

令和 4 年 5 月 25 日現在

機関番号：12102

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2020～2021

課題番号：20K22645

研究課題名（和文）孵化行動を調節する神経・内分泌ネットワークの解明

研究課題名（英文）Elucidation of the neuroendocrine control of hatching behavior

研究代表者

岡本 直樹（Okamoto, Naoki）

筑波大学・生存ダイナミクス研究センター・助教

研究者番号：10577969

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,200,000円

研究成果の概要（和文）：動物の示す多くの生得的行動は、遺伝的要因に加え、環境的要因に応じて柔軟かつ適切に調節される。本研究では、分子遺伝学的技術の発達したモデル生物、キイロショウジョウバエを用いて、昆虫の孵化ホルモンの実体を特定し、孵化行動の神経・内分泌機構を包括的に理解することを目指した。本研究により、アミド化修飾がその生理活性に必須な神経ペプチドが、孵化ホルモンとして機能する可能性が示唆された。また、孵化ホルモンは単一ではなく、アミド化修飾を有する複数の神経ペプチドが機能する可能性が示唆された。以上のように、現時点で孵化ホルモンの実体解明には至らなかったが、今後の研究を進める上で重要な研究成果が得られた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

卵生の動物において普遍的な初期発生現象である孵化の誘導機構については、これまでの研究では主に卵膜分解の分子機構や環境要因の解析に焦点が当てられてきた。本研究は、ショウジョウバエの豊富な遺伝学的ツールを利用することにより、孵化行動を制御する神経ペプチドの同定に迫る上で重要な成果が得られたことから、これまで未解明である孵化行動の神経・内分泌系による調節機構の理解に大きな進歩をもたらすと考えられる。

研究成果の概要（英文）：Animal innate behaviors are appropriately regulated in response to environmental factors. In this study, we used the fruit fly *Drosophila melanogaster*, a model organism with powerful genetic tools, to identify insect hatching hormone(s) and understand neural and endocrine mechanisms for regulating hatching behavior. This study suggested that amidated neuropeptides function as hatching hormones. In addition, this study suggested that multiple neuropeptides redundantly act as hatching hormones in *Drosophila*. Although we have not been able to elucidate the nature of the hatching hormones at this point, we have obtained essential research results for future studies.

研究分野：発生生物学、比較内分泌学、昆虫生理学

キーワード：生得的行動 孵化行動 神経分泌ペプチド 孵化ホルモン キイロショウジョウバエ 昆虫 ペプチドホルモン

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、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

動物は、遺伝的にプログラムされた生得的な行動をとることにより、個体の生存と種の繁栄をはかっている。動物の示す多くの生得的行動は、性差などの遺伝的要因に加え、栄養状態、温度、光周期などの環境的要因に応じて柔軟かつ適切に調節されることが知られている。その調節には内分泌ホルモンやフェロモンをはじめとする様々な調節因子が関わっており、それら調節因子の機能（発現・合成・分泌・作用）が、環境・遺伝的要因に応じて、中枢神経系や末梢組織などの組織・細胞を介して異なる制御を受けることにより、多岐にわたる生得的行動が厳密に制御・規定される。しかしながら、これまでの研究では「どのような環境・遺伝的要因により」、「どのような組織・細胞を介して」、「どのような調節因子によって」、それぞれ異なる生得的行動が適切に調節されるのかは、不明な点が多く残されている。

昆虫は、特徴的な行動を示すことなどから、生得的行動のしくみを解き明かすためのモデルとして、これまで様々な研究に寄与してきた。特に、発生過程における生得的行動の調節機構は、昆虫内分泌学の長い歴史とともに多くが明らかにされている。昆虫の発生過程における生得的行動の例としては、孵化、脱皮、蛹化、羽化などがあげられるが、適切に発生を進めていくためには、これらの行動が発達段階や環境条件に応じて正しく調節される必要がある。これまでの研究から、脱皮、蛹化、羽化行動が、エクジソン、脱皮誘導ホルモン、羽化ホルモンといった内分泌ホルモンが、発生段階に応じて作用することにより調節されることが明らかになっている。

昆虫の孵化行動は、概日リズム、温度変化、物理的刺激など様々な環境的要因が引き金となって誘導される。カイコガでは、概日リズム依存的に孵化行動を誘導する脳由来のホルモンの存在が示唆されている。さらに、キイロショウジョウバエでは、脳神経系で産生されるペプチドホルモン前駆体のプロセシング酵素の変異体において、孵化行動が異常になることから、神経由来のペプチドホルモンが孵化誘導に必要であると考えられている。つまり、孵化行動は、一見単純な卵からの脱出行動に見えて、様々な環境的要因依存的に神経由来のホルモンを介して調節される生得的行動であると予想される。しかしながら、孵化を誘導するホルモン（以下、孵化ホルモンと呼ぶ）の実体については、いかなる昆虫種においてもいまだに明らかになっていない。また、環境情報がどのような神経細胞や組織を介して統合され、孵化行動が調節されるのかもほとんど明らかになっていない。

2. 研究の目的

本研究では、昆虫の孵化ホルモンの実体を特定し、その産生細胞、作用細胞・組織を起点とした孵化行動の神経・内分泌機構を包括的に理解するとともに、環境情報によるその調節機構を解明することを目指す。研究材料には、分子遺伝学的技術の発達したモデル生物、キイロショウジョウバエ (*Drosophila melanogaster*: 以下、ショウジョウバエ) を主に用い、組織・細胞特異的な遺伝子操作技術、そのツールの豊富さを最大限に駆使することにより、孵化行動を制御する神経・内分泌機構を明らかにする。さらに、明らかにした孵化ホルモンの比較生物学的視点から解析を進めるため、キイロショウジョウバエと同じ双翅目昆虫であるネッタイシマカ (*Aedes aegypti*) を用いて孵化行動に関わる内分泌機構の機能的保存性、種特異性、さらにはその生理的意義を明らかにする。

3. 研究の方法

(A) ショウジョウバエ孵化ホルモンの探索

近藤周博士（東京理科大学）の協力のもと、ショウジョウバエに存在するペプチドホルモンをコードするほぼ全ての遺伝子（45 遺伝子）の各変異体系統を用いて、胚発生過程における致死性を解析し、孵化ホルモンの有力候補をスクリーニングした。スクリーニングにおいて孵化ホルモンの有力候補と考えられた *Capa* 及びその受容体 (*CapaR*) の機能欠損変異体系統（ホモ接合体、トランスヘテロ接合体）を用い、それらの孵化率を解析した。

神経分泌ペプチドのプロセシングに関わる様々な酵素をコードする遺伝子を脳神経系特異的にノックダウンし、それらの孵化率を解析した。その結果、C 末端のアミド化がその生理活性に必須な神経分泌ペプチドが孵化ホルモンとして機能することを示唆されたことから、アミド化修飾を有する神経ペプチドをコードする遺伝子群に着目し、それらの機能欠損変異体、神経特異的ノックダウン個体を用い、孵化ホルモンのスクリーニングを行った。

(B) 孵化ホルモン候補 *Capa* の新たな機能の発見と機能解析

時期特異的に *Capa* RNAi を誘導可能な変異体を作製し、様々なステージ特異的に *Capa* をノックダウンし、その表現型を解析した。その結果、終齢幼虫期において興味深い蛹の形状に関する表現型が得られたことから、以降の RNAi 実験は全て終齢幼虫期特異的に RNA を誘導し、表現

型を解析した。次に、Capa を産生する脳神経分泌細胞（以下、Capa 産生神経）を遺伝学的に除去した個体、神経特異的な *Capa* RNAi においても表現型解析を行なった。次に、様々な組織特異的に *Capa* 受容体 (*Capa receptor: CapaR*) をノックダウンし表現型解析を行なった。また、qPCR 及び遺伝子ノックイン系統を用いて、*CapaR* の発現解析を行なった。Ca²⁺濃度の測定は、QuantiChom Calcium Assay Kit (フナコシ) を用いて行なった。

4. 研究成果

(A) ショウジョウバエ孵化ホルモンの探索

ショウジョウバエに存在するペプチドホルモンをコードするほぼ全ての遺伝子 (45 遺伝子) の各変異体系統を用いて、発生過程における致死性を解析した。その結果、その変異体において孵化前に致死となる神経分泌ペプチド、Capability (*Capa*) を同定した。*Capa* は、昆虫において広く保存される神経分泌性ペプチドホルモンであり、その受容体 (*CapaR*) も同定されているが、これまでに胚発生期における機能に関する報告はない。

そこで、孵化ホルモンの有力候補と考えられる *Capa* 及びその受容体 (*CapaR*) の機能欠損変異体系統を用い、それらの孵化率を詳細に解析した。その結果、*Capa* 変異体のホモ接合体では孵化率が低下したものの、*Capa* や *CapaR* を含む遺伝子領域欠損系統 (Deficiency 系統) とのトランスヘテロ接合体では、*Capa* 及び *CapaR* 変異体ともに孵化率の顕著な低下は観察されないことが明らかになった。これは、当初想定していた孵化ホルモンとして、*Capa* が機能しないことを示唆する結果である。

次に、ショウジョウバエの神経分泌ペプチドが、実際に孵化ホルモンとして機能するか否かを検証するため、神経分泌ペプチドのプロセッシングに関わる様々な酵素をコードする遺伝子を脳神経系特異的にノックダウンし、それらの孵化率を解析した。その結果、生理活性ペプチドの C 末端のアミド化に関わる酵素であるペプチジルグリシン α ヒドロキシ化モノオキシゲナーゼ (PHM) のノックダウンにより、孵化率が顕著に減少することが明らかになった。この結果は、C 末端のアミド化がその生理活性に必須な神経分泌ペプチドが孵化ホルモンとして機能することを示唆する。そこで、C 末端のアミド化がその生理活性に必須な神経分泌ペプチドが孵化ホルモンであるという仮説のもと、成熟ペプチドにおいてアミド化修飾を有する神経ペプチドをコードする遺伝子群に着目し、それらの機能欠損変異体、神経特異的ノックダウン個体を用い、孵化ホルモンのスクリーニングを行った。しかしながら、各々の遺伝子の機能欠損変異体、神経特異的ノックダウン個体では、孵化率の顕著な低下は観察されなかった。この結果は、複数の神経分泌ペプチドが孵化ホルモンとしてリダンダントに働く可能性を示唆する。

現在、特に C 末端のアミド化が予想されるペプチドホルモンに着目して、以下の解析を今後行うことを予定している。まず、ペプチドホルモンを産生する様々な神経分泌細胞において特異的に遺伝子発現可能なドライバーを用いて、PHM をノックダウンし、孵化率を解析することにより、孵化行動を調節する神経分泌細胞を特定する。特定した神経分泌細胞で産生されることが知られるペプチドホルモンの完全機能欠損変異体を作製し、孵化行動への影響を解析し、孵化ホルモン候補となるペプチドホルモンを改めて選択する。計画当初に孵化ホルモンの最有力候補として想定していた神経分泌ペプチド *Capa* も、C 末端のアミド化が成熟ペプチドの生理活性に必須であることが知られていることから、*Capa* を含む複数の神経分泌ペプチドがリダンダントに働く可能性も考えられる。そこで、特定した神経分泌細胞で産生されるペプチドホルモンが複数存在する場合は、それらをコードする遺伝子の、二重変異体、三重変異体を作製し、孵化率の解析を行う。特定した神経分泌細胞の投射パターン、孵化行動前後における孵化ホルモン候補の発現・分泌パターンを詳細に解析するとともに、その神経分泌細胞特異的に孵化ホルモン候補遺伝子のノックダウン、神経活動の不活性化・活性化を誘導した際の孵化行動への影響を解析する。また、様々な組織・細胞特異的に孵化ホルモン候補の受容体遺伝子をノックダウンし、孵化行動への影響を解析することにより、特定した孵化ホルモンが作用する組織・細胞を特定する。

一方、孵化ホルモンとして当初予想していた *Capa* については、その後の解析により、昆虫の幼虫から蛹からの変態過程において極めて重要な生得的行動を調節することが明らかになった。想定外の発見ではあったが、この発見を機に、後胚発生期における生得的行動の調節因子として、*Capa* に関する詳細な解析も同時進行で進めており、これについての研究成果を (B) に示す。さらに、上記の孵化ホルモンのスクリーニングで着目したアミド化ペプチドホルモンの機能解析の過程で、ion transporting peptide (ITP) と呼ばれるペプチドホルモンに関する新たな研究も遂行している。

以上のように、現時点で孵化ホルモンの実体解明には至らなかったが、今後の研究を進める上で重要な研究展望が得られた。さらに、本研究を起点として得られた結果から新たな研究が開きつつある。

(B) 孵化ホルモン候補 *Capa* の新たな機能の発見と機能解析

当初の研究目的である上記研究 (A) は、孵化ホルモンの探索を行うものである。一方、以下に示す通り、孵化ホルモン候補として着目していたペプチドホルモン *Capa* に関する重要な結果

を得たため、(A) で行った研究とは独立に、新たな研究 (B) も遂行した。

孵化ホルモン候補として着目していた *Capa* の発生ステージ特異的な機能を探るため、時期特異的に *Capa* RNAi を誘導可能な変異体を作製し、様々なステージ特異的に *Capa* をノックダウンし、その表現型を解析した。その結果、終齢幼虫期に *Capa* をノックダウンした個体は、幼虫から蛹になる際の体全体の形状変化が起こらず、幼虫の形状によく似た細長い形状の蛹になることが明らかになった (図 1A)。重要なことに、*Capa* RNAi 個体は、形状変化は起こらないにも関わらず、蛹の特徴であるクチクラの硬化や着色は誘導された。これは、*Capa* RNAi 個体は、蛹化というプロセス自体に異常をきたしたわけではなく、形状変化というプロセスに異常をきたしたことを示す。興味深いことに、これら幼虫様の形状をした *Capa* RNAi 個体の蛹は、全てが蛹期の中に致死となった。すなわち、幼虫から蛹への個体全体の形状変化は、個体の正常な発生にとって必須のプロセスであると言える。次に、*Capa* を産生する脳神経分泌細胞 (以下、*Capa* 産生神経) を遺伝学的に除去した個体や神経特異的な *Capa* RNAi においても同様の表現型が観察された。以上の結果から、脳神経分泌細胞から分泌される *Capa* によって、幼虫から蛹への形状変化が制御されることが明らかになった。

次に、*Capa* が作用する組織を特定するため、様々な組織特異的に *Capa* 受容体 (*Capa receptor: CapaR*) をノックダウンした。その結果、脊椎動物の腎臓に相当する組織であるマルピーギ管 (MT) 特異的に *CapaR* をノックダウンした個体 (*CapaR* RNAi 個体) において、*Capa* RNAi 個体や *Capa* 産生細胞除去個体と同様、幼虫期の細長い形状を維持したまま蛹になった (図 1B)。また、*CapaR* の発現解析を行なった結果、*CapaR* は、MT の先端領域において高発現していることが明らかになった。ショウジョウバエにおいて MT の先端領域は、 Ca^{2+} の貯蔵・排出に特化した領域である。さらに、*CapaR* RNAi 個体における体液中の Ca^{2+} 濃度を測定した結果、コントロール個体と比較して顕著に減少していることが明らかになった (図 1C)。驚くべきことに、*CapaR* RNAi 個体を過剰量の Ca^{2+} を含む餌で飼育することによって、この形状異常の表現型が回復した (図 1B)。これらの結果は、*Capa* が MT に作用し、体液中への Ca^{2+} 放出を促すホルモンとして機能すること、*Capa* や *CapaR* RNAi 個体では、体液中の Ca^{2+} 濃度の低下により、低カルシウム血症様の状態に陥り、大量の Ca^{2+} 消費を要する蛹化時の体表筋肉の収縮に異常をきたした結果、蛹の形状が異常になったことを強く示唆する。

現在、上記予備結果を足掛かりとして、神経由来のペプチドホルモン *Capa* が全身性 Ca^{2+} の調節を介して、体全体の形状変化を時期特異的に誘導するメカニズムを包括的に解析している。

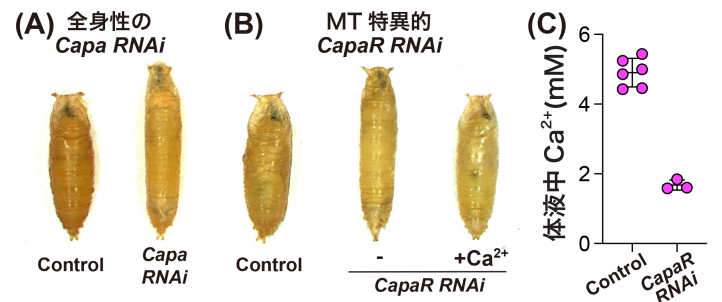


図 1. 蛹化時の形状変化と体液中 Ca^{2+} 濃度を調節する神経ペプチドホルモン *Capa* の発見

(A). 全身で *Capa* をノックダウンすると幼虫から蛹への体の形状変化が起こらず、細長い蛹になる。

(B). マルピーギ管 (MT) 特異的に *CapaR* をノックダウンすると *Capa* RNAi と同様に細長い蛹になる。この表現型は、過剰量の Ca^{2+} の摂食により回復する。

(C). MT 特異的に *CapaR* をノックダウンすると体液中 Ca^{2+} 濃度が顕著に減少する。

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 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Naoki Okamoto, Akira Watanabe	4. 巻 16
2. 論文標題 Interorgan communication through peripherally derived peptide hormones in <i>Drosophila</i>	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Fly	6. 最初と最後の頁 152 ~ 176
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1080/19336934.2022.2061834	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 該当する

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Akira Watanabe, Taishi Yoshii, Hiromu Tanimoto, Shu Kondo, Ryusuke Niwa and Naoki Okamoto
2. 発表標題 Isoform-specific expression patterns of ion transport peptide and its alternatively spliced variants imply their pleiotropic functions during development in <i>Drosophila</i>
3. 学会等名 第55回日本発生生物学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 渡邊 瑛, 丹羽 隆介, 岡本 直樹
2. 発表標題 ショウジョウバエIon transport peptide のアイソフォーム特異的な発現パターンの解析
3. 学会等名 第6回 KTTライフサイエンス研究会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 渡邊 瑛, 丹羽 隆介, 岡本 直樹
2. 発表標題 キイロショウジョウバエIon Transport Peptideのアイソフォーム特異的な機能解析
3. 学会等名 日本動物学会関東支部 第74回大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Naoki Okamoto
2. 発表標題 Endocrine regulation of body shape during development in Drosophila
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Akira Watanabe, Taishi Yoshii, Hiromu Tanimoto, Shu Kondo, Ryusuke Niwa and Naoki Okamoto
2. 発表標題 Isoform-specific expression patterns of ion transport peptide imply their pleiotropic functions in Drosophila
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Akira Watanabe, Taishi Yoshii, Hiromu Tanimoto, Shu Kondo, Ryusuke Niwa and Naoki Okamoto
2. 発表標題 Spatiotemporal expression patterns of ion transport peptide and its alternatively spliced variants imply their pleiotropic functions in Drosophila
3. 学会等名 The 14th Japan Drosophila Research Conference (JDRC14)
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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

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