

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

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 regulation mechanism participating in the diapause induction, we have investigated (1-1) the regulation mechanism of DH-PBAN gene expression, and (2) the neural network projecting into diapause hormone-producing cells (DHPCs) from the brain. In additionally, prothoracicotropic hormone (PTTH) plays a central role in controlling molting, metamorphosis, and diapause termination in insects by stimulating the prothoracic glands to synthesize and release the molting hormone. (1-2) We have investigated the regulation mechanism of PTTH gene expression.

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。カイコの卵休眠は休眠ホルモン (DH) によって誘導され、ある種の昆虫では前胸腺刺激ホルモン (PTTH) が蛹休眠の誘導と終結に関与する。いずれのホルモンも特定の神経分泌細胞で発現し、それらの特定の軸索 (神経繊維) を経由し、血液に放出され、機能を発現する。そのため、環境情報の受容からホルモン分泌に至るまでの分子機構の解明には、これら神経分泌細胞の分化過程と神経繊維ネットワークの解明が重要な鍵となる。

本研究は、(1) DH および PTTH をコードする遺伝子の発現調節機構の解析を行った。(2) DH 産生細胞群 (DHPCs) を巡る神経繊維ネットワークの解析による、脳から DHPCs に投射しているニューロンおよび DHPCs から投射しているニューロンの同定を試みた。

5年間の研究内容と成果

(1-1) カイコの卵休眠は母親世代の蛹の食道下神経節 (SG) から分泌される DH によって誘導される。休眠性の決定には DH をコードする遺伝子 (*DH-PBAN*) の発現量の増減と DH の血液中への放出量の増減により調節されている。*DH-PBAN* は SG 中の 7 対 14 個の細胞のみで発現し、合成された DH は軸索を經由し、分泌器官である側心体 (CC) から血液中に放出される。さらに、DH の分泌は脳からの神経支配を受けていることが示唆されている。組み換えバキュロウイルス (AcNPV) を利用してカイコの脳-中枢神経系における迅速・簡便なレポーター遺伝子解析系を開発した。*DH-PBAN* の上流域の下流に EGFP cDNA を挿入した AcNPV を作製し、蛹に注射した結果、内在性の *DH-PBAN* の発現細胞での蛍光を観察できた。このアッセイ系を利用して、*DH-PBAN* の発現に関わるシス制御領域を調査した。その結果、効果を異にする 2 つの領域が存在することが分かった。その内、DHPCs での発現のオン・オフを決定する領域 (DHC) を決定した。ゲルシフトアッセイ (GSA) により、SG からのタンパク質抽出物中に DHC に結合するタンパクを検出した。MatInspector によるトランス因子予測を行ったところ、哺乳類の脳下垂体で発現し、様々なホルモン遺伝子の発現などを通じて、脳下垂体の分化に重要な役割を果たす転写調節因子の Pituitary homeobox 1 (Pitx1) が候補に挙がった。Pitx1 認識配列をもつレポーター遺伝子の解析を行ったところ、SG の DHPCs で EGFP の発現が観察された。さらに、GSA で検出されたタンパクは Pitx1 認識配列を含むオリゴヌクレオチドにも結合した。以上のことより、*DH-PBAN* の DHC は、Pitx1 結合領域と相同性が高く、Pitx1 様の転写調節因子が結合する可能性が考えられた。そこで、カイコの Pitx1 ホモログ (BmPitx) をクローニングした。387 残基のアミノ酸をコードし、145 から 204 残基までがホメオドメイン (HD) であった。さらに、HD の

相同性検索を行ったところ様々な生物種の Ptx1 様タンパクがヒットした。つまり、カイコの SG には Pitx1 のホモログと考えられる mRNA が存在し、さらに HD の配列は、生物種間でよく保存されていることが分かり、類似のシスエレメントを認識すると予測された。BmPitx が、*DH-PBAN* の発現にどのような影響を与えるかを調査する目的で発現抑制型の組み換えウイルスを作製し、休眠タイプの蛹に注射し、成虫羽化後、産下卵の休眠性を調査したところ、非休眠卵と着色非休眠卵が観察された。以上のことから、*DH-PBAN* は BmPitx により、その発現が活性化されると考えられた。Pitx1 は哺乳類の脳下垂体で、種々のパートナータンパクと結合し種々のホルモン遺伝子の転写を活性化する。今回、無脊椎動物においてはじめて Pitx1 の標的遺伝子を同定したことになるが、昆虫においてもホルモン遺伝子の発現調節という哺乳類と共通の機能を持つと思われた。また、遺伝子発現抑制型の組み換え AcNPV による遺伝子導入による休眠性の変換は、新たな休眠卵誘導関連遺伝子の生物検定法の確立の足がかりになると考えられた。

(1-2) PTH は、前胸腺での脱皮ホルモン (エクダイソン) の分泌を刺激することにより、昆虫の脱皮、変態、蛹休眠の終結を制御する昆虫特異現象のペースメーカーとして働く。さらに、PTH の分泌は、光周性、温度などの環境情報により調節されている。しかしながら、この分泌の分子機構は明らかになっていない。そこで、PTH 産生細胞 (PTPCs) における細胞外シグナル受容機構を含めた PTH 分泌調節機構を明らかにするために、*PTH* 発現調節機構の解析を行った。組換え AcNPV 遺伝子導入法を利用し *PTH* プロモーターのレポーター遺伝子解析により、*PTH* 発現のオン/オフの決定と、発現増強に関わる二つのシスエレメントの同定に成功した。その内、発現増強に関わるエレメントにはカイコの MEF2 ホモログ (BmMEF2; Myocyte enhancer factor 2) が結合し、転写の活性化に関わることが明らかになった。さらに、オン/オフの決定には *PTH* プロモーター領域の -49 から -29 bp を含む領域に存在することが明らかになった。GSA の結果、カイコの脳内には *PTH* のプロモーター領域 -46 から -34bp に結合するタンパク質が存在することがわかった。そのタンパク質は上記の *DH-PBAN* のオン/オフを調節している転写因子 BmPitx の結合配列にも結合し、また、Pitx1 の抗体にも結合した。これらの結果から BmPitx が *PTH* の発現のオン/オフを決定する転写因子であることが強く示唆された。これらの結果から、昆虫の休眠に関わる 2 つのホルモンの神経分泌細胞特異的な発現には、BmPitx が関わっていることが分かった。さらに、発現する神経分泌細胞の識別には、未同定のパートナー因子が関わっていることが示唆された。

(2) 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 : SGLs) が可視化された。SGLs 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。SGLs 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。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。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た結果、あるプロモーターをもつ組み換えウイルスで休眠性の変換が観察された。以上の結果から、今後、休眠性に影響を与える脳内細胞が同定される可能性が高く、環境情報の受容から神経分泌細胞の分化と昆虫特異現象の発現とそれを繋ぐ神経繊維ネットワークの解明が行われると考えられる。