

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20570056

研究課題名(和文)

昆虫IGF様ペプチドの生理機能の解明

研究課題名(英文)

Study on the physiological function of IGF-like peptides in insects

研究代表者：

溝口 明 (Akira Mizoguchi)

名古屋大学・理学研究科・准教授

研究者番号：60183109

研究成果の概要(和文)：カイコガのIGF様ペプチド(BIGFLP)と機能的に相同なショウジョウバエのペプチド(DILP6)を同定し、それをコードする遺伝子の機能阻害実験および機能回復実験により、同ペプチドが変態期特異的に働く成長促進因子であることを証明した。また、BIGFLPの網羅的発現解析により、同ペプチドが主要産生組織である脂肪体だけでなく、脳内の神経分泌細胞や精巣・卵巣でも時期特異的に発現することを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：*Drosophila* insulin-like peptide-6 (DILP6) was identified to be the counterpart of *Bombyx* IGF-like peptide (BIGFLP), based on its spatiotemporal pattern and ecdysteroid-inducibility of gene expression. The *dilp6* mutant had a normal larval size but a smaller adult size. This phenotype of the mutant was rescued by *dilp6* overexpression in the fat body after the wandering stage, where and when this gene is normally expressed. These observations, together with our previous study on BIGFLP, strongly suggest that fat body-derived IGF-like peptide is a common regulator of postfeeding growth in insects. A systematic survey of BIGFLP expression in *Bombyx* revealed that this peptide is also expressed in the brain and gonads in a stage-specific manner, suggesting pleiotropic actions of this peptide in the regulation of *Bombyx* development.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2009年度	800,000	240,000	1,040,000
2010年度	900,000	270,000	1,170,000
総計	3,900,000	1,170,000	5,070,000

研究分野：昆虫内分泌学

科研費の分科・細目：基礎生物学 形態・構造

キーワード：インスリン様成長因子(IGF)、インスリン様ペプチド、昆虫、脂肪体、変態、成長、カイコガ、ショウジョウバエ

1. 研究開始当初の背景

ヒトのインスリンとインスリン様成長因子(IGFs)は同族のペプチドであるが、構造的特徴、産生組織、生理機能が異なる。前者はヘテロダイマー構造を持ち、主に代謝調節に働くのに対し、後者は単鎖ポリペプチドで、主たる機能は組織の成長促進である。無脊椎動物にもインスリン族ペプチドは広く存在

し、カイコガではインスリン型(ヘテロダイマー)構造をもつボンビキシンが同定されている(Nagasawa et al., 1986: Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83, 5840-5843.)。ボンビキシンは主に脳神経分泌細胞で産生され、摂食に伴う血中グルコース濃度の上昇に応答して分泌され、幼虫の糖代謝調節や翅原基の成長に関与することが知られている。近年、ショウジョウ

バエゲノム中にインスリン様ペプチド (DILPs) の遺伝子が見いだされ、分子遺伝学的研究により、DILPs シグナル伝達系がハエの成長、寿命、血糖調節などに関わることが示され注目を集めている (Brogiolo et al., 2001: Cur. Biol.11, 213-221.)。 *dilp* 遺伝子は7種類あるが、ペプチドは精製されておらず、それぞれの産物がインスリン型なのかIGF型なのかは不明である。これまでの研究では、主に脳で産生されインスリン型と推定されるDILPsに焦点があり、末梢組織が産生するDILPsの機能は解析されていない。

私はこれまで、カイコガの発育・変態を調節する種々の神経分泌ホルモンの構造と機能に関する研究を行なってきたが、それらホルモンの一つであるボンビキシンの研究の中で、カイコガ蛹血液中に、ボンビキシン抗体に認識されるがボンビキシンよりも分子量が大きいペプチド (8kD-bombyxin-like peptide: 8K-BLP) が高濃度で存在することを見出した。そして最近、その精製・純化と構造決定に成功し、この分子がIGF様の単鎖構造をもつことを明らかにした。これは無脊椎動物において初のIGF様ペプチドの発見である。その後の研究により、8K-BLPは、1) 蛹期特異的に主に脂肪体 (肝臓と脂肪組織の機能を併せ持つ組織で、胸腹部に広く分布) で産生され、血中に大量に放出されること、2) *in vitro* において成虫特異的組織 (生殖器原基、翅原基、飛翔筋原基など) の成長を促進すること、3) 8K-BLP 遺伝子の発現はエクジステロイドにより誘導されることなどを明らかにした。これらの結果は、同ペプチドが構造ばかりでなく、産生組織 (IGFの主要産生組織は肝臓)、血中濃度 (インスリンに比べ倍以上)、生理作用 (成長促進) においてもIGFと類似することを示す。こうした特徴を踏まえ、このペプチドはカイコガIGF様ペプチド (*Bombyx* IGFLP: BIGFLP) と命名された。カイコガにおける同ペプチドの発見は、無脊椎動物にもIGF様ペプチドが広く分布し、インスリン様ペプチドとは異なる生理的役割を担っていることを強く示唆する。

2. 研究の目的

昆虫の変態は、幼虫体内に未分化状態で維持されていた微小な成虫原基組織が、幼虫期に蓄積された生体材料とエネルギーを使って急速に成長・分化し、成虫体を形成する過程である。変態調節に関する従来の研究は、変態誘導におけるエクジステロイドの役割とその分子機構の解明に集中して進められ、大きな成果を上げてきた。しかし一方、変態に不

可欠な要素である原基組織の成長についての研究はほとんどない。前記のとおり、私たちは最近、カイコガにおいて変態期特異的に大量に分泌される新規のインスリン族ペプチドBIGFLPを発見し、それが成虫原基組織の成長を特異的に促進することを見出した。しかし、昆虫におけるIGF様ペプチドの生理的機能を確立するためには、同ペプチドの *in vivo* での作用の検証が必要であり、また、他種昆虫でのIGF様ペプチドの研究も不可欠である。

本研究は、変態期脂肪体が分泌するIGF様ペプチドの生理機能を *in vivo* において解析し、さらに、同ペプチドの産生組織を網羅的に検索して、それぞれの組織における分泌調節と生理機能の解析を進め、昆虫の変態 (成虫発育) における同ペプチドの生理的役割の全体像を明らかにすることを目的とする。BIGFLPは無脊椎動物ではじめて同定されたIGF様ペプチドであり、その研究の成果は、他の無脊椎動物の発育研究に多大な影響を与えるだけでなく、脊椎動物におけるIGF研究にも新たな視点を提供するものと期待される。

3. 研究の方法

1) BIGFLPは *in vitro* において成虫原基の成長を促進するが、その生理機能を解明するためには *in vivo* での作用の解析が不可欠である。カイコガに dsRNA を注射して遺伝子ノックダウン実験を行う一方、遺伝子操作が容易なショウジョウバエのBIGFLP相同遺伝子を同定し、その機能欠失変異体を作製して遺伝子の機能解析を行う。

2) 免疫組織化学、*in situ* ハイブリダイゼーション、および定量RT-PCRを用いてBIGFLP発現の網羅的解析を行い、発現の組織特異性と時期特異性を解明する。また、発現が確認された組織を *in vitro* で培養し発現調節機構を解析する。

3) BIGFLPの血中濃度と培地中に放出される量を定量するため、簡便な高感度測定法を開発する。測定原理としては、PTTHの測定などで実績のあるサンドイッチ法に基づく時間分解蛍光免疫測定法 (TR-FIA) を適用する。

4. 研究成果

1) カイコガにおいてBIGFLPの遺伝子ノックダウンを試みたが成功しなかった。そこで、BIGFLPの *in vivo* 機能解析を遺伝子操作が容易なショウジョウバエを使って行った。始めに、BIGFLPに相当するショウジョウバエのペプチドを探索した。7種類あるショウジョウバエのインスリン様ペプチド (DILP) 遺伝子の中から、BIGFLP遺伝子の特徴である i) 脂肪体での高発現、ii) 変態期特異的発現、iii) エクジステロイドによる発現誘導、の三基準を満たすものを探した結果、*dilp6* が該当する

ことを見つけた (図1)。

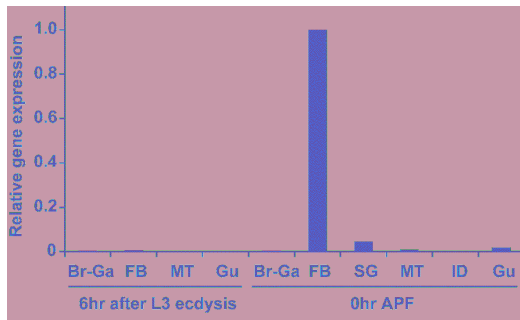


図1 変態期脂肪体特異的な *dilp6* 遺伝子の発現。摂食期 (3令脱皮後6時間) と摂食停止後 (囿蛹殻形成時) の各組織での *dilp6* 遺伝子発現レベルを定量 RT-PCR で測定した。Br-Ga, 脳・神経節複合体; FB, 脂肪体; MT, マルピーギ管; Gu, 腸; SG, 唾液腺; ID, 成虫原基。

2) P 因子転移を利用して *dilp6* 欠失変異体を作成し、表現型を解析した結果、摂食期の幼虫の成長には異常がないが、摂食停止後の成長に差が生じ、成虫のサイズが小さくなること明らかとなった (図2)。

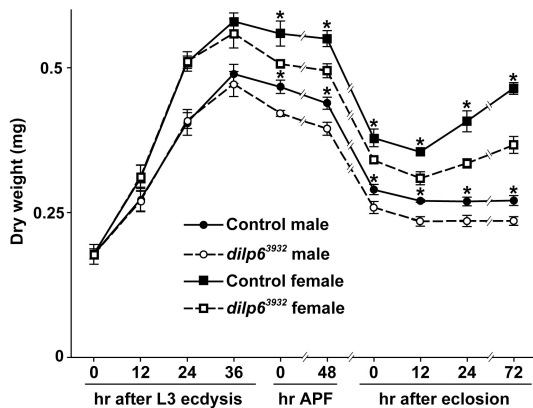


図2. *dilp6* 欠失変異体の体重変化。横軸は3令幼虫脱皮、囿蛹殻形成、および成虫羽化後の時間 (hr) を示す。黒塗りシンボルは野生型、白抜きシンボルは *dilp6* 欠失変異体の乾燥重量。丸はオス、四角はメス。

そこで、GAL4-UAS システムを使って、変態期の脂肪体特異的に *dilp6* を発現誘導したところ、変異体の成虫サイズは野生型のサイズまで回復した。この結果は、ショウジョウバエの IGF 様ペプチドである DILP6 が変態期の成長を促進する作用をもつことを示す。カイコガでは BIGFLP が *in vitro* 培養した成虫原基に対し成長促進作用をもつことが示されており、これらの結果を合わせて考えると、昆虫の IGF 様ペプチドは成虫の発達の促進機能をもつと結論される。

3) カイコガにおける BIGFLP 発現の網羅的解析により、同ペプチドは脂肪体だけでなく、

脳内の神経分泌細胞 (ボンビキシン産生細胞と同一)、卵巣小管鞘および精巣壁でも産生され、それぞれの産生開始時期は異なることが明らかとなった。図3に *BIGFLP* 遺伝子発現の発育に伴う変化を示すが、*BIGFLP* 特異抗体を用いた免疫組織化学での染色も同じ変化パターンを示す。

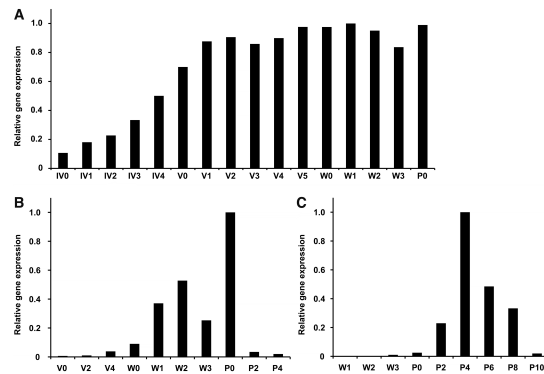


図3. 組織特異的な *BIGFLP* 遺伝子発現の変化。脳 (A)、卵巣 (B) および精巣 (C) での遺伝子発現レベルを定量 RT-PCR で測定した。横軸の数字は4令 (IV)、5令 (V)、ワンダリング (W)、蛹 (P) 開始からの日数。

脳神経分泌細胞での産生は4令初期から始まり、同じ細胞でのボンビキシンの産生が胚期に始まることと対照的である。卵巣小管鞘では吐糸期から蛹初期にかけて産生され、特に、発達初期の濾胞を包む領域に集中して観察された。精巣壁での産生は蛹初期から中期にかけてである。卵巣と精巣での *BIGFLP* 遺伝子発現はエクジステロドにより誘導され、脳内での発現はエクジステロイド非依存的であった。これらの結果は、*BIGFLP* が脂肪体以外の組織でも異なる調節を受けながら時期特異的に産生され、それぞれに異なる生理機能を果たしている可能性を示唆する。生殖巣が分泌する *BIGFLP* は傍分泌作用により生殖巣とその付属器官の発達に関わる可能性が考えられる。

ネフロサイトと総称される周気管腺・囲心細胞・食道下体でも蛹期に強い *BIGFLP* 免疫反応性が観察された。しかし、*in situ* ハイブリダイゼーションでは染色されず、また免疫電顕観察において免疫反応性はリソソーム中に観察されたことから、これらの組織は *BIGFLP* を血液中から取り込み、少なくともその一部を分解しているものと推定された。

4) *BIGFLP* 測定法を開発し、血中濃度や組織含有量の定量を可能にした。測定原理はサンドイッチ TR-FIA であり、その実施には、*BIGFLP* を捕捉する抗体と *BIGFLP* を検出する抗体の2種類の抗体が必要である。そこで、利用可能な様々な抗体の中で最も高感度に *BIGFLP* を検出できる組み合わせを検討した。

その結果、捕捉抗体として BIGFLP の C ドメインに対するマウスモノクローナル抗体の一つ D7H3 を、検出抗体として BIGFLP を交差認識するモルモット抗ボビキシン抗体を用いる組み合わせが最適との結論を得た。確立した測定法の感度は数 pg であり、同法の開発により、ウエスタンブロッティングでは検出できない微量の BIGFLP も容易に定量できるようになった。同法により血中濃度を測定すると、ワンダリング開始後 2 日目にはすでに上昇が始まっていることが明らかとなった (図 4)。また、カイコガ卵中にも高濃度に BIGFLP が蓄積するとの新知見も得られた。

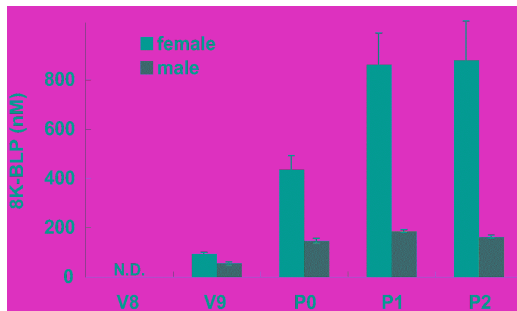


図 4. 血中 BIGFLP の変動. TR-FIA による測定. 発育ステージの説明は図 2 を参照.

5) 今後の展望

本研究により、昆虫には種を超えて IGF 様ペプチドが存在し、変態期の成長を調節していることが実証された。また、IGF 様ペプチドは、脂肪体から大量分泌されて全身的作用をもつ (内分泌作用) だけでなく、生殖腺でも産生されて局所的に働く (傍分泌作用) 可能性が示された。今後は、IGF 様ペプチドの傍分泌作用にも注目し、昆虫 IGF 様ペプチドの機能の全体像を明らかにする必要がある。また、従来、カイコガにおいては、成虫の発達と性成熟はもっぱらエクジステロイドにより調節されると考えられてきたが、IGF 様ペプチドの産生がエクジステロイドにより誘導されることと、同ペプチドが成長促進作用をもつことを考え合わせると、既知のエクジステロイドの作用の一部は IGF 様ペプチドにより仲介されている可能性が考えられる。今後は、変態期の発達におけるエクジステロイドの作用と IGF 様ペプチドの作用の関係を細胞レベルで解明していく必要がある。

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 4 件)

① N. Okamoto, N. Yamanaka, Y. Endo, H. Kataoka, A. Mizoguchi (2011) Spatiotemporal

patterns of IGF-like peptide expression in the silkworm *Bombyx mori* predict its pleiotropic action. *Gen. Comp. Endocrinol.* in press. 査読有.

② 溝口明, 岡本直樹 (2010) 昆虫で発見された IGF 様ペプチド: インスリンと IGF の進化と機能的本質を考える. *比較内分泌学* Vol. 36, No.138, 197-203. 査読無.

③ N. Okamoto, N. Yamanaka, Y. Yagi, Y. Nishida, H. Kataoka, M. B. O'Connor, A. Mizoguchi. (2009) A Fat body-derived IGF-like peptide regulates postfeeding growth in *Drosophila*. *Dev. Cell* 17: 885-891. 査読有.

④ N. Okamoto, N. Yamanaka, H. Satake, H. Saegusa, H. Kataoka, A. Mizoguchi (2009) An ecdysteroid-inducible insulin-like growth factor-like peptide regulates adult development of the silkworm *Bombyx mori*. *FEBS J.* 276, 1221-1232. 査読有.

[学会発表] (計 9 件)

① Naoki Okamoto, Naoki Yamanaka, Hiroshi Kataoka, Michael B. O'Connor, Akira Mizoguchi: Fat body derived IGF-like peptide regulates post-feeding growth in *Drosophila*, 18th International Ecdysone Workshop 2010, July 20, 2010, Czech Republic.

② Naoki Okamoto, Naoki Yamanaka, Hiroshi Kataoka, Michael B. O'Connor, Akira Mizoguchi: Functions of IGF-like peptides in the regulation of post-feeding growth in insects, 43rd Annual Meeting for the Japanese Society of Developmental Biologists, June 21, 2010, Kyoto, Japan.

③ 溝口明: 虫とヒトに共通する成長調節ホルモン: インスリンと IGF. 昆虫 DNA 研究会第 7 回研究集会, 2010 年 5 月 22-23, 名古屋.

④ 岡本直樹, 山中直岐, 片岡宏志, マイケル・オコナー, 溝口明: ショウジョウバエ IGF 様ペプチドが変態期の発育を制御する. 第 34 回日本比較内分泌学会大会・日本比較生理生化学会第 31 回大会合同大会, 2009 年 10 月, 広島.

⑤ 岡本直樹, 山中直岐, 片岡宏志, マイケル・オコナー, 溝口明: ショウジョウバエ IGF 様ペプチドが変態期の発育を制御する. 昆虫ワークショップ 2009, 2009 年 10 月, 福岡.

⑥ 岡本直樹, 山中直岐, 片岡宏誌, マイケル・オコナー, 溝口明: ショウジョウバエ IGF 様ペプチドが変態期の発育を制御する. 日本動物学会第 80 回大会, 2009 年 9 月 19 日, 静岡.

⑦ Naoki Okamoto, Naoki Yamanaka, Hiroshi Kataoka, Akira Mizoguchi: An IGF-like peptide regulates adult development of the silkworm *Bombyx mori*. 16th International Congress of Comparative Endocrinology, June 26, 2009, Hong Kong SAR, China.

⑧ Naoki Okamoto, Naoki Yamanaka, Hiroshi Kataoka, Akira Mizoguchi: 23th International Congress of Entomology 2008, July 28, 2008, Durban, Southern Africa.

⑨ 岡本直樹, 山中直岐, 片岡宏誌, 溝口明: ショウジョウバエ IGF-like peptide の検索, 第 79 回日本動物学会年会, 2008 年 9 月, 福岡

[図書] (計 1 件)

① 岡本直樹, 溝口明: 昆虫インスリン様ペプチドの構造と機能. 園部治之, 長澤寛道編 「脱皮・変態の生物学 - 昆虫と甲殻類のホルモン作用の謎を追う」東海大学出版会, pp. 247-267, 2011.

[その他]

本研究の成果は 2009 年 12 月 16 日付けの読売、中日、日刊工業新聞各紙で紹介された。

6. 研究組織

(1) 研究代表者

溝口 明 (MIZOGUCHI AKIRA)

名古屋大学・大学院理学研究科・准教授
研究者番号: 60183109

(2) 研究分担者

八木 克将 (YAGI YOSHIMASE)

名古屋大学・大学院理学研究科・助教
研究者番号: 10372525

(3) 連携研究者 なし

