

令和 4 年 5 月 16 日現在

機関番号：82111

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2021～2021

課題番号：21K20587

研究課題名(和文)アラタ体内在性抑制因子による終齢幼虫特異的な幼若ホルモン生合成停止の分子制御機構

研究課題名(英文) Molecular mechanisms underlying the cessation of JH biosynthesis in the corpora allata; Identification of the final instar-specific JHAMT inhibitory transcription factors

研究代表者

乾 智洋 (INUI, Tomohiro)

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・契約研究員

研究者番号：50911020

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、アラタ体内で幼若ホルモン(JH)生合成の主要な酵素であるJHAMTの発現を終齢特異的に抑制する遺伝子(JHAMT Repressor, JHAMT-Rep)の探索を行った。アラタ体を材料にRNA-seqによって終齢幼虫特異的に発現が上昇する遺伝子を網羅的に探索し、RNAiライブラリを作成した。コクヌストモドキを用いてRNAiスクリーニングを行った結果、JHAMT-Repの候補遺伝子を突き止めた。コクヌストモドキでは、このJHAMT-Rep候補遺伝子をRNAiノックダウンすると過剰脱皮が起こった。これは体内のJH濃度が終齢で低下せず、変態できなかったためだと考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

JHの変態抑制作用は昆虫に普遍的かつ特徴的な生理作用であり、昆虫の繁栄の要因の一つであることから、学術的な興味はもとより創農薬の有望なターゲットとして注目されており、その生合成やシグナル経路の解明が急務である。本研究の成果は、前述のJHAMT-Rep候補遺伝子の同定と機能解析から、JHの生合成制御機構の解明に貢献した。

研究成果の概要(英文)：In this study, we searched for genes that specifically repress the expression of JHAMT, a key juvenile hormone (JH) biosynthetic enzyme, (JHAMT Repressor, JHAMT-Rep) in the corpora allata (CA) in a final instar-specific manner. We comprehensively searched for genes whose expression is upregulated specifically in the last instar larvae by RNA-seq using total RNA extracted from CA, and created an RNAi library based on the transcriptomic data. The RNAi screening was performed using Red flour beetle, *Tribolium castaneum*, and the candidate genes for JHAMT-Rep were identified. RNAi knockdown of JHAMT-Rep candidate gene resulted in supernumerary larvae in *T. castaneum*. This result suggested that JH concentration in the body did not decrease in RNAi treated animals, and thus they could not metamorphose.

研究分野：昆虫生理学

キーワード：幼若ホルモン 変態 脱皮 アラタ体 転写因子

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

幼若ホルモン(JH)は昆虫に特有のホルモンであり、昆虫の発育過程におけるメインイベントである脱皮・変態を制御することから、学術的な興味はもとより創農薬の有望なターゲットとして注目されている。近年、標的細胞内での JH シグナル経路の解明が急速に進んだが、JH の生合成制御機構に関しては未解明な点が多い。

JH は、脳から派生するアラタ体と呼ばれるわずか 0.1mm ほどしかない微小器官で合成される。JH は、生物で広く保存されている前期経路(メバロン酸経路)を出発点として、昆虫特異的な後期経路を経て生合成される。幼虫期ではアラタ体で JH が盛んに合成され、JH の変態抑制作用を受けて幼虫発育が進む。そして、終齢幼虫に達するとアラタ体は突如として JH 生合成を停止し、蛹・成虫への変態が可能となる。このとき、アラタ体では後期経路の主要な JH 生合成酵素遺伝子の 1 つである *Juvenile hormone acid Omethyltransferase (JHAMT)* の発現が完全にシャットダウンすることで JH 生合成が律速される¹。しかし、終齢幼虫期に *JHAMT* の発現を低下させる分子メカニズムの理解はほとんど進んでいない。

2. 研究の目的

本研究では、JH 生合成器官であるアラタ体において終齢幼虫期特異的に発現し、JH 生合成のシャットダウンを実行する転写因子の単離同定と機能解析を行うことで、「終齢幼虫期におけるアラタ体での JH 生合成の停止は、分子レベルでどのように制御されているのか?」という学術的問いに迫ることを目的とした。終齢幼虫での JH 生合成は *JHAMT* 遺伝子の発現が停止することで律速される。本研究では、*JHAMT* の発現を負に制御する因子(*JHAMT* repressor, *JHAMT-Rep*)が存在するという作業仮説の検証を行う。

3. 研究の方法

(1) アラタ体における RNA-seq 解析

カイコ *Bombyx mori* の幼虫からアラタ体を摘出し、RNA-seq によって発現遺伝子を網羅的に探索した。4 齢(亜終齢)幼虫と 5 齢(終齢)幼虫のトランスクリプトームを比較し、5 齢幼虫でのみ高発現し、さらにアラタ体特異的に発現する遺伝子を絞り込んだ。

(2) RNAi による候補遺伝子スクリーニング

方法(1)で絞り込んだ遺伝子について、RNAi 効率が高いコクヌストモドキ *Tribolium castaneum* の幼虫を用いて RNAi による候補遺伝子の探索を行った。本研究のターゲットである *JHAMT-Rep* は *JHAMT* の発現を負に制御することから、候補遺伝子を RNAi によってノックダウンすると、終齢幼虫でも JH が合成され続けることによって過剰脱皮が引き起こされると考えられる。ノックダウンによって過剰脱皮が誘導された遺伝子については、遺伝子発現解析から JH との制御関係を調査した。

(3) 不完全変態昆虫における *JHAMT-Rep* 候補遺伝子の探索

JHAMT-Rep 候補遺伝子をコクヌストモドキで RNAi を行ったところ、当初の予想通り過剰脱皮が引き起こされる遺伝子が一つ存在した(後述)。この遺伝子が完全変態昆虫のみならず、不完全変態昆虫でも *JHAMT-Rep* として機能しているか否かを検証するために、不完全変態昆虫であるクサギカメムシ *Halyomorpha halys* を用いてオープンアクセスデータとオルソログ探索と RNAi によるノックダウンを行ったがコクヌストモドキで見られたような過剰脱皮は起こらなかった。そこで、クサギカメムシのアラタ体を用いて RNA-seq を行い、方法(1)と同じスキームで不完全変態昆虫における *JHAMT-Rep* 候補遺伝子を探索した。

4. 研究成果

(1) アラタ体における RNA-seq 解析

カイコのアラタ体における RNA-seq から、アラタ体特異的に発現し、JH の生合成停止前後で発現が上昇(696 遺伝子) 下降(1624 遺伝子)を抽出した。これらの遺伝子のアノテーション情報を利用して、転写因子や酵素、細胞内シグナル伝達に関与すると記述のあった 46 遺伝子について(2)の解析に使用するためにコクヌストモドキでのオルソログを検索した。

(2) RNAi による候補遺伝子スクリーニング

前項で絞り込んだ遺伝子について、RNAi によるスクリーニングを行ったところ、通常では 7 齢ないしは 8 齢から蛹変態するコクヌストモドキ幼虫が、9 齢から 10 齢になるまで幼虫-幼虫脱皮を行うという、過剰脱皮が転写因子 A(未発表のため、本報告書では転写因子 A と記載する)の RNAi 処理によって誘導された(表 1)。また、転写因子 A の RNAi 処理によって、8 齢に到達する個体数が顕著に増加した。

そこで、転写因子 A は JH の生合成またはシグナル伝達に抑制的に関与しており、RNAi によってノックダウンすることで体内の JH シグナルが活性化し続け、過剰脱皮が誘導されたという仮説を立て、遺伝子発現解析による検証を行った。JH はアラタ体で合成・分泌され、標的細胞

表 1. 転写因子 A ノックダウン個体の表現型

RNAi	RNAi処理を行った齢	total n	蛹変態した齢							死亡した齢					
			5	6	7	8	9	10	5	6	7	8	9	10	
ds <i>MalE</i>	5	12				7	4					1			
	6	9				6	3								
	7	11				7	4								
ds転写因子A	5	24				6	13	1			1	2		1	
	6	24				2	11	5	2		4				
	7	26				3	15	2	2			3	1		

では核内受容体 Met によって受容され、下流の転写因子 Kr-h1 の発現を誘導し、Kr-h1 が変態を抑制する^{2,3,4} (図 1)。転写因子 A をノックダウンした個体およびコントロール個体の 7 齢 0 日齢 (L7d0) と同齢の 4 日齢 (L7d4: コントロール個体では前蛹となるタイミング) から頭部と胸部第 1 節をサンプリングし、*JHAMT*、*Met* および *Kr-h1* の発現量をリアルタイム PCR 法によって測定した。その結果、これらの JH 関連遺伝子はノックダウン個体とコントロール個体で発現量に顕著な差はなく、現時点で転写因子 A が JH 生合成およびシグナル伝達にどのように関与するかは不明である (図 1)。

カイコやクサギカメムシで転写因子 A の発現はアラタ体に限られており、JH 生合成または分泌の制御に何らかの関与が考えられる。そこで、現在、RNAi 効率が高くアラタ体のサンプリングが容易なキボシカミキリで転写因子 A の詳細な機能を調査中である。

(3) 不完全変態昆虫における *JHAMT-Rep* 候補遺伝子の探索

クサギカメムシにおいて転写因子 A のオルソログを公開データから BLAST を用いて探索し、RNAi によるノックダウンを行ったが、コクヌストモドキで見られたような過剰脱皮は起こらなかった。また、クサギカメムシでは *JHAMT* としてデータベースに登録されている遺伝子のノックダウンでも早熟変態といったフェノタイプが観察できなかったことから、より詳細な *JHAMT* の配列と、それを制御する因子を探索するために、クサギカメムシのアラタ体を摘出し、RNA-seq による解析を行った。その結果、転写因子 A と同様のドメインを持つ転写因子が複数発現変動遺伝子として確認できたため、これらの遺伝子について RNAi を構築して解析を進めている。

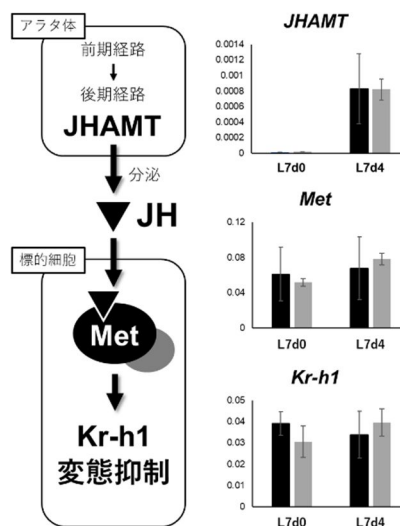


図 1. JH 関連遺伝子の発現量
左: JH 生合成、シグナル伝達経路の概念図
右: 発現量解析の結果。発現量を平均値 ± SD であらわす。転写因子 A ノックダウン個体 (黒) コントロール個体 (灰色)。縦軸は *RpL32* で補正した発現量。各データポイント n=3。

< 引用文献 >

1. Shinoda, T., & Itoyama, K. (2003). Juvenile hormone acid methyltransferase: a key regulatory enzyme for insect metamorphosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(21), 11986-11991.
2. Minakuchi, C., Zhou, X., & Riddiford, L. M. (2008). Krüppel homolog 1 (Kr-h1) mediates juvenile hormone action during metamorphosis of *Drosophila melanogaster*. *Mechanisms of development*, 125(1-2), 91-105.
3. Kayukawa, T., Nagamine, K., Ito, Y., Nishita, Y., Ishikawa, Y., & Shinoda, T. (2016). Krüppel homolog 1 inhibits insect metamorphosis via direct transcriptional repression of *Broad-Complex*, a pupal specifier gene. *Journal of Biological Chemistry*, 291(4), 1751-1762.
4. 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*, 114(5), 1057-1062.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Inui Tomohiro, Sezutsu Hideki, Daimon Takaaki	4. 巻 145
2. 論文標題 MicroRNA let-7 is required for hormonal regulation of metamorphosis in the silkworm, Bombyx mori	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Insect Biochemistry and Molecular Biology	6. 最初と最後の頁 103784 ~ 103784
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.ibmb.2022.103784	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2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 乾智洋、小瀧豊美、粥川琢巳
2. 発表標題 クサギカメムシにおける超早熟変態の分子メカニズムの解析
3. 学会等名 第66回日本応用動物昆虫学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 粥川琢巳、長峯啓佑、乾智洋、小林功、中尾肇、松尾隆
2. 発表標題 新規JH生成制御因子の機能解析
3. 学会等名 第66回日本応用動物昆虫学会大会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔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
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------