

## 個体発育におけるセロトニン生合成の役割

塩井 一馬 (筑波大学 生物学類) 指導教員: 島田 裕子 (筑波大学 生命環境系)

### 《背景・目的》

セロトニンは、アミノ酸のトリプトファンから産生される生体アミンであり、神経伝達物質やホルモンとして重要な生理活性を持つ。昆虫から脊椎動物に至るまで、セロトニンが記憶学習・概日リズム・睡眠・摂食・社会行動・生殖を制御することは広く知られている。一方、動物の個体発育に果たす役割については、未解明な部分が多く残されている。

所属研究室では、モデル生物であるキロシヨウジョウバエ (*Drosophila melanogaster*) において、新規セロトニン産生神経  $SEO_{PG}$  が、栄養を感知して脱皮ホルモン生合成器官である前胸腺 (prothoracic gland, PG) に投射することを見出した。脱皮ホルモンは、昆虫の脱皮や蛹化を制御し、発育の進行と成熟を司る。 $SEO_{PG}$  神経の機能を阻害すると、脱皮ホルモン生合成量が低下し、蛹化のタイミングが遅れたことから、セロトニンが脱皮ホルモン生合成を調節することで、個体発育に関与する可能性が示された。

この可能性を検証する目的で、2つのセロトニン生合成酵素遺伝子 *TRH* と *Henna* の完全機能欠失変異体が作製された。予想外なことに、*TRH* と *Henna* の完全機能欠失変異体、およびダブル変異体は蛹化し、成虫まで発育した。そこで本研究では、これらの変異体の発育過程を詳細に解析することで、セロトニンが脱皮ホルモン生合成調節と個体発育に果たす役割を追究した。

### 《方法》

#### ・蛹化タイミングの測定

野生型ならびに変異体の1齢幼虫を通常栄養条件・25°Cにおいて飼育し、孵化後7日間で蛹化した数を1日2回カウントした。

#### ・蛹サイズの測定

蛹を実体顕微鏡付カメラで撮影し、その画像をImageJを用いて解析した。

#### ・*Henna-GALA* 系統の作製

*Henna* 遺伝子上流のプロモーター領域 1169 kb をクローニングし、*GALA* 遺伝子上流に挿入したプラスミドを作製した。そして、*Henna* プロモーター領域の支配下で *GALA* が発現するトランスジェニック系統を作製した。

#### ・免疫組織化学染色法

3齢幼虫をリン酸緩衝液中で解剖し、脳神経系組織を3.7%ホルムアルデヒド溶液で固定した。固定後、試料を洗浄し、1次抗体あるいは2次抗体と共に振盪培養することで、標的タンパク質に蛍光標識を施した。試料は、共焦点レーザー顕微鏡 LSM700 を用いて観察した。

### 《結果・考察》

まず、*TRH* と *Henna* の発現パターンを qRT-PCR によって調べた。先行研究と一致して *TRH* は主に脳神経系で発現しており、*Henna* は脂肪体で多く発現していたが、脳神経系でも少し発現していた。次に、共同研究によって、各変異体のセロトニン量を LC-MSMS 解析によって定量した結果、*TRH* 変異体ではセロ

トニン量が劇的に減少するのに対して、*Henna* 変異体ではセロトニン量がほとんど減少せず、代わりにチロシン量が顕著に減少することがわかった。これは、*Henna* がフェニルアラニンからチロシンを生合成する活性を持つことと一致する。さらに予想外なことに、*TRH* と *Henna* のダブル変異体では、セロトニンに加えて、ドーパミンも劇的に減少した。

これらの結果を踏まえた上で、*TRH* と *Henna* の完全機能欠失変異体、およびダブル変異体の蛹化タイミングと蛹サイズを測定した。その結果、セロトニンが欠乏している *TRH* 変異体の蛹化タイミングは、コントロールとほぼ同じであった。それに対して、*Henna* 変異体とダブル変異体の蛹化タイミングは、コントロールと比較して約1~2日遅れた。また、蛹サイズは、*Henna* 変異体とダブル変異体でやや小さくなる傾向があった。以上の結果から、(1)セロトニン欠乏個体でも脱皮ホルモンは合成されること、(2)*Henna* が蛹化タイミングの調節に関与すること、が示唆された。

そこで、*Henna* が  $SEO_{PG}$  神経でセロトニン生合成を担う可能性を検討するために、*Henna* 遺伝子のプロモーター領域をクローニングし、*GALA* 遺伝子上流に挿入したトランスジェニック系統を作製した。*Henna* プロモーターの支配下で GFP を発現させたところ、脳の少数の細胞群でシグナルが検出されたものの、 $SEO_{PG}$  神経を含む領域にシグナルは見られなかった。このことから、*Henna* は、 $SEO_{PG}$  以外の神経細胞あるいは末梢組織で働くことにより、個体発育に関与する可能性が支持された。

現在は、*Henna* 変異体の表現型がセロトニン欠乏の結果ではなく、チロシン欠乏や脱皮ホルモン生合成不全の結果である可能性を検証するために、セロトニン前駆体 5-HTP、チロシン、および脱皮ホルモンを摂食させる事により、表現型が回復するかどうかを検討中である。また、*Henna* 変異体のバックグラウンドで、*Henna* あるいは *TRH* を組織特異的に強制発現させる事で、蛹化タイミングの遅れが回復されるか調べることも予定している。

本研究により、シヨウジョウバエの個体発育において、*TRH* の働きによって合成されるセロトニンではなく、*Henna* によって合成されるセロトニン、あるいはアミノ酸代謝産物が関与するという新しい可能性が見出された。

