

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 31 日現在

機関番号：11101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26850215

研究課題名(和文) 体節特異的なホルモン応答シグナルの分子機構の解明

研究課題名(英文) Molecular mechanisms of segment specific hormone response in programmed cell death

研究代表者

金児 雄 (Kaneko, Yu)

弘前大学・農学生命科学部・助教

研究者番号：90633610

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：開放血管系である昆虫において、ホルモンが体節特異的に作用する機構は不明であった。そこでカイコのベルソン氏腺をモデルとして解明に取り組んだ。後端体節のベルソン氏腺の細胞死はATG8とcaspase-3が作用することで引き起こされることを明らかとし、また体節特異的な遺伝子を多数見出した。一部はホルモンへ応答することから、これらの因子が相互作用することで体節特異的な応答を生み出していると考えられる。

研究成果の概要(英文)：A pair of dermal glands, Verson's glands, in lepidopteran insects, is attached to the dorsal part of every segment of the silkworm, *Bombyx mori*. We found that Verson's glands of the posterior abdominal segments, from 7th to 9th segments, underwent programmed cell death (PCD) during pupal metamorphosis, although the others produced pupal specific proteins. This PCD was prevented by the application of methoprene shortly after the last larval ecdysis. These results indicate that the decline of JH at the beginning of 5th instar is necessary to induce the PCD. To identify the genes involved in the death, we analyzed the transcripts of the A7 Verson's glands of JH treated larvae and non-treated larvae using the RNA-sequence technology. We identified that the number of transcripts of 105 genes were increased by JH application whereas those of 106 genes were decreased. RNAi of some genes whose expressions were altered by JH inhibited the PCD.

研究分野：昆虫生理学

キーワード：ホルモン応答 体節特異性 幼若ホルモン

### 1. 研究開始当初の背景

昆虫の脱皮や変態は主に2つのホルモンによって制御されている。一つはアラタ体から分泌される幼若ホルモン(JH)で、もう一方は前胸腺から分泌されるエクダイソンである。これら2つのホルモンのバランスによって、幼虫脱皮を引き起こすかまたは変態を引き起こすかが決定される。

完全変態昆虫であるカイコは4回の幼虫脱皮を繰り返し、十分に成長した後に蛹へと変態する。発育の際に、JH存在下でエクダイソンが作用すると幼虫から幼虫への脱皮が繰り返される。一方、蛹変態直前の終齢(5齢)幼虫に脱皮すると、体液中のJH濃度が急激に低下し5齢3日までにほぼ消失する。このJH濃度の低下は蛹変態に必要な不可欠である。つまり5齢初期にJHを投与すると蛹変態は抑制され、逆に終齢よりも若い時期にアラタ体(JHを合成・分泌する器官)を外科的に取り除きJHを欠乏させると早熟な蛹変態が誘導される。すなわちJH濃度の低下により、蛹への細胞の運命の方向付けである蛹コミットメントが誘導され、続いて起こる大きなエクダイソンのピークにより実際の蛹変態

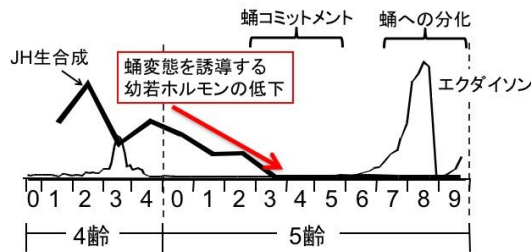


図1.カイコのアラタ体によるJH生成成および体液中エクダイソン濃度 (Kinjoh et al., 2007から改変)

が起こるのである(図1)。そこで蛹変態を分子レベルで解明するために、JH濃度の低下がどのような機構で誘導されるかをこれまでに申請者は明らかにした(Kaneko et al., 2011; 金児、比留間, 2011; Hiruma and Kaneko, 2013; Kaneko and Hiruma, 2014; Kaneko and Hiruma, 2015)。しかし変態を包括的に理解するためには、ホルモンの合成制御だけでなく、組織でのホルモンの応答機構を理解する必要がある。開放血管系である昆虫では体全体が同じ濃度のホルモンに曝されることで、各組織が蛹へと変化し、その結果として個体は正常な蛹へと変態する。しかし蛹変態時の各組織の運命は組織によって大きく異なる。例えば成虫特異的な組織は新たに分化が促され、幼虫特異的な組織は細胞死が引き起こされる。このように同じ体液環境下にもかかわらず各組織で異なる応答を示すことから、組織により異なるホルモン応答機構が存在すると考えられる。しかし組織間でのホルモン応答の差異を生み出す分子機構はほとんどわかっていない。このことを解明するためには、各体節に存在し体節によって蛹変態時の運命が異なるベルソン氏腺を研究材料として用いることが最適だと考

えられる。なぜなら同じ性質を持つ組織を実験材料とすることで、純粋に終齢期でのホルモン応答性の差異だけを比較できるからである。

### 2. 研究の目的

ベルソン氏腺は各体節に1対ずつ存在する単一の巨大細胞からなる組織で、幼虫脱皮時にクチクラ表面にワックス層を分泌する。全ての体節に存在するベルソン氏腺は脱皮直後から次の脱皮に向かって肥大化し、脱皮時に内溶液を分泌し、脱皮後には収縮するというサイクルを繰り返す。ところが終齢に脱皮した後、ほとんどの体節のベルソン氏腺は蛹変態に向かって再度肥大化するのに対して、後部の体節のベルソン氏腺は細胞死によって除去されることを申請者らは見出した。この細胞死は終齢脱皮直後にJHを塗布すると阻害できることから、JH濃度の低下が引き金となりベルソン氏腺の体節特異的な細胞死を引き起こすことがわかった。またベルソン氏腺を体のどの部位に移植しても、体節特異性が維持されることから、細胞自律的な機構であることもわかった。つまり後部体節のベルソン氏腺は、JHが消失することで細胞死を引き起こす。一方他の体節のベルソン氏腺は同じホルモン条件に曝されるにもかかわらず細胞死を起こすことなく肥大化する。そこで細胞死を起こす体節と起こさない体節のベルソン氏腺において、それぞれに特異的な因子を比較することで体節特異性を誘導するホルモン(特にJH)応答性因子を同定し、そのホルモン応答機構を分子レベルで解明する。このことにより開放血管系である昆虫における体節特異的なホルモン応答機構の謎に答えることを目的とした。

### 3. 研究の方法

カイコを研究材料とし、生理学的手法、免疫学的手法、分子生物学的手法を駆使した。まずベルソン氏腺の細胞死に關与する機構の解明を免疫染色およびRNAiによるノックダウンによって行うことで、ホルモン応答の最終的な出口の探索を行った。ベルソン氏腺で体節特異的に発現する候補遺伝子を探索する目的で、JHの有無および体節間で発現量の異なる遺伝子をRNA sequenceによる比較を行った。候補遺伝子の中から、JH応答性遺伝子を*in vivo*の実験系で探索した。得られた候補遺伝子群の機能の検証のために、dsRNA導入を用いたRNAiによるノックダウンを行った。これにより体節特異性を生み出す遺伝子群の単離を目指した。

### 4. 研究成果

#### (1)細胞死シグナルの検証

後端の体節は、蛹脱皮の1日前には体の中から完全に除去される。そこで、はじめにどのような過程で細胞死を起こしているかを検証するために、核の形態変化、核ゲノムの

断片化について調査した。その結果、終齢脱皮直後までは核は枝状に伸びているのに対して、脱皮から2日後には核形態が不明瞭になり始めた。ただし、アポトーシスで見られるような核の断片化は観察されなかった。一方で、核の形態が不明瞭になった脱皮後2日以降では、核ゲノムの断片化が確認できた。しかし、断片化は等間隔ではなく不規則であったので、このことから、細胞死の初期にはアポトーシスが起きていないことが確認できた。アポトーシスにおいて主要な役割を示す caspase-3 の細胞死への関与を、免疫組織染色によって確認した。すると蛹脱皮の3日前から、caspase-3 の活性化が確認でき、その後、組織が無くなるまで活性は維持された。また mRNA の発現を検証した結果、発現は終齢中期から上昇し、その後高い値で維持された。このことから、細胞死の後半でアポトーシス様の機構が働くことが示唆された。そこで細胞死を起こす体節のベルソン氏腺に対して、caspase-3 の RNAi を行った結果、細胞死が抑制された。

一方で、予定されている細胞死の中に自己貪食であるオートファジーを伴うものがある。そこでベルソン氏腺の細胞死において、オートファジーが関与するかどうかを、オートファジーの主要な因子である ATG8 に的を絞り検証した。ATG8 の発現量は終齢の脱皮後に上昇した。一方で、細胞死を起こさない体節では、ATG8 の発現量は細胞死を起こす体節に比べて 1/3 だった。そこで ATG8 の RNAi を行ったところ、細胞死が抑制された。これらの結果から、ベルソン氏腺の細胞死はオートファジーが起きたのちに、アポトーシスが起こることで引き起こされると考えられる。また ATG8 の発現は JH によって顕著に抑制されたことから、体節特異的なホルモン応答の出口の一つとして ATG8 が存在すると考えられる。

### (2) 体節特異的に発現する遺伝子の探索

体節特異的に発現し、細胞死を促進もしくは抑制する遺伝子が、ベルソン氏腺において体節特異性を生み出していると考えられる。そこでまず終齢期(5齢)で細胞死を起こす体節と起こさない体節で特異的に発現する遺伝子の探索を行うために、終齢期に細胞死を起こす腹部第7体節にあるベルソン氏腺と細胞死を起こさない腹部第1体節にあるベルソン氏腺で発現する遺伝子をマイクロアレイで比較し、体節特異的な候補遺伝子を得た。これらのうち発現量の差が大きな遺伝子に対して、real-time PCR による発現量の解析を行ったところ、ほとんどの遺伝子が細胞死を起こす体節、または細胞死を起こさない体節のどちらかでのみ発現することがわかった。

### (3) 体節特異的に JH へ応答する遺伝子の RNA sequence による網羅的探索

ベルソン氏腺の細胞死は JH により阻害されることから、体節特異的な細胞死の制御は JH 応答性遺伝子によると考えられる。そこで終齢0日皮直後に JH アナログであるメソブレンを塗布し、また比較のために溶媒だけを塗布したものを用意した。処理2日後に、細胞死を起こす腹部第7体節および細胞死を起こさない腹部第1体節のベルソン氏腺を取り出して、次世代シーケンサーによる RNA sequence による網羅的な発現量の解析を行った。

#### 細胞死を起こさない体節(腹部第1体節)における RNA sequence の結果

コントロール区、JH 処理区で発現していた遺伝子数は、それぞれ 10399、10377 であり、全体では 11437 であった。このうち、JH 処理によって発現量が抑制されたものが(コントロール>JH とコントロールのみ) 全体のうち 1.18% であった(図2)。一方で、JH 処理によって発現量が増加したのが(JH>コントロールと JH 処理のみ) 1.12% であった。これらの結果から、JH で発現量が変化する候補遺伝子が、264 得られた。

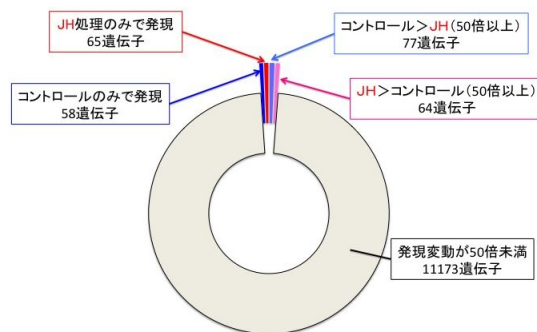


図2. RNAシーケンスの結果(腹部第1体節、5齢2日)

#### 細胞死を起こす体節(腹部第7体節)における RNA sequence の結果

コントロール区、JH 処理区で発現していた遺伝子数は、それぞれ 10365、10397 であり、全体では 11361 であった。このうち、JH 処理によって発現量が抑制されたものが(コントロール>JH とコントロールのみ) 全体のうち 0.93% であった(図3)。一方で、JH 処理によって発現量が増加したのが(JH>コントロール

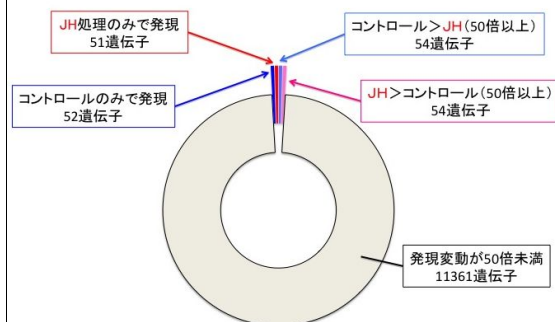


図3. RNAシーケンスの結果(腹部第7体節、5齢2日)

ールと JH 処理のみ) 0.92%であった。これらの結果から、JH で発現量が変化する候補遺伝子が、211 得られた。

(4) Real-time PCR による JH 応答性の確認  
(2)および(3)の結果で得られた候補遺伝子に対して、JH への応答性を Real-time PCR によって詳細に確認した。その結果、40 以上の遺伝子が JH への応答性を示した。

(5)RNAi による遺伝子の機能の検証  
以上の実験で得られた遺伝子に対して、ベルソン氏腺における RNAi を行い機能の検証を行った。そのうち、細胞死を起こさない体節に特異的な遺伝子である TCONS\_00034802 のノックダウンを行った結果、細胞死を起こす体節のベルソン氏腺へと形態が変化した。このことから、当該遺伝子はベルソン氏腺の体節情報の規定に関わっていることが示唆された。

今後、他の候補遺伝子の RNAi を行い、細胞死への影響を検証するとともに、ATG8 の発現誘導について検証することによって体節特異的なホルモン応答機構の解明に繋がると考えられる。

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 4 件)

Suang, S., Manaboon, M., Singtripop, T., Hiruma, K., Kaneko, Y., Tiansawat, P., Neumann, P., Chantawannakul, P.(2017) Larval diapause termination in the bamboo borer, *Omphisa fuscidentalis*. PLoS One, 12, (4): e0174919, doi.org/10.1371/journal.pone.0174919. (査読あり)

金児雄、比留間潔. (2016) 幼若ホルモン生合成の制御機構. 蚕糸・昆虫バイオテクノロジー, 85, (3): 117-125. <https://www.jstage.jst.go.jp/browse/konchubiotec/-char/ja/> (査読なし)

Suang, S., Manaboon, M., Chantawannakul, P., Tippawan, S., Hiruma, K., Kaneko, Y. (2015) Molecular cloning, developmental expression and tissue distribution of diapause hormone and pheromone biosynthesis activating neuropeptide in the bamboo borer *Omphisa fuscidentalis*. Physiological Entomology, 40, (3): 247-256. DOI: 10.1111/phen.12109. (査読あり)  
Kaneko, Y., Hiruma, K. (2015)

Allatotropin inhibits juvenile hormone biosynthesis by the corpora allata of adult *Bombyx mori*. Journal of Insect Physiology, 80, 15-21. doi.org/10.1016/j.jinsphys.2015.01.005 (査読あり)

〔学会発表〕(計 10 件)

金児雄、高木圭子、比留間潔. 体節特異的に起こる Verson's gland の細胞死の分子機構. 日本応用動物昆虫学会、2017 年 3 月 28 日、東京農工大学(東京都・小金井市)

金児雄、高木圭子、比留間潔. Verson's gland の蛹コミットメントにおける Broad-complex の制御機構. 日本蚕糸学会、2017 年 3 月 22 日、農林水産技術会議事務局筑波産学連携支援センター(茨城県・つくば市)

金児雄、高木圭子、比留間潔. 幼若ホルモンによる Verson's gland 蛹コミットメント抑制作用の分子機構. 日本応用動物昆虫学会、2016 年 3 月 27 日、大阪府立大学(大阪府・堺市)

金児雄、高木圭子、比留間潔. 栄養シグナルで誘導されるベルソン氏腺の蛹コミットメントの分子機構. 日本蚕糸学会、2016 年 3 月 18 日、京都工芸繊維大学(京都府・京都市)

金児雄、比留間潔. 幼若ホルモン生合成の制御機構. 昆虫ポストゲノム研究会、2015 年 10 月 17 日、ウエスパ椿山(青森県・深浦市)

比留間潔、金児雄. 単一細胞の蛹コミットメント誘導メカニズム. 昆虫ポストゲノム研究会、2015 年 10 月 17 日、ウエスパ椿山(青森県・深浦市)

金児雄、高木圭子、熊野健太、田村大、奈良岡留美、比留間潔. RNA シークエンスを用いたベルソン氏腺蛹コミットメントに関与する遺伝子の探索. 日本蚕糸学会、2015 年 9 月 27 日、北海道大学(北海道・札幌市)

Hiruma, K., Kaneko, Y. Pupal commitment of a single-celled Verson's gland is induced in a two-step process by the insulin and TOR/Akt signals, which occurs gradually, not on an all-or-none basis. 2nd International Insect Hormone (20th Ecdysone) Workshop, 2015 年 7 月 17 日、Crete (Greece)

金児雄、比留間潔. Verson's gland における体節特異的なホルモン応答. 日本応用動物昆虫学会、2015 年 3 月 27 日、山形大学(山形県・山形市)

Kaneko, Y., Hiruma, K. Allatotropin inhibits juvenile hormone synthesis by the adult corpora allata in *Bombyx mori*. 10th International Conference on

Juvenile Hormones, 2014 年 7 月 10 日、  
Tsukuba ( Japan )

6 . 研究組織

(1)研究代表者

金兎 雄 ( KANEKO, Yu )

弘前大学・農学生命科学部・助教

研究者番号 : 90633610