

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 11 日現在

機関番号：13301

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2010～2014

課題番号：22380034

研究課題名(和文) 昆虫変態の分子機構 - インスリン様ペプチドの作用と代謝制御

研究課題名(英文) Molecular Mechanism of Insect Metamorphosis: Action of Insulin-related Peptide

研究代表者

岩見 雅史 (IWAMI, Masafumi)

金沢大学・自然システム学系・教授

研究者番号：40193768

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,900,000円

研究成果の概要(和文)：カイコガをモデルに、(1) 昆虫変態に関わるインスリン様ホルモン(ボンビキシン)について、ゲノム情報を基に、新規遺伝子の同定を含め全貌を解明した。(2) インスリン機能に関連して、発生に伴うエネルギー源としての糖に着目し体内濃度の変化を解析した。結果、発生過程での糖利用酵素の活性調節が幼虫期ではエクジソンによる制御機構下にあることを示した。(3) 脳中枢神経回路での情報処理および制御機構解明のため、性フェロモンに対する性行動をモデルに、神経活動依存的遺伝子を用いて神経回路可視化可能システムの作出を試みた。結果、性フェロモンに応答してGFPシグナルが観察され、神経回路の可視化可能システムが確立できた。

研究成果の概要(英文)：Insect brain plays central role during the development by orchestrating hormone production and processing information of internal and external factors. An insulin family peptide, bombyxin, is one of the hormones regulating growth, metabolism, and reproduction, but its function still remains obscure. (1) We analyzed the full silkworm genome and identified five novel bombyxin families with their genomic organization and chromosomal location. (2) We indicated that the dietary carbohydrates hydrolyzing activity remained high throughout the last larval period and decreased to negligible levels until the pupal period and that the activity is developmentally regulated by ecdysone. To elucidate the brain function at the neural circuit level, we intended to visualize neural circuit underlying sex pheromone-induced innate behavior. (3) We established strains in which we could visualize neural projections and cell nucleus positions that were reliably labeled with GFP after pheromone stimulation.

研究分野：昆虫分子生物学

キーワード：昆虫 脱皮・変態 発生・分化 脳・神経 ホルモン

1. 研究開始当初の背景

昆虫は、幼虫から幼虫へ幼虫期を繰り返して寿命を延長する。一方、幼虫から蛹そして成虫への変態過程では、自己の寿命と引き替えに生殖サイクルへと移行する。この脱皮・変態といった昆虫独特のライフサイクルは、これまで、ほ乳類の生育とは無関係なものと考えられてきた。しかし、昆虫でインスリン様ペプチドが発見され、インスリンシグナルが個体の寿命や生殖を調節していることが明らかになるにつれ、個体全体の代謝、発育、生殖システムの調節は、無脊椎動物から高等脊椎動物まで基本的に共通の認識が生まれている。この認識の下、インスリン情報伝達系は酵母からヒトまで保存されていることが示すように、生命の生存に本質的な役割を担うものであり、寿命、代謝、発育調節、休眠、生殖、行動までも支配していると考えられる。

昆虫(ヤマユガ科エリサン)の変態を促すインスリン様ペプチドとしてカイコガより発見されたボンピキシンは、脳神経分泌細胞で産生され、重要な機能を担っていると予想されるが、その生理機能やインプットからアウトプットに至る脳内での情報処理機構は未解明の部分が多い。インスリンシグナルの情報処理機構は、昆虫と脊椎動物間で本質的には大差ないと考えられる。脊椎動物の実験系でのインスリンシグナルの解析は病態解析と結びつき膨大なデータはあるものの、複雑すぎて単一または少数の現象を処理する神経回路網の同定は困難であった。そこで、昆虫を実験材料とし、インスリン情報伝達系での生理作用の解明とホルモンに対する脳内での処理機構の解明の両者が求められていた。

2. 研究の目的

本研究では、カイコガをモデルに、ホルモン、とくにインスリン様ペプチド(ボンピキシン)の糖代謝への影響を生理的側面から解析すること、また、ホルモンの脳内でのシグナル伝達および処理機構を神経活動依存的に発現する遺伝子に注目して解析し、昆虫ひいては動物界に共通する個体全体の代謝、発育調節、脳内情報処理機構を探ることを目的とした。具体的には、(1) 多種の分子で構成されるボンピキシンの全体像の遺伝子レベルでの解明とプロボンピキシンCペプチドの作用検定系の確立、(2) 個体のホルモン動態や発生段階に伴うエネルギーとしての糖利用酵素の活性調節機構の解明、(3) 脳内での処理機構を性フェロモンに対する性行動を定型的行動のモデルとした感覚情報による中枢神経回路での行動制御機構の解明、を目的とした。

3. 研究の方法

遺伝子解析には、ゲノムデータベース KAIKObase(<http://sgp.dna.affrc.go.jp/KAIKObase/>)、cDNA データベース CYBERGATE database(http://150.26.71.213/cgi-bin/main_MX)を利用した。糖利用酵素の活性検定は常用される生化学的手法により測定した。例えば、トレハラーゼ活性は分解産物のグルコースを定量することにより測定した。同様に、二糖類の定量も酵素分解産物である単糖を定量することにより行った。活動神経回路網の同定には、神経活動依存的に発現する遺伝子として同定済みの Hr38 遺伝子プロモーターを利用した遺伝子組換えカイコガを作成し(図1)、共焦点レーザー顕微鏡等によるイメージング解析により行った。



図1. HR38 タンパク質が NBRE 配列に特異的に結合する転写活性化因子であることを利用し、GAL4/UAS システムによる GFP 遺伝子を発現させた。

上記の他は、一般的な分子生物学的手法に依った。カイコガ系統は主として錦秋×鐘和を用い、人工飼料により飼育した。遺伝子組換えカイコガの作成は、卵への遺伝子導入により行った。

4. 研究成果

(1) ボンピキシンの全体像の遺伝子レベルでの解析とCペプチドの作用検定系の確立

これまで、すでにゲノムあたり 30 コピー以上のボンピキシン遺伝子を単離済みであったが、ゲノムおよび cDNA データベースの網羅的解析により新規5ファミリーを同定した(図2)。また、同定遺伝子の構造と発現解析(発生過程での発現動態と細胞特異的発現動態)を行い、脂肪体や卵巣に強発現するインスリン祖先型と判断される遺伝子を同定した。

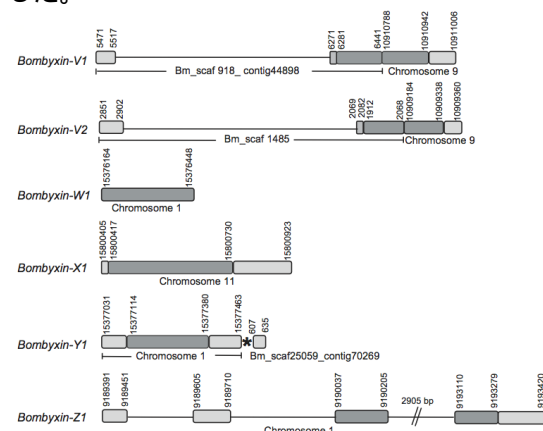


図 2. 新規に同定したボンピキシン遺伝子のエキソン・イントロン構成。イントロンは細線で、ORF は灰色太線で、配列未知部分は*で、KAIKObase (ver. 2) での chromosome / scaffold の位置は数字で示す。文献 より。

予備的実験では、ボンピキシンが低濃度でマルピーギ管（腎臓相当組織）細胞に対し MAP キナーゼを活性化すること、その活性化はインスリン受容体阻害剤で阻害されること、また、アミド化したプロボンピキシン C ペプチドが脂肪体に対し MAP キナーゼの活性化を示唆する結果を得たものの、定量結果の誤差が大きく、再現性が乏しい結果となり作用検定系の確立には至らなかった。

(2) ホルモン動態や発生段階に伴う糖利用酵素の活性調節機構の解明

幼虫から蛹への変態過程で、唯一の栄養源である桑の主要な二糖類のスクロースやマルトースを分解する中腸での糖利用酵素活性がどのような調節を受けるか調べた。前終齢幼虫において、両酵素の活性は、摂食期に高く維持されており、眠期では摂食開始期程度まで低下していた。眠期はエクジソンによって誘導されることから、眠期における酵素活性の低下が、飢餓あるいはホルモンによって引き起こされている可能性が考えられた。飢餓は酵素活性に影響しなかったが、結紮によりエクジソン合成組織を除去したところ、飢餓条件の個体に対して高い酵素活性が見られた。さらに、この結紮個体に対してエクジソン類似物を塗布したところ酵素活性の低下が見られたことから、糖利用酵素の制御が、栄養状態ではなくエクジソンによる内分泌調節機構を受けていることが示唆された。

次に、終齢幼虫を用いて、糖利用酵素の活性を発生段階に応じて測定した（図 3）。

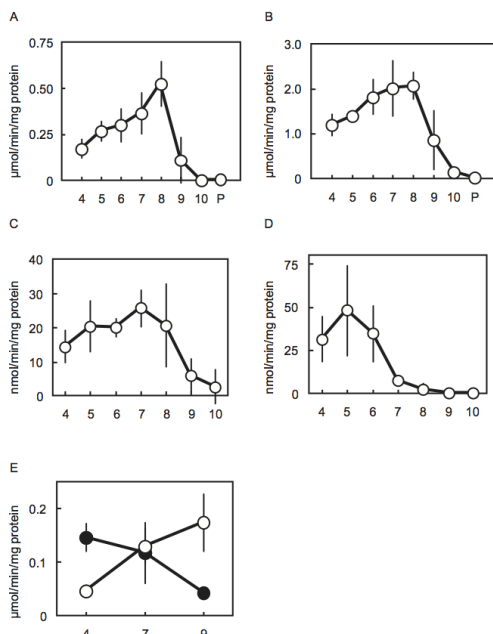


図 3. カイコガ終齢幼虫の中腸における糖分解酵素の活性変動。縦軸は単位タンパク質量 (mg) 当たりの活性値、横軸数字は脱皮後の日数、P は蛹化を示している。各パネル、A は α -glucosidase, B は sucrase, C は β -galactosidase, D は α -galactosidase, E は可溶性 trehalase (白丸), 膜 trehalase (黒丸) を、縦線は標準偏差の幅を示している。文献 より。

マルトース分解酵素活性は、飢餓個体に比較し遊離腹部では高いレベルが保たれて、エクジソン類似物により抑えられた。一方、スクロース分解酵素活性はエクジソン類似物による影響を受けなかった。すなわち、ホルモン環境、発育段階、栄養状態により糖利用酵素それぞれ異なった調節を受けていることが示された。これは、前終齢幼虫から終齢幼虫に至る過程での糖利用酵素の制御が栄養状態ではなくエクジソンによる内分泌調節によるものと異なり、栄養状態に応じて制御機構が変化することを示している。

上記に加え、得られた結果を要約すると、以下の結論が得られた（図 4）。

糖分解酵素の活性は発生に伴って変化する。すなわち、吐糸期には糖質消化酵素および膜型トレハラーゼの活性が低下する一方、中腸内トレハラーゼの活性は上昇する。

糖質消化酵素活性の低下と中腸内トレハラーゼの上昇は、体内エクジソン濃度の上昇により引き起こされる。

摂食期ではエクジソン濃度上昇が、摂食停止、吐糸行動、蛹化を起こすが、糖質消化酵素活性は高く維持される一方、吐糸期では蛹期以降に利用されない消化酵素の活性低下をもたらし、蛹期以降に利用される中腸内トレハラーゼの活性は上昇する。

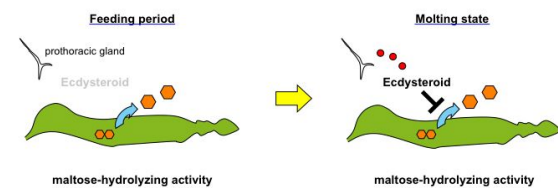


図 4. ホルモンや発生段階に伴う糖利用酵素の活性調節モデル

(3) 定型的行動のモデルとした感覚情報による中枢神経回路での行動制御機構の解明

神経活動依存的に発現する遺伝子として同定した Hr38 を利用した遺伝子組換えカイコガによる神経活動のマッピングを行った。HR38 の結合配列である NBRE の下流にコアプロモーターと GAL4 を配置したベクター (NBRE-GAL4) を導入済みのカイコガ系統を、UAS-GFP 系統と掛け合わせることで、性フェロモンに反応する神経回路の可視化可能系統を確立した。

雄のカイコガを性フェロモンで刺激したところ、NBRE を導入した一部のカイコガ系統において性フェロモン刺激依存的に GFP のシグナルが性フェロモン情報を処理する脳領域（触角葉）や性行動を制御する脳領域（食道下神経節）、脳高次中枢（キノコ体）などで認められた（図 5、6）。

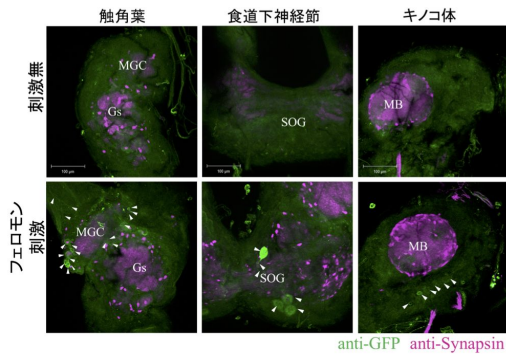


図 5. 性フェロモン刺激依存的に認められたシグナル。MGC は大系球体，Gs は常系球体，SOG は食道下神経節，緑色シグナルは GFP，紫色シグナルは抗 Synapsin 抗体による染色を示している。

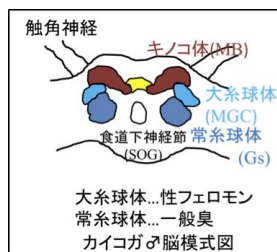


図 6. 図 5 で示されたシグナル分布の模式図。略は図 5 に同じ。

しかし、これまでの結果から想定される陽性細胞より GFP 陽性細胞の数が少なく、また、細胞体は染色されるものの神経線維の染色が弱いことから、GAL4 の前後にバキュロウイルス由来の翻訳エンハンサーである Syn21，p10T 配列を付加した系統を作成し、翻訳レベルで GAL4 の発現増強を試みた系統を作成した。この系統では、性フェロモン刺激依存的なシグナルが認められ、特に触角葉の性フェロモン受容領域である MGC においても投射する神経線維群が明確に認められるようになった。これらの結果から、性フェロモン情報を処理する神経回路の可視化は一部実現できたと判断される。今後、さらにシグナル強度を上げ、バックグラウンドを低下させ明瞭に GFP 陽性細胞を検出することで、脳内でのシグナル伝達および処理機構に関する全神経回路の可視化を達成できるものと考えられる。

<引用文献>

Aslam AFM *et al*, *Zool Sci*, 28, 609-616. 2011.

Suzuki T *et al*, *J Insect Physiol*, 57, 1282-1289. 2011.

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 11 件)

Taketoshi Kiya, Koudai Morishita, Keiro Uchino, Masafumi Iwami, and Hideki Sezutsu (2014) Establishment of tools for neurogenetic analysis of sexual behavior in the silkworm, *Bombyx mori*. *PLoS One*, **9**(11), e113156. 査読有, doi: 10.1371/journal.pone.0113156

Nozomi Fujita, Takumi Nishiuchi, Makoto Sato, Masafumi Iwami, and Taketoshi Kiya (2013) Visualization of neural activity in insect brains using a conserved immediate early gene, *Hr38*. *Curr. Biol.*, **23**(20), 2063-2070. 査読有, doi: 10.1016/j.cub.2013.08.051

Hiroto Matsui, Motonori Kakei, Masafumi Iwami, and Sho Sakurai (2012) Hormonal regulation of the death commitment in programmed cell death of the silkworm anterior silk glands. *J. Insect Physiol.*, **58**(12), 1575-1581. 査読有, doi: 10.1016/j.jinsphys.2012.09.012

Anuradha Roy, Sakiko Shimizu, Taketoshi Kiya, Kazuei Mita, and Masafumi Iwami (2012) Identification of 20-hydroxyecdysone-inducible genes from larval brain of the silkworm, *Bombyx mori*, and their expression analysis. *Zool. Sci.*, **29**(5), 333-339. 査読有, doi:10.2108/zsj.29.333

Taketoshi Kiya and Masafumi Iwami (2011) Identification and expression analysis of nervous wreck, which is preferentially expressed in the brain of the male silkworm moth, *Bombyx mori*. *Insect Mol. Biol.*, **20**(5), 667-674. 査読有, doi: 10.1111/j.1365-2583.2011.01096.x

Takumi Suzuki, Sho Sakurai, and Masafumi Iwami (2011) Steroidal regulation of hydrolyzing activity of the dietary carbohydrates in the silkworm, *Bombyx mori*. *J. Insect Physiol.*, **57** (9), 1282-1289. 査読有, doi: 10.1016/j.jinsphys.2011.06.003

Abu F M Aslam, Taketoshi Kiya, Kazuei Mita, and Masafumi Iwami (2011) Identification of novel bombyxin genes from the genome of the silkworm *Bombyx mori* and analysis of their expression. *Zool. Sci.*, **28**(8), 609-616. 査読有, doi: 10.2108/zsj.28.609

Shusaku Taguchi, Masafumi Iwami, and Taketoshi Kiya (2011) Identification and characterization of a novel nuclear noncoding RNA, Fben-1, which is preferentially expressed in the higher brain center of the female silkworm moth, *Bombyx mori*. *Neurosci. Lett.*, **496**(3), 176-180. 査読有, doi: 10.1016/j.neulet.2011.04.011

Hiroto Matsui, Motonori Kakei, Masafumi Iwami, and Sho Sakurai (2011) [Cover Article] Glucose oxidase prevents programmed cell death of the silkworm anterior silk gland through hydrogen peroxide production. *FEBS J.*, **278**(5), 776-785. 査読有, doi: 10.1111/j.1742-4658.2010.07996.x

Takumi Suzuki, Sho Sakurai, and Masafumi Iwami (2010) Juvenile hormone delays the initiation of rectal sac distention by disrupting ecdysteroid action in the silkworm, *Bombyx mori*. *Pesticide Biochem. Physiol.*, **97**(3), 199-203. 査読有, doi: 10.1016/j.pestbp.2010.01.005

Takumi Suzuki, Sho Sakurai, and Masafumi Iwami (2010) Physiological requirements for 20-hydroxyecdysone-induced rectal sac distention in the pupa of *Bombyx mori*. *J. Insect Physiol.*, **56**(6), 673-677. 査読有, doi: 10.1016/j.jinsphys.2010.02.006

[学会発表](計34件)

箕口昌杜. 初期応答遺伝子 *Hr38* はショウジョウバエの長期記憶において重要な役割を果たす. 日本分子生物学会第37回年会, 2014年11月26日, パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)

山田裕果. *Hr38* の神経活動依存的発現を利用した, カイコガの脳において性フェロモンに反応する神経回路の可視化. 日本分子生物学会第37回年会, 2014年11月26日, パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)

木矢剛智. 神経活動依存的に発現する遺伝子 *Hr38* を用いたショウジョウバエ脳においてメスに反応する神経細胞の検出. 日本分子生物学会第37回年会, 2014年11月26日, パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)

Taketoshi Kiya. Visualization of neural activity of forager honeybee brain by IEGs. International Union for the Study of Social Insects International Congress, 2014年7月14日, Queensland (Australia)

Taketoshi Kiya. Detection of neurons that respond to female in the brain of male *Drosophila*, using a neural activity marker gene, *Hr38*. 11th

Japanese *Drosophila* Research Conference, 2014年6月6日, 金沢歌劇座(石川県金沢市)

原千穂. 新規な初期応答遺伝子 *Hr38* の活動依存的発現を利用した, カイコガの脳において性フェロモンに反応する神経回路の可視化と機能解析法の開発. 日本分子生物学会第36回年会, 2013年12月4日, 神戸国際展示場(兵庫県神戸市)

山端宏葵. ミツバチの脳においてエクジステロイド・シグナルは長期記憶の形成を促進する. 日本分子生物学会第36回年会, 2013年12月4日, 神戸国際展示場(兵庫県神戸市)

佐藤優希. 神経活動依存的に発現する遺伝子 *Hr38* を用いたショウジョウバエ脳においてメスに反応する神経細胞の検出. 日本分子生物学会第36回年会, 2013年12月4日, 神戸国際展示場(兵庫県神戸市)

田口周作. 遺伝子組み換えカイコガを用いた幼若ホルモン生合成制御機構の解析. 日本動物学会第84回大会, 2013年9月28日, 岡山大学(岡山県岡山市)

木矢剛智. 初期応答遺伝子 *Hr38* を用いたショウジョウバエ脳においてメスに反応する神経回路の同定. 日本動物学会第84回大会, 2013年9月26日, 岡山大学(岡山県岡山市)

山端宏葵. ミツバチの脳においてエクダイソン・シグナルは長期記憶の形成を促進する. 日本動物学会第84回大会, 2013年9月26日, 岡山大学(岡山県岡山市)

Taketoshi Kiya. Identification of *Hr38* as a conserved neural activity-induced gene in insect brains: its application as a marker for neural activity and implication for neural activity-dependent modification of ecdysone signaling in the brain. Insect Hormones (19th Ecdysone) International Workshop, 2013年7月24日, Minneapolis (USA)

木矢剛智. 新規な初期応答遺伝子 *Hr38* を用いたショウジョウバエ脳においてメスに反応する神経細胞の検出. 日本神経科学会大会第36回大会, 2013年6月20日, 国立京都国際会館(京都府京都市)

木矢剛智. 昆虫で広く保存された新規な初期応答遺伝子 *Hr38* を用いた活動依存的な神経回路の可視化. 日本分子生物学会第35回年会, 2012年12月14日, 福岡国際会議場(福岡県福岡市)

Taketoshi Kiya. Neural activity visualization in insect brains by a conserved immediate early gene, *Hr38*. 10th Japanese *Drosophila* Research Conference, 2012年10月15日, 慈恵会医科大学(東京都)

Yuki Sato. Development of activity-dependent neural tracing methods in the brain of fruit fly, *Drosophila*

melanogaster. 10th Japanese Drosophila Research Conference, 2012年10月15日, 慈恵会医科大学(東京都)

Tomoyo Ohmura. Functional analysis of a novel immediate early gene, *Hr38*, in the long-term courtship memory in *Drosophila*. 10th Japanese Drosophila Research Conference, 2012年10月14日, 慈恵会医科大学(東京都)

木矢剛智. 新規な神経活動依存的遺伝子 M8 は昆虫で広く保存された有用な神経活動マーカーである. 日本神経科学学会大会第35回大会, 2012年9月20日, 名古屋国際会議場(愛知県名古屋市)

木矢剛智. 熱遺伝学的手法によるカイコガの神経活動および行動の操作. 日本動物学会第83回大会, 2012年9月15日, 大阪大学(大阪府豊中市)

森下広大. カイコガの性行動時の運動パターンを生成する神経基盤の解明. 日本動物学会第83回大会, 2012年9月15日, 大阪大学(大阪府豊中市)

⑲ 木矢剛智. 神経活動依存的に発現する遺伝子を用いた昆虫脳の神経回路可視化法の開発. 日本分子生物学会第34回年会, 2011年12月13日, パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)

⑳ 木矢剛智. 新規な神経活動依存的遺伝子を用いた昆虫脳の神経回路可視化法の開発. 日本動物学会第82回大会, 2011年9月21日, 大雪クリスタルホール(北海道旭川市)

㉑ 木矢剛智. 新規な神経活動依存的遺伝子を用いたカイコガ及びショウジョウバエの性フェロモン神経回路の可視化. 日本神経科学学会大会第34回大会, 2011年9月16日, パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)

㉒ 鈴木匠. エクジステロイドによる糖分解酵素活性の制御. 日本分子生物学会第11回春季シンポジウム, 2011年5月26日, 石川県立音楽堂(石川県金沢市)

㉓ 木矢剛智. 神経活動依存的に発現する遺伝子を用いた昆虫脳の神経回路可視化法の開発. 日本分子生物学会第11回春季シンポジウム, 2011年5月26日, 石川県立音楽堂(石川県金沢市)

㉔ 松井洋人. Glucose oxidase は *in vitro* におけるカイコガ前部絹糸腺の予定細胞死を抑制する. 日本分子生物学会第33回年会, 2010年12月9日, 神戸国際展示場(兵庫県神戸市)

㉕ 田口周作. 幼若ホルモン生合成期にアラタ体, 側心体で発現量増加する新規遺伝子の同定と解析. 日本分子生物学会第33回年会, 2010年12月8日, 神戸国際展示場(兵庫県神戸市)

㉖ 木矢剛智. 神経活動依存的に発現する遺伝子を用いた昆虫脳の神経回路可視化法の開発. 日本分子生物学会第33回年会, 2010年12月7日, 神戸国際展示場(兵庫

県神戸市)

㉗ 木矢剛智. 初期応答遺伝子を用いたカイコガ性フェロモン情報処理回路の探索. 日本動物学会第81回大会, 2010年9月25日, 東京大学教養部(東京都)

㉘ 松井洋人. カイコガ幼虫前部絹糸腺に存在する予定細胞死抑制因子の実体. 日本動物学会第81回大会, 2010年9月25日, 東京大学教養部(東京都)

㉙ 田口周作. 幼若ホルモン生合成期にアラタ体, 側心体で発現量増加する遺伝子の同定. 日本動物学会第81回大会, 2010年9月23日, 東京大学教養部(東京都)

㉚ 鈴木匠. カイコガ幼虫における中腸グルコースターゼ活性の制御. 日本動物学会第81回大会, 2010年9月23日, 東京大学教養部(東京都)

㉛ Sho Sakurai. Control of the timing of 20E-induced programmed cell death by a protein factor in *Bombyx* anterior silk gland. 18th International Ecdysone Workshop, 2010年7月21日, Ceske Budejovice (Czech)

㉜ Aslam AFM. Identification of novel bombyxin genes from the genome of the silkworm *Bombyx mori*. 4th Annual Arthropod Genomics Symposium, 2010年6月11日, Kansas City (USA)

[図書](計 1件)

Takumi Suzuki and Masafumi Iwami. Bentham Science Publishers, IL, USA. *Hemolymph proteins and functional peptides: Recent advances in insects and other arthropods*. 2012. pp 161-171. doi: 10.2174/97816080540151120101 [eISBN: 978-1-60805-401-5]

[その他]

ホームページ等

<http://bombyxin.umin.jp>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

岩見 雅史 (IWAMI, Masafumi)

金沢大学・自然システム学系・教授

研究者番号: 40193768

(2) 研究分担者

木矢 剛智 (KIYA, Taketoshi)

金沢大学・自然システム学系・特任助教

研究者番号: 90532309

(平成26年度より研究分担者)