

平成 30 年 6 月 22 日現在

機関番号：14303

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2016～2017

課題番号：16H06913

研究課題名(和文) コクヌストモドキ卵巣におけるチェックポイント制御機構の解明

研究課題名(英文) Nutritional regulation of oocyte growth in telotrophic ovary of red flour beetle, *Tribolium castaneum*

研究代表者

高木 圭子 (TAKAKI, KEIKO)

京都工芸繊維大学・応用生物学・助教

研究者番号：30401938

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円

研究成果の概要(和文)：端栄養型卵巣において保育細胞は卵巣の端に局在し、栄養管を通して物質を卵へ供給すると言われている。保育細胞が選択的に物質を運搬する方法は不明である。本研究で、ミトコンドリアが保育細胞から栄養管を通して卵へ供給されることを確認した。また、栄養状態の悪化が卵細胞の時期特異的な成長停止と細胞死を誘導することを示した。これにはインスリンシグナルと卵黄タンパク質遺伝子の制御が関与すると示唆される。更に、この細胞死には栄養管とミトコンドリアの消失が伴っていた。この消失は細胞死を誘導する原因なのか、もしくは細胞死が起こった結果なのか、今のところ不明であるが時期特異的な制御に重要な役割を果たすと予想される。

研究成果の概要(英文)：In order to discover putative systems that ensure balance of reproduction and survival of adults, effects of starvation on ovary of beetle, *Tribolium castaneum*, were examined as a model of telotrophic ovary. In this type of ovary, oocyte is encapsulated alone in monolayer follicle cells and connected to separated nurse cells by nutritive cord. Nurse cells compose syncytium, thus, it is also question how oocyte is controlled by nurse cells remotely. We got some results which indicate starvation inducible follicle defects following to arrest of the growth accompanied with suppression of vitellogenins genes in fat body. They were mimicked by depletion of insulin signaling in cell death genes dependent manner, but not TOR. Other results we obtained indicate that mitochondria are delivered from nurse cells to oocyte through nutritive cord. Whereas healthy ovariole had robust cords filled with mitochondria, crushed cord running to defected follicle was observed after starvation.

研究分野：昆虫学

キーワード：栄養 端栄養型卵巣 昆虫 細胞死

1. 研究開始当初の背景

(1) 昆虫の卵巣型は大きく分けて3つある。保育細胞を持たず、生殖細胞は卵細胞のみを持つ無栄養型卵巣、濾胞の中に卵とその姉妹細胞である保育細胞と一緒に包んでいる多栄養型卵巣、そして卵のみが濾胞に包まれて濾胞を形成し、保育細胞は端に局在して管で卵と連絡している端栄養型卵巣である。その中でも、モデル昆虫であるショウジョウバエの持つ多栄養型卵巣の研究は特に進んでいる。それに比べ、甲虫の持つ端栄養型卵巣の詳細な研究は乏しい。甲虫は、昆虫全体の中で最も多い種類である。甲虫の卵巣の詳細な制御機構を解明することは昆虫の生殖の全体を理解するために不可欠であると考えられる。

(2) ショウジョウバエ多栄養型卵巣は、卵と保育細胞が一つの濾胞に包まれた構造をしている。保育細胞は成長段階に応じて物質を卵に供給する。一方甲虫の端栄養型卵巣は、卵は一つだけ濾胞内に包まれている。保育細胞は卵巣の端に集合しており、保育細胞のみからなるシンシチウムを形成している。卵からは栄養管と呼ばれる管が一本伸び、保育細胞とつながっており物質を受け取っていると考えられているが、成長段階に応じてどのように物質を選択的に供給するかは現在まで明らかではない。

(3) 飢餓状態が生殖に与える影響は、ショウジョウバエでよく研究されている。Terashima et al., 2005によれば、昆虫ステロイドホルモン(エクダイソン)が飢餓状態の卵巣の発育を制御することが分かっている。多栄養型卵巣内の卵の発育段階は大きく分けて前卵黄合成期、卵黄合成期、卵殻合成期の三つに分けられるが、絶食によって卵黄合成期の初期で卵の成長が停止し、絶食が続けばそのまま細胞死を引き起こし、餌を食べられれば回復し成長の続きへ進行することが明らかとなっている。この生死の分かれ目となる卵黄合成期初期はチェックポイントと呼ばれることもある。

2. 研究の目的

(1) 飢餓状態でどのように生殖が制御されるか、甲虫であるコクヌストモドキをモデルとして解明することが目的である。

(2) 予備実験により、コクヌストモドキ端栄養型卵巣も多栄養型卵巣と同様、チェックポイントのシステムを持つことを見出した。しかし、卵に保育細胞が位置し、一緒に包まれている多栄養型卵巣と違い、端栄養型卵巣では保育細胞は離れて存在しており栄養管を通して卵とつながるもにて、時期特異的なチェックポイントのシステムがどのように制御されるか不明である。その解明を目指す。

(3) エクダイソンは端栄養型卵巣ではチェックポイントに関与しないという予備実験の結果を得ている。本当に関与しないのか確定する。

3. 研究の方法

(1) 実験動物と絶食の処理

コクヌストモドキは、32度のインキュベーターで全暗条件で飼育した。餌は小麦粉の全粒粉にイーストを混ぜたものを与えた。

実験には成虫脱皮後一週間から二週間の個体を基本的に用いた。絶食条件下での飼育は、万が一の共食いを防ぐため、96ウェルプレートに一匹ずつ分けて餌の無い状態においた。餌のある条件では、同様にウェルに成虫を分けて入れた状態で、餌と共に置いた。絶食後の各時間で、成虫をエタノールによって麻酔した後、卵巣とそれ以外の体の部分とにわけ、適宜処理した。

(2) 遺伝子発現解析

組織を摘出後、すぐに-20度で保管後、RNA抽出・cDNA合成を行い、realtime-qPCRによる解析のためのサンプルとした。

(3) 共焦点レーザー顕微鏡観察

卵巣の詳細な観察のため、解剖した卵巣はすぐに4%PFAで固定した後、抗体やphalloidin、リソトラッカーなどで適宜染色して観察を行った。

(4) RNAi

標的遺伝子の配列約500bpを元にT7RNAPolを用いdsRNAを合成し、個体に注射することでRNAiを誘導した。遺伝子が抑制されたことを確認するために、注射の3日後のcDNAをrealtime-qPCRによって解析した。qPCRに用いるプライマーは念のためdsRNAでは増幅しないように設計されている。注射の影響で餌を食べなくなった個体は、実験結果に影響することから、排除し解析には用いていない。食餌の確認は、卵巣を回収するため解剖する際に、腸に内容物が見られるかどうかで判断した。腸に白い内容物が存在する個体は餌を食べており、白い内容物が確認できない個体は餌を食べていないとみなした。

4. 研究成果

(1) コクヌストモドキ端栄養型卵巣において、絶食による卵の成長の停止と、細胞死を再確認した。少なくとも絶食12時間でこれらの影響が確認された。また、成長停止と細胞死は、卵黄合成期初期でのみ見られた。それよりも若い濾胞(前卵黄合成期)に異常は認められなかった。また卵殻合成期

の濾胞は消失した。この消失は、絶食を開始した時点ですでに形成されている卵殻合成熟期は産卵され、その後、若い濾胞は卵殻合成熟期に至るまで成長しなかったためと考える。さらに、エクダイソンが絶食による卵巣の制御に関与しないことを再確認し、確定した。絶食後 12 時間の個体を集め ELISA によりエクダイソン量を測定したが、絶食の有無による変化は認められなかった。この結果はショウジョウバエ多栄養型卵巣での、絶食によりエクダイソン量が上昇するという報告とは一致しない。また、コクヌストモドキの餌にエクダイソンを混ぜ与えたが、卵の成長の停止および細胞死は認められなかった。

以上のことから、絶食により卵黄合成熟期で成長が停止し生死の分かれ目ともいえるチェックポイントの現象は、端栄養型卵巣多栄養型卵巣、両方に保存されている現象であることが明らかとなった。しかしエクダイソンの動態は両者で大きく異なったことから、チェックポイントの現象は共通していても、その制御機構は卵巣型により異なることが示唆される。

(2) 絶食によって誘導される濾胞の崩壊を共焦点顕微鏡で詳細に観察したところ、最初に卵細胞の収縮が起こり、次に濾胞細胞の間に空隙が出来ることがわかった。卵細胞の収縮が起きた時点では、濾胞細胞に異常は認められなかった。卵細胞が収縮して消失したのち、濾胞細胞の間に泡状の空隙ができ、異常な形態を示した。この濾胞細胞間に空隙が出来る頃には、オートファジーマーカーであるリソトラッカーおよび抗活性型カスパーゼ抗体によるシグナルが検出されるようになった。これらの結果から、濾胞細胞の異常は、オートファジーとカスパーゼを伴うものであると明らかになった。

そこで、オートファジーとカスパーゼの関与を更にさぐるため、これらの関与が予想される遺伝子に対して RNAi を行った。dsRNA 注射後 3 日目の十分に RNA が抑制された個体を 12 時間絶食させたところ、リソトラッカーのシグナルを伴う濾胞の異常は、atg1、dcp-1 によってレスキューされた。一方でオートファジーに関与する遺伝子のうち atg13 などいくつかは、濾胞の異常に影響を与えなかった。以上のように幾つかの遺伝子の RNAi により異常な形態を示す濾胞はレスキューされたが、その一方で絶食による前卵黄合成熟期の成長停止はレスキューされなかった。これらの遺伝子は成長停止には関与しないことが示唆される。

(3) 絶食のシグナルを卵巣に伝える経路を明らかにするため、RNAi によって候補遺伝子のノックダウンを試みた。その結果、インスリン経路に関わる、インスリン受容体、及びその下流の Akt が RNAi によって抑制された個体では、十分に餌を食べている状態であっ

ても、卵黄合成初期に見られる成長の停止と、リソトラッカーのシグナルを伴う異常な濾胞の形成が誘導された。また、予想と異なり Target of Rapamycin の RNAi によって、卵黄合成熟期初期の成長停止および異常な濾胞の形成は誘導されなかった。

インスリンの関与を更に調べるために、インスリン経路のノックダウンで誘導される、濾胞の成長停止と異常な濾胞の出現が、絶食時と同様に atg1 と dcp-1 の RNAi によってレスキューすることが出来るか試みた。二種類の dsRNA を同時に注射し、その後餌が十分にある状態で飼育し、卵巣の様子を観察した。その結果、異常な濾胞の出現が抑制された。一方で、卵黄合成初期の濾胞の成長停止はレスキューされなかった。これは、絶食のときと同様の結果であった。

(4) 絶食に誘導される卵巣の異常とオートファジー、カスパーゼの関与を更に調べるために、絶食後の atg1、dcp1 の発現を qPCR によって確認したが、発現量の変化は認められなかった。遺伝子の転写を伴わない、ポストトランスクリプショナルな制御であることが考えられる。同様に、インスリン受容体および Akt の RNAi 後の atg1、dcp1 の発現量も調べたところ、やはり発現に変化は認められなかった。

絶食によって幾つかの遺伝子の発現変動を確認したところ、最も発現の変化が見られた遺伝子は、卵黄タンパク質遺伝子であった。これは、卵巣では発現しておらず、脂肪体で発現する遺伝子である。卵黄タンパク質は合成された後、体液に放出され、卵黄に取り込まれる。卵黄の取り込みは、濾胞の卵黄合成初期から始まるこれは、絶食によって卵黄合成初期で濾胞の成長が止まることと一致する。また、卵黄タンパク質遺伝子の発現は、インスリン受容体および Akt の RNAi によっても抑制されることが分かった。一方で TOR の RNAi では卵黄タンパク質の抑制は無かった。これは、RNAi による濾胞の成長停止や異常の誘導と一致する結果であった。絶食による濾胞の制御に卵黄タンパク質遺伝子の発現が関与されることが示唆された。

(5) 卵の発育は、一般的に保育細胞によって制御されていると考えられている。端栄養型卵巣の場合は、多栄養型卵巣とは異なり、保育細胞は濾胞に包まれておらず、卵巣小管の端に局在している。保育細胞の集団と卵は栄養管によってのみつながっており、卵の成長時期特異的に濾胞による制御がどのようになされているかは不明である。絶食によって誘導される、成長時期特異的な異常がどのように制御されているか調べるために、卵巣小管の詳細な観察を行った。保育細胞から卵へ供給されるものの一つにミトコンドリアがあることから、まずは抗ミトコンドリア抗体を用いて栄養を十分に与えられた、異常の

認められない卵巣の染色を行った。すると、保育細胞と若い卵細胞にミトコンドリアのシグナルが確認された。また、保育細胞と卵細胞をつなぐ栄養管と呼ばれる管の中にも強いミトコンドリアのシグナルがみとめられた。一方で、卵黄合成初期の卵では、若い卵とは異なり、全体がミトコンドリアのシグナルで染まることは無かった。しかし、栄養管から卵への出口の部分に、ミトコンドリアのシグナルの局在が確認できた。この局在は保育細胞から卵に運ばれてきたものであると考えられる。

一方で、絶食下で異常な濾胞を含む卵巣も同様に染色して観察した。その結果、絶食下においても、保育細胞及び若い卵では、ミトコンドリアのシグナルが観察され、餌が十分な個体の卵巣と比べて違いは認められなかった。また、これらの若い卵につながっている栄養管にも強いミトコンドリアのシグナルが確認された。しかし一部、つぶされているような形状を示す栄養管もあった。この栄養管は、絶食によって誘導される異常な形態を示している濾胞に向かって走っていた。形状は、つぶされているようであり、管の痕跡を残すのみであった。またミトコンドリアのシグナルも無かった。この異常な濾胞につながる栄養管の消失が、果たして濾胞の崩壊を引き起こす原因となっているのかは不明である。あるいは濾胞が崩壊した後にその影響で消失した可能性も排除できず、現在のところ判断は出来ない。しかし少なくとも絶食によって誘導される現象の一つであるといえる。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 1 件)

International Insect Hormone Workshop
(2017年7月9-14日)

発表者

Keiko Takaki, Yu Kaneko, Kiyoshi Hiruma,
Eiji Kotani, Hajime Mori, Marek Jindra

発表課題

Starvation effect on telotrophic
meroistic ovariole in *Tribolium castaneum*

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

雑誌「アグリバイオ」2017年12月号 特集「昆虫バイオテクノロジー」にて記事を執筆

6. 研究組織

(1) 研究代表者

高木圭子 (TAKAKI, Keiko)
京都工芸繊維大学 応用生物学系
助教
研究者番号：30401938

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

(4) 研究協力者

()