

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 4 月 27 日現在

機関番号：11101

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25292195

研究課題名(和文) 昆虫変態に伴う蛹コミットメントと細胞死の分子機構の解明

研究課題名(英文) Molecular mechanisms of pupal commitment and programmed cell death during insect metamorphosis

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,700,000円

研究成果の概要(和文)：蛹変態の分子機構を細胞のレベルで解明した。すなわち (1) 単一巨大細胞Verson's glandの蛹コミットメントは定説とは異なり幼虫から蛹へと徐々に起こる。(2) 蛹コミットメントには幼若ホルモン(JH)の低下と摂食(栄養)が重要であり、インスリン伝達経路とTORシグナル経路による2段階で起きる。(3) JHに支配されている体節特異的なVerson's glandの細胞死を司る1遺伝子を発見した。(4) 幼虫特異的な腹脚の鉤爪の細胞死は主としてアポトーシスで起こり、細胞死の決定は終齢脱皮の直前直後に起こる。

研究成果の概要(英文)：We have studied the molecular mechanisms of insect metamorphosis at a cellular level. (1) Pupal commitment of a single-celled Verson's gland occurs gradually. (2) This commitment is caused by the decline of JH titer and nutrition, and it occurs by a two-step process by both the insulin signaling and TOR signaling pathway. (3) We found a gene responsible for the segment specific cell death of Verson's glands, the gene of which is involved in the JH signaling pathway. (4) The cell death of a larval-specific organ, crochet, is caused by apoptosis, and the commitment of the death is initiated shortly before and/or after the final ecdysis.

研究分野：農学

キーワード：Verson's gland 蛹変態 エクダイソン コミットメント 幼若ホルモン インスリン crochet 細胞死

1. 研究開始当初の背景

完全変態昆虫の終齢期では、蛹発育に向かい幼虫組織が蛹特異的な組織や器官へと構築される。それと共に、蛹に存在しない幼虫特異的な組織は細胞死により排除されるなど劇的な変化が起こる。これら蛹への変化は主としてホルモン、特にエクダイソンと幼若ホルモン (JH) の共同作用により引き起こされる。蛹へと変態するためには幼虫細胞が蛹細胞へとコミットメントされることが必要であり、細胞の再構築や細胞死もコミットメントの過程を経て条件づけられる。コミットメントとは、生物の発生の過程で、細胞が「未分化な状態」から「分化後の運命が不可逆的に決定される状態」へ切り替えを起こすことである。

(1) 幼虫細胞から蛹細胞への構築メカニズム

① Verson's gland の蛹コミットメントの分子機構

幼虫期にエクダイソンと幼若ホルモン (JH) が同時に作用すると幼虫脱皮が引き起こされる (Hiruma, 2003)。終齢期になると血中の JH のレベルが低下し、その後エクダイソンが徐々に上昇してくる。我々はカイコを使用して、昆虫の皮膚の真皮細胞の蛹コミットメントは JH がほとんど不在の状態ですべてにエクダイソンに反応して 5 齢 (終齢) 4-5 日目に起こることをすでに明らかにしている (Muramatsu *et al.*, 2008)。

Verson's gland は巨大な 1 つの分泌細胞と 1 つの小さな saccule 細胞からなり、幼虫の真皮細胞から分化して各体節に 1 対ずつ存在する。腹部第 1 から 6 体節 (A1-A6) の Verson's gland の蛹コミットメントはまだ摂食中である 5 齢 1-3 日目に起こることをすでに見出している。これは 4-5 日に起こる真皮細胞のコミットメントより早く、この時期には JH もエクダイソンもほとんど血中に検出されない。これらのことはコミットメントの機構が皮膚とは異なることを示している。我々は DNA マイクロアレイにより、カイコの Verson's gland から幼虫及び蛹特異的に発現する遺伝子を多数得ており、これらを指標にして Verson's gland の蛹コミットメントの機構を明らかにする。皮膚とはその機構が全く異なり、インスリンが重要な役割を果たしているという予備結果を出しており、新規な機構の発見につながることを期待される。

② 単一細胞のコミットメントは all-or-none で起こるのか?

コミットメントは、動植物を問わず個々の細胞は中間型をとらずに all-or-none で引き起こされるのが発生生物学の定説となっている。この課題は発生学上の重要な命題であるにもかかわらず、良い材料が無いために研究がほとんど進んでいない。そこで巨大な 1 つの分泌細胞である Verson's gland (A1-A6) を使用してこの課題に挑戦する。幼虫と蛹に特異的に発現する遺伝子の発現スイッチ機構、すなわち Verson's gland の蛹コミットメントをモデルとして研究することにより、上記の命題が解決する。それに加えて単一細胞内で、ホルモン、特にインスリンと JH による遺伝子の on/off の調節機構が明らかになり、蛹変態時に起きる細胞の再構築機構のみならず発生生物学上の重要課題も解明できる。

(1) 蛹変態に伴う幼虫組織の細胞死

① 体節特異的な細胞死 (Verson's gland)

カイコの腹部 7 から 9 体節 (A7-A9) の Verson's gland は他の体節と異なり、終齢脱皮後に退化する。この細胞死は JH により抑制されることを我々は予備実験により示しており、開放血管系である昆虫で体節特異的に細胞死が起こる現象は異例である。このメカニズムを解明することにより、細胞死の誘導機構のみならず、開放血管系での体節特異性を生み出す機構が明らかになる。

昆虫の蛹変態時には細胞・器官の再構築や細胞死が起こり、それらの研究は蛹変態のメカニズム解明の中心となるものである。これらのメカニズムを解明することにより昆虫の蛹変態の機構のみならず、発生生物学など一般生物学への貢献も期待できる重要な研究となる。また実験動物のカイコはゲノムの解読が完了しており、様々な分子生物学的アプローチが容易に取り入れられるモデル生物である。カイコを含む鱗翅目昆虫は多くの害虫を含む分類群でもあるため多くの害虫にも適応でき、得られる結果は新規な、昆虫に特異的に作用する変態の阻害剤開発の有用な研究ともなる。

② Crochet 産生細胞

鱗翅目昆虫の幼虫に存在する腹脚とその先端のカギ爪 (crochet) は幼虫特異的な器官で、蛹変態に伴い退化する。この退化は 3 つのステップにより引き起こされることを我々は予備実験で見出している。第 1 ステップは 4 齢期に既に起こり、幼虫脱皮を引き起こすエクダイソンの上昇により引き起こされ、第 2 ステップは 5 齢 (終齢) 脱皮直後に起こる (メカニズム不明)。第 3 ステップは 5 齢期の 4 日目に皮膚の真皮細胞と同様なホルモン機構で細胞死により死滅する。第 1、第 2 ステップは細胞死を導く前に起こる crochet 産生細胞の形成能力の低下である。これらのメカニズムを確立することで蛹変態の生理機構の一端を明らかにする。

2. 研究の目的

本研究は昆虫の蛹変態時に起こる、幼虫細胞から蛹細胞へのコミットメント及び幼虫細胞の細胞死の機構を研究し、ホルモンシグナルに複雑に反応して引き起こされる蛹変態の生理分子機構を解明する。具体的にはカイコ (*Bombyx mori*) を使用し、①巨大細胞の Verson's gland を用いて、エクダイソンの代わりにインスリン伝達経路による蛹コミットメントの分子機構を単一細胞で解明する。②ホルモンにより制御される体節特異的な細胞死の誘導機構を、Verson's gland を用いて明らかにし、開放血管系で体節特異性を生み出す機構を解明する。③蛹変態に伴う腹脚の crochet 産生細胞の退化のホルモン制御を確立する。これらの研究により、蛹変態の生理生化学機構を細胞のレベルで明らかにする。

3. 研究の方法

本研究の目的を達成するために、生理学的手法と生化学・分子生物学的手法を駆使する。具体的には、組織培養、細胞内への核酸の注射 (Verson's gland は巨大単一細胞であるために可能)、プロモーター解析、RNA の発現制御など様々な手法を連携して研究する。

4. 研究成果

(1) 幼虫細胞から蛹細胞への構築メカニズム

① Verson's gland の蛹コミットメントの分子機構

Verson's gland の蛹コミットメントは栄養で誘導され、JH によって阻害された。そこで栄養に関わる遺伝子の、絶食と JH への応答性を調べた結果、インスリン受容体およびインスリン伝達経路の Akt 遺伝子の発現が影響を受けた。両遺伝子の RNAi によるノックダウンを行った結果、Akt の RNAi では蛹コミットメントが抑制されたが、インスリン受容体の RNAi は影響を与えなかった。また同じく栄養シグナルにかかわる Target of rapamycin (TOR) に対する RNAi でも蛹コミットメントが抑制された。以上の結果より、Verson's gland の蛹コミットメントは JH 不在下で栄養により活性化される Akt と TOR を介した 2 段階で制御されていることが明らかになった。

一方、JH の抑制作用の分子機構解明のため、JH 受容体である Met1 および Met2 の作用を RNAi 法により調べた。その結果、Met1 の RNAi では JH による抑制効果がレスキューされたが、Met2 の RNAi ではレスキューされなかった。このことから Verson's gland の蛹コミットメントの制御には Met1 を介した JH シグナルが関与することがわかった。

② 単一細胞 Verson's gland の蛹コミットメントは徐々に起こる

コミットメントは細胞レベルでは all-or-none で起こるというのが定説である。我々は非常に大きな Verson's gland を用いることにより、コミットメントの細胞レベルでの研究を行った。上述のように Verson's gland の蛹コミットメントは終齢 1 日から 3 日目にかけて起こる。そこでコミットメントの移行期である終齢 2 日の Verson's gland を用いて幼虫特異的遺伝子と蛹特異的遺伝子の発現解析を単一細胞レベルで行ったところ、調べたすべての両者の遺伝子が同時に発現していることを見出した。すなわちこの結果により、細胞レベルでは蛹コミットメントが定説とはことなり all-or-none ではなく、徐々に起こることを確立した。

(2) 蛹変態に伴う幼虫特異的組織の細胞死

① 体節特異的な細胞死 (Verson's gland)

終齢期では、カイコの腹部第 7-9 体節の Verson's gland は他の体節とは異なり肥大化せ

ず細胞死を起こし消失する。そこで細胞死の時期とタイプを調べたところ、終齢2日以降にアポトーシスおよびオートファジーの両者により細胞死が引き起こされていた。この体節特異的な細胞死は JH により抑制された。しかし、開放血管系を有する昆虫では体全体が同じ濃度のホルモンに曝されるため、体節特異性を生み出す要因は体節特異的な JH 応答因子を介していると考えられる。そこでマイクロアレイによる解析を行なった結果、細胞死を起こす腹部第7体節で特異的に発現する遺伝子を 355、細胞死を起こさない腹部第1体節で特異的に発現する遺伝子を 421 遺伝子得た。これらの遺伝子の機能を RNAi によって検証したところ、細胞死を起こす体節で特異的な遺伝子のうちの一つにおいて、JH 受容体である Met1 およびその下流で働く Kr-h1 の発現が有意に減少した。このことから、この遺伝子が細胞死の誘導において体節特異的な JH シグナルの制御に関わることが考えられる。

② 幼虫特異的組織の *crochet* 細胞の細胞死の機構

幼虫期の *crochets* は、真皮にある産生細胞によって形成され、幼虫脱皮の度に新しい *crochets* が作られる。終齢の産生細胞は、脱皮後4日目からカスパーゼ活性化を伴うアポトーシスによる細胞死を起こして除去されることを見出した。終齢前の幼虫期の *crochet* 産生細胞の産生能を詳細に調べたところ、幼虫脱皮直後にいったん低下し次の脱皮に向けて回復するが、終齢0日の産生細胞の産生能は細胞死を起こす前にも関わらず、完全には回復しなかった。また終齢脱皮直後から20Eを接食させて得られた過剰齢(6齢)幼虫の *crochets* には著しい異常が見られたことから、産生細胞の蛹への準備は終齢脱皮前後に既に始まっている事がわかった。以上の事から、蛹変態への準備はかなり早く、終齢脱皮へと決定されるとすぐに(直前もしくは直後に)始まるものと考えられる。

③ 栄養シグナルと蛹変態を誘導するタイマー

タバコスズメガ (*Manduca sexta*)では、発育期間と栄養は体の大きさを調節している。終齢幼虫を種々な期間絶食させ、その後正常な餌を

与えると、絶食時間の長さに比例して摂食期間が長くなり、6.5g以上にならないと蛹化しなかった。しかし JH 分泌器官のアラタ体を除去したグループでは、摂食開始後4日目に体重とは無関係に変態を始めた。つまり摂食により蛹化を促進するタイマーが開始した。餌の中にカゼインを含んでいれば他の栄養素有無には関係なくほとんど正常と同様に変態を開始した。これらのことから、次の2つが結論付けられた。1) 主として栄養素のうちタンパク質がタイマーを開始するのに必要である。2) 貧栄養状態は最小体重で蛹化するまで発育させるために、JHを通してタイマーの開始を抑制している。

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 9 件)

- ① 比留間潔 (2015). 昆虫の発育とホルモン:40年の研究生活で得たこと考えたこと. 東北蚕糸・昆虫利用研究報告 **40**, 1-7. <http://www.agr.hokudai.ac.jp/obunkon/VOL40.pdf>
- ② Suang, S., Manaboon, M., Chantawannakul, P., Singtripop, T., Hiruma, K., and Kaneko, Y. (2015). Molecular cloning, developmental expression, and tissue distribution of diapause hormone and pheromone biosynthesis activating neuropeptide in the bamboo borer, *Omphisa fuscidentalis*. *Physiol. Entomol.*, **40**, 247-256. DOI: 10.1111/phen.12109
- ③ Matsumoto, H., Ueno, C., Nakamura, Y., Kinjoh, T., Ito, Y., Shimura, S., Noda, H., Imanishi, S., Mita, K., Fujiwara, H., Hiruma, K., Shinoda, T., and Kamimura, M. (2015). Identification of two juvenile hormone inducible transcription factors from the silkworm, *Bombyx mori*. *J. Insect Physiol.* **80**, 31-41. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jinsphys.2015.02.011>
- ④ Kaneko, Y., and Hiruma, K. (2015). Allatotropin inhibits juvenile hormone biosynthesis by the corpora allata of adult

- Bombyx mori*. *J. Insect Physiol.* **80**, 15-21.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.jinsphys.2015.01.005>
- ⑤ Shinoda, T., Hiruma, K., and Shiotsuki, T. (2015). Preface. "Special Issue for proceedings of The Tenth International Conference on Juvenile Hormones". *J. Insect Physiol.* **80**, 1.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.jinsphys.2015.07.016>
- ⑥ 高木圭子・渡会直人・金児雄・比留間潔 (2014). 新しいタイプの農薬開発: 気門と腹脚のかぎ爪を阻害するイソチオシアネート化合物. 東北蚕糸・昆虫利用研究報告 **39**, 15-20.
<http://www.agr.hokudai.ac.jp/obunkon/No.39.pdf>
- ⑦ Kaneko, Y., and Hiruma, K. (2014). Short Neuropeptide F (sNPF) is a stage-specific suppressor for juvenile hormone biosynthesis by corpora allata, and a critical factor for the initiation of insect metamorphosis. *Dev. Biol.* **393**, 312-319.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.ydbio.2014.07.014>
- ⑧ Kayukawa, T., Murata, M., Kobayashi, I., Muramatsu, D., Okada, C., Uchino, K., Sezutsu, H., Kiuchi, M., Tamura, T., Hiruma, K., Ishikawa, Y., and Shinoda, T. (2014). Hormonal regulation and developmental role of Krüppel homolog 1, a repressor of metamorphosis, in the silkworm *Bombyx mori*. *Dev. Biol.* **388**, 48-56.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.ydbio.2014.01.022>
- ⑨ Suzuki, Y., Koyama, T., Hiruma, K., Riddiford, L.M., and Truman, J.W. (2013). A molt timer is involved in the metamorphic molt in *Manduca sexta* larvae. *PNAS* **110**, 12518-12525.
www.pnas.org/lookup/suppl/doi:10.1073/pnas.1311405110/-/DCSupplemental
- [学会発表] (計 24 件)
- ① 比留間潔 (2016). 昆虫の発育とホルモナー研究生活 40 年の歩み。日本昆虫学会第 76 回大会・第 60 回日本応用動物昆虫学会。2016 年 3 月 26-29 日。大阪府立大学。(招待講演)
- ② 金児雄・高木圭子・比留間潔 (2016). 幼若ホルモンによる Verson's gland 蛹コミットメント抑制作用の分子機構。日本昆虫学会第 76 回大会・第 60 回日本応用動物昆虫学会。2016 年 3 月 26-29 日。大阪府立大学。
- ③ 金児雄・高木圭子・比留間潔 (2016). 栄養シグナルで誘導されるベルソン氏腺の蛹コミットメントの分子機構。平成 28 年度蚕糸・昆虫機能利用学術講演会。2016 年 3 月 17-18。京都工芸繊維大学。
- ④ 河本夏雄・富田秀一郎・木内信・桑原伸夫・金児雄・比留間潔・水谷信夫・行弘研司 (2016). クワコ成虫の発生時期。平成 28 年度蚕糸・昆虫機能利用学術講演会。2016 年 3 月 17-18。京都工芸繊維大学。
- ⑤ 比留間潔・金児雄 (2015). 単一細胞の蛹コミットメント誘導メカニズム。2015 年昆虫ポストゲノム研究会。2015 年 10 月 17-18 日。ウエスバ椿山。(招待講演)
- ⑥ 金児雄・比留間潔 (2015). 幼若ホルモン合成の制御機構。2015 年昆虫ポストゲノム研究会。2015 年 10 月 17-18 日。ウエスバ椿山。
- ⑦ 高木圭子・金児雄・比留間潔 (2015). カイコガ終齢幼虫での、かぎ爪産生細胞の予定細胞死。2015 年昆虫ポストゲノム研究会。2015 年 10 月 17-18 日。ウエスバ椿山。
- ⑧ Hiruma, K. and Kaneko, Y. (2015). Pupal commitment of a single-celled Verson's gland is induced in a two-step process by the insulin and TOR/Akt signals, which occurs gradually, not on an all-or-none basis. The 2nd International Insect Hormone Workshop, July 12-18, 2015, Kolymbari, Crete, Greece.
- ⑨ 金児雄・高木圭子・熊野健太・田村大・奈良岡留美・比留間潔 (2015). RNA シークエンスを用いた Verson's gland 蛹コミットメントに関与する遺伝子の探索。日本蚕糸学会第 85 回大会。2015 年 9 月 26-27 日。北海道大学。
- ⑩ 高木圭子・野坂涼・金児雄・比留間潔 (2015). Telotrophic ovary における濾胞の貧栄養状態下での細胞死の制御機構。日本蚕糸学会第 85 回大会。2015 年 9 月 26-27 日。北海道大学。

- ⑪ 金児雄・比留間潔 (2015). Verson's gland における体節特異的なホルモン応答遺伝子の網羅的解析。第 59 回日本応用動物昆虫学会。2015 年 3 月 26-28 日。山形大学。
- ⑫ Hiruma, K., and Kaneko, Y. (2014). Cellular mechanisms of pupal commitment. 9th International Workshop on the Molecular Biology and Genetics of the Lepidoptera. August 17-23, 2014. Crete, Greece.
- ⑬ Kaneko, Y., and Hiruma, K. (2014). Allatotropin inhibits juvenile hormone synthesis by adult corpora allata in *Bombyx mori*. 10th International Congress on Juvenile Hormone. June 9-13, 2014. Tsukuba, Japan.
- ⑭ Takaki, K., Kaneko, Y., and Hiruma, K. (2014). Programed cell death of crochete forming cells during the last larval stadium of *Bombyx mori*. 10th International Congress on Juvenile Hormone. June 9-13, 2014. Tsukuba, Japan.
- ⑮ Kamimura, M., Ueno, C., Matsumoto, H., Shimura, S., Nakamura, Y., Noda, H., Imanishi, S., Mita, K., Hiruma, K., and Shinoda, T. (2014). Juvenile hormone enhances oxidative stress resistance through the induction of anti-oxidant gene expression in the silkworm, *Bombyx mori*. 10th International Congress on Juvenile Hormone. June 9-13, 2014. Tsukuba, Japan.
- ⑯ 比留間潔・鈴木裕一郎・小山貴司・Riddiford, L.M.・Truman, J.W. (2014). 栄養シグナルと蛹変態を誘導するタイマー。日本蚕糸学会第 84 回大会。2014 年 3 月 10-11 日。日本大学。
- ⑰ 金児雄・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。
- ⑱ 比留間潔 (2014)。学会賞受賞講演：昆虫の脱皮・変態の分子機構の解明。第 58 回日本応用動物昆虫学会。2014 年 3 月 26-28 日。高知市文化プラザかるぽーと。(招待講演)
- ⑲ 岡田悠・盛雄治・安田瑞来・金児雄・比留間潔 (2014)。Verson's gland におけるホルモン誘導性体節特異的細胞死誘導の機構。第 58 回日本応用動物昆虫学会。2014 年 3 月 26-28 日。高知大学。
- ⑳ 高木圭子・秋元真理・矢吹有紗・金児雄・比留間潔 (2014)。カイコの脱皮・変態に伴う幼虫腹脚かぎ爪の形成と消失の機構。第 58 回日本応用動物昆虫学会。2014 年 3 月 26-28 日。高知大学。
- 21 金児雄・雪森亜沙子・比留間潔 (2014)。栄養と幼若ホルモンで制御される Verson's gland 蛹コミットメントの分子機構。第 58 回日本応用動物昆虫学会。2014 年 3 月 26-28 日。高知大学。
- 22 比留間潔 (2014)。昆虫の発育とホルモンー現象から分子へー。第 25 回九州昆虫セミナー。2014 年 5 月 28 日。九州大学。(招待講演)
- 23 Hiruma, K., Kaneko, Y., and Riddiford, L.M. (2013). Pupal commitment of a single celled Verson's gland occurs gradually. International Insect Hormone (19th Ecdysone) Workshop 2013, July 22-26, University of Minnesota, Minnesota, USA.
- 24 Truman, J.W., Suzuki, Y., Koyama, T., Hiruma, K., and Riddiford, L.M. (2013). The role of molt timers in determining instar length in *Manduca sexta*. International Insect Hormone (19th Ecdysone) Workshop 2013, July 22-26, University of Minnesota, Minnesota, USA.

6. 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

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

(3)連携研究者

伴野 豊 (BANNO YUTAKA)
九州大学・連合農学研究科・准教授
研究者番号：50192711