

博士論文

フタホシコオロギにおける脂質代謝に調節される摂食行動

および生存の分子機構

東京大学大学院 農学生命科学研究科

応用生命化学専攻

生物有機化学研究室

平成 23 年度進学

氏名 小沼 貴裕

指導教員 作田 庄平

## 略語一覽

12:0: lauric acid

14:0: myristic acid

16:0: palmitic acid

18:0: stearic acid

18:1: oleic acid

18:2: linoleic acid

18:3: linolenic acid

AA: arachidonic acid

ACBP: acyl-CoA binding protein

ADAM: 9-anthryldiazomethane

AKH: adipokinetic hormone

AKHR: adipokinetic hormone receptor

ANOVA: analysis of variance

apoLp: apolipoprotein

ATGL: adipose-triglyceride lipase

BLAST: Basic Local Alignment Search Tool

cAMP: cyclic AMP

CBB: coomassie brilliant blue

CC: corpus cardiacum

CDS: coding region

CHCA:  $\alpha$ -cyano-4-hydroxycinnamic

CHO: chinese hamster ovary

CL: cluster

COG: clusters of orthologous groups

CSP: chemosensory protein

DAG: diacylglycerol

df: degree of freedom

dsRNA: double-stranded RNA

EF: elongation factor

EGF: epidermal growth factor

EGFP: enhanced green fluorescent protein

EPA: eicosapentaenoic acid

FFA: free fatty acid

Fmoc: *N*-9-fluorophenylmethoxy-carbonyl

FPKM: fragments per kilobase of exon per million mapped fragments

GAPDH: glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase

GnRH: gonadotropin-releasing hormone

GO: gene ontology

GPCR: G protein-coupled receptor

HDLp: high-density lipophorin

HE: hematoxylin and eosin

HEK: human embryonic kidney

Hemap: Hemolymph major anionic peptide

HPLC: high performance liquid chromatography

HSL: hormone-sensitive lipase

LDLp: low-density lipophorin

LDLR: low-density lipophorin receptor

LHA: lateral hypothalamic area

LpR: lipophorin receptor

LTP: lipid transfer particle

MALDI-TOF: matrix assisted laser desorption/ionization time of flight

MS: mass spectrometry

OBP: odorant-binding protein

OR: odorant receptor

ORF: open reading frame

PAGE: polyacrylamide gel electrophoresis

PCR: polymerase chain reaction

PEPCK: phosphoenolpyruvate carboxykinase

PG: prostaglandin

PVDF: polyvinylidene fluoride

RACE: rapid amplification of cDNA end

RNA-seq: RNA-sequencing

RNAi: RNA interference

RPCH: red pigment concentrating hormone

SDS: sodium dodecylsulfate

Serpin: serine protease inhibitor

SFA: saturated fatty acid

SOG: subesophageal ganglion

TAG: triacylglycerol

TFA: trifluoroacetic acid

TLC: thin-layer chromatography

TM: transmembrane

TSP: thrombospondin

UFA: unsaturated fatty acid

VgR: vitellogenin receptor

VMH: ventromedial hypothalamic



## 目次

序論	1
第一章 AKHR のノックダウン個体の摂食行動に関する解析	18
1-0 はじめに	18
1-1 AKHR のノックダウン個体の摂食行動に関わる表現型の解析*	18
1-1-1 AKHR のノックダウン個体の絶食耐性の解析*	18
1-1-2 AKHR のノックダウン個体の摂食量の解析*	19
1-1-3 AKHR のノックダウン個体の摂食行動の解析*	19
1-1-4 AKHR のノックダウン個体の運動活性の解析	23
1-2 まとめと考察	24
第二章 AKHR のノックダウン個体における、体内の栄養状態の解析、および体内の栄養状態と摂食周期との関連性の解析	44
2-0 はじめに	44
2-1 AKHR のノックダウン個体における、体内の脂質、糖質レベルの変動の解析*	44
2-1-1 AKHR のノックダウン個体における、体液中の脂質、糖質レベルの変動の解析*	44
2-1-2 AKHR のノックダウン個体における、脂肪体内の脂質の量的レベルの変動の解析	45
2-2 AKHR のノックダウン個体の摂食行動に対する、体液中への脂質、糖質の投与によるレスキュー実験	46
2-3 まとめと考察	48
第三章 摂食周期を規定する摂食モチベーションと体液中の栄養状態との関連性の解析	55
3-0 はじめに	55
3-1 通常個体および AKHR のノックダウン個体における、各摂食条件下での、体液中の脂質、糖質の量的レベルの変動の解析*	56
3-1-1 絶食条件下での、体液中の脂質、糖質の量的レベルの変動の解析*	56
3-1-2 通常摂食条件下での、体液中の脂質、糖質の量的レベルの変動の解析*	56
3-2 通常個体に対する、体液中への脂質、糖質の投与による、摂食モチベーションの変化に関する解析	57
3-3 まとめと考察	58
第四章 AKHR のノックダウン個体における、脂質輸送系と摂食行動との関連性の解析	67
4-0 はじめに	67
4-1 AKHR のノックダウン個体における、脂質輸送に関与する因子 LpR および ApoLp-III に関する解析*	68
4-1-1 AKHR のノックダウンが <i>LpR</i> の mRNA の発現レベルに与える影響の解析*	68
4-1-2 AKHR のノックダウンが体液中の ApoLp-III レベルに与える影響の解析*	69
4-1-2-1 フタホシコオロギの ApoLp-III の同定*	69
4-1-2-2 AKH 投与および AKHR のノックダウンと体液中 ApoLp-III の動態との関連性の	70

解析*	
4-2 LpR および ApoLp-III のノックダウン個体の摂食量の解析*	71
4-2-1 LpR のノックダウン個体の摂食量の解析*	71
4-2-2 ApoLp-III のノックダウン個体の摂食量の解析*	71
4-3 まとめと考察	73
<b>第五章 AKHR のノックダウン個体における、体内の脂質の質的レベルと摂食行動との関連性の解析</b>	83
5-0 はじめに	83
5-1 AKHR のノックダウン個体における、摂食行動に関与する新規分子の探索	83
5-1-1 cDNA サブトラクション法を用いた、脂肪体内にて、AKHR のノックダウンにより発現変動する遺伝子の探索	83
5-1-2 cDNA サブトラクション法により得た候補遺伝子のノックダウン個体の解析	85
5-1-3 フタホシコオロギの ACBP (acyl-CoA binding protein)の脂質代謝に関する機能の解析	86
5-2 AKHR のノックダウン個体、および ACBP のノックダウン個体における、体内の脂質の脂肪酸組成の解析	87
5-3 絶食条件下における体内の脂質の脂肪酸組成の解析	87
5-4 体内の脂質の質的レベルの変動が摂食行動に及ぼす影響の解析の試み	88
5-5 まとめと考察	89
<b>第六章 AKHR のノックダウン個体における、餌中の栄養分に対する嗜好性の変化、およびその嗜好性に関与する器官に関する解析</b>	104
6-0 はじめに	104
6-1 AKHR のノックダウン個体における、三大栄養素の嗜好性の解析	104
6-2 AKHR のノックダウン個体における、脂肪酸の嗜好性の解析	106
6-3 餌中のリノール酸の感知に関与する器官としての小腮(maxillary palps)の同定	107
6-3-1 触覚および小腮の切除実験	107
6-3-2 小腮における、餌中のリノール酸の感知の閾値の解析	107
6-4 餌中の TAG の感知に関する解析	108
6-5 逆行性染色法による、小腮における栄養分の感知に関与する神経系の探索	108
6-6 まとめと考察	109
<b>第七章 餌中のリノール酸の嗜好性に関与する分子の探索</b>	119
7-0 はじめに	119
7-1 RNA-seq による、フタホシコオロギの小腮で発現する OBP、CSP、および OR の <i>in silico</i> 探索	120
7-2 RNAi 法および choice assay による、リノール酸の感知に関与する OBP および CSP のスクリーニング	124

7-3	まとめと考察	125
<b>第八章</b>	<b>脂肪酸不飽和化酵素 desaturase のノックダウン個体の致死の原因の解析</b>	138
8-0	はじめに	138
8-1	desaturase のノックダウン個体の各組織での脂肪酸組成の解析	140
8-2	desaturase のノックダウン個体の脂肪酸の嗜好性の解析	141
8-3	desaturase のノックダウン個体の各組織の活性に関する解析	141
8-4	desaturase のノックダウン個体における致死のレスキュー実験	142
8-5	まとめと考察	144
<b>補項</b>		152
<b>第一項</b>	<b>本論文研究に用いた遺伝子のクローニングおよびノックダウン個体の調製</b>	152
S1-1	AKHR をコードする遺伝子の cDNA クローニングおよびそのノックダウン個体の調製	152
S1-2	LpR をコードする遺伝子の cDNA クローニングおよびそのノックダウン個体の調製	156
S1-3	ApoLp-III をコードする遺伝子の cDNA クローニングおよびそのノックダウン個体の調製	160
S1-4	サブトラクション法により得られた候補遺伝子の cDNA クローニングおよびそれらのノックダウン 個体の調製	163
S1-5	RNA-seq 解析により得られた、OBP および CSP をコードする候補遺伝子についてのノックダウン個 体の調製	169
S1-6	$\Delta 9$ 、 $\Delta 12$ -desaturase をコードする遺伝子の cDNA クローニングおよびそのノックダウン個体の調製	171
<b>第二項</b>	<b>本論文研究において解析した、補足的な実験結果</b>	178
S2-1	フタホシコオロギ AKH の合成、および AKH 投与成虫個体の摂食量の解析*	178
S2-2	AKHR のノックダウン終齢幼虫個体における、摂食行動に関わる表現型の解析*	179
S2-3	フタホシコオロギ通常オス個体における、体液中の脂質および糖質の標準レベルと摂食量との相関 関係の解析	180
S2-4	フタホシコオロギ ApoLp-III の脂質輸送における機能に関する解析	181
S2-5	他の昆虫種における体内の脂肪酸組成の解析	182
<b>総括</b>		183
<b>実験の部</b>		192
<b>謝辞</b>		211
<b>参考文献</b>		212

本目次において、修士論文にて発表済みのデータを含む項をアスタリスクにて示した。

## 序論

生物が生命現象を維持するためには、エネルギーの摂取と消費を絶えず繰り返さなければならない。摂食行動は、動物において、エネルギーを摂取する手段として、普遍的な一連の行動の1つである。摂食行動の様式は種によってさまざまであるが、1つの行動として摂食行動を観察すると、摂食行動は、食べ始める行動と、食べ終わる行動に分けることができる。体内に、これらの行動を調節する機構が存在するとすれば、食べ始める行動は、食べていない状態から、食べている状態への移行、すなわち、摂食モチベーションの増加と、逆の移行、すなわち、摂食モチベーションの減少を制御するような機構が考えられる。摂食の制御機構については、哺乳類をはじめとする脊椎動物を用いた研究が特に盛んに行われてきた。その詳細は後述の通りであるが、それらの研究によると、摂食モチベーションは、自律神経や内分泌系はもとより、学習、記憶、認知、情動など、状況に応じ変化する種々の因子の統合により、精巧かつ複雑に調節されている。

## 生物における恒常性

摂食行動は、外界から体内へ栄養分を取り入れるための行動であることを考えると、生物の体内は、栄養分を取り入れ、利用し排出する開放系と見なすことができる。1932年に、Cannon は、生物の体は開放系として、絶えず流動性を持ちながら、各臓器の協同により、或る定常状態を保つ機構が存在し、その制御機構のもとで、血液などの細胞外液の物理的、化学的性状が恒常的に一定の範囲に維持されていると提唱した<sup>1)</sup>。また、このような状態を恒常状態(ホメオスタシス、homeostasis)と定義づけた<sup>1)</sup>。

## 脊椎動物における、ホルモンネットワークによる摂食行動の恒常的制御

脊椎動物において、上述の、恒常性の概念を背景とした、エネルギー代謝が摂食行動を調節する機構に関する多くの研究により、摂食行動は、主に脳をオーガナイザーとする多くの臓器間相互作用がフィードバック作用することにより調節されていることが明らかにされた。

脊椎動物の摂食制御の中樞は、脳の視床下部であると考えられている。具体的には、間脳視床下部の腹内側核(ventromedial hypothalamic nucleus; VMH)を除去したラットは体重の

増加が認められ<sup>2)</sup>、間脳視床下部の外側野(lateral hypothalamic area; LHA)の除去により、体重および摂食量の減少が認められることから<sup>3)</sup>、それぞれ VMH が満腹中枢、LHA が摂食中枢であると考えられている。これらの視床下部の摂食行動制御領域野には、ニューロペプチド Y (neuropeptide Y; NPY)、オレキシン(orexin)、プロオピオメラノコルチン(proopiomelanocortin; POMC)、ガラニン(galanin)、アトラクチン(attractin)など、10 種類以上の神経ペプチドをそれぞれ特異的に産生するニューロンが存在しており、これらの神経ペプチド群を脳内に投与すると摂食行動が正あるいは負に制御されることが明らかにされた<sup>4)</sup>。つまり、摂食は視床下部において、促進と抑制の2方向のバランスにより調節されることが示された。

この視床下部における制御には、末梢組織からの刺激が大きく寄与している。末梢組織からのホルモンとして、例えば、脂肪細胞から分泌されるレプチン(leptin)が、視床下部の VMH などに働きかけ、摂食を抑制させることが知られている<sup>5)</sup>。また、胃で産生され、血液中に分泌されるグレリン(ghrelin)は、視床下部に働きかけ、摂食を亢進させる<sup>6)</sup>。このような、末梢組織から摂食中枢への刺激には、摂食に伴う消化管や血中などの糖質、アミノ酸、脂質の濃度変動、および体内のエネルギー代謝や、腸管の張りなどの物理的刺激などが感知され、シグナルとなる<sup>7,8)</sup>。つまり、体内の栄養状態などに反映される栄養要求性や、腸管の張りなどに反映される容量依存性などのパラメーターの刺激に応答し、最終的なアウトプットとしての摂食行動を決定するシステムが視床下部に存在し、摂食行動が制御されていると考えられている。

## 昆虫の摂食行動の生理学的基盤

一方、昆虫の摂食行動については、主に、トノサマバッタ *Locusta migratoria* を用いた、行動学的、生理学的な研究が行われてきた。トノサマバッタの5 齢幼虫の行動観察により、摂食行動が周期的におこることが示唆され<sup>9)</sup>、さらに、行動観察結果の数理的解析により、その周期性が証明された<sup>10)</sup>。タバコスズメガ *Manduca sexta* の幼虫についても同様の解析が行われ、摂食行動の周期性が見出されている<sup>11)</sup>。摂食行動の開始には、餌の存在による刺激だけではなく、様々な因子が関与している(図 0-1)。トノサマバッタを用いた生理学的研究から、摂食行動の開始に関与する外来性の因子として、1. 餌からの匂いや視覚的刺激、

2. 餌からの味覚と接触の刺激、3. 光、4. 温度、5. 外敵の有無などがある。内在性の因子として、1. 前回からの食餌からの経過時間、2. 体液中の栄養分の濃度、3. 腸の張り、4. 体液の浸透圧、5. 体液中のホルモン濃度、6. 排糞の影響、7. 個体ごとの摂食、排糞、移動などの行動開始と一致する 10 数分間のリズムなどが考えられている<sup>12)</sup>。また、摂食行動の終了についても、容量依存性と栄養要求性が深く関与する。トノサマバッタの後腸には、張りを感じずる感覚受容器が存在しており、餌による後腸の形状変化が摂食の終了に影響を与えることが示唆された<sup>13)</sup>。タバコスズメガでは、栄養分を希釈した餌を与えると、1 回の摂食時間が長くなることから、腸管における栄養分の感知が、摂食の終了に影響を与えることが示唆された<sup>14)</sup>。これらの知見から、上述の様々な因子が複合的に調節する摂食モチベーションが、ある閾値を超えると摂食行動が発現するモデル(Simpson モデル)(図 0-2)が提唱された<sup>15)</sup>。このモデルにおける縦軸である **feeding excitation** は、上述の生理学的知見をもとにした任意のパラメーターとして導入されており、パラメーターを構成するような因子に関して、分子レベルでは全く明らかにされていない。

## 昆虫の摂食行動と化学感覚との関連性

昆虫が摂食行動を行う際、まずは餌の情報を感知することが必要である。言い換えると、化学感覚器により、外界の化学物質を認識することが、摂食行動の調節に必須である。昆虫の化学感覚器は、嗅覚器と味覚器に大別される。このうち、摂食行動の最初の段階、すなわち、非摂食期間を過ごしていた場所から、餌に到達する段階においては、主に嗅覚を利用していると考えられている。一般的な昆虫の成虫の嗅覚器は、頭部に存在する触角(antenna)と小腮(maxillary palps)であるが、このうち小腮が、餌に対する嗅覚に関しては特に重要であると考えられている。実際、小腮を除去したカイコ *Bombyx mori* の幼虫では、匂いで餌に誘引される行動が弱くなる<sup>16)</sup>。匂いにより餌に到達した次の段階として、餌を口に含んで、摂食可能な餌であるかどうかを味覚で確認する行動(nibbling)をとる<sup>17)</sup>。この味覚による判断基準は、その餌に含まれている栄養分の組成が重要であると考えられている。例えば、タバコスズメガは、小腮に存在する感覚子が、餌中に含まれる糖質のうち、グルコース、スクロースやイノシトールなどの特定の糖質を感知して、大顎の動きが活性化される<sup>18)</sup>。また、カイコ幼虫では、カイコ幼虫が摂食するクワの葉から、カイコ幼虫を摂食

行動へ促す嗅覚・味覚因子として、惹きつける(誘引)因子(citral、terpinyl acetate、linalyl acetate、linalol、 $\beta$ - $\gamma$ -hexanol)、噛み付かせる(嚙咬)因子(b-sitosterol、isoquercitrin、morin)、および飲み込ませる(嚥下)因子(cellulose)が含まれていると示唆された<sup>19, 20)</sup>。以上のことから、化学感覚は、「食べるか、食べないか」の決定に重要な働きをしていると考えられる。しかし、体内の栄養状態などの、内在性の摂食行動を調節する因子による、「満腹か、空腹か」という状態を、化学感覚による「食べるか、食べないか」の決定にどのように反映させているかは、詳細には明らかにされていない。

### 昆虫の体内の栄養状態と self-selection

さて、昆虫の摂食行動を生態学および生理学的な側面から考えると、昆虫にとって、食物が限られた野生の条件において、体内に必要な栄養分(アミノ酸、糖質、脂質、ビタミン、ミネラル、水分)をバランスよく適切に満たすような食物は、多くは存在しない<sup>21)</sup>。このことは、一般的に植物は上述の栄養分をほとんど全て含んでいるものの、それぞれの含有量は植物種ごとに大きく異なることからわかる<sup>21)</sup>。つまり昆虫は、上述のような化学感覚システムを用い、体内の栄養要求を適切に満たすような餌を探索する必要がある。実際、トノサマバタ<sup>22)</sup>や、オオタバコガ *Heliothis zea*<sup>23)</sup>などを用いた生理学的研究から、昆虫には、体内の栄養要求を適切に満たすように、適切な量、および割合の栄養分を得られるような餌を自身で選択し摂食する、self-selection<sup>24, 25)</sup>と呼ばれるメカニズムを体内に有していることが知られている。このメカニズムは、実験的には、Geometric framework と呼ばれる手法によって、解析されてきている<sup>26)</sup>(図 0-3)。この解析の方法は、人工的に調製した、含有する栄養分が異なる餌を提示し摂食させ、その後一定の時間毎に、摂食した或る栄養分の量を縦・横軸としてプロットするというものである。この方法により、或る個体がそれらの栄養分をどの程度の比率で摂食するかを調べることができる(図 0-3)。Geometric framework 解析により、主要な栄養分である、タンパク質と糖質に関して、それらを種特有の比で選択して摂食することなどが明らかにされている<sup>27-34)</sup>(図 0-3, 表 0-1)。タンパク質や糖質以外の栄養分に関しては、上述の解析は一切なされていないものの、少なくとも、昆虫には、窒素源としてのタンパク質と、炭素源としての糖質について、それらを適切に選んで摂食するメカニズムが有ると考えられる。

上述の self-selection は、体内に存在する、栄養状態を感知するフィードバックシステムにより、恒常的に制御されていると考えられている<sup>35)</sup>。すなわち、体内の特定の栄養分の増加・減少などの、栄養状態の変化が、餌中の栄養分の嗜好性を調節していると考えられることができる。このような栄養状態に影響を与える主要な要因の一つとして、前回の餌の量や栄養的質が挙げられる<sup>36)</sup>。特に、体液中の栄養分の濃度は、直前に摂食した餌の栄養分が大きく反映される<sup>23,36)</sup>ため、体液中の栄養分の濃度と、self-selection などの摂食行動との関連性に関する生理学的研究がこれまでいくつかなされてきた。例えば、オオタバコガでは、トレハロースを皮下投与することで、体液中の糖質レベルを一過的に増加させると、餌中のスクロースの嗜好性が減ることが報告されている<sup>23)</sup>。また、カメムシの一種 *Oncopeltus fasciatus* において、体液中への特定のアミノ酸の投与が、摂食行動に影響を与えることが知られている<sup>37)</sup>。トノサマバッタにおいても、スクロースやアミノ酸混合溶液の体液中への注射投与が、摂食行動に影響を与えることが示唆されている<sup>38)</sup>。また、トノサマバッタが摂食する際に、食物を一時的に溜める器官であるそ嚢や、腸管、および体液中における栄養分の流動モデルから、体液中の栄養分の濃度が変動するリズムが、数理的に計算されモデル化された<sup>39)</sup>。このモデルによると、体液中の栄養分の濃度の減少と摂食行動の開始に関連性がある。以上のように、self-selection の栄養的制御に関して、生理学的研究が進められているが、その具体的な分子機構は、これまで全く明らかにされていない。

### AKH による栄養状態の調節機構

一般的に、昆虫における体液中の栄養状態は、栄養分の貯蔵や分解、輸送などに影響される<sup>40)</sup>。また、栄養分の代謝や輸送は、体液と、昆虫における脂肪組織や肝臓の役割をもつ脂肪体を、主要な場として行われる<sup>41)</sup>。脂肪体には、脂質や糖質を中心として、多くの栄養分が貯蔵エネルギーとして蓄えられている<sup>42)</sup>。脂肪体の貯蔵エネルギーである脂質や糖質は、エネルギーの需要に応じて、適宜分解され、体液中に動員され、他の組織で利用される<sup>43)</sup>が、このようなエネルギー物質の動員を制御する主要なペプチドホルモンとして、AKH (adipokinetic hormone、脂質動員ホルモン)が挙げられる。AKH は、トノサマバッタにおいて、脂肪体からの脂質を動員させる活性を担うホルモンとして発見された<sup>44)</sup>。その活性をもとに AKH は精製、単離され、そのアミノ酸配列が明らかとなった<sup>45)</sup>。なお、AKH



と、甲殻類から単離構造決定された RPCH (red pigment-concentrating hormone、赤色色素凝集ホルモン)<sup>46)</sup>とは、一次構造に類似性が見られることから、これらのペプチドホルモンは AKH/RPCH ファミリーペプチドと呼ばれ、現在までに 40 種類以上が同定されている<sup>47)</sup>(図 0-4-1)。AKH/RPCH ペプチドの構造的特徴としては、8-10 アミノ酸から成り、N 末端がピログルタミン酸、C 末端がカルボキシアミドとなっていることと、4 残基目のアミノ酸に芳香族アミノ酸であるフェニルアラニンまたはトリプトファン、8 残基目のアミノ酸にトリプトファン、9 残基目のアミノ酸にグリシンがファミリー内で保存されていることが挙げられる<sup>48)</sup>。

AKH の標的細胞内での作用機構に関しては、主にトノサマバッタをモデルとして解析されている(図 0-4-2)。まず、AKH は、脳に附属している側心体(corpus cardiacum; CC)の神経分泌細胞において合成、貯蔵され<sup>49)</sup>、体液中に分泌される。分泌された AKH は、主に脂肪体に存在する AKH 受容体(AKHR; AKH receptor)に結合し、脂肪体細胞内でのシグナル伝達を引き起こす<sup>50)</sup>。その全貌は明らかになっていないが、AKH 刺激により細胞内シグナル伝達経路の第 1 段階として、トノサマバッタでは、cAMP およびカルシウムイオンがセカンドメッセンジャーとして関与することが示唆されている<sup>51)</sup>。また、トノサマバッタやコガネムシの一種である、カタモンメンガタハナムグリ *Pachnoda sinuata* では、イノシトール三リン酸もセカンドメッセンジャーとして働くという報告もある<sup>52,53)</sup>。これらのセカンドメッセンジャーにより、グリコーゲンホスホリラーゼや、ホルモン感受性リパーゼが活性化される。さらに、これらの酵素により、脂肪体内に貯蔵されている、グリコーゲンやトリアシルグリセロール(triacylglycerol; TAG)を、それぞれトレハロースや 1,2-ジアシルグリセロール(1,2-diacylglycerol; 1,2-DAG)に分解し、それぞれを体液中へ動員する<sup>50,54,55)</sup>。その後、1,2-DAG は、脂質輸送タンパク質であるリポホリンにより体液中にて媒介輸送され、飛翔筋などのエネルギー需要のある器官に運ばれる<sup>56,57)</sup>。

上述のような、AKH の細胞応答に関する機序の研究が進められている一方、AKH が発見されてから 20 年以上の間、AKH 受容体(AKHR)の構造についての報告は皆無であった。しかし、近年の分子生物学的手法の発展および昆虫ゲノム情報の利用により、キイロショウジョウバエ(*Drosophila melanogaster*)とカイコの AKHR が同定された<sup>58,59)</sup>。他の神経ペプチドの受容体と同様に、AKHR は G タンパク質共役型 7 回膜貫通型受容体(GPCR)であること

が明らかとなり、GnRH (性腺刺激ホルモン放出ホルモン)受容体とのアミノ酸配列上の類似性が認められた。続いて、ワモンゴキブリ *Periplaneta americana*<sup>60, 61)</sup>、ハマダラカ *Anopheles gambiae*<sup>62, 63)</sup>、コクヌストモドキ *Tribolium castaneum*<sup>64)</sup>、ネッタイシマカ *Aedes aegypti*<sup>65)</sup> の AKHR をコードする cDNA のクローニングが行われた。また、セイヨウミツバチ *Apis mellifera*、アカイエカ *Culex pipiens* では、それらのゲノム情報から、AKHR の存在が推定されている。AKHR の機能的特徴および AKH と AKHR との相互作用の解析のために、CHO (Chinese hamster ovary)細胞、カエルの卵母細胞、HEK (Human embryonic kidney)細胞など、脊椎動物の細胞発現系を用いた AKHR 遺伝子の発現が行われ、それによるリガンド応答解析などが行われている<sup>59, 61, 66)</sup>。

AKH が、代謝および体内の栄養状態をどのように調節しているかについては、主にショウジョウバエの遺伝学的手法による変異体を用いた研究がなされてきた。例えば、AKHR を欠損させたショウジョウバエの変異体は、通常状態では、通常個体と同等の寿命、体サイズであるが<sup>67)</sup>、エネルギー貯蔵組織である脂肪体に、過剰な TAG やグリコーゲンの蓄積が見られ、肥満様の表現型を示す<sup>67, 68)</sup>。逆に、AKHR を過剰発現させたショウジョウバエの変異体では、脂肪体に貯蔵された TAG の急激な減少が見られる<sup>68)</sup>。また、同様に、遺伝学的手法により、AKH 産生細胞を欠失させたショウジョウバエの変異体では、体液中のトレハロース量が減少する<sup>69, 70)</sup>。これらの結果から、AKH は、体内のエネルギー代謝の恒常的制御に関与することが示唆される。

また、ショウジョウバエにおいて、AKH が運動の制御に影響を与えることが示唆されている。例えば、AKH 産生細胞を欠失させたショウジョウバエの変異体は、通常状態において、運動量の減少が見られた<sup>70)</sup>。また、絶食状態においては、通常個体は、採餌行動が促されることによると考えられる、運動量の増加が見られるが<sup>69)</sup>、AKH 産生細胞を欠失させた変異体では、野生型と比較して絶食状態での生存率が増加し(絶食耐性を獲得し)、絶食に伴う運動量の変動が見られなかった<sup>69, 70)</sup>。このことから、AKH が、内分泌学的制御だけでなく、運動に関与する神経系の制御にも重要であることが示唆される。すなわち、AKH が摂食などの行動の制御にも関与する可能性も示している。

## 昆虫の摂食行動の行動レベルに着目した研究

これまで昆虫の摂食行動に関する研究は、食べ始める行動、食べ終わる行動などの行動レベルに着目した研究はほとんどなされていなかった。その理由としては、定型的行動の分類に則した行動レベルの解析が困難であること等が挙げられる。また、このような行動に関与する内分泌学的制御もまったく明らかにされていなかった。そこで永田らは、安定した摂食周期を有するカイコ幼虫を用い、まずは詳細な行動観察の結果に基づいたアッセイ系を構築し、食べ始める行動を促すような生理活性物質を探索するという、新しい切り口の研究を開始した。その結果、カイコ幼虫の体液から、62 アミノ酸残基からなる新規ペプチド性因子である HemaP (hemolymph major anionic peptide) を同定した<sup>71)</sup>。HemaP は、脂肪体で産生され、その体液中の量と摂食モチベーションには正の相関がみられることや、摂食の制御に関与することが知られている食道下神経節(SOG; suboesophageal ganglion)内のドーパミンの利用に影響を与えることが分かってきた<sup>71)</sup>。HemaP と体内の栄養状態との関連性は具体的に明らかにされていないが、HemaP は両親媒性であることから、脂溶性の栄養分と結合する可能性もある。

さらに永田らは、上述のアッセイ系を用いて、ペプチドホルモンをはじめとする、いくつかのペプチド性因子を発見、あるいは摂食行動調節因子として再発見している<sup>72)</sup>。つまり、複雑な摂食行動の内分泌学的制御のネットワークを考えるうえで、関連する因子群を見出している状況にある。また、摂食行動を調節する因子が複数あることから、摂食行動は多くの因子群によって統合的に制御されているとも考えられる。

## 本論文研究の目的および特徴

上述のような研究背景の上で、私は、摂食行動観察による、行動レベルの解析を用い、栄養状態の変動が摂食行動を調節する機構を分子レベルで明らかにすることを本論文研究の目的とした。栄養状態の変動と摂食行動の関連性に関しては、これまで上述した生理学的研究に基づくと、体内の栄養状態は或る恒常状態(ホメオスタシス)が保たれていると考えられ、また、それが実現されるためには、栄養要求性の調節による、栄養の選択および摂取の恒常的な制御が重要であると考えられる(図 0-5-1)。そこで、本論文研究を展開するにあたって、大きく分けて(i) 摂食行動、(ii) エネルギー代謝、(iii) 化学感覚の3視点からの

分子生物学的アプローチにより、本論文研究の目的を達成することを目指した(図 0-5)。

研究材料としては、フタホシコオロギ *Gryllus bimaculatus* を用いた(図 0-6)。フタホシコオロギを用いる利点としては、(i) 大量入手、大量飼育が簡便であること、(ii) 比較的大型昆虫であるため、摂食行動観察が容易であること、(iii) RNAi 法の効果が確認されており、その方法も簡便であること<sup>73,74)</sup>、(iv) また、雑食性であることから、研究を展開していく上で結果的に、食性や嗜好性の変化を調べる実験系を組み立てることが容易であったことや、(v) 昆虫全般の特徴として、開放血管系であり、体内の組織間ネットワークが比較的単純であると考えられることから、体内の栄養分の「やりくり」を比較的容易に、包括的に捉えることができる。つまり、上述の栄養要求性の分子基盤を包括的に理解するモデルとなりうると考えられる。

本論文研究の特徴は、(i) 摂食行動観察により、「食べ始める行動・食べ終わる行動」について、時間的側面からの解析をする点、(ii) 摂食行動の根底の概念の一つである、栄養分補償性に対して、具体的な分子機構を明らかにしようとする点、そして、(iii) 行動・代謝・化学感覚の3つの視点からの摂食行動の分子基盤の研究を行う点である。

## 本論文研究の構成およびあらすじ (図 0-5-2)

本論文研究は、AKHR のノックダウン個体の表現型の解析を中心として進めたが、その解析は大きく分けて、(i) 摂食行動に関する解析(第一章)、(ii) エネルギー代謝に関する解析(第二、三、四、五章)、(iii) 化学感覚に関する解析(第六、七章)である。また、(iv) 上述の解析の過程で見出した、脂肪酸不飽和化酵素のノックダウン個体が致死となる原因の探索も行った(第八章)。以下に、具体的な各章のあらすじを記述する。

(i) 本研究の最初の足掛かりとして、RNAi 法によって、体内の栄養状態を変動させうるような遺伝子をノックダウンし、摂食行動にどのような影響を与えるかを調べることにした。実際には、AKHR 遺伝子をノックダウンすることで、摂食行動の周期性に顕著な変化が現れることを見出した(第一章)。

(ii) 上述の摂食行動の周期性の変化は、AKH シグナリングの欠損による、体内の脂質代謝や糖質代謝の変動によると考えられたため、AKHR のノックダウンが体内の脂質、糖質レベルに与える影響と、摂食行動の周期性との関連性を調べたところ、体液中の主要な脂

質である 1,2-DAG レベルが摂食行動の周期性に大きく関与していることが分かった(第二章)。そこで、体液中の脂質、糖質レベルの時間的変動を調べると、体液中の 1,2-DAG レベルは、或る一定レベルを保つように恒常的な制御を受けており、そのレベルからの増減が、摂食モチベーションの増減を調節していると考えられた(第三章)。

次に、AKHR のノックダウン個体における、体液中の 1,2-DAG レベルの減少が、どのように摂食行動の周期性の変化に投射されるのかを調べることにした。まずは、体液中の 1,2-DAG の輸送に関与する、脂質輸送タンパク質と脂質の巨大複合体であるリポホリンの量的変動に着目したが、リポホリンが、直接的に摂食行動の周期性の変化に関与しているわけではないようであった(第四章)。そこで、AKHR のノックダウン個体における、摂食行動に関与する新規因子を探索したところ、脂肪酸代謝を制御することで、体内の脂質の質的レベルを調節するタンパク質 ACBP (acyl-CoA binding protein)を見出した。そこで、AKHR のノックダウン個体の体内の脂肪酸組成を解析したところ、体液をはじめとするいくつかの組織において、含有する脂肪酸の飽和-不飽和脂肪酸のバランスは恒常的な調節を受けているようであり、さらに、AKHR をノックダウンすると、そのバランスが変動していた(第五章)。つまり、AKHR のノックダウン個体における摂食行動の周期性の変化には、第二章で示したような、体液中の脂質レベルの量的変化だけではなく、体内の脂質レベルの質的变化(脂肪酸組成の変化)も関与する可能性が示唆された。

(iii) 続いて、AKHR のノックダウン個体について、餌の栄養分に対する化学感覚について調べたところ、AKHR のノックダウン個体は、小腸を介して、リノール酸の嗜好性を増加させていることが分かった。また、逆行性染色の結果から、小腸における上述の嗜好性の調節は、食道下神経節(SOG)が関与していると考えられた(第六章)。これまでの結果を合わせると、AKHR のノックダウン個体は、脂質代謝の調節機構が部分的に欠損したため、体内の脂質の量的および質的レベルのバランスが変化し、その変化を補償するために、餌中のリノール酸の嗜好性を増加させており、その結果摂食行動の周期性に影響を与えた可能性が有る。さらに続いて、上述の嗜好性の調節に関与する分子を特定したいと考えた。そこで、小腸の RNA-seq 解析を行い、そのデータをもとにして、小腸においてリノール酸と結合し、嗅覚シグナルを伝える分子である、嗅覚結合タンパク質(OBP; odorant binding protein)または化学受容タンパク質(CSP; chemosensory protein)について、アッセイによるスク

リーニング探索を試みた(第七章)。

(iv) 第五章の研究の過程で、体内における 2 つの脂肪酸不飽和化酵素である、 $\Delta 9$ -desaturase および  $\Delta 12$ -desaturase を両方ノックダウンすることで、AKHR をノックダウンした時よりも大きく体内の脂肪酸の飽和-不飽和脂肪酸のバランスを崩し、かつ、両 desaturase のノックダウン 1-2 日後には致死になることを見出した。このような致死に着目することは、脂質代謝と、生物の生存のメカニズムとの関連性を見出す上で興味深い結果が得られるかもしれないと考え、致死の原因の解明を試みた(第八章)。

最後に、本論文研究では、多くの遺伝子を、すべて同様の常法により、クローニングおよび RNAi 法によりノックダウンを行っているが、本論文の記述に当たっては、補項としてそれらをまとめて記述した(補項第一項)。また、本論文研究において、それ自体は特に中心となるような結果ではないが、特筆したい結果も、補項としてそれらをまとめて記述した(補項第二項)。

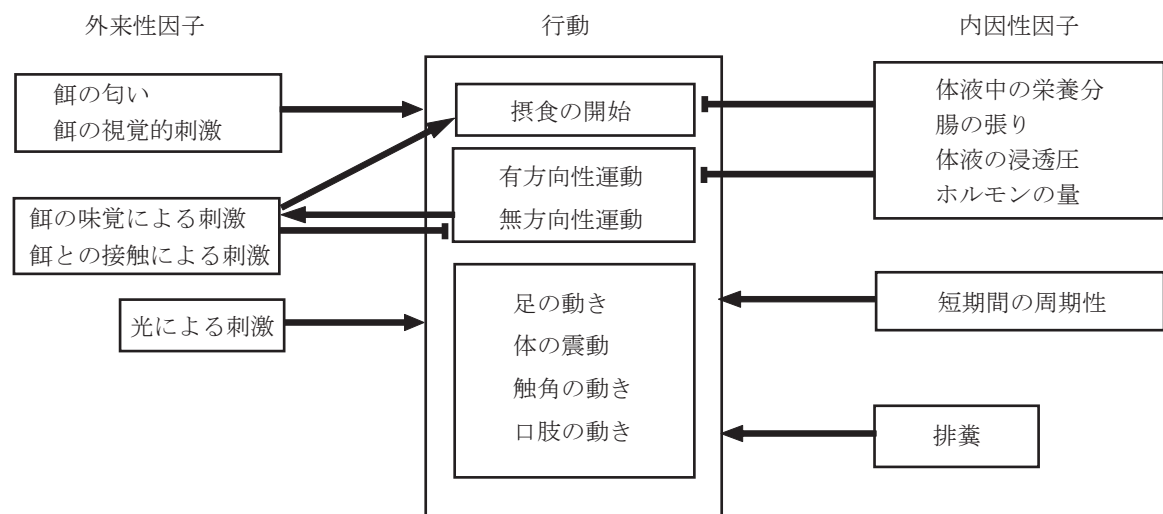


図 0-1. 昆虫の行動および摂食開始と、それを制御する外来性因子と内在性因子との関連性のモデル図。  
矢印と T バーは、それぞれ促進と抑制を示す。(Ref. 12 より改変 )

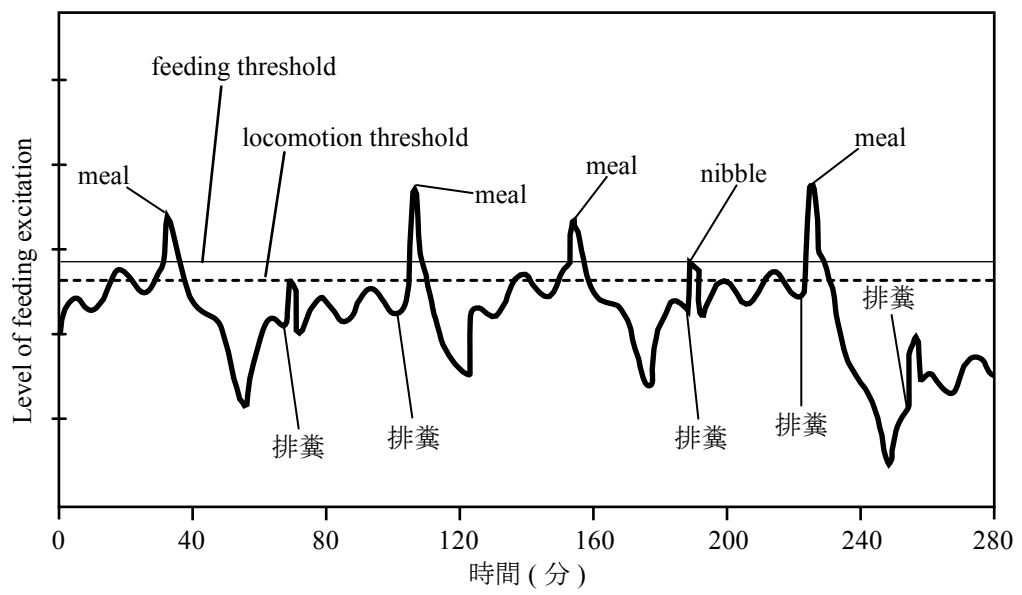


図 0-2. トノサマバットの摂食行動のシミュレーション (Simpsonモデル) (Ref. 15より改変)



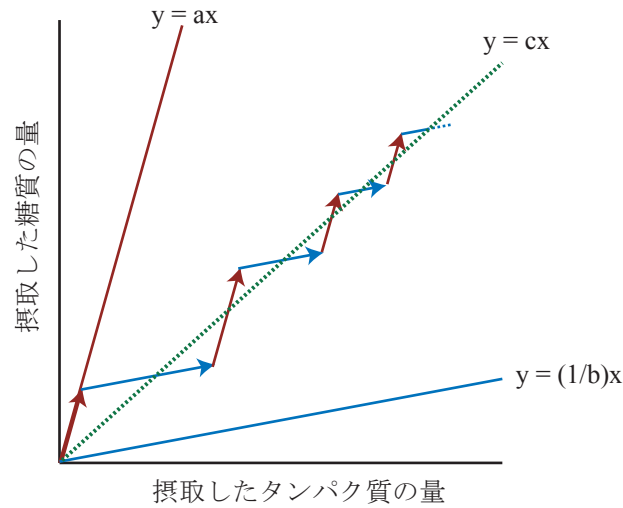


図 0-3. Geometric framework 解析の模式図。タンパク質：糖質 = 1:a ( $a > 1$ ) (高糖質餌) の割合で含む餌と、タンパク質：糖質 = b:1 ( $b > 1$ ) の割合で含む餌 (高タンパク質餌) の 2 種類を調製し、個体に提示し、自由に選択させ摂食させた場合、それぞれの栄養分を或る一定の比率 (タンパク質：糖質 = 1:c) (緑色の点線) で摂取するように、高糖質餌を摂食する期間 (赤色の矢印) と高タンパク質餌を摂食する期間 (青色の矢印) を繰り返す。

表 0-1. Geometric framework 解析により明らかになった、各昆虫種における、タンパク質と糖質を摂取する比率

昆虫種	タンパク質と糖質を摂取する比率 (タンパク質量：糖質量)	引用文献
<i>Locusta migratoria</i> トノサマバッタ (群生相)	0.7:1	27
<i>Melanoplus angustipennis</i> バッタの一種	1.1:1	28
<i>Melanoplus bivittatus</i> バッタの一種	0.8:1	28
<i>Melanoplus differentialis</i> バッタの一種	1.4:1	28
<i>Melanoplus femurrubrum</i> バッタの一種	1.7:1	28
<i>Melanoplus flavidus</i> バッタの一種	1.1:1	28
<i>Melanoplus foedus</i> バッタの一種	1:1	28
<i>Schistocerca gregaria</i> サバクトビバッタ	0.8:1	29
<i>Heliothis virescens</i> オオタバコガ	1.5:1	30
<i>Heliothis subflexa</i> ガの一種	1:1	30
<i>Heliothis zea</i> アメリカタバコガ	4:1	31
<i>Manduca sexta</i> タバコスズメガ	1:1	32
<i>Spodoptera exigua</i> シロイチモジヨトウ	1.1:1	33
<i>Spodoptera exempta</i> ガの一種	0.8:1	34
<i>Spodoptera littoralis</i> ガの一種	1.3:1	34

トノサマバッタ AKH-I	pQLNFTPNWGTamide	(Ref. 45)
トノサマバッタ AKH-II	pQLNFSAGW--amide	(Ref. 75)
トノサマバッタ AKH-III	pQLNFTPWW--amide	(Ref. 76)
ワモンゴキブリ AKH-I	pQVNFSPNW--amide	(Ref. 54)
フタホシコオロギ AKH	pQVNFSTGW--amide	(Ref. 77)
コクヌストモドキ AKH	pQLNFSSTDW--amide	(Ref. 47)
ショウジョウバエ AKH	pQLTFSPDW--amide	(Ref. 78)
タバコスズメガ AKH-I	pQLTFSSWG--amide	(Ref. 79)
ホッコクアカエビ RPCH	pQLNFS PGW--amide	(Ref. 46)

図0-4-1. 代表的なAKH/RPCHペプチドファミリーのアミノ酸配列。pQはピログルタミン酸残基を示す。-はギャップを示す。AKH; adipokinetic hormone (脂質動員ホルモン)、RPCH; red pigment-concentrating hormone (赤色色素凝集ホルモン)。

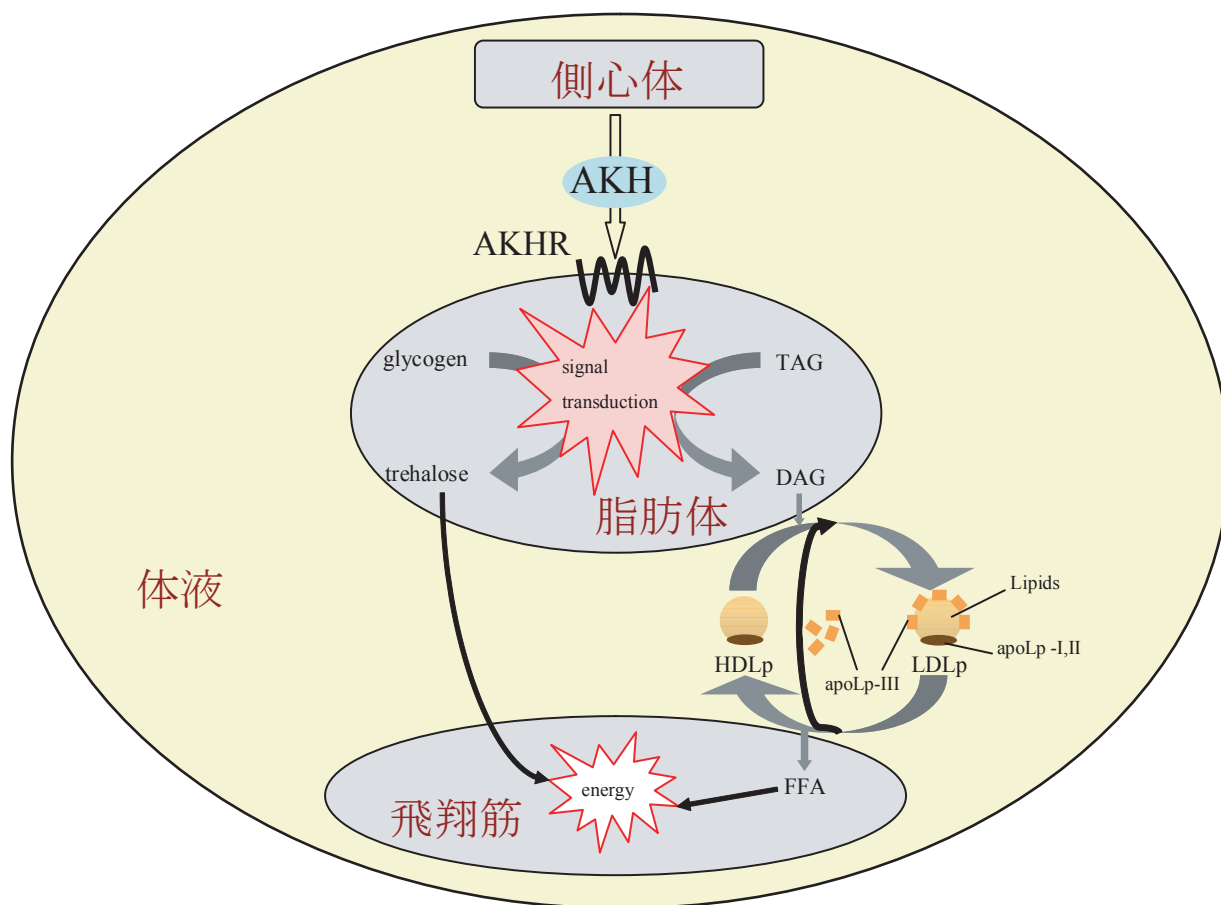
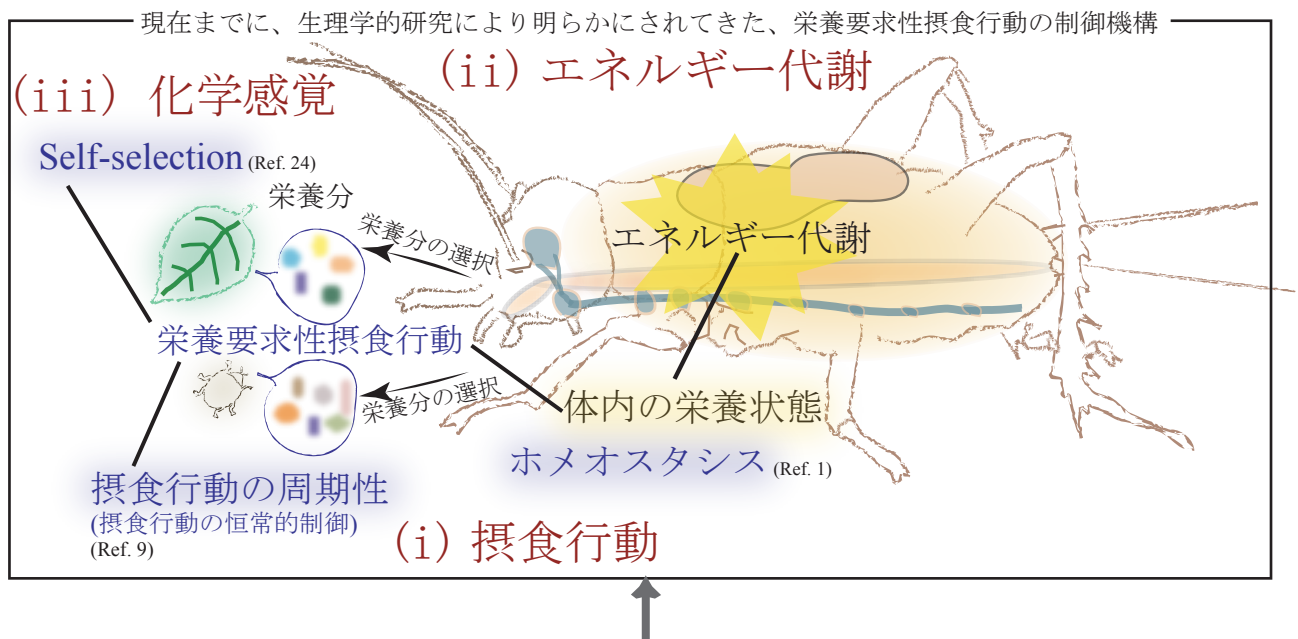


図0-4-2. AKHの作用機構の模式図。この図では、AKHによりエネルギー物質が動員される組織の例を飛翔筋とした。AKH; adipokinetic hormone (脂質動員ホルモン)、AKHR; adipokinetic hormone receptor (脂質動員ホルモン受容体)、apoLp; apolipophorin (アポリポホリン)、DAG; diacylglycerol (ジアシルグリセロール)、FFA; free fatty acid (遊離脂肪酸)、HDLp; high-density lipophorin (高密度リポホリン)、LDLp; low-density lipophorin (低密度リポホリン)、TAG; triacylglycerol (トリアシルグリセロール)。



摂食行動観察や、分子生物学的手法を用いて、上記の機構を分子レベルで明らかにする

図 0-5-1. 本論文研究の目的に関する模式図。

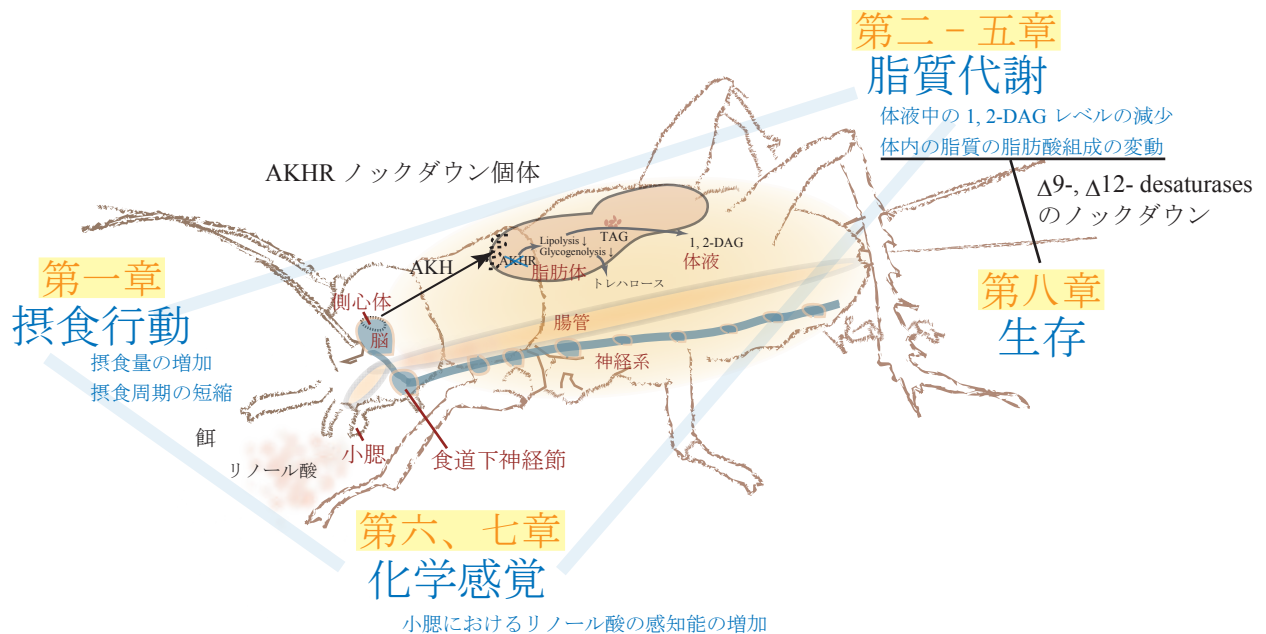


図 0-5-2. 本論文の構成に関する模式図。AKH; adipokinetic hormone (脂質動員ホルモン)、AKHR; adipokinetic hormone receptor (脂質動員ホルモン受容体)、TAG; triacylglycerol (トリアシルグリセロール)、1, 2-DAG; 1, 2-diacylglycerol (1, 2-ジアシルグリセロール)。



図 0-6. フタホシコオロギ (*Gryllus bimaculatus*) のメス ( 上部 )、オス ( 下部 ) の成虫。

## 第一章 AKHR のノックダウン個体の摂食行動に関する解析

### 1-0 はじめに

AKH (adipokinetic hormone、脂質動員ホルモン)は、昆虫のエネルギー代謝に関わるペプチドホルモンであり、主に、脂肪体内の貯蔵エネルギーを体液中に動員させる機能を有している<sup>80)</sup>。現在、AKH や構造上類似している RPCH (red pigment concentrating hormone、赤色素凝集ホルモン<sup>46)</sup>が属している AKH/RPCH ファミリーには 40 種類以上のペプチドが同定されている<sup>47)</sup>。また、AKH 受容体(AKHR)については、数種類の昆虫において同定およびクローニングが行われている<sup>58-65, 81)</sup>。AKH は、さまざまな昆虫種で生化学的および内分泌学的な解析が行われている。近年、主にキイロショウジョウバエを用いた遺伝学的解析によって、AKH シグナリングは、貯蔵エネルギー物質の分解・貯蔵のバランスを制御することで、体内のエネルギー代謝のホメオスタシスに影響を与えることが示唆されてきた。

そこで本章では、AKH による体内エネルギーのホメオスタシスの調節機構が摂食行動にどのような影響を与えるかを解析するために、フタホシコオロギを用いて、AKH シグナリングを人為的に制御することによる摂食行動への影響を解析することを目的とした。

解析に際して、AKHR をノックダウンしたフタホシコオロギを調製した(補項第一項; 図 S1-1)。そのために、まずは、フタホシコオロギの *AKHR* 遺伝子をクローニングした(図 S1-1 (A, B))。さらに、クローニングした *AKHR* 遺伝子の塩基配列を基に調製した dsRNA を投与することで、投与 2-4 日後に *AKHR* 遺伝子の mRNA の発現が顕著に減少するようなノックダウン個体を調製した(図 S1-1 (F))。

次に、調製した AKHR ノックダウン個体について、摂食行動に関与する表現型をいくつか解析した。特に、摂食行動の解析に関しては、摂食行動観察の結果をもとにして、数理学的手法により、摂食行動の周期性を解析した。

### 1-1 AKHR のノックダウン個体の摂食行動に関わる表現型の解析\*

#### 1-1-1 AKHR のノックダウン個体の絶食耐性の解析\*

キイロショウジョウバエでは、遺伝学的手法を用いた、AKH 産生細胞の欠損<sup>69)</sup>、あるいは AKHR のノックアウト<sup>67, 68)</sup>により、脂肪体内の貯蔵エネルギーの増加などの、体内のエ

エネルギー代謝の変動、および、それに伴う絶食耐性の増強が見られることが知られている。そこで、まずは、フタホシコオロギの AKHR 遺伝子のノックダウンが、キイロショウジョウバエと同様に、体内のエネルギー代謝の変動に伴い、絶食耐性が増強することを確認するために、フタホシコオロギの AKHR のノックダウン群の絶食耐性を解析した(図 1-1-1)。その結果、AKHR のノックダウン群において、メス(図 1-1-1 (A))、オス(図 1-1-1 (B))ともに、コントロール群と比較して、生存日数の延長が見られた。すなわち、AKHR のノックダウンによる絶食耐性の増強が認められた。この結果から、フタホシコオロギにおいても、AKHR は、キイロショウジョウバエの AKHR と同様、体内のエネルギー代謝を変動させる機能を有することが示唆された。

### 1-1-2 AKHR のノックダウン個体の摂食量の解析\*

フタホシコオロギの AKHR のノックダウンが摂食行動にどのように影響を与えるかを解析するために、まず、成虫の AKHR のノックダウン群の摂食量を解析した。解析方法としては、チャバネゴキブリ *Blattella germanica* において、摂食量はフンの量と相関関係にあることを参考にした<sup>82)</sup>。また、フタホシコオロギのフン 1 個あたりの重量はほぼ一定である(図 1-1-2-1)ことから、フンの数を摂食量の指標として、フンの数を 1 日毎に数えた(図 1-1-2-2)。その結果、AKHR のノックダウン群において、メス(図 1-1-2-2 (A))は投与後 2-7 日後、オス(図 1-1-2-2 (B))は投与後 3-4 日後に、コントロール個体と比較して、顕著に摂食量が増加した。その摂食量の増加は、メス、オスともに投与後 3 日目において最も顕著であった(メス: +71%、オス: +35%)。また、メスの AKHR のノックダウン群において、コントロール群と比較した摂食量の増加率が、投与後 3 日目以降は、時間の経過に伴い減少する傾向が見られた(図 1-1-2-2 (A))。

### 1-1-3 AKHR のノックダウン個体の摂食行動の解析\*

#### 1-1-3-1 フタホシコオロギの摂食行動観察方法の確立およびフタホシコオロギ成虫の摂食行動観察、摂食行動解析による摂食行動の周期性の解析\*

1-1-2 において、AKHR のノックダウンによって摂食量の増加が認められた。そこで、次に、AKHR のノックダウンが、行動レベルでどのような影響を与えるかを解析した。昆虫

の摂食行動の、行動レベルでの観察および解析は、フタホシコオロギと同じ直翅目昆虫であるトノサマバッタを中心に行われ、摂食行動に周期性が存在することが見出されている<sup>10)</sup>。また、永田らによって、カイコ幼虫を用いて摂食行動に周期性が存在することが見出されている<sup>17)</sup>。私は、フタホシコオロギを用いて同様の手法による研究を行うため、まず、フタホシコオロギの摂食行動の簡便な観察方法を確立した。それを用いた観察結果を基に、フタホシコオロギにおいても、摂食行動に周期性が存在するかを検討した。

フタホシコオロギ成虫の摂食行動観察は、図 1-1-3-1 (A, B)に示す方法で行った。ケージ内の手前側に餌(人工飼料)を置き、奥に水を含ませたティッシュペーパーを置き、各個体が自由に餌に到達できる状態で観察した。観察の際には、手前側にいる個体に注目することで、多くの個体の摂食行動を同時に観察することが可能である。

上記の観察方法を用いて、成虫のメスおよびオス個体の通常での摂食行動を 6 時間連続して観察した(図 1-1-3-1 (C))。その結果、各個体には、バラつきが見られるものの、摂食行動の頻度が高い時間と、そうでない時間が認められた。また、様々な時間の長さの gap (摂食以外の行動)が存在した。短いものは数秒間であり、長いものは数時間に及んだ。

昆虫における gap は、摂食時間中の gap (intra-meal gap)と、摂食と摂食との gap (inter-meal gap)の 2 種類が存在する。そこで、フタホシコオロギ成虫の摂食期の bout criterion を解析した。bout criterion とは、intra-meal gap と、inter-meal gap との境目となる時間である。昆虫には種特異的な bout criterion が存在することが知られている。フタホシコオロギ成虫の bout criterion を検討するために、図 1-1-3-1 (C)で示した摂食行動観察の結果をもとに、昆虫の摂食行動解析でよく用いられている log-survivor plot 解析を行った(図 1-1-3-2)。その結果、フタホシコオロギの平均の bout criterion は、メスが  $3.1 \pm 0.7$  分、オスが  $2.7 \pm 0.7$  分であった。これは、他の直翅目昆虫種の bout criterion とよく似ていた(表 1-1-3-1)。

次に、メス、オス、それぞれ約 3.1 分、約 2.7 分より長い gap を inter-meal gap と考え、inter-meal gap に規則性があるかどうか、つまり、摂食を開始するタイミングに周期性があるかどうかを解析した。inter-meal gap の分布が負の二項分布を示せば inter-meal gap に規則性がある、つまり、摂食を開始するタイミングに周期性があるとされる(実験の部を参照)。階級度数の  $\chi^2$  検定を行った結果、どの個体においても負の二項分布を示し、このことは、inter-meal gap の頻度が高い階級があることが示され、摂食を始めるまでのある一定の時間の長さが存在す

ることとなる(実験の部を参照)。すなわち、フタホシコオロギ成虫の摂食は時間的に規則的な周期性があることが明らかとなった。

さらに、1 回あたりの摂食時間の log-survivor plot 解析を行った(図 1-1-3-3)。1 回あたりの摂食時間についても、負の二項分布を示すかどうかを調べるために、階級度数の $\chi^2$ 検定を行った。その結果、どの個体においても負の二項分布を示し、フタホシコオロギ成虫の摂食時間には規則性が認められ、或る決まった長さの時間で摂食することが明らかとなった。

### 1-1-3-2 AKHR のノックダウン成虫個体の摂食行動の解析\*

次に、AKHR のノックダウン成虫個体について、1-1-3-1 の摂食行動観察および摂食行動解析の方法を用いて、AKHR のノックダウンが摂食行動にどのような影響を与えるかを解析した。摂食行動観察は、成虫メス、およびオスの AKHR-dsRNA 投与群、EGFP-dsRNA 投与群の計 4 群、各群 5 個体について、8 時間連続的に観察した。また、観察は、AKHR-dsRNA の投与により AKHR の mRNA の発現が顕著に抑制される、dsRNA 投与後 2、3 日目の 2 日間、計 16 時間行った(図 1-1-3-4、図 1-1-3-5)。その結果、各個体には、様々な長さの gap が存在したものの、メス、オスともに、AKHR-dsRNA の投与群は、コントロールである EGFP-dsRNA 投与群と比較して、長さの短い gap が、より多く存在していた。

次に、上記の摂食行動観察結果を用いて、gap について log-survivor plot 解析を行った(図 1-1-3-6、図 1-1-3-7)。その結果、メスの AKHR-dsRNA 投与群、メスの EGFP-dsRNA 投与群、オスの AKHR-dsRNA 投与群、オスの EGFP-dsRNA 投与群の各 4 群の平均の bout criterion の時間は、それぞれ  $1.9 \pm 0.8$  分、 $2.4 \pm 1.4$  分、 $2.7 \pm 1.2$  分、 $3.5 \pm 1.9$  分であり、メスの AKHR-dsRNA 投与群とメスの EGFP-dsRNA 投与群の平均の bout criterion の時間には、有意な差は認められなかった。オスについても同様に、有意な差が認められなかった。また、intermeal gap が負の二項分布を示すかを検討するため、階級度数の $\chi^2$ 検定を行った。その結果、どの個体においても負の二項分布を示し、AKHR のノックダウン個体およびコントロール個体の摂食行動は、規則的な周期性を有することが明らかとなった。

また、1 回あたりの摂食時間についても、同様に log-survivor plot 解析を行った(図 1-1-3-8、図 1-1-3-9)。1 回あたりの摂食時間についても gap の解析と同様に、負の二項分布を示すか



を階級度数の $\chi^2$ 検定により検討した。その結果、どの個体においても負の二項分布を示し、AKHR のノックダウン個体およびコントロール個体の摂食時間には規則性が存在する、すなわち決まった長さの摂食時間の存在が明らかとなった。

ところで、本実験の gap についての log-survivor plot 解析において、intermeal を示すプロット、つまりグラフの bout criterion の時間よりも長い時間のプロットに着目すると、メス、オスどちらにおいても、AKHR-dsRNA 投与群のプロットが EGFP-dsRNA 投与群のプロットと比較して、より短時間側にシフトしていた(図 1-1-3-8、図 1-1-3-9)。そこで、AKHR-dsRNA 投与群および EGFP-dsRNA 投与群のプロットをメス、オス毎に 1 つのグラフに重ね合わせた(図 1-1-3-10 (A))。その際、各個体のプロットの縦軸の値の最大値を同一の相対値として補正した。その結果、メス、オスどちらにおいても、AKHR-dsRNA 投与群のプロットは、EGFP-dsRNA 投与群のプロットと比較して、より短時間側にシフトしていた。すなわち、AKHR のノックダウンにより、コントロールと比較して intermeal の gap の時間が短縮したことが明らかとなった。

さらに、1 回あたりの摂食時間についてのプロットについても、gap についての解析と同様に、AKHR-dsRNA 投与群および EGFP-dsRNA 投与群のプロットをメス、オス毎に 1 つのグラフに重ね合わせた(図 1-1-3-10 (B))。その際、gap についての解析と同様に、各個体のプロットの縦軸の値の最大値を同一の相対値として補正した。その結果、メス、オスどちらにおいても、AKHR-dsRNA 投与群のプロットは、EGFP-dsRNA 投与群のプロットと比べ、分布に差が見られなかった。すなわち、AKHR のノックダウンによっては、コントロールと比較して 1 回あたりの摂食時間の長さは変化しないことが明らかとなった。

上記の摂食行動観察結果をもとに、メスの AKHR-dsRNA 投与群、メスの EGFP-dsRNA 投与群、オスの AKHR-dsRNA 投与群、オスの EGFP-dsRNA 投与群の各 4 群毎の、摂食間 gap の平均値(図 1-1-3-11 (A))、1 回あたりの摂食時間の平均値(図 1-1-3-11 (B))、摂食回数の平均値(図 1-1-3-11 (C))、合計摂食時間の平均値(図 1-1-3-11 (D))を算出した。その結果、メス、オスともに、AKHR-dsRNA 投与群では、コントロールと比較して、顕著な摂食間 gap の減少と、摂食回数の増加、およびそれに伴う合計摂食時間の増加が認められた。一方で、1 回あたりの摂食時間には、有意な差が認められなかった。以上の結果をまとめると、AKHR のノックダウンによる影響は、摂食頻度が増加するものの、その一方で、1 回の摂食の時

間は変わらないことが明らかとなった。

#### 1-1-4 AKHR のノックダウン個体の運動活性の解析

AKH は、脂質などの栄養分を体液中に動員させる活性を有するため、その発見当初から、トノサマバッタの長距離飛翔に代表されるような、昆虫の高い飛翔活性(flight activity)に関与することが知られていた<sup>87)</sup>。さらに近年、飛翔行動が見られない昆虫種である、カメムシの一種 *Pyrrhocoris apterus* において、AKH の投与実験により、体液中の AKH の増加が運動活性 (locomotor activity) の増加に寄与することも明らかにされた<sup>88)</sup>。また、フタホシコオロギについても、AKH の投与により体液中の脂質が顕著に増加し、その増加とほぼ同時に運動活性の増加が観察されることが報告されている<sup>89,90)</sup>。このことから、本論文研究で用いている、AKHR ノックダウン個体は、AKH シグナリングの欠損により、運動活性が変化している可能性が考えられる。また、1-1-3 で見られた、AKHR のノックダウンによる摂食頻度の増加は、運動活性の変化の影響を受けた結果であるとも考えられる。

そこで、AKHR のノックダウン個体について、運動活性を評価した。その方法としては、既にフタホシコオロギの運動活性の評価を行っていた文献に従った<sup>90)</sup>。具体的には、15.6 cm × 10.8 cm × 6 cm の容器の底面に、底面を 6 等分するような線を引き、10 分間あたりの、その線を個体が通過した回数を運動活性の指標とした(図 1-1-4 (A))。その結果、コントロール個体として用いた、EGFP のノックダウン個体および、dsRNA の代わりに水を投与した個体は、合成したフタホシコオロギ AKH (図 S2-1 (A))の投与によって、有意な運動活性の増加が見られた(図 1-1-4 (B))。これは、先行研究の結果と一致する結果であった<sup>89,90)</sup>。AKHR のノックダウン個体に関しては、コントロール個体と比較して、有意な運動活性の減少が見られ、かつ、AKH の投与による、運動活性の有意な増加も見られなかった(図 1-1-4 (B))。これらの結果から、AKHR のノックダウンによる AKH シグナリングの減弱は、AKH の投与による影響とは逆に、運動活性の減少をもたらすと考えられた。また、AKHR のノックダウン個体は、少なくとも、AKH の、運動活性の増加を促すようなシグナルを十分遮断しているということが示唆される。

## 1-2 まとめと考察

### フタホシコオロギの AKHR の cDNA クローニングに関して

本章では、フタホシコオロギの AKH の制御機構が摂食行動にどのような影響を与えるかを解析した。そのために、まず、フタホシコオロギの AKHR の cDNA クローニングを行った(図 S1-1 (A, B))。クローニングしたフタホシコオロギの AKHR は他の昆虫種の AKHR と、アミノ酸配列上、高い相同性を有していた(図 S1-1 (C))。系統樹による解析の結果、他の昆虫種の AKHR と同じグループに属する(図 S1-1 (D))ことから、クローニングしたフタホシコオロギの AKHR は他の昆虫種の AKHR と同様、AKH をリガンドとする受容体として機能すると考えられた。また、フタホシコオロギの AKHR の mRNA は、脂肪体特異的に発現が認められた(図 S1-1 (E))。この結果は、AKH が脂肪体を主な標的器官としている<sup>50)</sup>ことと一致している。ショウジョウバエ<sup>67)</sup>やワモンゴキブリ<sup>60)</sup>においても、AKHR の mRNA は主に脂肪体で発現している。しかし、AKHR は脂肪体以外の組織にも発現している種がいることが明らかとなっている。例えば、ショウジョウバエの AKHR は味覚神経にも発現しており<sup>67)</sup>、ワモンゴキブリの AKHR は脳や神経系においても発現している<sup>60)</sup>。このことから、AKH は脂肪体に作用しエネルギー代謝を制御する以外の機能を持つことも考えられるが、その詳細は明らかにされていない。

現在までに、多くの昆虫種において、1 昆虫種につき数種類の AKH が同定されている。一方、これまで、AKHR は昆虫種毎に 1 種類しか同定されていなかった。しかし、近年、ネッタイシマカにおいて、2 種類の AKHR (Aedae-AKHR-I、Aedae-AKHR-II)の存在が明らかになっている<sup>65)</sup>。Aedae-AKHR-I と Aedae-AKHR-II はスプライシングバリエントにより、脱感作に関わるとされる GPCR の C 末端領域のアミノ酸配列に違いが見られ、それぞれの発現パターンもわずかに異なる<sup>65)</sup>。このことから、Aedae-AKHR-I と Aedae-AKHR-II は異なる機能を有していることも考えられる。本論文においては、クローニングしたフタホシコオロギの AKHR は 1 種類しか見出していないが、複数種の AKHR が存在する可能性も考えられる。

### AKHR のノックダウンによる、発現抑制効果に関して

クローニングしたフタホシコオロギの AKHR の機能を解析するために、RNAi 法を用いた。

RNAi 法は、特定の遺伝子の発現を抑制させる効果的な手法であり、既に多くの昆虫種に対して用いられている。フタホシコオロギにおいても、その効果が確認されている<sup>73, 74, 91)</sup>。フタホシコオロギを用いた RNAi 法は、dsRNA の注射による投与、および、経口投与の 2 通りの方法によって効果が確認されている<sup>74)</sup>が、第一章における AKHR のノックダウンにおいては、AKHR-dsRNA の経口投与による方法を用いた。なお、その後、AKHR-dsRNA の注射による投与についても効果を確認したところ、mRNA の発現抑制効果は、注射による投与の方が大きいこともわかった(データ非掲載)。

### AKHR のノックダウン個体の絶食耐性の増強に関して

フタホシコオロギの AKHR のノックダウンにより、絶食耐性の顕著な増強が認められた。この結果は、キイロショウジョウバエにおける、AKHR のノックアウト個体、および AKH 産生細胞を欠失させた個体の表現型と一致した<sup>67, 68, 70)</sup>。また、これらの変異体個体は、脂肪体に貯蔵されるエネルギー物質である、グリコーゲンや Triacylglycerol (TAG) の過剰な蓄積が見られる<sup>67, 68)</sup>。このことは、AKH の制御機構の欠損により、貯蔵エネルギーの分解が抑えられ、その結果、外からエネルギーを取り込むことができない絶食条件下において、貯蔵エネルギーをより長い期間利用できることと解釈できる。本章の結果のとおり、フタホシコオロギにおいても同様の表現型が見られたことから、ショウジョウバエと同様、AKHR のノックダウンにより、体液中に動員される糖質および脂質レベルの減少、および、貯蔵エネルギーの蓄積量の増加が見られることが考えられる。この点に関しては、本論文の第 2 章において、AKH の制御機構と、体液中および脂肪体内の脂質、糖質レベルとの関連性を解析した。

### AKHR のノックダウン個体で見られた摂食頻度の増加に関して

フタホシコオロギへの AKHR-dsRNA 投与後 2、3 日目において、摂食量の増加が顕著に見られたことから、投与後 2、3 日目に摂食行動の観察を行った(図 1-1-3-4、図 1-1-3-5)。その結果、AKHR のノックダウン個体において、摂食周期の短縮が認められた(図 1-1-3-10、図 1-1-3-11)。この要因について、AKH の作用機構の面から考えると、体内のエネルギー代謝の変動による、体液中の栄養状態、あるいは脂肪体の貯蔵エネルギーの変動が要因であ

る可能性が考えられる。トノサマバッタにおいて、体液中の栄養分の濃度が、摂食による栄養分の摂取量を決定づける一つの要因として示唆されており<sup>36)</sup>、摂食行動は栄養分の濃度を反映すると解釈できる。このような状況を考慮すると、AKHR のノックダウンによる、体液中の栄養分の濃度の減少が、摂食行動を開始させる閾値を下げている可能性が考えられる。逆に、AKH の連続的な投与によって、摂食量の減少傾向が見られ、連続投与開始後 4 日目には、コントロールと比較して有意な摂食量の減少が認められた(図 S2-1 (B))。この投与条件では、投与後 4 日目において体液中の脂質、糖質の標準値(basal titre)の増加が見られている<sup>92)</sup>。つまり、体液中の栄養分の濃度が増加すると、摂食行動が抑制される可能性が考えられる。以上を合わせて考えると、AKH に制御される体液中の栄養分の濃度は、昆虫の体内に存在する栄養要求性に働きかけ、摂食行動を開始させる閾値に影響を与えると考えられる。

一方で、1 回あたりの摂食時間の長さは、摂食を終了させる行動と関連性があると考えられる。フタホシコオロギの AKHR のノックダウン群において、コントロール群と比較して、1 回あたりの摂食時間に変動は見られなかったことから(図 1-1-3-8、図 1-1-3-9)、摂食を終了させる行動は、AKH による制御とは独立に制御されていると考えられる。摂食を終了させる行動を制御する要因の 1 つとして、容量依存性制御(volumetric control)が考えられる。トノサマバッタにおいて、摂食により生じる中腸の張りが、摂食行動を制御することが明らかになっている<sup>13)</sup>。

#### AKHR のノックダウンによる摂食行動に関する表現型の変化における、成虫と終齢幼虫との相違について

成虫のフタホシコオロギで認められた、AKHR のノックダウンによる絶食耐性の増強、および摂食量の増加は、終齢幼虫では認められなかった(図 S2-2)。その理由として、成虫と終齢幼虫では、AKH のエネルギー代謝に関わる機能が同じではない可能性が考えられる。実際、フタホシコオロギの成虫と終齢幼虫は、ともに、AKH の投与により、糖質と脂質が動員されることが知られているが、動員される糖質と脂質の量、あるいはそれらの動員効果の持続時間は、成虫と終齢幼虫では異なる<sup>93)</sup>。別の理由として、終齢幼虫では、AKH の制御機構自体が、摂食行動に影響を与えない可能性が考えられる。このことは、終齢幼虫

と成虫において、摂食の目的が異なることが関連しているかもしれない。具体的には、終齢幼虫は主に成長のために、成虫においては主に生殖のために、摂食により栄養分を得ていると考えることができ、その違いにより、それぞれの摂食の制御システム自体に相違がある可能性も考えられる。

第一章において、AKHの制御機構は摂食行動に影響を与えることを示した。AKHの内分泌的に主要な作用は、脂質、糖質等の栄養分の体液中への動員である。そこで、AKHの作用機構に関与する因子、および、体液中の栄養分との濃度と摂食行動との関連性を解析することを目的として、第二章では、AKHRのノックダウン個体について、体液中の脂質、糖質レベルに変動がみられるかどうかを解析した。

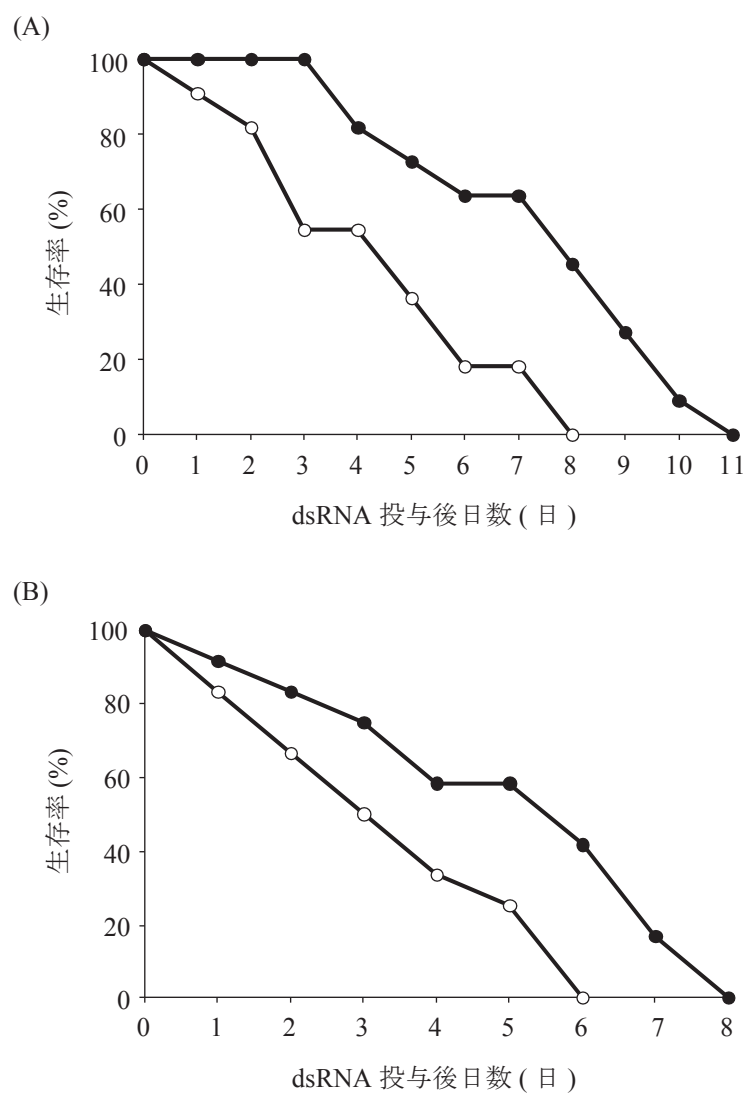


図 1-1. AKHR のノックダウン群の絶食耐性の解析。成虫脱皮 0 日目のメス (A) およびオス (B) に AKHR-dsRNA (●)、または EGFP-dsRNA (○) を投与後に、各個体を分け、絶食条件下で 1 日ごとの生存率を調べた。メス (A)、オス (B) どちらにおいても AKHR のノックダウン群はコントロール群と比較して絶食耐性が増強した (Wilcoxon signed-rank test,  $P < 0.05$ ,  $n = 12$ )。

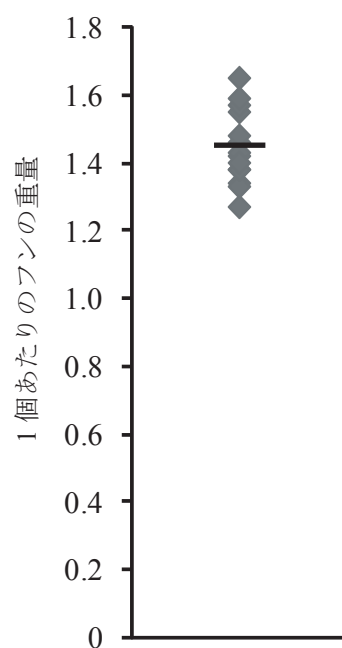


図 1-1-2-1. フタホシコオロギ成虫の 1 個あたりのフンの重量。フタホシコオロギの飼育ケージから、ランダムに 10 個ずつフンをサンプリングし、凍結乾燥後にその重量を計測した ( $n = 14$ )。1 個あたりのフンの重量の平均は、 $1.45 \pm 0.11$  mg であった。また、母平均の 95% 信頼区間は、1.38 mg から 1.51 mg であった。フタホシコオロギ成虫の 1 個あたりのフンの重量は、ほぼ一定であると考えられた。バーは平均値を示す。



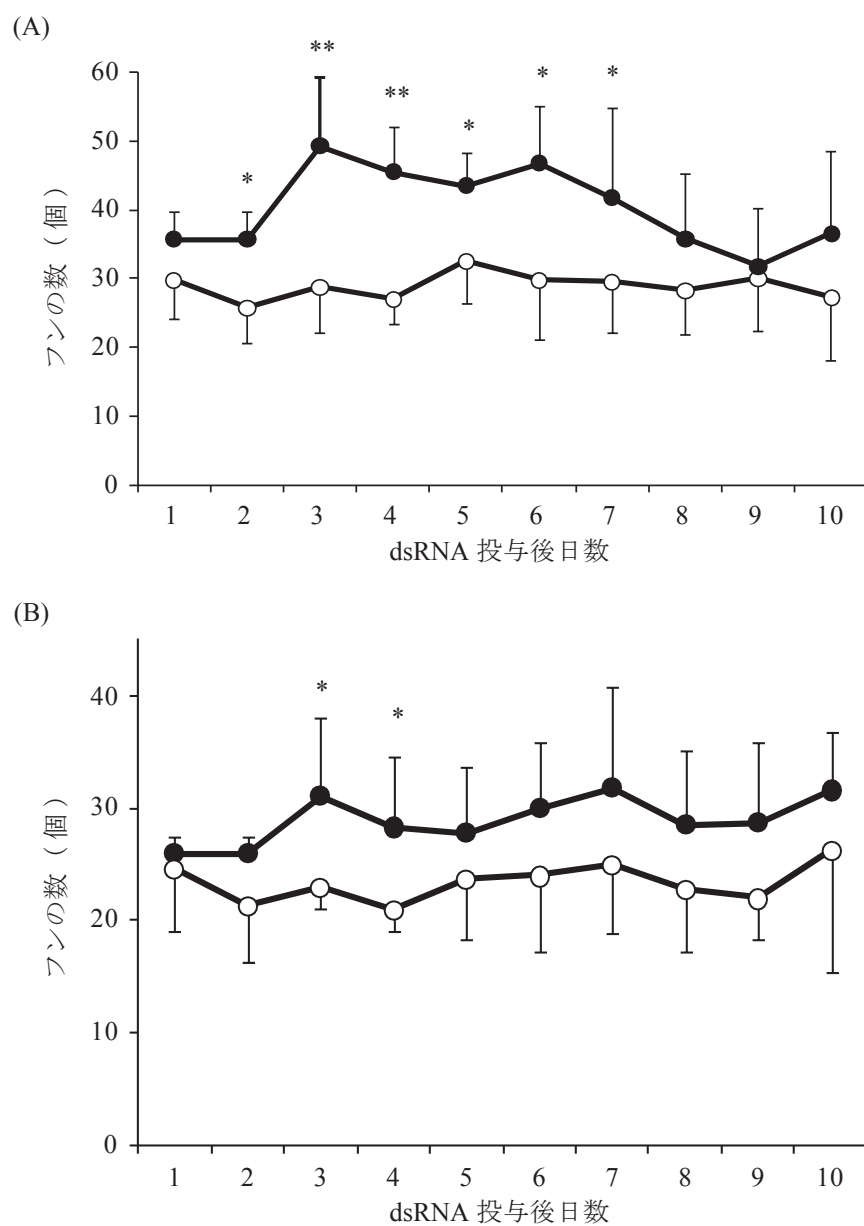
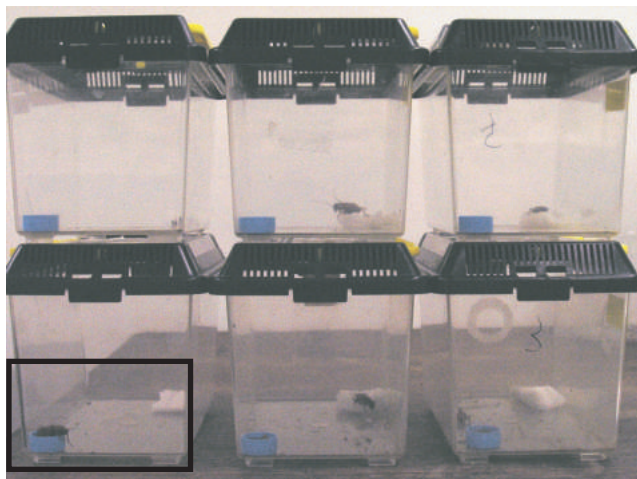
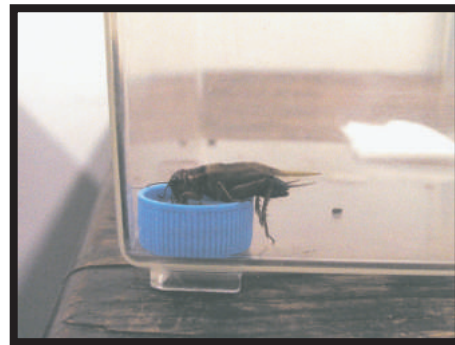


図 1-1-2-2. AKHR のノックダウン群の摂食量の解析。成虫脱皮後 0 日目のメス (A) およびオス (B) に AKHR-dsRNA (●) または EGFP-dsRNA (○) を投与後、1 日ごとにフンの数を調べ、摂食量の指標とした。アスタリスクは、コントロールに対して、有意な差が認められたことを示す (\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.005$ ; one-way ANOVA)。フンの数は、平均値  $\pm$  S.D. で示した ( $n = 5$ )。AKHR ノックダウン群はコントロール群と比較して摂食量の増加が認められた。

(A)



(B)



(C)

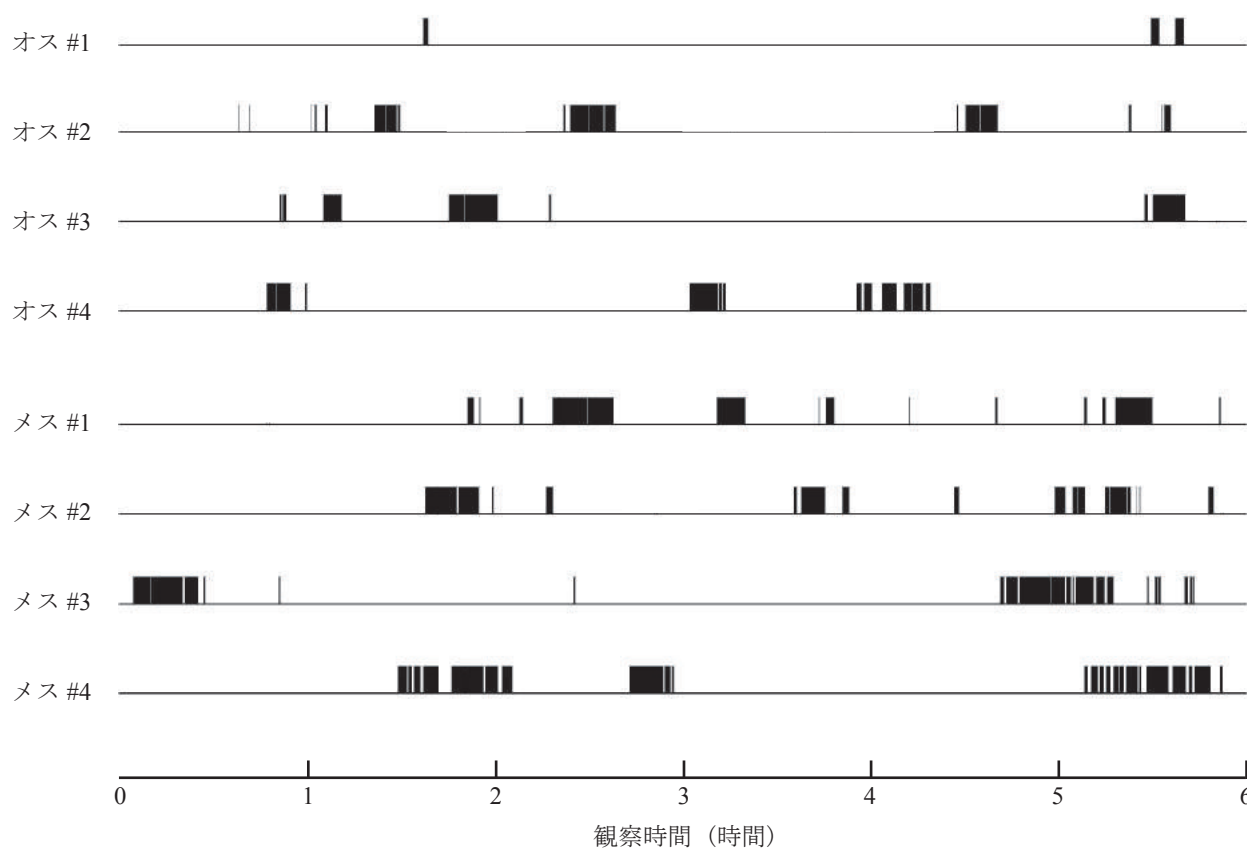


図 1-1-3-1. フタホシコオロギの摂食行動の観察方法と、通常摂食の成虫個体における観察結果。(A, B) フタホシコオロギ個体をそれぞれ 17 cm × 10 cm × 12 cm のケージに入れ、手前側に餌を置き、奥に水を含ませたティッシュペーパーを置き、各個体が自由に餌に到達できる状態で摂食行動を観察した (A)。(A) の写真の左下 (拡大写真: (B)) のような状態の個体を、摂食している個体とした。(C) フタホシコオロギ成虫の摂食行動パターン。観察は、6 時間連続して行った。黒の四角で示した部分は摂食している時間を示し、それ以外の部分は摂食以外の行動を示す。

表 1-1-3-1. 直翅目昆虫の bout criterion

昆虫種	成長段階	餌	bout criterion ( 分 )	引用文献
トノサマバッタ	5 齢幼虫	小麦幼植物	4 (2-6)	83
トノサマバッタ	5 齢幼虫	人工飼料	4	22
トノサマバッタ	成虫	人工飼料	4	84
サバクトビバッタ	5 齢幼虫	人工飼料	4	85
アメリカイナゴ	5 齢幼虫	小麦幼植物	2-9	86

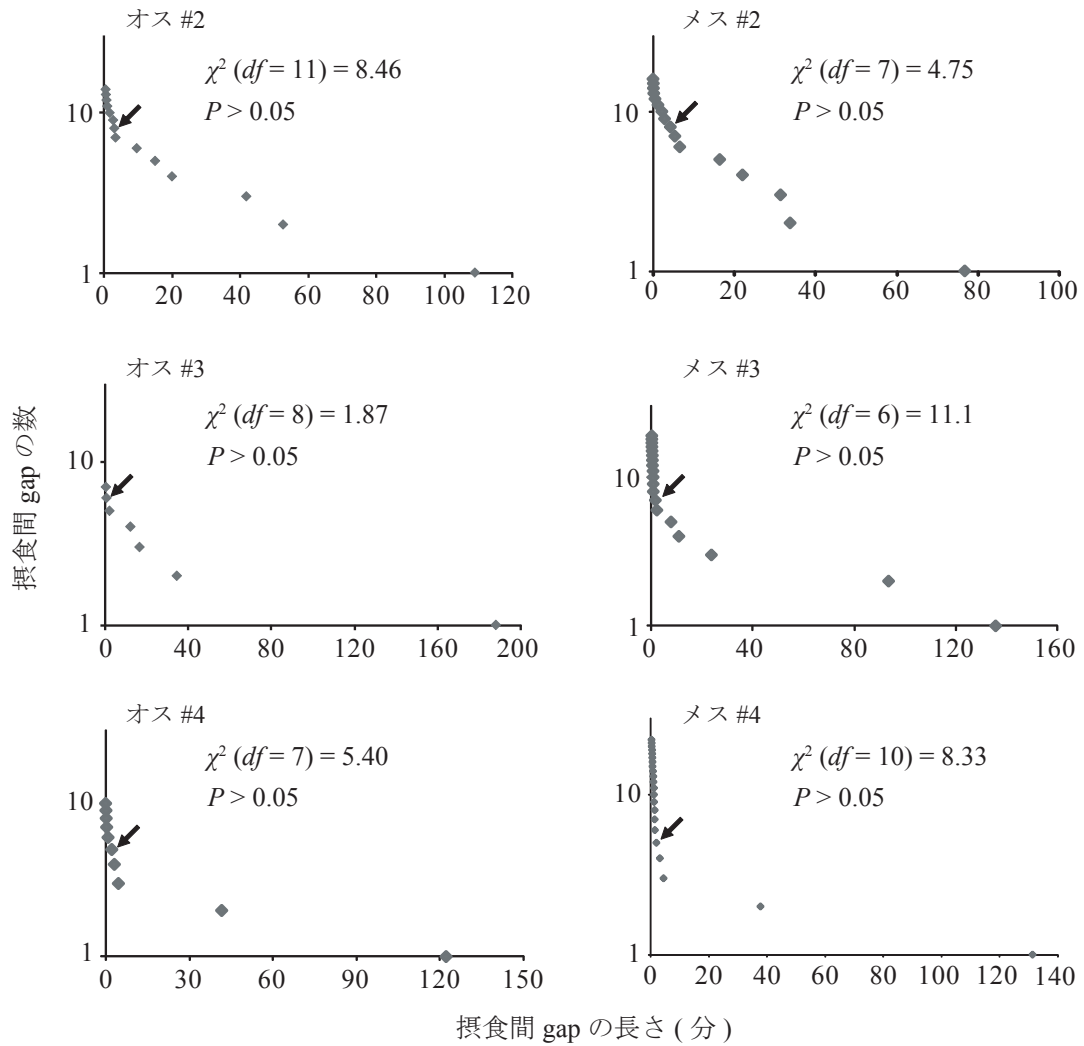


図 1-1-3-2. フタホシコオロギ成虫個体の摂食間 gap の log-survivor plots。縦軸が gap の番号を、横軸が gap の長さを示し、一つの点が一つの gap を示す。矢印は、bout criterion の位置を示し、その平均時間はメスが  $3.1 \pm 0.7$  分、オスが  $2.7 \pm 0.7$  分であった。全ての個体の intermeal gap は負の二項分布していた ( $P > 0.05$ )。df は自由度を示しており、gap の時間を階級度数の  $\chi^2$  検定を行った。その際の自由度における  $\chi^2$  値を併記した。

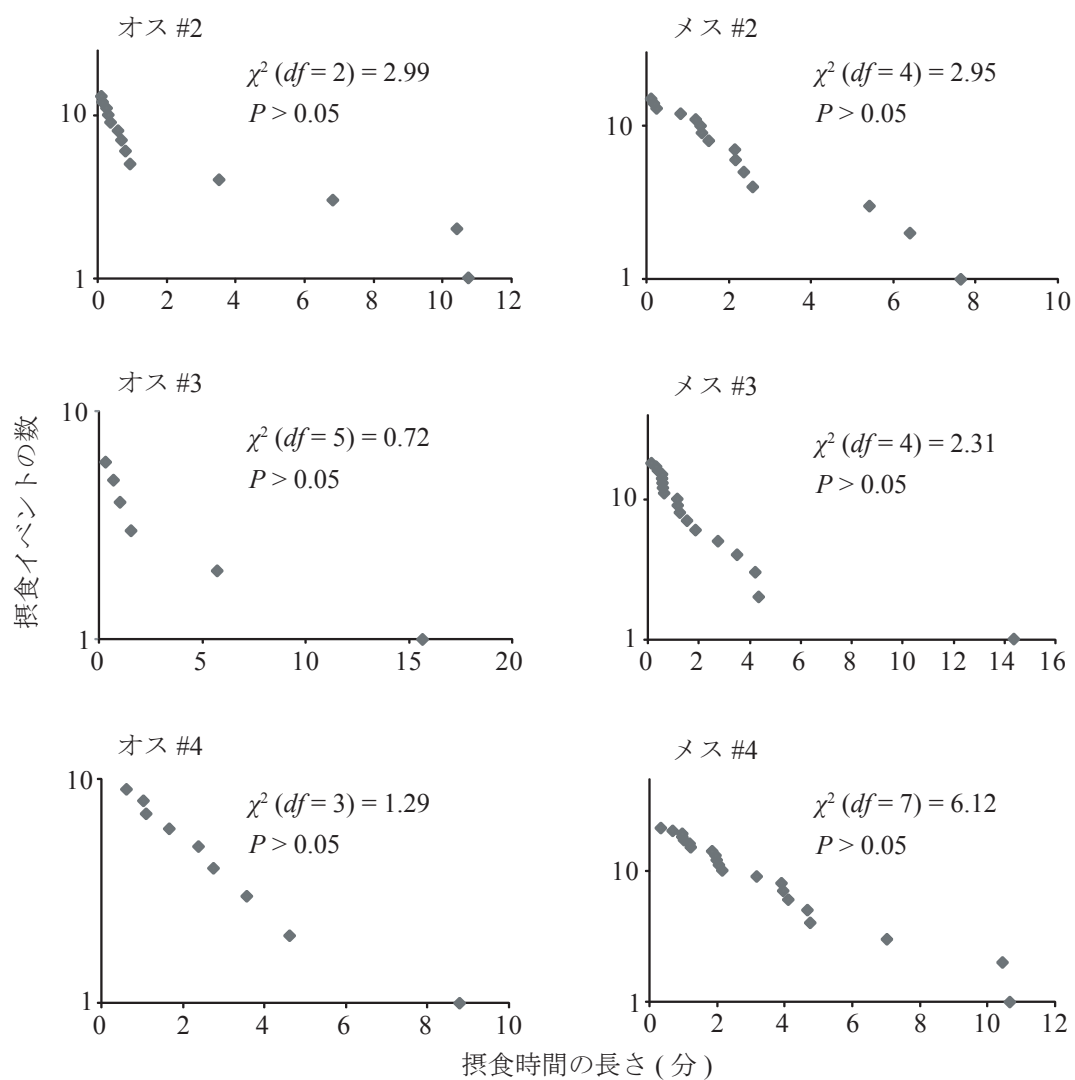
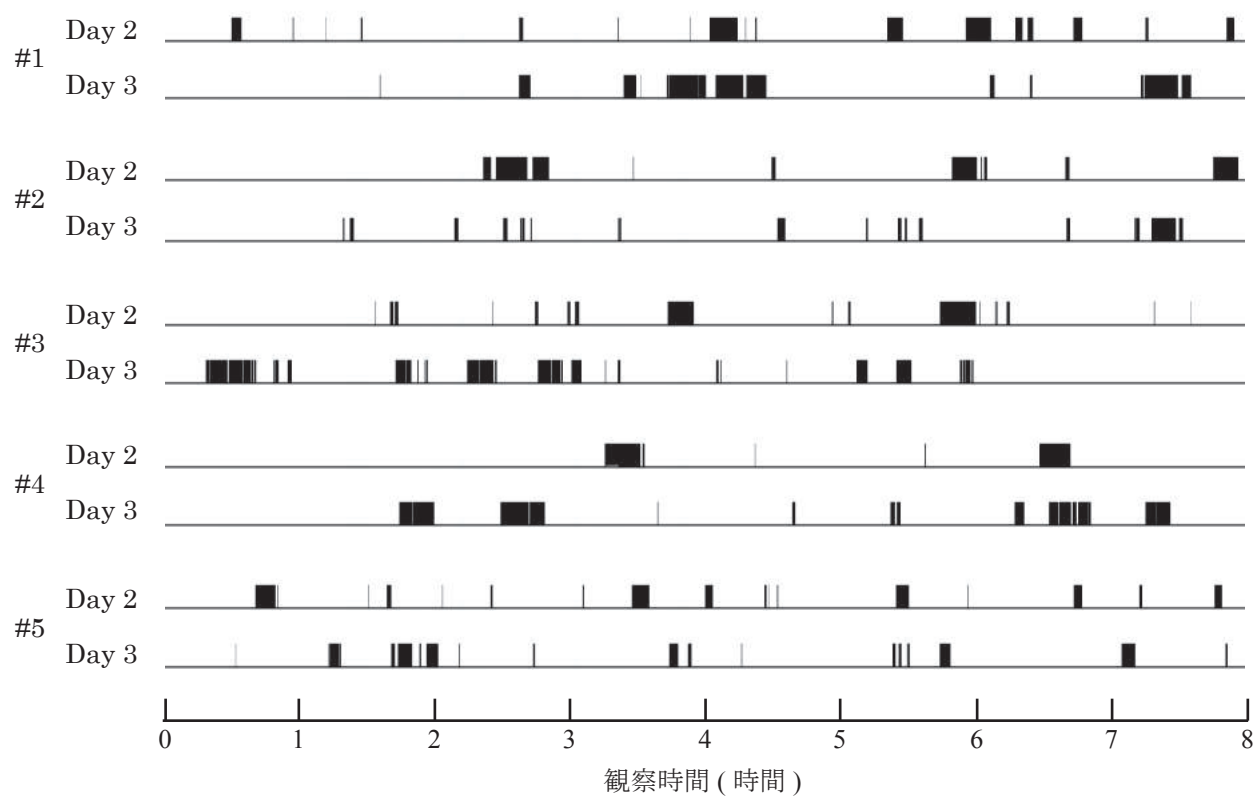


図 1-1-3-3. フタホシコオロギ成虫個体の摂食時間の log-survivor plots。縦軸は摂食イベントの番号を、横軸は摂食時間の長さを示し、一つの点が一つの摂食時間を示す。全ての個体の摂食時間は負の二項分布を示していた ( $P > 0.05$ )。df は自由度を示しており、gap の時間を階級度数の  $\chi^2$  検定を行った。その際の自由度における  $\chi^2$  値を併記した。

A



B

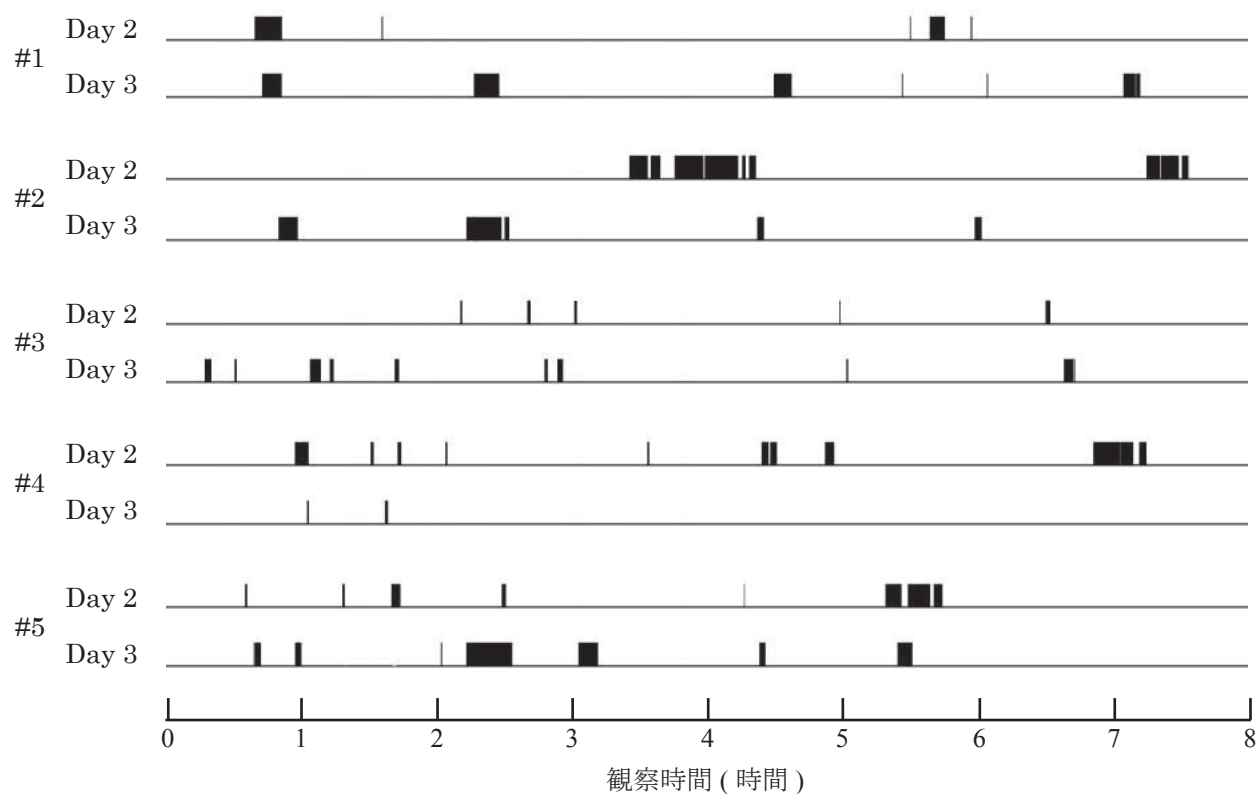
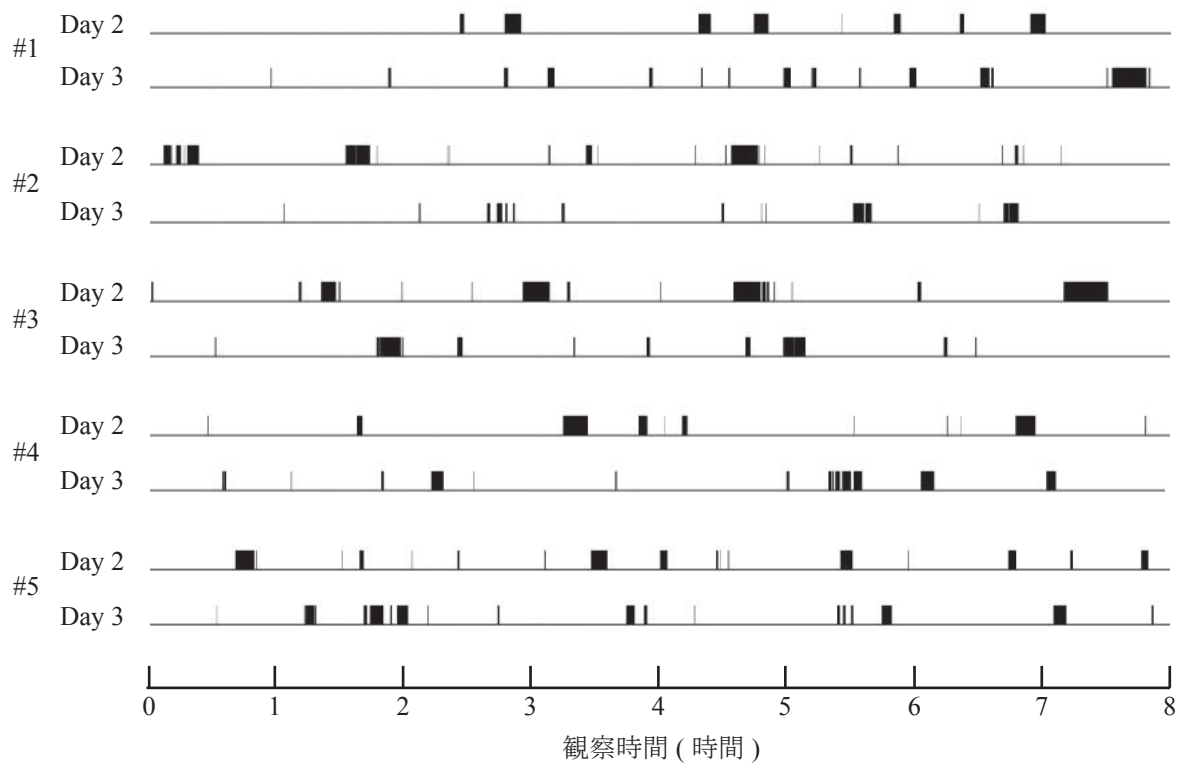


図 1-1-3-4. AKHR-dsRNA (A)、または EGFP-dsRNA (B) を投与したフタホシコオロギのメス成虫の摂食行動パターン。観察は、dsRNA 投与後 2、3 日目に各 8 時間連続して行った。黒の四角で示した部分は摂食している時間を示し、それ以外の部分は摂食以外の行動を示す。# 番号は各群における別々の個体を示す。

(A)



(B)

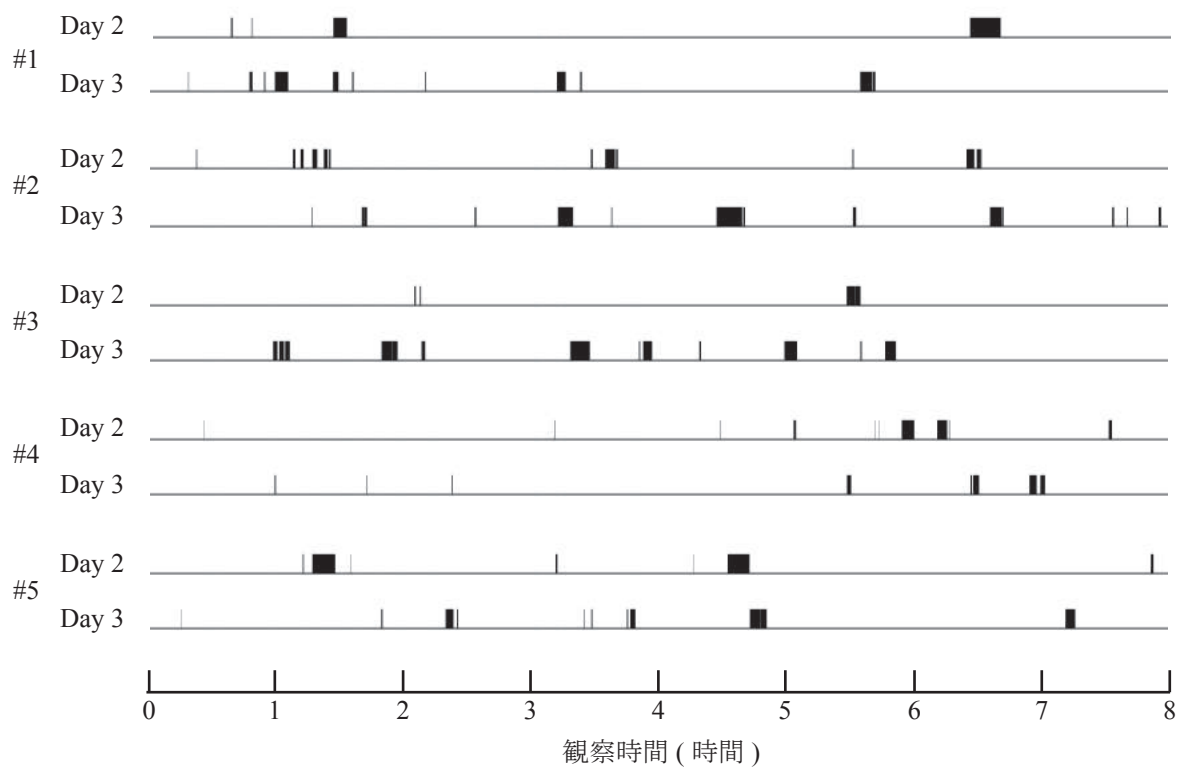


図 1-1-3-5. AKHR-dsRNA (A)、または EGFP-dsRNA (B) を投与したフトホシコオロギのオス成虫の摂食行動パターン。観察は、dsRNA 投与後 2、3 日目に各 8 時間連続して行った。黒の四角で示した部分は摂食している時間を示し、それ以外の部分は摂食以外の行動を示す。# 番号は各群における別々の個体を示す。

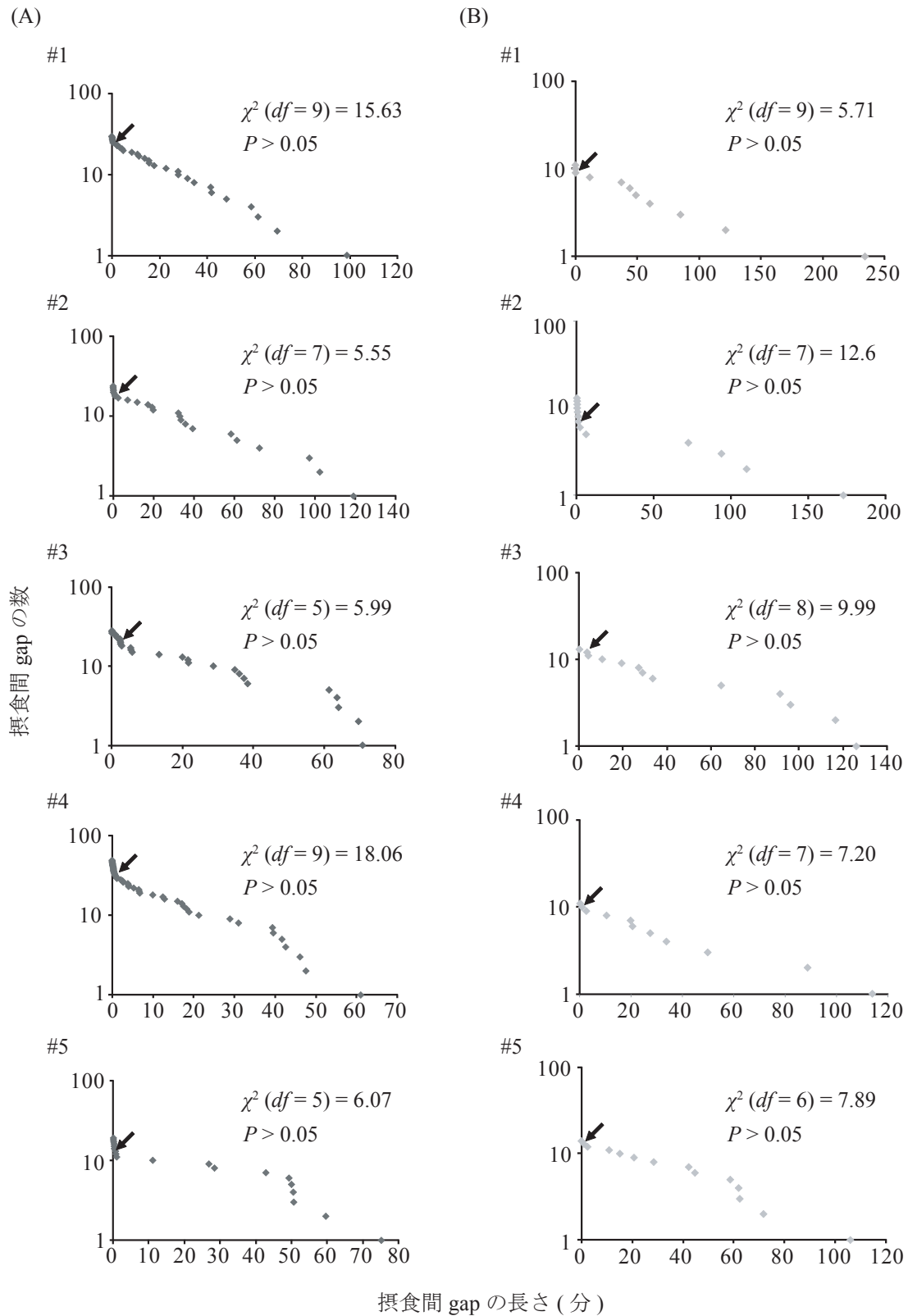


図 1-1-3-6. AKHR-dsRNA (A)、または EGFP-dsRNA (B) を投与したフトホシコオロギのメス成虫の摂食間 gap の log-survivor plots。縦軸が gap の番号を、横軸が gap の長さを示し、1 つの点が 1 つの gap を示す。矢印は、bout criterion の位置を示す。AKHR-dsRNA 投与群、EGFP-dsRNA 投与群の平均の bout criterion の時間は、それぞれ  $1.9 \pm 0.8$  分、 $2.4 \pm 1.4$  分であり、両群の bout criterion の時間に有意な差は認められなかった。全ての個体の intermeal gap は負の二項分布を示した ( $P > 0.05$ )。df は自由度を示しており、gap の時間を階級度数の  $\chi^2$  検定を行った。その際の自由度における  $\chi^2$  値を併記した。



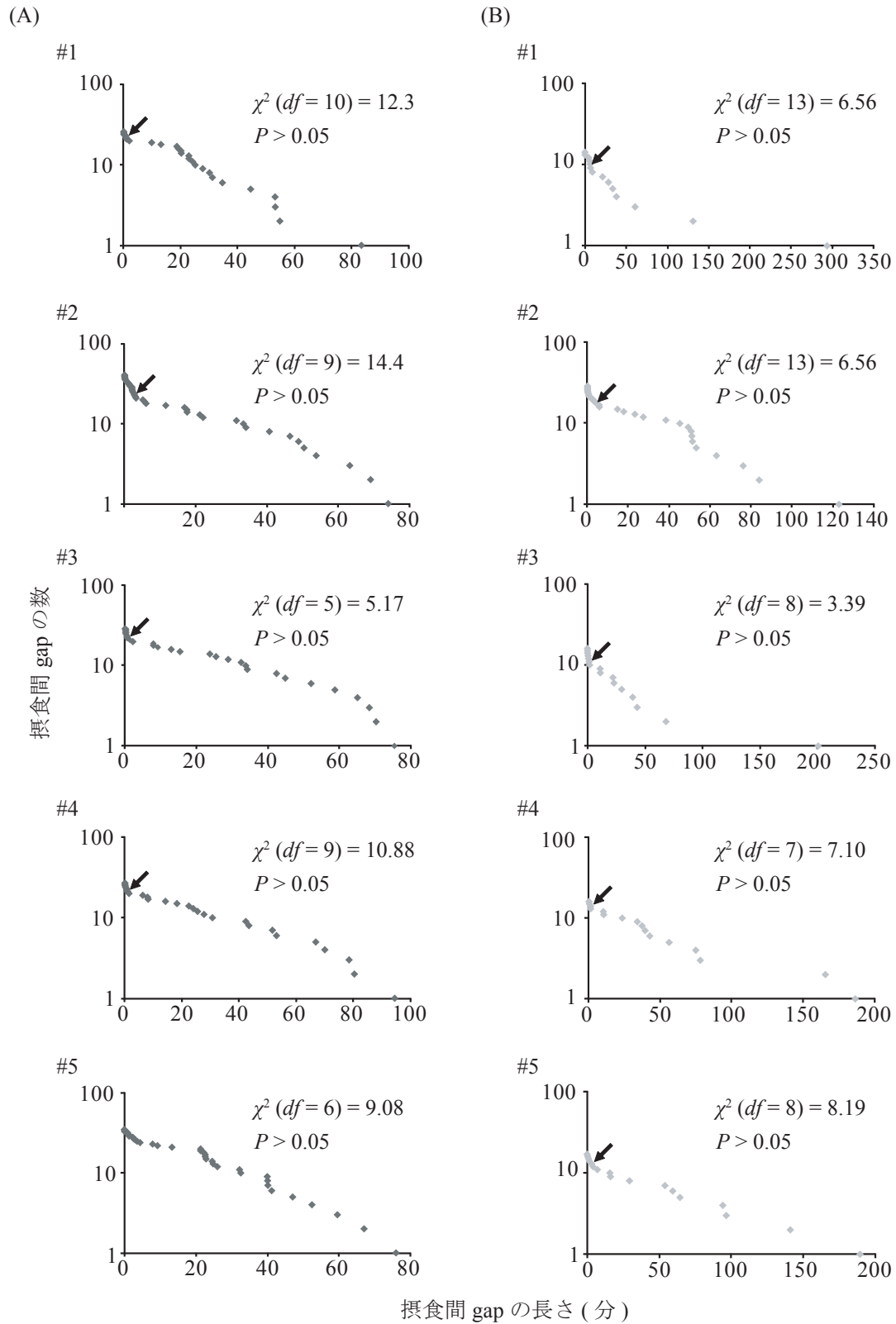


図 1-1-3-7. AKHR-dsRNA (A)、または EGFP-dsRNA (B) を投与したフトホシコオロギのオス成虫の摂食間 gap の log-survivor plots。縦軸が gap の番号を、横軸が gap の長さを示し、1 つの点が 1 つの gap を示す。矢印は、bout criterion の位置を示す。AKHR-dsRNA 投与群、EGFP-dsRNA 投与群の平均の bout criterion の時間は、それぞれ  $1.9 \pm 0.8$  分、 $2.4 \pm 1.4$  分であり、両群の bout criterion の時間に有意な差は認められなかった。全ての個体の intermeal gap は負の二項分布を示した ( $P > 0.05$ )。df は自由度を示しており、gap の時間を階級度数の  $\chi^2$  検定を行った。その際の自由度における  $\chi^2$  値を併記した。

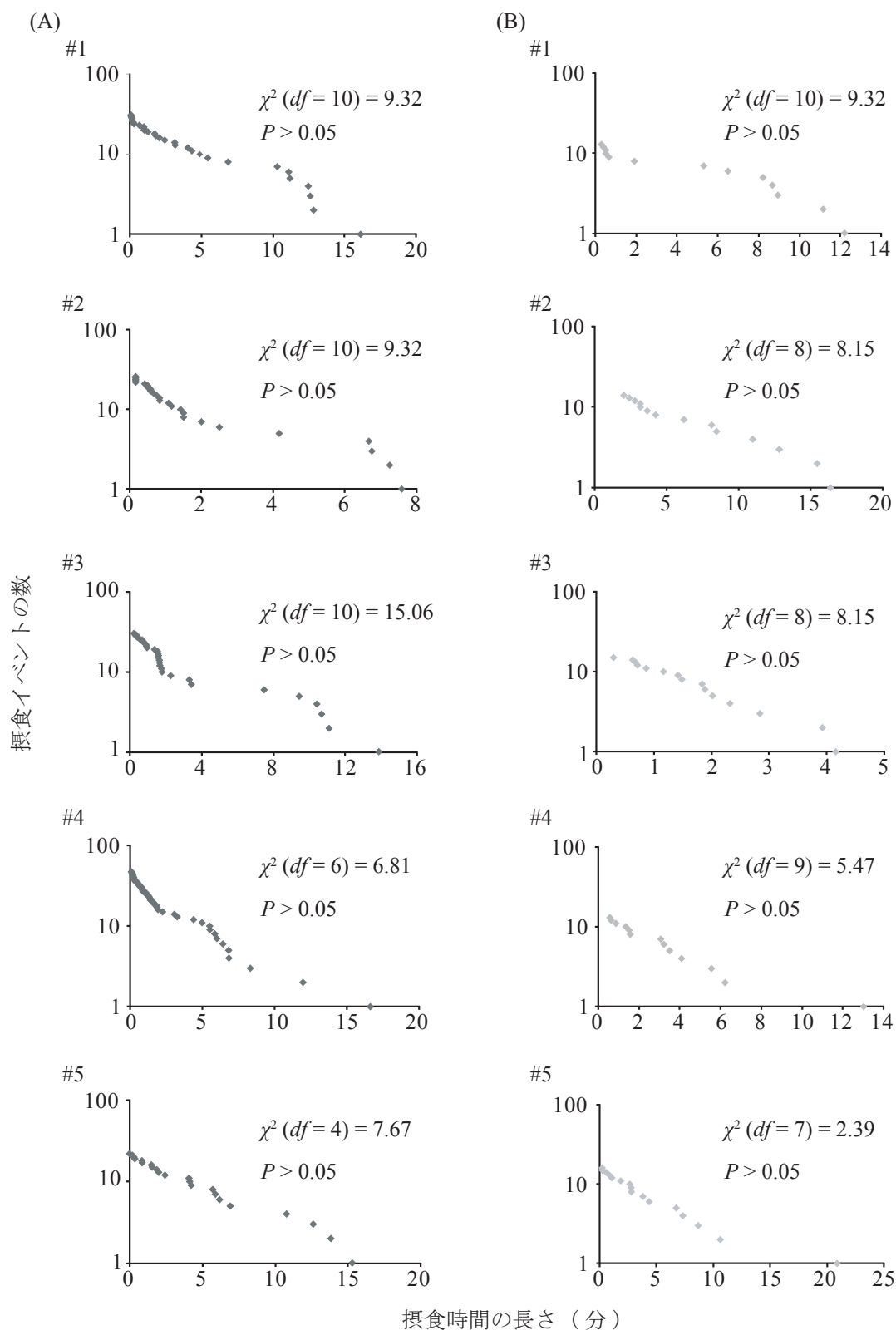


図 1-1-3-8. AKHR-dsRNA (A)、または EGFP-dsRNA (B) を投与したフタホシコオロギのメス成虫の摂食時間の log-survivor plots。縦軸が摂食イベントの番号を、横軸が摂食の長さを示し、1つの点が1つの摂食イベントを示す。全ての個体の摂食時間は負の二項分布を示した ( $P > 0.05$ )。dfは自由度を示しており、摂食時間を階級度数の  $\chi^2$  検定を行った。その際の自由度における  $\chi^2$  値を併記した。

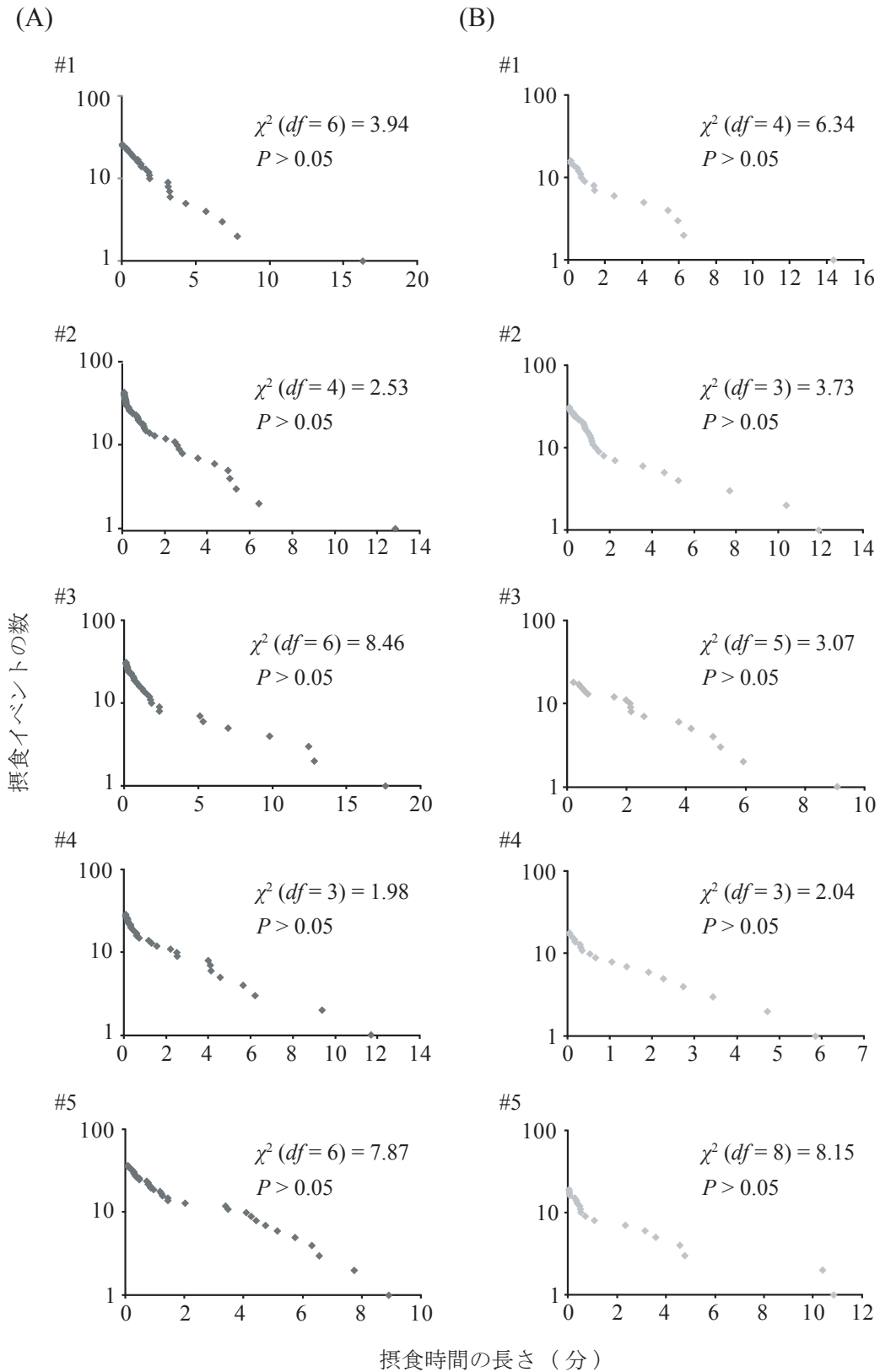
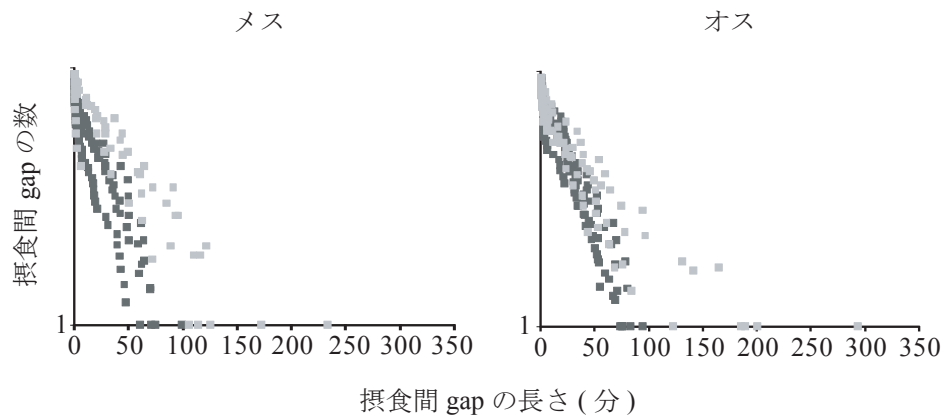


図 1-1-3-9. AKHR-dsRNA (A)、または EGFP-dsRNA (B) を投与したフタホシコオロギのオス成虫の摂食時間の log-survivor plots。縦軸が摂食イベントの番号を、横軸が摂食の長さを示し、1つの点が1つの摂食イベントを示す。全ての個体の摂食時間は負の二項分布を示した ( $P > 0.05$ )。df は自由度を示しており、摂食時間を階級度数の  $\chi^2$  検定を行った。その際の自由度における  $\chi^2$  値を併記した。

(A)



(B)

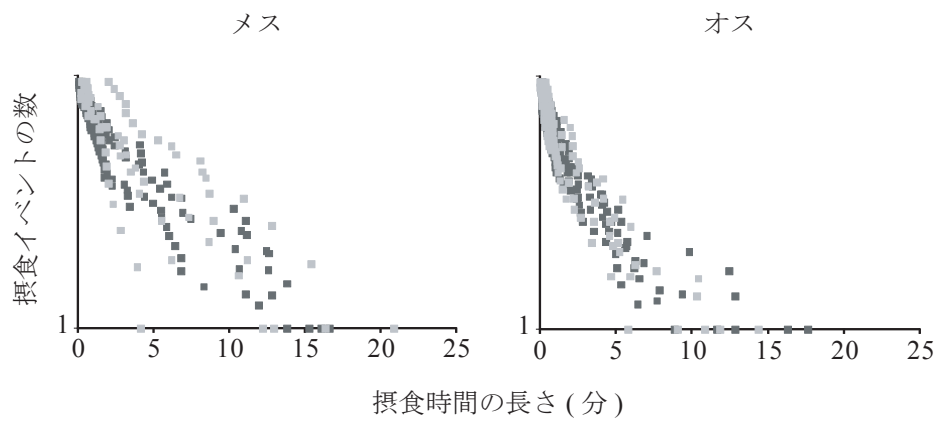


図 1-1-3-10. AKHR-dsRNA (濃灰色) または EGFP-dsRNA (薄灰色) を投与したフタホシコオロギ成虫個体の摂食間 gap の log-survivorplot (A) および摂食時間の log-survivor plot (B) をそれぞれメス、オス毎に重ねたグラフ。(A) のグラフの縦軸が gap の番号を、横軸が gap の長さを示し、1 つの点が 1 つの gap を示す。(B) のグラフの縦軸は摂食の番号を、横軸は摂食時間の長さを示し、1 つの点が 1 つの摂食時間を示す。(A), (B) のそれぞれのグラフにおいて、各個体のプロットの縦軸の値の最大値を同一の相対値に補正した。AKHR-dsRNA 投与個体は摂食間 gap のプロットの分布がコントロールと比較して左側へのシフトが見られた。一方、摂食時間の長さのプロットの分布はコントロールと比較して差が見られなかった。

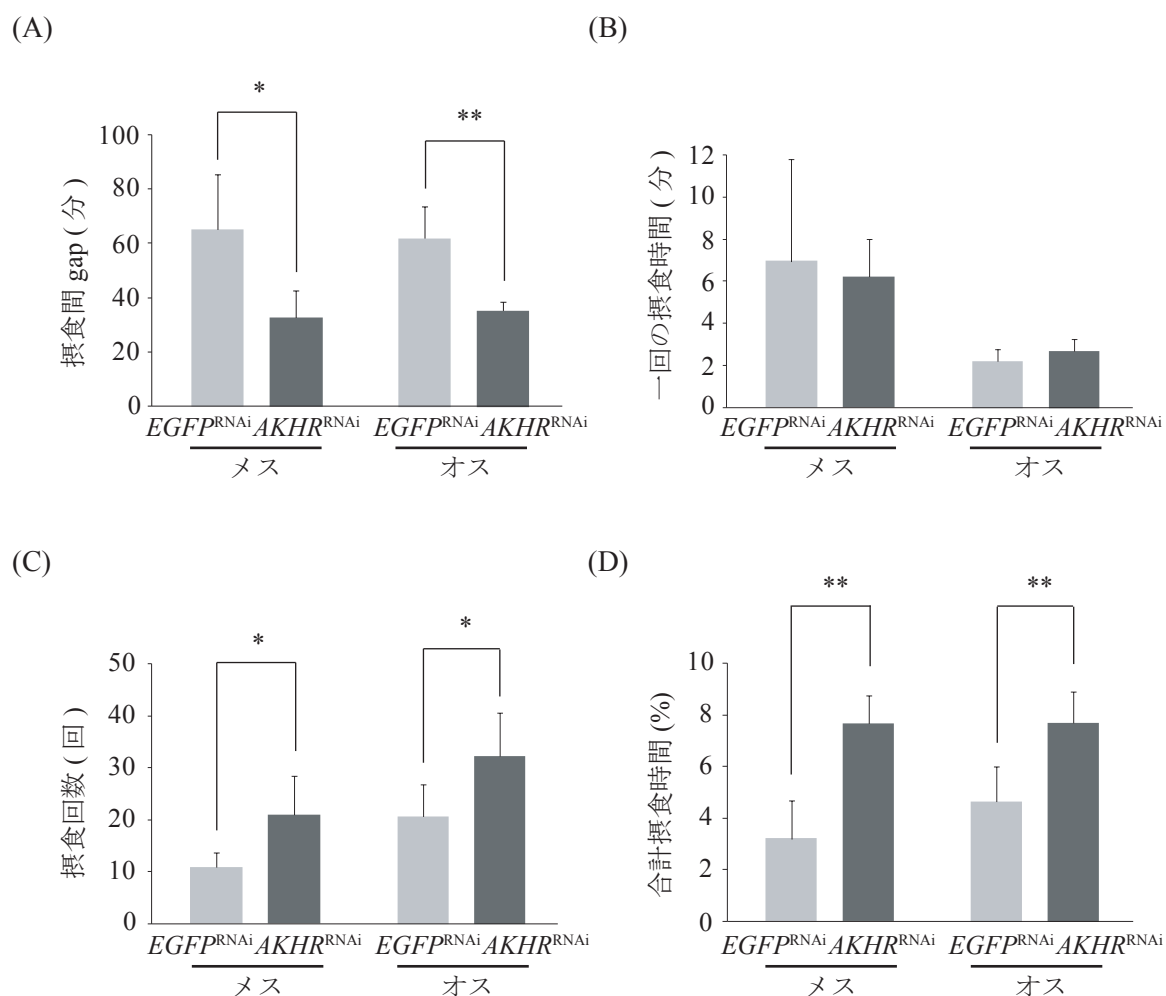
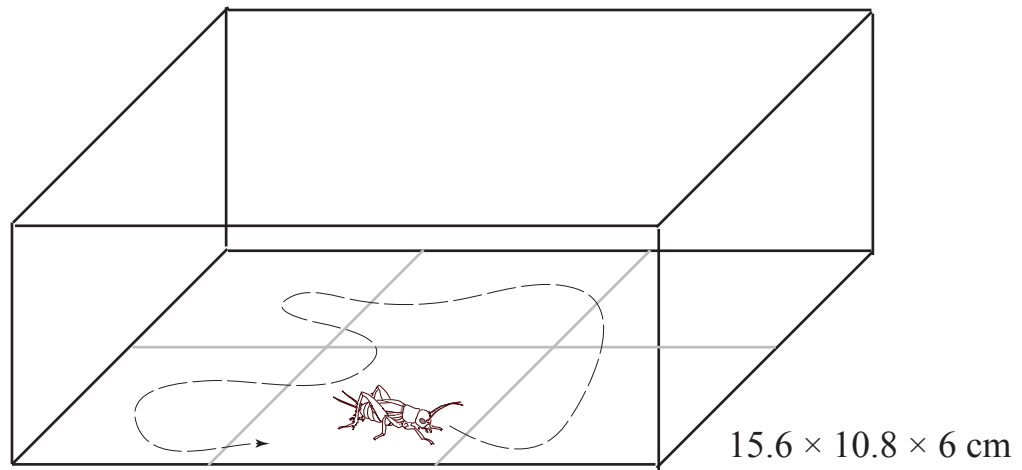


図 1-1-3-11. AKHR-dsRNA または EGFP-dsRNA を投与したフタホシコオロギのメス、オス成虫の摂食間 gap の時間の平均値 (A)、1 回の摂食時間の平均値 (B)、摂食回数の平均値 (C)、合計摂食時間の平均値 (D)。それぞれ平均値 + S. D. で示した (n = 5)。アスタリスクは、コントロールに対して、有意な差が認められたことを示す (\* $P < 0.05$ 、\*\* $P < 0.005$ ; one-way ANOVA)。AKHR-dsRNA 投与群は、メス、オス共に、コントロールと比較して摂食間 gap の減少、摂食回数の増加、およびそれに伴う合計摂食時間の増加が認められた。一方、1 回の摂食時間はコントロールと比較して有意な差が認められなかった (one-way ANOVA,  $P > 0.05$ )。

(A)



(B)

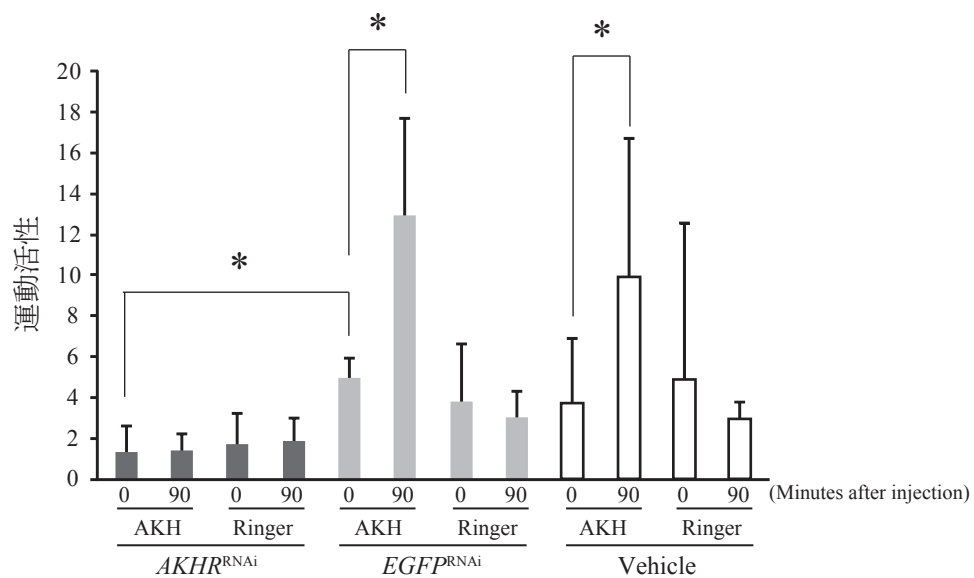


図 1-1-4. フタホシコオロギの運動活性の評価方法 (A) と、AKHR をノックダウンした成虫オス個体の運動活性 (B)。それぞれ平均値 ± S. D. で示した (n = 8)。アスタリスクは、コントロールに対して、有意な差が認められたことを示す (\* $P < 0.05$ ; Tukey's HSD test)。コントロール個体として用いた、EGFP のノックダウン個体および、dsRNA の代わりに水を投与した個体 (Vehicle) は、AKH の投与によって、有意な運動活性の増加が見られた。一方、AKHR のノックダウン個体は、EGFP のノックダウン個体と比較して、運動活性が有意に低下しており、かつ、AKH の投与による運動活性の増加も見られなかった。

## 第二章 AKHR のノックダウン個体における、体内の栄養状態の解析、および体内の栄養状態と摂食周期との関連性の解析

### 2-0 はじめに

第一章では、AKHR のノックダウン個体は、摂食周期の短縮が見られることを明らかにした。つまり、AKH の制御機構は摂食行動の周期性に影響を与えることがわかった。AKH の内分泌的に主要な作用は、脂質、糖質等の栄養分の体液中への動員である。実際、フタホシコオロギ成虫では、AKH の投与により、体液中の脂質および糖質レベルの一過的な増加が見られていることから、フタホシコオロギにおいても、AKH は脂質代謝および糖質代謝の制御に関与していると考えられる<sup>93)</sup>。一方、昆虫の摂食行動に関する生理学的研究から、体液中の栄養分の濃度は、摂食行動の調節に関与していると考えられている<sup>36)</sup>。そこで、本章では、まずは体液中の脂質および糖質の量的なレベルに着目し、AKHR のノックダウンにより、それらのレベルが変動するかどうかを調べた。その後、AKHR のノックダウン個体の摂食行動に対する、体液中への脂質、糖質の投与によるレスキュー実験により、第一章で見られた、AKHR のノックダウンによる摂食周期の短縮に関与する栄養分の絞り込みを試みた。

### 2-1 AKHR のノックダウン個体における、体内の脂質、糖質のレベルの変動の解析\*

#### 2-1-1 AKHR のノックダウン個体における、体液中の脂質、糖質レベルの変動の解析\*

一般的に、昆虫の体液中の脂質は、1, 2-DAG が主要成分であることが知られている<sup>94, 95)</sup>。実際に、フタホシコオロギの成虫の脂肪体および体液について、それぞれから抽出した脂質について、TLC を展開したところ、他の昆虫種と同様に、脂肪体から抽出した脂質からは TAG が、体液から抽出した脂質からは 1, 2-DAG が、それぞれ主要成分として検出されることを確認した(図 2-1-1 (A))。一方、体液中の糖質に関しては、昆虫の血糖とされているトレハロースが主要成分であり、グルコースが次に多く含まれる<sup>96)</sup>。そこで本論文研究では、体液中の 1, 2-DAG レベルは、体液から抽出した脂質を、総脂質定量法である sulfo-phospho-vanillin 法<sup>97)</sup>によって定量した。一方、体液中の糖質レベルに関しては、体液から抽出した糖質を、総糖質定量法である anthrone 法<sup>98)</sup>と、グルコースとトレハロースを

区別した定量法であるヘキソキナーゼ法とを用いて定量した。

まず、AKHR-dsRNA を投与したオスの成虫個体の体液を投与後 0、2 日目に回収し、体液中の 1, 2-DAG レベルを定量した(図 2-1-1 (B))。その結果、AKHR-dsRNA の投与後 2 日目において、体液中の 1, 2-DAG レベルが減少した。また、同様の傾向が、AKHR-dsRNA の投与後 3 日目においても見られた(データ非掲載)。

次に、同様に体液を回収し、体液中の糖質レベルとして、トレハロースレベルとグルコースレベルをそれぞれ定量した(図 2-1-1 (C, D))。その結果、AKHR-dsRNA の投与後 3 日目において、体液中のトレハロースレベルは、1, 2-DAG レベルと同様に、減少した(図 2-1-1 (C))。一方、グルコースレベルは、顕著な変動は見られなかった(図 2-1-1 (D))。

さらに、上述した、AKHR のノックダウン個体の体液中の 1, 2-DAG レベルおよびトレハロースレベルの減少は、AKH シグナリングの減弱に起因するかどうかを確かめるために、AKHR のノックダウン個体にフタホシコオロギ AKH を投与し、体液中の脂質レベルおよび糖質レベルが一過的に増加するかどうかを調べた(図 2-1-1 (E, F))。なお、AKH の投与に関しては、先行研究に従い<sup>93)</sup>、5 pmol の AKH を投与し、投与後 0、90 分に体液を回収し、体液中の 1, 2-DAG レベルおよび糖質レベルを定量した。その結果、コントロール個体に AKH を投与すると、体液中の 1, 2-DAG レベル、および糖質レベルが顕著に増加した(図 2-1-1 (E, F))。しかし、AKHR-dsRNA の投与 2 日目のノックダウン個体では、AKH の投与による、体液中の 1, 2-DAG レベル、および糖質レベルの顕著な増加は認められなかった(図 2-1-1 (E, F))。

これらの結果から、AKHR のノックダウンによって認められた体液中の 1, 2-DAG レベルおよびトレハロースレベルの或る程度の減少は、AKH による、脂質および糖質の動員活性が欠損したことに起因すると考えられた。

## 2-1-2 AKHR のノックダウン個体における、脂肪体内の脂質の量的レベルの変動の解析

2-1-1 で見られた、AKHR のノックダウン個体における体液中の 1, 2-DAG レベルおよびトレハロースレベルの減少は、AKH の作用による、脂肪体内の貯蔵エネルギーの動員に起因するかを確認するために、脂肪体内の貯蔵脂質である TAG を定量した。方法としては、脂肪体の Nile Red 染色、および、脂肪体から抽出した脂質を用いて sulfo-phospho-vanillin 法による定量を行った(図 2-1-2)。その結果、AKHR-dsRNA の投与後 2 日目の成虫オス個体に



において、Nile Red により蛍光染色される、脂肪細胞内の脂質小滴である脂肪滴(lipid droplet)の数が増加した(図 2-1-2 (A))。また、この結果と一致することに、AKHR-dsRNA の投与後 2 日目の成虫オス個体において、脂肪体内の TAG 量の増加が見られた(図 2-1-2 (B))。

## 2-2 AKHR のノックダウン個体の摂食行動に対する、体液中への脂質、糖質の投与によるレスキュー実験

AKHR のノックダウン個体で見られた、体液中の 1, 2-DAG レベル、およびトレハロースレベルの減少は、体液中の栄養状態の変動を意味する。この結果と、体液中の栄養状態の変動が摂食行動と関係があることを示唆する先行研究<sup>36)</sup>とを合わせて考えると、AKHR のノックダウン個体で見られた、摂食頻度の増加は、体液中の 1, 2-DAG レベル、およびトレハロースレベルの減少に起因する可能性が考えられた。この可能性について検討するために、AKHR のノックダウン個体に対する、体液中への脂質および糖質の投与によるレスキュー実験を行った。実験群として、AKHR のノックダウン個体に、1, 2-DAG およびトレハロースを投与することで、それらのレベルをコントロール個体程度まで戻した個体の調製を試みた(図 2-2 (A))。なお、体液中の 1, 2-DAG レベルを戻した個体の調製に関しては、フタホシコオロギ成虫オスの通常個体の体液から抽出した 1, 2-DAG をエタノール等の有機溶媒に溶解させ投与することを検討したが、この投与によっては体液中の 1, 2-DAG レベルは増加しなかった(データ非掲載)。その理由は、1, 2-DAG のような脂溶性の化合物は、大量に体液中に投与された場合、体液にて安定して存在できないからであると考えた。昆虫において、体液中の 1, 2-DAG は、遊離した状態ではほとんど存在せず、輸送タンパク質と、リポホリンと呼ばれる複合体を形成している<sup>56, 57)</sup>ことから、フタホシコオロギのリポホリンを投与することで、体液中の 1, 2-DAG レベルを増加させることができると考えた。なお、フタホシコオロギのリポホリンは、密度勾配遠心法により調製した(図 2-2 (B))。具体的には、フタホシコオロギの成虫オスの通常個体から回収した体液(500  $\mu$ L)と、4.4 g/mL の KBr 溶液 10 mL とを混合し、超遠心分離(40,000 rpm, 16 h, 4°C)し、その後、遠心分離したサンプルを上層から 1 mL 毎に分画した。その後、各画分を SDS-PAGE に供して、リポホリンをはじめとする体液中のタンパク質について、密度勾配による分画ができていることを確認し(図 2-2 (B-1)) (SDS-PAGE による、体液中のタンパク質の解析の詳細は第四章にて後述)、さらに、

各画分の密度および脂質含有量を分析することで、リポホリンを含有する画分を絞り込んだ(図 2-2 (B-2))。一般的に、昆虫のリポホリンの密度は 1.05-1.20 g/mL である<sup>99, 100)</sup>ことと、脂質含有量の分析から、画分 2 と画分 3 をリポホリンを多く含む画分と判断し、以降のリポホリンの投与に用いた。

次に、AKHR のノックダウンにより減少した、体液中の脂質レベルおよび糖質レベルを、コントロール群のレベル程度まで戻すようなリポホリンおよびトレハロースの投与量を検討した(図 2-2 (C, D))。その結果、まず、リポホリンおよびトレハロースの投与により、投与後数時間は、体液中の 1, 2-DAG レベルおよびトレハロースレベルが、投与量に依存した一過的増加が見られることが分かった(図 2-2 (C, D))。そして、体液中の 1, 2-DAG レベルおよびトレハロースレベルについての、AKHR のノックダウン個体とコントロール個体との差分を考慮すると、体液中の 1, 2-DAG レベルに関しては、AKHR のノックダウン個体に 1, 2-DAG を 270  $\mu$ g 程度含むようなリポホリンを投与することで、一過的にコントロール個体のレベルまで戻すことができると考えられ(図 2-2 (C))、トレハロースレベルに関しては、AKHR のノックダウン個体にトレハロースを 300  $\mu$ g 程度投与することで、一過的にコントロール個体のレベルまで戻すことができると考えられた(図 2-2 (D))。

次に、上述の方法で調製した実験群およびコントロール群(図 2-2 (A))に対して、摂食行動観察、およびその結果を基にした摂食行動解析を行った。観察および解析は、第一章の 1-1-3-2 における、AKHR をノックダウンした成虫オス個体に対する観察および解析と同様の方法で行った。すなわち、観察は、AKHR-dsRNA および EGFP-dsRNA の投与後 2 日目と、3 日目の 2 日間について 8 時間連続的に、計 16 時間行った。その際、リポホリン(1, 2-DAG に換算して 270  $\mu$ g)およびトレハロース(300  $\mu$ g)の投与は、各観察日の、観察開始時間の 1 時間前に 1 回行った。この理由としては、投与による物理的刺激に対して応答行動をする期間として 1 時間を見積もったためである。また、リポホリンおよびトレハロースの投与後 4 時間程度までは、体液中の 1, 2-DAG レベルおよびトレハロースレベルが一過的に増加する(図 2-2 (C, D))ことを考慮すると、観察開始時間の 1 時間前に投与することで、摂食行動観察結果には投与の効果が十分反映されると考えた。

(i) AKHR のノックダウン群、(ii) AKHR のノックダウン個体にリポホリンを投与した群、(iii) AKHR のノックダウン個体にトレハロースを投与した群、(iv) AKHR のノックダウン個

体にリポホリンとトレハロースを両方投与した群、および(v) EGFP のノックダウン群の 5 群について摂食行動観察結果を解析し、摂食間 gap の平均時間 (図 2-2 (E))、1 回の摂食時間の平均値(図 2-2 (F))、摂食回数の平均値(図 2-2 (G))、合計摂食時間の平均値(図 2-2 (H))を算出した。その結果、AKHR のノックダウン個体の摂食行動で見られるような、摂食間 gap の減少や、それに伴う摂食回数の増加および合計摂食時間の増加は、トレハロースの投与よりも、1,2-DAG の投与により、コントロール個体の各レベルまでレスキューされた(図 2-2 (E, G, H))。一方、1 回の摂食時間の長さは、各群間に差は見られなかった(図 2-2 (F))。この結果から、AKHR のノックダウンによる摂食頻度の増加は、体液中の 1,2-DAG レベルの減少に起因することが示唆された。

### 2-3 まとめと考察

#### AKHR のノックダウンによる、体液中の 1,2-DAG レベルおよびトレハロースレベルの減少に関して

AKHR のノックダウン個体では、AKH の投与による体液中の 1,2-DAG レベルおよび糖質レベルの増加が見られなかった(図 2-1-1 (E, F))ことから、AKHR のノックダウンで見られた、体液中の 1,2-DAG レベルおよびトレハロースレベルの減少は、AKH による、脂質および糖質の動員活性の欠損によると考えられた。しかし、これらの減少は、コントロール個体と比較して、2-3 割程度の減少であった。この減少量の意味付けとして、AKH のノックダウンにより影響を受けない、脂質の分解機構および糖質の分解機構が脂肪体内に存在するという可能性が考えられる。例えば、リパーゼによる脂質分解を考えると、キイロショウジョウバエにおいて、AKH シグナリングに制御されるホルモン感受性リパーゼ(hormone sensitive lipase; HSL)以外に、HSL とは独立に、貯蔵脂質を分解するリパーゼとして、brummer lipase (bmm)が存在することが報告されている<sup>101)</sup>。なお、bmm は、キイロショウジョウバエにおける、哺乳類 adipose triglyceride lipase (ATGL)のホモログである<sup>101)</sup>。キイロショウジョウバエにおいて、AKHR をノックアウトすると、脂肪体における *bmm* 遺伝子の発現が増加することから、HSL と bmm とは、リパーゼによる脂質の分解活性に関して、補償的に働いていると考えられている<sup>68)</sup>。また、このような脂質の分解機構の存在は、第一章で見られた、AKHR をノックダウンしたフタホシコオロギ個体の絶食耐性の増強(図 1-1)を説

明付けることができる。なぜなら、AKHR のノックダウンによつては、脂肪体における脂質の分解機構の全ては遮断されず、部分的に遮断されたため、絶食条件下において、貯蔵エネルギーをより長い期間利用できたと解釈できるからである。また、近年、カイコやチャバネゴキブリにおいて、ATGL ホモログは、インスリンシグナリングによりその遺伝子発現が調節されていることが明らかにされていることから<sup>102, 103)</sup>、上述の、脂質の分解機構における補償的作用は、AKH シグナリングとインスリンシグナリングとの拮抗的作用を示唆している可能性がある<sup>104)</sup>。つまり、AKHR のノックダウンによる AKH シグナリングの減弱に対して、インスリンシグナリングが拮抗的に働くことで、体液中の脂質レベルおよび糖質レベルが、見かけ上 2-3 割程度減少したとも考えられる。

#### レスキュー実験におけるリポホリンの投与に関して

本章の体液中の 1, 2-DAG レベルのレスキュー実験では、フタホシコオロギ成虫オスの通常個体から回収した体液由来のリポホリンを投与した。いくつかの昆虫種のリポホリンの脂質の成分組成分析によると、リポホリンに含まれる脂質種としては、1, 2-DAG、コレステロール、リン脂質、炭化水素などがあり<sup>105)</sup>、一般的には、リポホリンは、1, 2-DAG のみならず、コレステロールや炭化水素の輸送にも関与していると考えられている<sup>106)</sup>。フタホシコオロギ成虫オスの通常個体から回収した体液由来のリポホリンの脂質種の組成に関しては、体液から抽出した脂質の TLC 解析から考えると、1, 2-DAG が主要な脂質種であるとは考えられる(図 2-1-1 (A))が、他の脂質種も含まれると考えられる。そのため、厳密には、リポホリンの投与によつては、1, 2-DAG レベルのみを人為的に調節したとは言えない。また、リポホリンを投与すると、体液中のリポホリン量自体が増加するため、体液中の脂質輸送の動態が変わることも考えられる。実際、リポホリンの投与により増加した体液中の 1, 2-DAG レベルは、投与後数時間で元のレベルまで戻る(図 2-2 (C))ことから、投与されたリポホリンが積載している脂質の多くは、比較的速やかに他の組織にて積み下ろされていると考えられる。つまり、リポホリンの投与により、体液以外の他の組織における脂質レベルについても、予期しないような変動が起きているかもしれない。なお、このことは、トレハロースの投与についても同様である(図 2-2 (D))。

以上のことを考慮すると、本章にて行ったレスキュー実験により、AKHR のノックダウ

ン個体で見られる体液中の 1,2-DAG レベルの減少が、摂食周期の短縮の要因であることは断言できないものの、少なくとも、体液中の脂質レベルの減少は、摂食行動、およびその周期性の調節機構に大きな影響を与えているとは言える。

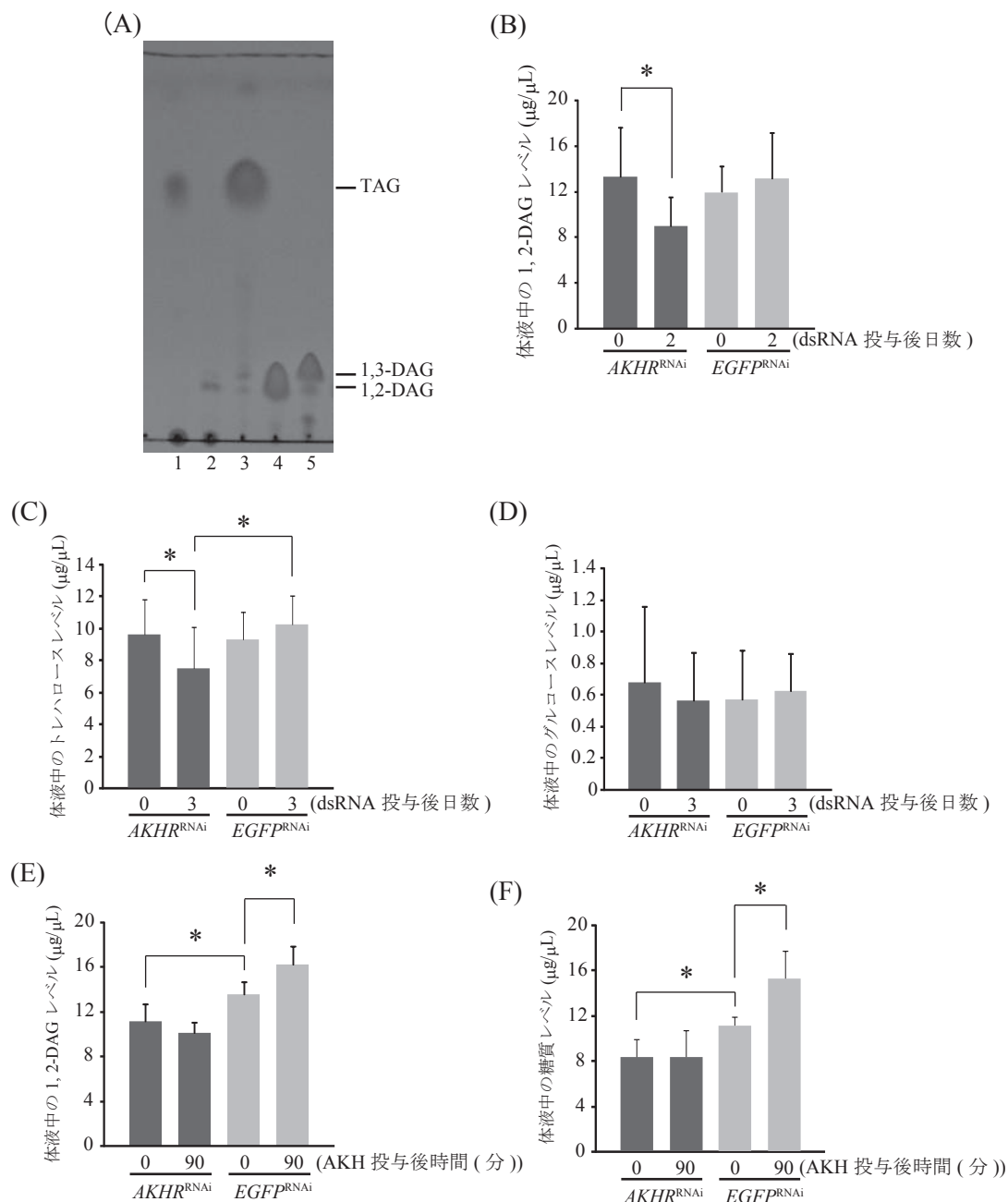


図 2-1-1. AKHR-dsRNA を投与したフタホシコオロギのオス成虫の体液中の脂質、糖質レベルの変動。  
 (A) TLC を用いた、フタホシコオロギの脂肪体および体液に含まれる脂質種の解析。脂肪体 ( レーン 1 ) および体液 ( レーン 2 ) から脂質を抽出し、TLC を展開し、スポットをヨウ素で検出した。スポットの同定のために、TAG として Triolein ( レーン 3 ) を、1, 2-DAG として 1, 2-Diolein ( レーン 4 ) を、1, 3-DAG として 1, 3-Diolein ( レーン 5 ) をそれぞれの標準物質として用いた。フタホシコオロギの脂肪体には TAG が、体液には 1, 2-DAG が、それぞれ主要な脂質種として含まれていた。(B-D) AKHR のノックダウン個体における体液中の 1, 2-DAG レベル (B) トレハロースレベル (C)、およびグルコースレベル (D) の定量。それぞれ平均値 + S. D. で示した (n = 12)。アスタリスクは、コントロールに対して、有意な差が認められたことを示す (\* $P < 0.05$ ; Tukey's HSD test)。AKHR のノックダウンにより、体液中の 1, 2-DAG レベルおよびトレハロースレベルの減少が見られた一方、グルコースレベルの変動は見られなかった。(E, F) AKHR のノックダウン個体に対する AKH の投与による、体液中の脂質および糖質レベルの変動の解析。それぞれ平均値 + S. D. で示した (n = 5)。アスタリスクは、コントロールに対して、有意な差が認められたことを示す (\* $P < 0.05$ ; Tukey's HSD test)。AKHR-dsRNA の投与 2 日目のノックダウン個体では、AKH の投与による、体液中の 1, 2-DAG レベル、および糖質レベルの有意な増加は認められなかった。

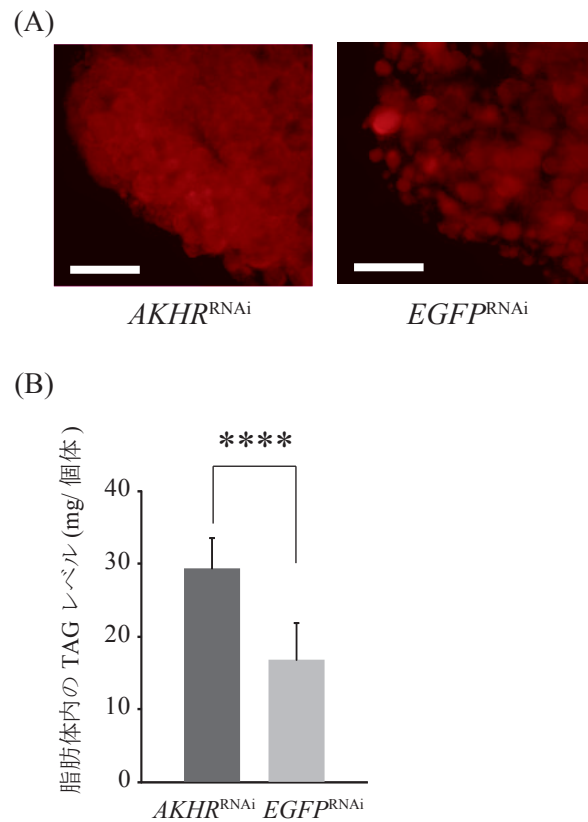
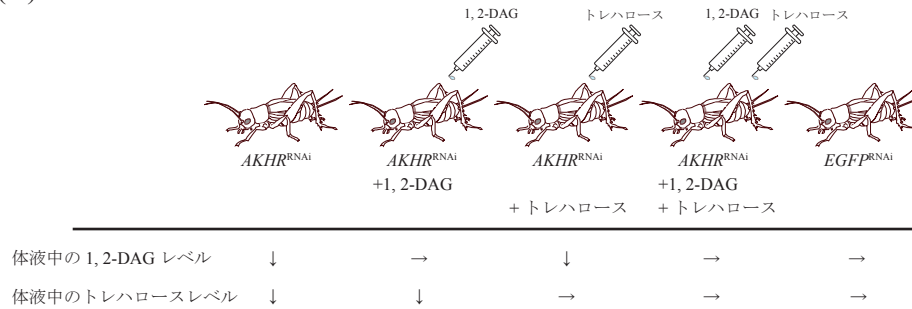
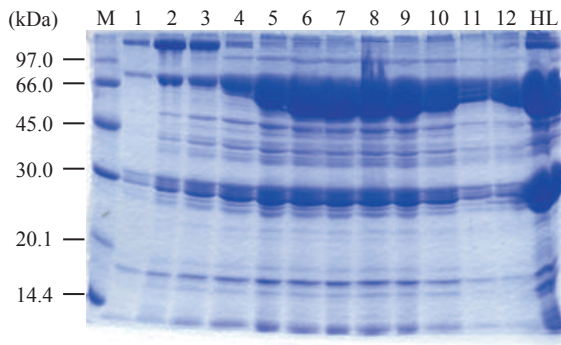


図 2-1-2. AKHR-dsRNA を投与したフトホシコオロギのオス成虫の脂肪体内の脂質レベルの変動。  
(A) AKHR-dsRNA および EGFP-dsRNA を投与したオス成虫の脂肪体の Nile Red 染色。バーは 25  $\mu$ m を示す。AKHR のノックダウンにより、脂肪滴の数が増加した。(B) AKHR-dsRNA および EGFP-dsRNA を投与したオス成虫の脂肪体内の TAG レベルの定量。それぞれ 平均値 + S. D. で示した (n = 8)。アスタリスクは、コントロールに対して、有意な差が認められたことを示す (\*\*\*\* $P < 0.00005$ ; Student's  $t$ -test)。AKHR のノックダウンにより、脂肪体内の TAG レベルが増加した。

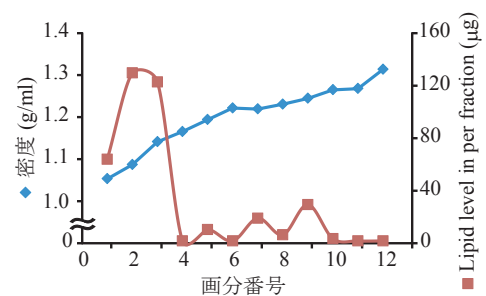
(A)



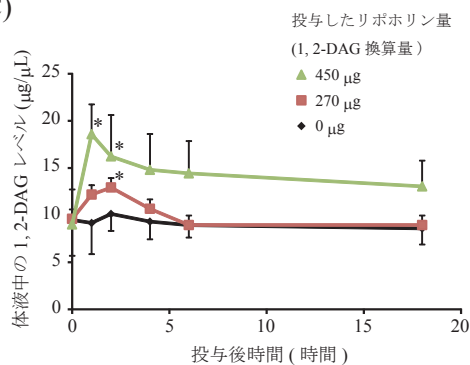
(B-1)



(B-2)



(C)



(D)

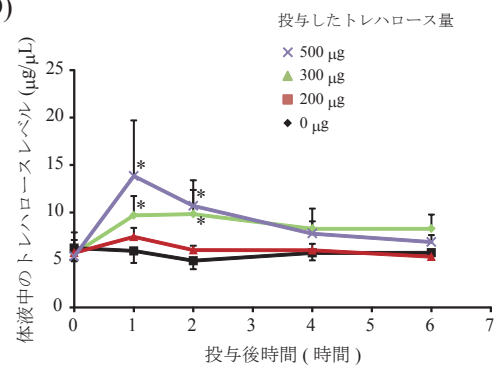


図 2-2. AKHR のノックダウン個体の摂食行動に対する、体液中への脂質、糖質の投与によるレスキュー実験。

(A) 本レスキュー実験で用いた実験群と対照群。AKHR のノックダウンによる体液中の 1,2-DAG レベルおよびトレハロースレベルの減少 (図中の ↓) を、それぞれ、フタホシコオロギ体液由来のリポホリンの投与およびトレハロースの投与によって、コントロール群のレベル (図中の →) まで戻した群を調製した。

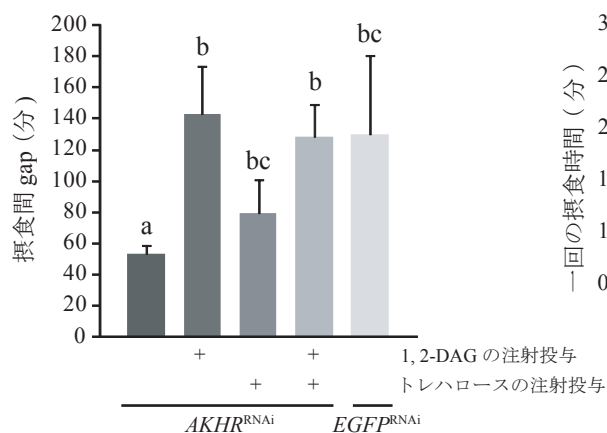
(B) フタホシコオロギのリポホリンの調製。(B-1) フタホシコオロギの体液を回収し、超遠心分離し、低密度から高密度の順に 12 の画分に分け、それぞれの画分 (レーン 1-12) および超遠心分離前の体液 (レーン HL) を

SDS-PAGE に供した。(B-2) (B-1) における各画分の密度および脂質含有量の分析。リポホリンが分画されると考えられる密度であり、かつ、脂質を多く含む画分である、画分 2、3 をリポホリン画分とした。

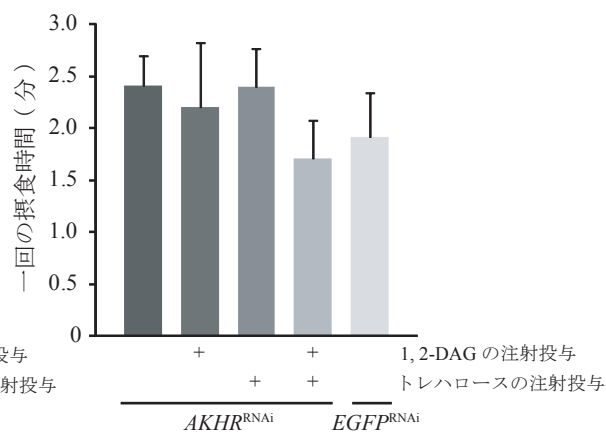
(C, D) AKHR のノックダウンにより減少した、体液中の脂質レベルおよび糖質レベルを、コントロール群のレベル程度まで戻すようリポホリンおよびトレハロースの投与量の検討。それぞれ平均値 + S. D. もしくは平均値 - S. D. で示した (n=5)。アスタリスクは、0 μg を投与したコントロールに対して、有意な差が認められたことを示す (\*P<0.05; Dunnett's test)。AKHR のノックダウンによって減少した体液中の 1,2-DAG レベルについては、1,2-DAG を 270 μg 程度含むようリポホリンを投与することで、一過的にコントロール個体のレベルまで戻すことができると考えられ (C)、AKHR のノックダウンによって減少した体液中のトレハロースレベルに関しては、トレハロースを 300 μg 程度投与することで、一過的にコントロール個体のレベルまで戻すことができると考えられた (D)。



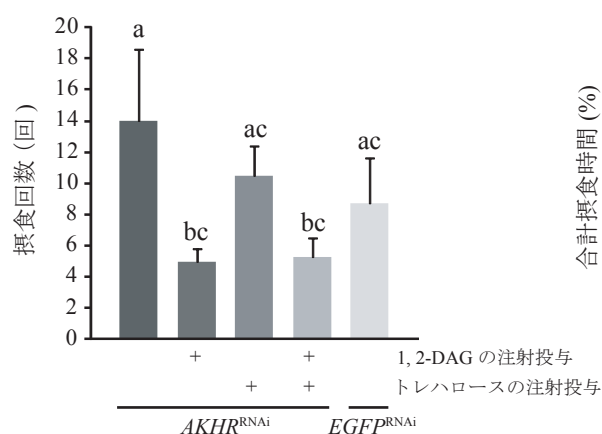
(E)



(F)



(G)



(H)

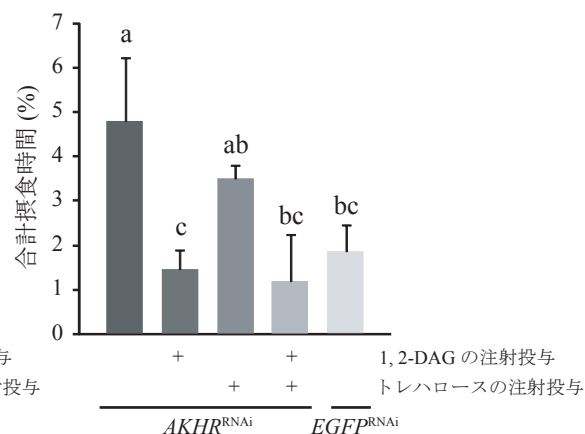


図 2-2 ( つづき ). (E-H) AKHR をノックダウンしたフタホシコオロギのオス成虫について、減少した体液中の 1, 2-DAG レベルおよびトレハロースレベルをレスキューした実験群についての摂食間 gap の平均時間 (E)、一回の摂食時間の平均値 (F)、摂食回数の平均値 (G)、合計摂食時間の平均値 (H)。それぞれ平均値 + S. D. で示した (n = 4)。異なるアルファベットは検定区間に有意差があることを示す ( $P < 0.05$ ; Tukey's HSD test)。AKHR のノックダウン個体で見られるような、摂食間 gap の減少や、それに伴う摂食回数の増加および合計摂食時間の増加は、トレハロースの投与よりも、リポホリンの投与により、コントロール個体のレベルまでレスキューされた。

### 第三章 摂食周期を規定する摂食モチベーションと体液中の栄養状態との関連性の解析<sup>†</sup>

#### 3-0 はじめに

第一章および第二章における、フタホシコオロギを用いた AKHR のノックダウン個体の解析から、体液中の 1, 2-DAG レベルの減少は、摂食行動の周期性の調節機構に影響を与えていると考えられた。摂食行動の周期性を行動レベルで考えると、食べている状態と食べていない状態との、或る周期を持った繰り返しであると言える。その際に、食べていない状態から食べている状態へ移行する確率を、「摂食モチベーション」と表現するならば、AKHR のノックダウン個体では、体液中の 1, 2-DAG レベルの減少によって、コントロール個体よりも、摂食モチベーションが高く保たれていると言い表すことができる。第一章における、フタホシコオロギの摂食行動の観察および解析から、例えば通常の成虫オス個体では、前の摂食から、長くとも 200-300 分経過すると、必ず次の摂食を行うことが分かる(図 1-1-3-7)。つまり、フタホシコオロギは、数分から数時間の間隔で、摂食モチベーションの増加と減少を繰り返していると言える。

そこで、本章では、フタホシコオロギ成虫オス個体を用いて、摂食状態や非摂食状態の時間経過、および各状態間の移行に伴う、体液中の 1, 2-DAG レベルおよび糖質レベルの変動を解析した。具体的には、(i) 長期的な非摂食状態(絶食状態)における体液中の 1, 2-DAG レベルおよびトレハロースレベルの変動と、(ii) 摂食状態から非摂食状態への移行後の、体液中の 1, 2-DAG レベルおよびトレハロースレベルの変動を解析した。また、それらの解析結果を、AKHR のノックダウン個体とコントロール個体とで比較した。さらに、摂食状態から非摂食状態への移行後の体液中の 1, 2-DAG レベルおよびトレハロースレベルの変動を、それぞれリポホリンおよびトレハロースの投与により人為的に調節することで、摂食モチベーションが変動するかを解析した。以上の解析結果から、摂食モチベーションと体液中の栄養分の濃度との関連性、および、その関連性に対する AKHR のノックダウンの影響を考察した。

### 3-1 通常個体および AKHR のノックダウン個体における、各摂食条件下での、体液中の脂質、糖質の量的レベルの変動の解析<sup>†</sup>

#### 3-1-1 絶食条件下での、体液中の脂質、糖質の量的レベルの変動の解析<sup>†</sup>

まず、フタホシコオロギ通常オス個体を長時間の非摂食条件、すなわち絶食条件におき、その時間経過に伴う、体液中の 1, 2-DAG レベルおよびトレハロースレベルの変動を解析した(図 3-1-1 (A))。その結果、絶食条件下では、時間経過に伴い、体液中のトレハロースレベルは顕著に減少した。しかし、体液中の 1, 2-DAG レベルに顕著な変動は見られなかった。一方、通常摂食条件下では、体液中の 1, 2-DAG レベルおよびトレハロースレベルに顕著な変動は見られなかった。

次に、絶食条件下での、体液中の 1, 2-DAG レベルおよびトレハロースレベルの変動について、AKHR-dsRNA の投与後 2 日目の AKHR のノックダウン個体と、コントロールである EGFP-dsRNA 投与個体とを比較した(図 3-1-1 (B))。その結果、AKHR のノックダウン個体は、コントロール個体と比較して、体液中の 1, 2-DAG レベルおよびトレハロースレベルの両方について、処理後 0 時間のレベル(標準値)は 2-3 割程度減少していたものの、絶食時間の経過に伴う変動に関しては、コントロール個体と同様の推移が見られた。

#### 3-1-2 通常摂食条件下での、体液中の脂質、糖質の量的レベルの変動の解析<sup>†</sup>

次に、摂食状態から非摂食状態への移行時における、体液中の 1, 2-DAG レベルおよびトレハロースレベルの変動を解析した。その方法としては、フタホシコオロギの成虫オス個体を、摂食状態を合わせるために、4 時間絶食させた後、餌を提示し、十分に摂食させ、再び絶食条件下においた。なお、フタホシコオロギの摂食周期を考えると、4 時間の絶食は、数回の摂食を逃している程度の絶食と考えられる。なお、この 4 時間の絶食時間後に、餌を提示すると、どの個体も 5-10 分間程度摂食を行っていたため(データ非掲載)、通常摂食条件下における、1 回分と同等の摂食を行ったと判断した。摂食終了直後の絶食条件開始を 0 分とし、開始 0、15、30、60、120、240 分後に体液を回収し、1, 2-DAG レベルおよびトレハロースレベルを定量した(図 3-1-2)。その結果、コントロール個体に関して、摂食終了後から 15-30 分後にかけて、体液中の 1, 2-DAG レベルおよびトレハロースレベルは、一過的に増加し、その後ゆるやかに元のレベル(標準値)まで戻った。また、AKHR-dsRNA の

投与後 2 日目の、AKHR のノックダウン個体は、コントロール個体と比較して、体液中の 1, 2-DAG レベルおよびトレハロースレベルの両方について、標準値は 2-3 割程度減少していたものの、摂食後の両レベルの変動は、コントロール個体と同様の推移が見られた。

### 3-2 通常個体に対する、体液中への脂質、糖質の投与による、摂食モチベーションの変化に関する解析

3-1-2 から、摂食状態から非摂食状態への移行時に、体液中の 1, 2-DAG レベルおよびトレハロースレベルが一過的に増加し、その後、ゆるやかに減少することがわかった。この実験では、餌を提示し、摂食させた後は、餌のない状態においたため、次の摂食への移行がいつ起こるかについては不明である。言い換えると、上述の体液中の栄養分の濃度の増減が、摂食モチベーションと関連性があるかは不明である。そこで、次に、体液中の栄養分の濃度の増減と摂食モチベーションとの関連性について詳細に調べるために、第二章の 2-2 で行ったように、リポホリンおよびトレハロースを投与することで、体液中の 1, 2-DAG レベルおよびトレハロースレベルを一過的に増加させ、その時の摂食モチベーションを調べた。摂食モチベーションを調べるためのアッセイの方法としては、餌を提示してから、食べ始めるまでの時間を計測した。

まずは、フタホシコオロギの通常オス個体へのリポホリンの投与が摂食モチベーションに与える影響を解析した。フタホシコオロギ通常オス個体にリポホリンを投与した際、体液中の 1, 2-DAG レベルの変動を確認すると、投与したリポホリン量依存的に、体液中の 1, 2-DAG レベルの一過的な増加が見られた(図 3-2-1 (A))。Ringer 溶液以外のコントロールとして、リポホリンを超遠心法により回収する際に、リポホリンを含まないと考えられる画分も回収し、投与したが、体液中の 1, 2-DAG レベルの有意な増加は見られなかった(図 3-2-1 (A))。次に、リポホリンを投与した後の、摂食開始までにかかる時間を調べた(図 3-2-1 (B))。具体的には、摂食状態を合わせるために、4 時間絶食させた後、リポホリンを投与し、その 30 分後に餌を提示し、その餌の摂食を開始するまでの時間を計測した。その結果、投与したリポホリン量依存的に、摂食開始までにかかる時間の延長が見られた。また、リポホリンを含まない画分の投与では、その効果は見られなかった。

トレハロースについても、同様の実験を行った。フタホシコオロギ通常オス個体にトレ

ハロースを投与した際、体液中のトレハロースレベルの変動を確認すると、投与したトレハロース量依存的に、体液中のトレハロースレベルの一過的な増加が見られた(図 3-2-2 (A))。なお、フタホシコオロギ通常オス個体にグルコースを投与した際の、体液中のグルコースレベルの変動も確認した(図 3-2-2 (B)左)。その結果、D-グルコースの投与によって、体液中の D-グルコースレベルが投与量依存的に増加した。一方、非代謝性の糖質である L-グルコース<sup>107, 108)</sup>の投与によっては、体液中の D-グルコースレベルは有意な変動が見られなかった。なお、D-グルコース量を投与した場合には、体液中の D-グルコースレベルの増加量が、投与量と比較すると少なかったため、D-グルコース量を投与した場合の、体液中のトレハロースレベルの増加量も調べた(図 3-2-2 (B)右)。その結果、D-グルコース量を投与した場合には、体液中のトレハロースレベルも増加が見られた。このことから、体液中の過剰な D-グルコースは、トレハロースに変換されると考えられた。なお、この結果は、Wyatt による仮説<sup>109)</sup>と一致する。この仮説は、(i) 体液中のグルコースは、脂肪体においてトレハロースに合成された後、体液中に放出され、(ii) そのトレハロースのうちの微量は中腸の細胞で再びグルコースに変換されて、体液中に放出される、という(i)、(ii)のサイクルによって、体液中のトレハロースとグルコースの濃度が保たれるというものである。

トレハロースおよび L-グルコースを投与した後の、摂食開始までにかかる時間を調べた結果、投与したトレハロース量依存的に、摂食開始までにかかる時間の延長が見られた。また、L-グルコースの投与では、その効果は見られなかった(図 3-2-2 (C))。

### 3-3 まとめと考察

#### 長時間の絶食条件下における、脂質レベルと糖質レベルの変動パターンの差異について

長時間の絶食条件下において、体液中のトレハロースレベルは顕著な減少が見られたが、体液中の 1, 2-DAG レベルは有意な変動は見られなかった(図 3-1-1)。この差異は、長時間の絶食条件下における、脂質代謝と糖質代謝の、代謝応答が異なることを反映していると考えられる。一般的に昆虫は、絶食条件下におかれた場合、先ず、脂肪体の貯蔵グリコーゲンを分解し、その後、脂肪体の貯蔵 TAG を分解すると考えられている<sup>110, 111)</sup>。これを踏まえると、フタホシコオロギにおける、絶食開始 16 時間後から見られるような、体液中のトレハロースレベルの急激な減少(図 3-1-1 (A)右)は、脂肪体の貯蔵グリコーゲンが、急激に

分解、利用されていることを意味するかもしれない。

一方、体液中の 1, 2-DAG レベルに関しては、体液中のトレハロースが急激に減少する、絶食開始 16 時間後以降も、大きな変動は見られなかった(図 3-1-1 (A)左)。このことは、脂肪体の TAG から分解、動員された 1, 2-DAG の量と、組織にて利用される 1, 2-DAG の量とが釣り合っていると考えることもできる。言い換えると、体液中の 1, 2-DAG レベルが、見かけ上、或る一定レベル(標準値)になるように、脂質代謝のバランスを保つ機構が存在することが示唆される。なお、トノサマバッタでは、絶食時間が 48 時間程度経過した後に、体液中の脂質レベルが増加すると報告されていることを考慮すると<sup>112)</sup>、フタホシコオロギにおいても、絶食処理時間を、本実験で解析した時間よりも長くすることで、体液中の 1, 2-DAG レベルが変動する可能性がある。

#### 摂食後の短時間における、体液中の 1, 2-DAG レベルおよびトレハロースレベルの一過的な増減に関して

また、摂食と摂食との間の非摂食時間を想定し、摂食後の体液中の 1,2-DAG レベルとトレハロースレベルを経時的に定量した結果、摂食後 15-30 分で一過的に増加し、60-120 分程度で摂食直後のレベルに戻ることを見出した(図 3-1-2)。これらの一過的な増加は、摂食された餌の消化、吸収に由来すると考えられた。摂食された餌由来の脂質の体内での移行については、放射性トレーサー実験により、数種類の昆虫で明らかにされている。例えばオオサシガメ *Rhodnius prolixus* において、摂食後、餌中の脂質が、中腸において吸収され、さらに分解および合成を経てそのほとんどが DAG として体液中に放出され、その後脂肪体に TAG として蓄えられることが知られている<sup>113)</sup>。昆虫種により、その移行時間に差はあるものの、同様の現象が、タバコスズメガ<sup>114)</sup>、オオモンシロチョウ *Pieris brassicae*<sup>115)</sup>等において見られている。また、トレハロースに関しては、上述の Wyatt による仮説<sup>109)</sup>によって説明がつく。つまり、消化された餌由来のグルコース等の糖質は、中腸から体液中に放出され、その後脂肪体にて速やかにトレハロースに変換され、再び体液中に放出されと考えられる。実際に、通常のフタホシコオロギ成虫オス個体について、図 3-1-2 と同様の実験を、グルコースレベルに関しても行ったところ、トレハロースとほぼ同様の摂食後時間に、同程度の増減割合で、一過的な増減が見られた(データ非掲載)。

また、興味深いことに、一過的に増加した体液中の 1,2-DAG レベルおよびトレハロースレベルは、速やかに減少する傾向が見られ、60-120 分で摂食直後のレベルに戻り、絶食の継続により、さらに減少する傾向が見られた。このことは、摂食からの経過時間に伴い、体液中の 1,2-DAG レベルおよびトレハロースレベルが、或る程度の範囲においては減少することを示す。また、第一章における、フタホシコオロギの摂食行動の観察および解析から、例えば通常の成虫オス個体では、前の摂食から、長くとも 200-300 分経過すると必ず次の摂食を行うことが分かる(図 1-1-3-7)。これらのことから、或る程度の 1,2-DAG レベルおよびトレハロースレベルの減少が、摂食の開始のトリガーとなることも推論できる。

#### **AKHR のノックダウン個体およびコントロール個体における、脂質レベルおよび糖質レベルの標準値に関して**

上述の、体液中の 1, 2-DAG レベルおよびトレハロースレベルの変動に関する考えを踏まえ、AKHR のノックダウン個体と、コントロール個体の、それらの変動を比較すると、1, 2-DAG レベルおよびトレハロースレベルのどちらについても、AKHR のノックダウン個体では、標準値の減少が見られたが、処理時間の経過に伴う変動に関しては、同様に推移した(図 3-1-1 (B)、図 3-1-2)。つまり、AKHR のノックダウン個体は、1, 2-DAG レベルおよびトレハロースレベルの標準値を決定づけるような、脂質代謝および糖質代謝の恒常的制御機構には欠損を持ちつつも、長時間の絶食に応答するような代謝機構は失っていないことを示す。AKH は、このような絶食に対する代謝応答に関与するとされるにも関わらず<sup>116)</sup>、AKHR のノックダウン個体にて、上述の代謝応答が見られていることは、第二章 2-3 の考察にて述べたような、AKH による脂質代謝および糖質代謝の制御機構以外の制御機構が、拮抗的、あるいは補償的に機能しているからであるかもしれない。つまり、体液中の 1, 2-DAG レベルおよびトレハロースレベルの標準値は、AKH やインスリンをはじめとする脂質代謝および糖質代謝の制御のバランスにより、見かけ上一定に保たれており、そのような機構は、AKHR のノックダウンでは、そのバランスは、結果的には僅かにしか崩されないと解釈できるかもしれない。この解釈を基に考えると、第二章および第三章で見られたような、AKHR のノックダウン個体における、体液中の 1, 2-DAG レベルおよびトレハロースレベルの僅かな変動が、第一章で見られたような、摂食行動に関わる表現型の絶

妙な変化に寄与したと言えるかもしれない。

## 体液中の 1, 2-DAG レベルおよびトレハロースレベルと、摂食モチベーションとの関連性について

摂食状態から非摂食状態への移行後の体液中の 1, 2-DAG レベルおよびトレハロースレベルの変動を、それぞれリポホリンおよびトレハロースの投与により人為的に調節することで、摂食モチベーションが変動するかを解析した(図 3-2-1、3-2-2)。その結果、リポホリンおよびトレハロースのどちらの投与によっても、投与量依存的に、摂食開始までの時間の遅延が見られた。これを言い換えると、体液中の 1, 2-DAG レベルおよびトレハロースレベルの、標準値からの増加量が多いほど、摂食モチベーションは減少すると言える。しかし、体液中の 1, 2-DAG レベルおよびトレハロースレベルの増加のみが、摂食モチベーションの増減を規定しているわけではない。このことは、例えばリポホリンの投与に関しては、1, 2-DAG を 270  $\mu\text{g}$  含むリポホリンを投与した場合、少なくとも、投与後 4 時間までは、体液中の 1, 2-DAG レベルの標準値からの有意な増加が見られるものの(図 3-2-1 (A))、その投与から 200 分程度で次の摂食を始める(図 3-2-1 (B))ことから考えられる。つまり、体液中の 1, 2-DAG レベルが増加した状態においても、摂食開始を促す程度の摂食モチベーションの増加が起こることとなる。この理由としては、複数の栄養分の濃度変動が、複合的に摂食モチベーションの増減を制御している可能性があることや、体液中の栄養分の濃度以外の因子も摂食モチベーションの増減を制御している<sup>15)</sup>ことが考えられる。

以上の考えに基づいて、通常摂食状態のフタホシコオロギの摂食モチベーションの増減を、体液中の栄養分の濃度という観点から考えると、(i) 摂食後に栄養分の濃度が増加することで、摂食モチベーションが減少し、(ii) その後、栄養分の濃度がゆるやかに減少し、或る閾値まで減少することが、摂食モチベーションの増加の一因となり、次の摂食を始める。この(i)、(ii)の繰り返しが、摂食行動の周期性を規定する機構の一端であると考えられる。また、この文脈のもとで、AKHR のノックダウン個体における摂食頻度の増加を考えると、AKHR のノックダウン個体は、体液中の 1, 2-DAG レベルの標準値が減少しているため、(ii)のように、摂食モチベーションの増加を促すような或る閾値までに減少する頻度が増加するため、頻繁な摂食行動が見られると考えられる。



しかし、体液中の 1, 2-DAG レベルの減少が、どのような分子機構で、摂食モチベーションに働きかけているかは、明らかではない。また、そのためには、摂食モチベーション自体の実体を分子レベルで説明づけることが必要である。そこで、次章からは、体液中の 1, 2-DAG レベルの変動と、摂食モチベーションの増減とを結びつけるような分子を探索することとした。現在までの AKH に関する教科書的な知見<sup>50)</sup>では、体液中の 1, 2-DAG レベルの変動に大きく関与する可能性のある分子として、体液中にて 1, 2-DAG を輸送する、リポホリンが挙げられる。そこで、第四章にて、体液中の 1, 2-DAG レベルの変動が、リポホリンを介して、摂食行動に投射されている可能性の有無を検討した。

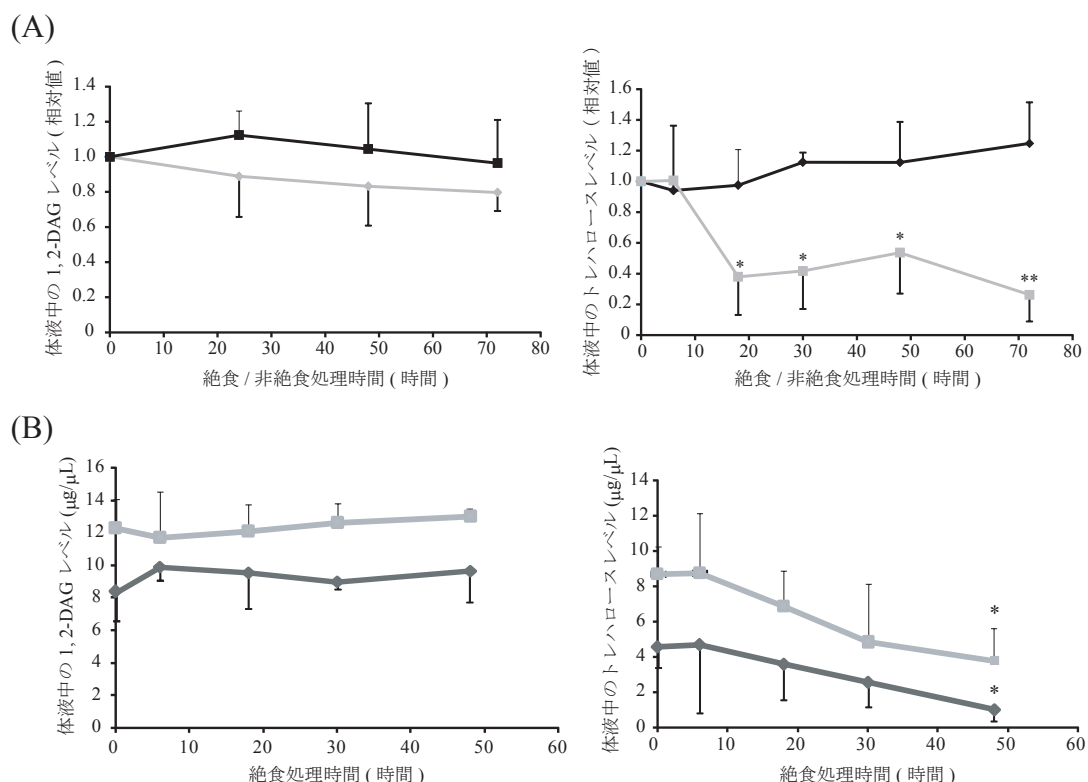


図 3-1-1. 通常オス個体および AKHR をノックダウンしたオス個体における、絶食条件下での、体液中の 1, 2-DAG レベルおよびトレハロースレベルの変動の解析。(A) 通常個体における、絶食条件下での、体液中の 1, 2-DAG レベル (左) および体液中のトレハロースレベル (右) の変動の解析。それぞれ平均値 + S. D. または平均値 - S. D. で示した (左: n=6, 右: n=4)。アスタリスクは、コントロール (処理 0 時間) に対して、有意な差が認められたことを示す (\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.005$ ; Dunnett's test)。通常個体では、通常摂食条件下 (黒色) では、体液中の 1, 2-DAG レベルおよびトレハロースレベルに有意な変動は見られなかった。一方、絶食条件下 (灰色) において、体液中のトレハロースレベルは顕著に減少するが、体液中の 1, 2-DAG レベルに有意な変動は見られなかった。(B) 絶食条件下での、体液中の 1, 2-DAG レベル (左) および体液中のトレハロースレベル (右) の変動についての、AKHR-dsRNA の投与後 2 日目の AKHR のノックダウン個体 (濃灰色) と、コントロールである EGFP のノックダウン個体 (薄灰色) との比較。それぞれ平均値 + S. D. または平均値 - S. D. で示した (n=5)。アスタリスクは、コントロール (処理 0 時間) に対して、有意な差が認められたことを示す (\* $P < 0.05$ ; Dunnett's test)。AKHR のノックダウン個体は、コントロール個体と比較して、体液中の 1, 2-DAG レベルおよびトレハロースレベルの両方について、標準値は或る程度減少しているものの、絶食時間の経過に伴う変動に関しては、コントロール個体と同様の推移が見られた。

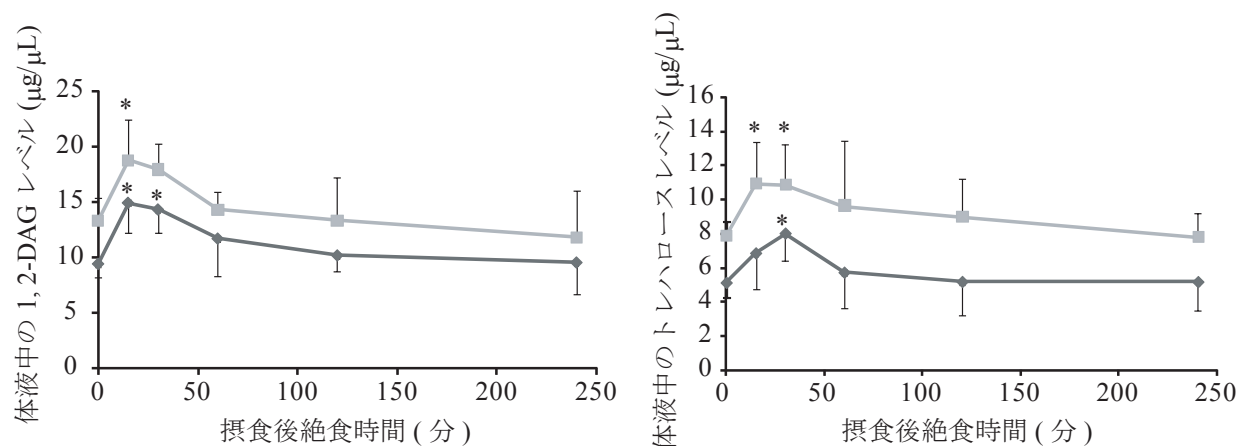
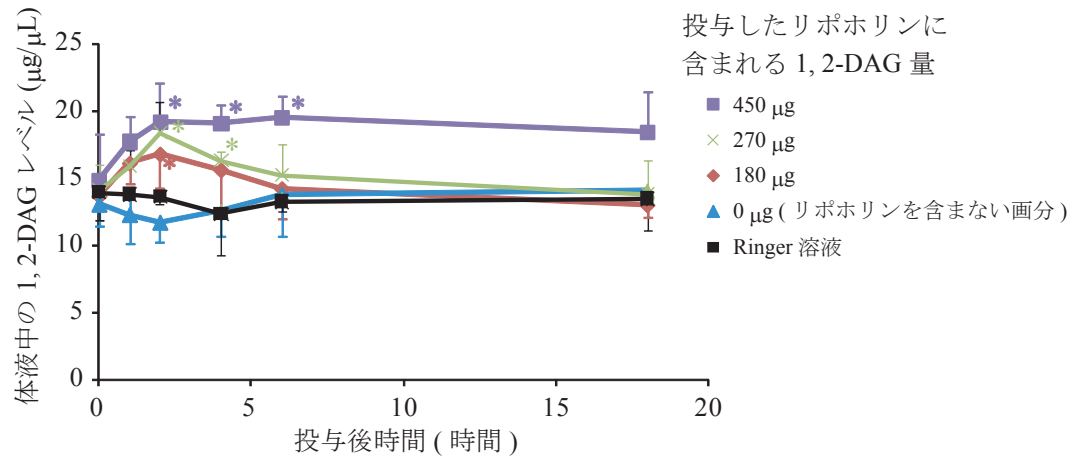


図 3-1-2. AKHR-dsRNA の投与後 2 日目の AKHR のノックダウン個体およびコントロール個体の、摂食後の短時間の絶食条件下における、体液中の 1,2-DAG レベル (左) およびトレハロースレベル (右) の経時的な変動の解析。AKHR-dsRNA (濃灰色) および EGFP-dsRNA (薄灰色) の投与後 2 日目のフタホシコオロギのオスの成虫を、摂食状態を合わせるために、4 時間絶食させた後、摂食条件下におき、十分に摂食させ、再び絶食条件下においた。摂食後の絶食条件開始を 0 分とし、開始 15、30、60、120、240 分後に体液を回収し、1,2-DAG レベルおよびトレハロースレベルを定量した。それぞれ平均値 + S. D. または平均値 - S. D. で示した (n = 5)。アスタリスクは、コントロール (絶食条件開始 0 分) に対して、有意な差が認められたことを示す (\* $P < 0.05$ ; Dunnett's test)。コントロール個体に関しては、摂食後から 15-30 分後にかけて、体液中の 1,2-DAG レベルおよびトレハロースレベルの一過的な増加が見られた。AKHR のノックダウン個体は、コントロール個体と比較して、体液中の 1,2-DAG レベルおよびトレハロースレベルの両方について、標準値は或る程度減少しているものの、摂食後の両レベルの変動は、コントロール個体と同様の推移が見られた。

(A)



(B)

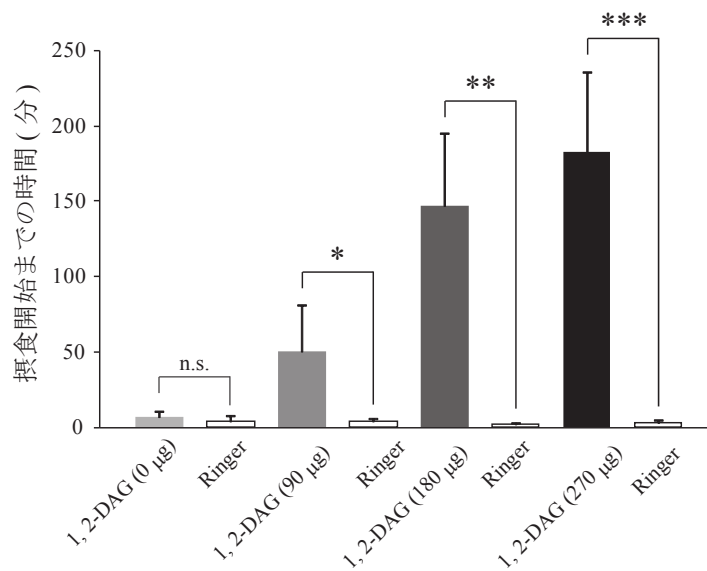


図 3-2-1. フタホシコオロギ通常オス個体へのリポホリンの投与が摂食行動に与える影響の

解析。(A) フタホシコオロギ通常オス個体にリポホリンを投与した際の体液中の 1, 2-DAG レベルの変動の解析。それぞれ平均値 + S. D. もしくは平均値 - S. D. で示した (n = 6)。

アスタリスクは、Ringer 溶液を投与したコントロールに対して、有意な差が認められたことを示す (\* $P < 0.05$ ; Dunnett's test)。なお、別のコントロールとして、リポホリンを超遠心法により回収する際に、リポホリンを含まないと考えられる画分も回収し、投与した。リポホリンの投与量依存的に、体液中の 1, 2-DAG レベルの一過的な増加が見られた。(B) フタホシコオロギ通常オス個体にリポホリンを投与した後の、摂食開始までにかかる時間の解析。摂食状態を合わせるために、4 時間絶食させた後、リポホリンを投与し、その 30 分後に餌を提示し、その餌の摂食を開始するまでの時間を計測した。それぞれ平均値 + S. D. で示した (n = 6)。アスタリスクは、Ringer 溶液を注射投与したコントロールに対して、有意な差が認められたことを示す (\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.005$ , \*\*\* $P < 0.0005$ ; Student's t-test)。リポホリンの投与量依存的に、摂食開始までにかかる時間の延長が見られた。また、リポホリンを含まない画分の投与では、その効果は見られなかった。

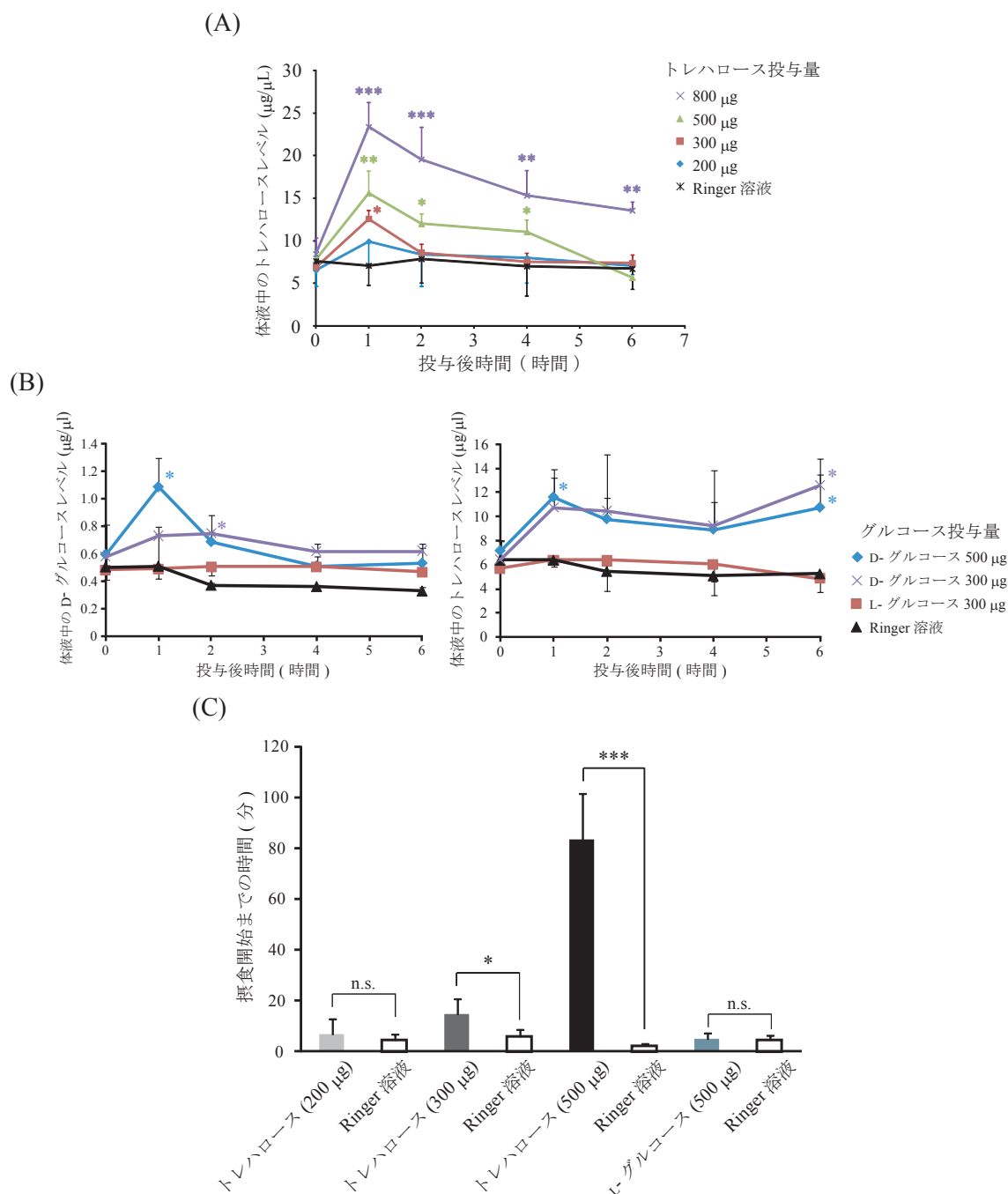


図 3-2-2. フタホシコオロギ通常オス個体への糖質の投与が摂食行動に与える影響の解析。(A) フタホシコオロギ通常オス個体にトレハロースを投与した際の体液中のトレハロースレベルの変動の解析。それぞれ平均値 + S. D. もしくは平均値 - S. D. で示した (n = 6)。アスタリスクは、Ringer 溶液を注射投与したコントロールに対して、有意な差が認められたことを示す (\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.005$ , \*\*\* $P < 0.0005$ ; Dunnett's test)。トレハロースの投与量依存的に、体液中のトレハロースレベルの一過的な増加が見られた。(B) フタホシコオロギ通常オス個体にグルコースを投与した際の体液中の D- グルコースレベル ( 左 ) およびトレハロースレベル ( 右 ) の変動の解析。それぞれ平均値 + S. D. もしくは平均値 - S. D. で示した (n = 6)。アスタリスクは、Ringer 溶液を注射投与したコントロールに対して、有意な差が認められたことを示す (\* $P < 0.05$ ; Dunnett's test)。D- グルコースの投与によって、体液中のグルコースレベルが投与量依存的に増加したが、投与後 1-2 時間にて速やかに減少し、それに伴い、体液中のトレハロースレベルが増加した。この効果は、L- グルコースの投与では見られなかった。(C) フタホシコオロギ通常オス個体に糖質としてトレハロース、および非代謝性の糖質として L- グルコースを投与した後の、摂食開始までにかかる時間の解析。摂食状態を合わせるために、4 時間絶食させた後、糖質を投与し、その 30 分後に餌を提示し、その餌の摂食を開始するまでの時間を計測した。それぞれ平均値 + S. D. で示した (n = 6)。アスタリスクは、Ringer 溶液を投与したコントロールに対して、有意な差が認められたことを示す (\* $P < 0.05$ , \*\*\* $P < 0.0005$ ; Student's t-test)。投与したトレハロース量依存的に、摂食開始までにかかる時間の延長が見られた。また、L- グルコースの投与では、その効果は見られなかった。

## 第四章 AKHR のノックダウン個体における、脂質輸送系と摂食行動との関連性の解析\*

### 4-0 はじめに

第一、二、および三章から、AKHR のノックダウン個体は、体液中の 1, 2-DAG レベルの標準値が減少しているため、摂食モチベーションの増加を促すような或る閾値までに減少する頻度が増加し、頻繁な摂食行動が見られると考えられる。しかし、体液中の 1, 2-DAG レベルの減少が、どのような分子機構で、摂食モチベーションに働きかけているかは、明らかではない。そこで、体液中の 1, 2-DAG レベルの変動と、摂食モチベーションの増減とを結びつけるような分子を探索することとした。

現在までの AKH に関する教科書的な知見<sup>50)</sup>では、体液中の 1, 2-DAG レベルの変動に関与する可能性のある分子として、体液中にて 1, 2-DAG を輸送する、リポホリンが挙げられる。リポホリンとは、脂質とリポタンパク質の複合体であり、昆虫における体液中の脂質の輸送を担っている<sup>41, 105, 106)</sup>。つまり、AKH の刺激により、脂肪体から体液中へ動員される脂質は、リポホリンにより輸送される機構がある(図 4-0)。AKH により体液中に動員される脂質のほとんどは、脂肪体に貯蔵されている TAG がホルモン感受性リパーゼ(HSL)により分解してできる 1, 2-DAG であることが、トノサマバッタを用いた研究で知られている<sup>117)</sup>。体液中に動員された 1, 2-DAG は、HDLp (High-density lipophorin; 高密度リポホリン)が LpR (Lipophorin receptor; リポホリン受容体)と結合することで<sup>118)</sup>、HDLp に取り込まれ、LDLp (Low-density lipophorin)を形成する<sup>41, 42)</sup>。また、LDLp を形成する際に、アポリポタンパク質である ApoLp-III (Apolipophorin-III; アポリポホリン-III)がその表面に結合し、脂質を LDLp に固定化させる<sup>119, 120)</sup>。

上述の脂質輸送の機構から、リポホリンの体液中の動態は、体液中の 1, 2-DAG レベルと関連性がある。すなわち、AKH により制御される、体液中の 1, 2-DAG レベルが摂食行動に関与しているならば、AKHR をノックダウンしたフタホシコオロギでは、体液中の 1, 2-DAG レベルの減少が、リポホリンを介して、摂食行動に投射される可能性がある。そこで、本章では、体液中の 1, 2-DAG レベルの変動が、リポホリンを介して、摂食行動に投射される可能性を検討した。具体的には、脂質輸送に関与する分子として、LpR と、脂質レベルに関連して体液中の挙動が大きく変わると考えられる ApoLp-III に注目して、AKH による制

御と、脂質輸送、および摂食行動との、三者の関連性について解析した。

#### 4-1 AKHR のノックダウン個体における、脂質輸送に関与する因子 LpR および ApoLp-III に関する解析\*

##### 4-1-1 AKHR のノックダウンが *LpR* の mRNA の発現レベルに与える影響の解析\*

AKH の制御する脂質輸送と LpR との関連性を解析するために、まず、LpR をコードする遺伝子の cDNA をクローニングした。フタホシコオロギの LpR は、未だ同定されていなかったため、他の昆虫種の LpR との相同性をもとに縮重プライマーを作製し、degenerate PCR を行った(図 S1-2 (A))。得られた部分塩基配列の演繹アミノ酸配列をもとに、BLAST 検索を行ったところ、フタホシコオロギ LpR をコードする遺伝子の cDNA の演繹アミノ酸配列は、トノサマバッタの LpR に最も高い相同性を示し(identity: 91%、similarity: 96%)、他の昆虫種の LpR と 90%以上の相同性を示したため、取得した cDNA は LpR をコードしていると考えられた(補項第二項; 図 S1-2 (B))。なお、フタホシコオロギの LpR の演繹アミノ酸配列において、YWXD モチーフが見られた(図 S1-2 (B))。このモチーフは、昆虫の LpR が属する、LDLR (low-density lipoprotein receptor) ファミリーが共通して持つ、EGF-precursor ドメイン内のモチーフである<sup>121, 122)</sup>。また、フタホシコオロギの LpR と、上記のファミリーに含まれる他の昆虫種の LpR、VgR、および哺乳類の LDLR との系統樹を作成したところ(図 S1-2 (C))、フタホシコオロギの LpR は、他の昆虫種の LpR と同じクレードに属した。これらの結果から、クローニングしたフタホシコオロギの LpR は、LpR としての機能を有することが示唆された。

次に、フタホシコオロギの *LpR* の mRNA の発現部位を調べるため、RT-PCR を用いて解析したところ、フタホシコオロギの *LpR* の mRNA は、成虫のメスにおいては、脂肪体、中腸、卵巢で発現が認められ(図 S1-2 (D)上部)、成虫のオスにおいては、脂肪体、中腸、筋肉で発現が認められた(図 S1-2 (D)下部)。

次に、フタホシコオロギの *LpR* の mRNA の発現が、AKHR のノックダウンによって変動するかどうかを調べた。その結果、AKHR-dsRNA を投与した個体は、脂肪体において *AKHR* の mRNA の発現の抑制とともに、*LpR* の mRNA の発現の抑制が認められた(図 4-1-1)。

#### 4-1-2 AKHR のノックダウンが体液中の ApoLp-III レベルに与える影響の解析\*

次に、脂質レベルと関連して体液中の挙動が大きく変わると考えられる、ApoLp-III に注目し、ApoLp-III の動態と、AKH の制御および摂食状態との関連性を解析した。リポホリンは体液中に多く存在するため、それを構成しているタンパク質であるアポリポホリン I (ApoLp-I)、II (ApoLp-II)、III (ApoLp-III) は体液中に高いレベルで存在する。そのため、昆虫の体液を SDS-PAGE<sup>123, 124)</sup>、あるいは Native-PAGE<sup>125, 126)</sup> に供し、CBB 染色することで、メジャーなバンドとして観察される。体液中には、リポホリンとして、HDLp と LDLp が存在し、さらに、リポホリン構成タンパク質として、遊離 ApoLp-III が存在する(図 4-0)。HDLp と LDLp を形成するタンパク質としては、ApoLp-I と、ApoLp-II があり、HDLp と LDLp は、それらと脂質が結合して形成されている<sup>56)</sup>。さらに、LDLp はその表面に ApoLp-III が結合している<sup>119, 120)</sup>。

##### 4-1-2-1 フタホシコオロギの ApoLp-III の同定\*

体液中に存在する HDLp、LDLp と遊離 ApoLp-III は、体液を Native-PAGE に供することで、HDLp、LDLp と遊離 ApoLp-III の 3 種のバンドとして観察される<sup>126)</sup>。一方、体液を SDS-PAGE に供すと、体液中の HDLp、LDLp と遊離 ApoLp-III は、それぞれ、HDLp は ApoLp-I と ApoLp-II のバンドとして、LDLp は ApoLp-I、ApoLp-II と ApoLp-III のバンドとして、遊離 ApoLp-III は ApoLp-III のバンドとして観察される<sup>127)</sup>。

本実験では、体液中の ApoLp-III の量を解析するために、体液を SDS-PAGE および Native-PAGE に供した。フタホシコオロギにおいて、ApoLp-III の同定はされていないため、まず、SDS-PAGE 上での、フタホシコオロギの ApoLp-III の同定を行った。

フタホシコオロギの ApoLp-III を同定するために、まず、フタホシコオロギの体液と、カイコ幼虫の体液を SDS-PAGE に供した(図 4-1-2-1 (A))。なお、カイコ幼虫の SDS-PAGE での ApoLp-III のバンドは既に同定されている。また、ApoLp-III は体液中に多く存在しており、さまざまな昆虫種において、約 18 kDa 程度である<sup>42)</sup>。これらのことから、図 4-1-2-1 (A)の矢印で示した 15 kDa 付近のバンドをフタホシコオロギの ApoLp-III のバンドであると考え、PVDF 膜に転写後に、N 末端アミノ酸配列を解析した。その結果、得られた N 末端のアミノ酸配列は、ヨーロッパイエコオロギの ApoLp-III のアミノ酸配列と高い相同性を有してい



た(図 4-1-2-1 (C))。そこで、同バンドをゲル内消化し、消化産物を逆相 HPLC により精製し(図 4-1-2-1 (B))、分離した消化産物をそれぞれアミノ酸配列解析に供した(図 4-1-2-1 (C))。その結果、得られた部分アミノ酸配列は、ヨーロッパイエコオロギの ApoLp-III のアミノ酸配列と、高い相同性が見出された。以上の通り、フタホシコオロギの ApoLp-III を同定した。

#### 4-1-2-2 AKH 投与および AKHR のノックダウンと体液中 ApoLp-III の動態との関連性の解析\*

AKH の制御機構と体液中の ApoLp-III の動態の関連性を解析するために、まず、AKH の投与による体液中の ApoLp-III の動態を、SDS-PAGE および Native-PAGE を用いて解析した。AKH 20 pmol、あるいは Ringer 溶液 2  $\mu$ L を成虫オス個体に投与し、同一個体について、投与後 0 分、90 分に体液を回収し、SDS-PAGE および Native-PAGE 解析に供した。その結果、SDS-PAGE による解析では、AKH の投与個体は、Ringer 溶液の投与個体と比較して、投与 90 分後まで、ApoLp-III のバンドの濃さに変動が見られなかった(データ非掲載)。一方、Native-PAGE による解析では、AKH 投与個体は、投与 90 分後に、ApoLp-III のバンドの濃さが減少する傾向が見られた(図 4-1-2-2 (A))。以上の結果から、AKH の投与により、体液中の遊離 ApoLp-III の量が減少すると考えられた。このことは、AKH の投与による、体液中への 1, 2-DAG の動員に応じて、HDLp から LDLp への形成が促進されるため、体液中の遊離 ApoLp-III が減少すると考えられた。

次に、AKHR のノックダウン個体に AKH を投与した場合、体液中の遊離 ApoLp-III が減少するかどうかを調べた。AKHR-dsRNA、または EGFP-dsRNA を投与後、2 日目の成虫オス個体に、AKH を投与し、0 分、90 分後に体液を回収し、Native-PAGE に供した。その結果、コントロールである EGFP-dsRNA 投与個体では、AKH の投与 90 分後に ApoLp-III のバンドの濃さが減少する傾向が見られた。一方、AKHR-dsRNA 投与個体では、ApoLp-III のバンドの強度にほとんど変動が見られなかった(図 4-1-2-2 (B))。また、AKH の投与前について、AKHR-dsRNA 投与個体と EGFP-dsRNA 投与個体とを比較すると、AKHR-dsRNA の投与個体について、ApoLp-III のバンドの濃さが減少する傾向が見られた(図 4-1-2-2 (B))。これらの結果から、AKH の投与のみならず、AKHR のノックダウンによっても、体液中の遊離 ApoLp-III が減少すると考えられる。この結果から、少なくとも、AKHR のノックダウン

によって、リポホリンによる体液中の脂質輸送に脆弱性を与えていることが考えられた。

なお、長時間の絶食条件下における、体液中の ApoLp-III の動態を Native-PAGE を用いて解析したところ、絶食開始後 24-36 時間に、ApoLp-III のバンドの濃さが減少する傾向が見られた(図 4-1-2-2 (C))。一方、通常摂食条件下では、ApoLp-III のバンドの強度に大きな変動は見られなかった(図 4-1-2-2 (C))。この結果から、少なくとも絶食開始後 24-36 時間では、体液中への脂質の動員およびその輸送が亢進していることが示唆された。

## 4-2 LpR および ApoLp-III のノックダウン個体の摂食量の解析\*

### 4-2-1 LpR のノックダウン個体の摂食量の解析\*

上述のとおり、AKHR のノックダウンにより、*LpR* の mRNA の発現が抑制されたことから(図 4-1-1)、AKHR のノックダウン個体では、脂質輸送に変化が生じていることが考えられた。また、AKHR のノックダウン個体において認められた摂食周期の短縮に、*LpR* の mRNA の発現の抑制が関与している可能性が考えられた。そこで、*LpR* のノックダウン個体を調製し、その摂食量を解析した。なお、dsRNA の調製は、AKHR-dsRNA の調製と同様の方法を用いた(図 S1-2 (E))。クローニングした、フタホシコオロギ *LpR* をコードする cDNA の部分塩基配列を基に、dsRNA を調製し(図 S1-2 (E-1, 2))、その dsRNA の経口投与後 2、3 日目に、脂肪体における *LpR* の mRNA の発現が大きく抑制されることを確認した(補項第一項; S1-2 (E-3))。

調製した *LpR*-dsRNA、または EGFP-dsRNA を羽化後 0 日目のメスに投与後、フンの数を 1 日毎に計測した(図 4-2-1)。その結果、*LpR* のノックダウン群は、コントロール群と比較して、摂食量の差異は認められなかった。

### 4-2-2 ApoLp-III のノックダウン個体の摂食量の解析\*

次に、AKHR のノックダウンにより、体液中の遊離 ApoLp-III が減少したことから、AKHR のノックダウン個体において認められた摂食周期の短縮に、体液中の遊離 ApoLp-III の減少が関与している可能性が考えられた。そこで、ApoLp-III のノックダウン個体を調製し、その摂食量を解析した。

ApoLp-III のノックダウン個体を調製するために、まずは、同定したフタホシコオロギの

ApoLp-III のアミノ酸配列を基に縮重プライマーを作製し、成虫オス個体の脂肪体由来の cDNA をテンプレートとして degenerate PCR による cDNA クローニングを試みた。しかし、目的の cDNA 断片をクローニングすることはできなかった。そこで、フタホシコオロギとヨーロッパイエコオロギの ApoLp-III のアミノ酸配列は、非常に高い相同性を持つことを利用し(図 4-1-2-1 (C))、ヨーロッパイエコオロギの ApoLp-III をコードする cDNA の塩基配列に特異的なプライマーを作製し、フタホシコオロギの ApoLp-III をコードする cDNA の部分塩基配列を得た(図 S1-3 (A))。さらに、3'-RACE 法を用いて、その下流の塩基配列を得た(図 S1-3 (A))。フタホシコオロギの ApoLp-III をコードする cDNA の塩基配列の演繹アミノ酸配列と、他の昆虫種の ApoLp-III のアミノ酸配列を比較すると、フタホシコオロギの ApoLp-III は、同じ直翅目昆虫であるヨーロッパイエコオロギの ApoLp-III と高い相同性を有していた(identity: 97%、similarity: 98%)が、その他の昆虫種の ApoLp-III とでは低い相同性を示した(図 S1-3 (B))。また、直翅目昆虫であるトノサマバッタとの相同性は、33%と低い相同性を示した。フタホシコオロギの ApoLp-III をコードする cDNA の塩基配列の演繹アミノ酸配列と、他の昆虫種の ApoLp-III との系統樹を作成したところ(図 S1-3 (C))、フタホシコオロギの ApoLp-III は、他の昆虫種の ApoLp-III と同じクレードに属した。この結果から、クローニングしたフタホシコオロギの ApoLp-III は、ApoLp-III としての機能を有することが示唆された。実際、昆虫種間での ApoLp-III のアミノ酸配列の相同性は低い<sup>128)</sup>、分子の構造としては、両親媒性ヘリックスを共通に持ち、その機能としては同等であると考えられている<sup>129)</sup>。次に、フタホシコオロギの ApoLp-III の mRNA の発現部位を調べるため、RT-PCR を用いて解析した結果、フタホシコオロギの ApoLp-III の mRNA は、成虫オス個体において、脂肪体特異的に発現が認められた(図 S1-3 (D))。この結果は、アポリポタンパク質が脂肪体で合成されると考えられている<sup>130)</sup>ことと一致した。

ApoLp-III-dsRNA の調製は、AKHR-dsRNA の調製と同様の方法で行った(補項第二項; S1-3 (E))。クローニングした、フタホシコオロギ ApoLp-III をコードする cDNA の部分塩基配列を基に、dsRNA を調製し(図 S1-3 (E-1, 2))、その dsRNA の経口投与後 2 日目に、脂肪体における ApoLp-III の mRNA の発現が大きく抑制されることを確認した(図 S1-3 (E-3))。なお、ApoLp-III のノックダウンによる、体液中の遊離 ApoLp-III のタンパク質レベルの減少は、ApoLp-III-dsRNA を 2 日毎に投与した場合、投与開始後 4 日目から確認された(図 S1-3 (E-4))。

調製した ApoLp-III-dsRNA、または EGFP-dsRNA を羽化後 0 日目のメス、またはオスに 2 日毎に投与し、フンの数を 1 日毎に計測した(図 4-2-2)。その結果、ApoLp-III のノックダウン群は、メス(図 4-2-2 (A))、オス(図 4-2-2 (B))のどちらにおいても、コントロール群と比較して、摂食量の差異は認められなかった。

#### 4-3 まとめと考察

第四章では、脂質輸送と摂食行動との関連性を明らかにすることを目的とした。そこで、脂質輸送に関与する分子として、リポホリンへの脂質の取り込みや細胞への脂質の取り込みに関わる LpR と、体液中の脂質レベルに関連して体液中の挙動を大きく変えると考えられる ApoLp-III に注目して、AKH による制御と脂質輸送、および摂食行動との、三者の関連性について解析した。

#### フタホシコオロギの LpR のクローニングに関して

LpR に関しては、現在までに、数種の昆虫でクローニングおよび特徴づけがなされている<sup>131, 132)</sup>。図 S1-2 においてクローニングした、フタホシコオロギの LpR をコードする遺伝子の塩基配列の演繹アミノ酸配列は、他の昆虫種の LpR のアミノ酸配列に高い相同性を有していたこと、および、系統樹による解析から、フタホシコオロギの LpR を同定したと考えた。また、クローニングしたフタホシコオロギの LpR は、他の昆虫種において明らかにされている機能を有していると考えた。

フタホシコオロギの LpR は、脂肪体、中腸、メスの卵巣、オスの筋肉に mRNA の発現が認められた。脂肪体における LpR の mRNA の発現は、図 2-0 の模式図で示した、脂質輸送での役割通り<sup>42)</sup>、脂肪体から動員された脂質の受け渡しに関与しているためであると考えられた。また、中腸における発現は、食餌由来の脂質の受け渡しに関与しているためであると考えられた。ちなみに、フタホシコオロギ以外の昆虫種においても、LpR の mRNA は、脂肪体や中腸以外にも発現が認められている。トノサマバッタにおいては、脂肪体、中腸、卵母細胞に発現が認められており<sup>133)</sup>、マデラゴキブリでは、脂肪体、中腸の他に、マルピーギ管、筋肉にも発現が認められている<sup>121)</sup>。また、カイコにおいては、スプライシングバリエーションによる 4 種類の isoform (LpR1-4)が知られており、それらのうち、LpR4 は、その

機能は明らかにされていないが、脳、中枢神経系に特異的な発現が認められている<sup>134)</sup>。

#### AKHR のノックダウンによる、脂肪体における *LpR* の mRNA の発現抑制に関して

興味深いことに、AKHR のノックダウン個体では、脂肪体における *LpR* の mRNA の発現抑制が見られた(図 4-1-1)。現在までに、AKH の作用機構と *LpR* の mRNA の発現調節の関連性については明らかになっていないが、AKH および *LpR* の機能から考えると、体内の脂質、あるいは脂質輸送の変動が関与していると考えられた。例えば、ハチノスツヅリガ *Galleria mellonella* においては、高脂質の餌を与えることで、*LpR* の mRNA の発現が増加することが知られていることから<sup>135)</sup>、脂質代謝と *LpR* の mRNA の発現には関連性があると考えられる。また、トノサマバッタでは、成虫脱皮後に 5 日間絶食後の脂肪体において、*LpR* の mRNA の発現の増加が見られていることから、絶食による、脂肪体内の貯蔵エネルギー量の減少に対して *LpR* の発現が応答しているとされている<sup>136)</sup>。フタホシコオロギにおいて、AKHR のノックダウンによって、脂肪体内の TAG レベルが増加することを考慮すると(図 2-1-2)、AKHR のノックダウンによる、脂肪体における *LpR* の mRNA の発現抑制は、脂肪体内の TAG レベルの増加に応答している可能性も考えられる。

#### AKHR のノックダウンによる、体液中の遊離 ApoLp-III の減少に関して

AKH により制御される脂質動員において、脂質の輸送動態に伴い、体液中の動態を大きく変える分子として、ApoLp-III に着目し、その量的な変動と、AKH の制御機構との関連性について解析を行った。フタホシコオロギへの AKH の投与により、体液中の脂質レベルが増加するが(図 2-1-1 (E, F))<sup>93)</sup>、その際に、体液中の ApoLp-III の挙動が変化するはずであると考え(図 4-0)、AKH の投与により体液中の脂質レベルが増加する、投与 90 分後の体液を Native-PAGE に供したところ(図 4-1-2-2 (A))、体液中の遊離 ApoLp-III の量が減少した。これは、図 4-0 で示したモデル図を支持する結果であった。一方、AKHR のノックダウン個体についても、体液中の遊離 ApoLp-III の量が減少した(図 4-1-2-2 (B))。また、AKHR のノックダウン個体は、AKH 刺激では、体液中の遊離 ApoLp-III の量の減少が見られなかったことから(図 4-1-2-2 (B))、AKHR のノックダウン個体における、体液中の遊離 ApoLp-III の減少は、少なくとも AKH 刺激によるものではないと考えられた。AKH に制御されるような、

脂肪体からの脂質の輸送以外の、脂質の輸送としては、例えば、中腸から食餌由来の脂質を脂肪体や他の組織へ輸送することが知られている<sup>42)</sup>。このことから、AKHR のノックダウン個体では、AKH の作用とは別の経路にて、脂質の輸送が亢進されている可能性が考えられた。

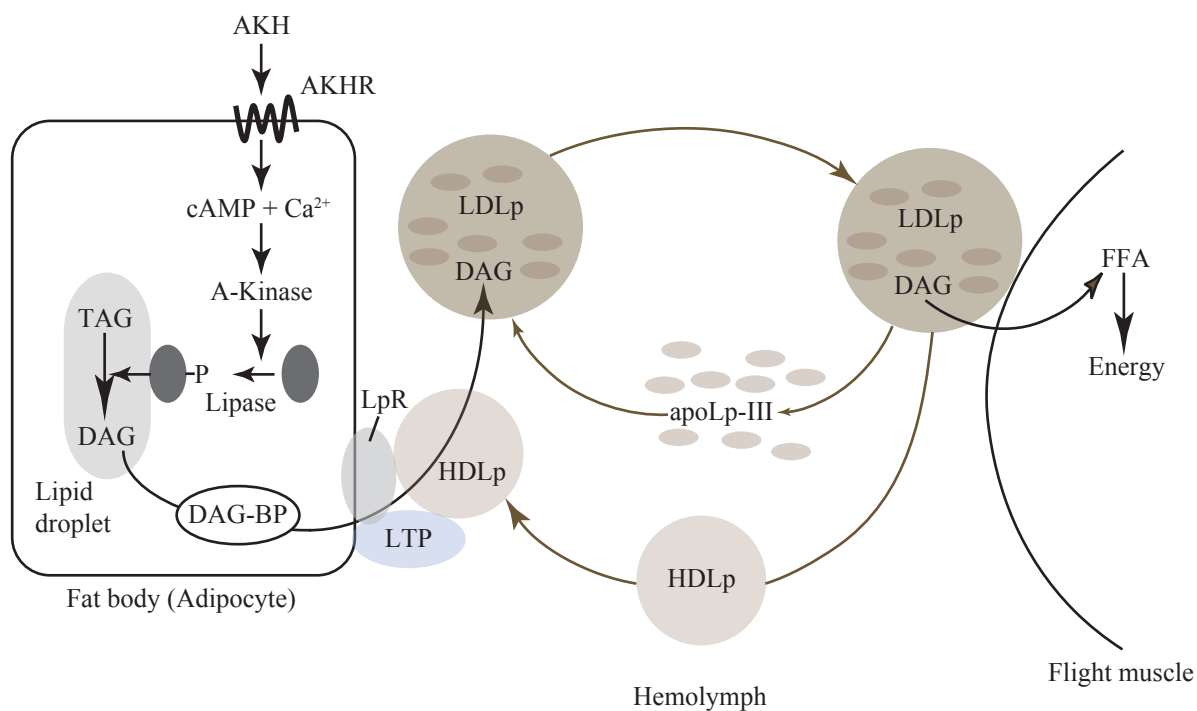
### 脂質輸送における ApoLp-III の機能に関して

ApoLp-III をノックダウンしたフタホシコオロギの成虫オス個体について、体液中の遊離 ApoLp-III がほぼ検出されなくなるような、ApoLp-III-dsRNA の連続投与開始後 6 日目にて(図 S1-3 (E-4))、体液中の 1, 2-DAG レベルを定量した。その結果、ApoLp-III のノックダウン個体は、コントロール個体と比較して、体液中の 1, 2-DAG レベルの顕著な変動は見られなかった(図 S2-4 (A))。つまり、体液中の遊離 ApoLp-III の減少は、体液中の 1, 2-DAG レベルには影響を与えないと考えられる。しかし、上述と同様の条件にて調製した ApoLp-III のノックダウン個体に、AKH を投与した場合、コントロール個体で見られるような、体液中の 1, 2-DAG レベルの顕著な増加は見られなかった(図 S2-4 (B))。つまり、フタホシコオロギにおいて、ApoLp-III は、AKH 刺激による急激な 1, 2-DAG の動員に伴う、体液中の 1, 2-DAG の輸送には必要であるが、通常状態における、体液中の 1, 2-DAG レベルの標準値を満たすような脂質輸送には必要がないと考えることができる。このことは、遊離 ApoLp-III の結合が必要でない、HDLp のみによって、通常状態における、体液中の 1, 2-DAG レベルの標準値を保つことができる可能性や、ApoLp-III を介さないような、体液中の脂質輸送機構が存在する可能性を示すかもしれない。

上述のような、AKHR のノックダウンによる、脂肪体における *LpR* の mRNA の発現量や、体液中の遊離 ApoLp-III 量への影響が(図 4-1-1、図 4-1-2-2 (B))、摂食行動の変化に関与するかを調べるために、*LpR* および ApoLp-III のノックダウン個体の摂食量を調べた(図 4-2-1、図 4-2-2)。しかし、*LpR* のノックダウン個体と、ApoLp-III のノックダウン個体のどちらに關しても、コントロール個体と比較して、顕著な差異は見られなかった(図 4-2-1、図 4-2-2)。なお、*LpR* のノックダウン個体と、ApoLp-III のノックダウン個体の摂食行動観察および解析も行ったが、AKHR のノックダウン個体で見られるような、摂食周期の短縮は見られな

かった(データ非掲載)。つまり、AKHR のノックダウン個体は、リポホリンによる脂質輸送機構に何らかの変化が見られると考えられるものの、摂食頻度の増加は、*LpR* の mRNA の発現の減少や、体液中の遊離 ApoLp-III の減少とは関連性がないことが示唆された。

そこで、次章では、AKHR のノックダウン個体における、摂食行動の変動に関与するような新規の分子を探索した。



( 文献 42 より改変 )

図 4-0. AKH 刺激による、脂肪体から体液への DAG の動員の機構の模式図。この図では、DAG の動員される組織を、例として、Flight muscle ( 飛翔筋 ) とした。apoLp-III: アポリポホリン -III (apolipoprotein-III)、DAG: ジアシルグリセロール (Diacylglycerol)、DAG-BP: ジアシルグリセロール結合タンパク質 (DAG-binding protein)、Fat body: 脂肪体、Hemolymph: 体液、FFA: 遊離脂肪酸 (Free fatty acid)、Flight muscle: 飛翔筋、HDLp: 高密度リポホリン (High-density lipophorin)、LDLp: 低密度リポホリン (Low-density lipophorin)、LpR: リポホリン受容体 (Lipophorin receptor)、LTP: 脂質転送タンパク質 (Lipid transfer particle)、TAG: トリアシルグリセロール (Triacylglycerol)。



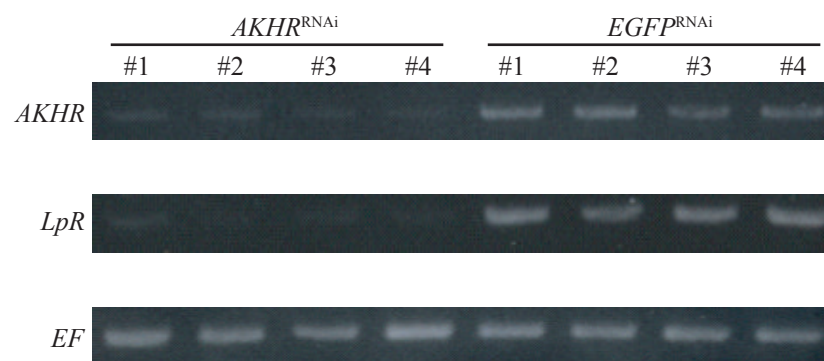


図 4-1-1. RT-PCR を用いた、*AKHR*-dsRNA および *EGFP*-dsRNA の投与後 2 日目のフタホシコオロギの、脂肪体における *LpR* の発現解析。*AKHR*-dsRNA、または *EGFP*-dsRNA をメス成虫個体に経口投与し、投与後 2 日目に脂肪体を摘出し、トータル RNA を抽出し、RT-PCR による発現解析を行った。*AKHR*-dsRNA を投与した個体は、*AKHR* の mRNA の発現の抑制とともに、*LpR* の mRNA の発現の抑制が認められた。

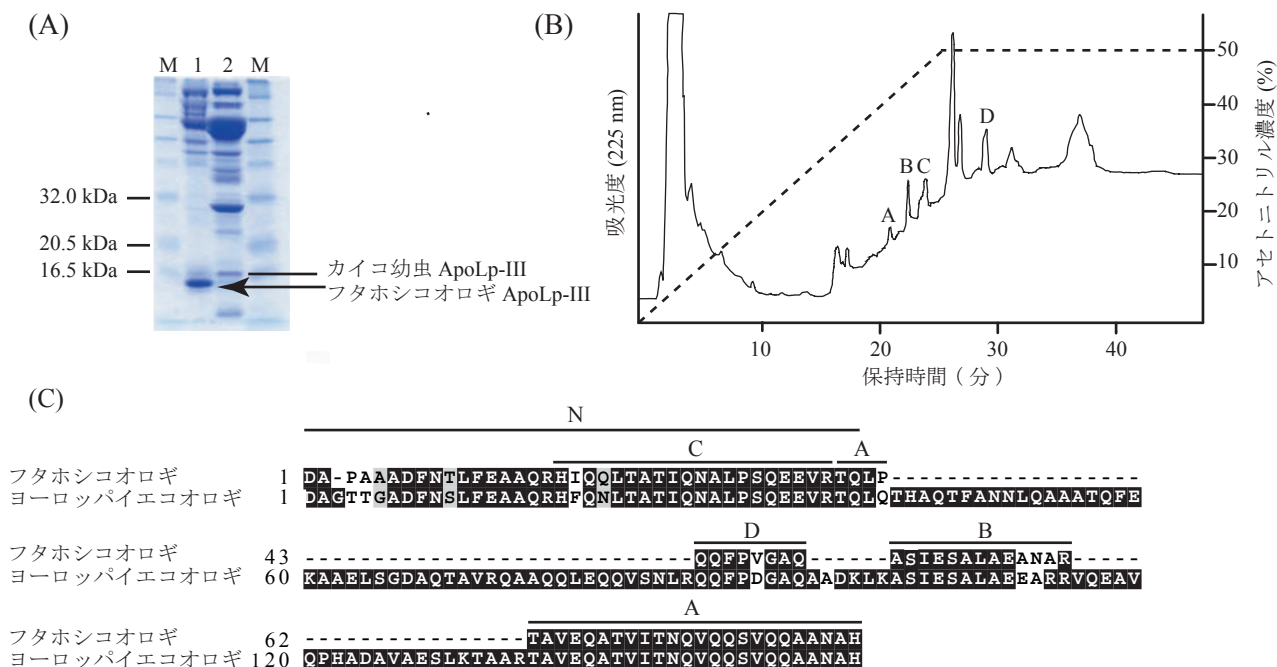
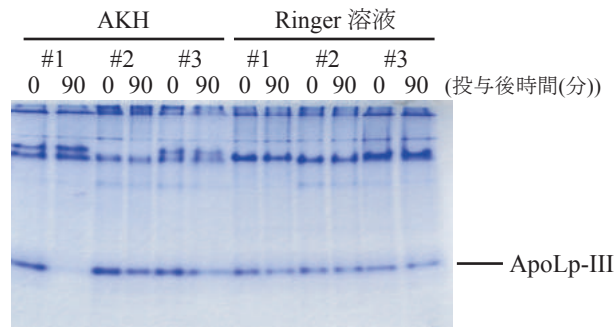
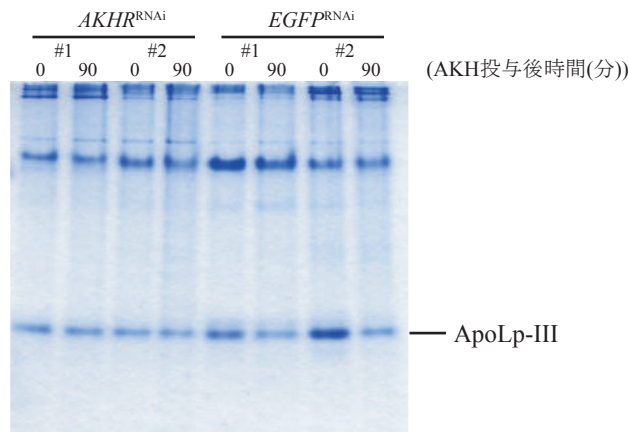


図 4-1-2-1. フタホシコオロギ ApoLp-III の同定。(A) フタホシコオロギの体液 ( レーン 1) およびカイコ幼虫の体液 ( レーン 2) を SDS-PAGE に供した。M は分子量マーカを示す。矢印で示したバンドは、フタホシコオロギの ApoLp-III と考えられたバンドである。(B) (A) で認められた、フタホシコオロギの ApoLp-III と考えられるバンドの、トリプシンによるゲル内消化産物を逆相 HPLC に供した。図中の A-D で示されるピークを、アミノ酸配列解析に供した。(C) ゲル内消化産物のアミノ酸配列解析の結果得られた部分アミノ酸配列および N 末端アミノ酸配列解析の結果得られた配列を基にした、フタホシコオロギの ApoLp-III の部分アミノ酸配列と、ヨーロッパエコオロギの ApoLp-III のアミノ酸配列のアラインメント。得られた部分アミノ酸配列での、ヨーロッパエコオロギの ApoLp-III のアミノ酸配列との相同性は、86% であった。

(A)



(B)



(C)

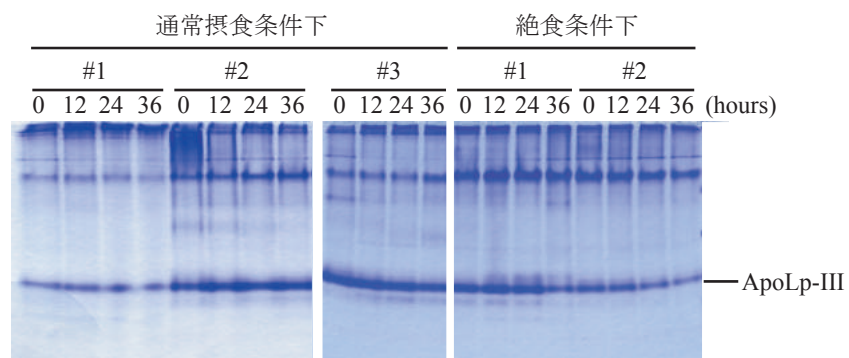


図 4-1-2-2. 体液中の ApoLp-III レベルの変動の Native-PAGE 解析。(A) AKH および Ringer 溶液の投与による、体液中の ApoLp-III レベルの変動の Native-PAGE 解析。フタホシコオロギ成虫オス個体に AKH 20 pmol あるいは Ringer 溶液 2  $\mu$ L を投与し、投与 0 分、90 分後に回収した体液を Native-PAGE に供した。# 番号は各群における別々の個体を示す。AKH の投与により、ApoLp-III のバンドの濃さが減少する傾向が見られた。(B) AKHR-dsRNA および EGFP-dsRNA の投与個体への AKH の投与による、体液中の ApoLp-III 量の変動の解析。フタホシコオロギ成虫オス個体に AKHR-dsRNA あるいは EGFP-dsRNA を投与し、投与後 2 日目の個体に、それぞれ AKH 20 pmol を投与し、投与 0 分、90 分後に回収した体液を Native-PAGE に供した。# 番号は、各群における別々の個体を示す。AKH の投与前において、AKHR-dsRNA の投与個体と EGFP-dsRNA 投与個体とを比較すると、AKHR-dsRNA 投与個体において、ApoLp-III のバンドの濃さが減少する傾向が見られた。また、EGFP-dsRNA 投与群は、AKH の投与によって、ApoLp-III のバンドの濃さが減少する傾向が見られたが、一方で、AKHR-dsRNA の投与群は、AKH の投与によって、ApoLp-III のバンドの濃さに変化は見られなかった。(C) 絶食条件下、あるいは通常摂食条件下の個体における、体液中の ApoLp-III レベルの経時的な変動の Native-PAGE 解析。フタホシコオロギ成虫オス個体を、絶食条件下、あるいは通常摂食条件下におき、条件開始時を 0 時間とし、12 時間毎にサンプリングした体液を Native-PAGE に供した。# 番号は各群における別々の個体を示す。通常摂食条件下の個体では、経過時間に伴う ApoLp-III のバンドの濃さに大きな変動は見られなかったが、絶食条件下の個体では、経過時間に伴い、ApoLp-III のバンドの濃さが減少する傾向が見られた。

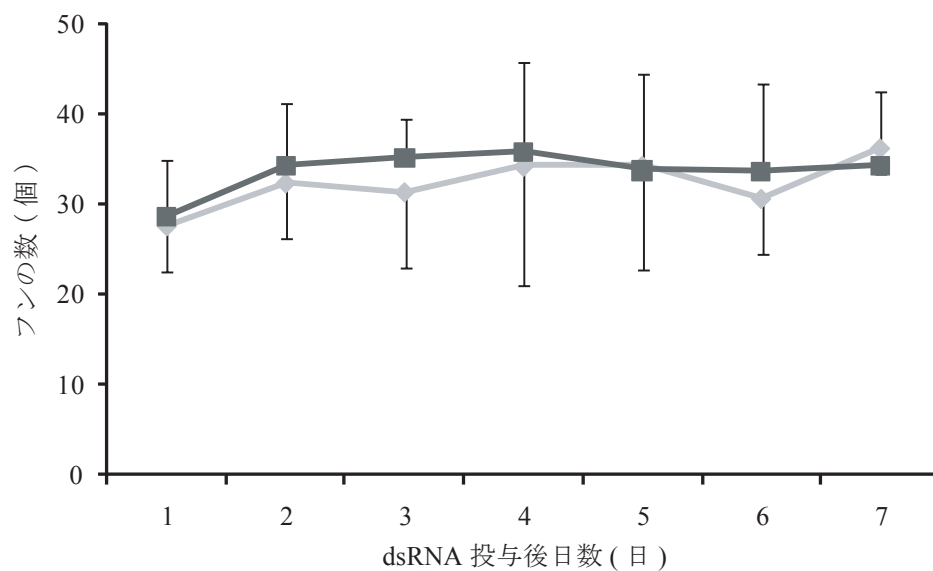
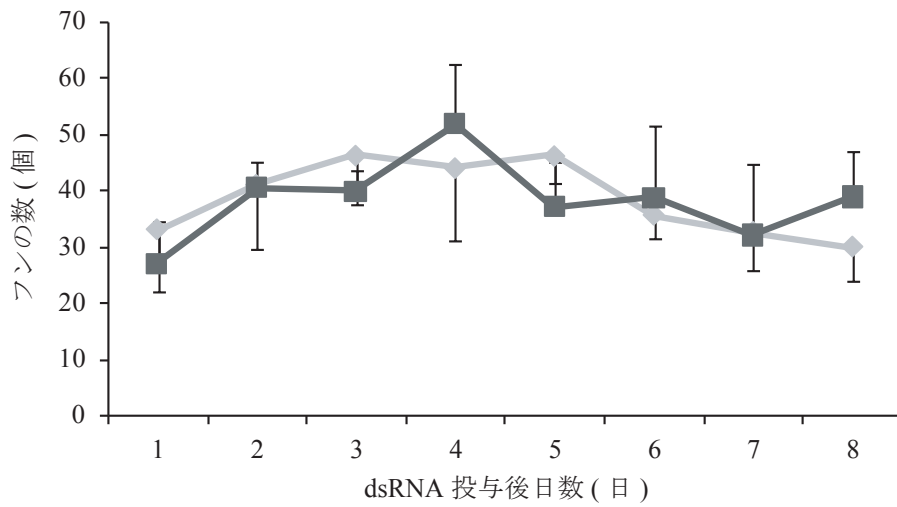


図 4-2-1. LpR のノックダウン個体の摂食量の解析。成虫脱皮 0 日目の成虫メス個体に LpR-dsRNA( 濃灰色 ) または EGFP-dsRNA ( 薄灰色 ) を投与後、1 日毎にフンの数を数え、摂食量の指標とした。フンの数は、平均値 + S. D. または平均値 - S. D. で示した (n=5)。LpR のノックダウン個体は、コントロール個体と比較して摂食量の顕著な差は認められなかった ( $P > 0.05$ ; Student's *t*-test)。

(A)



(B)

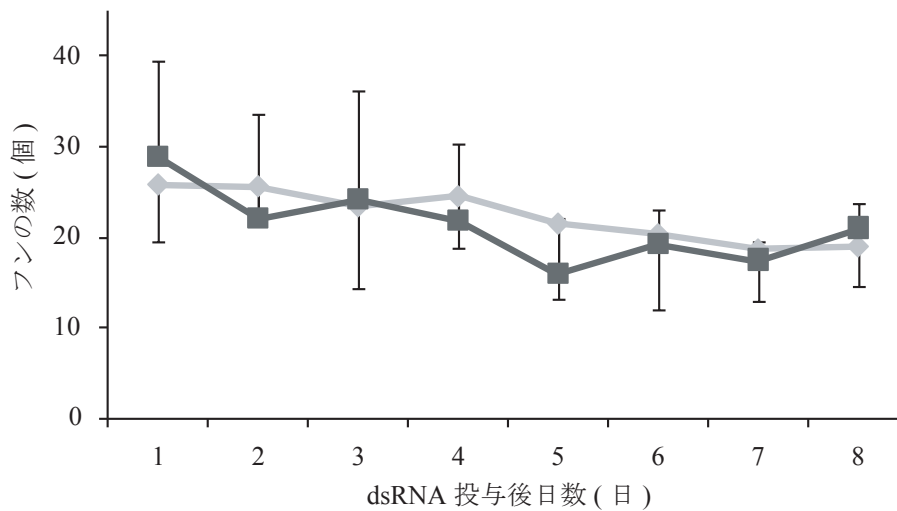


図 4-2-2. ApoLp-III のノックダウン個体の摂食量の解析。成虫脱皮 0 日目のメス (A)、およびオス (B) に ApoLp-III-dsRNA(濃灰色) または EGFP-dsRNA(薄灰色) を 2 日おきに投与し、投与開始後から 1 日ごとにフンの数を調べ、摂食量の指標とした。フンの数は、平均値 + S. D. または平均値 - S. D. で示した ( $n=6$ )。ApoLp-III のノックダウン個体は、メス、オスともに、コントロール個体と比較して摂食量の顕著な変動は認められなかった ( $P>0.05$ ; Student's  $t$ -test)。

## 第五章 AKHR のノックダウン個体における、体内の脂質の質的レベルと摂食行動との関連性の解析

### 5-0 はじめに

前章までの結果から、体液中の 1, 2-DAG レベルは、摂食モチベーションの調節に関与していると考えられた。AKHR のノックダウン個体において、体液中における脂質輸送系に変化が見られたものの、脂質輸送体であるリポホリンは、AKHR のノックダウン個体における、1, 2-DAG レベルの減少を、摂食頻度の増加へ、直接的に反映させるような分子ではないと考えられた。

この結果を踏まえ、本章では、AKHR のノックダウン個体における、摂食行動に関与する、新規分子を探索した。新規分子を探索する上で、AKHR のノックダウン個体における、摂食モチベーションの増加に関与する分子であるかどうかを指標として、スクリーニングを行った。そのスクリーニング方法として、cDNA サブトラクション法を用いて、AKHR のノックダウンにより発現レベルの増加または減少が見られるような遺伝子を、上述の分子をコードする、候補遺伝子として取得した。その後、得られた候補遺伝子をノックダウンし、そのノックダウン個体が、摂食行動に関する表現型に影響を与えるかどうかを解析した。

### 5-1 AKHR のノックダウン個体における、摂食行動に関与する新規分子の探索

#### 5-1-1 cDNA サブトラクション法を用いた、脂肪体内にて、AKHR のノックダウンにより発現変動する遺伝子の探索

cDNA サブトラクション法では、AKHR のノックダウン個体と、コントロール個体とで、比較する組織を、脂肪体とした。この理由としては、脂肪体は、栄養分の代謝や貯蔵に関与する主要な組織であり、体内の栄養分の代謝に関与する分子が取得できる可能性が高いと考えたからである。

そこで、AKHR のノックダウン個体と、コントロール個体との脂肪体から抽出した mRNA を出発材料として、cDNA サブトラクション法を行った。具体的な方法の概略としては、AKHR のノックダウン個体の mRNA 由来の cDNA 断片と、コントロール個体の mRNA 由

来の cDNA 断片とをハイブリダイズさせた後、ハイブリダイズしなかった cDNA 断片、すなわち、両ノックダウン個体間での発現量の差異を示す cDNA 断片を、PCR により指数関数的に増幅させるという方法である(図 5-1-1-1 (A))。この PCR によって、AKHR のノックダウンにより、脂肪体にて mRNA の発現レベルが増加している遺伝子に由来する、数十 bp から数百 bp の cDNA 断片が増幅された(図 5-1-1-1 (B)レーン 1)。また、同様の PCR により、AKHR のノックダウンにより、脂肪体にて mRNA の発現レベルが減少している遺伝子に由来する、数十 bp から数百 bp の cDNA 断片が増幅された(図 5-1-1-1 (B)レーン 4)。増幅された cDNA 断片をそれぞれサブクローニングし、塩基配列を解析した。AKHR のノックダウンによって、脂肪体にて mRNA レベルの発現が増加している遺伝子に由来するクローン(以下 a タイプクローン)については 166 クローンを(表 5-1-1-1)、AKHR のノックダウンによって、脂肪体にて mRNA の発現レベルが減少している遺伝子に由来するクローン(以下 e タイプクローン)については 157 クローンの塩基配列を解析した(表 5-1-1-2)。塩基配列を解析したクローンについて、クローン間で同様の塩基配列が見られることが多く(表 5-1-1-1 と表 5-1-1-2 の Frequency の列)、また、ポリ A 配列とそれより 5'側の数塩基に由来する配列等の、さらなる解析が困難であるクローンは、表 5-1-1-1 と表 5-1-1-2 には記載していない。結果としては、a タイプクローンは 9 種類のクローンを(表 5-1-1-1)、e タイプクローンは 12 種類のクローンを得た(表 5-1-1-2)。得られた塩基配列を BLASTn、BLASTx、tBLASTx のアルゴリズムを用いて、それぞれのクローンについて、他の昆虫種における相同配列を検索した(表 5-1-1-1、5-1-1-2)。

次に、9 種類の a タイプクローン、および 12 種類の e タイプクローンについて、ドットプロットによる 2nd スクリーニングを行った(図 5-1-1-2)。具体的な方法としては、塩基配列解析の際に調製していた、a タイプクローンおよび e タイプクローンを挿入したベクターをメンブレンにドットした後、AKHR のノックダウン個体の脂肪体由来の cDNA およびコントロール個体の脂肪体由来の cDNA 由来のプローブをハイブリダイズさせた。a タイプクローンに関しては、AKHR のノックダウン個体の脂肪体由来の cDNA をプローブにしてハイブリダイズさせた場合(図 5-1-1-2 (A)左)の方が、コントロール個体の脂肪体由来の cDNA をプローブにしてハイブリダイズさせた場合(図 5-1-1-2 (A)中)よりも強いシグナルが見られたとき、ポジティブと判断した。逆に e タイプクローンに関しては、コントロー

ル個体の脂肪体由来の cDNA をプローブにしてハイブリダイズさせた場合(図 5-1-1-2 (A) 中)の方が、AKHR のノックダウン個体の脂肪体由来の cDNA をプローブにしてハイブリダイズさせた場合(図 5-1-1-2 (A)左)よりも強いシグナルが見られたとき、ポジティブと判断した。上述の、ポジティブと判断したクローン(図 5-1-1-2 (A)右; 赤色で表記)、および、ポジティブかどうか判断がつかなかったクローン(図 5-1-1-2 (A)右; オレンジ色で表記)については、さらに別のロットの AKHR のノックダウン個体およびコントロール個体の脂肪体由来であるプローブを用いて、ドットブロットを再度行った(図 5-1-1-2 (B))。その結果、ポジティブと判断できたクローンを、本スクリーニングにおける最終的なポジティブクローンとした。最終的なポジティブクローンとして、a タイプグループからは、a-11、a-24、a-n26 を、e タイプグループからは、e-39 を得た(図 5-1-1-2 (B)、表 5-1-1-1、表 5-1-1-2)。これら 4 クローンは全て、BLAST 検索によって、他の昆虫種における相同配列は見出されていなかったため、RACE 法を用いて、各クローンの 5'側および 3'側の塩基配列を取得した後、再度 BLAST 検索を行った。その結果、クローン a-11 の塩基配列は、thrombospondin (TSP) をコードする cDNA の塩基配列と高い相同性を有していた(表 5-1-1-1、図 S1-4 (E))。クローン a-24 の塩基配列は、acyl-CoA binding protein (ACBP)をコードする cDNA の塩基配列と高い相同性を有していた(表 5-1-1-1、図 S1-4 (B))。クローン a-n26 の塩基配列は cellulase をコードする cDNA の塩基配列と高い相同性を有していた(表 5-1-1-1、図 S1-4 (F))。また、クローン e-39 の塩基配列は serine protease inhibitor (serpin)をコードする cDNA の塩基配列と高い相同性を有していた(表 5-1-1-2、図 S1-4 (G))。

次に、これらのクローンに由来する遺伝子は、AKHR のノックダウンによって、脂肪体におけるそれらの mRNA の発現レベルが、どの程度変動するのかを定量 PCR により確認した(図 5-1-1-3)。その結果、a タイプクローンに関しては、約 1.5-2.0 倍程度の mRNA の発現レベルの増加が、e タイプクローンに関しては、約 2.0 倍程度の mRNA の発現レベルの減少が見られた。

## 5-1-2 cDNA サブトラクション法により得た候補遺伝子のノックダウン個体の解析

次に、5-1-1 で得られた 4 クローンに由来する遺伝子が、摂食モチベーションの調節に関与するかどうかを解析するために、これらの 4 クローンのノックダウン個体をそれぞれ調



製し(図 S1-4 (H))、それらのノックダウン個体の摂食量を解析した(図 5-1-2)。その結果、ACBP をコードすると考えられる、クローン a-24 のノックダウン個体のみが、コントロール個体と比較して、dsRNA 投与後 2-5 日目において、顕著に摂食量が減少した(図 5-1-2)。一方、それ以外の 3 クローンのノックダウン個体では、コントロール個体と比較して、摂食量の差異は見られなかった(図 5-1-2)。この結果から、AKHR のノックダウン個体における、摂食モチベーションの増加に関与する分子のスクリーニングとしては、クローン a-24 がその条件を満たしたと判断したため、以降は、クローン a-24 について解析を進めることとした。

### 5-1-3 フタホシコオロギの ACBP (acyl-CoA binding protein)の脂質代謝に関する機能の解析

サブトラクション法により取得したクローン a-24 の塩基配列(図 S1-4 (A))の演繹アミノ酸配列と、他の昆虫種の ACBP のアミノ酸配列のアラインメント(図 S1-4 (B))、およびそれらのアミノ酸配列を用いて作成した分子系統樹から(図 S1-4 (C))、クローン a-24 は、フタホシコオロギ ACBP をコードしていると考えられた。ACBP とは、多くの生物種から、それらの高い相同性を基に見出されている、86-103 アミノ酸残基からなるタンパク質である<sup>137, 138</sup>)。ACBP は細胞内に局在し、acyl-CoA と結合し、輸送体として機能することで、acyl-CoA の代謝のバランスを調節していると考えられている<sup>137, 138</sup>)。実際に、ACBP をノックダウンした酵母、線虫、およびマウスにおいて、細胞内の脂肪酸組成が変動するような表現型が報告されている<sup>139, 140, 141</sup>)。また、ACBP をノックダウンした線虫においては、貯蔵 TAG 量も顕著に変動する<sup>140</sup>)。

そこで、サブトラクション法により取得した、フタホシコオロギの ACBP は、脂肪体内の脂質代謝に関して機能的に働いているかどうかを調べるために、まずは、ACBP をノックダウンしたフタホシコオロギの成虫オス個体の、体液中および脂肪体内における、脂質レベルを分析した(図 5-1-3)。その結果、ACBP のノックダウンにおける、体液中の 1, 2-DAG レベルの変動は見られなかった(図 5-1-3 (A))。また、ACBP をノックダウンしたフタホシコオロギの成虫オス個体から脂肪体を摘出し、Nile Red 染色を行った結果、脂肪体内の細胞における脂肪滴の大きさに変動は見られなかった(図 5-1-3 (B))。

## 5-2 AKHR のノックダウン個体、および ACBP のノックダウン個体における、体内の脂質の脂肪酸組成の解析

5-1-3 において、ACBP のノックダウン個体の体液中および脂肪体内における、脂質レベルが変動しなかった結果をうけて、次に、クローン a-24 (ACBP) のノックダウン個体について、体内の脂質の脂肪酸組成の変動を解析した(図 5-2)。なお、AKHR のノックダウン個体についても、同様に解析した(図 5-2)。具体的には、AKHR-dsRNA、a-24-dsRNA、あるいは EGFP-dsRNA の投与後 3 日目のフタホシコオロギ成虫オス個体から、各組織(体液、脂肪体、中腸、神経系) とフンをそれぞれ摘出、回収し、脂質を抽出した。抽出した脂質をけん化した後に、脂肪酸を抽出した。抽出した脂肪酸は、ADAM (9-anthryldiazomethane) により蛍光誘導体化した後に、HPLC に供した。HPLC のクロマトグラムにて見られた、7 種の脂肪酸(12:0、14:0、16:0、18:0、18:1、18:2、18:3) の各ピーク面積からモル濃度を算出し、その合計に対する各脂肪酸のモル濃度比を算出した。その結果、AKHR のノックダウン個体、および、ACBP のノックダウン個体における、体液中の脂質の脂肪酸組成に顕著な変動が見られた(図 5-2 (A))。特に、AKHR のノックダウン個体における体液中の脂質の脂肪酸組成に着目すると、ステアリン酸(18:0)の減少、およびリノール酸(18:2)の増加が見られた(図 5-2 (A))。すなわち、体液中の脂質における、飽和脂肪酸と不飽和脂肪酸のバランスが変動していた。

## 5-3 絶食条件下における体内の脂質の脂肪酸組成の解析

次に、5-2 にて解析した、体液中の脂質の脂肪酸組成が、どのように調節されているかを調べるために、絶食条件下での、体液中の脂質の脂肪酸組成の変動を、5-2 と同様に、HPLC を用いて解析した(図 5-3)。具体的には、フタホシコオロギ成虫オス個体を、絶食条件におき、絶食開始後 0、6、12、24、36 時間、および、その後の再摂食開始 24 時間後にて、体液を回収し、脂質を抽出した。抽出した脂質をけん化した後に、脂肪酸を抽出した。抽出した脂肪酸を ADAM と反応後、HPLC に供した。その結果、コントロールである絶食開始後 0 時間における脂肪酸組成と比較して、絶食条件下での体液中の脂質の脂肪酸組成の顕著な変動は見られなかった(図 5-3)。この結果から、少なくとも 36 時間の絶食条件下では、

体液中の脂質の脂肪酸組成は、一定に維持されていると考えられる。

#### 5-4 体内の脂質の質的レベルの変動が摂食行動に及ぼす影響の解析の試み

5-2 の解析で見られた、ACBP や AKHR のノックダウン個体における、体液中の脂質の脂肪酸組成の変動が、摂食行動に影響を与えるかを解析するために、体液中の脂質の脂肪酸組成を人為的に調節する方法を検討した。その方法として、上述の脂肪酸組成の解析で確認された、7 種類の脂肪酸(12:0、14:0、16:0、18:0、18:1、18:2、18:3)について、それぞれの脂肪酸をもつような TAG (TAG (12:0/12:0/12:0)、TAG (14:0/14:0/14:0)、TAG (16:0/16:0/16:0)、TAG (18:0/18:0/18:0)、TAG (18:1/18:1/18:1)、TAG (18:2/18:2/18:2)、TAG (18:3/18:3/18:3))を化学合成し、それぞれを人工飼料に加え、それを摂食させるという方法を試みた(図 5-4)。人工飼料の調製方法の詳細は、第六章および実験の部において後述するが、ここでは、摂食させる上で、栄養源とする脂肪酸を、単一の脂肪酸にすることを目的として調製した。

まずは、それぞれの脂肪酸(12:0、14:0、16:0、18:0、18:1、18:2、18:3)とグリセロールとをエステル化反応させ、反応産物をシリカゲルクロマトグラフィーにて精製した。精製した TAG のうち、TAG (18:0/18:0/18:0)について、<sup>1</sup>H NMR スペクトルにてその精製度を確認した。さらに、合成した 7 種の TAG (TAG (12:0/12:0/12:0)、TAG (14:0/14:0/14:0)、TAG (16:0/16:0/16:0)、TAG (18:0/18:0/18:0)、TAG (18:1/18:1/18:1)、TAG (18:2/18:2/18:2)、TAG (18:3/18:3/18:3))について、合成の確認のために、MS スペクトルにて分子質量を分析した。

次に、合成した 7 種の TAG が、それぞれ 2% (w/w)になるように加えた人工飼料を調製し、フタホシコオロギ成虫オス個体に、それらの人工飼料を 10 日間摂食させた。その後、各組織(中腸、体液、脂肪体、神経系)を摘出、回収し、脂質を抽出した。抽出した脂質をけん化した後に、脂肪酸を抽出した。抽出した脂肪酸は、ADAM と反応した後に、HPLC に供し、脂肪酸組成を解析した(図 5-4)。その結果、各人工飼料の摂食によって、各組織での脂質の脂肪酸組成が部分的に変動した。しかし、摂食させた人工飼料に含まれる TAG 由来の脂肪酸が、そのまま各組織の脂質の脂肪酸組成に反映されるわけではなかった。例えば、TAG (12:0/12:0/12:0)を 2%加えた人工飼料を 10 日間摂食させた場合の各組織の脂質の脂肪

酸組成に着目すると、中腸と神経系では、摂食した TAG に由来すると考えられる、12:0 レベルの増加が見られるものの(図 5-4 (A、D))、体液中での 18:1 レベルの増加、脂肪体での 18:1 レベルと 18:3 レベルの増加や、神経系での 18:2 レベルの増加といった、別の脂肪酸レベルの増加も見られた(図 5-4 (B、C、D))。その他の TAG を人工飼料に加えた場合でも同様に、摂食させた人工飼料に含まれる TAG 由来の脂肪酸が、そのまま各組織の脂質の脂肪酸組成に反映されるわけではなかった。これらの結果から、各組織では、見かけ上、脂肪酸組成が或る一定の組成を維持するように、脂肪酸の伸長、不飽和化や、分解等の代謝が調節されていると考えられた。

## 5-5 まとめと考察

### 本章にて行った cDNA サブトラクション法に関して

本章における cDNA サブトラクション法では、得られたクローンは、その塩基配列の重複が多く、多くのクローンの種類を得られなかった(表 5-1-1-1、5-1-1-2)。本論文研究で行った cDNA サブトラクション法では、実験操作上は、転写産物の存在率は補正されることから(図 5-1-1-1 (A))、本実験で得られたクローンの数は少ないと判断した。この理由の一つとして、PCR にて、差次的に発現した遺伝子の cDNA に由来する塩基配列の部分断片を増幅する際に、その増幅のされやすさに差異があることが考えられた(図 5-1-1-1 (B))。なお、このことを考慮して、PCR 産物のゲル抽出による精製の段階で、アガロースゲル電気泳動の結果にてメジャーに見えるバンドを除いて精製も行った。また、上述の PCR の際に、PCR に用いる DNA ポリメラーゼの変更も検討したが、改善はほとんど見られなかった。

しかし、少なくとも、ACBP に関しては、スクリーニングにおいてポジティブな結果を得ることができ、また、ACBP を手掛かりとして以降の研究を進めることも興味深いと判断した。そこで、サブトラクション法には検討の余地は残されるものの、次の過程に進むこととした。

### AKHR のノックダウンによる、脂肪体における *ACBP* の mRNA の発現レベルの増加に関して

昆虫において、AKH シグナリングと、ACBP との関連性については、これまで見出され

ていない。ただし、昆虫において、ACBP が脂質の代謝および輸送に関与していることは、いくつかの昆虫種にて報告されている。例えば、タバコスズメガ、および、オオサシガメ *Rhodnius prolixus* では、中腸にて発現する ACBP が、摂食した餌由来の脂質の輸送に関与していると考えられている<sup>142, 143)</sup>。これらのことから、フタホシコオロギにおいて見られた、AKHR のノックダウンと、脂肪体における ACBP の mRNA の発現レベルの増加とは、どのような文脈にて関連性があるかは明らかにできなかったものの、脂肪体内の脂質代謝の調節機構が変化していることを示すと考えられる。

#### フタホシコオロギの体内の脂肪酸組成解析に関して

5-4において、各 TAG を加えた人工飼料の摂食による脂肪酸組成の変動を解析した結果、摂食させた人工飼料に含まれる TAG 由来の脂肪酸が、そのまま各組織の脂肪酸組成に反映されるわけではないと考えられた。フタホシコオロギに上述の人工飼料を与えた場合、1 日あたり数十 mg 程度を摂食することから(データ非掲載)、10 日間の人工飼料の摂食に伴う、各 TAG の摂食量は数 mg 程度と見積もることができる。本実験では、フンの脂肪酸組成の解析は行っていないため、摂食した TAG から、どの程度の割合の脂肪酸が消化され、体内の組織に取り込まれたかは明らかではない。しかし、少なくとも、各 TAG を加えた人工飼料の摂食による、各組織での脂肪酸組成の変動は見られていることから、各組織の脂肪酸組成に影響を与えうる程度の量は、各 TAG 由来の脂肪酸が各組織に取り込まれていると判断した。

また、本論文研究にて行った脂肪酸組成解析にて用いた脂肪酸のサンプルは、各組織から抽出した全脂質のけん化により得ている。すなわち、この処理にて得られる脂肪酸は、遊離脂肪酸や、中性脂質に含まれる脂肪酸のみならず、リン脂質等の複合脂質に含まれる脂肪酸も由来する。つまり、脂肪酸レベルの変動を詳細に解析するためには、脂質種毎に解析を行う必要もあると考えられる。

#### AKHR のノックダウン個体における、体内の脂肪酸組成の変動について

AKHR のノックダウン個体では、体液中の脂質の脂肪酸組成に顕著な変動が見られた(図 5-2 (A))。この結果と、通常個体での体液中の脂質の脂肪酸組成は、見かけ上、一定に維持

されていることが示唆されたことと合わせて考えると(図 5-3、図 5-4 (A))、AKHR のノックダウンにより、体液中の脂質の脂肪酸組成のバランスを維持するような機構に変化を与えたと考えられる。また、体液中の脂質に含まれる主要な脂質種は、1, 2-DAG であるため(図 2-1-1 (A))、上述の脂肪酸組成の変動は、1, 2-DAG に含まれる脂肪酸組成が変動していることを示すと言える。AKHR のノックダウンにより、体液中の 1, 2-DAG の脂肪酸組成が変動する理由については、第一に、上述した、脂肪体内における *ACBP* の mRNA の発現レベルの増加の関与が考えられる。第二に、AKH による、脂肪体内の TAG を 1, 2-DAG に分解する活性の関連が考えられる。言い換えると、AKH により体液中に動員される 1, 2-DAG に含まれる脂肪酸種が、AKHR のノックダウンによる、体液中の 1, 2-DAG の脂肪酸組成が変動することと関連しているかもしれない。実際に、トノサマバッタにおいては、3 種類の AKH (AKH I、AKH II、AKH III)が見出されているが、それぞれの AKH の投与により動員される 1, 2-DAG に含まれる脂肪酸の組成に差異が見られる<sup>117)</sup>。この理由としては、AKH シグナリングの下流で働く TAG リパーゼが、TAG に含まれる脂肪酸種を選択して切断していると考えられているが、その切断の機構は明らかではない。

#### 他の昆虫種における体内の脂肪酸組成に関して

他の昆虫種においても、フタホシコオロギにて見られた、各組織の脂質における、見かけ上の、或る一定の脂肪酸組成が見られるかどうかを解析した。

まず、カイコ 5 齢 2 日目の幼虫について、各組織(中腸、体液、脂肪体)、人工飼料 (SILKMATE 2S、日本農産工)、およびフンに含まれる脂質の脂肪酸組成を解析した(図 S2-5 (A))。その結果、フタホシコオロギと同様に、各組織の脂質における、見かけ上の、或る一定の脂肪酸組成が見られた。また、これらの組成を、フタホシコオロギにおける組成と比較して考えると、その脂肪酸比は昆虫種間にて差異があることが示唆された。

また、予備的な解析ではあるが、東京大学柏キャンパス生命棟付近にて、8 月上旬に採集した、いくつかの昆虫種( $n = 1$ )の脂肪体内の脂質の脂肪酸組成を解析したところ、昆虫種間にて、脂肪体内の脂質の脂肪酸組成に差異があることが示唆された(図 S2-5 (B))。また、脂肪体内の脂質の脂肪酸組成は、特に脂肪体に貯蔵される TAG に含まれる脂肪酸組成を、特に反映すると考えられるため、昆虫種間により、貯蔵する TAG に含まれる脂肪酸組成を、

その種が適するような組成に調節していると考えられる。このような組成の差異が、昆虫種間におけるどのような特徴を反映しているかは明らかではない。このような特徴として、(i) 昆虫種毎の食性や、(ii) 生育可能な温度範囲などが挙げられると考えたが、これらの関連性を詳細に明らかにするために、(i) に関しては、各昆虫種が摂食する餌の脂肪酸組成や、(ii) に関しては、各昆虫種が生育する環境温度や、それに伴う脂肪酸組成の変動や、TAGの融点などを解析することで、興味深い結果が得られるかもしれないと考えている。

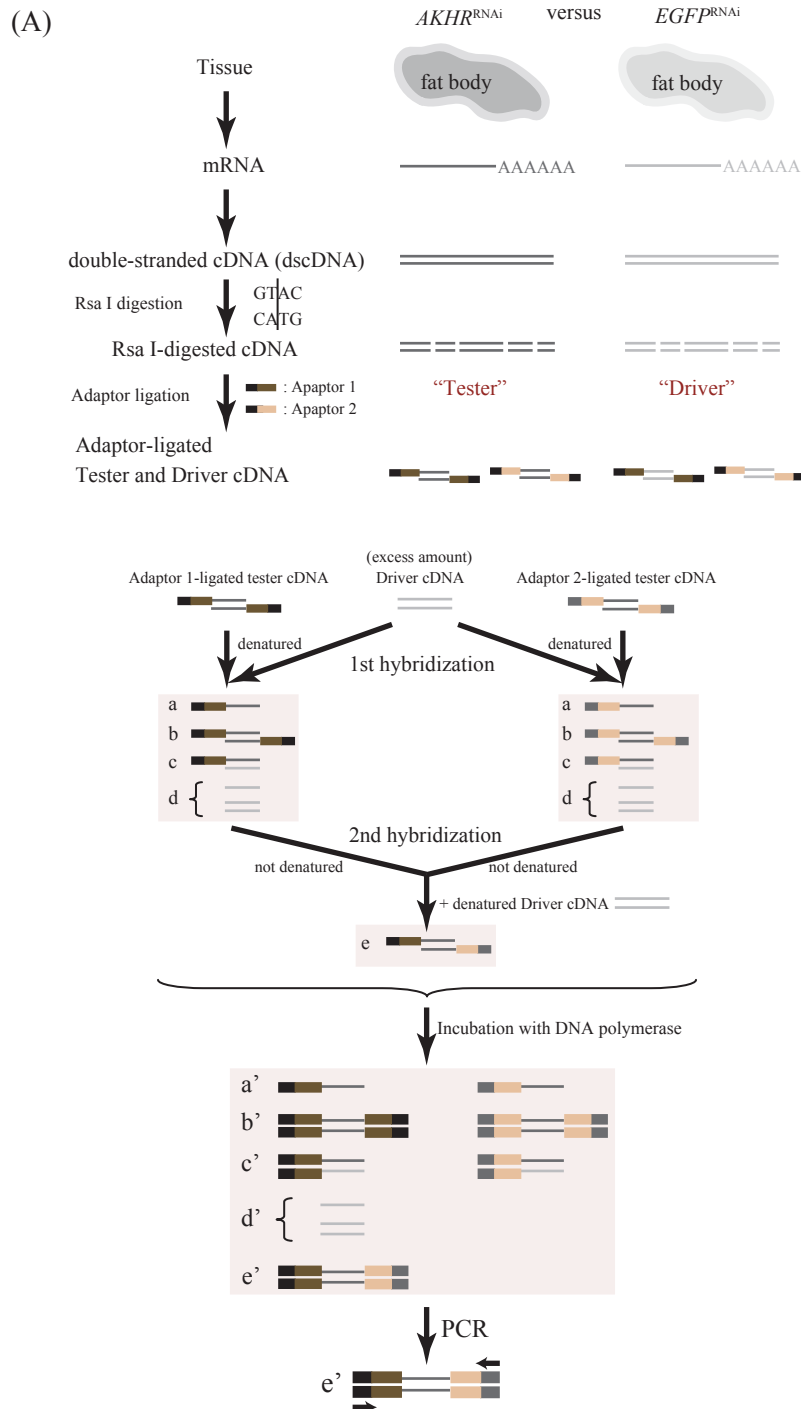


図 5-1-1-1. (A) 本論文研究にて行った、cDNA サブトラクション法の概要。具体的には、AKHR-dsRNA および EGFP-dsRNA の投与後 3 日目のフタホシコオロギ成虫オス個体から、脂肪体を摘出し、mRNA を抽出し、dscDNA を合成した。なお、発現量差を検討する、AKHR のノックダウン個体の脂肪体由来の dscDNA を Tester、コントロールとした EGFP-dsRNA 投与個体の脂肪体由来の dscDNA を Driver とした。Tester の dscDNA を Rsa I で消化した後、その消化産物と、配列の異なる 2 種の dscDNA アダプター (Apaptor1、2) とライゲーションした。次に、それぞれの、アダプターを付加した Tester dscDNA に過剰量の Driver dscDNA を加えて、加熱変性させた後、1 回目のハイブリダイゼーションを行い、4 種類の分子 (a、b、c、d) を形成させた。このとき、分子 a は、AKHR のノックダウン個体の脂肪体にて、コントロール個体と比較して、mRNA の発現量が増加した遺伝子をコードする塩基配列の部分断片を含んでいる。そこで、分子 a のみを後に取得するために、1 回目のハイブリダイゼーションを行ったサンプルを加熱変性させずに、再び過剰量の Driver dscDNA を加えて、2 回目のハイブリダイゼーションを行った。その結果、目的の分子 a 同士がアニーリングした、分子 e が形成される。その後、サンプルを DNA ポリメラーゼ処理し、a、b、c、d、e の分子の末端部分を 2 本鎖にした (a'、b'、c'、d'、e')。その後、Apaptor 1 と Apaptor 2 の塩基配列に相補的なプライマーをそれぞれ用いて PCR 反応を行い、目的の分子 e' を増幅させた。なお、Tester と Driver とを逆にして同様の処理を行うことで、AKHR のノックダウン個体の脂肪体にて、EGFP のノックダウン個体と比較して、mRNA の発現量が減少した遺伝子をコードする塩基配列の部分断片も増幅させた。



(B)

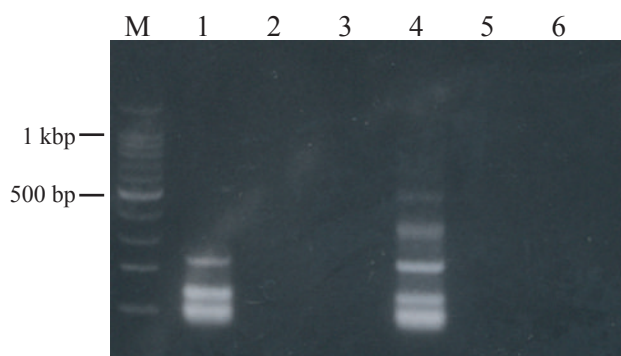


図 5-1-1-1 ( つづき ). (B) 図 5-1-1-1 (A) で示した、cDNA サブトラクション法における、PCR により得た部分塩基配列の部分断片のアガロースゲル電気泳動。レーン 1-3 は、AKHR のノックダウン個体の脂肪体由来の dscDNA を Tester に、コントロール個体の脂肪体由来の dscDNA を Driver にした場合の PCR 産物であり、レーン 4-6 は、コントロール個体の脂肪体由来の dscDNA を Tester に、AKHR のノックダウン個体の脂肪体由来の dscDNA を Driver にした場合の PCR 産物である。Apaptor1 と Adaptor2 の塩基配列に相補的なプライマーをそれぞれ用いた。レーン 1 とレーン 4 は、目的の塩基配列の部分断片を含む分子 ( 図 5-1-1-1 (A) の e' ) をテンプレートとして用いた場合の PCR 産物である。レーン 2 とレーン 5 は、図 5-1-1-1 (A) における、1 回目のハイブリダイゼーションの前の、Adaptor1 を付加した tester dscDNA ( 図 5-1-1-1 (A) の Adaptor1-ligated tester cDNA ) をテンプレートとした場合の PCR 産物である。レーン 3 とレーン 6 は、図 5-1-1-1 (A) における、1 回目のハイブリダイゼーションの前の、Adaptor2 を付加した tester dscDNA ( 図 5-1-1-1 (A) の Adaptor2-ligated tester cDNA ) をテンプレートとした場合の PCR 産物である。つまり、レーン 2 とレーン 3 は、レーン 1 に対するネガティブコントロールであり、レーン 5 とレーン 6 は、レーン 4 に対するネガティブコントロールである。レーン 1 およびレーン 4 の PCR 産物を精製し、塩基配列解析に用いた。

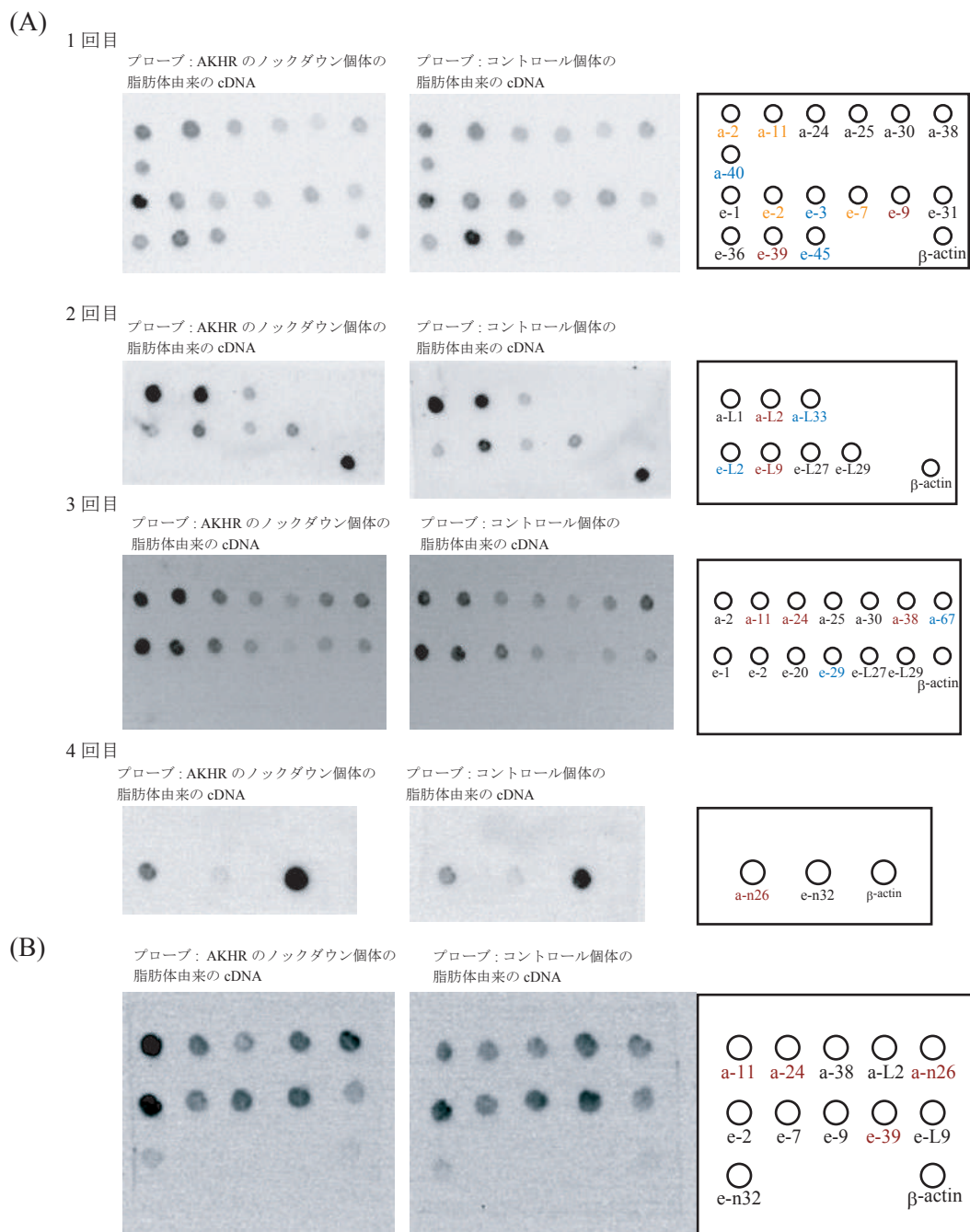


図 5-1-1-2. サブトラクション法により得られたクローンについての、ドットプロットによる 2nd スクリーニング。

(A) サブトラクション法により得られたクローンを挿入したベクターが調製でき次第、ドットプロットを行った。

a タイプクローン (図中にて、a を頭文字とするクローン) に関しては、AKHR のノックダウン個体の脂肪体由来の cDNA をプローブにしてハイブリダイズさせた場合 (左) の方が、EGFP のノックダウン個体の脂肪体由来の cDNA をプローブにしてハイブリダイズさせた場合 (中) よりも強いシグナルが見られたとき、ポジティブと判断した。逆に、e タイプクローン (図中にて、e を頭文字とするクローン) に関しては、EGFP のノックダウン個体の脂肪体由来の cDNA をプローブにしてハイブリダイズさせた場合 (中) の方が、AKHR のノックダウン個体の脂肪体由来の cDNA をプローブにしてハイブリダイズさせた場合 (左) よりも強いシグナルが見られたとき、ポジティブと判断した。ポジティブと判断したクローンは、赤色にて示した (右)。ポジティブかどうかの判断がつかなかったクローンは、オレンジ色にて示した。なお、ドットプロットと同時に進めていた、各クローンの塩基配列解析の結果、別のクローンと同一であると判断されたクローンは、青色で示した。(B) (A) にて、ポジティブであると判断されたクローン、およびポジティブかどうかの判断がつかなかったクローンについて、別のロットの、AKHR のノックダウン個体の脂肪体由来の cDNA およびコントロール個体の脂肪体由来の cDNA をプローブとして用いて、再確認した (左、中)。その結果、赤色で示した、a-11、a-24、a-n26、e-39 のクローンを、最終的に、ポジティブと判断した。なお、クローン名に L や n を記入したクローンは、図 5-1-1-1 (B) にて、PCR 産物をアガロースゲルから切り出して精製する際に、塩基長毎に分けて精製し、その後の実験に進めた場合に得られたクローンであることを示す。

表 5-1-1-1. cDNA サブトラクション法により取得した、AKHR のノックダウン個体の脂肪体にて、mRNA の発現レベルが増加した遺伝子をコードする塩基配列の部分断片の塩基配列解析と、その配列に対する BLAST 検索の結果、およびドットプロットによる 2nd スクリーニングの結果。

clone name	nucleotide length (bp)	Search results (BLASTn, BLASTx or tBLASTx)	similarity (%)	Frequency	Result of 2nd screening
a-2	63	no hit		29	false-positive
<b>a-11</b>	<b>442 (RACE)</b>	<b><i>Aedes aegypti</i> thrombospondin (TSP)</b>	<b>94</b>	<b>19</b>	<b>positive</b>
<b>a-24</b>	<b>563 (RACE)</b>	<b><i>Drosophila melanogaster</i> CG8498 (ACBP; Acyl-CoA-binding protein)</b>	<b>76</b>	<b>8</b>	<b>positive</b>
a-25	51	表 5-1-1-2 の e-7 と同様の配列		12	false-positive
a-30	71	<i>Gryllus bimaculatus</i> 28S ribosomal RNA gene (e-9 と同様の配列)	100	9	false-positive
a-38	88	no hit		19	false-positive
a-67	106	no hit		1	false-positive
a-L2	103	<i>Apis mellifera</i> zinc finger FYVE domain-containing protein 9	70	1	false-positive
<b>a-n26</b>	<b>1530 (RACE)</b>	<b><i>Teleogryllus emma</i> cellulase</b>	<b>81</b>	<b>8</b>	<b>positive</b>

Frequency は、クローンの塩基配列解析の結果、そのクローンと同様の塩基配列が得られた数を示す。クローン名に L や n を記入したクローンは、図 5-1-1-1 (B) にて、PCR 産物をアガロースゲルから切り出して精製する際に、塩基長毎に分けて精製し、その後の実験に進めた場合に得られたクローンであることを示す。

表 5-1-1-2. cDNA サブトラクション法により取得した、AKHR のノックダウン個体の脂肪体にて、mRNA の発現量が減少した遺伝子をコードする塩基配列の部分断片の塩基配列解析と、その配列に対する BLAST 検索の結果、およびドットプロットによる 2nd スクリーニングの結果。

clone name	nucleotide length (bp)	Search results (BLASTn, BLASTx or tBLASTx)	similarity (%)	Frequency	Result of 2nd screening
e-1	104	no hit		1	false-positive
e-2	102	no hit		1	false-positive
e-7	51	表 5-1-1-1 の a-25 と同様の配列	76	26	false-positive
e-9	71	<i>Gryllus bimaculatus</i> 28S ribosomal RNA gene (e-9 と同様の配列)	100	16	false-positive
e-31	87	no hit		4	false-positive
e-36	50	no hit		12	false-positive
<b>e-39</b>	<b>1311 (RACE)</b>	<b><i>Tenebrio molitor</i> serine protease inhibitor (serpin)</b>	<b>64</b>	<b>18</b>	<b>positive</b>
e-20	194	GBcontig28003, 28S ribosomal RNA gene	98	10	false-positive
e-L9	306	GBcontig31064, 18S ribosomal RNA gene	100	1	false-positive
e-L27	76	no hit		1	false-positive
e-L29	120	<i>Culex quinquefasciatus</i> Indy ( <i>I'm not dead yet</i> )	63	2	false-positive
e-n32	51	no hit		1	false-positive

Frequency は、クローンの塩基配列解析の結果、そのクローンと同様の塩基配列が得られた数を示す。クローン名に L や n を記入したクローンは、図 5-1-1-1 (B) にて、PCR 産物をアガロースゲルから切り出して精製する際に、塩基長毎に分けて精製し、その後の実験に進めた場合に得られたクローンであることを示す。

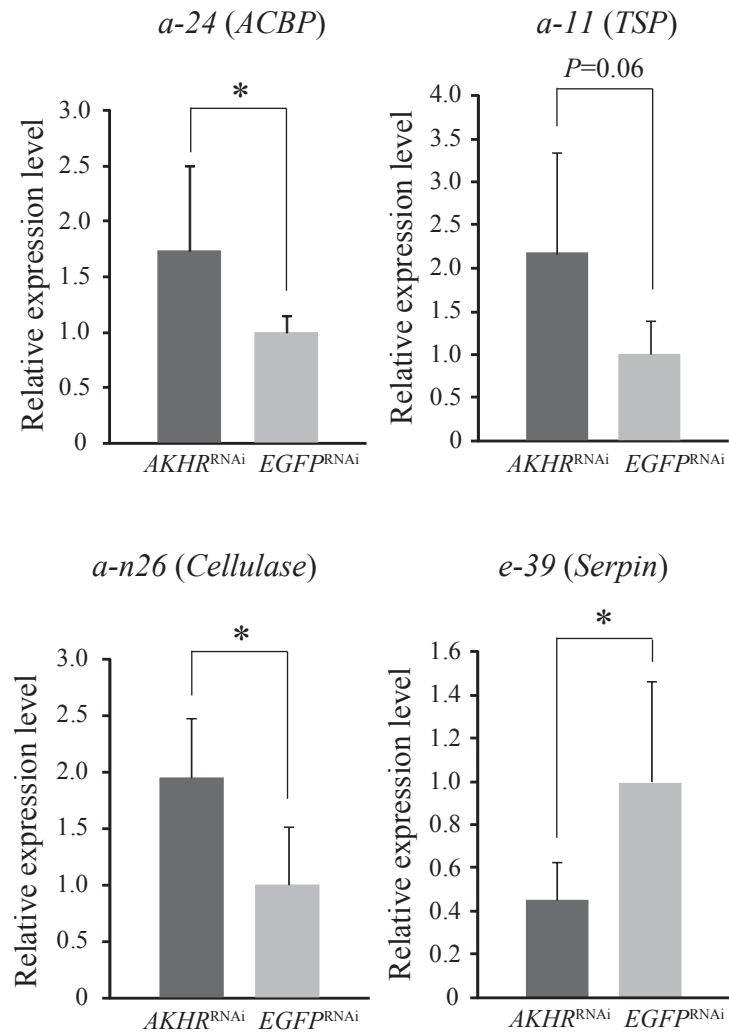


図 5-1-1-3. 定量 PCR を用いた、AKHR のノックダウン個体の脂肪体における各クローンの発現レベルの解析。フタホシコオロギの成虫オス個体へ、AKHR-dsRNA および EGFP-dsRNA を投与し、投与後 2 日目における脂肪体をテンプレートとした。EGFP のノックダウン個体における、内在性コントロールとして用いた EF に対する、各クローンの発現量を 1 とした。それぞれ平均値 + S. D. で示した (n = 5)。アスタリスクは、コントロール個体に対して、有意な差が認められたことを示す (\* $P < 0.05$ ; Student's *t*-test)。AKHR のノックダウン個体の脂肪体にて、クローン *a-24 (ACBP)*、*a-11 (TSP)* の mRNA の発現が顕著に増加し、クローン *e-39 (Serpin)* の mRNA の発現が顕著に減少していた。なお、*a-n26 (Cellulase)* の mRNA の発現の顕著な増加は見られなかった。

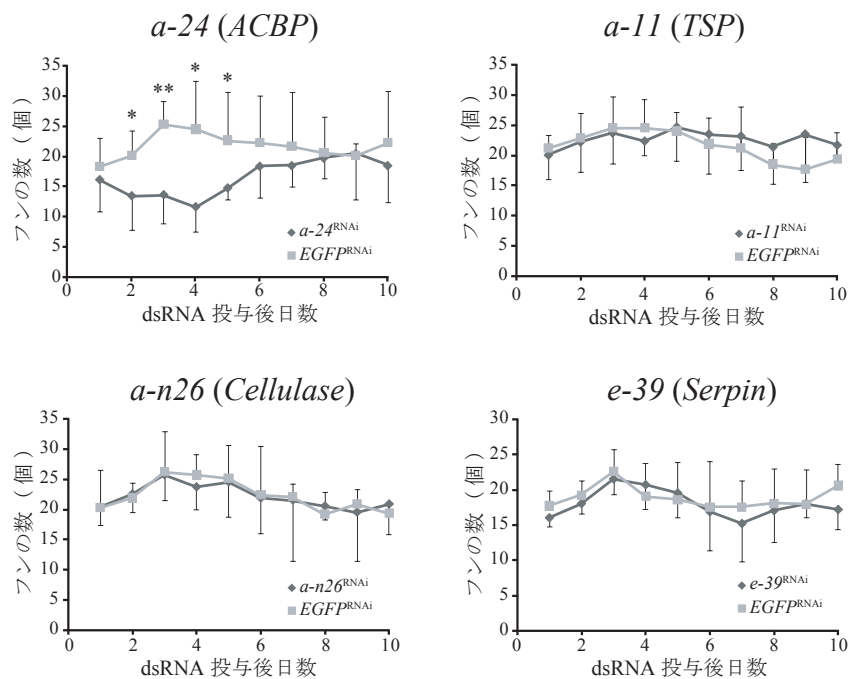
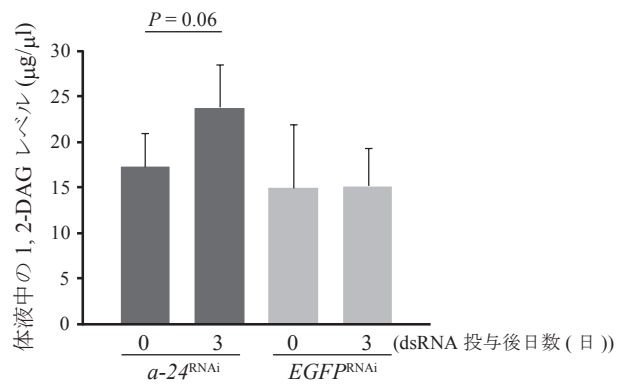


図 5-1-2. サブトラクション法で得られた各クローンのノックダウン個体の摂食量の解析。成虫脱皮後 0 日目のオスに各クローンの dsRNA (濃灰色) および EGFP-dsRNA (薄灰色) を投与後、1 日ごとにフンの数を調べ、摂食量の指標とした。フンの数は、平均値  $\pm$  S.D. で示した ( $n=5$ )。アスタリスクは、コントロール個体に対して、有意な差が認められたことを示す ( $*P<0.05$ ,  $**P<0.005$ ; Student's *t*-test)。クローン a-24 (ACBP) のノックダウン個体において、コントロール個体と比較してフンの数が顕著に減少した。それ以外のクローンのノックダウン個体においては、フンの数に顕著な変化は見られなかった。

(A)



(B)

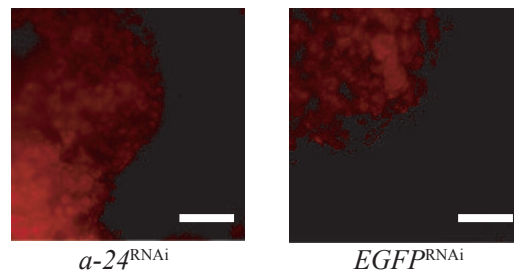


図 5-1-3. クローン a-24 (ACBP) をノックダウンしたフタホシコオロギのオス成虫個体の、体液中および脂肪体内における、脂質の量的レベルの定量。(A) a-24 (ACBP) をノックダウンしたオス成虫個体における、体液中の 1,2-DAG レベルの定量。それぞれ平均値 + S. D. で示した (n = 4)。クローン a-24 (ACBP) のノックダウンにより、体液中の 1,2-DAG レベルの顕著な変動は見られなかった。(B) クローン a-24 (ACBP) をノックダウンしたオス成虫個体の脂肪体の Nile Red 染色。バーは 25  $\mu\text{m}$  を示す。クローン a-24 (ACBP) のノックダウンにより、脂肪滴に変化は見られなかった。

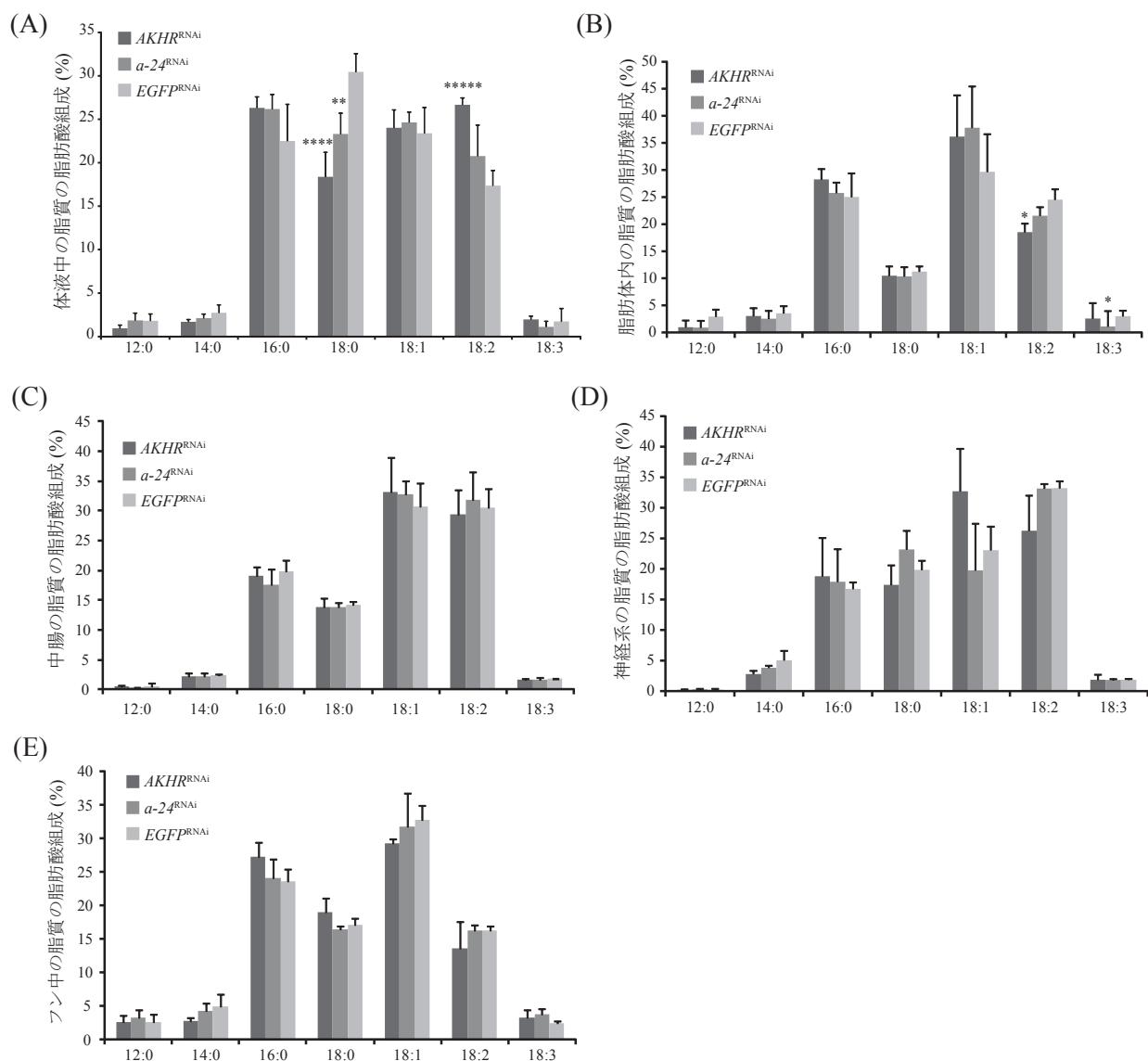


図 5-2. AKHR のノックダウン個体およびクローン a-24 (ACBP) のノックダウン個体の各組織とフンの脂肪酸組成の解析。AKHR-dsRNA、a-24-dsRNA、あるいは EGFP-dsRNA の投与後 3 日目のフタホシコオロギ成虫オス個体から、各組織 (体液 (A)、脂肪体 (B)、中腸 (C)、神経系 (D)) とフン (E) を摘出・回収し、脂質を抽出した。抽出した脂質をけん化した後に、脂肪酸を抽出した。抽出した脂肪酸は、ADAM 化反応した後に、HPLC に供した。HPLC のクロマトグラムにて見られた、7 種の脂肪酸 (12:0、14:0、16:0、18:0、18:1、18:2、18:3) の各ピーク面積から、各脂肪酸のモル濃度を算出した。算出した各脂肪酸のモル濃度の合計に対する、各脂肪酸の比をグラフに示した。それぞれ平均値 + S. D. で示した (n = 4-6 (A), n = 3 (B-E))。アスタリスクは、コントロール個体に対して、有意な差が認められたことを示す (\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.005$ , \*\*\*\* $P < 0.00005$ , \*\*\*\*\* $P < 0.000005$ ; Dunnett's test)。AKHR のノックダウン個体において、特に体液中の脂質に含まれる飽和脂肪酸と不飽和脂肪酸のバランスが顕著に変動していた。

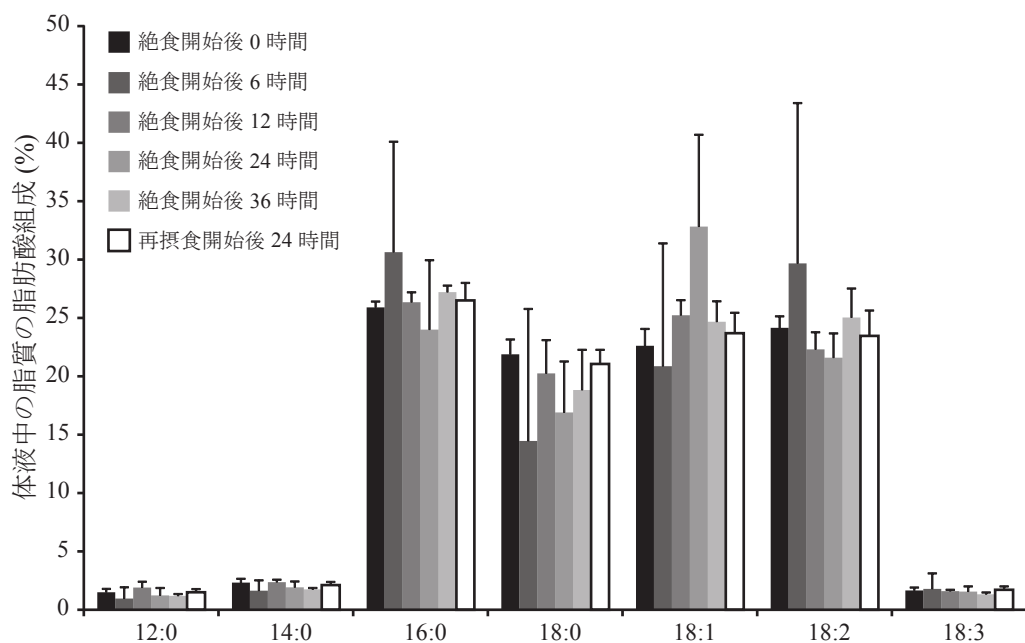


図 5-3. 絶食条件下での、体液中の脂質の脂肪酸組成の変動の解析。羽化後 0 日目のフタホシコオロギ成虫オス個体を、絶食条件におき、絶食開始後 0、6、12、24、36 時間、および、その後の再摂食開始後 24 時間にて、体液を回収し、脂質を抽出した。抽出した脂質をけん化した後に、脂肪酸を抽出した。抽出した脂肪酸は、ADAM と反応した後に、HPLC に供した。HPLC のクロマトグラムにて見られた、7 種の脂肪酸 (12:0、14:0、16:0、18:0、18:1、18:2、18:3) の各ピーク面積から、各脂肪酸のモル濃度を算出した。算出した各脂肪酸のモル濃度の合計に対する、各脂肪酸の比をグラフに示した。それぞれ平均値 + S. D. で示した (n = 3-6)。コントロールである絶食開始後 0 時間における各脂肪酸組成と比較して、絶食条件下での体液中の各脂肪酸組成の顕著な変動は見られなかった ( $P > 0.05$ ; Dunnett's test)。



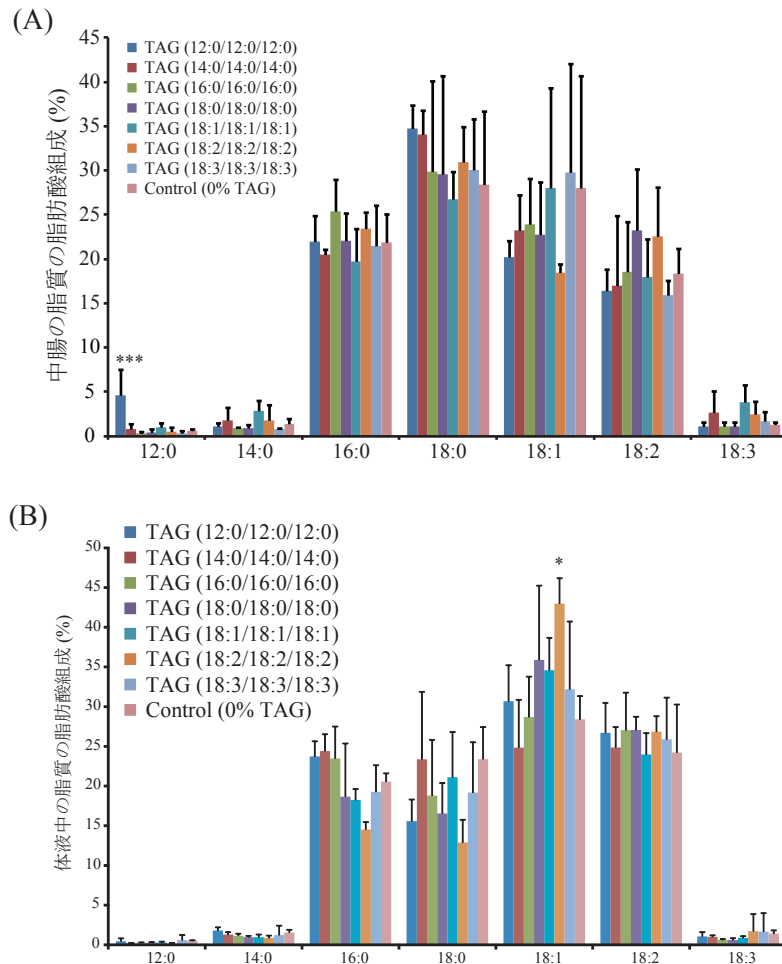


図 5-4. 化学合成した、7 種類の TAG (TAG (12:0/12:0/12:0)、TAG (14:0/14:0/14:0)、TAG (16:0/16:0/16:0)、TAG (18:0/18:0/18:0)、TAG (18:1/18:1/18:1)、TAG (18:2/18:2/18:2)、TAG (18:3/18:3/18:3)) を、2% (w/w) になるように加えた人工飼料を調製した。フタホシココロギ成虫オス個体に、それらの人工飼料を 10 日間摂食させた後、各組織 (中腸 (A)、体液 (B)、脂肪体 (C)、神経系 (D)) を摘出、回収し、脂質を抽出した。抽出した脂質をけん化した後に、脂肪酸を抽出した。抽出した脂肪酸は、ADAM 化反応した後に、HPLC に供した。HPLC のクロマトグラムにて見られた、7 種の脂肪酸 (12:0、14:0、16:0、18:0、18:1、18:2、18:3) の各ピーク面積から、各脂肪酸のモル濃度を算出した。算出した各脂肪酸のモル濃度の合計に対する、各脂肪酸の比をグラフに示した。  
(次ページへつづく)

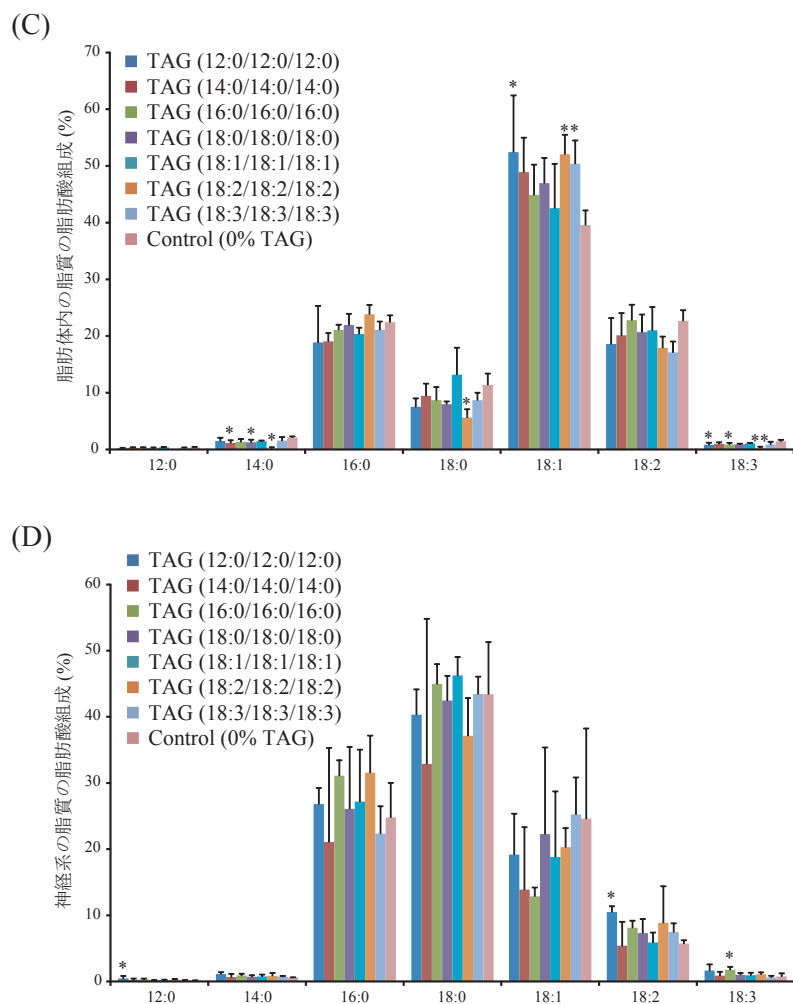


図 5-4 ( つづき ). それぞれ平均値 + S. D. で示した (n = 4)。アスタリスクは、TAG を加えなかった人工飼料を摂食させた、コントロール個体に対して、有意な差が認められたことを示す (\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.005$ , \*\*\* $P < 0.0005$ ; Dunnett's test)。各人工飼料の摂食によって、各組織での脂肪酸組成が部分的に変動した。しかし、摂食させた人工飼料に含まれる TAG が有する脂肪酸が、そのまま各組織の脂肪酸組成に反映されるわけではなかった。

## 第六章 AKHR のノックダウン個体における、餌中の栄養分の嗜好性の変化、およびその嗜好性に関与する器官に関する解析

### 6-0 はじめに

本論文研究のこれまでの結果から、AKHR をノックダウンしたフタホシコオロギ成虫個体における摂食行動の周期性の変化には、体液中の脂質レベルの量的変動だけではなく、質的変動(脂肪酸組成の変動)も関与する可能性が示唆された。つまり、体液中の 1, 2-DAG レベルの量的、質的変動を調節するような、体内の脂質代謝機構のバランスが変化していると考えられる。

序論に述べたように、昆虫は、体内の栄養要求性を適切に満たすように、適切な量、および割合の栄養分が得られるような餌を自身で選択し摂食する、**self-selection** と呼ばれる機構を体内に有していることが知られている<sup>24, 25)</sup>。AKHR をノックダウンしたフタホシコオロギ成虫個体では、体内の脂質代謝機構のバランスが変化しているため、体内の栄養要求性の観点から考えると、特に脂質の要求性が変化している可能性が考えられた。

**self-selection** の考え方から、このような栄養要求の変化を解析するためには、餌の栄養分の嗜好性を調べればよいと考えた。他の昆虫種において、餌の栄養分の嗜好性の解析方法として、人工飼料を用いた **choice** アッセイが用いられている<sup>27-34)</sup>。ただし、これまでの、昆虫における餌の栄養分の嗜好性の解析では、窒素源としてのタンパク質と、炭素源としての糖質との、2 パラメーターにのみ着目しており、脂質の嗜好性に関しては、これまで着目されていない<sup>27-34)</sup>。そこで、本章では、これまでの、他の昆虫種における、タンパク質と糖質の嗜好性の解析方法に基づきながら、脂質の要求性の解析方法を導入しつつ、フタホシコオロギ成虫オス個体の、脂質の嗜好性について着目して解析した。その結果、興味深いことに、AKHR のノックダウン個体は、脂質の中でも、特定の分子(リノール酸)に対して、嗜好性を増加させていることが分かった。また、リノール酸の嗜好性の増加は、嗅覚器官の一つである、小腮(図 6-0)を介して、起こることが示唆された。

### 6-1 AKHR のノックダウン個体における、三大栄養素の嗜好性の解析

上述したように、AKHR をノックダウンしたフタホシコオロギ成虫個体では、体内の脂

質代謝機構のバランスが変化しているため、体内の栄養要求として、特に脂質の嗜好性が変化している可能性が考えられた。そこで、先ず、AKHR のノックダウンにより、三大栄養素(タンパク質、糖質、脂質)の嗜好性が変化しているかどうかを、choice アッセイにより解析した(図 6-1)。方法としては、先ず、タンパク質、糖質、脂質のそれぞれを多く含むような、三種類の人工飼料を調製した(表 6-1)。なお、人工飼料の調製に関しては、フタホシコオロギと同じ直翅目昆虫であるトノサマバッタにおける、タンパク質と糖質との先行研究での人工飼料の調製方法に従って調製した<sup>144, 145)</sup>。具体的な栄養分の組成に関しては、例えば、表 6-1 における P-diet (タンパク質を多く含む人工飼料)では、タンパク質であるカゼインを、他の人工飼料(C-diet と L-diet)と比較して 4 倍になるようにした。この時、P-diet において、糖質や脂質の含有量を 0 にしない理由としては、それらの含有量を 0 にしてしまうと、その人工飼料を、昆虫が餌として認識しないと考えられるからである。また、フタホシコオロギ成虫では、人工飼料に、糖質を 5%以上程度入れない限り、その人工飼料を餌として認識せず、全く摂食しない(データ非掲載)。また、C-diet (糖質を多く含む人工飼料)や、L-diet (脂質を多く含む人工飼料)も、同様に調製した。脂質に関しては、これまでの先行研究での choice アッセイにて使われていないが、上述の、トノサマバッタを用いたタンパク質と糖質との choice アッセイでの人工飼料は、ステアリン酸(18:0)やリノール酸(18:2)を、脂質源として 0.125% (w/w)入れ調製されている<sup>144, 145)</sup>。そこで、この調製方法に従い、フタホシコオロギに用いる人工飼料として、先ずは、18:0 を脂質源とした(表 6-1)。なお、セルロース粉末は、消化されないような成分であり、人工飼料としての物性を、それぞれ均一にするために用いている。なお、フタホシコオロギ成虫個体に、セルロースのみを含むような人工飼料を提示した場合、その人工飼料をまったく摂食しないため、セルロースは栄養分の嗜好性には関与しないと考えられる(データ非掲載)。

このような人工飼料を用いて、choice アッセイを行った。具体的には、調製した 3 種類の人工飼料(P-diet、C-diet、L-diet)を、AKHR-dsRNA 投与後 2 日目のフタホシコオロギ成虫オス個体、およびコントロール個体に提示し、3 日間摂食させた。その後、各人工飼料の摂食量から算出した、各三大栄養素(タンパク質(カゼイン)、糖質(スクロースとデキストリン)、脂質(18:0))の摂取量の割合をグラフにした(図 6-1)。なお、アッセイにて、人工飼料を choice させる期間として 3 日間を設定している理由としては、アッセイ開始後 3 日目に

は、各人工飼料の嗜好性の、各個体間でのばらつきが少なく、収束することを確認したためである。choice アッセイの結果としては、AKHR のノックダウンによる、三大栄養素の嗜好性に変化は見られなかった。

## 6-2 AKHR のノックダウン個体における、脂肪酸の嗜好性の解析

表 6-1 における人工飼料の調製の段階では、脂質源として 18:0 を用いたが、その段階で、18:0 を脂質源の代表として用いるべきかどうかは判断できなかったため、人工飼料に含まれる 18:0 を他の脂肪酸種に変更して、choice アッセイを行うこととした。AKHR をノックダウンしたフタホシコオロギ成虫オス個体では、体液中の脂質の飽和脂肪酸と不飽和脂肪酸のバランスが変化した(図 5-2 (A))。このことを self-selection を踏まえて考えると、AKHR のノックダウンにより、飽和脂肪酸と不飽和脂肪酸の嗜好性のバランスが変化する可能性があると考えた。そこで、次に、飽和脂肪酸と、不飽和脂肪酸との嗜好性を解析することとした。具体的には、フタホシコオロギ体内に多く含まれる、三種の飽和脂肪酸(14:0、16:0、18:0) (比率 1:1:1)を含む人工飼料(SFA-diet)と、三種の不飽和脂肪酸(18:1、18:2、18:3) (比率 1:1:1)を含む人工飼料(UFA-diet)を調製した(表 6-2-1)。これらの二種の人工飼料を、AKHR-dsRNA の投与後 2 日目のフタホシコオロギ成虫オス個体およびコントロール個体に提示し、3 日間摂食させた。その結果、AKHR のノックダウンにより、不飽和脂肪酸を含む餌を顕著に嗜好した(図 6-2 (A))。

次に、AKHR のノックダウン個体において、嗜好性が増強している不飽和脂肪酸の絞り込みを行った(図 6-2 (B、C、D))。そのために、上述の UFA-diet で用いた、三種の不飽和脂肪酸(18:1、18:2、18:3)を、個別に添加した人工飼料を調製した(表 6-2-2)。まずは、飽和脂肪酸を含む人工飼料(SFA-diet)と、オレイン酸(18:1)を含む人工飼料(18:1-diet)とを、AKHR-dsRNA の投与後 2 日目のフタホシコオロギ成虫オス個体およびコントロール個体に提示し、3 日間摂食させた。その結果、AKHR のノックダウンにより、18:1 の要求性は変化しなかった(図 6-2 (B))。同様に、飽和脂肪酸を含む人工飼料(SFA-diet)と、リノレン酸(18:3)を含む人工飼料(18:3-diet)とを用いて choice アッセイを行った場合でも、AKHR のノックダウンにより、18:3 の要求性は変化しなかった(図 6-2 (D))。一方で、飽和脂肪酸を含む人工飼料(SFA-diet)と、リノール酸(18:2)を含む人工飼料(18:2-diet)とを用いて choice

アッセイを行った場合、AKHR のノックダウンにより、18:2 の嗜好性が顕著に増強した(図 6-2 (C))。

### 6-3 餌中のリノール酸の感知に関与する器官としての小腮(maxillary palps)の同定

#### 6-3-1 触覚および小腮の切除実験

次に、AKHR のノックダウンにより、18:2 の嗜好性が増加する機構を分子レベルで明らかにしたいと考えた。そのために、まずは、人工飼料中の 18:2 の感知に関与する器官を特定することとした。18:2 の感知には、触角および嗅覚器官が関与する可能性が高いと考えたため、フタホシコオロギ成虫における触角および嗅覚器官として、触角と小腮に着目した(図 6-0)。AKHR-dsRNA の投与後 2 日目の個体、およびコントロール個体について、触角や小腮を、ピンセットを用いて、それらを根元から切除した。これらの個体について、飽和脂肪酸を含む人工飼料(SFA-diet)と、リノール酸(18:2)を含む人工飼料(18:2-diet)とを用いて choice アッセイを行った。その結果、AKHR のノックダウンにより増加した、18:2 の嗜好性は、触角の切除による影響を受けなかった(図 6-3-1 (A))。一方、小腮を切除した場合、AKHR のノックダウンにより増加した 18:2 の嗜好性が、コントロール個体程度まで戻った(図 6-3-1 (B))。一方で、コントロール個体の小腮を切除した場合は、18:2 の嗜好性に影響は見られなかった(図 6-3-1 (B))。この結果から、AKHR のノックダウン個体における、18:2 は、小腮にて感知されていると考えられた。

#### 6-3-2 小腮における、餌中のリノール酸の感知の閾値の解析

次に、AKHR のノックダウン個体の小腮における、18:2 の感知が可能であるような、人工飼料中の 18:2 の濃度を解析した。表 6-2-2 にて示した、SFA-diet および、18:2-diet における、脂肪酸の濃度を、10% (A)、1% (B)、0.1% (C)に変更し、その他の成分の配合は同様にして choice アッセイを行った(図 6-3-2)。その結果、飽和脂肪酸を 10%含む人工飼料(SFA (10%)-diet)と、18:2 を 10%含む人工飼料(18:2 (10%)-diet)を用いた場合では、AKHR のノックダウンによる、顕著な要求性の増加が見られた(図 6-3-2 (A))。次に、飽和脂肪酸を 1%含む人工飼料(SFA (1%)-diet)と、18:2 を 1%含む人工飼料(18:2 (1%)-diet) を choice アッセイに用いた場合でも、AKHR のノックダウンによる、顕著な要求性の増強が見られた(図

6-3-2 (B))。一方、飽和脂肪酸を 0.1%含む人工飼料(SFA (0.1%)-diet)と、18:2 を 0.1%含む人工飼料(18:2 (0.1%)-diet)を用いた場合では、AKHR のノックダウンによる、顕著な要求性の増強は見られなかった(図 6-3-2 (C))。つまり、AKHR のノックダウン個体の小腸における、人工飼料中の 18:2 の感知の閾値は、0.1%から 1%の間であった。

#### 6-4 餌中の TAG の感知に関する解析

6-3 につづき、AKHR のノックダウンによる、TAG に対する要求性の変化も解析した(図 6-4)。具体的には、表 6-2-2 にて示した、SFA-diet および、18:2-diet について、含有する脂肪酸を、それぞれに対応する TAG に変更した人工飼料として、TAG (14:0/14:0/14:0)、TAG (16:0/16:0/16:0)、および TAG (18:0/18:0/18:0)を含むような、SFA-TAG-diet と、TAG (18:2/18:2/18:2)を含むような、TAG (18:2/18:2/18:2)-diet を調製した。それらの人工飼料を用いて choice アッセイを行った結果、AKHR のノックダウンによる、TAG (18:2/18:2/18:2)に対する要求性は見られなかった(図 6-4)。

#### 6-5 逆行性染色法による、小腸における栄養分の感知に関与する神経系の探索

次に、小腸における、18:2 の感知を制御する神経系を探索するために、小腸から投射している神経の逆行性染色を行った(図 6-5)。フタホシコオロギ成虫オス個体の片側の小腸を、小腸内へと連絡している神経が露出するように切断し、CoCl<sub>2</sub> 水溶液を内部に含ませたキャピラリーを、露出部分を覆うように差し込むことにより行った(図 6-5 (A、B))。その後、摘出した神経系を、ルベアン酸(ジチオオキサミド)の飽和溶液にて発色し、顕微鏡にて観察した。観察の結果、小腸から食道下神経節(SOG)に投射している神経軸索と(図 6-5 (C)の赤矢印)、食道下神経節内の、2 つのスポットおよびその周辺に(図 6-5 (C)の緑矢印)、コバルト錯体由来の着色が見られた。つまり、小腸で知覚したシグナルは、食道下神経節へと投射し、神経分泌細胞と考えられるいくつかの細胞を含む神経細胞および神経線維群が、小腸における 18:2 の感知、およびその嗜好性を調節するイベントに用いられ、制御していると考えられた。

## 6-6 まとめと考察

### 小腮と摂食行動との関連性について

小腮と摂食行動との関連性については、生理学的研究により、トノサマバッタや、サバクトビバッタ *Schistocerca gregaria* などにおいて研究されている<sup>146-151)</sup>。例えば、トノサマバッタでは、小腮は、摂食前に特に頻繁に動かし<sup>148)</sup>、また、好んで摂食するような餌の近くでは、より頻繁に動かす<sup>149)</sup>。このように、小腮は、餌の栄養分に対する化学感覚にとって重要な働きをしていると考えられてきた<sup>150)</sup>。また、トノサマバッタにおいて、小腮における化学感覚は、体内の栄養状態の影響を受けることが知られている。具体的には、トノサマバッタにアミノ酸溶液を投与することや、タンパク質の少ない餌を摂食させ続けることで、餌中のタンパク質に対する、小腮の興奮性が変化する<sup>151)</sup>。本論文研究では、フタホシコオロギの小腮を、18:2 の感知、および嗜好性に関与する器官として見出した。つまり、フタホシコオロギには、少なくとも、体内の栄養状態の変動を、18:2 の嗜好性の増加というアウトプットとして処理するような機構が存在すると言える。

### 小腮の神経内の逆行性染色に関して

小腮の神経内の逆行性染色に関しては、カイコ幼虫や、キイロショウジョウバエ成虫などにおいて、SOG (食道下神経節) との神経接続が知られている<sup>152, 153)</sup>。このことから、フタホシコオロギにおいても、小腮と SOG との神経連絡、および神経回路に関しては、それらの昆虫種と同様であると考えられる。

### 昆虫における、脂肪酸の感知機構に関して

昆虫における、脂肪酸の感知機構の存在については、少ないながらも報告がある。キイロショウジョウバエにおいては、成虫と幼虫とにおいて、脂肪酸種(14:0、16:0、18:0、18:1、18:2、18:3)の選好性が異なる<sup>154)</sup>。具体的には、幼虫は不飽和脂肪酸の選好性が高く、成虫は飽和脂肪酸の選好性が高い。しかし、この差異に関与する機構は明らかにされていない。また、セイシエルショウジョウバエ *Drosophila sechellia* では、他のショウジョウバエ種が忌避するような植物種に含まれる、オクタン酸(6:0)やヘキサン酸(8:0)を忌避しないような感知機構を獲得したと考えられている<sup>155)</sup>。ただし、体内の栄養状態の変動と関連した、脂



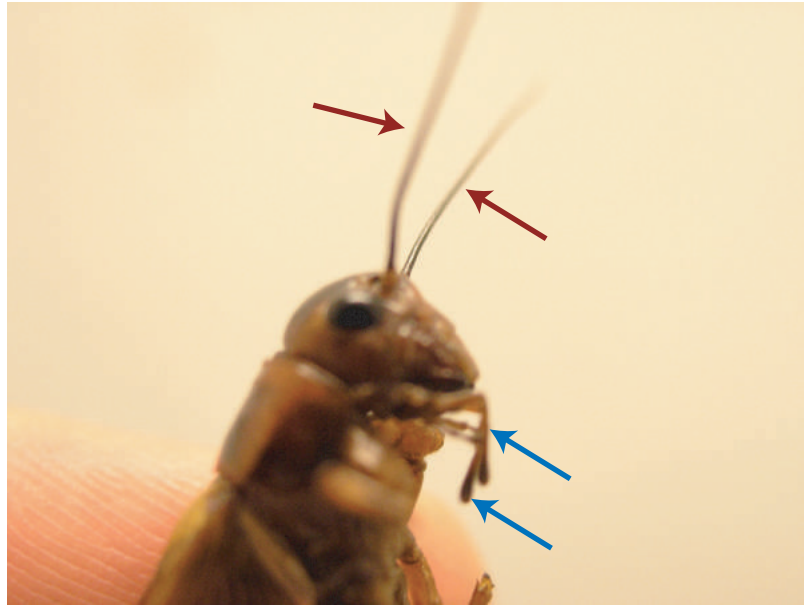
脂肪酸の嗜好性の調節に関しては、未だ報告がない。このことを考慮すると、本論文研究で見られた、AKHR のノックダウンによる、18:2 の嗜好性の増加という結果は、多くの示唆に富むと考えられる。

また、脂肪酸を感知するような濃度に関しては、上述のキイロショウジョウバエの報告では、0.5-10 mM 程度の脂肪酸濃度は十分感知できる<sup>154)</sup>。なお、本実験にて、フタホシコオロギの choice アッセイに用いた、18:2 を 0.5% (w/w) (5000 ppm)含む、18:2-diet における 18:2 の濃度は、それに近いことから、フタホシコオロギ成虫の脂肪酸の感知能は、キイロショウジョウバエのそれと同程度であるかもしれない。

#### コントロール個体における、18:2 の嗜好性に関して

触角および小腮の切除実験の結果、コントロール個体では、触角および小腮の切除に関わらず、18:2 の嗜好性は変化が見られなかった(図 6-3-1)。一方、AKHR のノックダウン個体では、小腮の切除により、コントロール個体程度まで嗜好性が戻る(図 6-3-1 (B))。これらを合わせて考察すると、上述のような、AKHR のノックダウンにより促されるような、18:2 の嗜好性を増強させるような、栄養要求機構が体内に存在するならば、コントロール個体では、その機構を「オフ」にしていると考えられる。この考えを基にすると、フタホシコオロギ成虫の通常個体が通常摂食条件におかれているならば、餌に対して、18:2 の嗜好性は発揮されないと考えられる。この考えの理由として、通常摂食条件においては、餌中には、動物性、植物性の餌のどちらに関しても、栄養源として 18:2 を豊富に含んでいると考えられるため、18:2 の嗜好性を調節するような機構を発揮させずとも、充分量の 18:2 を体内に摂取することとなるからであると考えられる。

(A)



(B)

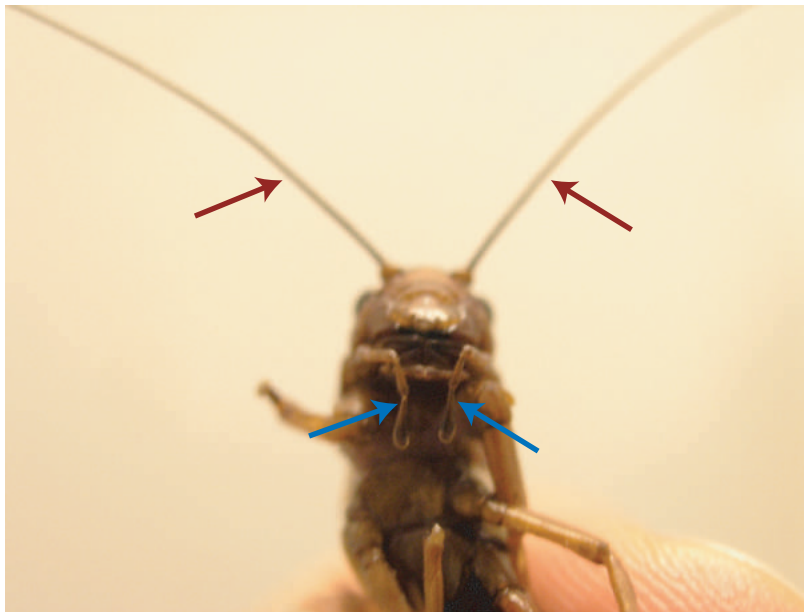


図 6-0. フタホシコオロギの触角 (赤矢印) および小腮 (青矢印)。(A) は、個体を横側から見た写真であり、(B) は、下側から見た写真である。

表 6-1. 図 6-1 における choice アッセイに用いた人工飼料の栄養分の組成 (%)

	P-diet	C-diet	L-diet
カゼイン	28	7	7
スクロース	3.5	14	3.5
デキストリン	3.5	14	3.5
ステアリン酸(18:0)	0.125	0.125	0.5
コレステロール	0.125	0.125	0.125
セルロース粉末	62.05	62.05	83.3
Wesson's salt	2.4	2.4	2.4
アスコルビン酸	0.3	0.3	0.3
合計	100	100	100

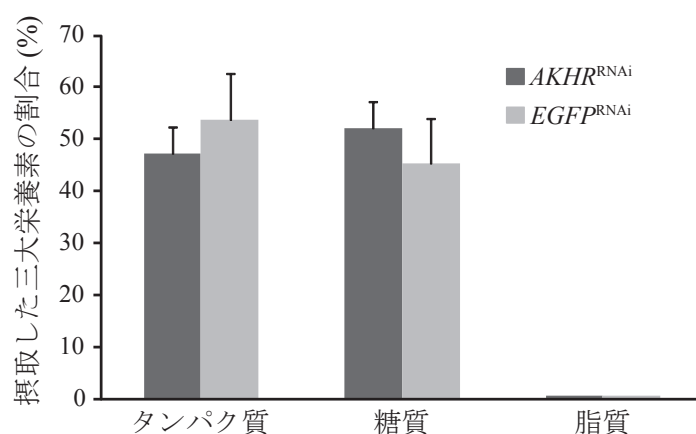


図 6-1. フタホシコオロギ成虫オス個体における、三大栄養素の choice アッセイ。choice アッセイにて用いた人工飼料の栄養分の組成は、表 6-1 に示した。(A) タンパク質を多く含む人工飼料 (P-diet)、糖質を多く含む人工飼料 (C-diet) と、脂質としてステアリン酸 (18:0) を多く含む人工飼料 (L-diet) の、三種の人工飼料を、AKHR をノックダウンしたフタホシコオロギ成虫オス個体およびコントロール個体に提示し、3 日間摂食させた。各人工飼料の摂食量から算出した、各三大栄養素 (タンパク質 (カゼイン)、糖質 (スクロースとデキストリン)、脂質 (18:0)) の摂取量の割合を、平均値 + S. D. で示した (n = 6)。その結果、AKHR のノックダウンによる、三大栄養素の嗜好性に変化は見られなかった ( $P > 0.05$ ; Student's t-test)。

表 6-2-1. 図 6-2 (A) における choice アッセイに用いた人工飼料の栄養分の組成 (%)

	SFA-diet	UFA-diet
カゼイン	28	28
スクロース	14	14
デキストリン	14	14
飽和脂肪酸(14:0、16:0、18:0) (比率1:1:1)	0.5	0
不飽和脂肪酸(18:1、18:2、18:3) (比率1:1:1)	0	0.5
コレステロール	0.5	0.5
セルロース粉末	40.3	40.3
Wesson's salt	2.4	2.4
アスコルビン酸	0.3	0.3
合計	100	100

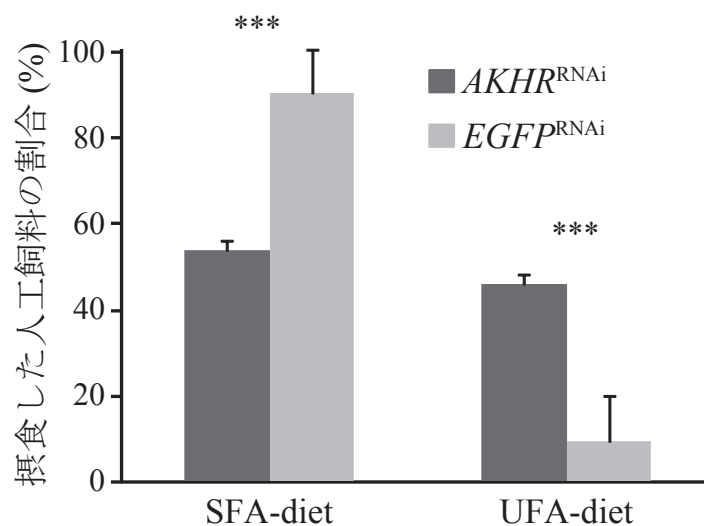


図 6-2. (A) フタホシコオロギ成虫オス個体における、脂肪酸の choice アッセイ。(A) 表 6-2-1 に示した、飽和脂肪酸を含む人工飼料 (SFA-diet) と、不飽和脂肪酸を含む人工飼料 (UFA-diet) とを、AKHR をノックダウンした、フタホシコオロギ成虫オス個体およびコントロール個体に提示し、3 日間摂食させた。各人工飼料の摂食量の割合を、平均値 + S. D. で示した (n=6)。その結果、AKHR のノックダウンにより、不飽和脂肪酸の嗜好性が顕著に増強した (\*\* $P < 0.0005$ ; Student's  $t$ -test)。

表 6-2-2. 図 6-2 (B、C、D)、図 6-3-1、図 6-3-2 における  
choice アッセイに用いた人工飼料の栄養分の組成 (%)

	SFA-diet	18:1-diet	18:2-diet	18:3-diet
カゼイン	28	28	28	28
スクロース	14	14	14	14
デキストリン	14	14	14	14
飽和脂肪酸(14:0, 16:0, 18:0) (比率1:1:1)	0.5	0	0	0
18:1	0	0.5	0	0
18:2	0	0	0.5	0
18:3	0	0	0	0.5
コレステロール	0.5	0.5	0.5	0.5
セルロース粉末	40.3	40.3	40.3	40.3
Wesson's salt	2.4	2.4	2.4	2.4
アスコルビン酸	0.3	0.3	0.3	0.3
合計	100	100	100	100

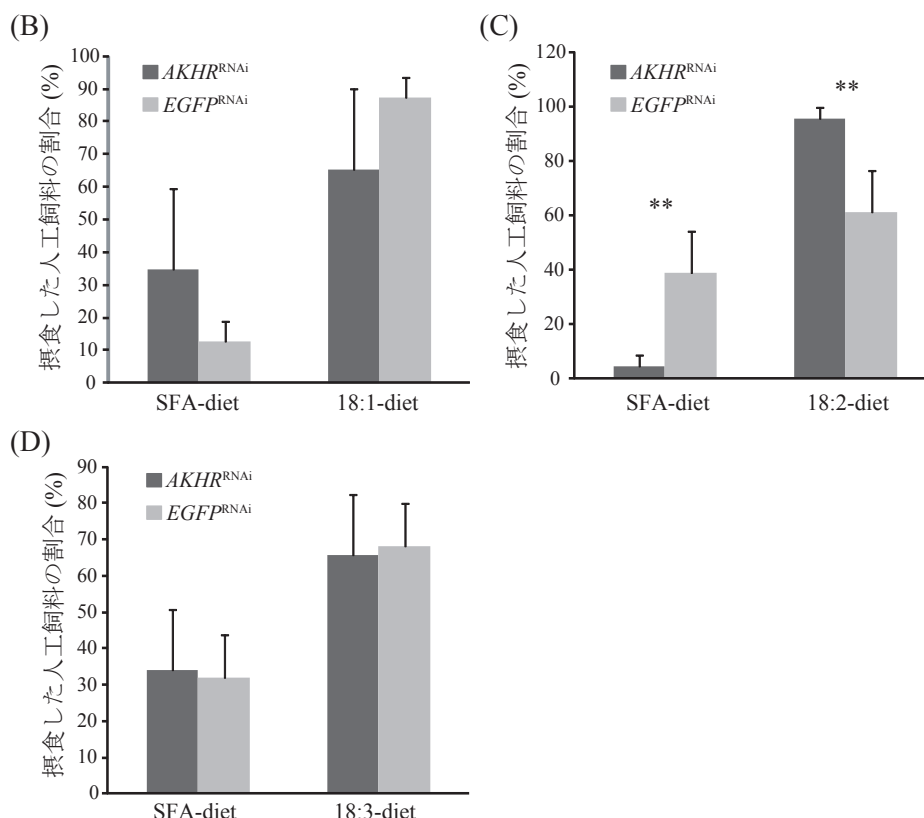


図 6-2 (つづき). (B、C、D) (A) の結果を受けた、*AKHR* のノックダウン個体において、要求性が増加している不飽和脂肪酸の絞り込み。(B) 表 6-2-2 に示した、飽和脂肪酸を含む人工飼料 (SFA-diet) と、オレイン酸 (18:1) を含む人工飼料 (18:1-diet) とを、*AKHR* をノックダウンしたフタホシコオロギ成虫オス個体およびコントロール個体に提示し、3 日間摂食させた。各人工飼料の摂食量の割合を、平均値 + S. D. で示した (n = 6)。その結果、*AKHR* のノックダウンにより、18:1 の嗜好性は変化しなかった ( $P > 0.05$ ; Student's *t*-test)。(C) 表 6-2-2 に示した、飽和脂肪酸を含む人工飼料 (SFA-diet) と、リノール酸 (18:2) を含む人工飼料 (18:2-diet) とを、*AKHR* をノックダウンしたフタホシコオロギ成虫オス個体およびコントロール個体に提示し、3 日間摂食させた。各人工飼料の摂食量の割合を、平均値 + S. D. で示した (n = 6)。その結果、*AKHR* のノックダウンにより、18:2 の嗜好性が顕著に増加した (\*\* $P < 0.005$ ; Student's *t*-test)。(D) 表 6-2-2 に示した、飽和脂肪酸を含む人工飼料 (SFA-diet) と、リノレン酸 (18:3) を含む人工飼料 (18:3-diet) とを、*AKHR* をノックダウンしたフタホシコオロギ成虫オス個体およびコントロール個体に提示し、3 日間摂食させた。各人工飼料の摂食量の割合を、平均値 + S. D. で示した (n = 6)。その結果、*AKHR* のノックダウンにより、18:3 の嗜好性は変化しなかった ( $P > 0.05$ ; Student's *t*-test)。

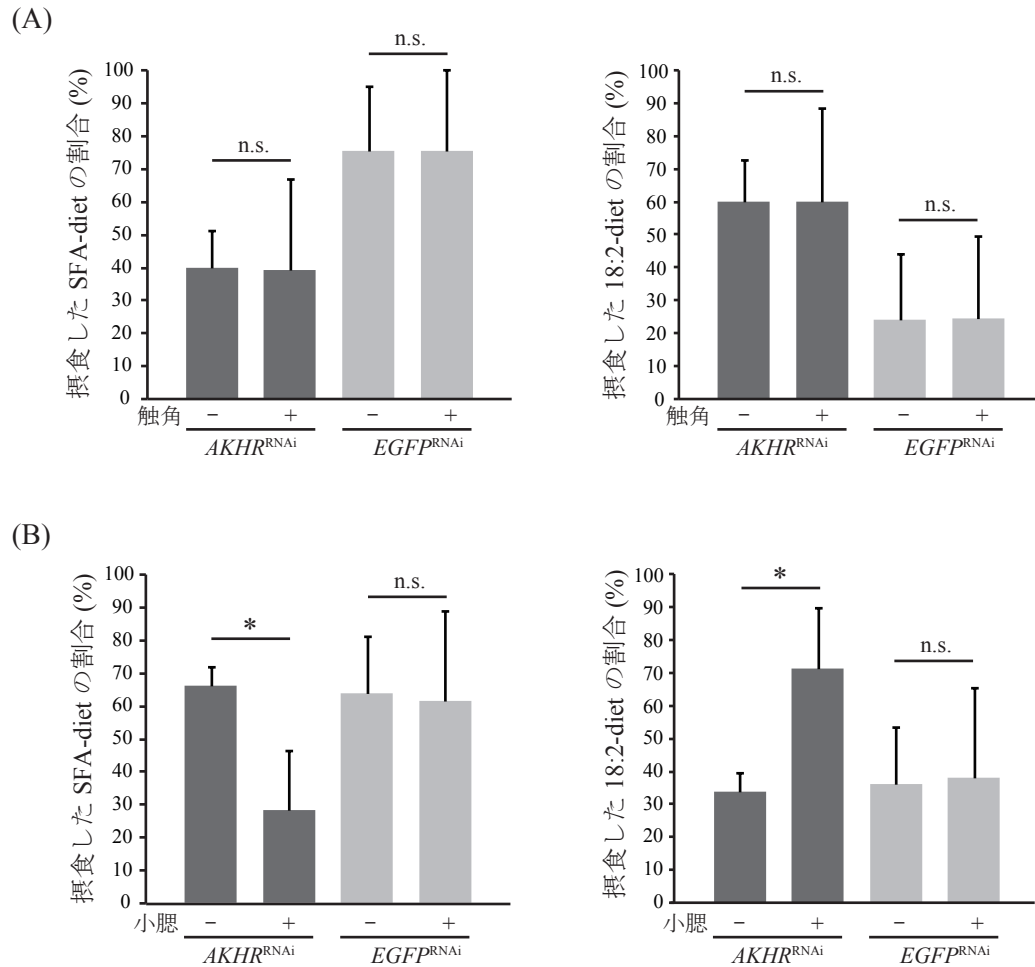


図 6-3-1. AKHR のノックダウンによる、リノール酸 (18:2) の感知に関与する器官の特定。

(A) AKHR をノックダウンしたフタホシコオロギ成虫オス個体、およびコントロール個体の触角を切除し ( 図中の -)、表 6-2-2 にて示した、SFA-diet および、18:2-diet を提示し、3 日間摂食させた。SFA-diet ( 左 ) および、18:2-diet ( 右 ) の摂食量の割合を、平均値 + S. D. で示した (n = 6)。その結果、AKHR のノックダウンによる、18:2 の嗜好性の増加は、触角の切除による影響を受けなかった ( $P > 0.05$ ; Student's *t*-test)。(B) AKHR をノックダウンしたフタホシコオロギ成虫オス個体、およびコントロール個体の小腮を切除し ( 図中の -)、表 6-2-2 にて示した、SFA-diet および、18:2-diet を提示し、3 日間摂食させた。各人工飼料の嗜好量の割合を、平均値 + S. D. で示した (n = 6)。その結果、AKHR のノックダウンによる、18:2 の嗜好性の増加は、小腮の切除により減少し、コントロール個体程度の嗜好性に戻った ( $*P < 0.05$ ; Student's *t*-test)。

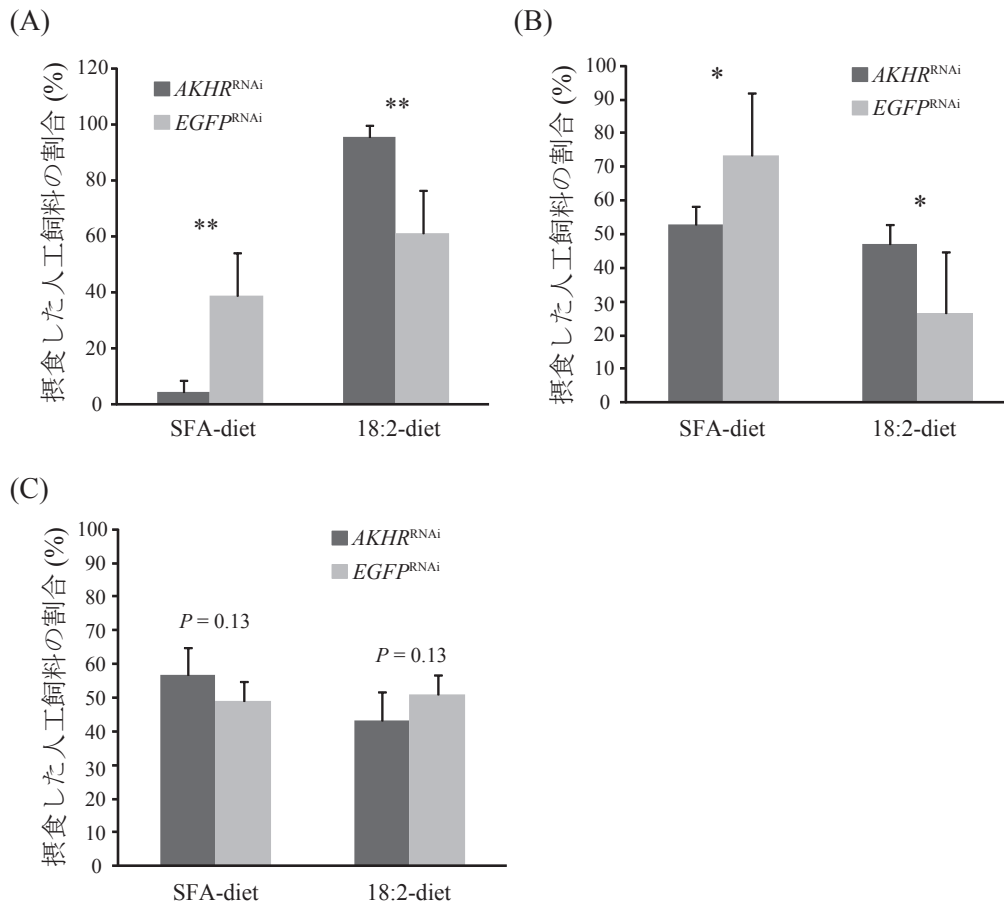


図 6-3-2. AKHR のノックダウン個体における、18:2 の感知が可能であるような、人工飼料中の 18:2 の濃度の解析。表 6-2-2 にて示した、SFA-diet および、18:2-diet における、脂肪酸の濃度 (0.5%) を、10% (A)、1% (B)、0.1% (C) に変更し、choice アッセイを行った。(A) 飽和脂肪酸を 10% 含む人工飼料 (SFA (10%)-diet) と、18:2 を 10% 含む人工飼料 (18:2 (10%)-diet) を提示し、3 日間摂食させた。各人工飼料の摂食量の割合を、平均値 + S. D. で示した ( $n = 6$ )。その結果、AKHR のノックダウンによる、顕著な嗜好性の増加が見られた (\*\* $P < 0.005$ ; Student's *t*-test)。(B) 飽和脂肪酸を 1% 含む人工飼料 (SFA (1%)-diet) と、18:2 を 1% 含む人工飼料 (18:2 (1%)-diet) を提示し、3 日間摂食させた。各人工飼料の摂食量の割合を、平均値 + S. D. で示した ( $n = 6$ )。その結果、AKHR のノックダウンによる、顕著な嗜好性の増加が見られた (\* $P < 0.05$ ; Student's *t*-test)。(C) 飽和脂肪酸を 0.1% 含む人工飼料 (SFA (0.1%)-diet) と、18:2 を 0.1% 含む人工飼料 (18:2 (0.1%)-diet) を提示し、3 日間摂食させた。各人工飼料の摂食量の割合を、平均値 + S. D. で示した ( $n = 6$ )。その結果、AKHR のノックダウンによる、顕著な嗜好性の増加は見られなかった ( $P > 0.05$ ; Student's *t*-test)。

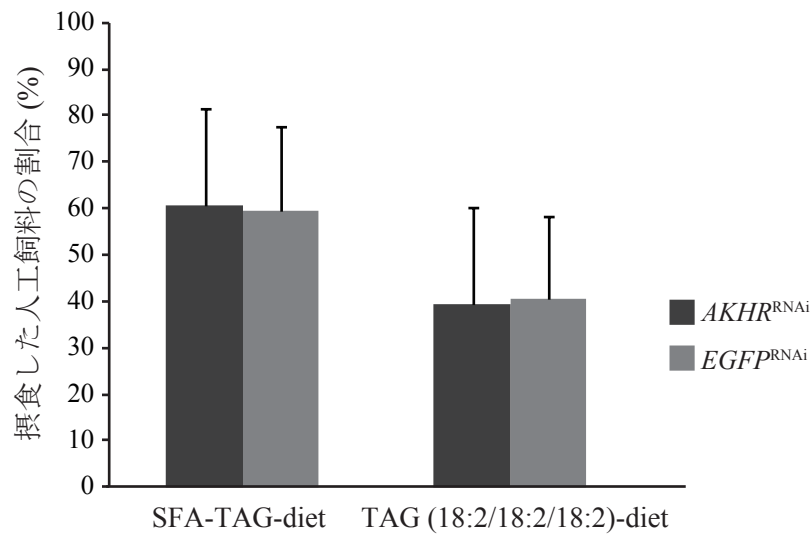


図 6-4. AKHR のノックダウンによる、TAG に対する嗜好性の解析。表 6-2-2 にて示した、SFA-diet および、18:2-diet について、含有する脂肪酸をそれぞれに対応する TAG に変更した人工飼料 (それぞれ、SFA-TAG-diet、および、TAG (18:2/18:2/18:2)-diet) を調製した。それらの人工飼料を用いて choice アッセイを行った。各人工飼料の摂食量の割合を、平均値 + S. D. で示した (n=6)。その結果、AKHR のノックダウンによる、TAG (18:2/18:2/18:2) に対する嗜好性は見られなかった ( $P > 0.05$ ; Student's *t*-test)。



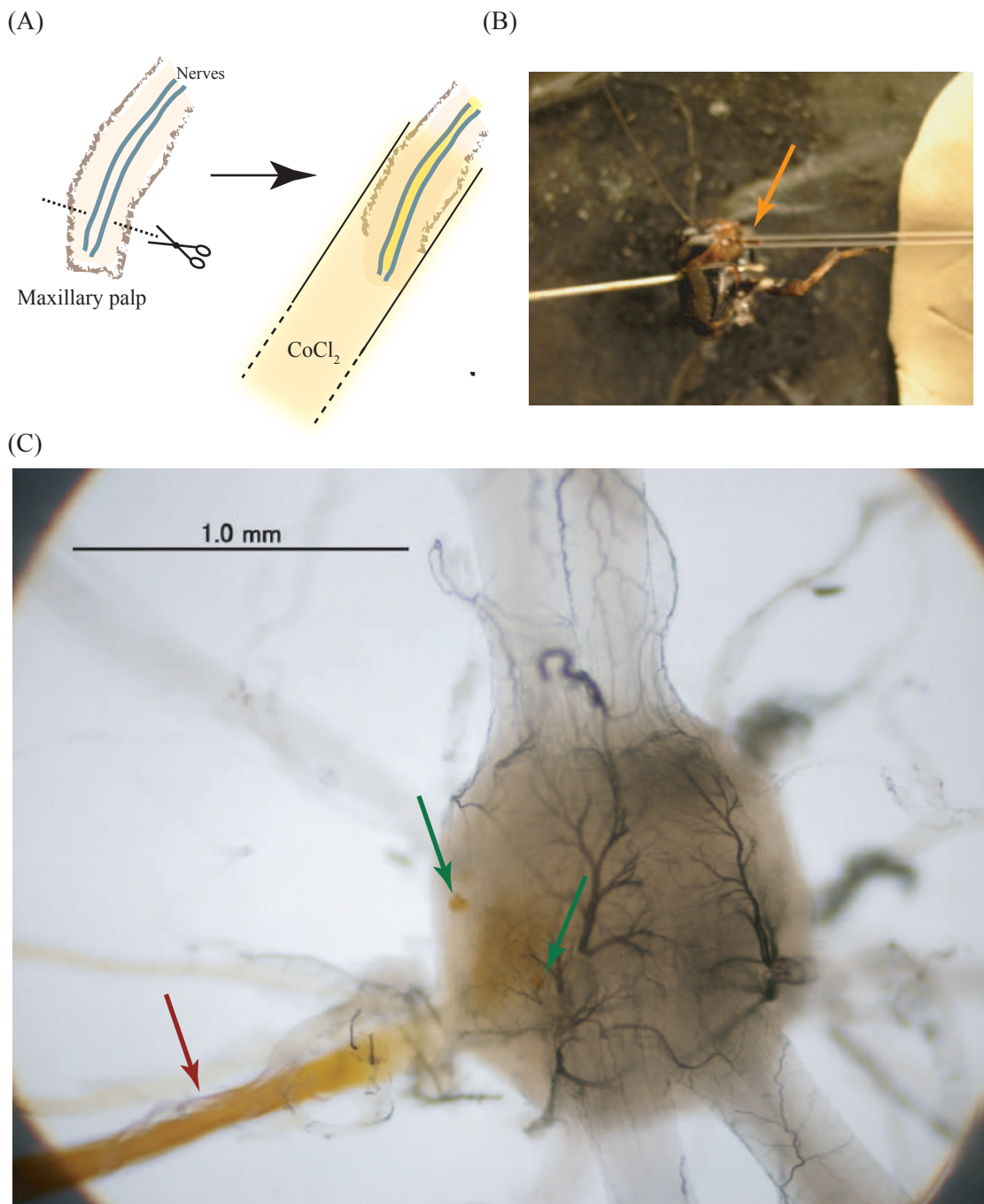


図 6-5. フタホシコオロギ成虫オス個体の小腮に投射する神経の逆行性染色。(A、B) 小腮に投射する神経の逆行性染色の模式図 (A) および、それを示す写真 (B)。フタホシコオロギ成虫オス個体の片側の小腮を、小腮内の神経が露出するように、解剖ばさみにより切断し、CoCl<sub>2</sub> 水溶液を内部に含ませたキャピラリーを、露出部分を覆うように差し込んだ ((B) のオレンジ色の矢印)。その後、頭部の神経系を摘出し、発色試薬として、ルベアン酸 (ジチオオキサミド) の飽和溶液を数滴添加し、顕微鏡にて観察した。(C) 観察の結果、小腮に連絡する神経 (図中の赤矢印) と、食道下神経節内の、2 つの比較的大きな細胞に (図中の緑矢印)、コバルト錯体に由来する染色が見られた。

## 第七章 餌中のリノール酸の嗜好性に関与する分子の探索

### 7-0 はじめに

前章において、AKHR をノックダウンしたフタホシコオロギ成虫オス個体は、18:2 (リノール酸)の嗜好性が増加し、その嗜好性の増加には、小腮における、18:2 の認識が必要であることを見出した。6-6 にて上述したように、キイロショウジョウバエにおいては、幼虫と成虫とで、飽和脂肪酸と不飽和脂肪酸に対する行動応答が異なることから<sup>154)</sup>、昆虫には、少なくとも或る程度は、脂肪酸種を認識する機構が存在すると考えられる。しかし、体内の栄養状態の変動と関連した、脂肪酸の認識および嗜好性の調節に関しては、未だ報告がない。そこで、本章では、フタホシコオロギ成虫の小腮において、脂肪酸を認識する分子を特定したいと考えた。18:2 が脂溶性の低分子有機化合物であることと、小腮が、主に嗅覚に関与する器官であることを合わせると、その嗜好性の調節機構は、特に嗅覚システムと関連性があると考えた。

昆虫が、小腮において、化学物質を認識する場合、先ず、化学物質が、小腮における化学感覚子(sensilla)の表面のクチクラの微小孔を通過する<sup>148, 156, 157)</sup>。この際、通過した化学物質が、18:2 のように、疎水性物質であった場合、嗅覚器内の体液環境に存在する、疎水性物質結合タンパク

質と結合して受容細胞膜へと運ばれる。そのような機能を有する、疎水性物質結合タンパク質として、odorant-binding protein (OBP; 匂い物質結合タンパク質)ファミリーや、chemosensory protein (CSP; 化学感覚タンパク質)が知られている<sup>158)</sup>。OBP ファミリータンパク質は、ヤマユガ *Antheraea polyphemus* のオス成虫の触角特異的に発現するタンパク質(フェロモン結合タンパク質; pheromone-binding protein; PBP)として発見された<sup>159)</sup>。それ以降、OBP や PBP が属する、OBP ファミリータンパク質は、主にゲノム情報から、直翅目、鱗翅目、等翅目、双翅目、膜翅目、半翅目、および鞘翅目にわたり、40 種以上の昆虫種にて、300 以上の分子の存在が見出されている<sup>160)</sup>。また、各昆虫種のゲノムにつき、数十の OBP 遺伝子の存在が推定されている<sup>161)</sup>。OBP ファミリーは、分子質量 15 kDa 程度の、水溶性低分子量タンパク質である<sup>160)</sup>。ファミリー内にて、一次構造のアミノ酸配列には高い相同性はないが、6 個のシステイン残基の位置が保存されている<sup>160, 162)</sup>。さらに、二次構造の推

定から、6 個の $\alpha$ -ヘリックス構造を含み、3 か所で、立体構造の枠組みに寄与するジスルフィド結合を形成している<sup>160, 162)</sup>。また、OBP のアミノ酸配列にて、システイン残基と、それ以外の残基との配列パターンが見出されている。例えば直翅目昆虫におけるパターンは、C-X<sub>25-30</sub>-C-X<sub>3</sub>-C-X<sub>35-41</sub>-C-X<sub>8-12</sub>-C-X<sub>8</sub>-C (C はシステイン残基、X はそれ以外のアミノ酸残基) である<sup>161)</sup>。

OBP と匂い物質との、あるいは、PBP とフェロモンとの、*in vitro* での結合アッセイによると、或る特定の匂い物質と結合する OBP は、複数存在すると考えられる<sup>160, 162, 198)</sup>。このことから、OBP の生理学的機能としては、或る特定の匂い物質に対して複数の OBP が結合することで、嗅覚応答を調節することも示唆されている<sup>162)</sup>。

なお、CSP に関しては、OBP と同様に、化学感覚器にて、脂溶性物質と結合するタンパク質として見出された<sup>163)</sup>。CSP は、分子質量 10 kDa 程度の、水溶性低分子量タンパク質であり、OBP と同様に、多くの昆虫種のゲノム情報から、その存在が推定されている<sup>160)</sup>。CSP の構造的特徴は、OBP ファミリーとは異なり、4 個のシステイン残基の位置が保存されている<sup>161)</sup>。さらに、二次構造の推定から、6 個の $\alpha$ -ヘリックス構造を含むと考えられている<sup>164)</sup>。また、CSP のアミノ酸配列パターンは、C-X<sub>6-8</sub>-C-X<sub>18-19</sub>-C-X<sub>2</sub>-C である<sup>162)</sup>。CSP は、OBP と同様に、*in vitro* での結合アッセイにより、様々な脂溶性分子との結合が明らかにされている<sup>160)</sup>。しかし、CSP の生理学的機能に関してはほとんど知見がなく、クロオオアリ *Camponotus japonicus* の触角にて、体表のワックス成分である長鎖炭化水素の認識に関与することが示されているのみである<sup>165)</sup>。

これらの知見を基に考えると、フタホシコオロギの小腿にて 18:2 の認識に関与する分子として、OBP、CSP、および OR が考えられる。これらの OBP、CSP、および OR の中から、18:2 の認識に関与するような分子を探索することとした。

#### 7-1 RNA-seq データを用いた、フタホシコオロギの小腿で発現する OBP、CSP、OR の *in silico* 探索

フタホシコオロギの成虫オス個体の小腿において、18:2 の認識に関与するような OBP、CSP、および OR を探索するために、フタホシコオロギの成虫オス個体の小腿を用いて、RNA-sequencing (RNA-seq) によるトランスクリプトーム解析を行うこととした。その具体的

な解析の概要を、図 7-1-1 に示した。フタホシコオロギ成虫オスの通常個体の 16 個体分の小腸から抽出、精製した、total RNA (21.4 µg)を解析用のサンプルとした。RNA-seq 解析により、read (タグ)から contig へのアッセンブリーと、contig から unigene へのアッセンブリーの結果、および、contig と unigene の塩基配列情報を得た。また、RNA-seq による、それらの塩基配列情報から、(i) unigene の GO (gene ontology) の分類の結果、(ii) unigene の機能のアノテーションと、COG (clusters of orthologous groups)機能分類の結果、(iii) unigene の pathway 解析の結果、(iv) unigene の protein coding region (CDS)の予測の結果、(v) SNP 解析の結果を得た。

read (タグ)から contig へのアッセンブリーと、contig から unigene へのアッセンブリーの結果、および、(ii) の unigene のアノテーションに関する概要を、図 7-1-2 に示した。シーケンシングの完了後、raw data (64,601,178 reads)からアダプター、インデックス、および低品質のデータを除き、clean data (53,890,492 reads、4,850,144,280 nt)とした(図 7-1-2 (A))。clean data から重複配列(約 2,500,000,000 nt)を除いた後、clean data から contig にアセンブリーした。アセンブリーされた contig は 75,961 個であり、それらの平均の塩基配列長は、306 nt であった(図 7-1-2 (A、B))。次に、それらの contig を用いてアセンブリーできた unigene は 39,862 個であり、それらの平均の塩基配列長は、524 nt であった(図 7-1-2 (A、C))。この 39,862 の unigene のうち、各 unigene 間の塩基配列に 70%以上の同一性が見出された場合、改めて、それらを cluster として分類した。その結果、39,862 個の unigene のうち、4,323 個の unigene が、2,087 個の cluster に分類された(図 7-1-2 (A))。すなわち、それ以外の 35,539 個の unigene が、singleton であった(図 7-1-2 (A))。なお、以降は、cluster に分類された、4,323 個の unigene に関しては、"CL"と表記することとし、それ以外の 35,539 個の各 unigene に関しては、そのまま"unigene"と表記することとする。次に、得られた 39,862 個の unigene および CL をアノテーションした結果、アノテーションできた unigene および CL は、22,622 個であった(図 7-1-2 (A、D))。

次に、アノテーションできた unigene および CL から、フタホシコオロギの OBP、CSP および OR をコードする遺伝子の *in silico* 探索を行った。具体的な探索方法は、図 7-1-3 に示した。まず、RNA-seq 解析のデータに含まれていた、各 unigene および CL の BLAST 検索結果を示すデータファイルから、OBP、CSP、あるいは OR を含むような unigene あるいは

CLを探索した(図 7-1-3 1. (i))。つまり、各 unigene および CL の BLAST 検索結果のうちに、一つでも、昆虫種の OBP、CSP、あるいは OR が含まれれば、その unigene および CL をピックアップした。その結果、14 個の、OBP と相同性のある分子をコードすると考えられる候補遺伝子(unigene および CL)を取得した。また、13 個の、CSP と相同性のある分子をコードすると考えられる候補遺伝子(unigene および CL)を取得した。ただし、上述の、各 unigene および CL の BLAST 検索結果を示すデータファイルからの探索では、探索漏れがある可能性が考えられた。すなわち、他の昆虫種との OBP、CSP および OR の相同性が低いため、BLAST 検索結果だけでは見出せないような、フタホシコオロギの OBP、CSP および OR が存在する可能性が考えられた。そこで、上述の BLAST 検索で得られた、計 27 の候補遺伝子の塩基配列と各演繹アミノ酸配列とを用いて、RNA-seq 解析により得られた全ての unigene および CL の塩基配列とその演繹アミノ酸配列に対して、local BLAST 検索を行った(図 7-1-3 1. (ii))。しかし、local BLAST 検索にて、OBP、CSP および OR をコードするような、新たな候補遺伝子は見出せなかった。

なお、RNA-seq 解析の、FPKM (Fragments per kilobase of exon per million mapped fragments) 値のデータから、計 27 個の OBP および CSP の候補遺伝子の mRNA の発現量を確認した(図 7-1-4)。また、比較対象として、ハウスキーピング遺伝子(EF-1 $\alpha$ 、 $\beta$ -actin、GAPDH、PEPCK)の FPKM 値も合わせて確認した。各候補遺伝子の FPKM 値は、計算式  $10^6 C / (NL / 10^3)$  にて算出される。C は、RNA-seq 解析の際の、各候補遺伝子のフラグメント配列の存在数を示し、N は、全 unigene および CL のフラグメント配列の存在数の合計を示し、L は、各候補遺伝子の CDS (コーディング領域)の塩基数である。すなわち、FPKM 値は、各候補遺伝子の mRNA の発現量の指標とされる。FPKM 値を比較した結果、候補遺伝子の発現量に大きな差異が見られた。具体的には、unigene34934 の FPKM 値は最も低く、1.9911 であり、unigene15927 の FPKM 値は最も高く、14428.4423 であった(図 7-1-4)。

次に、上述の、14 個の OBP、および、13 個の CSP の候補遺伝子の演繹アミノ酸配列が、予想される全長の ORF に満たない場合があった。その場合は、RACE 法により、全長の ORF をコードする塩基配列の取得を試みた(図 7-1-3 1. (iii))。RACE 法を行った unigene は、OBP の候補遺伝子である、unigene28848 と、CSP の候補遺伝子である、unigene3338、unigene10231、unigene16019、unigene16671、unigene34934 の、合計 6 個の unigene である。このうち、CSP

の候補遺伝子である unigene10231 について、全長の ORF をコードする塩基配列の 5'側は、未だ取得できていないが、それ以外の 5 個の unigene に関しては、RACE 法を完了し、全長の ORF をコードする塩基配列を取得した。

さらに、上述の、14 個の OBP、および、13 個の CSP の候補遺伝子の演繹アミノ酸配列のアラインメントを作成した(図 7-1-5、図 7-1-6)。その結果、OBP に関しては、unigene16264 と unigene28848 の演繹アミノ酸配列以外は、6 個のシステイン残基の位置が保存されていた(図 7-1-5)。ただし、他の昆虫種において、OBP ファミリーには、システイン残基が 6 つに満たないようなタイプの OBP (minus-C 型 OBP)も報告されているため<sup>162, 166)</sup>、unigene16264 と unigene28848 は、候補から除外しないことにした。CSP に関しては、全ての候補遺伝子の演繹アミノ酸配列にて、4 個のシステイン残基の位置が保存されていた(図 7-1-6)。

次に、CSP の候補遺伝子である unigene10231 以外の、26 個の候補遺伝子について、全長 ORF をコードする、cDNA の塩基配列をサブクローニングした(図 7-1-3 1. (iv))。なお、unigene10231 については、RACE 法により取得済みの、cDNA の部分塩基配列をサブクローニングした。その後、7-2 にて後述するアッセイのために、それぞれの候補遺伝子をコードする cDNA をサブクローニングしたベクターを鋳型として、dsRNA を調製した(図 7-1-3 1. (v)、図 S1-5 (A))。

解析データあるいは RACE 法により取得した、14 個の OBP の候補遺伝子と、13 個の CSP の候補遺伝子の演繹アミノ酸配列と、*in vitro* の結合実験によって、リガンドとの結合が示されている、他の昆虫種の OBP および CSP のアミノ酸配列とを比較することで、フタホシコオロギ OBP および CSP の候補のリガンドを推測できるかどうかを検討した。そのために、フタホシコオロギ OBP の候補遺伝子の演繹アミノ酸配列と、他の昆虫種の、リガンドが既知である全ての OBP のアミノ酸配列について、分子系統樹を作成した<sup>167-195)</sup>(図 7-1-7)。しかし、この分子系統樹からは、脂肪酸と結合するような、フタホシコオロギ OBP の候補遺伝子を推測することはできなかった。また、フタホシコオロギ CSP の候補に関しても、同様に、脂肪酸と結合するような、フタホシコオロギ CSP の候補遺伝子を推測することはできなかった<sup>196-203)</sup>(図 7-1-8)。

## 7-2 RNAi 法および choice アッセイによる、リノール酸の感知に関与する OBP および CSP のスクリーニング

7-1 にて得られた、フタホシコオロギ成虫の小腸にて、18:2 の認識に関与すると考えられる、計 27 個の OBP および CSP の候補遺伝子に対して、スクリーニングを行うこととした。その概要については、図 7-1-3 に示した。スクリーニングは、それぞれの候補遺伝子がコードする分子について、*in vivo* のスクリーニングと、*in vitro* のスクリーニングを段階的に行うこととし、それぞれを 1st スクリーニング、2nd スクリーニングと設定した(図 7-1-3 2、3)。なお、現在は 2nd スクリーニングの進行中であり、本論文では、1st スクリーニングの結果のみを以降に記述する。

1st スクリーニングの方法としては、RNAi 法と choice アッセイを組み合わせる行うこととした。具体的には、第六章にて見られたような、AKHR のノックダウンによる、18:2 の嗜好性の増強をコントロール(バックグラウンド)として、さらに、各候補遺伝子をノックダウン(AKHR と各候補遺伝子のダブルノックダウン)することで、18:2 の嗜好性の増強を打ち消すような分子を探索した。このアッセイを 1st スクリーニングとして行う理由としては、choice アッセイにおける、AKHR のノックダウン個体と、コントロール個体との、18:2 の嗜好性の差異は、比較的明確であるため、アッセイの指標として適すると考えたからである。また、各ノックダウン個体の choice アッセイに要する期間は 3 日間であるため、短期間で、ノックダウン個体を用いて、18:2 の嗜好性に関わる分子をスクリーニングできると考えたからでもある。

まず、フタホシコオロギ成虫オス個体に、AKHR-dsRNA と、上記の候補遺伝子の一つをノックダウンするような dsRNA とを投与した(図 7-1-2 (3. (i)))。なお、コントロールとして、AKHR-dsRNA のみを投与した個体と、EGFP-dsRNA のみを投与した個体も調製した。dsRNA の投与後 2 日目から、4 日目までの 3 日間、表 6-2-2 にて示した、SFA-diet と、18:2-diet とを用いて、choice アッセイを行った(図 7-1-2 (3. (ii))、図 7-2-1)。また、アッセイ終了時には、各ノックダウン個体を用いて、ノックダウンによる mRNA の発現抑制効果を確認した(図 S1-5 (B、C))。その結果、AKHR、および、投与した dsRNA に対応する候補遺伝子の mRNA の発現抑制効果が確認された。

choice アッセイの結果、候補遺伝子と AKHR とのダブルノックダウンにより、18:2 の嗜好性が顕著に減少したような候補と(図 7-2-1 中の\*)、提示した 2 種の人工飼料を等量摂食したような候補(図 7-2-1 中の†)とをポジティブと判断した。なお、候補遺伝子と AKHR とのダブルノックダウンした際、致死となる個体が見られた(図 7-2-1 中の§)。その場合は、その候補遺伝子に対応する dsRNA を 1/3-1/5 程度まで減少させて投与することで、致死とならないように、アッセイを行った。上述の判断指標にて、ポジティブと判断された、12 個の候補遺伝子については(図 7-2-1 中の赤字)、再度、同様のアッセイを行った(図 7-2-2)。その結果、1st スクリーニングでは、最終的に、7 つの候補遺伝子(OBPunigene16317、OBPunigene16937、OBP\_CL1190、CSPunigene15927、CSPunigene16449、CSPunigene17213、OBPunigene28848) をポジティブな候補遺伝子とした。

### 7-3 まとめと考察

#### RNA-seq の解析データから見出した OBP と CSP の候補遺伝子に関して

フタホシコオロギの小腸についての RNA-seq 解析のデータから、14 個の OBP と、13 個の CSP の候補遺伝子を見出した。他の昆虫種では、ゲノム情報から、各昆虫種あたり、OBP と CSP のどちらについても、数-数十程度の分子が見出されている<sup>160, 161)</sup>。本論文研究におけるフタホシコオロギの RNA-seq 解析では、小腸のみをサンプルとしているため、単純に比較はできないものの、フタホシコオロギの小腸についての RNA-seq の解析データから見出した OBP および CSP の候補 unigene の数は、極端に少ないわけではなく、妥当であると考えた。

しかし、シーケンシングの完了後の、contig へのアセンブリーの結果によると、contig にアセンブリーできなかった read が多く存在すると考えられる(図 7-1-2 (A))。contig にアセンブリーできなかった read に関しては、OBP、CSP、および OR の候補の探索に進めることはできなかったため、本論文研究での RNA-seq 解析では、全ての OBP および CSP の候補を見出すことはできていない可能性がある。

また、本論文研究の RNA-seq 解析では、OR の候補を見出すことはできなかった。このことは、OR の発現量が少ないことや、unigene および CL の塩基配列情報からの BLAST 検索にて、OR を見出せなかったことが考えられる。後者に関しては、昆虫の化学感覚受容体は



オルソログおよびパラログ遺伝子間で相同性が低いため、網羅的に OR を見出すのは難しいと考えられる。しかしながら、比較的新しい情報学的探索手法である、PSI-TBLASTN という手法により<sup>204)</sup>、昆虫のゲノムからの化学感覚受容体の探索が可能になった<sup>205-207)</sup>。このような手法を用いることで、フタホシコオロギの RNA-seq 解析のデータから、さらに詳細な解析により、OR の候補を見出すことが出来るかもしれない。

### OBP と CSP の候補遺伝子のスクリーニングに関して

RNAi 法と choice アッセイを組み合わせた、OBP と CSP の候補遺伝子の 1st スクリーニングにより、最終的に、7 つの OBP および CSP の候補遺伝子を見出した。このスクリーニングの結果から、これらの候補遺伝子がコードする分子は、18:2 だけではなく、他の脂肪酸種にも同等に結合する可能性はある。例えば、或る候補遺伝子のノックダウン個体の choice アッセイにて、提示した 2 種の人工飼料を、等量摂食した場合は、18:2 だけではなく、SFA-diet に含まれるような飽和脂肪酸(14:0、16:0、18:0)の認識能を失ったと考えられるため、その候補は、幅広い脂肪酸種に対して結合する可能性もある。また、OBP や CSP と、脂溶性物質との結合は、複数対複数であると考えられていることから、18:2 や、SFA-diet に含まれるような飽和脂肪酸(14:0、16:0、18:0)に結合するような OBP や CSP の候補が、現状で 7 つであることに関しては、あり得ると言えるであろう。

また、これらの 7 つの候補遺伝子の発現量を示す FPKM 値は、ばらつきが非常に大きかった(図 7-1-4)。例えば、候補遺伝子のうち、CSP の候補遺伝子である unigene15927 や、OBP の候補遺伝子である unigene16317 は、ハウスキーピング遺伝子(EF-1 $\alpha$ 、 $\beta$ -actin、GAPDH、PEPCK)と比較して発現量は非常に高い一方、それ以外の候補遺伝子は、上述のハウスキーピング遺伝子と比較して発現量は同等かそれ以下であった。上述した、OBP および CSP の候補遺伝子の発現量の差異は、OBP および CSP を発現する細胞を有する感覚子の数や、小腸内の受容膜近傍の体液環境での、それらの OBP および CSP のタンパク質レベルに反映されると考えられることから、各候補遺伝子の発現量の差異は、それぞれのリガンドとの結合量を決定する一つの要因となり得る。フタホシコオロギの小腸において、18:2 に結合するような OBP や CSP は、複数存在することも十分に考えられる。つまり、小腸内の OBP や CSP が複合的に、最終的に OR と結合する 18:2 量を調節し、18:2 の認識や嗜好性の調節

が発揮されているのかもしれない。

現在、これらの7種類の候補について、リコンビナントタンパク質を調製し、その後、*in vitro* における、各脂肪酸種との結合を、他の昆虫種での OBP および CSP のリガンド結合実験にてよく用いられる、脂溶性の蛍光プローブとリガンド候補との競合実験により解析する予定である<sup>160, 161)</sup>。この結合実験により、18:2 と結合する OBP や CSP を見出すことで、小腸内での 18:2 の認識機構について、さらなる知見を得ることを期待する。また、それらの、18:2 と結合する OBP や CSP が、AKHR のノックダウンや、脂質代謝の調節機構とどのように関連して変動するかを解析することも重要な課題である。

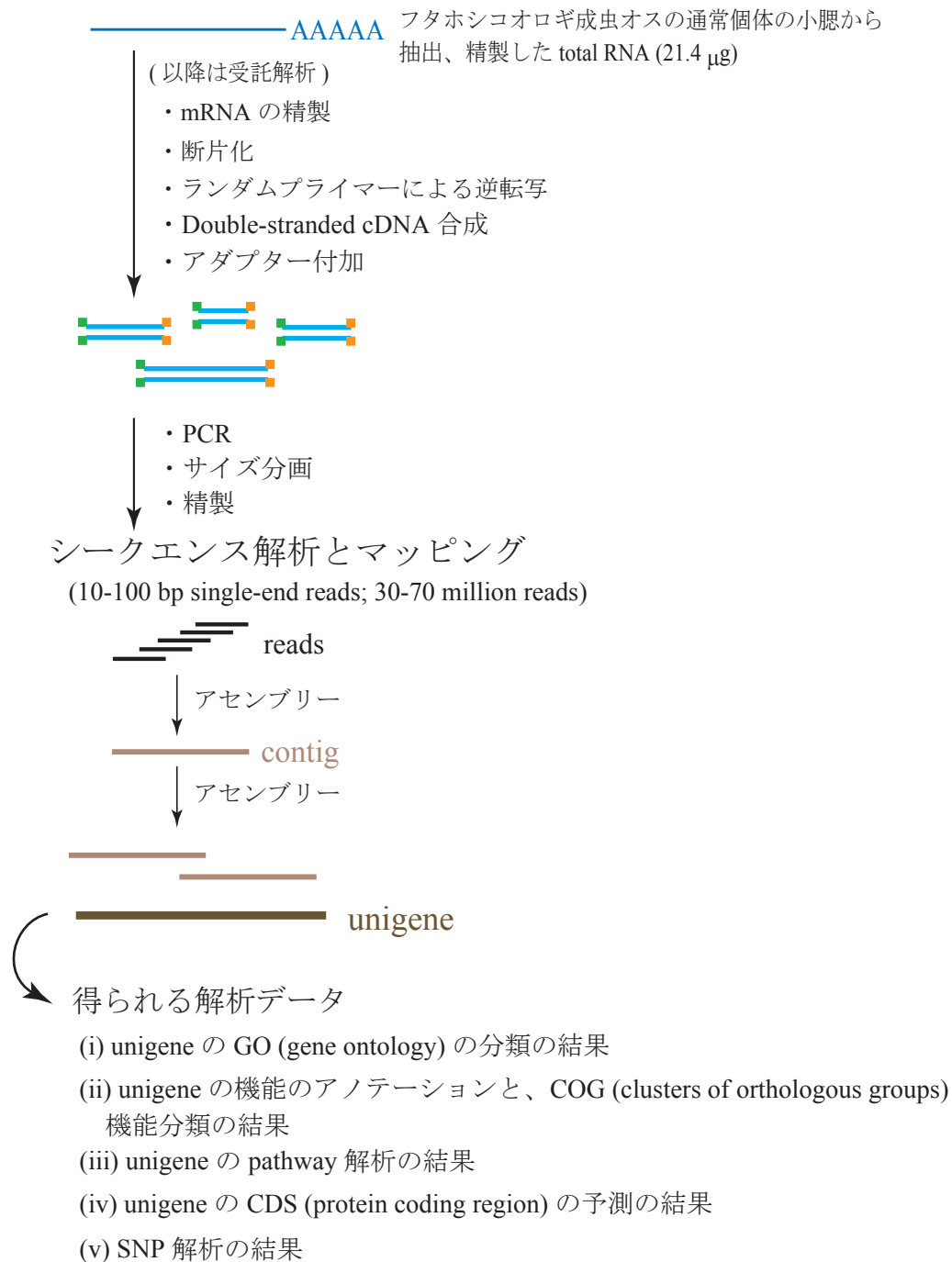


図 7-1-1. 本論文研究にて行った、フタホシコオロギ成虫オス個体の小腸を用いた RNA-seq 解析の概要。フタホシコオロギ成虫オスの通常個体の 16 個体分の小腸から抽出、精製した、total RNA (21.4  $\mu\text{g}$ ) を受託解析用のサンプルとした。

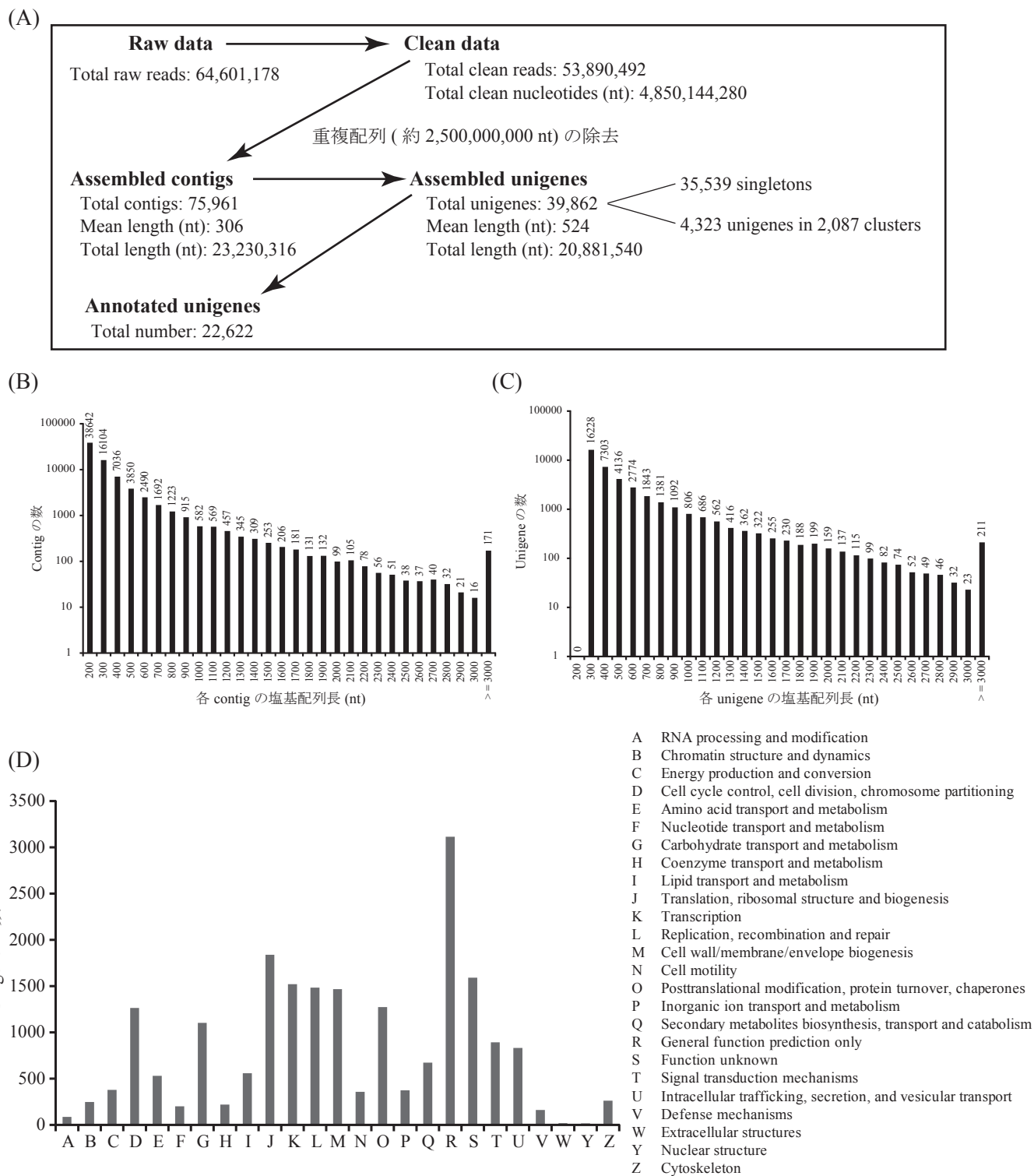


図 7-1-2. 本論文研究にて行った、フタホシコオロギ成虫オス個体の小腸を用いた RNA-seq 解析データ。  
(A) トランスクリプトーム解析の概要。シーケンシングの完了後、raw data からアダプター、インデックス、および低品質のデータを除き、clean data とする。clean data から重複配列を除き、contig としてアセンブリーする。この際、contig にアセンブリーできたデータは Clean data の約 48% となる。次に、contig を用いて、unigene にアセンブリーする。得られた 39,862 の unigene のうち、アノテーションできた unigene は、22,622 であった。(B) contig の塩基配列長の分布。(C) unigene の塩基配列長の分布。(D) unigene に関する、COG (clusters of orthologous groups) 機能分類の結果。

## 1. フタホシコオロギ成虫の小腸に発現する OBP、CSP および OR の *in silico* 探索

- (i) RNA-seq 解析の結果における、各 unigene および CL の BLAST 検索結果を用いて、OBP、CSP および OR をコードすると考えられる候補遺伝子 (unigene および CL) を探索した。
- (ii) (i) にて得られた各候補遺伝子の塩基配列と各演繹アミノ酸配列とを用いて、RNA-seq 解析により得られた全ての unigene および CL の塩基配列とその演繹アミノ酸配列に対して、local BLAST 検索を行った。

得られた候補遺伝子 (unigene および CL)

OBP をコードする候補遺伝子 : 14 個
CSP をコードする候補遺伝子 : 13 個
OR をコードする候補遺伝子 : 0 個

- (iii) RNA-seq 解析のデータに存在する、上記の 27 個の候補遺伝子がコードする演繹アミノ酸配列が、予測される全長の ORF に満たない場合は、RACE 法により、全長の ORF をコードする塩基配列を取得した。(対象: OBP の候補遺伝子のうちの 1 個と CSP の候補遺伝子のうちの 5 個)
- (iv) 26 個の候補遺伝子について、全長 ORF をコードする cDNA の塩基配列をサブクローニングした。
- (v) 27 個の候補遺伝子について、(iv) にて取得した塩基配列を基に、dsRNA をそれぞれ調製した。

## 2. RNAi 法と choice アッセイによる、候補遺伝子のスクリーニング

### (1st スクリーニング)

- (i) フタホシコオロギ成虫オス個体に、AKHR-dsRNA と、上記の候補遺伝子の一つをノックダウンするような dsRNA とを、投与した。(AKHR と、各候補遺伝子とのダブルノックダウン)
- (ii) 2 種の dsRNA 投与後 2 日目から、4 日目までの 3 日間、SFA-diet と、18:2-diet とを用いて、choice アッセイを行った。
- (iii) AKHR のノックダウンによる、18:2 の嗜好性の増強が、コントロール個体の嗜好性の程度にまで減少した場合、あるいは、2 種の人工飼料を、同等の量を摂食していた場合、その時ノックダウンした候補を、ポジティブと判断した。

ポジティブであった候補遺伝子

OBP をコードする候補遺伝子 : 4 個
CSP をコードする候補遺伝子 : 3 個

### 3. *in vitro* での結合アッセイ (2nd スクリーニング)

- (i) 1st スクリーニングにおいてポジティブであった候補について、それらの組み換えタンパク質を調製する。
- (ii) 各組み換えタンパク質と、各脂肪酸種との結合アッセイを行う。

18:2、および、他の脂肪酸種と結合するような OBP/CSP の同定

図 7-1-3. RNA-seq 解析のデータを基にした、18:2、および、他の脂肪酸種と結合するような OBP/CSP の探索スキームの概要。括弧にて示した部分は、現在調製、解析中の部分であり、本論文では記述しない。

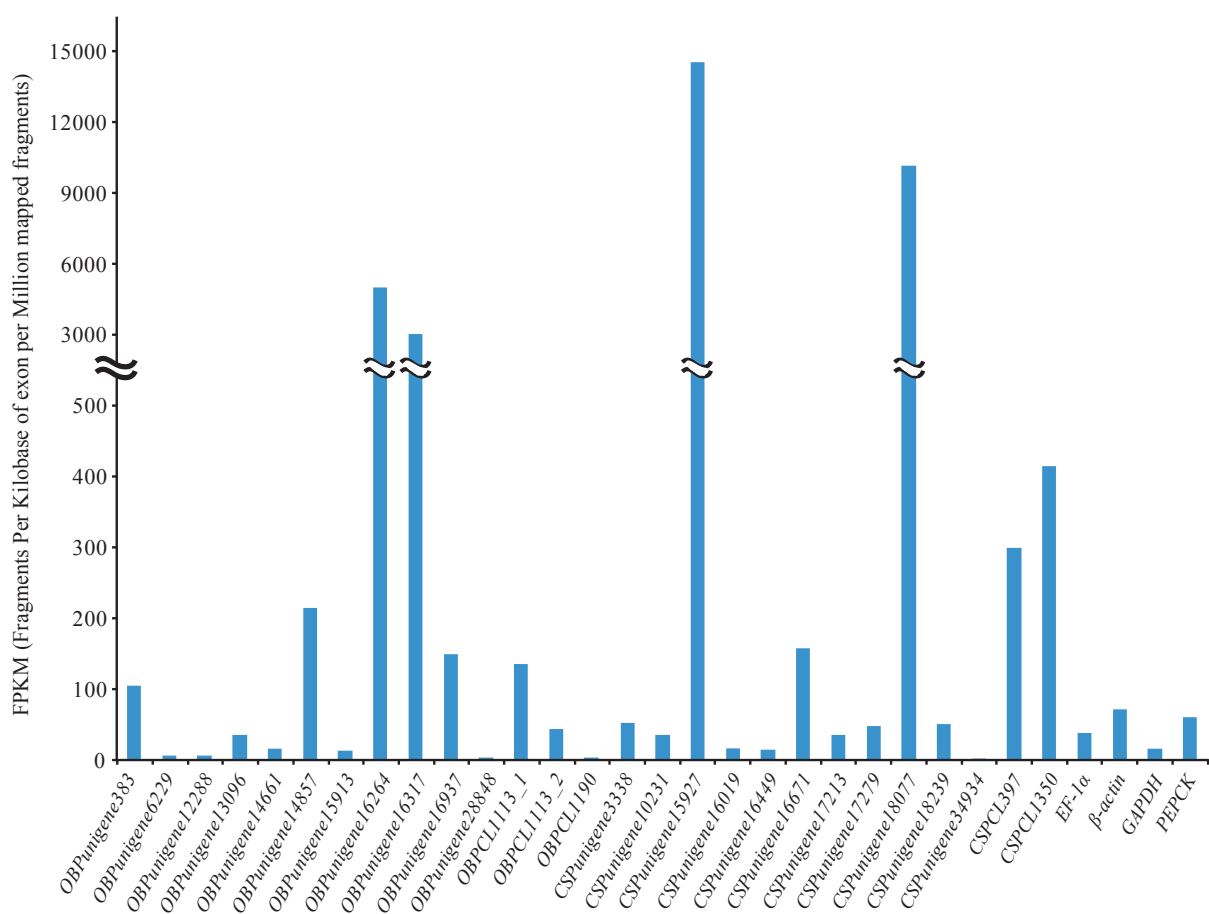


図 7-1-4. 14 個の OBP の候補遺伝子と 13 個の CSP の候補遺伝子、および、ハウスキーピング遺伝子 (EF-1α、β-actin、GAPDH、PEPCK) の FPKM (Fragments per kilobase of exon per million mapped fragments) 値。各候補遺伝子の FPKM 値は、 $10^6 C / (NL / 10^3)$  にて算出される。C は、RNA-seq 解析の際の、各候補遺伝子のフラグメント配列の存在数を示し、N は、全ての unigene および CL のフラグメント配列の存在数の合計を示し、L は、各候補遺伝子の CDS (コーディング領域) の塩基数であるすなわち、FPKM 値は、各候補遺伝子の mRNA の発現量の指標とされる。各 unigene および CL の番号の頭に、OBP および CSP を付け加え、それぞれが、OBP の候補であるか、CSP の候補であることを示した。

CL1113\_1 1 -----MQAFLVVAVVFTLVATSSAETTEGFGKTIPIAEHCETVVKGTDEDVETAV--HLSRD  
CL1113\_2 1 -----MQAFFVAAVVFTLVATSSAETSEVFQKTIPIAEGCASAKATDEDVETVV--HLKKD  
Unigene15913 1 -----MRVVVALLFIVSAISADTTEHFKAFLRPEAEICKEKLQASDDLNLAML--YLKRD  
Unigene14857 1 -----MHAALLALVAAAALQVSSAGDPAKMKETMEKCSGQNAISPDEMEAMK--SLTIP  
Unigene16317 1 -----MQPAAALAAALLFFAALQVTVAEVPEKKETAAKCRGEHPISDDELNGLK--SLTIP  
Unigene383 1 -----MNLPIISVVVVVAVAVCGARGASTDKFKKEVVEPVVKAKESEVAGATDADVEHV--MHREE  
Unigene6229 1 -----MLPAALEHLVRRNHNCVSVERRELQTRMRTLKATCKVSSGIPEDLSKIK--QEGP  
Unigene12288 1 -----MSPSVLVVLVLVLAFLVLTGATADLKTFLSEKKESWDVCKVKETGFKAGDPTAVW--KGEV  
Unigene16264 1 -----MNTILPALLLAAAFAFVVVECGCKGGKGGKGFMRCEMQEAGITKEQWKEMK--TQKTV  
Unigene13096 1 -----MKCLLFAVGVCCLIAGVVRGDDDMKEMMQLHNTCQGNTCVAEDLIVRAR--TGDFA  
Unigene16937 1 -----MQPSAASAAFAALSALLVFAAVGHGLELTGRIMDMAKMDKCKREETGADR--ESLKHV--AHGVL  
Unigene14661 1 -----MAHKNVKTIVSVFLICLLAGQVGTGLSLAQLKNDMMKMPRCMQRSKGASKDMVDAIQ--QQFA  
Unigene28848 1 -----MNAASAVALAAALAAGLIAAARAASAPAVGNPAAPPPPKGARCQETPTVA--EKLEK  
CL1190 1 MAAVAALVVVACCVGLLPSNALAAARPPAASKHATDAPSTTVAAGFTPNFTAIIMEQCNETYRIDMKLLEELNNTGSFRE

CL1113\_1 57 VTPV-GKCLMACVMEAI GMMRNG--TMASEEILKPYRSLFADDPRLSKAEVVRNCRVBAQKFP---TQTQMAH  
CL1113\_2 57 FTPE-GKCLMACVMEAI GVMRDG--TMASEEILKPYRSLFADDPRLSKADEVVRNCRVBAQKFP---TQTQMAH  
Unigene15913 54 LFSSEKAKVAGC VLERLGVMRDGRWTTVPAEKRLQVYHKAFADDVMRLEAADAVINLCHERADAKFKG--RQDGDVNAVY  
Unigene14857 53 SSDS-GKCFVLCFBEVGMINGG--SFNRATTEALARAKLKEPEELD KYMQLIEKCSDEVASHDN---KCTGTP  
Unigene16317 56 ETDE-GKCFVLCFBEVGMINGG--KFSQENAVKIMKEKLEKPEDEIEKHMQLIEKCNDEVASHDN---KCTGTP  
Unigene383 58 LGTRTGMCLQYCVFEKLGGMKDG--TVVSEALAVLHRIYDGFETLQNASDKIDRCEEVVMERTDL--N-DGDLAN  
Unigene6229 54 -SSEKGCFLGCMMEGMNIIEGG--AFAREERAERLVS AVYAEG-AKRRSARA AVRAQAEVTTTDR-----CTGG  
Unigene12288 58 DTQE-GRCYMGCMMEKATVI VNG--EFSPENAKELAEQCFAGE--VLATMREVLDTGAEVKTTRD-----CTGP  
Unigene16264 56 PDSEEAKKLMCCALKKTQMLKED--GESNPEVCKQRIDSAKEKLEKAGMQPEELKTCDDQGGADCPERAYNLLKCAQEK  
Unigene13096 55 DDRA-LKCYMKCLIFVETSAMTED-----GVLDGDAVIAMLEPQVKDEGSRVNVNCKSATG-----ADAEIAF  
Unigene16937 63 DDHESFQYIKCLMVQFSALSED-----GVVFVEEELENVNPPKEIEGHRIVLCAQGTSG-----VDACTAY  
Unigene14661 62 DDPK-LKCYTKCVQMGMQAMKKD--VYSADAAQAADKLLPDTHKERVKAATQCKDADAAGLTDP-----CEVAF  
Unigene28848 56 DIAECQEEIKLSILKEVLES LDA-----PQNEATVSRRRSKREAISGDDRRHAGCCLLCVYR-----RVGA  
CL1190 81 EKDETPMCLYHCVFDKGLMDTDG--TFNVVRVKD MYRTGAESSESRAQMDDMVAMCILQRDEADH-----SRVY

CL1113\_1 129 LAVFCTLVNTY-----  
CL1113\_2 129 LAVFCTLVNTY-----  
Unigene15913 132 DAIECFWRH-----  
Unigene14857 122 KLMECTKNYAPGLGIVLAGSA-----  
Unigene16317 125 KLLECFKTFAPGFGIVLP GSE-----  
Unigene383 132 AVQCQFRKLH-----  
Unigene6229 121 LVFECFRRHQVGLFGSGGA-----  
Unigene12288 124 VLMQCLMKIKAAKGV-----  
Unigene16264 133 TNLPPVALLHAGGKRRRGKSGKEE-----  
Unigene13096 117 NMHCKSYKENPKLYFLV-----  
Unigene16937 126 QVHRCYNSSNPVLYKEVLLAFDIKIDE  
Unigene14661 129 AISKNYADPEVFLFP-----  
Unigene28848 117 VDQRGFPA-----  
CL1190 150 GFVSCLMTEEIIIRGTPMTRGVQHDA-----

unigene3338 1 ----MNTGLALFVALTAFLGTATCAPS-----EEKFTTKYD--NVNLDEILRNERLFKKYXE  
CL1350 1 ----MNRGLAFALALAAALVAVALAAPA-----EEKYTDKYD--NVNLDEILSNRERLFKKYLE  
unigene16449 1 ----MHRAILLSLATCTLVVVVTAV-----ERYTDKYD--NINLQEI LNNERLFKKYLE  
unigene17279 1 ----MNRGISLALAVALLARTSAD-----EKYSDKYD--NIDLDNILHNERLFKKYMQ  
unigene10231 1 ----ALAALLAVALAGPAP-----DDKYTDKWD--NIDLDEILANDRLRNKYLE  
CL397 1 ----MNRGLAFALALAAALVAVALAGPAP-----DDKYTDKWD--NIDLDEILANDRLRNKYLE  
unigene15927 1 ----MKAVALCLALVVALVGAAP-----ADKYSRFD--HVDVDAILHNDRLDNYIK  
Unigene18077 1 ----MSRSVAVALTAALVAVCLAA-----DDKYSRFDG--TVNLDSILSDDQQLAQYRD  
unigene16019 1 ----MKAVFALALAAVVALAAAPK-----ETYSTKYD--NLDVDAILNNPRTLEAYFK  
unigene16671 1 MVSAAARPSAVVVALALAVIRASDSDAARRCDGVTIGEKYSRDYD--NVDVDAILNSQRLKAYVD  
unigene18239 1 ----MHGRAAVALAVALLAALCAAAP-----QETYSTYD--NVNLQALLADPQVQFLK  
unigene34934 1 ----MS-RSTAALAVAAALAVAAAAAR--AALAQDTXSSRXD--GTDLDAILADEGRVDQYVR  
unigene17213 1 MAATCLPSSLVCPRVAAALLAVLCVVCVS-----AQAAPRKISDEALEHALNDKRYLMRLK

α3 α4 α5

unigene3338 52 CLLADNDSSH-CTADGKELRKAIIPDALVNECAKCSDRQKEGSEKVIKHLRDNRPQ-DWEKLOAKWDP  
CL1350 52 CLLADNDSSH-CTADGKELRKAIIPDALTNCGCKCTDKQKSGTDKVVKFLRANKQA-DWERLOAKWDP  
unigene16449 49 CLLADSDSR-CTADGRELRKAIIPDALTTCECKCTAKQKRSAAATVIKHLRDNRPFG-DWAKLOAKWDP  
unigene17279 49 CLLDDDDRH-CTADGRDLRSIIEALTNGCECKCTDKQKSGLEKVIKHLREHNQD-DWEKLEAKWDP  
unigene10231 44 CLLADNDNH-CTPDGKELKKSIPDALTNDCAKCTNFQKNGSGKVIKHLRENKPE-DWQRLQAKFDFE  
CL397 53 CLLADNDNH-CTPDGKELRKNIIPDALTNECECKCTDKQKSGVEKVIKYLKEQKKE-DFDKLLAKWDP  
unigene15927 49 CLENTDDKG-CTQEGKALDVLAAEAIATDCAKCTDVQKGFVGKIIPFLRNKRV-EWKRLQAKYDP  
Unigene18077 51 CLVDAADDK-CNEQGKALKRILAEALQNDCAKCTDKQKSGAVKAIKFLNKNKPD-IWQQLSGKFDP  
unigene16019 50 CMVDQGP--CTPEGREFRKNLPDALATDCECKSDAKKNLIRKLSKHLIQHHP-KWEQVKKKFDPK  
unigene16671 66 CTMDRGA--CTKEGCFLLKAVVPDALGNECECKNDKQKRIAGKILSNLQFHRDGYWNEILNKYDP  
unigene18239 52 CFLQEGDGEPCESEMGRRVKAVLPEALPGDCCKCTGAQRVGLAKTVKFLNAKLFP-QWKQLEKKFDP  
unigene34934 56 CFLAEKDDD-CDEVERRVKAVLAEALTTDCAKCTERQKVGLPKTVRFARERPD-AWQQIQGKFDP  
unigene17213 61 CALGEAP--CDPVGRRLKTLAPLVLRGTCPCTPBEETRQIQRTLSHIQRHYPK-EWNRIVKQYSG

α6

unigene3338 116 EGIYNKRYAE--RLSS-----  
CL1350 116 QGVFVAKYAD--KLTR-----  
unigene16449 113 QGIFVSKYAE--RFPA-----  
unigene17279 113 EGLFRKAYAD--KFD-----  
unigene10231 109 DVMYMTKFAENRKASS-----  
CL397 117 EGVYRKKYEA--KYSS-----  
unigene15927 113 QGAWAKAHPDV-----  
Unigene18077 115 QGAFAKNHPDLFAMLTALVWIIISDSLPETCLA  
unigene16019 113 GEHHDRFQKFLNAH-----  
unigene16671 129 TGEFRRRHWEWTEDDDEDPED-----  
unigene18239 117 QGAYAKAHPFLF-----  
unigene34934 120 KRRYAAAHPELS-----  
unigene17213 123 R-----





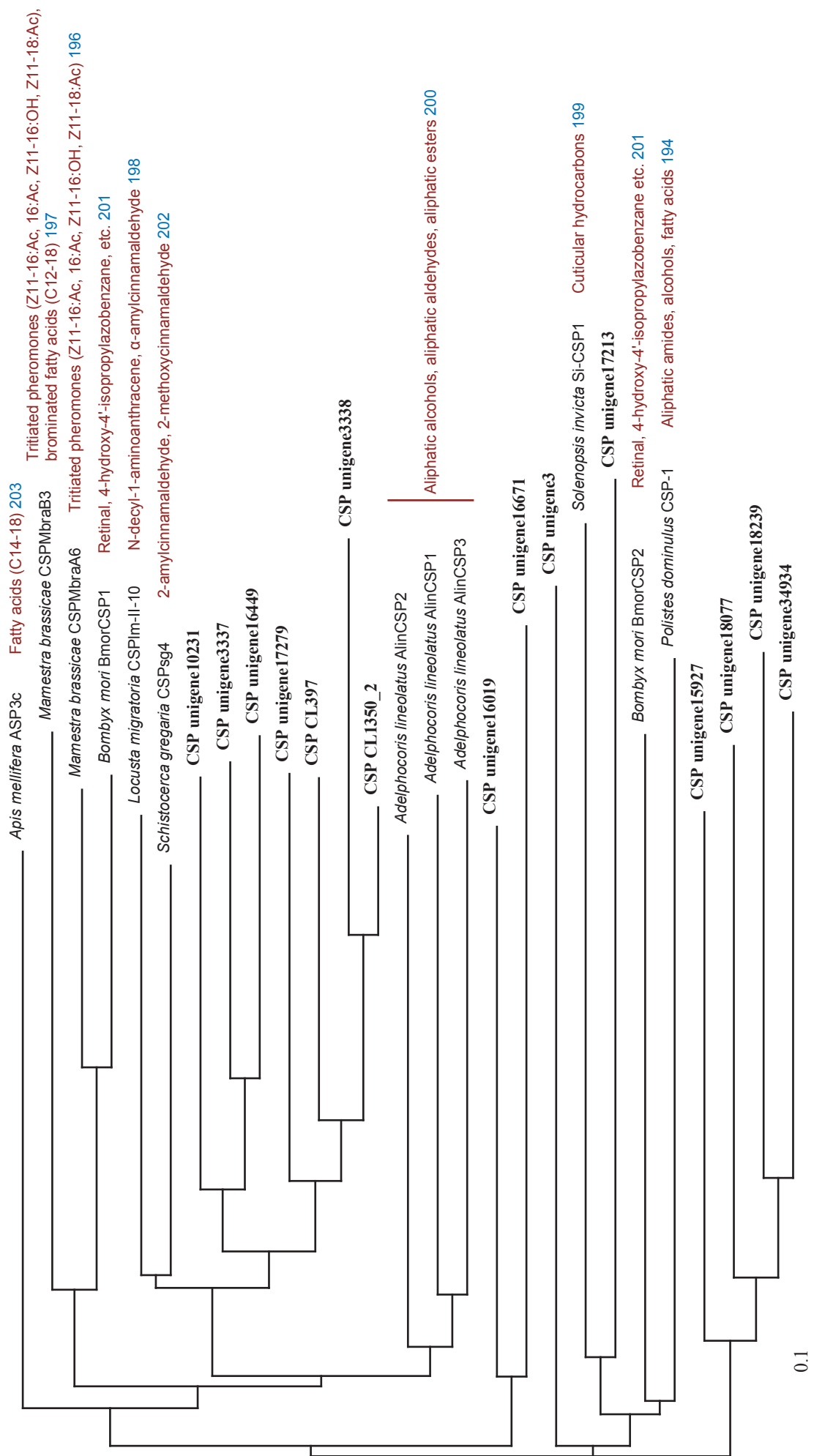


図 7-1-8. フタホシコロロギの CSP の候補遺伝子の演繹アミノ酸配列と、他の昆虫種の、リガン드가既知である全ての CSP のアミノ酸配列についての分子系統樹。濃い黒字は、フタホシコロロギの CSP の候補遺伝子を示す。赤字は、左の CSP に対して、*in vitro* において結合することが報告されているリガンドを示す。青字は引用文献番号を示す。

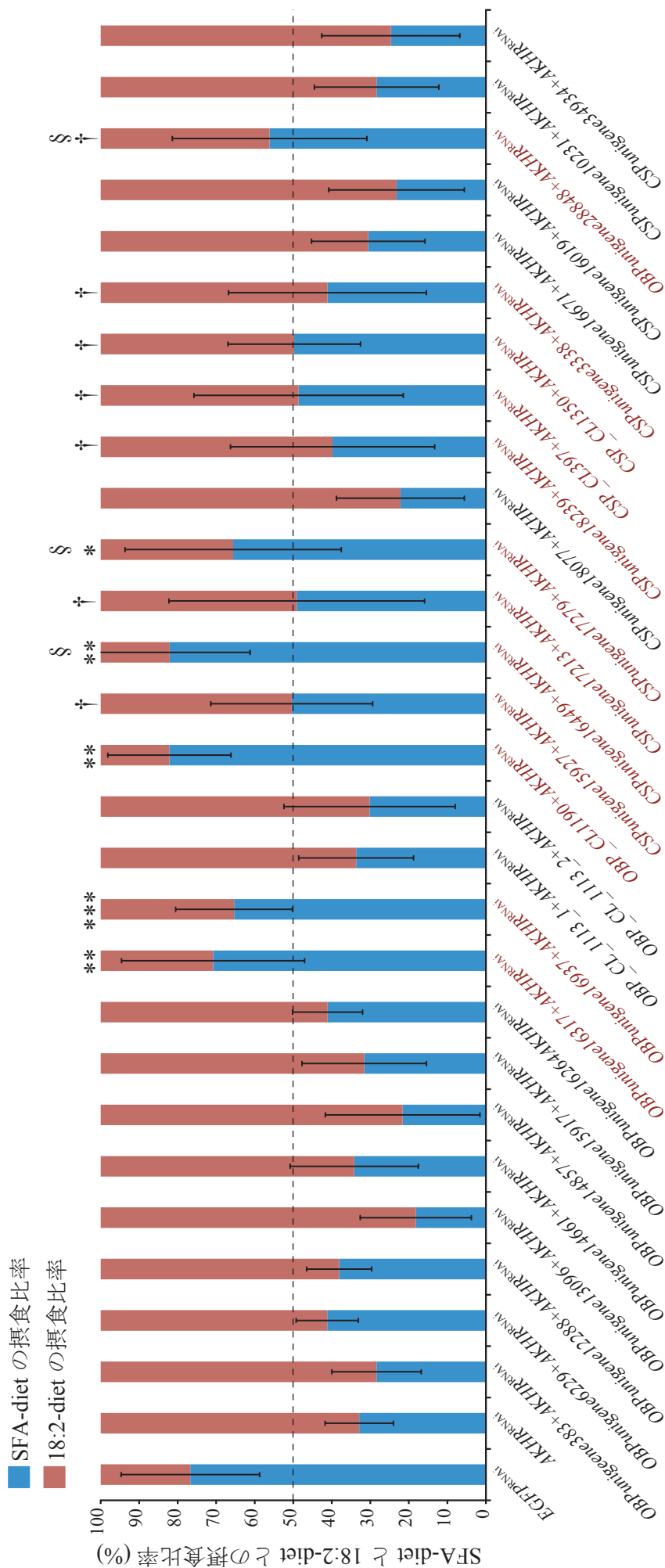


図 7-2-1. RNAi 法と choice アッセイによる、18:2 の認識機構に関する候補遺伝子のスクリーニング (1st スクリーニング; 1 回目)。グラフの各バーの下ラベルに示すように、フタホシコオロギ成虫オス個体を用いて、AKHR と、各候補をダブルノックダウンした。なお、AKHR のみをノックダウンした個体、および、EGFP-dsRNA を投与した個体は、ネガティブコントロールとして用いた。表 6-2-2 に示した、飽和脂肪酸を含む人工飼料 (SFA-diet) と、リノール酸 (18:2) を含む人工飼料 (18:2-diet) とを、各ノックダウン個体およびコントロールとして用いた。3 日間摂食させた。各人工飼料の摂食量の割合を、平均値  $\pm$  S. D. で示した ( $n = 6-8$ )。その結果、候補と AKHR とのダブルノックダウンにより、AKHR のノックダウンによる 18:2 の嗜好性が顕著に減少したような候補と ( $*P < 0.05$ ,  $**P < 0.005$ ,  $***P < 0.0005$ ; Dunnett's test)、候補と AKHR とのダブルノックダウンにより、提示した 2 種の人工飼料を等量摂食したような候補と (図中†) をポジティブ (グラフの各バーの下ラベル: 赤色) と判断した。なお、候補と AKHR とのダブルノックダウンした際、致死となる個体が見られた場合は (図中 §)、候補の dsRNA を 1/3-1/5 程度に減少させることで、致死にならないように、アッセイを行った。

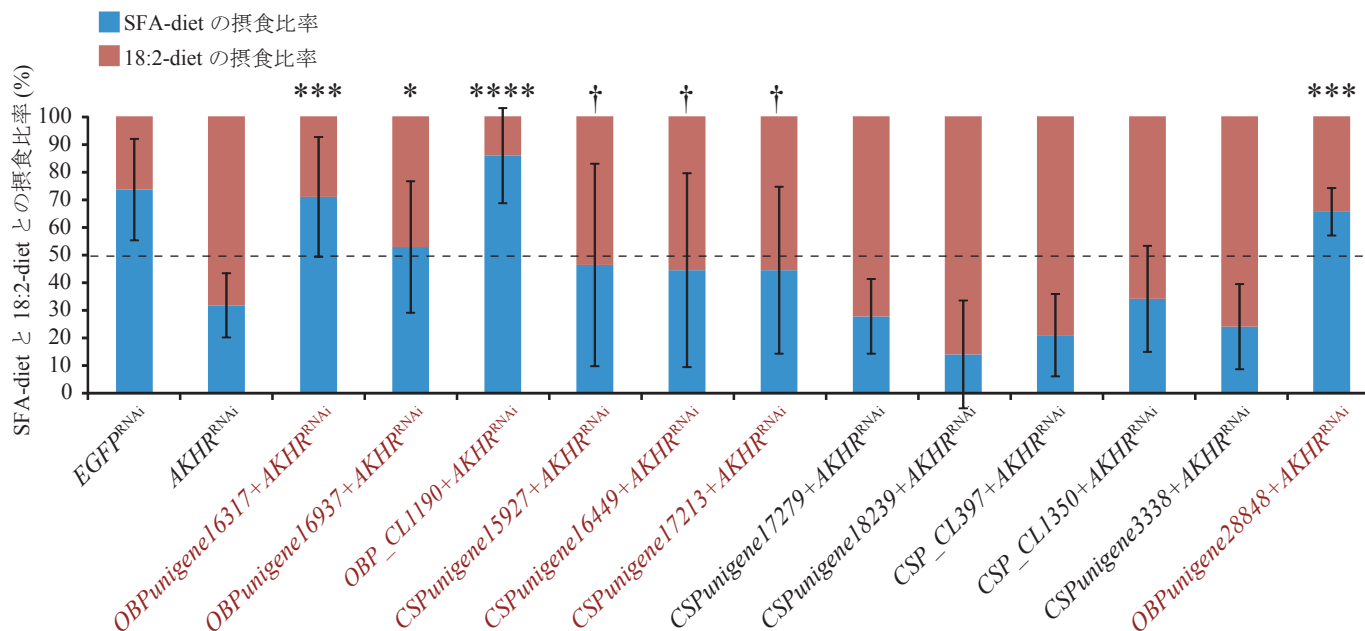


図 7-2-2. RNAi 法と choice アッセイによる、18:2 の認識機構に関する候補遺伝子のスクリーニング (1st スクリーニング; 2 回目)。図 7-2-1 において、ポジティブと判断した 12 の候補遺伝子について、再度、同様のアッセイを行った。グラフの各バーの下に示すように、AKHR と、各候補とをダブルノックダウンした。なお、AKHR のみをノックダウンした個体、および、EGFP-dsRNA を投与した個体は、コントロールとして用いた。表 6-2-2 に示した、飽和脂肪酸を含む人工飼料 (SFA-diet) と、リノール酸 (18:2) を含む人工飼料 (18:2-diet) とを、各遺伝子をダブルノックダウンしたフタホシコオロギ成虫オス個体およびコントロール個体に提示し、3 日間摂食させた。各人工飼料の摂食量の割合を、平均値  $\pm$  S. D. で示した ( $n = 6-8$ )。その結果、候補と AKHR とのダブルノックダウンにより、AKHR のノックダウンによる 18:2 の嗜好性が顕著に減少したような候補と ( $*P < 0.05$ ,  $***P < 0.005$ ,  $****P < 0.00005$ ; Dunnett's test)、候補と AKHR とのダブルノックダウンにより、提示した 2 種の人工飼料を等量摂食したような候補と (図中†) をポジティブ (グラフの各バーの下に示すように、赤色) と判断した。つまり、1st スクリーニングでは、7 つの候補遺伝子 (OBPunigene16317、OBPunigene16937、OBP-CL1190、CSPunigene15927、CSPunigene16449、CSPunigene17213、OBPunigene28848) をポジティブとした。

## 第八章 脂肪酸不飽和化酵素 desaturase のノックダウン個体の致死の原因の解析

### 8-0 はじめに

第五章の結果から、AKHR のノックダウン個体では、特に体液中において、飽和脂肪酸と不飽和脂肪酸のバランスが変動することを見出した(図 5-2 (A))。このバランスの変動は、特に、炭素鎖長 18 の脂肪酸である、18:0 (ステアリン酸)、18:1 (オレイン酸)、および 18:2 (リノール酸)における、飽和と不飽和のバランスにおいて見られた。そこで、このような、炭素鎖長 18 の脂肪酸の、飽和と不飽和のバランスを調節する機構と摂食行動との関連性を解析することとした。

生体内では、18:1、および 18:2 は、それぞれ、18:0 の不飽和化、および、それに続く、18:1 の不飽和化によって生合成される<sup>208-210)</sup>。これらの不飽和化に関与する、脂肪酸不飽和化酵素として、それぞれ、 $\Delta 9$ -desaturase、 $\Delta 12$ -desaturase が知られている<sup>208-210)</sup>。具体的には、 $\Delta 9$ -desaturase により、18:0 の  $\Delta 9$  位が不飽和化されることで、18:1 が生合成され、さらに、 $\Delta 12$ -desaturase により、18:1 の  $\Delta 12$  位が不飽和化されることで、18:2 が生合成される。動物は、 $\Delta 9$ -desaturase を体内に有する一方で、 $\Delta 12$ -desaturase は、一般的には、体内に有していないとされている<sup>209, 211-213)</sup>。 $\Delta 12$ -desaturase は、植物、菌類、および細菌類にてその存在が報告されている<sup>209, 214, 215)</sup>。すなわち、一般的に、動物は、18:2 を体内にて生合成することができないため、18:2 は必須脂肪酸とされている<sup>209)</sup>。

しかし、昆虫に関しては、一部の昆虫種において、18:2 を体内にて生合成できることが報告されている<sup>216)</sup>。このことは、放射性ラベル化した酢酸([1- $^{14}\text{C}$ ]酢酸)を体内に投与すると、放射性ラベル化された 18:2 が生合成されることにより、確認された<sup>216)</sup>。この報告によると、解析した 32 の昆虫種のうち、フタホシコオロギを含む 8 種の昆虫種において、体内にて 18:2 が生合成された<sup>216)</sup>。さらに近年、18:2 を生合成できると考えられてきた昆虫種である、ヨーロッパエコオロギと、コクヌストモドキから、 $\Delta 12$ -desaturase をコードする遺伝子がクローニングされた<sup>217)</sup>。また、ヨーロッパエコオロギの  $\Delta 12$ -desaturase が 18:1 の不飽和化活性を有することも確認された<sup>217)</sup>。ワモンゴキブリと、ハウレンソウケナガコナダニ *Tyrophagus similis*、および、ケナガコナダニ *Tyrophagus putrescentiae* においては、 $\Delta 12$ -desaturase をコードする遺伝子はクローニングされていないものの、体内に、

18:1 の不飽和化活性を有する酵素が存在することが確認された<sup>218, 219</sup>)。なお、フタホシコオロギにおいては、 $\Delta 12$ -desaturase をコードする遺伝子は、未だクローニングされていない。また、 $\Delta 9$ -desaturase に関しては、多くの昆虫種で見出されているが<sup>220-224</sup>)、フタホシコオロギにおいては、 $\Delta 9$ -desaturase をコードする遺伝子は、未だクローニングされていない。

そこで、本章では、フタホシコオロギにおいて、炭素鎖長 18 の脂肪酸の、飽和と不飽和のバランスを調節すると考えられる、 $\Delta 9$ -desaturase と  $\Delta 12$ -desaturase に着目することとした。そのために、まず、フタホシコオロギにおいて、 $\Delta 9$ -desaturase と  $\Delta 12$ -desaturase をコードすると考えられる、それぞれの遺伝子の cDNA をクローニングした(図 S1-6 (A-D))。 $\Delta 9$ -desaturase と  $\Delta 12$ -desaturase は、特に、脂肪体、中腸、神経系にて、mRNA の発現が見られた(図 S1-6 (G, H))。次に、 $\Delta 9$ -desaturase と  $\Delta 12$ -desaturase をそれぞれノックダウンしたフタホシコオロギ成虫オス個体を調製することとした(図 S1-6 (I))。 $\Delta 9$ -desaturase をノックダウンするために、 $\Delta 9$ -desaturase をターゲットとした dsRNA を調製し(図 S1-6 (A, I-1))、その dsRNA を投与すると、 $\Delta 9$ -desaturase のみならず、 $\Delta 12$ -desaturase もノックダウンされた(図 S1-6 (I-2))。このことは、2 つの desaturase をコードする遺伝子の cDNA における塩基配列の相同性が高いことに起因すると考えた。なお、この dsRNA は、 $\Delta 9$ -desaturase と  $\Delta 12$ -desaturase をダブルノックダウンできるような dsRNA ( $\Delta(9+12)$ -desaturase-dsRNA)として、その後の解析に用いることとした。 $\Delta 9$ -desaturase と  $\Delta 12$ -desaturase のそれぞれを、特異的にノックダウンするような dsRNA を調製するために、それぞれの cDNA の 3' UTR (非翻訳領域)の塩基配列を鋳型とするような、dsRNA を設計および調製した( $\Delta 9$ -desaturase-dsRNA、 $\Delta 12$ -desaturase-dsRNA) (図 S1-6 (A, B, I-1))。その結果、それぞれの dsRNA が、特異的に、それぞれの desaturase をノックダウンすることを確認できた(図 S1-6 (I-3))。

このように調製した dsRNA を投与し、その表現型を解析することとした。その結果、興味深いことに、 $\Delta(9+12)$ -desaturase-dsRNA を投与した、フタホシコオロギ成虫オス個体では、投与後 2 日目には、ほとんどの個体が致死となることを見出した。なお、片方の desaturase をノックダウンするような dsRNA ( $\Delta 9$ -desaturase-dsRNA と、 $\Delta 12$ -desaturase-dsRNA)の単独の投与では、致死は見られなかった。

上述のように、 $\Delta 9$ -desaturase と  $\Delta 12$ -desaturase は、脂肪酸の不飽和化に関与するため、このような致死は、体内の脂肪酸の不飽和化活性が欠損したことによることが示唆されるものの、その原因は明らかではない。また、 $\Delta 9$ -desaturase、および  $\Delta 12$ -desaturase により生合成される 18:2 は、一般的な動物では、必須脂肪酸であることを考慮すると<sup>209)</sup>、上述の致死は、体内の 18:2 の欠乏に起因する可能性もある。このような考えから、上述の致死の原因を解明することで、脂質代謝と、生物の生存のメカニズムとの関連性を見出す上で興味深い結果が得られるかもしれないと考えた。そこで本章では、 $\Delta 9$ -desaturase と  $\Delta 12$ -desaturase のダブルノックダウン個体における、致死直前の表現型の解析を中心として、致死の原因の解明を目指した。

### 8-1 desaturase のノックダウン個体の各組織での脂肪酸組成の解析

上述のように、 $\Delta 9$ -desaturase と  $\Delta 12$ -desaturase は、脂肪酸の不飽和化に関与する。そこで、 $\Delta 9$ -desaturase と  $\Delta 12$ -desaturase の単独、および両方をノックダウンしたフタホシコオロギ成虫オス個体における、各組織の脂肪酸組成を解析した(図 8-1)。フタホシコオロギの、 $\Delta 9$ -desaturase、 $\Delta 12$ -desaturase の mRNA の組織別発現解析の結果、それらは、主に、中腸、脂肪体、および、神経系に発現していたことを考慮して(図 S1-6 (G、H))、脂肪酸組成を解析する組織として、中腸、脂肪体、神経系、および、体液を用いた。

$\Delta 9$ -desaturase-dsRNA、 $\Delta 12$ -desaturase-dsRNA、および EGFP-dsRNA の投与後 3 日目のフタホシコオロギ成虫オス個体から、各組織(体液(A)、脂肪体(B)、中腸(C)、神経系(D))を摘出・回収した。 $\Delta(9+12)$ -desaturase-dsRNA を投与した個体においては、投与後 1-2 日後にて、運動性や接触刺激応答の低下などの判断材料から、致死の直前であると見なした個体から、同様の各組織を摘出・回収した。各組織から抽出した脂質をけん化した後に、脂肪酸を抽出した。抽出した脂肪酸は、ADAM 化反応した後に、HPLC に供した。HPLC のクロマトグラムにて見られた、7 種の脂肪酸(12:0、14:0、16:0、18:0、18:1、18:2、18:3)の各ピーク面積からモル濃度を算出し、その合計に対する各脂肪酸のモル濃度比を算出した。その結果、 $\Delta 9$ -desaturase と  $\Delta 12$ -desaturase を単独でノックダウンした個体、およびその両方をノックダウンした個体において、脂肪体、中腸、および神経系の脂質に含まれる飽和脂肪酸と不飽和脂肪酸のバランスが変動していた(図 8-1)。

## 8-2 desaturase のノックダウン個体の脂肪酸の嗜好性の解析

第五章および第六章にて、AKHR のノックダウン個体は、体液中の飽和脂肪酸と不飽和脂肪酸のバランスが変動し(図 5-2 (A))、さらに、不飽和脂肪酸である 18:2 の嗜好性が増強していることを明らかにした(図 6-2 (C))。これを踏まえると、 $\Delta 9$ -desaturase、 $\Delta 12$ -desaturase、およびその両方のノックダウン個体では、飽和脂肪酸と不飽和脂肪酸のバランスが顕著に変動しているため(図 8-1)、脂肪酸の嗜好性についても変動が見られる可能性が考えられた。そこで、 $\Delta 9$ -desaturase と  $\Delta 12$ -desaturase を単独でノックダウンした個体、およびその両方をノックダウンした個体について、飽和脂肪酸と不飽和脂肪酸との choice アッセイを行った。具体的には、表 6-2-1 に示した、飽和脂肪酸を含む人工飼料(SFA-diet)と、不飽和脂肪酸を含む人工飼料(UFA-diet)とを、 $\Delta 9$ -desaturase-dsRNA、 $\Delta 12$ -desaturase-dsRNA、 $\Delta(9+12)$ -desaturase-dsRNA、および EGFP-dsRNA を投与したフタホシコオロギ成虫オス個体に提示し、3 日間摂食させた。なお、 $\Delta(9+12)$ -desaturase-dsRNA の投与に関しては、投与後 3 日目までに致死とならないように、通常の投与量(3  $\mu$ g)の 1/5 程度を投与した。choice アッセイの結果、 $\Delta 9$ -desaturase と  $\Delta 12$ -desaturase を単独でノックダウンした個体、およびその両方をノックダウンした個体において、不飽和脂肪酸の嗜好性が顕著に増強した。

## 8-3 desaturase のノックダウン個体の各組織の変化に関する解析

$\Delta 9$ -desaturase と  $\Delta 12$ -desaturase のダブルノックダウン個体の致死に関与する組織を特定するために、HE (ヘマトキシリン・エオジン)染色によって、中腸、脂肪体、および神経系について、細胞核、細胞質を染色することで、組織学的観察を行った(図 8-3)。フタホシコオロギ成虫オス個体に、 $\Delta(9+12)$ -desaturase-dsRNA を投与し、投与後 1-2 日後にて、致死の直前であると見なした個体から、各組織(中腸(図 8-3 (A))、脂肪体(図 8-3 (B))、神経系(図 8-3 (C))) を摘出した。それらの組織を固定し、組織切片を作製した後、HE 染色を行った。その結果、中腸、脂肪体、神経系の全て組織において、コントロール個体と比較して、組織学的変化は見られなかった。なお、これらの組織の活性を調べるために、致死の直前であると見なした、 $\Delta 9$ -desaturase と  $\Delta 12$ -desaturase のダブルノックダウン個体から、中腸、



脂肪体、神経系を摘出し、各組織の ATP 量を、ルシフェリン/ルシフェラーゼ発光系を用いて定量した(データ非掲載)。その結果、中腸、脂肪体、神経系の全ての組織において、コントロール個体と比較して、ATP 量に顕著な変動は見られなかった。これらの結果から、致死に関与するような組織を特定することはできなかった。

#### 8-4 desaturase のノックダウン個体における致死のレスキュー実験

次に、 $\Delta 9$ -desaturase と  $\Delta 12$ -desaturase をダブルノックダウンした個体における、致死の原因となるような物質を探索することとした。そのために、 $\Delta 9$ -desaturase と  $\Delta 12$ -desaturase のダブルノックダウン個体の致死のレスキュー実験を行った(図 8-4)。 $\Delta 9$ -desaturase と  $\Delta 12$ -desaturase をダブルノックダウンした個体の脂肪酸組成の解析結果から、致死は、体内の脂肪酸組成のバランスの変動に起因する可能性が高いと考えたため(図 8-1)、先ず、ダブルノックダウン個体に、各脂肪酸種を過剰量摂取させることで、致死率に変化が見られるかどうかを調べた(図 8-4 (A、B))。その摂取は、各脂肪酸種を含む TAG として、フタホシコオロギの人工飼料に TAG (18:0/18:0/18:0)、TAG (18:1/18:1/18:1)、TAG (18:2/18:2/18:2)、および、TAG (18:3/18:3/18:3)をそれぞれ、2% (図 8-4 (A))、10% (図 8-4 (B))添加した人工飼料を摂食させることで行った。フタホシコオロギの成虫オス個体に、 $\Delta(9+12)$ -desaturase-dsRNA を投与した後に、上述の人工飼料をそれぞれ摂食させ、1 日ごとの生存率を調べた。その結果、TAG を添加しなかった人工飼料を摂食させた、コントロールと比較して、特に、TAG (18:2/18:2/18:2)を 10%添加した人工飼料を摂食させた場合に、生存率が最も上昇した(図 8-4 (B))。

昆虫においても、哺乳類と同様に、生体内において、18:2 は、アラキドン酸(20:4; arachidonic acid; AA)の生合成の原料となると考えられている<sup>225)</sup>。そこで、次に、AA を用いて、 $\Delta 9$ -desaturase と  $\Delta 12$ -desaturase をダブルノックダウンした個体の致死のレスキュー実験を行うこととした。なお、18:2 から AA への生合成に関しては、18:2 の脂肪酸鎖長の伸長、 $\Delta 6$  位の不飽和化、さらに、 $\Delta 5$ 位の不飽和化が続いて起こることにより生合成されるが、この一連の反応は18:3を原料とした場合でも生じ、その場合はエイコサペンタエン酸(20:5; eicosapentaenoic acid; EPA)が生合成される<sup>213)</sup>。そこで、EPA も致死のレスキュー実験に用いることとした。

先ず、AA および EPA を、過剰量摂取させることで、 $\Delta 9$ -desaturase と  $\Delta 12$ -desaturase をダブルノックダウンした個体の生存率が上昇するかどうか調べた(図 8-4 (C))。AA および EPA を過剰量摂取させるために、フタホシコオロギの人工飼料に、AA および EPA を、0.5%、あるいは 2.0%添加し、実験に用いた。フタホシコオロギの成虫オス個体に、 $\Delta(9+12)$ -desaturase-dsRNA を投与した後に、上述の人工飼料をそれぞれ摂食させ、1 日ごとの生存率を調べた。その結果、AA および EPA を添加しなかった人工飼料を摂食させた、コントロールと比較して、特に、AA を添加した人工飼料を摂食させた場合に、生存率の上昇が見られた(図 8-4 (C))。

次に、フタホシコオロギ成虫個体に、AA および EPA の過剰量を体液中へ投与することで、 $\Delta 9$ -desaturase と  $\Delta 12$ -desaturase をダブルノックダウンした個体の生存率が上昇するかどうか調べた(図 8-4 (D))。フタホシコオロギの成虫オス個体に、 $\Delta(9+12)$ -desaturase-dsRNA を投与した後に、AA および EPA を 5  $\mu$ g、50  $\mu$ g、または 250  $\mu$ g 投与し、その後、通常摂食条件におき、1 日ごとの生存率を調べた。その結果、AA を 50  $\mu$ g 投与した個体において、コントロール個体と比較して、最も生存率の上昇が見られた(図 8-4 (D))。

昆虫において、AA は、プロスタグランジン(PG)の生合成の原料になると考えられている。昆虫における PG の生合成経路は、ほとんど明らかにされていないが、様々な昆虫種の体内から、主に、 $\text{PGA}_2$ 、 $\text{PGD}_2$ 、 $\text{PGE}_2$ 、および  $\text{PGF}_{2\alpha}$  の 4 種の PG が検出されている<sup>226-232</sup>。また、様々な昆虫種において、 $\text{PGA}_2$ 、 $\text{PGD}_2$ 、 $\text{PGE}_2$ 、および  $\text{PGF}_{2\alpha}$  の投与実験と、それらの阻害剤を用いた実験から、それらが、自然免疫応答の活性化や<sup>233-238</sup>、産卵行動の活性化に関与することが明らかにされている<sup>233, 239-241</sup>。しかし、それぞれの分子種の構造と、機能との相関については明らかにされていない。

そこで、次に、フタホシコオロギ成虫個体に、 $\text{PGA}_2$ 、 $\text{PGD}_2$ 、 $\text{PGE}_2$ 、および  $\text{PGF}_{2\alpha}$  (図 8-4(H))を過剰量投与することで、 $\Delta 9$ -desaturase と  $\Delta 12$ -desaturase をダブルノックダウンした個体の生存率が增加するかどうか調べた(図 8-4 (E、F、G))。フタホシコオロギの成虫オス個体に、 $\Delta(9+12)$ -desaturase-dsRNA を投与した後に、 $\text{PGA}_2$ 、 $\text{PGD}_2$ 、 $\text{PGE}_2$ 、および  $\text{PGF}_{2\alpha}$  をそれぞれ、200 ng (図 8-4 (E))、2  $\mu$ g (図 8-4 (F))、20  $\mu$ g (図 8-4 (G))を、3  $\mu$ L の 100% エタノールに溶解させ、体液中へ投与した。その後、通常摂食条件におき、1 日ご

との生存率を調べた。その結果、特に、PGF<sub>2α</sub>を 20 μg 投与した個体において、コントロール個体と比較して、最も生存率の上昇が見られた(図 8-4 (G))。

## 8-5 まとめと考察

### フタホシコオロギの $\Delta 9$ -desaturase、および $\Delta 12$ -desaturase の分子系統解析に関して

クローニングした、フタホシコオロギ $\Delta 9$ -desaturase と $\Delta 12$ -desaturase をコードする遺伝子の cDNA の演繹アミノ酸配列と、他の生物種の $\Delta 9$ -desaturase と $\Delta 12$ -desaturase のアミノ酸配列をもとに、 $\Delta 9$ -desaturase、および $\Delta 12$ -desaturase のそれぞれについての系統樹を作成した(図 S1-6 (E、F))。その結果、 $\Delta 9$ -desaturase に関しては、フタホシコオロギをはじめとする昆虫種のクレードは、真菌類、細菌、および植物が構成しているそれぞれのクレードと、独立していた(図 S1-6 (E))。一方、 $\Delta 12$ -desaturase に関しては、フタホシコオロギをはじめとする昆虫種の属するクレードは、細菌が構成しているクレード内に見出された(図 S1-6 (F))。このことは、フタホシコオロギの $\Delta 12$ -desaturase は進化上、細菌などから水平伝播されたことを示唆する。このような水平伝播は、カイコの $\beta$ -フルクトフラノシダーゼにおいても、同様の例が見られる<sup>242)</sup>。

### フタホシコオロギの $\Delta 9$ -desaturase と $\Delta 12$ -desaturase の脂肪酸不飽和化活性に関して

フタホシコオロギの $\Delta 9$ -desaturase と $\Delta 12$ -desaturase の脂肪酸不飽和化活性に関しては、現在、京都大学大学院・農学研究科・応用生命科学専攻・化学生態学研究室との共同実験を行っている。フタホシコオロギの $\Delta 9$ -desaturase および $\Delta 12$ -desaturase の cDNA をそれぞれ、酵母での発現用ベクターに挿入し、酵母で発現させたそれぞれの酵素に対する脂肪酸の不飽和化の活性を、GC-MS を用いて測定した。その結果、現在のところ、 $\Delta 9$ -desaturase には、16:0、および 18:0 の不飽和化能が認められた一方、 $\Delta 12$ -desaturase に関しても、 $\Delta 9$ -desaturase と同様の触媒能が認められ、昆虫以外の生物種で認められる $\Delta 12$ -desaturase の本来の酵素活性である、18:1 から 18:2 への触媒能は微弱であった(共同研究者による私信)。これらの結果と、上述の、 $\Delta 12$ -desaturase の分子系統解析の結果を合わせて考えると、フタホシコオロギの $\Delta 12$ -desaturase は、進化の過程で細菌より得た後、 $\Delta 12$ -desaturase の本来の酵素活性が弱まり、それと引き換え、 $\Delta 9$ -desaturase の触媒活性を得たことが考えられた。

#### Δ9-、Δ12-desaturase をダブルノックダウンしたフタホシコオロギ個体の致死に関して

本章において、Δ9-desaturase と Δ12-desaturase をダブルノックダウンした個体の致死の原因の探索を進めたが、その原因の詳細については明らかにできないままとなった。先ず、致死の際に、或る組織の活性が低下することが観察できれば、致死の原因を考える上での第一歩となると考えたため、中腸、脂肪体、神経系における HE 染色を行った(図 8-3)。しかし、原因となる組織を特定することはできなかった。この観察において、Δ9-desaturase、Δ12-desaturase の mRNA が発現する主要な組織として、中腸、脂肪体、神経系のみを観察したが、それ以外の組織の観察を行うことで、致死の原因となる組織を特定できる可能性があるため、今後、中腸、脂肪体、神経系以外の組織の観察を行いたい。

また、致死のレスキュー実験に関しても、課題点が多く残された。AA や EPA、および PG を投与する実験と同時に、それらの定量系を立ち上げようとしたが、未だに立ち上げることはできていない。第五章において行ったように、AA や EPA、および PG を、ADAM により誘導体化した後に、HPLC に供すことを試みたが<sup>226)</sup>、現状では、クロマトグラムにおけるピークが見られないことや、見られたとしても定量性に乏しい結果しか得られていない。今後、この方法に関してさらなる検討を行うことと、別の定量系として、LC-MS、あるいは LC-MS/MS を用いた定量系に関しての検討も行っている。特に、PG に関しては、そもそも、フタホシコオロギ体内に、本実験で投与した、PGA<sub>2</sub>、PGD<sub>2</sub>、PGE<sub>2</sub>、PGF<sub>2α</sub>、および別の分子種の PG がどの程度存在するかどうか、そして、Δ9-desaturase と Δ12-desaturase をダブルノックダウンした個体ではそれらの量に減少が見られるかどうかは、特に解析する必要があるため、その検討を急ぎたい。

PG の体内の存在量に関しては、エンマコオロギ *Teleogryllus commodus* では、PGA<sub>2</sub>、PGE<sub>2</sub>、および PGF<sub>2α</sub> は、頭部や、卵巣に数十 ng 程度存在すると報告されている<sup>229)</sup>。また、投与量に関しては、例えば、エンマコオロギに対する、PGE<sub>2</sub> による産卵の活性化には、数 ng から数百 ng の投与で十分である<sup>241)</sup>。これらのことを考えると、今回レスキュー実験で投与したような量は、非常に過剰量であると考えられる。このことから、致死をレスキュー出来るような或る活性物質が存在するならば、それは、PGF<sub>2α</sub> とは別の物質である可能性はある。前段落にて上述したような、PG の定量系を確立した後に、その定量結果を踏まえ

ながら、別の活性物質の存在に関しても検討したい。また、そのような検討を行った後に、PG が致死の原因物質であることが強く示唆された場合は、まずは、PG の既知の生理学的機能である、自然免疫の活性化機能との関連性の有無について解析したい。

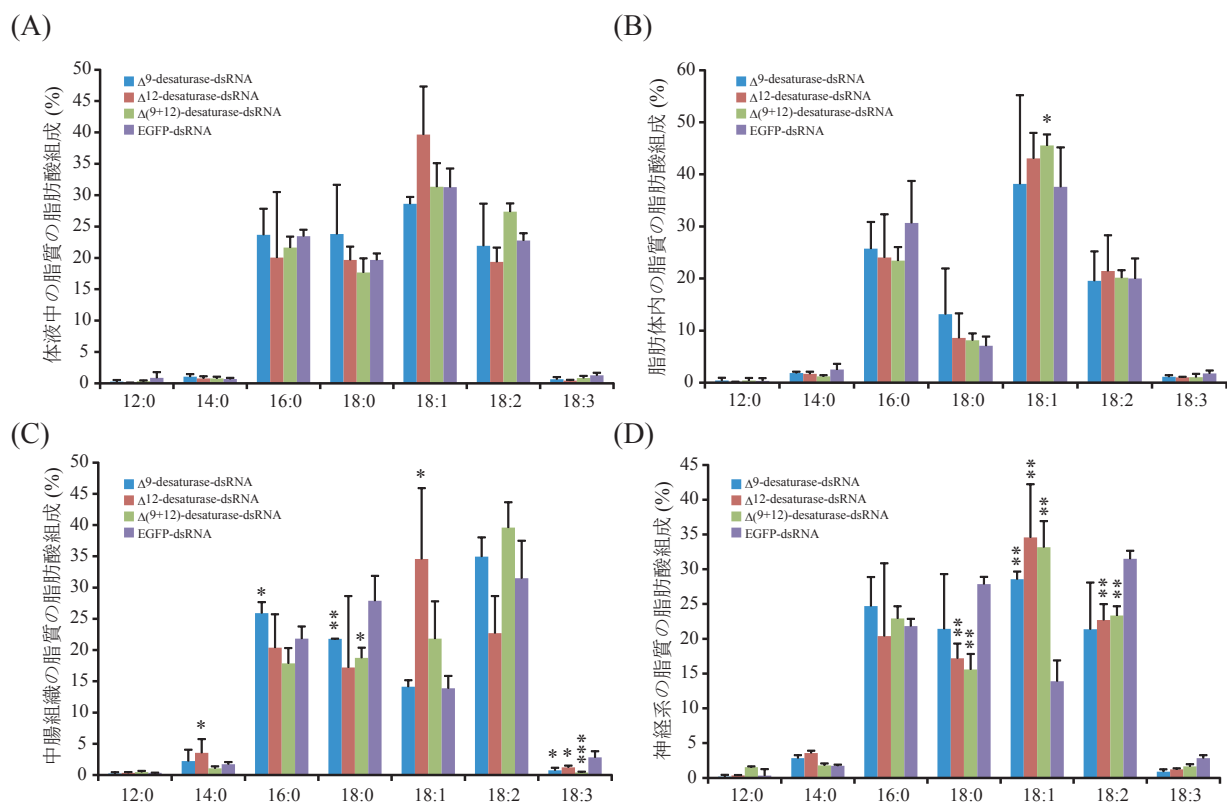


図 8-1.  $\Delta 9$ -、 $\Delta 12$ -desaturase のノックダウン個体における、各組織の脂肪酸組成の解析。

$\Delta 9$ -desaturase-dsRNA、 $\Delta 12$ -desaturase-dsRNA、および EGFP-dsRNA の投与後 3 日目のフタホシコオロギ成虫オス個体から、各組織 (体液 (A)、脂肪体 (B)、中腸 (C)、神経系 (D)) を摘出・回収した。 $\Delta(9+12)$ -desaturase-dsRNA を投与した個体においては、投与後 1-2 日後にて、運動性や接触刺激応答の低下などの判断材料から、致死の直前であると見なした個体から、同様の各組織を摘出・回収した。抽出した脂質をけん化した後に、脂肪酸を抽出した。抽出した脂肪酸は、ADAM 化反応した後に、HPLC に供した。HPLC のクロマトグラムにて見られた、7 種の脂肪酸 (12:0、14:0、16:0、18:0、18:1、18:2、18:3) の各ピーク面積から、各脂肪酸のモル濃度を算出した。算出した各脂肪酸のモル濃度の合計に対する、各脂肪酸の比をグラフに示した。それぞれ平均値 + S. D. で示した ( $n = 4-6$ )。アスタリスクは、コントロール個体に対して、有意な差が認められたことを示す (\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.005$ , \*\*\* $P < 0.0005$ ; Dunnett's test)。 $\Delta 9$ -、 $\Delta 12$ -desaturase を単独でノックダウンした個体、およびその両方をノックダウンした個体において、脂肪体、中腸、および神経系の脂質に含まれる飽和脂肪酸と不飽和脂肪酸のバランスが変動していた。

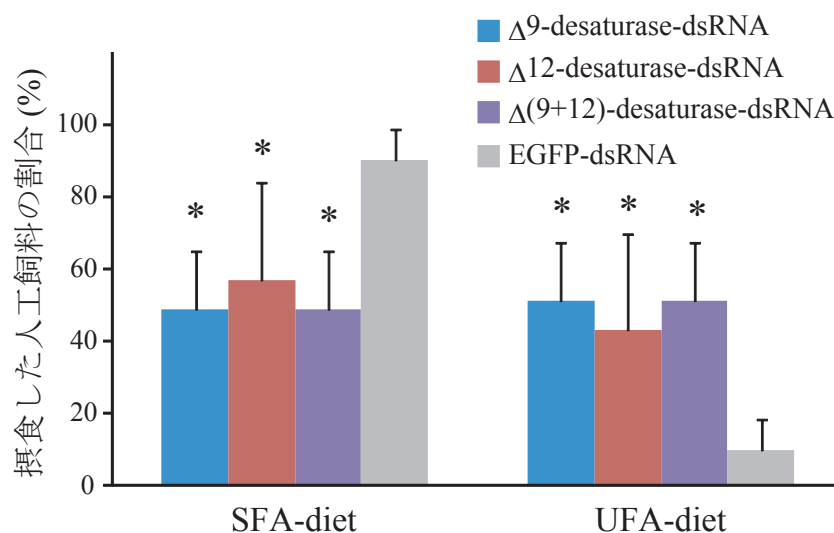


図 8-2.  $\Delta 9$ -、 $\Delta 12$ -desaturase をノックダウンしたフタホシコオロギ成虫オス个体における、脂肪酸の choice アッセイ。表 6-2-1 に示した、飽和脂肪酸を含む人工飼料 (SFA-diet) と、不飽和脂肪酸を含む人工飼料 (UFA-diet) とを、 $\Delta 9$ -desaturase-dsRNA、 $\Delta 12$ -desaturase-dsRNA、 $\Delta(9+12)$ -desaturase-dsRNA、および EGFP-dsRNA を投与したフタホシコオロギ成虫オス个体に提示し、3 日間摂食させた。なお、 $\Delta(9+12)$ -desaturase-dsRNA の投与に関しては、投与後 3 日目までに致死とならないように、通常の投与量 (3  $\mu$ g) の 1/5 程度を投与した。 $\Delta 9$ -desaturase-dsRNA、 $\Delta 12$ -desaturase-dsRNA、 $\Delta(9+12)$ -desaturase-dsRNA を投与した个体では、不飽和脂肪酸の嗜好性が顕著に増加した (\* $P < 0.05$ ; Student's  $t$ -test)。

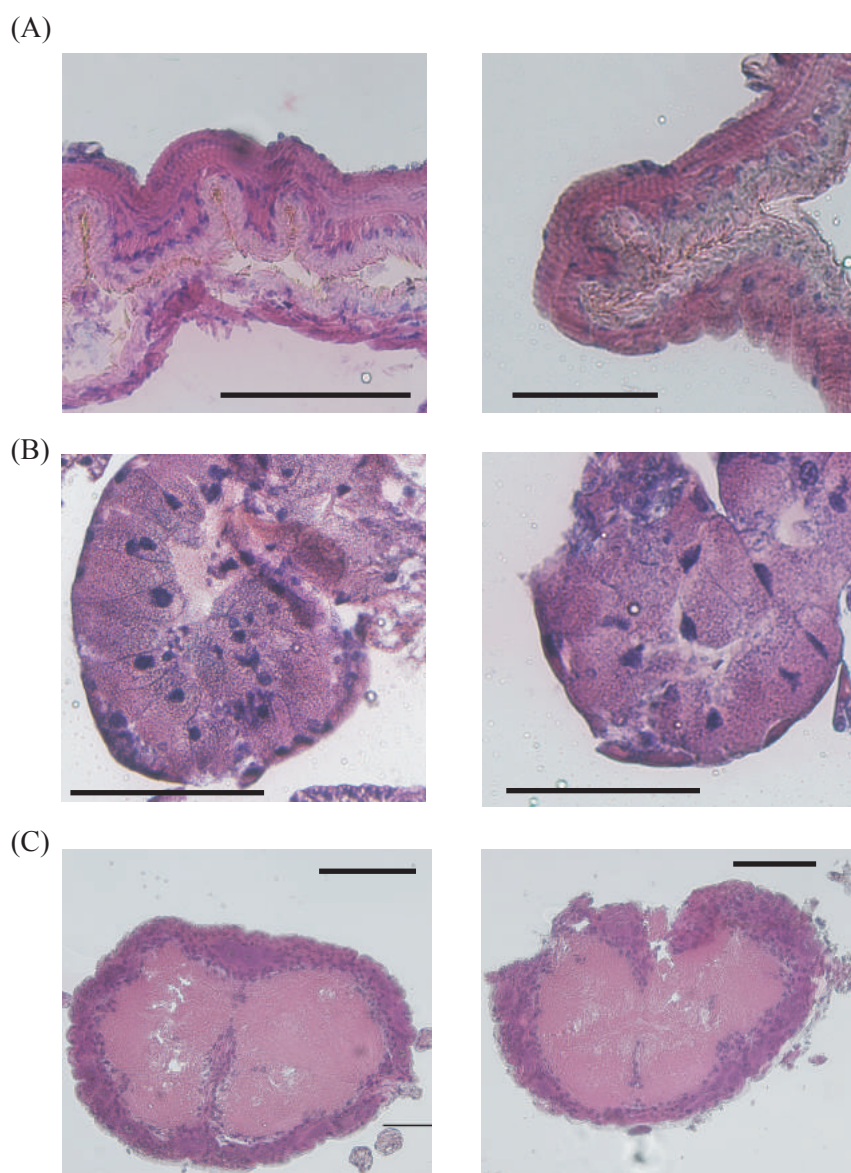


図 8-3.  $\Delta 9$ -、 $\Delta 12$ -desaturase をダブルノックダウンしたフタホシコオロギ成虫オス個体を用いた、各組織の HE (ヘマトキシリン・エオジン) 染色。 $\Delta(9+12)$ -desaturase-dsRNA の投与後、致死の直前である、フタホシコオロギ成虫オス個体 (左)、および EGFP-dsRNA の投与後 3 日目のフタホシコオロギ成虫オス個体 (右) から、各組織 (中腸 (A)、脂肪体 (B)、神経系 (C)) を摘出し、組織切片を作製した後、HE 染色を行った。バーは  $100\ \mu\text{m}$  を示す。中腸、脂肪体、神経系の全ての組織において、コントロール個体と比較して、組織学的変化は見られなかった。



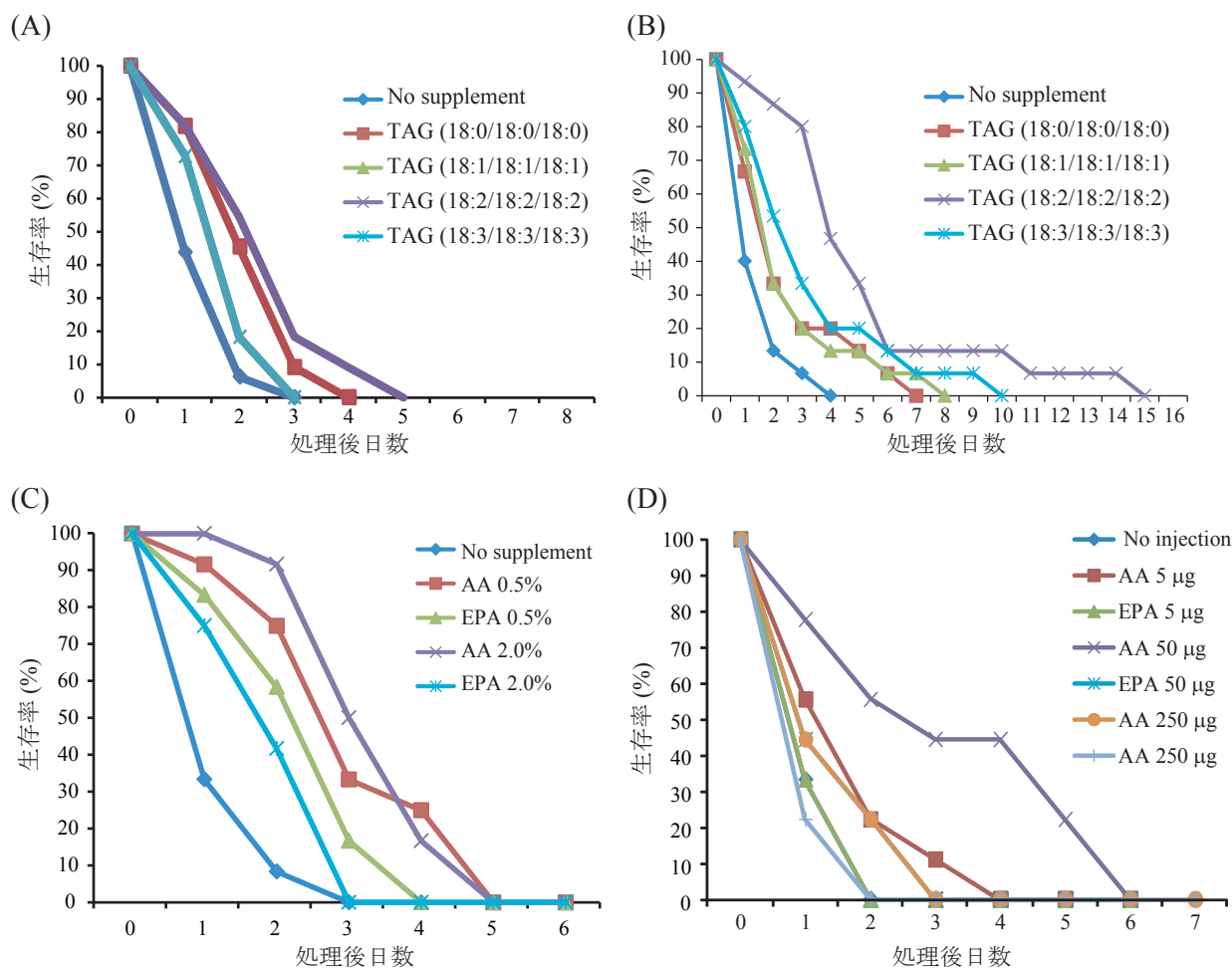


図 8-4.  $\Delta 9$ -、 $\Delta 12$ -desaturase のダブルノックダウン個体の致死のレスキュー実験。(A、B) 各脂肪酸種を含む TAG の摂食によるレスキュー実験。レスキューには、フタホシコオロギの人工飼料に TAG (18:0/18:0/18:0)、TAG (18:1/18:1/18:1)、TAG (18:2/18:2/18:2)、および、TAG (18:3/18:3/18:3) をそれぞれ、2% (A)、10% (B) 添加した人工飼料を用いた。フタホシコオロギの成虫オス個体に、 $\Delta(9+12)$ -desaturase-dsRNA を投与した後に、上述の人工飼料を摂食させ、1 日ごとの生存率を調べた ((A):  $n = 11-16$ 、(B):  $n = 15$ )。その結果、TAG を添加しなかった人工飼料を摂食させたコントロールと比較して、特に、TAG (18:2/18:2/18:2) を添加した人工飼料を摂食させた場合に、生存率の増加が見られた。(C、D) アラキドン酸 (AA) およびエイコサペンタエン酸 (EPA) の摂食、および投与によるレスキュー実験。(C) フタホシコオロギの人工飼料に、AA および EPA を、0.5%、あるいは 2.0% 添加し、レスキュー実験に用いた。フタホシコオロギの成虫オス個体に、 $\Delta(9+12)$ -desaturase-dsRNA を投与した後に、上述の人工飼料を摂食させ、1 日ごとの生存率を調べた ( $n = 12$ )。その結果、AA および EPA を添加しなかった人工飼料を摂食させたコントロールと比較して、特に、AA を添加した人工飼料を摂食させた場合に、生存率の増加が見られた。(D) フタホシコオロギ成虫個体に、AA および EPA を 5  $\mu\text{g}$ 、50  $\mu\text{g}$ 、または 250  $\mu\text{g}$  投与し、レスキュー実験に用いた。フタホシコオロギの成虫オス個体に、 $\Delta(9+12)$ -desaturase-dsRNA を投与した後に、3  $\mu\text{L}$  の 100% エタノールに溶解させた、AA および EPA を投与した。その後通常摂食条件におき、1 日ごとの生存率を調べた ( $n = 9$ )。その結果、AA を 50  $\mu\text{g}$  投与した個体において、特に、コントロール個体と比較して、生存率の増加が見られた。

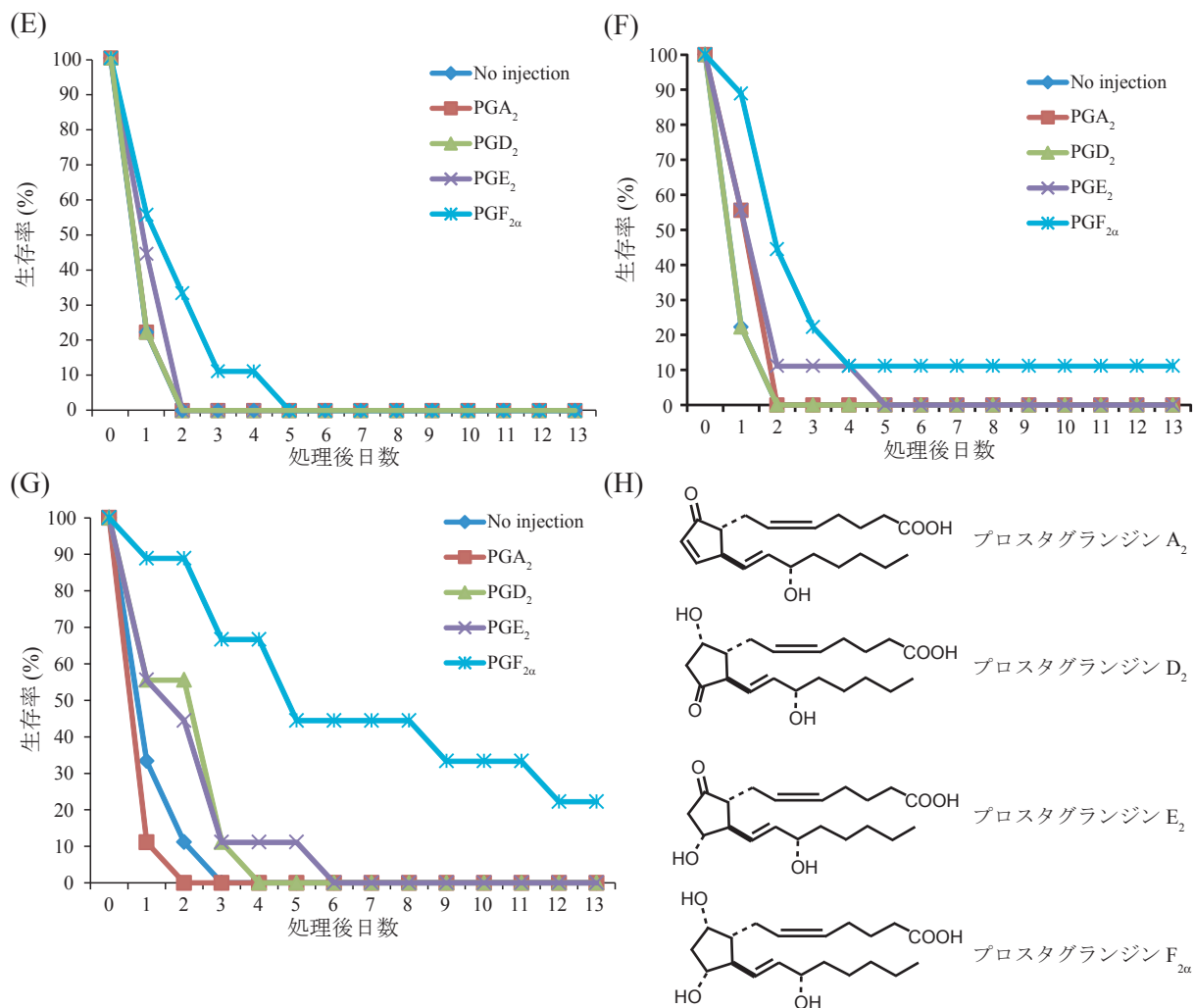


図 8-4 ( つづき ).  $\Delta 9$ -、 $\Delta 12$ -desaturase のノックダウン個体の致死のレスキュー実験。(E、F、G) プロスタグランジン (PG)  $\text{A}_2$ 、 $\text{D}_2$ 、 $\text{E}_2$ 、および  $\text{F}_{2\alpha}$  (H) の投与によるレスキュー実験。  
 フタホシコオロギの成虫オス個体に、 $\Delta(9+12)$ -desaturase-dsRNA を投与した後に、 $\text{PGA}_2$ 、 $\text{PGD}_2$ 、 $\text{PGE}_2$ 、 $\text{PGF}_{2\alpha}$  をそれぞれ、200 ng (E)、2  $\mu\text{g}$  (F)、20  $\mu\text{g}$  (G) を、3  $\mu\text{L}$  の 100% エタノールに溶解させ、投与した。その後、通常摂食条件におき、1 日ごとの生存率を、投与後 13 日後まで調べた (n = 9)。その結果、特に、 $\text{PGF}_{2\alpha}$  を 20  $\mu\text{g}$  投与した個体において、コントロール個体と比較して、生存率の増加が見られた。

## S1-1 AKHR をコードする遺伝子の cDNA クローニングおよびそのノックダウン個体の調製

- ・フタホシコオロギの AKHR をコードする遺伝子の cDNA のクローニング ( 図 S1-1 (A、B、C))
- ・フタホシコオロギ AKHR の mRNA の組織別発現解析 ( 図 S1-1 (D))
- ・AKHR-dsRNA の調製、および、AKHR-dsRNA の投与によるノックダウン個体の調製 ( 図 S1-1 (E))

```

ACGCGGGGGTGGGGGAAGGGATAGCGTTGATAGAGGTATTTTCNGTGCCCCCTGTCTCGCACTGTGAATCNAAGTACCGAGTGTCTGT -340
TACCTGATCCACGACCCCCAAAACGTGAGTTATGACTACAAAACATGCTTGAAGAAGTTASTYACTACACACGGGAGCNAAAAGTTTCCA -250
CTTTTCTATATCGGNNNTGCAAACTACGAGTCTTTCTGTAAAAAAATGGCACTTTCGGGCACATCGTTATAATAATTTTCGCCACAA -160
CGTAAGGGCGTGAAAGTAAAAATGCAATATTCAATGCCTGTTTTTACAAAACCCGGTCCGAACCTCATCCACTCGATGGTCAGTGACT -70
GCAACGAAGTCGTTTGTGTCCCGCAGGGTGCGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGCGTCGGCGATGGAGGCGTCGGCGGCGGCC 20
                                     M E A S A A P

GCCCATGTGGGTGCTGCCCTCCAACGCCAGCGACGGCGACCTGCAGCTGCCGCGACATGACCTTCAACTCGGGCCACGTCGTCTCCAT 110
P M W V L P S N A S D G D L Q L P R D M T F N S G H V V S I
          ▲
          TM I
CGCGTGCTACAGCGCGCTCATGGTGGCGTGGCGGGCGGCAACCTCACCGTGCTCACCATCATCTCTCGGCAGCGCGGGCGCGCGCTC 200
A C Y S A L M V A S A A G N L T V L T I I L R Q R G R A R S
          TM II
GCGCGTCAACACATGCTCATGCACCTCGCCATCGCGGACCTGCTGGTGACGTTCTCATGATGCCGCTGGAGATCGCGTGGCGGCGGAC 290
R V N H M L M H L A I A D L L V T F L M M P L E I A W A A T
          TM III
GGTGTGCTGGCGCGCGGGGACCTGCTCTGCGCCTCATGGCGTGTGCCGCTCTTCGGACTCTTCTCTCCAGCTTCGTCTCTGCTGTG 380
V S W R A G D L L C R L M A V C R V F G L F L S S F V L V C
          TM IV
CATCAGCATGGACAGGTACTTCGCCATTTTGCAGCCATGAGTCTGTGACAAGTCGATCGGCGGGCCGCATCATGTGACGGCTGCGCTG 470
I S M D R Y F A I L R P M S L S Q V D R R G R I M L T A A W
          TM V
GGTCATGTCCTTCTGTGCGCATGCCCCAGGCCATGGTGTTCAGCGTGACAGCCACCGACCGTCACGTGGTACGAGCAGTGCATCAC 560
V M S F L C S M P Q A M V F S V Q S H P T V T W Y E Q C I T
          TM VI
GTGGGGCGTGCTCAAGTCGACCGCGCGGAGGTGCTCTACGCCATCTTCTAGCTCCTCCTCATGTACGGCATCCCGTCTCCTCATCATCAT 650
W G V L K S H R A E V L Y A I F S S S F M Y G I P L L I I I
          TM VII
CTTCGCTACGGCTCCATCGTGGCTGAGATCTTCGGCGCTCGCGACGACGGGAGACGAGTGTTCGGCGCTCCAGCCTGGGCTTCTCT 740
F A Y G S I V A E I F R R S R R T G D D V F R R S S L G F L
          TM VIII
CGGGCGGGCCAAAGACGCGCTCGCTCAAGATGACGCTGGTTCATCGTGTGGACGCGCTTACTACATCATGTGCGGT 830
G R A K T R S L K M T L V I V L V F F M C W T P Y Y I M S V
          TM IX
CTGGTACTGGTTGACCGCGAGTCGGCGGAGCTGGTGAGCAGCGCATCCGAGCGGCCTGTTTCATCTTCGCGTGCACCAACTCGTGTAT 920
W Y W F D R E S A E L V D E R I R S G L F I F A C T N S C M
          TM X
GAACCCAAATCGTGTACGGCGCGTTCACCGTGCGGCGGGCGTGGCGGGCGCTGCAGAGTACCCAGAATCATCTAGGTGCAATTCTCA 1010
N P I V Y G A F N V R R G R G R A L R E Y P E S S R C N S Q
          TM XI
ACCATTTCTGCAAGGCGGAGATCATCTGCACCTGAGCAGTTGCAACAAGTGGCAAAATGGAGGAATGAAAAGAATACTCAATTGTTTCA 1100
P F S A R P R S S A P E Q L Q Q V A K W R N E K N T Q L F Q
          TM XII
ACTGGCAACTAATGGCTGGGACAGGAATGAAAAATCATCCTTTGAGAACATTGAATTAACCTGAGGAATGGTATTTTGAACATAATTA 1190
L A T N G W D R N G K S S F E N I E L T *
          TM XIII
GTGTGGTTATAATGGCTTTAAGTACAAAAAGTTTATAAATGTGAACGCTTTTAGAAGGTGAAGAGATGCGCCAATCTTATGATTACT 1280
GATATTTAATTACCTACATTCATTGATTTCTTGCAATTTAAGTAACTAAACAAGCCAAATACATTAGTCCATAAAAGCAAAGATAC 1370
AACAACAGGATACAGGATGATTCAAATAATATGAAGTACTGTACCTTCAACAACATCCTCACACTTCCAGCAATGAGTATGAGAGA 1460
GTTCCACAAGAAGTTGATCTTGTGTCGAGTTATTCTTAAGATATCCAGCAGCACAAATGAGATGTTGTTTTGTTTCATCCAATATCAGAGT 1550
ATTAGAAGAAAACTGCTATTCAAGATGTATCATGGTCAATAACAATAACAATTGACAATTTTCGAGTGAAGTTGATGAACCTTACCTTAAG 1640
GGGATAAAAGAAGTGACTCTGCCTGTGTATCAAGAGATTTAACCAAGTTAATGGAGGTACTTCATAAACACGAGTATCTCTGTTATAAA 1730
CTAGCTATGTAATGAAAAATATTCTTTTTCATTTCATCGTATTTATCAATAAATTCTCATAAACAAGTAG (A)n 1823

```

図 S1-1. (A) 他昆虫種の AKHR との相同性をもとに縮重プライマーを作製し ( 図中矢印)、degenerate PCR により、AKHR 遺伝子の部分塩基配列を取得した。得られた部分塩基配列をもとに、特異的プライマーを作製後、それらを用い、5'-、3'-RACE 法により全長の cDNA を取得した。最終的に決定したフタホシコオロギの AKHR の全長をコードする cDNA の塩基配列は、2253 bp であり、387 アミノ酸残基の ORF を有していた。また、7 箇所膜貫通 (transmembrane) 領域 ( 図中 TM) の存在が推定された。下線部はポリ A 付加シグナルを示す。また、黒の三角で示すアスパラギン残基には、N- 結合型糖鎖付加が推定される。

TM1

1	MSASAAPPMVWLPSLN	----	ASDG	-----	DLQL	LDLDFRFG	GHVVVSACVSLVLSVSA	
1	-MESSIKIITTTGLELWN	----	RVNNNSNY	-----	TELL	LDLDFRFG	GHVVVSIVFVSLVLSVSA	
1	-----	MLQTSDESL	-----	KCDN	-----	TMELD	LDLDFRFG	GHVVIVFVSLVLSVSA
1	VFSETLWKKMDPMSAE	-----	TVQDHRLLDKSLT	-----	LDL	LDLDFRFG	GHVVIVFVSLVLSVSA	
1	-----	MTATVVA	-----	LDV	-----	LDL	LDLDFRFG	GHVVIVFVSLVLSVSA
1	MASSCSQDOTLNCATVIT	-----	MATPES	-----	PTVLMREY	MDLDFRFG	GHRRSHITVSLVLSVSA	
1	NTMAAHIRIGRIEDHRR	-----	LADWSYATAGEEY	-----	EMH	MDLDFRFG	GHRRSHITVSLVLSVSA	
1	ENALIKTEREVLVHSGYSGENYNDVNTMPVYLSSTGQDQDNTWVG	-----	-----	-----	TNSNNWNR	MDLDFRFG	GHRRSHITVSLVLSVSA	
1	MAKVAEENDRDLSNWNS	-----	VNDTNGT	-----	ELH	MDLDFRFG	GHRRSHITVSLVLSVSA	
1	MDIDKVGSGPGGASQKNWHS	-----	LLHVNNTYD	-----	ELH	MDLDFRFG	GHRRSHITVSLVLSVSA	
1	MDIDKVGSGPGGASQKNWHS	-----	HLNYSYD	-----	ELH	MDLDFRFG	GHRRSHITVSLVLSVSA	

	TM II										TM III																																																															
50	GNL	SV	IT	L	T	I	L	R	Q	R	A	R	S	V	N	H	M	H	L	A	I	D	L	L	V	T	F	L	M	P	P	E	T	A	A	G	V	S	R	A	G	D	L	L	Q	L	A	V	C	F	F	G	L	I	S	S	F	V	L	C	S	I	M	D	R	V	P	A	L	R				
54	GN	F	V	I	L	T	L	T	R	S	V	S	K	S	R	I	T	I	L	M	H	L	A	I	D	L	L	V	T	F	L	M	P	P	E	T	A	A	G	V	S	R	A	G	D	L	M	C	R	A	I	S	F	F	G	L	I	S	S	F	V	L	C	S	I	M	D	R	V	P	A	L	R	
58	GN	F	V	I	M	I	T	I	K	R	S	S	R	I	T	I	L	M	H	L	A	I	D	L	L	V	T	F	L	M	P	P	E	T	A	A	G	V	S	R	A	G	D	L	M	C	R	A	I	S	F	F	G	L	I	S	S	F	V	L	C	S	I	M	D	R	V	P	A	L	R			
62	GN	F	V	I	L	T	L	R	R	S	N	A	R	S	R	I	T	I	L	M	H	L	A	I	D	L	L	V	T	F	L	M	P	P	E	T	A	A	G	V	S	R	A	G	D	L	M	C	R	A	I	S	F	F	G	L	I	S	S	F	V	L	C	S	I	M	D	R	V	P	A	L	R	
66	GN	F	V	I	L	T	L	R	R	S	N	A	R	S	R	I	T	I	L	M	H	L	A	I	D	L	L	V	T	F	L	M	P	P	E	T	A	A	G	V	S	R	A	G	D	L	M	C	R	A	I	S	F	F	G	L	I	S	S	F	V	L	C	S	I	M	D	R	V	P	A	L	R	
70	GN	S	V	I	T	L	T	R	S	V	S	K	S	R	I	T	I	L	M	H	L	A	I	D	L	L	V	T	F	L	M	P	P	E	T	A	A	G	V	S	R	A	G	D	L	M	C	R	A	I	S	F	F	G	L	I	S	S	F	V	L	C	S	I	M	D	R	V	P	A	L	R		
74	GN	L	S	V	I	T	L	A	C	R	V	S	A	R	S	I	T	I	L	M	H	L	A	I	D	L	L	V	T	F	L	M	P	P	E	T	A	A	G	V	S	R	A	G	D	L	M	C	R	A	I	S	F	F	G	L	I	S	S	F	V	L	C	S	I	M	D	R	V	P	A	L	R	
78	GN	L	S	V	I	T	L	A	C	R	V	S	A	R	S	I	T	I	L	M	H	L	A	I	D	L	L	V	T	F	L	M	P	P	E	T	A	A	G	V	S	R	A	G	D	L	M	C	R	A	I	S	F	F	G	L	I	S	S	F	V	L	C	S	I	M	D	R	V	P	A	L	R	
82	GN	L	S	V	I	T	L	R	R	S	N	A	R	S	R	I	T	I	L	M	H	L	A	I	D	L	L	V	T	F	L	M	P	P	E	T	A	A	G	V	S	R	A	G	D	L	M	C	R	A	I	S	F	F	G	L	I	S	S	F	V	L	C	S	I	M	D	R	V	P	A	L	R	
86	GN	L	S	V	I	T	L	R	R	S	N	A	R	S	R	I	T	I	L	M	H	L	A	I	D	L	L	V	T	F	L	M	P	P	E	T	A	A	G	V	S	R	A	G	D	L	M	C	R	A	I	S	F	F	G	L	I	S	S	F	V	L	C	S	I	M	D	R	V	P	A	L	R	
90	GN	L	S	V	I	T	L	R	R	S	N	A	R	S	R	I	T	I	L	M	H	L	A	I	D	L	L	V	T	F	L	M	P	P	E	T	A	A	G	V	S	R	A	G	D	L	M																											

1339 TM IV TM V  
 1340 PM - SSGQVDDRRGKLTIAVMFSGVCSLPAMVFSVQOSFHTVVTWYQCVLT - MGVLSRAARAVLHLSISSTFNTQILDLITAFASQST  
 1341 PL - QEWDDVRRGKLTIAVMFSGVCSLPAMVFSVQOSFHTVVTWYQCVLT - FNAFTHTITHTIGSGQIMIMVPLLVIVVVS  
 1342 PL - QILDVYVRGKLTIAVMFSGVCSLPAMVLFHSTVTPNYNVCQCVLT - FNFPSHLSQSLNMLSLIMVPLLVIVVVS  
 1343 PL - IYLRALDRDMGLTIAVMFSGVCSLPAMVFSVQOSFHTVVTWYQCVLT - FNFPTARELHLSQSLNMLSLIMVPLLVIVVVS  
 1344 PL - NLKSRGKLTIAVMFSGVCSLPAMVFSVQOSFHTVVTWYQCVLT - FNFPTARELHLSQSLNMLSLIMVPLLVIVVVS  
 1345 PM - MSKLLNVARQKLTIAVMFSGVCSLPAMVFSVQOSFHTVVTWYQCVLT - FNFPTKMHFTFRLVIGLVMGLPLLVIVVVS  
 1346 PL - KYVHERAVRGLTIAVMFSGVCSLPAMVFSVQOSFHTVVTWYQCVLT - FNFPSSEIIVQLHVLIVCLFVPLLVIVVVS  
 1347 PL - NLKSRGKLTIAVMFSGVCSLPAMVFSVQOSFHTVVTWYQCVLT - FNFPSNDVHTFSLVLMVPLLVIVVVS  
 1348 PL - KRSYNRGKLTIAVMFSGVCSLPAMVFSVQOSFHTVVTWYQCVLT - FNFPSRDFDKLQAASQSLVAFPLIMFLVCHALY  
 1349 PL - VWTAVTRAVRGLTIAVMFSGVCSLPAMVFSVQOSFHTVVTWYQCVLT - VGLSTREKHFVAFVFNMLLVIVPLVSTVCSGAAL  
 1350 PL - VGLSTREKHFVAFVFNMLLVIVPLVSTVCSGAAL  
 1351 PL - VINGIRGKLTIAVMFSGVCSLPAMVFSVQOSFHTVVTWYQCVLT - VGLVLDPSRYLHLSQSLNMLSLIMVPLLVIVVVS  
 1352

[illegible]

TM VII

```
002 CTNCCMNPPIVGVGPFVLRGR-----GRLRYPEPSESCNS-----QPPFS
003 CTNCCMNPPIVGVGPFNIDR-----NKTSARPTTIT-----R
006 CTNCCMNPPIVGVGPFNIRKK-----NKTPRTTITIT-----R
007 CTNCCMNPPIVGVGPFNIRK-----TKGVSPRVNITITSCRIPTPNDSGR
009 CTNCCMNPPIVGVGPFNIRK-----GK
015 SPNCCMNPPIVGVGPFNLRGRSGVGATGVRGVQQQLHQNVVALSGNSTGLNSRRGSSNSIYRNNSSQMSQKNSLRSGRGRNRETHLH
014 SPNCCMNPPIVGVGPFVLRKHKTK-----LKKTHKES-----C
013 SPNCCMNPPIVGVGPFVLRKSKDPGV-----KGGSVILNSAKY-----C
010 SPNCCMNPPIVGVGPFNIRGMNNNNPVS-----NNRITLSNRLDSSN-----Q
009 CTNCCMNPPIVGVGPFNRRNNWRAKG-----FNGRCRCSGSGRGKS-----RLPH
006 CTNCCMNPPIVGVGPFNRRNTWRSG-----NVRHRSQMSGRGKS-----RLPY
003 CTNCCMNPPIVGVGPFNRRNTWRSG-----NVRHRSQMSGRGKS-----RLPY
```

```

441 ARPPSSAPROHQVAKWRNEKNT -QLFLQATLNGWDRNGSSFENIELT-
438 VTPLSLSLKLLD-----
429 LTPLSLGLVKLLD-----
467 LPPFLSLSLKTLT-----
423 -----NDHDFK
405 PLPHRNSQAALTNVNGRDDQHGL -HTNSKNTNVLSDASNSSEKNAITSVICR
447 GSHLTLMRA-----
462 RCHRSERSGSS-----
452 LMRQRTNLSLNLNGRGQVMAAAV -SATTKLANVVSLEKGTANGNGSAAAAQTVPTPTPLVTIATPLATDDEANDDSCLSAVTIRCQDQSP
453 GESTETSAATLSRARSNGSDINGRRDSSYANGNGQPKHWNITINNHNVMGV-
448 GESMETSAATLNRRNSLGSDRNGRRDSAFNTYGTQKHNWITINNHNVMGV-

```

(C)

ミジンコ RPCHR  
フタホシコオロギ AKHR  
キロショウジョウバエ AKHR  
ハマダラカ AKHR

16 54 85

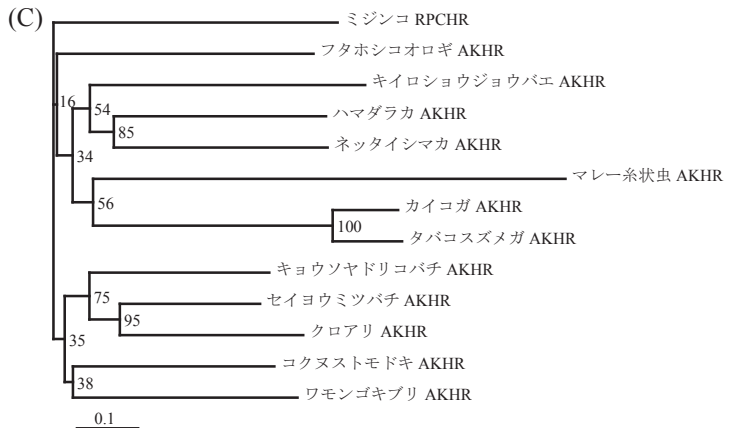
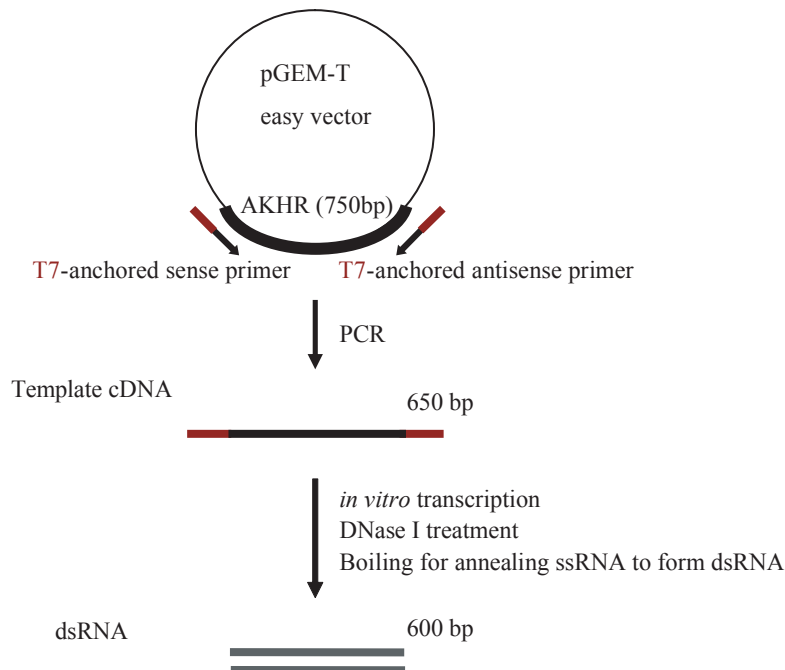




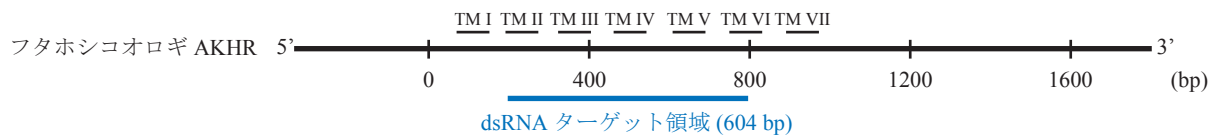
図 S1-1 ( つづき ). (E) RT-PCR を用いたフタホシコオロギの *AKHR* の組織別発現解析。  
 フタホシコオロギ成虫個体の各種組織 (1: 脂肪体、2: 前腸、3: 中腸、4: 後腸、5: マルピーギ管、  
 6: 気管、7: 筋肉、8: 卵巣/精巣、9: 神経系、10: 血球細胞 ) から調製したトータル RNA を用いた。  
 コントロールとして *EF* (elongation factor) を用いた。フタホシコオロギの *AKHR* は、メス ( 上部 )、  
 オス ( 下部 ) とともに、脂肪体特異的な mRNA の発現が認められた。

(F-1)

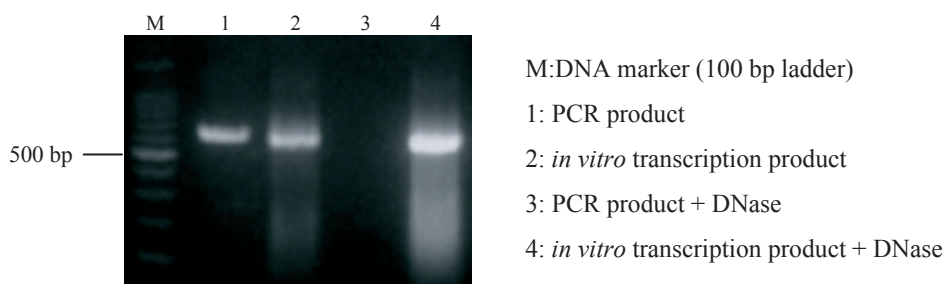
Expression vector



(F-2)



(F-3)



(F-4)

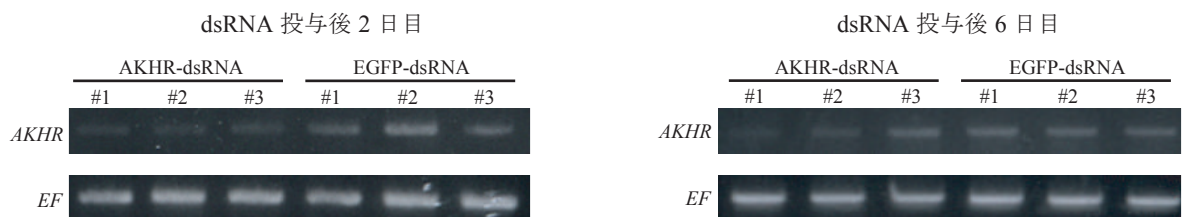


図 S1-1 ( つづき ). (F) AKHR-dsRNA の調製および、その投与による AKHR のノックダウンの確認。AKHR の ORF をコードする領域のうち、約 600 bp をターゲットとして、dsRNA を調製した (F-1, 2)。その後、アガロース電気泳動により dsRNA の精製度を確認した (F-3)。(F-2) の図で示す TM I-VII は膜貫通領域を示す。(F-3) の図で示すレーンは、それぞれ、レーン 1: *in vitro* transcription に用いたテンプレート cDNA、レーン 2: *in vitro* transcription 産物、レーン 3: DNase I 処理後のテンプレート cDNA、レーン 4: DNase I 処理後の *in vitro* transcription 産物。レーン 4 を調製後の dsRNA としてその後の実験に用いた。(F-4) 調製した AKHR-dsRNA の経口投与による、ノックダウン効果の確認。AKHR-dsRNA および EGFP-dsRNA の投与後 2 ( 左 )、6 日目 ( 右 ) の成虫オス個体の脂肪体を RT-PCR のテンプレートとした。# 番号は各群における別々の個体を示す。コントロールとして EF を用いた。AKHR-dsRNA の投与後 2 日目 ( 左 ) において AKHR の mRNA の発現が大きく抑制され、投与後 6 日目 ( 右 ) において抑制された発現の回復傾向が見られた。

## S1-2 フタホシコオロギの LpR をコードする遺伝子の cDNA クローニングおよびその ノックダウン個体の調製

- ・フタホシコオロギの LpR をコードする遺伝子の cDNA のクローニング ( 図 S1-2 (A、B、C))
- ・フタホシコオロギ *LpR* の mRNA の組織別発現解析 ( 図 S1-2 (D))
- ・LpR-dsRNA の調製、および、LpR-dsRNA の投与によるノックダウン個体の調製 ( 図 S1-2 (E))

(A)

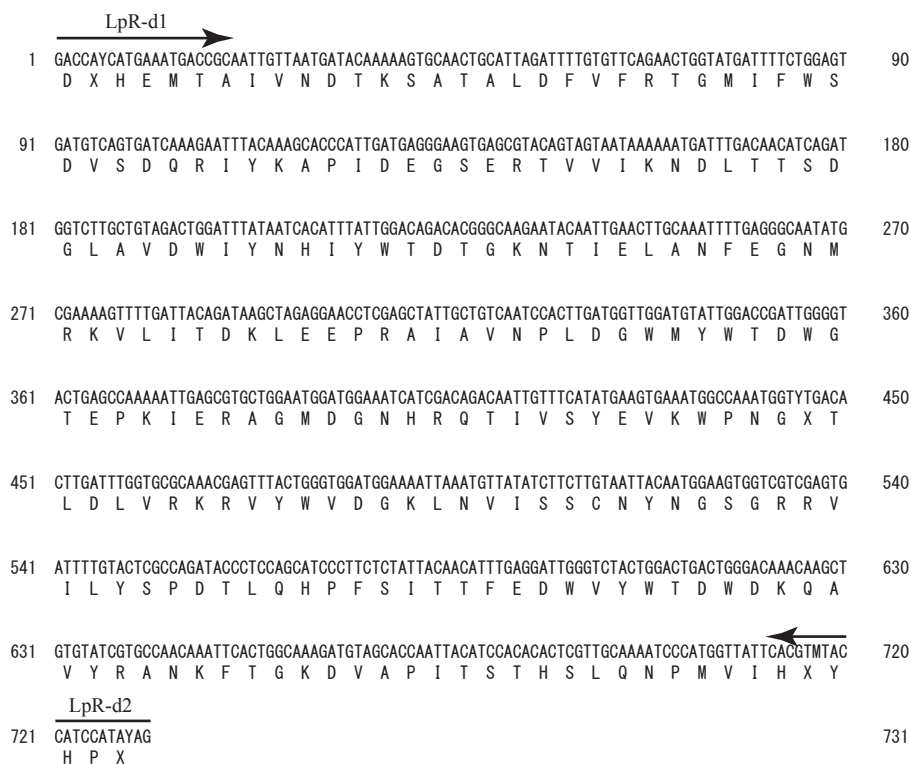


図 S1-2. (A) 他昆虫種の LpR との相同性をもとに縮重プライマーを作製し ( 図中矢印 )、  
degenerate PCR により、フタホシコオロギの LpR 遺伝子の部分塩基配列を取得した。



(B)

フタホシオオロギ	1	-----MLLWLDYLVTT-----ATLMSSGSMVLPPHS-----EDPDGHI-LPP-REVSRTCSSSEFKCENNRCIPVHWQCNDNEK
チャバネゴキブリ Long form	1	-----MLLWLDYLVTT-----ATLMSSGSMVLPPHS-----EDPDGHI-LPP-REVSRTCSSSEFKCENNRCIPVHWQCNDNEK
チャバネゴキブリ Short form	1	-----MLLWLDYLVTT-----ATLMSSGSMVLPPHS-----EDPDGHI-LPP-REVSRTCSSSEFKCENNRCIPVHWQCNDNEK
マデラゴキブリ	1	--MAWMNS-----LFLICFFAFLVR-----SELSDVCSLRQFRNNNGRCIPLTWTCEDDDCGDNDSD-ENAVCKETRECTDQFEFCNNRCIPVHWQCNDNEK
トノサマバッタ	1	--MAFVHLRSPSPSYTPWCLVILCFATLVLPAAAAAAG-----SLALDSDSACLRQFQANGHCIPLTWTCEDDDCGDNDSD-ENAVCKETRECTDQFEFCNNRCIPVHWQCNDNEK
ハチノスツヅリガ	1	MFVLVGGCHRAAPKFCASMWCI-DICVINIKIFGVSASDNKYLQATPEADGACSLKQFQANGHCIPLTWTCEDDDCGDNDSD-ENAVCKETRECTDQFEFCNNRCIPVHWQCNDNEK
カイコガ (Isoform 1)	1	MSLRYGCGORAAONICGMMWETICPLCVINVTETGAASNN-----TNVVSNGAHPMKQKQANGKCIPTWTV-EGDDDCGDNDSESTRCK-ESRTCHSSSEFKCTGRCIPVHWQCNDNEK
A		
フタホシオオロギ	69	DCSDGSDDEVPSVCQVKVCSPEEFTCRAMPGECVPLTWMCDDNPDSCDGSDEKACNETCRSDEFTCGNGKCIQRRWVCDRDDDCDGDSDQDCPHPPCNARETFENCSEN-FCITARWRCDG
チャバネゴキブリ Long form	69	DCSDGSDDEVPSVCQVKVCSPEEFTCRAMPGECVPLTWMCDDNPDSCDGSDEKACNETCRSDEFTCGNGKCIQRRWVCDRDDDCDGDSDQDCPHPPCNARETFENCSEN-FCITARWRCDG
チャバネゴキブリ Short form	69	DCSDGSDDEVPSVCQVKVCSPEEFTCRAMPGECVPLTWMCDDNPDSCDGSDEKACNETCRSDEFTCGNGKCIQRRWVCDRDDDCDGDSDQDCPHPPCNARETFENCSEN-FCITARWRCDG
マデラゴキブリ	90	DCSDGSDDEVPSVCQVKVCSPEEFTCRAMPGECVPLTWMCDDNPDSCDGSDEKACNETCRSDEFTCGNGKCIQRRWVCDRDDDCDGDSDQDCPHPPCNARETFENCSEN-FCITARWRCDG
トノサマバッタ	113	DCSDGSDDEVPSVCQVKVCSPEEFTCRAMPGECVPLTWMCDDNPDSCDGSDEKACNETCRSDEFTCGNGKCIQRRWVCDRDDDCDGDSDQDCPHPPCNARETFENCSEN-FCITARWRCDG
ハチノスツヅリガ	119	DCSDGSDDEVPSVCQVKVCSPEEFTCRAMPGECVPLTWMCDDNPDSCDGSDEKACNETCRSDEFTCGNGKCIQRRWVCDRDDDCDGDSDQDCPHPPCNARETFENCSEN-FCITARWRCDG
カイコガ (Isoform 1)	115	DCSDGSDDEVPSVCQVKVCSPEEFTCRAMPGECVPLTWMCDDNPDSCDGSDEKACNETCRSDEFTCGNGKCIQRRWVCDRDDDCDGDSDQDCPHPPCNARETFENCSEN-FCITARWRCDG
B		
フタホシオオロギ	188	DADCPDGDSDDEVNCTHSGGANTHSHCLPREFECDRLTCVHQSWMVCDGDDCPDGGSDSASERCQ-NVTCRPPDQFCRNRACIPGHLHCSGAPCPDSDSEENCTSPAPKCDPRTFEFCGG
チャバネゴキブリ Long form	188	DADCPDGDSDDEVNCTHSGGANTHSHCLPREFECDRLTCVHQSWMVCDGDDCPDGGSDSASERCQ-NVTCRPPDQFCRNRACIPGHLHCSGAPCPDSDSEENCTSPAPKCDPRTFEFCGG
チャバネゴキブリ Short form	188	DADCPDGDSDDEVNCTHSGGANTHSHCLPREFECDRLTCVHQSWMVCDGDDCPDGGSDSASERCQ-NVTCRPPDQFCRNRACIPGHLHCSGAPCPDSDSEENCTSPAPKCDPRTFEFCGG
マデラゴキブリ	209	DADCPDGDSDDEVNCTHSGGANTHSHCLPREFECDRLTCVHQSWMVCDGDDCPDGGSDSASERCQ-NVTCRPPDQFCRNRACIPGHLHCSGAPCPDSDSEENCTSPAPKCDPRTFEFCGG
トノサマバッタ	233	DADCPDGDSDDEVNCTHSGGANTHSHCLPREFECDRLTCVHQSWMVCDGDDCPDGGSDSASERCQ-NVTCRPPDQFCRNRACIPGHLHCSGAPCPDSDSEENCTSPAPKCDPRTFEFCGG
ハチノスツヅリガ	238	DADCPDGDSDDEVNCTHSGGANTHSHCLPREFECDRLTCVHQSWMVCDGDDCPDGGSDSASERCQ-NVTCRPPDQFCRNRACIPGHLHCSGAPCPDSDSEENCTSPAPKCDPRTFEFCGG
カイコガ (Isoform 1)	234	DADCPDGDSDDEVNCTHSGGANTHSHCLPREFECDRLTCVHQSWMVCDGDDCPDGGSDSASERCQ-NVTCRPPDQFCRNRACIPGHLHCSGAPCPDSDSEENCTSPAPKCDPRTFEFCGG
C		
フタホシオオロギ	307	GMCIPIAKVCDKKPDCPNWEDEPDKCKGKNECKENNGGCSQKCVDTFGGYVCDGRRGFKLMDNRTCDVNECCVPGTCSQSCINEKGTFFKCQCVGEGYLRDPDRHTCKAMEGHASLLFAR
チャバネゴキブリ Long form	307	GMCIPIAKVCDKKPDCPNWEDEPDKCKGKNECKENNGGCSQKCVDTFGGYVCDGRRGFKLMDNRTCDVNECCVPGTCSQSCINEKGTFFKCQCVGEGYLRDPDRHTCKAMEGHASLLFAR
チャバネゴキブリ Short form	307	GMCIPIAKVCDKKPDCPNWEDEPDKCKGKNECKENNGGCSQKCVDTFGGYVCDGRRGFKLMDNRTCDVNECCVPGTCSQSCINEKGTFFKCQCVGEGYLRDPDRHTCKAMEGHASLLFAR
マデラゴキブリ	325	GMCIPIAKVCDKKPDCPNWEDEPDKCKGKNECKENNGGCSQKCVDTFGGYVCDGRRGFKLMDNRTCDVNECCVPGTCSQSCINEKGTFFKCQCVGEGYLRDPDRHTCKAMEGHASLLFAR
トノサマバッタ	348	GMCIPIAKVCDKKPDCPNWEDEPDKCKGKNECKENNGGCSQKCVDTFGGYVCDGRRGFKLMDNRTCDVNECCVPGTCSQSCINEKGTFFKCQCVGEGYLRDPDRHTCKAMEGHASLLFAR
ハチノスツヅリガ	355	GMCIPIAKVCDKKPDCPNWEDEPDKCKGKNECKENNGGCSQKCVDTFGGYVCDGRRGFKLMDNRTCDVNECCVPGTCSQSCINEKGTFFKCQCVGEGYLRDPDRHTCKAMEGHASLLFAR
カイコガ (Isoform 1)	351	GMCIPIAKVCDKKPDCPNWEDEPDKCKGKNECKENNGGCSQKCVDTFGGYVCDGRRGFKLMDNRTCDVNECCVPGTCSQSCINEKGTFFKCQCVGEGYLRDPDRHTCKAMEGHASLLFAR
D		
フタホシオオロギ	427	RDHDIRKISLDHHEMTAIVNDTKSATALDFVFRGTGMIFWSDVSDRIYKAPIDEGSERTVVLDDGWMFWTDWGTEPKIERAGMDGNHRRITIVSYEVKWPNGLTLDLVKKRVYVVDGKLNVIS
チャバネゴキブリ Long form	427	RDHDIRKISLDHHEMTAIVNDTKSATALDFVFRGTGMIFWSDVSDRIYKAPIDEGSERTVVLDDGWMFWTDWGTEPKIERAGMDGNHRRITIVSYEVKWPNGLTLDLVKKRVYVVDGKLNVIS
チャバネゴキブリ Short form	427	RDHDIRKISLDHHEMTAIVNDTKSATALDFVFRGTGMIFWSDVSDRIYKAPIDEGSERTVVLDDGWMFWTDWGTEPKIERAGMDGNHRRITIVSYEVKWPNGLTLDLVKKRVYVVDGKLNVIS
マデラゴキブリ	445	RDHDIRKISLDHHEMTAIVNDTKSATALDFVFRGTGMIFWSDVSDRIYKAPIDEGSERTVVLDDGWMFWTDWGTEPKIERAGMDGNHRRITIVSYEVKWPNGLTLDLVKKRVYVVDGKLNVIS
トノサマバッタ	468	RDHDIRKISLDHHEMTAIVNDTKSATALDFVFRGTGMIFWSDVSDRIYKAPIDEGSERTVVLDDGWMFWTDWGTEPKIERAGMDGNHRRITIVSYEVKWPNGLTLDLVKKRVYVVDGKLNVIS
ハチノスツヅリガ	475	RDHDIRKISLDHHEMTAIVNDTKSATALDFVFRGTGMIFWSDVSDRIYKAPIDEGSERTVVLDDGWMFWTDWGTEPKIERAGMDGNHRRITIVSYEVKWPNGLTLDLVKKRVYVVDGKLNVIS
カイコガ (Isoform 1)	471	RDHDIRKISLDHHEMTAIVNDTKSATALDFVFRGTGMIFWSDVSDRIYKAPIDEGSERTVVLDDGWMFWTDWGTEPKIERAGMDGNHRRITIVSYEVKWPNGLTLDLVKKRVYVVDGKLNVIS
E		
フタホシオオロギ	170	SCNYDGSRRVILYSPDLQHPFSITTFEDVWVYWDWDKQAVYRANKFPQSKDVAPITSTHSLQNPVVIHYHYPYRQPDGNNHCAVNGHCSSLCLPAPQINSRSPKISACPDGLRLMD
チャバネゴキブリ Long form	605	SCNYDGSRRVILYSPDLQHPFSITTFEDVWVYWDWDKQAVYRANKFPQSKDVAPITSTHSLQNPVVIHYHYPYRQPDGNNHCAVNGHCSSLCLPAPQINSRSPKISACPDGLRLMD
チャバネゴキブリ Short form	605	SCNYDGSRRVILYSPDLQHPFSITTFEDVWVYWDWDKQAVYRANKFPQSKDVAPITSTHSLQNPVVIHYHYPYRQPDGNNHCAVNGHCSSLCLPAPQINSRSPKISACPDGLRLMD
マデラゴキブリ	623	SCNYDGSRRVILYSPDLQHPFSITTFEDVWVYWDWDKQAVYRANKFPQSKDVAPITSTHSLQNPVVIHYHYPYRQPDGNNHCAVNGHCSSLCLPAPQINSRSPKISACPDGLRLMD
トノサマバッタ	646	SCNYDGSRRVILYSPDLQHPFSITTFEDVWVYWDWDKQAVYRANKFPQSKDVAPITSTHSLQNPVVIHYHYPYRQPDGNNHCAVNGHCSSLCLPAPQINSRSPKISACPDGLRLMD
ハチノスツヅリガ	653	SCNYDGSRRVILYSPDLQHPFSITTFEDVWVYWDWDKQAVYRANKFPQSKDVAPITSTHSLQNPVVIHYHYPYRQPDGNNHCAVNGHCSSLCLPAPQINSRSPKISACPDGLRLMD
カイコガ (Isoform 1)	649	SCNYDGSRRVILYSPDLQHPFSITTFEDVWVYWDWDKQAVYRANKFPQSKDVAPITSTHSLQNPVVIHYHYPYRQPDGNNHCAVNGHCSSLCLPAPQINSRSPKISACPDGLRLMD
F		
フタホシオオロギ	244	RLMCGEETKSTTSSPSVSRSGTSSGSSNPHPDMTHAN-PSGITEPHNVKNSIMKPPVVMNTHLHPY-LEPSMEEDSGVAGIVIAVVTIVLLLAALAPVYRHYLHNRNVTSMNFDNF
チャバネゴキブリ Long form	725	RLMCGEETKSTTSSPSVSRSGTSSGSSNPHPDMTHAN-PSGITEPHNVKNSIMKPPVVMNTHLHPY-LEPSMEEDSGVAGIVIAVVTIVLLLAALAPVYRHYLHNRNVTSMNFDNF
チャバネゴキブリ Short form	725	RLMCGEETKSTTSSPSVSRSGTSSGSSNPHPDMTHAN-PSGITEPHNVKNSIMKPPVVMNTHLHPY-LEPSMEEDSGVAGIVIAVVTIVLLLAALAPVYRHYLHNRNVTSMNFDNF
マデラゴキブリ	743	RLMCGEETKSTTSSPSVSRSGTSSGSSNPHPDMTHAN-PSGITEPHNVKNSIMKPPVVMNTHLHPY-LEPSMEEDSGVAGIVIAVVTIVLLLAALAPVYRHYLHNRNVTSMNFDNF
トノサマバッタ	766	RLMCGEETKSTTSSPSVSRSGTSSGSSNPHPDMTHAN-PSGITEPHNVKNSIMKPPVVMNTHLHPY-LEPSMEEDSGVAGIVIAVVTIVLLLAALAPVYRHYLHNRNVTSMNFDNF
ハチノスツヅリガ	773	RLMCGEETKSTTSSPSVSRSGTSSGSSNPHPDMTHAN-PSGITEPHNVKNSIMKPPVVMNTHLHPY-LEPSMEEDSGVAGIVIAVVTIVLLLAALAPVYRHYLHNRNVTSMNFDNF
カイコガ (Isoform 1)	769	RLMCGEETKSTTSSPSVSRSGTSSGSSNPHPDMTHAN-PSGITEPHNVKNSIMKPPVVMNTHLHPY-LEPSMEEDSGVAGIVIAVVTIVLLLAALAPVYRHYLHNRNVTSMNFDNF
G		
フタホシオオロギ	843	VYRKTTEDDQFSEKNOYQP-QRIYPAVVGEEAQLPSTSPGTNDYV-----897
チャバネゴキブリ Long form	819	VYRKTTEDDQFSEKNOYQP-QRIYPAVVGEEAQLPSTSPGTNDYV-----863
チャバネゴキブリ Short form	819	VYRKTTEDDQFSEKNOYQP-QRIYPAVVGEEAQLPSTSPGTNDYV-----863
マデラゴキブリ	863	VYRKTTEDDQFSEKNOYQP-QRIYPAVVGEEAQLPSTSPGTNDYV-----907
トノサマバッタ	839	VYRKTTEDDQFSEKNOYQP-QRIYPAVVGEEAQLPSTSPGTNDYV-----883
ハチノスツヅリガ	869	VYRKTTEDDQFSEKNOYQP-QRIYPAVVGEEAQLPSTSPGTNDYV-----914
カイコガ (Isoform 1)	837	VYRKTTEDDQFSEKNOYQP-QRIYPAVVGEEAQLPSTSPGTNDYV-----886

図 S1-2 (つづき). (B) フタホシオオロギの LpR 遺伝子の演繹アミノ酸配列と他の昆虫種の LpR のアミノ酸配列とのアラインメント。フタホシオオロギの LpR 遺伝子の演繹アミノ酸配列は、他の昆虫種の LpR と高い相同性を有していた。図中に示す二重線は、YWTD モチーフを示す。図中に示す線は、各ドメイン (A: Putative signal peptide, B: Ligand-binding domain, C: EGF-precursor domain, D: Putative O-glycosylation domain, E: Transmembrane domain, F: Intracellular domain) を示す。チャバネゴキブリ (*Blattella germanica*) Long form: CAL47125、チャバネゴキブリ Short form: CAL47126、マデラゴキブリ (*Leucophaea maderae*): BAE00010、トノサマバッタ (*Locusta migratoria*): CAA03855、ハチノスツヅリガ (*Galleria mellonella*): ABF20542、カイコガ (*Bombyx mori*) isoform 1: NP\_001104808。



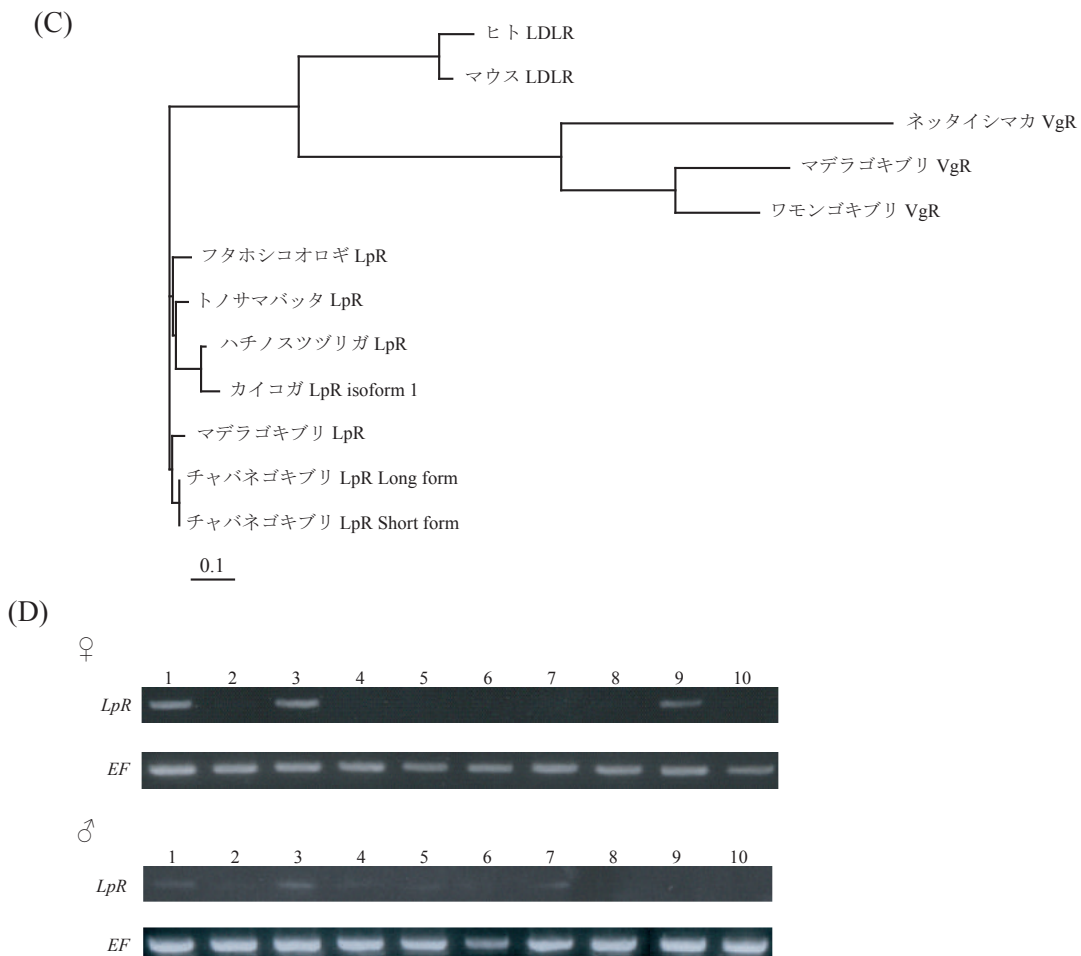
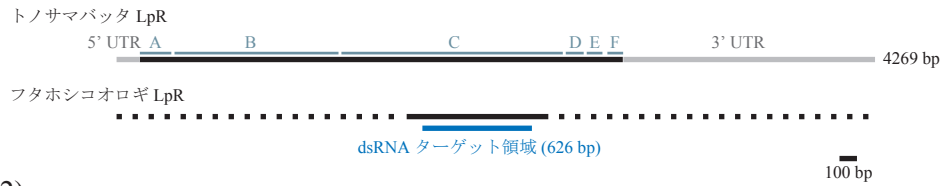
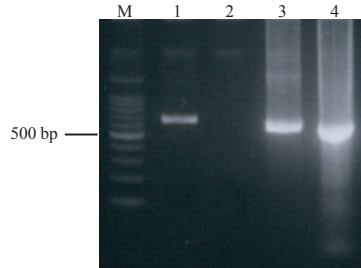


図 S1-2 ( つづき ). (C) フタホシコオロギの LpR の演繹アミノ酸配列と、他の昆虫種の LpR のアミノ酸配列、および VgR (Vitellogenin receptor: ビテロジェニン受容体) と、哺乳類の LDLR (low density lipoprotein receptor: LDL 受容体) のアミノ酸配列を基にして作成した系統樹。フタホシコオロギの LpR は、他の昆虫種の LpR と同じクレードに属していた。ヒト LDLR (*Homo sapiens* LDL receptor): NP\_000518、マウス LDLR (*Mus musculus* LDL receptor): NP\_034830、ネットアイシマカ VgR (*Aedes aegypti* vitellogenin receptor): AAK15810、マデラゴキブリ VgR (*Leucophaea maderae* vitellogenin receptor): BAE93218、ワモンゴキブリ VgR (*Periplaneta americana* vitellogenin receptor): BAC02725、トノサマバッタ LpR (*Locusta migratoria* lipophorin receptor): CAA03855、ハチノスツヅリガ LpR (*Galleria mellonella* lipophorin receptor): ABF20542、カイコガ LpR isoform 1 (*Bombyx mori* lipophorin receptor isoform 1): NP\_001104808、マデラゴキブリ LpR (*Leucophaea maderae* lipophorin receptor): BAE00010、チャバネゴキブリ LpR Long form (*Blattella germanica* lipophorin receptor Long form): CAL47125、チャバネゴキブリ LpR Short form (*Blattella germanica* lipophorin receptor Short form): CAL47126. (D) RT-PCR を用いたフタホシコオロギの LpR の組織別発現解析。フタホシコオロギ成虫の各種組織 (1: 脂肪体、2: 前腸、3: 中腸、4: 後腸、5: マルピーギ管、6: 気管、7: 筋肉、8: 神経系、9: 卵巣 / 精巣、10: 血球細胞) から調製したトータル RNA を用いた。コントロールとして EF を用いた。フタホシコオロギの LpR は、成虫メス (A) では脂肪体、中腸、卵巣に、成虫オス (B) では脂肪体、中腸、筋肉に mRNA の発現が認められた。

(E-1)



(E-2)



(E-3)

dsRNA 投与後 2 日目

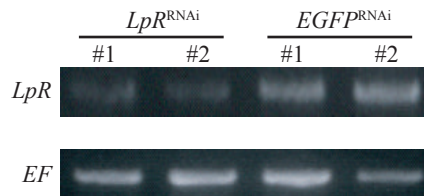


図 S1-2 ( つづき ). (E) LpR-dsRNA の調製および、その投与による LpR のノックダウンの確認。  
(E-1) LpR-dsRNA の調製のターゲットとした領域。トノサマバッタの LpR と対応させて示した。  
フタホシコオロギの LpR において、実線はクローニング済の配列、点線は未取得の配列を示す。  
A-F は各ドメイン (A: Putative signal peptide、B: Ligand-binding domain、C: EGF-precursor domain、  
D: Putative glycosylation domain、E: Transmembrane domain、F: Intracellular domain) を示す。(E-2)  
アガロース電気泳動による調製した LpR-dsRNA の確認。レーンはそれぞれ、レーン 1: *in vitro*  
transcription に用いたテンプレート cDNA、レーン 2: *in vitro* transcription 産物、レーン 3: DNase I  
処理後のテンプレート cDNA、レーン 4: DNase I 処理後の *in vitro* transcription 産物である。  
レーン 4 を調製後の dsRNA としてその後の実験に用いた。(E-3) RT-PCR を用いた LpR の  
ノックダウンの確認。LpR-dsRNA および EGFP-dsRNA の投与後 2 日目 ( 上部 )、3 日目 ( 下部 ) の  
成虫メス個体の脂肪体由来の RNA を RT-PCR のテンプレートとした。# 番号は各群における別々の  
個体を示す。コントロールとして EF を用いた。LpR-dsRNA の投与後 2 日目において *LpR* の  
mRNA の発現が大きく抑制された。

# S1-3 フタホシコオロギの ApoLp-III をコードする遺伝子の cDNA クローニングおよびそのノックダウン個体の調製

- ・フタホシコオロギの ApoLp-III をコードする遺伝子の cDNA のクローニング ( 図 S1-3 (A、B、C))
- ・フタホシコオロギ *ApoLp-III* の mRNA の組織別発現解析 ( 図 S1-3 (D))
- ・ApoLp-III-dsRNA の調製、および、ApoLp-III-dsRNA の投与によるノックダウン個体の調製 ( 図 S1-3 (E))

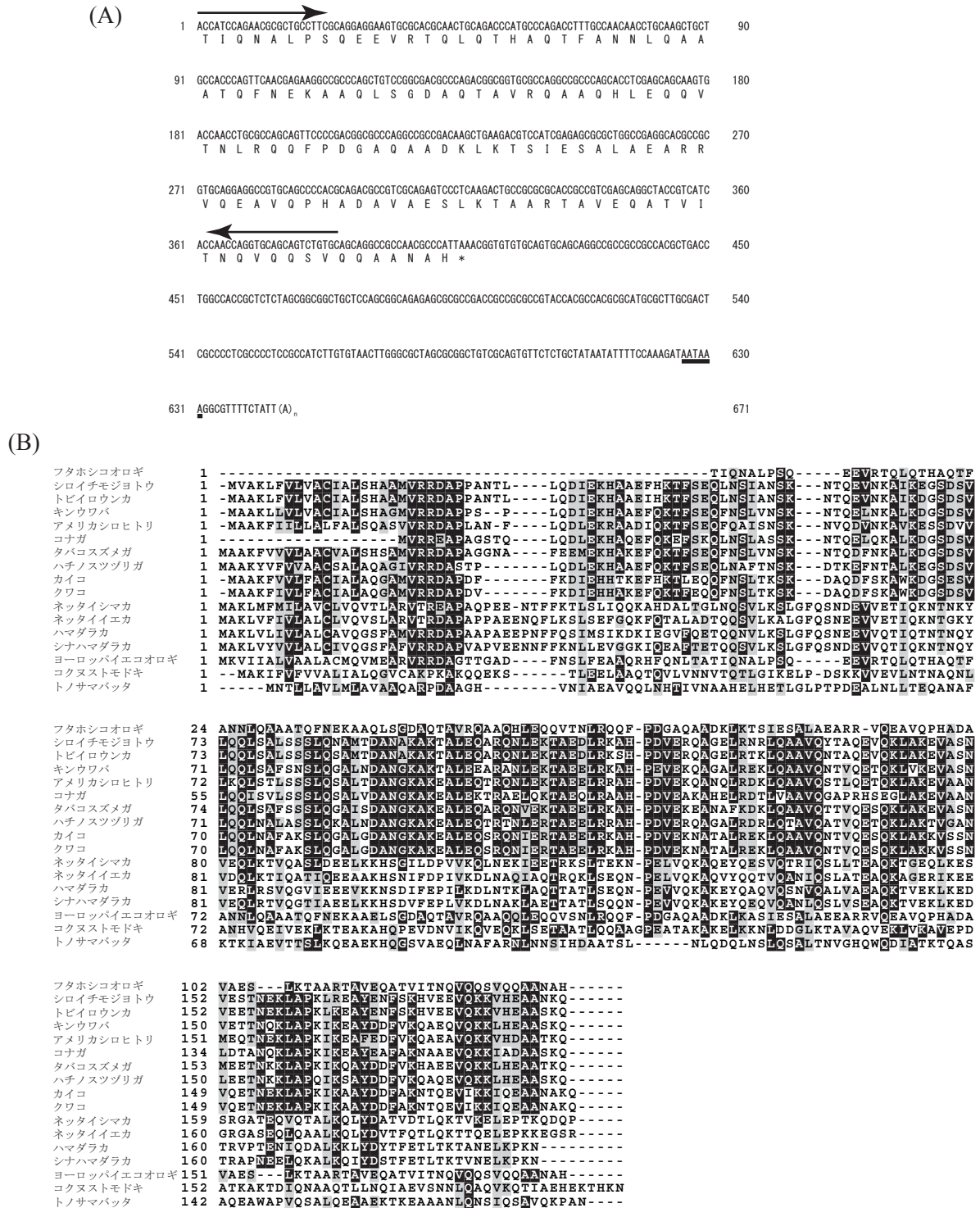


図 S1-3 (A) フタホシコオロギの ApoLp-III 遺伝子の部分塩基配列およびその演繹アミノ酸配列。矢印は cDNA クローニングに用いたプライマーを示す。(B) フタホシコオロギの ApoLp-III 遺伝子の部分塩基配列の演繹アミノ酸配列と、他昆虫種の ApoLp-III のアミノ酸配列とのアラインメント。

*Gryllus bimaculatus* ( フタホシコオロギ ), KC684976; *Spodoptera exigua* ( シロイチモジヨトウ ), AEW24424; *Nilaparvata lugens* ( トビイロウンカ ), ADE34171; *Trichoplusia ni* ( キンウワバ ), ABV68867; *Hyphantria cunea* ( アメリカシロヒトリ ), AAQ24031; *Plutella xylostella* ( コナガ ), ADK78218; *Manduca sexta* ( タバコスズメガ ), AAA29300; *Galleria mellonella* ( ハチノスツヅリガ ), CAA07363; *Bombyx mori* ( カイコ ), NP\_001037078; *Bombyx mandarina* ( クワコ ), AAB02851; *Aedes aegypti* ( ネッタイシマカ ), XP\_001659524; *Culex quinquefasciatus* ( ネッタイエカ ), EDS29975; *Anopheles gambiae* ( ハマダラカ ), ADM86753; *Anopheles sinensis* ( シナハマダラカ ), ADN52300; *Acheta domesticus* ( ヨーロッパイエコオロギ ), AAA64737; *Tribolium castaneum* ( コクヌストモドキ ), EFA05722; *Locusta migratoria* ( トノサマバタ ), AAA29280。

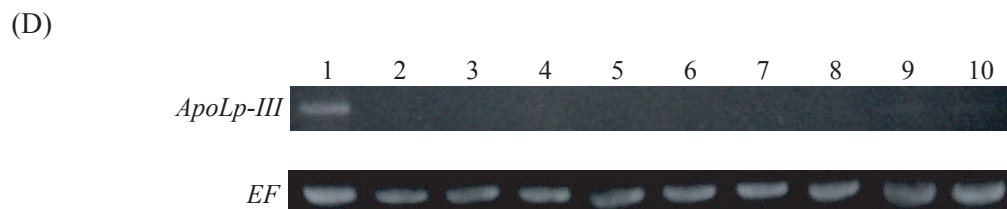
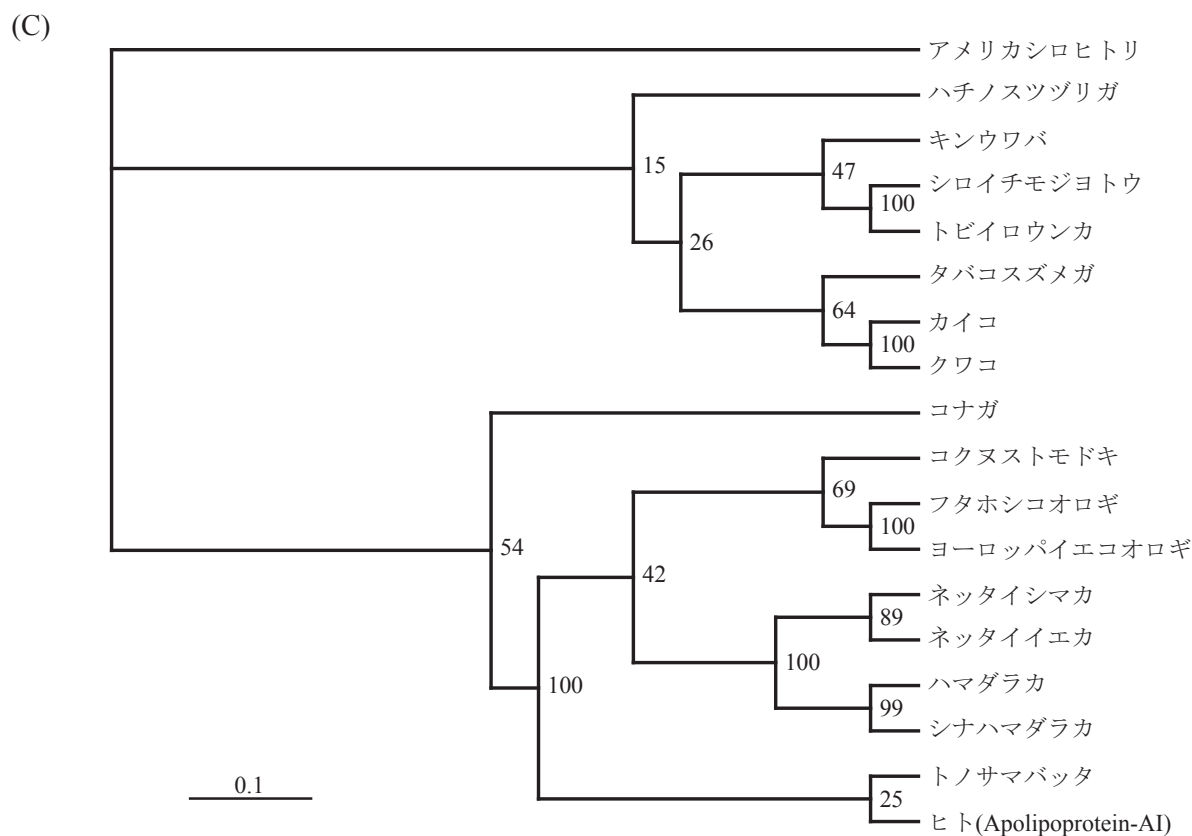


図 S1-3 ( つづき ). (C) フタホシコオロギの ApoLp-III の演繹アミノ酸配列と他の昆虫種の ApoLp-III のアミノ酸配列をもとに作成した分子系統樹。系統樹作成は近隣結合法を用いた。バーは、サイトあたりのアミノ酸置換数を示す。ヒトの Apolipoprotein-AI は、out group として用いた。(D) RT-PCR を用いたフタホシコオロギの ApoLp-III の mRNA の組織別発現解析。フタホシコオロギのオス成虫の各種組織 (1: 脂肪体、2: 前腸、3: 中腸、4: 後腸、5: マルピーギ管、6: 気管、7: 筋肉、8: 神経系、9: 精巣、10: 血球細胞) から調製したトータル RNA を用いた。コントロールとして EF (elongation factor) を用いた。フタホシコオロギの ApoLp-III は、脂肪体特異的に mRNA の発現が認められた。

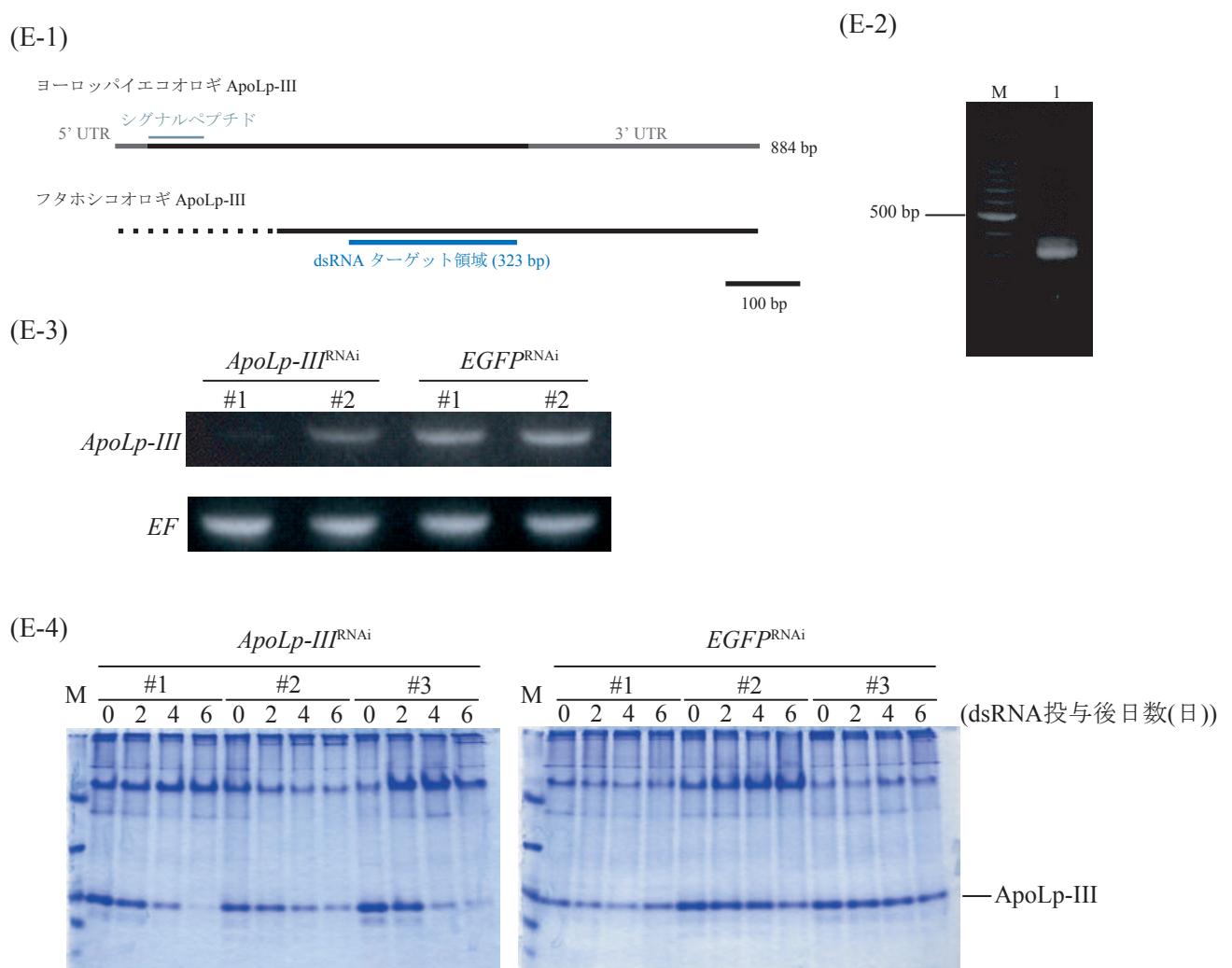


図 S1-3 ( つづき ). (E) *ApoLp-III* のノックダウン個体の調製、および、*ApoLp-III*-dsRNA の投与による、*ApoLp-III* のノックダウンの確認。(E-1) *ApoLp-III*-dsRNA の調製のターゲットとした領域。ヨーロッパイエコオロギの *ApoLp-III* と対応させて示した。フタホシコオロギの *ApoLp-III* において、実線はクローニング済の配列、点線は未クローニングの配列を示す。(E-2) アガロース電気泳動による調製した dsRNA の確認。M は分子量マーカー (100 bp ladder) を示す。レーン 1 は、DNase I 処理後の *in vitro* transcription 産物であり、調製後の dsRNA としてその後の実験に用いた。(E-3) フタホシコオロギの成虫オス個体への、*ApoLp-III*-dsRNA の投与により、投与後 2 日目に、*ApoLp-III* の mRNA の発現が大きく抑制された。(E-4) *ApoLp-III*-dsRNA を 2 日毎に投与し、投与開始後 6 日目までの、体液中の遊離 *ApoLp-III* レベルの変動を Native-PAGE 解析したところ、体液中の遊離 *ApoLp-III* レベルの漸次的な減少が見られた。# 番号は、各群における別々の個体を示す。

# S1-4 サブトラクション法により得た候補遺伝子の cDNA クローニングおよびそれらのノックダウン個体の調製

- ・サブトラクション法により得た候補遺伝子の cDNA のクローニング ( 図 S1-4 (A、B、C、E、F、G))
- ・クローン *a-24* (ACBP) の mRNA の組織別発現解析 ( 図 S1-4 (D))
- ・サブトラクション法により得たクローンのノックダウン個体の調製 ( 図 S1-4 (H))

(A)

```

10      20      30      40      50      60      70      80      90      100
GACTGSAGAGCGTGGTGGCGCATCGTATTTGCGTTTTGATCTGATTCCAGTCTCAGCCAAAACCTCACCATTGTCTCGAAGAGCAATTTCAACAAGCTG
M S L E E Q F Q Q A

110     120     130     140     150     160     170     180     190     200
CAGAGGATGTGAAGAACTGGCCAAAACCCCTTCAGATGATGAACCTCTTGAATCTATGCTTTATTCAAGCAAGGCACAGTTGGTGATGTCAACACCGC
A E D V K K L A K T P S D D E L L E I Y A L F K Q G T V G D V N T A

210     220     230     240     250     260     270     280     290     300
TAGACCAGGAATGTTGGATTTCAAAGGAAAGGCCAAGTGGGATGCTTGGGATTCAAAGAAAGGCATGTCAACCGATGCAGCTAAAGAGGCTTACATTGCA
R P G M L D F K G K A K W D A W D S K K G M S T D A A K E A Y I A

310     320     330     340     350     360     370     380     390     400
AAAGTGAAGCAGCTGATAGAAACATATGGAAGAAGTGAATTATTTCTCTGTAAGAAGTTCTCTGTTGTGAGAAATGGGGCACATCCTATTACTGTGTA
K V K Q L I E T Y G K N *

410     420     430     440     450     460     470     480     490     500
CACAAAGTGTGAATGCTCAATTATATGCAACTTAAATCTGTATAGAAAATGCCCAACTTTACTGTTTTTGGATTTTATAATATCTTGTACTGGCAAGAA
AAATTAACCTATTGAATAAATCTTTTTTAAAGTTGAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

```

(B)

フタホシコオロギ	1	MSLEEFQQAEDVKKIAKTPSDDELEIYALFKQCTVGDVN	TARPGMLDFKGGKAKWDAWDSKKG
コクヌストモドキ	1	MSLDERFKKAADDVQKIKSKPSNDLLEIYALFKQGSVGDVN	TDRPGMLDFKGGKAKWDAWNGKKG
セイヨウミツバチ	1	MTLDERFKKAADDVQKIKSKPSNDLLEIYALFKQGSVGDVN	TSRPGMLDFKGGKAKWDAWNGKKG
キョウソヤドリコバチ	1	MSLDERFKKAADDVQKIKSKPSNDLLEIYALFKQGSVGDVN	TSRPGMLDFKGGKAKWDAWNGKKG
ハマダラカ	1	MSLDERFKKAADDVQKIKSKPSNDLLEIYALFKQGSVGDVN	TEKPGFLDFKGGKAKWDAWNGKKG
ネットアイエカ	1	MSLDERFKKAADDVQKIKSKPSNDLLEIYALFKQGSVGDVN	TSRPGMLDFKGGKAKWDAWNGKKG
キイロショウジョウバエ	1	MSLDERFKKAADDVQKIKSKPSNDLLEIYALFKQGSVGDVN	TSRPGMLDFKGGKAKWDAWNGKKG
オオサシガメ	1	MSLDERFKKAADDVQKIKSKPSNDLLEIYALFKQGSVGDVN	TSRPGMLDFKGGKAKWDAWNGKKG
カイコ	1	MSLDERFKKAADDVQKIKSKPSNDLLEIYALFKQGSVGDVN	TSRPGMLDFKGGKAKWDAWNGKKG
オオタバコガ	1	MSLDERFKKAADDVQKIKSKPSNDLLEIYALFKQGSVGDVN	TSRPGMLDFKGGKAKWDAWNGKKG

フタホシコオロギ	67	STDAKAEAYIAKVKQLIETYSKN	-----
コクヌストモドキ	67	SQDKAKEEYIAKVESLIQSIGIQ	-----
セイヨウミツバチ	67	SQDAKAEQYIAKVEELISIIKNTTTTGSTETCECIERSKVS	-----
キョウソヤドリコバチ	67	SQDEAKKLYIAKVEALIASIKKK	-----
ハマダラカ	67	SQDEAKQAYVDKVKQLIDQHGILK	-----
ネットアイエカ	63	TQDEAKQAYVDKVAQLVEQHGILK	-----
キイロショウジョウバエ	67	SNTDAQAAYITKVKALIAAVGLKS	-----
オオサシガメ	66	SQSEAKESYVEKVKSLIASYGLKL	-----
カイコ	68	SKEDAQKAYIETVEGLIASIGLKE	-----
オオタバコガ	65	SQDDAKKQYIELAEKIAKPKFA	-----

(C)

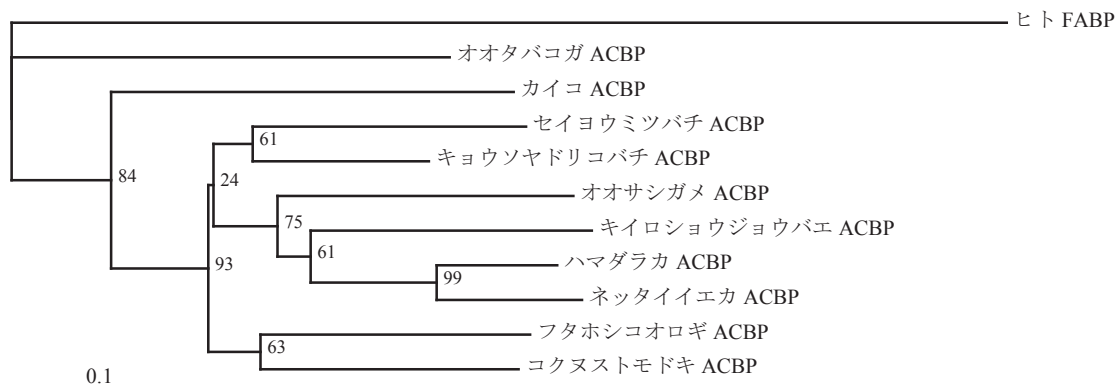


図 S1-4. (A) サブトラクション法にて得られた、クローン *a-24* の部分塩基配列およびその演繹アミノ酸配列。

下線はポリ A 付加シグナルを示す。(B) フタホシコオロギのクローン *a-24* の部分塩基配列の演繹アミノ酸配列と、他の昆虫種の ACBP のアミノ酸配列とのアラインメント。(C) フタホシコオロギのクローン *a-24* の部分塩基配列の演繹アミノ酸配列と、他の昆虫種の ACBP のアミノ酸配列をもとに作成した分子系統樹。系統樹作成は近隣結合法を用いた。バーは、サイトあたりのアミノ酸置換数を示す。ヒトの FABP (Fatty acid binding protein) は、out group として用いた。

*Tribolium castaneum* (コクヌストモドキ), XM\_969720; *Apis mellifera* (セイヨウミツバチ), XM\_003250461; *Nasonia vitripennis* (キョウソヤドリコバチ), XM\_003426292; *Anopheles gambiae* (ハマダラカ), XM\_308405; *Culex quinquefasciatus* (ネットアイエカ), XM\_001845341.1; *Drosophila melanogaster* (キイロショウジョウバエ), NM\_001258837.1; *Rhodnius prolixus* (オオサシガメ), ABY47892.1; *Bombyx mori* (カイコ), NP\_001037022.1; *Helicoverpa armigera* (オオタバコガ), ABK29477.1; *Homo sapiens* FABP (ヒト Fatty acid binding protein), AAC99800.1。



(D)

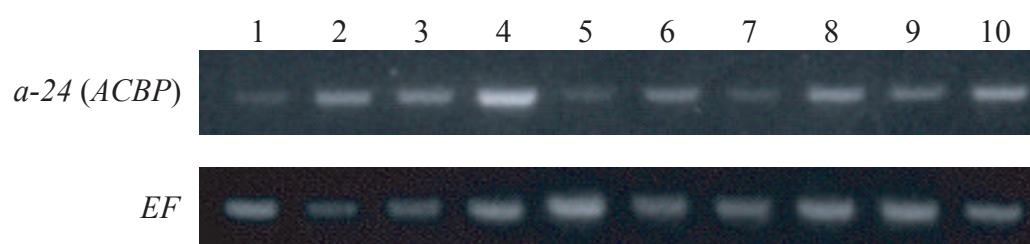


図 S1-4 ( つづき ). (D) RT-PCR を用いたフタホシコオロギのクローン *a-24 (ACBP)* をコードする mRNA の組織別発現解析。フタホシコオロギ成虫オス通常個体の各種組織 (1: 脂肪体、2: 前腸、3: 中腸、4: 後腸、5: マルピーギ管、6: 気管、7: 筋肉、8: 精巣、9: 神経系、10: 血球細胞 ) から調製したトータル RNA を用いた。コントロールとして EF (elongation factor) を用いた。フタホシコオロギの *a-24* は、全身に mRNA の発現が認められた。

図 S1-4 ( つづき ). (E) フタホンコオロギのクローン a-11 の部分塩基配列の演繹アミノ酸配列と、他の昆虫種の Thrombospondin (TSP) のアミノ酸配列とのアラインメント。*Aedes aegypti* ( ネットアイシマカ ), XM\_001658808.1; *Culex quinquefasciatus* ( ネットアイイエカ ), XM\_001866743.1; *Drosophila melanogaster* ( キイロショウジョウバエ ), NM\_001144330.2; *Nasonia vitripennis* ( キョウソヤドリコバチ ), XM\_001599561.2; *Apis mellifera* ( セイヨウミツバチ ), XM\_397221.4。



(F)

キョウソヤドリコバチ	1	-----MRSAFTTCITLLVVTTPAAIVVVVASPAYMLVRPLEDENDYARVLELSLLFYEAQRSGLTSEAGRVA
セイヨウミツバチ	1	MKRVVGGKSSMDSNMFVTCVTTLVITSIALIGTINANPPYY-VKPIEDENDYARVLELSLLFYEAQRSGLP-ENNRIPW
コクヌストモドキ	1	-----MFYSLWVLLFIT-----FGSADYRHALKLSLLFYEAQRSGLP-ASNRIW
エンマコオロギ	1	-----MQPLRCALVLVAVCAFVQ-----GGSYDYADVTKKSLLFYQARSGRLSGMDPLVSW
フタホシコオロギ	1	-----MKSFTFVLAFVVALAA-----VHANVDYGEALWKLSLLFYQARSGLSGMNSLVS
キョウソヤドリコバチ	71	RGDSALGDRGANGEDLTGGYYDAGDFVKFGFTMASTTTLLAWGAVSWPDAYAAVGQLDVIRETVKWATDYFVKCHVSEFE
セイヨウミツバチ	79	RGDSALDDRGANGEDLTGGYYDAGDFVKFGFTMASTTTLLAWGAVSWPEAYNAAGQLDLRRKATKWATDYFIKCHVSEYV
コクヌストモドキ	47	RGDSALDDHGLNNEDLTGGYYDASDYVKFSFTMAETTTLLTWGMLSFRHAYNEAGQYQHGLDAIKWATDYFIKCHASKYE
エンマコオロギ	53	RKDSALNDRGNNGEDLTGGYYDAGDFVKFGFPMAETTTLLSWGVIDYENTYSSIGASAAARAAIKWGTDYFIKAHVSAANE
フタホシコオロギ	52	RKDSALHDRGANGEDLTGGYYDAGDFVKFGFPMAETTTVLSWSTIDYADGYSKI GWLQEARNAIKWGTDYFIKAHVSKNE
キョウソヤドリコバチ	151	LYGQVGDFAIDHTFWGRPEELNTRPAFKIDPEHPGSDLAGETAALAAASLVFRTS-EPSYSEKLLRHARELYNFANKY
セイヨウミツバチ	159	FYGVQVGDFTDHTFWGRPEELNTRPAYKIDPDHPGSDLAGETAALAAASSIVFRNY-NPEYSANCLKHAKELYKFASKY
コクヌストモドキ	127	FYGVQVGDFTDHAFAWGRPEEMNMTTPAYKIDIHPGSDLAGETAALAAASLLFENF-NQSYSDLLRHATELYDFATMY
エンマコオロギ	133	LYGQVGNNGADHSWWGRPEEDMNMDRPAFKIDTSRPGSDLAETAALAAASIVFKNA-DSNYANTLLRHAKELYNFADNY
フタホシコオロギ	132	FYGVQVGVQEDHNYWGRPEEDMTESRTAYKIDASHPGSDLAETAALAAASVVFRKAGDTNYANTLLQHAKDLYNFADTY
キョウソヤドリコバチ	230	RGLYHEAIRGAAQYYESTDYGDELAWAAAWLYKASNESRYLEEAEEHHYQHFHLRERPNEFFYNKKVAGVQVLLAQLTGTQ
セイヨウミツバチ	238	RGLYHEAIRGAAQYYESTDYGDELAWAAAVWLFKATNDTMYLEEAEEHHYQHFHLKERPNEFFYNKKVAGVQVLLAQMTGQP
コクヌストモドキ	206	RGLYHDSIPGAKVYYESTGYGDELTAWAIWLYKTKDKVLYEQAETFYTKFRIKDRPNEFFYNKKVAGIQLLLAELTLRP
エンマコオロギ	212	RCKYSDSISDAAFYNSYSYEDELVWGAIWLWRATNDQNYLNKATQYYNQYSIQYKNSPLSWDDKSTGASALLAKLTGGD
フタホシコオロギ	212	RCKYSDSITDAKNFYSSYDYTDELVWGAIWIYRASNDQKYLTKAEQYVNSEGIIQYRTG-FGWDDKSLGATAMLMKLTGKS
キョウソヤドリコバチ	310	EYQNAHSFCNFSVRRQKRTRKGLLYIDKFGTLCCHAANVAFVCLQAADYPDIGDPKEYREFARQQIHYILGGRSRYVVG
セイヨウミツバチ	318	EYQNAARAFCDFSVYQQRTPKGLLYIDKFGTLCCHAANVAFVCLQAADSSGIGDSQKYREFAEQQIYYMLGGGRSRYVVG
コクヌストモドキ	286	EYLISTIKNFCDYTIKEQIRTPKGLIFIDKSGTLSHAANVAFCLHAGLTNLS-QAAVVSFAKEQINMYMLGSTGQSFVVG
エンマコオロギ	292	QKSAVQSFCDFYVYNQKTPKGLIYSDWGSIRQSMNAVVCLOAADAGVKT--GEYRSLAKKQLDYALGDAGRSFVVG
フタホシコオロギ	291	TKNNVLENFCNNLVYSQKTPKGLAFLGEWGSIRNSLNVAYTCMQAADEGIN--ATYQPLRQVADGLRPLRWQAQLRR
キョウソヤドリコバチ	390	WGRNPPKQPHHAASSCPDRPAPCGWPEFDRNRPNPQVLYGALVSGPDEADRFHDKRE-----DYVYTEVTLDYNAG--F
セイヨウミツバチ	398	WGRNPPKQPHHAASSCPDRPAICGWSEFDKDAPNPQILYGALVSGPDEADKFHDHRE-----DYVYTEVTLDYNAG--F
コクヌストモドキ	365	YGQNYPKQPHHSASSCPNLEPCGWKQFTWKGPNPQILYGALVSGPDQNDHYEDVRE-----EFLYNEVTLDYNAG--F
エンマコオロギ	370	FGNNPPPSHEQHRAASCPDAPAAACDWNNTYNGGQSNYHVLYGALVGGPDANDYYNDVRS-----DYVHNEVACDYNAG--F
フタホシコオロギ	369	IRQQPAHPRAPRFRSVVPQRPRRLRLEHFQRRPIQLPRAVRRPRGRPRRRQRLQRRSQRRYPQRGVRLQRRPGRAGRPO
キョウソヤドリコバチ	462	TGALAGLLQLQVKAAAVTSTPRAA-----
セイヨウミツバチ	470	TSALAGLLQLRVKSTA-----
コクヌストモドキ	437	QSTLAGLIYIENE-----
エンマコオロギ	442	QNVLVSLKANGY-----
フタホシコオロギ	449	EAGLLGHYHTSSPSLSVRKYARFEQFGLTAFGPYLLSSCCPNSDNKL

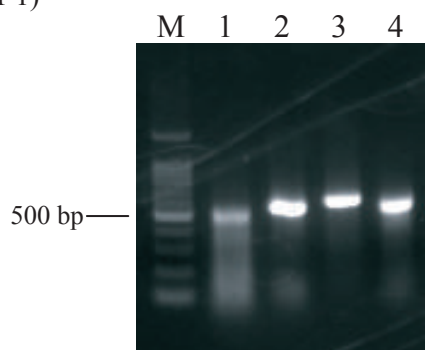
図 S1-4 ( つづき ). (F) フタホシコオロギのクローン a-n26 の部分塩基配列の演繹アミノ酸配列と、他の昆虫種の cellulase のアミノ酸配列とのアラインメント。*Nasonia vitripennis* ( キョウソヤドリコバチ ), XM\_001606404.2; *Apis mellifera* ( セイヨウミツバチ ), XM\_396791.3; *Tribolium castaneum* ( コクヌストモドキ ), EFA05721.1; *Teleogryllus emma* ( エンマコオロギ ), EU126927.2。

(G)

ハマダラカ Serpin	1	-----MADN-----SSSLDAQFVSQSNFATKLYQRISAKHAGENNVVISPFSS
ネッタイシマカ Serpin 4	1	-----MAQ-----TVDAQFVRKTNDFALDLYKQITANEK-KNVVISPFSS
コクヌストモドキ Serpin 20	1	MKSTLVLFIVYVSA-----EETAIQEFNTANNQFTSSVYKELSKTNN-GSFVVSPPSS
チャイロコメノゴミムシダマシ Serpin 1	1	MKCLTIFLLSVFLVLA-----ENGAVQEEFTKANNLETPAVYKQLAQTEK-DNFLVSPSS
キイロショウジョウバエ Serpin 1	1	-----MY-----YLCIFLWVTSVACQTSKEIYQLLSKSHNTNQLVVSPPSS
フタホシコオロギ	1	MRASLVITTFALAAAGESTPTPTTPAPPTPPASEVARRQAVTAAANAFSLRLYQAVKANAS--NVVISPPSS
ハマダラカ Serpin	43	ISACLSLAAMGAGGLTAEQMYSVLEFGAPDRKQTVADNVRRLMERLATD---STVNVANKIYVMQNYAVK
ネッタイシマカ Serpin 4	39	ISTCLSLAAMGAGGLTAEEMFRGLKY-DPAQKSSIAESYGNIMKNLDGN--KSLKIANKMYTMQKYSVK
コクヌストモドキ Serpin 20	54	AETVLAFAGSGCKGDSAEELRNSLHL--PNDKTKVESALKSLPKIKGNDL-YTLHAANKMYVKKDFAIK
チャイロコメノゴミムシダマシ Serpin 1	54	AETVLALLQSGCKDETAQELRTALHL--PDDKETVESAIKSLPKLKGSDL-YTLHTANKMYVKKDFSIAK
キイロショウジョウバエ Serpin 1	41	ITILSMVMFGAEGSTAKELQSALGLP-SEDKAIVAAARYGALLNDLQGEQEGPILKLANRIYVNDQYSLN
フタホシコオロギ	69	AAVLALLTRHXAAGATEEQQIASALQL--STDRETASGYGALLDLSLQNGE-AVLRTANRLVAHAGLGLK
ハマダラカ Serpin	110	GAENAIATGTSFRSEAESVNFASASAAAK-KINGWVEENTNNKIRDLSDDALDELSERMVLVNAVHFKGTW
ネッタイシマカ Serpin 4	105	SNFHEIAQKGFSEAESVNFQDNTATAK-KINTWVEQKTNDKIKDLISDDSLDDMTRLVLVNATHFKGTW
コクヌストモドキ Serpin 20	121	EEFKRAASQVYYADSESIDFTKNVEAAN-VMNSWVEKHTKSKIKNLIDSGLDQFFRAVLINAIYFKANW
チャイロコメノゴミムシダマシ Serpin 1	121	DGEKKAASQVYYADTDTIDFTQSVQAAK-TMNSWVEKHTNDKIHDLIDSNSLDQYTRAVLINAIYFKANW
キイロショウジョウバエ Serpin 1	110	QNYNLAVREPFKSEAESISLTNGPVAAE-RINQWVLDQTSGLIKGMIDPGSMSTSDVQALLVNATYFKGQW
フタホシコオロギ	136	ESERSTATGTSFRAGAEELDFVNATDASRAINTWVEQNTAGKIKDLFEEGAITQLTRXVVLVNAIYFKAGW
ハマダラカ Serpin	179	TYQFDPSLTRPFPFWLSEETESRDVPMMN-IKKHFAFNNFEELGFSALELTYGG--SDMTMMLLLPNERMG
ネッタイシマカ Serpin 4	174	THQFNPESTRPMPFWISETESVDVPMMN-TKKHFKHGVFDDLGAAALELTYSD--SDVSMILLPHERTG
コクヌストモドキ Serpin 20	190	SLEFFQLSLTQKKKFYKTPSDSIEVDMMOHLREDFNYYESPDLKAQFLELBFKG--DEASMVFVLPNEKDG
チャイロコメノゴミムシダマシ Serpin 1	190	SSPFFRLASTRNINFYKTATDITQVDALQHFRKYFKYYECPHLKAEFLELBFKG--NEASMMIVLPKERDG
キイロショウジョウバエ Serpin 1	179	ESKFDPAKTRASTFOVTANKSVPVQMAA-QMGTFRANYFRDLDAQVIELPYLN--SNLSMTITFLPREVEG
フタホシコオロギ	206	WKPFDVSETNSSFVHTPTSTQVNVPTMH-GTFQLDFGELPAVDAAKAVRLPYKAGDAQMSMVLIPNTVDG
ハマダラカ Serpin	246	LAALEEKTPTLNLAELAGKMHQEEVEVFLPKFKIEFTRDLNEDLQALGMERMFSDS-AEFPDILLEQNEPT
ネッタイシマカ Serpin 4	241	LSKLEENLHNIDIPDLTKMHSQEVEVFLPKFKIEFDLDLKETLEKLGMTMFSDS-ADFSELLEQNDPL
コクヌストモドキ Serpin 20	258	LARLESQLESVFVP--QHQLKSTYINVLVLPKFRIESEIDFKKVLTKLGVTKVFDGKQADLSGIAGEKGD
チャイロコメノゴミムシダマシ Serpin 1	258	LAALLESQIENVFAP--IHTLKTEYLNVLVLPKFRIETLINFNILKNLGVQKIFNETEADLSGISEGEKGD
キイロショウジョウバエ Serpin 1	246	LSALEEKLVGFARP----LVAKLEVYLKLPKFRIEERDELKETLEKLGIRELFTDK-SDSLGLFADKSGG
フタホシコオロギ	275	LERLEAGLDQLDLN--NLTPGFGEVILSLPKIXIESKYNLKEKLEKLGITELFNPS-ADLSGISEHN--L
ハマダラカ Serpin	315	KVSKVVHKAFIEVNEEGTEAAAAATGMVMMTCAMIMYP---MFTADHPFLYALKDSQGNILFIICKILKV--
ネッタイシマカ Serpin 4	310	KVSKVVHKAFIEVNEEGAEEAAATGMIMMRCMIHP---YFTVDHPFLYILKQNE-QMFFIGRMNQI--
コクヌストモドキ Serpin 20	326	IIDKVVQKDFIDVNEEGVEAAAAATYVVIVGPYSANQPKNFVADHPFIEYIKVKD-LIVFAGRVTEPKV
チャイロコメノゴミムシダマシ Serpin 1	326	IIVSQVAQKTFIDVSEEGVEAAAAATFVVVGVPTSALNVSPKNFNADHPFIEYIKVKD-TIIFAGRVTDPNH
キイロショウジョウバエ Serpin 1	310	KVSVSHKAFIEVNEEGAEEAGATSVAVTNRAGFSTF---LMADHPFAEVIRNAN-TIYFQGRVVSF--
フタホシコオロギ	340	YVDEVVQKTFIGVDERGTEAAVATGVNYQSYAAYTIE---EFNADHPFLIIEKDN-TILFGRVYNPLN

図 S1-4 ( つづき ). (G) フタホシコオロギのクローン e-39 の部分塩基配列の演繹アミノ酸配列と、他の昆虫種の serine protease inhibitor (Serpin) のアミノ酸配列とのアラインメント。 *Anopheles gambiae* (ハマダラカ)、EF015594.1; *Aedes aegypti* (ネッタイシマカ)、XM\_001658594.1; *Tribolium castaneum* (コクヌストモドキ)、EFA09186; *Tenebrio molitor* (チャイロコメノゴミムシダマシ)、BAI59109; *Drosophila melanogaster* (キイロショウジョウバエ)、CAB63096。

(H-1)



(H-2)

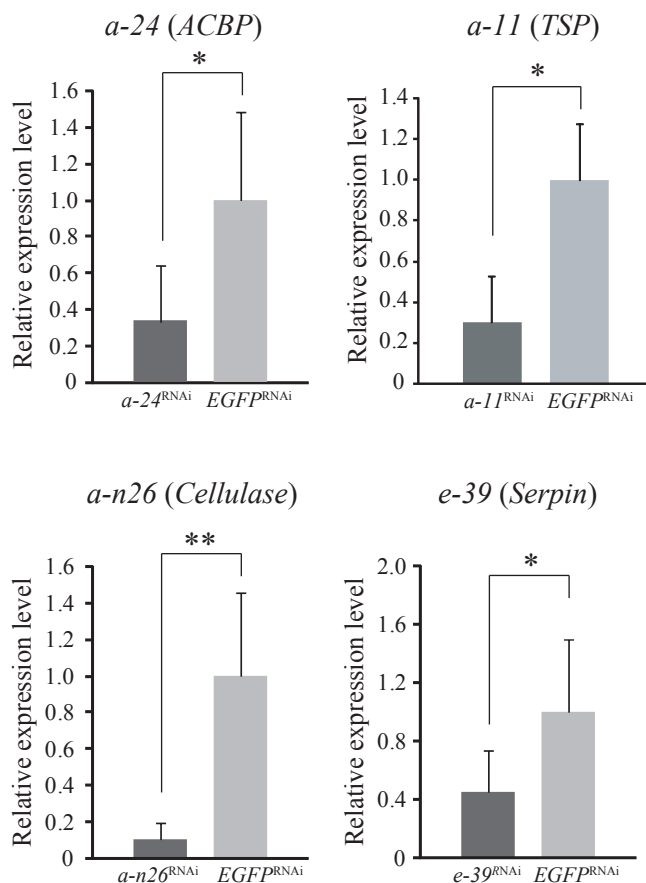


図 S1-4 ( つづき ). (H) サブトラクション法にて得られたクローンのノックダウン個体の調製。(H-1) アガロース電気泳動による調製した dsRNA の確認。M は分子量マーカー (100 bp ladder) を示す。レーン 1 は、クローン a-24 (ACBP) の dsRNA、レーン 2 は、クローン a-11 (TSP) の dsRNA、レーン 3 は、クローン a-n26 (Cellulase) の dsRNA、レーン 4 は、クローン e-39 (Serpin) の dsRNA であり、それぞれ、調製後の dsRNA としてその後の実験に用いた。(H-2) 定量 PCR を用いた、各クローンのノックダウンの確認。フタホシコオロギの成虫オス個体へ、各クローンの dsRNA を投与し、投与後 2 日目における脂肪体をテンプレートとした。EGFP のノックダウン個体における、内在性コントロールとして用いた EF に対する、各クローンの発現量を 1 とした。それぞれ平均値 + S. D. で示した (n = 4)。アスタリスクは、コントロールに対して、有意な差が認められたことを示す (\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.005$ ; Student's *t*-test)。各クローンの dsRNA の投与により、投与後 2 日目に、各クローンの mRNA の発現が大きく抑制された。

# S1-5 RNA-seq 解析により得られた、OBP および CSP をコードする候補遺伝子についてのノックダウン個体の調製

- OBP および CSP をコードする候補遺伝子についての dsRNA の調製 ( 図 S1-5 (A))
- AKHR と、OBP および CSP をコードする候補遺伝子についてのダブルノックダウン個体の調製 ( 図 S1-5 (B、C))

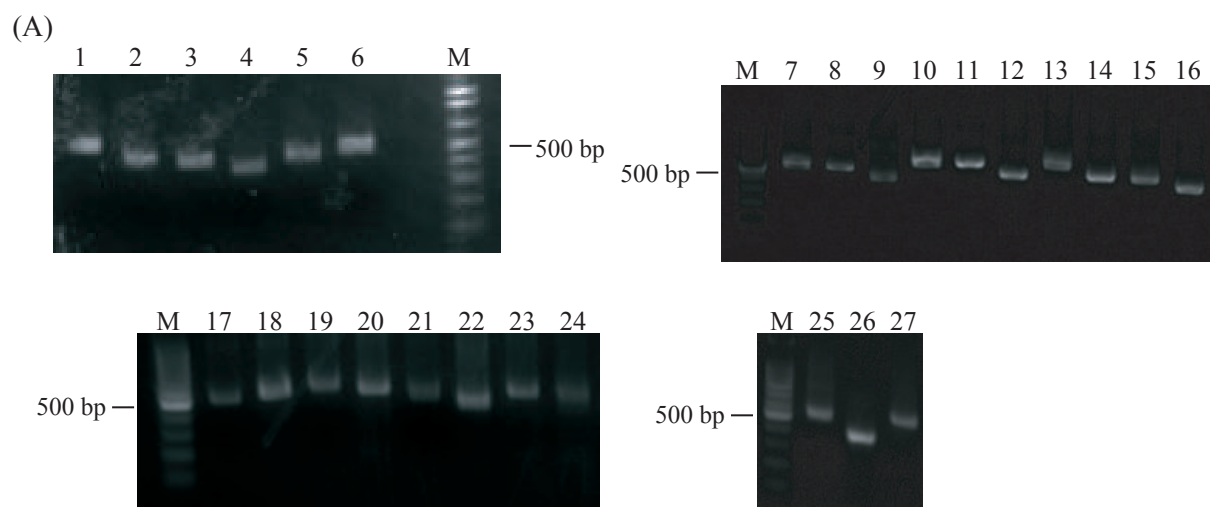
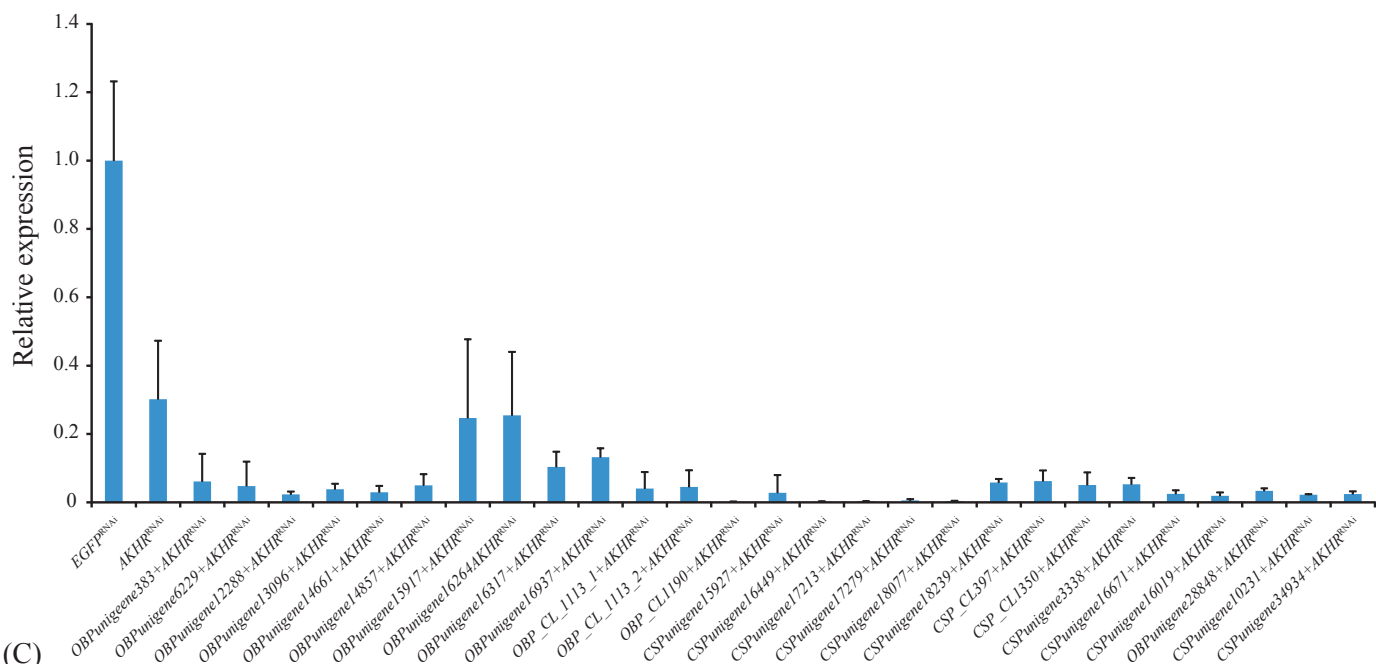


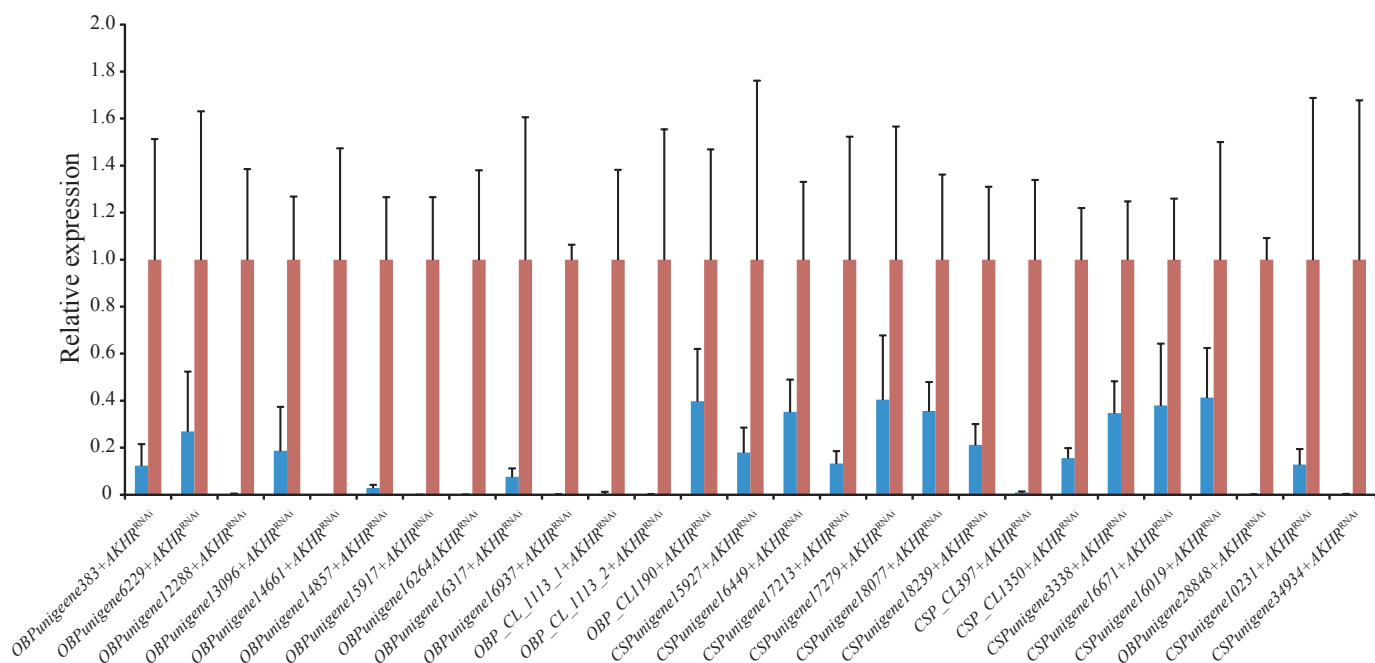
図 S1-5. RNA-seq 解析により得られた、OBP および CSP をコードする候補遺伝子についてのノックダウン個体の調製。(A) アガロース電気泳動による調製した dsRNA の確認。M は分子量マーカを示す。

レーン 1 は、OBPunigene383 の dsRNA、レーン 2 は、OBPunigene6229 の dsRNA、  
 レーン 3 は、OBPunigene12288 の dsRNA、レーン 4 は、OBPunigene13096 の dsRNA、  
 レーン 5 は、OBPunigene14661 の dsRNA、レーン 6 は、OBPunigene14857 の dsRNA、  
 レーン 7 は、OBPunigene15913 の dsRNA、レーン 8 は、OBPunigene16264 の dsRNA、  
 レーン 9 は、OBPunigene16317 の dsRNA、レーン 10 は、OBPunigene16937 の dsRNA、  
 レーン 11 は、OBP\_CL1113\_1 の dsRNA、レーン 12 は、OBP\_CL1113\_2 の dsRNA、  
 レーン 13 は、OBP\_CL1190 の dsRNA、レーン 14 は、CSPunigene15927 の dsRNA、  
 レーン 15 は、CSPunigene16449 の dsRNA、レーン 16 は、CSPunigene17213 の dsRNA、  
 レーン 17 は、CSPunigene17279 の dsRNA、レーン 18 は、CSPunigene18077 の dsRNA、  
 レーン 19 は、CSPunigene18239 の dsRNA、レーン 20 は、CSP\_CL397 の dsRNA、  
 レーン 21 は、CSP\_CL1350 の dsRNA、レーン 22 は、CSPunigene3338 の dsRNA、  
 レーン 23 は、CSPunigene16671 の dsRNA、レーン 24 は、CSPunigene16019 の dsRNA、  
 レーン 25 は、OBPunigene28848 の dsRNA、レーン 26 は、CSPunigene10231 の dsRNA、  
 レーン 27 は、CSPunigene34934 の dsRNA であり、それぞれ、調製後の dsRNA としてその後の実験に  
 用いた。AKHR-dsRNA は、S1-1 と同様の方法にて調製した。

(B)



(C)



S1-5 (つづき). (B、C) 定量 PCR を用いた、AKHR と、OBP および CSP の候補遺伝子についてのノックダウンの確認。フタホシコオロギの成虫オス個体へ、AKHR-dsRNA、および、各候補遺伝子に対応する dsRNA を投与した。(B) 各ノックダウン個体における、AKHR のノックダウンの確認。EGFP のノックダウン個体における、内在性コントロールとして用いた EF に対する、AKHR の発現量を 1 とした。それぞれ平均値 + S. D. で示した (n = 3-4)。(C) 各ノックダウン個体における、各候補遺伝子のノックダウンの確認。EGFP のノックダウン個体における、内在性コントロールとして用いた EF に対する、各候補遺伝子の発現量を 1 とした。それぞれ平均値 + S. D. で示した (n = 3-4)。

- ・フタホシコオロギの  $\Delta 9$ -desaturase、 $\Delta 12$ -desaturase をコードする遺伝子の cDNA のクローニング (図 S1-6 (A、B、C、D、E、F))
- ・フタホシコオロギの  $\Delta 9$ -desaturase、 $\Delta 12$ -desaturase の mRNA の組織別発現解析 (図 S1-2 (G、H))
- ・ $\Delta(9+12)$ -desaturase-dsRNA、 $\Delta 9$ -desaturase-dsRNA と  $\Delta 12$ -desaturase-dsRNA の調製、および、各 dsRNA の投与によるノックダウン個体の調製 (図 S1-2 (I))

図 S1-6. (A) フタホシコオロギ  $\Delta 9$ -desaturase をコードする遺伝子の cDNA の全長塩基配列と演繹アミノ酸配列。他の昆虫種の  $\Delta 9$ -desaturase との相同性をもとに縮重プライマーを作製し、degenerate PCR により、 $\Delta 9$ -desaturase をコードする遺伝子の cDNA の部分塩基配列を取得した。得られた部分塩基配列をもとに、5'-、3'-RACE 法により全長の cDNA を取得した。下線部はポリ A 付加シグナルを示す。また、赤色で示した部分塩基配列は、後述する、 $\Delta(9+12)$ -desaturase-dsRNA の調製の鋳型とした配列である。青色で示した部分塩基配列は、後述する、 $\Delta 9$ -desaturase-dsRNA の調製の鋳型とした配列である。

(B)

```

      10      20      30      40      50      60      70      80      90     100
GGCAGACAGCACGCTCAGCCCTGCGCGTCAACTCCGCGCGCGGACGGTCGCCCAAGGAACAGACCCCGCGATGGATCTCAACGAGGAAAGCGCGCCAG
                                     M D L N E E S A P S

      110     120     130     140     150     160     170     180     190     200
CGGGGTCTCTTTCGAAGAGGATGTGCCTGAGCAGGAAGCCAAGATGGCGAACGGAGGCGCGAAGAAGGCAAGAACTCGAAGAACCCTACCGGCTCGAA
G V L F E E D V P E Q E A K M A N G G P K K G K K L E E P Y R L E

      210     220     230     240     250     260     270     280     290     300
ATTGGTATGGTTCAATGTCTCTGTTTGTCTCCTCCATACTGGTGCATTGTACGGTGATATCTCATCTTTGCATCTGCCAAAATCTACACAACATTAT
I V W F N V L W F V L L H T G A L Y G V Y L I F A S A K I Y T T L

      310     320     330     340     350     360     370     380     390     400
ATGGCTTCTTGCTGTGCGAACTGTCCCTGCTGAGCATCACCGCGGGCGTCCACCGCCTGTGGGCCCATCGCGCCTACAAGGCCAAGTGGCCCTGCGGCT
Y G F L L C E L S L L S I T A G V H R L W A H R A Y K A K W P L R L

      410     420     430     440     450     460     470     480     490     500
CACCTCATGATCCTCAACCTGCTGGCGTACCAGAACTCCATCTACGAGTGGGCGCGGACCAACCGGTGCACCACAAGTTCAGCGAGACCAACGCGGAC
T L M I L N L L A Y Q N S I Y E W A R D H R V H H K F S E T N A D

      510     520     530     540     550     560     570     580     590     600
CCYGTGAACGCCAAGCGCGGCTTCTTCTTCTCGCACGTGGGCTGGCNGCTGTGCGCAAGCAYCCGAGGTGMGCGCYAARGGCGGCGCATCGACCTCA
X V N A K R G F F F S H V G W X L C R K X P E V X X X G G R I D L

      610     620     630     640     650     660     670     680     690     700
GCGACCTGGAGCGCGACCCCATCGTCATGTTCCAGAAGAGACATTATTACAAATTTGGTCCGTTTGCTTCCTTCGTGATTCCAACCTCTCATTCTATGTA
S D L E R D P I V M F Q K R H Y Y K L V P F A S F V I P T L I P M Y

      710     720     730     740     750     760     770     780     790     800
TTTCTGGGGAGAGACGCTGTCTAATTCTTGGTATGTGGCGACTATGTTCCGATATTGCCTCTCTCTCAACCTTACATGGCTCGTCAACAGTGGCGCTCAC
F W G E T L S N S W Y V A T M F R Y C L S L N L T W L V N S A A H

      810     820     830     840     850     860     870     880     890     900
ATGTGGGGCAACAAGCCATATGACAAGAATCAATCCTGTTGAAAACCTTGCTGTGCGCATTGGAAGCTTGGGGAGGGATGGCATAACTTCCACCACG
M W G N K P Y D K N I N P V E N L A V A I G S L G E G W H N F H H

      910     920     930     940     950     960     970     980     990     1000
TTTTCCCTTGGGACTACAAGACATCAGAACTCGGCAACTACAGCCTCAATTTACAAATGCCTTCATCGACCTGGCTGCTCCTTGGGTTGGCGTACGA
V F P W D Y K T S E L G N Y S L N F T N A F I D L A V L L G L A Y D

      1010    1020    1030    1040    1050    1060    1070    1080    1090    1100
CCTCAAGACCGTCCAGTCTCTATGATCAAGACTCGCGTAGGACGCGACCGGTGATGGCAGCCACGATGTGTGGGGTTGGGGAGACAAAGATCTCCGAAA
L K T V P V S M I K T R V G R T G D G S H D V W G W G D K D L P K

      1110    1120    1130    1140    1150    1160    1170    1180    1190    1200
GAACTTGCGATCAAACATATGATCGAAAACAGGAAACGGAGTAGTGTAAATGCAACAAAACCGCACCATATCAAATTTCTGTGACTGTGAAACATCCAT
E L A D Q T M I E N R K T E *

      1210    1220    1230    1240    1250    1260    1270    1280    1290    1300
CATTGTGTCAACCAAGAAGTGTAGAATATTATTGTTGTATGGTGTGGATTGACAAATGCTGAAGACTCAGAGTTGTACAAGGGAGGATGAAAAACA

      1310    1320    1330    1340    1350    1360    1370    1380    1390    1400
TCTTTGCGCCCTCATTATTAATTGTGATATTAATAATAGTTTGTGCAACGAGAAGTTAACGTCAGCTATGAGGGTAAGGTGGCAAAGTGAAGGTGGTTCGG

      1410    1420    1430    1440    1450    1460    1470    1480    1490    1500
TGACGAAATACTTTTTAAGATATTATCAACAATTAATTCATTGTATTCTTATGAATGTTTGACTGACGTTATACGTTTCTAATGTATGTAA

      1510    1520    1530    1540    1550    1560
TTTATAATAAAGAAATTGTGTGCAACTCCAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

```

図 S1-6 ( つづき ). (B) フタホシコオロギ  $\Delta 12$ -desaturase をコードする遺伝子の cDNA の全長塩基配列と演繹アミノ酸配列。他の昆虫種の  $\Delta 12$ -desaturase との相同性をもとに縮重プライマーを作製し、degenerate PCR により、 $\Delta 12$ -desaturase をコードする遺伝子の cDNA の部分塩基配列を取得した。得られた部分塩基配列をもとに、5'-、3'-RACE 法により全長の cDNA を取得した。下線部はポリ A 付加シグナルを示す。また、緑色で示した部分塩基配列は、後述する、 $\Delta 12$ -desaturase-dsRNA の調製の鋳型とした配列である。



(C)

キイロショウジョウバエ	1	MPPNAQAGAQSSD---SLIAASAAADAGSQPTKLQEDS	1	GVLFESW---VEITDGGGVKIDIT-VMKKAERKRRLKLVWRNLTIVGWFHLAALYGAYLWVTS
イエバエ	1	---MPPNAAPPTPALTESLLASANDGAN---PKVLHEAT	1	---ETIDGGGVKIDIE-RLKKAERKRRLKLVWRNLTIAEGYHLAALYGAYLWVTS
ネッタイエカ	1	---MAPNATVEA	1	---ETIDGGGVSKDIT-TLKRAERKRRLKLVWRNLTIAEGYHLAALYGAYLWVTS
オオタバコガ	1	---MAPNISEDV	1	---AATPDLLALSTPQVQKADNRKQL---VWRNLTIAFAYLHLAALYGAYLWVTS
オオカバマダラ	1	---MAPN-SSDA	1	---AATPDLLALPNTIQQADSYPRKY---VWRNLTIAFAYLHLAALYGAYLWVTS
フタホシコオロギ	1	---MAPNITSAP	1	---GVLFEGDTIGSAAKDFOAGINABEVKKPREPYRRQI-VWRNLTIAFAYLHLAALYGAYLWVTS
ヨーロッパイエコオロギ	1	---MAPNITSAP	1	---GVLFEGDTIGPAAKDQAEVNAEAKKKPREPYRRQI-VWRNLTIAFAYLHLAALYGAYLWVTS
キイロショウジョウバエ	97	KWQCCHLMYFITYVSGLCITAGAHRLWAHRSYKAKWPLRVILVIFNTAFQDANHWWARDHRVHHKYS	97	ETIDGGGVKIDIE-RLKKAERKRRLKLVWRNLTIAEGYHLAALYGAYLWVTS
イエバエ	94	KWQCHLMYFITYVSGLCITAGAHRLWAHRSYKAKWPLRVILVIFNTAFQDANHWWARDHRVHHKYS	94	ETIDGGGVSKDIT-TLKRAERKRRLKLVWRNLTIAEGYHLAALYGAYLWVTS
ネッタイエカ	69	KWQCHLMYFITYVSGLCITAGAHRLWAHRSYKAKWPLRVILVIFNTAFQDANHWWARDHRVHHKYS	69	ETIDGGGVSKDIT-TLKRAERKRRLKLVWRNLTIAEGYHLAALYGAYLWVTS
オオタバコガ	67	KWQCHLMYFITYVSGLCITAGAHRLWAHRSYKAKWPLRVILVIFNTAFQDANHWWARDHRVHHKYS	67	ETIDGGGVSKDIT-TLKRAERKRRLKLVWRNLTIAEGYHLAALYGAYLWVTS
オオカバマダラ	66	KWQCHLMYFITYVSGLCITAGAHRLWAHRSYKAKWPLRVILVIFNTAFQDANHWWARDHRVHHKYS	66	ETIDGGGVSKDIT-TLKRAERKRRLKLVWRNLTIAEGYHLAALYGAYLWVTS
フタホシコオロギ	73	KWQCHLMYFITYVSGLCITAGAHRLWAHRSYKAKWPLRVILVIFNTAFQDANHWWARDHRVHHKYS	73	ETIDGGGVSKDIT-TLKRAERKRRLKLVWRNLTIAEGYHLAALYGAYLWVTS
ヨーロッパイエコオロギ	73	KWQCHLMYFITYVSGLCITAGAHRLWAHRSYKAKWPLRVILVIFNTAFQDANHWWARDHRVHHKYS	73	ETIDGGGVSKDIT-TLKRAERKRRLKLVWRNLTIAEGYHLAALYGAYLWVTS
キイロショウジョウバエ	199	GVDSDDHRAPIILMFQKKYYLILMPLACFIPITVVPVMAWGSFMMNAFVATMFRWCFILNV	199	ETIDGGGVSKDIT-TLKRAERKRRLKLVWRNLTIAEGYHLAALYGAYLWVTS
イエバエ	196	GVDSDDHRAPIILMFQKKYYLILMPLACFIPITVVPVMAWGSFMMNAFVATMFRWCFILNV	196	ETIDGGGVSKDIT-TLKRAERKRRLKLVWRNLTIAEGYHLAALYGAYLWVTS
ネッタイエカ	171	GVDSDDHRAPIILMFQKKYYLILMPLACFIPITVVPVMAWGSFMMNAFVATMFRWCFILNV	171	ETIDGGGVSKDIT-TLKRAERKRRLKLVWRNLTIAEGYHLAALYGAYLWVTS
オオタバコガ	169	GVDSDDHRAPIILMFQKKYYLILMPLACFIPITVVPVMAWGSFMMNAFVATMFRWCFILNV	169	ETIDGGGVSKDIT-TLKRAERKRRLKLVWRNLTIAEGYHLAALYGAYLWVTS
オオカバマダラ	168	GVDSDDHRAPIILMFQKKYYLILMPLACFIPITVVPVMAWGSFMMNAFVATMFRWCFILNV	168	ETIDGGGVSKDIT-TLKRAERKRRLKLVWRNLTIAEGYHLAALYGAYLWVTS
フタホシコオロギ	175	GVDSDDHRAPIILMFQKKYYLILMPLACFIPITVVPVMAWGSFMMNAFVATMFRWCFILNV	175	ETIDGGGVSKDIT-TLKRAERKRRLKLVWRNLTIAEGYHLAALYGAYLWVTS
ヨーロッパイエコオロギ	175	GVDSDDHRAPIILMFQKKYYLILMPLACFIPITVVPVMAWGSFMMNAFVATMFRWCFILNV	175	ETIDGGGVSKDIT-TLKRAERKRRLKLVWRNLTIAEGYHLAALYGAYLWVTS
キイロショウジョウバエ	301	HHVFPWDYKTAEFCKMSLNFTTAFIDFFFAKIGWAYDLKTVSDTIKKRVKRTGDGSHATWGWGDVDP	301	ETIDGGGVSKDIT-TLKRAERKRRLKLVWRNLTIAEGYHLAALYGAYLWVTS
イエバエ	298	HHVFPWDYKTAEFCKMSLNFTTAFIDFFFAKIGWAYDLKTVSDTIKKRVKRTGDGSHATWGWGDVDP	298	ETIDGGGVSKDIT-TLKRAERKRRLKLVWRNLTIAEGYHLAALYGAYLWVTS
ネッタイエカ	273	HHVFPWDYKTAEFCKMSLNFTTAFIDFFFAKIGWAYDLKTVSDTIKKRVKRTGDGSHATWGWGDVDP	273	ETIDGGGVSKDIT-TLKRAERKRRLKLVWRNLTIAEGYHLAALYGAYLWVTS
オオタバコガ	271	HHVFPWDYKTAEFCKMSLNFTTAFIDFFFAKIGWAYDLKTVSDTIKKRVKRTGDGSHATWGWGDVDP	271	ETIDGGGVSKDIT-TLKRAERKRRLKLVWRNLTIAEGYHLAALYGAYLWVTS
オオカバマダラ	270	HHVFPWDYKTAEFCKMSLNFTTAFIDFFFAKIGWAYDLKTVSDTIKKRVKRTGDGSHATWGWGDVDP	270	ETIDGGGVSKDIT-TLKRAERKRRLKLVWRNLTIAEGYHLAALYGAYLWVTS
フタホシコオロギ	277	HHVFPWDYKTAEFCKMSLNFTTAFIDFFFAKIGWAYDLKTVSDTIKKRVKRTGDGSHATWGWGDVDP	277	ETIDGGGVSKDIT-TLKRAERKRRLKLVWRNLTIAEGYHLAALYGAYLWVTS
ヨーロッパイエコオロギ	277	HHVFPWDYKTAEFCKMSLNFTTAFIDFFFAKIGWAYDLKTVSDTIKKRVKRTGDGSHATWGWGDVDP	277	ETIDGGGVSKDIT-TLKRAERKRRLKLVWRNLTIAEGYHLAALYGAYLWVTS

(D)

ヨーロッパイエコオロギ	1	MDLNEESAPSGVLFEEVDVAREQEAQMANGGPKKGGKLEEPYRLIEIVWFNVLWF---	1	VLLHAG-ALYGVYLIIFASAKIYTTLYGFLICE
フタホシコオロギ	1	MDLNEESAPSGVLFEEVDVAREQEAQMANGGPKKGGKLEEPYRLIEIVWFNVLWF---	1	VLLHAG-ALYGVYLIIFASAKIYTTLYGFLICE
コクヌストモドキ	1	---MSAQITIT-TETTTQNAQFPQQYHWRNLTIAEGYHLAALYGAYLWVTS	1	VLLHAG-ALYGVYLIIFASAKIYTTLYGFLICE
ヨーロッパイエコオロギ	84	LSLSLSITAGVHRLWAHRAKAYKARLPLRLMLCIPOTLSLONHLYDWATYHRVHHKFFVD	84	CRKHPE
フタホシコオロギ	84	LSLSLSITAGVHRLWAHRAKAYKARLPLRLMLCIPOTLSLONHLYDWATYHRVHHKFFVD	84	CRKHPE
コクヌストモドキ	65	IAHQGVTAGSHRLWAHRAKAYKARLPLRLMLCIPOTLSLONHLYDWATYHRVHHKFFVD	65	CRKHPE
ヨーロッパイエコオロギ	167	VRAKGGRIDLSDLERDPIVMFQKRHHYYKLVPFV-SFVPIPTLIPMYFWGETLSNSWYVST	167	FRYCLSLNLTWLVNSAAHMGWGN
フタホシコオロギ	167	VRAKGGRIDLSDLERDPIVMFQKRHHYYKLVPFV-SFVPIPTLIPMYFWGETLSNSWYVST	167	FRYCLSLNLTWLVNSAAHMGWGN
コクヌストモドキ	148	VEDKYYKSIDFSDLDHADSIVMTIQKKYYHYHTFFAFVIGVYLPALIPWYFWGFNF	148	WTAFFVATMFRYCACTNHTFLVNSWAHMYGS
ヨーロッパイエコオロギ	248	KPYDKNNINP--VENLAVAIGSLGEGWHNFHHVFPWDYKTSBELGNYSLNFTNAPIDLA	248	VSMIKTRVGR-
フタホシコオロギ	248	KPYDKNNINP--VENLAVAIGSLGEGWHNFHHVFPWDYKTSBELGNYSLNFTNAPIDLA	248	VSMIKTRVGR-
コクヌストモドキ	230	KPYDKNNINP--VENLAVAIGSLGEGWHNFHHVFPWDYKTSBELGNYSLNFTNAPIDLA	230	VSMIKTRVGR-
ヨーロッパイエコオロギ	326	-----TGDGSHDV-----WGWGDKDLPKELADQTMENRKTE-	326	-----VSMIKTRVGR-
フタホシコオロギ	326	-----TGDGSHDV-----WGWGDKDLPKELADQTMENRKTE-	326	-----VSMIKTRVGR-
コクヌストモドキ	314	KFDKIDILNVDDHEDMLWGWGSDMAKEEMN-YVKENHRKED	314	-----VSMIKTRVGR-

図 S1-6 ( つづき ). (C) フタホシコオロギ  $\Delta 9$ -desaturase をコードする cDNA の塩基配列の演繹アミノ酸配列と他の昆虫種の  $\Delta 9$ -desaturase のアミノ酸配列とのアラインメント。 *Drosophila melanogaster* ( キイロショウジョウバエ ), CA079269; *Musca domestica* ( イエバエ ), AAN31393.1; *Culex quinquefasciatus* ( ネッタイエカ ), EDS41415.1; *Helicoverpa zea* ( オオタバコガ ), AAF81790.2; *Danaus plexippus* ( オオカバマダラ ), EHJ70677.1; *Acheta domesticus* ( ヨーロッパイエコオロギ ), AAK25796.1. (D) フタホシコオロギ  $\Delta 12$ -desaturase をコードする cDNA の塩基配列の演繹アミノ酸配列と他の昆虫種の  $\Delta 12$ -desaturase のアミノ酸配列とのアラインメント。 *A. domesticus* ( ヨーロッパイエコオロギ ), ABY26957.1; *Tribolium castaneum* ( コクヌストモドキ ), NP\_001137206。



(E)

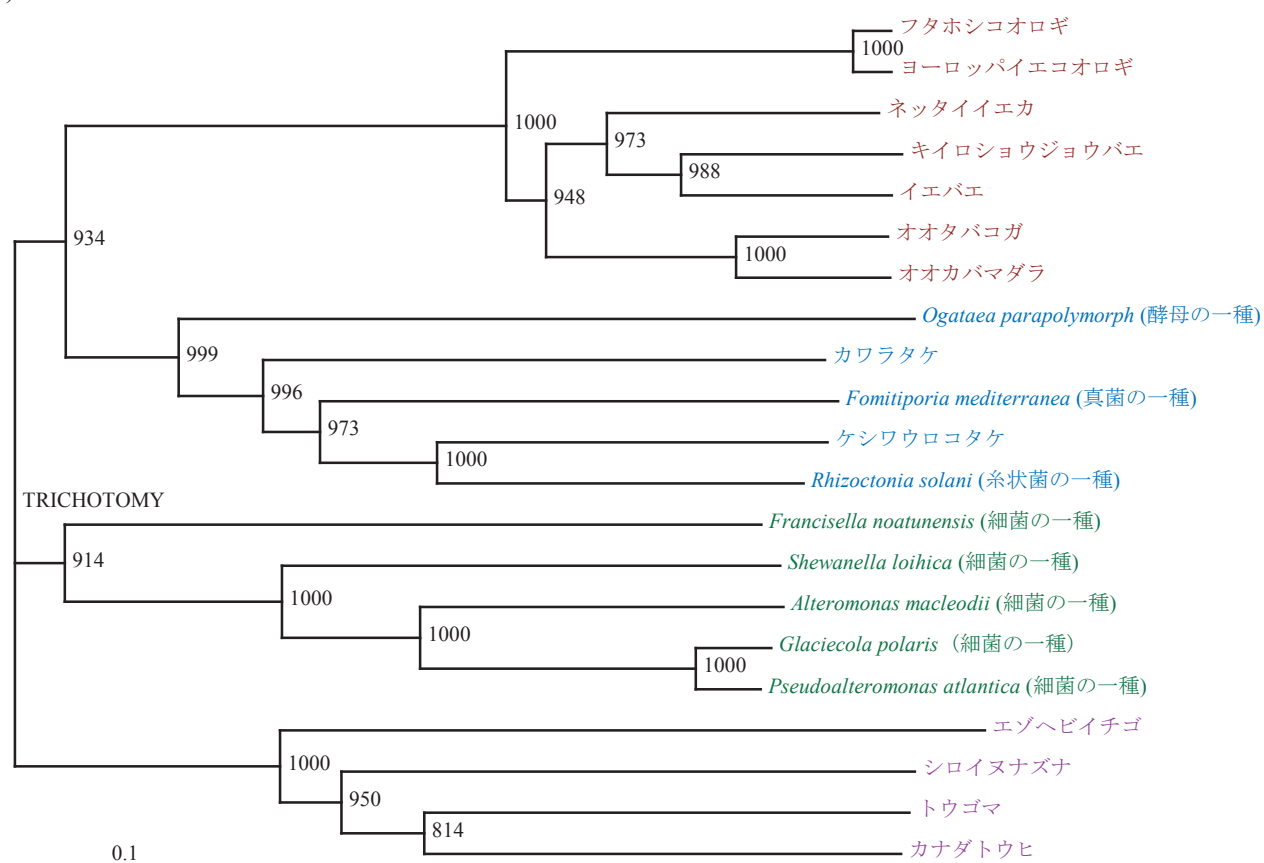


図 S1-6 ( つづき ). (E) フタホシコオロギ  $\Delta 9$ -desaturase をコードする遺伝子の cDNA の塩基配列の演繹アミノ酸配列と他の生物種の  $\Delta 9$ -desaturase のアミノ酸配列をもとに作成した分子系統樹。

系統樹作成は近隣結合法を用いた。バーは、サイトあたりのアミノ酸置換数を示す。

なお、昆虫を赤色にて、真菌類を青色にて、微生物を緑色にて、植物を紫色にて示した。

*Acheta domesticus* (ヨーロッパイエコオロギ), AAK25796.1; *Culex quinquefasciatus* (ネッタイエカ), EDS41415.1; *Drosophila melanogaster* (キイロショウジョウバエ), CA079269; *Musca domestica* (イエバエ), AAN31393.1; *Helicoverpa zea* (オオタバコガ), AAF81790.2; *Danaus plexippus* (オオカバマダラ), EHJ70677.1; *Ogataea parapolymorph* (酵母の一種), ESW97365.1; *Trametes versicolor* (カワラタケ), EIW55454.1; *Fomitiporia mediterranea* (真菌の一種), EJD00826.1; *Punctuliria strigosozonata* (ケシワウロコタケ), EIN08842.1; *Rhizoctonia solani* (糸状菌の一種), CCO33298.1; *Francisella noatunensis* (細菌の一種), WP\_014714685.1; *Shewanella loihica* (細菌の一種), WP\_011863945.1; *Alteromonas macleodii* (細菌の一種), WP\_014999556.1; *Glaciecola polaris* (細菌の一種), WP\_007106688; *Pseudoalteromonas atlantica* (細菌の一種), WP\_011576728.1; *Fragaria vesca* (エゾヘビイチゴ), XP\_004305981.1; *Arabidopsis thaliana* (シロイヌナズナ), AAF82164.1; *Ricinus communis* (トウゴマ), EEF44805.1; *Picea glauca* (カナダトウヒ), AAM12238.1。

(F)

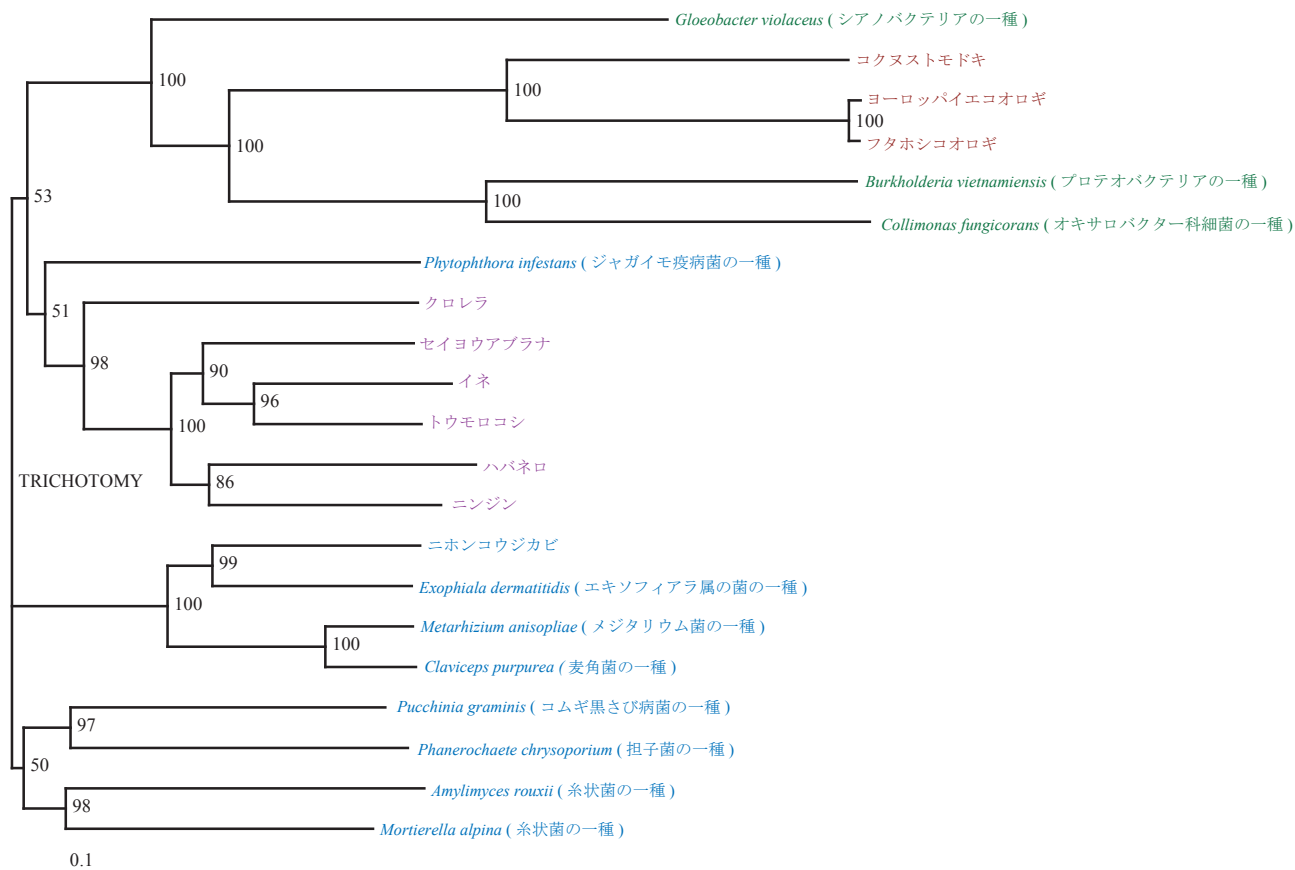


図 S1-6 ( つづき ). (F) フタホシコオロギ  $\Delta 12$ -desaturase をコードする遺伝子の cDNA の塩基配列の演繹アミノ酸配列と他の生物種の  $\Delta 12$ -desaturase のアミノ酸配列をもとに作成した分子系統樹。

系統樹作成は近隣結合法を用いた。バーは、サイトあたりのアミノ酸置換数を示す。

なお、昆虫を赤色にて、真菌類を青色にて、微生物を緑色にて、植物を紫色にて示した。

*Gloeobacter violaceus* ( シアノバクテリアの一種 ), AAF61413.1; *Tribolium castaneum* ( コクヌストモドキ ), NP\_001137206; *Acheta domesticus* ( ヨーロッパイエコオロギ ), ABY26957.1; *Burkholderia vietnamiensis* ( プロテオバクテリアの一種 ), WP\_021157997; *Collimonas fungicorans* ( オキサロバクター科細菌の一種 ), YP\_004751734.1; *Phytophthora infestans* ( ジャガイモ疫病菌の一種 ), AEQ16445.1; *Chlorella vulgaris* ( クロレラ ), ACF98528.1; *Brassica napus* ( セイヨウアブラナ ), ABG76201.1; *Oryza sativa* ( イネ ), BAC45173.1; *Zea mays* ( トウモロコシ ), NP\_001266540.1; *Capsicum chinense* ( ハバネロ ), CAI48076.2; *Daucus carota* ( ニンジン ), AAO38033.1; *Aspergillus oryzae* ( ニホンコウジカビ ), BAD04850.1; *Exophiala dermatitidis* ( エキソフィアラ属の菌の一種 ), EHY61278.1; *Metarhizium anisopliae* ( メジタリウム菌の一種 ), EFY96606.1; *Claviceps purpurea* ( 麦角菌の一種 ), ABS18716.1; *Puccinia graminis* ( コムギ黒さび病菌の一種 ), ELS31671.1; *Phanerochaete chrysosporium* ( 担子菌の一種 ), ACJ26016.1; *Amylomyces rouxii* ( 糸状菌の一種 ), AAD55982.1; *Mortierella alpina* ( 糸状菌の一種 ), AAL13300.1。

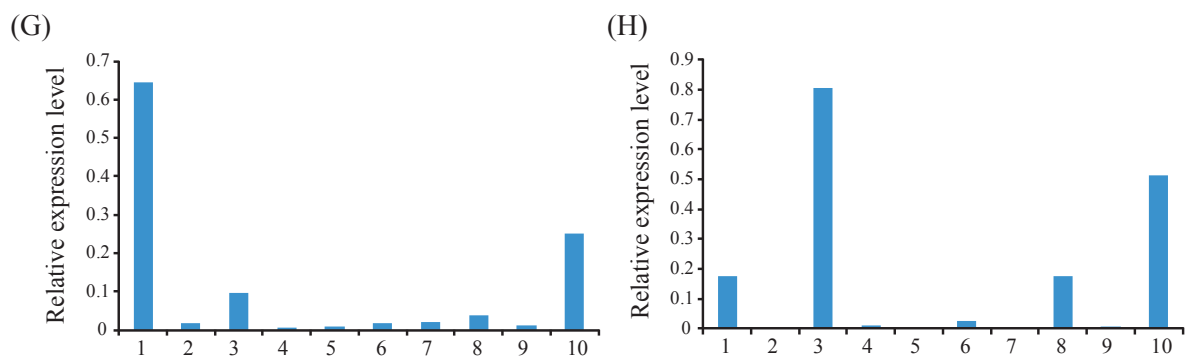


図 S1-6 ( つづき ). (H、I) 定量 PCR を用いたフタホシコオロギの  $\Delta 9$ -desaturase (G)、および  $\Delta 12$ -desaturase (H) の組織別発現解析。フタホシコオロギ成虫個体の各種組織 (1: 脂肪体、2: 前腸、3: 中腸、4: 後腸、5: マルピーギ管、6: 気管、7: 筋肉、8: 精巣、9: 卵巣、10: 神経系) から調製したトータル RNA を用いた。コントロールとして EF (elongation factor) を用いた。縦軸は、(各 desaturase の発現量)/(EF の発現量) とした (n = 1)。フタホシコオロギの  $\Delta 9$ -desaturase は、主に、脂肪体、中腸、および神経系に mRNA の発現が見られ、 $\Delta 12$ -desaturase は、脂肪体、中腸、精巣、および神経系に mRNA の発現が見られた。

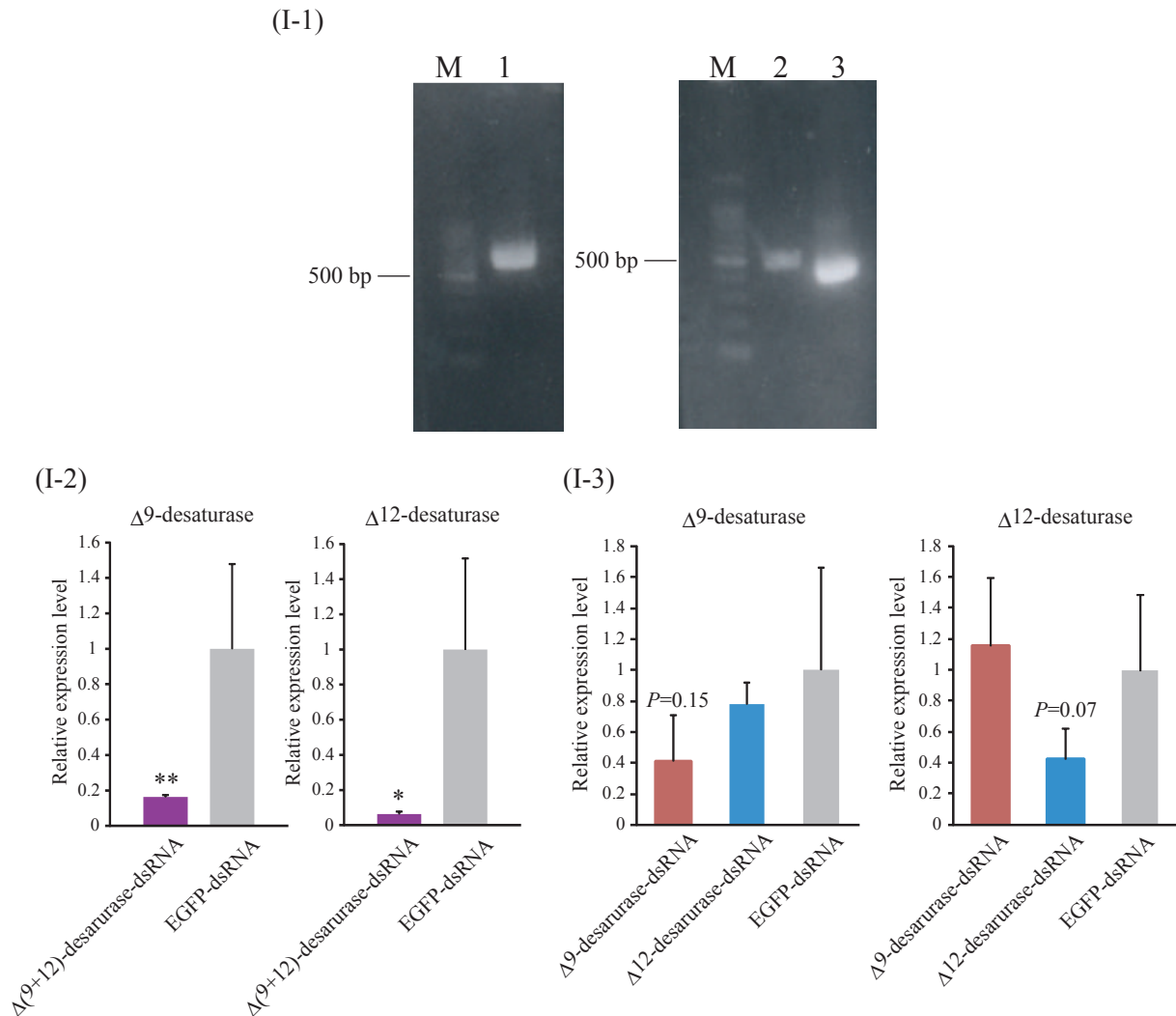


図 S1-6 ( つづき ). (I) フタホシコオロギ  $\Delta 9$ -、 $\Delta 12$ -desaturase のノックダウン個体の調製。(I-1)

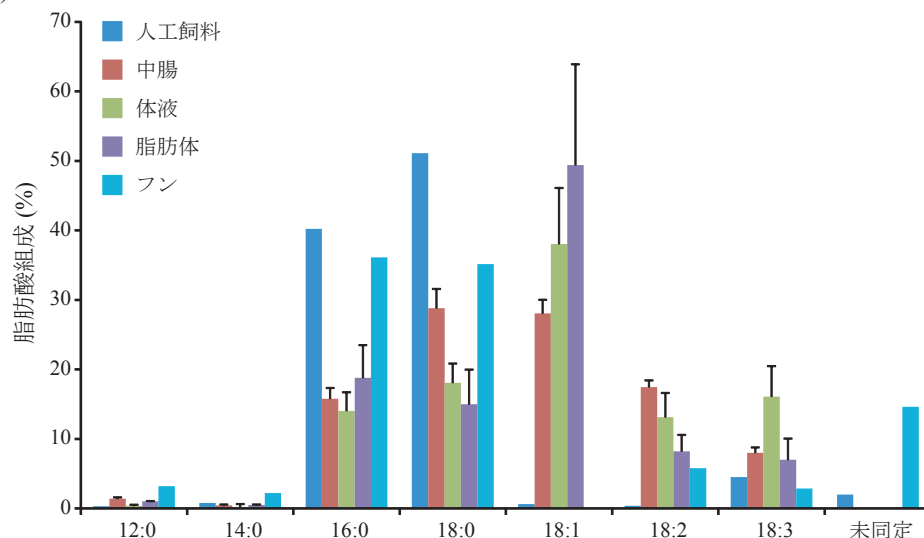
アガロース電気泳動による調製した dsRNA の確認。M は分子量マーカー (100 bp ladder) を示す。

レーン 1 は、図 S1-6 (A) において、赤色で示した、 $\Delta 9$ -desaturase をコードする cDNA の部分塩基配列を鋳型として調製した dsRNA ( $\Delta(9+12)$ -desaturase-dsRNA) である。レーン 2 は、図 S1-6 (A) において、青色で示した、 $\Delta 9$ -desaturase をコードする cDNA の 3' UTR の部分塩基配列を鋳型として調製した dsRNA ( $\Delta 9$ -desaturase-dsRNA) である。レーン 3 は、図 S1-6 (B) において、緑色で示した、 $\Delta 12$ -desaturase をコードする cDNA の 3' UTR の部分塩基配列を鋳型として調製した dsRNA ( $\Delta 12$ -desaturase-dsRNA) である。それぞれ、調製後の dsRNA としてその後の実験に用いた。(I-2、3) 定量 PCR を用いた、

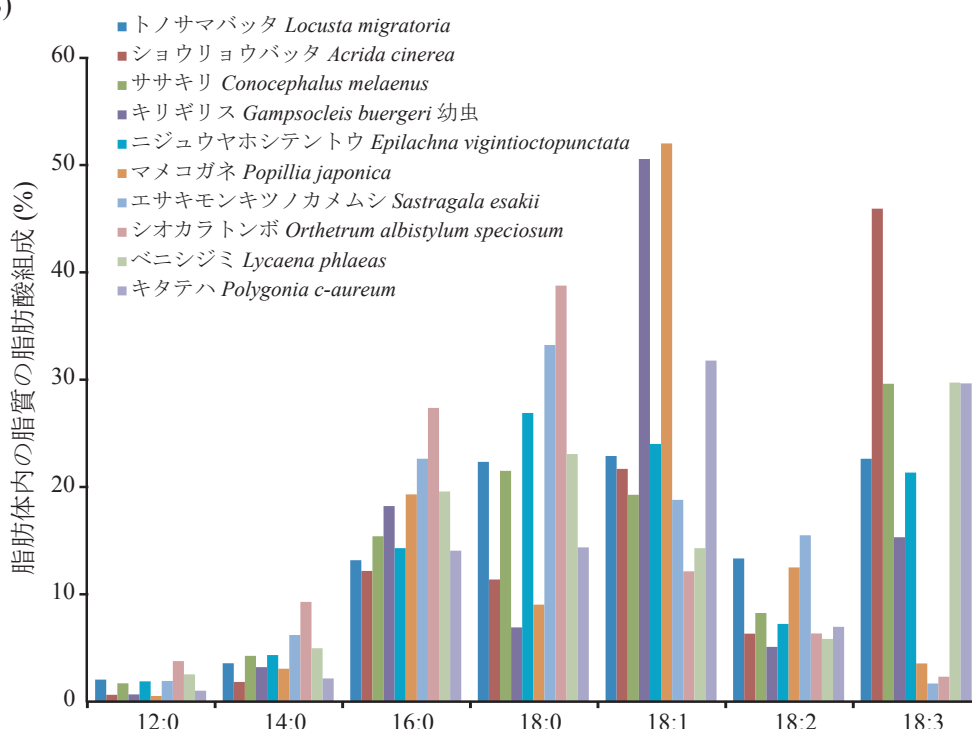
フタホシコオロギ  $\Delta 9$ -、 $\Delta 12$ -desaturase のノックダウンの確認。(I-1) フタホシコオロギの成虫オス個体へ、 $\Delta(9+12)$ -desaturase-dsRNA を投与し、投与後 2 日目における脂肪体をテンプレートとして、 $\Delta 9$ -desaturase (左) と  $\Delta 12$ -desaturase (右) のノックダウンを確認した。EGFP-dsRNA 投与個体における、内在性コントロールとして用いた EF に対する、 $\Delta 9$ -desaturase、または  $\Delta 12$ -desaturase の mRNA の発現量を 1 とした。それぞれ平均値 + S. D. で示した (左 :  $n=6$ 、右 :  $n=3$ )。アスタリスクは、コントロールに対して、有意な差が認められたことを示す (\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.005$ ; Student's  $t$ -test)。(I-2) フタホシコオロギの成虫オス個体へ、 $\Delta 9$ -desaturase-dsRNA、および  $\Delta 12$ -desaturase-dsRNA を投与し、投与後 2 日目における脂肪体をテンプレートとして、 $\Delta 9$ -desaturase (左) と  $\Delta 12$ -desaturase (右) のノックダウンを確認した。EGFP-dsRNA 投与個体における、内在性コントロールとして用いた EF に対する、各 mRNA の発現量を 1 とした。それぞれ平均値 + S. D. で示した ( $n=4$ )。

## S2-5 他の昆虫種における体内の脂肪酸組成の解析 (予備的実験)

(A)



(B)



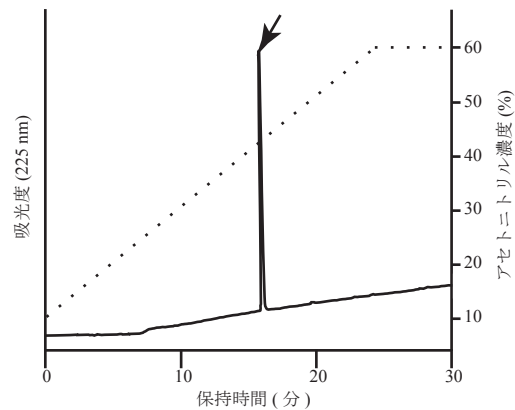
S2-5. 他の昆虫種における体内の脂肪酸組成の解析 (予備的実験)。(A) カイコ幼虫の各組織の脂肪酸組成の解析。カイコ 5 齢 2 日目の幼虫の各組織 (中腸、体液、脂肪体)、人工飼料 (SILKMATE 2S、日本農産工)、およびフンを摘出、回収し、脂質を抽出した。抽出した脂質をけん化した後に、脂肪酸を抽出した。抽出した脂肪酸は、ADAM と反応した後に、HPLC に供した。HPLC のクロマトグラムにて見られた、7 種の脂肪酸 (12:0、14:0、16:0、18:0、18:1、18:2、18:3) の各ピーク面積、および未同定のピーク面積の合計に対する、各ピークの比をグラフに示した。中腸、体液、および脂肪体は、それぞれ平均値 + S. D. で示した (n = 4)。各組織、人工飼料、およびフンの脂肪酸組成の差異は、カイコ幼虫がもつ、人工飼料の消化により生じた脂肪酸の代謝や貯蔵の様式を反映していると考えられる。(B) 東京大学柏キャンパス生命棟付近にて、8 月上旬に採集した、いくつかの昆虫種 (n = 1) の脂肪体内の脂質の脂肪酸組成の解析。各昆虫種の脂肪体を摘出し、脂質を抽出した。抽出した脂質をけん化した後に、脂肪酸を抽出した。抽出した脂肪酸は、ADAM と反応した後に、HPLC に供した。HPLC のクロマトグラムにて見られた、7 種の脂肪酸 (12:0、14:0、16:0、18:0、18:1、18:2、18:3) の各ピーク面積の合計に対する、各ピークの比をグラフに示した。昆虫種間にて、脂肪体内の脂質の脂肪酸組成に差異があることが考えられた。

## S2-1 フタホシコオロギ AKH の合成、および AKH 投与成虫個体の摂食量の解析

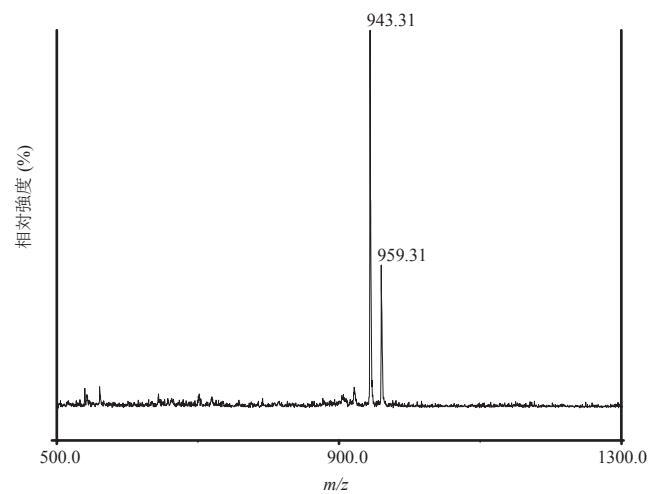
(A-1)

フタホシコオロギ AKH pQVNFSTGW-NH<sub>2</sub>

(A-2)



(A-3)



(B)

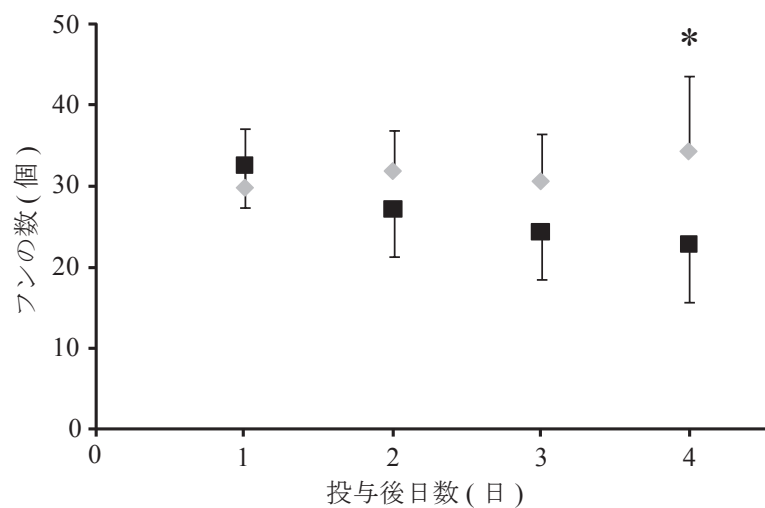


図 S2-1. フタホシコオロギ AKH の合成、精製 (A)、および、AKH を投与した成虫個体の摂食量の解析 (B)。(A-1) フタホシコオロギの AKH のアミノ酸配列。その平均分子質量の理論値は、920.43 である。(A-2) 最終精製段階の逆相 HPLC のクロマトグラム。矢印のピークを分取した。図中の点線は、アセトニトリル濃度を示す。(A-3) 分取したピークの MALDI-TOFMS スペクトル。[M+Na]<sup>+</sup> ( $m/z$  943.31) および [M+K]<sup>+</sup> ( $m/z$  959.31) の由来の検出されたイオンピークが得られた。(B) AKH (黒色) または Ringer 溶液 (灰色) を断続的に投与したフタホシコオロギ成虫メス個体における一日毎の摂食量の解析。成虫脱皮 0 日目のメスに AKH 100 pmol (黒色) または Ringer 溶液 (灰色) を 1 日に 2 回、それぞれ 2  $\mu$ L ずつ連続投与すると同時に、1 日ごとのフンの数を調べ、摂食量の指標とした。フンの数は、平均値  $\pm$  S.D. で示した ( $n=6$ )。アスタリスクは、コントロールに対して、有意な差が認められたことを示す (\* $P < 0.05$ ; Student's  $t$ -test)。

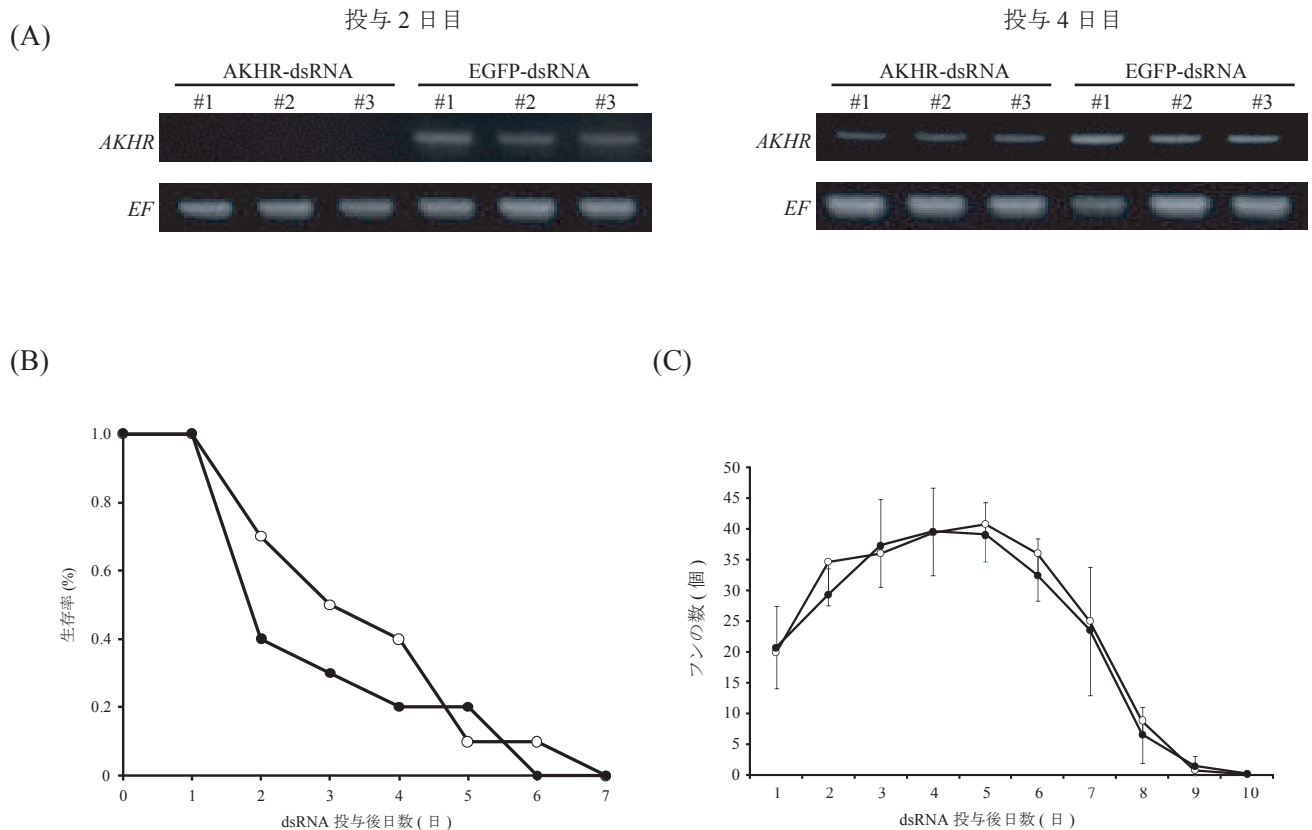


図 S2-2. AKHR のノックダウン終齢幼虫個体における、AKHR のノックダウン効果の確認および摂食行動に関わる表現型の解析。(A) RT-PCR を用いた AKHR のノックダウンの確認。AKHR-dsRNA および EGFP-dsRNA の投与後 2 (左)、4 日目 (右) の終齢幼虫メス個体の脂肪体を RT-PCR のテンプレートとした。# 番号は各群における別々の個体を示す。コントロールとして EF を用いた。AKHR-dsRNA の投与後 2 日目 (左) において AKHR の発現が抑制され、投与後 4 日目 (右) において抑制された発現の回復傾向が見られた。(B) AKHR のノックダウン終齢幼虫個体の絶食耐性の解析。終齢幼虫 0 日目のメスに AKHR-dsRNA (●) または EGFP-dsRNA (○) を投与後、絶食条件下で 1 日ごとの生存率を調べた。終齢幼虫では、AKHR のノックダウン群はコントロール群と比較して絶食耐性に有意な差は認められなかった (Wilcoxon signed-rank test,  $P > 0.05$ ,  $n = 10$ )。 (C) AKHR ノックダウン個体の摂食量の解析。終齢幼虫 0 日目のメスに AKHR-dsRNA (●) または EGFP-dsRNA (○) を投与後、1 日ごとのフンの数を調べ、摂食量の指標とした。フンの数は、平均値  $\pm$  S.D. で示した ( $n = 10$ )。終齢幼虫では、AKHR のノックダウン個体はコントロール個体と比較して摂食量に有意な差は認められなかった (Student's  $t$ -test,  $P > 0.05$ )。

S2-3 フタホシコオロギ通常オス個体における、体液中の脂質および糖質の標準レベルと摂食量との相関関係の解析

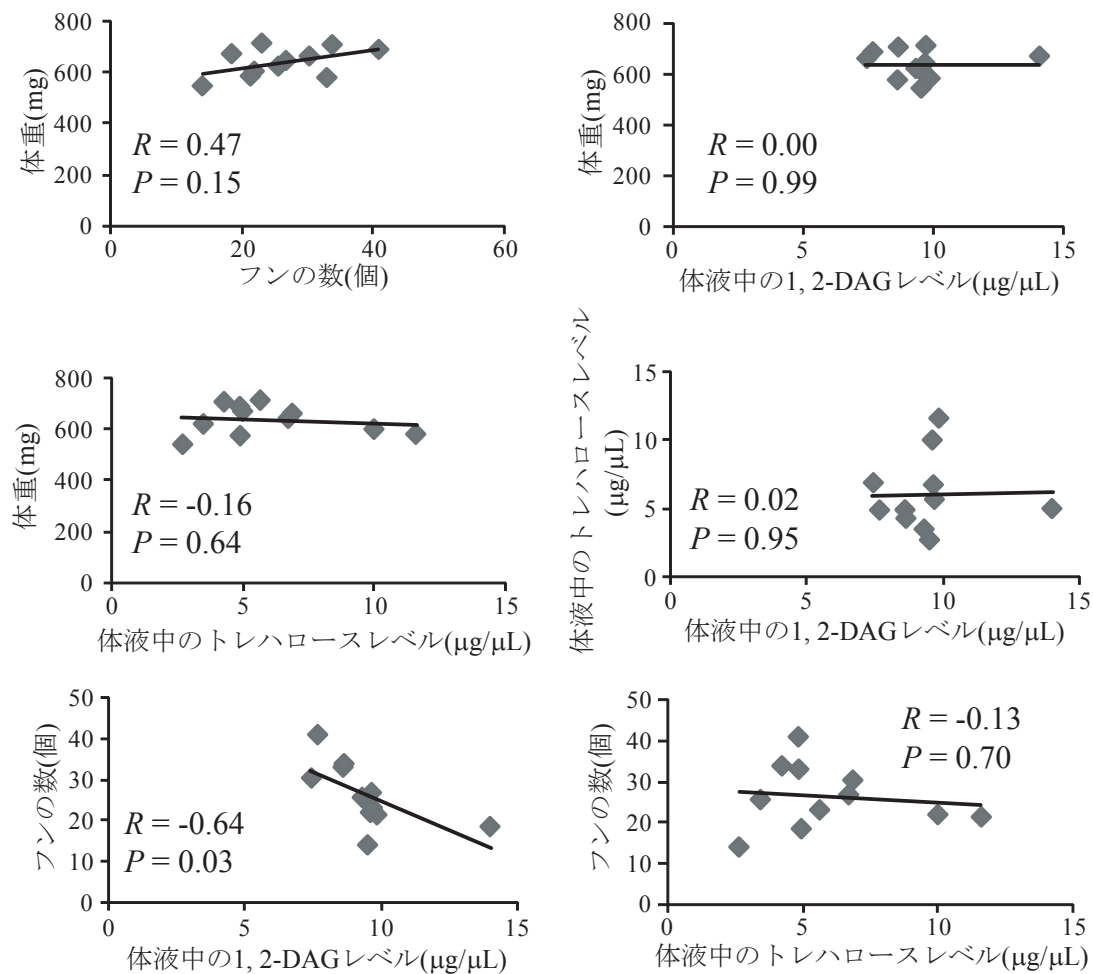
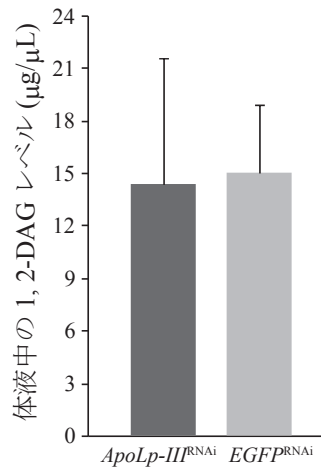


図 S2-3. フタホシコオロギ通常オス個体における、体液中の 1,2-DAG レベルとトレハロースレベル、および摂食量との相関関係の解析。方法としては、11 個体の成虫オスについて、(i) 体重、(ii) 摂食量の指標として、フンの数、(iii) 体液中の 1,2-DAG レベル、(iv) 体液中のトレハロースレベルを一週間計測・定量し、それぞれの平均値同士の組み合わせに関して相関関係を調べた。図における 1 プロットが 1 個体を示す。 $R$  はピアソンの相関係数を示す。その結果、体重と摂食量に正の相関 ( $R = 0.47$ ) が見られた。また、摂食量と体液中の脂質レベルに負の相関 ( $R = -0.64$ ) が見られた。それ以外の組み合わせに関しては、強い相関は見られなかった。



(A)



(B)

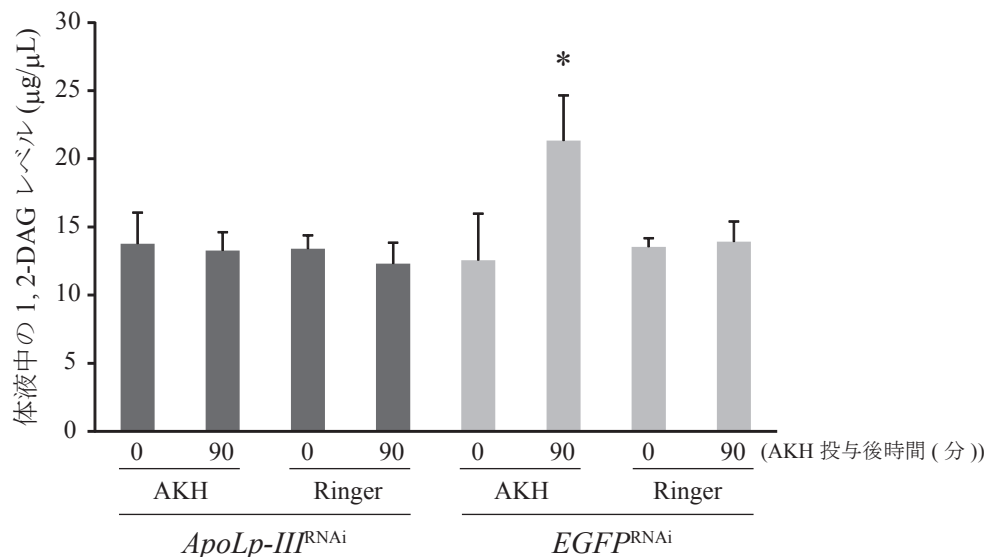


図 S2-4. フタホシコオロギ ApoLp-III のノックダウンが、体液中の 1,2-DAG レベルの標準値に与える影響、および、AKH 刺激による脂質の動員に与える影響。(A) フタホシコオロギ ApoLp-III のノックダウンが、体液中の 1,2-DAG レベルの標準値に与える影響。フタホシコオロギ成虫オス個体に、ApoLp-III-dsRNA、および EGFP-dsRNA を 2 日毎に投与し、投与開始後 6 日目における、体液中の 1,2-DAG レベルを定量した。それぞれ平均値 + S. D. で示した (n = 4)。ApoLp-III のノックダウンによって、体液中の 1,2-DAG レベルに顕著な変動は見られなかった。(B) フタホシコオロギ ApoLp-III のノックダウン個体への AKH の投与が、体液中の 1,2-DAG レベルに与える影響。ApoLp-III-dsRNA、および EGFP-dsRNA の連続投与開始後 6 日目のフタホシコオロギ成虫オス個体に、5 pmol の AKH を、または 3 μL の Ringer 溶液を投与し、投与後 0、90 分での体液中の 1,2-DAG レベルを定量した。それぞれ平均値 + S. D. で示した (n = 4)。アスタリスクは、コントロールに対して、有意な差が認められたことを示す (\* $P < 0.05$ ; Tukey's HSD test)。ApoLp-III のノックダウン個体では、コントロール個体で見られるような、AKH 刺激による体液中の 1,2-DAG レベルの顕著な増加は見られなかった。

## 総括

昆虫の摂食行動には、これまでの行動学的、生理学的研究により、周期性が存在することが知られている<sup>9-11)</sup>。また、生物は、体内の栄養要求を適切に満たすように、適切な量、および割合の栄養分を得られるような餌を自身で選択し摂食する、**self-selection** と呼ばれる機構を体内に有していることが知られている<sup>24, 25)</sup>。上述のような摂食行動の調節に関与する内在性因子の一つとして、体液中の栄養分の濃度変動が挙げられる<sup>35)</sup>。しかし、その具体的な分子レベルでの調節機構は、これまで明らかにされていない。

そこで、昆虫における体内の栄養状態の変動が摂食行動を調節する機構を、分子レベルで明らかにすることを本論文研究の目的とした。研究にあたって、昆虫の体内の脂質、糖質代謝を制御する、主要なペプチドホルモンの一つである、**AKH** (**adipokinetic hormone**; 脂質動員ホルモン)に着目した。具体的には、**AKHR** のノックダウン個体の表現型の解析を中心として、体内の栄養分の代謝、体外の栄養分の嗜好性、および、摂食行動の3つの観点からの解析を行った。研究材料としては、フタホシコオロギ *Gryllus bimaculatus* を用いた。フタホシコオロギを用いる利点は、(i) 大量入手、大量飼育が簡便であり、(ii) 比較的大型昆虫であるため、摂食行動観察が容易であり、(iii) **RNA 干渉(RNAi)**法の効果が確認されており、(iv) 雑食性であるため、摂食の嗜好性を解析しやすいことが挙げられる。

第一章では、フタホシコオロギの **AKH** の制御機構が摂食行動にどのような影響を与えるかを解析した。まず、フタホシコオロギの **AKHR** をコードする遺伝子の全長の **cDNA** をクローニングした(図 S1-1 (A))。次に、**RNAi** 法を用いて、**AKHR** をノックダウンしたフタホシコオロギを調製した(図 S1-1 (F))。この **AKHR** のノックダウン個体の摂食行動を観察した結果、摂食と摂食の間の時間が減少したが、1 回の摂食時間に変動は見られなかった(図 1-1-3-10、図 1-1-3-11)。すなわち、**AKHR** のノックダウンにより、摂食周期が短縮した。

第二章では、**AKH** の脂質および糖質動員作用に着目し、**AKHR** のノックダウン個体における、体内の脂質および糖質レベルの変動を解析した。さらに、**AKHR** のノックダウン個体における、それらの変動と摂食周期の短縮とに関連性があるかどうかを解析した。**AKHR**

をノックダウンしたフタホシコオロギの成虫オス個体における、体内の脂質および糖質レベルを分析したところ、体液中の 1, 2-DAG レベル、および体液中のトレハロースレベルが、2-3 割程度減少した(図 2-1-1 (B、C))。これらの減少が、第一章にて見られた、摂食周期の短縮に関与するかを解析するために、体液中へのリポホリン、およびトレハロースの投与によるレスキュー実験を行った。その結果、AKHR のノックダウン個体で見られるような、摂食周期の短縮は、トレハロースの投与よりも、リポホリンの投与により、コントロール個体程度までレスキューされた(図 2-2 (E-H))。つまり、AKHR のノックダウンによる、体液中の 1, 2-DAG レベルの減少が、摂食周期の短縮に大きく寄与していると考えられた。

第三章では、フタホシコオロギの体液中の脂質および糖質レベルが、絶食条件の経過や、摂食によってどのように変動するかを解析することで、体液中の脂質および糖質レベルと摂食モチベーションとの関連性を調べた。その結果、体液中の 1, 2-DAG レベルおよびトレハロースレベルは、見かけ上、或る一定のレベル(標準値)に調節されていると考えられた(図 3-1-2)。また、体液中の両レベルは、摂食終了後に、一過的に、標準値から増加し、その後緩やかに標準値以下まで減少した(図 3-1-2)。この結果を踏まえて、リポホリンおよびトレハロースの投与により、人為的に、体液中の 1, 2-DAG レベルおよびトレハロースレベルをそれぞれ一過的に増加させると、それらの増加量に依存して、摂食モチベーションが低下した(図 3-2-1、図 3-2-2)。以上の結果から、(i) 摂食後に、体液中の栄養分の濃度が増加することで、摂食モチベーションが低下し、(ii) その後、増加した濃度が、或る閾値まで減少することで、摂食モチベーションが上昇する、この(i)、(ii)の繰り返しが、摂食行動の周期性を規定する機構の一端であることが示唆された。この考えに基づくと、AKHR のノックダウン個体では、体液中の 1, 2-DAG レベルの標準値が減少することから、(ii) における、摂食モチベーションの上昇を促すような或る閾値までに減少する頻度が増加するため、頻繁な摂食行動が見られる可能性が考えられた。

第四章では、体液中の 1, 2-DAG レベルの変動が、どのような分子機序で、摂食モチベーションに働きかけているかを、リポホリンに着目して解析することにした。AKHR をノックダウンしたフタホシコオロギにおいて、体液中の脂質輸送の変化を解析したところ、

AKHR のノックダウンにより、脂肪体での *LpR* の mRNA の発現抑制、および、体液中の遊離 ApoLp-III レベルの減少が見られた(図 4-1-1、図 4-1-2-2 (B))。しかしながら、*LpR* および ApoLp-III のノックダウン個体の摂食量の解析の結果では、*LpR* のノックダウン個体と、ApoLp-III のノックダウン個体のどちらに関しても、コントロール個体と比較して、顕著な差異は見られなかった(図 4-2-1、図 4-2-2)。これらのことから、AKHR のノックダウン個体で見られる、上述の脂質輸送の変化は、摂食周期の短縮に、直接的には関与しないと考えられた。

第五章では、第四章の結果を踏まえ、新たな視点から、AKHR のノックダウン個体における、摂食行動の変化を分子レベルで解釈することを目指し、AKHR のノックダウン個体における、摂食行動に関与する、新規分子を探索した。その方法として、AKHR をノックダウンしたフタホシコオロギの成虫オス個体の脂肪体を用いた、cDNA サブトラクション法を行った。その結果、AKHR のノックダウン個体の脂肪体にて、ACBP (acyl-CoA binding protein) をコードすると考えられる遺伝子の mRNA の発現が増加することを見出した(図 5-1-1-2、図 5-1-1-3)。さらに、ACBP をノックダウンすると、AKHR のノックダウンとは逆に、摂食量の減少が見られた(図 5-1-2)。ACBP は細胞内に局在し、acyl-CoA と結合し、輸送体として機能することで、脂肪酸代謝のバランスを調節していることから<sup>137, 138)</sup>、AKHR をノックダウンしたフタホシコオロギにおいて、体内の脂肪酸代謝のバランスが変動している可能性が考えられた。そこで、AKHR のノックダウン個体の体内の脂肪酸組成を解析したところ、特に、体液中の脂質における、飽和脂肪酸と不飽和脂肪酸とのバランスが変動した(図 5-2)。一方で、通常個体における絶食条件下での脂肪酸組成の解析、および、特定の脂肪酸種の過剰摂取による脂肪酸組成の変動の解析では、体液中の脂質における、飽和脂肪酸と不飽和脂肪酸のバランスは、或る一定を保つような調節を受けていると考えられた (図 5-3、図 5-4 (B))。つまり、AKHR のノックダウン個体における摂食行動の周期性の変化には、体液中の脂質レベルの量的変動だけではなく、質的変動(脂肪酸組成の変動)も関与することが示唆された。

第六章では、前章までの、AKHR のノックダウン個体における、体液中の脂質の量的、

および質的レベルの変動が、摂食行動における栄養要求性に影響を与えるかどうかを解析した。AKHR をノックダウンしたフタホシコオロギ成虫オス個体について、摂食の嗜好性の変化について、choice アッセイにより解析したところ、AKHR のノックダウン個体は、口部の感覚器である小腮を介して、リノール酸(18:2)の嗜好性が増強していることを見出した(図 6-2 (C)、図 6-3-1)。また、逆行性染色法による、小腮の神経の染色結果から、小腮における 18:2 の嗜好性の調節は、食道下神経節(SOG)が関与していると考えられた(図 6-6)。これまでの結果を合わせて考えると、AKHR のノックダウン個体では、体液中の 1,2-DAG レベルの量的、質的変動を調節するような、体内の脂質代謝機構のバランスが変化し、その変化を補償するために、餌中の 18:2 の嗜好性を増強させており、その結果、摂食行動の周期性に影響が見られたと考えることができる。

第七章では、第六章の結果を受けて、AKHR のノックダウン個体における、小腮での、18:2 の嗜好性の増強に関与する分子を探索した。フタホシコオロギの小腮を用いて RNA-seq 解析を行い、その解析データを基にして、18:2 と結合し、嗅覚シグナルを伝える分子の候補として、14 の嗅覚結合タンパク質(OBP)、および 13 の化学受容タンパク質(CSP)をコードすると考えられる cDNA の、部分塩基配列情報を取得した(図 7-1-3)。AKHR と、各 OBP/CSP のダブルノックダウン個体について、18:2 に対する嗜好性を指標としてスクリーニングした結果、4 つの OBP および 3 つの CSP が、18:2 と結合する分子の候補として得られた(図 7-2-1、7-2-2)。現在、得られた各 OBP/CSP のリコンビナントタンパク質を作製し、*in vitro* での、18:2 や、他の脂肪酸種との結合を解析中である。

第八章では、飽和脂肪酸と不飽和脂肪酸とのバランスの調節に関与すると考えられる、 $\Delta 9$ -desaturase および  $\Delta 12$ -desaturase に着目した。フタホシコオロギにおいて、脂肪酸不飽和化酵素である、 $\Delta 9$ -desaturase および  $\Delta 12$ -desaturase をダブルノックダウンした場合、AKHR をノックダウンした場合よりも大きく体内の脂肪酸の飽和脂肪酸と不飽和脂肪酸とのバランスが崩れ、かつ、 $\Delta 9$ -desaturase および  $\Delta 12$ -desaturase の dsRNA の投与後 1-2 日には致死となることを見出した。致死の原因を解明するために、まずは、致死に関与する組織を探索したが、その特定はできなかった。次に、脂肪酸、および脂肪酸から生合成される生理活

性物質の投与による、致死のレスキュー実験の結果、プロスタグランジン  $F_{2\alpha}$  が、生存に関与している可能性が考えられた。現在、致死に至るまでの詳細な過程については、さらなる解析中である。

以上、本論文研究をまとめると、AKHR のノックダウン個体における、摂食周期の短縮は、現時点では以下のように推察できる(図 9)。AKHR のノックダウン個体は、体内の脂質代謝の調節機構が部分的に欠損することで、体液中の 1,2-DAG の量的レベル、および質的レベルが変動する。そのような、体内の脂質代謝の調節機構の欠損、あるいは、その欠損に起因する、体液中の 1,2-DAG の量的レベル、および質的レベルの変動は、どのような分子機構にて、体内で感知されるかは明らかにできなかったが、そのような変動は、SOG を介して、小腸における、18:2 の嗜好性の増強に反映され则认为られる。その結果、摂食周期が短縮した可能性が考えられる。なお、SOG は、他の昆虫種では、顎の運動性に関与すると考えられていることから<sup>243,244)</sup>、フタホシコオロギにおいて、18:2 の嗜好性の調節機構と顎の運動性の調節機構との関連性があるかもしれない。

また、 $\Delta 9$ -desaturase および  $\Delta 12$ -desaturase に着目した解析から、体内の脂肪酸組成のバランスが大きく崩れることは、昆虫を生存させるような機構にも影響を与えることが示唆された(図 9)。このことは、体内において、或る程度の不飽和脂肪酸量を維持することが、生存を維持するために必須であると考えられる。 $\Delta 9$ -desaturase および  $\Delta 12$ -desaturase のダブルノックダウン個体に対しての、18:2 から生合成される  $PGF_{2\alpha}$  の過剰量の投与により、致死が部分的にレスキューされたことから、上述の生存機構の維持には、 $PGF_{2\alpha}$  が部分的に関与している可能性は考えられる。しかし、 $\Delta 9$ -desaturase および  $\Delta 12$ -desaturase のダブルノックダウン個体が致死になる機構の全貌を明らかにするためには、致死の原因となる組織の特定や、原因物質のさらなる探索など、多くの解析が必要である。

上述の生存機構と、AKHR のノックダウン個体の解析から明らかとなった、18:2 の栄養要求性およびその嗜好性を調節する機構を体内に有するという結果を合わせて考えると、18:2 などの必須脂肪酸を摂取する現象は、生存を維持するために大きな意義を有すると言えるかもしれない。

本論文研究では、体液中の栄養分の濃度に特に着目して研究を進めた。体液は全ての組織と接するため、体液中の栄養分の濃度は、各組織での、栄養分の代謝、貯蔵や輸送などの収支に反映されると言える<sup>40, 41)</sup>。つまり、体液中の栄養分の濃度の変動を解析する場合は、他の組織にも着目する必要があると考えられる。本論文研究における脂肪酸組成の解析では、体液以外の組織として、栄養分の輸送や代謝に関与する中腸および脂肪体、そして、摂食行動の調節に関与する可能性がある神経系にも着目した。特定の脂肪酸種の過剰摂取による、それらの各組織での、脂肪酸組成の変動の解析の結果から(図 5-4 (B))、体内の栄養分の濃度の調節に関して、各組織間の関係は不明であるものの、組織毎に、脂肪酸組成を、見かけ上或る一定のバランスをとるように調節するような、脂質代謝機構があることが示唆された。すなわち、脂肪酸組成に着目することで、各組織での、栄養分の代謝、貯蔵や輸送などに関する、恒常的な調節機構を俯瞰することができた。これらを考慮すると、AKHR をノックダウンすることで、少なくとも、AKHR が発現する脂肪体では、脂質代謝の調節機構が、絶妙に欠損することにより、見かけ上、体液中の 1, 2-DAG の量的および質的レベルに、或る程度の変動が見られたと考えられる。そして、それらの変動が、摂食行動の栄養要求性を調節する機構に影響を与えることで、摂食周期の短縮や、18:2 の嗜好性の変化という、行動レベルでの大きな変化に反映されたと考えられる。

これまでに、キイロショウジョウバエにおいて、体内の栄養分の濃度変動と、摂食の亢進や抑制との関連性についての研究は行われてきた。例えば、哺乳類にてグリシンの代謝に関与する酵素をコードする遺伝子のキイロショウジョウバエホモログと考えられる、*pumpleless* 遺伝子の変異体の解析から、体内のアミノ酸レベルの変動と、摂食の抑制機構との関連性が報告された<sup>245, 246)</sup>。キイロショウジョウバエ幼虫では、フルクトース受容体である Gr (gustatory receptor) 43a が体内のフルクトース濃度を感知し、摂食に反映させると考えられている<sup>246)</sup>。また、キイロショウジョウバエ成虫の SOG から、餌中のスクロースを感知して、口吻の動きを制御することで摂食行動を調節するような神経細胞が同定された<sup>247)</sup>。しかし、これらの研究では、或る特定の栄養分の嗜好性に関しては全く解析されていない。つまり、本論文研究で行った、脂質代謝の調節機構と嗜好性の調節機構の関連性について、

分子レベルで解釈することは、昆虫、ひいては動物全般の摂食行動を考える上で、新しい視点と言えるであろう。

本論文研究において、フタホシコオロギには、18:2 の嗜好性を調節するような機構を体内に有することが示唆された。野生におけるフタホシコオロギの摂食行動を考えると、選択および摂取すべき栄養素は、18:2 以外にも多く存在すると考えられる。つまり、本論文研究にて明らかになりつつある 18:2 の嗜好性の調節機構以外にも、他の栄養素に対する嗜好性の調節機構が存在する可能性がある。つまり、体内の栄養分の摂取、代謝などによる、体内の様々な栄養分の濃度の変動を、それぞれ感知し、それらの変動に応じて、餌中における、それぞれの栄養素に対する嗜好性に反映させている可能性がある。

多くの生物種にとって、18:2 は必須栄養素であるが、8-0 で述べたように、一部の昆虫種では、18:2 を体内にて生合成できる<sup>216)</sup>。フタホシコオロギも 18:2 を体内にて生合成できるが<sup>216)</sup>、8-5 で述べたように、フタホシコオロギにおける 18:2 の生合成に参与する  $\Delta 12$ -desaturase の、18:1 から 18:2 への触媒能は微弱であった(データ非掲載)。このことから、フタホシコオロギの体内で生合成される 18:2 量は多くはなく、体内の生合成と合わせて、体外から摂取することにより、体内の 18:2 の要求量を満たしている可能性が考えられる。一方、ヨーロッパイエコオロギでは、フタホシコオロギと比較して、単位時間当たりの 18:2 の生合成量が 2.7 倍程度多く<sup>216)</sup>、また、ヨーロッパイエコオロギ  $\Delta 12$ -desaturase の、18:1 から 18:2 への触媒能は、フタホシコオロギのそれよりも強いと考えられた<sup>217)</sup>。

このような、18:2 の生合成量の差異は、両昆虫種間における、18:2 についての栄養要求性の差異に反映されるかもしれない。また、両昆虫種は近縁種であることと、 $\Delta 12$ -desaturase は、進化上、細菌などから水平伝搬された可能性があることを合わせて考慮すると(図 S1-6 (E))、両昆虫種における、18:2 の生合成量の差異に関する説明付けは多く考えられるが、一つの可能性として、両昆虫種が、共通祖先の  $\Delta 12$ -desaturase 遺伝子を獲得した後に、それらの活性に、食性や生育温度等の環境因子が選択圧として作用した可能性がある。また、その他の、18:2 を体内にて生合成できる昆虫間、および、生合成できない昆虫間における共通点の有無を検討したが、現在のところは見いだせていない。これを検討するためには、まずは、フタホシコオロギ、ヨーロッパイエコオロギや、他の直翅目昆虫種といった、近



縁種間において、18:2 の体内での生合成能、および 18:2 の嗜好性を詳細に解析し、その結果と、近縁種間での生態学的特徴とを合わせて考察することで、昆虫における、18:2 の摂取に関する、代謝と栄養要求性のネットワークについての知見が得られるかもしれない。

さらに、今後、第七章におけるスクリーニングを進めることにより、18:2 や他の脂肪酸種の嗜好性に関与するような OBP や CSP を見出すことができれば、その分子に着目した解析を他昆虫種へと展開し、比較することで、昆虫の化学感覚の調節機構と、食性との関連性についてのさらなる理解が得られると考えられる。

昆虫は、多種多様な食性をもつことから、昆虫によって、要求する栄養分の種類や量は異なると考えられる。様々な昆虫種にて、代謝の調節機構と、化学感覚の調節機構との関連性を見出し、それを昆虫種間にて比較することにより、昆虫の多種多様な食性や、生存戦略に関して、新たな知見が得られるかもしれない。

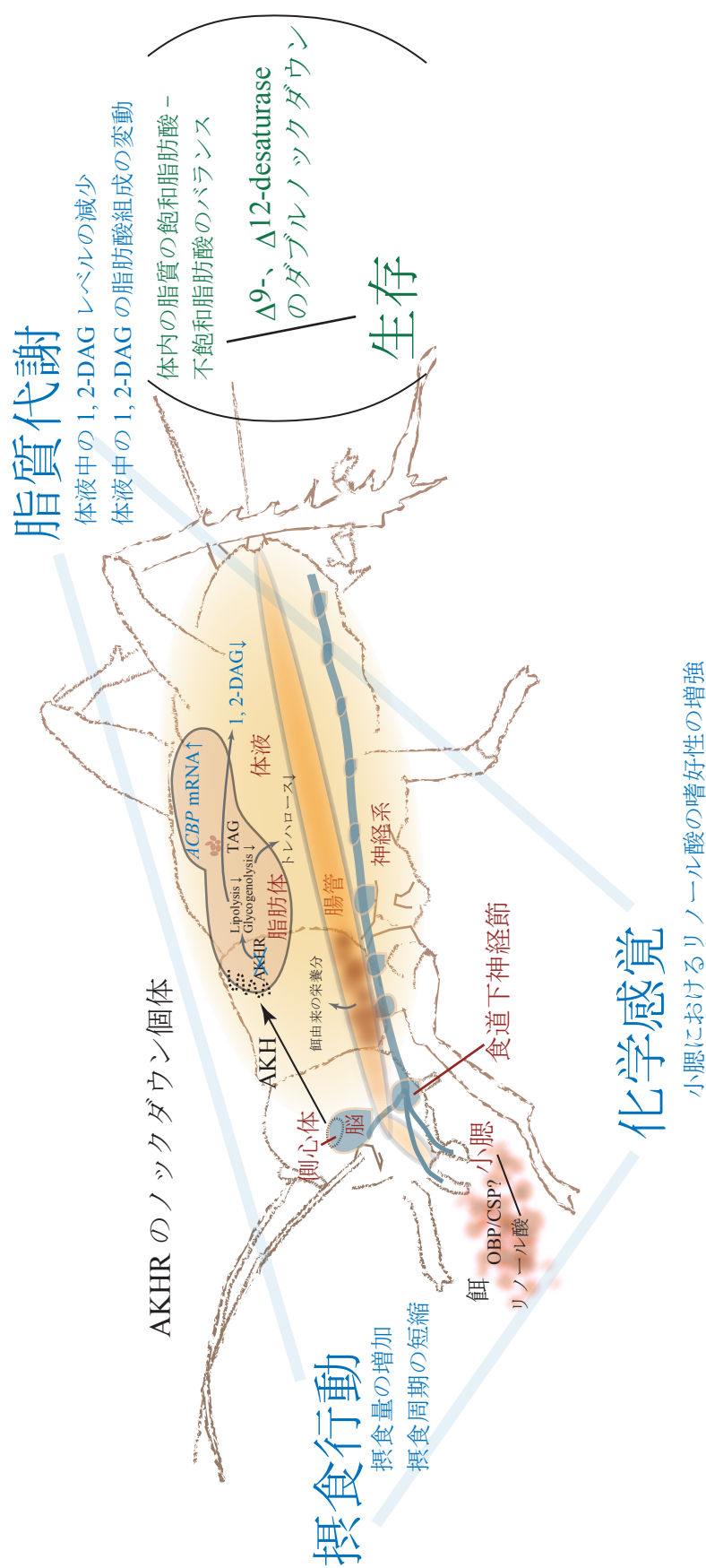


図 9. 本論文研究により明らかとなった、フタホシコオロギにおける、脂質代謝の調節と、化学感覚の調節とに反映される摂食行動の分子機構と、脂質代謝の調節と生存との関連性の概念図。

## 実験の部

### 機器

#### HPLC システム

システムコントローラー: 日本分光、802-SC

ポンプ: 日本分光、880-PU

UV 検出器: 日本分光、875-UV

記録装置: 日本分光、807-IT

システムコントローラー: 日立、L-6250

ポンプ: 日立、L-6050

UV 検出器: 日立、L-4000

蛍光検出器: 島津、RF-530 または島津、RF-20A

記録装置: 日立、D-2500

遠心濃縮機: Savant、Speed Vac® Plus SC210A

凍結乾燥機: EYELA、FDU-1000

PCR: Applied BioSystems、ABI 9700 Genetic Analyzer

: Bio NEER、MyGenie32 Thermal Block

定量 PCR: Applied BioSystems、7300 Real Time PCR System.

DNA シーケンサー: Applied Biosystems、ABI PRISM 310 Genetic Analyzer

ペプチド合成機: Aaptec、Apex 396-SC synthesizer

プロテインシーケンサー: Applied Biosystems、ProCise™ cLC

分光光度計: Nanodrop、ND-1000

: BIO-RAD、MODEL 550

実験に使用した試薬において特に記載のないものについては、関東化学またはナカライテスクの試薬を使用した。本項に記載されていない分子生物学実験の基本操作は、Molecular Cloning: A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Laboratory Press)を参考にして行った。

### 実験動物および実験飼料

フタホシコオロギ(*Gryllus bimaculatus*)は、成虫、5 齢幼虫、または終齢幼虫を月夜野ファーム(群馬県利根郡みなかみ町)より購入した。その後、27±1°C、湿度 70%、16 時間明期-8 時間暗期の下で、ウサギ用人工飼料(ORC4、オリエンタル酵母)を粉末状にして、実験に使用するまで飼育した。飼育の過程で、より飼育に適するような栄養素のバランスをもつ飼育用人工飼料として、上述のウサギ用人工飼料に、ネコ用人工飼料(フリスキードライ フィッシュミックス、ネスレ)を 1:1 の比で混合し、粉末状にしたものも用いた。

摂食行動に関する実験に用いた人工飼料に関しては、第一、二、三、四、五章の実験では、全て、ウサギ用人工飼料を用いた。一方、choice 実験をはじめとする、第六章以降の実験では、後述する、フタホシコオロギ用の人工飼料を適宜調製し、用いた。

### 各遺伝子の cDNA クローニング

脂肪体、あるいは、小腸(OBP/CSP をコードする遺伝子の場合)から TRIzol® Reagent (Invitrogen)を用いてトータル RNA を抽出した。300-500 ng のトータル RNA から、Super Script® III (5'-RACE に用いる場合は Super Script® II)を用いて逆転写反応を行った。逆転写のプライマーには、T7-dT

(5'-GCCCCAGTGAATTGTGAATACGACTCACTATAGGGAGGCGGT<sub>(24)</sub>-3')を用い、50°C で 60-90 分間程度反応した。なお、5'-RACE、3'-RACE に用いる cDNA の合成は、SMART™ RACE cDNA Amplification Kit (Clontech)を用いた。なお、AKHR の 3'-RACE に用いる cDNA の合成のみ、FirstChoice® RLM-RACE Kit (Ambion)を用いた。作製した cDNA をテンプレートとし、ExTaq を用いて付属のプロトコールに従って PCR を行った。なお、nested PCR を行う場合は、最初

のPCRの1/100倍量をテンプレートとしてPCRを行った。反応に用いるプライマーの濃度は、終濃度1  $\mu$ Mとした。それぞれのcDNAクローニングにおけるPCR条件は、基本的には、Ex Taqを用いて、94°C、30秒(最初のサイクルのみ3.5分); 60°C、30秒; 72°C、60秒を1サイクルとし、30サイクル反応させた。nested PCRの際には、アニーリング温度を50°Cとした。

以下に、各遺伝子のcDNAクローニングに用いたプライマーを示す。

#### AKHRのcDNAクローニング

AKHR-d1: 5'-ACNTTYTATGATGCCN-3'  
 AKHR-d2: 5'-RTARTANGGNGTCCARCA-3'  
 AKHR-3'RACE a: 5'-TCGCGACGCACGGGAGACGACGTGTT-3'  
 AKHR-3'RACE b: 5'-GACGCTGGTCATCGTGCTGGTCCTCTTCAT-3'  
 AKHR-3'RACE c: 5'-AGCGGCCTGTTTCATCTTC-3'  
 AKHR-5'RACE a: 5'-CATGCTGCACAGGAAGGACATGACCCCTGG-3'  
 AKHR-5'RACE b: 5'-GAAGCTGGAGAGGAAGAGTCCGAAGAC-3'  
 AKHR-5'RACE c: 5'-GCAGGATGATGGTGAGCA-3'  
 AKHR-ORFfor: 5'-CTCGATGGTCAGTGAAGCAACGAAGT-3'  
 AKHR-ORFrev: 5'-TTGCTGGAAAGTGTGAGGATGTTGTTGA-3'

#### LpRのcDNAクローニング

LpR-d1: 5'-TTNACNGCYTGRCARTGRIT-3'  
 LpR-d2: 5'-CKRTANGGRTGRTANACRTG-3'

#### apoLp-IIIのcDNAクローニング

Achdo-speFor: 5'-ACCATCCAGAACGCGCTGCCTT-3'  
 Achdo-speRev: 5'-GCACAGACTGCTGCACCTGGTT-3'  
 apoLp-III-3'RACE: 5'-AGGAAGTGCACGCAA-3'

#### クローン a-24 (ACBP)のcDNAクローニング

ACBP-3'RACE a: 5'-AGATTTATTCAATAGTTTAATTTTCTTGC-3'  
 ACBP-3'RACE b: 5'-TCAATAGTTTAATTTTCTTGCC-3'  
 ACBP-5'RACE a: 5'-GTTTGACATGCCTTTCTTTGAATCC-3'  
 ACBP-5'RACE b: 5'-CCTTTCCTTTGAAATCCAACAT-3'

#### クローン a-11のcDNAクローニング

TSP-3'RACE a: 5'-ACACTGGAGACACCGAGAACCAG-3'  
 TSP-3'RACE b: 5'-AAGGGCTGGAAGGAGAAG-3'  
 TSP-5'RACE a: 5'-ACCTTCTCCTTCCAGCCCTTGTT-3'  
 TSP-5'RACE b: 5'-GTTCTCGGTGTCTCCAGTGT-3'

#### クローン a-n26のcDNAクローニング

Cellulase-5'RACE a: 5'-TGAGTTTGACAACATGAAGAGAGC-3'  
 Cellulase-5'RACE b: 5'-AGACCAGGTTGCTCGAAG-3'

#### クローン e-39のcDNAクローニング

seprin-5'RACE a: 5'-TGATCTATTGATCTTAGTTTAGCGGATT-3'  
 seprin-5'RACE b: 5'-TTAGCGGATTATAGACTCTTCC-3'

#### $\Delta 9$ -desaturaseのcDNAクローニング

desat9-degF: 5'-TTCTTCTTCKCNCAYKTHGGNTGG-3'  
 desat9-degR: 5'-TGRTGGTAGTTGTGVHANCCCTC-3'  
 desat9-3'RACE a: 5'-TATGACAAGCACATCAACCCTGCT-3'  
 desat9-3'RACE b: 5'-CTGAGAATCTTGGAGTGGCTAT-3'  
 desat9-5'RACE a: 5'-GCATTTGACCATGTCTCATTCAC-3'

desat9-5'RACE b: 5'-CTTCTGGAACATGACGATTTT-3'  
 desat9-ORFfor: 5'-GGTGATCGTTCGTTGCG-3'  
 desat9-ORFrev: 5'-ACAGATTCCTTTACACCAAGAACA-3'  
Δ12-desaturase の cDNA クローニング  
 desat12-degF: 5'-GARGTNMGNGCNAARGGNGGNMG-3'  
 desat12-degR: 5'-TTYTCDATCATNGTYTGRTCNCG-3'  
 desat12-3'RACE a: 5'-TCCGATATTGCCTCTCTCTCAACC-3'  
 desat12-3'RACE b: 5'-AACAAGCCATATGACAAGAAC-3'  
 desat12-5'RACE a: 5'-CAGCGTCTCTCCCCAGAAATACAT-3'  
 desat12-5'RACE b: 5'-CTCTTCTGGAACATGACGAT-3'  
 desat12-ORFfor: 5'-CAGACAGCACGCTCAGC-3'  
 desat12-ORFrev: 5'-TCCCTTGTACAACCTCTGAGTCTT-3'  
OBP/CSP の cDNA クローニング  
 OBPunigene28848\_3'RACE a: 5'-CAGAACGAGGCGACCGTCAG-3'  
 OBPunigene28848\_3'RACE b: 5'-GTGTCTGTTGCAGTGTGTGTA-3'  
 CSPunigene3\_5'RACE a: 5'-GTCTTCCGGGTCTTCATCGTCGTC-3'  
 CSPunigene3\_5'RACE b: 5'-GTAGGGTCATACTTGTTAAGGA-3'  
 CSPunigene3337\_5'RACE a: 5'-GCACTTGGCGCACTCATTACAG-3'  
 CSPunigene3337\_5'RACE b: 5'-GGAATGGCCTTTCTGAGCTC-3'  
 CSPunigene3338\_3'RACE a: 5'-TCCGAAGAGAAAGTTCACCACCAAA-3'  
 CSPunigene3338\_3'RACE b: 5'-AACGAGCGGCTATTTAAGAAA-3'  
 CSPunigene10231\_5'RACE a: 5'-TTGTTCTCGCGAGGTGCTTGATC-3'  
 CSPunigene10231\_5'RACE b: 5'-GTATGGACTTCTTGAGCTCTTT-3'  
 CSPunigene16019\_5'RACE a: 5'-GTCCACGTCCAGGTTGTCGTAATT-3'  
 CSPunigene16019\_5'RACE b: 5'-CTACTGCTGCTGAGGAAGAT-3'  
 CSPunigene16671\_3'RACE a: 5'-TACGTGGACTGCATTATGGACCGC-3'  
 CSPunigene16671\_3'RACE b: 5'-GTGCACCAAGGAAGGCTG-3'  
 CSPunigene34934\_3'RACE a: 5'-CCAAGACGGTGCCTTCCTGG-3'  
 CSPunigene34934\_3'RACE b: 5'-CAGATCCAGGGCAAGTTC-3'  
 CSPunigene34934\_5'RACE a: 5'-GCCAGGAAGCGCACCGTCTTG-3'  
 CSPunigene34934\_5'RACE b: 5'-AAGCAGCGCACGTAAGTGG-3'  
 OBPunigene383\_ORFfor: 5'-CACACTGGATCACTCGGCTA-3'  
 OBPunigene383\_ORFrev: 5'-TCGTGGTGAAGAAACATGGA-3'  
 OBPunigene6229\_ORFfor: 5'-ACAACTGTTCCGGTGGAGAGG-3'  
 OBPunigene6229\_ORFrev: 5'-GTCGTGTTTTGTGCTCTTGC-3'  
 OBPunigene12288\_ORFfor: 5'-ATTTTTGTGCTTCCGACGAG-3'  
 OBPunigene12288\_ORFrev: 5'-TTCTTATCAGACTCCTTTTGCAG-3'  
 OBPunigene13096\_ORFfor: 5'-GCCTCATCGCTGGAGTAGTG-3'  
 OBPunigene13096\_ORFrev: 5'-TGTTGAACGTATTCTCTTGCTCA-3'  
 OBPunigene14661\_ORFfor: 5'-GCCATGGCTCACAAAAATGT-3'  
 OBPunigene14661\_ORFrev: 5'-CCAGTGATGTGAGTGGGAGA-3'  
 OBPunigene14857\_ORFfor: 5'-GTCGACGCCACTGCTCTC-3'  
 OBPunigene14857\_ORFrev: 5'-TCTGGATGTGCCAAAGTCTCT-3'  
 OBPunigene15913\_ORFfor: 5'-ATGCGTGCGGTCGTTGCT-3'  
 OBPunigene15913\_ORFrev: 5'-TCCTTTTCATCGTTGGTTGC-3'

OBPunigene16264\_ORFfor: 5'-ATCTGCCATCAGCTGTGAAC-3'  
 OBPunigene16264\_ORFrev: 5'-CTGCAGCACAGTGACACAGA-3'  
 OBPunigene16317\_ORFfor: 5'-ACCATGCAGCCCGCCGCCCT-3'  
 OBPunigene16317\_ORFrev: 5'-TGAACCTCGATCCGTAGCAA-3'  
 OBPunigene16937\_ORFfor: 5'-ATGCAGCCCTCCGCCGCTT-3'  
 OBPunigene16937\_ORFrev: 5'-GTCGAATGCAAGTGCGAGTA-3'  
 OBP\_CL1113\_1\_ORFfor: 5'-TATAACGCTCGCCTGGCAAC-3'  
 OBP\_CL1113\_1\_ORFrev: 5'-TGGCCATAATCGCCTTAAAT-3'  
 OBP\_CL1113\_2\_ORFfor: 5'-GTACGGCGGTCTCACAAGAG-3'  
 OBP\_CL1113\_2\_ORFrev: 5'-ACTCCTCCCCGTGACTTC-3'  
 OBP\_CL1190\_ORFfor: 5'-TTGTTTGTGACGCATCCAT-3'  
 OBP\_CL1190\_ORFrev: 5'-GCTGTTCCACGCTGACTGT-3'  
 CSPunigene15927\_ORFfor: 5'-CAAGCGCTTCGTAGTTCGTC-3'  
 CSPunigene15927\_ORFrev: 5'-ACGCCAAGAGAAAATGCAAG-3'  
 CSPunigene16449\_ORFfor: 5'-GCGTCTGTAGCGTTCCTTG-3'  
 CSPunigene16449\_ORFrev: 5'-GGGGCGGGTAGAGTACAATC-3'  
 CSPunigene17213\_ORFfor: 5'-CACCTCGGCAGCAAGAG-3'  
 CSPunigene17213\_ORFrev: 5'-AATTAGAGGGGGCTGGTGAG-3'  
 CSPunigene17279\_ORFfor: 5'-CAGCATCACCTACCACAAC-3'  
 CSPunigene17279\_ORFrev: 5'-TCACCGTTTGTACAATAACTTTGC-3'  
 CSPunigene18077\_ORFfor: 5'-CTATAAGAGCACCGGGATCG-3'  
 CSPunigene18077\_ORFrev: 5'-CAAACGAGAGCAAACGTCAA-3'  
 CSPunigene18239\_ORFfor: 5'-ACTTTCGCTCACCTCCACCT-3'  
 CSPunigene18239\_ORFrev: 5'-CTAGAAGAGCTCGGGGTGCGCCT-3'  
 CSP\_CL397\_ORFfor: 5'-GCTAGCGCCTTACATTTGCT-3'  
 CSP\_CL397\_ORFrev: 5'-AAGAGGAGTCAAATAGGCGAGA-3'  
 CSP\_CL1350\_ORFfor: 5'-GCCGCTAGCGTTTACATTT-3'  
 CSP\_CL1360\_ORFrev: 5'-GGCGTAGGAACAGAACTTGC-3'  
 CSPunigene3338\_ORFfor: 5'-GTCGCCCTCAACGCTCAAC-3'  
 CSPunigene3338\_ORFrev: 5'-AGTCTTTCGGCGTATCGTTT-3'  
 CSPunigene16671\_ORFfor: 5'-AGTGCTCTGCCTCCCGTCAC-3'  
 CSPunigene16671\_ORFrev: 5'-AGCACGTCTTCGTGTGCTA-3'  
 CSPunigene16019\_ORFfor: 5'-CGATCTTCCTCAGCAGCAGT-3'  
 CSPunigene16019\_ORFrev: 5'-GCGAAGCTAGAAATGCCAGT-3'  
 OBPunigene28848\_ORFfor: 5'-GCCGCCGCCGCTATGAAC-3'  
 OBPunigene28848\_ORFrev: 5'-GATTCAGTCGGGGATGAAAA-3'  
 CSPunigene34934\_ORFfor: 5'-GCCACAAGCACTCGCATT-3'  
 CSPunigene34939\_ORFrev: 5'-GAAGGCTCAGGTAAGAAGGAAAG-3'

#### クローニングした cDNA の塩基配列解析

cDNA クローニングにおける PCR 産物は、アガロース電気泳動後、ゲルから目的のバンドを、QIAGEN QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN)を用いて抽出した。DNA 断片は、pGEM-T easy vector (Promega)にサブクローニングし、そのベクターで大腸菌 XL-1 Blue 株を形質転換させた。形質転換には、ヒートショック法を用い、コンピテントセルを 42°C で 60 秒間加熱することにより行った。ゲルからの PCR 産物の抽出、および、サブクローニングは付属のプロトコールに従った。形質転換させた大腸菌は、アンピシリン(100 µg/mL)を含む LB 培地(1.0% Bacto™ Trypton (Difco) / 0.5%

Bacto™ Yeast Extract (Difco) / 1.0% NaCl / 1.5% Bacto™ Agar (Difco))に植菌し、37°Cで一晩培養した。目的の塩基配列の、ベクターへのインサートの有無の確認のために、大腸菌のプラスミドを鋳型として、PCRを行い、アガロース電気泳動の結果からインサートの有無を判断した。プライマーはM13Fw (5'-GTTTTCCTCCAGTCACGAC-3')、M13Rv (5'-CAGGAAACAGCTATGAC-3')を用いた。目的の塩基配列の、ベクターへのインサートが確認されたプラスミドを持つ大腸菌については、アンピシリン(100 µg/mL)を含む、液体LB培地(1.0% Bacto™ Trypton (Difco) / 0.5% Bacto™ Yeast Extract (Difco) / 1.0% NaCl)に植菌し、37°Cで6-8時間振盪培養した。増殖した大腸菌から、プラスミドをQIAprep Spin Miniprep Kit (QIAGEN)を用いて付属のプロトコールに従い抽出した。抽出したDNAは、Big Dye Terminator Ver.3 (Applied Biosystems)を用いたサイクルシーケンス反応を行い、DNAシーケンサーにより塩基配列を解析した。その際のプライマーはM13Fw、またはM13Rvを用いた。

### RT-PCRによる組織別発現解析

メス、オスの成虫個体から、脂肪体、前腸、中腸、後腸、マルピーギ管、気管、筋肉、卵巣、精巣、神経系、体液をそれぞれ摘出、回収し、TRIzol® Reagentに回収しRNAを抽出した。RNAは1 UのDNase I (RNase-free) (TaKaRa)を用いてDNase処理した(37°C、30分)。各500 ngのトータルRNAを用い、cDNAクローニングの方法と同様の方法で逆転写し、cDNAを合成した。合成したcDNAの1/10量を用いてPCRを行った。コントロールとして、フタホシコロギの伸長因子(EF: Elongation factor)に特異的なプライマーを用いた。PCRにはEx Taqを用い、94°C、30秒(最初のサイクルのみ3.5分); 60°C、30秒; 72°C、60秒を1サイクルとした。AKHRは37サイクル、LpRは33サイクル、apoLp-IIIは32サイクル、EFは30サイクル行った。PCRに用いたプライマーを以下に示す。

AKHR400For: 5'-ATGGACAGGTACTTCGCCATTTT-3'

AKHR400Rev: 5'-ATGAAGAAGAACAGCACGATGAC-3'

LpR330For: 5'-GGGAAGTGAGCGTACAGTAG-3'

LpR330Rev: 5'-ACCAAATCAAGTGTCAGACC-3'

apoLp-III300For: 5'-AGGAGGAAGTGCGCACGCAA-3'

apoLp-III300Rev: 5'-GCAGTCTTGAGGGACTCTGCGA-3'

EF300For: 5'-ATGCCTGTATCTTGACTGCTCA-3'

EF300Rev: 5'-ATGGTTTGCTTCCAGTTTCAGT-3'

### 定量的RT-PCRによる、組織別発現解析、およびdsRNAの投与によるノックダウンの確認

オスの成虫通常個体、または各dsRNAの投与後2-3日目のオスの成虫個体から、脂肪体、前腸、中腸、後腸、マルピーギ管、気管、筋肉、卵巣、精巣、神経系、体液、小腸をそれぞれ、解析の必要に応じて摘出、回収した。RNAの抽出およびcDNAの合成は、RT-PCRの方法と同様の方法で行った。合成したcDNAの1/50量を用いて定量PCRを行った。定量PCRは、Fast Start Universal SYBR Green Master (ROX) (Roche)を用い、反応条件は、95°C、15秒(最初のサイクルのみ10分15秒); 60°C、60秒を40サイクル行った。各遺伝子のmRNA発現レベルは、EFのmRNAの発現レベルに対する比で示し、比較Ct法を用いた。定量PCRに用いたプライマーを以下に示す。

rt-AKHRfor: 5'-ACAAGTGGCAAAATGGAGGA-3'

rt-AKHRrev: 5'-CCTGTCCCAGCCATTAGTTG-3'

rt-Effor: 5'-CCCTGCTGCTGTTGCTTT-3'

rt-Efrev: 5'-CCCATTTTGTTCGGAGTGC-3'

rt-LpRfor: 5'-CGAGTTTACTGGGTGGATGG-3'

rt-LpRrev: 5'-TCGACGACCACTTCCATTG-3'

rt-ApoIIIfor: 5'-TCGCAGAGTCCCTCAAGACT-3'

rt-ApoIIIrev: 5'-AGACTGCTGCACCTGGTTG-3'

rt-ACBPFfor: 5'-GCCAAAACCCCTTCAGATG-3'

rt-ACBPRev: 5'-TCACCAACTGTGCCTTGCT-3'

rt-serpinfor: 5'-GGTCTAGAGCGGCTGGAAG-3'

rt-serpinRev: 5'-CGAAGCCTGGAGTGAGGTT-3'  
 rt-cellulaseFor: 5'-CATCACCGACGCAAAGAAC-3'  
 rt-cellulaseRev: 5'-CTCCCCAAACCAGTTTCGTC-3'  
 rt-TSPFor: 5'-CTGGGCGTCTTCTGCTTCT-3'  
 rt-TSPRev: 5'-TGGGACGTTATCGTTGCAC-3'  
 rt-9desatFor: 5'-TGGTCAAATGCCTGGTTTG-3'  
 rt-9desatRev: 5'-GCACTGTTTACCAGCCAAG-3'  
 rt-12desatFor: 5'-AAATTGGTGCCGTTTGCTT-3'  
 rt-12desatRev: 5'-ACAGCGTCTCTCCCCAGAA-3'  
 rt-OBPunigene383For: 5'-GGTGGTGAGCAAGGAGGAG-3'  
 rt-OBPunigene383Rev: 5'-TCTGCAGCGTCTCGAAGTC-3'  
 rt-OBPunigene6229For: 5'-CAAAGTCAGCTCCGGGATT-3'  
 rt-OBPunigene6229Rev: 5'-TGGAAGGTCCCTCTTGTTTG-3'  
 rt-OBPunigene12288For: 5'-GTGCTGGCCACAATGAGAG-3'  
 rt-OBPunigene12288Rev: 5'-CCCGTCTCACACCTGTCC-3'  
 rt-OBPunigene13096For: 5'-TGCAAATGCTGCACAACAC-3'  
 rt-OBPunigene13096Rev: 5'-GGGCCCTCACAATCAAATC-3'  
 rt-OBPunigene14661For: 5'-CAAGGTCAATTCGCTGACG-3'  
 rt-OBPunigene14661Rev: 5'-CCTGCATCATACCCTGCAC-3'  
 rt-OBPunigene14857For: 5'-CGACGAAGTGGCATCACAT-3'  
 rt-OBPunigene14857Rev: 5'-ACCTGGGGCGTAGTTCTTG-3'  
 rt-OBPunigene15913For: 5'-CGGACGATGACTTGAATGC-3'  
 rt-OBPunigene15913Rev: 5'-AGGCACTTGGCCTTTTCAG-3'  
 rt-OBPunigene16264For: 5'-GCAAGAGGCAGGCATAACC-3'  
 rt-OBPunigene16264Rev: 5'-TCAGGCACGGTCTTCTGAG-3'  
 rt-OBPunigene16317For: 5'-GCTGGAGGAGAAGCCAGAC-3'  
 rt-OBPunigene16317Rev: 5'-GCAACTTCGTCGTTGCACT-3'  
 rt-OBPunigene16937For: 5'-GTGGAGGAGGAGCTGGAAA-3'  
 rt-OBPunigene16937Rev: 5'-CAACACAATGCGGTGTCCT-3'  
 rt-OBP\_CL1113\_1For: 5'-CACGGAAGGCTTTCAGAAGA-3'  
 rt-OBP\_CL1113\_1Rev: 5'-CGTGCCCTTTACCGTCTCT-3'  
 rt-OBP\_CL1113\_2For: 5'-GGTGGTCTTACCCTTGTTG-3'  
 rt-OBP\_CL1113\_2Rev: 5'-CTTCTGCTATGGGCCGAAT-3'  
 rt-OBP\_CL1190For: 5'-CGTAGGCTTGCTGCCTTCT-3'  
 rt-OBP\_CL1190Rev: 5'-TGGGGCATCTGTAGCATGT-3'  
 rt-CSPunigene15927For: 5'-CTGGAAAACACCGACGACA-3'  
 rt-CSPunigene15927Rev: 5'-TGGCTTCAGCCAACACATC-3'  
 rt-CSPunigene16449For: 5'-GCCGACGGGAGAGAACTTA-3'  
 rt-CSPunigene16449Rev: 5'-GTGCACTTGCTGCACTCG-3'  
 rt-CSPunigene17213For: 5'-ACGCTGTCCCACATCCAG-3'  
 rt-CSPunigene17213Rev: 5'-GGCCCGAGTACTGCTTGAC-3'  
 rt-CSPunigene17279For: 5'-ATGACCGTCACTGCACAGC-3'  
 rt-CSPunigene17279Rev: 5'-ACTTTTCGCAGCCATTGGT-3'  
 rt-CSPunigene18077For: 5'-AAGTACTCCGACCGCTTCG-3'  
 rt-CSPunigene18077Rev: 5'-CTGGTCGTCGCTCAAGATG-3'



rt-CSPunigene18239For: 5'-CGGTACGACAACGTGAACC-3'  
 rt-CSPunigene18239Rev: 5'-TGCAGGAAGCACTTGAGGA-3'  
 rt-CSP\_CL397For: 5'-ATGGCAAGGAGCTCAGGAA-3'  
 rt-CSP\_CL397Rev: 5'-GTGCACTTGCCACATTCGT-3'  
 rt-CSP\_CL1350For: 5'-GGCAAAGAGCTCAGGAAGG-3'  
 rt-CSP\_CL1360Rev: 5'-TCTGCTTGTCGGTGCATT-3'  
 rt-CSPunigene3338For: 5'-AAGCACTTGCGAGACAACC-3'  
 rt-CSPunigene3338Rev: 5'-TTCCCTCAGGATCCCCTT-3'  
 rt-CSPunigene16671For: 5'-CCCTACCGGGGAATTTAGG-3'  
 rt-CSPunigene16671Rev: 5'-TCTTCCGGGTCTTCATCGT-3'  
 rt-CSPunigene16019For: 5'-AACCTGATCCGCAAGCTCT-3'  
 rt-CSPunigene16019Rev: 5'-TCACCTGCTCCCACTTGTC-3'  
 rt-OBPunigene28848For: 5'-TGACCGACGCATTGCAGG-3'  
 rt-OBPunigene28848Rev: 5'-GGTCCACCGCACCACTC-3'  
 rt-CSPunigene10231For: 5'-ACGCTCTACCAACGACTG-3'  
 rt-CSPunigene10231Rev: 5'-GCTTGATCACCTTCCCGCT-3'  
 rt-CSPunigene34934For: 5'-AAGACGGTGCGCTTCCTG-3'  
 rt-CSPunigene34934Rev: 5'-GGGATCGAACTTGCCCTGG-3'

#### dsRNA の調製

dsRNA の調製のために、5'末端に T7 プロモーター配列を付加したプライマーを作製した。PCR は、作製したプライマーを用いて、各遺伝子の cDNA の塩基配列の全長あるいは一部を挿入配列として含むプラスミド(pGEM-T easy、Promega)を鋳型 DNA として用い、酵素は KOD-plus (TOYOBO)を用いて、そのプロトコールに従って行った。PCR は、94°C で 15 秒(最初のサイクルのみ 2 分 15 秒)、60°C で 20 秒、68°C で 1 分を、35 サイクル行った。それぞれの PCR 産物を QIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN)を用いて精製し、核酸濃度を定量した。これを転写反応の鋳型とし、1 µg の鋳型量あたり 500 U の T7 RNA polymerase (TaKaRa)を用いて 37°C、4 時間転写反応を行った。反応終了後、1 U の DNase I (RNase-free) (TaKaRa)を反応液に加え、37°C で 30 分間反応を行った。反応産物を、フェノール/クロロホルム抽出、およびエタノール沈殿により精製した。精製した dsRNA をそれぞれ 2% のアガロースゲルで電気泳動を行い、目的の長さの dsRNA が合成されていることを確認した。調製した各 dsRNA は、核酸濃度の定量後、3 µg/µL になるように DEPC 水を用いて希釈し、投与に用いた。T7 プロモーター付加プライマーの配列を以下に示す。

T7-AKHRFor: 5'-GCTTCTAATACGACTCACTATAGGTCAACCACATGCTCATGCAC-3'  
 T7-AKHRRev: 5'-GCTTCTAATACGACTCACTATAGTCCAGCACATGAAGAAGACCAG-3'  
 T7-LpRFor: 5'-GCTTCTAATACGACTCACTATAGTCTGGAGTGATGTCAGTGATCAAA-3'  
 T7-LpRRev: 5'-GCTTCTAATACGACTCACTATAGAACCATGGGATTTTGCAACG-3'  
 T7-apoLp-IIIFor: 5'-GCTTCTAATACGACTCACTATAGCAGACCTTTGCCAACAACGT-3'  
 T7-apoLp-IIIRev: 5'-GCTTCTAATACGACTCACTATAGACAGACTGCTGCACCTCCTT-3'  
 T7-EGFPFor: 5'-GCTTCTAATACGACTCACTATAGAGCTGACCCTGAAGTTCATCTG-3'  
 T7-EGFPRev: 5'-GCTTCTAATACGACTCACTATAGCTTGTACAGCTCGTCCATGC-3'  
 T7-ACBPFor: 5'-GCTTCTAATACGACTCACTATAGATCGTATTTGCGTTTTGATCT-3'  
 T7-ACBPRev: 5'-GCTTCTAATACGACTCACTATAGCCAAAAACAGTAAAGTTGGGCATT-3'  
 T7-TSPFor: 5'-GCTTCTAATACGACTCACTATAGAGTGGAAGAAGAACACGCAGAC-3'  
 T7-TSPRev: 5'-GCTTCTAATACGACTCACTATAGCAGATGTGGAGGCAAACCTTGTA-3'  
 T7-cellulaseFor: 5'-GCTTCTAATACGACTCACTATAGAGTGGGGCACTGACTACTTCATTA-3'  
 T7-cellulaseRev: 5'-GCTTCTAATACGACTCACTATAGGCTACCCTTGGTCAACTTCATC-3'  
 T7-serpinFor: 5'-GCTTCTAATACGACTCACTATAGAATATACTTCAAAGCCGGTTGGT-3'

T7-serpinRev: 5'-GCTTCTAATACGACTCACTATAGCGATGAAGGTCTTCTGTACGAC-3'  
T7-desat(9+12)For: 5'-CTTCTAATACGACTCACTATAGTTTGGCGAAATGTTATCCTCTT-3'  
T7-desat(9+12)Rev: 5'-GCTTCTAATACGACTCACTATAGAGCCAAGTCATGTTGAGTGTGA-3'  
T7-desat9For: 5'-CTTCTAATACGACTCACTATAGGCAAGAAGAATGGGGTTGAACT-3'  
T7-desat9Rev: 5'-GCTTCTAATACGACTCACTATAGAAAAAGTAAGCCTTCTCAGAAAAA-3'  
T7-desat12For: 5'-GCTTCTAATACGACTCACTATAGAACCGCACCATATCAAATTTCT-3'  
T7-desat12Rev: 5'-GCTTCTAATACGACTCACTATAGGGAGTTGCACACAATTCTTTATT-3'  
T7-OBPunigene383for: 5'-GCTTCTAATACGACTCACTATAGCACACTGGATCACTCGGCTA-3'  
T7-OBPunigene383rev: 5'-GCTTCTAATACGACTCACTATAGTCGTGGTGAAGAAACATGGA-3'  
T7-OBPunigene6229for: 5'-GCTTCTAATACGACTCACTATAGACAACCTGTTCCGTGGAGAGG-3'  
T7-OBPunigene6229rev: 5'-GCTTCTAATACGACTCACTATAGGTCGTGTTTTGTGCTCTTGC-3'  
T7-OBPunigene12288for: 5'-GCTTCTAATACGACTCACTATAGATTTTTGTGCTTCCGACGAG-3'  
T7-OBPunigene12288rev: 5'-GCTTCTAATACGACTCACTATAGTTCTTATCAGACTCCTTTTGCAG-3'  
T7-OBPunigene13096for: 5'-GCTTCTAATACGACTCACTATAGGCCTCATCGCTGGAGTAGTG-3'  
T7-OBPunigene13096rev: 5'-GCTTCTAATACGACTCACTATAGTGTGAACGTATTCTCTTGCTCA-3'  
T7-OBPunigene14661for: 5'-GCTTCTAATACGACTCACTATAGGCCATGGCTCACAAAATGT-3'  
T7-OBPunigene14661rev: 5'-GCTTCTAATACGACTCACTATAGCCAGTGATGTGAGTGGGAGA-3'  
T7-OBPunigene14857for: 5'-GCTTCTAATACGACTCACTATAGGTCGACGCCACTGCTCTC-3'  
T7-OBPunigene14857rev: 5'-GCTTCTAATACGACTCACTATAGTCTGGATGTGCCAAAGTCTCT-3'  
T7-OBPunigene15913for: 5'-GCTTCTAATACGACTCACTATAGATGCGTGCGGTCGTTGCT-3'  
T7-OBPunigene15913rev: 5'-GCTTCTAATACGACTCACTATAGTCCTTTTCATCGTTGGTTGC-3'  
T7-OBPunigene16264for: 5'-GCTTCTAATACGACTCACTATAGATCTGCCATCAGCTGTGAAC-3'  
T7-OBPunigene16264rev: 5'-GCTTCTAATACGACTCACTATAGCTGCAGCACAGTGACACAGA-3'  
T7-OBPunigene16317for: 5'-GCTTCTAATACGACTCACTATAGTGATGAGCTGAACGGTTTGA-3'  
T7-OBPunigene16317rev: 5'-GCTTCTAATACGACTCACTATAGTGAACCTCGATCCGTAGCAA-3'  
T7-OBPunigene16937for: 5'-GCTTCTAATACGACTCACTATAGATGCAGCCCTCCGCCGCTT-3'  
T7-OBPunigene16937rev: 5'-GCTTCTAATACGACTCACTATAGGTCGAATGCAAGTGCGAGTA-3'  
T7-OBP\_CL1113\_1for: 5'-GCTTCTAATACGACTCACTATAGTATAACGCTCGCCTGGCAAC-3'  
T7-OBP\_CL1113\_1rev: 5'-GCTTCTAATACGACTCACTATAGTGGCCATAATCGCCTTTAAT-3'  
T7-OBP\_CL1113\_2for: 5'-GCTTCTAATACGACTCACTATAGGTACGGCGGTCTCACAAGAG-3'  
T7-OBP\_CL1113\_2rev: 5'-GCTTCTAATACGACTCACTATAGACTCCTCCCCCGTGACTTC-3'  
T7-OBP\_CL1190for: 5'-GCTTCTAATACGACTCACTATAGTTGTTTGTGTTGACGCATCCAT-3'  
T7-OBP\_CL1190rev: 5'-GCTTCTAATACGACTCACTATAGGCTGTTCCACGCTGACTGT-3'  
T7-CSPunigene15927for: 5'-GCTTCTAATACGACTCACTATAGCAAGCGCTTCGTAGTTCGTC-3'  
T7-CSPunigene15927rev: 5'-GCTTCTAATACGACTCACTATAGACGCCAAGAGAAAATGCAAG-3'  
T7-CSPunigene16449for: 5'-GCTTCTAATACGACTCACTATAGGCGTCTGTAGCGTTCACTTG-3'  
T7-CSPunigene16449rev: 5'-GCTTCTAATACGACTCACTATAGGGGGCGGGTAGAGTACAATC-3'  
T7-CSPunigene17213for: 5'-GCTTCTAATACGACTCACTATAGCACCCCTCGGCAGCAAGAG-3'  
T7-CSPunigene17213rev: 5'-GCTTCTAATACGACTCACTATAGAATTAGAGGGGGCTGGTGAG-3'  
T7-CSPunigene17279for: 5'-GCTTCTAATACGACTCACTATAGCAGCATCACCTCACCACAAC-3'  
T7-CSPunigene17279rev: 5'-GCTTCTAATACGACTCACTATAGTACCGTTTTGTACAATAACTTTGC-3'  
T7-CSPunigene18077for: 5'-GCTTCTAATACGACTCACTATAGCTATAAGAGCACCGGGATCG-3'  
T7-CSPunigene18077rev: 5'-GCTTCTAATACGACTCACTATAGCAAACGAGAGCAAACGTCAA-3'  
T7-CSPunigene18239for: 5'-GCTTCTAATACGACTCACTATAGACTTTTCGCTCACCTCCACCT-3'  
T7-CSPunigene18239rev: 5'-GCTTCTAATACGACTCACTATAGCTAGAAGAGCTCGGGGTGCGCCT-3'

T7-CSP\_CL397for: 5'-GCTTCTAATACGACTCACTATAGGCTAGCGCCTTACATTTGCT-3'  
 T7-CSP\_CL397rev: 5'-GCTTCTAATACGACTCACTATAGAAGAGGAGTCAAATAGGCGAGA-3'  
 T7-CSP\_CL1350for: 5'-GCTTCTAATACGACTCACTATAGGCCGCTAGCGTTTTACATTT-3'  
 T7-CSP\_CL1360rev: 5'-GCTTCTAATACGACTCACTATAGGGCGTAGGAACAGAACTTGC-3'  
 T7-CSPunigene3338for: 5'-GCTTCTAATACGACTCACTATAGGTGCGCCCTCAACGCTCAAC-3'  
 T7-CSPunigene3338rev: 5'-GCTTCTAATACGACTCACTATAGAGTCTTTTCGGCGTATCGTTT-3'  
 T7-CSPunigene16671for: 5'-GCTTCTAATACGACTCACTATAGAGTGCTCTGCCTCCCGTCAC-3'  
 T7-CSPunigene16671rev: 5'-GCTTCTAATACGACTCACTATAGAGCACGTCCTTCGTGTGCTA-3'  
 T7-CSPunigene16019for: 5'-GCTTCTAATACGACTCACTATAGCGATCTTCCTCAGCAGCAGT-3'  
 T7-CSPunigene16019rev: 5'-GCTTCTAATACGACTCACTATAGGCGAAGCTAGAAATGCCAGT-3'  
 T7-OBPunigene28848for: 5'-GCTTCTAATACGACTCACTATAGGCCGCCGCCGCTATGAAC-3'  
 T7-OBPunigene28848rev: 5'-GCTTCTAATACGACTCACTATAGGATTACAGTCGGGGATGAAAA-3'  
 T7-CSPunigene10231for: 5'-GCTTCTAATACGACTCACTATAGGACGGCAAAGAGCTCAAGAAG-3'  
 T7-CSPunigene10231rev: 5'-GCTTCTAATACGACTCACTATAGGGGCGAGTCAGACAAATCACAT-3'  
 T7-CSPunigene34934for: 5'-GCTTCTAATACGACTCACTATAGAGTACGTGCGCTGCTTCTCTG-3'  
 T7-CSPunigene34934rev: 5'-GCTTCTAATACGACTCACTATAGGAGAGCAGGGCTATTACAGGTC-3'

#### dsRNA の投与およびノックダウンの確認

調製した各 dsRNA について、1 回の投与あたり 3 µg/µL の dsRNA を 1 µL、ピペットを用いて、直接的に経口投与 (AKHR-dsRNA、LpR-dsRNA、および ApoLp-III-dsRNA の場合)、もしくは、シリンジを用いて体液中へ投与した(それら以外の dsRNA の場合)。各 dsRNA の投与条件およびその条件における mRNA のノックダウンの確認としては、成虫脱皮 0 日目の個体に dsRNA を投与後、2、または 3 日目に小腸(OBP/CSP の場合)、あるいは脂肪体(OBP/CSP 以外の場合)を摘出し、前述した、RT-PCR 解析、もしくは定量的 RT-PCR 解析を行った。また、第七章のスクリーニングにおける、AKHR のノックダウンの確認は、小腸をテンプレートとして用いた。

#### 絶食耐性の解析

羽化後 0 日目の成虫、または脱皮後 0 日目の終齢幼虫に各 dsRNA を投与後、1 個体ずつ別々のケージ(17×10×12 cm)に移し、絶食条件下においた。絶食耐性は、上述の条件下において、1 日毎に生存している個体数を数えることで評価した。

#### 1 日毎の摂食量の解析

羽化後 0 日目の成虫に AKH 100 pmol、Ringer 溶液、あるいは各 dsRNA を投与後、1 個体ずつ別々のケージ(17×10×12 cm)に移し、通常摂食条件下におき、餌と水を自由に与えた。摂食量は、この条件下において、1 日毎にフンの数を計測することで評価した。なお、本解析にあたり、摂食量はフンの量と相関関係があるという報告と<sup>82)</sup>、成虫個体の 1 個あたりのフンの重量はほぼ均一であることから(図 1-1-2-1)、フンの数を摂食量の指標として用いた。

#### 摂食行動の観察および解析

フタホシコオロギの成虫の通常個体、もしくは各 dsRNA を投与した個体を 1 匹ずつ人工飼料と水と共にケージ(17 cm×10 cm×12 cm)に入れ、各個体が自由に餌に到達できる状態で観察を行った。また、餌をケージ内の手前側に置き、水を後側に置くことで、特に手前側に注目して観察した。観察は、通常個体については、1 日あたり 6 時間を 1 日間、各 dsRNA を投与した個体については、1 日あたり 8 時間を 2 日間連続して行った。行動観察により得られた摂食間 gap のデータを log-survivor plot 解析した。その方法としては、個体ごとに時間の長い順に摂食間 gap を並べ、1 からの順列にした。その摂食間 gap の順番を縦軸に、摂食間 gap の時間を横軸にとりグラフを作成し、bout criterion を算出した。算出方法は、log-survivor plot 解析で接線の傾きが変わる点を求める、つまり、グラフ内の点を、2 本の近似直線が引けるような 2 グループに分け、そのうちの摂食間 gap の順番が大きい方のグループの中で、その順番が最も小

さい点を求めるという方法で行い、この点を bout criterion とする。次に、bout criterion 以上の intermeal gap の検定を行った。intermeal gap を、その時間について(自由度+1)の階級に分け、階級内の gap の度数分布が、負の二項分布を示す  $\chi^2$  検定を行った。摂食周期が規則性を持つ場合は、摂食を始めるタイミングが規則性をもつことになる。つまり、intermeal が、摂食を始めるまでのある一定の長さに分布が偏り、それより離れた長さには分布が少ないと考えられる。intermeal が負の二項分布に従うならば、ある階級において intermeal gap の頻度が高いことが示され、摂食を始めるまでのある一定の長さが存在することとなり、摂食を始めるタイミングに規則性があると解釈できる。また、gap のデータと同様に、1 回あたりの摂食時間の長さについても、同様に log-survivor plot 解析を行った。

### 運動活性の解析

運動活性の解析方法としては、既にフタホシコオロギの運動活性の評価を行っている文献に従った<sup>90)</sup>。15.6 cm × 10.8 cm × 6 cm の容器の底面に、底面を 6 等分するような線を引き、10 分間あたりの、その線を個体が通過した回数を運動活性の指標とした。運動活性は、AKHR-dsRNA、EGFP-dsRNA、あるいは水の投与後 2、3 日目において解析した。解析を始める 1 時間前に、1 個体ずつ、上述の容器に移し、馴化させた。その後、30 分間容器内を録画した。その後に、各個体群に AKH 5 pmol、あるいは 5  $\mu$ L の Ringer 溶液を投与し、その 90 分後から、同様に 30 分間容器内を録画した。その後、それぞれの 30 分間の録画結果を、10 分間 × 3 ラウンドに分割し、各ラウンドあたりの、個体が底面の線を通過した回数の平均値を、各個体の運動活性とした。

### AKH の合成

AKH は、*N*-9-fluorophenylmethoxy-carbonyl (Fmoc)法による固相合成法で作製した(Aapptec, Apex 396-SC synthesizer)。操作やプログラムは、付属のプロトコールに従った。合成開始の C 末端アミノ酸残基には Fmoc の結合した Fmoc-NH-SAL レジン(Watanabe Chemical)を用いた。合成したペプチドはクリベージカクテル 2 mL (82.5% TFA、2.5% 1,2-ethanedithiol、5% anisole、5% phenol、5% water)をレジンに加え、ペプチドの切断と脱保護を、室温で 3 時間行った。その後、反応液中の合成ペプチドは、冷ジエチルエーテルを 3 倍量加え不溶化させた。遠心により得られた沈殿は、0.1% TFA/水で溶解し、PEGASIL300-ODS (250 mm × 4.6 mm  $\phi$ )カラムにより HPLC で精製した。HPLC での精製では、0.1% TFA を含むアセトニトリルの濃度を 10% から 60% まで上昇させるリニアグラジエント溶出を 30 分間で行った。流速は 1.0 mL/分、検出波長は 225 nm とした。最終精製に至るまで、HPLC での精製はこの手順で行った。最終精製段階での HPLC において分取した溶出液を MALDI-TOF MS を用いて分子質量を測定した。

### 合成した AKH についての、MALDI-TOF MS を用いた質量解析

MALDI-TOF MS は、Applied Biosystems の Voyager-DE STR を用いた。マスマスペクトルを測定する試料液 1  $\mu$ L と、マトリックス( $\alpha$ -cyano-4-hydroxycinnamic acid (CHCA)の 60% アセトニトリル/0.1% TFA 飽和溶液)をサンプルプレート上で 1:1 になるように混合し、リニアモードでマスマスペクトルを測定した。加速電圧は 20 kV に設定し、キャリアレーションには、トリプシン (Trypsin Sequencing Grade, Roche)の自己消化物、アンジオテンシン(BACHEM)を用いた。

### SDS-PAGE

SDS-PAGE のサンプルとして、成虫個体の体液を 2.2  $\mu$ L 当量用いた。実際には、サンプルバッファー(50 mM Tris-HCl (pH 6.8)、5% 2-メルカプトエタノール(2-ME)、2% SDS) 40  $\mu$ L に、個体から回収した直後の体液を 5  $\mu$ L 加え、100°C で 5 分間煮沸し、そのうち 20  $\mu$ L をローディングした。ゲルは 15% ポリアクリルアミドゲルを用いた。分子量マーカーには、Low Molecular Weight Calibration Kit for SDS-PAGE (Amersham Biosciences)を用いた。ゲル 1 枚あたり 25 mA の電流で泳動し、泳動先端がゲルの端に達したところで泳動を終了した。その後、CBB 染色した(0.25% CBB R-250/50% メタノール/5% 酢酸)。

### Native-PAGE

Native-PAGE のサンプルとしては、SDS-PAGE と同様に、成虫個体の体液を 2.2  $\mu$ L 当量用いた。実際には、サンプルバッファー(50 mM Tris-HCl (pH 6.8)、5% 2-メルカプトエタノール(2-ME)) 40  $\mu$ L に、個体から回収した直後の体液を

5  $\mu$ L 加え、そのうち 20  $\mu$ L をローディングした。ゲルは 11.25% ポリアクリルアミドゲルを用いた。SDS-PAGE と同様に、ゲル 1 枚あたり 25 mA の電流を流して泳動し、泳動先端がゲルの端に達したところで泳動を終了した。その後、CBB で染色した(0.25% CBB R-250/50% メタノール/5% 酢酸)。

#### アミノ酸配列解析

SDS-PAGE で分離したタンパク質を、PVDF 膜に転写した。CBB 染色により染色し、PVDF 膜上の目的サイズのタンパク質を切り出した。プロテインシーケンサーを用いて、この目的サイズのタンパク質の N 末端アミノ酸配列解析を行った。解析は HPLC チャート上で、スタンダード PTH-アミノ酸と溶出位置を比較することにより行った。

#### 各組織からの脂質および糖質の抽出

脂質および糖質の抽出方法は、Folch 法を改変した方法に基づいて行った<sup>92)</sup>。10 mg の  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  と 100  $\mu$ L の 75% メタノールを混和した溶液に、回収した直後の体液 5  $\mu$ L、湿重量を計測した後の各組織(中腸、脂肪体、神経系)、あるいはフンを加えた後、300  $\mu$ L のクロロホルム-メタノール溶液(1:1)を加え、ホモジェナイズ、ボルテックス後、遠心分離(13,000 rpm、常温、5 分間)し、上清を回収した。沈殿については、再度 150  $\mu$ L のクロロホルム/メタノール(1:1)を加え、ボルテックス、遠心分離(13,000 rpm、常温、5 分間)し、上清を回収した。これらの上清をあわせ、250  $\mu$ L のクロロホルム、150  $\mu$ L の 1M NaCl を加え、ボルテックス、遠心分離(13,000 rpm、常温、5 分)した。糖質を抽出する場合は、上層の水相を回収し、遠心濃縮機を用いて蒸発乾固させ、15、または 30  $\mu$ L の水に再溶解させた。脂質を抽出する場合は、下層の有機層を回収し、遠心濃縮機を用いて蒸発乾固させ、15、または 30  $\mu$ L のクロロホルム/メタノール(1:1)に再溶解させた。

#### TLC (Thin-layer chromatography、薄層クロマトグラフィー)

脂質抽出を行ったサンプルは、8 cm  $\times$  4 cm の TLC プレート(silica gel 60 F<sub>254</sub>、Merck)に、スポット量が 0.75  $\mu$ L または 1.5  $\mu$ L になるように、数回にわたりスポットして、展開した。展開溶媒は、ヘキサン:ジエチルエーテル:酢酸(60: 40: 1)を用いた。展開した TLC プレートは、ヨウ素の粒を入れた瓶に数分間入れることで、ヨウ素蒸気による発色でスポットを検出した。なお、スポットの同定のために、TAG、1,2-DAG、1,3-DAG の標準物質として、それぞれトリオレイン(Triolein、ナカライテスク)、1,2-ジオレイン(1,2-dioleoyl-*sn*-glycerol、Sigma-Aldrich)、1,3-ジオレイン(1,3-diolein、Sigma-Aldrich)を、また、オレイン酸(oleic acid、ナカライテスク)、コレステロール(cholesterol、Sigma-Aldrich)を用いた。

#### Sulfo-phospho-vanillin 法<sup>97)</sup>による脂質の定量

サンプルを、クロロホルム/メタノール (1:1)に再溶解させ、そのうち 1  $\mu$ L を、50  $\mu$ L の硫酸と混和し、100°C で 10 分間加熱した。常温まで冷ました後に、500  $\mu$ L のバニリン reagent (0.2% バニリン(関東化学)、67% リン酸)を添加し、混和した。10 分間静置した後に、分光光度計にて、540 nm の吸光度を測定した。スタンダードとしては、コレステロールを用いた。定量した脂質は、体液から抽出した場合は、1,2-DAG として、脂肪体から抽出した場合は、TAG として算出した。

#### Anthrone 法<sup>98)</sup>による糖質の定量

サンプルを、水に溶解させ、そのうち 1  $\mu$ L を、500  $\mu$ L の anthrone reagent (0.13% anthrone (関東化学)、67% 硫酸)と混和し、90°C で 10 分間加熱した。常温まで冷ました後に、分光光度計にて、590 nm の吸光度を測定した。

#### ヘキシキナーゼ法による D-グルコースおよびトレハロースの定量

グルコースの定量に関しては、サンプルを、適量の水に溶解させ、そのうち 1  $\mu$ L を、150  $\mu$ L の酵素反応溶液(3.3 mM ATP、3.3 mM  $\text{MgCl}_2$ 、83 mM Tris-HCl (pH 8.0))と、0.15 U のヘキシキナーゼ (ナカライテスク)と混和し、37°C で 30 分間反応させた。その後、2 分間煮沸することで酵素反応を停止させ、常温になるまで静置した。次に、この溶液を、150  $\mu$ L の酵素反応溶液(0.3 mM NADP、1.1 mM  $\text{MgCl}_2$ 、67 mM Tris-HCl (pH 8.0))と、0.1 U のグルコース 6 リン酸デヒドロゲナーゼ(Sigma)と混和し、37°C で 30 分間反応させた。反応液について、分光光度計にて、340 nm の吸光度を測定

した。トレハロースの定量に関しては、サンプルを、0.05 U のトレハラーゼ(sigma)により、37°C で 30 分間処理した後に、上述のグルコースの定量を行った。その結果から、トレハロース量は、各糖質サンプルについて、トレハラーゼ処理した場合のグルコース量と、トレハラーゼ処理していない場合のグルコース量との差分から算出した。

### 脂肪体の Nile Red 染色

脂肪体を摘出し、スライドガラス上で、4%のホルマリンに3時間常温で浸すことで固定した後に、PBS で3回洗浄した。固定した脂肪体を、Nile Red 溶液(Nile Red が 1 mg/mL になるようにアセトン中に溶解し、そのうちの 1  $\mu$ L を 100  $\mu$ L の PBS に混和した溶液)に数分間浸した。その後 PBS で3回洗浄し、脂肪体を蛍光顕微鏡(Olympus、BX53F)にて観察、撮影した。

### リポホリンの回収

通常摂食条件における、成虫脱皮後 0-10 日のフタホシコオロギの成虫オスの通常個体から回収した体液(500  $\mu$ L)と、4.4 g/10 mL の KBr 溶液 9.5 mL とを混合し、超遠心分離(40,000 rpm, 16 h, 4°C)し、その後に、遠心分離したサンプルを上層から 1 mL 毎に分画した。その後、各画分を SDS-PAGE に供して、リポホリンをはじめとする体液中のタンパク質について、密度勾配による分画ができていることを確認し、さらに、各画分の密度および脂質含有量を分析することで、リポホリンを含有する画分を絞り込んだ。一般的に、昆虫のリポホリンの密度は 1.05-1.20 g/mL であることと<sup>99,100</sup>、各画分の脂質含有量の分析から、リポホリンを多く含む画分を判断した。

### 摂食開始までにかかる時間の解析

羽化後 2-3 日のフタホシコオロギ成虫オス個体を、1 個体ずつ別々の容器(4.5 cm i. d.  $\times$  4 cm)に移した。摂食状態を合わせるために、4 時間絶食させた後、リポホリン、トレハロース(ナカライ)、D-グルコース(ナカライ)、L-グルコース(ナカライ)を投与し、その 30 分後に餌を提示し、その餌の摂食を開始するまでの時間を計測した。

### 体液中の 1,2-DAG レベルとトレハロースレベル、および摂食量との相関関係の解析

成虫脱皮 0 日目のフタホシコオロギの 11 個体について、各個体の体重を計測した後、1 個体ずつ別々の容器(4.5 cm i. d.  $\times$  4 cm)に移した。その後、各個体の 1 日毎のフンの数を、1 週間計測した。同時に、各個体の体液を、1 日毎に、1 週間回収した。各個体の体液から脂質、糖質を抽出し、1,2-DAG レベルおよびトレハロースレベルを定量した。各個体において、(i) 体重、(ii) 1 日あたりのフンの数の平均、(iii) 体液中の 1,2-DAG レベルの平均、(iv) 体液中のトレハロースレベルの平均の 4 つの組み合わせに関して、相関関係を調べた。

### cDNA サブトラクション法

cDNA サブトラクション法の概要は、図 5-1-1 (A)に示した。実験の手順は、Clontech PCR-Select™ (Invitrogen) のプロトコールに準じた。AKHR-dsRNA および EGFP-dsRNA の投与後 3 日目のフタホシコオロギ成虫オス個体から、脂肪体を摘出し、TRIzol® Reagent を用いて、total RNA を抽出した。その後、oligotex-dT30 mRNA purification kit (TaKaRa)を用いて、mRNA を精製した。精製した mRNA (各 2  $\mu$ g)をテンプレートとして、Clontech PCR-Select™ に準拠したプライマー(5'-TTTTGTACAAGCTT<sub>30</sub>N<sub>1</sub>N-3')を用いて逆転写反応を行った。Super Script® III を用いて、42°C で 30 分間反応させることで、1st strand cDNA を合成した。反応液を氷冷した後に、RNase H (TaKaRa)と、*E. coli* DNA polymerase I (TaKaRa)を添加し、16°C で 2.5 時間反応させることで、2nd strand cDNA を合成した。その後、2nd strand cDNA をフェノール/クロロホルム抽出およびエタノール沈殿により精製し、TE に溶解させた。その溶液に T4 DNA polymerase I を加え、37°C で 30 分間反応させることで、完全長の 2nd strand cDNA を合成した。得られた cDNA を、*Rsa*I により消化し(37°C、1.5 時間)、消化産物をフェノール/クロロホルム抽出およびエタノール沈殿により精製した。*Rsa*I 消化後の、AKHR のノックダウン個体の脂肪体に由来する cDNA (Tester cDNA)と、Adaptor 1 (5'-CTAATACGACTCACTATAGGGCTCGAGCGGCCCGCCCGGCAGGT-3')、および、Adaptor 2 (5'-CTAATACGACTCACTATAGGGCAGCGTGGTCGCGGCCGATTG-3')とをそれぞれライゲーションした。次に、Adaptor 1 が付加した Tester cDNA に、*Rsa*I 消化後の、EGFP-dsRNA 投与個体の脂肪体に由来する cDNA (Driver cDNA)

を過剰量混和し、ハイブリダイズさせた。ハイブリダイズは、混和したサンプルを denature (98°C で 1.5 分間インキュベート) した後に、68°C で 8 時間行った。なお、Adaptor 2 が付加した Tester cDNA にも、*Rsa* I 消化後の Driver cDNA を過剰量混和し、同様にハイブリダイズさせた。次に、ハイブリダイズ後の 2 種のサンプルと、denature した、過剰量の Driver cDNA とを混和し、68°C で一晩インキュベートした。その後、200  $\mu$ L の dilution buffer (20 mM HEPES、20 mM NaCl、0.2 mM EDTA (pH8.0)) を添加した。なお、Tester cDNA を EGFP-dsRNA 投与個体の脂肪体に由来する cDNA とし、Driver cDNA を AKHR のノックダウン個体の脂肪体に由来する cDNA とした場合も、同様に、アダプター付加とハイブリダイズを行った。

次に、上述のハイブリダイズにて濃縮された、発現量差のある cDNA を増幅するために、ハイブリダイズ後のサンプルをテンプレートとして、Adaptor 1 および Adaptor 2 に相補的な塩基配列を有するプライマー (5'-CTAATACGACTCACTATAGGGC-3') を用いて、PCR を行った。PCR は、75°C で 5 分間インキュベートし、アダプター配列を伸長した後に、Ex Taq を用いて、94°C、30 秒; 66°C、30 秒; 72°C、90 秒を 1 サイクルとし、27 サイクル反応させた。この PCR 産物を TE によって 25 倍希釈し、nested PCR のテンプレートとした。nested PCR は、Apaptor 1 および Adaptor 2 にそれぞれ相補的な塩基配列を有するプライマー (5'-TCGAGCGGCCCGCCGCGGCAGGT-3' と、5'-AGCGTGGTCGCGGCCGAGGT-3') を用いた。PCR は、Ex Taq を用いて、94°C、10 秒; 68°C、30 秒; 72°C、90 秒を 1 サイクルとし、12 サイクル反応させた。nested PCR 産物は、アガロースゲル電気泳動し、ゲルから抽出することで回収した。その後、回収した PCR 産物を、TA クローニングした。得たプラスミド DNA で大腸菌を形質転換した後、コロニー PCR によって、インサートを含むようなプラスミドをもつコロニーを選別し、それぞれのプラスミドを抽出した。抽出したプラスミドは、次の実験過程である、ドットプロットや、塩基配列解析に用いた。

### ドットプロット

各プラスミドを、約 100  $\mu$ g、2 枚のナイロンメンブレンに、それぞれが同じ位置関係になるようにドットした。その後、DNA をドットした面を上にして、トランスイルミネーターで 3 分間 UV を照射することにより、メンブレンに DNA を固定した。その後、メンブレンを 1 枚ずつ、25 mL 容の遠沈管に入れ、あらかじめ 42°C に温めておいた適量の Hybridization buffer (5  $\times$  SSC<sup>\*</sup>; 0.1% N-lauroylsarcosine (w/v); 0.02% SDS; 1% Blocking reagent<sup>\*</sup> (v/v)) を加え、ハイブリオーブにて 42°C で数時間振盪した(プレハイブリダイゼーション)。その後、新しいロットのフタホシコオロギ成虫オス個体から調製した、AKHR のノックダウン個体の脂肪体由来の cDNA、あるいは、コントロール個体の脂肪体由来の cDNA を DIG (digoxigenin) ラベルしたプローブ (1-2  $\mu$ L) を、それぞれ 70°C にて変性させた後に、プレハイブリダイゼーション中の各溶液に添加した。その後、50°C にて、一晩振盪した(ハイブリダイゼーション)。なお、DIG ラベルしたプローブは、それぞれの cDNA をテンプレートに、PCR DIG labeling mix (Roche) を用いて PCR 反応させることで調製した。この PCR 反応は、Ex Taq を用いて、94°C、30 秒(最初のサイクルのみ 3.5 分); 60°C、30 秒; 72°C、60 秒を 1 サイクルとし、30 サイクル反応させた。ハイブリダイゼーションの後、メンブレンを遠沈管から取り出し、別の遠沈管にて、low stringency buffer (2  $\times$  SSC<sup>\*</sup>, 0.1% SDS) を用いて、室温で 20 分間程度洗浄した。その後、high stringency buffer (0.2-0.5  $\times$  SSC<sup>\*</sup>, 0.1% SDS) を用いて、55°C で 20 分間、2 回洗浄した。洗浄後のメンブレンを、適量の solution 1 (0.1 M Tris-HCl (pH 7.4), 0.15 M NaCl) に浸し、30 分間振盪した。次に、ハイブリダイゼーションバッグにメンブレンを入れ、solution 2 (solution 1 + 1% Blocking reagent<sup>\*</sup>) を満たした後に、気泡が入らないようにシールし、数時間振盪した。その後、メンブレンを、solution 2 を満たした別のハイブリダイゼーションバッグに入れ、抗 DIG 抗体(Roche) を、3000 倍程度に希釈されるように加えた後、気泡が入らないようにシールし、数時間振盪した。その後、メンブレンを取り出し、25 mL 容の遠沈管にメンブレンを入れ、適量の solution 3 (solution 1 + 0.3% Tween) を加えて 10 分間、3 回洗浄した。その後、メンブレンを solution 4 (0.1 M Tris-HCl (pH 9.5), 0.1 M NaCl) に浸した。これらのメンブレンを取り出し、メンブレン上に CDP-star を 500  $\mu$ L 程度加えた。その 1-2 分後に、FLA-5000 (Fujifilm) を用いて、化学発光を検出した。

<sup>\*</sup> 20  $\times$  SSC: 3 M NaCl、300 mM sodium citrate (pH 7.0)

<sup>\*</sup> 10  $\times$  Blocking reagent: 10% Blocking reagent (Roche) (w/v) in maleic and buffer

### 脂肪酸組成の解析

各組織から抽出した脂質を、30  $\mu$ L- 100  $\mu$ L のクロロホルム/メタノール (1:1) に再溶解させ、さらに、200  $\mu$ L 程度の、

けん化試薬(1N KOH、90% MeOH)を加え、80-90℃で、1-2時間程度、けん化反応させた。その後、6N 塩酸を6  $\mu$ L 入れて pH を 2-3 に調整した。その後、遊離した脂肪酸を、ヘキサンを用いた溶媒抽出で回収した。具体的には、ヘキサンを 300  $\mu$ L を加え、よく振盪し、遠心分離(13,000 rpm、10 分間)した後に、上層を回収した。下層に対して、再度、同様にヘキサンを加え、遠心分離後に上層を回収した。上層をまとめた後に、DW を 200  $\mu$ L 加え、拡散によって水溶性成分を除いた。再度上層を回収し、遠心濃縮機を用いて蒸発乾固させた後、30  $\mu$ L のクロロホルム/メタノール (1:1)に再溶解させた。その後、そのうちの5  $\mu$ L を、ADAM (9-anthryldiazomethane)溶液と反応させることで、蛍光ラベル化した。ADAM 溶液は、ADAM 粉末 (フナコシ)を、1%になるようにアセトンに溶解させ、その後、メタノールで 10 倍希釈することで調製した。ADAM による蛍光ラベル化反応は、遮光にて、常温で 30 分間程度反応させた。反応後のサンプルのうち 5-10  $\mu$ L を、HPLC 解析に供した。HPLC 解析の条件は以下の通りである。

カラム: PEGASIL C8 SP100

流速: 1mL/min

溶媒: アセトニトリル:水 = 85:15

蛍光検出器: 島津 RF-530 または RF-20A

励起波長: 365 nm

蛍光波長: 412 nm

なお、スタンダードとして、12:0、14:0、16:0、18:0、18:1、18:2、18:3 の脂肪酸(ナカライテスク)由来の ADAM 誘導体を検量線作成に用いた。HPLC のクロマトグラムにて見られた、7 種の脂肪酸(12:0、14:0、16:0、18:0、18:1、18:2、18:3) の各ピーク面積から、モル濃度を算出し、その合計に対する各脂肪酸のモル濃度比を算出した。

#### TAG の化学合成

18:0 (15.11 g, 53.1 mmol)とグリセロール(1.29 g, 14.0 mmol)を 60 mL の四塩化炭素に溶解した溶液に、4-dimethylaminopyridine(6.49 g)および *N,N'*-dicyclohexylcarbodiimide (10.96 g)の四塩化炭素溶液 60 mL を氷冷下で加え、その混合溶液を氷冷下 16 時間攪拌した。反応液をろ紙でろ過して得られたろ液を減圧下濃縮し、粗 TAG を得た。得られた粗 TAG をシリカゲルカラム(ワコーゲル C-200、300 g)に付し、*n*-ヘキサン:酢酸エチルの割合を 30:1、20:1、10:1 と変化させた溶出液で段階溶出した。TAG の溶出画分を減圧下濃縮することで 3.33 g 得られた(収率 26.6%)。TAG(18:0/18:0/18:0): MALDI-TOFMS (2,5-dihydroxybenzoic acid matrix, positive)  $m/z$  913 ( $M+Na$ )<sup>+</sup>;  $\delta_H$  (CHCl<sub>3</sub>, 500 MHz): 5.27 (m, 1H), 4.35 (dd,  $J=4.5$  and 11 Hz, 2H), 4.15 (dd,  $J=5.5$  and 11 Hz, 2H), 2.32 (m, 6H), 1.20-1.30 (96H), 0.88 (t,  $J=7$  Hz, 9H). (図 A)



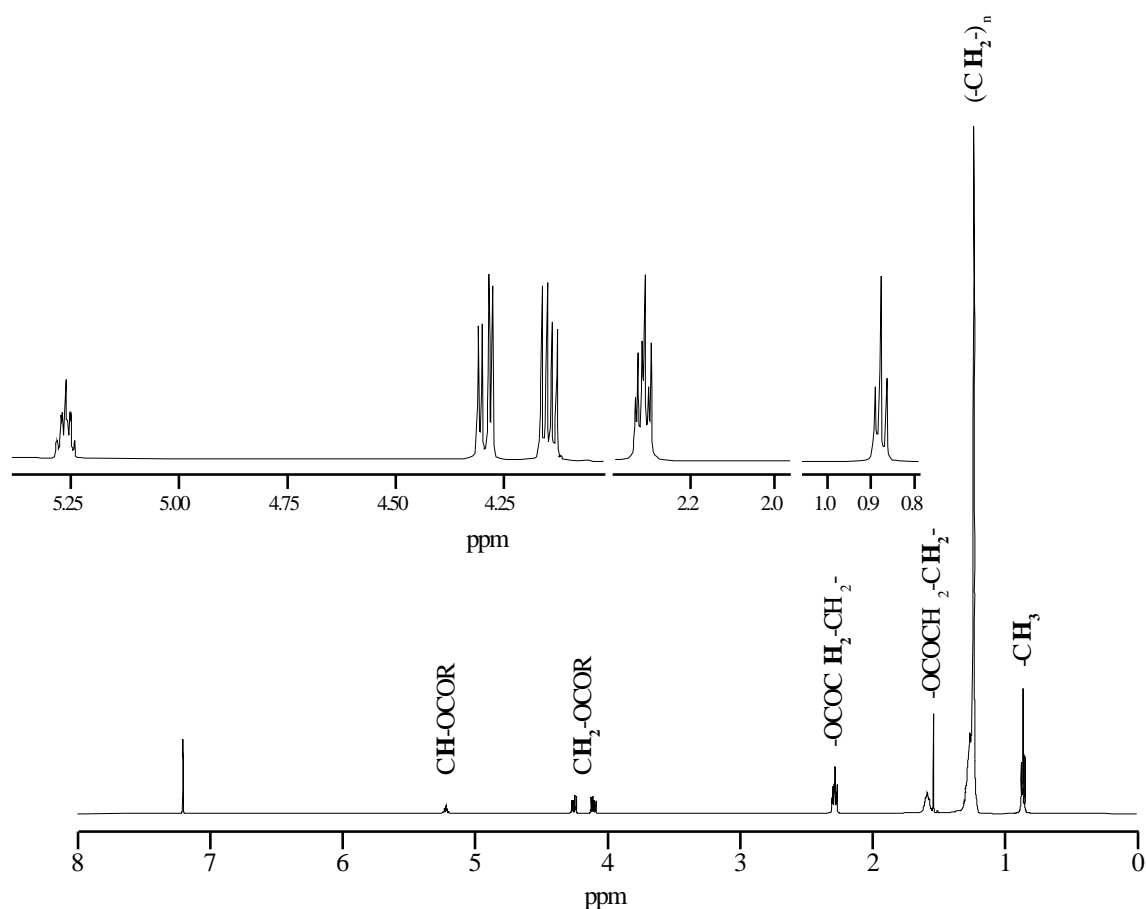


図 A

同様の方法で、18:1 (15.0 g, 53.1 mmol)とグリセロール(1.29 g, 14.0 mmol)を 60 mL の四塩化炭素に溶解した溶液に、4-dimethylaminopyridine(6.49 g)および *N,N'*-dicyclohexylcarbodiimide (10.96 g)の四塩化炭素溶液 60 mL を氷冷下で加え、その混合溶液を氷冷下 16 時間攪拌した。反応液をろ紙でろ過して得られたろ液を減圧下濃縮し、粗 TAG を得た。得られた粗 TAG をシリカゲルカラム(ワコーゲル C-200, 300 g)に付し、*n*-ヘキサン:酢酸エチルの割合を 30:1、20:1、10:1 と変化させた溶出液で段階溶出した。TAG の溶出画分を減圧下濃縮することで 8.00 g 得られた(収率 64.3%)。TAG(18:1/18:1/18:1): MALDI-TOFMS (2,5-dihydroxybenzoic acid matrix, positive)  $m/z$  907 ( $M+Na$ )<sup>+</sup>

同様の方法で、18:2 (14.9 g, 53.1 mmol)とグリセロール(1.29 g, 14.0 mmol)を 60 mL の四塩化炭素に溶解した溶液に、4-dimethylaminopyridine (6.49 g)および *N,N'*-dicyclohexylcarbodiimide (10.96 g)の四塩化炭素溶液 60 mL を氷冷下で加え、その混合溶液を氷冷下 16 時間攪拌した。反応液をろ紙でろ過して得られたろ液を減圧下濃縮し、粗 TAG を得た。得られた粗 TAG をシリカゲルカラム(ワコーゲル C-200, 300 g)に付し、*n*-ヘキサン:酢酸エチルの割合を 30:1、20:1、10:1 と変化させた溶出液で段階溶出した。TAG の溶出画分を減圧下濃縮することで 6.22 g 得られた(収率 50.4%)。TAG(18:2/18:2/18:2): MALDI-TOFMS (2,5-dihydroxybenzoic acid matrix, positive)  $m/z$  901 ( $M+Na$ )<sup>+</sup>

同様の方法で、18:3 (14.8 g, 53.1 mmol)とグリセロール(1.29 g, 14.0 mmol)を 60 mL の四塩化炭素に溶解した溶液に、4-dimethylaminopyridine (6.49 g)および *N,N'*-dicyclohexylcarbodiimide (10.96 g)の四塩化炭素溶液 60 mL を氷冷下で加え、その混合溶液を氷冷下 16 時間攪拌した。反応液をろ紙でろ過して得られたろ液を減圧下濃縮し、粗 TAG を得た。得られた粗 TAG をシリカゲルカラム(ワコーゲル C-200, 300 g)に付し、*n*-ヘキサン:酢酸エチルの割合を 30:1、20:1、10:1 と変化させた溶出液で段階溶出した。TAG の溶出画分を減圧下濃縮することで 5.33 g 得られた(収率 43.5%)。TAG(18:3/18:3/18:3): MALDI-TOFMS (2,5-dihydroxybenzoic acid matrix, positive)  $m/z$  895 ( $M+Na$ )<sup>+</sup>

同様の方法で、12:0 (10.6 g, 53.1 mmol)とグリセロール(1.29 g, 14.0 mmol)を 60 mL の四塩化炭素に溶解した溶液に、

4-dimethylaminopyridine (6.49 g)および *N,N'*-dicyclohexylcarbodiimide (10.96 g)の四塩化炭素溶液 60 mL を氷冷下で加え、その混合溶液を氷冷下 16 時間攪拌した。反応液をろ紙でろ過して得られたろ液を減圧下濃縮し、粗 TAG を得た。得られた粗 TAG をシリカゲルカラム(ワコーゲル C-200, 300 g)に付し、*n*-ヘキサン:酢酸エチルの割合を 30:1、20:1、10:1 と変化させた溶出液で段階溶出した。TAG の溶出画分を減圧下濃縮することで 6 g 得られた(収率 66.8%)。TAG(12:0/12:0/12:0): MALDI-TOFMS (2,5-dihydroxybenzoic acid matrix, positive)  $m/z$  661 (M+Na)<sup>+</sup>

同様の方法で、14:0 (12.1 g, 53.1 mmol)とグリセロール(1.29 g, 14.0 mmol)を 60 mL の四塩化炭素に溶解した溶液に、4-dimethylaminopyridine (6.49 g)および *N,N'*-dicyclohexylcarbodiimide (10.96 g)の四塩化炭素溶液 60 mL を氷冷下で加え、その混合溶液を氷冷下 16 時間攪拌した。反応液をろ紙でろ過して得られたろ液を減圧下濃縮し、粗 TAG を得た。得られた粗 TAG をシリカゲルカラム(ワコーゲル C-200, 300 g)に付し、*n*-ヘキサン:酢酸エチルの割合を 30:1、20:1、10:1 と変化させた溶出液で段階溶出した。TAG の溶出画分を減圧下濃縮することで 8.29 g 得られた(収率 81.5%)。TAG(14:0/14:0/14:0): MALDI-TOFMS (2,5-dihydroxybenzoic acid matrix, positive)  $m/z$  745 (M+Na)<sup>+</sup>

同様の方法で、16:0 (13.6 g, 53.1 mmol)とグリセロール(1.29 g, 14.0 mmol)を 60 mL の四塩化炭素に溶解した溶液に、4-dimethylaminopyridine (6.49 g)および *N,N'*-dicyclohexylcarbodiimide (10.96 g)の四塩化炭素溶液 60 mL を氷冷下で加え、その混合溶液を氷冷下 16 時間攪拌した。反応液をろ紙でろ過して得られたろ液を減圧下濃縮し、粗 TAG を得た。得られた粗 TAG をシリカゲルカラム(ワコーゲル C-200, 300 g)に付し、*n*-ヘキサン:酢酸エチルの割合を 30:1、20:1、10:1 と変化させた溶出液で段階溶出した。TAG の溶出画分を減圧下濃縮することで 7.76 g 得られた(収率 68.4%)。TAG(16:0/16:0/16:0): MALDI-TOFMS (2,5-dihydroxybenzoic acid matrix, positive)  $m/z$  829 (M+Na)<sup>+</sup>

#### フタホシコオロギ用の人工飼料の調製

フタホシコオロギ用の人工飼料の栄養分の組成は、トノサマバッタ用の人工飼料の栄養分の組成を参考にした<sup>144,145</sup>。フタホシコオロギ用の人工飼料の栄養分の組成は、実験により、適宜栄養分を変更して調製した。各実験における、それらの組成を、表 6-1、表 6-2-1、および表 6-2-2 に示した。タンパク質としては、カゼイン(ナカライテスク)を用いた。糖質としては、スクロース(関東化学)とデキストリン(ナカライテスク)を用いた。セルロース粉末(ナカライテスク)は、栄養分としてではなく、各人工飼料の物性を均一にさせるために用いた。なお、Wesson's salt (Sigma)は、ミネラル源として用いたが、その組成は以下の通りである。

炭酸カルシウム(21.000%)、硫酸銅(II)五水和物(0.039%)、リン酸鉄(III) (1.470%)、硫酸マンガン(II)一水和物(0.020%)、硫酸マグネシウム七水和物(9.000%)、硫酸アルミニウムカリウム(0.009%)、塩化カリウム(12.000%)、リン酸二水素カリウム(31.000%)、ヨウ化カリウム(0.005%)、塩化ナトリウム(10.500%)、フッ化ナトリウム(0.057%)、リン酸三カルシウム(14.900%)。

人工飼料に、常温で液体の脂質(18:1、18:2、18:3、TAG (18:1/18:1/18:1)、TAG (18:2/18:2/18:2)、TAG (18:3/18:3/18:3))を加える際は、直接混ぜるのみでは、均一に混和させることが困難である。そこで、脂肪酸や TAG を人工飼料に加える場合は、全ての場合において、脂質をエタノールに溶解させた後に、人工飼料に加え、よく振盪した後に、凍結乾燥させることで調製した。調製した人工飼料は全て 4℃ にて保存した。

#### choice アッセイ

各 dsRNA の投与後 2、3 日目の成虫オス個体を、1 個体ずつ別々のケージ(17×10×12 cm)に移した。シャーレ(2.9 cm i.d.)に、アッセイに用いる栄養分組成の人工飼料を、それぞれ入れた後、人工飼料の重量を、シャーレの重量も含めて計測した。シャーレをケージ内に入れ、水とともに、自由に与えた。3 日後に、それぞれのシャーレを取り出し、重量を計測することで、それぞれの人工飼料の摂食量を測定した。三大栄養素の嗜好性に関するアッセイ以外のアッセイでは、各人工飼料の摂食量と、それらの合計の摂食量から、各人工飼料の摂食比率を算出した。三大栄養素の嗜好性の解析の場合にのみ、三種類の人工飼料(表 6-1 における P-diet、C-diet および P-diet)のそれぞれの摂食量と、それぞれの人工飼料における、タンパク質(カゼイン)、糖質(スクロースとデキストリン)、および脂質(ステアリン酸とコレステロール)の組成から、三大栄養素の摂取比率を算出した。

## 小腸内の神経の逆行性染色

成虫脱皮後 1 日目の、フタホシコオロギ成虫オス個体の片側の小腸を、小腸へと連絡している神経が露出するように、解剖用ハサミにより切断し、 $\text{CoCl}_2$  を内部に含ませたキャピラリーを、露出部分を覆うように差し込んだ。4°C にて 2 日間静置した後に、キャピラリーを引き抜き、頭部の神経系を摘出した。摘出した神経系を、PBS にて数回洗浄した後、洗浄液に、発色試薬として、ルベアン酸(ジチオオキシミド)の水飽和溶液を数滴添加し、10 分間静置した。その後 PBS で洗浄し、顕微鏡(Olympus、BX53F)にて観察、撮影した。

## RNA-sequencing (RNA-seq) およびデータ解析

RNA-seq 解析は、BGI-JAPAN (株)にて受託解析した。受託解析の概要および解析データの一部は、図 7-1-1、図 7-1-2 に示した。フタホシコオロギ成虫オス個体 16 個体から、小腸を摘出し、TRIzol® Reagent に回収し、total RNA を抽出した。次に、total RNA に 1 U の DNase I (RNase-free) (TaKaRa)を加えて DNase 処理した(37°C、30 分間)。その後、フェノール/クロロホルム抽出、エタノール沈殿により回収した total RNA をスピニングカラムにより精製した。分光光度計にて、total RNA 量とその精製度を確認した。以降は BGI-JAPAN にて、total RNA から、Oligo (dT)を用いて、mRNA を精製した。mRNA を fragmentation buffer に加え、断片化した。断片化した mRNA をテンプレートとして、ランダムプライマーを用いて、cDNA を合成した。合成した cDNA 断片を精製し、EB buffer に再溶解させた。cDNA 断片にアダプターを付加して、断片末端を平滑化した後に、アダプターを付加した。これらの cDNA 断片を PCR により増幅させた。その後、増幅させた cDNA 断片の塩基配列を、Illumina HiSeq™ 2000 によりシーケンシングした。

シーケンシングにより、raw data (total raw reads: 64,601,178 reads)を得た。その後、raw data からアダプター、インデックス、および低品質のデータを除き、clean data を得た(total clean reads: 53,890,492 reads、total clean nucleotides (nt): 4,850,144,280 nt、GC percentage: 45.62%)。clean data から重複配列(約 2,500,000,000 nt)を除き、contig としてアセンブリーした(total contig number: 75,961、total length (nt): 23,230,316、mean length (nt): 306)。この際、contig にアセンブリーできたデータは clean data の約 48%であった。この contig を用いて、unigene にアセンブリーした(total unigene number: 39,862、total length (nt): 20,881,540、mean length (nt): 524)。この 39,862 の unigene のうち、各 unigene 間の塩基配列に 70%以上の同一性が見出された場合、改めて、それらを cluster (CL)として分類した。その結果、39,862 の unigene のうち、4,323 の unigene が、2,087 の cluster に分類された。これらの 4,323 の unigene は、以下“CL”と表記する。また、それ以外の 35,539 の unigene が、singleton であり、以下そのまま“unigene”と表記することにする。

これらの、39,862 の各 unigene および CL の塩基配列情報から、BLASTx および BLASTn により、アノテーションを行った(e-value < 0.00001)。39,862 の各 unigene および CL のうち、22,622 の unigene および CL がアノテーションされた。この際に、データベースとして NR を用いて Gene Ontology (GO)によるアノテーションも行った。また、39,862 の各 unigene および CL の塩基配列情報から、CDS (Protein coding sequence)を予測した。それぞれの予測された CDS から、演繹アミノ酸配列情報を得た。

各遺伝子(unigene および CL)の発現レベルの指標の算出には、FPKM (Fragments Per kb per Million fragments) method を用いた。FPKM の計算式は、 $\text{FPKM} = 10^6 C / (N L / 10^3)$  である。C は、RNA-seq 解析の際の、各候補遺伝子のフラグメント配列の存在数を示し、N は、全 unigene および CL のフラグメント配列の存在数の合計を示し、L は、各候補遺伝子の CDS (コーディング領域)の塩基数である。

また、39,862 の各 unigene の塩基配列情報から、SSR (Simple sequence repeats)および SNP (Single-nucleotide polymorphism)の解析も行った。

以下に、上述の解析で用いられたソフトウェアとデータベースを示す。

### contig、unigene のアセンブリーおよび cluster の分類

ソフトウェア: Trinity (release-20121005)、TGICL (v2.1)、Phrap (Release 23.0)

### unigene のアノテーション

ソフトウェア: BLAST (v2.2.26+x64-linux)

データベース: NT (release-20121005)、NR (release-201208007)、KEGG (Release 63.0)、Swiss-plot (release-2012\_08)、COG (release-20090331)

#### unigene の GO 分類

ソフトウェア: Blast2GO (v2.5.0)

データベース: GO (release 2012-10-01)

#### unigene の metabolic pathway 解析

ソフトウェア: Path\_finder (Unpublished)

データベース: KEGG

#### unigene の CDS の予測

ソフトウェア: ESTScan (v3.0.2)

#### unigene の SSR の解析

ソフトウェア: MicroSATellite、Primer3 (release 2.3.4)

#### unigene の SNP の解析

ソフトウェア: SOAPsnp (release 1.03)

### **RNA-seq 解析結果を用いた、フタホシコオロギの小腸に発現する OBP、CSP、OR の *in silico* 探索**

探索の概要は図 7-1-3. 1. に示した。上述の、各データベース(NT、NR、KEGG、Swiss-plot)を用いた BLASTn、BLASTx 検索による、39,862 の各 unigene および CL のアノテーション結果の全てから、その検索結果に、OBP、CSP、または OR を含むような候補遺伝子(unigene および CL)を探索した。その結果、検索結果に OBP が含まれるような 14 の候補遺伝子と、検索結果に CSP が含まれるような 13 の候補遺伝子を見出した。検索結果に OR が含まれるような候補遺伝子は見出されなかった。それらの 27 の各候補遺伝子の、予想される CDS の演繹アミノ酸配列を用いて、それぞれ、上述の 39,862 の各 unigene および CL の予想される CDS の演繹アミノ酸配列をデータベースとして、local BLAST 検索を行った。

得られた、OBP/CSP をコードする候補遺伝子について、それらの予測 CDS がコードする演繹アミノ酸配列が、予測される全長の ORF に満たないと考えられた場合は、RACE 法により、全長の ORF をコードする塩基配列を取得した。その後、全長 ORF をコードする、各候補遺伝子の cDNA の塩基配列をサブクローニングした。さらに、サブクローニングしたベクタープラスミドを鋳型として、前述した方法で、各候補遺伝子に対応する dsRNA を調製した。

### **RNAi 法と choice アッセイを用いた、18:2 の嗜好性に関与する OBP/CSP をコードする候補遺伝子のスクリーニング**

成虫脱皮後 0-2 日目のフタホシコオロギ成虫オス個体に、AKHR-dsRNA と、OBP/CSP をコードする各候補遺伝子に対応する dsRNA のいずれかとを投与した。それらの dsRNA の投与後 2 日目に、各個体を 1 個体ずつ別々のケージ (17×10×12 cm)に移した。その後、各シャーレ(2.9 cm i.d.)に入れた、フタホシコオロギ用の人工飼料(SFA-diet (脂肪酸濃度 5%))と 18:2-diet (脂肪酸濃度 5%))を提示し、3 日間摂食させた。その後、各人工飼料の摂食量を測定した。各人工飼料の摂食量と、それらの合計の摂食量から、各人工飼料の摂食比率を算出した。

### **HE (ヘマトキシリン・エオジン)染色**

フタホシコオロギの成虫オス個体から中腸、脂肪体、神経系を摘出し、適量のブアン液(飽和ピクリン酸/ホルマリン/酢酸(15:5:1))を入れた 4 mL 容のガラス瓶に加え、常温で一晩振盪させた。その後、各組織に、それぞれ適量の 70% エタノールを加えて、数十分振盪した。つづいて、同様に、80%エタノール、90%エタノール、95%エタノール、100%エタノール(3 回)の順で、20 分ごとに入れ替えながら振盪することで、組織の脱水を行った。その後、100%エタノールをキシレンで置換し、10 分間程度振盪させ、透徹処理を行った。その後、組織をキシレンから取り出し、事前に 65°C に加熱したパラフィンに包埋した。その後常温に静置してパラフィンを固化させた後に、組織を含むパラフィンブロックを切り出し、木の台座に接着して、マイクロームに設置した。その後、厚さ 10 μm になるように切片を切り出した。切片をスライドガラス上で伸展させた後に、スライドガラスを、キシレン、100%エタノール、90%エタノール、80%エタノール、70%エタノールの順に浸すことで洗浄した。その後、スライドガラスをヘマトキシリン溶液(5% マイヤーヘマトキシリン(関東化学))に 15 分浸した後、水で数分洗浄した。その後、スライドガラスをエオジン溶液(1% エオジン Y(ナカライテスク))に 5 分程度浸し、続いて、スライドガラスを、70%エタノールに 2 回、100%エタノール、

キシレンの順に、数分ごとに浸すことで、脱染色した。最後に、組織を封入し、顕微鏡(Olympus、BX53F)にて観察、撮影した。

#### 組織内の ATP 量の測定

組織内の ATP 量の測定には、『組織の』ATP 測定キット(和光純薬工業)を用いて、ホタルルシフェラーゼ発光反応により測定した。フタホシコオロギの成虫オス個体から中腸、脂肪体、神経系を摘出し、組織の湿重量の 100 倍量の PBS 中で、ホモジェナイズした。その後、遠心分離(1,000 g、10 分間、4°C)し、上清を回収した。そのうち 5  $\mu$ L (組織の湿重量に換算して 50  $\mu$ g)と、45  $\mu$ L の PBS、ATP 抽出液 50  $\mu$ L とを混和させ、30 分間室温にて静置することで、ATP を抽出した。その後、100  $\mu$ L の L/L (ルシフェラーゼ/ルシフェリン)試薬を混和させた。その直後に遮光し、常温にて 10 分間静置した後に、ルミノメーター(ATTO Luminescencer-JNR II AB-2300)にて、発光量を計測した。スタンダードとして、キット付属の ATP を用いて作製した検量線から、各組織内の ATP 量を算出した。

#### $\Delta 9$ -desaturase、 $\Delta 12$ -desaturase のダブルノックダウン個体の致死のレスキュー実験

$\Delta 9$ -desaturase、 $\Delta 12$ -desaturase のダブルノックダウン個体の致死のレスキュー実験では、(i) 人工飼料に過剰量の栄養分を添加し、その人工飼料を摂食させる方法と、(ii) 体液中への投与による方法との、二種類の方法をとった。

(i) では、フタホシコオロギの人工飼料(カゼイン: 28%、スクロース: 14%、デキストリン: 14%、コレステロール: 0.125%、セルロース: 41.2%、Wesson's salt: 2.4%、アスコルビン酸: 0.3%)に、化学合成した TAG (18:0/18:0/18:0)、TAG (18:1/18:1/18:1)、TAG (18:2/18:2/18:2)、および、TAG (18:3/18:3/18:3)をそれぞれ、2%、または 10% 添加した人工飼料を調製した。その際、TAG を添加した合計が 100%になるように、セルロース量を調製した。また、同様に、アラキドン酸(AA) (ナカライテスク)および、エイコサペンタエン酸(EPA) (ナカライテスク)を、0.5%、または 2.0%添加した人工飼料を調製した。フタホシコオロギの成虫オス個体に、 $\Delta(9+12)$ -desaturase-dsRNA を投与した後に、1 個体ずつ別々の容器(4.5 cm i. d.  $\times$  4 cm)に移した。その後、上述のように調製した人工飼料と水を容器に入れ、それらを自由に与えた場合の、1 日ごとの生存率を、生存個体を数えることにより調べた。

(ii) では、AA、EPA、PGA<sub>2</sub> (和光純薬工業)、PGD<sub>2</sub> (和光純薬工業)、PGE<sub>2</sub> (和光純薬工業)、PGF<sub>2 $\alpha$</sub>  (和光純薬工業)を用いた。AA および EPA に関しては、それぞれ、5  $\mu$ g、50  $\mu$ g、250  $\mu$ g を、3-5  $\mu$ L の 100%エタノールに溶解させた。PGA<sub>2</sub>、PGD<sub>2</sub>、PGE<sub>2</sub>、PGF<sub>2 $\alpha$</sub> に関しては、それぞれ、200 ng、2  $\mu$ g、20  $\mu$ g を、3  $\mu$ L の 100%エタノールに溶解させた。フタホシコオロギの成虫オス個体に、 $\Delta(9+12)$ -desaturase-dsRNA を投与した後に、1 個体ずつ別々の容器(4.5 cm i. d.  $\times$  4 cm)に移した。その後、AA、EPA、PGA<sub>2</sub>、PGD<sub>2</sub>、PGE<sub>2</sub>、およびPGF<sub>2 $\alpha$</sub> を投与した。その後、飼育用飼料(ウサギ用人工飼料/ネコ用人工飼料(1:1))と水を自由に与え、1 日ごとの生存率を、生存個体を数えることにより調べた。

## 謝辞

本研究を行うにあたり、研究および研究生生活の全般において、多くの御指導、御助言を頂いた、東京大学大学院・農学生命科学研究科・応用生命化学専攻・生物有機化学研究室の前教授の長澤寛道先生に心から感謝いたします。同研究室の作田庄平准教授には、研究および研究生生活の全般にわたり、多くの御指導、御助言をしてくださいました。心から感謝いたします。東京大学大学院・新領域創成科学研究科・先端生命科学専攻・分子認識化学研究室の片岡宏誌教授には、研究に関する御指導、御助言を頂きました。心から感謝いたします。

日々の実験を行うにあたって、東京大学大学院・新領域創成科学研究科・先端生命科学専攻・分子認識化学研究室の永田晋治准教授には、細部にわたり、貴重な御指導、御助言を頂き、また、日々の生活の中においても、多くの御指導を頂きました。心から感謝いたします。群馬大学生体調節研究所・生体情報部門・核内情報制御分野の諸岡信克助教には、実験の基本的な操作にはじまり、研究について多くの御指導を頂きました。心から感謝いたします。東京大学大学院・農学生命科学研究科・応用生命化学専攻・有機化学研究室の石神健准教授、渡邊秀典教授には、TAGの化学合成に関して、実験の御指導、および実験環境の御提供をして頂きました。心から感謝いたします。また、フタホシコオロギ $\Delta 9$ -、 $\Delta 12$ -desaturaseの酵素活性に関する共同研究をして頂いている、京都大学大学院・農学研究科・応用生命科学専攻・化学生態学研究室の、網干貴子博士研究員、森直樹准教授、吉永直子助教に、心から感謝いたします。

また、生物有機化学研究室の皆様には、多くの御指導、御助言、励まし、および刺激を頂きました。心から感謝いたします。

最後に、研究生生活を経済的に、精神的に支えてくださった両親に心から感謝いたします。

## 引用文献

- 1) Cannon WB (1932) *The wisdom of the body*. W. W. Norton & company, New York
- 2) Hetherington AW, Ranson SW (1940) Hypothalamic lesions and adiposity in the rat. *Anat. Rec.* 78:149-172
- 3) Anand BK, Brobeck JR (1951) Hypothalamic control of food intake in rats and cats. *Yale J. Biol. Med.* 24:123-140
- 4) Flier JS, Maratos-Flier E (1998) Obesity and the hypothalamus: novel peptides for new pathways. *Cell* 92:437-440
- 5) Ebihara K, Ogawa Y, Katsuura G, Numata Y, Masuzaki H, Satoh N, Tamaki M, Yoshioka T, Hayase M, Matsuoka N, Aizawa-Abe M, Yoshimasa Y, Nakao K (1999) Involvement of agouti-related protein, an endogenous antagonist of hypothalamic melanocortin receptor, in leptin action. *Diabetes* 48:2028-2033
- 6) Kojima M, Hosoda H, Date Y, Nakazato M, Matsuo H, Kangawa K (1999) Ghrelin is a growth-hormone-releasing acylated peptide from stomach. *Nature* 402:656-660
- 7) Morton GJ, Cummings DE, Baskin DG, Barsh GS, Schwartz MW (2006) Central nervous system control of food intake and body weight. *Nature* 443:289-295
- 8) Powley TL, Phillips RJ (2004) Gastric satiation is volumetric, intestinal satiation is nutritive. *Physiol. Behav.* 82:69-74
- 9) Simpson SJ (1981) An oscillation underlying feeding and a number of other behaviours in fifth instar *Locusta migratoria* nymphs. *Physiol. Entomol.* 6:315-324
- 10) Simpson SJ, Ludlow AR (1986) Why locusts start to feed: A comparison of causal factors. *Anim. Behav.* 34:480-496
- 11) Reynolds SE, Yeomans MR, Timmins WA (1986) The feeding behaviour of caterpillars (*Manduca sexta*) on tobacco and artificial diet. *Physiol. Entomol.* 11:39-51
- 12) Simpson SJ (1990) The pattern of feeding. In: Chapman RF, Joern A, (Eds.), *Biology of Grasshoppers*, John Wiley and Sons, New York, pp. 73-103
- 13) Simpson SJ (1983) The role of volumetric feedback from the hindgut in the regulation of meal size in fifth-instar *Locusta migratoria* nymphs. *Physiol. Entomol.* 8:451-467
- 14) Timmins WA, Bellward K, Stamp AJ, Reynolds SE (1988) Food intake, conversion efficiency, and feeding behaviour of tobacco hornworm caterpillars given artificial diet of varying nutrient and water content. *Physiol. Entomol.* 13:303-314
- 15) Simpson SJ (1995) The control of meals in chewing insects. In: Chapman RF, de Boer G, (Eds.), *Regulatory mechanisms of insect feeding*, Chapman and Hall, New York, pp.137-156
- 16) Ishikawa S (1969) Chemosensory basis of hostplant selection in the silkworm. *Ent. Exp. & Appl.* 12:544-554
- 17) Nagata S, Nagasawa H (2006) Effects of diet-deprivation and physical stimulation on the feeding behaviour of the larvae of the silkworm, *Bombyx mori*. *J. Insect Physiol.* 52:807-815
- 18) Glendinning JJ, Jerud A, Reinherz AT (2007) The hungry caterpillar: an analysis of how carbohydrates stimulate feeding in *Manduca sexta*. *J. Exp. Biol.* 210:3054-3067
- 19) Hamamura Y (1959) Food selection by silkworm larvae. *Nature* 183:1746-1747
- 20) Hamamura Y (1962) Food selection by silkworm larvae. *Nature* 194:754-755
- 21) Schoonhoven LM, van Loon JJA, Dicke M (2005) *Insect-Plant Biology*. Oxford: Oxford Univ. Press
- 22) Simpson SJ, Abisgold JD (1985) Compensation by locusts for changes in dietary nutrients: behavioral mechanisms. *Physiol. Entomol.* 10:443-452
- 23) Friedman S, Waldbauer GP, Eertmoed JE, Naeem M, Ghent AW (1991) Blood trehalose levels have a role in the control of dietary self-selection by *Heliothis zea* larvae. *J. Insect Physiol.* 37:919-928
- 24) Richter CP, Bareware B (1938) Nutritional requirements of pregnant and lactating rats studied by the self-selection method. *Endocrinology* 23:15-24
- 25) Waldbauer GP, Friedman S (1991) Self-Selection of Optimal Diets by Insects. *Annu. Rev. Entomol.* 36:43-63
- 26) Raubenheimer D, Simpson SJ (1993) The geometry of compensatory feeding in the locust. *Anim. Behav.* 45:953-964
- 27) Simpson SJ, Raubenheimer D (1996) Feeding behaviour, sensory physiology and nutrient feedback: a unifying model. *Entomol. Exp. Appl.* 80:55-64
- 28) Chambers PG, Simpson SJ, Raubenheimer D (1995) Behavioural mechanisms of nutrient balancing in *Locusta migratoria* nymphs.

*Anim. behav.* 50:1513-1523

- 29) Bremer ST, Joern A (2008) Coexisting generalist herbivores occupy unique nutritional feeding niches. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105:1977-1982
- 30) Simpson SJ, Raubenheimer D, Behmer ST, Whitworth A, Wright GA (2002) A comparison of nutritional regulation in solitary- and gregarious- nymphs of the desert locust *Schistocerca gregaria*. *J. Exp. Biol.* 205:121-129
- 31) Lee KP, Behmer ST, Simpson SJ (2006) Nutrient regulation in relation to diet breadth: a comparison of *Heliothis* sister species and a hybrid. *J. Exp. Biol.* 209:2076-2084
- 32) Waldbauer GP, Cohen RW, Friedman S (1984) Self-selection of an optional nutrient mix from defined diets by larvae of the cornworm, *Heliothis zea* (Boddie). *Physiol. Zool.* 57:590-597
- 33) Thompson SN, Redak RA (2005) Feeding behaviour and nutrient selection in an insect *Manduca sexta* L. and alterations induced by parasitism. *J. Comp. Physiol. A* 191:909-923
- 34) Merks-Jacques M, Despland E, Bede JC (2008) Nutrient utilization by caterpillars of the generalist beet armyworm, *Spodoptera exigua*. *Physiol. Entomol.* 33:51-61
- 35) Lee KP, Simpson SJ, Raubenheimer D (2004) A comparison of nutrient regulation between solitary and gregarious phases of the specialist caterpillar, *Spodoptera exempta* (Walker). *J. Insect Physiol.* 49:1161-1171
- 36) Simpson SJ, Raubenheimer D (1993) The central role of the haemolymph in the regulation of nutrient intake in insects. *Physiol. Entomol.* 18:395-403
- 37) McClain E, Feir D (1973) Role of volume and amino acid concentration in the feeding of *Oncopeltus fasciatus* on a liquid and a solid diet. *J. Insect Physiol.* 19:287-292
- 38) Abisgold JD, Simpson SJ (1988) The effect of dietary protein levels and hemolymph composition on the sensitivity of the maxillary palp chemoreceptors of locusts. *J. Exp. Biol.* 135:215-229
- 39) Wolesensky W, Joern A, Logan JD (2005) A model of digestion modulation in grasshoppers. *Ecol. Model.* 188:358-373
- 40) Mullins DE (1985) Chemistry and physiology of the hemolymph. In: Kerkut GU, Gilbert LI (eds.), *Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry and Pharmacology*, Vol. 3. Pergamon, Oxford, UK, pp. 355-400
- 41) Beenakkers AM, Van der Horst DJ, Van Marrewijk WJ (1985) Insect lipids and lipoproteins, and their role in physiological processes. *Prog. Lipid Res.* 24:19-67
- 42) Canavoso LE, Jouni ZE, Karnas KJ, Pennington JE, Wells MA (2001) Fat metabolism in insects. *Annu. Rev. Nutr.* 21:23-46
- 43) Aresse EL, Soulages JL (2010) Insect fat body: energy, metabolism, and regulation. *Annu. Rev. Entomol.* 55:207-225
- 44) Mayer RJ, Candy DJ (1969) Control of haemolymph lipid concentration during locust flight: An adipokinetic hormone from the corpora cardiaca. *J. Insect Physiol.* 15:611-620
- 45) Stone JV, Mordue W, Batley KE, Morris HR (1976) Structure of locust adipokinetic hormone, a neurohormone that regulates lipid utilisation during flight. *Nature* 263:207-211
- 46) Fernlund P, Josefsson L (1972) Crustacean color-change hormone: amino acid sequence and chemical synthesis. *Science* 177:173-175
- 47) Gäde G, Marco HG (2009) Peptides of the adipokinetic hormone/red pigment-concentrating hormone family with special emphasis on Caelifera: primary sequences and functional considerations contrasting grasshoppers and locusts. *Gen. Comp. Endocrinol.* 162:59-68
- 48) Gäde G (1996) The revolution in insect neuropeptides illustrated by the adipokinetic hormone/red pigment-concentrating hormone family of peptides. *Z. Naturforsch. C.* 51:607-617
- 49) Bogerd J, Kooiman FP, Pijnenburg MA, Hekking LH, Oudejans RC, Van der Horst DJ (1995) Molecular cloning of three distinct cDNAs, each encoding a different adipokinetic hormone precursor, of the migratory locust, *Locusta migratoria*. Differential expression of the distinct adipokinetic hormone precursor genes during flight activity. *J. Biol. Chem.* 270:23038-23043
- 50) Van der Horst DJ (2003) Insect adipokinetic hormones: release and integration of flight energy metabolism. *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.* 136:217-226
- 51) Vroemen SF, Van Marrewijk WJ, Van der Horst DJ (1995) Stimulation of glycogenolysis by three locust adipokinetic hormones



- involves Gs and cAMP. *Mol. Cell Endocrinol.* 107:165-171
- 52) Auerswald L, Gäde G (2002) The role of Ins (1,4,5)P(3) in signal transduction of the metabolic neuropeptide Mem-CC in the cetoniid beetle, *Pachnoda sinuata*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 32:1793-1803
  - 53) Vroemen SF, Van Marrewijk WJ, De Meijer J, Van den Broek AT, Van der Horst DJ (1997) Differential induction of inositol phosphate metabolism by three adipokinetic hormones. *Mol. Cell Endocrinol.* 130:131-139
  - 54) Scarborough RM, Jamieson GC, Kalish F, Kramer SJ, McEnroe GA, Miller CA, Schooley DA (1984) Isolation and primary structure of two peptides with cardioacceleratory and hyperglycemic activity from the corpora cardiaca of *Periplaneta americana*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 81:5575-5579
  - 55) Kaufmann C, Briegel H (2004) Flight performance of the malaria vectors *Anopheles gambiae* and *Anopheles atroparvus*. *J. Vector Ecol.* 29:140-153
  - 56) Van der Horst DJ, Van Hoof D, van Marrewijk WJ, Rodenburg KW (2002) Alternative lipid mobilization: the insect shuttle system. *Mol. Cell Biochem.* 239:113-119
  - 57) Weers PM, Ryan RO (2006) Apolipoprotein III: role model apolipoprotein. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 36:231-240
  - 58) Staubli F, Jorgensen TJ, Cazzamali G, Williamson M, Lenz C, Sondergaard L, Roepstorff P, Grimmelikhuijzen CJ (2002) Molecular identification of the insect adipokinetic hormone receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99:3446-3451
  - 59) Park Y, Kim YJ, Adams ME (2002) Identification of G protein-coupled receptors for *Drosophila* PRXamide peptides, CCAP, corazonin, and AKH supports a theory of ligand-receptor coevolution. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99:11423-11428
  - 60) Wicher D, Agricola HJ, Sohler S, Gundel M, Heinemann SH, Wollweber L, Stengl M, Derst C (2006) Differential receptor activation by cockroach adipokinetic hormones produces differential effects on ion currents, neuronal activity, and locomotion. *J. Neurophysiol.* 95:2314-2325
  - 61) Hansen KK, Hauser F, Cazzamali G, Williamson M, Grimmelikhuijzen CJ (2006) Cloning and characterization of the adipokinetic hormone receptor from the cockroach *Periplaneta americana*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 343:638-643
  - 62) Kaufmann C, Brown MR (2006) Adipokinetic hormones in the African malaria mosquito, *Anopheles gambiae*: identification and expression of genes for two peptides and a putative receptor. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 36:466-481
  - 63) Belmont M, Cazzamali G, Williamson M, Hauser F, Grimmelikhuijzen CJ (2006) Identification of four evolutionarily related G protein-coupled receptors from the malaria mosquito *Anopheles gambiae*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 344:160-165
  - 64) Li B, Predel R, Neupert S, Hauser F, Tanaka Y, Cazzamali G, Williamson M, Arakane Y, Verleyen P, Schoofs L, Schachtner J, Grimmelikhuijzen CJ, Park Y (2008) Genomics, transcriptomics, and peptidomics of neuropeptides and protein hormones in the red flour beetle *Tribolium castaneum*. *Genome Res* 18:113-122
  - 65) Kaufmann C, Merzendorfer H, Gäde G (2009) The adipokinetic hormone system in Culicinae (Diptera: Culicidae): molecular identification and characterization of two adipokinetic hormone (AKH) precursors from *Aedes aegypti* and *Culex pipiens* and two putative AKH receptor variants from *A. aegypti*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 39:770-781
  - 66) Huang H, He X, Deng X, Li G, Ying G, Sun Y, Shi L, Benovic JL, Zhou N (2010) *Bombyx* adipokinetic hormone receptor activates extracellular signal-regulated kinase 1 and 2 via G protein-dependent PKA and PKC but beta-arrestin-independent pathways. *Biochemistry* 49:10862-10872
  - 67) Bharucha KN, Tarr P, Zipursky SL (2008) A glucagon-like endocrine pathway in *Drosophila* modulates both lipid and carbohydrate homeostasis. *J. Exp. Biol.* 211:3103-3110
  - 68) Grönke S, Muller G, Hirsch J, Fellert S, Andreou A, Haase T, Jackle H, Kuhnlein RP (2007) Dual lipolytic control of body fat storage and mobilization in *Drosophila*. *PLoS Biol.* 5:e137
  - 69) Lee G, Park JH (2004) Hemolymph sugar homeostasis and starvation-induced hyperactivity affected by genetic manipulations of the adipokinetic hormone-encoding gene in *Drosophila melanogaster*. *Genetics* 167:311-323
  - 70) Isabel G, Martin JR, Chidami S, Veenstra JA, Rosay P (2005) AKH-producing neuroendocrine cell ablation decreases trehalose and induces behavioral changes in *Drosophila*. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 288:R531-R538
  - 71) Nagata S, Morooka N, Asaoka K, Nagasawa H (2011) Identification of a novel hemolymph peptide that modulates silkworm feeding motivation. *J. Biol. Chem.* 286:7161-7170

- 72) Nagata S, Morooka N, Matsumoto S, Kawai T, Nagasawa H (2011) Effects of neuropeptides on feeding initiation in larvae of the silkworm, *Bombyx mori*. *Gen. Comp. Endocrinol.* 172:90-95
- 73) Moriyama Y, Sakamoto T, Karpova SG, Matsumoto A, Noji S, Tomioka K (2008) RNA interference of the clock gene period disrupts circadian rhythms in the cricket *Gryllus bimaculatus*. *J. Biol. Rhythms* 23:308-318
- 74) Meyering-Vos M, Müller A (2007) RNA interference suggests sulfakinins as satiety effectors in the cricket *Gryllus bimaculatus*. *J. Insect Physiol.* 53:840-848
- 75) Siebert K, Morgan P, Mordue W (1985) Primary structures of locust adipokinetic hormones II. *Biol. Chem. Hoppe Seyler* 366:723-727
- 76) Oudejans RC, Kooiman FP, Heerma W, Versluis C, Slotboom AJ, Beenackers MT (1991) Isolation and structure elucidation of a novel adipokinetic hormone (Lom-AKH-III) from the glandular lobes of the corpus cardiacum of the migratory locust, *Locusta migratoria*. *Eur. J. Biochem.* 195:351-359
- 77) Gäde G, Rinehart KL (1987) Primary sequence analysis by fast atom bombardment mass spectrometry of a peptide with adipokinetic activity from the corpora cardiaca of the cricket *Gryllus bimaculatus*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 149:908-914
- 78) Schaffer MH, Noyes BE, Slaughter CA, Thome GC, Gaskell SJ (1990) The fruitfly *Drosophila melanogaster* contains a novel charged adipokinetic-hormone-family peptide. *Biochem. J.* 269:315-320
- 79) Ziegler R, Eckart K, Schwarz H, Keller R (1985) Amino acid sequence of *Manduca sexta* adipokinetic hormone elucidated by combined fast atom bombardment (FAB)/tandem mass spectrometry. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 133:337-342
- 80) Gäde G, Auerswald L (2003) Mode of action of neuropeptides from the adipokinetic hormone family. *Gen. Comp. Endocrinol.* 132:10-20
- 81) Shi Y, Huang H, Deng X, He X, Yang J, Yang H, Shi L, Mei L, Gao J, Zhou N (2011) Identification and functional characterization of two orphan G-protein-coupled receptors for adipokinetic hormones from silkworm *Bombyx mori*. *J. Biol. Chem.* 286:42390-42402
- 82) Gore JC, Schal C (2005) Expression, production and excretion of Bla g 1, a major human allergen, in relation to food intake in the German cockroach, *Blattella germanica*. *Med. Vet. Entomol.* 19:127-134
- 83) Simpson SJ (1982) Patterns in feeding: a behavioural analysis using *Locusta migratoria* nymphs. *Physiol. Entomol.* 7:325-336
- 84) Chyb S, Simpson SJ (1990) Dietary selection in adult *Locusta migratoria*. *Entomol. Exp. Appl.* 56:47-60
- 85) Raumenheimer D, Simpson SJ (1990) The effects of simultaneous variation in protein, digestible carbohydrate and tannic acid on the feeding behaviour of larval *Locusta migratoria* (L.) and *Schistocerca gregaria* (Forskål). I. Short-term studies. *Phys. Ent.* 5:219-223
- 86) Chapman RF, Beerling EAM (1990) The pattern of feeding of first instar nymphs of *Schistocerca americana*. *Physiol. Entomol.* 15:1-12
- 87) Mayer RJ, Candy DJ (1967) Changes in haemolymph lipoproteins during locust flight. *Nature* 215:987
- 88) Socha R, Kodrik D, Zemek R (1999) Adipokinetic hormone stimulates insect locomotor activity. *Naturwissenschaften* 88:85-86
- 89) Lorenz MW, Zemek R, Kodrik D, Socha R (2004) Lipid mobilization and locomotor stimulation in *Gryllus bimaculatus* by topically applied adipokinetic hormone. *Physiol. Entomol.* 29:146-151
- 90) Fassold K, El-Damanhoury HI, Lorenz MW (2010) Age-dependent cyclic locomotor activity in the cricket, *Gryllus bimaculatus*, and the effect of adipokinetic hormone on locomotion and excitability. *J. Comp. Physiol. A Neuroethol. Sens. Neural Behav. Physiol.* 196:271-283
- 91) Danbara Y, Sakamoto T, Uryu O, Tomioka K (2010) RNA interference of *timeless* gene does not disrupt circadian locomotor rhythms in the cricket *Gryllus bimaculatus*. *J. Insect Physiol.* 56:1738-1745
- 92) Lorenz MW (2003) Adipokinetic hormone inhibits the formation of energy stores and egg production in the cricket *Gryllus bimaculatus*. *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.* 136:197-206
- 93) Woodring J, Lorenz MW, Hoffmann KH (2002) Sensitivity of larval and adult crickets (*Gryllus bimaculatus*) to adipokinetic hormone. *Comp. Biochem. Physiol. A Mol. Integr. Physiol.* 133:637-644
- 94) Bailey E, Home JA, Izatt ME (1975) The effects of allatectomy on the lipid composition of the fat body and haemolymph of adult

*Locusta. Comp. Biochem. Physiol. B* 52:525-528

- 95) Nelson DR, Terranova AC, Sukkestad DR (1967) Fatty acid composition of the glycerine and free fatty acid fractions of the fat body, and hemolymph of the cockroach, *Periplaneta americana* (L.). *Comp. Biochem. Physiol.* 20:907-917
- 96) Thompson SN (2003) Trehalose - the insect 'blood' sugar. *Adv. Insect Physiol.* 31:205-285
- 97) Zöllner N, Kirsch K (1962) The quantitative determination of lipids (micromethod) by means of the sulfo-phospho-vanillin reaction common to many natural lipids (all plasma lipids). *Z. Ges. Exp. Med.* 135:545-561
- 98) Morris DL (1948) Quantitative determination of carbohydrates with Dreywood's anthrone reagent. *Science* 107:254-255
- 99) Ziegler R, Willingham LA, Sanders SJ, Tamen-Smith L, Tsuchida K (1995) Apolipoprotein-III and adipokinetic hormone in lipid metabolism of larval *Manduca sexta*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 25:101-108
- 100) Tsuchida K, Yokoyama T, Sakudoh T, Katagiri C, Tsurumaru S, Takada N, Fujimoto H, Ziegler R, Iwano H, Hamano K, Yaginuma T (2010) Apolipoprotein-III expression and low density lipoprotein formation during embryonic development of the silkworm, *Bombyx mori*. *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.* 155:363-370
- 101) Grönke S, Mildner A, Fellert S, Tennagels N, Petry S, Müller G, Jackle H, Kuhnlein RP (2005) Brummer lipase is an evolutionary conserved fat storage regulator in *Drosophila*. *Cell Metab.* 1:323-330
- 102) Buch S, Melcher C, Bauer M, Katzenberger J, Pankratz MJ (2008) Opposing effects of dietary protein and sugar regulate a transcriptional target of *Drosophila* insulin-like peptide signaling. *Cell Metab.* 7:321-332
- 103) Hossain MS, Liu Y, Zhou S, Li K, Tian L, Li S (2013) 20-Hydroxyecdysone-induced transcriptional activity of FoxO upregulates *brummer* and *acid lipase-1* and promotes lipolysis in *Bombyx* fat body. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 43:829-838
- 104) Suren-Castillo S, Abrisqueta M, Maestro JL (2013) FoxO is required for the activation of hypertrehalosemic hormone expression in cockroaches. *Biochim. Biophys. Acta* 1840:86-94
- 105) Katagiri C, Sato M, Tanaka N (1987) Small-angle X-ray scattering study of insect lipoprotein. *J. Biol. Chem.* 262:15857-15861
- 106) Chino H, Downer RGH, Wyatt GR, Gilbert LI (1981) Lipoproteins, a major class of lipoproteins of insect hemolymph. *Insect Biochem.* 4:491
- 107) Sasajima KI, Sinskey AJ (1979) Oxidation of L-glucose by a *Pseudomonad*. *Biochim. Biophys. Acta* 571:120-126
- 108) Dus M, Min S, Keene AC, Lee GY, Suh GS (2011) Taste-independent detection of the caloric content of sugar in *Drosophila*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 108:11644-11649
- 109) Wyatt GR (1967) The biochemistry of sugars and polysaccharides in insects. *Adv. Insect Physiol.* 4:287-360
- 110) Hill L, Goldsworthy GJ (1970) The utilization of reserves during starvation of larvae of the migratory locust. *Comp. Biochem. Physiol.* 36:61-70
- 111) Auerswald L, Gäde G (2000) Metabolic changes in the African fruit beetle, *Pachnoda sinuata*, during starvation. *J. Insect Physiol.* 46:343-351
- 112) Jutsum AR, Agarwal HC, Goldsworthy GJ (1975) Starvation and haemolymph lipids in *Locusta migratoria* (R&F). *Acrida* 4:47-52
- 113) Grillo LA, Majerowicz D, Gondim KC (2007) Lipid metabolism in *Rhodnius prolixus* (Hemiptera: Reduviidae): role of a midgut triacylglycerol-lipase. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 37:579-588
- 114) Tsuchida K, Wells MA (1988) Digestion, absorption, transport and storage of fat during the last larval stadium of *Manduca sexta*. Changes in the role of lipoprotein in the delivery of dietary lipid to the fat body. *Insect Biochem.* 18:263-268
- 115) Turunen S (2003) Metabolic pathways in the midgut epithelium of *Pieris brassicae* during carbohydrate and lipid assimilation. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 23:681-689
- 116) Cheeseman P, Goldsworthy GJ (1979) The release of adipokinetic hormone during flight and starvation in *Locusta*. *Gen. Comp. Endocrinol.* 37:35-43
- 117) Tomcala A, Bartu I, Simek P, Kodrik D (2010) Locust adipokinetic hormones mobilize diacylglycerols selectively. *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.* 156:26-32
- 118) Rodenburg KW, Van der Horst DJ (2005) Lipoprotein-mediated lipid transport in insects: analogy to the mammalian lipid carrier system and novel concepts for the functioning of LDL receptor family members. *Biochim. Biophys. Acta.* 1736:10-29
- 119) Soulages JL, Wells MA (1994) Effect of diacylglycerol content on some physicochemical properties of the insect lipoprotein,

- lipophorin. Correlation with the binding of apolipophorin-III. *Biochemistry* 33:2356-2362
- 120) Ryan RO, Van der Horst DJ (2000) Lipid transport biochemistry and its role in energy production. *Annu. Rev. Entomol.* 45:233-260
  - 121) Tufail M, Takeda M (2009) Insect vitellogenin/lipophorin receptors: molecular structures, role in oogenesis, and regulatory mechanisms. *J. Insect Physiol.* 55:87-103
  - 122) Springer TA (1998) An extracellular beta-propeller module predicted in lipoprotein and scavenger receptors, tyrosine kinases, epidermal growth factor precursor, and extracellular matrix components. *J. Mol. Biol.* 283:837-862
  - 123) Shapiro JP, Keim PS, Law JH (1984) Structural studies on lipophorin, an insect lipoprotein. *J. Biol. Chem.* 259:3680-3685
  - 124) Kawooya JK, Keim PS, Ryan RO, Shapiro JP, Samaraweera P, Law JH (1984) Insect apolipophorin III. Purification and properties. *J. Biol. Chem.* 259:10733-10737
  - 125) Wheeler CH, Goldsworthy GJ (1983) Qualitative and quantitative changes in *Locusta* haemolymph proteins and lipoproteins during ageing and adipokinetic hormone action. *J. Insect Physiol.* 29:339-347
  - 126) Mullen L, Goldsworthy G (2003) Changes in lipophorins are related to the activation of phenoloxidase in the haemolymph of *Locusta migratoria* in response to injection of immunogens. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 33:661-670
  - 127) Oliveira GA, Baptista DL, Guimaraes-Motta H, Almeida IC, Masuda H, Atella GC (2006) Flight-oogenesis syndrome in a blood-sucking bug: biochemical aspects of lipid metabolism. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* 62:164-175
  - 128) Kanost MR, Boguski MS, Freeman M, Gordon JI, Wyatt GR, Wells MA (1988) Primary structure of apolipophorin-III from the migratory locust, *Locusta migratoria*. Potential amphipathic structures and molecular evolution of an insect apolipoprotein. *J. Biol. Chem.* 263:10568-10573
  - 129) Smith AF, Owen LM, Strobel LM, Chen H, Kanost MR, Hanneman E, Wells MA (1994) Exchangeable apolipoproteins of insects share a common structural motif. *J. Lipid Res.* 35:1976-1984
  - 130) Sundermeyer K, Hendricks JK, Prasad SV, Wells MA (1996) The precursor protein of the structural apolipoproteins of lipophorin: cDNA and deduced amino acid sequence. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 26:735-738
  - 131) Van der Horst DJ, Roosendaal SD, Rodenburg KW (2009) Circulatory lipid transport: lipoprotein assembly and function from an evolutionary perspective. *Mol. Cell Biochem.* 326:105-119
  - 132) Ravikumar G, Vardhana KV, Basavaraja HK (2011) Characterization of lipophorin receptor (LpR) mediating the binding of high density lipophorin (HDLp) in the silkworm, *Bombyx mori*. *J. Insect Sci.* 11:150
  - 133) Dantuma NP, Potters M, De Winther MP, Tensen CP, Kooiman FP, Bogerd J, Van der Horst DJ (1999) An insect homolog of the vertebrate very low density lipoprotein receptor mediates endocytosis of lipophorins. *J. Lipid Res.* 40:973-978
  - 134) Gopalapillai R, Kadono-Okuda K, Tsuchida K, Yamamoto K, Nohata J, Ajimura M, Mita K (2006) Lipophorin receptor of *Bombyx mori*: cDNA cloning, genomic structure, alternative splicing, and isolation of a new isoform. *J. Lipid Res.* 47:1005-1013
  - 135) Lee CS, Han JH, Lee SM, Hwang JS, Kang SW, Lee BH, Kim HR (2003) Wax moth, *Galleria mellonella* fat body receptor for high-density lipophorin (HDLp). *Arch. Insect Biochem. Physiol.* 54:14-24
  - 136) Van Hoof D, Rodenburg KW, Van der Horst DJ (2003) Lipophorin receptor-mediated lipoprotein endocytosis in insect fat body cells. *J. Lipid Res.* 44:1431-1440
  - 137) Faergeman NJ, Knudsen J (1997) Role of long-chain fatty acyl-CoA esters in the regulation of metabolism and in cell signalling. *Biochem. J.* 323 ( Pt 1):1-12
  - 138) Knudsen J, Neergaard TB, Gaigg B, Jensen MV, Hansen JK (2000) Role of acyl-CoA binding protein in acyl-CoA metabolism and acyl-CoA-mediated cell signaling. *J. Nutr.* 130:294S-298S
  - 139) Gaigg B, Neergaard TB, Schneider R, Hansen JK, Faergeman NJ, Jensen NA, Andersen JR, Friis J, Sandhoff R, Schrøder HD, Knudsen J (2001) Depletion of acyl-coenzyme A-binding protein affects sphingolipid synthesis and causes vesicle accumulation and membrane defects in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Biol. Cell* 12:1147-1160
  - 140) Elle IC, Simonsen KT, Olsen LC, Birck PK, Ehmsen S, Tuck S, Le TT, Faergeman NJ (2011) Tissue- and paralogue-specific functions of acyl-CoA-binding proteins in lipid metabolism in *Caenorhabditis elegans*. *Biochem. J.* 437:231-241
  - 141) Lee L, DeBono CA, Campagna DR, Young DC, Moody DB, Fleming MD (2007) Loss of the acyl-CoA binding protein (Acbp) results in fatty acid metabolism abnormalities in mouse hair and skin. *J. Invest. Dermatol.* 127:16-23

- 142) Snyder MJ, Van Antwerpen R (1998) Evidence for a diazepam-binding inhibitor (DBI) benzodiazepine receptor-like mechanism in ecdysteroidogenesis by the insect prothoracic gland. *Cell Tissue Res.* 294:161-168
- 143) Alves-Bezerra M, Majerowicz D, Grillo LA, Tremonte H, Almeida CB, Braz GR, Sola-Penna M, Paiva-Silva GO, Gondim KC (2010) Serotonin regulates an acyl-CoA-binding protein (ACBP) gene expression in the midgut of *Rhodnius prolixus*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 40:119-125
- 144) Abisgold JD, Simpson SJ (1987) The physiology of compensation by locusts for changes in dietary protein. *J. Exp. Biol.* 129:329-346
- 145) Dadd RH (1982) The nutritional requirements of locusts—IV. Requirements for vitamins of the B complex. *J. Insect physiol.* 6:1-12
- 146) Haskell PT, Mordue AJ (1969) The role of mouthpart receptors in the feeding behaviour of *Schistocerca gregaria*. *Ent. Exp. Appl.* 112:591-610
- 147) Mordue AJ (1979) The role of the maxillary and labial palps in the feeding behaviour of *Schistocerca gregaria*. *Ent. Exp. Appl.* 25:279-288
- 148) Blaney WM, Chapman RF (1970) The functions of the maxillary palps of acrididae (Orthoptera). *Ent. Exp. Appl.* 13:363-376
- 149) Blaney WM, Winstanley C, Simmonds MSJ (1985) Food selection by locusts: An analysis of rejection behavior. *Ent. Exp. Appl.* 38:35-40
- 150) Blaney WM, Duckett AM (1975) The significance of palpation by the maxillary palps of *Locusta migratoria* (L); An electrophysiological and behavioural study. *J. Exp. Biol.* 63:701-712
- 151) Abisgold JD, Simpson SJ (1988) The effect of dietary protein levels and haemolymph composition on the sensitivity of the maxillary palp chemoreceptors of locusts. *J. Exp. Biol.* 135:215-229
- 152) Sato Y, Ikeda M, Yamashita O (1994) Neurosecretory cells expressing the gene for common precursor for diapause hormone and pheromone biosynthesis-activating neuropeptide in the suboesophageal ganglion of the silkworm, *Bombyx mori*. *Gen. Comp. Endocrinol.* 96:27-36
- 153) Stocker RF, Schorderet M (1981) Cobalt filling of sensory projections from internal and external mouthparts in *Drosophila*. *Cell Tissue Res.* 216:513-523
- 154) Fougeron AS, Farine JP, Pouchon JF, Everaerts C, Ferveur JF (2011) Fatty-acid preference changes during development in *Drosophila melanogaster*. *PLoS One* 6:e26899
- 155) Matsuo T, Sugaya S, Yasukawa J, Aigaki T, Fuyama Y (2007) Odorant-binding proteins OBP57d and OBP57e affect taste perception and host-plant preference in *Drosophila sechellia*. *PLoS Biol.* 5:e118
- 156) Steinbrecht AR (1999) Eguchi E, Tominaga Y (Eds.), *Atlas of arthropod sensory receptors: Dynamic morphology in relation to function*. Springer-Verlag, New York, pp. 155-176
- 157) Zacharuk RY (1985) Antennae and sensilla. In: Kerkut GA and Gilbert LI (Eds.), *Comprehensive insect physiology biochemistry and pharmacology*. Vol.6, Pergamon press, Oxford, pp. 1-60
- 158) Tunstall NE, Warr CG (2012) Chemical communication in insects: the peripheral odour coding system of *Drosophila melanogaster*. *Adv. Exp. Med. Biol.* 739:59-77
- 159) Vogt RG, Riddiford LM (1981) Pheromone binding and inactivation by moth antennae. *Nature* 293:161-163
- 160) Pelosi P, Zhou JJ, Ban LP, Calvillo M (2006) Soluble proteins in insect chemical communication. *Cell. Mol. Life Sci.* 63:1658-1676
- 161) Xu YL, He P, Zhang L, Fang SQ, Dong SL, Zhang YJ, Li F (2009) Large-scale identification of odorant-binding proteins and chemosensory proteins from expressed sequence tags in insects. *BMC Genomics* 10:632
- 162) Fan J, Francis F, Liu Y, Chen JL, Cheng DF (2011) An overview of odorant-binding protein functions in insect peripheral olfactory reception. *Genet. Mol. Res.* 10:3056-3069
- 163) Nomura A, Kawasaki K, Kubo T, Natori S (1992) Purification and localization of p10, a novel protein that increases in nymphal regenerating legs of *Periplaneta americana* (American cockroach). *Int. J. Dev. Biol.* 36:391-398
- 164) Tomaselli S, Crescenzi O, Sanfelice D, Ab E, Wechselberger R, Angeli S, Scaloni A, Boelens R, Tancredi T, Pelosi P, Picone D (2006) Solution structure of a chemosensory protein from the desert locust *Schistocerca gregaria*. *Biochemistry* 45:10606-10613
- 165) Ozaki M, Wada-Katsumata A, Fujikawa K, Iwasaki M, Yokohari F, Satoji Y, Nisimura T, Yamaoka R (2005) Ant nestmate and

- non-nestmate discrimination by a chemosensory sensillum. *Science* 309:311-314
- 166) Hekmat-Scafe DS, Scafe CR, McKinney AJ, Tanouye MA (2002) Genome-wide analysis of the odorant-binding protein gene family in *Drosophila melanogaster*. *Genome Res.* 12:1357-1369
  - 167) Qiao H, Tuccori E, He X, Gazzano A, Field L, Zhou JJ, Pelosi P (2009) Discrimination of alarm pheromone (*E*)- $\beta$ -farnesene by aphid odorant-binding proteins. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 39:414-419
  - 168) Sun YF, De Biasio F, Qiao HL, Iovinella I, Yang SX, Ling Y, Riviello L, Battaglia D, Falabella P, Yang XL, Pelosi P (2012) Two odorant-binding proteins mediate the behavioural response of aphids to the alarm pheromone (*E*)- $\beta$ -farnesene and structural analogues. *PLoS One* 7:e32759
  - 169) Wang SY, Gu SH, Han L, Guo YY, Zhou JJ, Zhang YJ (2013) Specific involvement of two amino acid residues in *cis*-nerolidol binding to odorant-binding protein 5 AlinOBP5 in the alfalfa plant bug, *Adelphocoris lineolatus* (Goeze). *Insect Mol. Biol.* 22:172-182
  - 170) Yang G, Winberg G, Ren H, Zhang S (2011) Expression, purification and functional analysis of an odorant binding protein AaegOBP22 from *Aedes aegypti*. *Protein Expr. Purif.* 75:165-171
  - 171) Liu Z, Vidal DM, Syed Z, Ishida Y, Leal WS (2010) Pheromone binding to general odorant-binding proteins from the navel orangeworm. *J. Chem. Ecol.* 36:787-794
  - 172) Xu W, Cornel AJ, Leal WS (2010) Odorant-binding proteins of the malaria mosquito *Anopheles funestus sensu stricto*. *PLoS One* 5:e15403
  - 173) Biessmann H, Andronopoulou E, Biessmann MR, Douris V, Dimitratos SD, Eliopoulos E, Guerin PM, Iatrou K, Justice RW, Krober T, Marinotti O, Tsitoura P, Woods DF, Walter MF (2010) The *Anopheles gambiae* odorant binding protein 1 (AgamOBP1) mediates indole recognition in the antennae of female mosquitoes. *PLoS One* 5:e9471
  - 174) Briand L, Nespoulous C, Huet JC, Takahashi M, Pernollet JC (2001) Ligand binding and physico-chemical properties of ASP2, a recombinant odorant-binding protein from honeybee (*Apis mellifera* L.). *Eur. J. Biochem.* 268:752-760
  - 175) Spinelli S, Lagarde A, Iovinella I, Legrand P, Tegoni M, Pelosi P, Cambillau C (2012) Crystal structure of *Apis mellifera* OBP14, a C-minus odorant-binding protein, and its complexes with odorant molecules. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 42:41-50
  - 176) Hua JF, Zhang S, Cui JJ, Wang DJ, Wang CY, Luo JY, Lv LM, Ma Y (2013) Functional characterizations of one odorant binding protein and three chemosensory proteins from *Apolygus lucorum* (Meyer-Dur) (Hemiptera: Miridae) legs. *J. Insect Physiol.* 59:690-696
  - 177) Hua JF, Zhang S, Cui JJ, Wang DJ, Wang CY, Luo JY, Lv LM (2012) Identification and binding characterization of three odorant binding proteins and one chemosensory protein from *Apolygus lucorum* (Meyer-Dur). *J. Chem. Ecol.* 38:1163-1170
  - 178) Zhou JJ, Robertson G, He X, Dufour S, Hooper AM, Pickett JA, Keep NH, Field LM (2009) Characterisation of *Bombyx mori* odorant-binding proteins reveals that a general odorant-binding protein discriminates between sex pheromone components. *J. Mol. Biol.* 389:529-545
  - 179) Gong ZI, Zhou WW, Yu HZ, Mao CG, Zhang CX, Cheng JA, Zhu ZR (2009) Cloning, expression and functional analysis of a general odorant-binding protein 2 gene of the rice striped stem borer, *Chilo suppressalis* (Walker) (Lepidoptera: Pyralidae). *Insect Mol. Biol.* 18:405-417
  - 180) Harada E, Nakagawa J, Asano T, Taoka M, Sorimachi H, Ito Y, Aigaki T, Matsuo T (2012) Functional evolution of duplicated odorant-binding protein genes, Obp57d and Obp57e, in *Drosophila*. *PLoS One* 7:e29710
  - 181) Ader L, Jones DN, Lin H (2010) Alcohol binding to the odorant binding protein LUSH: multiple factors affecting binding affinities. *Biochemistry* 49:6136-6142
  - 182) Sun YL, Huang LQ, Pelosi P, Wang CZ (2013) A lysine at the C-terminus of an odorant-binding protein is involved in binding aldehyde pheromone components in two *Helicoverpa* species. *PLoS One* 8:e55132
  - 183) Li ZQ, Zhang S, Luo JY, Cui JJ, Ma Y, Dong SL (2013) Two Minus-C odorant binding proteins from *Helicoverpa armigera* display higher ligand binding affinity at acidic pH than neutral pH. *J. Insect Physiol.* 59:263-272
  - 184) Guo H, Huang LQ, Pelosi P, Wang CZ (2012) Three pheromone-binding proteins help segregation between two *Helicoverpa* species utilizing the same pheromone components. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 42:708-716

- 185) Deng S, Yin J, Zhong T, Cao Y, Li K (2012) Function and immunocytochemical localization of two novel odorant-binding proteins in olfactory sensilla of the scarab beetle *Holotrichia oblita* Faldermann (Coleoptera: Scarabaeidae). *Chem. Senses* 37:141-150
- 186) Ju Q, Qu MJ, Wang Y, Jiang XJ, Li X, Dong SL, Han ZJ (2012) Molecular and biochemical characterization of two odorant-binding proteins from dark black chafer, *Holotrichia parallela*. *Genome* 55:537-546
- 187) Riviere S, Lartigue A, Quennedey B, Campanacci V, Farine JP, Tegoni M, Cambillau C, Brossut R (2003) A pheromone-binding protein from the cockroach *Leucophaea maderae*: cloning, expression and pheromone binding. *Biochem. J.* 371:573-579
- 188) Jiang QY, Wang WX, Zhang Z, Zhang L (2009) Binding specificity of locust odorant binding protein and its key binding site for initial recognition of alcohols. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 39:440-447
- 189) Ban L, Scaloni A, D'Ambrosio C, Zhang L, Yahn Y, Pelosi P (2003) Biochemical characterization and bacterial expression of an odorant-binding protein from *Locusta migratoria*. *Cell. Mol. Life Sci.* 60:390-400
- 190) Yin J, Feng H, Sun H, Xi J, Cao Y, Li K (2012) Functional analysis of general odorant binding protein 2 from the meadow moth, *Loxostege sticticalis* L. (Lepidoptera: Pyralidae). *PLoS One* 7:e33589
- 191) Zhang S, Chen LZ, Gu SH, Cui JJ, Gao XW, Zhang YJ, Guo YY (2011) Binding characterization of recombinant odorant-binding proteins from the parasitic wasp, *Microplitis mediator* (Hymenoptera: Braconidae). *J Chem. Ecol.* 37:189-194
- 192) He P, Zhang J, Liu NY, Zhang YN, Yang K, Dong SL (2011) Distinct expression profiles and different functions of odorant binding proteins in *Nilaparvata lugens* Stål. *PLoS One* 6:e28921
- 193) Liu SJ, Liu NY, He P, Li ZQ, Dong SL, Mu LF (2012) Molecular characterization, expression patterns, and ligand-binding properties of two odorant-binding protein genes from *Orthaga achatina* (Butler) (Lepidoptera: Pyralidae). *Arch. Insect Biochem. Physiol.* 80:123-139
- 194) Calvello M, Guerra N, Brandazza A, D'Ambrosio C, Scaloni A, Dani FR, Turillazzi S, Pelosi P (2003) Soluble proteins of chemical communication in the social wasp *Polistes dominulus*. *Cell. Mol. Life Sci.* 60:1933-1943
- 195) Zhong T, Yin J, Deng S, Li K, Cao Y (2012) Fluorescence competition assay for the assessment of green leaf volatiles and *trans*- $\beta$ -farnesene bound to three odorant-binding proteins in the wheat aphid *Sitobion avenae* (Fabricius). *J. Insect Physiol.* 58:771-781
- 196) Lartigue A, Campanacci V, Roussel A, Larsson AM, Jones TA, Tegoni M, Cambillau C (2002) X-ray structure and ligand binding study of a moth chemosensory protein. *J. Biol. Chem.* 277:32094-32098
- 197) Jacquin-Joly E, Vogt RG, Francois MC, Nagnan-Le Meillour P (2001) Functional and expression pattern analysis of chemosensory proteins expressed in antennae and pheromonal gland of *Mamestra brassicae*. *Chem. Senses* 26:833-844
- 198) Ban L, Scaloni A, Brandazza A, Angeli S, Zhang L, Yan Y, Pelosi P (2003) Chemosensory proteins of *Locusta migratoria*. *Insect Mol. Biol.* 12:125-134
- 199) Gonzalez D, Zhao Q, McMahan C, Velasquez D, Haskins WE, Sponsel V, Cassill A, Renthal R (2009) The major antennal chemosensory protein of red imported fire ant workers. *Insect Mol. Biol.* 18:395-404
- 200) Khan MR, Hu J, Ali GM (2012) Reciprocal loss of CArG-boxes and auxin response elements drives expression divergence of MPF2-Like MADS-box genes controlling calyx inflation. *PLoS One* 7:e42781
- 201) Qiao HL, Deng PY, Li DD, Chen M, Jiao ZJ, Liu ZC, Zhang YZ, Kan YC (2013) Expression analysis and binding experiments of chemosensory proteins indicate multiple roles in *Bombyx mori*. *J. Insect Physiol.* 59:667-675
- 202) Ban L, Zhang L, Yan Y, Pelosi P (2002) Binding properties of a locust's chemosensory protein. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 293:50-54
- 203) Briand L, Swasdipan N, Nespoulous C, Bezirard V, Blon F, Huet JC, Ebert P, Penollet JC (2002) Characterization of a chemosensory protein (ASP3c) from honeybee (*Apis mellifera* L.) as a brood pheromone carrier. *Eur. J. Biochem.* 269:4586-4596
- 204) Altschul SF, Madden TL, Schaffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W, Lipman DJ (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* 25:3389-3402
- 205) Robertson HM, Warr CG, Carlson JR (2003) Molecular evolution of the insect chemoreceptor gene superfamily in *Drosophila melanogaster*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100 Suppl 2:14537-14542
- 206) Holt RA, Subramanian GM, Halpern A, Sutton GG, Charlab R, Nusskern DR, Wincker P, Clark AG, Ribeiro JM, Wides R,

- Salzberg SL, Loftus B, Yandell M, Majoros WH, Rusch DB, Lai Z, Kraft CL, Abril JF, Anthouard V, Arensburger P, Atkinson PW, Baden H, de Berardinis V, Baldwin D, Benes V, Biedler J, Blass C, Bolanos R, Boscus D, Barnstead M, Cai S, Center A, Chaturverdi K, Christophides GK, Chrystal MA, Clamp M, Cravchik A, Curwen V, Dana A, Delcher A, Dew I, Evans CA, Flanigan M, Grundschober-Freimoser A, Friedli L, Gu Z, Guan P, Guigo R, Hillenmeyer ME, Hladun SL, Hogan JR, Hong YS, Hoover J, Jaillon O, Ke Z, Kodira C, Kokoza E, Koutsos A, Letunic I, Levitsky A, Liang Y, Lin JJ, Lobo NF, Lopez JR, Malek JA, McIntosh TC, Meister S, Miller J, Mobarry C, Mongin E, Murphy SD, O'Brochta DA, Pfannkoch C, Qi R, Regier MA, Remington K, Shao H, Sharakhova MV, Sitter CD, Shetty J, Smith TJ, Strong R, Sun J, Thomasova D, Ton LQ, Topalis P, Tu Z, Unger MF, Walenz B, Wang A, Wang J, Wang M, Wang X (2002) The genome sequence of the malaria mosquito *Anopheles gambiae*. *Science* 298:129-149
- 207) Honeybee Genome Sequencing Consortium (2006) Insights into social insects from the genome of the honeybee *Apis mellifera*. *Nature* 443:931-949
- 208) Sprecher H, Luthria DL, Mohammed BS, Baykousheva SP (1995) Reevaluation of the pathways for the biosynthesis of polyunsaturated fatty acids. *J. Lipid Res.* 36:2471-2477
- 209) Behrouzian B, Buist PH (2003) Mechanism of fatty acid desaturation: a bioorganic perspective. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids* 68:107-112
- 210) Behrouzian B, Buist PH (2002) Fatty acid desaturation: variations on an oxidative theme. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 6:577-582
- 211) Paton CM, Ntambi JM (2009) Biochemical and physiological function of stearoyl-CoA desaturase. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 297:E28-E37
- 212) Ntambi JM, Miyazaki M (2004) Regulation of stearoyl-CoA desaturases and role in metabolism. *Prog. Lipid Res.* 43:91-104
- 213) Guillou H, Zdravcevic D, Martin PG, Jacobsson A (2010) The key roles of elongases and desaturases in mammalian fatty acid metabolism: Insights from transgenic mice. *Prog. Lipid Res.* 49:186-199
- 214) Okuley J, Lightner J, Feldmann K, Yadav N, Lark E, Browse J (1994) Arabidopsis FAD2 gene encodes the enzyme that is essential for polyunsaturated lipid synthesis. *Plant Cell* 6:147-158
- 215) Blacklock BJ, Scheffler BE, Shepard MR, Jayasuriya N, Minto RE (2010) Functional diversity in fungal fatty acid synthesis: the first acetylase from the Pacific golden chanterelle, *Cantharellus formosus*. *J. Biol. Chem.* 285:28442-28449
- 216) Cripps C, Blomquist GJ, Renobales M (1986) De novo biosynthesis of linoleic acid in insects. *Biochim. Biophys. Acta* 876:572-580
- 217) Zhou XR, Horne I, Damcevski K, Haritos V, Green A, Singh S (2008) Isolation and functional characterization of two independently-evolved fatty acid  $\Delta 12$ -desaturase genes from insects. *Insect Mol. Biol.* 17:667-676
- 218) Borgeson CE, de Renobales M, Blomquist GJ (1990) Characterization of the  $\Delta 12$  desaturase in the American cockroach, *Periplaneta americana*: the nature of the substrate. *Biochim. Biophys. Acta* 1047:135-140
- 219) Aboshi T, Shimizu N, Nakajima Y, Honda Y, Kuwahara Y, Amano H, Mori N (2013) Biosynthesis of linoleic acid in *Tyrophagus mites* (Acarina: Acaridae). *Insect Biochem. Mol. Biol.* 43:991-996
- 220) Riddervold MH, Tittiger C, Blomquist GJ, Borgeson CE (2002) Biochemical and molecular characterization of house cricket (*Acheta domestica*, Orthoptera: Gryllidae)  $\Delta 9$  desaturase. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 32:1731-1740
- 221) Yoshiga T, Okano K, Mita K, Shimada T, Matsumoto S (2000) cDNA cloning of acyl-CoA desaturase homologs in the silkworm, *Bombyx mori*. *Gene* 246:339-345
- 222) Dallerac R, Labeur C, Jallon JM, Knipple DC, Roelofs WL, Wicker-Thomas C (2000) A  $\Delta 9$  desaturase gene with a different substrate specificity is responsible for the cuticular diene hydrocarbon polymorphism in *Drosophila melanogaster*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 97:9449-9454
- 223) Albre J, Lienard MA, Sirey TM, Schmidt S, Tooman LK, Carraher C, Greenwood DR, Lofstedt C, Newcomb RD (2012) Sex pheromone evolution is associated with differential regulation of the same desaturase gene in two genera of leafroller moths. *PLoS Genet* 8:e1002489
- 224) Liu W, Ma PW, Marsella-Herrick P, Rosenfield CL, Knipple DC, Roelofs W (1999) Cloning and functional expression of a cDNA encoding a metabolic acyl-CoA  $\Delta 9$ -desaturase of the cabbage looper moth, *Trichoplusia ni*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 29:435-443
- 225) Stanley DW (1990) *Eicosanoids in invertebrate signal transduction systems*. Princeton University Press, Princeton, New Jersey.



- 226) Tunaz H, Jurenka RA, Stanley DW (2001) Prostaglandin biosynthesis by fat body from true armyworms, *Pseudaletia unipuncta*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 31:435-444
- 227) Jurenka RA, Pedibhotla VK, Stanley DW (1999) Prostaglandin production in response to a bacterial infection in true armyworm larvae. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* 41:225-232
- 228) Murtaugh MP, Denlinger DL (1982) Prostaglandins E<sub>2</sub> and F<sub>2α</sub> in the house cricket and other insects. *Insect Biochem.* 12:599-603
- 229) Stanley-Samuelson DW, Klocke JA, Kubo I, Loher W (1983) Prostaglandins and arachidonic acid in nervous and reproductive tissue from virgin and mated female crickets *Teleogryllus commodus*. *Ent. Exp. Appl.* 34:35-39
- 230) Wakayama EJ, Dillwith JW, Blomquist GJ (1986) Occurrence and metabolism of prostaglandins in the housefly, *Musca domestica* (L.). *Insect Biochem.* 16:895-902
- 231) Tunaz H, Putnam SM, Stanley DW (2002) Prostaglandin biosynthesis by fat body from larvae of the beetle *Zophobas atratus*. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* 49:80-93
- 232) Gadelhak GG, Pedibhotla VK, Stanley-Samuelson DW (1995) Eicosanoid biosynthesis by hemocytes from the tobacco hornworm, *Manduca sexta*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 25:743-749
- 233) Stanley D, Kim Y (2011) Prostaglandins and their receptors in insect biology. *Front. Endocrinol.* (Lausanne) 2:105
- 234) Miller JS, Howard RW, Rana RL, Tunaz H, Stanley DW (1999) Eicosanoids mediate nodulation reactions to bacterial infections in adults of the cricket, *Gryllus assimilis*. *J. Insect Physiol.* 45:75-83
- 235) Stanley-Samuelson DW, Jensen E, Nickerson KW, Tiebel K, Ogg CL, Howard RW (1991) Insect immune response to bacterial infection is mediated by eicosanoids. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 88:1064-1068
- 236) Shrestha S, Kim Y (2009) Various eicosanoids modulate the cellular and humoral immune responses of the beet armyworm, *Spodoptera exigua*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 73:2077-2084
- 237) Lord JC, Anderson S, Stanley DW (2002) Eicosanoids mediate *Manduca sexta* cellular response to the fungal pathogen *Beauveria bassiana*: a role for the lipoxygenase pathway. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* 51:46-54
- 238) Phelps PK, Miller JS, Stanley DW (2003) Prostaglandins, not lipoxygenase products, mediate insect microaggregation reactions to bacterial challenge in isolated hemocyte preparations. *Comp. Biochem. Physiol. A Mol. Integr. Physiol.* 136:409-416
- 239) Stanley-Samuelson DW, Pelowuin JJ, Loher W (1986) Egg-laying in response to prostaglandin injections in the Australian field cricket, *Teleogryllus commodus*. *Physiol. Entomol.* 11:213-219
- 240) Machado E, Swevers L, Sdralia N, Medeiros MN, Mello FG, Iatrou K (2007) Prostaglandin signaling and ovarian follicle development in the silkworm, *Bombyx mori*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 37:876-885
- 241) Loher W, Ganjian I, Kubo I, Stanley-Samuelson D, Tobe SS (1981) Prostaglandins: Their role in egg-laying of the cricket *Teleogryllus commodus*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 78:7835-7838
- 242) Daimon T, Taguchi T, Meng Y, Katsuma S, Mita K, Shimada T (2008) β-fructofuranosidase genes of the silkworm, *Bombyx mori*: insights into enzymatic adaptation of *B. mori* to toxic alkaloids in mulberry latex. *J. Biol. Chem.* 283:15271-15279
- 243) Griss C, Simpson SJ, Rohrbacher J, Rowell CHF (1991) Localization in the central nervous system of larval *Manduca sexta* (lepidoptera: sphingidae) of areas responsible for aspects of feeding behavior. *J. Insect Physiol.* 37:477-481
- 244) Aubele E, Klemm N (1977) Origin, destination and mapping of tritocerebral neurons of locust. *Cell Tissue Res.* 178:199-219
- 245) Melcher C, Pankratz MJ (2005) Candidate gustatory interneurons modulating feeding behavior in the *Drosophila* brain. *PLoS Biol.* 3:e305
- 246) Zinke I, Kirchner C, Chao LC, Tetzlaff MT, Pankratz MJ (1999) Suppression of food intake and growth by amino acids in *Drosophila*: the role of *pumpless*, a fat body expressed gene with homology to vertebrate glycine cleavage system. *Development* 126:5275-5284
- 247) Mishra D, Miyamoto T, Rezenom YH, Broussard A, Yavuz A, Slone J, Russell DH, Amrein H (2013) The molecular basis of sugar sensing in *Drosophila* larvae. *Curr. Biol.* 23:1466-1471
- 248) Flood TF, Iguchi S, Gorczyca M, White B, Ito K, Yoshihara M (2013) A single pair of interneurons commands the *Drosophila* feeding motor program. *Nature* 499:83-87