

ショウジョウバエ概日時計調節遺伝子の発現メカニズムの追究

井口 彰 (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)

背景と目的

我々動物の記憶や学習、そして行動は、脳を構成する無数の神経細胞によって制御されている。脳の中の神経細胞は、用いる神経伝達物質や脳内における形態などの点で多種多様な種類が存在しており、複雑な脳機能は神経細胞に適切な多様性があることによって実現されている。しかし、発生過程において、個々の神経細胞が特定の機能を獲得する仕組みは未解明の部分が多い。そこで、私はモデル動物として世界中で広く用いられている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、脳神経細胞の分化メカニズムの解明を目指している。ヒトやマウスの脳を構成する神経細胞の数が億を超えているのに対し、ショウジョウバエの脳細胞はおよそ 10 万個である。よって、ショウジョウバエは、神経細胞の分化を研究する上で高等脊椎動物に比べてよりシンプルな解析系を提供する。

本実験で私は、ショウジョウバエの概日リズムの調節において必須の役割を果たす Pigment Dispersing Factor (PDF) 陽性神経細胞に着目した。PDF は神経伝達物質であり、ショウジョウバエの概日リズムの形成に最も重要な神経伝達物質であると考えられている [1, 2]。これまでの研究から、*pdf* 遺伝子は脳の 10 万個ある細胞のうちのわずか 16 個であることが知られている [3]。しかし、この極めて限局した *pdf* 遺伝子の発現制御メカニズムは今のところまったく解明されていない。そこで私は、*pdf* 遺伝子の発現に必要なエンハンサー解析を行うことを計画した。*pdf* 遺伝子の発現制御機構が解明されれば、脳神経細胞の分化についての新規メカニズムを解明するのみならず、概日リズムといった行動制御のメカニズムの理解にも繋がる。よって、本研究は、脳と行動を結ぶ重要な神経基盤の解明につながる意義を持つ。

方法

キイロショウジョウバエの系統

本実験では GFP 発現コンストラクトを持つトランスジェニック系統の樹立に当たり、*yv nos- φ c31 attP40* を用いた。

pdf 遺伝子上流領域のクローニング

pdf 遺伝子の転写領域の解析を行うために、*pdf* 遺伝子の開始コドン上流 300bp、250bp、200bp、150bp、そして 100bp の DNA 領域を取得した。まず、*pdf* 遺伝子座周辺のゲノムの塩基配列を FlyBase (<http://flybase.org>) から入手し、それを基に PCR プライマーを設計した。設計したプライマーを用いてゲノム DNA を鋳型に PCR を行い、*pdf* 遺伝子上流の DNA を増幅した。得られた上流領域の制御下で *GFP* 遺伝子を発現させるために、*GFP* コーディング配列を有し、かつ φ C31 インテグレーションを用いたショウジョウバエゲノムへの挿入が可能な pS3aG ベクター (Addgene #31171) を用いた。先に得た PCR 産物を pS3aG ベクターとライゲーションし、異なる長さの PDF 上流のクローニングを行った。

胚への DNA の顕微注入と系統の樹立

pdf 遺伝子上流領域を持つ pS3aG ベクター DNA を 0.1 ng/ μ l に調製し、*yv nos- φ c31 attP40* の胚に顕微注入した。顕微注入済みの胚から産まれてきた雄を、バランス系である *CyO/Roi* の未交尾メスと交配させることで系統を樹立した。

免疫染色

脳での *GFP* 発現細胞が s-LN ν 細胞 (PDF 陽性細胞) であるかを検討するために、樹立したトランスジェニック系統の成虫を解剖し、脳を摘出した。4%パラホルムアルデヒド (PFA) を含むリン酸生理食塩水 (PBS) で固定処理を行った後、PBS で PFA を洗い流した。次に、5%ロバ血清を含む PBS でブロッキング処理を行い、抗 PDF 抗体 [4] を用いて一次染色を行った。その後、蛍光色素 Alexa555 で標識した抗マウス抗体を二次抗体として用いることで、PDF タンパク質を可視化した。

共焦点レーザー顕微鏡を用いた観察と ImageJ による画像解析

脳の観察と写真撮影は、共焦点レーザー顕微鏡 LSM700 (カールツァイス) を用いて行った。画像解析には ImageJ ソフトウェア [5] を用いた。

結果と考察

私は、*pdf* 遺伝子の開始コドンより上流に存在する 300bp と 200bp のゲノム領域を *GFP* 遺伝子と融合させたトランスジェニック系統を樹立した。このショウジョウバエの脳を解剖して *GFP* のシグナルを確認したところ、いずれの系統においても *GFP* のシグナルが PDF 陽性細胞で確認された。一方で、200bp 支配下の *GFP* シグナルは、300bp 支配下のシグナルに比べ著しく減弱した。以上の結果は、*pdf* 遺伝子の PDF 陽性細胞での発現に必須のエンハンサーはこの 200bp 以内にあるが、発現レベルを調節するエンハンサーは 300bp から 200bp の間に存在することを示唆する。

今後の展望

現在までに *pdf* 上流 300bp と 200bp の元で *GFP* を発現する系統しか作製できていない為、*pdf* 上流 200bp 以下である 150bp、100bp と *GFP* 遺伝子との融合系統の作製を引き続き行っていく予定である。今後、PDF 発現に必須のエンハンサーが絞り込まれた際には、その塩基配列に結合する転写因子の同定を行い、*pdf* 遺伝子の発現調節機構の詳細を明らかにしていきたい。

参考文献

- [1] Renn et al. (1999) *Cell* **99**, 791-802.
- [2] Shafer & Yao (2014) *Curr Opin Insect Sci* **1**, 73-80..
- [3] Helfrich-Förster (2005) *Genes Brain Behav* **4**, 65-76.
- [4] Hanafusa et al. (2013) *PLOS One* **8**: e84495.
- [5] Schneider et al. (2012) *Nat. Methods* **9**, 671-675.