

令和 2 年 6 月 22 日現在

機関番号：11101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K08147

研究課題名(和文) 体節特異的に制御される蛹分化および細胞死の分子機構の解明

研究課題名(英文) The Mechanisms of segment specific response to hormones in pupal metamorphosis and cell death

研究代表者

金児 雄 (Kaneko, Yu)

弘前大学・農学生命科学部・准教授

研究者番号：90633610

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：昆虫の脱皮や変態は体液中へと分泌される主に2つのホルモンによって制御されている。ひとつは脱皮を誘導するエクジステロイドで、もう一方は現状維持作用を持つ幼若ホルモン(JH)である。これらホルモンへと応答して、各組織・器官に特有な現象が引き起こされる。昆虫は開放血管系であり、全ての細胞が同時期に同濃度のホルモンに曝されるにも関わらず異なる作用を引き起こす。そこでJHへの細胞特異的な応答に着目し、この機構の解明を試みた。その結果、種々の遺伝子が細胞の存在する位置特異的にホルモンへの応答を示し、またその応答の制御に一部のhomeotic geneが関わる可能性を見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

個々の組織におけるホルモン応答機構についての議論はされてきたものの、これまで開放血管系における体節特異的なホルモン応答の分子機構については全く理解が進んでいない。その結果、個体発育におけるホルモン応答機構の理解は十分には行われていなかった。本研究結果を基に今後理解が深まると考えられる。また本研究によるホルモンの体節特異的作用を導く因子の同定および作用機構の解明は、組織特異的に作用させることでより効率的な殺虫剤の開発に貢献するとともに、細胞死研究も対象とすることから殺虫剤の直接的な標的の探索への応用も期待できる。

研究成果の概要(英文)：Insect molting and metamorphosis are controlled mainly by two hormones secreted into hemolymph. One is ecdysteroids that induce molting, and the other is juvenile hormones (JH) that have the status quo action. Each cell shows unique response to the hormones. Because of open circulatory system in insects, all cells are exposed to the same concentration of the hormones at the same time. Therefore, we focused on the cell-specific response to JH and attempted to elucidate this mechanism. As a result, we found that various genes showed a response to hormones peculiar to the location of cells, and that some homeotic genes might be involved in the regulation of the response.

研究分野：昆虫生理学

キーワード：体節特異性 蛹変態

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

昆虫は数回の幼虫脱皮を経たのちに、一定の大きさになると蛹への変態を開始する。これら脱皮と変態は主に2つのホルモンによって制御されている。ひとつは前胸腺から分泌されるエクジステロイドで、もう一方はアラタ体から分泌される幼若ホルモン(JH)である。幼虫脱皮は、JHが存在する状態で、エクジステロイドに暴露することで引き起こされる。一方変態は、JHが無い状態で、エクジステロイドに曝されることで誘導される。完全変態昆虫であるカイコは、4回の幼虫脱皮後に、蛹変態が起こる幼虫時期である終齢幼虫になる。終齢幼虫へと脱皮すると、アラタ体におけるJH合成活性が急激に減少する。その結果、体液中にJHがほとんど無い状態でエクジステロイドに曝されることによって、蛹変態は引き起こされる。この現象は、外部からのJH処理によって阻害される。つまりJH濃度の低下によって、蛹変態の引き金が引かれる。昆虫の蛹変態時におけるホルモンへの応答は、細胞によって様々である。翅の素なる成虫原基は、細胞分裂が活性化され、その後分化が誘導される。一方で、幼虫特異的な組織は細胞死が誘導されることで体内から除去される。このように、蛹変態に向けて様々な細胞の特有の現象が、同一のホルモン状態によって誘導されることにより、個体レベルでの細胞応答の時期的な同調が測れることで、正常な蛹変態が誘導される。

これまで個々の組織において蛹変態時におけるホルモン応答機構が調べられてきた。将来翅になる成虫原基は分化が誘導され、一方で、幼虫特異的な組織であるカイコの絹糸腺は、細胞死関連因子であるカスパーゼが活性化されることで細胞死が誘導され、いずれの現象もJH投与によって抑制される。両組織ともJHが低下することに応じて、それぞれ特徴的な現象が始まるが、両者の組織のバックグラウンドが大きく異なるため、JH応答の差異を調べるには適していない。表皮細胞は、JHの低下に応じて、エクジステロイドへの応答性を獲得し、幼虫クチュラから、蛹クチュラを合成するようになる。しかし、体の全ての細胞がJHの低下に応じて同様の現象が起こる。そこで体の全ての体節に存在し、かつ体の前方部と後方部でJHへの応答が異なるベルソン氏腺を主な研究材料とすることで、細胞毎の異なるホルモン応答を生み出す分子機構の解明を試みた。

### 2. 研究の目的

昆虫体内の細胞は、自身の運命によって蛹変態時に異なる運命を辿る。成虫特異的な組織は分化を、幼虫特異的な組織では細胞死が誘導され、その他の細胞においては、再構成によって蛹へと適応する。これらの現象は、体液中に分泌されるホルモンによって誘導される。開放血管系である昆虫においては、全ての細胞が同時に同濃度のホルモンに曝される。同一体液環境下で、どのようにして異なる細胞の応答が引き起こされるのかについて、その分子機構は全く明らかになっていない。そこで本研究では、開放血管系における体節特異的なホルモン応答機構の解明を目指した。

### 3. 研究の方法

体節特異的なホルモンの作用機構を分子レベルで理解するため、生理学的手法、免疫学的手法、分子生物学的手法を駆使する。まずベルソン氏腺において体節特異的に発現し、かつJHへの応答を示す遺伝子の探索を行い、得られた候補遺伝子に対して、RNAiによるノックダウンにより、蛹分化、細胞死に影響を与える遺伝子群を探し出す。これにより体節特異的なホルモン応答を生み出す遺伝子群の同定ができる。さらに得られた遺伝子の一つひとつノックダウンし、他の遺伝子に与える影響を調べることで、遺伝子間のネットワークを解明する。加えて既知の細胞死関連遺伝子についても関与をRNAiによって検証する。最終的に、これらの遺伝子の終齢致死突然変異体における発現を解析し、比較することにより、より普遍的な体節特異性を生み出す分子機構が解明できる。

### 4. 研究成果

(1) 体節特異的な遺伝子の探索のために、腹部第1体節のベルソン氏腺と腹部第7体節のベルソン氏腺で発現する遺伝子のMicro arrayによる比較で得られた体節特異的な候補遺伝子の発現を、real-time qPCRで確認した。Micro arrayの結果、腹部第1体節および腹部第7体節のベルソン氏腺に特異的な遺伝子候補20ずつを解析した。解析した全てにおいて、体節特異性が確認された。さらに、胸部第1体節から腹部第9体節のベルソン氏腺で発現解析を行った結果、体節特異性は3つのタイプに分けることができ、細胞の蛹変態時の動態と一致することがわかった。このことから、体節特異的な遺伝子発現制御機構が存在することが確かめられた。これらの体節特異性とhomeotic geneとの関係性も検証した。動物の細胞の位置情報は初期発生において特異的なhomeotic geneが発現し維持されることで生み出されていると考えられている。そこで、昆虫の胸部および腹部で発現することが知られているhomeotic geneの発現を検証したところ、上記の3つのタイプに別れることがわかった。

(2) JH応答遺伝子の探索のために、JHを処理し、腹部第1体節のベルソン氏腺における遺伝子の継時的な発現変化を、RNAシーケンスを用いることで網羅的に行った。終齢開始時にJH類似物質を投与し、1日ごとにサンプリングを行い、RNAシーケンスを行った。すでにJHへの応答が確認できているKr h1の発現変化をreal-time qPCRの結果と比較したところ、ほぼ完全に結果が一致したことから、RNAシーケンスによる解析は信用に足ることが確認できた。RNA

シーケンスの結果、JH 類似物質処理期間が長くなるにつれて、JH 応答遺伝子の数が増えていった。この傾向は、ベルソン氏腺における JH への段階的な応答の結果と類似しており、今後 RNA シーケンスで得られた遺伝子の解析を行うことによって、JH 応答によって生み出されている現象の解析に繋がると考えられる。

(3) 体の後部の体節に位置するベルソン氏腺は細胞死を起こすので、関連遺伝子を RNAi によって探索した。これまでベルソン氏腺の細胞死に caspase3 が関わることを明らかにしていた。そこで、シグナル伝達経路のより詳細な検証を試みた。Caspase3 は上流の caspase によって活性化されると考えられている。そこでカイコの上流 caspase のひとつである caspase-Nc の関与を RNAi によって検証した結果、caspase-Nc をノックダウンすると caspase3 の活性化が抑制され、かつ細胞死も抑制された。さらに上流 caspase の活性化に関与するとされる IBM1 の発現を解析した結果、細胞死が起こる時期に発現の上昇が見られ、かつ JH 処理によって発現が抑制された。このことからベルソン氏腺の細胞死への関与が疑われたので、RNAi によって検証した。IBM1 のノックダウンにより、caspase3 の活性化および細胞死の抑制が確認できた。以上のことから、ベルソン氏腺の細胞死は、IBM1 が上流 caspase である caspase-Nc の活性化を促し、その結果、caspase3 が活性化されることで引き起こされると考えられる。これらの上流に JH が存在しており、今後、両者の関係を検証することで、体節特異的なホルモン応答の解析に繋がる。

(4) カイコ終齢致死変異体の解析も行った。終齢致死変異体の JH への応答を確認するために、JH 産生器官であるアラタ体を除去して、表現型を観察した。その結果、アラタ体を除去して JH を体内から強制的に無くしたところ、致死の表現型が通常よりも早く見られた。このことから終齢致死変異体は JH の減少に応じて、その表現型が出現することがわかった。また遺伝型を DNA マーカーで判別し、標準型の個体と終齢致死遺伝子をホモで持つ個体間で、遺伝子発現の差異を検証した。JH 関連遺伝子および細胞死関連遺伝子では、遺伝型間での差異は認められなかった。一方で、エクジステロイド関連遺伝子の発現が、終齢致死型において標準型と比べて有意に減少していた。

(5) 個体レベルでの遺伝子機能の評価のために、transgenic カイコにおける heat shock タンパク質 (hsp) プロモーターの検証を行った。カイコにおける過剰発現のために hsp70 のプロモーターが用いられているが、これまで適正な温度の検証がなされてこなかった。そこで、適正温度の検討と処理時間の検証を行った結果、40度以下であれば24時間以上処理しても個体は生存可能で、かつ遺伝子発現誘導も十分に行われることが確認できた。今後は、hsp70 プロモーターを使用した過剰発現系を利用することで、個体レベルでの検証も可能になった。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Suang, S., T. Singtripop, Chantawannakul, K. Hiruma, Y. Kaneko, M. Manaboon	4. 巻 45
2. 論文標題 Cloning and Developmental Expression of Methoprene-tolerant (Met) in Diapausing Larvae of the Bamboo Borer, <i>Omphisa fuscidentalis</i> Hampson.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Chiang Mai J. Sci.	6. 最初と最後の頁 2303-2311
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Suang Suphawan, Hiruma Kiyoshi, Kaneko Yu, Manaboon Manaporn	4. 巻 102
2. 論文標題 Diapause hormone directly stimulates the prothoracic glands of diapause larvae under juvenile hormone regulation in the bamboo borer, <i>Omphisa fuscidentalis</i> Hampson	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Archives of Insect Biochemistry and Physiology	6. 最初と最後の頁 e21603
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/arch.21603	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Taiki Sunada, Eiji Kotani, Yu Kaneko, Keiko Takaki	4. 巻 89
2. 論文標題 Functions of kinesin-1 motor protein in the telotrophic meroistic ovary of red flour beetle, <i>Tribolium castaneum</i>	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Insect Biotechnology and Sericology	6. 最初と最後の頁 17-24
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） <a href="https://doi.org/10.11416/jibs.89.1_017">https://doi.org/10.11416/jibs.89.1_017</a>	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Kaneko, Y., Hiruma, K.
2. 発表標題 Target of Rapamycin (TOR) induces the cell death commitment of Verson's gland of <i>Bombyx mori</i> .
3. 学会等名 3rd International Insect Hormone (21th Ecdysone) Workshop (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 金児雄・比留間潔
2. 発表標題 Target of Rapamycin (TOR) によるVerson's gland細胞死コミットメントの誘導
3. 学会等名 蚕糸・昆虫機能利用学術講演会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 三上翔平, 山下和志, 金児雄
2. 発表標題 Verson's glandの蛹コミットメントにおける4E-BPとS6kinaseの機能解析
3. 学会等名 蚕糸・昆虫機能利用学術講演会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 大森裕介, 高橋仁輝, 金児雄, 藤井告, 伴野豊
2. 発表標題 カイコ終齢致死変異体における遺伝子発現変動解析
3. 学会等名 蚕糸・昆虫機能利用学術講演会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Takaki, K., Y. Kaneko, M. Paroulek, K. Hiruma, E. Kotani, H. Mori, M. Jindra.
2. 発表標題 Effects of starvation on the telotrophic ovariole of Tribolium castaneum.
3. 学会等名 3rd International Insect Hormone (21th Ecdysone) Workshop (国際学会)
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 金児 雄, 塩見 邦博, 天竺桂 弘子, 他56名	4. 発行年 2019年
2. 出版社 (株)エヌ・ティー・エス	5. 総ページ数 304
3. 書名 カイコの実験単 ~カイコで生命科学をまるごと理解~	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
連携研究者	比留間 潔  (Hiruma Kiyoshi)  (70374816)	弘前大学・農学生命科学部・客員研究員   (11101)	