



Functions of serotonin receptors in integration of physiology and behavior in insects

Wang, Qiushi

(Degree)

博士 (学術)

(Date of Degree)

2014-03-25

(Date of Publication)

2015-03-01

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲第6028号

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1006028>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



博士論文内容の要旨

氏 名 王 秋実

専攻・講座 生命機能科学専攻 ・ 農環境生物学

論文題目 (外国語の場合は, その和訳を併記すること。)

Functions of serotonin receptors in integration of physiology and behavior in insects

(昆虫の生理および行動の統合性におけるセロトニン受容体の機能)

指導教員 竹田 真木生

Serotonin (5HT) is an important biogenic amine that plays a key role in the regulation and modulation of many physiological and behavioural processes in vertebrates and invertebrates. 5HT functions as a neurotransmitter, neuromodulator and neurohormone, in most insect. 5HT is responsible for the modulation of behaviors in insects, such as foraging, sensitivity to olfactory stimuli. 5HT also affects feeding in ants. Lines of evidence from various experimental approaches show that 5HT plays important physiological roles in the circadian system of insects.

These functions are mediated through the binding of serotonin to its receptors. In vertebrates, the serotonin receptors (5HTRs) were classified into seven groups on the basis of sequence homology, signaling properties, gene organization and pharmacological properties. These receptors play different roles in the nervous system. In insects, the serotonergic system seems to be similarly complex. Most of 5HTRs evolved before the divergence of invertebrate and vertebrate branches. Most of 5HTRs were located in the brain of insects. The apparent role of 5HTRs can be related to physiological functions and behavior, such as sleep, learning, memory, circadian light sensitivity and so on. Here, we showed 5HTR plays important roles in photoperiodism of *Antheraea pernyi* and polyethism in *Apis mellifera*.

In the *A. pernyi*, we provide evidence that 5HTR_B may lock the gate of PTTH release/synthesis. First, we found that 5HTR_B-like immunohistochemical reactivities (-ir) were co-localized with prothoracicotropic hormone (PTTH)-ir at the dorsolateral region of the protocerebrum (DL) and eclosion hormone (EH)-ir at DC and SOG. Therefore 5HTR_B may affect the PTTH release/synthesis. Second, dsRNA^{5HTR_B} was injected into pupa under LD 16:8 and LD 12:12. The result shows that dsRNA^{5HTR_B} will make early diapause termination. Furthermore, we prove that the injection of dsRNA^{5HTR_B} induced PTTH and EH accumulation. Therefore, we conclude that dsRNA^{5HTR_B} binding suppresses PTTH and EH synthesis and release.

(氏名： 王秋爽 NO. 2)

Luzindole and 5HT were co-injected under LD 16:8, the results show that 5HT maintains diapause while melatonin terminates it. This conclusion was supported by the injection of 5,7-dihydroxytryptamine (5,7-DHT) into diapause pupae under LD 12:12. This pharmacological result and the result below suggest that photoperiodic regulation of pupal diapause is likely regulated by a balance of 5HTR_B and melatonin receptor functions.

In *A. mellifera*, we conclude that *Am*5HTR_{2a} mRNA level was fluctuated while, other *Am*5HTRs (5HTR₁, 5HTR_{2b} and 5HTR₇) did not change, not only in the brain but also in the hypopharyngeal gland (HG). This is the first demonstration of 5HT in the HG. By injection of dsRNA^{5HTR_{2a}}, royalactin accumulation was reduced in the brain, indicating that *Am*5HTR_{2a} binding stimulates royalactin synthesis. It means that 5HT regulate royalactin synthesis. This conclusion was supported by injection of melatonin and 5,7-DHT. After injection of melatonin and 5,7-DHT, the level of royalactin transcript was also reduced, in the brain and HG. However, the royalactin transcript was increased, when after injection 5HT.

Present study strongly suggests that 5HTRs regulate a variety of physiology and behavior in insects. Our data demonstrate that 5HTR_B binding induced pupal diapause in *A. pernyi*. However, the roles of 5HTR_A were still unclear. In *A. mellifera*, 5HTR binding regulates polyphenism. However, it is unclear how 5HTR_{2a} controls the royalactin.

氏名	王 秋実		
論文 題目	Functions of serotonin receptors in integration of physiology and behavior in insects (昆虫の生理および行動の統合性におけるセロトニン受容体の機能)		
審査委員	区 分	職 名	氏 名
	主 査	教授	竹田 真木生
	副 査	教授	中屋敷 均
	副 査	准教授	宅見 薫雄
	副 査		印
	副 査		印
要 旨			
概要 生物は環境の変化の中で表現型を変えることがある。テントウムシの斑紋の場合や、産業黒化で有名な <i>Biston betularia</i> の場合のように、特定の遺伝子座に来る対立遺伝子の頻度の問題に帰せられるものは、遺伝的多型と呼ばれるが、遺伝子型は同じでも、特定の表現型のセットが環境条件の変化によって選択的に発現され、しかも、休眠や変態という発生過程だけでなく、形態や行動まで含めた形で一組の適応様式として大きなセットとして選択されることも往々見られる。後者を表現型多型といい、社会性昆虫の分業などに見られるような日齢に依存した特定の行動の選択的発現とその切り替えは行動多型と称される。この表現型多型は、日長、餌条件、社会心理学的な象徴刺激によって切り替えられ、可塑性がある。このような仕組みについては、昆虫類でさまざまな驚異的な例が報告されているが、実際の分子機構についてはほとんど分かっていない。 本研究は、生物界で未解明の謎として残されている、光周性と社会的分業の切り替え機構として、インドールアミン代謝とインドールアミン受容体機構に焦点をあてた。 第1章は、脊椎動物と昆虫で、インドールアミンの生理機能調節に果たす役割と制御機構について分かっていることをまとめ、プロジェクトの達成目標を立てた。 第2章は、サクサンの蛹休眠の制御にかかわる光周性のスイッチとして働く内分泌制御機構におけるインドールアミン代謝と受容体機構の役割を解明しようとした。これまでの研究から、サクサンの蛹休眠は10回の長日暴露で覚醒し、成虫分化がはじまり、成虫への変態が起こること、その変化は20ヒドロキシエクデソン (20E) により誘導されること、20Eの誘導は上流の前胸腺刺激ホルモン(PTTH)により誘導されること、PTTH 合成細胞は概日振動ニューロンに隣接すること、後者はインドールアミン代謝系を含有すること、そのうちメラトニンやその合成酵素アリルアルキルアミンN-アセチル転移酵素 (aaNAT) が概日振動し、光周期に感受性であること、aaNAT の RNAi によるノックアウトが光周性を壊すこと、概日系の遺伝子を同様にノックアウトすると、aaNAT の発現そして、光周性に影響を与えること、PTTH ニューロンにはメラトニン受容体が発現していることが明らかになっている (PLoS ONE 投稿現在改定中、候補者は第二執筆)。では、休眠の誘導と維持はどのようにになっているのかというのがこの章の問いである。理の当然として、セロトニンの役割が注目される。われわれは、サクサンから2種のセロトニン受容体遺伝子をクローニングし、抗体を作成した。サクサン脳において2種の抗体を用いて、免疫組織化学的な探索を行った結果、2種の受容体とも PTTH ニューロンに発現していた。そのうちの 5HTRB は光周期に感受性で、長日への暴露で発現が抑えられる。一方 5HTRA は、長日による活性化は見られなかった。この遺伝子を、RNAi でノックアウトしてやると、短日でも休眠が破れた。			

氏名	王 秋実
RNAi でノックアウトしてやると、短日でも休眠が破れた。セロトニンの注射は休眠を強化し、5,7-DHT も同様の効果を示した。このことから、サクサンの休眠は、高い 5HTRA の発現と、低い aaNAT のもとのセロトニン量の亢進により誘導・維持されると考えられる。高いメラトニン量とその放出は、PTTH の放出を促すと考えられる。こちらが休眠の覚醒機構になる。つまり休眠の誘導は PTTH ニューロン上の 5HTRB へのセロトニンの結合により、PTTH 放出のための扉に錠がかかる機構として実現し、長日の光周期は 5HTRB を抑制し、セロトニンのシグナルの駆動力としてはたらく aaNAT を活性化することでメラトニン系を活性化し、MT(メラトニン受容体)へのメラトニン結合が促進される結果起こると考えられた。光周性の一端と蛹休眠の導入機構が解明されたのである。この結果は PLoS ONE にすでに発表されている。 第3章は、ミツバチの行動多型とよばれる作業の切替機構についてインドールアミンの関与を調べた。これまでの研究活動の中で、ミツバチのワーカーは羽化後、内勤のナースとしてロイヤルゼリーの生産、ワックスの生産、子と女王の世話などをへて日齢が進むにつれ巣の外側の仕事にかかわり、門衛をへて外勤の花蜜や花粉を集めるが、日齢にしたがって aaNAT の活性があがっていくこと、日齢の若いハチにメラトニン注射を行うと外勤に転じ、巣に戻って8の字ダンスを踊ること、逆に採餌に従事している20日以上の日齢の進んだ個体にメラトニン受容体拮抗剤を投与すると巣から出て行かないことを観察している。内勤から外勤への切り替えは日齢20日くらいでおこなうが、メラトニンが外勤蜂の行動を誘導することが示唆される。では、何が内勤蜂を作るのかということが、本章の問いである。ミツバチゲノムは解読されており、ここから4種のセロトニン受容体が見つかった。内勤蜂のマーカーはロイヤルゼリー中のひとつのタンパク質であるロイヤラクチンである。この遺伝子発現は3日ころから上昇し、20日までに消える。はじめに4種のセロトニン受容体の転写活性を追った。4種のセロトニン受容体のうち 5HTR2a 以外の転写パターンは一定で、日齢に依存して変わらなかったが、5HTR2a だけは日齢依存的でロイヤラクチンに平行したパターンを示した。そこで、この遺伝子を RNAi を用いてノックアウトすると、ロイヤラクチンの発現が抑えられた。セロトニンはこれを増強し、メラトニンもこれを抑えた。本研究は、商業的にも価値が高いロイヤルゼリーの増産につながりかつ、分業の制御を可能にするもので意義が大きい。 尚、上記のほかに、候補者の参考論文としては、第一著者として1報、第二著者として1報の2編があり、が発表済みである。 本研究は、長い間生物界で驚異的な謎として残されてきた、光周性と社会性昆虫に見られる分業の仕組みを明らかにする上で、重要な集積であり、表現型多形の理解に新たな一歩を刻んだと考えられる。また、同じ簡単な機構が、まったく質の異なる現象の制御機構として利用されているということは、この機構の一般性を示唆するものである。よって、学位申請者王 秋実は、博士(学術)の学位を得る資格があると認める。	