

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 22 日現在

機関番号：22604

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23370035

研究課題名(和文) 摘出脳イメージングを核とする昆虫性行動の脳制御機構の研究

研究課題名(英文) Neurobiological research of the brain mechanisms controlling insect sexual behavior

研究代表者

坂井 貴臣 (Sakai, Takaomi)

首都大学東京・理工学研究科・准教授

研究者番号：50322730

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 11,800,000円、(間接経費) 3,540,000円

研究成果の概要(和文)：我々はCa<sup>2+</sup>透過性TRPチャネルをコードするpainless (pain) 遺伝子がショウジョウバエのメスの脳内インスリン分泌細胞(IPCs)で発現することを見出した。RNA干渉法によるIPCs特異的なPain発現抑制、IPCsの破壊、および神経分泌の抑制はいずれもメスの性的受容性を上昇させた。また、IPCsから分泌される3つのインスリン様ペプチド(11p2, 11p3, 11p5)の発現抑制システムやロックアウトシステムのメスも同様に性的受容性が上昇した。よって、IPCsで発現するPainはインスリン様ペプチドの分泌を制御する可能性が考えられた。

研究成果の概要(英文)：The *Drosophila* *painless* (*pain*) gene encodes a transient receptor potential channel. First, we identified that *pain*-reporter is expressed in insulin-producing cells (IPCs) in the adult brain. IPC-specific knockdown of *pain* expression, ablation of IPCs, and suppression of neurosecretion from IPCs enhance female sexual receptivity. Considering that *Pain* is a cation channel with Ca<sup>2+</sup> permeability, *pain* knockdown may disturb intracellular Ca<sup>2+</sup> signaling in IPCs, leading to defects in the neurosecretion. Thus, we examined whether lack of *Drosophila* insulin-like peptides affect female sexual receptivity. In *Drosophila*, insulin-like peptide 2, 3 and 5 (11p2, 11p3 and 11p5) are co-expressed in the IPCs. Females homozygous for 11p2-, 11p3-, or 11p5-knockout (KO) showed hyper sexual receptivity, and targeted expression of 11p2 RNAi in IPCs phenocopied the phenotype of 11p2-KO females. Thus, our results suggest that *Pain* regulates female sexual receptivity through 11p-secretion.

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：神経科学 昆虫 行動学 脳・神経 イメージング

## 1. 研究開始当初の背景

昆虫の性行動の脳制御機構に関しては、遺伝学の発達したショウジョウバエのオスで最も研究が進んでおり、神経科学的アプローチによりオスの求愛行動を制御する脳神経回路も詳細に同定されつつある。しかし、ショウジョウバエメスの性行動を制御する脳神経回路やその生理機構に関する知見は未だ得られていない。我々は  $Ca^{2+}$  を特異的に透過する TRP チャネルをコードする *painless* (*pain*) 遺伝子とショウジョウバエメスの性行動の関係について研究し、*pain* 機能喪失変異体メスでは野生型メスよりもオスを受け入れる度合い (性的受容性) が上昇し、瞬く間に野生型オスと交尾することをすでに報告していた (*Genes, Brain, and Behav.* (2009) 8: 546-557)。

その後の研究により、成虫脳のインスリン分泌細胞 (IPCs) 特異的な *pain* 遺伝子発現抑制、IPCs の破壊、IPCs からの神経分泌の阻害、はいずれもメスの性的受容性を著しく上昇させることを見出していた。これらの結果から、*pain* 変異体では IPCs からの神経分泌が抑制されている可能性が考えられた。

## 2. 研究の目的

*Pain* TRP チャネルが  $Ca^{2+}$  透過性のチャネルであることから、*Pain* TRP チャネルを介した  $Ca^{2+}$  流入が IPCs からの神経分泌を制御しており、神経分泌が抑制されるとメスの性的受容性が上昇するという仮説を立てるに至った。本研究では、これらの仮説を検証することを大きな目的とした。

(1) *pain* 遺伝子が実際に IPCs で発現していることを確認した後、IPCs から分泌され、かつ、メスの性的受容性の制御にかかわる情報伝達物質を同定するためのミニスクリーニングを遂行した。

(2) ミニスクリーニングで候補にあがったインスリンに着目し、主にノックアウト (KO) 系統を用いた行動解析を行った。また、性的受容性の制御におけるインスリン受容体の関与についても検証を行った。

(3) *pain* 変異体と野生型の脳神経系における  $Ca^{2+}$  流入を比較するため、ハエ摘出脳を用いた  $Ca^{2+}$  イメージング解析を行った。

## 3. 研究の方法

(1) *pain* 遺伝子が IPCs で発現していることを直接的に証明するため、*pain* - reporter の発現とインスリンの発現が IPCs で共局在するかどうか検証した。

(2) IPCs はインスリンのみならず、様々な情報伝達物質を放出している可能性がある。IPCs で作られ、かつ、実際にメスの性的受容性の制御にかかわる情報伝達物質を選別する研究を行った。

(3) (2) の研究から候補に挙がったインスリンに注目した。IPCs で発現するインスリンは 3 種類存在し (Ilp2, Ilp3, Ilp5)、それぞれが異なる遺伝子によりコードされている。そこで、それぞれの遺伝子のノックアウト (KO) 系統を用い、性的受容性の上昇が見られるか検証した。

(4) インスリン受容体の機能阻害により、メスの性的受容性が上昇するか検証した。

(5) ショウジョウバエのインスリンシグナルを抑制すると、*body size* の減少と共に体重が減少する。*pain* 変異体においてインスリンシグナルが抑制されているかどうかを推定するため、*pain* 変異体の体重を野生型と比較した。

(6) *pain* 変異体と野生型の脳神経系における  $Ca^{2+}$  流入を比較するため、蛍光  $Ca^{2+}$  プロンプ (GCaMP3) をキノコ体や IPCs に発現させたハエの摘出脳を用い、イメージング解析を行った。

## 4. 研究成果

(1) *pain*-promoter 活性を利用して蛍光レポーター GFP を発現させた形質転換バエを用い、抗インスリン抗体 (Ilp2) による免疫染色を行った。その結果、*pain*-positive neurons はインスリン分泌細胞を含んでいることが明らかになった (図 1)。

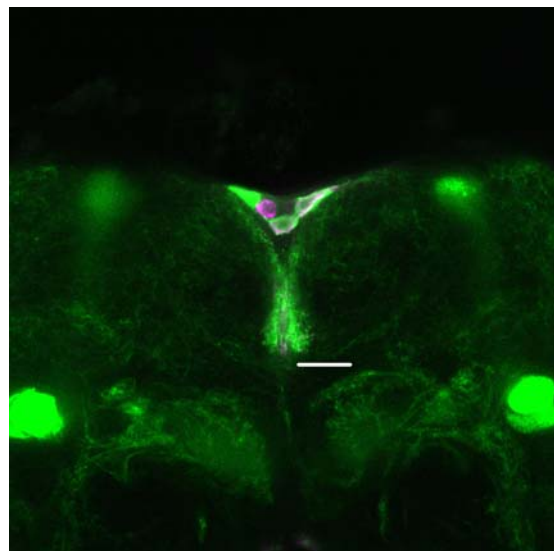


図 1 IPCs における *pain*-reporter (緑) とインスリン (マゼンダ) の共発現

(2) 我々の先行研究において、コリン作動性ニューロンおよび GABA 作動性ニューロンにおける *pain* 発現抑制によりメスの性的受容性が上昇することを見出していた (*Genes, Brain, and Behav.* (2009) 8: 546-557)。これらの結果が IPCs における *pain* 発現抑制の結果と類似することから、*Pain* TRP チャネルが IPCs からのアセチルコリンや GABA の放出を制御している可能性が考えられた。まず、アセチルコリン合成酵素をコードする *Cha* 遺伝子

および GABA 合成酵素をコードする Gad 遺伝子に注目し、IPCs 特異的な遺伝子発現抑制実験をおこなった。しかし、IPCs における Cha および Gad の発現抑制はメスの性的受容性に影響を与えなかった。さらに、抗 Cha 抗体、および抗 GABA 抗体を用いて免疫染色を行ったが、IPCs における Cha および GABA の発現は確認されなかった (図 2)。

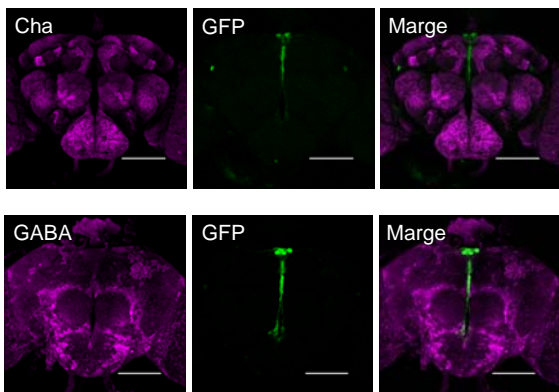


図 2 抗 Cha 抗体および抗 GABA 抗体による免疫染色

次に、多くの昆虫に保存される神経ペプチドである SIFamide (SIFa) に着目した。SIFa や SIFa 受容体の遺伝子発現抑制により、メスの性的受容性が上昇することが知られている (BBRC (2007) 352: 305-310)。SIFa 産生ニューロンは IPCs と同様にハエ成虫の脳幹部に存在することから、まず、IPCs の中に SIFa 産生ニューロンが含まれているかどうかを検証した。抗 SIFa 抗体を用いた免疫染色の結果、SIFa は IPCs には発現しておらず、SIFa 産生ニューロンと IPCs は異なるニューロンであることが明らかとなった (図 3)。さらに、IPCs において SIFa-RNAi を発現させたメスでは、性的受容性に特段の変化は見られなかった。よって、IPCs と SIFa 産生ニューロンはいずれもメスの性的受容性を制御するが、そのメカニズムは異なっている可能性が考えられた。

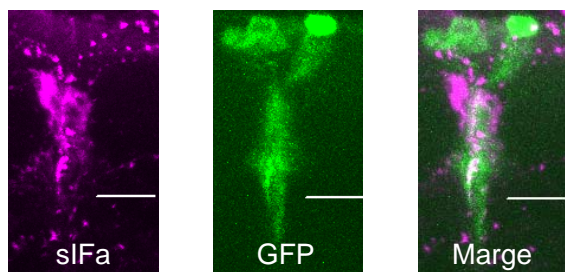


図 3 抗 SIFa 抗体による免疫染色

最後に、IPCs で発現するインスリンに注目した。IPCs には 3 種類のインスリン (IIP2, IIP3, IIP5) が発現しているが、そのうちの IIP2-RNAi を IPCs に発現させたメスでは性的受容性の上昇が確認された。IIP2, IIP3, IIP5 はそれぞれ異なる遺伝子によってコードされ

ているが、その遺伝子配列が非常によく似ていることから、RNAi を用いた実験ではどのタイプのインスリンがメスの性的受容性の制御に関与しているかを特定することはできない。しかし、メスの性的受容性が IPCs から放出されるインスリンにより制御されている可能性が本研究により示された。

(3) IPCs から放出される IIP2, IIP3, IIP5 のうち、メスの性的受容性の制御にかかわるインスリンを特定するため、それぞれのノックアウトシステムを用いてメスの性的受容性を測定した。その結果、全ての KO システムにおいてメスの性的受容性の上昇が確認された。また、IIP2, IIP3, IIP5 のトリプル KO システムのヘテロ接合体メスにおいても同様にメスの性的受容性の上昇が確認された (ホモ個体は致死率が高いため本研究には用いなかった)。以上の結果から、IIP2, IIP3, IIP5 のいずれのインスリンもメスの性的受容性の制御に必要であることが明らかとなった。

(4) ショウジョウバエのインスリン受容体 (InR) の機能阻害によりメスの性的受容性が上昇するかどうかを確かめるため、神経系全体に InR の dominant-negative (InR<sup>DN</sup>) を発現させた形質転換バエのメスを作製した。しかし、InR<sup>DN</sup> の強制発現では性的受容性の上昇を確認することはできなかった。InR-KO システムを作成して今後検証する必要がある。

(5) pain 変異体の体重が IIPs-KO システムと同様に野生型よりも減少しているかどうかを調べたところ、pain<sup>1</sup> 変異体メスを除くすべての変異体において体重の減少が確認された (図 4)。

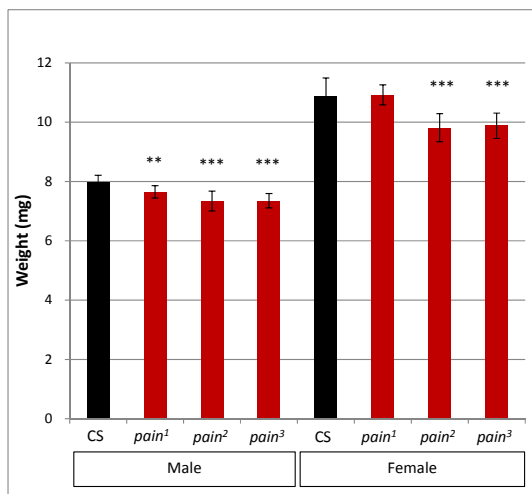


図 4 野生型 (CS) と pain 変異体の体重比較

この体重減少の表現型は IIP2-KO システムと類似していることから、pain 変異によりインスリンシグナルが抑制されている可能性が考えられる。一方、pain 変異体メスの卵巣のサイズを測定したところ、野生型と有意な違いが

見られなかった。よって、*pain* 変異体メスの性的受容性の上昇は生殖器の発達異常によるものとは考えにくい。

(6) 本研究において、高速撮影が可能な EMCCD カメラを用いたハエ摘出脳のイメージング解析装置のセットアップを完成させた。IPCs は 10 個程度の細胞集団であり GCaMP3 の蛍光も微弱であることから、 $\text{Ca}^{2+}$  反応の計測が困難であることが予想された。そこで、まず、測定が容易な成虫脳キノコ体を用いて  $\text{Ca}^{2+}$  イメージングの条件検討を行った (我々の先行研究から、*pain* はキノコ体でも発現していることを確認している)。KCL 刺激 (10, 20, 30, 40, 60, 80mM) に対するキノコ体の  $\text{Ca}^{2+}$  応答を測定したところ、30mM 以上の KCL 刺激に対して顕著な  $\text{Ca}^{2+}$  応答が確認された。また、刺激電極を用いてキノコ体に投射するプロジェクションニューロン (PN) を電気刺激した場合も顕著な  $\text{Ca}^{2+}$  応答を確認することができた。Pain TRP チャンネルにも効果のある TRP チャンネルの阻害剤処理 (5mM Camphor) により、キノコ体の  $\text{Ca}^{2+}$  応答は消失した。30mM KCL 刺激に対して *pain<sup>2</sup>* 変異体のキノコ体  $\text{Ca}^{2+}$  応答は野生型よりもわずかに低下したが、40mM 以上の KCL 刺激に対しては有意な違いが見られなかった。また、*pain<sup>2</sup>* はハイポモルフであり、*pain<sup>2</sup>* の発現量が野生型の約 30%程度まで減少していることを確認した。

Pain TRP チャンネルはショウジョウバエの熱センサーとして機能していることから、摘出脳の培養液の温度を上げることにより、Pain TRP チャンネルの活性化が可能かどうかを検証した。45°Cの熱刺激に対し、キノコ体で非常に小さな  $\text{Ca}^{2+}$  応答が認められた。*pain<sup>2</sup>* 変異体では熱刺激に対する  $\text{Ca}^{2+}$  応答が若干低下する傾向は認められたが、統計的な有意差を得るには至らなかった。

最後に、IPCs の  $\text{Ca}^{2+}$  応答測定を行った。60mM 以上の KCl 刺激により野生型の IPCs における  $\text{Ca}^{2+}$  応答が観察されることが明らかとなった (図 5)。

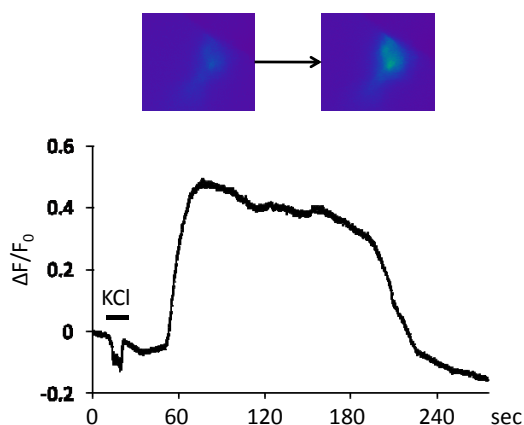


図 5 IPCs の  $\text{Ca}^{2+}$  応答

本研究の結果から、Pain TRP チャンネルを介した  $\text{Ca}^{2+}$  流入は非常に微量であることが示唆される。今後は  $\text{Ca}^{2+}$  応答の検出感度をさらに上げる必要がある。また、今後 *pain-KO* 系統を作成し、完全に Pain TRP チャンネルの発現を無くした場合の  $\text{Ca}^{2+}$  応答を野生型と比較することにより、野生型と *pain* 変異体の違いをより明確に示すことができると考えられる。

## 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 6 件)

- ① Sakai, T., Watanabe, K., Ohashi, H., Sato, S., Inami, S., Shimada, N., Kitamoto, T. (2014) Insulin-producing cells regulate the sexual receptivity through the Painless TRP channel in *Drosophila* virgin females. *PLoS ONE* 9(2): e88175.
- ② Sakai, T., Sato, S., Ishimoto, H., Kitamoto, T. (2013) Significance of the centrally expressed TRP channel Painless in *Drosophila* courtship memory. *Learning & Memory* 20: 34-40
- ③ Ueno K., Naganos S, Hirano Y, Horiuchi J, Saitoe M. (2013) Long-term enhancement of synaptic transmission between antennal lobe and mushroom body in cultured *Drosophila* brain. *J. Physiol.* 591: 287-302
- ④ Asano T., Taoka M., Shinkawa T., Yamauchi Y., Isobe T., Sato D. (2013) Identification of a cuticle protein with unique repeated motifs in the silkworm, *Bombyx mori*. *Insect Biochem. Molec. Biol.* 43: 344-351.
- ⑤ Sakai, T., Inami, S., Sato, S., Kitamoto, T. (2012) Fan-shaped body neurons are involved in period-dependent regulation of long-term courtship memory in *Drosophila*. *Learning & Memory* 19: 571-574.
- ⑥ 坂井貴臣 (2011) ショウジョウバエメスの性行動の神経遺伝学的研究 *比較生理生化学* 28: 225-230.

[学会発表] (計 15 件)

- ① Inami, S., Asano, T., and Sakai, T. “Neuropeptide-expressing neurons contribute to apterous-dependent long-term courtship memory in *Drosophila*” JSCPB2013 (日本比較生理生化学会第 35 回大会) 姫路 2013 年 7 月
- ② Shimada, N., Sakai, T. “Expression of the LIM homeobox gene, apterous, in the brain neurons is required for normal arousal-sleep” JSCPB2013 (日本比較生理生化学会第 35 回大会) 姫路 2013 年 7 月
- ③ Watanabe, K., Sakai, T. “Insulin-like peptides play a role in the regulation of sexual receptivity in *Drosophila* virgin females”

JSCP2013 (日本比較生理生化学会第 35 回大会) 姫路 2013 年 7 月

④Inami, S., Asano, T., and Sakai, T. “Mapping brain neurons involved in apterous-dependent regulation of long-term courtship memory in *Drosophila*”  
Neuro2013 京都 2013 年 6 月

⑤Shimada, N., Sakai, T. “The *Drosophila* LIM homeobox gene, *apterous*, is involved in the regulation of sleep/arousal”  
Neuro2013 京都 2013 年 6 月

⑥Watanabe, K., Sakai, T. “Expression of Pain TRP channels and Insulin-like peptides in the insulin producing neurons is involved in the regulation of sexual receptivity in *Drosophila* virgin females”  
Neuro2013 京都 2013 年 6 月

⑦佐藤翔馬, 坂井貴臣 「ショウジョウバエ成虫脳で発現する Painless TRP チャンネルの求愛長期記憶における役割」  
第 35 回 日本分子生物学会年会 福岡  
2012 年 12 月

⑧Sato, S., and Sakai, T. “The role of central nervous system-expressed Painless TRP channels in *Drosophila* long-term courtship memory”  
JDRC10 東京 2012 年 10 月

⑨Inami, S., Asano, T., Sakai, T. “The role of the LIM-homeobox gene, *apterous*, in *Drosophila* long-term courtship memory” JDRC10 東京  
2012 年 10 月

⑩Ohashi, H. and Sakai, T. “The role of Painless TRP channels in noxious heat response in *Drosophila* adults” JDRC10 東京 2012 年 10 月

⑪佐藤翔馬, 坂井貴臣 ショウジョウバエ求愛長期記憶における中枢神経系の Painless TRP チャンネルの役割 第 35 回日本神経科学大会 名古屋 2012 年 9 月

⑫大橋ひろ乃, 坂井貴臣 ショウジョウバエ成虫の侵害熱刺激反応における Painless TRP チャンネルの役割 第 35 回日本神経科学大会 名古屋 2012 年 9 月

⑬井並頌, 坂井貴臣 ショウジョウバエキノコ体における LIM ホメオボックス遺伝子 *apterous* の発現は長期記憶に必要である 第 35 回日本神経科学大会 名古屋 2012 年 9 月

⑭Sato, S., and Sakai, T. “The role of central nervous system-expressed Painless TRP channels

in *Drosophila* long-term courtship memory”  
日本比較生理生化学会第 34 回大会 葉山 (神奈川県) 2012 年 7 月

⑮佐藤翔馬, 坂井貴臣 成虫脳の mushroom bodies および *pars intercerebralis* における Painless 遺伝子の発現はショウジョウバエの長期記憶に関与する 第 34 回日本神経科学大会 横浜 2011 年 9 月

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]  
○出願状況 (計 0 件)

名称 :  
発明者 :  
権利者 :  
種類 :  
番号 :  
出願年月日 :  
国内外の別 :

○取得状況 (計 0 件)

名称 :  
発明者 :  
権利者 :  
種類 :  
番号 :  
取得年月日 :  
国内外の別 :

[その他]  
ホームページ等  
<http://www.tmu.ac.jp/stafflist/data/sa/489.html>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

坂井貴臣 (SAKAI, Takaomi)  
首都大学東京・理工学研究科・准教授  
研究者番号 : 23370035

### (2) 研究分担者

上野耕平 (UENO, Kohei)  
東京都医学総合研究所・研究員  
研究者番号 : 40332556

朝野維起 (ASANO, Tsunaki)  
首都大学東京・理工学研究科・助教  
研究者番号 : 40347266

### (3) 連携研究者

なし