

ショウジョウバエの形態形成に関わる神経分泌ペプチドに関する研究： インスリン様ペプチド Dilp8 との関連

程 智浩（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】

多細胞生物は、発生過程において時期特異的な形態形成イベントを経て最終的なからだが作られる。特に完全変態昆虫は、変態過程に極めてダイナミックな変貌を遂げることから、古くから多くの研究者を魅了してきた。興味深いことに、ほとんどの完全変態昆虫は、変態開始時に細長い形状の幼虫が縦方向に収縮し、ずんぐりとした形状の蛹になる。しかしながら、変態開始時の全身の形状変化がどのような分子メカニズムによって誘導されるのかはほとんど明らかになっていない。

所属研究室における先行研究により、キイロショウジョウバエ（以下、ショウジョウバエ）を用いて、変態開始時の形状変化に関与するペプチドホルモンをコードする *pupal contraction-inducing hormone* (*PCH*) 遺伝子（未発表のため、仮称とする）が同定された⁽¹⁾。すなわち、脳の神経分泌細胞から分泌されるペプチドホルモン *PCH* が、変態開始時の形状変化を誘導することが明らかになった⁽¹⁾。さらに、他の研究グループにより、同じくショウジョウバエを用いて、表皮細胞で産生されるインスリン様ペプチド 8 (*Dilp8*) が変態開始時の形状変化を誘導することが報告されている⁽²⁾。*PCH* 及び *dilp8* 変異体では、いずれの変異体においても変態開始時の形状変化に異常をきたし、蛹が細長くなる^(1,2)。以上の結果から、脳神経系由来の *PCH* と表皮細胞由来の *Dilp8*、両ホルモンの間に何らかの上下関係が存在し、時期特異的な形状変化が誘導される可能性が強く示唆された。

そこで本研究では、変態開始時に全身の形状変化を誘導する 2 つのペプチドホルモン、*PCH* と *Dilp8* の関係性を明らかにすることを目的として、先行研究の結果を再検証するとともに、*PCH* 及び *dilp8* の変異体やノックダウン個体を用いた表現型の比較解析を行なった。さらに、*PCH* 変異体における *dilp8* の発現量の変化を解析した。

【方法】

(1) 蛹縦横比 (Pupal axis ratio: PAR) 解析

背側を上として両面テープで蛹をスライド上に貼り付け、実体顕微鏡下で撮影した。ImageJ により蛹の長径 (Hight)、短径 (Width) を測定し、各個体の縦横比 ($PAR = \text{Hight} / \text{Width}$) を算出した。

(2) 翅サイズのばらつき (Fluctuating Asymmetry index: FAi) 解析

羽化後 1~3 日の成虫を、2-プロパノール中において保存した。翅を phosphate buffer saline (PBS) 中で解剖・摘出し、乳酸とグリセロールを 6:5 で混合した溶液でスライドガラス上にマウントし、おもりを乗せてしばらく置いた。その後 Apotome 顕微鏡 (ZEISS) を用いて翅を撮影し、ImageJ を用いて面積計測を行った。FAi は、以下の式で算出した。Ri, Li はそれぞれ各個体の右、左の翅の面積を指す。FAi = $\text{var} [(Ri - Li) / \{ (Ri + Li) / 2 \}]$

(3) 定量 RT-PCR 法による遺伝子発現量の解析

コントロール個体及び *PCH* 変異体を用いて、蛹化前後 (±2 時間) 及び蛹化時の個体から RNA を抽出し、逆転写反応によって cDNA を作成した。*dilp8* に対する特異的プライマーを用いてリアルタイム PCR を実施し、得られた定量値をハウスキーピング遺伝子 *rp49* で補正して遺伝子発現量を算出した。

【結果・考察】

(1) *PCH* 及び *dilp8* 変異体における表現型の比較

先行研究結果の再検証と、*PCH* 及び *dilp8* 変異体の表現型の比較を行うため、各変異体における蛹の縦横比 (PAR) を解析した。その結果、先行研究の結果通り、*PCH* 及び *dilp8* 変異体では、いずれもコントロールと比較して顕著に PAR が上昇した。また、それぞれの変異体の PAR の上昇率を比較した結果、その上昇率は同等であった。

以上の結果から、*PCH* 及び *dilp8* 変異体は、同様の蛹形状異常の表現型を示すことが確認された。

(2) *PCH* 変異体個体における翅サイズのばらつき

他の研究グループの研究により、*dilp8* 変異体では、蛹形状の異常だけでなく、成虫の翅サイズの左右差 (FAi) が大きくなることが報告されている⁽³⁾。一方、*PCH* 変異体における成虫の翅の FAi については明らかになっていない。そこで、*PCH* と *Dilp8* の関係性を明らかにするため、*PCH* 変異体を用いて、成虫の翅の FAi の解析を行なった。本結果と考察については、発表会にて報告する。

(3) *PCH* 変異体における *dilp8* 発現量の解析

脳神経系由来の *PCH* が、表皮細胞で産生される *Dilp8* の上流因子として機能するという仮説のもと、*PCH* 変異体における *dilp8* 発現量の解析を行なった。本結果と考察については、発表会にて報告する。

【参考文献】

- [1] 阿部奏人, 2022 年度 修士論文
- [2] F. Heredia et al (2021) *Nat Commun* 12, 3328
- [3] D. Blanco-Obregon et al (2022) *Nat Commun* 13, 5629