

平成 30 年 5 月 21 日現在

機関番号：13301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2017

課題番号：15K14895

研究課題名(和文) シングルセル内分泌学的手法による昆虫変態マスター細胞の検証

研究課題名(英文) Verification of insect metamorphosis master cells by single cell endocrinology approach

研究代表者

岩見 雅史 (Iwami, Masafumi)

金沢大学・自然システム学系・教授

研究者番号：40193768

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：昆虫の後胚発生において、脱皮は体サイズの成長に重要な現象である。この脱皮のタイミングは前胸腺で合成・分泌されるエクジソンによって制御され、さらにエクジソンの合成は脳のPTTH(前胸腺刺激ホルモン)細胞によって制御されている。本研究ではPTTH細胞の神経活動をカルシウムイメージングによって詳細に調べ、発生時における生理学的機能を明らかにした。またPTTH細胞の神経活動の人為的操作法やRNA-Seq解析法を確立した。さらに、PTTH遺伝子ノックアウト系統を作出し、発生におけるPTTHの重要性を解析した。

研究成果の概要(英文)：In the postembryonic development of insects, ecdysis is an important event for the animals to increase their body size. Timing of ecdysis is thus tightly controlled by the molting hormone ecdysone synthesized in the prothoracic glands, whose activity is regulated by prothoracicotrophic hormone (PTTH) neurons in the brain. In the present study, we investigated neural activity pattern of PTTH neurons during development by G-GaCMP6f-mediated Ca imaging and revealed their physiological function. We also established silkworm strains that can artificially manipulate level of neural activity by chemogenetic or optogenetic approaches. Furthermore, we established a PTTH-gene-knockout line and analyzed importance of PTTH on insect development.

研究分野：分子生物学・昆虫科学

キーワード：カイコガ 発生・分化 脱皮・変態 ホルモン 神経科学 遺伝子 神経分泌

1. 研究開始当初の背景

(1) 昆虫の後胚発生において脱皮や変態のタイミングはエクジソンによって決定される。一方、エクジソンの合成タイミングは、カイコガでは主に脳に2対4個存在する前胸腺刺激ホルモン (PTTH) 細胞により制御されている (図1)。加えて、PTTH 細胞の活動状態は、光・温度などの外的要因と栄養状態などの内的要因により制御がなされている。

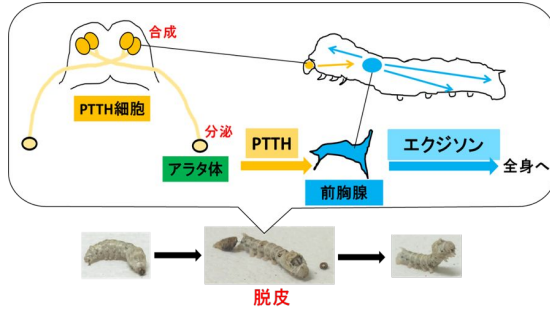


図1. PTTH とエクジソンの関係

研究代表者は、摂食期の幼虫にエクジソンを投与すると PTTH 細胞特異的にエクジソン受容体の発現が誘導されること、さらに下流遺伝子が PTTH 細胞特異的に誘導されることを見出し、PTTH 細胞が後胚発生時の脱皮タイミングを決定するマスター細胞であることを提唱してきた (FEBS J 273, 3861, 2006; Insect Biochem Mol Biol 38, 1001, 2008; Zool Sci 29, 333, 2012)。加えて、研究分担者も PTTH 細胞特異的に Ca インディケータータンパク質を発現する遺伝子組換えカイコガを作出し解析したところ、体内エクジソン濃度が低い摂食期には PTTH 細胞の Ca 変動は起こらないが、体内エクジソン濃度が上昇する脱皮期の前には自発的な Ca 変動が起こることを見出しており、この結果は、PTTH 細胞固有の生理学的性質が発生ステージ依存的に変化することを示していた。

2. 研究の目的

(1) 本研究では、PTTH 細胞の神経生理学的性質が発生ステージ依存的に変化する機構を、シングルセル・レベルで RNA-Seq 解析、神経生理学・遺伝学的アプローチを駆使して同定し解析することを目指したものである。特に PTTH 細胞が脱皮コントロールのマスター細胞であることを明確にし、その発生制御における機能的意義を明らかにするとともに、実態解明を目指すものである。

(2) 内的・外的な環境情報が PTTH 分泌細胞へと集約され、PTTH 細胞の神経活動状態へと還元されることで脱皮や変態のタイミングの制御が行われているという仮説を立て、PTTH 細胞の神経活動の詳細な解析及び人為的な操作による本仮説の検証も研究の目的とした。

3. 研究の方法

PTTH 細胞特異的にカルシウムセンサータンパク質である GCaMP6f を発現するカイコガ系統の作出し、Ca イメージングによる解析を行った。4 齢 0 日目から蛹 2 日目までの朝・昼・夕 (それぞれ ZT0-4, 4-8, 8-12) における神経活動の変化を調べた。また同時に体液中のエクジソン濃度を ELISA によって調べ、神経活動の変動と血中エクジソン濃度の関係を調べた。

血中エクジソンによる PTTH 細胞の神経活動への影響が考えられたので、餌にエクジソンを混ぜることで血中エクジソン濃度を操作し、それに伴って PTTH 細胞の神経活動がどのような影響を受けるか調べた。また幼若ホルモンによる影響も検討した。

PTTH 細胞での発生過程や生理状態による遺伝子発現変動を明らかにするため、少数細胞レベルでの RNA-Seq 法を確立した。(本実験に当たっては、科学研究費補助金 新学術領域研究「先進ゲノム支援」の支援を受けた。)

PTTH 機能を阻害するため、ゲノム編集技術 CRISPR/Cas9 を用いて、PTTH 遺伝子ノックアウト系統を作出し、発生における PTTH の役割を解析した。

PTTH 細胞の神経活動を人為的に操作できるデザイナー薬剤により活性化するデザイナー受容体 DREADD (活性化型: hM3D, 抑制型: hM4D) 発現系統とチャネルロドプシン (ReaChR) 発現系統を作出し、その有用性の検討を行った。

PTTH 細胞において発生時に重要な役割を担う遺伝子を同定する目的で、ショウジョウバエを用いて、PTTH 細胞特異的な RNAi ノックダウンによる遺伝子スクリーニング系統を構築した。この系統を用い、神経機能や発生に重要と考えられる遺伝子約 500 についてスクリーニングした。

4. 研究成果

PTTH 細胞特異的に GCaMP6f を発現するカイコガ系統を作出し、幼虫の semi *in vivo* および *ex vivo* 全脳プレパレーションで、PTTH 細胞およびアラタ体における Ca 動態を明らかにした (図2)。

本研究では、4 齢 0 日から蛹期までのすべての期間に渡って Ca 変動の詳細を明らかにした (図3)。全体の傾向として、朝は活動が活発で、夕には活動が減り、5 齢後半～蛹期に活発な発火が見られた。

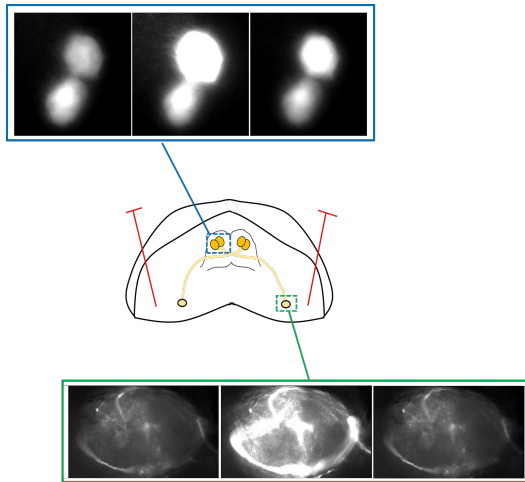


図2 . PTTH細胞(上)とアラタ体(下)におけるCa変動の実データ

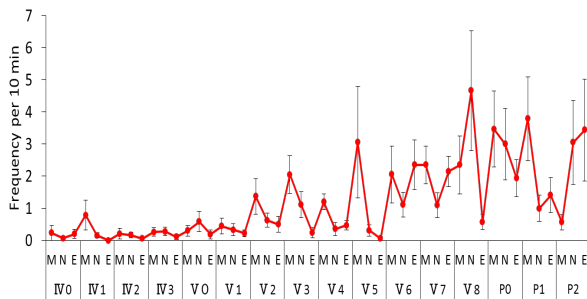


図3 . PTTH細胞のCa変動率(変動回数/10分間の観測)

この結果は、血中 PTTH 濃度を測った先行研究の結果 (Mizoguchi *et al*, *Insect Biochem Mol Biol* 15, 349, 2001) と類似しており、Ca 変動が PTTH 細胞の分泌活動の指標として適切であることを示している。また本結果は、PTTH 細胞の活動は、5 齢 2 日目から 5 日目までは明確な概日制御があるが、5 齢 6 日目以降は概日制御が消失し常時活発な状態となることを示している。

前述の結果より、PTTH 細胞の活動状態は発生ステージで大きく性質が変わることが明らかになった。昆虫の発生時における生理状態は、脱皮に関わるホルモンによって制御されることが多い。そこで本研究では、エクジソン及び幼若ホルモンによる PTTH 細胞の活動状態への影響を調べた。

その結果、5 齢初期に血中エクジソン濃度を増加させると PTTH 細胞の活動は抑制されるが、5 齢後期では逆に促進されるという新たな知見を見出すことができた。この結果は、血中エクジソン濃度を低く保つ必要がある 5 齢初期に PTTH 細胞の活動は血中エクジソンによってネガティブに制御されていること、逆に血中エクジソン濃度を一気に増加させる必要がある 5 齢後期ではポジティブに制御されていることを示唆している (図 4)。

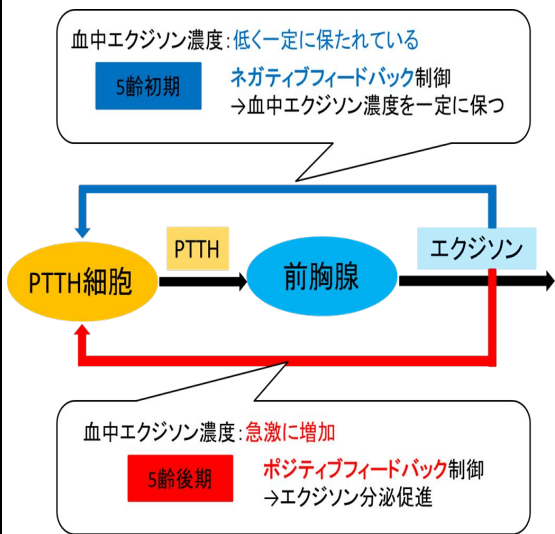


図4 . 本研究によって提案される、血中エクジソンによる PTTH 細胞の神経活動制御機構

一方、幼若ホルモン処理では PTTH 細胞の活動状態に有意な影響は認められなかった。先行研究では、幼若ホルモンは PTTH による血中エクジソン濃度増加にネガティブに作用することが報告されていた。このことから幼若ホルモンは前胸腺に作用しエクジソン合成を阻害するが、PTTH 細胞からの PTTH 分泌を抑制するわけではないことを示唆している。

前述のように、PTTH 細胞は体内の状態 (血中ホルモンや栄養状態) 及び体外からの情報によって自身の神経活動状態を変動させる。この分子基盤を明らかにする目的で、PTTH 細胞のシングルセル RNA-Seq を試みた。

まずシングルセル RNA-Seq のサンプル調整のため、幼虫の脳から PTTH 細胞を単離する条件を検討した。デイスパーゼ及びコラゲナーゼの濃度・時間を検討した結果、再現性良く PTTH 細胞を単離出来る条件を決定した。

本研究の 2 年度目に「先進ゲノム支援」による支援を受けることができたため、PTTH 細胞のシングルセル RNA-Seq 解析を試みた。この際、単一細胞では RNA 量が十分でなかったため、PTTH 細胞 30~50 個で 1 サンプルとした少数細胞からの RNA-Seq に変更して行った。しかし、技術的な困難さから、十分な質・量での結果を得るには至らなかった。

PTTH の発生における必要性を遺伝学的に明らかにすることを目的に、CRISPR/Cas9 を用いて PTTH ノックアウトシステムを作出し、解析を進めた。PTTH のノックアウトシステムは 2 齢で発生が停止するものと、4 齢で発生が停止するものが認められた。また、成虫にまで発生を続けるノックアウト個体は認められなかった。

しかし、これらの解析を進めている間に、他の研究グループから TALEN を用いた PTTH

ノックアウトの解析の論文が出版されたため、前述の結果を出版することができなくなった。そこで、今後は PTTH ノックアウトのバックグラウンドで Ca イメージングを行うことで、さらなる解析データを積み重ねて出版に繋がりたいと考えている。

PTTH 細胞の活動を人為的に操作できる DREADD (活性化型:hM3D, 抑制型:hM4D) 発現系統とチャンネルロドプシン (ReaChR) 発現系統を作出した。5 齢ワンドリング前日と蛹 2 日目に、DREADD もしくはチャンネルロドプシンを用いて神経活動を制御し、血中エクジソン濃度に変化が起こるかどうかを検討した。その結果、5 齢ワンドリング前日に、PTTH 細胞の神経活動を促進すると血中エクジソン濃度が上昇し、抑制すると下がること、蛹 2 日目に神経活動を促進すると、血中エクジソン濃度が下がるが、抑制すると上昇すること、を見出した。これは PTTH 細胞の神経活動を操作することで血中エクジソン濃度を人為的に操作できる可能性を示している。

ショウジョウバエを用いた RNAi スクリーニング系を構築し、PTTH 細胞で重要な機能を担う遺伝子の網羅的スクリーニングを行った。労力的な観点より全遺伝子を対象とすることはできないため、神経系で重要なシグナル伝達因子や発生過程で重要な役割を担う遺伝子、そしてマイクロ RNA にも着目し、約 500 遺伝子についてスクリーニングを行った。その結果、PTTH 細胞特異的にエクジソンシグナルを遮断すると蛹期に致死になることを見出した。また、同様の表現型が特定のシグナル経路の遮断でも得られることを見出した。

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 1 件)

Hara C, Morishita K, Takayanagi-Kiya S, Mikami A, Uchino K, Sakurai T, Kanzaki R, Sezutsu H, Iwami M, Kiya T. Refinement of ectopic protein expression through the GAL4/UAS system in *Bombyx mori*: application to behavioral and developmental studies.

Scientific Reports 7, 11795, 2017.

doi: 10.1038/s41598-017-12102-2

〔学会発表〕(計 1 件)

伊藤瑤子, 岩見雅史, 木矢剛智. PTTH 細胞の神経活動がカイコガ幼虫の脱皮タイミングを制御する機構の解析. 日本動物学会第 88 回大会(富山市), 2017.

〔その他〕

ホームページ等

http://ridb.kanazawa-u.ac.jp/public/detail.php?id=3156&page=1&org2_cd=342000

6. 研究組織

(1) 研究代表者

岩見 雅史 (IWAMI, Masafumi)

金沢大学・自然システム学系・教授

研究者番号: 40193768

(2) 研究分担者

木矢 剛智 (IWAMI, Masafumi)

金沢大学・自然システム学系・准教授

研究者番号: 90532309