



変態・休眠機構
領域番号：361

名古屋大学図書

科学研究費補助金 特定領域研究(A)(1)



20098447

昆虫の変態・休眠の分子機構

課題番号：08276103

平成8～11年度 研究成果報告書



平成13年1月

領域代表者 山下 興 亜
(名古屋大学・大学院生命農学研究科・教授)

「表紙写真は Gérard CHAVANCY 博士の好意による」



はじめに

研究の位置づけ

昆虫を単なる生物材料あるいはモデルとしてではなく、研究対象として正面から取り上げ、多様な生命活動の実態を分子の言葉で語る。このことを合い言葉に異分野の何人かの研究者が集い、昆虫研究に対する熱い思いを共有したのが平成5年の夏であった。学術研究は一般性や普遍性の追求であり、学術分野は用いる方法論や目的によって仕分けられるのが当然のこととして受け入れられている。生命科学研究においては、分類学上の特定の種や網に属する生物種を対象とした研究は、ヒトを除いてはあり得ず、すべての生物種に共通した遺伝、発生、生殖などの生命現象が研究の対象として取り上げられている。しかるに、昆虫研究はこのような既存の学術の分類には納まらず、学術研究の分野としての市民権が自動的に与えられることにはならない。生物種を特定した研究は、具体的に生きることの全体を把握することであり、一方、生物種を越えた共通の現象を取り扱う研究は、生きることの部分を解析することである。両者を並進させることによって、生命の理解は広がりかつ深まることを疑う余地はない。ここに、昆虫を特定した研究が生命科学研究のもう1つの研究として成り立つと位置付け、この昆虫研究を推進のための基盤とした。

新しい学術の領域を開拓するもう1つの推進力は、実績に裏打ちされた研究者の鋭い未来開拓志向から発生する。わが国は昆虫研究においては常に世界を先導する実績を上げ、わが国の研究活動を抜きにしては昆虫科学の世界は語れない状況を作りだしていた。特に、ここ20年間の昆虫の変態や休眠を中心とした高次生体機構の統御に関する神経内分泌学的、生物有機化学的かつ分子生物学的研究は、わが国の有する優れた研究環境と研究条件を十分に生かして進められ、その成果は単に昆虫科学の範囲に留まらず、生命科学の発展に大きな貢献をしてきた。この最も恵まれた研究環境と研究実績を共通の財産にすれば、未来志向の独自の研究領域を構築することが可能であると確信したのである。

わが国は、明治以来カイコという産業昆虫を活用し国の近代化のための経済基盤とした。このためにカイコの研究をあらゆる方策を用いて独自に展開した。西欧の科学技術の輸入によってではなく、わが国の研究者と技術者の知的な活動によって多くの先端的な科学技術が開発された。新しい科学技術の展開は多様な人材養成を通じてさらに加速し、より大きな自己増殖系を確立することになった。研究の推進にとって最も重要な要因は研究者の

能力と感性である。絶えることなく知を生み出す過程こそが研究活動であり、研究成果はその過程の軌跡である。それ故に、昆虫研究を勇気を持って進める研究者の養成はあらゆる機会をとらえて図らなければならない。この意味で本研究計画の設計にあたっても、この人材養成の視点を重視することにした。

20 世紀の後半の科学は生命科学を創出し、本格的な研究活動を進めた。そしてこの生命科学の成果は 21 世紀の人々によって本格的に評価されるだろう。人間は多様な留まることのない環境の変化に対応してより豊かな生活を築いてきた。昆虫はこの地球上の生物圏の巨大な構成者として今日を生きている。この昆虫の繁栄の実態を知ることは、人間がどのように生きていくかについて少なからず学術的な根拠を与えてくれるに違いない。人間はこれを真摯に学ばなければならない。昆虫だけではなく、この地球を共通の棲み家としている生物の生きざまを知ることが、そのまま人間の生きざまを決めることにつながると言ってもよい時代である。本研究が昆虫を取り上げて、あるいは昆虫に限って研究するもう 1 つの意図はここにもある。

科学研究を組織的にしかも大型予算の支援によって進めるためには、個別研究とは異なる視点と理念、そして目的と効果が当然表明されなければならないだろう。このことは研究者間での了解事項ではなく、広く社会に対して研究の意図とその効果を正しく開示し、その上で社会と歴史からの研究支援を得るために必要なことであると理解している。その意味で本研究の意図をまずここに述べ、本研究を大所高所から多くの方々にご理解いただく素材とした。

研究のねらい

本研究は 3 年間の準備期間を経て、平成 8 年から平成 11 年度までの 4 年間実施した。研究課題として取り上げた「昆虫の変態・休眠の分子機構」は、20 世紀後半の昆虫分子科学研究の総決算と 21 世紀に向けての新たな課題の探索を意図したものである。変態や休眠といった高次の生体機構を統御する鍵分子を化学的に同定し、生命現象を分子に還元することによって生きる機構を物質の運動として解明しようとする研究である。その主流はホルモン分子の精製、構造決定、化学合成であり、また形質変換や代謝変動をもたらす作用分子の発現と同定である。この研究に分子生物学の手法を導入することによって、そ

の遺伝子の同定や発現調節機構を解明し、鍵分子の生体内での動態から現象を説明することである。

確かに昆虫の変態・休眠の理解に分子の言葉が有効であることは、本研究を通じて確実に証明された。そして、これらの分子は変態や休眠の人為的な統御に応用できる見通しもついた。このような分子研究の飽くなき推進は、変態や休眠現象と共に、昆虫が発達させている社会性の確立、寄生・共生の成立や生体防御に関する鍵分子や生体反応、および関連遺伝子の発見をもたらした。昆虫の示す高次な生命現象の解明にとって分子科学の有効性があらためて証明されたのである。とはいっても、計画した事柄のすべてが分子レベルで解明できたわけではない。例えば、本研究では、昆虫が変態し休眠するために活用している環境の変化をどのように受容し、記憶し、反映しているのかについては、分子レベルで解明するには到らなかった。昆虫科学の新たな挑戦の場となろう。

本研究報告書は、地歩を固めながら、新たな課題の探索に勇敢に挑戦した延べ 53 名の研究者による研究成果をまとめたものである。昆虫研究が、このような壮大な計画と組織のもとに進められたのは、世界的にも例を見ない画期的なものである。この成果が世界の昆虫科学の新展開の礎になることを疑わないし、世界も期待していると自負している。

このような学術研究の設計や組織化さらには熱い研究活動に参加できたことに熱い感動を覚える次第です。計画立案から研究実施さらには研究成果の評価等に多くの方々から指導・助言をいただきました。関係各位に心から感謝申し上げます。

平成 13 年 1 月

領域代表者 山下 興 亜

目 次

I. 特定領域研究(A)「昆虫の変態・休眠の分子機構」の研究経過等の報告

1. 領域全体の当初の研究目標と目標の達成度, 学界への貢献度	1
2. 領域内における研究組織と研究班の連携状況	2
3. これまでの主な研究成果	4
4. 領域として研究と推進したうえでの問題点と対応措置	14
5. 今後の研究成果の取りまとめ方策	14
6. 研究を取りまとめる上での問題点	14

II. 研究成果の報告

1. 計画研究第1班「変態・休眠を支配するホルモン分子の動態と環境応答」

神経ペプチド受容体に関する研究	片岡 宏誌	東京大学	平成8~1115
昆虫の脳神経ペプチドホルモン（前胸腺刺激ホル モン）の分泌調節機構	相菌 泰生	神戸大学	平成8~1120
昆虫ペプチドホルモン分泌細胞の電氣的活動動態 の解析	市川 敏夫	九州大学	平成8~1126
神経ペプチドの遺伝子発現調節機構	岩見 雅史	金沢大学	平成8~1131
神経ペプチド遺伝子のマッピングと変異体の解析	嶋田 透	東京大学	平成8~1136
神経ペプチドの体内動態の解析ーカイコ前胸腺刺 激ホルモンの体内動態と分泌調節ー	溝口 明	名古屋大学	平成8~1141
エクジソン受容体分子の多型の解析ー翅形成にお けるエクジソンの受容と情報伝達ー	藤原 晴彦	東京大学	平成8~1146
カイコ胚休眠の分子機構	柳沼 利信	名古屋大学	平成8~1151
休眠ホルモンの遺伝子発現と作用の分子機構	山下 興亜	名古屋大学	平成8~1156

2. 計画研究第2班「変態における自己・非自己の認識転換と形作りの分子機構」

I. ワモンゴキブリ(<i>Periplaneta americana</i>)の肢, およびアフリカツメガエル(<i>Xenopus laevis</i>) の幼生の尾の再生芽に特異的に発現する蛋白 の同定と解析. II. ミツバチ(<i>Apis mellifera</i> L.)	久保 健雄	東京大学	平成8~1161
---	-------	------	--------	--------

脳の高次中枢(キノコ体)で領野特異的, 行動特異的に発現する遺伝子に関する研究. III. ミツバチ(*Apis mellifera* L.)働き蜂の齢差分業にともなう下咽頭腺の機能転換と, その柔軟性にする研究

昆虫の変態と組織の再編成	名取 俊二	理化学研究所	平成8~11	・・・66
蛋白パルミトイル化酵素の変態時での機能解析の研究	上野 孝治	基礎生物学研究所	平成9~11	・・・71
ステロイドホルモンによる生と死の決定: 20-ヒドロキシエクジソンによる成虫特異的組織の蛹コミットメントの幼虫特異的組織の予定細胞死の誘導	桜井 勝	金沢大学	平成8~11	・・・75
昆虫細胞内共生細菌ブフネラに関する分子細胞生物学的研究	石川 統	東京大学	平成8~11	・・・80
昆虫外皮の構築と機能: フェノール酸化酵素前駆体とそれを活性化するプロテアーゼカスケード構成要素を探りばりとしての研究	芦田 正明	北海道大学	平成8~11	・・・85
カイコ主要体液タンパク質遺伝子の発現調節機構に関する研究	富野 士良 泉 進	岡山理科大学 東京都立大学	平成8~9	・・・90

3. 公募研究 (第1班関係)

前胸腺刺激ホルモンの立体構造解析と機能相関	永田 宏次	東京大学	平成8~11	・・・93
フェロモン産生の分子メカニズムとホルモンによる調節機構	松本 正吾	理化学研究所	平成8~11	・・・98
発育阻害ペプチド (growth-blocking peptide, GBP) - ドーパミン系の生理機能	早川 洋一	北海道大学	平成8,9,11	・・・103
脱皮と変態の分子機構の解析	上田 均	国立遺伝学研究所	平成8~10	・・・107
カイコガ前胸腺および精巣におけるエクジステロイド合成の制御機構	普後 一	東京農工大学	平成8~10	・・・111
昆虫幼若ホルモンによる遺伝子発現の調節機構の研究	鎮西 康雄	三重大学	平成9~11	・・・115

蚕卵休眠に動員される情報伝達系に関する天然物 有機化学的研究	今井 邦雄	三重大学	平成8～9	・・・119
キタテハの夏型ホルモン活性物質の精製・単離と 作用機作の解析	遠藤 克彦	山口大学	平成8～9	・・・122
組換えバキュロウイルスを利用したPTTHの種特 異性に関する分子機構の解明	小林 淳	三重大学	平成8～9	・・・125
天蚕の前幼虫態休眠における新内分泌系の機能解 析と分子機構	鈴木 幸一	岩手大学	平成8～9	・・・128
線虫 <i>Caenorhabditis elegans</i> を用いた休眠機構の 解明	河野 強	鳥取大学	平成9, 11	・・・131
昆虫脳における神経ペプチドの放出に関する細胞 生物学的研究	遠藤 泰久	京都工芸繊維 大学	平成8	・・・134
幼虫形質の維持および蛹化決定過程における絹糸 遺伝子の発現制御機構の解析	滝谷 重治	北海道大学	平成8	・・・136
精巢の発育抑制	田中 利治	名古屋大学	平成8	・・・138
昆虫および植物におけるエクジソン生合成初期過 程機構の比較と解析	藤本 善徳	東京工業大学	平成8	・・・140
甲殻類のCHH族ペプチドをプローブとした昆虫前 胸腺抑制ホルモンの検索	渡邊 俊樹	東京大学	平成8	・・・142
成虫休眠の脳-アラタ体系による制御	沼田 英治	大阪市立大学	平成9	・・・144
エクジソン20-水酸化酵素遺伝子の単離と発現調節 に関する研究	園部 治之	甲南大学	平成10	・・・146
蛹休眠の光周期による制御：光受容，時計遺伝子， PTTH放出の上位機構	竹田真木生	神戸大学	平成10	・・・148
脱皮ホルモン様活性発現に必須の化学構造および その物理化学的性質の解明	中川 好秋	京都大学	平成10	・・・150
環境の長期現象情報受容器官としての脳内光受容 器の情報伝達システムの解明	針山 孝彦	東北大学	平成10	・・・152
シロアリ類のカースト分化における分子機構	松本 忠夫	東京大学	平成11	・・・154

4. 公募研究（第2班関係）

鱗翅目昆虫の成虫翅の形を決めている機構	児玉 隆治	基礎生物学研	平成8～9	・・・157
---------------------	-------	--------	-------	--------

ショウジョウバエをモデルとした成虫組織の形態形成メカニズム	多羽田哲也	東京大学	平成8～9	・・・160
ショウジョウバエ神経系細胞株を用いた変態ホルモンによる細胞死誘導機構の解析	程 久美子	日本医科大学	平成8, 10	・・・163
変態に伴うコオロギ概日リズムの位相逆転の神経・内分泌機構	富岡 憲治	山口大学	平成9～10	・・・166
昆虫成虫器官特異性の決定機構	倉田祥一郎	東北大学	平成10～11	・・・169
カイコの変態に関与する遺伝子のカタログ化	三田 和英	放射線医学総合研究所	平成10～11	・・・172
ショウジョウバエ変態時の細胞死の遺伝制御機構	谷村 禎一	九州大学	平成8	・・・175
カイコ卵への脂質の輸送と脂質代謝に関する研究	土田 耕三	国立感染症研究所	平成8	・・・177
ショウジョウバエ変態中の中樞神経系における細胞死	辻村 秀信	東京農工大学	平成9	・・・179
昆虫変態時の血球細胞による自己・非自己認識機構の解析	森 肇	京都工芸繊維大学	平成9	・・・181
カイコ食道下体の分泌機能動態の解析	佐藤 行洋	岩手大学	平成10	・・・183
家蚕の5齢致死突然変異利用による変態制御機構の解析	日下部宜宏	九州大学	平成11	・・・185
ショウジョウバエ細胞膜プロテオグリカンの成虫組織形成における機能	中藤 博志	東京都立大学	平成11	・・・187
昆虫培養細胞の初期化による形態形成能の回復に関する研究	三橋 淳	東京農業大学	平成11	・・・189

III. 公表論文リスト・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 191

第Ⅰ部．特定領域研究(A)「昆虫の変態・休眠の分子機構」の研究経過等の報告

1．領域全体の当初の研究目標と目標の達成度，学界への貢献度

当初の研究目標

昆虫は4億年前の古生代デボン期に地球上に陸上生活者として出現して以来，多くの進化の過程を経て今日の繁栄を築いている．昆虫が示すこの多様な生命活動の拡大・保存能力を理解することは，生命科学の貴重な研究領域である．

昆虫の生命活動は変態と休眠に拡大・強化されている．変態は生活資源や生活空間の拡大に，休眠は個体生命保持と種間の時間的な住み分けによる生活時間の統御戦略として機能している．変態も休眠も基本的には遺伝的に設計されたプログラムの一展開過程ではあるが，このプログラムの発現は体外・体内の情報に厳密に依存している．これらの情報は中枢神経系と末梢系の内分泌系からなる二重の調節機構によって多様なホルモンに変換され，ホルモンがすべての昆虫の脱皮や変態，休眠を基本的に制御している．そしてホルモンは時間と場所を指定し，特異的な代謝生理や細胞応答を誘導し，新たな生活パターンとしての変態や休眠を創出する．これらの指導概念を分子レベルで解明することを本研究の基本的な目標とした．

具体的には，2つの研究目的を掲げた．1つは変態・休眠を支配するホルモン分子の動態と環境応答機構の解明を目的とした．2つは変態における自己・非自己の認識転換と形作りの分子機構を解明することにした．これらの研究は相互に深く関連しているので，研究成果を総合することによって，昆虫の多様な生活史を統一的に理解しうるパラダイムを確立し，昆虫分子科学研究領域の確立を目指すことにした．

目標の達成度

本特定領域研究を計画した平成5～7年時点からみると今日の研究領域，研究方法，研究成果は格段に発展している．とりわけ当初計画時に解決すべきものとして掲げた具体的な課題，ペプチドホルモンの遺伝子構造の決定，発現調節機構の基本，ホルモン受容体の構造と発現動態，崩壊細胞を認識するタンパク質の同定とそのホルモン調節，器官再生を誘導完成させるタンパク質の同定と構造決定などはほぼ明らかにされた．また，研究成果の項に述べているとおり，各研究者がそれぞれの課題について解決し，総体としても初期の目標はほぼ達成された．本研究においては環境情報への応答機構を分子レベルで解明することにしたが，この点については機構解析まで切り込むことができない状況にとどまっている．しかし，一方で当初予期し得なかった新規な事実や機構を提案することもできた．その1つは新しいカイコの休眠卵の創出であり，ミツバチ脳の機能分化に関わる遺伝子の同定，前胸腺抑制ホルモンの発見と同定などである．これらの成果は今後の本領域の発展の基盤を提供している．

学界への貢献度

昆虫研究は生命科学研究の一分野として，また農学や医学研究の一分野として位置付けられ，多様な学協会に取り上げられている．本研究の成果は，それぞれの研究者の経歴と課題の位置付けに従い，分子生物学，生化学，動物学，内分泌学，応用昆虫学，蚕糸学，

農芸化学，医動物学，薬学等の分野の学界で報告されている．また，学術論文の多くは国際誌に発表されている．したがって，本研究成果は断片的ではあっても多くの学界に貢献しているといえる．また，本研究班の研究活動は農林水産省蚕糸・昆虫農業技術研究所のCOE 研究「昆虫特異機能の研究（平成8 年発足）」にも大きな影響を及ぼしているし，平成11 年度発足の日本学術振興会の未来開拓研究「昆虫特異機能の発現機構と開発」の企画，実施に反映されており，昆虫研究の新展開の機動力を発揮したといえる．

2．領域内における研究組織と研究班の連携状況

研究組織

本特定領域研究は，①「変態・休眠を支配するホルモン分子の動態と環境応答」と②「変態における自己・非自己の認識転換と形作りの分子機構」の2 つの計画班と公募研究から構成されている．全体を統括するために総括班を設けた．総括班及び計画班の構成員名簿，各班の構成の実績は下表の通りである．

平成12 年3 月現在

総括班（計12 名）	計画班A01（計9 名）	計画班A02（計9 名）
代表 山下 興亜 （名古屋大学生命農学研究科教授） 石川 統 （東京大学理学系研究科） 片岡 宏誌 （東京大学新領域創成科学研究科） 久保 健雄 （東京大学薬学系研究科） 桜井 勝 （金沢大学理学部） 鈴木 昭憲 （秋田県立大学） 鈴木 義昭 （H8,9；岡崎国立共同研究機構） 竹市 雅俊 （京都大学生命科学研究科） 長澤 寛道 （東京大学農学生命科学研究科） 名取 俊二 （理化学研究所） 日高 敏隆 （滋賀県立大学） 藤田 恒夫 （日本歯科大学新潟歯学部） 堀田 凱樹 （国立遺伝学研究所）	班長 片岡 宏誌 （東京大学新領域創成科学研究科教授） 相蘭 泰生 （神戸大学農学部） 市川 敏夫 （九州大学理学研究科） 岩見 雅史 （金沢大学自然科学研究科） 嶋田 透 （東京大学農学生命科学研究科） 溝口 明 （名古屋大学理学研究科） 藤原 晴彦 （東京大学新領域創成科学研究科） 柳沼 利信 （名古屋大学生命農学研究科） 山下 興亜 （名古屋大学生命農学研究科）	班長 久保 健雄 （東京大学薬学系研究科助教授） 芦田 正明 （H10～；北海道大学低温科学研究所） 石川 統 （東京大学理学系研究科） 泉 進 （H9；東京都立大学理学部） 上野 孝治 （H9～；岡崎国立共同研究機構） 名取 俊二 （理化学研究所） 桜井 勝 （金沢大学理学部） 富野 士良 （H8；東京都立大学理学部） 早川 洋一 （H8；北海道大学低温科学研究所）

構成員数

	平成 8 年度	平成 9 年度	平成 10 年度	平成 11 年度
総括班	13 名	13 名	12 名	12 名
計画班 第 1 班	9 名	9 名	9 名	9 名
第 2 班	6 名	7 名	6 名	6 名
公募研究	19 名	19 名	14 名	12 名
計	47 名	48 名	41 名	39 名

研究班の連携状況

昆虫の変態・休眠と研究対象をかなり特定したこと，そして研究方法論としては分子科学を基盤としたことから，研究者間での情報交換や研究協力が日常的に進められていた．このことを前提に研究企画，調整を進めた．まず領域全体の整合性は，総括班での検討に基づいて，毎年初夏に 1 回全員合宿による研究課題計画検討会で十分徹底された．各班内での相互調整は班長の元に個別に行った．研究中間報告を兼ねてのワークショップと公開講演会を開き，研究班間並びに研究者間の連携を深めた．また，毎年 1 月には各年の研究成果報告検討会を，総括委員会の元に開催し，研究成果の評価と指導助言を行った．各研究会等の開催実績を以下に表す．

年月日	事 項	場 所
8. 6.15	研究打合会	東京都東京大学
8. 8. 8－8. 8. 10	ワークショップ	長野県松本市
8.11. 5	平成 8 年度公開シンポジウム	東京都東京大学
9. 1. 6－9. 1. 7	研究成果検討会	愛知県名古屋市
9. 6.27－9. 6. 28	研究打合会	北海道千歳市
9.11. 1	平成 9 年度公開シンポジウム	東京都東京大学
10. 1. 6－10. 1. 7	研究成果検討会	愛知県名古屋市
10. 6.19－11. 6. 20	研究打合会	石川県金沢市
10. 8. 6－10. 8. 8	ワークショップ	静岡県田方郡
10.11. 9	平成 10 年度公開シンポジウム	東京都東京大学
11. 1. 5－11. 1. 6	研究成果検討会	愛知県名古屋市
11. 6.18－11. 6. 19	研究打合会	兵庫県神戸市
11. 8. 9－11. 8. 11	ワークショップ	神奈川県三浦郡
11.11.27	平成 11 年度公開シンポジウム	東京都東京大学
12. 1. 6－12. 1. 7	研究成果検討会	愛知県名古屋市

3. これまでの主な研究成果

1) 変態・休眠を支配するホルモン分子の動態と環境応答

(班長 片岡 宏誌)

環境情報（日長変化，温度変化，食物栄養変化など）を受容選別した脳を中心とした中枢神経系が，その情報を特定の脳神経ペプチドホルモンに変換し，末梢ホルモン系の制御を介し，最終的に細胞の生理状態を特化させることで，変態・休眠は実現されると推定した．この変態・休眠における情報系の解明を本班の主要な目的とした．そのため，それぞれのホルモン分子の遺伝子発現，分子動態，さらに細胞でのホルモン受容について分子レベルでの解明を進めた．

具体的には

- (1) 脳神経ペプチドホルモンの生合成・分泌の調節機構
- (2) 脳神経ペプチドホルモンの血中動態と標的器官における受容
- (3) 末梢ホルモンであるエクジソンに対する受容体の時期・組織特異的発現

を主要な課題として設定し，関連課題も含めて研究を遂行した．この4年間に得られた研究成果のうち重要なものを以下に紹介する．

(1) 脳神経ペプチドホルモンの生合成・分泌の調節機構

感覚器官を介して受容された体内外の環境情報は，脳神経ペプチドホルモンの産生細胞である神経分泌細胞に伝えられ，その遺伝子発現や電氣的活動の制御を通して，最終的に神経ペプチドホルモンの生合成や分泌を調節している道筋の概要を明らかにした．

ボンビキシンは昆虫インスリンとも呼ばれるペプチドホルモンであるが，その遺伝子構造は全く異なっており，約30コピーからなる多重遺伝子であることを突きとめ（図1-C），さらに各遺伝子間のスペーサー領域（転写調節領域を含む）の全塩基配列を決定し，その配列の特長と転写産物の同定から細胞特異的発現を調節するエレメントを推定した．さらに，転写調節領域に GFP を繋いだ人工遺伝子をカイコ幼虫脳にエレクトロポレーション法で直接導入し（図1-B），この領域が細胞特異的発現を担うことを確定した（図1-D）．また，遺伝子の転写方向と順番が遺伝子発現に重要であることを明らかにした．

また，カイコ卵休眠を支配する休眠ホルモン遺伝子の発現調節領域を同定するために，種々の長さのプロモーター領域に *lacZ* 遺伝子を繋いだ人工遺伝子を導入した形質転換シヨウジョウバエを作成した．その結果，約650bpの細胞特異的な調節領域の同定に成功した．本遺伝子発現はカイコにおいては環境温度の調節下にあることが示されているが，本形質転換体ではこの温度依存性を確認するには至らなかった．

一方，神経分泌細胞の電氣的な活動を長期（2～5日）に渡り連続して記録することに初めて成功した．その結果，同一の神経ペプチドホルモンを産生する神経分泌細胞群は，一つの自立的な機能単位として行動し，さらに上位中枢の制御下であり，生殖行動（交尾により性フェロモン分泌が完全に抑制されるなど）等の高次生体機能の解発に密接に結びついていることを初めて実証した．

(2) 脳神経ペプチドホルモンの血中動態と標的器官における受容

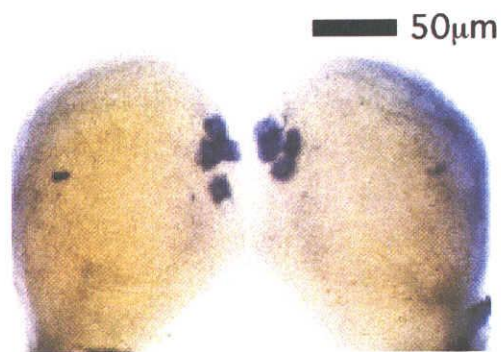
脳神経ペプチドホルモンの作用は直接的には血中濃度によって決まるが、昆虫では血中ペプチドホルモンの超微量分析法が必要なために放置されていた。本研究ではまず時間分解蛍光免疫測定法を活用した超微量定量法（検出感度 0.1pg）を確立し、カイコ血液中の前胸腺刺激ホルモン（PTTH）濃度の変動を初めて解明した（図 2-A）。このことにより、PTTH は単に前胸腺のエクジソン合成をオン・オフするだけではなく、その合成量の調節を行うこと、また、PTTH 分泌は個体の生理状態や末梢ホルモンによる調節下にもあることを明らかにし、従来の PTTH-エクジソンという単線思考を改良した。

哺乳類細胞を用いた発現クローニング法により、カイコの前胸腺に存在する PTTH 受容体をクローニングすることに成功した。PTTH 受容体は、いわゆる膜 7 回貫通型の G-タンパク質共役型受容体であると推定された（図 2-B）。この PTTH 受容体はその相同性から機能未知の膜タンパク質に属すると考えられた。この知見は PTTH の標的器官における作用機序、また、受容体レベルでの変態調節機構を理解する上での基盤を与えるばかりでなく、相同受容体の機能解析などにより新規な膜受容体研究の発展が期待される。さらに PTTH とは逆に前胸腺からのエクジソン分泌を抑制する前胸腺抑制ペプチドの構造を明らかにし、前胸腺でのエクジソン分泌が 2 つの脳神経ペプチドホルモンによって正負両面の調節下にあることを初めて実証した（図 2-C）。

(3) エクジソン受容体の時期・組織特異的発現

昆虫の変態を進めるホルモンはエクジソンであり、このホルモン作用の時間的かつ空間的な多様な作用の発現によって変態は完了する。このエクジソンの細胞・組織特異的な作用発現を受容体の多様性に注目して解析を進めた。

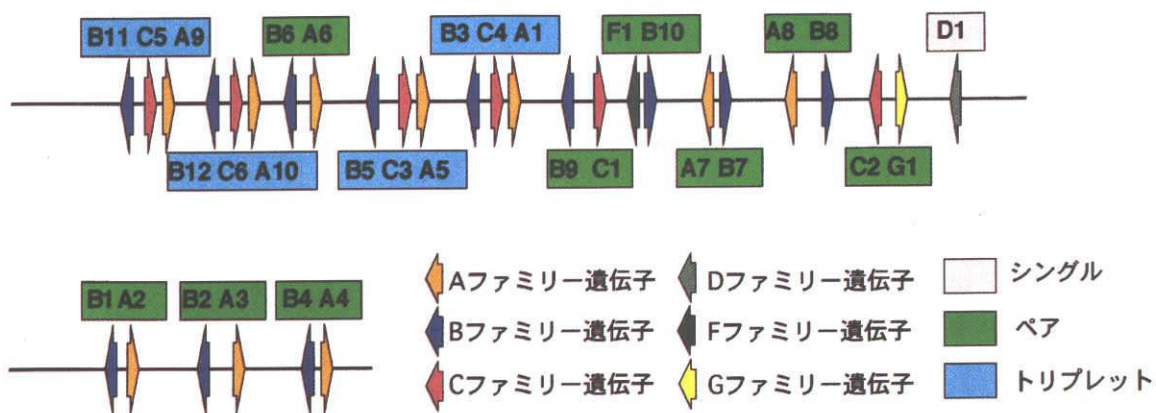
カイコなど鱗翅目昆虫の翅は、翅原基のうちの一部の細胞群に細胞死をもたらし、残りの細胞群を分化増殖させることによって完成する。エクジソンは細胞死領域と細胞増殖領域で異なるエクジソン受容体（EcR）（EcR A, EcR B1）を発現させ（図 3-A）、さらに EcR B1 の転写開始点上流には完全な CRE（cAMP 応答配列）が存在することから EcR アイソフォームの選択的発現には CRE-CREB 系を介した制御系が関与していることを示した。また、カイコ無翅突然変異体（*fl*）ではエクジソン発現カスケードの初期後期遺伝子の *BHR* および後期遺伝子の *urbain* の発現が翅のみで低下していることを見出した（図 3-B）。この過程で、翅で特異的に発現するカルシウム、リン脂質結合性モチーフをもった新たな膜タンパク質を同定した。受容体に関してはカイコ卵から 7 種類の EcR のアイソフォームが同定され、エクジソン作用の多様性が受容体の多様性によっている可能性も示された。



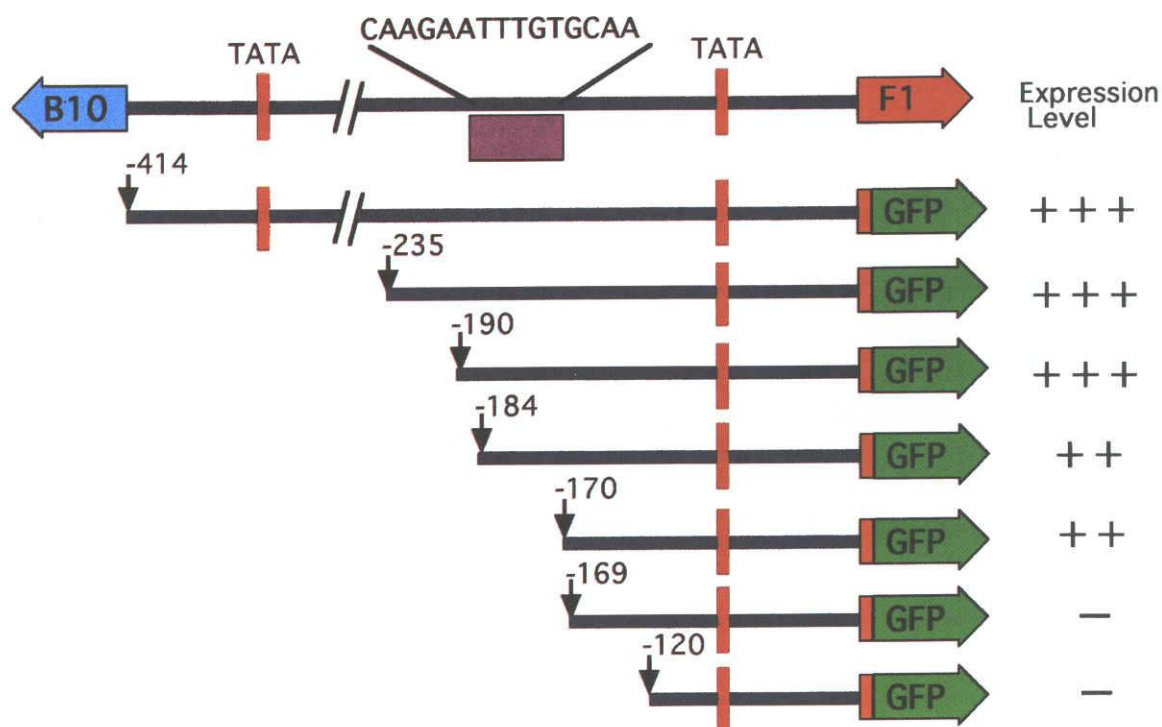
(A) ボンベキシン産生細胞の*in situ* ハイブリダイゼーション



(B) エレクトロポレーションによる GFP 融合遺伝子の導入

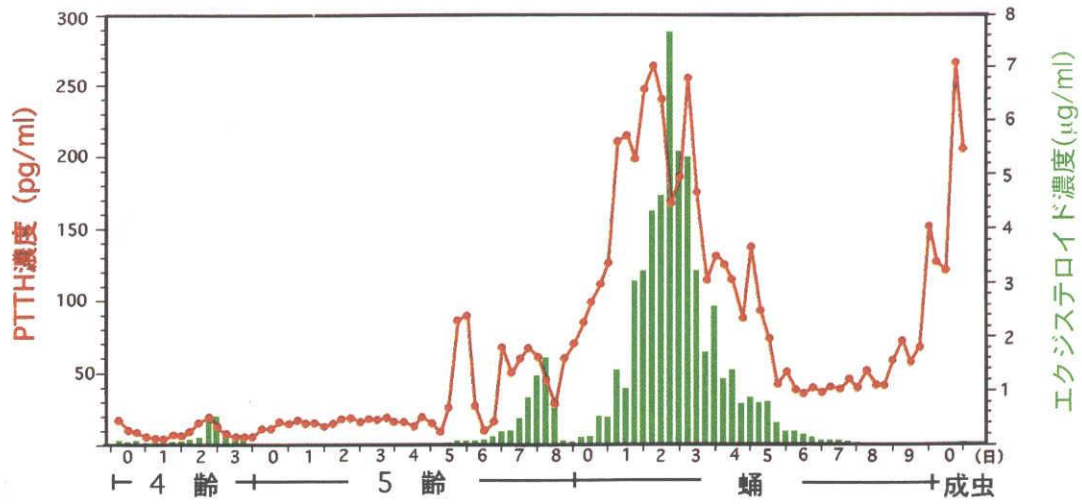


(C) ゲノム上でのボンベキシン遺伝子の構成

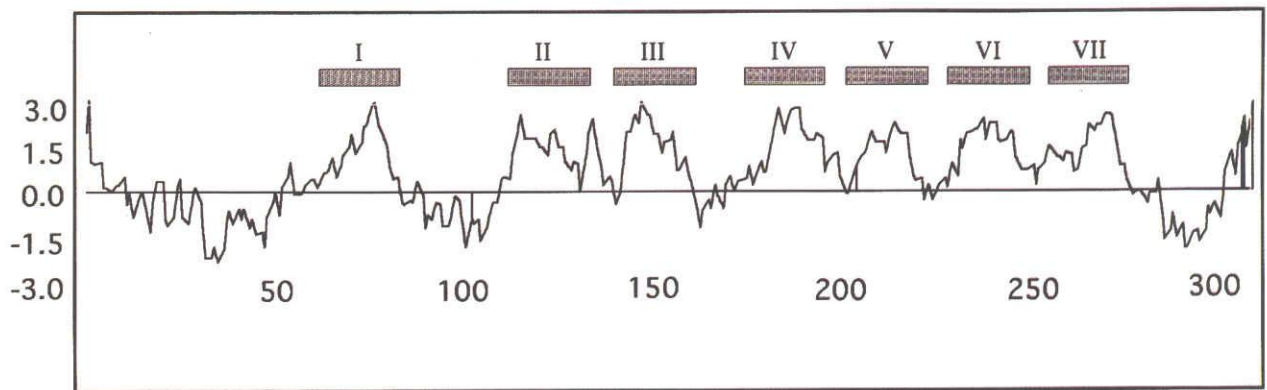


(D) 細胞特異的転写調節領域の解析

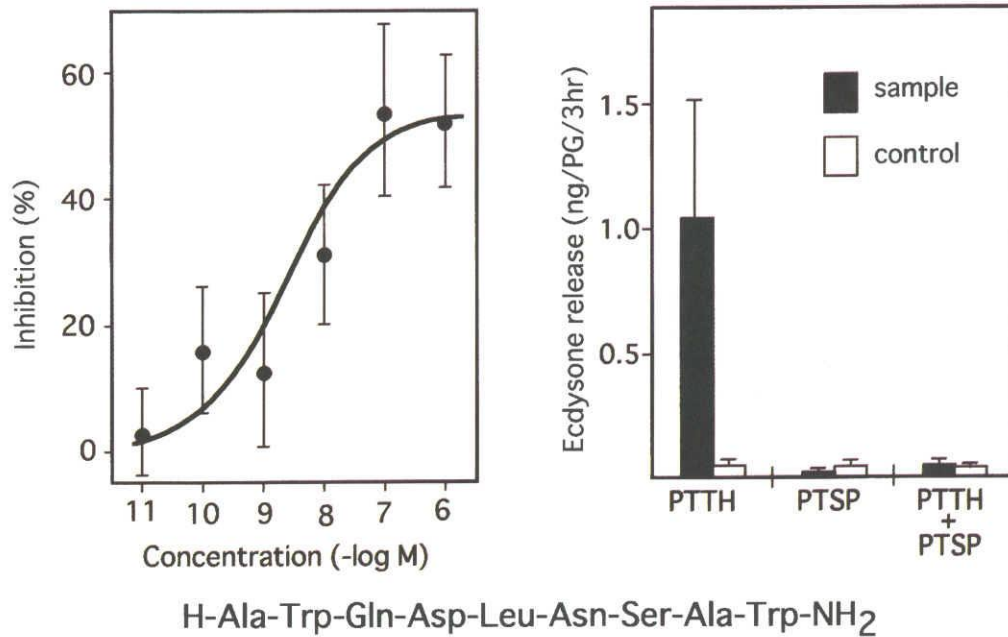
図1 ボンベキシン遺伝子の細胞特異的発現調節



(A) 前胸腺刺激ホルモン (PTTH) の血中濃度変動

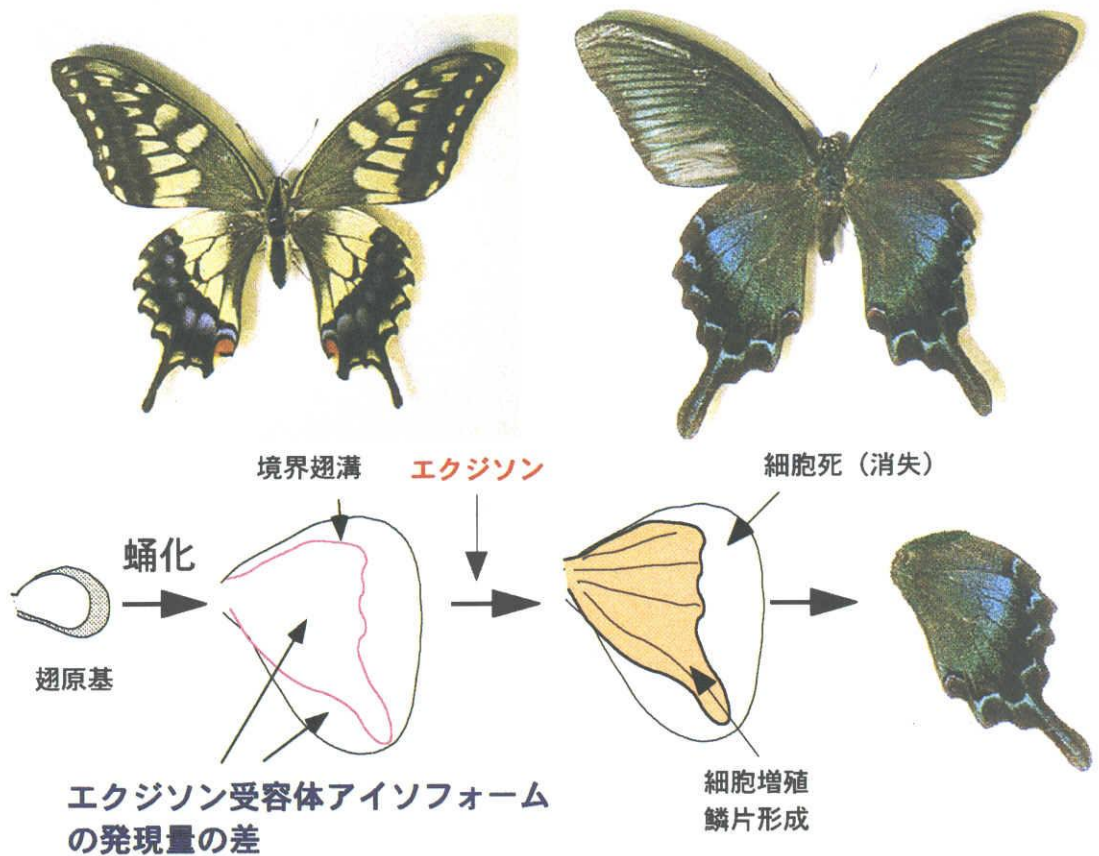


(B) PTTH受容体のハイドロパシープロファイル

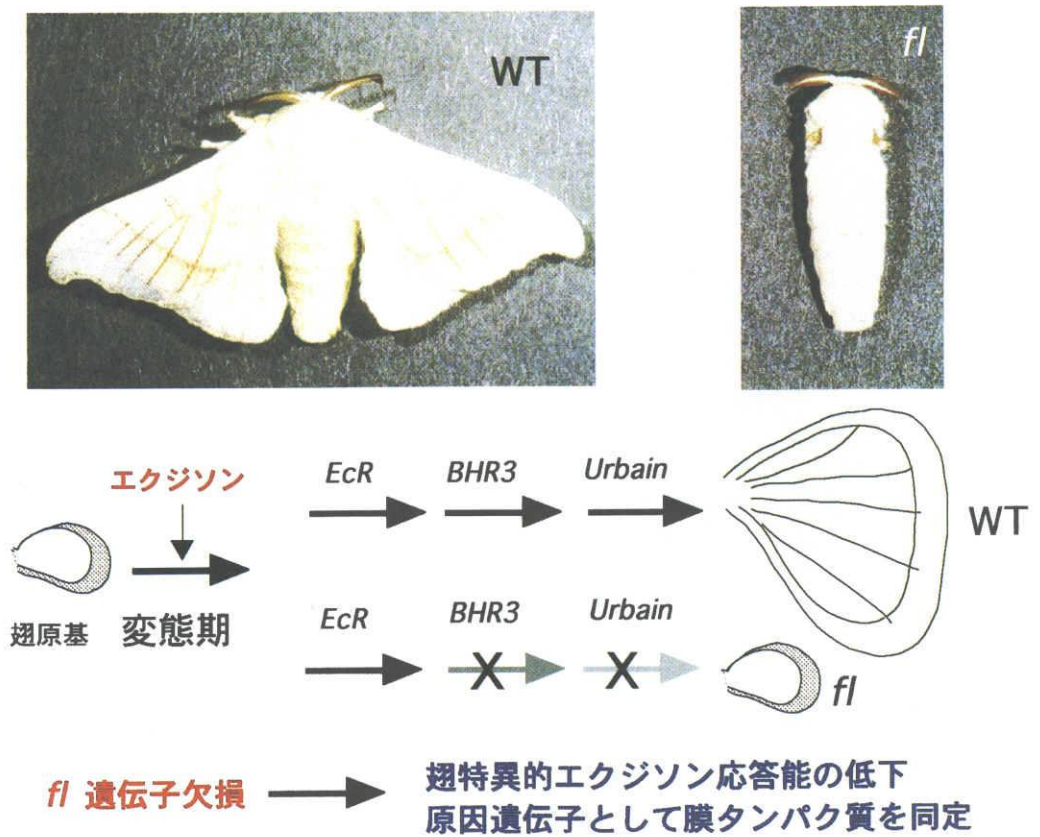


(C) 前胸腺抑制ホルモンの発見

図2 前胸腺からのエクジソン分泌の制御



(A) 鱗翅目昆虫の翅形成 (細胞増殖と細胞死)



(B) 翅だけが変態できないカイコ無翅変異体 *fl*

図3 エクジソンによる翅形成

2) 変態における自己・非自己の認識転換と形作りの分子機構

(班長 久保 健雄)

完全変態昆虫の変態期には、不要になった幼虫組織が体液細胞により非自己として認識され排除される一方で、成虫組織が新たに成虫原基から発生する。本班では、昆虫の変態を遂行する実働分子に焦点を絞り、(1) 変態における幼虫組織の識別・排除の分子機構の解明と(2) 成虫組織の発生の分子機構の解明を主要な課題として研究を遂行した。一方、(3) 社会性昆虫の行動の分子的基盤の解明についても、新たな課題として加え研究の幅を広げた。本研究を通じて、多数の独創的かつ学術的に価値ある成果が得られた。以下に代表的な研究成果を紹介する。

(1) 変態における幼虫組織の識別・排除の分子機構の解明

この課題では、幼虫組織の識別・排除機構に働く分子を生化学・分子生物学的に解析した。さらに、微生物の昆虫への感染・共生・寄生が、変態や発生にどのように影響するか検討した。

変態期の蛹では、体液細胞が幼虫組織を非自己として認識し、プロテアーゼを放出して崩壊させる。センチクバエにおいて蛹の体液細胞に特異的に発現し、EGF-like ドメインを含む新規な膜タンパク質が初めて同定され、それがスカベンジャー受容体としての活性をもつことが示され(図 4)、幼虫組織の認識・排除に働く有力な候補分子と考えられた。また、蛹の yellow body (幼虫中腸が崩壊し、成虫中腸へ変態する組織)に特異的に発現し、抗菌活性を併せ持つ新規なプロテアーゼが同定され、このタンパク質が幼虫中腸の崩壊のみでなく、腸内菌叢(normal flora)の排除に働く可能性が指摘された。これらの知見は、幼虫組織の識別・排除に関わる実働分子を同定した初めての例である。

RNA 合成阻害剤やタンパク質合成阻害剤を用いた実験から、カイコ絹糸腺のアポトーシスを引き起こすエクダイソンの作用には、遺伝子発現を伴うものと伴わないものがあることを示した。さらに、エクダイソンによる cAMP 上昇の結果から核受容体ではなく新たな膜受容体を介する可能性が示唆された。

カイコの体液性フェノール酸化酵素前駆体(proPO)カスケードの構成酵素(BAEEase)が、生体防御タンパク質を発現誘導する spaetzle をプロセスして活性化する一方で、卵にも存在し、背腹軸決定に働く *easter* と同様な機能をもつ可能性が示された。これらの知見は proPO カスケードが生体防御や胚発生に関わることを示唆しており、昆虫の発生の分子機構を考える上で非常に興味深い。

アブラムシの細胞内共生菌(ブフネラ)が、宿主に必須アミノ酸を供給することが明らかにされた。また、全ゲノム解析の結果、ブフネラは昆虫の必須アミノ酸合成系遺伝子を多く残す一方で、クエン酸回路の遺伝子をほとんど失っていることを見出した(図 5)。これらの知見はブフネラが、細胞外で生育できない完全共生菌として「アミノ酸供給性細胞内小器官」として特殊化したことを示している。また、アブラムシとの共生関係が、ブフネラの遺伝子発現に反映することも示された。本研究は、細胞内共生の分子の実体と、宿主の生育との関連を初めて示した点で極めて高い学術的価値をもつ。

(2) 成虫組織の発生の分子機構の解明

この課題では、成虫組織の発生や昆虫の器官再生に働く新規分子を同定し、一部については動物の発生全般に敷衍できるか検討した。

センチクバエ幼虫の中枢神経系を摘出し、エクダイソン存在下で *in vitro* 培養することにより、変態過程で起きる中枢神経系の再編成（幼虫神経細胞のアポトーシスと、成虫神経細胞の細胞増殖）を *in vitro* で再現することに成功した。これは、エクダイソンが直接、脳の神経細胞の運命決定に関わることを示すもので、昆虫の変態時の中枢神経系の再編成を解析する系を組み立てたものであり高く評価できる。

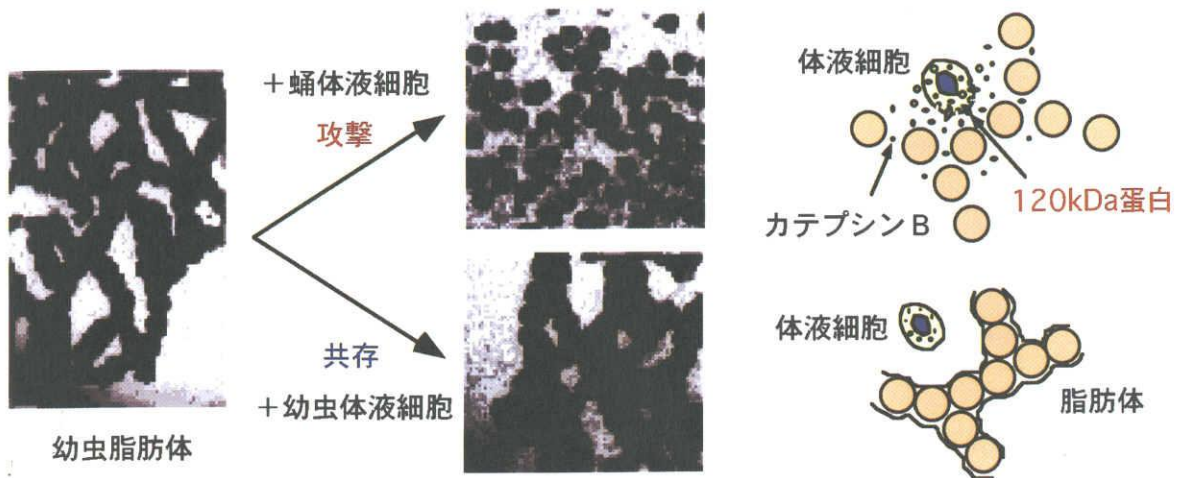
昆虫の器官再生の分子機構を解析する目的で、ワモンゴキブリの肢再生芽に発現するタンパク質を検索し、2種のC型レクチンと新規なマトリクスタンパク質（RAP, p10）が同定された。また、これらの知見を脊椎動物にも敷衍する目的で、ツメガエルでも幼生の尾再生芽に特異的に発現する遺伝子を検索し、やはり、2種の Ca^{2+} 依存性レクチンと、細胞間マトリクスタンパク質である type XVIII collagen を同定した。これらの知見は、昆虫と脊椎動物の両方に共通な器官再生の分子機構が存在することを示した最初のものである。

公募研究では、ショウジョウバエの形態形成の研究で、多くの重要な研究成果が得られた。翅形成におけるモルフォゲン（dpp）の活性調節に働く2種の新しい遺伝子（*dad*, *brinker*）を単離、複眼形成時に細胞膜結合性プロテオグリカンである Dally が、細胞増殖因子補受容体として機能すること、さらに複眼、触角、翅、肢といった主要な成虫器官のマスターコントロール遺伝子の発現を、Notch シグナリングが共通に制御していることを見出した。

(3) 社会性昆虫（ミツバチ）の社会性の分子的基盤に関する解析

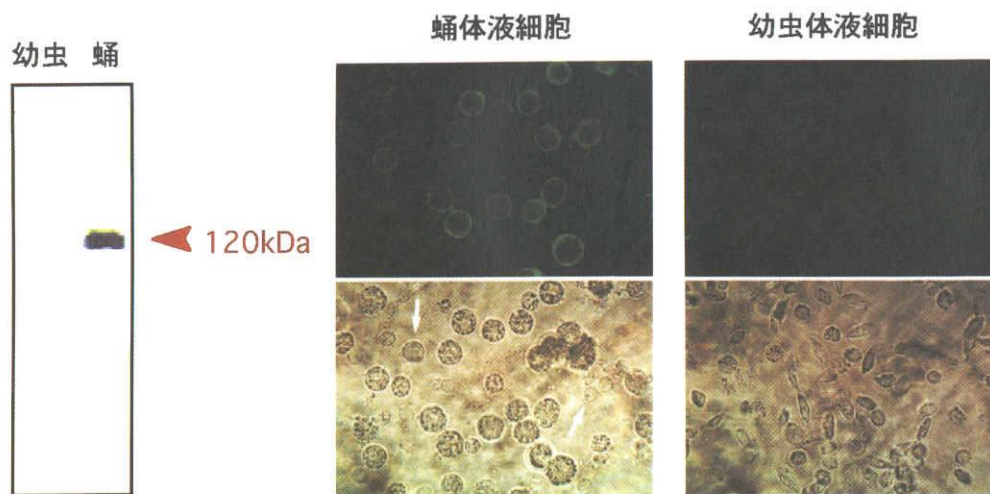
ミツバチは社会性昆虫であり、働き蜂は8字ダンスにより花の位置を教える。ミツバチの行動の分子的基盤を解明する目的で、脳の高次中枢（キノコ体）に特異的に発現する遺伝子を検索した。その結果、ミツバチのキノコ体では、 Ca^{2+} 情報伝達系の遺伝子発現が亢進し、神経可塑性が亢進している可能性を指摘した。さらに、キノコ体特異的な転写因子をコードする遺伝子（*Mbl-1*）を同定した（図6）。また、働き蜂の育児から採餌への分業に伴い、頭部分泌腺（下咽頭腺）の機能が、ローヤルゼリータンパク質から、花蜜をハチミツに加工する糖代謝酵素の合成へと転換することを示した。これらの知見は、昆虫の社会性の分子的基盤を解析した初めての例として評価できる。

この他にも多くの優れた成果が得られており、この4年間で昆虫生命科学はその面目を一新したと言って良い。本研究を通じて、昆虫の生きざまの新たな分子的側面が明らかにされた。これらの研究成果を礎に、生物多様性を指向する新しい生命科学のパラダイムの構築が可能になっており、今後の当該分野の発展に大きく寄与するものと高く評価できる。



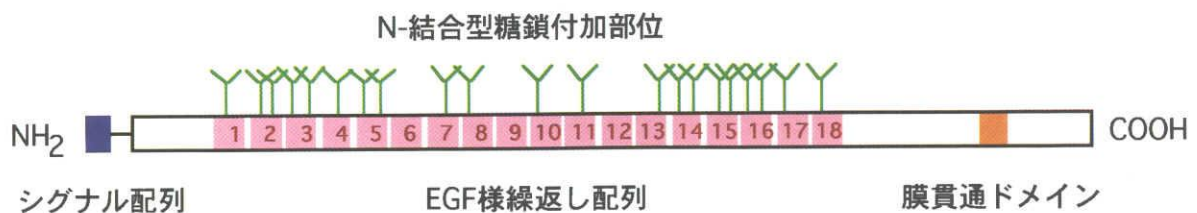
(A) 蛹体液細胞による幼虫脂肪体の崩壊

センチクバエの幼虫脂肪体を蛹体液細胞と培養すると、体液細胞がカテプシンBを放出し、脂肪体を崩壊させる。幼虫体液細胞にはこのような活性はない。



(B) 蛹体液細胞特異的なmAbが認識する抗原

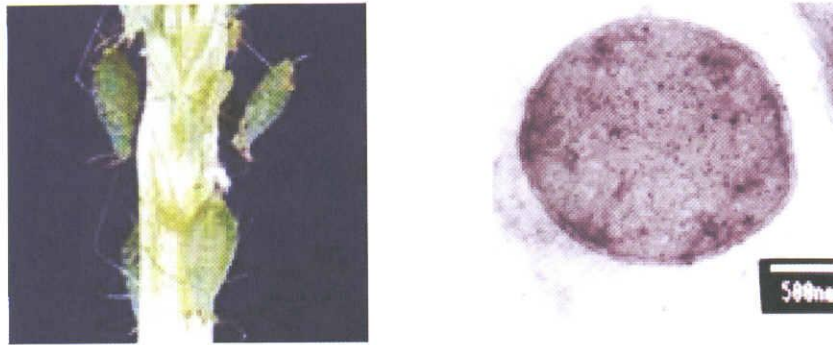
蛹体液細胞に特異的な120-kDa膜タンパク質を認識するmAbを樹立した。



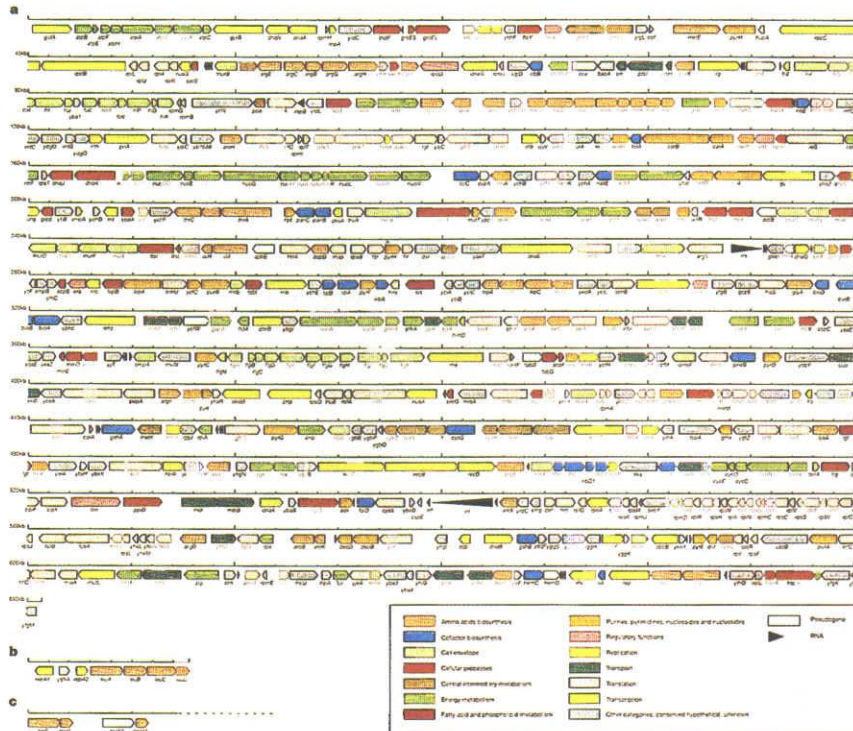
(C) 蛹体液細胞特異的な膜タンパク質の構造の模式図

120kDa膜タンパク質を精製した。cDNAの解析から、EGF様繰返し配列をもち、スキャベンジャー受容体の活性をもつ新規な膜タンパク質であることを示した。

図4 蛹体液細胞による幼虫組織（脂肪体）の崩壊



(A) 宿主のアブラムシ（左）と細胞内共生菌ブフネラ *Buchnera*（右）
アブラムシは窒素分が乏しい植物師管液を食餌とする。ブフネラは宿主の必須アミノ酸を合成する。

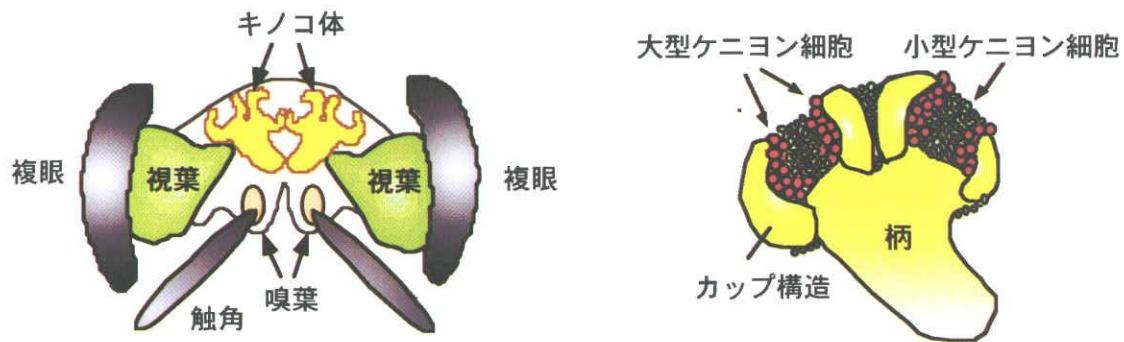


(B) ブフネラの全ゲノム解析による ORF 検索
aは染色体、b,cはプラスミド。583個のORFが存在し、ブフネラに固有なORFは4つある。

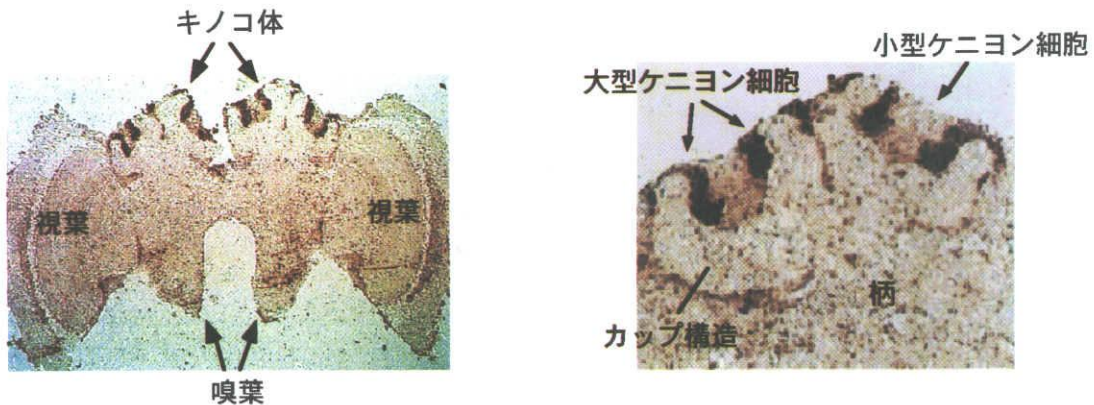
(C) ブフネラのゲノムと、その発現の特徴

- I. 大腸菌に近縁であるが、ゲノムサイズは1/7。
 - II. アブラムシの必須アミノ酸合成系の遺伝子は完全に保存されているが、非必須アミノ酸合成系の遺伝子のほとんどを失っている。
 - III. TCA回路の遺伝子群のほとんどを失っている。
 - IV. 共生関係の緊密さと遺伝子発現が相関する。
- ↓
1. 細胞内ではしか生存できない**完全共生菌**である。
 2. 「**アミノ酸供給性細胞小器官**」として進化しつつある。
 3. 宿主の生育状態と、細胞生理が関連する。

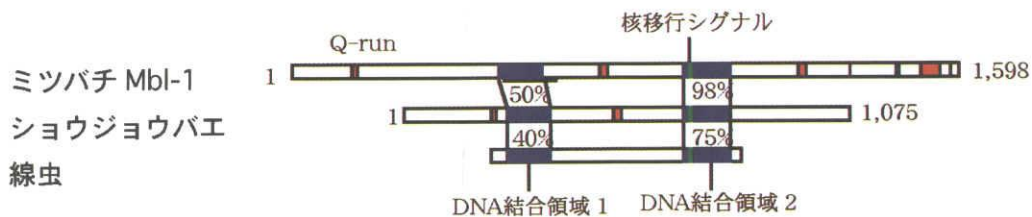
図5 アブラムシの細胞内共生菌ブフネラの遺伝子解析



(A) ミツバチの頭部と脳の模式図（左）と、左側のキノコ体の模式図（右）
ミツバチのキノコ体は顕著に発達しており、大型と小型のケニヨン細胞から構成される。



(B) 大型ケニヨン細胞特異的に発現する遺伝子、*Mbl-1*。
キノコ体特異的に発現する遺伝子を differential display 法で検索し、*Mbl-1*を得た。



(C) *Mbl-1*がコードする転写因子様タンパク質と、他の動物種におけるホモログ。



(D) *Mbl-1*の機能に関する仮説
大型ケニヨン細胞では、神経可塑性に働く遺伝子が選択的に発現する。

図6 ミツバチ脳のキノコ体の大型ケニヨン細胞特異的に発現する*Mbl-1*

4. 領域として研究を推進したうえでの問題点と対応措置

昆虫という動物種を対象とした重点領域あるいは特定領域の研究班が組織されたのは今回が初めてであり、領域研究として研究を進めたことに大きな意義を感じている。これまでも個々の研究者が高いレベルの研究を展開していたが、領域研究として「昆虫の変態・休眠の分子機構」という共通の目標を設定し、年3回の研究打合会と研究成果検討会を開催することで、班員相互の理解と新たな共同研究体制が生まれ、昆虫科学の新しいパラダイムの創設に大きく貢献した。また、大学院生を含む若手研究者に対しても公開シンポジウム、ワークショップなどを通じて、研究成果のみならず昆虫科学の新たな発展の方向性を伝えることで、本分野の人材の育成にも貢献できたと考えている。一方で、本領域研究の期間内に解決できなかった課題も残されており、昆虫科学が今後さらに発展する余地と必要性を有していることを強く認識した。具体的には、昆虫の環境受容、昆虫の社会性、昆虫と微生物の間の感染や共生の問題について、個別に新しい分野を開拓する意義や必要性を感じている。その一部は、現在、科学技術庁の COE 研究や学術振興会の未来開拓研究に継承されているが、今後、新たな研究組織の発足を計画する必要がある。

5. 今後の研究成果の取りまとめ方策

本研究班の4年間の研究成果を冊子にまとめて発刊する。このために本研究班に参加したすべての研究者から研究成果の報告書を平成12年6月末日を締切に集めた。個別研究の成果の概要を計画班長を中心にまとめ、報告書の編集を進めている。また、これらの研究成果を公表した研究論文は多数あるので、別冊にまとめることにしている。平成12年年末までには刊行し、関連した研究機関や学協会を始め関係者に配布し、今後の本領域研究の推進のための資料とする。

また、本研究成果を中心とした総説等を各種の科学月刊雑誌に投稿し、研究分野と研究成果の公表に努めている。さらに単行本として発刊することも計画している。さらに文部省学術公開研究費による「大学と科学」を活動の一貫として平成12年12月に神戸市で「昆虫から学ぶ生きる知恵」と題し、本研究の結果を広い視点から公開する。

6. 研究を取りまとめるうえでの問題点

本研究領域は課題対応として組織したので、研究者の所属は実に多くの学問分野に渡っており、限られた学問領域の研究成果として取りまとめるには困難であり、また研究成果に対する評価も分かれるところである。事実、各研究者の研究成果は多様な学術誌に公表されているので、本研究班全体の成果や研究動向を関知する点で弱点を残している。

また、昆虫の変態・休眠に特化した大型研究プロジェクトの推進は世界的にも極めて先進的であり、外国研究者の期待するところである。国際的な視点からのまとめと、その発信をどうするかについては今後検討すべきところである。

神経ペプチド受容体に関する研究

片岡宏誌（東京大学大学院新領域創成科学研究科）

1. 目的

昆虫の変態・休眠は脳および神経節で産生される数多くの神経ペプチドによってコントロールされている。1990年代前半までに変態・休眠に関わる主要な神経ペプチド類の化学構造、遺伝子構造が明らかとなり、抗体やDNAプローブを用いた産生細胞の同定、さらに日長変化や昆虫の発育等の体内外の環境変化による神経ペプチド遺伝子の発現や体内動態について解析が進められている。一方、これら神経ペプチドの情報を受容し、細胞の機能を変化させるための最初のステップである受容体については、これまでほとんど解析が進められていなかった。また、神経ペプチドの多くは昆虫の発育段階の特定の時期にのみ作用を示すことから受容体レベルでの神経ペプチドの作用調節機構が存在することが予想されている。

本研究は変態・休眠に関わる神経ペプチド類の受容体の構造を明らかにするとともに、日長変化や昆虫の発育等の環境により神経ペプチドの作用が受容体レベルでいかにコントロールされているかを明らかにすることを目的とする。具体的には

- (1) 前胸腺からのエクジソン分泌を促進する前胸腺刺激ホルモン（PTTH）受容体を明らかにし、受容体レベルでのエクジソン合成・分泌調節機構を解明する。
- (2) 変態の調節に関わると思われるインスリン族ペプチド、ボンビキシン受容体を明らかにする。また、受容体の発現組織、発現時期などの解析からボンビキシンの生理作用を解明する。
- (3) C末端がFXPRL-アミドという共通の構造をもち、同一の遺伝子にコードされている休眠ホルモン（DH）および性フェロモン生合成活性化神経ペプチド（PBAN）に対する受容体を明らかにし、FXPRL-アミド型神経ペプチドの作用の多様性と受容体の関係を解明する。
- (4) 変態・休眠に関わる新規神経ペプチドについてその構造と作用機構を明らかにする。
- (5) 遺伝子の相同性を利用し、カイコ以外の昆虫についても神経ペプチド類の構造を明らかにする。

2. 方法と結果

(1) PTTH受容体について

5齢吐糸直前のカイコ幼虫から摘出した前胸腺500対を材料として、プラスミドpME18SをベクターとするcDNAライブラリーを作製した。作製したライブラリーは 5.2×10^6 のサイズをもち、1.5kbp以上のインサートが95%以上の割合で含まれており、PTTH受容体のスクリーニングに適当であると考えられた。

次に、(A)FITC-PTTHとの結合活性を指標にFACSを利用した濃縮、(B)PTTHを結合後、抗PTTH抗体およびmagnetic beadsが結合した抗ウサギIgG抗体を利用した濃縮、により

PTTH受容体遺伝子のクローニングを試みた。(A) FITC-PTTHを用いたFACSによるPTTH受容体遺伝子のクローニングでは、構築したcDNAライブラリー約100万クローン分をCOS7細胞に導入し、2日間培養後、FITC-PTTHと混合し、FACSを用いて蛍光強度の強い細胞を回収した。回収した細胞からプラスミドを抽出し、大腸菌内で増幅させた。増幅したプラスミドを再びCOS7細胞に形質転換し、FITC-PTTHと結合した細胞をFACSで回収した。この操作を数回繰り返すことにより、約1.4kbpのcDNAが濃縮された。濃縮されたcDNAを有する12クローンについて配列を確認したところ、11クローンが同一の配列を有していた。一方、(B)の抗PTTH抗体および抗ウサギIgG抗体-magnetic beadsを用いたクローニングでは、(A)と同様、cDNAライブラリーを形質導入したCOS7細胞にPTTH、一定時間後にPTTH抗体を加え培養した。この細胞に抗ウサギIgG抗体が結合したmagnetic beadsを加え、磁石に吸着する細胞を回収した。回収した細胞からプラスミドを抽出し、大腸菌内で増幅後、再びCOS7細胞に形質導入した。この操作を5回繰り返すことで約1.4kbpのcDNAが濃縮された。(A)で得られたDNAをプローブとしてサザンハイブリダイゼーションを行ったところ、調べた12クローンのうち、9クローンが同一のものと考えられた。

(A)および(B)で得られた複数のクローンについて配列分析を行ったところ、5'側が17bp短いものを含む2種類のクローンが存在していたが、途中の配列は両者で同一であった。得られた配列は1,370bpからなり、3'にポリA付加シグナル、それに続き、ポリAが付加されていた。また、翻訳領域は307アミノ酸からなり、疎水性領域（膜貫通領域と思われる）が7カ所存在した（図-1）。したがって、得られたPTTH受容体は、いわゆる膜7回貫通型受容体であると推定された。

(2) ボンビキシン受容体について

RT-PCRで増幅されたインスリン受容体のチロシンキナーゼ領域と非常に相同性の高い配列を元にBM-N4細胞から調製したcDNAライブラリーのスクリーニング、5'-および3'-RACEなどを行い、ボンビキシン受容体と思われる遺伝子の全構造を明らかにした。この遺伝子から推定されるボンビキシン受容体およびインスリン受容体の模式図で示した（図-2）。ボンビキシン受容体はインスリン受容体と同様、 α サブユニットと β サブユニットが一つの遺伝子上にコードされており、その境界にKVKRというプロセッシング部位が存在している。また、 α サブユニットにはシステインに富む領域が、 β サブユニットには膜貫通領域とともにチロシンキナーゼ領域が存在しており、基本的な構造はインスリン受容体と同じであった。この受容体が真のボンビキシン受容体であることを確認するため、COS7細胞およびバキュロウィルスを用いてBM-N4細胞に発現させ、放射性ボンビキシンとの結合実験およびボンビキシン刺激による自己リン酸化実験を行ったが、現在までいずれもポジティブな結果は得られていない。また、RACE法で増幅した複数の塩基配列およびゲノム遺伝子の塩基配列の解析からalternative splicingにより少なくとも2種類の受容体タンパクが合成されていると考えられた。

一方、RT-PCRによりボンビキシン受容体の発現を調べたところ、卵巣、脳、脂肪体、絹糸腺など、様々な組織で発現していることが明らかとなった。また、発現量が多かった卵巣についてノーザンブロッティングを行ったところ、上簇期、蛹0、3日目では約10kbの単一なバンドが検出されたが、蛹6日以降ではバンドはほとんど検出されなかった。

また、ボンビキシンの生理作用を解明する一環として、蛹脱皮直前のカイコ終齢幼虫から抽出した脂肪体をボンビキシンを含む培養液中で12時間培養し、この培養液からマグネシウム-ヘパリン沈澱法でリポプロテイン画分を精製してSDS-PAGEで分析した。ボンビキシンを添加していない対照区に比べ、3種類のリポプロテインと思われるタンパク質の分泌が誘導されることが明らかとなった。また、異なる発育段階の脂肪体を用いて同様の実験を行ったところ、ボンビキシンによるリポプロテインの分泌誘導は血液中のエクジソン濃度が高くなる蛹脱皮直前から起こることが明らかとなった。

(3) PBAN/DH受容体について

約1,300頭の雌成虫のフェロモン腺から調製したmRNAを用いて、プラスミドpME18SをベクターとするcDNAライブラリーを作製した。作製したライブラリーは 2.0×10^7 のサイズをもち、平均1.2kbpのインサートが95%以上の割合で含まれていた。現在、FITCで標識したPBANとの結合を指標にFACSを用いたスクリーニングを行っている。また、蛹期の卵巣を集め、cDNAライブラリー作製の準備を進めている。

(4) 変態・休眠に関わる新規神経ペプチドについて

農水省蚕昆研との共同研究で、前胸腺からのエクジソン分泌を抑制する前胸腺抑制ペプチド (PTSP) を単離した。このペプチドはC末端がアミド化された9残基のペプチドであり、タバコスズメガから筋収縮抑制活性を指標に単離されたペプチドと同一であった。PTSPは単独で前胸腺からのエクジソン分泌を抑制するばかりでなく、PTTHと共存すると濃度依存的にPTTHによるエクジソン分泌促進活性を抑制することが分かった。一方、前胸腺内のcAMP濃度を上昇させる因子は逆相HPLCでPTTHとは明確に分離できることが分かり、この因子を単離するために大量の脳を現在集めている。

(5) 遺伝子の相同性を利用した神経ペプチド類のクローニング

カイコPTTHとの相同性を利用し、エビガラスズメおよびタバコスズメガからPTTH遺伝子をクローニングした。さらに、大腸菌を用いた大量発現、活性型ダイマーへの再構成を行い、各々の昆虫でPTTHとして機能することを確かめた。また、ショウジョウバエからのPTTHのクローニングのため、PCR、脳cDNAライブラリーのスクリーニング、ゲノムライブラリーのスクリーニングを行ったが、鱗翅目昆虫のPTTHと相同性のある遺伝子は得られなかった。

3. 考察

発現クローニング法により遺伝子側から明らかになったPTTH受容体はいわゆる膜7回貫通型のG-タンパク質共役型受容体であった。また、このPTTH受容体と相同性がある遺伝子がショウジョウバエ、マウス、センチュウなどのDNAデータベースに登録されていた。これらは機能未知の受容体タンパク質として登録されており、これら受容体のリガンドがいかなるペプチドであるのか、また、そのペプチドがいかなる機能を有しているのか興味を持たれる。PTTHは他の動物のペプチドホルモンとは相同性が無く、さらに同じ鱗

翅目昆虫の間でも50%程度の相同性しか示さず、鱗翅目以外の昆虫から相同性を利用したPTTHのクローニングは困難を極めていることから、相同性がある受容体が存在していることは今後の研究の進展に期待が持てる。

一方、ボンビキシン受容体についてはインスリン受容体との相同性をもとに受容体候補遺伝子のクローニングに成功した。しかし、この受容体候補タンパク質が真にボンビキシン受容体であるとの実験的データは得られなかった。その理由として、この候補遺伝子を哺乳類細胞などで高発現した場合、翻訳後のプロセッシング、または二量体化がうまくいかず、ボンビキシンとの結合や自己リン酸化が観察できなかったと予想されるが、この候補遺伝子以外にボンビキシン受容体が存在していることも考えられる。

その他の神経ペプチド受容体については今のところクローニングに成功していないが、PTTH受容体の発現クローニングに成功するまでに確立した、少量の組織からのcDNAライブラリー構築技術、様々なスクリーニング法を駆使することで近い将来成功するものと確信している。

変態・休眠に関わる新規神経ペプチドとして、前胸腺からのエクジソン分泌を抑制するPTSPを単離・構造決定したが、このPTSPが実際に生体内で作用していることを今後確かめる必要がある。また、PTSP受容体や前胸腺内cAMP上昇因子を明らかにすることで、PTTHとの協調作用による前胸腺からのエクジソン分泌調節機構を解明できるものと考えている。

また、蛹休眠におけるPTTHの役割を明らかにするためにエビガラスズメ、タバコスズメガからのPTTH遺伝子のクローニングと活性型レコンビナントPTTHの調製に成功した。今後PTTH受容体のクローニングを進め、PTTHによる蛹休眠の制御機構解明を目指す。

4. 自己評価と今後の方策

本研究での最大の成果はPTTH受容体のクローニングである。本特定領域研究が発足する以前から準備を進めていたが、前胸腺という微小な組織から、効率良く、しかも質の高いcDNAライブラリーを構築することが難しく、PTTH受容体のクローニングに最終年度までかかってしまった。そのため当初計画した、日長変化や昆虫の発育等の環境による神経ペプチドの受容体レベルでの変態・休眠調節機構を十分に解析する時間がなかった。これらについては今後引き続き解析を進める予定である。しかし、この間に蓄積した実験技術は今後他の神経ペプチド受容体のクローニングに大いに生かせるものと考えている。

一方、変態・休眠に関わる新規神経ペプチドとしてPTSPの単離・構造解析に成功したのは予想外の結果であった。この成果は農水省蚕昆研との共同研究によって得られたが、今後、前胸腺からのエクジソン分泌の調節機構を考える上で非常に重要な神経ペプチドであると思われる。また、エビガラスズメやタバコスズメガPTTHなど、今後蛹休眠など個々の昆虫に特徴的な変態・休眠現象を追求するための重要な分子プローブを得られたことで今後の研究の発展が期待される。

5. 図・表

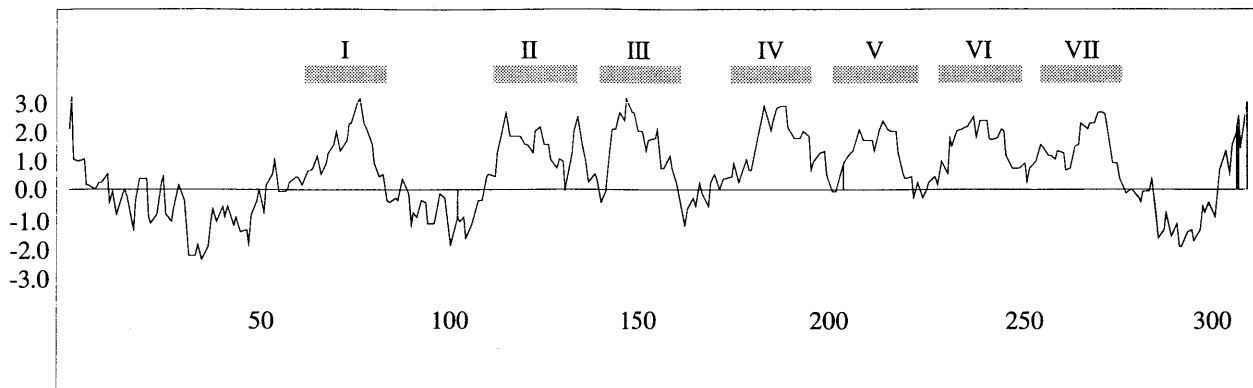


図-1 PTTH受容体のハイドロパシープロット

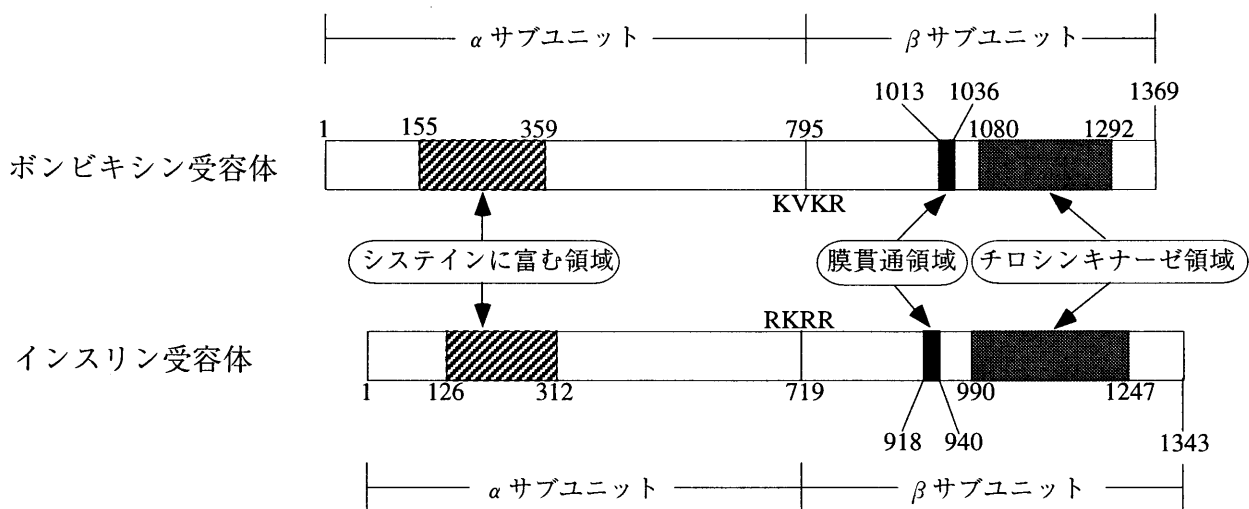


図-2 ボンビキシン受容体前駆体とインスリン受容体前駆体の模式図

代表的な発表論文

S. G. Dedos, H. Fugo and H. Kataoka (1998) A new cerebral factor stimulates IP_3 levels in the prothoracic glands of *Bombyx mori*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 28, 767-774.

S. G. Dedos, H. Fugo, S. Nagata, M. Takamiya and H. Kataoka (1999) Differences between recombinant PTTH and crude brain extracts in cAMP-mediated ecdysteroid secretion from the prothoracic glands of the silkworm, *Bombyx mori*. *Journal of Insect Physiology*, 45, 415-422.

S. D. Ha, S. Nagata, A. Suzuki and H. Kataoka (1999) Isolation and structure determination of a paralytic peptide from the hemolymph of *Bombyx mori*. *Peptides*, 20, 561-568.

Y.-J. Hua, Y. Tanaka, K. Nakamura, M. Sakakibara and H. Kataoka (1999) Identification of a prothoracicostatic peptide (PTSP) from the larval brain of the silkworm, *Bombyx mori*. *Journal of Biological Chemistry*, 274, 31169-31173.

K. Nagata, K. Maruyama, K. Kojima, M. Yamamoto, M. Tanaka, H. Kataoka, H. Nagasawa, A. Isogai, H. Ishizaki and A. Suzuki (1999) Prothoracicotropic Activity of SBRPs, the insulin-like peptides of the Saturniid silkworm *Samia cynthia ricini*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 266, 575-578.

昆虫の脳神経ペプチドホルモン（前胸腺刺激ホルモン）の分泌調節機構

相菌 泰生（神戸大学農学部生物機能化学科）

1. 目的

昆虫は、そのライフサイクルにおいて、形態的、生理的な変化をともなう脱皮・変態を営む。この脱皮・変態は、末梢ホルモンであるエクジソンと幼若ホルモンによって調節制御されるが、両ホルモンの分泌は、脳の神経分泌細胞から分泌される神経ペプチドホルモンによって支配されている。このうち、前胸腺によるエクジソン分泌は、前胸腺刺激ホルモン（Prothoracicotropic Hormone : PTTH）により調節制御されていることは周知の事実である。従って、脱皮・変態は分泌された PTTH により誘起される末端的生理現象と言えるが、PTTH の体液中への分泌にはリズムが観察されることから、神経分泌細胞に対する何らかの情報伝達が関与していることは容易に推測できるにもかかわらず、その実態は未知のまま残された課題であった。そこで、神経分泌細胞による PTTH 分泌を調節する化学物質の同定とこの物質にによって誘導される細胞内シグナル伝達系の解明を当面の研究目的とした。まず、PTTH を生合成・分泌する脳神経分泌細胞が存在する脳-側心体-アラタ体（脳複合器官）を用いて、PTTH の分泌を促進する神経伝達物質を検索した。次いで、有効な神経伝達物質として見出されたアセチルコリン（Ach）が誘起する PTTH 分泌促進に関与する細胞内シグナル伝達系を解明するため、薬理学的方法を駆使して、アセチルコリン受容体（AchR）のサブタイプの同定、及びこの受容体により誘導される細胞内シグナル伝達に関与する機能タンパク質の解析を行った。他方、この AchR と PTTH に対する特異抗体を用いた脳複合器官の免疫組織化学ケイ光二重染色を行うことで PTTH 分泌促進が、Ach の PTTH 産生神経分泌細胞に対する直接的作用によるものか否かを検討した。さらに、このシグナル伝達系でリン酸化されるタンパク質分子の検出及びその機能の解析によって、低分子量 GTP 結合タンパク質（small molecular weight GTP binding protein: sGTP-BP）が重要な役割を果たしている可能性が示唆されたので、その詳細を検討するため、カイコの脳から sGTP-BP の cDNA のクローニングを行い、発現タンパク質分子の特性を解析した。

一方、エビガラスズメでは、PTTH の分泌抑制により蛹の休眠が誘導され、また、その分泌により休眠蛹が覚醒することが推定されている。従って、この休眠蛹における覚醒は、PTTH 分泌調節の分子機構の研究にとって格好の題材といえる。そこで、この分子機構にアプローチするため、エビガラスズメ休眠蛹における神経内分泌カスケード（神経分泌細胞による PTTH 分泌と、分泌された PTTH の刺激による前胸腺のエクダイソン分泌）の覚醒への関与、及び神経伝達物質による PTTH 分泌調節を検討した。

2. 方法

試料としたカイコ幼虫（雄）は、25℃、明 12h/暗 12h の条件下で、人工飼料を用いて飼育し、適時、脳複合器官の摘出及び体液の採取を行い実験に供した。分泌された PTTH の力価は、in vitro において PTTH の刺激によりカイコ幼虫（5 令 6 日目）の前胸腺から分泌されるエクダイソン量を RIA で測定することにより間接的に評価した。

他方、エビガラスズメの休眠蛹の覚醒へ関与する神経内分泌カスケードの検討には、休

眠蛹（蚕糸昆虫農業技術研究所で作製）を、全暗下、10℃で60日間低温処理した後、覚醒条件（明16h/暗8h、28℃）へ移し適時実験に供した。また、神経伝達物質による休眠蛹のPTTH分泌調節に関する実験には、休眠蛹へ試薬を投与するか、或るいは摘出脳複合器官を試薬溶液中でインキュベートした。PTTH-titerは5令3日目の幼虫の前胸腺を用いたBioassayにより評価した。また、前胸腺より分泌されたエクジステロイド量はRIAにより測定した。

3. 結果と考察

1) カイコにおける前胸腺刺激ホルモン（PTTH）の分泌調節機構

幼虫（5令3日目）から摘出した脳複合器官によるPTTHの分泌に対する神経伝達物質の効果を灌流システムで検討し、1mMのカルバコール（Ach-agonist）及びセロトニン（5-HT）が、*in vitro*で特異的にPTTHの分泌を促進することを見出した。この際、カルバコールによる分泌促進が5分以内に誘導されたのに比べ、5-HTによる誘導には20分を要した。このことから、神経細胞と神経分泌細胞間の情報伝達において、カルバコールの方が5-HTよりもPTTH産生神経分泌細胞に近い上流にあることが予測された。また、このPTTH分泌が、ムスカリン（Ach-agonist）により促進され、アトロピン（muscarinic Ach-antagonist）によって特異的に阻害されたことから、PTTH分泌に、ムスカリン性Ach受容体（mAChR）を介する細胞内シグナル伝達機構系の関与が示唆された。そこで、ムスカリンのPTTH産生神経分泌細胞に対する作用が、直接か間接かを、抗-mAChR-抗体と抗-PTTH-抗体を用いた脳複合器官の免疫組織化学ケイ光二重染色で調べ、mAChRがPTTH産生神経分泌細胞に発現されていることを認めた。この結果から、AchがPTTH産生神経分泌細胞表層のmAChRに直接作用して細胞内シグナル伝達を誘起することによりPTTHの分泌を促進することが推定された。

次いで、このシグナル伝達の詳細を明らかにするため、種々の阻害剤と促進剤の脳複合器官によるPTTH分泌促進に対する影響を薬理学的方法により解析し、図1に示すようなシグナル伝達系がPTTH分泌に関与していることを推定した。PTTH分泌は、Phospholipase C (PLC) の阻害剤であるNCDC (2-amino-4-carboxyphenyl-N, N-diphenyl-carbamate)、Protein kinase C (PKC) の阻害剤であるCalphostin C 及びCalmodulin antagonistであるW-7 [N-(6-aminohexyl)-5-Chloro-1-naphthalene-sulfonamide] により特異的に阻害され、GTP γ S によって促進された。しかし、Calphostin C、或るいは、W-7単独の作用でPTTH分泌が抑制されることから、この系において、PKCとCa/Calmodulin dependent protein kinase (CaM-K) の両方のprotein kinaseによるタンパク質のリン酸化が必須であることが明らかになった。従って、この系でリン酸化されるタンパク質をSDS-PAGEとラジオオートグラフィーにより解析した。その結果、32kDと21kDのタンパク質がCaM-Kにより、また、25kDのタンパク質がprotein kinase Cにより特異的にリン酸化されることを示すとともに、この25kDのリン酸化タンパク質の機能としてGTP結合活性を認めた。このうち、25kDと21kDのリン酸化タンパク質は、PTTH産生神経分泌細胞の軸索末端が位置するアラタ体に局在していることを確認した。

他方、GTP非置換性のGDP β Sと、非水解性のGTP γ SのPTTH分泌に対する効果を検討し、このシグナル伝達系で、sGTP-BPが生理的に重要な役割を果たしている可能性

を見出した。そこで、sGTP-BP の分子機能を明らかにするため、カイコ幼虫の脳から作製された cDNA ライブラリーから、Rab-family に属する sGTP-BP の cDNA をクローン化し、その塩基配列を決定した。次いで、大腸菌でこの遺伝子を発現させた後、精製を行った。精製蛋白質 (BRab) は、分子量 25kD で、GTP に対する結合定数 ; $K_a = 1.5 \times 10^6 \text{M}^{-1}$ 、GDP に対する結合定数 ; $K_a = 0.58 \times 10^6 \text{M}^{-1}$ 、GTPase 活性 : 5mmole/min/mole of BRab を示した。さらに、この蛋白質に結合した [^3H]-GDP の GTP γ S 及び GDP による置換速度を測定したところ、それぞれ $k(\text{ex}) = 8.9 \text{mmole/min/mole of BRab}$ と $k(\text{ex}) = 7.7 \text{mmole/min/mole of BRab}$ であった。この結果から、この蛋白質は GTP にたいし高い親和性を有す sGTP-BP であることが明らかになった。

一方、PTTH 分泌調節について、Ach に対する脳複合器官の PTTH 分泌応答能が、5 令幼虫～蛹期の期間中に変動することを新たに見出した。このことは、PTTH 産生神経分泌細胞における mAChR の機能、mAChR の発現量、シグナル伝達系、顆粒開口分泌などが成長時期により異なった調節制御を受けていることを示唆するもので興味深い生理現象である。

さらに、マウス抗-BRab 抗体を作製し、この抗体とウサギ抗-PTTH 抗体を併用して、5 令幼虫の脳複合器官切片の免疫ケイ光二重染色を行い、PTTH 産生神経分泌細胞の PTTH 分泌サイトである軸索末端に PTTH と BRab が共存していることを確認した。他方、コリン作動性ニューロンのマーカーである Cholineacetyl transferase (*D.melanogaster* 由来) の C-末端アミノ酸配列に対する特異抗体を作製して、5 令幼虫の脳を免疫組織化学染色したところ神経分泌細胞の樹状突起が存在するニューロパイル部に点～短線状の分布が認められた。これらの結果から、PTTH 産生神経分泌細胞は、Ach による刺激をニューロパイルに位置する樹状突起の mAChR で受容した後、BRab が関与するシグナル伝達系を介してアラタ体に伸びた軸索の末端から PTTH を分泌することが示唆された。

2) エピガラスズメの休眠蛹における前胸腺刺激ホルモンの分泌調節機構

まず、エピガラスズメ休眠蛹の覚醒を誘起する神経内分泌カスケードの神経伝達物質による調節を検討した。全暗で低温処理された休眠蛹は、明 16h/暗 8h、28℃の覚醒条件下、15～16 日で成虫化した。この期間中の、体液中エクジステロイドのレベルと PTTH-titer の変動を解析した。図 2 に示すように、エクジステロイドのレベルは、5～9 日目に亘って単一のピークを示したのに対し、PTTH-titer は、1～3 日目と、5～9 日目に 2 つのピークを示し、2 つのフェイズに分れて分泌されていることが認められた。さらに、この PTTH-titer の変動に対応する脳複合器官の神経伝達物質に対する応答能を検討し、5-HT に対して 1～2 日目と 5 日目の脳複合器官が、カルバコールに対しては、4 日目と 7 日目の脳複合器官が応答して PTTH を分泌する能力を保持していることを認めた。この実験で、体液中への PTTH の分泌が 2 つのフェイズに分画されているにもかかわらず、第 1 フェイズの分泌時期にはエクジステロイドは分泌されず、しかも、この時期の脳複合器官が、5-HT だけに特異的に応答する興味深い事実が認められた。そこで、MLD7222 (5-HT antagonist) を第 1 フェイズの蛹に投与することで休眠覚醒への影響を調べた。その結果、第 1 フェイズの PTTH 分泌は抑制され、これにともない、図 3a, b に示すように、エクジステロイドの分泌は遅れ、ひいては成虫化も遅延する事が認められた。しかし、第 2 フェ

イズ（5～9日目）にMDL72222、或るいはアトロピン（Ach antagonist）を個別に投与しても、エクジステロイドの分泌と成虫化の時期に何ら影響を及ぼさないことが認められた。以上の実験で、エビガラスズメ休眠蛹の覚醒に神経内分泌カスケードが関与していること、及びこのカスケードは、神経伝達物質により上位支配され、特に、5-HTにより誘導される第1フェイズのPTTH分泌が、休眠覚醒にとって生理的に重要であることが示唆された。

4. 研究成果にたいする自己評価と今後の方策

カイコの脳神経分泌細胞によるPTTH分泌において、(1) 神経伝達物質の一種であるAchが直接神経分泌細胞のmAChRを介した細胞内シグナル伝達を誘導することで分泌を促進すること(2) このシグナル伝達に、heterotrimeric GTP-BPとsGTP-BPが関与すること(3) 2種の蛋白質リン酸化酵素（PKC, CaM-K）が関与することが必須であり、PKCがリン酸化する25kDの蛋白質がGTP結合活性を示すことなどを初めて見出した。これらの研究成果は、当初の目的と計画を達成し得たものとして、評価に値すると考えている。今後、このシグナル伝達機構をより詳細に解明するため、(1)カイコ脳のProtein kinaseの精製、(2) 神経分泌細胞内の小胞輸送や分泌顆粒のエキソサイトーシスに関与するRab-family sGTP-BP遺伝子群のクローニングと発現、(3) 発現蛋白質のリン酸化とリン酸化による機能制御、(4) エフェクター蛋白質の検索と相互作用などを解析することが必要である。

エビガラスズメ休眠蛹の覚醒誘導における第1フェーズのPTTH分泌について、(1) 5-HTによるPTTHの分泌調節機構、(2) 休眠蛹覚醒における生理的意義、(3) PTTH遺伝子の発現調節との関連などが残された重要な課題である。

5. 発表論文

原著論文：

Y.Aizono, Y.Endo, D.B.Sattelle, and Y.Shirai (1997) Prothoracicotrophic hormone-producing neurosecretory cells in the silkworm, *Bombyx mori*, express a muscarinic acetylcholinereceptor. *Brain Research*, 763, 131-136.

Y.Shirai, M.Sumida and Y.Aizono (1997) Carbachol induced protein phosphorylation in the brain-corpus cardiacun-corpus allatum complex of silkworm, *Bombyx mori*. *Applied Entomology and Zoology*, 32, 573-581.

Y.Shirai, T.Uno and Y.Aizono (1998) Small GTP-binding proteins in the brain-corpus cardiacun-corpus allatum complex of silkworm, *Bombyx mori*: Involvement in the secretion of prothoracicotrophic hormone. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 38, 177-184.

T.Uno, M.Ueno, A.Nakajima, Y.Shirai and Y.Aizono (1998) Molecular cloning of cDNA for BRab from the brain of *Bombyx mori* and biochemical properties of BRab expressed in *Escherichia coli*. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 62, 1885-1891.

Y.Jiang, K.Kiguchi and Y.Aizono (1999) Neuroendocrine cascade involved in molting and metamorphosis in the sweet potato hornworm, *Agrius convolvuli*. *Journal of Sericultural Science of Japan*, 68, 387-395.

著書：

相菌泰生、白井康仁(1998) 神経ペプチドホルモンの分泌調節：カイコの前胸腺刺激ホルモン。ホルモンの分子生物学—8「無脊椎動物のホルモン」(日本内分泌学会編)、149-172. 学会出版センター

6. 図と説明

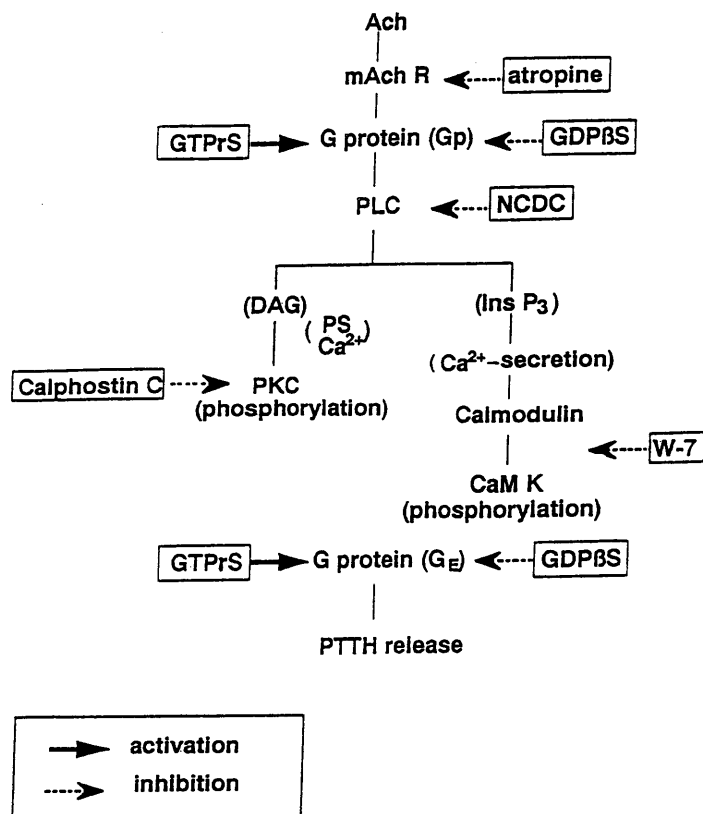


図 1. アセチルコリンにより誘導される PTTH 分泌に関するシグナル伝達機構

G protein (Gp) : heterotrimeric GTP binding protein, G protein (Gp) : small molecular weight GTP-binding protein, PLC : phospholipase C, DAG : diacyl-glyceride, Ins P₃ : inositol 3-phosphate, NCDC : phospholipase C inhibitor, Calphostin C : protein kinase C inhibitor, W-7 : calmodulin antagonist, PKC : Protein kinase C. CaMK : Ca²⁺/Calmodulin dependent protein kinase.

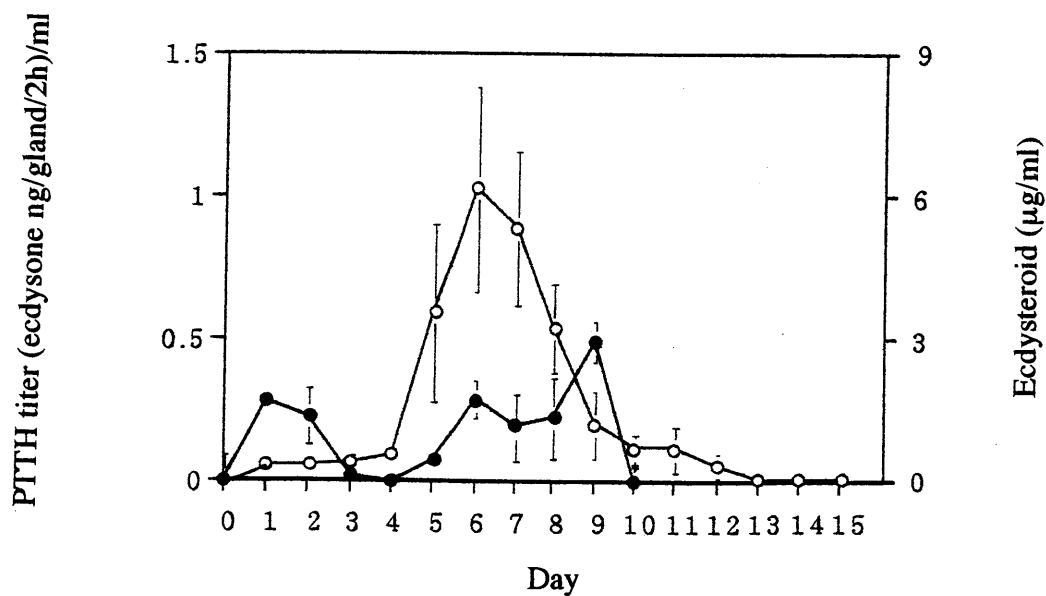


図 2. エビガラスズメ休眠蛹の覚醒にともなう夜中の PTTH 力価とエクジステロイドレベルの変動

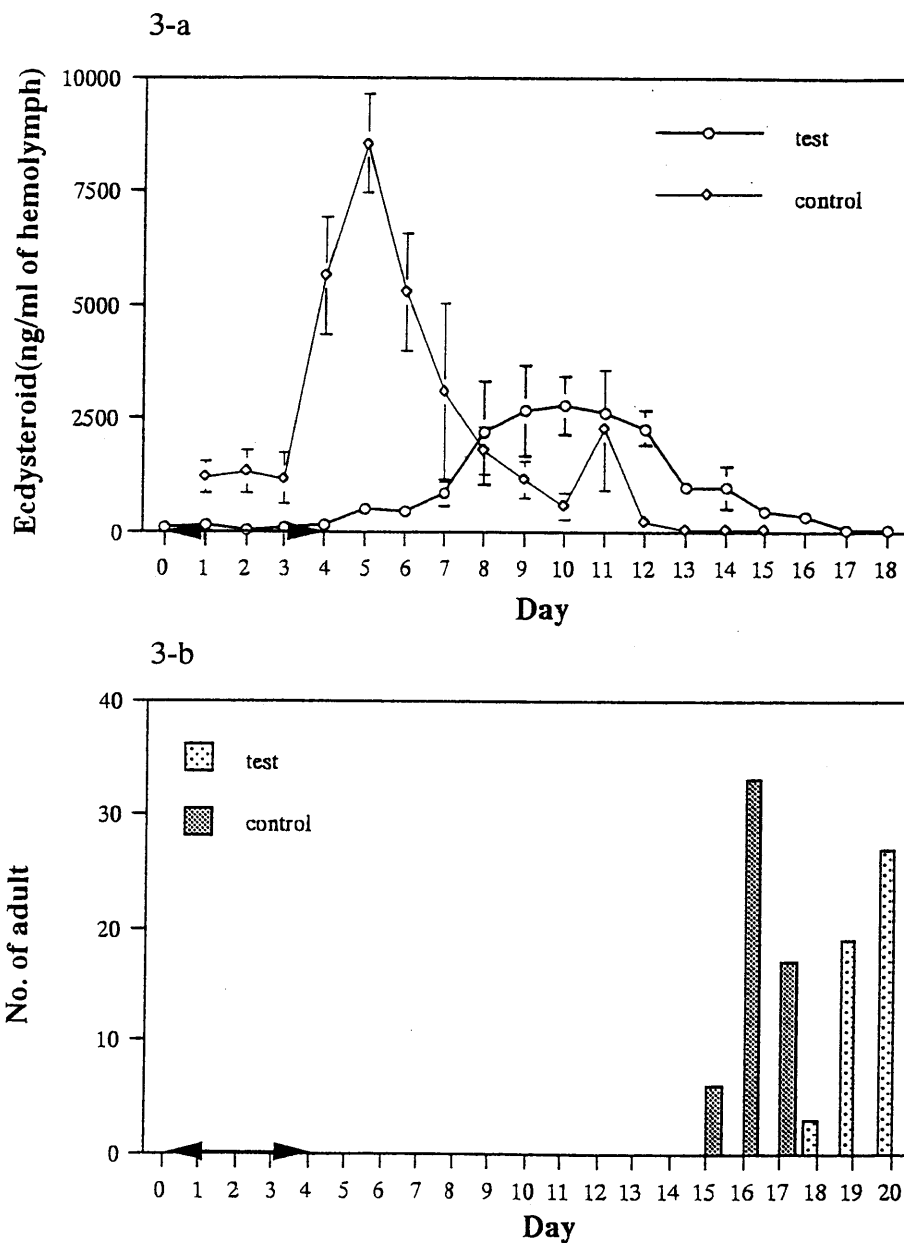


図 3a ; 休眠蛹の覚醒初期 (0~4 日) に投与した MDL72222 の体液中エクジステロイドレベルに及ぼす影響

3b ; 休眠蛹の覚醒初期 (0~4 日) に投与した MDL72222 の覚醒に及ぼす影響

昆虫ペプチドホルモン分泌細胞の電氣的活動動態の解析

市 川 敏 夫 (九州大学大学院・理学研究院・生物科学部門)

[研究成果]

1) 目的

昆虫のペプチドホルモンは神経分泌細胞から体液中あるいは神経節中に分泌されて、その作用を現すので、ペプチドホルモンの機能やその分泌調節機構を解明する上では、神経分泌細胞の電氣的（分泌）活動の長期的観察やその内的・外的要因による変動などを解析することは不可欠であるが、これまで細胞の同定や記録が困難でほとんどなされてこなかった。カイコガではたくさんの神経ペプチドの構造決定がなされ、その分泌細胞も同定されている。そこで本研究ではカイコガを用いて、P B A N分泌細胞やボンビキシン分泌細胞など同定された神経分泌細胞の電氣的な振る舞いを時々刻々に、かつ長期的に観察して、神経分泌細胞の内的制御機構、行動との関係、外的（環境）刺激に対する応答特性、概日リズムなどを明らかにすることを目的とした。

2) 方法と結果

(1) P B A N分泌細胞

カイコガの性フェロモン生合成活性化神経ペプチド（P B A N）を分泌する細胞は食道下神経節(SG)に 5 対あり、軸索を小顎神経を介して側心体に通っている。小顎神経を吸引電極の中に導入して、P B A N分泌細胞の電氣的活動 3—6 日間連続記録した。また、同時に求愛行動と心電図も記録した。

P B A N分泌細胞の活動の特徴は以下の通りである。

(a) 求愛行動との相関

カイコガの雌は数秒間に 1 回の割り合いで腹部を持ち上げ、フェロモン腺を後方に突き出す求愛行動（コーリング）をするが、P B A N分泌細胞はコーリングの際の腹部上昇期に同期してバースト発火をしていた（図 1）。

(b) 心臓拍動逆転リズムとの相関

鱗翅類昆虫等の成虫には血液が頭部から腹部へ送られる forward beating 期とその逆の backward beating 期が交互に訪れる心臓拍動逆転現象があるが、この心臓拍動の逆転リズムと同期して P B A N分泌細胞の活動の変化（ゆらぎ）があった（図 1）。

(c) 感覚刺激や交尾による抑制

活動電位の発生は尾部への接触刺激、床への振動刺激および光の明滅刺激によって一時的に抑制された（びっくり効果）。また活動電位の発生は、正常オスとの交尾および去勢オスとの交尾でも、交尾期間中はほぼ完全に抑制された。交尾終了（割愛）後、電氣的活動は去勢オスと交尾した場合には再開され、正常オスと交尾した場合には通常電氣的活動は停止したままであった。

(d) サーカディアンリズム

明暗周期下で分泌細胞の電氣的活動には日周リズムが観察されるが、恒常暗黒下または恒常薄明下で周期が約 23 時間の自由継続することから、このリズムは概日リズムであることが分かった。また、約 100 lux 程度の恒明条件下では周期が約 17 時間に短縮

し、カイコガの概日時計は光に非常に敏感で、周期が容易に短縮する性質をもつことも分かった。

(e) 同期的発火

小顎神経で記録されるスパイク様の活動電位は単独の細胞が発するスパイクではなく同期して発火した複数細胞のスパイクが重畳した複合電位であった。また左右の神経分泌細胞群の発火も10ミリ秒の差もなく完全に同期していた。このような同期的発火パターンにおける個々の細胞の発火確率や発火順位の解析を行った結果、5対の神経分泌細胞は同期的発火に同等に参加しているのではなく、細胞群の内部にはよく発火する細胞からあまり発火しない細胞まできれいな順位があった。

炭酸ガス麻酔や低温麻酔をして上位中枢からの制御信号を減ずると、たくさんの細胞が同期発火する割合が極端に減ること、およびギャップ結合の阻害剤のハロセン(halothane)麻酔をすると1、2個の細胞のみが発火する場合が大多数になった。

(2) ボンビキシン分泌細胞

ボンビキシン分泌細胞は片側の脳半球に4個の細胞体があり、反対側のアラタ体に軸策終末を持つ。蛹化直後にアラタ体を吸引電極の中に導入し、蛹期間前期わたってボンビキシン分泌細胞の活動を長期記録した。

ボンビキシン分泌細胞は太い軸策の終末突起を持つので、振幅の大きな活動電位(スパイク)が記録され、他の細胞が発するスパイクと容易に区別できた。

ボンビキシン分泌細胞の活動の特徴は以下の通りである。

(a) ウルトラディアンリズム

細胞群の活動パターンの特徴は持続時間が6-20分の連続的発火が周期的におきること、その周期は26℃で約20-40分の“ウルトラディアンリズム”であった(図2)。周期的発火は昼夜の別なく続き、日周リズムは見られなかった。ウルトラディアンリズムの周期は温度依存的で温度が上がるに伴ってリズムの周期は短くなった。その Q_{10} は約2.3であった。

(b) 蛹期間中の発火活動の変動

一日毎の総発火数をカウントしてみると、蛹化後からだんだん活動頻度が上がり、蛹3-4目が最も高くなり、以後ゆっくりと減少するパターンになった。オスとメスで発火頻度やパターンに有意な差は見られなかった。

(c) 各細胞固有のリズム

各細胞のウルトラディアンリズムの平均周期は同じではなく少しずつ異なり、発火活動は完全には同期していない(図2)。しかし、左右の細胞群の活動周期には高い相関があり、協調的關係が保たれていた。

(d) 糖応答性

血中濃度の約10倍の濃度になるようにグルコースを注射しても活動頻度とパターンには変化は見られなかった。また同様にボンビキシンを注射しても発火活動には変化は見られなかった。

(e) 心臓活動期間中の活動抑制

蛹期間中期の心臓の拍動は連続的ではなく、数分続く拍動が約100分周期で起こる。そ

の心臓活動期に同期してボンビキシン分泌細胞の活動停止または活動低下が観察された。

(3) その他の神経分泌細胞

P T T H分泌細胞、休眠ホルモン分泌細胞、あるいは period 遺伝子発現細胞（時計細胞）と思われる電氣的活動を記録できたが、まだスパイクの選別が完全ではなく、継続中である。

3) 考察

(1) P B A N分泌細胞

神経分泌細胞の発火リズムと腹部運動リズムの同期性より両者に共通のリズム発生機構（オシレーター）による支配がある。

細胞の電氣的活動と血液循環との相関は、頭部で血中に放出されたペプチドが速やかに腹部末端のフェロモン腺に到達するのに都合がよい。また分泌活動のゆらぎはフェロモン腺へのホルモン刺激が間欠的になり、連続的刺激によるP B A N受容体の脱感作（desensitization）を抑制する効果があると考えられる。

既交尾メスにおける抑制のメカニズムは交尾の際の機械的刺激によって分泌細胞は一時的に抑制され、精液中の精子または精巣由来物質による（化学的？）刺激によって長期的な抑制（記憶）になると考えられる。

P B A N分泌細胞のサーカディアンリズムは細胞群の活動が概日時計によって制御されていることを示唆する。サーカディアンリズムの時計細胞は側方神経分泌細胞であることがサクサンで示されており、カイコガでも相同な細胞が時計細胞であるか否かの解析が待たれる。

P B A N分泌細胞群の同期的発火は個々の細胞が相互にギャップ結合等を介して電氣的に結合しており、細胞群が組織化された一つの自律的な機能単位として振る舞っていることを示唆する。しかし、全ての細胞が一斉に発火するわけではなく、発火毎の発火細胞数や発火細胞の組み合わせなど同期的活動のダイナミクスは決して単純ではない。またP B A N細胞群は機能的に均一な細胞の集団ではなく、活動状態に高低の差がある。上位中枢からの制御の仕組みとしては（1）上位中枢からの信号は5個の細胞のうち、1-2個の細胞の発火をトリガーする、（2）1個の細胞に発火が開始されると周りの3個までの細胞に（ギャップ結合によって）発火が広がる、（3）2個以上の細胞に発火がトリガーされなければ全細胞へ発火は広がらないことが考えられる。

(2) ボンビキシン分泌細胞

血中に放出されてボンビキシンは分解または受容体への結合などで速やかに除去され、その半減速度は1時間以内であると報告されている。ボンビキシン分泌活動がウルトラディアンリズムであることはボンビキシンの血中濃度もかなり揺らぐと考えられる。P B A Nの場合と同様に、ボンビキシン受容体の脱感作が抑制されてボンビキシンが効果的に働くのに役だっていると考えられる。

蛹期間中のボンビキシンの血中濃度は蛹中期に最も高く、発火頻度の変動ともほぼ一致するので、電氣的活動と分泌は比例していると考えられる。

各細胞が固有の周期のリズムをもつことは、他のオシレーターの制御によってリズム

が発生するのではなく、細胞自身が温度依存的なオシレーターの機能をもっていることを示唆する。

幼虫ではグルコース注射によってボンビキシン分泌が増加するとの報告があるが、蛹や成虫ではグルコースに対する応答性は消失し、糖代謝調節ではなく、成長促進因子として機能していると考えられる。

心臓活動による細胞活動の一時的抑制は個々の細胞のリズムの部分的な同期（協調的活動）に役立っていると考えられる。

4) 計画に対する達成度の自己評価と今後の方策

神経分泌細胞の活動の長期記録をするとき、細胞外記録法を使わなければならないが、その場合たくさんの活動電位波形から目的の細胞の活動電位を同定（選別）しなければならない。P B A N分泌細胞とボンビキシン分泌細胞ではその問題をうまく解決でき、それぞれの特徴的な活動パターンを明らかにすることができ、目的の大半は達成されたと考える。しかし、P T T H分泌細胞、休眠ホルモン分泌細胞、あるいはperiod 遺伝子発現細胞（時計細胞）などでは同定の問題は未解決で、活動パターンを明らかにするまでには至らなかった。今後レーザーなどを使って目的の細胞のみを残す微小手術法を開発し、解析する必要があると考える。

5) 図の説明

図 1. P B A N分泌細胞の活動、求愛行動と血液循環の相関

A: 分泌細胞の電氣的活動波形、B: 分泌細胞の 20 秒あたりの発火頻度分布、C: 求愛行動の際の腹部上下運動、D: 心電図。心電図のゆっくりした心拍の backward beating 期には発火活動と腹部運動が盛んであるが、頻脈の forward beating 期では両者とも低下している。

図 2. ボンビキシン分泌細胞の発火活動のウルトラディアンリズム

A: 4 個の細胞群の電氣的活動波形、B: 4 個の細胞集団の 30 秒毎の発火頻度分布、C: 個々の細胞の発火のタイミング。右端の数値は各細胞の発火リズムの平均周期。各細胞は固有のリズムで発火している。

「発表論文」

I. Shimizu, S. Aoki and T. Ichikawa (1997) Neuroendocrine control of diapause hormone secretion in the silkworm, *Bombyx mori*.. Journal of Insect Physiology, 43, 1101-1109

T. Ichikawa (1998): Activity patterns of neurosecretory cells releasing pheromonotropic neuropeptides in the moth *Bombyx mori*.. Proceeding of National Academy of Science of USA, 95, 4055-4060.

T. Ichikawa, K. Imafuku and K. Tawada (1999) Synchronous firing patterns of a set of insect neurosecretory cells. Neuroscience Letters, 264, 85-88

T. Ichikawa and K. Ito (1999) Calling behavior modulates heartbeat reversal rhythm in the silkworm, *Bombyx mori*.. Zoological Sciences, 16, 203-209

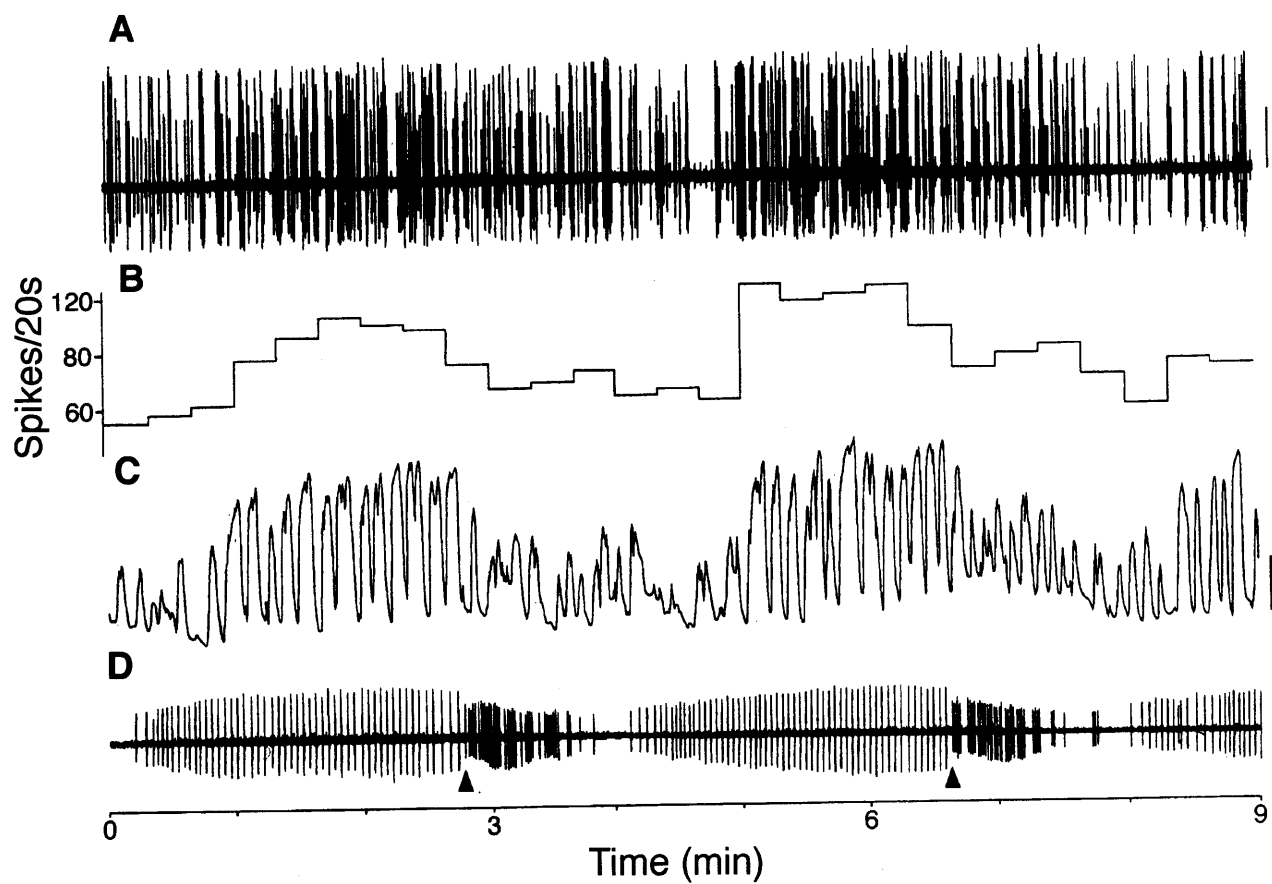


图1

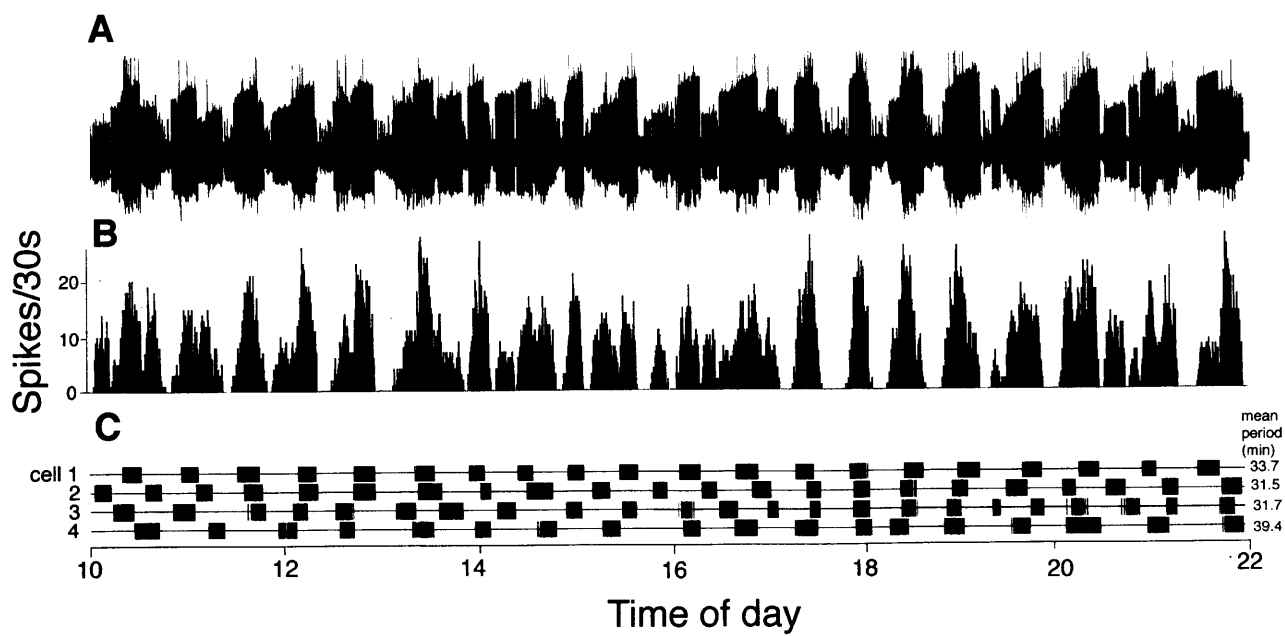


图2

神経ペプチドの遺伝子発現調節機構

岩見雅史（金沢大学大学院自然科学研究科）

1) 目的

昆虫は無脊椎動物で最も高度に発達した脳を持つといわれているが、その細胞数はわずかに数万である。それにもかかわらず、億単位の細胞で構成される脊椎動物の脳と同様の基本様式を持ち合わせることから脳の研究材料として好適である。また、昆虫では、発生や成長を司る多くのペプチドが脳でつくられており、いわば脳は司令塔の役割を担っている。カイコの神経ペプチドであるボンビキシンは、ヤマユガの一種のエリサンに対して変態を誘導する活性を持つインスリン様ペプチドであり、発生、成長に重要な役割を果たしている。ボンビキシン遺伝子は、少なくとも32コピーからなる多重遺伝子族を形成している。これら遺伝子は、塩基配列の相同性から、A～Gの7ファミリーに分類され、異なるファミリーに属する遺伝子が転写の向きを異にする遺伝子で構成されるペアもしくはトリプレットを基本単位としてゲノム中にクラスターを形成している。ボンビキシン遺伝子は、カイコ脳内では、背側中央部の8個（4対）の大型の神経分泌細胞のみ特異的に発現されている（図1a, b）。

本研究では、ボンビキシン遺伝子の細胞特異的発現調節機構を明らかにすることにより、細胞が環境応答をどのように受容し、それを遺伝子発現へと出力しているかを解明することを目的とした。具体的には、ボンビキシン遺伝子の、①細胞特異的発現調節配列の解明、②脳以外の組織における発現、③遺伝子群中に存在する個々の遺伝子の発現解析、④遺伝子発現をもたらし様々な内的、外的因子の探索を目的とした。また、これらを行うため、⑤非トランスジェニック昆虫における発現解析のための系統的な遺伝子導入系の開発を必要とした。

2) 方法と結果

2)-1. ボンビキシン遺伝子群の転写様式の解析

カイコ蛹の脳を用いて、ボンビキシンcDNAの大量解析を行い、cDNAの出現頻度から各遺伝子の発現状況を調べた。約250クローンのcDNA解析を行った結果、以下の興味深い知見を明らかにした（図2）。

① ボンビキシンAファミリー遺伝子では、ペアに属する遺伝子のみ発現しており、4コピー存在するトリプレットに属する遺伝子は発現していないか、発現していても微量であった。すなわち、Aファミリー遺伝子ではペア特異的発現が見られた。プロモーター部位の塩基配列の結果、ペアに属する遺伝子とトリプレットに属する遺伝子間での配列の差異はほとんどなく、考察で述べるとおり、プロモーター配列よりペア、トリプレットといった遺伝子構成や遺伝子の転写方向が発現の有無を左右していることが推察された。

② トリプレットに属するBファミリー遺伝子には発現が見られたが、ペアに属するBファミリー遺伝子には発現するものと発現しないものがあった。プロモーター部位の塩基配列の結果、発現していた遺伝子と発現が見られない遺伝子間で塩基配列の違いが見ら

れた。この配列の違いが発現の違いをもたらしていると考え、レポーター遺伝子を用いて解析中である。③Cファミリー遺伝子はAファミリー遺伝子同様、ペアに属する2コピーの遺伝子のみ発現しており、4コピー存在するトリプレットに属する遺伝子は発現していなかった。すなわち、Cファミリー遺伝子でもペア特異的発現が見られた。トリプレット中のCファミリー遺伝子では、転写終結配列を失っており、これが原因で発現が見られないと推察された。

2)-2. 発現解析のための遺伝子導入法

これまでトランスジェニック系を有さない動物では、レポーター遺伝子を用いたインタクトな組織での発現解析は困難であった。そこで、先に述べた特徴的なボンビキシン遺伝子の発現様式を解析するため、エレクトロポレーションやマイクロインジェクションによるインタクトな組織への遺伝子導入系を開発した(図1c)。本法により、あらゆる動物でのレポーター遺伝子による細胞特異的発現の解析が可能となった。

2)-3. 細胞特異的転写エレメント

エレクトロポレーションによるインタクトな組織への遺伝子導入系を用いて、ボンビキシンF1遺伝子の細胞特異的発現調節エレメントを解析した。F1遺伝子上流領域を様々な長さで欠損させたレポーター遺伝子を、カイコ幼虫脳に導入後、脳を *in vitro* 培養した。レポーターにはGFP (Green Fluorescent Protein) を用いた。顕微鏡下で、GFPの発現を調べた結果、F1遺伝子の翻訳開始点より約170塩基上流に存在する配列(5'-AAACCTACACTGTCGAAACAGT-3')を含む領域が、ボンビキシン遺伝子の細胞特異的転写エレメントであることを明らかにした(図2)。神経分泌細胞特異的転写エレメントとして初めてのものであった。

2)-4. ボンビキシン遺伝子の脳以外の組織での発現

逆転写PCR法により、神経節、表皮、脂肪体、精巣、卵巢、絹糸腺、マルピーギ管、中腸、後腸での発現を見出した。卵巢では、卵巢小管の表層に近い数層の細胞が発現していることが *in situ* hybridization により示された(図1d)。脳以外でのボンビキシン遺伝子の発現は、インスリン遺伝子が主として膵臓などの消化管で発現し、脳を始めとする諸組織での発現は微量であることと対照的であり、分子進化の過程で同一遺伝子の発現部位が変化したことを示している。また、これまでの知見を総合すると、ボンビキシンが線虫のインスリン様ペプチド同様、生殖細胞の成熟においても重要な役割を果たしていることが示唆された。

2)-5. 新規ボンビキシン遺伝子の単離

遺伝子発現のための塩基配列の解析中に、二つの新規ボンビキシン遺伝子を見出した。それぞれ、ボンビキシンF1、ボンビキシンG1遺伝子と命名した。また、既知のアミノ酸配列を元に、ボンビキシンE1遺伝子を単離した。これら遺伝子は、他のボンビキシン遺伝子やインスリン遺伝子同様、シグナルペプチド、B鎖、Cペプチド、A鎖からなる前駆体をコードしていた。いずれの遺伝子も、カイコ脳の背側中央部に存在する8個

の神経分泌細胞で特異的に発現されていた。

3) 考察

3)-1. 非トランスジェニック昆虫における遺伝子発現解析

昆虫は、熱帯から寒帯まで広く分布し、変態や休眠をライフサイクルに取り込むことにより、様々な環境に適応する能力を獲得してきた。これは、昆虫が未知の遺伝子資源の宝庫であることを示している。しかし、ショウジョウバエ以外の昆虫は、豊富な生理・内分泌研究のデータがありながら、トランスジェニック系がないため、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。

本研究により、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が簡便に行えるようになった。本実験系は、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これまでにない利点を有しており、これまで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ほとんど出来なかった動物材料での分子生物学的研究が大いに触発、促進され、これら動物の持つ多様な遺伝子資源の解明と利用が急速に進むはずである。

近年、マウスやショウジョウバエ動物種でトランスジェニック系が開発され、実用化が見込めるものもあるが、その数はせいぜい数種にとどまっている。しかし、トランスジェニック個体を作成する手間も時間も多大であり、決して簡便な実験系ではない。もちろん、遺伝子改変動物の作成はトランスジェニックの手法に頼らざるを得ないが、おびただしい数の実験を効率よく行うためには、簡便な実験系が必要であり、その開発が望まれていた。

3)-2. 神経分泌細胞特異的転写エレメント

ボンビキシン遺伝子発現細胞は脳片半球に4個しか存在せず、厳密な細胞特異性を示している。加えて、神経分泌細胞における特異的発現調節エレメントはこれまでに知られていない。本研究により、ボンビキシン産生細胞での特異的転写エレメントの配列が明らかとなった。この転写エレメントと相同の配列は脊椎動物ゲノム中にも存在しており、これら配列が実際に働いているか、どの遺伝子を調節しているかを調べることで、脊椎動物の神経系で発現している新規ペプチド遺伝子の同定へとつなげたい。

3)-3. 遺伝子配列ではなく遺伝子構成による発現調節機構

遺伝子発現はそのプロモーターの配列により、一元的に規定されると考えられている。一方、遺伝子発現にはクロマチンの構造が大きな役割を果たしていることも古くから知られている。本研究で明らかになったボンビキシン遺伝子の発現様式は、遺伝子の転写向きと順番が遺伝子発現に重要であることを端的に示しており、新たな転写調節機構を提示しうると考えられる。ある遺伝子の下流に位置する遺伝子の転写が抑えられる機構として、RNA competition が知られているが、その実体は明らかでない。本実験系は、これら新規概念の実体を解明することが可能なモデルであり、上記の遺伝子発現解析法により解析可能であると考えられる。

4) 研究に対する達成度の自己評価と今後の方策

当初目的とした④ 遺伝子発現をもたらす様々な内的、外的因子の探索については、③ 遺伝子群中に存在する個々の遺伝子の発現解析の結果、ボンビキシン遺伝子の発現調節がこれまでにない機構で行われているらしいことを見出し、この機構の解明を目指したこと、⑤ 非トランスジェニック昆虫における発現解析のための系統的な遺伝子導入系の開発に多くの時間が必要であったことから、明らかにすることが出来なかった。しかし、塩基配列に依らない遺伝子構成による発現調節機構の発見は新規であり、上流に位置する遺伝子との相互作用による発現調節機構の解明とその知見を応用した遺伝子ベクターの構想は、基礎および応用面で有益である。発現解析のための遺伝子導入法は、昆虫の、遺伝子レベルでの研究に役立ち、この分野での研究が飛躍的に行い易くさせた意義は大きい。細胞特異的転写エレメントは、脳神経分泌細胞での特異的発現を司るものであり、このエレメントを操作、または他の遺伝子のプロモーターとして用いることにより、将来の遺伝子改変昆虫での遺伝子の自由自在な発現に役立つ。以上、当初の目的はほぼ達成され、加えていくつかの新知見が得られたと考えられる。

代表的な発表論文

- H. Kondo, M. Ino, A. Suzuki, H. Ishizaki and M. Iwami (1996) Multiple gene copies for bombyxin, an insulin-related peptide of the silkworm *Bombyx mori*: structural signs for gene rearrangement and duplication responsible for generation of multiple molecular forms of bombyxin. *Journal of Molecular Biology*, 259, 926-937.
- M. Iwami, A. Tanaka, N. Hano and S. Sakurai (1996) Bombyxin gene expression in tissues other than brain detected by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) and in situ hybridization. *Experientia*, 52, 882-887.
- S. Tsuzuki, T. Masuta, M. Furuno, S. Sakurai and M. Iwami (1997) Structure and expression of bombyxin E1 gene, a novel family gene that encodes bombyxin-IV, an insect insulin-related neurosecretory peptide. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 117B, 409-416.
- I. Yoshida, K. Moto, S. Sakurai and M. Iwami (1998) A novel member of bombyxin gene family: structure and expression of bombyxin G1 gene, an insulin-related peptide gene of the silkworm *Bombyx mori*. *Development Genes and Evolution*, 208, 407-410.
- K. Moto, S. E. Abdel Salam, S. Sakurai and M. Iwami (1999) Gene transfer into insect brain and cell-specific expression of bombyxin gene. *Development Genes and Evolution*, 209, 447-450.

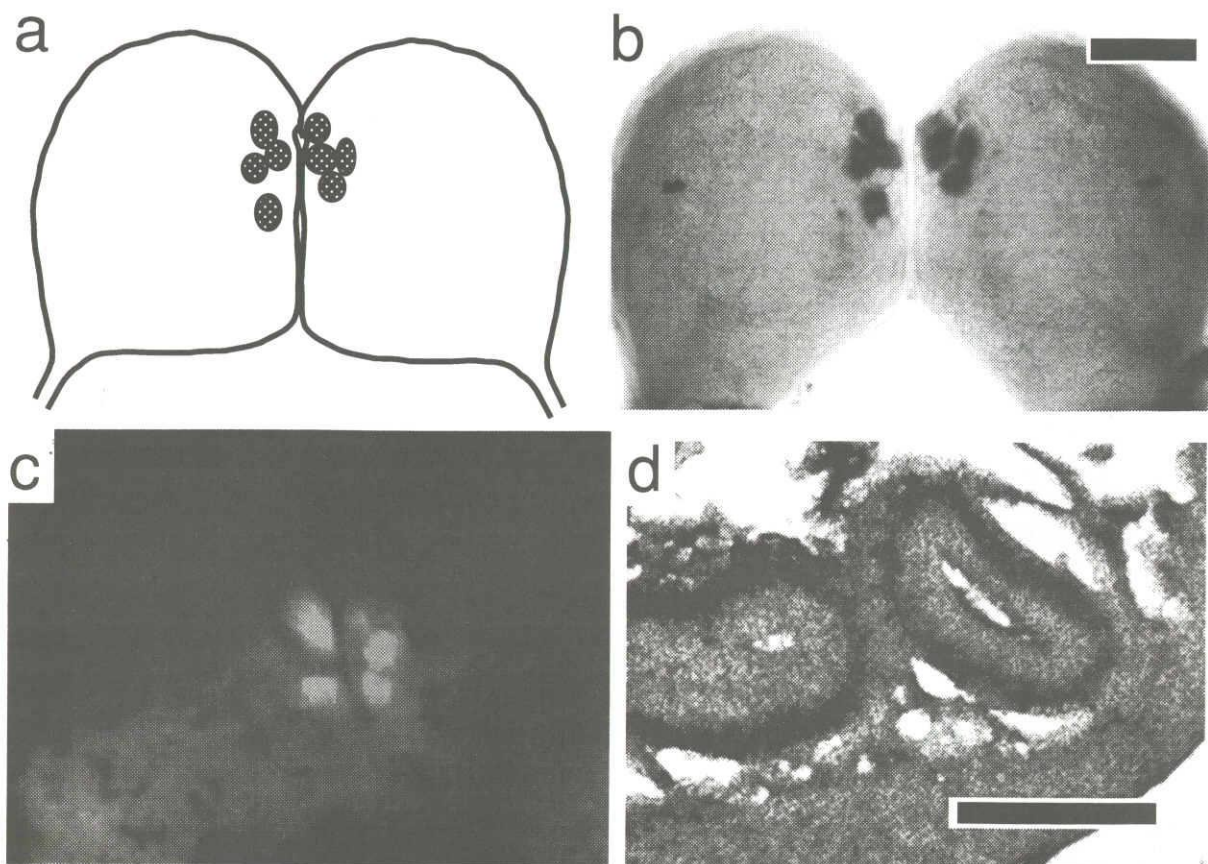


図1 a) カイコ脳におけるボンビキシン産生細胞の模式図。b) *in situ* hybridization によるカイコ脳でのボンビキシン産生細胞。c) 開発した遺伝子導入系を用いてボンビキシン・GFPレポーター遺伝子の発現を見たもの。ボンビキシン産生細胞のみにGFPの蛍光が見られる。d) *in situ* hybridization による卵巣でのボンビキシン産生細胞の同定。

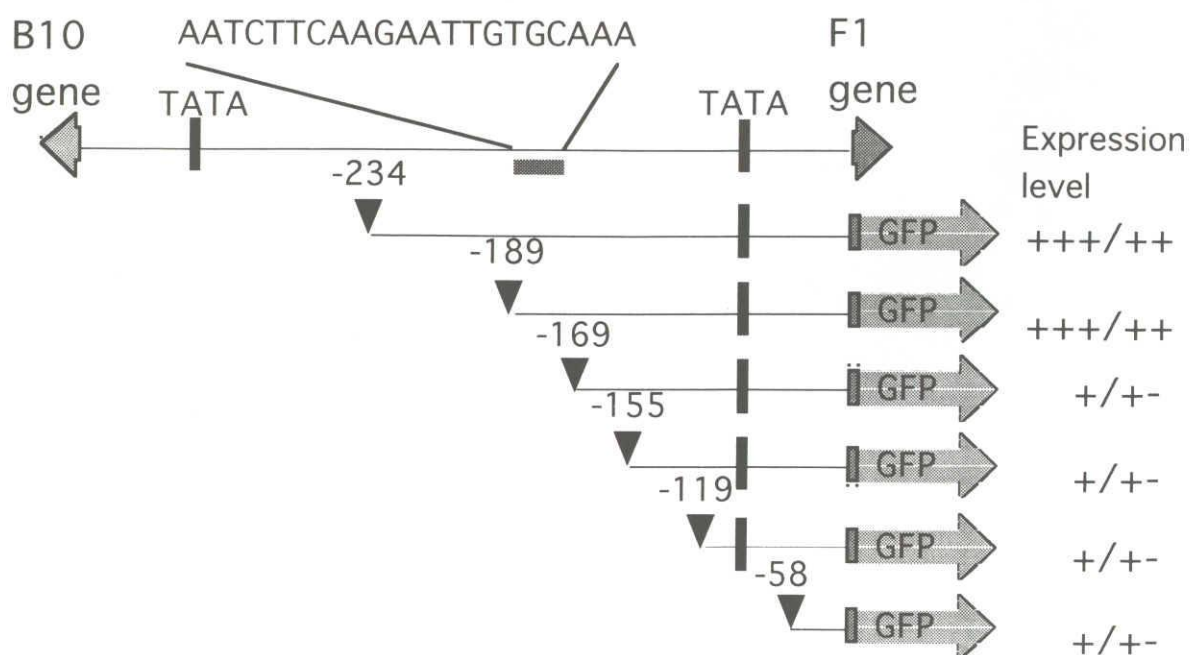


図2 ボンビキシン遺伝子のボンビキシン細胞特異的転写エレメント。ボンビキシンF1遺伝子の上流配列を欠失した断片をGFPレポーター遺伝子に接続し発現を調べた。この結果より、翻訳開始点-189から-170を含む配列が重要であることが分かる。

神経ペプチド遺伝子のマッピングと変異体の解析

嶋 田 透

東京大学 大学院 農学生命科学研究科 生産・環境生物学専攻

目的

昆虫の変態・休眠などの後胚発生は、さまざまなペプチドホルモンや低分子ホルモンを介して複雑に制御されている。こんにち昆虫のゲノム解析は急激な勢いで進展しており、ペプチドホルモン・ステロイドホルモンなどの作用機構を遺伝子発現のネットワークとして理解することが可能である。しかし、ショウジョウバエ以外の昆虫、たとえば鱗翅目昆虫では、遺伝子と機能を関連づける手法—特に形質転換技術—がいまだ開拓途上にあり、変態・休眠を司る遺伝子の構造や機能を知ることはショウジョウバエのように容易にはできない。そこで本研究ではカイコの突然変異系統および変異形質の連鎖地図を活用することにより、変態や休眠を遂行する遺伝子を発見し、その機能を推定しようとした。また、研究期間中に急速に進展したカイコのゲノム解析の情報をいち早く利用し、変態・休眠に関与する可能性のある遺伝子を特定することを試みた。

材料と方法

1. 供試昆虫：家蚕は、東大で維持している標準系統p50・支108号のほか九州大学および蚕糸昆虫研より分譲された多数の突然変異系統を用いた。クワコは埼玉県坂戸市由来（東大で1982年から累代）の系統を用いた。2. 単一ヌクレオチドプライマーイクステンション法（SNUPE）は、Buzin *et al.* (Development 120: 3529-3536, 1994) によった。3. ノーザン解析・サザン解析・遺伝子クローニング・塩基配列決定などは、常法によった。4. ディファレンシャルディスプレイは、吉田（「植物のPCR実験プロトコル」秀潤社, 1995）によった。5. 連鎖解析には、ソフトウェアMapmaker (Lander *et al.*, 1987, Genomics 1:174) を用いた。6. プライマーイクステンションによる転写開始点の決定には、LI-COR DNA sequencer 4000L (Aboka) を用いた。7. ゲルシフトアッセイは ^{32}P または Digoxigenin で標識したプローブを胚子の核抽出物と反応させて行った。

結果と考察

1. カイコの休眠胚に特異的に発現する遺伝子*BmEts*はETS転写因子をコードする

カイコの胚休眠は、母体に由来する休眠ホルモンによって誘導される。しかし、休眠ホルモンがいかにして胚子の細胞分裂を停止させるのか、その機構はほとんど分かっていない。本課題では、休眠胚に特異的に発現する遺伝子を探索し、それと非休眠突然変異との関連を調査することにより、胚休眠の機構を解明しようとした。

RNAディファレンシャルディスプレイ法により、産卵後数十時間経過した休眠予定の胚子と同時期の非休眠予定の胚子のRNAを比較した。その結果、休眠卵に特異的に発現するcDNA増幅断片をいくつか得た。そのうちの一つD-1の塩基配列を決定したところ、ETS転写因子に特有のETSドメインをコードしていることが判明し、この遺伝子を*BmEts*と名付けた。ノーザン解析を行った結果、低温暗催青による非休眠卵および着色非休眠卵*pnd*において*BmEts* mRNAがほとんど発現しないことが明らかになった(Suzuki *et al.*, 1999)。しかし第2着色非休眠卵

(*pnd-2*) は *BmEts* の発現に影響しなかった。さらに、*BmEts* の完全長 cDNA 3,803 bp を単離し構造決定したところ、390 アミノ酸をコードする ORF が認められ、コードされるタンパク質は、DNA 結合領域である ETS ドメインのみならずタンパク質間相互作用領域である pointed ドメインを併せもつ典型的な ETS 転写因子であることが判明した。全ゲノムデータの探索と分子系統解析より、*BmEts* タンパク質の ortholog はキイロショウジョウバエのゲノムには存在せず、線虫 (*C. elegans*) に存在すること、ならびに最も近縁の paralog はショウジョウバエ E74 とその orthologs であることが判明した。また、カイコ (*p50*) とクワコの戻し交雑世代を用いた連関検索の結果、*BmEts* は *pnd* や *pnd-2* とは異なる染色体に座乗していた。*BmEts* 遺伝子の休眠特異的転写の機構を知るために、ゲノムライブラリーから *BmEts* のクローンを単離し、転写開始点から 1100 bp 上流までのプロモーター領域の塩基配列を決定した。また、プライマーエクステンションによって正確な転写開始点を決定した。*BmEts* のプロモーターは TATA ボックスを欠いていた。プロモーター領域から 13 種類の DNA プロブ (各 100 bp 位) を作成し、ゲルシフトアッセイによりプロモーターに結合するタンパク質の有無を調査した。しかし、いずれの領域においても休眠卵と非休眠卵のゲルシフトパターンの差異が少なく、休眠特異的なタンパク質因子の結合を特定するには至らなかった。

BmEts の発現が *pnd* によって抑えられることは、休眠ホルモンのシグナル伝達の早い段階で *pnd* 遺伝子の産物が必要であることを示している。*BmEts* のプロモーターの活性化に *pnd* 遺伝子の産物が関与する可能性がある。また、*BmEts* タンパク質の標的遺伝子が何であるかについても今後解明が必要である。

2. カイコの概日時計遺伝子 *BmClock*, *BmCry- α* , *BmCry- β* の構造と発現

カイコの cDNA 大量解析プロジェクトにより、すでに 18,000 クローンの cDNA の部分塩基配列が明らかになっている (三田, 嶋田ら)。その中から、ショウジョウバエやマウスなどで概日時計のコンポーネントとされている Clock および Cryptochrome の相同配列をコードする cDNA を各 2 クローンずつ発見した。Clock のホモログ (*BmClock*) と推定される cDNA クローン NV021827 は、752 bp からなり、585 アミノ酸をコードする ORF を持っていた。推定アミノ酸配列をショウジョウバエ CLOCK と比較した結果、Basic Helix-Loop-Helix, PAS-1, PAS-2 の三つの機能的ドメインが高度に保存されていた。Cry のホモログ (*BmCry- α*) と推定される NV060419 は 4509 bp からなり、730 アミノ酸をコードする ORF を持っていた。推定アミノ酸配列の分子系統解析の結果、この *BmCry- α* はショウジョウバエの Cry よりも哺乳動物の Cry-1・Cry-2 に近い遺伝子であると考えられた。いっぽう、ショウジョウバエの Cry に類似する cDNA クローンとしては、NV021772 (1587 bp, ORF 308aa, *BmCry- β* と仮称) が得られている。

哺乳動物やショウジョウバエで、生物時計の中心をなす遺伝子は *period* である。最近カイコでも、RT-PCR によって *period* cDNA の部分塩基配列が明らかにされた。演者らは、その配列をもとにゲノムの遺伝子 *Bmper* を PCR で取得し、カイコ数品種とクワコの *Bmper* を比較した。その結果、カイコの *Bmper* の第 3 イントロンは約 2.0 kb であるが、クワコの第 3 イントロンは約 2.5 kb であることに気付いた。この第 3 イントロンの長さの種間差異を利用し、カイコ雌 × (カイコ × クワコ) F1 雄という交雑を行って、*Bmper* の連鎖解析を実施した。その結果、*Bmper* は Z 染色体の 26.8 に占座することが明らかになった。Z 染色体には古くから休眠性を支配する主働遺伝子 *Lm* (晩熟) の存在が知られている。*Bmper* も日長の変化を測定するための光周時計として、休眠性に影響を与える可能性があるので、*Lm* と *Bmper* の間の関係に注目したが、*Lm* の

座位は2.0とされているので、*Lm*と*Bmper*は異なる遺伝子であろう。なお、筆者らはカイコのZ染色体上で遺伝子量の補正（細胞あたりのmRNA量を等しくする）が行われないことを明らかにしてきた（次項）。すでにGotter et al. (1999)は、サクサンの*period*ホモログがZ染色体に座乗することを報告しており、サクサンでは*period*遺伝子の発現は雄が雌の2倍であるという。蛾類における羽化行動や成虫の行動の雌雄差を、*period*がZ染色体に座乗していることによって説明できる可能性がある。

3. 鱗翅目昆虫の変態・休眠はZ染色体上の遺伝子に強く支配される

鱗翅目昆虫の休眠性は、ほとんどが伴性遺伝を示す。カイコでは、*Lm*遺伝子が休眠性を支配する。カイコのZ染色体については、塩基配列がまったく判明していなかった。そこで、Zにある3種類のRAPDと1種類のRFLPの塩基配列を決定した。サザン解析により、1種類のRAPD (N20.76a)は、似た配列がゲノム上に複数あることが分かったが、他の二つのRAPDとRFLPは、単一コピーであると推定された。ノーザン解析の結果、あるRAPD (T15.180a)に対応するmRNAが種々の組織で発現していることが判明した。SNuPE法による解析により、幼虫の中腸では、このmRNAが雄において雌の倍量存在することが分かった。すなわちT15.180aの転写は遺伝子量補正を受けていない。いっぽう、支108号雌×大造雄のF1雌の中腸と、大造雌×支108号雄のF1雌の中腸からそれぞれmRNAを調製し、ディファレンシャルディスプレイを行った結果、差異のあるバンドが複数得られた。それらの塩基配列を決定したのち、支108号と大造での塩基配列の差異を探索し、正逆交雑F1雌で差があるかどうかを検定した。その結果、一個のクローンがZ染色体由来であることが判明した。その塩基配列から推定されるアミノ酸配列はキロシヨウジョウバエの飛翔筋のZ帯に存在するKettinタンパク質と相同性を示したので、この遺伝子を*Bm kettin*と呼ぶことにした。中腸における*Bm kettin*の発現量を、ノーザン法等で比較したが、雄の発現量が雌の発現量の約2倍の値を示し、やはり遺伝子量補正が見られなかった。おそらく、カイコには、性染色体の遺伝子発現量を補正する機構が欠けている。

T15.180aと*Bm kettin*の塩基配列が、家蚕とクワコでそれぞれ異なっていたので、産卵行動と体重に関して、この二つのDNAマーカーを用いた連鎖解析を行い、相互に強く連鎖していることを確認した。また、*Bm kettin*と*os* (伴性油) および*e* (長節) による3点交雑実験を行い、*Bm kettin*の古典的地図上の位置を確定した。

Z染色体に遺伝子量補正がないとすると、遺伝子量の厳密な統御が必要な遺伝子は、Z染色体に存在し得ない。鱗翅目昆虫では、生活環、雑種不妊、生殖行動など「種の独自性を表現する遺伝子」がZ染色体に座乗する場合が多い。その理由は不明だが、これらの遺伝子の発現量は、雌雄で異なっているはずである。

4. カイコの第10染色体におけるエクジソン受容体遺伝子とE75遺伝子の座位

カイコのエクジステロイド受容体遺伝子*BmEcR*およびエクジステロイドに対する初期応答遺伝子*BmE75*の所属染色体を同定するために、*BmE75*のAB両アイソフォームに共通のタンパク質コード領域と、*BmEcR*のBアイソフォームの転写開始点上流域に、それぞれPCRプライマーを設計し、品種間のPCR-RFLP多型を見いだした。大造 (p50) とさまざまな突然変異系統を交雑し、後代のゲノムDNAのPCR-RFLPと形質の連鎖を調査した。その結果、"B系統" (*w-2*, *ch*, *mhn*, *so*) を用いて (p50 × B) F1 ♀ × B ♂ の交雑を行った場合に、*w-2* (第二白卵) と*BmE75*と*BmEcR*の三者間に完全な連鎖を認めた。すなわち、*BmE75*と*BmEcR*は、*w-2*と同じ第10染色体に座乗

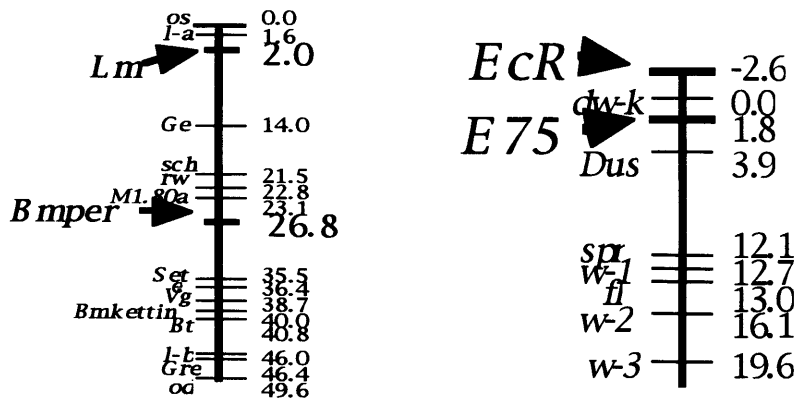
する。続いて、B♀×(p50×B)F1♂の交雑によって、遺伝子の座位を特定しようと考えた。なお、同じ第10染色体に座位する*w-1*(第一白卵)の原因遺伝子と考えられているキヌレニン3-モノオキシゲナーゼ遺伝子(*KMO*)の塩基配列からイントロンを挟むプライマーを設計したところ、B系統とp50の間で長さの差異を認めたので、これもマーカーとして用いた。その結果、*BmEcR*は-2.6、*BmE75*は+1.8付近にそれぞれ占座することが分かった。これら2遺伝子の近傍には*k*矮小蚕遺伝子*dw-k*(0.0)がある。

5. カイコの性決定遺伝子の構造と発現

昆虫では生殖機能のみならず、形態形成・発育・行動などさまざまな機能において明瞭な雌雄差が存在する。昆虫の性決定は、ショウジョウバエにおいてよく研究されているが、ショウジョウバエの性決定は、昆虫に広く見られるエピスタティックな機構によるのではなく、性染色体の数に依存する特殊なシステムである。カイコの性は、W染色体の有無によって決定されるので、ショウジョウバエとはまったく異なる機構が存在する。本研究では、W染色体が無数のレトロトランスポゾンで埋め尽くされた特異な染色体であることを示した。一方、cDNA大量解析のデータから、ショウジョウバエの性決定遺伝子*doublesex*、*fruitless*、*transformer-2*および性決定関連遺伝子*san filk*、*maleless*に相同なカイコのcDNAを発見した。ノーザン解析とRT-PCRを併用した結果、*doublesex*のホモログ*Bmdsx*のmRNAは発育段階や組織を問わずに随所で発現していたが、mRNAの一次構造が雌雄で異なることが判明した。他の性決定遺伝子についても構造・発現を解析した。

計画に対する達成度の評価と今後の方策

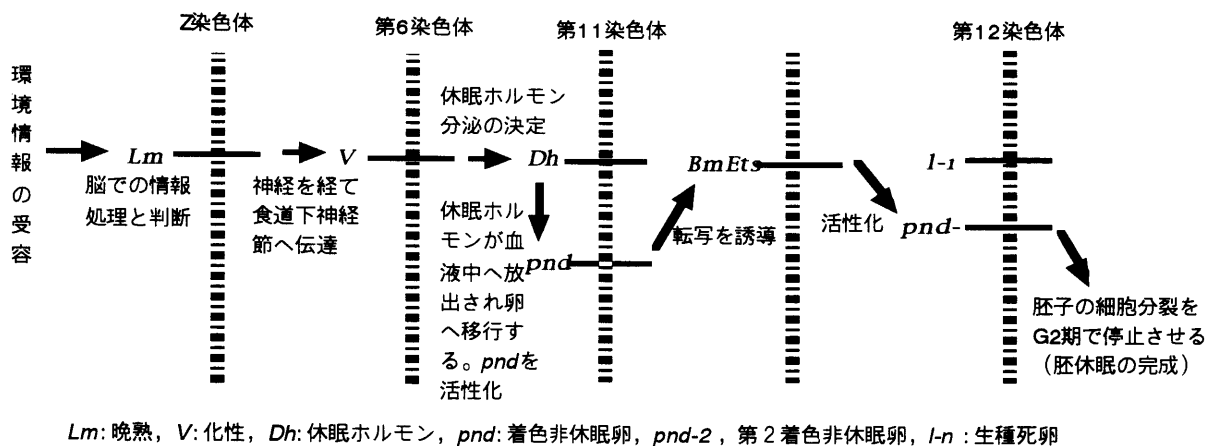
1. カイコの胚休眠特異的な遺伝子の探索については、*BmEts*の発見により所期の目的を達した、非休眠突然変異との関係についても解明できた。ただ*BmEts*の制御機構やコードするタンパク質の機能の解明は今後に残された。
2. カイコのエクジステロイド応答に関わる遺伝子*BmEcR*、*BmE75*、*BmUSP*などのマッピングに成功し、一部については既存の突然変異との関連性が推定された。突然変異の原因遺伝子であることを実証することは今後の課題に残された。
3. カイコのZ染色体には*Lm*をはじめとする発育・休眠に深く関わる遺伝子座が存在する。本研究では、Z染色体の遺伝子の構造を決定することに成功し、それらの転写量が遺伝子量補正を受けないことを初めて実証した。鱗翅目昆虫の伴性遺伝子の量補正に関する長年の議論に決着をつけた。
4. カイコの概日時計のコンポーネントの一つ*Bmpα*がZ染色体にコードされることを明らかにし、さらに*BmClock*・*BmCry-α*・*BmCry-β*という新しいコンポーネント候補を発見した。これらの機能、とくに概日時計としてだけでなく光周時計として休眠・生殖などの季節適応を支配しているかどうかは今後の研究の焦点となる。
5. カイコをはじめとする鱗翅目昆虫の性決定機構については、これまで分子レベルの知見がほとんどなかった。性は生殖機構を通じて変態や休眠などの生理現象とも深く結びついており、性の理解なしに変態・休眠を理解することはできない。本課題では*doublesex*がカイコにおいても性特異的な転写産物を生じており、性のスイッチとして機能している可能性が高いことを示した。今後、性染色体の機能も含めた性決定機構を包括的に解明してゆくことになる。



左：Z染色体上の*Bmper*の座位

右：第10染色体上の*BmEcR* および*BmE75*の座位

遺伝学的にみた休眠誘導の情報伝達



代表的な発表論文

M. G. Suzuki, T. Shimada and M. Kobayashi (1998) Absence of dosage compensation at the transcription level of a sex-linked gene in a female heterogametic insect, *Bombyx mori*. *Heredity* 81, 275-283.

H. Abe, M. Kanehara, T. Terada, F. Ohbayashi, T. Shimada, S. Kawai, M. Suzuki, T. Sugasaki and T. Oshiki (1998) Identification of novel random amplified polymorphic DNAs (RAPDs) on the W chromosome of the domesticated silkworm, *Bombyx mori*, and the wild silkworm, *B. mandarina*, and their retrotransposable element-related nucleotide sequences. *Genes and Genetic Systems* 73, 243-254.

M. G. Suzuki, T. Shimada and M. Kobayashi (1999) *Bm kettin*, a homologue of the *Drosophila kettin* gene, is located on the Z chromosome in *Bombyx mori* and is not dosage compensated. *Heredity* 82, 170-179.

M. G. Suzuki, T. Terada, M. Kobayashi and T. Shimada (1999) Diapause-associated transcription of *BmEts*, a gene encoding an ETS transcription factor homolog in *Bombyx mori*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 29, 339-347.

H. Abe, F. Ohbayashi, T. Shimada, T. Sugasaki, S. Kawai, K. Mita, T. Oshiki (2000) Molecular structure of a novel gypsy-Ty3-like retrotransposon, *Kabuki* and nested retrotransposable elements on the W chromosome of the silkworm, *Bombyx mori*. *Molecular and General Genetics* (in press).

神経ペプチドの体内動態の解析 －カイコ前胸腺刺激ホルモンの体内動態と分泌調節－

溝口 明（名古屋大学大学院理学研究科生命理学専攻）

研究成果

1. 目的

昆虫の脱皮・変態は、脳が分泌する神経分泌ホルモンの一つ、前胸腺刺激ホルモン（PTTH）の支配下にあると考えられている。しかし、PTTH の実際の分泌動態はこれまでほとんど知られていない。本研究では、まず、カイコ PTTH の微量測定法を開発して PTTH の体内動態を調査し、更にエクジステロイドの体内動態を調べ、PTTH 分泌と前胸腺活動との関連の詳細を明らかにする。次いで、PTTH の分泌を調節する因子の同定およびそれら因子による調節の機構を探究し、脱皮、変態がカイコの発育に調和して起こる仕組みを解明する。

2. 方法と結果

1) PTTH 微量定量法の開発

サンドイッチ法に基づく時間分解蛍光免疫測定法（TR-FIA）による PTTH の超微量測定法を開発した。捕捉抗体には抗 rPTTH マウスモノクローナル抗体（3E5）を、トレーサー抗体には抗 rPTTH ウサギポリクローナルを使用した。また、シグナル増幅のためアビジン－ビオチン系を利用した。本法による PTTH の検出限界は約 0.1 pg（3 アtomol）であり、測定感度において通常のラジオイムノアッセイを遥かに凌ぐものであった。カイコ血液中には測定に干渉する成分が複数存在し、抗原抗体反応を阻害したり、抗体の非特異的結合を促進したりする。従って、血中 PTTH 濃度の測定にはサンプル血液の前処理が必要であった。試行錯誤の結果、干渉物質の除去には血液の希釈および熱処理（70℃、5分）が極めて有効であることが分かった。熱処理後の PTTH 回収率は血液を採取するカイコの発育段階により若干異なるが、概ね一定（75～85%）であった。

2) 発育に伴う血中 PTTH 濃度の変動

実験材料にはカイコの一代交雑品種、錦秋 x 鐘和 の雄を用いた。カイコはLD12:12の光周期、26度の恒温条件下で、人工飼料（シルクメイト）を与えて飼育した。錦秋 x 鐘和には、日本在来種である錦秋を母体種とするタイプ（日母と略）と支那種である鐘和を母体種とするタイプ（支母と略）とがあり、また、越年卵由来のものと冷浸卵（人工付活卵）由来のものがある。これらの中から、日母越年卵、日母冷浸卵、支母冷浸卵由来のそれぞれのカイコについて、4令から成虫羽化までの期間にわたり6時間毎に血液サンプルを採取し、TR-FIAによりサンプル中の PTTH 濃度を測定した。測定は個体毎に行ない、4匹の平均値をもって各時刻の血中 PTTH 濃度とした。濃度変動のパターンは何れのタイプのカイコでもよく似ていた。日母越年卵由来のカイコの血中 PTTH 濃度の変動の特徴は以下のとおりである。

4令幼虫では5令への脱皮の2日前に PTTH 濃度のピークがあり、その前日にも低いピークが認められた。ピーク時の PTTH 濃度は約 20 pg/ml であった。5令幼虫の血中

PTTH濃度は、摂食期には低く（約20 pg/ml）推移し、ワンダリング直前の暗期には有意に減少した。ワンダリング当日の明期において PTTH濃度は急上昇しピーク（約90 pg/ml）を形成した。翌日には上昇前のレベルに下降したが、再び上昇し、2日間にわたる二峰性のピークを形成した。ピークにおけるPTTH濃度は約70 pg/mlであった。PTTH濃度はその後再び急上昇し、蛹化を迎えた。蛹化後もPTTH濃度は上昇し続け、蛹化後1日から3日にかけて200 pg/ml以上の高い値を維持した。この間には不明瞭ながら約1日周期の濃度変動が認められた。その後は急速に減少し蛹化後6～8日で最低値となったが、羽化の接近につれ再び上昇した。

3) 血中 PTTH 濃度変化とエクジステロイド濃度変化の相関

PTTH が前胸腺によるエクジソン分泌を刺激するとすれば、両ホルモンの血中濃度の変動には高い相関が認められるはずである。これを確かめるため、PTTH 濃度の測定に使用した同じ血液を用いてエクジステロイド濃度を測定し、発育に伴う血中濃度の変動を調べた。エクジステロイドの測定はRIAによった。

エクジステロイドの血中濃度は発育に伴って特徴的に変動し、PTTH 濃度との間には以下のような関係が認められた。1) エクジステロイドのピークには常に PTTH のピークが先行している。2) ワンダリング前日から前蛹期にかけて血中エクジステロイド濃度は段階的に上昇するが、上昇期には常に PTTH 濃度の上昇が伴っている。3) PTTH 濃度のピークの高さとそれに続くエクジステロイドのピークの高さには相関が認められる。4) 5令摂食期にも低濃度の PTTH が血中に存在するが、この時期の血中エクジステロイド濃度は極めて低い。これは4令期における両者の関係と対照的である。5) 蛹終期にも血中 PTTH 濃度が上昇するが、この時期にエクジステロイド濃度の上昇はない。

以上の観察結果は、PTTH がエクジステロイドの分泌を即時的かつ濃度依存的に促進するだけでなく、前胸腺のエクジステロイド合成分泌能を長期的に高める作用を持つことを示唆する。5令初期においては、4令でのピーク時と同程度の PTTH が血中に存在するにもかかわらずエクジステロイド濃度が極めて低い。このことは、この時期における前胸腺の低活性は PTTH の不在が原因ではないことを示すものであろう。前胸腺退化後の蛹終期にも PTTH 分泌があることは、PTTH の標的が前胸腺だけではない可能性を示唆する。

4) 5令幼虫への PTTH 抗体注射の効果

5令初期に PTTH が血中に低濃度で存在する意義を調べる目的で、5令幼虫の様々な発育時期において PTTH 抗体(3E5 マウスモノクローナル抗体)を注射し、その後の発育速度に及ぼす影響を調べた。この抗体は予め PTTH 活性を阻害することを除脳蛹アッセイにより確認しており、対照区には無関連のマウスモノクローナル抗体を同量注射した。抗体注射はワンダリングの時期を遅らせ、その効果は5令初期およびワンダリング直前期で高く、その間の時期では比較的低かった。この結果は、5令初期の低濃度の PTTH が前胸腺に対し何らかの作用（活性化の時期を早める作用）を持つことを示唆する。

5) PTTH 分泌に及ぼす環境要因

カイコの幼虫脱皮やワンダリング、繭作りの開始、ガットパーズは、一日の限られた時

間帯に集中して起こる。これらの行動はエクジステロイドによって誘発されることから、エクジステロイドの分泌を支配する PTTH の分泌には光周期依存的なゲートが存在すると考えられてきた。事実、血中 PTTH 濃度の変化をくり返し調べると、特に 4 令中期およびワンダリング期の PTTH 濃度の上昇は特定の時間帯に起こっていることが分かる。また、蛹化後の数日間にわたっては血中 PTTH 濃度の変化に日周リズムがあるように見える。そこで、PTTH 分泌と明暗周期との関連を確かめるために、発育が同調した個体群を 5 令 2 日目に二分し、それぞれを 12 時間ずらした光周期下に置いた。すると、ワンダリング期に生じる PTTH のピークは両個体群の間ではほぼ 12 時間ずれて生じた。この結果は、少なくともこの時期において PTTH の分泌のタイミングが光周期依存的であることを示す。蛹化後に観察される血中濃度の周期的変動は個体群の平均値において検出されるものであり、これが個体レベルでの変動を反映するかどうかは分からない。同一個体から 48 時間にわたり 6 時間ごとに採血し血中濃度の変化を調べた実験では日周期的変動は見出せなかった。PTTH 分泌の日周リズムについては更なる検討が必要である。

幼虫を飢餓状態に置くと変態の時期が遅れることから、栄養の不足は幼虫の発育を阻害するばかりでなく、PTTH の分泌に影響を与える可能性が考えられる。そこで、5 令 1 日の幼虫を絶食させ、血中 PTTH 濃度の変化を摂食個体と比較した。絶食 2 時間後、血中 PTTH は急速に減少し、5 時間で最低（対照の半分以下）となり、その後回復に向かった。絶食後 3 時間で再摂食させると PTTH 濃度の減少は止まり、直ぐに対照の水準に回復した。この結果は、幼虫の栄養状態が PTTH 分泌に影響を与えること示す。

6) PTTH 分泌に及ぼす内分泌要因

ホルモンの分泌に対し他のホルモンが影響を及ぼす例は多く知られている。PTTH 分泌についても、幼若ホルモン (JH) による阻害的あるいは促進的作用やエクジステロイドによる負のフィードバック調節の存在が示唆されている。しかし、これらのホルモンの効果を直接的に示した例はない。これまでに示唆されてきたホルモンによる PTTH 分泌調節作用を検証する目的で、JH-I および 20 ヒドロキシエクジソン (20E) を塗布あるいは注射し、その後の血中 PTTH 濃度の変化を調べた。

5 令脱皮当日に $3 \mu\text{g}$ の JH-I を塗布すると PTTH 濃度は上昇し、12 時間後に対照の約 1.6 倍となった。この効果は 30 ng の少量でも認められた。発育時期を変えて調べると、JH-I による PTTH 分泌促進効果は 5 令 1～2 日に最大で、その後次第に低下し、ワンダリング期以降は認められなかった（調査は蛹化 1 日後まで）。ワンダリング前日の明期開始直後に $3 \mu\text{g}$ の JH-I を塗布すると、ワンダリングやガットパーズの時刻に変化はないものの、それらに先行する吐糸管の着色に半日～1 日の遅れが生じた。吐糸管の着色はエクジステロイドにより誘導されることが知られているため、PTTH とエクジステロイドの血中濃度の時間的变化を詳細に調べ対照区と比較した。対照区では、PTTH 濃度は明期の間に上昇し暗期に入ると著しく低下し、次の明期で急激に上昇した。これに対し、JH-I 処理区では暗期における低下がなく、対照区との間に大きな差が見られた。エクジステロイドの濃度変化のパターンは PTTH のそれと平行しており、JH 塗布に起因するエクジステロイド濃度の低下は認められなかった。このことは、JH 塗布による吐糸管の着色の遅れは、JH-I が直接吐糸管に作用しエクジステロイドへの反応を阻害した結果であると考

えられる。JH-I による PTTH 分泌促進効果は4令期においても認められたが、その効果は比較的小さかった。4令では血中 JH 濃度が高いため、脳の JH に対する反応は既に飽和に近い状態にあるのかもしれない。以上の結果は、JH が4令期と5令初期において、PTTH 分泌に対し正の調節因子として機能していることを強く示唆するものである。

エクジステロイドはその分泌が PTTH の支配下にあることから、負の制御因子として働くと考えられてきた。事実、ワンダリング当日の PTTH 濃度上昇期に 20E を注射したところ、濃度依存的に PTTH 濃度の上昇が抑制された。従って、ワンダリング期に上昇した PTTH 濃度がその後急速に低下する原因は、エクジステロイドによる負のフィードバック調節機構が作動することにあると考えられる。一方、20E は正のフィードバック調節因子として変態時期の決定に極めて重要な役割を担っていると考えられる。血中エクジステロイド濃度はワンダリング2日前には極めて低く、前日には僅かに上昇する。ワンダリングの2日前に微量の 20E を注射すると、血中 PTTH 濃度は一時的には減少し翌日には大きく上昇した。この結果は、ワンダリング前日の僅かな血中エクジステロイド濃度の上昇が、脳の PTTH 分泌能を劇的に変化させることを強く示唆する。

7) カイコ脳の灌流培養系の開発

様々な因子が脳の PTTH 分泌に影響を与えることが明らかとなったが、これら因子が脳に直接作用するか否かは *in vivo* の実験からは判定できず、*in vitro* で検討する必要がある。また、脳の分泌活動の自律性と調節性を見極めるためにも *in vitro* 系での研究は不可欠である。そこで、脳―側心体―アラタ体複合体の長期灌流培養システムを開発した。灌流液を1時間毎に分取し各分画中の PTTH 濃度を TR-FIA により測定することにより、脳の分泌活動を経時的に調べることができる。培養の結果、脳―側心体―アラタ体複合体には自律的な分泌の周期性があることが明らかとなった。その基本周期は約半日または1日であると推定される。

3. 考察

血中 PTTH 濃度を実測することにより PTTH 分泌のダイナミックな変動の実態が解明され、更に、そうした変動をもたらし仕組みの全体像が明らかになってきた。本研究で得られた結果に基づいて推定されるカイコ終令期での PTTH 分泌の調節メカニズムおよび前胸腺の活性化の仕組みは以下の通りである。4令終期に極めて低い水準にあった脳の PTTH 分泌活性は、脱皮期に分泌される JH に応答して回復し、数日に渡って低いながらも一定の水準を保つ。この間、PTTH は不活性化した前胸腺に作用して、徐々にエクジステロイド分泌能を回復させる。PTTH の分泌量はカイコの栄養状態に依存し、従って、幼虫の餌不足は前胸腺の活性化に影響を与える。前胸腺からのエクジステロイド分泌が低水準ながら高まると、脳はその影響を受けるようになる。エクジステロイドの脳に対する作用は、短期的には PTTH 分泌の抑制であり、その後の PTTH 分泌活性の亢進である。脱皮後4～5日でエクジステロイド分泌量が閾値を超えると、吐糸管の着色を誘導し、同時に脳の PTTH 分泌能力を数倍に上昇させる。しかし、脳の分泌活性は短期的には抑制され、また、PTTH 分泌には光周期依存的なゲートが存在するため、PTTH の大量分泌は翌日に起こる。この分泌に刺激されて前胸腺は更に活性化され、分泌されたエクジステロイドが

ワンダリング、営繭行動、ガットパーズ等を誘導する。一旦活性化した脳は成虫発生期まで高い分泌能力を維持するが、エクジステロイドによる負のフィードバック調節と自律的なゲート機構により、PTTHの分泌量は周期的に変動する。前胸腺はこの変動に従って段階的に更に活性化し分泌のピークを迎え、分泌された大量のエクジステロイドは蛹への変態を誘導する。このように、脳と前胸腺は相互に作用しあいながら、幼虫の発育と調和した変態プログラムの進行を可能にしているものと考えられる。

4. 計画に対する達成度の自己評価と今後の方策

本研究の目標としたカイコ PTTH の体内動態と分泌調節機構の大枠の理解はほぼ達成された。その中で多くの新しい発見があり、また、昆虫の変態調節における PTTH の位置付けについての新たな視点を提供しえたと考える。とりわけ、幼虫摂食期における脳と前胸腺の相互作用と漸進的変化が蛹への変態の開始時期を規定するという概念は全く新しいものであり、変態統御機構の理解にとって重要な研究成果である。

分泌調節についての大枠の理解は成しえたものの、詳細な点についてはまだ多くの研究課題が残されている。in vitro 系での確認を必要とする問題もあり、開発した灌流培養系を活用して、分泌調節のより深い理解を目指したい。また、内分泌調節機構の理解のためには、ホルモンの体内動態と並んで受容機構の発現動態の解明が不可欠である。今後の新たな目標の一つとしたい。一方、蛹休眠は PTTH の分泌停止に起因すると考えられていることから、休眠誘導条件下での PTTH の分泌動態と分泌調節の研究は、蛹休眠機構の理解にとって極めて重要である。短日条件下で蛹休眠を行なうスズメガを材料にして、PTTH 分泌プログラムの環境依存的切り替えのメカニズムを追究していく予定である。スズメガ PTTH の微量測定法は既に開発済みである。

発表論文

- 1) S. Satake, M. Masumura, H. Ishizaki, K. Nagata, H. Kataoka, A. Suzuki and A. Mizoguchi (1997) Bombyxin, an insulin-related peptide of insects, reduces the major storage carbohydrates in the silkworm *Bombyx mori*. Journal of Comparative Biochemistry and Physiology, 118B, 349-357.
- 2) S. Satake, K. Nagata, H. Kataoka and A. Mizoguchi (1999) Bombyxin secretion in the adult silkworm *Bombyx mori*: sex-specificity and its correlation with metabolism. Journal of Insect Physiology, 45, 939-945.
- 3) M. Masumura, S. Satake, H. Saegusa and A. Mizoguchi (2000) Glucose stimulates the release of bombyxin, an insulin-related peptide of the silkworm, *Bombyx mori*. General and Comparative Endocrinology, 118, 393-399.
- 4) A. Mizoguchi, Y. Ohashi, K. Hosoda, J. Ishibashi and H. Kataoka (2000) Developmental profile of the changes in the prothoracicotropic hormone titer in hemolymph of the silkworm *Bombyx mori*: correlation with ecdysteroid secretion. Insect Biochemistry and Molecular Biology, in press.
- 5) L. I. Gilbert, R. Rybczynski, Q. Song, A. Mizoguchi, R. Morreale, W. A. Smith, H. Matubayashi, M. Shionoya, S. Nagata and H. Kataoka (2000) Dynamic regulation of prothoracic gland ecdysteroidogenesis: *Manduca sexta* recombinant prothoracicotropic hormone and brain extracts have identical effects. Insect Biochemistry and Molecular Biology, in press.

エクジソン受容体分子の多型の解析

- 翅形成におけるエクジソンの受容と情報伝達 -

藤原晴彦（東京大学大学院・新領域創成科学研究科・先端生命科学専攻）

研究成果

1) 目的

昆虫が変態する際には、幼虫組織が崩壊すると同時に、様々な組織がダイナミックな発生・分化をとげる。変態時の組織分化の引きがねを引くのはエクジソンであり、その多様な作用の基盤となっている分子メカニズムに興味をもたれる。エクジソンは核においてエクジソン受容体 (EcR/USP) に受容されたあと、複数の初期（初期・後期）遺伝子群の転写を誘導し、さらに形態形成の主体となる多数の後期遺伝子を活性化する。このような階層的な情報伝達系は、上流の一部については判明しているものの、個々の組織分化でどのように異なった経路の遺伝子活性化がおこるのか、またそれらが細胞の分裂や分化にどのように働きかけるのかについては全く不明である。

本研究の目的は、エクジソンを受容する分子であるエクジソン受容体 (EcR) の遺伝子構造と発現調節機構を解析し、組織分化の調節因子と考えられる EcR アイソフォームの役割を明らかにすることである。また、変態時にエクジソンによって急速な形態形成が引き起こされる鱗翅目昆虫の翅をモデルとし、エクジソン情報伝達の分子機構を解明することである。具体的には、(1) エクジソンが翅形成過程でどのような細胞応答を引き起こすか、(2) さらにその応答性にエクジソン受容体、エクジソン誘導性遺伝子がどのように関連しているか、(3) また翅形成とエクジソン応答の接点となる新規遺伝子を検索することである。

2) 方法と結果

(A) カイコエクジソン受容体アイソフォームの構造と発現調節機構

変態時の組織分化の方向性、例えば細胞増殖か細胞死するかは、EcR アイソフォームの種類によってコントロールされている可能性がある。この仮説を検証するために、カイコの EcR (BmEcR) アイソフォームを RACE 法で同定し、各発現をノーザンハイブリダイゼーション法で調べた。さらに、BmEcR アイソフォームの各転写開始点と近傍の構造を決定し (図 1)、転写因子との相互作用をゲルシフト法で解析した。その結果、BmEcR には 2 種類のアイソフォーム A, B1 があり、いずれも低濃度のエクジソンによって転写が誘導されることが確認された。カイコの変態時には前部絹糸腺以外のすべての組織で B1 フォームが多量に発現しており、“幼虫組織では B1、成虫化に向かう組織では A が優勢” というショウジョウバエで示唆された EcR の発現と組織の発生運命との関連は、カイコを含む鱗翅目昆虫では単純には成立しないことが確認された。BmEcRA, B1 のそれぞれの転写開始点はゲノム上では 20 kb 以上離れており、両者の転写開始点近傍の構造には有意な類似性はなかった。A と B1 の転写開

始点上流には TATAbox は認められず、B1 の転写には initiator が使われている可能性が高い。唯一見られた明瞭な違いは、B1 の転写開始点上流に完全な CRE (cyclic AMP 応答配列) が保存されていたことである。この CRE はゲルシフト解析により細胞内の転写因子と相互作用しており、さらに cAMP を上昇させる処理をした培養細胞抽出液で相互作用は増強された。また、培養した精巣と前部絹糸腺ではフォルスコリンによって EcRB1 によって発現が上昇した。以上の観察から EcR アイソフォームの選択的発現には CRE- CREB 系を介した制御系が関与していると考えられる。

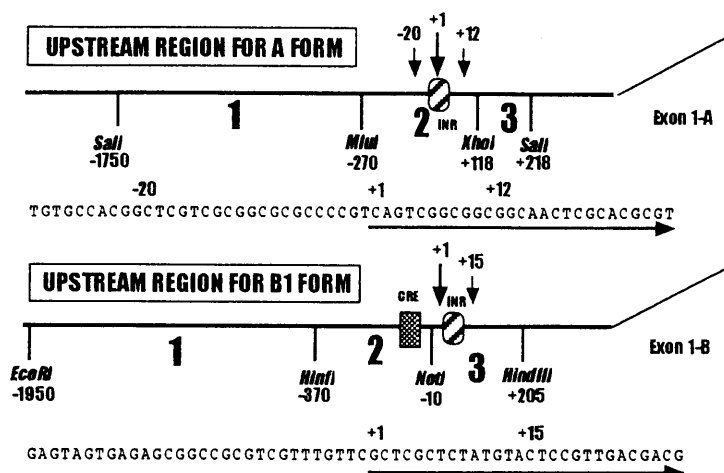


図1 カイコエクジソン受容体 (EcR)アイソフォーム転写開始点近傍の遺伝子構造

BmEcR A及びB1の転写開始点 (矢印) とその上流約2000ヌクレオチドの構造を模式的に示した。
INR: initiator motif
CRE: cAMP responsive element

(B) カイコ無翅突然変異体 fl におけるエクジソン情報伝達系の発現異常

カイコの fl 変異体は蛹・成虫時に翅を欠損するが、他の組織は正常である。これまでの解析により、5 齢時に翅原基の発生が停止するとともに、エクジソンへの応答性が翅特異的に低下していることが判明していた。エクジソン遺伝子発現カスケードのどの部分に異常があるのかを調べるために、既知もしくは新規関連遺伝子の発現を培養翅原基を用いて野生型と fl で比較した。12 種類の遺伝子発現を解析したところ、fl での初期後期遺伝子の BHR3 (脊椎動物 ROR の orthologous 遺伝子) と後期遺伝子 urbain の mRNA の相対的発現量がそれぞれ野生型の 50、20%に低下していた (表 1)。BHR3 の発現低下は翅のみで観察され、脂肪体、精巣では野生型と変わらなかった。BHR3 の翅での発現低下が fl の翅欠損の原因となっていると推定される。BHR3 の発現が組織特異的に制御されていることを見いだした最初の報告である。

さらに fl で発現異常になっている遺伝子を differential display 法によって検索したところ、リボソームタンパク質結合因子、フィブリリンなどの新規遺伝子が過剰発現していることが判明した。一方、fl で完全に発現がみられない遺伝子は 2 種類あり、そのうち 1 種類はカルシウム、リン脂質結合性モチーフをもった新たなタンパク質である。この遺伝子は fl ゲノム上で欠失している、DNA マーカー連鎖解析から fl と同じ第 10 リンケージグループに存在する、翅特異的に発現するなどの点から fl 遺伝子そのものである可能性が高い。

Gene	Class	WT		<i>fl</i>	
		-20E	+20E	-20E	+20E
EcR-A	Ecdysone receptor	50.4 ±19.3	100±39.3	39.6±14.0	106.9±50.1
EcR-B1	Ecdysone receptor	18.2 ±16.2	100±16.9	32.5±38.5	92.7±17.0
USP	Ecdysone receptor	112 ±30.1	100±7.7	75.5±17.1	96.5±21.9
E75	Early	15.7 ±12.3	100±6.9	10.9±4.2	119 ±41.5
BHR3	Early-late	0.70±0.93	100±9.1	6.9±4.7	56.6±16.9**
Urbain ^a	Late	1.2 ±0.5	100±38.5	3.5±4.0	21.1±6.9*
BHR38	Nuclear receptor	51.3 ±21.6	100±42.7	71.8±23.6	98.6±35.7
Actin A3	Housekeeping	109 ±32.2	100±7.0	111 ±27.1	105 ±4.6
β-Tubulin	Housekeeping	60.2 ±21.6	100±43.5	61.1±9.83	68.5±15.4
EF-1α	Housekeeping	115 ±12.0	100±18.0	69.2±11.3	61.8±3.6**
Apterous	Homeotic	92.6 ±23.6	100±30.3	93.1±2.4	96.4±26.9

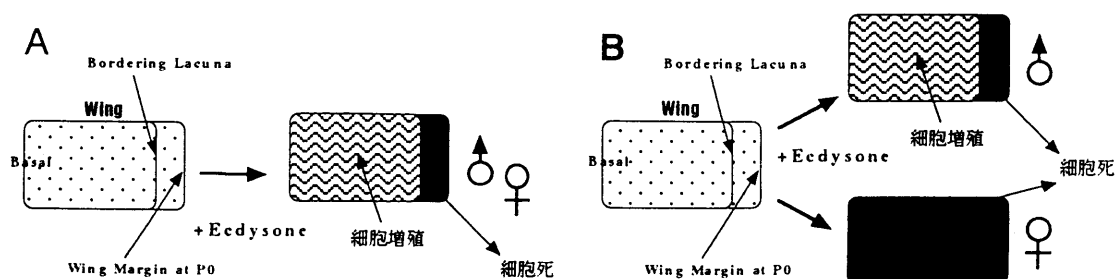
表 1. 培養翅原基における各種遺伝子の相対的発現量の比較

野性型、*f l* の 5 齢翅原基を 2ug/ml20E 添加、非添加で 6 時間培養し、各種遺伝子の mRNA の相対的発現量 (+20E,野性型を 100 とする) を比較した。

(C) 翅形成におけるエクジソン誘導性アポトーシス

翅のおおよその形は蛹化直前に完成するが、蛹の過程で翅周縁部の消失と鱗毛（鱗片）形成がおこる。蛹時のエクジソンがこれらの現象の引きがねになっている可能性を検証するために、蛹化直後のカイコの翅を培養しエクジソン添加の細胞分化に対する影響を TUNEL 法、BrdU 法で調べた。その結果、翅周縁部の境界翅溝（bordering lacuna）の外側ではエクジソンによって細胞死がまた内側の領域では細胞増殖が誘導された（図 2）。EcR アイソフォームの発現量の差が、細胞死領域と細胞増殖領域の応答と関連している可能性が示唆された。

一方、アカモンドクガのメスでは蛹時に翅が退縮し成虫時に翅が欠損する。これも同様に蛹直後の雌雄の翅を培養し、エクジソン添加の影響を調べた。雄の翅はカイコの翅と同様に境界翅溝の外側でのみ細胞死がおこったが、メスでは翅全体でアポトーシスがおこりその結果翅が退縮した（図 2）。この結果はエクジソンだけで性的二型を完全に誘導でき、さらに雌雄でのアポトーシスの領域特異性がエクジソン受容体の差違によってもたらされている可能性が示唆された。



カイコの翅はエクジソンによって細胞死と細胞増殖する アカモンドクガのメスの翅はエクジソンによって退縮する

図3 蛹期の翅のエクジソンに対する応答

3) 考察

EcR アイソフォームの発現解析から、組織全体での発現を比較する限りは鱗翅目と双翅目の相同器官の発現パターンは大きく異なった。ひとつの可能性は、組織分化の方向性はいずれもアイソフォームの発現量と関連しているが、A フォームと B1 フォームの相対的な比率ではなく、それぞれ組織分化の閾値があり、その値が鱗翅目と双翅目では異なるのかもしれない。一方、EcR アイソフォームの発現の特異性は組織全体ではなく、組織の中でも領域特異的に決まっていると思われる。これは、カイコ蛹翅を境界翅溝の内側と外側、またアカモンドクガの雌雄の翅で、いずれも EcR アイソフォームの発現が領域によって大きく異なっていたという結果が支持する。アイソフォームの選択的発現には B1 フォーム転写開始点上流の CRE が関与している可能性がある。強制的に cAMP 濃度を上昇させると組織によっては B1 フォームの発現量が上昇することから、膜タンパク質を経由して cAMP の濃度変化が最終的には CREB (CRE binding protein) などの活性化を誘導し、B1 のみが選択的に転写されると思われる。ただし、その情報伝達経路、組織による応答の差違のメカニズムについては不明である。

f 1 翅原基での発現異常解析からエクジソン遺伝子活性化経路のうち BHR3 と Urbain の 2 種類が翅特異的に低下していることが示された。この結果はエクジソンのカスケードの一部が特定の組織分化の情報経路に組み込まれている可能性を示唆する。f 1 ではこれ以外に本来低下すべき EcRB1 の発現が誘導後上昇したままになることが観察された。これは、BHR3 が EcR の発現を抑制するという他の報告と一致する。BHR3 が EcRB1 アイソフォームの発現にのみ影響を与えたことは興味深い。一方、f 1 遺伝子の欠損がどのような形でエクジソンカスケードの影響を与えるのかについては不明であるが、本研究中发现した f 1 候補遺伝子が膜結合性である事実などを考えあわせると、細胞膜由来の情報伝達系がエクジソンのカスケードに影響を及ぼしているのではないだろうか。エクジソンのカスケードはさらに性決定過程ともリンクしていることがアカモンドクガの解析から明らかになった。アカモンドクガの翅では性決定遺伝子活性化経路がエクジソン受容体の発現レベルもしくはエクジソン誘導性経路に何らかの影響を与え、その結果、オスとメスでのエクジソン受容とその後の形態形成に大きな影響を与えるのだろう。

4) 計画に対する達成度の自己評価と今後の方策

昆虫の翅形成の分子機構については、ショウジョウバエを中心として膨大なデータが蓄積されつつある。しかし、これらの研究の多くは初期発生の進行と発生運命の決定に注目しており、ホルモン作用と発生の接点を探る視点は欠落している。本研究では、“ホルモンによる形態形成の制御”という視点から、とくに翅形成という特定の組織分化に対するエクジソンの影響に的を絞り、カイコの突然変異体さらには特異な翅形成を示す野性のガを利用・解析する系を確立した。

EcR 遺伝子の構造・発現解析など初期計画はほぼ達成されたと考えているが、

研究途上で新たな課題が次々に浮かび上がり、それらに対してはさらに十分な検証が必要であると思われる。その中でも EcR 分子の機能の検定はエクジソンの作用と組織分化の関連を知る上で必要不可欠である。最近開発された RNAi 法による遺伝子ノックアウトがカイコでも可能と考えられ、今後 EcR アイソフォームの機能検定をおこなう予定である。また、f l 変異系統でのエクジソン情報伝達系の解析も当初計画通り進められたが、当初予想しなかった BHR3 遺伝子の機能の実体を今後解析する必要がある。f l 変異系統での最大の収穫は f l 遺伝子本体の同定である。今後、f l 遺伝子の RNAi によるノックアウトもしくは f l 系統への導入で救済できるかなどの検証が必要であるが、これまで全く見つかっていない新たな情報分子がエクジソン遺伝子カスケードと接点を持っている可能性がある。本研究ではこれまでに着目されていなかったアカモンドクガといった素材や翅周縁部での細胞死などを対象に、エクジソンの新たな作用を見いだした点を特に自己評価している。昆虫を研究対象とする最大のメリットはその多様性にあると考えている。今後は、それぞれ異なる原因により変態時に翅が生じない 3 種の鱗翅目昆虫（カイコ fl 変異体、アカモンドクガ、ミノガ）の翅欠損に関わるシステムを比較分析し、性・組織特異的なエクジソン応答の分子機構を解明する。また、アリなど社会性昆虫の翅形成の遺伝子制御と比較し、昆虫の性、社会性と翅発達の適応的關係を検証したい。

代表的な発表論文（5 編以内）

（原著論文）

1. M. Kamimura, S. Tomita and H. Fujiwara (1996) Molecular cloning of an ecdysone receptor B1 isoform homologue from the silkworm, *Bombyx mori*, and its mRNA expression during wing disk development. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 113B, 341-347.
2. H. Fujiwara and T. Hojyo (1997) Developmental profiles of wing imaginal discs of flugellos (fl), a wingless mutant of the silkworm, *Bombyx mori*. *Development Genes and Evolution*, 207, 12-18.
3. T. Hojyo and H. Fujiwara (1997) Reciprocal transplantation of wing discs between a wing deficient mutant (fl) and wild type of the silkworm, *Bombyx mori*. *Development Growth and Differentiation*, 39, 599-606.
4. M. Kamimura, S. Tomita, M. Kiuchi and H. Fujiwara (1997) Tissue-specific and stage-specific expression of two silkworm ecdysone receptor isoforms -- ecdysteroid-dependent transcription in cultured anterior silk glands. *European Journal of Biochemistry*, 248, 786-793.
5. T. Matsuoka and H. Fujiwara (2000) Expression of ecdysteroid-regulated genes is reduced specifically in the wing discs of the wing-deficient mutant (fl) of *Bombyx mori*. *Development Genes and Evolution*, 210, 120-128.

カイコ胚休眠の分子機構

柳沼 利信（名古屋大学大学院生命農学研究科）

1. 目的

カイコの蛹期に休眠ホルモンの作用を受けた卵巣に由来する産下卵は、頭葉・尾節形成（中胚葉分節化）直後に、胚細胞分裂をG2期で停止し、休眠に入る。25℃保護卵においては、この休眠状態は維持される。休眠期にグリコーゲンを素に約150mMのソルビトールが変換蓄積される。この高濃度のソルビトールは、細胞内の安定化をもたらすという従来の考えに加えて、最近、直接胚細胞の発育停止をもたらすarrestorそのものであるという提案がなされている。これらの卵を5℃に約60日間冷蔵することによって休眠が覚醒する。この覚醒期にソルビトールは再びグリコーゲンに変換される。この変換系を調節するのがソルビトール脱水素酵素（SDH）である。SDH活性は、休眠卵にはほとんど認められないが、5℃冷蔵による覚醒期に出現増加する。この活性は、転写のレベルで調節されている。つまり、5℃冷蔵40～50日後にSDH mRNAは特に卵黄細胞中に出現し、増加する。この時期の卵を25℃に保護することによって胚細胞分裂・胚発育は再開され、幼虫体の形態形成が進行し、12日後に幼虫が一斉に孵化し始める。

以上の現象を分子レベルで理解するために、まず、（1）細胞分裂をG2期で長期間停止させ得る分子機構、及び（2）5℃低温刺激からSDH遺伝子発現（休眠覚醒）までの分子機構を解明することを目的として研究を進めた。

1-1. カイコ休眠胚細胞分裂停止の調節機構

休眠胚細胞はG2期で停止することから、調節点はG2期からM期への移行に関わる Mitosis promoting factor（MPF）にあると考え、その構成成分である Cdc2 kinase と Cyclin-Bに注目し、まず各cDNAの単離とmRNAおよびタンパクの発現調査を行った。

2-1. 方法と結果

① Sequence homology に基づいたRT-PCRによる部分的cDNAの増幅とPCR産物を用いたcDNAライブラリー（カイコ卵から調製）のスクリーニングを行った結果、Cdc2 kinase 相同体のcDNA（1,973 nt; Mr of 36,975）と、同時に*Drosophila*とhumanから単離されている Cdc2-related kinase（Dcdrk; PISSLRE kinase）に最も良く類似したタンパクをコードするcDNA（1,415 nt; Mr of 45,121）を単離し、後者を *Bombyx* Cdc-related kinase（Bcdrk）と命名した。また、Cyclin-B相同体のcDNA（2,496 nt; Mr of 59,324）を単離した。

② Semi-quantitative RT-PCR を用いて、休眠開始期の卵、及び塩酸処理による非休眠化した卵における各mRNA（2.7 kb for Cdc2 kinase; 1.5 kb for Bcdrk; 2.5 kb for Cyclin-B）の量的変動を調査した。卵当たりで表現した場合には Cdc2 kinase 及びBcdrkの mRNA量は、継続的に細胞分裂を進行させている非休眠卵で高かったが、Cyclin-Bの場合には差異が認められなかった。

③次に、SDS-PAGE後のウェスタン・イムノブロット法によって、各タンパクの量的変動を調査したところ、Cdc2 kinase タンパク（35 kDa前後）は量的に休眠卵と非休眠卵との間に差異が認められなかった。対照的に、Cyclin-Bタンパク（66 kDa前後）は休

眠卵では極めて低いレベルにあることが判明した。

3-1. 考察

Dcdrkや PISSLRE kinase については未だ明確な機能は明らかになっていないが、カイコ卵においては、mRNAの量的変動型が極めて似ていることから、BcdrkはCdc2 kinase と類似した機能を持つものと考えられる。

以上の結果は、休眠卵ではCyclin-Bタンパクの発現が極めて少ないために、MPFが活性型になり得ず、G2期で胚細胞分裂が停止するものと考えられた。

4-1. 計画に対する達成度の自己評価と今後の方策

当初の計画は、ほぼ達成されたものと考えられる。強いて言えば、免疫組織化学的に、分裂細胞と非分裂細胞の染め分けがまだ行われていない。考察の結論を確かなものとするためにも、是非行いたいところである。Cyclin-BのmRNA量のレベルでは、休眠卵と非休眠卵の間で差異は認められていないので、翻訳レベルでの調節機構の解明が今後の課題である。

1-2. 数種ステロイドホルモン・レセプター

SDH遺伝子の構造を解析したところ、COUP-TF/Seven-up (SVP) のようなステロイドホルモン・レセプター・スーパーファミリーの一員が認識・結合すると考えられる共通配列が5'-上流域に認められた。このことから、5°CによるSDH遺伝子発現にステロイドホルモン・レセプターが係わることが考えられた。ここでは、特に、SVP、*Bombyx* hormone receptor39 (BHR39) 及び Ecdysteroid hormone receptor (EcR) 等のSDH遺伝子発現への関与を明らかにすることを目的をした。

2-2. 方法と結果

①Sequence homologyに基づくRT-PCRによる部分的cDNAの増幅とcDNAライブラリー(カイコ卵から調製)のスクリーニングを組み合わせて、SVP、BHR39及びEcRのcDNAを単離した。特に、SVPに関してはリガンド結合部位を含むもの(α)と含まないもの(β)の2種のcDNAを、EcRに関してはB1タイプが2種類とAタイプが2種類、並びにリガンド結合部位が短いB1タイプが1種類とAタイプが2種類の計7種類のアイソフォームをコードするcDNAを単離した。

②25°C保護休眠卵と5°C冷蔵卵とを用いて、SVP(α)、BHR39及びEcRのmRNA量の変動を調査したところ、SVP(α)のmRNA量に差異が認められ、SDH mRNAの量的変動型に類似していた。また、非休眠卵における胚発生に伴う各mRNA量の変動を調査したところ、SVP(α)及びEcR-B1のmRNAは反転期でピークを示す釣鐘型を示した。

③次に、SDS-PAGE/ウェスタン・イムノブロットによって、SVP(α)、EcR-A、EcR-B1、USP、E75及びBHR3の各タンパクの量的変動を調査した。休眠卵の場合には、EcR-A/B1及びE75は卵齢、低温処理等に関わりなくほぼ一定レベル、BHR3は卵齢が経るに従い減少傾向、USPは卵齢に伴い減少した。対照的にSVP(α)は産下2日後に出現し、長期冷蔵によって増加する傾向を示した。非休眠卵の場合には、EcR-A/B1の母親由来のタンパクは即座に壊され、EcR-B1の胚由来のタンパクは反転期に増加し、そ

の後減少した。このパターンはmRNA量の変動型と一致していた。EcR-Aはむしろ反転期には低いレベルで、孵化時に向けて増加する傾向を示し、EcR-B1とは鏡像関係を示した。更に興味深いことは、EcR-B1の量的に増加する時期には2本のバンドが出現することである。この低分子のバンドがB1タイプのリガンド結合部位のないアイソフォームであるのかどうか明らかにすることが、今後の課題である。

④胚発育期にはEcR-AとB1は鏡像関係にあることが示されたので、この点を確認するために、カイコ5齢～蛹～成虫までの中腸及び卵巣のEcR-A/B1のタンパクの量的変動を調査した。両組織においてEcR-Aレベルは5齢初期に高く、吐糸期にかけて低くなった。これとは対照的にEcR-B1のレベルは吐糸期から蛹化にかけて高くなった。この時期にも明らかに鏡像関係が認められた。また、卵巣においては成虫化に伴い卵中にEcR-A/B1の蓄積が認められた。

⑤ステロイドホルモン・レセプターの中でSVP (α) がSDH遺伝子発現と係わる可能性が高くなったので、SVP (α) のSDH遺伝子5'-上流域への結合能の解析を行った。

TNT (転写/翻訳系) によって合成したカイコSVP (α) タンパクとSDH遺伝子の5'-上流域のステロイドホルモン・レセプターが認識結合すると考えられる共通配列部分を含む箇所 (放射能で標識した-277~-253) とを反応させ、5%SDS-PAGE電気泳動後、オートラジオグラフィーを取ったところ、gel shift するバンドが見出された。非標識のprobe (50~100倍) を同時に加えた場合には、このバンドは消失した。以上の結果は、休眠冷蔵卵におけるSDH遺伝子発現にSVPタンパクが転写因子として深く関わる事を示唆している。

3-2. 考察

種々のステロイドホルモン・レセプターのmRNA及びタンパクの量的変動を調査したが、SVP (α) を除いては、SDH mRNA の量的変動と類似したものは認められなかった。以上の結果から、EcRはmRNA及びタンパク・レベルでの量的変動を介して休眠/覚醒と関わるものではない事、むしろ量的変動は胚発育と関わる事が示唆された。また、カイコの発育期にはEcR-AとB1のタンパクレベルは互いに鏡像関係にあること、エクジステロイド・タイターが低いときにはEcR-Aが、高いときにはEcR-B1が役割を担うことが考えられた。

SVPタンパクの結合能解析によりSDH遺伝子発現への関与が更に深められたが、他の因子との共働も考えられる。SDH遺伝子上には、幼虫脂肪体特異的な遺伝子群が持つ consensus sequence (TGAAAAG) が5'-上流域 -203~-197 に、*Drosophila*の*sisterless A*や*Sex-lethal*のX:A numerator gene が持つ numerator box (CAGGTAG) が第3イントロンの+2241~+2247に見出されている。*Drosophila*の*sisA*や*Sxl*は卵黄細胞内で盛んに発現していることから、実は、この consensus sequence がカイコ休眠卵の卵黄細胞でのSDH遺伝子の発現に係わるものではないかと考えられ、SDH遺伝子におけるCAGGTAG配列の機能解析が急務となってきている。

4-2. 計画に対する達成度の自己評価と今後の方策

SDH遺伝子発現に係わる調節因子を見出すという点では、SVPが明らかとなり、当初の計画は達成されたものと考えている。しかし、EcRの各アイソフォームがそれぞれどのような機能を持つかについては、まだ不明である。特に、リガンド結合部位を持たな

いアイソフォームが、本来のEcR/USPが標的とする遺伝子にリガンド非依存的に結合し、抑制的に作用する可能性も考えられる。休眠とは離れて、EcR自体の機能を考える上で、この解析は今後の課題である。

1-3. 低温誘導性遺伝子*Samui*

5°C刺激がカイコ卵のどのような分子によって感受されるのか、感受された情報はどのような分子機構によりSDH遺伝子発現という形で出力されるのか。この点に挑戦する試みとして、RNA differential display法を用い、5°C刺激により比較的初期において発現する遺伝子を単離することを目的とした。

2-3. 方法と結果

①25°C保護休眠卵と5°C冷蔵休眠卵とから抽出したRNAを用いて RNA differential display 法を行い、低温誘導性遺伝子のcDNA (2,400nt; 677aa, Mr of 75,975) を単離した。ssDNA結合ドメインに相当する配列が、また、このタンパクの前半にはQPQQQTやKSPQQHQPPPPの繰返し配列が、後半には核移行シグナルであるKKDKやKRDK配列などKに富むアミノ酸配列が見出された。

②Northern hybridization により2.5kbのRNAが検出された。RT-PCRをも加えた解析から、休眠卵において、このmRNAは、少なくとも5°C冷蔵後5~6日には増加し、冷蔵後20日をピークとして減少した。0°C冷蔵は5°Cほど効果的ではないが、長期冷蔵により mRNA 量の増加が認められた。また、5°C冷蔵20日間後、25°Cに戻した場合には、mRNA量は直ちに減少した。低温により誘導される遺伝子であることから、*Samui*遺伝子と命名した。

③次に、特異的抗体を用いて、*Samui*タンパクの量的変動を調査した。ウェスタン・イムノブロット解析から、抗*Samui*抗体に陽性なバンドとしてp90とp100が検出された。mRNA量と並行して変動するのは、p100バンドであった。20日間5°C冷蔵した卵を25°Cに戻した場合、卵内に蓄積された*Samui*タンパクは、mRNAよりも1日程遅れて減少することが明らかになった。p90とp100との関係はまだ不明であるが、*Samui* cDNAを用いて、in vitro 転写・翻訳系でタンパクを合成させたところ、p90とp100とに相当するタンパクバンドが検出されることから、両者とも*Samui*タンパクと考えられる。

④以上のことは、休眠卵において*Samui*タンパクが5°Cの情報を担うものであることを示唆している。それでは、非休眠卵では*Samui*発現の誘導が認められるのかどうかを検討した。休眠胚の形態と類似した時期の卵を用いた場合には、mRNA及びタンパクの量的増加が認められたが、発現量の強さと発現期間の長さにおいて休眠卵の場合よりは劣っていた。このことから、*Samui*タンパクは、非休眠卵では低温からの保護の情報を、休眠卵ではその機能に加えて、休眠覚醒へ繋がる（次の発育を調節する）情報を担うものと考えられた。

③最近の相同性検索から、*Samui*タンパクは、哺乳類の silencer of death domains (SODD) や chaperone 分子であるBAG-protein 4 が共有するBAG-domainと良く類似した domain を持つことが判明した。哺乳類のBAG-protein familyはHSP70/HSC70と結合し、細胞内のシグナル伝達系を調節することが知られている。また、相手のパートナー分子を変えることによって下流に伝達する情報系を変え得ることも明らかになっている。そこで、*Samui*タンパクが構造の類似だけではなく、機能的にもHSP70と結合すること

が可能かどうかを検討した。このためにまず、カイコ HSP70 cDNA を単離し、カイコ HSP70も、他の生物種とよく類似した構造を持つことを確認した。その上で、*Samui* cDNAを用い、転写/翻訳系で合成させた*Samui*タンパクと大腸菌のHSP70とが in vitro 下で結合すること、また、抗HSP70抗体で沈殿させたカイコの細胞分画中に、抗*Samui*抗体で反応するp100とp90が検出されたことから、*Samui*タンパクは機能的にも BAG-protein family の一員であることが明らかとなった。

3-3. 考察

環境の5°C情報を、比較的早い時期に担う遺伝子として*Samui*遺伝子を単離することが出来た。実際の休眠卵内での機能を明らかにすることが急務である。休眠卵と非休眠卵とでは、*Samui*タンパクの生理的役割が異なると考えられるので、休眠卵と非休眠卵における、真のパートナー・タンパクを同定することが肝要である。また、この遺伝子の発現調節機構を明らかにすることによって、5°Cに対するセンサーの単離に向けての方法論が確立するものと考えられる。

4-3. 計画に対する達成度の自己評価と今後の方策

5°C刺激とSDH遺伝子発現との間を繋ぐ分子機構の解析の手始めとして、DDを用いて新規の遺伝子*Samui*を単離することが出来た。休眠卵での機能はまだ明らかではないが、BAG domainを持った遺伝子は昆虫類ではまだ単離されていない。*Drosophila*のgenomic DNA解析の結果、*Samui*とよく似た遺伝子を見つけることが出来た。昆虫種におけるBAG-proteinの機能解析が可能な状態になってきたと考えられる。BAG-proteinを介する細胞内伝達系が脊椎動物と同様に無脊椎動物でも共通であるのかどうか、休眠を離れたとしても興味深い問題である。この点においても、当初の計画はまず達成されたものと考えられる。

5. 代表的な発表論文

T. Niimi, O. Yamashita and T. Yaginuma (1996) Structure of the *Bombyx* sorbitol dehydrogenase gene: a possible alternative use of the promoter. *Insect Molecular Biology*, 5, 269-280.

T. Niimi, S. Morita, O. Yamashita and T. Yaginuma (1997) The profiles of mRNA levels for BHR39, a *Bombyx* homolog of *Drosophila* hormone receptor 39, and *Bombyx* FTZ-F1 in the course of embryonic development and diapause. *Development, Genes and Evolution*, 207, 410-412.

柳沼利信・新美輝幸 (1997) カイコの胚休眠とソルビトール脱水素酵素. *化学と生物*, 35, 468-470.

M. Takahashi, H. Iwasaki, T. Niimi, O. Yamashita and T. Yaginuma (1998) Changing profiles in mRNA levels of Cdc2 and a novel Cdc2-related kinase (Bcdrk) in relation to ovarian development and embryonic diapause of *Bombyx mori*. *Applied Entomology and Zoology*, 33, 551-559.

T. Yaginuma and O. Yamashita (1999) Oxygen consumption in relation to sorbitol utilization at the termination of diapause in eggs of the silkworm, *Bombyx mori*. *Journal of Insect Physiology*, 45, 621-627.

休眠ホルモンの遺伝子発現と作用の分子機構

山下興亜（名古屋大学大学院生命農学研究科）

1. 目的

カイコの休眠ホルモンは胚休眠を積極的に誘導する神経ペプチドホルモンとして1952年にわが国で発見された。休眠ホルモンの発見は昆虫の休眠内分泌学の体系化を促した。つまり、成長促進ホルモンの欠損説に加えて、休眠誘導に特化されたホルモン機構の存在を提案したからである。この休眠内分泌機構に関する一連の研究は、名古屋大学を拠点としたわが国において進められ、多くの研究成果を蓄積し、常に世界の斯学を先導してきた。本研究はこれらの実績を飛躍させ、昆虫休眠の制御機構に関する新たな知見を得、さらに休眠を介して実現している昆虫の生命活動の特異性を提案することを目指し、休眠ホルモンの遺伝子発現とその作用を分子レベルで解明することを目標に掲げた。

具体的な研究目的としては2つを掲げた。1つは休眠ホルモン遺伝子の発現、動態等のホルモン分子に関する研究であり、もう1つは休眠ホルモンの作用と休眠の生化学的な実態の解明である。休眠ホルモンの化学構造や遺伝構造等に関するこれまでの一連の研究結果が、休眠ホルモンのシナージスト（協力剤）分子の発見、同定とその作用の解明、休眠ホルモン遺伝子の発現調節機構の解明、休眠ホルモンの分泌調節機構等に関する研究を設計させた。一方、作用機構研究は、休眠ホルモンが発育中の卵巣に作用して、トレハラーゼ遺伝子の発現を誘導することを1つの出発点とし、卵巣でのホルモンレセプターの同定実験を計画した。またトレハラーゼ阻害剤を新しく開発したことによりトレハラーゼ非依存性の休眠ホルモン作用の存在が確認された。このことは休眠に関する生理学や代謝生化学に一大転換をもたらすものであり、休眠ホルモンの新たな標的遺伝子や休眠分子の検索と同定を研究の俎上に乗せ、休眠研究領域を拡大させた。

2. 方法と結果

1) 休眠ホルモン遺伝子の発現、生産と動態

(1) 休眠ホルモン協力剤（VAP ペプチド）の分離、同定と生理作用

カイコの成虫頭部を出発材料として休眠ホルモン活性物質を抽出すると、有機溶媒（メタノール：ジクロロメタン＝1：1）に回収され、しかもその活性はブタノール－水分配によってブタノール層に回収された。本活性物質をHPLCによって精製し、単一のペプチドとして単離した。構成アミノ酸の分析により、Val, Ala, Pro が全アミノ酸数の約80%を占めていたので、本ペプチドをVAP ペプチドと仮称した。N末端の55個のアミノ酸配列を化学的に決定した。この配列をもとにcDNAをクローニングし、アミノ酸配列を推定した結果、VAP ペプチドは68個のアミノ酸からなる分子量約8kDaの極めて疎水性の高い塩基性のペプチドであることが決定された。本ペプチドと類似のアミノ酸配列を有するペプチドは知られておらず、新規なペプチドとして同定された。本cDNAを大腸菌に形質転換し、多量に生合成し、生物活性を調査した。その結果、VAP ペプチドそのものには休眠卵誘導活性は全く認められなかった。しかし、休眠ホルモンと本ペプチドの混合物を投与することによって、休眠ホルモンの力価は著しく増強された。例えば、休眠ホルモンとVAP ペプチドの1：20の混合物を

注射すると、ホルモン臨界濃度は 100 分の 1 以下に低下した。またこの活性は N 末端側に局在していた。これらの結果は、ホルモン作用を増強するペプチド（協力剤）が生体内に存在することを示した最初の研究成果である。本ペプチドはホルモン剤の効率的な利用法の開発に資するものである。

(2) 休眠ホルモン遺伝子の発現調節

休眠ホルモン遺伝子の発現調節シスエレメントを同定するために、形質転換ショウジョウバエを作成した。休眠ホルモン遺伝子の種々の長さを持つ 5' 領域に lacZ 遺伝子をつないだコンストラクトを 24 種作成し、P 因子を用いて yw 系統に注射により導入した。形質転換した 120 系統についてレポーター遺伝子の発現を酵素活性と酵素タンパク質の免疫活性から調査した。その結果、休眠ホルモン遺伝子は幼虫と成虫の食道下神経節の 2 個と腹部神経節の 6 個の神経分泌細胞のみで発現された。この発現には 5' 上流域の -4683 から -4033 までの 650bp が必須であることが結論された。この発現に及ぼす環境温度の影響を調査したが、これまでのところカイコで見られた温度による遺伝子発現の促進は確認されていない。

(3) 休眠ホルモンの中枢神経系における分布と動態

休眠ホルモンの生合成は、休眠ホルモン遺伝子の発現を初発反応とすること、この発現は食道下神経節に局在する 12 個の神経分泌細胞によってのみ起こること、そしてこの発現は環境の温度の制御下にあることを、予備的な研究から明らかにしている。

そこで、本研究では、これらの結果を追試し、その上で休眠ホルモンの中枢神経系内での輸送と分泌についての検討を進めた。胚期における本遺伝子の発現が高温によって促進されることを除いては、これまでの研究結果を確認した。免疫組織化学的な観察の結果から、休眠ホルモンは食道下神経節の下唇節に存在する 2 個の神経分泌細胞で主として生合成され、食道下神経節－側心体神経を経由して側心体とアラタ体に輸送され、アラタ体から血流中に放出されることを明らかにした。

一方、休眠ホルモンの C 末端および N 末端を認識するモノクローナル抗体を作成し、ELISA 法等によって休眠ホルモンの定量実験を系統的に進めた。その結果、食道下神経節－側心体－アラタ体に存在する休眠ホルモン量は、蛹の前期に高く、中－後期に急激し、成虫羽化時には痕跡的な値になることが判明した。ここで興味あることは、非休眠性の蛹でも、これらの器官には休眠性蛹に匹敵する量の休眠ホルモンが蓄積されていたこと、そしてこの高い蓄積量が蛹の後期まで維持されていたことである。つまり、休眠性と非休眠性の違いは、ホルモンの放出機能の差異にもあることが証明された。したがって、休眠ホルモンによる休眠制御は、休眠ホルモン遺伝子の発現制御とホルモン分泌制御の二重の制御系によることを初めて明らかにした。

2) 休眠ホルモンの作用機構

(1) 休眠ホルモンによって調節される遺伝子

休眠ホルモンの作用に関するこれまでの一連の研究から、休眠ホルモンの標的酵素は卵巣のトレハラーゼであり、休眠ホルモンはトレハラーゼ遺伝子の発現を活性化すること、そしてこの遺伝子発現はホルモンの直接的な作用であることが明らかにされている。後述するようにトレハラーゼ不活性化の状況においても休眠が誘導されるこ

とから、休眠ホルモンは複数の標的遺伝子を有していることが推定された。

そこで、休眠ホルモンの有無により、その発現量が異なる遺伝子の検索を行った。その結果、休眠ホルモンによってその発現が増大する3種の遺伝子の同定に成功した。1つは新規のP450遺伝子(CYP305B1)であり、2つはレトロトランスポゾン様遺伝子であった。トレハラーゼ遺伝子に対する休眠ホルモン作用に比較し、これらの遺伝子に対する作用は、①短時間反応であること、②応答量が異なること、そして③応答する細胞の生理的な時期が異なること、から休眠ホルモンは複数の反応系を制御していると推測された。これらの相互関係については、現在検討中であるが、休眠誘導機構の実態を理解する上で、貴重な示唆を与えるものである。

(2) もう1つの休眠代謝系の発見

カイコ卵の休眠を特徴づける物質的な基盤はソルビトールの蓄積である。このソルビトールは血中のトレハロースを出発素材とし、卵形成中に合成、蓄積され、卵に持ち込まれたグリコーゲンから合成される。この炭水化物の代謝系の転換にかかわる卵巣トレハラーゼの活性を休眠ホルモンが調節している。つまり休眠ホルモンは卵巣でトレハラーゼ遺伝子を発現の活性化し、卵巣でのグリコーゲン蓄積量を高めているのである。この一連の研究によりカイコの卵休眠の代謝生理学が確立され、この成果が他の昆虫や甲殻類の休眠生化学研究の指針になっている。

ところが、最近になりトレハラーゼの特異的な阻害剤、トレハゾリンが放線菌から分離、同定された。この阻害剤をカイコの休眠性蛹に投与したところ、卵巣グリコーゲンの合成はほぼ完全に阻害され、グリコーゲンを欠損した卵を人為的に作成することに成功した。グリコーゲン欠損卵は休眠に入り、また適当な休眠覚醒処理によって胚発生を再開し、幼虫が孵化し、胚発育を完了した。このグリコーゲン欠損卵が休眠に入った場合、休眠期間を通じてソルビトールの蓄積は一切認められなく、ソルビトール欠損の休眠卵が作成された。このソルビトール欠損休眠卵ではトレハロースが対照区に比較して約2~5倍量蓄積されていた。トレハロースがなぜ蓄積するのか、またトレハロースが休眠物質なのか、については現在検討中である。昆虫や甲殻類の休眠個体ではソルビトール、グリセロールなどの多価アルコール等が多量に蓄積することが一般的な現象として確認され、この半世紀の間、休眠代謝のセントラルドクマとされてきた。しかし、このカイコでのソルビトール欠損休眠卵の創出は、セントラルドグマの改訂にせまるものとして注目される。

3. 考察

本研究は、休眠ホルモンの生合成機構と作用機構を分子の言葉で解読することを目的に進めた。休眠ホルモンは30年間にわたる研究によって24個のアミノ酸からなるペプチドであることが判明した。この研究結果が、本研究を推進させる基盤であり、かつ、その発展を保証する根拠となっている。休眠ホルモン分子の生産、輸送、分解等による生体内でのホルモン情報の動態を体内外の環境応答等との関連で解明することが、休眠ホルモンの分子研究につながる課題である。この課題を休眠ホルモン遺伝子発現の調節機構、休眠ホルモンの生産、分泌器官とその調節さらに血液中での動態の調査に分けて検討した。前二者については、ショウジョウバエの形質転換系、環境条件の改変さらに

は特異抗体の作成等の実験系を整備した上で、研究を進め、一定の結論を得るに至った。少なくとも休眠ホルモンの調節は環境温度によって誘導される遺伝子発現と成熟ペプチドの神経分泌細胞からの放出過程との2つの段階で調節されていることが結論された。ホルモン分子の研究との関連で、VAP ペプチドと命名した新規なペプチドが発見、同定され、休眠ホルモンの協力剤として作用とすることが明らかになった。人工合成物質が協力剤となることは知られているが、天然にしかもカイコの体内にこのような機能物質が存在したことは、初めての記録であり、研究の副産物とはいえ貴重な発見であるといえる。

休眠は個体レベルでの現象であり、一部の組織や器官の変化によるものではない。多価アルコール類が休眠時に異常に高い濃度で蓄積していることは体内の自由水を結合水に変換し、生化学的に不活性な状態を創出し、あらゆる生体機能を低下させることによって生命活動を最低レベルで維持していると理解されている。ところで、今回トレハラーゼ阻害剤を用いてのソルビトール欠損休眠卵の創出は、休眠の代謝系には代替え可能な複数の物質代謝系が準備されており、状況に応じて対応可能な休眠生理の重層性と可塑性を明らかにした。このことは1950年後半からの休眠生理の理解を大幅に改訂することになり、今後の研究の発展の礎石を与えたといえる。

4. 計画に対する達成度の自己評価と今後の方策

4カ年間の研究活動から、計画通りに推進できた研究課題は休眠ホルモン遺伝子の発現調節機構の解析と休眠ホルモンの生産、分布の動態調査、休眠ホルモンによるトレハラーゼ遺伝子の発現調節機構の解析である。計画通り進まなかった課題は血中でのホルモン動態の調査と卵巣までのレセプターの解明である。当初計画にはなく研究の過程で新たに発見された事実は、休眠ホルモンのシナージストとしてのVAP ペプチドの発見と作用、トレハザリンによるソルビトール欠損休眠卵の作出、そして休眠ホルモンによって誘導される新規な3種類の遺伝子の同定である。これらの予期しなかった新知見が本研究の飛躍をもたらした。今後は研究途中の課題と新規な事項を中心に研究を進めることがまず望まれる。

代表的な発表論文（5編以内）

- O. Yamashita (1996) Diapause hormone of the silkworm, *Bombyx mori*: Structure, gene expression and function. J. Insect Physiol., **42**, 669-679.
- Y. Sato, K. Shiomi, H. Saito, K. Imai and O. Yamashita (1998) Phe-X-Pro-Arg-Leu-NH₂ peptide producing cells in the central nervous system of the silkworm, *Bombyx mori*. J. Insect Physiol., **44**, 333-342.
- K. Shiomi, Y. Sato, K. Imai and O. Yamashita (1998) A hydrophobic peptide (VAP-peptide) of the silkworm, *Bombyx mori*: Structure, expression and an enhancing function of diapause hormone activity. Insect Biochem. Molec. Biol., **28**, 75-82.
- N. Katagiri, O. Ando and O. Yamashita (1998) Reduction of glycogen in eggs of the silkworm, *Bombyx mori*, by use of a trehalase inhibitor, trehazolin, and diapause induction in glycogen-reduced eggs. J. Insect Physiol., **44**, 1205-1212.

Y. Ishida, T. Niimi and O. Yamashita (2000) The *cis*-regulatory region responsible for the *BomDH-PBAN* gene expression in FXPRLamide peptide producing neurosecretory cells of the transformed *Drosophila*. J. Seric. Sci. Jpn., 69(2), 111-119.

図表



Expression of reporter gene in flies transformed with constructs covering various regions of 7 kb 5'-flanking sequence of the *BomDH-PBAN* gene

Transformed constructs	Range (bp)	Length (b)	Obtained lines	Expression
P[-7.0 DHP]	-7,033~-1	7,033	5	+
P[-6.0 DHP]	-6,033~-1	6,033	2	+
P[-7.0~-2.0 DHP]	-7,033~-2,033	5,000	4	+
P[-5.0 DHP]	-5,033~-1	5,033	11	+
P[-7.0~-3.0 DHP]	-7,033~-3,033	4,000	7	+
P[-7.0~-4.0 DHP]	-7,033~-4,033	3,000	11	+
P[-4.0 DHP]	-4,033~-1	4,033	5	-
P[-7.0~-5.0 DHP]	-7,033~-5,033	2,000	4	-
P[-3.0 DHP]	-3,033~-1	3,033	5	-
P[-1.6 DHP]	-1,655~-1	1,655	6	-
P[-0.5 DHP]	-574~-1	574	7	-
P[-5033~-4133 DHP]	-5,033~-4,133	900	5	+
P[-4883~-4033 DHP]	-4,883~-4,033	850	8	+
P[-5033~-4233 DHP]	-5,033~-4,233	800	5	+
P[-4683~-4033 DHP]	-4,683~-4,033	650	4	-
P[-5033~-4433 DHP]	-5,033~-4,433	600	4	-
P[-4583~-4033 DHP]	-4,583~-4,033	550	8	-
P[-4483~-4033 DHP]	-4,483~-4,033	450	1	-
P[-4383~-4033 DHP]	-4,383~-4,033	350	8	-
P[-5033~-4733 DHP]	-5,033~-4,733	300	9	-
P[-4283~-4033 DHP]	-4,283~-4,033	250	2	-
P[-5033~-4833 DHP]	-5,033~-4,833	200	2	-
P[-4183~-4033 DHP]	-4,183~-4,033	150	2	-
P[-4083~-4033 DHP]	-4,083~-4,033	50	2	-

I. ワモンゴキブリ (*Periplaneta americana*) の肢、および アフリカツメガエル (*Xenopus laevis*) 幼生の尾の再生芽に特異的に 発現する蛋白の同定と解析

久保 健雄 (東京大学大学院薬学系研究科)

1) 目的

ワモンゴキブリは器官の再生能が高く、再生の研究材料として優れている。本研究では、肢の再生の分子機構を解明する目的で、再生芽特異的に発現する、新規な蛋白の同定と解析を行った。さらに、昆虫から得られた知見を脊椎動物に敷衍するため、アフリカツメガエルを用いて、幼生の尾の再生芽に特異的に発現する蛋白 (遺伝子) の同定と解析を行った。

方法と結果

- A. ワモンゴキブリの体液性レクチンである regenectin は、肢の再生芽の筋芽細胞の周囲に一過的に局在し、再生における筋形成への関与が示唆されている。今回、cDNA の解析から、regenectin 遺伝子は再生芽の上皮組織で発現することが判明した。さらに、ワモンゴキブリには、体液性レクチンのファミリーが存在し、regenectin は、生体防御に働く体液性レクチン (LBP、LPS-binding protein) とともに、このファミリーに属することが判明した。
- B. ワモンゴキブリの肢の再生芽で発現し、上皮組織に局在する蛋白 (p10) の cDNA を単離した。その結果、P10 はシグナル配列を持つ前駆体蛋白から作られる分泌蛋白で、頭部と触角にも発現することが分かった。P10 は、ショウジョウバエの触覚特異的な蛋白 A10、及び蚕 *C. cactorum* の口吻特異的蛋白 CLP-1 とも有意な相同性を示し、多様な機能をもつと考えられた。
- C. ワモンゴキブリの肢の再生芽で、再生過程に一過的に発現する新規な蛋白 Rap 60 と Rap 40 を精製し、一次構造と発現の解析を行った。その結果、両者は、再生上皮組織で特異的に発現する新規な前駆体蛋白 (RAP、regeneration-associated protein) からプロセスされて生じること (図 1)、再生芽の外側に分泌されるマトリクス蛋白であることが判明した。
- D. ワモンゴキブリの体液性レクチンのホモログを同定する目的で、ツメガエル血清から Ca^{2+} 依存性の糖結合蛋白 (35kDa lectin) を同定し、cDNA を単離した。その結果、このレクチンは、卵や胚期に発現するレクチン (cortical granule lectin) と同じファミリーに属することが判明した。さらに、幼生の尾の再生芽からこのファミリーの新規なサブタイプの cDNA を単離し、尾の再生芽で遺伝子発現が亢進していることを示した。
- E. アフリカツメガエル幼生の尾の再生芽で選択的に発現する遺伝子を differential display 法で検索し、type XVIII collagen と neuronal pentraxin 1 (NP1; 哺乳類では脳で選択的に発現する) のホモログが、再生芽に特異的に発現することを見出した。NP1 は、胚発生期にはほとんど発現しないことから、再生に固有なプロセスに関与すると考えられる。

3) 考察

ワモンゴキブリの肢の再生芽に選択的に発現する新規な蛋白を 3 つ (regenectin, p10, RAP)、ツメガエル尾の再生芽に選択的に発現する遺伝子を 2 つ (type XVIII collagen, NP1) 同定した。特に regenectin に関する研究からは、再生における形態形成と感染防御に共通な分子的側面があることが示唆された。一方、ツメガエルにも血清レクチンがファミリーを形成し、その

内のサブタイプが尾の再生芽選択的に発現することを示した。昆虫と脊椎動物の再生の分子機構に類似性があることを指摘した点で、本研究は意義深い。

4) 計画に対する達成度の自己評価と今後の方策

ワモンゴキブリの肢の再生芽で発現する新規な蛋白を世界に先駆けて同定した。又、ツメガエルでも、これまで再生への関与が報告されていない新規な遺伝子を同定した。これらの成果は動物の器官再生の分子機構を理解する上で重要であり、所期の目標を十分達成できたと考えている。今後は、ツメガエルにおける当該遺伝子の機能証明が重要な課題である。

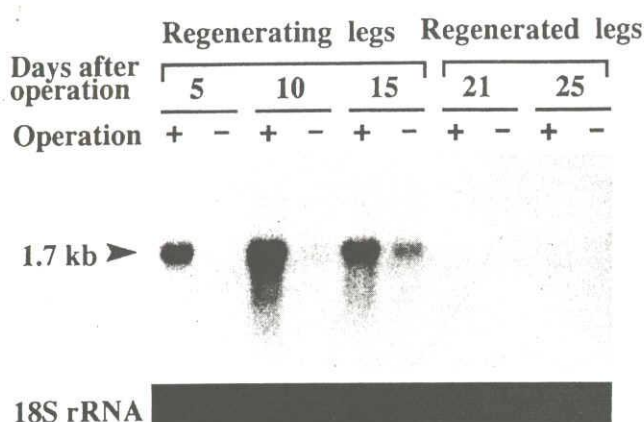


図1 ワモンゴキブリの肢の再生芽におけるRAP遺伝子の発現（ノザンブロット解析）
数字は肢切断後の日数、+は再生芽、-は対照として正常な肢を示す。21、25は、脱皮して再生が完了した肢についての結果を示す。

II. ミツバチ (*Apis mellifera* L.) 脳の高次中枢（キノコ体）で領野特異的、行動特異的に発現する遺伝子に関する研究

1) 目的

ミツバチは社会性昆虫であり、そのコロニーは女王蜂、働き蜂、雄蜂という役割の異なる個体からなる。又、その働き蜂は、8の字ダンスという記号的コミュニケーションによって仲間の働き蜂に記憶した花の位置を教える。本研究では、ミツバチの行動を規定する分子的基盤を解明する目的で、脳のキノコ体で領野特異的、行動特異的に発現する遺伝子の同定と解析を行った。

2) 方法と結果

A. ミツバチの脳でキノコ体選択的に発現する遺伝子を differential display 法で検索し、以下の3つの遺伝子 (A-C) を同定した。その1つは、イノシトール3リン酸受容体 (IP_3R) 遺伝子のミツバチホモログと考えられた。さらにミツバチでは、細胞内 Ca^{2+} 情報伝達系に働く、 Ca^{2+} /カルモジュリン依存性プロテインキナーゼ II と、プロテインキナーゼ C 遺伝子が、キノコ体選択的に発現することを見出した。 Ca^{2+} 情報伝達系は記憶・学習などの神経可塑性に重要である。従って、ミツバチではキノコ体を構成する神経細胞（ケニヨン細胞）の可塑性が、他の領野に比べて亢進している可能性が指摘できる。

- B. 2 番目の遺伝子 (*KI-1*) は、キノコ体を構成する 2 種類の介在神経細胞 (大型と小型のケニヨン細胞) の内、大型ケニヨン細胞に選択的に発現していた。*KI-1* の cDNA は 12kbp に及び、約 2kbp の ORF の下流に、約 10kbp の長い 3' 非翻訳領域を有していた。*KI-1* がコードする蛋白は、既知の蛋白との相同性を示さず、新規な遺伝子であると考えられた。*KI-1* 蛋白は大型ケニヨン細胞に固有な細胞機能に関与するものと考えられる (図 2)。
- C. 3 番目の遺伝子 (*Ks-1*) は小型ケニヨン細胞に選択的に発現していた (図 2)。*Ks-1* cDNA のサイズは約 17kbp であったが、蛋白をコードすると考えられる長い ORF は見つからなかった。従って、*Ks-1* 転写産物は、非翻訳性 RNA として機能する可能性が考えられる。非翻訳性 RNA としては、哺乳類の *Xist* やショウジョウバエの *roX-1* 転写産物が同定されているが、*Ks-1* 転写産物は、性差 (雄蜂と働き蜂、女王蜂) に依らず発現する点、神経細胞のサブタイプ選択的に発現する点でそれらとは異なる。
- D. ミツバチのカースト (女王蜂と働き蜂) 選択的に、脳のキノコ体で発現する遺伝子を、differential display 法で探索し、約 50 個の候補遺伝子を同定した。この内の 1 つは女王蜂、2 つは働き蜂のキノコ体に選択的に発現することが、RT-PCR により確認された。

3) 考察

昆虫の脳のキノコ体の機能については不明な点が多い。本研究は、2 つのケニヨン細胞が遺伝子の発現様式でも区別できることを示しており、ケニヨン細胞の役割分担を探る上で、重要な知見である。また、ケニヨン細胞で Ca^{2+} 情報伝達系に働く蛋白群の遺伝子発現が亢進していることは、脳の高次中枢としてのキノコ体の機能を考える上で、興味深い。

4) 計画に対する達成度の自己評価と今後の方策

ミツバチの脳で領野特異的、行動特異的に発現する遺伝子を単離したのは世界でもこれが初めての例である。本研究成果は、特定領域研究の当初の目標に対応するものではないが、行動の解析は今後の昆虫科学の重要な課題であり、学術的に価値ある成果だと考えている。ミツバチにおける当該遺伝子の機能解析とともに、哺乳類ホモログの検索が、今後の重要な課題である。

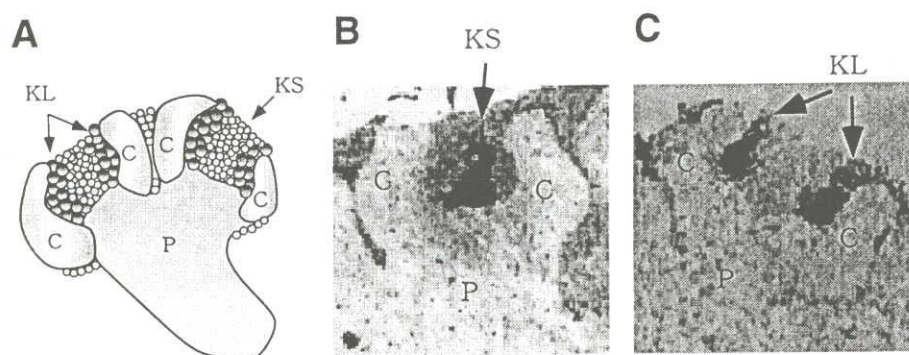


図 2 ミツバチ脳のキノコ体の模式図 (A) と *Ks-1* (B)、*KI-1* 遺伝子 (C) の発現パターン
KS、小型ケニヨン細胞；KL、大型ケニヨン細胞；C、キノコ体の傘の部分；P、柄の部分

III. ミツバチ (*Apis mellifera* L.) 働き蜂の齢差分業にともなう 下咽頭腺の機能転換と、その柔軟性に関する研究

1) 目的

ミツバチの働き蜂は羽化後の日齢に伴い、幼虫に下咽頭腺から分泌されるローヤルゼリーを与える育兒から、花の蜜を採集してハチミツに加工する採餌蜂へと分業（齢差分業）する。本研究では、下咽頭腺の機能が齢差分業によってどのように変わるか分子レベルで調べるとともに、コロニーの状況に応じた柔軟性の有無について検討した。

2) 方法と結果

- A. 育兒蜂と採餌蜂の下咽頭腺で発現する主要な蛋白を精製し、その性状を解析した結果、育兒蜂では、3種類の構造が類似したローヤルゼリー蛋白、採餌蜂では、花の蜜をハチミツに生成するのに必要な糖代謝酵素群 (α -glucosidase, glucose oxidase, amylase) を主要な蛋白として発現することを見出した。また、これらの遺伝子の発現様式の転換は、単一の分泌細胞のレベルで生じることを明らかにした。このことは、働き蜂の齢差分業に伴って、下咽頭腺の分泌細胞の機能が転換することを示している（図3）。
- B. コロニーから女王蜂を除き、若い働き蜂の供給（羽化）を止めたコロニーを作成することにより、老齢の働き蜂が育兒をする状況を人工的に作り出した。この状況では、老齢の働き蜂の下咽頭腺が、若い蜂同様、ローヤルゼリー蛋白を発現することを見出した。このことは、下咽頭腺の機能転換は単に生理的加齢に伴って起きるのではなく、コロニーの状況に応じた柔軟性をもつことを示している。

3) 考察

働き蜂の齢差分業は、変態という形態形成期を過ぎた働き蜂（成虫）で起きる点で特徴的であり、その分子機構の解明は、動物の細胞分化の可塑性に関する新しい視点をもたらすと期待される。また、社会性昆虫の、コロニーの状況に応じた労働（生理状態）の分配機構を解析する上で、下咽頭腺は有用なモデルになると思われる。

4) 計画に対する達成度の自己評価と今後の方策

この研究も、当領域研究の当初の目標に対応するものではないが、変態に依らない新しい細胞機能の調節方法という点で、昆虫科学にとって意義ある成果だと考えている。今後は、下咽頭腺の細胞機能を調節する要因（細胞内、個体間）の解析が重要な課題である。

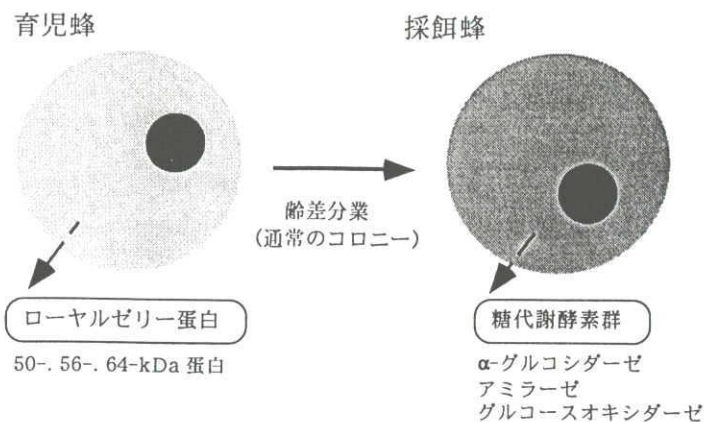


図3 働き蜂の下咽頭腺細胞の機能転換

代表的な発表論文

1. K. Ohashi, S. Natori and T. Kubo (1997) Change in the mode of gene expression of the hypopharyngeal gland cells with an age-dependent role change of the worker honeybee *Apis mellifera* L. *European Journal of Biochemistry*, 249, 797-802.
2. T. Arai, K. Kawasaki, T. Kubo and S. Natori (1998) Cloning of cDNA for regenectin, a humoral lectin of *Periplaneta americana*, and expression of the regenectin gene during leg regeneration. *Insect Biochemistry Molecular Biology*, 28, 987-994.
3. K. Ohashi, S. Natori and T. Kubo (1999) Expression of amylase and glucose oxidase in the hypopharyngeal gland with an age-dependent role change of the worker honeybee (*Apis mellifera* L.). *European Journal of Biochemistry*, 265, 127-133.
4. T. Arai, T. Kubo and S. Natori (2000) Identification, characterization and cDNA cloning of two novel proteins secreted into the external space of the regenerating leg of *Periplaneta americana*. *Insect Biochemistry Molecular Biology*, 30, 287-295.
5. A. Kamikouchi, H. Takeuchi, S. Natori and T. Kubo (2000) Concentrated expression of the genes for calmodulin kinase II and protein kinase C in the mushroom bodies of the honeybee *Apis mellifera* L. *Journal of Comparative Neurology*, 417, 501-510.

昆虫の変態と組織の再編成

名取俊二（理化学研究所・名取特別研究室）

1) 研究目的

完全変態昆虫では、幼虫と成虫では形態、行動、食餌などが全く異なっている。昆虫の変態は大雑把に分けて、エクダイソン、幼若ホルモンおよび脳ホルモン（神経ペプチド）によりコントロールされている。ホルモンが支配するのは言うまでもなく特定の遺伝子の発現である。変態の際には、三種類のホルモンのバランスが時間とともに変化し、その変化に呼応して遺伝子発現のパターンが変わることになる。変態は蛹という閉じた系の中で進行する。蛹の中では、幼虫の組織の崩壊と成虫組織の構築が進行する。成虫組織は成虫原基が伸張、分化することにより形成される。これは、エクダイソンの支配を受ける反応で、ショウジョウバエやセンチクバエでは成虫原基をエクダイソンとともに培養することにより、*in vitro* で成虫構造を形成させることが可能である。成虫構造の形成は成虫原基の細胞の遺伝子の中にプログラムされており、エクダイソンにより引き金が引かれると、時間経過とともに次々に遺伝子の活性化が起こり、結果として自律的に成虫の形態形成が進行するよう見える。一方、蛹の中では不要となった幼虫組織の崩壊と排除が見られるが、そのメカニズムに注目した研究は比較的少ない。

この特定領域研究で私たちは、主としてセンチクバエ (*Sarcophaga peregrina*) の変態期に起きる組織崩壊、および組織再編成の過程を生化学的に研究し、その分子機構を明らかにすることを目的とした。

2) 方法および結果

1. 蛹の顆粒細胞のみに発現する膜蛋白の同定

蛹の時期に幼虫の脂肪体が崩壊するメカニズムを調べた結果、脂肪体は体液細胞の一つである顆粒細胞 (granulocytes) が分泌するカテプシン B により壊されることが明らかになった。幼虫が蛹になった瞬間から、顆粒細胞は今まで自己組織と見て共存していた脂肪体を非自己と認識するようになり攻撃を開始する。どうして蛹になると顆粒細胞の自己と非自己の認識が変わるのか長い間不明であった。そこで、蛹の体液細胞の表面蛋白とのみ反応するようなモノクローナル抗体 (MAb) の調製を試みた。その結果、蛹の顆粒細胞と特異的に反応する抗体を産生する4種類のハイブリドーマを得た。これらの MAb が認識する抗原は共通で、細胞表面にある分子量 120 kDa の蛋白であった。

MAb に対するアフィニティーを利用して蛹体液細胞の膜面分から抗原蛋白の精製を試みた。その結果、可溶化した膜蛋白を抗体カラムに一回通すだけでこの 120- kDa 蛋白をほぼ単一蛋白として純化することが出来た。この蛋白の cDNA を取得し、一次構造を決定した。その結果 120-kDa 蛋白は、アミノ酸 741 残基からなる1回膜貫通型の蛋白で、C-末端側にアミノ酸 17 残基の膜貫通ドメインがあり、細胞の外側に出る部分に EGF リピートが 18 回繰り返して存在していた。

また、糖鎖付加可能部位が 8 カ所存在し、この蛋白が糖蛋白である可能性が示された。

細胞質側には C-末端を含む 47 残基が突き出ていることが判明した。この蛋白の機能はまだ不明であるが、蛹の顆粒細胞に特異的に発現する膜蛋白であること、EGF リピートを多く含むことなどから推察すると、蛹の時期に壊されるべき幼虫組織を識別するような認識分子である可能性が考えられる。すなわち、顆粒細胞の認識の転換を担う分子がこの 120-kD 蛋白である可能性が高い。蛹の顆粒細胞はカテプシン B を貯えており、幼虫の脂肪体のような壊されるべき組織を認識して付着するとカテプシン B を放出し、そのカテプシン B により基底膜がこわされて細胞が遊離するものと思われる。

2. 幼虫の中腸崩壊に関与する新しいセリンプロテアーゼの同定

センチクバエの幼虫と成虫では食餌が異なるので、消化酵素や腸内細菌も異なるはずである。変態時には幼虫の消化管（中腸）から成虫の消化管へと組織の変換が起きる。この場合先ず、幼虫の中腸を包み込むような形で yellow body（黄色体）という組織が形成される。これは幼虫の中腸の周辺に存在する、成虫中腸の芽細胞が分裂して形成する袋状の組織で、この中で幼虫の中腸が崩壊する。ついで yellow body が伸張し、成虫の中腸となる。

われわれは以前から、センチクバエの抗菌蛋白を研究してきたが、その中の一つにザルコトキシシン IA がある。ザルコトキシシン IA はアミノ酸 39 個よりなる両親媒性の蛋白で、その疎水性部分がバクテリアの細胞膜に作用して膜の電気化学的なポテンシャルを消失させるため、主としてグラム陰性菌に対して致死的に作用する。

蛹の蛋白を調べている過程で、たまたまザルコトキシシン IA の抗体と非常によく反応する、分子量 26 kDa の蛋白が蛹化後 3 – 5 日の間に一過性に出現することを見出した。この蛋白を精製し、cDNA をクローニングした。cDNA の解析から、この 26-kDa 蛋白はアミノ酸 239 残基よりなり、一次構造はウシのトリプシンと 40% の相同性があることが分かった。実際にこの蛋白のプロテアーゼ活性を測定し、阻害剤などの影響を調べた結果、26-kDa 蛋白はトリプシンとよく似た基質特異性を示すセリンプロテアーゼであることが明らかになった。また、この蛋白の発現する組織を調べたところ、蛹の時期に形成される yellow body にかなり選択的に発現していることが分かり、この蛋白が幼虫の中腸の崩壊を引き起こす主要な酵素であることが示唆された。

26-kDa 蛋白はザルコトキシシン IA の抗体と交差反応を示すが、とくにザルコトキシシン IA と相同性の高い配列は含まれていなかった。エピトープマッピングの結果、エピトープは塩基性のアミノ酸と疎水性のアミノ酸が両親媒性の構造をつくっている部分に落ち、ザルコトキシシン IA も両親媒性の蛋白なので、ザルコトキシシン IA の抗体の中にこのような構造を共通に認識する抗体が含まれていたものと思われる。そこで、26-kDa 蛋白に抗菌活性があるかどうかを調べた。その結果、26-kDa 蛋白にはザルコトキシシン IA と同程度の抗菌活性が認められた。コントロールとしたウシのトリプシンには抗菌活性は全く認められなかった。おそらく、26-kDa 蛋白はセンチクバエの蛹の時期に中腸を崩壊させると同時に、yellow body の中に遊離してくる幼虫の腸内細菌（normal flora）を殺菌し排除する機能を持つものと思われる。

この蛋白が出現することにより幼虫の腸内細菌は駆逐され、成虫の腸内細菌が新しく住

みつくことになる。この蛋白のプロテアーゼ活性を DFP 処理により失活させても抗菌活性は全く失われなかった。従って、抗菌活性はプロテアーゼ活性とは全く独立の活性であり、両活性は異なるドメインにより担われているものと思われる。このようなプロテアーゼに関してはこれまでに報告された例はなく、おそらく完全変態昆虫だけに見られる新しいタイプのプロテアーゼと考えてよいだろう。

3. 変態と中枢神経系の再編成

変態の過程ではさまざまな幼虫組織が崩壊し、新しい成虫組織が形成されるが、中枢神経系がどのように入れ替わるのか殆ど分かっていなかった。われわれはセンチクバエの幼虫の中枢神経系を取り出し、エクダイソン存在下に培養することにより、変態過程で起きる中枢神経系の変化を一部 *in vitro* で再現することに成功した。すなわち、 10^{-6} M エクダイソンとともに幼虫の中枢神経系を 2 日間培養すると脳半球の肥大と、二つの脳半球間の距離の拡大が認められた。これは蛹化初期に見られる脳の変化と同じである。この場合エクダイソンの濃度は 10^{-6} M が至適であり、これより濃度が高くても低くても中枢神経系の変化は認められなくなる。この濃度は丁度センチクバエの蛹化を誘導するエクダイソンの濃度でもある。このような中枢神経系の変化は、培養系にエクダイソンが持続して存在しなくても、中枢神経系が一過的にこの濃度のエクダイソンに曝されれば自律的に誘導されることが分かった。エクダイソンに曝す時間を調べたところ、1 時間で十分であり、10 分曝しただけでも変化の誘導が認められることが確認された。この事実は、エクダイソンは中枢の変化誘導の引き金を引くだけで、一旦引き金がひかれると、後は自動的に変化が進行することを示唆する。

次に、中枢神経系の細胞レベルでどのような変化が起きているかを調べた。その結果、視神経が発達する脳半球の表層部および深部で神経芽細胞の増殖が、また幼虫の脳の髄質の一部でアポトーシスによる神経細胞の死が、同時に進行することが明らかになった。つまり、変態過程で昆虫の脳では、神経芽細胞から新しい成虫の視神経が発生すると同時に、一部の幼虫神経細胞は死に、残った神経細胞と新しく生じた神経細胞によって成虫の中枢神経系が再編成されることが示された。図 1 にエクダイソンによって誘導される神経芽細胞の分裂を BrDU の取り込みで検出した像を示した。この図で、A はエクダイソンで処理した中枢、B は処理しない中枢である。処理しない場合には BrDU の取り込みは認められないが、エクダイソン処理により視神経が発達する領域にシグナルが認められるようになる。このシグナルのパターンは、蛹に BrDU を投与して神経細胞の分裂を見た、C のパターンとよく似ていた。

一方、中枢神経が再編成される過程で起きる細胞死を TUNEL 法により調べた。これはアポトーシスによって生じる DNA の断片化を検出する方法である。エクダイソン存在下に培養した中枢神経系では、視髄と前大脳の境界部分で顕著な細胞死が認められるが、エクダイソンがないとこのような細胞死は起こらないことが分かった。蛹化 1 日後の蛹の脳半球の中でも細胞死が起きており、そのパターンは *in vitro* でエクダイソン存在下に中枢神経系を培養したときに見られる細胞死とよく似ていた。この結果から、変態の過程で昆虫の脳の一部の細胞は死に、新しい神経細胞が生じて中枢全体で神経ネットワークの

再編成が起きることが明らかになった。これは昆虫の変態過程で、中枢神経系の再編成が明確に示された最初の例である。

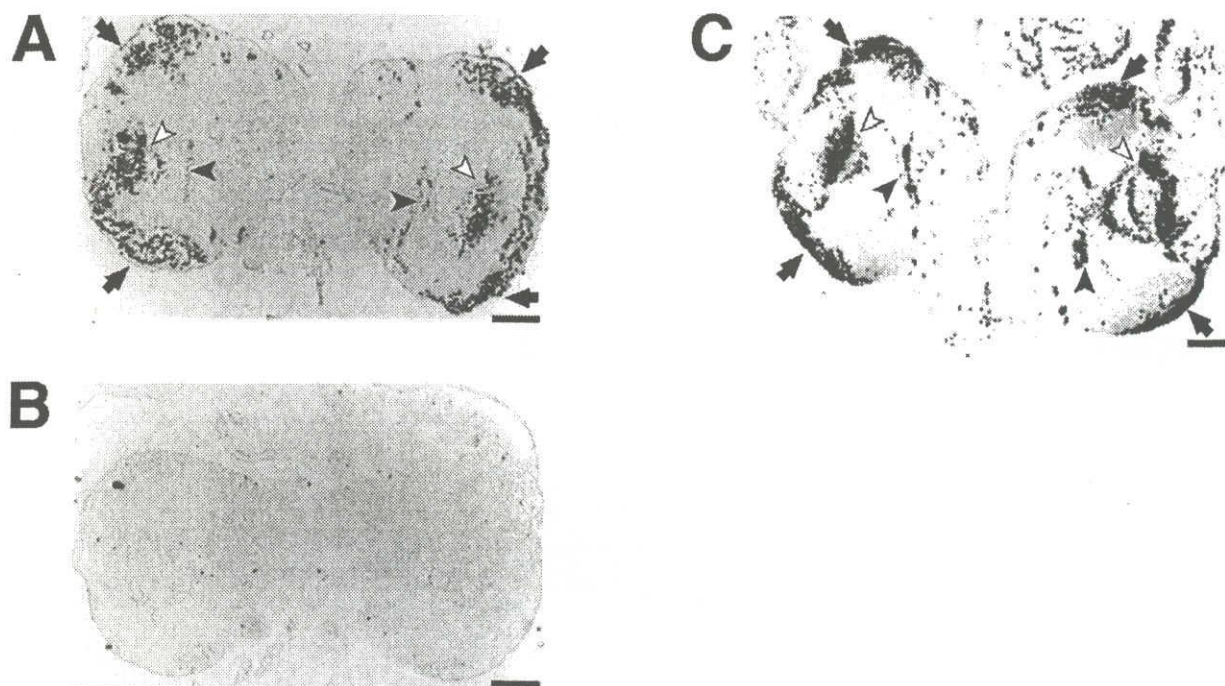


図1 エクダイソン処理した幼虫の脳内の細胞増殖

幼虫の中枢神経系を取り出し、A エクダイソン存在下、B 非存在下で処理後 BrDU の取り込みで細胞増殖を調べた。C は蛹に BrDU を投与し脳内の細胞増殖を見たもの。グレインは BrDU の取り込みを示す。矢印はいずれも視神経が発達する部位。バーは 100 μ m。

3) 考察

昆虫の変態の過程では分子レベル、細胞レベルおよび組織レベルで複雑な変化が誘起される。変態は成虫組織の発生過程であるが、別の見方をすると幼虫組織の排除の過程と見ることが出来る。本研究では、主として後者の立場からセンチニクバエの変態過程を調べた。その結果、第1項に示したような蛹顆粒細胞に特異的に発現する新しい膜蛋白と、第2項に示した yellow body に特異的に出現するプロテアーゼを発見した。この膜蛋白は、壊されるべき幼虫組織の認識分子か、あるいはカテプシン B の放出に関与するリセプターではないかと思われるが、それを証明するのは今後の課題である。またプロテアーゼに関しては、抗菌活性を併せ持つという大変ユニークな性質が明らかになったが、酵素学的な研究をもう少し進める必要がある。とくに、このプロテアーゼの基質が何であるか、早急に同定する必要があるだろう。もしその基質が中腸特異的な蛋白ならば、このプロテアーゼの出現する意味が明瞭になる。

一方、第3項に示した中枢神経系の再編成は、多くの人が予想した現象であるが、具体

的に細胞分裂と細胞死が示された点で意味がある。この研究では細胞分裂が起きる部位と細胞死が起きる部位を大雑把に示しただけであるが、今後は一つ一つの神経細胞について、きちんと同定して行く必要がある。また細胞分裂を誘導するのも、細胞死を誘導するのもエクダイソンであることは明瞭である。おそらく中枢神経系の再編成の過程で起きる神経細胞の分裂と死はプログラムされた反応で、エクダイソンは単に引き金を引くだけだろうが、その分子メカニズムはまだ明らかではない。この際エクダイソンによって特別の遺伝子が活性化される必要があるのか、あるいは遺伝子を介さないエクダイソンの作用機構があるのか、今後明らかにして行く必要がある。

4) 計画に対する達成度の自己評価と今後の方策

4年間の研究により、センチクバエの変態期に起きる組織崩壊、および組織再編成の過程を生化学的に研究し、その分子機構を明らかにするという当初の目的は一応多達成する事が出来た。しかし、これで十分と言うわけではなく、ここに報告した分子あるいは現象について、更なる解析が必要であることは明らかである。昆虫の変態と組織の再編成という大きな命題にアプローチする手掛かりを得たと言う点では、満足すべき達成度を得たと評価したい。今後はこの研究を深めると同時に、これらがどこまで普遍性があるのか、昆虫の種を変えて調べてみたいと考えている。

S. Hori, A. Kobayashi and S. Natori (1997) Monoclonal antibodies against pupa-specific surface antigens of *Sarcophaga peregrina* (flesh fly) hemocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 236, 497-501

Y. Nakajima, Y. Tsuji, K. Homma and S. Natori (1997) A novel protease in the pupal yellow body of *Sarcophaga peregrina* (flesh fly): Its purification and cDNA cloning. *J. Biol. Chem.* 272, 23805-23810.

T. Kunieda, S. Kurata and S. Natori (1997) Regeneration of *Sarcophaga* imaginal discs *in vitro*: Implication of 20-hydroxyecdysone. *Dev. Biol.* 183, 86-94.

Y. Fujita, S. Kurata, K. Homma and S. Natori (1998) A novel lectin from *Sarcophaga*. *J. Biol. Chem.* 273, 9667-9672.

I. Fujii, Y. Tanaka, K. Homma and S. Natori (1999) Induction of *Sarcophaga* central nervous system remodeling by 20-hydroxyecdysone *in vitro*. *J. Biochem.* 125, 613-618.

蛋白パルミトイル化酵素の変態時での機能解析の研究

上野孝治（基礎生物学研究所）

1) 目的

研究代表者は、カイコの初期発生の発生機構の解析の過程で、腹部の肢の細胞で多量に発現される p260/270 を見い出した。この蛋白質は、分子量 260 と 270 キロダルトンの二つの高分子蛋白質で構成されている。それぞれの蛋白質の cDNA のクローニングを行い全構造を明らかにした後、精製した p260/270 の試験管内での機能解析を行なった結果、この蛋白質は蛋白質パルミトイル化酵素であることを明らかにした。蛋白質パルミトイル化は、細胞内の情報伝達に深く係わる低分子量 G 蛋白質や三量体 G 蛋白質などが受ける化学修飾の一つである。この修飾がそれらの蛋白質の情報伝達の制御に関与していると考えられているが、その分子機構は未だ明らかにされていないのが実情である。

本研究の最終的な目的は、発生時に特定の組織、細胞で発現する蛋白質パルミトイル化酵素に注目し、その機能を解析することにより蛋白質パルミトイル化がどのような機構で情報伝達を制御するかの分子機構を解明することである。そのための第一ステップとして、マウスの胚発生時に蛋白質パルミトイル化酵素が神経細胞で多量に発現されるという現象に焦点をあて、この酵素の機能の解明を目的として研究を行った。さらに次のステップとして、マウスの神経細胞の解析で得られた情報を基礎にして、昆虫の変態時での蛋白質パルミトイル化酵素の機能の解明を目的として研究を行った。

2) 方法と結果

(a) マウスの胚で発現する蛋白質パルミトイル化酵素の機能の解析

蛋白質パルミトイル化酵素の機能の解析の最初の試みとして、昆虫以外の動物の胚発生時にも p260/270 のホモログが発現しているか否かを解析した。カイコの p260 と p270 のアミノ酸配列を EST (Expressed Sequence Tags) データベースでホモロジー解析を行った結果、マウスの胚でこれらの蛋白質のホモログと考えられる mRNA が発現していることが明らかになった。

マウスの胚の cDNA クローンの塩基配列を解析した結果、ORF が 2504 アミノ酸の大きな蛋白質をコードする mRNA が胚で発現されていることがわかった。この蛋白質はホモロジー解析から fatty acid synthase (FAS) であることが明らかになった。FAS はパルミチン酸を合成する酵素として知られている。このことは FAS が蛋白質パルミトイル化酵素そのものであることを示唆した。

FAS の mRNA がどのような組織で発現されているかを明らかにするため、マウスの胚の切片をこの cDNA をプローブとして *in situ* hybridization で解析した。その結果、受精後 10 から 11 日の早い段階のマウスの胚で、mRNA が脳等の中枢神経系や神経節などの末梢神経系の細胞で多量に発現されていることを明らかにした。発現はすべての中枢神経系と末梢神経系で観察されたが、この時期に神経系の細胞の発生分化が行なわれることがわかっている。

次に FAS を発現する細胞を同定するため、N 端部位のアミノ酸配列に対する特異抗体を調製し免疫化学的な解析を行なった。マウスの胚の脳から取り出した初代培養細胞を解析した結果、神経細胞でこの蛋白質が特異的に発現されることが明らかになった。この観

察をもとにカイコの初期発生段階での p260/270 の発現を詳細に解析し直した結果、カイコでも脳組織で p260/270 が発現されていることが明らかになった。以上の解析から、マウスやカイコの胚の神経細胞で蛋白質パルミトイル化酵素が発現されていることから、この蛋白質が神経細胞の発生分化に関与している可能性が考えられた。

マウスの神経細胞に特異的な各種の抗体で解析した結果、この蛋白質は軸索伸張を制御する Growth-Associated Protein 43 (GAP-43) とよく似た局在性を示すことを明らかにした。GAP-43 は三量体 G 蛋白質の G_o と関係して情報伝達を調節することで軸索伸張を制御すると考えられているが、この際 GAP-43 が蛋白質パルミトイル化により修飾を受けると G_o の活性化が阻害されることがわかっている。このことからマウスでは蛋白質パルミトイル化酵素が GAP-43 のパルミトイル化を行なうことで軸索伸張を制御しているのではないかと考えられる。

FAS が蛋白質パルミトイル化酵素であることを確認するため、FAS をマウスの胚から精製し試験管内で蛋白質パルミトイル化活性を測定した。その結果、精製した FAS が GAP-43 をパルミトイル化する活性をもつことを明らかにした。この修飾は GAP-43 の N 端部位のシステインを認識しておこる反応であり、この反応は FAS の阻害剤であるセルレニンで完全に阻害された。

セルレニンを初代培養した神経細胞の培地に添加すると、神経細胞の軸索が 2 時間以内に消失することを明らかにした。このときの神経細胞内の GAP-43 のパルミトイル化は完全に抑制されていたことから、セルレニンが神経細胞内で FAS による GAP-43 のパルミトイル化を阻害することで軸索伸張を抑制したと考えている。

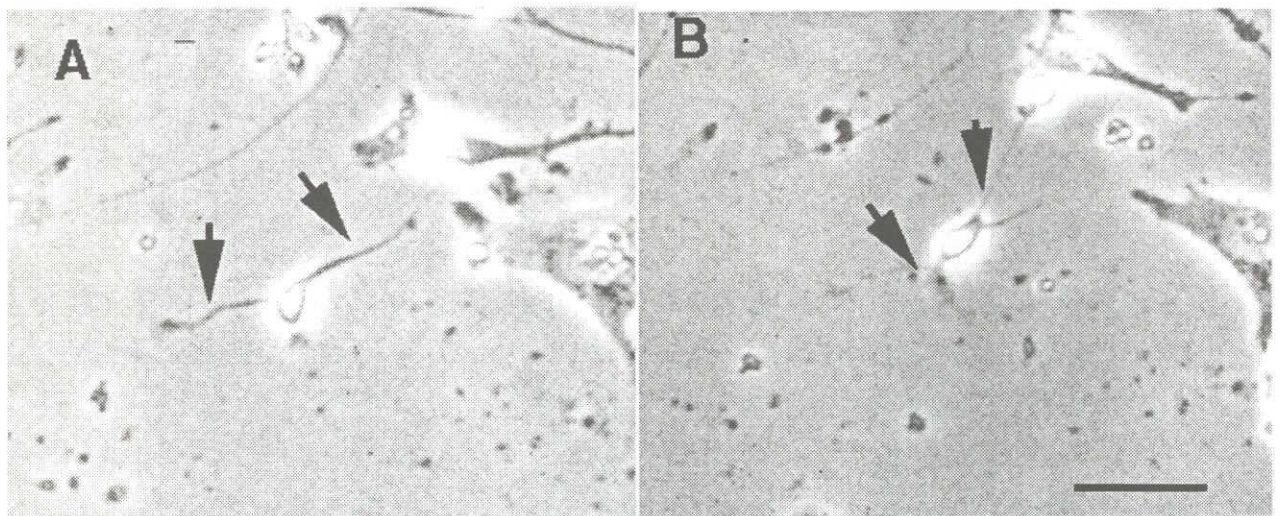


図1 神経細胞に対するセルレニンの効果

セルレニンを添加する前 (A) に比べると添加後 2 時間 (B) で軸索が消失している。

以上のことから、マウスの発生段階で神経細胞で蛋白質パルミトイル化酵素は GAP-43 のパルミトイル化を行なうことで軸索伸張を制御している可能性を示唆した。

(b) 昆虫の変態時に発現する蛋白質パルミトイル化酵素の機能の解析

昆虫の変態時には幼虫の神経系から成虫の神経系への再構築が行われる。その神経系の再構築に焦点をあて蛋白質パルミトイル化酵素の機能の解析を行った。

昆虫の変態時の蛋白パルミトイル化酵素の発現を調べるため、ショウジョウバエの蛹を用い、蛹全体のホモジェネートをカイコの p260/270 の抗体による immunoblot 法で解析した。その結果、p260/270 の抗体に反応する分子量およそ 260 キロダルトンの蛋白質が検出された。このことは変態時にも蛋白パルミトイル化酵素が発現されていることを示唆する。

p260/270 の抗体を用いてショウジョウバエの蛹の脳を用いた免疫蛍光法の解析を行った。その結果、脳や食道下神経節で蛋白質パルミトイル化酵素が発現されており、特に神経節から出た軸索部分にこの酵素が検出されることが明らかになった。昆虫の GAP-43 の特異抗体を調製して解析した結果、蛋白質パルミトイル化酵素の発現パターンは GAP-43 の発現と類似していることがわかった。二つの蛋白質の発現パターンが類似していることから、変態時にも蛋白質パルミトイル化酵素が神経細胞の軸索伸張に関与していることが考えられる。

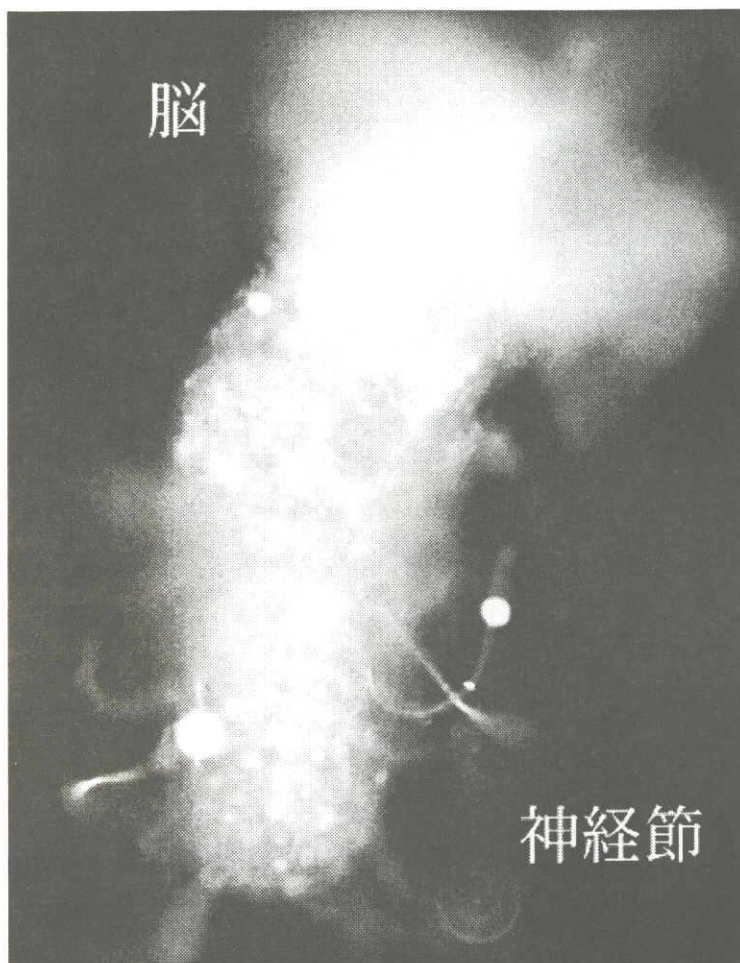


図2 p260/270 の抗体によるショウジョウバエの蛹の脳の免疫蛍光法

3) 考察

マウスの胚で発現する蛋白質パルミトイル化酵素の機能の解析を行った結果、神経細胞でこの酵素は GAP-43 のパルミトイル化を行なうことで軸索伸張を制御している可能性を示唆した。神経細胞ではパルミトイル化の修飾を受けた多く種類の蛋白質が存在することがわかっている。本研究は、軸索伸張の制御だけではなく神経細胞における情報伝達の制御全般の分子機構の解明の基礎になるものだと考える。

後期発生である昆虫の変態時にも蛋白質パルミトイル化酵素が神経系で発現されることを明らかにした。変態時の神経系の再構成の分子機構は大変興味ある問題である。今後は神経系再構成の最大の問題である選択的な神経系ネットワークの構築の分子機構を明らかにする研究が必要であると考ええる。

4) 研究に対する達成度の自己評価と今後の方策

カイコの初期発生で発現する p260/270 の発見からこの研究が始まり、マウスの胚で発現する蛋白質パルミトイル化酵素の解析で、この酵素の分子的な機能を論ずるところまで到達した。この研究は情報伝達での蛋白質パルミトイル化の分子機構を明らかにする最初のステップになると考えている。

昆虫の変態時に発現する蛋白質パルミトイル化酵素の機能の解析では、この酵素が神経系の細胞で発現されていることを示す結果が得られたが、その機能の解析が行われていない。今後は、蛋白質パルミトイル化酵素の活性を抑制すると変態時の神経系の再構成にどのような影響がおこるかなどの機能の解析が必要であると考ええる。

この研究を基礎にして、昆虫と哺乳類の動物の発生の共通機構を解析するという研究を行い、生物に共通する発生の制御機構を分子レベルで明らかにできるのではないかと考えている。

5) 発表論文

T. Nagata, Y. Suzuki, K. Ueno, H. Kokubo, X. Xu, C. -c. Hui, W. Hara, and M. Fukuta, (1996) Developmental expression of the *Bombyx Antennapedia* homologue and homeotic changes in the *Nc* mutant. *Genes to Cells*, 1, 555-568

K. Ueno and Y. Suzuki (1997) p260/270 expressed in embryonic abdominal leg cells of *Bombyx mori* can transfer palmitate to peptides. *J. Biol. Chem.* 272, 13519 - 13526

H. Kokubo, K. Ueno, K. Amanai and Y. Suzuki, (1997) Involvement of the *Bombyx Scr* gene in development of the silk gland. *Develop. Biol.* 186, 46 – 57

K. Matsunami, H. Kokubo, K. Ohno, P.-x. Xu, K. Ueno and Y. Suzuki (1999) Embryonic silk gland development in *Bombyx*: molecular cloning and expression of the *Bombyx trachealess* gene. *Dev. Genes Evol.* 209, 507 – 514

ステロイドホルモンによる生と死の決定：20-ヒドロキシエクジソンによる成虫特異的組織の蛹コミットメントと幼虫特異的組織の予定細胞死の誘導

桜井 勝（金沢大学理学部生物学科）

本研究の目的は昆虫の変態に際して見られる成虫特異的組織での蛹コミットメントや幼虫特異的組織の予定細胞死のホルモン支配を明らかにすることにある。このために、まず体液中のホルモン動態を詳細にし、ついで、細胞レベルでのステロイドホルモンによる決定や細胞死の分子機構を明らかにすることを目指した。

1. 終齢幼虫の体液幼若ホルモンとエクジステロイド濃度の変動

目 的

昆虫の変態は一義的には幼若ホルモン（JH）とエクジステロイドの支配下に進行する。これまでに、大まかな体液中のホルモン濃度が測定されてきたが、近年の変態に関わる諸現象が時間軸を細かくとって記載され解析されるようになり、ホルモン動態に関する詳細な知見が必要となっていた。そこで、カイコ幼虫期におけるJHとエクジステロイド濃度の詳細な変動を測定することとした。

方 法

幼虫から体液を採取し、JH、エクジステロイドともにラジオイムノアッセイでホルモン濃度を測定した。また、アラタ体培養によるJH分泌能の変動測定、除脳・前胸腺刺激ホルモン、20E投与による変態におけるエクジステロイドの各濃度ピークの持つ意味の推定を行った。

結 果

JH濃度は幼虫脱皮時に鋭いピークを示す。4 齢期間中は顕著な増減を示さず、ある程度の濃度で推移した。5 齢初期に急激に低下し、2 日には検出限界以下となった。JH酸の変動は4 齢ではJH濃度と関連無く高い濃度で推移したが5 齢ではほぼJH濃度変化と同じ濃度で変動した。5 齢前蛹期には期待されたように高いJHピークが認められた。3～5 齢期間のJH濃度変動は、各齢期でかなり様相が異なることも併せて明らかとなった。

エクジステロイド濃度は、4 齢と5 齢期間中2 時間毎にデータをとった。4 齢の脳臨界期以前は増減はあるものの20～30 ng/mlの濃度で推移し、各暗期のはじめに濃度の立ち上がりがあった。70 時間を中心とした鋭いピークがあり、脱皮直後には数ng/mlと低い値となった。5 齢脱皮後、濃度は検出限界ぎりぎりとなり、低い値は3 日まで続いた。その後暗期に上昇、明期に減少という日変動を繰り返しながら濃度は徐々に上昇した。また、吐糸管着色、ガットパージに対応する明確なピークが観察できた。

考 察

本研究で、これまではっきりしなかったJHとエクジステロイド濃度の詳細な変化を記述し、既に観察されてきた形態変化を含めた変態に関わる現象との対応関係を明らかにし

た。またJH濃度変化は3、4、5齢期で異なり、エクジステロイド濃度変化も4齢と5齢の各初期で大きく異なっていた。これらの変動は、4齢を幼虫たらしめ5齢を変態導入期たらしめる要因を解析する上で有力な手がかりを与えるものと思える。次節に述べる翅成虫原基の蛹コミットメントのホルモン支配がこれまでの説では説明つかず、新たな説明を導入するに至ったのも、JHとエクジステロイド濃度の詳細は変動結果に基づいたものである。

計画に対する達成度の自己評価と今後の方策

当初の計画通りに結果は出た。この研究は基礎データの収集であり、これで終了したものである。しかし、5齢脱皮前後の前胸腺の活性調節が変態導入に密接な関わりがあると考えられるため、この時期の前胸腺の活性調節の分子機構を探りつつある。

2. 蛹コミットメントのホルモン支配

目 的

前節で述べたとおり、鱗翅目昆虫の終齢幼虫期の体液中のJH濃度は摂食期の間低い濃度に保たれる。しかし、摂食期が終わるところになると再び上昇し始め、蛹脱皮を誘導するエクジステロイドの高まりが起こる前蛹期には幼虫脱皮時以上の濃度になる。しかし、JH存在下でのエクジステロイド分泌にもかかわらず、幼虫は幼虫へと脱皮せず蛹へと変態する。これは終齢幼虫の諸器官が前蛹期に入るところまでにすべて蛹変体の決定を受けており、決定を受けた器官はJHの有無にかかわらずエクジステロイドに応答して蛹変体を行うためである。この決定を蛹コミットメントという。蛹コミットメントがなされる時期は組織により異なり、タバコスズメガの表皮細胞ではその時期は摂食停止直前にある。これまで蛹コミットメントに関してはタバコスズメガの表皮細胞以外ではほとんど研究がなされなかった。そこで、カイコガの翅成虫原基の蛹コミットメントの時期を特定するとともに、あわせてその内分泌支配機構とそれに続く分子機構を解明することを目的とした。

方 法

カイコガ幼虫の翅成虫原基を4齢1日の幼虫腹部に移植し、ホスト幼虫が5齢1日になったとき移植片を取り出し蛹クチクラの有無を観察し、あるいはクチクラタンパク質の同定に供した。この方法を本稿では移植検定とよぶ。また、人為的に早熟蛹コミットメントの誘導方法を確立するため、体外培養系でJH誘導体（JHA、メソプレン）、20-ヒドロキシエクジソン（20E）の投与のタイミングと作用時間を種々に変化させた。

結 果

移植検定後に形成される蛹クチクラの面積に対応したスコアリング法を導入し、検定結果を数値で表示できるようにした。また、このスコアリングが形成される蛹クチクラタンパク質の多寡によく相関していることをウェスタンブロットにより示した。移植検定により以下のことを明らかにした。翅成虫原基の蛹コミットメントは脱皮直後から始まり、ほぼ16時間で翅成虫原基のすべての細胞で完了する。脱皮直後の翅成虫原基細胞はホルモンフリーで培養することで蛹コミットメントを誘導でき、20Eはそれほど効果を示さな

い。ホルモンフリーで誘導される蛹コミットメントはJHAで抑制されるが、20E存在下ではJHAは蛹コミットメントを抑制できない。このときのJHA濃度は体液最大JH濃度の約100倍であった。カイコガ翅成虫原基は4齢期の頭部膨出（HCS、head capsule slippage）期（脱皮約24時間前）以後20Eに対しての応答能を示すようになる。このころのJHA感受性（20Eによる蛹コミットメント誘導の抑制効果）は5齢脱皮時よりも約100倍高く、その臨界濃度は体液最高濃度に近似していた。

4齢HCS以前の翅成虫原基は培養系において20E応答能をまったく示さない。そこで、培養系で20E処理をする前に、細胞内残存JHを消去する目的で、翅成虫原基をホルモンフリーで一定時間培養し、その後20Eにさらすと、原基は蛹コミットメントされた。このときの20Eによる蛹コミットメント誘導に対するJHAの抑制効果は、HCS時のさらに約100倍低い濃度で十分に見られた。以上の結果は、翅成虫原基の蛹コミットメントはHCS以後に始まり、20Eにより誘導されるものの、蛹コミットメントの進行は一義的には翅成虫原基のJH応答性の壊失によるものと考えられる。また、蛹コミットメントが幼虫脱皮を境として、可逆的変化から不可逆的に固定される過程を経て確立することも明らかとなった。

これらのホルモン処理による蛹コミットメント誘導時でのエクジソン受容体（EcRAとEcRB1）の発現を追跡したが、遺伝子発現レベルでは有意な変動は何ら見られなかった。

考 察

本研究は、これまでタバコスズメガの表皮細胞にほぼ限られてきた蛹コミットメントの研究を、表皮由来の翅成虫原基に敷衍し、その起きる時期もホルモン支配機構も異なることを示した。ただし、ホルモン支配に関しては翅成虫原基での本研究が数段緻密であり、恐らく表皮細胞でも翅成虫原基と同様な過程をへて蛹コミットメントが進行するものと考えられる。

計画に対する達成度の自己評価と今後の方策

蛹コミットメントのホルモン条件を明らかにし、培養系で自由に組織に蛹コミットメントを起こさせる系を確立するという、当初の計画の一部は達成できたと考えている。しかしホルモンによりもたらされた決定状態の維持機構に迫ることは、その糸口すら見出せなかった。蛹コミットされる以前の翅成虫原基細胞は20E応答性を示さないが、コミットされると20Eに応答して急激に細胞分裂をはじめめる。ここにコミットされた状態がいかなるものであるかを解明する手がかりがあるものと考え、現在G1,G2チェックポイント関連遺伝子の網羅的なスクリーニングをしている。

3. エクジステロイドによる幼虫特異的組織の予定細胞死の誘導とその分子機構

目 的

変態に際して幼虫特異的組織の多くは予定細胞死（PCD）により除去される。昆虫のPCDは古くは前胸腺や絹糸腺で、近年では神経細胞で知られており、いずれもエクジステロイドによるものとされてきた。一方、ステロイドホルモンによるPCDは、グルココ

ルチコイドによるアポトーシスがよく知られているものの、そのホルモン支配の詳細と分子機構についてはほとんど研究が進んでいない現状である。20Eによるカイコガの前部絹糸腺のPCDをモデルとして、ステロイドホルモンによるアポトーシスの分子機構に迫ることが本研究の目的である。

方 法

カイコガ5齢幼虫のガットパージした当日の前部絹糸腺（ASG）を材料とし、第一にそのホルモン支配の詳細を、ついでこれまでに知られている種々のアポトーシス誘導あるいは阻害剤の作用を検討した。さらに、20Eにより誘導される初期遺伝子をディファレンシャルディスプレイとサブトラクションにより同定した。

結 果

培養系でPCDを完了させるには、20E刺激は42時間必要である。20Eチャレンジ後8時間以後では α -アマニチンによる阻害は見られないことから、細胞死に必要な遺伝子発現は8時間以内で完了する。またシクロヘキシミドやエメチンの差次的投与により、細胞死に必要なタンパク質合成はホルモンチャレンジ18時間以内に完了する。しかし、24時間のホルモン刺激では、細胞死はほんのわずかしかな進行せず、DNAラダーを生じるには31時間の、核の断片化には42時間のホルモン刺激を必要とする。これは細胞死を誘導する上で、ステロイドホルモンの作用は遺伝子発現を伴うものと、遺伝子発現と関係ないものとの2種類が時間差をもって機能することを示唆している。

20Eにより発現する初期遺伝子を7種類同定し、すべてに関してcDNA全長の塩基配列を決定した。その結果、すべてが新規遺伝子であり、特筆すべきはアネキシンVと相同性の高い遺伝子が同定されたことである。また2種類はORFを持たなかった。しかし、20Eに誘導される初期遺伝子のAshburnerによるすべてのクライテリアを満足することから、この遺伝子はRNAのままで（恐らくcoactivatorとして）機能していることが示唆される。確かに、このRNAと特異的に結合するタンパク質が、絹糸腺粗抽出物中に5-6種類見出されたことから、ある種のタンパク質をアSEMBルする機能があることが示された。

遺伝子発現を伴わないであろう20E作用は、恐らく膜受容体を介したものと想定し、種々の細胞内シグナル伝達調節にかかわる薬剤を用いて薬理的検討を加えた結果、少なくとも20E除去をdbcAMPが補償すること、適当なホルモン前処理を施した絹糸腺に培養系で20Eを加えると10分以内に細胞内cAMPレベルが急上昇することなどから、膜受容体の関与が示唆された。また、このときの20E作用が恐らくカスパーゼ3の活性化と関連し、核の凝縮と断片化にも関わることを明らかにした。

考 察

ステロイドホルモンによるアポトーシスは古くから知られているものの、その分子機構の解明は、Fasリガンドによるアポトーシスに見られるような膜受容体を介した細胞死に比べ相当に後れている。本研究は、ステロイドホルモンの引き起こされる細胞死は、ホルモン作用の点からみて2段階の進行に分けうることを示した。第一は核受容体を介した

遺伝子発現を伴うものであり、第二は膜受容体・シグナル伝達機構を介した細胞死関連酵素群の活性化によるものである。遺伝子発現を伴わない (non-genomic) ステロイドホルモン作用を示唆する結果は脊椎動物、無脊椎動物を問わず散見されるようになった。本研究で得られた成果がステロイドホルモンの新たな作用機構の解明につながるものと期待している。また、結果には示さなかったが、第二の過程に入った細胞に翻訳阻害物質を作用させると突発的に細胞死が進行した。これは、細胞死抑制因子の補給路を断ったためと考えられ、これまでに知られているタンパク合成阻害剤による細胞死の分子機構の解明の糸口となり得る。

計画に対する達成度の自己評価と今後の方策

当初計画したほとんどの部分が終わり、細胞死に関しては計画はほぼ達成したものと考えられる。新規遺伝子探索は当初期待していた転写調節因子らしきものがクローニングされておらず、細胞死の引き金を引く遺伝子があるはずであるが、未同定である。しかし、昆虫の幼虫特異的組織である絹糸腺の細胞死でも、カスパーゼ3が関わること、アネキシンV相同遺伝子がクローニングされてきたこと、coactivatorとしての機能を保有するであろうRNAがクローニングされたことから、これらを発展させた研究を策定している。一方、膜受容体を介するステロイドホルモン作用を示唆する強い傍証を得たことから、直截的なその存在証明と膜受容体のクローニングを進めることが目下の急とするところである。これらを勘案すると計画に対する達成度は7割くらいかと思える。これまでとってきた戦略に基本的な誤りは無いものと思え、今後はクローニングした遺伝子の機能探索、および20Eの膜受容体の同定に焦点を絞る予定である。

発表論文

S. Niimi and S. Sakurai (1997) Developmental changes in juvenile hormone and juvenile hormone acid titers in the hemolymph and in vitro juvenile hormone synthesis by corpora allata of the silkworm, *Bombyx mori*. *Journal of Insect Physiology*, 43, 875-884.

S. Sakurai, M.Kaya and S. Satake (1998) Hemolymph ecdysteroid titer and ecdysteroid-dependent developmental events in the last-larval stadium of the silkworm, *Bombyx mori*: role of low ecdysteroid titer in larval-pupal metamorphosis and a reappraisal of the head critical period. *Journal of Insect Physiology*, 44, 867-881.

J. Terashima, N. Yasuhara, M. Iwami and S. Sakurai (2000) Programmed cell death triggered by insect steroid hormone, 20-hydroxyecdysone, in the anterior silk gland of the silkworm, *Bombyx mori*. *Development, Genes and Evolution* (in press).

S. Tsuzuki, M. Iwami and S. Sakurai (2000) Ecdysteroid-inducible genes in the programmed cell death during insect metamorphosis. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* (in press).

昆虫細胞内共生細菌ブフネラに関する分子細胞生物学的研究

石川 統 (東京大学大学院理学系研究科)

〔目的〕 アブラムシ類は脂肪体内に数十個の菌細胞をもち、その細胞質にブフネラとよばれる共生細菌をきわめて多数収納している。ブフネラを菌細胞より単離して培養することは不可能であり、宿主アブラムシも、抗生物質等でブフネラを失わせると、矮小化し、正常な子孫を残せなくなる。このことから明らかのように、ブフネラと宿主昆虫の間には相互依存度のきわめて高い、絶対的共生関係が維持されている。この共生の1つの鍵を握っているのは、窒素代謝、とくにアミノ酸代謝である。われわれのこれまでの研究によって、アブラムシ類が窒素分に乏しい植物師管液を常食としながら、後生動物としては例外的に旺盛な増殖力を示すのは、ブフネラが宿主の合成できない必須アミノ酸を生産し、提供しているからであることが明らかになった。

本研究では、これまでに得られた結果をさらに掘り下げ、本共生系の本質を理解する目的でブフネラのゲノム構造および遺伝子発現についてくわしく調べることを主要な目的とした。材料はすべて、研究室において20年余にわたって継代飼育してきたエンドウヒゲナガアブラムシ (*Acyrtosiphon pisum*) のクローンである。

〔方法と結果〕

1. ゲノムサイズ: rDNA, ストレスタンパク質 GroEL など、数十種類に及ぶ遺伝子構造の比較から、ブフネラは大腸菌にきわめて近縁なプロテオバクテリア・ガンマ亜族に属する細菌であることが強く示唆されていた。他方、ブフネラとアブラムシ類の細胞内共生には約2億年の歴史があることも示唆されている。この進化学的時間の間にゲノムがどのような変貌を遂げているかを知る手始めとして、ブフネラゲノムのサイズを正確に測定することを行った。このため、約100頭のアブラムシから外科的に菌細胞を単離し、キャピラリー法でそれらからブフネラを混在物なしに放出させ、DNAを精製した。ブフネラゲノムは非常にA/Tに富むDNAからなることがわかっていたので、認識部位に多数のG/Cを含む制限酵素によって切断し、それらをパルスフィールドゲル電気泳動で分離し、各断片のサイズの総和をもってゲノムサイズとした。8種類の制限酵素による結果は、一致してブフネラのゲノムサイズは650kb前後、形状は環状二本鎖であることを示した。その他に、2種類の小型のプラスミドの含まれることも明らかとなった。この結果は、ブフネラゲノムは近縁な大腸菌ゲノムの約1/7にサイズを縮小していることを示している。また、既知の遺伝子のマッピングから、ブフネラは同じガンマ亜族の中でインフルエンザ菌よりもはるかに大腸菌に近いことが確認された。

2. ゲノムコピー数: 後述のブフネラの遺伝子発現を調べている過程で奇妙な現象に気づいたことがきっかけとなって、ブフネラが各細胞に平均100以上のゲノムコピーをもつ、きわめて例外的な細菌であることが明らかとなった。ゲ

ノムコピー数の測定は以下にのべる3つの方法によった。第1の方法はドットプロット・ハイブリダイゼーション法である。このために大腸菌およびブフネラ細胞から定量的に DNA を抽出し、それを PCR で増幅させた遺伝子断片（プローブ）とハイブリダイズさせた。その結果、groE オペロンは双方のゲノムとも1コピーしかもたないことが知られているにもかかわらず、シグナルの強さは、ブフネラ細胞が大腸菌細胞の約100倍のgroEコピーをもつことを示した。また、大腸菌ゲノムに7コピー、ブフネラゲノムに1コピー含まれることのわかっている rDNA の断片をプローブとした場合にも、細胞当たりではブフネラの方が大腸菌より10倍近い rDNA コピーをもつことが示された。

これらの結果だけでは、特定の遺伝子がブフネラ細胞内で特異的に増幅されている可能性も捨てきれないため、次に細胞内の DNA 量を直接比較する方法を用いることにした。これには、単離し、プロピジウムイオダイト(PI)などで処理した細胞に励起光を当て、放射される蛍光の強さを微量測定する方法、video-intensified microscope photon-counting system(VIMPCS)を用いた。これには、同一視野に置いた大腸菌および酵母細胞と放射される蛍光の強さを比較するという方法を採用した。ブフネラ同様、これらのゲノムサイズは既知なので、蛍光の強さをゲノムサイズで除した商がゲノムコピー数にあたる。それによって得られた結果とドットプロット解析の結果を併せ考えると、ブフネラ細胞ではゲノム全体が著しく増幅されているが、その範囲は20倍程度から数百倍までに及ぶことが明らかになった。

ブフネラのゲノムコピーがこのように多数あることは、その後に行ったりアルタイム定量 PCR 法によっても確かめられたので、次には、これに VIMPCS 法を併用して宿主昆虫の発生段階およびモルフの違いによるコピー数の変化を検討した。その結果、母虫から伝達された直後のブフネラではゲノムコピー数が少なく、その後次第に増加し、老齢化で再び減少することがわかった。また、飛行直後の有翅型ではコピー数の増加していることもわかった。

3. ゲノム解析：従来から、大腸菌遺伝子断片をプローブとして、ブフネラゲノムからはすでに数十の遺伝子が同定されていたが、このような個別遺伝子の探索ではゲノムの全貌には迫れないし、とくに失われた遺伝子の情報は得られない。われわれは大腸菌と近縁でありながら、ブフネラのゲノムサイズが1/7に縮小していることに注目し、そのゲノム解析を遂行することにした。大腸菌ゲノムと遺伝子レパートリーを比較することによって、2億年の細胞内共生がゲノムにどのような影響を与えたかを直接査定できると期待されたからである。ゲノム解析のためにわれわれは約2000頭のアブラムシから外科的にブフネラを採取し、そのDNAを純粋な形でとり出した。解析は whole genome shotgun random sequencing 法により、7回以上の redundant reading によって、誤差<0.01%で全塩基配列を読むことに成功した。ORFの探索は GeneHacker program によって行い、予測されたものをさらに BLAST programs で解析した。その結果、染色体ゲノムは全長640,681bpの環状二本鎖であり、他に7,786bpのロイシン合成系遺伝子をコードしたプラスミドと、7,248bp x nのトリプトファン合

成系遺伝子をコードしたプラスミドをもつことが明らかになった。これは、これまで解析された細菌ゲノムとしては、*Mycoplasma genitalium*(580kb)について2番目に小さいものである。ゲノム DNA のコード領域は全長の 88%であったが、そこには rDNA 1 個、tRNA 遺伝子 32 個の他、583 個の ORF が同定された。これらのうちには、機能既知の遺伝子に対応する配列は 500、機能未知既同定遺伝子は 79 であり、ブフネラ固有の遺伝子は 4 個にすぎなかった。これまで解析されたゲノムには、例外なしに 20%以上の未同定遺伝子がみつまっていることを考えると、それがわずか 4 個しかないというブフネラゲノムはきわめて例外的である。579 個の既同定遺伝子の圧倒的多数についてみても、もっとも配列同一性の高いのは大腸菌遺伝子である。これらの結果は、ブフネラは予想されたとおり、2 億年の共生を通じて大腸菌に近い祖先の細菌から、ほぼ一方的に遺伝子を失って、後者の 1/7 にまでゲノムサイズを縮小させたことを強く示唆している。

寄生は共生への一里塚であると言われることが多い。その意味では、ブフネラという絶対共生細菌のゲノムに残された遺伝子レパートリーを、最近相次いでゲノム解析の行われたリケッチア、クラミジア、マイコプラズマ等の寄生細菌のゲノムのそれと比較してみることは大変に興味深い。これらの寄生細菌もゲノムサイズの縮小という点では、ブフネラと同様の進化的傾向を示しているからである。その結果もっとも目を引いたのは生合成系、とくにアミノ酸生合成系遺伝子群にみられる違いであった。寄生細菌ではこれらの供給をほぼ全面的に宿主細胞に仰いでいる状況を反映して、アミノ酸生合成系遺伝子のほとんどすべては失われている。ところが、ブフネラでは、これらの遺伝子が大腸菌の半分に当たる数十個程度も残している。さらにくわしく調べてみると、ブフネラが残しているのは、昆虫を含む後生動物が自らは合成できない不可欠（必須）アミノ酸生合成系遺伝子ばかりである。他方、昆虫の合成できる、いわゆる可欠アミノ酸生合成系の遺伝子は 1、2 の例外を除いてすべて失っている。このことは、宿主がグルタミンやアスパラギンをブフネラに与え、必須アミノ酸を生産させているという従来の栄養生理学的研究結果をゲノムのレベルであますところなく裏書きするものである。宿主とブフネラの相互依存関係の 1 つの鍵を握っているのが、このようなアミノ酸合成における密接な相補性であることが強く示唆されたことになる。

ゲノム解析の結果は、ブフネラが独立生活生物では考えられないような遺伝子を欠いた生物であることを、さまざまな系について明らかにした。その 1 つはクエン酸回路系の遺伝子を、1 つを除いてすべて失っていることである。多くの証拠からブフネラは酸素呼吸を行う好気性細菌であることは間違いない。事実、大腸菌に似た電子伝達系の遺伝子をもっているし、F₁F₀ATP シンターゼ遺伝子も備えている。そうすると、酸化リン酸化に不可欠な電子供与体(NADH など)をどのように調達しているかが問題になる。クエン酸回路をもたない好気性生物はこれまでに知られていないので、何らかの形で宿主からの助けを得ているはずである。もう 1 つだけ非常に奇妙な例を挙げると、ブフネラはリン

脂質合成系の遺伝子を一切もっていないことである。リン脂質は細胞膜の主要な構成成分なので、これがつくれなければ、限界膜をつくれないうずだが、もちろんブフネラはそれをもっている。

4. 菌細胞共生系における遺伝子発現：これまでの研究によって、菌細胞共生系は宿主昆虫が老齢化（40 日齢以上）すると崩壊し、相互依存性を失うことが示唆されていた。このことに着目し、若い、さかんに産子中の宿主の共生系で高発現されている遺伝子産物こそ、共生の鍵を握るものと考え、ディファレンシャルディスプレイ法によって老齢虫と若齢虫の菌細胞発現遺伝子を比較した。その結果、若齢虫の菌細胞共生系で特異的に発現されている遺伝子の中には、ブフネラのいくつかの必須アミノ酸合成系遺伝子が含まれていることが明らかになった。前述のゲノム解析の結果と併せ考えると、必須アミノ酸合成系遺伝子は存在するだけでなく、これらのブフネラ遺伝子は共生系においてたしかに機能していることが明らかになった。同様に、ブフネラのリボフラビン合成遺伝子も菌細胞共生系で高発現されており、当ビタミンがブフネラから宿主に供給されている事実が裏づけられた。一方、共生系で高発現されている宿主側の遺伝子の1つとしてS アデノシルメチオニン・デカルボキシラーゼが検出された。この発現は共生系において高濃度に見いだされるスベルミジン濃度の消長と対応することがわかった。共生系の調節に、このポリアミンがどのような機構で関与しているかは今後の課題として残されている。

[考察]

本研究の目的の1つは、昆虫生理とは直接の関係はないが、典型的共生細菌のあり方をミトコンドリア等の細胞小器官との対比の下に問うことであつた。この目的は十分に達せられたと言える。ミトコンドリア、色素体ともに、共生に伴う著しいゲノムサイズの縮小が大きな特徴として知られているが、もう1つの特徴はゲノムコピー数の増大である。ブフネラゲノムについての、われわれの解析結果はこれら2つの特徴は、現在進行形の共生細菌であるブフネラによっても共有されていることが明らかにし、細胞内共生説を初めて実証した。

ゲノムの塩基配列の解析結果も、共生細菌ブフネラがいくつかの点で、細胞小器官に似た進化をたどっていることをはっきりと示している。それは寄生細菌とは違って、ブフネラが宿主に対して必須アミノ酸の供与という明確な役割を果たしている点である。これはミトコンドリアが真核生物に対してATPを供給していることに対比されうるであろう。その意味では、アブラムシのブフネラはもはや、アミノ酸供給性細胞小器官とよんでよいかもしれない。他方、遺伝子レパートリーをみる限り、ブフネラは宿主から多数の物質的援助を受けなければ生存できないことが示唆される。この点でも、ブフネラは細胞小器官に酷似している。例えば、遺伝子レベルでのクエン酸回路の欠損は、ミトコンドリアと同様に酵素の輸入という形で補われているのであろうか。それとも、何らかの間接的手段で電子供与体そのものが宿主から補充されているのであろうか。リン脂質合成系の見かけ上の欠損についても調べるべき課題は同様である。ポストゲノムへの興味を駆り立てられる課題である。

[達成度・自己評価・今後の方策]

本報告でのべる限り、当分担課題は昆虫生理に直接関わるものではなく、その点では、やや後ろめたさを感じないわけにはいかない。しかし、昆虫の生理に潜む1つの大きな特徴は、自己と非自己を厳密に峻別するというよりも、自らに欠けているものを他によって補うという進化的傾向をもつことである。この柔軟性に富む傾向がニッチの拡大に手を貸し、昆虫に今日の繁栄をもたらしたのだとさえいえる。昆虫のもつこのような柔軟性をもっともよく象徴しているのが、細菌等微生物との共生の現象であり、絶対的相互依存性という意味で、アブラムシとブフネラの細胞内共生はその極にあると言えるものである。筆者らは、この20数年この現象にとり組んできた関係で、栄養生理などの面におけるブフネラと昆虫との直接的関わりについては、ほぼ研究を終えており、後に残されていたのは、それらの成果を遺伝子ならびにゲノムのレベルで検証することであった。そのような段階で、本重点領域研究が発足し、おかげをもって十分にその目的を達成することができた。

今後の最大の課題はゲノムレベル、あるいは遺伝子レベルで露呈された、ブフネラの不完全さが、タンパク質、あるいは代謝産物のレベルでどのように補われているかを明らかにすることである。もう1つの興味の対象は、ゲノム解析で明らかになったブフネラ固有の4種類の未同定遺伝子である。例外的に残されたこれら4個の遺伝子こそ、ひょっとすると共生にとってもっとも重要な意味をもつものかもしれない。さまざまな共生系における、これらの遺伝子の分布と、その起源を明らかにすることが当面の課題である。

[代表的発表論文]

A. Nakabachi & H. Ishikawa (1999) Provision of riboflavin by endosymbionts to the host aphid, *Acyrtosiphon pisum*. *J. Insect Physiol.* **45**, 1-6.

H. Charles & H. Ishikawa (1999) Physical and genetic map of *Buchnera*, the primary endosymbiont of the pea aphid *Acyrtosiphon pisum*. *J. Mol. Evol.* **48**, 142-150.

K. Komaki & H. Ishikawa (1999) Intracellular bacterial symbionts of aphids possess many genomic copies per bacterium. *J. Mol. Evol.* **48**, 717-722.

K. Komaki & H. Ishikawa (2000) Genomic copy number of intracellular bacterial symbionts of aphids varies in response to developmental stage and morph of their host. *Insect Biochem. Mol. Biol.* **30**, 253-258.

S. Shigenobu, H. Watanabe, M. Hattori, Y. Sakaki & H. Ishikawa (2000) Mutualism as revealed by the genome sequence of *Buchnera* sp. APS, an endocellular bacterial symbiont of aphids. *Nature*, in press.

昆虫外皮の構築と機能：フェノール酸化酵素前駆体とそれを活性化するプロテアーゼカスケード構成要素を探りばりとしての研究

芦田正明 （北海道大学 低温科学研究所）

（研究成果）

1) 目的。 昆虫は変態の際に古い外皮を脱ぎ捨て新しい外皮を身にまとう。昆虫が後期発生においてこの変態にともなう”脱皮”という過程を経なければならないのは外骨格を持つ生き物としての宿命であり、また昆虫の生き様を特徴づける生化学現象でもある。したがって、この事実注目した一部の研究者が古くから、外皮（クチクラ）の形成・分解、生理機能、あるいは硬化・着色（*sclerotization*）の仕組みを究明して変態の神秘を解きあかす糸口をつかもうとしたのは正しい選択であったといえる。しかし、一般にクチクラは外骨格、いわゆる “死んだ部分”とみなされ物理的な防御機能のみ強調され、多彩な動的機能が発揮される場と考えられることは希である。さらに、最近の研究動向をみると、クチクラの主要構成タンパク（多くの場合機能不明のタンパク）の合成の転写レベルでのホルモン支配と、その主要タンパクが幼虫クチクラを構成するかあるいは蛹のクチクラを構成するかにのみ関心をむけた研究が主流である状況がずっとつづいている。このような視点からの研究ではクチクラについてのより深い理解、言い換えれば、変態・脱皮についての深い理解に到達することは困難だと思われる。

申請者は最近、クチクラを “死んだ部分” とする従来の常識を変えなければならないことを如実に示す事実を観察し、2つの論文に報告した。それらは、a) クチクラは傷ついたとき、傷害部分におけるバクテリア（異物）を認識しその存在を表皮細胞につたえ、表皮細胞による抗菌タンパク（セクロピン）合成とクチクラへの分泌を誘導することができること。したがって、クチクラは物理的であると同時に化学的にも *protective armour* であり、まさに昆虫の生体防御の最前線であることを示した論文 { *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 90, 6275 (1993) } とクチクラにも血液と同じようになフェノール酸化酵素前駆体 (*proPO*) カスケードが存在すること。そして、クチクラの *proPO* カスケード構成要素の内、すくなくともその1つ、*proPO* は血液から運ばれるらしいこと、しかもこの *proPO* のクチクラでの存在様式が今まで観察された例がないような規則性をもっていることを示した論文 { *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 92, 10698 (1995) } の2つである。また、未発表であるが我々は家蚕 *proPO* カスケードを構成する1つのセリンプロテアーゼの一次構造がショウジョウバエ初期胚の背腹軸を決定するセリンプロテアーゼカスケードの構成要素の1つ、イースター (*easter*) と非常に高いホモロジーを示すことを観察している。この高いホモロジーは昆虫の主要な生体防御機構の1つである *proPO* カスケードの構成要素が初期発生における形態形成にも関与しているか否かを検討してみることが必要であることを示している。家蚕の卵にも *proPO* カスケードが存在し、卵の *proPO* は血液のものと同じである可能性が高いという我々の観察結果と併せて考えると興味深い。

クチクラについてより深い理解を得るためには、表皮細胞による発生時期特異的なクチクラ構成タンパクの合成制御について研究するのみでなく、構成タンパクがクチクラを構築

するしくみ、様々な生理機能が脱皮・変態にともなってどのように発現するか、さらに、その生理機能を担うタンパクの合成場所、多機能性などが明らかにされる必要がある。このような視点に立つとproPOカスケードは良い研究対象である。その理由として、

1) 上に述べたような我々の観察事実。2) 各脱皮に同調して硬化・着色(sclerotization)に関与するproPOカスケードが存在し、活性化されるらしいという山崎(跡見女子学園大学)の観察(山崎の観察したproPOカスケードではラッカーゼタイプのproPOが活性化され、今まで我々が扱ってきたproPOカスケードとはこの点で異なる)。3) Peter Karlsonが30年以上前に着目して変態ホルモンの作用機構を研究したように、クチクラの硬化・着色はホルモンの制御を受けていることなどの諸事実あげることができる。本申請課題では以下に記す諸点についてintegument(クチクラと表皮細胞)の生理機能を総合的に研究し昆虫の変態の分子機構に迫ることをめざす。a) 表皮細胞がどの程度微細にクチクラを構成するタンパクの分布を支配できるか。b) どのような分子識別が表皮細胞膜上でなされて血液からのクチクラへのタンパクの移送が決まるのか。c) ラッカーゼタイプのproPOとチロシナーゼタイプのproPOの2種類のproPOが本当に存在するか。もし存在するとするとラッカーゼタイプのproPOはどの組織で合成され、その合成と活性化はどのようなメカニズムにより制御されているか。d) proPOカスケードを構成するセリンプロテアーゼ前駆体が初期胚発生において背腹軸決定に関与するセリンプロテアーゼ前駆体とどのような関係にあるか。

ProPOは昆虫の生理を特徴づける分子と考えられている。この分子に関連した研究で申請者は世界をリードしてきた。本申請課題のようなProPOの働きを用意する仕組みを多面的に研究する試みは前例がない。我々はintegumentのproPOカスケードのみではなく、卵のproPOカスケードについても研究を1996年度から本格的にスタートさせた。本申請課題の研究を推進することで昆虫変態の分子機構の研究に新生面を開くことができると考えている。

(方法と結果)

a) クチクラのproPOは本当に血液から運ばれてくるか。また、その仕組みはいかなるものか。目的の項で述べたようにproPOはクチクラで今まで観察された例がないような規則性をもって局在している。我々はこのproPOは表皮細胞では合成されず、血液から運ばれているらしいことをすでに報告している。昆虫では表皮細胞を横切ってタンパクが運ばれる、いわゆるtransepithelial protein transportの機構について全く研究がなされていない。血液のproPOはすでに精製され、その性質が良く研究されているが、クチクラからproPOが精製されたと言う報告はなされていない。そこで、まずproPOをクチクラから精製することを試みた。クチクラを0.33mM p-amidinophenyl-methanesulfonylfluoride と5mM EDTAを含む50mM アセテート緩衝液、pH5.2で1時間抽出し、その抽出液をCM-トローヨパールカラムクロマトグラフィーに供した。素通り画分のproPOをスーパーQ-トローヨパールカラム、ハイドロキシアパタイトカラム、Mono-Qカラムによるクロマトグラフィーで精製した。精製の過程でクチクラからのproPOは二つの画分に分かれ

たが、それぞれを均一な標品として得ることが出来た。未変性条件下での電気泳動で移動度が大きいproPOをproPO-CF、小さいproPOをproPO-CSと命名した。血液からもproPOを精製し、未変性条件下での電気泳動で移動度が異なり、しかも、それぞれがクチクラのproPOと同じ移動度を示す標品を得ることが出来た。血液の二種類のproPOをproPO-HF、proPO-HSと命名した。proPO-CFとproPO-HFをF型proPO、proPO-CSとproPO-HSをS型proPOと呼ぶことにした。箇々のカイコ幼虫の血液とクチクラについて、F型proPOとS型proPOの有無を調べるとF型proPOとS型proPOの両者を血液とクチクラに持つ個体とF型proPOのみを血液とクチクラに持つ個体が存在することが判明した。F型proPOのみを持つ個体をFタイプ幼虫と呼ぶことにした。Fタイプ幼虫の体腔に精製したproPO-HS (S型proPO) を注入し、48時間後に、その個体のクチクラに存在するproPOを電気泳動で解析した。その結果、クチクラにはF型proPOとS型proPOが存在することが確認できた。この結果は注入されたproPO-HSがクチクラに移動したことを示している。昆虫でtransepithelial protein transportが直接証明できたのは本例が最初である。面白いことに、同じ注入実験を精製したクチクラのproPO-CSを用いて行くと、proPO-CSはクチクラに移動しないことが判明した。この注入実験の結果は血液のクチクラへ移動したproPOは移動の過程で修飾を受け、血液のproPOとは異なっていることを示唆している。おそらく、その修飾のために体腔へ注入されたクチクラのproPOはクチクラへ移動できなかったと考えられる。クチクラの受けているこの修飾を明らかにすることは昆虫におけるtransepithelial protein transportの機構を解明するための手がかりになることが期待された。この修飾を明らかにするために、クチクラと血液のS型proPO (proPO-CS) をペプチドマッピング、アミノ酸配列分析、Matrix assisted desorption ionization mass spectrometry等を駆使して解析した。proPO-CSは他の血液やクチクラのproPOと同様に異なる2つのサブユニットから構成されている。それらをproPO-CS-plとproPO-CS-pIIと命名した。proPO-CS-plは逆相カラムクロマトグラフィーでproPO-CS-pIIより保持時間が短く、早くに溶出されてくるポリペプチドである。分析の結果、proPO-CS-plは5ないし6箇所メチオニン残基がメチオニンサルホキシドに酸化されていることが明らかになった。proPO-CS-pIIは一箇所でメチオニン残基がメチオニンサルホキシドに酸化されていた。proPOは節足動物のヘモシアニンに相同なタンパクであることを我々はすでに報告している。X線構造解析により明らかにされた立体構造を鋳型にSwiss Model ServerにproPO-CS-plとproPO-CS-pIIの一次構造を与え、それぞれのサブユニットのモデル立体構造を調べたところ、全てのメチオニンサルホキシドは分子表面へ側鎖が露出しているような構造をとっている可能性が高いことが明らかになった（ヘモシアニンと相同性が低いN末端とC末端部分のメチオニンサルホキシドについてはその部分のモデル構造を組み立てるできなかったので表面に露出しているか否か、protein modelingの手法では検討できなかった。

b) proPOカスケードを構成するセリンプロテアーゼ前駆体が初期胚発生において背腹軸決定に関与するセリンプロテアーゼ前駆体とどのような関係にあるか。proPOカ

スケードを構成するプロテアーゼの一つであるBAEEase前駆体（proBAEEase）はカビやバクテリアの細胞壁成分で引き金がひかれるプロテアーゼカスケードの働きで活性化されてBAEEaseになる。このBAEEaseは1995年に我々の研究室で精製され、ごく最近cDNAがクローニングされた。ショウジョウバエの初期発生において、胞胚期の囲卵腔でprospaetzleをspaetzleにプロセッシングするプロテアーゼのイースターは胚の背腹軸を決定するのに重要な働きをしていることが知られている。BAEEaseの推定一次構造はイースターのそれに非常に近い。spaetzleはショウジョウバエの幼虫や成虫で抗カビペプチドの合成誘導に際して、細胞外シグナリングに必須の分子であることがHoffmannらのグループにより証明されている。しかし、prospaetzleのプロセッシングにはイースターは関与していないことも明らかになっている。リコンビナントのprospaetzleを合成し、BAEEaseがこれをspaetzleへプロセッシングするか否か検討したところ、prospaetzleはBAEEaseによりspaetzleへプロセッシングされることが示された。

（考察）

Transepithelial protein transportにより血液からクチクラへ輸送されるタンパク（proPO）の性質を輸送前と後で比較した。昆虫でTransepithelial protein transportが始めて直接証明できた。さらに、表皮細胞はメチオニン残基が6箇所あるいは5箇所酸化されているサブユニットを持つクチクラのproPOを血液からクチクラへは輸送しないことが明らかにされた。このことは、表皮細胞のTransepithelial protein transportの機構はproPOの微細な構造の違いを認識していることを示している。今まで全く手のつけられていなかった、昆虫でのTransepithelial protein transportの機構の解明のための研究の方向が、本研究により示された。それは、以下の諸点についての研究である：1）表皮細胞はproPOを細胞に取り込むための受容体をもっているか（proPOのreceptor mediated uptakeがおこなわれているか）；2）カイコ以外の昆虫でproPOがカイコで観察されたと同じようにTransepithelial protein transportで血液からクチクラへ運ばれているか；3）proPO以外のタンパクでtrans-epithelial protein transportにより血液からクチクラへ輸送されるタンパクはメチオニン残基の酸化を受けるか；4）もし、proPOの受容体があるとすれば、その単離。これらの諸点についての解答を得ることができれば、昆虫におけるtrans-epithelial protein transportについての我々の理解は大いに前進すると期待できる。proPOが血液からクチクラへ移行するのは5令においては、起蚕後48時間までである。それ以後クチクラの厚さは増加しているにもかかわらず移行しない。本研究は移行の制御という新しい研究課題を提供した。

BAEEaseがprospaetzleをspaetzleへプロセッシングしたという事実はproPOカスケードが体内に侵入した異物の周囲でメラニンを合成するために存在する以外に、抗菌ペプチドによる液性の生体防御反応の発動にも働いていることを示している。proPOカスケードはベータ1、3-グルカンやペプチドグリカンという、種々の細菌細胞壁に共通して存在する物質と特異的に結合するパターン認識タンパクを構成成分として保持している。BAEEaseの働きを介して、proPOカスケードは異物を認識し、その存在を細胞へ伝えるという細胞外シグナル伝達の役割を担っていることが明らかになった。したがっ

て、proPOカスケードが名実ともに昆虫の主要な生体防御機構の一つであることを示すことが出来た。ProBAEEaseはカイコ卵にも存在している。現在、proBAEEaseの卵での局在を免疫電顕の手法で調べている。また、proBAEEaseのmRNAのアンチセンス鎖の発現がヒートショックプロモーターにより制御できるようにした遺伝子が導入されたトランスジェニックカイコを得ることを試みている。ProBAEEaseはかなり大量にクチクラに存在している。ProBAEEaseやproPO活性化酵素のクチクラでの局在を調べることにより、クチクラ構築の仕組みについて分子レベルでの研究の足掛かりが得られると考えている。

(計画に対する達成度の自己評価と今後の方策)

目的の項で設定した研究題目の内ラッカーゼ型のフェノール酸化酵素については全く研究成果をあげることができなかった。この研究が困難であったのではなく、単に研究を行う人手がなかっただけで、今後取り組みればそれなりの成果をあげると考えられる。クチクラの構築の問題は、それを真正面から取り組んでも、現在の我々の技術力ではちょっと歯が立たない。この研究課題のゴールは遠いが、本研究はクチクラの構築の問題の一面を攻めるきっかけとなる新領域を開拓したと評価できると考えている。proPOカスケードを構成するセリンプロテアーゼ (BAEEaseとproPO活性化酵素) が卵にも存在することが明らかになりBAEEaseはprospatzleのspatzleへのプロセッシングを触媒する。幼虫や成虫でこのプロセッシングを触媒する酵素を発見することに、昆虫の免疫機構の携わっている研究者がしのぎを削っている。本研究でこの酵素を発見できたこと、しかも、その酵素がproPOカスケードの構成要素であったことは誇ってよい成果である。

(代表的な発表論文)

- H.Yoshida, K.Kinoshita and M. Ashida (1996) Purification of peptidoglycan recognition protein from hemolymph of the silkworm, *Bombyx mori*.. Journal of Biological Chemistry, **271**, 13854-13860.
- D.Satoh, A.Horii, M.Ochiai and M.Ashida (1999) Prophenoloxidase-activating enzyme of the silkworm *Bombyx mori*: purification, characterization, and cDNA cloning. Journal of Biological Chemistry, **274**, 7441-7453.
- M.Ochiai and M.Ashida (1999) A pattern recognition protein for peptidoglycan: cloning the cDNA and the gene of the silkworm *Bombyx mori*.. Journal of Biological Chemistry, **274**, 11854-11858.
- M.Ochiai and M.Ashida (2000) A pattern-recognition protein for beta-1,3-glucan: the binding domain and the cDNA cloning of beta-1,3-glucan recognition protein from the silkworm *Bombyx mori*.. Journal of Biological Chemistry, **275**, 4995-5002.
- M.Ashida and D.Satoh (2000) Prophenoloxidase-activating enzyme of insect - a mini review -. European Journal of Entomology in press.

カイコ主要体液タンパク質遺伝子の発現調節機構に関する研究

富野 士良（岡山理科大学基礎理学科）

泉 進（東京都立大学理学研究科）

1) 目的

カイコ終齢幼虫摂食期の脂肪体は主要体液タンパク質である 30K タンパク質を活発に合成している。これまでの研究から 30K タンパク質の生合成は幼若ホルモン（JH）により抑制されることが明らかになっている。本研究はカイコ脂肪体における 30K タンパク質遺伝子の JH による発現制御機構を細胞ならびに分子レベルで解析することを主な目的とした。

2) 方法と結果

カイコ 30K タンパク質遺伝子の JH による発現調節機構を解明するため、脂肪体初代細胞培養系を確立し、この系における体液タンパク質生合成について解析を行った。次に、30K タンパク質遺伝子 5' 上流領域を連結したルシフェラーゼ遺伝子を、エレクトロポレーション法を用いて脂肪体初代培養細胞に導入することにより、30K タンパク質遺伝子の発現調節領域を解析した。

実験方法

カイコ終齢幼虫より脂肪体を摘出し、ディスパーゼで基底膜を消化することにより細胞を完全に分散させた。解離した脂肪体細胞を TC100 昆虫培地（10% ウシ胎児血清を含む）で培養した。次いで、各種欠失変異を持つ 30K タンパク質遺伝子 5' 上流領域（-1668 から -48 まで）とリポーター遺伝子であるルシフェラーゼ遺伝子を連結した DNA を作製し、これらを脂肪体初代培養細胞にエレクトロポレーション法により導入した。2 日間の培養後、細胞を回収し、タンパク質を抽出してルシフェラーゼ活性を測定することにより、プロモーターの活性を測定した。

結果

脂肪体の細胞分散させるためにトリプシン等、各種プロテアーゼ処理を試みた。その結果、ディスパーゼを用いて穏やかに分散させた細胞が最も高い生存率を示した。また、培地は 10% 牛胎児血清を含む TC100 培地が最適であることが判明した。解離した脂肪体細胞は培養開始後、数時間で培養プレート上に付着し、細胞移動を起こし、培養開始後 4 日目までには凝集し、脂肪体様の構造を形成した。この状態の細胞は 1 カ月以上生存可能であった。この脂肪体初代培養細胞の体液タンパク質合成能を解析したところ、30K タンパク質および貯蔵タンパク質 SP1・SP2 が活発に合成されていた。それらの合成は培養開始後少なくとも 14 日目まで続いた。アラタ体を除去した幼虫個体を用いた実験から、30K タンパク質の生合成は JH によって抑制されることが示唆されている。そこで JH 存在下で脂肪体細胞を培養し、30K タンパク質やその他のタンパク質の生合成に JH がどのような影響を及ぼすかについて検討した。その結果、30K タンパク質の生合成のみが JH により完全に抑制され、貯蔵タンパク質を含む他のタンパク質の生合成には全く変化が見られなかった。以上の結果から、この脂肪体初代培養細胞は、体液タンパク質遺伝子を長期間発現し続け、さらに、JH が直接脂肪体細胞にはたらき、30K タンパク質遺伝子の発現を抑制することが明らかとなった。

次に、30K タンパク質遺伝子の上流域-1668 までを持つプロモーターにルシフェラーゼ

遺伝子を連結したコンストラクトを作成し、これらをエレクトロポレーション法により脂肪体初代培養細胞に導入することにより、そのプロモーター活性を測定した。DNAを導入した細胞を2日間培養し、細胞抽出液を調製してルシフェラーゼの活性を測定したところ、強いルシフェラーゼ活性が得られた。コントロールとして、表皮タンパク質遺伝子5'上流領域にルシフェラーゼを連結した遺伝子を導入した細胞を同様の方法で処理したが、ルシフェラーゼ活性をほとんど検出することができなかった。従って、この脂肪体細胞遺伝子導入発現解析系は組織特異性を有することが判明した。次に、30Kタンパク質遺伝子5'上流領域の各種欠失変異体を用いてエンハンサー領域の解析を行った。その結果を図-1に示す。-848まで欠失させたプロモーターの活性は-1668までを持つプロモーターと比較して約2倍のプロモーター活性を示した。上流域を-376まで削り込むとプロモーター活性はほぼ-1668コンストラクトと同様になった。さらに、5'上流領域の-176まで削り込んでもプロモーター活性に変化は見られなかったが、-48まで削るとプロモーター活性は一気に減少した。この結果は、30Kタンパク質遺伝子の脂肪体特異的発現を制御するエンハンサー配列が-176から-48の領域に存在することを示唆する。

先に述べたように、脂肪体細胞をJH存在下で培養すると、細胞はJHに対して直接応答し、30Kタンパク質の合成を完全に停止する。そこで、-1670までの30Kタンパク質遺伝子5'上流領域と連結したリポーター遺伝子を脂肪体細胞に導入し、JHがプロモーターの活性に及ぼす影響について解析した。図-2に示す通り、JHで処理した細胞から調製した抽出液中のルシフェラーゼ活性は、JH処理をしないものに比べ、約30%まで低下した(図-2)。細胞性アクチン遺伝子のプロモーターは脂肪体細胞中で強いプロモーター活性を示すが、この活性はJHにより何ら影響を受けなかった。これらの結果は、30Kタンパク質遺伝子の-1668までの5'上流領域に、JHに応答して遺伝子の発現を抑制するシス調節領域が存在することを示すものである。

3) 考察

本研究において、カイコ脂肪体の初代細胞培養系が確立し、この系を用いてカイコ体液タンパク質遺伝子の発現調節機構を細胞レベルで解析することが可能となった。またこの系を用いることによりJHやエクジソン等の昆虫ホルモンによる体液タンパク質生合成の調節機構を直接解析することが可能となった。実際、JHは終齢幼虫初期の脂肪体細胞に直接作用し、30Kタンパク質の合成を完全に抑制した。また、30Kタンパク質遺伝子プロモーターコンストラクトを脂肪体初代培養細胞に導入した実験の結果から、この遺伝子の5'上流域にはJHに応答し、遺伝子の発現を抑制するシス調節領域が存在することを明らかにした。これはJHによる転写抑制性シス制御領域が遺伝子上流に存在するということを示した初めての結果である。現在、この領域を更に限定するための実験が進行中である。

4) 計画に対する達成度の自己評価および今後の方策

我々は、カイコ脂肪体細胞の初代培養系および、エレクトロポレーション法による脂肪体細胞への遺伝子導入ならびにプロモーター活性測定法系を確立することができた。よって、当初の研究目的を期間内に十分達成できたと考えている。尚、脂肪体細胞初代培養に関しては、既に発表済みである(Kishimoto *et al.*, 1999)。DNA導入実験に関しては、現在

投稿準備中である。今後はこの系を駆使し、JH 応答性転写抑制に関わるシス配列ならびにその配列を認識する転写因子の検索を行う予定である。

図 1.

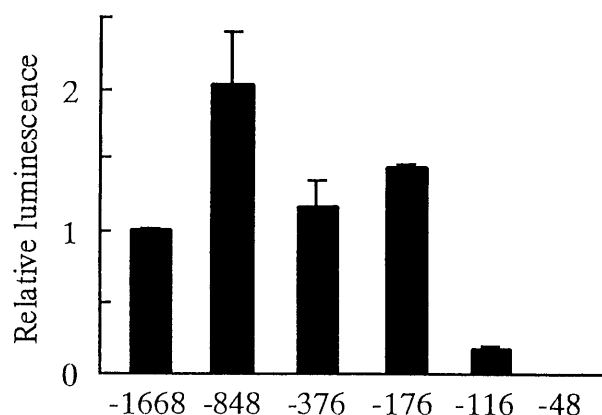


図 1. 30K タンパク質遺伝子 5' 上流域各種欠損変異体のプロモーター活性. 縦軸はルシフェラーゼの相対活性、下に示した数字は遺伝子上流域の欠失点を示す。

図 2.

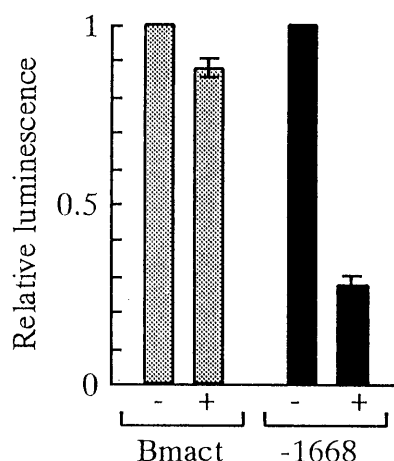


図 2. プロモーター活性に JH が及ぼす影響. Bmact はカイコ細胞性アクチンのプロモーター、-1668 は 30K タンパク質遺伝子上流-1668 までを持つコンストラクトを示す。各コンストラクトを導入した脂肪体細胞を JH 存在下 (+) および非存在下 (-) で培養した。縦軸はルシフェラーゼの相対活性を示す。

発表論文

A. Kishimoto, H. Nakato, S. Izumi, and S. Tomino (1999) Biosynthesis of major plasma proteins in the primary culture of fat body cells from the silkworm, *Bombyx mori*. *Cell and Tissue Research*. 297, 329-335

K. Shofuda, T. Togawa, H. Nakato, S. Tomino and S. Izumi (1999) Molecular cloning and characterization of a cDNA encoding a larval cuticle protein of *Bombyx mori*. *Comparative Biochemistry and Physiology, Series B*, 122, 105-109.

H. Nakato, M. Takekoshi, T. Togawa, S. Izumi and S. Tomino (1997) Purification and cDNA cloning of evolutionally conserved larval cuticle proteins of the silkworm, *Bombyx mori*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 27, 701-709.

E. Mine, H. Sakurai, S. Izumi and S. Tomino (1997) In vitro transcription system from cultured cells and fat-body tissue of the silkworm, *Bombyx mori*. *Molecular Biotechnology*, 8, 79-88.

前胸腺刺激ホルモンの立体構造解析と機能相関

永田宏次 (東京大学生物生産工学研究センター)

1) 目的

前胸腺刺激ホルモン(PTTH)は、昆虫の脱皮・変態を制御している最上位のホルモンである。脳の神経分泌細胞で合成され、アラタ体から分泌され、前胸腺に作用して、脱皮ホルモン、エクジソンの生合成を促進する。

PTTHの化学構造の解析が最も進んでいるのは、カイコガ(*Bombyx mori*)であり、これまでに、アミノ酸配列(Kawakami et al., 1990, Kataoka et al., 1991)、ジスルフィド架橋様式(Ishibashi et al., 1994)、糖鎖構造(S. Nagata et al., 1999)が決定されている。カイコガPTTH (bPTTH)分子は約30 kDaの糖タンパク質であり、タンパク質部分は109アミノ酸残基からなるポリペプチド鎖のホモダイマーで、N末端から41残基目のAsn側鎖に糖鎖が結合している。アミノ酸配列の相同性を基に、他種の昆虫にも、bPTTHホモログが存在することが示されており、これらは各種昆虫のPTTHの候補と考えられている。

本研究では、PTTH分子の立体構造を決定し、その分子構造に基づいて、前胸腺刺激活性の発現に必要な構造要素を特定することを目的とした。bPTTHあるいはそのホモログの立体構造を一つ決定できれば、それ以外のホモログの立体構造モデルの構築も可能となり、カイコガ・エリサン(*Samia cynthia ricini*)・タバコスズメガ(*Manduca sexta*)の間で見られるPTTHの種特異性の原因を、分子構造に基づいて解釈することが可能になると期待される。また、bPTTHは、アミノ酸配列の相同やジスルフィド架橋様式の類似から、脊椎動物の増殖因子群(神経成長因子 β -NGF・トランスフォーミング成長因子TGF- β 2・血小板由来成長因子PDGF-BB)・ホルモン群(絨毛性ゴナドトロピンCG・卵胞刺激ホルモンFSH・黄体形成ホルモンLH・甲状腺刺激ホルモンTSH)や無脊椎動物のcoagulogen (カプトガニの血液凝固に関与するタンパク質)・Spätzle (ショウジョウバエの胚の背腹軸決定や抗真菌に関与するタンパク質でTollのリガンド)と同じく「シスチンノット」群に属すると推測されている(Noguti et al., 1995)。PTTH分子の立体構造を明らかにすることで、これらの他の「シスチンノット」群のタンパク質と構造や機能の比較も可能になる。

2) 方法と結果

2-1) 概説

NMR法による構造解析もX線回折法による構造解析も、数十ミリigramの高純度タンパク質を安定して供給できる系を確立することが重要である。bPTTHの天然物は極微量しか得られないので、本研究では、まず、大腸菌を宿主として組換えbPTTH (rbPTTH)の発現・精製系の効率化・大規模化を進めた。次に、大量調製したrbPTTHを用いて、NMR測定と結晶化実験を行った。この段階で、非還元条件でのSDS-PAGEゲル電気泳動においてシャープなバンドを形成する組換えタバコスズメガPTTH候補分子(rmPTTHc)と

異なり、rbPTTHはスミアなバンドを形成することがわかり、立体構造の多形の可能性が示唆されたため、構造解析の標的分子を、rbPTTHからrmPTTHcに変更した。

rmPTTHcの ^{13}C , ^{15}N 標識体を調製し、3核3重共鳴法を用いるNMR解析により、これまでに、部分的に、二次構造情報を得ることができた。rmPTTHcは、シスチンノット群に共通な4本の β ストランドに、特有なN末端部 β ストランドを加えた計5本の β ストランドからなることが予測された。

2-2) 組換えカイコガPTTH (rbPTTH)の大量調製

大腸菌BL21(DE3)を宿主としT7プロモータ制御下にrbPTTHを生産し、得られた封入体を巻き戻し、精製、濃縮してrbPTTHを得た。このrbPTTHの巻き戻しでは、rbPTTHの封入体を8 M尿素で可溶化した後、透析していたが、分子会合や沈殿を抑えるためにPTTH濃度を低くする必要があった(30 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 以下)。大容量の希薄タンパク質溶液を扱うこの方法は、大量調製には不向きであった。そこで、新たに発現ベクターを構築し、rbPTTHの大量調製をすることにした。N末端に6xHisおよびrTEVプロテアーゼ認識配列を付加したbPTTHポリペプチドを大腸菌BLR(DE3)pLysSで生産し、封入体を6 M尿素で可溶化後、タンパク質間相互作用を抑えるために、6xHis付加rbPTTHポリペプチドをNi-NTA Sepharoseに結合させた状態で巻き戻したところ、1 mg/mlの高タンパク質濃度であっても、会合や沈殿を抑制し、目的のホモダイマーを主産物として得ることができた。その後、6xHisタグをrTEVプロテアーゼ処理により定量的に除去した。この結果、従来法の1/30の液量で巻き戻しが可能になり、大腸菌で発現したPTTHを効率よく大量調製することが可能になった。

2-3) rbPTTHの2次元 ^1H -NMR解析

UnityINOVA分光計(^1H 共鳴周波数500 MHz、Varian)、5 mm径プローブ(Varian)を用いて、温度25°Cで、上記の方法で大量調製したrbPTTHの1次元および2次元 ^1H -NMRを測定した。タンパク質濃度2 mM、溶媒50 mM Na phosphate/100 mM NaCl/0.02% NaN_3 , pH 6.8の試料を用いた。 ^1H -NMRシグナルの化学シフトの分布から、rbPTTHは β 構造を含むことが示された。さらに、線幅の広いNMRシグナルと狭いものとが混在することから、rbPTTHはrigidな立体構造をとる中央部分とflexibleな立体構造をとる周辺部とからなることが示唆された。

2-4) rbPTTHの結晶化実験

sparse matrix法により、rbPTTHの結晶化条件を検索した。Crystal Screen (Hampton Research)を用いて、50 種類の塩・緩衝液・沈殿剤の組み合わせのもとでrbPTTH (濃度10 mg/ml)の結晶化を試み、各条件での結晶成長度を評価した。2条件で微結晶を得た。pH 6.5-8.5、沈殿剤としてPEGを用いた場合に良い結果が得られる傾向があった。しかし、ロットの異なるrbPTTHを用いたところ、各条件で同様の結晶成長の傾向が認められたものの、微結晶は得られなかった。

2-5) 立体構造解析の標的としてのbPTTHと他種のPTTH候補分子(mPTTHc)の評価

非還元条件でのSDS-PAGE分析において、rbPTTHは泳動度が小さくスミアだが、組換えタバコスズメガPTTH候補分子(rmPTTHc)は泳動度が大きくシャープなバンドを形成する(松林秀貴、私信)ことから、rmPTTHcはrbPTTHに比べて均一性の高いコンパクトな高次構造をとることが示唆された。ゆえに立体構造解析の標的分子としてrbPTTHよりもrmPTTHcの方が好ましいと判断し、今後は、rmPTTHcの構造解析を進めた。

2-6) ^{13}C , ^{15}N 標識タバコスズメガPTTH候補分子(rmPTTHc)の多核多次元NMR解析

炭素源・窒素源として ^{13}C 標識ブドウ糖・ ^{15}N 標識塩化アンモニウムのみを含むM9最少培地中で、組換え大腸菌を培養し、 ^{13}C , ^{15}N 標識rmPTTHcポリペプチド鎖を得た。安定同位体標識のために最少培地を用いる必要があるため、目的タンパク質の収量は低く、2 lの培養液から巻き戻し、精製の後、1.4 mgの ^{13}C , ^{15}N 標識rmPTTHcを得た。

UnityINOVA分光計(^1H 共鳴周波数500 MHz, Varian)、8 mm径プローブ(Nalorac)を用いて、温度25°Cで、タンパク質濃度0.1 mM、溶媒50 mM Na phosphate/100 mM NaCl/0.02% NaN_3 , pH 6.8の試料のNMRを測定した。rmPTTHcの ^1H -NMRシグナルの化学シフトの分布は、rbPTTHのものと似ており、rmPTTHcも β 構造を含み、rbPTTHと類似の立体構造を有することが示唆された。さらに、rbPTTHのものと同様に、線幅の広いNMRシグナルと狭いものとが混在することから、rmPTTHcもrigidな立体構造をとる中央部分とflexibleな立体構造をとる周辺部とからなることが示唆された。

2次元 ^1H - ^{15}N HSQCスペクトル(スピン-スピン結合した ^1H と ^{15}N との相関を検出する)からも、rmPTTHcが β 構造に富むことが支持された。

主鎖原子(^1H , ^{15}N , $^{13}\text{C}^\alpha$, $^{13}\text{C}^\beta$, ^{13}C)を帰属するために、各種3次元 ^1H - ^{13}C - ^{15}N NMRスペクトル[HN(CO)CA, HNCA, CBCA(CO)NH, HNCACB, HNCO]を測定、解析した。これまでに、帰属すべき96残基[全アミノ酸残基数(106)-Pro残基数(9)-N末端残基数(1)]のスピンのうち43残基分を特定した。現在、主鎖帰属の完成を目指し進行中である。

2-7) mPTTHcのNMRデータに基づく二次構造予測

主鎖帰属したアミノ酸について、 ^1H , ^{15}N , $^{13}\text{C}^\alpha$, $^{13}\text{C}^\beta$, ^{13}C の化学シフト値を用いて、Chemical Shift Index (CSI, Wishart et al., 1992)により二次構造を予測した。CSIによる二次構造解析は、タンパク質主鎖の化学シフトが二次構造を敏感に反映することに基づいており、信頼度の高い予測が可能である。この結果を結晶構造が報告されているあるいは構造が予測されているシスチンノット群の二次構造と比較したところ、rmPTTHcプロトマーには、シスチンノット群に共通して見られる β ストランド4本($\beta 1$ - $\beta 4$)のうち $\beta 1$, $\beta 3$, $\beta 4$ に相当する3本の β ストランドが存在すること、 $\beta 3$ と $\beta 4$ の間に特定の二次構造を有しない領域が存在すること、N末端近くに他のシスチンノット群には見られない β ストランド($\beta 0$)が存在することが示唆された(図1, m-nmr)。 $\beta 2$ は低感度のため検出されなかったが、シスチンノット群の基本構造において $\beta 1$ は $\beta 2$ と逆平行 β シートを形成することにより安定に存在しうるので、 $\beta 1$ の存在は $\beta 2$ の存在をも示唆する。それゆえ、rmPTTHcの

二次構造は、基本的にシスチンノット群に共通な4本の β ストランドを含んでおり、さらにrmPTTHcに特有なN末端部 β ストランド($\beta 0$)を加えた計5本の β ストランドからなることが予測された(図1、m-pred)。

3) 考察

現在までに得られたNMRデータから、rmPTTHcの二次構造は、シスチンノット群に共通な4本の β ストランドに特有なN末端部 β ストランド($\beta 0$)を加えた計5本の β ストランドからなることが予測された。この予測は、 $\beta 0$ の有無を除いて、Noguti et al., 1995により報告されたbPTTHの二次構造予測と矛盾しない。

他のシスチンノット群では、ダイマー中のプロトマーが、同方向に並ぶ場合と逆方向を向く場合とが報告されている。他のシスチンノット群に類似のプロトマーの立体構造をrmPTTHcにも仮定すると、ペプチド鎖間のジスルフィド結合は、細長いプロトマーの端に存在することになるので、安定なダイマー形成のために、プロトマー同士は同方向に並ぶことが予想される。

bPTTHとrmPTTHcには交差活性がない。この種特異性は、アミノ酸配列の相同性が低く、分子表面に露出していると予想される $\beta 3$ と $\beta 4$ の間のループ部分のアミノ酸配列の違いに起因すると推測される。他の領域(β ストランド、その間のループ、ペプチド鎖末端)のアミノ酸配列相同性が50%以上であるのに対し、このループ部分の相同性は27%と、他と比較して極端に低い。

4) 計画に対する達成度の自己評価と今後の方策

本研究では、PTTH分子の立体構造を決定し、その分子構造に基づいて、前胸腺刺激活性の発現に必要な構造要素を特定することを目的としたが、まだ立体構造決定には成功しておらず、多核多次元NMR法による構造解析を進めている途中である。目的を達成できていない主な原因は、組換PTTHの分子量が約25 kとNMR構造解析の目的分子としては大きいため、線幅が増大し感度が著しく低下することにある。NMR構造解析を成功させるためには、 ^1H を ^2H で置換した ^2H , ^{13}C , ^{15}N 標識体を調製し、 ^1H と ^{13}C の双極子-双極子相互作用に起因する緩和による感度低下を抑制する必要がある。rbPTTHもrmPTTHも β 構造に富み、NMRシグナルの分離度は高いので、感度低下の問題が解決できれば、プロトマーの二次構造解析→プロトマーの三次構造決定→プロトマー間NOE情報によるホモダイマーの三次構造決定の順に、構造解析を進展させることができると考えている。また、X線結晶構造解析では、安定同位体標識を必要とせず、大腸菌以外の宿主を用いる生産系を利用することも可能である。巻き戻しを必要としないバキュロウィルス発現系等を利用して、組換PTTHを効率的に生産し、結晶化条件の検討を進めることも計画している。

謝辞 rbPTTH, rmPTTHcの発現系を御供与いただいた片岡宏誌先生(東大)、研究初期に精製rbPTTHを御供与いただいた永田晋治氏(東大)、rbPTTH, rmPTTHcの分析結果を御提供いただいた松林秀貴氏(東大)、bPTTHの立体構造モデルの原子座標を御供与いただいた郷 通子先生(名大)に心より感謝申し上げます。

5) 図表とその説明

hCG	SKEFLRPRCKPINATLAVK		EGCPVCITVNTTICAG		YCFMTRVLQGV
TGFβ	ALDAAYCFRNVQDMCCLRPYID	FKRDL	GWNHIEPEGYNANFCAG	ACPTLWSSDT(12)	
PDGF	SLGHLTIARFAMIAECKTRTEVFRIERR		LIDRTNANFLVWPPCVVEVQRCSS	CCNN	
NGF	GEFSVCDSESVVWGDKTATDINGKEVTVLAEVNMNSVFRQYFFETKCRASMPVESGCRGIDSKEN				
coag	PPFIHFKESECPVETRDCE	PVFGYTVAGSFVIVQAP	RAGFRQCVWQHKCRFGSN	SCGY	
spz	CRSIRKLVI	FKKGLRADDTRQLIVND	HYKQAIQIERCEGADQ	PCDFANFPQ	
common	==β1==>		==β2==>		
bPTTH	GNIQVE	NQALPDPPCTCKYKKEIEDLGE	MSVPRFIETNNCKNTQQ		PTCRP
b-pred	==β1==>		==β2==>		
mPTTHc	GNIKVESTNQALPDPPCECYKKGFINLGE		NVFESNIETINCSIMQ		QSCPT
m-nmr	cbbbbbb	bbbbb	bb	bbbb	bb
m-pred	c==β0==>cc	==β1==>		==β2==>	
hCG	PALFQVVCNYRDVRFESIRLPGC		PRGVNFWHYAVALSCQCALCRSTTDCGGPKDHFLLTCDDEP(31)		
TGFβ	NPEASAPCCVQDLEPLTILYYIG		KTPRIEQLSNMIVKSCKCS		
PDGF	RMVQCRAPTQVQLAPVQVKIEIV		KKKPIFKATVTLEDELACRCETVAARPVV		
NGF	WSYCTTHTTFVKALTTD		EQQAARFIAIDTACVCLERKATRG		
coag	WGRCTQCRSVVLVTNL		EKDGFLECFRTCCGCPCRSF		
spz	SYNPICKQHYTQQLABIKSD		GELDVVQNSFKIFSCCKALKTG		
common	-----β3----->		-----β4----->		
bPTTH	PYICKESLYSITILKRRETSQESLIPNELKTAWVAESHPVSVACLCTRDYQLATNM				
b-pred	-----β3----->		-----β4----->		
mPTTHc	PYICKESIYSIKILRKRSMAEKSLAPTELSIGWVAESLPISVGCICTEDTVI				
m-nmr	bb		ooooooo	ooo	cbbbb
m-pred	-----β3----->		ooooooo	ooo	oo-----β4----->o

図1. シスチンノット群に属するタンパク質のアミノ酸配列・二次構造の比較。hCG, 絨毛性ゴナドトロピン、TGFβ, トランスフォーミング成長因子β2、PDGF, 血小板由来成長因子-BB、NGF, β-神経成長因子、coag, coagulogen、spz, Spitzle、bPTTH, カイコガ PTTH、mPTTHc, タバコスズメガPTTH候補分子の各アミノ酸配列。common, シスチンノット群に共通してみられる4本のβストランド(β1-β4)、b-pred, bPTTHの二次構造予測(Noguti et al., 1995)、m-nmr, ¹⁵C化学シフトに基づく二次構造解析結果(b, βストランド、c, ランダムコイル)、m-pred, NMRデータに基づくmPTTHcの二次構造予測。

代表的な発表論文

K. Nagata, N. Kudo, K. Abe, S. Aral and M. Tanokura (1999) NMR structural studies of a rice cysteine proteinase inhibitor, oryzacystatin-I. In Peptide Science 1998 (edited by M. Kondo), 333-336. Protein Research Foundation, Osaka.

K. Nagata, K. Maruyama, K. Kojima, M. Yamamoto, M. Tanaka, H. Kataoka, H. Nagasawa, A. Isogai, H. Ishizaki and A. Suzuki (1999) Prothoracicotropic activity of SBRPs, the insulin-like peptides of the saturniid silkworm *Samia cynthia ricini*. Biochemical and Biophysical Research Communications, 266, 575-578.

フェロモン産生の分子メカニズムとホルモンによる調節機構

松本正吾（理化学研究所）

目的

ともすれば昆虫は下等な生物であって、系統樹において脊椎動物の下に位置していると誤解されることもあるが、昆虫は無脊椎動物の頂点に立つ生物であり、脊椎動物における哺乳類と対極をなす最も進化した生物である。別の言い方をすると、哺乳類が脊椎動物でもっとも進化した生物であるのに対し、昆虫は脊椎動物とは全く違った方向に進化した最も高等な生物であると言える。一方、地球上に生存する全動物種は 100-150 万種と見積もられているが、そのうちの 78% が昆虫であり、昆虫は今日最も繁栄している生物集団であると断言することができる。この昆虫の繁栄を考えると、今日ある個々の昆虫はそれぞれが発育、生殖は勿論のこと、環境適応、生体防御、ひいては社会性にもつながる高度な合目的行動や個体間の交信などを達成してきたひとつの完成した生物の形であると捉えることが出来る。

このような成り立ちを背景として、昆虫は脊椎動物とは異なる独自の多様性を持ち、細胞・組織・個体レベルでは脊椎動物に無い数多くのユニークな機能が存在する。しかし、昆虫が生物である以上、それらの機能を支える根源的な生命原理はあらゆる生物に共通した分子の言葉で解き明かすことが可能である。したがって、昆虫あるいはそれを構成する細胞の機能に着目し、それが成り立つ分子メカニズムを解明することは、他の生物では見えてこなかったり、解析の難しかった共通した原理を昆虫を用いることで初めて見出すことが可能であり（例えば、ホメオティック遺伝子）、昆虫固有の機能やそれを支配する遺伝子は未活用の重要な生物資源であると考えられる。

生物としての原型を古生代デボン紀にまでに遡ることができる昆虫は、4 億年という長い年月の間、様々な環境に適応する過程で小さなサイズに適した機能、構造を獲得してきた。高等脊椎動物では神経系を集中し統合することで脳が発達してきたが、昆虫では、神経系を分散させ、神経ホルモンを合成・分泌する神経内分泌を発達させることで知能によって変わる機能を獲得した。すなわち、各体節に散在する神経節ははしご状神経系を介して全体として中枢神経系を形成するとともに、それぞれが神経内分泌器官として様々なペプチド性の神経ホルモンを合成・分泌し、発生、生殖、ホメオスタシスはもとより、脱皮・変態、休眠などの環境適応、フェロモン産生によるケミカルコミュニケーションなど多様な昆虫の生存戦略を生理的に支えている。しかし、殆どの昆虫ペプチドホルモンが脊椎動物とのあいだに一次構造上の共通性を持たないことが次第に明らかとなり、昆虫固有の現象のみならず、ホメオスタシスなどの生物に共通した現象も昆虫特有の調節機構で制御されていると考えられるに至っている。したがって、多様な”昆虫神経ホルモン”を切り口として昆虫の生命現象を解析し、その分子メカニズムを明らかにすることは、昆虫固有の生存戦略・環境適応の分子基盤を理解するとともに、生物に普遍的な現象に対しても脊椎動物とは異なった昆虫独自の調節機構を知り、両者を対比させることで生物の多様性を理解し、この理解に基づいて新たな応用への糸口を見いだす可能性を秘めている。

こうした観点から、本特定領域研究において、私は昆虫の典型的な機能であるフェロモ

ン産生の分子メカニズムとホルモンによる調節機構を分子生物学、細胞生物学、生化学、有機化学的手法を用いる様々な角度から解析し、その全体像を明らかにすることを試みた。

方法と結果

鱗翅目昆虫の性フェロモンは第 8-9 腹節節間膜が機能的に分化してできたフェロモン腺の真皮細胞で生合成される。カイコの場合、性フェロモン（ボンビコール）の産生は食道下神経節に由来するペプチドホルモン PBAN により一意的に支配されている。したがって、このフェロモン産生系ではホルモン(PBAN)→標的細胞→フェロモン合成・放出という極めてクリアーかつシンプルな刺激/応答反応が進行する。

そこでまず標的細胞におけるフェロモン産生の分子機構の全体像を大まかに把握ため、フェロモン腺、フェロモン合成細胞、ミクロソーム画分を用いた様々なフェロモン合成系を構築し、合成 PBAN および特異的酵素阻害剤等を用いて PBAN の細胞内シグナル伝達のカスケードを検討した。その結果、PBAN による外部シグナルはカルシウムイオンの細胞内流入、カルモジュリン、カルシニューリンを介してボンビコール生合成経路に伝えられ、ボンビコール生合成の最終段階に関与するアシル CoA レダクターゼを活性化することでボンビコールの合成を促進することが示唆された。同時に、セルフリー系での解析からボンビコール生合成経路をとりまく生化学的環境が把握された。

次に、フェロモン産生機構を分子レベルで検証する目的で、フェロモン腺の細胞質およびミクロソーム画分よりアフィニティー等によりタンパク質を精製し、配列分析、TOF-MS 等により cyclophilin B, acyl-CoA binding protein (ACBP), calmodulin, apolipoprotein III をフェロモン産生に関わる機能分子として同定した。また、東大（嶋田）、放医研（三田）との共同研究の中でカイコの EST database 構築の一環としてフェロモン腺より cDNA ライブラリーを作製し、ランダムに 1000 クローンを配列決定し、上記タンパク質のほか、機能分子として acyl-CoA Δ 11 desaturase, cytochrome B5, hormone-sensitive lipase, ACBP, fatty acid binding protein 遺伝子をクローニングするとともに、別途、遺伝子の保存領域からプライマーを作成し、calcineurin A subunit, calcineurin B subunit, MS2 homolog 遺伝子をクローニングした。

一方、細胞内ダイナミクスの解析などフェロモン産生過程を細胞レベルで可視的に検証するため、フェロモン合成の integrity を保持した細胞を均質な cluster として調製する方法を確立し、フェロモン合成細胞が他の真皮細胞に見られない特徴的な油滴状顆粒を大量に細胞質に形成することを共焦点レーザー顕微鏡により見いだした。Nile Red で特異的に染色されるこの油滴状顆粒は成虫羽化 1 日前に急激に形成され、羽化後の PBAN 分泌によるフェロモン産生に伴って急激に減少・消失した。そこで、FAB-MS 等により油滴状顆粒の化学的実体を解析したところ、ボンビコール前駆体の脂肪酸を主要な構成成分とする様々な分子種からなるトリアシルグリセロールであったことから、細胞質に形成された油滴状顆粒はフェロモン前駆体の貯蔵顆粒であることがわかった。さらに、油滴状顆粒の形成過程を電顕レベルで詳細に観察したところ、その形成期には基底膜より大規模なエンドサイトシスが認められ、陥入物より油滴状顆粒が形成されることが示された。一方、ノーザンブロッティングから油滴状顆粒の形成期には acyl-CoA Δ 11 desaturase, ACBP, MS2 homolog の転写も一斉に起こることが示され、フェロモン合成細胞では羽化 1 日前にフェ

ロモン産生に向けてダイナミックな変化が細胞内で進行することがわかった。

考察

(1) フェロモン産生過程における細胞内ダイナミクス

羽化直後のボンビコール産生細胞の細胞質には Nile Red で染色される特徴的な 油滴状顆粒が多数見られ、この顆粒は ボンビコール前駆体あるいはそのキャリアーと推測された。一方、油滴状顆粒の化学的実体は、ボンビコール産生細胞よりアセトンで油滴状顆粒を抽出し、シリカゲルあるいはドコシルカラムを用いた HPLC で分離したのち、FAB-MS および MS-MS で構造解析を行った結果、油滴状顆粒は様々な分子種からなるトリアシルグリセロールであるが、構成脂肪酸として C16:1 acid, C16:2 acid およびオレイン酸、リノール酸、リノレン酸を持つことがわかった。前二者はボンビコールの前駆体であるため、油滴状顆粒はフェロモン前駆体の貯蔵物として機能するものと考えられた。また、リノール酸、リノレン酸はカイコにおいて必須脂肪酸であるため、食餌に由来し、ボンビコール産生細胞内に取り込まれたものと考えられた。

油滴状顆粒は羽化 2 日前から出現するが、羽化 1 日前に大量に形成されることが光顕で示された。そこで油滴状顆粒の形成過程をさらに電顕で詳細に検討したところ、羽化 2 日前には細胞質に多数の小顆粒が存在し、その一部はミトコンドリアと融合していることがわかった。また、この時期、基底膜より物質の細胞内流入が起こり、引き続き羽化 1 日前の大規模な流入の中でサイズの大きい油滴状顆粒が多数形成され、羽化当日までに電子密度の高い成熟した顆粒となることがわかった。ボンビコール生合成の生化学的考察から、これらの過程は、ボンビコール産生細胞で *de novo* に合成されたパルミチン酸がミトコンドリアでパルミトイル CoA に変換されたのち、小胞体膜上で不飽和化されてボンビコール前駆体が作られ、これが基底膜より流入した必須脂肪酸を含むグリセリドと反応することでトリアシルグリセロールとなってボンビコール前駆体の貯蔵物である油滴状顆粒が形成されたものと解釈された。

(2) フェロモン産生に関わる機能分子遺伝子の発現

カイコ性フェロモンであるボンビコールはフェロモン産生細胞で *de novo* に合成され、アセチル CoA が脂肪酸合成系によりパルミテートに変換された後、不飽和化、アシル基の還元を経て作られる。一方、ボンビコールの産生は神経ホルモン PBAN により引き金が引かれる。すなわち、PBAN の外部シグナルがフェロモン産生細胞の膜表面レセプターに伝えられた後、細胞外カルシウムイオンの細胞内流入、カルモジュリン、カルシニューリンを介し、最終的にボンビコール生合成の最終酵素アシル CoA レダクターゼが活性化されることでボンビコールの産生が促される。これまでにクローニングしたボンビコール産生過程に関与する機能分子遺伝子の発現をノーザンブロットィングで調べたところ、フェロモン腺より得られた ACBP (pgACBP) は脂肪体、卵巢でも若干発現しているがフェロモン腺での発現は顕著であり、羽化 1 日前より急激に発現し、羽化後も継続された。一方、中腸より得られた ACBP (mgACBP) は pgACBP とは 50% の相同性しか持たないが、幼虫期の中腸のみならずフェロモン腺でも顕著に発現し、フェロモン腺での発現は pgACBP 同様、羽化 1 日前に急激に起こることがわかった。したがって、フェロモン腺では 2 種の

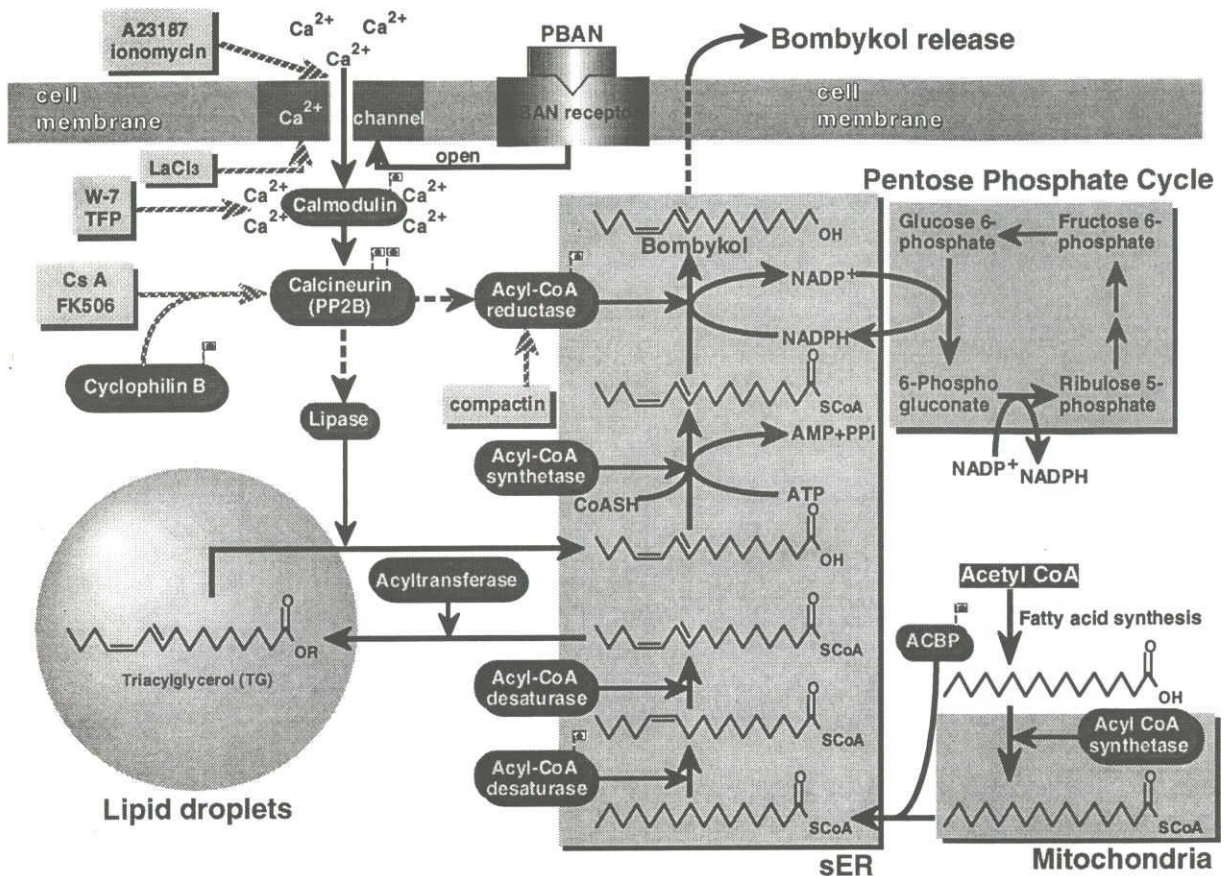
ACBP が発現し、それぞれが異なる機能を担ってフェロモン産生に関わる可能性が示唆された。また、MS2 homolog は植物種子に存在する脂肪酸をアルコールへと還元する酵素 MS2 と高い相同性を持ち、様々な組織のうち、フェロモン腺のみに特異的に発現することからボンビコール生合成酵素であるアシル CoA レダクターゼとして機能する可能性が示唆された。これらの遺伝子のうち、acyl-CoA desaturase , ACBP, MS2 homolog はいずれもフェロモン腺で顕著に発現され、かつ、羽化1日前に急激に発現される。一方、ボンビコール産生細胞では丁度この時期にボンビコール前駆体の貯蔵物である油滴状顆粒が大量に形成される。したがって、ボンビコール産生細胞では羽化1日前にボンビコールの産生に向けてダイナミックな変化が一斉に起こり、PBAN 以外の何らかの要因がこれらのイベントの引き金を引くものと考えられる。

計画に対する達成度の自己評価と今後の方策

近年、昆虫神経ホルモンに関する化学的研究の発展はめざましく、それらの成果をもとに、ホルモン遺伝子の発現調節、受容体の解析、細胞内シグナル伝達などが分子レベル・細胞レベルから解析されてきている。しかし、神経ホルモンが支配する多様な生命現象そのものがどのような分子基盤の上で成り立ち、どのように制御されているかという分子レベルでの理解は驚くほど乏しい。こうした中、本研究課題の PBAN によるフェロモン産生機構の解明は、組織・細胞レベルでの解析に適した日本固有ともいえる大型実験昆虫であるカイコを用い、カイコ EST database を有効に利用することでフェロモン産生の分子基盤がかなり明確になってきたものと考えている。

一方、フェロモン産生機構のみならず、昆虫機能全般を分子レベルで包括的に理解するためには、昆虫を見据え、その特性を生かした新しい方法論の確立が必要不可欠であり、昆虫の様々な機能解析に適用しうる技術を開発し、これを標準化することは、多様な昆虫の分子機構を解明する上で強力な武器となりうる。こうした観点から、今後、昆虫機能の分子機構解析のためのベクター系をカイコ/バキュロウイルスの系を用いて構築・標準化し、これらの手法をカイコ性フェロモン産生の分子機構解明に実践・展開することで、現在切望されている昆虫機能解析研究への適用性を実証したいと考えている。

カイコにおけるフェロモン産生の分子メカニズム



代表的な発表論文

S. Matsumoto, R. Ozawa, K. Uchiumi and M. Kurihara M (1996) Cell-free production of the silkworm sex pheromone bombykol. *Bioscience Biotechnology Biochemistry*, 60, 369-373.

S. Matsumoto (1997) Intracellular signal transduction of pheromone biosynthesis activating neuropeptide (PBAN) in lepidopteran insects. *Recent Research Development in Agricultural & Biological Chemistry*, 1, 33-49.

A. Fonagy, N. Yokoyama, R. Ozawa, K. Okano, S. Tatsuki, S. Maeda and S. Matsumoto (1999) Involvement of calcineurin in the signal transduction of PBAN in the Silkworm *Bombyx mori* (Lepidoptera). *Comparative Biochemistry and Physiology B*, 124, 51-60.

A. Fonagy, N. Yokoyama, K. Okano, S. Tatsuki, S. Maeda and S. Matsumoto (2000) Pheromone producing cells in the silkworm, *Bombyx mori*: Identification and their morphological changes in response to pheromonotropic stimuli. *Journal of Insect Physiology*, 46, 735-744.

T. Yoshiga, K. Okano, K. Mita, T. Shimada and S. Matsumoto S (2000) Pheromone gland specific acyl-CoA desaturase in *Bombyx mori*. *Gene*, 246, 33-39.

発育阻害ペプチド(growth-blocking peptide,GBP)ードーパミン系の生理機能

早川洋一 (北海道大学低温科学研究所)

1) 目的

寄生バチによって寄生された宿主昆虫では、多くの場合、顕著な発育遅延が観察される。 発育阻害ペプチド(GBP)は、そうした被寄生宿主アワヨトウ幼虫血液から単離・構造決定された生理活性ペプチドである。 終齢初期に寄生されたアワヨトウ幼虫血液中のGBP濃度は、24時間以内に正常の約3ー4倍まで上昇する。 また、10ー数10p

moleのGBPを人為的に注射された未寄生アワヨトウ終齢初期幼虫では、顕著な発育阻害が観察される。 これらの結果から、GBPは、昆虫発育を調節するホルモン様生理活性ペプチドと考えられている。 本研究では、GBPによる昆虫発育調節の分子機構及びGBPのさらに広範な生理機能の解明をその研究目的に据えた。

2) 方法と結果

上記研究目的を達成するため、具体的には下記の3つの方向からの研究を行った。

ア) 寄生に伴う血中GBP濃度上昇分子機構の解明

イ) GBP作用機序におけるドーパミンの役割

ウ) 昆虫中枢神経系におけるGBP及びドーパミン産生細胞の同定

以下、順に実験方法・結果を詳述する。

ア) 寄生に伴う血中GBP濃度上昇分子機構の解明

アワヨトウGBPは、そのcDNA解析の結果、アミノ酸147残基からなる前駆体として合成されることが分かっている。 活性型GBPは、この前駆体GBPの限定加水分解によって生じることになる。 したがって、本研究では、まず抗GBPモノクローナル抗体を作成し、これを用いて前駆体GBPおよび活性型GBPを正確に測定するアッセイ系を確立した。 基本的には、HPLCとELISA法を組み合わせた測定方法である。

このアッセイ法を用いて、脂肪体中のGBP前駆体濃度 (GBPの主な合成器官は脂肪体と神経組織であるが、脂肪体での合成量が圧倒的に多い) と血中GBP濃度を測定した。 その結果、前駆体GBPと活性型GBP濃度は寄生後徐々に増加し、それぞれ18時間、26時間にして最高値に達することが明らかになった。

次に、GBPcDNAをプローブに用いノーザンブロットによってGBPmRNAレベルの変化を調べた。 この結果、脂肪体GBPmRNAレベルは、寄生、未寄生いずれの個体においても有意な差がないことが明らかになった。 すなわち、寄生に伴う脂肪体中の前駆体GBP濃度の上昇は、転写レベルの変化ではなく翻訳レベルの活性化によるものであると結論するに至った。

また、上述のように前駆体GBPから活性型GBPへの活性化には特定のプロセッシング酵素の関与が考えられるが、この酵素についても検討を行った。 この酵素を精製した結果、分子量約55KDaのセリン型プロテアーゼであり、基質特異性から哺乳動物血液凝固系の酵素ファクターXに似た酵素であることが明らかになった。 さらに、このプロセッシング酵素活性を寄生、未寄生個体で調べた結果、明らかに寄生に伴う活性上昇が起っていることが確認された。 したがって、寄生に伴う血中GBP濃度の上昇は、脂肪体でのGBPmRNAの翻訳レベルでの活性化とその後の修飾に関わ

るプロセッシング酵素の活性化、両過程によるものであることが明らかになった。

イ) GBP作用機序におけるドーパミンの役割

GBPによる発育阻害現象を解析する過程で一つの事実に気付いた。寄生バチの寄生によって発育遅延を来しているアワヨトウ幼虫血中ドーパミン濃度は、通常レベルの約2-3倍に上昇している点である。この血中ドーパミン濃度上昇は、健康な幼虫へのGBP注射によっても誘起されることが分かった。昆虫では、ドーパミンプールが2ヶ所存在する。一つは他の多くの動物同様に中枢神経組織であり、もう一つは表皮である。しかも、表皮のドーパミン含量は、中枢神経組織の量をはるかに凌ぐレベルであり、血中のドーパミンは主に表皮由来であると予想した。単離した表皮を用いた培養実験によって、GBPには、ドーパ脱炭酸酵素(DDC)を活性化して表皮ドーパミン濃度を上昇させる活性があり、しかも、表皮から培地中への分泌を促進する作用もあることを証明した。また、ドーパミンやドーパミンD2レセプターアゴニストの注射によってもアワヨトウ幼虫発育が遅延することから、GBPによる発育遅延効果はドーパミンの生理作用に起因する可能性の高いことが明らかになった。さらに、GBPは、脳内ドーパミンに対しても表皮同様の効果を示すことを証明した。すなわち、単離した脳の培養液にGBPを添加することによって脳内ドーパミン濃度は上昇する。こうした一連の実験によって、GBPの重要な生理機能の一つが特定の組織細胞内でのドーパミン濃度上昇作用であることが明らかになった。

次に、アワヨトウ幼虫発育を通して中枢神経組織・血液・表皮のGBP、ドーパミン濃度を測定した。この結果、GBP、ドーパミン濃度とも各脱皮時の眠の時期に上昇することが明らかになった。この事実は、GBPドーパミンの新たな生理作用を示唆するものと解釈された。すなわち、脱皮時には新しい表皮が古い表皮の下に準備されるため、この時期の激しい行動を抑える必要がある。さもなくば、できたての新しい表皮に致命的な損傷を与えかねない。私達は、GBPドーパミンが、この行動が顕著に鈍くなる眠の誘導に関わっているものと予想した。さらに、もし、この解釈が正しいとしたら、GBPドーパミンはより長期の静止状態である休眠の誘導にも関与しているものと予想した。こうした作業仮説を検証するため、蛹休眠性をもつヨトウガを用い蛹変態前後での体内ドーパミン濃度を測定した。その結果、予想通り、短日(休眠誘導条件)で飼育した個体の脳・血液内ドーパミン濃度は、長日(非休眠誘導)で飼育した個体のそれに比べ約2-3高いことが明らかになった。この際、脳内のGBPmRNAレベル及びDDCmRNAとも休眠に入る個体で高まっていることもわかった。さらに、幼虫期後半、1% DOPA混入人工飼料を与えたヨトウガでは、長日条件で飼育しても約7割の個体が休眠に入ることが分かった。そして、これらDOPA摂取個体における蛹変態時の脳内ドーパミン濃度は、やはり、短日条件飼育個体同様高まっていることが明らかになった。

このDOPA含有飼料による人為的休眠誘導は、新たなドーパミンの生理作用の可能性を示唆する結果と解釈された。すなわち、DOPA摂取によって脳内ドーパミンが高まる時期は幼虫期であり、その後、前蛹期を経て実際に休眠が誘導されるのは約1週間後のことである。したがって、飼料として吸収されたDOPAが蛹変態時の脳内ドーパミンを誘起しているのではなく、幼虫期にDOPA摂取によって一度高まったド

ーパミンがその後再度生じるドーパミン上昇を引き起こしていることになる。　　という事は、休眠誘導に必要な短日経験をしている個体脳内でも同様なドーパミン濃度上昇が起っているに違いないと予想し実験を行った。　　4 齢幼虫期まで長日条件で飼育したヨトウガを5 齢脱皮日に短日に移し、その後経時的に脳内ドーパミン濃度を測定した結果、特に夜間、長日飼育個体よりも短日飼育個体の方が脳内ドーパミン濃度が30ー40%程度高まっていることが分かった。

ウ) 昆虫中枢神経系におけるドーパミン産生細胞の同定

上述の短日条件下で高まる脳内ドーパミンが、短日環境経験の記憶に直接関係しているものと予想し、このドーパミン産生細胞の同定を試みた。　　抗ドーパ脱炭酸酵素と抗ドーパミン抗体を免疫組織染色に用いた。前者は、アワヨトウのドーパ脱炭酸酵素cDNAをクローニングし、これを大腸菌で発現させたものをウサギに免疫して調製した。後者は市販の抗体を用いた。

抗ドーパ脱炭酸酵素抗体を用いて染色した結果、4ヶ所の細胞及び細胞群にはっきりとした染色像が得られた。　　側方部(図1、1)、前方部(図1、2)、脳間部(図1、3)と後方部(図1、4)である。　　一方、抗ドーパミン抗体を用いた場合には、側方部と脳間部の染色像は見られたものの前方部、後方部の染色細胞群は明瞭ではなかった。　　また、これらの細胞および細胞群における短日、長日飼育条件下での染色強度の大きな差は今のところ見られていない。

3) 考察

ア) 寄生に伴う宿主体内での血中GBP濃度上昇は、GBP遺伝子発現の翻訳レベルでの活性化と前駆体GBPを活性型GBPへ変換するプロセッシング酵素の活性上昇によってもたらされることが明らかになった。　　しかし、現時点では、翻訳レベルの活性化がどのように起るのか?　　あるいは、プロセッシング酵素の活性上昇がどのように誘起させるのか?　　については全く分かっていない。　　前者については、翻訳活性を抑制するファクターが存在し、このファクター濃度が寄生された宿主アワヨトウ幼虫では減少するため結果的に翻訳レベルが上昇する可能性を考えている。　　また、後者プロセッシング酵素の活性上昇については、プロセッシング酵素の活性化を想定している。　　すなわち、通常は不活性型で存在するプロテアーゼが寄生によって活性化するために、前駆体GBPから活性型GBPへのプロセッシングが盛んに進むことになる。

イ、ウ) GBPは、表皮においても脳においてもドーパミン濃度上昇活性をもつ。　　表皮を用いてこの分子機構を解析した結果、これはGBPが表皮真皮細胞内のカルシウム濃度を上昇させ、これによりドーパ脱炭酸酵素(DDC)遺伝子発現の転写レベルを活性化させるために起るらしいことが分かっている。　　ただ、現時点では、DDC遺伝子に対する転写因子について何も分かっていないので、細胞内カルシウムがどのようにDDC遺伝子の転写レベルを上昇させるかについても不明である。

休眠誘導に関わるドーパミンには、2つの生理的側面が考えられる。　　一つは、蛹変態時に3ー4倍高まる脳内ドーパミンであり、これは神経調節因子として直接休眠誘導に関与するホルモン分泌調節の役割を担っているものと考えられる。　　ヨトウガのような蛹休眠昆虫では、蛹変態直後の前胸腺刺激ホルモンの分泌を抑え成虫へ一連

の発生を停めるものと予想される。 もう一つのドーパミンの生理作用とは、短日条件を経験している時期に脳内で高まり、恐らく、その経験を一種の記憶として固定させるために機能しているものと考えられる。 この作業仮説を実証する為に、まず脳内ドーパミン産生細胞の同定を試みた。 脳内では、主なドーパミン産生細胞群が4箇所同定できたが、これが全てとは思っていない。 さらに、染色条件等の検討を行い、より精密な分析を行う必要がある。

4) 計画に対する達成度の自己評価と今後の方策

GBPの寄生に伴う濃度上昇機構については、大枠が本研究によって明らかにできたと思っている。 今後は、GBP遺伝子の翻訳調節ファクターの同定、及び、前駆体GBPプロセッシング酵素の一次構造決定を急がねばならない。 また、脳・血液内GBPは、寄生に限らず各種ストレスでその濃度上昇が観察される。 これらの濃度上昇についても、寄生時のメカニズムで説明可能かどうか併せて明らかにしておく必要がある。

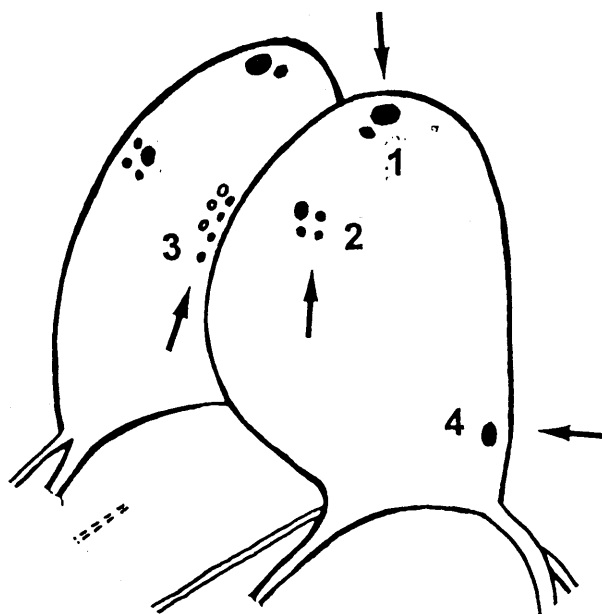
GBP-ドーパミン系が昆虫の発育調節を担っている可能性についての提言が、今後の昆虫生理学の新たな展開に寄与するものであることを願っている。 そのためには、寄生・休眠に限らず、さらに広範な生理現象への関与についても検討を行わなければならないし、また、各々の現象への関与についても、より厳密な証明が必要となる。

”ドーパミンが昆虫の記憶形成・固定に関与する脳内ファクターである”という作業仮説については、現時点で評価できるだけの実績もない。 ただ、今後は、ヨトウガを用いてオーソドックスな研究を進める一方で、ショウジョウバエを用いる分子遺伝・分子生物学的研究も必要になってくるものと考えている。

5) ドーパミン産生細胞の脳内分布

図1、 抗ドーパ脱炭酸酵素抗体による組織免疫染色

抗ドーパ脱炭酸酵素抗体を用いたヨトウ5齢幼虫脳の組織免疫染色像をイラスト化したもの



脱皮と変態の分子機構の解析

上田 均 (国立遺伝学研究所・形質遺伝研究部門)

研究成果

1) 目的

FTZ-F1は、エクジソンのパルスによって誘導され、孵化直前の後期胚、幼虫脱皮、蛹化の直前に一過的に発現する転写因子である。カイコの*in vitro*転写系および*transgenic fly*を用い、FTZ-F1遺伝子の5'末端上流域に存在する転写調節にかかわるエレメントを細かく解析する。さらに、これらの転写調節領域に塩基配列特異的に結合する転写因子をクローニングし、その構造および発現パターンを解析することにより、FTZ-F1の発現調節機構を明らかにする。一方、ショウジョウバエのFTZ-F1変異株を解析すること、および、FTZ-F1の標的遺伝子を検索し、どのような遺伝子がどのようなメカニズムでFTZ-F1によって制御されているか明らかにすることにより、FTZ-F1の脱皮、変態時における機能を明らかにする。また、FTZ-F1による転写の活性化に必要なMBFの発現パターンの解析、さらに、MBF変異株を解析することにより、MBFの脱皮や変態時での機能を明らかにする。以上の解析により、昆虫の脱皮、変態時にエクジソンによって制御される転写因子の遺伝子発現制御のカスケードの一端を明らかにする。

2) 方法と結果

A、FTZ-F1の発現誘導機構

FTZ-F1プロモーターの様々な領域にレポーター遺伝子を結合した融合遺伝子を持つ*transgenic fly*系統を作成し、レポーター遺伝子の発現パターンを観察したところ、転写開始点を+1として-0.7から+0.5kbの領域(時期特異性領域と命名)によって発現時期特異性が少なくとも決まること、および、-2.4から-1.5kbの領域(エンハンサー様領域と命名)は、転写に正に作用する領域であることが明らかとなった。生体内のショウジョウバエ胚および変態初期のステージの異なる様々な核抽出液から時期特異性領域に結合する因子を検索したところ、エクジソンの体液中の濃度の変化に応じて検出される2つの因子、I-4、II-4/II-7を見い出した。II-4/II-7の結合DNA配列を決定したところ、その結合部位は、転写開始点の下流に3ヶ所存在(+170、+270、+450)し、その結合配列から核内レセプタースーパーファミリーに属する因子で、エクジソン誘導性の転写因子DHR3であることが示唆された。そこで、II-4/II-7の結合部位をプローブとしたゲルシフト系にDHR3抗体を加えたところ、II-4/II-7のバンドは、スーパーシフトし、II-4/II-7は、DHR3であると考えられた。次に結合因子I-4の結合部位のDNA結合配列を決定したところ、-0.3kbに結合する事が判明し、その配列から、新規の因子であると推定された。次に、I-4あるいはII-4/II-7部位に塩基置換を生じたFTZ-F1遺伝子転写制御領域にレポーター遺伝子を結合した融合遺伝子を持つ*transgenic fly*系統を作成し、レポーター遺伝子の発現パターンを観察したところ、いずれも融合遺伝子の発現時期は変化しないが、野生型制御領域を持つ融合遺伝子に比べ大きく低下し、I-4とDHR3は、FTZ-F1遺伝子の発現に正に働くと考えられた。以上の結果から、I-4結合部位、DHR3結合部位とエンハンサー様領域と合わせ、少なくとも3つの領域が転写活性化にかかわることが明らかになったが、これらの3つ

の領域のいずれかを欠くと発現量が大きく低下することから、FTZ-F1遺伝子発現に、お互いに相乗的に作用する領域であると考えられた。一方、-2.4~-0.7kbの領域を熱ショックプロモーターに結合した融合遺伝子では、エクジソンの濃度が高い時期からの発現が観察されるが、熱ショックプロモーターをFTZ-F1遺伝子のベータプロモーター領域-50~-+50bpと置き換えたところ、本来の発現パターンであるエクジソンプルス後からの発現がみられた。このことから、FTZ-F1遺伝子のベータプロモーター領域-50~-+50bpにエクジソン高濃度下で負に制御する領域があると推定された。以上のことから、FTZ-F1遺伝子の発現誘導機構については、3つの正に働く領域と1つの負に働く領域によって、エクジソンプルスの後に発現するものと考えられた(図)。

B、FTZ-F1の脱皮、変態過程における機能

FTZ-F1の変異株は、胚致死であったので、熱ショックでFTZ-F1を発現できる融合遺伝子を持つhsFTZ-F1遺伝子を導入し、熱ショックでrescueを試みた。胚ステージの熱ショックでFTZ-F1変異株は、1齢幼虫に成ることができたが、2齢には成らなかった。この1齢中期幼虫に再び熱ショックを与えFTZ-F1強制発現させると、2齢に成ることができたが、3齢には成れなかった。これらの結果から、FTZ-F1は、脱皮に必要であることが示唆された。次に、変態期におけるFTZ-F1変異株の観察をおこなったところ、前蛹期で発生が停止していることが明らかになった。また、hsFTZ-F1遺伝子を導入し、前蛹期の様々な時期に熱ショックを与えると、前蛹期中期から後期にかけての内在性FTZ-F1が発現する時期にFTZ-F1を発現させた場合のみ効率の良い発生異常の回復が観察された。これらの結果から、FTZ-F1は、前蛹期中期から後期において時期特異的に発現することが重要な転写因子であると推定した。さらに、各組織でのFTZ-F1の機能を推定するため、体の内部を観察したところ、唾腺のヒストリシス、中枢神経系の発達、成虫原基の発達、消化器官系の発達など様々な器官で異常が観察された。この結果から、FTZ-F1は、変態期に多くの器官で様々な作用をする重要な因子であると考えられた。前蛹期後期のFTZ-F1変異株に熱ショックでBroad Complex (BR-C)を発現できる遺伝子を導入し、熱ショックでBR-Cを誘導したところ、FTZ-F1変異株の形質のうち、唾腺のヒストリシスに関してはrescueでき、唾腺のヒストリシスに関してはBR-Cは、FTZ-F1の下流で働く因子であることが示唆された。

C、ショウジョウバエFTZ-F1の標的遺伝子の発現制御

ゲルシフト法による解析により、ショウジョウバエ蛹のクチクラをコードするEDG84A遺伝子の転写開始点の上流100bpの位置にFTZ-F1が結合することが明らかとなり、FTZ-F1の標的遺伝子のひとつであることが予想された。そこで、この部位に変異を導入したEDG84A遺伝子プロモーター領域にレポーター遺伝子を融合した遺伝子を有するtransgenic fly系統を作成し、レポーター遺伝子の発現を調べたところ、発現は観察されず、この遺伝子は、FTZ-F1の標的遺伝子であると考えられた。次に、組織特異発現を制御する機構を明らかにするため、EDG84A遺伝子転写開始点近傍の様々な領域をレポーター遺伝子を結合した融合遺伝子を持つtransgenic fly系統を作成し、レポーター遺伝子の発現パターンを観察した結果、-408bpから-194bpの間に腹部表皮での発現を抑制する因子が作用すること、-174bpから-145bpの間に頭部と胸部表皮での発現に必要な因子が作用すること、-103bpより下流に腹部表皮での発現に正に働く因子が作用することが示唆され

た。以上のことから、EDG84A遺伝子が、時期特異的に発現するFTZ-F1と組織特異性を規定する因子の協調作用により、発現制御がおこなわれていると考えられた。

D、MBFの解析

BmFTZ-F1と、そのコアクチベーターであるMBF1とMBF2の抗体を用いたウエスタンブロットおよび組織染色により、カイコの4齢から5齢にかけての絹糸腺での存在量および細胞内局在を調べた。BmFTZ-F1は、4齢脱皮約半日前のスピラクルステージD3からあらわれ、脱皮後速やかに消失した。MBF1の存在量に大きな変化がみられなかったが、MBF2は、4齢始めからスピラクルステージD3まで存在し、その後速やかに消失し、脱皮後再び現れた。BmFTZ-F1は、核に局在したが、MBF1とMBF2は、通常はほとんど細胞質に局在し、スピラクルステージD3の時期にのみ核に局在した。以上の結果、MBFの存在量および細胞内局在は、眠期内で時期的に制御されており、脱皮過程において何らかの意味がある可能性が示された。

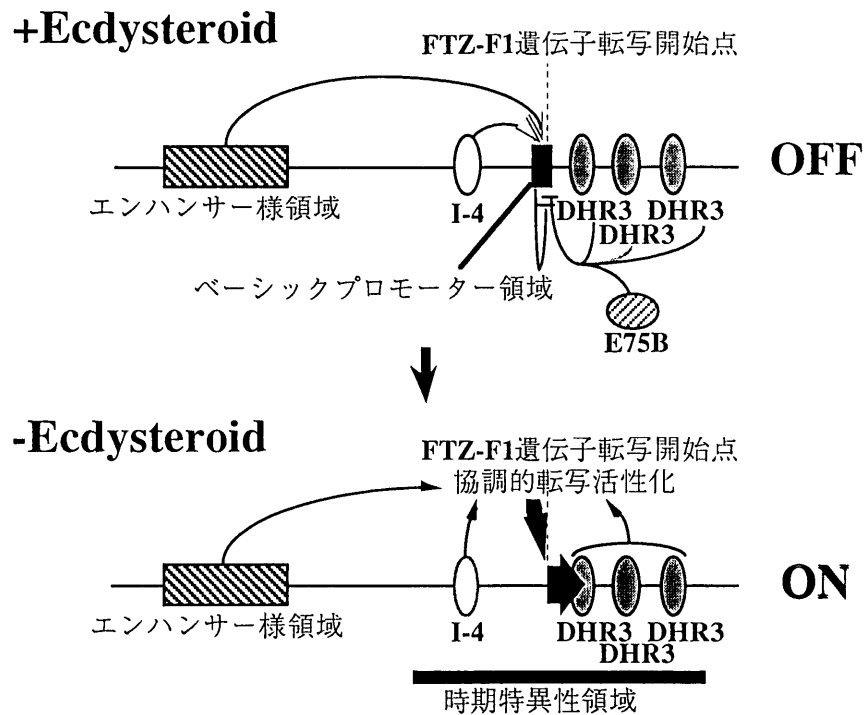
カイコの近縁種のエリ蚕のMBF2のクローニングにより、MBF2内での保存領域が明らかとなった。この保存領域をもとにデータベースのサーチを行なったところ、MBF2と弱いホモロジーを有する因子をカイコから2個、ショウジョウバエから2個見いだした。これらは、いずれもエリ蚕MBF2で保存されている領域内に保存されている領域が存在し、MBF2は、ファミリーを形成している因子であることが推定された。また、MBF2の発現パターンの解析などから、それぞれのMBF2は、組織特異的に発現している可能性が示唆された。

3) 考察

FTZ-F1は、エクジソンで誘導され時期特異的に発現することが重要な転写因子であると考えられ、この因子の上流と下流に位置する遺伝子を明らかにすることにより、エクジソンによる遺伝子発現カスケードの一端を明らかにすることができた。また、組織特異性を規定する因子の協調作用により、脱皮や変態過程で同じホルモン支配下におこる組織特異的な現象を説明する一例を示すことができ、変態の機構の解明にこのような因子の同定が重要であると考えられた。一方、FTZ-F1遺伝子の発現制御機構は、予想以上に複雑な機構で制御されていると推定され、正確に時期特異的に発現することが重要なFTZ-F1遺伝子の発現制御を行なう上で意味のあるものではないかと考えられた。

4) 計画に対する達成度の自己評価と今後の方策

FTZ-F1遺伝子の転写制御機構については、大まかな点が明らかにすることはできたが、まだ詳細は今後の解析が必要で、続けて解析する予定である。FTZ-F1の機能に関しては、幸にも適当な変異株が得ることができ、脱皮や変態過程における重要性を十分示すことができた。また、標的遺伝子についても発現機構をある程度明らかにすることができ、組織特異性を規定する因子の重要性を示すことができた。しかし、その組織特異的発現を決める因子の同定まで至らず、今後解析を続ける予定である。また、他の標的遺伝子の検索も行なったが得ることはできず、今後の課題として残った。MBFの解析については、発現パターンの解析および試験管内の解析にとどまり、今後、変異株の取得等を行なって機能を明らかにすることによって初めて意味あるものか判断され则认为している。



図、FTZ-F1遺伝子転写制御機構のモデル

高エクジソン時には、ベーシックプロモーター領域およびDHR3に結合したE75Bによって転写の抑制がおこなわれるが、エクジソンレベルが低下すると、エンハンサー様領域、I-4、DHR3の協調的作用によりFTZ-F1遺伝子が転写されるようになる。

代表的な発表論文

T. Murata, Y. Kageyama, S. Hirose and H. Ueda (1996) Regulation of the *EDG84A* gene through FTZ-F1 during metamorphosis in *Drosophila melanogaster*. *Molecular Cellular Biology*, 16, 6509-6515.

Y. Kageyama, S. Masuda, S. Hirose and H. Ueda (1997) Temporal regulation of the mid-prepupal gene FTZ-F1: DHR3 early-late gene product is one of plural positive regulators. *Genes to Cells*, 2, 559-569.

K. Takemaru, F.-Q. Li, H. Ueda and S. Hirose (1997) Multiprotein bridging factor 1 (MBF1) is an evolutionarily conserved transcriptional coactivator that connects a regulatory factor and TATA element-binding protein. *Proceeding of National Academy of Science USA*, 94, 7251-7256.

Q.-X. Liu, H. Ueda and S. Hirose (1998) Comparison of sequences of a transcriptional coactivator MBF2 from three Lepidopteran species *Bombyx mori*, *Bombyx mandarina* and *Samia cynthia*. *Gene*, 220, 55-59.

Q.-X. Liu, H. Ueda, and S. Hirose (2000) MBF2 is a tissue- and stage-specific coactivator that is regulated at the step of nuclear transport in the silkworm *Bombyx mori*. *Developmental Biology*, in press.

カイコ前胸腺および精巣におけるエクジステロイド合成の制御機構

普後 一 (東京農工大学農学部生物生産学科昆虫生化学教室)

目的

エクジステロイドは、昆虫の発育・成長に重要な役割を持つホルモンであり、その合成や放出の制御は高次中枢によってなされている。本研究は、前胸腺あるいは精巣でのエクジステロイド合成を制御しているペプチドホルモンについて、それらの作用機構、組織における時間的・合成的制御機構、ホルモン相互の作用機構、変態・脱皮にかかわるそれらホルモン類の変動などについて、生理生化学的に明らかにすることを目的としている。

材料と方法

1. 供試昆虫

供試カイコ品種は、J106号×大造種を用いた。全齢桑で飼育した。前胸腺に関する実験には雌個体を、精巣に関する実験には雄個体を用いた。

2. 器官培養法

精巣あるいは精巣被膜の培養は、24穴ウエルの中で行った。培養液はGraceの培地(Gibco)を用いた。前胸腺の培養は、96穴ウエルの中で行った。培養液はGraceの培地を用いた。それぞれの器官の培養時間は実験によって異なるが、精巣培養では3時間を基本とし、前胸腺培養は1時間を基本的な培養時間とした。各器官を入れたウエルは25℃の定温培養装置の中に保持した。培養終了時、各器官あるいは培養液からのエクジステロイドの抽出を行った。

3. エクジステロイドの抽出と検定法

精巣からのエクジステロイドの抽出は、精巣をクロロホルム：メタノール(2:1)で磨碎し、遠心上清に対し半量の蒸留水を加え水層分画を得た。これを直接ラジオイムノアッセイ(RIA)法に供した。一部の実験では、この分画を更にSep-Pak C18カートリッジを用いて大別し、HPLC-RIA分析や、抱合型エクジステロイドの酵素処理を行い、エクジステロイドを定量した。

培養液中のエクジステロイド量は、最初に培養液100μlに対しメタノールを500μl加え、培養液中のエクジステロイドを抽出した。抽出物中のエクジステロイド量はRIA法で定量した。

前胸腺で作られたエクジステロイドの抽出・定量法は、基本的には精巣の場合と同様である。また、培養液中のエクジステロイドは直接RIA法に供した。

4. 各種ホルモン類および化学薬剤存在下での器官の培養

基本的には器官培養液に所定のホルモン類や薬剤を加え、器官を培養した。水溶性のものは蒸留水に溶解させ、不溶の薬剤はDMSOに溶解させた。DMSOの終濃度は5%に統一させた。有機溶媒、各種阻害剤、ラジオアイソトープ等はデュポン社、第一化学、SIGMA社より購入した。

カイコ神経ペプチドホルモンは、rPTTH, Bombyxin, 羽化ホルモンは東京大学・片岡教授より譲渡された標品を用いた。脂質動員ホルモン(AKH)はSIGMA社より購入した。Testis-ecdysiotropin (TE)は、USDAのLoeb博士より譲渡されたマイマイガTEを用いた。

幼若ホルモン類似物質であるフェノキシカルブは、一部合成標品を用いたが、基本的にはチバガイギー社より譲渡された純度99%の標品を用いた。フェノキシカルブは水不溶性であるのでアセトンに溶解した。

結果と考察

1. 精巣におけるエクジステロイド合成の制御機構

カイコガ精巣でのエクジステロイドの消長は、ほぼ体液中のエクジステロイドの変化と平行して変動していた。精巣エクジステロイドは5齢直後から検出されるが、特に吐糸期を境に急激にその力価は増大する。しかし、精巣エクジステロイド含量は体液中の約1/100~1/300程度と低い。精巣で検出されるエクジステロイドの約1/3は精巣被膜に存在しており、仮に精巣でエクジステロイドが合成されているとするならば精巣被膜での合成が考えられる。

精巣に存在するエクジステロイドの組成について検討したところ、主なエクジステロイドはエクジソン (E) と20-ヒドロキシエクジソン (20E) であった。発育段階でのエクジステロイド組成の変化について検討したところ、5齢6日目~8日目にかけて抱合型エクジステロイドの含量が増加し、蛹期では低減することが明らかとなった。この結果はラベルされたEの取りこみ実験でも証明された。抱合型エクジステロイドの生理作用はほとんどないといわれているが、精巣での一時的な抱合型エクジステロイド存在の生理的意味について現在是不明である。

精巣を培養すると、培養液中にエクジステロイド活性が検出される(培養液中に検出されるエクジステロイドはEと20Eである)。培養開始より経時的にエクジステロイドは培養液中に増加してくる。しかし、精巣中のエクジステロイド含量は反対に低下することが判明した。

精巣をラベルされたE ($^3\text{H-E}$) と同時に培養すると、Eは精巣に取り込まれる。Eの精巣への取りこみ率は発育段階を通じてそれほど変化はない(0.15%程度)が、取りこまれたEは20Eへと変換される(図1)ことが証明された。即ち、5齢4日目でのEはほぼ60%が20Eに変換されるが、発育時期が進むにつれてその変換率は高くなった。しかし、蛹期になると取りこまれたEは殆ど20Eへ変換されなくなることが判明した(図1)。

精巣が独自にエクジステロイドを合成しているのか、あるいは精巣に存在しているエクジステロイドが体液由来であるのかについて検討した。まず、培養条件下での精巣でのエクジステロイド含量の変化を調査したが、経時的に含量は低下することが判明した。次に、既知カイコガペプチドホルモンあるいは脳磨砕抽出物の精巣エクジステロイド合成活性について検討したが、供試したホルモンは全て精巣でのエクジステロイド含量を増加することはなかった。マイマイガTEについても検討したが、TEによる精巣エクジステロイド合成活性化の効果は認められなかった。更に、遊離腹部を用いた実験で精巣独自のエクジステロイド合成機構の存在について検討した。遊離腹部にEあるいは20Eを投与すると、投与量に応じて精巣エクジステロイド量が増加し、含量は投与後約1時間でピークを迎えた。即ち、精巣独自の合成存在を示唆する結果は得られなかった。また、ペプチドホルモン類のセカンドメッセンジャーとしてホルモン作用を増幅させる酵素の活性化剤あるいは阻害剤などの投与、カルシウム、環状ヌクレオチド、G-タンパク質の関与などについて詳細に検討したが、いずれも精巣でのエクジステロイドの含量を増加あるいは低下させる効果は認められなかった。加えて、培養液中のエクジステロイド量が培養精巣内エクジステロイド含量を左右することも判明した。

これらの実験結果から、カイコガ精巣独自のエクジステロイド合成機構はなく、精巣中に存在するエクジステロイドは体液由来のEあるいは20Eとその代謝産物であるものと結論した。

2. 前胸腺におけるエクジステロイド合成制御機構

幼若ホルモン類似物質であるフェノキシカルブを投与された5齢幼虫は、投与時期によってフェノキシカルブに対する生理的反応が変化する。即ち、5齢前半では6齢幼虫が誘導され、中期の投

与では営繭出来ずに永続幼虫となり、後期では蛹には変態できるが成虫変態できない個体や永続蛹が誘導される。従って、フェノキシカルブは脱皮や変態のホルモン支配を詳細に検討する上で有力な実験ツールとなる。

昆虫の変態・脱皮は幼若ホルモンやエクジステロイド（前胸腺ホルモン）そして前胸腺刺激ホルモン（PTTH）で制御されている。基本的には体内のエクジステロイドの消長が脱皮や変態の誘導に反映されている。しかし、カイコガでの前胸腺におけるエクジステロイド合成制御機構の生理・生化学的研究は殆どなされていなかった。先に記したフェノキシカルブによって誘導される多くの生理的变化は、このエクジステロイドの消長を攪乱させると予想される。そこで、フェノキシカルブ投与個体を用いて、前胸腺におけるエクジステロイド合成制御機構の解明を行った。

カイコガ5齢幼虫前胸腺に対するrPTTHのエクジステロイド合成刺激作用ならびにcAMP含量について検討した。rPTTHは前胸腺を刺激し、培養液中にエクジステロイドを放出させる能力をもっていた。但し、5齢初期の前胸腺はrPTTHに殆ど反応しなかった。次に、rPTTHの作用機作を明らかにするためセコンドメッセンジャーとしてcAMP含量を測定した。その結果、一部の例外を除いてrPTTHは前胸腺中のcAMP含量を増加させることはなかった（5齢3～4日目の前胸腺は顕著にrPTTHに反応し、cAMPあるいはエクジステロイド合成を増加させた）。しかし、IBM X存在下で前胸腺を培養すると前胸腺はrPTTHに顕著に反応しcAMP量は増加した。また、前胸腺がrPTTHに反応してcAMPを増加させる機構の一部にはカルシウムの存在が不可欠であることが判明した。カルシウムイオノフォア、フォルスコリン、カルシウムイオンチャンネル阻害剤、カルモデュリン阻害剤等の投与実験の結果より、 Ca^{2+} -カルモデュリン系の存在やcAMP依存性プロテインキナーゼの存在が示唆された。

一方、カイコガ脳一側心体-アラタ体由来する前胸腺内cAMP濃度を増加させる、新規物質の存在が強く示唆された。この新規物質は熱安定性でありトリプシン感受性の分子量5000以下のペプチドであり、濃度依存的に前胸腺のcAMP量を増加させる。また、前胸腺内のIP₃含量を増加させる新規ペプチドの存在も示唆された。これらの少なくとも2種の新規ペプチドは作用する時期が異なり、cAMPやIP₃が前胸腺のエクジステロイド合成に関与していることが明らかとなった。

これらフェノキシカルブ投与個体や正常個体を材料に行った一連の実験結果から、従来考えられてきた前胸腺でのエクジステロイド合成制御機構に加えて、新規ペプチドの介在を提唱した（図2）。rPTTHは前胸腺刺激作用を持つペプチドホルモンであることは間違いないが、更に前胸腺でのエクジステロイド合成は前胸腺自体の発育分化とあいまって、新規ペプチド（脳由来）がPTTH分泌以前に前胸腺に作用していないと（即ち、cAMP合成機構やIP₃誘導に伴うカルシウムの介在経路の構築）、連続したエクジステロイド合成が進行しないことが明らかとなった。またフェノキシカルブ投与個体では、前胸腺自体でのこうした新規ペプチドの受容体形成を攪乱することも示唆された。

計画達成度の自己評価と今後の方策

今回の研究によって多くの新知見が得られたものと評価しており、当初計画の約8割は達成されたものと考えている。

精巣独自のエクジステロイド合成制御機構のうち合成系存在はほぼ否定された。体液由来のエクジステロイドの精巣への取りこみの事実とそれらが精巣内で代謝されている事実は、精巣における精子形成にエクジステロイドが関与していることを示唆する。また体液中に存在する30Kタンパク質の取りこみの事実も、動的な精巣での精子形成との関連で興味深い。しかし、カイコガ精巣で

の有核精子や無核精子形成の時間的な精子変態の機構解明には至らなかった。精子変態にはエクジステロイドが強く関与していることは示唆されたが、培養条件下で再現する必要がある。精巣での糖代謝と精子形成との関連についても解決すべき課題が残っている。更に、精巣でのエクジステロイド代謝経路の解明も検討課題の1つである。これらの問題に関して、現在も研究を進めており、近い将来結果が報告できるものと考えている。

一方、前胸腺でのエクジステロイド合成制御機構の多くの部分が明らかにされたが、新規ペプチドの性状、脳内合成場所の特定、分泌経路、時間的空間的作用発現機構、幼若ホルモンの介在、カルシウムの介在、リン酸化タンパク質の同定と作用機構、ボンビキシンの存在意義と作用機構、成虫頭部でのPTTHの存在理由、PTTHの時期特異的発現機構、PTTH受容体の解析、新規ペプチドの受容体の解明など多くの未解決な研究課題が残されていると考えている。

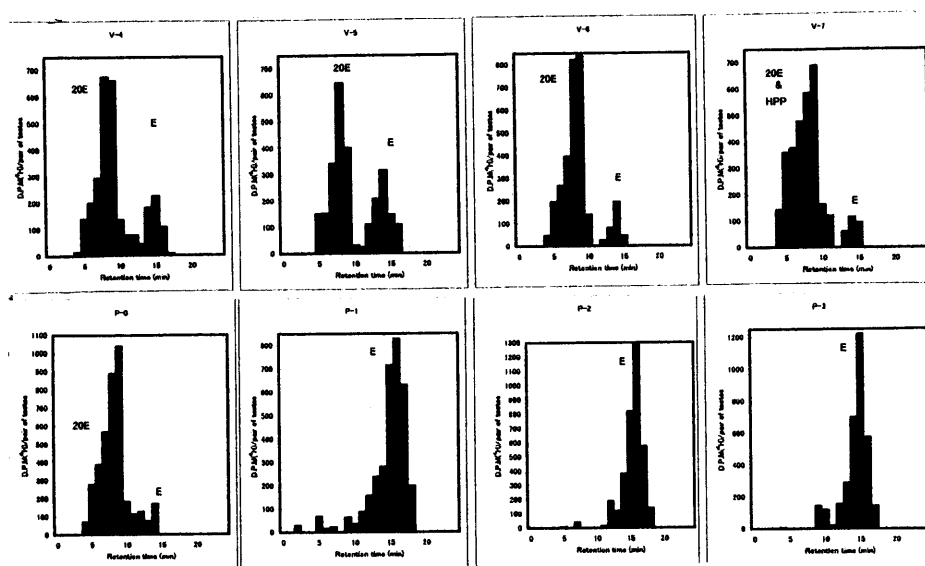


図1. カイコガ精巣におけるエクジステロイドの変換

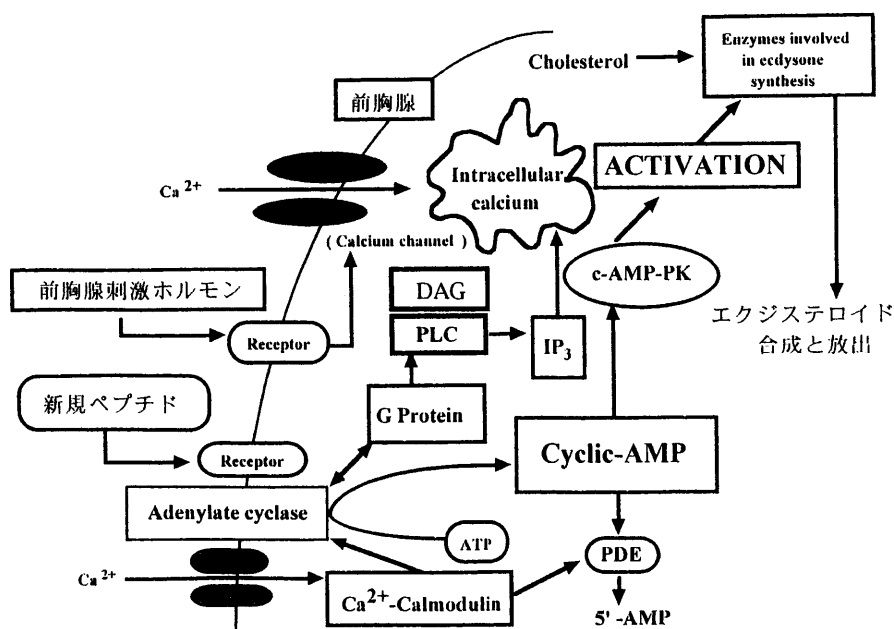


図2. カイコガ前胸腺におけるエクジステロイド合成制御機構

昆虫幼若ホルモンによる遺伝子発現の調節機構の研究

鎮西康雄（三重大学医学部医動物学教室）

研究成果

研究－１　ホソヘリカメムシの幼若ホルモン依存性遺伝子の探索

1) 目的

昆虫の幼若ホルモン(Juvenile Hormone=JH) はエクジソンと共に変態を調節するホルモンとして知られる。また、JH は変態以外にも休眠・生殖・相変異・体色などの昆虫にとって基本的で重要な現象の調節も行っている。JH によるこれらの現象の制御は新たな遺伝子の発現を通して行われていると考えられており、事実、JH によって発現が調節されている遺伝子（たとえばピテロジェニン）が多数明らかにされている。しかし、未だ JH 受容体は同定単離されておらず、JH による遺伝子発現の調節機構は明らかにされていない。この研究は JH により、より直接的に発現が誘導される遺伝子を探索し、それらの発現誘導の機構を明らかにすることを目的とした。

2) 方法と結果

ホソヘリカメムシの休眠雌成虫にアセトンとアセトンに溶解した JH とを処理し、脂肪体から RNA を抽出し、arbitrary primers を用いて PCR を行い、JH 処理・未処理で違いのある PCR 産物を検出し、そのバンドをゲルから抽出した。これらを再クローニングし、プローブとして再び、JH 処理・未処理でノーザンブロット解析を行って、発現の違いが明確なクローンを選抜した。その結果、これまで未解析の遺伝子として JH 抑制性遺伝子(JH repressible genes) が 3 つ(JR-1,2,3) と JH 誘導性遺伝子((JH inducible/JH stimulatory genes)が 1 つ(JI-1)とれた。これらの塩基配列を解析し、データベースにより既知遺伝子との相同性を検索した。その結果、JR-3 とした遺伝子は既知の昆虫や動物で知られる transferrin と相同性が高く、ホソヘリカメムシの transferrin(RcTf)と同定した。RcTf の発現と JH による発現の調節について検討した。その他の遺伝子についてはいずれも相同なものがなく、新規遺伝子であることが判った。

3) 考察

Differential Display (D-D) 法により、JH 処理によって誘導されたり抑制されたりする遺伝子が複数とれた。第一段階で分離されたもののほとんどが、それ以下の検討で false positive であることがわかり、結果的には 7 つ（このうち 3 つは既知の Cpa, CPb, Vg) に過ぎなかったことは、D-D 法の困難さを認識した。得られた遺伝子を利用して、その発現の機構を比較検討し、JH 作用機構の解明に資する研究につなげる必要がある。

4) 計画に対する達成度の自己評価と今後の方策

JH によって発現を制御されている遺伝子を D-D 法で検索し、これら遺伝子の上流調節領域を解析し、JH による遺伝子発現調節を研究するのが目的である。しかし、現在はいくつか目的とする遺伝子 cDNA がとれた段階で止まっている。その意味では本来の目的はまだ達成されていない。これを足がかりに遺伝子のクローニング、上流域の解析を行い、発現調節の機構に切り込む研究を行いたい。

研究－2 ホソヘリカメムシのシアノプロテイン (CP) の合成調節

1) 目的

JH は変態や休眠・生殖・相変異・体色などの昆虫にとって重要な現象の調節を行うホルモンであるが、その分子レベルでの作用機構はまだ未解明な部分が多い。未だ JH 受容体は同定単離されておらず、更に JH による遺伝子発現の調節機構は明らかにされていない。この研究は JH による特定遺伝子の発現を調節する分子機構について明らかにすることを目指し、特に JH によって発現調節される遺伝子の上流調節領域と結合する因子のクローニングを目的とした。

2) 方法と結果

貯蔵タンパク質の 1 種であるホソヘリカメムシの体液タンパク質 cyanoprotein (CP) の JH による遺伝子の発現調節について調べた。まず CP を精製し、その諸性状を解析した。CP は分子量 76kDa の 2 つの異なる単量体 CPa, CPb をサブユニットとする 6 量体分子で、発育ステージ、休眠・非休眠、雌・雄でそのサブユニット構成が変わることを明らかにした。CP は脂肪体で合成され、体液に分泌されて貯蔵されるが、卵成熟期に一部は体液から卵母細胞に取り込まれることが判った。サブユニット CPa, CPb 遺伝子の発現(mRNA レベル・タンパク質合成のレベル)は発育ステージ、休眠・非休眠、雌・雄で異なり、それはそれぞれ JH による直接的な制御下にあることを示した。即ち CPa および CPb は構造的にはよく似た分子であるが、これらの遺伝子は JH に対して異なった反応性を示し、JH によって CPa 遺伝子の発現は誘導活性化され、CPb 遺伝子の発現は抑制されることが明らかになった。

CPa/CPb の遺伝子をクローニングし、その構造解析を行った。それぞれ 11 のエクソンから成り、上流域の遺伝子構造では CPa に特異的な反復配列があることが判った。これらの反復配列をプローブとして用い、JH 処理未処理の脂肪体核抽出タンパク分画を用いたゲルシフト解析を行った。その結果 CPa 遺伝子の-540bp 付近にある AGGTATTGATTACCT の inverted repeat は核内リセプタースーパーファミリの responsive element のコンセンサス配列 AGGTCA に近く、JH 処理した脂肪体にはこの繰り返し配列に特異的に結合する因子のあることを明らかにした。

3) 考察

この特異な繰り返し配列に結合する因子は JH 受容体か、あるいは JH によってより直接的に発現が誘導される因子であることが示唆される。この脂肪体核因子をクローニングすることが更に一步 JH 受容体に近づくと確信し、現在 yeast one hybrid system によってこの因子のクローニングを試みている。即ち、この配列を pHISi-reporter plasmid に組み込み、LacZ を reporter とし、一方脂肪体 cDNA を pGAD424 に組み込み YM4271 strain の yeast に取り込ませ、lacZ の発現を増強するクローンをスクリーニングする。これによって特異反復配列に結合する因子がクローニングされるはずである。

4) 計画に対する達成度の自己評価と今後の方策

最終的な目標としている JH 受容体のクローニングはまだできていない。その意味で達成感はない。しかし、現在、上述の特異繰り返し配列に結合する因子のクローニングが期待できる段階にきており、これが完成すれば、少なくとも JH receptor に一步近づいたといつて良いだろう。

研究-3 新規転写調節因子のクローニングと機能解析

1) 目的

JH 受容体を同定し、クローニングするための一つのアプローチとして、JH 受容体が転写調節因子の一つである可能性があることから、転写調節因子のファミリーに属する因子をクローニングし、それらの機能解析することで、JH 受容体を検索することを目的とした。

2) 方法と結果

カイコ幼虫の cDNA を template として、核受容体の zinc finger domain の保存領域に基づいて設計した primers で PCR を行い、得られたフラグメントをプローブとして cDNA ライブラリーから新しい orphan receptor GRF をクローニングし、全塩基配列を明らかにした。GRF はカイコの FTZ-F1 と脊椎動物で知られる germ cell nuclear factor (GCNF) に近い構造をしていた。GRF の mRNA は 8 kb でほとんどの組織で検出できた。その発現はエクダイソンのピークより少し遅れていた。この発現パターンは early-late gene の DHR 3 と近く、FTZ-F1 より先行していた。GRF は多くの組織で発現し、エクダイソンと対応して極く限られた時期にでてくることが明らかになった。組み替え GRF を用いて、エストロゲン受容体の応答配列の half site AGGTCA との結合をゲルシフトアッセイにより調べたところ、特異な結合が観察された。これらのことから、GRF はエクダイソンカスケードを構成する一因子である可能性が証明さ

れた。

3) 考察

GRF は新しい転写調節因子としてクローニングされたが、これはエクダイソンカスケードの一部を担う因子の可能性がある。その意味でこの研究成果はエクダイソンとの関係で重要である。しかし、これが JH 受容体である可能性はまだテストされていない現在、本来の目的である JH との関連は今後の課題である。

4) 計画に対する達成度の自己評価と今後の方策

本来の計画では得られた核受容体が JH 受容体であることを検討することになっているが、この点はやられていない。従って、JH 受容体を探索するという当初の目的は未だ達成されていない。現在のところ、この strategy によって JH 受容体を明らかにする研究は実行していない。

代表的な発表論文

T. Shinoda, K. Miura, and Y. Chinzei (1996) Vitellogenins and vitellins in the bean bug, *Riptortus clavatus* (Heteroptera: Alydidae) : Purification, immunological identification and induction by juvenile hormones. Archives of Insect Biochemistry and Physiology, 31: 395-412

M. Hirai, M. Yuda, T. Shinoda and Y. Chinzei (1998) Identification and cDNA cloning of novel juvenile hormone responsive genes from fat body of the bean bug, *Riptortus clavatus* by mRNA differential display. Insect Biochemistry and Molecular Biology. 28: 181-189

K. Miura, T. Shinoda, M. Yura, S. Nomura, K. Kamiya, M. Yuda and Y. Chinzei (1998) Two hexameric cyanoprotein subunits from an insect, *Riptortus clavatus*: Sequence, phylogeny European Journal of Biochemistry, 258 : 929-940

J-P. Charles, T. Shinoda and Y. Chinzei (1999) Characterization and DNA-binding properties of GRF, a novel monomeric binding orphan receptor related to GCNF and β FTZ-F1. European Journal of Biochemistry, 266: 181-190.

M. Hirai, D. Watanabe and Y. Chinzei (2000) A juvenile hormone-repressible transferrin-like protein from the bean bug, *Riptortus clavatus*: cDNA sequence analysis and protein identification during diapause and vitellogenesis. Archives of Insect Biochemistry and Physiology, 44 :17-26

蚕卵休眠に動員される情報伝達系に関する天然物有機化学的研究

今井邦雄（三重大・生物資源）

【目的】

カイコの卵休眠現象は、母蛾が卵であった時期の外部環境情報の記憶に基づき、来るべき環境を予察して引き起こす現象で、次世代で発現する。その過程には複数の生体分子を介する多段階の情報伝達機構の存在とそれらの統御支配機構の存在が推察できる。その中で、休眠ホルモン（DH）は中心的役割を担う鍵物質であり、発見以来40年の追求の末に単離構造決定できた。その構造、研究過程での蓄積、その後の発展等に基づき、本研究では、休眠誘導に関連する新奇物質の探索、および、化学合成を用いる DH 活性発現部位の特定、それらの利用を目指す高活性誘導体や類縁体の調製を目的とした。

【方法、結果】

1) 休眠誘導に関連する新奇物質の探索

DH の研究過程の内、かなり長期間は雄蚕蛾頭部の有機溶媒抽出物が材料とされてきた。この材料中の活性物質は、その物理化学的性質が蛹食道下神経節から単離された DH とは全く異なることから、別種の物質と考えられ、その機能発現機構に興味を持たれていた。そこで、この材料から再探索を行った。その結果、極めて脂溶性に富む特異な構造のペプチドを単離構造決定できた。本ペプチドの部分構造を持つ化学合成類縁体や大腸菌に発現させた本ペプチドは、残念ながら、それら自身で休眠誘導することはなかった。しかし、それらは DH と共存させると、DH の活性発現閾値を数十倍低下させる協力剤的能力を持つことが判明した。また、DH は蛋白分解酵素であるトリプシンやカイコ体液で処理すると極めて速やかに分解するが、本ペプチドはその速度を著しく低下させること、および、その速度低下が本ペプチドの酵素阻害に基づくのではなく DH 分子の保護作用に基づく可能性を示唆できた。本ペプチドのこれらの性質は DH の投薬法改良の一手段を与えるものと考えている。さらにその後の検討の結果、本ペプチドは蚕蛾のクチクラ層に存在することを明らかにできた。この存在部位から考えて、本物質は生体内で直接に休眠現象を統御するものではないであろう。むしろ、本ペプチドは、クチクラの主成分であるキチンに特異的に結合することが判明したことから、蛾の外骨格形成に重要な役割を担う物質である可能性が強くなった。

2) DH 活性発現部位の特定、高活性誘導体や類縁体の調製（図参照）

以前の研究で、DH の構造を確認するために行った化学合成により、そのC末端はアミド型であることを明らかにしていた。実際、アミド型は生物活性を持つのに対し、遊離カルボン酸型は全く不活性であった。さらに、その構造中の断片を各種化学合成して活性を調べた結果、C末端部に活性発現に必須な部分が存在することを明らかにしていた。そこで、C末端ペンタペプチドの末端をアミド型からエステル、メチルア

ミドやジメチルアミドに変更してみたがいずれも不活性であり、現時点では、C末端が単純アミドであることが活性発現に必須であると考えている。次により短鎖のペプチドアミドを調製した結果、トリペプチドアミドが活性発現に必要な最小単位構造であることを見いだした。その活性はペンタペプチドアミドに比べ、20 倍程度弱いものであった。この最小単位のN末端に芳香族脂肪酸を結合させ、その芳香環をペンタペプチドアミドのフェニルアラニンと同一の位置を占めるように設計した誘導体を合成したところ、活性が回復し、ペンタペプチドとほぼ同程度の活性となることがわかった。次に芳香環と活性最小単位をつなぐ鎖長を順次短くしたところ、いずれの誘導体も類似した活性を示したものの、その鎖長が長くなるほど活性が強まる傾向を認めた。この事実は、芳香環の存在自身が活性増強に寄与するのではなく、修飾基の脂溶性が関与する可能性を示唆していた。そこで、芳香環を持たないパルミチン酸で修飾した活性最小単位を調製したところ、活性発現閾値がペンタペプチドとほぼ同程度まで回復し、さらに興味深いことには、最大産下休眠卵数が大幅に改善され、産下卵のおよそ 70%を休眠させることができるようになった。現在使用している生物検定条件を考慮すると、投薬時期や投薬法を最適化すれば産下卵を全て休眠させる可能性がある。さらに修飾剤の炭素鎖長を変化させ産下休眠卵数との関係を調べた結果、鎖長が短い誘導体は低活性であるが炭素数 16 から 18 で最大活性となり、それ以上では逆に低下することがわかった。

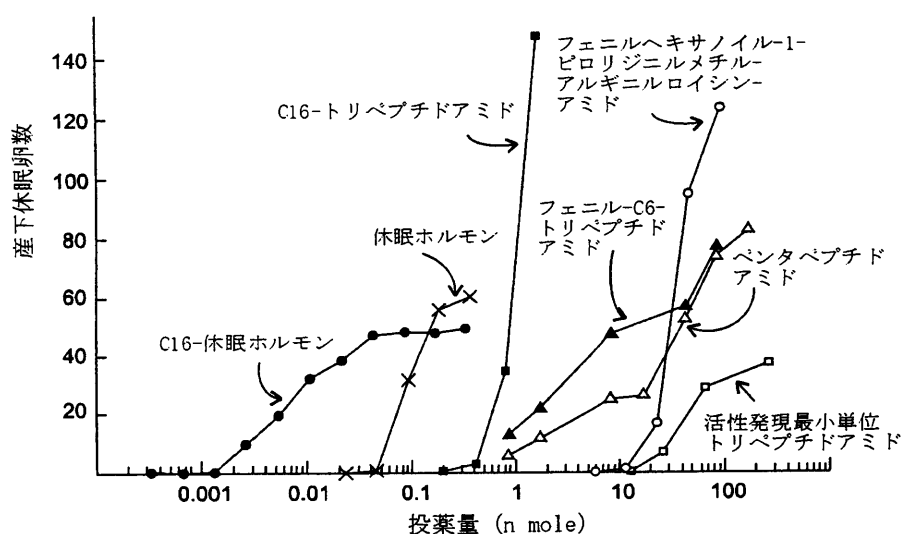
これと類似する活性増強は DH 自身の脂肪酸修飾の際にも認められた。すなわち、パルミトイル化した DH の活性発現閾値は非修飾体よりも数十倍低い値を示した。この活性発現閾値の低下の機構は不明であるが、存在の仮定されている DH 受容体との相互作用を脂肪酸修飾が強化している可能性があり、興味深い。一方で、類似の誘導体調製法を用い、蛍光標識や光アフィニティー標識した DH も合成しており、これらの誘導体はそれらと親和性を持つ生体分子探索の道具となりうると期待している。

さて、上にも述べたように DH は、体液処理により、極めて速く分解失活する。その分解経路はトリプシン分解と類似したものであり、アルギニン残基で切断されるものであるが、その第一段目の分解で DH 分子は活性を失うと考えられる。分子構造上この分解を受けにくい分子を 2 種、設計し、酵素に対する抵抗性と休眠誘導能を調べた。その内の一つイソブチルマロナミル-D-アルギニルシクロペンチルアミドは酵素分解に抵抗性を示したものの、休眠誘導能を全く示さなかった。これに対し、フェニルヘキサノイル-1-ピロリジニルメチルアルギニルロイシンアミドは興味深い活性を示した。すなわち、活性発現閾値はトリペプチドアミドとほぼ同等ながら、最大産下休眠卵数はペンタペプチドや DH 自身よりも大きくなった。おそらくこの現象は、本類縁体の受容体との適合性は必ずしも十分ではないが、本物質が酵素分解に対して著しい抵抗性を示すことに起因し、生体内に長くとどまり得たために、引き起こされたのではないかと推察している。

【まとめと今後の課題】

今回の研究では、当初目標の一つとした新休眠誘導物質は今後の課題としてのこったが、その過程で DH の活性を増強する新奇ペプチドを単離構造決定することができ、それがホルモン分子を酵素分解から保護するという、興味深い性質を見いだした。また、本ペプチドは、蚕体内ではホルモン活性増強に寄与すると言うよりも、昆虫の外骨格形成に寄与している可能性を指摘でき、新たな研究課題を提供するところとなった。一方、化学合成を用いた検討により、24 アミノ酸からなる DH の活性発現最小単位はC末端のトリペプチドアミドであること、その脂肪酸誘導体が最大産下休眠卵数を大幅に向上させることや、DH の脂肪酸誘導体は天然ホルモンよりも低い活性発現閾値を示し、現時点における最強活性物質であることを明らかにできた。

以上の結果に基づき、今後、一方でより有効な活性分子を分子設計・創製して利用を図り、他方で今回の研究で残った新奇活性物質や DH と親和性を持つ生体分子を追求すると共に、新たに提起されたクチクラ形成蛋白の課題も取り入れて研究を展開させていきたいと考えている。



図：
休眠ホルモン、誘導体、
断片ペプチドとその誘導
体の休眠誘導活性

K. Imai, K. Sugiura, T. Komiya, and O. Yamashita (1996) Isolation and partial structure of a unique lipophilic peptide, VAP peptide, from the heads of male silkworm moths. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 60, 355-357.

K. Shiomi, Y. Sato, K. Imai, and O. Yamashita (1998) A hydrophobic peptide (VAP-peptide) of the silkworm, *Bombyx mori*: structure, expression and an enhancing function of diapause hormone activity. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 28, 75-82.

K. Imai, T. Nomura, H. Katsuzaki, T. Komiya, and O. Yamashita (1998) The minimum structure of diapause hormone required for biological activity. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 62, 1875-1879.

K. Shiomi, T. Niimi, Y. Sato, K. Imai, and O. Yamashita (1998) A hydrophobic peptide (VAP-peptide) of the silkworm, *Bombyx mori*: A unique role for adult activity proposed from gene expression and production at the terminal phase of metamorphosis. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 28, 671-676.

K. Shiomi, T. Niimi, K. Imai and O. Yamashita (2000) Structure of the VAP-peptide (BM ACP-6.7) gene in the silkworm, *Bombyx mori* and a possible regulation of its expression by BmFTZ-F1. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 30, 119-125.

キタテハの夏型ホルモン活性物質の精製・単離と作用機作の解析

遠藤克彦・山中 明 (山口大学理学部自然情報科学科)

はじめに

キタテハ *Polygonia c-aureum* の夏型と秋型の季節型は幼虫期の日長と温度によって、脳から分泌される夏型ホルモンを通じて決定される。このキタテハの夏型ホルモンは、蛹の脳から 2%NaCl で抽出される分子量は約 4500 のペプチドである。このキタテハの夏型ホルモンと同じ活性を持つ脳神経ペプチドが数種のチョウ目昆虫の蛹の脳から抽出されている。また、カイコガ *Bombyx mori* 成虫の脳-食道下神経節複合体から得た 2%NaCl 抽出液中には強い夏型ホルモン活性が存在し、その活性物質は分子量が約 4500 のペプチドであることが明らかにされている。

今回の研究では、カイコガ成虫の脳-食道下神経節抽出液中の夏型ホルモン活性物質を精製・単離し、その性質 (アミノ酸配列を含む) と作用機作を明らかにすることにあった。

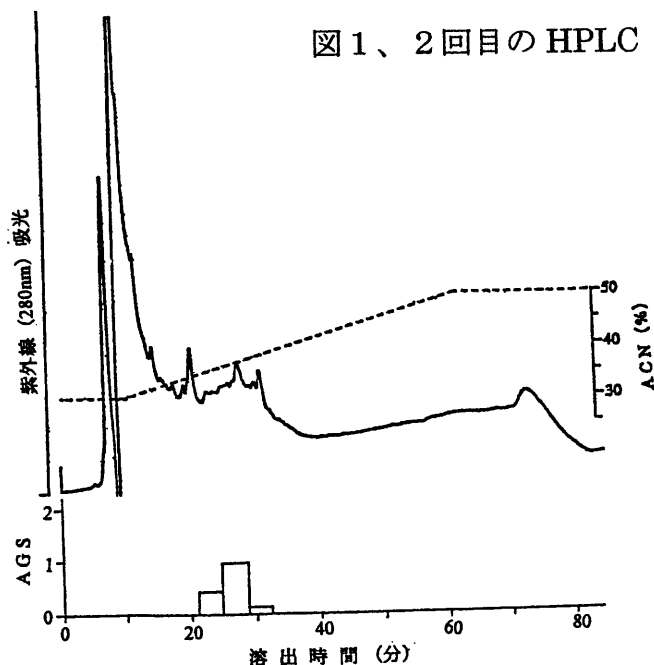
1、夏型ホルモン活性物質の精製・単離

カイコガ成虫から 20,000 個の脳-食道下神経節複合体を集め、2%NaCl 抽出液を作成し、ゲルろ過、陰イオン交換クロマトグラフィーによって部分精製を行った後に、逆相高速液体クロマトグラフィーによって、3つの紫外線 (280nm) 吸光のピークを含む高度に精製された夏型ホルモン活性物質の分画を得ることに成功した。この分画を SDS-PAGE で展開して銀染色を行ったところ、分子量が約 4500 に相当する位置にバンドが染色された。得られた分画を回収・凍結乾燥後、2回目の逆相高速液体クロマトグラフィーを行った (図

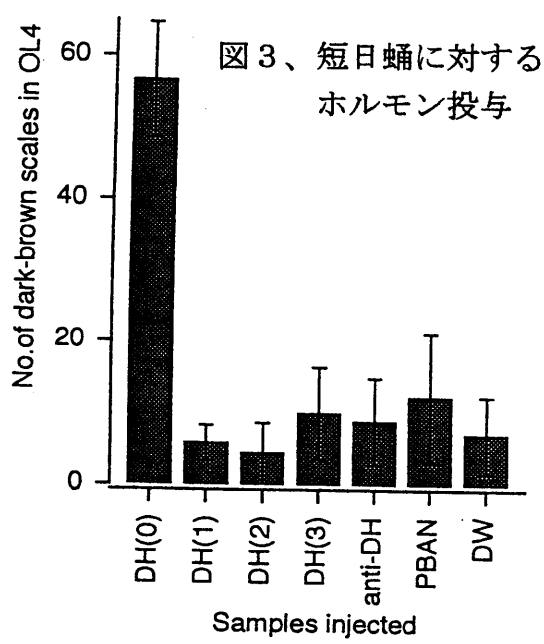
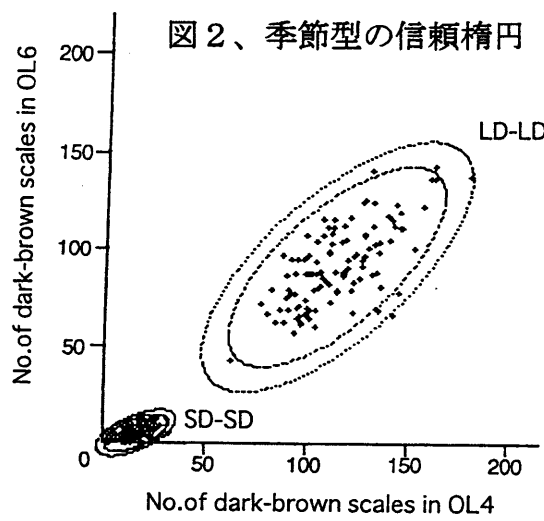
1)。3つの紫外線 (280nm) の吸光のピークと、その間の溶出液 1 つを含む 4 つの分画を回収し、各分画の夏型ホルモン活性を検定したところ、回収した 2 つめの紫外線吸光のピークを含む溶出分画に夏型ホルモン活性物質が回収されていた。しかし、その分画の夏型ホルモン活性は低く、2回目の逆相高速液体クロマトグラフィーの回収率はかなり低い値であると (35%程度) と推定された。また、その凍結乾燥分画の予備的なシーケンス実験から、夏型ホルモン活性物質の N-末端はブロックされていることが考えられた。

2、カイコガの季節型発現調節とホルモン

2 化性のカイコガ (大造) には、翅の文様が異なる 2 つのタイプの成虫があり、その違いは特に雄成虫で顕著であることを見出し、さらに前翅外横線第 4 室と第 6 室の黒褐色の鱗粉数をもとに、信頼楕円法によって両雄成



虫と其中間型を区別することに成功した(図2)。これら2つのタイプの雄成虫の発現に成虫の休眠卵産卵性発現と同様に、胚期と幼虫期の日長と温度によって決定されることを示し、この雄成虫の翅のパターンの違いがカイコガの季節型(夏型と秋型)による違いであるとの結論をえた。即ち、胚期と幼虫期を短日条件下(比較的低温下)で飼育した雄は、前翅の中央線が薄い褐色の夏型成虫(SD-SD:雌は非休眠卵を産下する成虫)となり、胚期を長日条件下(比較的高温下)で飼育した雄は、前翅の中央線が黒い褐色の秋型成虫(LD-LD:雌は休眠卵を産下する成虫)になる。そこで、このカイコガの季節型の発現に脳内に存在することが明らかにされている夏型ホルモン活性物質が関与しているかどうかを調べるために、短日と長日条件下で得られた蛹化当日の蛹で脳の除去する手術を行い、手術蛹から羽化した雄成虫の翅の黒褐色の鱗粉数を調べ、手術による季節型発現への影響を調べた。その結果、両条件下で得られたいずれの除脳蛹からも、中間型を含む成虫が羽化した。この蛹の脳に対する手術の結果に、脳抽出液、食道下神経節抽出液、休眠ホルモン(DH)、フェロモン生合成活性化神経ペプチド(PBAN)等の投与結果(図3)を加えると、カイコガ成虫の季節型発現には食道下神経節で生産され、側心体またはアラタ体から分泌される休眠ホルモンが関与している可能性が示唆される。



3、アゲハチョウの季節型発現と夏型ホルモン

これまでに、6種のチョウで季節型発現の内分泌が調節機構が調べられ、そのうちの4種で季節型の発現に対する夏型ホルモンの関与が明らかにされている。しかし、蛹で休眠する2種のチョウについては季節型の発現が夏型ホルモンにはよらないとされている。しかし、蛹で休眠し、春型と夏型の季節型を持つアゲハチョウ *Papilio xuthus* では季節型の発現に体液的な要因が関与している可能性が示唆されている。そこで、後翅背面に並ぶ白紋のサイズをもとに、信頼楕円法を用いて春型と夏型の季節型を分類し、アゲハチョウの蛹の脳抽出液およびカイコガ成虫の夏型ホルモン活性物質の部分精製分画が冷蔵休眠蛹から夏型成虫の発現を促すかどうかを調べた。その結果、アゲハチョウの夏型ホルモンは、キタテハの夏型ホルモンと同様な方法で抽出・部分精製が可能であり、抽出・部分精製された夏型ホルモンを休眠後の休眠蛹に投与すれば、夏型成虫が生ずることが明らかとなっ

た。また、カイコガ成虫の脳内に存在し、キタテハの短日蛹に夏型成虫の発現を促す夏型ホルモン活性物質がアゲハチョウに対しても同様な作用を持つことが確かめられた。

4、アゲハチョウの蛹表皮褐色化ホルモン (PCMH) の検定法の確立と部分精製

アゲハチョウに脳で生産され、前胸神経節から分泌される蛹表皮褐色化ホルモン (browning hormone) が存在することが示されてから、既に長い年月が経過している。しかし、そのホルモン活性物質は抽出・精製はもとより、その活性検定法さえ確立されていなかった。今回、アゲハチョウ前蛹の結紮腹部を用いて蛹表皮褐色化ホルモンの検定法が可能となり、さらに、その活性物質の抽出・部分精製によって、このホルモンが夏型ホルモンより分子量の小さいペプチド (2500 程度) であることを明らかにした。

4、今回の研究のまとめ

今回の研究計画では、カイコガ成虫の脳内に存在する夏型ホルモン活性物質の精製・単離を主目的とし、夏型ホルモンの作用機作の解析をそれに次ぐ目的とした。しかし、野生昆虫を大量飼育することの困難さと人手不足のために、本科学研究費を受領した2年間の間に当初の計画の約半数しか達成することができなかった。その後も受領した研究費によって購入した研究機材を活用して研究を続け、当初の計画で目的とした大部分の事項を達成することができたと考えています。

発 表 論 文

D. Tanaka, T. Sakurama, K. Mitsumasu, A. Yamanaka and K. Endo (1997) Separation of bombyxin from a neuropeptide of *Bombyx mori* showing summer-morph-producing hormone (SMPH) activity in the Asian comma butterfly, *Polygonia c-aureum* L. Journal. Of Insect Physiology, 43: 197-201.

J. Tsurumaki, J. Ishiguro, A. Yamanaka and K. Endo (1999) Effects of photoperiod and temperature on seasonal morph development and diapause-egg oviposition in a bivoltine race (Daizo) of the silkworm, *Bombyx mori*. Journal of Insect Physiology, 45: 101-106.

A. Yamanaka, K. Endo, W. Kong and M. Watanabe (1999) Isolation and infectivity of *Klebsiella oxytoca* from cadaver larvae of swallowtail butterfly *Papilio xuthus* L. Information, 2: 155-160.

A. Yamanaka, K. Endo, H. Nishida, N. Kawamura, Y. Hatase, W. Kong, H. Kataoka and A. Suzuki (1999) Extraction and partial characterization of pupal-cuticle-melanizing hormone (PCMH) in the swallowtail butterfly, *Papilio xuthus* L. (Lepidoptera, Papilionidae). Zoological Science, 16: 261-298.

A. Yamanaka, J. Tsurumaki and K. Endo (2000) Neuroendocrine regulation of seasonal morph development in a bivoltine race (Daizo) of the silkworm, *Bombyx mori* L. Journal of Insect Physiology, 46: 803-808.

組換えバキュロウイルスを利用した PTTH の種特異性に関する分子機構の解明

小林 淳（三重大学工学部）

1) 目的

Ecdysteroid UDP-glucosyltransferase (*egt*) 遺伝子を欠失させたバキュロウイルスにカイコ由来の前胸腺刺激ホルモン(PTTH)を発現させると、感染カイコ幼虫では死亡時期が早まり、ヤガ科の *Spodoptera* 幼虫ではウイルスの増殖が阻害されるという相反する結果がえられ、PTTH の種特異的作用の関与が示唆された。そこで、本研究課題は、これらの現象の分子機構を解明する端緒として、カイコ及び異種昆虫の PTTH 及びそれらのキメラ分子をバキュロウイルスに発現させるための実験系の構築を行い、それらを駆使してカイコ幼虫の死亡時期と体液中のエクジステロイド量および幼虫組織におけるウイルス増殖との関係を比較検討し、PTTH のアミノ酸配列における種間変異と種特異的活性の関係を明らかにすることを目的として遂行された。

2) 方法と結果

3 種鱗翅目昆虫（カイコ、タバコスズメガおよびエリサン）の PTTH 及びそれらのキメラ分子の cDNA を作製し、*egt* 遺伝子を欠失させたカイコ核多角体病ウイルス (BmNPV(-*egt*)) に導入し、得られた各組換えウイルスをカイコ幼虫に感染させ、エクジステロイドの変動及び幼虫発育を経時的に調査した。

その結果、①3 種類の昆虫由来の PTTH をそれぞれ導入した BmNPV(-*egt*) をカイコ 4 齢幼虫（脱皮直後）及び 5 齢幼虫（脱皮 2 日後）に接種すると、カイコ由来の PTTH を生産するウイルスに感染した幼虫においてのみ、体液エクジステロイド量の増加時期が著しく早まり、脱皮及び吐糸期の開始も早まった。

②カイコ PTTH の種特異的活性領域を限定するために、カイコとタバコスズメガの PTTH をさまざまな位置で組換えたキメラ分子を作製し、その活性の有無を検討した結果、最終的に 2 回組換えキメラ分子 M73B13M20PTTH（M はタバコスズメガ由来、B はカイコ由来の配列、数字はアミノ酸残基数）に強い活性が認められ、このキメラ PTTH に含まれるカイコ PTTH 由来の 13 アミノ酸配列がカイコに対する主要な特異活性ドメインであると判断された。

3) 考察

カイコ PTTH の種特異的活性を決定する主要ドメインとして、本研究の結果から結論づけられた 13 アミノ酸配列は、Noguti et al. (1995) により予測された PTTH の立体構造における二つの β ストランドに挟まれたループ部分にほぼ一致していた。この 13 アミノ酸残基からなる配列はカイコ PTTH 全体の中では、親水性ならびに極性が高く、しかも、側鎖の bulkiness が低い部位であり、タバコスズメガ PTTH の対応する部位の配列にも、同様の特徴が共通に認められた。ただし、両者の対応する部位の配列間で、電荷の分布が明らかに異なっていた。以上の解析結果から、PTTH の種

特異性決定部位は、おそらく、前胸腺細胞膜上の PTTH 受容体上に形成された窪みにはまりこむループとして機能しており、受容体の窪みには、ちょうど PTTH のループと正反対の電荷が分布しているため、両者は静電的相互作用により強い親和力で結合する可能性が示唆された。すなわち、PTTH 活性の種特異性とは、主にループ部分の電荷分布に起因する受容体との親和力の強弱により決定されるという仮説が考察により導き出された。

4) 計画に対する達成度の自己評価と今後の方策

本研究課題では、さまざまなキメラ PTTH 分子を生産する組換えバキュロウイルスをカイコ幼虫に感染させるという比較的簡便なアッセイ系を活用することにより、PTTH の種特異的活性決定部位を 13 アミノ酸残基に限定し、その配列解析から種特異的活性の分子メカニズムとして PTTH と受容体との静電的相互作用が重要であるという仮説を提唱できた。これらの成果は、研究目的の達成という観点からみて、完璧とはいえないものの本質的な前進であると自己評価できる。

今後は、成果の論文発表を急ぐとともに、自ら提唱した仮説を立証し、また一般化するために、種特異的活性決定部位 13 アミノ酸残基の電荷分布を人為的に変更して活性を調べるとともに、各種キメラ PTTH の前胸腺表面への受容体を介した結合能に関する解析、ならびにエリサン PTTH にカイコ PTTH のキメラ分子においても同様の結果が得られるかなどを検証する。

また、本研究の副次的成果として、組換え PTTH に付加された N 型糖鎖構造を解析することによりバキュロウイルス遺伝子発現系の N-グリコシル化能力を簡便に評価できることが判明したので、代謝工学的改変した昆虫培養細胞における N-グリコシル化特性解析に活用し、有用糖タンパク質生産系の確立に役立てる予定である。

5) 主要成果図

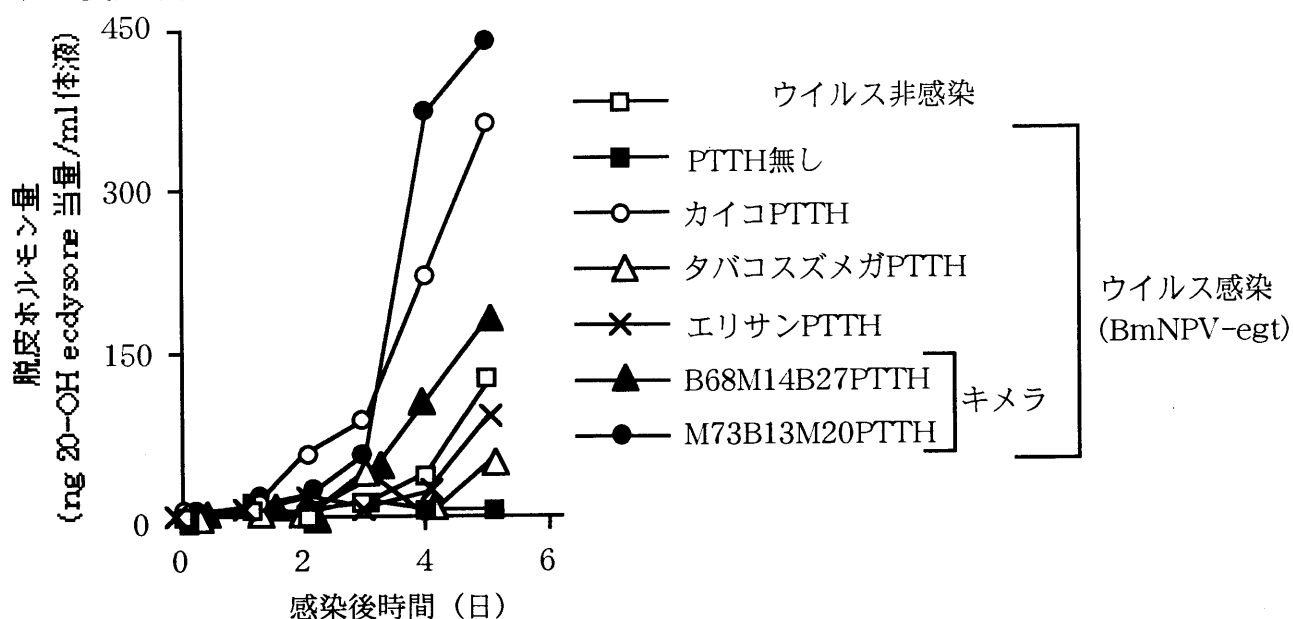


図 1. ウイルス接種カイコ幼虫体液中の脱皮ホルモン量の変動。カイコ 5 齢幼虫（脱皮後 2 日目）に各種 PTTH 発現ウイルスを幼虫 1 個体当たり 2.5×10^3 PFU 接種した。

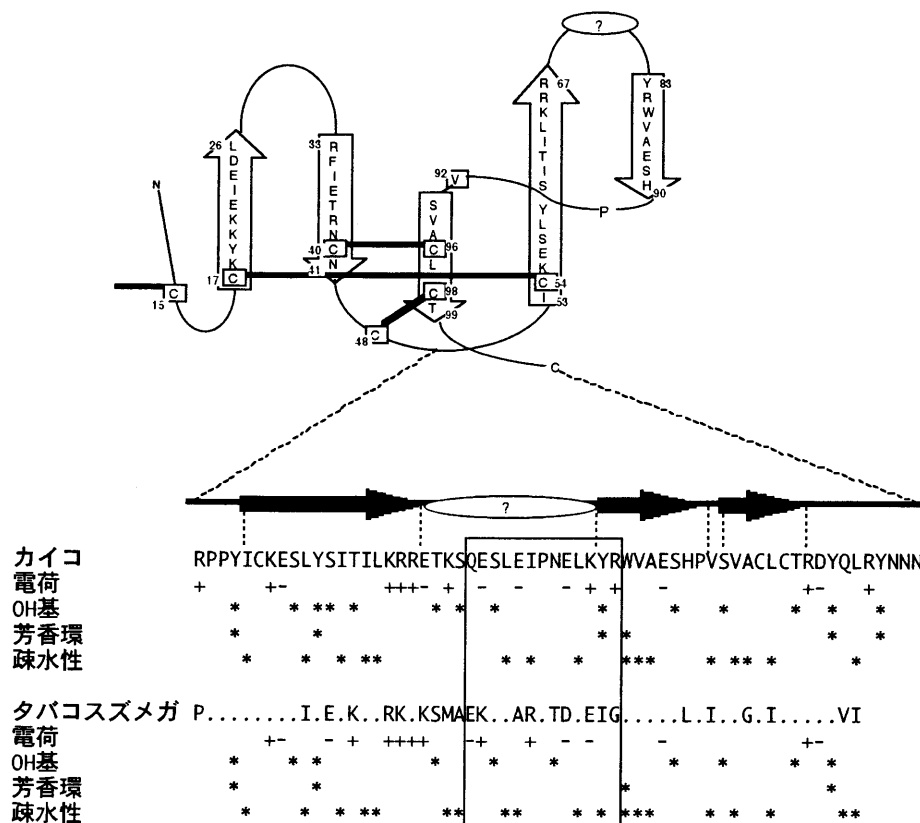


図2. カイコ PTTH の立体構造予測 (Noguti et al., 1995) (上図) 及び種特異的活性に
関与する 13 アミノ酸配列 (下図枠内) のカイコ及びタバコスズメガ間での比較。

6) 代表的な発表論文

(原著論文)

Y. Takenaka, J. Kobayashi, Y. Matsuda, C. Gong, M. Nagaya, M. Miyajima and T. Yoshimura, T. (1999) Evaluation of SpIm Insect cells using a novel baculovirus expression vector system employing the *Hyphantria cunea* NPV. *Animal Cell Technology*, 10, 271-275.

T. Kanaya and J. Kobayashi (2000) Purification and characterization of an insect hemolymph protein promoting *in vitro* replication of the *Bombyx mori* nucleopolyhedrovirus. *Journal of General Virology*, 81 1135-1141.

(著書等)

小林 淳 (1996) カイコを用いた物質生産「動物生産生命工学」(村松達夫編), 97-109 文永堂書店.

小林 淳・宮脇成壽 (1997) 昆虫ウイルス「ウイルス学」(畑中正一編), 397-410, 朝倉書店.

小林 淳 (2000) 害虫防除のための昆虫病原微生物バイオテクノロジー -組換えバキュロウイルス殺虫剤を中心に-, 日本農薬学会誌, 25 63-66.

天蚕の前幼虫態休眠における新内分泌系の機能解析と分子機構

鈴木 幸一（岩手大学農学部）

1. 目的

卵殻内で幼虫体が形成された状態で休眠する天蚕（ヤママユ）の前幼虫態休眠においては、これまで知られている昆虫の休眠機構では説明できない新しい内分泌系の介在が推定されている（Suzuki et al., 1990）。すなわち、従来の中枢神経系ホルモンや末梢ホルモンに依存しない生理活性物質の存在が予想されている。それは、中胸部位から分泌される休眠を維持する機能の抑制因子（Repressive Factor, RF）と腹部第3～5節から分泌され後休眠期に作用する成熟因子（Maturation Factor, MF）の存在である。いずれもペプチド様物質であると推定されているが、その構造と具体的な機能については、依然として不明である。

本研究では、両因子ならびに補助因子（麻痺性ペプチド）の単離構造解析と分泌器官の同定を行いながら、昆虫の休眠機構に新しい提案を試みるものである。

2. 方法と結果

1) RF の同定

休眠中の前幼虫 1,500 頭より酸メタノール抽出し、熱処理、アセトン沈澱処理、そして 3 回の高速液体クロマトグラフィーによる溶出で、最終的に単離精製することができた。この単離精製物を構造解析した結果、C末端がアミド化されている新規のペンタペプチドであった。生理活性としては、休眠覚醒処理した前幼虫に合成ペプチドを注射すると、覚醒が遅延し、抗体を休眠中の前幼虫に注射すると、休眠が覚醒した。

2) MF の同定

休眠覚醒した前幼虫 2,000 頭から、上記同様の抽出方法により、単離精製を進めプロテインシークエンサーで構造解析した。その結果、7～8 個のアミノ酸配列を有するものと推定されたが、最終決定までには至らなかった。生理活性としては、後休眠期の一つの特徴であるメラニン様物質の沈着が皮膚に観察された。

3) 補助因子（麻痺性ペプチド）の同定

休眠中または休眠覚醒した前幼虫から RF および MF の単離精製過程において、昆虫の麻痺性ペプチドファミリーに属する天蚕由来の麻痺性ペプチド（*Antheraea yamamai* の Paralytic Peptide, Any-ParP）の存在を確認することができた。従って、この Any-ParP の単離精製を 5 齢幼虫の体液から進めた。エタノール抽出物を 3 回の逆相高速液体クロマトグラフィーで単離精製し、プロテインシークエンサーで構造解析した。その結果、タバコスズメガ麻痺性ペプチドの N 末端から 12 番目のロイシンがメチオニンに置換し、1 個の S-S-結合を有する 23 個のアミノ酸残基からなるペプチドを同定することができた。

4) 分泌器官の同定

作製した上記 RF の抗体が保存に耐えられないことから、本実験では、FMRF アミド、SP、CCK-8、PP の各抗体を使用し、免疫組織化学的手法で観察した。その結果、休眠中の前幼虫および休眠覚醒した前幼虫の前腸-中腸境界部で、90～100 個の FMRF アミド陽性双極ニューロンが集中して観察された。この部位はすでに想定されている RF の分泌部

位と一致した。また、FMRF アミド、SP、CCK-8、PP の各陽性細胞が中腸の内分泌細胞に、さらに FMRF アミド陽性双極ニューロンは消化管神経系で観察された。これらの部位もまた、推定されている MF の生産領域と一致した。

3. 考察

本研究は、昆虫の休眠機構の分野において新しい内分泌系の存在を分子レベルで提案することであった。これまで、休眠ホルモンによる胚休眠の誘導、幼若ホルモンによる幼虫休眠の誘導、脱皮ホルモン分泌阻止による蛹休眠の誘導、そして幼若ホルモン分泌阻止による成虫休眠の誘導が知られている。しかし、多様な生存環境に適応するために発達させた昆虫の休眠戦略様式においては、従来の昆虫ホルモンの機能では説明できない現象が認められる。

日本原産の天蚕（ヤママユ）は卵内で幼虫体がほぼ完成した状態で休眠越冬し、カイコの胚休眠とは異なる前幼虫態休眠型である。このタイプでは、中枢神経系ホルモンおよび末梢ホルモンでは説明できないモデルが提案 (Suzuki et al., 1990) されていることから、本研究ではこのモデルの実体化に焦点をあてた。その結果、最終的には休眠維持の機能を有する新規ペプチドの構造決定に成功した（遺伝子 Any-RF ならびに休眠制御物質およびその製造方法、登録番号：第 3023790 号）。この新規生理活性ペプチドは、天蚕の前幼虫態休眠のメカニズム解明の大きな糸口になるのみならず普遍的な休眠制御物質となる可能性がある。なぜなら、ラット肝ガン細胞の培養系に本物質を添加することで、細胞増殖が停止することを明らかにしている（未発表）。従って、この系を利用すれば、昆虫細胞および動物細胞の細胞増殖制御剤の開発にもなりえる。

本研究では、最終的に MF の同定ならびに分泌器官の同定には至らなかったが、分泌器官に関しては、既存の各種の抗体を利用した免疫組織化学的手法により、前腸と中腸の境界部において双極ニューロン、そして中腸の上皮組織に内分泌細胞を観察することができた。この結果は、すでに推定されている RF と MF の分泌部位に相当するものであり、今後は本来の抗体を利用することで、休眠制御に係わる因子の新しい分泌器官を最終的に決定できると考えられる。

一方、本研究では補助因子として、休眠中の前幼虫から天蚕麻痺性ペプチド (Any-ParP) の活性画分を得ながら、5 齢幼虫体液で構造決定することができた。23 個のアミノ酸残基からなる昆虫麻痺性ペプチドファミリーの Any-ParP が、休眠中のものと構造が一致するかどうか、さらに休眠中にどのような機能で休眠成立に貢献しているかについては今度の課題として残っている。以上の知見に基づいた新しい内分泌系のモデルを、第 1 図に示した。

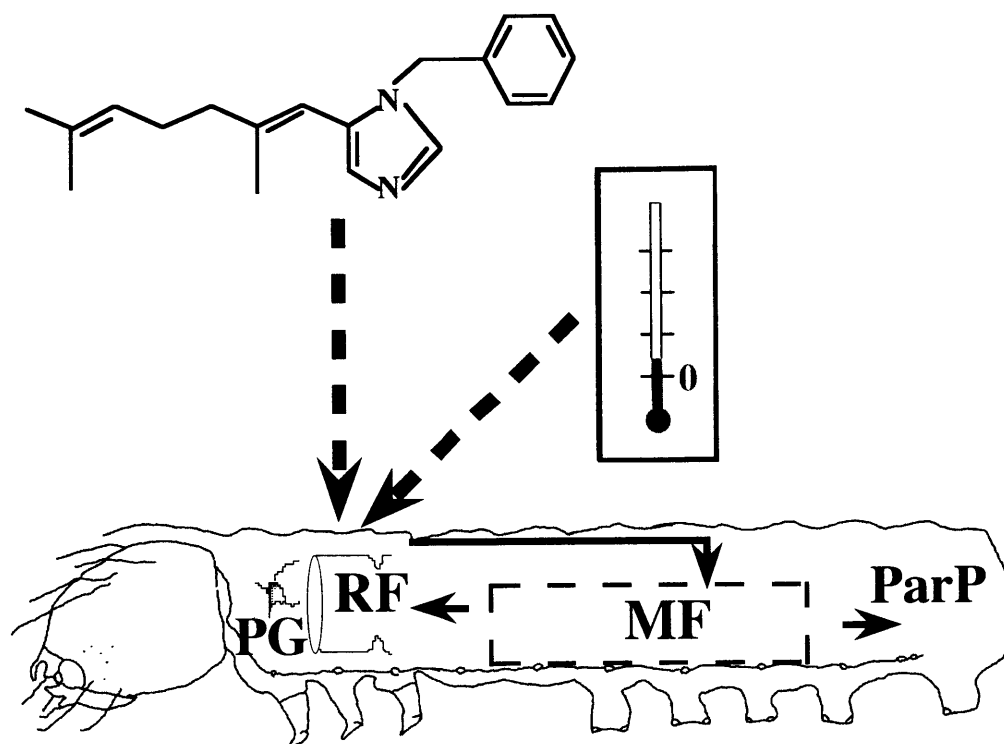


Fig. 1. 前幼虫の休眠制御系のモデル

このモデルは、イミダゾール化合物で休眠が解除されることから、その鏡像として長期低温接触による休眠解除のモデルと考えられる。

PG, 前胸腺; RF, 抑制因子; MF, 成熟因子; ParP, 麻痺性ペプチド

4 達成度の自己評価と今後の課題

本研究は2年間の成果であるために、目標の半分に止まった。しかし、その後研究を継続することで、生物界において新規の生理活性物質を発見することができた。この新規物質は、今後昆虫の休眠機構を解明する上で、遺伝子の同定を含めて有望な分子になると期待できる。

5. 発表論文

Y. An, T. Nakajima and K. Suzuki (1998) Immunohistochemical demonstration of mammalian- and FMRFamido-like peptides in the gut innervation and endocrine cells of the wild silkworm, *Antheraea yamamai* (Lepidoptera: Saturniidae) during diapause and post-diapause of pharate first-instar larvae. *European Journal of Entomology*, 95, 185-196.

A. Seino, Y. Sato, T. Yamashita, Y. Sato and K. Suzuki (1998) Identification of a novel member of the paralytic peptide family in the silkworm *Antheraea yamamai*. *The Journal of Sericultural Science of Japan*, 67, 473-478.

鈴木幸一・安 嬰 (1998) 昆虫の新しい情報処理器官の探索. 日本比較内分泌学会ニューース, 88, 10-13.

線虫 *Caenorhabditis elegans* を用いた休眠機構の解明

河野 強（鳥取大学農学部）

1. 目的

線虫 *Caenorhabditis elegans* の生活環には「耐性幼虫形成」と呼ばれる現象が知られている。これは、生存に不利な環境（高フェロモン濃度、餌の不足、高温）に応答して一時的に生育を停止する現象であり、昆虫類の幼虫休眠と類似している。この「耐性幼虫形成 (daf: dauer larva formation)」に関しては遺伝学および分子生物学的研究が進展しており、最近、「耐性幼虫形成」を制御する遺伝子座の1つ *daf-2* がインスリン/インスリン様増殖因子-I (IGF-I) 受容体ホモログをコードしていることが明らかにされた。さらに、*daf-2* は線虫 *C. elegans* の脂質代謝および寿命に関与することも明らかにされている。本研究の目的は、線虫 *C. elegans* のいわゆる休眠機構を解明することにより昆虫類にも共通する重要な知見を得ることである。そこで本研究では、休眠の鍵分子である DAF-2 (insulin/IGF-I 受容体ホモログ) のリガンド分子の探索と発現パターンの解析および機能解析を行なうこととした。

2. 方法と結果

2-1. 線虫のinsulin/IGF様分子の探索

C. elegans のゲノムプロジェクト情報を詳細に解析し、ボンビキシン（カイコガのインスリン族ペプチド）A鎖が有する4つのシステイン残基が完全に保存されている3つの遺伝子を選定した。さらにRACE法により完全長のcDNAの構造を明らかにし、それぞれ Ceinsulin-1, Ceinsulin-2, Ceinsulin-3 と命名した。Ceinsulin-1, -2 は95アミノ酸残基よりなる前駆体タンパクをコードしており、インスリン族ペプチドに特有な6つのシステイン残基が完全に保存されていた。両者のアミノ酸相同性は約35%であった。一方、Ceinsulin-3 は91アミノ酸残基よりなる前駆体タンパクをコードしており、インスリン族ペプチドに特有な6つのシステイン残基が完全に保存されていたが、Ceinsulin-1, -2 との相同性は極めて低かった（10%未満）。

2-2. Ceinsulin-1, -2 ペプチドの構造

Ceinsulin-1, -2 はその前駆体構造がインスリンのもの（シグナルペプチド, B鎖, Cペプチド, A鎖）と酷似していることから、成熟型ペプチドは2本のポリペプチド（A鎖およびB鎖）がジスルフィド結合によって架橋された構造をとると予想された。そこで、Ceinsulin-1 B鎖に対する抗ペプチド抗体を作製し、還元および非還元条件下でウェスタン解析を行った。その結果、両条件下で同一の分子量のバンド（約8 KDa: シグナルペプチドのみが切り出された場合の分子量に相当）が検出されたことから、Ceinsulin-1 は1本のポリペプチドからなるIGF型であることが明らかとなった。

さらに、DiscoverIII/Insight II を用いて Ceinsulin-1, -2 の高次構造を予想し、インスリンおよびIGF-I の結晶構造と比較したところ、全体的な高次構造は類似しているが、 α -ヘリックスの形状から Ceinsulin-1, -2 の予想高次構造はインスリンの結晶構造と類似していることが判明した。また、Ceinsulin-1, -2 の受容体認識面を比較したところ酷似していたことから、両者は同一の受容体を認識する可能性が示唆された。

2-3. Ceinsulin-1の発現パターンの解析

Ceinsulin-1発現量の動的変動を解析するために、各生育段階の線虫より全RNAおよびペプチド画分を調製し、遺伝子発現量についてはRT-PCRを用いて、タンパク発現量についてはウェスタンブロットを用いてそれぞれの発現量を解析した。アクチン転写産物を内部標準とした場合、卵から4齢幼虫へと発育に伴ってCeinsulin-1転写産物の量は増大し、成虫ではCeinsulin-1転写産物は検出されなかった。また、耐性幼虫でも3齢幼虫の場合と同程度のCeinsulin-1転写産物が検出された。一方、Ceinsulin-1ペプチドは、それぞれ等量のペプチド画分を用いた場合、卵、2齢幼虫および3,4齢幼虫にのみ検出された。その発現量は卵で最も多く、2齢幼虫では僅かに検出されたに過ぎなかった。

2-4. Ceinsulin-1, -2, -3の生理機能の解析

RNA-mediated interference 法 (RNAi) によりCeinsulinsの生合成を阻害し、表現型を観察した。Ceinsulin-1を阻害した場合、産卵後の生育日数が増加（平均で約1.5倍）した。これは、*daf-2*変異体の表現型の1つと酷似している。また、Ceinsulin-3を阻害した場合、子孫の数が約半分に減少した。これは、産卵時に餌が少ない場合の子孫の減少と類似している。一方、耐性幼虫形成には全く変化が認められなかった。なお、Ceinsulin-2を阻害した場合の表現型については現在検討中である。

3. 考察

今回、遺伝子側からの解析から、線虫のインスリン族ペプチドを同定したが、何れも1本のポリペプチドからなるIGF型の分子であると考えられた。しなしながら、Ceinsulin-1, -2についてはその前駆体構造および高次構造がインスリンと類似していることから、インスリンとIGFのハイブリット型の分子であると考えられる。さらに詳細な解析を行うことにより、インスリン型の分子を見出すことができると考えられる。また、Ceinsulin-1の発現量の変動は転写レベル、翻訳レベルで必ずしも一致しておらず、転写後の制御機構が存在すると考えられる。また、休眠時では転写産物は存在してもそのタンパクは存在しないことから、休眠時には生育再開後に必要な転写産物を保有したまま翻訳機構がシャットダウンしているのではないかと考えられる。*daf-2*変異体の表現型としては、耐性幼虫形成、延命、脂質蓄積が知られているが、Ceinsulin-1は延命のみに関与していた。このことは、それぞれの表現型には個別のリガンド分子が関与していることを示唆する。

4. 計画に対する達成度・自己評価と今後の方策

計画に対する達成度は60%であると考えている。不足分はCeinsulinsの発現部位の同定ができていないこと、Ceinsulin-2についての発現量の変動および生理機能を解析していないことに対応する。しかしながら、DAF-2のリガンド分子である可能性が極めて高いCeinsulin-1を世界に先駆けて見出すことができたことは称讃に値する。今後は、遺伝子破壊により明確な表現型を見出すと共にCeinsulinsがDAF-2のリガンド分子であることを生化学的に証明する予定である。また、Ceinsulin-2が休眠を制御するリガンド分子であるかどうかを一刻も早く検証する必要がある。さらに、Ceinsulinsの発現制御とフェロモンおよび

餌シグナルとの関わりを解析することも極めて重要な課題として存在する。

5. 図表とその説明

Ceinsulin-1

1: MVHRLFIVLIAIILVAKSTAISLQQADGRMKMCPGGSTFTMAWSMSCSM

51: RRRKRDVGRYFEKRALIAPSIRQLQTICCVGCNVEDLLAYCAPI

Ceinsulin-2

1: MAAVAAGFLFSRPAPITRDTIRPPRAKHGSLKLCPPGGASFLDAFNLICP

51: MRRRRRSVSENYNDGGGSLGRTMNMCCETGCEFTDIFAICNPFG

Ceinsulin-3

1: MSSYRQTLFILIIILIVIIILFVNEGQGAPHHDKRHTACVLKIFKALNVMCN

51: HEGDADVLRRTASDCCRESCSLTEMLASCTLTSSSESTRDI

図1. Ceinsulin-1, -2, -3 前駆体のアミノ酸配列. ゲノムプロジェクト情報を検索し, 得られた部分塩基配列を基にRACEを行い, 全長のcDNA配列を決定し, 前駆体のアミノ酸配列を得た。Ceinsulin-1前駆体の下線部のアミノ酸配列は抗ペプチド抗体作製に用いた抗原部位を示す。

6. 発表論文

- 1) 河野 強, 木村靖夫 (1998) 無脊椎動物のグルタミン酸トランスポーターの役割. 化学と生物, 36, 558-559.
- 2) Kawano, T., Takuwa, K., Ishiguro, M., Nakajima, T. and Kimura, Y. (1999) Structures of insulin-like peptides of the nematode *Caenorhabditis elegans*. Peptide Science 1998: M. Kondo (Ed.), 117-120, Protein Research Foundation, Osaka.
- 3) Kawano, T., Takuwa, K., Kuniyoshi, H., Juni, N., Nakajima, T., Yamamoto, D. and Kimura, Y. (1999) Cloning and characterization of a *Drosophila melanogaster* cDNA encoding a glutamate transporter. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **63**, 2042-2044.
- 4) Kawano, T., Ito, Y., Ishiguro, M., Takuwa, K., Nakajima, T. and Kimura, Y. (2000) Molecular cloning and characterization of a new insulin/IGF-like peptide of the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, in press.
- 5) Kawano, T., Kuniyoshi, H., Juni, N., Yamamoto, D., Takuwa, K., Nakajima, T., Masuda, R. and Kimura, Y. (2000) Genomic structure of a *Drosophila melanogaster* gene, *Dglt-1*, encoding a glutamate transporter and analyses of the spatial distribution of the transcript. *J. Biochem. Molec. Biol. Biophys.*, in press.

昆虫脳における神経ペプチドの放出に関する細胞生物学的研究

遠藤泰久（京都工芸繊維大学）

1) 目的：昆虫の変態調節の中心的存在である種々のペプチドホルモンの精製がすすんでいるが、それら神経ペプチドを産生するニューロンの構造は光顕レベル以上での解析は行われていない。免疫電顕による微細構造の観点から、カイコなどの脳および中枢神経系におけるペプチドニューロンの構造と機能を分子レベルで解析することを目標に、本研究ではまず神経分泌ニューロンの神経連絡・神経回路の解明および脳内における神経ペプチドの放出を微細構造レベルで明らかにすることをめざした。

2) 方法と結果：カイコ幼虫を材料にボンビキシンを産生するニューロンを免疫電顕レベルで同定し、その微細構造を検討した。またボンビキシンニューロンにHorseradish peroxidaseを注入標識し、樹状突起および入力線維を電顕によって観察し、神経分泌の上位調節機構を検討した。ペプチド以外のアミノ酸、NOなどの低分子 transmitterとの共存性を免疫組織化学および酵素組織化学的に検討した。脳内での神経ペプチドの放出について、摘出した脳を高濃度のカリウムで刺激し、タンニン酸固定により電顕的に放出像を検討した。

ボンビキシンニューロンの細胞体は周囲をグリアで取り囲まれており、細胞体周辺で入力線維は認められなかった。腹側に走る神経突起は1本の太い樹状突起を同側に分岐した後 central bridge に達し、反対側の半球に分布した。同側の樹状突起は分岐し徐々に細くなりながら、ニューロパイルの背側の縁を側方に向かって半球の約1/2 までのびていた。central bridge付近でも神経突起から多数の短い分岐がみられた。反対側に入ってすぐにもう1本の太い樹状突起を分岐し、ニューロパイルの背側の縁を側方に向かってのびるが同側ほど多数の分岐はみられなかった。樹状突起内にはボンビキシンの抗体と反応する芯有り小胞 cored vesicleが存在した。

3) 考察：昆虫の神経分泌ニューロンの樹状突起は多数の神経終末によって支配されていることが、微細構造レベルで明らかになった。樹状突起内の芯有り小胞にも神経ペプチドが含まれており、脳内で非シナプス的に放出されることから、神経ペプチドの脳内での新

4) 計画に対する達成度の自己評価と今後の方策：

入力線維の起源、transmitter の免疫組織化学的同定、神経回路の構築機構などが、今後の研究課題である。脳内で放出される神経ペプチドの生理機能を明らかにするため、昆虫の神経細胞初代培養系の開発が必要であろう。

5) 図および説明：カイコ5令幼虫の脳におけるボンビキシンニューロンの神経突起の分布。HRPを注入し、パラフォルムアルデヒド固定後、過酸化水素-ジアミノベンジジンで発色させた。細胞体から伸びる太い軸策が反対側に伸びるほか、両側のニューロピルに細かく分岐した樹状突起が分布する。電顕で観察すると、樹状突起内にも神経ペプチドを含む小胞が存在しており、脳内での放出が見られた。



Aizono Y, Endo Y, Sattelle DB, Shirai Y (1997) Prothoracicotropic hormone-producing neurosecretory cells in the silkworm, *Bombyx mori*, express a muscarinic acetylcholine receptor. *Brain Research*, 763, 131-136

Takei N, Kuramoto H, Endo Y, Hatanaka H (1997) NGF and BDNF increase the immunoreactivity of vesicular acetylcholine transporter in cultured neurons from the embryonic rat septum. *Neuroscience Letters*, 226, 207-209

Miyoshi T, Endo Y (1998) Immunohistochemical study on peptidergic neurons containing FMRFamide in the stomatogastric nervous system of the American cockroach. *Applied Entomology and Zoology*, 33, 133-138

Takei N, Numakawa T, Kozaki S, Sakai N, Endo Y, Takahashi M, Hatanaka H (1998) Brain-derived neurotrophic factor induce rapid and transient release of glutamate through the non-exocytotic pathway from cortical neurons. *J. Biol. Chem.* 273(42), 27620-27624

Nakanishi S, Ichikawa J, Endo Y (1998) Localization of cytoplasmic free calcium ions in PC12 cells with varicose fibers. *Archives Histology and Cytology*, 61, 221-232

幼虫形質の維持および蛹化決定過程における 絹糸遺伝子の発現制御機構の解析

滝谷 重治（北海道大学遺伝子実験施設）

1) 目的 カイコ絹糸遺伝子の発現は幼虫脱皮のサイクルに依存して変動し、眠期には停止し脱皮後再活性化されるという過程を繰り返すが、この変化は転写レベルで制御されていることが明らかになっている。この制御に関わっている転写因子を同定し機能を明らかにすることを通して、幼虫脱皮と絹糸遺伝子の発現の同調機構を理解する。最終的には、絹糸遺伝子ばかりでなく、幼虫脱皮過程での遺伝子発現制御機構の全体像の理解を目指す。本計画においては、フィブロイン遺伝子の転写制御領域に結合する因子のうち、その発現と相関して幼虫脱皮サイクルで活性の変動する因子 FMBP-1 (Fibroin Modulator Binding Protein-1) の遺伝子をクローニングし、その動態と機能を 4 齢および 5 齢を中心に解析する。また、幼虫脱皮や変態過程での遺伝子発現制御機構の上位にあると考えられる核内受容体や、エクジステロイドによって発現が制御される転写因子群を検出し、4 齢および 5 齢における絹糸腺での発現を解析して、絹糸遺伝子の発現や FMBP-1 活性の変動との相関関係を整理し、それぞれの遺伝子の上下関係の理解、ターゲット探索のための準備を行う。

2) 方法と結果

(1)後部絹糸腺から調製した粗核抽出液を DNA アフィニティーカラムで分画することで、FMBP-1 をほぼ単一の標品として得ることのできる精製法を確立した。この方法を用いて 5 齢 1 日幼虫約 15000 頭分の絹糸腺を処理し、数十ピコモルの FMBP-1 タンパク質を得た。以前の分画では SDS-PAGE によって分子量 32 kDa と 31 kDa の 2 本のバンドが検出されたが、新たに精製した分画では 32 kDa のほぼ均一なタンパク質が得られた。これをリシルエンドペプチダーゼで分解し 4 種のペプチドの 65 アミノ酸残基を決定した結果、新規タンパク質であることが明らかになった。アミノ酸配列をもとに後部絹糸腺 poly(A)RNA より調製した cDNA を用いて PCR を行ったところ、別々に決定した 2 つのペプチドを含む PCR-DNA 断片を得ており、全長の cDNA を得るため、現在ライブラリーのスクリーニングを行っている。当初 FMBP-1 活性の一部と考えられ最初に精製が完了した p36 タンパク質は、遺伝子クローニングと機能解析を行い、FMBP-1 の DNA 結合に対する促進効果を有することを確認した。しかし、その特異性については否定的結果となり、幼虫脱皮サイクルでの発現パターンや組織特異性などからもフィブロイン遺伝子の発現制御に関与しているという積極的証拠は得られなかった。

(2)核内受容体遺伝子およびエクジステロイドで誘導される初期遺伝子 *Broad Complex* が属する BTB 遺伝子ファミリーのそれぞれで保存された領域を参考に PCR プライマーを設計し、4 齢 3 日と 5 齢 1 日の後部絹糸腺 poly(A)RNA 由来 cDNA を鋳型として PCR を行い、*HNF4*、*EcR*、*FTZ-F1*、*E78*、*Usp*、*BRC*、*BTBVII* などを検出した。これら遺伝子の cDNA 断片をプローブとして、4 齢から 5 齢幼虫の絹糸腺 RNA を用いたノーザンハイブリダイゼーションを行った。a)ヘテロダイマーを形成してエクダイソンレセプターとして機能すると考えられる *EcR* と *Usp* の発現が対照的に推移する。*EcR* RNA 量は 4 齢 60 時間から 78 時間で高レベルに達した後眠期に徐々に低下し、さらに脱皮を境に急激に低下した。一方、

Usp RNA レベルは 4 齢脱皮直後に高く 60 時間まで徐々に低下する。その後 72 時間から 87 時間では一段と低下して低いレベルで維持されるが、脱皮直前に急激に増加し 5 齢初期では高レベルで維持された後低下していく。 b)*HNF4* RNA レベルは 4 齢を通じて徐々に増加するが、4 眠期 D2 から脱皮直前まで最も高くなり脱皮後低下するが、5 齢初期に比較的高いレベルの時期がありその後低下する。 c)*FTZ F1* RNA には従来の報告通り 4 眠期に急激なピークを作って発現する分子種と、それとは異なり、同時期に発現を開始するものの 5 齢脱皮後にゆるやかなピークを作る分子種が存在し、両者は一部コード領域が異なっている可能性が示唆された。 d)*BRC* RNA は 4 齢から 5 齢初期にかけて検出され、脱皮直前に高レベルとなることがわかった。しかし 5 齢初期に低下した後検出されなくなった。

3) 考察 (1)*FMBP-1* には転写制御因子で活性化ドメインとして知られている酸性アミノ酸に富んだ領域が見出されているが、現在までのところ部分的な cDNA しか得られていないため全体構造は不明である。今後の機能解析のために、全コード領域をカバーする cDNA のクローニングが必要である。(2)本研究で検出した転写制御因子の遺伝子の発現はいずれも 4 齢と 5 齢とでは異なっており、特に 4 齢では脱皮後 RNA 量が増加する遺伝子であっても、5 齢 12 時間から 24 時間では減少した。ノーザン解析には total RNA を用いているのでフィブロイン mRNA の影響は大きくないと考えている。このような 4 齢と 5 齢における違いが生じる機構、およびその結果発現が影響される下位の遺伝子の解析が重要である。また、4 齢から 5 齢初期に見られる *EcR* と *Usp* 遺伝子の対照的な発現が下位遺伝子の発現制御にどのような影響を与えているか興味ある問題である。(3)遺伝子相互の関係や機能に関する解析はこれからであるが、現在までの解析においても新たな知見が得られており、各遺伝子の動態と機能の異なった昆虫間での比較、特定の組織での解析、幼虫脱皮サイクルと変態時との比較は、幼虫脱皮サイクルでの遺伝子発現制御機構の解明に有用だと考えている。

4) 計画に対する達成度と今後の方策 本研究では *FMBP-1* の構造、機能、動態の解析を中心に、絹糸遺伝子の発現制御と幼虫脱皮の同調機構を明らかにし、さらに関連すると思われる転写制御因子についても解析を進めることを意図していたが、当初予定していた量では *FMBP-1* のアミノ酸配列を決定できず、その後の大部分の労力を *FMBP-1* の精製に費やさざるを得なかった。このため、計画していた各因子の機能解析はほとんど行なえなかった。ようやくアミノ酸配列を決定することができ cDNA 断片も得られたことから、今後は組換えタンパクの発現、*in vitro* 転写系やトランスフォーメーション系、トランスジェニックなどを用いて *FMBP-1* の機能を明らかにしていく。同時に、核内受容体や *BRC* 遺伝子の動態についても明らかにし幼虫脱皮サイクルでの遺伝子発現制御機構を解明したい。

H. Kokubo, S. Takiya, V. Mach and Y. Suzuki (1996) Spatial and temporal expression pattern of *Bombyx fork head/SGF-1* gene in embryogenesis. *Development Genes and Evolution*, 206, 80-85.

S. Takiya, H. Kokubo and Y. Suzuki (1997) Transcriptional regulatory elements in the upstream and intron of the fibroin gene bind three specific factors POU-M1, Bm Fkh and *FMBP-1*. *Biochemical Journal*, 321, 645-653.

精巣の発育抑制

田中利治（名古屋大学大学院生命農学研究科・環境昆虫学研究室）

1. 目的

鱗翅目昆虫では幼虫期に精巣を発達させるものが多いが、細胞分裂周期とその分化がどのように幼虫期のホルモンと関連して発育が進むかは明らかになっていない。この精巣の発育・分化とホルモン作用とのかかわりをあきらかにすることを目的とする。発育に関わる一連の出来事はかなり複雑なため、突然変異体などを用いて行うことが多いが、本研究では、寄生蜂に寄生された寄主精巣の発育が停止することに着目して、精巣の分化を明らかにしていく。体内捕食寄生バチが寄生すると、寄主の鱗翅目幼虫の精巣発育は寄生時点で止まり、次第に壊れていく。この寄生去勢の程度は、寄生時の寄主の発育段階で異なり、精巣の発育や精子形成の過程がさまざまな程度に阻害される。これは寄生蜂の卵巣中に存在する共生ウイルス（ポリドナウイルス）と毒液の作用によることが最近わかってきた。産卵時に寄主体内に注入されたこのウイルスがつくる活性タンパクが、寄主精巣での体細胞分裂や減数分裂過程を止めている可能性が示唆されている。また寄生後発育が停止するにも関わらず、エクジステロイドリセプター量が寄主精巣において異常に増加するなどの現象もみられている。ウイルスのどのような働きで精巣の発育や精子形成過程が壊されていくのか、本研究では、共生ウイルスが寄主精巣の発育及び分化過程のどこに影響を与えているのかをまず明らかにする。

2. 方法

寄主としてアワヨトウ、寄生バチにコマユバチ科のカリヤコマユバチを用いた。精巣細胞の細胞周期の解析には、PI 染色によるフローサイトメトリー法や HE 染色によるパラフィン切片法を用いた。核酸の抽出、サザンやノーザンブローディング等は常法に従った。また、cDNA ライブラリーの作成はキット（TimeSaver）を用いて行った。

3. 結果と考察

- (1) 寄生されるステージによって、精巣内の細胞の壊れ方が違うことが解った。特に寄主が終齢になると、寄生されてもかなりの精細胞が精子にまで変態できることが、フローサイトメトリーでもパラフィン切片でも確かめられた。
- (2) フローサイトメトリーの結果から、終齢の0日目からそれまでのステージで止まっていた分裂が動き出すことが解った。
- (3) 終前齢に JHA(50ng/larva)を塗布しておく、その幼虫の精巣の発育は止まり、大きくならなかったことから終齢期における精巣の急激な成長の開始には JH が下がる必要があるが示唆された。
- (4) ポリドナウイルスによる制御は、細胞分裂周期で G2/M block がはずれたものには及ばないことが示唆された。
- (5) 寄生された寄主の精巣の cDNA ライブラリーを作成した。その中で 4kbp 前後のもの一部をシークエンスし、さらに上流域をシークエンスしたところ、RNaseT2 の活性領域が含まれていた。

4. 計画に対する達成度の自己評価と今後の方策

今回の研究で、精巣における細胞分裂周期には G2/M block が存在し、JH 値が下がることがその block をはずす刺激になっているといったことが示された。しかし、2-3 の問題が未解決のままとなったことは残念であった。寄生された寄主の精巣で、異常に多くのエクダイソンリセプターが発現していることが抗体を使ったコンピティティングアッセイで示されたが、それを確かめるためのリセプターのシーケンスが間に合わなかった。現在進行中であり、早晚事実関係がわかってくる予定である。さらに寄主精巣中で発現している RNaseT2 と細胞分裂周期の停止、さらにはアポトーシスとの関連は、anti-sense RNA を使ったり、in situ hybridization 等を行って明らかにしていく。

5. 発表論文

E. Tagashira and T. Tanaka (1998) Parasitic castration of *Pseudaletia separata* by *Cotesia kariyai* and its association with polydnavirus gene expression. J. Insect Physiol. 44: 733-744.

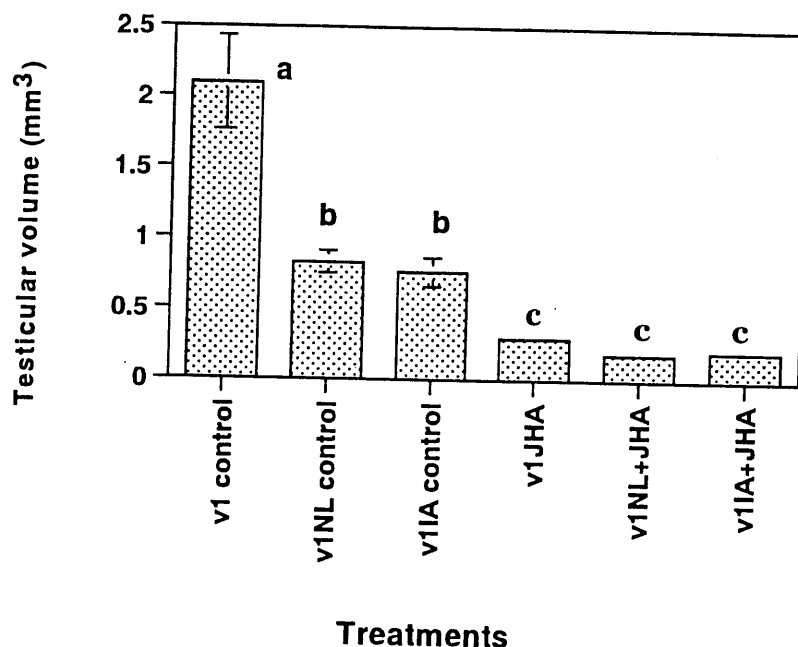


図1 精巣発育に及ぼす幼若ホルモンの効果

JHA(S-31183)は、アセトンに溶かしてアワヨトウ幼虫5齢1日目に塗布。
有意差検定は一元配置の分散分析を行い、異なったアルファベットは $p < 0.01$ で有意。

昆虫および植物におけるエクジソン生合成初期過程機構の比較と解析

藤 本 善 徳 (東京工業大学・大学院・理工学研究科)

目 的：昆虫における20-hydroxyecdysone (**1**)の生合成機構に関して、その比較的初期の過程、すなわち、cis-A/B環-7-エン-6-オン構造がいかに形成されるかについては、2、3の報告はあるものの依然として不明のままとなっている。植物エクジステロイドの生合成研究においてもこの点についてははっきりしていない。我々が生合成研究に用いているシソ科植物*Ajuga reptans* var. *atropurpurea*の毛状根組織培養系は植物エクジステロイド類の生合成研究の優れた実験系であり。この実験系を用いて、エクジステロイド生合成初期過程の機構解明に関する基礎的研究を行い、重水素標識5 β -ケトール(3 β -hydroxy-5 β -cholest-7-en-6-one)が効率よく20-hydroxyecdysoneに取り込まれること、ならびにコレステロールの3 α 位、4 β 位、4 α 位の水素はそのまま脱離することなく**1**に取り込まれることを既に見いだした、これらのデータを基に、さらに詳細にcis-A/B環-6-エン-6-オン構造が形成される機構に関する研究を行い、昆虫や他の植物においてこれまでに報告のある経路と比較する。さらには、昆虫や他の植物において必要な生合成研究を行い、その差違をお互い詳しく比較する。

方法と結果：実験系としては上記のシソ科植物*Ajuga reptans* var. *atropurpurea*の毛状根組織培養系を使用する。投与基質としては主として重水素標識ステロイド基質を合成し使用する。予想中間体を含む種々の標識基質が取り込まれたか否か、ならびに標識に変化があったか否かを ^2H -NMRまたは ^{13}C -NMRスペクトルにより解析する。

[6- ^2H]cholesterolの投与実験からcholesterolの6位水素は**1**の5位に転位することがわかった。*Ajuga*毛状根においてこれ迄にわかった水素の挙動をまとめて図1に示す。[3 α ,6 α - $^2\text{H}_2$]-lathosterolおよび[3 α ,6 β - $^2\text{H}_2$]lathosterolの投与実験により、これらが、いずれも**1**に取り込まれ、後者の6 α - ^2H は**1**の5位に転位することがわかった。この結果は、7-dehydrocholesterolに一旦変換された後に取り込まれたことを示すものであり、この植物実験系においても昆虫と同様に7-dehydrocholesterolが生合成中間体であることがわかった。

さらに、5 β -ケトールの次の中間体の可能性のあるものとして重水素標識5 β -ケトジオール(3 β ,14 α -dihydroxy-5 β -cholest-7-en-6-one)を投与したが取り込みは見られなかった。一方、重水素標識2 β ,3 β -dihydroxy-5 β -cholest-7-en-6-oneは良好に取り込まれた。さらに、重水素標識2 β ,3 β ,14 α -trihydroxy-5 β -cholest-7-en-6-oneは取り込まれないことが示された。

次に、7-dehydrocholesterolから5 β -ケトールの間の可能な中間体として、5 α ,6 α -epoxycholest-7-en-3 β -olの投与を試みたが化合物の不安定さのため明確な結果は得られていない。以上の予想中間体基質の構造と**1**への取り込みの有無をまとめて図2(標識については記していない)に示す。

別の角度からの取り組みとして、植物には7-eneのないエクジステロイドも存在するので7-ene飽和させた化合物に関して検討し、3 β -hydroxy-5 β -cholestan-6-oneが良好に取り込まれることがわかった。

考察：*Ajuga*毛状根におけるcis-A/B環-7-エン-6-オン構造の形成機構は、報告のあるシダ*Polypodium vulgare*およびバッタ*Schistocerca gregaria*の場合と比較して明らかに異なっており大変興味をもたれる。2位または14位に水酸基を導入した化合物の取り込み

の結果は解釈に悩むところであるが、本実験系では、14位に水酸基のある化合物は何らかの生合成調整（阻害）作用をもっている可能性がある。あるいは、14位水酸化は側鎖の水酸化の後に起こる可能性を示唆しているとも考え得る。

計画に対する達成度の自己評価と今後の方策： *Ajuga* 毛状根における実験系での *cis*-A/B 環-7-エン-6-オン構造の形成機構については、重要な知見をいくつか見だし目的をほぼ達成したと考えている。最終的には7-dehydrocholesterolと5 β -ケトールの間の中間体の構造を確定した段階で100%達成と認識しているが、幸運にも7-ene飽和させた3 β -hydroxy-5 β -cholestan-6-oneが良好に取り込まれることがわかったので、問題が単純化され、cholesterolの5-eneがいかに5 β -6-oneに変化するのかに絞って研究を進めればよいことがわかった。現在、可能な中間体を集中的に調べているところである。他の植物や昆虫においての研究は2、3、4年目の計画として挙げたが1年目のみしか採択されなかったため経費、備品等の関係で実験開始に至らなかった。

図1. *Ajuga* 毛状根における20-hydroxyecdysone生成時の水素の挙動

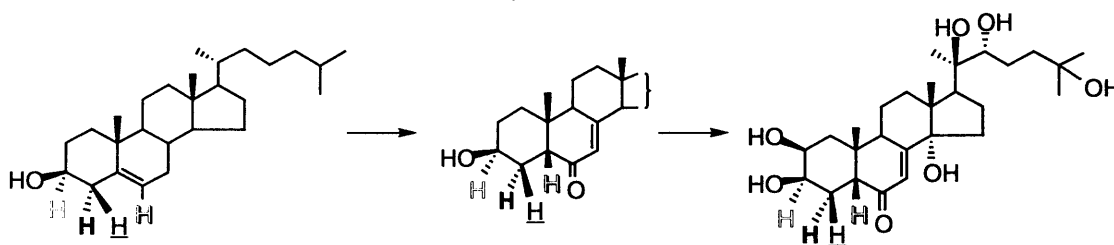
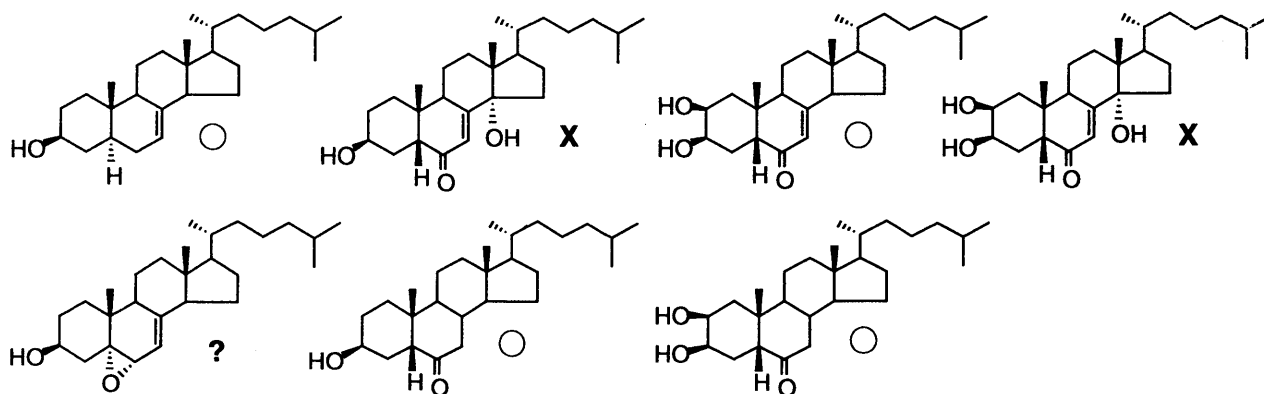


図2. 予想中間体投与基質の構造と20-hydroxyecdysoneへの取り込みの有無（有○、無X）



発表論文

Y. Fujimoto, T. Kushiro and K. Nakamura (1997) Biosynthesis of 20-Hydroxyecdysone in *Ajuga* Hairy Roots: Hydrogen Migration from C-6 to C-5 during *cis*-A/B Ring Formation. *Tetrahedron Letters*, 38, 2697-2700.

K. Ohyama, Kushiro, T., K. Nakamura and Y. Fujimoto (1999) Biosynthesis of 20-hydroxyecdysone in *Ajuga* hairy roots: Metabolic fate of 6 α - and 6 β -hydrogens of lathosterol. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 7, 2925-2930.

K. Ohyama, Kushiro, T., K. Nakamura and Y. Fujimoto (2000) Biosynthesis of Sterols and Ecdysteroids in *Ajuga* Hairy Roots. *Lipids*, 35, 279-288.

R. Hyodo and Y. Fujimoto (2000) Biosynthesis of 20-hydroxyecdysone in *Ajuga* hairy roots: The possibility of 7-ene introduction at a later stage. *Phytochemistry*, 53, 733-737.

甲殻類のCHH族ペプチドをプローブとした 昆虫前胸腺抑制ホルモンの検索

渡邊 俊樹 (東京大学海洋研究所)

研究成果

1) 目的：昆虫と同じく節足動物門に属する甲殻類では、CHH族ペプチドと呼ばれる一群のペプチドホルモンの存在が知られている。これらのペプチドは約75アミノ酸からなり、保存された位置に6個のCys残基を含み3つの分子内ジスルフィド結合を形成する。甲殻類のいくつかの種では、複数のCHH族ペプチドが確認されており、それらは血糖上昇、脱皮抑制（Y器官からのエクジステロイド放出の抑制）、卵黄形成抑制、大顎器官抑制（メチルファルネソエイト放出抑制）の活性を有している。CHH族ペプチドは構造上の細かい特徴から2つのタイプに分けられる。血糖上昇ホルモン（CHH）の殆どはタイプ1に属しており、脱皮抑制ホルモン（MIH）、卵黄形成抑制ホルモン（VIH）、大顎器官抑制ホルモン（MoIH）はタイプ2に属している。昆虫においてもCHH族ペプチドの存在が一例のみ知られている。バッタ *Schistocerca gregaria* の側心体から放出されるイオン輸送ペプチド（ITP）は腸における水や塩類の吸収や酸の分泌の調節を行なう。アミノ酸配列から見て、ITPはタイプ1のCHH族ペプチドである。

多様な機能を持つ種々のCHH族ペプチドが、昆虫においても甲殻類同様に存在するかどうかを調べるためにこの研究を計画した。とりわけ、脱皮抑制活性を持つCHH族ペプチドが昆虫にも存在するかどうかに興味の中心を置いた。研究対象としては鱗翅目のカイコ (*Bombyx mori*) を選び、脳などの神経節から抽出したmRNAを鋳型にした逆転写PCRを行ない、CHH族ペプチドをコードするcDNAの単離と配列解析、および発現の解析を試みた。

2) 方法と結果：PCRプライマーのセットは、タイプ1とタイプ2を増幅するためのものを別々に設計した。これらの縮重プライマーは、それぞれのタイプの間で良く保存されているペプチド配列を基にデザインした。まず、カイコのタイプ1のCHH族ペプチドのcDNAを得るために、5種の甲殻類のCHHとバッタのITPの間で保存の良い部分を2つ選んで縮重プライマーを設計し、カイコの脳（アラタ体および側心体が付随）、食道下神経節および胸部神経節から単離したmRNAを鋳型としたRT-PCRを行なった。その結果、CHH族ペプチドをコードすると考えられるcDNAの短い断片を単離できた。次に5' RACEを行なってcDNAの5'末端部分を得て、それをプローブとしてcDNAライブラリーのスクリーニングを行ない、全open reading frameを含むcDNAクローンを単離し、ヌクレオチド配列の決定とタンパク質配列の推定を行なった。このcDNAは72アミノ酸からなるCHH族ペプチドをコードしていると推定された。BmCHHLと名付けられたこのペプチドは、バッタのITPにアミノ酸レベルで63%同一であった。mRNAの発現は、5齢4日目の幼虫では脳前方の5～6個の細胞（半球あたり）で見られた。また、幼虫終齢0～7日の間でmRNA発現量の変化は見られなかった。

タイプ2のペプチドをコードするカイコのcDNAを同様の方法で検索したが、得られな

かった。

3) 考察 : BmCHHLとバッタのITPとの間の配列の類似が高いことから、BmCHHLはカイコにおけるITPである可能性が高いと考えている。BmCHHLはCHH族のタイプ1に属しており、本研究ではタイプ2のペプチドをカイコにおいて見い出すことはできなかった。この理由として、昆虫にはタイプ2のCHH族ペプチドが存在しない可能性が考えられる。最近、キイロショウジョウバエの全ゲノム配列が公開されたので、CHH族ペプチド配列の検索を行なったところ、タイプ1に属するペプチドをコードする遺伝子1つのみが見い出され、タイプ2の配列を持つものは見つからなかった。なお、ショウジョウバエで見い出されたタイプ1のペプチドはバッタのITPやBmCHHLに比較的高い相同性を示しており、ショウジョウバエにおけるITPである可能性がある。

本研究の結果、直翅目以外の昆虫でもCHH族ペプチドが存在することが明らかとなったが、甲殻類でみられるような多様なペプチドの存在を見い出すことはできなかった。甲殻類で見られたCHH族ペプチドの多様化は、昆虫では起こっていないと考えられる。

4) 計画に対する達成度の自己評価と今後の方策 : 初期の目標通り、カイコのCHH族ペプチド一つのcDNAクローニングを行なうことができたので、一応の満足をしている。しかしながら、本研究の期間内にこのペプチドの機能の解析を行なうことができなかったのは残念である。バッタのITPの研究をしているカナダのJ. Phillipsのグループと、カイコにおけるBmCHHLのITP活性を調べる共同研究の話が進んでいるので、BmCHHLの機能の解析は今後行ないたい。

5) 図1 : *Schistocerca gregaria*のITP配列(上)と推定BmCHHL配列(下)のFASTAアラインメント。*は同一アミノ酸を示し、左の番号はopen reading frame中のアミノ酸番号を表わす。

```
57 SFFDIQCKGVYDKSIFARLDRICEDCYNLFREPQLHSLCRSDCFKSPYFKGCLQA
   ***      ***** * ***** ** *****
36 SFFTLECKGVFDAAIFARLDRICDDCFNLFREPQLYTLCAECFTTPYFKGCMES

112 LLLIDEEEEKFNQMVEIL-NH2
   * * * * *
91 LYLYDEKEQIDQMIDFV-NH2
```

代表的な発表論文

- 1) T. Ohira, T. Watanabe, H. Nagasawa and K. Aida (1997) Molecular cloning of a molt-inhibiting hormone cDNA from the kuruma prawn *Penaeus japonicus*. *Zoological Science*, 14, 785-789.
- 2) H. Endo, H. Nagasawa and T. Watanabe (2000) Isolation of a cDNA encoding a CHH-family peptide from the silkworm *Bombyx mori*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 30, 355-361.

成虫休眠の脳－アラタ体系による制御

沼田英治・志賀向子（大阪市立大学理学部）

1. 目的

成虫休眠とは内分泌系を介した生理的な生殖の抑制である。さまざまな昆虫が成虫休眠に入って冬を越すことが知られており、その多くは光周期（日長）による調節を受けている。私たちは光周期によって調節された成虫休眠をもつホソヘリカメムシとルリキンバエにおいてアラタ体除去・アラタ体神経の切断実験を行い、休眠中は脳がアラタ体の分泌活性を神経経路で抑制していることを明らかにした。本研究では、休眠時にアラタ体の分泌活性を調節している中枢機構を明らかにすることを目的とする。その過程で、成虫休眠の示す性質のうちでアラタ体が関与しないものが発見されたので、これについても検討する。

2. 方法と結果

ルリキンバエにおいて脳からアラタ体へ軸索を伸ばしている神経細胞を特定するために、側心体と脳を結ぶ神経あるいはアラタ体自身にニッケルイオンを注入してバックフィルを行った。さらに脳の部分切断を併用することにより神経の連絡経路を詳細に検討した。その結果、側心体・アラタ体を含む後脳神経複合体へは脳間部、脳側方部および食道下神経節の細胞群が軸索を伸ばしていた。そのうち、脳間部の細胞群は側心体まで、脳側方部の細胞群はアラタ体まで軸索を伸ばしていた。

次に、ルリキンバエにおいて、休眠中の脳によるアラタ体活性の抑制が、脳内のどの細胞によって担われているかを明らかにするため、脳間部や脳側方部の神経分泌細胞を除去して、その効果を調べた。脳間部の細胞群を除去したところ、休眠・非休眠のいずれを誘導する条件下でもすべて休眠成虫のように卵巣発達が抑制された状態となり、アラタ体が小さくなっていた。一方、脳側方部の細胞群を除去すると、条件にかかわらず卵巣が発達し、休眠を回避した。

ホソヘリカメムシにおいては、休眠・非休眠成虫およびそれらのアラタ体を除去したものやアラタ体神経を切断したもので、クチクラの力学的伸展性を引っ張り試験機で、体内の脂質含量をクロロホルム・メタノールで抽出して測定した。その結果、休眠成虫では非休眠成虫のものよりクチクラの伸展性が小さく脂質の蓄積量が大きかった。血リンパ中の蛋白質のパターンや生殖器官の発達に影響するアラタ体除去やアラタ体神経の切断は、この性質に影響を与えなかった。

3. 考察

ルリキンバエにおいては、脳間部の細胞群はアラタ体の分泌活性を液性経路で促進しており、休眠中のアラタ体活性は脳側方部の細胞によって神経経路で抑制されていると考えられる。日長情報が受容されてから、この細胞に情報が受け渡される経路、そしてアラタ体活性を抑制する分子機構に興味をもたれる。

ホソヘリカメムシにおいては、成虫休眠の示す性質のうち、血リンパ中の蛋白質の変化や生殖器官の抑制はアラタ体を介して、クチクラの伸展性と脂質の蓄積はアラタ体を介さないで調

節されていることが明らかになった。アラタ体を介さない成虫休眠の制御機構については今後の課題である。

4. 計画に対する達成度の自己評価と今後の方策

予定したことは、ルリキンバエではほぼ達成された。ホソヘリカメムシでは、アラタ体に関与しない休眠の性質がみつかったことは予想外の発見であったが、神経分泌細胞の除去実験はできなかったことが反省点である。

アラタ体の幼若ホルモン分泌活性の放射化学的測定法を導入し、ルリキンバエの脳間部、脳側方部の神経分泌細胞の卵巣発達に対する効果が、アラタ体分泌活性と関係があるのかどうかを、明らかにしたい。

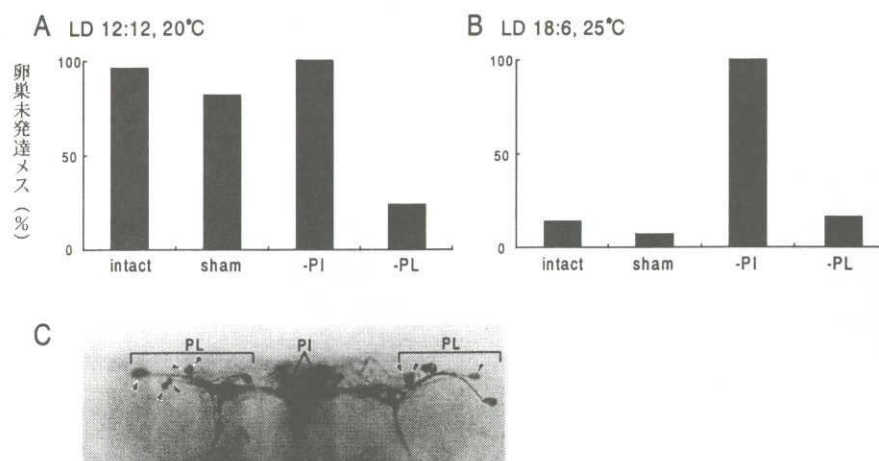


図 ルリキンバエの脳間部 (PI) または脳側方部 (PL) 神経分泌細胞除去の卵巣発達に対する効果。写真はバックフィルによって染色されたルリキンバエ脳の細胞体を示す。

代表的な発表論文

- A. Morita, K. Soga, T. Hoson, S. Kamisaka and H. Numata. (1999) Changes in mechanical properties of the cuticle and lipid accumulation in relation to adult diapause in the bean bug, *Riptortus clavatus*. *Journal of Insect Physiology*, 45, 243-249.
- I. Toyoda, H. Numata and S. Shiga (1999) Role of the medial neurosecretory cells in the ovarian development of the blow fly *Protophormia terraenovae*. *Zoological Science*, 16, 187-191.
- N. A. Tanigawa, S. Shiga, and H. Numata (1999) Role of the corpus allatum in the control of reproductive diapause in the male blow fly, *Protophormia terraenovae*. *Zoological Science*, 16, 639-644.
- S. Shiga and H. Numata (2000) The roles of neurosecretory neurones in the pars intercerebralis and pars lateralis in reproductive diapause of the blow fly, *Protophormia terraenovae*. *Naturwissenschaften*, 87, 125-128.
- S. Shiga, I. Toyoda and H. Numata (2000) Neurones projecting to the retrocerebral complex of the adult blow fly *Protophormia terraenovae*. *Cell and Tissue Research*, 299, 427-439.

エクジソン20-水酸化酵素遺伝子の単離と発現調節に関する研究

園部治之（甲南大学理学部）

1. 目的

エクジソン20-水酸化酵素 (EC.1.14.99.22) は、エクジソンを基質として20-ヒドロキシエクジソン（脱皮ホルモン）の生合成を触媒する酵素である。この酵素はチトクロームP450の一種であり、カイコ卵ではミクロソーム型である (Horike and Sonobe, 1999)。カイコ卵の初期発生の段階では、休眠卵に比べ非休眠卵でエクジソン20-水酸化酵素活性が著しく高いことから、この酵素活性の違いが休眠卵と非休眠卵の20-ヒドロキシエクジソン量の違いの原因となっている可能性が考えられた (Sonobe et al., 1999, Makka and Sonobe, 2000)。しかし、カイコ卵におけるエクジステロイドの水酸化活性に関しては、これまで全く研究は行われていなかった。そこで本研究では、カイコの非休眠卵を用いてミクロソーム型電子伝達系を構成しているNADPHチトクロームP450還元酵素とエクジソン20-水酸化酵素の遺伝子を単離し、これらの酵素の発現パターンから20-ヒドロキシエクジソンの生合成機構を解明しようとするものである。

2. 材料と方法

(1)cDNAライブラリーの作製：ポリA⁺ RNA をカイコ（錦秋 X 鐘和）の非休眠卵（産卵後3日目）より調製し、cDNAライブラリー合成キット（Gibco-BRL社）を用いてpSV-SPORTプラスミドベクターに構築した。得られた10⁷クローンは1000クローンを1集団として分割し保存した。

(2)NADPHチトクロームP450還元酵素遺伝子の単離：すでに知られているショウジョウバエ、イエバエ、ラット、酵母のNADPHチトクロームP450還元酵素遺伝子の保存された塩基配列(540bpと2kbp付近)を基にしてオリゴヌクレオチドを合成し、RT-PCR法によりcDNA断片を得た。さらに、これをプローブとしてcDNAライブラリーのスクリーニングを行い、得られたクローンの塩基配列を決定した。

(3)エクジステロイド応答性ほ乳類細胞の作製：エクジステロイド誘導性発現ベクター(pIND, Invitrogen社)のエクジステロイド応答配列の下流にルシフェラーゼをコードする遺伝子を導入した。レポータープラスミドを制限酵素で線状化した後、エクジステロイドレセプター遺伝子 (EcR/RXR)をトランスフェクトした安定な形質転換細胞 (EcR293細胞, Invitrogen社)に導入した。さらに、ネオマイシンによりレポーター遺伝子がEcR293細胞のゲノム内へ組み込まれた細胞を選択した。そのうち、エクジステロイド（例えば、ポナステロンA）誘導／非誘導値が1000倍以上のものを単離し株化した。

(4)レポーターアッセイ：LucEcR293細胞へ、Qiagen社のキットを利用してカイコ非休眠卵cDNAライブラリーを組み込み、ルシフェラーゼアッセイキット（Promega社）を用いてレポーターアッセイを行った。

3. 結果と考察

(1)NADPHチトクロームP450還元酵素遺伝子の単離

得られたcDNAのオープンリーディングフレームは2061塩基、677アミノ酸残基をコードしており、イエバエやショウジョウバエのそれと60.3%、ラットのそれとは43.5%の相同性がみられた。特に、FMN,FAD結合部位のアミノ酸配列はよく保存されていた。得られた配列の1.9kbをpET28ベクターを用いて大腸菌に組み込み、目的タンパク質を発現さ

せ、そのタンパク質のポリクローナル抗体を作製した。この抗体を用いてウエスタンブロットングを行ったところ、80kDa付近にバンドが検出された。このバンドはイエバエのNADPHチトクロームP450還元酵素の分子量(76kDa)と符合していた。次に、休眠卵と非休眠卵の胚発生に伴う本酵素の発現変動をウエスタンブロットングにより調べた。休眠卵ではこのバンドはほとんど検出されなかったが、非休眠卵では胚発生の3日目から胚の発育に伴って徐々に増加した。この結果は、胚発生初期に観察されたミクロソーム型エクジソン20-水酸化酵素活性の上昇は、NADPHチトクロームP450還元酵素の誘導によるものではなく、P450の発現レベルで調節されていることを示唆している。

(2) LucEcR293細胞のエクジステロイドに対する応答性

LucEcR293細胞を用いてcDNAライブラリーからエクジソン20-水酸化酵素をスクリーニングするためには、ルシフェラーゼ遺伝子が20-ヒドロキシエクジソンでは発現するが、エクジソンでは発現しないエクジソンの最大濃度を求める必要がある。LucEcR293細胞は20-ヒドロキシエクジソンやエクジソン、25-デオキシエクジソンにはほとんど反応しなかったが、ポナステロンAやムリストロンAには強く反応した。この結果は、LucEcR293細胞は25-デオキシエクジステロイドの20位が水酸化された場合に強く反応する可能性を示している。また、LucEcR293細胞はポナステロンAに対して濃度依存的に反応することが明らかとなった。さらに、エクジソン20-水酸化酵素によるはエクジソンから20-ヒドロキシエクジソンの生合成は25-デオキシエクジソンにより阻害されることや、25-デオキシエクジソンをカイコ卵ミクロソーム画分とインキュベートするとポナステロンAが生産されることから、エクジソン20-水酸化酵素は25-デオキシエクジソンも基質としているものと推察された。それ故、LucEcR293細胞では、25-デオキシエクジソンの20位の水酸化を指標としてエクジソン20-水酸化酵素のスクリーニングが可能であると結論された。

(3) cDNAライブラリーからエクジソン20-水酸化酵素遺伝子のスクリーニング

エクジステロイド応答性EcR293細胞を10 μ M 25-デオキシエクジソンの存在下で24時間培養し、ルシフェラーゼ活性を測定した。現在まで1.5 $\times 10^4$ クローンをアッセイしたが、特にレポーター活性を上昇させるクローンは得られていない。

4. 発表論文

- 岡本, 原田, 園部 (1998) 動物のステロイドホルモンとP450, 化学と生物, 36(9), 619-618.
- N. Horike and H. Sonobe (1999) Ecdysone 20-monooxygenase in eggs of the silkworm *Bombyx mori*: enzymatic properties and developmental changes. Arch. Insect Biochem. Physiol. 41, 9-17.
- H. Sonobe, H. Tokushige, T. Makka, H. Tsutsumi, N. Hara and Y. Fujimoto (1999) Comparative studies of ecdysteroid metabolism between diapause eggs and non-diapause eggs of the silkworm, *Bombyx mori*. Zool. Sci. 16, 935-943.
- T. Makka and H. Sonobe (2000) Ecdysone metabolism in diapause eggs and non-diapause eggs of the silkworm, *Bombyx mori*. Zool. Sci. 17, 89-95.
- N. Horike, H. Takemori, Y. Nonaka, H. Sonobe and M. Okamoto (2000) Molecular cloning of NADPH-cytochrome P450 oxidoreductase from silkworm eggs: its involvement in the hydroxylation of ecdysone. Europ. J. Biochem. (in press)

蛹休眠の光周期による制御：光受容、時計遺伝子、PTTH 放出の 上位機構

竹田真木生（神戸大学自然科学研究科）

目的（１）変態の神経内分泌的調節機構とそれを担う液性因子の解明には、脱皮や変態、休眠覚醒、形態形成の再開といった目に見える出来事に先立って変動する因子の動態の解明が必要であるが、これまでその出来事を非破壊的に検出することは出来なかった。そこで、一つの試みとして近赤外光のスペクトル解析から *Antheraea* 蛹休眠の終結と形態形成の再開前後の変化を個体別に追跡した。（２）*Antheraea* の休眠は光周期に依存し、光周期の読みとりには概日振動が関わっていると考えられる。そこで、概日時計に関わっていると考えられる PER(*Periplaneta*), DBT (*Bombyx*) および CRY(*Drosophila*)の抗体を作り、これを *Antheraea* と *Periplaneta* の脳を用いて、他の関連する抗原との解剖学的位置関係を明らかにしようとした。さらに、arylalkylamine N-acetyltransferase(NAT)活性とメラトニンの動態をしらべた。（３）エクダイソン放出に先立つモノアミン動態から示唆された、5-HT とカテコールアミンの効果を調べるためにこれらの遮断薬及び拮抗薬等を用いた薬理学的効果をしらべた。また、いくつかの JHA の効果を調べた。

方法と結果；（１）得られたスペクトルの２次微分解析で、少なくとも雌雄差、形態形成の開始に伴い変化する成分グループとタイミングの同定までは成功した。（２）PER 抗体は *Antheraea* で Sauman らの作成した抗体と同じ細胞を染めた。DBT 抗体は PER 抗体と完全に同じ細胞を染めた。休眠蛹および發育蛹脳における NAT(*Drosophila*)に対する抗血清によるマッピングの結果、この抗血清の認識する抗原の分布が、Per 蛋白質（ゴキブリ）様抗原の分布と完全に重なった。少なくとも *Antheraea* では、時計の歯車（PER によって示される）と出力系＝時計の針（NAT によって示される）の場所が一致したことにより、出力系の伝達システムがメラトニンによって担われていることが強く示唆される。ゴキブリでは従来考えられていた位置からかなりずれたところに PER/DBT 染色部位があったから、ゴキブリの概日ペースメーカーの解剖学的な位置については再検討が必要である。NAT およびメラトニンの概日変動が観察され、出力系にインドールアミンが関与する可能性が強くなった。NAT 活性は低温や長日による休眠の覚醒過程と並行的に高まった。インドールアミン系は概日的シグナルを与えながらインターバルのシグナルにもなることが分かった。（３）5HT の注射は休眠を破るのには有効ではなかったが、ZR515 は休眠を終結させ

た。

考察 (1) 時計の細胞の脳内の位置と時計関連遺伝子の動態がある程度明らかになった。(2) 時計の出力系がインドールアミンであることが示唆され、これは日周期的なシグナルとインターバルを示すシグナルの伝達の両方の性質を持つことが分かった。(3) 蛹休眠の覚醒と幼虫組織の崩壊、成虫形成が非破壊的にある程度モニターできるようになった。(4) JHA によって休眠の人工覚醒の道が開けた。

発表論文

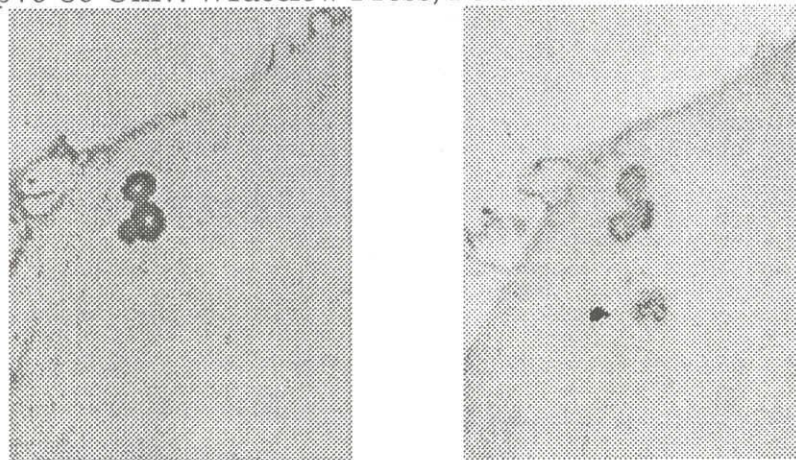
・ Takeda, M and S.D.Skopik (1997) Photoperiodic time measurement and related physiological mechanisms in insects and mites. *Annual Review of Entomology* 42,323-349.

・ Takeda, M., M. Matsumoto and Y. Tohno (1997) Diapause intensity and ecdysiotroph: Comparisons between two *Antheraea* species having summer and winter diapause at pupae. *European Journal of Entomology* 94,67-73

・ Ichihara, N, M. Okada, H. Nakagawa and M. Takeda (1997). Purification of serotonin N-acetyltransferase from cockroach testicular glands. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 27,241-246

・ Sakamoto, T., N. Ichihara and M. Takeda (1998) Characterization of indolamine N-acetyltransferase activity from the head ganglia of the American cockroach, *Periplaneta americana*. *Appl. Entomol. Zool.* 33,97-104.

・ Ichihara, N. M. Okada and M. Takeda (1998) Purification of arylalkylamine N-acetyltransferases from three organs of the American cockroach. In *Insects: Chemical Physiological and Environmental Aspects*. Eds: Konopinska, D., G. Goldsworthy, J. Nawrot, I. Orchard and G. Rozinski. pp70-80 Univ. Wraoclow Press, Poland



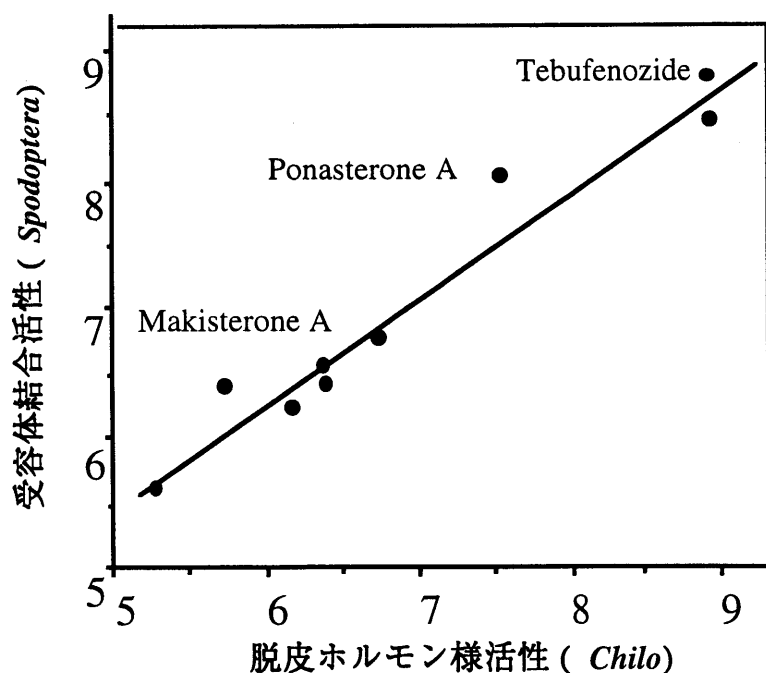
Antheraea 脳の隣接切片。左、抗 NAT. 右、抗 PER。同一細胞が染まっている。

脱皮ホルモン様活性発現に必須の化学構造およびその物理化学的性質の 説明

中川好秋（京都大学大学院農学研究科）

【目的】昆虫の脱皮ホルモンである 20-ヒドロキシエクダイソンはステロイド骨格を有する化合物であるが、平面構造が天然型のホルモンとは全く異なるジベンゾイルヒドラジンが脱皮ホルモン様活性を示すことが見い出された。そこで、本研究では、これらヒドラジン類が 20-ヒドロキシエクダイソン様活性を示す理由を明らかにすることを目的として、両系列化合物を 3 次元で重ね合わせ、立体構造と活性の関係を定量的に解析することによって、活性発現に必須の化学構造を明らかにすることを目的とした。また、20-ヒドロキシエクダイソンはすべての昆虫に共通の脱皮ホルモンであるにも拘わらず、殺虫剤として実用されているヒドラジン化合物の一つであるテブフェノジドは鱗翅目昆虫に対しては非常に強い殺虫活性を示すが、鞘翅目昆虫に対しては弱い殺虫効果しか示さないことが分かっている。この昆虫種間での選択性の違いが、いかなる化学的性質の違いによるものかを明らかにしようとした。

【方法と結果】殺虫活性：鱗翅目昆虫であるニカメイチュウ(*Chilo suppressalis*)およびヨトウムシ(*Spodoptera exigua*)、鞘翅目昆虫であるコロラドハムシ(*Leptinotarsa decemlineata*)に対して各種化合物のジメチルスルホキシド溶液を各幼虫の背板に局所投与し、約 1 週間後に致死率を求めた。薬量と致死率の関係から 50%致死薬量を求め、殺虫活性を求めた。ジベンゾイルヒドラジン類の構造と殺虫活性の関係は共に鱗翅目昆虫であるニカメイチュウとヨトウムシ間では非常に良く似ているが、それらと鞘翅目に対する結果とは大きく異なるものであった。脱皮ホルモン活性：無菌飼育した休眠ニカメイチュウの腹部背板を切り取り、脱皮ホルモンで 24 時間培養した後、 $[^{14}\text{C}]$ -N-アセチルグルコサミンを含む培地に移



してさらに 3 日間培養し、表皮に取り込まれた放射能を液体シンチレーションカウンターで測定した。濃度と放射能取込み量との関係から脱皮ホルモン活性を定量的に求めた。その結果ニカメイチュウに対する脱皮ホルモン様活性と殺虫活性の間には 1 対 1 の関係が存在した。受容体結合活性：ヨトウガ蛹卵巣由来の細胞 Sf-9 をポナステロンのトリチウム標識体と 30 分間インキュベートし、細胞に取り込まれた放射能を測定し、脱皮ホルモン類縁体によるポナステロン取り込み阻害効果を調べ、濃度応

答曲線より受容体結合活性を定量的に評価した。Sf-9 細胞における受容体結合活性とニカメイチュウにおける脱皮ホルモン活性との間には直線関係が存在し（図），リガンド-受容体結合様式がヨトウムシとニカメイチュウの間で良く似ていることが構造活性相関解析の結果明確となった。

【考察】一連のジベンゾイルヒドラジン類の殺虫活性，脱皮ホルモン様活性，受容体結合活性を評価し，活性間での関係を定量的に解析した結果，互いに直線的に対応し，受容体結合活性が殺虫活性発現の原因であることが明確となった。また，構造活性相関の解析から一方のベンゾイル部がエクダイソン類の C-17 位アルキル側鎖に対応していることを明確にした。さらに，ジベンゾイルヒドラジン類については疎水性の上昇と共に活性は上昇するが，最適の疎水性が存在し，その大きさが昆虫種間で異なることがわかった。

【計画に対する達成度の自己評価と今後の方策】海外の研究者との共同研究を行い，一連の化合物の殺虫活性をニカメイチュウだけでなく，他の鱗翅目害虫であるヨトウムシや鞘翅目害虫コロラドハムシに対しても測定することができ，構造活性相関の種間における違いに関わる化合物の物理化学的性質を明確にすることができたことは大きな成果と考える。またニカメイチュウにおける脱皮ホルモン様活性をインビトロで測定し，脱皮ホルモン様活性発現にとって重要な構造上の条件を抽出することができた。次の段階として，受容体に対する結合活性を評価することを目的として，ニカメイチュウの脱皮ホルモン受容体遺伝子のクローニングおよび受容体の大量発現系を構築中である。また，本研究では，昆虫細胞を用いて受容体結合活性の評価を行っているが，このモデル系では，脱皮ホルモン類の受容体結合活性を非常に簡単に，かつ再現性よく求めることができ，非常に優れた検定法で他の細胞系にも応用可能である。

1. Y. Nakagawa, K. Hattori, B. Shimizu, M. Akamatsu, H. Miyagawa and T. Ueno (1998) Quantitative structure-activity studies of insect growth regulators XIV. Three-dimensional quantitative structure-activity relationship of ecdysone agonists including dibenzoylhydrazine analogs. *Pesticide Science*, 53, 267-277.
2. G. Smagghe, Y. Nakagawa, B. Carton, A. K. Mourad, T. Fujita and L. Tirry (1999) Comparative ecdysteroid action of ring-substituted dibenzoyl-hydrazines in *Spodoptera exigua*. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 41, 42-53.
3. Y. Nakagawa, G. Smagghe, S. Kugimiya, K. Hattori, T. Ueno, L. Tirry and T. Fujita (1999) Quantitative structure-activity studies of insect growth regulators XVI. Substituent effects of dibenzoylhydrazines on the insecticidal activity to Colorado potato beetle *Leptinotarsa decemlineata*. *Pesticide Science*, 55, 909-918.
4. Y. Nakagawa, K. Hattori, C. Minakuchi, S. Kugimiya, and T. Ueno (2000) Relationships between structure and molting hormonal activity of tebufenozide, methoxyfenozide, and their analogs in cultured integument system of *Chilo suppressalis* Walker. *Steroids*, 65, 117-123
5. Y. Nakagawa, C. Minakuchi and T. Ueno. Inhibition of [3 H]ponasterone A binding by ecdysone agonists in the intact Sf-9 cell line. *Steroids*, in press.

環境の長期現象情報受容器官としての脳内光受容器の情報伝達システムの解明

針山孝彦（東北大学・大学院情報科学研究科・情報生物）

1) 目的

生物は、地球環境の影響を受ける際に、外界の変化を環境情報として利用し、適応する。環境情報のひとつである光は、色や形や動きなどと云った短期的な現象を認識するものと日長の変化に対応した休眠・変態などの制御といった長期的な現象を認識するものとに分けることができる。その長期変化を受容する器官は複眼の他に、別の器官の存在が示唆されてきたが、私は甲虫の脳内に新たな光受容器の存在を明らかにした。この光受容器官と、昆虫の変態・休眠との関係を明らかにすることにより、光の長期現象を生物がいかに認識しているかを解明することを目的とする。研究の第一段階の到達目標としては、脳内光受容器の生理学的特徴を複眼のそれと比較し長期現象における役割を検討する。第二段階としてこの光受容器が節足動物一般に存在しているかどうか形態学的に明らかにする。第三段階として昆虫脳において脳内光受容器の神経系の配行を明らかにし機能上の性質を解明することなどを短期的目標として設定した。

2) 方法と結果

上記目的を達成するために、一年間を通し、幼虫期は水中で貝を捕獲しながら過ごし、蛹期は土中に入り、時期を同じくして一斉に成虫になり空中を飛び光交信をして交尾をするというホタルを本研究の主材料として選んだ。脳内光受容器は、脳の背側後部に位置し色素細胞に囲まれている。光受容器は多くの微絨毛をもちその配行は複雑で複眼などで見られる規則性は観察されなかった。この形態学的に光受容器であると推定されていた脳内光受容器の単一細胞に微小電極を刺入し電気生理学的に光受容スペクトル感度を測定した。すると 530nm にスペクトル応答極大があり、複眼の 380nm と 560nm(ホタルの発光スペクトルに一致している)とは大きくずれていることが分かった。詳細に脳内光受容器の細胞数を、電子顕微鏡を用いて調べると少なくとも 8 個の細胞からなり、電気生理学的にこれらすべての細胞は 530nm に応答極大をもつことを明らかにした。この脳内光受容器はこれまでに調べた甲虫のほとんどの脳内に存在しているだけでなく、他の完全変態昆虫の脳にも存在していることを見出した。それだけでなくフナムシやザリガニといった甲殻類の脳にも相似器官があることを発見し、現在生理学的に明らかにしようとしている。

ホタルの脳内における光受容細胞の神経の配行を明らかにするために、微小電極内に荷電している蛍光物質を注入しておき、刺入した細胞に電気泳動的にこの蛍光物質を入れ神経を染め出した。背側後部に位置している脳内光受容器から伸びている神経は背側を通り前方に伸びていることが分かった。その方向にはリズムに関係している Per 抗体で染色される細胞群が存在しており、脳内光受容器が生体のなんらかのリズム現象と関係していることが強く示唆された。

3) 考察

鱗翅目の幼虫結紮尾部に、脳移植をすることにより光周期に依存した長期現象を誘引することができるという実験により示された、「脳に長期現象に関係する光受容部位がある」ということは 1970 年代から考えられてきた。昆虫のように情報処理系として非常に小さな脳では、入力素子としての感覚器官を目的別にして処理能力を減らす必要があると考えられる。今回明らかにした脳内光受容器は、複眼とは異なるスペクトル波長に応答極大をもち、極微弱な光にも応答する能力を持っていることが分かった。特定研究(A)公募の研究期間が終わった後の研究から、ホタルは、日長に依存して脱皮・変態を行い、同期して成虫脱皮することが分かった。土中で蛹化する

この昆虫は、この高感度の光受容器を用いて地上光の変化を受容している可能性も考えられる。

4) 計画に対する達成度の自己評価と今後の方策

貴重な一年間の公募研究をさせていただいて、その期間内に、1. 光受容器だと形態学的に考えられていた器官が、実際に生理学的に光応答を示し、そのスペクトル応答は複眼とは異なることを見出した。また、2. その光受容細胞は、複眼視細胞の光応答に比べ、約 100 倍高い感度を持っていることを示した。脳内における神経配行から、3. この光受容器は Per 抗体ポジティブ細胞群と何らかの神経連絡をもっていることなどを示すことができ、短期間の研究としては充分達成できたと考えている。その後、約 1 年半過ぎ、1. ホタルは、日長に依存して脱皮・変態を行っていること、2. 発生学的に、脳内光受容器は、幼虫側単眼が蛹化時に脳内に引きこまれて形成されるものであること、3. 最終幼虫期に、幼虫側単眼を外科的に除去し、成虫までの生存率を調べると（成虫の脳内光受容器が消失する）、片眼除去個体に比べ、両眼除去個体の方が死ぬ確率が高くなること、などが分かった。現在はこの3の現象が、外科手術によるものなのか、実際に脳内光受容器の生理学的役割の為なのかを検証している。今後も、幼虫期も成虫期も複雑な行動をしているこのホタルを用い、1. 脳内光受容器の長期現象に対する情報処理システムを、神経ネットワークのレベルまで掘り下げて解明しつつ、2. 変態という劇的な変化の中で、脳自身がどのように役割を変えていくかを生理学的レベルで解明していきたいと思っている。その方策として、現在ショウジョウバエなどで遺伝学的に調べられている、複眼原基などを例として示される新しく形成される部分でなく、脳内光受容器のように幼虫期の感覚器官や情報処理系としての脳がどれほど保存されているかということに注目し、遺伝学から行動学まで種々の手法を用いて変態前後の情報処理系の変化を明らかにする。

原著論文

T.Hariyama, A.Terakita, M.Sakayori, Y.Katsukura, K.Ozaki & Y.Tsukahara (1998) Chromophore distribution and ultraviolet visual pigment in the compound eyes of the Japanese fireflies *Luciola cruciata* and *L.lateralis* (Coleoptera, Lamphyridae). J.Comp.Physiol.183, 165-170

T.Hariyama (2000) The brain as a photoreceptor: intracerebral ocelli in the firefly. Naturwissenschaften, in press.

T.Hariyama, V.B.Meyer-Rochow, T.Kawauchi, Y.Takaku and Y.Tsukahara (2000) Diurnal changes of retinula cell sensitivities and receptive fields (Two-dimensional angular sensitivity functions) in the apposition eyes of *Ligia exotica* (Crustacea, Isopoda). Journal of experimental biology, in press.

著書

針山孝彦 (1999) 節足動物の視覚系と外界との関係比較生理生化学 16, (2) 86-97

T.W.Cronin and T.Hariyama (2000) Spectral Sensitivity in Crustacean Eyes. In Physiology of the crustacean nervous system (edited by Konrad Wiese) Springer Verlag, Heidelberg. in Press

シロアリ類のカースト分化における分子機構

松本忠夫（東京大学総合文化研究科・広域システム科学系）
三浦 徹（東京大学総合文化研究科・生命環境系）

1) 目的

多くの生物の特徴は、形態のみならず他の性質も完全に遺伝的に決定されるものではない。そして、生物は多かれ少なかれ環境に依存して、表現型を変えることができる。この性質を表現型可塑性というが、社会性昆虫といわれるグループでは、それが顕著に出て同じコロニーの中にこのような表現型の異なった個体を生じ（カースト分化）、共同生活をしている。本研究課題においては、特にシロアリにおけるカースト分化のメカニズムを解明すべく、兵隊カースト特異的に発現する遺伝子の解析を目的とした。そのために、幼若ホルモン類似体 (JHA) を用いた兵隊誘導に関する先行研究をベースにして、兵隊分化に関する分子生物学的研究をオオシロアリを材料にして進めた。また、材料をシロアリに加えて、アブラムシの研究も行った。アブラムシは複雑な生活環を持ち、有翅型・無翅型、無性世代・有性世代などの様々な表現型多型を示す非常に興味深い昆虫である。アブラムシの表現型多型のうち、最も個体発生の早い段階で現れるものは、単為生殖胚と有性生殖胚の違いである。前者は母虫の卵巣小管の中で、卵の成熟を待たずに連続的に発生が開始されるのに対し、後者は卵成熟・受精を経て胚発生が開始される。この両者の比較を目的とした研究の第一歩として、エンドウヒゲナガアブラムシ *Acyrtosiphon pisum* の単為生殖胚の初期発生を蛍光抗体法などによって、詳細に観察を行った。

2) 方法と結果

オオシロアリ *Hodotermopsis japonica* の職蟻と兵隊の頭部から mRNA を抽出・精製し、Differential Display 法を行うことで、成熟兵隊の頭部で特異的に発現されている遺伝子の同定を試みた。いくつかの兵隊特異的遺伝子候補のバンドを切り出し、配列を決定したところ、そのほとんどが新規の遺伝子であることが分かった。そのうち1つの候補では、northern hybridization で兵隊で非常に強く発現されていることが明らかとなった。さらに、これらの遺伝子の発現部位の特定、RACE 法による全長の決定を行った。さらに、得られた遺伝子断片をプローブにした *in situ* hybridization を行った結果、この遺伝子 (SOL1 と命名) は大顎腺で特異的に発現されていることが分かった (図1)。

エンドウヒゲナガアブラムシ *Acyrtosiphon pisum* の単為生殖胚の初期発生を蛍光抗体法などによって、詳細に観察を行った。25℃条件下で飼育しているエンドウヒゲナガアブラムシの単為生殖世代の成虫及び幼虫を PBS 中で解剖し、卵巣小管を摘出。4%パラホルムアルデヒド中で固定し、PBS 中で洗浄した卵巣小管中の胚に、TOTO/phalloidin による核・細胞膜の染色、抗 vasa 抗体 (生殖細胞)・抗 Dll 抗体 (菌細胞)・抗 en 抗体 (体節構造) を用いた蛍光抗体染色を施し、共焦点レーザー顕微鏡で観察を行った。その結果、生殖細胞の分化や、細胞内共生バクテリアの初期胚への感染方法、菌細胞の発生学的起源など、いくつかの新しい知見を得た。

3) 考察

本研究のオオシロアリ兵隊が特異的に発現している遺伝子がコードするタンパク質には、アミノ酸配列の N 末端側に疎水性のアミノ酸残基が集中して存在するシグナル・ペプチドが見られ、これは分泌タンパク質である可能性が示唆される。その機能はまだ分からないが、攻撃に関与する物質か、他個体に作用するフェロモンである可能性がある。

また、アブラムシの単為発生に関して、いくつかの新しい知見が明らかになった。卵巣小管先端の形成細胞巢にある保育細胞のうちの一つが排出された卵細胞は、極体の放出・同調核分裂・細胞化を経て、胚盤葉となる。その後、胚盤葉の最後端の細胞群が、包胚腔に落ち込み、生殖細胞へと分化する。その後、後極側に存在していた多核の領域に、バクテリアが感染し菌細胞を形成する。これとほぼ同時に陥入が起こり、胚条が形成され、胚条は伸張成長し、頭尾軸を形成し、肢原基を生じる。中枢神経系の成立後、胚子反転が起こり、脳・複眼・筋肉・クチクラの形成を経て、母虫体内から一齢幼虫として産み落とされる。このようにアブラムシの単為胚発生は、研究の蓄積のあるショウジョウバエのそれと非常に異なっており、また卵形成と胚発生が同時に進行しているので、非常に興味深い現象といえる。

4) 計画に対する達成度の自己評価と今後の方策

本研究から、シロアリの大顎腺特異的に発現される SOL1 遺伝子の同定に成功した。社会生物学ではカースト特異的に発現する遺伝子の存在は示唆されてはきたものの、これまで社会性昆虫のカースト特異的な遺伝子を同定した仕事はほとんどなく、特にシロアリに於いては初めての報告となった。また、最近の分子生物学的な技術がこのような研究に非常に有効な道具として利用できることを示した (Miura et al. 1999)。今後は、この遺伝子産物であるタンパク質の動態を追跡するために、大顎腺タンパクの解析・大腸菌を用いた大量発現・抗体の作成などを行う。更には、抗体を用いた免疫組織科学、精製したタンパクを用いて他個体への影響をみる機能解析などを行う方針である。また、幼若ホルモン類似体 (JHA) は兵隊カーストの分化誘導を行うが、この際の形態形成過程を追ひ、発現する遺伝子の同定を行う。

アブラムシに関しては、単位発生という現象を詳細に観察してステージングを行い、生殖細胞の分化や、共生バクテリアを含む菌細胞の発生学的起源などいくつかの新規の知見を得ることができた。今後は、生活史の中で行う有性生殖卵における胚発生を同様の方法で観察し、発生の最も初期に顕れる表現型多型のメカニズムと進化への理解を深めることを目標にしている。

代表的な発表論文 (5 編)

T. Miura, A. Kamikouchi, M. Sawata, H. Takeuchi, S. Natori, T. Kubo and T. Matsumoto (1999) Soldier caste-specific gene expression in the mandibular glands of *Hodotermopsis japonica* (Isoptera: Termopsidae). PNAS, 96, 13874-13879.

G. Tokuda, N. Lo, H. Watanabe, M. Slaytor, T. Matsumoto and H. Noda (1999) Metazoan cellulase genes from termites: intron/exon structures and sites of expression. Biochimica et Biophysica Acta,

M. Machida, O. Kitade and T. Matsumoto (2000) Uric acid storage in the Japanese damp-wood termite *Hodotermopsis japonica* (Isoptera: Termitidae). *Sociobiology*, 35, 1-8.

T. Miura and T. Matsumoto (2000) Soldier morphogenesis in a nasute termite: discovery of a disc-like structure forming a soldier nasus. *Proc. R. Soc. Lond. B*, 267, 1-5.

T. Miura, Y. Roisin and T. Matsumoto (2000) Molecular phylogeny and biogeography of the nasute termite genus *Nasutitermes* (Isoptera: Termitidae) in the Pacific tropics. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 16, in press.

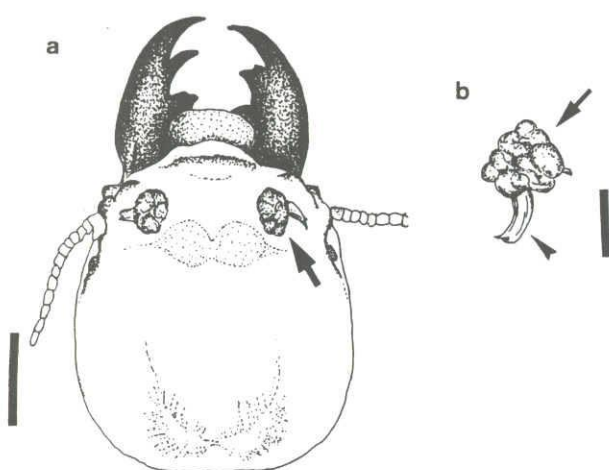


図1 オオシロアリの兵隊頭部における大顎腺
(a) 大顎腺は多くの腺房を持った一対の管状の器官であり、頭部を解剖することで容易に分かる。
(b) 大顎腺には付属腺がある。

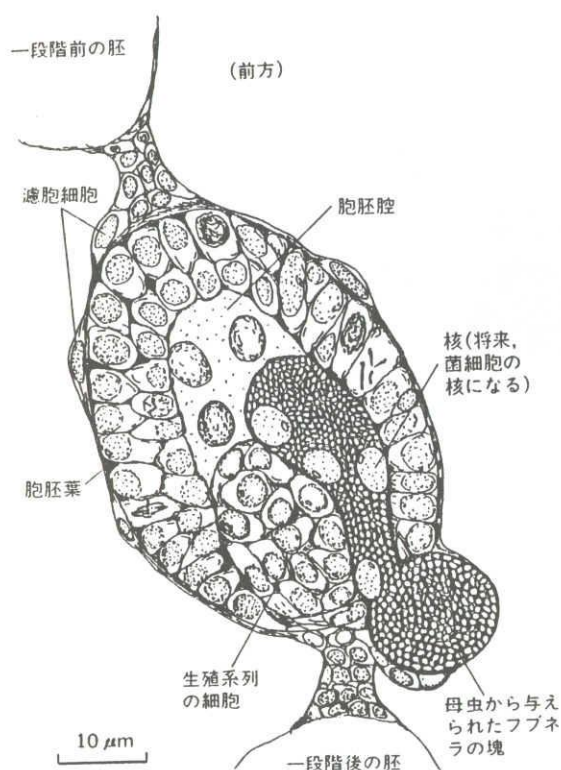


図2 アブラムシの胞胚（単為生殖虫）

胞胚の初期に胚の後部（図の下側）から生殖系列の細胞（次世代の虫をつくる）が分化し、胞胚腔へ進入する。これに引き続いて、やはり後部から母虫の菌細胞に由来するフブネラの塊が胞胚腔へ流入する。やがて、これらのフブネラを含む細胞がいくつかでき、菌細胞のもと（菌細胞原基）になる。生殖系列の細胞群と菌細胞原基は胚の形態形成には使われず、しばらく温存される。

鱗翅目昆虫の成虫翅の形を決めている機構

基礎生物学研究所発生生物学研究系 児玉隆治

J T 生命誌研究館 吉田昭広

研究成果

1) 目的

鱗翅目昆虫（チョウ・ガ）の成虫の翅と蛹化直後の蛹の翅は、異なった輪郭をもっている。例えばタテハチョウでは、成虫の翅は鋸歯状の輪郭をもっているが、蛹の翅は比較的単純でなめらかな形の輪郭をしている。このような違いをもたらすのは、変態に伴って蛹の翅が成虫の翅へと変化する過程で、蛹の翅の外縁から少し内側に成虫の翅の形をした境界線ができ、その内側では鱗粉細胞の出現などの成虫翅への分化が起こるのに対して、外側では細胞が消失するというプロセスであることが多くの鱗翅目昆虫について報告されている。この現象は、細胞死による形作りという点で、脊椎動物の四肢の指が、指間の部分の細胞死によってできる過程と類似している。

吉田（研究分担者）は、これまで鱗翅目昆虫の翅の鱗粉細胞が特有の配列をつくりながら分化していくメカニズムを研究してきた。その過程で、上述の翅周辺部分の形態形成現象が、現代的な解析を加えるにたる興味深い系であることに気づいた。一方、児玉（代表者）は、これまでに脊椎動物における単層上皮形成過程に注目して、細胞パターンの形成と個々の細胞の動的な形態変化との相関を超微形態学的手法によって解析してきた。その経験を活かして1990年から吉田と共同研究を開始し、細胞死の過程について主に形態学的な観察をおこなってきた。重点研究開始までに、(1)周辺部分の細胞は上皮としての連続性を維持しながら順次細胞死をおこし、全域の細胞死が半日から1日以内に完了すること、(2)細胞死はアポトーシスの特徴を備えていることが明らかとなっていた。

具体的目的を以下のように設定した。(1) [細胞死のプロセスをより明確に記述する] 速やかで大規模な細胞死を実現するためには、翅を構成する各細胞がどのような役割を果たしているのかという観点から、既におこなっている形態的観察に加えて、いくつかの鱗翅目の種や器官を比較検討しながら、細胞生物学的な方法による検討を加える。

(2) [細胞死をおこすべき部分はいつ決定されるか] 細胞死への運命決定のタイミングを、蛹の翅の各部分の交換移植実験や器官培養などの方法をもちいて検討する。実験に先立って、モンシロチョウを材料としてこれらの技法が適用できるように十分準備をおこなう。

2) 方法と結果

a) 退化域（蛹の翅から成虫翅への変化の過程で除去される部分）の退縮にたいして、顆粒細胞（マクロファージ）がどのような寄与をしているかを検討するため、モンシロチョウを用いて顆粒細胞の作用を阻害する実験を試みた。方法として、多量の異物を注入して食作用を飽和させる、あるいは鉄の微小粉末を取り込ませておいて、磁石によって退化域から隔離することを試みた。多量の異物（墨汁）を注入した場合に翅の発生自体が阻害されることと、鉄粉などの懸濁・注入がうまくいかず、確定的な結果は得られなかった。

b) 蛹の翅に対して実験的操作を加えやすくするために、モンシロチョウを使って培養を試みた。培養器、培養液（エクダイソンの添加量）など種々の組み合わせを試みたが、翅自体の分化が再現性よく培養環境下で実現されるにはいたらなかった。

c) 退化域の細胞の速やかな除去は、顆粒細胞が退化域に集中することによって可能になっていると考え、カイコガの蛹を用いて実際にそのような体液に流れの制限が起こっているかを検討した。蛹化後2～5日目のモンシロチョウの蛹の腹部に、生理食塩水で希釈した墨汁またはフェリチン溶液を注入し、一定時間後に固定して翅での各マーカの分布を観察した。墨汁の粒子は、退化域の細胞死がもっとも急速に進行する蛹化後4日目では、退化域だけに流入し分解期に分化域には全く見られないが、その前後では翅全体に均一に流入することがわかった。またフェリチン粒子については、退化が急速に進行する3. 5日目では、退化域の粒子数が、分化域の粒子数を大きく上回るのに対して、2. 5日目ではその差は小さいことがわかった。これらの結果から、退化域の除去が急速に進行する時期に限って、体液循環が退化域直下に制限されており、これにともなって顆粒細胞の循環もこの部分に限局していることが間接的に示された。

d) カイコガにおいて、細胞死と細胞周期の関連・翅の形成過程における翅上皮間の接着状態ならびに個々の上皮細胞の形態の変化などの検討をこころみたがまとまった結果を得るにいたらなかった。

e) アカモンドクガは、雌雄で成虫の翅の大きさが著しく異なっている。蛹の翅までは雌雄とも同じように形成されるが、成虫ではメスは痕跡程度の翅しかもたない。この原因が細胞死の領域や程度の差にあるのではないかと考え、翅での細胞死の良いモデル系になる可能性を考慮して詳しく検討した。蛹化後約2. 5日でメスの翅だけが著しい収縮を起こすことが明らかになった。収縮の様子を光学顕微鏡切片で観察したところ、雌の翅の退化域は、そのサイズがあまり変化しないままに翅全体の収縮が起こっていることがわかった。分化域の細胞が連続的に退化域に移動しながら細胞死を起こしている可能性が考えられ、細胞の標識などの詳細な実験が必要なことがわかった。

f) エリサンの蛹の触覚は、凹凸のない原基から樹枝状の突起をもつ形への変化を示す。翅での形態形成と比較するために、その形態形成過程を観察した。触覚でも多数の細胞が細胞死によって除去されていることがわかったが、DNA断片化を示す細胞の分布は、将来除去される部分とは一致せず、むしろ樹枝状に残る部分に多かった。このことは触覚の形態形成が翅でのように静的な切り抜きによるのではなく、むしろ細胞のダイナミックな並べ替えによって起きることを示唆している。

3) 考察

鱗翅目昆虫の蛹における形態形成の諸過程において、細胞死による細胞の選択的な除去が、普遍的に用いられるプロセスであることが一連の研究の結果、明らかになってきた。また、細胞死のプロセスを急速に進行させるために、顆粒細胞の集中的な循環という補助手段がとられているらしいことが分かったが、そのことがプロセスの進行速度とどのような関連をもっているかは、検討することができなかった。

アカモンドクガ、エリサンなどを用いた結果は明確な結果を出すには至らなかったが、将来有用な系となる見通しができた。アカモンドクガにおいては蛹の性によって、大規模

な細胞移動を伴う細胞死が起こっている可能性がある。性差と関連した調節機構も興味深い。またエリサンの触覚において、将来触覚として生き残る部分にむしろ細胞死が多く観察されたという結果は、これまでの翅での単純なスキームでは説明できないものであり、細胞の移動を精密に検出する手法などを開発しながら、詳細に解析することにより、新しい形態形成のプロセスが明らかになる可能性がある。

4) 計画に対する達成度の自己評価と今後の方策

所期の目的のうち、形態形成に関わる細胞死の仕組みに関しては、いろいろの材料を用いて、複数の視点から検討を加えることができた。また、今後興味深いと考えられる系について予備的な観察をすることができた。しかしながら、目的の部分の後半に挙げたような、実験発生生物学的な手法による研究は実施することができず、多くの結果が観察の段階にとどまってしまったことは、反省すべき点である。鱗翅目昆虫の蛹の翅は、外部に面していて、クチクラ層の透明度の高い種を選べば、外部からの観察や手術も比較的容易である。また、ある程度の大きさを有するの点も、手術に向いている。最近、シロオビアゲハを用いて、蛹の翅の発生過程を連続観察することを試みている。翅発生に関して重要な関連性をもつ翅脈、気管、気管小枝などのダイナミックな形成過程が、十分に観察できている。今後、このような生きた材料を連続的に観察する手法と、適当な細胞標識法を組み合わせることにより、細胞死の過程を連続観察が可能にしていきたい。これまでの静的な観察だけでは見逃していたダイナミックな局面を観察することにより、実状に即した細胞の理解が得られることと考える。

代表的発表論文

1. R. Kodama, A. Yoshida and T. Mitsui (1995) Programmed cell death at the periphery of the pupal wing of the butterfly, *Pieris rapae*. Roux's Archives of Developmental Biology, 204, 418-426.
2. A. Yoshida, M. Motoyama, A. Kosaku and K. Miyamoto (1996) Nanoprotuberance array in the transparent wing of a hawkmoth, *Cephonodes hylas*. Zoological Science, 13, 525-526.
3. E. Takayama and A. Yoshida (1997) Color pattern formation on the wing of the butterfly *Pieris rapae*. 1. Cautery induced alteration of scale color and delay of arrangement formation. Development Growth and Differentiation, 39, 23-31.
4. E. Takayama, M. Motoyama and A. Yoshida (1997) Color pattern formation on the wing of a butterfly *Pieris rapae*. 2. Color determination and scale development. Development Growth and Differentiation, 39, 485-491.
5. A. Yoshida, Y. Arita, Y. Sakamaki, K. Watanabe and R. Kodama (1998) Transformation from the pupal to adult wing in *Oidaematophorus hirosakianus* (Lepidoptera: Pterophoridae). Annals of the Entomological Society of America, 91, 892-857.

ショウジョウバエをモデルとした成虫組織の形態形成メカニズム

多羽田哲也

東京大学・分子細胞生物学研究所

研究成果

目的

変態期における形態形成メカニズムをショウジョウバエの翅形成をモデルシステムとして解明する。翅の前駆組織である成虫原基は、前部と後部の2つの発生コンパートメントから成り立っており、これが前後軸に沿ったパターン形成の最初の枠組みとなる。前後部コンパートメントの境界に発現するモルフォゲンの勾配によって、前後軸にそった位置情報が設定される。後部コンパートメントで発現するヘッジホッグは前部コンパートメントに分泌され、勾配を形成し、短距離のモルフォゲンとして機能すると同時に、長距離のモルフォゲンとして働く Dpp の発現を誘導する。翅はこの2つのモルフォゲンの作用によって形作られている。本研究は、モルフォゲンが細胞の分化を制御する機構を理解することを目指している。

方法と結果

1. Dpp シグナルに拮抗する Dad

Dpp モルフォゲンの作用メカニズムを解析するために、Dpp により発現が誘導される新しい遺伝子 *daughters against dpp(dad)* を同定した。Dad は Dpp の信号伝達因子である Mad と N 末側の Mad homology(MH) 1 domain においてほとんど相同性が認められないものの C 末側の MH2 domain において弱い相同性を持つことが分かった。*dad* 変異クローンでは Dpp のターゲット遺伝子として知られる *sal* や *omb* の転写の亢進が観察され、*dad* は Dpp に発現誘導されるものの Dpp シグナルを抑制する作用があることが解った。Dad は、Dpp 受容体により Mad がリン酸化される過程を競合阻害することにより Dpp シグナルを抑制していると考えられる。このことによって Dpp モルフォゲン勾配の活性を調節しているのであろう。

2. Dpp シグナルに拮抗する Brinker

Dpp のターゲットの探索を続けるうちに *dad* と完全に相補的な発現をする遺伝子 *brinker* を単離した。遺伝子の発現パターンから予想されるとおり *brinker* の発現は Dpp シグナルにより抑制されていた。*brinker* は既知のタンパク質に特に高いホモロジーは見られないが、核に局在することおよび転写因子の特徴を表す構造に弱い相同性があることから、転写因子をコードしていると考えられる。*brinker* の変異クローンを翅に作ると小さな翅様の構造が形成され、それは Dpp を異所的に発現させた際に見られる構造と似ていることから、Dpp のターゲット遺伝子の発現を抑制する作用があるのではないかと考えられた。しかし、その構造は高レベルの Dpp により形成されるものではなく、*brinker* は Dpp シグナルのターゲットの一部を制御するか、あるいはターゲットの抑制が不完全である

ことが示唆された。実際にターゲットであるいくつかの遺伝子の発現を調べてみると、brinker 変異クローンにおいてターゲットは異所的に発現していたもののその発現レベルは、内在の高レベルな発現に比べると低いものであった。遺伝学的な解析から brinker は Mad の下流あるいは Mad とは独立して機能することが明らかとなった。このことは Dpp モルフォゲンによるターゲットの制御が、少なくとも2つの経路を通ることを示している。1つは brinker の発現を抑えることによって間接的にターゲットの発現を活性化する機構、もう1つは brinker を経由せずにターゲットを活性化する機構である。ターゲットの高レベルの発現にはこの両者のシグナルが必要とされる。

3. Dpp モルフォゲン活性の視覚化

Dpp シグナルの活性は Dpp を発現する細胞で最も高いなだらかな勾配を描くものと考えられていた。実際に Dpp シグナルの活性を可視化するために Dpp の主要な信号伝達因子／転写因子である Mad のりん酸化状態を指標にすることを考えた。Mad は Dpp 受容体によってりん酸化されることにより活性化され核に移行し、転写因子として機能する。そこでりん酸化 Mad に特異的な抗体で組織染色を試みると、翅成虫原基における染色パターンは予想外のものであった。Dpp を発現している細胞の周囲にシグナルが検出されるものの Dpp を発現している細胞自身においてはシグナルは非常に低くなっている。また、周囲の細胞におけるシグナルは予想通り勾配を形成しているが、ターゲット遺伝子の発現を考えると、それは期待されたものよりも勾配が急であるように思われる。その勾配は後部コンパートメントにおいてより急であることがみてとれる。いくつかの実験により Hh がりん酸化 Mad のレベル (Dpp シグナル) を抑制していることがわかった (下図)。このことから、Hh には Dpp を誘導すると同時に、同じ細胞において Mad のりん酸化を抑える働きがあることが明らかになった。抑制メカニズムを調べた結果、Hh は Dpp シグナルの主な受容体である tkv の発現を抑えることによって、Dpp 発現細胞における Dpp シグナルを抑制していることがわかった。後部コンパートメントの Tkv レベルが前部のそれより高いことが、りん酸化 Mad の勾配が両コンパートメントで異なることも説明する。Hh による Dpp シグナルの抑制には2つの意味があると思われる。1つは Dpp シグナルを抑制することによって、そこでパターン形成を行う Hh シグナルと干渉しないようにすること、もう1つは Tkv レベルを下げて、より多くの Dpp 分子の拡散に寄与していると考えられる。この抑制が将来翅になる部分に限られていることも、この考えを支持するものである。つまり、器官として最大の面積を持つ翅においてはより遠くまで Dpp が運ばれる必要があるからである。

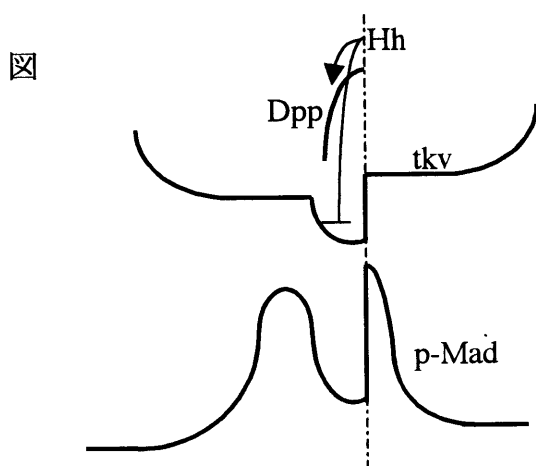
考察

以上のようにモルフォゲンは自身の分布や、活性を制御する分子を自身の転写ターゲットとすることで、巧妙な制御機構を作っている。その共通メカニズムは自身の受容体の発現を制御することである。モルフォゲン分子の細胞外での移動に関わる分子の報告も相次いでいる。モルフォゲンが単なる拡散によって釣り鐘型の濃度勾配を作り、ターゲットの遺伝子がそれに一次的に応答するという考えはもはや単純に過ぎるようである。モルフォゲンという分泌タンパク質の濃度勾配という不安定なものを唯一の手がかりとする以上、

様々なフィードバック制御を含む精緻なメカニズムが必要になることは自然なことであろう。

達成度の自己評価と今後の方策

モルフォゲンの活性を調節するメカニズムのいくつかを解明しえたことは評価に値すると思っている。細胞がシグナルのレベルをどのように識別し、分化、増殖に結びつけているか、という問いに対する解は得られていないので、今後の大きな課題といえる。



Hh は受容体 Tkv の発現を抑えることによって Dpp シグナル（リン酸化 Mad）のレベルを抑制する。

発表論文

K. Tsuneizumi, T. Nakayama, Y. Kamoshida, T.B. Kornberg, J. L. Christian and T. Tabata (1997) *Daughters against dpp* modulates *dpp* organizing activity in *Drosophila* wing development. *Nature*, 389, 627-631.

H. Inoue, T. Imamura, Y. Ishidou, M. Takase, Y. Udagawa, Y. Oka, K. Tsuneizumi, T. Tabata, K. Miyazono, M. Kawabata (1998) Interplay of signal mediators of decapentaplegic (Dpp): molecular characterization of mothers against dpp, Medea, and daughters against dpp. *Molecular Biology of the Cell*, 9, 2145-2156.

M. Minami, N. Kinoshita, Y. Kamoshida, H. Tanimoto, T. Tabata (1999) brinker is a target of Dpp in *Drosophila* that negatively regulates Dpp-dependent genes. *Nature*, 398, 242-246.

H. Tanimoto, S. Itoh, P. ten Dijke, T. Tabata (2000) Hedgehog creates a gradient of Dpp activity in *Drosophila* wing imaginal discs. *Molecular Cell*, 5, 59-71.

ショウジョウバエ神経系細胞株を用いた

変態ホルモンによる細胞死誘導機構の解析

程 久美子 (日本医大・薬理)

1. 目的

昆虫は、変態期に幼虫組織を排除し成虫組織を形成する。必要がなくなった幼虫組織は死に至るが、これはアポトーシスと呼ばれる能動的な死であると考えられている。このような細胞死の機構を解析することは、昆虫の変態の機構を解明する上で重要と考える。ショウジョウバエにおける細胞死は胚発生期、さらに中枢神経系においては変態期、羽化直後に起こることが報告されている。これらの細胞死は変態ホルモンである ecdysteroid の生体内濃度の変化と、発現している ecdysone 受容体のタイプが深く関わっている可能性が示唆されている。変態期の中枢神経系においては、ecdysteroid 濃度がほぼ完全に低下した時期に EcR-A 受容体を強く発現している細胞で細胞死が起こることが示されている (Robinow, et.al., 1993)。

一方、ショウジョウバエにおいては突然変異系統の解析から、*reaper*, *hid* (*head involution defective*), *grim* という細胞死を誘導する遺伝子が単離されている (White, et.al., 1994; Grether, et.al., 1995; Chen, et.al., 1996) が、これらの遺伝子の発現がどのように制御されているかはまだ明らかではない。

本研究は、既存の胚由来細胞株と私達が樹立したショウジョウバエ神経系細胞株をモデル系として用い、昆虫の変態期における細胞死の機構を解析することを目的とし、ecdysteroid が細胞死誘導遺伝子の発現を制御しているか、またどのタイプの ecdysone 受容体が細胞死に関与しているかを解析する。

2. 方法と結果

材料と方法

(1) 3種のショウジョウバエ培養細胞株 (胚由来細胞株: S2、幼虫中枢神経系由来細胞株: BG2-c2, BG3-c2) を用いた。S2 は非神経細胞の性質を示し、20-hydroxyecdysone (HE) 反応性から BG2-c2 は幼虫型、BG3-c2 は成虫型神経細胞の性質を示す。

(2) 細胞死は、trypan blue による死細胞染色法、およびアポトーシス実行 protease である caspase-3 活性の測定によって検出した。

(3) 細胞死誘導遺伝子 (*reaper*, *hid*, *grim*) の発現は Northern blot 法、Ecdysone 受容体 (EcR-A, EcR-B) の発現は Northern blot 法または RT-PCR 法によって検出した。

結果

(1) 20-HE を加えると、胚由来細胞株 S2 において、caspase-3 活性の上昇を伴うアポトーシスと考えられる細胞死が誘導された。この時、細胞死誘導遺伝子のうち、*reaper* と *hid* の発現が強く誘導された。さらに、ecdysone 受容体のうち、EcR-A の発現も誘導された[図]。

(2) 幼虫型神経細胞株 BG2-c2 では 20-HE を加えても、アポトーシスは誘導されなかった。

この時、EcR-A と *reaper* の発現は誘導されたが、*hid* の発現は一過性に上昇した後、変化しなかった。20-HE を除去することによって、EcR-A の発現量はさらに上昇し、*hid* の発現が誘導され、アポトーシスが起った[図]。

(3) 成虫型神経細胞株 BG3-c2 においては、20-HE を加えても、除いてもアポトーシスは起らなかった。20-HE を加えると *reaper* が誘導され、*hid* は強く抑制された。この時、EcR の発現はほとんど変化しなかったが、20-HE を除くと EcR-A の発現量が上昇し、*hid* が誘導された[図]。

3. 考察

20-HE は、少なくとも細胞死誘導遺伝子のうち *reaper*, *hid* の発現を制御する作用があることが明らかとなった。調べた3つの細胞株においては20-HEは*grim*の発現には影響を与えなかった。

S2細胞は20-HEを加えた時に、BG2-c2細胞は20-HEを加えた後、除去した時にアポトーシスが誘導されたが、いずれの場合も、死に至る時点においては、細胞死誘導遺伝子 *reaper* と *hid* 両者の発現量が顕著に上昇した。BG2-c2 および BG3-c2 細胞では、20-HE を加えた時に *reaper* のみの発現が誘導されたが、アポトーシスは起らなかった。従って、20-HE によるアポトーシス誘導には、*reaper* と *hid* の両者が必要である可能性が示唆された。

S2, BG2-c2 細胞においてアポトーシスが起る時には、EcR-A の発現量が上昇した。特に、BG2-c2 細胞では、20-HE を加えても、その後除去しても EcR-A の発現が誘導され続けた。このことは、変態期の中樞神経系において EcR-A 発現細胞で細胞死が起こるという報告と一致している。

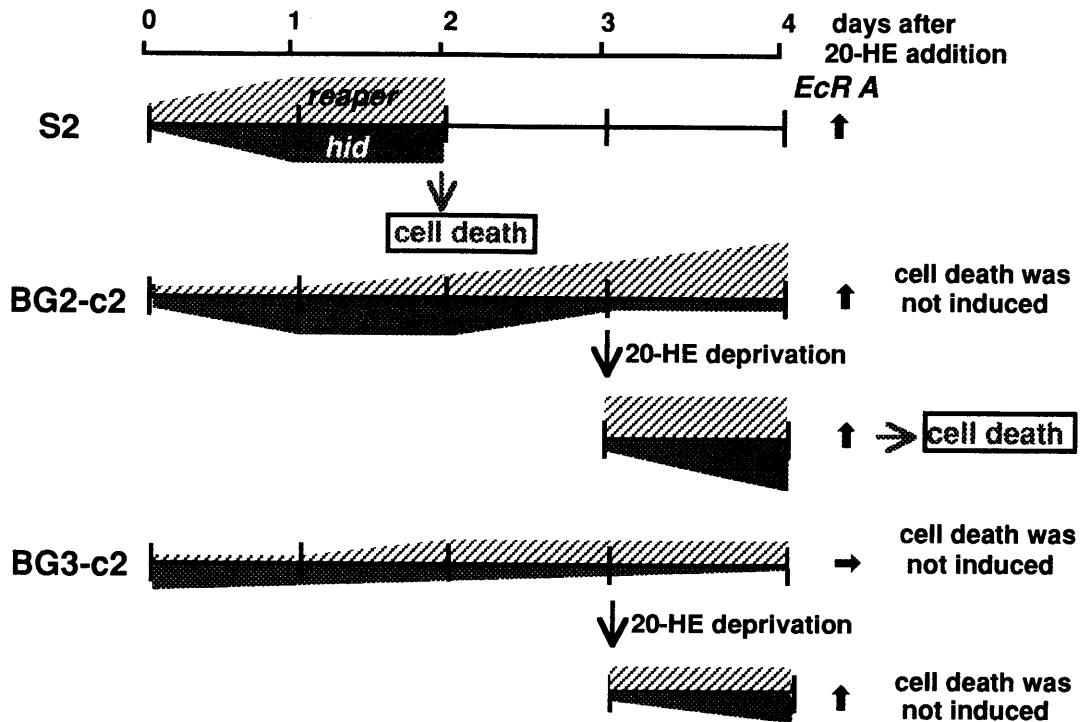
4. 計画に対する達成度の自己評価と今後の方策

ショウジョウバエの細胞死誘導遺伝子 *reaper*, *hid*, *grim* の発現がどのように制御されているかはまだ報告されていない。本研究により、少なくとも *reaper*, *hid* の発現は、20-HE によって制御されることが明らかとなった。このことは、変態期における細胞死誘導機構において、細胞死誘導遺伝子が関与している可能性が強く、それらの発現は変態ホルモンによって制御されるという新しい知見を得たことになり、この点においては、当初の目的の一部を達成したと考えている。しかしながら、*reaper* と *hid* の機能的な違いはわかっていないため、なぜ 20-HE による細胞死において両者が共に誘導されるのかは明らかでない。私達は各々の遺伝子を導入した安定形質発現細胞株をすでに作製しているので、これらを用いて、アポトーシスに至る下流の経路を解析したいと考えている。

変態ホルモンによる細胞死誘導に関わる ecdysone 受容体タイプの同定については、細胞死がおこる時点では EcR-A の強い発現があることはわかったが、どの受容体がどの細胞死誘導遺伝子の発現を誘導または抑制するかという直接的な受容体タイプの関与は解析できなかった。この理由は、それぞれのタイプの受容体の機能を個別に解析する効率的な手法がなかったためである。私たちは double stranded-RNA interference (RNAi) という新しい手法を導入し、この手法がショウジョウバエ培養細胞において、非常に有効であるという結果を得ている。そこで、この手法を用いて、3種の細胞株において、それぞれの受容体を機能的にノックアウトすることを試みており、S2細胞においては、EcR-A のノック

アウトにより、caspase-3 活性が上昇し、EcR-B のノックアウトにより caspase-3 活性が抑制されるという結果を得ているので、今後は、それぞれの受容体タイプによる細胞死誘導遺伝子の発現制御が解析できる可能性があると考えている。

[図] 20-hydroxyecdysone による細胞死の制御



発表論文

(原著論文)

M. Nagano, H. Suzuki, K. Ui-Tei, T. Miyake and Y. Miyata (1998) H-7-induced apoptosis in the cells of a *Drosophila* neuronal cell line through affecting unidentified H-7-sensitive substance(s). *Neurosci. Res.*, 31, 113-121.

A. Sato, T. Kojima, K. Ui-Tei, Y. Miyata and K. Saigo (1999) Dfrizzled-3, a new *Drosophila* Wnt receptor, acting as an attenuator of Wingless signaling in *wingless* hypomorphic mutants. *Development*, 126, 4421-4430.

Y. Takagi, K. Ui-Tei and S. Hirohashi (2000) Adhesion-dependent tyrosine phosphorylation of Enabled in *Drosophila* neuronal cell line. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 270, 482-487.

K. Ui-Tei, M. Nagano, S. Sato and Y. Miyata (2000) Calmodulin-dependent and -independent apoptosis in cells of a *Drosophila* neuronal cell line. *Apoptosis*, 5, 133-140.

(著書)

程久美子 (1997) 昆虫の神経細胞：ショウジョウバエの神経細胞株樹立法. ニューロサイエンスラボマニュアル I 「神経細胞培養法」 (畠中寛 編)、212-219.

変態に伴うコオロギ概日リズムの位相逆転の神経・内分泌機構

富岡憲治 (山口大学理学部)

研究成果

1) 目的:

昆虫は変態に伴い、行動も変化する。これは、変態に伴う神経系内の神経回路が新しく作られることを意味している。不完全変態昆虫である直翅目フタホシコオロギでは、行動の概日リズムが幼虫期には昼行性であるが、成虫脱皮後約1週間のうちに、夜行性に逆転する。この行動変化は極めて明瞭で、雌雄を問わずすべての個体で見られる。概日リズムを造り出す概日時計は脳の一部である視葉に存在しており、その動きは視葉遠心性ニューロン群の電気活動を指標として連続的にモニターすることができる。その視葉ニューロン群の活動は幼虫、成虫ともに、夜にピークをもつリズムを示すことから、時計それ自身の性質は変態によっては殆ど変化せず、時計と活動を引き起こす中枢とが構成する神経回路が組み変わることが、リズムの位相逆転の原因と考えられる。これらの背景の下に、本研究では、①脱皮による成虫化にともなうリズムの昼行性から夜行性への位相逆転が、どのような神経回路の組み換えによって生ずるのかを明らかにすること、また、②その神経回路組み換えに対するエクダイソンや JH の生理作用を明らかにすることを目的とした。

2) 方法と結果:

a) 神経系の形態学的変化の解析: 実験動物にはフタホシコオロギ(*Gryllus bimaculatus*)雄を用いた。bromo-deoxyuridin (BrDU)を用いた分裂細胞標識による解析では、各脱皮により増加する細胞群は、視葉では視葉板と視髄の間、脳ではキノコ体部分に集中している。その他に脳では広い領域にわたって分裂する細胞が散在していた。しかし、細胞の増殖数は若齢幼虫では多いが、令を経るに従って減少し、成虫脱皮後はわずかに8令脱皮後の増加の約30%にすぎなかった。

概日リズムを造り出す概日時計は脳の一部である視葉に存在している。そこで、ニッケルのバックフィルにより、その出力ニューロンの脳内投射領域を調べたところ、投射領域それ自体には幼虫と成虫とで大差は無いが、成虫では領域内での分枝数が特に脳中央部付近で著しく発達することがわかった。さらに、電位感受性色素を用いた光学的測定法により、視葉の内キアズマ部分を電気刺激して脳内の応答領域を解析したところ、幼虫では前大脳中央腹側付近が興奮性の応答を示すのに対して、成虫では抑制性の応答を示すこと、さらに、前大脳背側部では幼虫の抑制性応答に対して、成虫では興奮性となることが明らかとなった。

これらの結果は、リズム逆転が新たなニューロングループの分化によって引き起こされるものではなく、既に分化しているニューロンが、成虫脱皮後新たな回路を形成するか、既に存在する神経回路の機能的修飾ことによって引き起こされる可能性を示唆している。

b) 生体アミン類の関与: リズム逆転に関与する神経回路を検討するため、幼虫と成虫での脳内アミン量の比較を行った。脳内アミン量の測定には、高速液体クロマトグラフィー(HPLC)に接続した電気化学検出器(ECD)を用いた。その結果、脳内セロトニン量は、8令幼虫期には6 pmol/mg であるが、成虫脱皮後リズム逆転を完了するまでの間に急激に増加し、幼虫期の約2倍に達することがわかった(図1)。そこで、脳内セロトニン量の増

加とリズム逆転との関係を明らかにするため、5,7-dihydroxytryptamine (5,7-DHT)によるセロトニン性ニューロンの選択的阻害と p-chlorophenylalanine (p-CPA) によるセロトニンの合成阻害とを試みた。5,7-DHT の脳内投与では脳内セロトニン量が約 30%減少し、多くの個体で幼虫期の昼の活動が著しく増加し、この明期の高活動性は成虫期を通じて維持された(図 2)。また、リズム逆転が生じた個体でも、逆転までに要する日数が、リンガー液を投与した対照と較べて長くなる傾向があった。一方、p-CPA の成虫での経口投与では脳内セロトニン量が対照の 20%以下にまで減少し、夜行性から昼行性へ活動性が逆転することも観察された。ドーパミンも成虫化に際して増加するが、ドーパミン生合成阻害剤 3-iodo-tylosin の投与では、脳内ドーパミン量が劇的に減少したにも関わらず活動リズムは正常な時間経過で逆転した。

c) 内分泌系の関与：この成虫化に伴うリズム逆転への JH や ecdysone の関与を調べるために、アラタ体の切除・移植や ecdysone の投与などの活動リズムへの影響について解析した。7 令・8 令時でのアラタ体の切除では、幼虫期が若干延びるもののほぼ正常な発生を遂げ、成虫脱皮後リズム逆転もほぼ正常な時間経過で生じた。正常雌成虫から摘出したアラタ体 2～3 対を 8 令腹部へ移植した場合も、移植個体はほぼ正常な時間経過で夜行性リズムへと変化した。8 令幼虫脱皮直後に ecdysone (5 µg) を投与した場合も幼虫期が延長したが、成虫脱皮後リズム逆転が生じた。この場合には幼虫期に夜間の活動がやや増加したものや、成虫脱皮後リズム逆転が生じるまでの日数が延長したものが現れた。

3) 考察

不完全変態の昆虫では形態学的にはそれほど劇的な変化は生じないが、このコオロギの場合のように成虫化とともに行動レベルで劇的な変化を遂げる場合が多い。今回の生理学的・形態学的解析の結果は、不完全変態の昆虫では成虫化に伴うニューロンの新たな分化よりも、既に形成されている回路が機能的に変化あるいは修飾されることにより、新たな出力パターンの形成を行うようになるらしいことを示すものである。

本研究では、セロトニン量がリズム逆転と軌を一にして増加すること、セロトニンの減少により成虫化に伴うリズム逆転後も昼行性成分が強くなり、逆に夜行性成分が弱くなることが示され、セロトニン系が明期の活動を抑制し、暗期の活動を増加させることにより、リズム逆転を引き起こす可能性が示唆された。成虫の活動リズムは温度を 20℃にすると夜行性から昼行性に変化するが、20℃では脳内セロトニンレベルが有意に低下すること、セロトニンのリズム逆転への関与を強く示唆する。セロトニン性ニューロンは視葉ニューロンの脳内投射部位である脳側方部や中心体に広く分布しており、温度実験の結果はセロトニン性ニューロンの機能的変化が、リズム逆転に深く関与することを示唆している。

一方、昆虫の変態は JH や ecdysone によって制御されているが、今回の実験から後胚発生後期でこれら内分泌系を攪乱しても、脱皮後のリズムは幼虫では昼行性、成虫では夜行性となることが示された。この結果は、活動リズムを形成する神経回路の機能は少なくとも各令期の 1 つ前の令期には既に運命づけられていることを示唆している。

4) 計画に対する達成度の自己評価と今後の方策

本研究では、①脱皮による成虫化にともなうリズムの昼行性から夜行性への位相逆転が、どのような神経回路の組み換えによって生ずるのかを明らかにすること、また、②その神経回路組み換えに対するエクダイソンや JH の生理作用を明らかにすることを目的とした。

①に関しては、成虫化に伴うニューロンの新たな分化よりも、既に形成されている時計から活動駆動部へ至る回路内の、セロトニン性ニューロンの機能的変化が重要であることを明らかとし、②に関しては、JH、エクダイソンはこの回路の修飾に直接には関与せず、個体発生の制御を通して間接的に作用することが示唆する結果を得、大筋では目標を達成できたと考えている。今後は、JH、エクダイソンを個体発生のいろいろな時期に投与するなどして、いつ、どのようにしてこの回路の機能修飾が決定されるのかを検討する必要がある。

5) 図とその説明

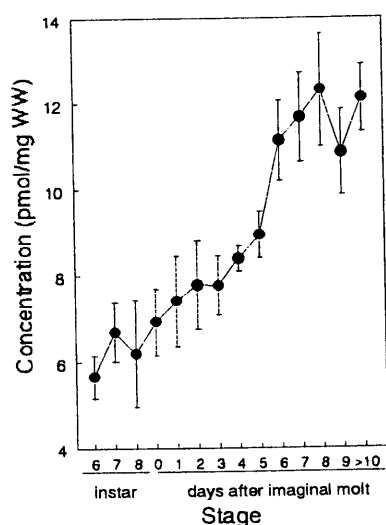


図 1. 脳内セロトニン量の成虫脱皮前後の変化。A: 成虫脱皮後、セロトニン量は日数の経過とともに徐々に増加し、リズム逆転後は幼虫の約 2 倍に達した。

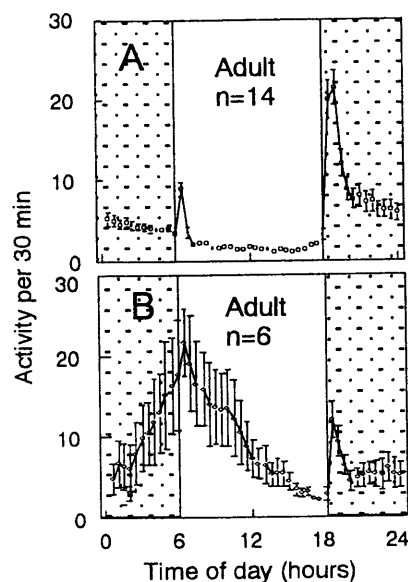


図 2. セロトニン性ニューロンに対する特異的神経毒 (5,7-DHT) の活動リズムへの影響。A: リズム逆転後の典型的な夜行性活動リズム。B: 5,7-DHT によりセロトニン量を低下させると、夜間の活動が減少し、昼の活動が増加する。図の斜線部は夜 (暗期: 18 時~6 時) を示す。

代表的な発表論文

- K. Tomioka (1998) The optic lobe: a component of the circadian timekeeping mechanism in insects. *Trends in Comparative Biochemistry and Physiology*, 5, 161-169.
- M. Germ and K. Tomioka (1998) Effects of 5,7-DHT injection into the optic lobe on the circadian locomotor rhythm in the cricket, *Gryllus bimaculatus*. *Zoological Science*, 15, 317-322.
- K. Tomioka (1999) Light and serotonin phase shifts the optic lobe circadian pacemaker in vitro in the cricket *Gryllus bimaculatus*. *Journal of Comparative Physiology A* 185, 437-444.
- K. Tomioka (2000) Protein synthesis is a required process for the optic lobe circadian clock in the cricket *Gryllus bimaculatus*. *Journal of Insect Physiology*, 46, 281-287.
- I. Nishinokubi and K. Tomioka (2000) Analysis of the mechanism underlying the rhythm reversal from diurnal to nocturnal in the cricket *Gryllus bimaculatus*, with special reference to the role of serotonin. *Zoological Science*, in press.

昆虫成虫器官特異性の決定機構

倉田 祥一郎 (東北大学 大学院 薬学研究科)

1) 目的

100万種を越えると言われる昆虫は、驚くべき多様性を示している。この多様性は、昆虫がその生活環に「変態」と「休眠」を取り入れることで獲得できたと考えられる。変態時に、それぞれの成虫器官の特異性（アイデンティティー）がどのようにして決定されるのかという問題を明らかにすることは、昆虫変態の分子機構あるいは器官発生の分子機構の一端を解明すると共に、昆虫の多様性がどのようにして獲得されたかという生物進化の問題を考える際にも重要である。

完全変態昆虫であるショウジョウバエは、変態時に新たに成虫構造を形作る。この成虫構造の基となる細胞集団が成虫原基である。この成虫原基は、すでに幼虫の体内に存在しており、その原基特異的なアイデンティティーは決定されている。例えば、複眼は複眼原基から生じ、通常、他の翅原基や肢原基などから生ずることはない。近年、この原基特異的なアイデンティティーの決定に、重要な役割を担う遺伝子が同定されてきた。例えば、複眼の決定に関わる遺伝子が *eyeless (ey)* である。*ey* は成虫原基の中では複眼原基で特異的に発現しており、その発現がない変異体では複眼ができない。逆に、この遺伝子を異所的に他の原基で発現させると、その原基から複眼が生ずる。したがって、*ey* 遺伝子発現の有無が複眼の器官決定に極めて重要である。同様に、*vestigial (vg)* は翅の決定に、*Distal-less (Dll)* は触角と肢の決定に関わる。

これらの遺伝子は、器官形成をより上位で支配するマスターコントロール遺伝子と捉えることが出来る。器官特異性の決定機構を明らかにするためには、これらのマスターコントロール遺伝子の発現がどのように制御されているのか明らかにする必要がある。これまでに、これらのマスターコントロール遺伝子 (*ey*, *vg*, *Dll*) の発現を Notch シグナリングが共通に制御していることを明らかにした。そこで本研究では、ショウジョウバエの主要な成虫器官である複眼、触角、翅、肢の特異性が決定される分子機構を明らかにするために、この Notch シグナリングを中心とした器官決定の共通機構からどのようにしてそれぞれの器官特異性が発現するのか解析した。

2) 方法と結果

複眼と触角の特異性決定機構

これまでに、Notch シグナリングが状況に応じて主要な成虫器官である複眼、触角、翅、肢の特異性を決定していることを明らかにしている。たとえば、複眼原基と触角原基の一部で、Notch シグナリングを活性化すると新たに *ey* の発現が誘導され、本来の複眼に加えて2番目の複眼が誘導される。その Notch シグナリングを活性化する際に、*ey* が発現できない状況にすると、複眼原基で *Dll* が発現し、複眼が触角に変換する。この結果は、複眼原基では、*ey* が *Dll* の発現を抑制していることを示唆している。そこで、触角原基で発現している *Dll* の発現を *ey* が抑制するかどうか、触角原基で *ey* を異所的に発現させて調べた。その結果、*ey* の発現により *Dll* の発現が抑制されることが明らかとなった。一方、触角原基では *ey* の発現が抑制されているために、*Dll* の発現が維持さ

れることが考えられる。実際、触角原基で発現し Dll と共に働き、触角の決定に重要な Extradenticle (Exd) を複眼原基で発現させると、ey の発現が抑制され、複眼が形成されない。したがって、複眼と触角の特異性が決定される機構として、次のようなことが考えられる。Notch シグナリングは、複眼原基と触角原基の二つの原基において同じように ey と Dll の発現を誘導する。ところが、複眼原基では、ey が Dll の発現を抑制し、ey の発現だけが維持される。その結果、複眼としてのアイデンティティーが確立される。一方、触角原基では、Exd などにより ey の発現が抑制され、その結果、ey が Dll を抑制しないために Dll の発現が維持され、触角としてのアイデンティティーが確立する。

このモデルに従うならば、ey が発現しない突然変異体では、複眼原基において ey が Dll を抑制しないために Dll の発現が誘導されて複眼が触角に変換することが予想される。しかしながら、その変異体では複眼が触角に変換することではなく、複眼原基で細胞死が誘導されていた。そこで、カスパーゼを阻害して細胞死を抑制する p35 をその突然変異体で発現し細胞死を抑制した。その結果、ey が発現しない突然変異体で細胞死を抑制すると、複眼原基で Dll の発現が誘導されて複眼が触角に変換した。

これらの結果は、複眼と触角のアイデンティティーが決まる際には、アイデンティティーの決定に重要な役割を果たす遺伝子同士の相互抑制が、器官の特異性の決定には重要であることを示唆している。さらに、正しい器官特異性が獲得されなかった場合には細胞死を誘導する機構が存在していることも同時に示唆している。

翅と肢の特異性決定機構

一つの共通な機構から器官の特異性が発現するもう一つの機構として、ホメオティック遺伝子による位置情報の付加が考えられる。Notch シグナリングを複眼原基で活性化する際に、Antennapedia (Antp) を同時に発現させると、複眼が胸から生ずる翅と肢に変換する。この Antp は胸となる領域で発現するホメオティック遺伝子である。

そこで、翅と肢を誘導する際に、Antp 蛋白のどの領域が必要であるか調べるために、様々な変異型 Antp 蛋白を発現させて検討した。その結果、まず、翅と肢のどちらの誘導にも Antp 蛋白の DNA 結合に関わるホメオドメインが必須であることが明らかとなった。この結果は、翅と肢の誘導に対して Antp は転写因子として働いていることを示している。そこで次に、Antp による転写の活性化が必要であるのか、それとも転写の抑制が必要であるのか明らかにするために、転写抑制に働く engrailed の転写抑制ドメインと Antp 蛋白とのキメラ蛋白を発現させた。その結果、翅と肢のどちらの誘導に対しても Antp による転写の活性化が必要であることが明らかとなった。さらに、翅の誘導には、Antp 蛋白の 4 種類のアミノ酸からなる YPWM モチーフが必要であるのに対して、肢の誘導には必要でないことがわかった。この結果は、Antp が翅と肢の特異性を決定する際、それぞれ個別に機能ドメインを使い分けて、それらの決定に関わることを示している。そして、翅のアイデンティティーの決定に、YPWM モチーフに結合して、ホメオティック遺伝子の co-factor として働く Exd が関与していることが考えられる。

器官決定の共通機構の普遍性

ショウジョウバエの複眼形成を上位で支配している ey 遺伝子のホモログは、脊椎動物にも存在し Pax6 と呼ばれている。この Pax6 はショウジョウバエの ey と同様に、眼

の形成に不可欠で、この遺伝子の欠損は眼の形成不全を引き起こし、マウスでは小眼症、ヒトでは無虹彩症の原因遺伝子である。R. Lung らは、アフリカツメガエルを用いて Pax6 の過剰発現により異所的な眼が誘導されることを示し、我々は Pax6 同様 ey の過剰発現によりアフリカツメガエルにおいても異所的な眼の形成を誘導できることを明らかにしている。これらの結果は、ey と Pax6 は構造だけでなく、機能的にも相補的であり、無脊椎動物と脊椎動物の間で眼の形成過程が保存されていることを示している。

ショウジョウバエで明らかにした異なる器官の特異性決定を共通に制御している機構が、脊椎動物の器官形成時にも存在しているのか検討するために、ショウジョウバエの ey と同様に脊椎動物の Pax6 遺伝子の発現も Notch シグナリングを中心とした共通機構により制御されているのかどうか検討した。そのために、アフリカツメガエルの胚で人為的に Notch シグナリングを活性化した。その結果、Notch シグナリングの活性化により異所的な Pax6 の発現が誘導された。さらに、ショウジョウバエと同じように、本来の眼に加えて、第二の眼が誘導された。この結果は、ey と同様に Pax6 の発現も Notch シグナリングを中心とした共通機構により制御されていることを示唆している。

3) 考察

今回、ショウジョウバエの主要な成虫器官である複眼、触角、翅そして肢のすべてにおいて、それらの器官形成を上位で支配するマスターコントロール遺伝子の発現は、Notch シグナリングにより共通に、しかも、その細胞で発現している遺伝子の状況に応じて制御されていること、そしてその共通機構から特異性が発現する機構について明らかにできた。ショウジョウバエが異なる器官を形成するのに、一つの共通な機構を使用していることの生物学的意義を考えると、進化の過程で、眼も触角も肢も翅も持たない祖先生物が、すでに Notch シグナリングにより形態形成を制御する基本機構を有していて、生物はこの機構をうまく利用して、そしてこの機構を少し変えながら多様な器官形成を獲得したのではないかと推測できる。もしそうであるならば、同じ祖先生物から進化したと考えられる脊椎動物も、同じような器官形成の共通機構を有している可能性が考えられる。Pax 6 の発現が ey と同じように Notch シグナリングにより制御されているという事実はこの可能性を支持している。

4) 計画に対する達成度の自己評価と今後の方策

器官の多様性が一つの共通な機構から生み出されることを示すことができたことは、本研究の大きな成果である。この成果はこれまでの概念を大きく打ち破るもので、研究計画時には予想だにできないものであった。本研究の成果として、器官改変誘導が自在にできるようになったことにより、体細胞を改変して多様な機能細胞を得て、生物の持つ様々な機能を高度に利用する新しい生命科学技術の開発が可能となった。

代表的な発表論文

S. Kurata, M. J. Go, S. Artavanis-Tsakonas, and W. J. Gehring (2000) Notch signaling and the determination of appendage identity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97, 2117-2122.

倉田祥一郎 (2000) ショウジョウバエの器官形成：Notch シグナリングと器官アイデンティティの決定. *実験医学*, 18, 1347-1352.

カイコの変態に関与する遺伝子のカタログ化

三田和英（放医研）

1) 目的： 本研究の目的は、カイコを用いて変態や脱皮時の組織から cDNA ライブラリーを作成し、その EST を決めることにより変態や脱皮に関与する遺伝子群をリストアップし、それらの遺伝子の発現様式を調べることにより、変態や脱皮に伴う成虫組織の形成機構、器官再生機構を分子生物学的に解明することである。具体的には翅原基と複眼の変態前後の cDNA カタログ化を行い、変態に伴う遺伝子発現パターンの変化を解析し、変態に関わる遺伝子を網羅する。

2) 方法と結果：

＜方法＞カイコはゲノム解析用の標準系統として確立された p50（大造）を使用した。翅原基については宇都宮大学の川崎秀樹博士の協力で5令幼虫4日目（V-4）、吐糸開始日（S0）、吐糸後2日目（S2）、吐糸後3日目（S3）の cDNA ライブラリーを調べた。cDNA ライブラリー作製は、各組織から RNA を抽出し、oligo dT をプライマーとして cDNA 合成を行い、directional cloning 法でベクターに組み込む方法をとった。各 cDNA ライブラリーから 1000 個ずつ cDNA クローンをランダムに拾い、その 5' 側から塩基配列を決定する。得られたシーケンスデータはプロティンデータベースとアミノ酸ホモロジー検索を行い、遺伝子分類を行うとともに、EST データベース内でホモロジー検索を行い、各組織・ステージ別の発現プロフィールを作製する。複眼については組織が小さく、抽出に時間がかかるので各ステージの cDNA ライブラリーを作成するのが困難なので、S0 期から P3 期までの複眼の RNA を混ぜて cDNA ライブラリーを作成し、解析には RT-PCR 法や DNA チップを使用する方法をとる。

＜結果＞翅原基の cDNA 解析：変態に伴う遺伝子発現パターンの変化を調べ、変態に関わる遺伝子を網羅するために、変態前後の4つのステージの翅原基の cDNA ライブラリーを比較した（図）。S2 期でエクジソン値が最大となり、組織分化が始まる。5令4日目（V-4）と S0 期では翅形成の遺伝子発現は見い出せず、それ以外のさまざまな遺伝子が発現している。遺伝子発現パターンは単細胞の分裂酵母や培養細胞と非常によく似ておりこの時期の翅原基は未分化細胞の特徴を示している。、その中で、5種類の修復遺伝子やいくつかのクロマチン構造形成に関わる遺伝子が見い出された。これらはこの時期に特異的に発現しており、細胞分化に伴うクロマチン構造の変化を示唆するものと思われる。エクジソン値が最大の S2 期では Urbain や ACE (angiotensin converting enzyme) の発現が特異的にみられる。ノーザン解析から ACE はエクジソンで誘発遺伝子で、early effector gene family に属することが分かった。その後、変態が進行するに従い、Tubulin, Keratin, Cuticle, Mucin などの翅形成に必須の構造遺伝子の発現が極めて活発になる。Urbain や ACE の発現とこれら構造タンパク質遺伝子の発現が少しずれていることは、エクジソンによる遺伝子活性化カスケードを示唆するものと思われる。

複眼の cDNA 解析：複眼については S0-P3 期の混合した cDNA ライブラリーを作成し、複眼組織で特異的に発現している遺伝子を中心に 30 種類の遺伝子について RT-PCR 法で各ステージの遺伝子発現プロフィールを解析した。DNA 修復遺伝子、Rad50 や MRE11 については翅原基と同様に分化直前に発現していることが分かった。ACE の発現につい

ては S2 期で強く発現していたが、複眼では極めて弱くしか発現していなかった。これに対し、EcR-B 遺伝子は複眼の S2,S3 期で強いバンドが得られたが、翅原基ではその発現はかなり少ないことが分かった。複眼で見つかった EcR-B cDNA のシーケンスをこれまで発表されている EcR-B mRNA シーケンスと比較したところ、CDS の 3ヶ所で 6-20bp の欠損が見られた。

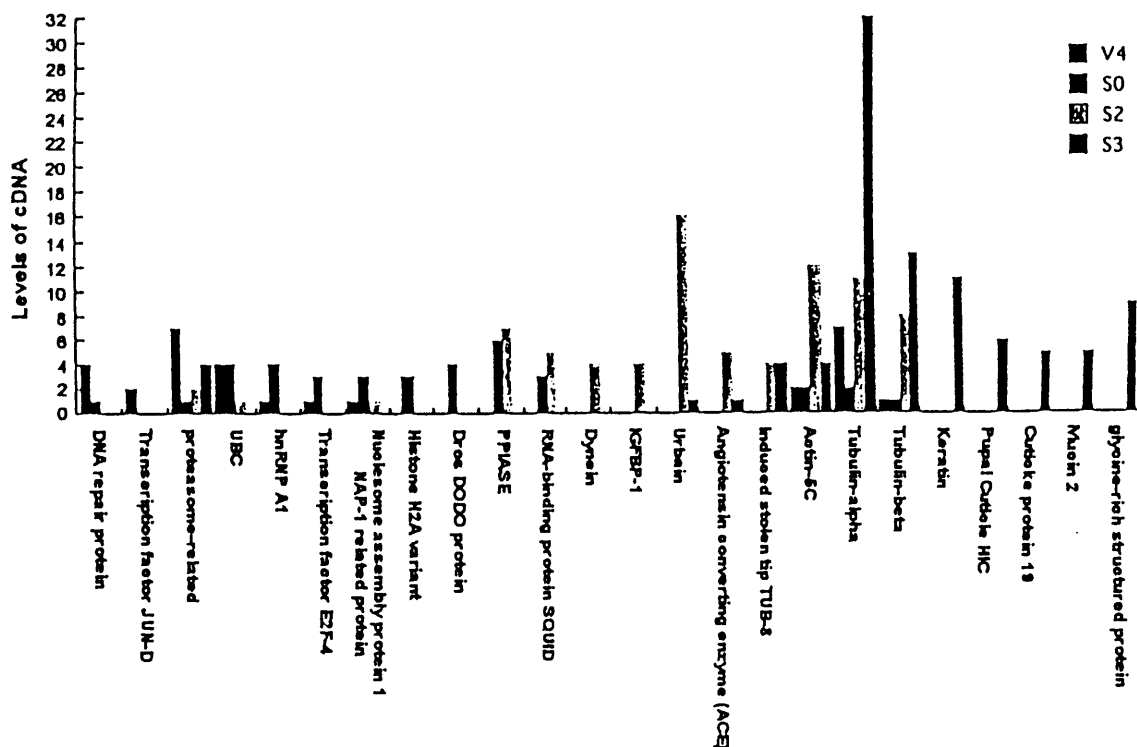
3) 考察：

- ①翅・複眼原基では組織分化直前に修復遺伝子やクロマチン構造形成に関わる遺伝子が特異的に発現し、組織分化に伴うクロマチン構造変化を示唆している。このことは分化後の急激な組織の発達のための特定遺伝子群の活発な転写を保証するために必要と考えられる。
- ②ACE はエクジソンの early effector gene であり、翅原基に主要に発現している。羽の成長に必須の遺伝子カスケードの最上流遺伝子に位置し、組織特異性を与えるものと推定される。
- ③EcR-B はシングルコピー遺伝子であるので、複眼ライブラリーで見つかった EcR-B cDNA の欠損は alternative splicing の結果であり、その産物 EcR-B が組織特異性を示している可能性がある。いくつかの組織の EcR-B mRNA を調べて、これらの欠損が組織特異的か否かを定めることが必要である。
- ④翅原基の変態事象を通してユビキチン遺伝子やユビキチン経路に関わる遺伝子の全てを同定し、その発現プロフィールを決めた。その結果、ユビキチン経路が変態過程に重要な役割を担っていることを明らかにした。Polyubiquitin gene が翅原基の変態に関与し、エクジソンでその発現が誘導されることが分かった。
- ⑤全 EST データベースから組織特異的に発現する遺伝子 111 個と constitutive expression を示す遺伝子 44 個を選び、その GC content を比較したところ、house-keeping 遺伝子の方が tissue-specific 遺伝子より 7%高いことが分かった。このことは高等動物における house-keeping 遺伝子が高 GC 領域に、組織特異的遺伝子がより AT 領域に存在するということと一致しており、高等動物での染色体モザイク構造が昆虫ゲノムでも小規模ながら存在する可能性を示唆する。

4) 計画に対する達成度の自己評価と今後の方策：

- ①カイコ EST データベース構築について：現在までに約 30 種の様々な組織・発生段階の cDNA ライブラリーを解析し、約 20,000 EST を決めた。そのうち 14,500 は DDBJ/GeneBank/EMBL に登録し公開されている。さらに全 EST データベースは 'SilkBase' と名付けて Webb 上で <http://www.ab.a.u-tokyo.ac.jp/silkbase> のサイトで公開されている。カイコ EST データベースは様々な分野の研究者に利用されている。今後カイコ EST データベースがカイコ全遺伝子の 90%をカバーするように拡充を行う。
- ②EST の DNA チップ： これまでに分類したカイコ 6,000 遺伝子を張り付けた DNA チップを作成し、これを用いて各組織の変態前後の遺伝子発現パターンの変化を調べて、組織特異的遺伝子を全てリストアップすることが本研究課題の柱の 1 つであったが、DNA チップの作成が間に合わなかった。そのため、RT-PCR 法で代用した。DNA チップは現在 6,000 遺伝子のプライマー合成が完了し、1—2ヶ月のうちに DNA チップが完成する

見通しである。DNA チップは本研究課題だけでなく、他の全ての研究に有効に利用されることは明らかであり、完成後は希望者に公開する予定である。



図：連続したステージ V4, S0, S2, S3 期の翅原基における遺伝子発現パターンの変化。縦軸は各ライブラリー中での同一クローンの数。

発表論文

S. Ichimura, K. Mita and K. Sugaya (1997) A major non-LTR retrotransposon of *Bombyx mori*, L1Bm. *J. Mol. Evol.* 45, 253-264.

K. Mita, M. Morimyo, K. Okano, T. Shimada and S. Maeda (1999) The construction of EST database for genome analysis of *Bombyx mori*. *RIKEN Review* 22, 63-67.

J. Lee, Y. Hahn, J.H. Yun, K. Mita and J.H. Chung (2000) Characterization of JDP genes, an evolutionarily conserved J domain-only protein family, from human and moths. *Biochim. Biophys. Acta*, 1447, 325-333.

T. Yoshiga, K. Okano, K. Mita, T. Shimada and S. Matsumoto (2000) cDNA cloning of acyl-CoA desaturase homologs in the silkworm, *Bombyx mori*. *Gene*, 246, 339-345.

G-X. Quan, K. Mita, K. Okano, T. Shimada, N. Ugajin, N. Goto, E. Kannke and H. Kawasaki (2000) Isolation and particular expression of ecdysteroid-inducible angiotensin-converting enzyme-related gene in wing discs of *Bombyx mori*. *Insect Mol. Biol.*, in press.

ショウジョウバエ変態時の細胞死の遺伝制御機構

谷村 禎一 九州大学大学院・理学研究院 生物科学部門

木村 賢一 北海道教育大学・岩見沢分校 生物学教室

1) 目的

完全変態性の昆虫であるショウジョウバエは、変態過程を通して形態、行動が大きく変化する。その変化に伴い、神経-筋肉系も幼虫型から成虫型へと再構築される。本研究では、変態期の細胞死に関わる遺伝子の同定を行う。ショウジョウバエでは、*reaper*, *hid*, *grim*が細胞死に関わる遺伝子として同定されており、それぞれの遺伝子産物は独立に細胞死を引き起こすことができる。しかし、変態時の細胞死にどのような遺伝子カスケードが関わっているかはわかっていない。この問題を解明する系を開発するために、これまで他の生物でその機能が明らかにされている細胞死の抑制遺伝子あるいは実行遺伝子をGAL-4/UAS異所発現系を用いてショウジョウバエの発生途上の特定の細胞群で発現させ、その機能を細胞レベルで明らかにする。

2) 方法と結果

Gal4-UAS systemは、酵母の転写因子Gal4とそのターゲット配列であるUASを用いてショウジョウバエで目的とする遺伝子の異所的な発現を誘導する系である。UAS vectorに、ヒト*bcl-2*, *ICE*, 線虫*ced-3*を組み込み、P因子形質転換法により、異なる染色体部位にベクターが挿入された系統を確立した。得られた複数のUAS系統を、種々のGAL-4系統と交配し、致死の時期、形態異常の有無を調べた。GAL-4の発現はUAS-lacZとの交配で β -ガラクトシダーゼの活性発現によりモニターした。細胞死はTUNEL法あるいはAO染色で検出した。

bcl-2

胚発生、変態時など正常発生過程で顕著な細胞死が生ずる時期にhsp promoterを用いた*bcl-2*の強制発現により、細胞死が抑制されるかを以下の系において検討した。1)胚発生後期(stage11以降) 2)3齢後期の眼原基でのcell death 3)APF (After Puparium Formation) 50hr (20℃)の眼原基。ウェスタン法で*bcl-2*タンパク質の発現は確認されたが、すべての系において正常な細胞死に対する明らかな抑制は認められなかった。さらに、変態時に細胞死を起こす特定のニューロンに対する作用も調べたが効果は認められなかった。また、UAS-*bcl-2*を種々のGAL4系統と交配し、形態異常などを調べたが効果はなかった。当時、ショウジョウバエの*bcl-2*ホモログはまだクローニングされていなかったが、種特異性の制約により効果が認められなかった可能性もある。

ced-3/ICE

交配に用いたUAS系統あるいはGAL4系統の違いによって多様な異常が認められた。*ced-3*と*ICE*は共に同様な効果が認められた。*sca-GAL4*とUAS-*ced-3/ICE*の交配のある組み合わせでは、胚致死となりPNSの形態異常が認められた。弱い発現レベルの系統との交配では成虫が得られたが、体表の剛毛が完全に欠損していた。UAS系統による異常の違いは、UAS-*ced-3/ICE*の挿入部位の位置効果による発現量の差によるものと考え

えられた。GAL4の発現と細胞死が生じる細胞群は一致していたことから、形態異常は *ced-3/ICE* の働きによると考えられる。このことは、*ced-3/ICE* による細胞死は細胞死抑制遺伝子 p35 の同時発現によって抑制されたことから支持される。ring gland で GAL4 が発現している系統との交配では、3 令以後、変態が進行しない giant larva が得られ、prothoracic gland が細胞死を起こしていることが確認された。

3) 考察

以上の結果から、ショウジョウバエの細胞死の実行にも *ced-3/ICE* と相同な遺伝子関わっていると示唆される。また、この異所的発現系を利用することによって、異常を抑制あるいは促進する突然変異体をスクリーニングすることによって、細胞死を制御している未知の遺伝子を同定し、それらの遺伝子の変態時の役割を解明することが可能であると考えられる。さらに、この系は、様々な GAL4 系統を用いることによって特定の細胞群の cell ablation 法としても利用できる。

4) 計画に対する達成度の自己評価と今後の方策

単年度の研究によって、ショウジョウバエの変態時の細胞死の研究の手がかりとなる系を確立することができた。*ced-3/ICE* の効果を抑制あるいは促進する新規の突然変異体を同定し分子レベルの解析を行うことによって変態時における細胞死の研究が進展すると期待される。2000年にショウジョウバエの全ゲノム配列が決定されたことにより、新規の遺伝子の研究は加速されると思われる。

発表論文

A. Shigenaga, K.-I. Kimura, Y. Kobayakawa, Y. Tsujimoto and T. Tanimura (1997) Cell ablation by ectopic expression of cell death genes, *ced-3* and *Ice*, in *Drosophila*. Development, Growth and Differentiation 39, 420-436.

A. Shigenaga, Y. Funahashi, K.-I. Kimura, Y. Kobayakawa, S. Kamada, Y. Tsujimoto and T. Tanimura (1997) Targeted expression of *ced-3* and *Ice* induces programmed cell death in *Drosophila*. Cell Death and Differentiation 4, 371-377.

K.-I. Kimura, A. Usui-Ishihara and K. Usui (1997) G2 arrest of cell cycle ensures a determination processes of sensory mother cell formation in *Drosophila*. Development, Genes and Evolution 207, 199-202.

T. Awasaki and K.-I. Kimura (1997) *pox-neuro* is required for development of the chemosensory bristles in *Drosophila*. Journal of Neurobiology, 32, 707-721.

木村賢一 (1998). ショウジョウバエにおけるアポトーシス. 「アポトーシスと疾患基礎編」(井川 洋二 編), 44 - 54, 医薬ジャーナル

カイコ卵への脂質の輸送と脂質代謝に関する研究

土田耕三（国立感染症研究所・放射能管理室）

1) 目的

卵細胞への脂質取り込みについて研究した。脂質やカロチノイドは、難水溶性であるためタンパクに結合しており、リポタンパク(リポホリン、Lp やビテロジェニン、Vg)として体液中を移動し、卵巣などの組織まで運搬される。しかしながら、卵細胞が体液から脂質を取り込むメカニズムについて研究した報告は少ない。本研究は、体液中の Lp から、卵細胞が脂質を取り込む際に関与する新たな物質をみつけ、特異的な脂質取り込みを可能にするメカニズムを明らかにしようとするものである。

2) 方法と結果

Vg ならびに Lp の脂質部分を放射能ラベルしておき、卵巣とともに培養し、脂質取り込み量を調べた。また、同時に Vg と Lp 本体であるタンパク部分が卵細胞内に取り込まれるかを知るために、卵胞内の Vg ならびに Lp 量の変化を調べた。Vg は卵細胞中に増え、培養液から卵細胞に移行していた。Vg が特異的に結合するリセプターとおもわれる 68KDa のタンパクを卵細胞膜分画から同定した。Lp は卵細胞に取り込まれず、培養前後においてその濃度はほとんど変化しなかった。この結果は、Vg はインターナニゼーションするのに対して、Lp は卵細胞中に入っていないことを示していた。しかしながら、Lp から脂質は確実に卵細胞内に取り込まれており、Vg とは異なる、脂質を取り込む特別な機構が存在していることがわかった。

卵胞を、抗 lipid transfer particle(LTP)IgG とともに培養してから、Lp からの脂質取り込み実験を行うと、脂質は卵細胞へ移行できなかった。また、雌蛹に抗 LTP IgG を注射すると、卵は形成されなかった。Lp は、ジアシルグリセロール (DG), リン脂質、コレステロール、ハイドロカーボン、脂肪酸やカロチノイドを運搬している。これら脂質のうちコレステロールと脂肪酸の取り込みは LTP が関与せず、拡散によって卵細胞まで移行していた。DG やカロチノイドの卵細胞へ移行は LTP によっておこなわれていた。また間接蛍光抗体法の結果は、LTP が卵細胞膜に結合して体液側に存在する像がえられた。

カロチノイドも LTP を介して卵細胞へ移行されていた。卵細胞内にはカロチノイドと特異的に結合するタンパクがあって、このタンパクの有無がカロチノイドの透過性を支配しているとおもわれた。少なくとも 4 つのカロチノイド結合タンパク (CBP) の存在を明らかにし、このうち、分子量 33,000(33K)と 41,000(41K)のタンパク 2 種類を精製した。33K と 41K は、それぞれ結合しているカロチノイドがちがっており、33K はルテイン、41K はβカロチンを結合していた。33K タンパクは、中腸、絹糸腺および卵胞においてタンパクの存在が確認され、しかもカイコの突然変異種である黄血系 Y 遺伝子をもつ系統のみで発現し、対立遺伝子である +Y 系統 (白血白繭) では見られなかった。したがって、この 33K のルテイン結合タンパクは Y 遺伝子の産物であることを明らかにした。

3) 考察

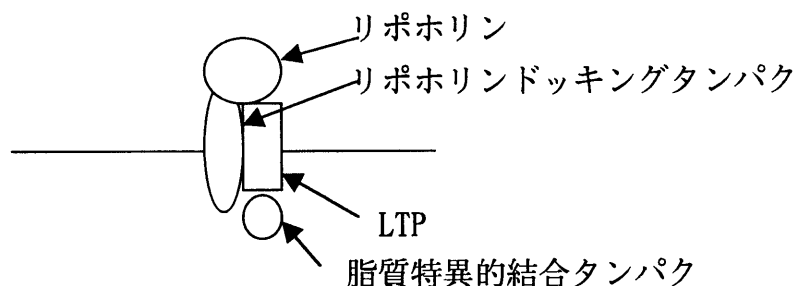
卵細胞への脂質運搬に関して、主たる2つの経路、VgとLpから、があり、Vgはリセプターを介したインターナリゼーションによって卵細胞内へ取り込まれ卵黄タンパクの主成分となるに対し、もう一方の経路であるLpは卵細胞へ取り込まれず、卵細胞の外側にあつて脂質のみを卵細胞内へ移行させる特別な機構が働いていることがわかった。卵細胞の外側には、LTPがあつて、Lpの持つ脂質を卵細胞へ受け渡す働きをしていた。カロチノイドの移行で見ると、Y遺伝子を持つ系統は、カロチノイドを特異的に結合するタンパクを細胞内に有しており、このタンパクを持たない系統(+Y)はLpからカロチノイドを受け取れないために組織が黄色にならなかった。Lpからの脂質移行にはLTPと細胞内にある脂質特異的結合タンパクが必要であることがわかった。Y遺伝子の産物である33KDaの発現は組織特異的であり、このようなタンパクの存在が、リポホリンの運んでいる脂質の中から決まった脂質が、決まった組織に取り込まれるのを可能ならしめているのではないかと考えられた。

4) 計画に対する達成度の自己評価と今後の方策

計画は3年計画であつたが予算の配分は1年のみであつたため、達成度は十分ではなかつたが、1年で行つた研究は満足できる結果が得られたと自己評価した。今後は、CBP等の遺伝子、組織特異的発現を起こすメカニズム、突然変異体の遺伝子解析等が必要と考えている。ビテロジェニンレセプターの解析も行う。

5) 最小限の図表とその説明

卵細胞への脂質輸送



卵細胞膜にはリポホリンドッキングタンパク、LTPがあつて脂質を細胞内へとりこむが細胞内にも脂質結合タンパクが必要である。

発表論文

H. Takeda, Y. Kawaguchi, T. Ohshiki, H. Maekawa and K. Tsuchida (1997) Impaired yolk protein uptake by oocytes of a *Bombyx mori* mutant. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 26, 607-616.

K. Tsuchida, J.L. Soulages, A. Moribayashi, K. Suzuki, H. Maekawa and M. A. Wells (1997) Purification and properties of a lipid transfer particle from *Bombyx mori*: comparison to the lipid transfer particle from *Manduca sexta*. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1337, 57-65.

K. Tsuchida, M. Arai, Y. Tanaka, R. Ishihara, R.O. Ryan and H. Maekawa (1998) Lipid transfer particle catalyzes transfer of carotenoids between lipophorins of *Bombyx mori*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 28, 927-934.

ショウジョウバエ変態中の中枢神経系における細胞死

辻村秀信*1、古賀裕美子 1、木村賢一 2 (1:農工大・農・発生生物、2:北海道教育大)

研究目的

多くの動物は成長過程において行動型を転換する。昆虫の変態における行動型の転換はその典型的な例である。われわれは、動物の成長過程における行動型の転換の細胞・分子機構を明らかにする目的で、昆虫の変態における行動型の転換を研究している。

完全変態昆虫においては、変態により行動が幼虫型から成虫型に劇的に変化する。おもに鱗翅目昆虫を用いた研究により、この行動転換は筋肉系と感覚器官の他に、中枢神経系の再構築により実現されることが明らかにされている。この中枢神経系の再構築においては、幼虫特異的ニューロンの選択的細胞死、成虫特異的ニューロンの細胞分化、両用ニューロンの幼虫型から成虫型への特異性の転換と神経結合の変更が起こる。これらの変化の内、細胞死は幼虫神経回路の消失に重要である。

本研究では、ショウジョウバエを用いることにより、この幼虫特異的ニューロンの選択的細胞死の調節にはたらく遺伝子と細胞・分子機構を明らかにすることができるとかんがえ、その最初の研究として、ショウジョウバエの中枢神経系で変態中に起こる細胞死を経時的に観察し、その動態と特徴を解析した。

方法と結果

0. 変態中の様々な発生段階において、ショウジョウバエの中枢神経系におこる細胞死をTUNEL法により染色して検出した。

1. 変態中のショウジョウバエの中枢神経系で起こる細胞死は、発生段階、体節・部位により異なるパターンを示した。

2. 視葉では、3令幼虫期には細胞死は少数しか観察されないが、囲蛹殻形成後 12 時間から急激に増え、囲蛹殻形成後 24 時間をピークに囲蛹殻形成後 48 時間まで多数の細胞死が観察された。囲蛹殻形成後 12 時間からの細胞死は主として視葉前面全域と、後面の背と腹の周辺部のみに見られた。囲蛹殻形成後 42 時間では視葉前面での細胞死数は減少し、一方、視葉後面での細胞死が比較的多数見られた。囲蛹殻形成後 48 時間には細胞死はほとんど見られなくなった。しかし、囲蛹殻形成後 72 時間には視葉腹側の小領域でのみ再び少数の細胞死が見られた。

3. 脳では、細胞死数は囲蛹殻形成後 12 時間から増加し、囲蛹殻形成後 24 時間をピークに囲蛹殻形成後 48 時間まで観察された。特徴的部位はなかった。

4. 食道下神経節では腹側で囲蛹殻形成後 6 時間から 36 時間まで少数の細胞死がみられた。背側では細胞死はほとんど見られなかった。また、背側では囲蛹殻形成後 42 から 48 時間と囲蛹殻形成後 72 時間に少数の特徴的細胞死がみられた。

5. 胸部神経節では、腹側および背側で囲蛹殻形成後 6 時間から 48 時間まで細胞死が見られた。

6. 腹部神経節では背側と腹側で非常に異なる細胞死パターンを示した。腹側では、細胞死は囲蛹殻形成後激増し、6 時間には鋭いピークとなり、その急速に減少しつつ囲蛹殻形成後 36 時間まで多数の細胞死がみられた。いっぽう、腹側では囲蛹殻形成後 6 時間から

48 時間まで少数の細胞死が見られた。

7. 囲蛹殻形成後 42 時間から 48 時間には脳、食道下神経節、胸部神経節、腹部神経節で、特徴的な大きな細胞の細胞死が観察された。胸部神経節と腹部神経節では、神経節背側の正中線上またはそれに近い中央部位に散在する細胞死像が観察された。食道下神経節と脳では特定の部位に観察された。

8. 囲蛹殻形成後 72 時間には食道下神経節、胸部神経節、腹部神経節の正中線上に特徴的な小細胞の死が観察された。この細胞死は囲蛹殻形成後 84 時間にも見られることもあった。

考察

0. 変態中の細胞死は 5 つの相で起こることが明らかになった (図 1)。

1. 細胞死は腹部神経節のように幼虫特異的神経の細胞死が予期される領域だけでなく、視葉のように成虫特異的ニューロンが分化する領域でも多数観察された。これは、幼虫神経回路の消失に関係する細胞死とともに、成虫神経回路形成中にも細胞死が起こることを示している。

2. 中枢神経系の部位により異なる細胞死パターンを示した。同じ腹髄でも、前後軸方向の部位により、背腹の違いにより、細胞死パターンは異なった。部位特異性を決める因子の関与が示唆される。

3. 昆虫の変態を調節するエクジステロイドの血中濃度の変化と一定の関係で起こる細胞が存在する死が存在した。エクジステロイドの関与が示唆される。すなわち、食道下神経節、胸部神経節、腹部神経節で起こる囲蛹殻形成後 6 時間から見られる細胞死は 3 令後期のエクジステロイドのピークの後にみられた。(あるいは、エクジステロイド濃度の減少に一致して見られた)。脳と視葉における囲蛹殻形成後 12 時間から急増する細胞死は、蛹期のエクジステロイドのピークに一致して起こった。食道下神経節、胸部神経節、腹部神経節でも、同じ時期に少数の細胞死が見られた。

4. 囲蛹殻形成後 42-48 時間と囲蛹殻形成後 72 時間には特徴的な細胞死が観察された。エクジステロイド以外に細胞死の時期を決める因子、たとえば、細胞間相互作用などの存在が示唆される。

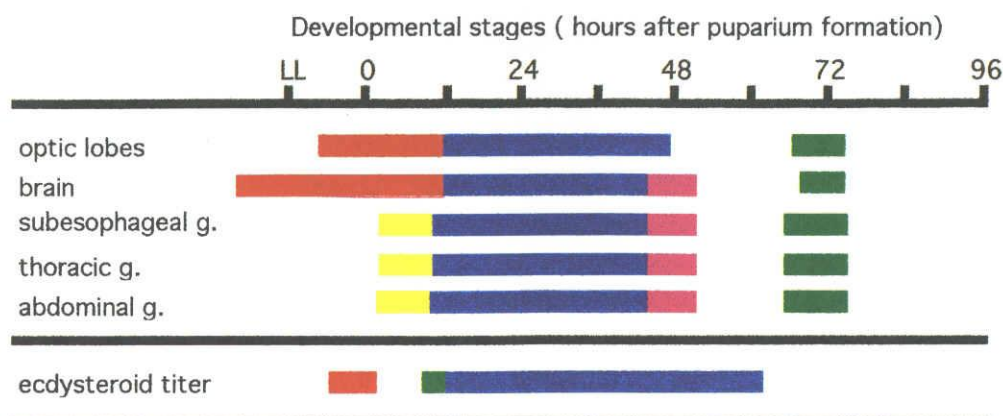


図1 ショウジョウバエ変態中の中枢神経系における細胞死は5相で起こる。

昆虫変態時の血球細胞による自己・非自己認識機構の解析

森 肇（京都工芸繊維大学繊維学部）

目的：昆虫の血球細胞は、原白血球、顆粒細胞、小球細胞、プラズマ細胞などからなり、酸素を運搬するための血色素をもつ血球や止血に関与する血小板などはみられない。これらの血球は、侵入してきた病原体や脱皮・変態において生じた古い組織を捕食する食作用（phagocytosis）と、大型の異物を血球細胞が多数集まって包み込んでしまう包囲作用（encapsulation）を行う。カイコの顆粒細胞では、哺乳類の止血・血栓因子であるフォンビルブラント因子（von Willebrand Factor）のホモログが作られている。本来この因子は血管壁が損傷した際、血管内皮下組織に存在するコラーゲンが露出することにより活性化を受け、粘着タンパク質としての機能を発揮し、この血管損傷部位に血小板を粘着させ、さらに血小板相互の結合にも機能し、最終的には血小板による血栓形成を行わせる。しかし、開放血管系であり、しかも血小板を持たない動物である昆虫にこの因子と構造的によく似たタンパク質が存在する事実は、昆虫での止血や生体防御、特に自己と非自己の識別に新たな考え方をもたらすものと期待される。そこで、このカイコにみられるフォンビルブラント因子ホモログ（ヘモサイチン、hemocytin）の機能解析と遺伝子転写機構を調べた。

方法と結果

1) バキュロウイルスベクターによるドメインの発現：図1に示したようにヘモサイチンのほぼ全領域をカバーする4つのcDNAクローンをバキュロウイルスベクターを用いて発現させた。なお、発現タンパク質は細胞外に分泌されるようにした。

2) コラーゲン結合ドメインの検索：発現したタンパク質とコラーゲン（タイプ1からタイプ4）とヘパリンとの接着活性はELISA法により測定した。

3) トランジェントアッセイ：ヘモサイチン遺伝子のプロモーターの下流にルシフェラーゼ遺伝子を組み込んだベクターを作製した。このベクターを、ショウジョウバエのアクチン遺伝子プロモーター下でガラクトシダーゼ遺伝子を発現するベクターとともに、ショウジョウバエの血球細胞由来KC167細胞にトランスフェクションした。24時間後、48時間後にLPSあるいはエクジステロイドを投与し、ルシフェラーゼ活性を測定した。なお、トランスフェクション効率はガラクトシダーゼ活性によって補正した。

考察：コラーゲンおよびヘパリンに対する結合活性はドメインD'''に、また細胞接着活性はドメインBに存在することがわかった（図2）。これまでに、フォンビルブラント因子内にはコラーゲンおよびヘパリンに結合するドメイン、さらにcoagulation factor VIII complex、インテグリンであるglycoprotein Ib（GPIb）およびglycoprotein IIb/IIIa（GPIIb/IIIa）に結合するドメインが同定されている。特に、フォンビルブラント因子では分子内のRGD配列を介して、これら血小板表面に存在するインテグリン（GPIbおよびGPIIb/IIIa）と結合することにより細胞接着活性がみられるのに対して、このヘモサイチンにはRGD配列はドメインBを含む全領域に存在しない。このことから、ドメインB内には、フィブロネクチンやラミニンなどに存在するのと同様に、RGD配列以外の細胞接着配列が存在するものと考えられた。今後、合成ペプチドを用いた細胞接着阻害やヘモサイチンが認識するインテグリン（血球細胞膜や細胞外マトリックスなどの）

の同定を行う。図3 a,b に示すようにヘモサイチン遺伝子のプロモーターはLPS およびエクジステロイドによって転写が調節されていることがわかった。これまでに、ヘモサイチン遺伝子は血球細胞において脱皮や変態もしくはLPSなどの病原微生物の構成成分によっても、その発現が制御されていることがわかっていたが、この結果からこれらの因子がプロモーターに直接作用していることが示された。

計画に対する達成度の自己評価と今後の方策：当初の目的であったヘモサイチンによる自己・非自己の認識についての解析には至らなかったが、この研究とは別にカイコにおけるジーンターゲットを開発したので、今後コンディショナルターゲットなどによるヘモサイチン遺伝子のノックアウト解析が可能となるであろう。

発表論文

森 肇、森 宏、小谷英治、山川 稔 (1998) 昆虫の生体防御の仕組み 生物科学 50, 163-168

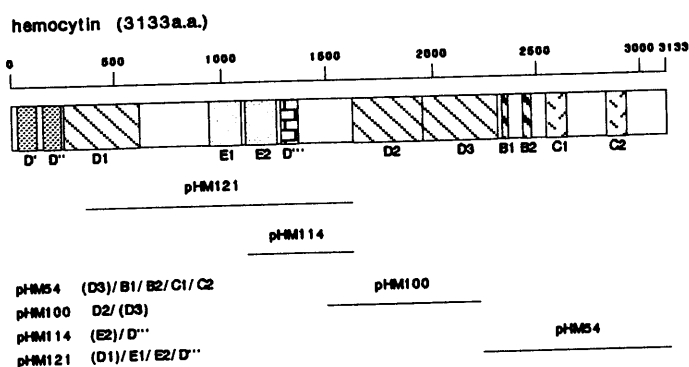


図1 ヘモサイチンのドメイン構造およびヘモサイチンをコードするcDNA

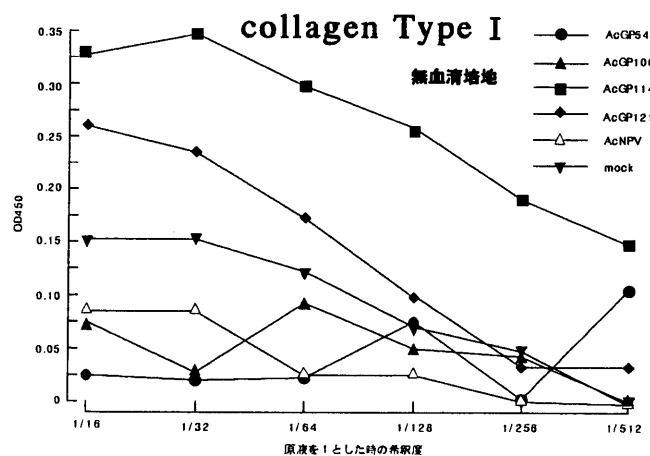


図2 ヘモサイチンの各ドメインとコラーゲンとの結合

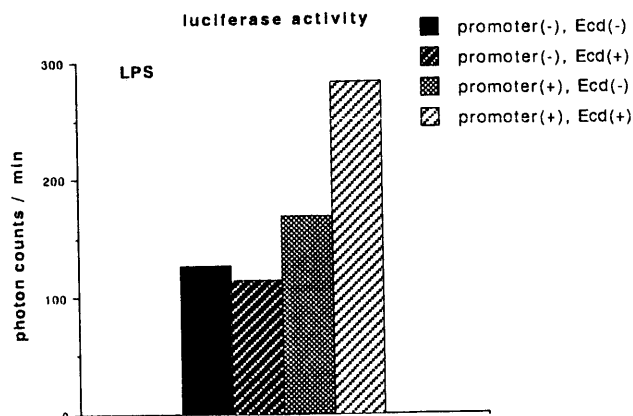
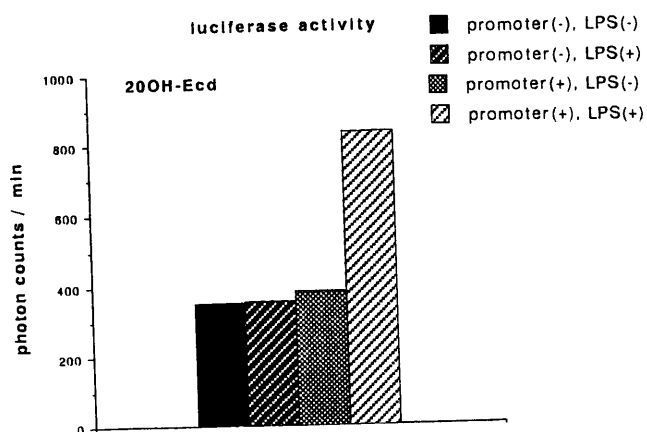


図3 レポーター遺伝子のトランジェントアッセイ (a) LPS による誘導、(b) エクジステロイドによる誘導：promoter(-)はプロモーター非存在下、promoter(+)はヘモサイチン遺伝子プロモーターを挿入した場合。LPS とエクジステロイドの誘導はそれぞれ(+)と(-)で示した。

カイコ食道下体の分泌機能動態の解析

佐藤行洋（永眠のため鈴木代筆、岩手大学農学部）

1. 目的

昆虫の食道下体は、前腸と中腸の間において正中線を横断するように存在している帯状の器官である。カイコでは、Toyama (1902)が胚発生期における食道下体を記載し、中胚葉起源であると指摘した。桜井 (1915)は幼虫期の食道下体の形態を記載した。さらに、近年では超微形態の観察から赤井 (1976)が、

摂食期間中には細胞質が暗調顆粒で満たされ、眠期にはこれがすべて崩壊し体液中に放出されると示唆している。このことから、幼虫脱皮周期とともに多数の顆粒を形成し細胞外に放出する器官であると想定されるが、その後、昆虫の食道下体に関する研究は系統的になされていない。

従って、本研究では食道下体の生理機能解明を目標として、幼虫発育に伴う形態変化とタンパク質構成について明らかにすることとした。

2. 方法と結果

1) 食道下体の欠損実験

カイコ 4 眠脱皮直後の個体から、微細外科手術方法で食道下体をできる限り摘出した。手術後の幼虫における体重変動ならびに外部形態を調査したところ、対照区と比較して、体重や外部形態において著しい差は認められなかった。

2) 組織観察

各ステージの幼虫から食道下体を摘出し、固定後樹脂包埋し、ガラスナイフで切片を作製し、トルイジンブルーとアズール II で染色し観察した。一方、電子顕微鏡用切片を作製し、酢酸ウランとクエン酸鉛で染色し観察した。その結果、4 齢 0 日では色素陽性の顆粒はほとんど観察されないが、摂食を開始すると増加し始め、眠期には細胞質が色素陽性顆粒で満たされる状態となった。5 齢 0 日では顆粒は色素で染色されなくなった。また電子顕微鏡観察によると、

4 眠期の細胞質は様々な電子密度の顆粒で満たされており、時折、顆粒を形成する膜が細胞膜と融合している像が観察された。この像は、食道下体細胞がエキソサイトーシスによって顆粒内容物を血リンパへ放出していることを示すものと考えられた。

3) タンパク質解析

食道下体器官のタンパク質構成を SDS-PAGE で分析し、特定のタンパク質についてはゲルから PVDF 膜に転写しボンソー S で染色した後、バンドを切り出しエドマン分解法で N 末端配列を決定した。その結果、分子量 27K と 14.8K のタンパク質 (p 27 と p 14.8) が変動し、4 齢 0 日では検出されないが日齢の進行とともに増加し、眠期には最大量の蓄積となった。脱皮が完了し 5 齢になると両タンパク質とも減少した (第 1 図)。さらに、p 14.8 の N 末端配列を解析したところ、カイコリゾチームの N 末端配列と一致した。

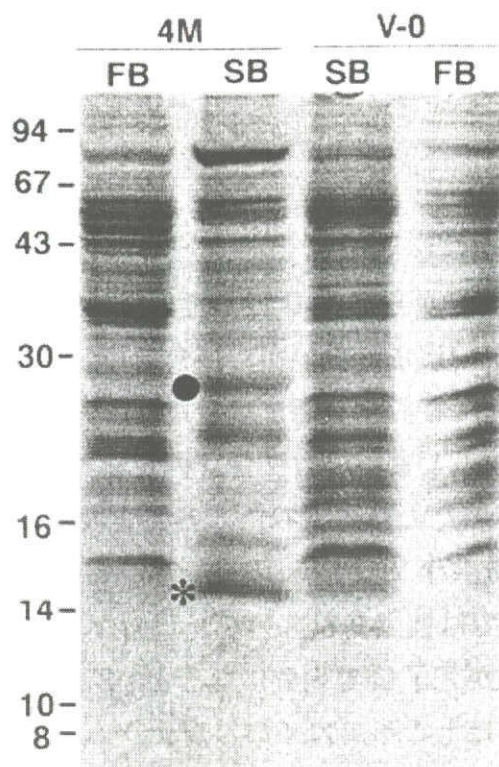


Fig. 1. 脱皮前後における食道下体と脂肪体のタンパク質構成の変化：脱皮前（4眠期，4 M）と脱皮後（5令0日令，V-0）の食道下体（SB）と脂肪体（FB）のタンパク質を電気泳動し、タンパク質構成を比較した。4眠期の食道下体に特有なバンドを2種類同定し、分子量に基づき、それぞれp27（●）とp14.8（*）と命名した。p27は幼虫が脱皮して5令になると検出されなくなり、p14.8は減少する。

3. 考察

本研究成のカイコ食道下体の形態観察とタンパク質レベルの解析により、まったくその生理機能が不明であった昆虫器官の食道下体について一つの解釈を提案することができる。すなわち、エキソサイトーシスによる顆粒内容物の活発な放出、ならびりゾチーム様タンパク質の存在、そして外科手術による器官欠損個体の生存状態を確認した。これらの結果から、本器官が昆虫の脱皮変態またはホメオスタシスに直接関与するのではなく、生体防御系を支える昆虫特有の一つの器官である可能性が考えられる。

4. 達成度の自己評価と今後の課題

本研究は1年間のみ研究成果であるために、昆虫食道下体の機能について可能性を提案しただけに止まった。しかし、本研究による新しい知見は、昆虫において生理機能が不明のままになっている器官について解明するための重要な糸口を切り開いた。

5. 発表論文

Y. Sato (1998) Morphological implication of the subesophageal body as a secretory organ in the silkmorm, *Bombyx mori*. The Journal of Sericultural Science of Japan, 67, 367-372.

山下興亜、佐藤行洋（1998）無脊椎動物で独自の発展を遂げたホルモン 2：休眠ホルモンとPBAN. ホルモンの分子生物学-8「無脊椎動物のホルモン」（日本比較内分泌学会編），85-104，学会出版センター

家蚕の 5 齢致死突然変異利用による変態制御機構の解析

日下部 宜宏、古賀 克己、河口 豊、伴野 豊

(九州大学大学院生物資源環境科学研究科)

研究成果

1) 目的

昆虫の変態は劇的な形態変化を伴いながら、その体内では膨大な種類の生化学反応が巧妙かつ秩序ある制御機構のもとで進行している。例えば、幼虫から蛹への変態期には実際に変態脱皮の起こる以前からその準備が行われており、蛹期には幼虫組織を崩壊し、積極的に排除する機構が存在し、一方、新たに必要となる組織が形成され、成虫原基の分化と増殖が誘導され始める。これら一連の制御機構の解明は基礎生物学の重要課題の一つである細胞の分化と組織の機能獲得機構の追究に大きく貢献できるものであり、昆虫の変態がそのモデル系として最も有利であるといえる。

2) 方法と結果

新たに発見された幼虫致死突然変異、5 齢死蚕 (lethal last-instar larva: *l-li*) はホモ個体が 5 齢中期に突然斃死する変異体である。*l-li* はホモ個体が 5 齢 3 日に一斉に致死することから、幼虫から蛹への変態期において本来崩壊しない組織が細胞死のプログラム異常により崩壊している可能性が考えられた。5 齢 3 日に死亡したホモ個体の各組織よりゲノム DNA を抽出し、アガロースゲル電気泳動法により解析したところ、いずれの組織においても顕著な DNA の断片化は認められなかった。そこで、より感度の高いアポトーシス検出法である LM-PCR 法を用いて解析したところ、精巣においては正常、*l-li* ホモ個体ともにアポトーシス細胞が検出されたが、中腸においては *l-li* ホモ個体にのみアポトーシスが高頻度で観察された。次に、*l-li* ヘテロ個体の交配により得られた 4 齢起蚕 125 個体に KK-42 を各 50 μg 経皮投与し、3 眠蚕を誘導後、*l-li* が終齢致死形質か否かの検討を行った。この交配系においては、*l-li* が終齢致死形質であれば 25% の個体が 4 齢期において死亡する。KK-42 処理区において 4 齢 7-8 日に 28.8% の個体が死亡したことから、*l-li* は終齢致死形質であると考えられた。また、KK-42 処理による誘導 3 眠蚕においても、LM-PCR 法による細胞死の解析を行ったところ、誘導 3 眠蚕においても中腸におけるアポトーシスの亢進が認められた。これらの結果より、*l-li* 遺伝子の形質は中腸において発現している可能性が高いと考えられたため、死亡直前の中腸タンパク質組成を 2 次元電気泳動法を用いて、*l-li* ホモ個体と同時期の正常個体とのあいだで比較した。正常と比較して、その発現が増加しているタンパク質スポットが数個検出されたが、これらのスポットを構成するタンパク質の同定までにはいたらなかった。誘導 3 眠蚕を用いた実験により、*l-li* は終齢致死形質であると考えられたが、より詳細な死亡時期の解析を体液タンパク質を指標にした Native-PAGE により行った。5 齢期死亡蚕の体液タンパク質プロファイルが正常の 5 齢 2 日に相当し、性的成熟に伴うタンパク質の発現が認められない時期であるのに対し、KK-42 誘導 3 眠蚕における死亡蚕においては、性的成熟に伴うタンパク質の発現が認められた (図 3)。これらの結果より、*l-li* は終齢致死形質

ではあるものの、体液タンパク質からみたカイコ発育ステージとの相関は認められなかった。

3) 考察

本研究の結果、*l-li* は終齢致死形質であり、その発現組織は中腸であると推測された。しかし、中腸タンパク質の2次元電気泳動法による解析においては正常と *l-li* ホモ個体間で数スポットの相違が認められたのみであった。アポトーシスに伴うゲノム DNA の程度も、中腸を含むいずれの組織においても微量であることから、中腸の一部の細胞のみが死亡し、それが中腸組織全体を壊死させる可能性が考えられる。また、体液タンパク質プロフィールからみた死亡時期は、5 齢期死蚕と KK-42 誘導 4 齢期死蚕との間で大きく異なることから、*l-li* 遺伝子の形質発現は単に性的成熟に伴って行われるのではなく、蛹化に伴い崩壊すべき中腸において、*l-li* 遺伝子が発現に関連したホルモン間の微妙なバランスに過って応答し、終齢期中腸崩壊におよぶのではないかと考えられる。

4) 計画に対する達成度の自己評価と今後の方策

今回の研究においては当初予定していた研究計画のうち、カスパーゼ、アネキシン V などのアポトーシス分子マーカーを用いた細胞死の解析、遺伝的 3 眠蚕を用いた解析が行えなかった。しかし本研究の研究期間が1年間であったため、研究計画に対する達成度は高いと考える。今後は2次元電気泳動法による解析において相違が認められたスポットの同定、解析を行うとともに、中腸における正常と *l-li* ホモ個体間の遺伝子発現の相違をディファレンシャルディスプレイ法により解析する予定である。

発表論文

Y. Kawaguchi, T. Kusakabe, and K. Koga (1999) Unique chorion structure of the mottled gray (*mgr*) egg, an egg-character mutation of *Bombyx mori* (Lepidoptera: Bombycidae). Appl. Entomol. Zool, 34, 359-364.

Y. Kawaguchi, T. Kusakabe, Y. Banno, and K. Koga (1999) Effect of ooplasmic size on the larval development as observed in the small egg mutant *emi* of *Bombyx mori*. J. Sericult. Sci. JPN, 68, 245-250.

T. Kusakabe, A. Hine, S. Hubert, G. Wargner, and C. C. Richardson (1999) Cys4 zinc-binding motifs in sequence-specific, single-stranded DNA recognition. Proc. Natl. Aca. Sci. USA. 96, 4295-4300.

H. Matsuo, T. Moriguchi, T. Takagi, T. Kusakabe, S. Buratowski, M. Sekine, Y. Kyogoku, and G. Wagner (2000) Efficient synthesis of ¹³C, ¹⁵N labeled RNA containing the cap structure m⁷GpppA. J. Am. Chem. Soc., 122, 2417-2412.

T. Kusakabe, Y. Sugimoto, Y. Hirota, S. Tone, Y. Kawaguchi, K. Koga, and T. Ohyama (2000) Isolation of replicational cue elements from a library of bent DNAs of *Aspergillus oryzae*. Mol. Biol. Reports in press

ショウジョウバエ細胞膜プロテオグリカンの 成虫組織形成における機能

中藤博志 (東京都立大学 理学部)

目的

FGF などのいくつかの細胞増殖因子は細胞膜上のプロテオグリカンの糖鎖（ヘパラン硫酸）に結合することにより初めてその受容体を活性化できると考えられている(プロテオグリカン補受容体説)。しかしこれらプロテオグリカンが細胞増殖因子補受容体として機能する分子機構は解明されていない。私たちは、ショウジョウバエの細胞膜結合型ヘパラン硫酸プロテオグリカンであるDallyが、複眼形成時に、Dpp (ハエのTGF- β) のシグナル伝達に機能すること、初期胚表皮においてはDppシグナル系には関与せず、Wingless (ハエのWnt) シグナル系において機能すること、を明らかにしてきた。このようにDallyは、異なる組織、または発生段階において、異なるリガンドと相互作用しうる。本研究では、Dallyのリガンド特異性に関し、以下の2つの疑問に解答を得ることを目的とし解析をおこなった。(1) Dallyのリガンド特異性は組織レベルで決定されるのか？(2) Dallyのリガンド特異性はいかにして調節されているのか？

方法と結果

解析(1)：*dally*変異体の成虫背板の表現型は非常に多様であり、一種類のシグナル系の異常では説明しにくい。この点を明らかにするため、背板形成過程におけるDallyの機能、特にDallyのリガンドの特定化を目指して遺伝学的解析をおこなった。その結果、*dally*変異体の成虫背板では、11種の機械感覚毛のうちaDC, pSA, pPAが欠失することが明らかになった(図1)。これらの*dally*表現型に関して遺伝学的相互作用を解析したところ、aDC, pSAの表現型は、DppのタイプII受容体である*punt*の変異により増強された。また、pPAの表現型は*wg*変異により悪化した。以上の観察は、aDC, pSAの形成過程にはDallyがDpp補受容体として、一方、pPAの形成過程では、Wg補受容体として機能していることを示唆している。

解析(2)：ヘパラン硫酸-タンパク質間の相互作用はヘパラン硫酸の硫酸化(硫酸基パターン)により制御されうる。そこで、ヘパラン硫酸硫酸基転移酵素のcDNAクローニング、および機能解析(二本鎖RNAの注入による機能阻害実験)をおこなった。これまで、ショウジョウバエでは未同定であった、ヘパラン硫酸6-O硫酸基転移酵素、および二種類のヘパラン硫酸3-O硫酸基転移酵素(*dHS3ST-A, B*)のcDNAクローンを単離した。これらの遺伝子の機能を推定するため、初期胚への二本鎖RNAの注入による機能阻害実験(dsRNAi実験)をおこなった。その結果、*dHS3ST-A*、および、*-B*の二本鎖RNAをそれぞれ注射した胚において、低頻度(5-20%)で、歯状突起および頭部構造(mouth hook)の欠失が見られた。また、*dHS3ST* RNAを双方同時に注射したところ、上記の強い表現型が高頻度(>50%)で観察された(図2)。

考察

*dally*変異体の成虫背板の表現型の解析により、Dallyが、ひとつの組織の発生過程においても複数の細胞増殖因子リガンドと特異的に相互作用しており、Dallyの機能は組織特異的というよりも個々の細胞レベルで調節されていることが示唆された。このようなDallyのリガンド特異性を制御しうるメカニズムとして、Dallyの糖鎖、ヘパラン硫酸の特異的部位の硫酸化が関与している可能性が考えられる。ショウジョウバエのヘパラン硫酸硫酸基転移酵素cDNAの単離、および遺伝子構造の決定をおこなったが、これらの遺伝子座には既存の突然変異は存在しない。そこで、*dHS3ST-A, B*のdsRNAi実験をおこなったところ、両二本鎖RNAを同時に注射した胚では、胚の形態異常が観察された。このことから、ヘパラン硫酸の3-O位の硫酸化が特定のシグナル伝達系に必要であること、このシグナル系が初期胚の形態形成に機能していること、*dHS3ST-A, B*が部分的にredundantな機能を持つこと、が示唆される。

自己評価と今後の方策

研究計画時当初の目的をほぼ達成できたと考えている。今後、Dallyの糖鎖を実際にヘパラン硫酸硫酸基転移酵素群がいに制御し、細胞間シグナル系に影響を及ぼすかといった問題にアプローチするため、ヘパラン硫酸硫酸基転移酵素遺伝子の突然変異体の作成を計画している。

図とその説明

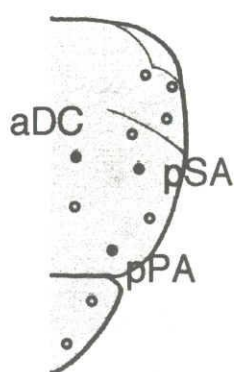
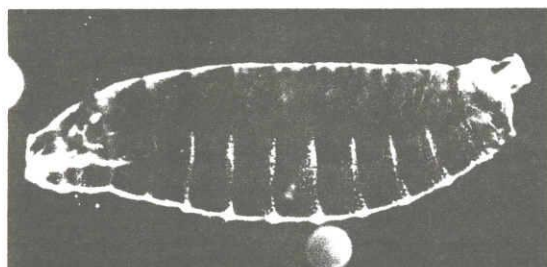
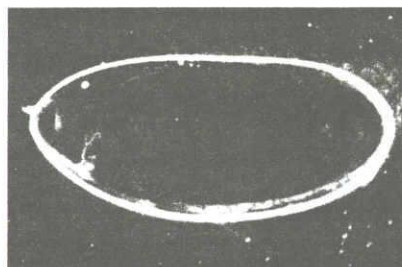


図1 (A) ショウジョウバエ背板の機械感覚毛の位置。図は背板の右半分を示す。黒丸で示した aDC, pSA, pPA は *dally* 変異体で欠失する。aDC, pSA の表現型は Dpp のタイプ II 受容体をコードする *punt* 遺伝子の変異により増強され、pPA の表現型は *wg* 変異により悪化した。(本文参照)

図2 ヘパラン硫酸3-O硫酸基転移酵素遺伝子の機能阻害実験



(A) buffer を注射したもの



(B) *dHS3ST* 二本鎖 RNA を注射したもの。

発表論文

(原著論文)

- 1) H. Nakato, T. Futch and S.B. Selleck (1995) *division abnormally delayed (dally)* gene: a putative integral membrane proteoglycan that affects cell division patterning during post-embryonic development of the nervous system in *Drosophila*. *Development* 121, 3687-3702.
- 2) S. Jackson, H. Nakato, M. Sugiura, A. Jannuzzi, R. Oakes, V. Kaluza, C. Golden and S. Selleck (1997) *dally*, a *Drosophila* glypican, controls cellular responses to the TGF- β -related morphogen, Dpp. *Development* 124, 4113-4120.
- 3) M. Tsuda, K. Kamimura, H. Nakato, M. Archer, W. Staatz, B. Fox, M. Humphrey, S. Olson, T. Futch, V. Kaluza, E. Siegfried, L. Stam, and S.B. Selleck (1999) A cell surface proteoglycan, Dally, regulates Wingless signalling in *Drosophila*. *Nature* 400, 276-280.

(著書など)

- 4) H. Nakato (1999) Function of Dally in Decapentaplegic and Wingless signalling pathways. In "Cell Surface Proteoglycans in Signalling and Development" (Eds. Lander, A., Nakato, H., Selleck, S.B., Turnbull, J.E. and Coath, C.) pp. 181-187. Human Frontier Science Program, Strasbourg.
- 5) 中藤博志 (2000) ショウジョウバエ細胞膜プロテオグリカン機能の遺伝学的解析. 生化学 72 (2), 109-113.

昆虫培養細胞の初期化による形態形成能の回復に関する研究

三 橋 淳 (東京農業大学)

1. 目的

貧栄養培養等の処理でいわゆる「初期化」された細胞は各種の細胞に分化する能力、すなわち全能性をもっていると考えられる。昆虫の培養細胞にもこのような初期化現象が見られるかどうかを明らかにすることを目的とする。そのためまず昆虫の培養細胞で、全能性をもつものが作れるかどうかを検討する。哺乳動物では全能性をもつと云われる ES (embryonic stem) 細胞が知られているので、カイコガの発生初期の数段階の胚を用いて細胞培養を試み、全能性をもつ培養細胞が得られるかどうかを検討する。

2. 方法と結果

カイコガ成虫を雌雄別々に羽化させ、約 2 時間交尾させてそのまま 5. C の冷蔵庫に保存した。冷蔵庫から取り出した成虫は、未だ交尾しているものは割愛し、産卵させた。約 1 時間産卵させ、産卵後 5 時間以内、8-8.5、15、20、22.5、25、28、30、40、時間、休眠期に胚を取り出し培養した。まず胚をキッチンハイターに 5 分間浸漬し、滅菌蒸溜水で洗い、70%エタノールで 3 分間滅菌した。更に滅菌蒸溜水で洗い、マキシモフスライドグラスのくぼみを満たした Carlson 液中に移した。Carlson 液中で 2 本のピンセットを用いて卵殻をやぶり、卵内容物を取り出し、胚盤葉ができているものは胚盤葉だけを選び分け、またハッキリ胚盤葉が認められない初期の卵では卵内容物の大部分を培養に用いた。胚盤葉形成以後の胚はできるだけ小さく切って培養した。

選り分けた胚盤葉または卵の内容物は Carlson 液で洗い、Carlson 液を培地に置き換えて、培養フラスコに移した。培地には MGM-464 に牛胎児血清を 20%加えたものを使用した。

産卵後 8 時間以前の卵の内容物を培養した場合は、細胞は得られなかった。この時期は未だ energid の状態で、細胞はできていないためと思われた。

15 時間卵では、わずかに胚盤葉と思われる半透明の細胞シートが見られたが、これを培養すると短時間の内に細胞遊出が起こった。遊出した細胞は卵黄細胞と胚細胞で、胚細胞の一部は分裂して増殖した。培養の初期には球状の細胞が主体をなしていたが、日数を経るにつれ数種の形の異なった細胞が見られるようになった。まず一部に赤色色素をもつ漿膜細胞が分化してきた。また 1 ヶ月を経過する頃には、神経細胞と思われる樹枝状突起をもつ細胞も見られ、簡単なニューロンのネットワークを形成した。

20 時間以後の卵からの培養でも細胞の遊出と分化は同様に起こった。

25 時間の卵では既に漿膜が分化をし始めていて、胚に付着した部分の漿膜から赤色色素をもつ漿膜細胞が遊出した。

30 時間以後の卵では漿膜は既に濃く着色していたので、漿膜を除去し、胚の部分だけを培養したが、除去が不十分であったためか一部赤色色素をもった細胞が遊出した。

40 時間の胚細胞の培養では、遊出し mono layer を形成していた一群の細胞が、培養 40 日頃から contraction を始めた。

休眠期に入った胚の培養でも、細胞の遊出、一部増殖が見られた。これは in vitro では休眠は細胞レベルでは覚醒されることを示すものと思われる。

以上の結果から、初期胚の培養では胚盤葉が形成されれば、培養可能であり、連続鶏代性細胞系を作出できる可能性があることが分かった。

3. 考察

漿膜形成前の胚を培養しても、培養中赤色色素をもつ細胞が出現する事から、漿膜細胞が分化した事が分かる。漿膜に分化しなかった細胞からは、培養の経過とともに各種の形態をもつ細胞が出現するので、引き続きなんらかの分化が起こっていると考えられる。そのうち顕著なものは1ヶ月以上培養した場合に出現する神経細胞と思われる細胞であった。このように非常に初期の胚細胞を培養しても分化が起こる事から、ES 細胞様の細胞系を作る事は難しいかも知れない。しかし分化していない細胞も残っていると思われるので、クローニングにより未分化な細胞、全能性をもつ細胞を得る可能性は残っている。

計画に対する達成度の自己評価と今後の方策

単年度の研究であり、実験期間が6ヶ月くらいしかなかった割には良い成果が得られたと思う。最大の成果は産卵後15時間という非常に早期の胚を形成する細胞を培養できた事である。またこの初期胚の細胞が培養中に分化を示す事も重要な結果で、今後細胞分化、発生の研究に利用する事ができよう。

発表論文

- Mitsuhashi, J. (1998) Vitamin requirements of the cultured flesh fly cells, *Sarcophaga peregrina* (Diptera, Sarcophagidae). Archives of Insect Biochemistry and Physiology 37, 283-286.
- Komiya, K., Agui, N. and Mitsuhashi, J. (1998) Effect of culture medium on the in vitro secretion activity of prothoracic glands from *Pseudaletia separata*. Archives of Insect Biochemistry and Physiology 38, 147-154.
- Mitsuhashi, J. (1998) Polyamine as a growth promoter for cultured insect cells. In Vitro Cellular and Developmental Biology 34A, 619-621.
- Ohashi, A., Mitsuhashi, J. and Sato, K. (1999) A simplified method for screening acetylcholinesterase inhibitors by the flesh fly (Dipt. Sarcophagidae) cell culture system. Journal of Applied Entomology 123, 307-308.

III. 公表論文リスト

計画研究1班

片岡宏誌

- T. Kawano, H. Kataoka, H. Nagasawa, A. Isogai and A. Suzuki (1997) Molecular cloning of a new type cDNA for pheromone biosynthesis activating neuropeptide in the silkworm, *Bombyx mori*. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* **61**, 1745-1747.
- S. Satake, M. Masamura, H. Ishizaki, K. Nagata, H. Kataoka, A. Suzuki and A. Mizoguchi (1997) Bombyxin, an insulin-related peptide of insects, reduces the major storage carbohydrates in the silkworm *Bombyx mori*. *Comparative Biochemistry and Physiology* **118B**, 349-357.
- A. Suzuki, S. Nagata and H. Kataoka (1997) *Bombyx* prothoracicotropic hormone: chemistry and biology. In "Phytochemicals for Pest Control, ACS Symposium Series, 658, (edited by P. A. Hedin, R. Hollingworth, E. P. Masler, J. Miyamoto and D. Thompson), 268-276. American Chemical Society, Washington, DC.
- M. Y. Choi, M. Tanaka, H. Kataoka, K. S. Boo and S. Tatsuki (1998) Isolation and identification of the cDNA encoding the pheromone biosynthesis activating neuropeptide and additional neuropeptides in the oriental tobacco budworm, *Helicoverpa assulta* (Lepidoptera: Noctuidae). *Insect Biochemistry and Molecular Biology* **28**, 759-766.
- S. G. Dedos, H. Fugo and H. Kataoka (1998) A new cerebral factor stimulates IP3 levels in the prothoracic glands of *Bombyx mori*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* **28**, 767-774.
- A. Suzuki, A. Mizoguchi and H. Kataoka (1998) *Bombyx* brain-neuropeptides: chemistry and biology. In *Insects. Chemical, Physiological and environmental aspects, 1997* (edited by D. Konopinska et al.), 19-25. Wydawnictwo Uniwersytetu Wrocławskiego, Wrocław.
- 片岡宏誌 (1998) 無脊椎動物で独自の発展を遂げたホルモン 1: 前胸腺刺激ホルモン. ホルモンの分子生物学-8「無脊椎動物のホルモン」(日本比較内分泌学会編), 71-83, 学会出版センター.
- S. Satake, K. Nagata, H. Kataoka and A. Mizoguchi (1999) Bombyxin secretion in the adult silkworm *Bombyx mori*: Sex-specificity and its correlation with metabolism. *Journal of Insect Physiology* **45**, 939-945.
- S. G. Dedos, H. Fugo, S. Nagata, M. Takamiya and H. Kataoka (1999) Differences between recombinant PTTH and crude brain extracts in cAMP-mediated ecdysteroid secretion from the prothoracic glands of the silkworm, *Bombyx mori*. *Journal of Insect Physiology* **45**, 415-422.
- S. D. Ha, S. Nagata, A. Suzuki and H. Kataoka (1999) Isolation and structure determination of a paralytic peptide from the hemolymph of *Bombyx mori*. *Peptides* **20**, 561-568.
- Y.-J. Hua, Y. Tanaka, K. Nakamura, M. Sakakibara and H. Kataoka (1999) Identification of a prothoracicostatic peptide (PTSP) from the larval brain of the silkworm, *Bombyx mori*. *Journal of Biological Chemistry* **274**, 31169-31173.
- K. Nagata, K. Maruyama, K. Kojima, M. Yamamoto, M. Tanaka, H. Kataoka, H. Nagasawa, A. Isogai, H. Ishizaki and A. Suzuki (1999) Prothoracicotropic Activity of SBRPs, the insulin-like peptides of the Saturniid silkworm *Samia*

cynthia ricini. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **266**, 575-578.

- K. Nagata, H. Hatanaka, D. Kohda, H. Ishizaki, K. Momomura, K. Tamori, T. Kadowaki, M. Tanaka, H. Kataoka, H. Nagasawa, A. Isogai, A. Suzuki and F. Inagaki (1999) Three-dimensional structure and receptor-recognition sites of bombyxin-II, an insulin-like brain-secretory peptide of the silkworm. In *Peptide Science - Present and Future* (edited by Y. Shimonishi), 245-248. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.
- S. Nagata, J. Kobayashi, H. Kataoka and A. Suzuki (1999) Structure of glycoside of *Bombyx mori* prothoracicotropic hormone. In *Peptide Science - Present and Future* (edited by Y. Shimonishi), 166-167. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.
- S. -D. Ha, A. Suzuki, S. Nagata, M. Tanaka and H. Kataoka (1999) Structure determination and cDNA cloning of paralytic peptide in *Bombyx mori*. In *Peptide Science - Present and Future* (edited by Y. Shimonishi), 460-461. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.

相蘭泰生

- Y. Aizono, Y. Endo, D. B. Sattelle, and Y. Shirai (1997) Prothoracicotropic hormone-producing neurosecretory cells in the silkworm, *Bombyx mori*, express a muscarinic acetylcholinereceptor. *Brain Research* **763**, 131-136.
- Y. Shirai, M. Sumida and Y. Aizono (1997) Carbachol induced protein phosphorylation in the brain-corpus cardiacun-corpus allatum complex of silkworm, *Bombyx mori*. *Applied Entomology and Zoology* **32**, 573-581.
- Y. Shirai, T. Uno and Y. Aizono (1998) Small GTP-binding proteins in the brain-corpus cardiacun-corpus allatum complex of silkworm, *Bombyx mori*: Involvement in the secretion of prothoracicotropic hormone. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology* **38**, 177-184.
- T. Uno, M. Ueno, A. Nakajima, Y. Shirai and Y. Aizono (1998) Molecular cloning of cDNA for BRab from the brain of *Bombyx mori* and biochemical properties of BRab expressed in *Escherichia coli*. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry* **62**, 1885-1891.
- 相蘭泰生, 白井康仁(1998) 神経ペプチドホルモンの分泌調節：カイコの前胸腺刺激ホルモン。ホルモンの分子生物学—8「無脊椎動物のホルモン」(日本内分泌学会編)。149-172, 学会出版センター。
- Y. Jiarnng, K. Kiguchi and Y. Aizono (1999) Neuroendocrine cascade involved in molting and metamorphosis in the sweet potato hornworm, *Agrius convolvuli*. *Journal of Sericultural Science of Japan* **68**, 387-395.

市川敏夫

- I. Shimizi, S. Aoki and T. Ichikawa (1997) Neuroendocrine control of diapause hormone secretion in the silkworm, *Bombyx mori*. *Journal of Insect Physiology* **43**, 1101-1109.
- T. Ichikawa (1998): Activity patterns of neurosecretory cells releasing pheromoneotropic neuropeptides in the moth *Bombyx mori*. *Proceeding of National Academy of Science of USA* **95**, 4055-4060.
- 市川敏夫 (1998) 昆虫のペプチドホルモン分泌細胞の活動パターン。比較生理生化学, 15, 124-130.

T. Ichikawa, K. Imafuku and K. Tawada (1999) Synchronous firing patterns of a set of insect neurosecretory cells. *Neuroscience Letters* **264**, 85-88.

T. Ichikawa and K. Ito (1999) Calling behavior modulates heartbeat reversal rhythm in the silkworm, *Bombyx mori*. *Zoological Sciences* **16**, 203-209.

市川敏夫 (2000) 昆虫の変態と脳の再編成. もうひとつの脳—微小脳の研究入門 (富永・宗岡編) 印刷中, 倍風館

岩見雅史

H. Kondo, M. Ino, A. Suzuki, H. Ishizaki and M. Iwami (1996) Multiple gene copies for bombyxin, an insulin-related peptide of the silkworm *Bombyx mori*: structural signs for gene rearrangement and duplication responsible for generation of multiple molecular forms of bombyxin. *Journal of Molecular Biology* **259**, 926-937.

M. Iwami, A. Tanaka, N. Hano and S. Sakurai (1996) Bombyxin gene expression in tissues other than brain detected by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) and in situ hybridization. *Experientia* **52**, 882-887.

M. Iwami, I. Furuya and H. Kataoka (1996) Bombyxin-related peptides: cDNA structure and expression in the brain of the hornworm *Agrius convolvuli*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* **26**, 25-32.

Y. Nomura, M. Komatsuzaki, M. Iwami and S. Sakurai (1996) Purification and characterization of hemolymph 3-oxoecdysteroid 3 β -reductase of the silkworm, *Bombyx mori*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* **26**, 249-257.

S. Tsuzuki, T. Masuta, M. Furuno, S. Sakurai and M. Iwami (1997) Structure and expression of bombyxin E1 gene, a novel family gene that encodes bombyxin-IV, an insect insulin-related neurosecretory peptide. *Comparative Biochemistry and Physiology* **117B**, 409-416.

Y. Oda, M. Iwami, M. Osanai and S. Sakurai (1997) Dynamics of hemolymph sorbitol-6-phosphate and its control by ecdysteroid in the larvae of the silkworm, *Bombyx mori*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* **27**, 461-468.

I. Yoshida, S. Tsuzuki, S. E. Abdel Salam, M. Ino, A. M. Korayem, S. Sakurai and M. Iwami (1997) Bombyxin F1 gene: structure and expression of a new bombyxin family gene that forms a pair with bombyxin B10 gene. *Zoological Science* **14**, 615-622.

岩見雅史 (1997) ボンビキシン: 昆虫インシュリン様神経ペプチドホルモン. 生物科学ニュース, 303, 13-16.

I. Yoshida, K. Moto, S. Sakurai and M. Iwami (1998) A novel member of bombyxin gene family: structure and expression of bombyxin G1 gene, an insulin-related peptide gene of the silkworm *Bombyx mori*. *Development, Genes and Evolution* **208**, 407-410.

S. Morii, C. Fujii, T. Miyoshi, M. Iwami and E. Itagaki (1998) 3-ketosteroid- Δ^1 -dehydrogenase of *Rhodococcus rhodochrous*: sequencing of the genomic DNA and hyperexpression, purification, and characterization of the recombinant enzyme. *Journal of Biochemistry* **124**, 1024-1032.

本賢一, 吉田郁代, Salah Eldin Abdel Salam, 桜井勝, 岩見雅史 (1998) 蛍光を利用した遺伝子発現解析

ーボンビキシン遺伝子の脳神経分泌細胞特異的発現ー. 比較生理生化学, 15, 315-322.

岩見雅史, 本賢一 (1998) インスリンと同じ先祖を持つ昆虫ホルモンーボンビキシン. 化学と生物, 36, 8-10.

岩見雅史 (1998) ボンビキシン: 昆虫の変態を誘導するインスリン様ホルモン. 生化学, 70, 305-308.

岩見雅史 (1998) 非トランスジェニック昆虫における発現解析. 日本比較内分泌学会ニュース, 91, 14-17.

岩見雅史 (1998) 脊椎動物と無脊椎動物で同一の祖先をもつホルモン: ボンビキシンとインスリン. ホルモンの分子生物学シリーズ8「無脊椎動物のホルモン」(日本比較内分泌学会 編), 37-70. 学会出版センター.

K. Moto, S. E. Abdel Salam, S. Sakurai and M. Iwami (1999) Gene transfer into insect brain and cell-specific expression of bombyxin gene. *Development, Genes and Evolution* **209**, 447-450.

S. Morii, S. Sawamoto, Y. Yamauchi, M. Miyamoto, M. Iwami and E. Itagaki (1999) Steroid monooxygenase of *Rhodococcus rhodochrous*: sequencing of the genomic DNA and hyperexpression, purification, and characterization of the recombinant enzyme. *Journal of Biochemistry* **126**, 624-631.

C. Fujii, S. Morii, M. Kadode, S. Sawamoto, M. Iwami and E. Itagaki (1999) Essential tyrosine residues in 3-ketosteroid-delta1-dehydrogenase from *Rhodococcus rhodochrous*. *Journal of Biochemistry* **126**, 662-667.

岩見雅史 (1999) カイコ. ひつじ科学ブックス「実験室の小さな生きものたち」(羊土社「実験医学」編集部 編), 62-65, 羊土社.

M. Iwami (2000) Bombyxin: an insect brain peptide that belongs to the insulin family. *Zoological Science* **17**, in press.

Y. Oda, M. Uejima, M. Iwami and S. Sakurai (2000) Role of ecdysteroids in the dynamics of insect haemolymph sugar. *Zoological Science* **17**, in press.

S. Tsuzuki, J. Terashima, M. Iwami and S. Sakurai (2000) Genes induced by ecdysteroid in the programmed cell death of the anterior silk gland. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, in press.

嶋田 透

大林富美, 阿部広明, 嶋田 透, 川合伸也, 横山 岳, 黄色俊一, 小林正彦 (1996) 限性形蚕・限性セーブルならびに限性黒色蚕W染色体に存在する同一のRAPD. 日本蚕糸学雑誌, 65, 395-398.

H. Abe, T. Shimada, S. Kawai, F. Ohbayashi, T. Harada, T. Yokoyama, T. Oshiki and M. Kobayashi (1996) Nucleotide sequence of the random amplified polymorphic DNA (RAPD) on the W chromosome of the silkworm, *Bombyx mori* (Lepidoptera: Bombycidae). *Applied Entomology and Zoology* **31**, 633-637.

嶋田 透, 片岡宏誌 (1996) 変態と休眠の遺伝子. ネオ生物学シリーズ -ゲノムから見た新しい生物像- 第9巻: 昆虫 [超能力の秘密] 第8章 (pp. 112-126) 共立出版.

M. G. Suzuki, T. Shimada and M. Kobayashi (1998) Absence of dosage compensation at the transcription level of a sex-linked gene in a female heterogametic insect, *Bombyx mori*. *Heredity* **81**, 275-283.

H. Abe, M. Kanehara, T. Terada, F. Ohbayashi, T. Shimada, S. Kawai, M. Suzuki, T. Sugasaki and T. Oshiki (1998) Identification of novel random amplified polymorphic DNAs (RAPDs) on the W chromosome of the domesticated

- silkworm, *Bombyx mori*, and the wild silkworm, *B. mandarina*, and their retrotransposable element-related nucleotide sequences. *Genes and Genetic Systems* **73**, 243-254.
- F. Ohbayashi, T. Shimada, T. Sugasaki, S. Kawai, K. Mita, T. Oshiki, and H. Abe (1998) Molecular structure of the copia-like retrotransposable element Yokozuna on the W chromosome of the silkworm, *Bombyx mori*. *Genes and Genetic Systems* **73**, 345-352.
- R. Cheng, T. Shimada and Y. Ukai (1998) Estimation of the position, effect and action mode of a semi-lethal factor locus on a DNA polymorphism linkage map in silkworm, *Bombyx mori*. *Genes and Genetic Systems* **73**, 337-343.
- H. Abe, F. Ohbayashi, T. Shimada, T. Sugasaki, S. Kawai and T. Oshiki (1998) A complete full-length non-LTR retrotransposon, BMC1, on the W chromosome of the silkworm, *Bombyx mori*. *Genes and Genetic Systems* **73**, 353-358.
- 嶋田 透 (1998) 絹糸昆虫におけるゲノムの進化. *Japanese Journal of Biometrics* (日本計量生物学会) **19**, 15-27.
- M. G. Suzuki, T. Shimada and M. Kobayashi (1999) Bm kettin, a homologue of the *Drosophila* kettin gene, is located on the Z chromosome in *Bombyx mori* and is not dosage compensated. *Heredity* **82**, 170-179.
- M. G. Suzuki, T. Terada, M. Kobayashi and T. Shimada (1999) Diapause-associated transcription of BmEts, a gene encoding an ETS transcription factor homolog in *Bombyx mori*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* **29**, 339-347.
- M. G. Suzuki, T. Shimada, T. Yokoyama and M. Kobayashi (1999) The influence of triploidy on gene expression in the silkworm, *Bombyx mori*. *Heredity* **82**, 661-667.
- T. Yoshiga, K. Okano, K. Mita, T. Shimada and S. Matsumoto (2000) cDNA cloning of acyl-CoA desaturase homologs in the silkworm, *Bombyx mori*. *Gene* **246**, 339-345.
- H. Abe, F. Ohbayashi, T. Shimada, T. Sugasaki, S. Kawai, K. Mita, T. Oshiki (2000) Molecular structure of a novel gypsy-Ty3-like retrotransposon, Kabuki and nested retrotransposable elements on the W chromosome of the silkworm, *Bombyx mori*. *Molecular and General Genetics*, in press.
- E. G. Abraham, H. Sezutsu, T. Kanda, T. Sugasaki, T. Shimada and T. Tamura (2000) Identification and characterization of a silkworm ABC transporter gene homologous to *Drosophila* white. *Molecular and General Genetics*, in press.
- 嶋田 透 (2000) カイコの生殖と休眠を支配する遺伝子ネットワーク. 第 19 回基礎育種学シンポジウム報告 (学術会議育種学研連) (印刷中).
- 嶋田 透 (2000) カイコのゲノム研究の意義, 現状および展望. 平成 12 年度日本農学会シンポジウム講演要旨「農学領域におけるゲノムサイエンスの展開—2000—」, 17-27.

溝口 明

R. Rybczynski, A. Mizoguchi and L. I. Gilbert (1996) *Bombyx* and *Manduca* prothoracicotropic hormones: an

- immunologic test for relatedness. *General and Comparative Endocrinology* **102**, 247-354.
- S. Satake, M. Masumura, H. Ishizaki, K. Nagata, H. Kataoka, A. Suzuki and A. Mizoguchi (1997) Bombyxin, an insulin-related peptide of insects, reduces the major storage carbohydrates in the silkworm *Bombyx mori*. *Comparative Biochemistry and Physiology* **118B**, 349-357.
- S. Satake, K. Nagata, H. Kataoka and A. Mizoguchi (1999) Bombyxin secretion in the adult silkworm *Bombyx mori*: sex-specificity and its correlation with metabolism. *Journal of Insect Physiology* **45**, 939-945.
- S. Satake, Y. Kawabe and A. Mizoguchi (2000) Carbohydrate metabolism during starvation in the silkworm *Bombyx mori*. *Archives of insect biochemistry and Physiology* **44**, 90-98.
- M. Masumura, S. Satake, H. Saegusa and A. Mizoguchi (2000) Glucose stimulates the release of bombyxin, an insulin-related peptide of the silkworm, *Bombyx mori*. *General and Comparative Endocrinology* **118**, 393-399.
- A. Mizoguchi, Y. Ohashi, K. Hosoda, J. Ishibashi and H. Kataoka (2000) Developmental profile of the changes in the prothoracicotropic hormone titer in hemolymph of the silkworm *Bombyx mori*: correlation with ecdysteroid secretion. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, in press.
- L. I. Gilbert, R. Rybczynski, Q. Song, A. Mizoguchi, R. Morreale, W. A. Smith, H. Matubayashi, M. Shionoya, S. Nagata and H. Kataoka (2000) Dynamic regulation of prothoracic gland ecdysteroidogenesis: *Manduca sexta* recombinant prothoracicotropic hormone and brain extracts have identical effects. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, in press.
- Y. Hayakawa, A. Ohnishi, A. Mizoguchi and C. Yamashika (2000) Distribution of growth-blocking peptide in the insect central nervous system. *Cell and Tissue Research*, in press.

藤原晴彦

- M. Kamimura, S. Tomita and H. Fujiwara (1996) Molecular cloning of an ecdysone receptor B1 isoform homologue from the silkworm, *Bombyx mori*, and its mRNA expression during wing disk development. *Comparative Biochemistry and Physiology* **113B**, 341-347.
- H. Takahashi, S. Okazaki and H. Fujiwara (1997) A new family of site-specific retrotransposons, SART1, is inserted into telomeric repeats of the silkworm, *Bombyx mori*. *Nucleic Acids Research* **25**, 1578-1584.
- H. Fujiwara and T. Hojyo (1997) Developmental profiles of wing imaginal discs of flugellos (*fl*), a wingless mutant of the silkworm, *Bombyx mori*. *Development, Genes and Evolution* **207**, 12-18.
- T. Hojyo and H. Fujiwara (1997) Reciprocal transplantation of wing discs between a wing deficient mutant (*fl*) and wild type of the silkworm, *Bombyx mori*. *Development Growth and Differentiation* **39**, 599-606.
- M. Kamimura, S. Tomita, M. Kiuchi and H. Fujiwara (1997) Tissue-specific and stage-specific expression of two silkworm ecdysone receptor isoforms -- ecdysteroid-dependent transcription in cultured anterior silk glands. *European Journal of Biochemistry* **248**, 786-793.
- H. Fujiwara, T. Matsuoka and M. Kamimura (1997) Expressions of genes induced by ecdysteroid during wing disc

development of wingless (*fl*) mutant of the silkworm. In *Advances in Comparative endocrinology* (edited by S. Kawashima and S. Kikuyama) 175-179. *Monduzzi Editore, Italy*.

藤原晴彦, 松岡朋子 (1998) 昆虫ステロイドホルモンによる転写制御. *化学と生物*, 36, 75-77.

藤原晴彦, 神村学 (1998) 昆虫ステロイドホルモンの受容と情報伝達. ホルモンの分子生物学-8「無脊椎動物のホルモン」(日本比較内分泌学会編), 105-126, 学会出版センター, 105-126.

M. Kamimura, M. Takahashi, S. Tomita, H. Fujiwara and M. Kiuchi (1999) Expression of ecdysone receptor isoforms and trehalase in the anterior silk gland of *Bombyx mori* during an extra larval molt and precocious pupation induced by 20-hydroxyecdysone administration. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology* **41**, 79-88.

H. Takahashi and H. Fujiwara (1999) Transcription analysis of the telomeric repeat-specific retrotransposons TRAS1 and SART1 of the silkworm *Bombyx mori*. *Nucleic Acids Research* **27**, 2015-2021.

藤原晴彦 (1999) 昆虫の擬態と変態: 細胞生物学から見た虫の装いと衣替え- 第一話 蚕の紋様の話. *ミクロスコピア*, 16, 254-258.

T. Matsuoka and H. Fujiwara (2000) Expression of ecdysteroid-regulated genes is reduced specifically in the wing discs of the wing-deficient mutant (*fl*) of *Bombyx mori*. *Development, Genes and Evolution* **210**, 120-128.

T. Sasaki and H. Fujiwara (2000) Detection and distribution patterns of telomerase activity in insects. *European Journal of Biochemistry* **267**, 1-8.

H. Fujiwara, Y. Nakazato, S. Okazaki and O. Ninaki (2000) Stability and telomere structure of chromosomal fragments in two different mosaic strains of the silkworm, *Bombyx mori*. *Zoological Science*, in press.

藤原晴彦 (2000) 昆虫の擬態と変態: 細胞生物学から見た虫の装いと衣替え- 第二話 華麗なるアゲハの変身. *ミクロスコピア*, 17, 12-17.

藤原晴彦 (2000) 昆虫の擬態と変態: 細胞生物学から見た虫の装いと衣替え- 第三話 虫の翅の作り方、無くし方. *ミクロスコピア*, 17, 28-32.

柳沼利信

T. Niimi, O. Yamashita, and T. Yaginuma, (1996) Structure of the *Bombyx* sorbitol dehydrogenase gene: a possible alternative use of the promoter. *Insect Molecular Biology* **5**, 269-280.

M. Takahashi, T. Niimi, H. Ichimura, T. Sasaki, O. Yamashita and T. Yaginuma, (1996) Cloning of a B-type cyclin homolog from *Bombyx mori* and the profiles of its mRNA level in non-diapause and diapause eggs. *Development, Genes and Evolution* **206**, 288-291.

T. Yaginuma, T. Mizuno, C. Mizuno, M. Ikeda, T. Wada, K. Hattori, O. Yamashita and G. M. Happ, (1996) Trehalase in the spermatophore from the bean-shaped accessory gland of the male mealworm beetle, *Tenebrio molitor*: purification, kinetic properties and localization of the enzyme. *Journal of Comparative Physiology B* **166**, 1-10.

H. Iwasaki, M. Takahashi, T. Niimi, O. Yamashita, and T. Yaginuma, (1997) Cloning of cDNA encoding *Bombyx* homologues of Cdc2 and Cdc2-related kinase from eggs. *Insect Molecular Biology* **6**, 131-141.

- T. Niimi, S. Morita, O. Yamashita and T. Yaginuma, (1997) The profiles of mRNA levels for BHR39, a *Bombyx* homolog of *Drosophila* hormone receptor 39, and for *Bombyx* FTZ-F1 in the course of embryonic development and diapause. *Development, Genes and Evolution* **207**, 410-412.
- K. Sato, M. Komoto, T. Sato, H. Enei, M. Kobayashi and T. Yaginuma, (1997) Baculovirus-mediated expression of a gene for trehalase of the mealworm beetle, *Tenebrio molitor*, in insect cells, SF-9, and larvae of the cabbage armyworm, *Mamestra brassicae*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* **27**, 1007-1016.
- 柳沼利信 (1997) 昆虫の生理と行動. 性の決定・胚発生・雌の生殖系・雄の生殖系. 植物保護の辞典 (本間保男他編), p. 99-106, 朝倉書店, 東京.
- 柳沼利信, 新美輝幸 (1997) カイコの胚休眠とソルビトール脱水素酵素. 化学と生物, 35, 468-470.
- T. Yaginuma (1997) A cold-inducible gene of sorbitol dehydrogenase in diapause eggs of *Bombyx mori*. *Miscellaneous Publication of the National Institute of Sericultural and Entomological Science* (22), 5-7.
- M. Takahashi, H. Iwasaki, T. Niimi, O. Yamashita and T. Yaginuma, (1998) Changing profiles in mRNA levels of Cdc2 and a novel Cdc2-related kinase (Bcdrk) in relation to ovarian development and embryonic diapause of *Bombyx mori*. *Applied Entomology and Zoology* **33**, 551-559.
- T. Yaginuma and O. Yamashita, (1999) Oxygen consumption in relation to sorbitol utilization at the termination of diapause in eggs of the silkworm, *Bombyx mori*. *Journal of Insect Physiology* **45**, 621-627.

山下興亜

- K. Imai, K. Sugiura, T. Komiya and O. Yamashita (1996) Isolation and partial structure of a unique lipophilic peptide, VAP peptide, from the heads of male silkworm moths. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry* **60**, 355-357.
- T. Yaginuma, T. Mizuno, C. Mizuno, M. Ikeda, T. Wada, K. Hattori, O. Yamashita and G.M. Happ. (1996) Trehalase in the Spermatophore from the bean-shaped accessory gland of the male mealworm beetle, *Tenebrio molitor*: purification, kinetic properties and localization of the enzyme. *Journal of Comparative Physiology B* **166**, 1-10.
- T. Niimi, O. Yamashita and T. Yaginuma (1996) Structure of the *Bombyx* sorbitol dehydrogenase gene: a possible alternative use of the promoter. *Insect Molecular Biology* **5**(4), 269-280.
- M. Takahashi, T. Niimi, H. Ichimura, T. Sasaki, O. Yamashita and T. Yaginuma (1996) Cloning of a B-type cyclin homolog from *Bombyx mori* and the profiles of its mRNA level in non-diapause and diapause eggs. *Development, Genes and Evolution* **206**, 288-291.
- 山下興亜 (1996) 休眠ホルモン作用活性化タンパク質(VAP ペプチド)の同定と作用. 蚕糸・昆虫研資料, 21, 85-87.
- O. Yamashita (1996) Diapause hormone of the silkworm, *Bombyx mori*: Structure, gene expression and function. *Journal of Insect Physiology* **42**, 669-679.
- H. Iwasaki, T. Takahashi, T. Niimi, O. Yamashita and T. Yaginuma (1997) Cloning of cDNAs encoding *Bombyx* homologues of Cdc2 and Cdc2-related kinase from eggs. *Insect Molecular Biology* **6**(2), 131-141.

- G. Starnecker, P.B. Koch, S. Matsumoto, K. Endo and O. Yamashita (1997) Occurrence of four neuropeptides in the anterior central nervous system of the butterfly, *Precis coenia*. *Naturwissenschaften* **84**, 152-154.
- M. Ikeda and O. Yamashita (1997) Structure of the gene encoding vitellin-degrading protease of the silkworm, *Bombyx mori*. *The Journal of Sericultural Science of Japan* **66** (5), 346-350.
- Z.-H. Su, Y. Itani and O. Yamashita (1997) Structure of trehalase gene of the silkworm, *Bombyx mori* and phylogenetic relationship of trehalases. *The Journal of Sericultural Science of Japan* **66** (6), 457-465.
- N. Maki and O. Yamashita (1997) Purification and characterization of a protease degrading 30kDa yolk proteins of the silkworm, *Bombyx mori*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* **27**, 721-728.
- T. Niimi, S. Morita, O. Yamashita and T. Yaginuma (1997) The profiles of mRNA levels for BHR39, a *Bombyx* homolog of *Drosophila* hormone receptor 39, and *Bombyx* FTZ-F1 in the course of embryonic development and diapause. *Development, Genes and Evolution* **207**, 410-412.
- 山下興亜 (1997) 休眠の知恵. リサ, 26.
- Y. Sato, K. Shiomi, H. Saito, K. Imai and O. Yamashita (1998) Phe-X-Pro-Arg-Leu-NH₂ peptide producing cells in the central nervous system of the silkworm, *Bombyx mori*. *Journal of Insect Physiology* **44**, 333-342.
- K. Shiomi, Y. Sato, K. Imai and O. Yamashita (1998) A hydrophobic peptide (VAP-peptide) of the silkworm, *Bombyx mori*: Structure, expression and an enhancing function of diapause hormone activity. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* **28**, 75-82.
- K. Shiomi, T. Niimi, Y. Sato, K. Imai and O. Yamashita (1998) A hydrophobic peptide (VAP-peptide) of the silkworm, *Bombyx mori* : a unique role for adult activity proposed from gene expression and production at the terminal phase of metamorphosis. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* **28**, 671-676.
- K. Imai, T. Nomura, H. Katsuzaki, T. Komiya and O. Yamashita (1998) Minimum structure of Diapause Hormone required for biological activity. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry* **62**(10), 1875-1879.
- Y. Fujiwara and O. Yamashita (1998) Developmental changes and hormonal regulation of mRNA of *Bombyx mori* larval serum protein (BmLSP). *The Journal of Sericultural Science of Japan* **67**(5), 393-401.
- N. Katagiri, O. Ando and O. Yamashita (1998) Reduction of glycogen in eggs of the silkworm, *Bombyx mori*, by use of a trehalase inhibitor, trehalozin, and diapause induction in glycogen-reduced eggs. *Journal of Insect Physiology* **44**, 1205-1212.
- M. Takahashi, H. Iwasaki, T. Niimi, O. Yamashita and T. Yaginuma (1998) Changing profiles of mRNA levels of Cdc2 and a novel Cdc2-related kinase (Bcdrk) in relation to ovarian development and embryonic diapause of *Bombyx mori*. *Applied Entomology and Zoology* **33**(4), 551-559.
- W. Xu, Y. Sato and O. Yamashita (1999) Molecular characterization of the cDNA encoding diapause hormone and pheromone biosynthesis activating neuropeptide in *Bombyx mandarina*. *The Journal of Sericultural Science of Japan* **68**(5), 373-379.
- Y. Ishida, T. Niimi and O. Yamashita (1999) The stage-and cell-specific expression of the *Bombyx mori* diapause

hormone-pheromone biosynthesis activating neuropeptide (*BomDH-PBAN*) gene in the transformed *Drosophila*. *The Journal of Sericultural Science of Japan* **68**(5), 417-427.

K. Shiomi, T. Niimi, K. Imai and O. Yamashita (2000) Structure of the VAP-peptide (*BmACP-6.7*) gene in the silkworm, *Bombyx mori* and a possible regulation of its expression by *BmFTZ-F1*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* **30**, 119-125.

Y. Ishida, T. Niimi and O. Yamashita (2000) The *cis*-regulatory region responsible for the *BomDH-PBAN* gene expression in FXPRLamide peptide producing neurosecretory cells of the transformed *Drosophila*. *The Journal of Sericultural Science of Japan* **69**(2), 111-119.

計画研究 2 班

久保健雄

K. Kawasaki, T. Kubo and S. Natori (1996) Presence of the *Periplaneta* lectin-related protein family in the American cockroach *Periplaneta americana*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* **26**, 355-364.

K. Ohashi, M. Sawata, H. Takeuchi, S. Natori and T. Kubo (1996) Molecular cloning of cDNA and analysis of expression of the gene for α -glucosidase from the hypopharyngeal gland of the honeybee *Apis mellifera* L. *Biochemical and Biophysical Research Communication* **221**, 380-385.

T. Kubo, M. Sasaki, J. Nakamura, H. Sasagawa, K. Ohashi, H. Takeuchi and S. Natori. (1996) Change in the expression of hypopharyngeal gland proteins of the worker honeybees (*Apis mellifera* L.) with age and/or role. *Journal of Biochemistry* **119**, 291-295.

T. Horio, T. Kubo and S. Natori (1996) Purification and cDNA cloning of the alcohol dehydrogenase of the flesh fly *Sarcophaga peregrina*: A structural relationship between alcohol dehydrogenase and a 25-kDa protein. *European Journal of Biochemistry* **237**, 698-703.

S. Haq, T. Kubo, S. Kurata, A. Kobayashi and S. Natori (1996) Purification, characterization, and cDNA cloning of a galactose-specific C-type lectin from *Drosophila melanogaster*. *Journal of Biological Chemistry* **271**, 20213-20218.

N. Adachi, T. Kubo and S. Natori (1996) Purification, characterization, and cDNA cloning of ABP-2 (Arylphorin gene-specific binding protein-2) that specifically binds to the ABP-1-binding sequence in the arylphorin gene of *Sarcophaga peregrina*. *Journal of Biochemistry* **120**, 1239-1246.

久保健雄、大橋一晶、竹内秀明、澤田美由紀、上川内あづさ、名取俊二 (1996) ミツバチの分子社会生物学 化学と生物 **34**, 793-798.

T. Kubo, T. Arai, K. Kawasaki and S. Natori (1996) Insect lectins and epimorphosis. *Trends Glycosci. Glycotech.* **8**, 357-364.

S. Natori and T. Kubo (1996) Role of lectins in development and morphogenesis in insects. In *New Directions in Invertebrate Immunology* (edited by K. Soederhall, S. Iwanaga and G. R. Vasta) 175-187, SOS Publications, Fair

Haven.

- K. Ohashi, S. Natori and T. Kubo (1997) Change in the mode of gene expression of the hypopharyngeal gland cells with an age-dependent role change of the worker honeybee *Apis mellifera* L. *European Journal of Biochemistry* **249**, 797-802.
- Y. Sekizawa, T. Kubo, H. Kobayashi, T. Nakajima and S. Natori (1997) Molecular cloning of cDNA for lysenin, a novel protein in the earthworm *Eisenia foetida* that causes contraction of rat vascular smooth muscle. *Gene* **191**, 97-102
- 荒井俊光、久保健雄 ゴキブリの器官再生の謎に挑む (1997) ミクロスコピア **14**, 32-37.
- A. N-Kitabayashi, T. Arai, T. Kubo and S. Natori (1998) Molecular cloning of cDNA for p10, a novel protein that increases in the regenerating legs of *Periplaneta americana* (American cockroach). *Insect Biochemistry and Molecular Biology* **28**, 785-790.
- T. Arai, K. Kawasaki, T. Kubo and S. Natori (1998) Cloning of cDNA for regenectin, a humoral lectin of *Periplaneta americana*, and expression of the regenectin gene during leg regeneration. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* **28**, 987-994.
- A. Kamikouchi, H. Takeuchi, M. Sawata, K. Ohashi, S. Natori and T. Kubo (1998) Preferential expression of the gene for a putative inositol 1,4,5-triphosphate receptor homologue in the mushroom bodies of the brain of the worker honeybee *Apis mellifera* L. *Biochemical and Biophysical Research Communication* **242**, 181-186.
- K. Ohashi, S. Natori and T. Kubo (1999) Expression of amylase and glucose oxidase in the hypopharyngeal gland with an age-dependent role change of the worker honeybee (*Apis mellifera* L.). *European Journal of Biochemistry* **265**, 127-133.
- T. Miura, A. Kamikouchi, M. Sawata, H. Takeuchi, S. Natori, T. Kubo and T. Matsumoto (1999) Soldier-caste specific gene expression in the mandibular glands of *Hodotermopsis japonica* (Isoptera: Termitidae). *Proceedings of National Academy of Sciences USA* **96**, 13874-13879.
- 竹内秀明、上川内あづさ、澤田美由紀、吉野大輔、大原麻耶、久保健雄 (1999) ミツバチのキノコ体に選択的に発現する遺伝子の同定と解析 日本比較生理生化学誌 **16**, 266-277.
- H. Shiraishi, A. Kobayashi, Y. Sakamoto, T. Nonaka, Y. Mitsui, N. Aozasa, T. Kubo and S. Natori. (2000) Molecular cloning and characterization of SRAM, a novel insect Rel/Ankyrin-family protein present in nuclei. *Journal of Biochemistry* **127**, 1127-1134.
- A. Kamikouchi, H. Takeuchi, S. Natori and T. Kubo (2000) Concentrated expression of the genes for calmodulin kinase II and protein kinase C in the mushroom bodies of the honeybee *Apis mellifera* L. *Journal of Comparative Neurology* **417**, 501-510.
- T. Arai, T. Kubo and S. Natori (2000) Identification, characterization and cDNA cloning of two novel proteins secreted into the external space of the regenerating leg of *Periplaneta americana*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* **30**, 287-295.

K. Ohashi, M. Sasaki, H. Sasagawa, J. Nakamura, S. Natori and T. Kubo (2000) Functional flexibility of the honeybee hypopharyngeal gland in a dequeened colony. *Zoological Science*, in press.

久保健雄、大橋一晶、上川内あづさ、澤田美由紀、大原麻耶、吉野大輔、竹内秀明 (2000) ミツバチの社会性を巡る分子生物学－昆虫の社会性の進化にどのようにアプローチするか－ 蛋白質核酸酵素 **45**, 1229-1236.

名取俊二

T. Kubo, M. Sasaki, J. Nakamura, H. Sasagawa, K. Ohashi, H. Takeuchi and S. Natori (1996) Change in the expression of hypopharyngeal-gland proteins of the worker honeybees (*Apis mellifera* L.) with age and/or role. *Journal of Biochemistry* **119**, 291-295.

H. Sugiyama and S. Natori (1996) Transmethylation reaction is essential for *Sarcophaga* lectin gene expression. *Journal of Biochemistry* **119**, 354-359.

K. Ohashi, M. Sawata, H. Takeuchi, S. Natori and T. Kubo (1996) Molecular cloning of cDNA for α -glucosidase from the hypopharyngeal gland of the honeybee *Apis mellifera* L. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **221**, 380-385.

T. Ito, Q. Xu, H. Takeuchi, T. Kubo and S. Natori (1996) Spermatocyte-specific expression of the gene for mouse testis-specific transcription elongation factor SII-T1. *FEBS Letters* **385**, 21-24.

K. Kawasaki, T. Kubo and S. Natori (1996) Presence of the *Periplaneta* lectin-related protein family in the American cockroach *Periplaneta americana*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* **26**, 355-364.

K. Homma, T. Matsushita and S. Natori (1996) Purification, characterization, and cDNA cloning of a novel growth factor from the conditioned medium of NIH-Sape-4, an embryonic cell line of *Sarcophaga peregrina* (flesh fly). *Journal of Biological Chemistry* **271**, 13770-13775.

J-Y Leem, C. Nishimura, S. Kurata, I. Shimada, A. Kobayashi and S. Natori (1996) Purification and characterization of N- β -alanyl-5-S-glutathionyl-3, 4-dihydroxyphenylalanine, a novel antibacterial substance of *Sarcophaga peregrina* (flesh fly). *Journal of Biological Chemistry* **271**, 13575-13577.

T. Horio, T. Kubo and S. Natori (1996) Purification and cDNA cloning of the alcohol dehydrogenase of the flesh fly *Sarcophaga peregrina*: A structural relationship between alcohol dehydrogenase and a 25-kDa protein. *European Journal of Biochemistry* **237**, 698-703.

S. Haq, T. Kubo, S. Kurata, A. Kobayashi and S. Natori (1996) Purification, characterization, and cDNA cloning of a galactose-specific C-type lectin from *Drosophila melanogaster*. *Journal of Biological Chemistry* **271**, 20213-20218.

Y. Sekizawa, N. Ohta, S. Natori and H. Kobayashi (1996) Immunocytochemical localization of lysenin, a novel protein isolated from the coelomic fluid of the earthworm *Eisenia foetida*. *Biomedical Research* **17**, 327-330.

K. Homma and S. Natori (1996) Identification of substrate proteins for cathepsin L that are selectively hydrolyzed during the differentiation of imaginal discs of *Sarcophaga peregrina*. *European Journal of Biochemistry* **240**,

- N. Adachi, T. Kubo and S. Natori (1996) Purification, characterization, and cDNA cloning of ABP-2 (Arylphorin gene-specific binding protein-2) that specifically binds to the ABP-1-binding sequence in the arylphorin gene of *Sarcophaga peregrina*. *Journal of Biochemistry* **120**, 1239-1246.
- Y. Hirakura, J. Alvarez-Bravo, S. Kurata, S. Natori and Y. Kirino (1996) Selective interaction of synthetic antimicrobial peptides derived from sapecin B with lipid bilayers. *Journal of Biochemistry* **120**, 1130-1140.
- T. Kubo, T. Arai, K. Kawasaki and S. Natori (1996) Insect lectins and epimorphosis. *Trends Glycosci. Glycotech.* **8**, 357-364.
- S. Natori and T. Kubo (1996) Role of lectins in development and morphogenesis in insects. In *New Directions in Invertebrate Immunology* (edited by K. Soederhall, S. Iwanaga and G. R. Vasta) 175-187, SOS Publications, Fair Haven.
- 久保健雄, 大橋一晶, 竹内秀明, 澤田美由紀, 上川内あづさ, 名取俊二 (1996) ミツバチの分子社会生物学 化学と生物 **34**, 793-798.
- T. Kunieda, S. Kurata and S. Natori (1997) Regeneration of *Sarcophaga* imaginal discs in vitro: Implication of 20-hydroxyecdysone. *Developmental Biology* **183**, 86-94.
- S. Ohtsuki, K. Homma, S. Kurata and S. Natori (1997) Molecular cloning of cDNA for *Sarcophaga* prolyl endopeptidase and characterization of the recombinant enzyme produced by an *E. coli* expression system. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* **27**, 337-343.
- T. Yano, A. Kobayashi, S. Kurata and S. Natori (1997) Purification and characterization of cathepsin B mRNA 3' - untranslated-region-binding protein (CBBP), a protein that represses cathepsin B mRNA translation. *European Journal of Biochemistry* **245**, 260-265.
- S. Ohtsuki, K. Homma, S. Kurata and S. Natori (1997) Nuclear localization and involvement in DNA synthesis of *Sarcophaga* prolyl endopeptidase. *Journal of Biochemistry* **121**, 1176-1181.
- S. Hori, A. Kobayashi and S. Natori (1997) Monoclonal antibodies against pupa-specific surface antigens of *Sarcophaga peregrina* (flesh fly) hemocytes. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **236**, 497-501.
- Y. Nakajima, Y. Tsuji, K. Homma and S. Natori (1997) A novel protease in the pupal yellow body of *Sarcophaga peregrina* (flesh fly): Its purification and cDNA cloning. *Journal of Biological Chemistry* **272**, 23805-23810.
- M. Shimoaraiso, T. Nakanishi, T. Kubo and S. Natori (1997) Identification of the region in yeast S-II that defines species specificity in its interaction with RNA polymerase II. *Journal of Biological Chemistry* **272**, 26550-26554.
- Y. Sekizawa, T. Kubo, H. Kobayashi, T. Nakajima and S. Natori (1997) Molecular cloning of cDNA for lysenin, a novel protein in the earthworm *Eisenia foetida* that causes contraction of rat vascular smooth muscle. *Gene* **191**, 97-102.
- M. Hijikata, A. Kobayashi, J.-Y. Leem, H. Fukasawa, Y. Uehara and S. Natori (1997) Inhibition of protein tyrosine

- kinase by 5-S-GAD, a novel antibacterial substance from an insect. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **237**, 423-426.
- K. Ohashi, S. Natori and T. Kubo (1997) Change in the mode of gene expression of the hypopharyngeal gland cells with an age-dependent role change of the worker honeybee *Apis mellifera* L. *European Journal of Biochemistry* **249**, 797-802.
- Y. Nakajima, J. Alvarez-Bravo, J-H Cho, K. Homma, S. Kanegasaki and S. Natori (1997) Chemotherapeutic activity of synthetic antimicrobial peptides: correlation between chemotherapeutic activity and neutrophil-activating activity. *FEBS Letters* **415**, 64-66.
- 名取俊二 (1997) 昆虫の生体防御機構の研究から創薬を考える アニテックス 69, 259-264.
- 本間光一, 名取俊二 (1997) 昆虫の生体防御機構と創薬への応用 化学と生物 35, 484-490.
- 小林綾子, 名取俊二 (1997) 生体防御と発生における昆虫体液細胞の機能について- センチニクバエの最近の研究から: マクロファージと生体防御-新しい研究の展開- (日本生体防御学会編) 25-53, 菜根出版.
- 本間光一, 名取俊二 (1997) 昆虫の変態と分化に関与するプロテアーゼ 日本応用酵素協会誌 32, 19-16.
- K. Homma and S. Natori (1997) Growth factors of *Sarcophaga peregrina*. In *Invertebrate Cell Culture: Novel Directions and Biotechnology Applications* (edited by K. Maramorosch and J. Mitsuhashi) 69-76, Science Publishers, Inc., Enfield.
- S. Natori (1997) Relation between insect defense proteins and development of the fleshfly, *Sarcophaga peregrina*. In *Molecular Mechanism of Immune Response in Insects* (edited by P. T. Brey and D. Hultmark) 245-260 Chapman and Hall, London.
- H. Kobayashi, Y. Sekizawa, S. Shioda, S. Natori, T. Nakajima and M. Umeda (1997) Lysenin, a novel bioactive protein isolated from coelomic fluid of the earthworm *Eisenia fetida* ... Structure, secretion and biological activity. In *NEuropean oendocrinology Retrospect and Perspectives* (edited by H.W. Korf and K.H. Usadel) 255-269.
- H. Okuyama, S. Kurata, K. Homma and S. Natori (1998) Selective inactivation of elongation factor-2 (EF-2) in free adipocytes obtained by treating *Sarcophaga* larval fat bodies with chymotrypsin. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* **28**, 301-307.
- A. Kamikouchi, H. Takeuchi, M. Sawata, K. Ohashi, S. Natori and T. Kubo (1998) Preferential expression of the gene for a putative inositol 1,4,5-trisphosphate receptor homologue in the mushroom bodies of the brain of the worker honeybee *Apis mellifera* L. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **242**, 181-186.
- M. Okamoto, I. Mitsuhashi, M. Ohshima, S. Natori and Y. Ohashi (1998) Enhanced expression of an antimicrobial peptide sarcotoxin IA by GUS fusion in transgenic tobacco plants. *Plant Cell Physiology* **39**, 57-63.
- T. Ishino, S. Ohtsuki, K. Homma and S. Natori (1998) cDNA cloning of prolyl endopeptidase and its involvement in DNA synthesis by Swiss 3T3 cells. *Journal of Biochemistry* **123**, 540-545.
- Y. Fujita, S. Kurata, K. Homma and S. Natori (1998) A novel lectin from *Sarcophaga*. *Journal of Biological Chemistry*

- Y. Tsuji, Y. Nakajima, K. Homma and S. Natori (1998) Antibacterial activity of a novel 23-kDa serine proteinase in the yellow body of *Sarcophaga peregrina* (flesh fly) pupae. *FEBS Letters* **425**, 131-133.
- A. Nomura-Kitabayashi, T. Arai, T. Kubo and S. Natori (1998) Molecular cloning of cDNA for p10, a novel protein that increases in the regenerating legs of *Periplaneta americana* (American cockroach). *Insect Biochemistry and Molecular Biology* **28**, 301-307.
- Y. Taira, T. Kubo and S. Natori (1998) Molecular cloning of cDNA and tissue-specific expression of the gene for SII-K1, a novel transcription elongation factor SII. *Genes to Cells* **3**, 289-296.
- S.Y. Lee, M.Y. Cho, J.H. Hyun, K.M. Lee, K. Homma, S. Natori, S. Kawabata, S. Iwanaga and B.L. Lee (1998) Molecular cloning of cDNA for pro-phenoloxidase activating factor I, a serine protease is induced by lipopolysaccharide or 1,3- β -glucan in coleopteran insect, *Holotrichia diomphalia* larvae. *European Journal of Biochemistry* **275**, 615-621.
- T. Ito, M.F. Seldin, M.M. Taketo, T. Kubo and S. Natori (1998) Gene organization and chromosome mapping of the testis-specific S-II. *Mammalian Genome* **11**, 915-917.
- Z-B. Zheng, S. Nagai, N. Iwanami, A. Kobayashi, M. Hijikata, S. Natori and U. Sankawa (1998) Selective inhibition of src protein tyrosine kinase by analogues of 5-S-glutathionyl- β -alanyl-L-dopa. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin* **46**, 1950-1951.
- T. Arai, T. Kubo and S. Natori (1998) Cloning of cDNA for regenectin, a humoral C-type lectin of *Periplaneta americana*, and expression of the regenectin gene during leg regeneration. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* **28**, 987-994.
- J. Nakajima-Shimada, S. Natori and T. Aoki (1998) Effects of synthetic undecapeptides on *Trypanosoma cruzi* in vitro. *Parasitology International* **47**, 203-209.
- J.Y. Leem, H.Y. Park, H. Fukazawa, Y. Uehara and S. Natori (1998) Inhibition effects of 5-S-GAD on phosphorylation of V-SRC and BCR-ABL tyrosine kinase. *Biological and Pharmaceutical Bulletin* **21**, 784-785.
- 名取俊二 (1998) 昆虫の生体防御分子から創薬へ 現代化学 2月号, 32-37.
- 名取俊二 (1998) センチニクバエの生体防御システム *Biomedical Perspectives* **7**, 77-87.
- 名取俊二 (1998) 昆虫の生体防御とレクチン 蛋白質・核酸・酵素 **42**, 1941-1944.
- Z-B. Zheng, S. Nagai, N. Iwanami, D-Y. Sun, A. Kobayashi, M. Hijikata, S. Natori and U. Sankawa (1999) Different inhibitory effects of 5-S-glutathionyl- β -alanyl-L-dopa (5-S-GA-LD) analogues on autophosphorylation of src protein tyrosine kinase. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin* **47**, 136-137.
- S. Yamaguchi, K. Homma and S. Natori (1999) A novel egg-derived tyrosine phosphatase (EDTP) that participates in the embryogenesis of *Sarcophaga peregrina* (flesh fly). *European Journal of Biochemistry* **259**, 946-953.
- M. Ohshima, I. Mitsuhara, M. Okamoto, S. Sawado, K. Nishiyama, H. Kaku, S. Natori and Y. Ohashi (1999) Enhanced resistance to bacterial diseases in transgenic tobacco leaf overexpressing sarcotoxin IA, a bactericidal peptide of

- insect. *Journal of Biochemistry* **125**, 431-435.
- M-Y. Cho, H-S. Lee, K-M. Lee, K. Homma, S. Natori and B-L. Lee (1999) Molecular cloning and functional properties of two early-stage encapsulation-relating proteins from the coleopteran insect, *Tenebrio molitor* larvae. *European Journal of Biochemistry* **262**, 737-744.
- Y. Fujimoto, A. Kobayashi, S. Kurata and S. Natori (1999) Two subunits of 26/29-kDa proteinase are probably derived from a common precursor protein. *Journal of Biochemistry* **125**, 566-573.
- Fujii, Y. Tanaka, K. homma and S. Natori (1999) Induction of *Sarcophaga* central nervous system remodeling by 20-hydroxyecdysone *in vitro*. *Journal of Biochemistry* **125**, 613-618.
- H-S. Lee, M-Y. Cho, K-M. Lee, T- H. Kwon, K. Homma, S. Natori and B-L. Lee (1999) The prophenoloxidase of coleopteran insect larvae was activated during cell clump/cell adhesion of insect cellular defense reactions. *FEBS Letters* **455**, 255-259.
- M-Y. Cho, H-W. Choi, G-Y. Moon, M-H. Kim, T- H. Kwon, K. Homma, S. Natori and B-L. Lee (1999) An 86-kDa diapause protein 1-like protein is a component of early-staged encapsulation-relating proteins in coleopteran insect, *Tenebrio molitor* larvae. *FEBS Letters* **451**, 303-307.
- Z-B. Zheng, S. Nagai, N. Iwanami, A. Kobayashi, S. Natori and U. Sankawa (1999) Inhibition effects of 5-S-glutathionyl- β -alanyl-L-dopa analogues against Src protein tyrosine kinase. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin* **47**, 777-782.
- W.S. Price, A. Kobayashi, H. Ide, S. Natori and Y. Arata (1999) Visualizing the postembryonic development of *Sarcophaga peregrina* (flesh fly) by NMR microscopy. *Physiological Entomology* **24**, 386-390.
- K. Ohashi, S. Natori and K. Kubo (1999) Expression of amylase gene in the hypopharyngeal gland with an age-dependent role change of the warker honeybee (*Apis mellifera* L.). *European Journal of Biochemistry* **265**, 127-133.
- R. Iijima, S. Yamaguchi, K. Homma and S. Natori (1999) Stage-specific Inhibition of *Xenopus* embryogenesis by aprotinin, a serine protease inhibitor. *Journal of Biochemistry* **126**, 912-916.
- U. Theopold, M. Rissler, M. Fabbri, O. Schmidt and S. Natori (1999) Insect glycoBiology: a lectin multigene family in *Drosophila melanogaster*. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **261**, 923-927.
- M. Hijikata, HN. Matsumoto, A. Kobayashi, A. Nifuji, M. Noda and S. Natori (1999) Induction of apoptosis of monocyte-macrophage lineage cells by 5-S-GAD. *FEBS Letters* **457**, 405-408.
- JH. Cho, K. Homma, S. Kanegasaki and S. Natori (1999) Activation of human neutrophils by a synthetic anti-microbial peptide, KLKLLLLLKLK-NH₂, via cell surface calreticulin. *European Journal of Biochemistry* **266**, 878-885.
- T. Miura, A. Kamikouchi, M. Sawata. H. Takeuchi, S. Natori, T. Kubo and T. Matsumoto (1999) Soldier-caste specific gene expression in the mandibular glands of *Hodotermopsis japonica* (Isoptera: Termopsidae). *Proceedings of National Academy of Sciences USA* **96**, 13874-13879.
- A. Kobayashi, P.T. Brey, K. Katsube, A.D. Torre, C.W. Roth, S. Natori and R. Ollo (1999) Identification and

characterization of *sevenless* in the malaria insect vector *Anopheles gambiae*. *Insect Molecular Biology* **8**, 277-285.

S. Natori, H. Shiraishi, S. Hori and A. Kobayashi (1999) The roles of *Sarcophaga* defense molecules in immunity and metamorphosis. *Dev. Comp. Immunol.* **23**, 317-328.

名取俊二 (1999) 昆虫の変態と組織の再編成生 蛋白質・核酸・酵素 **44**, 2041-2048.

名取俊二 (1999) 昆虫免疫が拓く生物学と薬学のフロンティア - センチニクバエの生体防御機構 科学 **69**, 688-696.

上野孝治

T. Nagata, Y. Suzuki, K. Ueno, H. Kokubo, X. Xu, C. -c. Hui, W. Hara, and M. Fukuta, (1996) Developmental expression of the *Bombyx Antennapedia* homologue and homeotic changes in the *Nc* mutant. *Genes to Cells* **1**, 555-568.

K. Ueno and Y. Suzuki (1997) p260/270 expressed in embryonic abdominal leg cells of *Bombyx mori* can transfer palmitate to peptides. *Journal of Biological Chemistry* **272**, 13519-13526.

H. Kokubo, K. Ueno, K. Amanai and Y. Suzuki, (1997) Involvement of the *Bombyx Scr* gene in development of the silk gland. *Developmental Biology* **186**, 46-57.

K. Matsunami, H. Kokubo, K. Ohno, P.-x. Xu, K. Ueno and Y. Suzuki (1999) Embryonic silk gland development in *Bombyx*: molecular cloning and expression of the *Bombyx trachealess* gene. *Development, Genes and Evolution* **209**, 507-514.

桜井 勝

S. Niimi and S. Sakurai (1997) Developmental changes in juvenile hormone and juvenile hormone acid titers in the hemolymph and in vitro juvenile hormone synthesis by corpora allata of the silkworm, *Bombyx mori*. *Journal Insect Physiology* **43**, 875-884.

I. Yoshida, S. Tsuzuki, S. E. A. Salam, M. Ino, A. M. Korayem, S. Sakurai and M. Iwami (1997) Bombyxin F1 gene: Structure and expression of a new bombyxin family gene that forms a pair with bombyxin B10 gene. *Zoological Science* **14**, 615-622.

Y. Oda, M. Iwami, M. Osanai and S. Sakurai (1997) Dynamics of haemolymph sorbitol-6-phosphate and its control by ecdysteroid in the larvae of the silkworm, *Bombyx mori*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* **27**, 461-468.

S. Tsuzuki, T. Masuta, M. Furuno, S. Sakurai and M. Iwami (1997) Structure and Expression of Bombyxin E1 gene: A novel family gene that encodes bombyxin-IV, an insect insulin-related neurosecretory peptide. *Comparative Biochemistry and Physiology* **117B**, 409-416.

I. Yoshida, K. Moto, S. Sakurai and M. Iwami (1998) A novel member of the bombyxin gene family: structure and expression of bombyxin G1, an insulin-related peptide gene of the silkworm *Bombyx mori*. *Development Genes*

- S. Sakurai, M. Kaya and S. Satake (1998) Hemolymph ecdysteroid titer and ecdysteroid-dependent developmental events in the last-larval stadium of the silkworm, *Bombyx mori*: role of low ecdysteroid titer in larval-pupal metamorphosis and a reappraisal of the head critical period. *Journal of Insect Physiology* **44**, 867-881.
- T. Singtripop, S. Wanichacheewa, S. Tsuzuki and S. Sakurai (1999) Larval Growth and diapause in a tropical moth, *Omphisa fuscidentalis* Hampson. *Zoological Science* **16**, 725-733.
- K. Moto, S. Salam, S. Sakurai and M. Iwami (1999) Gene transfer into insect brain and cell-specific expression of bombyxin gene. *Development Genes and Evolution* **209**, 447-450.
- J. Terashima, N. Yasuhara, M. Iwami and S. Sakurai (2000) Programmed cell death triggered by insect steroid hormone, 20-hydroxyecdysone, in the anterior silk gland of the silkworm, *Bombyx mori*. *Development, Genes and Evolution*, in press
- S. Tsuzuki, M. Iwami and S. Sakurai (2000) Ecdysteroid-inducible genes in the programmed cell death during insect metamorphosis. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, in press.
- T. Singtripop, S. Wanichacheewa and S. Sakurai (2000) Juvenile hormone-mediated termination of larval diapause in the bamboo borer, *Omphisa fuscidentalis*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, in press.
- Y. Oda, M. Uejima, M. Iwami and S. Sakurai (2000) Role of ecdysteroids in the dynamics of insect hemolymph sugar. *Zoological Science*, in press.

石川 統

- H. Dohra, K. Yamamoto, M. Fujishima and H. Ishikawa (1997) Cloning and sequencing of gene for a periplasmic 5.4 kDa peptide of the macronucleus-specific symbiont *Holospira obtusa* of the ciliate *Paramecium caudatum*. *Zoological Science* **14**, 69-75.
- S. Aoki, C. D. von Dohlen, U. Kurosu and H. Ishikawa (1997) Migration to roots by first-instar nymphs, and not by alates, in the gall aphid *Clydesmithia canadensis*. *Naturwissenschaften* **84**, 35-36.
- S. Sato and H. Ishikawa (1997) Expression and control of an operon from an intracellular symbiont which is homologous to the *groE* operon. *Journal of Bacteriology* **179**, 2300-2304.
- S. Sato and H. Ishikawa (1997) Structure and expression of the *dnaKJ* operon of *Buchnera*, an intracellular symbiotic bacteria of aphid. *Journal of Biochemistry* **122**, 41-48.
- Y. Hongoh and H. Ishikawa (1997) Uric acid as a nitrogen resource for the brown planthopper, *Nilaparvata lugens*: Studies with synthetic diets and aposymbiotic insects. *Zoological Science* **14**, 581-586.
- S. Masui, T. Sasaki and H. Ishikawa (1997) *groE*-homologous operon of *Wolbachia*, an intracellular symbiont of arthropods: A new approach for their phylogeny. *Zoological Science* **14**, 701-706.
- H. Harada, H. Oyaizu, Y. Kosako and H. Ishikawa (1997) *Erwinia aphidicola* and, a new species isolated from pea aphid, *Acyrtosiphon pisum*. *Journal of General and Applied Microbiology* **43**, 349-354.

- H. Harada and H. Ishikawa (1997) Phylogenetic relationship based on *groE* genes among phenotypically related *Enterobacter*, *Pantoea*, *Klebsiella*, *Serratia*, and *Erwinia* species. *Journal of General and Applied Microbiology* **43**, 355-361.
- H. Harada and H. Ishikawa (1997) Experimental pathogenicity of *Erwinia aphidicola* to pea aphid, *Acyrtosiphon pisum*. *Journal of General and Applied Microbiology* **43**, 363-367.
- A. Nakabachi and H. Ishikawa (1997) Differential display of mRNAs related to amino acid metabolism in the endosymbiotic system of aphids. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* **27**, 1057-1062.
- T. Fukatsu and H. Ishikawa (1998) Differential immunohistochemical visualization of the primary and secondary intracellular symbiotic bacteria of aphids. *Applied Entomology and Zoology* **33**, 321-326.
- M. Morioka and H. Ishikawa (1998) Insect chaperonin 60: Symbionin. In *Methods in Enzymology*, Vol. 290, eds. G. H. Lorimer & T. O. Baldwin, Academic Press, New York, pp. 181-193.
- H. Dohra, M. Fujishima and H. Ishikawa (1998) Structure and expression of a *groE* -homologous operon of a macronucleus-specific symbiont *Holospira obtusa* of the ciliate *Paramecium caudatum*. *Journal of Eukaryot. Microbiology* **45**, 71-79.
- Y. Imura, H. Ishikawa, K. Yamamoto and F. Sehnal (1998) Hemagglutinating properties of apolipoprotein III from the hemolymph of *Galleria mellonella* larvae. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology* **38**, 119-125.
- S. Aoki, U. Kurosu, T. Fukatsu and H. Ishikawa (1998) *Cerataphis jamuritsu*, a subtropical aphid producing soldiers in large, hard gall (Homoptera). *Entomology Science* **1**, 327-333.
- A. Nakabachi and H. Ishikawa (1999) Provision of riboflavin by endosymbionts to the host aphid, *Acyrtosiphon pisum*. *Journal of Insect Physiology* **45**, 1-6.
- H. Charles and H. Ishikawa (1999) Physical and genetic map of *Buchnera*, the primary endosymbiont of the pea aphid *Acyrtosiphon pisum*. *Journal of Molecular Evolution* **48**, 142-150.
- T. L. Wilkinson and H. Ishikawa (1999) The assimilation and allocation of nutrients by symbiotic and aposymbiotic pea aphids *Acyrtosiphon pisum*. *Entomologia Experimentalis et Applicata* **91**, 195-201.
- K. Komaki and H. Ishikawa (1999) Intracellular bacterial symbionts of aphids possess many genomic copies per bacterium. *Journal of Molecular Evolution* **48**, 717-722.
- T. Sasaki and H. Ishikawa (1999) *Wolbachia* infections and cytoplasmic incompatibility in the almond moth and the Mediterranean flour moth. *Zoological Science* **16**, 739-744.
- S. Masui, S. Kamoda, T. Sasaki and H. Ishikawa (1999) The first detection of the insertion sequence ISW1 in the intracellular reproductive parasite *Wolbachia*. *Plasmid* **42**, 13-19.
- H. Ishikawa (1999) Chemically-defined diets in studies of the intracellular symbioses of Homoptera with microorganisms. *International Journal of Ecology and Environmental Sciences* **25**, 267-276.
- K. Matsumoto, M. Morioka and H. Ishikawa (1999) Phosphocarrier proteins in an intracellular symbiotic bacterium of aphids. *Journal of Biochemistry* **126**, 578-583.

- Y. Hongoh, T. Sasaki and H. Ishikawa (2000) Cloning, sequence analysis, and expression in *Escherichia coli* of the gene encoding a uricase from the yeast-like symbiont of the brown planthopper, *Nilaparvata lugens*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* **30**, 173-182.
- K. Komaki and H. Ishikawa (2000) Genomic copy number of intracellular bacterial symbionts of aphids varies in response to developmental stage and morph of their host. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* **30**, 253-258.
- T. L. Wilkinson and H. Ishikawa (2000) Injection of amino acids substitutes for bacterial supply in aposymbiotic pea aphids (*Acyrtosiphon pisum*). *Entomologia Experimentalis et Applicata* **94**, 85-91.
- T. Sasaki and H. Ishikawa (2000) Horizontal transfer of *Wolbachia* in the Mediterranean flour moth, *Ephestia kuehniella*, by embryonic microinjection. *Heredity*, in press.
- A. Nakabachi and H. Ishikawa (2000) Polyamine composition and expression of genes related to polyamine biosynthesis in an aphid endosymbiotic bacterium, *Buchnera*. *Applied and Environmental Microbiology*, in press.
- S. Shigenobu, H. Watanabe, M. Hattori, Y. Sakaki and H. Ishikawa (2000) Mutualism as revealed by the genome sequence of *Buchnera* sp. APS, an endocellular bacterial symbiont of aphids. *Nature*, in press.
- S. Kamoda, S. Masui, H. Ishikawa and T. Sasaki (2000) *Wolbachia* infection and cytoplasmic incompatibility in the cricket, *Teleogryllus taiwanemma*. *Journal of Experimental Biology*, in press.
- Y. Hongoh and H. Ishikawa (2000) Evolutionary studies on uricases of fungal endosymbionts of aphids and planthoppers. *Journal of Molecular Evolution*, in press.

芦田正明

- H.Yoshida, K.Kinoshita and M. Ashida (1996) Purification of peptidoglycan recognition protein from hemolymph of the silkworm, *Bombyx mori*. *Journal of Biological Chemistry* **271**, 13854-13860.
- M.Tsuchiya, N. Asahi, F.Suzuoki, M. Ashida and S.Matsuura (1996) Detection of peptidoglycan and β -glucan with silkworm larvae plasma test. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, **15**, 129-134
- M.Ashida (1996) Studies on the phenol oxidase system of insect. *Zoological Science* **13**, 3-4.
- C.T.Liu, R.F. Hou, M.Ashida and C.C.Chen (1997) Effects of inhibitors of serine protease, phenoloxidase and dopa decarboxylase on the melanization of *Dirofilaria immitis* microfilariae with *Armigeres subalbatus* hemolymph *in vitro*. *Parasitology* **115**, 57-68.
- W.-J.Lee, A. Ahmed, D.Torre, A.Kobayashi, M. Ashida and Brey, P.T. (1998) Molecular cloning and chromosomal localization of prophenoloxidase cDNA from the malaria vector *Anopheles gambiae*. *Insect Molecular Biology* **7**, 41-50.
- M.Ashida and P.T.Brey (1998) Recent advances on the research of the insect prophenoloxidase cascade (Eds. Brey, P.T. and Hultmark, D.). In *Molecular mechanisms of immune responses in insects*. Chapman & Hall/London, 135-172.

- D.Satoh, A.Horii, M.Ochiai and M.Ashida (1999) Prophenoloxidase-activating enzyme of the silkworm *Bombyx mori*: purification, characterization, and cDNA cloning. *Journal of Biological Chemistry* **274**, 7441-7453.
- M.Ochiai and M.Ashida (1999) A pattern recognition protein for peptidoglycan: cloning the cDNA and the gene of the silkworm *Bombyx mori*. *Journal of Biological Chemistry* **274**, 11854-11858.
- M.Ochiai and M.Ashida (2000) A pattern-recognition protein for beta-1,3-glucan: the binding domain and the cDNA cloning of beta-1,3-glucan recognition protein from the silkworm *Bombyx mori*. *Journal of Biological Chemistry* **275**, 4995-5002.
- M.Ashida and D.Satoh (2000) Prophenoloxidase-activating enzyme of insect - a mini review -. *European Journal of Entomology*, in press.

泉 進・富野土良

- H. Nakato, M. Takekoshi, T. Togawa, S. Izumi and S. Tomino (1997) Purification and cDNA cloning of evolutionally conserved larval cuticle proteins of the silkworm, *Bombyx mori*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* **27**, 701-709.
- E. Mine, H. Sakurai, S. Izumi and S. Tomino (1997) In vitro transcription system from cultured cells and fat-body tissue of the silkworm, *Bombyx mori*. *Molecular Biotechnology* **8**, 79-88.
- A. Kishimoto, H. Nakato, S. Izumi, and S. Tomino (1999) Biosynthesis of major plasma proteins in the primary culture of fat body cells from the silkworm, *Bombyx mori*. *Cell and Tissue Research*. **297**, 329-335.
- K. Shofuda, T. Togawa, H. Nakato, S. Tomino and S. Izumi (1999) Molecular cloning and characterization of a cDNA encoding a larval cuticle protein of *Bombyx mori*. *Comp. Biochem. Physio Insect Biochemistry and Molecular Biology* **122**, 105-109.

公募研究 (第1 班関係)

永田宏次

- S. Satake, M. Masumura, H. Ishizaki, K. Nagata, H. Kataoka, A. Suzuki and A. Mizoguchi (1997) Bombyxin, an insulin-related peptide of insects, reduces the major storage carbohydrates in the silkworm *Bombyx mori*. *Comparative Biochemistry and Physiology* **B118**, 349-357.
- K. Nagata, H. Hatanaka, D. Kohda, H. Ishizaki, K. Momomura, K. Tamori, T. Kadowaki, M. Tanaka, H. Kataoka, H. Nagasawa, A. Isogai, A. Suzuki and F. Inagaki (1997) Three-dimensional structure and receptor-recognition sites of bombyxin-II, an insulin-like brain-secretory peptide of the silkworm. In *Advances in Comparative Endocrinology* (edited by S. Kawashima and S. Kikuyama), 121-124, Monduzzi Editore S.p.A., Bologna.
- K. Nagata, K. Maruyama, K. Kojima, M. Yamamoto, M. Tanaka, H. Kataoka, H. Nagasawa, A. Isogai, H. Ishizaki and A. Suzuki (1999) Prothoracicotropic activity of SBRPs, the insulin-like peptides of the saturniid silkworm *Samia cynthia ricini*. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **266**, 575-578.

- S. Satake, K. Nagata, H. Kataoka and A. Mizoguchi (1999) Bombyxin secretion in the adult silkworm *Bombyx mori*: Sex-specificity and its correlation with metabolism. *Journal of Insect Physiology* **45**, 939-945.
- K. Nagata, H. Hatanaka, D. Kohda, H. Ishizaki, K. Momomura, K. Tamori, T. Kadowaki, M. Tanaka, H. Kataoka, H. Nagasawa, A. Isogai, A. Suzuki and F. Inagaki (1999) Three-dimensional structure and receptor-recognition sites of bombyxin-II, an insulin-like brain-secretory peptide of the silkworm. In *Peptide Science - Present and Future* (edited by Y. Shimonishi), 245-248, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.
- K. Nagata, N. Kudo, K. Abe, S. Arai and M. Tanokura (1999) NMR structural studies of a rice cysteine proteinase inhibitor, oryzacystatin-I. In *Peptide Science 1998* (edited by M. Kondo), 333-336. Protein Research Foundation, Osaka.
- 田之倉優, 永田宏次 (1999) タンパク質工学. 分子生物学 (田沼靖一編), 274-288, 丸善.
- 田之倉優, 永田宏次, 佐々木宏 (1999) X 線および NMR による三次元構造解析. 魚介類筋肉タンパク質—その構造と機能 (西田清義編), 38-45, 恒星社厚生閣.

松本正吾

- S. Matsumoto, R. Ozawa, K. Uchiumi and M. Kurihara M (1996) Cell-free production of the silkworm sex pheromone bombykol. *Bioscience Biotechnology Biochemistry* **60**, 369-373.
- R. Ozawa and S. Matsumoto (1996) Intracellular signal transduction of PBAN action in the silkworm, *Bombyx mori*: Involvement of acyl CoA reductase. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* **26**, 259-265.
- S. Matsumoto, A. Fonagy, A. Suzuki and T. Mitsui (1996) Multifunctionality of PBAN related neuropeptides: Melanotropic activity of FXPRLamide peptides. In *Insect Pheromone Research: New Direction* (edited by R. T. Carde and A. K. Minks), 64-73. Chapman & Hall, New York.
- A. Fonagy, S. Matsumoto and T. Mitsui (1996) Mode of action of pheromone biosynthesis activating neuropeptide in *Bombyx mori*. In *Insect Pheromone Research: New Direction* (edited by R. T. Carde and A. K. Minks), 83-95. Chapman & Hall, New York.
- S. Matsumoto (1997) Intracellular signal transduction of pheromone biosynthesis activating neuropeptide (PBAN) in lepidopteran insects. *Recent Research Development in Agricultural & Biological Chemistry* **1**, 33-49.
- S. Matsumoto and A. Fonagy (1997) Functional diversity of insect neuropeptides having FXPRLamide at the C-terminus. In *Advances in Comparative Endocrinology* (edited by S. Kawashima and S. Kikuyama), 1341-1346. Monduzzi Editore, Bologna.
- M. Iwanaga, N. Dohmae, A. Fonagy, K. Takio, H. Kawasaki, S. Maeda and S. Matsumoto (1998) Isolation and Characterization of Calmodulin in the Pheromone Gland of the Silkworm, *Bombyx mori*. *Comparative Biochemistry and Physiology* **120B**, 761-767.
- A. Fonagy, N. Yokoyama, R. Ozawa, K. Okano, S. Tatsuki, S. Maeda and S. Matsumoto (1999) Involvement of calcineurin in the signal transduction of PBAN in the Silkworm *Bombyx mori* (Lepidoptera). *Comparative*

- A. Fonagy, N. Yokoyama, K. Okano, R. Ozawa, S. Tatsuki, S. Maeda and S. Matsumoto (1999) Recent findings in the mode of action of the pheromone biosynthesis activating neuropeptide (PBAN) in the silkworm, *Bombyx mori* (Lepidoptera). In *Recent Developments in Comparative Endocrinology and Neurobiology* (edited by. E. Roubos, S. E. Wendelaar Bonga, H. Vaudry and A. De Loof), 107-108. Shaker Publishing B. V., Maarstricht.
- 小澤理香、松本正吾 (1999) ガの性フェロモン合成- その調節における細胞内シグナル伝達. 環境昆虫学- 行動・生理・化学生態 (日高敏隆、松本義明監修、本田計一、本田洋、田付貞洋編)、173-187、東京大学出版会
- A. Fonagy, N. Yokoyama, K. Okano, S. Tatsuki, S. Maeda and S. Matsumoto (2000) Pheromone producing cells in the silkworm, *Bombyx mori*: Identification and their morphological changes in response to pheromonotropic stimuli. *Journal of Insect Physiology* **46**, 735-744.
- T. Yoshiga, K. Okano, K. Mita, T. Shimada and S. Matsumoto (2000) Pheromone gland specific acyl-CoA desaturase in *Bombyx mori*. *Gene* **246**, 33-39.
- 早川洋一
- Y. Hayakawa and K. Yazaki (1997) Envelope protein of parasitic wasp's symbiont virus, polydnavirus, protects the wasp eggs from cellular immune reactions by the host insect. *European Journal of Biochemistry* **246**, 820-826.
- H. Noguchi and Y. Hayakawa (1997) Role of dopamine at the onset of pupal diapause in the cabbage armyworm *Mamestra brassicae*. *FEBS Letters* **413**, 157-161.
- Y. Hayakawa and A. Ohnishi (1998) Cell growth activity of growth-blocking peptide. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **250**, 194-199.
- Y. Hayakawa and H. Noguchi (1998) Growth-blocking peptide expressed in the insect nervous system: cloning and functional characterization. *European Journal of Biochemistry* **253**, 810-816.
- Y. Hayakawa, A. Ohnishi and Y. Endo (1998) Mechanism of parasitism-induced elevation of haemolymph growth-blocking peptide levels in host insect larvae. *Journal of Insect Physiology* **44**, 859-866.
- H. Matsumoto, H. Noguchi and Y. Hayakawa (1998) Primary cause of mortality in the armyworm larvae simultaneously parasitized by parasitic wasp and infected with bacteria. *European Journal of Biochemistry* **252**, 299-304.
- 早川洋一 (1998) "寄生バチとポリドナウイルス"、ウイルス、48, 67-72.
- 早川洋一 (1998) 昆虫の寄生戦略とホルモン. ホルモンの分子生物学—8 『無脊椎動物のホルモン』(日本比較内分泌学会編)、177-198、学会出版センター.
- T. Aizawa, N. Fujitani, Y. Hayakawa, A. Ohnishi, T. Ohkubo, Y. Kumaki, K. Kawano, K. Hikiti and K. Nitta (1999) Solution structure of an insect growth factor, growth-blocking peptide. *Journal of Biological Chemistry* **274**, 1887-1890.
- B. F. Volkman, M. E. Anderson, K. D. Kevin, Y. Hayakawa, M. R. Strand and J. L. Markley (1999) Structure of the

- insect cytokine peptide plasmatocyte-spreading peptide 1 from *Pseudoplusia includens*. *Journal of Biological Chemistry* **274**, 4493-4496.
- V. Kostal, H. Noguchi, K. Shimada and Y. Hayakawa (1999) Dopamine and serotonin in the larval CNS of a drosophila fly, *Chymomyza costata*: are they involved in the regulation of diapause? *Archives of Insect Biochemistry and Physiology* **42**, 147-162.
- V. Kostal, H. Noguchi, K. Shimada and Y. Hayakawa (2000) Circadian factor influences induction of seasonally expressed hibernar diapause in a drosophila fly, *Chymomyza costata*. *Journal of Insect Physiology* **46**, 887-896.
- M. R. Strand, Y. Hayakawa and K. D. Clark (2000) Plasmatocyte spreading peptide (PSP1) and growth blocking peptide (GBP) are multifunctional homologs. *Journal of Insect Physiology* **46**, 817-824.
- V. Kostal, K. Shimada and Y. Hayakawa (2000) Induction and development of winter larval diapause in a drosophila fly, *Chymomyza costata*. *Journal of Insect Physiology* **46**, 417-428.
- Y. Hayakawa, A. Ohnishi, A. Mizoguchi and C. Yamashika (2000) Distribution of growth-blocking peptide in the insect central nervous tissue. *Cell and Tissue Research*, in press.

上田 均

- T. Murata, Y. Kageyama, S. Hirose and H. Ueda (1996) Regulation of the EDG84A gene through FTZ-F1 during metamorphosis in *Drosophila melanogaster*. *Molecular Cellular Biology* **16**, 6509-6515.
- 上田 均、竹丸憲一、李 豊、広瀬 進 (1996) FTZ-F1 による転写調節. 蛋白質核酸酵素, 41, 1210-1218, 共立出版
- F.-Q. Li, K. Takemaru, M. Gotoh, H. Ueda, H. Handa, H. and S. Hirose (1997) Transcriptional activation through intraction of MBF2 with TFIIA. *Genes to Cells* **2**, 143-153.
- Y. Kageyama, S. Masuda, S. Hirose and H. Ueda (1997) Temporal regulation of the mid-prepupal gene FTZ-F1: DHR3 early-late gene product is one of plural positive regulators. *Genes to Cells* **2**, 559-569.
- K. Takemaru, F.-Q. Li, H. Ueda and S. Hirose (1997) Multiprotein bridging factor 1 (MBF1) is an evolutionarily conserved transcriptional coactivator that connects a regulatory factor and TATA element-binding protein. *Proceeding of National Academy of Science USA* **94**, 7251-7256.
- 上田 均 (1997) エンハンサー因子と転写コアクチベーター. 転写のメカニズムと疾患 (編集: 田村隆明, 村松正実), 52-59, 羊土社
- 上田 均 (1997) 転写因子 FTZ-F1 の作用機構. 生化学, 69, 244-247.
- Q.-X. Liu, H. Ueda and S. Hirose (1998) Comparison of sequences of a transcriptional coactivator MBF2 from three Lepidopteran species *Bombyx mori*, *Bombyx mandarina* and *Samia cynthia*. *Gene* **220**, 55-59.
- 上田 均 (1998) 昆虫ステロイドホルモンで制御される遺伝子群. ホルモンの分子生物学 8 「無脊椎動物のホルモン」 (日本比較内分泌学会編), 127-148, 学会出版センター.
- 上田 均 (1999) 昆虫変態期における遺伝子発現機構. 蛋白質核酸酵素, 14, 2049-2059. 共立出版

Q.-X. Liu, H. Ueda, and S. Hirose (2000) MBF2 is a tissue- and stage-specific coactivator that is regulated at the step of nuclear transport in the silkworm *Bombyx mori*. *Developmental Biology*, in press.

上田 均 (2000) ショウジョウバエの核内レセプターの発生における役割と転写制御, 実験医学, 18, 268-275. 羊土社

上田 均 (2000) ホルモン応答遺伝子の解析. 生物化学実験法 4 3. 「遺伝子発現研究法」, 77-94. 学会出版センター

普後 一

H. Fugo, M. Yamauchi and S.G. Dedos (1996) Testicular ecdysteroids in the silkworm, *Bombyx mori*. *Proceedings of the Japan Academy* **72**, Ser. B, 34-37.

S.G. Dedos, H. Fugo and H. Kataoka (1998) A new cerebral factor stimulates IP3 levels in the prothoracic glands of *Bombyx mori*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* **28**, 764-774.

S.G. Dedos, H. Fugo, S. Nagata, M. Takamiya and H. Kataoka (1999) Differences between recombinant PTTH and crude brain extracts in cAMP-mediated ecdysteroid secretion from the prothoracic glands of the silkworm, *Bombyx mori*. *Journal of Insect Physiology* **45**, 415 - 422.

S. Dedos and H. Fugo (1999) Downregulation of the cAMP signal transduction cascade in the prothoracic glands is responsible for the fenoxycarb-mediated induction of permanent 5th instar larvae in *Bombyx mori*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* **29**, 723-729.

S. Dedos and H. Fugo (1999) Induction of dauer larvae by application of fenoxycarb early in the 5th instar of the silkworm, *Bombyx mori*. *Journal of Insect Physiology* **45**, 769-775.

鎮西康雄

T. Shinoda, K. Miura, and Y. Chinzei (1996) Vitellogenins and vitellins in the bean bug, *Riptortus clavatus* (Heteroptera: Alydidae): Purification, immunological identification and induction by juvenile hormones. *European Journal of Biochemistry* **31**, 395-412.

M. Hirai, D. Watanabe, A. Kiyota and Y. Chinzei (1998) Nucleotide sequence of vitellogenin mRNA in the bean bug, *Riptortus clavatus* : analysis of processing in the fat body and ovary. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* **28**, 537-547.

M. Hirai, M. Yuda, T. Shinoda and Y. Chinzei (1998) Identification and cDNA cloning of novel juvenile hormone responsive genes from fat body of the bean bug, *Riptortus clavatus* by mRNA differential display. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* **28**, 181-189.

K. Miura, T. Shinoda, M. Yura, S. Nomura, K. Kamiya, M. Yuda and Y. Chinzei (1998) Two hexameric cyanoprotein subunits from an insect, *Riptortus clavatus*: Sequence, phylogeny *European Journal of Biochemistry* **258**, 929-940.

- J-P Charles, T. Shinoda and Y. Chinzei (1999) Characterization and DNA-binding properties of GRF, a novel monomeric binding orphan receptor related to GCNF and β FTZ-F1. *European Journal of Biochemistry* **266**, 181-190.
- M. Hirai, D. Watanabe and Y. Chinzei (2000) A juvenile hormone-repressible transferrin-like protein from the bean bug, *Riptortus clavatus*: cDNA sequence analysis and protein identification during diapause and vitellogenesis. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology* **44**, 17-26.

今井邦雄

- K. Imai, K. Sugiura, T. Komiya, and O. Yamashita (1996) Isolation and partial structure of a unique lipophilic peptide, VAP peptide, from the heads of male silkworm moths. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* **60**, 355-357.
- K. Shiomi, Y. Sato, K. Imai, and O. Yamashita (1998) A hydrophobic peptide (VAP-peptide) of the silkworm, *Bombyx mori*: structure, expression and an enhancing function of diapause hormone activity. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* **28**, 75-82.
- K. Imai, T. Nomura, H. Katsuzaki, T. Komiya, and O. Yamashita (1998) The minimum structure of diapause hormone required for biological activity. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* **62**, 1875-1879.
- K. Shiomi, T. Niimi, Y. Sato, K. Imai, and O. Yamashita (1998) A hydrophobic peptide (VAP-peptide) of the silkworm, *Bombyx mori*: A unique role for adult activity proposed from gene expression and production at the terminal phase of metamorphosis. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* **28**, 671-676.
- Y. Sato, K. Shiomi, H. Saito, K. Imai, and O. Yamashita (1998) Phe-X-Pro-Arg-Leu-NH₂ peptide producing cells in the central nervous system of the silkworm, *Bombyx mori*. *Journal of Insect Physiology* **44**, 333-342.
- K. Shiomi, T. Niimi, K. Imai and O. Yamashita (2000) Structure of the VAP-peptide (BM ACP-6.7) gene in the silkworm, *Bombyx mori* and a possible regulation of its expression by BmFTZ-F1. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* **30**, 119-125.

遠藤克彦

- I. Yokoyama, K. Endo, A. Yamanaka and K. Kumagai (1996) Species-specificity in the action of big and small prothoracicotrophic hormone (PTTHs) of the swallowtail butterflies, *Papilio xuthus*, *P. machaon*, *P. bianor*, and *P. helenus*. *Zoological Science* **13**, 449-454.
- D. Tanaka, T. Sakurama, K. Mitsumasu, A. Yamanaka and K. Endo (1997) Separation of bombyxin from a neuropeptide of *Bombyx mori* showing summer-morph-producing hormone (SMPH) activity in the Asian comma butterfly, *Polygonia c-aureum* L. *Journal of Insect Physiology* **43**, 197-201.
- K. Endo, Y. Fujimoto, K. Kondo, A. Yamanaka, M. Watanabe, W. Kong and K. Kumagai (1997) Stage-dependent changes of the prothoracicotrophic hormone (PTTH) activity of brain extracts and of the PTTH sensitivity of prothoracic glands in the cabbage armyworm, *Mamestra brassicae*, before and after aestival and winter diapause.

- G. Sternecker, P. B. Koch, S. Matsumoto, K. Endo and O. Yamashita (1997) Occurrence of the four neuropeptides in the anterior central nervous system of the butterfly, *Precis coenia*. *Naturwissenschaften* **84**, 152-154.
- J. Tsurumaki, J. Ishiguro, A. Yamanaka and K. Endo (1999) Effects of photoperiod and temperature on seasonal morph development and diapause-egg oviposition in a bivoltine race (Daizo) of the silkmoth, *Bombyx mori*. *Journal of Insect Physiology* **45**, 101-106.
- A. Yamanaka, K. Endo, W. Kong and M. Watanabe (1999) Isolation and infectivity of *Klebsiella oxytoca* from cadaver larvae of swallowtail butterfly *Papilio xuthus* L. *Information* **2**, 155-160.
- A. Yamanaka, K. Endo, H. Nishida, N. Kawamura, Y. Hatase, W. Kong, H. Kataoka and A. Suzuki (1999) Extraction and partial characterization of pupal- cuticle-melanizing hormone (PCMH) in the swallowtail butterfly, *Papilio xuthus* L. (Lepidoptera, Papilionidae). *Zoological Science* **16**, 261-298.
- A. Yamanaka, J. Tsurumaki and K. Endo (2000) Neuroendocrine regulation of seasonal morph development in a bivoltine race (Daizo) of the silkmoth, *Bombyx mori* L. *Journal of Insect Physiology* **46**, 803-808.

小林 淳

- 小林淳 (1996) カイコを用いた物質生産「動物生産生命工学」(村松達夫編), 97-109 文永堂書店.
- 小林淳・宮嶋成壽 (1997) 昆虫ウイルス「ウイルス学」(畑中正一編), 397-410, 朝倉書店.
- Y. Takenaka, J. Kobayashi, Y. Matsuda, C. Gong, M. Nagaya, M. Miyajima and T. Yoshimura, T. (1999) Evaluation of Splm Insect cells using a novel baculovirus expression vector system employing the *Hyphantria cunea* NPV. *Animal Cell Technology* **10**, 271-275.
- T. Kanaya and J. Kobayashi (2000) Purification and characterization of an insect hemolymph protein promoting in vitro replication of the *Bombyx mori* nucleopolyhedrovirus. *Journal of General Virology* **81**, 1135-1141.
- 小林淳 (2000) 害虫防除のための昆虫病原微生物バイオテクノロジー -組換えバキュロウイルス殺虫剤を中心に-, 日本農薬学会誌, **25** 63-66.

鈴木幸一

- Y. An, T. Nakajima and K. Suzuki (1998) Immunohistochemical demonstration of mammalian- and FMRFamide-like peptides in the gut innervation and endocrine cells of the wild silkmoth, *Antheraea yamamai* (Lepidoptera: Saturniidae) during diapause and post-diapause of pharate first-instar larvae. *European Journal of Entomology* **95**, 185-196.
- A. Seino, Y. Sato, T. Yamashita, Y. Sato and K. Suzuki (1998) Identification of a novel member of the paralytic peptide family in the silkmoth *Antheraea yamamai*. *The Journal of Sericultural Science of Japan* **67**, 473-478.
- 鈴木幸一・安 嬰 (1998) 昆虫の新しい情報処理器官の探索. 日本比較内分泌学会ニュース, **88**, 10-13.

河野 強

- 河野 強, 木村靖夫 (1998) 無脊椎動物のグルタミン酸トランスポーターの役割. 化学と生物, 36, 558-559.
- T. Kawano, K. Takuwa, M. Ishiguro, T. Nakajima and Y. Kimura (1999) Structures of insulin-like peptides of the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Peptide Science* 1998: M. Kondo (Ed.), 117-120, Protein Research Foundation, Osaka.
- T. Kawano, K. Takuwa, H. Kuniyoshi, N. Juni, T. Nakajima, D. Yamamoto and Y. Kimura (1999) Cloning and characterization of a *Drosophila melanogaster* cDNA encoding a glutamate transporter. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry* 63, 2042-2044.
- T. Kawano, Y. Ito, M. Ishiguro, K. Takuwa, T. Nakajima and Y. Kimura (2000) Molecular cloning and characterization of a new insulin/IGF-like peptide of the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, in press.
- T. Kawano, H. Kuniyoshi, N. Juni, D. Yamamoto, K. Takuwa, T. Nakajima, R. Masuda and Y. Kimura (2000) Genomic structure of a *Drosophila melanogaster* gene, *Dglt-1*, encoding a glutamate transporter and analyses of the spatial distribution of the transcript. *Journal of Biochemistry. Molecular. Biol. Biophys*, in press.

遠藤泰久

- Aizono Y, Endo Y, Sattelle DB, Shirai Y (1997) Prothoracicotropic hormone-producing neurosecretory cells in the silkworm, *Bombyx mori*, express a muscarinic acetylcholine receptor. *Brain Research* 763, 131-136.
- Takei N, Kuramoto H, Endo Y, Hatanaka H (1997) NGF and BDNF increase the immunoreactivity of vesicular acetylcholine transporter in cultured neurons from the embryonic rat septum. *Neuroscience Letters* 226, 207-209.
- Miyoshi T, Endo Y (1998) Immunohistochemical study on peptidergic neurons containing FMRFamide in the stomatogastric nervous system of the American cockroach. *Applied Entomology and Zoology* 33, 133-138.
- Takei N, Numakawa T, Kozaki S, Sakai N, Endo Y, Takahashi M, Hatanaka H (1998) Brain-derived neurotrophic factor induce rapid and transient release of glutamate through the non-exocytotic pathway from cortical neurons. *Journal of Biological Chemistry* 273(42), 27620-27624.
- Nakanishi S, Ichikawa J, Endo Y (1998) Localization of cytoplasmic free calcium ions in PC12 cells with varicose fibers. *Archives Histology and Cytology* 61, 221-232.

滝谷重治

- H. Kokubo, S. Takiya, V. Mach and Y. Suzuki (1996) Spatial and temporal expression pattern of *Bombyx fork head/SGF-1* gene in embryogenesis. *Development Genes and Evolution* 206, 80-85.
- S. Takiya, H. Kokubo and Y. Suzuki (1997) Transcriptional regulatory elements in the upstream and intron of the fibroin gene bind three specific factors POU-M1, Bm Fkh and FMBP-1. *Biochemical Journal* 321, 645-653.

田中利治

- E. Tagashira and T. Tanaka (1998) Parasitic castration of *Pseudaletia separata* by *Cotesia kariyai* and its association with polydnavirus gene expression. *Journal of Insect Physiology* **44**, 733-744.

藤本善徳

- Y. Fujimoto, T. Kushiro and K. Nakamura (1997) Biosynthesis of 20-Hydroxyecdysone in *Ajuga* Hairy Roots: Hydrogen Migration from C-6 to C-5 during cis-A/B Ring Formation. *Tetrahedron Letters* **38**, 2697-2700.
- K. Ohyama, Kushiro, T., K. Nakamura and Y. Fujimoto (1999) Biosynthesis of 20-hydroxyecdysone in *Ajuga* hairy roots: Metabolic fate of 6a- and 6b-hydrogens of lathosterol. *Bioorganic and Medicinal Chemistry* **7**, 2925-2930.
- K. Ohyama, Kushiro, T., K. Nakamura and Y. Fujimoto (2000) Biosynthesis of Sterols and Ecdysteroids in *Ajuga* Hairy Roots. *Lipids* **35**, 279-288.
- R. Hyodo and Y. Fujimoto (2000) Biosynthesis of 20-hydroxyecdysone in *Ajuga* hairy roots: The possibility of 7-ene introduction at a later stage. *Phytochemistry* **53**, 733-737.

渡辺俊樹

- T. Ohira, T. Watanabe, H. Nagasawa and K. Aida (1997) Molecular cloning of a molt inhibiting hormone cDNA from the kurama prawn *Penaeus japonicus*. *Zoological Science*, **14**, 785-789.
- H. Endo, H. Nagasawa and T. Watanabe (2000) Isolation of a cDNA encoding a CHH-family peptide from the silkworm *Bombyx mori*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* **30**, 355-361.

沼田英治

- J. Matsuo, S. Nakayama and H. Numata (1997) Role of the corpus allatum in the control of adult diapause in the blowfly, *Protophormia terraenovae*. *Journal of Insect Physiology* **43**, 211-216.
- A. Morita and H. Numata (1997) Role of the neuroendocrine complex in the control of adult diapause in the bean bug, *Riptortus clavatus*. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology* **35**, 347-355.
- S. Shiga, J. Matsuo, I. Toyoda and H. Numata (1997) Role of the brain-retrocerebral complex in the control of adult diapause in the blow fly, *Protophormia terraenovae*. In *Advances in Comparative Endocrinology 1*. (edited by S. Kawashima and S. Kikuyama), 129-133. Monduzzi Editore, Bologna.
- A. Morita and H. Numata (1997) Role of the corpus allatum and the brain in the control of adult diapause in the bean bug, *Riptortus clavatus*. In *Advances in Comparative Endocrinology 1*. (edited by S. Kawashima and S. Kikuyama), 191-195. Monduzzi Editore, Bologna.
- A. Morita, K. Soga, T. Hoson, S. Kamisaka and H. Numata (1999) Changes in mechanical properties of the cuticle and lipid accumulation in relation to adult diapause in the bean bug, *Riptortus clavatus*. *Journal of Insect Physiology* **45**, 243-249.

- I. Toyoda, H. Numata and S. Shiga (1999) Role of the medial neurosecretory cells in the ovarian development of the blow fly *Protophormia terraenovae*. *Zoological Science* **16**, 187-191.
- N. A. Tanigawa, S. Shiga, and H. Numata (1999) Role of the corpus allatum in the control of reproductive diapause in the male blow fly, *Protophormia terraenovae*. *Zoological Science* **16**, 639-644.
- S. Shiga and H. Numata (2000) The roles of neurosecretory neurones in the pars intercerebralis and pars lateralis in reproductive diapause of the blow fly, *Protophormia terraenovae*. *Naturwissenschaften* **87**, 125-128.
- S. Shiga, I. Toyoda and H. Numata (2000) Neurones projecting to the retrocerebral complex of the adult blow fly *Protophormia terraenovae*. *Cell and Tissue Research* **299**, 427-439.

園部治之

- 岡本, 原田, 園部 (1998) 動物のステロイドホルモンと P450, 化学と生物, **36(9)**, 619-618.
- N. Horike and H. Sonobe (1999) Ecdysone 20-monooxygenase in eggs of the silkworm *Bombyx mori*: enzymatic properties and developmental changes. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology* **41**, 9-17.
- H. Sonobe, H. Tokushige, T. Makka, H. Tsutsumi, N. Hara and Y. Fujimoto (1999) Comparative studies of ecdysteroid metabolism between diapause eggs and non-diapause eggs of the silkworm, *Bombyx mori*. *Zoological Science* **16**, 935-943.
- T. Makka and H. Sonobe (2000) Ecdysone metabolism in diapause eggs and non-diapause eggs of the silkworm, *Bombyx mori*. *Zoological Science* **17**, 89-95.
- N. Horike, H. Takemori, Y. Nonaka, H. Sonobe and M. Okamoto (2000) Molecular cloning of NADPH-cytochrome P450 oxidoreductase from silkworm eggs: its involvement in the hydroxylation of ecdysone. *European Journal of Biochemistry*, in press

竹田真木生

- M. Takeda and S.D. Skopik (1997) Photoperiodic time measurement and related physiological mechanisms in insects and mites. *Annual Review of Entomology* **42**, 323-349.
- M. Takeda, M. Matsumoto and Y. Tohno (1997) Diapause intensity and ecdysiotroph: Comparisons between two *Antheraea* species having summer and winter diapause at pupae. *European Journal of Entomology* **94**, 67-73.
- N. Ichihara, M. Okada, H. Nakagawa and M. Takeda (1997) Purification of serotonin N-acetyltransferase from cockroach testicular glands. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* **27**, 241-246.
- T. Sakamoto, N. Ichihara and M. Takeda (1998) Characterization of indolamine N-acetyltransferase activity from the head ganglia of the American cockroach, *Periplaneta americana*. *Applied Entomology and Zoology* **33**, 97-104.
- N. Ichihara, M. Okada and M. Takeda (1998) Purification of arylalkylamine N-acetyltransferases from three organs of the American cockroach. In *Insects: Chemical Physiological and Environmental Aspects*. Eds: Konopinska, D., G. Goldsworthy, J. Nawrot, I. Orchard and G. Rozinski. pp70-80 Univ. Wraoclow Press, Poland.

中川好秋

- Y. Nakagawa, K. Hattori, B. Shimizu, M. Akamatsu, H. Miyagawa and T. Ueno (1998) Quantitative structure-activity studies of insect growth regulators XIV. Three-dimensional quantitative structure-activity relationship of ecdysone agonists including dibenzoylhydrazine analogs. *Pesticide Science* **53**, 267-277.
- G. Smagghe, Y. Nakagawa, B. Carton, A. K. Mourad, T. Fujita and L. Tirry (1999) Comparative ecdysteroid action of ring-substituted dibenzoyl-hydrazines in *Spodoptera exigua*. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology* **41**, 42-53.
- Y. Nakagawa, G. Smagghe, S. Kugimiya, K. Hattori, T. Ueno, L. Tirry and T. Fujita (1999) Quantitative structure-activity studies of insect growth regulators XVI. Substituent effects of dibenzoylhydrazines on the insecticidal activity to Colorado potato beetle *Leptinotarsa decemlineata*. *Pesticide Science* **55**, 909-918.
- Y. Nakagawa, K. Hattori, C. Minakuchi, S. Kugimiya, and T. Ueno (2000) Relationships between structure and molting hormonal activity of tebufenozide, methoxyfenozide, and their analogs in cultured integument system of *Chilo suppressalis* Walker. *Steroids* **65**, 117-123
- Y. Nakagawa, C. Minakuchi and T. Ueno. Inhibition of [3H]ponasterone A binding by ecdysone agonists in the intact Sf-9 cell line. *Steroids*, in press.

針山孝彦

- T. Hariyama, A. Terakita, M. Sakayori, Y. Katsukura, K. Ozaki & Y. Tsukahara (1998) Chromophore distribution and ultraviolet visual pigment in the compound eyes of the Japanese fireflies *Luciola cruciata* and *L. lateralis* (Coleoptera, Lampyridae). *Journal of Comparative Physiology* **183**, 165-170
- 針山孝彦 (1999) 節足動物の視覚系と外界との関係比較生理生化学 16, (2) 86-97
- T. Hariyama (2000) The brain as a photoreceptor: intracerebral ocelli in the firefly. *Naturwissenschaften*, in press.
- T. Hariyama, V. B. Meyer-Rochow, T. Kawauchi, Y. Takaku and Y. Tsukahara (2000) Diurnal changes of retinula cell sensitivities and receptive fields (Two-dimensional angular sensitivity functions) in the apposition eyes of *Ligia exotica* (Crustacea, Isopoda). *Journal of experimental biology*, in press.
- T.W.Cronin and T.Hariyama (2000) Spectral Sensitivity in Crustacean Eyes. In Physiology of the crustacean nervous system (edited by Konrad Wiese) Springer Verlag, Heidelberg. in Press

松本忠夫

- T. Miura, A. Kamikouchi, M. Sawata, H. Takeuchi, S. Natori, T. Kubo and T. Matsumoto (1999) Soldier caste-specific gene expression in the mandibular glands of *Hodotermopsis japonica* (Isoptera: Termopsidae). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **96**, 13874-13879.
- G. Tokuda, N. Lo, H. Watanabe, M. Slaytor, and H. Noda (1999) Metazoan cellulase genes from termites: intron/exon

structures and sites of expression. *Biochimica et Biophysica Acta* **1447**, 146-159.

- M. Machida, O. Kitade and T. Matsumoto (2000) Uric acid storage in the Japanese damp-wood termite *Hodotermopsis japonica* (Isoptera: Termopsidae). *Sociobiology* **35**, 1-8.
- T. Miura and T. Matsumoto (2000) Soldier morphogenesis in a nasute termite: discovery of a disc-like structure forming a soldier nasus. *Proceedings of the Royal Society of London SER. B* **267**, 1-5.
- T. Miura, Y. Roisin and T. Matsumoto (2000) Molecular phylogeny and biogeography of the nasute termite genus *Nasutitermes* (Isoptera: Termitidae) in the Pacific tropics. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **16**, in press.

(第2 班関係)

児玉隆治・吉田昭広

- A. Yoshida, M. Motoyama, A. Kosaku and K. Miyamoto (1996) Nanoprotuberance array in the transparent wing of a hawkmoth, *Cephonodes hylas*. *Zoological Science* **13**, 525-526.
- E. Takayama and A. Yoshida (1997) Color pattern formation on the wing of the butterfly *Pieris rapae*. 1. Cautery induced alteration of scale color and delay of arrangement formation. *Development Growth and Differentiation* **39**, 23-31.
- E. Takayama, M. Motoyama and A. Yoshida (1997) Color pattern formation on the wing of a butterfly *Pieris rapae*. 2. Color determination and scale development. *Development Growth and Differentiation* **39**, 485-491.
- A. Yoshida, Y. Arita, Y. Sakamaki, K. Watanabe and R. Kodama (1998) Transformation from the pupal to adult wing in *Oidaematophorus hirosakianus* (Lepidoptera: Pterophoridae). *Annals of the Entomological Society of America* **91**, 892-857.

多羽田哲也

- K. Tsuneizumi, T. Nakayama, Y. Kamoshida, T.B. Kornberg, J. L. Christian and T. Tabata (1997) *Daughters against dpp* modulates *dpp* organizing activity in *Drosophila* wing development. *Nature* **389**, 627-631.
- H. Inoue, T. Imamura, Y. Ishidou, M. Takase, Y. Udagawa, Y. Oka, K. Tsuneizumi, T. Tabata, K. Miyazono, M. Kawabata (1998) Interplay of signal mediators of decapentaplegic (Dpp): molecular characterization of mothers against dpp, Medea, and daughters against dpp. *Molecular Biology of the Cell* **9**, 2145-2156.
- M. Minami, N. Kinoshita, Y. Kamoshida, H. Tanimoto, T. Tabata (1999) brinker is a target of Dpp in *Drosophila* that negatively regulates Dpp-dependent genes. *Nature* **398**, 242-246.
- H. Tanimoto, S. Itoh, P. ten Dijke, T. Tabata (2000) Hedgehog creates a gradient of Dpp activity in *Drosophila* wing imaginal discs. *Molecular Cell* **5**, 59-71.

程久美子

- 程久美子 (1997) 昆虫の神経細胞：ショウジョウバエの神経細胞株樹立法。ニューロサイエンスラボマニユ

アル I 「神経細胞培養法」(畠中寛 編)、212-219.

- M. Nagano, H. Suzuki, K. Ui-Tei, T. Miyake and Y. Miyata (1998) H-7-induced apoptosis in the cells of a *Drosophila* neuronal cell line through affecting unidentified H-7-sensitive substance(s). *Neuroscience Research* **31**, 113-121.
- A. Sato, T. Kojima, K. Ui-Tei, Y. Miyata and K. Saigo (1999) Dfrizzled-3, a new *Drosophila* Wnt receptor, acting as an attenuator of Wingless signaling in *wingless* hypomorphic mutants. *Development* **126**, 4421-4430.
- Y. Takagi, K. Ui-Tei and S. Hirohashi (2000) Adhesion-dependent tyrosine phosphorylation of Enabled in *Drosophila* neuronal cell line. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **270**, 482-487.
- K. Ui-Tei, M. Nagano, S. Sato and Y. Miyata (2000) Calmodulin-dependent and -independent apoptosis in cells of a *Drosophila* neuronal cell line. *Apoptosis* **5**, 133-140.

富岡憲治

- K. Tomioka (1998) The optic lobe: a component of the circadian timekeeping mechanism in insects. *Trends in Comparative Biochemistry and Physiology* **5**, 161-169.
- M. Germ and K. Tomioka (1998) Effects of 5,7-DHT injection into the optic lobe on the circadian locomotor rhythm in the cricket, *Gryllus bimaculatus*. *Zoological Science* **15**, 317-322.
- K. Tomioka (1999) Light and serotonin phase shifts the optic lobe circadian pacemaker in vitro in the cricket *Gryllus bimaculatus*. *Journal of Comparative Physiology A* **185**, 437-444.
- K. Tomioka (2000) Protein synthesis is a required process for the optic lobe circadian clock in the cricket *Gryllus bimaculatus*. *Journal of Insect Physiology* **46**, 281-287.
- I. Nishinokubi and K. Tomioka (2000) Analysis of the mechanism underlying the rhythm reversal from diurnal to nocturnal in the cricket *Gryllus bimaculatus*, with special reference to the role of serotonin. *Zoological Science*, in press.

倉田祥一郎

- S. Kurata, M J. Go, S. Artavanis-Tsakonas, and W J. Gehring (2000) Notch signaling and the determination of appendage identity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **97**, 2117-2122.
- 倉田祥一郎 (2000) ショウジョウバエの器官形成 : Notch シグナリングと器官アイデンティティの決定. 実験医学、18, 1347-1352.

三田和英

- S. Ichimura, K. Mita and K. Sugaya (1997) A major non-LTR retrotransposon of *Bombyx mori*, L1Bm. *Journal of Molecular Evolution* **45**, 253-264.

- K. Mita, M. Morimyo, K. Okano, T. Shimada and S. Maeda (1999) The construction of EST database for genome analysis of *Bombyx mori*. *RIKEN Review* **22**, 63-67.
- J. Lee, Y. Hahn, J.H. Yun, K. Mita and J.H. Chung (2000) Characterization of *JDP* genes, an evolutionarily conserved J domain-only protein family, from human and moths. *Biochemica et Biophysica Acta* **1447**, 325-333.
- T. Yoshiga, K. Okano, K. Mita, T. Shimada and S. Matsumoto (2000) cDNA cloning of acyl-CoA desaturase homologs in the silkworm, *Bombyx mori*. *Gene* **246**, 339-345.
- G-X. Quan, K. Mita, K. Okano, T. Shimada, N. Ugajin, N. Goto, E. Kannke and H. Kawasaki (2000) Isolation and particular expression of ecdysteroid-inducible angiotensin-converting enzyme-related gene in wing discs of *Bombyx mori*. *Insect Molecular Biology*, in press.

谷村禎一・木村賢一

- A. Shigenaga, K.-I. Kimura, Y. Kobayakawa, Y. Tsujimoto and T. Tanimura (1997) Cell ablation by ectopic expression of cell death genes, *ced-3* and *Ice*, in *Drosophila*. *Development, Growth and Differentiation* **39**, 420-436.
- A. Shigenaga, Y. Funahashi, K. -I. Kimura, Y. Kobayakawa, S. Kamada, Y. Tsujimoto and T. Tanimura (1997) Targeted expression of *ced-3* and *Ice* induces programmed cell death in *Drosophila*. *Cell Death and Differentiation* **4**, 371-377.
- K. -I. Kimura, A. Usui-Ishihara and K. Usui (1997) G2 arrest of cell cycle ensures a determination processes of sensory mother cell formation in *Drosophila*. *Development, Genes and Evolution* **207**, 199-202.
- T. Awasaki and K.-I. Kimura (1997) *pox-neuro* is required for development of the chemosensory bristles in *Drosophila*. *Journal of Neurobiology* **32**, 707-721.
- 木村賢一 (1998). ショウジョウバエにおけるアポトーシス. 「アポトーシスと疾患基礎編」(井川洋二編), 44-54, 医薬ジャーナル.

土田耕三

- H. Takeda, Y. Kawaguchi, T. Ohshiki, H. Maekawa and K. Tsuchida (1997) Impaired yolk protein uptake by oocytes of a *Bombyx mori* mutant. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* **26**, 607-616.
- K. Tsuchida, J.L. Soulages, A. Moribayashi, K. Suzuki, H. Maekawa and M.A. Wells(1997) Purification and properties of a lipid transfer particle from *Bombyx mori*: comparison to the lipid transfer particle from *Manduca sexta*. *Biochimica et Biophysica Acta* **1337**, 57-65.
- K. Tsuchida, M. Arai, Y. Tanaka, R. Ishihara, R.O. Ryan and H. Maekawa (1998) Lipid transfer particle catalyzes transfer of carotenoids between lipophorins of *Bombyx mori*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* **28**, 927-934.
- Y. Yamauchi, C. Hoeffler, A. Yamamoto, H. Takeda, R. Ishihara, H. Maekawa, R. Sato. S. Su-II, M. Sumida, M.A. Wells and K. Tsuchida (2000) cDNA and deduced amino acid sequences of apolipophorin-IIIs from *Bombyx mori*

and *Bombyx mandarina*. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology* **43**, 16-21.

V. Narayanaswami, Y. Yamauchi, P.M. Weers, H. Maekawa, R. Sato, K. Tsuchida, K. Oikawa, C.M. Kay and R.O. Ryan (2000) Spectroscopic characterization of the conformational adaptability of *Bombyx mori* apolipophorin-III. *European Journal of Biochemistry* **267**, 728-736.

Y. Yamauchi, J. Ragland, H. Maekawa, R. Sato, K. Hamano, M.A. Wells and K. Tsuchida (2000) cDNA and deduced amino acid sequence of apolipophorin-III from *Agrius convolvuli* (Sphingidae:Lepidoptera). *Applied Entomology and Zoology* **35**, 21-26.

E.L. Arresse, L.E. Canavoso, Z.E. Jouni, J.E. Pennington and K. Tsuchida (2000) Lipid storage and mobilization in insects: current status and future directions. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* **30**, in press.

辻村秀信

森 肇

森 肇、森 宏、小谷英治、山川 稔(1998) 昆虫の生体防御の仕組み 生物科学 50, 163-168

佐藤行洋

Y. Sato (1998) Morphological implication of the suboesophageal body as a secretory organ in the silkworm, *Bombyx mori*. *The Journal of Sericultural Science of Japan* **67**, 367-372.

山下興亜、佐藤行洋 (1998) 無脊椎動物で独自の発展を遂げたホルモン 2 : 休眠ホルモンと PBAN. ホルモンの分子生物学-8「無脊椎動物のホルモン」(日本比較内分泌学会編), 85-104, 学会出版センター

日下部宜宏

Y. Kawaguchi, T. Kusakabe, and K. Koga (1999) Unique chorion structure of the mottled gray (*mgr*) egg, an egg-character mutation of *Bombyx mori* (Lepidoptera: Bombycidae). *Applied Entomology and Zoology* **34**, 359-364.

Y. Kawaguchi, T. Kusakabe, Y. Banno, and K. Koga (1999) Effect of ooplasmic size on the larval development as observed in the small egg mutant *emi* of *Bombyx mori*. *The Journal of Sericultural Science of Japan* **68**, 245-250.

T. Kusakabe, A. Hine, S. Hubert, G. Wargner, and C. C. Richardson (1999) Cys4 zinc-binding motifs in sequence-specific, single-stranded DNA recognition. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*. **96**, 4295-4300.

H. Matsuo, T. Moriguchi, T. Takagi, T. Kusakabe, S. Buratowski, M. Sekine, Y. Kyogoku, and G. Wagner (2000) Efficient synthesis of ¹³C, ¹⁵N labeled RNA containing the cap structure m7GpppA. *Journal of American Chemical Society* **122**, 2417-2412.

T. Kusakabe, Y. Sugimoto, Y. Hirota, S. Tone, Y. Kawaguchi, K. Koga, and T. Ohyama (2000) Isolation of

replicational cue elements from a library of bent DNAs of *Aspergillus oryzae*. *Molecular Biology Reports*, in press

中藤博志

- S. Jackson, H. Nakato, M. Sugiura, A. Jannuzzi, R. Oakes, V. Kaluza, C. Golden and S. Selleck (1997) *dally*, a *Drosophila* glypican, controls cellular responses to the TGF- β -related morphogen, Dpp. *Development* **124**, 4113-4120.
- A. Kishimoto, H. Nakato, S. Izumi, and S. Tomino (1999) Biosynthesis of major plasma proteins in the primary culture of fat body cells from the silkworm, *Bombyx mori*. *Cell and Tissue Research* **297**, 329-335.
- M. Tsuda, K. Kamimura, H. Nakato, M. Archer, W. Staatz, B. Fox, M. Humphrey, S. Olson, T. Futch, V. Kaluza, E. Siegfried, L. Stam, and S.B. Selleck (1999) A cell surface proteoglycan, Dally, regulates Wingless signalling in *Drosophila*. *Nature* **400**, 276-280.
- H. Nakato (1999) Function of Dally in Decapentaplegic and Wingless signalling pathways. In "Cell Surface Proteoglycans in Signalling and Development" (Eds. Lander, A., Nakato, H., Selleck, S.B., Turnbull, J.E. and Coath, C.) pp. 181-187. Human Frontier Science Program, Strasbourg.
- H. Nakato, S. Izumi and S.B. Selleck (1999) The function of Dally, a *Drosophila* glypican, in Dpp signaling. In "Animal Cell Technology: Basic & Applied Aspects", (ed. Kitagawa, Y., Matsuda, T., and Iijima, S.) 10, pp. 1-5. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.
- 中藤博志 (2000) ショウジョウバエ細胞膜プロテオグリカン機能の遺伝学的解析。生化学 72 (2), 109-113.

三橋 淳

- J. Mitsuhashi (1998) Vitamin requirements of the cultured flesh fly cells, *Sarcophaga peregrina* (Diptera, Sarcophagidae). *Archives of Insect Biochemistry and Physiology* **37**, 283-286.
- K. Komiya, N. Agui and J. Mitsuhashi (1998) Effect of culture medium on the in vitro secretion activity of prothoracic glands from *Pseudaletia separata*. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology* **38**, 147-154.
- J. Mitsuhashi (1998) Polyamine as a growth promoter for cultured insect cells. *In Vitro Cellular and Developmental Biology* **34A**, 619-621.
- A. Ohashi, J. Mitsuhashi and K. Sato (1999) A simplified method for screening acetylcholinesterase inhibitors by the flesh fly (Dipt. Sarcophagidae) cell culture system. *Journal of Applied Entomology* **123**, 307-308.