

平成 30 年 6 月 25 日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K15071

研究課題名(和文) 蛹化能力付与因子(competence factor)の探索

研究課題名(英文) Research on the competence factor 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) 2,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、なぜ若齢のカイコ幼虫(1齢、2齢幼虫)が幼若ホルモン(JH; Juvenile Hormone)の存否と無関係に幼虫脱皮を行うのか、その理由の解明を目的とした。カイコの1齢、2齢幼虫の皮膚を終齢幼虫に移植することで、カイコの1齢幼虫は組織レベルでは幼虫脱皮を経験しなくてもダイレクトに蛹変態できることを明らかにした。さらに、JH受容体ノックアウト個体を用いることで、このダイレクトな蛹変態はJHによって抑制されることが判明した。次に、体サイズが蛹変態の能力に与える影響を明らかにし、体サイズに関連する何らかの液性因子が蛹化能力を付与する可能性を見出した。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study is to investigate the reason why very young silkworm larvae are incompetent to metamorphosis. For this, we performed implantation assays using the very young larvae and found that when the integuments of neonate larvae were implanted into last instar host larvae, they are able to directly produce pupal cuticle at the time of pupal metamorphosis of the host. In addition, we found that body size is a key factor for the acquisition of competence for metamorphosis. Our results suggest that the tissues of very early instar larvae can metamorphose when provided with unidentified blood-borne factor(s) present in final-instar larvae, and that juvenile hormones can block the action of that factor(s) to prolong the feeding period until larvae attain a certain body size for metamorphosis.

研究分野：昆虫生理学

キーワード：カイコ 脱皮 変態 幼若ホルモン 脱皮ホルモン ゲノム編集 実験形態学

1. 研究開始当初の背景

Bounhiol や福田宗一の時代から行われてきた実験形態学、そして近年の分子遺伝学的解析において、様々な手段で幼若ホルモン(JH)を除去しても、カイコや他のほとんどの昆虫(不完全変態昆虫も含む)では、1齢・2齢幼虫は蛹に変態できないことが断片的に示唆されてきた¹⁻³。最近、申請者の研究グループは、ゲノム編集技術を用いて多数の遺伝子ノックアウトカイコを作出し、この説の正否を厳密かつ体系的に検証した。その結果、JH 生合成遺伝子をノックアウトしても(体内から JH が完全に無くなる)、JH 受容体をノックアウトしても(JH を受容できない)、1齢・2齢の幼虫が蛹へと変態することはないことが判明した(ただし、皮膚のごく一部は例外的に2齢から蛹クチクラを作る)。言い換えると、「昆虫の幼虫は若齢のうち、幼若ホルモンがあっても無くても、必ず幼虫脱皮を行う」ということになる。その理由はこれまでの昆虫内分泌学の知見からは説明できない。

2. 研究の目的

本研究では、なぜ若齢の幼虫が JH と無関係に幼虫脱皮を行うのか、その理由の解明を目的とする。古典的な実験形態学の結果と、申請者らの解析結果を合わせて考えると、幼虫が変態するためには、未知の「蛹化能力を与える液性因子」= “competence factor”が必要であると推定される。本研究では第1に、この液性因子が本当に存在するのかを検証し、その因子の精製・同定へ向けた足掛かりを得る。また、体サイズが蛹化能力に与える影響を調査することを目的とする。

3. 研究の方法

本研究ではまず、実験形態学的手法を用いて、組織レベルでの competence 獲得機構を調査する。

1930年代、ドイツの Piepho は、ハチノスツヅリガを用いた皮膚移植実験を行った。この実験によると、1齢の皮膚片を終齢の幼虫に移植すると、ホストが蛹化するタイミングで移植片も蛹へと変態することができたという。この結果は、少なくとも組織レベルでは1齢の皮膚はダイレクトに蛹へと変態することができること、そして何らかの液性因子が移植片に変態する能力を与えたことを示唆している。

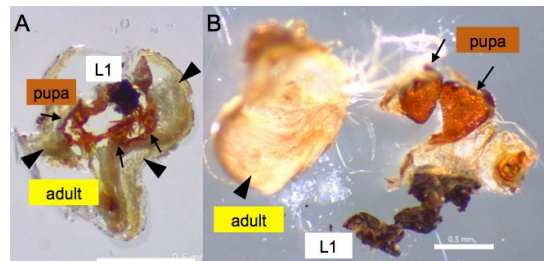
そこで本研究では、まず第1に、この Piepho の実験がカイコにおいて再現できるか調査する。具体的には、正常型あるいは JH 受容体ノックアウト変異体の1齢幼虫の皮膚を正常型の5齢幼虫の体に移植し、移植された皮膚片がダイレクトに蛹変態を起こすか否か調査する。また、移植片の蛹変態の程度・頻度が移植片の JH 受容体の有無に影響されるかを調査する。

次に、蛹化能力が体サイズによって獲得される可能性を検証する。カイコでは脱皮ホルモンを生合成できない変異系統が2種類存在する(*nm-g, nobo*)。これらの個体は脱皮ホルモンを合成できないため、1齢あるいは2齢で脱皮できなくなり、大きな1齢、2齢幼虫となる。この系統と JH 受容体(*Met1*)のダブルミュータントを作出し、脱皮ホルモンを摂食させるまたは注射することでレスキュー・脱皮させる。体サイズが通常より大きくなった個体は、1齢あるいは2齢から蛹形質を示すか調査する。

4. 研究成果

(皮膚移植実験)

カイコの標準系統の若齢幼虫(1齢の孵化直後あるいは2齢への脱皮直後;ドナー)の皮膚片を採取し、5齢(終齢)脱皮直後のカイコ(ホスト)の標準系統の体内へと移植した。そして、ホストが蛹または成虫へと変態した後に移植片を摘出し、移植片によって新たに生産されたクチクラの構造を実体顕微鏡および走査型電子顕微鏡を用いて観察した。その結果、ドナーの皮膚片は、ホストの変態に同調して、蛹あるいは成虫のクチクラを作ることが明らかとなった(図1)。



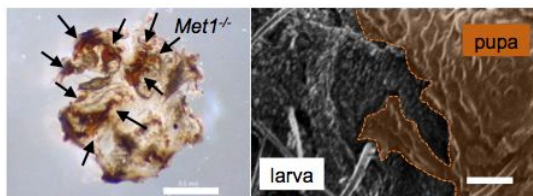
(図1) 移植片が生産したクチクラ

孵化直後の1齢幼虫の皮膚を5齢幼虫(ホスト)に移植し、ホストが成虫になった後に摘出した。1齢幼虫の真皮細胞は、ホストの蛹化、成虫化と同調して、蛹クチクラ(pupa; 矢印)、成虫クチクラ(adult; 矢頭)を生産したことがわかる。Aは移植片の切片、Bは移植片を開いた状態の写真である。

この結果は、(1)およそ80年前にドイツの Piepho がハチノスツヅリガを用いて行った結果がカイコにおいても再現可能であること、そして、(2)例え孵化直後の皮膚片であっても、終齢幼虫の体内環境に置かれるとダイレクトに変態できることを示唆している。個体レベルではカイコの1齢、2齢幼虫は変態できないことを考えると、終齢幼虫の体内には、若齢幼虫には無い何らかの液性因子が存在し、それが移植片に蛹化能力を付与した可能性がある。

さらに、幼若ホルモンの受容体(*Met1*)のノックアウト個体を用いた皮膚移植実験を行

い、幼若ホルモンが移植片の変態に与える影響を調査した。孵化直後の *Met1* ノックアウト1 齢幼虫の皮膚片を、正常系統の4 齢幼虫に移植し、ホストが5 齢に脱皮した後に移植片を摘出して観察を行ったところ、パッチ状の蛹クチクラの形成が認められた(図2)。同様の実験をコントロールの正常系統の皮膚片を用いて行くと、蛹クチクラの形成は全く観察されなかった。



(図2) *Met1* KO 個体の皮膚片の移植実験
JH を受容できない *Met1* ノックアウトの皮膚片は、4 齢幼虫に移植すると次の脱皮の際に一部がパッチ状に早熟変態して蛹クチクラを形成する。左はクチクラを実体顕微鏡下で観察した写真(矢印が蛹クチクラのパッチ)、右は SEM で観察した写真(右側の網掛け部分が蛹クチクラ)。

この結果から、カイコの真皮細胞の蛹コミットメントは幼若ホルモンによって抑制されること、幼若ホルモンが無い状態では、体液中の何らかの液性因子によって蛹化能力が付与される可能性が示唆された⁵。

以上のように、皮膚移植実験の結果から、蛹化能力付与因子(competence factor)の探索・単離に向けた基礎的なデータを得ることができた。

(体サイズの影響を調べる実験)

幼虫の体サイズが蛹化能力に与える影響を調査するために、幼若ホルモン受容体 *Met1* のノックアウト系統と、脱皮ホルモン生合成酵素である *nm-g* を欠損した系統を交配し、幼若ホルモンを受容できず、かつ、脱皮ホルモンを生合成できない個体を得た。*nm-g* 変異体の幼虫は脱皮ホルモンを生合成できないため、1 齢または2 齢幼虫が通常よりも大きな個体へと成長した後に幼虫脱皮を行うことができずに斃死する。通常よりも大きく成長した *Met1* と *nm-g* の2 重変異体の2 齢幼虫に脱皮ホルモンの摂食または注射によって人為的な脱皮を誘導したところ、3 齢に脱皮した際に成虫原基(翅原基等)が早熟変態することが判明した。

これまでの知見では、カイコの成虫原基の早熟変態は最も早く3 齢から起きることが知られていたが、今回我々は2 齢からの早熟変態に成功したことになる。幼若ホルモンは成虫原基の成長や変態を抑制し、この作用はインスリンシグナリングによって解除されることが報告されている^{6,7}。従って、今回我々が見出した成虫原基の2 齢からの早熟

変態は、成虫原基の変態が幼若ホルモンによって負に制御されていることの遺伝学的な証拠を提示するとともに、体サイズが蛹化能力の付与に重要であることを強く示唆している。

<引用文献>

1. Daimon et al. 2012. PLoS Genet. 8: e1002468.
2. Feyereisen et al. 2012. PLoS Genet. 8: e1002591.
3. Smykal et al. 2014. Dev Biol 390: 221-30.
4. Daimon et al. 2015. PNAS 112: E4226-35.
5. Inui and Daimon. 2017. J Insect Physiol 100: 35-42.
6. Truman et al. 2006 Science 312: 1385-8.
7. Koyama et al. 2008 Dev Biol 324: 258-65.

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 3 件)

3. Miwa Uchibori-Asano, Takumi Kayukawa, Hideki Sezutsu, Tetsuro Shinoda, Takaaki Daimon (2017) Severe developmental timing defects in the prothoracicotropic hormone (PTTH)-deficient silkworm, *Bombyx mori*. Insect Biochemistry and Molecular Biology 87: 14-25.

2. Tomohiro Inui, Takaaki Daimon (2017) Implantation assays using the integument of early stage *Bombyx* larvae: insights into the mechanisms underlying the acquisition of competence for metamorphosis. Journal of Insect Physiology 100: 35-42.

1. 大門高明 (2017) ゲノム編集と昆虫の変態制御. アグリバイオ 1(14): 34-38.

[学会発表](計 20 件)

20. 峯村俊儀、大出高弘、新美輝幸、塩月孝博、大門高明「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」第62 回日本応用動物昆虫学会大会 鹿児島大学群元キャンパス 2018 年3 月25-27 日、鹿児島県鹿児島市

19. 山本学、大門高明「ホメオティック遺伝子 *Scr* によるカイコの幼虫脱皮回数制御機構」第62 回日本応用動物昆虫学会大会 鹿児島大学群元キャンパス 2018 年3 月25-27 日、鹿児島県鹿児島市

18. 乾智洋、瀬筒秀樹、大出高弘、大門高明「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」第 62 回日本応用動物昆虫学会大会 鹿児島大学群元キャンパス 2018 年 3 月 25-27 日、鹿児島県鹿児島市

17. 山下大志、大出高弘、**大門高明**「カイコの変態抑制遺伝子 *Kr-h1* の機能解析」第 62 回日本応用動物昆虫学会大会 鹿児島大学群元キャンパス 2018 年 3 月 25-27 日、鹿児島県鹿児島市

16. 峯村俊儀、大出高弘、新美輝幸、塩月孝博、**大門高明**「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」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 名古屋大学農学部 平成 30 年 3 月 19-20 日、愛知県名古屋市千種区

15. 大山千春、大出高弘、瀬筒秀樹、**大門高明**「*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」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 名古屋大学農学部 平成 30 年 3 月 19-20 日、愛知県名古屋市千種区

14. 乾智洋、瀬筒秀樹、大出高弘、**大門高明**「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」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 名古屋大学農学部 平成 30 年 3 月 19-20 日、愛知県名古屋市千種区

13. 山下大志、大出高弘、**大門高明**「*Kr-h1* によるカイコの変態抑制機構」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 名古屋大学農学部 平成 30 年 3 月 19-20 日、愛知県名古屋市千種区

12. **大門高明**「昆虫ゲノムとゲノム編集：昆虫科学が目指すもの」つくばテクノロジーショーケース 2018 ミニシンポジウム つくば国際会議場 2018 年 2 月 8 日、茨城県つくば市（招待講演）

11. **Takaaki Daimon**. Genetic Engineering of the domesticated silkworm, *Bombyx mori*. The 3rd KU-KUGSA Bilateral Symposium on Food, Environment and Life for Next Generation. Dec 4, 2017. Kasetsart University, Bangkok, Thailand (Oral presentation).

10. **Takaaki Daimon**, Taishi Yamashita, Tomohiro Inui, Miwa Uchibori-Asano, Tetsuro Shinoda. Knockout studies on key genes for metamorphosis in the silkworm, *Bombyx mori*. The 3rd International Insect Hormone Workshop. July 10, 2017. Nasu, Japan (Oral presentation).

9. Tomohiro Inui, **Takaaki Daimon**. Implantation assays using the integument of early

instar *Bombyx* larvae provide insights into the mechanisms underlying the acquisition of competence for metamorphosis. The 3rd International Insect Hormone Workshop. July 10, 2017. Nasu, Japan (Poster presentation).

8. **大門高明**「カイコの変異体とゲノム編集を活用した脱皮・変態の研究」第 61 回日本応用動物昆虫学会大会小集会 ナショナルバイオリソースプロジェクト(NBRP)「カイコ」の概要 東京農工大学小金井キャンパス 2017 年 3 月 27-29 日、東京都小金井市

7. 山本学、**大門高明**「ホメオティック遺伝子によるカイコにおける脱皮回数制御機構」第 61 回日本応用動物昆虫学会大会 東京農工大学小金井キャンパス 2017 年 3 月 27-29 日、東京都小金井市

6. 乾智洋、**大門高明**「若齢幼虫が蛹変態できないのはなぜか？実験形態学からのアプローチ」第 61 回日本応用動物昆虫学会大会 東京農工大学小金井キャンパス 2017 年 3 月 27-29 日、東京都小金井市

5. 山下大志、瀬筒秀樹、篠田徹郎、**大門高明**「ゲノム編集カイコを用いた変態の鍵遺伝子の機能解析」第 61 回日本応用動物昆虫学会大会 東京農工大学小金井キャンパス 2017 年 3 月 27-29 日、東京都小金井市

4. 乾智洋、**大門高明**「カイコ若齢幼虫における幼若ホルモン非依存的な変態制御機構」平成 29 年度 蚕糸・昆虫機能利用学術講演会 日本蚕糸学会第 87 回大会 農林水産技術会議事務局筑波産学連携支援センター 平成 29 年 3 月 21-22 日、茨城県つくば市

3. **Takaaki Daimon**. A new era of sericultural science. The 2nd KU-KUGSA Bilateral Symposium on Food, Environment and Life for Next Generation. Dec 6, 2016. Kyoto, Japan (oral presentation).

2. **Takaaki Daimon**, Miwa Uchibori, Tetsuro Shinoda. The MEKRE93 pathway in *Bombyx*. XXV International Congress of Entomology (ICE2016). Sep.25-30, 2016. Orlando, Florida, USA (Invited, oral presentation)

1. **大門高明**「ゲノム編集カイコを用いた昆虫の脱皮変態機構の解析」自然科学研究機構基礎生物学研究所 共同利用研究研究会 昆虫デザイン研究会 2016 年 7 月 7-8 日（愛知県岡崎市）（招待講演）

〔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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大門 高明（DAIMON, Takaaki）
京都大学・大学院農学研究科・教授
研究者番号：70451846