

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 5月13日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2012

課題番号：21780047

研究課題名（和文） 内分泌攪乱法による昆虫ホルモン情報伝達ネットワークの解明

研究課題名（英文） Studies on multiple hormonal regulation of insect development by endocrine perturbation

研究代表者

小野 肇 (ONO HAJIME)

京都大学・大学院農学研究科・助教

研究者番号：70452282

研究成果の概要（和文）：

昆虫では脱皮ホルモン 20-hydroxyecdysone (20E) と幼若ホルモン (JH) が脱皮や変態を制御している。本研究では、20E のみならず、20E の前駆体である ecdysone (E) が幼虫の発育に必要であり、幼虫脱皮タイミングを制御していることを明らかにした。また、E と JH が相互作用して変態のタイミングを制御していることを明らかにした。脱皮ホルモンの分泌時期と分泌量を操作する方法を確立して、発生プログラムの決定機構を解析した。また、3-オキシステロイド類を E の生合成中間体として特徴づけた。

研究成果の概要（英文）：

In insects, a steroid hormone, 20-hydroxyecdysone (20E), plays important roles in the regulation of developmental transitions by initiating signaling cascades via the ecdysone receptor (EcR). Although 20E has been well characterized as the molting hormone, its precursor ecdysone (E) has been considered to be a relatively inactive compound because it has little or no effect on classic EcR mediated responses. I elucidate that not only 20E but also E is essential for the regulation of developmental timing in *Drosophila melanogaster*. I also explored a system in which ecdysteroid level is reduced by ectopic expression of an inactivating enzyme. By using the system, I find that developmental fate of second instar larva is converted to pupariation instead of molting to third instar at a low level of ecdysteroid. Further, I characterized 3-oxo steroids as components of the ecdysteroid biosynthetic pathway.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2000000	600000	2600000
2010年度	500000	150000	650000
2011年度	500000	150000	650000
2012年度	500000	150000	650000
年度			
総計	3500000	1050000	4550000

研究分野：昆虫生理学

科研費の分科・細目：農学・応用昆虫学

キーワード：昆虫ホルモン・エクジステロイド・ショウジョウバエ

1. 研究開始当初の背景

昆虫の発育制御には複数の昆虫ホルモン

が関与しており、これらの複合作用によって脱皮、変態が制御されている。主に鱗翅目

昆虫を用いた実験から、ステロイドホルモンである 20-hydroxyecdysone (20E) が脱皮や変態を引き起こし、幼若ホルモン (JH) が変態を抑制するように働くことが知られている。しかし、ショウジョウバエでは、JH が欠損しても正常に蛹化できることから、昆虫種によって昆虫ホルモンの機能が異なると考えられる。また、20E の作用機構について詳細が明らかにされているものの、その前駆体である ecdysone (E) については核受容体 EcR に結合しないため、発育制御における役割はほとんど分かっていない。

20E のタイター変化については鱗翅目昆虫やショウジョウバエにおいて詳細な解析がなされている。脱皮や変態の前に 20E のタイターは上昇するが、興味深いことに終齢幼虫の時期において、小さい 20E のタイターが複数回認められる。これより、複数段階のタイター変化により、変態のプログラムが決定されていると考えられるが、その機構については明らかにされていない。

上記のように 20E は昆虫の発育において重要な役割を果たすが、その生合成経路は完全には明らかにされていない。昆虫は摂食により取り込んだコレステロールから前胸腺において E を生合成する。その後、E は前胸腺から体内へ放出され、各組織で酸化されて 20E へ変換される。この過程において、前胸腺で他のステロイドホルモンには見られないエクジステロイドの特異な立体構造が形成されるが、その過程がブラックボックスとして未解明のまま残されている。

2. 研究の目的

本研究では、昆虫ホルモンの分泌を人為的に攪乱することで、どのような形で昆虫ホルモン情報伝達ネットワークが生体内で張り巡らされており、それがどのように個体レベルでの発生を精密に制御しているのか、を明らかにすることを目的とした。また、全く研究されてこなかった、昆虫ホルモンの分泌のレベルと発生プログラムの決定の関連について明らかにすることを目的とした。また、近年明らかにされた昆虫ホルモンの生合成酵素の機能を低下させる RNAi 法を利用して、生合成中間体の解析を行った。遺伝子の発現を操作することが容易にできるショウジョウバエを材料にして、以下の目標を挙げて研究を進めた。

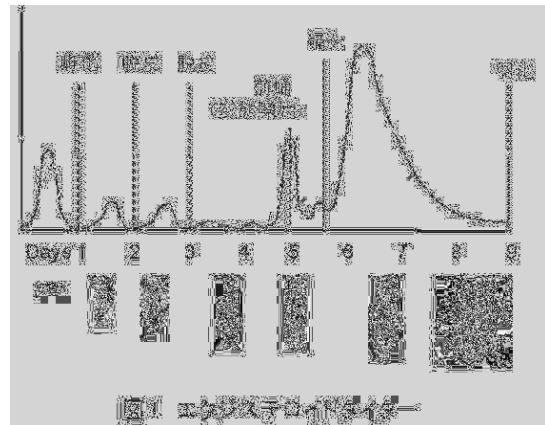
(1) E の機能解析

20E は食物中のステロール類からコレステロールを経由して生合成される。その際、コレステロールは前胸腺において E へ変換される。生合成された E は体内へ放出され、末梢組織で 20E へと酸化される。この生合成機構に着目して、前胸腺から E の代わりに

20E が放出されるようなショウジョウバエシステムを作成して、E が発育においてどのような役割を果たしているのかを明らかにする。さらに、その知見に基づいて、E を含む複数のホルモンがどのように相互作用して昆虫の発育を制御しているのかを明らかにする。

(2) エクジステロイドの分泌時期と分泌量と発生プログラムの決定の関連性の解析

エクジステロイドは周期的に生合成され、昆虫の脱皮変態といった発生変遷が引き起こされる (図 1)。エクジステロイドが生合成される時期以外では、エクジステロイドを不活性化する酵素が働いていることが考えられる。このような不活性化酵素を特定の時期に発現させることができれば、エクジステロイドの分泌時期を操作することができる。また、不活性化酵素の誘導発現量を操作することで、エクジステロイドタイターが正常時より小さくなるように調節することが可能と考えられる。このような方法を確立して、全く研究されてこなかった、昆虫ホルモンの分泌の時期およびレベルと発生プログラムの決定の関連について解析を試みる。



(3) E を分泌できない幼虫を用いたエクジステロイド生合成中間体の特徴づけ

主にショウジョウバエの変異体の研究から、エクダイソン生合成酵素の同定が進んできており、ブラックボックス内で働いている可能性のある酵素も複数同定されている。このような生合成酵素の働きを抑制すると E を分泌できない幼虫がえられる。この幼虫に生合成中間体の候補物質を与えて発育の様子を観察することで、その物質が中間体として機能しているかを調べることができる。このような新しいアプローチで生合成経路の解明を試みる。

3. 研究の方法

近年、主要な低分子昆虫ホルモンの生合成酵素や不活性化酵素の同定が進み、生合成・代謝レベルでの分子機構が明らかにされてきている。ショウジョウバエでは、昆虫ホル

モンに関わる酵素遺伝子を、本来発現していない器官で異所的に発現させたり、特定の時期での発現を誘導することが可能である。このような手法を用いれば、分泌されるホルモンの分子種を変化させるといった個体レベルでの内分泌攪乱を引き起こさせることが可能となる。そこで、各研究目標について、それぞれ以下の様な方法を開発した。

(1) E の機能解析

E は前胸腺で生合成された後、体内の各末梢組織で酸化酵素 Shd によって 20E へと変換される。これより、本来、前胸腺で発現していない Shd を前胸腺で異所発現させれば、前胸腺内で E が 20E へ変換されるため、体内へ放出される分子種 E ではなく 20E となる。このような幼虫の発育を観察し、E の幼虫での発育の役割の解明を試みた。さらに、幼虫体内でのエクジステロイドのタイターを測定した。また、E 生合成酵素や生合成関連遺伝子の発現レベルを解析した。このような方法を用いて、20E が前胸腺で分泌されることで、ホルモン分泌にどのような影響が生じるかを調べた。

E の蛹化時における役割を調べるために、野生型幼虫を E が含まれない餌で 3 齢まで生育させて、3 齢への脱皮直後から E を摂取させた。この場合の蛹化のタイミングや蛹の体サイズを測定した。さらに、E と JH の相互関係を調べるために、E と JH のアナログであるメソプレンを摂取させて、蛹化のタイミングや蛹の体サイズを測定した。

(2) エクジステロイドの分泌時期と分泌量の操作法の確立

ショウジョウバエではプロゲステロン類縁体 RU486 を摂取させたときだけ、任意の遺伝子を発現させる系が確立されている。これより、RU486 を摂取させることでエクジステロイド不活性化酵素を発現させる系を作製すれば、特定の時期のエクジステロイドの分泌を操作することができる。その際に RU486 の摂取量を変えることで、不活性化酵素の発現量を調整することができるので、エクジステロイドの分泌量も操作することができる。すなわち、エクジステロイドが生合成される時期に RU486 を摂取させれば、発現が誘導された不活性化酵素によって前胸腺内で生合成されたエクジステロイドはただちに不活性化される。摂取させる RU486 量が少なければ、誘導される不活性化酵素の発現量が小さくなるため、エクジステロイドの不活性化は一部しか進まず、実質的にはエクジステロイドタイターが小さくなることが期待できる。

このような系統を用いて、2 齢幼虫後期でのエクジステロイドタイターを操作して、その後の発育がどうなるかを調べた。また 3 齢

幼虫ではエクジステロイドの大きなタイターの上昇の前に小さいピークが観察される。この小さいピークが観察される時期に不活性化酵素の発現を誘導した結果、観察される現象から、エクジステロイドの小さいピークが発生プログラムの決定にどのような役割を果たすのかを解析した。

(3) エクダイソン生合成酵素ノックダウン幼虫を用いたエクダイソン中間体の解析

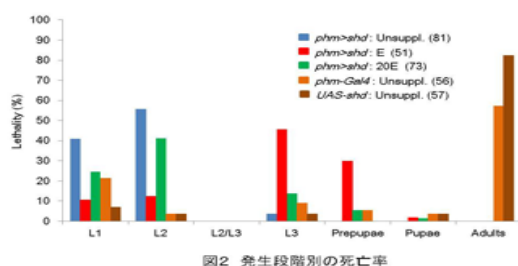
エクダイソン生合成酵素の発現を RNAi 法によりノックダウンしたショウジョウバエ幼虫は脱皮できずに死亡する。これより、有機合成した候補中間体を RNAi 幼虫に摂食させて脱皮活性を検定し、活性を示した化合物を生合成中間体とみなした。実際に、摂食させた化合物が中間体であれば、その後、エクジステロイドへ変換されて 20E に誘導される転写因子が活性化されると考えられるため、エクジステロイドのタイターの測定や 20E 誘導遺伝子の発現量を解析した。

4. 研究成果

研究成果として以下の知見を得た。

(1) 20E とは異なる E の機能の解明

ショウジョウバエ幼虫で Shd を前胸腺で異所発現させて、前胸腺内で 20E を生合成させた。このような幼虫は 1 齢から 2 齢への脱皮のタイミングが遅れ、全て 2 齢までの段階で死亡した。一方で E の摂取により正常なタイミングで脱皮して 3 齢（終齢）まで発育した。なお、20E を摂取させても E を摂取させた場合に比較して、発育がレスキューされる割合は低かった（図 2）。



次に、Shd を前胸腺で異所発現させた幼虫についてエクジステロイドの動態を解析した。その結果、Shd の発現により 20E へと変換される E は予測通りほとんど検出されなかったが、20E のタイターも低下していた。これより、幼虫の発育異常の原因として 20E の情報伝達が妨げられている可能性やエクジステロイドの生合成に異常が生じた可能性が考えられたため、20E により転写が誘導される転写因子やエクジステロイド生合成酵素の遺伝子の発現量を解析した。その結果、20E 誘導性転写因子の発現量の低下は認められなかったが、エクジステロイド生合成酵素

の発現量の低下が認められた。これより、前胸腺でEから変換された20Eは前胸腺内部で、あるいは分泌直後に前胸腺に作用して、エクジステロイド生合成酵素の遺伝子発現を抑制したことが考えられる。このような生合成された20Eの前胸腺に対するフィードバック作用によって、エクジステロイド生合成は調節され、分泌レベルが正常に維持されていると考えられる(図3)。

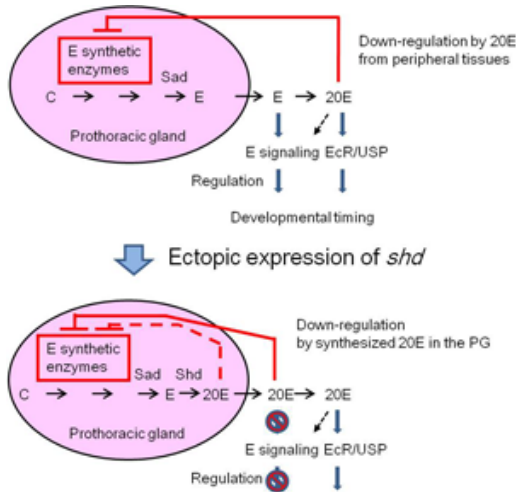


図3 前胸腺でのエクジステロイド生合成のフィードバック調節

野生型3齢幼虫ではEの摂取により蛹化のタイミングが早まり体サイズの減少が認められた。このような効果は20Eを摂取させた場合にはほとんど認められなかった。一方で、Eと幼若ホルモン類縁体methopreneを混合して摂取させると、正常なタイミングで蛹化して体サイズの減少は認められなくなった。これより、JHの役割としてEによる蛹化の早期化を抑制することで幼虫の発育異常を阻止していることが考えられた。そこで、アラタ体の細胞死によりJHを分泌できなくなった3齢幼虫にEを摂取させた。しかし、蛹化時期は早期化したものの、幼虫の発育異常は認められなかったことから、蛹化が可能になる時期まで、3齢幼虫はEには応答できないと考えられた。Eを摂取した3齢幼虫が摂食を停止したときの体重と、蛹化を遂げるために必要な3齢幼虫の最低体重(MVW)を比較すると、両者の値はほぼ一致した。以上の結果から、3齢幼虫はMVWを超えた時点からEに回答できるようになり、JHはMVWから摂食停止に至る時期にEの作用を抑制することで蛹化時期と体サイズの決定に関与してことを明らかにした(図4)。

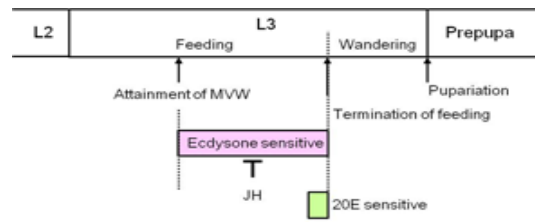
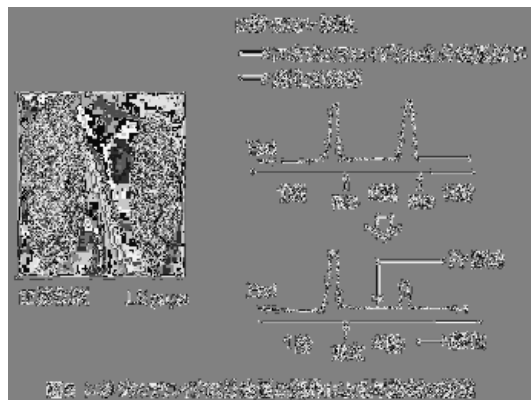


図4 EとJHによる蛹化時期の決定機構

(2) 時期特異的エクジステロイド不活性化法による脱皮変態の運命決定機構の解析

時期特異的にエクジステロイドを不活性化させるために、RU486を与えた時だけ、前胸腺でエクジステロイド不活性化酵素CYP18Aの遺伝子が発現する系統を確立した。この系統ではPrを与えない場合、ショウジョウバエは成虫へと発育した。しかし、各齢期の幼虫にPrを与えると、全ての個体が脱皮あるいは変態できずに死亡した。一方で、1齢幼虫にPrとエクダイソンを同時に摂取させると3齢へと発育した。以上より、Prを摂取させた時期にCYP18Aの発現によりエクジステロイドが不活性化されていると考えられる。

確立した系を用いて、エクジステロイドの分泌量によって脱皮変態の運命決定がどのようになるか検証した。摂取させるPr量によってCYP18Aの発現量を制御することができるため、2齢幼虫に対して異なる濃度のPrを含むえさを与えて発育を観察した。2齢幼虫に高濃度のPrを摂取させると、脱皮できずに死亡したが、低濃度のPrを摂取させると3齢幼虫へと脱皮せず蛹化する個体(早熟蛹)が認められた(図5)。すなわち、低濃度のPrの摂取により低レベルでCYP18Aが発現したため分泌された一部のエクジステロイドが不活性化したと考えられる。そして、早熟蛹の中には羽化直前の成虫まで発育を遂げた。これより、2齢から3齢への脱皮が起こらなくても成虫への発育のプログラムが実行されることが示された。脱皮のプログラムと変態のプログラムはそれぞれ独立していると考えられる。



(3) エクダイソン生合成中間体としての3-オキソステロイド類の解析

エクダイソン生合成酵素の Spookier (Spok) の RNAi ノックダウン幼虫はエクダイソンを生合成できないため1齢で致死となる。このような幼虫に、エクダイソンや Black Box 以降の下流の中間体を摂取させると脱皮が可能となる。

Spok-RNAi 幼虫に Δ^4 -diketol, diketol, ketodiol を含む酵母エサを摂食させた。その結果、diketol や ketodiol を与えた場合、約80%の1齢幼虫が2齢へと脱皮し、約10%の幼虫が3齢まで発育した。 Δ^4 -diketol を与えた場合、約15%の1齢幼虫が2齢へと脱皮したのち死亡した。次に、1齢後期の幼虫のエクジステロイドを定量した。その結果、酵母エサのみを摂食させた場合に比べて、 Δ^4 -diketol あるいは diketol を摂取させた場合、それぞれ、約8.5倍、約30倍のエクジステロイドが検出された(図6A)。さらに中間体候補物質から変換された20Eによって転写因子が誘導されているかを遺伝子発現量を定量して解析した。その結果、diketol を摂取した1齢後期の幼虫では、E74A, E74B, E75A および β -Ftz-F1 は野生型幼虫と同程度に誘導された。一方、 Δ^4 -diketol を摂取した1齢後期の幼虫では、E75A のみが野生型幼虫と同程度に誘導された(図6B)。

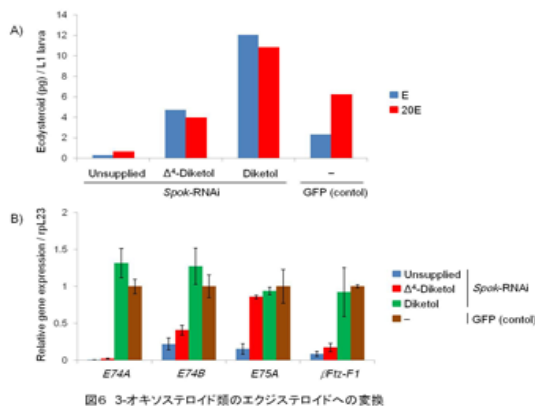
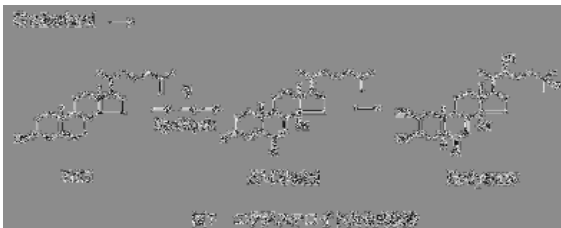


図6 3-オキソステロイド類のエクジステロイドへの変換

E75A は微量の20Eによって誘導されることから、 Δ^4 -diketol は微量ながらエクジステロイドへと変換され、Spok-RNAi 幼虫の脱皮を引き起こすと考えられる。また、Spok は7dCと Δ^4 -diketol間の反応段階で作用していると考えられる(図7)。



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1件)

Hajime Ono, Sayo Morita, Ichiyoh Asakura, Ritsuo Nishida, Conversion of 3-oxo steroids into ecdysteroids triggers molting and expression of 20E-inducible genes in *Drosophila melanogaster*, Biochemical and Biophysical Research Communications, 421, 561-566, 2010. doi: 10.1016/j.bbrc.2012.04.045 査読有

[学会発表] (計16件)

① 海江田祐也、木村亮太、西田律夫、小野肇 昆虫の脱皮ホルモン ecdysone 生合成経路の中間候補物質の解析、第57回日本応用動物昆虫学会大会、2013年3月28-29日、日本大学(藤沢市)

② 小野肇、ショウジョウバエにおける ecdysone と JH による蛹化時期の決定機構の解析、第57回日本応用動物昆虫学会大会、2013年3月28日、日本大学(藤沢市)

③ Hajime Ono, Ryota Kimura, Sayo Morita, Ichiyoh Asakura, Ritsuo Nishida, Characterization of intermediates in the Black Box of the ecdysone biosynthetic pathway in *Drosophila melanogaster*, JDRC10 Japanese *Drosophila* Research Conference, 2012年10月13-15日、慈恵医科大学(東京都)

④ 小野肇、増田亮太、西田律夫、エクダイソン不活性化によるショウジョウバエの発育制御の解析、第56回日本応用動物昆虫学会大会、2012年3月29日、近畿大学(奈良市)

⑤ 木村亮太、吉永直子、森直樹、西田律夫、小野肇 エクダイソン生合成経路 Black Box 中間体の解明 第56回日本応用動物昆虫学会大会、2012年3月28-29日、近畿大学(奈良市)

⑥ 増田亮太・西田律夫・小野肇 エクダイソン不活性化によるショウジョウバエの蛹化メカニズムの解析 第56回日本応用動物昆虫学会大会、2012年3月28-29日、近畿大学(奈良市)

⑦ 小野肇、森田沙代、浅倉一洋、木村亮太、吉永直子、森直樹、西田律夫、Ecdysone 生合成中間体候補物質となる3-オキソステロイド類の解析、日本農芸化学会2012年度大会、2012年3月24日、京都女子大学(京都市)

⑧ 木村亮太、吉永直子、森直樹、西田律夫、小野肇 Ecdysone 生合成における Black Box 初期経路の中間体候補物質の解析 日本農芸化学会2012年度大会、2012年3月24日、京都女子大学(京都市)

⑨ 増田 亮太、吉永 直子、森 直樹、西田 律夫、小野 肇 エクジステロイド分泌の変動に着目したショウジョウバエの蛹形成メカニズムの解析、日本農芸化学会 2011 年度（平成 23 年度）大会、2012 年 3 月 23 日、京都女子大学（京都市）

⑩ 小野肇、森直樹、西田律夫、ショウジョウバエの前胸腺における時期特異的なエクジステロイド不活性化法の確立、日本農芸化学会 2011 年度（平成 23 年度）大会、2011 年 3 月 27 日、京都女子大学（京都市）

⑪ Hajime Ono, Michael B. O'Connor Ecdysone, not just 20-hydroxyecdysone, is essential for molting and metamorphosis to occur with correct timing in *Drosophila melanogaster*, The 18th International Ecdysone Workshop, 2010 年 7 月 20 日、Biology Center of the Czech Academy of Sciences（チェコ共和国）

⑫ Hajime Ono, Michael B. O'Connor Ecdysone has distinct roles from 20-hydroxyecdysone in regulating of developmental timing in *Drosophila melanogaster*, 43rd Annual Meeting for the Japanese Society of Developmental Biologists, 2010 年 6 月 21-22 日、京都国際会館（京都市）

⑬ 浅倉一洋、西田律夫、小野肇 ショウジョウバエにおける ecdysone 生合成経路 Black Box 内の中間体の解析、2010 年 3 月 27-28 日、千葉大学西千葉キャンパス（千葉市）

⑭ 小野肇 ショウジョウバエにおける 20E とは異なる ecdysone による発育制御、第 54 回日本応用動物昆虫学会大会、2010 年 3 月 27 日、千葉大学西千葉キャンパス（千葉市）

⑮ 小野肇、西田律夫、Michael B. O'Connor ショウジョウバエにおける ecdysone による脱皮変態のタイミングの決定、昆虫ワークショップ 09 福岡、2009 年 10 月 30 日、ウェルサンピア福岡（福岡県福津市）

⑯ 小野肇、西田律夫、Michael B. O'Connor キイロショウジョウバエにおける ecdysone による発育のタイミングの決定、日本動物学会第 80 回大会、2009 年 9 月 19 日、静岡グランシップ（静岡市）

〔その他〕

ホームページ等

www.chemeco.kais.kyoto-u.ac.jp

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小野 肇 (ONO HAJIME)

京都大学・大学院農学研究科・助教

研究者番号：70452282