

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 2 年 10 月 7 日現在

機関番号：37104

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K07419

研究課題名(和文) 栄養応答性ホルモンCCha2による環境に応じた神経回路形成の解析

研究課題名(英文) Analysis of the neural reorganization by a sugar-responsive hormone, CCha2.

研究代表者

佐野 浩子 (SANO, Hiroko)

久留米大学・付置研究所・講師

研究者番号：90506908

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：栄養状態に応じて神経回路の組みかえが起こる仕組みを明らかにするために、ショウジョウバエにおいて、糖の摂取がペプチドホルモンCCha2を介して求愛行動を支配するFruitless神経回路形成を制御する仕組みを解析した。その結果、糖(グルコース)の摂取は、グルコースをソルビトールを経てフルクトースに変換するポリオール経路と呼ばれる代謝経路を介してCCha2の発現を活性化することが明らかになった。CCha2はインスリンの分泌を促進し、インスリンがFruitless神経回路に作用することにより、求愛行動が活性化することが明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

環境に応じた神経回路の組みかえは行動の変化に直結することから、そのメカニズムの解明は動物が環境に適応するための仕組みや、環境要因と遺伝要因の組み合わせによる個体差すなわち個性がどのように生じるのかを理解することに役立つと考えられる。また、環境が関与すると考えられている精神疾患の発症メカニズムの解明にも道を開く可能性がある。

研究成果の概要(英文)：In order to clarify the mechanisms of neural reorganization by nutritional conditions, we analyzed how a sugar-responsive hormone, CCha2, regulates the formation of Fruitless neurons that are required for courtship behavior of adult male flies. We have shown that glucose ingestion is transmitted to a transcription factor, Mondo, through the polyol pathway resulting in the expression of CCha2. CCha2 then promotes insulin secretion, which in turn activates Fruitless neurons. We have further shown that appropriate level of insulin signaling is required for proper function of Fruitless neurons.

研究分野：発生遺伝学、代謝内分泌学

キーワード：ホルモン 栄養応答 遺伝子発現 糖代謝 求愛行動 神経回路 インスリン

1. 研究開始当初の背景

脳は遺伝と環境の影響を受けて形成される。遺伝的に同一な一卵性双生児の個性が異なることは、環境が脳に不可逆的な変化をもたらすことを示している。しかし、環境情報がどのようにして脳神経回路形成の場に伝えられるのかは、ほとんど分かっていない。少数の研究から、ホルモンの関与が示唆されている。例えば、ストレスホルモンであるコルチゾールは、マウス海馬でのシナプス形成を阻害する。また、発達期の脳のステロイドホルモンへの暴露は、マウスの性行動や攻撃行動を左右する。しかし、発達期の神経回路に作用するホルモンは極めて少数しか同定されていないことに加え、1~1000億個の細胞から成る哺乳類の脳に対するホルモンの作用を細胞レベルで解明することは技術的な困難を伴う。これに対し、ショウジョウバエの脳は約10万個の細胞から成り、様々な行動を遥かに単純な神経回路で制御している。例えば、雄が交尾前に行う求愛行動は約2000個の細胞から成る神経回路で制御されており、優れた研究モデルを提供する。この神経回路は、幼虫~蛹期にかけて *Fruitless* (*Fru*) という雄特異的な転写因子によって形成されることから、*Fru* 神経回路と呼ばれている。*Fru* 神経回路の形成に対するホルモンの影響を解析すれば、環境によって脳が影響を受ける仕組みを分子・細胞レベルで明らかにできると考えられる。*Fru* 神経回路に作用するホルモンは不明であったが、申請者らは、糖感受性ペプチドホルモン *CCHa2* が *Fru* 神経回路に作用することを示唆する予備的結果を得た。

CCHa2 は、13アミノ酸から成るペプチドホルモンである。*CCHa2* は糖の摂取に応じて幼虫の脂肪体や腸から分泌され、*CCHa2* 受容体 (*CCHa2-R*) を介して脳のインスリン産生細胞を直接活性化してインスリン様ペプチドの分泌を促すことにより、栄養摂取と成長のバランスを調節している (Sano *et al.*, 2015a)。申請者らは、*CCHa2* が成長の制御に加え、成虫雄の求愛行動に必要であることを示す予備の結果を得た。これは、*CCHa2* が糖摂取に応じて *Fru* 神経回路形成を制御する可能性を示唆している。

2. 研究の目的

本研究は、*CCHa2* による求愛行動制御機構を明らかにすることを目的とする。予備的な結果から、*CCHa2* は糖の摂取に応じて求愛行動を制御し、それは求愛行動で中心的な役割を担う *Fru* 神経回路の形成を介する可能性が高いことが示唆された。そこで、糖→*CCHa2*→*Fru* 神経回路→求愛行動という一連の制御カスケードを分子・細胞レベルで明らかにするために、糖摂取依存的な *CCHa2* 合成機構および *CCHa2* による *Fru* 神経回路形成機構に焦点を当てた解析を行う。

3. 研究の方法

CCHa2 が糖の摂取依存的に合成されるメカニズムを明らかにするために、*CCHa2* の発現に必要な転写因子を同定し、同定した転写因子を活性化する代謝経路を同定した。いずれも RNAi もしくは CRISPR/Cas9 システムを用いて候補となる遺伝子を阻害し、糖依存的な *CCHa2* の発現が阻害されるかどうかを調べた。

CCHa2 による *Fru* 神経回路形成機構については、以下の手順で解析を行った。まず、*CCHa2* が機能する発生ステージを特定するために、*CCHa2-R* の時期特異的な阻害システムの構築を試みた。次に、*CCHa2* が作用する脳神経細胞を同定するために、*Fru* 神経回路における *CCHa2-R* およびインスリン受容体 (*InR*) の発現を調べ、それらの細胞の神経活動を破傷風毒素を用いて阻害し、求愛行動に異常が見られるかどうか調べた。さらに、*Fru* 神経細胞において *CCHa2-R* および *InR* が必要であるかどうかを調べるために、これらの遺伝子を *Fru* 神経細胞でノックダウンまたは活性化し、求愛行動に対する影響を解析した。

4. 研究成果

(1) 糖の摂取依存的な *CCHa2* 合成機構

① *CCHa2* の発現に必要な転写因子の同定

Mondo/ChREBP は進化的に保存された糖応答性転写因子であり、ショウジョウバエでは *Mondo* という単一の遺伝子にコードされている。ショウジョウバエ *Mondo* は哺乳類 *Mondo/ChREBP* と同様に糖によって活性化されて代謝関連遺伝子群のマスター制御因子として機能することが報告された。そこで、*Mondo* を RNAi を用いてノックダウンし、グルコース依存的な *CCHa2* の発現を調べた結果、ノックダウン個体ではグルコース依存的な *CCHa2* の発現がほとんど起こらなくなった。このことから、*CCHa2* の発現には *Mondo* が必要であることが明らかになった。

② *CCHa2* の活性化に必要な代謝経路の同定

申請者はこれまでに、*CCHa2* の発現はグルコース、ソルビトール、フルクトースの摂食により誘導されることを明らかにしている (Sano, 2015b)。ショウジョウバエにおいてソルビトールを代謝するのはポリオール経路のみであることから、*CCHa2* の発現にはポリオール経路が必要であると予想された。そこで、ポリオール経路を触媒するアルドース還元酵素 (*Aldose reductase: AR*) およびソルビトール脱水素酵素 (*Sorbitol dehydrogenase: Sodh*) 遺伝子の変異体を CRISPR/Cas9 システムを用いて作製した。変異体をグルコースを含む飼料で飼育し、幼虫における *CCHa2* の発現を調べたところ、野生型と比較して有為な現象が見られた。これらの変異体ではグルコースの主要な代謝経路である解糖系やペントースリン酸経路は正常であることから、

ポリオール経路は CCHa2 の発現において重要な役割を持つことが明らかになった。

③ Mondo の活性化に必要な代謝経路の同定

CCHa2 の発現にポリオール経路が必要であることが明らかになったことから、ポリオール経路由来の代謝産物は Mondo を活性化すると予想した。哺乳類 Mondo/ChREBP はグルコース存在下で核へ移行することが知られている。そこで、ポリオール経路代謝産物による Mondo の核移行を調べた。内在性 Mondo の細胞内局在を可視化するために、CRISPR/Cas9 システムを用いて、ゲノム中の Mondo 遺伝子翻訳領域の C 末端に黄色蛍光タンパク質 Venus をノックインした。この系統由来の幼虫脂肪体を培養し、ポリオール経路代謝産物を培地中に投与した。その結果、グルコース、ソルビトール、フルクトースのいずれも Mondo の核移行を促進した。②で作製したポリオール経路の変異体を用いて同様な実験を行ったところ、AR 変異体および Sodh 変異体のどちらにおいてもグルコースによる Mondo の核移行は阻害され、Mondo の核移行は下流の代謝産物の投与によりレスキューされた。これらの結果から、Mondo による CCHa2 の発現にはポリオール経路が必要であり、ポリオール経路は Mondo の核移行を制御することが明らかになった。

④ Mondo を介した糖依存的な遺伝子発現制御におけるポリオール経路の役割

ポリオール経路は CCHa2 だけでなく Mondo 標的遺伝子の遺伝子発現を制御する可能性が考えられた。そこで、絶食幼虫に糖を摂取させ、先行研究によって報告された Mondo 標的遺伝子の発現変動を RNA-seq を用いて解析した。ショウジョウバエにおいて、グルコースは解糖系、ペントースリン酸経路、ポリオール経路の 3 つの経路で代謝される。グルコースの摂取はこれらの 3 経路すべての活性を亢進し、ソルビトールの摂取はポリオール経路の活性のみを亢進させると考えられる。グルコース摂取とソルビトール摂取による Mondo 標的遺伝子の発現変動を比較したところ、高い相関が見られたことから、ポリオール経路は単独で 3 経路が活性化した場合と同様の遺伝子発現変動を引き起こすことが明らかになった。ポリオール経路によって制御される遺伝子には代謝酵素関連遺伝子が多く含まれることから、ポリオール経路は Mondo を介して、糖摂取に応じた代謝モードの切り替えに関与することが明らかになった。

以上の解析から、糖の摂取はおもにポリオール経路によって Mondo 転写因子に伝達され、CCHa2 の発現を引き起こすことが明らかになった。また、ポリオール経路は CCHa2 以外の Mondo 標的遺伝子の多くを制御しており、糖摂取に応じて代謝を最適化することが示唆された。

(2) CCHa2 による Fru 神経回路形成機構

① CCHa2 が機能する発生ステージの特定

ショウジョウバエの脳神経回路は幼虫から蛹期にかけて形成される。CCHa2 が Fru 神経回路の形成に必要であれば、CCHa2-R を幼虫〜蛹期で特異的に阻害した場合に求愛行動が低下するはずである。そこで、CCHa2-R を時期特異的に阻害するためのシステムの構築を試みた。まず、CCHa2-R のエクソンを挟むように Flippase の標的配列 (FRT) をゲノム中に挿入した。この系統とヒートショックプロモーターに Flippase を連結したコンストラクトを導入した系統 (hs-FLP) を交配し、得られた個体にヒートショックをかけることにより、CCHa2-R を欠損させることができるかどうか調べた。その結果、ヒートショックにより CCHa2-R の欠損が起こることが明らかになったが、ヒートショックをかけないコントロール系統においても若干の欠損が起こることが明らかになった。飼育温度を低下させる等の検討を行ったが、改善されなかった。

② CCHa2 が作用する脳神経細胞の同定および機能解析

CCHa2 は直接またはインスリンを介して間接的に Fru 神経細胞に作用する可能性が考えられた。これらの可能性を検証するために、まず Fru 神経細胞で CCHa2-R およびインスリン受容体 (InR) が発現しているかどうかを FLP-out 法を用いて調べた。その結果、CCHa2-R および InR のいずれも Fru 神経細胞で発現することが明らかになった。次に、CCHa2-R または InR を発現する Fru 神経細胞に破傷風毒素を発現させて、神経活動を阻害し、求愛行動が低下するかどうかを調べた。その結果、いずれの個体においても求愛行動は低下したことから、CCHa2-R または InR を発現する Fru 神経細胞は求愛行動に必要なことが明らかになった。しかし、Fru 神経細胞で CCHa2-R をノックダウンしても求愛行動に変化は見られなかった。CCHa2-R は Fru 神経細胞で機能しないか、またはノックダウンが不十分であった可能性がある。一方、Fru 神経細胞で InR をノックダウンしたところ、求愛行動の低下が見られた。InR の恒常的活性型を発現させた場合にも求愛行動の低下が見られたことから、Fru 神経細胞における適正なレベルのインスリンシグナルが求愛行動に必要なことが明らかになった。

<引用文献>

Sano, H.*, Nakamura, A., Texada, M. J., Truman, J.W., Ishimoto, H., Kamikouchi, A., Nibu, Y., Kume, K., Ida, T., and Kojima, M. The nutrient-responsive hormone CCHamide-2 controls growth by regulating insulin-like peptides in the brain of *Drosophila melanogaster*. *PLoS Genetics* 11, e1005209 (2015a).

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

Sano, H.* Coupling growth to nutritional status: the role of novel periphery-to-brain signaling by the CCHA2 peptide in *Drosophila melanogaster*. *Fly 9*, 183-187, (2015b).

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1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 Ishimoto, H. and Sano, H. | 4. 巻 136 |
| 2. 論文標題 Ex vivo calcium imaging for visualizing brain responses to endocrine signaling in Drosophila. | 5. 発行年 2018年 |
| 3. 雑誌名 Journal of Visualized Experiments | 6. 最初と最後の頁 57701 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3791/57701. | 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6件（うち招待講演 0件/うち国際学会 3件）

| |
|---|
| 1. 発表者名 Sano, H., Nakamura, A., Yamane, M., Niwa, H., Araki, K., Takemoto, K., Ishiguro, K., Takada, Y., Nishimura, T., and Kojima, M. |
| 2. 発表標題 The role of the polyol pathway in Mondo-mediated maintenance of metabolic homeostasis in Drosophila melanogaster. |
| 3. 学会等名 2019 Insect Hormone Workshop（国際学会） |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 佐野浩子 |
| 2. 発表標題 個体はどのようにして糖摂取を感知するのか？：ショウジョウバエおよびマウスモデルを用いた遺伝学的解析 |
| 3. 学会等名 第7回TOR研究会 |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 Sano, H., Nakamura, A., Yamane, M., Niwa, H., Nishimura, T., and Kojima, M. |
| 2. 発表標題 The polyol pathway is crucial for glucose sensing and sugar-responsive changes in metabolic gene expression. |
| 3. 学会等名 第52回日本発生物学会年会 |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 Sano, H., Nakamura, A., Yamane, M., Niwa, H., and Kojima, M. |
| 2. 発表標題 The polyol pathway is the principal sugar-sensing pathway for sugar-responsive gene expression mediated by Mondo/ChREBP. |
| 3. 学会等名 第70回日本細胞生物学会第51回日本発生生物学会合同大会 |
| 4. 発表年 2018年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 Sano, H., Nakamura, A., Yamane, M., Niwa, H., and Kojima, M. |
| 2. 発表標題 The polyol pathway is the principal sugar-sensing pathway for Mondo/ChREBP-mediated transcription. |
| 3. 学会等名 CDB Symposium 2018 (国際学会) |
| 4. 発表年 2018年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 Sano, H., Nakamura, A., Yamane, M., Niwa, H., and Kojima, M. |
| 2. 発表標題 Mechanisms for the sugar-dependent expression of the CCha2 peptide and its roles in Drosophila physiology and behavior. |
| 3. 学会等名 The 3rd Insect Hormone Workshop (国際学会) |
| 4. 発表年 2017年 |

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

| |
|---|
| <p>Researchmap link https://researchmap.jp/sapphire</p> <p>久留米大学分子生命科学研究所遺伝情報研究部門ホームページ https://www.kurume-u.ac.jp/site/lifescience/list95.html</p> |
|---|

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 |
|-------|---|---|----|
| 研究協力者 | 山元 大輔 (Yamamoto Daisuke) | | |
| 連携研究者 | 石元 広志 (Ishimoto Hiroshi) (80643361) | 名古屋大学・大学院理学研究科 附属ニューロサイエンス研究センター 産学協同部門 栄養神経科学講座・特任准教授 (13901) | |