

ショウジョウバエの栄養状態に応答したモノアミン生合成酵素遺伝子の発現変化

竹股 ひとみ (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哺乳類を含む幅広い生物の生理機能を調節する生理活性物質であり、発生や成長、生殖など様々な側面で役割を果たしている。中でも、動物において発生タイミングの制御における役割は重要で、幼若期にステロイドホルモンが特定のタイミングで生合成されることで個体は適切な時期により成熟したステージへと移行できる。この生合成タイミングは栄養状態や光といった外部環境によって変化するが[1,2,3]、外部環境がステロイドホルモン生合成タイミングを制御するメカニズムについては不明な点が多い。

今回私は、個体の栄養状態がステロイドホルモン生合成タイミングに影響を与えるメカニズムの解明を目的とし、キイロショウジョウバエ *Drosophila melanogaster* (以下、ショウジョウバエ) を材料として研究を行った。昆虫における主要なステロイドホルモンであるエクジステロイドは、ショウジョウバエでは前胸腺という器官で生合成される。そこで私は、外部環境因子を前胸腺へ伝えるシグナル、そして前胸腺にはそれを受け取る受容体があるのではないかという仮説を立てた。

当研究室の島田が行った前胸腺特異的 RNAi スクリーニングにより、前胸腺でのエクジステロイド生合成に必須と考えられる受容体候補遺伝子が見出された(未発表)。本研究ではその受容体候補遺伝子のリガンドに注目し、幼虫期に摂取する栄養状態によってリガンドをコードする遺伝子やリガンドの生合成を担う酵素をコードする遺伝子の発現が、生体内のどこでどのように変化するかを解析した。

材料・方法

(1)ショウジョウバエ系統

野生型ショウジョウバエとして *Oregon-R* を用いた。後述(4)の実験に利用した *ddc-GALA* と *UAS-GFP* 系統は米国の Bloomington *Drosophila* Stock Center より入手した。

(2)エサの調製とショウジョウバエの飼育

ショウジョウバエにとって主なタンパク源は酵母である。当研究室の島田による先行研究より、酵母量の違うエサでショウジョウバエを飼育すると蛹化のタイミングに差が出るのがわかっている[4]。この先行研究を参考として私は、通常ハエを飼育しているエサの酵母量を基準とし、それよりも酵母量が多いエサ (Rich food) と少ないエサ (Poor food) を調製した。野生型の成虫を集めて交尾させ受精卵を回収したのち、孵化したばかりの1齢幼虫を Rich food と Poor food に分けて 25°C で飼育した。Rich food で飼育した野生型幼虫では孵化後平均 3.7 日で半数が蛹化するのに対して、Poor food で飼育した野生型幼虫では孵化後平均 6.8 日で半数が蛹化することを確認した。

(3)発現解析

飼育 4 日目の 3 齢幼虫の全身において、上述の候補受容体のリガンドをコードする遺伝子、またはリガンドの生合成を担う酵

素をコードする遺伝子の発現量を、定量的逆転写 PCR によって検討した。Rich food と Poor food で発現量に差があった遺伝子については、同じ条件で飼育した後に各組織を解剖によって摘出し、それぞれに由来する逆転写物を用いて定量的 PCR を行った。

(4)蛍光観察

発現量が高い組織が特定された遺伝子のうち、後述するように私はドーパ脱炭酸酵素遺伝子 (*dopa decarboxylase*, 以下 *ddc*) に焦点を当てた。*ddc* の組織別発現を詳細に検討する目的で、*ddc* のプロモーター活性の支配下で緑色蛍光タンパク質遺伝子 (*gfp*) を幼虫体内で発現させたトランスジェニック系統の蛍光を観察した。具体的には、ショウジョウバエで整備されている異所的遺伝子発現システムである GAL4/UAS システムを利用し、*ddc-GALA* 系統と *UAS-gfp* 系統を交配させ、その子孫の幼虫での蛍光シグナルを蛍光顕微鏡を用いて観察した。

(5)体液成分分析

Rich food あるいは Poor food で飼育した野生型幼虫から体液を採取した。体液中に含まれるモノアミン、アミノ酸、そして糖の成分を、質量分析計を用いて分析した。この分析に当たっては、(独)理化学研究所生命システム研究センターの升島努チームリーダーの研究室のご協力を得た。

結果・考察

飼育 4 日目に採取したサンプルで行った定量的逆転写 PCR により、飼育したエサの違いによって発現に差を示す候補リガンド遺伝子あるいは候補リガンド生合成関連遺伝子が特定された。その中でも特に顕著な発現の違いを示した遺伝子は、ドーパミンとセロトニンの生合成に必須の *ddc* であった。幼虫の各組織に由来する逆転写物を用いて定量的 PCR を行ったところ、*ddc* の発現量は幼虫表皮で顕著に高かった。*ddc* が幼虫表皮で多く発現していることは以前から知られていたが、その発現が栄養状態に応答するという報告はされていない。もし栄養状態に応答して発現が変化するのであれば、幼虫表皮の DDC によって生合成されるモノアミン類がシグナルとなり前胸腺へ働きかけ、エクジステロイド生合成に影響を与えて個体の発生を変化させるという仮説が考えられる。現在、*ddc* を含む複数の遺伝子の発現の違いが栄養状態と発生段階のどちらによるものなのかを調べるための準備を進めている。結果は発表会にて報告する。

参考文献

- [1]Rewitz *et al.* (2013) *Curr. Top. Dev. Biol.* 105: 37-67
- [2]Yamanaka *et al.* (2013) *Science* 341: 1113-1116
- [3]Niwa and Niwa (2014) *Genes Genet. Syst.* 89: 27-34
- [4]Shimada-Niwa and Niwa (2014) *Nat. Commun.* 5: 5778