

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 12 日現在

機関番号：11101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011 ~ 2012

課題番号：23658044

研究課題名（和文） 脱皮行動誘導ホルモン（ETH）による幼若ホルモンの合成制御

研究課題名（英文） Regulation of juvenile hormone biosynthesis by ecdysis triggering hormone

研究代表者

比留間 潔（HIRUMA KIYOSHI）

弘前大学・農学生命科学部・教授

研究者番号：70374816

研究成果の概要（和文）：脱皮行動誘導ホルモン（Ecdysis Triggering Hormone, ETH）は、ecdysis を誘導するペプチドホルモンである。しかし ETH は幼若ホルモン（JH）産生器官であるアラタ体での JH 合成を強く促進し、この作用は終齢脱皮の 6 時間前に最も強くみられ、これは終齢脱皮時の JH 合成が盛んに行われる時期と一致していた。またこの時期のみにアラタ体で ETH 受容体が高発現していることを見だし、この時期特異的な JH 合成刺激作用は ETH 受容体発現の有無によることが示唆された。これらのことから ETH がアラタ体を刺激して幼虫脱皮直前の JH 合成のピークを生み出す要因の一つであることを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：Ecdysis triggering hormone (ETH) produced by Inka cells is a peptide hormone that induces insect ecdysis. We found that (1) ETH mRNA expression occurred in the corpora allata (CA) shortly before the last larval ecdysis, (2) EHT stimulated juvenile hormone (JH) biosynthesis by CA, and this stimulative action was observed primarily 6 hr before the last larval ecdysis, which was corresponded with the increase in JH synthesis during the molt. These results indicate that the increase in the JH titer during the last larval molt is due to the ETH action. Thus, a single hormone mediates two different phenomena, behavior and growth; a hormone that is responsible for behavior regulates JH synthesis, a key hormone involved in growth and metamorphosis.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：応用昆虫学

キーワード：昆虫生理学、脱皮行動誘導ホルモン、幼若ホルモン、変態、行動

1. 研究開始当初の背景

昆虫の脱皮と変態は前胸腺で合成されるエクダイソンとアラタ体で合成される幼若ホルモン（JH）により制御されている（図 1）。幼虫期にエクダイソンと JH が同時に作用すると幼虫脱皮が引き起こされる（Hiruma, 2003）。完全変態昆虫のカイコでは、終齢脱皮後に血中の JH がほぼ消失しかけた 3 日目から徐々に上昇するエクダイソンにより皮膚の蛹コミットメントが誘

導され、その後の高濃度のエクダイソンにより実際の蛹へと分化する（Muramatsu et al, 2008）。

4 齢期と終齢（5 齢）期の JH 合成の変動（図 1）は種々のペプチドホルモン、カテコールアミン、エクダイソン、栄養、及び脳との神経連絡により巧みに調節されている（Hiruma and Kaneko, 2013）。しかしそれだけではすべてが説明できず、他の要因の関与が必要である。

終齢脱皮直前に上昇する JH は(図 1 の太い矢印) 終齢の摂食期間を調節して蛹コミットメントのタイミングを調節する (Hiruma et al., 1999) など、蛹の体重調節に重要な役割を担っており、カイコの場合にはこの JH の存在が長く続くほど大きな繭/蛹が形成される。Ecdysis 時に ecdysis triggering hormone (ETH; 脱皮行動誘導ホルモン)の大量な分泌が起きていることを鑑みると、この JH の上昇は ETH による可能性があるが、ETH は全く異なる作用を持つホルモンであるため、考慮の対象ではなかった。

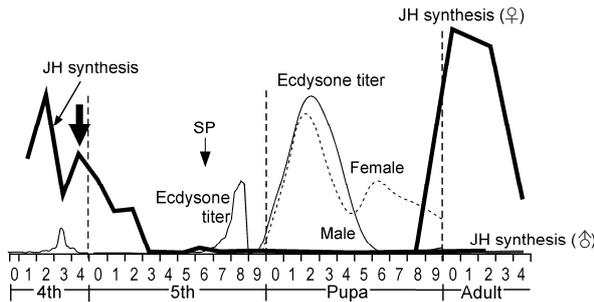


図 1. カイコのアラタ体による JH 生合成と血中エクダイソン変動。JH の血中濃度の変動は、JH の生合成とほとんど同じパターンを示す(Kinjoh et al., 2007)。SP, spinneret pigmentation.

Molting と ecdysis は日本語では共に「脱皮」と記述され区別できないが、molting は apolysis から始まり ecdysis(脱皮行動)に至る過程であり、ecdysis は molting の最後に起こる古い表皮を脱ぎ捨てる行動である。両者は全く別の生理現象であり、異なるホルモンで制御されている。

昆虫の脱皮行動のホルモン制御機構はタバコスズメガとカイコでよく研究されている。Ecdysis 前に減少するエクダイソンに反応して脳から corazonin (CRZ)が分泌される。CRZ は各気門付近に存在する ETH 産生細胞である Inka 細胞に作用して ETH の放出を促し、ETH は脳の ventromedial (VM)細胞からの eclosion hormone (EH)の放出を刺激する。EH は Inka 細胞に対して正のフィードバック機構で ETH と EH のさらなる分泌を促す。ETH は pre-ecdysis 行動と ecdysis 行動を誘発する。一方 EH は胸腹部の神経球に存在する crustacean cardioactive peptide (CCAP)細胞からの CCAP の放出を刺激し、CCAP と ETH の共同作用で ecdysis を引き起こす(図 2; Zitnan and Adams, 2005)。

幼虫の molting は脳からの前胸腺刺激ホ

ルモンにより刺激された前胸腺から分泌されるエクダイソンと、アラタ体から分泌される JH との共同作用で起こる。前述のように

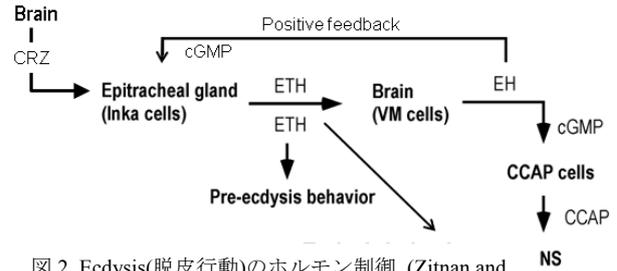


図 2. Ecdysis(脱皮行動)のホルモン制御 (Zitnan and Adams, 2005)。ETH と CCAP が ecdysis behavior を誘導する。CRZ; corazonin; EH, eclosion hormone; ETH, ecdysis triggering hormone; CCAP, crustacean cardioactive peptide; CNS, central nervous system; VM cells, ventromedial cells.

アラタ体での JH 分泌調節は、脳からの種々のペプチドホルモンやエクダイソンその他多くの要因がかかわっていることが突き止められているが、脱皮行動のみに関わる ETH の関与は想定外である。

しかし我々はカイコの ETH 受容体の mRNA が、本来の作用点とは異なるアラタ体で多量に発現しているという、全く予想していなかった予備結果を得た(図 3)。この結

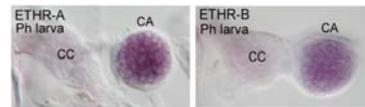


図 3. ETH 受容体の 2 つの isoform (ETHR-A と B) の mRNA の局在。In situ hybridization による。両者の isoform とともに終齢幼虫への ecdysis 前のアラタ体に発現していた。CC, 側心体; CA, アラタ体。

果は、ETH は脱皮行動の誘導ばかりでなく、アラタ体にも作用して JH 合成に何らかの役割を果たし、昆虫の発育制御にも間接的にかかわっていることを強く示唆している。もし ETH が JH 合成刺激作用を持つならば、そのメカニズムの解明により、ETH の JH 合成に及ぼす作用機構の一端が明らかになる。得られた結果を応用することで、ETH 及び ETH 受容体の時ならぬ過剰発現あるいはサイレンシングにより、ecdysis 不全ばかりでなく JH の異常分泌を引き起こす事が可能となり、昆虫の成長発育障害、卵巣発育障害などが誘導でき、新規なアイデアでの鱗翅目害虫の防除技術、薬剤を開発できると考えられる。

2. 研究の目的

Molting や発育・変態は主としてエクダイソンと幼若ホルモン(JH)により綿密に統合されて引き起こされ、molting の最終段階である ecdysis は ETH と CCAP により引き起こされることが知られている。両者は全く異なる独立した現象であり、その制御機構も異なっている。本研究は脱皮行動を引き起こす ETH が発育・変態の鍵となる JH の合成をも制御していることを検証し、「行動」と「発育・変態」という異なる現象が ETH により統合されて制御されていることの解明に挑戦する。

3. 研究の方法

カイコを使用し、免疫学、生理学(組織培養など)、生化学、分子生物学的手法を駆使する。具体的には、(1)アラタ体を ETH を含む培地で培養することにより、ETH が JH 合成活性を支配する発育時期を詳細に調べ、(2) それと共に *in situ* hybridization と real time PCR により ETH 受容体のアラタ体内での詳細な変動を明らかにする。(3)ETH 受容体の組み換えカイコを作成し、ETH 受容体をアラタ体のみで過剰発現することにより *in vivo* での ETH の作用を検討するばかりでなく、幼虫の発育に及ぼす作用についても研究する。

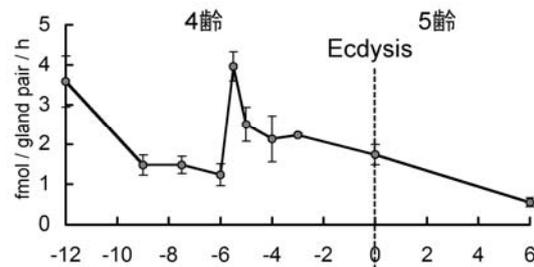
4. 研究成果

(1) 終齢脱皮(ecdysis)を誘導する ETH はアラタ体での JH 合成を促進する

JH 合成能が ecdysis 直前に上昇することはすでに見出している(図 1)。そこで JH 合成の変動を詳細に調べるために、終齢への ecdysis の前後数時間にわたり 1 時間間隔でアラタ体の JH 合成能力を調べた。その結果、ecdysis の 5.5 時間前に JH 合成能が最大となり、その後減少した(図 4 上)。

次に ETH のアラタ体での JH 合成に及ぼす作用を調べるために、同じバッチの幼虫のアラタ体を 0.1 μ M の ETH を含む培地で 6 時間培養したところ、ecdysis の 6 時間前に ETH を含まない培地で培養したアラタ体より 5 倍近く JH 合成性が促進された(図 4 下)。その後 ETH による JH 合成促進効果は激減した。それは一度 ETH にさらされると ETH に対する感度が減少することを示している。これらの実験は 3 セット行い、すべて同様な結果を

アラタ体における JH 合成



ETHによるJH合成の促進

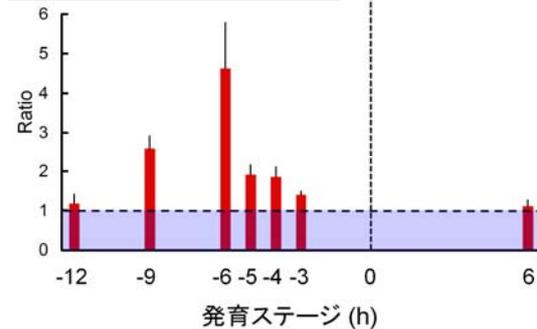


図 4. 終齢脱皮(ecdysis)時のアラタ体における JH 合成活性と ETH による JH 合成の促進との関係。それぞれの時期のアラタ体を 6 時間培養し、培地に合成・放出された JH 量を測定することにより、JH 合成能を測定した。ETH の作用は ETH (0.1 μ M)存在下でアラタ体を 6 時間培養した。Ratio は ETH を含む培地で合成された JH 量を、含まない培地で合成された JH 量で割ることによって算出した。(N=3-4, \pm SEM)

得た(図 4 の結果はその中の 1 セット)。

タバコスズメガでは Inka 細胞での ETH 合成は、molting を誘導するエクダイソンの血中濃度の上昇と共に開始され、血中への放出は ecdysis 約 1 時間前から起こることが報告されている(Zitnan and Adams, 2005)。そこでカイコの ETH の血中濃度の ETH の計測を試みたが、ecdysis の 6 時間前後の濃度は検出限界以下であり計測できなかった。そこで ecdysis の 6 時間前のアラタ体を使用して ETH の JH 合成の dose response を調べたところ検出限界以下の 10 pM と極めて低い濃度でも JH 合成を促進することが分かった(結果省略)。これはごく少量の ETH が ecdysis の 6 時間前には血中に放出されていることを示しており、この少量の ETH の作用でアラタ体での JH 合成が促進されるものと考えられる。

(2) ETH 受容体の変動

終齢への ecdysis が起こる直前だけに ETH が JH 合成を刺激していることから ETH

の作用が受容体発現の有無と関連している可能性がある。そこで、2つのETH受容体のisoform、ETHR-AとETHR-B、のアラタ体でのmRNAの発現変動パターンを詳しく調べた。図5に示すように2つの受容体の発現は終齢へのecdysisの約20時間前にピークが見られた。一方、JH合成の起こらない蛹化直前

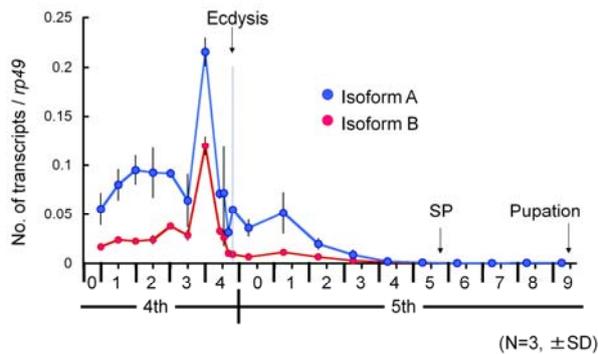


図5. アラタ体における2つのETH受容体 (isoform A と isoform B) mRNA の4 齢期と 5 齢期の変動。

のアラタ体には受容体のシグナルは検出されなかった。受容体の発現は ecdysis 前はかなり早い時期に起きているが、タンパク質への翻訳時間を考慮すると ETH の JH 合成刺激作用が最大となる6時間前後に受容体タンパク質は充分量存在すると考えられる。すなわち、これらの結果は、受容体の変動はETHの時期特異的なJH合成能を引き出していることを示している。

以上の結果は、終齢脱皮時に上昇するJH血中濃度はその時期にアラタ体で合成されるJHに起因しており、そのJH合成活性の上昇はInka細胞で合成放出されるETHによることが明らかとなった。またETHの時期特異的なJH合成能はETH受容体の出現に起因していることが示唆された。一方、moltingを誘導するエクダイソンの血中濃度がecdysis前に下降するが、その下降に反応してJH合成が促進されることも示し(Hiruma and Kaneko, 2013)、JH合成の上昇は両者の共同作用であることを明らかにした。

(3) ETH受容体を過剰発現させる組み換えカイコの作成

ETHのJH合成刺激に対する直接的な役割を明確にするため、スロバキアのZitnan博士のグループと共同で、アラタ体のみでETH

受容体を強制発現させる組み換えカイコを作成した。アラタ体に特異的に作用させるためのプロモーターとしては、JH合成の最初のステップであるacetyl-CoAをacetoacetyl-CoAに変換するacetoacetyl-CoA thiolaseのプロモーターを使用した。このプロモーターとヒートショックプロモーターの影響下にETHの受容体であるETHR-AとETHR-BのcDNAを組み込んだコンストラクトをゲノムに持つカイコを作成した。しかし熱処理により両者の受容体を過剰発現させることができず、phenotypeにも異常は見出せなかった。これは今後の課題として残される。

Ecdysisという「行動」を引き起こすペプチドホルモンが、「変態、発育」に関与するJHの分泌調節をも行うということが解り、「脱皮行動」と「変態・発育」という全く別個の事象の接点を見出し(図6)、両者を統合的にとらえる出発点を作ることができた。

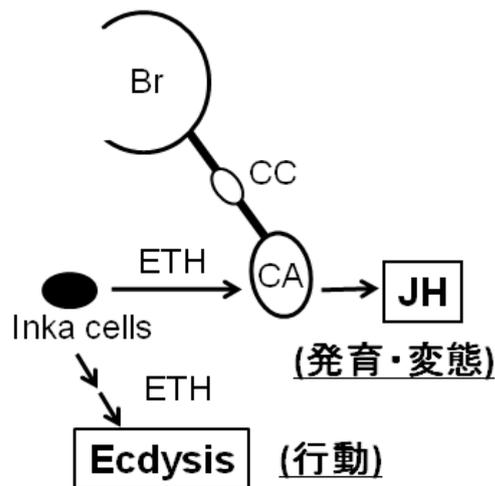


図6. ETH作用の要約。ETHはecdysisに関与するばかりでなく、アラタ体に作用して、発育、変態を制御するJHの合成を促進する。Br, 脳; CC, 側心体; CA, アラタ体; ETH, ecdysis triggering hormone.

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)

- ① Hiruma, K., and Kaneko, Y. (2013). Hormonal regulation of insect metamorphosis with special reference to juvenile hormone biosynthesis. *Curr. Top. Dev. Biol.* **103**, 73-100.

DOI:<http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-385979-2.00003-4>

〔学会発表〕（計 1 件）

- ① 金児雄・比留間潔（2012）. 脱皮行動誘導ホルモン(ETH)による幼若ホルモン合成の促進。第 56 回日本応用動物昆虫学会。2012 年 3 月 27—29 日。近畿大学。

5. 研究組織

(1)研究代表者

比留間 潔 (HIRUMA KIYOSHI)

弘前大学・農学生命科学部・教授

研究者番号：70374816

(2)研究分担者

()

研究者番号：

(3)連携研究者

()

研究者番号：