

論文内容の要旨

論文題目 動物のステロイドホルモン生合成に関与する新規 Rieske 型酸化酵素 Neverland に関する研究

氏名 吉山 拓志

【序論】

ステロイドホルモンは、多細胞生物の細胞分化や増殖、生体内の恒常性の維持、性の分化と行動など、多彩な生命現象を制御する必須の作用分子である。ステロイドホルモンは、コレステロールを原料として、それぞれの内分泌器官に特有の酵素を介して合成される。そのため、ステロイドホルモンの作用機構を理解するためには、内分泌器官におけるステロイドホルモン生合成の制御機構についての理解が不可欠である。これまでのステロイドホルモン生合成に関する研究は脊椎動物を中心に進められ、多くのステロイドホルモン生合成酵素の分子実体が明らかにされてきた。しかしながら、複雑な脊椎動物のシステムにおいては、それらの酵素の遺伝的な発現制御機構や相互作用について、詳しい知見を得ることが困難である。

本研究では、ステロイドホルモン生合成の分子機構とその生体内における役割を理解するために、脱皮と変態という明確な発育段階の指標を持ち、かつ遺伝学的な解析が容易な昆虫をモデル生物として用いた。昆虫のステロイドホルモンであるエクジソンは、前胸腺において合成され、胚発生や幼虫脱皮および変態の進行を厳密に制御している。前胸腺におけるエクジソン生合成経路については、個体サイズが大きく生化学的な解析が容易な鱗翅目を用いた研究により、その詳細が明らかにされている。また近年、ショウジョウバエ変異体の解析により、前胸腺におけるエクジソン生合成に関与するいくつかの遺伝子が報告されている。しかしながら、ショウジョウバエの前胸腺は非常に小さく、なおかつ他の組織と癒合しているために、局所的な発現を指標とした逆遺伝学的な解析はなされてこなかった。一方で、近年の分子生物学の進歩により、鱗翅目昆虫であるカイコの遺伝子情報も整備されつつある。そこで本研究では、カイコを用いた逆遺伝学的手法と、ショウジョウバエを用いた分子遺伝学的手法を組み合わせることによって、エクジソン生合成に関与する新規遺伝子の同定と機能解析を目指した。

【本論】

1. 新規Rieske型酸化酵素Neverlandの同定

エクジソン生合成に関与する遺伝子の一部は、体液中のエクジソン量の変動に沿って発現量が変動する。そこで、エクジソン生合成に関与する遺伝子の探索にあたり、前胸腺で発現し、かつその発現量が発育段階に沿って変化する遺伝子に着目した。約 6,000 個のカイコ EST クローンがスポットされた DNA マイクロアレイを用いて、カイコ前胸腺における遺伝子発現量をエクジソン分泌活性が低い時期（5 齢 1 日目）と高い時期（5 齢ワンダリング行動 2 日目）とで比較した。その結果、低い時期と比較して高い時期に発現量が 3 倍以上増加する遺伝子を 35 個見出した。続いて、これらの遺伝子について逆転写 PCR によってカイコにおける組織別発現分布を調べたところ、前胸腺で最も高い発現量を示す遺伝子を 6 個見出した。5'RACE 法によって、*prgv0240*、*prgv0649*、*prgv0253* および *prgv0382* の 4 遺伝子の cDNA 全長を決定した。

そのうちのひとつ *prgv0382* [以下、この遺伝子を *neverland* (*nvd*) と呼ぶ] は 453 残基からなるタンパク質をコードしており、原核生物の Rieske 型オキシゲナーゼに属する遺伝子の一部と高い相同性を示した。BLAST 検索の結果、Nvd 相同分子は原生動物、節足動物、棘皮動物、脊椎動物のうちの魚類、両生類、鳥類を含む動物界に広く保存されていることが判明した。原核生物の Rieske 型オキシゲナーゼは多様な基質特異性を示し、一般的に外来性のステロイドや芳香族化合物の異化に関与することが知られている。そのため、動物の発生や個体維持において、Nvd が何らかの酸化還元酵素として働く可能性が示唆された。

2. ショウジョウバエ個体を用いた *neverland* の機能解析

カイコ Nvd 予測アミノ酸配列を元にショウジョウバエゲノムに対する BLAST 検索を行い、ショウジョウバエ *nvd* は第 3 染色体ヘテロクロマチン上に位置し、6 つのエキソンから構成される全長 76Kb の遺伝子であることを明らかにした。

nvd の発現パターンを *in situ* RNA ハイブリダイゼーション法によって調べたところ、胚発生期および幼虫期のいずれにおいても、エクジソン生合成器官である前胸腺細胞で特異的に発現していた。さらに、定量的 PCR によって前胸腺細胞における発育段階に沿った発現量の変動を調べたところ、エクジソン分泌活性に沿って発現量が変動していることが判明した。

続いて、生体内における *nvd* の機能に迫る目的で、GAL4/UAS 系を利用して *nvd* に対する RNAi を誘導した。その結果、前胸腺以外の組織で *nvd* の RNAi を誘導させた個体は正常に羽化したが、前胸腺において RNAi を誘導した個体は、脱皮できずに 1 齢幼虫のまま致死となった。このことは、前胸腺における *nvd* の発現が個体発育に必須であることを示している。最近、カナダのグループの研究によって、1 齢致死となる *nvd* 欠損突然変異株が同定された。そこで、欠失突然変異株の前胸腺特異的に *nvd* トランスジーンを発現させたところ、表現型が回復し成虫まで発育が進んだ。以上の結果は、*nvd* の前胸腺における発現が、ショウジョウバエ個体の正常な発育にとって必要かつ十分であることを示している。

次に、*nvd* のエクジソン生合成における役割を検討した。*nvd* RNAi 個体内のエクジソン量をラジオイムノアッセイによって定量したところ、正常個体と比較して有意に低下していた。これらの表現型は、20-ヒドロキシエクジソンや、エクジソン生合成の前駆体である 7-デヒドロコレステロールの摂食により回復したが、コレステロールでは回復しなかった。以上の結果は、*nvd* がショウジョウバエのエクジソン生合成においてコレステロールから 7-デヒドロコレステロールへの変換に関与することを強く示唆している。

3. S2 細胞を用いたNeverlandの機能解析

これまでのエクジソン生合成に關与する P450 オキシゲナーゼの研究では、ショウジョウバエ由来の培養細胞 S2 細胞を利用した発現系により酵素活性が同定されてきた。そこで、P450 と同じく酸化還元酵素であることが予想される Nvd の分子機構に迫る目的で、S2 細胞系を用いてその酵素活性を調べた。Nvd とコレステロールを共培養すると、濃度依存的かつ時間依存的な代謝産物の生成が見られた。分取した代謝産物のヒドラゾン誘導体を ESI-MS/MS 法によって分析したところ、代謝産物は 7-デヒドロコレステロールであることが示された。以上の結果は、Nvd がコレステロールを 7-デヒドロコレステロールへと変換する活性を持つことを示している。また、ショウジョウバエ、線虫およびゼブラフィッシュ Nvd もコレステロールの 7-デヒドロコレステロールへの変換活性を持っていたことから、Nvd の活性が進化的に保存されていることが示唆される。

原核生物の Rieske 型オキシゲナーゼは、Rieske [2Fe-2S] クラスタ領域と非ヘム鉄結合領域を持っており、これらの領域では、進化的に保存された極性アミノ酸が酵素活性の發揮に重要な役割を果たしている。そこで、Nvd における保存領域の役割に迫る目的で、これらの領域に点変異を導入したコンストラクトの酵素活性を調べた。その結果、いずれの領域に点変異を導入したコンストラクトも、酵素活性が消失していた。このことは、Nvd のコレステロール 7,8-デヒドロゲナーゼ活性の發揮には、Rieske [2Fe-2S] クラスタ領域および非ヘム鉄結合領域の両者が必須であることを示している。

免疫細胞染色により Nvd の細胞内局在を調べたところ、Nvd はミトコンドリアへ局在する膜タンパク質であることが示された。膜貫通部位を欠失させたコンストラクトでは酵素活性が有意に低下していたことから、Nvd の酵素活性の發揮には、ミトコンドリアへの局在が重要であることが示唆される。

【結論】

これまでの研究では、エクジソン生合成の最初の段階であるコレステロールから 7-デヒドロコレステロールへの変換は、小胞体に局在する P450 オキシゲナーゼによって担われていると予想されていた。本研究で、その変換は真核生物 Rieske 型酸化酵素に属する新規遺伝子 *neverland* によって、ミトコンドリアにおいて行われることを明らかにした。*neverland* ファミリーに属する遺伝子群は、動物界に広く保存されているが、哺乳類では欠落している。本研究の発見は、エクジソン生合成機構の全体像の解明を大きく促進するのみならず、進化的に保存された新規 Rieske 型酸化酵素のステロイドホルモン生合成への關与を示したことで、動物界におけるステロイド代謝機構の研究に新しい展開をもたらすことが期待される。

我々の研究とときを同じくして、線虫の *neverland* 相同遺伝子 *daf-36* も、ステロイドホルモン生合成および個体の發育タイミングの制御に必要であることが報告された。このことは、*neverland/daf-36* が、生化学的にも個体發育の面においても、機能的に保存された新規ファミリーであることを意味する。*neverland* は、動物界におけるステロイド代謝機構の進化と多様化、さらには發育タイミング調節機構の進化的保存性を考える上で、今後重要な足がかりとなるだろう。