

令和 2 年 6 月 26 日現在

機関番号：82636

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K15155

研究課題名(和文)成虫休眠を調節する脳内神経回路とその生理機能

研究課題名(英文)Physiological function of dormancy-regulating brain neural circuit

研究代表者

原 佑介(Hara, Yusuke)

国立研究開発法人情報通信研究機構・未来ICT研究所フロンティア創造総合研究室・研究員

研究者番号：20749064

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：脳内インスリン産生細胞(IPC)はショウジョウバエの生殖休眠制御中枢である。この細胞の生理学的な機能解析を行った結果、休眠誘導条件で飼育した成虫雌のIPCは低温に応答しないが、非休眠誘導条件で飼育した成虫雌のIPCは著明な低温応答性を獲得することを明らかにした。また、この低温応答を担う分子として特定の味覚受容体とK2Pチャネルを同定した。さらに、IPC内のインスリン遺伝子の発現も飼育条件により大きく変動することを明らかにした。これらの結果から、IPCは環境条件に依存してその膜特性とインスリン遺伝子の発現を巧みに変化させることにより、休眠制御中枢としての役割を担っているものと考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

休眠は生物が進化させた普遍的な季節適応戦略の一つであるが、その体内機構はほとんどが謎に包まれていた。今回の研究成果により、休眠を司るIPCの遺伝子発現や膜特性が環境に応じて柔軟に変化する事が明らかとなり、生物の環境適応を担う細胞機構の実像が見えてきた。IPCは臍細胞と機能的に相同な細胞と位置付けられている。したがって、臍細胞においても同様な未知の機能が隠されている可能性も考えられ、我々ヒトを含む多様な生物の環境適応のしくみや、人工的なストレス耐性賦与技術の開発を考える上で本研究の成果は重要な知見となり得る。

研究成果の概要(英文)：Brain insulin-producing cells (IPCs) play a key role in controlling reproductive dormancy in *Drosophila*. We found that IPCs in females raised under non-dormant condition acquire strong responsiveness to cold stimuli while IPCs in females raised under dormant condition do not. A gustatory receptor and a K2P channel were identified to be involved in the temperature response of IPCs which is observed in females raised under non-dormant condition. Furthermore, we found that the expression of insulin genes changes in IPCs depending on the breeding conditions. Together, these results suggest that IPCs adjust their membrane properties and insulin-gene expression depending on the environmental conditions. These features of IPCs would enable them to function as a key regulator of reproductive dormancy.

研究分野：神経生理学

キーワード：休眠 環境適応 ショウジョウバエ 脳 神経生理 インスリン 味覚受容体 K2Pチャネル

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

野外に暮らす生物は極度の高温や低温、乾燥、食料の枯渇など絶えず様々な環境ストレスに晒されている。このような環境ストレスを生き抜くために生物は休眠という生存戦略を編み出した。休眠はストレスにより生じる一時的な発育・生殖の休止で、特に昆虫において広く見られる現象である。休眠様式の変化は個体の至適生育条件や生息域の変化を導き、最終的には種分化さえも引き起こす原動力となりうる。また、休眠の多型が生まれる事により、種全体としての適応度が変化する事も想定される。したがって、休眠を司る生理機構や体内ネットワークを探る事は、生物の適応進化の内的機構の解明につながる。しかし、休眠の適応的意義についてはこれまで様々な昆虫を用いた研究が行われてきたものの、従来休眠研究で用いられてきた昆虫は遺伝学的な解析が困難であったため、休眠の内的機構の解明に向けた取り組みは大きな進展を見せていないのが現状である。この課題を解決するため、本研究では遺伝学の好材料であるショウジョウバエの生殖休眠に注目し、その内的機構の解明を図った。

2. 研究の目的

本研究の目的は、ショウジョウバエの生殖休眠制御中枢であるインスリン産生細胞 (IPC) の温度応答機構の解明、及び新規休眠制御ニューロンの同定とその機能解析である。

- (1) ショウジョウバエの成虫雌は、羽化後「低温・短日・飢餓 (以下、休眠条件)」で飼育されると、生殖休眠する。この休眠は、脳内の脳間部という場所に存在する IPC により制御されている。IPC は中枢ニューロンでありながら、機能的には哺乳類の膵β細胞に相同な細胞で、体液中のグルコース濃度に応じてインスリン様ペプチドを分泌する。また、IPC は脂肪体という組織からアミノ酸に関する栄養情報も受け取っており、複数の栄養情報を統合する代謝制御中枢としての機能を担っている。一方で、休眠誘導に重要な光や温度といった環境因子が IPC にどのように作用するのかが不明であった。そこで、事前の研究において、申請者はそれら環境因子の IPC への作用を電気生理学的手法により解析した。その結果、IPC は温度変化に対して興味深い応答を示すことを見出した。すなわち、非休眠条件 (室温・長日・摂食) で飼育した成虫雌の IPC は、低温に対して大きく脱分極応答し、持続的な発火を生じるが、休眠条件で飼育した成虫雌の IPC では小さな脱分極応答しか生じず、持続的発火も見られない。このことから、IPC は環境条件に依存して温度応答特性を変化させ、休眠調節を行っているものと推察された。しかし、非休眠条件の IPC で生じた低温応答の分子機構については不明であった。そこで、本研究ではその分子実体の特定を図った。
- (2) 休眠を制御する新規脳内神経回路の探索として、Dorsal lateral peptidergic neuron (DLP) に注目した。このニューロンは他種のアエロゾルにおいて生殖休眠制御に関与する可能性が指摘されていた。また、我々の予備実験においても、DLP が休眠制御に関与する可能性を示唆するデータが得られていた。これらの知見に基づき、本研究では DLP の機能解析を計画した。

3. 研究の方法

- (1) 温度変化により IPC に生じる膜特性の変化の電気生理学的な解析と、IPC における既知の温度受容体の発現を探ることにより、IPC の温度応答に関わる分子を探索・同定する。
- (2) DLP の強制活性化・不活性化を行った際の休眠率の評価、光遺伝学と電気生理学を組み合わせた DLP と IPC のシナプス接続の解析、及び DLP で発現する神経ペプチドの休眠調節における機能の解析を行い、これらのデータを統合することで、休眠制御における DLP の機能を解明する。

4. 研究成果

- (1) 最初に、羽化直後における IPC の低温応答について調べた。その結果、この時期の IPC では低温刺激に対して膜電位はほとんど変化せず、持続的発火も観察されなかった。このことから、IPC の低温応答特性は羽化直後の不応答が基底状態で、その後の飼育条件によって強い応答性を獲得するかが決まることが明らかとなった。
続いて、非休眠条件で観察される低温応答の分子機構を探った。事前に行なっていた実験結果から、本研究では IPC の低温応答を担う候補分子として K2P チャネルに注目し、スクリーニングを行った。その結果、低温応答に関与する一つの K2P チャネルを同定することに成功した。さらに、温度感知に関与することが知られていた味覚受容体が IPC で発現していることを見出し、この味覚受容体の機能解析を行った結果、この分子もまた IPC の低温応答に関与することを明らかにした。
続いて、IPC の遺伝子発現解析を行うため、シングルセル解析系を立ち上げた。これは、電気生理学実験で使用するパッチクランプ電極を用いて単一細胞を回収し、発現解析に供試する手法で、膜特性と遺伝子発現との対応づけが可能となる。この手法を用いて上記の K2P チャネルと味覚受容体の発現を調べたところ、どちらも IPC での発現が確認された。続いて、IPC で発現する 4 つのインスリン遺伝子 (*dilp1*, *dilp2*, *dilp3*, *dilp5*) について RT-PCR による発現解析を行なった。その結果、それら遺伝子の発現は温度応答特性と同様に羽化後の飼育条件によって変化することが明らかとなった。

- (2) 当初計画していた DLP の機能解析における休眠評価の手法について、課題が浮上した。従来、生殖休眠は卵黄蓄積の有無により択一的に評価するという手法が一般的であったが、この手法では卵黄の定量的な評価を行うことができず、また卵黄の識別が容易では無いことから、スループットも低かった。休眠評価におけるこれら問題点の解決は、DLP の機能解析やその先の休眠研究を進めていく上で重要課題であると考えられた。そこで、この課題を解決するため、新たな休眠評価法の確立を図った。具体的には、卵黄タンパク質遺伝子に GFP タグをつけた組換え遺伝子を発現させ、その蛍光強度を測定することで卵黄蓄積量の定量化を試みた。その結果、この遺伝子を持つ雌の卵室では、本来卵黄が蓄積する場所に局限して GFP が確認された。また、その蛍光強度は飼育条件や遺伝学的操作に応じて期待された通りの数値変化を示した。したがって、本手法は卵黄蓄積量を適正に定量化できており、従来法の課題を解決する有効な手法を確立できたものと考えられる。

以上の通り、本研究では IPC の生理的機能について、当初の想定を超える学術的成果を得ることができた。また、シングルセル解析系と新規休眠評価法を確立でき、技術面でも大きな進展があった。DLP の機能解析については具体的な結果を得るには至らなかったが、本研究によって強化された解析基盤を応用することにより、将来的に大きな成果を得ることが期待できる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Nakano Ryosuke, Iwamura Masashi, Obikawa Akiko, Togane Yu, Hara Yusuke, Fukuhara Toshiyuki, Tomaru Masatoshi, Takano-Shimizu Toshiyuki, Tsujimura Hidenobu	4. 巻 453
2. 論文標題 Cortex glia clear dead young neurons via Drpr/dCed-6/Shark and Crk/Mbc/dCed-12 signaling pathways in the developing Drosophila optic lobe	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Developmental Biology	6. 最初と最後の頁 68 ~ 85
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2019.05.003	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 -

1. 著者名 Ojima Noriyuki, Hara Yusuke, Ito Hiroki, Yamamoto Daisuke	4. 巻 14
2. 論文標題 Genetic dissection of stress-induced reproductive arrest in Drosophila melanogaster females	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 PLOS Genetics	6. 最初と最後の頁 e1007434
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pgen.1007434	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Hara Yusuke, Sudo Tatsuya, Togane Yu, Akagawa Hiromi, Tsujimura Hidenobu	4. 巻 436
2. 論文標題 Cell death in neural precursor cells and neurons before neurite formation prevents the emergence of abnormal neural structures in the Drosophila optic lobe	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Developmental Biology	6. 最初と最後の頁 28 ~ 41
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ydbio.2018.02.004	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5件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 4件）

1. 発表者名 Yusuke Hara, Daisuke Yamamoto
2. 発表標題 Multimodal Gustatory receptor 28b coordinates transcription with electrical activities in brain insulin neurons for cold acclimation
3. 学会等名 第43回日本神経科学大会（国際学会）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 原佑介
2. 発表標題 環境ストレス応答を担う脳内神経ペプチド産生細胞の機能的連関
3. 学会等名 ACT-X 「生命と科学」領域 第1回領域会議
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yusuke Hara, Noriyuki Ojima, Hiroki Ito, Daisuke Yamamoto
2. 発表標題 Sustained exposure to environmental stress alters electrical responses to cold in brain insulin neurons
3. 学会等名 Neuro2019 (第42回日本神経科学大会・第62回日本神経化学会大会 合同大会) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yusuke Hara, Noriyuki Ojima, Hiroki Ito, Daisuke Yamamoto
2. 発表標題 Acclimatization to cold temperature of brain insulin neurons drives reproductive dormancy
3. 学会等名 13th Japanese Drosophila Research Conference (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Yusuke Hara, Noriyuki Ojima, Sae Yaoita, Hiroki Ito, Daisuke Yamamoto
2. 発表標題 Brain insulin cells sense cold via Gustatory Receptor 28b and control diapause in Drosophila
3. 学会等名 The 3rd International 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〕

第9回森脇大五郎賞3rd Prize受賞
http://www2.nict.go.jp/frontier/evoneuro/topics/180920_jdrc.html

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
--	---------------------------	-----------------------	----