

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 15 日現在

機関番号：12605

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26850216

研究課題名(和文)新規分子蛍光センサーを用いた昆虫ホルモン運搬機構の解明

研究課題名(英文)Understanding of insect hormone traffic using FRET-based biosensor

研究代表者

菊田 真吾(Kikuta, Shingo)

東京農工大学・(連合)農学研究科(研究院)・助教

研究者番号：90718686

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：FRET型幼若ホルモンセンサーを細胞に導入し、発現させて蛍光シグナルを得ることが本課題の目的であるが、主に1)培養細胞レベル 2)昆虫生体レベルの二段階で検証を行い、JHの輸送によりセンサーがもたらす蛍光変化から輸送機構を明らかにしようとする試みである。細胞質発現センサーと培地の弱酸性化により、JH添加直後の蛍光変化を検出することができた。この結果は、細胞内にJHが取り込まれていることを示唆した。2)カイコ幼虫への一過的なセンサー遺伝子の導入は達成できたが、当初予定していた脂肪体への導入はできなかった。これは脂肪体の絶縁の性質により導入効率に問題があったためと考えられた。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study is to introduce a FRET-based juvenile hormone sensor into cells and express it to obtain the fluorescent signals.

1) culture cell level, change in cytoplasmic fluorescence signals caused by the sensor after JH addition. The results indicate that JH was incorporated across transmembrane unrelated to transporters or mediation by receptors.

2) insect tissue level, introduction of a transient sensor gene to silkworm larvae could be achieved, but it was not possible to introduce it to fat body which was originally planned. It was thought that this was due to the problem of introduction efficiency due to the insulation of the fat body.

研究分野：昆虫分子生物学

キーワード：FRET 分子イメージング 遺伝子導入

1. 研究開始当初の背景

(1) 幼若ホルモン (Juvenile hormone, JH) は昆虫の成長や変態、生殖などの調節に関与する生体内分子のひとつである。JH は細胞膜を隔てて運搬されると考えられている。この JH 運搬には細胞膜透過、受容体、トランスポーターを介した3種類の経路が考えられている。しかし、細胞膜上や特定の細胞内領域のみに存在する微量な JH を検出することが困難であるため、細胞膜を介した JH 運搬機構の解明に至っていない。

(2) ほ乳類の肝臓に相当する機能をもつ脂肪体は、昆虫の血糖であるトレハロース産生のものであり、生体内の恒常性に関わる。JH はトレハロース関連遺伝子の発現を制御することが示されたが、細胞膜を隔てた JH の運搬機構は不明である。そこで本課題は JH 特異的なセンサーを用いて、昆虫生体内における標的細胞の JH を蛍光で検出することで、その存在を示し、JH 運搬機構を解明することを目的とする。

2. 研究の目的

昆虫の成長や変態に中心的な役割を果たす JH は、体液を循環し、標的細胞で作用するが、細胞膜を隔てた JH の運搬機構は不明である。この機構の解明には、細胞膜近傍や細胞内領域、核内に存在する微量な JH を検出する必要がある。2012年に申請者は、リガンド結合によるタンパクの構造変化を蛍光波長変動として検出できる JH センサーを開発した。JH センサーを細胞や昆虫生体に発現させると、「生きたままの状態での生体内分子の可視化」が可能となる。そこで本研究では、JH センサーを用いて、昆虫生体内における標的細胞の JH 蛍光イメージングを行うことにより、JH の運搬機構を解明することを目的とする。

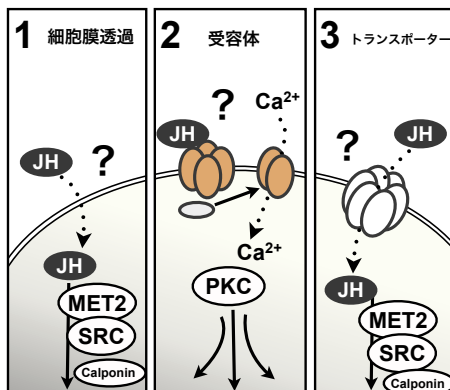


図1 細胞膜を隔てたJH運搬機構

幼若ホルモン (JH) が遺伝子発現制御に至るまでの輸送経路は不明である。細胞膜近傍や特定の細胞内領域に存在する JH を検出することが課題である。

3. 研究の方法

(1) 細胞内に発現させた FRET JH センサーを用いて蛍光シグナルを得た。昆虫やほ乳類由来培養細胞に細胞膜や核内への移行シグナルを付加した発現部位調節型 FRET JH センサーを発現させた。培地に滴下した JH の存在を蛍光変化の情報で捉えることを試みた。JH と相互作用をするタンパクをセンサーと共に細胞内に発現させて、JH が目的タンパクと複合体を形成する細胞内領域を調べた。

(2) エレクトロポレーション法で昆虫生体への一過性の遺伝子導入を行った。アンカーを介して細胞膜内外に連結するセンサーを用いて、JH が脂肪体へ到達する様相や脂肪体細胞内に局在化させた FRET JH センサーを用いて JH の可視化を試みた。生体表皮への JH 塗布や、生体内 JH 濃度が高い幼虫齢期を用いて解析を行うことにより、細胞膜を隔てた JH 運搬機構の解明を目指した。

4. 研究成果

(1) 細胞内局在の JH 検出

① 細胞内局在型発現コンストラクトの作製
FRET JH センサーをヒト腎胎児由来細胞 HEK293T に発現させた。併せて昆虫由来培養細胞に適用可能なセンサーベクターも開発した。既存の JH センサー発現コンストラクトは、移行シグナルを持たないため、細胞質に発現された。そこで発現領域を調整した FRET JH センサーを構築した。具体的に、アンカーを介して細胞膜外に連結する FRET JH センサーには、N 末端に Igκ 鎖リーダー配列と C 末端に PDGFR 膜貫通アンカードメインを付加した。一方、細胞膜内近傍型 FRET センサーは N 末端に Lck ドメインを付加する。核局在には、c-myc や SV40T などの核移行シグナル配列を N 末端に付加した。細胞膜近傍の FRET 検出には至らなかったが、細胞内の限局した領域を検出できるバイオセンサーの開発に成功した。

② FRET JH センサーの作動確認

分子イメージング解析の結果、一度蛍光変化を引き起こすと、元々の蛍光波長によるシグナル値の上昇がみられなくなった。これは、センサーと JH が結合している状態のままであることを示唆しており、センサーが不可逆的である可能性が考えられた。リガンド結合タンパクに付加された蛍光タンパク2種類には互いに結合することはないため、JH の乖離にはリガンド結合タンパクに原因があるものと推定された。センサーにアミノ酸変異を加えると、可逆性を付与することが可能である。しかしその反面、センサーとしての機能を失うことが懸念された。イメージングを用いたセンサーの作動を確認することは多大な労力とコストを要するので、in vitro による蛍光変化を検出することでセンサーの動きを知ることはできないかと考えた。標的細胞

胞膜近傍で、JH を放出するという知見から、細胞膜近傍の酸性 pH により、JH の乖離すなわち、センサーの可逆性を示すことができると考えた。蛍光タンパクの pKa を考慮した結果、およそ pH 6 で蛍光変化を示すことがわかった。この結果は、蛍光シグナル値の結合状態から乖離状態の ratio 値に戻ったことにより判断された。センサー自体を変えることは必要とせず、イメージング時の培地組成を弱酸性にすることで、蛍光変化を捉えることができると想定された。

③細胞イメージング

JH センサーを発現させた細胞内の蛍光変化は、細胞質発現型のみで観察された。細胞膜内外近傍の FRET 検出には至らなかった。今後のセンサー改良が不可欠である。この結果から、JH は細胞に直接輸送される可能性が高いことが示された。

(2) 昆虫生体内の JH 検出

バイオセンサー発現コンストラクトをカイコに微量注射した後、エレクトロポレーション法により、一過的に組織内への遺伝子導入を試みた。その結果、当初予定していた脂肪体への発現はみられなかった。これは、脂肪体の絶縁作用により、電気穿孔が不十分であったことが考えられた。中腸、絹糸腺、マルピーギ管において高い蛍光シグナルを得ることに成功した。しかし FRET による微弱な蛍光変化を検出することはできなかった。今後、検出用カメラや顕微倍率等を調整することにより、高い輝度を得ることができると期待している。

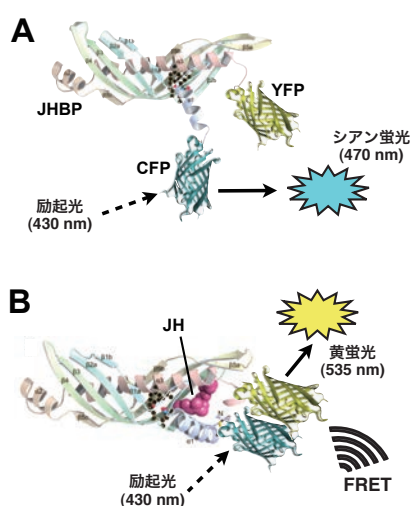


図2 FRET JH センサーの概要

(A) JHBPに二種類の蛍光タンパク (CFPとYFP)を付加したセンサーの状態。JHフリーの状態では、CFPの蛍光を呈する。

(B) JH結合時のセンサーの状態。JHBPの構造変化により、二種類の蛍光タンパク間の物理的距離が近づくため CFPからYFPへエネルギー移動が生ずる (FRET)。JH結合時は、YFPの蛍光を呈する。

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)

1. Shingo Kikuta, Haruka Endo, Natsuo Tomita, Tomoyuki Takada, Chiharu Morita, Kiyoshi Asaoka, Ryoichi Sato
Characterization of a ligand-gated cation channel based on an inositol receptor in the silkworm, *Bombyx mori*.
Insect Biochemistry and Molecular Biology 74:12-20. 2016.

doi:10.1016/j.ibmb.2016.04.010

査読あり

2. Shingo Kikuta, Bi-Huei Hou, Ryoichi Sato, Wolf B. Frommer, Takahiro Kikawada
FRET sensor-based quantification of intracellular trehalose in mammalian cells

Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry

80:162-165. 2016

DOI:10.1080/09168451.2015.1069699

査読あり

3. José A. Martínez-Quintana, Shingo Kikuta, Monserrath Felix-Portillo, Alma B. Peregrino-Uriarte, Gloria Yepiz-Plascencia

A novel functional glucose transporter in the white shrimp *Litopenaeus vannamei*-LvGLUT2- is up-regulated during hypoxia in hepatopancreas

Marine Environmental Research

112(Part A):61-67. 2015

doi:10.1016/j.marenvres.2015.09.007

査読あり

4. Shingo Kikuta, Yuki Nakamura, Makoto Hattori, Ryoichi Sato, Takahiro Kikawada, Hiroaki Noda

Herbivory-induced glucose transporter gene expression in the brown planthopper, *Nilaparvata lugens*

Insect Biochemistry and Molecular Biology 64:60-67. 2015

doi:10.1016/j.ibmb.2015.07.015

査読あり

5. Okada, J., Kikuta, S., Gusev, O., Suetsugu, Y., Cornette, R., Sakuma, T., Yamamoto, T., Kikawada, T.

Construction of Optimized CRISPR/Cas System to Reveal the Mechanisms of Anhydrobiosis in the Sleeping Chironomid
Cryobiology and Cryotechnology

61(1):69-73. 2015

<http://ci.nii.ac.jp/naid/110009959817>

査読あり

*本研究課題で必要とされた試薬の一部や解析ツールを用いたことで、得られた研究成果も含む。たとえばほ乳類細胞 HEK293T 細胞を用いた分子イメージングは、カルシウムイメージングの解析にも使われた。

〔産業財産権〕

○取得状況（計 1 件）

名称：幼若ホルモンセンサー

発明者：山崎 俊正、塩月 孝博、黄川田 隆洋、土屋 渉、菊田 真吾

権利者：山崎 俊正、塩月 孝博、黄川田 隆洋、土屋 渉、菊田 真吾

種類：公開特許公報 (A)

番号：特開 2016-161420 (P2016-161420A)

取得年月日：平成 28 年 9 月 5 日

国内外の別： 国内

6. 研究組織

(1) 研究代表者

菊田 真吾 (KIKUTA Shingo)

東京農工大学・大学院農学研究院・助教

研究者番号：90718686