幼若ホルモンの分子的作用機構

特に脱皮・変態の制御について

神 村 学

独立行政法人農業生物資源研究所

Molecular Action of Juvenile Hormone, Especially for Regulation of Molting and Metamorphosis. Manabu KAMIMURA Developmental Biology Department, National Institute of Agrobiological Sciences; Tsukuba, Ibaraki 305-8634, Japan. *Jpn. J. Appl. Entomol. Zool.* 48: 1-12 (2004)

Abstract: Recent progresses in researches for molecular mechanisms underlying juvenile hormone (JH) actions are reviewed. Discussed topics are 1. Effects of JH on ecdysone signaling pathway, 2. Identification of JH-inducible genes from cell lines, 3. Regulation of yolk proteins genes by JH, 4. JH receptor.

Key words: Juvenile hormone; ecdysone; receptor; metamorphosis; reproduction

はじめに

幼若ホルモン (juvenile hormone: JH) は、昆虫において多彩な生理現象に関与する多機能性ホルモンである。1930 年代に JH が発見されて以来 (Wigglesworth, 1934, 1936), 基礎から応用まで JH に関係する様々な研究が世界中でなされてきた (Retnakaran et al., 1985; Riddiford, 1985, 1994; Wyatt and Davey, 1996; Dhadialla et al., 1998)。わが国においても JH に関して多くの研究が行われており、例えばこの 10 年ほどの間に Applied Entomology and Zoology および日本応用動物昆虫学会誌に掲載された JH 関連の論文を見ても、脱皮・変態 (Kotaki et al., 1993; Kamimura, 1995; Kamimura and Kiuchi, 1998; Yoshiga and Tojo, 2001)、休眠 (Watanabe and Tanaka, 1998; Tsumuki and Hirai, 1999)、性成熟 (Ono, 1993; 野村・宮田, 2000; Bertuso and Tojo, 2002) の制御と幅広い生理現象が取り上げられている。また、JH と似た活性を持つ JH 類似化合物 (JH analog: JHA) についても、昆虫成長制御剤 (Insect Growth Regulator: IGR 剤) としての利用に関する応用研究 (Kamei et al., 1993; Borlototti et al., 2000) のみならず抵抗性系統の作出 (Li et al., 1997; Li and Shono, 1997; Zhang et al., 1998) についても報告が掲載されている。対象となる昆虫も半翅目、鞘翅目、脈翅目、鱗翅目、双翅目と幅が広い。

しかし、これらの研究のほとんどは個体・組織レベルのものであり、よりミクロな細胞レベルさらに生化学・分子生物学レベルでの作用機構の解明は遅々として進まなかった (Riddiford, 1996)。もう一方の脂質性多機能ホルモンである脱皮ホルモン (エクジステロイド) の分子的作用機構

が、主にキイロショウジョウバエ (*Drosophila melanogaster*) を材料として詳細に解析されているのとは対照的である (Thummel, 1995; Riddiford et al., 2000)。その理由としては、JH は疎水性が強く精密な定量実験を行うのが難しい、光学異性体が存在し一方にしか生物活性がない、また、最近まで比活性の高い放射性ラベル体が合成できなかった、という化学的な問題がまず挙げられる (Riddiford, 1994)。また、分子遺伝学的な解析が容易なキイロショウジョウバエにおいて、JH に関係する突然変異系統がほとんど作出されていなかった、ということもある。しかし、ここ数年、主にキイロショウジョウバエやタバコスズメガ (*Manduca sexta*) を用い、JH の分子的作用機構の実体に取り組む研究成果が、少しずつではあるが報告されてきている。本稿では、筆者が携わっている脱皮・変態の制御に関する研究を中心に、ここ数年間の JH の分子的作用機構研究のトピックスを紹介したい。なお、1990 年代前半までの JH の分子的作用機構の研究に関しては、英語の総説では Riddiford (1994, 1996)、Wyatt and Davey (1996) が、日本語の総説では東原 (1994, 1995) が詳しく、最近の JH 研究全般については Gilbert et al. (2000) や Davey (2000) が参考になるので、参照されたい。

本稿をまとめるにあたり校閲いただいた農業生物資源研究所の竹田敏博士、木内信博士、生研機構ポスドクの中原雄一博士に感謝する。

JH 分子種

JH はセスキテルペノイド骨格を持つホルモンであり、昆虫および甲殻類から存在が知られている。昆虫では頭部に

あるアラタ体で主に作られ、血中に分泌される。1967 年に JH の 1 分子種である JH-I の構造が報告されて以来 (Röller et al., 1967), 1990 年代前半までに 7 種類の JH が同定されていた (第 1 図) (Riddiford, 1994; 東原, 1995)。JH-III が昆虫で最も一般的に見られる JH であり, JH-0, I, II, 4-methyl-JH I は主として鱗翅目, JH III-bisepoxide はショウジョウバエなどの高等双翅目, ファルネセン酸メチルエステル (methyl farnesoate: MF) はゴキブリから報告されている。なお, MF は甲殻類でも JH として機能していると考えられている。

近年になって, JH の前駆体および分解産物と考えられてきた JH II 酸 (第 1 図) にホルモン活性が有ることが示された (Ismail et al., 1998, 2000)。タバコスズメガでは, ピテロジェニンの合成は脂肪体において前蛹期に開始するが, そのためには, 脂肪体が少量の JH II 酸にさらされる必要があることがわかった。同様に, JH II 酸にさらされないベルソン氏腺 (Verson's gland: 脱皮腺とも呼ばれる) は蛹期タンパク質を合成できるようにならなかった。これらの作用はメソブレン酸では代替できたが, メソブレンには効果が無いことから, 末端のカルボキシル基がこれらの生理活性に必要なことも示されている。

また, トノサマバッタ (*Locusta migratoria*) のアラタ体から 2 種類の JH-III 水酸化物が同定され, 少なくともそのうち 1 種 (12'-OH JH-III) (第 1 図) には JH 活性が有ることが確認された (Darrouzet et al., 1997; Couillaud et al., 1998)。

今後, 様々な種における詳しい化学的および生理学的分析を通して, さらに活性型 JH のリストは増えると予想される。事実, チャバネアオカメムシ (*Plautia stali*) など数種のカメムシの JH は既知のものとは異なった構造をしていると報告されている (Kotaki, 1993, 1996)。

JH の生理作用

JH が関与する生理現象としては, 胚発生, 脱皮・変態, 性成熟, 休眠, 相変異, カースト分化, 寿命 (成虫期間の長さ) などが古くから知られている (Riddiford, 1994; Wyatt and Davey, 1996; Tatar and Yin, 2001)。これらの中で特によく調べられているのは幼虫期での幼虫脱皮, 変態の決定と, 成虫期での性成熟促進作用である。JH は, 幼虫期には脱皮ホルモンと共同して働き, 血液中に JH が存在する状態で脱皮ホルモンが作用すると幼虫脱皮が繰り返され, JH の非存在下で脱皮ホルモンが作用すると幼虫から蛹への変態が誘導される。すなわち, JH は幼虫脱皮を繰り返させる現状維持 (status quo) の機能を担っている。一方, 成虫期には多くの場合 JH は単独で働き, 脂肪体での卵黄形成タンパク質 (vitellogenin) の合成と分泌, 卵巣での卵黄タンパク質の取り込みと他の卵タンパク質の合成, 付属腺の発達, 性フェロモンの合成などの生殖に関係する生理現象を誘導する。いずれの場合にも, JH の作用は組織・細胞特異的である。

これらの知見のほとんどは, JH の分泌器官であるアラタ体の除去や個体, 組織培養系への JH もしくは JHA 処理などの実験生理学的手法により明らかにされたものである。近年になって, キイロショウジョウバエを用いた分子遺伝学的解析が JH の生理機能の研究にも適用され始めた。それらの研究により JH が関与することが確認された, もしくは新たに明らかとなった現象として, 蛹期の生殖器官の捻転 (360 度向きを変える) (Adam et al., 2003), 成虫の歩行活動性の雌雄差の発生 (Belgacem et al., 2002), 寿命の決定 (Tatar et al., 2001) などがある。最近, キイロショウジョウバエにおいて脱皮ホルモンの寿命制御への関与も報告さ

第 1 図 JH の構造

現在までに 9 種類の JH が同定されている。JH II 酸と 12'-OH JH-III は最近になって JH 活性があることが報告された分子種である。

れており (Simon et al., 2003), JH の作用との関係にも興味を持たれる。

JH の脱皮ホルモン・シグナリングへの関与

前項で述べたように, JH は幼虫期には脱皮ホルモンと共同して働き, 脱皮ホルモンが幼虫脱皮を誘導するのか, それとも蛹化を誘導するのかを決める (Riddiford, 1985). この生理作用から, JH は脱皮ホルモン・シグナリングに関与する分子の発現や機能に影響を与えることが予想されていた。それらは, 最近になってようやく実証されはじめたところである。まず, 現在明らかになっている脱皮ホルモンの分子的作用機構 (藤原・神村, 1998; Riddiford et al., 2000) について簡単に説明する (第2図(A))。

血中に放出された脱皮ホルモンは標的細胞に到達し細胞膜を通過した後, 細胞内に存在する脱皮ホルモン受容体 (ecdysone receptor: EcR) とウルトラスピラクル (ultraspiracle: USP) というタンパク質のヘテロ2量体と結合する。この複合体は, 標的となる遺伝子のプロモーター上にある脱皮ホルモン応答配列に結合してその遺伝子の転写を誘導する。このようにして脱皮ホルモンと受容体の複合体により直接転写を誘導される遺伝子は初期遺伝子と呼ばれている。今までにクローニングされた初期遺伝子には構造遺伝子とともに数種の転写因子が含まれており, これらの転写因子がさらに多数の遺伝子の転写を誘導する。後期遺伝子と呼ばれるこうした遺伝子がコードするタンパク質が, 実際に様々な生理機能を担うエフェクター分子であると考えられている。このように, 脱皮ホルモンは受容体タンパク質と結合した後, 少数の初期遺伝子を介して多数の後期遺伝子群の転写を段階的に誘導し, 脱皮ホルモンの効果を増強すると同時に, 他の様々な因子との相互作用の機会を増やすことによって, 複雑な時期特異的, 組織特異的反応を制御すると考えられる。以下, 脱皮ホルモン受容体, 初期遺伝子, それ以外の脱皮ホルモン誘導性遺伝子の順に JH の影響を見ていく。

1. 脱皮ホルモン受容体に対する制御

EcR, USP は, とともに核内受容体スーパーファミリーに属す転写因子であり, 脊椎動物のステロイドホルモン受容体や甲状腺ホルモン受容体, レチノイン酸受容体とよく似た構造をしている (Riddiford et al., 2000)。EcR, USP とともに, 多くの昆虫で N 末端の A/B 領域と呼ばれる転写活性化領域のみが異なる複数のアイソフォームが存在する。

Berger et al. (1992) は, キイロショウジョウバエ S3 細胞株に hsp 27 遺伝子由来の脱皮ホルモン応答配列にレポーターとして CAT 遺伝子をつないだコンストラクトを一過的に導入して, 脱皮ホルモン添加によりレポーター遺伝子の発現が誘導されるアッセイ系を構築し, JH の作用を調べた。JH 活性物質 (JHA) のメソプレンを加えた場合には脱

第2図 JH の脱皮ホルモン・シグナリングへの関与

(A) 脱皮ホルモンの分子的作用機構の模式図。血液を通じて標的細胞に到達した脱皮ホルモンは, 核内に移行し脱皮ホルモン受容体 (EcR-USP) と結合した後, 脱皮ホルモン応答配列を介して少数の初期遺伝子の転写を誘導する。初期遺伝子産物のうち Broad-complex, E74, E75 などの転写因子がさらに多数の後期遺伝子の転写を誘導する。後期遺伝子の遺伝子産物が実際の生理機能の主要部分を担うと考えられている。

(B) JH の脱皮ホルモン受容体および初期遺伝子に対する発現制御。脱皮ホルモン受容体の構成要素である EcR と USP の発現はリガンドである脱皮ホルモンにより誘導され, さらに脱皮ホルモン-EcR-USP 複合体により Broad-complex, E74, E75 などの初期遺伝子の発現が誘導される。タバコスズメガなどの鱗翅目を用いた研究から, JH が EcR, USP, E74 の発現を抑制し, E75 の発現を促進することがわかってきた。また, JH は BR-C の発現に対しては幼虫期では抑制的に働くのに対して, 蛹期では促進的に働く。なお, 図中の は転写活性化, は転写抑制を表す。

皮ホルモンによるレポーター遺伝子の発現が濃度依存的に抑えられた。JH III によってもレポーター遺伝子の発現は抑制されたが, JH 活性を持たないレチノイン酸やファーンソール, ファーンシル酢酸には抑制効果は見られなかった。この結果は, JH が脱皮ホルモンと受容体 (EcR-USP) の複合体による脱皮ホルモン応答配列を介した転写誘導を阻害することを示唆することになるが, 現在にいたるまで追試はなされていないようである。筆者も, カイコ培養細胞 NISES-BoMo-DK10 およびイラクサキンウバ培養細胞

High Five を用いて同様の実験を行ったが、再現できなかった（神村ら、未発表）。JH の作用は組織・細胞特異性が非常に高いので、実験に用いる細胞の種類が重要なのかも知れない。

タバコスズメガからは、2 種類の EcR アイソフォーム（EcR-A および EcR-B1）と 2 種類の USP アイソフォーム（USP-1 および USP-2）が報告されている（Fujiwara et al., 1995; Jindra et al., 1996, 1997）。真皮の培養系に脱皮ホルモンを処理すると、両 EcR アイソフォームの mRNA の発現は処理後数時間以内と 12 時間以降の 2 回にわたって誘導され、USP-1 mRNA の発現は 12 時間以後に誘導された（Hiruma et al., 1997, 1999）。このように、EcR, USP は脱皮ホルモン受容体の構成要素であると同時に、脱皮ホルモン誘導性遺伝子としての性質も持っている。脱皮ホルモンによる EcR の発現誘導はタンパク質合成阻害剤の影響を受けないので、初期遺伝子であることも示されている（Jindra et al., 1996）。そして、脱皮ホルモンによるこれらの mRNA の発現誘導は JH-I の添加により濃度依存的に抑制された（Hiruma et al., 1999）。ただし、JH-I による発現抑制効果はかなり遅くなってから現れ、脱皮ホルモン添加後数時間以内に見られる初期の EcR-A, EcR-B1 の発現誘導には影響しなかった。一方、EcR-A, EcR-B1 タンパク質は JH-I を処理した場合に細胞内にとどまる時間が長くなり、JH は mRNA への影響とは逆に EcR タンパク質の発現を正の方向に制御することがわかった（Hiruma et al., 1999）。このように、タバコスズメガでは、JH は脱皮ホルモン受容体の発現を、mRNA とタンパク質の両方のレベルで制御していることがわかった。

筆者らは、カイコ（*Bombyx mori*）の前部絹糸腺を用いて EcR mRNA の発現に対する JH の影響を調べている。カイコでもタバコスズメガ同様に EcR-A, EcR-B1 の 2 種類の EcR アイソフォームがクローニングされている（Swevers et al., 1995; Kamimura et al., 1996, 1997）。前部絹糸腺では、4 齢期では EcR-A が齢期の前半に、EcR-B1 は後半に発現するのに対して、5（終）齢期では両者は同時にともに齢期の後半で発現する（Kamimura et al., 1997）。様々なホルモン処理により幼虫脱皮あるいは蛹化を人為的に誘導し EcR mRNA の発現動態を調べた結果、4, 5 齢期における EcR の発現パターンの違いが幼虫脱皮過程では成長、蛹化時には崩壊という絹糸腺の脱皮ホルモンに対する時期特異的応答と密接に結びついていることがわかった（Kamimura et al., 1999; 神村ら、未発表）。また、5 齢幼虫に対して脱皮ホルモンを単独もしくは JHA と組み合わせる実験から、脱皮ホルモンによる EcR-A mRNA の発現誘導は JH の影響を受けないのに対して EcR-B1 mRNA の発現が抑制されることも示された（Kamimura et al., 1999; 神村ら、未発表）。これらの結果から、4 齢期中では血中 JH 濃度が高い

ことにより EcR-B1 の発現が抑制されて EcR-A に対して相対的に発現が遅れるのに対して、5 齢期中では JH 濃度が低いために発現が抑制されず齢期後半での脱皮ホルモン濃度の増加により両者の発現が同時に誘導されると考えられる。USP については、カイコからは他種で報告されているアイソフォームのうち 1 つしかクローニングされていないが、前部絹糸腺では蛹化直前により小型の mRNA が一過的に発現することがノーザン・ブロットングにより明らかになっており（Hirai et al., 2002）、この小型の USP mRNA の発現制御に JH が関与しているのかどうか興味を持たれる。

2. 脱皮ホルモン応答性経路の初期遺伝子の発現に対する制御

1) Broad-complex

Broad-complex (BR-C) は C_2H_2 タイプの zinc finger DNA 結合ドメインを持つ転写因子であり、選択的スプライシングによりキロショウジョウバエでは 4 種の zinc finger アイソフォーム（Z1, Z2, Z3, Z4 アイソフォーム）が生じる（Bayer et al., 1996）。BR-C は終齢幼虫後期に特異的に発現すること、および、BR-C 遺伝子の突然変異系統では幼虫成長過程は問題ないが正常に蛹化できず死亡することから、BR-C が蛹化に必要な遺伝子セットの発現を選択的に誘導する可能性が示唆されてきた（Bayer et al., 1996）。最近、ショウジョウバエの真皮に BR-C を強制発現する実験によりこの仮説が証明された（Zhou and Riddiford, 2002）。終齢である 2 齢幼虫の皮膚に Z1 アイソフォームを強制発現した場合には、幼虫脱皮に向けて発現するはずの幼虫クチクラタンパク質遺伝子 LCP65A-b の発現が抑えられ、代わりに蛹クチクラタンパク質遺伝子 Edg78E の発現が誘導された。一方、蛹の皮膚に Z1 アイソフォームを強制発現した場合には、羽化に向けて発現するはずの成虫クチクラタンパク質 ACP65A の発現が抑えられ、やはり Edg78E の発現が誘導され、形態的には、着色して剛毛が多数生えた成虫の皮膚の代わりに、透明で剛毛を欠く蛹様の皮膚が作られた。効果は弱いものの、Z2, Z3, Z4 アイソフォームの強制発現でも同様の結果が得られている。このように、少なくとも真皮細胞では、BR-C は蛹の皮膚を作る転写因子として機能する。

さて、JH と BR-C との関係であるが、前蛹期に JHA のピリプロキシフェンを塗布したところ、通常は発現の見られない後期蛹の腹部真皮に BR-C が発現し、BR-C を強制発現した場合と同様に ACP65A の発現が抑えられて Edg78E の発現が誘導された（Zhou and Riddiford, 2002）。この結果は前蛹期での JH 処理により成虫腹部の形態異常が起こるという知見（Riddiford and Ashburner, 1991）とよく一致しており、JH 処理が BR-C の再発現を誘導することにより腹部に再度の蛹化反応を引き起こしたことを示唆している。

タバコスズメガからは、3 種の BR-C アイソフォーム (Z2, Z3, Z4) が報告されている (Zhou et al., 1998b). ショウジョウバエと同様にタバコスズメガ BR-C mRNA も蛹化過程でのみ発現する。培養系での実験から、幼虫真皮では BR-C mRNA の発現は脱皮ホルモンにより誘導され、JH はその誘導を濃度依存的に抑制することがわかった (Zhou et al., 1998b). すなわち、4 齢中は血中に高濃度の JH が存在することにより脱皮ホルモンによる BR-C の誘導が抑えられると考えられる。翅原基においては 5 齢中期から BR-C が発現するが、やはり JH 処理により不完全ながら発現が抑えられた。一方、蛹期では逆に JH が BR-C の発現に対して促進的に働いた (Zhou and Riddiford, 2002). 蛹の翅に JHA を塗布したところ、キイロショウジョウバエの場合と同様に、通常は発現の見られない蛹期後期で BR-C が発現した。同様の結果は蛹期の翅の培養系でも再現され、培養系に脱皮ホルモンを添加しただけでは BR-C mRNA の誘導は見られなかったが、脱皮ホルモン添加の前に JH を加えておくことにより BR-C mRNA の発現が誘導できた。このように、タバコスズメガでは、JH は BR-C の発現を、幼虫期と蛹期とで全く逆の方向に制御することがわかった。

また、カイコでも 3 種類の BR-C アイソフォーム (Z1, Z2, Z4) が得られている (Reza ら, 未発表). BRC mRNA は、前部絹糸腺では 4 齢期中は発現せず、5 齢期の後半になって初めて発現する。タバコスズメガの幼虫真皮と同様に、脱皮ホルモンによって BR-C mRNA の発現は誘導され、JH により抑制されることが *in vivo* と *in vitro* の両方の実験で確認されている (第 3 図)。

2) E74

E74 は ETS DNA 結合領域を持つ転写因子であり、キイロショウジョウバエとタバコスズメガから cDNA が報告されている (Burtis et al., 1990; Stilwell et al., 2003). 古くは Richards (1978) がキイロショウジョウバエの唾液腺の培養系を用いて、巨大多系染色体のパフ (遺伝子の転写が活発な領域) 形成を指標に JH の E74 の発現 (パフ名は 74EF) に対する影響を調べている。唾液腺培養系へのメソプレンの添加により、囲蛹殻形成期での脱皮ホルモンによる 74EF パフ形成誘導は影響を受けなかったが、前蛹後期でのパフ形成誘導が濃度依存的に抑制された。この結果から E74 の前蛹後期における発現が JH により抑制されることが示唆されるが、mRNA の発現レベルでは確認されていない。

タバコスズメガでは、2 種類ある N 末端領域のアイソフォーム (E74A, E74B) のうち、E74B mRNA の脱皮ホルモンによる発現誘導が JH-I 処理により濃度依存的に抑制されることが、幼虫真皮の培養系を用いた実験により示されている (Stilwell et al., 2003). E74B の発現時期とホルモンに対する反応性は真皮の蛹コミットメント (JH 感受性を

第 3 図 カイコの脱皮ホルモン誘導性遺伝子に対する JH の影響

脱皮ホルモンである 20- ヒドロキシエクジソンを 5 齢 4 日のカイコ幼虫に注射し、その後に JH 活性物質のフェノキシカルブを塗布した場合 (+20E+JH) としない場合 (+20E) との間で、脱皮ホルモン誘導性遺伝子 mRNA の前部絹糸腺における発現を比較した。これらのホルモン処理により、前部絹糸腺では、通常の幼虫脱皮時に見られるクチクラ層の更新 (+20E+JH) と蛹化時に見られる細胞死 (+20E) が、ホルモン処理後 36 時間以内に誘導される (Takahashi et al., 2003). 図中、trehalase, CYP9G1, OCT-1 は mRNA differential display 法により同定した蛹化過程で特異的に発現する遺伝子で、蛹化特異的転写因子である BR-C の転写制御を受けていると考えている。BHR3 は脱皮ホルモン応答性の初期後期遺伝子 (初期遺伝子と後期遺伝子の両方の特徴を持つ) で核内受容体の 1 種 (Matsuoka and Fujiwara, 2000). なお、カイコの前部絹糸腺では chitinase の発現は JH 処理の影響を受けないが、タバコスズメガの真皮では JH により強く抑制されると報告されている (Kramer et al., 1993).

失い、JH の有無に関係なく脱皮ホルモン刺激により蛹化が誘導されるようになること) の誘導時期とよく一致することから、終齢幼虫期に JH 濃度の低い状態で脱皮ホルモン濃度が上昇することにより E74B の発現が誘導され、それによって蛹コミットメントが起こると推測されている。

3) E75

E75 は EcR や USP と同様に核内受容体スーパーファミリーに属す転写因子であり、キイロショウジョウバエとタバコスズメガのほか、数種の双翅目昆虫と鱗翅目昆虫から cDNA が得られている (Henrich and Brown, 1995). EcR や USP と同様に、N 末端 A/B 領域のみが異なる複数のアイソフォームが存在することが多い。ハチノスツツリガ (*Gal-*

leria mellonella) では、2 種類あるアイソフォーム (E75A, E75B) の両方の mRNA が脱皮ホルモンにより誘導されるが、E75A mRNA の発現量のみが JH II 添加により増加することが、絹糸腺の培養系を用いて示された (Jindra and Riddiford, 1996). なお、JH II 単独では発現誘導は見られないことから、JH それ自身に E75 の発現を誘導する効果があるのではなく、脱皮ホルモンによる発現誘導を増強する作用を持つと考えられる。

タバコスズメガの真皮培養系でも、JH-I を用いて同様の結果が得られている (Zhou et al., 1998a). 終齢幼虫期に真皮細胞が蛹コミットメントを起こさずに幼虫形質を維持するために、JH により E75A の発現が高まるが必要ではないかと推測されている。

3. 他の脱皮ホルモン誘導性遺伝子の発現に対する制御
筆者のグループでは、カイコの前部絹糸腺を用いた mRNA differential display 法により、トレハラーゼや P450 の 1 種 CYP9G1 など 10 個ほどの遺伝子を蛹化過程で特異的に発現する脱皮ホルモン誘導性遺伝子として単離している (Kamimura et al., 1999; 高橋ら, 未発表). これらは BR-C と同様に、4 齢期中は発現せず、絹糸腺がプログラム細胞死により崩壊する (Chinzei, 1975) 5 齢期後半の蛹化過程でのみ発現する。これらの遺伝子は、血中 JH 濃度が高い 5 齢幼虫初期には脱皮ホルモン処理によって誘導できないが、あらかじめ 4 齢中期にアラタ体を取り除いておいてから 5 齢期の始めに脱皮ホルモン処理すると強い発現誘導が見られ、その誘導は脱皮ホルモン処理前に JHA の 1 種フェノキシカルブ処理を行うと見られなくなった。また、JH 濃度が低い 5 齢中期では脱皮ホルモンにより発現を誘導できるが、やはりフェノキシカルブ処理により発現が見られなくなった (第 3 図). 以上の結果から、これらの蛹化特異的遺伝子が、JH の非存在下で脱皮ホルモン濃度が上昇することにより誘導されることがわかった。これらの遺伝子のいくつかについて、脱皮ホルモンおよび JH による転写制御機構を解析中である。転写開始点上流部に BR-C の結合サイト様配列が多数存在し、培養細胞株 NISES-BoMo-DK10 および High Five ではこれらの遺伝子のプロモーター領域を介したレポーター遺伝子の発現がカイコ BR-C の強制発現により増強されることから、終齢幼虫期に JH 非存在下で脱皮ホルモンにより BR-C が誘導され、さらに BR-C がこれらの遺伝子の転写を一括して誘導するのではないかと考えている (高橋ら, 未発表)。

その他にも、タバコスズメガの β -N-acetylglucosaminidase (Zen et al., 1996) とキチナーゼ (Kramer et al., 1993), カイコのキチナーゼ様遺伝子 BmChiR1 (Takahashi et al., 2002) (第 3 図), ショウジョウバエの microRNA (miRNA: 18–25 塩基からなる non-coding RNA) である mir-100, mir-125, let-7 (Sempere et al., 2003) などの脱皮ホルモンによる発現誘

導が JH 処理により抑制されることが示されている。これらの遺伝子に対する JH の発現制御の分子メカニズムは解析されていない。

以上のように、主に鱗翅目において、JH が脱皮ホルモン受容体の構成要素である EcR と USP, および 3 種の初期誘導性転写因子の発現を制御していることが明らかになってきた (第 2 図(B)). これらの分子は脱皮ホルモン・シグナリングの最上流部に位置し多数の遺伝子の発現に大きな影響を与えうることから、JH がこれらの分子の発現調節を行うことを通じて脱皮ホルモンの作用を調整し、幼虫脱皮を繰り返すのかそれとも蛹化に向かうのかという脱皮の性質を決めている可能性が強く示唆される。しかし、キイロショウジョウバエにおける BR-C の強制発現の実験を除いて、これらの遺伝子の発現が幼虫脱皮から蛹化の切り替えに関与していることを直接示す報告はない。鱗翅目においてもトランスジェニック昆虫の作出が可能になってきており (Tamura et al., 2000; Handler, 2002), 今後はタバコスズメガやカイコなどで分子遺伝学的な手法を用いて、これらの遺伝子の機能解析を行うことが望まれる。さらに、これらの遺伝子発現に対する JH の制御メカニズムを解析することにより、JH の分子的作用機構の実体にも迫ることができる。

JH 初期誘導性遺伝子の培養細胞からの単離

培養細胞を用いて JH の作用を分子レベルで解析することはほとんど行われていなかったが、ようやく最近になってそのような解析がなされ始めた。ここでは、JH により直接転写が誘導される遺伝子、すなわち JH の初期誘導性遺伝子を培養細胞株から単離する試みについて述べる。

Dubrovsky のグループは、mRNA differential display 法により、キイロショウジョウバエの S2 培養細胞株から 6 種のメソブレン誘導性遺伝子を単離した (Dubrovsky et al., 2000, 2002). これらの全長 cDNA をクローニングした結果、そのうち 3 種類は新規遺伝子であり JhI (juvenile hormone inducible)-1, 21, 26 と名付けた。また、1 種類は既知の minidiscs (mnd) 遺伝子と同一であった。これらの遺伝子の発現はメソブレンのほか、JH-III によっても誘導されたが、ファーネソールやファーネシル酢酸、レチノイン酸など JH 活性を持たないテルペノイドの影響は受けなかった。また、これら 4 種の遺伝子の発現はショウジョウバエ個体においても、蛹期でのメソブレン塗布により誘導された。これらは全てメソブレン処理後数時間以内に誘導され、少なくとも mnd についてはタンパク質合成阻害剤の影響を受けないことから初期誘導性遺伝子であることが明らかにされている。さらに、JhI-26 については、転写開始点上流 3 kb 内に JH 応答領域が存在することが、S2 細胞を用いたレポーター遺伝子アッセイにより示されている。キイロショ

ウジョウバエでは、このほかに miRNA である mir-34 の S2 細胞での発現がメソブレンにより誘導されることが最近報告されたが、誘導機構の詳細は明らかにされていない (Sempere et al., 2003)。

また、ハマキガの 1 種 *Choristoneura fumiferana* 由来の培養細胞株 CF-203 に対しても mRNA differential display によるスクリーニングが行われ、JH の不活性化酵素である JH エステラーゼ (JHE) が JH 誘導性遺伝子として同定された (Feng et al., 1999)。CF-203 細胞において、JHE mRNA は JH-I 処理後 1 時間以内と非常に早期に誘導されることから、JHE は JH の初期誘導性遺伝子であると考えられる。他の種でも、JHE 遺伝子の発現が JH により誘導されることは個体・組織レベルでは調べられていたが (Wroblewski et al., 1990; Venkataraman et al., 1994)、培養細胞で JH による発現誘導が確認されたのはこれが初めての報告になる。なお、カイコの絹糸腺においても、JHE mRNA の発現が JH により誘導される (菊池ら、未発表) (第 3 図)。

今後は、JH によるこれらの遺伝子の転写制御機構を培養細胞を用いて解析することにより、様々な知見が得られると期待される。例えば、キイロショウジョウバエの JhI-26 のように、培養細胞を用いたレポーター遺伝子アッセイでプロモーター領域が JH に応答することが確認できれば、さらに詳しい転写制御機構により JH 応答配列を比較的容易に同定できるだろうし、また続けて、同定した JH 応答配列に結合する転写制御因子を単離することも可能だろう。脱皮ホルモン受容体 (EcR) をクローニングする際に、脱皮ホルモン応答配列の同定と応答性の異なる細胞株の存在が非常に大きな役割を果たしたように (Koelle et al., 1991)、JH 受容体の同定ならびに JH の分子レベルでの作用機構を解明するために、JH 応答配列の同定と JH 応答性の異なる複数の細胞株の存在が大きな役割を果たすに違いない。組織・個体レベルでの転写制御研究は、キイロショウジョウバエを除く昆虫ではまだ非常に大きな困難を伴うことから、鱗翅目などでは培養細胞を用いた JH 研究の加速が望まれる。現在、著者のグループでも、カイコ培養細胞から cDNA マイクロアレイを用いた JH の初期誘導性遺伝子の単離を試みている。

性成熟関連遺伝子に対する JH の発現制御機構

多くの虫で、成虫の性成熟は JH のみにより誘導されることから、JH の作用機構を解析するモデル実験系として様々な研究がなされてきた (Wyatt and Davey, 1996)。性成熟関連遺伝子、タンパク質の発現に対する JH の影響が様々な虫で調べられているが、ほとんどの場合に、ピテロジェニンほかの卵黄形成タンパク質の発現は JH 処理の半日後以降に見られることから、JH による複雑な発現コントロールを受けていることが想像される (Wyatt and Davey,

1996; Hirai et al., 1998; Miura et al., 1998)。卵黄形成タンパク質遺伝子の発現誘導にこのような大きなタイムラグが生じる機構として、Wyatt et al. (1996) は、低濃度の JH 存在下で細胞はまず JH 誘導性遺伝子の転写に必要なタンパク質を用意して、その後 JH 濃度が高まると実際にそれらを使って卵黄形成タンパク質遺伝子の発現を誘導すると考え、はじめの低濃度での JH の作用を“プライミング (priming) 効果”と名付けた。事実、トノサマバッタの脂肪体では、遺伝子発現を誘導しない程度の低濃度の JH を前処理しておくことにより、後に高濃度の JH を処理した際のピテロジェニン mRNA の発現が早まった (Wyatt et al., 1996)。

JH のプライミング効果の分子メカニズムは、トノサマバッタの血液性 21 kDa タンパク質 (jhp 21) 遺伝子を用いて解析されている。jhp 21 mRNA はメス成虫の脂肪体でのみ発現し、JH により誘導される (Zhang et al., 1993)。in vitro 転写系を用いた解析により、オス成虫やブレコセンを処理して血中 JH 濃度を下げたメス成虫の脂肪体由来の核抽出物は jhp 21 mRNA の転写誘導能が低い、無処理のメス成虫やブレコセン処理した後メソブレンを処理したメス成虫の脂肪体由来の核抽出物は jhp 21 mRNA を高レベルで転写する能力があることがわかった (Zhang et al., 1996)。さらに、プロモーター領域の改変実験により、この転写誘導能の違いが、jhp 21 遺伝子の転写開始点の 1,152 bp 上流に位置する 15 bp からなるパリンδροーム様配列 (GAG-GTTCGAGACCTC) に依存することが示された。Zhang et al. (1996) は、この配列が JH 応答配列ではないかと推測している。また、jhp 21 mRNA の転写能力の低い核抽出物中には、このパリンδροーム様配列に結合する転写因子が少量しか含まれないが、JH 処理により徐々に含有量が増えることが、ゲルシフト・シフトアッセイにより示されている (Zhou et al., 2002)。また、このパリンδροーム様配列が脱皮ホルモン応答配列とよく似ていること、および、USP が JH 受容体であるという報告もあることから (次項を参照)、この転写因子中に USP が含まれるのかも調べられた。しかし、ゲルシフト・アッセイにおいて抗 USP 抗体を加えた場合でもプローブとタンパク質複合体の移動度がほとんど変わらないことから、幼若ホルモン応答配列に結合する転写因子中には USP は含まれていないことがわかった (Zhou et al., 2002)。以上のように、トノサマバッタのメス成虫脂肪体では、JH 処理により JH 依存性転写因子の発現もしくは再構成が誘導され、それが jhp 21 遺伝子の転写開始点上流部にあるパリンδροーム様 JH 応答配列に結合して転写を誘導することがわかってきた。この転写因子の同定が今後の課題である。

チャバネゴキブリ (*Blattella germanica*) では、脂肪体におけるピテロジェニン遺伝子の発現が JH により 2 時間以内に誘導されることが報告された (Comas et al., 1999)。これ

は、他の昆虫で報告されている卵黄形成タンパク質遺伝子の発現誘導が JH 処理後半日以上たつてみられるのと対照的である。脂肪体の培養系を用いた実験で、タンパク質合成阻害剤により JH による発現誘導が阻害されること、また JH のブライミング効果が見られることから、JH 依存性のタンパク質がピテロジェニンの発現に必要なことが示されているが、誘導が 2 時間以内と非常に早いことから、JH による直接の転写制御も同時に受けている早期誘導性遺伝子である可能性も示唆されている (Comas et al., 1999, 2001)。

JH 受 容 体

JH の生理作用が多岐にわたり、また作用機構も様々であることから、JH が複数の受容体およびシグナル伝達経路を持っていることが古くから予想されていた。実際、膜型および核内型という細胞内での局在が異なる 2 種類の JH 受容体が存在すると報告されている (Riddiford, 1994; Wyatt and Davey, 1996)。膜受容体に関しては分子的な実体は明らかにされていないが、核内受容体に関してはキロショウジョウバエで 2 種類の分子について JH 受容体候補として研究が進められている。

1. USP

脱皮ホルモン受容体の構成要素である USP は、昆虫における脊椎動物のレチノイン酸 X 受容体 (retinoid X receptor: RXR) のホモログ分子である。JH が RXR のリガンドであるレチノイン酸とよく似た構造をしていること、およびメソプレノ酸が RXR に結合して標的遺伝子の転写を誘導しうることから、USP が JH の受容体である可能性が示唆されていたが、それを直接示す結果は得なかった (Harmon et al., 1995)。一方、Jones and Sharp (1997) は、結合試験の際にタンパク質の蛍光強度の変化を観察することにより、キロショウジョウバエ USP が JH と結合することにより立体構造を変化させることを示した。USP は JH III や JH III-bisepoxide、JH III 酸とは結合したが、ファネソールとは結合しなかった。また、USP が JH と結合することによりダイマー～オリゴマー化することがゲルシフト・アッセイおよび酵母の two-hybrid アッセイにより示されている (Jones and Sharp, 1997)。さらに続報で、メソプレノ酸が USP と結合することや、JH-USP 複合体が AGGTCA-12bp-AGGTCA のダイレクト・リピート配列 (DR12) を介してレポーター遺伝子の転写を誘導すること、点突然変異を導入して JH との結合能を失った USP はレポーター遺伝子の転写を誘導できなくなることを報告している (Jones et al., 2001; Xu et al., 2002)。しかし、ヤガ科の 1 種 *Heliothis virescens* およびキロショウジョウバエ USP の結晶構造解析の結果は、JH よりかなり大型のリン脂質が USP のリガンドであることを示唆しており、JH が USP のリガンドであるというモデルを支持していない (Billas et al., 2001;

Clayton et al., 2001)。

2. Methoprene-tolerant (Met)

Wilson のグループは、メソプレノ酸処理に対して耐性を持つキロショウジョウバエの突然変異系統 Methoprene-tolerant (Met) を用いて、JH 受容体の研究を行っている。Met 系統は JH III やメソプレノ酸以外の JHA に対しても耐性を示すが、他の殺虫剤に対する耐性は持たないので、JH 関連化合物に対する感受性だけが低い突然変異である (Wilson and Fabian, 1986)。JH の虫体内への浸透性や分解能力、排出能力などを野生型と比較したところ、Met 系統では細胞抽出物の JH 結合能のみが低くなっていることが明らかになった (Shemshedini and Wilson, 1990)。このことから、Met 系統では細胞内 JH 結合タンパク質もしくは受容体に変異することにより JH に対する感受性が低くなっていることがわかった。最終的に、P 因子のタギングにより Met 遺伝子を同定したところ、basic helix-loop-helix (bHLH) PAS 遺伝子ファミリーの転写因子であった (Ashok et al., 1998)。bHLH-PAS ファミリーには脊椎動物のダイオキシン受容体など、リガンドと結合し同じファミリーの他のメンバーとヘテロ 2 量体を作ることにより、遺伝子の転写を誘導する転写因子が含まれている。Met の JH シグナリングにおける役割は明らかになっていないが、Met が JH と結合した後、他の bHLH-PAS 遺伝子ファミリーのメンバーとヘテロ 2 量体を作って、JH 関連遺伝子の転写制御を行う、というのが最も考えやすいモデルだろう。もしくは、他の bHLH-PAS 遺伝子ファミリーが真の JH 受容体であり、Met 自身はそのヘテロ 2 量体化のパートナーかもしれない。しかし、Met 遺伝子の完全欠失系統でも JH 感受性が低くなる以外に大きな生物学的影響が見られない (Wilson and Ashok, 1998)。すなわち、Met を介する JH シグナリング系は発生や性成熟を含めた生理現象に必須ではないと考えられるなど奇妙な点も多い。いずれにしろ、Met 遺伝子に関して、今後さらに詳しい生化学的、分子生物学的解析が必要である。

その他にも、光アフィニティーラベルした JH 関連化合物を用いた生化学的な手法により、タバコスズメガの真皮細胞から JH 受容体を単離する試みがなされた (Palli et al., 1990)。最終的に、29 kDa の核内タンパク質 (JP29) が JH 結合タンパク質として単離され cDNA も得られたが (Palli et al., 1994)、さらに詳細な実験により JP29 の JH に対する結合能はそれほど高いものではなく、また表皮の色素顆粒中にも多量に存在することから、現在では JP29 は JH 受容体ではないと考えられている (Charles et al., 1996; Shinoda et al., 1997)。

以上のように、キロショウジョウバエで USP と Met の 2 種類の転写制御因子が核内 JH 受容体の候補として研究が進められているが、まだ明瞭な形では証明できていない。

特に, USP が JH 受容体であるという仮説に関しては結晶構造解析の結果以外にも, 他の実験系では結果を再現できないなどの問題点もあり (例えば Baker et al. (2000)), 支持しない研究者も多い。ただ, USP は EcR 以外にも HR38 や HR78, Seven-up などの他の核内受容体スーパーファミリーのメンバーともヘテロ 2 量体を作ることが知られており (Sutherland et al., 1995; Hirai et al., 2002; Zhu et al., 2003), また, 脱皮・変態過程では JH は脱皮ホルモンの作用を調整することにより様々な生理作用を発揮することから, 他核内受容体が真の JH 受容体であり USP とヘテロ 2 量体となり, EcR-USP を介する脱皮ホルモン・シグナリングに影響を及ぼす可能性も考えられる。鱗翅目では脱皮ホルモン系への JH の影響が明瞭に見られるので, カイコやタバコスズメガを用いた USP の研究により, それらの可能性も検討できるのではないかと期待している。

おわりに

JH の発見からほぼ 70 年 (Wigglesworth, 1934, 1936), JH の化学的同定から 35 年がたつが (Röller et al., 1967), その作用機構の詳細はいまだ謎のベールに包まれたままであり, この数年でようやくその分子機構の一端が明らかになってきたという状況にある。生理的な機能の重要性や応用の可能性の広さから常に注目されながら大枠さえも謎のままという研究テーマは, 昆虫生理・生化学の歴史の中で, JH の作用機構くらいではないだろうか。それゆえ, JH 研究は依然魅力に満ちた研究領域だと思う。世界的に見ても JH 関連の研究者は減ってきており, また JH 研究では予算も取りにくくなっているという。JH の分子的作用機構の解明, 特に JH 受容体の同定が, JH 研究の火を消してしまわないためのブレイクスルーになると考えている。JH 受容体の同定は昆虫学のみならず, 一般の生物学, 分子生物学研究全体に大きなインパクトを与えるものになるに違いない。また, 今後ますますさかんになるであろうゲノム解析およびショウジョウバエ以外の昆虫での分子遺伝学的解析が, 今後の JH 研究に力を発揮するものと期待している。

摘 要

幼若ホルモン (JH) の分子的作用機構に関する最近の研究を概観した。取り上げた主な話題は, 1. JH の脱皮ホルモンシグナリングに対する影響, 2. JH により誘導される遺伝子の培養細胞からの単離, 3. 卵黄形成タンパク質の発現に対する JH の制御, 4. JH 受容体, である。

引用文献

- Adam, G., N. Perrimon and S. Noselli (2003) The retinoic-like juvenile hormone controls the looping of left-right asymmetric organs in *Drosophila*. *Development* 130: 2397–2406.
- Ashok, M., C. Turner and T. G. Wilson (1998) Insect juvenile hormone

- resistance gene homology with the bHLH-PAS family of transcriptional regulators. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95: 2761–2766.
- Baker, K. D., J. T. Warren, C. S. Thummel, L. I. Gilbert and D. J. Mangelsdorf (2000) Transcriptional activation of the *Drosophila* ecdysone receptor by insect and plant ecdysteroids. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 30: 1037–1043.
- Bayer, C., L. von Kalm and J. W. Fristrom (1996) Gene regulation in imaginal disc and salivary gland development during *Drosophila* metamorphosis. In *Metamorphosis: Postembryonic Reprogramming of Gene Expression in Amphibian and Insect Cells* (L. I. Gilbert, J. R. Tata and B. G. Atkinson eds.). Academic Press, Inc., San Diego, USA, pp. 321–361.
- Belgacem, Y. H., J. R. Martin, V. Sevala, S. Shu, S. B. Ramaswamy and C. Schal (2002) Neuroendocrine control of a sexually dimorphic behavior by a few neurons of the pars intercerebralis in *Drosophila*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99: 15154–15158.
- Berger, E. M., K. Goudie, L. Klieger, M. Berger and R. DeCato (1992) The juvenile hormone analogue, methoprene, inhibits ecdysterone induction of small heat shock protein gene expression. *Dev. Biol.* 151: 410–418.
- Bertuso, A. G. and S. Tojo (2002) The nature and titre of juvenile hormone in the brown planthopper, *Nilaparvata lugens* (Homoptera: Delphacidae) in relation to wing morphogenesis and oocyte development. *Appl. Entomol. Zool.* 37: 117–125.
- Billas, I. M., L. Moulinier, N. Rochel and D. Moras (2001) Crystal structure of the ligand-binding domain of the ultraspiracle protein USP, the ortholog of retinoid X receptors in insects. *J. Biol. Chem.* 276: 7465–7474.
- Bortolotti, L., C. Porrini, A. M. Sbrenna and G. Sbrenna (2000) Ovicidal action of fenoxycarb on a predator, *Chrysoperla carnea* (Neuroptera: Chrysopidae). *Appl. Entomol. Zool.* 35: 265–270.
- Burtis, K. C., C. S. Thummel, C. W. Jones, F. D. Karim and D. S. Hogness (1990) The *Drosophila* 74EF early puff contains E74, a complex ecdysone-inducible gene that encodes two ets-related proteins. *Cell* 61: 85–99.
- Charles, J. P., H. Wojtasek, A. J. Lentz, B. A. Thomas, B. C. Bonning, S. R. Palli, A. G. Parker, G. Dorman, B. D. Hammock, G. D. Prestwich and L. M. Riddiford (1996) Purification and reassessment of ligand binding by the recombinant, putative juvenile hormone receptor of the tobacco hornworm, *Manduca sexta*. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* 31: 371–393.
- Chinzei, Y. (1975) Induction of histolysis by ecdysterone *in vitro*: breakdown of anterior silk gland in silkworm, *Bombyx mori* (Lepidoptera: Bombycidae). *Appl. Entomol. Zool.* 10: 136–138.
- Clayton, G. M., S. Y. Peak-Chew, R. M. Evans and J. W. Schwabe (2001) The structure of the ultraspiracle ligand-binding domain reveals a nuclear receptor locked in an inactive conformation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98: 1549–1554.
- Comas, D., M. D. Piulachs and X. Belles (1999) Fast induction of vitellogenin gene expression by juvenile hormone III in the cockroach *Blattella germanica* (L.) (Dictyoptera, Blattellidae). *Insect Biochem. Mol. Biol.* 29: 821–827.
- Comas, D., M. D. Piulachs and X. Belles (2001) Induction of vitellogenin gene transcription *in vitro* by juvenile hormone in *Blattella germanica*. *Mol. Cell. Endocrinol.* 183: 93–100.

- Couillaud, F., F. Rossignol, E. Darrouzet, T. S. Dhadialla, G. R. Carlson and D. P. Le (1998) The release of isoprenoids by locust corpora allata *in vitro*. *J. Insect Physiol.* 44: 103–111.
- Darrouzet, E., B. Mauchamp, G. D. Prestwich, L. Kerhoas, I. Ujvary, F. Couillaud, S. M. Ismail, K. Satyanarayana, J. Y. Bradfield, K. H. Dahm and G. Bhaskaran (1997) Hydroxy juvenile hormones: new putative juvenile hormones biosynthesized by locust corpora allata *in vitro*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 240: 752–758.
- Davey, K. G. (2000) The modes of action of juvenile hormones: some questions we ought to ask. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 30: 663–669.
- Dhadialla, T. S., G. R. Carlson and D. P. Le (1998) New insecticides with ecdysteroidal and juvenile hormone activity. *Annu. Rev. Entomol.* 43: 545–569.
- Dubrovsky, E. B., V. A. Dubrovskaya and E. M. Berger (2002) Juvenile hormone signaling during oogenesis in *Drosophila melanogaster*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 32: 1555–1565.
- Dubrovsky, E. B., V. A. Dubrovskaya, A. L. Bilderback and E. M. Berger (2000) The isolation of two juvenile hormone-inducible genes in *Drosophila melanogaster*. *Dev. Biol.* 224: 486–495.
- Feng, Q. L., T. R. Ladd, B. L. Tomkins, M. Sundaram, S. S. Sohi, A. Retnakaran, K. G. Davey and S. R. Palli (1999) Spruce budworm (*Choristoneura fumiferana*) juvenile hormone esterase: hormonal regulation, developmental expression and cDNA cloning. *Mol. Cell. Endocrinol.* 148: 95–108.
- Fujiwara, H., M. Jindra, R. Newitt, S. R. Palli, K. Hiruma and L. M. Riddiford (1995) Cloning of an ecdysone receptor homolog from *Manduca sexta* and the developmental profile of its mRNA in wings. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 25: 845–856.
- 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). 学会出版センター, 東京, pp. 105–126. [Fujiwara, H. and M. Kamimura (1998) Receptor and signalling of insect steroid hormone. In *Hormones of Invertebrate* (The Japan Society for Comparative Endocrinology ed.). Japan Scientific Societies Press, Tokyo, pp. 105–126.]
- Gilbert, L. I., N. A. Granger and R. M. Roe (2000) The juvenile hormones: Historical facts and speculations on future research directions. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 30: 617–644.
- Handler, A. (2002) Use of the piggyBac transposon for germ-line transformation of insects. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 32: 1211–1220.
- Harmon, M. A., M. F. Boehm, R. A. Heyman and D. J. Mangelsdorf (1995) Activation of mammalian retinoid X receptors by the insect growth regulator methoprene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92: 6157–6160.
- Henrich, V. C. and N. E. Brown (1995) Insect nuclear receptors: a developmental and comparative perspective. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 25: 881–897.
- Hirai, M., T. Shinoda, M. Kamimura, S. Tomita and T. Shiotsuki (2002) *Bombyx mori* orphan receptor, BmHR78: cDNA cloning, testis abundant expression and putative dimerization partner for *Bombyx* ultraspiracle. *Mol. Cell. Endocrinol.* 189: 201–211.
- Hirai, M., 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 Biochem. Mol. Biol.* 28: 537–547.
- Hiruma, K., D. Bocking, R. Lafont and L. M. Riddiford (1997) Action of different ecdysteroids on the regulation of mRNAs for the ecdysone receptor, MHR3, dopa decarboxylase, and a larval cuticle protein in the larval epidermis of the tobacco hornworm, *Manduca sexta*. *Gen. Comp. Endocrinol.* 107: 84–97.
- Hiruma, K., T. Shinoda, F. Malone and L. M. Riddiford (1999) Juvenile hormone modulates 20-hydroxyecdysone-inducible ecdysone receptor and ultraspiracle gene expression in the tobacco hornworm, *Manduca sexta*. *Dev. Genes Evol.* 209: 18–30.
- Ismail, S. M., C. Goin, K. Muthumani, M. Kim, K. H. Dahm and G. Bhaskaran (2000) Juvenile hormone acid and ecdysteroid together induce competence for metamorphosis of the Verson's gland in *Manduca sexta*. *J. Insect Physiol.* 46: 59–68.
- Ismail, S. M., K. Satyanarayana, J. Y. Bradfield, K. H. Dahm and G. Bhaskaran (1998) Juvenile hormone acid: evidence for a hormonal function in induction of vitellogenin in larvae of *Manduca sexta*. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* 37: 305–314.
- Jindra, M., J.-Y. Huang, F. Malone, M. Asahina and L. M. Riddiford (1997) Identification and mRNA developmental profiles of two ultraspiracle isoforms in the epidermis and wings of *Manduca sexta*. *Insect Molec. Biol.* 6: 41–53.
- Jindra, M., F. Malone, K. Hiruma and L. M. Riddiford (1996) Developmental profiles and ecdysteroid regulation of the mRNAs for two ecdysone receptor isoforms in the epidermis and wings of the tobacco hornworm, *Manduca sexta*. *Dev. Biol.* 180: 258–272.
- Jindra, M. and L. M. Riddiford (1996) Expression of ecdysteroid-regulated transcripts in the silk gland of the wax moth, *Galleria mellonella*. *Dev. Genes Evol.* 206: 305–314.
- Jones, G. and P. A. Sharp (1997) Ultraspiracle: an invertebrate nuclear receptor for juvenile hormones. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94: 13499–13503.
- Jones, G., M. Wozniak, Y. Chu, S. Dhar and D. Jones (2001) Juvenile hormone III-dependent conformational changes of the nuclear receptor ultraspiracle. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 32: 33–49.
- Kamei, M., A. Kamada, Y. Utsumi and T. Ishi (1993) Laboratory and field evaluation of methoprene and its slow-release formulation, Altosid(R) 10F, against the sprinkler sewage filter fly, *Psychoda alternata* Say (Diptera: Psychodidae). *Appl. Entomol. Zool.* 28: 19–25.
- Kamimura, M. (1995) Effects of a juvenile hormone analogue, fenoxycarb, on larval growth of the silkworm, *Bombyx mori* (Lepidoptera: Bombycidae). *Appl. Entomol. Zool.* 30: 487–489.
- Kamimura, M. and M. Kiuchi (1998) Effects of a juvenile hormone analog, fenoxycarb, on 5th stadium larvae of the silkworm, *Bombyx mori* (Lepidoptera: Bombycidae). *Appl. Entomol. Zool.* 33: 333–338.
- Kamimura, M., 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. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* 41: 79–88.
- Kamimura, M., S. Tomita and H. Fujiwara (1996) Molecular cloning of an ecdysone receptor (B1 isoform) homologue from the silk-

- worm, *Bombyx mori*, and its mRNA expression during wing disc development. *Comp. Biochem. Physiol.* B113: 341–347.
- Kamimura, M., 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. *Eur. J. Biochem.* 248: 786–793.
- Koelle, M. R., W. S. Talbot, W. A. Segraves, M. T. Bender, P. Cherbas and D. S. Hogness (1991) The *Drosophila* EcR gene encodes an ecdysone receptor, a new member of the steroid receptor superfamily. *Cell* 67: 59–77.
- Kotaki, T. (1993) Biosynthetic products by Heteropteran corpora alata *in vitro*. *Appl. Entomol. Zool.* 28: 242–245.
- Kotaki, T. (1996) Evidence for a new juvenile hormone in a stink bug, *Plautia stali*. *J. Insect Physiol.* 42: 279–286.
- Kotaki, T., H. Nakakita and M. Kuwahara (1993) Crowding inhibits pupation in *Tribolium freemani* (Coleoptera: Tenebrionidae): effects of isolation and juvenile hormone analogues on development and pupation. *Appl. Entomol. Zool.* 28: 43–52.
- Kramer, K. J., L. Corpuz, H. K. Choi and S. Muthukrishnan (1993) Sequence of a cDNA and expression of the gene encoding epidermal and gut chitinases of *Manduca sexta*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 23: 691–701.
- Li, Z., K. Harada and T. Shono (1997) Genetic analysis of pyriproxyfen resistance in the housefly, *Musca domestica* L. *Appl. Entomol. Zool.* 32: 217–226.
- Li, Z. and T. Shono (1997) Toxicities of pyriproxyfen to susceptible and resistant strains of houseflies. *Appl. Entomol. Zool.* 32: 373–378.
- Matsuoka, T. 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*. *Dev. Genes Evol.* 210: 120–128.
- Miura, K., 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 and developmental and juvenile hormone regulation. *Eur. J. Biochem.* 258: 929–940.
- 野村昌弘・宮田 正 (2000) 昆虫成長制御剤 pyriproxyfen のハスモンヨトウの繁殖に及ぼす影響 . 応動昆 44: 81–88.** [Nomura, M. and T. Miyata (2000) Effects of pyriproxyfen, insect growth regulator on reproduction of common cutworm, *Spodoptera litura* (Fabricius) (Lepidoptera: Noctuidae). *Jpn. J. Appl. Entomol. Zool.* 44: 81–88.]
- Ono, T. (1993) Effect of a JHA on pheromone production in the potato tuberworm moth, *Phthorimaea operculella* (Lepidoptera: Gelechiidae). *Appl. Entomol. Zool.* 28: 121–124.
- Palli, S. R., E. O. Osir, W. Eng, M. F. Boehm, M. Edwards, P. Kulcsar, I. Ujvary, K. Hiruma, G. D. Prestwich and L. M. Riddiford (1990) Juvenile hormone receptors in insect larval epidermis: identification by photoaffinity labeling. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87: 796–800.
- Palli, S. R., K. Touhara, J. P. Charles, B. C. Bonning, J. K. Atkinson, S. C. Trowell, K. Hiruma, W. G. Goodman, T. R. Kyriakides, G. D. Prestwich, B. D. Hammock and L. M. Riddiford (1994) A nuclear juvenile hormone-binding protein from larvae of *Manduca sexta*: a putative receptor for the metamorphic action of juvenile hormone. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91: 6191–6195.
- Retnakaran, A., J. Granett and T. Ennis (1985) Insect growth regulators. In *Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry, and Pharmacology* (G. A. Kerkut and L. I. Gilbert eds.). Pergamon Press, Oxford, pp. 529–601.
- Richards, G. (1978) Sequential gene activation by ecdysone in polytene chromosomes of *Drosophila melanogaster*. VI. Inhibition by juvenile hormones. *Dev. Biol.* 66: 32–42.
- Riddiford, L. M. (1985) Hormone action at the cellular level. In *Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry, and Pharmacology* (G. A. Kerkut and L. I. Gilbert eds.). Pergamon Press, Oxford, pp. 37–84.
- Riddiford, L. M. (1994) Cellular and molecular actions of juvenile hormone I. General considerations and premetamorphic actions. *Adv. Insect Physiol.* 24: 213–274.
- Riddiford, L. M. (1996) Molecular aspects of juvenile hormone action in insect metamorphosis. In *Metamorphosis: Postembryonic Reprogramming of Gene Expression in Amphibian and Insect Cells* (L. I. Gilbert, J. R. Tata and B. G. Atkinson eds.). Academic Press, Inc., San Diego, USA, pp. 223–251.
- Riddiford, L. M. and M. Ashburner (1991) Effects of juvenile hormone mimics on larval development and metamorphosis of *Drosophila melanogaster*. *Gen. Comp. Endocrinol.* 82: 172–183.
- Riddiford, L. M., P. Cherbas and J. W. Truman (2000) Ecdysone receptors and their biological actions. *Vitam. Horm.* 60: 1–73.
- Röller, H., K. H. Dahm, C. C. Sweeley and B. M. Trost (1967) The structure of the juvenile hormone. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 6: 179–180.
- Sempere, L. F., N. S. Sokol, E. B. Dubrovsky, E. M. Berger and V. Ambros (2003) Temporal regulation of microRNA expression in *Drosophila melanogaster* mediated by hormonal signals and broad-complex gene activity. *Dev. Biol.* 259: 9–18.
- Shemshedini, L. and T. G. Wilson (1990) Resistance to juvenile hormone and an insect growth regulator in *Drosophila* is associated with an altered cytosolic juvenile hormone-binding protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87: 2072–2076.
- Shinoda, T., K. Hiruma, J. P. Charles and J. M. Riddiford (1997) Hormonal regulation of JP29 in the epidermis during larval development and metamorphosis in the tobacco hornworm, *Manduca sexta*. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* 34: 409–428.
- Simon, A. F., C. Shih, A. Mack and S. Benzer (2003) Steroid control of longevity in *Drosophila melanogaster*. *Science* 299: 1407–1410.
- Stilwell, G. E., C. A. Nelson, J. Weller, H. Cui, K. Hiruma, J. W. Truman and L. M. Riddiford (2003) E74 exhibits stage-specific hormonal regulation in the epidermis of the tobacco hornworm, *Manduca sexta*. *Dev. Biol.* 258: 76–90.
- Sutherland, J. D., T. Kozlova, G. Tzertzinis and F. C. Kafatos (1995) *Drosophila* hormone receptor 38: a second partner for *Drosophila* USP suggests an unexpected role for nuclear receptors of the nerve growth factor-induced protein B type. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92: 7966–7970.
- Swevers, L., J. R. Drevet, M. D. Lunke and K. Iatrou (1995) The silkworm homolog of the *Drosophila* ecdysone receptor (B1 Isoform): Cloning and analysis of expression during follicular cell differentia-

- tion. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 25: 857–866.
- Takahashi, M., K. Kikuchi, S. Tomita, S. Imanishi, Y. Nakahara, M. Kiuchi and M. Kamimura (2003) Transient *in vivo* reporter gene assay for ecdysteroid action in the *Bombyx mori* silk gland. *Comp. Biochem. Physiol.* 135B: 431–437.
- Takahashi, M., M. Kiuchi and M. Kamimura (2002) A new chitinase-related gene, BmChiR1, is induced in the *Bombyx mori* anterior silk gland at molt and metamorphosis by ecdysteroid. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 32: 147–151.
- Tamura, T., C. Thibert, C. Royer, T. Kanda, E. Abraham, M. Kamba, N. Komoto, J. L. Thomas, B. Mauchamp, G. Chavancy, P. Shirk, M. Fraser, J. C. Prudhomme and P. Couble (2000) Germline transformation of the silkworm *Bombyx mori* L. using a piggyBac transposon-derived vector. *Nat. Biotechnol.* 18: 81–84.
- Tatar, M., A. Kopelman, D. Epstein, M. P. Tu, C. M. Yin and R. S. Garofalo (2001) A mutant *Drosophila* insulin receptor homolog that extends life-span and impairs neuroendocrine function. *Science* 292: 107–110.
- Tatar, M. and C. Yin (2001) Slow aging during insect reproductive diapause: why butterflies, grasshoppers and flies are like worms. *Exp. Gerontol.* 36: 723–738.
- Thummel, C. S. (1995) From embryogenesis to metamorphosis: the regulation and function of *Drosophila* nuclear receptor superfamily members. *Cell* 83: 871–877.
- 東原和成 (1994) 昆虫の成長・変態を制御するしくみ 幼若ホルモンの作用・代謝機構の研究はどこまで進んでいるか. 化学と生物 32: 13–22. [Touhara, K. (1994) Regulation of insect growth and metamorphosis—Recent progress of juvenile hormone research. *Kagaku to Seibutsu* 32: 13–22.]
- 東原和成 (1995) 幼若ホルモンの作用と制御機構. 昆虫の生化学・分子生物 (大西英爾・園部治之・高橋 進 編). 名古屋大学出版会, 名古屋, pp. 167–189. [Touhara, K. (1995) Mechanism of juvenile hormone action and regulation. In *Recent Advances in Insect Biochemistry and Molecular Biology* (E. Onishi, H. Sonobe and S. Takahashi eds). The University of Nagoya Press, Nagoya, pp. 167–189.]
- Tsumuki, H. and M. Hirai (1999) Effects of JH and ecdysone on endogenous ice nucleus production in larvae of the rice stem borer, *Chilo suppressalis* Walker (Lepidoptera: Pyralidae). *Appl. Entomol. Zool.* 34: 119–121.
- Venkataraman, V., P. J. O'Mahony, M. Manzcak and G. Jones (1994) Regulation of juvenile hormone esterase gene transcription by juvenile hormone. *Dev. Genet.* 15: 391–400.
- Watanabe, M. and K. Tanaka (1998) Effect of juvenile hormone analogs on diapause termination and myo-inositol content in *Aulacophora nigripennis* adults (Coleoptera: Chrysomelidae). *Appl. Entomol. Zool.* 33: 259–262.
- Wigglesworth, V. B. (1934) The physiology of ecdysis in *Rhodnius prolixus*. II. Factors controlling moulting and metamorphosis. *Q. J. Microscop. Sci.* 77: 191–222.
- Wigglesworth, V. B. (1936) The function of the corpora allata in the growth and reproduction of *Rhodnius prolixus* (Hemiptera). *Q. J. Microscop. Sci.* 79: 91–121.
- Wilson, T. G. and M. Ashok (1998) Insecticide resistance resulting from an absence of target-site gene product. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95: 14040–14044.
- Wilson, T. G. and J. Fabian (1986) A *Drosophila melanogaster* mutant resistant to a chemical analog of juvenile hormone. *Dev. Biol.* 118: 190–201.
- Wroblewski, V. J., L. G. Harshman, T. N. Hanzlik and B. D. Hammock (1990) Regulation of juvenile hormone esterase gene expression in the tobacco budworm (*Heliothis virescens*). *Arch. Biochem. Biophys.* 278: 461–466.
- Wyatt, G. R., R. P. Braun and J. Zhang (1996) Priming effect in gene activation by juvenile hormone in locust fat body. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* 32: 633–640.
- Wyatt, G. R. and K. G. Davey (1996) Cellular and molecular actions of juvenile hormone. II. Roles of juvenile hormone in adult insects. *Adv. Insect Physiol.* 26: 1–155.
- Xu, Y., F. Fang, Y. Chu, D. Jones and G. Jones (2002) Activation of transcription through the ligand-binding pocket of the orphan nuclear receptor ultraspiracle. *Eur. J. Biochem.* 269: 6026–6036.
- Yoshiga, T. and S. Tojo (2001) Effects of a juvenile hormone analog, methoprene, on the hemolymph titers of biliverdin-binding proteins in the common cutworm, *Spodoptera litura* (Lepidoptera: Noctuidae). *Appl. Entomol. Zool.* 36: 337–343.
- Zen, K. C., H. K. Choi, N. Krishnamachary, S. Muthukrishnan and K. J. Kramer (1996) Cloning, expression, and hormonal regulation of an insect beta-N-acetylglucosaminidase gene. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 26: 435–444.
- Zhang, J., A. McCracken and G. R. Wyatt (1993) Properties and sequence of a female-specific, juvenile hormone-induced protein from locust hemolymph. *J. Biol. Chem.* 268: 3282–3288.
- Zhang, J., D. S. Saleh and G. R. Wyatt (1996) Juvenile hormone regulation of an insect gene: a specific transcription factor and a DNA response element. *Mol. Cell. Endocrinol.* 122: 15–20.
- Zhang, L., K. Harada and T. Shono (1998) Cross resistance to insect growth regulators in pyriproxyfen-resistant housefly. *Appl. Entomol. Zool.* 33: 195–197.
- Zhou, B., K. Hiruma, M. Jindra, T. Shinoda, W. A. Segraves, F. Malone and L. M. Riddiford (1998a) Regulation of the transcription factor E75 by 20-hydroxyecdysone and juvenile hormone in the epidermis of the tobacco hornworm, *Manduca sexta*, during larval molting and metamorphosis. *Dev. Biol.* 193: 127–138.
- Zhou, B., K. Hiruma, T. Shinoda and L. M. Riddiford (1998b) Juvenile hormone prevents ecdysteroid-induced expression of broad complex RNAs in the epidermis of the tobacco hornworm, *Manduca sexta*. *Dev. Biol.* 203: 233–244.
- Zhou, S., J. Zhang, M. Hirai, Y. Chinzei, H. Kayser, G. R. Wyatt and V. K. Walker (2002) A locust DNA-binding protein involved in gene regulation by juvenile hormone. *Mol. Cell. Endocrinol.* 190: 177–185.
- Zhou, X. and L. M. Riddiford (2002) Broad specifies pupal development and mediates the 'status quo' action of juvenile hormone on the pupal-adult transformation in *Drosophila* and *Manduca*. *Development* 129: 2259–2269.
- Zhu, J., K. Miura, L. Chen and A. S. Raikhel (2003) Cyclicity of mosquito vitellogenic ecdysteroid-mediated signaling is modulated by alternative dimerization of the RXR homologue Ultraspiracle. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100: 544–549.