

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 28 日現在

機関番号：13901

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23780050

研究課題名(和文) 昆虫の胚発生における幼若ホルモンの機能およびシグナル伝達経路の解明

研究課題名(英文) Role and signaling pathway of insect juvenile hormones in embryonic development

研究代表者

水口 智江可 (Minakuchi, Chieka)

名古屋大学・生命農学研究科・助教

研究者番号：90509134

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円、(間接経費) 990,000円

研究成果の概要(和文)：昆虫の脱皮・変態を制御する脱皮ホルモンと幼若ホルモン(JH)は、生殖や胚発生においても機能を有すると考えられているが、分子的な知見がほとんど得られていない。そこで甲虫コクヌストモドキの胚発生におけるJHの機能と、JHシグナル伝達経路を解明することを目的として研究に着手した。胚発生においてJHシグナル伝達を抑えるとふ化率が低下すること、またそのJHシグナル伝達経路には脱皮・変態期と同様の受容体や初期応答遺伝子が関与していることが解明された。また、胚期の中でJH生合成の高まる時期を定量PCR法により明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Little is known about the role of juvenile hormone (JH) in embryonic development as well as its signaling pathway. We analyzed the function and signaling pathway of JH in the red flour beetle, *Tribolium castaneum*. Knockdown of JH signaling resulted in low hatching rate, suggesting that JH might be essential for embryonic development. We also showed that the JH receptor and an early-response gene are involved in JH signaling in embryonic stage. The JH-biosynthetic activity in the embryonic stage was also examined by quantitative RT-PCR of JH biosynthetic enzymes.

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農学・応用昆虫学

キーワード：昆虫 幼若ホルモン

1. 研究開始当初の背景

昆虫の脱皮・変態は、脱皮ホルモンと幼若ホルモン (JH) によって厳密な制御を受ける。現在までに、発育に伴う体内ホルモン濃度の消長や、ホルモン作用の分子機構が詳しく解明されてきた。その結果、種々の昆虫種に共通して、脱皮ホルモンが脱皮・変態を誘導する作用を、また JH が蛹や成虫への変態を抑制する作用を持つことが明らかになってきている。

脱皮ホルモンと JH は脱皮・変態の制御以外にも、生殖、胚発生、および休眠においても機能を有すると考えられているが、脱皮・変態期におけるホルモン作用と比べると分子的な知見がほとんど得られていない。このうち胚発生に関しては、正常な胚発生進行には脱皮ホルモンが必要であることがショウジョウバエで知られている (Gilbert and Warren, *Vitam. Horm.* 73 31-57, 2005)。一方、胚期の JH に関しては、ある種の昆虫で胚発生後期に JH 濃度が高まることや、プレコセンという薬品の投与により JH 生合成器官を破壊すると dorsal closure や中腸の形態形成が異常になることが知られている (Goodman and Granger, *The juvenile hormone, in: Comprehensive Molecular Insect Science*, v3. pp. 319-408)。さらに我々は最近、JH 受容体である Methoprene-tolerant (Met) を甲虫コクヌストモドキの胚期にノックダウンすると、幼虫の孵化率が顕著に低下することを見出した (未発表)。このように、胚期に JH が何らかの役割を果たすことが種々の昆虫種で示唆されているが、分子的な知見はまだ得られていなかった。

2. 研究の目的

我々はこれまでコクヌストモドキを用いて、後胚発生すなわち脱皮・変態期におけるホルモン作用に関する研究に取り組んできたわけであるが、次は胚発生におけるホルモンの役割を明らかにしたい、という着想に至った。本研究では、コクヌストモドキを初めとする昆虫の胚発生における JH の濃度変動、役割およびシグナル伝達経路に関して、新規の知見を得ることを目的とする。

3. 研究の方法

本研究は胚期の JH の役割とシグナル伝達経路の解明を目的としているが、JH は脱皮ホルモンと協調して種々の生理現象を調節することが知られている。そこで JH のみではなく脱皮ホルモンについても濃度変動や役割を調べ、両者の協調を解明したいと考えた。具体的には以下の方法で研究を進めた。なお、項目(1)~(4)ではコクヌストモドキを用い、項目(5)ではそれ以外の昆虫を用いることで、ホルモンの役割が種々の昆虫で保存され

ているかどうか考察することにした。

(1) コクヌストモドキ胚発生におけるホルモン生合成酵素の発現時期の解析

コクヌストモドキから、複数の脱皮ホルモン生合成酵素遺伝子 (*phantom, shade* など) が単離・同定されている (Parthasarathy *et al.*, *Insect Biochem. Mol. Biol.* 40, 429-39, 2010)。そこで胚期におけるこれらの発現変動を定量 PCR 法によって調べ、生合成の時期を特定する。

JH 生合成経路の最後の 2 ステップを触媒する JH 酸メチル基転移酵素とエポキシダーゼ (それぞれ JHAMT, CYP15 と省略) は、我々によってクローニング済みである (Minakuchi *et al.*, *FEBS J.* 275, 2919-31, 2008; 未発表)。そこで上記と同様に定量 PCR 法でこれらの発現時期を調べることとした。

(2) コクヌストモドキにおける JH 生合成器官の同定

一般にホルモン生合成酵素の多くは、生合成器官において特異的に発現することが知られている。そこでホルモン生合成酵素の配列をプローブとして用いた *in situ* ハイブリダイゼーション法により、JH 生合成器官であるアラタ体を視覚化し、ホルモン生合成器官の存在を確認する。

(3) コクヌストモドキ胚期の器官形成における JH の役割に関する解析

我々はこれまでに、JH 受容体である Met を RNAi 法により胚期にノックダウンすると、幼虫の孵化率が顕著に低下することを見出した (未発表)。そこで、このような JH シグナルを阻害した胚においてどのような異常が生じているか観察する。

また、JH 生合成の最終段階を触媒する JHAMT および CYP15 を同時にノックダウンすることにより「JH 欠乏の胚」を作成し、器官形成に及ぼす影響を調べる。さらに、この「JH 欠乏の胚」に JH あるいはその前駆体を投与して表現型がレスキューされるかどうかを調べる。

(4) コクヌストモドキ胚期における JH 誘導性遺伝子の機能解析

脱皮・変態期においては Met が JH の受容体として、また転写因子 *Krüppel homolog 1 (Kr-h1)* が JH 初期応答遺伝子として機能する。コクヌストモドキでは胚期にも *Kr-h1* の発現がみられるため、幼虫期と共通のシグナル伝達経路が存在する可能性が高いと考えている。そこでこのような既知の JH シグナル伝達因子を RNAi 法でノックダウンした胚を作成し、胚期の器官形成に対する影響を調べる。

(5) 不完全変態昆虫の胚期における JH 誘導性遺伝子の発現解析 (博士研究員 Isabelle

Veal、および農業生物資源研究所の塩月博士・上樂博士との共同研究)

一般に完全変態と不完全変態では、ホルモンの種類は共通であるがシグナル伝達経路に差があると考えられている。そこで不完全変態のカイガラムシにおいても、**JH** シグナル伝達に関与すると考えられる転写因子の cDNA クローニングを行った。

以上(1)から(4)の結果を総括し、胚期における **JH** シグナル伝達経路を推定してゆく。また(5)の結果を、完全変態昆虫における(1)から(4)の結果と比較することで、昆虫の進化に関する考察を行う。

4. 研究成果

(1) コクヌストモドキ胚発生におけるホルモン生合成酵素の発現時期の解析

複数の脱皮ホルモン生合成酵素遺伝子 (*spo*, *phm*, *dib*, *sad*, *shd*) に関して、胚期における発現プロファイルを定量 PCR 法によって調べたが、恒常的に発現しているものが多く、この発現プロファイルが脱皮ホルモン生合成活性を反映しているかどうか不明であると考えた。そこで脱皮ホルモン誘導性遺伝子 (*E75*, *HR3*, *HR4*) の発現プロファイルを同様に調べたところ、約 90 時間の胚期のうち 70 時間頃に発現のピークがあったことから、この時期に脱皮ホルモン生合成活性が高まっていると考えられる。

JH 生合成経路の最後の 2 ステップを触媒する **JHAMT** および **CYP15** についても定量 PCR 法で発現時期を調べたところ、約 90 時間の胚期のうち 60 時間頃に発現のピークが見られたことから、この頃に **JH** 生合成が始まることが示唆された。

(2) コクヌストモドキにおける **JH** 生合成器官の同定

JH 生合成酵素である **JHAMT** および **CYP15** の配列をプローブとして用いた *in situ* ハイブリダイゼーションを実施した。

まず幼虫期における **CYP15** の発現部位を探索したところ、**JHAMT** の場合と同様に脳の近くにあるアラタ体にシグナルが見いだされたが、**JHAMT** と比べてシグナルは非常に弱かった。

次に胚期における **JHAMT** および **CYP15** の発現部位を探索したところ、**JHAMT** では頭部に左右 1 対のシグナルが検出され、その位置からアラタ体だと考えられた。一方 **CYP15** では、今のところバックグラウンドが高すぎるため、顕著なシグナルを検出するには至っていない。今後さらに実験条件を検討する予定である。

(3) コクヌストモドキ胚期の器官形成における **JH** の役割に関する解析

JH 受容体である **Met** を RNAi 法により

胚期にノックダウンした場合の表現型を詳細に観察した。その結果、産卵数には有意な影響が見られないものの、**Met** ノックダウンでは孵化の最中に死亡する個体や、孵化しても体型が扁平で動きが鈍く、そのまま死に至る個体が多かった。今後の研究で、神経系や筋肉などへの影響を詳しく調査する予定である。

JH 生合成の最終段階を触媒する **JHAMT** および **CYP15** を同時にノックダウンすることにより「**JH** 欠乏の胚」の作成を試みたが、今のところ **Met** ノックダウンの場合のような顕著な致死効果は見られていない。

JHAMT と **CYP15** のノックダウン効率を定量 PCR 法で確認したところ、効率はそれほど高くなかった。このように **JH** 濃度を十分に抑えることができていない可能性があるため、さらに実験条件の検討を続けている。

(4) コクヌストモドキ胚期における **JH** 誘導性遺伝子の機能解析

脱皮・変態期においては **Met** が **JH** の受容体として、また転写因子 **Kr-h1** が **JH** 初期応答遺伝子として機能する。本研究において **Met** ノックダウン胚における転写因子の発現量を調査したところ、**Kr-h1** の発現が通常個体よりも減少していることが明らかになった。したがって胚発生においても後胚発生と同様に、**Met** と **Kr-h1** を介する **JH** シグナル伝達経路が存在するということが示唆された。

(5) 不完全変態昆虫の胚期における **JH** 誘導性遺伝子の発現解析 (博士研究員 Isabelle Veal、および農業生物資源研究所の塩月博士・上樂博士との共同研究)

不完全変態のカイガラムシにおいて、**JH** シグナル伝達に関与すると考えられる転写因子 **Kr-h1** の cDNA クローニングを行った。縮重プライマーを用いて得られた部分配列をもとに、農業生物資源研究所で作成されたトランスクリプトームのデータベースを検索し、**Kr-h1** の cDNA 全長配列を明らかにした。定量 PCR 法により、カイガラムシ胚期における変動を調べたところ、胚発生の中盤から発現レベルが上昇し、孵化直前まで高いレベルを保った。**Kr-h1** は種々の昆虫で **JH** 誘導性遺伝子として知られていることから、カイガラムシでもおそらく胚発生の中盤に **JH** 生合成が始まり **Kr-h1** の発現が誘導されていると考えられる。

現在のところ **Kr-h1** の発現解析を行ったにとどまっているが、今後は他の転写因子との関連などについても解析を行う予定である。

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0件）

〔学会発表〕（計5件）

- ① Fumika Ishii, Yumiko Washidu, Toshiharu Tanaka, Ken Miura, Tetsuro Shinoda and Chieka Minakuchi
“Expression and functional analysis of CYP15A1, a juvenile hormone epoxidase, in the red flour beetle *Tribolium castaneum*.”
10th International Conference on Juvenile Hormones, 2014年6月9日（つくば市）
- ② Isabelle Veal, Takahiro Shiotsuki, Akiya Joraku, Toshiharu Tanaka and Chieka Minakuchi
“Sexual dimorphism in scale insects (Coccoidea): *broad* and *kr-h1* expression in *Planococcus kraunhiae* (Kuwana).”
10th International Conference on Juvenile Hormones, 2014年6月9日（つくば市）
- ③ 鷲津ゆみ子、三浦健、田中利治、篠田徹郎、水口智江可
「コクヌストモドキの胚発生期における幼若ホルモンの生合成および機能」
第159回日本昆虫学会・第96回日本応用動物昆虫学会合同東海支部会講演会、
2013年3月9日（名古屋大学）
- ④ Fumika Ishii, Ken Miura, Toshiharu Tanaka and Chieka Minakuchi
“Juvenile hormone biosynthetic organs in the final larval instar of the red flour beetle *Tribolium castaneum*.”
第24回国際昆虫学会、2012年8月19日～25日（韓国）
- ⑤ 粥川琢巳、水口智江可、神村学、今西重雄、三田和英、篠田徹郎
「JH応答配列を利用した新規IGRスクリーニングシステムの開発」
第56回日本応用動物昆虫学会大会、2012年3月29日（近畿大学奈良キャンパス）

〔図書〕（計0件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計0件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：

番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況（計0件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

【アウトリーチ活動】

名古屋市昭和生涯学習センター主催、昭和
金曜科学夜話にて講演
「昆虫の生存戦略 ～脱皮・変態とホルモン～」
2012年11月16日、名古屋市

6. 研究組織

(1)研究代表者

水口 智江可 (MINAKUCHI CHIEKA)
名古屋大学・大学院生命農学研究科・助教
研究者番号：90509134

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし

(4)研究協力者

Isabelle Veal
JSPS 外国人特別研究員

石井 史果
名古屋大学・大学院生命農学研究科・大学院生