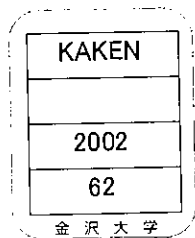


Mechamisms of gene expression and physiological function of bombyxin

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2018-11-19 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: lwami, masafumi メールアドレス: 所属:
URL	https://doi.org/10.24517/00052831

This work is licensed under a Creative Commons Attribution-NonCommercial-ShareAlike 3.0 International License.





ボンビキシンの遺伝子転写機構と生理機能

(課題番号 13660058)

平成13年度～平成14年度
科学研究費補助金(基盤研究(C)(2))研究成果報告書



平成15年3月

研究代表者 岩見 雅史

(金沢大学大学院自然科学研究科生命科学専攻 助教授)



KAKEN
2002
62

ポンピキシンの遺伝子転写機構と生理機能

(課題番号 13660058)

平成13年度～平成14年度
科学研究費補助金（基盤研究（C））研究成果報告書

平成15年3月

研究代表者 岩見 雅史
(金沢大学大学院自然科学研究科生命科学専攻 助教授)

はしがき

昆虫発生学は古く養蚕学を背景にして、わが国の研究が大きく貢献している分野の一つである。すなわち1940年、福田宗一により脱皮、変態を促す脱皮ホルモンの生産器官が前胸腺であることが発見されて以降、前胸腺刺激ホルモンや休眠ホルモンの構造解明をはじめ、ほとんどの昆虫ペプチドホルモンが本邦で発見されている。

研究代表者は、1980年代後半から1990年代初頭にかけて、ボンビキシン遺伝子や前胸腺刺激ホルモン遺伝子を単離してきた。特に、ボンビキシン研究について重点的に研究を行い、この10数年で、急速な深まりを見せた。この過程で、カイコゲノム中に存在する32コピー以上のボンビキシン遺伝子を単離、解析し、これらがペアやトリプレットを基本単位としてA～Gの7ファミリーで構成される多重遺伝子族形成していることを証明してきた。また、脳内での発現細胞および発現型遺伝子の同定を行なうとともに、ボンビキシン産生細胞で転写をもたらすエレメントの同定に肉薄しつつあった。さらに、カイコガ以外の大型昆虫からもボンビキシン族ペプチドホルモンをコードする10個の遺伝子を単離、解析し、カイコ・ボンビキシン遺伝子同様、多重遺伝子族を形成していること、脳内の中央部に存在する神経分泌細胞で発現することを見出した。これらのうち、ヤマユガ科のエリサンのボンビキシン様分子は変態ホルモンであるエクジソンの合成、分泌を促進する前胸腺刺激活性を有することが示されるなど、昆虫インスリン様分子の機能面での実像にも迫りつつあった。

加えて、研究代表者は、昆虫で容易に遺伝子転写解析を行うための遺伝子導入法を研究し、エレクトロポレーション（電気穿孔）法により、比較的簡便に生きた昆虫組織へ遺伝子が導入可能なことを示してきた。このような状況下で、ボンビキシン遺伝子の脳神経分泌細胞特異的転写機構を探ることを目的に、本課題による研究を行った。

本研究は、同じ研究室で、同じくカイコガを研究材料とする桜井勝教授、研究室の多くの学部学生ならびに大学院学生の、助言、そして協力のもとになされたものである。この場を借りて、これらの方々に感謝いたします。

平成15年3月
研究代表者
岩見 雅史

研究組織

研究代表者： 岩 見 雅 史

(金沢大学大学院自然科学研究科生命科学専攻 助教授)

研究経費

	直 接 経 費	間 接 経 費
平成 1 3 年度	1, 8 0 0 千円	0 千円
平成 1 4 年度	1, 6 0 0 千円	0 千円
計	3, 4 0 0 千円	0 千円

研究発表

(1) 学会誌等

1. Tsuzuki, S., Iwami, M., and Sakurai, S.
Ecdysteroid-inducible genes in the programmed cell death during insect metamorphosis.
Insect Biochem. Mol. Biol., **31** (4-5), 321-331 (2001).
2. Abdel Salam, S. E., Moto, K., Sakurai, S., and Iwami, M.
Transcription element responsible for the brain cell-specific expression of the bombyxin gene that encodes an insect insulin-related peptide.
Zool. Sci., **18** (4), 543-549 (2001)
3. Obara, Y., Miyatani, M., Ishiguro, Y., Hirota, K., Koyama, T., Izumi, S., Iwami, M., and Sakurai, S.
Pupal commitment and its hormonal control in wing imaginal discs.
J. Insect Physiol., **48** (10), 933-944 (2002)
4. Moto, K., Kojima, H., Kurihara, M., Iwami, M., and Matsumoto, S.
Cell-specific expression of enhanced green fluorescence protein under the control of neuropeptide gene promoters in the brain of the silkworm, *Bombyx mori*, using *Bombyx mori* nucleopolyhedrovirus-derived vectors.
Insect Biochem. Mol. Biol., **33** (1), 7-12 (2003)

(2) 口頭発表

1. 岩見雅史.
昆虫インスリン様ペプチドの多様性.
国立遺伝学研究所研究会『ペプチド分子の機能の多様性』（三島市）2001年3月.
2. Salah Eldin Abdel Salam、本賢一、桜井勝、岩見雅史.
ボンビキシン遺伝子の脳神経分泌細胞での転写を司る2つのエレメント.
日本動物学会第72回大会（福岡市）2001年9月.
3. 小山貴司、岩見雅史、桜井勝.
カイコ翅成虫原基の蛹コミットメントの解析.
日本動物学会第72回大会（福岡市）2001年9月.
4. 金児雄、都築誠司、岩見雅史、桜井勝.
カイコガ前部絹糸腺のアポトーシスに関わる遺伝子の機能解析.
日本動物学会第72回大会（福岡市）2001年9月.
5. 掛井基徳、岩見雅史、桜井勝.
Hormonal control of death commitment in the anterior silk gland of the silkworm, *Bombyx mori*.
日本比較内分泌学会第26回大会（東京都）2001年10月.
6. Takashi Koyama, Yoshikazu Obara, Masafumi Iwami, and Sho Sakurai.
Relationship between pupal commitment and cell cycle in the wing discs of the silkworm, *Bombyx mori*.
The 14th Naito Conference "Bioactive Natural Products and Their Modes of Action [III] - Insect Bioactive Molecules and Their Modes of Action" (Hayama, Japan) 2001年10月.
7. Salah Eldin Abdel Salam、本賢一、桜井勝、岩見雅史.
ボンビキシン遺伝子の脳神経分泌細胞特異的転写エレメントと遺伝子構成依存性転写様式
日本分子生物学会第24回年会（横浜市）2001年12月.
8. Takashi Koyama, Masafumi Iwami, and Sho Sakurai.
Ecdysteroid controls pupal commitment and cell cycle in the wing discs of the silkworm, *Bombyx mori*.
The 15th International Ecdysone Workshop "Molecular Biology of Ecdysone Responses" (Crete, Greece) 2002年6月.
9. 本賢一、小島寿夫、岩見雅史、松本正吾.
バキュウロウイルスを利用した昆虫脳神経ペプチド遺伝子のプロモーター解析系
日本動物学会第73回大会（金沢市）2002年9月

10. 小山貴司, 岩見雅史, 桜井勝.
カイコ翅成虫原基の蛹コミットメントと細胞周期のホルモン支配
日本動物学会第73回大会 (金沢市) 2002年9月.
11. 高木圭子, 岩見雅史, 桜井勝.
カイコガ幼虫前胸腺の活性調節機構
日本動物学会第73回大会 (金沢市) 2002年9月.
12. 金児雄, 岩見雅史, 桜井勝.
カイコガ前部絹糸腺の予定細胞死に関わる遺伝子の発現動態
日本動物学会第73回大会 (金沢市) 2002年9月.
13. 関本隆志, 岩見雅史, 桜井勝.
カイコガ前部絹糸腺の予定細胞死における初期遺伝子の発現様式
日本動物学会第73回大会 (金沢市) 2002年9月.
14. 掛井基徳, 岩見雅史, 桜井勝.
カイコ前部絹糸腺における死のコミットメントのホルモン支配
日本動物学会第73回大会 (金沢市) 2002年9月.
15. El-mogy Mohamed, 岩見雅史, 桜井勝.
カイコガ前部絹糸腺の予定細胞死に関与するエクジソン膜受容体
日本動物学会第73回大会 (金沢市) 2002年9月.
16. 伊賀正年, 岩見雅史, 桜井勝.
タンパク質合成阻害剤により誘導されるカイコガ前部絹糸腺アポトーシスの多型
日本動物学会第73回大会 (金沢市) 2002年9月.
17. 小山貴司, 岩見雅史, 桜井勝.
カイコ翅成虫原基における細胞周期のホルモン支配
日本比較内分泌学会第26回大会 (岡山市) 2002年11月.

(3) 出版物

1. 岩見雅史. 昆虫から学ぶ生きる知恵. 『ホルモンを作り出す遺伝子』, pp. 31-42. クバプロ、東京, 2001年10月.
2. 岩見雅史.
血糖抑制ホルモン
『新ホルモンハンドブック』 (日本比較内分泌学会 編), 印刷中, 南江堂、東京. 2003年.
インスリン様ペプチド
『新ホルモンハンドブック』 (日本比較内分泌学会 編), 印刷中, 南江堂、東京. 2003年.
ボンビキシン
『新ホルモンハンドブック』 (日本比較内分泌学会 編), 印刷中, 南江堂、東京. 2003年.

研究成果

1. 研究の背景と意義

昆虫は、変態や休眠をライフサイクルに取り込み、様々な環境に適応する適応能力を獲得してきたことが示すように、未知の遺伝子資源の宝庫である。その熱帯から寒帯に及ぶ広い分布が示すように、生理的適応性、個体の生き残り戦略のいずれをとっても遺伝的多様性に裏付けられた高度な生命システムを有している。

インスリンはヒトをはじめとする脊椎動物から海綿にいたる下等な無脊椎動物まで広く存在している。ヒトのインスリンと比較して、無脊椎動物のインスリン（インスリン様分子）は、昆虫での研究例は少ないが、ショウジョウバエではゲノムプロジェクトの進展に伴い、遺伝子レベルでの解析が急速になされつつある。線虫においても、近年急速に研究が進み、個体の寿命に関わる *daf-2* 遺伝子がインスリン様受容体をコードしていること、*Daf-2* のリガンドと考えられるインスリン様分子の遺伝子ミュータントが長寿傾向を示すことが証明され、インスリン様分子が個体の寿命にも関わっていることが明らかになり、インスリンの持つ多機能性が注目され始めている。

昆虫インスリン様分子（ボンビキシン）は、ヤママユガ科のエリサンの除脳蛹に対して、前胸腺を刺激し変態を誘導するホルモンとして発見され、昆虫の脱皮・変態を統御するホルモンである可能性が注目された。ペプチド分析により、ボンビキシンは、インスリンと相同性を有することが見いだされ、引き続き、行われた遺伝子の単離からも、遺伝子構成上および塩基配列上から昆虫インスリンともいえる分子であることが確かめられた。加えて、インスリンとボンビキシンのハイブリッド分子は、弱いながらもインスリン活性を有していることが示すように、機能的にもボンビキシンは、インスリンと類似している。カイコガの場合、ボンビキシン遺伝子は、ハプロイドゲノム当たり 32 コピー以上存在し、脳中央部のわずか 8 個の神経分泌細胞が最大の産生部位となっている。また、カイコガ以外の多くの昆虫で、遺伝子が多重遺伝子族を形成し、脳内の神経分泌細胞で発現していることが証明されつつある。ボンビキシンがエリサンの前胸腺を刺激し、脱皮・変態を誘導することにより発見された経緯が示すように、昆虫においてもインスリン様分子が、単なる糖代謝の調節にとどまらず、発育統御の重要な部位に位置し、多岐にわたる生命現象を支配していると考えられる。

インスリン様分子であるボンビキシン遺伝子の転写機構と機能に関する知識は、将来、遺伝子操作により昆虫に新機構を与える際の有力なターゲットであり、またプロモーターのデザインの有用な指針となる。また、脊椎・無脊椎動物同一起源のホルモン分子を無脊椎動物の系で解析することは、これまで脊椎動物の実験系では見過ごされていた動物の発生・代謝の内分泌支配を明らかにするのみならず、多様な生物種で同一分子がいかに機能を付与されているかを精査することにより未利用の遺伝子資源の開発が可能となるはずである。

2. 研究の成果

2-1. ボンビキシン遺伝子の脳神経細胞特異的転写エレメント

脳中央部のわずか8個の神経分泌細胞で特異的に発現するボンビキシン遺伝子の転写機構を探るため、ボンビキシン遺伝子の一つ、ボンビキシンF1遺伝子を用い、脳神経細胞特異的転写エレメントの同定を行った。ボンビキシンF1遺伝子上流域を欠損させた様々なレポーター遺伝子を、カイコガ5齢幼虫 (*Bombyx mori*) の脳に導入し、プロモーター解析を行った。プロモーターの検定には、GFP (緑色蛍光タンパク質、実際には、Enhanced Green Fluorescent Protein を用いた) レポーター 遺伝子を脳にエレクトロポレーションにより直接導入し、一過性の発現を解析する系を用いた (図1)。

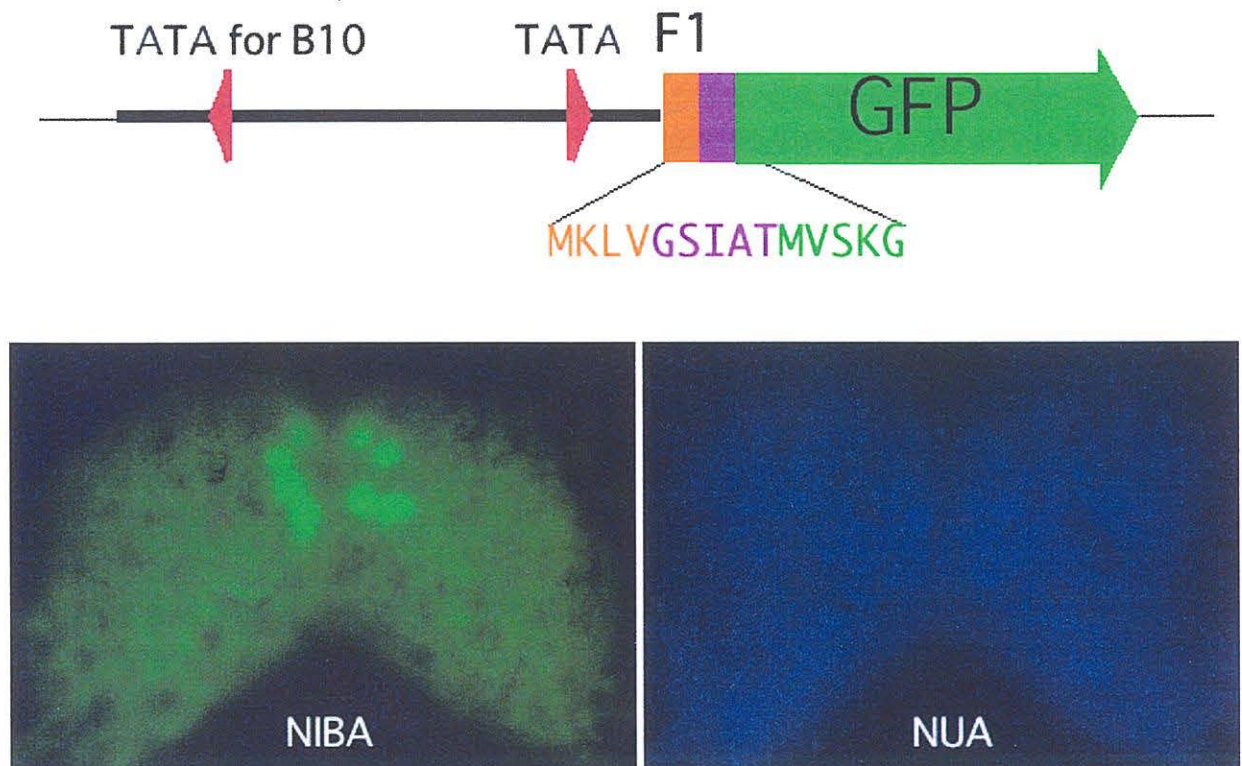


図1 レポーター遺伝子のカイコ脳での細胞特異的発現。ボンビキシンF1遺伝子プロモーターをGFPレポーターにつないだ遺伝子をカイコ脳に導入し、蛍光顕微鏡で観察した。上、導入したレポーター遺伝子の構造を示す。アミノ酸配列はGFPのアミノ末端部を示している。TATAは、TATAボックスを示している。下、NIBAは、GFP観察用のフィルターセットを用いGFPの蛍光を見たもので、NUAは自家蛍光を見たもの。中央部に存在するボンビキシン産生細胞のみがGFPを発現していることがわかる。

転写エレメントは、脳内のボンビキシン産生細胞 (脳中央部に位置する左右4対、計8個の神経細胞) でのみ転写させうるもの、ボンビキシン産生細胞での転写量を増加させるものの2種が見つかった。1塩基単位で、上流域を欠損させたものや、塩基を置換させたものにより、前者、すなわち細胞特異性を司るエレメント

(BOSE, B0mbyxin gene-Specific Element と命名) の配列が 5'-AAACCTACACAC-3' であること (図2)、後者、すなわち転写量を増加させるアクティベーターが 5'-TCAAG-3' であることを示した (図3)。加えて、これらの配列を含む二本鎖合成オリゴヌクレオチド (BOSE配列を含むもの: 5'-AAACCTACACACTGTCGAAACAGTT-3' およびアクティベーター配列を含むもの: 5'-AATCTTCAAGAATTTGTGCAAA-3') を用いた競合アッセイを行ったところ、前者については発現がみられなくなり、後者については発現量の低下がみられた (図4)。

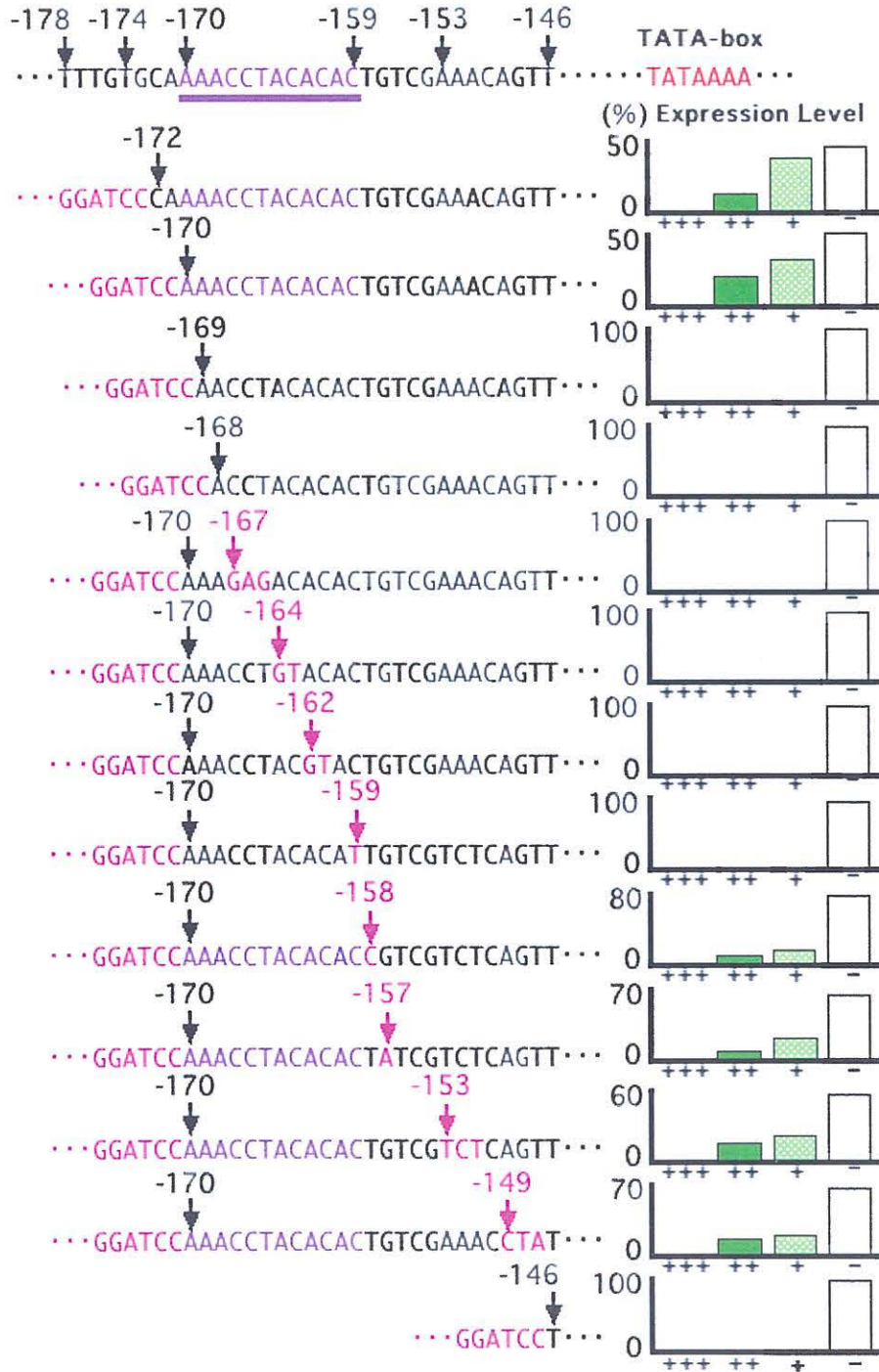


図2 (前ページ) ポンビキシン遺伝子プロモーターの解析 (BOSE配列)。ポンビキシンF 1 遺伝子プロモーターを上流側より欠失させることにより、また、プロモーター欠失変異体を数多く用いることにより、12塩基からなる配列 (AAACCTACACAC) がポンビキシン産生細胞での発現を司る転写エレメント (BOSE) であることを示した。数字は翻訳開始点からの距離を塩基対で示している。右の棒グラフは何パーセントの脳がどの程度の発現を示したかを表した。発現レベルは高い (+++)、普通 (++)、低い (+) の3段階で示した。-は発現がなかったことを示す。

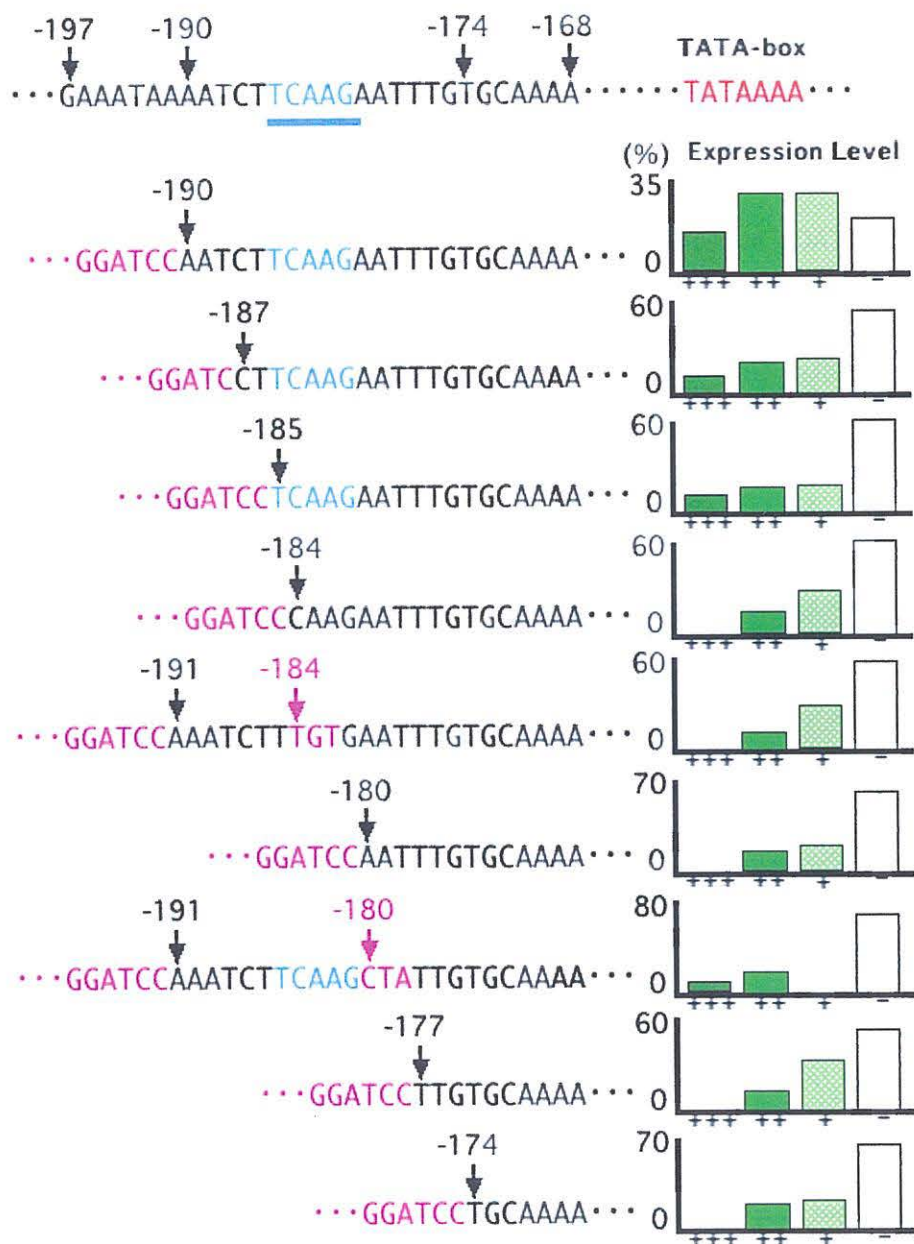


図3 ポンビキシン遺伝子で発現量上昇させる転写エレメント (アクティベーター)。図2と同様に、プロモーター欠失変異体を数多く用い、TCAAG配列が発現量を上昇させるスイッチであることを示した。下線で示したTCAAG配列が1塩基でも欠けると発現量が低下する。薄く示した配列は、レポーター中の制限酵素の配列もしくは変異させた配列を示している。

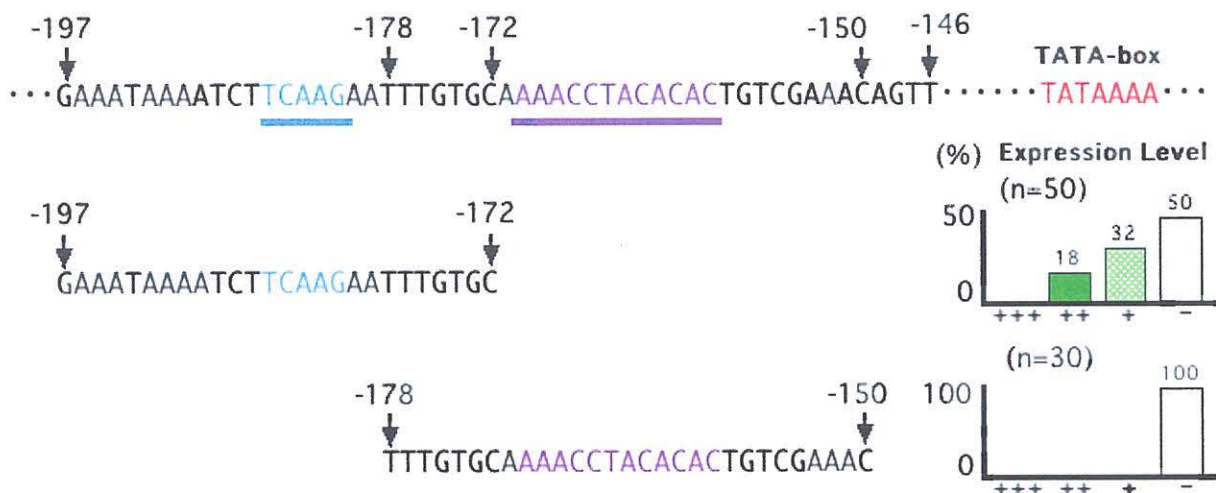


図4 二重鎖オリゴヌクレオチドを用いた競争阻害によるBOSEおよびアクティベーター配列の検定。下線で示したBOSEおよびアクティベーター配列を有する2種類の二重鎖オリゴヌクレオチドを、レポーター遺伝子と同時にエレクトロポレーションを行い、競争的阻害により、GFPの発現の変化を調べた。アクティベーター配列を有する二重鎖オリゴヌクレオチドでは発現量が低下し、BOSE配列を有するものでは発現の消失が見られた。

BOSE配列は既知のエレメント配列と相同性を有しない新規な配列を有していた。一方、後者（アクティベーター）はカ（*Anopheles gambiae*）において、腸で発現するトリプシン遺伝子の転写エレメントと相同性を有していた。ここで得られた転写エレメントは、脳内の特定の細胞でのみ発現させるエレメントであり、今後、遺伝子操作昆虫において特定細胞で遺伝子を発現させる武器となる。また、脳での転写を増加させるエレメントと腸での転写を司るエレメントの相同性は、脳神経分泌細胞－腸ホルモン産生細胞の同一起源説に示唆を与えるものである。

2-2. ボンビキシン遺伝子の遺伝子構成依存性の転写

ボンビキシン遺伝子は塩基配列の相同性からA-Gの7ファミリーに分類され、これら遺伝子がペア、トリプレットを基本単位としてクラスターを形成している。遺伝子転写様式は、特徴的である。Aファミリー遺伝子はペアを構成する遺伝子のみが発現しておりトリプレットを構成する遺伝子は発現していない。一方、Bファミリー遺伝子は遺伝子構成に無関係に発現している遺伝子と発現していない遺伝子が存在している。このことは、プロモーター部位の遺伝子配列に加えて、遺伝子構成が転写に影響を及ぼしていると考えられる。実際、Aファミリー遺伝子を用いた実験では、ペア、トリプレットといった遺伝子構成が転写に影響を及ぼしていることが示された（図5）。遺伝子の向きと順番が遺伝子発現に重要であることが端的に示される実験系は本系以外になく、新たな転写調節機構を提示しうると考えられる。

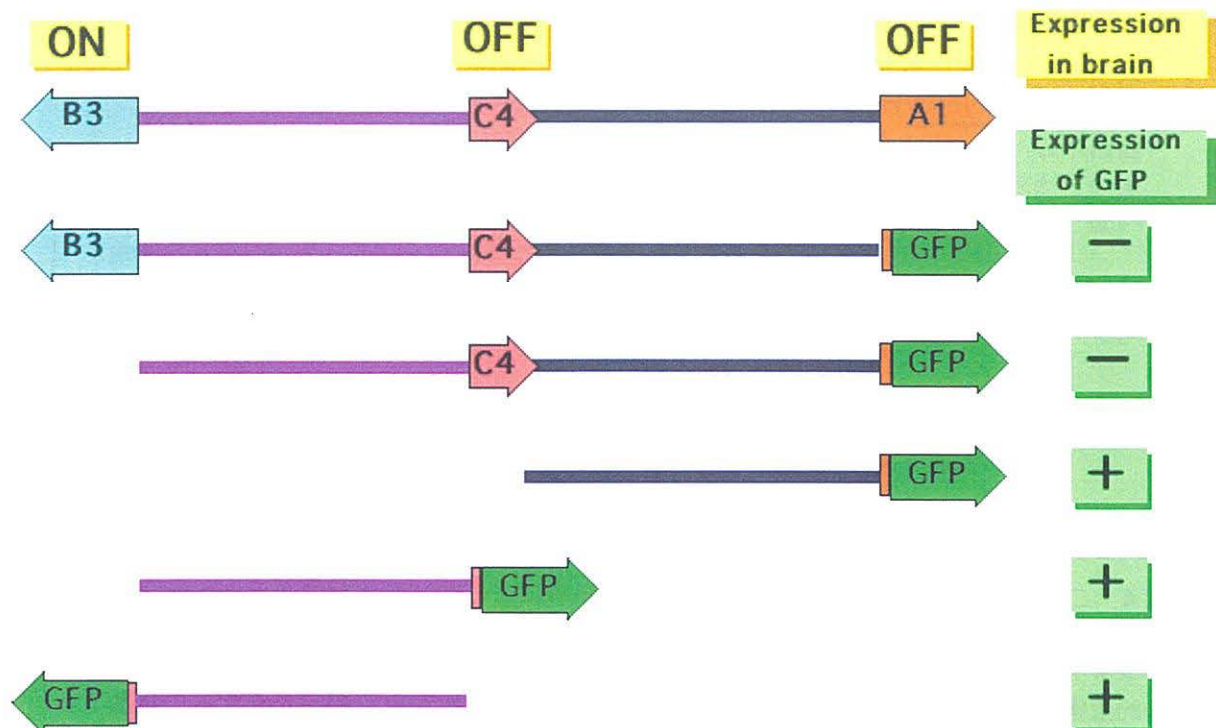


図5 ボンビキシン遺伝子の遺伝子構成依存的発現のレポーター遺伝子を用いた確認。GFPをレポーターにさまざまな遺伝子構成を持つボンビキシン遺伝子の発現量を調べた結果。ボンビキシンA1遺伝子プロモーターは、それ単独で発現させると発現するが、他の遺伝子と組み合わせると発現しなくなる。C4遺伝子も同様である。このことから、ボンビキシン遺伝子は発現がペアやトリプレットといった遺伝子構成に影響されることがわかる。

2-3. カイコガ幼虫脳への遺伝子導入系の開発

昆虫は未知の遺伝子資源の宝庫であり、かつ、豊富な生理・内分泌研究のデータがありながら、ショウジョウバエ以外の昆虫は、トランスジェニック系の利用が容易でないため、これまでほとんど分子生物学の研究対象とはなり得なかった。そこで、エレクトロポレーション（電気穿孔）法を用いたカイコガへの遺伝子導入系を開発し、カイコガ幼虫脳へ遺伝子を導入し、一過性の発現系でレポーター遺伝子によるプロモーター解析を行ってきた。

エレクトロポレーション法は、これまで実用的には困難と考えられてきた非トランスジェニック系でのレポーター遺伝子の転写解析を可能にした。特に、マウスやショウジョウバエのような膨大な手間も時間も要するトランスジェニック系を作成することなく、多種類のレポーター遺伝子の簡便な解析を可能にするという点で優れた遺伝子導入法であった。しかし、エレクトロポレーション法による遺伝子導入効率は、せいぜい50%程度であり、改善が望まれていた。エレクトロポレーション法に代表される物理的手法による遺伝子導入では、大幅な効率の向上が望まれないことから、バキュロウイルスを用いた遺伝子導入系の開発を行った（理化学研究所分子昆虫学研究室 本賢一特別研究員、松本正吾主任研究員との共同研究）。

Bombyx mori nucleopolyhedrovirus (BmNPV) および *Autographa californica* nucleopolyhedrovirus (AcNPV) を遺伝子導入用ウイルスとして用いたところ、レポーター遺伝子の発現量が前者を用いた場合、格段に高く、カイコガ幼虫への毒性も許容範囲であることから、前者を遺伝子導入用ベクターとして用いることとした。レポーター遺伝子としてEGFP遺伝子を、発現用のドライバーとしてボンビキシン遺伝子プロモーター（脳背側中央部の4対8個の神経分泌細胞で発現）、前胸腺刺激ホルモン遺伝子プロモーター（脳背側側方部の2対4個の神経分泌細胞で発現）、および、アクチン遺伝子プロモーター（発現の特異性はなくユビキタスに発現）を用いた。BmNPVをベクターとして用いた場合、アクチン遺伝子プロモーターをドライバーとすると、ほぼすべての細胞にEGFPの蛍光が見られ、高い導入効率（100%近い）が得られた。ボンビキシン遺伝子プロモーターおよび前胸腺刺激ホルモン遺伝子プロモーターをドライバーとした場合、それぞれの神経分泌細胞でのみ発現がみられ、厳密な細胞特異性を有していた。加えて、ボンビキシン遺伝子プロモーターでは中央部の8個の神経分泌細胞で、前胸腺刺激ホルモン遺伝子プロモーターでは側方部の4個の神経分泌細胞で、すなわち、いずれの場合においても、発現すべき細胞すべてで蛍光が見られた（図6）。

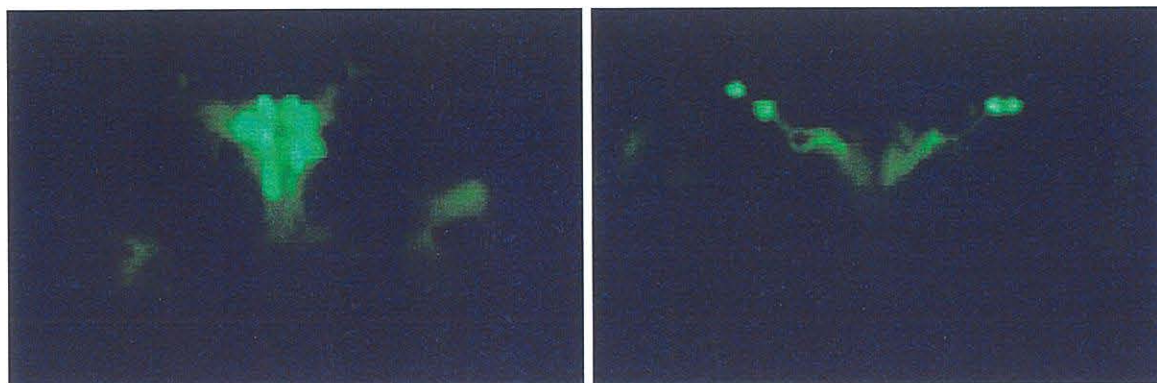


図6 BmNPVを遺伝子導入用ウイルスとして用い、ボンビキシン遺伝子プロモーター（左）および前胸腺刺激ホルモン遺伝子プロモーター（右）支配下で、GFP遺伝子を発現させ、蛍光顕微鏡下でGFPの発現を観察した。いずれにおいても、極めて高い導入効率で、かつ、厳密な細胞特異性が得られた。

このことより、BmNPVをベクターとして用いた遺伝子導入系は、極めて効率の高い系である。ウイルスをベクターとする系とエレクトロポレーションの系、両者の利点を生かすことで、これまで簡便なトランスジェニック系がなく遺伝子発現や作用の解析を行いたくても困難であった昆虫での分子生物学的研究が大いに触発、促進され、昆虫の持つ多様な遺伝子資源の解明と、その利用が急速に進むはずである。