

塩見 邦博

目的別テーマ：バイオファイバー生合成機構の解明

1 6年度研究テーマ

15-2-16：昆虫の環境応答における神経繊維ネットワークの解析

ABSTRACT

Organisms have adapted to seasonal fluctuations by evolving internal clocks and neuroendocrine systems to anticipate the variations of living conditions. In the silkworm, Bombyx mori, photoperiodic and temperature signals from the brain is likely to transfer the subesophageal ganglion (SG) where it is decoded as a varying secretion of diapause hormone (DH), and then DH can act at developing ovaries, which would then be implicated in the regulation of embryonic diapause. To reveal the molecular mechanism of diapause induction, we investigated the neural network projecting into DH-producing neurosecretory cells from brain using baculovirus gene transfer system.

研究目的

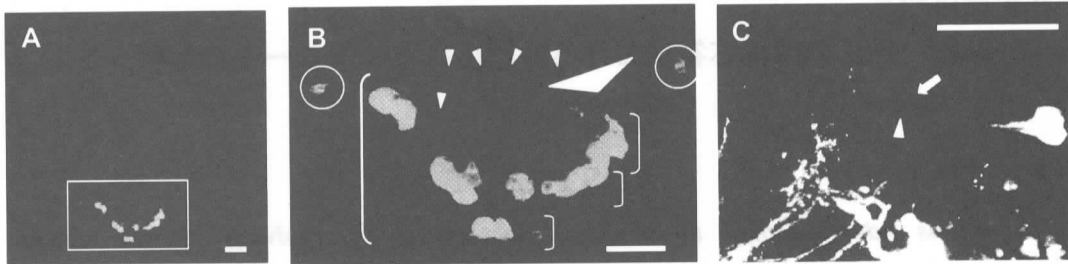
休眠は昆虫が独自に進化を遂げた環境応答機構である。カイコの胚休眠は、食道下神経節から分泌される休眠ホルモン (DH) によって誘導される。DH の分泌量の調節には、脳間部および脳前方領域内の細胞からの神経支配を受けていることが知られているが、分子レベルでの解明には至っていない。本年度は、生存環境情報の受容から DH の分泌に至る脳内情報処理機構を、分子レベルで明らかにするために、組み換え AcNPV を用いた遺伝子導入法を用いて、食道下神経節 (SG) の休眠ホルモン産生細胞群 (DHPCs) を巡る神経ネットワークの解析を試みた。

一年間の研究内容と成果

まず、DHPCs において、経シナプストレーサー分子である小麦胚芽アグルチニン (WGA) cDNA および *GFP-TTC* cDNA を強制発現させることにより、DHPCs を巡る順行性及び逆行性投射神経の可視化と細胞の同定を試みた。*DH-PBAN* プロモーター下で WGA cDNA を強制発現させ、抗 WGA 抗体によるホルマウント免疫組織化学 (WMIHC) を行った。その結果、DHPCs および、DHPCs から SG 前方に伸長する神経、さらに SG 側方の 2 対 4 個の細胞 (SG lateral cells : SGLCs) が可視化された。SGLCs における DH の発現は観察されず、さらに、ウイルスまたはプロモーター依存的な WGA の発現も確認されなかったため、SGLCs には、DHPCs からシナプスを經由し WGA が伝達されたと考えられた。現在、SGLCs のキャラクタライゼーションを進めており、胚休眠誘導との関連を調べている。

次に、脳内に存在するペプチドホルモン遺伝子、概日リズムおよび光周性関連遺伝子の産生細胞をアポトーシス誘導因子である *reaper (rpr)* cDNA の強制発現により破壊し、*DH-PBAN* mRNA および DH 量の変化と休眠卵誘導活性に及ぼす影響を調査した。まず、*DH-PBAN* プロモーター下で *rpr* cDNA を強制発現させ、DHPCs の破壊実験を行なった。*DH-PBAN* プロモーター下で *rpr* cDNA と *EGFP* cDNA を同時に強制発現させると、DHPCs において GFP 蛍光の消失が見られた。さらに、抗 DH 抗体による WMIHC を行ったところ、DHPCs の細胞体が認められないものもあった。また、ノーザンブロットにより、SG 中の *DH-PBAN* mRNA 量も減少していることがわかった。次に、羽化ホルモン (*Eh*)、ボセロプシン (*Bcop*)、

ピリオド (*per*)、前胸腺抑制ペプチド (*ptsp*) の各遺伝子の 5' 上流域をクローニングし、緑色蛍光タンパク質 (*EGFP*) cDNA を用いたレポーター遺伝子解析を行なった。その結果、各遺伝子の内在性 mRNA の発現細胞での *EGFP* の発現が確認できた。現在、各種プロモーター下で *rpr* cDNA を強制発現させ、DH 量の変化および胚休眠誘導への影響を調べている。



図。DHCs における WGA の発現。カイコに *v* [DH7/WGA] を注射し、脳-SG を摘出し、抗 WGA 抗体を用いて免疫染色を行った。DHCs および DHCs から SG 前方に伸張する神経、さらに SG 側方の細胞 (SGLCs) が可視化された。A. 脳-SG の腹側の図 (前方が上)。ボックスは DHCs および SGLCs を示している。B. SG の拡大図。括弧は DHCs を、サークルは SGLCs を、矢じりは DHCs から SG 前方に伸張する神経を示している。C. SG 側方部分の拡大図。矢じりは SGLCs から DHCs の神経へつながる神経を、矢印は SGLCs から SG 前方へ伸張する神経を示している。スケールバーは 50 μ m を示す。

展望

WGA による経シナプス標識により検出された、SGLCs のキャラクタライゼーションを進め、DH 機能と胚休眠誘導との関連を調査していく。休眠誘導に関連があると推測される *EH*、*Bcop*、*per* および *ptsp* 遺伝子の産生細胞を *rpr* により破壊し、DH 量および休眠誘導に及ぼす影響を調査する。

さらに、細胞外シグナルの受容・伝達による神経分泌細胞の分化と神経繊維の誘導機構の解析を推進するため、昆虫の変態や蛹休眠をコントロールする前胸腺刺激ホルモン (PTTH) の産生細胞を利用し、解析していく。