

令和 4 年 6 月 17 日現在

機関番号：14303

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K06072

研究課題名(和文) 卵細胞の成長時期に応じた輸送は栄養管によってどのように制御されるか

研究課題名(英文) Involvement of nutritive cord in the stage specific regulation of telotrophic ovary

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・准教授

研究者番号：30401938

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)：物質輸送に関わると予想されるいくつかの遺伝子に対してdsRNAをコクヌストモドキに注射し、卵巣に現れる表現型を解析した。キネシン1遺伝子のRNAiは、体細胞の濾胞細胞が正常な構造を保てない表現型を示した。体細胞は保育細胞からの連絡が無いことから、おそらく栄養管との関連は低い、興味深い表現型であったため、詳細に解析し、学術誌Journal of Insect Biotechnology and Sericologyにて、その結果を発表した。また、おそらく保育細胞からの栄養管による連絡と関連すると思われる、飢餓による時期特異的な卵および濾胞細胞の細胞死を解析し、現在投稿論文としてまとめている。

研究成果の学術的意義や社会的意義

端栄養型卵巣に関する分子生物学的研究は非常に少ない。特に、生殖細胞の構造などが大きく異なる多栄養型卵巣と端栄養型卵巣の比較は、生殖細胞が将来個体となる卵と、卵をケアする保育細胞と役割を分担するように進化した過程や意義を探るうえで、学術的に重要であると考えられる。本研究では、物質輸送に関わるキネシンのノックダウンが、卵黄合成期初期特異的に異常を誘導することが明らかとなった。この時期は多栄養型卵巣でも特異的な細胞死が確認される時期であることから、この時期の濾胞特異的な進化的に保存された機構を示唆するものと考えている。生殖に関わる知見は、害虫防除や保全のための新しい技術開発の一助になると考えている。

研究成果の概要(英文)：We have tried RNAi against candidate molecules involved in the transportation from nurse cells to oocyte via nutritive cord. Most candidates did not show specific phenotype, except Kinesin-1. The RNAi against Kinesin-1 induced abnormal double layered follicle at vitellogenic stage. The details of the phenotype of Kinesin-1 RNAi was published in the Journal of Insect Biotechnology and Sericology and presented in the meeting of The Japanese Society of Sericultural Science.

Vitellogenic stage specific follicle death induced by starvation is supposed to be regulated by nurse cells nutritive cord. In order to test the hypothesis, we analyzed the details of the follicle cells. We observed insulin signaling and nuclear phase of somatic follicle cells play important roles in the follicle death, but they did not seem to be involved in the transportation of nutritive cord. We reported those results in the conference of The Molecular Biology Society of Japan.

研究分野：昆虫生理

キーワード：単栄養型卵巣

## 1. 研究開始当初の背景

昆虫の卵巣は、卵巣小管と呼ばれる数珠状の構造が束になった構造をしている。この数珠の粒は濾胞といい、生殖細胞とそれを包む一層の濾胞細胞(体細胞)で構成される。卵巣の中で濾胞が連なる部分を vitellarium と呼び、後端に進むほど卵細胞の成長が進み、十分に成長した卵細胞は輸卵管に放出され、最終的に産卵に至る。

昆虫の卵巣の分類はその構造の違いから、無栄養型卵巣・栄養型の二つに大きく分類される。無栄養型は生殖細胞から卵細胞のみが産生される、最も原始的な構造の卵巣である。栄養型卵巣は、生殖細胞から保育細胞と卵細胞の二つの細胞が産生され、保育細胞が卵の成熟に有用な役割を果たす。栄養型卵巣は多栄養型と端栄養型の二つに分類でき、ショウジョウバエなどでみられる多栄養型卵巣の発育について最もよく研究される。多栄養型卵巣は、卵細胞とその姉妹細胞である保育細胞が、一つの濾胞に包まれているのが特徴である。保育細胞は、同じ濾胞の中にある卵細胞の成熟具合などに応じて必要な物質を供給し、卵細胞が十分に成熟すると最終的に細胞死によって除去されることがわかっている。

一方、コウチュウ目などでみられる端栄養型卵巣では、卵細胞は単体で一層の濾胞細胞にくるまれ、保育細胞とは離れて存在する。すべての保育細胞は成虫期までに作られ、卵巣小管内の anterior 側に局在し、シンシチウムを形成する。この部分は tropharium と呼ばれる。Tropharium の posterior 側には前卵細胞が局在し、時期になると濾胞細胞にくるまれながら posterior 側へ、卵巣小管を成熟しながら移動する。そのため、posterior から anterior に向かって濾胞は成熟しながら連なる。この部分を vitellarium と呼ぶ。保育細胞のシンシチウムからは栄養管と呼ばれる複数の管が、vitellarium に伸びており、一本の栄養管につき一つの卵細胞に連絡している。多栄養型卵巣と同様、卵細胞は、成熟時期に応じた保育細胞からの物質の供給を必要とすると考えられる。そのため、栄養管を介した物質の輸送は、卵の発育時期特異的に行われると予想される。これまでに申請者は、コウチュウ目のコクヌストモドキにおいて、濾胞の成長や細胞死が時期特異的に制御されることを示唆するデータを得ており、これらの時期特異的な現象に、保育細胞が関わると考えられる。しかし、シンシチウムである保育細胞から、成熟具合の異なる卵細胞それぞれに向かって、どのように選択的に物質が輸送されているのか、そもそも選択的な物質供給をしているのかも含め、全く分かっていない。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、シンシチウムである保育細胞から、長くて数百  $\mu\text{m}$  にもおよぶ栄養管を介して、どのように卵の成長時期特異的な物質輸送が制御されているか、を明らかにすることである。このような長い輸送については、神経軸索などで知られているが、これは体細胞での現象である。本研究で対象とするような生殖細胞でのこのような長い物質輸送はほかに例がない。この制御機構が明らかになることは生物学的にも大きな意義があると考えられる。

昆虫の進化に伴って、生殖器官も変化してきた。それまで卵細胞のみであったメスの生殖細胞は、役割分担をするように保育細胞と卵細胞に分かれたと申請者は考えている。端栄養型卵巣では保育細胞と卵細胞の機能が完全には分離しておらず、多栄養型では、次世代となる卵細胞とそれを維持する保育細胞として、はっきり役割が区別されていると考えられる。本研究で対象とする物質輸送機構は、言い換えるなら保育細胞と卵細胞の連絡がどのように行われるかを解明することを通して、昆虫の生殖組織の進化の軌跡を明らかにすることに寄与できると考えている。

また、本研究は生殖器官を対象とすることから、基礎研究のみならず、卵巣を標的とした新規の害虫防除法の開発、また希少昆虫の保全のための技術開発などに寄与できると考えて本研究を遂行した。

## 3. 研究の方法

RNA sequence : 保育細胞で特異的に発現している mRNA を探索するため、Tropharium と Vitellarium の間で発現する遺伝子を次世代シーケンサーによって解析した。

遺伝子発現解析 : RNAi の効率や、他の遺伝子との関連は、realtime-qPCR によって解析した。

systemic RNAi : コウチュウ目は systemic RNAi が可能である。体腔に、ノックダウンしたい目的遺伝子の部分配列を持った二本鎖 RNA を注射することで、体全体に RNAi を誘導することが可能である。輸送に関わると予想される遺伝子を systemic RNAi でノックダウンする。オフターゲットを考慮し、一つの遺伝子のうち二か所の配列で二本鎖 RNA を作成し、それぞれ別に注射し、二つの配列でそれぞれ得られた結果の間に矛盾が無いものをその遺伝子の影響として採用した。羽化後数日はコクヌストモドキの卵巣は未成熟で、濾胞はほとんど形成されていない。本

研究では、羽化してから一週間以上かつ二週間未満の、十分に成熟した卵巣を持つ個体ですべての実験を行った。

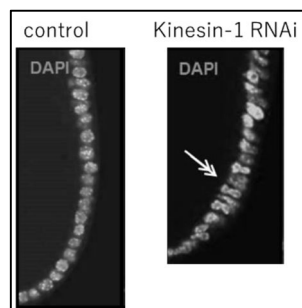
卵巣の形態の観察：卵巣の形態の変化を共焦点レーザー顕微鏡によって観察した。観察のため卵巣は、解剖後に4%パラホルムアルデヒドによって固定し、その後、DAPI、Phalloidin、抗体などで適宜染色した。lysotrackerは、卵巣を取り出してすぐに染色し、その後パラホルムアルデヒドによって固定した。

#### 4. 研究成果

保育細胞から卵細胞へと運搬される分子を探索するため、保育細胞で高く発現する遺伝子を次世代シーケンサーによって解析した。Trophariumとvitellariumで発現する遺伝子を比較した結果、得られた2204遺伝子のうち、TrophariumにおいてVitellariumよりも発現が100倍以上高かった遺伝子が10得られた。いずれも機能が未知の遺伝子であり、GO解析の結果も、これら10遺伝子に共通点は見出すことができなかった。網羅的なRNAiによるphenotypeのデータベースであるiBeetle-Baseによると、TC016158などいくつかの遺伝子は本研究とはあまり関係ないとみられるものの、胚発生時のクチクラ形成や、頭部の形成に異常をもたらすなど、興味深いphenotypeを示していた。TC016311など、産卵数が減少するものの、致死性の高いものもあった。その他に、vitellariumでは発現せずtropharium特異的に発現していた遺伝子が228あった。現在、これらの遺伝子の一部に対してRNAiを行い、卵成熟への影響を検証しているところである。

物質輸送に関与すると予想されるモーター遺伝子などをRNAiによって抑制し、卵巣における影響を解析することで、栄養管における物質輸送に関わる分子の探索を行った。その結果、キネシン1遺伝子の抑制によって誘導される、卵黄合成期初期に特異的な濾胞の異常が観察された。また、その他のキネシンやダイニンのRNAiでは、卵巣に明確な変化は認められなかった。予備実験で、抗ミトコンドリア抗体が、栄養管の内部を強く染め、また栄養管の卵細胞への開口部にシグナルの局在を確認していた。このことから保育細胞から栄養管を介して、卵細胞にミトコンドリアが運搬されていると考えられる。そこで、キネシン1遺伝子をRNAiによって抑制した後、抗ミトコンドリア抗体による染色を試みた。しかしながら、栄養管で見られるミトコンドリアのシグナル、および栄養管から卵細胞への開口部に局在していたシグナルに変化は認められなかった。この結果から、キネシン1のRNAiでは少なくともミトコンドリアの運搬に影響を与えることはないことが示唆された。

キネシン1RNAiによって誘導される濾胞の異常を詳細に解析したところ、卵黄合成期初期の濾胞に含まれる体細胞である濾胞細胞に主に異常が見られることを確認した(右図、Sunada et al., 2020より改変)。ショウジョウバエやカイコガのもつ多栄養型卵巣において、卵黄合成期初期は特殊な時期であることが知られている。これらの昆虫の卵巣では、親個体が貧栄養下にあると、濾胞の成長が停止する。この停止は、卵黄合成期初期に特異的に起こることが報告されている。また、飢餓が続くと、成長が停止していた濾胞は細胞死を起こすが、再度栄養を得ると、再び成長が介される。これらのことから、卵黄合成期初期は、親の栄養状態をモニターして、濾胞自身はそれに応じて生きるか死ぬかスイッチするチェック



ポイントとして機能する時期であると考えられている。本研究で得られたキネシン1の異常もこの時期特異的にみられることから、端栄養型卵巣においても卵黄合成期初期が特別な時期である可能性が考えられる。そこで、このフェノタイプを詳しく解析することにした。

キネシン1のRNAiによって得られる異常は、濾胞細胞が、本来一層であるところが、二層になるという異常であった。そこで、濾胞細胞が過剰に細胞分裂を行ったことが原因であると考え、細胞分裂M期のマーカーである抗リン酸化ヒストン3抗体で染色を行った。その結果、正常な卵巣と比較して、過剰な細胞分裂は認められなかった。このことから、キネシン1のRNAiで誘導される異常は、細胞分裂の異常を伴わないと考えられる。

卵黄合成期に至るより前に、濾胞細胞は、卵細胞を取り囲む細胞と、濾胞と濾胞をつなぐstalkを構成するstalk cellの二種類に分化する。この分化に異常が起きていないか検証するために、濾胞細胞の分化への関与が知られているeyes absent (eya)タンパク質を認識する抗体で染色した。しかし、キネシン1RNAiを行った卵巣と正常な卵巣の間で、eyaシグナルを示した濾胞細胞の位置に大きな変化は見られなかった。分化後のstalk cellではcutタンパク質が発現していることが知られている。そこで抗cut抗体で染色し、シグナルの認められた細胞の数を数えて、コントロールとキネシン1RNAiとで比較したが、細胞の数に変化は見られなかった。以上の結果から、濾胞細胞の分化もキネシン1のRNAiによる異常の原因ではないことが示唆された。ショウジョウバエ多栄養型卵巣においては、stalkの形成にモータータンパク質が関与することが知られている。しかし本研究の結果から、少なくともキネシンを含むいくつかのタンパク質はstalkの形成に関与せず、多栄養型卵巣と端栄養型卵巣ではその形成の制御機構に違いがあることが考えられる。

本来一層である濾胞細胞が二層になることから、細胞接着に関わる因子が関与しないか明らかにするため、カドヘリン、p120、カテニン等に対する抗体を用いて染色を試みた。しかし、様々な染色条件を試してみたものの、市販の抗体はコクヌストモドキでは反応しなかった。今後、良い抗体を得ることができれば、細胞接着との関与を詳細に解析できると考えている。

以上の結果は、Functions of kinesin-1 motor protein in the telotrophic meristematic ovary of red flour beetle, *Tribolium castaneum* というタイトルで、Journal of Insect Biotechnology and Sericology (2020) に投稿し、掲載された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Taiki Sunada, Eiji Kotani, Yu Kaneko, Keiko Takaki	4. 巻 89
2. 論文標題 Functions of kinesin-1 motor protein in the telotrophic meroistic ovary of red flour beetle, <i>Tribolium castaneum</i>	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Insect Biotechnology and Sericology	6. 最初と最後の頁 17-24
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.11416/jibs.89.1_017	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Keiko Takaki, Koji Hazama, Maiko Yazaki, Eiji Kotani & Yu Kaneko	4. 巻 55
2. 論文標題 Maturation of telotrophic ovary accompanied with ecdysteroidogenic activity and contrastive decrease in ecdysteroids in the whole body of red flour beetle, <i>Tribolium castaneum</i> (Coleoptera: Tenebrionidae)	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Applied Entomology and Zoology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s13355-020-00682-x	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 砂田泰輝、高木圭子、小谷英治
2. 発表標題 Kinesin-1モータータンパク質による時期特異的な濾胞細胞の形態制御機構の解明
3. 学会等名 日本蚕糸学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 矢崎真唯子、小谷英治、高木圭子
2. 発表標題 エクダイソンによる端栄養型卵巣の時期特異的な制御機構の解明
3. 学会等名 日本蚕糸学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 砂田泰輝、小谷英治、高木圭子
2. 発表標題 端栄養型卵巣における飢餓による生殖制御機構の解明
3. 学会等名 日本分子生物学会
4. 発表年 2021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

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関