

## 昆虫ホルモン Ion Transport Peptide に関する研究：組織別選択的スプライシングの発見と受容体探索

渡邊 瑛 (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

全ての多細胞生物は、体内の恒常性や発生イベントを外的・内的要因の変化に応じて柔軟に調節している。その重要な調節因子として働くホルモンは、内分泌細胞・器官によって合成・分泌され、それが体内の様々な組織に受容されることで多岐にわたる機能を発揮する。ホルモンの種類は非常に多く、種を超えて広く保存されているもの、逆に特定の動物種に特異的に存在するものなど様々である。

Ion transport peptide (以下、ITP) は、節足動物間で広く保存されるペプチドホルモンとして知られており、甲殻類や昆虫において、脱皮、性成熟の調節、血糖上昇作用などの多岐にわたる機能が報告されている。また、選択的スプライシングによって、一つの ITP 遺伝子から異なるアミノ酸配列を持つペプチド (ITP 及び ITP-like : ITPL) が作られることが知られている。しかしながら、これまでの研究において、ITP と ITPL の機能的な違い、さらにはそれらの進化的に保存された受容体すら明らかになっておらず、その作用機序の詳細は不明である。

そこで本研究では、分子遺伝学的研究に長けたキョウジョウバエ *Drosophila melanogaster* (以下、ショウジョウバエ) を用いて、ITP と ITPL の発現パターン及び機能的な違いを明らかにし、さらにそれらの受容体を明らかにすることを目的とした。ショウジョウバエでは、選択的スプライシングによって、ITP 遺伝子から3つの異なるペプチド (ITP, ITPL1, ITPL2) が作られる。ITP は、特定の脳神経分泌細胞で産生されることが明らかにされている一方、ITPL1 と ITPL2 の発現パターンは不明である。また、これまでの研究では、ショウジョウバエ成虫期における ITP の機能は報告されているが、発生過程における機能は未知である。研究室における先行研究により、ITP 遺伝子機能欠損変異体は、発生過程において致死になることが明らかになっており、ITP または ITPL の発生過程における重要性が示唆された。

## 材料と方法

・定量 RT-PCR 法による ITP 遺伝子の各アイソフォーム (ITP, ITPL1, ITPL2) の組織・発生段階別の発現解析

ショウジョウバエの組織または個体から RNA を抽出し、逆転写反応によって cDNA を作成した。ITP, ITPL1, ITPL2 特異的プライマーを用いてリアルタイム PCR を実施した。得られた定量値をハウスキーピング遺伝子 *rp49* で補正し、特定の組織・発生段階における遺伝子発現量を算出した。

・Gal4-UAS システムを用いた ITP と ITPL2 発現組織の可視化  
ITP または ITPL2 のコーディング領域の末端に T2A-Gal4 を in-frame ノックインした系統 (ITP-T2A-Gal4, ITPL2-T2A-Gal4)<sup>2,3)</sup> を、UAS-*mCD8-GFP* と交配し、GFP を発現させることで ITP または ITPL2 発現組織を可視化した。

・ITP, ITPL1 の免疫組織化学染色

ショウジョウバエの3齢幼虫から組織を解剖し、ITP または ITPL1 に対する特異的抗体を用いて免疫組織化学染色を行い、共焦点レーザー顕微鏡 LSM900 (Carl Zeiss) 及び ApoTome 蛍光顕微鏡 (Carl Zeiss) を用いて蛍光像を観察した。

・ITP 及び受容体候補遺伝子のオーソログ探索と分子系統樹作成  
対象遺伝子のアミノ酸配列を問合せ配列とし、節足動物9種 (昆虫7種、甲殻類1種、軟甲類1種) 及び線虫 *C. elegans* を対象として、NCBI Non-redundant protein sequences database を用いた相同性検索を行い対象遺伝子のオーソログを探索した。特定した各オーソログのアミノ酸配列を用いて ClustalW と TreeDyn に よって分子系統樹を作成した。

## 結果・考察

・ITP, ITPL1, ITPL2 の時期・組織特異的発現解析

定量 RT-PCR 法によって、ITP 遺伝子の各アイソフォーム (ITP, ITPL1, ITPL2) の時期・組織特異的発現解析を行った結果、ITPL2 が ITP や ITPL1 と比較して発現量が高く、また幼虫から蛹へ変態する時期に急激に発現量が上昇することが分かった。また各組織間の発現量を比較した結果、ITP が脳でのみ発現量が高いのに対し、ITPL2 は脳だけではなく、腸、気管、マルピーギ管などの末梢組織で発現量が高いことがわかった。さらに、ITP-T2A-Gal4, ITPL2-T2A-Gal4 系統及び ITP, ITPL1 抗体を用いて、各アイソフォームの産生細胞を解析した結果、ITPL1 は ITP とは異なる脳神経分泌細胞で産生され、ITPL2 は脳のグリア細胞や腸、マルピーギ管で高発現していることが示唆された。

・ITP, ITPL1, ITPL2 受容体候補の探索

ITP 及び ITPL1, -L2 は、高次構造形成に必要な複数のシステイン残基を有するが、そのペプチド構造の一部が、既知のペプチドホルモン (仮にホルモン A とする) と類似の特徴を持つことが明らかとなった。このことから、ITP 及び ITPL1, -L2 がホルモン A 受容体と同じファミリーに属する受容体に作用することが予想された。そこで、ショウジョウバエゲノムに存在する全ての A 受容体ファミリー遺伝子及び ITP 遺伝子の生物種における保存性を、様々な節足動物のゲノムデータベースを用いて解析した。その結果、ITP 遺伝子をゲノム中に有する種において保存されている唯一の A 受容体ファミリー遺伝子を特定した。

本研究によって、ITP 遺伝子の組織・発生段階における発現パターンがアイソフォームによって異なることが明らかになった。さらに、生物種間における保存性の解析から ITP 及び ITPL1, -L2 受容体の候補が予想された。今後は、ITP 遺伝子の各アイソフォーム別の変異体や組織特異的ノックダウンによる表現型解析を行うことで ITP の発生過程での機能を解析すると共に、その表現型と本研究で特定した候補受容体の変異体やノックダウンによる表現型が一致するかなどの面から、候補受容体が ITP 及び ITPL1, -L2 受容体として適当であるかを解析していく。

## 参考文献

- 1) Webster et al., *Gen Comp Endocrinol.* 2012;175(2):217-233.
- 2) Deng et al., *Neuron* 2019;101(5):876-893.
- 3) Kondo et al., *Cell Rep.* 2020;30(1):284-297.