

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 4 日現在

機関番号：13601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25660264

研究課題名(和文)カイコの休眠性を決定する光と温度センシング機構間の接点を探る

研究課題名(英文)Molecular analyses of light-sensing mechanism participating in diapause induction of the silkworm, *Bombyx mori*

研究代表者

塩見 邦博 (SHIOMI, Kunihiro)

信州大学・学術研究院繊維学系・准教授

研究者番号：70324241

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：申請者らは、胚期の光センサー分子の同定と、光センサー遺伝子の発現制御に関わる温度センサーの活性化シグナル分子の探索を行なった。その結果、次世代の休眠化に必要とされる光の感受性時期、期間、光波長、照度を明らかにした。また、カイコのゲノム中に存在するオプシン遺伝子や関連遺伝子をクローニングし、胚期における発現動態解析を行ない、発現時期と発現細胞を同定した。さらに、BmTRPA1 のノックダウンにより発現量に変化する遺伝子群を同定した。それらに加えて、休眠誘導への関与が推測された遺伝子に関してゲノム編集技術である TALEN によりノックアウト系統を作成し、休眠誘導への影響を調査した。

研究成果の概要(英文)：Bombyx embryonic diapause is a unique process of seasonal polyphenism that is induced transgenerationally as a maternal effect in the bivoltine strain. Progeny diapause is determined by environmental factors such as light (photoperiod) and temperature during maternal embryogenesis. Both thermal and light (photoperiod) information was stored until the mid-pupal stage and was integrated with neuropeptide signaling to determine diapause phenotype, although the molecular mechanism(s) participating in light (photoperiod)-sensing and storage and integration of information remain unknown. In this study, we analyzed the light-sensing mechanism participating in diapause induction.

研究分野：環境分子昆虫学

キーワード：カイコ (*Bombyx mori*) 休眠 オプシン ゲノム編集 温度感受性 TRP チャネル

1. 研究開始当初の背景

カイコは母蛾の胚期の環境条件(温度・光)により次世代胚の休眠性が決定される。これは、季節的多型誘導現象の一つであり、「predictive adaptive response」として次世代個体の適応度を上げる生活史戦略として生物学的に興味深い現象である。温度条件に関しては、胚が 25 ・全暗 (25DD) と 15 ・全暗 (15DD) の温度の違いを感受し、休眠性が決定される。申請者らは、母蛾の胚期に温度センサーである BmTRPA1 が約 22 以上の環境温度を受容し、蛹期に休眠ホルモン (DH) の放出を促進することで休眠卵が誘導されることを明らかにした。一方、胚を 20 に保護すると、全明 (20LL) で次世代は休眠卵になり、全暗 (20DD) では非休眠卵になる。胚期に青色や緑色光を受容する光センサーであるロドプシン類が光受容と休眠誘導に関与していると推測されているが、詳細で確実な分子レベルの知見は得られていない。申請者らは、カイコの休眠誘導には 25 と 15 の温度の違いを受容 (センシング) する温度センサーである BmTRPA1 と、明と暗を識別する光センサー分子が関与し、さまざまな環境条件において、これらのセンサー分子とシグナル伝達系の活性化および神経ネットワーク形成の二者択一的な可塑的变化による環境情報の統合が起こり、約一ヶ月後に行なわれる DH の血中への放出制御に繋げて休眠性を決定していると考えている。

申請者らはこれまでに、光条件によりオプシン遺伝子の発現が変化することや、BmTRPA1 の活性化が光センサー遺伝子の発現に関与している可能性を示す知見を得ており、これらは光センサーが温度受容においても休眠を誘導する分子・神経ネットワークの活性化に協調的に働いている可能性を示している。生物の季節的多型は、環境要因が複合的に関与し誘導される。今回得られた知見をもとに光と温度センシング機構間の接点を探ることを試みる。

2. 研究の目的

申請者らは次の [A] ~ [C] の3つの研究計画を実行し、胚期のオプシンの機能を明らかにするとともに、この光センサー分子と BmTRPA1 の活性化とシグナル伝達系の活性化に関わり、休眠誘導に協調的に働く分子の探索を行なう。[A] カイコ胚の光感受特性と休眠性との関係の解析。[B] 胚期のオプシン遺伝子の発現調節機構と休眠誘導への関与の調査。[C] RNA-seq. 解析による光・温度センサーのノックダウンにより発現量が変化分子群の探索とゲノム編集技術を利用したノックアウトシステムによる機能解析。これらの研究は、下記の (1) ~ (3) の斬新性とチャ

レンジ性を有している。

(1) 複雑に絡み合う環境要因の影響を分子レベルで明らかにする

季節的多型は変動する季節への適応戦略であり、生物の発生可塑性の一つとして進化してきた。昆虫では、光・光周期や気温、栄養条件などの外環境の変化に応じて発生プログラムの再編成を行ない、体や翅の色彩パターン・サイズの変化や休眠に代表される分化・成熟過程の変化を誘導する。しかしながら環境情報の受容から表現型の発現に至る分子機構は謎のままであり、現代生物学の重要な課題である。さらに、自然界では季節的な環境の変動は複数の環境要因の連動した変動を意味する。そのため、ある単一の環境要因により誘導される季節的多型も別の環境要因により修飾される。そして、これが巧妙な生活史戦略となり得る。つまり、季節的多型の包括的で深い理解と、その知見のフィールドでの利用を考慮した場合には、その解析を単一の環境要因をターゲットにしたものでは不十分であり、複数の環境要因を対象にし、分子機構を解明する必要がある。本研究では、季節的多型の誘導機構を複合的な環境要因をターゲットにして、その分子機構の解明を目指す。

(2) 即時的な反応ではなく、長期的な環境応答における感覚生理学研究

生物の感覚受容の分子機構に関しては、そのセンサー分子の同定をはじめとして、近年急速に理解が深まっている。昆虫の温度センシングに関してもキイロショウジョウバエで、温度走性や高温侵害刺激受容などの分子機構が明らかにされつつある。しかしながら、これらの感覚受容はいずれも刺激に対する即時的な応答であり、申請者らが対象としている環境応答とは異なる。申請者らは環境情報の受容から休眠性の決定という、現象発現までに約1か月間を要する環境応答機構を対象としている。しかもこの現象は母性効果による世代を超えたものであり、未知の分子機構が潜んでいる可能性が大きく、これまでの感覚生理学研究と一線を画した斬新性とチャレンジ性を有する研究である。

(3) 昆虫の胚期の光センサーの機能は未知である

昆虫の複眼における形態視、色覚または偏光視に関しては、キイロショウジョウバエやチョウやガやミツバチで比較的研究が進んでおり、成虫期におけるロドプシン類をはじめとする光センサー分子に関する多くの知見がある。また、概日時計の光同調に関わる因子として青色光受容分子であるクリプトクロムの解析や概日時計遺伝子と光周性

と季節的多型誘導の関連も分子レベルでの研究が行なわれている。しかしながら、本申請で対象とする胚発育期における光センサー分子の解析は皆無である。そのため、本研究はこれまでに明らかにされてこなかった昆虫胚の感覚受容機構に関して新たな知見を得ることとなる。

3. 研究の方法

研究計画の [A] ~ [C] の詳細は以下の通りである。

[A] カイコ胚の光感受特性と休眠性との関係の解析

我々は、通年人工飼料育が可能で 20LL および 20DD により、次世代がそれぞれ 100% 休眠および非休眠卵となる二化性系統を選抜している。この系統を利用し、精緻に温度、日長、光波長および照度がコントロールできるシステムを利用し、カイコの休眠誘導に関わる母蛾の胚期の光感受特性について調査する。調査内容として、次世代の休眠化に必要とされる光の感受性時期、期間、光波長、照度を明らかにする。特に光波長に関しては、ターゲットとしているオプシン分子の光受容特性との関連性を知るために詳細に調査する。また、温度センシング機構との接点を探るため、上記で明らかにした光センシング特性を各種の飼育温度で検討し、後に行なう分子群の機能との関連性を調査する。さらに、光周期が与える影響を調査し、カイコの胚休眠と光周期と概日時計の関与を推察する。

[B] 胚期のオプシン遺伝子の発現調節機構と休眠誘導への影響の調査

20LL・25DD において発現の亢進が観察されているオプシン遺伝子をはじめとしてカイコゲノムにコードされる全 6 種類のオプシン遺伝子に関して、25DD・15DD・20LL・20DD における発現量の調査を詳細に行ない、光・温度条件の違いによる発現変動の差異を調査する。このことにより、すべてのオプシン遺伝子に対して温度センシング機構間との接点を探る。

さらに、卵へのマイクロインジェクション法を利用し、二本鎖 RNA によるノックダウン実験、ゲノム編集技術 (TALEN) のよるノックアウト系統の作出および、*piggyBAC* ベクターによる GAL4/UAS システムを利用したオプシン遺伝子発現細胞の細胞死誘導およびテタヌス毒素 (TNT) の発現による神経伝達遮断による休眠性に与える影響を調査する。この実験では、胚を 25DD または 20LL に保護し、次世代を休眠性に運命づけた卵へ注射を行ない、休眠性の変化を観察し、候補遺伝子の休眠性への関与を調査する。さ

らに、光・温度センシング機構間の接点を探るため、オプシン遺伝子のノックダウンによる温度感受特性も調査する。また、BmTRPA1 ノックダウン個体による光感受特性とオプシン遺伝子発現に与える影響を調査する。

[C] RNA-seq. 解析による光・温度センサーのノックダウンにより発現量が変化する分子群の探索

20LL においてオプシン遺伝子の二本鎖 RNA 注射によるノックダウンを行なった後、反転期における RNA-seq. 解析を行なう。無処理の個体と発現遺伝子を比較することにより光センシングとシグナル伝達系に関わる可能性のある遺伝子の探索を行なう。さらに、温度センシングとの接点を探るため、25DD において BmTRPA1 のノックダウンを行なった個体による RNA-seq. 解析を行ない、発現量が変化するオプシン遺伝子をはじめとする光センシング、シグナル伝達系に関わる遺伝子の探索を行なう。また、上記のオプシン遺伝子と BmTRPA1 ノックダウン個体による RNA-seq. 解析により、発現量の変化する共通の遺伝子を探索し、環境情報の統合のための解析の手がかりとする。

4. 研究成果

カイコの休眠誘導には 25 と 15 の温度の違いを受容 (センシング) する温度センサーである BmTRPA1 と、明と暗を識別する光センサー分子が関与し、さまざまな環境条件において、これらのセンサー分子とシグナル伝達系の活性化および神経ネットワーク形成の二者択一的な可塑的变化による環境情報の統合が起こり、約一ヶ月後に行なわれる DH の血中への放出制御に繋げて休眠性を決定していると考えられる。そこで、申請者らは次の [A] ~ [C] の 3 つの研究計画を実行し、胚期のオプシンの機能を明らかにするとともに、この光センサー分子と BmTRPA1 の活性化とシグナル伝達系の活性化に関わり、休眠誘導に協調的に働く分子の探索を行なった。[A] の「カイコ胚の光感受特性と休眠性との関係の解析」では、LED ライトを用い、次世代の休眠化に必要とされる光の感受性時期、期間、光波長、照度を明らかにした。[B] の「胚期のオプシン遺伝子の発現調節機構と休眠誘導への影響の調査」では、まず、カイコのゲノム中に存在するオプシン遺伝子や関連遺伝子をクローニングし、胚期における発現動態解析を行ない、発現時期と発現細胞を同定した。さらに、[C] の「RNA-seq. 解析による光・温度センサーのノックダウンにより発現量が変化する分子群の探索」では、BmTRPA1 のノックダウンにより発現量が変化する遺伝子群を同定した。それらに加えて、

BmTRPA1 と上記の [A], [B], [C] の結果より休眠誘導への関与が推測された遺伝子に関してゲノム編集技術である TALEN によりノックアウト系統を作出し、休眠誘導への影響を調査した。それらの結果、光センシングに関わる候補分子と、温度センシングと光センシングの両方の下流で働く可能性のある候補分子を特定した。今後、これらの分子の機能解析を進めることにより、predictive adaptive response の分子実体が明らかになるとともに、光と温度情報のセンシング機構間の接点と考えられる環境情報の統合の分子機構が明らかになると考えられる。

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1件)

Sato, A., Sokabe, T., Kashio, M., Yasukochi, Y., Tominaga, M., Shiomi, K. Embryonic thermosensitive TRPA1 determines transgenerational diapause phenotype of the silkworm, *Bombyx mori*. Proc Natl Acad Sci U S A, 査読有, 111(13):E1249-E1255 2014. DOI: 10.1073/pnas.1322134111.

[学会発表](計8件)

國井雅代, 新井満美子, 土屋良磨, 松野久美子, 塩見邦博; カイコの胚休眠と光受容体の関係; 日本蚕糸学会中部支部講演要旨集第69号, 14, 2013年11月9日, 信州大学理学部. 松本市.

新井満美子, 國井雅代, 土屋良磨, 松野久美子, 鈴木穰, 山本希, 黒川顕, 塩見邦博; カイコの休眠誘導に関わる遺伝子の探索-胚期の温度感受性時期における RNA-seq. 解析-; 日本蚕糸学会中部支部講演要旨集第69号, 6, 2013年11月9日, 信州大学理学部. 松本市.

松野久美子, 内野恵郎, 田中良弥, 國井雅代, 新井満美子, 土屋良磨, 田中良明, 瀬筒秀樹, 塩見邦博; カイコの休眠誘導における蛹脳のコラゾニンの作用機構の解析; 日本蚕糸学会中部支部講演要旨集第69号, 19, 2013年11月9日, 信州大学理学部. 松本市.

土屋良磨, 國井雅代, 向田萌香, 久保田穂香, 中西弘充, 安河内祐二, 瀬筒秀樹, 高須陽子, 塩見邦博; カイコ蛹期の休眠ホルモン放出制御と GABA 受容体との関係; 日本蚕糸学会中部支部講演要旨集第70号, 11, 2014

年10月25日, 岡谷商工会議所・岡谷蚕糸博物館. 岡谷市.

國井雅代, 土屋良磨, 向田萌香, 新井満美子, 鈴木穰, 黒川顕, 山本希, 安河内祐二, 瀬筒秀樹, 高須陽子, 一田昌利, 塩見邦博; カイコの休眠誘導に関わる遺伝子の探索-温度・光条件の異なる胚子の RNA-seq. 解析-; 日本蚕糸学会中部支部講演要旨集第70号, 16, 2014年10月25日, 岡谷商工会議所・岡谷蚕糸博物館. 岡谷市.

向田萌香, 土屋良磨, 國井雅代, 鈴木穰, 山本希, 黒川顕, 塩見邦博; カイコの休眠誘導に関わる蛹期の脳-食道下神経節内の遺伝子の RNA-seq. 解析による探索; 日本蚕糸学会中部支部講演要旨集第70号, 17, 2014年10月25日, 岡谷商工会議所・岡谷蚕糸博物館. 岡谷市.

塩見邦博, 佐藤梓, 曾我部隆彰, 加塩麻起子, 安河内祐二, 鈴木穰, 山本希, 黒川顕, 富永真琴; カイコの次世代卵の休眠性を決定する温度感受性 TRP チャネル. 日本遺伝学会第86回大会; WS15 TRP チャネルの機能的多様性と生理的意義, 2014年9月19日, 長浜市. (招待講演)

塩見邦博; カイコの休眠誘導と温度感受性 TRP チャネル. 平成26年度学融合研究事業 戦略的共同研究 「温度感受システムの進化生理学」2015年2月26日, 総合研究大学院大学. 逗子市. (招待講演)

[その他]

科学新聞; 温度感受性チャネル TRPA1 の活性化がカイコ卵の休眠性を決定.(カイコの休眠誘導に関して80年来の謎を解明した。) 2014. 4 11.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

塩見 邦博 (SHIOMI, Kunihiro)

信州大学・学術研究院繊維学系・准教授

研究者番号: 70324241