

特集：カイコから害虫ゲノムへの展開

昆虫脱皮ホルモン生合成酵素の 昆虫制御剤ターゲットとしての可能性

筑波大学大学院生命環境科学研究科 丹 羽 隆 介

はじめに

本稿は、昆虫の発育に必須の役割を果たす脱皮ホルモンの生合成に働く酵素群の同定の歴史と分子的特徴を整理し、将来的に昆虫制御剤 (insect growth regulator, 以下 IGR) の開発における可能性について概説することを目的とする。

脱皮は、動物が進化の過程で獲得した極めて普遍的な発生イベントである。現在までの分子系統学的解析によれば、昆虫類を含む節足動物や線虫類等が、脱皮現象を基本的な共通指標とする「脱皮動物群 (Ecdysozoa)」としてグルーピングされる。なかでも、昆虫類は、その成長戦略として脱皮とともに変態をも獲得し、生活史を劇的に変更できる環境適応能を身につけた。昆虫の脱皮と変態の過程は、その変化の激しさゆえに古くから多くの人々を魅了してきた。そして、膨大な研究によって、「脱皮ホルモン」として知られるエクジステロイドの適切な作用が、昆虫の脱皮と変態を制御するうえでの鍵であることが明らかにされてきた。

エクジステロイドの生合成は、節足動物および一部の線形動物に限定されており、脊椎動物を含むその他の動物種においては認められない。また、エクジステロイドを人工的に投与しても、エクジステロイドを持たない生物種に対しては致死的な効果はほぼない。よって、エクジステロイドの機能をかく乱する作用のある薬剤は、選択性の高い IGR になると考えられてきた。実際に、最も脱皮ホルモン活性の高いエクジステロイドである 20-ヒドロキシエクジソン (20E) が直接作用する核内受容体 EcR/USP は、過去 30 年近くにわたって IGR ターゲットとして注目され、多くの研究がなされてきた。その一つであるジベンゾイルヒドラジン類は、すでに実用化されて農薬として用いられている (NAKAGAWA, 2005)。しかしながら、その殺虫効果はごく一部の鱗翅目昆虫に限定されており、それ以外の害虫に対して有効な IGR

とは言えない。また、EcR/USP をターゲットとした研究は世界的に現在も進行中ではあるものの、既存薬を上回る薬剤の発見には至っていない。こうした状況から、エクジステロイドに着目した新しい IGR 開発のためには、EcR/USP などのエクジステロイドの「受容」以外に狙いを置いた新しい別の開発戦略が求められている。

そこで注目されるのが、エクジステロイドの「生合成」である。EcR/USP を介したエクジステロイドの受容にかかわる遺伝子レベルの制御機構は、1980 年代からの極めて多くの研究によって詳細が明らかにされてきた。それに比べて、エクジステロイドの生合成経路にどのような遺伝子が関与するのかの研究は大きく立ち後れていた。しかしながら、この 10 年間の筆者のグループを含むいくつかのグループによる解析により、エクジステロイド生合成に必須の役割を果たす酵素およびその遺伝子の同定が一気に進んだ。こうして同定された酵素に対する特異的な阻害剤をもし見いだすことができれば、新しい IGR の発見につながるのではないか、というのが現在の筆者の期待である。

I エクジステロイドの生合成経路

エクジステロイドは、幼虫期において前胸腺 (prothoracic gland) と呼ばれる特殊な内分泌器官において、また成虫期には雌卵巢において生合成されることが古典的に知られている。エクジステロイドの構造が決定された 1965 年以降、エクジステロイドが前胸腺や卵巢でどのような中間段階を経て生合成されるのかが盛んに研究された。それには、放射線ラベルをした中間基質を利用し、どのようなラベル体がエクジステロイドに取り込まれるのかを検討する精緻なトレーサー実験に依るところが大きい (桜井, 1995; GILBERT et al., 2002)。

前胸腺あるいは卵巢におけるエクジステロイドの産生の出発材料は、コレステロールである。昆虫はアセチル CoA など低分子化合物からステロイド骨格を合成することができないため、他の動物からコレステロールを摂取するか、植物由来のステロールを消化管でコレステロールに変換する。コレステロールは、脂質運搬にかかわるリポフォリントンパク質と結合し、これが前胸腺や卵

Potential of Biosynthetic Enzymes of Insect Molting Hormones as Targets for the Insect Growth Regulator. By Ryusuke NIWA

(キーワード: エクジステロイド, 脱皮ホルモン, 生合成, 酵素, 前胸腺)

巢等のエクジステロイド産生器官に運ばれる。

現在までに明らかにされているエクジステロイド生合成過程を図-1に示す。前胸腺あるいは卵巣に運ばれたコレステロールは、まず脱水素化され、7-デヒドロコレステロールに変換される。次いで、7-デヒドロコレステロールは、A/B環のシス型への立体構造の変化、C6のケト化、C14の水酸化を経て5 β -ケトジオールと呼ばれる中間産物になる。7-デヒドロコレステロールから5 β -ケトジオールへと至る過程に存在するはずの中間産物については、その構造が不安定のために正確な同定がなされておらず、「ブラックボックス」と呼称されている。5 β -ケトジオールからエクジソンへと至る過程は3段階の変換ステップで構成されており、C25、C22、C2が段階的に水酸化されることでエクジソンとなる。エクジソンはその後に20Eに変換されるが、この反応だけは前胸腺ではなく、脂肪体や筋肉等の末梢組織で起こる。この20Eが主に体液中を循環して様々な組織に働きかけることで、脱皮および変態が誘導される。

II エクジステロイドの生合成酵素の実体

1960～90年代までに、エクジステロイド生合成過程の中間産物およびその生化学的変換ステップについては多くのことが既に解明されていたが、それぞれの変換ス

テップにどのような酵素がかかわるのか、その分子の実体は長らく不明のままであった。しかしながら、キロショウジョウバエ *Drosophila melanogaster* およびカイコガ *Bombyx mori* を利用した分子遺伝学的手法と網羅的遺伝子発現解析によって、この10年間で一気に解明が進んだ。コレステロールから20Eに至るまでの中間体の変換にかかわる酵素として、現在までに7種類の酵素が判明しており、以下に詳述するように、遺伝子ファミリーとしては3タイプに分類される。以下の記載順は、歴史的な同定順に準ずる。

1 シトクロム P450 モノオキシゲナーゼ

シトクロム P450 モノオキシゲナーゼ (以下、「P450」)、微生物から植物、動物まで生物界に広く分布する一群のヘムタンパク質であり、基質に一つの酸素分子を付加する活性を持つ (大村, 2009)。図-1に挙げるように、エクジステロイド生合成過程には、水酸基の生成など酸素分子の付加によって担われる反応が存在し、P450の関与は古くから予想されていた。現在までに、以下の五つのP450が、エクジステロイド生合成経路に関与することが判明している。(1) Disembodied (Dib)/CYP302A1 (Chávez et al., 2000; Warren et al., 2002), (2) Shadow (Sad)/CYP315A1 (Warren et al., 2002), (3) Shade (Shd)/CYP314A1 (Petryk et al., 2003), (4) Phantom

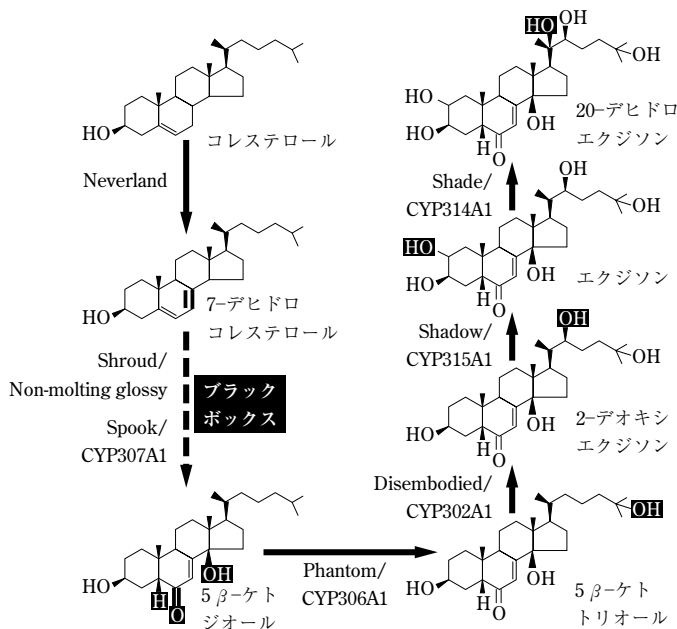


図-1 エクジソン生合成経路と関与する酵素
エクジソンおよび20Eの生合成過程それぞれのステップで生じる触媒反応の部位を、太線あるいは白黒反転文字で示す。

(Phm)/CYP306A1 (NIWA et al., 2004; WARREN et al., 2004), (5) Spook (Spo)/CYP307A1 (NAMIKI et al., 2005; ONO et al., 2006)。

これら五つの P450 の同定には、「ハロウィーン突然変異株群」と呼ばれる一連のキロシヨウジョウバエの胚性致死変異株の発見が鍵となった。この突然変異株群では、胚期のエクジステロイド量が野生型に比べて著しく減少しており、また胚のクチクラ構造に共通した特徴的な形成不全が見られる。これらの突然変異株に付けられた *spook* などの名称はいずれも「幽霊」「亡霊」の意味であることから、最初の発見者である Michael B. O'CONNOR 博士はこの一連の突然変異株群に「ハロウィーン (お化けの集まり)」の名を付けた (CHÁVEZ et al., 2000; WARREN et al., 2002)。酵素名としては、キロシヨウジョウバエの突然変異株名に基づく名称とともに、P450 国際命名規約に則った「CYP」で始まる名称も用いられる。

現在までに、Phm/CYP306A1, Dib/CYP302A1, Sad/CYP315A1 および Shd/CYP314A1 については、生化学的実験によって内在性基質が決定されており、図-1 に示すような特異的な変換ステップにそれぞれ必須の役割を果たしている。

Spo/CYP307A1 については、「ブラックボックス」内で機能することが明らかにされているのみで、基質の特定には至っていない。また、多くの昆虫のゲノムでは、遺伝子重複によって複数の Spo/CYP307A1 の相同分子がコードされている。これらの相同分子は Spookier/CYP307A2 および Spookiest/CYP307B1 と命名され、Spook/CYP307A1 と同様の触媒機能を担うと考えられている (ONO et al., 2006)。

これら五つの P450 をコードするそれぞれのオーソログ*は、エクジステロイドを生合成する節足動物内で高度に保存されていると考えられている (REWITZ and GILBERT, 2008)。

2 Rieske 型酸化酵素

本酵素に分類される Neverland (Nvd) は、筆者および片岡宏誌博士 (東京大学) のグループによって、カイコのゲノム情報に基づく網羅的な遺伝子発現解析から同定された酵素である (YOSHIYAMA et al., 2006)。Rieske ドメイン**は、電子伝達系酵素や一部のステロイド代謝酵素に見られる特徴的なアミノ酸モチーフ**として知

* オーソログ：異なる生物に存在する相同な機能を持った遺伝子群。

** ドメイン、モチーフ：いずれもタンパク質の立体構造を指し、ドメインの方がより大きな領域に用いられる。

られている。中間体を利用した摂食レスキュー実験から、Nvd はコレステロールから 7-デヒドロコレステロール (7dC) の変換を担う酵素であることが強く示唆されている (図-1)。筆者のグループは現在までに、Nvd の酵素活性をアッセイする実験系の確立に成功し、Nvd がコレステロール 7,8-デヒドロゲナーゼ活性を持つことを強く示唆するデータを得ている (吉山・柳川ら、未発表)。また、ハロウィーン P450 および Nm-g/Sro (後述) のオーソログが節足動物ゲノムにしか見いだされないのに対して、Nvd オーソログは線虫 *Caenorhabditis elegans* や後口動物等のエクジステロイドを生合成しない動物種にも強く保存されている。実際、線虫や後口動物由来の Nvd も、コレステロール 7,8-デヒドロゲナーゼ活性を有することを確認している (塩谷ら、未発表)。

3 短鎖型脱水素・還元酵素 (Short-chain dehydrogenase/reductase)

短鎖型脱水素・還元酵素は、やはり微生物から植物、動物まで生物界に広く分布し、様々な基質を取る多様な酵素ファミリーとして進化している。本酵素に分類されるエクジステロイド生合成酵素 Non-molting glossy/Shroud (Nm-g/Sro) は、篠田徹郎博士 (農業生物資源研究所)、嶋田透博士 (東京大学)、勝間進博士 (東京大学)、および筆者のグループによる共同研究によって明らかにされた (NIWA et al., 2010)。Nm-g/Sro は、脱皮異常および体内エクジステロイド量の減少を示すカイコガの突然変異株 *nm-g* の原因遺伝子クローニングによって見いだされた。さらに我々は、*nm-g* 遺伝子のキロシヨウジョウバエオーソログ *sro* がキロシヨウジョウバエの個体発生においてもエクジステロイド生合成に必須の役割を果たすことを突き止めた。カイコガとキロシヨウジョウバエを併用した詳細な分子遺伝学的解析から、Nm-g/Sro も「ブラックボックス」内で必須の役割を果たす酵素であることが明らかとなっているが、基質は特定されていない。

III 最も現実的な IGR はどれか

II 章で述べた計七つのエクジステロイド生合成酵素は、従来の IGR 開発ターゲットであった核内受容体 EcR/USP とは当然のことながら構造的に大きく異なる。よって、エクジステロイド生合成酵素の活性に影響を与える化合物を同定できれば、従来の研究から同定された化合物とは全く違ったタイプの新規 IGR 発見につながる可能性がある。七つの酵素はいずれも有効な IGR ターゲットとなるポテンシャルを秘めている。しかし一方、当面の研究開発上で最も現実的なターゲットを考え

た場合、P450の一つである Shd (Shd), すなわちエクジソンから 20E に変換を担う酵素に筆者は注目している。Shd を現実的なターゲットと考える理由は、以下の除去法に基づく。

(1) ヒトを含む脊椎動物に影響がない IGR 開発を鑑みた場合、脊椎動物にも存在する Neverland はターゲットとしては向かない。

(2) 「ブラックボックス」内の生合成ステップについては、厳密な中間産物が特定されておらず、いまだに不明な点が多い。中間産物がわからない以上、Spo/Spookier/Spookiest および Nm-g/Sro に対する特異的阻害を検討する方法は今のところない。

(3) 残った Phm, Dib, Sad, Shd については、それぞれの酵素活性を検定するための実験系も存在する。しかしながら、Phm, Dib および Sad のそれぞれの基質である 5 β -ケトジオール, 5 β -ケトトリオールおよび 2-デオキシエクジソンは市販薬とし利用可能な状態ではなく、大規模なスクリーニングに必要な量の基質を安定的に入手するのは容易ではない。

以上のことから、基質 (エクジソン) が複数の製薬会社から安定的に販売され、エクジステロイドを産生しない生物には存在しない Shd は、現時点で最もターゲットとして好適であろう。

おわりに

エクジステロイド生合成酵素、特に Shd をターゲットとした創農薬研究は、EcR/USP に着目したアプローチでは見いだせなかった IGR 開発の新しい戦略となるものと期待できる。しかし、数十万~数百万種類の化合物を含むケミカルライブラリーを利用した迅速なスクリー

ニングのためには、技術的に改良しなければならない点が多い。特に、高速液体クロマトグラフィーを元にした現在の酵素活性アッセイ系は、大量の化合物をテストするには時間がかかりすぎる。また、費用対効果を考慮した場合には、基質であるエクジソンの調達費用も現状よりも下げたいのが実情である。さらに、効率的なスクリーニングの実現には、ケミカルライブラリーを闇雲に用いるのではなく、エクジステロイド生合成酵素の基質結合部位の形状にはまり込む候補化合物を絞り込むための計算化学的手法を採用することも重要である。こうした問題の解決のためには産学官の連携がどうしても必要であろう。近い将来、筆者のグループが何らかの形でこうした連携研究の提案と推進に少しでも貢献できればと切望している。

引用文献

- 1) CHÁVEZ, V. M. et al. (2000): *Development* **127**: 4115 ~ 4126.
- 2) GILBERT, L. I. et al. (2002): *Annu. Rev. Entomol.* **47**: 883 ~ 916.
- 3) NAKAGAWA, Y. (2005): *Vitamines Hormones* **73**: 131 ~ 173.
- 4) NAMIKI, T. et al. (2005): *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **337**: 367 ~ 374.
- 5) NIWA, R. et al. (2004): *J. Biol. Chem.* **279**: 35942 ~ 35949.
- 6) ——— et al. (2010): *Development* **137**: 1991 ~ 1999.
- 7) ONO, H. et al. (2006): *Dev. Biol.* **298**: 555 ~ 570.
- 8) 大村恒雄 (2009): P450 の分子生物学 第 2 版 (大村恒雄・石村 巽・藤井義明編), 講談社, 東京, p. 1 ~ 14.
- 9) PETRYK, A. et al. (2003): *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **100**: 13773 ~ 13778.
- 10) REWITZ, K. F. and L. I. GILBERT (2008): *BMC Evol. Biol.* **8**: 60.
- 11) 桜井 勝 (1995): 昆虫の生化学・分子生物学 (大西英爾・園部治之・高橋 進編), 名古屋大学出版会, 名古屋, p. 93 ~ 115.
- 12) WARREN, J. T. et al. (2002): *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **99**: 11043 ~ 11048.
- 13) ——— et al. (2004): *Insect Biochem. Mol. Biol.* **34**: 991 ~ 1010.
- 14) YOSHIYAMA, T. et al. (2006): *Development* **133**: 2565 ~ 2574.

農林水産省プレスリリース (23.1.16 ~ 23.2.15)

農林水産省プレスリリースから、病害虫関連の情報を紹介します。

<http://www.maff.go.jp/j/press/syouan> の後にそれぞれ該当のアドレスを追加してご覧ください。

◆ 病害虫関連の発表はございませんでした。