

昆虫を用いた栄養分依存的な選好性摂食行動の 内分泌制御の解明

永田 晋治

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 准教授

緒 言

生理学的研究の知見から、昆虫においても、哺乳類など多くの生物種と同様に、行動や生体内のホメオスタシスに関わる調節が内分泌系で制御されていることが明らかにされている。すなわち、脳神経系で産生され分泌されるホルモン類による調節機構は、生物種全般に共通して認められる生体を維持するための重要なメカニズムである。近年、様々な生物種のゲノム配列およびトランスクリプトーム解析の情報が容易に入手できるようになり、比較生物学的なアプローチは、ゲノム生物学を手技的あるいは概念的に切り離すことのできない分野となった。

上記の通り、行動制御あるいは代謝制御には内分泌系が重要であるが、内分泌系の中心的な役割を担っているホルモン類の発見や同定は生化学的な研究に対して遅れをとっていたことは否めない。ところが、ゲノムや網羅的解析の情報開示により、その解析は *in silico* で容易にできるようになり、ゲノムにコードされたホルモン類はいまや有限個の要素として考えることができるようになった。実際に、私たちの研究グループでは、非モデル昆虫種である不完全変態昆虫のフタホシコオロギ *Gryllus bimaculatus* を用いて、多くのホルモン類を同定することに成功した。これら同定したホルモン類の中で、摂食行動を調節する神経ペプチド類に関しては、モデル昆虫種であるカイコ *Bombyx mori* で明らかにしている情報¹⁾を参照することで、フタホシコオロギでも同様のホルモン類が摂食行動を調節する因子として重要であることを明らかにしつつある。

近年、私たちの研究グループでは、代謝と内分泌系が調節する摂食行動を明らかにするため、非モデル生物であるフタホシコオロギを用いて、栄養分依存的な行動解析をスピーディーにすることを実現してきた。例えば、人工飼料を開発し、選好性行動のビデオモニタリングによる動作軌道解析も可能とした。また、フタホシコ

オロギでは、RNA干渉法 (RNAi法) による、標的の遺伝子のノックダウンが容易であるため、栄養学的手法を兼ね備えた、行動解析も簡便化された有用な生物種として提案できる段階となった。

その中で、昆虫において生体内の脂質制御調節機構に重要である脂質動員ホルモン Adipokinetic hormone (AKH) に着目して研究している²⁾。このAKHは、8残基のアミノ酸からなるペプチドホルモンで、脳に連絡する側心体という神経球で産生分泌されている。またAKHは、体内の栄養状態を感知し、体内で貯蔵されていた脂質や糖質を体液中 (血液中) に動員する機能を有するため、哺乳類のグルカゴンの機能的なオルソログと考えられている。体内の脂質代謝制御が、生物が摂食行動を発現するために重要であることは言うまでもなく、体内の栄養状態と選好性が密接に関連していることも明らかにしている³⁾。しかし、現在のところ、そのメカニズムを分子レベルで記述できる段階ではない。ここでは、AKH受容体 (AKHR) をRNA干渉法にてノックダウンしたコオロギ個体の生化学的な解析を中心とし、代謝レベルでの行動メカニズムを明らかにすることを目的とした。特に、脂肪酸組成が栄養状態、内分泌状態にตอบสนองダイナミックに変動することを見出したため報告する。

実験方法

動物

研究室にて飼育しているフタホシコオロギおよび購入したもの (月夜野フード、群馬) を用いた。長日条件で28℃にて飼育および観察した。

RNA干渉法

すでに報告している小沼らの条件²⁾と同様に行った。すなわち、T7の塩基配列を有するプライマー (フォワード、リバース) を用いてAKHRの部分塩基配列をコードするcDNAをPCRにて増幅した。このPCR

産物を用いて、T7RNAポリメラーゼにてRNAを合成し2本鎖RNAを作製後、コオロギに皮下注射することでAKHR遺伝子の転写量をノックダウンさせた個体を調製した。

脂質・脂肪酸分析

脂質成分は、解剖して摘出したフタホシコオロギの組織あるいは体液をクロロホルム：メタノール（1:1）により抽出し、その抽出溶液をLorenzらの方法により分画後⁴⁾、脂質画分を得た。全脂質量はリン酸バニリン法にて分析した。さらに、抽出後の脂質成分をけん化しADAMにて蛍光標識し、逆相HPLCにて定量した。

RT-PCR

目的の遺伝子は、RT-PCRにて発現を確認した。RT-PCRにはフタホシコオロギの成虫を解剖後RNAを抽出し調製したcDNAを用いた。

結 果

1. AKH受容体の発現量低下による体内の脂質成分の変化

フタホシコオロギのAKH受容体（AKHR）をコードする2本鎖RNAを成虫雄の個体に皮下注射により投与した。その結果、AKHRの発現部位である脂肪体において3日後には顕著な発現量の低下が認められた。この個体を用いて、まず、体液（血液）中の全脂質量を定量した。その結果、AKHRノックダウン個体では、体液中の脂質量が顕著に低下した（図1A）。

この脂質成分を明らかにするため、脂質の主成分であるDAGから脂肪酸を遊離させその成分を分析した。

その結果、脂肪酸組成中、ステアリン酸（18:0）の含有量が顕著に低下した（図1B）。また、脂肪酸組成の変動がAKHによるものかを確認するために、化学合成をしたAKHを皮下注射した後の、ステアリン酸含有率を分析したが、AKH投与により脂肪酸組成は変動した（図1C）。すなわち、AKHは飽和脂肪酸であるステアリン酸の組成比に影響を与えることがわかった。

2. 脂肪酸不飽和化酵素の転写変動

次に脂肪酸の飽和、不飽和に関わる酵素であるステアロイルCoA還元酵素（SCD）の発現変動と脂肪酸合成に関わることを検討した。フタホシコオロギの場合は、一般的な生物種と異なり $\Delta 9$ だけでなく、 $\Delta 12$ もゲノム上にコードされており、共にSCDとして働くことをあらかじめ見出していた。そこで、両SCDを共にRNAiによりノックダウンすると、致死となった（図2A）。次に、SCDの転写変動を定量的PCRにより分析したところ、絶食により脂肪組織（脂肪体：Fat body）内での転写が大きく変動していた。すなわち、絶食後のフタホシコオロギでは、顕著にSCDの転写量が低下した（図2B）。

次に、食餌によるSCDの発現量の回復を検討したところ、絶食後に減少した脂肪体内のSCDの転写量は再給餌により回復することがわかった。

このSCDの転写量回復が、食餌でどの成分によるものかを明らかにするため、人工飼料にタンパク質、脂質、糖質の3つの組成を別々に添加した餌を用いて、それぞれを再給餌した際の脂肪体内のSCDの転写量を測定した。その結果、糖質でのみSCDの転写量の回復が

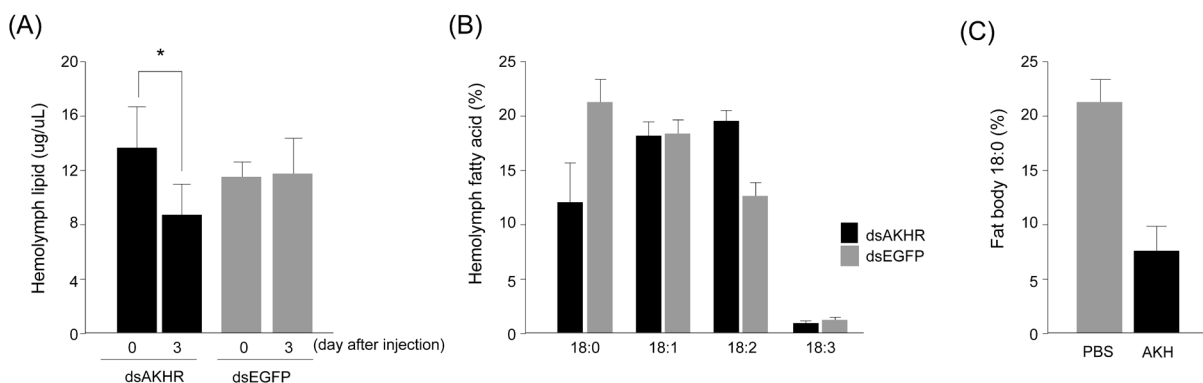


図1 AKH受容体のノックダウンによる、コオロギの脂質および脂肪酸組成の変動

(A) AKHRのノックダウンにより体液中の脂質レベルが下がった。(B) AKHRのノックダウンにより体内の脂肪酸組成の変動が認められた。(C) 化学合成したAKHをコオロギの投与した際のステアリン酸組成が変化した。

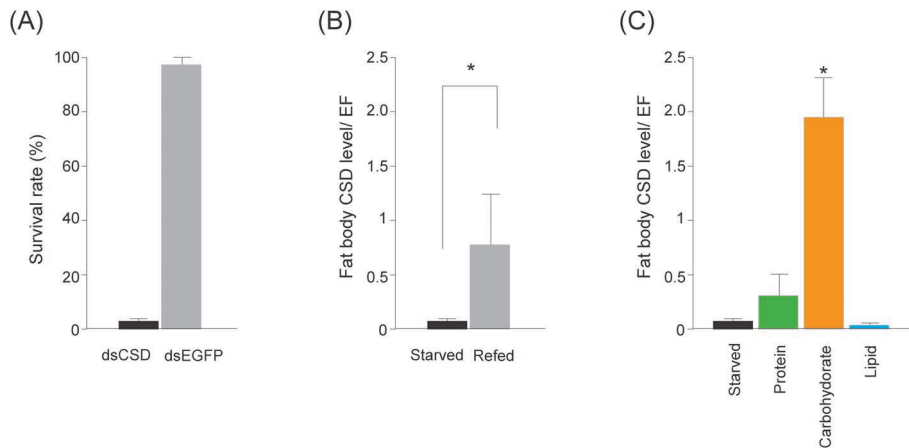


図2 フタホシコオロギのCSDの転写変動解析

(A) CSDのノックダウン個体の生存率。(B) 絶食によるCSDの転写量の変動。(C) CSDの栄養分による転写量変動解析。

認められた (図2C)。また、このSCDの発現量はグルコースを摂取するだけでも回復することが明らかとなった。

3. 脂肪酸の選好性摂食

上述の通り、脂肪酸が体内の代謝および行動に重要であることが明らかとなった。このことから、飽和および不飽和脂肪酸の選好性を検討した。その結果、不飽和脂肪酸の選好性が非常に高いことがわかった。このことはAKHRをノックダウンした個体でも認められ、その割合が変化した (図3)。

考 察

無脊椎動物であるキロシヨウジョウバエ *Drosophila melanogaster* はモデル昆虫として、様々な生命現象を明らかにしてきたサイエンスツールである。これまでの研究により、昆虫種でも生命原理を支える分子基盤が哺乳類と類似し、哺乳類のモデルとして幅広い分野で利用されている。ところが、栄養分の選好性など行動を考慮した実験のデザインに関しては、現在主に用いられている実験昆虫種では難しい。本実験では、コオロギを用いた場合でも、他の生物種と同様に扱えることがわかった。

特に、選好性の行動実験では、Video-monitoringにより、これまでにマウスなどを用いて数日かかっていた観察実験でも、コオロギを用いれば数時間で同様の実験結果が可能であることがわかった。また、AKHの効果で脂肪酸の組成が変化するという結果が得られたが、この結果は他の昆虫種で得られているものと非常に似ている。脂肪酸組成に関しては合成と分解のFluxであるた

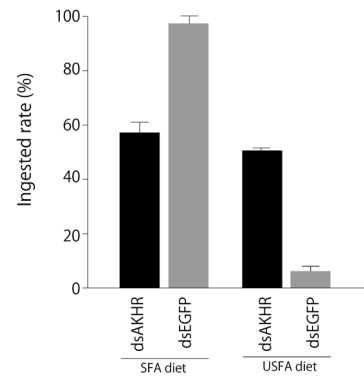


図3 フタホシコオロギの脂肪酸選好性解析

AKHR個体とコントロール個体の脂肪酸組成の異なる人工飼料の選好性解析。飼料の脂肪酸には飽和脂肪酸 (SFA) と不飽和脂肪酸 (USFA) をそれぞれ用いた。

め実際の生合成や摂取量、分解量など全代謝に関連する分子群の動態を明らかにすることが重要であることは間違いない。つまり、ホルモン動態により、血液中の液性因子すなわち代謝物の濃度 (レベル) を介して代謝経路が変動すると予想できる。

また、体内の脂質成分、特に体液中の脂質成分により栄養分の選好性が変動することは非常に興味深い。ただし、SCDの転写量を見る限り、脂質を要求する際には脂質でなく糖質により転写量を回復させるデータから、代謝の大規模の変遷がコオロギの中で生じていることが予想できた。この脂肪酸合成酵素が糖質により補償される仕組みは、哺乳類の飢餓状態を補償する仕組みと同様であり、昆虫の場合は代謝構造が簡単に飢餓にさらされるようになっていることも予想される。

要 約

本研究では、フタホシコオロギを用いて摂食行動と内分泌系との関連性を明らかにするために、哺乳類のグルカゴンに相当するホルモンAKHに着目した。AKHの投与および受容体のノックダウンにより体内の脂肪酸組成が変動した。その生合成に関連するSCDはノックダウンで致死、また栄養状態で発現が変動するが特に餌中の糖質によって変動することが明らかとなった。

謝 辞

本研究課題に対して助成を賜りました公益財団法人三島海雲記念財団ならびに選考の労をとっていただいた諸先生方に心より感謝申し上げます。

文 献

- 1) S. Nagata, et al.: *Gen. Comp. Endocrinol.*, **172**, 90–95, 2011.
- 2) T. Konuma, et al.: *Endocrinology*, **153**, 3111–3122, 2012.
- 3) Y. Tsukamoto, et al.: *Frontiers in Physiology*, **5**, e95, 2014.
- 4) M. W. Lorenz: *Comp. Biochem. Physiol. B*, **136**, 197–206, 2003.