

平成 30 年 6 月 14 日現在

機関番号：33902

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H04610

研究課題名(和文) 昆虫の成虫原基の成長発達を誘導する内分泌メカニズムの解明

研究課題名(英文) Endocrine mechanisms regulating the growth and development of imaginal disks.

研究代表者

溝口 明 (Mizoguchi, Akira)

愛知学院大学・教養部・教授

研究者番号：60183109

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、*in vitro*培養したカイコガのオス生殖器官原基の成長に及ぼす新規インスリン様ペプチド(BIGFLP)と脱皮変態ホルモン(20E)の個別的な作用と複合的な作用を調べ、さらに、それぞれのホルモンの作用に関する細胞内シグナル伝達経路を解析した。その結果、20Eが原基の伸長を促進すること、両ホルモンが加算的にタンパク質合成を促進すること、BIGFLPと20Eの作用にはそれぞれインスリン/IGFシグナル伝達経路とMAPK経路が関与することなどが明らかになった。BIGFLP欠失変異体を使った解析では、同ホルモンが卵巣の成長発達に重要な働きをすることが示された。

研究成果の概要(英文)：A large quantity of an insulin-like growth factor (IGF)-like peptide is secreted after pupation in *Bombyx mori*. Hypothesizing that the growth and development of adult tissues are regulated by the combined effects of this peptide (BIGFLP) and 20-hydroxyecdysone (20E), we investigated the growth-promoting effects of these hormones on the male genital disks of *B. mori* cultured *in vitro* and further analyzed the cell signaling pathways mediating hormone actions. We revealed that 20E induces the elongation of genital disks, that both hormones stimulate protein synthesis in an additive manner, and that BIGFLP and 20E exert their effects through the insulin/IGF signaling pathway and MAPK pathway, respectively. These results show that the growth and development of the genital disk are coordinately regulated by both BIGFLP and 20E. The analyses using a BIGFLP-deficient mutant produced by CRISPR-Cas9 system showed that BIGFLP plays a critical role in the growth control of ovaries.

研究分野：昆虫内分泌学

キーワード：昆虫 成虫原基 エクジステロイド IGF様ペプチド 細胞内シグナル伝達 成長 カイコガ

1. 研究開始当初の背景

昆虫の発育を特徴づける脱皮・変態は、前胸腺が分泌する脱皮ホルモン(エクジステロイド;通称エクジソン)により誘導される。エクジソンは毎回の脱皮前に分泌されて脱皮関連遺伝子群の発現を誘導する一方、蛹期には大量に分泌されて幼虫組織の崩壊と成虫組織の成長発達を調節すると考えられている。こうしたエクジソン作用の分子機構の研究はこれまで主にショウジョウバエを材料として精力的になされてきており、特に、蛹化脱皮を導くエクジソン応答遺伝子群については既に膨大な知見が蓄積している。これに対し、蛹化後に大量分泌されるエクジソンの作用についての研究は、ほとんどが幼虫組織の崩壊誘導に関するもので、変態の最も重要部分である成虫器官の成長発達に関する研究と知見は非常に限られていた。

10年近く前、報告者らはカイコガの蛹血液から新規のインスリン族ペプチドを精製・構造決定することに成功し、それが、1)単鎖構造をもつこと、2)蛹脂肪体で大量に産生されること、3)合成分泌がエクジソンにより誘導されること、4)成虫原基組織の成長を促進することなどを明らかにした。これらの構造的・生理学的特徴は脊椎動物のインスリン様成長因子(IGF)に類似することから、我々は同ペプチドを *Bombyx* IGF-like peptide (BIGFLP)と命名した。BIGFLPがエクジソンの支配下で分泌され成虫原基の成長を促進することは、このペプチドがエクジソンによる成虫器官の発達調節のしくみの重要な一部を担っていることを強く示唆する。そこで我々は、成虫原基に対するエクジソンとBIGFLPの作用とその関連を詳細に解析すれば、蛹期における成虫器官の発達調節のしくみを解明できると考え、この研究を計画するに至った。

2. 研究の目的

幼虫期間には未分化状態で維持されてきた成虫原基は変態期(前蛹・蛹期)に急速に成長発達して成虫の体を作る。成虫原基を構成する細胞群の発生運命はすでに幼虫期に決定しているが、原基を急速に成長発達させるのはホルモンの働きであ

る。本研究ではカイコガの蛹初期に急速に成長発達する生殖器原基(雄では生殖付属腺、精囊、射精管などを形成する)に焦点を当て、ホルモンがどのようなしくみで原基の成長発達を誘導するのかを明らかにする。

3. 研究の方法

(1)蛹化直前のカイコガから生殖器原基を抽出して数日間培養し、20-ヒドロキシエクジソン(活性型エクジソン;以後20Eと略)とBIGFLPの単独投与が原基の成長に及ぼす効果を明らかにする。研究を通して主に雄を使用する。原基の成長の指標として、長軸の長さ、タンパク質量、細胞周期のS期とM期にある細胞の数を測定する。予備的実験において、20Eは主に伸長促進効果が強く、BIGFLPはタンパク質合成促進作用が強いとの結果が得られている。両ホルモンの濃度を変化させ、効果の濃度依存性と有効濃度の閾値を明らかにする。さらに、両者を組み合わせて投与した時の複合的効果についても調べる。

(2)両ホルモンの作用の質的な違いは、シグナル伝達経路の違いを反映すると考えられることから、予想されるシグナル伝達経路の特異的阻害剤をホルモンと組み合わせて投与し、成長促進に対する阻害効果を調べる。阻害効果がある場合には、予想した経路の関与が強く示唆される。予備的実験において、BIGFLPの作用はインスリン/IGFシグナル伝達経路(IIS経路)を、20Eの作用はMAPK経路を介することが示唆されている。

IIS経路もMAPK経路もリン酸化カスケードで構成されることから、経路を構成するタンパク質のリン酸化レベルのホルモン依存的変化を調べることにより(ウエスタン解析による)その経路の関与を確認する。抗リン酸化タンパク質抗体は市販のものが利用できる。

(3)20EとBIGFLPに应答する細胞はそれぞれのシグナル伝達経路の下流に位置するリン酸化ERK(活性型MAPK)とリン酸化Akt(活性型Akt)の存在により同定することができる。それぞれに対

する抗体を使って、その原基内での局在を明らかにする。また、ホルモン投与により BrdU の取り込み(S 期の細胞の指標)が促進される部位とヒストン H3 のリン酸化(M 期細胞の指標)が促進される部位を、抗 BrdU 抗体と抗リン酸化ヒストン H3 抗体を使って同定する。

(4) 20E は核内受容体である EcR と結合して遺伝子発現調節をすると一般に考えられており、MAPK 経路との直接的な接点は知られていない。最近、ステロイドホルモンが核内受容体ではなく細胞膜受容体を介して作用する例が広く知られるようになった。20E の作用についても膜受容体(DopEcR, EcGPCR など)の関与を示す例が報告されていることから、そうした受容体の関与について検討する。

(5) BIGFLP の生理機能解析はこれまで専ら *in vitro* 実験によりなされてきた。カイコガでは遺伝子操作が困難であることがその主な理由である。しかし、最近開発された CRISPR/Cas9 法による遺伝子破壊は成功例が報告されつつあり有望である。同法により BIGFLP 欠失変異体を作成し、表現型を解析する。さらに BIGFLP 注射によるレスキュー実験を行い、変異体の表現型が回復することを確かめる。また、BIGFLP 遺伝子は脂肪体だけでなく生殖巣などでも発現するため、BIGFLP にはパラクリン作用がある可能性が考えられる。この可能性についても検討する。

4. 研究成果

(1) 20E と BIGFLP の生理的濃度の測定

In vitro 組織培養実験で使用するホルモンの濃度は生体内での濃度に設定する必要がある。カイコガの血中エクジステロイド濃度はすでに各種イムノアッセイによってなされているが、使用抗体は 20E とエクジソンを識別せず、他のエクジステロイド代謝物とも交差反応するため、個々のエクジステロイドの濃度は不明である。そこで、LS-MS/MS 解析による正確な定量を試みた。その結果、蛹化後には先ずエクジソンの濃度が上昇し、約 2

日後に 20E の濃度が上昇すること、雄での 20E のピーク濃度は約 600 ng/ml でありイムノアッセイでの測定値よりも大幅に低いことなどがわかった。血中 BIGFLP 濃度も蛹初期において測定されているが、蛹期を通しての測定はなされていない。そこで今回改めて時間分解免疫測定法による測定を行った。その結果、蛹化後 1 日から蛹終期まで比較的高濃度に存在し、特に雌においては雄の数倍の濃度であることがわかった。こうした結果を踏まえ、組織培養時のホルモンの濃度を決定した。

(2) 20E と BIGFLP が雄性生殖器原基の成長に及ぼす効果

生殖器原基の成長に及ぼすホルモンの効果を、組織サイズの増加と組織タンパク質量の増加を指標として解析した。BIGFLP の添加は原基サイズを全体的に増加させたが、形態の変形には影響を与えなかった。一方、20E の添加は原基(とりわけ予定射精管と予定付属腺)の著しい伸長を誘導した。BIGFLP は組織タンパク質量を濃度依存的に増加させ、20E の添加はタンパク質量のさらなる増加をもたらした。しかし、タンパク質合成に及ぼす両ホルモンの効果は相乗的ではなく加算的であった(Two-way ANOVA による解析)。

(3) ホルモンの効果に及ぼすシグナル伝達阻害剤の影響

両ホルモンの作用に関わる細胞内シグナル伝達経路を解明する目的で、シグナル伝達阻害剤をホルモンと同時に培地中に添加し、その効果を解析した。一般にインスリン/IGF の成長促進作用のシグナル伝達においては PI3K を経由する IIS 経路の関与が知られている。そこでまず、PI3K 阻害剤である LY294002 の効果を調べた。同阻害剤は BIGFLP による原基サイズの増加とタンパク質量の増加の両方を阻害した。一方、20E による原基の伸長とタンパク質量の増加には影響しなかった。これらの結果は、BIGFLP の原基に及ぼす成長促進作用は IIS 経路を介しているが、20E によるタンパク質増加作用は別の経路を介していることを示唆した。

20E の作用は一般的には核内受容体を介して発現すると考えられている。しかし、20E の成長促進作用に核内受容体が関与するとの報告はない。観察された作用には別の経路が関与するかもしれないと考え、組織の成長・分化に広く関わっている MAPK 経路の関与の可能性を検討した。同経路の阻害剤である U0126 を培地に添加すると、20E による原基の伸長とタンパク質増加の両方が濃度依存的に阻害された。一方、U0126 は BIGFLP による成長促進作用に全く影響を与えなかった。この結果より、20E による原基の成長促進作用には MAPK 経路が関与することが強く示唆された。

(4) BIGFLP と 20E による IIS 経路と MAPK 経路の活性化

阻害剤実験により、BIGFLP は IIS 経路を、20E は MAPK 経路を活性化して原基の成長を促進することが示唆された。これを確認するため、両ホルモンがそれぞれの経路を実際に活性化できるかどうかを調べた。IIS 経路の活性化は同経路の構成要素である AKT のリン酸化で判定できる。BIGFLP を培地に添加すると、5 分後に原基中の AKT のリン酸化が認められ、20 分後にはピークに達した。このリン酸化は LY29400 の添加により阻害された。

一方、20E は MAPK 経路の構成要素である ERK のリン酸化を促進した。ERK のリン酸化は 20E 添加後 15 分以内でわずかに起き、その後強化されたが安定化するまでには 24 時間を要した。培地への U0126 の添加は 20E 添加後 24 時間の ERK リン酸化を阻害しただけでなく、ホルモン非依存的リン酸化も減少させた。

阻害剤実験の結果から予想されるように、BIGFLP は ERK のリン酸化を促進せず、20E は AKT のリン酸化を促進しなかった。このことは、BIGFLP と 20E が共にタンパク質合成を促進するが、そのメカニズムは異なることを示している。

(5) BIGFLP と 20E のシグナル伝達経路のクロストークの可能性の検証

BIGFLP と 20E のタンパク質合成促進作用に関わ

るシグナル伝達経路は異なることが示されたが、各経路の上流が異なっても下流においてクロストークがある可能性はある。MAP 経路の下流が IIS 経路下流の TOR 経路に合流する例も報告されていることから、両ホルモンの作用には共通して TOR 経路が関わる可能性を考え、TOR 経路の阻害剤であるラパマイシンを使って検証した。ラパマイシンは BIGFLP による原基サイズの増加とタンパク質量の増加を阻害したが、20E による原基の伸長とタンパク質量の増加を阻害しなかった。このことから、BIGFLP のシグナル伝達 (IIS 経路) の下流には TOR 経路があり、20E のシグナル伝達 (MAP 経路) の下流には TOR 経路はないことがわかった。BIGFLP は TOR 経路の構成要素である 4EBP-1 のリン酸化を促進した。このリン酸化は BIGFLP 添加 20 分後から検出され 1 時間後にピークに達した。20E も 4EBP-1 のリン酸化を弱く促進したが、リン酸化のピークは 20E 添加後 6 時間であった。20E によるリン酸化 4EBP-1 の増加は 20E が 4EBP-1 タンパク質を増加させた結果である可能性がある。

(6) ホルモン刺激後のリン酸化 AKT とリン酸化 ERK の原基内での局在

両ホルモンが生殖器原基のどの部位に作用するのかを特定するため、ホルモン刺激後のリン酸化 AKT とリン酸化 ERK の局在を、それぞれに対する抗体を使った免疫組織化学により調べた。BIGFLP 処理から 20 分後、リン酸化 AKT は原基全体で増加した。一方、20E 処理後 48 時間において、リン酸化 ERK は予定外部生殖器および予定内部生殖器 (貯精囊・射精管・付属腺) で増加した。これらの結果は、BIGFLP は IIS 経路の活性化を通して原基の全領域の成長を促進すること、20E による MAPK 経路の活性化は内部生殖器の伸長と外部生殖器の形態形成の両方に必要であることを示唆する。

(7) BIGFLP と 20E が細胞周期に及ぼす影響

細胞増殖に及ぼす両ホルモンの効果を調べるため、ホルモン添加後の原基細胞の中で S 期と M 期にある細胞の数を、それぞれ BrdU の取り込みとヒ

ストン H3 のリン酸化を指標として調べた。その結果、両ホルモンは共に、予定外部生殖器・予定射精管・予定付属腺において S 期の細胞を増加させた。一方、20E のみが M 期の細胞数を増加させた。したがって、20E は細胞増殖を促進するが、BIGFLP は DNA 合成のみを促進すると考えられる。BIGFLP による BrdU 取り込み促進効果は 20E に比べ弱いことから、BIGFLP のこの作用は、タンパク質合成促進による間接的な効果なのかもしれない。興味深いことに、MAPK 経路阻害剤の U0126 は 20E による M 期細胞数の増加を阻害しなかった。このことは、20E の細胞増殖促進作用には、同ホルモンのタンパク質増加作用や組織伸長作用のシグナル伝達経路とは別の経路が関わっていることを示す。

(8) 細胞膜に存在する 20E 受容体の探索

20E は MAPK 経路を短時間で活性化することから、この作用に関与する 20E 受容体は核内受容体の EcR ではなく、細胞膜上に存在する受容体であると考えられる。これまでに 20E の膜受容体として報告されているものは、ショウジョウバエで発見された DopEcR (ドーパミンにも応答する) とガの一種で見つかった未同定の GPCR タイプの受容体 (ErGPCR) である。そこで、これらの受容体の関与を検討した。DopEcR 遺伝子のホモログはカイコゲノム中に存在したが、定量 RT-PCR を使って生殖腺原基での発現量を調べたところ、ほとんど検出されなかった。また、ドーパミンは ERK のリン酸化を促進しなかった (MAPK 経路を活性化しなかった)。ErGPCR の関与の可能性については、その特徴である USP のリン酸化を介したエクジソン応答遺伝子 E75A の発現が AKT 阻害剤 U0126 により阻害されるかどうかで検証した。結果はネガティブであった。したがって、これら二つの受容体は関与していないと考えられた。しかし、GPCR の阻害剤である suramin が 20E による原基の伸長とタンパク質合成促進を阻害したことから、未知の GPCR が 20E 受容体として働いている可能性がある。もう一つの可能性として、細胞膜に結合した EcR が 20E のノンゲノミック作用を仲介することが考えられ

た。それは、脊椎動物のステロイドホルモン受容体 (核内受容体) がそのような働きをする例が知られているからである。抗 EcR 抗体を使って EcR の細胞内局在を調べたところ、細胞膜画分からも EcR が検出されたため、現在この可能性も検討中である。

(9) ゲノム編集による BIGFLP 欠失変異体の作出と表現型の解析

BIGFLP の生理機能を *in vivo* で解析する目的で、CRISPR/Cas9 法を使って BIGFLP 遺伝子欠損変異体を作成した。変異体の体重変化を調べたところ、雌雄共に終令中期以降に有意な減少が認められた。雄では野生型との差が小さかったが (10 数%)、雌では 20-30% の減少であった。変異体の成虫器官のサイズを、前翅の面積、前脚の長さ、触覚の長さについて計測し、野生型と比較したところ一定レベルの減少が見られ、その程度は雄の体重の減少率とほぼ同じであった。一方、変異体の卵巣の重量は野生型に比べ劇的に減少し、減少率は約 40% であった。また、変異体の産卵数は野生型の約半分であった。このことから、BIGFLP は成虫組織の成長を促進すること、とりわけ卵巣の発達には極めて重要な役割を果たすことが明らかとなった。

(10) BIGFLP 欠失がボンピキシン分泌の増加により補償される可能性の検討

BIGFLP 欠失変異体では体重と各種器官のサイズの減少が見られたが、卵巣発達の著しい低下を除き、その効果は予想よりも小さかった。その原因が脳由来のインスリン様ペプチド (ボンピキシン) の補償的分泌増加による可能性を調べるため、変異個体の脳除去実験を行った。しかし、その効果はほとんど認められなかった。したがって BIGFLP 欠失変異体においてボンピキシン分泌が亢進している可能性は低いと考えられた。しかし、脂肪体などの末梢組織で発現するインスリン様ペプチド遺伝子は BIGFLP 以外にもあることから、今後はこれらの発現レベルの変化を調べる必要もある。

(11) 卵巣産生 BIGFLP のパラクリン作用の検証
BIGFLP は蛹脂肪体だけでなく卵巣でも作られる。
したがって、卵巣発達に及ぼす BIGFLP の効果は卵
巣自身が作る BIGFLP のパラクリン作用による可
能性が考えられた。BIGFLP 欠失変異体での卵巣発
達の著しい低下の原因が、脂肪体由来の BIGFLP の
欠失によるものか、あるいは卵巣産生 BIGFLP の欠
失によるものかを明らかにするため、変異体と野
生型の個体間で卵巣の相互移植実験を行なった。
野生型の卵巣を変異体に移植すると、卵巣重量は
変異体と同程度となり、一方、変異体の卵巣を野
生型に移植すると、卵巣重量は野生型と同程度と
なった。この結果より、卵巣発達に必要な BIGFLP
は主に脂肪体に由来することがわかった。

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8件)

Fujinaga, D., Kohmura, U., Okamoto, N.,
Kataoka, H., Mizoguchi, A. (2017) Insulin-like
growth factor (IGF)-like peptide and
20-hydroxyecdysone regulate the growth and
development of the male genital disk through
different mechanisms in the silkworm, *Bombyx
mori*. *Insect Biochemistry and Molecular
Biology* 87, 35-44. 査読有

Yamada, N., Mizoguchi, A. (2017) Endocrine
changes during diapause development in the
cabbage army moth *Mamestra brassicae*.
Physiological Entomology 42, 239-245. DOI:
10.1111/phen.12189. 査読有

Yamada, N., Kataoka, H., Mizoguchi, A.
(2017) Myosuppressin is involved in the
regulation of pupal diapause in the cabbage army
moth *Mamestra brassicae*. *Scientific Reports* 7,
41651. DOI:10.1038/srep41651. 査読有

Yamada, N., Okamoto, N., Kataoka, H.,

Mizoguchi, A. (2016) Endocrine mechanisms
regulating post-diapause development in the
cabbage armyworm, *Mamestra brassicae*. *PLoS One*
11, e0146619. Doi:10.1371/journal.pone.0146619.
査読有

[学会発表](計4件)

藤永大輝、八木克将、塩見邦博、片岡宏誌、溝
口明「カイコガ IGF 様ペプチド遺伝子欠損変異体
の解析」日本蚕糸学会第 88 回大会, 2018.

Daiki Fujinaga, Hiroshi Kataoka and Akira
Mizoguchi "IGF-like peptide and 20-hydroxy
-ecdysone regulate the development of the
genital imaginal disk during pupal-adult
development in the silkworm, *Bombyx mori*." The
3rd International Insect Hormone Workshop,
2017.

藤永大輝、片岡宏誌、溝口明「カイコガ雄性生
殖器原基の発達におけるホルモン調節機構」日本
農芸化学会 2017 年度京都大会, 2017.

藤永大輝、溝口明「カイコガ生殖器原基の成長
発達のホルモン調節機構」日本動物学会第 86 回大
会, 2015.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

溝口 明 (Mizoguchi Akira)
愛知学院大学・教養部・教授
研究者番号: 60183109

(2) 研究分担者

八木 克将 (Yagi Yoshimasa)
名古屋大学・理学研究科・助教
研究者番号: 10372525

塩見 邦博 (Shiomi Kunihiro)
信州大学・繊維学部・准教授
研究者番号: 70324241

(3) 研究協力者

藤永 大輝 (Fujinaga Daiki)
東京大学・新領域創成科学研究科・
大学院生