

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 20 日現在

機関番号：12102

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26840074

研究課題名(和文) 光受容体が介するステロイドホルモン生合成調節機構の解明

研究課題名(英文) Steroid hormone biosynthesis is mediated by photoreceptor in *Drosophila*

研究代表者

島田 裕子 (SHIMADA, Yuko)

筑波大学・生命領域学際研究センター・研究員

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)：動物の発育プログラムの進行において、中心的な役割を担うステロイドホルモンの生合成は、栄養条件や光周期条件などに外的要因に応じて適当に調節されている。しかし、いつどのくらいの量のステロイドホルモンを生合成・分泌させるのかを決定する分子機構には未だ不明な点が多い。本研究では、キイロショウジョウバエを用いて、光受容体の1つであるロドプシン2がステロイドホルモン生合成器官でシグナル伝達を行う可能性を検証し、ホルモン生合成との関連を明らかにすることを目指した。しかしながら、ロドプシン2の機能欠損個体の表現型を解析した結果、ステロイドホルモン生合成に関与する可能性は低いことが示唆された。

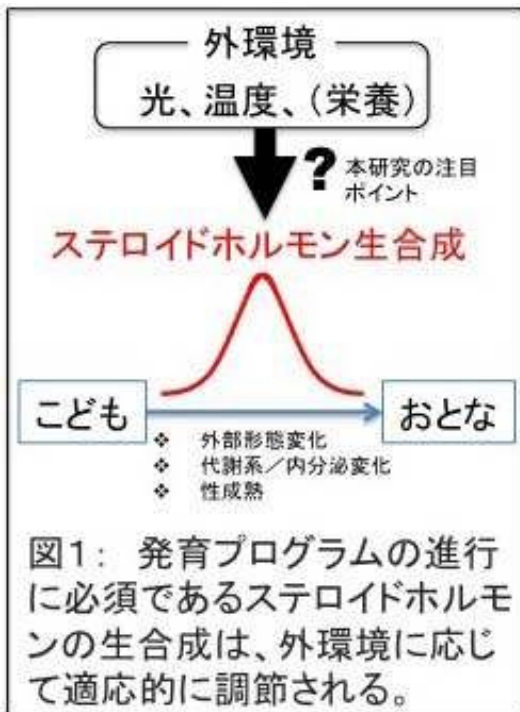
研究成果の概要(英文)：Steroid hormones have essential roles in animal development, homeostasis, and reproduction. The biosynthesis of steroid hormones is affected by various environmental conditions including nutrition and photoperiod. However, the underlying mechanism remains to be elucidated. In this research, we examined a role of a photoreceptor, rhodopsin 2 on steroid hormone biosynthesis in the fruit fly *Drosophila melanogaster*. We generated two independent knock-out fly strains and analyzed phenotype on larval development and adult behaviors. Unexpectedly, these mutant flies are fully viable and no abnormal defects in development and adult circadian rhythms. This result suggests that rhodopsin 2 is not involved in steroidogenesis in *Drosophila*.

研究分野：分子発生遺伝学

キーワード：キイロショウジョウバエ 光受容体 ロドプシン2 ステロイドホルモン エクジステロイド

1. 研究開始当初の背景

「こども」(幼若)から「おとな」(成熟)へ至る過程は、個体の生存維持のみならず繁殖成功を確実にするために、外部形態や生理状態の変化を伴う。例えばヒトの第2次性徴や昆虫の変態が挙げられる。こうした発育プログラムの進行に伴う変化に対して、動物種を超えて中心的な役割を果たすのがステロイドホルモンである(図1)。ステロイドホルモンの生合成は、器官や体サイズ等の内的要因、あるいは栄養条件/温度条件/光周期などの外的要因に応じて、適応的に調節される。しかしながら、いつ、どのくらいの量のステロイドホルモンを生合成・分泌させるのかを決定する分子機構には未だ不明な点が多く残されている。



昆虫の発育進行(脱皮・変態)を制御するステロイドホルモンであるエクジステロイドの生合成調節機構の研究は、カイコガなどの大型昆虫を用いた生理学的研究から日本が常に世界を牽引してきた分野である。近年は、キイロショウジョウバエ *Drosophila melanogaster* を用いた分子遺伝学的手法によって、申請者が所属する研究室ならびに海外のグループによってエクジステロイド生合成酵素遺伝子群が同定されてきた[1]。

エクジステロイドは、幼虫期に前胸腺と呼ばれる特殊な内分泌器官において生合成される。先行研究から、外環境を感知してエクジステロイド生合成を調節する液性因子として、前胸腺刺激ホルモン(prothoracicotropic hormone, PTH) [2]とインスリン様ペプチド[3]が知られている。PTHは個体の器官サイズや光に応じて、またインスリンは栄養に応じて、それぞれ脳の神経分泌細胞群から分泌される。これらの液性因子は、それぞれの受容体を介して前胸腺でのエクジ

ステロイド生合成経路を調節する(図2)。しかし、自然界において昆虫が曝される外界情報は多種多様であることを考えると、これらの液性因子および受容体以外にも、前胸腺に情報を送る/受け取る仕組みがあることが想定される。

そこで申請者は、前胸腺がどのような外部入力を受けるのかを明らかにするために、前胸腺で機能する膜受容体を探索した。すなわち、ゲノム中で膜受容体をコードしていると予想される遺伝子約300個(細胞接着分子と嗅覚・味覚受容体を除く)に対して前胸腺特異的 RNAi による機能低下を誘導し、幼虫の発育不全を引き起こす遺伝子をリストアップした。その結果、PTTH やインスリンの受容体を含む15個の受容体候補遺伝子群を同定した。

15個の膜受容体の中で、申請者はロドプシン2に注目した。ロドプシンファミリーは三量体Gタンパク質共役型受容体であり、視細胞における光受容機能が広く知られている[4]。一方、ごく最近にロドプシンが温度や音の感知に関与することが相次いで報告されたことから[5,6]、光受容以外の機能が注目されつつある。そこで申請者は、「眼」ではなく「ステロイドホルモン生合成器官/前胸腺」で働くロドプシン2の機能を追究すれば、外環境に応答した生物の発育調節プログラムの新たな側面を明らかにできると着想した。

これまでに、申請者ならびに同じ研究室に所属する梅井洋介(修士課程2年)は、ロドプシン2遺伝子が環状線(前胸腺、アラタ体、側心体を含む組織)で発現すること、ならびにロドプシン2ノックダウン個体の致死性は活性型エクジステロイドの摂食によりレスキューされることを示した。この結果から、前胸腺でロドプシン2の機能が低下するとエクジソン生合成が抑制されることが示唆された。さらに最近、ノックアウト変異体の作出に成功し、バッククロスを完了した。

2. 研究の目的

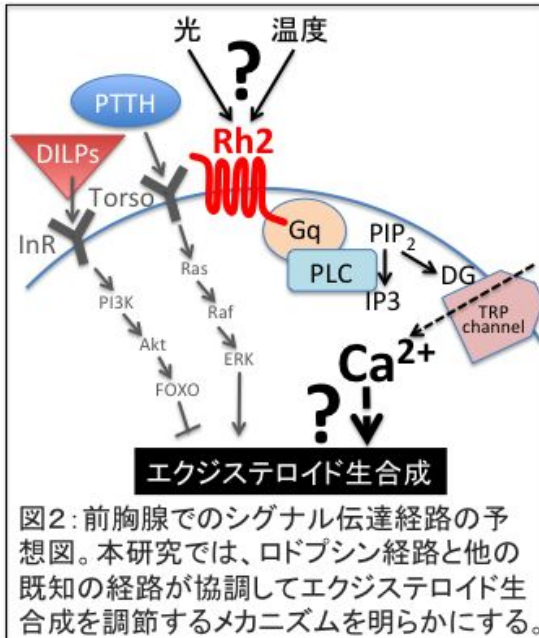
本研究では、前胸腺でロドプシン2が介するシグナル伝達経路の役割を追究する上で、以下の2つの問題を解決することを目指す。

(1)「下流」は何か?

ロドプシン2が介するシグナル伝達経路がエクジステロイド生合成経路のどのステップを調節するのかを明らかにする目的で、ノックアウト個体における各エクジステロイド生合成遺伝子の発現を解析する。また、ロドプシン2経路下流で調節されると予想されるPKCの活性やCa²⁺レベルの変動を前胸腺でモニターする。さらに、既知のPTH経路およびインスリン経路と協調して、あるいは独立にエクジソン生合成のタイミングを調節するかどうかを調べる。

(2) 「上流」は何か？

前胸腺において、ロドプシン2が光または温度に応答する可能性を検証する。野生型ならびにノックアウト個体を用いて、様々な光周期条件と温度条件下での発育への影響を調べる。



3. 研究の方法

【平成26年度】

(1) 前胸腺でのロドプシン2シグナル伝達経路の役割の解析

ロドプシン2ノックアウト変異体の発育を詳細に解析し、様々な光周期条件において脱皮と変態のタイミングに異常があるかを調べた。蛹化が遅れる場合はエクジステロイド合成不全と判断し、ロドプシン2が介するシグナル伝達経路がエクジステロイド合成経路のどのステップを調節するのかを明らかにする目的で、各エクジステロイド合成遺伝子群の発現をqRT-PCR法と免疫組織化学法によって解析した。また、ELISA法を用いて体液中のエクジステロイド量を定量した。

(2) 光受容におけるロドプシン2の機能解析

野生型ならびにロドプシン2ノックアウト変異体の幼虫を12時間ごとの明暗周期下および恒暗/恒明条件下で飼育し、24時間ごとの成長段階を記録した。続いて、前胸腺での各種エクジステロイド合成酵素遺伝子の発現パターンおよびエクジステロイド量が光条件により影響を受けるかどうかを調べた。さらに、カルシウムプローブGCaMP6やCameleon2.1を発現させた前胸腺を各光条件で可視化し、カルシウムレベルの変動を解析することによって、前胸腺が光に直接応答するかどうかを検討した。生きた3齢幼虫の前胸腺において蛍光タンパク質の挙動を追跡するライブイメージング系は、申請

者によって既に確立されている。

(3) 前胸腺での光シグナル伝達経路の解析
眼で知られているロドプシンのシグナル伝達経路(ロドプシン 三量体 G q ホスホリパーゼ C)が前胸腺においても機能するのかを確認するため、発育プログラムの調節におけるロドプシン2変異体と既知の下流因子の変異体(G q[1], *norpA*)との遺伝的相互作用を調べた。

【平成27年度】

(1) PTTH経路ならびにインスリン経路とのクロストークの解析

既知のPTTH経路およびインスリン経路とのクロストークを調べるために、それぞれの経路の受容体遺伝子をRNAi法によってノックダウンし、下流因子の活性をモニターした。具体的には、PTTH経路の活性は抗リン酸化ERKに対する特異的抗体を用いた染色によって、インスリン経路の活性はPH-GFPの細胞内局在によって検討した。

(2) 温度受容におけるロドプシン2の機能解析

野生型およびロドプシン2ノックアウト個体を、生存可能な15から29の範囲で飼育して、24時間ごとの成長段階を記録した。上述の実験同様に、エクジステロイド生成量を調べた。

4. 研究成果

平成26年度においては、ロドプシン2機能変異体の発育を解析した。前胸腺でロドプシン2の機能をノックダウンした個体や、完全ノックアウト個体では、蛹になるタイミングは、コントロール個体に比べて1~2日程度遅れることがわかった。ただ、このノックアウト個体の蛹のサイズは、コントロールと差はほとんどなく、従来知られているエクジステロイド合成不全の蛹の表現型(蛹のサイズが大きい)とは異なっていた。そこで、蛹化のタイミングの遅れが、エクジステロイド合成不全に依るものかどうかを調べるために、ノックアウト個体に活性型エクジソンを摂食させたところ、蛹化のタイミングの遅れはレスキューされなかった。同様に、ロドプシンが介するシグナル伝達経路の因子であるホスホリパーゼCの変異体*norpA*の表現型も活性型エクジソンの摂食でレスキューされなかった。以上の結果から、ロドプシン2変異体で見られた蛹化タイミングの遅れは、エクジステロイド合成不全によるものではないことが示唆された。

平成27年度においては、ロドプシン2ノックアウト個体の成虫の表現型に異常があるかどうかを検討した。*Drosophila* Activity Monitorシステムを用いて、成虫の行動リズムを約2週間にわたって解析したが、コントロールと比べて、行動リズムに顕著な異常は見られなかった。

以上の結果から、ロドプシン2が前胸腺で

のエクジステロイド生合成に關与する可能性は低いと結論した。ロドプシン2のノックアウト個体は世界で初の作出であることから、今後は、この系統を用いて、エクジステロイド生合成調節以外の機能解析を探っていく予定である。

<引用文献>

[1] 丹羽(共著)『脱皮と変態の生物学』東海大学出版、2011.

[2] McBrayer et al., Dev. Cell 13:857-871, 2007.

[3] Colombani et al., Science 336:582-585, 2012.

[4] Montell, Trends in Neuroscience 35:356-363, 2012.

[5] Shen et al., Science 331:1333-1336, 2011.

[6] Senthilan et al., Cell 150:1042-1054, 2012.

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7件) 全て査読有

Niwa YS, Niwa R, Transcriptional regulation of insect steroid hormone biosynthesis and its role in controlling timing of molting and metamorphosis. Development, Growth&Differentiation, 58, 94-105, 2016. DOI: 10.1111/dgd.12248

Komura-Kawa T, Hirota K, Shimada-Niwa Y, Yamauchi R, Shimell M, Shinoda T, Fukamizu A, O'Connor MB, Niwa R, The Drosophila Zinc Finger Transcription Factor Ouija Board Controls Ecdysteroid Biosynthesis through Specific Regulation of spookier. PLoS Genetics, 11(12), e1005712, 2015. DOI: 10.1371/journal.pgen.1005712

Ohhara Y, Shimada-Niwa Y, Niwa R, Kayashima Y, Hayashi Y, Akagi K, Ueda H, Yamakawa-Kobayashi K, Kobayashi S, Auto-crine regulation of ecdysone synthesis by 3-octopamine receptor in the prothoracic gland is essential for Drosophila metamorphosis. Proc Natl Acad Sci USA, 112(5), 1452-1457, 2015. DOI: 10.1073/pnas.1414966112

Burn KM, Shimada Y, Ayers K, Lu F, Hudson AM, Cooley L, Somatic insulin signaling regulates a germline starvation response in Drosophila egg chambers. Developmental Biology, 398(2), 206-17, 2015. DOI: 10.1016/j.ydbio.2014.11.021

Niwa R, Niwa YS, Enzymes for ecdysteroid

biosynthesis: Their biological functions in insects and beyond. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 78(8), 1283-1292, 2014.

DOI: 10.1080/09168451.2014.942250

Niwa YS*, Niwa R, Neural control of steroid hormone biosynthesis during development in the fruit fly Drosophila melanogaster. Genes & Genetic Systems, 89(1), 27-34, 2014. *責任著者
DOI: 10.1266/ggs.89.27

Shimada-Niwa Y*, Niwa R*, Serotonergic neurons respond to nutrients and regulate the timing of steroid hormone biosynthesis in Drosophila. Nature Communications, 5, 5778, 2014. *責任著者
DOI: 10.1038/ncomms6778

[学会発表](計3件)

Shimada-Niwa Y, Neural controls of developmental transition via modulating steroid hormone biosynthesis in the fruit fly Drosophila melanogaster. 48th Annual meeting of the Japanese Society of Developmental Biologists, 2015年6月5日, つくば国際会議場(茨城県つくば市)

Shimada-Niwa Y, The mapping and functional analysis of the prothoracic gland innervating neurons controlling ecdysteroid biosynthesis in Drosophila melanogaster. The 2nd international insect hormone workshop, 2015年7月13日, クレタ島(ギリシャ)

島田裕子「ステロイドホルモン生合成を介した昆虫発育を調節する新規セロトニン神経の役割」IGER セミナー(アドバンス生命理学特論), 2016年1月15日, 名古屋大学理学部(愛知県名古屋市)

[その他]

筑波大学生命環境系

丹羽研究室

<http://niwa-lab.org>

6. 研究組織

(1)研究代表者

島田 裕子 (SHIMADA, Yuko)

筑波大学・生命領域学際研究センター
研究員

研究者番号: 30722699