

平成 21 年 6 月 7 日現在

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2005-2008

課題番号：17380033

研究課題名（和文） ステロイドホルモンによる転写因子の制御とその変態に及ぼす役割

研究課題名（英文） The regulation of transcription factors by an insect steroid hormone and its role on molting and metamorphosis

研究代表者

比留間 潔 (HIRUMA KIYOSHI)

弘前大学・農学生命科学部・教授

研究者番号： 70374816

研究成果の概要：（1）昆虫皮膚のメラニン化、硬化現象に重要な酵素、ドーパデカルボキシラーゼ(DDC)発現の分子メカニズムを解明した。DDCはエクダイソンにより制御されているが、エクダイソンレセプターからその発現までのカスケードを明らかにした。またその中の1つの転写因子 HR4 がエクダイソンにより制御されているばかりでなく、その合成に関与していることを見出した。この系は哺乳類には存在せず、昆虫に特異的な新規薬剤開発のヒントになると思われる。（2）蛹発育時に不要な *crochet* 細胞の細胞死がホルモンばかりでなく、栄養が重要な役割を持っていることを明らかにした。（3）幼若ホルモン(JH)が成虫原基の成長を積極的に抑制するという新規作用を見出し、そのうえインスリンシグナル経路以外の栄養を必要としない経路が存在し、細胞の発育を支配していることを見出した。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2005年度	5,300,000	0	5,300,000
2006年度	4,500,000	0	4,500,000
2007年度	2,600,000	780,000	3,380,000
2008年度	2,600,000	780,000	3,380,000
年度			
総計	15,000,000	1,560,000	16,560,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：応用昆虫学

キーワード：遺伝子、応用動物、昆虫、発生・分化、昆虫生理学

1. 研究開始当初の背景

昆虫皮膚の黒化及び硬化に重要なドーパデカルボキシラーゼ(DDC)の発現に至るまでの転写因子の相互作用について明らかにし、エクダイソン(20E)から始まりDDCの発現に至るカスケードの全容を解明する。(1)MHR4の発現調節機構の解明—MHR3とE75Bの役割。(2)DDC発現調節機構の解明—DDC発現前に発現が on, off する MHR3, E75B, MHR4 を中心として研

究。(3)カイコを用いてBHR3(MHR3のホモログ)とBHR4(MHR4のホモログ)のRNAiを発現するgermlineを作り、それらの要因の役割を個体、細胞レベルで調べる。

2. 研究の目的

昆虫変態の機構を分子のレベルで明らかにする。それにより、哺乳類には存在しないエクダイソンカスケードを明らかにすることにより、新規な

農薬開発のための基礎研究を行う。

3. 研究の方法

(1) 昆虫の細胞株を使用して遺伝子の transfection を行い、種々の転写因子間の相互作用を解明する。またプロモーターのアッセイを行い、それぞれの転写因子の作用点を明らかにする。(2) 組織培養法を駆使して細胞のホルモン応答性、転写因子などのホルモン制御機構を調べる。

4. 研究成果

(1) 幼虫脱皮のメカニズム

Dopa decarboxylase (DDC)の発現誘導するエクダインカスケードの解明

Dopa decarboxylase (DDC)、の発現はエクダインと幼若ホルモン(juvenile hormone, JH)の制御下にあり、DDCはdopaをdopamineに変換し、昆虫のクチクラのメラニン化及び硬化に必要な酵素である。タバコスズメガ *Manduca sexta* を使用し、皮膚におけるDDCの発現を導くまでの種々なエクダイン誘導性転写因子間の相互作用についてほぼ完了することができた。メラニン化が起こる幼虫の脱皮間には、エクダイン受容体(EcR-A, EcR-B1)ならびにそのパートナーであるUSP(USP-1, USP-2)の増減と共に、様々な転写因子は発現しては消えていくことを私はすでに明らかにしている。またMHR3はEcR-B1/USP-1を介してエクダインにより直接にその発現が誘導され、EcR-A/USP-2はその作用を阻害することも明らかにしている。この科研

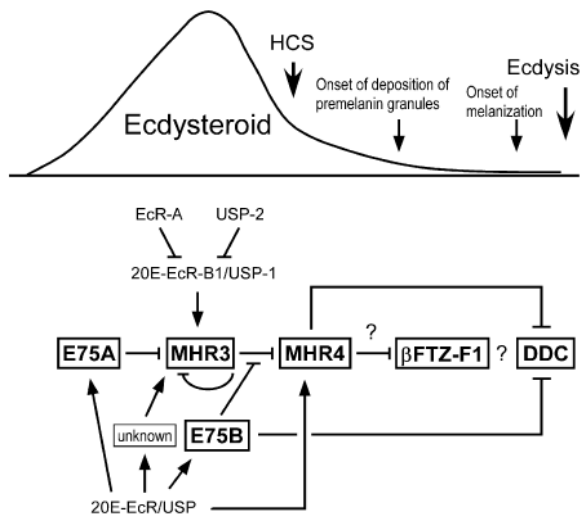


図 1. DDC を誘導するまでのエクダインレセプター、転写因子間の相互作用。上図はエクダイン血中濃度の変動と、付随して起こる事象。

費の援助では、エクダイン応答性転写因子であるE75A, E75B, MHR3, MHR4のDDCの発現調節に及ぼす役割、及びMHR4発現の調節機構を明らかにした。

E75Aの活性化とMHR3に及ぼすE75Aの作用:

E75Aは低濃度のエクダインにより、直接に活性化される。またE75A及びMHR3自身がMHR3のプロモーター領域にあるMREに結合することを見出した。E75AをGV1細胞で強制発現させると、20Eにより発現が誘導されるはずのMHR3のプロモーターが抑制された(図1)。しかしMHR3のプロモーター上のMREを除くと、この抑制は見られなかった。これらの実験結果から、E75AはMREを介してMHR3の発現を抑制しているものと考えられた。またMHR3も同様な機構でMHR3自身をネガティブにフィードバック制御していることが明らかになった(図1)。

MHR3とE75BはMHR4の発現を調節する:

終齢脱皮の間、真皮細胞中のMHR3 mRNAの発現は血中エクダイン濃度の上昇と並行して起り、E75Bの発現がそれに続く。その後エクダインが減少する時にMHR4の発現が起る。

MHR4が全く発現していない4齢2日の真皮細胞を20Eと共に培養すると、MHR4のmRNAは20Eに反応して1-2時間後に一過的に増加するが、6時間後には一時低いレベルまで減少してしまう。しかし、その後上昇して2回目のピークが21-24時間後に現れる。タンパク質合成阻害剤を使用した実験結果から20EはMHR4の発現を直接活性化するが、20Eにより誘導されるタンパク質が最初の抑制を引き起こし(培養6時間後)、このタンパク質が減少した後、再びMHR4遺伝子の発現が再開すると考えられた。発現パターンからMHR3がこの阻害タンパク質の1つであることが示唆された。

GV1細胞株では、MHR3の発現は真皮細胞と同様に20Eにより誘導されるが、MHR4は誘導されない。これはMHR3がMHR4の発現を阻害しているからとも考えられる。RNAi法により、20EによるMHR3の誘導を阻害したところ、MHR4の発現が20Eにより誘導された。この結果からMHR3はMHR4発現の阻害タンパク質の一つであることがわかった(図1)。

一方、細胞株では真皮細胞とは異なり、E75BはMHR4と同様に20Eにより発現が誘導されない。ところがE75Bを強制的に発現させると、MHR3により発現が抑制されているMHR4の発現が20Eにより誘導された。明らかにE75BはMHR3の存在下で20EによるMHR4の発現を誘導した。これはE75BがMHR3と結合して2量体を形成することにより、MHR3のMHR4発現阻害作用を抑制していることを明らかにした(図1)。

E75BとMHR4によるDDC発現の制御:GV1細胞にE75Bを強制発現させると20Eの存在の有無にかかわらずDDCのプロモーターは抑制された。MHR4も同様な抑制作用を持っていたが、MHR3はプロモーターの活性化にほとんど影響を与えなかった(図1)。よって、E75BとMHR4はDDC発現の抑制因子であることがわかった(図1)。

DDCのプロモーター領域にはFTZ-F1 response elementが存在し、この配列は大腸菌で作製したβFTZ-F1のrecombinant proteinと結合した。真皮細胞でのβFTZ-F1の20Eによる発現調節はDDCの調節と非常に良く似ており(20Eにさらした後に20Eを除くと発現する)、発現のタイミングもDDCの少し前であることから、βFTZ-F1はDDCの活性化因子である可能性が考えられた。しかしβFTZ-F1のDDC制御についての役割は実験結果が振れて明らかにすることができなかった。

エクダインの血中濃度が下がるとE75BとMHR4が消失するのに加えて、他の未同定な阻害因子も減少し、それらによってDDCの発現のタイミングが調節されていると考えられる。これらのことからDDCの制御はかなり複雑で、未同定のものを含む多くの因子が複雑に絡み合って制御されていることがわかった。DDCを積極的に活性化する因子は今のところ不明である。

(2) 蛹変態のメカニズム

エクダイン誘導性転写因子BHR4の脱皮・変態に及ぼす役割

以上の転写因子が昆虫の発育に及ぼす役割を直接に調べるために、トランスジェニックカイクを作成し蛹変態に及ぼす役割について研究した。カイクの転写因子BHR4(MHR4のカイクでのホモログ)の発現を制御できるBHR4の過剰発現とBHR4 RNAiのgermlineを作成した。両者共にhspプロモーターの制御下にあり、熱ショックによって発現が自由に制御できる。

まず初めにBHR4を熱ショックにより継続的に発現させ、BHR4が降下するのを阻害してBHR4の変態に及ぼす役割を調べた。その結果、アポリシス後、脱皮行動を全く起こさずに幼虫のクチクラの内部で蛹化する個体が観察された。このことから、BHR4の発現が抑えられることが、脱皮行動を引き起こすことに重要である可能性が考えられる。この時に見られた異常個体はエクダインアゴニストを注射した時と同様な異常形態を示した。しかしエクダインのアゴニストの注射はBHR4の発現停止に影響を及ぼさなかった。そのうえBHR4過剰発現個体ではエクダインの血中濃度が低下しないことを見出し、BHR4は

エクダインの合成調節を行っていることを示唆する結果を得た。BHR4は直接に前胸腺に作用してエクダイン合成を調節しているのかは今後の課題である。

蛹変態に伴う細胞の分化(幼虫に特異的なcrochet細胞の細胞死)

昆虫の変態時には、種々のcellular eventsが一つの状態から他の状態に変化しなければならず、commitment及びdeterminationが起こる必要がある。その後、エクダインの作用により最終的な変化が引き起こされる。幼虫特異的組織である腹脚の爪(crochet)は蛹への変態の際に退化し、これはcrochetの細胞死が起っているためと考えられる。この細胞死は5齢3日目から始まり、4日には完了した。この細胞死のcommitmentには皮膚の蛹commitmentに重要な転写因子broadは関与していなかった。一方、crochet細胞の形成能力の低下が、細胞死に先だって起こることを見出した。それは4齢後期から5齢4日目にかけて2段階で起こり、その後、5齢3-4日目にcrochet細胞の細胞死が起った。1段階目の能力の低下は幼虫脱皮を引き起こすエクダインによって引き起こされ、2段階目は栄養の摂取によっていることを突き止めた。その時annexin IXが上昇し、その後に細胞死に関与していると考えられる転写因子E74Bの上昇・低下が見られ、これら因子の共同作用により、crochet細胞の形成能力の低下から細胞死に至ることが示唆された。

新しいJH作用の発見—JHの成虫原基に及ぼす作用

上記研究の過程で、JHの新規な作用を発見した。鱗翅目昆虫は双翅目昆虫とは異なり、眼と翅の成虫原基は終齢幼虫になりprimordiumから形成される。タバコスズメガでは、これらの原基は終齢脱皮後18時間後に形成され始め、24時間後からproliferationが始まった。ところが、最終齢幼虫を絶食させるとJH血中濃度が上昇し、成虫原基の形成が阻害され、摂食により回復した。一方、これらの成虫原基は、アラタ体除去してJH濃度の上昇を阻害した幼虫を絶食させた場合にはゆっくりと形態形成したが、摂食をさせた時のように大きく発育しなかった。JH処理はこの発育を阻害した(図2)。また形態形成を行なう時には、Broadの発現が見られることも示した。この時の原基の形態形成はエクダインの作用とは無関係で、JHによる阻害作用は、他の物質を介さない、組織への直接作用の結果であることを明らかにした。成虫原基が5齢期に正常に大きく発育するためには明らかに摂食が必要であり、得られた結果を説明するために、終齢幼虫に特

異的に現れ、原基のJHによる抑制作用に打ち勝つ作用があるmetamorphosis-initiating factor (MIF) の存在を仮定することが必要である(図2)。これらの研究から、最終齢幼虫における成虫原基は、JH阻害を受ける形態形成発育と、摂食による形態形成発育との2つの制御を受けている事を明らかにした。

JH は昆虫の脱皮時に存在すると、現在の状

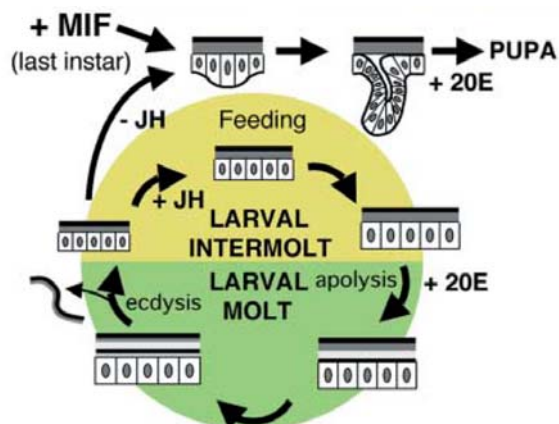


図2. 摂食期間中の JH の作用。JH は摂食期間、成虫原基の形成と成長を抑制する役割を持っている。最終齢幼虫期におけるその作用は摂食に反応して作られる metamorphosis initiating factor (MIF)の放出によって隠されてしまう。

態を維持する脱皮を引き起こす。すなわち JH は現状維持(status quo)ホルモンと言われ、JH の発育に及ぼす役割は、脱皮ホルモンであるエクダイソンの作用を修飾するものであるのみであると長い間信じられてきた。タバコスズメガでは、最終齢幼虫(5齢)を絶食させると JH 血中濃度が下がり、幼虫脱皮を繰り返して6齢幼虫になる事が知られている。この現象をうまく利用する事により、上記のように JH が成虫 primordium から成虫原基への形態分化を阻害するという、JH の全く新しい作用機構を明らかにする事が出来た。また摂食によりセットされ、幼虫の体重に作用されないタイマーが存在する事を発見し、それは幼虫の大きさとは無関係に働くことを見出した。またインスリンシグナル経路は人を含む全ての生物にとって重要な発育成長の経路であるが、この実験系により栄養に作用されない、インスリンシグナル経路以外の経路が存在することを発見する事が出来た。

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 6 件)

- ① Hiruma, K., and Riddiford, L.M. The molecular mechanisms of cuticular melanization: the ecdysone cascade leading to dopa decarboxylase expression in *Manduca sexta*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* **39**, 245-253 (2009). 査読有
- ② 比留間潔. 昆虫皮膚のメラニン化の分子機構。化学と生物 **46**, 571-578 (2008). 査読無
- ③ Muramatsu, D., Kinjoh, T., Shinoda, T., and Hiruma, K. The role of 20-hydroxyecdysone and juvenile hormone in pupal commitment of the epidermis of the silkworm, *Bombyx mori*. *Mech. Dev.* **125**, 411-420 (2008). 査読有
- ④ Hiruma, K., and Riddiford, L.M. The coordination of the sequential appearance of MHR4 and dopa decarboxylase during the decline of the ecdysteroid titer at the end of the molt. *Mol. Cell. Endocrinol.* **276**, 71-79 (2007). 査読有
- ⑤ Keshan, B., Hiruma, K., and Riddiford, L.M. Developmental expression and hormonal regulation of different isoforms of the transcription factor E75 in the tobacco hornworm, *Manduca sexta*. *Dev. Biol.*, **295**, 623-632 (2006). 査読有
- ⑥ Truman, J.W., Hiruma, K., Alle, J.P., MacWhinnie, S.G.B., Champlin, D.T., and Riddiford, L.M. Juvenile hormone is required to couple imaginal disc formation with nutrition in insects. *Science* **312**, 1385-1388 (2006). 査読有

[学会発表] (計 30 件)

- ① 比留間潔・Lynn M. Riddiford・Stuart E. Reynolds (2009). Bisacylhydrazine ecdysone agonistと内在幼若ホルモンの相互作用による過剰脱皮誘導。第53回日本応用動物昆虫学会。2009年3月28-30日。北海道大学。
- ② 比留間潔 (2009) 実験形態学に始まり再び実験形態学へ。第53回日本応用動物昆虫学会。2009年3月28-30日。北海道大学。
- ③ 秋元真理・金児 雄・比留間 潔 (2009) カイコcrochet細胞における形成能力のホル

- モン制御および細胞死のメカニズム。第 53 回日本応用動物昆虫学会。2009 年 3 月 28—30 日。北海道大学。
- ④ 村松大輔・比留間潔 (2009) コミットメントは all-or-none で起こるか—Verson's gland を用いた単一細胞のコミットメント機構の解析。第 53 回日本応用動物昆虫学会。2009 年 3 月 28—30 日。北海道大学。
- ⑤ 横山拓彦・比留間潔・富田秀一郎 (2009) カイコの転写因子 BHR4 発現と血中エクダイソン濃度との関連。第 53 回日本応用動物昆虫学会。2009 年 3 月 28—30 日。北海道大学。
- ⑥ Yamanaka, N., Žitňan, D., Kaneko, Y., Hiruma, K., Tanaka, Y., Shinoda, T., and Kataoka, H. (2008). *Bombyx* neuropeptide GPCR transcriptome reveals authentic neuroendocrine network. XXIII International Congress of Entomology. July 6-12, 2008, International Convention Centre, Durban, South Africa.
- ⑦ Hiruma, K., and Muramatsu, D. (2008). Hormonal control of pupal commitment of the epidermis of the silkworm, *Bombyx mori*: comparison with that of *Manduca sexta*. Ecdysone Workshop 2008. July 20-24, 2008, Ulm, Germany.
- ⑧ 比留間潔・小山貴司・鈴木裕一郎・Riddiford, L.M.・Truman, J.W. (2008). 幼若ホルモンの形態形成抑制の役割とその栄養シグナルとの相互作用。第 52 回日本応用動物昆虫学会。2008 年 3 月 26—29 日。宇都宮大学。
- ⑨ 村松大輔・比留間 潔 (2008). カイコ皮膚の幼虫—蛹コミットメントのホルモン制御。第 52 回日本応用動物昆虫学会。2008 年 3 月 26—29 日。宇都宮大学。
- ⑩ 秋元真理・村松大輔・金児 雄・比留間 潔 (2008). カイコcrochetにおけるdeath commitmentの制御機構。第 52 回日本応用動物昆虫学会。2008 年 3 月 26—29 日。宇都宮大学。
- ⑪ 横山拓彦・比留間潔・富田秀一郎 (2008). カイコの転写因子 BHR4 の過剰発現による蛹化脱皮への影響。第 52 回日本応用動物昆虫学会。2008 年 3 月 26—29 日。宇都宮大学。
- ⑫ 神村学・松本均・志村幸子・今西重雄・三田和英・篠田徹郎・金城輝則・比留間潔 (2008). カイコ培細胞株の幼若ホルモンに対する応答。第 52 回日本応用動物昆虫学会。2008 年 3 月 26—29 日。宇都宮大。
- ⑬ Keshan, B., Hiruma, K., and Riddiford, L.M. (2007). The alteration in the expression level of ecdysteroid-induced early gene, E75, by juvenile hormone. Regional Symposium on Current Research Thrust in Animal Sciences. March 15 -16, 2007. North-Eastern Hill University, India.
- ⑭ 比留間潔, Truman, J.W., Champlin, D.T., Riddiford, L.M. (2007). 成虫原器の形成と成長に及ぼす幼若ホルモンの役割。日本応用動物昆虫学会第51回大会。2007年3月27—29日。
- ⑮ 村松大輔、金城輝則、金児雄、比留間潔 (2007). カイコ皮膚の培養系における幼虫—蛹コミットメントの制御。日本応用動物昆虫学会第51回大会。2007年3月27—29日。
- ⑯ 横山拓彦, 比留間潔, 富田秀一郎 (2007). 転写因子 BHR3 と BHR4 カイコの発育と変態に及ぼす役割-遺伝子組み換えカイコの作成。日本応用動物昆虫学会第51回大会。2007年3月17—29日。
- ⑰ Hiruma, K., Kaneko, Y., Kinjoh, T., and Shinoda, T. (2007). Regulation of juvenile hormone biosynthesis by the corpora allata in *Bombyx mori*. 9th International Conference on Juvenile Hormone. August 5-10, 2007. York, England.
- ⑱ Kaneko, Y., and Hiruma, K. (2007). Dopamine is a regulator of juvenile hormone biosynthesis by the corpora allata in *Bombyx mori*. 9th International Conference on Juvenile Hormone. August 5-10, 2007. York, England.
- ⑲ Truman, J.W., Koyama, T., Suzuki, Y., Hiruma, K., and Riddiford, L.M. (2007). The morphostatic role of juvenile hormone and its interaction with nutrient-dependent signaling. 9th International Conference on Juvenile Hormone. August 5-10, 2007. York, England.
- ⑳ Hiruma, K. (2006). Regulation of enzymes involved in juvenile hormone biosynthesis. The 54th Annual Meeting of the Entomological Society of America. December 10-13, 2006. Indianapolis, USA.
- ㉑ Keshan, B., Hiruma, K., and Riddiford,

L.M. (2006). Differential regulation of ecdysone-induced early gene E75 by juvenile hormone during molting and metamorphosis in the tobacco hornworm, *Manduca sexta*. The 54th Annual Meeting of the Entomological Society of America. December 10-13, 2006. Indianapolis, USA.

⑳ Hiruma, K. (2006). An overview of the molecular aspect of *Manduca* endocrinology. Japan-USA Joint Symposium. Hornworms as Experimental Insects: In Retrospect and Prospect. Abstract p. 5-7. January 28, 2006. Tokyo Silk Hall.

㉑ 比留間潔, Riddiford, L.M. (2006). エクダイソンに誘導される核レセプター、MHR3とE75B、は転写因子MHR4の調節因子であると共に、dopa decarboxylase発現の阻害因子である。日本応用動物昆虫学会第50回大会。講演要旨p. 33. 2006年3月27-29日。筑波大学。

㉒ Truman, J.W., Hiruma, K., Allee, J.P., MacWhinnie, S.G.B., Champlin, D., and Riddiford, L. M. (2006). A direct role of JH in the control of imaginal disc formation and growth in *Manduca*. Fly Meeting. 2006 Ecdysone Workshop Wednesday, March 29, 2006, Lanier Grand Ballroom A, Hilton Americas, Houston, TX.

㉓ Truman, J.W., Hiruma, K., Allee, J.P., MacWhinnie, S.G.B., Champlin, D., and Riddiford, L.M. (2006). A direct role of JH in the control of imaginal disc formation and growth in *Manduca*. The 5th International Symposium on Molecular Insect Science. May 20-24, 2006. Tucson, AZ.

㉔ Hiruma, K., and Riddiford, L.M. (2006). The coordination of the sequential appearance of MHR4 and dopa decarboxylase during the decline of the ecdysteroid titer at the end of the molt. The 16th International Ecdysone Workshop. Abstract p.64. July 10-14, 2006. Ghent, Belgium.

㉕ Shinoda, T., Kinjoh, T., Mita, K., and Hiruma, K. (2006). Cloning and expression analysis of juvenile hormone biosynthetic enzymes and E75 isoforms in the silkworm, *Bombyx mori*. The 7th International workshop on Molecular Biology and Genetics of the Lepidoptera. August 20-26, 2006. Kolympari, Crete,

Greece.

㉖ 水口智江可、比留間潔、Riddiford, L.M. (2006). *Manduca sexta*皮膚における *molting* 遺伝子の発現誘導機構。昆虫ワークショップ06金沢。2006年9月13-15日。石川県青少年総合研修センター。

㉗ Hiruma, K. (2005). Regulation of the ecdysone-induced cascade of transcription factors that lead to the induction of dopa decarboxylase expression. NIAS/COE International Symposium: Present Status of Studies for Utilization of Insect Properties. Abstract p. 31. October 4-5, 2005. Tsukuba International Congress Center.

㉘ Keshan, B., Hiruma, K., and Riddiford, L.M. (2005). The ecdysone-induced early gene E75 in *Manduca sexta*: its developmental regulation and hormonal control in epidermis and developing wing. Frontiers in Molecular Endocrinology. Abstract p. 27. December 12-15, 2005. Hyderabad, India.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

比留間 潔 (HIRUMA KIYOSHI)
弘前大学・農学生命科学部・教授
研究者番号：70374816

(2) 研究分担者

富田 秀一郎 (TOMITA SHUICHIRO)
農業生物資源研究所・主任研究員
研究者番号：30360457