

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 25 年 5 月 12 日現在

機関番号：11101

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2010 ～ 2012

課題番号：22380032

研究課題名（和文） 蛹変態の分子機構の解明

研究課題名（英文） Molecular mechanisms of pupal 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（和文）：昆虫の蛹変態の分子メカニズムの一端をカイコを使用して明らかにした。(1) 細胞レベルのコミットメントは定説とは異なり、all-or-none で起こるのではなく蛹変態する単一細胞 Verson's gland を使用しての研究により、徐々に起こることを証明した。(2) 幼虫特異的な組織 *crochet* 産生細胞の退化は、栄養によりインスリン伝達経路が不活化される結果引き起こされることを予備実験ながら示した。(3) 蛹コミットメントに必要な終齢期での JH 合成の停止には、エクダイソンの低下ならびにドーパミンと sNPF の作用により起こることを示した。(4) エクダイソン誘導性転写因子 BHR4 は前胸腺にフィードバックしてエクダイソン合成を抑制する作用を見出し、それにより蛹化のタイミングを調節していることを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：We have studied molecular mechanisms of pupal metamorphosis in *Bombyx mori*, specifically; (1) We determined using a single celled Verson's gland that the pupal commitment of one cell occurs gradually with various intermediate phases, which is different from the well known hypothesis. (2) Our preliminary studies showed that the decline in the competent of larval specific *crochet* forming cells, is due to nutrients by inactivating the insulin signaling pathway. (3) The cessation of JH biosynthesis in the last instar larvae is caused by several factors to work together to guarantee its cessation; such as the decline in ecdysone titer and the release of dopamine and sNPF. (4) The ecdysone inducible transcription factor BHR4 acts back to the prothoracic glands to suppress the ecdysone biosynthesis, so that this factor regulates the timing of pupal ecdysis.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	6,300,000	1,890,000	8,190,000
2011 年度	4,200,000	1,260,000	5,460,000
2012 年度	4,200,000	1,260,000	5,460,000
年度			
年度			
総計	14,700,000	4,410,000	19,110,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：応用昆虫学

キーワード：昆虫生理学、昆虫ホルモン、エクダイソン、幼若ホルモン、変態

1. 研究開始当初の背景

(1) 細胞のコミットメント

生物の発生の過程で、細胞は「未分化な

状態」から「分化後の運命を定められた状態」への切り替えを起こし、この切り替えはコミットメントと呼ばれる。コミットメントの誘

導は、個々の細胞は中間型をとらずに all-or-none で引き起こされるのが定説となっている(Gilbert, 2006)。蛹へのコミットメントは、終齢脱皮後血中の幼若ホルモン(JH)が消失した状態で少量のエクダイソンのピークが現れることにより誘導され(皮膚の蛹コミットメントの場合)、その後の高濃度のエクダイソン分泌により実際の蛹へと分化する(Riddiford, 1976; Muramatsu et al., 2008)。

コミットメントの機構を細胞レベルで研究した例は、哺乳類の赤血球のヘモグロビン生成においてだけである。胎児と成体のヘモグロビンを転写する遺伝子が拮抗しあって発現し、ステージ特異的なヘモグロビンを生成する(Stamatoyannopoulos, 2005)。昆虫においても、個々の細胞のコミットメントは赤血球の場合と同様に all-or-none で起こると考えられている(Riddiford, 1991)。しかし単一細胞から分化する不完全変態昆虫の剛毛は、成虫脱皮の臨界期に JH を処理することにより幼虫と成虫の中間型に分化する事が知られており(Wigglesworth, 1934)、個々の細胞のコミットメントは徐々に起こることも考えられる。この課題は発生学上の重要な命題であるにもかかわらず、良い材料が無いために研究が進んでいない。皮膚の真皮細胞はこの研究には小さ過ぎて不適である。ところが Verson's gland は巨大な1つの分泌細胞であり、幼虫の真皮細胞から分化して各体節に1対ずつ存在する。その期間は発育時期特異的なタンパク質を合成することが知られている

(Lane et al., 1986)。我々もカイコの Verson's gland で発育時期及び体節に特異的なタンパク質を見出している。これらのタンパク質の発現のスイッチ機構をモデルとして研究することにより、上記の命題が解決する。

(2) 幼虫細胞の細胞死とそのコミットメント

蛹に不要な幼虫細胞は退化し、幼虫細胞の死は蛹変態に不可欠な事象である。カイコの終齢4日目に幼虫特異的組織である腹脚のカギ爪(crochet)産生細胞は退化消失する。これらの細胞死のコミットメントは皮膚とは異なりエクダイソンと JH との関係だけでは起こらず、他の要因が存在することを我々は既に突き止めており、このコミットメント機構を明らかにする。また4齢期の腹部7から9体節(A7-A9)の Verson's gland は他の体節と異なり、終齢脱皮後に退化する。そのコ

ミットメント機構及び体節特異性について明らかにする。

(3) JH 合成調節機構の解明

幼虫の組織が蛹コミットメントするためには JH の血中濃度の減少が不可欠である。アラタ体での JH 合成制御をおこなう物質がいくつか同定されているが、統一的な研究はおろか、蛹変態と関連づけた統合的な研究は全くなされておらず、昆虫変態の引き金となる JH 合成の停止のメカニズムについては不明である。これを明らかにすることにより、蛹変態誘導の引き金となる JH 合成の停止のメカニズムを解明する。

(4) 転写因子 BHR4 の蛹化への役割

エクダイソンが作用する時には様々な転写因子が発現して、エクダイソンシグナルカスケードを形成する。Early-late gene の1つである hormone receptor 4 (HR4) は、単量体のオーフアン核内レセプターで、molting の時期のエクダイソンのサージに反応して発現する。その後エクダイソン濃度の低下とともに発現が低下し、脱皮行動の前には消失することが種々の昆虫で知られている。タバコスズメガ *Manduca sexta* ではエクダイソンカスケード内における転写因子間の相互関係の一端が解明されており、*Manduca* HR4

(MHR4) はそれらの中でも中心的な位置づけにあるが、これらの研究結果はすべて培養細胞を用いた実験によるものであり、実際に生体内でどのような役割を果たしているのかは鱗翅目昆虫では明らかにされていない。本研究ではカイコをモデルとして用い、*Bombyx* HR4 (BHR4) が蛹変態に及ぼす役割について明らかにする。

2. 研究の目的

ホルモンシグナルに複雑に応答して引き起こされる昆虫の蛹変態の分子機構を、終齢期の決定から蛹脱皮に至るまで、総合的に解明することを目的とする。具体的には、(1) Verson's gland を使用して、単一細胞レベルでのコミットメント機構を明らかにし、発生学上の重要命題を解決する。(2) 蛹分化に幼虫細胞の死は不可欠であり、腹脚の crochet 産生細胞及び各体節に存在する Verson's gland を使用し、細胞死とそのコミットメント機構を体節の認識と関連付けて解明する。(3) 蛹変

態を引き起こす鍵となる JH 合成の停止のメカニズムを解明する。(4) 蛹化の最終段階である蛹脱皮時における、エクダイソン誘導性転写因子 BHR4 のフィードバックによるエクダイソン合成調節機構を解明する。

3. 研究の方法

生理学的手法（組織培養など）と生化学・分子生物学的手法を駆使する。(1) Verson's gland を使用し、すでに作成が完了している custom made のマイクロアレイをスクリーニングし、それら遺伝子の単一細胞内での発現解析を細胞レベルで解明する。(2) Crochet 産生細胞と Verson's gland の細胞死の分子機構及びその体節特異的制御について *in vivo* と *in vitro* で調べる。(3) JH 合成を *in vitro* で計測して、その合成調節、特に不活化する物質を同定する。(4) 蛹脱皮制御機構解明のために、転写因子 BHR4 のエクダイソン合成調節機構を組み換えカイコを使用して明らかにする。

4. 研究成果

(1) 単一細胞 Verson's gland の蛹コミットメント機構

カスタムメイドの DNA マイクロアレイをスクリーニングして、幼虫期及び蛹期特異的に発現する遺伝子を複数見いだした。そこでこれらの遺伝子発現を指標とし、移植実験によるコミットメントのアッセイを行った結果、移植 Verson's gland における幼虫型の遺伝子群は、ドナーが終齢 1 日の時期に減少を始め、終齢 3 日までには発現が消失した。一方蛹型の遺伝子群の発現は終齢 2 日から発現が上昇し始め、3 日にはピークに達した。このことから Verson's gland における蛹コミットメントは終齢 1 日から 3 日にかけて起こることがわかった。そこでコミットメントの移行期である終齢 2 日の Verson's gland を用いて幼虫特異的遺伝子と蛹特異的遺伝子の発現解析を単一細胞レベルで行ったところ、複数の両者の遺伝子が同時に発現していることを見出した。すなわちこの結果は、細胞レベルでは蛹コミットメントが定説とはことなり all-or-none ではなく、徐々に起こるということを示唆している。

(2) Crochet 産生細胞と Verson's gland の体節特異的な細胞死

Crochet 産生細胞 — 幼虫特異的な器官

である crochet 産生細胞は蛹変態に伴い退化する。この細胞の crochet 形成能力は終齢幼虫脱皮後 2 日間で徐々に低下し、その後 24 時間以内に細胞は死に到る。エクダイソンと幼若ホルモンはその過程にほとんど影響を与えなかったが、絶食は形成能力の低下を抑制した。故に栄養がその抑制に重要な役割を担っており、その中の糖が最も重要な要因であることを見出した。しかし正常な餌を摂食している終齢幼虫にインスリンを注射すると産生細胞形成能力の低下が抑制されたが、インスリン伝達経路の阻害剤である

wortmannin の処理はインスリンの作用を中和した。Crochet 産生細胞でのインスリン受容体の発現は、絶食により発現は 10 倍近く上昇した。これらの結果は確立されているインスリン伝達経路のメカニズムと異なり、栄養の欠乏によりこの伝達経路が活性化され、その活性化が crochet 産生細胞の形成能力の維持に必要であることを示している。すなわち終齢脱皮後の摂食によりインスリン伝達経路が不活化されるために、crochet 産生細胞の形成能力が低下し、その後に細胞死が引き起こされることを見出した。

Verson's gland — Verson's gland は脱皮前に肥大化し、脱皮時に内容物を分泌して縮小する。しかし、蛹への脱皮時においては腹部第 7-9 体節の Verson's gland はその他の体節とは異なり、肥大化せずに脱皮直前には消失した。このことから腹部第 7-9 体節の Verson's gland のみが終齢幼虫期に細胞死を起こすことが示唆された。そこで、細胞死のタイプの決定とその起こる時期の特定したところ、細胞死は終齢 1.5 日以降にオートファジーによって引き起こされることが解った。また、細胞死コミットメントは終齢脱皮後 12 時間から 36 時間にかけて起こることが分かった。さらに、4 齢 3 日-5 齢 0 日幼虫へ JH analog の methoprene を処理したところ、細胞死が抑制され、細胞死のコミットメントも起こらなくなった。故に、この体節特異的な細胞死は終齢脱皮後の JH の低下に起因していることが明らかになった。

(3) 蛹コミットメントに必要な不可欠な終齢幼虫期における JH 合成の停止

① エクダイソンによる JH 合成制御

終齢期では血中の JH 濃度は脱皮後 3 日目までに急速に低下する。一方 5 齢期の血中

エクダイソン濃度は脱皮直前から急激に低下し、脱皮 12 時間後にはほぼ検出限界以下となることから、エクダイソン濃度の低下が JH 合成の低下を引き起こすことが示唆される。20-Hydroxyecdysone (20E) を摂食させてエクダイソンの血中濃度を人為的に上昇させる実験から、5 齢脱皮後に JH 合成能が急激に低下する要因は、血中エクダイソンの消失によることが明らかとなった。特に JH 合成の律速酵素の一つと考えられる juvenile hormone acid methyl transferase (JHAMT) 遺伝子の発現停止がエクダイソンの低下により引き起こされ、*in vitro* の研究からこのエクダイソンの作用は脳からの神経連絡を介してアラタ体に作用することも明らかとなった。

② 神経伝達物質による JH 合成制御

カイコにおいては 5 齢脱皮後に生体アミンのひとつであるドーパミンの血中濃度が上昇することが報告されている。*In vitro* 実験より、5 齢期ではドーパミンによりアラタ体での JH 合成が抑制された。この作用は 2 つの isoform があるドーパミン受容体 (BmDopR1 と BmDopR2) のうち BmDopR2 を介している可能性をしめした。

③ ペプチドホルモンによる JH 合成制御

Short neuropeptide F (sNPF) は側心体で合成されるペプチドで、その受容体はアラタ体に存在し、5 齢初期のアラタ体の JH 合成を強く抑制することを見出した。すなわち sNPF も終齢期での JH 合成停止に関与している重要な要因の一つであることを示した。一方、アラトトロピン(AT)受容体の発現場所はアラタ体ではなく、側心体であることをすでに明らかにしている。その上 AT の活性はタバコスズメガの雌成虫のみで知られ、カイコを含めて他の昆虫種では全く活性が見られないことが知られている。本研究では脳から分泌された AT が側心体で sNPF の合成促進を行い、その結果 JH 合成の低下を引き起こすという新規のスキームを見出した。ペプチドホルモンは JH 合成の初期に基質の取り込みに関与すると考えられているが、ペプチドホルモンによる JH 合成制御は基質の取り込みばかりでなく、JH 合成遺伝子の発現制御も介していることが明らかになった。

以上の結果を総合すると、蛹へとコミットメントが起こる終齢幼虫では、JH 合成の停止が必須であり、これを保証するために脱皮

直後からエクダイソン血中濃度の低下やドーパミンが JH 合成の停止に決定的に作用し、ペプチドホルモンである sNPF も協調的に、しかも 3 要因すべて異なる作用機構で JH 合成停止に向けて幾重にも保険を掛けるシステムであることを明らかにした。

(4) 転写因子 BHR4 の蛹化への役割

昆虫の脱皮ホルモンであるエクダイソンの作用は、種々の転写因子を介して引き起こされ、BHR4 の蛹発育に及ぼす役割について研究した。BHR4 は単量体のオーファン核内レセプターで、蛹化を誘導する血中エクダイソン濃度の上昇に伴い発現し、その後蛹化前にホルモン濃度の下降と共に発現が低下して蛹脱皮前には消失する。蛹化前のこの BHR4 の役割を解明するため、BHR4 を熱ショック処理により過剰発現する組み換えカイコを作製し、蛹化前に本来低下するはずの BHR4 の発現を阻害すると蛹脱皮が妨げられた。この現象は蛹化前に大量のエクダイソンを注射したカイコの表現型と一致した。そこで BHR4 を過剰発現させた個体の血中エクダイソン濃度を測定したところ、蛹化前に低下するはずのエクダイソン濃度が低下しないことが観察された。これらはエクダイソンにより発現が誘導される BHR4 が、逆にエクダイソンの合成に関与している事を強く示唆している。そこで BHR4 を過剰発現したカイコの前胸腺におけるエクダイソン生合成酵素遺伝子のうち、*neverland*、*spook*、*phantom*、*disembodied*、*shadow* の 5 種類の発現量を計測した結果、*disembodied*、*shadow* を除く 3 種類の遺伝子の発現が促進され、さらにその発現パターンは BHR4 を過剰に発現した時のクジステロイドの濃度パターンとほぼ一致していた。このことから、カイコの BHR4 過剰発現による蛹化脱皮行動の阻害はエクジソノカスケードの攪乱によるものではなく、前胸腺におけるエクダイソン合成促進によるものであることが明らかとなった。

これらの結果は、エクダイソンにより発現が誘導される転写因子の BHR4 がフィードバックして、エクダイソン合成系に逆に働きかけて蛹脱皮のタイミングを調節するという今まで想定されていなかったことを見出した。

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 7 件)

- ① Hiruma, K., and Kaneko, Y. (2013). Hormonal regulation of insect metamorphosis with special reference to juvenile hormone biosynthesis. *Curr. Top. Dev. Biol.* **103**, 73-100.
doi:http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-385979-2.00003-4
- ② Yokoyama, T., Hiruma, K., and Tomita, S. (2012). BHR4 nuclear receptor coordinates the timing of pupal ecdysis through ecdysteroid biosynthesis in *Bombyx mori*. *J. Insect Biotech. Sericol.* **81**, 45-53.
http://jss.or.jp/modules/pico3/index.php?content_id=1
- ③ 金児雄・比留間潔 (2011). 発育時期特異的な昆虫幼若ホルモン生合成の制御機構。比較内分泌学 **37**, 204-211.
http://jsce1975.jp/newsletter.php
- ④ Kaneko, Y., Shinoda, T., and Hiruma, K. (2011). Remodeling of the corpora cardiaca and the corpora allata during adult metamorphosis in *Bombyx mori*: identification of invisible corpora cardiaca by the expression of adipokinetic hormone. *Appl. Ent. Zool.* **46**, 87-93.
DOI:10.1007/s13355-010-0013-y
- ⑤ Kaneko, Y., Kinjoh, T., Kiuchi, M., and Hiruma, K. (2011). Stage-specific regulation of juvenile hormone biosynthesis by ecdysteroid in *Bombyx mori*. *Mol. Cell. Endocrinol.* **335**, 204-210.
doi:10.1016/j.mce.2011.01.012
- ⑥ Kaneko, Y., Furuta, K., Kuwano, E., and Hiruma, K. (2011). An anti-juvenile hormone agent, ethyl 4-(2-benzylhexyloxy)benzoate, inhibits juvenile hormone synthesis through the suppression of the transcription of juvenile hormone biosynthetic enzymes in the corpora allata in *Bombyx mori*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* **41**, 788-794.
doi:10.1016/j.ibmb.2011.05.009
- ⑦ Hiruma, K., and Riddiford, L.M. (2010). Developmental expression of mRNAs for epidermal and fat body proteins and hormonally regulated transcription factors in the tobacco hornworm, *Manduca sexta*. *J. Insect Physiol.* **56**, 1390-1395.
doi:10.1016/j.jinsphys.2010.03.029

[学会発表] (計 22 件)

- ① 比留間潔・秋元真理・杉目康広・金児雄 (2013). インスリンによる *crochet* 産生細胞の細胞死誘導。第 57 回日本応用動物昆虫学会。2013 年 3 月 27—29 日。日本大学。
- ② 盛雄治・金児雄・比留間潔 (2013). カイコ *Verson's gland* の体節特異的に起こる細胞死に対する JH による制御。第 57 回日本応用動物昆虫学会。2013 年 3 月 27—29 日。日本大学。
- ③ 横山拓彦・比留間潔・冨田秀一郎 (2013). カイコのエクダイソン応答性転写因子 BHR4 の蛹化時期における生体内での役割。第 57 回日本応用動物昆虫学会。2013 年 3 月 27—29 日。日本大学。
- ④ 金児雄・比留間潔 (2013). インスリンにより誘導される *Verson's gland* の蛹コミットメント。第 57 回日本応用動物昆虫学会。2013 年 3 月 27—29 日。日本大学。
- ⑤ 粥川琢己・小林功・内野恵郎・瀬筒秀樹・木内信・比留間潔・石川幸男・篠田徹郎 (2013). 変態制御作用を有する *Krüppel homolog 1* 遺伝子の機能解析。第 57 回日本応用動物昆虫学会。2013 年 3 月 27—29 日。日本大学。
- ⑥ 比留間潔・秋元真理・杉目康広・金児雄 (2013). 栄養により不活化されるインスリン伝達経路。日本蚕糸学会第 83 回大会。2013 年 3 月 18—19 日。農林水産技術会議事務局筑波事務所。
- ⑦ 盛雄治・金児雄・比留間潔 (2013). JH によって制御されるカイコ *Verson's gland* の体節特異的な細胞死。日本蚕糸学会第 83 回大会。2013 年 3 月 18—19 日。農林水産技術会議事務局筑波事務所。
- ⑧ 金児雄・比留間潔 (2013). 単一細胞の蛹コミットメント; *Verson's gland* を用いた解析。2013 年 3 月 18—19 日。農林水産技術会議事務局筑波事務所。

- ⑨ Hiruma, K., Akimoto, M., Sugime, Y., and Kaneko, Y. (2012). The insulin signaling pathway is required for the death of crochet forming cells during pupal metamorphosis. XXIV International Congress of Entomology, August 19-25, 2012, Daegu, Korea. (招待講演)
- ⑩ 金児雄・比留間潔 (2012). 脱皮行動誘導ホルモン(ETH)による幼若ホルモン生合成の促進。第56回日本応用動物昆虫学会。2012年3月27—29日。近畿大学。
- ⑪ 金児雄・石原和成・比留間潔 (2012). 単一細胞の蛹コミットメント。第56回日本応用動物昆虫学会。2012年3月27—29日。近畿大学。
- ⑫ 盛雄治・金児雄・比留間潔 (2012). カイコ Verson's gland の体節特異的な細胞死。第56回日本応用動物昆虫学会。2012年3月27—29日。近畿大学。
- ⑬ 横山拓彦・比留間潔・富田秀一郎 (2012). カイコの転写因子 BHR4 のエクダイソン合成に対する影響。第56回日本応用動物昆虫学会。2012年3月27—29日。近畿大学。
- ⑭ 比留間潔 (2011). カイコの変態とホルモン—現象から分子へ—。平成23年度日本蚕糸学会・合同大会。2011年11月4—6日。岩手大学。(学術シンポジウム招待講演)
- ⑮ 金児雄・石原和成・盛雄治・比留間潔 (2012). 単一細胞の蛹コミットメント; Verson's gland を用いた細胞レベルでの解析。第55回日本応用動物昆虫学会。2011年3月27—29日。九州大学。
- ⑯ 金城輝則・比留間潔 (2011). エクダイソン誘導性転写因子を介した JH 合成酵素遺伝子の制御。第55回日本応用動物昆虫学会。2011年3月27—29日。九州大学。
- ⑰ 杉目康広・秋元真理・金児雄・比留間潔 (2011). インスリン依存的な crochet 形成能力の制御機構。第55回日本応用動物昆虫学会。2011年3月27—29日。九州大学。
- ⑱ 横山拓彦・比留間潔・富田秀一郎 (2011). カイコの転写因子 BHR4 強制発現によるエクダイソン濃度低下の阻害。第55回日本応用動物昆虫学会。2011年3月27—29日。九州大学。
- ⑲ Kinjoh, T., and Hiruma, K. (2010). 20-Hydroxyecdysone as a regulator for the expression of insect juvenile hormone biosynthesis. 第22回日本分子生物学会。2010年12月7—10日。神戸ポートアイランド。
- ⑳ Hiruma, K. (2010). Introduction for the Karlson speaker of 2010. The 18th International Workshop on Ecdysone Workshop. July 19-23, 2010. Ceske Budejovice, Czech Republic. (招待講演)
- 21 Hiruma, K., Kaneko, Y., and Kinjoh, T. (2010). Regulation of juvenile hormone synthesis by corpora allata. The 18th International Workshop on Ecdysone Workshop. July 19-23, 2010. Ceske Budejovice, Czech Republic.
- 22 Kinjoh, T., Kaneko, Y., Kiuchi, M., and Hiruma, K. (2010). Regulation of juvenile hormone biosynthesis by 20-hydroxyecdysone in *Bombyx mori*. The 18th International Workshop on Ecdysone Workshop. July 19-23, 2010. Ceske Budejovice, Czech Republic.

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

(3)連携研究者

篠田徹郎 (SHINODA TETSURO)

農業生物資源研究所・ユニット長

研究者番号：10355620