

令和 2 年 5 月 14 日現在

機関番号：13301

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K19224

研究課題名(和文)植物ステロイドホルモンによる訪花性昆虫の行動制御～行動から分子機構まで～

研究課題名(英文)Control of behavior of flower-visiting insects by plant steroid hormone

研究代表者

木矢 剛智(KIYA, TAKETOSHI)

金沢大学・生命理工学系・准教授

研究者番号：90532309

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 5,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、昆虫の行動が植物ステロイドホルモンを介した記憶増強によって植物側から操作されている、という大胆な仮説を検証したものである。本研究により、植物ステロイドホルモンは外来のリガンドとして昆虫の脳の一部の神経細胞に作用し、長期記憶形成を促進する活性を持つことを見出した。更なる仮説の検証が必要であるが、このような仕組みが昆虫全般に備わっているとすると、植物と昆虫の関係性(共進化も含め)について新たな概念が形成されることに繋がると考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、訪花性昆虫のモデルとしてミツバチの働き蜂を用い、学習や行動を測定することで、植物ステロイドホルモンがミツバチの行動に与える影響を調べた。また遺伝学的解析が容易なショウジョウバエを用い、植物ステロイドホルモンが昆虫脳に作用する分子神経機構を明らかにした。これらの研究より、従来考えられていたよりもより密接な関係が昆虫と植物の間にあることが見出された。

研究成果の概要(英文)：This study evaluated our hypothesis that the plant steroid hormone affects the behavior of insects by promoting formation of long-term memory. Our study have revealed that the plant steroid hormone functions as an external ligand for nuclear receptor in insects, and facilitates the formation of long-term memory by affecting on a part of neurons in the brain. Although further evaluation is necessary, our study provides novel evidence for a new concept of relationships between insects and plants.

研究分野：昆虫分子生物学

キーワード：植物ステロイド ミツバチ ショウジョウバエ Hr38 神経活動 ステロイドホルモン 昆虫 花粉

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

我々はこれまで、昆虫の脳において神経活動依存的に発現量が増加する遺伝子(初期応答遺伝)に着目し、初期応答遺伝子を神経活動マーカーとして用いた昆虫脳の神経活動マッピング系を構築してきた。また本実験系を用いることで、様々な昆虫の脳において生得的行動を制御する神経回路機能を明らかにする研究を行ってきた。

以前に我々は、幅広い昆虫種において高度に保存されている初期応答遺伝子 *Hr38* を同定した (*Current Biology*, 2013)。 *Hr38* は核内受容体をコードしており、昆虫のステロイドホルモン(脱皮ホルモン)によって活性が制御される転写因子であった。そこで我々は、 *Hr38* を神経活動のマーカーとして利用することだけではなく、 *Hr38* 自体が有する神経系における機能を、ステロイドホルモンと高次脳機能といった観点より調べてきた。研究開始当初、脱皮ホルモンによって *Hr38* を活性化すると、本来ならば短期記憶しか形成されない条件でも長期記憶が形成されるようになることを見出した。ステロイドホルモンによる長期記憶形成促進効果は、ショウジョウバエ及びミツバチにおいて認められたことから、この現象は昆虫の脳において進化的に保存された現象であると考えられた。

これまでに成虫のショウジョウバエでは脱皮ホルモンが体内で合成されることが知られていたが、ミツバチの働き蜂の体内には脱皮ホルモンが検出されないことが報告されていた。我々はミツバチ(働き蜂)の体液および脳における脱皮ホルモンをいくつかの手法で測定してきたが、先行研究のとおり脱皮ホルモンは検出されなかった。すなわちミツバチの働き蜂の脳には、脱皮ホルモンによって長期記憶が促進される機能はあるにも関わらず、体内にはこれを誘発する物質がないということを示している。

そこで我々は、長期記憶を促進するステロイドホルモンは、ミツバチの体内で合成されるのではなく、野外の植物に由来するのではないかと考え、本研究を開始した。植物ではブラシノステロイドと呼ばれる植物ステロイドホルモンが広く知られ、植物の体全体、特に花粉に高い濃度で存在すること、一部の植物では昆虫の脱皮促進活性をもったステロイドホルモンが合成されていることが知られている。ミツバチは採餌の際に花粉を集めるので、花粉の植物ステロイドホルモンがミツバチに作用し、採餌した植物に対する長期記憶が促進される可能性を考えた。一方、植物側においてもミツバチに自身と同種の花を訪花してもらうことで受精効率を上げることが出来るというメリットがあるため、植物がステロイドホルモンによってミツバチの行動を操作する機構が進化してきた可能性があると考え、本研究を構想した。

2. 研究の目的

本研究の目的は、昆虫の行動は植物ステロイドホルモンを介した記憶増強によって植物側からも操作されている、という大胆な仮説を検証するものである。従来、昆虫の訪花行動では、昆虫が自由意思によって好みの花を訪れることが前提条件として考えられてきた。そのうえで、植物は昆虫の好みの蜜や匂いを用意することで花粉の運搬を昆虫に依存し、時には共進化をするという、両者の関係が考えられてきた。しかし、我々は最近の研究より、植物が合成するステロイドホルモンが昆虫の行動を制御している可能性を見出してきた。これは従来考えられてきた植物が昆虫に従属する関係とは逆に、植物が昆虫の行動を操作する機構を進化的に獲得してきた可能性を示すものである。本研究では、訪花性昆虫のモデルとしてミツバチの働き蜂を用い、実験室内外における学習や行動を測定することで、植物ステロイドホルモンがミツバチの行動に与える影響を調べ、上記仮説を検討することを目的とした。さらに遺伝学的解析が容易なショウジョウバエを用いることで、植物ステロイドホルモンが昆虫脳に作用する分子神経機構を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

研究開始時点において我々は、ミツバチの働き蜂を用いた学習系により、昆虫のステロイドホルモン(脱皮ホルモン)が長期記憶形成の促進効果を持つことを見出していた。また同時に、ミツバチの体内では脱皮ホルモンが合成されないことも確認していた。そこで我々は、植物の花蜜・花粉に存在する脱皮ホルモン様活性をもった植物ステロイドホルモンが、ミツバチの働き蜂の脳に作用しているのではないかと考えて以下の検討を行った。

(1) 植物ステロイドホルモンの投与による長期記憶形成促進活性の検討

ミツバチを用いた学習アッセイ系では、本来ならば短期記憶しか成立しない学習条件でも、学習時にステロイドホルモンを投与することで、長期記憶を成立させることが出来る。本アッセイ系を用い、植物ステロイドホルモンにも長期記憶形成促進活性があるかどうか調べた。

(2) 脱皮ホルモン及び植物ステロイドホルモンが脳において作用する分子基盤の解明

脱皮ホルモンや植物ステロイドホルモンがどのような遺伝子カスケードを介して長期記憶形成を促進するのか明らかにすることを目的に、RNA-Seqによる遺伝子発現解析を行った。

上述の研究を行う過程において、ミツバチを用いて分子遺伝学的な解析を進めることは困難であったため、分子遺伝学的な解析にはショウジョウバエを用いた。ショウジョウバエの求愛学習アッセイ系を利用し、脱皮ホルモンや植物ステロイドホルモンが脳のどのような神経回路に

作用するのかということ以下により解析した。

(3) 脱皮ホルモンや植物ステロイドホルモンが作用する脳領域の探索

ショウジョウバエの求愛学習アッセイを用いた研究により、脱皮ホルモンの投与の代わりに *Hr38* の過剰を発現することで長期記憶形成を促進させられることを見出していった。そこでこれを利用して、様々な神経回路に *Hr38* を過剰発現することで脱皮ホルモンや植物ステロイドホルモンが作用する脳領域の候補の探索を行った。

(4) *Hr38* が植物ステロイドホルモンの受容体として機能する可能性の検討

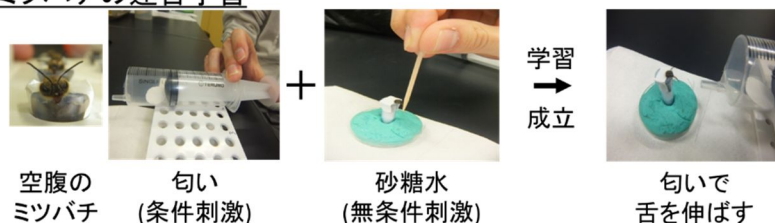
ショウジョウバエの求愛学習アッセイを用いた研究により、植物ステロイドホルモンを投与した場合に長期記憶形成の促進が認められるかを検討した。また *Hr38* の転写活性を *in vivo* で測定できるアッセイ系を構築し、脱皮ホルモンや植物ステロイドホルモンが *in vivo* の脳において *Hr38* の転写を活性化するのかを検討した。さらに RNAi によって *Hr38* を機能阻害し、植物ステロイドホルモンの受容体として機能するか検討した。

4. 研究成果

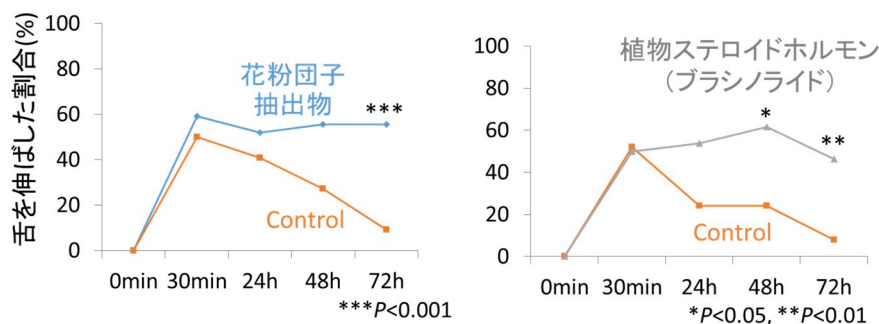
(1) 植物ステロイドホルモンの投与による長期記憶形成促進活性の検討

下図に示すようなミツバチの働き蜂を用いたアッセイを行い、植物ステロイドホルモン(ブラシノライド)や花粉団子(植物ステロイドホルモンの供給源と考えられる)から抽出した脂質を投与し、長期記憶形成の促進が認められるか検討した。

ミツバチの連合学習



その結果、いずれにおいても本来ならば短記憶しか形成されない条件(72時間では記憶がない条件)での学習でも、長期記憶の保持(72時間での記憶)が認められた。この結果は、花粉団子抽出物や植物ステロイドホルモンによって、ミツバチの長期記憶形成が促進されることを示している。



(2) 脱皮ホルモン及び植物ステロイドホルモンが脳において作用する分子基盤の解明

脱皮ホルモン(20Eおよび3epi-20E)もしくは溶媒(コントロール)を投与した働き蜂の脳よりRNA抽出を行い、各1000万リード程度ずつHiSeq3000によってシーケンスを解析した。しかしながら、これと比べて特徴的な大きな変動を示す遺伝子はなく、数倍程度の少量の発現量増加を示す遺伝子が多数得られた。この結果は、脱皮ホルモンが脳において誘導する遺伝子発現は多数の協調した遺伝子群であり、大きな効果を持つ特定の遺伝子が発現誘導されるわけではないことを示唆している。

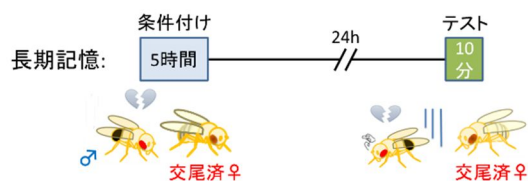
また、植物ステロイドホルモン(ブラシノライド)を投与した働き蜂の脳のサンプリングまでは終了したが、シーケンス解析は時間的に終わることが出来なかった。今後、機会を見て解析を進め、上記の脱皮ホルモンとの比較を行ってゆきたいと考えている。

(3) 脱皮ホルモンや植物ステロイドホルモンが作用する脳領域の探索

ショウジョウバエのオスは、生得的にメスに交尾を試みる。しかし交尾済みのメスはオスからの交尾を再度受け入れないため、オスからのアプローチを拒絶する。この経験を繰り返すとオスのショウジョウバエは周囲に未交尾のメスがいないことを学習し、交尾を求めること(求愛)を

行わないよう行動が変化する (CI の低下として評価される)

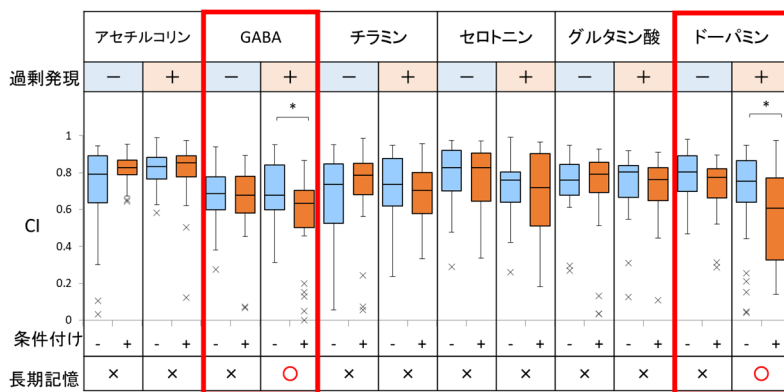
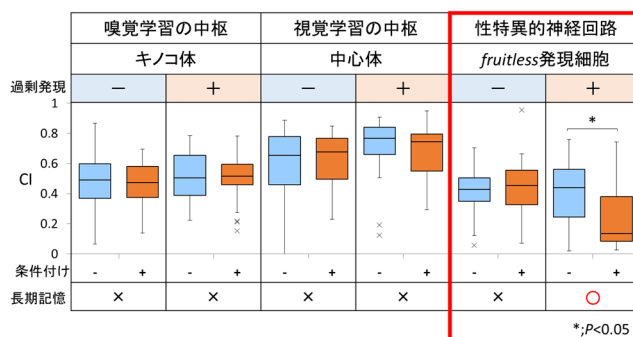
求愛記憶のアッセイ法



$$\text{Courtship index (CI)} = \frac{9\text{分}}{10\text{分}} = 0.9$$

記憶あり→CIが低下する

このような求愛記憶のアッセイ法を用い、植物ステロイドホルモンの受容体と考えらえる *Hr38* が脳のどのような細胞で機能することが重要か検討した。以前に我々は *Hr38* を過剰発現することで長期記憶形成を促進させることが出来ることを見出していたので、本手法を用いて *Hr38* の過剰発現によって記憶形成促進が起こる脳領域のスクリーニングを行った。

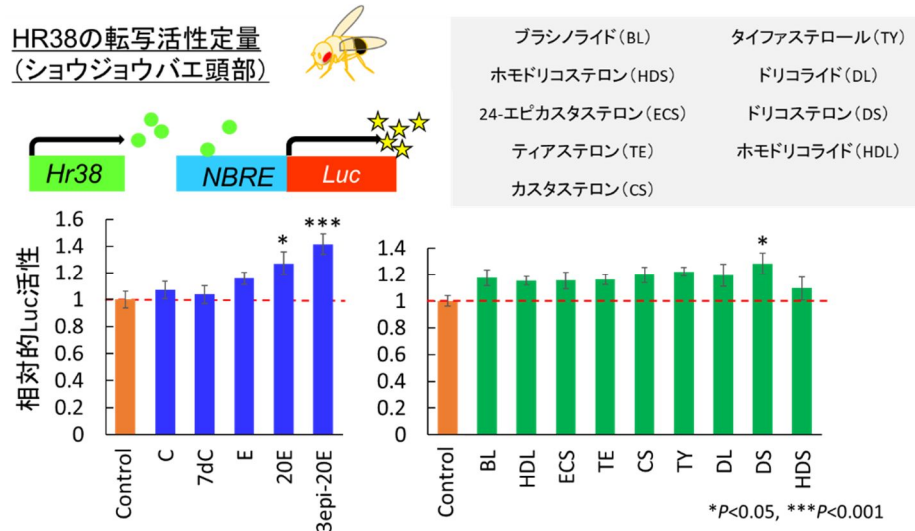


その結果、脳の性を決定する *fruitless* 及び GABA やドーパミンを神経伝達物質として用いる神経において長期記憶形成の促進が認められた。これらの結果は、植物ステロイドホルモンがこれらの神経細胞に作用している可能性を示唆している。今後、これらの細胞において植物ステロイドホルモンが *Hr38* を介して作用していることを詳細に検討する必要があるが、本現象の作用機序に迫るための重要なデータを得ることが出来た。

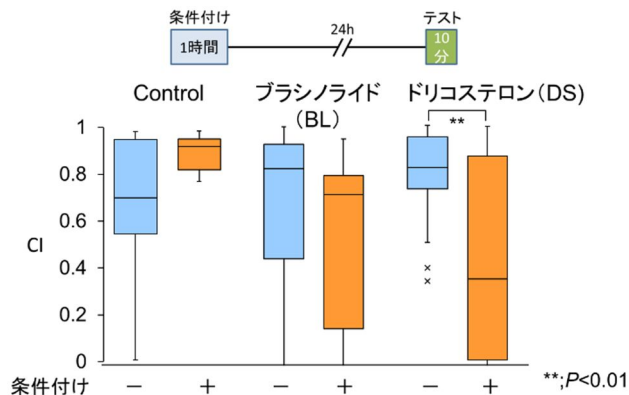
(4) *Hr38* が植物ステロイドホルモンの受容体として機能する可能性の検討

植物ステロイドホルモンの受容体として *Hr38* が機能する可能性を見出していたので、これをレポーターアッセイによって検討した。*Hr38* がコードするタンパク質はステロイドホルモンを受容する核受容体 (転写活性化因子) であり、*NBRE* として知られる DNA 配列に特異的に結合することが知られていた。そこでタンデムに配置した *NBRE* 配列の下流にルシフェラーゼ遺伝子を配置した遺伝子組換えショウジョウバエを用い、*in vivo* (ショウジョウバエ脳) において *HR38* タンパク質の転写活性を検出できる手法を構築した。本手法を用いると *HR38* の本来のリガンドとして知られる脱皮ホルモン (20E および 3epi-20E) による転写活性促進が検出できることを確認した。そのうえで手に入る限りの植物ステロイドホルモンを投与し、*HR38* の転写活性

への影響を検討したところ、脱皮ホルモンに比べ転写活性を促進する効果は低かったものの、全ての植物ステロイドホルモンが転写活性の増加傾向を示した。特にドリコステロンは転写活性の促進活性が高く、コントロールに比べ有意な増加を引き起こした。これらの結果は、植物ステロイドホルモンは HR38 の転写活性を外来性のリガンドとして制御することを示している。



そこで次に求愛記憶のアッセイ法を用い、植物ステロイドホルモンの投与が長期記憶形成を促進するか検討した。その結果、ドリコステロンを投与した場合、長期記憶形成が促進されることを見出した。有意ではないものの HR38 の転写活性促進活性をもっていたブラシノライドの投与では有意な長期記憶形成の促進は認められなかったが、その傾向は認められ、HR38 の転写活性促進活性と長期記憶形成促進活性に相関関係があることが強く示唆された。



さらにここで見られた植物ステロイドホルモンによる長期記憶形成促進活性が HR38 を介しているのかということ RNAi による機能阻害実験により検討した。Geneswitch 法を利用した RNAi により、成虫脳特異的な *Hr38* ノックダウンを行ったところ、実験群のみならずコントロール群においてもドリコステロンによる長期記憶形成促進活性が消失するという結果となった。Geneswitch 法は遺伝子発現にリークが多い手法であるため、コントロール群において *Hr38* RNAi が多少なりとも発現してしまったため、このような結果となったのではないかと考えている。今後は、別のアプローチによりリーク発現のない方法で検討してゆく予定である。

以上を総括すると、植物ステロイドホルモンは外来のリガンドとして HR38 に作用し、その転写活性を増加させることで、脳の一部の神経細胞に作用し、長期記憶形成を促進する活性を持つことが仮説として提唱できるに至った。更なる仮説の検証が必要であるが、このような仕組みが昆虫全般に備わっているとすると、植物と昆虫の関係性 (共進化も含め) について新たな概念が形成されることに繋がると考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 木矢 剛智
2. 発表標題 初期応答遺伝子を利用したミツバチの脳の神経活動の可視化
3. 学会等名 ミツバチサミット2019（招待講演）
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----