

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 6 年 5 月 23 日現在

機関番号：12102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K06197

研究課題名(和文) 成長から成熟への変遷を司るコラゾニン神経の上流探索と機能解析

研究課題名(英文) A neuronal switching system from growth to maturation

研究代表者

島田 裕子 (Shimada, Yuko)

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：30722699

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：多くの生物の発生過程には幼若期から成体期へと移行する変遷ステップがあり、生殖機能の発達を伴って生理状態が大きく変化する。この変化を担うのは、個体内外の環境に反応してステロイドホルモンが適切に生合成されることである。しかしながら、環境依存的に発育から成熟へのタイミングを図る分子機構を追究した研究は未だ数少ない。本研究では、キイロショウジョウバエを用いて、飢餓条件下の終齢幼虫が成熟のタイミングを早める現象(早熟蛹化)に着目した。そして、早熟蛹化では、末梢組織においてステロイドシグナリングが増強する分子機構を新たに見出した。本研究の成果は、発生過程における生体応答の柔軟性を追究する展開となった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

多くの生物の発生過程には幼若期から成体期へと移行する変遷ステップがあり、生殖機能の発達を伴って生理状態が大きく変化する。この変化を担うのは、個体内外の環境に反応してステロイドホルモンが適切に生合成されることである。しかしながら、環境依存的に発育から成熟へのタイミングを図る分子機構を追究した研究は未だ数少ない。本研究では、キイロショウジョウバエを用いて、飢餓条件下の終齢幼虫が成熟のタイミングを早める現象(早熟蛹化)に着目した。そして、早熟蛹化では、末梢組織においてステロイドシグナリングが増強する分子機構を新たに見出した。本研究の成果は、発生過程における生体応答の柔軟性を追究する展開となった。

研究成果の概要(英文)：The developmental process of many organisms involves a transition step from juvenile to adult stages, which is accompanied by a significant change in physiological state with the development of reproductive function. This change is mostly mediated by steroid hormone biosynthesis in response to the internal and external environment of the individual. However, few studies have investigated the molecular mechanisms that regulate the timing of development to maturity in an environment-dependent manner. In this study, we focused on the phenomenon of precocious pupariation, in which starvation conditions accelerate the timing of metamorphosis of the final instar larvae of the fruit fly *Drosophila melanogaster*. We found a new molecular mechanism by which steroid signaling is enhanced in the peripheral tissues during precocious pupation. The results of this research have led to the pursuit of the flexibility of biological responses in context-dependent manners throughout development.

研究分野：発生生物学

キーワード：キイロショウジョウバエ ステロイドホルモン 成熟 神経経路 コラゾニン産生神経 エクジステロイド生合成 トランジスタシス 蛹化

1. 研究開始当初の背景

多くの生物の発生過程には、「生殖能力を有さない幼若期 (こども)」から「生殖能力を有する成体期 (おとな)」へと移行する変遷ステップが設けられており、次世代に子孫を残すために体内の生理状態が大きく変化する。この変化には、「成長 (体サイズの変化)」と「成熟 (生殖器の発達)」の側面があり、それらを担う主要な生体分子の1つとして、ステロイドホルモンが挙げられる。従来の研究において、(1) 個体内外の環境にตอบสนองしてステロイドホルモンが生合成されること、(2) ステロイドホルモン量の増減により生体応答が変化することは、哺乳類でもよく知られている。しかしながら、**環境依存的にホルモンの量を適正に調節する神経経路の全容を明らかにした研究はほとんどない。そのような中、本研究では、生物の成長から成熟への変遷(トランジスタシス)を司る神経内分泌機構の普遍的な分子基盤を解明することを目指した。**

私たちの研究グループでは、キイロショウジョウバエ *Drosophila melanogaster* を主材料として、昆虫ステロイドホルモン/エクジステロイドの生合成調節機構の解析を行っている[文献1]¹。エクジステロイドは、幼虫期において前胸腺という内分泌器官で生合成されて、体液中に分泌される。エクジステロイドがいつ、どのくらいの量合成されるのかは、前胸腺に注射する脳神経系によって支配されており、特に中心的な役割をするのは、前胸腺刺激ホルモン産生神経 (以下、PTTH 神経) である[文献2]²。近年私たちは、高い濃度 (ピークレベル) のエクジステロイドが成熟を促進する一方、低い濃度 (基底レベル) が成長を抑制することを報告した[文献3]³。しかしながら、ピークレベルと基底レベルの2つのエクジステロイド生合成に対して、PTTH 神経がそれぞれをどのように調節し分けるのは全く不明であった。また、これらの神経経路がどのような環境条件にตอบสนองするのかも不明であった。

2. 研究の目的

本研究は、従来の神経科学で研究されてきた「生理学的な満腹中枢」を担う神経回路ではなく、成長から成熟へ変遷する過程で十分な栄養が蓄えられたという「発生的な満腹中枢」を担う神経経路を明らかにすることを目的とする。そのために、私たちがこれまでに同定したエクジステロイド生合成調節に関わる神経経路が「成熟に十分な栄養が体内に蓄えられた」という情報を、いつどのように受けとっているのかを調べることが必要である。

従来の研究において、昆虫類で成熟 (蛹化) に十分な栄養が体内に蓄えられた状態は幼虫の重量「critical weight (CW)」として表現されている[文献4]⁴。キイロショウジョウバエの critical weight は 0.5~0.6 g に相当し、標準的な餌条件では3齢 (終齢) 幼虫初期 (3齢脱皮以降 10時間前後) に CW に達する[文献5]⁵。興味深いことに、幼虫は、CW に到達した後も摂食し続ける。そして、ピークレベルのエクジステロイドは、この CW 獲得後約 12~24 時間が経過してから合成される。従って、この最低限の栄養量は、成長から成熟への変遷の必要条件ではあるものの、成熟のタイミングは、CW 獲得以降の栄養シグナルによっても別途調節される可能性がある。そこで本研究では、CW 獲得後の栄養条件を詳細に検討することによって、基底レベルからピークレベルへのエクジステロイド生合成を促す神経経路とそのトリガーシグナルを明らかにできると着想した。

3. 研究の方法

ショウジョウバエ成虫をグレープ寒天上で飼育して産卵させる。22 時間後に孵化したばかりの1齢幼虫を約 30~40 匹ピックアップし、小バイアルで飼育する。孵化後 72 時間の3齢幼虫を2つのグループにわけて、1つは新しい餌バイアルに戻し、もう1つは何も含まれていない寒天培地上か、水を含んだスポンジの上で飼育する。そして、24~48 時間以内にそれらのグループの幼虫が蛹化するタイミングを記録した。そして、蛹化した個体の全体数を 100%とした時の、各タイムポイントでの蛹化率を算出した。

4. 研究成果

(1) **早熟蛹化 (precocious pupariation) は、孵化後 64~90 時間の個体を飢餓条件に置くことで観察された。**

私たちは、3齢幼虫を様々な発生時期から飢餓条件 (1% 寒天培地) において蛹化するタイミングを記録した。その結果、孵化後 55 時間では、20%以下の個体しか蛹化しなかったのに対して、孵化後 64 時間から 94 時間の個体では、ほぼ 100%が蛹化した (図1)。そして、孵化後 64, 68, 72, 90 時間の個体において、餌中に留めたコントロール個体よりも早く蛹化する傾向があった。一方、孵化後 94 時間の個体では、蛹化するタイミングは餌中の個体とほとんど変わらなかった。これらの結果から、私たちの実験環境において、既報の早熟蛹化の表現型が再現できることが確認された[文献6]⁶。以降の実験では、孵化後 72 時間の個体を飢餓条件に置くこととした。

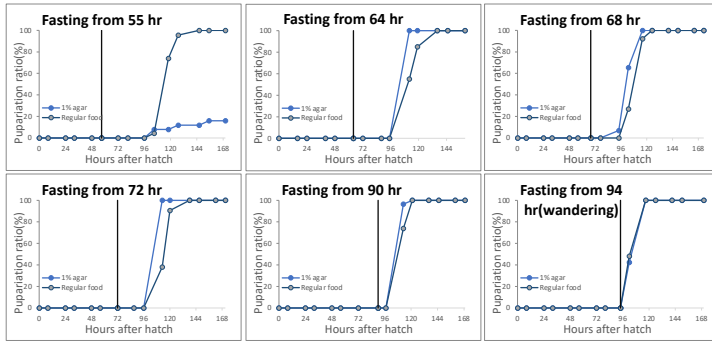


図1：孵化後64-90時間の個体を飢餓条件におくと、通常餌条件の個体と比べて蛹化のタイミングが早まる。

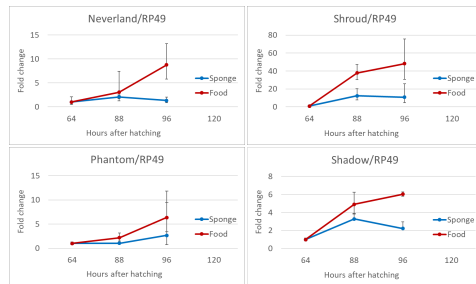


図2：早熟蛹化条件において、蛹化のタイミングが早まるにも関わらず、エクジステロイド関連遺伝子群の発現は増加しなかった。

(3) エクジステロイド生合成低下個体 *sro*-RNAi が、CW 後の飢餓条件において蛹化した。

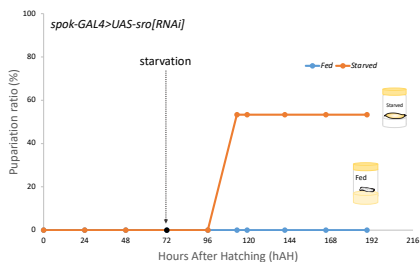


図3：エクジステロイド生合成酵素遺伝子の1つ *shroud* (*sro*) の機能低下個体を孵化後72時間から飢餓条件に置くと、約半数以上が蛹化した（橙線）。通常餌条件下では、この個体は蛹化しない（青線）。

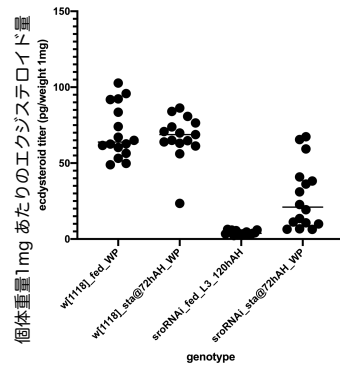


図4：飢餓条件において、*sro* 機能低下個体のエクジステロイドタイターが増加した。

(4) エクジステロイド生合成低下個体が、CW 後の飢餓条件において蛹化した。

私たちは、*sro* 機能低下個体以外に、複数の異なるエクジステロイド生合成低下変異体を飢餓条件に置く実験を行った。エクジステロイド生合成に関与する遺伝子群は、エクジステロイド生合成遺伝子のみならず、エクジステロイド生合成遺伝子の転写調節因子やエクジステロイドシグナル伝達経路の因子を含む。それらの変異体は、エクジステロイド生合成量が十分ではないために、各発生段階で発育が停止する。これらを飢餓条件に置くと、*sro* 機能低下個体と同様に、発育が進行する表現型が観察された（図5）。さらに、CW 後に飢餓条件に置くタイミングが早いほど、蛹化率が高まる傾向も確認された。以上の結果から、エクジステロイド生合成が低下する個体全般において、CW 後の飢餓条件によってエクジステロイド生合成が促進される新しいメカニズムがあることが示唆された。

(2) 早熟蛹化において、エクジステロイド生合成遺伝子群の発現は促進されなかった。

昆虫の脱皮と変態を支配するホルモン・エクジステロイドは、食餌中のコレステロールを原材料として、多段階の酵素反応経路によって合成される。私たちの研究グループと海外のグループは、各生合成ステップを担う酵素遺伝子群を同定し、その発現が幼虫期の脱皮直前あるいは蛹化直前において

劇的に増加することをこれまでに報告してきた[文献7]。従って、早熟蛹化においては、飢餓シグナルによってエクジステロイド生合成遺伝子群の発現時期が早まるのではないかと、私たちは仮説を立てた。ところが予想に反して、早熟蛹化直前のエクジステロイド生合成遺伝子群の発現は増加しておらず、むしろ飢餓条件下では、発現量は変わっていなかった（図2）。この結果から、早熟蛹化において、前胸腺でのエクジステロイド生合成経路は活性化されていないことが示唆された。

(2)の結果は、早熟蛹化はエクジステロイド生合成を伴わないことを示唆しており、エクジステロイド生合成遺伝子群の転写調節が蛹化のタイミングを決定するという従来の定説と合致しない。この結果に驚いた私たちは、CW 後の飢餓条件におけるエクジステロイド生合成経路の活性化を詳細に調べるために、エクジステロイド生合成遺伝子の1つである *shroud* (*sro*) の機能低下個体を飢餓条件に置く実験を行った。*sro* 機能低下個体では、蛹化に必要な量のエクジステロイドを合成できないので、通常の餌条件では100%蛹化しない（図3青線）。ところが、孵化後72時間で飢餓に置いた *sro* 機能低下個体は、通常餌条件とは異なり、半数以上が蛹化した（図3橙線）。

実験当初は、私たちは、この結果が信じられずに、交配実験に用いた系統が汚染されている可能性や、飢餓条件によって *sro* の機能低下を引き起こす外来遺伝子強制発現誘導系（GAL4/UASシステム）やRNA干渉（RNAi）の効果が弱まったためではないかと考えた。しかし、飢餓条件においても遺伝子発現やRNAiの効果は持続することが確認された。また、*sro* 機能低下個体において、他のエクジステロイド生合成遺伝子群の発現が上昇していないことも確認した。さらに、幼虫体内のエクジステロイド量をELISA法によって測定したところ、飢餓条件において *sro*-RNAi 個体でのエクジステロイド量が増加していることがわかった（図4）。以上の実験結果から、CW 後の飢餓条件では、前胸腺でのエクジステロイド生合成遺伝子の発現に依存せずに、エクジステロイド量が増えて蛹化が誘導される可能性が支持された。

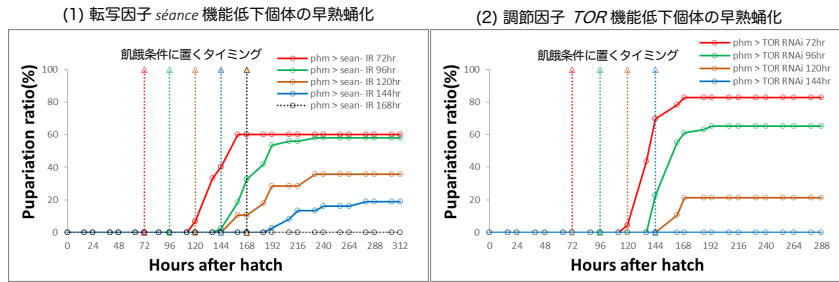


図5：飢餓条件において、*sro* 機能低下個体だけではなく、他のエクジステロイド生合成低下個体の発育進行も誘導された。

は幼虫致死であり、エクジステロイド生合成能力を完全には欠失していない。そこで、前胸腺でのエクジステロイド生合成が完全に抑制された幼虫を作出するために、GeneSwitch システムを用いて、前胸腺細胞を時期特異的に除去する実験を行った。具体的には、アポトーシス誘導遺伝子 *reaper* と *hid* を前胸腺細胞で強制発現させることによって、幼虫期でのエクジステロイド生合成を完全に阻害した。

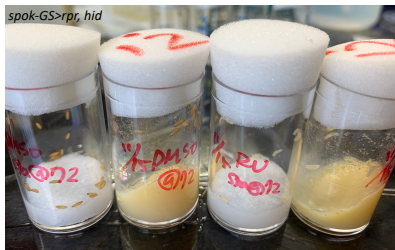


図6：前胸腺を幼虫期に除去した個体は、飢餓条件においても蛹化しなかった。

まず、標的遺伝子の発現を誘導する化合物 RU486 を幼虫の食餌中に加えるタイミングを図り、3 齢幼虫にはなるが蛹化は全くしない、という条件を設定した。そして、RU486 摂食後の個体において、前胸腺が細胞死誘導によって顕著に縮退することを確認した。次に、この個体を飢餓条件においたところ、全く蛹化することはなかった (図6)。この結果から、CW 後の飢餓条件によって蛹化が誘導されるには、前胸腺でエクジステロイドが少しは生合成されることが大前提であることが示唆された。例えば、前胸腺以外の組織がエクジステロイド生合成を行うようになるという可能性は低いと私たちは結論した。

(6) CW 後の飢餓条件において、脂肪体でのエクジステロイドシグナル伝達経路が亢進した。

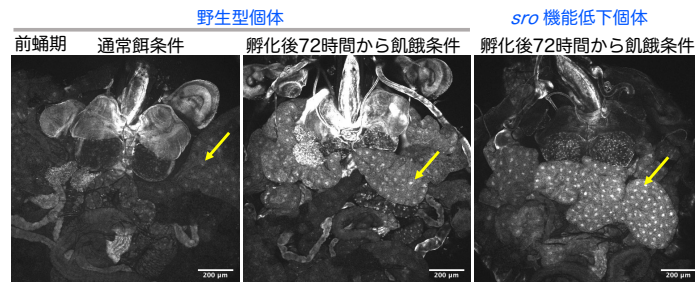


図7：エクジステロイドシグナル伝達経路の活性をモニターする系統 *EcRE-GFP* を飢餓条件においたところ、脂肪体における GFP シグナルが顕著に亢進していた。

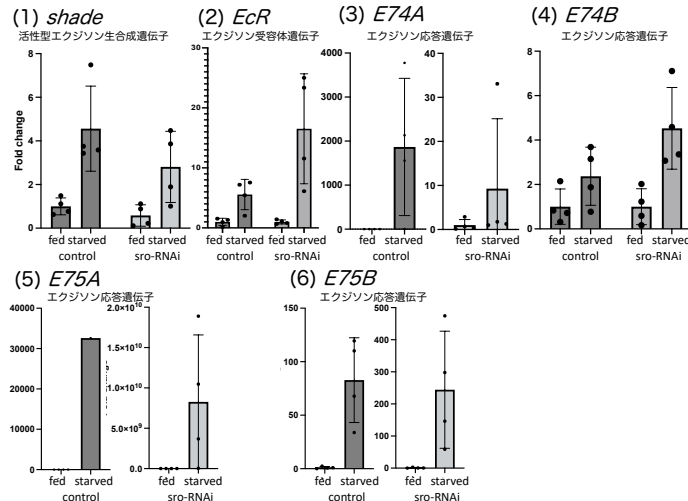


図8：飢餓条件後20時間において、エクジステロイドシグナル関連遺伝子の発現が顕著に増加した

応答遺伝子 *E74A*, *E74B*, *E75A*, *E75B* の発現が顕著に亢進されていた (図8)。これらの発現の増加は、野生型よりも *sro-RNAi* 個体においてより顕著に検出された。以上の結果から、CW 後の飢餓条件において、前胸腺ではなく、脂肪体において活性型エクジソン生合成ならびにエクジステロイドシグナル伝達経路が増進することが強く示唆された。

[5] 早熟蛹化において、前胸腺でのエクジステロイド生合成は必須である。

エクジステロイド生合成遺伝子の完全機能欠失変異体は胚性致死であるのに対して、上記実験で用いているエクジステロイド生合成低下個体

は幼虫致死であり、エクジステロイド生合成能力を完全には欠失していない。そこで、前胸腺でのエクジステロイド生合成が完全に抑制された幼虫を作出するために、GeneSwitch システムを用いて、前胸腺細胞を時期特異的に除去する実験を行った。具体的には、アポトーシス誘導遺伝子 *reaper* と *hid* を前胸腺細胞で強制発現させることによって、幼虫期でのエクジステロイド生合成を完全に阻害した。

まず、標的遺伝子の発現を誘導する化合物 RU486 を幼虫の食餌中に加えるタイミングを図り、3 齢幼虫にはなるが蛹化は全くしない、という条件を設定した。そして、RU486 摂食後の個体において、前胸腺が細胞死誘導によって顕著に縮退することを確認した。次に、この個体を飢餓条件においたところ、全く蛹化することはなかった (図6)。この結果から、CW 後の飢餓条件によって蛹化が誘導されるには、前胸腺でエクジステロイドが少しは生合成されることが大前提であることが示唆された。例えば、前胸腺以外の組織がエクジステロイド生合成を行うようになるという可能性は低いと私たちは結論した。

(6) CW 後の飢餓条件において、脂肪体でのエクジステロイドシグナル伝達経路が亢進した。

エクジステロイド生合成経路では、前胸腺細胞でエクジソンが合成された後、エクジソンは体液中に分泌されて、主に脂肪体で活性型エクジソン (20-ヒドロキシエクジソン) に変換される。そして、活性型エクジソンが体液中を循環し、各細胞のエクジステロイド受容体と結合し、共に核内へと移行して下流標的遺伝子群の転写を調節する。そこで、CW 後の飢餓条件が、エクジステロイドシグナル伝達経路に及ぼす影響を調べるために、エクジステロイド受容体応答配列の下流に GFP を繋いだ系統 *EcRE-GFP* を可視化した。その結果、飢餓条件後の 24 時間～前蛹段階において、*EcRE-GFP* が脂肪体で顕著に亢進することがわかった (図7 矢印)。それに対して、前胸腺での *EcRE-GFP* はほとんど変化が見られなかった。

この結果と一致して、CW 後の飢餓条件において、脂肪体での活性型エクジソン生合成遺伝子 *shade*、エクジソン受容体 *EcR*、エクジソン

(7) CW後の飢餓条件において、脂肪体での *FOXO* ならびに *dilp6* が早熟蛹化に關与する可能性

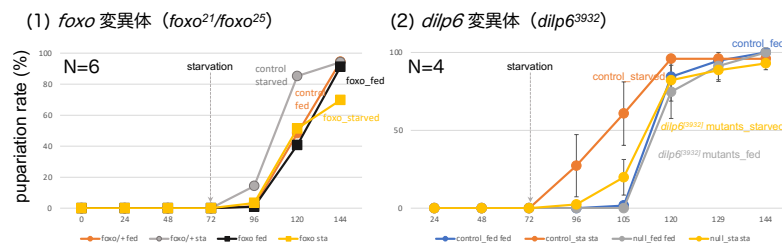


図9: *foxo* 変異体および *dilp6* 変異体において、飢餓条件での早熟蛹化が顕著ではなかった

上記実験結果は、CW後の飢餓条件は、前胸腺のエクジステロイド生合成経路ではなく、脂肪体での活性型エクジソンの産生、ならびにエクジステロイドシグナル伝達経路を亢進することを示唆している。とすると、飢餓シグナルを脂

肪体で受け取るメカニズムが、脂肪体でのエクジステロイド産生やシグナル伝達経路にも關与している可能性があげられる。

この仮説を検証するために、私たちは、飢餓応答遺伝子としてよく知られている転写因子 Forkhead box sub-group 0 (Foxo)、ならびに、脂肪体で発現するインスリン様成長因子 (IGF) Dilp6 (Drosophila insulin-like peptide 6) に着目した。興味深いことに、*foxo* 変異体と *dilp6* 変異体を CW後に飢餓条件に置いたところ、早熟蛹化の表現型が、野生型に比べてあまり顕著ではないという結果を得た (図 9)。一方で、両者の機能を脂肪体で低下させた個体では、早熟蛹化は観察された。以上の結果から、飢餓条件において、Foxo と Dilp6 がエクジステロイドシグナル伝達経路を亢進する可能性について、今後も詳細な解析が必要である。

(8) 研究成果のまとめ

私たちは、生物の成長から成熟への変遷を司るシグナルを調べる過程において、栄養条件が真逆の役割を持つことに着目した。すなわち、成長過程では、栄養は成長を促進するシグナルであるのに対して、成長から成熟へ向かう過程では、栄養が逆に早熟を抑えるブレーキの役割を果たす。そして、このブレーキが抑えるのは、前胸腺のエクジステロイド生合成経路ではなく、脂肪体において活性型エクジソンを産生する酵素遺伝子 *shade* の転写と、その下流で駆動されるエクジステロイドシグナル伝達経路であることを、私たちは見出した。この発見は、これまでに、脱皮ホルモンの生合成は、前胸腺に注射する神経支配ならびに前胸腺の遺伝子群の転写調節機構で説明できるとしてきた定説とは、一線を画す。

本研究成果は、動物の繁殖成功戦略と現代社会の飽食と子供の早熟化を生物学的に検討する上での基礎科学的知見を提供する。自然界全般では、餌が十分でない状況で成熟化が促進される仕組みは自然の摂理にかなっている。飢餓時の早熟化は、昆虫に限らず脊椎動物でも見られる現象である。一方、現代の先進国では、栄養過多による若者の早熟化とガン・成人病のリスク増大の相関関係が指摘されている。どちらも、貧栄養あるいは富栄養の条件が生物の成熟と相関すると考えられているものの、発育段階の遷移に必要な栄養量の見積もりは困難で、分子機構はほとんど不明である。それに対して、発育段階が明瞭な昆虫をモデル系として成長と成熟の分子基盤を追究する本研究は、学術的にも社会的にも意義ある発生生物学の知識として世に還元してあげると考えられる。

【参考文献】

1. Niwa, Y. S. & Niwa, R. Transcriptional regulation of insect steroid hormone biosynthesis and its role in controlling timing of molting and metamorphosis. *Dev. Growth Differ.* **58**, 94–105 (2016).
2. Niwa, Y. S. & Niwa, R. Neural control of steroid hormone biosynthesis during development in the fruit fly *Drosophila melanogaster*. *Genes Genet. Syst.* **89**, 27–34 (2014).
3. Imura, E. *et al.* The Corazonin-PTTH Neuronal Axis Controls Systemic Body Growth by Regulating Basal Ecdysteroid Biosynthesis in *Drosophila melanogaster*. *Curr. Biol.* **30**, 2156–2165.e5 (2020).
4. Koyama, T., Mendes, C. C. & Mirth, C. K. Mechanisms regulating nutrition-dependent developmental plasticity through organ-specific effects in insects. *Frontiers in Physiology* vol. 4 SEP Preprint at <https://doi.org/10.3389/fphys.2013.00263> (2013).
5. Koyama, T., Rodrigues, M. A., Athanasiadis, A., Shingleton, A. W. & Mirth, C. K. Nutritional Control of Body Size Plasticity through FoxO-Ultraspiracle Mediated Ecdysone Biosynthesis. *Elife* (2014).
6. Xie, X.-J. *et al.* CDK8-Cyclin C Mediates Nutritional Regulation of Developmental Transitions through the Ecdysone Receptor in *Drosophila*. *PLoS Biol.* **13**, e1002207 (2015).
7. Niwa, R. & Niwa, Y. S. Enzymes for ecdysteroid biosynthesis: their biological functions in insects and beyond. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **78**, 1283–1292 (2014).

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2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 2件）

1. 著者名 Yuko S. Niwa and Ryusuke Niwa	4. 巻 32
2. 論文標題 Endocrinology: Non-insulin-producing cells secrete insulin under nutrient shortage	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Current Biology	6. 最初と最後の頁 R380-R382
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.cub.2022.0	査読の有無 無
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 Mizuno Yosuke, Imura Eisuke, Kurogi Yoshitomo, Shimada Niwa Yuko, Kondo Shu, Tanimoto Hiromu, Hucklesfeld Sebastian, Pankratz Michael J., Niwa Ryusuke	4. 巻 63
2. 論文標題 A population of neurons that produce hugin and express the diuretic hormone 44 receptor gene projects to the corpora allata in Drosophila melanogaster	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Development, Growth & Differentiation	6. 最初と最後の頁 249 ~ 261
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/dgd.12733	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2件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 島田裕子
2. 発表標題 Starvation induces precocious pupariation in Drosophila melanogaster
3. 学会等名 第54回日本発生物学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 島田裕子
2. 発表標題 栄養と発育をつなぐ神経内分泌機構の研究
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会年会
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
研究協力者	林 信光 (Lin Hsin Kuang)	筑波大学・大学院生命環境科学研究科・大学院生 (12102)	
研究協力者	ハニフ ハスナ (Hanif Hassna)	筑波大学・生命環境学群生物学類・学部生 (12102)	
研究協力者	阿部 奏仁 (Abe Kanato)	筑波大学・生命環境学群生物学類・学部生 (12102)	
研究協力者	大原 裕也 (Ohara Yuya)	静岡県立大学・食品栄養科学部・助教 (23803)	
研究協力者	岡本 直樹 (Okamoto Naoki)	筑波大学・生存ダイナミクス研究センター・准教授 (12102)	
研究協力者	丹羽 隆介 (Niwa Ryusuke)	筑波大学・生存ダイナミクス研究センター・教授 (12102)	

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