

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2007～2010

課題番号：19380033

研究課題名（和文） 昆虫のホルモン応答及び変態に関するシスエレメント、トランス因子の解析

研究課題名（英文） Analysis of cis-element and trans-factors relating with responsiveness and metamorphosis of insect

研究代表者

川崎 秀樹 (KAWASAKI HIDEKI)

宇都宮大学・農学部・教授

研究者番号：00134263

研究成果の概要（和文）：エクダイソンパルスで誘導されるクチクラ蛋白質遺伝子上流域をクローニングし応答配列を明らかにした。また、遺伝子銃によるカイコの翅原基、翅組織への遺伝子の導入法を開発した。エクダイソンに直接誘導される遺伝子のプロモーター解析を行い、*BRC-Z2*、*EcRE* を始めて明らかにした。クチクラタンパク質遺伝子及び転写因子の組織発現特異性を調べ、皮膚の真皮細胞での発現には転写因子で発現特異性があることを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：We isolated upstream region of cuticle protein genes *BMWCP2* and *BMWCP5* and clarified the ecdysone responsive sequence. We constructed the method of the introduction of DNA into wing discs and wing tissues by a gene gun. We clarified that *BR-C Z2*, which is an early ecdysone responsive gene, bound and activated the promoter activity the *BMWCP10*. We found *EcRE* upstream of *BMWCP10* and showed the binding of *EcR* to *EcRE* by a gel electrophoresis mobility sift assay and a reporter assay. We found that the different transcription factors were expressed in different region of the epidermis.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	5,600,000	1,680,000	7,280,000
2008年度	3,700,000	1,110,000	4,810,000
2009年度	3,200,000	960,000	4,160,000
2010年度	2,800,000	840,000	3,640,000
年度			
総計	15,300,000	4,590,000	19,890,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農学・応用昆虫

キーワード：(1) カイコ (2) 翅原基 (3) クチクラ蛋白質遺伝子

(4) 遺伝子銃 (5) *FTZ-F1* (6) *BR-C* (7) エクダイソン (8) *EcRE*

1. 研究開始当初の背景

カイコの遺伝情報についてはカイコのESTのデータベース構築により多くの遺伝子の解析が可能になり、カイコのゲノム情報に関し

ては、かなりのものが得られるようになってきており、遺伝子の調節領域を含む配列のクローニングもかなりのものについて可能になってきている。クチクラタンパク質遺伝子は

いくつかの種でゲノム構造が調べられており、遺伝子の重複が認められている (Synder et al., 1982; Charles et al., 1997; Rondot et al., 1998)。さらに、近年数種の昆虫でゲノム配列が明らかになってきたことにより、遺伝子の上流域の解析も可能となっており、遺伝子発現調節領域の解析も始まってきている (Lemoine et al., 2004)。

クチクラタンパク質遺伝子は mRNA の発現量が多く、ホルモン応答性が顕著で、ホルモンによる発現調節機構を調べるには非常に優れた材料であると考えられる。

2. 研究の目的

エクダイソン応答性の異なるクチクラタンパク質遺伝子のうちエクダイソンパルスで誘導される遺伝子上流域をクローニングし、翅原基の培養系を用いてプロモーターアッセイの系を確立し、エクダイソンパルスに応答する配列を確認する。

翅原基の培養系を用いて、3種のエクダイソン応答配列について明らかにする。並行して、発現時期を決定するシスエレメント、トランス因子を追跡する。

プロモーターアッセイは培養細胞を用いて行われているが、器官レベルになると、適用する系の確立が難しく、現在までにそれほど行われていない。本研究ではプロモーターアッセイの系を確立し、今後様々な遺伝子の調節領域への応用を目指す。

3. 研究の方法

クチクラタンパク質遺伝子とその発現に関与する転写因子の関係を明らかにするために、多くのクチクラタンパク質遺伝子及び数種の転写因子の発現をリアルタイムPCR法で解析した。

遺伝子銃によるカイコの翅原基、翅組織への遺伝子の導入法を、器官の時期、培養条件について検討し、様々な条件で可能になるように行

った。5歳4日目と吐糸後2日目の器官を取り出して遺伝子銃で金粒子の付着した目的の配列を含んだプラスミドDNAの器官への導入を行った。

異なる発現様式を見せるクチクラタンパク質遺伝子上流域配列を調べ、エクダイソン応答性転写因子の結合部位と結合因子の追跡を行った。

4. 研究成果

(1) 遺伝子銃によるカイコの翅原基、翅組織への遺伝子の導入法を確立し、レポータープラスミドの上流にクチクラタンパク質遺伝子上流域の遺伝子調節領域を挿入し、レポーターアッセイにより、プロモーター活性を検定するシステムを構築した。

このシステムと、ゲルシフトアッセイを組み合わせて、クチクラタンパク質遺伝子のプロモーターの解析を行った。

(2) ゲノム情報をもとに、蛹化時に発現するタイプのクチクラタンパク質遺伝子上流域の遺伝子調節領域のプロモーター解析を行い、*BMWCP2* 及び *BMWCP5* のプロモーターが β FTZ-F1 が遺伝子上流に結合することで活性化することを明らかにし、クチクラタンパク質遺伝子が β FTZ-F1 のターゲットであることを証明するとともに、エクダイソンシグナリングがクチクラタンパク質遺伝子の発現を調節していることを明らかにできた。

(3) *BMWCP5* では、 β FTZ-F1 とともに、BR-C もプロモーター活性を高める作用があることを確認できた。

(4) エクダイソンに直接誘導される *BMWCP10* では遺伝子発現調節領域にエクダイソンレセプターが結合できる配列 EcRE が存在し、実際にレセプターが結合し遺伝子のプロモーターの活性化に働いていることを確かめられた。

(5) 胸部の皮膚では転写因子 β FTZ-F1 と上流に β FTZ-F1 の結合部位を持つ *BMWCP9* が発現するのに対し、腹部の皮膚では転写因子 E75 と上流に E75 の結合部位を持つ *BMWCP4* が発現することを明らかにした。

(6) 頭部では BR-C Z2 が主に働いてその結合部位を有するクチクラタンパク質遺伝子だけが発現することを明らかにした。

(7) 12種のソフトクチクラタンパク質の発現解析を行い、5齢初期に発現するもの、蛹化前に発現するもの、エクダイソンの上昇期に発現するもの等異なる発現時期を有することを明らかにし、これらがエクダイソン応答性についても異なる応答を行うことを突き止めた。

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 14 件)

1. Ecdysone directly and indirectly regulates a cuticle protein gene, *BMWCP10*, in the wing disc of *Bombyx mori*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* (2010). 40, 453-459. Wang, Moriyama, Iwanaga, Kawasaki.
2. Analysis of ecdysone-pulse responsive region of *BMWCP2* in wing disc of *Bombyx mori*. *Comp. Biochem. Physiol.* 153, 101-108. (2009). Nita, Wang, Zhong, Mita, Iwanaga, Kawasaki
3. Identification and functional characterization of the *Rad23* gene of the silkworm, *Bombyx mori*. *Bioscience report.*30, 19-26.2009. Xu, Xu, Wang, Kawasaki
4. Activation of *BMWCP10* promoter and regulation by BR-C Z2 in wing disc of *Bombyx mori*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* (2009). 39, 615-623. Wang, Iwanaga, Kawasaki
5. β FTZ-F1 and Broad-Complex positively regulate the transcription of the wing cuticle protein gene, *BMWCP5*, in wing discs of *Bombyx mori*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* (2009). 39, 624-633. Wang, Iwanaga, Kawasaki
6. Purification and expression analysis of imaginal disc growth factor in the silkworm, *Bombyx mori*. *J. Insect Physiol.* (2009). 55,1065-1071. Wang, Sakudoh, Kawasaki, Iwanaga, Araki, Fujimoto, Takada, Iwano, Tsuchida.
7. Establishment and characterization of the *Bombyx mandarina* cell line. *J. Invert. Pathol.* (2009). 101, 124-129. Iwanaga, Arai, Shibano, Kawasaki, Imanishi
8. 総説:カイコゲノム情報から導かれる遺伝子発現制御研究の始まり. 蚕糸・昆虫バイオテック、78, 121-124. 2009. 川崎.
9. The degradation of the basement membrane in the metamorphic organs during the larval-pupal transformation of *Bombyx mori*. *J. Insect Biotech. Seric.* (2008) 77, 133-139. Manickam, Iwanaga, Kawasaki.
10. The genome of a lepidopteran model insect, the silkworm *Bombyx mori*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* (2008). 38, 106-1045. Xia et al
11. Genome-wide identification of cuticular protein genes in the silkworm, *Bombyx mori*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* (2008).38,1165-1173. Futahashi, Okamoto, Kawasaki, Zhong, Iwanaga, Mita, Fujiwara.
12. 平成18年に養蚕農家で生じた不結繭蚕の原因追跡。大日本蚕糸会研究報告。(2008) 56, 15-21. 小川・代田・岩永・川崎.
13. 総説:特集:カイコのホルモン. カイコ

- の眠性変化から見た変態の内分泌基盤。蚕糸・昆虫バイオテック. 2008. 77, 117-123. 川崎.
14. Angiotensin-converting enzyme activity in the hemolymph during last larval and pupal stages of the silkworm, *Bombyx mori*. *J. Insect Biotech. Seric.* (2007) 76, 17-23. Yan, Iwanaga, Kawasaki.
[学会発表] (計 22 件)
1. 低濃度のエクダイソンに反応する初期応答遺伝子 E74B の解析. 王、森山、岩永、川崎. 日本蚕糸学会、2011.3.20-21 東京.
 2. カイコ終齢幼虫期の翅原基における細胞周期の内分泌制御機構の解明. 森山、大吉、長内、王、岩永、川崎. 日本蚕糸学会、2011.3.20-21 東京.
 3. 20-hydroxyecdysone and juvenile hormone analogue prevent precocious metamorphosis in recessive trimolter mutants of *Bombyx mori* via Krüppel-homolog 1 and Broad. Wang, Moriyama, Iwanaga, Kawasaki. 日本蚕糸学会、2011.3.20-21 東京.
 4. 低濃度のエクダイソンに反応する初期応答遺伝子. 王、森山実、岩永、川崎. 日本分子生物学会、2010.12.7-10 神戸.
 5. カイコ終齢幼虫における翅原基の細胞周期を制御する機構の解析. 森山、大吉、長内、王、岩永、川崎. 日本分子生物学会、2010.12.7-10 神戸.
 6. Analysis of regulation of the expression of cuticle protein genes expressed in wing discs of *Bombyx mori*. Wang, Nita, Moriyama, Iwanaga, Kawasaki. *Chec*, 2010, 7.19~7.22.
 7. カイコ翅原基でエクダイソンに誘導されるクチクラ蛋白質遺伝子 BMWCP10 のプロモーター解析. Wang, Iwanaga, Kawasaki. 日本蚕糸学会、2010.4.3-4.4.上田
 8. 5 齢期のカイコ翅原基にみられる 2 度の細胞分裂ピークの解析. 森山・大吉・長内・岩永・川崎. 日本蚕糸学会、2010.4.3-4.4.上田
 9. Activation of *BMWCP10* promoter and regulation by Ecdysone receptor and BR-C Z2 in wing disc of *Bombyx mori*. Wang, Iwanaga, Kawasaki. 日本分子生物学会 2009.12.9~12. 横浜.
 10. カイコの翅原基細胞でエクダイソンは細胞周期関連遺伝子の発現を調節している. 大吉・長内・岩永・川崎. 日本分子生物学会 2009.12.9~12. 横浜.
 11. カイコゲノム情報から導かれる遺伝子発現制御研究の始まり. 川崎. 日本蚕糸学会、関東支部会、2009.11.6-7. 宇都宮.
 12. Activation of *BMWCP10* promoter and regulation by BR-C Z2 in wing disc of *Bombyx mori*. Wang, Iwanaga, Kawasaki. 日本蚕糸学会、2009.3.21-22 東京農工大
 13. カイコにおける成虫原基成長因子の発現解析. 王・作道・川崎・荒木・岩野・岩永・藤本・高田・土田. 日本蚕糸学会、2009.3.21-22 東京農工大
 14. エクダイソンはカイコ翅原基で *E2F4* を抑制し、*cyclin E*・*E2F1* を活性化して細胞周期を進行させる. 大吉、長内、岩永、川崎. 日本蚕糸学会、2009.3.21-22 東京農工大
 15. β FTZ-F1 and Broad-Complex positively regulate the transcription of the wing cuticle protein gene, *BMWCP5*, in the wing disc of *Bombyx mori*. Wang, Nita, Iwanaga, Kawasaki. 日本分子生物学会.2008.12.9-12 神戸
 16. エクダイソンはカイコ翅原基で *E2F4* を

抑制し、*cyclin E*・*E2F1*を活性化して細胞周期を進行させる。大吉, 長内、岩永、川崎。日本分子生物学会。2008.12. 9-12 神戸

17. Promoter activity of the silkworm cuticle protein *BMWCP5* gene is mediated by FTZ-F1. Wang, Nita, Iwanaga, Kawasaki. 日本蚕糸学会. 2008.3.20-21 名古屋.
18. エクダイソンに誘導されるカイコ翅原基細胞分裂に伴う細胞周期関連遺伝子の解析. 長内・岩永・川崎。日本蚕糸学会.2008.3. 20-21 名古屋.
19. Transcriptional regulation of the *BMWCP2* and *BMWCP5* genes . Wang, Nita, Iwanaga, Kawasaki APSEI2008. 2008.3. 21-22 Nagoya.
20. Expression pattern of BmADAMTS-1 and BmADAMTS-like genes coincide with the basement membrane degradation in the metamorphic organs of *Bombyx mori*. Manickam, Ote, Shimada , Iwanaga, Kawasaki. APSEI2008. 2008.3. 21-22 Nagoya.
21. カイコの翅原基でクローニングされた6グループのクチクラ蛋白質遺伝子—発現パターン、ホルモン応答能、ゲノム構造、進化—。川崎・鐘・岩永・三田.日本応用動物昆虫学会。2008.3. 23-25 宇都宮。
22. 平成18年に農家で発生した不結繭蚕の原因追跡. 小川・代田・岩永・川崎。日本蚕糸学会、関東支部大会 2007.11.17 東京。

[その他]

ホームページ等

<http://ousei.mine.utsunomiya-u.ac.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

川崎秀樹 (KAWASAKI HIDEKI)

宇都宮大学・農学部・教授

研究者番号：00134263

(2) 研究分担者

岩永将司 (IWANAGA MASASHI)

宇都宮大学・農学部・准教授

研究者番号：40400717