

論文の内容の要旨

論文題目 フタホシコオロギにおける交尾と卵巣摘出による
 栄養選好性変化の分子機構の解明

氏 名 塚本 悠介

【序論】

タンパク質や糖質といった栄養素にはそれぞれ異なる役割があり、生存や成長のために、栄養素をバランス良く摂取することが生物にとって不可欠である。そのため、「セルフセレクション」と呼ばれる機構を生得的に備え、栄養バランスが偏らないようにしている。自らの足りない栄養素を認識し、自律的にそれを補うように摂食するこの機構は、ヒトを含めた哺乳類、鳥類、魚類、そして昆虫と、動物に広く共通して見出されている。本研究では、セルフセレクションに見られるような本能的な栄養素の選択性を栄養選好性と呼ぶ。この栄養選好性の制御は、生理学的な知見に留まっておらず、分子機構は明らかになっていない。これまでに、栄養選好性は、偏食や妊娠・交尾などのライフイベント、成長や加齢といったライフステージ、気温や湿度などの気候の影響を受けることが分かっている。

本研究では、栄養選好性制御機構を解明するために、顕著に栄養選好性が変化する昆虫の交尾後のメスの摂食行動に着目した。交尾により転写が変動するものの中に、栄養選好性の制御に関わる因子があると推測し、その因子の同定と、その因子による栄養選好性調節機構の解明を目指した。研究対象には、摂食行動解析系が確立されているフタホシコオロギ(*Gryllus bimaculatus*)を用いた。フタホシコオロギは、大型のため1個体の組織からのペプチド精製や組織培養などの実験が可能であり、RNA干渉法による遺伝子発現操作が容易であるという点でも本研究に適している。

【結果と考察】

卵巣摘出メスの栄養選好性の解析

フタホシコオロギにおいて、交尾後のメスは処女メスに比べ、タンパク質を摂食する割合が大きい。まず、この栄養選好性の変化は、交尾により惹起される産卵行動と、独立して生じるか解析した。具体的には、卵巣を摘出し、産卵が出来ないメス(卵巣摘出メス)の交尾後の栄養選好性を解析した。栄養選好性は、異なる栄養素を含む2種類のエサの摂食割合から栄養素の選好性を評価するジオメトリックフレームワーク(GFW)解析により評価した。GFW解析の結果、卵巣摘出メスでは、交尾の有無に関わらず、偽施術した処女メスの群に比べ、タンパク質選好的な摂食をした。すなわち、卵巣摘出により、交尾と同様にタンパク質選好的な摂食が引き起こされた。

交尾後のメスと卵巣摘出メスの体内の観察

交尾後のメスと卵巣摘出メスにおいて、いずれもタンパク質選好的な摂食行動を示したことから、共通のメカニズムによりタンパク質選好的な摂食が生じていると推測した。交尾後のメスと卵巣摘出メスの体内の組織を観察したところ、いずれも対照群と比較して、脂肪体において顕著な脂肪滴の蓄積が認められた。また、交尾後のメスと卵巣摘出メスの脂肪体は、対照群と比較していずれも重量の増加が認められた。脂肪体は、エネルギーの貯蔵と供給を担い、脊椎動物の肝臓と脂肪組織に相当する器官である。全身の代謝を司る脂肪体において、過度な脂肪滴の蓄積が生じていることから、交尾や卵巣摘出により、脂肪体において何らかの代謝変動が生じたと考えられた。

トランスクリプトーム解析による栄養選好性制御因子の探索

交尾と卵巣摘出による脂肪体の変化と栄養選好性の変化に何らかの関わりがあると考え、交尾後のメスと卵巣摘出メスと処女メスの脂肪体由来の total RNA を用いて、RNA-sequencing により網羅的に転写物を解析した。得られた発現データを用いて、サンプル間のクラスター解析を行ったところ、卵巣摘出メスと交尾後のメスと処女メスで別々のクラスターに分かれた。このことから、交尾や卵巣摘出が、脂肪体における遺伝子発現パターンに影響を与えていることがわかる。処女メスに対して、交尾後と卵巣摘出メスで共通した変動を示し、かつ、内分泌系に関わる Contig を探索した結果、インスリン様ペプチドと相同性の高いタンパク質をコードしている Contig の処女メスに対する発現量比が、いずれの場合も増加していた。この Contig を *Gryllus insulin*

*like peptide (gilp)*とし、以降の解析に進んだ。

gilp の発現解析とペプチド探索

脂肪体において交尾と卵巣摘出によって *gilp* の発現量が増加したので、他の *Gilp* 産生組織における発現量を定量 PCR によって解析した。その結果、交尾と卵巣摘出のいずれの場合においても、脳や中腸では発現量の変化は認められず、脂肪体でのみ顕著な発現量の増加が認められた。続いて、脂肪体における *Gilp* の産生・分泌を組織培養系により確認した。脂肪体を摘出し、液体培地を入れ替え続けた群(還流)と同じ液体培地を循環させた群(循環)において、*4ebp* の発現量を比較した。その結果、循環は還流に比べて、*4ebp* の発現量が減少した。*4ebp* はインスリンシグナリングの活性化により、発現量が減少することが知られている。すなわち、液体培地の循環により、脂肪体のインスリンシグナリングが活性化した。これは、脂肪体から *Gilp* が分泌され、オートクラインによりシグナルが活性化されていると考えられる。以上より、交尾や卵巣摘出により脂肪体において *Gilp* の産生・分泌、およびインスリンシグナリングが活性化されることが明らかになった。

インスリンシグナリングによる栄養選好性の制御機構の発見

インスリンは脊椎動物から無脊椎動物まで広く保存されており、代謝や成長など様々な生理現象を調節する重要なホルモンであるため、交尾や卵巣摘出により脂肪体において産生・分泌が活性化される *Gilp* が栄養選好性の調節に関与していることが考えられた。そこで、ヒトインスリンの投与によりインスリンシグナリングを活性化させた時の栄養選好性を解析したところ、タンパク質選好的な摂食行動が認められた。次に、インスリンシグナリングを抑制し、交尾や卵巣摘出後の栄養選好性を GFW 解析により調べた。具体的には、インスリンシグナリングの活性化に重要な因子であるインスリン受容体基質(*IRS*)を RNA 干渉法により、ノックダウンしたメスの栄養選好性を調べた。その結果、コントロールである *DsRed* の二本鎖 RNA(*dsRNA*)を投与した群は、交尾によりタンパク質選好的な摂食を示すのに対し、*IRS* をノックダウンした群では、交尾後のタンパク質選好的な摂食が抑制された。また、同様に、*IRS* をノックダウンした卵巣摘出メスも、*DsRed* の *dsRNA* を投与した場合に認められるタンパク質選好的な摂食行動が認められなかった。更に、インスリンシグナリングの下流の因子をノックダウンしたところ、*4ebp*、*PDE*、*Erk* のノックダウンでは栄養選好性に影

響は認められなかったが、*AKT*、*GSK*、*p70S6K* をロックダウンすると、*IRS* をロックダウンした場合と同様に、交尾や卵巣摘出により引き起こされるタンパク質選好的な摂食行動が抑えられた。以上より、インスリンシグナリングの活性化が、交尾や卵巣摘出により引き起こされるタンパク質選好的な摂食行動に必要であることが示された。

【結論】

本研究では、栄養選好性を評価できる *GFW* 解析を用いて、フタホシコオロギにおいて、交尾による栄養選好性の変化を見出したことを足掛かりに、栄養選好性調節機構の解析を進めてきた。その過程で、卵巣摘出によりタンパク質選好的な摂食行動が惹起することと、交尾と卵巣摘出により脂肪体において脂肪滴が蓄積することを見出した。トランスクリプトーム解析とそれに続く定量 *PCR* による発現解析により、交尾と卵巣摘出により脂肪体において *gilp* の発現量が上昇することが明らかになった。そして、インスリンシグナリングを抑制することで、交尾後や卵巣摘出後に認められていたタンパク質選好的な摂食行動が抑えられることから、インスリンシグナリングによって栄養選好性が調節されていることが明らかとなった。これまで、栄養選好性を調整する分子やシグナルは見出されておらず、本研究が初めての例になる。また、インスリンとそのシグナルは生物種間での保存性が高いため、本研究で得られた知見はフタホシコオロギや昆虫に限らず、多くの生物に共通して存在する仕組みであることが考えられる。一方で、*gilp* の発現量を上昇させる具体的な分子や物質や、インスリンシグナリングの活性化から行動変化に至るまでのメカニズム等、未だに不明な点が残されている。これら詳細な解析を進めることで、適切な栄養選好性の調節により担保される「セルフセレクション」という、生物の複雑であり魅力的な行動のメカニズムの全容に迫ることができると確信している。