

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 30 日現在

機関番号：37104

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24770203

研究課題名(和文) ショウジョウバエをモデルとした栄養環境と協調した生殖巣形成の解析

研究課題名(英文) Analysis of coordinated regulation of metabolism and ovarian development in *Drosophila*

研究代表者

佐野 浩子 (Sano, Hiroko)

久留米大学・分子生命科学研究所・講師

研究者番号：90506908

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円、(間接経費) 1,080,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、環境に適応した発生メカニズムの一端を明らかにすることを目的とし、ショウジョウバエの代謝•内分泌器官である fat body による卵巣形成制御機を解析した。その結果、fat body から分泌されるインシュリン (Dilp6) およびステロイドホルモン (エクジソン) が、卵巣において生殖幹細胞ニッチとして機能する terminal filament の形成を制御することが明らかになった。

研究成果の概要(英文)：We have studied the mechanisms as to how the *Drosophila* adipose tissues regulate ovarian development aiming at clarifying coordinated regulation of metabolism and development. In this study, we found that adipose tissue-derived Insulin (Dilp6) and steroid hormone (20-hydroxyecdysone) regulate the formation of terminal filament, which functions as a part of germline stem cell niche in the ovary.

研究分野：生物科学

科研費の分科・細目：発生生物学

キーワード：ショウジョウバエ 脂肪組織 インシュリン エクジソン 生殖幹細胞ニッチ

1. 研究開始当初の背景

ショウジョウバエにおいて、ヒトの脂肪組織に相当する fat body は、胚期中胚葉から形成され、摂食行動が盛んな幼虫期に脂質代謝器官としての活動を開始する。これまで、fat body は単に脂質貯蔵器官と認識されてきた。しかし、最近、fat body はアミノ酸センサーを発現しており、これによって感知した栄養レベルに従って、何らかのシグナルを体液中に分泌し、脳からのインシュリン分泌や神経幹細胞の分裂を制御することが報告された (Geminard *et al.*, 2009; Chell and Brand, 2010; Sousa-Nunes *et al.*, 2011; Rajan and Perrimon, 2012)。これらの結果は、fat body が内分泌器官として機能し、栄養環境に応じて、体内の様々なシステムを制御する中枢であることを示唆している。このような知見から、栄養環境と協調した器官形成に興味を持ち、以下に述べる研究を着想した。

ショウジョウバエの生殖巣は、fat body に囲まれた状態で発生する。精巣は胚期に分化を開始するのに対し、卵巣は、fat body の活動が盛んな幼虫期において、ダイナミックな細胞分化や増殖を行う。また、線虫では生殖巣の除去が個体の寿命を延長することが知られており、生殖巣は維持コストの高い器官であると考えられている。これらのことから、卵巣形成は、栄養依存的に fat body の制御を受けるのではないかと予想した。

卵巣は始原生殖細胞と体細胞性生殖巣原基から構成される。3 令幼虫期になると、体細胞性生殖巣原基から、terminal filament が分化する。Terminal filament は将来 cap cell とともに生殖幹細胞ニッチとしてはたらき、その基部に位置する始原生殖細胞を生殖幹細胞に分化させることが知られている。また、蛹期には、terminal filament 間に仕切りができ、それぞれが成虫卵巣において卵巣小管になる。従って、terminal filament は、産卵数や産卵期間に影響を与える重要な組織であると言える。そこで、申請者は、terminal filament に注目し、terminal filament の形成に影響を与える fat body 由来のシグナルの探索を行った。

2. 研究の目的

本研究は、優れたモデル生物であるショウジョウバエを用いて、栄養環境と協調した生殖巣形成の制御メカニズムを解明することを目的として行った。卵巣形成を制御する fat body 由来のシグナルを同定し、それらのシグナルがどのようにして卵巣形成を制御するのかを明らかにすることにより、環境に適應した発生メカニズムの一端を明らかにすることを目指して解析を行った。

3. 研究の方法

(1) 卵巣形成を制御する fat body 由来の分子の同定

研究を開始した時点において、fat body から分泌されるホルモンとして、インシュリン

ペプチドの一種である *Drosophila* Insulin-like peptide 6 (Dilp6) および活性型エクジソンである 20-hydroxyecdysone (20E) が同定されていた (Okamoto *et al.*, 2009; Slaidina *et al.*, 2009)。そこで、これらのホルモンの産生が阻害される突然変異体において、terminal filament 形成が異常になるかどうかを、免疫染色法を用いて解析した。また、申請者の所属研究室において、低分子量ペプチドである CCHamide-2 (CCHa2) が同定されていた。CCHa2 は主に fat body で発現することから、CCHa2 の機能について、遺伝学的手法を用いて解析した。

(2) Fat body 由来の新規シグナル分子の同定および機能解析

上記の Dilp6, 20E 以外にも、fat body からは様々なシグナルが分泌されることが予想される。そこで、fat body から分泌される新規ペプチドシグナルの候補遺伝子を、トランスクリプトーム解析を用いて同定した。

4. 研究成果

(1) *dilp6* の機能

dilp6 の突然変異体では、terminal filament の本数が正常個体と比較して少なくなることが明らかになった。*dilp6* を fat body 特異的にノックダウンした個体においても、同様の表現型が観察された。次に、卵巣においてインシュリンシグナルが受容されているかどうかを明らかにするために、terminal filament を含む卵巣の体細胞成分において特異的にインシュリン受容体 (InR) の dominant negative または constitutive active form を発現させた。その結果、dominant negative form を発現させた場合には、*dilp6* 変異体と同様な terminal filament 形成の阻害が見られた。Constitutive active form を発現させた場合には、*dilp6* 変異体とは逆に、terminal filament の増加が見られた。これらのことから、fat body 由来の Dilp6 が卵巣に働きかけて、terminal filament 形成を制御することが明らかになった。

(2) 20E の機能

ステロイドホルモンの一種であるエクジソンは、昆虫の発生の進行を制御する代表的なホルモンとして知られている。ショウジョウバエにおいては、前胸腺においてコレステロールが不活性型のエクジソンに変換され、体液中に放出された後、fat body や腸などの末梢組織において、*shade* 遺伝子にコードされた酵素のはたらきによって、活性型の 20E に変換される。そこで、fat body および腸において *shade* 遺伝子をノックダウンしたところ、terminal filament の本数が減少することが明らかになった。次に、卵巣において 20E シグナルが受容されているかどうかを明らかにするために、卵巣の体細胞成分において特異的にエクジソン受容体 (EcR) の dominant

negative または constitutive active form を発現させた。その結果、dominant negative form を発現させた場合には、shade 変異体と同様な terminal filament の本数の減少および短縮が見られた。Constitutive active form を発現させた場合には、shade 変異体の場合とは逆に、terminal filament の本数の増加と伸長が観察された。これらのことから、fat body および腸由来の 20E が卵巣に働きかけて、terminal filament 形成を制御することが明らかになった。

(3) CCHa2 の機能

CCHa2 はショウジョウバエ成虫から生化学的に精製された 13 アミノ酸から成る生理活性ペプチドである。組織特異的リアルタイム PCR によって、CCHa2 が幼虫期の fat body で強く発現することが明らかになった。そこで、CCHa2 シグナルの機能解析を行った。培養細胞を用いたカルシウムアッセイにより CCHa2 の受容体である G タンパク質共役型受容体が同定されていたことから、CCHa2 受容体の機能欠損型変異体を作製した。変異体の作製は、homologous recombination を利用したジーンターゲティングおよび TALEN ゲノム編集法を用いて行った。ジーンターゲティングでは、CCHa2 受容体のコーディング領域をほとんど欠損した変異体を単離することができた。また、TALEN ゲノム編集法では、N 末端にフレームシフト変異が導入された変異体を単離することに成功した。いずれも、CCHa2 受容体の機能を完全に欠損した null allele であると考えられる。現在、これらの変異体を用いて、卵巣形成の異常を解析中である。

(4) Fat body 由来の新規シグナル候補遺伝子

Fat body 由来の新たなシグナル候補遺伝子を同定するために、幼虫期の fat body から mRNA を単離し、RNA-seq 法を用いてトランスクリプトーム解析を行った。得られたトランスクリプトームを詳細に解析することにより、摂食期および非摂食期で発現量が異なり、シグナルペプチドを持つ分泌型遺伝子(膜タンパク質を除く)を 374 個同定した。次に、脂肪体で特異的または優先的に発現する遺伝子を選別することにより、候補遺伝子を 40 個にまで絞り込んだ。これらの遺伝子のアミノ酸配列中で、リジン (K) およびアルギニン (R) から成る、生理活性ペプチドのプロセシング配列に挟まれた領域が進化的に保存されているかどうかを調べた。その結果、57 個のペプチド領域 (21 遺伝子) が、ショウジョウバエ科で保存されていることが明らかになった。さらに、57 個のうち 16 個 (8 遺伝子) のペプチド領域が、蚊(双翅目)やカイコ(鱗翅目)でも保存されていることが明らかになった。このような高い保存性は、これらのペプチド領域が重要な機能を持つことを強く示唆しており、ホルモンとしてはたら

ることが予想された。

今後、これらの候補遺伝子の中で、進化的保存性の高い 8 個の遺伝子に焦点を絞り、それらの卵巣形成における機能を明らかにするとともに、これらのペプチドが受容体を活性化するはたらきを持ち、実際に生体内で合成されていることを明らかにする予定である。

以上の解析からは、fat body 由来のホルモンが卵巣形成を制御することが明らかになった。また、新たな脂肪体ホルモンの候補遺伝子が同定された。これらの解析を卵巣形成に留まらず、代謝や行動にも拡大することにより、fat body を中心とした内分泌制御機構およびその生理的意義が明らかになることが期待される。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 2 件)

1. Ida, T., Takahashi, T., Tominaga, H., Sato, T., **Sano, H.**, Kume, K., Ozaki, M., Hiraguchi, T., Shiotani, H., Terajima, S., Nakamura, Y., Mori, K., Yoshida, M., Kato, J., Murakami, N., Miyazato, M., Kangawa, K., and Kojima, M. Isolation of the bioactive peptides CCHamide-1 and CCHamide-2 from *Drosophila* and their putative role in appetite regulation as ligands for G protein-coupled receptors. *Frontiers in Endocrinology*, 3, Article 177 (2012). DOI: 10.3389.

2. **Sano, H.*.**, Renault, A., Kunwar, P.S., Barbosa, V., Clark, B.N., Ishihara, S., Sugimura, K., and Lehmann, R. (*Corresponding author) The *Drosophila* actin regulator ENABLED regulates cell shape and orientation during gonad morphogenesis. *PLoS One*, 7, e52649 (2012). DOI: 10.1371.

[学会発表](計 2 件)

1. **Sano, H.**, Ishimoto, H., Kamikouchi, A., Nakamura, A., Texada, M., Truman, J., Ida, T., and Kojima, M. Analysis of the fat body-derived peptide CCHamide-2 in *Drosophila*. 第 36 回日本分子生物学会, 神戸, 2013 年 12 月 3-6 日.

2. **Sano, H.**, Ida, T., and Kojima, M. Analysis of the peripheral tissue-derived peptides, CCHamide-1 and -2, and dRYamide-1 and -2 in *Drosophila*. Insect Hormones (19th Ecdysone) International Workshop, 2013. July 21-26, 2013, Minneapolis, USA.

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

http://www.lsi.kurume-u.ac.jp/molecular_genetics/index.html

6. 研究組織

(1) 研究代表者

佐野 浩子 (Hi roko Sano)

研究者番号：90506908

(2) 研究分担者

なし ()

研究者番号：

(3) 連携研究者

なし ()

研究者番号：