

論文の内容の要旨

論文題目

昆虫ステロイドホルモン生合成器官におけるコレステロール取り込みの分子機構

氏 名 五十嵐 史彦

【序論】

エクジソンは昆虫の脱皮・変態の引き金となるステロイドホルモンである。エクジソンは前胸腺と呼ばれる器官でコレステロールを原料として生合成され、その生合成は脳神経ペプチドである前胸腺刺激ホルモン（prothoracicotropic hormone, PTH）によって促進される（図 1A）。近年、前胸腺に発現する複数のエクジソン生合成酵素が同定され、さらにその一部が PTH によって転写制御を受けるなど、エクジソン生合成・分泌の制御メカニズムが明らかにされてきている。しかしながら、前胸腺における原料物質（コレステロール）の取り込み機構については、その分子機構がほとんど解明されておらず、エクジソン生合成制御機構の全容解明に向けて解決すべき重要課題として残されている。

昆虫はコレステロールの *de novo* 生合成経路を失っているため、必要なコレステロールは全て食餌に由来する。例えば、肉食性昆虫は食餌から直接、食植性昆虫では β -シトステロールなどの植物ステロールを腸管で変換することで、コレステロールを得ている（図 2）。腸管を経由したコレステロールは、昆虫の主要なリポタンパク質（リポフォリン）と結合して各組織へと輸送される。すなわち、リポフォリンは前胸腺へコレステロールを供給する分子であると考えられる。しかしながら、リポフォリンと共役してコレステロール取り込みを行う受容体の実態や取り込みの制御メカニズムは明らかにされていない。

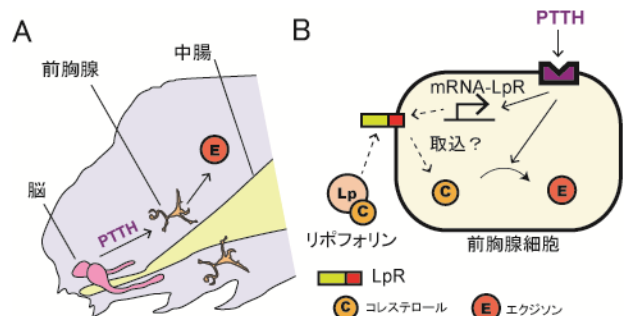


図 1. (A) カイコの頭部と前胸腺の位置。(B) PTH の前胸腺に対する作用および前胸腺細胞におけるコレステロール取り込みメカニズムの作業仮説。

近年、当研究室で行われたカイコ前胸腺を用いたトランスクリプトーム解析から、哺乳類 LDL 受容体 (LDLR) と相同性を持つ LpR (Lipophorin receptor) の発現が PTH 刺激後の前胸腺で上昇することが見出された (図 1B)。これまで LpR についてはリポフォリンのアポタンパク質と結合することが明らかにされているのみだが、LDLR は LDL と結合したコレステロールを LDL-LDLR 複合体として細胞内に取り込む。このことから、前胸腺細胞におけるコレステロール取り込みメカニズムは、リポフォリン-LpR を介した取り込み経路が PTH によって制御される機構である可能性が考えられた (図 1B)。そこで本研究は、リポフォリンからのコレステロール取り込み時における PTH の役割や LpR など取り込み関連分子の機能を明らかにし、昆虫前胸腺におけるコレステロール取り込みの分子機構の解明を目指した。

【結果および考察】

1. LC/APCI-MS/MS システムによるカイコ幼虫で見出される 7 種類のステロールの定量分析系の構築

研究開始当初、コレステロールの供給源である食餌やリポフォリン、さらには前胸腺の含有するステロールの組成が不明であった。このため、まずカイコで代謝されるステロール類の定量分析系の確立を行った。

昆虫で見出されるステロールはお互いの構造が似ており (図 2)、また、昆虫サンプルは一般的に小さく試料から得られる代謝物が微量である。そのため、構造特異性および感度を伴った分析系が必要と考えられた。そこで、本研究では LC/APCI-MS/MS システムに着目した。このシステムではイオン化の際に誘導体化処理を必要としない大気圧化学イオン化法 (APCI) を用いるため、サンプル調製が簡便で済む。さらに、タンデムマスマスペクトロメトリー (MS/MS) を行うため、構造特異的な検出および感度に優れている。分析対象は、図 2 に示す 7 種のステロールとした。また、定量の際の内部標準にはコレステロール-3,4-¹³C₂ を用いた。

まず各ステロールの APCI-MS スペクトルを解析したところ、3 位の OH 基が脱水されたイオン [M+H-H₂O]⁺ が最も強いピークとして得られた。APCI-MS/MS スペクトルの解析では、各ステロールのステロイド骨格の A 環および B 環を含むフラグメントイオンが主なピークとして得られた (図 3A)。この結果を基に、脱水イオンおよびフラグメントイオンを選択的に捉えるチャンネルを設定し、複数のステロールの構造特異的な一斉定量システムを構築した (図 3B)。定量限界 (LOQ: S/N 比 ≥ 10) は、1 回の分析当たり 0.05 ng から 0.5 ng の範囲であり、カイコ 1 匹分の前胸腺が含有するコレステロール量 (約 40 ng から 60 ng) の測定に十分な感度だった。確立した分析系を用いてリポフォリンのステロール

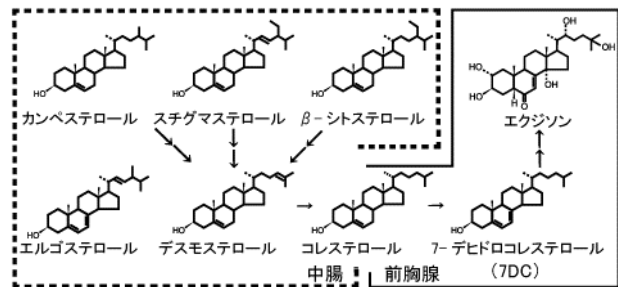


図 2. 今回分析したステロール類の全構造およびエクジソンの構造。植物ステロール (β-シトステロール、カンベステロール、スチグマステロール) およびエルゴステロールはカイコの食餌 (人工飼料) に含まれるステロール。デスモステロールは、中腸で植物ステロールがコレステロールへ変換される際の代謝中間体。7-デヒドロコレステロール (7DC) は、前胸腺におけるエクジソン生成経路においてコレステロールから生成される最初の代謝中間体。

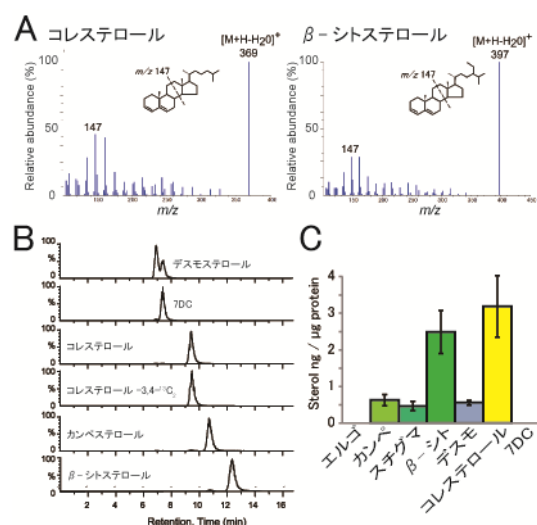


図 3. (A) コレステロールと β-シトステロールの APCI-MS/MS スペクトル。(B) デスモステロール、7-デヒドロコレステロール (7DC)、コレステロール、コレステロール-3,4-¹³C₂、カンベステロール、β-シトステロールの MRM (Multiple Reaction Monitoring) クロマトグラム。(C) リポフォリンのステロール組成。

組成を調べたところ、食餌に含まれるβ-シトステロールなどの植物ステロールがリポフォリンに結合していることが分かった(図3C)。また、カイコ5齢期前胸腺の含有ステロール量のエクジソン生合成期前後における変動パターンを分析したところ、エクジソン生合成期であるワンダリング期にコレステロールおよび7-デヒドロコレステロールの蓄積量が増加していた(図4A)。このため、前胸腺ではワンダリング期にコレステロール取り込み活性が高まることが示唆された。

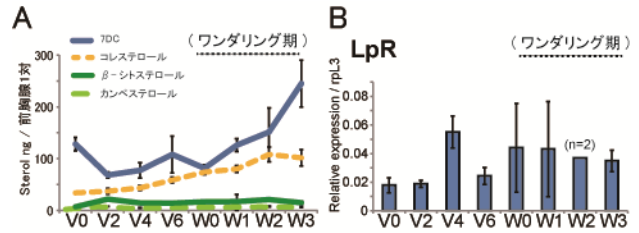


図4. (A) カイコ5齢期前胸腺における含有ステロール量の経時変動。(B) LpR転写産物の発現変動。各平均値±標準偏差。n=4。

2. 前胸腺におけるリポフォリン由来コレステロール取り込み活性の解析

5 齢期の前胸腺における LpR の発現を調べたところワンダリング期に発現レベルが高く(図4B)、また体液中の PTTH 濃度はワンダリング期に高い。このことからリポフォリン-LpR を介した取り込み経路が PTTH よって調節される機構が考えられた。そこで、PTTH 刺激時前胸腺における LpR の発現上昇の確認およびリポフォリン由来コレステロール蓄積活性の有無の検証を、前胸腺器官培養系を用いて行った。なお、実験にはワンダリング期直前のカイコ5 齢6 日目(V6)の前胸腺を用いた。

まず3時間PTTH刺激した前胸腺におけるLpRの発現を定量PCRで解析した。その結果、PTTH刺激画分(PTTH+)では、PTTH刺激を行わなかったPTTH-やEcdy+画分と比べて、LpRの発現が高く、PTTHによってLpRの発現が誘導されることが示された(図5)。

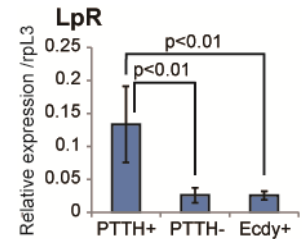


図5. PTTH刺激(10 nM, 3時間)した前胸腺におけるLpR転写産物の発現。Ecdy+はエクジソン刺激画分。各平均値±標準偏差。n=6。

次に、1対の前胸腺を単離し3時間PTTH刺激を行った後、片方の前胸腺はリポフォリン入り培地(Lp+)へ、もう片方はリポフォリンを含まない培地(Lp-)へ移し、さらに12時間PTTH刺激を行った。その結果、PTTH刺激および(Lp+)で培養した前胸腺から、リポフォリン由来と考えられるコレステロールの蓄積が認められた(図6A)。PTTH-およびEcdy+画分の前胸腺では、(Lp+)と(Lp-)の間にこのような差は見られなかったことから、PTTHによってリポフォリン由来コレステロールの取り込みが促進されることが示唆された。また、PTTH刺激下の前胸腺が(Lp+)の培地に放出したエクジソン量は(Lp-)に対して約2倍と、高いレベルであった(図6B)。

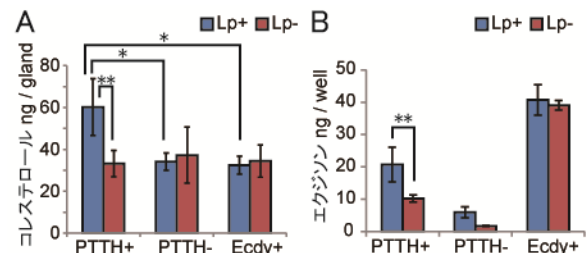


図6. (A) PTTH刺激(10 nM, 15時間)した前胸腺におけるコレステロールの蓄積。Lp+におけるリポフォリン濃度は1 mg/mlとした。(B) 各培地から検出されたエクジソンの量。各平均値±標準偏差。n=5, * p < 0.05, ** p < 0.01。

さらに、Alexa546で蛍光ラベルしたリポフォリン(Alexa546-Lp)を用いて、リポフォリンの局在解析を行ったところ、PTTH刺激した前胸腺の細胞膜付近および細胞間隙からAlexa546-Lpの蛍光が認められた(図7A)。このとき、PTTH刺激した前胸腺ではAlexa546-Lpの蛍光密度が上昇しており(図7B)、このことからリポフォリンの結合活性が高まっていることが示された。

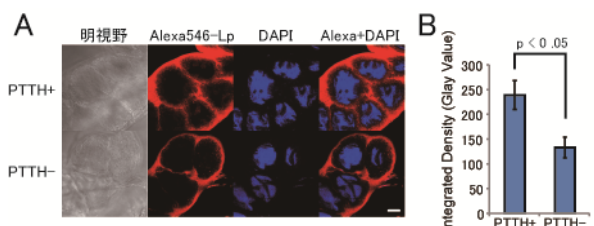


図7. (A) PTTH刺激下15時間の前胸腺におけるリポフォリン(Alexa-Lp)の局在。スケールバー=20 μm。(B) (A)の画像解析。Alexa546のシグナル密度。各平均値±標準偏差。n=4。

3. コレステロール取り込みを担う分子の機能解析

最後に、コレステロール取り込みを担う分子として LpR の機能解析を行った。また、機能解析を行う分子としては細胞内コレステロール輸送に関わるとされる Npc1a にも着目した。Npc1a はワンダリング期の前胸腺で発現が高く、PTTH 刺激で発現上昇がみられた。培養細胞としては、内在性のリポフォリン結合活性が低い CHO 細胞を用いた。

CHO 細胞には内在性のコレステロールが多量に含まれるため、LpR の取り込み活性を評価するためには、培養細胞系にほとんど存在しない同位体標識コレステロールを用いる必要があった。そこで、安定同位体標識コレステロール（コレステロール-d7）を含有させたリポフォリンを作成し、LpR 発現細胞と共培養することで、リポフォリン由来コレステロール-d7 の蓄積活性の有無を検証した。その結果、LpR 発現細胞画分でコントロールと比べて有意なコレステロール-d7 の蓄積が認められた（図 8A）。さらに、LpR 発現細胞にリポフォリンが局在しているか否かを検証するために、LpR の C 末端に GFP 配列を結合させたコンストラクトを作成し、細胞に発現させて、Alexa546-Lp と共培養した。その結果、LpRGFP 発現細胞から特異的に Alexa546-Lp の蛍光が認められた（図 8B）。これらの結果から、LpR にはリポフォリン由来コレステロールを細胞内に取り込む活性があることが示された。

Npc1a の機能解析では、機能再構成系の構築を行うために、まず Npc1aGFP コンストラクトを用いて CHO 細胞における局在を調べた。その結果、意外にも細胞膜からシグナルが観測された。このため Npc1a は細胞膜上で何らかの機能を有していると考え、リポフォリンとの結合の有無およびリポフォリン由来コレステロール-d7 の蓄積活性を調べた。その結果、Npc1a 発現細胞画分からコレステロール-d7 の蓄積が観測された（図 8A）。この結果は、Npc1a がリポフォリン由来のステロールと結合することを示しており、Npc1a に存在する進化的に高く保存されたステロール結合ドメインに起因するものと考えられる。

【結論】

本研究から、PTTH 刺激後の前胸腺では LpR の転写が誘導されること、および前胸腺におけるリポフォリン由来コレステロールの取り込みが PTTH によって促進されることが分かった。また、機能解析実験により、LpR のリポフォリン由来コレステロール取り込み活性を確認し、Npc1a についてはリポフォリン由来ステロールとの結合を示唆する結果が得られた。すなわち、前胸腺におけるコレステロール取り込みメカニズムは、PTTH 刺激によって LpR の発現レベルが上昇し、コレステロール取り込み経路が活性化されるという分子機構が考えられた。本研究は、昆虫前胸腺におけるコレステロール取り込みの分子基盤に関する初めての知見であり、今後 PTTH 刺激時における取り込み関連分子の機能およびコレステロール動態の解明が期待される。

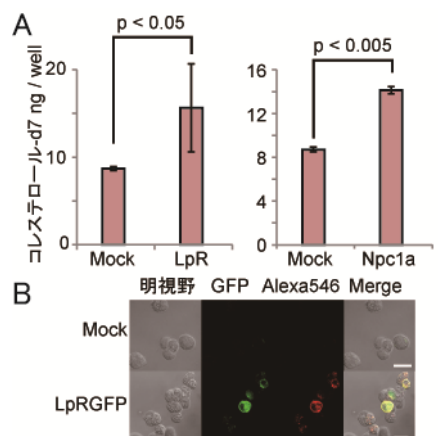


図8. (A) LpRあるいはNpc1a発現細胞画分におけるリポフォリン由来コレステロール-d7の蓄積。各平均値±標準偏差, n=6。(B) 共焦点イメージングによる、LpRGFPとAlexa546-Lpの局在解析。スケールバー=10 μ m。