

令和 3 年 6 月 13 日現在

機関番号：13601

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2017～2020

課題番号：17H03941

研究課題名(和文)カイコの休眠誘導にみられる脳可塑性の新奇メカニズムの分子・細胞動態解析

研究課題名(英文)Molecular analysis of brain plasticity in diapause induction of the silkworm

研究代表者

塩見 邦博 (Shiomi, Kunihiro)

信州大学・学術研究院繊維学系・教授

研究者番号：70324241

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,900,000円

研究成果の概要(和文)：カイコ (*Bombyx mori*) の胚休眠誘導における母蛾の環境温度の受容から次世代卵の休眠性の決定に至る過程の分子機構の解析を行った。蛹期には GABA 性神経伝達と脳内神経ペプチドのコラゾニンシグナル経路が休眠ホルモン (DH) シグナル経路の上位で機能し、DH の放出制御に関わっていることを明らかにした。母蛾が胚期に受容した温度情報により蛹期の脳内神経ネットワークで階層的で可塑的な変化が生じることを示した。また、カイコの温度センサー (BmoTRPA1) のノックアウト系統では温度依存的休眠誘導がクワコのように光周期依存的になることを発見した。

研究成果の学術的意義や社会的意義
昆虫をはじめとする生物の環境応答機構における分子機構の解明として意義があるばかりか、蚕糸科学やカイコが家畜化された過程を探る上で非常に重要な研究成果となりうる。

研究成果の概要(英文)：Diapause is a common response to seasonal changes in environmental conditions found in many species of insects as well as other animals, but we do not yet fully understand the molecular mechanisms underlying this important physiological switch in *Bombyx mori*. Our research highlighted the presence of a GABAergic and corazonin signaling system that induces progeny diapause through diapause hormone release. Furthermore, we performed a comparative analysis between the Kosetsu strain of *B. mori* and a Japanese population of the wild mulberry silkworm *B. mandarina* concerning the hierarchical molecular mechanisms in diapause induction. We hypothesize that TRPA1-activated signals are strongly linked to the signaling pathway participating in diapause induction in *Kosetsu* to selectively utilize the temperature information as the cue because temperature-dependent induction was replaced by photoperiodic induction in the TRPA1 knockout mutant.

研究分野：蚕糸科学

キーワード：休眠 温度センサー カイコ クワコ

1. 研究開始当初の背景

カイコ (*Bombyx mori*) は産卵後 2~3 日の胚発生の初期に細胞分裂を停止し、卵 (胚) のステージで胚休眠する。休眠を開始した卵は酸素消費量が極端に低下し、休眠間発育と呼ばれる独自の糖代謝系を作動させる。2 化性のコウセツ系統では、母蛾の胚期の温度や光 (日長) により母性効果として次世代卵の休眠性が決定する (図 1)。例えば、卵を 25 °C 全暗 (25DD) に保護すれば次世代卵は休眠する。15 °C 全暗 (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。このように、親が受けた温度情報が記憶・保存され、子供 (胚) の運命 (表現型) がプログラミングされる。また、コウセツ系統は 25DD と 15DD では休眠性の決定には温度条件が優先的に作用し、光 (日長) 条件は関係しない温度依存的休眠誘導機構をもつ。

一般的に、昆虫の休眠を含む季節的多型の誘導には、概念的なモデルが提唱されている。まず、環境情報をセンサー分子が受容し、受容された情報は脳可塑性を通して、比較的長期間に渡って記憶・保存 (storage) され、その後、統合 (integrate) される。そして、神経内分泌機構へ翻訳 (translate) されたのち、ホルモンの分泌調節などを介して、表現型の可塑的变化が起こると考えられている。我々のこれまでの研究は、カイコの胚休眠誘導の分子機構がこの概念モデルによく符合することを示している。神経ペプチドホルモンである休眠ホルモン (DH) が蛹期の食道下神経節 (SG) で合成され、血液中に放出された後、卵巣にある DH 受容体 (DHR) に作用して休眠卵が誘導される (図 1)。さらに、DH および DHR 遺伝子のノックアウト (KO) 系統では、いかなる環境条件においても休眠卵を産卵しない (Shiomi et al., 2015)。つまり、複数の環境情報は、最終的には DH シグナリングに「統合」され、これが唯一の経路として休眠性は決定される。これらに加えて、環境情報の受容に関しては、母蛾の胚期に温度センサーである BmoTRPA1 が約 21 °C 以上の環境温度を受容し、その活性化によって、蛹期に DH の放出が促進される (Sato et al., 2014)。一方、環境情報の記憶・保存と統合を行なう脳可塑性に関しては、1950 年代から休眠性の決定には DH の放出制御が重要であり、この放出制御には脳からの神経支配が関与していることが推測されていた。つまり、胚子が受けた温度条件により、蛹の脳で可塑的な変化が生じ、25DD では血液中への DH の放出促進が生じ、15DD では、DH の放出抑制が生じると推測されていた。しかしながら、その分子機構の詳細は不明のままであった。

一方、カイコの祖先種として知られているクワコ (*Bombyx mandarina*) も胚休眠する昆虫種であるが、日本に生息する 2 化性のクワコの休眠性は母蛾 (メス成虫) が幼虫期に受けた光周期 (日長) によって決定する。例えば、16 時間明条件 : 8 時間暗条件 (16L8D) のような長日条件では非休眠卵となり、8L16D のような短日条件では休眠卵を産卵する。このように、カイコのコウセツ系統では典型的な温度依存的休眠誘導を示すが、日本に生息する 2 化性のクワコでは光周期依存的休眠誘導を示す。しかしながら、その違いを生み出す分子機構については不明のままであった。

2. 研究の目的

(1) これまでに、DH 放出の上位で脳内神経ペプチドであるコラゾニン (Crz) および GABA 性神経伝達が関与し、Crz の作用により DH の放出が促進される可能性を示していた (図 1)。そこで、これらの分子群の階層的な作用により DH の放出制御がなされ、休眠性が決定する分子機構の解析を行った。

(2) クワコの休眠誘導における DH シグナル経路を調査するとともに、BmoTRPA1 の KO 系統の表現型を観察し、温度依存的と光周期依存的休眠誘導の分子機構の比較を行った。

3. 研究の方法

(1) カイコの胚休眠誘導において DH シグナル経路の上位で働く分子群の同定と階層性の解明を目指して、Crz および Crz 受容体、さらに GABA 性神経伝達に関わる分子群の発現動態を解析するとともに、多種の遺伝子改変カイコを利用して、詳細な分子・細胞動態解析、表現型の解析を行った。

(2) クワコの DH, DHR および BmoTRPA1 のオーソログ (BmaTRPA1) をクローニングし、DH シグナル経路と休眠誘導の関係および BmaTRPA1 の活性化温度閾値を調査した。また、カイコの BmoTRPA1 の KO 系統を作成し、種々の温度および光周期条件における次世代卵の休眠性を調査した。

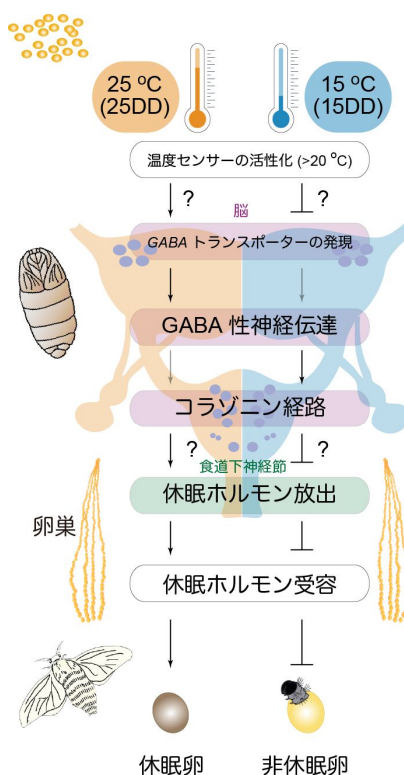


図 1. カイコと休眠誘導の階層的なシグナル経路

4. 研究成果

(1) カイコの蛹期には GABA 性神経伝達と Crz シグナル経路が DH シグナル経路の上位で機能し, DH の放出制御に関わっていることを明らかにした (Tsuchiya et al., 2021)。Crz は DH の放出促進に関わっており, 25DD では Crz の作用により DH の放出が促進され休眠卵が誘導される。一方, 15DD では GABA 性の抑制性の神経伝達が Crz の分泌を抑制し, その結果, DH の放出が抑制され非休眠卵が誘導される。この GABA 性の神経伝達にはイオン透過型 GABA 受容体サブユニットの一つである 8916 が関与する可能性を示した。また, GABA 性神経伝達において, シナプス間隙の GABA を一掃する働きをもつ細胞性 GABA トランスポーター (BmGAT) は 25DD の蛹において 15DD に比べて 100 倍程度も遺伝子発現量が高い。そのため, 25DD では GABA シグナルが一過的になり Crz の放出が起こり, 15DD では GABA のシグナルが持続的となり非休眠卵の誘導に繋がっていると考えられた。このように, 母蛾が胚期に受容した温度情報により蛹期の階層的な脳内神経ネットワークで可塑的な変化が生じることを示した (図 1)。

(2) クワコはカイコと相同性の高い DH と DHR をコードする遺伝子を持ち, これらによる DH シグナル経路により休眠卵が誘導される可能性を示した。また, クワコの卵内にもカイコと相同性の高い温度センサー (BmaTRPA1) が存在し, 25 で活性化されることを明らかにした。つまり, カイコとクワコでは休眠誘導のキッカケとなる環境情報は異なるが, 誘導に関わる分子機構は類似性が高いと考えられた。一方, ゲノム編集技術 (TALEN システム) を利用し, カイコの温度センサー (BmoTRPA1) の KO システムを作出した。この系統では休眠誘導に関わる胚期での温度受容ができないと考えられるが, その休眠性はクワコと同じ様に幼虫の日長条件により休眠性が決定されることがわかった (図 2)。つまり, 短日条件で休眠卵, 長日条件で非休眠卵が産卵された。おそらく, コウセツ系統の野生型では温度情報および BmoTRPA1 の活性化シグナルと休眠誘導に関わる何らかの装置に強い繋がりがあがるが, KO システムでは, この繋がりが解除され, カイコの祖先種のクワコと同じように幼虫期の光周期依存的な休眠性の決定機構が働くと考えられた。また, コウセツ系統のような温度に依存して休眠性を決定する系統は, クワコからカイコが家畜化される過程において, 人為的に日長管理よりも温度管理が容易なことから家畜化における人為選抜の過程でカイコ集団内に広がったのではないかと推測した。

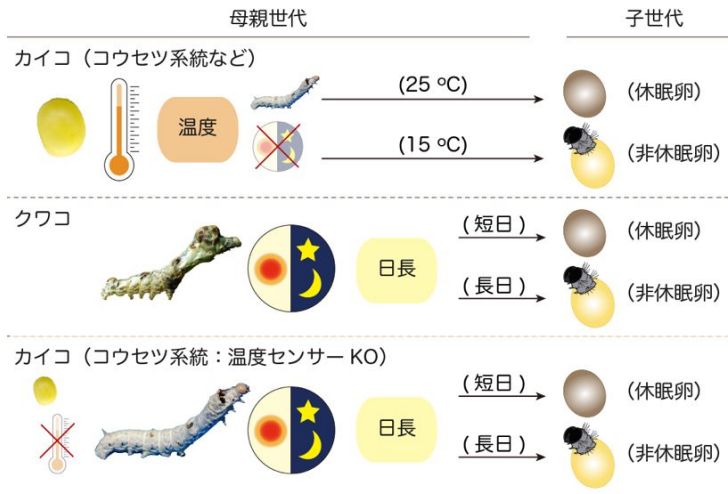


図 2. カイコとクワコの休眠性決定のキッカケとなる環境情報の違い

<引用文献>

1. Takeshi Yokoyama, Shigeru Saito, Misato Shimoda, Masakazu Kobayashi, Yoko Takasu, Hideki Sezutsu, Yoshiomi Kato, Makoto Tominaga, Akira Mizoguchi, Kunihiro Shiomi: Comparisons in temperature and photoperiodic-dependent diapause induction between domestic and wild mulberry silkworms. *Sci. Rep.*, 11, 8052, 2021 年, doi: 10.1038/s41598-021-87590-4
2. Ryoma Tsuchiya, Aino Kaneshima, Masakazu Kobayashi, Maki Yamazaki, Yoko Takasu, Hideki Sezutsu, Yoshiaki Tanaka, Akira Mizoguchi, Kunihiro Shiomi: Maternal GABAergic and GnRH/corazonin pathway modulates egg diapause phenotype of the silkworm *Bombyx mori*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, Vol.118, No.1, e2020028118, 2021 年, doi: 10.1073/pnas.2020028118
3. Kunihiro Shiomi, Yoko Takasu, Masayo Kunii, Ryoma Tsuchiya, Moeka Mukaida, Masakazu Kobayashi, Hideki Sezutsu, Masatoshi Ichida (Takahama), Akira Mizoguchi: Disruption of diapause induction by TALEN-based gene mutagenesis in relation to a unique neuropeptide signaling pathway in *Bombyx*. *Sci. Rep.*, Vol.5, pp.15566, 2015 年, doi: 10.1038/srep15566
4. Azusa Sato, Takaaki Sokabe, Makiko Kashio, Yuji Yasukochi, Makoto Tominaga, Kunihiro Shiomi: Embryonic thermosensitive TRPA1 determines transgenerational diapause phenotype of the silkworm, *Bombyx mori*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, Vol.111, No.13, pp.E1249-E1255, 2014 年, doi: 10.1073/pnas.1322134111

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Takeshi Yokoyama, Shigeru Saito, Misato Shimoda, Masakazu Kobayashi, Yoko Takasu, Hideki Sezutsu, Yoshiomi Kato, Makoto Tominaga, Akira Mizoguchi, Kunihiro Shiomi	4. 巻 11
2. 論文標題 Comparisons in temperature and photoperiodic-dependent diapause induction between domestic and wild mulberry silkworms	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Sci. Rep.	6. 最初と最後の頁 8052
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-021-87590-4	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Ryoma Tsuchiya, Aino Kaneshima, Masakazu Kobayashi, Maki Yamazaki, Yoko Takasu, Hideki Sezutsu, Yoshiaki Tanaka, Akira Mizoguchi, Kunihiro Shiomi	4. 巻 118
2. 論文標題 Maternal GABAergic and GnRH/corazonin pathway modulates egg diapause phenotype of the silkworm <i>Bombyx mori</i>	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Proc Natl Acad Sci U S A	6. 最初と最後の頁 e2020028118
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1073/pnas.2020028118	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Daiki Fujinaga, Kunihiro Shiomi, Yoshimasa Yagi, Horoshi Kataoka, Akira Mizoguchi	4. 巻 9
2. 論文標題 An insulin-like growth factor-like peptide promotes ovarian development in the silkworm <i>Bombyx mori</i>	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Sci. Rep.	6. 最初と最後の頁 18446
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-019-54962-w	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 塩見 邦博	4. 巻 65
2. 論文標題 カイコの休眠誘導と in hand な環境適応	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 低温生物工学会誌	6. 最初と最後の頁 51-55
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計20件（うち招待講演 4件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 塩見 邦博
2. 発表標題 カイコの休眠誘導とin hand な環境適応
3. 学会等名 第 64 回 低温生物工学会「環境適応と休眠－哺乳類・昆虫・植物・微生物－」セミナー（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 塩見 邦博
2. 発表標題 カイコとクワコで休眠誘導のしくみは異なるか？
3. 学会等名 第 25 回 日本野蚕学会シンポジウム企画「クワコ研究会 2019」（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 森田 開斗・横山 岳・國井 雅代・兼島 愛乃・小林 正和・白鳥 夏帆・村上 実・塩見 邦博
2. 発表標題 カイコの緑色オプシンの二重機能の解析
3. 学会等名 日本蚕糸学会中部支部講演要旨集第75号, p6
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 横山 岳・齋藤 茂・下田 みさと・小林 正和・塩見 邦博
2. 発表標題 クワコの休眠誘導における関連分子の調査
3. 学会等名 日本蚕糸学会中部支部講演要旨集第75号, p7
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 兼島 愛乃・白鳥 夏帆・村上 実・森田 開斗・小林 正和・塩見 邦博
2. 発表標題 カイコの休眠誘導におけるAKH/Crz 関連ペプチド (ACP) の役割の調査
3. 学会等名 令和2年度蚕糸・昆虫機能利用学術講演会日本蚕糸学会第90回大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 村田 彰久・村上 実・小林 正和・横山 岳・池田 健人・大門 高明・沼田 英治・塩見 邦博
2. 発表標題 カイコの休眠誘導における温度情報と時計遺伝子群の関係について
3. 学会等名 令和2年度蚕糸・昆虫機能利用学術講演会日本蚕糸学会第90回大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 尾辻奈菜・小林正和・山崎真希・高須陽子・瀬筒秀樹・溝口明・塩見邦博
2. 発表標題 カイコの細胞性 GABA トランスポーター遺伝子の発現特性と休眠誘導との関係
3. 学会等名 平成30年度蚕糸・昆虫機能利用学術講演会日本蚕糸学会88回大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 兼島愛乃・山下剛司・山崎真希・小林正和・塩見邦博
2. 発表標題 カイコの休眠誘導における AKH/コラゾニン関連ペプチド (ACP) の役割の調査
3. 学会等名 日本蚕糸学会 中部支部第74回・東海支部第70回研究発表会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 山下剛司・兼島愛乃・小林正和・山崎真希・塩見邦博
2. 発表標題 時計関連遺伝子のノックアウト系統の作出と休眠性への影響の調査
3. 学会等名 日本蚕糸学会 中部支部第74回・東海支部第70回研究発表会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 塩見邦博
2. 発表標題 カイコの休眠誘導における環境温度応答の分子解析
3. 学会等名 第91回日本生化学会 シンポジウム 1S05e「モデル生物から理解する感覚受容の新規メカニズム」(招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 塩見 邦博
2. 発表標題 カイコにおける休眠卵産生の分子機構に関する研究
3. 学会等名 平成31年度日本蚕糸学会賞受賞記念講演(招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 尾辻奈菜・小林正和・山崎真希・須崎寿史・山本大智・田中雄士・塩見邦博
2. 発表標題 カイコの休眠誘導における細胞性 GABA トランスポーターの機能解析
3. 学会等名 日本蚕糸学会中部支部第73回・東海支部第69回大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 須崎寿史・山本大智・尾辻奈菜・田中雄士・小林正和・山崎真希・溝口明・塩見邦博
2. 発表標題 ヨトウガの蛹休眠誘導におけるミオサブプレッシンの機能解析
3. 学会等名 日本蚕糸学会中部支部第73回・東海支部第69回大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 尾辻 奈菜・小林 正和・山崎 真希・高須 陽子・瀬筒 秀樹・溝口 明・塩見 邦博
2. 発表標題 カイコの細胞性 GABA トランスポーター遺伝子の発現特性と休眠誘導との関係
3. 学会等名 平成 30 年度蚕糸・昆虫機能利用学術講演会日本蚕糸学会88回大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 塩見邦博・横山 岳2・下田みさと・齋藤 茂・富永 真琴
2. 発表標題 カイコとクワコの温度センサーと休眠誘導
3. 学会等名 温熱生理研究会 2020
4. 発表年 2019年～2020年

1. 発表者名 村田 彰久・小林 正和・兼島 愛乃・池上 雅人・河本 陽大・溝口 明・塩見 邦博
2. 発表標題 カイコにおける時計遺伝子と休眠誘導経路の関係
3. 学会等名 日本蚕糸学会中部支部講演要旨集第76号, 16
4. 発表年 2020年～2021年

1. 発表者名 池上 雅人・新井 満美子・小林 正和・兼島 愛乃・村田 彰久・河本 陽大・塩見 邦博
2. 発表標題 カイコの核内受容体 (HR3) 遺伝子の発現と休眠誘導との関係
3. 学会等名 日本蚕糸学会中部支部講演要旨集第 76号, 17
4. 発表年 2020年～2021年

1. 発表者名 兼島 愛乃・池上 雅人・河本 陽大・村田 彰久・小林 正和・塩見 邦博
2. 発表標題 カイコの休眠誘導における AKH/Crz 関連ペプチド (ACP) の役割の調査
3. 学会等名 日本蚕糸学会中部支部講演要旨集第 76号, 18
4. 発表年 2020年～2021年

1. 発表者名 村田 彰久・本間 哲・小林 正和・兼島 愛乃・池上 雅人・河本 陽大・溝口 明・塩見 邦博
2. 発表標題 カイコの温度依存的休眠誘導における時計遺伝子の関与
3. 学会等名 令和 3 年度蚕糸・昆虫機能利用学術講演会日本蚕糸学会第 91 回大会
4. 発表年 2020年～2021年

1. 発表者名 池上 雅人・新井 満美子・小林 正和・兼島 愛乃・村田 彰久・河本 陽大・塩見 邦博
2. 発表標題 カイコの休眠誘導における核内受容体遺伝子の発現解析
3. 学会等名 令和 3 年度蚕糸・昆虫機能利用学術講演会日本蚕糸学会第 91 回大会
4. 発表年 2020年～2021年

〔図書〕 計2件

1. 著者名 塩見 邦博 他	4. 発行年 2020年
2. 出版社 株式会社 朝倉書店	5. 総ページ数 210
3. 書名 カイコの科学	

1. 著者名 金児 雄, 塩見 邦博, 天竺桂 弘子, 外川 徹, 横山 岳 他	4. 発行年 2019年
2. 出版社 エヌ・ティー・エス	5. 総ページ数 304
3. 書名 カイコの実験単 カイコで生命科学をまるごと理解!	

〔産業財産権〕

〔その他〕

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	溝口 明 (Mizoguchi Akira) (60183109)	愛知学院大学・教養部・教授 (33902)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------