

論文の内容の要旨

論文題目 IGF様ペプチドと20-ヒドロキシエクジソンによる
成虫器官発達制御機構の解析

氏 名 藤永 大輝

【序論】

動物の器官は機能に適した形とサイズに発達することで有効な機能を獲得する。完全変態昆虫の場合、餌を食べて体を大きくする幼虫期と成虫の体を作る変態期を経て成虫になる。翅や生殖器などの成虫器官は幼虫期には成虫原基として幼虫体内に存在している。成虫原基の分化は幼虫期に進行するものの、変態期までは未発達な状態で保持されている。変態期になると、変態を誘導するステロイドホルモンである 20-ヒドロキシエクジソン (20E) が成虫原基の発達を誘導する。これまで、成虫器官の形とサイズは幼虫期の成虫原基の段階で既に決まっており、20E はその発達の引き金を引くホルモンであると考えられていた。

一方、20E 以外にも変態期の成虫原基の発達を誘導するペプチド因子も知られている。哺乳類のインスリン様成長因子 (IGF) との類似性から、IGF 様ペプチド (IGFLP) と名付けられたこのペプチドは変態期の 20E によって脂肪体で産生が誘導され、血中に大量に分泌される。器官培養実験から、IGFLP は成虫原基の細胞成長を誘導することが明らかになっている。

IGFLP の発見により、「IGFLP と 20E の協調的な作用が成虫原基の発達を誘導する」という仮説が提示された。すなわち、成虫器官の形やサイズは幼虫期に決定するのではなく、変態期の成長因子によって制御されると考えられる。ところが、それぞれの作用メカニズムに関する知見は乏しく、ステロイドホルモンである 20E とペプチドホルモンである IGFLP がどのように協調して成虫原基を発達させるかは不明であった。

そこで、本研究は「IGFLP と 20E による成虫器官の発達制御機構を明らかにする」ことを目的に成虫原基培養系による作用機構の解析と *IGFLP* 欠損変異体を用いた解析を行った。

【結果と考察】

第一章 生殖器原基の成長発達を制御するホルモン作用の解析

IGFLP と 20E による成長促進作用を直接的に解析するために、蛹期に劇的に伸長するカイコガ雄性生殖器に着目し、器官培養系を確立した (図 1)。生殖器原基に IGFLP と 20E を作用させると、IGFLP は①原基のサイズと重量を増加させ、②原基のタンパク質合成を促進し、③DNA 合成を促進した。20E は①原基の伸長成長 (形態形成) を誘導し、②タンパク質合成を促進し、③DNA 合成を促進し、④細胞分裂を促進した。20E と IGFLP を同時に添加し、原基を培養すると、タンパク質量と重量はさらに増加した。

次に、IGFLP と 20E の作用に関与する細胞内シグナル伝達経路を解析した。インスリンシグナルの阻害剤は IGFLP による原基の成長促進作用を阻害したが、20E の作用を阻害しなかった。一方で、分裂促進因子活性化タンパク質キナーゼ (MAPK) 経路の阻害剤は 20E による原基の形態形成を阻害したが、IGFLP による原基の成長を阻害しなかった。また、IGFLP と 20E はインスリンシグナルと MAPK 経路をそれぞれ活性化した。以上の結果から、IGFLP はインスリンシグナルを、20E は MAPK 経路を活性化することで、異なる機構で生殖器原基の発達を誘導することが明らかになった。

一般的に、20E の受容体は核内受容体であるエクジソン受容体 (EcR) であり、その作用は遺伝子発現を介していると考えられている。一方で、MAPK 経路は細胞膜受容体からの刺激を受けて活性化する。このことから、20E には EcR 以外にも細胞膜受容体が存在し、MAPK 経路の活性化にはその受容体が関わる可能性が考えられた。そこで、G タンパク質共役型受容体 (GPCR) の阻害剤であるスラミンの存在下で 20E 作用させると、20E による原基の伸長成長とタンパク質合成が阻害された (図 2)。さらに、スラミンの存在下では 20E による MAPK 経路の活性化が阻害されたことから、20E による MAPK 経路の活性化と原基の成長促進には GPCR が関わることを示唆された。その一方で、MAPK 経路阻害剤とスラミンは 20E が EcR を介して転写を促進する遺伝子 (*e75a* と *e93*) の発現を阻害しなかった。また、両阻害剤は 20E による細胞分裂促進を 30%程度しか阻害しなかった。以上の結果から、20E には GPCR を介した応答と EcR を介した応答の 2 つの作用経路があり、前者は主に形態形成やタンパク質合成を、後者は主に細胞分裂をそれぞれ誘導することが明らかになった。

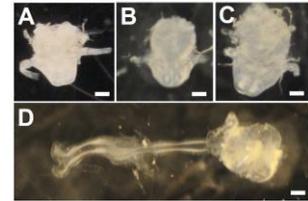


図 1: 培養前後の生殖器原基
カイコガから雄性生殖器原基を摘出し、5日間培養した。
(A) 培養前、(B) ホルモンなし
(C) IGFLP 100 nM 添加
(D) 20E 添加
スケールバー: 200 μm

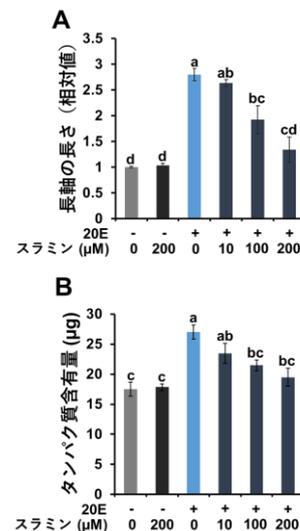


図 2: GPCR 阻害剤による 20E 依存的な器官発達の阻害
GPCR 阻害剤のスラミンと 20E を添加して生殖器原基を培養し、5日後の(A)長軸の長さ、(B)タンパク質含有量を測定した。

第二章 IGFLP と 20E の協調作用の解析

IGFLP と 20E は同時期に作用するため、細胞内では何らかの協調的な制御があると考えられた。そこで、20E がインスリンシグナルに与える影響を解析した結果、20E はインスリンシグナルの構成因子の発現を促進した。また、20E は低濃度の IGFLP によるインスリンシグナルの活性化を促進し、高濃度の IGFLP によるインスリンシグナルの活性化を抑制した。

次に、タンパク質翻訳を制御する Target of rapamycin (TOR) 経路の阻害剤の存在下で原基を培養した結果、IGFLP による原基サイズの増大とタンパク質の増加が阻害された。さらに、IGFLP は TOR 経路を活性化した。この活性化はインスリンシグナルの阻害剤で阻害されたことから、IGFLP はインスリンシグナルを介して TOR 経路を活性化し、原基の成長を促進することが示された。一方、TOR 経路阻害剤は 20E による原基の成長を阻害しなかった。しかし、20E は TOR 経路の構成因子の発現量を増減させたことから、20E は IGFLP による TOR 経路を介したタンパク質合成をさらに促進することが示唆された。

第三章 IGFLP 遺伝子欠損変異体の解析

生体内での IGFLP の機能を明らかにするために、CRISPR/Cas9 法を用いて IGFLP 遺伝子欠損変異体を作成し、表現型を解析した。IGFLP は変態期の脂肪体だけでなく、脳と蛹期の精巣壁、卵巣小管でも発現する。変異体では摂食期終盤から野生型よりも体重が低下したことから、幼虫期の脳由来の IGFLP が幼虫の成長を促進することが示された。成虫器官のサイズを測定すると、変異体では触角と脚の長さが低下し、雄性生殖器の重量が低下した。このことから、IGFLP は生体内でも成虫原基の成長を促進することが裏付けられた。

蛹化初日から経日的に卵巣重量を測定した結果、変異体の卵巣重量は劇的に低下することが示された (図 3)。変異体の産卵数は野生型の約 50% だったが、卵サイズや胚発生は正常だったことから、変異体では造卵数が低下することが明らかになった。変異体に IGFLP を投与すると、卵巣のインスリンシグナルが活性化したが、血中では速やかに分解されるため、卵巣重量は回復しなかった。そこで、変異体の蛹化初日の卵巣を野生型に移植した結果、卵巣重量は野生型と同程度に発達した。このことから、蛹の血液中の IGFLP によって卵巣が発達することが示された。

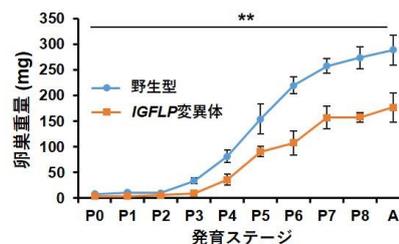


図 3：野生型と変異体の卵巣重量変動

野生型と IGFLP 変異体の雌蛹から経日的に卵巣を摘出し、重量を測定した。Pn は蛹化 n 日後を示し、A は成虫を示す。

第四章 IGFLP と 20E が翅原基に与える影響の解析

続いて、翅原基と生殖器原基のホルモン応答を比較した。翅原基では生殖器原基と異なり、20E によって MAPK 経路が抑制された。一方で、*e75a* の転写が促進されたことから、20E

は EcR を介して作用することが示された。20E によるシグナル伝達経路の構成因子の転写制御パターンは生殖器原基と異なっていた。また、20E は高濃度の IGFLP によるインスリンシグナルの活性化をさらに促進したことから、20E による経路構成因子の転写制御によって、インスリンシグナルの活性化度合いが制御される可能性が示唆された。

第五章 細胞膜局在型 20E 受容体の検証

生殖器原基において、20E による MAPK 経路の活性化には GPCR が関わることを示唆されたが、受容体は同定されていない。20E 作用に関与する既知の GPCR は生殖器原基に発現しておらず、その GPCR 特有の細胞応答も見られないことから、これらは関与していないことが示された。また、遺伝子発現解析から、生殖器原基には複数の 7 回膜貫通型 GPCR 遺伝子が発現しているほか、EcR が細胞膜に局在する可能性が示唆された。哺乳類ではステロイドホルモンの核内受容体が細胞膜に局在し、MAPK 経路の活性化に関与することから、細胞膜局在 EcR も同様に 20E による MAPK 経路の活性化に関わる可能性がある。

【結論】

本研究により、変態期の 20E と IGFLP によって生殖器原基をはじめとする様々な組織の発達が制御されることが明らかになった。変態期になると、20E が生殖器原基などに作用する。生殖器原基では 20E が GPCR や MAPK 経路の活性化を介して形態形成やタンパク質合成を促進する。また、主に MAPK 経路非依存的に細胞分裂を誘導する。さらに、インスリンシグナルや TOR 経路の構成因子の発現を調節する。IGFLP

は 20E によって分泌が誘導され、インスリンシグナル伝達経路とその下流の TOR 経路を介してタンパク質合成を促進し、原基のサイズを増大させる (図 4)。すなわち、20E は成虫器官発達制御における主要因子として形態形成を誘導する一方で、IGFLP の作用を介してインスリンシグナルと TOR 経路を活性化することで、器官サイズを増大させる。このように、20E と IGFLP が異なる機構で協調的に器官発達を誘導することで、変態期に成虫器官が劇的に成長発達することが明らかになった。

また、変異体解析から、①幼虫期に体重を増加させる。②触角、脚、雄性生殖器を大きくする。③蛹期に卵巣重量と造卵数を増加させる。という IGFLP の生体内での機能が明らかになった。

変態期に少なくとも 2 種類ホルモンの協調して成虫原基の発達を制御するという本研究結果は「成虫器官のサイズは幼虫期の成虫原基の段階で既に決まっている」という従来の解釈を覆す発見であり、成虫器官発達制御機構に新たな観点を与える重要な成果となった。

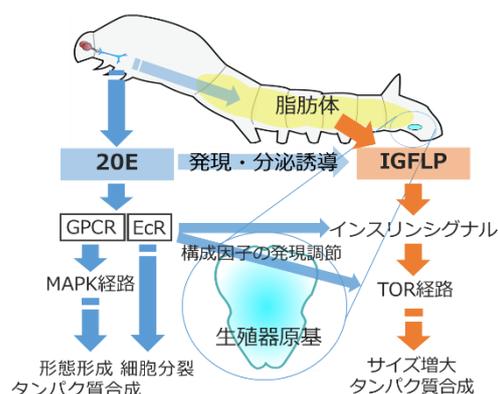


図 4 : 20E と IGFLP による生殖器原基の発達促進機構