

令和元年6月20日現在

機関番号：23803

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K18579

研究課題名(和文) 昆虫の変態を制御する栄養チェックポイント機構の解明

研究課題名(英文) Elucidation of nutrient checkpoint regulating insect metamorphosis

研究代表者

大原 裕也 (Ohhara, Yuya)

静岡県立大学・食品栄養科学部・助教

研究者番号：80771956

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、昆虫の変態開始を決定づける栄養チェックポイントの実体に迫るべく、ショウジョウバエを用い遺伝学・栄養学的解析を行った。その結果、アミノ酸摂取によりエクジステロイド産生が活性化し、蛹への変態が誘発されること、栄養摂取により前胸腺のインスリン/TORシグナルが活性化し、これにより核内倍加の進行ならびにエクジステロイド産生が促進されること、前胸腺における核内倍加の進行により、前胸腺細胞のゲノムDNAの特定領域にコピー数の減少が引き起こされることを見出した。これらの研究結果は、従属栄養生物の発育過程の分子メカニズムを理解する上で重要な知見となる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、これまで未知であった昆虫の変態を決定づける栄養チェックポイントの一端を明らかにし、特に、インスリン・TORシグナルおよび核内倍加が「大人になるか、ならないか」を決定する上で重要であることを見出した。この成果は、従属栄養生物の個体発育の分子基盤を理解する上で重要な知見となる。また、本研究で得られた知見は、益虫・害虫の発育制御技術の開発・確立にも有益なヒントをもたらすと考えられる。

研究成果の概要(英文)：Insects initiate ecdysone biosynthesis and metamorphosis once they attain enough body weight. This suggests the presence of nutrient checkpoint determining the initiation of ecdysone biosynthesis. In this study, we investigated the molecular mechanisms of ecdysone biosynthesis in *Drosophila* prothoracic gland. We found that amino acid feeding is essential for ecdysone biosynthesis and that nutrient signaling Insulin/TOR pathway upregulates ecdysone biosynthesis through the regulation of endocycle, a variant of cell cycle without mitosis. Furthermore we found that endocycle causes genomic DNA remodeling the prothoracic gland cells. This study provides the basis to understand the molecular mechanisms of nutrient-dependent insect development.

研究分野：発生生物学

キーワード：エクジソン 前胸腺 TOR 核内倍加

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19（共通）

1. 研究開始当初の背景

動物個体は、時間軸に沿って生理的状态および形態を変化させ、幼若期から成体期へと成熟する。哺乳類の2次性徴を例に見れば明らかのように、動物の成熟過程を誘発する因子はステロイドホルモンである。昆虫の性成熟に相当する変態もまたステロイドホルモンによって制御されており、幼虫から蛹・成虫への移行、という明確な判断基準によって変態過程を観察できる昆虫は、動物の成熟過程の制御機構を研究するうえで理想的なモデル生物である。

昆虫の変態過程を誘発するステロイドホルモンはエクジステロイドであり、内分泌組織である前胸腺から産生されたエクジステロイドは全身に作用し変態を引き起こす。近年、遺伝学的手法が整ったショウジョウバエを用い、エクジステロイド産生を制御する分子機構の解明が精力的に進められている。Prothoracicotropic hormone (PTTH)、Insulin-like peptides (ILPs) といったエクジステロイド産生制御因子の作用機序の解析に加え、新たなエクジステロイド産生制御因子の同定が進められてきた。また、エクジステロイド産生は個体を取り巻く栄養状態によって影響を受けることが知られており、栄養状態がエクジステロイド産生に影響を及ぼす代表的な例として Critical weight (CW) が挙げられる。CW とは、幼虫期における固有の体重であり、栄養摂取により体重が CW に到達した幼虫個体では、その後の栄養状態によらずエクジステロイド産生が活性化し変態が誘発されるのに対し、CW 到達前に栄養飢餓環境へと移された幼虫個体ではエクジステロイド産生が活性化せず変態が誘発されない。このことから、栄養状態を感知しエクジステロイド産生の活性化を決定する機構 (CW チェックポイント) が存在すると以前より予想されてきた。しかしながら、CW チェックポイントを司る分子機構は未だ不明であり、ILPs など既知のエクジステロイド産生制御因子が CW チェックポイントにどのように関わるのかについても不明な点が多く残されている。そこで本研究では、CW チェックポイントの分子機構に迫ることを目的とした。

2. 研究の目的

申請者は予備的な研究によって、前胸腺において核内倍加と呼ばれる M 期を伴わない細胞周期が CW 到達期までに3回進行すること、前胸腺における核内倍加はエクジステロイド産生の活性化ならびにエクジステロイド産生に必須であること、栄養応答性のキナーゼ・Target of rapamycin (TOR) が核内倍加の制御を介してエクジステロイド産生を活性化することを見出した。これらの結果は、TOR 依存的な核内倍加の進行により、エクジステロイド産生が活性化することを示している。これらの結果を踏まえ申請者は、TOR および核内倍加は CW チェックポイントの一端を担っている重要な要因であると考え、エクジステロイド産生を制御する CW チェックポイント機構を明らかにする研究を展開した。

3. 研究の方法

(1) ショウジョウバエの飼育

ショウジョウバエはコーンミール、エビオス、グルコースを含む餌を用い 12 時間明暗・25°C の環境で飼育した。蛹へ移行した個体の割合は、基本的にふ化後 84 時間から 12 時間おきカウントした。

栄養環境を変えた場合の発育過程の変化を観察するために、スクロース (炭水化物)、トリプトン (タンパク質)、レシチン (脂質) のいずれかを添加しない餌を作製し、これをふ化後 48 時間から 24 時間飢餓条件下で飼育した幼虫個体と与え、その後の発育過程を観察した。

(2) Gal4/UAS システムを用いた遺伝子発現制御

前胸腺および脂肪体選択的な Gal4 系統として、それぞれ、phantom-22-Gal4 (phm-Gal4) および Cg-Gal4 を用いた。これらの Gal4 系統と、任意の UAS 系統 (標的遺伝子に対する dsRNA を発現する系統、機能阻害型 TOR 等) とを交配し得られた次世代の個体を組織選択的な遺伝子操作個体として研究に用いた。

(3) 免疫染色・組織染色

リン酸緩衝液 (PBS) 中で幼虫個体を解剖し、4%パラホルムアルデヒドを用い得られた組織を固定した。組織の洗浄、固定、抗体反応、蛍光試薬処理を行い、目的の分子を可視化した。前胸腺のラベルには抗 Disembodied 抗体、DNA の検出には Hoechst をそれぞれ用いた。

(4) 定量 RT-PCR (qPCR)

フェノール・クロロホルム方を用いて Total RNA を精製し、得られた RNA をテンプレートに cDNA を逆転写した。次いで、cDNA をテンプレートとして、Rotor-Gene (QIAGEN 社) を用い qPCR を行った。対象とした遺伝子の発現量は、ribosomal protein 49 (rp49) の発現量で補正した。

(5) DNA シーケンシング

解剖により摘出・プールのした前胸腺からスピンカラム法によりゲノム DNA を精製し、イルミナ社の Hi-Seq を用いゲノム DNA のシーケンシングを行った。ライブラリの調整、シーケンシング、およびシーケンシングデータの解析はかずさ DNA 研究所に委託した。得られたデータは IGV を用い可視化した。

4. 研究成果

(1) インスリンシグナルおよびアミノ酸シグナルは TOR および核内倍加の上流で機能する

前胸腺の TOR および核内倍加の上流で機能するシグナル伝達経路を明らかにするために、本研究では特にインスリンシグナルおよびアミノ酸シグナルに着目し遺伝学的解析を行った。まず、インスリンシグナルが核内倍加の進行を制御する可能性を検証するために、機能阻害型および活性化型インスリン受容体 (InR.DN および InR.CA) を前胸腺で発現させ、その個体の表現型を観察した。その結果、InR.DN を発現させた前胸腺では核内倍加の進行が遅延し、その個体ではエクジステロイドによって制御される蛹化が遅延した。一方、InR.CA を過剰発現させた前胸腺では核内倍加の進行が更新し、この個体では早熟変態が引き起こされた。これらの結果は、インスリンシグナルは前胸腺の核内倍加の進行およびエクジステロイド産生を促進することを示している。さらに、InR.CA に加えて機能阻害型 TOR (TOR.DN) を前胸腺に共発現させた個体では、核内倍加および蛹化の亢進がキャンセルされ、蛹化が阻害された。

加えて、CW 到達期の前から飢餓にした個体では核内倍加および蛹化が抑制される一方で、InR.CA を発現する個体では飢餓状態にもかかわらず核内倍加および蛹化が誘発された (図 1)。以上の結果は、CW 到達期においてインスリンシグナルは TOR を介して核内倍加の進行を促進することで、その後のエクジステロイド産生を決定づけることを示している。

また、細胞内アミノ酸によって活性化し TOR の活性を調節する RagA タンパク質の機能を阻害したところ、核内倍加の進行および蛹化が遅延したことから、RagA を介したアミノ酸シグナルもまた TOR および核内倍加の進行を制御することが示唆される (図 1)。

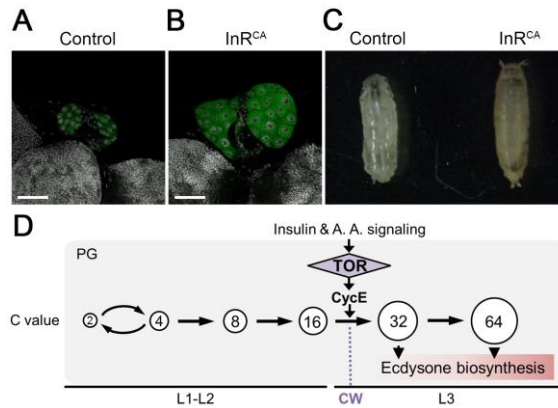


図 1. 前胸腺におけるインスリンシグナルの役割

(A-C) CW 到達前から飢餓条件下で飼育したコントロール個体の前胸腺 (A)、飢餓と同時に InR.CA を発現させた個体の前胸腺 (B)、および幼虫で致死のコントロール個体と蛹化した InR.CA 個体を示す。(D) CW チェックポイント制御機構のモデル図

(2) 前胸腺細胞における Under replicated region の同定

前胸腺細胞では、核内倍加が進行することによって多糸染色体 (縦裂した多数の染色糸が重合した巨大染色体) が構成され、このような染色体では複製が抑制されコピー数が減少した Under-replicated 領域 (UR 領域) が存在することが報告されている。UR によって該当領域に存在する遺伝子の発現が減少しうることから、一つの可能性として、核内倍加の進行によりエクジステロイド産生を抑制する遺伝子領域に UR が形成され、これによりエクジステロイド産生の抑制が解除される、という仮説が考えられる。この可能性を検証する第一歩として、前胸腺ゲノム DNA のどの領域に UR が引き起こされるのかを明らかにするために、前胸腺のゲノム DNA を対象に次世代シーケンシングを行った。その結果、前胸腺ゲノム DNA 中に少なくとも 22 か所の UR 領域を見出した。しかしながら、ほとんど全ての UR 領域においてコピー数の減少率は 1-2 割程度であり、UR の形成がエクジステロイド産生の活性上昇に寄与する主要なメカニズムであるとは考えにくい。今後、UR 以外のゲノム DNA における不可逆的変化に着目していく予定である。

(3) アミノ酸摂取により CW チェックポイントが打破される

前述の通り、CW 到達期における核内倍加の進行はインスリンシグナルによって促進される。昆虫のインスリンであるインスリン様ペプチド群 (ILPs) は脳のインスリン産生細胞 (IPCs) から分泌されるが、その分泌活性は体内のアミノ酸によって調節されることが知られている。また、RagA を介したアミノ酸シグナルもまたエクジステロイド産生を調節する。これらのことから、CW 到達期におけるアミノ酸摂取がインスリンシグナルの活性化、核内倍加の進行、ならびに蛹化を決定づけると考えられる。この可能性を検証するために、CW 到達前から飢餓条件下で飼育した個体に、アミノ酸、糖、または脂質を含まない餌を投与し、各群の表現型を観察した。その結果、アミノ酸を含まない餌で飼育した個体ではエクジステロイド合成酵素の発現が低下し、蛹化が引き起こされなかった (図 2)。さらに、この個体に活性化型エクジステロイドである 20E を投与することで、蛹化が引き起こされた (図 2)。これらの結果は、CW 到達期におけるアミノ酸摂取によりエクジステロイド産生ならびに蛹化が引き起こされることを示している。今後、アミノ酸摂取と前胸腺におけるインスリンシグナルおよび RagA シグナルとの関連を解析する予定である。

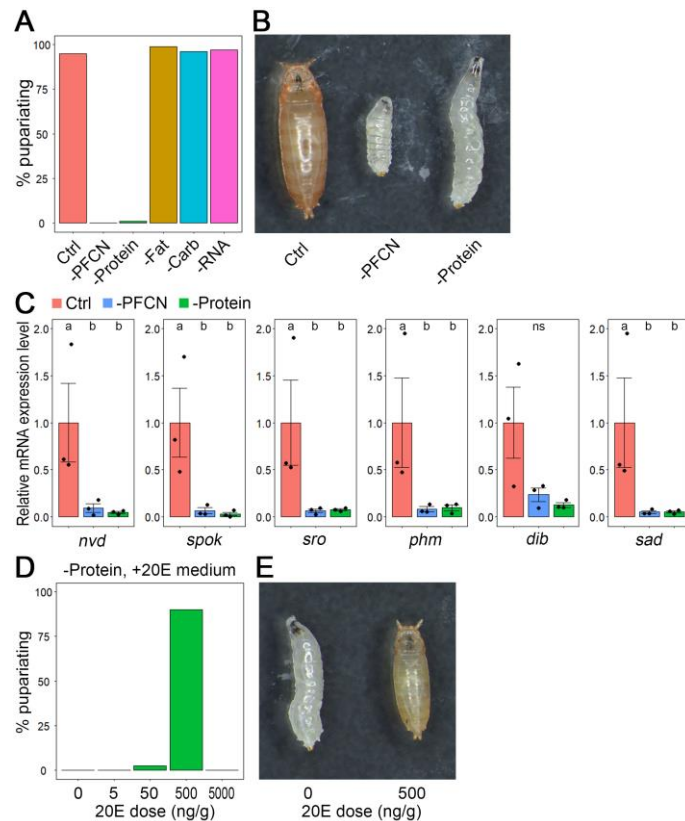


図 2. アミノ酸摂取による CW の打破

(A-C) CW に到達する直前のステージから特定の栄養素を除去した餌で飼育した個体群における、蛹に移行した個体の割合：全ての栄養素を含む餌で飼育した個体群，Control；栄養素を含まない餌で飼育した群，-PFCN；タンパク質除去餌で飼育した群，-Protein；リン脂質除去餌で飼育した群，-Fat；スクロース除去餌で飼育した群，-Carb；RNA 除去餌で飼育した群，-RNA。(B) 蛹に移行した Control，および、幼虫で発生を停止した-PFCN および-Protein 群。(C) Control，-PFCN，および-Protein 群におけるエクジステロイド合成酵素群の遺伝子発現量。異なる英字は有意差を示す ($P < 0.05$, Dunnett's test) (D) 20E を摂取した-Protein 群における、蛹に移行した個体の割合。20E の濃度は横軸に示す。(E) 幼虫で発生を停止した 20E 非投与の-Protein 群，および、20E 投与により蛹に移行した-Protein 群。

(4) 脂肪体で機能するアミノ酸依存的な発育制御因子の同定

IPCs における ILPs の分泌制御は、脂肪体が中心的な役割を果たしている。脂肪体はアミノ酸依存的に CCH amide2 をはじめとしたペプチドホルモンを分泌し、IPCs におけるインスリン分泌を促進することが明らかとなっている。本研究では、脂肪体に発現するアミノ酸依存的にホルモン分泌を調節する新規因子を同定するために、脂肪体選択的な RNAi スクリーニングを行った。その結果、脂肪体選択的なノックダウンにより発育遅延・停止を示す 5 遺伝子を選抜した。このうち、Heat shock protein 90 (Hsp90) はアミノ酸情報とホルモン分泌とを繋ぐ因子である可能性を示唆する結果を得ている：Hsp90 の発現量は、アミノ酸を含まない餌で飼育した個体において低下する；Hsp90 を脂肪体選択的にノックダウンした個体では ILPs の一種である ILP5 の発現が低下し、成長が遅延し蛹化が起こらない。以上の結果から、Hsp90 を脂肪体-ILCs 軸を制御する新規因子として着目し、詳細な遺伝学的解析および遺伝子発現解析を行っている。

以上、本研究では、これまで未知であった昆虫の変態を決定づける栄養チェックポイントの一端を明らかにし、特に TOR および核内倍加が重要であることを見出した。この成果は、従属栄養生物の個体発育の分子基盤を理解する上で重要な知見となる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計2件)

1. Ohhara Y, Kobayashi S, Yamakawa-Kobayashi K, Yamanaka N. Adult-specific insulin-producing neurons in *Drosophila melanogaster*. *J Comp Neurol*. 526:1351-1367 (2018).
2. Ohhara Y., Kobayashi S., Yamanaka N. Nutrient-Dependent Endocycling in Steroidogenic Tissue Dictates Timing of Metamorphosis in *Drosophila melanogaster*. *PLoS Genet*. 13:e1006583 (2017).

〔学会発表〕(計6件)

1. 大原裕也, 中村安希, 小林公子 ショウジョウバエ内分泌組織における mitotic-to-endocycle switch の制御機構 日本分子生物学会 (2016年12月)
2. Yuya Ohhara. RNAi screen to identify novel cell cycle regulators in *Drosophila prothoracic gland*. The 3rd international Insect Hormone Workshop (2017年7月).
3. 大原裕也 ショウジョウバエ発育過程において, TOR シグナルは変態開始を決定づける栄養チェックポイントとして働く 生命科学系学会合同年次大会 (2017年12月) (招待講演)
4. 大原裕也 ショウジョウバエ発育過程における核内倍加の役割 日本蚕糸学会 (2018年3月) (招待講演)
5. 大原裕也, 小林公子 ショウジョウバエ発育過程において SUMO 化経路は neverland の発現ならびにエクジステロイドの産生を制御する 日本分子生物学会 (2018年12月)
6. 大原裕也 ショウジョウバエ発育過程における栄養シグナルの役割 日本生態学会全国大会 (2019年3月) (招待講演)

〔図書〕(計1件)

大原裕也 幼虫が昇る「大人への階段」 JT 生命誌研究館

<https://brh.co.jp/seimeishi/journal/093/research/1.html>

〔産業財産権〕

○出願状況 (計0件)

○取得状況 (計0件)

〔その他〕

ホームページ等

人類遺伝学研究室 HP <http://dfns.u-shizuoka-ken.ac.jp/labs/cellphys/index.html>

6. 研究組織

(1)研究分担者：なし

(2)研究協力者

研究協力者氏名：山中 直岐

ローマ字氏名：Naoki Yamanaka

研究協力者氏名：佐藤 昌直

ローマ字氏名：Masanao Sato

研究協力者氏名：小林 悟

ローマ字氏名：Satoru Kobayashi

研究協力者氏名：林 良樹

ローマ字氏名：Yoshiki Hayashi

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。