

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 2 年 4 月 2 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17H03943

研究課題名(和文) 蛹化・成虫化を司る発生プログラムの分子解剖

研究課題名(英文) Molecular characterization of key genes for insect metamorphosis

研究代表者

大門 高明(Daimon, Takaaki)

京都大学・農学研究科・教授

研究者番号：70451846

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,100,000円

研究成果の概要(和文)：本課題では、蛹変態・成虫変態の発生プログラムの分子機構を明らかにすることを目的として、カイコにおける蛹化・成虫化のマスター遺伝子の機能を解明するとともに、それらが幼若ホルモンによってどのように制御されているのか、の解明に取り組んだ。本課題によって、幼若ホルモンがKr-h1転写因子を誘導すること、Kr-h1が蛹化マスター遺伝子broadおよび成虫化マスター遺伝子E93をそれぞれ抑制することが示された。さらに、ノックアウト解析等によって、これらの遺伝子群の生体内での役割が明確に明らかにされた。本課題の成果は、昆虫の変態の遺伝子基盤の解明に大きく貢献するものと考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

昆虫がどのように変態というユニークな生活史を獲得したのか、そして蛹変態・成虫変態に特有の形質発現はどのようにコントロールされているのか、という問いに答えることは、地球の生態系の維持に欠かすことのできない昆虫の成功の秘訣を解き明かすことに他ならない。さらに、本研究で注目する幼若ホルモンは、相変異・カースト分化・休眠性・行動の調節にもco-optされており、本研究の成果は、進化学・発生学・生態学分野へ大きなインパクトをもたらすと期待される。さらに、農学分野ではbiorationalな害虫防除剤の開発へ向けて、基盤となる知識を提供するものと期待される。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study is to investigate the roles and regulatory mechanisms of key genes for insect metamorphosis. By using the silkworm (*Bombyx mori*) as a experimental model, we revealed the roles of Kr-h1, a transcription factor that mediates anti-metamorphic action of juvenile hormones (JHs), broad, a transcription factor that acts as a pupal specifier, and E93, a transcription factor that triggers adult morphogenesis. Our experiments using knockout silkworms also demonstrated the molecular mechanisms of genetic interaction of these transcription factors. We further showed that how the number of larval molts are determined in the silkworm. Collectively, our results will lead to a better understanding of physiological and endocrinological control of insect metamorphosis.

研究分野：昆虫生理学

キーワード：カイコ 変態 幼若ホルモン 蛹 成虫 発生 進化 ゲノム編集

1. 研究開始当初の背景

昆虫は地球上で最も繁栄しているグループの1つであり、生存のために多彩な生理・生態を発達させてきた。最も顕著な現象の1つが、完全変態昆虫における幼虫・蛹・成虫という発育ステージの分業化である。しかし、昆虫がなぜ、幼虫から蛹へ、さらに蛹から成虫へと変態できるのか、その遺伝子基盤はほとんど明らかにされてこなかった。昆虫の変態は、幼若ホルモン (Juvenile Hormone; JH) によって抑制されることが古くから知られていたが、近年になって、幼若ホルモン受容体と、幼虫・蛹・成虫のマスター遺伝子 (それぞれ *Kr-h1*, *broad*, *E93*; 全て転写因子) が単離されたことで、昆虫の内分泌学・発生学は新たなステージに入ったと言える。幼虫・蛹・成虫に固有の発生プログラムを生み出す機構と、そのプログラムをスイッチングする機構について、JH とマスター遺伝子を足がかりにして切り込むことができるようになったのである。

2. 研究の目的

本課題では、幼虫・蛹・成虫の形質発現を支配すると考えられる3つの変態マスター遺伝子 (*Kr-h1*, *broad*, *E93*) に着目し、カイコのゲノム編集技術を駆使してその機能を解明するとともに、これらの遺伝子がどのように幼若ホルモンによって制御され、そしてこれらの遺伝子がどのようにクロストークするのかを明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

3-1. 遺伝子ノックアウト解析

本研究ではまず、TALEN を用いて *Kr-h1*, *broad*, *E93* 遺伝子のノックアウトカイコ系統を樹立し、その表現型解析を行った。

3-2. モザイク解析

樹立したノックアウト系統と、カイコの遺伝的モザイク系統 (モザイク遺伝子 *mo* をもつ系統) とを交配し、次世代以降で *mo* をホモに固定し、さらにターゲット遺伝子をホモまたはヘテロでもつようにして系統を樹立・維持した。また、*in vivo* electroporation 法による簡便な遺伝子機能解析系を利用するために、CRISPR/Cas9 ベクターを若齢幼虫に注射し、その後エレクトロポレーションをする、という方法を構築した。

3-3. 過剰発現実験

piggyBac ベクターを用いて、*broad* の4つのアイソフォームそれぞれについて UAS-*broad* 系統 (組換えカイコ系統) を樹立した。樹立後、全身で GAL4 を発現する GAL4 ドライバー系統と交配し、GAL4 と UAS-*broad* 遺伝子を両方もつ個体において、表現型解析を行った。

3-4. 遺伝子発現解析

ノックアウト系統において脂肪体または真皮細胞における RT-qPCR 解析を常法に従って行った。

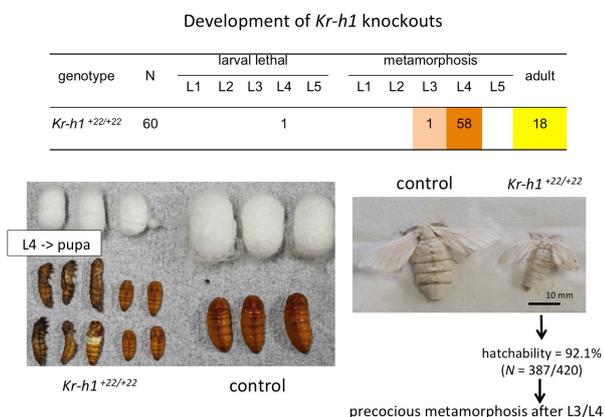
4. 研究成果

4-1. 遺伝子ノックアウト解析

TALEN を用いて *Kr-h1*, *broad*, *E93* の遺伝子ノックアウトカイコ系統を樹立した。それぞれの表現型は以下ようになった。

(*Kr-h1*)

Kr-h1 のノックアウトカイコ (ホモ個体) は半数近くが早熟変態によって蛹変態時に異常をきたして致死したが、残りの個体は早熟変態するものの、正常に蛹化、羽化した。正常に羽化した個体同士を交配して得られた卵からも孵化個体が得られたため、ホモ系統として維持することとした。ホモ化した系統における孵化率は 92.1% となり、標準系統と同等のものであったため、*Kr-h1* は胚発生において欠損可能であることが判明した。しか



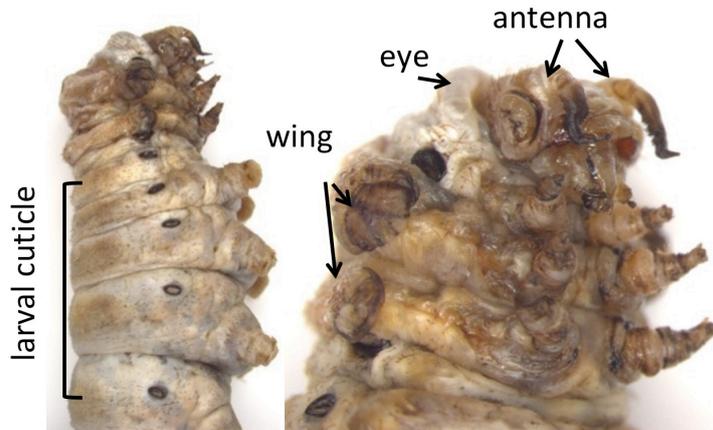
し、*Kr-h1* ノックアウト系統は、すべての個体が3歳または4歳で早熟変態を起こし、通常よりも顕著に小さい蛹・成虫となった。
この早熟変態という表現型は、幼若ホルモン欠損系統と良く似ており、*Kr-h1* が幼若ホルモンの下流に位置して現状維持作用を担う、という現在のモデルが強く支持される結果となった。

(*broad*)

broad のノックアウト個体は、ホモで致死したため、ノックアウトアリルはヘテロ維持することとした。

broad ノックアウト個体では、5歳（終齢）に到達するまでは正常のものと同様に成長に変化が見られなかった。しかし、終齢になると吐糸行動の開始が遅れ、正常に繭を作る個体はほとんどいなかった。*broad* ノックアウト個体は最終的に斃死するが、その際、興味深い表現型が観察された（右図）。アポリシスによって剥離したクチクラをピンセットで剥いて観察したところ、*general* な真皮細胞のつくったクチクラは幼虫のままであった。しかし、成虫原基（翅・複眼・触角）は不完全な蛹変態を遂げており、一部の成虫原基（複眼）については、蛹を飛び越して成虫へとオーバーシュートしていた（SEMにより表面微細構造を確認）。

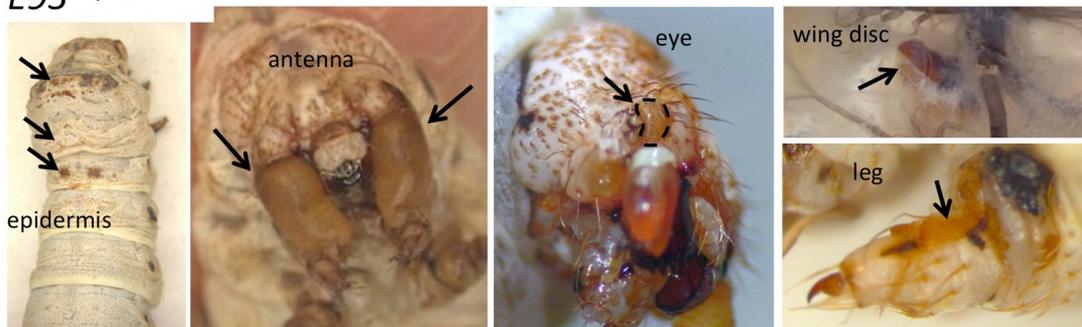
この事実は、少なくとも真皮細胞においては *broad* は蛹変態に必須の転写因子であること、しかし、成虫原基においては、*broad* の非存在下においても変態のための形態形成が部分的に進行してしまうことを示唆している。



(*E93*)

E93 のノックアウト個体はホモで致死したため、ノックアウトアリルはヘテロ維持することとした。*E93* は *adult specifier* である、と提案されていたため、ノックアウト個体は正常に蛹化し、成虫化の際に異常が生じると予想していた。しかし興味深いことに、*E93* ノックアウト個体は、5歳まで正常に成長し、ほとんどの個体は6歳幼虫へと過剰脱皮した。過剰脱皮した *E93* ノックアウト個体を詳細に観察すると、皮膚のごく一部が蛹化する（下図最左）、触角・複眼・翅原基・脚原基が蛹化する（下図）、という現象が観察された。この事実は、*E93* には、*adult specifier* であるという細胞自律的な機能に加えて、システム的な役割を持つ可能性を示唆する。*E93* ノックアウト個体の表現型は、幼若ホルモンの投与によって人為的に6歳に過剰脱皮させた幼虫の表現型と酷似している。したがって、1つの可能性として、*E93* はアラタ体における幼若ホルモン合成を負に制御する、ということが考えられる。これは今後の重要な研究課題である。

E93 -4/-4



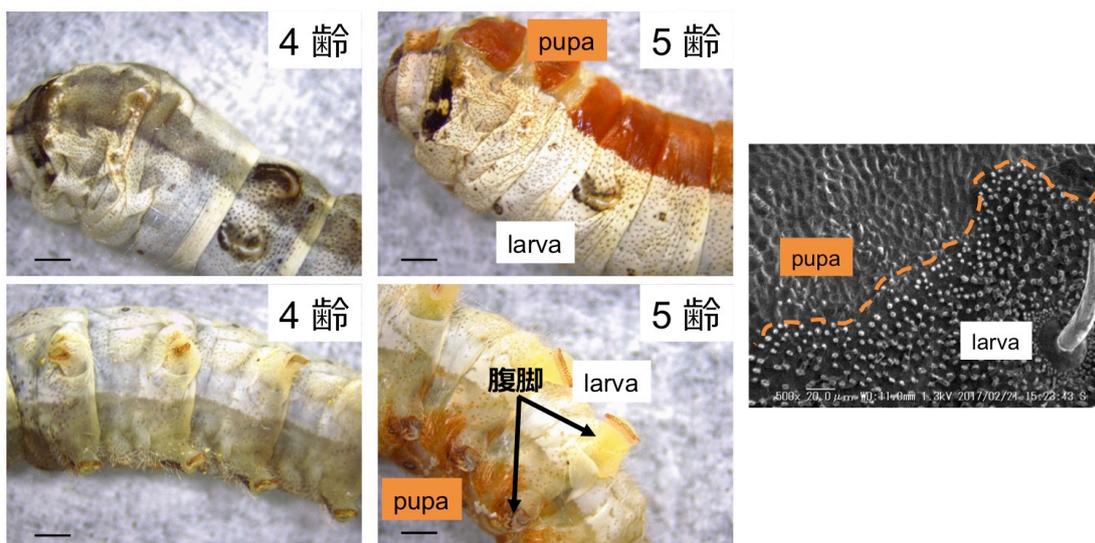
4-2. モザイク解析

カイコの遺伝的モザイクシステムを利用して、*Kr-h1*, *broad*, *E93* のモザイク解析を行った。以下に、それぞれの遺伝子のモザイク表現型を述べる。

(*Kr-h1*)

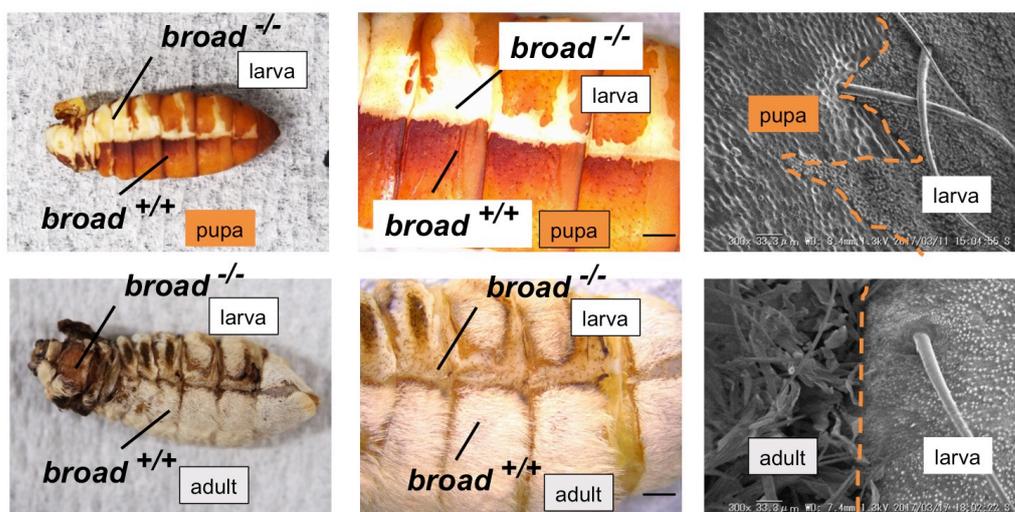
Kr-h1 モザイク個体では、4歳幼虫が5歳幼虫に脱皮する際に、*Kr-h1* の機能が失われた領域で早熟変態が起きた。すなわち、下の写真の個体の場合、右半身だけが蛹に早熟変態した結果、

half-larva half-pupa という半身モザイクとなった。SEM でクチクラの表面微細構造を観察すると、幼虫と蛹のクチクラは明瞭な境界をもって接していた。以上の結果は、*Kr-h1* は細胞自律的に変態を抑制することを強く示唆している。



(*broad*)

broad モザイク個体では、蛹化の直前まで異常が観察されなかった。しかし、蛹化した個体を観察すると、体の一部が幼虫のままにとどまる、という表現型が観察された（つまり、幼虫と蛹のモザイク）。多くの個体が蛹期に致死したが、下図で示した個体は、成虫に到達した。この個体では、幼虫のままにとどまっていた皮膚の領域が、そのまま幼虫にとどまる、という驚くべき表現型が観察された（つまり、幼虫と成虫のモザイク）。この事実は、ノックアウト解析で観察されたように、*broad* は general epidermis において蛹化に必須であるということ強く裏付けている。さらに、general epidermis では、蛹を経ないと成虫になれない、という可能性も示唆している。成虫原基では adult overshoot が許されている一方で、general epidermis はそうではない。その理由は不明であるが、コミットメントのタイミングが両者で全く異なることを考えると、成虫原基と general epidermis では、コミットメントのプロセスが大きく異なることが想像できる。



(*E93*)

Kr-h1, *broad* と同様の手法でモザイク解析を試みたが、*E93* についてはモザイク表現型が 1 例も観察されなかった。このことも、*E93* がシステミックな役割をもつことを裏付けているように考えられる。

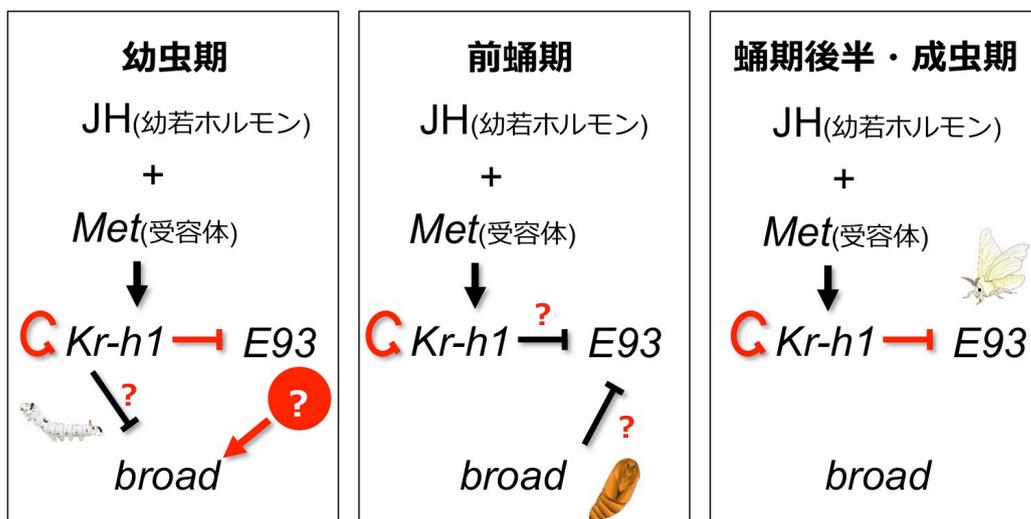
4-3. 過剰発現解析

蛹変態のマスター遺伝子である *broad* の機能をさらに追求するために、*broad* のアイソフォー

ムごとに overexpression し、その表現型を観察した。供試した *broad* のアイソフォームは、*broad-Z1*, *broad-Z2*, *broad-Z4* の3種類である。それぞれについて UAS トランスジェニック系統を樹立し、全身で GAL4 を発現する GAL4 ドライバー系統と交配した (193-2 系統)。その結果、*broad-Z1* 過剰発現個体は正常に発育すること、*broad-Z2* 過剰発現個体 (幼虫) は顕著な発育遅延を示し、最終的に幼虫期で致死すること、*broad-Z4* 過剰発現個体は胚子期に致死することが明らかになり、*broad* の機能はアイソフォームごとに大きく異なることが強く示唆された。当初期待した表現型は、*broad* の過剰発現によって人為的に蛹化を (部分的にでも) 引き起こすことができるか? (= *broad* の発現が蛹変態の十分条件であるか)、であった。しかし、致死した個体をよく観察しても、蛹化の痕跡を見つけることができなかった。*broad* を過剰発現しても、体内に幼若ホルモンがあると蛹コミットメントが進行しないのかもしれない。この可能性を検証するために、今後、幼若ホルモンを欠損させたバックグラウンドで同様の *broad* 過剰発現実験を行う必要がある。

4-4. 遺伝子発現解析

Kr-h1 ノックアウト系統における *broad*, *E93* の発現動態を、qRT-PCR によって調査した。その結果、*Kr-h1* は自身を負に制御する、という結果が得られた。これまで、幼若ホルモンシグナル経路においてフィードバックが働くことは知られていなかったため (その存在は十分予想できるが)、意義のある発見であると考えられる。さらに、*Kr-h1* は幼虫期・成虫期において *E93* の転写を抑制することも見出した。さらに、従来は幼虫期において *Kr-h1* は *broad* を抑制すると考えられてきたが、*Kr-h1* の非存在下でも *broad* の転写レベルは全齢期を通じて変化しなかった。この事実は、従来の説を再考する必要があることを示唆している。特に、*broad* の発現誘導には、蛹化能力を付与する因子 (competence factor、未同定、下図の赤丸の中の「?」で示した) の存在が関わる可能性が提案されているため、今後の重要な研究課題となっている。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 5件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Ikeda Kento, Daimon Takaaki, Sezutsu Hideki, Udaka Hiroko, Numata Hideharu	4. 巻 34
2. 論文標題 Involvement of the Clock Gene period in the Circadian Rhythm of the Silkworm <i>Bombyx mori</i>	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Biological Rhythms	6. 最初と最後の頁 283 ~ 292
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1177/0748730419841185	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Masashi Tanaka, Takaaki Daimon	4. 巻 26
2. 論文標題 First molecular genetic evidence for automictic parthenogenesis in cockroaches	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Insect Science	6. 最初と最後の頁 649-655
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） https://doi.org/10.1111/1744-7917.12572	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Masashi Tanaka, Takaaki Daimon	4. 巻 53
2. 論文標題 Tissue localization of aggregation pheromones in the American cockroach, <i>Periplaneta americana</i> (Blattodea: Blattellidae)	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Applied Entomology and Zoology	6. 最初と最後の頁 447-452
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） https://doi.org/10.1007/s13355-018-0573-9	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Inui Tomohiro, Daimon Takaaki	4. 巻 100
2. 論文標題 Implantation assays using the integument of early stage <i>Bombyx</i> larvae: Insights into the mechanisms underlying the acquisition of competence for metamorphosis	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Journal of Insect Physiology	6. 最初と最後の頁 35 ~ 42
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jinsphys.2017.05.002	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Uchibori-Asano Miwa, Kayukawa Takumi, Sezutsu Hideki, Shinoda Tetsuro, Daimon Takaaki	4. 巻 87
2. 論文標題 Severe developmental timing defects in the prothoracicotropic hormone (PTTH)-deficient silkworm, <i>Bombyx mori</i>	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Insect Biochemistry and Molecular Biology	6. 最初と最後の頁 14~25
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ibmb.2017.06.007	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 大門高明	4. 巻 1
2. 論文標題 ゲノム編集と昆虫の変態制御	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 アグリバイオ	6. 最初と最後の頁 34-38
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計25件 (うち招待講演 2件 / うち国際学会 5件)

1. 発表者名 大門高明
2. 発表標題 人とカイコの関わり、その歴史と未来
3. 学会等名 第64回日本応用動物昆虫学会大会公開シンポジウム (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 白井雄、大出高広、大門高明
2. 発表標題 Targeted gene disruption by receptor-mediated ovary transduction (ReMOT) in the red flour beetle, <i>Tribolium castaneum</i>
3. 学会等名 第64回日本応用動物昆虫学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 乾智洋、山下大志、粥川琢巳、大門高明
2. 発表標題 プロモーターに着目した蛹変態の鍵遺伝子Broad-Complexのカイコにおける発現解析
3. 学会等名 第64回日本応用動物昆虫学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 大門高明、山本学
2. 発表標題 Moltinismによるカイコの幼虫脱皮回数制御機構
3. 学会等名 第64回日本応用動物昆虫学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 白井雄、大出高広、大門高明
2. 発表標題 ReMOT法によるコクヌストモドキのゲノム編集
3. 学会等名 令和2年度蚕糸・昆虫機能利用学術講演会 日本蚕糸学会第90回大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 大門高明
2. 発表標題 カイコの眠性遺伝子Mはどのようにして脱皮回数を決定するのか？
3. 学会等名 令和2年度蚕糸・昆虫機能利用学術講演会 日本蚕糸学会第90回大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 白井雄、大出高広、大門高明
2. 発表標題 昆虫卵移行ペプチドを用いた新規のゲノム編集法確立への試み
3. 学会等名 日本遺伝学会第91回大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Takaaki Daimon, Gaku Yamamoto, Takashi Koyama, Christen Mirth, Tetsuro Shinoda
2. 発表標題 A Hox gene Sex combs reduced controls the number of larval molts in the silkworm, Bombyx mori
3. 学会等名 The 4th International Insect Hormone Workshop (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Tomohiro Inui, Hideki Sezutsu, Takahiro Ohde, Takaaki Daimon
2. 発表標題 MicroRNA let-7 regulates pupal metamorphosis in the silkworm, Bombyx mori
3. 学会等名 The 4th International Insect Hormone Workshop (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 白井雄、大出高広、大門高明
2. 発表標題 新規の昆虫卵移行ペプチドの開発
3. 学会等名 日本ゲノム編集学会第4回大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 乾智洋、瀬筒秀樹、大出高広、大門高明
2. 発表標題 マイクロRNA let-7はカイコ幼虫において蛹変態を制御する
3. 学会等名 第63回日本応用動物昆虫学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 峯村俊儀、大出高広、新美輝幸、塩月孝博、大門高明
2. 発表標題 無変態昆虫マダラシミにおける幼若ホルモン関連遺伝子群の発現解析
3. 学会等名 第63回日本応用動物昆虫学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 乾智洋、瀬筒秀樹、大出高広、大門高明
2. 発表標題 マイクロRNA let-7によるカイコ幼虫の蛹変態制御機構の解明
3. 学会等名 平成31年度蚕糸・昆虫機能利用学術講演会 日本蚕糸学会第89回大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Takaaki Daimon, Tomohiro Inui, Xavier Belles
2. 発表標題 Toward understanding the endocrine basis of contracted life cycles of "bizarre" beetles"
3. 学会等名 昆虫ポストゲノム研究会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Tomohiro Inui, Takaaki Daimon
2. 発表標題 Implantation assays using the integument of early instar Bombyx larvae provide insights into the mechanisms underlying the acquisition of competence for metamorphosis
3. 学会等名 The 3rd International Insect Hormone Workshop (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Takaaki Daimon, Taishi Yamashita, Tomohiro Inui, Miwa Uchibori-Asano, Tetsuro Shinoda
2. 発表標題 Knockout studies on key genes for metamorphosis in the silkworm, Bombyx mori
3. 学会等名 The 3rd International Insect Hormone Workshop (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Takaaki Daimon
2. 発表標題 Genetic Engineering of the domesticated silkworm, Bombyx mori
3. 学会等名 The 3rd KU-KUGSA Bilateral Symposium on Food, Environment and Life for Next Generation (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 大門高明
2. 発表標題 昆虫ゲノムとゲノム編集：昆虫科学が目指すもの
3. 学会等名 つくばテクノロジーショーケース2018 ミニシンポジウム (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 乾智洋、瀬筒秀樹、大出高弘、大門高明
2. 発表標題 ヘテロクロニック遺伝子let-7によるカイコの変態制御機構
3. 学会等名 平成30年度 蚕糸・昆虫機能利用学術講演会 日本蚕糸学会第88回大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 大山千春、大出高弘、瀬筒秀樹、大門高明
2. 発表標題 broad強制発現カイコから蛹化プロセスの遺伝子基盤を探る
3. 学会等名 平成30年度 蚕糸・昆虫機能利用学術講演会 日本蚕糸学会第88回大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 峯村俊儀、大出高弘、新美輝幸、塩月孝博、大門高明
2. 発表標題 無変態昆虫マダラシミの胚発生期では、幼若ホルモン関連遺伝子群はどのように発現しているのか
3. 学会等名 平成30年度 蚕糸・昆虫機能利用学術講演会 日本蚕糸学会第88回大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 山下大志、大出高弘、大門高明
2. 発表標題 カイコの変態抑制遺伝子Kr-h1の機能解析
3. 学会等名 第62回日本応用動物昆虫学会大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 乾智洋、瀬筒秀樹、大出高弘、大門高明
2. 発表標題 カイコにおけるヘテロクロニック遺伝子let-7の機能解析
3. 学会等名 第62回日本応用動物昆虫学会大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 山本学、大門高明
2. 発表標題 ホメオティック遺伝子Scrによるカイコの幼虫脱皮回数 of 制御機構
3. 学会等名 第62回日本応用動物昆虫学会大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 峯村俊儀、大出高弘、新美輝幸、塩月孝博、大門高明
2. 発表標題 マダラシミの胚発生期における幼若ホルモン関連遺伝子群の発現解析
3. 学会等名 第62回日本応用動物昆虫学会大会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------	---------------------------	-----------------------	----