

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 25 日現在

機関番号：82112

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2009 ～ 2011

課題番号：21380040

研究課題名（和文）

昆虫神経ペプチド発現細胞の網羅的マッピングによる神経ペプチドネットワークの解明

研究課題名（英文）

Comprehensive mapping of the neuropeptide-expressing cells in insect.

研究代表者

田中 良明（TANAKA YOSHIAKI）

独立行政法人農業生物資源研究所・昆虫成長制御研究ユニット・上級研究員

研究者番号：90355735

研究成果の概要（和文）：

昆虫の発育を制御する神経ペプチドシグナルネットワークの全容を解明するために、カイコガの神経ペプチドやそれらの受容体遺伝子が神経系のどの細胞で発現するか、またどの組み合わせで共発現するかを網羅的に解析した。また、脱皮変態を誘導する脱皮ホルモンの合成制御や脱皮行動に関与する神経ペプチドを新たに同定した。これらの結果は昆虫の発育が複雑な神経ペプチドシグナルネットワークによって制御されることを示唆している。

研究成果の概要（英文）：

We mapped the expression of neuropeptide and their receptor genes in the nervous system of the silkworm *Bombyx mori* to explore the network of neuropeptides regulating insect development. We have identified several neuropeptides which are involved in the regulation of ecdysteroidogenesis or ecdysis behavior. These results suggest that complex networks of neuropeptide signaling regulate insect development.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	5,500,000	1,650,000	7,150,000
2010 年度	4,300,000	1,290,000	5,590,000
2011 年度	4,300,000	1,290,000	5,590,000
年度			
年度			
総計	14,100,000	4,230,000	18,330,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農学・応用昆虫学

キーワード：昆虫、脳・神経、応用動物、受容体、ゲノム

1. 研究開始当初の背景

変態や休眠をはじめとした昆虫の生存戦略には、神経ペプチドが重要な役割を担っている。近年、数種の昆虫の全ゲノム解読により、神経ペプチドおよび受容体候補遺伝子が網羅的に同定され、さらに、受容体候補遺伝子を発現させた培養細胞の利用により、各昆虫種における神経ペプチドと受容体との対

応関係が明らかになってきた。しかし、昆虫種間で神経ペプチドや受容体の種類に大きな違いはないことから、神経ペプチドや受容体が昆虫体内の“どの発育時期”に“どの細胞”で発現するかといった時空間的な発現パターンの違いが昆虫種特異的な生存戦略に重要であることが示唆される。また、同じ細胞中でどのような神経ペプチドと受容体が

発現しているかを網羅的に解析することで、神経ペプチドシグナルの新たなネットワークが発見される可能性がある。キイロショウジョウバエ (*Drosophila melanogaster*) は神経ペプチドの研究が最も進んでいる昆虫の一つであるが、このような組織レベルでの発現解析には体の小さいショウジョウバエよりもカイコガ (*Bombyx mori*) のような大型昆虫の方が適しており、また、カイコガでも近年神経ペプチド関連遺伝子がショウジョウバエと同様網羅的に単離されている。そこで、私たちはカイコガを材料として神経ペプチドおよび受容体遺伝子の時系列的・空間的発現パターンを解析し、昆虫の発育を制御する神経ペプチドネットワークの全容解明に向けた解析をおこなった。

2. 研究の目的

本研究では、脳を含めた中枢神経系全体や末梢神経系の分泌細胞を対象として、全神経ペプチドおよび受容体の発現細胞をマッピングした。特に、以下の2点について重点的に解明を試みた。

1) 前胸腺の脱皮ホルモン生合成制御に関与する神経ペプチドネットワークの解明：

私たちの研究グループは、従来前胸腺刺激ホルモン (PTTH) など脳から血液中に分泌される液性因子のみによって制御されると考えられていた前胸腺における脱皮ホルモン生合成活性調節に、中枢神経系から前胸腺に投射する1本の神経を介した制御機構も関与することを既に明らかにしている。しかし、カイコガでは中枢神経系から前胸腺に7本の神経が投射するなど神経支配による前胸腺活性調節機構の全容はまだ解明されていない。また、中枢神経系だけでなく、末梢神経で発現する神経ペプチドの役割も解明されていない。本研究では前胸腺に投射するニューロンの細胞体や末梢神経における神経ペプチドの発現を解析することで、前胸腺活性を制御する神経ペプチドネットワークの全体像を明らかにすることを試みた。

2) ペプチドホルモンにより制御される神経ペプチドネットワークの解明：

最近の研究により、一つのペプチドホルモ

ンの情報伝達の下流に、様々な神経ペプチドが関与する複雑なネットワークが存在することが明らかになってきた。例えば、脱皮行動を誘導する Ecdysis-triggering hormone (ETH) は、神経球に存在する ETH 受容体発現細胞から様々な神経ペプチドを分泌させ、各々の神経ペプチドが様々な標的器官に作用することで、複数の生理現象や行動が組み合わせられた脱皮行動全体を制御している。このように、ペプチドホルモン受容体発現細胞で共発現する神経ペプチドの同定は、そのペプチドホルモンに制御されるネットワークを解明する大きな手がかりとなり得る。本研究では神経ペプチド受容体と共発現する神経ペプチドを網羅的に同定することで、ペプチドホルモンによって制御される新規の神経ペプチドネットワークを探索した。特に、ショウジョウバエよりも多くの神経ペプチドが関与すると推測されるカイコガの ETH によって制御される神経ペプチドネットワークの全容解明を試みた。

3. 研究の方法

本研究では、脱皮期や摂食期のカイコガ幼虫の神経系を材料として、DNA プローブを利用したホールマウント *in situ* ハイブリダイゼーションにより遺伝子の発現細胞や発現時期を解析した。また、神経ペプチドを特異的に認識する抗体を作製し、これらの抗体を用いた免疫染色と *in situ* ハイブリダイゼーションとの二重染色により、特定の細胞で共発現する神経ペプチドや受容体を解析した。

13. 研究成果

ホールマウント *in situ* ハイブリダイゼーションにより、神経ペプチドに関しては、ほぼ全ての遺伝子について神経での発現を確認した。また、49個の神経ペプチド受容体遺伝子のうち、11個の遺伝子が脳や側心体、前額神経球で発現することを確認した。これらの発現パターンから、特に以下の2点が新たに解明された。

1) 前胸腺の脱皮ホルモン生合成制御に関与する神経ペプチドネットワーク全体像の解明

既に神経投射による前胸腺の制御に関わる

ことが明らかになっている前胸神経節中の2対の FMRF アミド関連ペプチド (BRFa) 発現細胞で共発現する神経ペプチド遺伝子をホールマウント *in situ* ハイブリダイゼーションにより探索したところ、オルコキニンが1対の BRFa 発現細胞で共発現することが明らかになった。そこでオルコキニンを特異的に認識するマウス抗体を作製して前胸腺に投射する神経を免疫染色したところ、オルコキニンと BRFa が共発現する神経細胞だけが前胸腺に軸索を投射することが明らかになった。この結果から、オルコキニンも神経投射を介した前胸腺の活性制御に関与することが示された。

キイロシヨウジョウバエで性行動を制御する性ペプチド受容体のカイコガホモログが脱皮期に前胸腺で強く発現することが定量的 PCR による解析から明らかになった。また、哺乳動物培養細胞を用いた受容体の機能解析により、性ペプチド受容体のカイコガホモログが前胸腺抑制ペプチド (PTSP) をリガンドとすることが特定された。PTSP は脳や腹部神経球など様々な器官で発現するが、*in situ* ハイブリダイゼーションおよび免疫染色の結果から、脳における PTSP の発現は摂食期に高く脱皮期に低いのに対し、結腸上の末梢神経に付着する epiproctodeal gland における PTSP の発現は脱皮期にのみ発現していた。このことから、epiproctodeal gland で合成される PTSP が脱皮期の前胸腺に作用することが推定された。

以上の結果、カイコガ前胸腺における脱皮ホルモン生合成の制御は、脳などの中枢神経系から分泌される神経ペプチドホルモン、神経支配、抹消神経から分泌される神経ペプチドなどが関与する複雑な機構によって精密に制御されていることが明らかになった。

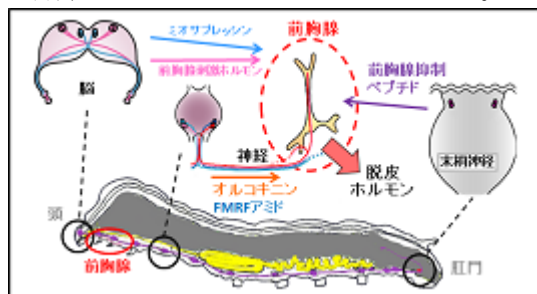


図 1. カイコガにおける脱皮ホルモン生合

成制御機構. 本研究により新たに末梢神経から分泌される前胸腺抑制ペプチドや、神経を介して運ばれるオルコキニンが関与することを明らかにした。

2) ETH シグナルにより制御される神経ペプチドネットワークの解明

In situ ハイブリダイゼーションの結果から、食道下神経球や腹部神経球中の ETH 受容体発現細胞で Bmk5 や利尿ホルモン 45 (DH45)、グリコプロテインホルモン、ニューロパルシンが共発現することが新たに明らかになった。また、様々な昆虫種のゲノムから新規に発見されたアラトスタチン CC は、カイコガの各脱皮期後半に食道下神経球のバーシコン (脱皮後の皮膚の着色・硬化を誘導する神経ペプチド) 産生細胞で強く発現することが確認された。これらの神経ペプチドはキイロシヨウジョウバエなどの他昆虫種で脱皮行動への関与が報告されていないことから、カイコガの脱皮行動はより複雑な神経ペプチドネットワークによって制御されることが示唆された。

以上の結果から、カイコガ神経ペプチドおよび受容体遺伝子の時空間的発現プロファイルは、昆虫の発育を制御する神経ペプチドネットワークの全容解明に有用であることが示された。

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 7 件)

1. Tanaka Y. Recent topics on the regulatory mechanism of ecdysteroidogenesis by the prothoracic glands in insects. *Front. Endocrin.* 査読有. 2 (2011), 107. DOI: 10.3389/fendo.2011.00107.
2. 田中良明. 比較ゲノムから見えてきた昆虫の神経ペプチド関連遺伝子群の特徴と害虫防除への利用展望. *植物防疫 査読無.* 65 (2011), 139-143. http://www.jppa.or.jp/shuppan/month_2011.html
3. Yamanaka N, Roller L, Žitňan D, Satake H,

- Mizoguchi A, Kataoka H, Tanaka Y. Bombyx orcokinin is brain-gut peptide involved in the neuronal regulation of ecdysteroidogenesis. J. Comp. Neurol. 査読有. 519 (2011), 238-246.
DOI: 10.1002/cne.22517.
4. Kim Y-J, Bartalska K, Audsley N, Yamanaka N, Yapici N, Lee J-Y, Kim Y-C, Markovic M, Isaac R, Tanaka Y, Dickson B. MIPs are Ancestral Ligands for the Sex Peptide Receptor. Proc. Natl. Sci. USA 査読有. 107 (2010), 6520-6525.
DOI: 10.1073/pnas.0914764107.
5. Yamanaka N., Hua Y-J., Roller L., Spalovská-Valachová I., Mizoguchi A, Kataoka H., Tanaka Y. Bombyx prothoracicostatic peptides activate the sex peptide receptor to regulate ecdysteroid biosynthesis. Proc. Natl. Sci. USA 査読有. 107(2010), 2060-2065.
DOI: 10.1073/pnas.0907471107.
6. Roller L, Žitňanová I, Dai L, Šimo L, Park Y, Satake H, Tanaka Y, Adams M.E, Žitňan D. Ecdysis triggering hormone signaling in arthropods. Peptides 査読有. 31 (2009), 429-441.
DOI: 10.1016/j.peptides.2009.11.022
7. Mitsumasu K, Tanaka Y, Niimi T, Yamashita O, Yaginuma T. Novel gene encoding precursor protein consisting of possible several neuropeptides expressed in brain and frontal ganglion of the silkworm, *Bombyx mori*. Peptides 査読有. 30 (2009), 1233-1240.
DOI: 10.1016/j.peptides.2009.03.023.

[学会発表] (計 4 件)

1. 田中良明, 行弘文子, Roller L, Žitňan D., 溝口明, カイコ神経ペプチド関連遺伝子発現細胞の網羅的マッピング, 日本動物学会第82回大会, 2011年9月23日, 旭川市神楽地区公共施設群 (北海道) .
2. 田中良明, PTH 以外の神経ペプチドによる前胸腺活性制御機構, 日本動物学会第81回大会, 2010年9月23日, 東

京大学 (東京都) .

3. 田中良明, 比較ゲノムから見えてきた昆虫の神経ペプチド関連遺伝子群の特徴と害虫防除への利用展望, NIAS シンポジウム「ポストゲノム時代の害虫防除研究のあり方 第3回」, 2010年9月10日, 秋葉原コンベンションホール(東京都) .
4. 田中良明, カイコのゲノムから見えてきた今後のホルモン研究, 日本蚕糸学会関東支部第60回大会, 2009年11月7日, 宇都宮大学 (栃木県) .

[図書] (計 1 件)

田中良明. 東海大学出版会,
脱皮と変態の生物学. (2011)
231-245 ページ (総ページ数 496)

[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

<http://www.nias.affrc.go.jp/org/DivInsect/GrowthRegulation/page01.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

田中 良明 (TANAKA YOSHIKI)
独立行政法人農業生物資源研究所・昆虫成長制御研究ユニット・上級研究員
研究者番号:
90355735

(2) 研究分担者

溝口 明 (MIZOGUCHI AKIRA)
名古屋大学大学院 理学系研究科 准教授
研究者番号:
60183109