

## 塩見邦博

### 目的別テーマ：バイオフィバー生合成機構の解明

#### 15年度研究テーマ

15-2 -16 : テーマ名 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

*Expression of the diapause program is triggered by a particular set of environmental signals such as photoperiod, temperature and food quality, which are transduced into endogenous chemical messengers, hormones, in the neuroendocrine organs. The embryonic diapause of the silkworm, Bombyx mori, is induced by a neuropeptide hormone, diapause hormone (DH), which is secreted from the suboesophageal ganglion (SG) at the pharate adult stage. Since the diapause type of SG is active in both synthesis and release of DH compared to the non-diapause of SG, it is concluded that there are two steps in the regulation of DH secretion from SG: at the level of gene expression and hormone release. To reveal the regulation mechanism participating in the diapause induction, we have investigated (1) the regulation mechanism of DH-PBAN gene expression, and (2) the neural network projecting into diapause hormone-producing cells (DHPCs) from the brain.*

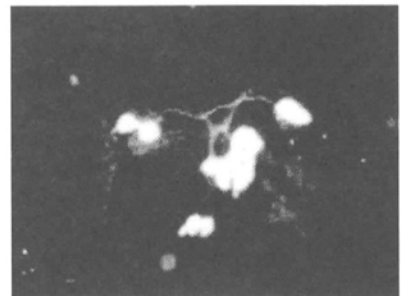
#### 研究目的

休眠は昆虫が独自に進化を遂げた環境応答機構である。カイコの卵休眠は母親世代の蛹の食道下神経節 (SG) から分泌される休眠ホルモン (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* 遺伝子) 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* 遺伝子は SG 中の 7 対 1 4 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。

本研究は休眠性の決定機構を解明するために本年度は、(1) *DH-PBAN* 遺伝子の発現調節機構の解析と、(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の同定を試みた。(1) を通し、神経分泌細胞の発生分化機構と軸索の誘導機構の解明の手がかりを得ることができ、(2) を通して、環境情報の受容からホルモン分泌に至るまでの神経繊維ネットワークの解明の手がかりを得られる。

#### 一年間の研究内容と成果

(1) 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* 遺伝子の上流域の下流に EGFP cDNA を挿入した AcNPV を作製し、蛹に注射した結果、内在性の遺伝子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* 遺伝子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 3 つの領域が存在することが分かった。その内、DHPCs での発現をオン・オフにする領域を 20 塩基 (DHC) まで限定した。ゲルシフトアッセイ (GSA) により、SG からのタンパク抽出物中より DHC に結合するタンパクを検出した。さらに、DHC の塩基を一部置換した DNA を用い、レポーターアッセイと GSA を行い、GSA で検出されたタンパク質は DHC に直接結合して *DH-PBAN* 遺伝子の発現をオンにすると推測された。



MatInspector によるトランス因子予測を行ったところ、候補の一つとして、ほ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 I (Ptx1) がヒットした。Ptx1 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、Ptx1 認識配列を含むオリゴヌクレオチドをプローブに用い GSA を行ったところ、DHC と同様の位置にシフトバンドが確認された。以上のことより、DH-PBAN 遺伝子の DHC は、Ptx1 結合領域と相同性が高く、Ptx1 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 Ptx1 ホモログ (BmPtx1) 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 Ptx1 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。

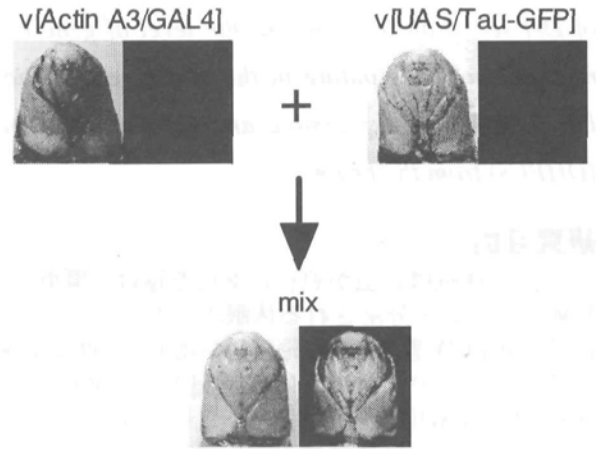


BmPtx1 の構造

BmPtx1 が、DH-PBAN 遺伝子の発現にどのような影響を与えるかを調査する目的で 2 種類の組み換えウイルスを作製した。一つめは、DH 産生細胞での BmPtx1 の過剰発現を誘導し、二つめは発現抑制を誘導するウイルスである。これら 2 種類のウイルスを利用したレポーター遺伝子解析の結果から、BmPtx が DHC への結合を通して DH-PBAN 遺伝子の発現調節を行っていることが推測された。

(2) DHPCs で小麦胚芽アグルチニン (WGA) およびテタヌス毒素 C フラグメント (TTC) を強制発現し、DHPCs を巡る順行性および逆行性の神経ネットワークの可視化を行った。その結果、脳間部に存在する 2 対 4 個の大型のニューロンが DHPCs へ投射している可能性を示した。また、この細胞は脳内光受容細胞の可能性が高いことが推測された。

さらに、カイコの脳—中枢神経系でのニューロン・神経繊維の標識と機能解析を効率的に進めるために、キイロショウジョウバエで利用されている GAL4/UAS システムをカイコへの AcNPV を利用した遺伝子導入法へ適用することに成功した。



**展望**

DH-PBAN 遺伝子の発現のオン・オフを決定するシスエレメント (DHC) への BmPtx1 の関与を詳細に調査し、カイコの休眠誘導に不可欠な DH-PBAN 遺伝子の発現を中心とする神経分泌細胞の分化・特殊化を解析していく。さらに、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、細胞外シグナルの受容・伝達機構を、昆虫の変態をコントロールする前胸腺刺激ホルモンの産生細胞を利用し解析していく。

AcNPV を利用した GAL4/UAS システム

DHPCs を巡る神経ネットワークの可視化を進め、脳内ニューロンのキャラクタライゼーションを行う。さらに、このニューロンの破壊による休眠性の変化を解析し、目的の達成を試みる。