

機関番号：24402

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20570074

研究課題名 (和文) 神経分泌細胞による昆虫の休眠調節機構

研究課題名 (英文) Diapause control mechanisms by neurosecretory cells in insects

研究代表者

志賀 向子 (SHIGA SAKIKO)

大阪市立大学・大学院理学研究科・教授

研究者番号：90254383

研究成果の概要 (和文)：ルリキンバエにおける脳間部、脳側方部内神経分泌細胞の生殖休眠調節における役割について調べた。脳側方部に免疫陽性を示す FMRF アミド様ペプチドが、休眠中にアラタ体の幼若ホルモン合成を抑制することが示唆された。休眠と非休眠条件でエクジステロイド量と卵黄たんぱく質遺伝子の発現量が大きく異なることがわかった。脳間部は卵黄たんぱく質発現の調節に関わるが、エクジステロイド量の調節には不可欠ではないことがわかった。

研究成果の概要 (英文)：Diapause controlling mechanisms by neurosecretory cells in the pars intercerebralis and pars lateralis were examined in the blow fly *Protophormia terraenovae*. FMRFamide, of which immunoreactivity was observed in the pars lateralis and the corpus allatum, showed weak inhibitory effects on juvenile hormone production by the corpus allatum. Ecdysteroid titers and *yolk protein* gene expression were low under diapause conditions compared with nondiapause conditions. Removal experiments suggest the pars intercerebralis is important to control *yolk protein* expression but not ecdysteroid titers under nondiapause conditions

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2009 年度	900,000	270,000	1,170,000
2010 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：基礎生物学

科研費の分科・細目：動物生理・行動

キーワード：休眠、エクジステロイド、インスリン受容体、脳間部、ルリキンバエ、幼若ホルモン

1. 研究開始当初の背景

昆虫の休眠調節については、内分泌機構の理解は進みつつあるものの、神経機構の理解は進んでいない。これまでに多くの昆虫で幼若ホルモン (JH) やエクジステロイド (Ecd) と休眠の関係が示されてきたが、ホルモン合成を調節する神経機構は明らかになっていない。

研究代表者らはルリキンバエにおいて、①脳間部が卵巣発達 (生殖) に、脳側方部が生殖休眠に必要であることを示した。また、②非休眠条件 (長日・高温条件) に比べ、休眠条件 (短日・低温条件) では JH の合成活性が低く、非休眠条件で JH 合成を阻害すると卵巣が発達しないこと、短日条件で JH を塗布すると卵巣が発達すること

が明らかになっている。これら①と②から、脳間部や脳側方部にある神経分泌細胞がJH合成を調節することにより、休眠を調節している可能性が考えられる。

これまでに脳間部、脳側方部を除去し、ホルモン合成に対する影響が調べられたが、この手法では脳間部、脳側方部自体の機能を探ることはできない。そこで本研究では、器官培養を行いホルモン合成活性に対する脳間部、脳側方部に存在する物質の影響を調べる。私たちはこれまでに、質量分析法により脳間部と脳側方部に合計4種類の神経ペプチドを決定した。これら以外にも、免疫組織化学により脳間部、脳側方部に存在する神経ペプチドの候補を挙げた。これらの中に、JH合成を調節する物質が存在する可能性がある。

JH合成を調節する神経ペプチドは数種類の昆虫で明らかになっている。JH合成を抑制するゴキブリの「アラトスタチン」や、促進するタバコズメガの「アラトトロピン」はいずれも脳側方部にある。これらの例を見ると、ルリキンバエにおいても脳間部や脳側方部の神経分泌細胞がJH調節を担う可能性がある。さらに、私たちはこれまでにルリキンバエの脳側方部を含む領域にはアラタ体のJH合成を抑制する因子が存在するという結果を得ている。この結果も本研究の着想にいたった理由の一つである。

一方、ハエ目昆虫の卵巣発達にはJHのほかEcdも重要であることが知られている。そこで、ルリキンバエにおいてもEcdの血中濃度を非休眠と休眠条件で比較し、休眠調節機構におけるEcdの役割や、Ecd量と脳間部、脳側方部の関係について調べる必要がある。

これまでに、脳側方部と休眠の関係については議論されてきたが、脳間部が休眠調節に関わるのかどうかについては不明であった。脳間部が卵巣発達に不可欠であることは明らかになっているが、脳間部が卵巣発達の何を調節しているのか、また、脳間部からの神経分泌作用が非休眠と休眠条件で異なるかについてはわかっていない。同じハエ目昆虫である蚊では、休眠調節機構にインスリン様ペプチドが関与し、脳間部でインスリン様ペプチドが合成されると報告されている。そこで、インスリン様ペプチドやインスリンカスケードに注目し、脳間部と休眠調節の関連について調べる。

2. 研究の目的

ルリキンバエにおいて、神経分泌細胞群の存在する脳間部、脳側方部による休眠調節機

構を次の3点において明らかにする。1) 脳側方部組織とそこに存在するペプチドから、JH合成を抑制する物質、細胞を明らかにする。2) Ecdの成虫休眠調節における役割を明らかにする。3) 脳間部およびインスリンカスケードの休眠調節における役割について明らかにする。

3. 研究の方法

ホルモン量の測定には、基本的にはJHには放射化学アッセイ法、Ecdにはラジオイムノアッセイ法を用いる。さらに、ホルモン測定の検出感度を上げるため、Gas Chromatography-Mass Spectrometry (GCMS)の導入を検討した。ハエのEcdにはエクジソンと20ヒドロキシエクジソンが、JHとしてJuvenile hormone III-bisepoxide (JHB3)が存在する。GCMSを用いることにより、これらのホルモンを区別して1個体分のサンプルを定量することが可能となる。

脳間部除去や移植はタングステン針を用いた実験形態学的手法を用いた。また、ノーザンハイブリダイゼーションにより、卵黄タンパク質遺伝子、インスリン受容体遺伝子の発現解析を行った。

4. 研究成果

(1) GCMSによるホルモン測定方法の検討

エクジステロイドのトリメチルシリル化を行い、GCMSによるエクジステロイドの測定を試みたが、検出感度を上げることができず目的の濃度の検量線を得ることができなかった。アラタ体培養液をGCMSで解析した結果、幼若ホルモンIIIビスエポキシド(JHB3)の位置にピークが出現した。しかし、幼若ホルモンについてもGCMSによる定量は困難であった。今後幼若ホルモンの合成量は従来の放射化学アッセイ法により、エクジステロイドはラジオイムノアッセイ法へ切り替え、定量することにした。

(2) 脳側方部神経ペプチドの幼若ホルモン合成に対する影響の解析

これまでに、脳側方部にJH合成活性の抑制機能があることが示唆されている。そこで、脳側方部の細胞に免疫陽性を示す色素胞拡散ホルモン(PDH)、FMRFamide、質量解析により脳側方部に存在が示されたコラゾニンのJH合成活性に対する影響を調べた。その結果、わずかながらFMRFamideがJH合成を抑制することがわかった(図1)。

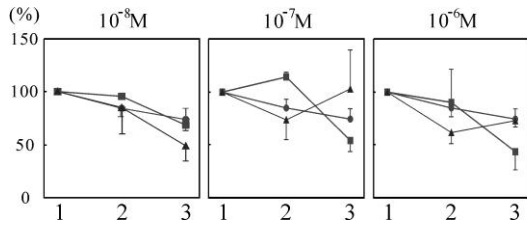


図1 放射化学アッセイ法による JH 合成活性に対する PDF (■)、FMRFamide (▲)、コラゾニン (◆) の影響。培養液を変えて 3 回培養 (横軸) を行い、2 回目の培養で各濃度のペプチドを入れて合成活性を測定した。2, 3 回目の活性を 1 回目の合成活性に対する割合で示している (縦軸)。

これまでに FMRFamide 抗体を用いた免疫組織化学により、アラタ体内の神経線維と脳側方部の細胞体が染色されている。これらから、アラタ体へ投射する脳側方部ニューロンが短日条件下で FMRFamide 様ペプチドを用いて JH の合成を抑制している可能性がある。

(3) 休眠、非休眠条件におけるエクジステロイド量の比較および、エクジステロイド量に対する脳間部除去の影響

血リンパ中および卵巣中のエクジステロイド量を非休眠、休眠条件で比較した。その結果、非休眠条件では卵黄蓄積の起こる直前から増加し、卵黄蓄積の途中で最大となり、卵母細胞が完全に成熟した段階ではエクジステロイド量が減少した (図 2 A)。一方、休眠条件では卵巣は発達せず、エクジステロイド量は低いままであった (図 2 B)。

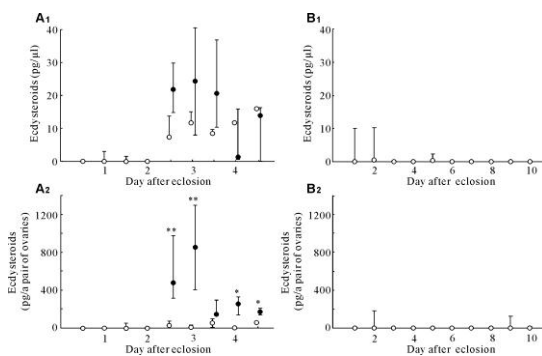


図2 エクジステロイド血中濃度 (A1, B1) と卵巣内の量 (A2, B2) A 非休眠条件、B 休眠条件 ○卵黄が蓄積していない個体、●卵黄蓄積個体

次に 非休眠条件のハエの脳間部を除去し、血リンパおよび卵巣のエクジステロイド量をラジオイムノアッセイ法によって測定した。その結果、これらのエクジステロイド量に有意

な変化は見られなかった (図 3)。

このことから、休眠中は Ecd 量が低下していることがわかった。また、脳間部を除去しても Ecd 量に変化がなかったことから、Ecd 量の調節には脳間部は不可欠ではないと考えられた。

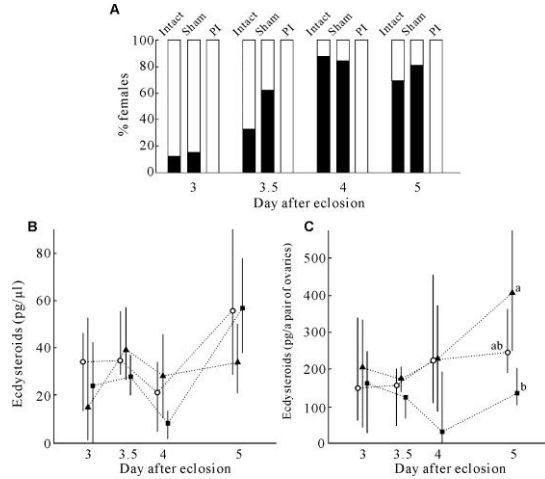


図3 脳間部除去個体の卵巣発達率 (A) と血中エクジステロイド濃度 (B)、卵巣内エクジステロイド量 (C) ○無処理、▲シャム手術、■脳間部除去

(4) 休眠、非休眠条件における卵黄タンパク質発現の比較および、卵黄タンパク質発現に対する脳間部除去の影響

二種類の卵黄タンパク質遺伝子 (*Pt-yp1*, *Pt-yp2*) をクローニングした。これらは脂肪体と卵巣に特異的に発現しており (図 4)、その発現は卵黄蓄積前の卵巣ステージ 2-より始まり、論脳蓄積途中のステージ 2+, 3, 4 で強くなった。また、休眠条件では発現していなかった。

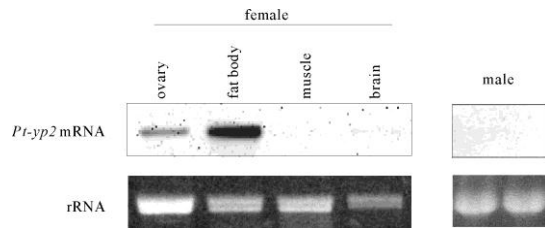


図4 卵黄タンパク質遺伝子 *Pt-yp2* の発現 卵巣 (ovary) と脂肪体 (fat body) で強い発現が見られる。オス個体全体からは発現が見られない。

非休眠条件のハエの脳間部を除去すると、脂肪体と卵巣の *yp2* の発現が対照群に比べて有意に低下した。

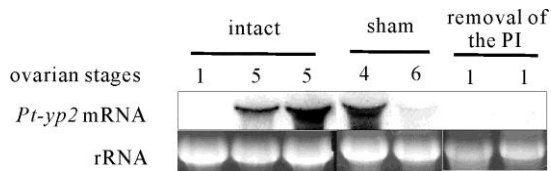


図5 脳間部除去の卵黄タンパク質遺伝子 *Pt-yp2* の発現に対する影響 非休眠条件下で脳間部を除去すると、卵巣が発達せず、*Pt-yp2* の発現も見られない。

以上より、ルリキンバエでは休眠中の卵黄タンパク質の発現は非休眠条件と比べ低下しており、脳間部から分泌される物質が脂肪体での *Pt-yp2* の発現に不可欠であると考えられる。

(5) 脳間部除去個体への非休眠あるいは休眠脳間部の移植の効果

非休眠条件で脳間部を除去すると卵巣が発達しない。非休眠条件で脳間部を除去した個体に非休眠あるいは休眠個体から脳間部組織を移植し、卵巣発達が回復するか調べた。その結果、非休眠脳間部の移植個体では、休眠脳間部の移植個体にくらべ多少卵巣発達する個体の割合が多かった(図5)。その差は有意なものではなかったため、今後再検討する必要があるが、休眠条件では卵巣発達に必要な神経分泌物質の放出量が低下している可能性がある。

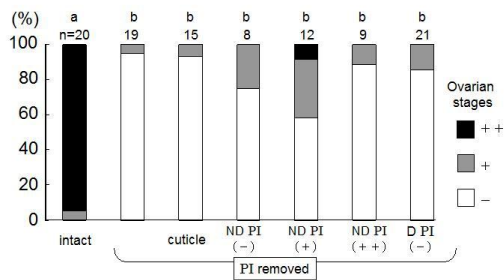


図5 脳間部 (PI) 除去個体への非休眠条件脳間部 (NDPI) あるいは休眠条件脳間部 (DPI) 移植の影響 卵巣発達途中個体 (+) からの脳間部移植で卵巣発達個体の割合が高かった。

(6) インスリン様ペプチド遺伝子、インスリンレセプター遺伝子のクローニング及び発現解析:

インスリン様ペプチド遺伝子のクローニングを試みたが、ハエ目昆虫における遺伝子の共通配列に乏しく、クローニングの成功には至

らなかった。インスリンレセプター遺伝子 (*InR*) をクローニングし、卵巣と脂肪体で発現解析を行ったところ、*InR* の発現は脂肪体において、非休眠条件よりも休眠条件で発現が高いことがわかった(図6)。

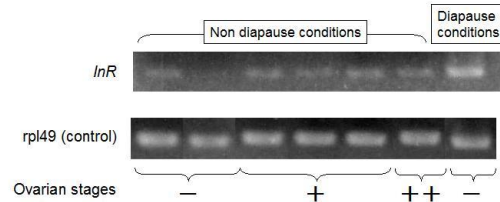


図6 脂肪体におけるインスリン受容体遺伝子 (*InR*) の発現 休眠条件の発現は非休眠条件に比べて高い。

次に、非休眠条件で脳間部を除去すると脂肪体における *InR* の発現が対照群に比べて高くなった(図7)。

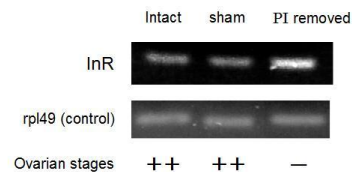


図7 非休眠条件における脳間部除去 (PI removed) の *InR* 発現に対する効果 脳間部を除去すると対照区に比べて *InR* の発現量が高くなった。

以上の結果は、休眠条件でインスリンカスケードが働き、非休眠条件では脳間部がインスリンカスケードを抑制することにより非休眠となることが示唆された。これは、これまでに蚊で報告されている結果と矛盾する。今後、*InR* の発現量を定量化してこの結果を検証するとともに、インスリンカスケードで作用する他の遺伝子についても調べ、ルリキンバエの成虫休眠とインスリンカスケードの関連について調べる必要がある。

以上より、ルリキンバエの休眠調節機構において、JH合成を抑制するニューロンの候補として脳側方部の FMRamide ニューロ

ンが挙げられた。また、脳間部から分泌される物質により、インスリンカスケードを介して卵黄たんぱく質発現を調節する可能性が考えられた。今後、これらの結果を検証することが必要である。その上で、FMRamide様ペプチドを同定してJH合成抑制物質を明らかにすること、インスリンカスケードの調節を担う脳間部細胞を明らかにすることにより、休眠調節の神経機構の解明を細胞レベルで進めることができるようになるだろう。

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5件)

- ① Hamasaka, Y., Watari, Y., Arai, T., Numata, H., Shiga, S. (2011) Comparison of the effect of constant light on the circadian rhythm of white-eye mutant and wild-type blow fly *Protophormia terraenovae*. *Biological Rhythm Research, in press* (査読あり)
- ② Muguruma, F., Goto, S.G., Numata, H., and Shiga, S. (2010) Effect of photoperiod on clock gene expression and subcellular distribution of PERIOD in the circadian clock neurons of the blow fly *Protophormia terraenovae*. *Cell and Tissue Research* 340: 497-507. (査読あり)
- ③ Inosaki, A., Yasuda, A., Shinada, T., Ohfuné, Y., Numata, H. and Shiga S. (2010) Mass spectrometric analysis of peptides in brain neurosecretory cells and neurohemal organs in the adult blow fly, *Protophormia terraenovae*. *Comparative Biochemistry and Physiology - Part A: Molecular & Integrative Physiology* 155: 190-199. (査読あり)
- ④ Hamanaka, Y., Tanaka, S., Numata, H. and Shiga, S. (2009) Morphological characterization of neurons projecting to the ring gland in the larval blow fly, *Protophormia terraenovae*. *Zoological Science* 26: 227-237. (査読あり)
- ⑤ Shiga, S. and Numata, H. (2009) Roles of PERIOD immunoreactive neurons in circadian rhythms and photoperiodism in the blow fly, *Protophormia terraenovae*. *Journal of Experimental Biology* 212: 867-877. (査読あり)

[学会発表] (計9件)

- ① Sakiko Shiga A neurobiological approach towards insect photoperiodism 9th Göttingen Meeting of the German Neuroscience Society 2011年3月27日

Göttingen, Germany

- ② 久我義行, 志賀向子 ルリキンバエの脳間部神経分泌細胞による休眠調節 日本動物学会第81回大会 2010年9月23日 東京大学教養学部(東京)
- ③ 久我義行, 志賀向子 ルリキンバエの成虫休眠における脳間部の役割 日本比較生理生化学会第32回大会 2010年7月19日 九州産業大学工学部(福岡)
- ④ 六車文明, 後藤慎介, 沼田英治, 志賀向子 ルリキンバエに脳内の時計遺伝子発現とPER分布に対する光周期の影響 第34回日本比較内分泌学会大会・日本比較生理生化学会第31回大会合同大会 2009年10月23日 千里ライフサイエンスセンター(豊中市)
- ⑤ 志賀向子 体内時計を用いて季節を知る 第34回日本比較内分泌学会大会・日本比較生理生化学会第31回大会合同大会 2009年10月22日 千里ライフサイエンスセンター(豊中市)
- ⑥ 六車文明, 後藤慎介, 沼田英治, 志賀向子 ルリキンバエにおける時計遺伝子の発現とPERIODの細胞内分布に対する光周期の影響 日本動物学会第80回大会 2009年9月17日
- ⑦ 六車文明, 後藤慎介, 沼田英治, 志賀向子 ルリキンバエにおけるPERIODの遺伝子発現と細胞内局在に対する光周期の影響 2008年11月8日 岡山大学(岡山市)
- ⑧ 志賀向子, 浜中良隆 ルリキンバエの時計機構に関わる神経回路 日本動物学会第79回大会 2008年9月5日 福岡大学(福岡市)
- ⑨ 田中彩子, 後藤慎介, 沼田英治, 志賀向子 ルリキンバエ卵黄タンパク質遺伝子の発現における脳間部の役割 日本比較生理生化学会第30回大会 2008年7月19日 北海道大学(福岡市)

[図書] (計1件)

- Goto, S.G., Shiga, S., and Numata, H. (2009) Photoperiodism in insects: perception of light and the role of clock genes. In: *Photoperiodism: Seasonal Time Measurement*. Nelson, R.J., Denlinger, D.L. and Somers, D. (eds.) Oxford University Press. pp258-286.

6. 研究組織

(1)研究代表者

志賀 向子(SHIGA SAKIKO)
大阪市立大学・大学院理学研究科・教授
研究者番号:90254383

(2)研究分担者

沼田 英治(NUMATA HIDEHARU)
京都大学・大学院理学研究科・教授
研究者番号:70172749

後藤 慎介 (GOTO SHINSUKE)
大阪市立大学・大学院理学研究科・准教授
研究者番号:70347483

(3)連携研究者
なし