

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 8 月 29 日現在

機関番号：82111

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K15072

研究課題名(和文) 幼若ホルモンによる成虫化抑制分子メカニズムの解明

研究課題名(英文) Molecular mechanism underlying juvenile hormone-mediated repression of adult metamorphosis

研究代表者

粥川 琢巳 (Kayukawa, Takumi)

国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構・生物機能利用研究部門・主任研究員

研究者番号：70580463

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円

研究成果の概要(和文)：幼若ホルモン(JH)は、幼虫の成虫化を抑えるホルモンとして知られている。近年、E93遺伝子が成虫化決定遺伝子として機能し、その発現はJHによって抑制されることが報告されたが、その分子メカニズムは明らかにされていなかった。本研究では、培養細胞系を用いて、JHによるE93の抑制に関わるシスおよびトランス因子を特定し、JHによる成虫化抑制分子メカニズムを解明した。

研究成果の概要(英文)：Juvenile hormone (JH) represses precocious metamorphosis of larval to adult transitions. Ecdysone-induced protein 93F (E93) functions as an adult specifier gene in the pupal-adult transition. JH is known to repress E93 expression to prevent immature larvae from bypassing the pupal stage and progressing to precocious adult development; however, the molecular mechanism underlying JH-mediated E93 repression remains unknown. Here, I identified a cis- and trans-element concerning the repression, and demonstrated molecular mechanism underlying juvenile hormone-mediated repression of precocious larval-adult metamorphosis.

研究分野：昆虫生理学・生化学・分子生物学

キーワード：幼若ホルモン 成虫化決定因子 抑制分子メカニズム 転写因子 脱皮・変態

1. 研究開始当初の背景

幼若ホルモン (JH) は、昆虫の脱皮・変態の過程において、幼虫の蛹化および成虫化を抑えるホルモンとして知られている。これまで私は、JH シグナル経路の中核と JH による蛹化決定遺伝子 (*BR-C* 遺伝子) の抑制分子メカニズムを明らかにしてきた。2014 年 (本研究課題申請前年) に、*E93* 遺伝子が成虫化決定遺伝子として初めて特定されたが、JH による *E93* の抑制分子メカニズムは明らかにされていなかった。

2. 研究の目的

本研究では、カイコ培養細胞系を用いて、JH による *E93* 遺伝子の抑制に関するシスおよびトランス因子を同定し、その知見に基づいて JH による *E93* 遺伝子の抑制分子メカニズムを解明する。

3. 研究の方法

カイコ培養細胞を用いたレポーターアッセイ、RNAi、強制発現により、JH による *E93* の抑制に関わるシス因子及びトランス因子を特定する。また、ChIP-seq 及びゲルシフトアッセイによりトランス因子のシス因子への結合を生化学的に証明する。

4. 研究成果

カイコの皮膚をホルモン入りの培地で組織培養すると、成虫化決定遺伝子 *E93* がエクダイソンで誘導され、JH によってその誘導が抑制される。また、カイコ培養細胞でも同様の結果が得られた。そこで、培養細胞に *E93* の上流域を連結したレポーター (P_{E93} レポーター) を導入してホルモンによる応答を調べたところ、エクダイソン依存的にレポーターが活性化され、JH によってその活性が抑制された。また、*Kr-h1* の RNAi を行ったところ、JH による抑制効果がなくなることから、*E93* の JH による抑制に *Kr-h1* が関与していることが示唆された (図 1)。

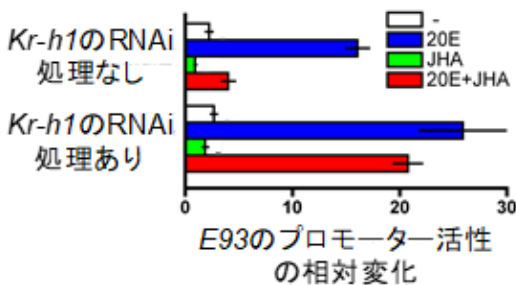


図 1 P_{E93} レポーターを使用したレポーターアッセイによる *Kr-h1* の *E93* 発現抑制効果。 : 対象区, 20E: エクダイソン処理区, JHA: JH 処理区, 20E+JHA: エクダイソンと JH の同時処理区。

次に *E93* のエクダイソンによる誘導と、JH による抑制に関与しているシス因子の特定

を試みた。*E93* の上流域を眺めると、エクダイソン応答配列 (ecdysone response element, EcRE) と *BR-C* から特定した *Kr-h1* の結合配列 (*Kr-h1* binding site, KBS) と相同性の高い配列が、転写開始点から約 2kb 上流に隣接して見出された。 P_{E93} レポーターから EcRE 様配列を抜くと、エクダイソン依存的なレポーター活性がなくなり、KBS 様配列を抜くと、JH による抑制効果が見事になくなった。別のアプローチとして、*Kr-h1* の ChIP-seq を行ったところ、*E93* の KBS 様配列付近に enrich するピークが見られた。また、ChIP-seq の結果をもとにモチーフ解析を行った結果、*BR-C* と *E93* の KBS と相同性の高いコンセンサス配列 (TGACCTNNNYAAC) が得られた (図 2)。さらに、ゲルシフトアッセイにより、*Kr-h1* の KBS への結合を生化学的に証明することができた。



図 2 レポーターアッセイ及び ChIP-seq から特定した *Kr-h1* の結合配列 (KBS)。灰色の網掛けは、保存性が高い DNA 塩基を示す。

以上の結果から、終齢幼虫後期の JH が *Kr-h1* を誘導し、誘導された *Kr-h1* が成虫化決定遺伝子 *E93* の上流に結合し、結合した *Kr-h1* が *E93* の転写を抑制することで、幼虫の早熟成虫化 (幼虫が蛹期を飛ばして直接成虫になってしまう現象) を抑制していることが明らかになった (図 3)。

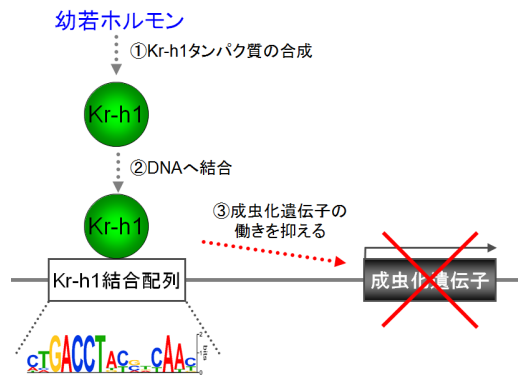


図 3 幼若ホルモンによる成虫化抑制の分子メカニズム。

続いて、*Kr-h1* による転写抑制の分子メカニズムを解析した。EcRE と KBS が非常に隣接しているため (28base), 「*Kr-h1* が KBS に結合すると、物理的にエクダイソン受容体 (EcR) が EcRE に結合できなくなるのではないか?」と考えた。この仮説を検証するため

に, EcRE と KBS を含んだプローブを使ってゲルシフトアッセイを行ったが, 予想に反して EcR の EcRE への結合が阻害されなかった. 次の仮説として, 「Kr-h1 に相互作用するコリプレッサーが, 転写を抑制しているのではないか?」と考えた. コリプレッサーとして, ヒストン脱アセチル化に関わる Groucho (Gro) や C-terminal binding protein (CtBP) が挙げられる. Gro は WRPW モチーフを持つ転写因子と, CtBP は PDXLS モチーフを持つ転写因子と相互作用し, ヒストンの脱アセチル化に関わるタンパク質群と複合体を形成して, 転写を抑制する. Kr-h1 には, どちらのモチーフも見受けられず, また RNAi や two-hybrid assay でもこれらのコリプレッサーの関与を示すデータが得られなかった. Kr-h1 は全体の 6 割以上がジンクフィンガードメインを占め, 残りのアミノ酸配列にはほとんど相同性がない. しかし, Kr-h1 の C 末端には, 保存された 6 アミノ酸領域が 2 ヶ所ある (C-terminal conserved domain, CtCD). 興味深いことに, この CtCD を deletion すると, Kr-h1 による抑制効果がなくなることから, この配列が転写抑制に関わる重要な配列であることが示唆された (図 4).

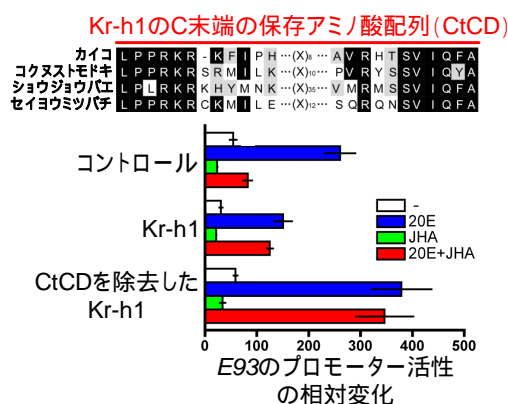


図 4 Kr-h1 保存アミノ酸配列 (CtCD) の E93 発現抑制効果. : 対象区, 20E: エクダイソン処理区, JHA: JH 処理区, 20E+JHA: エクダイソンと JH の同時処理区.

現在, CtCD の詳細な機能解析を進めており, 今後 Kr-h1 の抑制メカニズムの全容を解明して行く.

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 3 件)

Kayukawa T, Jouraku A, Ito Y, Shinoda T (2017). Molecular mechanism underlying juvenile hormone-mediated repression of precocious larval-adult metamorphosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*

114: 1057-1062.

DOI: 10.1073/pnas.1615423114.

Uchibori-Asano M, Kayukawa T, Sezutsu H, Shinoda T, Daimon T (2017). Severe developmental timing defects in the prothoracicotropic hormone (PTTH)-deficient silkworm, *Bombyx mori*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 87: 14-25.

DOI: 10.1016/j.ibmb.2017.06.007

粥川琢巳(2016). 標的細胞内 JH シグナル経路の解明と新規昆虫成長制御剤の開発. 蚕糸・昆虫バイオテック 85: 107-115.

[学会発表](計 6 件)

粥川琢巳, 篠田徹郎, 米須清明, 岡部隆義 (2018). 幼若ホルモン受容体を標的とした新規昆虫成長制御剤の開発. 第 62 回日本応用動物昆虫学会大会.

Kayukawa T, Shinoda T (2017). Transcriptional regulatory cascade of juvenile hormone controlling insect metamorphosis. The 3rd International Insect Hormone Workshop.

粥川琢巳, 伊藤由果, 篠田徹郎 (2017). 変態抑制遺伝子 *Kr-h1* と成虫化決定遺伝子 *E93* の double knockdown でどうなるのか? 第 61 回日本応用動物昆虫学会大会.

長峯啓佑, 星崎杉彦, 粥川琢巳, 石川 幸男, 新谷 喜紀 (2017). キボシカミキリの蛹化カスケード開始におけるインスリンシグナリングの関与. 第 61 回日本応用動物昆虫学会大会.

Kayukawa T, Shinoda T (2016). How does juvenile hormone prevent pupal metamorphosis in holometabolous insects? XXV International Congress of Entomology.

Toru T, Kayukawa T, Uchida K, Ishinoda H, Suzuki D, Shinoda T (2016). Expression of hairy gene is induced by juvenile hormone in tissue dependent manner. XXV International Congress of Entomology.

[図書](計 0 件)

該当なし

[産業財産権]

出願状況(計 1 件)

名称: 有害生物防除剤

発明者: 粥川琢巳, 篠田徹郎

権利者: 同上

種類: 特許

番号: 特願 2017-134415 号

出願年月日：平成29年7月10日
国内外の別：国内

取得状況（計 0件）
該当なし

〔その他〕

粥川琢巳，成果情報『幼若ホルモンによる成虫化抑制の分子機構』

http://www.naro.affrc.go.jp/project/results/4th_laboratory/nias/2016/nias16_s17.html

粥川琢巳，プレスリリース『幼若(ようじやく)ホルモンが成虫化を抑える仕組みを解明 - 昆虫の発育をコントロールする技術に期待 -』，

http://www.naro.affrc.go.jp/publicity_report/press/laboratory/nias/073137.html

6. 研究組織

(1) 研究代表者

粥川 琢巳 (KAYUKAWA, Takumi)

国立研究開発法人・農業食品産業技術総合研究機構・生物機能利用研究部門・昆虫制御研究領域・昆虫機能制御ユニット・主任研究員

研究者番号：70580463

(2) 研究分担者

該当なし

(3) 連携研究者

該当なし

(4) 研究協力者

該当なし