

平成 21年 5月 25日現在

研究種目：若手研究（スタートアップ）
 研究期間：2007-2008
 課題番号：19880015
 研究課題名（和文） ショウジョウバエにおけるホルモンの複合作用による発生プログラムの制御機構の解明
 研究課題名（英文） Study on mechanisms of developmental programs synergically regulated by hormones in *Drosophila melanogaster*
 研究代表者
 小野 肇 (ONO HAJIME)
 京都大学・大学院農学研究科・助教
 研究者番号：70452282

研究成果の概要：

昆虫の発生プログラム制御機構の中でも、発生のタイミング決定機構については未知の部分が多い。これまでに鱗翅目昆虫では体のサイズにより変態のタイミングが決定されることが報告されている。しかし、ショウジョウバエでは体のサイズにより変態のタイミングが決定されるのではなく、神経ペプチドである PTH の分泌によりエクジステロイドが生合成され変態のタイミングが決定されることを明らかにした。さらに、脱皮ホルモンの 20E そのものが変態のタイミングを決定するのではなく、前駆体である ecdysone が決定因子であること、さらに、発生タイミングの決定に伴って体サイズが決定されることを明らかにした。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1360000	0	1360000
2008年度	1350000	405000	1755000
年度			
年度			
年度			
総計	2710000	405000	3115000

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、生理活性、シグナル伝達、発生・分化、発現制御

1. 研究開始当初の背景

昆虫における発生プログラム決定は内分泌系によって制御されているが、その機構において複数のホルモンが関与していることが、脱皮変態の過程に関する研究によって明らかにされている。そのうち、ステロイドホルモンがもっとも主要な役割を果たしている。

昆虫や甲殻類では特有の骨格を持つエクジステロイドの一種である 20-Hydroxyecdysone (20E) が脱皮ホルモンと

して特徴づけられている。昆虫では 20E が脱皮や変態を引き起こすことが明らかにされている。また、鱗翅目昆虫では、幼虫の発生運命がステロイドホルモンとセスキテルペンの幼若ホルモンとの複合作用によって決定されることが明らかにされている。すなわち、幼若ホルモンのレベルが高いときにステロイドホルモンが分泌されれば、幼虫から幼虫への脱皮が起こり、幼若ホルモンのレベルが低いときにステロイドホルモンが分泌されれば、幼虫から蛹への変態が起こる。こ

の変態への移行のチェックポイントなるのが critical weight と考えられている。鱗翅目昆虫では、終齢初期の幼虫が飢餓条件下におかれると蛹化できなくなったり、蛹化のタイミングが遅れたりするが、終齢幼虫が一定の体重に至った後には、飢餓条件下におかれても蛹化のタイミングが遅れなくなる。この体重が critical weight と定義されている。

以上のような、発生過程において観察される段階的なイベントが、ホルモンの複合作用によって、どのように精密に制御されているのかは不明な点が多い。その理由として、ショウジョウバエは遺伝学的な手法を駆使できる利点がある一方で、体サイズが小さいために、ホルモン分泌組織の外科的除去によるホルモン機能の解析が困難であることが挙げられる。また、発生プログラムの制御において、特定の時期にホルモン生産を引き起こさせるタイマーの役割を果たす因子が特定されていないことも挙げられる。

2. 研究の目的

研究背景を踏まえて、本研究では、ショウジョウバエの脱皮変態過程においてタイマーとスイッチの役割を果たす因子の特定と機能の解析を目的に研究を進めた。昆虫特有の発生運命の決定は、数種類のホルモンの複合的な作用によって制御されているが、そのうち主要な役割を果たすのはステロイドホルモンであるエクジステロイドであり、神経ペプチドである PTHH の刺激により周期的に生合成されて脱皮変態を引き起こす。最近、ショウジョウバエの PTHH や昆虫ホルモンの生合成酵素が同定されたことから、これらの遺伝子発現を人為的に制御することにより、ホルモンの分泌操作が可能と考えられる。これより、遺伝学的手法を用いて PTHH やエクジステロイドの分泌異常個体を作製して、その表現型の解析を行った。特定のホルモンの分泌異常が引き起こされることで、そのホルモンがどのような発生段階でどのような機能をしており、また、他のホルモンとどのように相互作用しているかを解明することを試みた。また、これまで脱皮ホルモン活性を持たないと考えられていた 20E の前駆体である ecdysone が活性を示す結果を得ている。これより、未知の情報伝達経路が発生タイミングの決定に関与していると考えられることから、新規の情報伝達系を特定し、脱皮過程に関与する他のホルモン類と相互作用している可能性を検討する。

3. 研究の方法

これまでに、昆虫ホルモンの機能については、主に比較的大型の鱗翅目昆虫を中心に多くの知見が得られてきている。その理由としてホルモンの体内での循環を阻止する結索

実験やホルモン分泌組織の外科的除去といった方法が利用できることが挙げられる。一方で、鱗翅目昆虫では遺伝子変異株を得ることや RNAi 実験により特定の遺伝子をノックダウンすることが困難であることから、昆虫ホルモンの分子レベルでの機能解明は限度がある。一方で、ショウジョウバエは体サイズが小さいため外科的実験は困難であるが、遺伝学的手法を用いて、特定の組織で本来発現していない遺伝子を強制的に発現させる事ができる。この方法を用いて、昆虫ホルモンを生合成する組織での遺伝子発現を操作して、以下のようなホルモン分泌異常を起こす系統を研究に用いた。

(1) PTHH 機能除去個体の解析

ショウジョウバエの PTHH は脳の特定の細胞で発現している。これより、PTHH のプロモーターを用いて、PTHH を生産している神経細胞で細胞死誘導因子 Grim を発現させた。この方法により、PTHH 神経細胞で細胞死が引き起こされ、PTHH 分泌機能を失った個体が得られた。このような個体について発生のタイミングや分泌されるホルモンの変化について解析を行った。また、蛹化タイミングならびに体サイズ決定因子を明らかにするために critical weight を測定した。さらに、PTHH により制御される生合成関連遺伝子の同定を行った。

(2) エクジステロイド 分泌異常個体の解析

20E は食物中のステロール類からコレステロールを経由して生合成される。その際、コレステロールは前胸腺において ecdysone へ変換される。生合成された ecdysone は体内へ放出され、末梢組織で生合成酵素 Shd によって触媒されて、20E へと酸化される。これより、この生合成機構に着目して、本来、前胸腺で発現していない Shd を分子遺伝学的手法によりショウジョウバエ前胸腺で人為的に異所発現させた。この操作によって、前胸腺内で ecdysone が 20E へ変換されるため、体内へ放出される分子種は ecdysone ではなく 20E となると考えられる。このような方法を用いて得られた個体について発育の変化の解析を行った。

20E 情報系とは異なる ecdysone 情報伝達系の解明を行うために、候補受容体 DHR38 に応答するエクジステロイド類縁体を合成した。合成した化合物が ecdysone と同様の機能を示すかどうかを明らかにするため、エクジステロイド分泌異常個体に摂取させて応答を観察した。

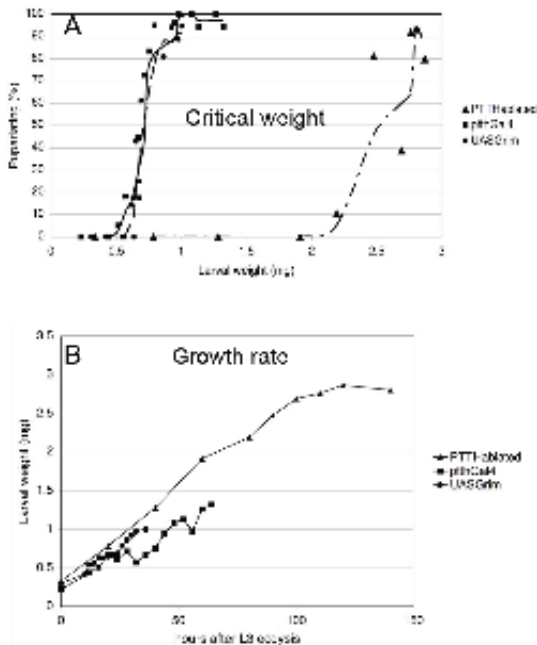
4. 研究成果

研究成果として以下の知見を得た。

(1) ショウジョウバエにおける PTH の機能の特徴づけ

PTH の機能を除去した幼虫の発生様式について解析を行った。その結果、発育の遅延が認められ、それに伴う幼虫、蛹、成虫の体サイズの増大が認められた。鱗翅目昆虫では、PTH は 20E 生産を刺激する役割を果たすことが明らかにされていることから、幼虫の 20E タイターを計測した。その結果、本来脱皮する時期に 20E の生産は認められなかった。しかし、遅延した脱皮時に 20E のピークが認められた。これより、20E 生産の時期の遅れに伴って、幼虫期間の延長と体サイズの増大が認められたものと考えられる。

次に、蛹化決定因子を特定するために、蛹化プログラムの開始のタイミングを決定する critical weight を測定した。その結果、PTH 機能除去幼虫の critical weight は 2.5mg であり、コントロールに用いた 2 系統の幼虫の critical weight (0.72mg および 0.71mg) に比較して増加した (図 1)。なお、PTH 機能除去幼虫の成長率はコントロールと一致した。これより、従来考えられていたような体のサイズが蛹化を決定するのではなく、PTH による 20E の生産時期によって蛹化のタイミングが決定されることが明らかとなった。すなわち、ショウジョウバエでは PTH が 20E の生産時期を制御することで、脱皮変態のタイミングを決定する主要なタイマーの役割を果たすことが明らかとなった。



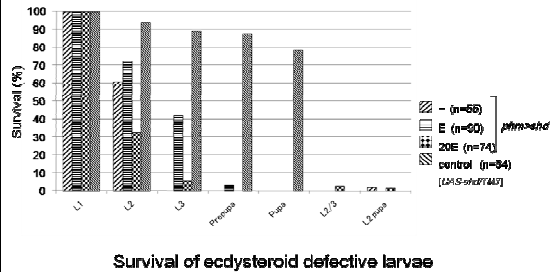
(図 1) PTH 機能除去幼虫の critical weight (A) PTH 機能除去幼虫 (PTTHablated) では、コントロール (ptthGal4 および UASGrim) に比較して critical weight) が増加している。(B) 成長

率は PTH 機能除去幼虫とコントロールはほぼ一致している。

エクジステロイド生合成酵素遺伝子の発現時期は、20E が生産される時期に一致する。これより、PTH の 20E 生合成制御機構を明らかにするために、PTH 機能除去終齢幼虫におけるエクジステロイド生合成酵素遺伝子の発現を定量 PCR 法により解析した。その結果、4 種の生合成酵素 (nvd, spok, phm, dib) の発現が幼虫期間を通じて非常に低い状態であることが判明した。一方で、解析したうち 2 種の生合成酵素 (sad, shd) は、野生型と同様に、変態の時期に先立って発現量が大きくなった。これより、PTH はすべての生合成酵素を同じように制御しているのではなく、特定の生合成酵素の発現を制御していることが明らかになった。また、PTH 機能除去終齢幼虫の遅延した脱皮時に 20E のピークが認められたが、この時期においても、4 種の生合成酵素の発現量は非常に低い状態であった。これより、PTH を介さない、同時に、4 種の生合成酵素 (nvd, spok, phm, dib) の発現が律速とならない 20E 生合成機構の存在が示唆された。

(2) ショウジョウバエにおけるホルモン分泌操作によるエクダイソンの機能解析

前胸腺から ecdysone の代わりに 20E が放出されるエクジステロイド分泌異常個体について解析した。その結果、エクジステロイド分泌異常個体では、半数以上の個体が 2 齢幼虫へと脱皮したが、その後、全ての幼虫が 3 齢へと脱皮できずに死亡した。一方で、ecdysone の摂取により、半数近くの個体が 3 齢へと発育し、一部は蛹化を開始した。なお、20E を与えても、レスキューの効率は上がらなかった (図 2)。このような結果から、ecdysone は幼虫の脱皮に必須であり、20E とは異なる生理活性を持つことを明らかにした。



(図 2) エクジステロイド分泌異常幼虫の生存率

エクジステロイド分泌異常幼虫は、2 齢幼虫の段階で致死となるが、ecdysone を摂取させることで 3 齢幼虫へと発育し、一部の個体は蛹化した。しかし、羽化する個体は認められ

なかった。

次に、蛹化時における ecdysone の機能を追究した。まず、ecdysone を摂取してレスキューされた幼虫が 3 齢へと脱皮した直後に、ecdysone を含まない餌に移して発育を観察した。その結果、ecdysone が蛹化に必須であるという予想とは異なり、蛹化して成虫へと羽化する個体が認められた。これより、ecdysone が蛹化を阻害する作用を持つ可能性を考えた。そこで、野生型の幼虫に ecdysone を含まない餌で 3 齢まで生育させて、3 齢への脱皮直後から ecdysone を摂取させた場合の発育を観察した。その結果、ecdysone を摂取させた個体は、蛹化の時期の死亡率が高まった。また正常に蛹化した場合でも、コントロールに比較して、蛹化した個体の重量が 60% 程度となり非常に大きな差が認められた。この原因を明らかにするために、蛹化開始のタイミングを調べてみた。その結果、ecdysone を摂取させた個体はコントロールや 20E を含む餌を与えた場合に比べて、12 時間以上、蛹化が早まって開始した。これより、ecdysone を摂取させた場合、蛹化の準備ができていない状態で、蛹化が開始してしまうため死亡したり、蛹化のタイミングが早まるためサイズの減少が認められたりするものと考えられる。

以上の結果から、ecdysone は 20E とは異なる機能をもつことが示された。これより、ecdysone の情報伝達経路の解明を試みた。最近、最近、ecdysone が核受容体 DHR38 に結合することが報告されたことから、ecdysone の受容系に関して DHR38 を介した情報伝達系が候補として考えられた。しかし、ecdysone を幼虫に与えても、体内で 20E へと変換され、EcR/USP 受容体に結合するため、DHR38 の関与を明らかにすることができない。最近、エクジステロイド類縁体の 3-epi-20E が EcR/USP 受容体に結合せず DHR38 に特異的に結合することが報告された。これより、ecdysone が DHR38 に受容されるなら、3-epi-20E が ecdysone の代わりの機能を果たすことが期待できる。そこで、3-epi-20E を合成して、エクジステロイド分泌異常個体に摂取させて、ecdysone と同様に幼虫脱皮をレスキュー可能か検討した。その結果、一部の幼虫は 2 齢へと脱皮したが、その後、全ての幼虫が 3 齢へと脱皮できずに死亡した。すなわち、エクジステロイドを摂取していない個体と同様の発育を示したことより、DHR38 以外の未知の受容体を介した ecdysone の情報伝達が機能している可能性が考えられた。

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 1 件)

(1) McBrayer Z. *, Ono, H. *, Shimell M. J. *, Parvy J., Beckstead R. B., Warren J. T., Thummel C., Dauphin-Villemant C., Gilbert L. I., and O' Connor M. B.

(*These authors contributed equally to this work)

Prothoracicotropic hormone regulates developmental timing and body size in *Drosophila*.

Developmental Cell **13**: 857-871 (2007)

(査読あり)

[学会発表] (計 3 件)

(1) 小野肇、西田律夫、Michael B. O' Connor
ショウジョウバエにおけるホルモン分泌操作によるエクダイソンの機能解析

2009 年 3 月 28-30 日

第 53 回 日本応用動物昆虫学会大会

北海道大学高等教育機能開発センター(札幌市)

(2) Ono H., Warren J. T., Rewitz K., Gilbert L. I. and O' Connor M. B.

Spook and Spookier, highly related P450 enzymes, code for stagespecific components of the ecdysteroid.

2007 年 9 月 10-14 日

The 8th Japanese *Drosophila* Research Conference

つくば国際会議場エポカル (つくば市)

(3) Ono H., Warren J. T., Rewitz K., Gilbert L. I. and O' Connor M. B.

Spook and Spookier, highly related P450 enzymes, code for stage specific components of the ecdysteroid.

The 8th Japanese *Drosophila* Research Conference

2007 年 7 月 2-4 日

淡路夢舞台国際会議場 (淡路市)

[その他]

受賞

2007 年 7 月

表彰機関: The 4th Asia-Pacific Conference on Chemical Ecology

受賞名: Prize for Excellent Poster Presentation

題名: Spook and Spookier, highly related P450 enzymes, code for stage-specific components of the ecdysteroid biosynthetic pathway in *Drosophila*

melanogaster.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小野 肇 (ONO HAJIME)

京都大学・大学院農学研究科・助教

研究者番号：70452282

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし