

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2006～2009

課題番号：18380040

研究課題名（和文） 脳作動遺伝子の網羅的解析による昆虫変態機構の解明

研究課題名（英文） Molecular mechanism of insect metamorphosis revealed by analyzing the brain-expressed genes.

研究代表者

岩見 雅史（IWAMI MASAFUMI）

金沢大学・自然システム学系・教授

研究者番号：40193768

研究分野：分子生物学・応用昆虫学

科研費の分科・細目：応用昆虫学

キーワード：遺伝子，カイコ，脳・神経，発生，マイクロアレイ，エクジソン，幼若ホルモン

1. 研究計画の概要

昆虫における成長，脱皮，変態，代謝，生殖，行動などの生理的機能の制御には，脳から分泌されるペプチドホルモンが重要な役割を果たしている。一方，末梢ホルモンであるエクジソンや幼若ホルモンも，脳にフィードバック制御を行うことが示唆されている。しかし，これまでの研究では，様々なホルモンが脳内で遺伝子発現にどのように関わり，その結果，どのような生理作用を及ぼすかについては不明であった。個々のホルモンの作用機構については断片的な報告はなされているが，どの遺伝子の発現を誘導し，どの遺伝子の発現を抑えるといった網羅的かつ包括的な遺伝子レベルでの解析は少ない。そこで本研究では，変態時に脳で作動する遺伝子の網羅的な解析を行い，ホルモン間の分子レベルでの相互作用や変態の分子機構を探ることを目的とした。

上記目的のために，カイコガ幼虫脳と蛹脳において作動している遺伝子セットの変更を網羅的に解析する。単に，サブトラクションライブラリーだけでなく，DNA マイクロアレイによる遺伝子発現解析を併用し，変態過程における作動遺伝子セットを系統的に解析する。マイクロアレイを用いた実験は，（独）農業生物資源研究所の施設を利用し，三田和英博士との共同研究として行う。

2. 研究の進捗状況

(1) 変態ホルモンであるエクジソンに応答するカイコガ脳発現遺伝子を同定するため，エクジソン（20-hydroxyecdysone, 20E）によ

り発現を誘導した脳サブトラクションライブラリーから，20E 誘導遺伝子を10単離した。20E に対する応答性を逆転写-PCR で確認し，脳内発現部位の特定を行ったところ，ほとんどの遺伝子が前胸腺刺激ホルモン（PTTH）産生細胞でのみ発現することを示した。

(2) カイコガ 16,000 遺伝子を搭載した DNA マイクロアレイを利用し，20E 応答遺伝子および5 齢期各ステージ発現遺伝子の網羅的解析を行った。結果，20E により直接発現量が2倍以上変化した80 遺伝子を特定した。これら遺伝子のうち，5 齢8 日幼虫脳でも発現量の高い11 遺伝子および20E により発現量が大きく変化した遺伝子に的を絞り，脳内発現部位の特定を行ったところ，大部分が PTTH 産生細胞特異的な発現を示した。

(3) 一部の遺伝子について，RNA 干渉によるノックダウンを試みた。20E により発現が上昇する *bombeil-2* 遺伝子のノックダウンでは蛹化異常や成虫時の脚の形成異常，*U11* 遺伝子では体重増加率の減少や胸部クチクラの剥離不全，*U25* 遺伝子では体重増加率の減少や蛹化時の繭形成不能等の表現型が得られた。

(4) 4 齢，5 齢，過剰脱皮する予定の5 齢（F5 齢と表記）のそれぞれ0 日幼虫の脳において遺伝子の発現比較を行い，4 齢と5 齢の比較により5 齢で発現が高かった遺伝子，および5 齢とF5 齢の比較により5 齢で発現が高かった4 遺伝子を幼虫形質維持関連遺伝子として同定した。また，どちらの比較でも5 齢で発現が優位に高かった26 遺伝子中，発現比率

が2倍以上の8遺伝子にも注目した。発現を解析したところ、8遺伝子中3遺伝子が終齢において優位な発現動態を示し、蛹化関連遺伝子であることが示唆された。

3. 現在までの達成度

②おおむね順調に進展している。
(理由)

当初の目的としたDNAマイクロアレイによる遺伝子発現データを収集し、変態(蛹化促進および幼虫形質維持)に関わる候補遺伝子を約50特定できた。逆転写-PCRによる発現解析により、相当数の遺伝子が目的遺伝子としての発現動態を示しており、脳内発現細胞は変態を制御するマスター細胞であるPTTH細胞であった。マイクロアレイによる網羅的遺伝子発現データは同分野の基礎的データとして役立つことが期待される。

4. 今後の研究の推進方策

引き続き、幼虫脳と蛹脳における発現遺伝子セットの変更を網羅的に解析する。加えて、幼若ホルモンによって誘起される過剰脱皮個体を利用し、幼若ホルモン応答遺伝子の網羅的解析と機能解析も目指す。これら網羅的解析により同定された遺伝子の発現部位の解析と、RNA干渉法による遺伝子ノックダウンにより、変態制御および形態変化に必要な遺伝子の同定と機能解明を目指す。

5. 代表的な研究成果

(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19件)

① Suzuki T., Sakurai S., and Iwami M., Rectal sac distention is induced by 20-hydroxyecdysone in the pupa of *Bombyx mori*. *Journal of Insect Physiology*, **55** (3), 250-254, (2009). 査読有

② Hossain M., Shimizu S., Matsuki M., Imamura M., Sakurai S., and Iwami M., Expression of 20-hydroxyecdysone-induced genes in the silkworm brain and their functional analysis in post-embryonic development. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, **38** (11), 1001-1007 (2008). 査読有

③ Iga M., Iwami M., and Sakurai S., Nongenomic action of an insect steroid hormone in steroid-induced programmed cell death. *Molecular and Cellular Endocrinology*, **263** (1-2), 18-28 (2007). 査読有

④ Hossain M., Shimizu S., Fujiwara H., Sakurai S., and Iwami M., EcR expression in the prothoracicotropic hormone-producing neurosecretory cells of the *Bombyx mori* brain: an indication of the master cells of insect metamorphosis. *FEBS Journal*, **273** (16), 3861-3868 (2006). 査読有

[学会発表] (計24件)

① Aslam A. F., Hossain M., Shimizu S., Sakurai S., and Iwami M., Expression and functional analysis of the 20-hydroxyecdysone-induced genes in brain of the silkworm *Bombyx mori*: RNAi analysis of *bombeil* -1, 3, 5 and -8 genes. 第31回日本分子生物学会, 2008年12月11日, 神戸国際会議場.

②伊東慎矢, 桜井勝, 野田博明, 三田和英, 岩見雅史, カイコガ (*Bombyx mori*) 幼虫の脳における変態調節機構に関与する遺伝子の網羅的解析. 第30回日本分子生物学会, 2007年12月13日, パシフィコ横浜.

③ Hossain M., Shimizu S., Matsuki M., Imamura M., Sakurai S., and Iwami M., Expression and functional analysis of the 20-hydroxyecdysone- (20E-) induced brain genes during development of the silkworm *Bombyx mori*. 日本分子生物学会2006フォーラム, 2006年12月8日, 名古屋国際会議場.

④ Shimizu S., Hossain M., Kaneko Y., Sakurai S., Noda H., Mita K., and Iwami M., Comprehensive analysis of gene expression induced by 20-hydroxyecdysone (20E) in the silkworm brain: Analysis with microarray. 20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology, 2006年6月20日, 京都国際会議場.

[図書] (計2件)

① Iga M. and Sakurai S., Springer, Ecdysone, structures and functions (2008) "Genomic and Nongenomic Actions of 20-Hydroxyecdysone in Programmed Cell Death" pp. 411-423.

② 岩見雅史, 南江堂, ホルモンハンドブック 新訂 eBook版 (2007) pp. 1787-1799, pp. 1806-1827.

[その他]

ホームページアドレス
<http://bombyxin.umin.jp>