

# Molecular and morphological analyses of programmed cell death at pupal metamorphosis in the silkworm, *Bombyx mori*

メタデータ	言語: eng 出版者: 公開日: 2017-10-05 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: Kaneko, Yu メールアドレス: 所属:
URL	<a href="http://hdl.handle.net/2297/14630">http://hdl.handle.net/2297/14630</a>

氏名	金児 雄
学位の種類	博士(理学)
学位記番号	博甲第802号
学位授与の日付	平成18年3月22日
学位授与の要件	課程博士(学位規則第4条第1項)
学位授与の題目	Molecular and morphological analyses of programmed cell death at pupal metamorphosis in the silkworm, <i>Bombyx mori</i> (カイコガ蛹変態時に誘導される予定細胞死の分子生物学的・形態学的解析)
論文審査委員(主査)	櫻井 勝(自然科学研究科・教授)
論文審査委員(副査)	岩見 雅史(自然科学研究科・教授), 東 浩(自然科学研究科・助教授), 福森 義宏(自然科学研究科・教授), 山口 正晃(自然科学研究科・助教授)

In *Bombyx mori*, a holometabolous insect, 20-hydroxyecdysone (20E) is the hormone that coordinates complex processes of post-embryonic development. Most larval specific tissues degenerate via programmed cell death (PCD) at pupal metamorphosis. I showed that the fat bodies of *B. mori* undergo PCD at the larval-pupal metamorphosis. The fat bodies exhibited nuclear fragmentation and DNA fragmentation, which were characteristic of the PCD, from 1 to 2 days after pupation. Simultaneously, caspase-3 like protease activity was increased. When day 10 fifth instar fat bodies were cultured with 1  $\mu$ M 20E, they underwent PCD. Those data suggest that the PCD of fat body is regulated by 20E. Anterior silk gland undergoes PCD during pupal metamorphosis, which is triggered by 20E. *Annexin IX (ANX IX)* has been identified as a 20E-inducible gene in dying ASGs. Annexins are conserved throughout animals, but their precise functions remain to be seen. The expression profiles of *ANX IX* were different between tissues, depending on whether they undergo PCD or not, i.e., tissues destined to die initiated the PCD sequence after *ANX IX* was down-regulated. In addition, the expression of *ANX IX* may be regulated by 20E via EcR/USP. These results suggest that *ANX IX* participates in determining the timing of PCD.

多細胞生物において、予定細胞死は発生段階のみならず恒常性維持にとって必要不可欠な機構である。その特異な現象から、形態学的な見地からの研究は古くから行われており、また近年その実行段階における遺伝子が様々な分子生物学的・遺伝学的手法を用いて明らかとなってきた。哺乳動物において予定細胞死は、caspase 依存的な経路と非依存的な経路に大別され、caspase 依存的な系では caspase-3 が活性化されることにより細胞死が実行される。caspase-3

はその上流因子である caspase-8, caspase-9 などにより活性化される。活性化された caspase-3 は、CAD/DFF40 を活性化して DNA の断片化を誘導する。この caspase の系に関わる因子として以下のものが知られている。ミトコンドリアからのシトクロム C の放出に関与する Bcl-2 family、caspase-9 の活性化を促す Smac/DIABLO、caspase-9 と複合体を形成してその活性を促進する Apaf-1、caspase-9 の活性化を阻害する IAP、細胞膜のブレッピングを引き起こす Rock1 などが知られている。また、caspase 非依存的 DNA 分解因子の AIF や endonuclease G なども報告されている。しかし、その有用性故に研究は細胞死の実行段階に偏っている。

昆虫において脱皮・変態は活性型のエクジソンである 20-hydroxyecdysone (20E) と幼若ホルモン(JH)によって制御されている。JH 存在下で 20E 刺激にさらされると幼虫脱皮が促され、20E 単独では変態が促される。終齢後期の 20E 刺激により幼虫特異的な組織は予定細胞死により除去される。キイロショウジョウバエにおいて、20E により誘導される予定細胞死に関わる因子が明らかになりつつある。20E により誘導される EcR、ultraspiracle、E74、Broad-complex、 $\beta$  FTZ-F1 そして E93 がその後 caspase を活性化して細胞死を誘導するとされている。しかし、キイロショウジョウバエにおける報告も細胞死の実行段階に偏ったもので、同濃度の 20E にさらされた組織がどのようにしてその組織特異的な時期に細胞死を起こすのかという疑問に対する研究はほとんどなされていない。

キイロショウジョウバエと同様に完全変態昆虫であるカイコガの絹糸腺も蛹脱皮時に細胞死を起こすことが知られている。絹糸腺は、前部、中部、後部の 3 つの部域に分けられる。そのうち前部絹糸腺の細胞死は終齢である 5 齢 6 日以降の絹糸腺を 20E とともに培養することで *in vitro* で再現できる。前部絹糸腺において 20E により誘導される因子として得られていた annexin IX (ANX IX) について研究を行った。その過程で、カイコガの脂肪体が細胞死を起こすことがわかったので併せて報告する。

ANX family は生物をとおして保存されている遺伝子で、 $Ca^{2+}$  依存的に働くことが知られている。その機能は多岐のわたり細胞死に関連するという報告も多数あるが、機能が未知なものも多い。カイコガ ANX IX も機能が不明なひとつである。

カイコガを含む鱗翅目昆虫において、脂肪体は蛹変態時に細胞死を伴わない組織の再構成を行うことにより蛹へと適応すると考えられていた。カイコガの脂肪体において蛹脱皮直後に DNA の断片化が観察された。また、同時期に核の断片化も観察された。このことから、脂肪体が蛹変態時に細胞死を起こすことが示唆された。また、caspase の活性測定と活性型 caspase 認識抗体を用いた実験

から、この細胞死には caspase が関与していることが示唆された。20E 存在下で脂肪体を培養したところ、蛹脱皮直前の 5 齢 10 日までは細胞死を誘導できなかった。一方、5 齢 10 日の脂肪体は 1  $\mu$ M の 20E に応答して細胞死を起こした。このことから、脂肪体の細胞死は 20E により誘導されることが示唆された。しかし、1  $\mu$ M より高い濃度でも低い濃度でも細胞死は誘導できなかった。

絹糸腺における細胞死は、その核形態と DNA ladder の検出時期から後部、中部、前部絹糸腺の順序で起こっていた。これらの結果をふまえて ANX IX の発現を 5 齢をとおして様々な組織において追ったところ、細胞死を起こさない組織では体液中のエクジソン濃度が上がる時期に発現量が上昇し、一方細胞死を起こす組織ではエクジソン濃度が上がる時期に発現量が減少していた。また、発現量の減少は細胞死を先に起こすものから順に観察された。5 齢 7 日の前部絹糸腺を 20E とともに培養すると、ANX IX の発現が培養開始 2 時間から上昇し 24 時間後には培養開始時と同程度まで減少したが、20E・タンパク質合成阻害剤共存在下で培養を行うと発現の減少が抑えられた。また、20E による ANX IX の発現誘導は濃度依存的であった。これらのことから、ANX IX が初期遺伝子であることが示唆された。培養に供する絹糸腺の時期を変えて 20E で培養をおこなったところ、時期によって 20E に対する応答が異なった。20E 応答能を獲得する以前の絹糸腺においては、20E によって発現の誘導はみられなかったが応答能獲得後の 5 齢 7 日、8 日においては 20E で発現が誘導された。一方、*in vivo* において発現が減少する時期の体液中心エクジソン濃度である 0.1  $\mu$ M 20E で培養を行った結果、5 齢 5 日、6 日の絹糸腺で ANX IX の発現が抑制された。ANX IX の上流域に EcR response element が存在したことから、ANX IX の発現調節に 20E 関内受容体である EcR/USP が関与していると考え、EcR および USP の発現量の変化を計測した。発生段階において、EcR-A、EcR-B1、USP-2 は体液中心エクジソン濃度の変化に呼応して発現量が増加した。USP-1 は 5 齢 6 日のみ特異的に発現量が増加した。培養に供する絹糸腺の時期を変えて 20E で培養をおこなったところ、EcR-A、EcR-B1、USP-2 いずれも 20E で発現が促進されたが、USP-1 の発現に 20E との相関関係はみられなかった。EcR の isoform の量比を比較すると 20E 応答能獲得時期である 5 齢 6 日と 7 日で発現量の比が逆転した。また、*in vivo* におても 5 齢 6 日でのみ発現量に差異が認められなかった。このことから、ANX IX の発現量の調節に EcR の isoform の比が重要であることが示唆された。低濃度の 20E とともに培養を行った結果、EcR-B1 のみいずれの時期の絹糸腺でも発現量が増加したが、EcR-A、USP-1、USP-2 については時期特異的な応答を示した。以上の結果と、これまでの ANX に対する知見から ANX IX が細胞死抑制的に働くことによって、その発現量が蛹脱皮時上昇する組織で細胞死を抑え、一方細胞死を起こす組織では組織特異的な時期に発現量が減少することによ

て細胞死を進行させるのではないかと、推察している。

## 学位論文審査結果の要旨

動物の発生は、形態形成と細胞死の同時進行により進んでいく。昆虫の発生において、幼虫特異的組織は蛹化とともに予定細胞死により崩壊・除去される。本論文提出者は、昆虫ステロイドホルモンである 20-ヒドロキシエクジソン (20E) による脂肪体と絹糸腺の予定細胞死を研究対象とした研究を行った。鱗翅目昆虫の幼虫脂肪体細胞は蛹変態後に成虫脂肪体細胞へと形態変化を経て存続することが定説であった。しかし、カイコ脂肪体 DNA は蛹 1・2 日でラダーを示すこと、TUNEL 陽性細胞が出現することから、以前の定説は間違いである可能性があることを指摘した。一方、予定細胞死とアネキシン IX (ANX IX) との関連を探る研究では、脂肪体と絹糸腺の ANX IX の発現動態から、ANX IX が細胞死抑制に働き、その down-regulation が細胞死実行のタイミングを規定するとの仮説を立てるに至った。また、20E は核受容体 (EcR/USP) に結合しその作用を示すことから、*EsR* と *USP* の発現調節と ANX IX の関連を精査した。第 1 の結果は鱗翅目昆虫脂肪体の成虫分化の定説を覆すものである。また論点は状況的証拠に基づくものではあるものの、ステロイドホルモンが誘導する幼虫組織の予定細胞死に ANX IX の関与を示唆したことは、細胞死の実行のタイミングとホルモン支配の研究に先鞭を付けるものであり、審査員一同は、本論文は学位 (理学) を授与するに足るものと判断した。