

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 9 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2012～2015

課題番号：24380033

研究課題名(和文) カイコ休眠ホルモン作用時から休眠開始遺伝子 pnd 発現までを結ぶ分子機構の解明

研究課題名(英文) Molecular mechanism intervened between the action of diapause hormone on developing ovaries and the expression of pnd gene that is the diapause-initiating gene

研究代表者

柳沼 利信 (YAGINUMA, Toshinobu)

名古屋大学・生命農学研究科・名誉教授

研究者番号：60135332

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 15,000,000 円

研究成果の概要(和文)： 休眠ホルモンはメス蛹の発育卵巣に作用し、胚期での休眠を誘導する。休眠開始遺伝子として pnd 遺伝子を単離している。休眠ホルモン・シグナルと pnd 遺伝子発現とを結ぶ分子機構としてインスリン・シグナル伝達系が関与することを検証した。カイコ・インスリン様ペプチド(BmILP)の mRNA 発現が休眠性卵では非休眠性卵より低いこと、pnd 遺伝子の 5' -上流域に転写因子 Fox0 (インスリン・シグナル伝達系の下流に位置する) が認識・結合するシス・エレメントが見出された。

研究成果の概要(英文)： In the silkworm (*Bombyx mori*), diapause hormone that is biosynthesized in the subesophageal ganglion is released into the hemolymph and acts on developing ovaries in the mid-pupal stage of females, in order to induce embryonic diapause that occurs 2-3 days after oviposition. As a diapause-initiating gene, we have already isolated the pnd (pigmented and nondiapausing egg) gene. Therefore, we here conducted the experiments to examine whether the insulin-signal transduction system is intervened between the diapause-signal and the expression of pnd gene. We show that the mRNA expression of insulin-like peptide (BmILP) is lowered in diapause-eggs than in nondiapausing-eggs, and that the cis-element recognized and bound by Fox0 transcriptional factor located at the downstream of insulin-signal transduction system is found in the 5' -upstream region of the pnd gene.

研究分野：昆虫科学

キーワード：昆虫分子生物学 蚕糸学 カイコ胚休眠 休眠ホルモン 休眠開始遺伝子 遺伝子発現調節 シグナル伝達系

1. 研究開始当初の背景

(1) カイコの胚休眠は、神経ペプチドホルモンである休眠ホルモンによって誘導される。休眠ホルモンは、食道下神経節の神経分泌細胞で合成された後、側心体-アラタ体連合体に送られ、この連合体から血液中に分泌される(図1左パネル参照)。血液中の休眠ホルモンは、メス蛹中期の発育卵巣を標的とし、卵母細胞表面に発現する休眠ホルモン受容体を介して各卵母細胞内に休眠ホルモン・シグナルを伝達する(図1中パネル参照)。この休眠ホルモン・シグナルを受容した卵のみが産卵・受精後の胚発生の初期段階で休眠を開始する。胚の形態から見ると、胚の両端が肥大し、中胚葉分節化直後に細胞分裂・発育が停止し、休眠に入る、産卵2~3日後に相当する(図1右パネル参照)。蛹中期から成虫羽化まで5~6日かかることから、休眠ホルモン作用時と休眠開始時の間には約一週間のズレがあることになる。

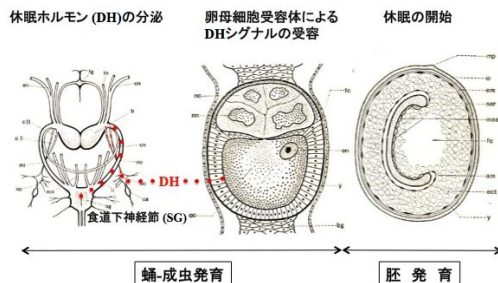


図1. 休眠ホルモンの分泌、受容および休眠開始の模式図

(2) 卵母細胞における休眠ホルモンの直接的な作用としては、炭水化物代謝の調節が知られている。休眠ホルモンが発育卵母細胞の膜結合型トレハラーゼの発現を促進し、その酵素活性を上昇させる。このことが血糖トレハロースの卵母細胞内への取り込みを促進する。この糖を素材として卵母細胞内にグリコーゲンの蓄積を引き起こす。休眠開始とともにグリコーゲンから耐寒・耐凍剤であるソルビトールとグリセロールが合成される。休眠中の耐寒・耐凍剤のより高い濃度の素材を休眠ホルモンが発育卵母細胞の発育時に準備するという仕組みである(図1中パネル)。

(3) 同時に、休眠ホルモンは卵母細胞内に3-ヒドロキシキヌレニンの蓄積を促進する。産卵後1~1.5日にかけて卵全体を覆う、胚外域から一層の漿膜細胞が形成されるが、この細胞内の色素顆粒中に3-ヒドロキシキヌレニンからオモクローム色素が生成される(図1右パネル参照)。オモクローム色素の生成は、休眠卵においてのみで起こるが、オモクローム色素生成が阻害される突然変異体でも休眠卵となることから、休眠開始に必須な現象ではない。

(4) 一方、着色非休眠卵 (*pigmented and*

nondiapausing egg, pnd) という突然変異体が知られている。[*pnd*メス蛾 x *pnd*オス蛾]の卵は、漿膜にオモクローム色素の形成が生じるものの、非休眠性となる。[*pnd*メス蛾 x 野生型オス蛾]の卵は、漿膜にオモクローム色素が形成され、休眠性となる。つまり、漿膜にオモクローム色素が形成されることから、この卵は休眠ホルモン・シグナルを受容しているが、*pnd*遺伝子の産物が生成されないために休眠が開始されないことを示している。*pnd*遺伝子の産物が休眠開始に直接関わるとされる。

2. 研究の目的

(1) 最近、研究代表者らはポジショナルクローニング法とRNA干渉法の組み合わせにより休眠開始遺伝子 *pnd* を単離することに成功した。さらに、休眠ホルモン・シグナル受容の完成卵において発現が抑制される遺伝子(インスリン様ペプチド, BmILP)の単離にも成功している。

(2) そこで本研究課題では、休眠ホルモンから *pnd* 遺伝子発現を結ぶ分子機構を明らかにすることを目指した。特にインスリン・シグナル系が関わるかどうかを中心に検討した。

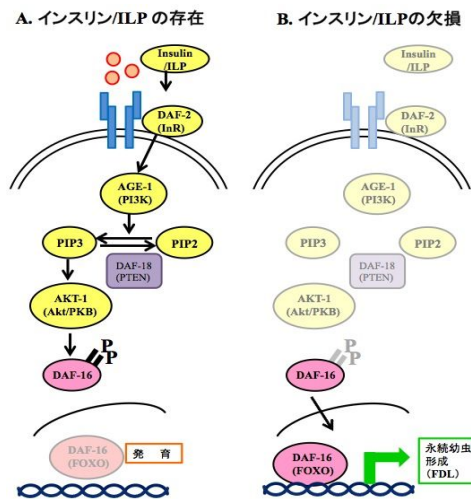


図2. *C. elegans*における永続幼虫形成への移行を調節するインスリン・シグナル系。A, 活性型インスリン・シグナル系による発育の促進。B, 不活性型インスリン・シグナル系による永続幼虫の形成。InR, インスリン受容体; PI3K, フォスフォノシチド3-キナーゼ; PTEN, 脱リン酸化酵素(テニンシン相同体); Ark/PKB, セリシン/スレオニンタンパク質キナーゼ; FoxO, フォークヘッド転写因子。

(3) インスリン・シグナル伝達系と永続幼虫形成(休眠と呼ばれる場合がある)の関係については、線虫 *Caenorhabditis elegans* において詳細に研究されている(図2参照)。つまり、休眠ホルモン・シグナルがインスリン・シグナル伝達活性を抑制し、結果として脱リン酸型の転写因子 FoxO が核内に入り、*pnd* 遺伝子を発現させるという仮説の検証である。

3. 研究の方法

(1) リアルタイム定量的PCR法

- (2) RNA 干渉法
- (3) インスリン・シグナル伝達系に関わる不活性化剤および活性化剤の胚発育への影響解析
- (4) DNA マイクロアレイ法
- (5) 特異的抗体の作製と検出法の検討

4. 研究成果

- (1) カイコのインスリン様ペプチド (BmILP)、インスリン受容体 (BmInR)、磷酸化酵素 BmAkt、転写因子 (BmFox0) (シグナル伝達系における各位置付けは図 2 参照) の遺伝子の発現解析
 休眠ホルモン・シグナルを受容した、また受容していない完成卵の DNA マイクロアレイ解析の比較からすでに単離している BmILP の cDNA 塩基配列に従い、リアルタイム定量的 PCR 法によって BmILP mRNA の発現解析を進めた。休眠ホルモン・シグナルを受容していない非休眠性卵の胚発育に伴う BmILP mRNA 量は、休眠性卵より有意に高かった。
 産卵 1 日後に約 15% の塩酸溶液に休眠性卵を浸漬すると、休眠開始を回避することが知られている。この塩酸処理した人工非休眠卵と水に浸漬した対象区の休眠卵とで比較すると、人工非休眠卵で mRNA 量が有意に高くなることが認められた。休眠覚醒のため 5 日に冷蔵した場合に、冷蔵期間に伴い mRNA 量の増加が認められた。
 BmInR、BmAkt、BmFox0 に対応する mRNA 量に関しては、非休眠性卵と休眠性卵との間には有意な差異は認められなかった。
- (2) *pnd* 遺伝子の 5' -上流域における Fox0 転写因子が認識・結合するシス・エレメントの探索
 図 2 に示されているように、インスリン・シグナル系の下流に転写因子 Fox0 が位置する。この転写因子が認識・結合するシス・エレメントは良く知られているので、*pnd* 遺伝子の 5' -上流域の塩基配列を探索し、共通するシス・エレメントを見出した。
 以上の結果は、休眠ホルモン・シグナルと *pnd* 遺伝子発現の間にインスリン・シグナル系が関与することを強く示唆する。
- (3) インスリン・シグナル伝達系の不活性化または活性化による卵の非休眠性および休眠性への影響
 インスリン・シグナル伝達系のリガンド活性化剤としてヒトのインスリン、ウシのインスリンおよびインスリン安定化剤 (MSDC-0160) を休眠性卵に注射し、非休眠化されるかどうかを検討した。非休眠化は、幼虫の孵化および染色による胚の形態変化から判断した。

Akt 活性化剤として Everolimus, H-Leu-Ile-OH, SC-79, Fumonisin を休眠性卵の注射した。

PI3-kinase 活性化剤として SC-3036 を休眠性卵に注射した。

Akt 不活性化剤として MK-2206 を非休眠性卵に注射した。

PTP 不活性化剤として bpV(H0pic) を、protein kinase C 阻害剤として Rottlerin を非休眠性卵に注射し、休眠性卵のように発育停止が生じるかを検討した。

休眠性卵に各活性化剤を注射しても、休眠胚の発育段階を超えてさらに発育することは認められなかった。また、非休眠性卵に注射した場合には、多く卵が休眠胚まで発育することがなかった。細胞分裂自体が妨害されたと考えられた。

- (4) RNA 干渉法による休眠性卵への影響
 BmInR、BmAkt、BmFox0 の二本鎖 RNA を合成し、多核性胞胚期の非休眠性卵に注射し、インスリン・シグナル伝達系の活性を抑制したときに人為的に休眠化が生じるかを検討した。いずれの場合にも、胚の形成自体が阻害され、休眠化の判定はできなかった。
 以上の結果は、(3) の結果とあわせて、休眠胚に至る発育段階までの細胞分裂にインスリン・シグナル伝達系が必須であることが判明した。
- (5) In vitro mRNA 合成と卵への注射の影響
 インスリン・シグナル系のリガンドとしてヒトおよびウシのインスリンを用いたが、休眠性卵を非休眠性に変更できなかったため、BmILP cDNA に基づき、in vitro で機能的 mRNA を生合成し、用いることとした。
 休眠性卵の多核性胞胚期と産卵 1 日後 (塩酸処理により休眠開始変更可能な時期) に、BmILP mRNA を注射し、産卵 10 ~14 日後 (発育卵であれば十分に孵化期に達している時期) に胚の形態を観察した。結果は、いずれも、休眠期で胚が発育を停止し、休眠期を超えて発育する卵は認められなかった。
- (6) マイクロアレイ解析
 さらなる解析のために、産卵 1 日後の休眠性卵と塩酸処理後の人工非休眠性卵を用いて、3~6 時間間隔で全 RNA を抽出し、DNA マイクロアレイ解析を進めた。
 また、産卵 2 日後から休眠覚醒処理のため、5 日に冷蔵した卵と休眠維持のため連続 25 日に保存した卵から、それぞれ全 RNA を抽出し、マイクロアレイ解析を進めた。
- (7) BmILP 特異的抗体の作製と検出の検討

カイコ・インスリン様ペプチドを検出するために、特異的抗体を作製した。主としてウエスタンブロット法によるECL発光を組み合わせて検討した。

(8) 今後の課題

休眠ホルモン・シグナルが卵内のインスリン・シグナル伝達系の活性を抑制し、結果として生じる脱リン酸型の転写因子FoxOが胚細胞の核内に入り、*pnd* 遺伝子の発現を促進し、休眠が開始されるという仮説の解明に挑戦した(図2参照)。これまで述べたように、発現解析等では限りなく上記の仮説が支持されることを示している。しかし残念ながら、BmILP mRNAを過剰発現させることで、休眠性卵を人工的に非休眠化させることはできなかった。線虫 *C. elegans* などではインスリン様ペプチドが30~40種類存在し、それぞれが相互作用しながら永続幼虫形成(幼虫休眠)を調節していると考えられている(Mastunaga et al., 2016)。当然、カイコでも多数のインスリン様ペプチドの存在が知られている。従って、単独ではなく、複数のILPの相互作用を検討する必要があるように思われる。

<引用文献>

Matsunaga, Y., Honda, Y., Honda, S., Iwasaki, T., Qadota, H., Benian, G.M. and Kawano, T. Diapause is associated with a change in the polarity of secretion of insulin-like peptides. *Nature Communications*, Vol. 7, 2016, 10573 | DOI: 10.3038/ncomms10573

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3件)

柳沼利信, カイコ胚休眠の研究-特に筆者の見聞を中心に-, 蚕糸・昆虫バイオテク, 査読無, 84巻, 2015, 99-118
Kobayashi, N., Takahashi, M., Kihara, S., Niimi, T., Yamashita, O. and Yaginuma, T., Cloning of cDNA encoding a *Bombyx mori* homolog of human oxidation resistance 1 (OXR1) protein from diapause eggs, and analyses of its expression and function, *Journal of Insect Physiology*, 査読有, Vol. 68, 2014, 58-68
Masumoto, M., Ohde, T. Shiomu, K., Yaginuma, T. and Niimi, T., A baculovirus immediate-early gene, *ie1*, promoter drives efficient expression of a transgene in both *Drosophila melanogaster* and *Bombyx mori*, *PLoS ONE*,

査読有, Vol. 7, 2012, e49323.

[学会発表](計7件)

Yaginuma, T., Molecular Mechanisms of Embryonic Diapause of *Bombyx mori*, 第22回国際動物学会, シンポジウム招待, 平成28年11月18日, 沖縄コンベンションセンター(沖縄県宜野湾市)

太田広人, 菅野輝子, 光増可奈子, 柳沼利信, 浅岡潔, 林直孝, 今井哲弥, 森村茂, 新留琢郎, 摂食行動調節に関わるカイコドーパミン受容体 BmDopR2 のアンタゴニストスクリーニングと in vivo 活性評価, 日本農薬学会, 平成27年3月18~20日, 玉川大学(東京都町田市)

菅野輝子, 野田啓太, 光増可奈子, 柳沼利信, 朝岡潔, 林直孝, 今井哲弥, 森村茂, 新留琢郎, 太田広人, 無脊椎動物特異的ドーパミン受容体に作用するアンタゴニストの効率的スクリーニング系の構築, 日本農薬学会, 平成26年3月13日~15日, 筑波大学(茨城県つくば市)

木原昌平, 岡圭庫, 新美輝幸, 柳沼利信, カイコの漿膜形成と着色の分子機構の解明に向けて, 蚕糸・昆虫機能利用学術講演会, 平成26年3月11日, 日本大学生物資源科学部(神奈川県藤沢市)

木原昌平, 岡圭庫, 新美輝幸, 柳沼利信, カイコの漿膜形成に関わる *zerknuell1* の発現解析, 日本蚕糸学会東海支部, 平成25年11月9日, 信州大学理学部(長野県松本市)

木原昌平, 新美輝幸, 城所久良子, 門野敬子, 柳沼利信, カイコ休眠ホルモン・シグナルによって調節される遺伝子の発現解析, 蚕糸・昆虫機能利用学術講演会, 平成25年3月18日, 農林水産技術会議事務局筑波事務所(茨城県つくば市)

Yaginuma, T., Niimi, T., Kidokoro, K., Kadono-Okuda, K. and Yamashita, O., Molecular Mechanisms of *Bombyx mori* Embryonic Diapause, 第24回国際昆虫学会議, シンポジウム招待, 平成24年8月21日, EXCO-コンベンションセンター(韓国大邱市)

[図書](計2件)

Yaginuma, T. and Niimi, T., Academic Press, FXPRLamide peptide family, In *Handbook of Hormones-Comparative Endocrinology for Basic and Clinical Research-* (Takei, Y., Ando, H., Tsutsui, K., eds.), 2015, 395-405
Miya, K., Tokai University Press, The Reproductive System and Gametogenesis of *Bombyx mori*-An ultrastructural point of view II- (Suzuki, K., Goryo, M., Yaginuma, T., eds.), 2015, 1-600

〔産業財産権〕

出願状況（計0件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況（計0件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6．研究組織

(1)研究代表者

柳沼 利信 (YAGINUMA, Toshinobu)
名古屋大学・生命農学研究科・名誉教授
研究者番号：6 0 1 3 5 3 3 2

(2)研究分担者

新美 輝幸 (NIIMI, Teruyuki)
基礎生物学研究所・大学共同利用機関等の
部局等・教授
研究者番号：0 0 2 9 3 7 1 2