

論文の内容の要旨

応用生命化学専攻
平成23年度博士課程 進学
氏名 小沼 貴裕
指導教員名 作田 庄平

論文題目

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

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。また、昆虫は、他の生物種と同様に、体内の栄養要求を適切に満たすために、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。このような栄養要求性で生じる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示唆されている。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、AKH が制御する、脂質、糖質代謝により変動する、体内の栄養分の濃度が、摂食行動、およびその栄養要求性をどのように調節しているかを解析した。研究材料には、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 AKHR のノックダウン個体の摂食行動に関する解析

まず、フタホシコオロギの AKH 受容体(AKHR)遺伝子をコードする cDNA 全長をクローニング

した。次に、RNAi法を用いて、AKHRをノックダウンしたフタホシココロギを調製した。AKHR-dsRNAの経口投与により調製したノックダウン個体では、投与後2、3日目に、AKHRのmRNAの発現が顕著に抑制された。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。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 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

AKHは、脂肪体に作用し、貯蔵エネルギー物質である、TAG(トリアシルグリセロール)およびグリコーゲンを分解し、体液中に1,2-DAG(1,2-ジアシルグリセロール)およびトレハロースを、それぞれ動員させる。そこで、AKHRをノックダウンしたフタホシココ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定量したところ、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。これらの減少が、第一章にて見られた、摂食周期の短縮と関与するかを解析するために、体液中への、昆虫の体液中の脂質輸送体であるリポホリン、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。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 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

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における、体液中の1,2-DAGレベルの減少が、摂食モチベーションの上昇に関与している可能性が考えられた。その可能性を検討するために、フタホシココロギ成虫オス個体における、絶食条件や、摂食直後での体液中の1,2-DAGレベルおよびトレハロースレベルの変動を解析した。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、或る一定のレベル(標準値)に制御されていると考えられた。また、体液中の両物質のレベルは、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。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、摂食開始までにかかる時間の延長が見られたことから、摂食モチベーションが低下したと考えられた。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、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しているため、(ii)においてコントロール個体よりも、相対的に、摂食モチベーションの上昇を促すような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 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

体液中の 1,2-DAG レベルが、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、明らかでないため、その分子機構を探ることにした。現在までの AKH に関する教科書的な知見から、リポホリンが、上述の分子機構に関与する分子の候補となると考えた。そこで、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動を解析したところ、AKHR のノックダウンにより、脂肪体での *LpR* (*lipophorin receptor*; リポホリン受容体)の mRNA の発現抑制、および、体液中の遊離 ApoLp-III (*apolipophorin-III*; アポリポホリン-III)レベルの減少が見られた。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、上述の脂質輸送の脆弱性は、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 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

次に、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て、摂食行動の周期性の変化に関与する新規因子を、cDNA サブトラクション法により探索したところ、細胞内の脂肪酸代謝を制御するタンパク質である ACBP (*acyl-CoA binding protein*)を見出した。そこで、体内の脂肪酸組成を解析した。その結果、AKHR のノックダウン個体では、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。一方で、通常個体では、そのバランスは、或る一定を保つような調節を受けていると考えられた。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)も関与する可能性が示唆された。

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

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、リノール酸の嗜好性を増強させていることを見出した。また、逆行性染色法による、小腮の神経の染色結果から、小腮におけるリノール酸の嗜好性の調節は、食道下神経節 (*suboesophageal ganglion*; SOG)が関与していると考えられた。これまでの結果を合わせると、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、餌中のリノール酸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 餌中のリノール酸に対する嗜好性に関与する分子の探索

続いて、AKHR のノックダウン個体における、小腸での、リノール酸の嗜好性の変化に関与する分子を探索した。フタホシコオロギの小腸の RNA-seq 解析を行い、そのデータを基にして、リノール酸と結合し、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; odorant binding protein)、および 13 の化学受容タンパク質(CSP; chemosensory protein)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。AKHR と、各 OBP/CSP とのダブルノックダウン個体について、リノール酸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、リノール酸と結合する分子の候補として得られた。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、リノール酸や、他の脂肪酸種との結合を解析中である。

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探索

第五章にて述べた、飽和脂肪酸と不飽和脂肪酸とのバランスの調節には、脂肪酸不飽和化酵素である、 $\Delta 9$ -desaturase および $\Delta 12$ -desaturase が関与する。 $\Delta 9$ -desaturase および $\Delta 12$ -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では、AKHR をノックダウンした場合よりも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を大きく崩し、かつ、ダブルノックダウンした場合は、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、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。

本論文研究から、フタホシコオロギでは、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、摂食行動、およびその栄養要求性を調節していることが示唆された。また、多くの生物種にとって、リノール酸は必須栄養素であることを考慮すると、「生きるために必要な栄養分の不足を感知し、その栄養分を餌から見つけて食べる」という、摂食行動の栄養要求性の分子メカニズムの一端を明らかにしたと考えられる。本論文研究のように、代謝の調節機構と、化学感覚の調節機構との関連性を分子レベルで解析することにより、昆虫の多種多様な食性や、生存戦略に関して、さらなる理解をもたらすことが期待される。

参考文献

Takahiro Konuma, Nobukatsu Morooka, Hiromichi Nagasawa, Shinji Nagata. "Knockdown of the adipokinetic hormone receptor increases feeding frequency in the two-spotted cricket *Gryllus bimaculatus*." *Endocrinology* 153: 3111-3122, 2012.