

ショウジョウバエのステロイドホルモン生合成を調節する新規因子の探索と機能解析

福岡 怜奈 (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

多細胞生物の一生は受精卵から始まり、子から大人へと発生を遂げた後、死を迎えることで終わる。この時間軸に沿った成長過程は、ステロイドホルモンによって厳密に調節されている。昆虫では、昆虫の主要なステロイドホルモンである「エクジステロイド」が適切なタイミングに生合成・分泌されることで、脱皮や変態を誘導する¹。エクジステロイドは、外部から摂取した餌に含まれるコレステロールをもとに前胸腺と呼ばれる内分泌器官で合成されることが知られている。そして、この前胸腺でのエクジステロイド生合成のタイミングは、光・温度・栄養・湿度といった環境条件によって柔軟に変化する²。しかし、外部環境からの情報を統合しながら前胸腺でのエクジステロイド生合成活性を適切に調節するメカニズムには未だに不明な点が多い。

このような中で指導教官である丹羽は、キロショウジョウバエ (*Drosophila melanogaster*; 以下ショウジョウバエ) での未同定のエクジステロイド生合成調節因子を発掘するために、カルフォルニア大学バークレー校ショウジョウバエゲノムプロジェクトの網羅的遺伝子発現データベース³を利用した遺伝子探索を行った。このデータベースは、ショウジョウバエにおける 7917 遺伝子の発現パターンを RNA *in situ* hybridization によって調べた結果を、文字情報と画像によって記載している。そして、7917 遺伝子のうち、エクジステロイドを生合成している環状腺 (前胸腺、側心体、アラタ体からなる複合体) と羊漿膜の 2 領域で発現している遺伝子を調べたところ、4 遺伝子に絞り込むことができた。この 4 遺伝子はすべて膜貫通タンパク質をコードしており、何らかの細胞外シグナルを受容する機能を持つことが期待できる。

そこで私は、このショウジョウバエ 4 遺伝子のエクジステロイド生合成における役割を追究する目的で、分子遺伝学的手法を中心とした機能解析を実施した。

材料と方法

(1) ショウジョウバエの飼育と系統

ショウジョウバエは寒天、コーンミール、グルコース、乾燥酵母を煮詰めて混ぜ合わせたものを標準エサとして、25°C、もしくは 17°C で飼育した。今回の実験では、野生型として *y¹w¹¹⁸* あるいは *w¹¹⁸* という系統を用いた。

(2) 候補遺伝子の発現解析

候補遺伝子が前胸腺で発現しているかどうかを RNA *in situ* hybridization 法によって検証した。また、定量逆転写 PCR を用いて、候補遺伝子の各組織における発現量を調べた。

(3) 機能欠損変異個体の作出

候補遺伝子の機能欠損変異個体の作出には、ゲノム編集技術である CRISPR/Cas9 法を用いた。ガイド RNA 発現ベクターの作製と変異体の樹立方法は先行研究に従った⁴。

(4) 機能欠損変異個体の発生のタイミング測定

候補遺伝子が発生の進行に関与するかどうかを確認するために、CRISPR/Cas9 法によって作出した候補遺伝子機能欠損個体の発

生タイミングを測定した。採卵容器内に成虫を入れ、4 時間後に寒天プレートに産み付けられた受精卵を回収した。25°C で 34 時間飼育後、この受精卵から孵化した 1 齢幼虫 (産卵後 36±2 時間) を回収した。回収した 1 齢幼虫を標準エサに移し入れ、25°C で飼育し、その発生の経過を測定した。なお、コントロールには、候補遺伝子変異のヘテロ接合体を用いた。

結果

3 齢幼虫の脳-前胸腺複合体を用いた *in situ* hybridization による発現解析の結果、4 遺伝子全てが前胸腺で発現していることを確認した。また、4 遺伝子のうちの 1 つ *candidates of genes regulating ecdysteroid biosynthesis-1* (*cgreb-1*; 仮称) に関しては、幼虫の様々な組織における発現量を定量逆転写 PCR によって検討した結果、前胸腺で極めて特異的に発現していることも確認した。

次いで、CRISPR/Cas9 法を用いて、4 遺伝子それぞれのタンパク質読み枠にフレームシフト変異を導入した機能欠損変異体の取得に成功した。これらの機能欠損個体の表現型解析を実施したところ、現在までに、*cgreb-1* 変異体に関しては、コントロール個体と比べて蛹化のタイミングが 1 日程度遅れることを見出した。

考察

候補遺伝子の発現解析と機能欠損変異体の表現型解析の結果から、CGREB-1 が前胸腺を介した発生タイミングの調節に関与することが示唆された。今後は、*cgreb-1* 変異体の蛹化タイミングの遅延がエクジステロイド生合成不全によるものであることを確認する必要がある。そこで、*cgreb-1* 変異体での血中エクジステロイド量を測定すると共に、発生タイミングの表現型が活性型エクジステロイド(20E)の摂食によって回復するかを検討する予定である。

cgreb-1 遺伝子は、DEP (Disheveled/EGL10/Pleckstrin) ドメインをもつ複数回膜貫通型タンパク質をコードすることが予想される。DEP ドメインは細胞内シグナル伝達に関与するドメインであることから⁵、CGREB-1 は何らかの細胞外シグナルを受容することでエクジステロイド生合成を調節すると予想している。CGREB-1 がどのようなシグナルを受容するかを解明も、今後の重要な課題である。

参考文献

1. Niwa, R. & Niwa Y.S. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **78**, 1283-1292 (2014)
2. Niwa, Y. S. & Niwa, R. *Genes Genet. Syst.* **89**, 27-34 (2014)
3. Tomancak, P. *et al. Genome Biol.* **8**, R145 (2007)
4. Kondo, S. & Ueda, R. *Genetics* **195**, 715-721 (2013)
5. Martemyanov, K. A. *et al. J. Neurosci.* **23**, 10175-81 (2003)