

# Genetic dissection of stress-induced reproductive arrest in *Drosophila melanogaster* females

著者	小島 紀幸
号	16
学位授与機関	Tohoku University
学位授与番号	生博第369号
URL	<a href="http://hdl.handle.net/10097/00126114">http://hdl.handle.net/10097/00126114</a>

	おじま のりゆき
氏名（本籍地）	小島 紀幸
学位の種類	博士（生命科学）
学位記番号	生博第369号
学位授与年月日	平成31年3月27日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
研究科，専攻	東北大学大学院生命科学研究科 （博士課程）生命機能科学専攻
論文題目	Genetic dissection of stress-induced reproductive arrest in <i>Drosophila melanogaster</i> females（ショウジョウバエのストレス誘導性卵巣発育停止の分子遺伝学的解析）
博士論文審査委員	（主査）准教授 小金澤 雅之 教授 東谷 篤志 教授 大橋 一正 助教 梅津 大輝

## 論文内容の要旨

### 1. はじめに

休眠とは生物が一定期間活動を停止させることであり、昆虫では環境の変化を受けて生殖器官の活動を停止させる場合がある。例えばカイコガは休眠現象が古くから研究されており、休眠を誘導するホルモンも同定されている。しかしながら、これらの昆虫では休眠現象は明確であっても、その基盤となるメカニズムの解析は難しい。一方で、遺伝研究のモデル生物であるキイロショウジョウバエ (*Drosophila melanogaster*) では、温度と光周期によって、卵巣が活動を停止させる生殖休眠（卵巣休眠）を示すことが知られている。そこで本研究では、さまざま遺伝子ツールを利用することのできるショウジョウバエを用いて卵巣休眠機構の分子基盤・中枢基盤を明らかとすることを目標とした。

### 2. ショウジョウバエの卵巣休眠条件の確立

分子細胞レベルでの解析に先立ち、これまで明確でなかった卵巣休眠誘導条件の確立を行った。過去の知見では温度条件および日長条件の操作のみで休眠誘導を検討していたが、本研究では、低温（11℃）且つ短日条件とした上で、成虫を羽化後から飢餓状態におき高いストレスを与えることにより、顕著な卵巣休眠・非休眠の誘導が安定的に出来ることを見出した。具体的には、羽化後 6 時間以内の雌を、短日条件（10L : 14D）に暴露すると卵室内に卵黄蓄積のない卵巣をもつ個体（卵巣休眠個体）が多くなり、一方で長日条件（16L : 8D）に暴露すると卵室内に卵黄を蓄積させる個体（卵巣非休眠個体）が多くなる変化を確認した。このことは、本種の雌が、羽化後に暴露された厳しい環境条件を事前に察知し、卵巣発育を制御することで、延命につなげるためのメカニズムをもっていることを示唆する。

### 3. 卵巣休眠における光周反応とサーカディアンリズムの関連性

卵巣休眠は長日条件に比べ短日条件の方がより強く誘導されるという明確な光周性を示す。光周反応はサーカディアンリズムを制御する機構と関連のある事が示唆されている。そこで、休眠における光周反応とサーカディアンリズムとの関連性を調査するため、羽化後の光受容の伝達に関与している 2 つの因子、色素拡散因子（PDF）とクリプトクロム（CRY）に焦点をおき、それぞれの変異体を使った卵巣休眠率を比較した。その結果、PDF 変異体では休眠の光周性が消失したのに対して、CRY 変異体では光周性は維持されたままであることが明らかとなり、PDF が卵巣休眠・非休眠の伝達に重要な役割を果たしている可能性が示唆された。

### 4. 卵巣休眠決定の中枢機構

インスリン様ペプチドを分泌する脳内のインスリン産生細胞（IPCs）は、ショウジョウバエだけでなく他の昆虫においても、生殖休眠・非休眠を決定する中枢として注目されている細胞群である。IPCs の活動レベルがショウジョウバエの卵巣休眠の誘導と関連性があるかどうかを調べるため、Ca<sup>2+</sup>流入による細胞の興奮をモニタリングすることが出来る TRIC

アッセイを行った。その結果、長日条件下で維持されたハエよりも短日条件下で維持されたハエの IPCs の活動レベルが有意に低い事が明らかとなった。さらに、脳 IPCs でのみ発現する GAL4 系統を利用して、これらの細胞の強制活性化ならびに不活性化実験を行ったところ、強制活性化により卵巣休眠率が顕著に低下し、不活性化により休眠率が増加することが明らかとなった。これらの解析から、IPCs の活動レベルが低いときは、卵巣休眠する可能性が高くなり、IPCs の活動レベルが高いときは、卵巣休眠する可能性が低くなることが示唆された。また、IPCs の不活性化による増強された休眠では、光周期応答性が喪失したことから、卵巣休眠における光周期情報は IPCs において統合されることも示唆された。

## 5. 卵巣休眠決定の出力機構

生殖休眠をするさまざまな昆虫種では、アラタ体によって合成された幼若ホルモン (JH) が、生殖休眠に重要な役割を果たしている。また、アラタ体を構成する細胞表面には、インスリン受容体 (InR) の存在が指摘されていることから、インスリンシグナル伝達系を介して JH 合成がアラタ体内で誘導されている可能性が高いと考えた。そこで、アラタ体で発現する GAL4 系統を用いて、InR の活性化と不活性化、その後の細胞内シグナル伝達分子として知られている PI3K や mTOR、さらに翻訳調節因子である eIF4E の結合タンパク質 4E-BP の卵巣休眠への影響を調査した。その結果、インスリンシグナル伝達系においては InR, PI3K, mTOR の機能阻害、および 4E-BP の活性化が卵巣休眠を誘導することが明らかとなった。また、JH がアラタ体で機能するメバロン酸経路に関与する酵素群により最終的に合成されることから、その代謝系における重要な酵素、3-ヒドロキシ-3-メチルグルタリル CoA レダクターゼ (HMGCR) の機能阻害実験と、JH 酸 O-メチルトランスフェラーゼ (JHAMT) の強制発現実験を行った。その結果、JH 合成に関与する 2つの酵素、HMGCR と JHAMT の機能阻害も同様に休眠誘導をもたらすことが明らかとなった。これらの結果は、インスリンシグナル伝達系を介したアラタ体での JH 合成量の低下が最終的に卵巣休眠につながることを示唆する。

## 論文審査結果の要旨

昆虫は比類なき環境適応能力を有しており、地球上のほとんどあらゆる場所に生息している。日本の国土の多くが含まれる温帯圏では、冬季の低温と餌の欠乏が昆虫の生存を脅かす大きな要因となりうるが、こうした環境ストレスに抗して生存を続ける術として、多くの昆虫が休眠機構を発達させてきた。休眠の際立った特徴は、冬の訪れを日長の変化からあらかじめ察知し、生理状態を変化させる機構が存在する点である。すなわち、光周期感受性である。本研究では、不明な点の多い休眠の神経制御機構について、遺伝学的手法を縦横に駆使することのできるキイロショウジョウバエを用いて解明することを目指した。キイロショウジョウバエの雌は低温・短日条件下に置かれると一部の卵の成熟が抑えられ、卵黄の蓄積が起こらなくなる。卵成熟の停止は他の昆虫の生殖休眠に広く見られる現象であるが、キイロショウジョウバエでは停止する割合が低くばらつきが大きい。本研究では低温・短日に加えて絶食させること（「休眠誘導条件」と呼ぶ）で、安定かつ高頻度の卵成熟停止を引き起こすことに成功した。この卵成熟の停止は、脳のインスリン合成ニューロン（IPC）の活動を人為的に高めることで解消され、神経活動を抑制することで促進された。また、転写レポーターによる神経活動レベルの測定から、休眠条件ではIPCの活動が低下していることがわかった。IPCに接続を持つ体内時計ニューロンには光感受性を有するものがあり、成虫の朝の活動に関わる **morning cell** では **PDF** タンパク質が光同調を媒介する一方、夕刻の活動に関わる **evening cell** では **CRY** タンパク質が重要とされている。本研究は、卵成熟の光周期感受性が *pdf* 変異によって失われるのに対して、*cry* 変異は効果がないことを明らかにした。IPCはその軸索を幼若ホルモン（JH）合成器官のアラタ体に伸ばしている。そこでアラタ体でインスリン・シグナル系などの一連の遺伝子の発現を操作したところ、インスリン・シグナルの低下がJHの減少を介して卵成熟の停止をもたらし、インスリン・シグナルの亢進は逆に卵成熟を促進することがわかった。以上の研究から、脳のインスリン産生ニューロンが環境応答としての卵成熟制御の要であり、休眠を特徴付ける日周期感受性は体内時計ニューロンからの入力によってもたらされることが明らかとなった。このように、本研究は休眠の理解に新たな一石を投じる成果を含んでおり、小島紀幸が自立して研究活動を行うに必要な高度の研究能力と学識を有することを示している。したがって、小島紀幸提出の論文は、博士（生命科学）の博士論文として合格と認める。