

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24年 5月 1日現在

機関番号：13601

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2008～2011

課題番号：20380033

研究課題名（和文）多様な季節的多型を誘導するホルモン協働作用の分子解析

研究課題名（英文）Molecular analysis of hormonal orchestration that induces various seasonal polyphenisms

研究代表者

塩見 邦博 (SHIOMI KUNIHIRO)

信州大学・繊維学部・准教授

研究者番号：70324241

研究成果の概要（和文）：りんごや桜の害虫として知られているヒメシロモンドクガ (*Orgyia thyellina*) は、幼虫期の日長条件により、翅サイズや幼虫体色、繭色、卵休眠、卵サイズ、卵色、卵殻の厚さ、産卵数などに季節的多型を持つ昆虫である。我々は、このドクガの卵休眠は、カイコの卵休眠を誘導することで知られている FXPRL アミド族神経ペプチド (FXPRLa) に属する休眠ホルモン (DH) により誘導されることを明らかにし、さらに DH は休眠だけでなく卵のさまざまな多型誘導に関わっていることを明らかにした。これらの結果より、FXPRLa は生活史トレードオフ戦略の一端を担っており、さらに、卵休眠誘導におけるペプチド作用は、FXPRLa 受容体のレベルでカイコとは異なる進化過程を経ていることが推測された。

研究成果の概要（英文）：To analyze the molecular mechanisms involved in reproductive polyphenism, including the diapause induction of *Orgyia thyellina*, we first cloned and characterized the diapause hormone-pheromone biosynthesis activating neuropeptide (DH-PBAN) cDNA encoding the five Phe-X-Pro-Arg-Leu-NH₂ (FXPRLa) neuropeptides. We revealed that not only does the *Orgyia* DH induce embryonic diapause, but also that this neuropeptide induces seasonal polyphenism, participating in the hypertrophy of follicles and ovaries. This is the first study showing that a neuropeptide has a pleiotropic effect in seasonal reproductive polyphenism to accomplish seasonal adaptation. We also show that a novel factor (i.e., the DH neuropeptide) acts as an important inducer of seasonal polyphenism underlying a life-history tradeoff.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	5,700,000	1,710,000	7,410,000
2009年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2010年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2011年度	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			
総計	10,600,000	3,180,000	13,780,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農学・応用昆虫学

キーワード：昆虫生理学、昆虫神経内分泌学

1. 研究開始当初の背景

ヒメシロモンドクガ (*Orgyia thyellina*) は、幼虫期の日長条件の違いによりさまざま

な季節的多型を発現する。なかでも、その産下卵においては、長日条件では卵殻の薄い小型の非休眠卵を多数産下し、短日条件では、

卵殻が厚い大型の休眠卵を少数産下する。また、長日条件の成虫は、発達した飛翔筋をもつが、短日条件では、短翅型となり決して飛ぶことができない。これらの季節的多型は oogenesis-flight シンドロームに当てはまるトレードオフ戦略であると考えられる。しかしながら、この種をはじめとする昆虫の季節的多型誘導やさまざまな生物に見られるトレードオフ戦略の分子機構の詳細は明らかにされていない。

2. 研究の目的

我々はカイコ (*Bombyx mori*) の胚休眠を誘導する休眠ホルモン (DH) がこのドクガにおいても胚休眠を誘導し、DH と他の様々なホルモン分子の協働作用 (数種のホルモンおよび受容体の量・質の微調節) により多様な季節多型が誘導されるという仮説を立てた。そこで、これらを立証し、昆虫ホルモンの単一の分子解析による現象・機構の解明から、複数の分子の協働作用による現象の理解、または単一ホルモンの多面作用の解明へ向けた視点をもった成果を狙った。

3. 研究の方法

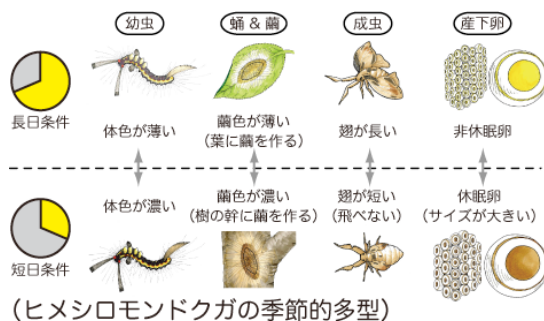
上記に関わる分子機構を解明する目的で (1), (2), (3) のプロジェクトを立ち上げた。

- (1) 多型誘導に関わる分子群の同定。
- (2) カイコおよびヒメシロモンドクガにおける DH の血中濃度の測定。
- (3) DH および FXPRL アミド受容体遺伝子群のクローニングと細胞生理学的解析。

4. 研究成果

(1) ヒメシロモンドクガの DH をコードする cDNA (*DH-PBAN* cDNA) を RT-PCR 法によりクローニングし、化学合成した DH とその抗体の注射により、この神経ペプチドホルモンが卵の休眠をはじめとする卵形成に関わる季節的多型を誘導することを明らかにした。さらに、RT-PCR、*in situ* ハイブリダイゼーションおよび免疫組織化学的解析により、ヒメシロモンドクガにおいてもカイコと同様の神経内分泌システムにより DH の分泌が行なわれることが推測された。さらにカイコでは、DH と同様の C 末端アミノ酸配列 (FXPRL アミド) をもつ α -SGNP、 β -SGNP、 γ -SGNP、PBAN は休眠誘導活性を示さないが、ヒメシロモンドクガにおいては、DH 以外の FXPRL アミドにおいても休眠をはじめとする短日型の表現型が誘導されることが分かった。これらのことより、二種の昆虫では、FXPRL アミド受容体の質・量的な差異が二種

における多型誘導の差異をもたらすと予測された。これらの成果は、昆虫の神経ペプチドホルモンがさまざま季節的多型の誘導を行なう多面作用をもつということをはじめて明らかにした。さらに生活史のトレードオフ戦略にペプチドホルモンが関わることもはじめて明らかにした。但し、ホルモン受容機構を中心とする、その分子メカニズムの解明には及ばず、今度の課題である。また、翅の多型において一部の個体で、抗 FXPRL アミド抗体の注射により短日条件で飼育した成虫の翅の長翅化が観察された。このことは、生活史のトレードオフ戦略の卵形成と翅形成の両方に FXPRL アミドが関与している可能性を示している。抗体注射実験や遺伝子ノックダウン実験により翅形成における FXPRL アミドの関与を検証していくことが期待される。



(2) カイコにおける血液中の DH の測定を可能にする血液の抽出法およびサンドイッチ ELISA 法を確立した。比較的低分子鎖からなる昆虫のペプチドホルモンの血中濃度の測定に世界ではじめて成功した。この方法により、血液中の DH の pg/ml レベルの測定が可能となった。さらに一化性 (遺伝的に休眠性) および多化性 (遺伝的に非休眠性) の系統における蛹発育期の DH 濃度の変動を調査したところ、一化性系統では約 30 pg/ml の濃度で成虫羽化期まで推移するのに対し、多化性系統では約 10 pg/ml の濃度で推移した。これらのことより、これらの系統では血液中の DH 濃度の違いが休眠性を決定する主因であると推測された。今後は、カイコの二化性系統やヒメシロモンドクガの蛹-成虫発育期における血中 DH 濃度の測定を行ない、環境条件と蛹期の DH 濃度と休眠性の関係を明らかにすることが期待される。

(3) ヒメシロモンドクガの DH および PBAN 受容体オーソログ cDNA を 5 種類クローニングした。さらに、RT-PCR 法により、長日および短日条件の蛹の卵巣における DH 受

容体の発現量を調査した。日長条件の違いにより発現量に違いが見られ、短日条件において強い発現を確認した。今後は、既にクローニングした受容体のリガンドとの親和性を細胞生理学的に解析するとともに、各組織における発現動態を詳細に調査することが期待される。

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6件)

- ① Uehara, H., Senoh, Y., Yoneda, K., Kato, Y., Shiomi, K.; An FXPRLamide neuropeptide induces seasonal reproductive polyphenism underlying a life-history tradeoff in the tussock moth. *PLoS ONE*, 6(8), e24213, 2011, 査読有
(doi:10.1371/journal.pone.0024213)
- ② Ohtsuka, K., Atsumi, T., Fukushima, Y., Shiomi, K.; Identification of a *cis*-regulatory element that directs prothoracicotropic hormone gene expression in the silkworm *Bombyx mori*. *Insect Biochem Mol Biol*. 41, 356-361, 2011, 査読有
(http://dx.doi.org/10.1016/j.ibmb.2011.02.002)
- ③ Hagino, A., Kitagawa, N., Imai, K., Yamashita, O., Shiomi, K.; Immunoreactive intensity of FXPRLamide neuropeptides in response to environmental conditions in the silkworm, *Bombyx mori*. *Cell Tissue Res*. 342, 459-469, 2010, 査読有
(doi:10.1007/s00441-010-1083-4)
- ④ 塩見邦博「昆虫の季節戦略と私の研究展望」蚕糸・昆虫バイオテック, 日本蚕糸学会, Vol. 79, 25-28, 2010, 査読無
- ⑤ 塩見邦博「カイコの季節戦略を規定する環境温度の受容と記憶に関わるセルセンサーの解明」CELLSENSOR, 第5号, P.19, 2009, 査読無
- ⑥ 柳沼利信, 新美輝幸, 塩見邦博「カイコの胚休眠の分子機構-特に休眠ホルモンの合成と受容、および休眠開始期に発現する遺伝子について-」化学と生物, 日本農芸化学会, Vol. 3, 206-213, 2008, 査読無

[学会発表] (計16件)

- ① 久保田穂香・西岡拓哉・塩見邦博; カイコのイオン透過性 GABA 受容体サブユニット群の免疫細胞化学的解析: 休眠ホルモン放出との関連性の調査; 日本蚕糸学会中

部支部講演要旨集第 67 号, 5, 2011.

- ② 王紅・溝口明・塩見邦博; カイコの蛹期における血液中の休眠ホルモン濃度の測定; 日本蚕糸学会中部支部講演要旨集第 67 号, 8, 2011.
- ③ 塩見邦博; チョウ目昆虫の季節戦略と感覚センサー; シンポジウム「昆虫の排泄・水分調節の解明と応用展開-アクアポリンファミリーの生理とその破綻-」; 新潟大学大学院, 2010. 12. 27.
- ④ 塩見邦博; 昆虫の季節戦略と温度センサー; 特定領域研究「細胞感覚」2010 年夏の班会議 in 札幌, 2010. 7. 5.
- ⑤ 塩見邦博; カイコの休眠誘導と温度・湿度センサー; シンポジウム「昆虫の排泄・水分調節の解明と応用展開-アクアポリンファミリーの生理とその破綻-」; 岡山大学資源生物科学研究所, 2009. 1. 6.
- ⑥ 佐藤梓・曾我部隆彰・西岡拓哉・王紅・瀬尾裕樹子・富永真琴・塩見邦博; カイコの TRPA1 は休眠性の決定に関与する環境温度受容体である。; 日本蚕糸学会中部支部講演集第 65 号, 19, 2009.
- ⑦ 佐藤梓・曾我部隆彰・西岡拓哉・王紅・瀬尾裕樹子・富永真琴・塩見邦博; カイコの TRPA1 は多数のリガンドを持つ。; 日本蚕糸学会中部支部講演集第 65 号, 20, 2008.
- ⑧ 瀬尾裕樹子・上原裕史・佐藤梓・西岡拓哉・王紅・加藤義臣・塩見邦博; 抗 FXPRL アミド抗体の注射によるヒメシロモンドクガの季節的多型への影響; 日本蚕糸学会中部支部講演集第 65 号, 28, 2009.
- ⑨ 佐藤梓・石丸祐樹・上原裕史・西岡拓哉・塩見邦博; カイコの温度センサータンパク質の脳内局在性の解析; 日本蚕糸学会 7 9 回大会講演要旨集, 82, 2009.
- ⑩ 上原裕史・加藤義臣・佐藤梓・西岡拓哉・石丸祐樹・塩見邦博; FXPRL アミド神経ペプチドはトレードオフ戦略に関わる卵の季節的多型を誘導する; 日本蚕糸学会 7 9 回大会講演要旨集, 86, 2009
- ⑪ 佐藤梓・石丸祐樹・上原裕史・西岡拓哉・塩見邦博; カイコの脳-神経系における温度センサー発現細胞の同定; 日本蚕糸学会中部支部講演集第 64 号, 8, 2008.
- ⑫ 石丸祐樹・上原裕史・佐藤梓・西岡拓哉・塩見邦博; カイコの胚発生時期における温度センサー遺伝子の発現動態の解析; 日本蚕糸学会中部支部講演集第 64 号, 9, 2008.
- ⑬ 西岡拓哉・上原裕史・佐藤梓・石丸祐樹・塩見邦博・安河内祐二・田中良明; カイコ

の PDF cDNA 全塩基配列の決定と脳内の局在性の調査;日本蚕糸学会中部支部講演集第 64 号, 22, 2008.

- ⑭ 上原裕史・加藤義臣・佐藤梓・石丸祐樹・西岡拓哉・塩見邦博;ヒメシロモンドクガの卵多型におけるトレードオフの休眠ホルモンによる誘導;日本蚕糸学会中部支部講演集第 64 号, 23, 2008.
- ⑮ Sato, A., Uehara, H., Fukushima, Y., Hirabayashi, M., Kajiura, Z., Nakagaki, M., Shiomi, K. : Molecular cloning and expression analysis of thermoTRP homologs of the silkworm, *Bombyx mori* : Asia-Pacific Congress of Sericulture and Insect Biotechnology (APSERI 2008 NAGOYA), 2008. 3. 21-22.
- ⑯ Uehara, H., Sato, A., Fukushima, Y., Shiomi, K., Kato, Y. : Molecular cloning and functional analysis of cDNA encoding the diapause hormone on diapause induction and seasonal polyphenism in the *Orgyia thyellina* : Asia-Pacific Congress of Sericulture and Insect Biotechnology (APSERI 2008 NAGOYA), 2008. 3. 21-22.

[図書] (計 4 件)

- ① 柳沼利信, 新美輝幸, 塩見邦博 “第 1 2 章 休眠ホルモンによるカイコガ胚休眠の調節”「脱皮と変態の生物学」(園部治之・長澤寛道 編) 東海大学出版会, pp. 269-291. 2011.
- ② 塩見邦博, 加藤義臣 “動物の感覚センサーと環境応答”「応用生物学入門」(平林公男, 白井孝治 共編) オーム社, pp. 35-60.
- ③ 塩見邦博 “昆虫季節戦略を展開する休眠ホルモンと遺伝子”「虫たちが語る生物学の未来」pp. 142-145. 2009. 衣笠会
- ④ Shiomi, K. “Molecular Mechanisms of Cell-specific Expression of Neuropeptide Hormone Genes, *DH-PBAN* and *PTTH* in the Silkworm, *Bombyx mori*” In *Developmental gene expression regulation* (Eds Nathan C. Kurzfield) pp. 169-187. 2009. Nova Science Publishers, Inc..

[その他]

ホームページアドレス

<http://soar-rd.shinshu-u.ac.jp/profile/ja.WCnpjFkV.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

塩見 邦博 (SHIOMI KUNIHIRO)

信州大学・繊維学部・准教授

研究者番号 : 70324241

(2) 研究分担者

溝口 明 (MIZOGUCHI AKIRA)

名古屋大学・理学研究科・准教授

研究者番号 : 60183109

東 政明 (AZUMA MASAOKI)

鳥取大学・大学院連合農学研究科・教授

研究者番号 : 20175871

富永 真琴 (TOMINAGA MAKOTO)

大学共同利用機関法人自然科学研究機

(共通施設)・岡崎統合バイオサイエンスセ

ンター・教授

研究者番号 : 90260041

太田 広人 (OHTA HIROTO)

熊本大学自然科学研究科・助教

研究者番号 : 60450334

(3) 研究協力者

加藤 義臣 (KATO YOSHIOMI)

国際基督教大学・名誉教授