

Title	脱皮ホルモン生合成を制御する物質とその活性発現機構
Author(s)	亀山, 眞由美
Citation	
Issue Date	
oaire:version	
URL	https://hdl.handle.net/11094/39386
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed 大阪大学の博士論文について https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed をご参照ください。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

氏 名	かめ やま ま ゆ み 亀 山 真 由 美
博士の専攻分野の名称	博 士 (葉 学)
学 位 記 番 号	第 1 1 6 0 3 号
学 位 授 与 年 月 日	平 成 6 年 1 2 月 5 日
学 位 授 与 の 要 件	学 位 規 則 第 4 条 第 2 項 該 当
学 位 論 文 名	脱皮ホルモン生合成を制御する物質とその活性発現機構
論 文 審 査 委 員	(主査) 教 授 北 川 勲 (副査) 教 授 今 西 武 教 授 岩 田 宙 造 教 授 北 泰 行

論 文 内 容 の 要 旨

甲殻類や昆虫類などの節足動物は、脱皮を繰り返して成長する。この脱皮という現象は、主に、脱皮を促進するホルモンと、抑制するホルモンによって制御されている。脱皮を促進するホルモンは、昆虫類でも甲殻類でもエクジソン (2β , 3β , 14α , $22R$, 25 -ペンタヒドロキシ- 5β -コレスト- 7 -エン- 6 -オン) で、食餌由来のコレステロールから脱皮ホルモン生産器官で生合成されるが、その生合成経路の詳細はいまだに明らかにされていない。一方、脱皮を抑制するホルモンは、昆虫類では幼若ホルモンがよく知られているが、その分子レベルでの作用機作は解明されていない。甲殻類では、脱皮を抑制するホルモンは、脱皮抑制ホルモン (Molt Inhibiting Hormone, MIH) とよばれ、眼柄から分泌される。脱皮は、表皮細胞の形態変化のみならず、種々の生理変化を含む複雑な現象である。それらの複合結果としての“脱皮”という現象を指標に、物質レベルでの探索が試みられてきたが、ペプチド性の MIH の一次構造が明らかにされたのは、1990年代にはいつてからのことで、その作用機作はまだ明らかにされていない。

そこで著者は、MIH 活性物質の本体及びその作働機作を明らかにする目的で、MIH を脱皮ホルモン・エクジソンの生合成抑制物質と考え、脱皮ホルモン生産器官 (Y 器官) において *in vitro* で生産されるエクジソン産生量の定量的なバイオアッセイの結果を指標に、甲殻類の MIH 活性物質の探索を行った。その結果、ブルークラブの眼柄から、アミノ酸の一種 3-ヒドロキシ-L-キヌレニンと、体液中のアミノ基転移酵素によって変換されて生成されるキサンツレン酸を活性物質として見出した。

著者は、昆虫類と甲殻類の脱皮ホルモン生産器官による *in vitro* のエクジソン生合成は一連の化学反応の集成であると考え、3-ヒドロキシ-L-キヌレニン及びキサンツレン酸の脱皮ホルモン生合成の阻害機構について、甲殻類 (アメリカザリガニ) と昆虫類 (カイコ) を比較検討して以下の成果を得た。

まず、3-ヒドロキシ-L-キヌレニンは、カイコの脱皮ホルモン生産器官である前胸腺のエクジソン産生を *in vitro* では阻害しないのに対し、キサンツレン酸は、前胸腺の細胞膜を通過しさえすれば、阻害作用を示すことが明らかになった。また、既存のエクジソン生合成阻害試薬では、前胸腺のインキュベーション培地からそれを除去しても阻害効果が持続されるのに対し、キサンツレン酸では、除去により前胸腺のエクジソン産生能が回復することから、キサンツレ

ン酸は、エクジソン生合成の調節物質になり得ることが示唆された。

次に、キサンツレン酸のエクジソン生合成阻害機構について検討した。脱皮ホルモン産生器官において、細胞内カルシウムの増加はエクジソンの産生を活性化させるが、キサンツレン酸による阻害作用とは作働点が異なることを、カルシウムイオノホアを用いた実験により示した。また、キサンツレン酸のエクジソン生合成阻害作用が、コレステロールからエクジソンが生合成される過程における水酸基添加反応を触媒する、シトクロム P-450 に対するものであると仮定し、モデル系での検討を試みた。そしてまず、ラット肝で誘導されたシトクロム P-450 にキサンツレン酸を添加すると、可視部吸収の長波長シフトが認められることを明らかにした。次に、キサンツレン酸にシトクロム c を添加した際の、プロトン核磁気共鳴スペクトル及び電子スピン共鳴スペクトルの変化から、キサンツレン酸は、エクジソン生合成に関わる P-450 の活性中心のポルフィリン鉄へ配位し、その結果 P-450 を暫定的に不活性化することにより、エクジソンの生合成を抑制することが示唆された。

さらに、エクジソン生合成過程におけるキサンツレン酸の阻害作用点について検討した。コレステロールからエクジソンへの生合成経路にある、一連の水酸化反応の初期の基質と考えられる $3\beta, 14\alpha$ -ジヒドロキシ- 5β -コレスト-7-エン-6-オンを合成し、アメリカザリガニ及びカイコの脱皮ホルモン生産器官 (*in vitro*) における、エクジソンへの変換を検討したが、エクジソン産生量の顕著な増加は認められず、また、キサンツレン酸の添加による特定のエクジソン生合成前駆物質の蓄積も認められなかった。このことから、生合成経路及びキサンツレン酸の作働点が複数箇所に亘っていることが示唆された。

そこで、水酸化の段階をエクジソンから逐次的に遡行して検討することにし、エクジソン生合成の直前の前駆物質と考えられる化合物のうち、2-デオキシエクジソンについて検討した。重水素標識した [$23, 23, 24, 24$ - $^2\text{H}_4$] 2-デオキシエクジソンを合成し、カイコまたはアメリカザリガニの脱皮ホルモン生産器官の培養液に添加してインキュベーションした。その結果、添加によりエクジソンの産生量は増大し、産生されたエクジソンには重水素が含まれることが質量分析により確認され、2-デオキシエクジソンは、カイコまたはアメリカザリガニの脱皮ホルモン生産器官で、エクジソンへ変換されることを証明した。さらに、その変換は分子状酸素が関与する一原子酸素添加反応で、キサンツレン酸によって阻害されることを明らかにした。

一方、3-デヒドロエクジソンは、アメリカザリガニの Y 器官の主生産物で、エクジソンと同じく脱皮ホルモン作用を示すが、その生合成経路はエクジソンとは異なることが示唆されている。エクジソンの前駆体 2-デオキシエクジソンは、3-デヒドロエクジソンに全く変換されないため、3-デヒドロエクジソンの生合成経路は、エクジソンのものと上流で分岐しているか、または生合成部位がサブセルレベルで分化し、エクジソンの生合成とは別々に進行する可能性が示唆された。

論文審査の結果の要旨

甲殻類や昆虫類が環境に適応する能力が強いのは、堅い外骨格を持っているためであるが、その反面、成長の過程で脱皮を繰り返さなければならない。そして、その脱皮の促進と抑制はホルモンによって制御されている。

本論文では、甲殻類アメリカザリガニと昆虫類カイコを題材として選び、3-ヒドロキシ-L-キヌレニンおよびキサンツレン酸の、脱皮ホルモン生合成阻害機構を比較検討し、キサンツレン酸がエクジソン生合成において、電子伝達系依存性の一原子酸素添加酵素シトクロム P-450 に作用して、阻害活性を発現することを明らかにしている。

以上の成果は、博士（薬学）の学位論文として充分価値あるものと認められる。