

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 6 月 14 日現在

機関番号：82112

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21580070

研究課題名（和文） 昆虫の休眠における脱皮ホルモンの役割の解明

研究課題名（英文） Study of the role of ecdysteroid for insect diapause

研究代表者

木内 信 (KIUCHI MAKOTO)

独立行政法人農業生物資源研究所・昆虫科学研究領域・領域長

研究者番号：90391549

研究成果の概要（和文）：脱皮ホルモン濃度が低い状態で維持されることが各種の昆虫の幼虫期および蛹期の休眠の維持に必要なだということはよく知られているが、これらの虫の休眠を誘導する内分泌シグナルについてはよく分かっていない。そこで、幼虫期に休眠するオオワタノメイガを使って、休眠誘導における脱皮ホルモンの役割を調べた。まず、昆虫病原性糸状菌である緑きょう病菌から脱皮ホルモン 22 位酸化酵素 (Ecdysteroid-22-oxidase: E22O) を精製・単離し、E22O を使って昆虫体内の脱皮ホルモン濃度を下げる（血液中の活性型脱皮ホルモンを不活性化する）技術を開発した。オオワタノメイガの非休眠幼虫に E22O を注射したところ、ワンダリング後何も食わず数ヶ月間生き続けた。また、E22O 処理虫では低温（5℃）への耐性が増し、一定期間低温においた後に通常の温度に戻すと成長を再開した。これらの成長、生存特性は短日処理により休眠を誘導した幼虫のものと変わらなかったことから、オオワタノメイガの非休眠幼虫に E22O を注射することにより休眠が誘導されたものと結論した。この結果は、脱皮ホルモン濃度の低下が昆虫の休眠を誘導する内分泌的刺激になりうることをはじめて示したものである。

研究成果の概要（英文）：Many researches suggested that larval and pupal diapauses are maintained by ecdysteroid deficiency, however, the endocrinological cue to trigger diapause is still not very clear. We therefore examined the role of ecdysteroid for the induction of the larval diapause of *Haritalodes basipunctalis*. When non-diapausing larvae of *H. basipunctalis* were injected with an ecdysteroid inactivating enzyme ecdysteroid-22-oxidase (E22O) identified from *Nomuraea rileyi*, they survived for a few months without eating anything. The E22O-injected larvae also acquired high cold-hardiness, a characteristic often observed in insects in diapause. Furthermore, they resumed development after being exposed to chilling conditions, which is the environmental stimulus to break diapause in many insect species. These developmental and survival characteristics were indistinguishable from those of the normal diapausing larvae, suggesting strongly that the E22O injection induced the larval diapause in *H. basipunctalis*. To the best of our knowledge, this is the first report indicating that a reduction in the ecdysteroid titer is a sufficient endocrinological stimulus to induce diapauses in insects.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2010年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2011年度	1,200,000	360,000	1,560,000
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：応用昆虫学

キーワード：昆虫生理

1. 研究開始当初の背景

多くの昆虫は、光周期や温度などの環境条件を受容して、様々なホルモンの分泌量を調節することにより休眠の誘導や維持、覚醒を制御すると考えられているが、なかでも脱皮ホルモンが休眠の制御に関与することを示す報告が多い。そのような種では、休眠状態で脱皮ホルモン濃度が低く、休眠虫に対する脱皮ホルモンの注射により休眠を打破できることから、脱皮ホルモン濃度の低下が休眠の誘導や維持に重要だと示唆されてきた。しかし、これまでは、脱皮ホルモン濃度を人為的に下げる方法がなかったため、脱皮ホルモンが昆虫の休眠の制御、特に休眠の誘導に具体的にどのように関わっているのかは明らかにできていなかった。

2. 研究の目的

課題担当者らは、昆虫病原性糸状菌の緑きょう病菌 (*Nomuraea rileyi*) が脱皮ホルモン 22 位酸化酵素 (Ecdysteroid-22-oxidase: E22O) を寄主昆虫の血液中に分泌し、脱皮ホルモンを不活性化して脱皮・変態を阻害することを生理学的な実験が明らかにしているが (図 1) (Kiuchi et al., 2003 *Arch. Insect Physiol. Biochem.* 52: 35-44)、E22O の同定はできていなかった。そこで、この酵素を精製・単離した後に、この酵素の組み替え体タンパク質を各種の昆虫の体内に注射し、脱皮ホルモン濃度を人為的に低下させて休眠に対する影響を調べることにより、休眠誘導における脱皮ホルモンの役割を明らかにする。

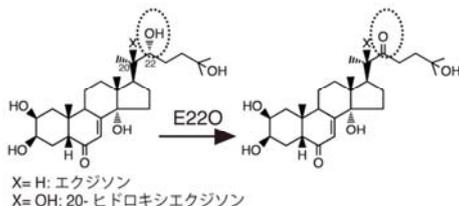


図 1 E22O による脱皮ホルモンの不活性化反応
E22O により 22 位の水酸基をカルボニル基に酸化されたエクジステロイドでは、脱皮ホルモン活性が著しく低下する。

3. 研究の方法

(1) E22O の同定

まず、緑きょう病菌の培養液から、HPLC により E22O を精製・単離した。この際、200 μM のエクジソン液に各サンプルを加えて 10 分培養した後に生成される 22-デオキシエクジソンの量を HPLC で分析することにより、HPLC 活性を評価した。次に、単離した E22O および V8 プロテアーゼによる E22O の限定加水分解産物の N 末端アミノ酸配列をアミノ酸シーケンサーで解読した。得られたアミノ酸配列を元に設計した縮重プライマーを使った RT-PCR により E22O の部分 cDNA をクローニングし、さらに RACE 法により全長 cDNA を得た。得られた E22O cDNA を pIZT-V5/His ベクターにサブクローニングして、Sf9 細胞株にトランスフェクション法で導入し、組換え体タンパク質を発現させた。細胞摩砕液および培養上清の E22O 活性を調べることにより、クローニングした cDNA が実際に E22O をコードしていることを確認した。

(2) E22O を使った生理学実験

E22O 発現プラスミドを Sf9 細胞に導入した後、抗生物質で数ヶ月間選抜することにより、E22O 遺伝子を恒常的に発現する細胞株 (Sf9-E22O) を作出した。Sf9-E22O の馴化培地に多量の組換え E22O タンパク質が含まれることから、この馴化培地を E22O 液として用いた。各種の昆虫にこの E22O を注射した後に、脱皮ホルモン濃度、脱皮・変態、休眠への影響などを調べた。脱皮ホルモン濃度については、血液のメタノール抽出物をそのままラジオイムノアッセイ (RIA) 法で測定して総エクジステロイド濃度を測定するほか、血液のメタノール抽出物を HPLC で分画した後に RIA 法にかけることにより、個々のエクジステロイドの濃度も測定した。

4. 研究成果

(1) E220 の同定

疎水性相互作用クロマトグラフィー、ゲル濾過、イオン交換クロマトグラフィーの3段階の HPLC 分画により、緑きょう病菌培養液から E220 タンパク質を精製した。精製されたタンパク質の分子量は、SDS-PAGE とゲル濾過の両方で 76 kDa と見積もられたことから、E220 は単量体タンパク質と考えられた (図 2 A, B)。また、精製した E220 タンパク質を使って、エクジソンと 20-ヒドロキシエクジソンを基質とした速度論的な解析を行った。2つの基質に対する K_m 値は $4.3 \mu\text{M}$ で等しかったが、 K_{cat} 値はエクジソンを基質とした場合には $8.4/\text{s}$ で 20-ヒドロキシエクジソンに対する値 ($2.6/\text{s}$) に比べて 3 倍ほど高かった (図 2 C)。この結果から、E220 が 20-ヒドロキシエクジソンに比べてエクジソンをより早く不活性化することがわかった。緑きょう病菌は、寄主昆虫の前胸腺から分泌されたエクジソンが強い脱皮ホルモン活性を持つ 20-ヒドロキシエクジソンに変換される前に不活性化することにより、寄主の脱皮・変態を抑えているものと考えら得る。また、E220 の K_m 値と V_{max} 値を既報の脱皮ホルモン分解酵素のものと比較したところ、 K_m 値はどの酵素も大きな違いは無かったが、 V_{max} 値は E220 のものが他の酵素のものよりかなり大きく、E220 が既知のどの酵素よりも効率的に脱皮ホルモンを不活性化することがわかった。

次に、E220 cDNA をクローニングした。まず、精製した E220 の N 末端のアミノ酸配列をシーケンスした。さらに、E220 を V8 プロテアーゼにより限定加水分解し、その分解産物を単離した後にそのうちの 1 断片の N 末端アミノ酸配列をシーケンスした。これらの 2 種のアミノ酸配列をもとに縮合プライマーを設計し、RT-PCR により約 200 bp の E220 の部分 cDNA をクローニングし、さらに 5' RACE および 3' RACE により 1,963 bp からなる全長 cDNA を得た。得られた cDNA は 594 アミノ酸からなる新規の FAD 結合型の酸化還元酵素をコードしていた。このアミノ酸配列は、他の糸状菌類から報告されている数種の酸化還元酵素と高い配列相同性を示したが、それらの中にホルモンもしくはステロイドを基質とするものは含まれていなかった。

最後に、得られた cDNA が実際に E220 をコードしていることを確認した。コード領域の全長を含む cDNA を発現ベクターに組み込み、Sf9 細胞に発現させたところ、培養上清から緑きょう病菌培養液を上回る強い E220 活性が検出された (図 3)。一方、細胞摩砕物からは E220 活性は検出されなかった。この結果から、得られた cDNA が実際に E220 をコードしていること、および E220 が分泌タンパク質であることが確認できた。

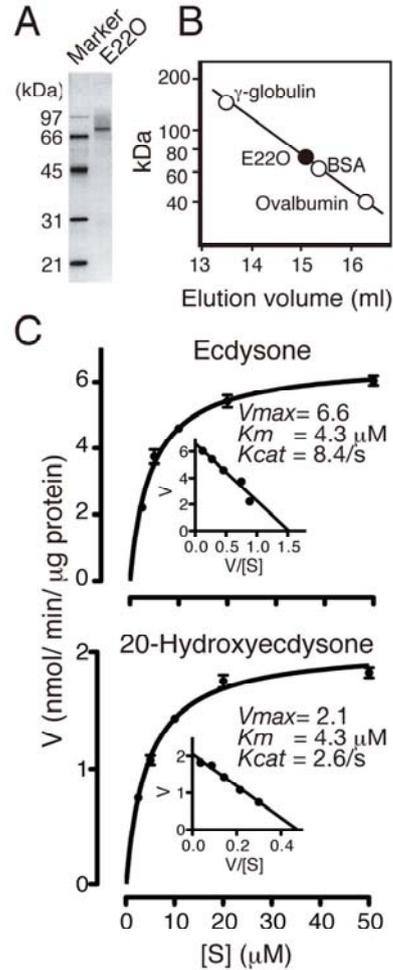


図 2 精製した E220 タンパク質の生化学的特性 (A) SDS-PAGE、(B)ゲル濾過、(C) 2 種の脱皮ホルモンを基質とした速度論的解析

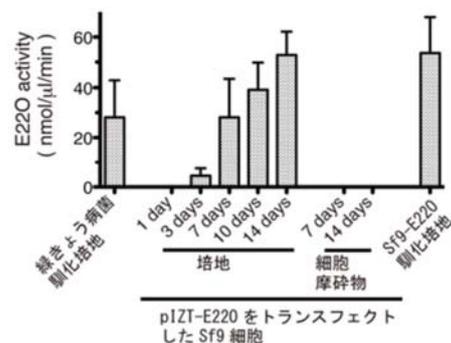


図 3 様々な培養上清や細胞摩砕物の E220 活性

(2) E220 を使った休眠における脱皮ホルモンの役割の解析

まず、E220 を安定的に得るために、E220 を恒常的に発現する培養細胞を作出した。E220 の発現プラスミドを S9 細胞に導入後、

抗生物質を加えて培養することにより選抜した。数ヶ月後には、全ての細胞が抗生物質存在下でよく育ち、また、馴化培地に高レベルの E220 活性が認められたことから(図 3)、この細胞を Sf9-E220 と名付け、この細胞の馴化培地を E220 液として用いて各種の生理学的解析を行うことにした。

まず、E220 処理により実際に昆虫体内の脱皮ホルモン濃度が下がるかを確認した。蛹化後 2 日のカイコ (*Bombyx mori*) の蛹に E220 を注射し、その 2 日後に血液中の脱皮ホルモンを抽出して定量し、通常の Sf9 細胞の培養上清を注射した対照区の虫の脱皮ホルモン濃度と比較した(図 4)。対照区と E220 処理区の虫の間でエクジソン濃度に差は見られなかったが、20-ヒドロキシエクジソンの濃度は対照区の虫では 600 ng/ml 以上あったのに対し、E220 処理区ではその 1/3 以下に抑えられていた。一方、対照区では 22 位がカルボニル基に酸化された 22-デオキシエクジソンと 22-デオキシ-20-ヒドロキシエクジソンが検出できなかったのに対し、E220 処理区ではこれらの酸化エクジステロイドが多量に含まれていた。この結果から、E220 の注射により血液中の 20-ヒドロキシエクジソン濃度が実際に低下することが確認された。

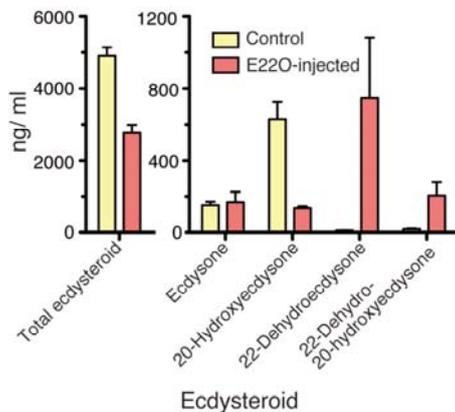


図 4 E220 処理によるカイコ蛹の血液中の脱皮ホルモン濃度の変化

次に、カイコを含む様々な昆虫の幼虫や蛹に E220 を注射して、成長が影響を受けるか、さらに休眠が誘導されるかを調べた。カイコの蛹化後 2 日の蛹に E220 を注射して前述のように 20-ヒドロキシエクジソン濃度を下げた場合には蛹期間が延長し 2 割ほどの個体で羽化が阻害されたが、休眠は誘導されなかった。カイコの野生種であるクワコ (*Bombyx mandarina*) は卵期に加えて蛹期でも休眠することが知られているので、E220 を注射して休眠を誘導できるか調べたが、カイコと同様に蛹期間が延長するだけで休眠は誘導されなかった。ほかには、チョウ目のホシシヤク (*Naxa seriaria*)、コウチュウ目のチャイロ

コメノゴミムシダマシ (*Tenebrio molitor*)、ハエ目のヒロズキンバエ (*Lucilia sericata*)、カメシ目のホソヘリカメムシ (*Riptortus clavatus*) などの様々な分類群に属す虫の幼虫に E220 を注射したが、脱皮や変態は強く阻害されたものの、休眠に対するはっきりとした影響は認められなかった。一方、チョウ目のオオワタノメイガ (*Haritalodes basipunctalis*) の非休眠幼虫に注射した場合には、この虫の休眠ステージである老熟幼虫(ワンダリング後の幼虫)で数ヶ月間何も食わず生存し続ける個体が現れ、休眠が誘導された可能性が示唆された。そこで、E220 処理によりオオワタノメイガの非休眠幼虫に休眠が誘導された可能性をさらに詳しく調べた。

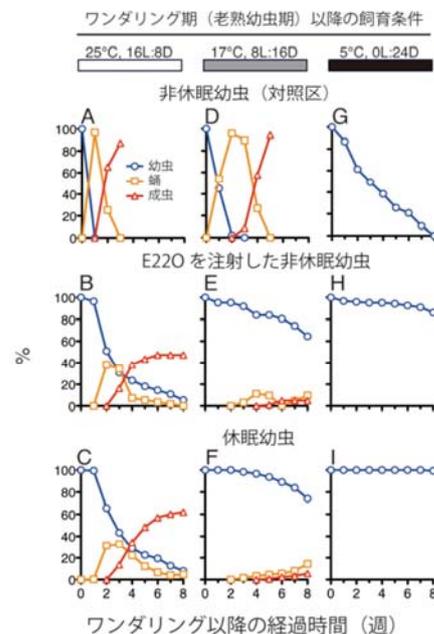


図 5 E220 を注射したオオワタノメイガの成長、生存特性 25°C、16L8D 条件で飼育した非休眠幼虫 (A, D, G)、25°C、16L8D 条件で飼育した後にワンダリング期に E220 を注射した幼虫 (B, E, F)、17°C、8L16D 条件で飼育した休眠幼虫 (C, F, I) をワンダリング期以降に 25°C、16L8D 条件 (A, B, C)、17°C、8L16D 条件 (D, E, F)、5°C、恒暗条件 (G, H, I) においてその後の成長、生存を調べた。

オオワタノメイガ幼虫は高温長日条件 (25°C、16L8D) で飼育すると休眠せず、ワンダリング後数日で蛹化し、さらに 2 週間ほどして成虫に羽化するが(図 5A)、中温短日条件 (17°C、8L16D) で飼育するとワンダリング後休眠に入りそのまま数ヶ月間は蛹化しない(図 5F)。また、非休眠虫では低温への耐性は弱く 5°C におくと 2 ヶ月の間で全ての個体が死亡したが(図 5G)、非休眠虫は高

い低温耐性を持ち 5°C においても数ヶ月間は生き続けた (図 5 I)。高温長日条件で飼育して非休眠になるように運命づけた虫にワンダリング期に E220 を注射したところ、蛹化が大幅に遅れ数ヶ月間幼虫のままでいる個体が多く現れた (図 5 B)。E220 処理虫を中温短日条件下におくと、ほとんどの個体が数ヶ月間幼虫のままで生き続けた (図 5 E)。また、E220 処理虫は 5°C でも 2ヶ月間生存し続けた (図 5 H)。これらの成長、生存特性は無処理の非休眠虫のもの (図 5 A, D, G) とは大きく異なり、休眠虫のもの (図 5 C, F, I) と非常によく似ていた。

オオワタノメイガの休眠幼虫では、1ヶ月以上の間 5°C におくことで休眠から覚醒させ、成長を再開させることができる (図 6 A)。そこで、E220 においても、低温処理により成長を再開できるかを調べた。E220 を注射した幼虫を 1ヶ月半の間 5°C においた後に中温短日条件におくと、休眠幼虫と同様に蛹化さらに羽化した (図 6 B)。このように、E220 処理虫においても、一定期間の低温処理により成長を再開させることができた。

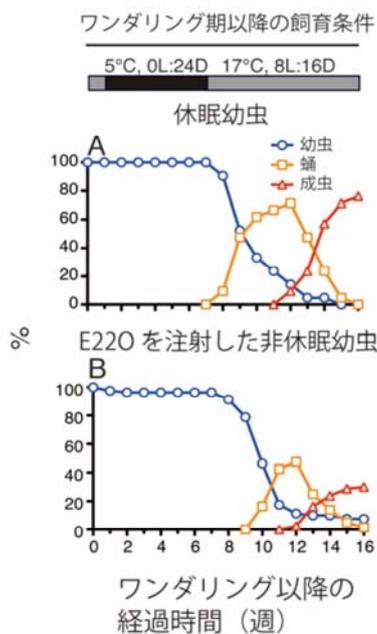


図 6 E220 を注射したオオワタノメイガ幼虫の成長再開 17°C、8L16D 条件で飼育して休眠させた虫 (A) および 25°C、25°C、16L8D 条件で飼育した後にワンダリング期に E220 を注射した虫 (B) をワンダリング期以降に 17°C、8L16D に 1 週間おいた後に 5°C、恒暗条件に 1ヶ月半おき、さらに 17°C、8L16D にもどして飼育し、その間の成長、生存を調べた。

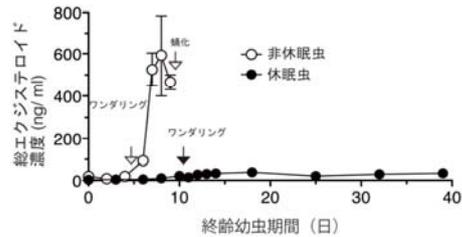


図 7 オオワタノメイガの非休眠幼虫と休眠幼虫の血液虫脱皮ホルモン濃度の比較

最後に、休眠幼虫と非休眠幼虫との間で血液中の脱皮ホルモン濃度を比較した。非休眠幼虫では摂食期には総エクジステロイド濃度は 20 ng/ml 以下であったが、ワンダリング期になると急増し、蛹化の 1 日前には 600 ng/ml に達した。一方、休眠幼虫では摂食期のエクジステロイド濃度は非休眠幼虫と同じく 20 ng/ml 以下であり、ワンダリング期に入ると若干上昇したが、その後数週間をわたって 40 ng/ml を越えることはなかった。このように、休眠幼虫の血液虫脱皮ホルモン濃度は、非休眠幼虫のものに比べてはるかに低く抑えられていた。

以上のように、E220 を注射したオオワタノメイガの幼虫は、①何も食わず数ヶ月間生き続ける、②低温 (5°C) への耐性が増す、③一定期間低温においた後に通常の温度に戻すと成長を再開する、という結果が得られた。これらの成長、生存特性は中温短日条件で飼育することにより休眠を誘導した幼虫のもの変わらないことから、オオワタノメイガの非休眠幼虫に E220 を注射することにより休眠が誘導されたことが強く示唆された。これまでは多くの虫の幼虫期と蛹期の休眠において、脱皮ホルモン濃度が低く抑えられていることが休眠の維持に重要だという結果が得られていた。実際、オオワタノメイガの休眠虫においても、脱皮ホルモン濃度は低く抑えられていた (図 7) しかし、休眠を誘導する内分泌的の刺激についてはよく分かっていなかった。本研究により、脱皮ホルモン濃度の低下が、休眠を誘導する内分泌的の刺激になりうることはじめて示された。今後、E220 処理がどのようにオオワタノメイガ幼虫の休眠を誘導するかを調べることにより、休眠誘導機構の詳細を明らかにできると考えている。また、E220 を使うことにより他の虫の休眠誘導における脱皮ホルモンの役割も明らかにすることができると期待される。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 10 件)

1. Kamimura M, Saito H, Niwa R, Niimi T, Toyoda K, Ueno C, Kanamori Y,

- Shimura S, Kiuchi M. (2012) Fungal ecdysteroid-22-oxidase: a new tool for manipulating ecdysteroid signaling and insect development. *J Biol Chem*. 287: 16488-16498.
2. Kanamori Y, Hayakawa Y, Matsumoto H, Yasukochi Y, Shimura S, Nakahara Y, Kiuchi M, Kamimura M (2010) A eukaryotic (insect) tricistronic mRNA encodes three proteins selected by context-dependent scanning. *J Biol Chem* 285: 36933-36944.
 3. Nakahara Y, Kanamori Y, Kiuchi M, Kamimura M (2010) Two hemocyte lineages exist in silkworm larval hematopoietic organ. *PLoS One* 5, e11816.
 4. Nakahara Y, Shimura S, Ueno C, Kanamori Y, Mita K, Kiuchi M, Kamimura M (2009) Purification and characterization of silkworm hemocytes by flow cytometry. *Dev Comp Immunol* 33: 439-448.

[学会発表] (計 19 件)

1. 神村学, 丹羽隆介, 新美輝幸, 豊田衣子, 上野千尋, 志村幸子, 木内信 (2012) カビ由来の脱皮ホルモン分解酵素を用いた簡便な脱皮ホルモン濃度低下法の開発. **第 56 回日本応用動物昆虫学会大会講演要旨**, 14
2. 神村学, 豊田衣子, 上野千尋 & 木内信 (2010) 脱皮ホルモン分解酵素を利用したオオワタノメイガ幼虫の休眠誘導. **第 54 回日本応用動物昆虫学会大会講演要旨**, 67.
3. 神村学, 上野千尋, 豊田衣子, 志村幸子 & 木内信 (2009) 昆虫病原性糸状菌由来の酵素を利用した脱皮ホルモン不活性化技術の開発. **平成 21 年度蚕糸昆虫機能利用学術講演会-日本蚕糸学会第 79 回大会要旨集**, 49.

[図書] (計 4 件)

1. 神村学 (2009) 脱皮ホルモンと幼若ホルモン. *分子昆虫学-ポストゲノムの昆虫研究-* (神村学, 日本典秀, 葛西真治, 竹内秀明, 島山正統, 石橋純 編), 共立出版, 東京 145-157.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

木内信 (KIUCHI MAKOTO)
(独) 農業生物資源研究所・
昆虫科学研究領域・領域長

研究者番号 : 90391549

(2) 研究分担者

神村学 (KAMIMURA MANABU)
(独) 農業生物資源研究所・
昆虫成長制御研究ユニット・主任研究員
研究者番号 : 60370649