

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 10 日現在

機関番号：35303

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22570076

研究課題名（和文）ハエの羽化リズムを調節する概日時計出力機構の神経・内分泌学的研究

研究課題名（英文）Neurological and Endocrinological analysis of the output pathways of circadian clock driving eclosion rhythm in the flies, *Drosophila melanogaster* and *Sarcophaga crassipalpis*

研究代表者

泰山 浩司 (YASUYAMA KOUJI)

川崎医科大学・医学部・准教授

研究者番号：60148690

研究成果の概要（和文）：

ショウジョウバエにおいて概日時計が羽化ゲートを制御する仕組みを調べるため、羽化の前後のみに存在する PDF-Tri ニューロンと羽化に関わるニューロン (CCAP-, EH-, corazonin-ニューロン) との接続を解析し、シナプス結合することを明らかにした。また、シリアカニクバエの羽化リズムの解析から、羽化ゲートの決定には、羽化 20～16 時間前までに起こるエクジステロイド量低下と、羽化 6 時間前から羽化までに出る時刻情報が駆動するホルモンカスケードが関わると考えられた。

研究成果の概要（英文）：

To understand how the circadian clocks time the gate of eclosion in *Drosophila melanogaster*, we examined the neuronal connection focusing on the putative clock neurons, PDF-Tri neurons, that transiently occur associated with eclosion, and showed the synaptic connections between the PDF-Tri and the peptidergic (CCAP-, EH- or corazonin) neurons involved in eclosion behavior. We also analyzed the eclosion rhythms in the flesh fly *Sarcophaga crassipalpis*, and revealed that two mechanisms are required for determination of the gate of eclosion. One is driven by low titer of 20-hydroxyecdysone between 20 h and 16 h before eclosion, and the other is driven by the signal from the circadian clock transmitted later than 6 h before eclosion.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	2,500,000	750,000	3,250,000
2011 年度	600,000	180,000	780,000
2012 年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：基礎生物学・動物生理 行動

キーワード：羽化リズム，ハエ目昆虫，概日時計，ペプチドニューロン，免疫電顕法

1. 研究開始当初の背景

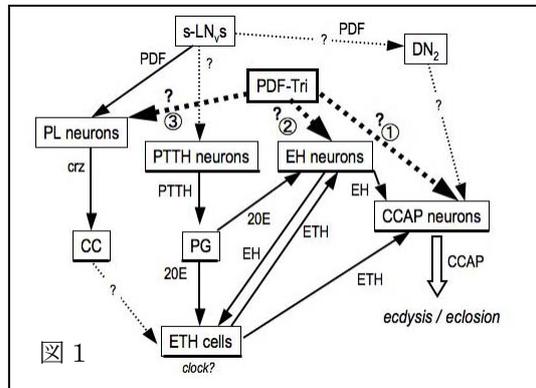
キイロショウジョウバエ (*Drosophila melanogaster*) では、時計遺伝子 *period* (*per*)

や *timeless* (*tim*) を発現するニューロン集団のうち、脳の側縁部にある s-LN_vs が概日時計ニューロンとして重要な役割を担っている。

s-LN_vs は PDF ペプチド (色素拡散因子) を特異的に産生している、このペプチドは時計情報を伝える重要な神経化学物質とみなされている。

昆虫の羽化は一日の特定の時間帯に起こる。キイロショウジョウバエは明暗サイクルのもとでは明期開始直後に揃って羽化し、このリズムは恒暗条件下で自由継続する。per 遺伝子変異体 *per⁰* では羽化リズムがみられない (Konopka and Benzer, 1971)。また、PDF を発現する LN_vs を選択的細胞死によって除去した個体や、PDF を産生できない *pdf⁰* 変異体でも羽化リズムはみられなくなる (Myers et al., 2003)。このことから、羽化リズムが脳にある概日時計ニューロンによって制御されていることは明らかであるが、羽化を誘起するホルモンカスケードのどこに時刻情報が入力するのか、未だ不明である。

ハエやガにおけるこれまでの報告から、羽化を誘起するホルモンカスケードには、図 1 に示すように 5 種類 of ホルモン (crustacean cardioactive peptide (CCAP), 羽化ホルモン (EH), 脱皮誘発ホルモン (ETH), 前胸腺刺激ホルモン (PTTH), エクジステロイド (20E)) が関係すると考えられている。20E の体液中濃度が低下すると、EH と ETH の分泌が起こり、EH と ETH は互いの正のフィードバックによって分泌が増強される。ETH は前脱皮運動に関わり、EH は脱皮運動を駆動する CCAP の分泌を刺激する (図中の略号: CC, 側心体; crz, コラゾニン; PDF, 色素拡散因子; PG, 前胸腺)。



概日時計ニューロンから、これらのホルモンを産生する羽化関連細胞への出力経路には、直接シナプス入力する神経性出力経路と、概日時計ニューロンから時刻情報を受ける中継細胞が神経ホルモンによって羽化関連細胞を制御する液性出力経路が想定される。また、羽化関連細胞自身に時計機能が内在する可能性も考えられる。キイロショウジョウバエには、蛹期中期に後大脳に出現し羽化後 4 日以内に消失する PDF 産生ニューロン (PDF-Tri) がある (Helfrich-Förster, 1997)。PDF-Tri

は羽化の前後のみに存在し、その投射域が羽化関連細胞の一つである CCAP ニューロンと重なることから (Park et al., 2003), 羽化リズムのコントロールに関与している可能性が考えられる。

申請者らはこれまでに免疫電顕法を用いて、ルリキンバエ (*Protophormia terraenovae*) の PDF 抗体陽性の概日時計ニューロンが、脳背側-側方部にあり側心体に投射する神経分泌細胞 (PL ニューロン, コラゾニンを産生) とシナプス結合することを明らかにした (Hamanaka et al., 2005)。これは、概日時計ニューロンの出力が、PL ニューロン-側心体を介して ETH 細胞に伝えられ、羽化リズムをコントロールするという液性出力経路を示唆する。

このような状況の下に、概日時計システムと羽化を誘起するホルモンカスケードの接点を検索・同定する研究を立案した。

2. 研究の目的

本研究は、概日時計システムと羽化を誘起するホルモンカスケードの接続関係を明らかにすることを目的とする。具体的には、(1) 神経性出力経路の検証: キイロショウジョウバエにおいて、羽化の前後のみに見られ、概日時計ニューロンに特異的な PDF ペプチドを発現することから羽化の制御に関わる可能性が考えられるニューロン、PDF-Tri に注目し、このニューロンと羽化関連細胞 (CCAP ニューロン, EH ニューロン, PL ニューロンなど) の間の機能的結合 (図 1 の①, ②, ③の経路) の有無を明らかにするため、共焦点レーザー顕微鏡および電子顕微鏡を使う免疫組織化学法によって両者のシナプス結合を検証する。また、キイロショウジョウバエと大型ハエの PDF 産生ニューロンや羽化関連細胞の形態を比較し、羽化リズムの制御経路を構成する共通ニューロンの抽出を目指す。(2) 液性出力経路の検証: 実験形態学的手法が容易な大型のハエ (シリアカニクバエ *Sarcophaga crassipalpis*) の羽化リズムを解析し、その結果をもとに蛹期の様々な時期にコラゾニンやエクジステロイドなどを投与して、羽化リズムに及ぼす影響を調べる。

3. 研究の方法

(1) 実験動物

神経性出力経路の検証には、キイロショウジョウバエの野生型 (Canton-S), CCAP-GAL4/UAS-GFP 系統, *w¹¹¹⁸*-Gal4/UAS-GFP 系統 (EH ニューロンの標識) と、シリアカニクバエを用いた。液性出力経路の検証にはシリアカニクバエを用いた。

(2)免疫組織化学

脳組織：羽化直前(ファレート成虫)，羽化後(5-48時間)に脳を摘出・固定し，一次抗体(PDF抗体とCCAP抗体，またはコラズニン抗体)と蛍光色素標識二次抗体(Alexa Fluor 488または594)を用いて二重染色を行い，共焦点レーザー顕微鏡を用いて観察した。

脳後方内分泌腺複合体：時計遺伝子の発現の有無を調べるため，PER抗体を用いてABC法によって免疫染色した。また，PER抗体(二次抗体：Alexa Fluor 488標識)に加えて，脂質動員ホルモン(AKH)抗体(二次抗体：TRITC標識)とDAPIによる三重染色を行った。

(3)免疫電顕法

アビジン-ビオチン複合体によるプレエンベッディング法(ABC酵素抗体法)と，10nmコロイド金標識二次抗体を用いるポストエンベッディング法(10nm金コロイド法)を併用する，二重染色免疫電顕法によってニューロン間のシナプス結合関係を調べた。

(4)新たな二重染色免疫電顕法の試み

1.4nmコロイド金標識二次抗体を用いるプレエンベッディング法(1.4nmコロイド金法)とABC酵素抗体法によるプレエンベッディング法を併用する免疫電顕法を試みた。この方法では樹脂包埋前に二重免疫染色を行うので，染色過程の繁雑さを軽減できる利点がある。

(5)羽化リズムの記録

シリアカニクバエの羽化は，光電式の‘fall ball’羽化記録装置で検出し，6分間隔で積算値を集計した。記録データはR値を用いて解析し，羽化リズムの有無を判定した。

(6)シリアカニクバエ蛹へのホルモン投与

コラズニン：蛹の腹部に全量が2fmolもしくは1pmolとなるように1 μ L注射した。対照群には等量の蒸留水を注射した。

20E：蛹の腹部に1 μ L(0.2, 2, 20, 200, 2000 ng/個体；10%エチルアルコール溶解)注射した。対照群には等量の10%エチルアルコールを注射した。

4. 研究成果

(1)神経性出力経路の検証：羽化関連ニューロンの形態学的解析

① PDF-Tri ニューロン

キイロショウジョウバエのPDF-Triは困蛹殻形成後3日に出現し，羽化後4日以内に消失することから，概日時計と羽化ホルモンカスケードの連絡に関与している可能性が考えられる。PDF-Triの細胞体は後大脳(食道下神経節(SOG)前方部)に1-2対存在する。これまでにPDF-Triの詳細な形態は記載されていなかったが，今回の観察から以下のことが

明らかとなった。細胞体から派出した軸索は二叉し，一方は細胞体近く(mandibular segment)で分枝を出し，さらにmedian bundle(MB)を通して脳間部に走行する。MBを走行する繊維は，食道孔の側壁域にも分枝を出す。他方はさらに二叉して，食道孔の下面に沿ってmaxillary segmentの背側を通る経路(SOG背側経路)と，mandibular segmentとmaxillary segmentとの境界部を通る経路(SOG中央経路)を走行して食道下神経節後方に投射する。

シリアカニクバエにはPDF-Triに対応するニューロンは見られなかったが，前大脳側縁部にあるPDFニューロン(キイロショウジョウバエのLN_sに相当)から発する繊維がSOGに投射していた。シリアカニクバエのPDFニューロンの形態は，ルリキンバエのそれと類似していた(Nässel et al., 1993)。脳半球あたり大型の細胞体4個，小型細胞体が4個あり，これらから発した繊維は視葉，前大脳(食道孔背側域，前大脳側葉，キノコ体傘部の周辺域)，触角葉に広く分布する。食道孔背側域から食道孔側壁を下降する繊維が，SOGに達する。

ルリキンバエには，細胞体が中心複合体の背方にあり，食道孔背側のニューロパイルに繊維が走行するPDF抗体陽性のPLニューロンが存在するが(Hamanaka et al., 2005)，シリアカニクバエでは見られなかった。

② CCAP ニューロン

キイロショウジョウバエCCAP-Gal4/UAS-GFP系統のファレート成虫を使ってCCAPニューロンの脳内分布と形態を調べた。細胞体の位置に基づき脳半球あたり4タイプのCCAPニューロンに分類した(sog_L:SOG側方部に4個，sog_M:SOG下方部に1個，ca_M:キノコ体傘部に近接する前大脳後方背側部に2個，dmp_A:前大脳前方中央部に1個；数は半球あたりの個数)。このうち，dmp_AはCCAP抗体では免疫標識されず，EH抗体に陽性であった。また，ca_M以外のニューロンは羽化後3日以内に見られなくなった。sog_L由来の神経繊維は食道孔直下のSOG中央部に分枝する。ca_Mからの繊維は細胞体と脳間部の間に同側性に分布する。

シリアカニクバエの羽化24時間前，直後，24時間後，48時間後の個体でCCAPニューロンの形態を比較した。羽化24時間前ではキイロショウジョウバエと同様に，sog_L4対，sog_M1対，ca_M1対の細胞体が見られた。SOGのCCAPニューロン(sog_Lとsog_M)はキイロショウジョウバエの場合と同じく，羽化後2日目には見られなくなった。細胞体の免疫染色性は24時間後には低下し始め，48時間後では検出でき

なくなった。一方, ca_v には染色性の低下は見られなかった。

③ EHニューロン

キイロショウジョウバエ w^{1118} -Gal4/UAS-GFP 系統のファレット成虫を使って EH ニューロンの脳内分布と形態を調べた。大型の 1 対の細胞体が前大脳前方中央部に見られた。細胞体から発した軸索は二叉し (第 1 分岐), 一方は前大脳背側後方に走行し脳間部で多数の細い分枝を出して終末する。他方の神経繊維は触角葉の後方を通して食道下神経節に下降し, さらに二叉する (第 2 分岐)。一方の神経繊維は MB に沿って下行して食道孔の側壁で細かく分枝し, さらに食道下神経節正中部に走行する。他方は MB より外側の経路を通して下行し, 食道孔側壁に沿って脳を貫いて前方から後方へと走行する。細胞体の位置や, 第 1・2 分岐の箇所は個体によって差異が見られた。

3 種類の EH 抗体を入手し, シリアカニクバエで免疫染色を行ったが, 良好な染色結果が得られなかったため EH ニューロンの形態解析は行えなかった。

④ コラゾニン(Crz)ニューロン

Crz 抗体陽性ニューロン[キイロショウジョウバエでは DLP ニューロン (Choi et al., 2005); ルリキンバエでは PL ニューロン (Hamanaka et al., 2007) と呼ばれる]は前大脳背側-側方部に ~7 対あり, 神経繊維は主に 2 つの経路を走行する。一方は, MB を通って SOG に走行し, PDF-Tri の繊維が走行する SOG 中央経路に入る。他方は後側方経路 (posterior lateral tract, PLT) を経て食道孔に向かい, 食道孔背側壁にそって前方から後方に走行する。

シリアカニクバエのファレット成虫 (羽化 24 時間前) の脳における Crz ニューロンの分布を調べた。前大脳背側-側方部に ~7 対の細胞体が見られた。これらの細胞体から発する繊維の投射経路はキイロショウジョウバエのそれと類似する。MB を通って SOG に走行した繊維は, 食道孔側壁で PDF 陽性繊維と接する。シリアカニクバエの Crz ニューロンは, ルリキンバエの PL ニューロンに形態学的に対応する。前者は PDF 抗体陰性で, 後者は Crz 抗体と PDF 抗体に陽性であることが大きな相違点であった。

⑤ キイロショウジョウバエ PDF-Tri と CCAP-, EH-, Crz ニューロンの連絡 (図 1 の ①, ②, ③ の経路)

ABC 酵素抗体法/10nm 金コロイド法併用の免疫電顕法による解析から, PDF-Tri は SOG で CCAP ニューロンにシナプス結合すること

が明らかになった。シナプス結合は SOG 背側経路と SOG 中央経路で観察され, ともに PDF-Tri から CCAP ニューロンへの出力シナプスであった。

共焦点レーザー顕微鏡による観察から, PDF-Tri と EH ニューロンは, 前大脳脳間部 (MB 背側起始部周辺), 食道孔側壁部, SOG 背側正中部で神経繊維の投射域が重なり, PDF-Tri と Crz ニューロンも同様の領域で神経繊維が接することが明らかになった。SOG 中央経路を走行し終末する Crz ニューロンの投射繊維を PDF-Tri 神経繊維が密に取りまく。三次元画像解析から, PDF-Tri と Crz ニューロンは SOG 中央経路でシナプス連絡していると考えられた。

1. 4nm コロイド金法/ABC 酵素抗体法併用によるプレエンベッド二重染色免疫電顕法は, 良好な弁別染色が可能な有用な方法であることが明らかになった。この免疫電顕法による PDF-Tri と EH-, Crz ニューロンとのシナプス結合の証明は今後の課題である。

以上の結果から, 前大脳脳間部, 食道孔側壁, SOG 背側部, SOG 中央経路と, これらを連絡する MB は, 羽化の誘起と制御に関連するニューロン群のシナプス結合の場となっていると考えられた。

(2) 液性出力経路の検証: シリアカニクバエの羽化リズムと羽化に関わるホルモンカスケードの解析

①羽化リズム

明暗 12 時間:12 時間, 25°C で飼育すると, 囲蛹化から 13~14 日目 (約 300~360 時間) で羽化し, 明期前半に羽化が集中した。恒暗 25°C においても, 囲蛹化から 13~14 日間でほとんどの個体が羽化し, 主観的明期の前半に羽化が集中した。

恒明恒温 (25°C または 28°C) で数世代飼育した個体群には羽化リズムは見られなかった。恒明 28°C で飼育した個体の蛹期に, TC サイクル (T: 28°C, C: 22°C) 12 時間:12 時間を 2 回与えると羽化リズムが見られるようになり, 羽化 2 日前でも TC サイクルに同調した。

②低温パルス刺激の羽化リズムへの影響

22°C・4 時間, または 4°C・1 時間の低温パルス刺激を与えると, パルス刺激を与えた概日時刻に依存して羽化リズムの位相シフトが見られた。これをもとに求めた位相反応曲線は共にタイプ 1 であった。22°C・4 時間パルス刺激では羽化 18 時間前まで, また, 4°C・1 時間パルス刺激では 6 時間前まで位相変位を引き起こすのに有効であった。

③コラゾニン投与の羽化リズムへの影響

タバコスズメガではコラゾニンが下流のホルモンカスケードを駆動させることが報告されている。シリアカニクバエ蛹にコラゾニンを注射し、羽化時刻に与える影響を調べた。その結果、羽化の約 5-10 時間前の注射により羽化時間が早まったのは 11 個体中 2 個体のみであった。

④20-ヒドロキシエクジソン (20E) 投与の羽化リズムへの影響

投与時刻依存的に羽化リズムの位相シフトが見られた。羽化 20 時間前では、0.2, 2 または 20 ng 注射した個体に、また羽化 16 時間前では 20 または 200 ng 注射した個体に、対照群と比較して有意に位相の遅れが見られた (Steel-Dwass test, $P < 0.01$)。羽化 12 時間前、8 時間前に注射した場合には位相シフトは見られなかった。

⑤脳後方内分泌腺複合体の PER 免疫染色

PER 抗体陽性の細胞核が、脳後方内分泌腺複合体の側方領域に見られた。この領域は側心体のマーカーである AKH 抗体に陰性であった。PER 免疫染色性には日周変動があり、羽化 24 時間前 (ZT0) には多くの核に強い染色が見られ、羽化 18 時間前 (ZT6) には陽性の核が減少した。羽化 12 時間前 (ZT12) と 6 時間前 (ZT18) には陽性の核は見られず、羽化直後には PER 抗体陽性の核の割合は増加し、羽化後 6 時間 (ZT6) では見られなくなった。このことから、羽化直前の前胸腺には末梢時計が存在すると考えられた。

これらの結果から、シリアカニクバエでは羽化 20-16 時間前までに起こるエクジステロイド量の低下と羽化 6 時間前から羽化までに出る時刻情報が駆動するそれぞれのホルモンカスケードが、羽化ゲートの決定に関わると考えられた。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 2 件)

① Hamasaka, Y., Watari, Y., Arai, T., Numata, H., Shiga, S. (2011) Comparison of the effect of constant light on the circadian rhythm of white-eye mutant and wild-type blow fly *Protophormia terraenovae*. *Biological Rhythm Research* 42, 303-311. doi: 10.1080/09291016.2010.511132 (査読有)

② Umezaki Y., Yasuyama K., Nakagoshi H., Tomioka K. (2011) Blocking synaptic transmission with tetanus toxin light chain reveals modes of neurotransmission in the PDF-positive circadian clock neurons of *Drosophila*

melanogaster. *Journal of Insect Physiology*. 57:1290-9. doi: 10.1016/j.jinsphys.2011.06.004 (査読有)

[学会発表] (計 4 件)

① Selcho M., Yasuyama K., Hensgen R., Wegener C. (2013) The neuronal circuit underlying timing of eclosion behavior in *Drosophila*. 10th Göttingen Meeting of the German Neuroscience Society, Göttingen, Germany, March 13-15.

② 山本美貴, 志賀向子 (2012) シリアカニクバエの概日時計はいつ羽化時刻を知らせるか, 日本動物学会 第 83 回大会, 大阪府・豊中, 2012 年 9 月 13 日

③ Hase H., Matsumura R., Yasuyama K., Shiga S. (2012) Morphological analysis of neuronal connections between pigment-dispersing factor-immunoreactive neurons and pars intercerebralis neurons in the blow fly, *Protophormia terraenovae*. 日本比較生理生化学会 第 34 回大会, 神奈川県・葉山, 2012 年 7 月 7 日

④ Selcho M., Yasuyama K., Hensgen R., Wegener C. (2012) Anatomy of peptidergic neurons involved in *Drosophila* eclosion. Neurofly 2012 (European Fly Neurobiology Meeting), Padua, Italy, September 3-7.

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等

<http://www.kawasaki-m.ac.jp/med/study/01.html>

http://www.sci.osaka-cu.ac.jp/biol/aphys/theme_01.html

6. 研究組織

(1) 研究代表者

泰山 浩司 (Yasuyama Kouji)
川崎医科大学・医学部・准教授
研究者番号: 60148690

(2) 研究分担者

志賀 向子 (Shiga Sakiko)
大阪市立大学・理学(系)研究科(研究院)・教授
研究者番号: 90254383

(3) 連携研究者

松村 龍成 (Matsumura Ryusei)
川崎医科大学・医学部・助教

研究者番号：90388934