

女性ホルモンでおばけ退治！！～昆虫エクジステロイド生合成調節因子 Noppera-bo の生化学的解析～

荒井怜奈（筑波大学 生物学類）

指導教員：丹羽隆介（筑波大学 生命環境系）

【背景・目的】

昆虫の脱皮と変態の誘導の制御には、ステロイドホルモンであるエクジステロイドが中心的な役割を果たす。エクジステロイドの生合成と生理作用は節足動物及び一部の線形動物に限定されており、哺乳動物には認められていない。よって、エクジステロイド生合成を選択的に阻害する薬剤は、ヒトを含む哺乳動物に無害な農薬の開発に繋がる可能性がある。

所属研究室において先年同定された Noppera-bo (Nobo) は、エクジステロイド生合成を担う器官である前胸腺において、前駆体であるコレステロールの細胞内挙動を調節するグルタチオン *S*-転移酵素(以後、GST) である。 *Drosophila melanogaster* (以後、ショウジョウバエ) で *nobo* 機能欠損個体は、エクジステロイド生合成不全を原因として胚性致死になる[1]。所属研究室は、すでに可溶化 Nobo 組換えタンパク質の調製方法、および人工蛍光基質 3,4-DNADCF を用いた組換え Nobo の試験管内酵素活性アッセイ系を確立している[2]。また、所属研究室において、このシステムを利用した酵素活性阻害剤の大規模スクリーニングが行われ、Nobo に対する阻害剤の1つとして女性ホルモンである β -エストロジオールが同定されている[2]。さらに、ショウジョウバエ由来の Nobo (以後、DmNobo) とグルタチオン (以後、GSH)、そして β -エストロジオールの共結晶を X 線結晶構造解析した結果、DmNobo の 113 番目のアスパラギン酸残基が β -エストロジオールと水素結合を形成することが示唆されている (小祝・稲葉ら、未発表)。しかし、この水素結合が β -エストロジオールの阻害活性に必須であるかどうかはまだ検討されていない。そこで私は、これらの先行的知見および技術に基づいて、DmNobo の阻害活性のメカニズムについて生化学的解析を行った。

【材料と方法】

(1)DmNobo の精製

大腸菌で DmNobo (野性型および変異型)を発現させるために His タグ配列をもつ PColdII ベクター(タカラバイオ)に *Dmnobo* 遺伝子のコーディング配列を挿入したコンストラクト(pColdII-DmNobo)を作製した。これを大腸菌株 BL21-CodonPlus -RIL Competent Cells (Agilent) に導入し、37°Cで形質転換体を培養した。培養した菌体は細胞粉碎した。その後、遠心分離によって回収した上清を HiTrap TALON カラム (GE Healthcare) を使ったアフィニティクロマトグラフィーに供することで、DmNobo を単離して精製を行った。

(2)3,4-DNADCF を用いた酵素活性アッセイ

3,4-DNADCF は、GST 活性依存的に GSH と結合すると、蛍光強度が増加する[2]。酵素溶液(100 mM NaPi Buffer pH6.5, 0.01 % Tween-20, 2% DMSO, 2 mM GSH)と基質溶液(100 mM Napi Buffer pH6.5, 1 mM 3,4DNADCF) を 1:1 で混和した後、一定時間ごとに蛍光強度を測定し、DmNobo 活性を評価した。

(3)ショウジョウバエ *nobo* ノックアウト個体への *DmNobo*(野生型および変異型)遺伝学的レスキュー実験

ショウジョウバエ *nobo* ノックアウト個体内で DmNobo(野生型および変異型)を発現させるために GAL4-UAS システムを用いた[4]。これは酵母由来の転写因子 GAL4 をショウジョウバエの特定のエンハンサーの制御下で発現させることで、GAL4 結合配列である UAS の下流に配置した遺伝子を誘導させるシステムである。本研究では *nobo* ノックアウト背景で前胸腺特異的 GAL4 ドライバーである *phm-GAL4* と野生型 *DmNobo* あるいは変異型 *DmNobo* 遺伝子を発現させるための UAS システムを掛け合わせることで遺伝学的レスキュー実験を行った。なお、ショウジョウバエは寒天、コーンミール、グルコース、乾燥酵母を煮詰めて混ぜ合わせたものを標準エサとして、25°Cもしくは17°Cで飼育した

【結果・考察】

私は、 β -エストロジオールとの水素結合を生じさせない DmNobo 変異分子として、113 番目のアスパラギン酸残基をアラニンに変えた変異型 DmNobo(以後 D113A 変異 DmNobo)を作出した。

D113A 変異 DmNobo 組換えタンパク質は野生型 DmNobo 組換えタンパク質と同程度の GST 比活性をもっていたにも関わらず、 β -エストロジオールに対する阻害活性は失われていた。よって、DmNobo が β -エストロジオールに対する阻害活性をもつには 113 番目のアスパラギン酸との水素結合が必要であることが分かった。

また、野生型 DmNobo 組み換えタンパク質の β -エストロジオールに対する阻害様式を調べるために、 β -エストロジオールの非存在下と存在下で Line weaver-Burk plot(LB-plot)を引いた。その結果、野生型 DmNobo 組み換えタンパク質は、 β -エストロジオールの非存在下と存在下でミカエリス定数(Km)に変化はなく、最大反応速度(Vmax)だけが変化した。このことから野生型 DmNobo 組み換えタンパク質は非競合阻害の様式で β -エストロジオールに対する阻害活性を起こしていることが示唆された。

さらに現在、*nobo* ノックアウト個体に D113A 変異 *Dmnobo* を発現させたショウジョウバエシステムを作製し、DmNobo の 113 番目のアスパラギン酸の生体内における役割を検討するための実験も行っている。

これらの一連の知見は、将来的な Nobo をターゲットにした新規農薬の開発と作用機序の解明に向けた基礎的データとして重要な意義を持つものと考えられる。

【参考文献】

1. Enya S et al. *Scientific Report* 4: 6586 (2014) .
2. Fujikawa et al. *ChemComm* 51: 11459-11462 (2015) .
- 3.丹羽. 化学と生物 54: 508-512(2016) .
4. Brand & Perrimon. *Development* 118: 401-415 (1993) .