

ショウジョウバエ S2 細胞を用いた幼若ホルモン応答遺伝子の探索と解析

2006 年 3 月修了

先端生命専攻 分子認識科学分野

学生証番号 46503 飯代 智之

指導教官 片岡宏誌教授

【序論】

昆虫は現在、地球上で 500 万種、動物種の実に 75% を占めていると言われるほど多様に分化している。繁栄の裏には昆虫独自の環境適応機構を進化させてきたことにあり、なかでも脱皮・変態は最も重要な生理現象のひとつである。生育過程で幼虫は幼虫へと複数回脱皮し成長し、適当な時期に幼虫から蛹、蛹から成虫へと変態する。脱皮・変態はステロイドホルモンであるエクジソンとセスキテルペノイド脂質様ホルモンである幼若ホルモン (Juvenile Hormone, JH) に協調的に制御されている。エクジソンは脱皮を誘導するが、JH が幼虫期に体液中に存在すると幼虫から幼虫へと脱皮する。JH が体液中から欠如する時に、エクジソンは幼虫から蛹への形態変化を進行させる。

JH は脱皮・変態だけでなく、生殖、休眠、社会性昆虫のカースト分化、寿命をはじめとしてさまざまな昆虫の生理現象を制御する多機能性ホルモンであることが古くから研究されている。これらの研究のほとんどは個体・組織レベルでのものであり、よりミクロな細胞レベルさらには生化学・分子生物学レベルでの作用機構の解明は近年まで遅々と進んでおらず、JH 受容体も特定されていない。

本研究は DNA マイクロアレイを用いてキョロショウジョウバエ S2 細胞において JH 応答遺伝子の網羅的に探索を行い、JH の分子作用機構の解明を試みた。

【結果と考察】

JH 応答遺伝子は 2 種類の応答パターンが考えられる。ひとつは JH に直接応答し、遺伝子発現が増えるあるいは負の制御を受ける遺伝子。もうひとつは脱皮・変態からエクジソンにも応答し、その応答を JH が調節する遺伝子。これらの遺伝子を探索するため、キョロショウジョウバエ S2 (Schneider's Line 2) 細胞に JH 類似活性物質メソプレンを添加し、添加後 2 時間、8 時間における遺伝子発現変化を DNA マイクロアレイを用いて約 13,000 個の遺伝子について網羅的に解析した。メソプレン添加後 2 時間で 790 遺伝子の発現が増加し、うち発現量が 2 倍以上に増加した遺伝子は 120 個であった。また、添加後 2 時間で遺伝子発現が減少した遺伝子は 247 個、

うち 36 遺伝子の発現量が 0.6 倍以下に減少した (図 1)。メソプレン添加後 8 時間では 782 遺伝子の発現が増加し、うち発現量が 2 倍以上に増加した遺伝子は 161 個であった。また、添加後 8 時間で遺伝子の発現が減少した遺伝子は

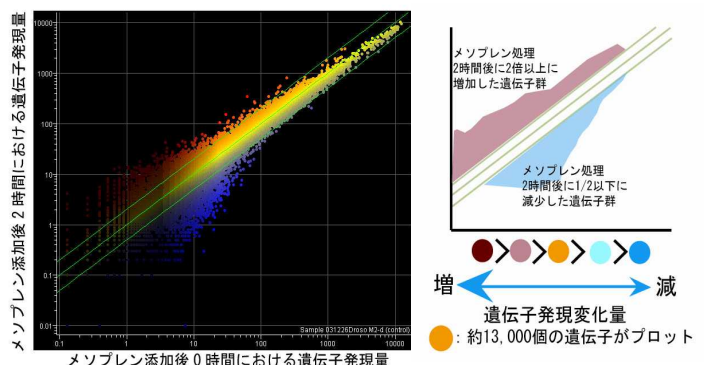


図 1 DNA マイクロアレイを用いて、S2 細胞へのメソプレン添加後 2 時間における遺伝子発現変化を網羅的に解析。

473 個、うち 66 遺伝子の発現量が 0.6 倍以下に減少した。これらの遺伝子の中から、メソプレレン添加後 2 時間と 8 時間で発現量が 2 倍以上に増加したメソプレレン誘導遺伝子に注目し、真の JH 応答遺伝子をスクリーニングするため以下の実験を行った。まず、S2 細胞にメソプレレンを添加し、DNA マイクロアレイのデータが再現できるかと、2 時間よりも早い段階で遺伝子発現の増加がみられるかを検証した(図 2)。結果、*E75D*、*Cyp6a20*、*kr-h1*、*GATA d*、*CG2865* はメソプレレン添加後 30 分以内に遺伝子発現が誘導されることがわかった(図 2)。次に、JH の生物活性によって、これらの遺伝子が応答するかを確かめるため JH 光学異性体を用いた。JH 光学異性体は一方にしか生物活性がないことから、これら天然型 10R-JH と非天然型 10S-JH を分離して S2 細胞に添加し、遺伝子発現の違いをみることで JH 応答遺伝子のスクリーニングができると考えた。多くの遺伝子は天然型と非天然型両方で同じ遺伝子発現変化の挙動を示すもの、非天然型にのみ応答を示す遺伝子であった。しかし、*E75D* は JH 光学異性体を 10nM、100nM の濃度で S2 細胞に添加したときに天然型で遺伝子発現がみられたことから、有力な JH 応答遺伝子と考えられた(図 3)。また、JH は脱皮・変態においてエクジソンと協調的に作用して遺伝子発現を制御していると考えられることから、S2 細胞へエクジソンのみ、エクジソンと同時にメソプレレンを添加し、DNA マイクロアレイの解析からえられたメソプレレン応答遺伝子の遺伝子発現パターンの変化を調べた。結果、エクジソン応答性が報告されている遺伝子 *E75*、*kr-h1* で特異な遺伝子発現パターンの違いが見られたことから、JH は遺伝子レベルでエクジソンに応答する遺伝子を制御し、脱皮・変態を制御している可能性がある(図 4)。また、この実験から *Cyp6a8*、*Cyp6a20*、*GstD2* は JH にのみ応答している遺伝子と考えられた。さらにこれらの遺伝子に注目し、キイロショウジョウバエ *D.melanogaster* 個体で胚期から成虫期までの遺伝子発現の挙動を調べた結果、*Cyp6a8*、*Cyp6a20*、*GstD2* は 3 齢幼虫期から蛹期での遺伝子発現が低かった。この時期は体液での JH 濃度が低いことが報告されており、これらの遺伝子が脱皮・変態の制御に関わっている可能性が考えられる。

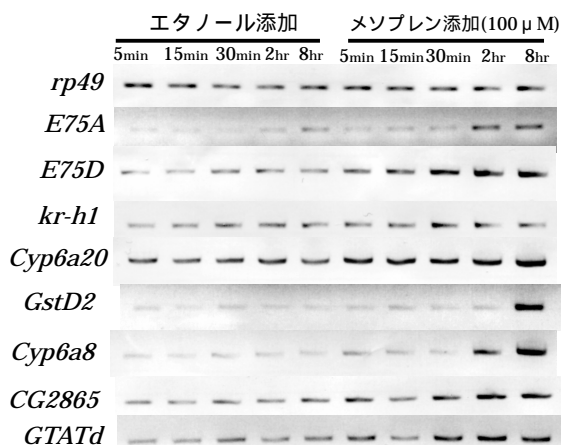


図 2 S2 細胞へのメソプレレン添加による遺伝子発現変化
rp49 はハウスキープ遺伝子

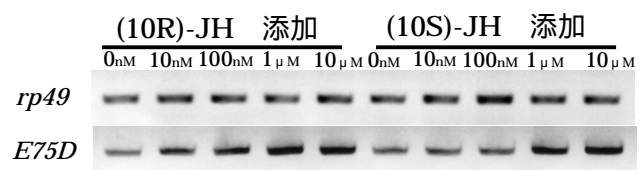


図 3 S2 細胞への JH 光学異性体添加による遺伝子発現変化の比較

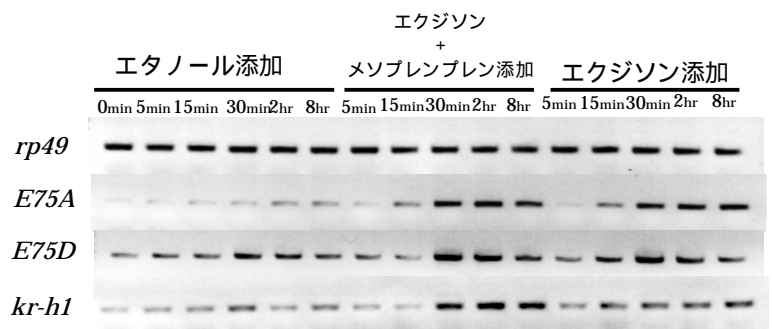


図 4 S2 細胞へのエクジソン、エクジソン + メソプレレン添加による遺伝子発現変化