

# 研究終了報告書

## 「環境ストレス応答を担う脳内神経ペプチド産生細胞の機能的連関」

研究期間：2019年10月～2022年3月

研究者：原 佑介

### 1. 研究のねらい

地球に暮らす生き物は絶えず様々な環境変動に晒されている。特に、気温が低く、食糧に乏しい冬は、多くの生物にとって厳しい季節である。そのような過酷な環境ストレスを生き抜くため、生物は休眠という適応戦略を進化させてきた。休眠とは発育や繁殖を自律的に停止させ、不適な環境を時間的に回避するための機構である。しかし、休眠を司る体内機構は未だ多くが謎に包まれている。そこで、本研究ではモデル生物であるキロショウジョウバエの休眠に着目し、休眠制御機構の解明を図った。

キロショウジョウバエの成虫雌は、羽化後、低温・飢餓のストレス条件に晒されると、卵巣の発育を停止させて生殖休眠する。本研究では、この休眠を制御する内的機構の解明を目的として、脳内に存在する3種類の神経分泌細胞、インスリン産生細胞(IPC)、DH44ニューロン、dorsal lateral peptidergic neuron(DLP)に注目した。IPCは脳間部と呼ばれる場所に存在するニューロンで、その名が示す通りインスリンを産生する。IPCは卵巣発育を促進するホルモン(JH)の産生器官であるアラタ体に投射しており、インスリンシグナルを介してアラタ体でのJH合成を制御することで、卵巣発育に作用する(Ojima et al., 2018)。DH44ニューロンはIPCと同じく脳間部に細胞体を持つ神経分泌細胞で、アラタ体に投射している。ただし、休眠制御における機能は現時点では不明である。DLPは脳間部の側方に位置するニューロンで、脳間部とアラタ体に投射している。DLPはコロラドハムシなどの他の昆虫でも同定されており、休眠制御への関与が示唆されている(志賀, 2004)。各ニューロンの形態的特徴と機能に関するこれらの知見から、この三種類のニューロンは相互に接続して一つの機能的回路を形成し、卵巣発育を制御している可能性が考えられる。そこで、本研究では電気生理学、光遺伝学、シングルセル解析等の実験手法を組み合わせ、これらニューロンの機能的連関と、環境変化に対する各ニューロンの機能調節の可能性を探り、脳内単一ニューロンのレベルから休眠制御を担う体内機構の解明を目指した。

### 2. 研究成果

#### (1) 概要

最初に新たな休眠評価方法を確立した。従来のショウジョウバエの休眠研究では、成虫雌の卵巣内に卵黄の蓄積があるか否か見分けることによって休眠か非休眠かを判定していた。しかし、実際には卵巣内に蓄積する卵黄量は発育に応じて連続的に変化する。そのため、従来の二者択一的な基準では卵巣の成熟状態を適切に評価することができない。そこで、卵黄タンパク質、Yp1にGFPが連結した組換えタンパク質を用いてその蓄積度合いをGFPの蛍光強度によって測定し、卵巣発育状態を定量的に評価する手法を確立した。

続いて、この新たな評価法を用いて、餌中の脂肪酸組成の違いが卵巣発育に与える効果を調べた。ショウジョウバエの成虫雌は高い温度では飽和脂肪酸を多く含む餌 (Yeast food) を好み、低い温度では不飽和脂肪酸を多く含む餌 (Plant food) を好むことが知られている。そこで、本研究ではこの二つの異なる餌で飼育した成虫雌の卵巣発育状態を比較した。その結果、Plant food で飼育した成虫雌の卵巣は、Yeast food で飼育した成虫雌の卵巣と比べて著しく発育が抑制されることが明らかとなった。

不飽和脂肪酸の摂取が卵巣発育を抑制する場合、その作用は卵巣発育を制御する脳内ニューロンを介するものと予想された。そこで、上記二つの餌で飼育した成虫雌において、卵巣発育制御への関与が既知である IPC の生理学的解析を行った。その結果、Yeast food と Plant food で飼育した成虫雌の IPC はそれぞれ異なる膜特性を示すことが明らかとなった。さらに、シングルセル解析を行ったところ、それぞれの餌で飼育した成虫雌の IPC 間ではインスリンや他の神経ペプチドの発現が大きく変化していることが明らかとなった。

## (2) 詳細

### ① Yp1::GFP を用いた新たな休眠評価方法の確立

従来、ショウジョウバエの休眠は卵黄蓄積の有無により判定されていた。すなわち、卵巣内に卵黄蓄積が全く無ければ「休眠」、ほんの僅かでも蓄積があれば「非休眠」という評価である (Saunders et al., 1989)。しかし、卵巣内に蓄積する卵黄量は発育に応じて連続的に変化するため、二者択一的な判定方法では卵巣の成熟状態を適切に評価することができない。また、卵黄が微量である場合には識別自体が困難であるため、判定にエラーを生じる可能性が高く、さらに解析のスループットが低いという問題も存在していた。そこで、本研究では卵黄タンパク質の一つである Yp1 に GFP タグがついた組換えタンパク質、Yp1::GFP (Sarov et al., 2016) を用い、卵巣内の GFP の蛍光強度を測ることで卵黄の定量化を試みた。最初に、この組換え遺伝子を持つ成虫雌において GFP の発現を調べたところ、GFP は卵巣に局限し、卵母細胞内の卵黄蓄積が見られる場所に一致して GFP が局在していることが確認された (図 1)。続いて、Yp1::GFP を用いた休眠評価の有効性を検討した。過去の研究から、羽化後の成虫雌を「低温・飢餓」の条件で飼育すると、多くの個体で卵黄の蓄積が消失するが、「低温・餌あり」の条件で飼育すると、ほぼ全ての個体で卵黄の蓄積が生じることが知られている (Ojima et al., 2018)。そこで、この二つの条件において Yp1::GFP を用いて従来基準 (卵黄蓄積の有無の判定) に基づく休眠率の測定を行なったところ、過去の報告と一致して、「低温・餌あり」に比べて「低温・飢餓」の方が休眠率は高かった。続いて、卵巣内の蛍光強度を比較したところ、「低温・飢餓」に比べて「低温・餌あり」の方が蛍光強度は高く、休眠率と一致した結果が得られた。

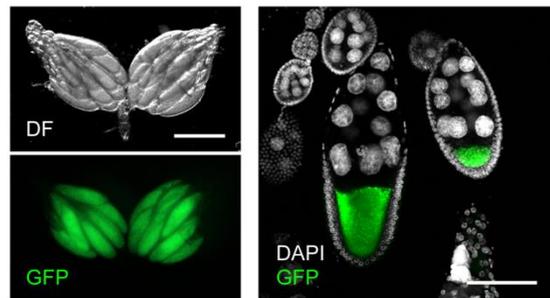


図 1. 成虫雌の卵巣全体 (左) と卵室 (右) における Yp1::GFP の発現。

### ② 異なる脂肪酸組成を持つ餌が卵巣発育に与える影響の解析

続いて、この新たな評価方法を用いて、餌中の脂肪酸組成の違いが卵巣発育に与える効果を調べた。ショウジョウバエの成虫雌は高い温度では飽和脂肪酸を多く含む餌 (Yeast food) を好み、低い温度では不飽和脂肪酸を多く含む餌 (Plant food) を好む (Brankatschk et al., 2018)。一般に、不飽和脂肪酸の摂取は膜リン脂質の脂肪酸の組成を変化させ、膜の流動性を増加させることで個体に低温耐性を賦与することが知られている。この機構は恒流動性適応と呼ばれ、環境の温度変化に対する細胞機能の維持や調節に重要な役割を果たすと考えられている。ショウジョウバエの成虫雌で見られる温度依存的な脂質選考性の変化も、温度変化に対する細胞機能の適応的調節にはたらくものと考えられる。特に、「温度」という一つの環境因子が、生殖休眠と脂質選考性という二つの生理的現象のトリガーになるという事実を考慮すると、本種で見られる温度依存的な脂質選考性の変化は休眠制御を担う細胞の機能調節において重要な意味を持つ可能性が考えられる。そこで、温度依存的な脂質選考性の変化が休眠制御において重要な意味を持つのかどうかを調べるため、Yeast food と Plant food で飼育した成虫雌において卵巣発育状態を比較した。解析の結果、Plant food で飼育した成虫雌の卵巣は Yeast food で飼育した成虫雌の卵巣と比べて発育が強く抑制されることが明らかとなった (図 2)。

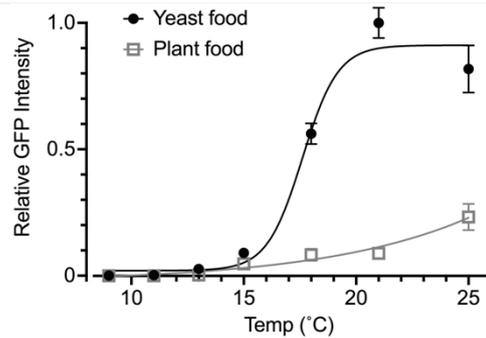


図 2. 卵黄蓄積量の温度応答曲線に対する餌の効果。

### ③ 異なる脂肪酸組成を持つ餌が IPC の膜特性に与える作用の解析

餌中の飽和脂肪酸と不飽和脂肪酸が卵巣発育に異なる作用をする場合、その作用は卵巣発育を制御する体内機構への作用を介するものと推察される。過去の研究から、脳内のインスリン産生細胞 (IPC) は卵巣発育を制御することが知られている (Ojima et al., 2018)。そこで、IPC の膜特性に対する Yeast/Plant food 飼育の効果を経電生理学的手法により解析した。その結果、この二つの異なる餌で飼育した成虫雌の IPC は異なる膜特性を示すことが明らかとなった。

### ④ 異なる脂肪酸組成を持つ餌が IPC の遺伝子発現に与える影響の解析

ショウジョウバエのゲノム中には 8 個のインスリン遺伝子 (*Drosophila insulin-like peptide, Dilp*) がコードされている。このうち、IPC では *Dilp1, Dilp2, Dilp3, Dilp5* の 4 種類のインスリン遺伝子が発現している。そこで、これらの遺伝子発現に対する Yeast/Plant food 飼育の作用を調べるため、single-cell qPCR を行った。その結果、それぞれの餌で飼育した成虫雌の IPC の間ではそれらインスリン遺伝子の発現が大きく異なることが明らかとなった。

### ⑤ Patch-seq 解析

Yeast food と Plant food で飼育した成虫雌の IPC における遺伝子発現の違いをさらに探るため、自然科学研究機構の郷康広特任准教授との共同研究を実施し、Patch-seq によるシングルセル解析を行った。解析の結果、二つの飼育条件間で発現が大きく異なる遺伝子が数十個同定された。

### 3. 今後の展開

本研究では食性の変化が IPC の生理に作用し、卵巣発育に大きな変化をもたらすことが明らかとなった。このことから、休眠への関与が示唆される DH44 ニューロン と DLP の機能にも食性の変化は何らかの作用をもたらす可能性が高いと推察される。今後それら細胞についても早期に解析を実施したい。また、Patch-seq の結果、食性の変化によって IPC での発現が大きく変化する遺伝子が同定された。その中には従来 IPC では発現しないと考えられていた神経ペプチドも含まれていた。今後それら遺伝子の生理的機能に関して解析を進め、新たな研究展開へと繋げたい。

より長期的な展望としては、非モデル種への展開を視野に入れている。ゲノム編集技術の隆盛により、キイロショウジョウバエで開発されてきた遺伝学的ツールを非モデル種に応用した研究が近年盛んになりつつある (Tanaka et al., 2017; Seeholzer et al., 2018; Ding et al., 2019)。休眠の様式や休眠を誘導するための環境条件は同じショウジョウバエ属にあっても種毎に異なっており、その内的機構も異なる進化を遂げているに違いない。将来、本研究で用いた解析アプローチを近縁種へと応用していくことで、単一ニューロンレベルでの休眠の比較生理学研究へと展開させていきたい。

地球上で最大の繁栄を成し遂げた昆虫の巧みなストレス耐性機構を正確に把握し、包括的理解を進めることで、人工冬眠をはじめとする人工低代謝技術、恒常性制御技術、さらに昆虫脳に倣った効率的な情報処理技術開発のためのシーズを得ることを視野に入れ、今後研究を大きく飛躍させたい。

### 4. 自己評価

本研究では、新たな休眠評価方法の確立を行い、この手法を用いて食性の違いが卵巣発育に与える影響を明らかにすることができた。これらの研究成果は当初計画には含まれていないものであったが、今回確立した手法は休眠評価の新たなスタンダードとして当該分野に波及することが期待され、生殖休眠の研究に一石を投ずるものである。また、食性と休眠の関係に関する研究成果は、今後の展開に新たな方向性を示した。これらの成果は、今後の強固な研究基盤となることから、重要な成果であると評価できる。

本研究最大の目的である休眠を司る体内機構の解明については、IPC の機能調節を通じた新たな休眠制御機構の提唱に至ることができた。本目的に対し、脳内単一ニューロンの生理のレベルで具体的な回答が得られたことから、大きな成果を得られたものと評価できる。

また、この研究を通じて、新たな共同研究に着手し、Patch-seq に成功した。昨今シングルセル解析の重要性が増す中、本手法を新たに習得できたことは非常に大きな技術的進展と評価でき、将来の研究を強力に加速することが期待できる。

一方、本研究では IPC 以外にも二種類の脳内神経分泌細胞に注目していたが、新規休眠評価法の確立と休眠と食性との関係に関する研究に時間を割いたため、それらの細胞についての研究に着手できなかった。しかし、現在これら細胞の解析に必要な遺伝学的ツールの作成を進めており、近日中に解析を開始できる状況が整いつつある。本研究で培われた新たな実験手法と組み合わせることで、当初計画よりも遥かに詳細な研究を行うことが見込める。

## 5. 主な研究成果リスト

### (1) 代表的な論文(原著論文)発表

研究期間累積件数: 1件

1. Yusuke Hara<sup>#</sup>, Daisuke Yamamoto<sup>#</sup>. Effects of Food and Temperature on *Drosophila melanogaster* Reproductive Dormancy as Revealed by Quantification of a GFP-Tagged Yolk Protein in the Ovar. *Frontiers in Physiology*, 2022, 12(803144). (# co-corresponding)

キイロショウジョウバエの卵黄タンパク質、Yp1 に GFP を付加したマーカーを用いて、その蓄積の度合いを蛍光強度に基づいて定量的に計測する方法を確立した。従来の卵黄蓄積の有無に基づく二者択一的な休眠評価法と比較し、本手法では遥かに厳密に卵巣成熟を評価することが可能であり、これを通じて同種での生殖休眠の研究に一石を投じた。

### (2) 特許出願

研究期間全出願件数: 0 件(特許公開前のもも含む)

### (3) その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

[学会発表]

1. Diet-dependent electrical and transcriptional changes detected in brain insulin-producing cells and their possible involvements in organismal stress responses.  
Yusuke Hara, Kosei Sato, Yasuhiro Go, Daisuke Yamamoto  
The 44th Annual Meeting of the Japan Neuroscience Society. Jul 28, 2021
2. Multimodal Gustatory receptor 28b coordinates transcription with electrical activities in brain insulin neurons for cold acclimation.  
Yusuke Hara, Daisuke Yamamoto  
The 43rd Annual Meeting of the Japan Neuroscience Society. Jul 29, 2020