

令和元年5月28日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K07791

研究課題名(和文) カイガラムシの性的二型の分子基盤：性決定機構と幼若ホルモンの役割

研究課題名(英文) Molecular dissection of sexual dimorphic metamorphosis in scale insects

研究代表者

水口 智江可 (MINAKUCHI, Chieka)

名古屋大学・生命農学研究科・講師

研究者番号：90509134

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：カイガラムシのオスは翅を持つ成虫へ変態するが、メスは幼形成熟を遂げる。本研究はカイガラムシの性決定・性分化メカニズムを解明すると共に、性特異的形質の発達におけるホルモンの役割を調べることを目的とした。その結果、他種昆虫で成虫形態形成への関与が知られる転写因子E93が、カイガラムシではオス特異的に発現することを見出した。このE93の転写調節領域の塩基配列を解読したところ、JH初期応答遺伝子Kruppel homolog 1の結合配列および性決定因子doublesex結合配列が確認された。従って、内分泌シグナリングと性決定・性分化グナリングの間にクロストークの存在することが強く示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

昆虫の性特異的形質の発達におけるホルモンの役割に関しては、昆虫全般を見渡してもほとんど研究例がなく、本研究は強いインパクトを与える先駆的なものである。また本研究の成果は、カイガラムシの特殊な変態がどのように進化したかという謎の解明につながるものであり、生物学における学術的な意義が極めて大きい。さらに、本研究で得られた知見を利用すれば、世界的な農業害虫であるカイガラムシ類のホルモン作用をかく乱することで致死効果をもたらすような新規殺虫剤の開発が可能になると考えられ、将来的には植物保護に大きく貢献すると期待できる。

研究成果の概要(英文)：Scale insects have evolved extreme sexual dimorphism, as demonstrated by juvenile-like (or neotenic) females and winged males. This study aimed to elucidate the mechanism of sexual determination/differentiation in scale insects, as well as hormonal regulation of sexual dimorphic metamorphosis. We revealed that an adult specifier E93 is expressed exclusively in male metamorphosis, while female development proceeds with near absence of E93. Sequence analysis of the 5' regulatory region of E93 identified the presence of Kruppel homolog 1 binding site as well as doublesex binding site. These results indicated a crosstalk between hormonal cascade and sexual determination/differentiation cascade.

研究分野：昆虫生理学

キーワード：幼若ホルモン カイガラムシ 性的二型

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

カイガラムシはカメムシ目カイガラムシ上科に属する昆虫の総称であり、その多くが果樹などに口吻を刺して吸汁する害虫である。カイガラムシはゴキブリなどと同様に、蛹期がなく幼虫から成虫へと成長する「不完全変態」と分類されているが、オスは幼虫から擬蛹と呼ばれる時期を経て有翅成虫へ変態する一方、メスは幼虫から翅のない成虫へと幼形成熟を遂げる。このようにカイガラムシは後胚発生において顕著な性的二型を示す。

一般的に昆虫の性決定および性分化では、性決定遺伝子 *doublesex (dsx)* が雌雄で異なった選択的スプライシングを受け、性特異的な遺伝子群の発現を制御する。一部の昆虫種では *dsx* のスプライシングを制御する遺伝子 *transformer (tra)* の存在が知られている。カイガラムシは雌雄共に受精卵から発生するが、オスでは paternal genome elimination という現象によって父親由来のゲノムが不活性化され、母親由来のゲノムのみから遺伝子の発現が起こる。しかしそれに引き続く性決定シグナリング経路は不明である。

昆虫の変態は脱皮ホルモンと幼若ホルモン (JH) によって制御される。ホルモンで制御される転写因子のうち、JH 初期応答遺伝子である *Krüppel homolog 1 (Kr-h1)*、翅形成を誘導する *broad*、成虫の形態形成を誘導する *E93* が、変態における鍵因子として注目されている。しかし、カイガラムシの特殊な発育様式を制御する内分泌機構は不明であった。

### 2. 研究の目的

本研究では、カイガラムシの性決定・性分化メカニズムを解明すると共に、性特異的形質の発達におけるホルモンの役割を詳細に調べることを目的とした。その具体的な内容は、以下の通りである。

#### (1) フジコナカイガラムシの性決定・性分化メカニズムの解明

性決定に関わる主要因子である *dsx* の発現解析および機能解析を行い、性決定・性分化シグナリングの中核部分を明らかにする。

#### (2) フジコナカイガラムシの性特異的形質の発達におけるホルモンの役割

ホルモンで発現制御される3転写因子 (*Kr-h1*, *broad*, *E93*) が、性特異的形質の発達 (特にオスの翅形成) に関与するか検証する。また、雌雄でホルモン濃度が異なっているかどうかを機器分析により確認する。性決定遺伝子をノックダウンした場合における、3転写因子 (*Kr-h1*, *broad*, *E93*) の発現への影響を調べ、性決定・性分化シグナリングと内分泌シグナリングの関連を調べる。

### 3. 研究の方法

**【性決定遺伝子の単離および発現解析】** フジコナカイガラムシにおいて性決定遺伝子 *dsx* の cDNA 単離を行い、発育に伴う発現プロファイルを定量 RT-PCR または半定量 RT-PCR により調べた。

**【ホルモンの定量】** フジコナカイガラムシ 2 齢若虫を多数集めて磨砕し、LC/MS/MS により JH および脱皮ホルモンの定量を試みた。

**【遺伝子ノックダウンおよびノックアウトの実験系確立】** 二本鎖 RNA の注射により遺伝子ノックダウンを引き起こす RNAi 法を試み、注射に用いる個体の発育段階や二本鎖 RNA 濃度について条件検討を行った。また、ゲノム編集により遺伝子ノックアウトを実施することを念頭に、実験条件の検討を行った。

**【ホルモンにより発現制御される転写因子の発現解析】** 他種昆虫においてホルモンで発現制御されることが知られている転写因子 (*Kr-h1*, *broad*, *E93*) について、定量 RT-PCR 法により発現解析を行った。

**【内分泌シグナリング因子の網羅的解析】** フジコナカイガラムシで内分泌シグナリングに関わる因子を新たに同定することを目的として、JH 様活性物質処理後のオス個体および未処理のオス個体におけるトランスクリプトーム解析を行い、JH 様活性物質により発現が誘導または抑制される遺伝子を探索した。

**【ホルモンにより発現制御される転写因子 *E93* の転写調節機構解明】** カイガラムシのオス特異的に発現する転写因子 *E93* に関して、フジコナカイガラムシと近縁でありゲノム情報が入手可能なミカンコナカイガラムシを対象として、転写調節領域の配列解読を実施した。この転写調節領域内で、転写因子結合配列を探索した。

#### 4. 研究成果

**【性決定遺伝子の単離および発現解析】** 性決定遺伝子 *dsx* の cDNA 単離を行い、アイソフォームを複数同定した。また発育に伴う発現プロファイルを定量または半定量の RT-PCR により調べたところ、性特異的に発現するアイソフォームの存在が確認された。また、オスと比較して JH 濃度の低いメス 3 齢若虫に JH 様活性物質を投与したところ、*dsx* の発現が誘導されたことから、*dsx* の転写が JH による制御を受けていることが示唆された。

**【JH の定量および濃度変動説明】** フジコナカイガラムシ 2 齢若虫を多数集めて磨砕し、LC/MS/MS により JH 定量を試みた。その結果、他種昆虫で知られているような JH 分子種である JH III および JH skipped bisepoxide は検出されなかった。この原因として、フジコナカイガラムシ体内の JH 分子種の化学構造が他種昆虫とは異なっていること、また体内に含まれる夾雑物の影響により JH の抽出・定量が困難であること、が示唆された。それに代わる方法として、発育に伴う JH 生合成酵素遺伝子の発現変動を雌雄別に調査し、JH 濃度の変動を予測した。

**【脱皮ホルモンの定量および濃度変動説明】** フジコナカイガラムシ若虫を多数集めて磨砕し、LC/MS/MS によって脱皮ホルモン検出を試みた。最初の試行では、脱皮ホルモン類（他種昆虫で知られている ecdysone や 20-hydroxyecdysone）が検出可能であるという予備的結果を得ていたが、それ以降は脱皮ホルモン類を検出することができなかった。これは夾雑物の影響によるものと考えており、今後は虫体からのサンプル調製方法の検討が必要であると考えている。それに代わる方法として、発育に伴う脱皮ホルモン生合成酵素遺伝子の発現変動を雌雄別に調査し、脱皮ホルモン濃度の変動を予測した。

**【遺伝子ノックダウンの実験系確立】** 二本鎖 RNA の注射によりノックダウンを引き起こす RNAi 法を試みた。注射に用いる昆虫の発育段階や二本鎖 RNA 濃度について条件検討を重ねたが、今のところ効果的なノックダウンは確認されていない。二本鎖 RNA を摂食させる実験も試行したものの、こちらも成功には至っていない。

**【遺伝子ノックアウトの実験系確立】** CRISPR-Cas9 システムなどのゲノム編集技術により遺伝子ノックアウトを実施することを目指して、フジコナカイガラムシ胚へのマイクロインジェクションについて検討を行った。胚発生のごく初期 (blastoderm stage 以前) にガイド RNA 等を注射する必要があるが、フジコナカイガラムシでは卵がメス成虫の体外へ産下される時点では既にこの時期を過ぎて胚発生が進行していることが判明した。よって、メス成虫を解剖して卵を取り出し、ガイド RNA 等を注射した後に、孵化するまで *in vitro* で培養する必要があると考えた。そこでメス成虫を解剖して取り出した卵の培養を試みたが、ほとんど孵化しなかった。このように、現時点ではフジコナカイガラムシで CRISPR-Cas9 システムを実施するのは技術的に困難だと考えている。

**【ホルモンにより発現制御される転写因子の発現解析】** 他種昆虫においてホルモンにより発現制御されることが知られている転写因子 *broad* の各アイソフォームについて発現解析を行い、複数のアイソフォームのうち転写が JH に応答するものを特定した。JH 初期応答遺伝子である *Kr-h1* についても発現解析を行ったところ、外部形態の性的二型が顕著になる 2 齢若虫終盤ではメスよりもオスで高く発現していたことから、この時期の JH 濃度はオスの方が高いことが示唆された。また、他種昆虫で成虫形態形成に関わることが知られる転写因子 *E93* が、カイガラムシではオス特異的に発現することを見出した。

**【JH シグナリング因子の網羅的解析】** フジコナカイガラムシで JH シグナリングに関わる因子を新たに同定することを目的として、JH 様活性物質処理後の個体および未処理の個体におけるトランスクリプトーム解析を行い、JH 様活性物質処理によって発現が誘導または抑制される転写物を複数見出した。その中から、gene ontology (GO) として「蛹期」、「変態」、「性的二型」、あるいは「翅形成」への関与が推定されるものを選び出した。これらの因子について、発育に伴う発現変動を定量 RT-PCR により明らかにした上で、各因子の機能について考察した。

**【ホルモンにより発現制御される転写因子 *E93* の転写調節機構説明】** 上記のように、他種昆虫で成虫形態形成に関わることが知られる転写因子 *E93* が、カイガラムシではオス特異的に発現することを見出した。フジコナカイガラムシと近縁でありゲノム情報が入手可能なミカンコナカイガラムシを対象として、*E93* の転写調節領域の配列解読を進めた。約 6 kb の領域について配列解読が終了し、この領域内に JH 初期応答遺伝子 *Kr-h1* の結合配列を確認できた。また、レポーターアッセイを行うためのコンストラクト作成が終了した。

【性特異的形質の発達におけるシグナリング経路の解明】 フジコナカイガラムシの性特異的形質の発達において、JH シグナリングに関わる複数の転写因子に加えて、性決定遺伝子 *dsx* も関与することが想定される。そこで、上記 *E93* の転写調節領域内で転写因子結合配列を探索したところ、*dsx* 結合配列の候補配列を同定することができた。よって、JH シグナリングと性決定シグナリングの間のクロストークが改めて示唆された。

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 2 件) \* 主要なものを以下に列挙

1. Vea IM, Tanaka S, Tsuji T, Shiotsuki T, Jouraku A, Minakuchi C (2019) “*E93* expression and links to the juvenile hormone in hemipteran mealybugs with insights on female neoteny.” *Insect Biochem Mol Biol* 104: 65-72. doi: 10.1016/j.ibmb.2018.11.008 (査読有)
2. Vea IM, Tanaka S, Shiotsuki T, Jouraku A, Tanaka T, Minakuchi C (2016) “Differential juvenile hormone variations in scale insect extreme sexual dimorphism.” *PLoS One* 11: e0149459. doi: 10.1371/journal.pone.0149459 (査読有)

[学会発表] (計 16 件)

1. Sapin G, Tomoda K, Miura K, Minakuchi C. “Elucidate the Roles of *E75* during pupal-adult metamorphosis of red flour beetle, *Tribolium castaneum*.” 第 63 回日本応用動物昆虫学会大会、2019 年 3 月
2. 村松美幸、Vea IM、田中彩友美、辻知広、三浦健、水口智江可「性的二型を示すフジコナカイガラムシにおける脱皮ホルモン生合成酵素遺伝子の発現解析」第 63 回日本応用動物昆虫学会大会、2019 年 3 月
3. 成瀬祥矢、塩月孝博、上樂明也、三浦健、水口智江可「ホソヘリカメムシにおける幼若ホルモン様活性物質の殺卵活性」第 63 回日本応用動物昆虫学会大会、2019 年 3 月
4. 水口智江可「害虫防除への応用を目指した、昆虫ホルモン作用の基礎研究」第 43 回日本比較内分泌学会大会およびシンポジウム仙台大会、2018 年 11 月
5. 成瀬祥矢、三浦健、水口智江可「ホソヘリカメムシの産卵と胚発生における幼若ホルモン受容体の機能解析」第 62 回日本応用動物昆虫学会大会、2018 年 3 月
6. Vea IM, Tanaka S, Tsuji T, Suzuki Y, Shiotsuki T, Jouraku A, Miura K and Minakuchi C. “Hormonal regulation of metamorphosis in hemimetabolous thrips and scale insects.” The 3rd International Insect Hormone Workshop, 2017 年 7 月
7. 成瀬祥矢、三浦健、水口智江可「コクヌストモドキの産卵と胚発生における幼若ホルモン関連遺伝子の機能解析」第 61 回日本応用動物昆虫学会大会、2017 年 3 月
8. 辻知広、Isabelle Vea、塩月孝博、上樂明也、三浦健、水口智江可「フジコナカイガラムシにおけるエクダイソン初期応答遺伝子 *E75* の cDNA クローニングと発現解析」第 61 回日本応用動物昆虫学会大会、2017 年 3 月
9. 田中彩友美、Isabelle Vea、三浦健、水口智江可「フジコナカイガラムシの顕著な性的二型形成における幼若ホルモンの役割」第 61 回日本応用動物昆虫学会大会、2017 年 3 月
10. 梅浩平、水口智江可、外川徹「タカサゴシロアリの兵隊分化における small-RNA シーケンス解析」第 61 回日本応用動物昆虫学会大会、2017 年 3 月
11. Vea IM, Yonei S, Shiotsuki T, Jouraku A, Niimi T, and Minakuchi C. “Identification and expression profiles of sex-specific doublesex transcripts in the non-holometabolous scale insects (Hemiptera: Coccoomorpha).” 25th International Congress of Entomology, September 2016
12. Vea IM, Tanaka S, Shiotsuki T, Jouraku A, Tanaka T, Minakuchi C. “Role of the Juvenile Hormone in establishing scale insect extreme sexual dimorphism.” Society for Integrative and Comparative Biology Annual Meeting, January 2016

13. Vea IM, Tanaka S, Shiotsuki T, Jouraku A, Tanaka T, Minakuchi C. “Scale insect development and the adult specifier E93: towards an understanding of female neoteny.” Society for Integrative and Comparative Biology Annual Meeting, January 2016
14. 成瀬祥矢、三浦健、水口智江可「コクヌストモドキの胚発生における幼若ホルモン生合成酵素遺伝子の機能解析」日本昆虫学会第76回大会・第60回日本応用動物昆虫学会大会合同大会、2016年3月
15. 田中彩友美、Isabelle Vea、塩月孝博、上樂明也、三浦健、水口智江可「フジコナカイガラムシにおける幼若ホルモンシグナル伝達関連因子 Taiman の cDNA 単離および発現解析」日本昆虫学会第76回大会・第60回日本応用動物昆虫学会大会合同大会、2016年3月
16. Vea IM, Tanaka S, Shiotsuki T, Jouraku A, Tanaka T, Minakuchi C. “Role of broad in scale insect juvenile hormone signaling during male quiescent stages.” 日本昆虫学会第76回大会・第60回日本応用動物昆虫学会大会合同大会、2016年3月

〔図書〕（計0件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計0件）

名称：  
 発明者：  
 権利者：  
 種類：  
 番号：  
 出願年：  
 国内外の別：

○取得状況（計0件）

名称：  
 発明者：  
 権利者：  
 種類：  
 番号：  
 取得年：  
 国内外の別：

〔その他〕

総説など

1. 水口智江可「不完全変態昆虫の性決定」昆虫と自然、54(5), 8-10, 2019年
2. 水口智江可「害虫防除への応用を目指した、昆虫ホルモン作用の基礎研究」比較内分泌学、45(166), 39, 2019年1月 doi: 10.5983/nl2008jsce.45.39
3. 水口智江可「特集『幼若ホルモン (JH) 研究の最新トピックス』にあたって」蚕糸・昆虫バイオテック、85(3), 85-86, 2016年12月 doi: 10.11416/konchubiotec.85.3\_085

関連論文

1. Toga K, Minakuchi C, Maekawa K (2017) “Soldiers are differentiated from male larval stages in incipient colonies of *Nasutitermes takasagoensis* (Isoptera: Termitidae).” Appl Ent Zool 52: 329-335. doi: 10.1007/s13355-017-0485-0 (査読有)
2. Suzuki Y, Shiotsuki T, Jouraku A, Miura K, Minakuchi C (2017) “Benzoylurea resistance in western flower thrips *Frankliniella occidentalis* (Thysanoptera: Thripidae): the presence of a point mutation in chitin synthase 1.” J Pestic Sci 42: 93-96. doi: 10.1584/jpestics.D17-023 (査読有)
3. Minakuchi C, Ishii F, Washidu Y, Ichikawa A, Tanaka T, Miura K, Shinoda T (2015) “Expressional and functional analysis of CYP15A1, a juvenile hormone epoxidase, in the red

flour beetle *Tribolium castaneum*.” J Insect Physiol 80: 61-70.  
doi: 10.1016/j.jinsphys.2015.04.008 (査読有)

4. Minakuchi C, Ohde T, Miura K, Tanaka T, Niimi T (2015) “Role of scalloped in the post-embryonic development of the red flour beetle *Tribolium castaneum* (Coleoptera: Tenebrionidae).” Appl Ent Zool 50: 17-26. doi: 10.1007/s13355-014-0297-4 (査読有)
5. Suzuki Y, Furuta K, Maeda K, Yokoi K, Miura K, Tanaka T, Minakuchi C (2015) “Insecticidal activity and up-regulation of juvenile hormone response genes by juvenile hormone agonists in the western flower thrips, *Frankliniella occidentalis*.” J Pestic Sci 40: 92-98. doi: 10.1584/jpestics.D14-098 (査読有)

ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究分担者 該当なし

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号 (8桁)：

### (2) 研究協力者

研究協力者氏名：Isabelle Vea (現・University of Illinois at Chicago、博士研究員)

### (3) 連携研究者 (氏名、所属機関名、職名)

小野 肇 京都大学農学研究科、助教

宮下 正弘 京都大学農学研究科、准教授

新美 輝幸 基礎生物学研究所、教授

篠田 徹郎 農研機構、ユニット長 (現・福島大学、教授)

塩月 孝博 農研機構、上級研究員 (現・島根大学、教授)

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。