

令和 5 年 6 月 9 日現在

機関番号：13301

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K21307

研究課題名（和文）植物ステロイドホルモンが昆虫の記憶を操作する分子神経機構

研究課題名（英文）Molecular and neural mechanisms that plant steroid hormone regulates insect memory

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メカニズムを調べたものである。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ドーパミン神経に作用し、記憶を増強させることを見出した。また、本作用において発現変動する遺伝子として、ドーパミン合成酵素を候補として見出した。さらに、このような作用を媒介する因子としてHR38の機能解析を進めた。また、HR38の機能を制御する因子を新規に同定するためのスクリーニング系を構築した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、主にショウジョウバエを用いた遺伝学的解析を行い、植物ステロイドホルモンが昆虫の脳に作用する分子神経機構の一端を明らかにした。具体的には、脳の報酬系として知られるドーパミン神経に、転写因子HR38を介して作用することを明らかにした。本研究より、昆虫と植物の異種間相互作用といった新たな概念を見出し、その機構の一端にまで迫ることが出来た。また、動物の行動が植物の物質によって制御される現象を新たに発見したことにより、動物-植物相互作用の新たな例を提示できたと考えられる。

研究成果の概要（英文）：We investigated our hypothesis that insect behavior is manipulated by plants through memory enhancement mediated by plant steroid hormones. We found that plant steroid hormones act on dopaminergic neurons in the insect brain as an exogenous ligand to enhance memory. We also found that dopamine synthetic genes are involved in this action. Furthermore, we established screening systems for HR38 cofactors, to elucidate the molecular mechanisms of HR38 function.

研究分野：昆虫科学

キーワード：植物ステロイドホルモン ミツバチ ショウジョウバエ ドーパミン Hr38 送粉 記憶 種間相互作用

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

我々は、昆虫で高度に保存された神経活動依存的に発現量が増加する遺伝子(初期応答遺伝子 *Hr38*)を同定し(*Current Biology*, 2013) これを神経活動のマーカーとして用い、生得的行動を制御する神経回路に関する研究を行ってきた(*PNAS*, 2019)。*Hr38*は核受容体をコードしており、昆虫のステロイドホルモンであるエクジソン(脱皮ホルモン)類縁体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*の神経活動マーカーとしての利用に加え、*Hr38*の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ミツバチとショウジョウバエを用い調べてきた。その結果、ステロイドホルモン(脱皮ホルモン)によって *Hr38*が活性化すると、本来ならば短期記憶しか形成されない条件においても長期記憶が形成される現象が昆虫の脳には存在することを見出した。

上記研究の過程で我々は、ミツバチの働き蜂では脱皮ホルモンを合成する卵巢が退縮していて、体液や脳に脱皮ホルモンが存在しないにも関わらず、ステロイドホルモンによる長期記憶形成の促進が認められたことから、ミツバチの働き蜂は野外の植物からステロイドホルモン様の物質を取り込んでいる可能性を考え、研究を行っていた。

### 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

#### (1) 植物ステロイドホルモンが作用する脳神経回路の解明

研究開始時点において、我々はショウジョウバエを用いた遺伝学的解析より、ステロイドホルモン(脱皮ホルモン類縁体)が脳のGABA作動性(抑制性)神経とドーパミン作動性(報酬系)神経で、核受容体である *Hr38*を活性化することで長期記憶形成を促進させることを見出しつつあった。そこで本研究では、本知見をいくつかのショウジョウバエシステムを用いて詳細に確認するとともに、植物ステロイドホルモンが脱皮ホルモンと同様の機構で長期記憶を促進しているのかを調べた。具体的には、GABA作動性神経やドーパミン作動性神経特異的に *Hr38*をRNAiによってノックダウンした個体を作成して実験を行った。

#### (2) 植物ステロイドホルモンが制御する分子カスケードの解明

*Hr38*は転写因子をコードしており、植物ステロイドホルモンは *Hr38*を活性化することで下流の遺伝子発現を制御し、長期記憶を誘発していると予想される。そこで本研究では *Hr38*がどのような遺伝子発現を制御しているか明らかにすることを目指した。具体的には、*Hr38*を過剰発現したショウジョウバエを用いて、発現変動する遺伝子のスクリーニングを行った。

#### (3) HR38による植物ステロイドホルモン受容機構の解析

HR38は様々な脱皮ホルモン類縁体によって活性化される核受容体であるにも関わらず、構造の異なる植物ステロイドホルモンによっても転写活性化されることを見出してきた。HR38のタンパク質の立体構造より、HR38は核受容体としては非典型的に、リガンド受容部が自身のアミノ酸によって満たされており、リガンド結合サイトがないことが報告されていた。これらのことから我々は、HR38にはコファクターがあり、コファクターが様々なステロイドホルモンと結合することで幅広いリガンド受容性を持つのではないかと仮説を立てた。本研究では、このよう

なコファクターのスクリーニングを行うための、ルシフェラーゼアッセイ系と遺伝学的スクリーニング系を構築した。

#### 4. 研究成果

##### (1) 植物ステロイドホルモンが作用する脳神経回路の解明

まず、ショウジョウバエを用いた遺伝学的解析より、長期記憶形成に *Hr38* が作用する神経回路の同定に取り組んだ。脳の GABA 作動性（抑制性）神経とドーパミン作動性（報酬系）神経が重要と予想して詳細な解析を行った。当初の予想に反して、GABA 作動性の抑制性の神経回路は重要ではなく、ドーパミン作動性神経回路のみが、重要な神経回路であることを見出した。これは以前に行ったスクリーニングではいくつかの神経回路が候補であったものの、詳細な解析によって特定の神経回路だけに絞り込むことが出来たことを示している。ドーパミン神経の中でも、報酬系を司る PAM 神経と呼ばれる一部のドーパミン神経が重要であることを確認した。

次に、この神経回路で *Hr38* の機能を RNAi で阻害し、植物ステロイドホルモンによる記憶増強への影響を調べた。その結果、PAM 神経において、学習後（consolidation phase）に *Hr38* の機能を阻害すると植物ステロイドホルモンによる記憶増強は消失することを見出した。これは、植物ステロイドホルモンを介した記憶増強は、ドーパミン神経において *Hr38* の機能を介することを明らかにしたと考えられる。

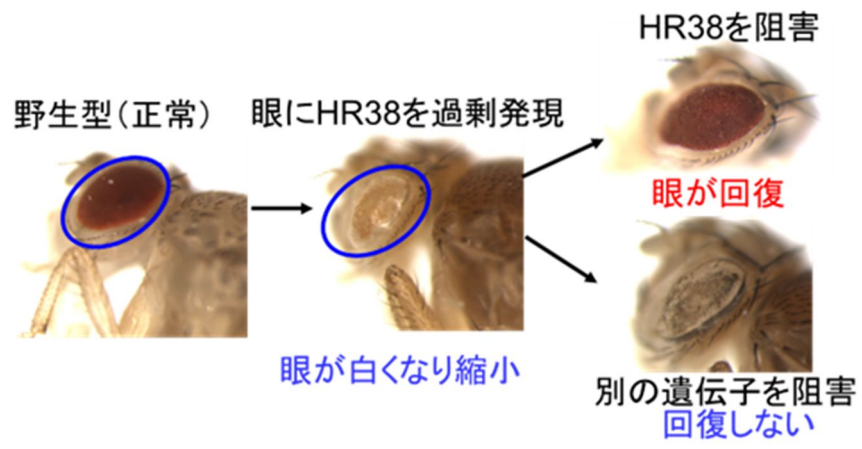
##### (2) 植物ステロイドホルモンが制御する分子カスケードの解明

以前に、ショウジョウバエを用い、全神経細胞で *Hr38* を過剰発現させ、その下流で変動する遺伝子のスクリーニング（RNA-Seq 解析）を行ったが、明確に変動する遺伝子を同定することは出来なかった。全神経細胞で発現させてスクリーニングしたことが問題であったと考え、本研究では、*Hr38* の働きが重要であることを見出したドーパミン神経特異的に *Hr38* を過剰発現させ、その下流で変動する遺伝子のスクリーニング（RNA-Seq 解析）を行った。その結果、TH や DDC といったドーパミン合成酵素遺伝子の発現量増加は認められたものの、大きな発現変動を示す新規な遺伝子は同定出来なかった。これは、*Hr38* のターゲット遺伝子が TH と DDC のみであるという可能性と、頭部全体から抽出した RNA を用いてスクリーニングを行ったため特異的な発現変動遺伝子を同定出来なかった可能性の双方が考えられた。今後、ドーパミン神経のみを用いたスクリーニングを行うことで、このような問題の解決を図ることが出来ると考えられる。また、このような問題がありつつも、*Hr38* は少なくともドーパミン合成酵素遺伝子の上流にあることが見出されたので、これらの遺伝子が植物ステロイドホルモンによって発現制御されていることを今後明らかにしてゆくことが重要であるとも考えられた。

##### (3) HR38 による植物ステロイドホルモン受容機構の解析

HR38 タンパク質の転写活性を定量化することが出来れば、コファクターの同定に繋がると考え、S2 細胞を用いた HR38 転写活性検出のためのルシフェラーゼアッセイ系を構築した。これまでのところ、既知のリガンドである 3-epi-20E によって HR38 転写活性が増加することを確認できている。コファクターのスクリーニングのための基礎技術が構築できたと考えられる。

また、ショウジョウバエの遺伝学的手法によって、コファクターをスクリーニングするための方法を構築した。次ページの写真のように、ショウジョウバエの複眼特異的に HR38 を過剰発現すると細胞が死ぬため、眼が白くなり縮小するが、このショウジョウバエ系統において HR38 の機能を阻害すると眼が回復することを見出した。本手法を用いることで、生体内において HR38 と遺伝学的に相互作用する因子（コファクターの可能性のある因子）をスクリーニングすることが出来る。今後、このような系統を用いて HR38 のコファクターを同定し、HR38 による植物ステロイドホルモン受容機構を明らかにすることが出来ると期待される。



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 0件）

1. 著者名 Rikako Nakamura, Takeru Yamazaki, Yui Kondo, Miho Tsukada, Yusuke Miyamoto, Nozomi Arakawa, Yuto Sumida, Taketoshi Kiya, Satoshi Arai, Hirohisa Ohmiya	4. 巻 145(19)
2. 論文標題 Radical Caging Strategy for Cholinergic Optopharmacology	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 J Am Chem Soc	6. 最初と最後の頁 10651-10658
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1021/jacs.3c00801	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Masami Nakata, Yusuke Kikuchi, Masafumi Iwami, Seika Takayanagi-Kiya, Taketoshi Kiya	4. 巻 129
2. 論文標題 Identification and characterization of sexually dimorphic neurons that express the sex-determining gene doublesex in the brain of silkworm Bombyx mori	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Insect Biochem Mol Biol	6. 最初と最後の頁 103518
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.ibmb.2021.103518	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計10件（うち招待講演 0件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 木矢 剛智・子浦 由大・國生 龍平・金子 佳樹・岩見 雅史・木矢 星歌
2. 発表標題 ノックインカイコを用いたBmdsx 発現細胞の可視化と機能解析
3. 学会等名 令和5年度蚕糸・昆虫機能利用学術講演会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 金子 佳樹・國生 龍平・岩見 雅史・木矢 剛智
2. 発表標題 Q システムを利用したカイコにおける外来遺伝子発現制御法の確立
3. 学会等名 令和5年度蚕糸・昆虫機能利用学術講演会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 國生 龍平・子浦 由大・岩見 雅史・木矢 剛智
2. 発表標題 TAL-PITCh 法を用いたノックインによるelav-T2A-GAL4 カイコ系統の作出
3. 学会等名 令和5年度蚕糸・昆虫機能利用学術講演会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 國生 龍平・木矢 剛智
2. 発表標題 CRISPR-Cas13d によるカイコ内在性遺伝子のノックダウン
3. 学会等名 令和4年度蚕糸・昆虫機能利用学術講演会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 上野 真純・叶田 貴之・岩見 雅史・木矢 星歌・木矢 剛智
2. 発表標題 フリップアウト法によるカイコガ脳における単一細胞ラベル法の確立
3. 学会等名 令和4年度蚕糸・昆虫機能利用学術講演会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 木矢 剛智
2. 発表標題 Splitシステムを利用した活動依存的神経回路ラベル法の高度化
3. 学会等名 第92回日本動物学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 木矢 剛智
2. 発表標題 Splitシステムを利用した活動依存的神経回路ラベル法の高度化
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 上野 真純, 中田 匡美, 岩見 雅史, 木矢 星歌, 木矢 剛智
2. 発表標題 カイコガにおけるfruitlessホモログ遺伝子の発現および機能解析
3. 学会等名 令和3年度蚕糸・昆虫機能利用学術講演会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 木矢 剛智
2. 発表標題 メスのショウジョウバエの脳で性行動時に活動した神経回路の初期応答遺伝子を利用した可視化
3. 学会等名 第91回日本動物学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 木矢 剛智
2. 発表標題 メスのショウジョウバエの脳で性行動時に活動した神経回路の初期応答遺伝子を利用した可視化
3. 学会等名 第43回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2020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
---------	---------