

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 5 日現在

機関番号：11101

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2012～2013

課題番号：24880008

研究課題名(和文) 昆虫の脱皮・変態を支配する幼若ホルモン生合成の時期特異的な制御機構の解明

研究課題名(英文) Regulation of juvenile hormone biosynthesis by peptide hormones

研究代表者

金児 雄 (Kaneko, Yu)

弘前大学・農学生命科学部・助教

研究者番号：90633610

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円、(間接経費) 690,000円

研究成果の概要(和文)：昆虫の発育に幼若ホルモン(JH)は重要であるが、JHの合成制御が発育時期でどのように制御されるかはよくわかっていなかった。JH合成制御因子であるallatotropin(AT)、allatostatin-C(AST-C)、short neuro peptide F(sNPF)の役割を時期を追って検証した結果、AST-Cは幼虫期全般において抑制作用を示したが、sNPFは幼虫期では時期特異的にJH生合成を抑制した。一方ATは幼虫期ではsNPFの転写制御を行い、成虫への羽化前後ではJH生合成を抑制していた。このようにJH生合成は種々の因子が時期特異的に作用することで、制御されていることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Juvenile hormone is one of key regulator of insect development, e.g.; molting, metamorphosis, reproduction, caste differentiation, and diapause. In holometabolous insects, JH determines the timing for initiation of pupal metamorphosis. We examined the regulation of JH biosynthesis by peptide hormones. During larval stages, short neuro peptide F stage dependently inhibited JH biosynthesis, and its expression was regulated by AT. But AT did not show any effect on larval CA activity. In contrast, AT showed inhibitory effect on pupal and adult CA. These results indicate that JH biosynthesis is regulated by stage specific peptide hormones.

研究分野：農学

科研費の分科・細目：応用昆虫学

キーワード：幼若ホルモン 昆虫生理学 ペプチドホルモン

1. 研究開始当初の背景

完全変態昆虫は幼虫脱皮を繰り返した後、十分な大きさに達すると蛹へと変態する。この脱皮、変態は主にエクダイソンと幼若ホルモン(JH)の2つのホルモンにより制御されている。幼若ホルモンが高濃度で存在するときにエクダイソンに曝されると幼虫から幼虫への脱皮が引き起こされる。しかし蛹変態直前の幼虫期である終齢(5 齢)に脱皮すると、体液中の JH 濃度が急激に低下し 5 齢 3 日までにほぼ消失する。この状態で少量のエクダイソンが分泌されることで、蛹コミットメント(蛹への分化の方向付け)が誘導される。すなわち JH の低下が蛹変態の引き金になり蛹コミットメントが起こり、その後続くエクダイソンの大きなピークにより実際の蛹分化が引き起こされる(図1、Muramatsu *et al.*, 2008)。5 齢初期に JH を投与するとコミットメントが阻害されることから、蛹コミットメントの誘導には終齢初期の JH の低下が不可欠と言える。また終齢よりも若い個体から JH 分泌器官であるアラタ体を外科的に取り除き JH を欠乏させると早熟な蛹を誘導できることから、蛹変態において JH が重要な抑制因子であることがわかる。

体液中の JH 濃度の変動は主に JH 生合成によって制御されることが報告されている。これまでにエクダイソン、生体アミン類、ペプチドホルモン(allatostatin, allatotropin など)が JH 生合成を制御する因子として知られていたが(金児・比留間, 2011)これまでの研究は JH 生合成に関与する因子の同定のみ行われてきたため、正常な昆虫の発生に重要である時期特異的な JH 生合成の制御について、これらがどのように作用するかはほとんど解析されていない。

そこで申請者らは、特に蛹変態の開始に重要な終齢初期の JH 生合成の低下に着目して、発生過程に沿った JH 生合成制御の解析を行ってきた。その結果、終齢への脱皮時に体液中のエクダイソンが消失し、その消失が JH 合成酵素遺伝子の発現を低下させることにより JH 生合成の完全な停止を引き起こすことを明らかにした(Kaneko *et al.*, 2011)。加えてドーパミンがアラタ体へと作

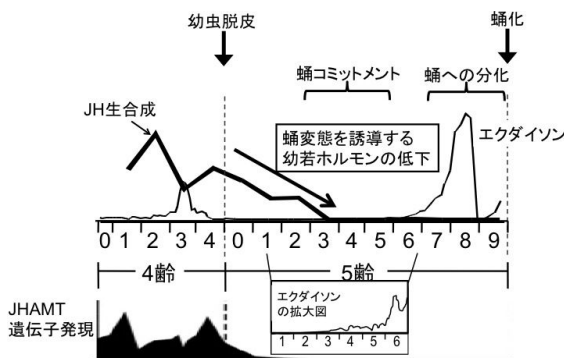


図1. カイコのアラタ体によるJH生合成、体液中エクダイソン濃度及びJH合成酵素遺伝子の代表としてJHAMT遺伝子の変動パターン(Kinjoh *et al.*, 2007から改変)

用して、JH 生合成の低下を担っていることもみいだした(金児・比留間, 2011)。

JH 生合成を制御する因子は他にペプチドホルモンの allatotropin (AT) と allatostatin (AST) が報告されている。AT は JH 生合成を制御する因子として同定されたものの、その作用機構は明らかになっていなかった。近年その受容体が単離され発現解析が行われた結果、その発現はアラタ体ではなく側心体でみられた(Yamanaka *et al.*, 2008)。また側心体で合成されアラタ体で働く新たな JH 生合成を抑制するペプチドホルモン short neuropeptide F (sNPF) の単離もおこなわれ、sNPF の産生細胞と AT 受容体の側心体内での発現場所が同じであったことから、AT が sNPF を介して JH 生合成を制御することが強

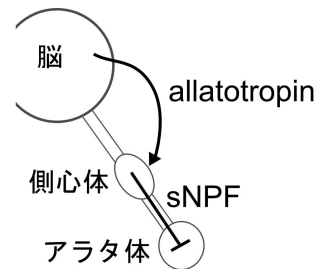


図2. allatotropinによるJH制御機構の作業仮説

(金児・比留間, 2011より改変)

く示唆される(図2参照)。

しかしながらこれらのペプチドホルモンが時期特異的に作用するかどうかについてはほとんど知見がなかった。つまり実際の発生過程において、これらの因子がどのように JH 生合成を制御しているかについては、不明である。そこで特に終齢期における JH 生合成の抑制に焦点を置いて、種々のペプチドホルモンによる時期特異的な JH 生合成制御機構の解明を目指した。

加えて、これまで JH 生合成制御因子は、その単離に焦点が当てられており、作用機構については十分に解析されたとは言えない。そこで、AST や sNPF といったペプチドホルモンがどのように作用するかも併せて検証を行った。

2. 研究の目的

昆虫の脱皮・変態はエクダイソンと JH のバランスによって制御されている。JH の消失により幼虫から蛹への変態が引き起こされることから、JH 生合成調節機構の解明は昆虫の発生・変態を理解する上で不可欠である。それにもかかわらず、その機構はいまだ不明である。そこで JH 生合成に関与する因子を同定し、その作用機構を分子レベルで発生時期に沿って解析することにより、変態の制御機構を解明することを目的とする。そのためには制御因子間の相互作用も含めた解析が必要となる。特に転写レベルでの相互の

作用に着目することで研究を行った。

3. 研究の方法

カイコを材料として、研究を行った。JH 合成器官であるアラタ体を各種ペプチドホルモン存在下で培養し、JH 生合成量に与える影響を測定した。また実験に供与するアラタ体を異なる時期のカイコから摘出し使用することで、ペプチドホルモンへの時期特異的な応答を検証した。

またアラタ体におけるペプチドホルモンの受容体の発現量を時期を追って測定した。それと共にペプチドホルモン間での相互作用を検証するために、ペプチドホルモンに暴露後、他のペプチドホルモン受容体の発現量を調べた。

ペプチドホルモンの JH 生合成における作用機構を検証するために、ペプチドホルモンで処理し、JH 生合成に関わる酵素遺伝子群の発現量を比較検討した。

4. 研究成果

(1) 幼虫期におけるペプチドホルモンの作用

JH 生合成は終齢へ脱皮後に徐々に減少し始め、終齢脱皮後3日までに完全にストップする。そこでこの JH 生合成の停止に AST-C、sNPF、AT がどの様に参与するかを調べた。

AST-C: 濃度依存性を検証した結果、AST-C は 0.5 μ M 以上で有意に JH 生合成を抑制した。4 齢 1 日から 5 齢 1 日まで 1 日毎に AST-C に対するアラタ体の感受性を検証した結果、いずれの時期においても JH 生合成が AST-C によって抑制を受けたことから、AST-C は全ての時期において作用し、アラタ体による過剰な JH 生合成を抑制していることが示唆された。

これまで AST-C による JH 生合成の抑制は、基質の取り込み作用することで引き起こされるとされていた。しかし AST-C でアラタ体を刺激後、アラタ体における JH 生合成酵素遺伝子の発現を調べたところ、HMG Co-A reductase (HMGR), mevalonate kinase (MevK), IPP isomerase (IPPI) の 3 つの酵素の発現が特異的に減少していた。このことから AST-C は JH 合成酵素遺伝子の発現を転写レベルで制御することによって、JH 生合成の抑制を引き起こしていることが明らかになった。これまで JH 合成酵素遺伝子を転写レベルで制御するような報告はなく、JH 合成の研究において新たな視点を与えることとなった。

sNPF: 濃度依存性の実験から、sNPF は 0.75 μ M 以上の濃度で、JH 生合成を抑制すること

が明らかになった。発育時期を追って検証した結果、sNPF は 4 齢 3 日と 5 齢初期にのみ特異的に作用することがわかった。この時期は側心体によってアラタ体の活性が抑制を受ける時期と一致しており、生体内でも sNPF が時期特異的に作用することを強く支持する結果である。また受容体の発現を検証したところ、sNPF に感受性の高い、4 齢 3 日と 5 齢初期に掛けて発現量が上昇したことから、受容体の発現が上昇することにより感受性が高まり、その結果、時期特異的な応答が生み出されていると示唆される。この受容体の発現は、エクダイソンを与えることで抑制されることから、発現制御の一部はエクダイソンによって制御されることが明らかになって来た。

sNPF を添加して培養後、JH 生合成酵素遺伝子の発現を測定すると、HMGR、IPPI の発現が特異的に阻害されており、sNPF の JH 生合成阻害効果は、JH 生合成酵素遺伝子の転写レベルでの制御に依存していた。

AT: 先述のように AT 受容体はアラタ体に近接する側心体で発現していたことから、側心体における AT 受容体の発現変動を解析した。すると、sNPF の側心体内での発現変動パタ

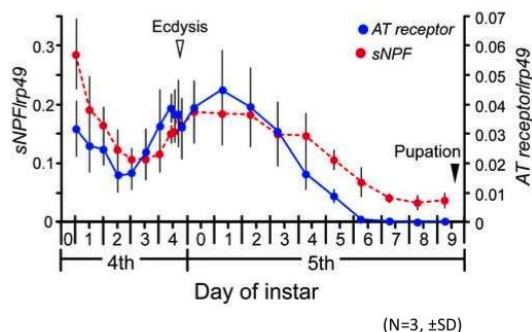


図3. 側心体におけるAT受容体とsNPFの発現変動

ーンと酷似していた(図3)。そこで AT が sNPF を転写レベル制御することを想定し、側心体を AT で刺激し sNPF の発現量を検証した。その結果、sNPF の発現は AT に因って確かに促進され、その効果は時期特異的に見られた。一方で AT をアラタ体に作用させても JH 合成活性には影響を与えなかった。これらのことから、幼虫期において AT は sNPF を転写レベル制御することで間接的に JH 合成を制御していると考えられる。これまで AT のこのような作用は、全く考えられていなかった。

以上の結果から、幼虫期の JH 生合成は、AST-C と sNPF が独立に、しかし一部重複する作用点に作用して制御されており、その作用点は JH 生合成酵素遺伝子を転写レベルでの制御であることを新たに見いだした(図4)。終齢期においては、これまで報告していたエクダイソンおよびドーパミンに加え、AST-C と sNPF が協調して作用することで、完全に JH 生合成の停止を招き、その結果、

蛹への変態の誘導が開始されると考えられる。加えて本申請研究により、ATがsNPFの転写を促すという新規の作用も見出すこと

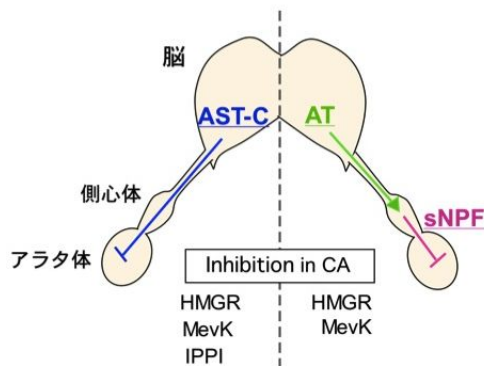


図4. 幼虫期におけるペプチドホルモンによるJH合成制御機構が出来た。

(2) 成虫期におけるペプチドホルモンによるJH合成制御

カイコでは終齢中期から蛹期間全般においてJH合成は完全にストップする。しかし、成虫への羽化直前になるとオスでは引き続きJH合成は行われぬが、メスではJH合成が再開される(図5)。これまでATは

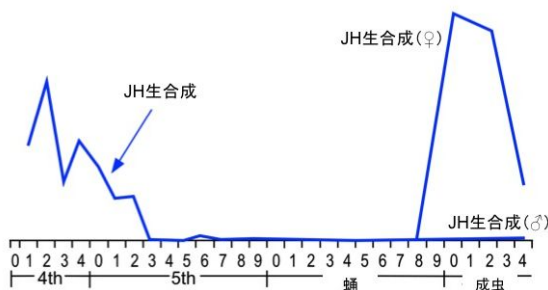


図5. JH合成の発育時期に沿った変動

成虫のメスでのみJH合成を促進することが報告されていた。そこでカイコ成虫におけるATの作用を検証した。成虫のメスから側心体-アラタ体-食道の複合体を抽出し、ATを作用させると、予想に反してJH合成が約50%まで抑制された。この抑制効果はアラタ体-食道複合体でも観察できたが、アラタ体単独では作用しなかった。このことからATによるJH合成抑制効果は、食道を介してアラタ体へと伝わっていると考えられる(図6)。

一方羽化1日前の側心体-アラタ体-食道の複合体をATで刺激すると、約20%までJH合成量が抑制された。しかし側心体が無い状態のアラタ体-食道複合体、アラタ体単独には作用しなかった。このことから、羽化前ではATは側心体を介して、JH合成の抑制を行うことがわかった。側心体を介してJH合成の抑制が行われたことから、sNPFの関与を検証した結果、羽化前のアラタ体はsNPFを添加して培養を行うとJH合成活性が低

下した。以上の結果から、羽化前のATによるJH合成活性の低下はsNPFを介して行われていることが示唆される。

次に雌雄差を生み出す要因を検証するために、羽化前と羽化直後においてAT、sNPF及びその受容体の発現を検証した。するとオスにおいては脳でのATの発現が羽化後に上昇するのに対して、メスでは逆に減少した。しかしAT受容体の発現は、雌雄及び発育時期で発現量に差異は認められなかった。一方でsNPFの発現は雌雄で差はなく、また羽化前と羽化後で発現に変動は見られなかった。しかしsNPF受容体1はオスでは羽化に向かって発現量が上昇した。一方メスではsNPF受容体2の発現量が、羽化に向かって上昇した。

以上の結果から、カイコ成虫においては他

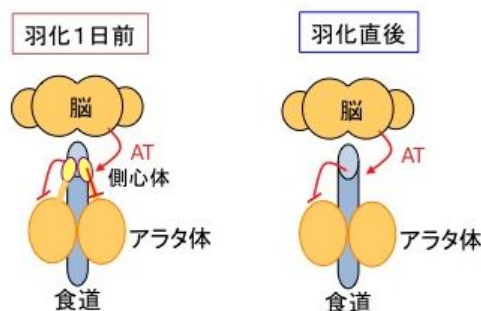


図6. ATのシグナル伝達の発育時期による差異

羽化前ではATは側心体を介してJH合成の抑制を行い、羽化後では食道を介してシグナルがアラタ体に伝わると考えられる。

の昆虫とは異なり、ATはJH合成を抑制し、その作用機構は羽化を境に異なることが明らかになった(図6)。またATの発現が、オスでは上昇するのに対しメスでは逆に減少することから、オスにおいてはATが存在し続けることでJH合成を抑制し、メスではATが減少することで、抑制から解放されることでJH合成が活性化されることが示唆された。またこのような雌雄差にはsNPFの受容体の発現も一役買っていることが考えられるもの、その役割については明らかにすることが出来なかった。

今回、発育時期に沿って検証を行ったことで、これまで特定の時期での報告が多かったペプチドホルモンが時期特異的に作用することを明らかに出来た。特にsNPFは終齢時期に作用して蛹への変態に関与することがわかった。一方ATは幼虫の時期にはsNPFの転写制御を行い、成虫時期ではJH合成を抑制する機能があることが明らかとなり、同一ホルモンが発育時期によって異なる機能を持つことが明らかになった。

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)

Hiruma, H., Kaneko, Y.: Hormonal regulation of insect metamorphosis with special reference to juvenile hormone biosynthesis. *Curr. Top. Dev. Biol.*, 103, 73-100. 2013.
DOI: 10.1016/B978-0-12-385979-2.00003-4.

[学会発表](計 2件)

金兎雄・比留間潔(2014)カイコ成虫における allatotropin による JH 生合成抑制作用とその機構. 日本蚕糸学会第 84 回大会, 2014 年 3 月 10-11 日, 日本大学生物資源科学部(神奈川県)

金兎雄・比留間潔(2013)インスリンにより誘導される Verson's gland の蛹コミットメント. 日本応用動物昆虫学会第 57 回大会, 2013 年 3 月 27~29 日, 日本大学生物資源科学部(神奈川県)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

金兎雄 (KANEKO YU)
弘前大学・農学生命科学部・助教
研究者番号: 90633610

(2) 研究分担者

()

研究者番号:

(3) 連携研究者

()

研究者番号: