

令和元年6月25日現在

機関番号：82636

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2017～2018

課題番号：17K19371

研究課題名（和文）休眠の神経制御

研究課題名（英文）Neural control of diapause

研究代表者

山元 大輔（Yamamoto, Daisuke）

国立研究開発法人情報通信研究機構・未来ICT研究所・上席研究員

研究者番号：50318812

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）：代表的な実験室系統、w¹¹¹⁸を用い、低温・短日・飢餓を組み合わせた条件に羽化後1週間、成虫を置くことにより、雌の卵巣休眠（卵黄蓄積が起こらない状態）を誘導した。即ち、14段階に区分される卵発生のstage-7を超えて発生の進む卵は、全卵巣に一つもない状態となる。この計測法を用いて、休眠を引き起こす細胞間および細胞内の情報伝達機構を解明した。脳のインスリン産生細胞（IPC）の活動レベルが低いほど、卵巣休眠率は高い傾向にあった。さらに、主要な内分泌腺の一つ、アラタ体における幼若ホルモン合成を遺伝的に操作する実験の結果から、幼若ホルモンの合成活性が高いほど卵巣休眠率が低いことも明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

休眠は、「もう一つの生命」とでも呼ぶべき異質の生存状態であり、劇的なストレス耐性を生命体に賦与する。その機構の解明は、従来、我々が手にしたことの無い異次元の生命操作技術を提供するかもしれない。今回の成果は、脳のインスリン産生細胞がその制御の中心にあることを示しており、これらの細胞の隣細胞との機能的類似性を考えると、ヒトでも相同の機能がある可能性も否定できず、新たな環境適応への道を模索する上で、斬新な視点を提供しうる。

研究成果の概要（英文）：We found that *Drosophila melanogaster* females enter reproductive dormancy when they are kept for a week immediately after eclosion under stressful conditions, i.e., the combination of short-day length, low temperature and starvation. Here, reproductive dormancy is defined as the arrested oogenesis with no yolk accumulation in the oocyte. We showed that brain insulin-producing cells (IPCs) play a key role in controlling the initiation and termination of dormancy; Higher activity levels in IPCs were correlated with lower dormancy rates, whereas lower activity levels were correlated with higher dormancy rates. IPC activities appear to stimulate juvenile hormone synthesis in the corpora allata, thereby promoting yolk accumulation in the oocyte.

研究分野：生理学

キーワード：インスリンシグナリング

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

申請者は、これまで30年近くを費やして、キイロショウジョウバエの求愛行動を生み出す神経機構の解明を進めてきた。その動機は、ある動物集団の中に行動的多型が生ずることによって同所的種分化が起こるのではないかという自身の仮説を実験的に検証したいと思ったことにある。そのためには、行動を規定する遺伝子の特定から始めなければならなかった。一方、休眠は「行動」ではないが、集団内に異なる形で環境適応を遂げた(遂げようとする)集団を生み出すことで、これもまた同所的種分化を引き起こし得るのではないかと考えるのである。休眠は実際、「もう一つの生命」とでも呼ぶべき異質の生存状態であり、劇的なストレス耐性を生命体に賦与する。その機構の解明は、従来、我々が手にしたことの無い異次元の生命操作技術を提供するかもしれない。そうした考えから本研究構想を提案した。

2. 研究の目的

休眠は環境ストレスを回避して個体と種の存続を支える強力な生存戦略として、主に昆虫で発達を遂げた。これまで休眠研究の中心となってきた昆虫では遺伝学的解析が困難であり、分子レベルでの実験的操作が思うようにならなかった。一方、昆虫には遺伝学の優れたモデル生物であるキイロショウジョウバエがいる。ところが、キイロショウジョウバエは休眠をしないというのが常識的理解となっていた。そこで、試行錯誤を繰り返し、実験室系統に高率且つ安定に休眠を誘導する条件を見出すに至った。こうして、休眠機構の解析にキイロショウジョウバエを用いる基盤が確立できたことから、本申請の休眠研究を着想した。その目的は、休眠の開始と終結を司令する脳の機構と、その司令を基に代謝を全身性に抗ストレス型に切り換える内分泌機構の全容解明である。

3. 研究の方法

(1) JH 合成律速酵素 HMGR に着目し、その遺伝子の発現を HMGR-Gal4 を用いてモニターしつつ、insulin シグナル下流因子のアラタ体での操作を行って、休眠とこの遺伝子の転写との関連性を把握する。

(2) Insulin を合成している脳間部の神経分泌細胞、IPC に神経活動履歴モニターの NFAT システムを適用し、その活動性の差を休眠条件と非休眠条件で比較する。

(3) IPC の休眠制御機能が、経シナプス、液性に入力してくる温度・日長・栄養条件情報に依拠するばかりでなく、当該細胞に発現している温度・光受容体・イオンチャンネルに媒介される可能性を想定し、IPC でそれらの遺伝子をノックダウンした際の休眠特性を解析する。

(4) IPC にて細胞自律的に機能する温度・光受容体・チャンネルの特性を解明するためパッチクランプ法を適用し、温度・光刺激に対する IPC の膜電位応答、IPC に栄養情報を入力するホルモン応答を記録する。

(5) 以上の一連の実験により、休眠の誘導・離脱を支配する温度を中心とした感覚情報が、内分泌情報へと転換されて個体の生理・生化学的状态を切り替える仕組みの大枠を同定単一ニューロンのレベルから解明する。

4. 研究成果

キイロショウジョウバエの Windsor 系統では、インスリンシグナル伝達系の PI3K の機能低下により休眠しやすい特性がもたらされることが示唆されていた。我々は代表的な実験室系統、*w¹¹¹⁸* を用い、低温・短日・飢餓を組み合わせた条件に羽化後1週間、成虫を置くことにより、雌の卵巣休眠(卵黄蓄積が起こらない状態)を誘導しうることを見出した。すなわち、14段階に区分される卵発生の stage-7 を超えて発生の進む卵は、全卵巣に一つもない状態となる。この計測法を用いて、休眠を引き起こす細胞間および細胞内の情報伝達機構を解明した。実験によれば、IPC の活動レベルが低いほど、卵巣休眠率は高い傾向にあった。さらに、主要な内分泌腺の一つ、アラタ体における幼若ホルモン合成を遺伝的に操作する実験の結果から、幼若ホルモンの合成活性が高いほど卵巣休眠率が低いことも明らかになった。実際、アラタ体に於いてインスリン下流要素を操作すると、その機能低下によって卵巣休眠率は上昇した。これらのことから、脳の IPC はアラタ体に作用し、幼若ホルモン合成を調節することを介して、卵巣の発達を制御すると考えられた。幼若ホルモンが直接卵巣に作用するのか、他の臓器、例えば脂肪体を介して卵巣の成熟を制御するのかについては、今後の課題として残された。続いて休眠制御の中心的役割を果たす IPC に着目し、休眠誘導条件がこれらの細胞にどのように作用するかを検討した。生きた個体の脳を露出させ、露出部分のみを生理的食塩水によって灌流しつつ、whole cell patch-clamp にて電気活動を記録する方法を確立した。IPC には Dilp3-GAL4 によって駆動された GFP を発現させ、その蛍光の所在をランドマークとして電極を配置した。これらのニューロンは-50mV 程度の静止膜電位を持ち、外向き通電刺激によってオーバーシュートする活動電位を発生させた。休眠しない条件の長日、高温、摂食条件にて飼育した被験個体を用い、灌流液の温度を 25°C から 10°C に急冷すると、IPC は静止膜電位をゆっくりと脱分極させ、それに重畳して活動電位を発生させた。これに対し、成虫羽化後に1週間にわたって卵巣休眠誘導条件の低温、短日、飢餓に置いた個体では、同様の急性的寒冷刺激を与えても弱く脱分極するのみであり、さらに活動電位の発生もほとんど認められなかった。このことから、脳の IPC そのものが環境条件にตอบสนองしてその生理的特性を変化させ、インスリンやその他の物質の分泌活動を変化させると考えられた。それを通じて、休眠の誘導や離脱が起こる可能性があると考えられる。一方 IPC は、光照射に対しては僅かな過分極応答を示し、この光への応答は外液中に加えた tetrodotoxin によって消失することから、シナプス性に発生しているものと思われた。

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文](計 15 件)

1. Nojima, T., Chauvel, I. B., Houot, B., Bousquet, F., Farine, P., Everaerts, C., Yamamoto, D. and *Ferveur, J.F. (2019) The *desaturase1* gene affects reproduction before, during and after copulation in *Drosophila*. *J. Neurogenet.* doi: 10.1080/01677063.2018.1559843. [Epub ahead of print] PMID:30724684 査読有
2. *Sato, K., Ito, H., Yokoyama, A., Toba, G. and *Yamamoto, D. (2019) Partial proteasomal degradation of Lola triggers the male-to-female switch of a dimorphic courtship circuit. *Nature Commun.* 2019 Jan 11;10(1):166. doi: 10.1038/s41467-018-08146-6. PMID:30635583. 査読有
3. *Kimura, K.-i., Urushizaki, A., Sato, C. and Yamamoto, D. (2018) A novel sex difference in *Drosophila* contact chemosensory neurons unveiled using single cell labeling. *J. Neurogenet.* 2018 Nov 20:1-9. doi: 10.1080/01677063.2018.1531858. [Epub ahead of print] PMID:30457022. 査読有
4. Miwa, Y., Koganezawa, M. and *Yamamoto, D. (2018) Antennae sense heat stress to inhibit mating and promote escaping in *Drosophila* females. *J. Neurogenet.* 32, 353-363. 査読有
5. Ojima, N., Hara, Y., Ito, H. and *Yamamoto, D. (2018) Genetic dissection of stress-induced reproductive arrest in *Drosophila melanogaster* females. *PLoS Genet.* 14, e1007424. 査読有
6. Ote, M. and *Yamamoto, D. (2018) The *Wolbachia* protein TomO interacts with a host RNA to induce polarization defects in *Drosophila* oocytes. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* 2018 Sep;99(1):e21475. doi: 10.1002/arch.21475. Epub 2018 May 30. PMID:29851149. 査読有
7. Ote, M. and *Yamamoto, D. (2018) Enhancing Nanos expression via the bacterial TomO protein is a conserved strategy used by the symbiont *Wolbachia* to fuel germ stem cell maintenance in infected *Drosophila* females. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* 2018 Apr 27:e21471. doi: 10.1002/arch.21471. [Epub ahead of print] PMID:29701280. 査読有
8. Zhang, B., Sato, K. and *Yamamoto, D. (2018) Ecdysone signaling regulates specification of neurons with a male-specific neurite in *Drosophila*. *Biol. Open* 7, bio029744. doi:10.1242/bio.029744. 査読有
9. *Takahashi, Y., Tanaka, R., Yamamoto, D., Suzuki, N. and Kawata, M. (2018) Balanced genetic diversity improves population fitness. *Proc. R. Soc. B* 285, 20172045. 査読有
10. Yanagisawa, H., Ishii, T., Endo, K., Kawakami, E., Nagao, K., Miyashita, T., Akiyama, K., Watabe, K., Komatsu, M., Yamamoto, D. and *Eto, Y. (2017) L-leucine and SPNS1 coordinately ameliorate dysfunction of autophagy in mouse and human Niemann-Pick type C disease. *Sci. Rep.* 7, 15944. 査読有
11. Chowdhury, Z. S., Sato, K. and *Yamamoto, D. (2017) The core-promoter factor T RF2 mediates a Fruitless action to masculinize neurobehavioral traits in *Drosophila*. *Nature Commun.* 8, 1480. 査読有
12. Tanaka, R., Highchi, T., Kohatsu, S., Sato, K. and *Yamamoto, D. (2017) Optogenetic activation of the *fruitless*-labeled circuitry in *Drosophila subobscura* males induces mating motor acts. *J. Neurosci.* 37, 11662-11674. 査読有
13. Hamada-Kawaguchi, N. and *Yamamoto, D. (2017) Ovarian polarity and cell shape determination by Btk29A in *Drosophila*. *Genesis* doi: 10.1002/dvg.23042. Epub 2017 Jul 19. PMID:28639397. 査読有
14. *Yamamoto, D. and Kohatsu, S. (2017) What does the fruitless gene tell us about nature vs. nurture in the sex life of *Drosophila*? *Fly (Austin)* 11, 139-147. 査読有
15. Higuchi, T., Kohatsu, S. and *Yamamoto, D. (2017) Quantitative analysis of visually induced courtship elements in *Drosophila subobscura*. *J. Neurogenet.* 31, 49-57. 査読有

*: corresponding author

[学会発表](計 20 件)

1. Yamamoto, D. Studying a mini-brain of insects for the understanding of mechanisms underlying perceptual decision-making. MOST-NICT Joint Workshop on AI for ICT, GIS NTU Convention Center, Taipei, Taiwan(国際学会), 2018.

2. 三輪祐輔、小金澤雅之、山元大輔. 環境ストレスによって雌の性的受容性が変化する機構. 次世代脳プロジェクト第3回シンポジウム、東京, 2018.
 3. Hara, Y., Ojima, N., Ito, H. and Yamamoto, D. Acclimatization to cold temperature of brain insulin neurons drives reproductive dormancy 第13回日本ショウジョウバエ研究会、京都, 2018.
 4. Rindner, D., Hara, Y. and Yamamoto, D. Experience-dependent nonsynaptic plasticity in *Drosophila* Central Brain Neurons. 第41回日本神経科学大会、神戸, 2018.
- 他 16 件.

〔図書〕(計 0 件)

〔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://www2.nict.go.jp/frontier/evoneuro/index.html>

6 . 研究組織

(1)研究分担者 無

(2)研究協力者 無

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。