

卵巣発達を制御する神経とホルモンの研究—ショウジョウバエを用いた解析—

黒木 祥友 (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

生物は環境に応じて体内の生理活性を変化させ、その環境に適応する柔軟性を持つ。この柔軟な変化を可能にするために重要な働きを持つ因子の1つがホルモンである。しかし、環境からの情報の入力に対して、ホルモン生合成が制御されるメカニズムについては未解明な点が多く残されている。

現在、私はモデル生物であるキイロショウジョウバエ (*Drosophila melanogaster*) の幼若ホルモン (Juvenile Hormone; JH) の生合成制御に焦点を当て、環境に応じたホルモン生合成制御の研究を行っている。JH は、昆虫の頭部に位置するアラタ体という器官で生合成される。JH は、昆虫のライフサイクルを通じて多面的な機能を持つことが知られている。そのうちの1つが卵巣発達への関与である¹。一方、これまでにショウジョウバエメスの卵巣発達は様々な環境要因によって制御されることが明らかになっている²。例えば、低温環境や短日条件下では、卵巣発達を行わなくなることが示されている。卵巣発達過程が JH によって大きく影響されることを鑑みれば、これらの環境条件がアラタ体における JH 生合成に影響を及ぼすことが容易に想定される。しかし、実際には、個体を取り巻く外環境からの刺激をアラタ体に伝え、幼若ホルモン生合成を制御している経路は、現在までほとんど明らかにされていない。

このような状況の中、所属研究室ではキイロショウジョウバエ成虫において、偶然にもアラタ体に投射する神経を発見していた。しかし、この神経がアラタ体における JH の生合成に関与するかは不明であった。そこで、私は、この神経が環境からの入力を受けて、JH 生合成を制御しているのではないかという仮説を立て、実験を行っている。

方法

(1) アラタ体投射神経の免疫組織化学染色法

脳およびアラタ体を PBS(phosphate-buffered saline) 中で解剖することで摘出した。固定のために 4% パラホルムアルデヒド/PBS 中で 30 分、室温で処理した。固定されたサンプルは、PBS で 3 回洗浄、0.3% PBT(PBS+0.3% TritonX-100) で 5 分ごとに 2 回洗浄された。その後、blocking solution(PBS with 0.3% TritonX-100 and 2% BSA) で 1 時間、室温でブロッキング処理された。その後、1 次抗体を Can get signal solution (ToYoBo) で希釈し、4°C で一晩処理した。1 次抗体処理後、0.3% PBT で 20 分洗浄し、以下の蛍光標識された 2 次抗体を Can get signal solution で希釈し、遮光状態で 2 時間、室温で処理した。Alexa Fluor 488 or 546 (1:200; Thermo Fisher Scientific) マウント処理のために、FluorSave reagent (Calbiochem) を用いた。

(2) 成熟卵の計測

ショウジョウバエは 25°C、標準エサで羽化後 4 日間育てたものを使用した。それぞれのショウジョウバエの卵巣を解剖し、成熟卵の個数を計測した。

(3) dTrpA1 による神経発火の誘導

ショウジョウバエの温度感受性陽イオンチャネルである dTrpA1 は、25°C より低い温度では、チャネルを閉じ陽イオンの流入を起こさせない。一方、25°C 以上の温度ではチャネルが開き、陽イオンを細胞内に流入させる。そのため、dTrpA1 を神経系に発現させ、ショウジョウバエを飼育する温度を変化させることで、時期特異的に神経を活性化させることができる³。ショウジョウバエ幼虫を 20°C で飼育し、羽化直後から 20°C または 31°C で 4 日間飼育した。その後、卵巣を解剖し成熟卵の計測を行った。

(4) メソプレレン摂食によるレスキュー実験

メソプレレンは、JH の類縁体である⁴。羽化直後のショウジョウバエメスを、メソプレレン/エタノール溶液(終濃度 3.35M) もしくは、エタノール(コントロールとして)を加えた標準エサ上で 25°C、4 日間飼育した。その後、解剖し成熟卵の計測を行った。ただし、dTrpA1 による神経発火を誘導する際は、20°C または 31°C で 4 日間飼育を行った後に解剖した。

結果・考察

アラタ体投射神経の免疫科学組織染色から、この神経はオスメスとともに存在する神経であり、特定の神経ペプチドを介してアラタ体に作用している可能性が示唆された。また、この神経を、遺伝学的手法を用いて活性化することで、卵巣発達が抑制されることを確認した。さらに、この卵巣発達の抑制はメソプレレンの摂食により解除される。これらの実験結果と、JH によって卵巣の卵巣発達が制御されているという先行研究を踏まえて、私は、このアラタ体投射神経は JH 生合成を負に制御していると考えている。また、卵巣発達には様々な環境要因が関与することから、この神経は何らかの環境刺激を受容しているのではないかと考えている。

今回、機能解析を行った神経のように、アラタ体に直接投射し、その機能を制御する神経はあらゆる昆虫においてこれまで発見されていなかった。また、神経細胞の直接投射による内分泌系の制御は、動物界を通じていまだ報告が少ない。このことから本研究は、生物が獲得した内分泌系の制御機構の重要な一例を発見したといえる。

参考文献

1. Postlethwait, J. H., Bownes, M. & Jowett, T. Sexual phenotype and vitellogenin synthesis in *Drosophila melanogaster*. *Dev. Biol.* (1980).
2. Flatt, T., Tu, M. P. & Tatar, M. Hormonal pleiotropy and the juvenile hormone regulation of *Drosophila* development and life history. *BioEssays* (2005).
3. Hamada, F. N. *et al.* An internal thermal sensor controlling temperature preference in *Drosophila*. *Nature* (2008).
4. Charles, J.-P. *et al.* Ligand-binding properties of a juvenile hormone receptor, Methoprene-tolerant. *Proc. Natl. Acad. Sci.* (2011).