

ショウジョウバエの幼若ホルモン合成器官に投射する神経細胞の探索

水野 陽介 (筑波大学 生物学類)

指導教員：丹羽 隆介 (筑波大学 生存ダイナミクス研究センター)

背景・目的

生物が環境の変化に対応し生存するためには、様々な器官が適切に制御される必要がある。その機構を担う重要な生体分子がホルモンである。ホルモンとは、内分泌系にて合成・放出され、体液中を循環し、標的に働きかける物質である。

所属研究室が扱うキイロショウジョウバエ *Drosophila melanogaster* (以下、ショウジョウバエ) を含む昆虫では、幼若ホルモン (Juvenile Hormone; 以下 JH) が様々な生理現象を制御している¹。JH は、成虫の脳近傍にあるアラタ体と呼ばれる内分泌器官において合成され、血中へ放出される。JH が成虫の生理現象に果たす役割については研究が進んでいる一方で、JH の合成・放出を制御するような外部からのシグナルについては未だ理解が乏しい。脳はアラタ体の近くに存在し、環境情報を統合する中枢であるので、脳からアラタ体への直接的な神経支配が存在すると考えられる。しかし、ショウジョウバエ成虫の脳からアラタ体へ直接投射する神経の記載は十分に進んでいない。そこで私は、成虫における脳からアラタ体に投射する神経を同定することを目的とした。

方法

(1) アラタ体投射神経の免疫組織化学染色

ショウジョウバエ成虫を phosphate-buffered saline (PBS) の中で解剖し、脳とアラタ体を取り出した。それらを 3.7%ホルムアルデヒド/PBS に入れ、45 分間室温で処理した。その後サンプルを PBS で 3 回洗浄したのち、0.3%PBT (PBS+0.3% TritonX-100) に入れ、15 分間置いた。次に、blocking solution (PBS with 0.3% TritonX-100 and 2% Bovine serum albumin) にサンプルを入れ、1 時間室温で処理した。続いて、一次抗体を blocking solution で希釈した溶液にサンプルを入れ、4°C暗所で一晩処理した。翌日、サンプルを PBS で 3 回洗浄したのち、0.3%PBT に入れ 15 分間置いた。その後、二次抗体を blocking solution で希釈した溶液にサンプルを入れ、室温暗所で 2 時間処理した。最後に PBS でサンプルを 3 回洗浄し、プレパラート上にマウントした。Alexa Flour 488 or 555 (1:200; Thermo Fisher Scientific) マウント処理のために、FlourSave (Merk Millipore) を用いた。

(2) GAL4-UAS システムを用いたアラタ体投射神経の標識

GAL4-UAS システムとは、酵母由来の転写因子 *GAL4* を特定のエンハンサーの制御下で発現させ、*GAL4* が結合する配列である UAS の下流に配置した遺伝子を発現させる手法である²。今回は、アラタ体投射神経で発現すると予測される *GAL4* システムとレポーター遺伝子である *GFP* を発現する UAS システムを掛け合わせて実験を行った。

(3) GRASP (GFP Reconstitution Across Synaptic Partners) 法を利用したアラタ体投射神経の上流の特定

GRASP 法は、神経のシナプス形成を可視化するための手法である³。まず蛍光物質である GFP を 2 つの spGFP に分け、それぞれの spGFP を膜結合タンパクとして別々の神経で発現させる。神経がシナプスを形成していた場合、2 つの spGFP は接近して結

合し、蛍光を発する。この手法を用いて、アラタ体投射神経と、その上流にあると予想される神経がシナプスを形成しているかどうかについて調べた。

結果・考察

所属研究室では、ショウジョウバエの幼虫において脳からアラタ体へと投射する神経を同定していた (井村英輔ら、未発表)。そこで私は、これらの神経で *GAL4* を発現するシステムを用いて、成虫においてもアラタ体投射神経が見られるかを確認した。免疫組織化学染色の結果、候補に挙がっていた系統のうち、3 つの系統にて成虫においてもアラタ体投射神経を確認することができた。

これら 3 系統のうち、上位の神経の推測が容易であるという理由から、*Dh44-R2* (*Diuretic hormone 44-Receptor 2*) のエンハンサー領域の一部によって *GAL4* の発現が制御されている系統に注目した。*Dh44-R2* は G タンパク質共役型受容体であり、神経ペプチド *Dh44* の受容体である⁴。*Dh44* はショウジョウバエにおいて多面的な役割を担う^{5,6,7}。上記のアラタ体投射神経は *Dh44-R2* を発現している可能性が高いので、その上位神経は *Dh44-R2* のリガンドである *Dh44* (*Diuretic hormone 44*) を産生する神経だと推測される。GRASP 法を用いて、*Dh44-R2-GAL4* でラベルされるアラタ体投射神経と *Dh44* 産生神経が接続しているかを検討したところ、これら 2 種の神経群の接続部位と予想される位置に GFP の蛍光が観察された。よって、これらの神経はシナプスを形成していることが示唆された。

今回の解析から、*Dh44* 産生神経から *Dh44R2* 神経、さらにアラタ体へとつながる一連の神経回路の存在が確認された。一方で、今回同定したアラタ体投射神経がどのような神経伝達物質を介してアラタ体を制御しているのか、また今回着目した神経の活性化により、アラタ体の機能がどのように変化するのかについては不明である。アラタ体の制御機構を解明する上で、上記 2 つの課題は非常に重要であると考えられる。

参考文献

1. Flatt, T., Tu, M.P., and Tatar, M., *BioEssays* (2005) 27, 999-1010.
2. Brand, H. A., and Perrimon, N., *Development* (1993) 118, 401-415.
3. Feinberg H. E., VanHoven, K M., Bendesky, A., Wang, G., Fetter, D. R., Shen, K., and Bargmann, I. C., *Neuron* (2008) 57, 353-363.
4. Hector, C. E., Bretz, C. A., Zhao, Y., and Johnson, E. C., *Journal of Experimental Biology* (2009) 212, 3142-3147.
5. Chen, D. Y.C., and Dahanukar, A., *Cell Research* (2008) 28, 1048-1049.
6. C. E., Dornan, A. J., Halberg, K. A., Terhzaz, S., Dow, J. A. T., and Davies, S. A., *Peptide* (2016) 80, 96-107.
7. Lee, K.M., Daubnerová, I., Chung, J., and Kim, Y.J., *Current Biology* (2015) 25, 790-797.