

松本分子昆虫学研究室

Molecular Entomology Laboratory

主任研究員 松本正吾
MATSUMOTO, Shogo

全動物種の7割以上を占め、脊椎動物とは全く違った方向に進化してきた昆虫は、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独自の多様性と数多くのユニークな機能や能力を獲得してきた。昆虫が持つ多様な機能や能力に着目し、それが成り立つメカニズムを分子レベルで解明することは、普遍的な生命原理を理解するとともに、それらの理解に基づいて環境保全、食糧確保や有用物質生産など応用面での展開を可能にする。当研究室では、モデル昆虫として知られるカイコガやショウジョウバエを用いて、昆虫あるいはそれを構成する組織・細胞が示す固有の機能発現の分子機構を解明する。また、昆虫を見据え、その特性を生かした新しい系、方法論を確立し、これらの手法を機能発現の分子機構解析に応用し、実践する。これらの成果に基づき、農学、医学、生命科学の分野での応用面への展開をはかる。

1. 昆虫において発現される基本的生命現象を支える分子機構の解明

(1) PBANによるCa²⁺チャネル活性化機構の解析 (Hull^{*1}, 徳田, 松本)

ガ類性フェロモンの産生は神経ホルモンPBANがフェロモン腺細胞に作用することで引き金が引かれる。これまでに多くのガで、PBANの細胞内シグナリングの過程で細胞外Ca²⁺の細胞内流入が起こることが示唆されてきた。しかし、このイベントが直接証明されたことはない。今回、我々はカイコガフェロモン腺を用い、蛍光Ca²⁺イメージングを行うことで、この出来事を初めて直接証明するとともに、この過程がSOCチャネルを介した系であることをRNAiによる遺伝子発現抑制、生化学的、薬理学的手法を用いて示した。一方、近年SOCチャネル活性化への関与が指摘されているSTIM1, Orai1 ホモログがカイコガフェロモン腺細胞においても発現していることを見だし、Sf9細胞での一過性発現から、Orai1 がplasma membrane (PM)に局在し、ER Ca²⁺ストア枯渇に伴ってSTIM1 がERからPMに移行したのち、Orai1 と共局在することを見いだした。さらに、RNAiによりOrai1 あるいはSTIM1 の遺伝子発現を抑制するとボンピコール(カイコガ性フェロモン)産生が抑制されたことから、これらのタンパク質がPBAN刺激に伴うSOCチャネルの活性化に直接関わっていることを示した。

(2) PBAN刺激によりリン酸化を受けるタンパク質の単離、同定 (大西^{*1}, 加治^{*2}, 阿津澤, 松本)

ボンピコール生合成メカニズムには、タンパク質のリン酸化を伴うシグナル伝達の存在が予想されるため、PBANの刺激によりリン酸化を受けるタンパク質を検索した。3種類の抗-リン酸化アミノ酸抗体を用いたImmunoblot解析から、PBANの刺激によりリン酸化を受ける5種類のタンパク質(35, 42, 45, 72, 160 kDa)を検出した。そのうちの1つである42kDaタンパク質は、脂肪滴膜上に存在し、脂質分解を制御するLipid storage droplet protein 1 (Lsdp1)であることが示唆された。今後、残り4つのタンパク質について解析を行っていく。

(3) カイコガフェロモン腺特異的遺伝子の機能解析 (大西^{*1}, 橋本^{*2}, 阿津澤, 松本)

RNAi法を用いたスクリーニングの結果、7クローンについてボンピコール生合成経路への関与が示された。その中から、fatty acid transport protein (FATP)と同一性があるクローンについてその機能解析を行った。FATPを発現抑制することで、フェロモン産生細胞内の脂肪滴の蓄積が弱まり、脂肪滴内のTG量、TGの構成脂肪酸解析から、リノール酸、リノレン酸を多く含むTGが減少していることが明らかになった。以上の結果から、FATPは脂肪酸のフェロモン産生細胞内への取り込みに関与することで、ボンピコール生合成に関与することが示された。

(4) アワヨトウ性フェロモン生合成関連遺伝子の解析 (本, 栗原, 杉谷^{*2}, 松本)

ガ類昆虫アワヨトウ (*Pseudaletia separata*) の幼虫は、イネ、ムギ、トウモロコシ、イネ科牧草等のイネ科植物の害虫である。ガ類昆虫の性フェロモンは種特異的かつ強力な誘引活性を有し、これを利用した標的昆虫異性間における交信攪乱法が従来の農薬に代わる環境に優しい害虫防除法として着目されていることから、アワヨトウ性フェロモン生合成関連遺伝子の単離を試みた。アワヨトウの性フェロモン成分 (*Z*-11-hexadecen-1-yl acetate) は palmitate を基質とした 11 位の不飽和化、末端アシル基の還元反応、末端 OH 基のアセチル化の 3 反応からなり、それぞれ 11 不飽和化酵素、アシル基還元酵素 (pgFAR)、脂肪族アルコールアセチル基転移酵素 (FAAT) の 3 種類の酵素が関与していると考えられる。これらのうち、11 不飽和化酵素遺伝子はすでに多数のガ類昆虫から単離されていることから degenerate RT-PCR を行った結果、カイコガ Desat1 と 73.9% の同一性を有する 566bp の部分配列を得た。また RT-PCR による時期特異的発現解析結果から、フェロモン腺におけるこの遺伝子の転写レベルが羽化 2 日目から急激に上昇し、フェロモン産生が開始される羽化 3 日目で最も高いことが明らかとなった。一方、pgFAR と FAAT は degenerate RT-PCR による遺伝子単離が困難であると予想されたことから、羽化 3 日目のフェロモン腺平均化 cDNA ライブラリーを作製した。現在、このライブラリーを用いて網羅的な EST 解析を行っている。

(5) カイコを利用した性決定機構の比較生物学的研究 (鈴木, 松本)

本研究は、カイコの性決定機構の解明を通じて、他に例のない性決定システムを同定することを目的とする。既に我々は、カイコの KH ドメイン RNA 結合タンパク質の 1 種 BmPSI が、*Bmdsx* のオス型のスプライシングを制御することを明らかにしている。Northern blot 解析の結果、BmPSI は雌雄で等しく発現していることが確認されたが、リン酸化セリン抗体を用いた Western blot 解析により、BmPSI はメス細胞において特異的にリン酸化されていることが明らかとなった。この事実は、BmPSI のメス特異的リン酸化が *Bmdsx* の性特異的スプライシング制御に関わる可能性を示唆している。そこでまず、雌雄の培養細胞で発現させた BmPSI を用いてその標的 RNA である CE1 に対する結合能を評価したところ、BmPSI の CE1 に対する結合能に雌雄差はみられないことが明らかとなった。次に、KH ドメイン RNA 結合タンパク質のリン酸化を阻害することが知られているリン酸化阻害剤 (Staurosporine, JNK inhibitor II, PD98059) をメス細胞に処理し、*Bmdsx* mRNA のスプライシングに及ぼす影響を調べた結果、どの阻害剤を処理した場合も *Bmdsx* のスプライシングパターンに変化がみられないことがわかった。従って、BmPSI のリン酸化が *Bmdsx* の性特異的スプライシング制御に直接的に関わる可能性は低いと予

想される。

(6) *Drosophila nucleolar GTP binding protein 1(dngbp1)* 遺伝子の機能解析 (常泉, 松尾^{*2}, 伊藤^{*2}, 一瀬, 松本)

本研究ではショウジョウバエ複眼に形態異常を示す変異株より単離した *Drosophila nucleolar GTP binding protein 1(dngbp1)* 遺伝子の機能解析を目的としている。*dngbp1* 遺伝子機能を完全に欠失した個体は致死となることが観察され、形態異常を示した変異株は *dngbp1* 遺伝子の部分機能欠損であることが分かった。DNGBP1 タンパク質は普遍的に核小体に局在し、GTP 結合ドメインに GTP が結合することにより機能が発揮される。*dngbp1* 機能を欠損した細胞では細胞死が引き起こされるものの、この細胞死はカスパーゼ非依存的であった。今後相互作用因子の同定を行い詳細な解析を行っていく。

2. 昆虫ウイルスと宿主昆虫細胞との分子応答機構の解明

(1) 昆虫ウイルスと宿主昆虫との分子応答機構の解明 (姜, 松田^{*3}, 栗原, 松本)

バキュロウイルスは核内の特定領域で複製を行うが、この増殖場所についてはあまり解析されておらず、特にその場所にかかわる宿主側の因子などについては全くわかっていない。そこで、カイコ核多角体病ウイルス (BmNPV) の増殖場所構成因子の1つである ORF8 と相互作用する宿主のクローンの同定を行ってきた。今年度は、すでに得られていた4つのクローン (培養細胞系由来) に加えて、BmNPV に感染したカイコ由来のライブラリーより3つの新たなクローンが得られた。まず、新たに得られたクローン (2d-2, 2d-4, 2d-5) に対し抗体を作製し、ウエスタン解析を行った結果、2d-2 はウイルス感染の後期までコンスタントな発現を示す 60 kDa のタンパク質をコードしており、2d-4 によってコードされる 30 kDa のタンパク質は細胞外に分泌される可能性が示された。2d-5 は、120 kDa のタンパク質をコードしており、感染直後に発現が急激に低下していることがわかった。次に、ORF8 と相互作用する7つのクローンの塩基配列を決定し、相同性やモチーフ検索を行ったところ、EGF, ZnF や LDLa などのモチーフを多数持つことがわかり、これらの宿主因子が lipoprotein receptor pathway や Notch signaling などに関わるタンパク質であることが示唆された。そこで、Notch の阻害剤を処理した結果、ウイルスの plaque の形成が阻害されることがわかった。また、阻害剤処理によって感染経過において少々の遅延はあるものの、感染は成立することがわかり、ウイルスによる細胞への侵入の段階において Notch signaling pathway が関わっていることが示唆された。次に、ウイルス感染において ORF8 と宿主因子との相互作用が担う機能を調べるため、dsRNA 導入による RNAi を試みたところ、3つの宿主因子の発現を抑制すると、ウイルスの侵入が阻害されることがわかった。また、阻害剤処理時同様、感染経過において少しの遅延は起こるが、感染は成立することも明らかになった。また、RNAi を施し、ウイルス感染の吸着の時間を短くすると、plaque の形成が阻害されるクローンがあることもわかった。これは、相互作用する宿主因子の発現抑制により、ウイルスの感染効率、特に侵入の段階が影響を受けていることを示唆するので、さらに解析を行っていく予定である。

(2) バキュロウイルスベクターの開発と応用 (永峰, 阿部^{*2}, 栗原, 松本)

新規バキュロウイルスベクターの開発を目的としてバキュロウイルス増殖機構の解析を進めている。バキュロウイルスの感染細胞内には DNA 複製及び粒子形成を行う virogenic stroma とウイルス膜形成及び多角体形成を行う peristromal region と呼ばれる核内領域が形成されるが、これらのウイルス誘導核ドメインの形成が宿主細胞の核構造にどのような影響を与えるのかについてはこれまで全く明らかにはされていなかった。そこで、感染細胞内のクロマチンの動態を蛍光タンパク質タグ化ヒストンを用いて解析した結果、宿主クロマチンは上述の2つのウイルス誘導核ドメインから排除されることによって核周縁部へ移動させられていることが明らかとなった。

3. 昆虫遺伝子の機能解析・機能発現のための遺伝子導入・ターゲティング系の構築

(1) カイコガフェロモン産生細胞における遺伝子機能解析系の構築 (本, 栗原, 松本)

カイコガ性フェロモン産生の分子メカニズムの解明を目的としたカイコガ EST データベースの解析により、これまでにフェロモン腺から 312 個の独立 EST クローンを得た。しかしながら、カイコガでは個体レベルでの遺伝子機能解析系が未だに不十分なため、それらのほとんどは機能不明である。そこで、昨年度までにトランスポゾン *piggyBac* とカイコガフェロモン腺特異的遺伝子 *desat1* の上流領域 (3,844bp) を用いて実験系の構築を試みた結果、GFP マーカー遺伝子をカイコガ個体でフェロモン腺特異的に発現できることが明らかとなった。一方、今後解析すべきフェロモン産生関連遺伝子候補は多数に及ぶことから、インビトロジェン社の Gateway システムに対応したカイコガ遺伝子導入用ベクター、すなわち Gateway カセットの上流に *desat1* の上流配列を有するベクター (pBRD-GW1) を作製した。さらに、pBRD-GW1 の Gateway カセット部分を GFP 遺伝子に置き換え、トランスポゼース発現用のヘルパー DNA (pHA3PIG) とともに 1,743 個のカイコガ pnd-w1 系統の産下 5-8 時間受精卵に微量注入した。孵化した 140 頭の幼虫を成虫にまで生育させた後、交配させ、33 蛾区の G 1 世代を得た。pBRD-GW1 を利用した場合、トランスジェニックカイコガは G 1 世代以降において眼特異的に DsRed を発現することから、得られた G 1 世代幼虫の単眼を蛍光顕微鏡下で観察した結果、1 蛾区 2 頭の DeRed 陽性個体を得た。さらに DeRed 陽性幼虫を成虫にまで生育させた後、メスのフェロモン腺を蛍光顕微鏡下で観察した結果、フェロモン腺において GFP の蛍光が観察された。以上の結果から、本実験系において Gateway システムが利用可能であることが明らかとなった。

(2) 相同組み換えを利用したカイコのジーンターゲティング法の開発 (鈴木, 松本)

遺伝子の機能を解析する最も確実な手法は相同組み換えによる gene targeting 法であるが、カイコでは実用的な gene targeting 法が未だ開発されていない。そこで、あらゆる生物に応用が可能とされている Golic らによって開発された gene targeting 法をカイコに応用することにした。Golic の方法に基づくターゲティングがカイコ細胞内でも起こることを確認するため、カイコ培養細胞に FLP-I-*SceI* 発現プラスミドとフィブロイン L 鎖遺伝子を標的とするターゲティングドナーコンストラクトをコトランスフェクションした。これらの細胞のゲノム DNA を抽出し、PCR 法による解析を行った結果、期待通りに *Fib-L* 遺伝子座の破壊が起きていることを確認することが出来た。次に、ターゲティングの起きた細胞を視覚的に捉えるため、*Fib-L* 遺伝子断片に EGFP の ORF を in-frame で融合したドナーコンストラクトを用いて同様のトランスフェクション実験を行った。その結果、およそ 10,000~20,000 個に 1 個の割合で EGFP 蛍光を示す細胞が観察された。以上の結果から、カイコ細胞内でも Golic の方法に基づくターゲティングが起こることが明らかとなった。

*1 協力研究員, *2 研修生, *3 訪問研究員

insects as model systems. Insects, which comprise more than 70% of all animal species, provide unique and useful systems to analyze fundamental biological events at the cellular, tissue, and individual organismal levels. Using these insect systems, we are elucidating, from various aspects, the molecular mechanisms underlying specific biological events that are exhibited by insects. These findings can then be applied to the agricultural, environmental, industrial, and/or medical science fields.

1. Molecular mechanisms underlying fundamental biological events exhibited by insects

(1) *Bombyx mori* homologs of STIM1 and Orai1 play a role in the PBAN-induced influx of extracellular Ca^{2+} . Sex pheromone production in most female moths is dependent on the presence of extracellular Ca^{2+} , suggesting that PBAN regulates Ca^{2+} influx. We recently provided the first direct demonstration of this critical event via fluorescent Ca^{2+} imaging and showed that it proceeds via store-operated Ca^{2+} (SOC) channels. We further showed that transcripts encoding *Bombyx* homologs of STIM1 and Orai1 are expressed in the pheromone gland. When transiently expressed in Sf9 cells, Orai1 localized to the plasma membrane while STIM1 moved from the ER complex to the plasma membrane where it co-localized with Orai1 following depletion of ER Ca^{2+} stores. RNAi-based knockdown of STIM1 and Orai1 in pheromone glands resulted in significant reduction in bombykol production but had no effect on GAPDH or catalase activities suggesting a direct role for the SOC proteins.

(2) Isolation and characterization of intracellular proteins that are phosphorylated in response to PBAN stimulation. Because PBAN signaling induces an influx of extracellular Ca^{2+} into the pheromone producing cells, it is suggested that a series of phosphorylation events are involved in the PBAN intracellular signal transduction cascade. To identify proteins that are phosphorylated in response to PBAN, we performed immunoblots with three types of antibodies against phosphorylated amino acids. To date, five immunoreactive bands (35, 42, 45, 72, 160 kDa) have been detected. One of those bands (42kDa) has been identified as Lipid storage droplet protein 1 (Lsdp1), a protein that associates exclusively with the surface of the lipid droplet and regulates lipolysis.

(3) Screening and functional analysis of pheromone gland-specific genes in *Bombyx mori*. We have screened for EST clones that are potentially involved in the sex pheromone biosynthetic mechanism of *Bombyx mori*. Using RNAi methodologies, 7 EST clones were selected from 88 EST clones. One of those has high homology to the fatty acid transport protein (FATP), which acts during lipogenesis. Suppression of FATP gene expression prevented accumulation of the triacylglycerols (TGs) that are mainly composed of the C_{18} unsaturated fatty acyl groups (i.e., linoleic acid and linolenic acids) necessary for synthesis of the lipid droplets in the pheromone gland. Consequently, we concluded that FATP plays a role in the importation of the dietary lipids that are required for TG storage in the bombykol biosynthetic pathway.

(4) Comparative analysis of the sex determination mechanism using *Bombyx mori* as a model organism. We have identified BmPSI as a *trans*-acting factor that negatively regulates splicing of *Bmdsx* female exons. Northern blot analysis showed no differences in the expression patterns of BmPSI mRNAs between male and female cells, while Western blot analysis using an anti-phosphoserine antibody resulted in female-specific serine phosphorylation of BmPSI. We tested the RNA-binding ability of the phosphorylated BmPSI and found that the phosphorylation status of BmPSI did not affect its ability to bind RNA. Treatment of female cells with staurosporine, JNK inhibitor II, and PD98059 had little or no influence on the sex-specific splicing of *Bmdsx* mRNA. Thus the female-specific phosphorylation of BmPSI may be irrelevant to the sex-specific regulation of *Bmdsx* mRNA.

(5) Analysis of *Drosophila nucleolar GTP binding protein 1 (dngbp1)*. At the time of pattern formation, body planning is needed for a precise developmental program. We have established a mutant that shows abnormal phenotype in the adult eye, and isolated a novel specific gene, *Drosophila nucleolar GTP binding protein 1 (dngbp1)*. The *dngbp1* null mutants are lethal, but the hypomorphic allele has partial loss of function of *dngbp1*. The DNGBP1 protein is ubiquitously expressed in the nucleolus, and its precise function depends on the binding of GTP to its GTP binding domain. The loss of function of *dngbp1* causes cell death that is independent from the caspase dependent pathway. We are planning to isolate the interacting molecules and analyze its function in detail.

2. Molecular interactions between insect viruses and their hosts

(1) Molecular mechanisms underlying host regulation by baculoviruses. We identified 3 additional host clones as BmNPV ORF8 interacting partners from cDNA libraries of infected insect larvae. The interaction between ORF8 and each host clone was confirmed using a yeast two-hybrid assay, which also showed that the N-terminal region of ORF8 is important for the interaction with most host clones. Homology search using deduced amino acid sequences and western analysis suggest that these host factors are either membrane bound proteins or secreted proteins. Further analysis, including RNAi and inhibition of the Notch signaling pathway, suggested that these host factors may be involved in the entry of BmNPV.

(2) Development and application of baculovirus vectors. In baculovirus infection, viral DNA replication and nucleocapsid assembly occur within a subnuclear region, the virogenic stroma, while intranuclear envelopment and polyhedra formation occur within another subnuclear region, the peristromal region. To investigate whether formation of these virus-induced subnuclear compartments affects the nuclear architecture of host cells, we examined the intracellular localization of DsRed-tagged histone H4 and GFP-tagged viral proteins. Microscopy of virus-infected cells expressing these proteins clearly demonstrated that host cell chromatin is relocated to the nuclear periphery in association with expansion of the two discrete virus-induced subnuclear compartments.

3. Development of gene transfer/targeting systems in insects

(1) Establishment of a gene analysis system in *Bombyx mori* PG. To understand the molecular mechanisms of sex pheromone production, 312 independent EST clones have been obtained

from pheromone glands of the silkworm, *Bombyx mori*. However, the functions of most of the clones remain unclear because *in vivo* gene analysis in *B. mori* has not been fully developed. In this study, we established a transgenic gene analysis system in the pheromone glands of *B. mori* by using the *piggybac* transposon and the upstream region of a pheromone gland-specific gene, *desat1*. Furthermore, we have determined that we could use the Gateway system in silkworm pheromone glands.

(2) Development of gene targeting techniques by homologous recombination in *Bombyx mori*.

We performed gene targeting experiments using *Bombyx* cultured cells to rapidly confirm whether targeted gene disruption can occur in *Bombyx* cells according to Golic's method by co-transfecting BmN cells with the targeting donor vector and FLP-I-*SceI* expression plasmid. PCR-based assays demonstrated that the *Fib-L* loci was disrupted by insertion of the targeting donor vector in the expected manner. Visualization of targeting events using a targeting donor construct in which EGFP was fused in-frame to the *Fib-L* gene fragment revealed that the targeted disruption occurred at a rate of ~1/20,000 cells.

Staff

Head

Dr. Shogo MATSUMOTO

Members

Dr. WonKyung KANG
Dr. Toshihiro NAGAMINE
Dr. Masataka SUZUKI
Dr. Kazuhide TSUNEIZUMI
Dr. Ken-ichi MOTO
Mr. Shinji ATSUSAWA
Ms. Kazue TOKUDA
Mr. Masaaki KURIHARA
Mr. Katsunori ICHINOSE
Dr. Jimmy Joe HULL^{*1}
Dr. Atsushi OHNISHI^{*1}

^{*1} Contract Researcher

in collaboration with

Dr. Hiroyuki KOSHINO (Advanced Development and Supporting Center Molecular Characterization Team)
Dr. Shunya TAKAHASHI (Advanced Development and Supporting Center Molecular Characterization Team)

Visiting Members

Dr. Noriko MATSUDA (JSPS)

Trainees

Ms. Kana HASHIMOTO (Graduate School of Engineering, Hosei Univ.)
Ms. Eriko MATSUO (Graduate School of Science & Engineering, Saitama Univ.)
Ms. Misato KAJI (Graduate School of Science & Engineering, Saitama Univ.)
Ms. Emiko ITO (Graduate School of Science & Engineering, Saitama Univ.)
Mr. Atsushi ABE (Faculty of Life Sciences, Toyo Univ.)
Mr. Kenta SUGITANI (School of Agriculture, Meiji Univ.)