

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 4 年 6 月 2 日現在

機関番号：13301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2021

課題番号：18K05674

研究課題名(和文) 前胸腺刺激ホルモン細胞の神経活動による昆虫発生タイミング制御機構の解明

研究課題名(英文) Neurogenic control of PTTH cells during insect development.

## 研究代表者

岩見 雅史 (Iwami, Masafumi)

金沢大学・生命理工学系・教授

研究者番号：40193768

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：昆虫の幼虫は各齢において十分なサイズに達してから次の齢へと脱皮・変態する。発生タイミングが内外の環境によって適応的に制御される機構の全貌は未だに不明のままである。本研究は、「なぜ昆虫の幼虫は適切なタイミングで脱皮・変態するのか？」という疑問をPTTH細胞の生理特性に着目して解くことを目的とした。本研究では、電気生理学的手法によるPTTH細胞の神経活動の解析・PTTH細胞の神経活動を制御するシグナル因子の解析・PDFおよびPDF受容体のノックアウト系統の作出と解析・PTTH細胞の神経活動制御による発生タイミング制御の検討を行い、上記の疑問の一端を解き明かした。

## 研究成果の学術的意義や社会的意義

地球上で最も繁栄している動物は昆虫であり、その中でも幼虫から蛹を経て成虫となる完全変態昆虫がその大多数を占めている。このような繁栄の基盤の一つとして、柔軟かつ適切な発生タイミングの制御が挙げられる。本研究では、この仕組みの一端を、脳のホルモン分泌細胞に着目し明らかにした。本研究は学術的な面での価値だけでなく、環境に適応して生きる昆虫の仕組みを知るという点においてSDGsにも貢献するものである。

研究成果の概要(英文)：Insect larvae molt and metamorphose to the next instar after reaching sufficient size at each instar. The mechanism by which the timing of development is adaptively controlled by the internal and external environment remains unclear. We addressed the question, "Why do insect larvae molt and metamorphose at the appropriate timing?" by focusing on the physiological properties of PTTH cells in the brain. In this study, we analyzed the neural activity of PTTH cells by electrophysiological methods, analyzed the signaling factors that control the neural activity of PTTH cells, generated and analyzed knockout lines of PDF and PDF receptors, and investigated the regulation of developmental timing by controlling the neural activity of PTTH cells. We have clarified some of the above questions.

研究分野：昆虫分子生物学

キーワード：PTTH エクジソン 神経活動 PDF ペプチド 脱皮 変態 発生タイミング

## 1. 研究開始当初の背景

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の体内濃度変動によって決定される。従来、エクジソンの合成は、脳の PTH 細胞で生合成された PTH が前胸腺を刺激することで制御されていると考えられてきた(図1)。しかし近年、ショウジョウバエにおいて PTH 細胞を除去した研究やカイコガで PTH をノックアウトした研究により、PTH が無くとも成虫になれること、すなわち PTH は発生には必要ではないことが示された。研究代表者らは以前、遺伝子組換えカイコガを駆使した研究により、PTH 細胞からの神経分泌を阻害すると、先行研究と同様に、カイコガ幼虫は成虫になることは出来るものの、血中エクジソン濃度の低下や増加タイミングの遅れにより後胚発生が著しく遅延することを明らかにしてきた。これらの研究より PTH は、前胸腺の活性を絶対的に制御する因子というよりは、様々な因子によって活性準備段階とされた前胸腺を強力に賦活化して、急激な血中エクジソン濃度増加を誘導する発生タイミング決定因子と捉え直す必要があると考えた。

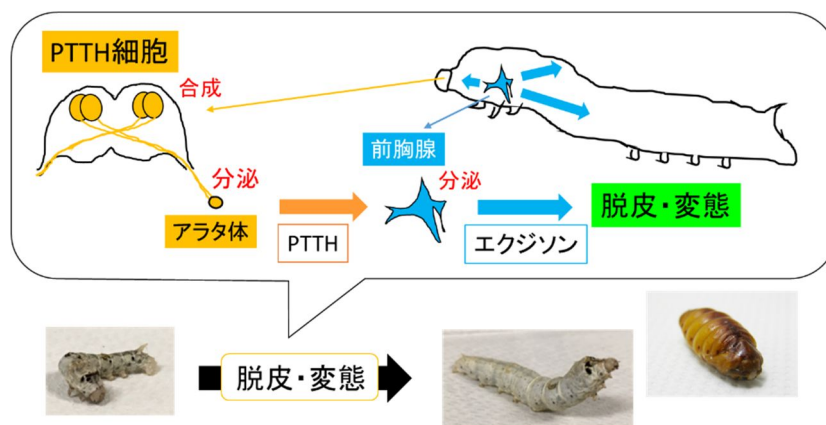


図1. PTH とエクジソンと脱皮の関係

## 2. 研究の目的

PTH 細胞からの PTH 分泌が発生タイミング制御に重要であったことから、研究代表者らは PTH 細胞特異的に  $Ca^{2+}$  インジケータタンパク質 (GCaMP6f) を発現させた遺伝子組換えカイコガを作出し  $Ca^{2+}$  イメージングによる PTH 細胞の神経活動動態を詳細に調べてきた。研究開始時点において、

PTH 細胞の神経活動は血中 PTH 濃度の変動に先行する形で相関すること、

朝に活動が高く夕方に低いといった概日制御を受けること、

血中エクジソン濃度を低く保つ必要がある摂食期には PTH 細胞の活動に対しエクジソンは抑制的に働くが、急激に血中エクジソン濃度を増加させる脱皮期には促進的に働くといった合目的なフィードバック制御があること、を見出していた。

これらの背景から、PTH 細胞には個体の内外の情報が集約し、その生理特性(興奮性)に反映される機構があること、そして PTH 細胞の生理特性の変動こそが発生タイミングの決定に重要であると考えた。

昆虫の幼虫は各齢において十分なサイズに達してから次の齢へと脱皮・変態し、栄養不足などにより成長が遅れた場合には脱皮のタイミングも遅延する。しかしながら、発生タイミングが内外の環境によって適応的に制御される機構の全貌は未だに不明のままであった。本研究は、「なぜ昆虫の幼虫は適切なタイミングで脱皮・変態するのか?」という本質的疑問を PTH 細胞の生理特性に着目して解くことを目的とした。

## 3. 研究の方法

### (1) 電気生理学的手法による PTH 細胞の神経活動の解析

これまでに  $Ca^{2+}$  イメージングによって計測してきた PTH 細胞の活動が、どのような電気生理学的活動を反映したものであるかということ、パッチクランプ法によって解析した。

### (2) PTH 細胞の神経活動を制御するシグナル因子の解析

以前にシングルセル RNA-Seq によって PTTH 細胞選択的に発現する遺伝子のスクリーニングを行った。このデータより G タンパク質共役型受容体に着目すると、PTTH 細胞には PDF 受容体が高発現していることを見出していた。これまでの  $\text{Ca}^{2+}$  イメージングによる神経活動解析より、PTTH 細胞は朝に良く活動し、夕方には活動が低下するといった概日制御があることを見出していたことや、PDF は朝を知らせるシグナル因子であることがショウジョウバエを用いた研究で明らかとなっていたことから、PTTH 細胞の活動性を PDF が概日制御すると仮説を立て、下図のようなシステムを用いて神経活動の解析を行った。

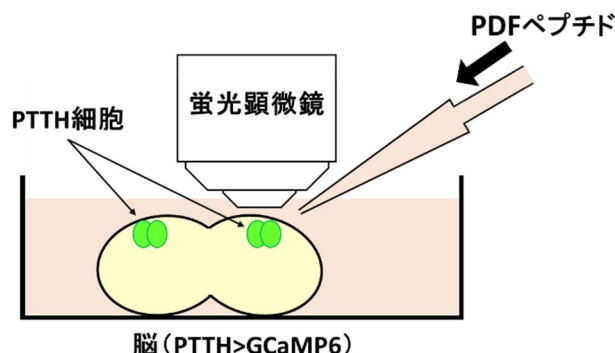


図 2 . PTTH 細胞の活動を  $\text{Ca}^{2+}$  イメージングによって解析するシステム

### ( 3 ) PDF および PDF 受容体のノックアウト系統の作出と解析

PTTH 細胞の活動性を PDF が概日制御しているとの仮説を検証すべく、PDF および PDF 受容体のノックアウト系統を CRISPR/Cas9 によって作出した。これらの系統を用いて、脱皮回数や脱皮や羽化にかかった日数といった発生過程の観察・ $\text{Ca}^{2+}$  イメージングによる神経活動解析をおこなった。

### ( 4 ) PTTH 細胞の神経活動制御による発生タイミング制御の検討

PTTH 細胞の神経活動変動が発生タイミング制御に重要であるという仮説を検証すべく、人為的な神経活動操作を行った。これまでに確立してきた光・化学遺伝学的手法(チャンネルロドプシンや DREADD) によって PTTH 細胞の神経活動を任意のタイミングで制御することが出来る系統を用い、5 齢幼虫の PTTH 細胞の神経活動を活性化・抑制し、血中エクジソン濃度や発生タイミングに与える影響を調べた。

## 4 . 研究成果

### ( 1 ) 電気生理学的手法による PTTH 細胞の神経活動の解析

神経発火を loose-cell パッチクランプ法によって測定したところ、 $\text{Ca}^{2+}$  イメージングで見られた発火と同期する形で 0.5~2Hz での神経発火があることが分かった。これにより、 $\text{Ca}^{2+}$  イメージングで計測した神経活動が、実際に活動電位の発生を伴った神経活動によることが確認できた。一方、細胞膜電位を測るためのホールセルパッチクランプは成功しておらず、概日リズムによる細胞膜電位の変化があるのかといったことや、どのようなイオンチャンネルによって活動電位が発生しているのかという点については、将来の課題として残った。

### ( 2 ) PTTH 細胞の神経活動を制御するシグナル因子の解析

図 2 に示すようなシステムを構築し、 $\text{Ca}^{2+}$  イメージングによって PTTH 細胞を PDF ペプチドで刺激した際の応答を解析した。その結果、PDF ペプチドは PTTH 細胞の神経活動を誘発することを見出した(図 3)。

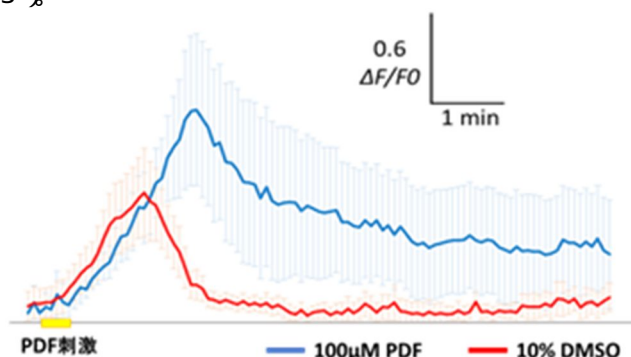


図 3 . PDF ペプチドで PTTH 細胞を刺激した際の神経活動応答  
この結果は、PTTH 細胞が PDF ペプチドに反応して神経活動が起こることを示している。し

かし、神経応答を見るのに必要な濃度が 100 $\mu$ M と、神経伝達物質並みに高かったことや、溶媒の DMSO にも一過的な応答が見られたことから、実験結果の解釈には注意が必要で、詳細な検討が今後必要である。

### ( 3 ) PDF および PDF 受容体のノックアウト系統の作出と解析

PDF ノックアウトのホモ系統は生存可能で、脱皮回数の減少などの大きな発生プログラムの障害は認められなかった。しかし発生を詳細に解析したところ、野生型と比較して、幼虫の途中で脱皮タイミングが少しずつ遅延し、結果的に羽化が数日遅延するという表現型や体重が減少するという表現型が認められた。さらに PDF ノックアウトの遺伝的背景において PTH 細胞特異的に GCaMP6f を発現する遺伝子組換えカイコを作出し、神経活動の概日リズムを調べたところ、概日リズムが失われることを見出した。これは PTH 細胞の活動性を PDF が概日制御しているとの仮説を支持する結果であると考えられる。

PDF 受容体のノックアウトのホモ変異体系統を作出したところ、死亡率の増加や大幅な発生の遅れは認められなかった。今後、PDF ノックアウト系統の解析と同様の詳細な表現型解析によって表現型をさらに詳細に調べる必要がある。また、PDF ノックアウトの遺伝的背景において PTH 細胞特異的に GCaMP6f を発現する遺伝子組換えカイコを確立した。本系統を用いて、PTH 細胞の神経活動が概日リズムを維持しているかどうかを調べ、PDF ノックアウトの表現型と比較解析をしてゆく必要がある。

### ( 4 ) PTH 細胞の神経活動制御による発生タイミング制御の検討

PTH 細胞にチャネルロドプシン (ReaChR もしくは CsChrimson) を発現させ、光によって神経活動を操作し、発生タイミングや血中エクジソン濃度の動態を調べた。まず、CsChrimson を発現させた系統では、一定の割合で PTH mutant と同様の表現型 (2 齢での発生停止) を示す個体が現れた。脳を調べると PTH 細胞が失われていたことから、CsChrimson の発現は (光による刺激無しでも) PTH 細胞にとって毒性をもつことが考えられた。一方、PTH 細胞への ReaChR の発現は特段の発生異常を認めなかったので、この系統を用いて 5 齢幼虫後期に神経活動を操作する実験を行った。その結果、ワンダリングの開始が早まること、血中エクジソン濃度の増加といった表現型が認められた。この結果は、PTH 細胞の神経活動が発生タイミングの制御に重要であることを示している。

一方、DREADD (hM3D, hM4D) はカイコでは正常に機能しないという結果となった。hM3D や hM4D には mCherry を fusion してあるので、免疫染色によって発現を調べたが、PTH 細胞での発現は認められなかった。一つの可能性として、哺乳動物の細胞での発現用に最適化されているため、昆虫の細胞では適切に細胞膜に発現できなかった可能性を考えている。ショウジョウバエにおいて DREADD が正常に作動するとの論文も出ているが、系統がストックセンターに寄託されていなかったため、我々の手で実際の作動を確認することは出来なかった。ショウジョウバエでの DREADD を用いた論文が、これまでにほとんど出版されていないといったことから、昆虫で DREADD を機能させるためには、特別な条件や詳細な最適化が必要であると考えている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 叶田貴之, 伊藤瑤子, 岩見雅史, 木矢星歌, 木矢剛智
2. 発表標題 PTTH細胞が脱皮タイミングを制御する神経機構の解析
3. 学会等名 令和3年度蚕糸・昆虫機能利用学術講演会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 叶田貴之, 伊藤瑤子, 岩見雅史, 木矢星歌, 木矢剛智
2. 発表標題 PTTH細胞が脱皮タイミングを制御する神経機構の解析
3. 学会等名 令和2年度蚕糸・昆虫機能利用学術講演会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

金沢大学研究者情報－岩見雅史 <a href="https://ridb.kanazawa-u.ac.jp/public/detail.php?id=3156">https://ridb.kanazawa-u.ac.jp/public/detail.php?id=3156</a>
---

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
研究分担者	木矢 剛智  (Kiya Taketoshi)  (90532309)	金沢大学・生命理工学系・准教授    (13301)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------