

Genomic action of steroid hormone in the silkworm brain during morphogenesis

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/10.24517/00052830

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



ステロイドホルモンによる脳の機能と形態の制御機構

課題番号 15580039

平成 15 年度—平成 17 年度科学研究費補助金
(基盤研究 (C)) 研究成果報告書

平成 18 年 4 月

研究代表者 岩見 雅史
金沢大学自然科学研究科教授

金沢大学附属図書館



0800-04195-X

EN

16

ステロイドホルモンによる脳の機能と形態の制御機構

(課題番号 15580039)

平成15年度～平成17年度

科学研究費補助金(基盤研究(C))

研究成果報告書

平成18年4月

研究代表者 岩見 雅史

金沢大学自然科学研究科教授

はしがき

ホメオボックス遺伝子の例を持ちだすまでもなく、昆虫分野の研究により、高等脊椎動物の理解が進んだ例は数多い。最近では、昆虫や線虫でのインスリン作用の研究進展により、インスリンの持つ多彩な機能が明らかになりつつある。インスリンは「血糖調節・代謝調節」に係わるホルモン作用に加え、線虫や昆虫での研究により、個体の生き残り戦略の要となる分子であることが示されつつある。すなわち、インスリンは進化上極めて保存されており、「血糖調節・代謝調節」のみならず、寿命、代謝、発育調節、休眠、生殖の中心を占めると考えられるようになってきた。無脊椎動物で最初にインスリン様分子が発見されたのは、カイコガのボンビキシンであり、その変態を誘導する作用によってであった。この理解に昆虫の研究が果たした役割は大きい。

一方、昆虫は、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。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。昆虫は、環境への適応から、自己の寿命、代謝、発育調節、休眠、生殖を調節するすべを有している。これは、生命の寿命、代謝、発育調節、休眠、生殖を理解するモデルとして昆虫が秀でていることを端的に示している証左である。本邦では早くからこの利点に着目し、特筆すべき成果をあげてきた。本研究もこれら多くの先達に負っている。

本研究は、昆虫の変態、すなわち幼虫から蛹への過程に焦点を当て、その分子機構を解明しようとするものである。昆虫の変態を実行する分子がステロイドホルモンであるエクジソンであることから、また、昆虫の変態を高次でコントロールする器官が脳であることから、エクジソンが脳に作用し、どのような遺伝子の発現を誘導、または、抑制するかという視点から研究を組みあげた。エクジソンにより発現が調整される遺伝子の発現細胞の同定から、これまで前胸腺刺激ホルモンを産生する細胞として知られてきた脳側方部の神経分泌細胞が、変態のマスター細胞であることを示唆する結果が得られた。期せずして、「ステロイドホルモンによる脳の機能と形態の制御機構」の要となる細胞の同定に成功した。

本研究は、研究室の多くの大学院学生や学部学生、とりわけ、MD Monwar Hossain 氏、清水咲子氏、今村公紀氏、松木正尋博士の協力なくしては成しえなかった。この場を借りて、これらの方々に感謝する。

平成18年4月
研究代表者
岩見 雅史

研究組織

研究代表者: 岩見雅史(金沢大学自然科学研究科教授)

研究分担者: 桜井 勝(金沢大学自然科学研究科教授)

交付決定額(配分額)

(金額単位:千円)

	直接経費	間接経費	合計
平成15年度	1,100	0	1,100
平成16年度	1,000	0	1,000
平成17年度	1,100	0	1,100
総計	3,200	0	3,200

研究発表

(1) 学会誌等

1. Takashi Koyama, Masafumi Iwami, and Sho Sakurai (2004).
Ecdysteroid control of cell cycle and cellular commitment in *Bombyx mori* wing discs.
Molecular and Cellular Endocrinology, **213** (2), 155-166.
2. Takashi Koyama, Yoshikazu Obara, Masafumi Iwami, and Sho Sakurai (2004).
Commencement of pupal commitment in late penultimate instar and its hormonal control in wing imaginal discs of the silkworm, *Bombyx mori*.
Journal of Insect Physiology, **50** (2-3), 123-133.
3. Mohamed Elmogy, Masafumi Iwami, and Sho Sakurai (2004).
Presence of membrane ecdysteroid receptor in the anterior silk gland of the silkworm, *Bombyx mori*.
European Journal of Biochemistry, **271** (15), 3171-3179.
4. Motonori Kakei, Masafumi Iwami, and Sho Sakurai (2005).
Death commitment in the anterior silk gland of the silkworm, *Bombyx mori*.
Journal of Insect Physiology, **51** (1), 17-25.

5. Yasunori Oda, Masafumi Iwami, and Sho Sakurai (2005).
Membrane-bound sorbitol-6-phosphatase in fat body cells controls the dynamics of sorbitol-6-phosphate, a major hemolymph sugar in the silkworm.
Insect Biochemistry and Molecular Biology, **35** (11), 1289-1292.
6. Yu Kaneko, Keiko Takaki, Masafumi Iwami, and Sho Sakurai (2006).
Developmental profile of annexin IX and its possible role in programmed cell death of the *Bombyx mori* anterior silk gland.
Zoological Science, **23**, in press.
7. Takayuki Sekimoto, Masafumi Iwami, and Sho Sakurai (2006).
Coordinate responses of transcription factors to ecdysone during programmed cell death in the anterior silk gland of the silkworm, *Bombyx mori*.
Insect Molecular Biology, **15**, in press.

(2) 口頭発表

1. 伊賀正年, 岩見雅史, 桜井勝 (2003).
カイコガ前部絹糸腺予定細胞死における20Eシグナルカスケード.
日本動物学会第74回大会(函館市)
2. 小山貴司, 関本隆志, 岩見雅史, 桜井勝 (2003).
カイコ翅成虫原基の20E応答能獲得と初期遺伝子群の発現解析.
日本動物学会第74回大会(函館市)
3. 関本隆志, 岩見雅史, 桜井勝 (2003).
カイコガ前部絹糸腺の予定細胞死における初期・初期後期遺伝子の発現動態.
日本動物学会第74回大会(函館市)
4. 金児雄, 都築誠司, 岩見雅史, 桜井勝 (2003).
カイコガにおけるアネキシン9と細胞死との相互関係.
日本分子生物学会第26回大会(神戸市)
5. Mohamed El-Mogy, Masatoshi Iga, Takahiro Sekimoto, Masafumi Iwami, and Sho Sakurai (2004).
Genomic & non-genomic action of ecdysteroid: both are required for completion of programmed cell death in the anterior silk gland.
XXII International Congress of Entomology (Brisbane, Australia).
6. Yu Kaneko, Seiji Tsuzuki, Masafumi Iwami, and Sho Sakurai (2004).
Annexin IX participates in the determination of timing of PCD.
XXII International Congress of Entomology (Brisbane, Australia).

7. 松木正尋, 今村公紀, 清水咲子, 金児雄, 小山貴司, 桜井勝, 岩見雅史 (2004).
カイク変態時に脳においてエクジソンにより誘導される遺伝子の網羅的解析.
日本動物学会第75回大会(神戸市)
8. Elmogy, Mohamed, 岩見雅史, 桜井勝 (2004).
カイクガ前部絹糸腺から見いだされたエクジソン膜受容体.
日本動物学会第75回大会(神戸市)
9. 関本隆志, 岩見雅史, 桜井勝 (2004).
カイクガ前部絹糸腺の予定細胞死における初期・初期後期遺伝子の発現動態.
日本動物学会第75回大会(神戸市)
10. 伊賀正年, 岩見雅史, 桜井勝 (2004).
前部絹糸腺細胞死における非ステロイドシグナルカスケード.
日本動物学会第75回大会(神戸市)
11. 金児雄, 都築誠司, 岩見雅史, 桜井勝 (2004).
細胞死の時期決定に対するアネキシンIX の関与.
日本動物学会第75回大会(神戸市)
12. 松木正尋, 今村公紀, 清水咲子, 金児雄, 小山貴司, 桜井勝, 岩見雅史 (2005).
カイク変態時に脳においてエクジソンにより誘導される遺伝子の網羅的解析—昆虫生理学的アプローチによる脳機能の解明—.
脳革新科学COE第1回国内シンポジウム(金沢市)
13. 岩見雅史 (2005).
昆虫脳におけるエクジソン応答遺伝子の網羅的解析.
脳革新科学COE第2回国内シンポジウム(金沢市)
14. Md. Monwar Hossain, Sakiko Shimizu, Yu Kaneko, Masahiro Matsuki, Masanori Imamura, Sho Sakurai, Masafumi Iwami (2005).
Comprehensive analysis of gene expression induced by 20-hydroxyecdysone (20E) in the silkworm brain: Identification of two novel genes.
日本分子生物学会第28回大会(福岡市)
15. 清水咲子, Monwar Hossain, 金児雄, 桜井勝, 野田博明, 三田和英, 岩見雅史 (2005).
カイクガ幼虫脳におけるエクジソン応答遺伝子のマイクロアレイによる網羅的解析.
日本分子生物学会第28回大会(福岡市)

研究成果

1. 研究の背景と意義

昆虫では、脳が後胚発生の中枢に位置し、発生を総合的にプロデュースしている。脳はステロイドホルモンであるエクジソンの合成・分泌を刺激する前胸腺刺激ホルモンを産生し、加えて、インスリン様ペプチドホルモンであるボンビキシンの最大の産生器官でもある。また、中枢神経系に属するアラタ体では幼若ホルモンが合成されている(図1)。しかし、これまでの研究では、脳内で様々なホルモンが遺伝子発現にどのように関わり、その結果、どのような生理作用を及ぼすかについては手つかずの領域であった。個々のホルモン、例えば、エクジソンが変態期の脳再編成に必須な役割を果たしている。また、前胸腺刺激ホルモンはエクジソンのフィードバック作用を受けているなど断片的な報告はなされているが、どの遺伝子の発現を誘導し、どの遺伝子の発現を抑えるといった遺伝子レベルでの網羅的な詳細は不明である。

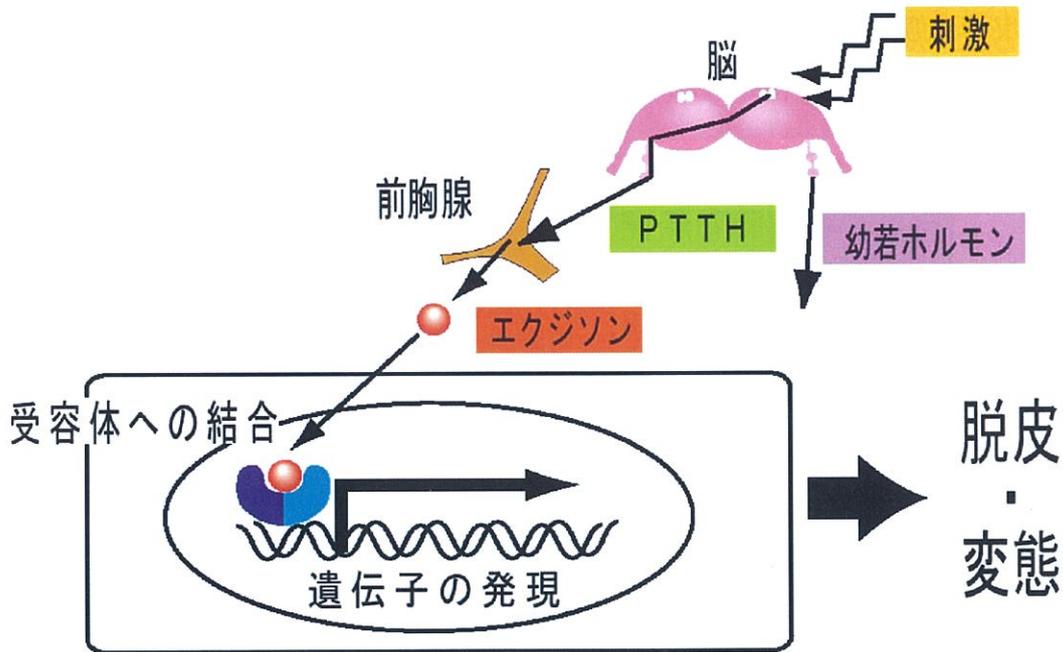


図1 脳内の神経分泌細胞からは、エクジソンの合成と分泌を支配する前胸腺刺激ホルモン(PTTH)が分泌され、脱皮・変態を最上位で支配している。エクジソンは体内の諸器官の細胞中の受容体に結合し、転写因子として働き脱皮・変態を遂行させる。

これまで、昆虫の脱皮・変態といった独特のライフサイクルは、哺乳類の生育とは無関係であると考えられてきた。しかし、昆虫の変態を誘導するホルモンとしてボンビキシシンが発見されたり、線虫やショウジョウバエで、インスリン様ペプチド受容体遺伝子のノックアウト個体が長寿であることが示されたことなどが契機となり、昆虫と哺乳類の生育に多くの共通点が見いだされつつある。哺乳類では、ノックアウトマウスを使った実験で、インスリン様増殖因子受容体欠損では長寿傾向が見られ、ストレス耐性が増加する(哺乳類では、この他ステロイドホ

ルモン、レプチン、GHRH、TSH等多くの因子が関与し、複雑な機構を有する)報告がなされている。昆虫でも、インスリン情報伝達系の下流にはエクジソンと幼若ホルモンが位置し、個体全体の寿命・生殖等を規定していることが明らかになりつつある。これらの例をはじめとして、ヒトを頂点とする高等脊椎動物でも、昆虫等の無脊椎動物でも、中枢神経系が成長を調節(無脊椎動物では中枢神経系より直接分泌されるインスリン様ペプチドを介して、脊椎動物においても最終的にインスリン様ペプチドを介して)している概念が急速に受け入れられつつある。このように、高等脊椎動物と無脊椎動物間で生命の基本戦略が保存させていることが明らかとなりつつある。しかし、高等脊椎動物においてはむしろ、昆虫においても、発生を司るホルモンにより脳でいかなる遺伝子が作動し、作動した遺伝子により、どのように個体全体の成長、脱皮、変態、生殖、寿命を制御しているかは未だ未知の領域である。

本研究では、昆虫の発生を実行するエクジソンの脳における作用機構を解明する。これまでに述べてきた変態の中樞機能としての役割に加え、脳自身、変態時における脳の神経網の再編を伴う形態変化(図2)を伴うことから、脳形態形成におけるエクジソンの役割についても解明を目指す。そこで、カイコ脳でのエクジソン応答遺伝子の網羅的な解析を中心に行い、脱皮や変態時に脳で作動する遺伝子の全貌を明らかにすることを試みた。

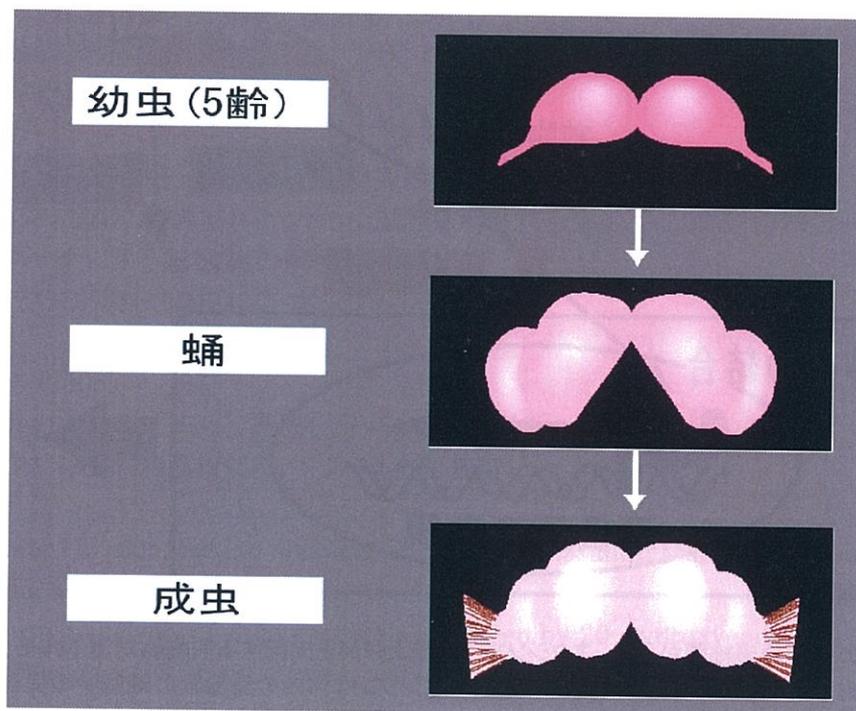


図2 幼虫から蛹への変態時に、さまざまな遺伝子がエクジソンに反応して発現され、その結果として幼虫脳から成虫脳へのダイナミックな変換が起こる。すなわち、神経網の再編が起こり、成虫脳に特異的な視葉や嗅覚葉を形成する神経細胞が変態時にエクジソンによって成熟を促され、不必要になった神経細胞は予定細胞死によって除去される。

2. 研究の成果

昆虫脳の変態制御の中核としての機能および形態形成の分子機構を探るために、サブトラクションライブラリーおよびDNAチップを用いてカイコガ幼虫脳におけるエクジソン応答遺伝子を網羅的に解析した。DNAチップを用いた発現解析実験は、独立行政法人農業生物資源研究所の三田和英博士との共同研究により行った。

2-1. サブトラクションライブラリーによるエクジソン応答遺伝子の同定と解析

カイコガ幼虫の脳にエクジソンを投与し精製した mRNA からコントロールの mRNA を差し引いたサブトラクションを行った(図3)。具体的には、20-hydroxyecdysone (20E)を、体液中にほとんど検出されず、投与した 20E の影響のみを調べる事が可能な5 齢 2 日目の幼虫(図4)に投与し、脳より抽出した均質化した mRNA をもとにサブトラクション cDNA を作成した(サブトラクションの対象として昆虫リンゲル液を投与した個体から抽出した脳の RNA 由来 cDNA を用いた)。しかし、サブトラクション法では必ずしもエクジソン応答遺伝子のみを得られるわけではないため、目的の cDNA を絞り込むために1次スクリーニングとしてコロニーハイブリダイゼーションを、2次スクリーニングとして各コロニーより単離した PCR によるプラスミドに対するサザンハイブリダイゼーションを行った。

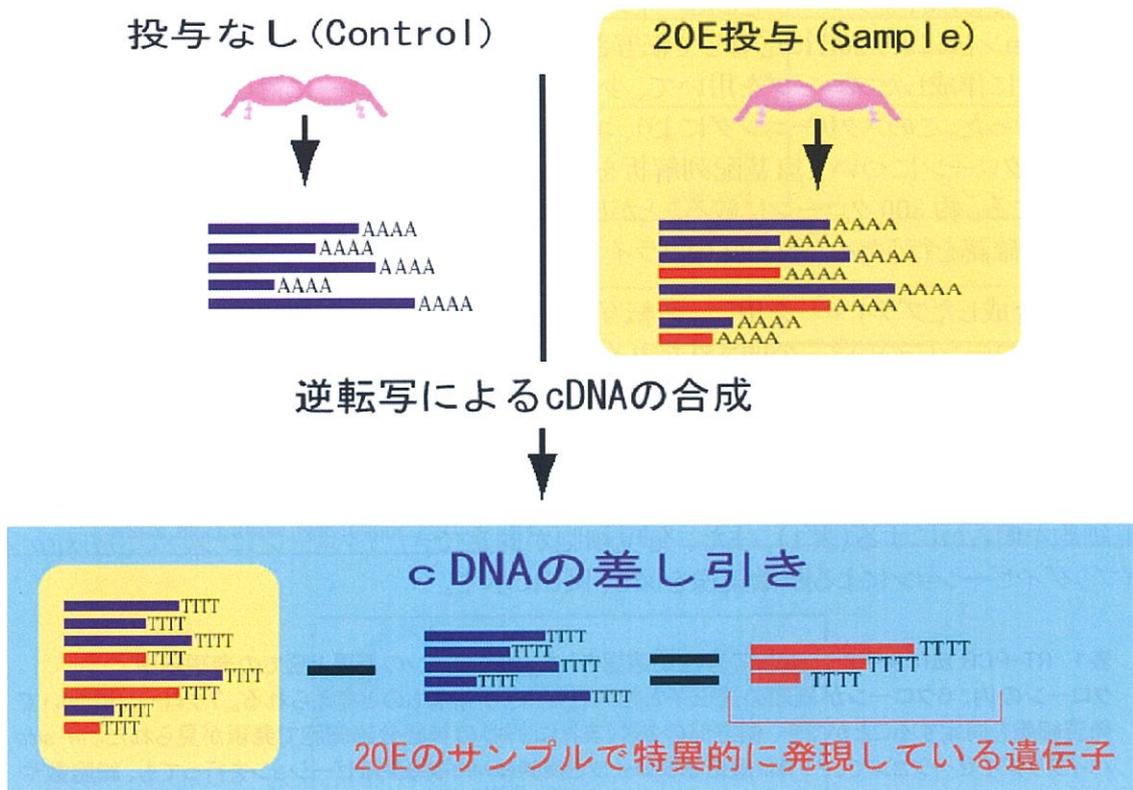


図3 本研究でのサブトラクションの原理と得られた cDNA の構成を表す模式図

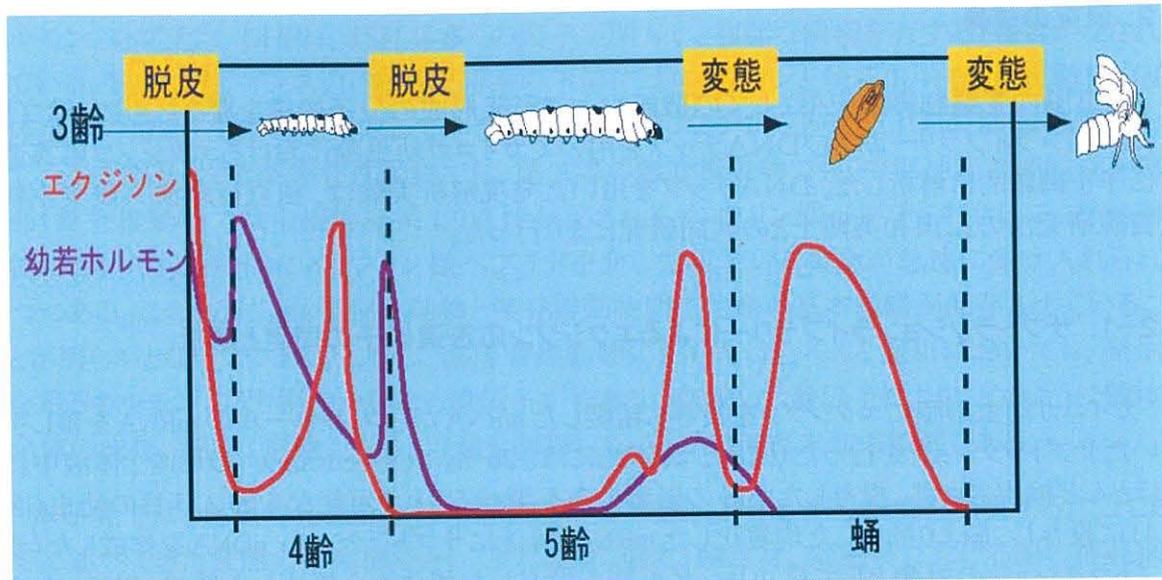


図4 カイコガ幼虫から成虫に至る脱皮・変態過程におけるエクジソンおよび幼若ホルモンの体内濃度の経時的変化。5齢2日幼虫では、エクジソンおよび幼若ホルモンの体内濃度が低いため、エクジソンによる遺伝子発現の変化を捉えやすいため、本実験系に用いた。

コロニーハイブリダイゼーションに対して陽性を示す約 10,000 コロニーに対して、通常の mRNA 由来 cDNA をプローブとしたハイブリダイゼーションによるスクリーニングを、また、サブトラクション法により 20E に応答して転写された mRNA 由来 cDNA を均質化した後、濃縮し、これをもとに作成したプローブを用いて、少なくとも 5,000 コロニーに対してハイブリダイゼーションを行った。このスクリーニングにより、エクジソン応答遺伝子クローンを約 1,500 単離し、すべてのクローンについて塩基配列解析を行った。生物情報的手法により、重複クローンを除いたところ、約 300 クローンに絞ることが出来た。この約 300 クローンについて、エクジソン応答性の確認を行うため、約 600 のプライマーをデザインし合成した。

現在、合成したプライマーを用い、逆転写-PCR 法により発現の確認を行うとともに、これら約 300 クローンについて、公開されたカイコゲノム情報をもとに、生物情報的手法により、解析を続行中である。

以下、これまでに逆転写(RT)-PCR 法によりエクジソン応答性が確認された 10 クローンについて、その遺伝子の概略と、whole-mount *in situ* ハイブリダイゼーションによる脳での発現細胞を明らかにする(表1)。また、発現細胞が同定できた7クローンについて、*in situ* ハイブリダイゼーションによる顕微鏡像を図5、図6に示す。

表1 RT-PCR 法によりエクジソン応答性が確認された 10 クローンの概要と脳での発現細胞。
クローンの内、6クローンが既知の遺伝子と相同性がなく新規なものと考えられる。7クローンについて発現細胞を同定することができ、側方部の2対(まれに3対)の神経分泌細胞で発現が見られた。*in situ* ハイブリダイゼーションで、PTTH 遺伝子プローブと同時にハイブリダイゼーションを行っても、細胞数や位置が変化しなかったことから、これら遺伝子の発現細胞はいずれも PTTH 産生細胞であると結論した。

遺伝子 ID	相同性な配列名	脳内発現細胞 (single probe)	脳内発現細胞 (20E-induced gene+PTTH gene)
Bombeil-1	Cytochrome P450 enzyme <i>Drosophila melanogaster</i>	2 pairs of lateral NSCs	2 pairs of lateral NSCs
Bombeil-2	Cyclic nucleotide and voltage gated ion channel of <i>Heliothis virescens</i>	2 pairs of lateral NSCs	2 pairs of lateral NSCs, one brain expressed in 3 pairs
Bombeil-3	No homology	2 pairs of lateral NSCs	2 pairs of lateral NSCs
Bombeil-4	No homology	2 pairs of lateral NSCs. Some preparation in 3 pairs	2 pairs of lateral NSCs
Bombeil-5	No homology	2 pairs of lateral NSCs. Some preparation in 3 pairs	2 pairs of lateral NSCs
Bombeil-6	No homology	2 pairs of lateral NSCs, Some preparation in 3 pairs	2 pairs of lateral NSCs
Bombeil-7	Glutamiyl-tRNA synthetase of <i>Drosophila melanogaster</i>	2 pairs of lateral NSCs, Some preparation in 3 pairs	2 pairs of lateral NSCs
Bombeil-8	No homology	ND	ND
Bombeil-9	Lysine-tRNA synthetase of <i>Xenopus laevis</i>	ND	ND
Bombeil-10	No homology	ND	ND

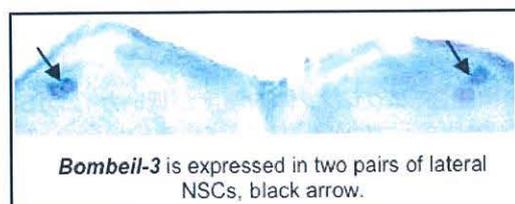
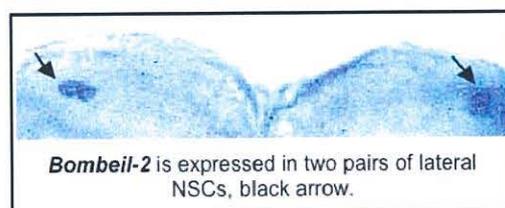
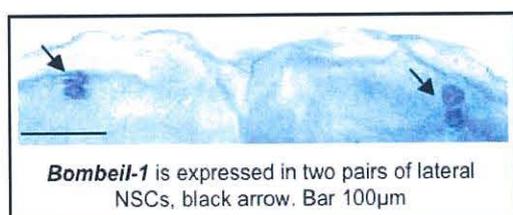


図5 Bombeil-1、-2、-3 についてジゴキシゲニンで標識したオリゴヌクレオチドプローブによる whole-mount *in situ* ハイブリダイゼーションの結果を示す。矢印で示したように、左右2対の PTTH 産生細胞でのみ発現が見られる。

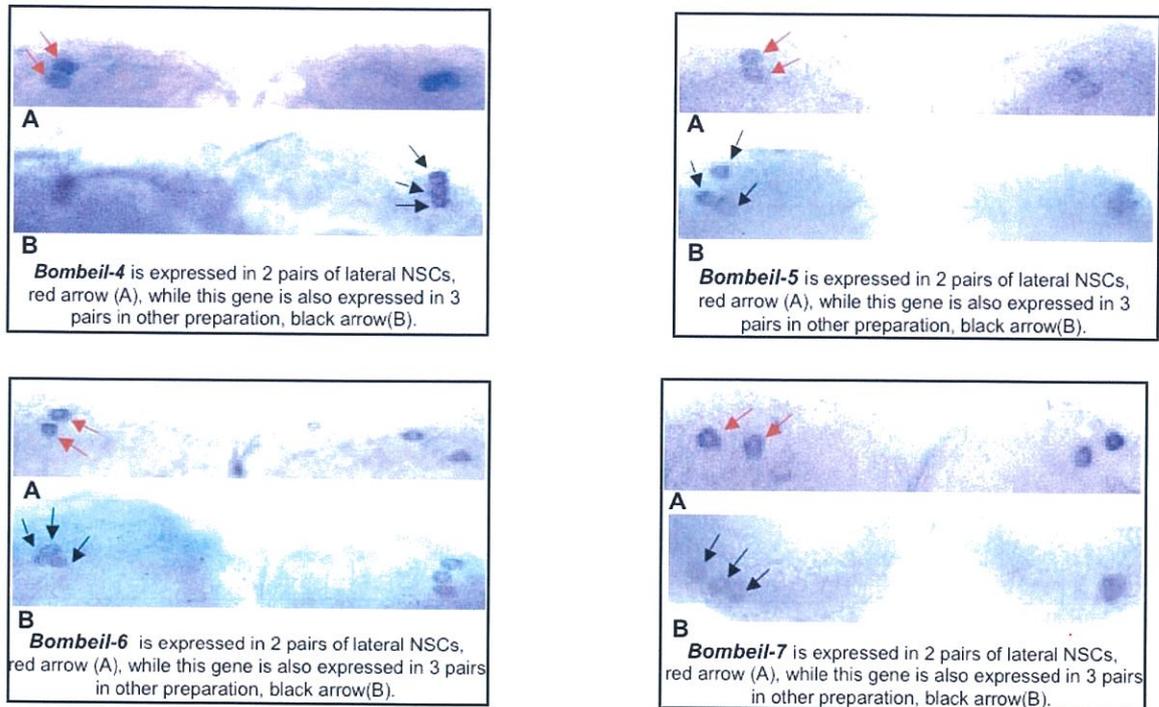


図6 Bombeil-4、-5、-6、-7 についてジゴキシゲンで標識したオリゴヌクレオチドプローブによる whole-mount *in situ* ハイブリダイゼーションの結果を示す。いずれも2対の PTTH 産生細胞でのみ (各 A パネル; 赤矢印)、または PTTH 産生細胞を含む3対の細胞で発現が見られる (各 B パネル; 黒矢印)。

逆転写-PCR 法によりエクジソン応答性が確認された7クローンのすべてが PTTH 産生細胞で発現していることが明らかとなった(図4、5)。Bombeil-8、Bombeil-9、Bombeil-10 についても同様に発現細胞の同定を試みたが、細胞特異性を見いだせなかった。これは、これら遺伝子の発現量が低いため陽性のシグナルの検出が出来なかったためと考えられる。

2-2. DNAマイクロアレイによるエクジソン応答遺伝子の同定と解析

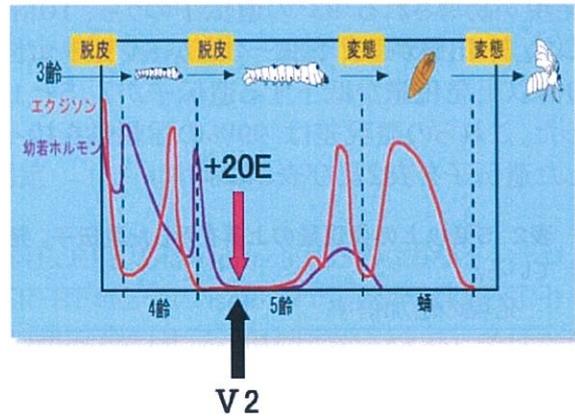
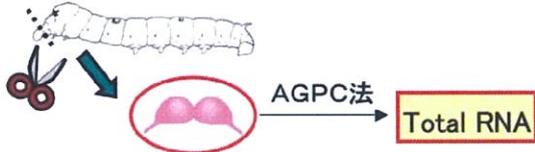
カイコガ遺伝子の約 80%を網羅した 16,000 遺伝子で構成される DNA チップを用いた。カイコガ5齢2日幼虫に 20E 投与2時間後の脳を摘出し、RNA を精製した。この RNA に昆虫リンゲル液を投与した個体から摘出した脳の RNA をコントロールとして、DNA チップに対してハイブリダイゼーションを行った。再現性を期すため、それぞれの RNA 由来 cDNA を Cy3 または Cy5 で標識したスワップ実験を採用した(図7)。また、DNA チップによる発現解析の一例を図8に示す。

図7(次ページ上段) 方法の概略図。エクジソン体内濃度が低いカイコガ5齢2日幼虫 20 投与2時間後の脳を摘出し、RNA を精製し、DNA チップによる発現解析を行った。コントロールとして、昆虫リンゲル液を投与2時間後の脳からの RNA を用いた。

方法

<RNAサンプル>

- ・5齢2日(V2)・・・control
- ・20E投与2時間後のV2(+20E)



<マイクロアレイ>

- ・Color Swapを行いデータの信頼性を高めた

V2_Cy3 × +20E_Cy5
V2_Cy5 × +20E_Cy3

直接的な20E応答をみる
(初期応答)
.. *in vitro*

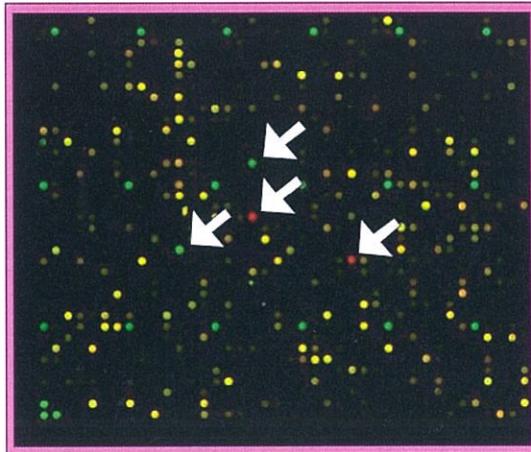
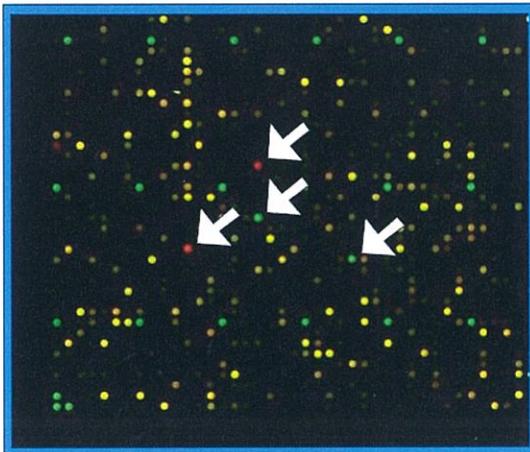
* DNAチップは(Agilent Technology社,
16,000 genes/plate)を使用

● Cy3 のシグナル

● Cy5 のシグナル

スライド1: V2_Cy3 × +20E_Cy5

スライド2: V2_Cy5 × +20E_Cy3



- が 20Eにより発現量が**上昇**した遺伝子
- が 20Eにより発現量が**減少**した遺伝子

- が 20Eにより発現量が**上昇**した遺伝子
- が 20Eにより発現量が**減少**した遺伝子

図8 DNA チップによる発現解析結果の一例。スライド1では、赤の点(スポット)が Cy3 のシグナルを示し、エクジソン(20E)により発現量が上昇した遺伝子を、緑の点(スポット)が Cy5 のシグナルを示し、エクジソンにより発現量が減少した遺伝子を現している。スライド2では、color swap を行い、緑の点(スポット)が発現量が上昇した遺伝子を、赤の点(スポット)が発現量が減少した遺伝子を現している。

エクジソンにより発現が誘導される93の遺伝子、発現が抑制される97遺伝子を同定した。発現が誘導される93の遺伝子のうち、10倍以上発現量が上昇する遺伝子が5、5-10倍が9、3-5倍が15、1.36-3倍が64であった。一方、発現が抑制される遺伝子97のうち、10倍以上発現量が低下する遺伝子が7、5-10倍が9、3-5倍が13、1.36-3倍が70であった。これらの発現差は99%の信頼性を持って有意であった。5倍以上の発現量の差を示した遺伝子を表2及び表3に示す。

表2 5倍以上の発現量の上昇を示した遺伝子。発現の上昇倍率の高いものから低いものへ順に並べている。

発現の増加倍率	相同な配列名
100.00	BHR3 mRNA for hormone receptor 3 [<i>Bombyx mori</i>]
34.80	No homology
15.20	Arylphorin alpha subunit precursor [<i>Manduca sexta</i>]
13.62	BmSLP gene for hemolymph protein [<i>Bombyx mori</i>]
12.44	No homology
8.84	Cytochrome P450 [<i>Drosophila melanogaster</i>]
7.19	No homology
7.16	Sex-specific storage-protein 2 precursor [<i>Bombyx mori</i>]
6.95	Sex-specific storage-protein 1 precursor [<i>Bombyx mori</i>]
6.23	Low molecular mass 30kDa lipoprotein 19G1 [<i>Bombyx mori</i>]
6.01	No homology
5.38	exonuclease GOR [<i>Homo sapiens</i>]

表3 5倍以上の発現量の低下を示した遺伝子。発現の低下倍率の高いものから低いものへ順に並べている。

発現の減少倍率	相同な配列名
33.95	No homology
29.02	ENSANGP00000016970 [<i>Anopheles gambiae</i>]
22.44	Chemosensory protein 1 [<i>Heliothis virescens</i>]
16.42	Muscle LIM protein Mlp84B [<i>Drosophila melanogaster</i>]
11.01	Myosin regulatory light chain 2 [<i>Drosophila melanogaster</i>]
10.95	Troponin I [<i>Lonomia obliqua</i>]
10.71	Synchronous muscle-specific protein mp20 [<i>Drosophila melanogaster</i>]
8.53	ENSANGP00000020450 [<i>Anopheles gambiae</i>]
8.51	No homology
7.88	No homology
7.28	No homology
6.82	Myosin light chain alkali (catalytic) [<i>Drosophila melanogaster</i>]
6.57	No homology
6.26	Bombyrin [<i>Bombyx mori</i>]
6.19	Tropomyosin I isoform [<i>Drosophila melanogaster</i>]
6.16	No homology

これら遺伝子の脳での発現細胞について同定中である。また、生物情報学的手法により遺伝子の特性についても解析中である。

2-3. エクジソン受容体遺伝子発現細胞の同定

エクジソン受容体複合体はエクジソン受容体(EcR)と Ultraspiracle (USP)よりなるヘテロ二量体である。カイコガではEcRはEcR-AとEcR-B1の2つの isoform が、USPにはUSP-1とUSP-2の2つの isoform が存在し、それぞれの組み合わせにより核受容体として、多様な遺伝子発現を調節し、脱皮、変態をはじめさまざまな生理現象を引き起こしている。変態過程では、一般に、*EcR-A*は分化・成長する細胞で発現し、*EcR-B1*は崩壊・除去される細胞で発現していると考えられている。また、USPは幼若ホルモンを介することにより、エクジソン受容体複合体の核受容体としての機能に影響を及ぼしていることも示唆されている。

そこで、*EcR-A*の脳におけるエクジソンに対する応答性と発現細胞の同定を試みた。まず、エクジソンに対する応答性を5齢2日幼虫に20Eを投与し、2時間後、脳を摘出し、RNAを精製した。コントロールとして、昆虫リンゲル液を投与した個体からの脳RNAを用いた。RT-PCRにより、*EcR-A*は脳においてもエクジソンに応答することを確認した(図9)。

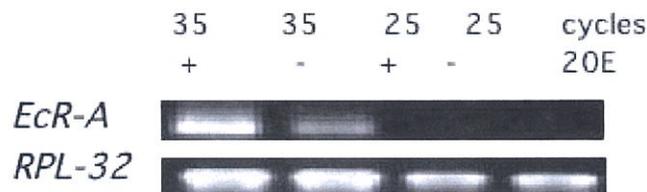


図9 *EcR-A* 遺伝子のエクジソンに対する応答性。コントロールとして、エクジソンにより誘導されないリボソームタンパク質 *RPL-32* 遺伝子の発現を見た。数字はPCRのサイクル数を、+、-は20E投与の有無を示している。35サイクル、20E+で顕著にバンドが濃くなっていることから、*EcR-A* 遺伝子はエクジソンにより脳での発現が誘導されることが分かる。

次に、*EcR-A*が脳内で局在し発現しているか知るため、脳を上下に2分割し、それぞれよりRNAを抽出し、RT-PCRにより発現を調べた。図10に示すとおり、これら遺伝子は脳の上部分でのみ発現が見られ、局在を示すことが明らかとなった。

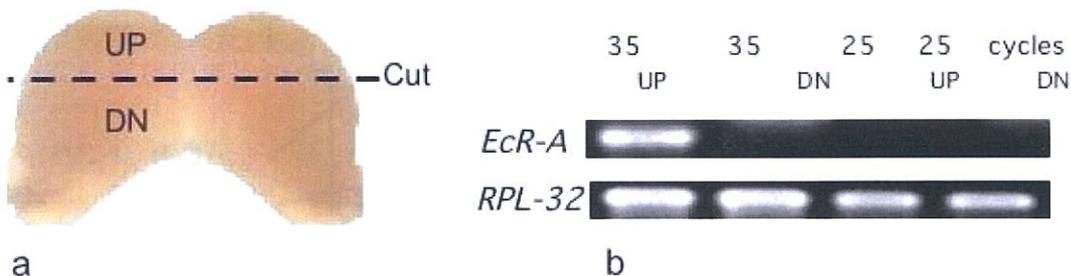


図10 a: 5齢2日の脳を図に示すように上下2分割しRNAを抽出した。b: 2分割した脳を用いたRT-PCRの結果。UPは脳上部由来のRNAを、DNは脳下部由来のRNAを使用した結果を示す。*EcR-A* 遺伝子の発現は脳における部位危険異性を示し、上部でのみ発現が見られる。

そこで、*in situ* ハイブリダイゼーションによる *EcR-A*、*EcR-BI*、*USP* の各遺伝子発現細胞の同定を行った。20E により刺激後2時間経過した5齢2日、5齢7日、蛹2日の脳を用いた。結果は、5齢2日、5齢7日幼虫では、脳内における主たる発現細胞が PTTH 産生細胞であった(図11)。一方、蛹2日の脳では、PTTH 産生細胞に加え、終脳に位置する細胞(TCC; tritocerebral cell)や視葉細胞での発現が見られた(図12)。TCC の変態時の機能は不明であるが、視葉細胞は成虫での複眼形成に不可欠であり、蛹期に視葉が形成されることを考えると、*EcR-A* が視葉形成に重要な役割を担っていることが示唆される。

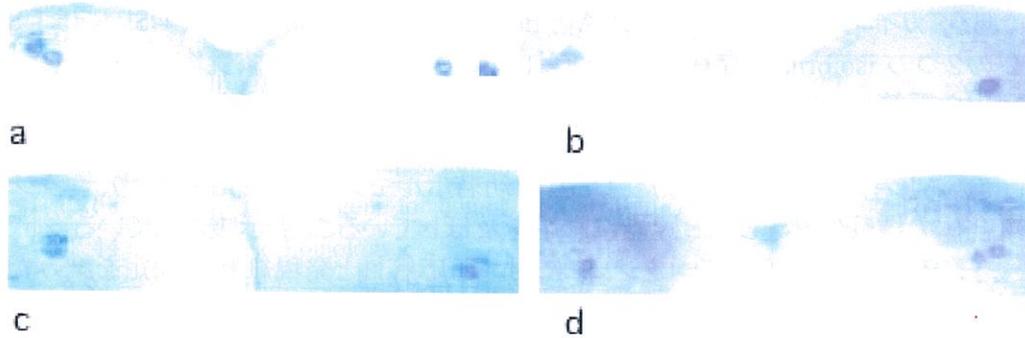


図11 *in situ* ハイブリダイゼーションによる *EcR-A* および *PTTH* 発現細胞の同定。a: 20E により刺激後2時間経過した5齢2日幼虫の脳側方部での *EcR-A* mRNA の局在。b: 20E により刺激後2時間経過した5齢2日幼虫の脳側方部での *PTTH* mRNA の局在。c: 20E により刺激後2時間経過した5齢2日幼虫の脳を用い、*EcR-A* と *PTTH* 両プローブを混合しハイブリダイズさせ側方部での *EcR-A* と *PTTH* mRNA の局在を見たもの。発現細胞が2対と変わらず、*EcR-A* と *PTTH* が同じ細胞で発現していることが分かる。d: 蛹2日の脳側方部での *EcR-A* mRNA の局在。それぞれの実験では、3' 末端をジゴキシゲニンで標識したプローブを用いた(*EcR-A* については、*EcR isoforms* のうち *EcR-A* のみとハイブリダイズする配列を使用。*PTTH* についてもハイブリダイゼーションの特異性を確認済み)。

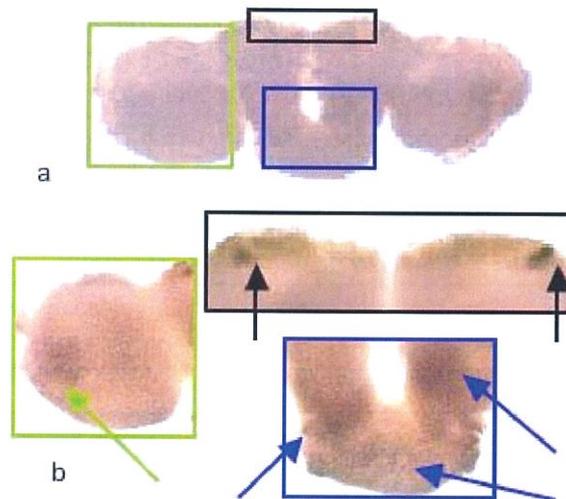


図12 蛹2日の脳全体での *EcR-A* mRNA の局在。a: 脳全体像。b: 発現部位の拡大図。側方部(黒四角の囲みと黒矢印)2対の PTTH 産生細胞に加えて、終脳部(青四角の囲みと青矢印)と視葉(黄緑の四角の囲みと黄緑の矢印)で発現が見られる。

これらの結果が、*in situ* ハイブリダイゼーションでのプローブによる非特異的結合でなく、特異的なものであることを示すため、抗 *EcR-A* 抗体(東京大学新領域創成科学研究科藤原晴彦教授より供与)による、免疫組織化学を行った。その際、PTTH 産生細胞を確認するため、抗 PTTH 抗体(名古屋大学理学研究科溝口明助教授より供与)を同時に使用した実験も行った。使用した脳は、20E により刺激後6時間経過した5齢2日、5齢7日、蛹2日の個体由来のものである(図13)。

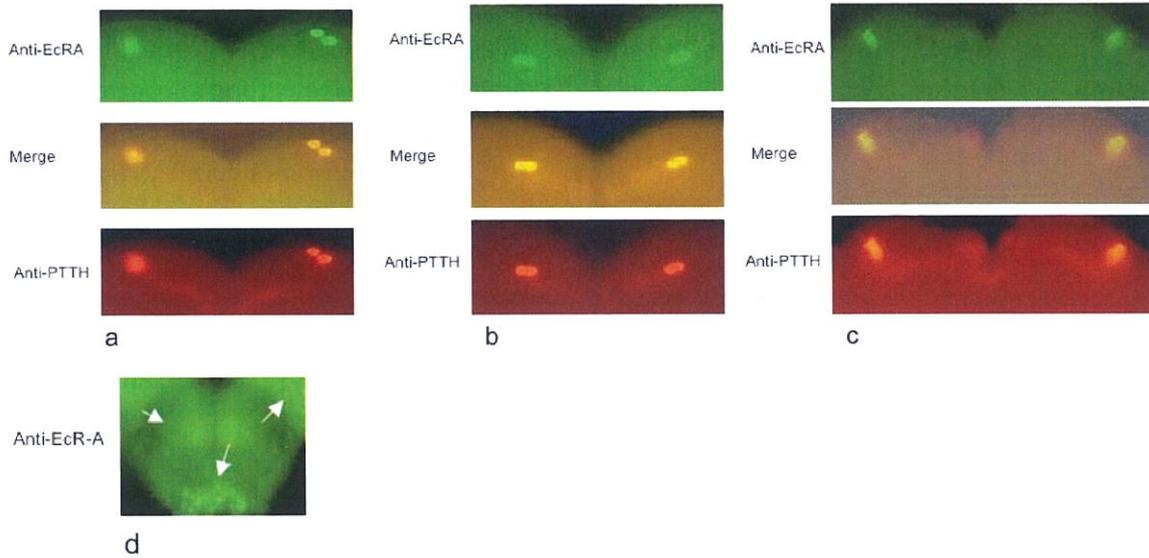


図13 免疫組織化学による EcR-A 産生細胞の同定。a: 20E により刺激後6時間経過した5齢2日幼虫の脳の側方部。b: 5齢7日幼虫の脳の側方部。c: 蛹2日の脳の側方部。d: 蛹2日の脳の終脳部と視葉。矢印の細胞が抗 EcR-A 抗体と反応する(Anti-EcR-A)。それぞれの実験では、抗 EcR-A 抗体(Anti-EcRA; 2次抗体として FITC を結合させた抗ウサギ IgG 抗体を使用)、抗 PTTH 抗体(Anti-PTTH; 2次抗体として Taxes-Red を結合させた抗マウス IgG 抗体を使用)、抗 EcR-A 抗体と抗 PTTH 抗体を同時に反応させた(Merge)。抗 PTTH 抗体では軸索が明瞭に認識されるが、抗 EcR-A 抗体ではほとんど反応が見られないことが分かる。

免疫組織化学でも、*in situ* ハイブリダイゼーションと同様の結果が得られた。したがって、5齢幼虫では、*EcR-A* 遺伝子の脳内における主たる発現細胞が PTTH 産生細胞であり、蛹の脳では、PTTH 産生細胞に加え、終脳細胞や視葉細胞での発現が確認された。現在、*EcR-BI* 遺伝子、*USP* 遺伝子についても *in situ* ハイブリダイゼーションと免疫組織化学により同様の結果を得ているが、現在追試中であるので詳細は割愛する。

2-4. 変態調節のマスター細胞としての PTTH 産生細胞

エクジソン応答遺伝子のほとんど及びエクジソン受容体遺伝子が、PTTH 産生細胞でのみ発現していることは、PTTH 産生細胞が昆虫の変態において、脳の機能と形態の制御機構を支配する細胞、すなわち、“master cells”の役割を担っていることを示唆している。一方、蛹期においては、*EcR-A* が形態形成、すなわち視葉形成等に重要な役割を担っていることが示唆される。