

平成 23 年 5 月 12 日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2008～2010

課題番号：20570204

研究課題名（和文）生物の持つタイマーの分子機構—ショウジョウバエが蛹になるタイミングの決定機構—

研究課題名（英文）Molecular mechanism of biological timer—determination mechanism of pupation timing of *Drosophila*—

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

研究成果の概要（和文）：

消失するタイミングがショウジョウバエの蛹化のタイミング決定に重要な Blimp-1 のエクダイソンレベル低下による発現停止機構を明らかにした。また Blimp-1 はその発現量、分解速度が蛹化のタイミング決定に重要な因子で、砂時計の砂のような役割で時間を計る役割を持つことを示した。さらに、明らかにしたタイマーシステムが様々な器官でほぼ同じタイミングで進行するが、器官によって進行速度に多少の違いがあることを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：

We uncovered mechanism to determine the termination of Blimp-1 expression which is important to determine the pupation timing in *Drosophila*. We also found that expression level and stability of Blimp-1 are important factor to determine the pupation timing and Blimp-1 works as sands in hourglass. Furthermore, we found that this timer system proceeds almost the same speed in different organs, but the speed is slightly different depending organs.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合 計
2008 年度	2,500,000	750,000	3,250,000
2009 年度	800,000	240,000	1,040,000
2010 年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総 計	3,800,000	1,140,000	4,940,000

研究分野：

科研費の分科・細目：

キーワード：発生、ショウジョウバエ、タイミング、タイマー、エクダイソン、蛹化

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何

らかの機構で時間を計り、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

ることは言うまでもない。この時間制御機構として周期的に動くいわゆる時計の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に関しての解析は進んでいない。

完全変態昆虫は幼虫期に成長した後、変態過程に入り蛹を経て成虫となる。この変態は昆虫ホルモンであるエクダイソンで誘導されるが、キイロショウジョウバエの変態初期において、幼虫期の終わりにある一過的なエクダイソンの放出によって幼虫は体の表皮を蛹の形に変形させる。これを囲蛹殻形成と言い、囲蛹殻形成後約12時間で幼虫は蛹へとなる（蛹化）。しかし、囲蛹殻形成後12時間後に蛹化する機構については、囲蛹殻形成後11時間頃にある一過的なエクダイソンの放出によることが示唆されていること以外わかっていなかった。我々は、ショウジョウバエとカイコを用いた解析により、転写因子FTZ-F1がエクダイソンのパルス（上昇後低下）の後に一過的に体全体で発現すること、そして、その時期特異的なFTZ-F1の発現が後期胚発生、幼虫脱皮、変態の進行に必要であることを明らかにした。特に変態期初期においては囲蛹殻形成後約8時間から10時間に発現のピークを迎え、その発現が消失したり発現時期が早まると蛹になれないこと、発現時期が遅くなればなるほど蛹になる効率が悪くなり、5時間以上遅れると全く蛹になれなくなることを示した。これらのことは、FTZ-F1が時期特異的に発現することが必要な因子であることを示しており、この遺伝子の時期特異的発現の制御機構の解析の重要性を示した。そこでFTZ-F1遺伝子の転写制御領域を解析し、同定した制御領域に塩基特異的に結合する因子Blimp-1を同定するに至った。そして、エクダイソンによってBlimp-1遺伝子が直接誘導され、高エクダイソン時にのみ発現し、FTZ-F1遺伝子の転写抑制因子として作用することを明らかにした。さらに、その解析の過程でBlimp-1タンパク質の分解速度が非常に早いこと、また、mRNAの分解速度も早いことを示唆する結果を得た。以上のことから、囲蛹殻形成後12時間で蛹になる時間のコントロールは、Blimp-1の発現誘導および分解速度によってFTZ-F1の発現時期が決定し、誘導されたFTZ-F1がエクダイソンパルスの時期を決定することによってなされていることが明らかになってきた。

2. 研究の目的

(1) タイマー機構の解明

転写因子 FTZ-F1 の発現時期が蛹化を誘導

すると考えられているエクダイソンパルスを本当に誘導するのか明らかにする。また、誘導するならばその機構はどのようなものか明らかにする。一方、この時間決定機構の中で重要となるエクダイソンパルス終了後のBlimp-1の発現の停止の分子機構を明らかにする。以上のことにより、タイマーの全容の解明をおこなう。

(2) 各組織でのタイマーの存在意義の解明

同定したタイマーに関わる因子のうちFTZ-F1は、体全体でほぼ同時に一過的に発現することがわかっており、このうち蛹化のタイミングを決める器官がどこか明らかにする。また、各組織で少なくともFTZ-F1が発現するところまでタイマーが進んでいることは明らかになっているが、それらが完全に同調しているか調べるとともに、また、ほぼ同調している意義を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) タイマー機構の解明

① 蛹化のタイミング決定のための時間測定機構

hs-FTZ-F1 遺伝子（熱ショックプロモーターとFTZ-F1 cDNA 融合遺伝子）を持つ *hs-FTZ-F1* トランスジェニックフライ系統あるいは *hs-Blimp-1* 遺伝子（熱ショックプロモーターとBlimp-1 cDNA 融合遺伝子）を持つ *hs-Blimp-1* トランスジェニックフライ系統、さらにタンパクが安定化する変異を持つBlimp-1を発現できる *hs-Blimp-1ΔPR3* 系統でFTZ-F1あるいはBlimp-1を本来の発現時期とは異なる時期に発現させ、蛹化のタイミングあるいはエクダイソン合成系酵素の遺伝子の発現パターンへの影響を調べた。また、*Blimp-1* 変異株あるいは *hs-Blimp-1* 系統を用いて、*Blimp-1* あるいは *hs-Blimp-1* 遺伝子量を変化させることによる蛹化のタイミングへの影響を調べた。

② *Blimp-1* 遺伝子の転写終結および消失の機構の解析

唾腺および成虫原基を含む体前半部分の器官を培養する際に、Blimp-1を誘導させるホルモンであるエクダイソン、タンパク合成阻害剤シクロヘキシミド、転写阻害剤のアクチノマイシンDの添加の有無によってBlimp-1 mRNA量がどのように変化するかをRT-PCR法で定量した。

(2) 各組織でのタイマーの存在意義の解明

① タイマー構成因子の発現パターンの解析

タイマー構成因子の遺伝子の発現パターンを抗体組織染色法で経時的に様々な組織／器官で調べた。

② タイマー遺伝子の組織特異的ノックダウンと組織特異的強制発現

GAL4-UAS システムを用いて様々な組織特異的にタイマー遺伝子の発現をノックダウ

ンあるいは強制発現した場合に蛹化のタイミングに及ぼす影響を調べた。

4. 研究成果

(1) タイマー機構の解析

① 蛹化のタイミング決定のための時間測定機構

hsFTZ-F1 系統を用いて FTZ-F1 を熱ショックプロモーター依存下に本来の発現時期よりも早く発現させたところ、蛹化のタイミングが早くなり、Blimp-1 の発現の終了によって FTZ-F1 の発現のタイミングが決定されるという今まで得られている結果を支持した。

Blimp-1 のタンパクの分解促進領域を一部欠失しているためタンパクの安定性が増大した Blimp-1 Δ PR3 を熱ショックプロモーター依存的に発現させると、全長の Blimp-1 を同様に発現させた場合に比べて、FTZ-F1 の発現および蛹化のタイミングの遅延がより顕著になった。次に安定化した Blimp-1 Δ PR3 を熱ショックプロモーター下に発現できる *hs-Blimp-1* Δ PR3 遺伝子を 1 コピー持つ場合と 2 コピー持つ場合で、同じ熱ショックによる影響の違いを調べたところ、コピー数の増加に応じて蛹化のタイミングが遅くなった。また、*Blimp-1* 遺伝子の欠失変異あるいは P エlement 挿入による変異をヘテロに持つ個体をもちいることで、遺伝子量を半分にする影響を調べた。その結果、Blimp-1 遺伝子量が半分になると、蛹化のタイミングが早くなり、P エlement を除くことによって回復した。以上のことから Blimp-1 は、発現量および安定性が蛹化のタイミングの決定に重要であり、蛹化のタイミングを決める分子タイマーの重要な因子で、砂時計の砂のような役割を持つと考えられた。

hs-Blimp-1 系統を用いて、熱ショックにより Blimp-1 の発現時期を延長させることで FTZ-F1 の発現時期を延長させた上で、エクダイソン依存性初期遺伝子およびエクダイソン合成系遺伝子の発現パターンを解析したところ、エクダイソンパルス of タイミングが遅延していることを示唆する結果が得られ、FTZ-F1 はエクダイソンパルス of タイミングを制御することで蛹化のタイミングを決めていると考えられた。

② *Blimp-1* 遺伝子の転写終結および消失機構の解析

Blimp-1 の発現が終了するタイミングを決める機構を知るため、3 齢後期幼虫の体の前半部分の器官を 20 ヒドロキシエクダイソン存在下で培養したところ、E75A mRNA 量は、3 時間まで増加したもののその後減少したのに対して、Blimp-1 mRNA 量は、1.5 時間まで増加し、その後変動しなかった。また、培養開始後 6 時間にシクロヘキシミドを加えてさらに 1.5 時間培養したところ、E75A mRNA

量は変動しなかったが、Blimp-1 mRNA 量は増加した。次に、器官培養系にアクチノマイシン D を加えて転写を止めたところ、Blimp-1 mRNA 量は急激に低下した。さらに、体内のエクダイソン濃度が高い時期が約 7 時間続いた前蛹になってから 2 時間の個体の器官を 20 ヒドロキシエクダイソン存在下で培養したところ、E75A mRNA の新たな誘導は観察されなかったが、Blimp-1 mRNA の誘導は低エクダイソン時個体の由来の器官と同様に観察された。これらのことから、*Blimp-1* 遺伝子は、エクダイソンレベルが高いと常に発現するが、Blimp-1 mRNA は非常に不安定で、エクダイソン濃度低下すると転写が終了し、直ちに分解するため、エクダイソン濃度が低下後すぐに Blimp-1 が消失するようになっていることが明らかになった。

(2) 各組織でのタイマーの存在意義の解析

① タイマー構成因子の発現パターンの解析

同定したタイマーシステムが異なる器官で同じタイミングで進行するか調べるために、前蛹期の唾腺、トラキア、中腸、リンググランドでの Blimp-1 と FTZ-F1 の発現パターンを経時的に観察した。その結果、両因子ともほぼ同じタイミングで発現することが明らかになったが、器官によっては多少異なる結果が得られた。このことから Blimp-1 と FTZ-F1 によるタイマーシステムがショウジョウバエ前蛹の様々な器官で基本的に同じタイミングで進行するが、器官によってはその進行速度が異なっており、変態期における器官の違いによっておこる現象の違いに対応している可能性が示された。

② タイマー遺伝子の組織特異的ノックダウンと組織特異的強制発現

この蛹化のタイミングに関与する時間決定タイマーがショウジョウバエのどの組織で働いているか調べるために、GAL4 と GAL80 を用いたシステムで、前蛹期に時期特異的に特定の組織で Blimp-1 と FTZ-F1 いずれかの強制発現あるいは、RNAi 法による発現抑制をおこなった。そのために、既作成している *UAS-Blimp-1* 系統に加えて、*UAS-FTZ-F1* 系統、*UAS-FTZ-F1 RNAi* 系統、*UAS-Blimp-1* 系統を作成した。そして、前胸腺、アラタ体、脂肪体での強制発現あるいは発現抑制をおこなったが、蛹化のタイミングへの影響はほとんど見られず、これらの器官は蛹化の決定に中心的役割を果たしていない可能性が高まり、特定の器官で蛹化のタイミングを決めているのではない可能性が考えられた。

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 1 件）

Kazutaka Akagi and Hitoshi Ueda, Regulatory mechanisms of ecdysone-inducible *Blimp-1* encoding a transcriptional repressor that is important for the prepupal development in *Drosophila*, Development, Growth & Differentiation, 査読有 Vol, 2011, in press.

〔学会発表〕（計 3 3 件）

Hitoshi Ueda, Mechanism to determine pupation timing during prepupal period in *Drosophila*, 18th International Ecdysone Workshop, July, 20, 2010, Ceske Budejovice, Czech.

Kazutaka Akagi, Moustafa Sarhan and Hitoshi Ueda, A transcriptional repressor Blimp-1 works as an hourglass timer during metamorphosis. 51st Annual Drosophila Research Conference, USA, April, 7-11, 2010, Washington DC.

Kazutaka Akagi, Moustafa Sarhan and Hitoshi Ueda, A transcriptional repressor Blimp-1 works as an hourglass timer during metamorphosis-Determination mechanism of pupation timing by transcription factors-. Ecdysone workshop, 51st Annual Drosophila Research Conference, USA, April, 7-11, 2010, Washington DC.

Kazutaka Akagi, Moustafa Sarhan and Hitoshi Ueda, A transcriptional repressor Blimp-1 works as an hourglass timer during *Drosophila* metamorphosis, DECODE Winter Workshop 2010, January, 18-20, 2010, Yuzawa.

Kazutaka Akagi, Moustafa Sarhan and Hitoshi Ueda, A transcriptional repressor Blimp-1 works as an hourglass timer to determine pupation timing in *Drosophila*, 第 3 2 回 日本分子生物学会年,会 2009 年 12 月 9-12, 横浜.

Moustafa Sarhan, Kazutaka Akagi and Hitoshi Ueda, A transcriptional repressor Blimp-1 works as an hourglass in a biological timer system to determine pupation timing in *Drosophila*, The 9th Japanese Drosophila Research Conference, July 6-8, 2009, Kakegawa.

Kazutaka Akagi, Moustafa Sarhan and Hitoshi Ueda, The importance of controlled expression of the transcriptional repressor Blimp-1 in a biological timer system to determine pupation timing in *Drosophila melanogaster*, 50th Annual Drosophila Research Conference, March 4-8, 2009, Chicago, USA.

赤木一考、Moustafa Sarhan、上田均, 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における転写抑制因子 Blimp-1 の発現制御の重要性, 第 3 1 回日本分子生物学会年会／第 8 1 回日本生化学会大会合同大会、2 0 0 8 年 1 2 月 9 ～ 1 2 日, 神戸.

Kazutaka Akagi, Moustafa Sarhan and Hitoshi Ueda, Regulation mechanism of the *Blimp-1* gene which plays an important role to determine pupation timing, Ecdysone workshop, April 2, 2008, San Diego, USA.

Kazutaka Akagi and Hitoshi Ueda, Regulatory mechanism of temporal expression of Blimp-1, an important factor for determination of pupation timing, 49th Annual Drosophila Research Conference, April 2-6, 2008, San Diego, USA.

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