

博士論文

キイロショウジョウバエの変態タイミングを決める
生物タイマーの分子機構と栄養シグナルの影響

**Molecular mechanism of biological timer to determine
developmental timing and effects of nutritional condition
during metamorphosis of *Drosophila melanogaster***

平成 30 年 3 月

西田 遥

岡山大学大学院
自然科学研究科

目次

1. 要旨	1
2. 序論	4
3. 材料と実験方法	9
3-1. ショウジョウバエの系統	
3-2. 1 齢幼虫前期および前蛹期におけるショウジョウバエのステージング	
3-3. injection の方法	
3-4. ショウジョウバエの幼虫期間, 前蛹期間および蛹期間の測定	
3-5. 標準培地と貧栄養条件前蛹の飼育方法について	
3-6. Western blotting 法	
3-7. Total RNA 抽出および cDNA 合成	
3-8. RT-PCR 法	
4. 結果と考察	14
第 1 章 蛹化タイミングを決定する生物タイマーの分子機構と存在部位	
I-1. 序論	14
I-2. 結果	14
I-2-1. 蛹化タイミングを最終決定するのは 20E である	
I-2-2. 脂肪体における <i>shade</i> 遺伝子の発現が蛹化タイミング決定に重要である	
I-3. 考察	15
I-3-1. 蛹化タイミング決定における 20E と <i>shade</i> 遺伝子の重要性	
I-3-2. 同定された生物タイマー機構は脂肪体に存在する	
I-3-3. 蛹化タイミングを決める生物タイマーが脂肪体で機能している生物学的意義	
第 2 章 栄養シグナルが生物タイマーに与える影響の解析	
II-1. 序論	18
II-2. 結果	18
II-2-1. 標準の飼育条件における発生時間は雌雄で異なる	
II-2-2. 3 齢幼虫後期特異的な飢餓状態により困蛹殻形成後の変態タイミングが遅れる	
II-2-3. 3 齢幼虫後期特異的な飢餓状態は前蛹期における FTZ-F 1 の発現開始を遅らせる	
II-2-4. 貧栄養条件前蛹のオスにおける生物タイマー分子機構関連遺伝子の発現パターン	

II-2-5.	貧栄養条件前蛹のメスにおける生物タイマー分子機構関連遺伝子の発現パターン	
II-2-6.	3 齢幼虫後期におけるグルコース摂取量の変化は蛹化タイミングに影響を及ぼす	
II-2-7.	培地に含まれるグルコース濃度と幼虫の成長速度は反比例する	
II-3.	考察	23
II-3-1.	発生過程における雌雄差	
II-3-2.	貧栄養ストレス応答における雌雄差	
II-3-3.	TGP における貧栄養状態が同定された生物タイマー機構に与える影響	
II-3-4.	TGP における貧栄養状態で変態タイミングにばらつきが生じる原因	
II-3-5.	幼虫発生に影響を与える栄養源	
第 3 章 生物タイマーへの栄養シグナルの入力経路に関する解析		
III-1.	序論	26
III-2.	結果	26
III-2-1.	TOR パスウェイは蛹化タイミング決定に影響しない	
III-2-2.	インスリンパスウェイは蛹化タイミング決定に影響しない	
III-3.	考察	27
III-3-1.	TOR パスウェイが蛹化タイミングを決めるタイマーに与える影響について	
III-3-2.	インスリンパスウェイが蛹化タイミングを決めるタイマーに与える影響について	
III-3-3.	インスリンおよび TOR パスウェイの前蛹期における影響	
5.	総合考察	29
6.	謝辞	30
7.	引用文献	31
8.	図表	34

1. 要旨

多くの生物において、発生特異的なイベントが起こるタイミングはおおむね正確に制御されている。このような発生過程におけるタイミングの決定およびその制御は個体のサイズを決める重要な要素であるとともに、様々な環境条件に適応して生存するために用いられる手段でもある。しかし、その決定および制御システムはほとんど明らかになっていない。

完全変態昆虫であるキイロショウジョウバエは、最終齢である3齢幼虫後期におけるエクジステロイドの急激な濃度上昇によって囲蛹殻形成が誘導され、蛹の前段階である前蛹となる。25°Cの恒温条件下で飼育したキイロショウジョウバエでは、囲蛹殻形成後 (after puparium formation (APF)) 2時間から3時間でエクジステロイドの体内濃度が一度低下する。その後 APF11 時間付近にエクジステロイドの体内濃度が再度上昇することにより蛹化が誘導されるとされ、およそ APF12 時間で蛹化が完了して蛹となる。キイロショウジョウバエは前蛹期間を含め、幼虫期間・蛹期間の長さはほぼ決まっていることから、各発生ステージの期間を決めるタイマー機構が存在すると考えられる。所属研究室による前蛹期間決定の分子機構に関する先行研究により、転写調節因子をコードする *ftz-fl* 遺伝子に変態開始を誘導するエクジステロイドパルス後の前蛹中後期に時期特異的に発現し、この FTZ-F1 の発現タイミングが蛹化のタイミングを決定することが明らかにされている。また、*ftz-fl* 遺伝子のプロモーター領域に結合して *ftz-fl* 遺伝子の発現時期を制御するエクジステロイド誘導性の転写抑制因子 *Blimp-1* が高エクジステロイド時にのみ発現することで、*ftz-fl* 遺伝子の発現タイミングを制御することが明らかにされている。さらに *Blimp-1* の安定性は低く、*Blimp-1* 遺伝子の発現終結後に素早く分解することで *ftz-fl* 遺伝子の発現タイミングをより正確に制御することも明らかにされている。また、FTZ-F1 と *Blimp-1* による発生タイミングの決定機構は蛹期間にも同様に存在することが示されている。

本研究では FTZ-F1 の発現時期が蛹化のタイミングを決定する制御機構の未解明部分を明らかにするとともに、解析したタイマー機構の生物学的意義を示すことを目的とした。

1. 分泌された E を活性化するタイミングが蛹化タイミングを決める

エクジステロイドホルモンは摂食により体内に取り入れられた植物ステロールを原料として、エクジステロイドホルモン合成酵素をコードする *Halloween* 遺伝子群産物によって前胸腺でエクダイソン (Ecdysone (E)) として産生され、血リンパへ放出される。E は血リンパによって全身に運搬されたのち、末梢組織において *Halloween* 遺伝子群の一つである変換酵素 *Shade* によって活性型エクダイソン (20-Hydroxyecdysone (20E)) に変換され、脱皮や変態を誘導する。幼虫期においては、前胸腺で発現する *Halloween* 遺伝子群に含まれるいくつかの遺伝子の発現制御に FTZ-F1 が関与することが知られているため、前蛹期においても E の合成時期の決定

に FTZ-F1 が関わると予想し、前蛹後期にエクジステロイドホルモンの体内濃度が上昇するより少し前の APF8 時間の前蛹個体に E あるいは 20E を顕微注入したところ、20E によってのみ蛹化タイミングが早まることを示す結果が得られた。この事実は、E が前胸腺から放出される段階が変態タイミング決定において重要であるというこれまでの定説に反し、E を 20E に変換する段階が蛹化タイミングを決定することを示唆した。そこで、E を 20E に変換する酵素 Shade をコードする *shade* 遺伝子を *GAL4/UAS* システムを用いて組織特異的に強制発現および発現抑制して蛹化タイミングを測定した。その結果、脂肪体における *shade* 遺伝子の強制発現が蛹化タイミングを早め、発現抑制が遅延させた。一方で、筋肉や神経を含む他の組織では、*shade* 遺伝子の強制発現が蛹化タイミングを早めたが、発現抑制が蛹化を遅延させることはなかった。また、*ftz-fl* 遺伝子と *Blimp-1* 遺伝子についても *shade* 遺伝子と同様に、蛹化タイミング決定においては脂肪体での発現が重要であるという結果、および前蛹期に FTZ-F1 が Shade を誘導することを示す結果が共同研究者よりもたらされた。これらの結果により、蛹化タイミングを決定する生物タイマーは脂肪体で機能しており、蛹化タイミングを最終的に決定するのは Shade が E を 20E に変換するタイミングであることが明らかとなった。

2. 栄養状態が蛹化タイミングを決める生物タイマーに与える影響の解析

脂肪体は個体の栄養状態を感知する器官であるだけでなく、変態昆虫において成虫の個体サイズ決定に関与することが近年の研究で明らかになっている。同定した蛹化タイミングを決める生物タイマー機構が脂肪体で機能していることから、栄養状態のシグナルが蛹化のみならず、囲蛹殻形成と羽化のタイミング決定に与える影響を解析することを次の目的とした。

これまで、ショウジョウバエの発生研究において蛹期以前のステージでは雌雄を分けた解析はほとんどおこなわれていない。しかし、成虫サイズが雌雄で異なることなどから、栄養状態が生育に与える影響は雌雄で異なる可能性が高いと考え、まず野生株を用いて栄養が十分に摂取可能な標準飼育条件下で発生プロファイルを調べ、その結果を雌雄間で比較した。この比較によって、幼虫期間はオスの方が短く、前蛹および蛹期間はメスの方が短いという結果が得られた。次に、幼虫期間の中で成虫個体のサイズに最も大きな影響を及ぼす 3 齢幼虫後期特異的に飢餓状態においた貧栄養条件個体で蛹化と羽化のタイミングを測定した。その結果、貧栄養によって蛹化と羽化のタイミングが遅れ、その影響はオスにおいてより顕著であった。さらに個体間での前蛹および蛹期間のばらつきが大きくなることがわかった。続いて、貧栄養シグナルの生物タイマーへの入力個所を調べるために、貧栄養条件前蛹個体における生物タイマーのキー因子である FTZ-F1 の発現時期を Western blotting 法によって調べた。その結果、貧栄養状態によって FTZ-F1 の発現開始時期は、コントロール個体の場合と比較して 30 分から 1 時間遅れただけでなく、発現上昇時期にも個体差がみられた。このことは、貧栄養条件前蛹個体の蛹化タイミングが遅延し、個体間のばらつきが大きくなることと一致していた。さらに、同条件でタイマーの分子機構に含まれる他の遺伝

子の発現パターンを RT-PCR 法によって調べたところ、*Blimp-1* 遺伝子の前蛹前期での発現期間は延長し、*ftz-fl* 遺伝子の発現開始時期は遅延していた。この両遺伝子の発現パターンの変化は、オスでより顕著に観察された。さらに貧栄養状態によって前蛹前期での *shade* 遺伝子の発現低下タイミングが早まるとともに、前蛹後期での発現が遅延していた。よって、前蛹後期に蛹化を誘導する *ftz-fl* 遺伝子と *shade* 遺伝子の発現は、*Blimp-1* 遺伝子の発現が延長することによって遅延したと推定された。これらの結果に加えて、貧栄養状態は E の生合成を促す *PTTH* 遺伝子や、E に直接誘導される初期遺伝子である *E75A* 遺伝子の発現上昇や低下のパターンが不明瞭となることが示されたことから、3 齢幼虫後期特異的な貧栄養状態は、少なくとも蛹化タイミングを決める生物タイマー分子機構で鍵となるエクジステロイドパルスに影響を及ぼす可能性が生じた。

3. 生物タイマーへの栄養シグナルの入力経路に関する検証

栄養シグナル伝達機構としてインスリンあるいは TOR パスウェイが存在していることは広く知られている。同定された生物タイマーへ栄養シグナルが入力される経路として、これらのパスウェイが関与する可能性を検証するため、*GAL4/UAS* システムを用いて前蛹期の脂肪体特異的にインスリンと TOR パスウェイの活性を変化させ、蛹化タイミングへの影響を調べた。その結果、インスリンと TOR パスウェイの双方において活性化および抑制をしても蛹化タイミングへの影響はほとんどみられなかったことから、少なくとも前蛹期においては蛹化タイミングを決めるタイマー機構への栄養シグナル伝達にインスリンあるいは TOR パスウェイが関与する可能性は低いことが示唆された。ただ、栄養条件の変化を生じさせたのは幼虫期からであり、蛹化タイミングを決めるタイマーへの栄養シグナルは変態期以前に入力されている可能性が考えられるとともに、他の機構を用いてシグナルが伝達される可能性も考えられた。

2. 序論

発生生物学の分野において、生物のボディープランや形態形成については古くから盛んに研究されている。そして、発生にかかる時間はヒトの妊娠期間がおおよそ 10 ヶ月であるように、多細胞生物の発生過程に要する時間は種特異的に決まっており、例えばヒトでは、胚→乳幼児→幼児→成人、キイロショウジョウバエを含む完全変態昆虫では、胚→幼虫→蛹→成虫といったように、時間軸に沿って複数の発生ステージが存在する。あるステージからより成熟したステージへの移行タイミングは適切に調節されており、その過程においてあらゆる器官の形成や成長の速度が制御・同期されることで決められた時間の中で発生は進行する。このような事実から、生物はある発生現象から一定時間を測定し、次の発生現象のタイミングを決定する生物タイマーと呼べるような機構を持っていると考えられる。生物における時間的な制御機構として、概日時計については歴史も古く盛んに研究されている(Allada and Chung, 2010)。発生過程においては、脊椎動物の体節形成時計の振動を同期させる分子機構が明らかにされる(Saga, 2012)など、周期性のある時間制御機構については数多く報告されている。また、完全変態昆虫の変態タイミングについても、概日時計の制御を受けることを示す例は数多く知られているが、この機構だけでは説明できない事象も数多く存在する。本研究において着目した生物タイマーは、ある発生イベントから次のイベントまでの時間を正確に計測・維持する目的で存在すると考えられる。そして、種特異的に発生時間が決まっていることから、生物タイマーは重要なメカニズムであると考えられるが、その存在を示す報告は数少なく(Suzuki et al, 2013)、その分子機構や機能している体の部位も明らかになっていない。

このような状況下で、完全変態昆虫における各発生ステージの移行、つまり脱皮や羽化を含む変態は、ステロイドホルモンの一種であるエクジステロイドによって制御されることが知られている (Fig. 1)。昆虫におけるエクジステロイドは摂食により体内に取り込まれた植物ステロールを原料に、前胸腺で合成されエクダイソン (Ecdysone (E)) として血リンパに放出される。この生合成経路に関わる酵素類は、主にショウジョウバエ、カイコ、タバコスズメガを用いた解析によって同定されており、それらは主にシトクロム P450 酸化酵素に属するものである。Fig. 2 に示す E の生合成経路で働く酵素として Neverland, Shroud, Spook, Spookier, CYP6T3, Phantom, Disembodied, Shadow などが知られている(Niwa et al, 2014)。これらの酵素をコードする遺伝子群の大半は Halloween 遺伝子群として知られており、ほとんどの Halloween 遺伝子は幼虫期において前胸腺特異的に発現することが知られている。しかし、Halloween 遺伝子群の中で前胸腺特異的な発現を示さない酵素もある。それは、前胸腺から血リンパによって全身に運搬された E を末梢組織において変態行動を誘導する活性型エクダイソン (20-Hydroxyecdysone (20E)) に変える酵素 Shade であり (Fig. 3)、幼虫期における *shade* 遺伝子は脂肪体と中腸での発現が高いことが知られている(Petryk et al, 2003)。また、前胸腺における E の生合成を誘導するのは、

脳から分泌される神経ペプチドの一種である前胸腺刺激ホルモン (Prothoracicotropic hormone (PTTH)) であることも知られている(Fellner et al, 2005)。しかし、これらのホルモン合成および分泌のタイミングを制御する機構は、いくつかの例外を除いて解明されておらず、昆虫が発生タイミングをどのようにして知るのかは根本的には明らかでない。

私が研究材料としているキイロショウジョウバエを 25°C の恒温条件下で飼育した場合の発生過程における脱皮・変態のタイミングとエクジステロイドの体内濃度変化を Fig. 1 に示す。キイロショウジョウバエの発生は、その過程で何度かエクジステロイドレベルが上昇し、下降すること (エクジステロイドパルス) でコントロールされており、幼虫が前蛹となる囲蛹殻形成 (puparium formation) も、孵化後に 2 度の幼虫脱皮を経て、3 齢幼虫後期におけるエクジステロイドパルスによって誘導される。25°C の恒温条件下では、囲蛹殻形成後 (After Puparium Formation (APF)) 2 時間から 3 時間でエクジステロイドレベルは一度減少する。そして、APF11 時間付近に再度現れるエクジステロイドレベルの上昇によって蛹化が誘導され(Hodgetts et al, 1977; Riddiford, 1993), APF 約 12 時間で蛹化が完了する(Thummel, 1996)。このことから、ショウジョウバエは囲蛹殻形成から約 12 時間後の蛹化タイミングを決定するエクジステロイドを用いた生物タイマーを持つと考えられる。

変態期における遺伝子の発現制御機構の研究は、真核生物で分子生物学的手法を用いることができなかった 35 年程前に、ショウジョウバエの唾腺染色体のパフを用いた実験によっておこなわれ、その研究によって 1974 年に Ashburner モデルが提唱された(Ashburner, 1974; Ashburner et al, 1974)。このモデルは、その後の分子生物学的研究により基本的に正しいことが示される(Thummel, 1996)とともに修正された(Thummel, 2002)。Ashburner モデルによると、前胸腺から放出された E が Ecdysone receptor (EcR) と特異的に結合し、E75A 遺伝子や E74A 遺伝子を含む初期遺伝子群 (early genes) を直接的に誘導する(Yao et al, 1993)。続いて、初期遺伝子群がコードする転写因子の産物である early タンパクは、ホルモンに対する生理学的応答をより直接的に制御する後期遺伝子群 (late genes) を誘導する。その一方で、初期遺伝子群は自身の転写産物が蓄積されると、フィードバック的に自身の発現を抑制する。また、初期遺伝子産物は、初期遺伝子と同様に E によって直接誘導されて初期遺伝子よりすこし後に発現する初期後期遺伝子群 (early-late genes) の高いレベルでの発現にも必要とされる(Lam et al, 1997)。このように、エクジステロイドパルスによって発現が誘導される遺伝子群はいくつか存在しているが、それらとは異なり、エクジステロイドパルス後に発現する前蛹中期遺伝子 (mid-prepupal genes) の存在がある。それらの 1 つとして知られているのが、*ftz-f1* 遺伝子である(Lavorgna et al, 1991)。FTZ-F1 は体節形成遺伝子 *fushi tarazu* (*ftz*) のプロモーターに結合する転写制御因子として発見された核内受容体型転写因子であり、ゲルシフトアッセイによる解析で FTZ-F1 には α FTZ-F1 および β FTZ-F1 の 2 つのアイソフォームが存在していることが明らかにされている(Ueda, 1990)。同じ遺伝子から転写・翻訳される α FTZ-F1 と

β FTZ-F1 は大半の領域を共有しているが、それぞれ異なる N 末端領域を有しており、その発現時期や機能が異なることが知られている。 α FTZ-F1 は初期胚で発現し、体節形成において *ftz* 遺伝子に付随して機能すること (Ueda, 1990) (Lavorgna et al, 1991) が明らかにされている。一方で、 β FTZ-F1 は後期胚での発現に加え、エクジステロイドパルス後にあたる脱皮や蛹化・羽化前の特定の時期に一過的に全身で発現しており (Yamada et al, 2000) (Sullivan and Thummel, 2003), 各発生ステージにおける一過的な β FTZ-F1 の発現は、胚形成・幼虫脱皮および蛹化に必要な不可欠であることが知られている (Yamada et al, 2000)。さらに、 β FTZ-F1 は 3 齢幼虫後期において前胸腺で発現して Halloween 遺伝子群に属する *phantom* 遺伝子と *disembodied* 遺伝子の発現制御をすることも報告されており (Parvy et al, 2005), 変態期において重要な因子であることが明らかになってきている。

蛹化タイミングを決めるタイマー機構に関する研究において、まずは *ftz-fl* 遺伝子のプロモーター領域に結合して *ftz-fl* 遺伝子の発現時期を制御する E 誘導性の 2 つの転写制御因子 Blimp-1 と DHR3 が同定され (Kageyama et al, 1997), Blimp-1 は *ftz-fl* 遺伝子の発現のタイミングを転写抑制によって制御することが明らかになった (Agawa et al, 2007)。さらに、*Blimp-1* 遺伝子の転写はエクジステロイドパルスによって直接誘導され、前蛹前期にエクジステロイドの体内濃度が低下すると直ちに終結することも示された (Agawa et al, 2007; Akagi and Ueda, 2011)。ただし、*Blimp-1* 遺伝子領域には 20E 誘導性のパフは同定されておらず、初期遺伝子のように自身の遺伝子産物の蓄積によって転写をフィードバック抑制することはないため、*Blimp-1* 遺伝子は上述したような初期遺伝子群とは区別されている。その後、*Blimp-1* 遺伝子の mRNA およびタンパク質は安定性が低く、分解速度が非常に速いことも示され、このような特徴により、体内のエクジステロイド濃度が低下するタイミングと Blimp-1 の発現が機能できないレベルにまで低下するタイミングまでの間に生じる時間のばらつきを最小限にとどめ、*ftz-fl* 遺伝子の誘導タイミングが正確に制御されていると考えられた。さらに、RNAi 法により *Blimp-1* 遺伝子をノックダウン、あるいは発現量を半分にすることで Blimp-1 の発現量を低下させると *ftz-fl* 遺伝子の発現時期が早まるという結果と、Blimp-1 タンパク質を安定化させる変異を導入すると *ftz-fl* 遺伝子の発現時期が遅くなるという結果から、分解速度の速い Blimp-1 は *ftz-fl* 遺伝子の転写抑制因子として砂時計の砂のようにはたらくことで *ftz-fl* 遺伝子の発現タイミングを厳密に制御していることが示された (赤木, 博士論文 2011)。このように、蛹化タイミングを決める生物タイマーについては、*ftz-fl* 遺伝子と *Blimp-1* 遺伝子を中心とした分子機構が明らかになりつつある。また、これら 2 つの遺伝子は蛹発生においても重要な役割を果たすだけでなく、羽化タイミング決定においても、同様の生物タイマー機構がはたらいっていることが示されている (Sultan, 博士論文 2014)。では、幼虫期における発生タイミング決定はどのように制御されるのだろうか。完全変態昆虫の成虫はクチクラ質の頑丈な外骨格を持っており、成虫になってからサイズが変わることがないため、変態期に入るまでの栄養状態と成長可能な幼虫期の長さが一生の

サイズを決定する。また、昆虫は変態期において摂食行動をしないため、幼虫成長や幼虫期の栄養状態はその後の変態期における発生とそのタイミング決定に影響を及ぼす。このことから、幼虫期の栄養状態が蛹化タイミングを決める生物タイマー機構に与える影響を解析する必要があると考えられる。

栄養状態と変態開始タイミングの関係については、タバコスズメガの最終齢幼虫で **minimal viable weight (MVW)** と呼ばれる生存可能な最小体重と、**critical weight (CW)** と呼ばれる変態開始タイミングを決定する体重が存在する事が明らかにされている(Nijhout and Williams, 1974)。MVW に達すると、それ以降に飢餓状態に置かれても変態することができるといわれている。CW は MVW よりも後にある発生のチェックポイントで、CW に達するとその後起こる変態開始のタイミングが決定するといわれている。これらの言葉が定義されるより古くに、ショウジョウバエの幼虫においても CW のようなチェックポイントが産卵後 (**After Egg Laying (AEL)**) 70 時間に存在することは 1938 年に Beadle らによる飢餓実験で示され、**Seventy hours** と呼ばれていた (注 1) (Beadle et al, 1938)。しかし、タバコスズメガにおいて MVW と CW が定義されて以降、CW の代替詞として MVW を使うショウジョウバエ研究者が多く、未だにショウジョウバエにおいてはこの 2 つの言葉の定義が曖昧である(Callier and Nijhout, 2013)。なお、現在では一般的に産卵後 (**After Egg Laying (AEL)**) 84 時間頃に MVW と CW にほぼ同時に達するとされている。本研究における CW は、飢餓状態に置かれても、標準培地を自由に摂食可能な標準条件で飼育を続けた場合と同様に、その個体群の半数が一定時間後に変態を開始する重量と定義した。また CW 到達後、囲蛹殻形成までの期間は **Terminal Growth Period (TGP)** と呼ばれ、ここでの成長が最終的なサイズを決める。ただし、この TGP は可塑性の高い期間であると言える。例えば、前胸腺における E の生合成を誘導する PTH 合成を阻害すると、CW が大きくなるが、この場合、成長率は変化することなく、TGP が延長することによって成虫サイズが大きくなる(McBayer et al, 2007)。また、TOR パスウェイを幼虫の前胸腺特異的に抑制すると、やはり成長率は変化することなく、TGP が延長することによって成虫サイズが大きくなる(Layalle et al, 2008)ことが示されている。このような栄養状態と変態を関連付けた研究はここ 10 年ほど盛んにおこなわれるようになっており、*Drosophila* insulin-like peptides (Dilps) の発生や変態における機能解析も進んでいる(Okamoto and Yamanaka, 2015)。しかし、これらのいずれの報告も、成長阻害に伴う幼虫期の延長や、その後の変態イベントの遅延を示しているにも関わらず、生物タイマー的な時間制御の視点から語られている報告はほとんどない。よって本研究では、生物の発生における時間的制御において、生物タイマー機構が用いられている生物学的意義の理解を深めることを目的として、蛹化タイミングを決める生物タイマーの分子機構の未解明部分を明らかにするとともに、幼虫期および TGP における栄養状態が生物タイマー機構に与える影響を解析した。さらに、生物タイマー機構が栄養シグナルを受け取る経路として、幼虫発生に関連の深いインスリンおよび TOR パスウェイが関与する可能性を検証した。

(注 1) 現在の一般的な標準 25℃の恒温条件で飼育した場合に AEL70 時間で CW 様のチェックポイントに到達するとは考えにくく、当時の飼育条件が現在のものと大きく異なっていたためと推察される。

3. 材料と実験方法

3-1. ショウジョウバエの系統

ショウジョウバエの injection 実験, 幼虫後期特異的な栄養源の影響を解析した実験, その他の実験のコントロール系統およびホスト系統としては, $y^1Df(1)^{w67c1}$ (以後 *yw* 系統とする) を用いた。また, すべての貧栄養条件前蛹の解析には, *Oregon-R* 系統 (以後 *OR* 系統とする) を用いた。インスリンに関する UAS 系統 *UAS-Akt*, *RNAi UAS-InR RNAi*, *UAS-PTEN RNAi*, *UAS-myc-Dp110CAAX*, *UAS-InR^{K1409A}*, TOR パスウェイに関する UAS 系統 *UAS-TOR RNAi*, *UAS-RagA RNAi*, *UAS-Raptor RNAi*, *UAS-Rheb* および *Cg-Gal4*, *24B-Gal4*, *Mef-Gal4*, *C855a-Gal4* 系統は理化学研究所の岡本直樹博士より分与していただいた。*UAS-shade* 系統は京都大学の小野肇助教より分与していただいた。*UAS-shade RNAi* 系統は国立遺伝学研究所 (NIG) より分与していただいた。*ppl-Gal4* 系統は東京大学の三浦正幸教授より分与していただいた。*elav-Gal4*, *Repo-Gal4*, *Gal80^Δ* 系統は中越英樹教授より分与していただいた。その他, 実験に用いたトランスジェニック系統は上田均教授より分与していただいた。

3-2. 1 齢幼虫前期および前蛹期におけるショウジョウバエのステージング

① 1 齢幼虫前期におけるショウジョウバエのステージング

標準培地に 3 時間~6 時間程度産卵を行った後, 卵をアップルジュース寒天プレート上へ移して飼育した。20 時間後, 既に孵化している 1 齢幼虫を取り除き, 以後 2 時間ごとに 1 齢幼虫を回収し, 回収時間を AH (After Hatching) 0 時間とした。また, AH0 時間で発生タイミングを揃えていない実験での産卵時間は 3 時間とし, 成虫を取り出した時間を AEL (After Egg Laying) 0 時間とした。

② 前蛹期におけるショウジョウバエのステージング

ショウジョウバエの 3 齢幼虫はエサの中にもぐっているが, 囲蛹殻形成の数時間前になると飼育容器の壁面に上りはじめて歩きまわるワンダリングを行う。囲蛹殻形成をすると, 幼虫の時に表皮にあった体節が見えなくなり, 蛹の形態になる。この時点での体色は白色であるが, 時間が経過すると茶色に変色していく。サンプル採集は, 飼育しているバイアル中の白色前蛹個体を全て除いた後, 新たに前蛹となった個体を 30 分に一度の間隔で観察し, 30 分以内に白色前蛹となった個体を採集して APF0 時間のサンプルとした。採集後シャーレに並べた個体は, 精巢の有無によって雌雄を判別した。

3-3. injection の方法

電動マイクロインジェクター IM-31 を使用して 1 個体あたり 50nl を, 尾部に近い腹腔に injection を行った。それぞれの実験に適したタイミングで injection を行い, Ringer Solution (以後, RS とする) を同じタイミングで injection した個体をコントロール

とした。injection 実験に用いた Ecdysone と 20-Hydroxyecdysone の濃度はともに 2 μ g/ml とし、5mM まで 100%EtOH で希釈し RS で 2 μ g/ml まで希釈を行った。RS の組成は以下に示す通りとする。(Ringer Solution 組成: 130mM NaCl, 4.7mM KCl, 1.9mM CaCl₂)

3-4. ショウジョウバエの幼虫期間、前蛹期間および蛹期間の測定

① 幼虫期間の測定

AEL0 時間で発生タイミングを揃えた個体群を用いて、新たに白色前蛹となった個体を採集・観察することにより、幼虫期間を測定した。

② 前蛹期間の測定

シャーレに並べた白色前蛹個体をインターバル撮影機能付きデジタルカメラで 10 分ごとに撮影した。前蛹個体は蛹化行動が起こるとクチクラ内の空気が移動し頭部とクチクラの先端の間にできる気泡の移動を蛹化のマーカ―として蛹化タイミングを記録し、前蛹期間を測定した。ただし、injection 実験の前蛹期間に関しては APF10 時間から 30 分ごとに実体顕微鏡を用いて蛹化タイミングの観察をおこない、前蛹期間を測定した。

測定した前蛹期間の有意差はコルモゴロフ-スミルノフ検定 (KS 検定) を用いて検定した。

③ 蛹期間の測定

シャーレに並べた前蛹個体を、蛹化後はインターバル撮影機能付きデジタルカメラで 30 分ごとに撮影し、羽化のタイミングを記録することで、蛹期間を測定した。

3-5. 標準培地と貧栄養条件前蛹の飼育方法について

標準培地および実験に用いた各種培地の組成を下記に示す。なお、すべての培地に防腐剤としてボーキニン、プロピオン酸を加えた。実験に用いた全ての系統はこの標準培地において 25°C の恒温条件で飼育した。

	標準培地 (%)	飢餓培地 (%)	0× Glu (%)	0.5× Glu (%)	2× Glu (%)	0× yeast (%)
Glucose	10	—	—	5.0	20	10
Yeast	4.0	—	4.0	4.0	4.0	—
Cornmeal	6.3	—	6.3	6.3	6.3	6.3
Agar	0.7	0.7	0.7	0.7	0.7	0.7

貧栄養条件前蛹または、幼虫後期特異的な栄養源の影響を解析した実験では、AEL0 時間または AH0 時間で発生タイミングを揃えた幼虫を実験に適したタイミングまで標準培地で飼育した後、薬さじによって飼育培地ごとシャーレに幼虫を移し、蒸留水で洗浄した後に各種培地へ移行した。

3-6. Western blotting 法

ステージングを行った前蛹 1 個体を微小遠心管に採取し、通常個体は 50 μ l、貧栄養条件前蛹は 25 μ l の SDS-PAGE sample buffer (1%SDS, 10mM Tris-HCL (pH6.8), 0.02M DTT, 0.01% BPB, 4% Glycerol) 中でペレットミキサーを用いてすり潰し、ホモジェネートを作製した。ホモジェネートは使用時まで -80°C で保存した。SDS-PAGE は、濃縮ゲル 4%および分離ゲル 8%で作製し、 95°C で 5 分間熱処理したホモジェネートを 10 μ l ずつアプライした後、20mA の一定電流で約 2 時間行った。電気泳動終了後、transfer buffer (192mM Glycin, 25mM Tris, 20% MtOH) にゲルを 15 分間浸した後、5 分間 transfer buffer に浸しておいたニトロセルロースメンブレン (Whatman) 上に置き、メンブレンと同様の処理を施したフィルターペーパーで挟んだ状態で、Trans-blot SD Semi-Dry Transfer Cell (Bio-Rad) を用いて 12V で 30 分間メンブレンへ転写した。転写終了後、メンブレンは 3%Trichloroacetic Acid, 3%Sulfosalicylic Acid に溶解した 0.2%Ponceau S (Nacalai) で約 1 分間振盪し、TBST (10mM Tris-HCL (pH8.0), 150mM NaCL, 0.05% Tween20) でリンス後、転写されたタンパク量を確認した。その後、TBST で 10 分間ずつ 3 度洗浄した。次に、5%Skim milk を含む TBST で 2 時間振盪してブロッキングを行った後、5%Skim Milk を含む TBST で 5000 分の 1 に希釈した anti-FTZ-F1 を 1 時間反応させた。1 次抗体反応終了後、メンブレンを TBST で 10 分間ずつ 3 度洗浄し、5%Skim Milk を含む TBST で 1 万分の 1 に希釈した anti-rabbit HRP (Cappel) で 2 時間反応させた。2 次抗体反応終了後、メンブレンを TBST で 10 分間ずつ 3 度洗浄し、Immobilon Western (MILLIPORE) で 5 分間反応させ、得られたシグナルを X 線フィルムに露光することで FTZ-F1 を検出した。

3-7. Total RNA 抽出および cDNA 合成

NucleoSpin RNA (TaKaRa) を用いて Total RNA を抽出し、約 100 μ l の核酸抽出液を得た。核酸抽出液は 10 μ l の 3M NaOAc と 300 μ l の 100% cold-EtOH を加えて -20°C で 30 分間放置した後、 4°C 、15,000rpm で 15 分以上遠心して、上清を取り除いた。沈殿を 10 分間室温で乾燥させた後、11 μ l の RNase Free Water に溶かして Total RNA を得た。

得られた Total RNA の濃度は Nano-Drop ND-1000 (LMS) を用いて測定した。各サンプル 1 μ g の Total RNA と RNase Free Water で 9 μ l の Total RNA 溶液を調整し、これを cDNA 合成の template とした。template は 65°C で 15 分間熱処理した後、11 μ l の ReverTra Ace solution (※) を加え、PCR サーマルサイクラー (TaKaRa) を用いて 30°C 10 分間 $\rightarrow 42^{\circ}\text{C}$ 60 分間 $\rightarrow 99^{\circ}\text{C}$ 5 分間インキュベートすることで逆転写反応をおこし、cDNA を合成した。

※ReverTra Ace solution

5×ReverTra buffer (TOYOBO)	4.0 μl
dNTP mixture (2mM) (TaKaRa)	5.0 μl
Oligo (dT) primer (10 pmol/μl, 15 mer) (Novagen)	0.5 μl
RNase inhibitor (40 unit/μl) (TaKaRa)	0.5 μl
ReverTra Ace (100 unit/μl) (TOYOBO)	1.0 μl
TOTAL	11 μl

3-8. RT-PCR 法

合成した cDNA を TE で 20 倍に希釈して template とし, PCR サーマルサイクラー (TaKaRa) を用いて PCR 反応をおこなった後, 6%の TBE-ポリアクリルアミドゲルで電気泳動した。ゲルは LAS-4000mini (FUJIFILM) で撮影してバンドを検出し, 解析に用いた。

① PCR 反応液の調整

10×One Taq buffer (Biolabs)	1.0 μl
dNTP mixture (2.5mM) (TaKaRa)	0.8 μl
Upper primer (10 pmol/μl)	0.2 μl
Lower primer (10 pmol/μl)	0.2 μl
One Taq Polymerase (5 unit/μl) (Biolabs)	0.1 μl
mili Q	5.7 μl
cDNA	2.0 μl
TOTAL	10 μl

② PCR サイクル

95°C 2 分間

↓

94°C 30 秒間

↓

55°C 2 分間

↓

72°C 30 秒間

↓

72°C 5 分間

× 各 primer に応じたサイクル数

③ 使用した primer とサイクル数

遺伝子名		primer 配列	サイクル数
<i>Blimp-1</i>	Upper	5'-CGCACCTCCAGAAGCATCAT	30
	Lower	5'-GGGCAGAGATCACAGGCATA	
<i>E74A</i>	Upper	5'-ACTGTGCCACCAAGCTGGAGT	32
	Lower	5'-CGCTGAGCTTGTCCATTCGCTT	
<i>E75A</i>	Upper	5'-AGCCGCAGCAGCAAATG	28
	Lower	5'-ACCCGAGTGGTGCAGAT	
<i>ftz-f1</i>	Upper	5'-GCCGATTCCAGAAGTGCCTC	27
	Lower	5'-GCTTGATGTCCGGACCCATC	
<i>PTHH</i>	Upper	5'-TGAGGATCTGGTGACCACCAAACGCA	28
	Lower	5'-TTCCAGTGGCCTGCAATTGGATCCA	
<i>shade</i>	Upper	5'-GATGACGAGGCTGCTGGATTAC	32
	Lower	5'-AGCACCGGGATCTCCAGTAACA	
<i>rp49</i>	Upper	5'-CCACCAGTCGGATCGATATG	27
	Lower	5'-CACGTTGTGCACCAGGA ACT	

④ TBE-ポリアクリルアミドゲル電気泳動

作成後約 30 分間の予備泳動をした 6% の TBE-ポリアクリルアミドゲルに、1 μ l の TypeII Gel-loading Buffer (0.25% Bromophenol blue, 0.25% Xylene cyanol, 15% Ficoll (Type400 Pharmacia)) を加えた PCR 産物を 4.0 μ l ずつアプライし、90V で約 2 時間の電気泳動をおこなった。電気泳動終了後、0.5 μ g/ml ethidium bromide 溶液中で 30 分間振盪することで染色し、LAS-4000mini (FUJIFILM) でバンドを検出した。

4. 結果と考察

第1章

蛹化タイミングを決定する生物タイマーの分子機構と存在部位

I-1. 序論

生物の発生に要する時間は種特異的にある程度決まっており、生物にはある発生イベントから次の発生イベントが起こるまでの時間を計測する生物タイマーと呼べる機構が備わっていると考えられる。完全変態昆虫であるショウジョウバエの前蛹期間は、幼虫から前蛹となる囲蛹殻形成から、前蛹が蛹となる蛹化までの期間であり、発生マーカーが明確なだけでなく、25°Cの恒温飼育条件下ではおよそ12時間と決まっている (Fig. 1)。そのために、囲蛹殻形成から12時間を計測し、蛹化タイミングを決める生物タイマー機構に着目して先行研究はおこなわれ、転写抑制因子 *Blimp-1* に制御される転写因子 *FTZ-F1* の発現時期が蛹化タイミングを決定する制御機構が明らかにされた (Fig. 4)。本研究では *FTZ-F1* の発現時期が蛹化タイミングを決定する制御機構の未解明部分を明らかにするとともに、解析している生物タイマー機構の存在部位を特定することで生物学的意義を示すことを目的とした。

I-2. 結果

I-2-1. 蛹化タイミングを最終決定するのは20Eである

3齢幼虫後期の前胸腺において、*FTZ-F1* がE合成遺伝子の一部の転写制御に関わることが示されていることから、蛹化タイミングを決める生物タイマー機構においても、*FTZ-F1* がE合成に関わる酵素遺伝子の転写制御に関わり、前胸腺で生物タイマーが機能している可能性が高いと考えられた。一方で、研究の開始段階においては、Eが前胸腺から放出されるタイミングが蛹化タイミング決定に重要であるとされ、総説 (Thummel, 1996)にも書かれていたにも関わらず、それを決定づける証拠は示されていなかった。そこで、最初に前蛹期でEが生合成および放出されるタイミングの蛹化タイミング決定における重要性を検証するために、前蛹後期に起きる内在性のエクダイソンパルスよりも数時間早いAPF8時間にEをインジェクションし、蛹化タイミングを観察した (Fig. 5)。しかし、予想に反してEのインジェクションによって蛹化タイミングが有意に早まることはなかった。そこで、同条件で20Eのインジェクションをおこなった。その結果、蛹化タイミングの平均時間はRSをインジェクションしたコントロールと比較して平均24分早まり、KS検定により有意な差があることが示された。幼虫期にはEが20Eに変換されるのは脂肪体や中腸であること (Petryk et al, 2003)から、この結果は、蛹化タイミングを決定するのは前胸腺からEが放出されるタイミングだという定説を覆し、Eが血リンパによって末梢組織に運搬された後に20Eに変換されるタイミングが重要であることを強く示唆した。加えて、この結果は

前胸腺以外の末梢組織のどこで生物タイマーが機能しているのかという新たな疑問を生じさせた。

I-2-2. 脂肪体における *shade* 遺伝子の発現が蛹化タイミング決定に重要である

蛹化タイミング決定において *Blimp-1* 遺伝子と *ftz-f1* 遺伝子が重要な役割を果たすことは示されていたが、これらの遺伝子は様々な組織で発現が確認されていたことから、生物タイマーの存在部位は特定されていなかった。また、上述の実験により、E が 20E に変換されるタイミングが重要であることが示されたため、E の変換酵素 Shade をコードする *shade* 遺伝子の前蛹期での発現パターンが重要となった。しかし、*shade* 遺伝子は幼虫期において脂肪体と中腸での発現が高いことが報告されているだけで(Petryk et al, 2003)、前蛹期における時期および組織特異的な発現パターンは知られていなかった。そこで *shade* 遺伝子を組織特異的に強制発現および発現抑制することで、生物タイマーの所在の特定を試みた。その結果、脂肪体特異的な *shade* 遺伝子の強制発現によって蛹化タイミングはコントロールと比較して平均 30 分早まり、発現抑制によって蛹化タイミングは平均 18 分遅延した。双方の結果は共に、KS 検定により有意な差があることが示された (Fig. 6)。この結果より、蛹化タイミング決定において機能する *shade* 遺伝子の主要な発現器官が脂肪体であることが示唆された。脂肪体以外にも神経、グリア、筋肉、上皮組織特異的に同様の検証をおこなったところ、神経 (Fig. 7A)、筋肉 (Fig. 7C, D)、上皮組織 (Fig. 7E) 特異的な *shade* 遺伝子の強制発現によって蛹化タイミングは有意に早まった。しかし、グリア特異的な *shade* 遺伝子の強制発現によって蛹化タイミングへの影響は観察されなかった (Fig. 7B)。その一方で、*shade* 遺伝子の発現抑制による影響を検証した全ての組織において、蛹化タイミングが有意に遅延することはなかった (Fig. 7A, C, D, E)。

I-3. 考察

I-3-1. 蛹化タイミング決定における 20E と *shade* 遺伝子の重要性

本実験を始めた当初、E の体内濃度が上昇することで、それまでに同定されていた *ftz-f1* 遺伝子と *Blimp-1* 遺伝子を中心とした蛹化タイミングを決定する生物タイマーが動くと予想していたため、本来 E が放出されるより早いタイミングに E をインジェクションすることにより、蛹化タイミングを早めることができると予想していた。しかし、インジェクションする E の濃度やタイミングを変えても蛹化が早まることはなく、20E のインジェクションによって蛹化が早まった。また、*shade* 遺伝子の強制発現で蛹化タイミングが早まり、ロックダウンにより蛹化タイミングが遅れたことから、E はあくまで 20E の前駆物質であり、蛹化タイミングを決定するのは E が 20E に変換されるタイミングであることが強く示唆された (Fig. 5)。しかし、20E のインジェクションによって蛹化タイミングを早めることができるのは 30 分程度であり、実際に APF8 時間より前に 20E をインジェクションしても蛹化を早めることはできなかった (data not shown)。その理由としては、インジェクションされた 20E に細

胞コンピテンスが間に合わなかった可能性が考えられた。また、*shade* 遺伝子の強制発現によっても同様に、蛹化タイミングを早めることができるのは 30 分程度であり、その理由としては、*shade* 遺伝子が発現しているにもかかわらず、E が合成および放出されて全身に存在していなければ蛹化を早めることができない可能性が考えられた。さらに、*shade* 遺伝子のノックダウンによって誘導できる蛹化タイミングの遅れもまた、30 分程度であった。このような蛹化タイミングの遅延が観察された系統は、複数の *shade* RNAi 遺伝子が挿入されており、単一の *shade* RNAi 遺伝子挿入系統では蛹化タイミングの遅れは観察されなかったことから、RNAi によるノックダウンのレベルは低く、*shade* 遺伝子がある程度のレベルで発現していることによって E の 20E への変換が起こるために、蛹化タイミングの遅れる限界がある可能性が考えられた。

さらに、共同研究者が *Blimp-1* 遺伝子の発現を内在性の発現時期よりも 1 時間延長させた個体で、複数のエクダイソン生合成遺伝子の発現パターンを調べたところ、他のエクダイソン生合成遺伝子よりも *shade* 遺伝子の発現のみが顕著に遅れることが示され、これらの結果は *Blimp-1* 遺伝子の発現延長によって *ftz-f1* 遺伝子の発現タイミングが遅延し、*shade* 遺伝子の発現タイミングが遅れたためと考えられた。また、*Blimp-1* 遺伝子の発現延長による蛹化の遅れも観察された。さらに、*shade* 遺伝子は前蛹中期には発現が見られないが、前蛹中後期に発現していること、前蛹期に *ftz-f1* 遺伝子をノックダウンすると *shade* 遺伝子の発現が顕著に低下すること、および前蛹中期での FTZ-F1 の強制発現によって *shade* 遺伝子が誘導されるというデータを共同研究者が得た。以上のことから、FTZ-F1 が *shade* 遺伝子の発現を制御しており、FTZ-F1 によって誘導された *shade* 遺伝子の産物によって E が 20E に変換されるタイミングが蛹化タイミング決定に重要であるというデータがさらに支持され、蛹化タイミングを決める生物タイマーの分子機構の全容が明らかになった。

I-3-2. 同定された生物タイマー機構は脂肪体に存在する

蛹化タイミングを決める生物タイマーの分子機構の最終段階は、全身に運搬された E が変換酵素 Shade によって 20E に変換される段階であることが明らかになったため、Shade をコードする *shade* 遺伝子に着目し、生物タイマーの所在の特定を試みた。その結果、脂肪体特異的な *shade* 遺伝子の強制発現によって蛹化タイミングは早まり、発現抑制によって遅延した (Fig. 6)。脂肪体以外でも神経、グリア、筋肉、上皮組織特異的に同様の検証をおこない、神経、筋肉、上皮組織特異的な *shade* 遺伝子の強制発現によって蛹化タイミングが有意に早まること確認された (Fig. 7) が、検証をおこなったいずれの組織においても *shade* 遺伝子の発現抑制によって蛹化タイミングが有意に変化することはなかった。この結果は、脂肪体以外の組織では元々 *shade* 遺伝子の発現がない、あるいは発現していたとしても蛹化タイミング決定に寄与する発現ではないということを示唆した。また、*shade* 遺伝子の強制発現で蛹化タイミングが早まったのは、E は血リンパによって全身に運搬されて存在していると考えられるため、異所的に強制発現された *shade* 遺伝子によって各組織で E が 20E に変換されたため、蛹化を誘導したと考えられた。一方で、グリア特異的な *shade* 遺伝

子の強制発現では、他の組織のように蛹化タイミングが早まることはなく、血リンパによって全身に運搬されると考えられている E の分布がグリアにはない可能性や、グリアの組織量の少なさから、蛹化を誘導するほどの 20E が合成されなかった可能性が考えられた。以上のことから、生物タイマーの機能している器官は脂肪体であることが強く示唆された。その後、共同研究者によって前蛹期においても *shade* 遺伝子の発現が脂肪体で高いことが示され（中山, unpublished data), 本実験結果が支持された。また、共同研究者によって *Blimp-1* 遺伝子と *ftz-f1* 遺伝子についても脂肪体特異的な発現の重要性が検証された結果, *Blimp-1* 遺伝子と *ftz-f1* 遺伝子も *shade* 遺伝子同様に、脂肪体での発現が蛹化タイミング決定において重要であるというデータが示され、同定された生物タイマーは脂肪体で機能しているということが示された。

I-3-3. 蛹化タイミングを決める生物タイマーが脂肪体で機能している生物学的意義
以上をまとめると、同定された生物タイマーが機能しているモデル図は Fig. 8 のようになる。脂肪体は栄養状態を感知する器官であると同時に、摂食行動可能な幼虫期に囲蛹殻形成から羽化までに必要な脂質を蓄える器官でもある。同定された生物タイマーが脂肪体で機能していることから、栄養状態の影響を受けることが強く示唆された。事実、囲蛹殻形成までに脂肪体に蓄積された脂質を動員することでその後の変態は進行するが、この脂質動員を引き起こす主なホルモンはエクジステロイドであると考えられている(King-Jones and Thummel, 2005)。また、発生の進行は、発生ステージの移行タイミングと成長が適切に制御されることが必要不可欠である。実際に、幼虫期に 20E を過剰摂取させる、または前胸腺での E の生合成を過剰に促進することで幼虫の成長が遅れることと、反対に E の受容体を全身的にノックダウンすることにより幼虫の成長が早まることが知られており(Colombani et al, 2005), E や 20E の成長阻害機能における唯一の中継組織が脂肪体であることも示されている(Delanoue et al, 2010)。幼虫期の成長は栄養状態と切り離して考え難く、これらの事実も同定されたタイマーが栄養状態から影響を受ける可能性を支持していると考えられた。よって、同定された生物タイマーが脂肪体に存在することは、単にタイミングを決めるだけでなく、栄養状態の変化とそれによって生じる様々な問題に適応して発生時間を調節するためである可能性などが考えられた。

第2章 栄養シグナルが生物タイマーに与える影響の解析

II-1. 序論

脂肪体は個体の栄養状態を感知し、個体サイズの決定にも関わる器官であることが明らかになっている(Nijhout et al, 2014)。完全変態昆虫の成虫は外骨格を持ち、成虫になってからサイズが変わることはない。つまり囲蛹殻形成までの栄養状態が一生のサイズを決定する。このことから、成長可能な幼虫期間を決定する発生タイミングの調節も、生物のサイズを決定する重要な要素であると考えられる。ショウジョウバエの幼虫を、十分な栄養が摂取可能な標準培地において 25°C の恒温条件下で孵化直後から幼虫を飼育した場合、幼虫の半数は AEL84 時間頃まで生育すると、飢餓状態に置かれても、標準培地で飼育を続けた場合と同様に、一定時間後に変態を開始するといわれる **Critical weight (CW)** と呼ばれる重量に到達する (Fig. 9)。また CW 到達後、囲蛹殻形成までの約 36 時間は **Terminal Growth Period (TGP)** と呼ばれ、ここでの成長が最終的なサイズを決める。本研究では、TGP における成長と栄養状態が同定された生物タイマーに与える影響を調べた。

一方、蛹化タイミングを決める生物タイマーの分子機構に深い関わりのある遺伝子の中には、E によって誘導される遺伝子があり、これらの遺伝子は様々なタイミングで発現することで変態行動に関与すると同時に、同定された生物タイマーにも影響を与えていると考えられる。そのために、本研究で栄養状態のシグナルが蛹化・羽化のタイミング決定に与える影響を解析するにあたり、同定された生物タイマーではたっている因子だけでなく、生物タイマーを取り巻く関連因子への影響も調べることで、生物タイマーが脂肪体で機能している生物学的意義の理解を深めることを目的とした。

II-2. 結果

II-2-1. 標準の飼育条件における発生時間は雌雄で異なる

これまで発生の研究において蛹期以前のステージで雌雄を分けた解析はほとんどおこなわれていないが、栄養状態が生育に与える影響は雌雄で異なる可能性があると考えられた。実際に、第2章で述べた 20E のインジェクション実験においても、雌雄を分けて実験をおこなった場合には、蛹化タイミングを早める効果の高いインジェクションタイミングが雌雄で異なっていた (data not shown) ため、まず標準条件で飼育された野生株を用いて発生プロファイルを調べ、雌雄間でその結果を比較した (Fig. 10)。その結果、幼虫期間はメスに比べて、オスの方が平均で約 5 時間短いということが明らかになった (Fig. 10A)。これに対して、前蛹期間は平均で約 12 分、蛹期間は平均で約 3 時間半メスの方が短いという結果になった (Fig. 10B, C)。いずれのステージにおいても、雌雄間の時間的な発生進行の違いは無視できるものではないと考えられたため、以後の実験は全て雌雄を分けておこなうこととした。

II-2-2. 3 齢幼虫後期特異的な飢餓状態により囲蛹殻形成後の変態タイミングが遅れる

本研究では発生進行の個体差を考慮し、一般的に CW に到達するとされる AEL84 時間から 4 時間後の AEL88 時間から飢餓状態にした個体を貧栄養条件個体または貧栄養条件前蛹として用い、一方で孵化直後から囲蛹殻形成まで標準培地で飼育を続けた標準条件個体または標準条件前蛹を全実験のコントロールとして用いた。

まず、貧栄養条件前蛹と標準条件前蛹であるコントロール前蛹の平均体積を比較すると、オスで 42.9%、メスでは 52.8% も小さくなっていた (Fig. 11A, B)。次に、貧栄養条件前蛹とコントロール前蛹の蛹化タイミングを比較した結果、オスの貧栄養条件前蛹では蛹化タイミングが平均で約 2 時間遅れ (Fig. 12A)、メスでは平均で約 1.5 時間遅れていた (Fig. 12B)。また、貧栄養条件前蛹では蛹化タイミングのばらつきもコントロールと比較して大きかった。なお、貧栄養条件におけるメスの蛹化率が 84.6% であるのに対して、オスの蛹化率は 39.0% であった。さらに、蛹化後も観察を続けて羽化タイミングを比較した結果、オスの貧栄養条件前蛹では羽化タイミングが平均で約 5.5 時間遅れ (Fig. 13A)、メスでは平均で約 5 時間遅れた (Fig. 13B)。また、蛹化タイミングと同様に、羽化タイミングについても個体間のばらつきがコントロールと比較して大きくなり、羽化率についてもメスが 53.8% であるのに対して、オスは 24.4% と低い羽化率となった。これらの結果から、貧栄養状態のシグナルが蛹化と羽化のタイミング決定に影響を与えることが明らかになった。なお、ここで示す蛹化率および羽化率は、蛹化タイミングを観察するために APF0 時間で回収した前蛹の個体数を分母として算出したものである。

II-2-3. 3 齢幼虫後期特異的な飢餓状態は前蛹期における FTZ-F1 の発現開始を遅らせる

次に同定された蛹化タイミングを決めるタイマー機構に貧栄養状態がどのように影響を与えたかを解析するために、貧栄養条件前蛹を用いてタイマー機構において重要な因子の一つである FTZ-F1 の APF6 時間から APF9 時間までの発現パターンを Western blotting 法によって調べた (Fig. 14)。その結果、コントロールのオスでは APF6.5 時間から FTZ-F1 の発現が観察され、APF7.5 時間ではかなり高いレベルの発現が観察され、その後 APF9 時間にかけて発現レベルはさらに上昇していた (Fig. 14A)。これに対して、貧栄養条件前蛹のオスでは APF7.5 時間から FTZ-F1 の微弱ながら明らかな発現が観察され、APF8 時間から APF9 時間にかけては、個体によっては高いレベルでの発現がみられたが、APF9 時間でも弱い発現しか観察されない個体もあった (Fig. 14A)。コントロール前蛹のメスでも APF6.5 時間から FTZ-F1 の発現は観察され、APF7.5 時間以降は強い発現が安定して観察された (Fig. 14B)。これに対して、貧栄養条件前蛹のメスでは APF7 時間から FTZ-F1 の弱い発現が観察される個体があったが、オスよりも発現開始時期に大きな個体差がみられ、APF8~9 時間でも強い発現が確認できない個体が見られた (Fig. 14B)。

II-2-4. 貧栄養条件のオス前蛹個体における生物タイマー分子機構関連遺伝子の発現パターン

貧栄養状態のシグナルが、蛹化タイミングを決めるタイマーの分子機構において前蛹中後期での FTZ-F1 の発現タイミングを遅延させることが明らかになった。これにより、その上流にある *ftz-fl* 遺伝子を含むタイマー分子機構の遺伝子とエクジソン関連遺伝子の発現パターンに貧栄養状態のシグナルが与える影響を解析し、オスの結果を Fig. 15 と Fig. 16 に示した。まず、タイマーの分子機構において FTZ-F1 の発現を抑制制御している *Blimp-1* 遺伝子の発現を調べたところ、コントロール前蛹では APF5 時間で発現が減少し、APF6 時間でほぼ消失するのに対し、貧栄養条件前蛹では APF7 時間でようやく発現が明らかな減少を示し、APF8 時間でほぼ消失していた (Fig. 15A)。次に、コントロール前蛹では *Blimp-1* の発現が減少する APF5 時間に先立ち、APF4 時間から *ftz-fl* 遺伝子の発現が上昇し始め、APF7 時間にかかなり高い発現に達していた。これに対して、貧栄養条件前蛹では APF5, 6 時間の発現開始タイミングに個体差がみられ、APF7 時間以降では高いレベルの安定した発現が確認できた (Fig. 15A)。また、コントロール前蛹の前蛹前期における *shade* 遺伝子の発現は APF1 時間まで強い発現が観察されたのに対し、貧栄養条件前蛹では APF0 時間でのみ強い発現が観察された (Fig. 15B)。また、コントロール前蛹では前蛹中期においても *shade* 遺伝子の発現が観察され続け、APF10 時間まで一定のレベルで発現が確認されたが、内部コントロールである *rp49* 遺伝子の発現が APF9 時間から APF12 時間にかけて減少していることから、APF9~10 時間で観察される *shade* 遺伝子の発現は相対的に上昇したと考えられ、その後 APF11 時間から発現が消失していた (Fig. 15B)。一方で、貧栄養条件前蛹でも前蛹中期において *shade* 遺伝子の低い発現が観察され、APF9 時間から徐々に発現レベルが上昇し、その発現は APF12 時間まで確認された (Fig. 15B)。これらの同定されたタイマーの分子機構で重要な役割を果たす遺伝子の解析結果に加え、エクジステロイドパルスに直接発現を誘導される初期遺伝子 *E75A* 遺伝子と *E74A* 遺伝子も同様に発現パターンを調べた (Fig. 16)。コントロール前蛹においては、*E75A* 遺伝子は APF2 時間から発現が急激に低下し、蛹化を誘導するエクジステロイドパルスと同時期の APF9 時間に発現が再上昇していた (Fig. 16A)。これに対して、貧栄養条件前蛹では APF3 時間から明らかに緩やかな発現低下が観察され、解析をおこなった APF9 時間まででは *E75A* 遺伝子の発現再上昇は観察されなかった (Fig. 16A)。同様に、コントロール前蛹における *E74A* 遺伝子の発現は APF2 時間から低下し始め、APF5~8 時間までかなり低い発現が維持された後、やはり蛹化を誘導するエクジステロイドパルスと同時期の APF9~10 時間で一過的に発現が上昇した (Fig. 16B)。これに対して、貧栄養条件前蛹では APF3~4 時間で一時的に発現が低下したが、APF5~8 時間では発現がゆるやかに上昇し、APF9 時間から高い発現となり、この高い発現は APF12 時間まで維持されていた (Fig. 16 B)。さらに、前胸腺にはたらきかけてエクジステロイドの生合成を誘導する *PTTH* 遺伝子についても、同様に発現パターンを解析した。その結果、*PTTH* 遺伝子の発現はコントロール前蛹では APF3 時間から上昇

し、APF5～8 時間で高い発現維持された後、低下するというパターンがみられた。対して、貧栄養条件前蛹では *PTTH* 遺伝子の発現は APF4 時間で一過的に明らかな上昇が観察されたが直ちに低下し、全体的に低い発現しか観察されなかった (Fig. 16A)。

II-2-5. 貧栄養条件のメス前蛹個体における生物タイマー分子機構関連遺伝子の発現パターン

II-2-4 に示すオスの結果と同様の解析をメスについてもおこない、その結果を Fig. 17 と Fig. 18 に示した。まず、タイマーの分子機構において FTZ-F1 の発現を抑制制御している *Blimp-1* 遺伝子の発現を調べたところ、コントロールでは APF5 時間から発現が減少し始め APF6 時間で低レベルになったのに対し、貧栄養条件前蛹では APF6 時間で、コントロールの APF5 時間と同程度の発現レベルとなり、APF7 時間で発現が低レベルになった (Fig. 17A)。次に、コントロール前蛹では *Blimp-1* 遺伝子の減少する APF5 時間に先立ち、APF3 時間から *ftz-fl* 遺伝子の発現が上昇し始め、APF5 時間で明確な発現が観察されるようになり、APF7 時間でかなり高い発現に達していたのに対して、貧栄養条件前蛹では APF5～6 時間の発現レベルは低く、また個体差がみられ、APF 7 時間でより高いレベルに達するものの、APF8 時間以降でもコントロール前蛹の同じ時間と比較するとその発現レベルは低かった (Fig. 17A)。また、コントロール前蛹の前蛹前期における *shade* 遺伝子の発現は APF1 時間まで強い発現が観察され、その後 APF3 時間までに低下したのに対し、貧栄養条件前蛹では APF0 時間でのみ強い発現が観察され、APF2 時間までに低下した (Fig. 17B)。また、コントロール前蛹では前蛹中期においても *shade* 遺伝子の低い発現が観察され続け、APF8～9 時間で上昇した後、APF10 時間以降は発現が消失していた。一方で、貧栄養条件前蛹では前蛹前中期にあたる APF2～7 時間では *shade* 遺伝子の発現はほとんど観察されず、APF8～11 時間で上昇している個体がみられたが、必ずしも高いレベルでの発現が観察されるわけではなく、個体差があることが示唆された (Fig. 17B)。次に、エクジステロイドパルスに直接発現を誘導される初期遺伝子 *E75A* 遺伝子と *E74A* 遺伝子も同様に発現パターンを調べたところ (Fig. 18)、コントロール前蛹においては、*E75A* 遺伝子は APF2～4 時間にかけて発現が緩やかに低下し、蛹化を誘導するエクジステロイドパルスと同時期の APF9 時間に発現が再上昇していた (Fig. 18A)。これに対して、貧栄養条件前蛹では APF3 時間から発現がほぼ消失し、解析をおこなった APF9 時間まででは発現の再上昇は観察されなかった (Fig. 18A)。一方で、コントロール前蛹における *E74A* 遺伝子の発現は APF5～7 時間でやや低下し、*E75A* 遺伝子と同様に蛹化を誘導するエクジステロイドパルスと同時期の APF8～10 時間で一過的に発現が上昇した (Fig. 18B)。これに対して、貧栄養条件前蛹では APF3～7 時間で発現が低下した後、APF8～9 時間で高いレベルの発現が観察された個体がみられ、APF10～12 時間においてはほとんどの個体で高い発現が観察されていた (Fig. 18B)。さらに、前胸腺にはたらきかけてエクジステロイドの生合成を誘導する *PTTH* 遺伝子についても、同様に発現パターンを解析した結果、*PTTH* 遺伝子の発現はコントロール前蛹では APF4 時間からゆるやかに上昇し始め、APF8～9 時間ではかなり高い発現に達してい

た (Fig. 18A)。これに対して、貧栄養条件前蛹では *PTTH* 遺伝子の発現は APF4~5 時間で一過的に上昇したが、すぐに低下し、全体的に低い発現しか観察されなかった (Fig. 18A)。

II-2-6. 3 齢幼虫後期におけるグルコース摂取量の変化は蛹化タイミングに影響を及ぼす

これまで、TGP における飢餓状態が蛹化タイミングを決める生物タイマーの分子機構に関わる遺伝子の前蛹期における発現パターンに与える影響を解析し、貧栄養条件は同定されたタイマー機構のキー因子である *Blimp-1* 遺伝子、*ftz-fl* 遺伝子および *shade* 遺伝子の発現に影響することが示された。また、その影響はエクジステロイドパルスに関連する遺伝子にも及んでいた。ここで、標準培地に含まれる栄養源は複数あることから、TGP において完全飢餓状態ではない栄養条件で飼育した場合、同定された生物タイマーに影響があるか否かを調べた (Fig. 19)。実験方法としては、貧栄養条件と同様に 3 齢幼虫後期特異的に培地に含まれるアミノ酸源であるイーストと、糖であるグルコースの濃度を変えて蛹化タイミングを観察することで、生物タイマーへの影響を解析した。その結果、蛹化タイミングはグルコース摂取量の影響を受けて変化することが明らかになった。オスにおいては、蛹化タイミングが低グルコースによってコントロールより平均で 40 分早まっていた (Fig. 19A)。一方で、必須アミノ酸源であるイーストの濃度を幼虫期全体で変化させると、イーストの濃度が高いほど幼虫発生が早く進行することが報告されている (Shimada and Niwa et al, 2014) にも関わらず、3 齢幼虫後期特異的な低イーストは蛹化タイミングをコントロールに比べてわずかに早めたが、高グルコースよりも蛹化タイミングへの影響が少なかった (Fig. 19A)。また、メスについては低グルコースによってコントロールより平均で蛹化が 26 分早まり、高グルコースによって平均で 14 分遅延していた。さらに、低イーストによってわずかに早まるという結果になったが、その差は有意とは言えず概ねオスと同じ結果となった (Fig. 19B)。

II-2-7. 培地に含まれるグルコース濃度と幼虫の成長速度は反比例する

前述の実験より、TGP におけるグルコース摂取量が生物タイマーの分子機構に影響を与えることが示唆された。グルコースは幼虫発生に必須ではないため、孵化直後から 0, 5, 10, 20% とグルコース濃度を変えた培地で飼育した幼虫の囲蛹殻形成タイミングを観察し、幼虫期を測定した。その結果、グルコース濃度が高ければ高いほど、幼虫期間は延長することが分かった (Fig. 20A)。加えて、グルコースの発生時間への影響には雌雄差があり、高グルコースによる幼虫期間延長の影響はオスでより顕著にみられ、標準飼育条件ではメスの方が長い幼虫期間が、20% グルコースの培地ではオスの方が長くなっていた (Fig. 20A)。また、AEL96 時間において各培地で飼育した幼虫のサイズを比較したところ、グルコース濃度が高い培地で飼育することによって成長速度が低下していることが明らかになった (Fig. 20B)。さらに、幼虫サイズの比較写真から、最もグルコース濃度の高い 20% グルコース培地で飼育された幼虫は AEL96

時間においてまだ2 齢幼虫であり，著しい成長速度の低下が示された。

II-3. 考察

II-3-1. 発生過程における雌雄差

II-2-1 より前蛹と蛹期間はオスの方が長い，幼虫期間はメスの方が長いことが示された (Fig. 10)。また，II-2-2 より標準条件で囲蛹殻形成まで飼育した場合，キイロショウジョウバエはオスよりメスの方が大きくなるが，AEL88 時間から飢餓状態にした前蛹の体積には雌雄差がほとんどなかった (Fig. 11) ことから，成長速度は雌雄でほぼ同じであるために，最終到達サイズの大きいメスの方が幼虫期は長くなる可能性が考えられた。また，メスの CW がオスよりも大きいことが幼虫期間に雌雄差を生じさせている可能性も考えられた (小山博士 私信)。さらに，標準条件における幼虫期間はメスの方が長いため，雌雄ともに AEL88 時間から飢餓状態にした場合，メスの方が蛹化率は低くなると予想されたが，意外なことに貧栄養条件におけるメスの蛹化率が 84.6% であるのに対して，オスの蛹化率は 39.0% であった (Fig. 12)。

摂食行動をしない囲蛹殻形成後のステージにおいて必要なエネルギーは，それ以前に脂肪細胞に蓄積された脂質を分解して補われ，この脂質動員は EcR が媒介するエクジステロイドの正の制御を受けることが知られている (Kamoshida et al, 2012)。よって，雌雄の蛹化タイミングが異なることから，脂質動員のタイミングや効率が，メスの方が優れているために，蛹化や羽化が早い可能性などが考えられた。

II-3-2. 貧栄養ストレス応答における雌雄差

II-2-2 より，TGP における貧栄養状態によって生じる蛹化と羽化のタイミングの遅れはオスでより顕著であったこと (Fig. 12, 13) から，貧栄養に対する耐性はメスの方が強く，栄養という環境ストレスに適応して発生時間の恒常性を維持する能力はメスの方が優れていると推察された。II-3-1 で述べたように，CW はメスのほうが重い可能性が考えられ，実際に雌雄ともに AEL88 時間で飢餓状態に移行した本実験条件では，囲蛹殻形成した個体の多くがオスであり，メスの囲蛹殻形成した個体数は非常に少なかった。しかし，貧栄養条件前蛹の蛹化率と羽化率はともにメスの方が高く，CW という発生チェックポイント通過後に発生の進行を維持する能力はメスの方が優れているという考えが支持された。今後の解析においては，CW が雌雄で異なる可能性を認識し，飢餓状態への移行時期を雌雄で分けることが必要となると考えられた。

II-3-3. TGP における貧栄養状態が同定された生物タイマー機構に与える影響

II-2-3, 4, 5 の結果を総合して，*Blimp-1* 遺伝子の発現時期が延長したことによって，*ftz-fl* 遺伝子とその下流にある *shade* 遺伝子の発現開始時期が遅れたと考えられたことから，貧栄養のシグナルは *Blimp-1* 遺伝子より上流に入力されていることが示唆された (Fig. 15, 17)。さらに，エクジステロイドパルスに応じて発現が変化する初期遺伝子 *E75A* 遺伝子および *E74A* 遺伝子については，コントロール前蛹では囲蛹殻形成直後の高い発現が前蛹前期で素早く低下し，前蛹後期に起こる蛹化を誘導する 20E の

体内濃度上昇と同時期だと考えられる APF9 時間から上昇し、2~3 時間でその発現は消失していた (Fig. 16, 18)。しかし、貧栄養条件前蛹では困蛹殻形成直後の高い発現はゆるやかに低下し、前蛹後期に起こる発現の上昇は APF9~10 時間から始まり、4~5 時間もその発現は継続していた (Fig. 16, 18)。さらに、コントロール前蛹では *PTTH* 遺伝子の発現が前蛹中後期に上昇したが、貧栄養条件前蛹では明確に上昇しなかった (Fig. 16A, 18B)。これらの結果に加えて、*Blimp-1* 遺伝子はエクジステロイドレベルが高い時期にのみ発現するという特徴があるために、貧栄養によって *Blimp-1* 遺伝子の前蛹前期における発現が延長していたことから、貧栄養によって E 合成が十分に誘導されなかったために、変態を誘導するエクジステロイドパルス継続時間が長引く、またはエクジステロイドレベルの上昇や下降が緩やかになることでエクジステロイドパルスがシャープでなくなり、同定されたタイマー機構が厳密に制御されない状態になっている可能性が考えられた。これらは雌雄に共通していたことだが、*Blimp-1* 遺伝子の発現時期の延長や、*ftz-fl* 遺伝子の発現開始時期の遅れはオスでより顕著であり、II-2-2 の結果から考えられた栄養という環境ストレスに対して発生の恒常性を維持する能力はメスの方が優位であるという推察がより支持される結果となった。

II-3-4. TGP における貧栄養状態で変態タイミングにばらつきが生じる原因

貧栄養条件前蛹の蛹化タイミングが遅延するだけでなく、その発現レベルに大きな個体差が見られた原因は、II-2-3 で示した、FTZ-F1 の前蛹中期での発現解析結果から推察できる。コントロール前蛹と比較した場合に、貧栄養条件前蛹における FTZ-F1 の発現タイミングが全体的に遅延するとともに、発現量と発現開始時期に個体差が生じており、これが蛹化タイミングのばらつきを生む一因だと考えられた。

II-3-5. 幼虫発生に影響を与える栄養源

II-2-6 より、TGP における摂取量が、蛹化タイミングを決める生物タイマーの分子機構に与える影響が大きい栄養源はグルコースであることが示された (Fig. 19)。また、幼虫期全体に渡るグルコースの摂取量は幼虫発生に影響を与え、成長速度とグルコース摂取量が反比例することが II-2-7 より示された (Fig. 20)。さらに、0%グルコース培地で飼育した個体はグルコースを含む培地で飼育した場合に比べ、幼虫期間が短くなるにも関わらず成虫サイズは大きくなり、個体サイズもグルコース摂取量と反比例するという結果が得られた (data not shown)。成虫と幼虫に共通する事実として、高グルコース培地を与えると摂食量が減少することが知られている (Pasco and Leopold, 2012; Rovenko et al, 2015)。しかし、高グルコース培地は減少した摂食量を補うに足る高カロリーを含んでいるため、飢餓様の状態になるのではなく、幼虫の成長を阻害したのは別の理由によると考えられた。さらに、高グルコースに関する研究は、哺乳類における肥満や肥満関連疾患のメカニズム解明のために様々な生物を用いてさかんにおこなわれている。ショウジョウバエを用いた研究では、高グルコース培地が幼虫発生を阻害することは既に知られており、その原因は高グルコースが脂肪体に

おけるインスリン耐性を引き起こすことで、インスリンの下流にあるシグナリング活性が低下するためであることが示されている(Pasco and Leopold, 2012)。また、ショウジョウバエの成虫においては、高グルコースによって体内の糖質および脂質の貯蔵が増加すると同時に、体内の水分量が減少することに加え、イースト由来の代謝産物の体内での消費量が著しく増加することが示されている(Rovenko et al, 2015)。さらに、栄養に関する研究では、ショウジョウバエの成虫におけるイーストの摂取量を制限すると、脂質代謝が促進されて寿命が延長することが知られている(Katewa et al, 2016)。低グルコース培地によって幼虫発生が促進されることについては、明確に結論づけた報告がない。しかし、様々な報告を考え合わせると、低グルコース培地を与えられた幼虫は摂食量が増加し、イースト由来の代謝産物の体内での消費が低下することで効率の良い脂質代謝が起こるために、成長速度が増したと推察された。

第3章

生物タイマーへの栄養シグナルの入力経路に関する解析

III-1. 序論

栄養代謝経路に關与する代表的なシグナリングパスウェイにインスリンおよび TOR パスウェイ (Fig. 21) が知られており、インスリンパスウェイは糖の、TOR パスウェイはアミノ酸の情報伝達を主に担う経路である。インスリンおよび TOR パスウェイとショウジョウバエの発生に關する報告は数多く存在し、その多くが幼虫期の成長制御におけるインスリンや TOR パスウェイの機能を解析したものである。その中には、栄養状態と変態タイミングや成虫サイズの制御との関連性が示されたものもいくつかある。そして、ショウジョウバエの幼虫成長を制御する主な栄養源はアミノ酸であり、その摂取量を脂肪体が感知することで成長が適切に制御される (Colombani et al, 2003) ことを示す結果から、TOR パスウェイが成長制御において重要な役割を担うことは明白である。一方、インスリンパスウェイに關しては、*Drosophila insulin-like peptides* (Dilps) の発生や変態における機能解析も幅広くおこなわれている (Okamoto and Yamanaka, 2015)。Dilps は現時点で、8つのサブタイプが同定されており、その中でも、末梢組織から E を抑制する Dilp8 や、脂肪体で機能して 20E によって活性化される Dilp6 などは、変態過程において何らかの機能を果たすことが示唆されている。このような状況下で私は、本研究の第3章で述べたように、幼虫期および TGP における栄養状態が蛹化タイミングを決める生物タイマー機構に影響を与えることを示した。そこで、同定された生物タイマー機構が栄養シグナルを受け取る経路として、インスリンおよび TOR パスウェイが利用されている可能性を検証した。

III-2. 結果

III-2-1. TOR パスウェイは蛹化タイミング決定に影響しない

第3章で述べてきた幼虫期における栄養状態の変化は、当然ながらその後の蛹化タイミングを決めるタイマー機構にも影響を及ぼす可能性があると考えられる。事実、第3章で述べた幼虫期の栄養条件を変化させる実験においては、幼虫期間と同様に前蛹期間が変化していた。そこで、栄養シグナルの生物タイマーへの入力に營養状態への適応に深く関わるインスリンあるいは TOR パスウェイを介する可能性を調べるため、前蛹期の脂肪体特異的にインスリンおよび TOR パスウェイの関連遺伝子の発現を変化させ、蛹化タイミングを観察することで解析することとした。本実験では GAL4/UAS システムに必要な遺伝子に加え、温度感受性 GAL4 阻害タンパク GAL80^{ts} を発現できる *tub-Gal80^{ts}* 遺伝子を持った個体を産卵から困蛹殻形成まで 18°C で飼育することで GAL80^{ts} を発現させて GAL4 を阻害し、困蛹殻形成後 29°C に飼育温度を変えることで前蛹期特異的に GAL4 を発現させて、蛹化タイミングに及ぼす影響を観察した。

その結果、*Rheb* 遺伝子の強制発現によって TOR パスウェイを活性化した個体では、

蛹化率が低下したものの、蛹化タイミングへの影響は観察されなかった (Fig. 22A, C) (Table. 1)。また、TOR パスウェイを抑制することになる *RagA* 遺伝子の発現抑制により、雌雄ともに蛹化タイミングが早まり、蛹化率への影響はほぼ観察されなかった (Fig. 22B, D)。しかし、Gal4 系統の代わりに *yw* を *UAS-RagA* に掛け合わせたコントロールの結果と比較した結果では、蛹化タイミングに影響があるとは言えなかった (data not shown)。また、同様に TOR パスウェイを抑制する *Raptor* 遺伝子および *TOR* 遺伝子の発現抑制によっても、蛹化タイミングに大きな影響は観察されなかった (Fig. 22B, D)。ただし、オスでは蛹化率がやや低下していた (Fig. 22B)。

III-2-2. インスリンパスウェイは蛹化タイミング決定に影響しない

次に、インスリンパスウェイの関連遺伝子についての解析結果を Fig. 23 に、蛹化率や平均の蛹化タイミングの計測結果一覧を Table.1 に示す。

まず、*Dp110* 遺伝子の強制発現によってインスリンパスウェイを活性化した個体では、雌雄ともに蛹化タイミングが著しく遅れ、蛹化率も低くなった (Fig. 23A, C)。しかし、Gal4 系統の代わりに *yw* を *UAS-myc-Dp110CAAX* に掛け合わせたコントロールの結果と比較した結果では、蛹化タイミングに影響があるとは言えなかった (data not shown)。次に、PIP₃ を脱リン酸化することによって、細胞内の PIP₃ レベルを減少させ、PI3K/ PIP₃ を介する細胞内シグナルに対して抑制作用を示すと考えられている *PTEN* 遺伝子 (Maehama et al, 2000) の発現抑制によってインスリンパスウェイを活性化した。その結果、雌雄ともに蛹化タイミングのばらつきが大きくなり、特にメスでは蛹化率が著しく低下した (Fig. 23A, C)。しかし、蛹化タイミングへの影響はみられなかった (Table. 1)。その一方で、*Akt* 遺伝子、*InR* 遺伝子の発現抑制および、*InR* のドミナントネガティブを強制発現することによってインスリンパスウェイを抑制したところ、蛹化率はコントロールと比較するとやや低い結果となったが、蛹化タイミングへの影響は観察されなかった (Fig. 23B, D)。

III-3. 考察

III-3-1. TOR パスウェイが蛹化タイミングを決めるタイマーに与える影響について

TOR パスウェイはアミノ酸の情報伝達を担うパスウェイであることから、その活性化によって蛹化タイミングが早まり、抑制によって遅延することが期待された。しかし、TOR パスウェイの活性変化が蛹化タイミングに影響を与えることはなかった (Fig. 22) ため、前蛹期の脂肪体特異的な TOR パスウェイの活性が、同定された生物タイマー機構による蛹化タイミング決定に影響を及ぼす可能性は低いと考えられた。ただし、メスにおいては *Raptor* 遺伝子および *TOR* 遺伝子の発現抑制によって TOR パスウェイを抑制した場合に、蛹化タイミングが変わることはなかった (Fig. 22D) が、オスにおいてはコントロールと比較して蛹化タイミングがやや遅延した (Fig. 22B) ため、栄養状態への適応における雌雄差を生じさせる上で *Raptor* 遺伝子および *TOR* 遺伝子が関与する可能性が考えられた。

III-3-2. インスリンパスウェイが蛹化タイミングを決めるタイマーに与える影響について

インスリンパスウェイは糖の情報伝達を担うパスウェイであることから、第3章における実験において、グルコースの過剰摂取で幼虫発生や蛹化が遅れた結果 (Fig. 19, 20) と同様に、インスリンパスウェイの活性化によって蛹化は遅くなると予想していた。反対に、低グルコースでは蛹化が早まったこと (Fig. 19, 20) から、インスリンパスウェイの抑制によって蛹化は早まることが期待された。しかし、インスリンパスウェイの活性変化が蛹化タイミングに影響を与えることはなかった (Fig. 23) ため、前蛹期の脂肪体特異的なインスリンパスウェイの活性が、同定された生物タイマー機構による蛹化タイミング決定に影響を及ぼす可能性は低いと考えられた。

III-3-3. インスリンおよび TOR パスウェイの前蛹期における影響

本実験においては、インスリンおよび TOR パスウェイの活性変化が蛹化タイミング決定に与える影響を解析したが、両パスウェイの活性変化によって蛹化タイミングに影響はみられなかった (Fig. 22, 23)。これらの結果から、インスリンおよび TOR パスウェイは栄養摂取に応答してはたらく情報伝達経路であるため、囲蛹殻形成直前から羽化までの栄養摂取をおこなわない変態期においては活性が高くない可能性が示唆された。あるいは、変態期における栄養シグナルの伝達経路としては、今回検証したインスリンおよび TOR パスウェイとは別の機構がはたらいっている可能性も考えられた。また、本実験では前蛹期の脂肪体特異的にインスリンおよび TOR パスウェイの活性を変化させて解析をおこなったために、蛹化タイミングへの影響が検出されなかった可能性がある。なぜなら、グルコースの過剰摂取による成長阻害や貧栄養状態による蛹化タイミングの遅延は、幼虫期、つまりは摂食行動が見られるステージでの影響を前蛹期において観察したものであり、第3章で示した3齢幼虫後期特異的なグルコースの過剰摂取による蛹化タイミングの遅れも、3齢幼虫後期でインスリンパスウェイの活性が変化した影響が蛹化タイミング決定に影響を及ぼしたと考えられるためである。よって、3齢幼虫後期にインスリンおよび TOR パスウェイの活性を変化させて蛹化タイミングの観察をおこなえば期待された結果が得られる可能性も考えられた。

総合考察

本研究では、生物発生において、ある発生イベントから次の発生イベントが引き起こされるまでの期間を測定する生物タイマー機構の生物学的意義を示すことを目的として様々な解析をおこなってきた。キイロショウジョウバエの囲蛹殻形成から、蛹化タイミングを決定する生物タイマー機構に着目し、その分子機構の未解明部分を明らかにするとともに、生物タイマー機構の存在部位を突き止めた。また、同定された生物タイマーが栄養感知器官である脂肪体で機能することが示されたため、栄養状態と生物タイマーの関係性について解析を進め、生物タイマー機構は栄養状態に適応しながら、発生のタイミングを制御することを示した。

本研究で材料とした完全変態昆虫であるキイロショウジョウバエのように、発生マーカーの明確でない哺乳類などにおいても、発生に要する時間は種特異的に決まっている。本研究で同定された生物タイマーの分子機構は、時間的なレンジを設定することで、分化と器官形成の進行や代謝をコーディネートさせ、発生を適切に進行するという生物学的意義を持つと考えられる。また、発生における成長制御については、栄養感知と生理活性の関係から、ある一定のサイズに到達する、または十分な栄養が獲得できる、などの条件が満たされた時に次の発生ステージへ進行すると一般的には考えられる。よって、様々な環境条件に適応する中で、発生時間が延長することは、発生が遅延すること以外の弊害を伴わないような印象を与える。しかし、本研究で示された様々な要因によって蛹化タイミングが遅れた実験では、すべてのケースにおいて高い致死率を伴っていた。この事実は、本研究で同定された生物タイマーが決定した時間内に次の発生イベントが起こることの重要性を示している。したがって、生物タイマー機構は単に発生のタイミングを正確に決めるだけでなく、様々な環境に適応するために利用されることで、生物の生存に寄与している可能性を示すことができたと考えられる。

謝辞

本研究に際して、終始的確かつ熱心なご指導をいただきました岡山大学大学院自然科学研究科地球生命物質科学専攻 上田均教授に心より深く感謝申し上げます。

本論文をまとめるにあたり、ご精読、有益なる御助言を賜りました岡山大学大学院自然科学研究科地球生命物質科学専攻 富岡憲治教授、中越英樹教授に心より御礼申し上げます。中越英樹教授にはご指導のみならずショウジョウバエの系統を分与していただきましたことに対しましても、感謝いたします。

本研究を遂行するにあたり、ショウジョウバエの系統を分与していただきました理化学研究所 岡本直樹博士、京都大学大学院農学研究科 小野肇助教授、東京大学大学院薬学系研究科 三浦正幸教授、国立遺伝学研究所 (NIG) に厚く御礼申し上げます。

赤木一考博士、Abdel-Rahman Sultan 博士、石川浩史博士、松島由紀子博士には、本研究をおこなう上で多くの有益なご助言をしていただきましたことに、心より深く感謝申し上げます。

本研究を進める上で、博士後期課程でともに切磋琢磨しました友人の黒田聖子氏、小坂恵氏と Hamdy Aly 氏の存在が大きな支えとなりました。三氏の努力が実を結びますよう心からの声援を送るとともに、深く感謝いたします。また、日々の研究生活において様々なご協力をいただきました分子発生制御研究室の皆さまに心より感謝いたします。

最後に、本研究をおこなうにあたり、多くの支援をいただきました祖母 太田寛子と、常に私の意思を尊重し、支え励まし続けてくれた家族、友人と The Lockers の仲間に深い感謝の意を記し、謝辞とさせていただきます。

引用文献

Abdel-Rahman Sultan 博士論文 (2014)

Analysis of control mechanism of the pupal development and eclosion timing by transcription factors FTZ-F1 and Blimp-1 in *Drosophila melanogaster*

赤木一考 博士論文 (2011)

ショウジョウバエにおける前蛹期間決定の分子機構

前濱朝彦, Jack E. Dixon (2000) 総説 癌抑制遺伝子 PTEN—脂質ホスファターゼとしての機能—

蛋白質 核酸 酵素 Vol.45 No.14 pp.2405-2414

Agawa Y, Sarhan M, Kageyama Y, Akagi K, Takai M, Hashiyama K, Wada T, Handa H, Iwamatsu A, Hirose S, Ueda H (2007). *Drosophila* Blimp-1 is a transient transcriptional repressor that controls timing of the ecdysone-induced developmental pathway. *Mol Cell Biol* 27:8739-8747.

Akagi K, Ueda H (2011). Regulatory mechanisms of ecdysone-inducible Blimp-1 encoding a transcriptional repressor that is important for the prepupal development in *Drosophila*. *Dev Growth Differ* 53:697-703.

Allada R, Chung BY (2010). Circadian organization of behavior and physiology in *Drosophila*. *Annu Rev Physiol* 72:605-624.

Ashburner M (1974). Sequential gene activation by ecdysone in polytene chromosomes of *Drosophila melanogaster*. II. The effects of inhibitors of protein synthesis. *Dev Biol* 39:141-157.

Ashburner M, Chihara C, Meltzer P, Richards G (1974). Temporal control of puffing activity in polytene chromosomes. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 38:655-662.

Beadle GW, Anderson RL, Maxwell J (1938). A Comparison of the Diffusible Substances Concerned with Eye Color Development in *Drosophila*, *Ephesia* and *Habrobracon*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 24:80-85.

Callier V, Nijhout HF (2013). Body size determination in insects: a review and synthesis of size- and brain-dependent and independent mechanisms. *Biol Rev Camb Philos Soc* 88:944-954.

Colombani J, Raisin S, Pantalacci S, Radimerski T, Montagne J, Leopold P (2003). A nutrient sensor mechanism controls *Drosophila* growth. *Cell* 114:739-749.

Colombani J, Bianchini L, Layalle S, Pondeville E, Dauphin-Villemant C, Antoniewski C, Carre C, Noselli S, Leopold P (2005). Antagonistic actions of ecdysone and insulins determine final size in *Drosophila*. *Science* 310:667-670.

Delanoue R, Slaidina M, Leopold P (2010). The steroid hormone ecdysone controls systemic growth by repressing dMyc function in *Drosophila* fat cells. *Dev Cell* 18:1012-1021.

Fellner SK, Rybczynski R, Gilbert LI (2005). Ca²⁺ signaling in prothoracicotropic hormone-stimulated prothoracic gland cells of *Manduca sexta*: evidence for mobilization

- and entry mechanisms. *Insect Biochem Mol Biol* 35:263-275.
- Hodgetts RB, Sage B, O'Connor JD (1977). Ecdysone titers during postembryonic development of *Drosophila melanogaster*. *Dev Biol* 60:310-317.
- Kageyama Y, Masuda S, Hirose S, Ueda H (1997). Temporal regulation of the mid-prepupal gene FTZ-F1: DHR3 early late gene product is one of the plural positive regulators. *Genes Cells* 2:559-569.
- Kamoshida Y, Fujiyama-Nakamura S, Kimura S, Suzuki E, Lim J, Shiozaki-Sato Y, Kato S, Takeyama K (2012). Ecdysone receptor (EcR) suppresses lipid accumulation in the *Drosophila* fat body via transcription control. *Biochem Biophys Res Commun* 421:203-207.
- Katewa SD, Akagi K, Bose N, Rakshit K, Camarella T, Zheng X, Hall D, Davis S, Nelson CS, Brem RB, Ramanathan A, Sehgal A, Giebultowicz JM, Kapahi P (2016). Peripheral Circadian Clocks Mediate Dietary Restriction-Dependent Changes in Lifespan and Fat Metabolism in *Drosophila*. *Cell Metab* 23:143-154.
- King-Jones K, Thummel CS (2005). Developmental biology. Less steroids make bigger flies. *Science* 310:630-631.
- Lam GT, Jiang C, Thummel CS (1997). Coordination of larval and prepupal gene expression by the DHR3 orphan receptor during *Drosophila* metamorphosis. *Development* 124:1757-1769.
- Lavorgna G, Ueda H, Clos J, Wu C (1991). FTZ-F1, a steroid hormone receptor-like protein implicated in the activation of fushi tarazu. *Science* 252:848-851.
- Layalle S, Arquier N, Leopold P (2008). The TOR pathway couples nutrition and developmental timing in *Drosophila*. *Dev Cell* 15:568-577.
- McBrayer Z, Ono H, Shimell M, Parvy JP, Beckstead RB, Warren JT, Thummel CS, Dauphin-Villemant C, Gilbert LI, O'Connor MB (2007). Prothoracicotropic hormone regulates developmental timing and body size in *Drosophila*. *Dev Cell* 13:857-871.
- Nijhout HF, Williams CM (1974). Control of moulting and metamorphosis in the tobacco hornworm, *Manduca sexta* (L.): growth of the last-instar larva and the decision to pupate. *J Exp Biol* 61:481-491.
- Nijhout HF, Riddiford LM, Mirth C, Shingleton AW, Suzuki Y, Callier V (2014). The developmental control of size in insects. *Wiley Interdiscip Rev Dev Biol* 3:113-134.
- Niwa R, Niwa YS (2014). Enzymes for ecdysteroid biosynthesis: their biological functions in insects and beyond. *Biosci Biotechnol Biochem* 78:1283-1292.
- Okamoto N, Yamanaka N (2015). Nutrition-dependent control of insect development by insulin-like peptides. *Curr Opin Insect Sci* 11:21-30.
- Parvy JP, Blais C, Bernard F, Warren JT, Petryk A, Gilbert LI, O'Connor MB, Dauphin Villemant C (2005). A role for betaFTZ-F1 in regulating ecdysteroid titers during post-embryonic development in *Drosophila melanogaster*. *Dev Biol* 282:84-94.
- Pasco MY, Leopold P (2012). High sugar-induced insulin resistance in *Drosophila* relies on the lipocalin Neural Lazarillo. *PLoS One* 7:e36583.
- Petryk A, Warren JT, Marques G, Jarcho MP, Gilbert LI, Kahler J, Parvy JP, Li Y, Dauphin Villemant C, O'Connor MB (2003). Shade is the *Drosophila* P450 enzyme that mediates the hydroxylation of ecdysone to the steroid insect molting hormone 20-hydroxyecdysone. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:13773-13778.

- Riddiford LM (1993). Hormone receptors and the regulation of insect metamorphosis. *Receptor* 3:203-209.
- Rovenko BM, Perkhulyn NV, Gospodaryov DV, Sanz A, Lushchak OV, Lushchak VI (2015). High consumption of fructose rather than glucose promotes a diet-induced obese phenotype in *Drosophila melanogaster*. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* 180:75-85.
- Saga Y (2012). The synchrony and cyclicity of developmental events. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 4:a008201.
- Shimada Niwa Y, Niwa R (2014). Serotonergic neurons respond to nutrients and regulate the timing of steroid hormone biosynthesis in *Drosophila*. *Nat Commun* 5:5778.
- Sullivan AA, Thummel CS (2003). Temporal profiles of nuclear receptor gene expression reveal coordinate transcriptional responses during *Drosophila* development. *Mol Endocrinol* 17:2125-2137.
- Suzuki Y, Koyama T, Hiruma K, Riddiford LM, Truman JW (2013). A molt timer is involved in the metamorphic molt in *Manduca sexta* larvae. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110:12518-12525.
- Thummel CS (1996). Flies on steroids--*Drosophila* metamorphosis and the mechanisms of steroid hormone action. *Trends Genet* 12:306-310.
- Thummel CS (2002). Ecdysone-regulated puff genes 2000. *Insect Biochem Mol Biol* 32:113-120.
- Ueda H, Hirose S (1990). Identification and purification of a *Bombyx mori* homologue of FTZ-F1. *Nucleic Acids Res* 18:7229-7234.
- Yamada M, Murata T, Hirose S, Lavorgna G, Suzuki E, Ueda H (2000). Temporally restricted expression of transcription factor betaFTZ-F1: significance for embryogenesis, molting and metamorphosis in *Drosophila melanogaster*. *Development* 127:5083-5092.
- Yao TP, Forman BM, Jiang Z, Cherbas L, Chen JD, McKeown M, Cherbas P, Evans RM (1993). Functional ecdysone receptor is the product of EcR and Ultraspiracle genes. *Nature* 366:476-479.

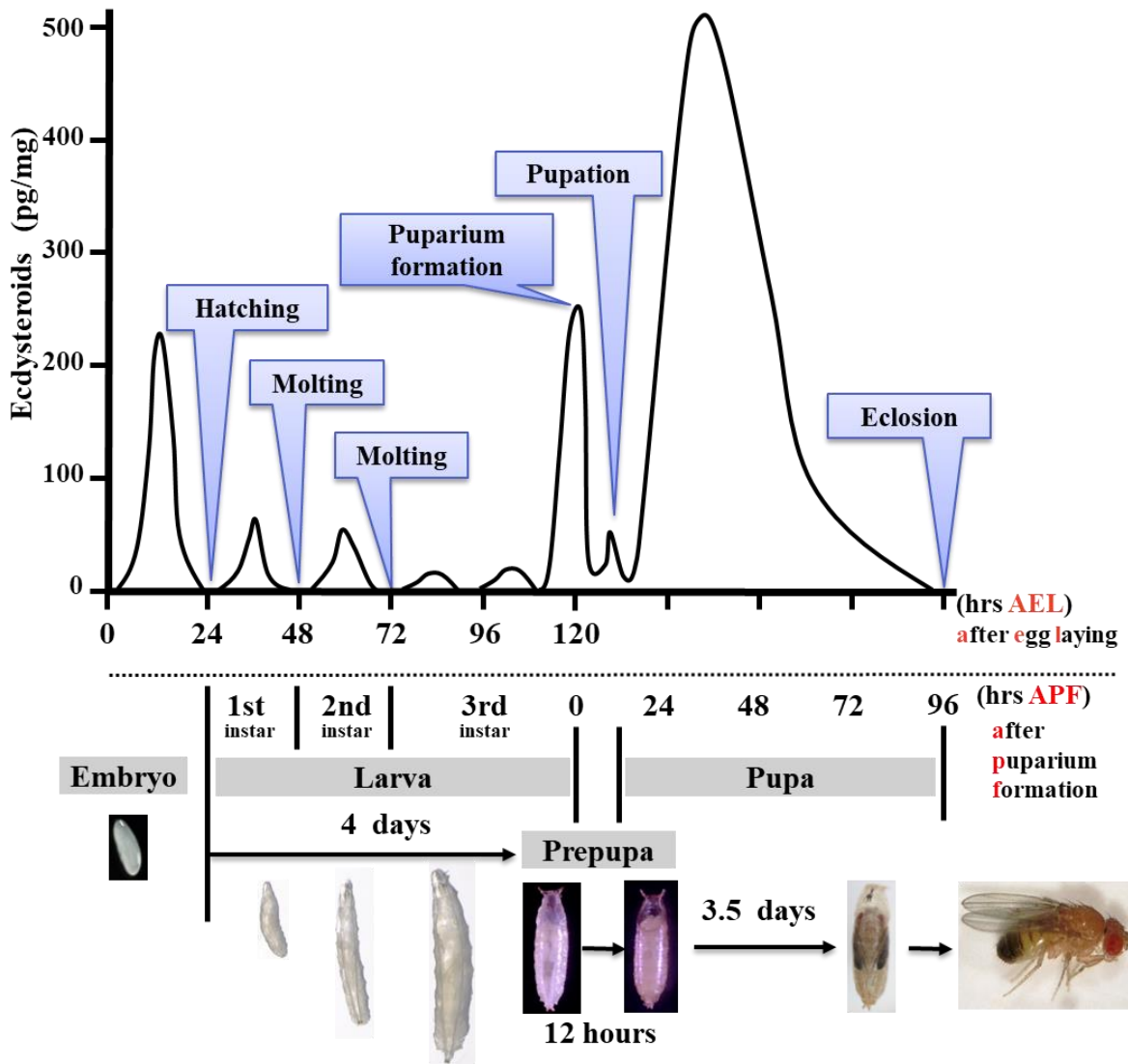


Fig. 1. 25°C恒温飼育条件下でのキイロショウジョウバエの発生過程と体内エクダイソン濃度の変化

孵化 (Hatching), 脱皮 (Molting), 囲蛹殻形成 (Puparium formation), 蛹化 (Pupation) および羽化 (Eclosion) といった変態行動は, その前の時期特異的に体内エクダイソンの濃度が一過的に上昇・下降すること (エクダイソンパルス) が引き金となって起きる。25°Cの恒温条件でキイロショウジョウバエを飼育した場合, エクダイソンパルスの放出タイミングはおおよそ図で示した通りとなり, 最初のパルスから次のパルスが放出されるタイミング, つまりは各行動が起こるタイミングを計測する生物タイマーの存在が示唆される。

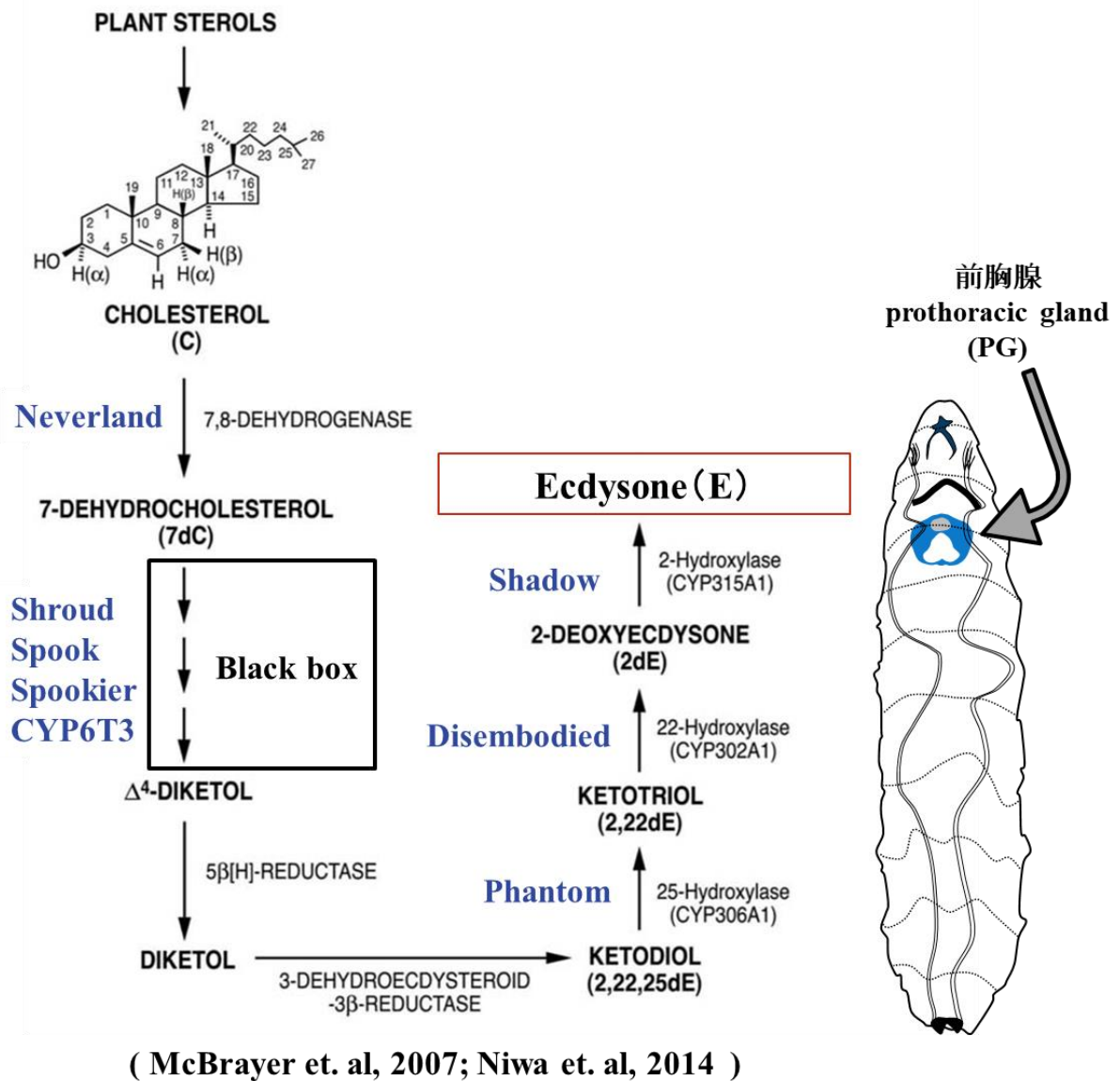


Fig. 2. 植物ステロールからエクダイソン (E) への生合成経路とキイロシヨウジョウバエ幼虫の前胸腺

エクダイソン (E) は、摂食により体内に取り込まれる植物ステロールを原料として前胸腺で生合成される。これまでに同定されている、エクダイソンの生合成酵素を青字で示す。なお、7dC から Δ^4 -DIKETOL までは、その経路が不明であるために Black box と呼ばれている。

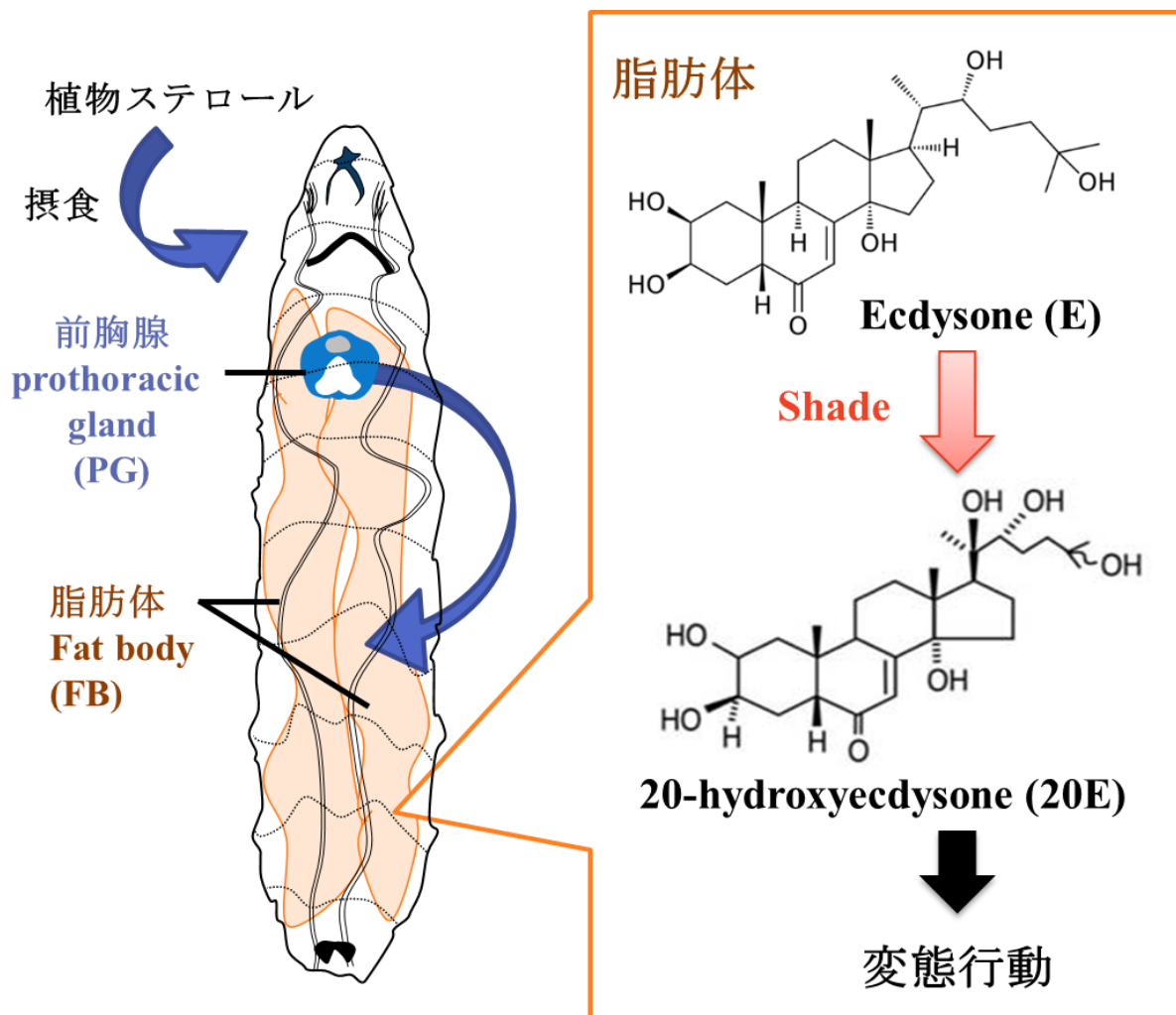


Fig. 3. エクダイソンは脂肪体において活性型エクダイソン (20E) へ変換される

植物ステロールを原料に前胸腺で合成されたエクダイソンは血リンパに放出され、全身の脂肪体に運搬される。その後、脂肪体での発現が高いエクダイソン生合成酵素 Shade によって活性型エクダイソン (20E) に変換され、蛹化をはじめとする変態行動を引き起こすことが知られている。

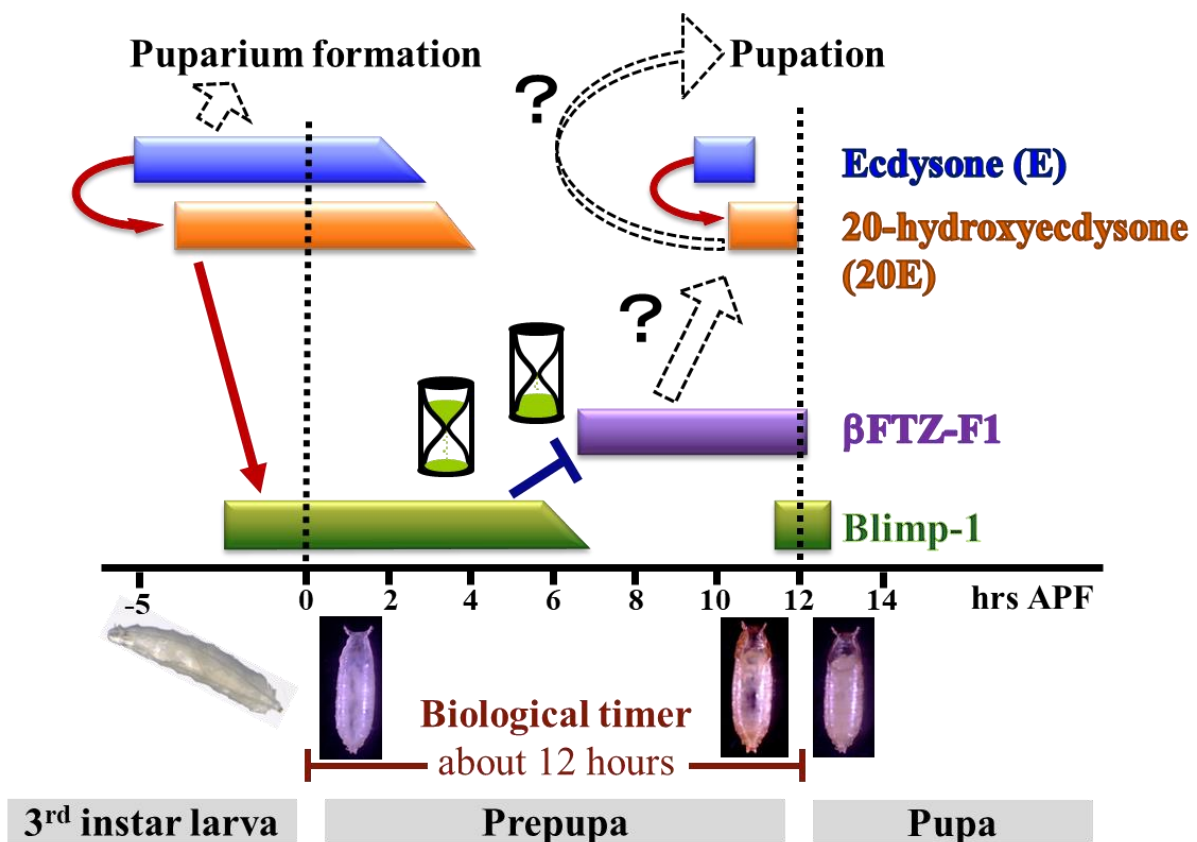


Fig. 4. キイロシヨウジョウバエの蛹化タイミングを決める生物タイマーの分子機構モデル

先行研究により 20E 誘導性遺伝子の一つである Blimp-1 はエクダイソンによって直接誘導されることが明らかになっている。20E レベルが低下すると Blimp-1 の合成は素早く停止し、Blimp-1 タンパクの安定性が極めて低いために素早く分解して消失することで、FTZ-F1 の発現タイミングを正確に制御している。したがって、Blimp-1 タンパクは砂時計の砂に例えることができる。また、FTZ-F1 の発現タイミングが蛹化タイミング決定において重要なはたらきをすることが明らかになっている。しかし、FTZ-F1 の発現がどのような機構で蛹化タイミングを決めるかは明らかにされていない。

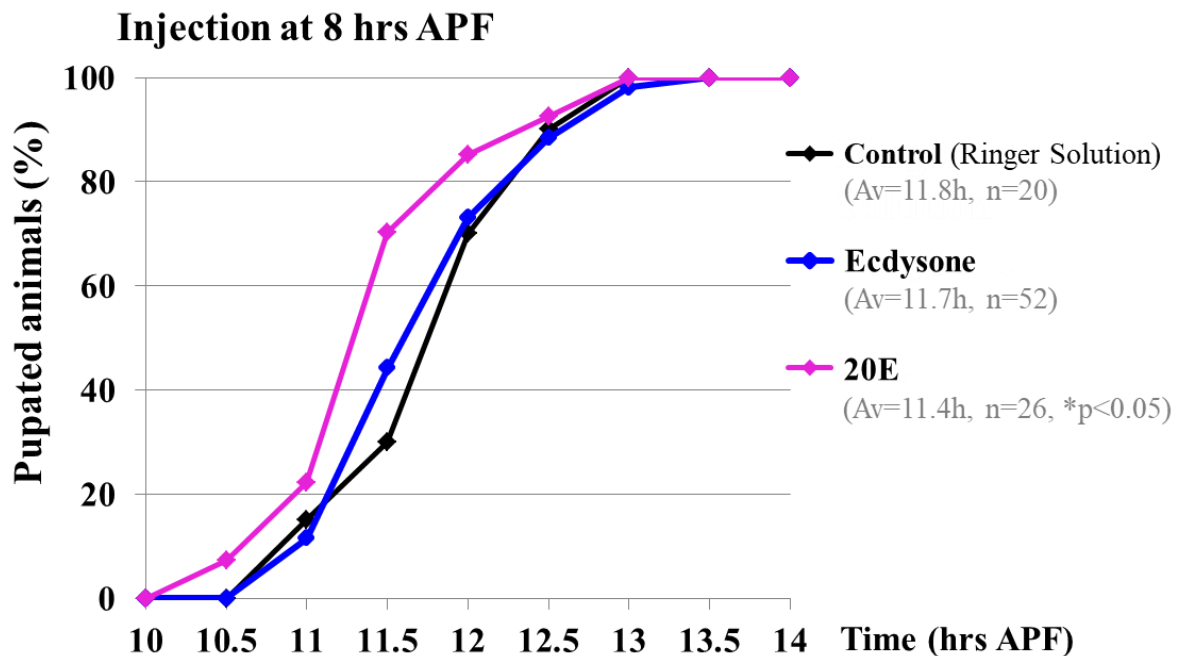


Fig. 5. 20E のインジェクションにより蛹化タイミングは早まる

yw のオスを用いて、蛹化を誘導する内在性のエクダイソン及び 20E の体内濃度上昇がみられる APF10 時間よりも 2 時間早い APF8 時間で、E あるいは 20E (2 μ g/ml) を 50nl インジェクションし、30 分ごとに観察することで、蛹化タイミングを測定した。コントロールとして Ringer Solution (RS) をインジェクションした個体群を用いた。(*p<0.05 KS 検定により、RS をインジェクションした個体群と蛹化タイミングの差を検定した。)

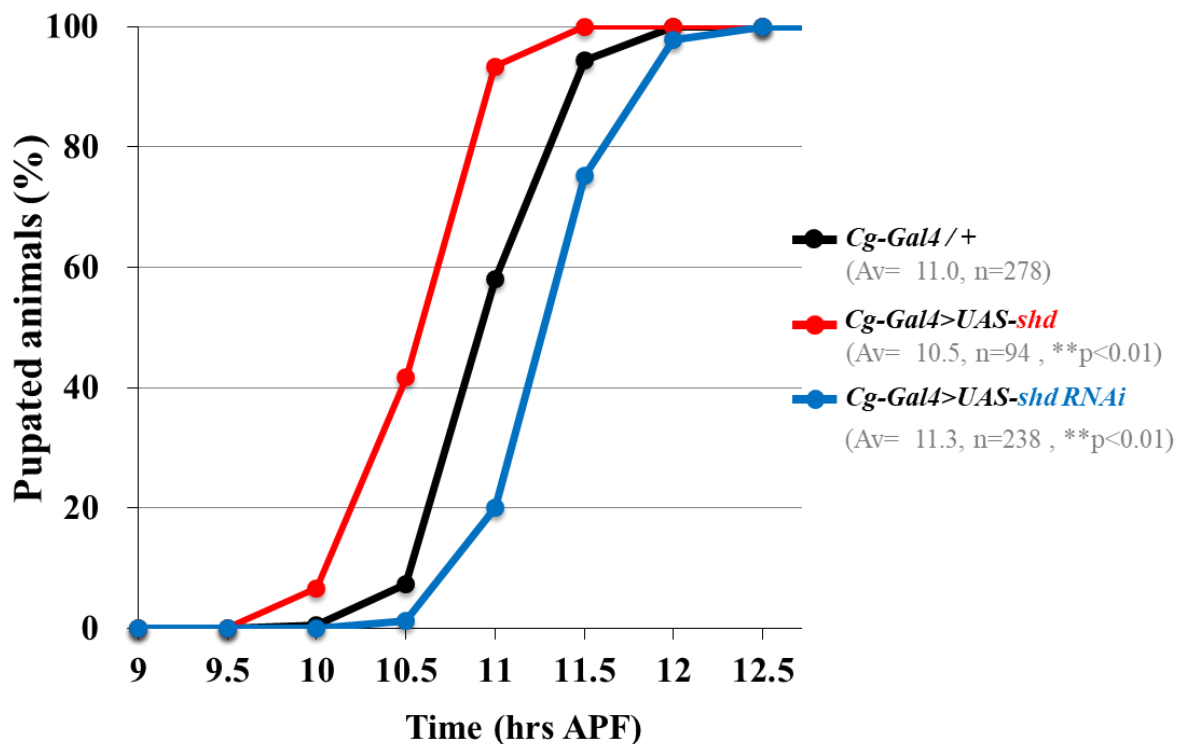


Fig. 6. 脂肪体特異的な *shade* の強制発現および発現抑制は蛹化タイミングに影響する

GAL4/UAS システムを用いて、脂肪体特異的に *shade* の強制発現及び、発現抑制をおこない 30 分ごとに観察し、蛹化タイミングを測定した。Control 系統として、*Cg-Gal4/+* を用いた。

(**p<0.01 KS 検定により、Control 系統である *Cg-Gal4/+* との有意差を検定した。)

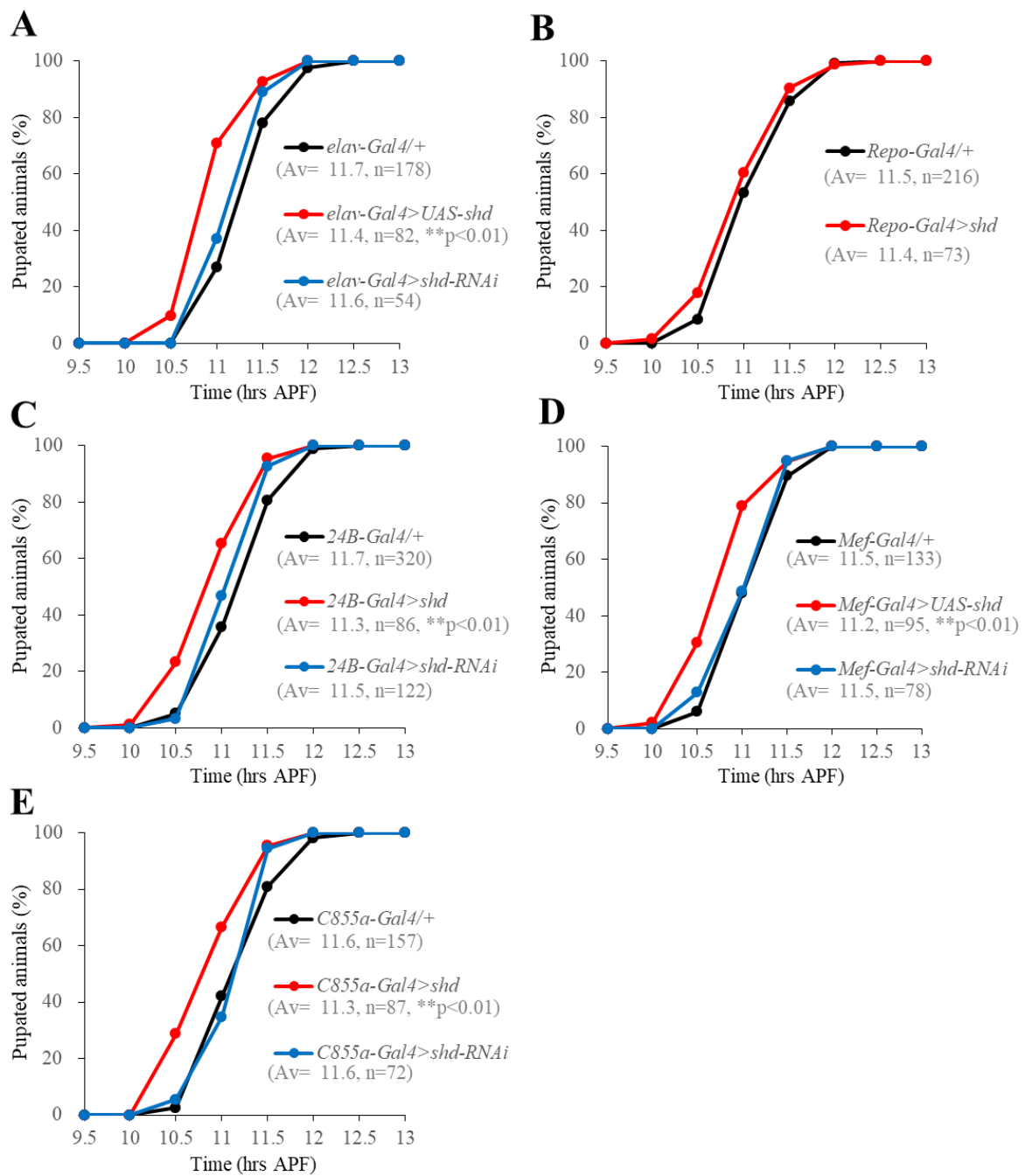


Fig. 7. 様々な組織特異的な *shade* の強制発現と発現抑制の蛹化タイミングへの影響

GAL4/UAS システムを用いて、神経 (A)、グリア (B)、筋肉 (C)、筋肉 (D)、上皮 (E) 特異的に *shade* の強制発現及び、発現抑制をおこない 30 分ごとに観察し、蛹化タイミングを測定した。

(** $p < 0.01$ KS 検定により各 Control 系統との有意差を検定した。)

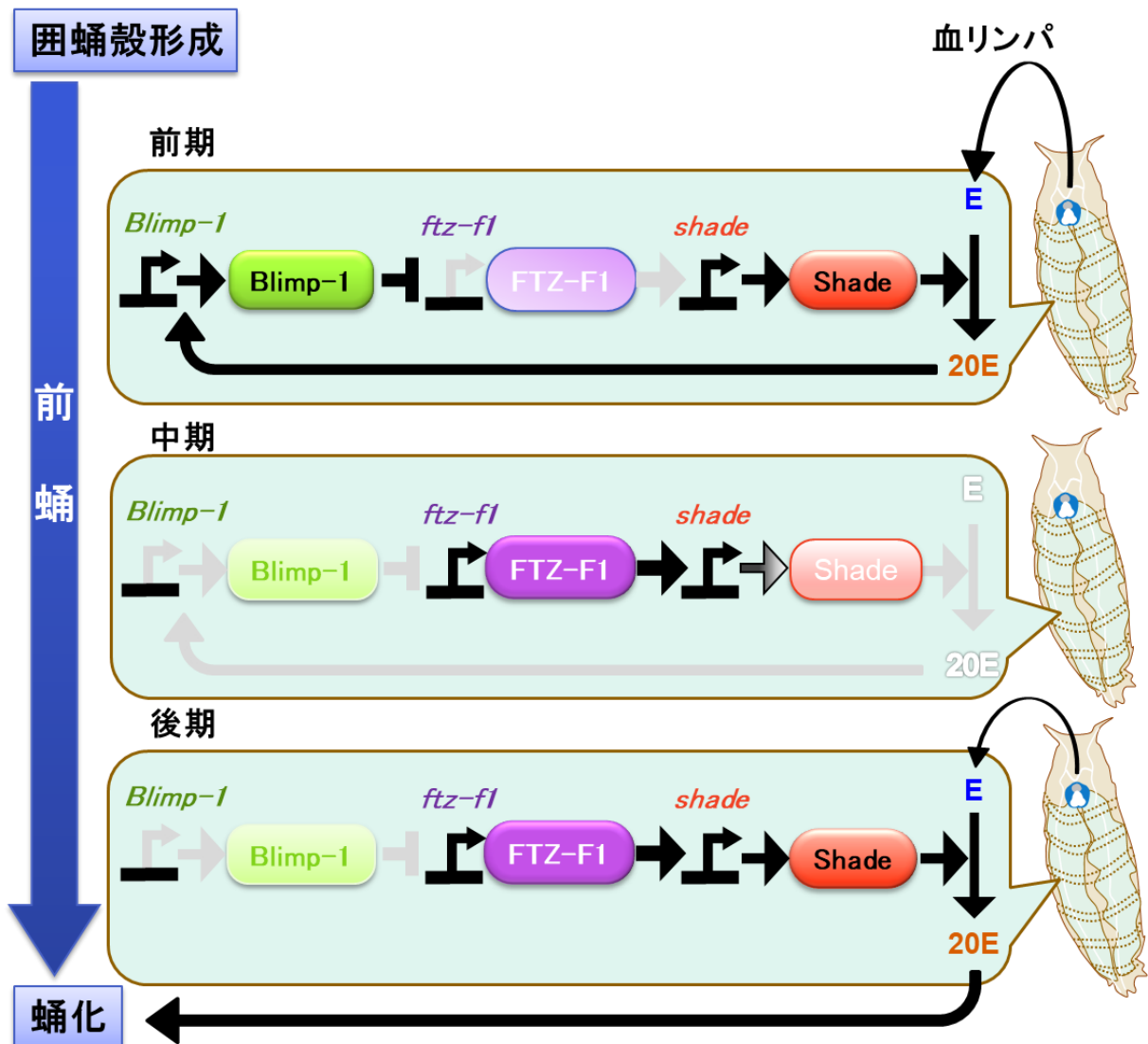


Fig. 8. 蛹化タイミングを決める生物タイマーは脂肪体にある

囲蛹殻形成を誘導する E が前胸腺で合成され、血リンパによって全身に分布する脂肪体に運搬される。前蛹前期では FTZ-F1 非依存的に発現する *shade* 遺伝子によって E が 20E に変換されることで 20E レベルが高い状態にある。よって、20E に誘導される *Blimp-1* が発現しており、FTZ-F1 の発現は抑制されているため、FTZ-F1 依存的な *shade* 遺伝子の発現は起こらない。前蛹中期になると、E の合成および *shade* 遺伝子の発現が停止し、20E レベルが低下することで *Blimp-1* の発現が終息する。これに伴い、*ftz-fl* 遺伝子の発現が始まり、*shade* 遺伝子の発現を誘導し始める。前蛹後期になると、脂肪体において *shade* 遺伝子産物が十分に蓄積し、この Shade により脂肪体に存在する E が 20E に変換され蛹化を誘導する。

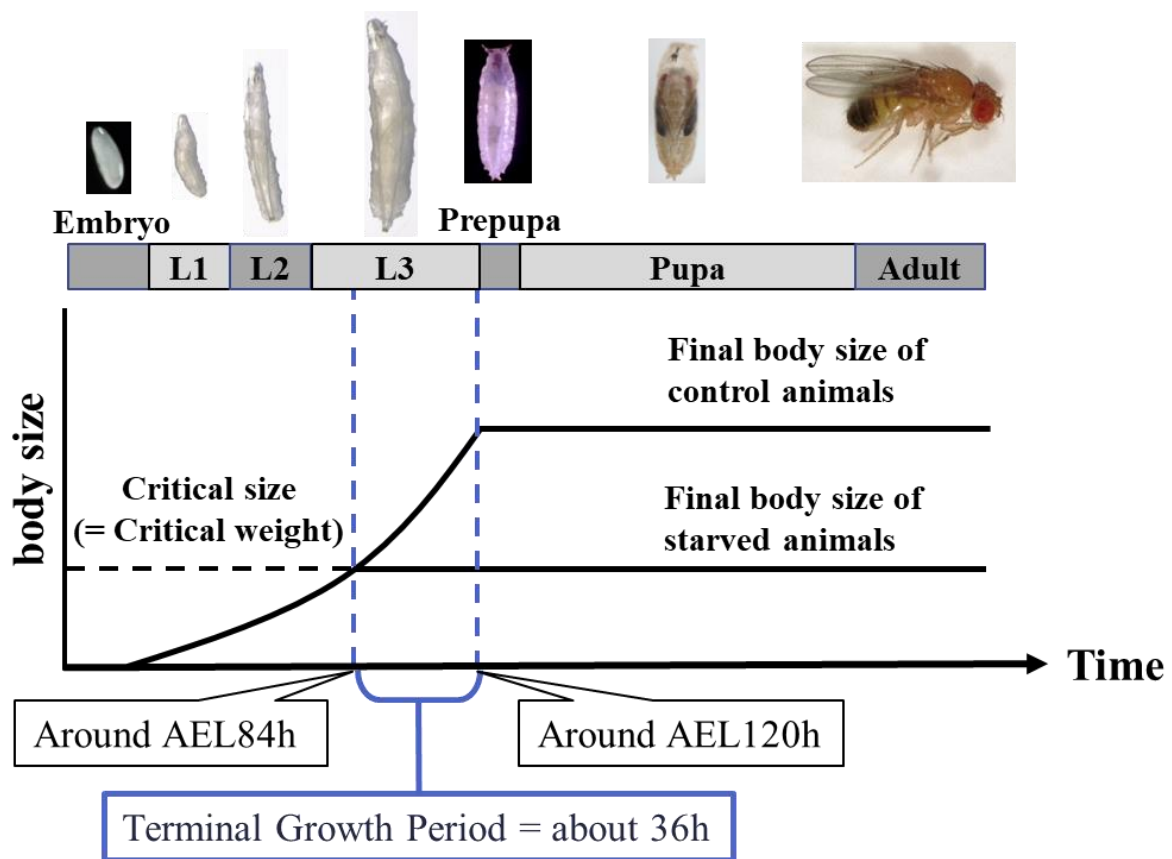


Fig. 9. 標準飼育条件における body growth のモデル

十分な栄養が摂取可能な飼育条件で孵化直後から飼育した場合、幼虫は AEL84 時間頃に Critical weight (CW) と呼ばれる重量に到達する。CW 到達後の幼虫は、飢餓状態に置かれてもその後も標準条件で飼育を続けた場合と同様に、一定時間後に変態を開始するといわれている。また図に示すように CW 到達後、囲蛹殻形成まで (Terminal Growth Period) の成長が最終的な body size を決める。本解析で、CW 到達直後 (AEL88 時間) から飢餓状態で飼育した個体を貧栄養条件個体とした。

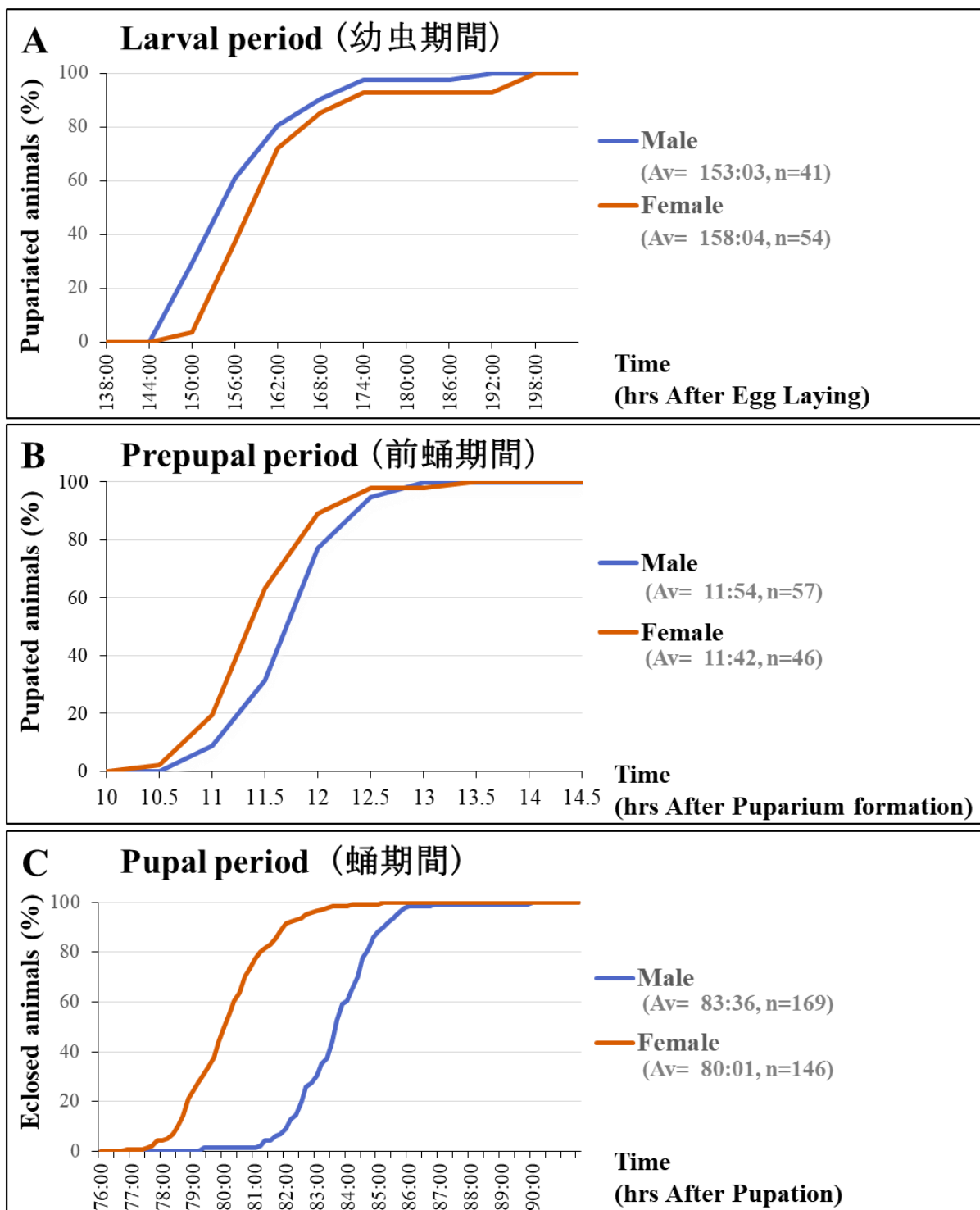
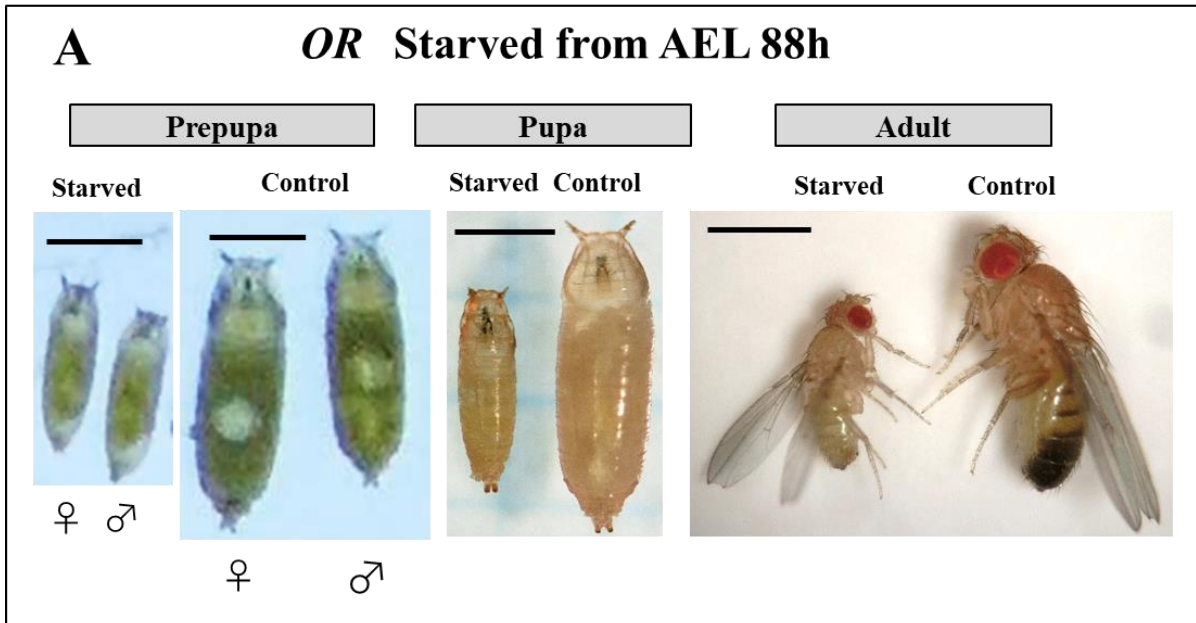


Fig. 10. 標準飼育条件における発生時間の雌雄比較

所属研究室での標準栄養条件の培地で野生型である *OR* 系統を飼育した場合の発生プロファイルを雌雄間で比較した。1 時間ごとに囲蛹殻形成した個体数を数えることで幼虫期間を、10 分ごとに蛹化した個体数を数えることで前蛹期間を、30 分ごとに羽化した個体数を数えることで蛹期間をそれぞれ測定した。(A) 幼虫期間、(B) 前蛹期間、(C) 蛹期間。



B

Average of volume (mm ³)	Control	Starved
Male	1.485	0.848
Female	1.839	0.868

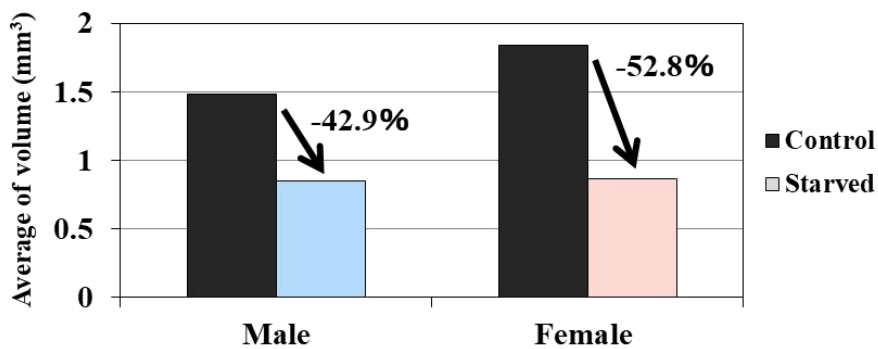


Fig. 11. 標準飼育条件個体と貧栄養条件個体のサイズ比較

(A) AEL88 時間から貧栄養条件で飼育した個体と標準条件で囲蛹殻形成まで飼育した雌雄の前蛹 (左), オスの蛹 (中央), 成虫 (右) でのサイズ比較写真。(scale bar = 1mm)

(B) AEL88 時間から貧栄養条件で飼育した個体と標準条件で囲蛹殻形成まで飼育した個体の平均体積を表とグラフで示す。

OR Starved from AEL 88h

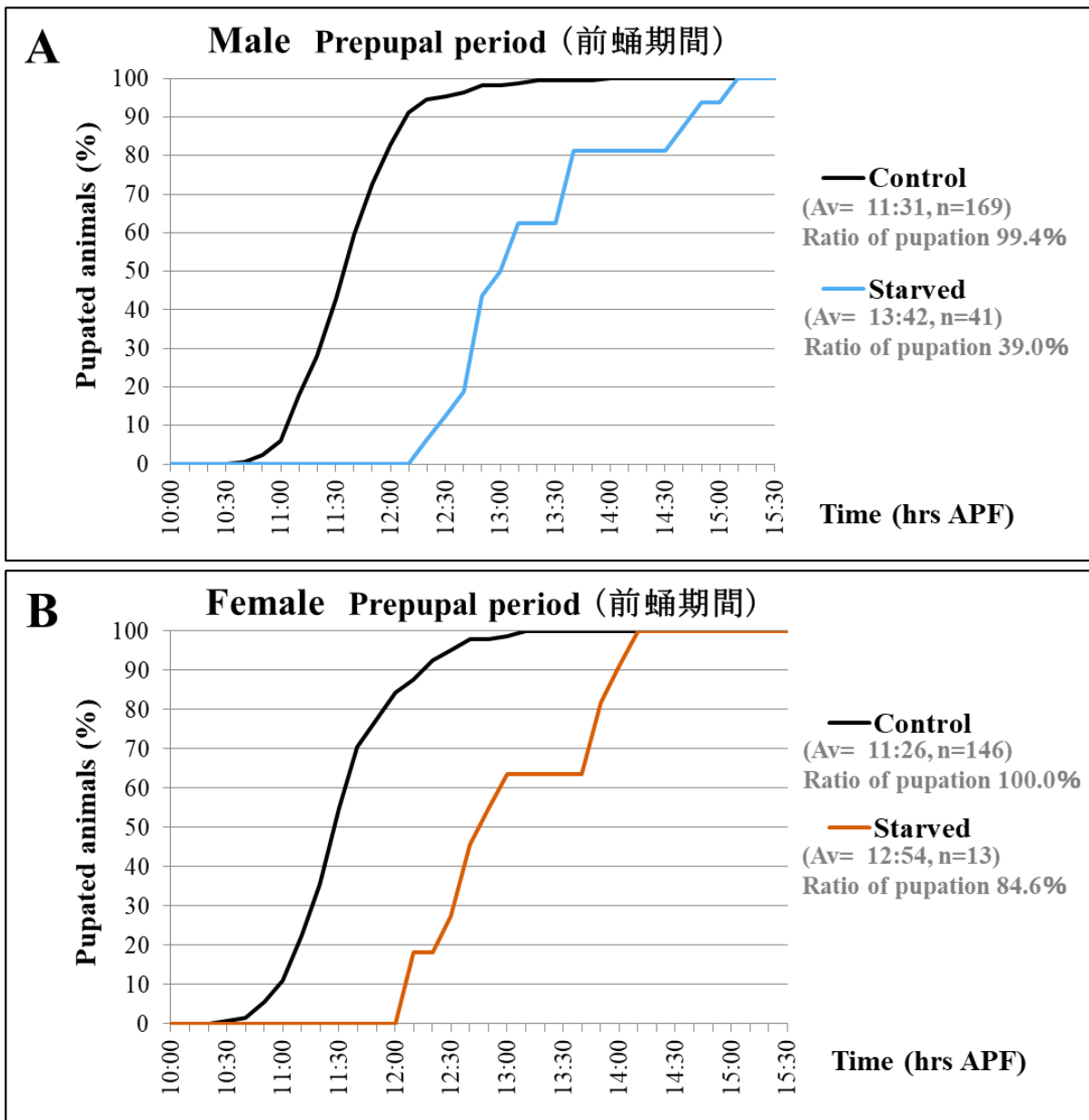


Fig. 12. 3 齢幼虫後期に飢餓状態にすると前蛹期間が延長する

CW 到達後の AEL88 時間で飢餓状態にした前蛹と、 囲蛹殻形成まで通常培地で飼育したコントロール前蛹の蛹化タイミングを 10 分ごとに観察した。オスの結果を (A), メスの結果を (B) にそれぞれ示す。

OR Starved from AEL 88h

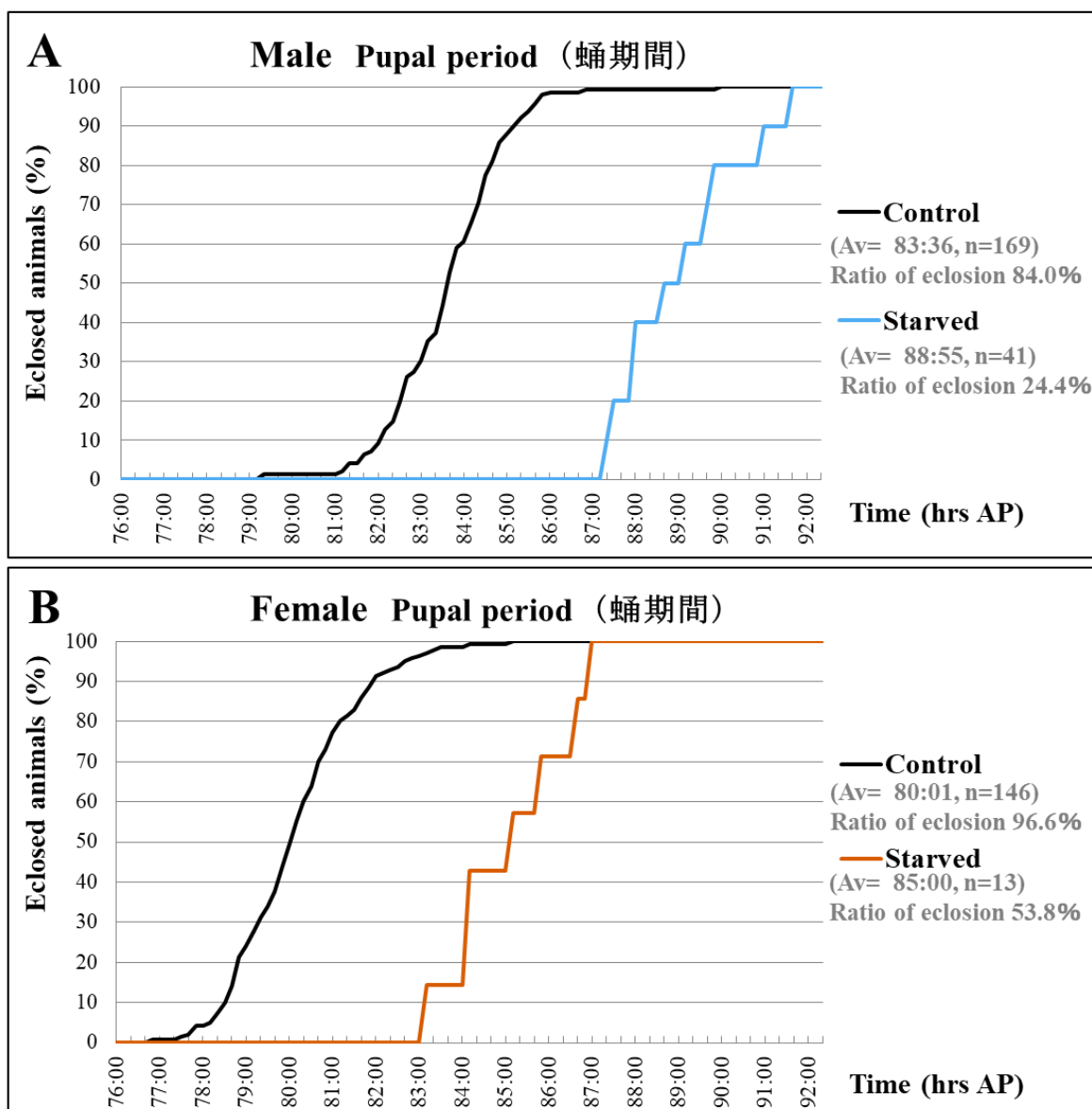


Fig. 13. 3 齢幼虫後期に飢餓状態にすると蛹期間が延長する

CW 到達後の AEL88 時間で飢餓状態にした前蛹と、囲蛹殻形成まで通常培地で飼育したコントロール蛹の羽化タイミングを 30 分ごとに観察した。オスの結果を (A), メスの結果を (B) にそれぞれ示す。

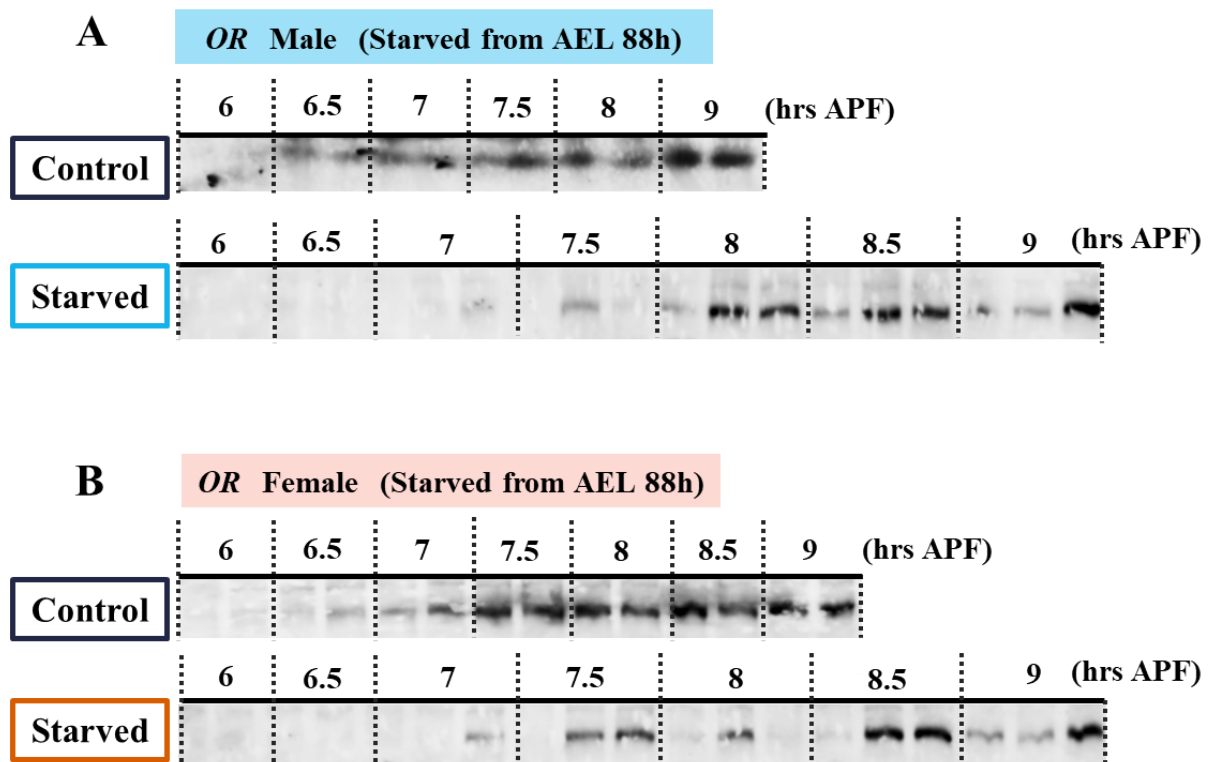


Fig. 14. 3 齢幼虫後期での飢餓状態は前蛹期の FTZ-F1 発現タイミングに影響を与える

通常培地で飼育したコントロール前蛹と AEL88 時間で飢餓状態にした前蛹の APF6~9 時間の個体を 30 分ごとに回収し、Western blotting 法で FTZ-F1 の発現パターンを調べた。オスの結果を (A)、メスの結果を (B) にそれぞれ示す。

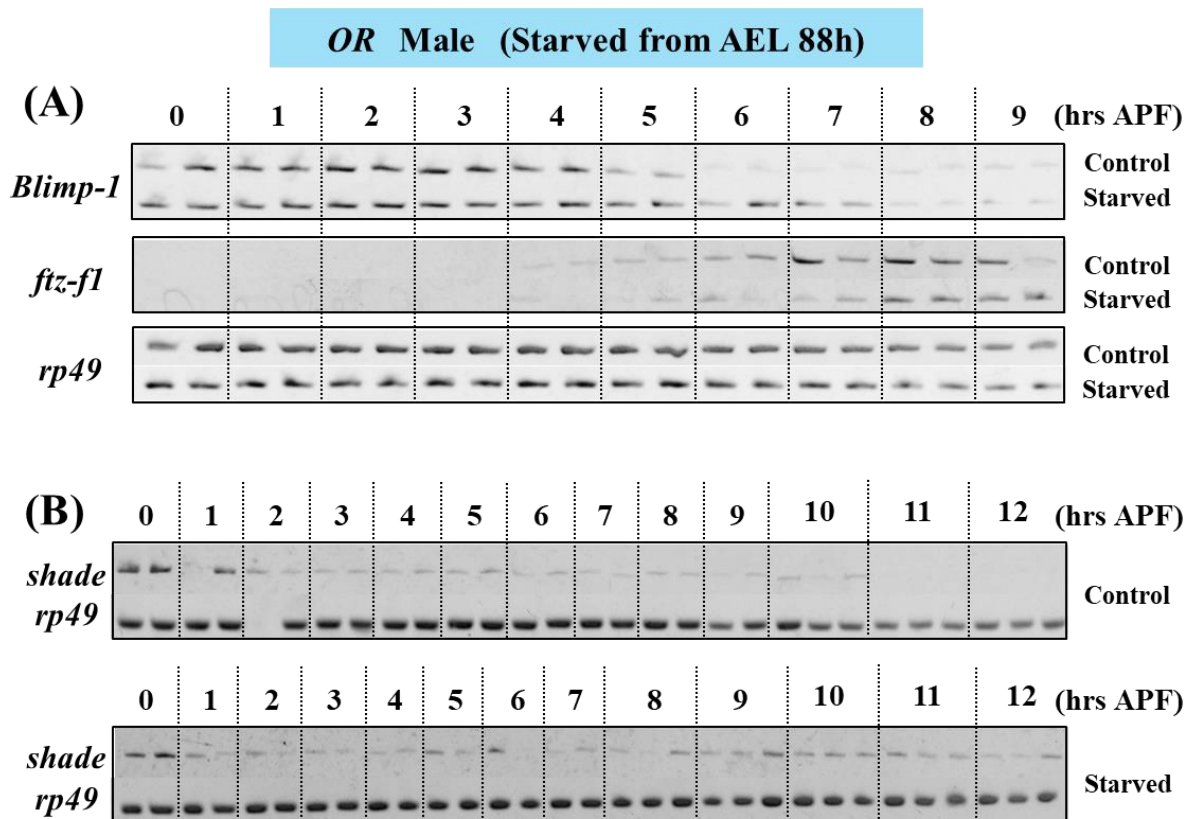


Fig. 15. 3 齢幼虫後期での飢餓状態は生物タイマー分子機構に含まれる遺伝子の発現パターンに影響を与える (オス)

AEL88 時間で飢餓状態にした前蛹と標準培地で囲蛹殻形成まで飼育したコントロール前蛹個体の RNA を囲蛹殻形成後から 1 時間ごとに回収し, *Blimp-1* 遺伝子 (A), *ftz-f1* 遺伝子 (A), *shade* 遺伝子 (B) の mRNA の発現パターンを RT-PCR 法で解析した。内部コントロールとして *rp49* 遺伝子の発現パターンを示す。なお, バンドが確認できないレーンは実験上のミス等で発現が検出できなかったものと考えられる。

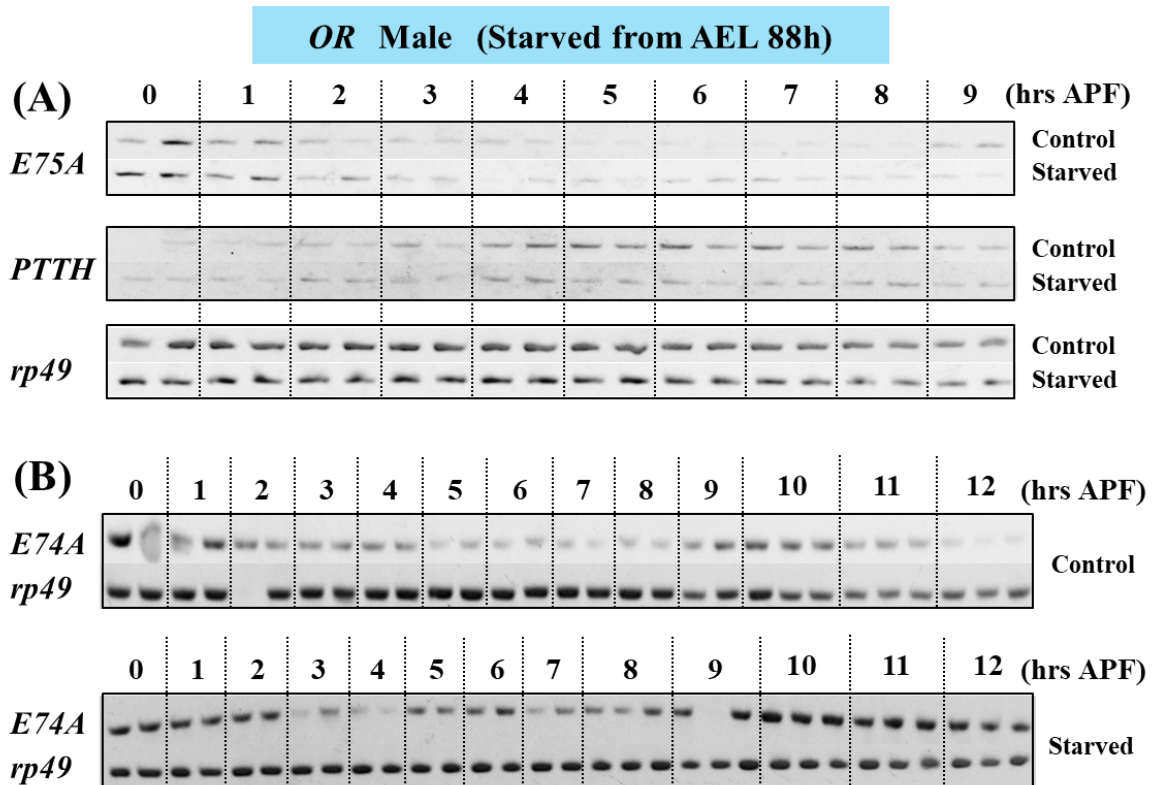


Fig. 16. 3 齢幼虫後期での飢餓状態はエクダイソン関連遺伝子の発現パターンに影響を与える (オス)

AEL88 時間で飢餓状態にした前蛹と標準培地で囲蛹殻形成まで飼育したコントロール前蛹個体の RNA を囲蛹殻形成後から 1 時間ごとに回収し、*E75A* 遺伝子 (A)、*PTTH* 遺伝子 (A)、*E74A* 遺伝子 (B) の mRNA の発現パターンを RT-PCR 法で解析した。内部コントロールとして *rp49* 遺伝子の発現パターンを示す。なお、バンドが確認できないレーンは実験上のミス等で発現が検出できなかったものと考えられる。

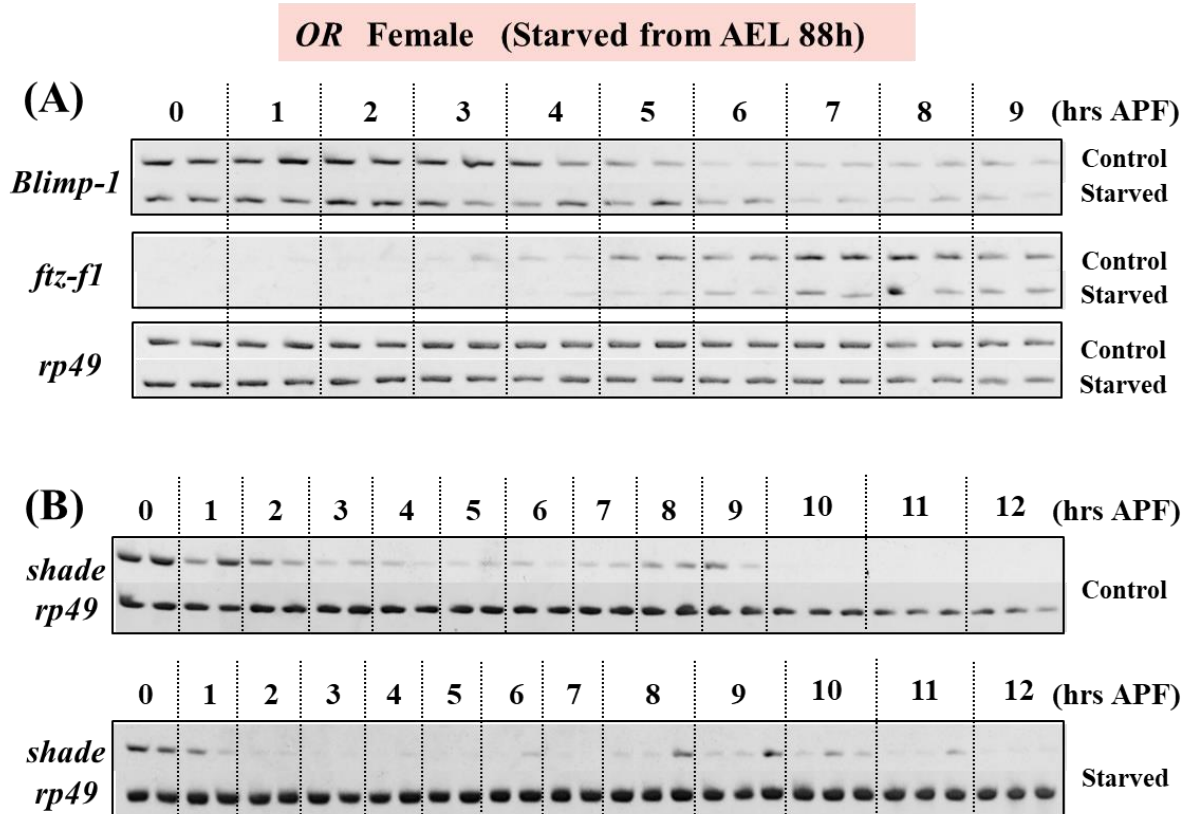


Fig. 17. 3 齢幼虫後期での飢餓状態は生物タイマー分子機構に含まれる遺伝子の発現パターンに影響を与える (メス)

AEL88 時間で飢餓状態にした前蛹と標準培地で囲蛹殻形成まで飼育したコントロール前蛹個体の RNA を囲蛹殻形成後から 1 時間ごとに回収し、*Blimp-1* 遺伝子 (A)、*ftz-fl* 遺伝子 (A)、*shade* 遺伝子 (B) の mRNA の発現パターンを RT-PCR 法で解析した。内部コントロールとして *rp49* 遺伝子の発現パターンを示す。なお、バンドが確認できないレーンの実験上のミス等で発現が検出できなかったものと考えられる。

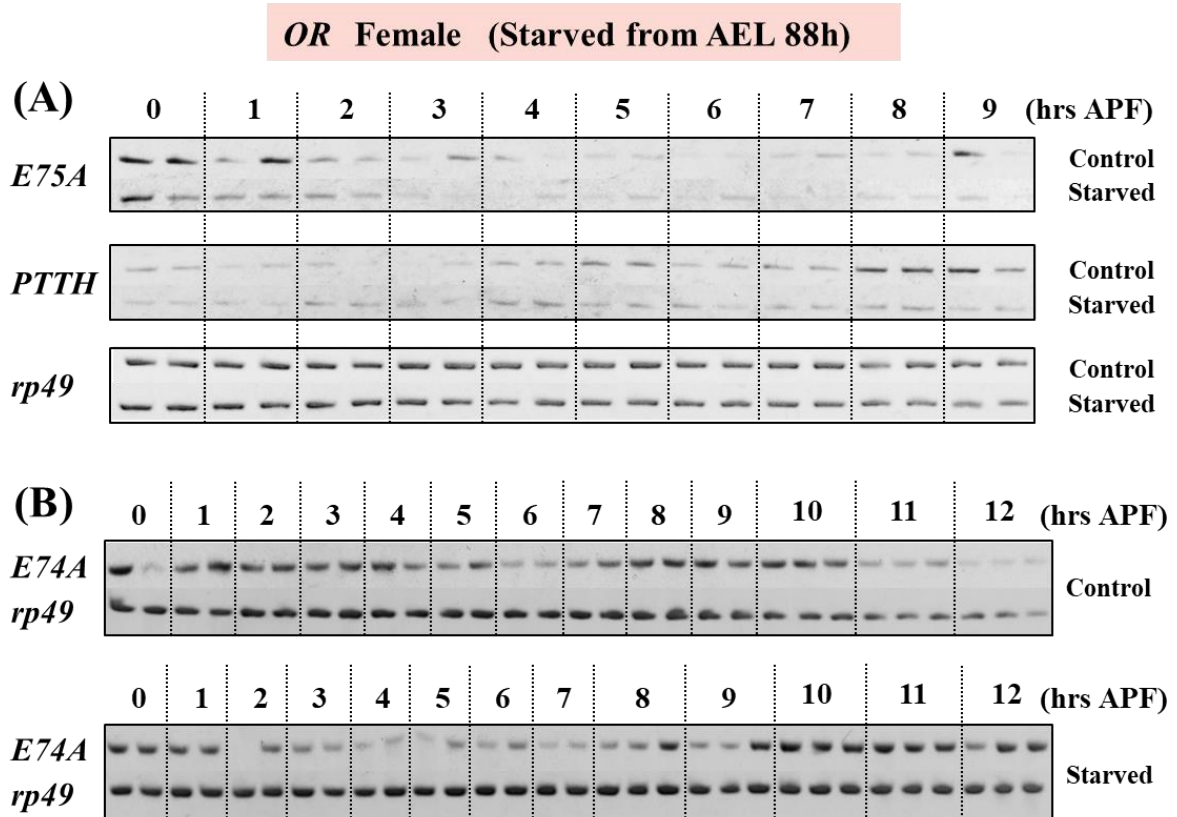


Fig. 18. 3 齢幼虫後期での飢餓状態はエクダイソン関連遺伝子の発現パターンに影響を与える (メス)

AEL88 時間で飢餓状態にした前蛹と標準培地で囲蛹殻形成まで飼育したコントロール前蛹個体の RNA を囲蛹殻形成後から 1 時間ごとに回収し、*E75A* 遺伝子 (A)、*PTTH* 遺伝子 (A)、*E74A* 遺伝子 (B) の mRNA の発現パターンを RT-PCR 法で解析した。内部コントロールとして *rp49* 遺伝子の発現パターンを示す。なお、バンドが確認できないレーンは実験上のミス等で発現が検出できなかったものと考えられる。

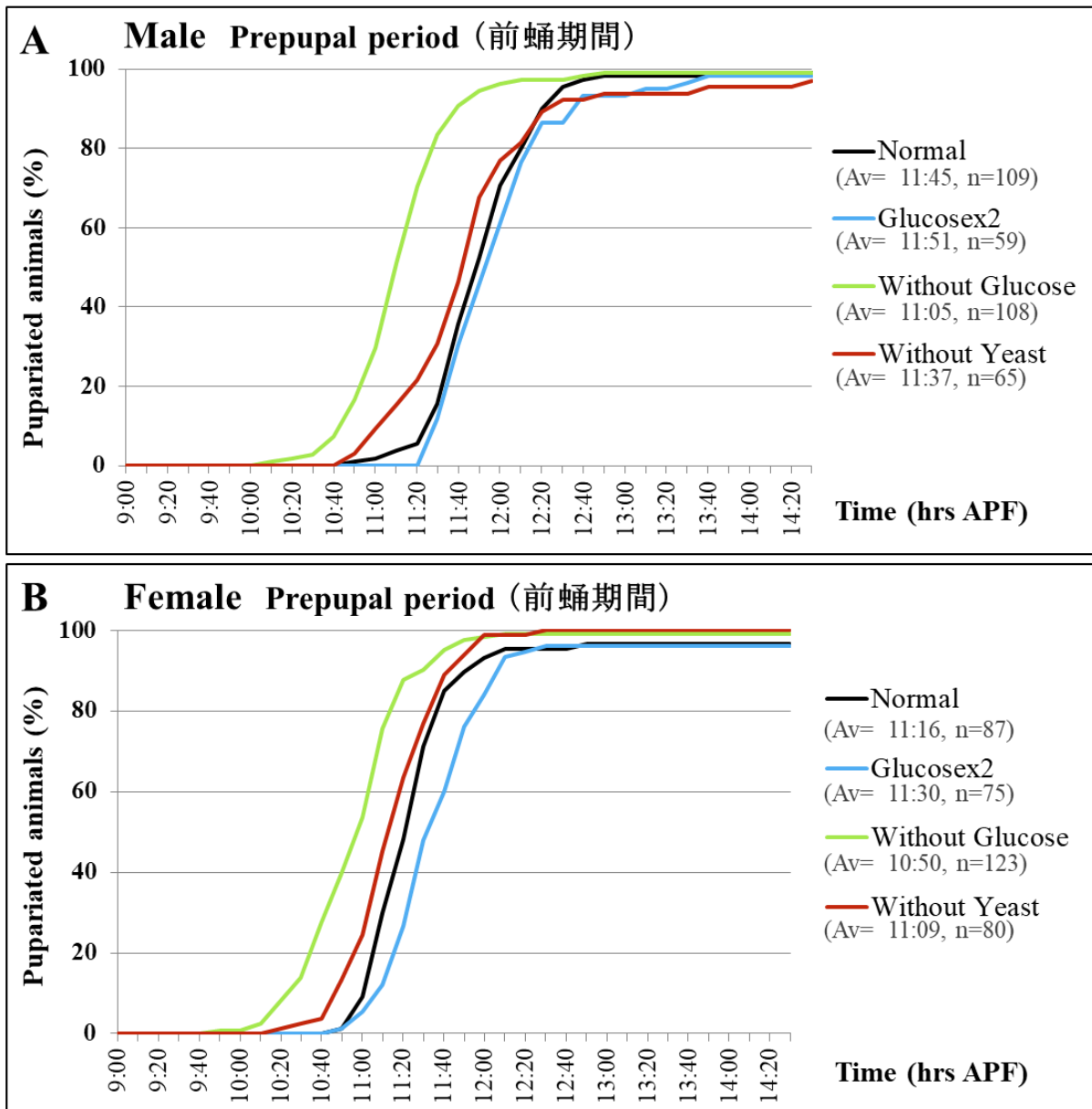


Fig. 19. グルコースは3 齢幼虫後期での摂取量が変わること
で蛹化タイミングに影響を与える

3 齢幼虫後期特異的に栄養条件を変えた培地で飼育した *yw* の前蛹の蛹化タイミングを30分ごとに蛹化タイミングを観察した結果。オスの結果を (A), メスの結果を (B) にそれぞれ示す。

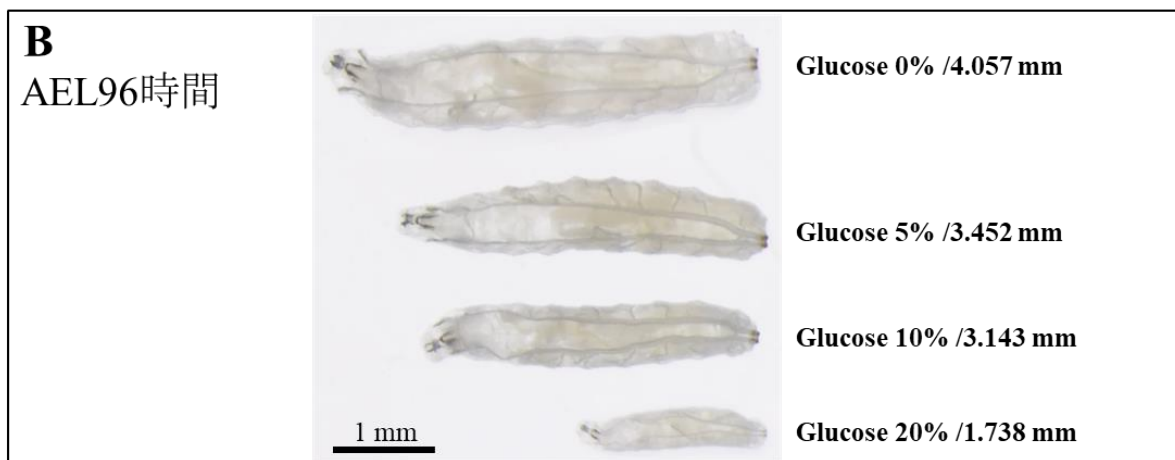
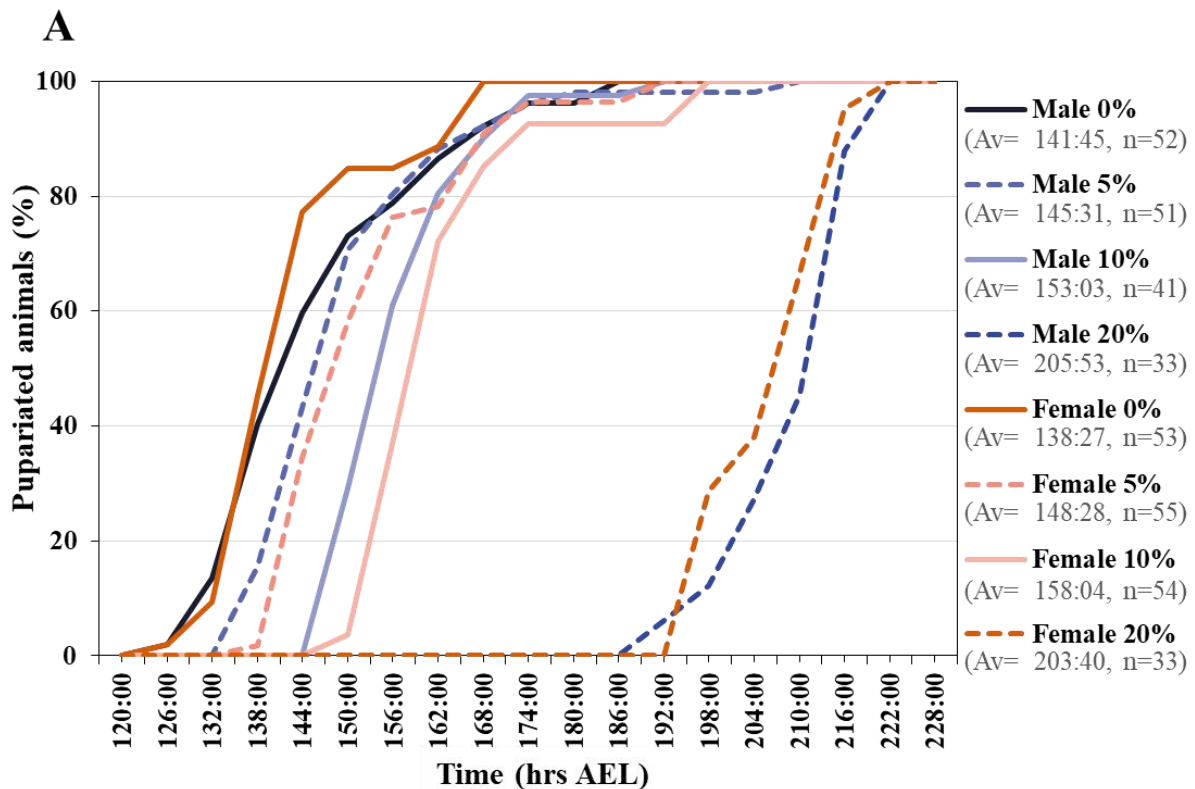


Fig. 20. グルコースの摂取量は幼虫発生に影響する

(A) 孵化直後から 0, 5, 10, 20% とグルコース濃度を変えた培地で飼育した OR を 1 時間ごとに観察し、幼虫期間を計測した。オスの結果を青系色、メスの結果を赤系色で示す。

(B) グルコース濃度を変えた培地で飼育した幼虫の AEL96 時間でのサイズ比較写真。

高グルコースにより幼虫期間が延長し、グルコース濃度に反比例して growth rate の上昇がみられた。また、高グルコースによる幼虫期間の延長はオスでより顕著であった。

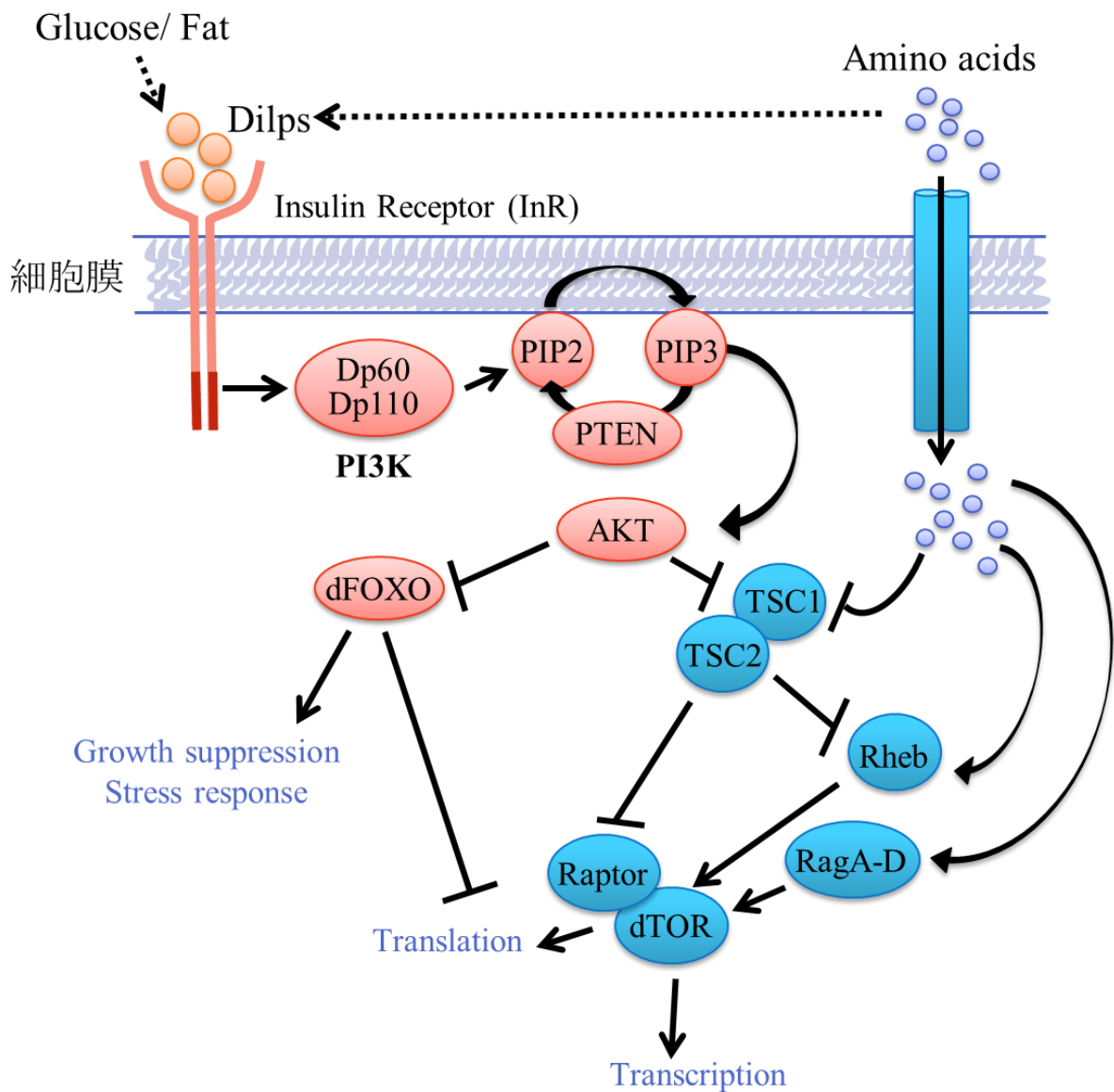


Fig. 21. インスリンおよび TOR パスウェイの模式図

インスリンパスウェイに関係する因子を赤，TOR パスウェイに関係する因子を青で示す。

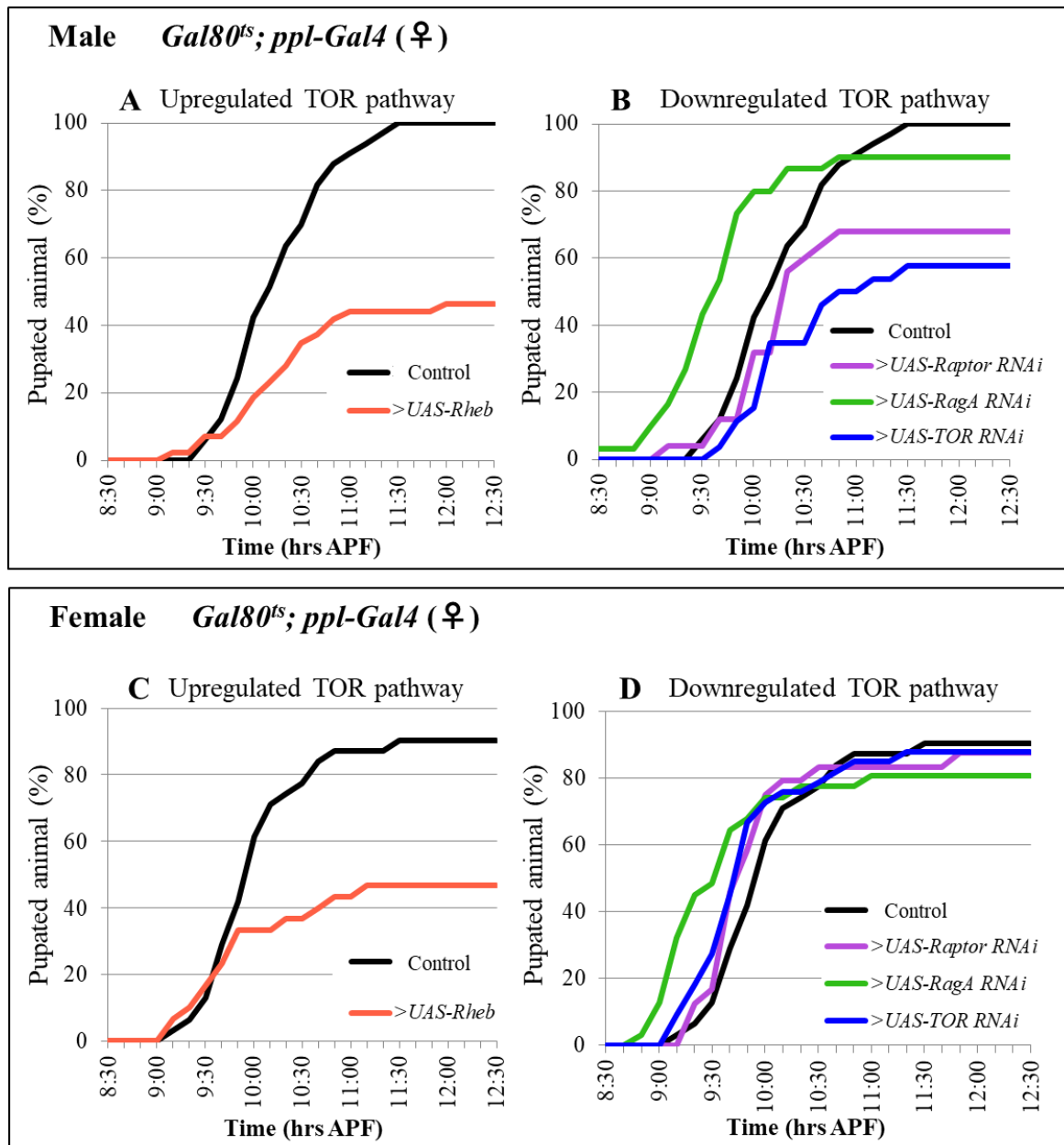


Fig. 22. 前蛹期特異的に脂肪体において TOR パスウェイに含まれる遺伝子の発現を変化させても蛹化タイミングに影響しない

GAL4/UAS システムおよび、温度感受性 *GAL4* 阻害タンパク *Gal80^{ts}* を用いて、囲蛹殻形成後の脂肪体特異的に TOR パスウェイの活性を変化させて 10 分ごとに蛹化タイミングを観察した。 *Gal80^{ts}; ppl-Gal4* に TOR パスウェイに含まれる因子の UAS 系統を掛け合わせて、 *Rheb* 遺伝子を強制発現 (橙) および、 *Raptor* 遺伝子 (紫)、 *RagA* 遺伝子 (緑)、 *TOR* 遺伝子 (青) の発現を抑制した。 *Gal80^{ts}; ppl-Gal4* に *yw* を掛け合わせて得られた個体をコントロール (黒) とした。オス個体において TOR パスウェイを活性化した結果を (A)、抑制した結果を (B) に示す。メス個体において TOR パスウェイを活性化した結果を (C)、抑制した結果を (D) に示す。

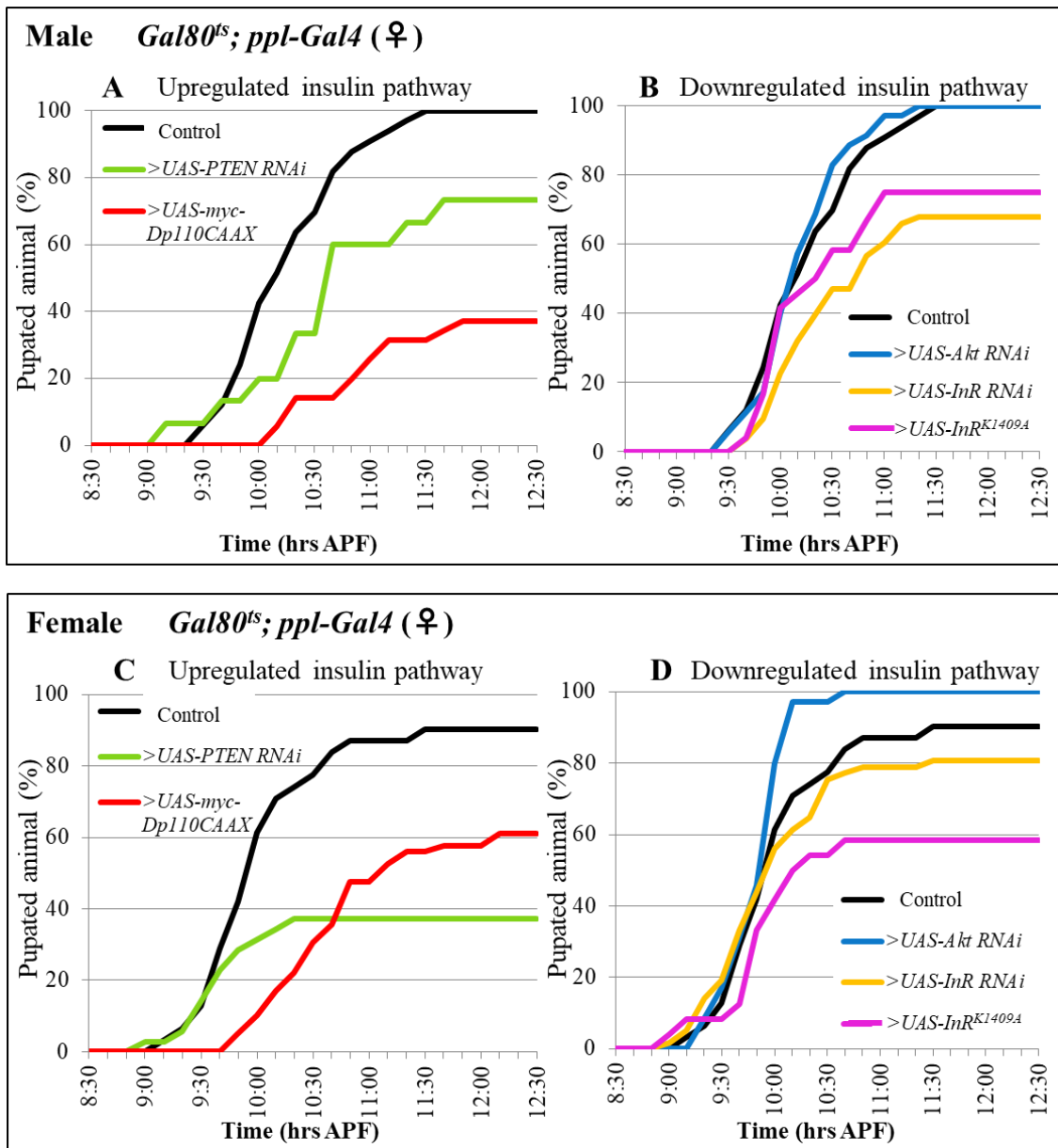


Fig. 23. 前蛹期特異的に脂肪体においてインスリンパスウェイに含まれる遺伝子の発現を変化させても蛹化タイミングに影響しない

GAL4/UAS システムおよび、温度感受性 *GAL4* 阻害タンパク *Gal80^{ts}* を用いて、囲蛹殻形成後の脂肪体特異的にインスリンパスウェイの活性を変化させて 10 分ごとに蛹化タイミングを観察した。 *Gal80^{ts}; ppl-Gal4* にインスリンパスウェイに含まれる因子の *UAS* システムを掛け合わせて、 *Dp110* 遺伝子 (赤) またはインスリン受容体 (*InR*) のドミナントネガティブ (桃) を強制発現および、 *PTEN* 遺伝子 (黄緑) , *Akt* 遺伝子 (青), *InR* 遺伝子 (黄) の発現を抑制した。 *Gal80^{ts}; ppl-Gal4* に *yw* を掛け合わせて得られた個体をコントロール (黒) とした。オス個体においてインスリンパスウェイを活性化した結果を (A), 抑制した結果を (B) に示す。メス個体においてインスリンパスウェイを活性化した結果を (C), 抑制した結果を (D) に示す。

	MALE	Regulation	Prepupa (n=)	Ratio of pupation (%)	Average	Comparison with average of control
Control	<i>Gal80^{ts}; ppl-Gal4 >yw</i>		33	100.0	10:07	
TOR	> <i>UAS-TOR RNAi</i>	down	26	57.7	10:12	+ 0:05
	> <i>UAS-RagA RNAi</i>	down	30	90.0	9:27	- 0:40
	> <i>UAS-Raptor RNAi</i>	down	25	68.0	9:58	- 0:09
	> <i>UAS-Rheb</i>	up	43	46.5	10:07	± 0:00
Insulin	> <i>UAS-Akt RNAi</i>	down	35	100.0	10:04	- 0:03
	> <i>UAS-InR RNAi</i>	down	53	67.9	10:13	+ 0:06
	> <i>UAS-PTEN RNAi</i>	up	15	73.3	10:18	+ 0:11
	> <i>UAS-myc-Dp110CAAX</i>	up	35	37.1	10:40	+ 0:33
	> <i>UAS-InR^{K1409A}</i>	down	24	75.0	10:04	- 0:03

	FEMALE	Regulation	Prepupa (n=)	Ratio of pupation (%)	Average	Comparison with average of control
Control	<i>Gal80^{ts}; ppl-Gal4 >yw</i>		31	90.3	9:50	
TOR	> <i>UAS-TOR RNAi</i>	down	33	87.9	9:38	- 0:12
	> <i>UAS-RagA RNAi</i>	down	31	80.6	9:19	- 0:31
	> <i>UAS-Raptor RNAi</i>	down	24	87.5	9:41	- 0:09
	> <i>UAS-Rheb</i>	up	30	46.7	9:43	- 0:07
Insulin	> <i>UAS-Akt RNAi</i>	down	35	100.0	9:42	- 0:08
	> <i>UAS-InR RNAi</i>	down	57	80.7	9:44	- 0:06
	> <i>UAS-PTEN RNAi</i>	up	35	37.1	9:52	+ 0:02
	> <i>UAS-myc-Dp110CAAX</i>	up	59	61.0	10:29	+ 0:39
	> <i>UAS-InR^{K1409A}</i>	down	24	58.3	9:42	- 0:08

Table. 1. 前蛹期の脂肪体特異的にインスリンおよび TOR パスウェイ関連遺伝子の発現を変化させた場合の蛹化タイミング計測結果一覧

UAS-myc-Dp110CAAX は myc タグの付いた PI3K の触媒ユニットである Dp110 と、細胞膜への移行シグナルの認識部位である CAAX-Box を強制発現することのできる系統である。また、*UAS-InR^{K1409A}* はアミノ酸置換によって機能部位が欠損したインスリン受容体(ドミナントネガティブ)を強制発現することのできる系統である。