

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 2 日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25440110

研究課題名(和文) ショウジョウバエ発生過程の特定の期間を決める生物タイマーの分子機構とその調節

研究課題名(英文) The molecular mechanism to determine the specific periods of development and its control 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) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究でキイロショウジョウバエの蛹化のタイミングを決める生物タイマーの分子機構を明らかにした。つまり、分泌されたエクダイソンを20ヒドロキシエクダイソン(20E)に変換する酵素Shadeが蛹化のタイミングを決めること、次に、Shadeは、前蛹への変換を誘導する20Eによって誘導される転写抑制因子Blimp-1によって発現時期が決まる転写因子FTZ-F1によって誘導されることを示した。さらに、この同定したタイマーは栄養状態を感じる器官である脂肪体で働くことを明らかにし、栄養情報を脂肪体でタイマー機構に伝える可能性が示唆された。一方、FTZ-F1は3齢幼虫期の決定に重要な役割をすることを示した。

研究成果の概要(英文)：We showed biological timer system to determine pupation timing in molecular level in *Drosophila melanogaster*. We demonstrate that the ecdysone-20-monooxygenase, Shade, determines the pupation timing by converting E to 20-hydroxyecdysone (20E) in the fat body, which is the organ that senses nutritional status. The timing of shade expression is determined by its transcriptional activator FTZ-F1. The FTZ-F1 gene is activated after a decline in the expression of its transcriptional repressor Blimp-1, which is temporally expressed around puparium formation in response to a high titer of 20E. These results suggest that fat body may determine pupation timing by transducing the signal of nutritional information to the identified timer system. In addition, we showed that the expression timing of FTZ-F1 plays important role for the determination of the 3rd instar period.

研究分野：発生生物学

キーワード：生物タイマー 変態 エクダイソン ショウジョウバエ 蛹 FTZ-F1 Blimp-1 Shade

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何らかの機構で計り、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。時間を計る機構としては生物時計の機構がよく知られ、その分子機構もかなり明らかになっている。しかし、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。

2. 研究の目的

(1) 完全変態昆虫キイロショウジョウバエ (*D. melanogaster*) 幼虫が変態期初期に囲蛹殻形成した後、ほぼ12 時間後に蛹化して蛹になるタイミングを決定する生物タイマーの分子機構を解明する。

(2) この機構により蛹化のタイミングを決める器官を特定する。

(3) 蛹化タイミングを決める器官以外の器官でのタイマー機構の役割を解明する。

(4) 環境要因によって解析しているタイマー機構が影響を受ける機構を解明する。

(5) 幼虫期間の時間決定の分子機構を解明する。

以上により、生物が時間を計り、発生のタイミングを知る分子機構およびその機構がはたらく体の部位を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 前蛹期前後に20-hydroxyecdysone (20E) パルスで誘導される転写抑制因子 *Blimp-1*、*Blimp-1* が20E レベル低下とともに消失することで発現する転写活性化因子の *FTZ-F1*、および、*FTZ-F1* の標的遺伝子の可能性のある *Shade* の発現時期を免疫染色法あるいは RT-PCR 法で経時的に詳細に解析した。

(2) 熱ショックプロモーターを利用した *FTZ-F1* の強制発現およびノックダウンを行い、標的遺伝子候補の発現への影響を RT-PCR 法で調べた。

(3) *GAL4-UAS* システムによる強制発現および RNAi によるノックダウンさらに温度感受性 *GAL80* を用いて *FTZ-F1* と *Blimp-1* および *Shade* の発現を前蛹期に器官特異的に変動させ、蛹化タイミングに与える影響を調べた。

(4) 3 齢幼虫期に貧栄養状態で飼育した個体での前蛹期間を測定し、幼虫期の栄養状態が蛹化のタイミングに与える影響を調べた。

(5) *ftz-f1* 変異個体の 3 齢幼虫期間を測定すると共に、3 齢および蛹期間における *FTZ-F1* の発現を免疫染色法およびウェスタンブローディング法あるいは RT-PCR 法で解析した。また、*FTZ-F1* の強制発現およびノックダウンの影響が 3 齢および蛹期間に与える影響を調べた。

(6) *ecdysone* (E) あるいは 20E をインジェクションし、蛹化のタイミングあるいは蛹期の *FTZ-F1* の発現のタイミングに与える影響を調べた。

4. 研究成果

(1) E を 20E に変換する酵素をコードする *shade* 遺伝子は、前蛹期においてはその後期に時期特異的に発現することを明らかにした。さらに、 β *FTZ-F1* を前蛹期に強制発現あるいはノックダウンによる発現低下させることにより、*shade* 遺伝子がそれぞれ誘導あるいは誘導されなくなることを示し、前蛹期後期の *Shade* の発現のタイミングは β *FTZ-F1* によって制御されていることを明らかにした。

(2) 前蛹期における *Blimp-1*、 β *FTZ-F1* の発現時期を免疫組織染色法で解析し、各器官でほぼ同時に同定したタイマーが進むことを明らかにした。次に、前蛹期における *Blimp-1*、 β *FTZ-F1* あるいは *Shade* の器官特異的強制発現あるいはノックダウンを行った結果、*Blimp-1* 強制発現、*ftz-f1* あるいは *shade* ノックダウンで蛹化のタイミングが遅延し、*blimp-1* ノックダウン、*FTZ-F1* あるいは *Shade* 強制発現で蛹化のタイミングが早期化する結果が得られた。

また、前蛹期中期でのEのインジェクションは蛹化のタイミングに影響を与えなかったが、20Eのインジェクションでは蛹化の早期化が観察された。これらのことから、脂肪体で発現するShadeによって蛹化の直前に前胸腺から体内に分泌されていたEを20Eに変換することで蛹化が誘導されることを明らかにし、蛹化のタイミングはEの分泌のタイミングではなく、同定したタイマー機構によって脂肪体で20Eが合成されることで決まることによるという今までの概念とは異なる結論を得た。また、蛹化のタイミングを決定する機構のほぼ全容が明らかになり、発生過程における生物タイマーの分子機構（時間を計る機構）を初めて明確に解明したこととなった。さらにShadeの発現のタイミングを大きく遅延させる操作を行うと蛹化率が低下することを明らかにし、同定したシステムで蛹化のタイミングを決定する重要性を示すことができたとともに、他の要因が蛹化の適切なタイミングをある一定の期間に決めていることを示すことができた。一方、他の器官でのノックダウンの影響は観察されず、他の器官でのタイマーの存在理由は明らかにすることはできなかった。

(3) 貧栄養状態で飼育した前蛹は蛹化のタイミングが遅延すること、さらに、少なくとも栄養素の中のグルコースは蛹化タイミング決定に重要であることを明らかにし、脂肪体が栄養状態のシグナルを感知して、同定したタイマーの進行速度を調節することが推測された。

(4) FTZ-F1は3齢幼虫期の2回の特定の時期に一過的に前胸腺で発現することを明らかにした。次に、複数の $ftz-ft$ 変異系統個体の3齢期間が延長すること、3齢期で一過的なFTZ-F1の強制発現あるいはノックダウンが3齢期間に影響を与える結果を得た。これらのことから、FTZ-F1の3齢期の発現が3齢期間決定にかかわることが強く示唆された。ま

た、FTZ-F1は蛹期では20Eレベル低下後に体全体で発現すること、および、20Eの注射によってFTZ-F1の発現時期が遅延することを明らかにし、蛹期においてもFTZ-F1は20Eパルス後に誘導されることを明らかにした。さらに一過的なFTZ-F1の強制発現あるいはノックダウンにより蛹期間に影響を与えることを示し、FTZ-F1の発現のタイミングが蛹期間の決定にも重要な役割をすることを明らかにした。これらの結果は、幼虫期間と蛹期間の決定の分子機構の解明の大きな手がかりとなった。また、FTZ-F1が異なる発生の時期においても共通に発生タイミング決定に用いられることを示す結果が得られたことから、FTZ-F1が発生タイミング決定において幅広く重要な役割を担う因子であると考えられた。

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)

A biological timer in the fat body comprised of Blimp-1, β FTZ-F1 and Shade regulates pupation timing in *Drosophila melanogaster*, Kazutaka Akagi, Moustafa Sarhan, Abdel-Rahman Sultan, Haruka Nishida, Azusa Koie, Takumi Nakayama and Hitoshi Ueda, Development 査読あり in press, 2016

Function of the nuclear receptor FTZ-F1 during the pupal stage in *Drosophila melanogaster*. Abdel-Rahman Sultan, Yasuhiro Oishi and Hitoshi Ueda, Dev Growth Differ. 査読あり 56, 2014, 245-53
doi:10.1111/dgd.12125.

[学会発表](計 11件)

Hitoshi Ueda, Unstable character of transcriptional repressor Blimp-1 contributes to accurate time measuring system for pupation timing in *Drosophila melanogaster*. The 2nd International Insect Hormone Workshop, July 12-18, 2015, Crete, Greece.

Hitoshi Ueda, Biological timer in fat body determines pupation timing in *Drosophila melanogaster*. 48th Meeting of the Japanese

Society of Developmental Biologists, Jun, 2-5, 2015, Tsukuba.

Hitoshi Ueda, Functional analysis of Blimp-1 during pupal developmental stage in *Drosophila*. March 4-8, 2015, Chicago, USA.

Hitoshi Ueda, Timer system to determine pupation timing exists in fat body. Ecdysone WS, 55st Annual *Drosophila* Research Conference, March 4, 2015, Chicago, USA.

Hitoshi Ueda, Determination of pupation timing by biological timer in fat body during prepupal period in *Drosophila melanogaster*. CDB Symposium 2015 "Time in Development", Mar. 23-25, 2015, Kobe.

Hitoshi Ueda, Functional analysis of Blimp-1 during pupal developmental stage in *Drosophila*, 54st Annual *Drosophila* Research Conference, March 26-30, 2014, San Diego, USA.

Hitoshi Ueda, Transcription factors \square FTZ-F1 and Blimp-1 in fat body control the timing of late-pupal development and eclosion, Ecdysone WS, 54st Annual *Drosophila* Research Conference, March 26, 2014, San Diego, USA.

Hitoshi Ueda, Functional analysis of Blimp-1 during pupal developmental stage in *Drosophila*, 54st Annual *Drosophila* Research Conference, March 26-30, 2014, San Diego, USA.

Hitoshi Ueda, Control of developmental timing by transcription factors in fat body during metamorphosis in *Drosophila melanogaster*, 1st International Insect Hormone Workshop, July 21-26, Minneapolis, USA, 2013.

Hitoshi Ueda, Transcription factor controls the fat body remodeling in *Drosophila*, 46th Meeting of the Japanese Society of Developmental Biologists, May, 28-31, 2013, Matsue.

Hitoshi Ueda, Transcription factors FTZ-F1 and Blimp-1 control the pupal development and eclosion timing in *Drosophila*. April 3-7, 2013, Washington D.C. USA.

[その他]

ホームページ等

<http://www.biol.okayama-u.ac.jp/ueda/Uedatop.html>

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

上田 均 (UEDA, Hitoshi)

岡山大学・大学院自然科学研究科・教授

研究者番号：60201349