

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 24 日現在

機関番号：24402

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2012～2015

課題番号：24370032

研究課題名(和文)ハエの休眠調節に関わる脳ニューロンと分子の特定

研究課題名(英文)Analysis of brain neurons and molecules involved in diapause control in flies.

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,300,000円

研究成果の概要(和文)：ハエの休眠調節に関わる脳ニューロンと分子を探すことを目的とした。長日高温、短日低温で飼育されたハエの脳から126,231のコンティグを得た。全コンティグの21%にGO termが付加され、そのうち、0.4%が短日・低温に应答して発現が有意に上昇した。qPCRにより光周期 および温度条件による発現量に違いが出る遺伝子が一つ見つかった。神経繊維の切断実験から、脳側方部ニューロンは、短日低温条件においてPLTを通して卵巢発達を抑制する信号を出し、休眠を誘導すると考えられた。脳側方部ニューロンが休眠を誘導する際、上記で検出された短日低温条件3日目で発現上昇がみられる遺伝子が関わっているのかもしれない。

研究成果の概要(英文)：We have studied neurons and molecules involved in diapause control in flies. Previous studies have shown 2 types of neurosecretory cells, the pars intercerebralis neurons (PI) and pars lateralis neurons (PL), and small ventral lateral neurons (sLNv) as circadian clock neurons are important for photoperiodic control of diapause. Severance of fiber tracts suggest that the PL with axons in the posterior lateral tract (PLT) is crucial for diapause control by suppressing ovarian development under short days. We found a gene sequence of which mRNA levels increased in 3 days after transferring to short days. The results suggest that sLNv submit different signals between short days and long days to the PL, which directly control ovarian development by changing gene expression.

研究分野：動物生理学

キーワード：休眠 光周性 トランスクリプトーム解析

1. 研究開始当初の背景

(1) 鳥のさえずりや渡り、哺乳類の冬眠など多くの動物は、季節に合わせた生活史を持つ。昆虫の場合、生存に適した季節に成長、繁殖し、不適切な季節にはそれらを一時的に停止した「休眠」という状態に入る。成長と休眠の調節は、一定期間受容された光周期や温度情報が脳によって処理され、内分泌系が切り替わることによって起こる。これまでの研究はいずれもホルモンや遺伝子の解析に基づくものが多く、その神経機構の研究は1960-80年代にアメリカやヨーロッパ、日本で行われたが、いずれも脳の重要性が示されたところで終わり、その後、国内外ともにほとんど研究が進んでいない (Bowen et al. 1984; Hasegawa and Shimizu 1984)。光周性や休眠の調節機構は、脳の長期的な環境情報処理という点からも興味深い。

(2) 休眠調節の中でも光周期による調節機構には、古くから概日時計の関与が指摘されており、光周性機構は時間生物学分野においても関心がもたれてきた。近年、いくつかの昆虫種において光周性に概日時計遺伝子が関与することが示された (Ikeno et al. 2010)。また、概日時計ニューロンの光周性への関与が示された (Shiga and Numata 2009)。

(3) 私たちは、これまでにルリキンバエの休眠調節に必要な3つの脳ニューロン群、概日時計ニューロン群 (sLNv)、脳間部 (PI)、そして脳側方部 (PL) を明らかにした (図1)。しかしながら、これらニューロン群の機能的な結合様式や、休眠を回避する長日高温条件と休眠を誘導する短日低温条件でこれらのニューロン群にどのような違いがあるかについては明らかにされていない。

(4) 昆虫の休眠調節の神経機構を探る研究は、国内外の時間生物学、動物生理学分野においても他にほとんど例がない。その理由は、実験室で長年飼育されてきたキイロショウジョウバエでは光周期による休眠調節が明瞭に現れないことや、神経機構を探るには反応が長期的であり、取り組みにくいことなど考えられる。

2. 研究の目的

本研究では、ルリキンバエで蓄積された休眠調節に重要な脳領域の知見と、ノハラカオジロショウジョウバエのモデル動物との近縁性という利点を組み合わせることにより、バエの休眠調節に関わる脳ニューロンと分子を探す。異なる光周期、温度情報を一定期間受けると、休眠調節ニューロンにどのような変化が起こるのだろうか？本研究では特に遺伝子発現に注目し、休眠調節に重要な遺伝子の候補を挙げることを目的とした。遺伝

子解析の実験には、ルリキンバエを用い、ゲノム編集の試みにはキイロショウジョウバエと非常に近縁なノハラカオジロショウジョウバエを合わせて用いる。この種も成虫の光周期と温度によって休眠が調節される。また、ルリキンバエにおいて休眠調節に関わるニューロン群の機能的な結合様式を脳の微小破壊実験により明らかにする。これらの成果に基づいて、今後、その活動状態やそこへ入力する上流のニューロンへと解析を進め、脳が一定期間の光周期、温度情報をどのように統合し、内分泌系を切り替えるのか、長期的な環境情報の脳内処理機構の解明へと研究が発展すると期待される。

3. 研究の方法

(1) 昆虫

北海道帯広で採集したルリキンバエ (*Protophormia terraenovae*) と、NBRB 由来のノハラカオジロショウジョウバエ (*Drosophila triauralia*) 大沼系統を実験室で飼育し、用いた。

(2) トランスクリプトーム解析

明期 (L) 暗期 (D) 18:6h、25 (長日高温) で飼育した羽化後1、2日のルリキンバエ成虫と、LD 12:12h、20 (短日低温) で飼育した羽化後3、7日のルリキンバエ成虫のから脳間部、脳側方部、sLNvを含む脳領域を切り出し (図1) cDNA ライブラリを作製した。これら4種類のサンプルを区別し、次世代シーケンサーにより RNA-seq データを得た。

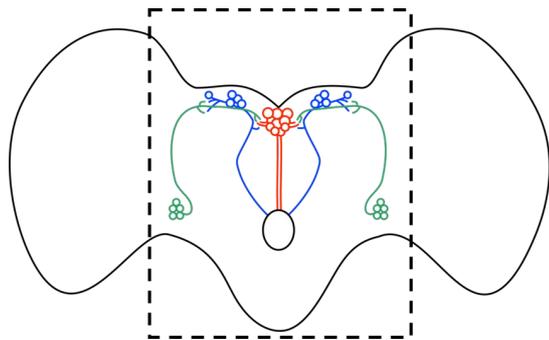


図1 Schematic illustration of a brain region examined for RNA sequencing. Total RNA was extracted from the region of a broken line rectangle including neurons in the pars intercerebralis (red), in the pars lateralis (blue) and small-ventral lateral neurons (green).

R vesion.3.1.2.のパッケージ TCC (Sun et al., 2013) を用いて、ルリキンバエ脳の RNA-seq データを解析した。ND と D のフラグメントカウントデータに対して iDEGES/DESeq 正規化 (Anders et al., 2010; Kadota et al., 2012; Sun et al., 2013)

を行った。ND、D ごとに正規化したカウントデータを使用して、ND と D 間で負の二項検定を行い、Benjamini-Hochberg 法で補正した。そして、有意差有りとして検出されたコンティグの中でも、偽の陽性率 (False Discovery Rate) が 0.001 より小さいものを休眠・非休眠間で発現が変動している遺伝子とした。

(3) リアルタイム PCR

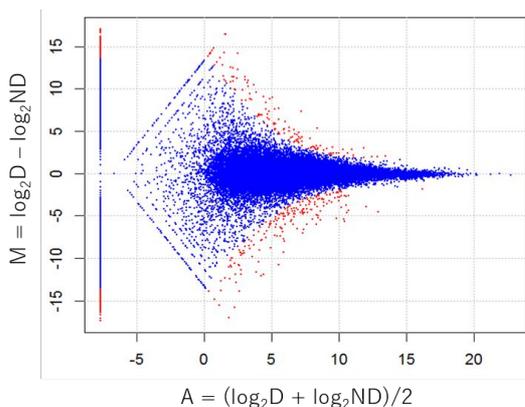


図4 Testing for differential expression between diapause and nondiapause conditions. Log(2) fold change expression versus log(2) abundance of iDEGES/DESeq normalized counts. Genes with higher expression under diapause conditions have positive fold change values. The red color marks genes detected as differentially expressed at false discovery rate at 0.001 when Benjamini-Hochberg multiple testing adjustment is used. (Anders and Huber 2010)

トランスクリプトームシーケンシング解析において、条件によって発現量に差が見られた配列を元に、遺伝子配列を選び出し、それらの発現量を長日高温、短日低温条件で比較した。

(4) in situ hybridization

リアルタイム PCR 解析により、長日高温、短日低温条件で発現量に差がある遺伝子配列を元にプローブを作製し、クリオスタット切片を用いて in situ hybridization を行った。

(5) 免疫組織化学

上記候補遺伝子の塩基配列からアミノ酸配列を予測し、その抗体を作製し免疫染色を行った。また、脳間部と sLNv のつながり、あるいは脳間部と脳側方部ニューロンとのつながりを調べるため、バックフィルと pigment-dispersing factor (PDF) の抗体を用いて二重染色を行い、共焦点レーザー顕微鏡を用いて接続の有無を観察した。

(6) 脳内神経線維の切断

長日高温条件で飼育したハエを羽化後 1 日に図 2 に示す 3 種類の箇所での神経切断を行っ

た。タングステンナイフで切り込みを入れた後、小さなサララップ片を挿入し、再生を防いだ。

切断後、長日高温条件で 5 日間、あるいは短日低温条件で 10 日間飼育し、卵巣の状態を調べ、切断の成功をバックフィルにより神経線維を染色することにより調べた。

4. 研究成果

(1) 休眠条件で発現が上昇する遺伝子

ルリキンバエの脳中央部-食道神経節に発現する遺伝子を次世代シーケンサーにより解析し、長日高温条件羽化後 1 日、2 日、短日低温条件羽化後 3 日、7 日の合計 4 サンプルからそれぞれ 1 億リードペアを得た。これらのアセンブリを行い 126、231 のコンティグ (トランスクリプト配列) を得た。これら配列データを用いて Gene Ontology (GO) 解析を行った。その結果、全コンティグの 21% に GO term が付加され (図 3)、そのうち、0.4% が短日・低温に反応して発現が有意に変化することがわかった (図 4)。

長日高温条件と短日低温条件で発現量に 1.5 倍以上の差が存在する遺伝子を 3 つ選出し、リアルタイム PCR により光周期および温度条件による差を調査した。その結果、1 つの遺伝子のみには差が確認された (図 5)、次に、温度を一定とし、長日と短日条件の間でこの遺伝子発現を調べたところ、短日条件を受容して 3 日目で発現量が有意に上昇することがわかった。

(2) 遺伝子発現部位の確認

In situ hybridization の方法を確認するため、最初に多くの昆虫で脳内に高発現することが知られているオクトパミン合成酵素のチラミン b ヒドロキシラーゼと、ドーパミン合成酵素であるドーパデカルボキシラーゼの遺伝子配列を用いて発現細胞を染色することができた。この方法を用いて、短日条件 3 日目で発現が上昇することが確認された

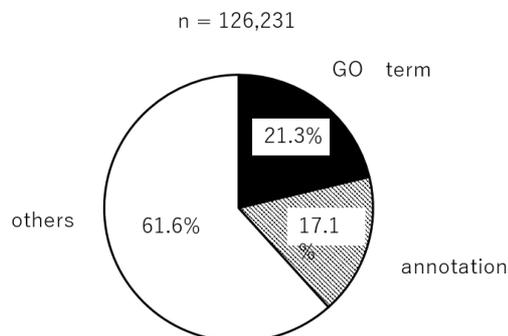


図3 Percentage of contigs with GO terms, annotation or others in *Protophormia terraenovae*

遺伝子（図5）の染色を行ったが、現在のところまだ染色像は得られていない。

また、図5の遺伝子がコードする一部アミノ酸配列に基づき抗体を作製した。これを用いてルリキンバエの脳切片を作製して免疫組織化学染色を行ったところ、食道下神経節に少数の細胞体が染色された。今後、これらのニューロンの免疫特異性、解剖学的位置を詳しく調べ、光周期条件により染色性に違いが見られるか調べる予定である。

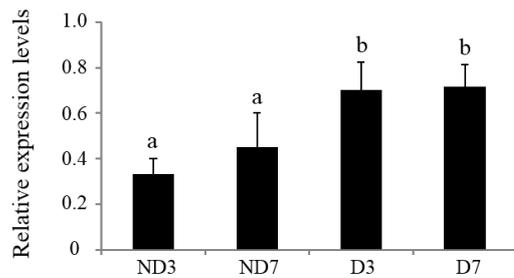


図5 Comparison of expression levels of comp34326 in the brain. mRNA expression was analyzed by quantitative real-time PCR. ND3 and ND7 show females on respective 3 and 7 days after eclosion under LD 18:6. D3 and D7 show females on respective 3 and 7 days after eclosion under LD 12:12. *elongation factor 2* was used as the control gene for normalization. The highest value was set at 1.0. Mean±SE (n = 6) is shown. Different letters above the columns indicate significant difference. (Tukey test, P<0.05)

(3) 脳間部ニューロンとPDF免疫陽性ニューロンの接続

まずルリキンバエの脳をシナプシン抗体を用いてニューロパイル構造を解析した。そして、バックフィルとPDF抗体を用いて脳ニューロンの二重染色を行った。PDF抗体は概日時計ニューロンと卵巣発達を抑制する脳側方部ニューロンの一部を標識する。その結果、前大脳の背側中央部で、PDF免疫陽性ニューロンから卵巣発達に重要な脳間部ニューロンへ神経接続があることがわかった（図6）。さらにPDFとシナプシンの二重免疫染色により、PDF免疫陽性ニューロンは脳

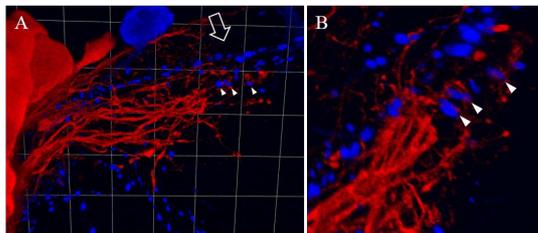


図6 3D reconstructions of PI neurons (red) and PDF-ir neurons (blue) in the superior medial protocerebrum. A, in frontal view; B, an enlarged image in dorsal view (an arrow direction in A). Arrowheads indicate morphological contacts between PI fibers and PDF-ir varicosities. A, one unit is 23.86 mm

間部、脳側方部ニューロンの付近でシナプス

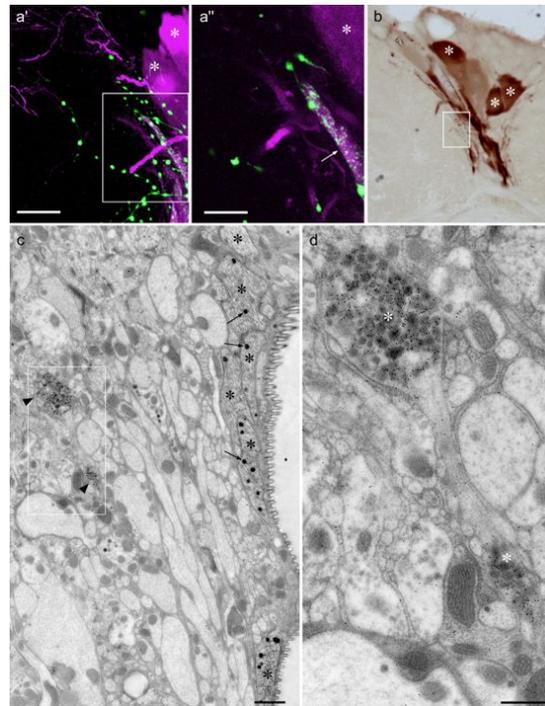


図7 Frontal view of double labeling of PI neurons by backfilling and PDF-ir neurons in the superior medial protocerebrum. **a** PDF-ir fine varicosities (green) are seen on thick fibers of PI neurons (asterisks, magenta). **b** Frontal view of backfilled PI neurons (asterisks) in a semithin plastic section. **c** PDF-ir fiber profiles found within the boxed area in **b**. PDF-ir varicose profiles (arrowheads), which contain DCVs labeled with immunogold particles, were found in the vicinity of biotin-labeled fiber profiles of PI neurons (asterisks). Bars 10 μm in **a**; 5 μm in **a'**; 50 μm in **b**; 1 μm in **c**; 0.5 μm in **c'**

出力していることがわかった。

電子顕微鏡観察により、ルリキンバエの脳間部ニューロンと神経ペプチドpigment-dispersing factor (PDF)ニューロンの神経線維形態を調べた。その結果、脳間部ニューロンの入力部は前大脳と食道孔近くに、出力部は食道孔近くに存在することが分かった。また、PDF免疫陽性のdense core vesicleを前大脳に豊富に持つことがわかり、PDFニューロンは前大脳でペプチドを傍分泌していると考えられた（図7）。

(4) PDF免疫陽性ニューロンの分枝形態の日長条件による比較

PDF免疫陽性ニューロンの前大脳部の投射がルリキンバエより単純であるノハラカオジロショウジョウバエを用いて実験した。PDF陽性ニューロンの分枝形態を長日条件、短日条件のそれぞれ昼と夜と比較した。その結果、PDFニューロンの分枝の広がり方に1日の時刻、または日長による変化は見られなかった。これより、概日時計ニューロンの分枝形態の変化により時刻情報や日長

情報が伝えられる可能性は低いと考える。

(5) 神経切断の休眠調節に対する影響

卵巣発達に必要な脳間部ニューロン、休眠誘導に必要な脳側方部ニューロンの神経繊維を切断し、これらニューロンの休眠調節様式を調べた。その結果、脳間部ニューロンへ入力する神経線維を切断しても(図2切断箇所3、図8PI-PL cut) 長日高温、短日低温条件ともに卵巣ステージに影響がみられなかったことから、脳間部ニューロンは光周期と温度による休眠調節には直接関与しないと考えられた。一方、posterior lateral tract (PLT) 切断実験(図2切断箇所2、図8PLT cut) から、脳側方部ニューロンは、短日低温条件においてPLTを通して卵巣発達を抑制する信号を出し、休眠を誘導すると考えられた。

(7) ゲノム編集

ルリキンバエにおいて概日時計遺伝子のノックアウト・ノックイン個体を作製すべく、本種におけるゲノム編集技術の確立を目指して実験を行った。CRISPR/Cas9 systemを用い、必要なプラスミドはAddgeneから入手した。二本鎖RNA導入による遺伝子発現抑制技術RNAi法の確立でよく用いられるIaccase2遺伝子を、対象の遺伝子とした。ルリキンバエから30分間隔で卵を採取し、CasヌクレアーゼmRNAとIaccase2遺伝子のガイ

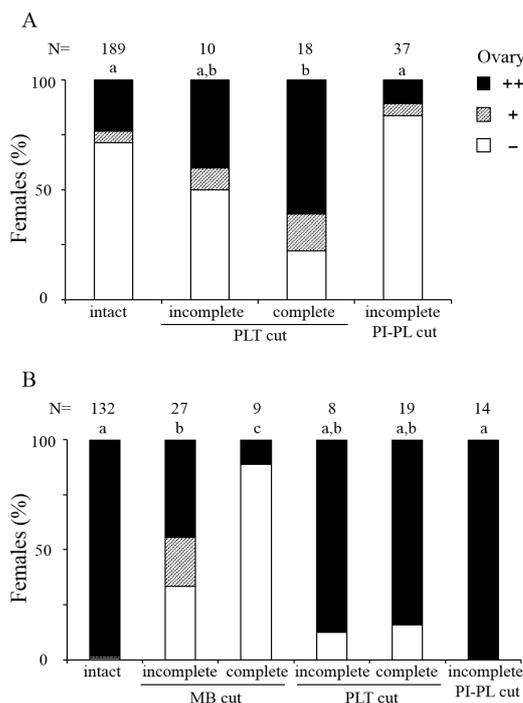


図8 Effects of each severance of neural fibers on ovarian development under (A) LD 12:12 at 20C (B) LD 18:6 at 25C. Different letters above the columns indicate significant differences in the proportions of previtellogenic females (Tukey-type multiple comparison test for proportions P<0.05)

ドRNAの混合液をガラスキャピラリーで注入した。297卵に注射を行い、20個体が生存した。19個体からDNAを抽出し、SURVEYORヌクレアーゼアッセイにより変異の検出を行った結果、19個体中6個体で変異が検出された。本方法で、ルリキンバエでもゲノム編集が可能であることがわかった。

また、ノハラカオジロショウジョウバエ *Drosophila triauraria* のゲノム編集を行うため、光周性が出る温度、光周期条件を確立した。現在 *white* 遺伝子、*period* 遺伝子のノックアウト系統の確立を進めつつある。

<引用文献>

- Anders *et al.*, 2010 Anders S. and Huber W. (2010) *Genome Biology* 11:R106.
 Bowen *et al.* (1984) *Proc Natl Acad Sci USA* 81:5881
 Hasegawa and Shimizu 1984 (1984) *J Insect Physiol* 33:58814
 Ikeno, T., Tanaka, S. I., Numata, H. & Goto, S. G. (2010) *BMC Biology* 8, 116.
 Kadota *et al.*, 2012 Kadota K., Nishiyama T. and Shimizu K. (2012) *Algorithms for Molecular Biology* 7:5.
 Shiga and Numata (2009) *Journal of Experimental Biology* 212: 867-877.
 Sun J., Nishiyama T., Shimizu K. and Kadota K. (2013) *BMC Bioinformatics* 14: 219.

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 7 件)

- Yasuyama, K., Hase, H., Shiga, S. (2015) *Neuroanatomy of the pars intercerebralis neurons in the blow fly *Protophormia terraenovae* with an interest in connections with pigment-dispersing factor-immunoreactive neurons.* *Cell Tissue Research*, 362, 33-43. 査読有 10.1007/s00441-015-2192-x
 Shimokawa, K., Numata, H., Shiga, S. (2014) *Pars intercerebralis promotes oviposition in the bean bug, *Riptortus pedestris* (Heteroptera: Alydidae).* *Applied Entomology and Zoology*, 49, 525-528. 査読有 10.1007/s13355-014-0281-z
 Ikeno, T., Numata, H., Goto, S. G., Shiga, S. (2014) *The involvement of the brain region containing pigment-dispersing factor-immunoreactive neurons in the photoperiodic response of the bean bug *Riptortus pedestris*.* *Journal of Experimental Biology*, 217, 453-462. 査読有 10.1242/jeb.091801.
 Tanaka, A., Kuga, Y., Tanaka, Y., Goto, S. G., Numata, H., Shiga, S. (2013)

Effects of ablation of the pars intercerebralis on ecdysteroid quantities and yolk protein expression in the blow fly, *Protophormia terraenovae*. *Physiological Entomology*, 38, 192-201. 査読有
10.1111/phen.12012
Matsumoto, K., Numata, H., Shiga, S. (2013) Role of the brain in photoperiodic regulation of juvenile hormone biosynthesis in the brown-winged green bug *Plautia stali*. *Journal of Insect Physiology*, 59(4):387-93 査読有
10.1016/j.jinsphys.2013.01.007
Shiga, S. (2013) Photoperiodic plasticity in circadian clock neurons in insects. *Frontiers in Invertebrate Physiology* 4, Article 69 査読有
10.3389/fphys.2013.00069
Shiga, S. (2012) Plausible neural circuitry for photoperiodism in the blow fly, *Protophormia terraenovae*. *Acta Biologica Hungarica* 63 (Supple.2), 36-47. 査読有 10.1556/ABiol.63.2012.

〔学会発表〕(計 10 件)

口開麻由・志賀向子 ルリキンバエの脳における短日低温に应答する遺伝子の探索 (公社)日本動物学会第86回大会 2015年9月17日 新潟県 新潟市 朱鷺メッセ:新潟コンベンションセンター

志賀向子 昆虫における光周性神経機構の解析 (公社)日本動物学会第85回大会 2014年9月11日 宮城県 仙台市 東北大学川内北キャンパス

Sakiko Shiga, Hiroyuki Hase Mode of inhibition of ovarian development by pars lateralis neurons responding to photoperiod in the blow fly *Protophormia terraenovae*. 2014 July 31st International Congress of Neuroethology/JSCPB, Hokkaido, Sapporo, Sapporo Convention Center

長谷紘明, 橋真一郎, 後藤慎介, 志賀向子 ルキンバエの休眠・非休眠条件の脳におけるトランスクリプトーム解析 (公社)日本動物学会第 84 回大会 2013 年 9 月 28 日 岡山県 岡山市 岡山大学津島キャンパス

泰山浩司, Mareike Selcho, 松村龍成, 志賀向子, Christian Wegener 羽化前に出現し羽化後に消失するショウジョウバエ後大脳 PDF ニューロンの構造解析 (公社)日本動物学会第 84 回大会 2013 年 9 月 28 日 岡山県 岡山市 岡山大学

津島キャンパス

志賀向子 虫たちの多様なリズム 野外生態から脳へ 生物リズム若手研究者の集い 2013 年 8 月 27 日 山梨県 南都留郡 四季の宿「ぼぶら」

Hiroaki Hase, Sakiko Shiga Effect of severance of neural fibers in the brain on reproductive diapause in the blow fly, *Protophormia terraenovae* JSCPB2013 2013 年 7 月 13 日 兵庫県 姫路市 イーグレひめじ

志賀向子 昆虫の休眠制御に関わる神経機構 日本応用動物昆虫学会第 57 回大会, 2013 年 3 月 27 日 神奈川県 藤沢市 日本大学生物資源科学部

久我義行・後藤慎介・沼田 英治・志賀向子 ルリキンバエの休眠調節における脳間部とインスリンシグナルの役割 (社)日本動物学会第 83 回大会, 2012 年 9 月 15 日 大阪府 豊中市 大阪大学豊中キャンパス

Hiroaki Hase, Sakiko Shiga Morphological Analysis of Neuronal Connections between the Pars Intercerebralis Neurons and Pigment-Dispersing Factor-Immunoreactive Neurons in the Blow Fly, *Protophormia terraenovae*. 日本比較生理生化学会第 34 回大会, 2012 年 7 月 7 日 神奈川県 葉山市 湘南国際村センター

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

泰山浩司 (YASUYAMA, Koji)
川崎医科大学・医学部・教授
研究者番号: 60148690

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