

## ショウジョウバエのステロイドホルモン合成器官で発現する新規遺伝子の機能解析

高尾 悠 (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)

### 背景・目的

ステロイドホルモンは様々な多細胞生物の正常な発生や成長に重要な役割を担っている。昆虫における主要なステロイドホルモンはエクジステロイドと呼ばれる。

エクジステロイドは、脱皮を意味する「ecdysis」に由来する名称の通り、脱皮や変態などの昆虫の発生過程における劇的な変容を適切なタイミングで誘導するのに必須である。エクジステロイドが適切に機能するためには、これらの時間的ポイントの前に体内での生合成を活性化させることが必要である。現在まで検討されたあらゆる昆虫の幼虫において、エクジステロイドは前胸腺またはその相同な内分泌腺で生合成されることが確認されている[1]。

特にキイロショウジョウバエ *Drosophila melanogaster* (以下、ショウジョウバエ) を用いた研究から、過去 10 年の間にエクジステロイド生合成を担う酵素の解明が飛躍的に進んだ。現在までに知られているエクジステロイドの生合成経路と生合成酵素は 図 1 のとおりである[1,2]。

これらのエクジステロイドの生合成を行う酵素の遺伝子群は Spook や Phantom といった幽霊を意味する名前が付けられていることが多く、これにあやかり「ハロウィン遺伝子群」と総称される。一方で、ハロウィン遺伝子群によってコードされている酵素の機能や活性は、発生過程の段階に応じて適切に制御されているはずであるが、その制御メカニズムには未だ不明点が多い。

私が所属する研究室の小村らによる先行研究で、ショウジョウバエ前胸腺でのエクジステロイド生合成の制御に必要な新規遺伝子の探索が行われた。この研究によって、いくつかの機能未知の遺伝子の前胸腺内での発現を二重鎖 RNA 干渉 (RNAi) 法によって抑制したところ、成虫にまで成長せずに死んでしまう表現型が現れた。また、それらのさらにいくつかの遺伝子では、発現抑制によって現れたその表現型が、活性型エクジステロイド (20-ヒドロキシエクジソン; 以下、20E) を摂取することにより回復することが分かった。私は、これらの機能未知の遺伝子群は前胸腺でのエクジステロイド生合成に関与する制御遺伝子をコードするのではないかと考えた。本研究では、既知の機能ドメインとの類似性を全く示さないタンパク質をコードする遺伝子 *UGE<sub>PG-1</sub>* (仮称) について機能解析を行った。

### 方法

本研究で用いた、2 つの *UGE<sub>PG-1</sub>* のノックアウト系統は、CRISPR/Cas9 システム[3] によって小村によって樹立された系統である。この系統は *UGE<sub>PG-1</sub>* 遺伝子のコーディング領域の途中に 1 塩基または 4 塩基の欠失を持ち、結果として読み枠の途中にストップコドンを生じる (小村ら 未発表)。またこの系統は GFP を発現するバランスーによってバランスされているため、ノックアウトホモ接合体の識別は GFP 蛍光の有無によって判断できる。

#### (1) 致死時期の決定

*UGE<sub>PG-1</sub>* ノックアウト個体の致死時期を調べるために、*UGE<sub>PG-1</sub>* ホモ接合体あるいはヘテロ接合体 (コントロール) の幼虫を孵化直後に採取し、孵化後 2~36 時間での生存率を 2 時間ごとに計測した。

#### (2) 20E 摂取

*UGE<sub>PG-1</sub>* RNAi 個体の成長阻害は 20E を摂取させることにより回復したが、*UGE<sub>PG-1</sub>* ノックアウト個体でも同じように回復するか確かめる必要があった。この目的のために *UGE<sub>PG-1</sub>* ノックアウトホモ接合体とヘテロ接合体 (コントロール) を、20E を混ぜ込んだ餌を含むグレーププレートに移し、72 時間後にそれぞれの生存率と成長段階を調べた。

#### (3) ハロウィン遺伝子群の発現量測定

*UGE<sub>PG-1</sub>* は前胸腺でのハロウィン遺伝子群の発現調節に関与するかどうかを調べた。産卵後 36 時間経った *UGE<sub>PG-1</sub>* ノックアウトホモ接合体とヘテロ接合体 (コントロール) から RNA を抽出し、定量逆転写 PCR によってハロウィン遺伝子群の発現量を測定した。

#### (4) *UGE<sub>PG-1</sub>* の時間的な発現量変化の測定

野生型 Oregon-R の幼虫を孵化後 2~36 時間にかけて、2 時間ごとに採取し、RNA を抽出した。それらを鋳型として定量逆転写 PCR によって *UGE<sub>PG-1</sub>* の発現量の時間的な変化を測定した。

### 結果

詳細は発表会にて報告する。

### 参考文献

- [1] 丹羽(2011)『脱皮と変態の生物学 - 昆虫と甲殻類のホルモン作用の謎を追う』(園部、長澤編) pp. 55-76.
- [2] Niwa and Niwa (2014) *Biosci Biotechnol Biochem* 78: 1283-1292.
- [3] Kondo and Ueda (2013) *Genetics* 195: 715-721.

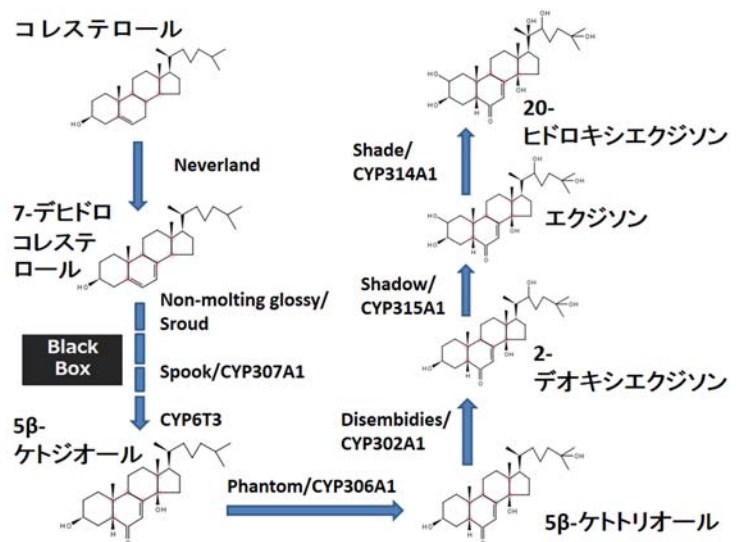


図 1 エクジソン生合成経路とそれに関与する酵素 [1]