

1. [ONSA 奨励賞受賞講演]

放射化学アッセイ法を利用したチャバネアオカメムシに おける光周性の神経内分泌機構に関する研究

京都大学 大学院理学研究科

松本 圭司

チャバネアオカメムシのメス成虫は明瞭な光周性を示し、短日条件により卵巣発達を抑制し冬を越す。光周性の神経内分泌機構を解明するため、卵巣発達に必要な幼若ホルモン（JH）合成の調節機構に着目して研究をおこなってきた。JH合成器官を³H-メチオン存在下で培養し、分泌されたJHに含まれる³H量を測定することでJH合成量を測定できる。本講演では、この放射化学アッセイ法を基軸とした研究成果について紹介する。

放射化学アッセイ法を利用したチャバネアオカメムシにおける光周性の 神経内分泌機構に関する研究

国立大学法人 京都大学 大学院理学研究科
生物科学専攻
松本圭司

1. はじめに

生物が1日の昼や夜の長さ（光周期）に反応する性質を光周性と呼ぶ。温帯地域に生息する昆虫の多くは、光周性により発育や生殖に不適な季節を休眠に入ってやり過ごす。休眠とは成長や生殖を停止した特殊な生理状態であり、昆虫種によって卵、幼虫、蛹、成虫期のいずれのステージで休眠するかが決まっている。成虫で休眠する昆虫は、秋の短日条件で休眠に入り卵巣発達を抑制する。これまでに、多くの昆虫において、短日条件では卵巣発達に必要な幼若ホルモン（juvenile hormone, JH）の合成活性が低下すると報告されている。しかし、光周期による JH 合成調節の神経内分泌機構は明らかになっていない。光周期による JH 合成調節の神経内分泌機構を探るためには JH 合成を調節するニューロンと物質の特定が必要である。しかしながら、いずれの昆虫においても光周性における JH 合成調節物質やニューロンの特定には至っていない。JH は昆虫種により構造が様々であり、JH 合成調節機構を調べるうえで JH の構造が判明していること、またその合成量を定量できることが必要不可欠である。チャバネアオカメムシ（図1）は JH の構造（図2）が同定されているので[1、2]、JH 合成活性の測定が可能である。そのため、JH 合成調節の神経内分泌機構を調べるのに適している。本稿では、放射化学アッセイ法による JH 合成活性測定を主軸とした光周性の神経内分泌機構に関する研究を報告する。



図1 チャバネアオカメムシ。

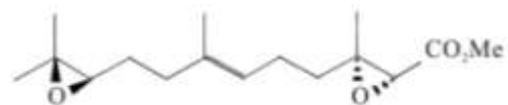


図2 チャバネアオカメムシの JH 構造。

2. 放射化学アッセイ法による JH 合成活性の測定

JH はアラタ体（corpus allatum, CA）（図3）で合成・分泌される。JH 合成経路の最終ステップでメチルトランスフェラーゼによるメチル化とエポキシダーゼによるエポキシ化が起こる[3]。放射化学アッセイ法は、昆虫体内から取り出したアラタ体を ^{14}C または ^3H でラベル

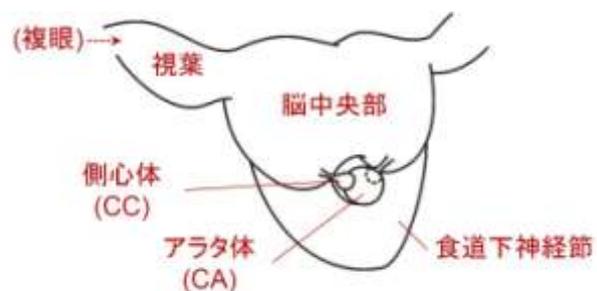


図3 チャバネアオカメムシの脳とアラタ体の模式図。

したメチオニン存在下で培養し、メチル化の際に JH に取り込まれた ^{14}C 、 ^3H を測定することで JH 合成量を算出する手法である。この手法は 1974 年に Tobe and Pratt によって提唱され [4、5]、以降様々な昆虫種において JH 合成活性を測定する方法として用いられてきた [3]。本研究では下記の方法で JH 合成活性を測定した。

- (I) チャバネアオカメムシから側心体 - アラタ体複合体 (CC-CA) または CA を取り出し、 ^3H -メチオニン含有培地で培養する。
- (II) 3 時間の培養後、培地にヘキサンを加えて JH を抽出する。
- (III) 薄層クロマトグラフィ (thin-layer chromatography、TLC) により、JH のマーカールと同じ移動度の区画を切り出す。
- (IV) 切り出した TLC プレートに液体シンチレーションカクテル (Ultima Gold、Perkin Elmer) に入れ、液体シンチレーションカウンター (Tri-Carb 2910TR) で測定をおこなった。

3. 異なる光周期における JH 合成活性と卵巣発達

チャバネアオカメムシのメス成虫は卵巣発達に明瞭な光周性を示し、短日条件では卵巣を発達させず休眠に入るが、長日条件では卵巣を発達させる [6]。JH 合成調節にも光周性が見られるのかを

調べるため、短日条件 (明期 : 暗期 = 12 時間 : 12 時間、 25°C) で飼育したメス成虫を羽化 15 日目に長日条件 (明期 : 暗期 = 16 時間 : 8 時間、 25°C) に移し、短日条件で飼育し続けた個体との JH 合成活性を比較した。飼育のスケジュールは図 4 に示す。長日条件に移した日を day 0 とし、day 0、4、6、8、10 の JH 合成活性を比較した。

その結果、短日条件では JH 合成活性は低いままであったが、長日条件に移すとわずか 4 日で有意に上昇した (図 5)。このように JH 合成活性が明瞭な光周性を示すことが明らかとなった [7]。



図 4 JH 合成活性に用いた個体の飼育スケジュール。

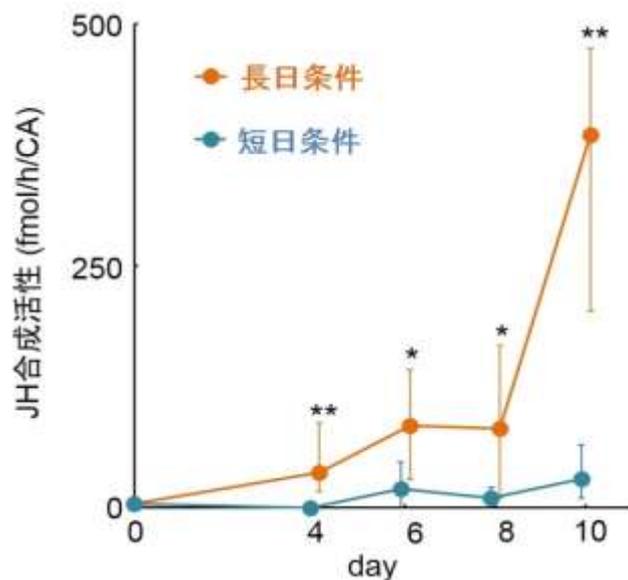


図 5 異なる光周期における JH 合成活性。
(Mann-Whitney U test, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$)。

4. 脳の JH 合成調節に対する役割

4.1 CC-CA に神経連絡する脳ニューロン

脳の JH 合成調節に対する役割を調べるため、まず JH 合成を調節する脳ニューロンを探索

した。CC-CA から色素を注入し、CC-CAに神経連絡するニューロンを染色した。その結果、脳側方部や脳間部に細胞体をもつニューロンがCC-CAに投射することが明らかとなった。図6にCC-CAに投射するニューロンの模式図を示す。この模式図では左側の側心体を通るニューロンのみを示している。これらニューロンのいずれかが JH 合成を調節すると考えられる[7]。

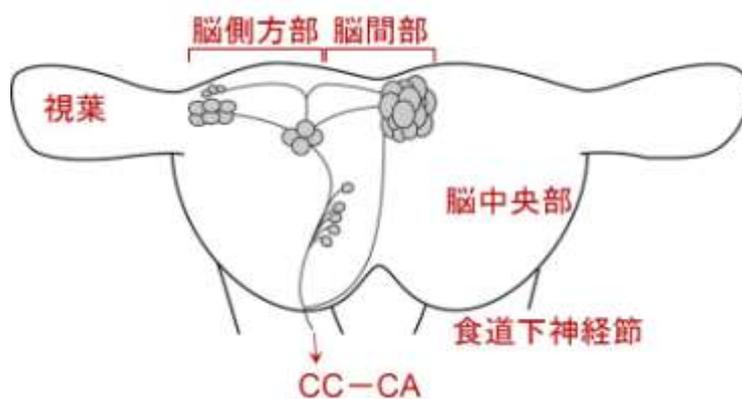


図6 CC-CAに連絡するニューロンの模式図。

4.2 JH 合成調節における脳の役割

脳が JH 合成を促進するのか抑制するのかを調べるため、脳側方部と脳間部を含む脳領域（脳中央部）と CC-CA を共培養し、その時の CA の JH 合成活性を放射化学アッセイ法により測定した。その結果、

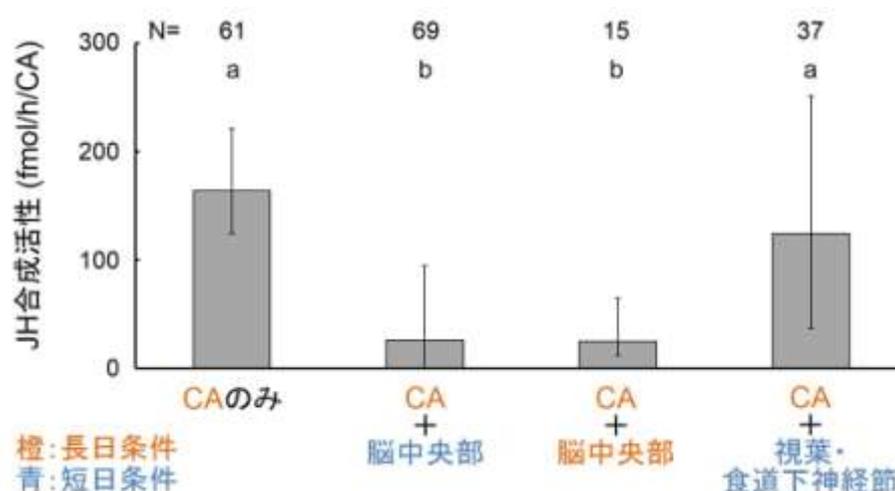


図7 JH 合成活性に対する脳中央部の影響 (Steel-Dwass test、 $P < 0.05$)。

脳中央部存在下

での CA の JH 合成活性は、CC-CA のみの培養時や視葉・食道下神経節存在下での JH 合成活性よりも有意に低かった (図7)。また、短日条件および長日条件由来の脳中央部のどちらにも JH 合成抑制効果が見られた。脳中央部には光周期に関係なく JH 合成抑制効果が見られることから、光周期により JH 合成抑制物質の合成が調節されるのではなく分泌が調節されていると考えられる[7]。

5. JH 合成抑制調節物質の同定

5.1 JH 合成抑制物質の特性

JH 合成抑制物質を特定するため、加熱処理やペプチターゼ処理により抑制物質の特性を調べた。脳中央部の 80%メタノール抽出物を作製し、これに 100°C 30 分の加熱処理を行ったのち、CA の放射化学アッセイ用の培地に加え、CA を培養したところ加熱処理をしていない脳抽出物を加えた時と同様の強い JH 合成抑制効果を示した。一方、トリプシン処理をした脳抽出物はトリプシン処理をしていない脳抽出物よりも JH 合成抑制効果が低くなった。これらの結果から、JH 合成抑制物質はペプチドである可能性が高いと考えられる[8]。

5.2 既知 JH 合成抑制ペプチド

4.1 から JH 合成抑制物質はペプチドである可能性が高い。そこで、これまで JH 合成に光周性を示さない昆虫で知られている JH 合成抑制ペプチドが本種の JH 合成に影響するのかを調べた。既知の JH 合成抑制ペプチドとして、アラトスタチン類が挙げられる。これはアミノ酸配列 C 末端側の特徴により大きく 3 つに分類され、Y/FXFGL-NH₂ タイプ、W(X)₆W-NH₂ タイプ、PISCF タイプが存在する。Y/FXFGL-NH₂ タイプは主にゴキブリ目昆虫で抑制効果が知られており、W(X)₆W-NH₂ タイプはフタホシコオロギ *Gryllus bimaculatus* とチャイロコメノ

ゴミムシ *Tenebrio molitor* の 2 種で、PISCF タイプは主にチョウ目昆虫で知られている [9]。また、アラトスタチン類以外にもアラトトロピンと short-neuropeptide F がカイコガ *Bombyx mori* においてのみ JH 合成抑制効果があることが知られている [10-11]。これらペプチドについてチャバネアオカメムシの JH 合成に影響するかどうかを調べた。長日条件で飼育したメス成虫の CC-CA を取り出し、放射化学アッセイ法による 3 時間の培養を 3 回おこなった。3 時間毎に新しい培地に替え、2 回目の培地にのみ上記のペプチドのいずれか 1 種を加えた (図 8)。その結果、W(X)₆W-NH₂ タイプのアラトスタチンでのみ JH 合成抑制効果が見られ、その他のペプチドでは JH 合成への影響は見られなかった (表 1) [8]。

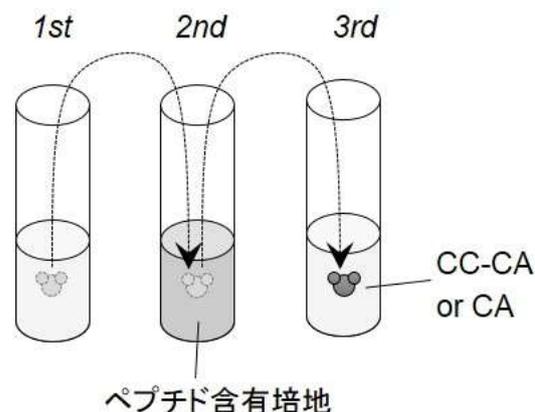


図 8 CC-CA または CA の 3 時間×3 回培養。

表 1 本研究で使用したペプチドのアミノ酸配列と JH 合成効果の有無。

ペプチド	アミノ酸配列	抑制効果
Y/FXFGL-NH ₂ タイプ アラトスタチン	AYSYVSEYKRLPVYNFGL-NH ₂	×
	GGSLYSFGL-NH ₂	×
	GDGRLYAFGL-NH ₂	×
W(X) ₆ W-NH ₂ タイプ アラトスタチン	AWRDLSGGW-NH ₂	○
PISCF タイプ アラトスタチン	SYWKQCAFNAVSCF-NH ₂	×
アラトトロピン	GFKNVALSTARGF-NH ₂	×
short-neuropeptide F	NSNRSPQLRLRF-NH ₂	×

5.3 チャバネアオカメムシの JH 合成抑制物質

W(X)₆W-NH₂ のアミノ酸配列をもつペプチドはトノサマバッタ *Locusta migratoria* において後腸や輸卵管ではたらくホルモンとして最初に同定されており [12]、 “myoinhibitory peptide (MIP)” と名付けられた。本実験において JH 合成抑制効果が見られたのは *G. bimaculatus* 由来の Grybi-MIP1 である。では、チャバネアオカメムシは自身で MIP を合成しているのだろうか。本種の脳に MIP があるのか調べるため、本種脳の RNA-seq データから MIP

をコードする DNA 配列を探したところ、9 種の MIP (Plast-MIP と名付けた) を含む MIP 前駆体ペプチドをコードする DNA 配列が見つかった (図 9)。そこで 9 種の Plast-MIP のうち、Plast-MIP1、5、8 の 3 種について、本種の JH 合成に影響するかどうか調べた。4.2 と同様に CA を 3 回培養し、2 回目の培地にのみ Plast-MIP1、5、8 (濃度はいずれも 10^{-6} M) のいずれかを加えた。その結果、いずれの Plast-MIP にも強い JH 合成抑制効果が見られた (図 10a)。また、Plast-MIP1 について 10^{-8} 、 10^{-6} 、 10^{-4} M の濃度で JH 合成への影響を調べたところ、 10^{-8} M では抑制効果が見られなかったが、 10^{-6} M と 10^{-4} M では抑制効果が見られた (図 10b)。このことから、Plast-MIP が JH 合成抑制効果を示す閾値は 10^{-8} ~ 10^{-6} M にあると考えられる [8]。

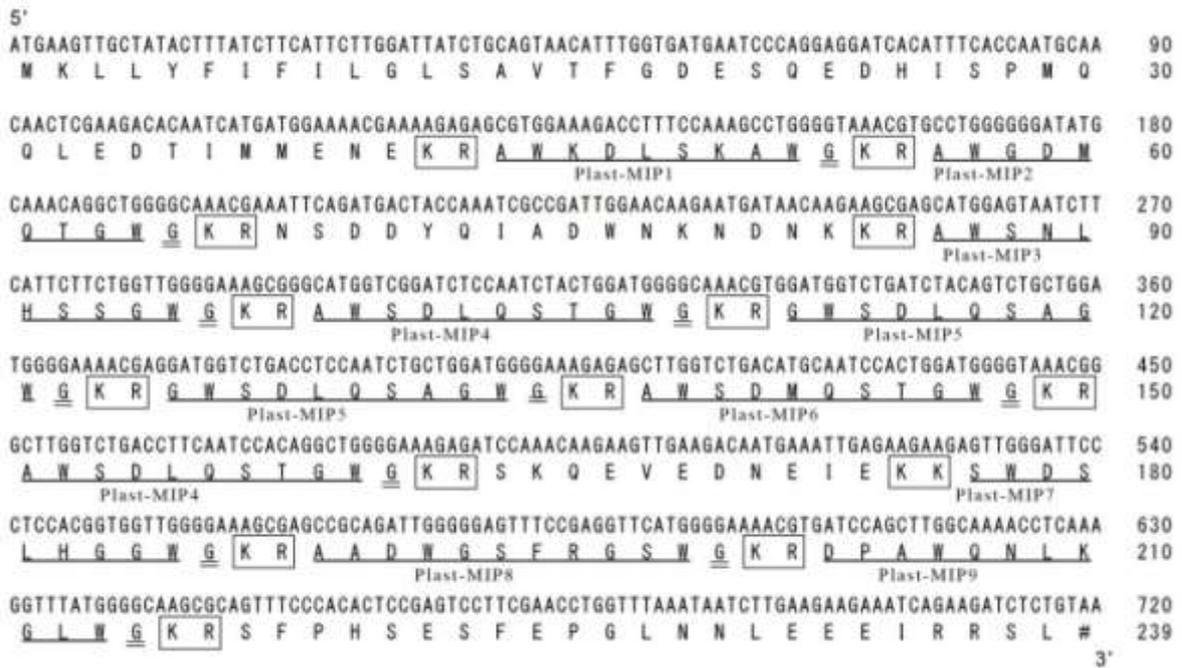


図 9 Plast-MIP 前駆体をコードする cDNA 配列とそのアミノ酸配列。

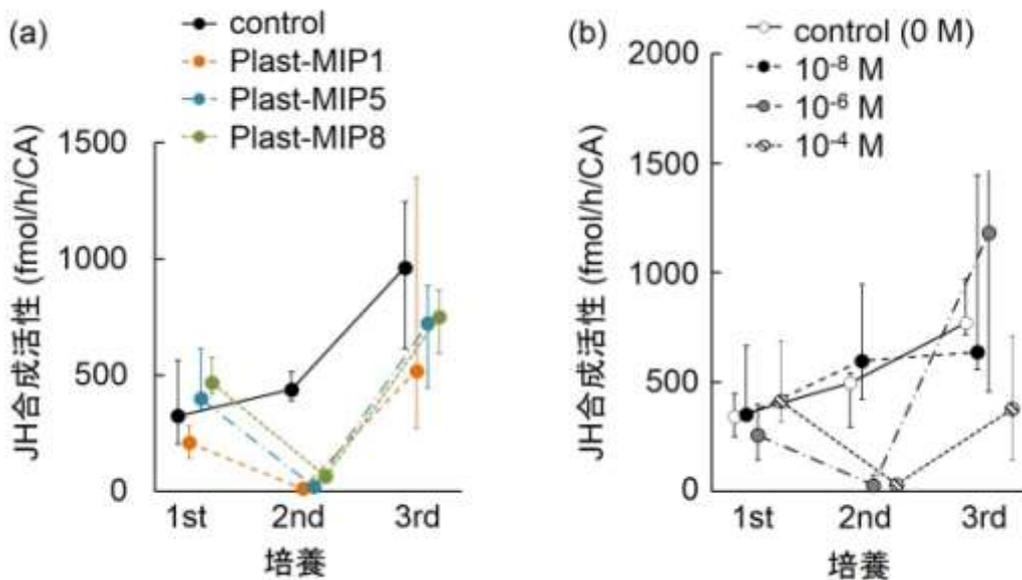


図 10 (a) Plast-MIP1、5、8 の JH 合成活性に対する影響、(b) 10^{-8} 、 10^{-6} 、 10^{-4} M の Plast-MIP1 の JH 合成活性に対する影響。

5.4 脳内の Plast-MIP の発現

Plast-MIP が脳中央部に存在するかを調べるために、脳中央部の 80%メタノール抽出物の MALDI-TOF MS 解析をおこなった。得られたスペクトルのうち、 m/z 1,238.56 が Plast-MIP8 の推定分子量の値と一致した (図 11a の矢印)。そこで、 m/z 1,238.56 を前駆体イオンとして MS/MS 解析をおこなったところ、アミノ酸配列も Plast-MIP8 のものと一致した (図 11b)。これらの結果より、少なくとも Plast-MIP8 は脳中央部に存在すると考えられる。

さらに、異なる光周期において脳中央部の Plast-MIP 前駆体ペプチドをコードする遺伝子 *Plast-Mip* の mRNA 発現量を比較した。短日・長日条件の day 10 (図 4) のメス成虫から脳中央部を取り出し、mRNA を抽出してリアルタイム PCR 法により mRNA 発現量を測定した。その結果、短日条件と長日条件ともに *Plast-Mip* mRNA の発現が見られ、短日・長日条件間ではその発現量に有意差は無かった (図 12)。このことから、Plast-MIP は光周期に関係なく脳中央部で合成されていると考えられる [8]。

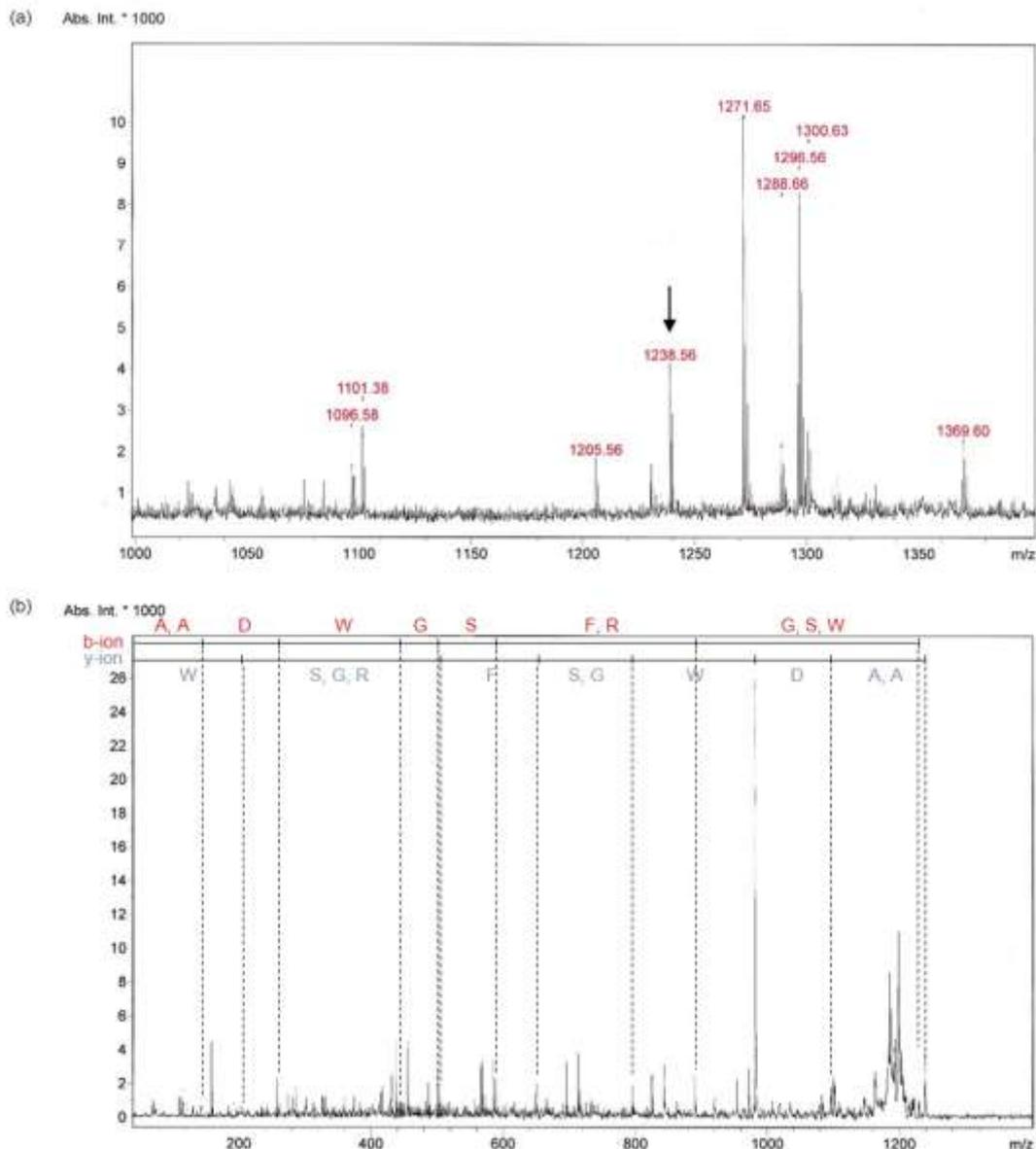


図 11 (a) 脳中央部の 80%メタノール抽出物の MALDI-TOF MS により得られたスペクトル、(b) m/z 1,238.56 をプレカーサーイオンとした MS/MS により得られたスペクトル。

6. まとめ・今後の展望

以上の結果から、チャバネアオカメムシでは光周期に関係なく JH 合成抑制物質 Plast-MIP が脳中央部に存在することがわかった。これより、短日条件では Plast-MIP が分泌されることで JH 合成が抑制され休眠に入るが、長日条件では Plast-MIP が分泌されないため JH 合成が上昇し卵巣発達すると考えられる。ゴキブリの 1 種 *Diploptera punctata* やフタホシコオロギ *G. bimaculatus* では、脳側方部の細胞体を含むニューロンに Y/FXFGL-NH₂ タイプのアラトスタチンや MIP が存在し[13-14]、JH 合成を抑制していると考えられている。これら知見と、チャバネアオカメムシにおいて脳間部や脳側方部に細胞体をもつニューロンが CC-CA に神経連絡していることから、これらニューロンのいずれかで Plast-MIP が合成され、JH 合成を抑制している可能性が高い。

本研究により、JH 合成に光周性を示す昆虫における JH 合成調節物質を初めて明らかにすることができた。今後は、Plast-MIP がどのニューロンで合成されているのか、また、異なる光周期によって Plast-MIP の分泌がどのように制御されているかを調べる必要がある。これらが明らかになれば、光周性における神経内分泌機構の理解に大きく寄与できると考えられる。

謝辞

本研究を進めるにあたって、御指導いただきました志賀向子先生（大阪大学・院理）、後藤慎介先生（大阪市立大学・院理）、に深く御礼申し上げます。また、JH マーカーを合成して提供して下さった品田哲郎先生（大阪市立大学・院理）、チャバネアオカメムシを提供して下さった小滝豊美博士（農研機構）、RNA-seq データを提供して下さった篠田徹郎博士、田中良明博士、末次克行博士（農研機構）、MALDI-TOF MS、MS/MS 解析をして下さった下中智美様（大阪市立大学・複合先端）、MALDI-TOF MS 用サンプル調製のためのカラムを提供して下さった Christian Wegener 博士（Biocenter、University of Würzburg）に心から感謝いたします。また、本研究の一部は JSPS 特別研究員奨励費（DC2、No. 14J06595）の助成を受けて実施しました。

参考文献

- [1] T. Kotaki, T. Shinada, K. Kaihara, Y. Ohfuné, H. Numata, *Org. Lett.*, 11 (2009) 5234-5237.
- [2] T. Kotaki, T. Shinada, K. Kaihara, Y. Ohfuné, H. Numata, *J. Insect Physiol.*, 57 (2011) 147-152.
- [3] W. G. Goodman, N. A. Granger, *Comprehensive Molecular Insect Science*, 3 (2005) 319-408.
- [4] G. E. Pratt, S. S. Tobe, *Life Sci.*, 14 (1974) 575-586.

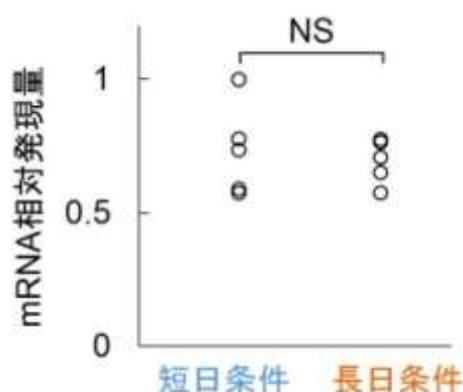


図 12 *Plast-Mip* mRNA の相対発現量。
(Mann-Whitney U test、 $P > 0.05$).

- [5] S. S. Tobe, G. E. Pratt, *Biochem. J.*, 144 (1974) 107-113.
- [6] T. Kotaki, S. Yagi, *Appl. Entomol. Zool.*, 24 (1989) 42-51.
- [7] K. Matsumoto, H. Numata, S. Shiga, *J. Insect Physiol.*, 59 (2013) 387-393.
- [8] K. Matsumoto, Y. Suetsugu, Y. Tanaka, T. Kotaki, G. G. Shin, T. Shinoda, S. Shiga, *J. Insect Physiol.*, 96 (2016) 21-28.
- [9] W. G. Bendena, S. S. Tobe, *Can. J. Zool.*, 90 (2012) 521-544.
- [10] N. Yamanaka, S. Yamamoto, D. Žitňan K. Watanabe, T. Kawada, H. Satake, Y. Kaneko, K. Hiruma, Y. Tanaka, T. Shinoda, H. Kataoka, *PLoS One*, 3 (2008) e3048.
- [11] Y. Kaneko, K. Hiruma, *J. Insect Physiol.*, 80 (2015) 15-21.
- [12] L. Schoofs, G. M. Holman, T. K. Hayes, R. J. Nachman, A. De Loof, *Regul. Pept.*, 36 (1991) 111-119.
- [13] B. Stay, K. K. Chan, P. Woodhead, *Cell Tissue Res.* 270 (1992) 15-23.
- [14] G. Witek, P. Verhaert, M. W. Lorenz, K. H. Hoffmann, *Eur. J. Entomol.*, 96 (1999) 279-286.