

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 25 日現在

機関番号：12201

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26840122

研究課題名(和文)新規制御関係獲得による幼若ホルモン経路の機能分化過程の解明

研究課題名(英文)Functional diversification process of juvenile hormone pathway through the acquisition of novel regulatory relationships

研究代表者

宮川 一志 (Miyakawa, Hitoshi)

宇都宮大学・バイオサイエンス教育研究センター・准教授

研究者番号：30631436

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は幼若ホルモン(JH)が、節足動物の生活環を支える共通の機能を維持したまま、柔軟に新規の多様な機能を獲得してきたその機能分化過程の理解を目的としている。

平成26年度は甲殻類と昆虫類を含む4種の節足動物の間でJH受容体であるMetのリガンド特異性を比較した結果、様々なJH物質に対して分類群間でMetが異なる感受性を示し、またその違いがMetのアミノ酸配列に依存することを明らかにした。平成27年度はMetによる下流の遺伝子の転写活性化能を甲殻類と昆虫類で比較し、それが分類群間で保存されていることを明らかにした。これらの知見は節足動物類におけるJH経路の進化過程の解明に寄与すると期待される。

研究成果の概要(英文)：Over the course of evolutionary time, juvenile hormone (JH) and its signaling pathway have acquired novel functions, both flexibly and repeatedly, while retaining their core roles related to the arthropod life cycle. To elucidate the process of functional diversification of JH, first, I compared the ligand selectivity of the JH receptor, Met, against four in four arthropod species (i.e., three insects: *Drosophila*, *Aedes*, *Tribolium*, and one crustacean: *Daphnia*) by performing a two-hybrid luciferase assay with Met and SRC orthologs. Obtained results suggest that the sequence structure of Met affects its ligand sensitivity. Next, I compared downstream signal cascade of Met between insect and crustacean species, and demonstrated that transcriptional activation function of Met was conserved between taxa. These findings may shed light on the relationship between functional diversification in hormonal signaling and the molecular evolution of hormone receptors.

研究分野：進化発生学

キーワード：幼若ホルモン Methoprene-tolerant 節足動物 ミジンコ リガンド特異性

1. 研究開始当初の背景

(1) 発生過程における JH 経路の新規制御関係獲得は進化的に重要である

幼若ホルモン (Juvenile hormone: JH) は多くの昆虫や甲殻類において共通して脱皮や変態の制御などに関与する重要なホルモンである。また一方で JH はそれぞれの種や分類群で新規に獲得された現象の制御を担う例も数多く知られている。この JH 経路が共通の機能を維持しつつ多面発現的に様々な新規機能を獲得した背景を理解することは多様な節足動物の進化過程を理解する上で重要である。

(2) JH 受容体に生じたアミノ酸の変異がリガンド特異性を変化させる

節足動物が分化する過程で起こったと予想される JH リガンドの獲得と転換は JH 経路の進化における最も大きなイベントの一つである。研究代表者のこれまでの研究より甲殻類であるミジンコ JH 受容体のアミノ酸配列に少数の変異が生じるだけで新たなリガンドと上流シグナルの獲得が可能となることが示唆されており (Miyakawa et al., 2013) 同様の変異をより広範の節足動物を用いて解析することが JH 経路の進化を考える上で有益であると期待される。

(3) JH 受容体が新たな下流遺伝子を獲得することでシグナル経路が進化する

JH 受容体を含む多くのホルモン受容体はリガンドと結合すると転写活性化因子として働く。そのため、受容体が新規のターゲット遺伝子を獲得することで JH 経路は新たな機能を発揮することが可能となると予想される。しかしながら、種間で JH 受容体と下流遺伝子の間の制御関係に違いが存在するかはわかっていない。

2. 研究の目的

JH 経路が節足動物内でどのように進化し多様な機能を獲得してきたかという命題に対し、JH 経路の主要な構成因子である JH 受容体に着目して、以下の2点を明らかにすることを目的とした。

(1) 新規リガンド獲得による上流シグナルの多様化の分子基盤

(2) 新規ターゲット遺伝子獲得による下流シグナルの多様化の分子基盤

3. 研究の方法

(1) 新規リガンド獲得による上流シグナルの多様化の分子基盤

代表的な昆虫種であるキイロショウジョウバエ、ネッタイシマカ、コクヌストモドキおよび甲殻類であるミジンコの4種の節足動物より JH 受容体である Methoprene-tolerant (Met) と steroid

receptor coactivator (SRC) の2つの遺伝子のオーソログをそれぞれ単離し、JH 存在下で特異的に起こる Met と SRC のヘテロ二量体化を two-hybrid luciferase assay によって検出することで、様々な JH 物質に対するリガンド特異性を種間で比較した。

(2) 新規ターゲット遺伝子獲得による下流シグナルの多様化の分子基盤

昆虫類において JH 受容体 Met と SRC による直接的な発現制御が知られているクルツペルホモログ 1 (Kr-h1) 遺伝子について、その制御配列 (JH 応答配列: JHRE) を昆虫類であるコクヌストモドキより単離し、この JHRE が甲殻類であるミジンコの JH 受容体においても機能するかを reporter assay によって調べた。

4. 研究成果

(1) 新規リガンド獲得による上流シグナルの多様化の分子基盤

幼若ホルモン活性を持たない前駆物質であるファルネセン酸 (farnesoic acid: FA)、甲殻類の幼若ホルモンであるファルネセン酸メチル (methyl farnesoate: MF)、昆虫類の幼若ホルモンである幼若ホルモン III (juvenile hormone III: JH III)、および殺虫剤成分である人工化合物のメトプレン (methoprene) の4種の JH 物質に対しての前出の4種の節足動物の JH 受容体の応答を解析した結果、いずれの種においても、非活性物質である FA ではほとんど応答がみられない一方で、MF、JH III、methoprene には顕著な応答が確認できた。また、昆虫類ではミジンコと比較して JH III により応答しやすくなっているなど、種間におけるリガンド特異性の差異も見出された。

続いて上記で明らかになった種間のリガンド特異性の違いが、ヘテロ二量体を構成する Met と SRC のどちらの (あるいは両方の) 性質に依存しているのかを明らかにするために、人為的に異種の Met と SRC の組み合わせによって JH を受容した時にそのリガンド特異性がどのようになるかを、ミジンコとコクヌストモドキの Met と SRC を使用して調べた。その結果、SRC がミジンコとコクヌストモドキどちらの種のものであるかにかかわらず、リガンド特異性は Met の由来する種の特徴を示すことが明らかになった。

上記より、節足動物類の JH のリガンド特異性は Met の配列構造に由来することが明らかとなったため、最後に Met のどのアミノ酸部位がリガンド特異性に寄与しているかを調べた。複数の節足動物の Met のマルチプルアライメントより見出された「昆虫類と甲殻類で互いに異なるアミノ酸部位」に着目し、このアミノ酸部位に、昆虫類には甲殻類型のアミノ酸を、逆に甲殻類 (ミジンコ) には昆

虫類型のアミノ酸を導入した変異型 Met を作成してそのリガンド特異性を解析することでリガンド特異性に寄与する Met のアミノ酸部位を調べた。その結果、ミジンコの Met に存在するスレオニンバリンをバリンに変換することで、JH に対する応答性が大きく上昇することが明らかとなった（図 1）。一方で、昆虫類 3 種における同様の位置のバリンをスレオニンに変換すると JH に対する応答性が一様に低下した。これらの結果はこのアミノ酸部位の違いがで明らかになった種間のリガンド特異性の差異の原因となりうることを示唆しており、リガンド特異性を担う分子基盤を理解する上で重要な知見である。

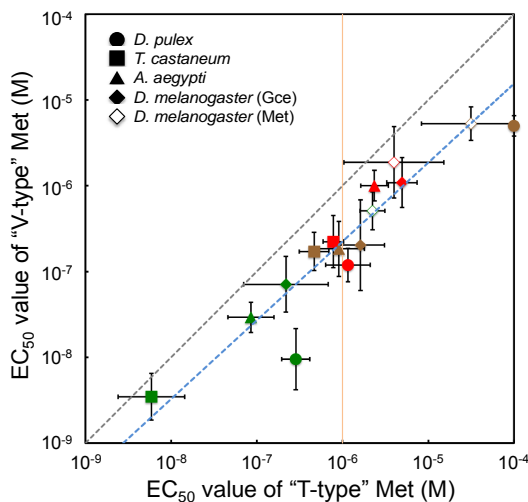


図 1 変異導入によるリガンド特異性の変化

(2) 新規ターゲット遺伝子獲得による下流シグナルの多様化の分子基盤

コクヌストモドキの Kr-h1 遺伝子の -477~+1883 に存在する JHRE を Luciferase の上流に組み込んだレポータープラスミドを作製し、ミジンコの Met と SRC の全長を発現するベクタープラスミドとともに培養細胞に導入することで Met と SRC のヘテロダイマー化ではなくミジンコの JH 受容体が本来持っている転写活性化能を測定する実験系を確立した（図 2）。

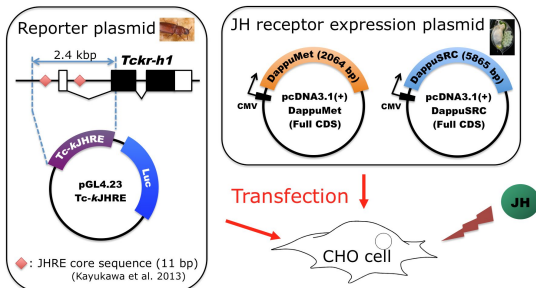


図 2 確立したレポーターシステム

上記のシステムを用いて、MF および JH III に対するレポーター遺伝子の転写活性を測定した結果、ミジンコの Met と SRC を発現させた細胞ではコクヌストモドキの JHRE を介した JH 依存的な Luciferase の転写活性化が検出された。この活性は Met もしくは SRC のみを発現させた細胞では見られなかったことから、JH 依存的なヘテロダイマー化によるものであることが予想された（図 3）。

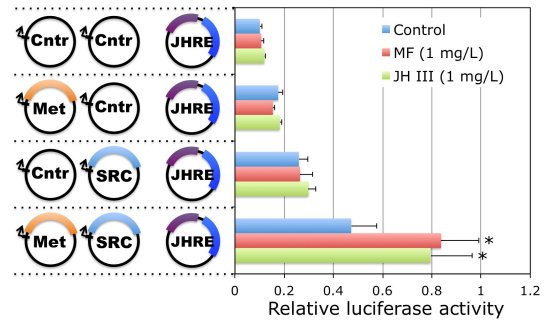


図 3 ミジンコの Met と SRC による JHRE を介した転写活性

コクヌストモドキにおいては JH 受容体である Met は JHRE 内に 2ヶ所存在する 11 bp のコア配列を介して相互作用することが知られている（Kayukawa et al., 2013）。そこで、ミジンコで見られた JHRE を介した転写活性が昆虫同様このコア配列を介して作用しているかを調べるためにコア配列を欠損させた JHRE に対してもミジンコの Met と SRC が転写活性を示すかを調べた。その結果、2ヶ所のコア配列部分を欠損させると、この JH 依存的な転写活性化は見られなくなった（図 4）。これは、ミジンコの JH 受容体が昆虫同様の特定の JHRE 配列を介して DNA と相互作用していることを示しており、さらに(1)の結果も考慮すると、JH 受容体はリガンド特異性は種間で様々に変化するにもかかわらず、転写因子としての特徴は節足動物類において広く保存されている可能性を示唆する。

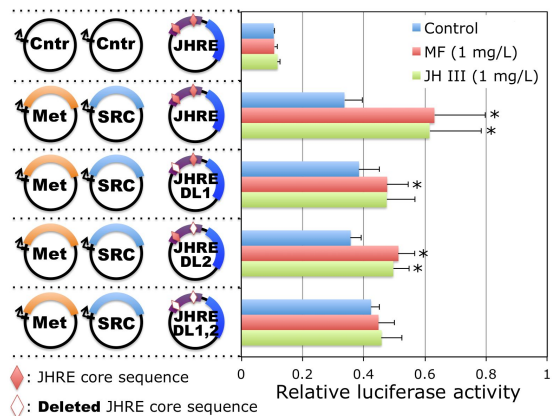


図 4 コア配列を欠損した JHRE を介した転写活性

<引用文献>

Miyakawa H, Toyota K, Hirakawa I, Ogino Y, Miyagawa S, Oda S, Tatarazako N, Miura T, Colbourne JK, Iguchi T (2013) A mutation in the receptor Methoprene-tolerant alters juvenile hormone response in insects and crustaceans. *Nature Communications*, 4:1856

Kayukawa T, Tateishi K, Shinoda T (2013) Establishment of a versatile cell line for juvenile hormone signaling analysis in *Tribolium castaneum*. *Scientific Reports*, 3:1570

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8件)

Sumiya E, Ogino Y, Toyota K, Miyakawa H, Miyagawa S, Iguchi T (2016) Neverland regulates embryonic moltings through the regulation of ecdysteroid synthesis in the water flea *Daphnia magna*, and may thus act as a target for chemical disruption of molting. *Journal of Applied Toxicology*, in press, doi:10.1002/jat.3306, 査読有り

Toyota K, Miyakawa H, Hiruta C, Furuta K, Ogino Y, Shinoda T, Tatarazako N, Miyagawa S, Shaw JR, Iguchi T (2015) Methyl farnesoate synthesis is necessary for the environmental sex determination in the water flea *Daphnia pulex*. *Journal of Insect Physiology*, 80:22-30, doi:10.1016/j.jinsphys.2015.02.002, 査読有り

Toyota K, Miyakawa H, Yamaguchi K, Shigenobu S, Ogino Y, Tatarazako N, Miyagawa S, Iguchi T (2015) NMDA receptor activation upstream of methyl farnesoate signaling for short day-induced male offspring production in the water flea, *Daphnia pulex*. *BMC Genomics*, 16:186, doi:10.1186/s12864-015-1392-9, 査読有り

Miyakawa H, Sato M, Colbourne JK, Iguchi T (2015) Ionotropic glutamate receptors mediate inducible defense in the water flea *Daphnia pulex*. *PLoS One*, 10:e0121324, doi:10.1371/journal.pone.0121324, 査

読有り

Abe R, Toyota K, Miyakawa H, Watanabe H, Oka T, Miyagawa S, Nishide H, Uchiyama I, Tollefsen KE, Iguchi T, Tatarazako N (2015) Diofenolan induces male offspring production through binding to the juvenile hormone receptor in *Daphnia magna*. *Aquatic Toxicology*, 159:44-51, doi:10.1016/j.aquatox.2014.11.015, 査読有り

Sumiya E, Ogino Y, Miyakawa H, Hiruta C, Toyota K, Miyagawa S, Taisen I (2014) Roles of ecdysteroids for progression of reproductive cycle in the fresh water crustacean *Daphnia magna*. *Frontiers in Zoology*, 11:60, doi:10.1186/s12983-014-0060-2, 査読有り

Miyakawa H, Toyota K, Sumiya E, Iguchi T (2014) Comparison of JH signaling in insects and crustaceans. *Current Opinion in Insect Science*, 1:81-87, doi:10.1016/j.cois.2014.04.006, 査読有り

Toyota K, Kato Y, Miyakawa H, Yatsu R, Mizutani T, Ogino Y, Miyagawa S, Watanabe H, Nishide H, Uchiyama I, Tatarazako N, Iguchi T (2014) Molecular impact of juvenile hormone agonists on neonatal *Daphnia magna*. *Journal of Applied Toxicology*, 34:537-544, doi:10.1002/jat.2922, 査読有り

[学会発表](計2件)

宮川一志, 井口 泰泉: 幼若ホルモン経路の進化をもたらす受容体型転写因子 Methoprene-tolerant の新規制御関係獲得過程の解明. 第16回日本進化学会大会, 2014年8月21日~24日, 高槻現代劇場(大阪府高槻市)

Hitoshi Miyakawa, Masanao Sato, Yukiko Ogino, Shinichi Miyagawa, John K. Colbourne, Taisen Iguchi: Analysis of the reception and molecular signaling downstream of a crustacean juvenile hormone, methyl farnesoate, in *Daphnia pulex*. 10th International Conference on Juvenile Hormones (JHX), 2014年6月9日~13日, 文部科学省研究交流センター (茨城県つくば市)

[その他]
ホームページ

<http://c-bio.mine.utsunomiya-u.ac.jp/miyakawa/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

宮川 一志 (MIYAKAWA, Hitoshi)
宇都宮大学・バイオサイエンス教育研究センター・准教授
研究者番号：30631436

(2) 研究協力者

井口 泰泉 (IGUCHI, Taisen)
宮川 信一 (MIYAGAWA, Shinichi)
荻野 由紀子 (OGINO, Yukiko)
蛭田 千鶴江 (HIRUTA, Chizue)
豊田 賢治 (TOYOTA, Kenji)
角谷 絵里 (SUMIYA, Eri)