

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 2 年 5 月 28 日現在

機関番号：15301
 研究種目：基盤研究(C) (一般)
 研究期間：2017～2019
 課題番号：17K07412
 研究課題名(和文) ショウジョウバエの発生タイミングを決める生物タイマーと環境要因の影響の分子機構

 研究課題名(英文) Molecular mechanisms of biological timers that determine developmental timing and environmental effects in *Drosophila*

 研究代表者
 上田 均 (Ueda, Hitoshi)

 岡山大学・自然科学研究科・教授

 研究者番号：60201349
 交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：ショウジョウバエを用いて栄養状態が発生タイミングに影響を及ぼす分子機構解析し、幼虫期の栄養状態の情報が前蛹期前期以前の早い段階で入力され、前蛹期間に影響を及ぼすこと、インスリンとTORパスウェイ因子が関わるが、その機構は単純ではなことも明らかになった。3前蛹期間を決める機構においてBlimp-1はFBX011によって認識されて26Sプロテアソームで分解されること、また、短ペプチドのPriがその過程で重要な役割を果たすことが示唆された。3齢幼虫期に前胸腺で発現するFTZ-F1遺伝子プロモーター領域を明らかにし、この領域が3齢幼虫期間を決定する機構において重要な役割をすることを示す結果を得た。

研究成果の学術的意義や社会的意義
 生物が正確に時間を測るタイマーの分子機構は解析されておらず、本解析は生命現象を分子レベルで理解する上で重要な意義がある。さらに、生物は環境に適応する手段として時間調節を多くの場合使うことから、この機構の解明は生物の環境変化への対応機構という観点、および、昆虫変態期の時間制御という点からも重要な意味がある。またホルモンシグナルだけで補えない時間情報を与える機構として、生物を分子レベルで理解する上で新しく重要な視点の解析で、生物の利用や害虫駆除さらには医療面でも役立つことが期待される。さらに、Insulin やTOR 経路はヒトでも働いており、ヒトの健康等に貢献できる成果が出る可能性もある。

研究成果の概要(英文)：We analyzed the molecular mechanisms to affect nutritional signals during the larval period on developmental timing of *Drosophila*. We found that the signal goes in before the early stage of prepupa and that the mechanism may not be simple, although at least some of the Insulin and TOR pathway factors contribute to the pathway. In the mechanism to determine prepupal period, we got results to suggest that Blimp-1 degrades in 26S proteasome identified by FBX011 and that the short peptide Pri contributes in the degradation system. We identified the promoter region of the FTZ-F1 gene which is expressed in the prothoracic gland during 3rd instar larva and got results to show that this region plays an important role to determine the 3rd instar larval period.

研究分野：発生生物学

キーワード：タイミング 栄養 ショウジョウバエ エクダイソン 変態

様式 C - 19, F - 19 - 1, Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

生物は発生過程や生命活動中にしばしば時間を計り、その情報を利用しており、これが個々の生物にとって重要である場合がある。この時間制御機構として概日時計や脊椎動物発生過程での体節形成機構などのように周期的に動くいわゆる時計機構の解析は進んでいるものの、生物がある特定の時期にのみ時間を計るタイマーに相当する機構の解析およびその意義に関する研究は進んでいない。また、生物は様々な環境状況に反応して対応を行い、そのひとつの有力な手法が時間的制御であるが、その機構に関しての解析もほとんど行われていない。我々はキロシヨウジョウバエの3齢幼虫期、前蛹期、蛹期の特定の時期に時期特異的に発現し、それぞれの期間に影響を及ぼす因子を明らかにするとともに、前蛹期に関してはかなり詳しく、その期間の決定機構を明らかにしてきた。さらに、その決定機構が脂肪体で働いていること、幼虫期の栄養状態が前蛹期間に影響を及ぼすことを明らかにしてきた。

2. 研究の目的

幼虫期の栄養状態が前蛹期間および蛹期間の長さに影響を及ぼす分子機構解析、前蛹期間および蛹期間の決定にどの栄養素が影響するかの解析、また、影響する栄養素が同定したタイマーのどの段階にどのような機構で影響を及ぼすかを解析することで、発生過程で栄養状態の情報を受容して対応する分子機構を明らかにすることを目的とした。また、3齢幼虫期、前蛹期および蛹期の決定に関わる因子を検索し明らかにするとともに、同定した因子の発現制御機構および役割を明らかにすることで、3齢幼虫期、前蛹期および蛹期の決定の詳しい機構の解明を目指した。

3. 研究の方法

前蛹期間の決定に各栄養素が与える影響を調べるため、エサから糖質あるいはタンパク質を除いた状態で幼虫を飼育し、前蛹期間への影響を調べた。次に、栄養状態シグナルが伝わる機構の解明を目指すため、GAL4-UAS システムを用いて既知の栄養状態のシグナル伝達パスウェイの活性を部位および時期特異的に変え、前蛹期間へ与える影響を調べた。また、3齢幼虫期間、前蛹期間、および蛹期間の決定の詳しい機構を明らかにするため、エクダイソンパルスタイミングを決める可能性のある因子を含め、3齢幼虫期間、前蛹期、および蛹期に影響を与える因子の候補の変異株あるいは RNAi 系統での各ステージ期間への影響を調べるとともに、発現パターンを解析した。さらに、その中で重要な因子についてはプロモーターも含め発現制御機構の解析を通じて、その発現制御機構を調べた。

4. 研究成果

(1) 栄養状態が蛹化タイミングに影響を与える機構の解析

シヨウジョウバエ幼虫を3齢期の様々なタイミングで寒天だけの培地に移し、飢餓状態に飼育したところ、AEL88 時間以降に移したのであれば、効率よく困蛹殻形成し蛹化できることが判明した。そこで、AEL88 時間に3齢幼虫を寒天だけの培地に移すことで飢餓状態に飼育したのち、前蛹期間を測定した。その結果、飢餓にすることにより、約0.5時間前蛹期が延長し、3齢中後期の栄養状態が前蛹期間の決定に関わることが明らかになった。関係する栄養素を調べるため、培地からグルコースあるいはイーストを除いた状態で同様に飼育したが、前蛹期間への影響はみられず、貧栄養での前蛹期間の延長は、アミノ酸あるいは糖質以外の栄養素あるいは栄養素全体の影響の可能性が高まった。

次にこの栄養シグナルを伝える機構を調べるために、Insulin と TOR パスウェイの活性を変化させ、前蛹期間への影響を調べた。蛹化タイミングを決めるタイマー機構は脂肪体で働いているので、分子遺伝学的手法を用いて脂肪体特異的に前蛹期に Insulin と TOR パスウェイの活性を変化させたところ、TOR パスウェイの一つの因子の活性を低下させた時のみ前蛹期間が延長した。

次に3齢幼虫後期に脂肪体特異的に Insulin あるいは TOR パスウェイの活性を変化させたところ、Insulin と TOR パスウェイのそれぞれ1つの因子の活性の変化で、前蛹期間が変化した。脂肪体以外の器官で Insulin あるいは TOR パスウェイが働いてシグナルが伝わる可能性があるため、3齢幼虫後期に体全体で Insulin と TOR パスウェイ(図1)の活性を変化させたところ、Insulin と TOR パスウェイのそれぞれ1つの因子の活性の変化で、前蛹期間が変化した。以上のことから、3齢中後期の栄養状態が、前蛹期間に影響を及ぼすこと、また、そのシグナルを伝える機構に Insulin と TOR パスウェイの一部の因子に関わることが明らかになった。Insulin と TOR パスウェイの全ての因子での影響が見られな

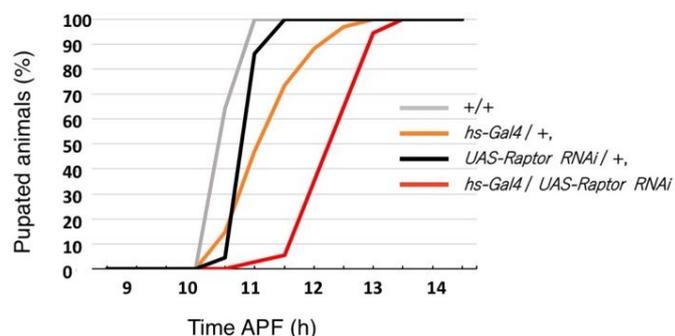


図1. TORパスウェイが前蛹期間に及ぼす影響
幼虫後期(AEL106時間)に全身でRaptorをknockdownさせ、TORパスウェイの活性をダウンさせた時の前蛹期間(蛹化タイミング)。
APF: after puparium formation

かった理由として、用いた手法では十分前蛹期間に影響を与えなかった可能性や未知のパスウェイが関わっている可能性などが考えられた。脂肪体特異的発現制御と体全体での発現制御の解析結果の一部に違いが見られたことから、栄養状態を伝える経路は、脂肪体だけでは説明できないと考えられた。

次に栄養状態がエクダイソンパルスへの影響を調べるために RT-PCR 法で *ptth*, *E75A*, *E75B*, *shade*, *blimp-1*, *cyp18a* 遺伝子の前蛹期での発現を比較したところ、発現タイミングに違いが見られ、エクダイソンパルスのタイミングに影響を及ぼすことで、前蛹期間が延長している可能性が示唆された。

(2) 前蛹期間に影響を与える因子の検索

前蛹期間を決定する機構をさらに詳しく明らかにするために、前蛹期間に影響を与える因子の検索を変異株の前蛹期間を測定することによって行った。その結果、26S プロテアソーム構成因子のひとつのサブユニットの変異株で、前蛹期間の延長が見られた(図2)。そこで、他のサブユニットの変異株での前蛹期間を測定したところ、20S サブユニット部分及びリッドの構成成分の調べた全ての変異株で、前蛹期間の延長が見られた。同定したタイマー機構において、Blimp-1 の分解速度が低下したため、前蛹期間が延長したと予想された。そこで、26S プロテアソーム構成因子の変異株で前蛹期に Blimp-1 を *hs-Blimp-1* transgene より熱ショックで誘導し、誘導された Blimp-1 の分解速度を調べたところ、Blimp-1 の分解速度が低下していることが明らかになった。

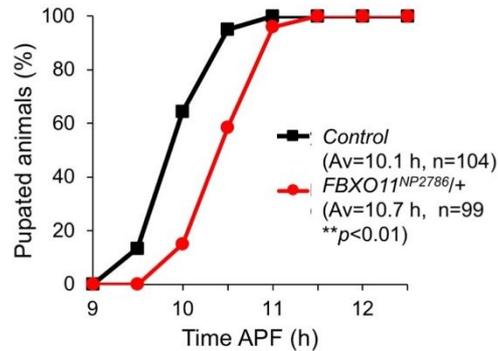


図2. FBXO11が前蛹期間に及ぼす影響
前蛹期間を野生型と *FBXO11* heterozygote 変異個体と比較した結果。*FBXO11* 変異個体では前蛹期間が約0.6時間延長した。
APF: after puparium formation

線虫では FBXO11 が SCF ユビキチンリガーゼ複合体の標的認識因子として Blimp-1 をユビキチン化し、プロテアソームの分解のシグナルとなることが示されていたので、ショウジョウバエの FBXO11 での前蛹期間を測定した。その結果、FBXO11 変異株で前蛹期間の延長が見られ、FBXO11 が SCF ユビキチンリガーゼ複合体の標的認識因子として Blimp-1 にユビキチン化を誘導し、プロテアソームの分解のシグナルとなることで分解を促進することが示唆された。

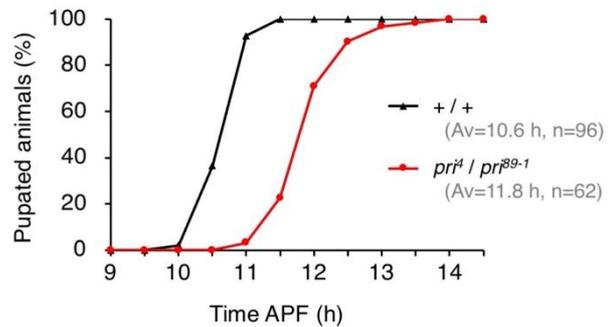


図3. Priが前蛹期間に及ぼす影響
前蛹期間を野生型と *pri* transheterozygote 変異個体と比較した結果。*pri* 変異個体では前蛹期間が約1.2時間延長した。
APF: after puparium formation

次に、タイマーが動いている脂肪体特異的に26S プロテアソーム構成因子を RNAi 法でノックダウンしたところ前蛹期間の延長が見られ、また、FBXO11 変異株による前蛹期間の延長が、FTZ-F1 を *hs-FTZ-F1* 遺伝子から熱ショックで誘導することで回復することができた。以上のことから同定した Blimp-1 の分解経路が前蛹期間を決めるタイマー機構において重要であることを確認することができた(文献1)。

短ペプチド Polished rice (Pri) は、エクダイソンで誘導されて Blimp-1 の分解時期に発現すること、および、*pri* 変異株の一部の変異形質は *blimp-1* および *ftz-f1* 変異株の変異形質と類似していることから、Pri が同定しているタイマー機構に関与する可能性を調べた。*pri* 変異株で前蛹期間が延長すること(図3)、また、Blimp-1 分解速度が低下することを示す結果が得られ、Pri が Blimp-1 分解に関わることで、同定しているタイマー機構に重要な役割を果たすことが示唆された。

(3) 蛹期間の決定機構

困蛹殻形成期にエクダイソンパルスの期間決定に重要な役割をする Broad についてその変異株を用いて蛹期間への影響を調べたが、その変異株で羽化タイミングに影響は見られず、蛹におけるエクダイソンパルスは困蛹殻形成期のものと異なる機構で制御されていると考えられた。一方、PTTH の発現時期の解析の結果、PTTH 発現時期はエクダイソンパルス期間に影響を及ぼすことが示唆された。

蛹期の Blimp-1 の強制発現で FTZ-F1 の発現が遅れること、ノックダウンで発現促進がおこることから、Blimp-1 によって FTZ-F1 の発現タイミングが制御されると考えられた。一方、*E75* 変異株で羽化タイミングが遅延しないことから、少なくとも蛹期間を決めるタイマー機構において FTZ-F1 の発現を抑制しているとは考えにくいことがわかった。

(4) 3 齡幼虫期間の決定機構

幼虫期に発現する FTZ-F1 の発現制御領域を調べる一つの方法として、予想される制御領域近傍に挿入した P エlement 内部の遺伝子の発現を調べることにより、発現制御領域を推定した。その結果、この推定した領域に P エlement が挿入した場合、および、この部位に挿入している P エlement の imprecise excision による欠失より、3 齡期間が大きく延長することから、この領域が遺伝子発現に重要であることを示すことができた。また、3 齡期での FTZ-F1 の時期特異的強制発現あるいはノックダウンにより、3 齡期間に影響が出ること示唆する結果が得られ、3 齡期での FTZ-F1 の時期特異的発現の重要性が確認された。

クチクラを中性条件で分解する酵素を発見し(文献 2)、剥がすことが困難な蛹クチクラがある個体でもマイルドな条件でクチクラを分解し、*LacZ* を用いたレポーターアッセイの際の組織染色ができるようになる可能性が生じた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Aly, H.amdy, Akagi, Kazutaka. and Ueda, Hitoshi	4. 巻 60
2. 論文標題 Proteasome activity determines pupation timing through the degradation speed of timer molecule Blimp-1	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Dev, Growth Differ.	6. 最初と最後の頁 502-508
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/dgd.12569	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 E. Tabata, A. Kashimura, S. Wakita, M. Ohno, M. Sakaguchi, M. Y. Sugahara, Y. Imamura, S. Seki, H. Ueda, V. Matoska, O. Bauer and F. Oyama	4. 巻 7
2. 論文標題 Protease resistance of porcine acidic mammalian chitinase under gastrointestinal conditions implies that chitin-containing organisms can be sustainable dietary resources	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 12963
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-017-13526-6	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計13件（うち招待講演 1件/うち国際学会 5件）

1. 発表者名 Hitoshi Ueda, Haruka Nishida and Mayu Nakanishi
2. 発表標題 Effects of nutritional signal in the timer system to determine prepupal period in Drosophila melanogaster
3. 学会等名 Joint Annual Meeting of JSDB 51st and JSCB 70th
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Haruka Nishida, Mayu Nakanishi and Hitoshi Ueda
2. 発表標題 Why timer system to measure prepupal period is present in fat body?
3. 学会等名 13th Japanese Drosophila Research Conference
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Koichi Miyagawa and Hitoshi Ueda
2. 発表標題 Mechanism of transcriptional activation by two different transcriptional activators through a single binding site
3. 学会等名 13th Japanese Drosophila Research Conference
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 K. Miyagawa and H. Ueda
2. 発表標題 Mechanism of transcriptional activation by two different transcriptional activators through a single binding site
3. 学会等名 58st Annual Drosophila Research Conference (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 H. Nishida, K. Akagi and H. Ueda
2. 発表標題 The advantages of repressor usage for a precise time measurement system in the development of Drosophila melanogaster
3. 学会等名 4th Asia-Pacific Drosophila Research Conference (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 H. Aly, Y. Kageyama and H. Ueda
2. 発表標題 Molecular players affecting the biological timer system to determine pupation timing in Drosophila
3. 学会等名 4th Asia-Pacific Drosophila Research Conference (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 H. Aly, K. Akagi and H. Ueda
2. 発表標題 Degradation mechanism of a transcriptional repressor dBlimp-1, which regulate the pupation timing in Drosophila
3. 学会等名 The 3rd International Insect Hormone Workshop (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 上田均
2. 発表標題 昆虫の形づくりのしくみとその多様性
3. 学会等名 日本遺伝学会第89大会公開講演会 (招待講演)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 H. Aly, K. Akagi, Y. Kageyama and H. Ueda
2. 発表標題 Molecular players affecting the biological timer system to determine pupation timing in Drosophila
3. 学会等名 第39回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 中西 真由, 上田 均
2. 発表標題 キイロショウジョウバエの転写因子 FTZ-F1による羽化タイミングの制御
3. 学会等名 第39回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Koich Miyagawa, Handy Aly, Kazutaka Akagi, Yuji Kageyama and Hitoshi Ueda
2. 発表標題 Function of Polished rice small peptide for a biological timer to determine prepupal period in <i>Drosophila melanogaster</i>
3. 学会等名 4th International Insect Hormone Workshop (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Koich Miyagawa, Handy Aly, Kazutaka Akagi, Yuji Kageyama and Hitoshi Ueda
2. 発表標題 Function of Polished rice small peptide for the determination of prepupal period in <i>Drosophila melanogaster</i>
3. 学会等名 第52回発生物学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 上田 均、宮川航一、Handy Aly、赤木一考、影山裕二
2. 発表標題 Polished rice small peptide contributes to a biological timer system to determine pupation timing in <i>Drosophila melanogaster</i>
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

分子発生制御研究室（上田研） https://sites.google.com/view/uedalabinokayamauniv/home 岡山大学理学部生物学科上田研究室Research Projects https://sites.google.com/view/uedalabinokayamauniv/project

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----