

## キロショウジョウバエの生殖休眠を制御する神経回路に関する研究

平 清乃 (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】

休眠は、生存に不利な環境下で発生や生殖を抑制する生存戦略である。キロショウジョウバエ (*Drosophila melanogaster*, 以下ショウジョウバエ) を含む一部の昆虫においては、低温短日条件に置くと卵巣などの生殖器官が縮退する生殖休眠が見られる。この生殖休眠の制御には、アラタ体という内分泌器官から放出される幼若ホルモンが重要であることが古くから示されている<sup>1)</sup>。ショウジョウバエでは、所属研究室の先行研究により、アラタ体に直接投射する CA-LP 神経が生殖休眠を制御していることが明らかになっていた<sup>2)</sup>。

CA-LP 神経の機能をさらに理解するためには、この神経に接続する上流神経の同定と機能解析が不可欠である。所属研究室の先行研究において、ショウジョウバエの脳神経を網羅的に再構築したコネクトームデータベース<sup>3)</sup>を利用して CA-LP 神経上流神経の探索が行われた。その結果、CA-LP 神経と多くのシナプスを形成する複数の神経があることが明らかになった<sup>2)</sup>。しかし現状では、これらの神経が生殖休眠の制御に関わるかは一切検討されていない。そこで私は、これらの CA-LP 神経上流神経の詳細を調べることを目標に、これらの神経を特異的に標識するトランスジェニックシステムの探索とその標識神経の解剖学的観察を実施した。

### 【方法】

#### ・GAL4-UAS システム

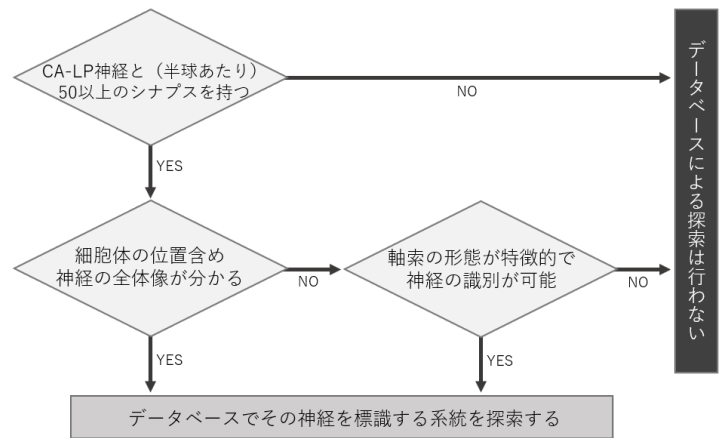
ショウジョウバエでは GAL4-UAS システムを用いて組織特異的な遺伝学的操作が可能である。このシステムでは、酵母由来の転写因子 GAL4 を特定のエンハンサーの制御下で発現させることで、GAL4 結合配列である UAS 配列の下流の任意の遺伝子を発現させることができる。本研究では、ストックセンターより取り寄せた GAL4 システムと、UAS 配列の下流に GFP を配置したシステムを交配させ、取り寄せたシステムが標識する神経を可視化した。

#### ・免疫組織化学染色による脳の観察

神経の形態観察を行うため、免疫組織化学染色によって GFP の蛍光強度の増強や、神経分泌因子の可視化を行った。解剖によって取り出した脳を 4%パラホルムアルデヒド/PBS で固定した後、2%仔牛血清アルブミン/PBT (PBS+Tryton-X100) でブロッキング処理した。その後任意の 1 次抗体を用いて、Alexa 蛍光標識 2 次抗体によって染色した。蛍光像は共焦点レーザー顕微鏡 (Carl Zeiss LSM900) を用いて撮影した。脳を立体的にマウントする場合は、スライドガラスにビニールテープを巻いてカバーガラスを浮かせることで脳が潰れないようにした。

#### ・CA-LP 神経上流神経を標識する可能性のあるシステムの探索

ハーワードヒューズ医学研究所 Janelia Farm によって公開されているショウジョウバエ脳のイメージングデータベース (<https://neuronbridge.janelia.org/>)<sup>4)</sup> を利用した。次のフローチャートに則り、3 つの神経 (それぞれ Body Id: 296544262、5813055822、481501144) について GAL4 システムの探索を行った。



### 【結果・考察】

本研究では、CA-LP 神経上流神経の 1 つ (Body Id: 296544262) に集中した解析を実施した。この神経を標識する GAL4 システムを 6 システム選択した。このうち、ストックセンターに存在する 5 システムを取り寄せ、GAL4-UAS システムを用いて標識神経を確認した。その結果、2 システムにおいて CA-LP 神経上流神経に類似した形態の神経が標識された。

次に、上記 2 つの GAL4 システムを用いて、この神経の特徴づけを試みた。先行研究で報告されている neuropeptide F (NPF) 産生神経の形態が CA-LP 神経上流神経に類似していた<sup>2)</sup>ため、抗 NPF 抗体による免疫組織化学染色を利用して、GAL4 で標識される神経が NPF 陽性かを検討した。しかしながら、GAL4 で標識される神経は抗 NPF 抗体で染色されなかった。続いて、CA-LP 神経に発現している受容体の情報から CA-LP 神経上流神経が myoinhibitory peptide (Mip) を放出している可能性が考えられた。しかし、Mip 産生神経の形態を観察した結果、Mip 産生神経は CA-LP 神経上流神経とは異なっていた。よって、この CA-LP 神経上流神経は Mip 産生神経ではないことが示唆された。

なお、ストックセンターから取り寄せられなかった 1 システムはエンハンサー配列が判明しており、現在自分たちの手でこのシステムを作製することを試みている。

### 【今後の展望】

CA-LP 神経上流神経が産生する神経伝達物質の特定を進めるとともに、入手した GAL4 システムの標識神経が本当に CA-LP 神経上流神経であるかを確認するために CA-LP 神経との接続や生殖休眠への影響を調べる。さらに、split-GAL4 システム<sup>5)</sup>を用いてより特異的に神経を標識するシステムを作製することも検討している。

### 【参考文献】

- 1) Kurogi et al. (2021) *Front. Ecol. Evol.* 9, e715029.
- 2) Kurogi et al. (2022) *bioRxiv* doi:10.1101/2022.05.28.492955
- 3) Scheffer et al. (2020) *eLife* 9, e57443.
- 4) Clements et al. (2022) *bioRxiv* doi:10.1101/2022.07.20.500311
- 5) Deng et al. (2019) *Neuron* 101, 876-893
- 6) Luan et al. (2020) *Front. Neural Circuits* 14, e603397