

昆虫ステロイドホルモン合成酵素遺伝子の発現に関わる

新規 Zinc フィンガータンパク質の機能解析

小村 達也 (筑波大学 生物学類) 指導教員: 丹羽 隆介 (筑波大学 生命環境系)

多細胞生物の発生や成長は、受精卵として始まり、生殖能力を持つ成体へと発育を遂げる。そうした時間軸に沿った成長過程には幾つものステップが設けられている。例として完全変態を行う昆虫に着目すると、幼虫は成長過程の中で特定時期に特定回数の脱皮を行い、特定時期に蛹になり、特定時期に羽化をすることで成虫となる。本研究ではキイロショウジョウバエ (*Drosophila melanogaster*; 以下、ショウジョウバエ) を用いて、時間軸における発生制御機構の解明を目的とした。昆虫の脱皮や変態は、ステロイドホルモンの一つである「エクジステロイド」によって厳密に制御されている。幼虫期において、エクジステロイドは「前胸腺」という内分泌器官において、食物中のコレステロールから特異的な中間基質を経て生合成される (図 1)。しかし、前胸腺内でどのような分子がエクジステロイド生合成を調節するのかについては、未解明な点が多く残されている。

(独) 農業生物資源研究所の篠田氏らが行ったマイクロアレイ解析により、他の組織に対して前胸腺での発現量が高い遺伝子が取り上げられた。さらに、所属研究室の丹羽が、篠田氏の解析で見出された遺伝子群を対象とした RNAi スクリーニングを実施し、脱皮と変態の制御に関わる複数の候補遺伝子を見出した。本研究では、丹羽の RNAi スクリーニングで得られた遺伝子の 1 つであり、一部の昆虫のみに存在する新規 Zinc フィンガータンパク質 (以下、本文中では「Zfptk」とする) に着目した。そして、Zfptk がエクジステロイド生合成に関与することを検証するため、zfpk の前胸腺での発現、前胸腺で zfpk を RNAi 誘導した個体における発生タイミングに関する表現型、そして RNAi 誘導個体でのエクジステロイド生合成遺伝子の発現量を解析した。

方法

・発現解析: 野生型の 3 齢幼虫を用い、*in situ* ハイブリダイゼーション法と免疫組織化学法により zfpk の前胸腺での発現を検証した。また定量逆転写 PCR により、他の組織に対する前胸腺での発現比を検討した。

・RNAi 解析: RNAi 法は、標的遺伝子に対応する二本鎖 RNA (dsRNA) を用いて標的遺伝子の mRNA を分解し、機能低下を引き起こす技術である。本研究では、zfpk に対応する dsRNA をコードする系統と dsRNA の発現を誘導する系統とを交配することで、zfpk の RNAi を誘導した個体を作製した。

結果

in situ ハイブリダイゼーション法および定量逆転写 PCR 法を用いた発現解析の結果より、幼虫期において、zfpk は前胸腺で特異的に発現していることを明らかにした。

zfpk を RNAi 誘導した個体は、2 齢幼虫で致死となる表現型を示した。2 齢の RNAi 個体から RNA を抽出し、定量逆転写 PCR によってエクジステロイド生合成酵素遺伝子の発現量を検

証したところ、エクジステロイド生合成中間体の 7-デヒドロコレステロール (7-dC) から 5β-ケトジオール (5β-kd) への変換ステップで機能する spookier (spok) (Ono et al., 2006) の発現量だけが低下していた。同様に、免疫組織化学法を用いた実験から、RNAi 個体の前胸腺では Spok タンパク質の量が大きく低下していた。zfpk の RNAi による致死性は、活性型エクジステロイド (20-デヒドロエクジソン) もしくは 5β-kd を摂取させた場合に回復したが、7-dC を摂取させた場合は回復しなかった。

考察

一連の実験より、zfpk がエクジステロイド生合成酵素遺伝子の 1 つである spok に特異的な発現制御を担うことが示唆された (図 1)。一般的に、Zinc フィンガーモチーフを持つタンパク質は、特異的な配列の DNA あるいは RNA に結合し、転写制御因子や転写後調節因子として機能する。従って、zfpk は Zinc フィンガーを介して spok の上流配列に結合して転写制御、あるいは spok の mRNA に結合して mRNA の安定性に寄与すると予想される。一方、spok の発現調節に関わるタンパク質としては既に Molting defective (Mld) の存在が知られている (Neubueser et al., 2005)。よって、Zfptk が Mld と相互作用して spok の発現を制御している可能性も考えられる。

zfpk は、前胸腺のみで発現し、かつ発現制御に関わることが予想される遺伝子として初めての事例であり、前胸腺をエクジステロイド生合成器官として特徴づける機能をもつと期待される。さらに、エクジステロイド生合成酵素が昆虫種で広く保存されている一方で、zfpk は一部の昆虫種にのみ存在する。このことから、昆虫の様々な種が環境などに応じて、発生を制御するメカニズムを独自に進化させてきた可能性が考えられる。

引用文献

Ono et.al (2006), Spook and Spookier code for stage-specific components of the ecdysone biosynthetic pathway in Diptera, *Dev. Biol.* **298**, 555-570

Neubueser et al. (2005), molting defective is required for ecdysone biosynthesis, *Dev. Biol.* **280**, 362-372

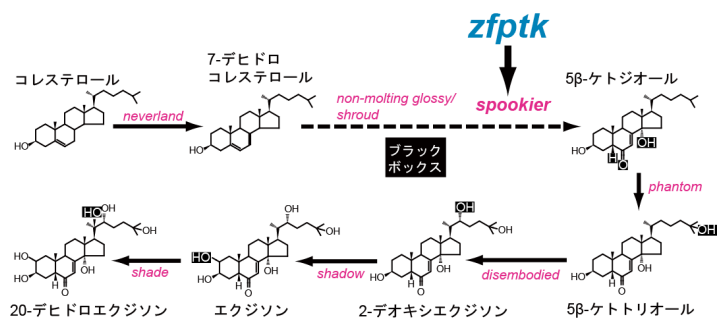


図 1. エクジステロイド生合成経路と zfpk