

機関番号：13901

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21780046

研究課題名(和文)

アザミウマにおける脱皮・変態のホルモンによる制御機構解明

研究課題名(英文)

Hormonal regulation of thrips' molting and metamorphosis

研究代表者：

水口 智江可(MINAKUCHI CHIEKA)

名古屋大学・大学院生命農学研究科・助教

研究者番号：90509134

研究成果の概要(和文)：農業害虫であるアザミウマは、蛹の過程を経ずに幼虫が成虫へと変態する「不完全変態昆虫」として分類されているものの、成虫になる前にほとんど動かない「蛹のような時期」が存在する。これは他のどの昆虫種とも異なったユニークなものであるが、ホルモンによる制御機構は不明であった。本研究では、アザミウマの幼若ホルモンシグナルを伝達する2つの転写因子を特定するとともに、アザミウマのユニークな変態様式がどのような進化を遂げて出来上がったのか考察を行った。

研究成果の概要(英文)：Thrips are classified as one of the hemimetabolous species that develop directly from larva to adult, but there are quiescent and non-feeding stages called propupa and pupa between larval and adult stages. Thus, the manner of thrips' metamorphosis is quite different from other hemimetabolous or holometabolous species. The mechanism how thrips' metamorphosis is regulated by hormones has not yet been investigated. In this study, we isolated cDNAs encoding two transcription factors involved in juvenile hormone signaling in two thrips species. From the results of this study, we speculated how thrips' metamorphosis has evolved.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2010年度	1,200,000	360,000	1,560,000
総計	2,800,000	840,000	3,640,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農学・応用昆虫学

キーワード：昆虫、害虫防除、幼若ホルモン、アザミウマ

## 1. 研究開始当初の背景

昆虫は脱皮・変態を経て成虫へと発育するが、一般に昆虫の変態は脱皮ホルモンと幼若ホルモン(JH)によって厳密に制御されている。昆虫の変態は次の3つに分類することが

できる。

- ・無変態(成長に伴う外部形態変化がなく、大きさだけが変化するもの)
- ・不完全変態(蛹の過程を経ずに、幼虫が成虫に直接変態するもの)

- ・ 完全変態（幼虫・蛹・成虫の順に変態するもの）

一般には、原始的な無変態昆虫から不完全変態や完全変態が発生したと考えられており、発育に伴う幼若ホルモン (JH) の分泌時期や JH 誘導性遺伝子の発現時期のシフトに伴って変態が発生したと推測される。

ところで世界的な農業害虫であるアザミウマは、蛹の過程を経ずに幼虫が成虫へと変態する「不完全変態昆虫」として分類されている。しかしながら幼虫期と成虫期の間に、ほとんど動かず摂食もしない「蛹のような時期」が2～3期存在し、この期間に幼虫組織の一部の崩壊と成虫組織の形成が起こる (図1)。このようなアザミウマの変態様式は、他のどの昆虫種とも異なったユニークなものであるが、ホルモンによる制御機構は今まで全く調べられていなかった。

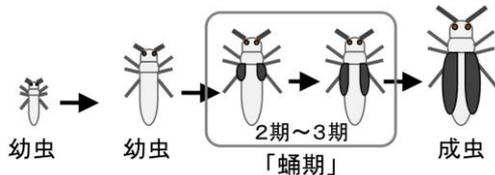


図1 アザミウマの脱皮・変態

## 2. 研究の目的

本研究の目的は以下の2点にまとめられる。

### (1) アザミウマの特殊な変態様式の進化過程解明

本研究では、完全変態昆虫において蛹特異的転写因子として知られている *broad-complex (broad)* の発育に伴う発現変動をアザミウマにおいて調べ、昆虫種間で比較することによって、アザミウマの特殊な変態様式がどのような進化を経て出来上がったのか考察する。またアザミウマには「蛹のような時期」が2期である種と3期である種が存在するので、その両者間でも *broad* の発現時期を比較する。

### (2) アザミウマにおける幼若ホルモン (JH) による変態制御機構解明

JH による変態制御機構や JH シグナル伝達経路は、これまで完全変態昆虫を中心として研究が行われており、不完全変態昆虫では解明がほとんど進んでいない。そこで本研究

では、不完全変態であるアザミウマにおいて JH シグナル伝達に関わる因子を同定し、変態制御におけるそれらの役割を調べる。

## 3. 研究の方法

### (1) 実験材料

以下の2種のアザミウマを用いて研究を行った。

- ①ミカンキイロアザミウマ：幼虫期と成虫期の間に蛹のような時期が2期存在する。
- ②アカメガシワクダアザミウマ：幼虫期と成虫期の間に蛹のような時期が3期存在する。

### (2) 蛹特異的遺伝子 *broad-complex* および JH 初期応答遺伝子 *Krüppel homolog 1* の cDNA クローニング

昆虫間で配列の保存されている部位で縮重プライマーを設計し、2種のアザミウマ組織からそれぞれ調製した cDNA を用いて、*broad* の cDNA クローニングを行った。さらに RACE 法を用いて5'側と3'側の部分も増幅し、cDNA 全長の塩基配列を解読した。

完全変態昆虫で JH シグナル伝達における鍵遺伝子であることが知られている *Krüppel homolog 1 (Kr-h1)* についても同様に、縮重プライマーを用いて cDNA クローニングを行った。さらに RACE 法により cDNA 全長の塩基配列を解読した。

### (3) アザミウマの発育に伴う *broad* および *Kr-h1* の発現変動解析

2種のアザミウマ組織からそれぞれ調製した cDNA を用いて、定量 PCR 法により、発育に伴う *broad* および *Kr-h1* の発現変動を調べた。

### (4) アザミウマに対する JH 様活性物質投与実験

種々の発育段階における2種のアザミウマに対して JH 様活性物質 (JHM) を投与し、蛹や成虫への変態が阻害されるかどうか調べることによって、アザミウマ体内に内在性 JH が豊富に存在する時期を推測した。

### (5) アザミウマにおける *broad* および *Kr-h1* の JH による発現誘導性の調査

完全変態昆虫においては JHM 投与によって蛹から成虫への変態を人工的に阻害すると、*broad* および *Kr-h1* の発現が誘導されることが報告されている (Zhou and Riddiford, 2002)。そこで (4) の実験で JHM を投与した

後のアザミウマ個体において、*broad* と *Kr-h1* が JHM によって発現誘導されるかどうか調査した。

#### 4. 研究成果

##### (1) 2 種のアザミウマにおける *broad* および *Kr-h1* の cDNA クローニング

ミカンキイロアザミウマにおいて *broad* の cDNA クローニングを行った結果、選択的スプライシングによって生じる複数のアイソフォームの存在が明らかになった。同様にアカメガシワクダアザミウマからも、*broad* の相同遺伝子を単離することに成功した。

また、ミカンキイロアザミウマおよびアカメガシワクダアザミウマから *Kr-h1* の cDNA クローニングを行い、*Kr-h1* の相同遺伝子を単離した。これらは Zn フィンガー領域において他種昆虫の *Kr-h1* と極めて高い配列相同性を示した。

##### (2) 2 種のアザミウマの発育に伴う *broad* および *Kr-h1* の発現変動

この解析の結果を図 2 にまとめた。このように 2 種のアザミウマでは、「蛹のような時期」の数が異なるものの、*broad* および *Kr-h1* の発現パターンには両者に以下のような共通性がみられた。

① *broad* は胚発生の後期、および幼虫期終盤から *propupa* にかけて高く発現しており、1 齢幼虫や *pupa* では低い。

② *Kr-h1* は胚発生の後期に高く発現し、その後 *propupa* まで連続した発現が見られ、*pupa* では極めて低い。

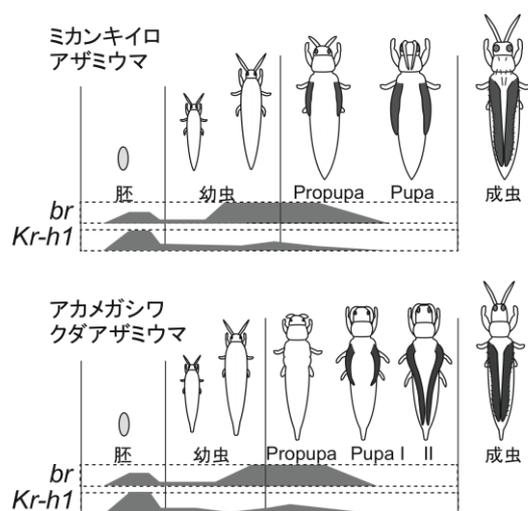


図 2 *broad* および *Kr-h1* の発現変動

##### (3) アザミウマの特殊な変態様式の進化過程に関する考察

(2)で明らかになった *broad* の発現パターンを、アザミウマ以外の昆虫でこれまでに報告されているものと比較したところ、以下の点が明らかになった。

① アザミウマの胚発生期に見られる *broad* の発現は、不完全変態のカメムシやゴキブリでの発現パターンと類似しており、完全変態昆虫ではみられないパターンである。

② アザミウマの幼虫期終盤から *propupa* にかけて見られる *broad* の発現は、不完全変態昆虫よりもむしろ完全変態昆虫のパターンに似ている。

以上の結果から、アザミウマの *pupa* 期は完全変態の蛹期に相当することが示唆された。しかしながらアザミウマの変態様式は、不完全変態から完全変態への進化の途上というよりはむしろ、独自の進化を遂げて生じたと考えられる。

また、「蛹のような時期」が 2 期である種と 3 期である種の間で、*broad* の発現時期や外部形態変化を詳細に比較したが、両者で明確な対応関係を見出すことはできなかった。

##### (4) アザミウマにおける JH シグナル伝達経路

2 種のアザミウマにおいて JHM 投与実験を行った結果、投与の時期に関わらず、*pupa* から成虫への変態が阻害された。この結果から、幼虫から *propupa* までは内在性 JH 濃度が高く、*pupa* では低いということが推測された。

また JHM を投与した後のアザミウマ個体において、*broad* および *Kr-h1* の発現が顕著に誘導されることが判明した。従って、アザミウマにおいて JHM 投与によって変態を阻害した場合、そのシグナル伝達には *broad* および *Kr-h1* が関与することが示唆された。このようにアザミウマにおいて、完全変態昆虫で報告されていると同様の JH シグナル伝達経路の存在が初めて示された。

#### 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 2 件)

1) Minakuchi C, Tanaka M, Miura K, and Tanaka

T. "Developmental profile and hormonal regulation of the transcription factors *broad* and *Krüppel homolog 1* in hemimetabolous thrips." *Insect Biochem. Mol. Biol.* **41**, 125-134, 2011 (査読有)

2)水口智江可、篠田徹郎 「昆虫の幼若ホルモンのシグナル伝達における *Krüppel homolog 1 (Kr-h1)* 遺伝子の機能」 比較内分泌学 **36**, 53-60, 2010 年 (査読無)

[学会発表] (計 6 件)

1)水口智江可、三浦健、田中利治 「アカメガシワクダアザミウマにおける *broad-complex* および *Krüppel homolog 1* の発現時期と JH による発現誘導性」 第 55 回日本応用動物昆虫学会大会、2011 年 3 月、九州大学

2)水口智江可 「昆虫における脱皮・変態の幼若ホルモンによる制御メカニズム」 日本下垂体研究会第 25 回学術集会、2010 年 8 月、愛知県田原市

3)水口智江可、田中美帆、三浦健、田中利治 「ミカンキイロアザミウマにおける幼若ホルモンによる脱皮・変態の制御機構」 日本農薬学会第 35 回大会、2010 年 5 月、北海道大学

4)水口智江可、田中美帆、三浦健、田中利治 「ミカンキイロアザミウマにおける転写因子 *broad-complex* の発現解析」 第 54 回日本応用動物昆虫学会大会、2010 年 3 月、千葉大学

5)Minakuchi C, Tanaka M, Miura K, and Tanaka T. "RNA interference-mediated gene knockdown in the western flower thrips, *Frankliniella occidentalis*." 第 9 回アザミウマとトスポウウイルスに関する国際会議、2009 年 9 月、オーストラリア

6)Minakuchi C, Tanaka M, Miura K, and Tanaka

T. "Developmental expression profile of the transcription factor that regulates molting and metamorphosis of the western flower thrips, *Frankliniella occidentalis*." 第 9 回アザミウマとトスポウウイルスに関する国際会議、2009 年 9 月、オーストラリア

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

○取得状況 (計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年月日:

国内外の別:

[その他]

ホームページ等

該当なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

水口智江可 (MINAKUCHI CHIEKA)  
名古屋大学・生命農学研究科・助教  
研究者番号: 90509134

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし