

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 7 日現在

機関番号：13601

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2012～2015

課題番号：24380031

研究課題名(和文)カイコの胚休眠誘導における環境温度情報の保存・記憶の分子解析

研究課題名(英文)Molecular mechanism of induction of embryonic diapause in *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) 12,600,000円

研究成果の概要(和文)：カイコの休眠誘導に見られる環境温度の受容から休眠ホルモン(DH)放出に繋がる分子・神経ネットワーク機構の解析を行ない、概念的に仮定した情報の保存・記憶の分子実体の解明を目指した。そのために主に、(1) BmTRPA1 シグナル経路および DH 放出制御機構の解析、(2) 休眠誘導関連遺伝子の網羅的なスクリーニングと機能解析を行なった。温度センサータンパク質である BmTRPA1 が母蛾の胚期に20 以上の環境温度を受容し、そのことが、蛹期の DH の放出に繋がり、最終的に休眠の誘導がなされることを明らかにし、それらの過程に関わる分子群の候補を特定した。

研究成果の概要(英文)：In the bivoltine strain of the silkworm, *Bombyx mori*, embryonic diapause is induced transgenerationally as a maternal effect. Progeny diapause is determined by the environmental temperature during embryonic development of the mother; however, its molecular mechanisms are largely unknown. Here, we show that the *Bombyx* TRPA1 ortholog (BmTrpA1) acts as a thermosensitive transient receptor potential (TRP) channel that is activated at temperatures above ~21 °C and affects the induction of diapause in progeny. In addition, we show that embryonic RNAi of BmTrpA1 affects diapause hormone release during pupal-adult development. Furthermore, we searched the candidate genes participating in diapause induction. This is the first study to identify a thermosensitive TRP channel that acts as a molecular switch for a relatively long-term predictive adaptive response by inducing an alternative phenotype to seasonal polyphenism.

研究分野：環境分子昆虫学、蚕糸科学

キーワード：カイコ 温度センサー RNA-seq. 解析 休眠ホルモン

## 1. 研究開始当初の背景

カイコの胚休眠誘導にみられる環境適応は親子2世代にわたった独自の環境応答機構をもつ。胚を25 (25DD) に保護すれば次世代卵は休眠し、胚発生初期で細胞分裂を停止し形態形成が停止する。15 (15DD) では次世代は非休眠卵となり、約1週間で幼虫が孵化する。次世代卵の産下時期を自然界に例え、それぞれ初秋と初春と考えればその適応的意義が見てとれる。このように、親が受けた温度条件により、子供(胚)の運命(表現型)がリプログラミングされる。

これまでの研究で、ヒトやいくらかの動物で温度センサーとして機能することが知られている TRP (Transient receptor potential) チャンネルに関して、カイコゲノムにコードされるすべてのオルソログ遺伝子をクローニングし、網羅的な RNAi 実験を行なった。その結果、母蛾の卵での *BmTRPA1* の発現抑制が次世代卵の休眠性を転換することを明らかにした。さらに、細胞生理学的解析により *BmTRPA1* は約22 以上の温度で活性化する温度センサーであることを突き止めた。このチャンネルは胚期において25 の温度を受容し、次世代での休眠誘導を誘起するセンサー分子である可能性が示唆された。さらに、神経ペプチドホルモンである休眠ホルモン (DH) が蛹期の卵巣の DH 受容体 (DHR) に作用して休眠卵が誘導されることが知られている。また、DH の血液中への放出は脳により制御されていると考えられている。おそらく、カイコの休眠誘導には25 と15 の温度情報をセンシングする温度センサーが存在し、保護温度条件の違いにより、これらのいずれかのセンサー分子の活性化が誘起され、ホルモン放出の制御に繋がる約1ヶ月におよぶ環境情報の保存・記憶を伴う分子・神経ネットワークに可塑的変化がもたらされ、休眠性が決定していると考えられる。しかしながら、この分子メカニズムは未だ不明のままであった。

## 2. 研究の目的

本研究では、温度情報の受容から DH 放出に繋がる分子・神経ネットワーク機構の解析を行ない、概念的に仮定した環境情報の保存・記憶の分子実体の解明を目指した。そのために、(1) *BmTRPA1* シグナル経路および DH 放出制御機構の解析、(2) 休眠誘導関連遺伝子の網羅的なスクリーニングと機能解析、さらに、(3) 昆虫で未同定の低温センサーの同定、の以上3点を行なう予定であった。

## 3. 研究の方法

### (1) *BmTRPA1* シグナル経路および DH 放出制御機構の解析

まず、胚期における *BmTRPA1* の発現細胞および神経投射パターンを免疫組織化学、*in situ* ハイブリダイゼーションより調査し、25 と15 の温度の違いに伴う可塑的変化の有無を解析した。次に、ゲノム編集技術の一つである TALEN (transcription activator-like effector nuclease) を利用して二化性系統において DH をコードする遺伝子 (*DH-PBAN*; *DHP*) および *DHR* 遺伝子に突然変異を誘発させ、それぞれのタンパク質の生産が全く起こらない、ノックアウト (KO) 変異体を作成した。これらの系統を利用し、胚期に受容した環境情報は、DH シグナル経路に統合されて、休眠性が決定されるかを確認した。さらに、我々は既に DH 放出に関連する可能性のある蛹の脳内遺伝子をクローニングしている。*DHP* および *DHR* の KO 系統およびこれらの遺伝子の KO 系統を利用し、休眠性への影響と DH シグナル経路との階層性を調査した。

### (2) 休眠誘導関連遺伝子の網羅的なスクリーニングと機能解析

卵を25DD および15DD に保護した胚子や蛹の脳-食道下神経節 (SG) において RNA-seq. 解析を行い、遺伝子発現量の異なる遺伝子群を網羅的に同定した。また、*BmTRPA1* の RNAi における個体でも RNA-seq. 解析を行なった。その後、同定された遺伝子の発現動態を調査するとともに、RNAi 実験や KO 系統の作出により、これらの遺伝子が休眠性に与える影響を調査した。RNA-seq. 解析は新学術領域研究「ゲノム支援」の援助により行なった。

### (3) 昆虫で未同定の低温センサーの同定

次世代が非休眠卵になる温度条件である15 の温度で活性化する温度センサーとそのリガンドの同定を目指した。まず、カイコゲノムに存在する全 TRP チャンネル遺伝子の全長 cDNA のクローニングを行ない、それらのチャンネルの細胞生理学的解析を行なった。細胞生理学的解析では、哺乳類細胞を用いて、Ca<sup>2+</sup> イメージングを行ない、低温で活性化される TRP を探索した。

## 4. 研究成果

### (1) *BmTRPA1* シグナル経路および DH 放出制御機構の解析

胚期における *BmTRPA1* の発現細胞を免疫染色により明らかにした。さまざまな昆虫種において TRPA オルソログは、神経系での発現が観察されている。カイコの胚においては腹肢などの非神経系での発現が観察された。このことは、*BmTRPA1* が表皮細胞などで温度受容を行ない、その情報が脳に伝えら

れ休眠誘導に関与する可能性を示した。

次に、TALEN による *DHP* および *DHR* の KO 系統の作出を行なった。これらの KO 系統では、25DD にも関わらず、非休眠卵が産出された。さらに、DH の N 末端と C 末端のそれぞれを特異的に認識する 2 種類の抗体を利用し、血液中の DH を特異的に検出した。蛹血液 150  $\mu$ l 当たり、85.8 amol (0.57 pM) の検出限界を持つ測定系を開発した。この測定系を利用し、野生型の 25DD と 15DD の血液中の DH 濃度を測定したところ、両者とも数 pM オーダーの DH が存在し、25DD が 15DD の約 2 倍の血中濃度であることが判明した。また、*DHP* の KO 系統では血液中に DH は全く検出されなかった。これらの結果から、胚期に受けたさまざまな環境情報は DH と *DHR* から構成される DH シグナル経路に統合され、これが唯一の経路として休眠性の決定がなされると結論づけられた。また、二化性系統では胚期の温度条件の違いは蛹期の血液中の DH 濃度の違いとなり、卵巣での DH 受容とシグナル伝達系に差異を生じ、休眠性の決定に繋がるのではないかと推測された。さらに、カイコのゲノム中には、*capa* と呼ばれる遺伝子が存在し、この遺伝子には CAPA-PK と呼ばれる FXPRLa がコードされている。つまり、カイコゲノム中には 6 種類の FXPRLa が存在し、さらに CAPA-PK の C 末端は Trp-Phe-Gly-Pro-Arg-Leu-NH<sub>2</sub> で DH と同一である。また、*DHR* は、ほ乳類のニューロメジン U (NMU) 受容体と類縁関係があると考えられているが、カイコのゲノム中には NMU 受容体相同体が複数存在している。我々の結果は、カイコにおいて、DH と *DHR* より構成される DH シグナリング経路は、多種存在する FXPRLa と NMU 受容体相同体の中で、選択的に共進化を起こし、休眠誘導に関わっていることを示している。

さらに、これまでの研究で、蛹の脳内に存在する、ある神経ペプチドを非休眠卵産生タイプの蛹に注射したところ、用量依存的に休眠卵が誘導されることを発見した。さらにその活性は DH のものより、時期的に先行していた。そこで、*DHP* および *DHR* の KO 系統において同様の実験を行なったところ、休眠卵はまったく産生されなかった。このことから、この脳内神経ペプチドは、DH シグナルの上位で作用し、DH の放出制御に関わる可能性が示された。さらに、*piggyBAC* 形質転換カイコによる GAL4-UAS システムを利用し、この神経ペプチドの産生細胞の細胞死、神経伝達阻害を誘導する実験を行なうための形質転換カイコの作出を行なった。現在、DH の放出制御および休眠性に与える影響を調査中である。また、GABA 性神経伝達が

DH シグナル経路の上位に関わることも同様の実験で明らかにした。現在、これらのシグナル系に関わると推測される遺伝子の KO 系統を作出し、休眠性に与える影響を調査している。

## (2) 休眠誘導関連遺伝子の網羅的なスクリーニングと機能解析

胚期から蛹中期に至る約一ヶ月間にいたる環境情報の保存と統合に関わる遺伝子の同定を目指して、25DD と 15DD に曝した胚子と蛹の脳-SG 複合体において RNA-seq. 解析を行なった。その結果、胚期においては、25DD、15DD および BmTRPA1 のノックダウン個体間で比較したところ、25DD に比べて 15DD および BmTRPA1 ノックダウン個体で発現量が有意に高いか、もしくは低い遺伝子をピックアップした。このような遺伝子が合計 56 個見つかり、これらの中には、成長因子、ペプチドホルモン受容体、核内レセプターや多数の機能未知遺伝子が含まれていた。これらの遺伝子の中には BmTRPA1 の活性化シグナルの下流で働き、休眠誘導に関わっている遺伝子が含まれている可能性がある。また、25DD と 15DD で胚期と蛹期の脳-SG で発現量に有意な差のある遺伝子を調査したところ、蛹期の脳-SG で発現量に差のあった遺伝子の約 20 %が、胚子でも差のある遺伝子であった。このことは、特定の遺伝子群のライフステージを通じた発現量の違いが休眠性の決定に重要である可能性を示している。さらに、蛹の脳-SG 複合体においても 25DD に比べて 15DD および BmTRPA1 ノックダウン個体で発現量が有意に高いか、もしくは低い遺伝子を多数ピックアップした。これらの内、興味深い遺伝子に関しては、25DD および 15DD における胚発育期または、蛹-成虫発育期を通しての遺伝子発現量をリアルタイム PCR 法により調査し、発現量に有為な差が観察された遺伝子については、TALEN による KO 系統を網羅的に作出している。

## (3) 昆虫で未同定の低温センサーの同定

Ca<sup>2+</sup> イメージング法により、カイコにおける新規の温度感受性 TRP チャンネルを同定した。しかしながら、低温により活性化されるチャンネルではなかった。今後も低温センサーの同定を継続し、休眠性に関係する温度センサーが同定できれば、そのチャンネルのリガンドの探索を行なう。明らかになったリガンドを胚に処理することにより休眠性の転換が可能か否かも調査する予定である。

これまでに知られている温度感受性 TRP チャンネルの機能は、すべて即時的な温度応答反応である。カイコにおいても胚期以外にも

幼虫期や成虫期の脳-中枢神経系を含むさまざまな組織で発現が観察された。このことは、BmTRPA1 が休眠誘導以外にも侵害刺激受容や温度走性などへの関与が推測される。一方、カイコの休眠誘導に見られるような比較的長期間にわたる温度応答反応への関与は我々の報告が初めてであり、おそらくカイコの BmTRPA1 は、昆虫に一般的に機能している即時的な機能と、カイコにおいて新規に獲得した機能の両方を持つようになったと考えられる。

## 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4件)

Shiomi, K., Takasu, Y., Kunii, M., Tsuchiya, R., Mukaida, M., Kobayashi, M., Sezutsu, H., Ichida (Takahama), M., Mizoguchi, A. Disruption of diapause induction by TALEN-based gene mutagenesis in relation to a unique neuropeptide signaling pathway in *Bombyx*. *Sci. Rep.* 5, 15566, 2015. (査読有)

DOI:10.1038/srep15566.

塩見邦博「カイコの休眠誘導と環境応答」蚕糸・昆虫バイオテック, 日本蚕糸学会, Vol. 84 (2), 119-126. 2015. (査読無)

<http://ci.nii.ac.jp/naid/40020564555>

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*, 111(13):E1249-E1255 2014. (査読有)

DOI:10.1073/pnas.1322134111.

Masumoto, M., Ohde, T., Shiomi, K., Yaginuma, T., Niimi, T.; A baculovirus immediate-early gene, *ie1*, promoter drives efficient expression of a transgene in both *Drosophila melanogaster* and *Bombyx mori*. *PLoS ONE*, 7(11), e49323, 2012. (査読有)

DOI:10.1371/journal.pone.0049323.

[学会発表](計16件)

田中まみ・向田萌香・土屋良磨・田中佑磨・渡井拓人・塩見邦博;カイコのインスリン受容体の完全長 cDNA のクローニングとアイソフォーム同定の試み;日本蚕糸学会中部支部第 71 回・東海支部第 67 回大会, 2015.12.4, 信州大学理学部(長野県松本市).

渡井拓人・田中まみ・田中佑磨・土屋良磨・高須陽子・瀬筒秀樹・塩見邦博;カイコにおけるコラゾニンおよびその受容体遺伝子のノックアウトが休眠性に及ぼす影響の調査;日本蚕糸学会中部支部第 71 回・東海支部第 67 回大会, 2015.12.4, 信州大学理学部(長野県松本市).

田中佑磨・田中まみ・渡井拓人・土屋良磨・國井雅代・高須陽子・瀬筒秀樹・塩見邦博;カイコの休眠誘導における温度情報の受容・保存に関わる遺伝子の探索-候補遺伝子の発現動態解析-;日本蚕糸学会中部支部第 71 回・東海支部第 67 回大会, 2015.12.4, 信州大学理学部(長野県松本市).

土屋良磨・田中まみ・田中佑磨・渡井拓人・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 性神経伝達の関係調査;日本蚕糸学会中部支部第 71 回・東海支部第 67 回大会, 2015.12.4, 信州大学理学部(長野県松本市).

塩見邦博・高須陽子・國井雅代・土屋良磨・向田萌香・小林正和・瀬筒秀樹・一田(高濱)昌利・溝口明;TALEN を利用した休眠ホルモンシグナル経路の遮断がカイコの休眠誘導に及ぼす影響;日本蚕糸学会 85 回大会, 2015.9.26, 北海道大学農学部(北海道札幌市).

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. 2 26, 総合研究大学院大学(神奈川県逗子市).(招待講演)

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第 70 回・東海支部第 66 回大会, 2014.10.25, 岡谷商工会議所・岡谷蚕糸博物館(長野県岡谷市).

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第 70 回・東海支部第 66 回大会, 2014.10.25, 岡谷商工会議所・岡谷蚕糸博物館(長野県岡谷市).

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第 70 回・東海支部第 66 回大会, 2014.10.25, 岡谷商工会議所・岡谷蚕糸博物館(長野県岡谷市).

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, 2014.9.19, 長浜バイオ大学(滋賀県長浜市).(招待講演)

塩見邦博・國井雅代・新井満美子・向田萌香・鈴木穰・黒川顕・山本希;カイコの胚

休眠誘導における環境温度情報の保存・記憶の分子解析；新学術領域研究「ゲノム支援」拡大班会議, 2014.8.20, ポートピアホテル(兵庫県神戸市)。

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メラトニンの作用機構の解析；日本蚕糸学会中部支部第 69 回・東海支部第 65 回大会, 2013.11.9, 信州大学理学部(長野県松本市)。

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第 69 回・東海支部第 65 回大会, 2013.11.9, 信州大学理学部(長野県松本市)。

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第 69 回・東海支部第 65 回大会, 2013.11.9, 信州大学理学部(長野県松本市)。

塩見邦博・國井雅代・新井満美子・鈴木穰・登坂真紀子・菊池泰司・今村聖実・黒川顕・山本希；カイコの胚休眠誘導における環境温度情報の保存・記憶の分子解析；新学 3 領域研究「ゲノム支援」拡大班会議, 2013.8.28, ポートピアホテル(兵庫県神戸市)。

田中良弥・國井雅代・久保田穂香・田中良明・塩見邦博；カイコの休眠性とメラトニンの免疫染色強度；日本蚕糸学会中部支部第 68 回大会, 2012.11.10, 信州大学繊維学部(長野県上田市)。

〔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. 2014. 4 11. に掲載。

## 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：7 0 3 2 4 2 4 1

### (2)研究分担者

溝口 明 (MIZOGUCHI, Akira)  
愛知学院大学・教養部・教授  
研究者番号：6 0 1 8 3 1 0 9

太田 広人 (OHTA, Hiroto)  
熊本大学・自然科学研究科・助教  
研究者番号：6 0 4 5 0 3 3 4  
(H24 H25)

白井 孝治 (SHIRAI, Koji)  
信州大学・学術研究院繊維学系・准教授  
研究者番号：0 0 2 9 3 4 9 9  
(H24 H25)

中西 弘充 (NAKANISHI, Hiromitsu)  
信州大学・サテライト・ベンチャー・ビジネス・ラボラトリー・助教  
研究者番号：9 0 4 4 3 0 0 1  
(H24 H25)