解析を行った（第3章）。

1. 発現クローニング法を用いた MIH 受容体遺伝子のクローニング

これまでにクルマエビ MIH 受容体の解析を行い、MIH 受容体タンパク質は Y 器官特異的に発現する約 70 kDa の膜タンパク質であることを示した (1)。Y 器官は非常に微小な器官であり、MIH 受容体をタンパク質側から同定することは困難であると考えられた。そこで、Y 器官由来 cDNA ライブラリーを作製し、COS7 細胞を用いた発現クローニングにより、MIH 受容体をコードする cDNA のクローニングを試みた。受容体への結合を評価するため、リガンドである MIH の各種標識体、FLAG タグ融合組換え体を作製した。まず、ビオチン標識した MIH と抗ビオチン抗体プレートを用いたパニング法を用いて cDNA クローンの濃縮を行ったが、細胞とプレートの非特異的な結合が強いため、特定クローンの濃縮には至らなかった。次に、リガンドを標識反応不要な FLAG タグ融合 MIH に変更し、非特異的結合を抑えるために磁気ビーズを用いてパニングを行った。その結果、ミトコンドリア呼吸鎖複合体 III の形成に必須なシャペロンタンパク質である、BCS1 に相同性を示すクローンが得られた。得られたクローンの演繹アミノ酸配列中には、BCS1 に特徴的なミトコンドリア輸送シグナルが保存されており、ミトコンドリア内膜への局在が予想されたため、クローンは MIH 受容体ではないと判断した。次に、1 細胞レベルで蛍光リガンドとの結合が検出可能である FACS を用いた。蛍光リガンドとして FITC-MIH を調製し、クローンの濃縮を行った。その結果、RING-finger ドメインを有するクローンが得られた。しかし、このクローンは配列中に膜貫通領域を有していないため、MIH 受容体ではないと考えられた。以上 3 種類のリガンドで MIH 受容体遺伝子の発現クローニングを試みたが、MIH 受容体をコードする候補遺伝子を得るには至っていない。

2. MIH によって活性化される Y 器官細胞内シグナル伝達経路の解析

MIH は Y 器官細胞膜上の受容体に作用した後、どのような細胞内シグナル伝達経路を経て、エクジステロイドの生合成、分泌の抑制に至るのか、その作用機構は知られていない。これまでに MIH シグナルには cAMP、cGMP、Ca²⁺等の関与が指摘されてきたが、クルマエビの Y 器官においては不明であった。そこでまず、MIH 刺激による Y 器官細胞内 cAMP、cGMP 濃度を測定した結果、cAMP 濃度には有意な差は見られなかったが、cGMP 濃度は MIH 濃度依存的に上昇した。また、6 種類のクルマエビ CHH のひとつである CHH-VII による刺激では、cGMP 濃度は上昇しなかった。すなわち、Y 器官上に存在する MIH 受容体は、CHH と MIH を明確に区別していることが示された。次に、MIH 刺激により Y 器官細胞内において cGMP が産生されることから、MIH シグナル伝達経路には cGMP 合成酵素であるグアニル酸シクラーゼ (GC) の関与が予想された。一般的に、GC は細胞膜上に存在する膜型 GC (mGC) と、細胞質中に存在する可溶性 GC (sGC) に大別される。Y 器官で機能する GC の種類を判定するため、sGC 特異的阻害剤である ODQ が MIH シグナルへ及ぼす影響を調べた結果、MIH 刺激による cGMP 濃度の上昇は、ODQ 存在下においても変化しなかったことから、MIH のシグナル伝達に関与する GC は、sGC ではなく mGC であることが示唆された。

mGC は ANP などのペプチドホルモンの受容体として機能する例があることから、Y 器官に発現する mGC が MIH 受容体である可能性が考えられた。

MIH のシグナル伝達に關与する GC を同定するため、クルマエビの Y 器官から GC をコードする cDNA をクローニングし。その結果、mGC に相同性を有する MjGC1 を得た。組織別発現解析の結果、*MjGC1* mRNA は全身で発現が確認された。MIH 受容体は Y 器官特異的な分子であることを考慮すると、MjGC1 は MIH 受容体ではないことが予想された。しかし、MjGC1 が MIH 受容体としてではなく、その下流で活性化されて機能する可能性は残された。そこで、MIH のシグナル伝達経路における MjGC1 の關与を明らかにするため、RNAi 法により *MjGC1* mRNA のノックダウンを試みたが、*MjGC1* 特異的な転写量の減少は確認できなかった。

現在、MjGC1 が MIH 受容体であることを積極的に支持するデータは存在しないが、アオガニの MjGC1 オーソログが MIH 受容体であるとする報告がある。そこで、実際に MjGC1 が MIH 受容体として機能するのかを明らかにするため、異種発現系を用いて MjGC1 の機能解析を行った。まず、全長 MjGC1 を COS7 細胞に発現させ、FACS を用いて FITC-MIH との結合解析を行ったが、MIH 特異的な結合は見られなかった。次に、MjGC1 発現細胞を MIH または眼柄抽出物存在下で培養し、細胞内 cGMP 濃度を測定したが、cGMP 濃度に変化は見られなかった。以上のことから、MjGC1 の MIH シグナル伝達への關与に未だ検討の余地はあるものの、MjGC1 は MIH の直接結合する受容体分子ではないことが示唆された。

3. Y 器官における脱皮抑制機構の解析

MIH の脱皮抑制活性はエクジステロイドの分泌量の低下として現れることから、MIH の作用機構のひとつとして、エクジステロイドの生合成を抑制する可能性が考えられる。近年、ショウジョウバエとカイコにおいてエクジステロイド生合成経路の解明が進められ、コレステロールから 20-ヒドロキシエクジソンまでの生合成のうち、最終 4 反応を触媒する生合成酵素をコードする、Halloween 遺伝子群が同定された。脱皮直前になると、Halloween 遺伝子の発現量は上昇し、その結果血中エクジステロイド濃度が上昇する。甲殻類と昆虫は、両者ともエクジステロイドを脱皮ホルモンとすることから、その生合成経路は互いに類似したものであると考えられた。そこで、クルマエビ Y 器官より Halloween 遺伝子のホモログをクローニングし、発現解析を行った。その結果、ketodiol から ketotriol への変換を担う 25-hydroxylase である Cyp306a1 (*phantom*) に相同性を有する cDNA、*MjPhm* を得た。組織別発現解析の結果、*MjPhm* mRNA は Y 器官特異的に発現していた。また、脱皮後期、脱皮間期、脱皮前期の Y 器官での *MjPhm* の発現量を測定したところ、脱皮前期にのみ高い発現が見られた。以上の結果から、*MjPhm* のエクジステロイド生合成への關与が強く示唆された。次に、Y 器官を MIH 存在下で培養し、*MjPhm* mRNA の発現量を測定したところ、MIH 存在下では *MjPhm* の発現量が有意に減少していた。この結果から、MIH による脱皮抑制機構には、エクジステロイド生合成遺伝子の転写抑制の關与が示された。しかし、*MjPhm* mRNA の発現は、脱皮しない期間でも一定の発現量を維持していたことから、クルマエビにおけるエクジステロイド生合成の制御には、転写調節制御以外の機構も働いていることが示唆された。

血中のエクジステロイド濃度は脱皮前期に増加するが、脱皮直前に急激に減少する。このような濃度制御機構には、Y 器官にはエクジステロイド濃度を感知し、エクジステロイド生合成を停止するような、MIH の抑制制御とは異なる抑制機構が存在することが予想された。そこで、エクジソン受容体 (EcR) に着目し、クルマエビの EcR とその共役受容体分子であるレチノイド X 受容体 (RXR) の cDNA をクローニングし、脱皮周期間における発現解析を行った (2)。その結果、Y 器官では脱皮前期に向かい発現量は上昇傾向を示したが、顕著な発現変化は見られなかった。EcR の発現はエクジソン濃度と明確な相関を示さなかったことから、脱皮直前のエクジステロイド濃度減少は EcR の発現量ではなく、転写活性化能の変化によって生じるのではないかと考えられた。今後、EcR とエクジステロイド生合成制御との関連性を調べることで、脱皮直前におけるエクジステロイド生合成の制御機構が明らかになるとと思われる。

4. 総括

本研究において、クルマエビ MIH のシグナル伝達経路において cGMP の関与が示され、MIH の作用機構にはエクジステロイド生合成遺伝子の抑制が関与していることが示唆された。これにより、今まで生物活性でのみ語られていた甲殻類の脱皮制御機構の一端を、分子レベルで示すことができた。MIH のシグナル伝達に関与する候補分子として GC のクローニングを行ったが、Y 器官特異的に発現する GC は見当たらなかった。これより、MIH のシグナル伝達は、1 分子の mGC が担うのではなく、MIH 特異的に結合する受容体と、MIH 受容体の下流で活性化する GC の両方が寄与するシステムを考える必要がある。一方、MIH シグナルの出力となるエクジステロイドの制御に関しては、*MjPhm*、*EcR* の発現解析の結果より、MIH のみで行われるものではなく、EcR によるネガティブフィードバックや、他因子による制御をうける可能性が予想される。

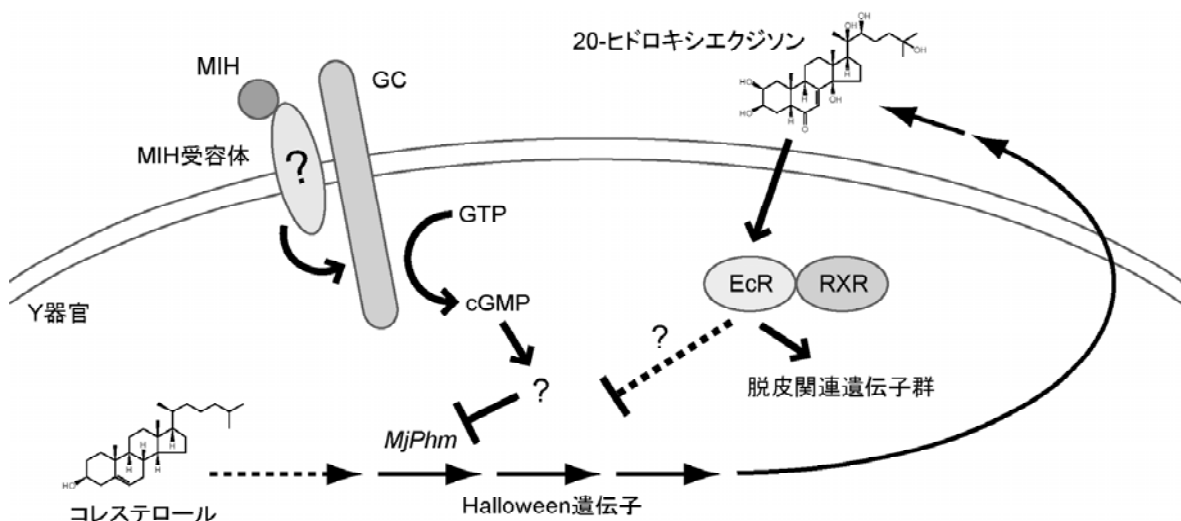


図. Y 器官細胞内における MIH の作用機構のモデル参考文献

1. Asazuma H, Nagata S, Katayama H, Ohira T, Nagasawa H., *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 1040 (2005), 215-8.
2. Asazuma H, Nagata S, Kono M, Nagasawa H., *Comp. Biochem. Physiol.*, 148B (2007), 139-50.