

修士論文

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

東京大学新領域創成科学研究科

先端生命専攻 分子認識科学分野

2004 年度入学

46503 飯代智之

【目次】	
【緒言】	p1
【実験方法】	p11
【結果】	p17
§ DNA マイクロアレイを用いた幼若ホルモン応答候補遺伝子の探索	p17
○DNA マイクロアレイを用いた S2 細胞へのメソプレレン添加による遺伝子発現変化解析	p17
○メソプレレン添加によって S2 細胞で遺伝子発現変化を示した遺伝子群の GO 解析	p18
○S2 細胞へのメソプレレン添加による遺伝子発現変化とマイクロアレイの検証	p20
§ JHⅢ 光学異性体の添加による遺伝子発現変化の比較	p21
○キラルカラム AS-H を用いた順相 HPLC による JHⅢ 光学異性体の分離	p22
○GC-MS による 4 つのフラクションの成分分析	p22
○S2 細胞への JH 光学異性体の添加による遺伝子発現変化の比較	p23
§ S2 細胞へのメソプレレン+エクジソンおよびエクジソン添加による遺伝子発現の変化	p24
§ キイロショウジョウバエにおける JH 応答候補遺伝子の発現	p25
【考察】	p26
§ S2 細胞における JH 応答	p26
§ JH 応答遺伝子	p28
○E75	p28
○Cyp6a8, Cyp6a20, GstD2	p29
○Kr-h1	p30
【図表】	p32
【参考文献】	p64
【謝辞】	p73

【緒言】

昆虫は現在命名されているものだけでも、少なくとも 90 万種存在し、毎年 2,000 種以上の新種が報告されている(Saito et al,2002)。さらに熱帯雨林の樹幹部には未知の昆虫が存在し、その数を含めると昆虫は地球上で 500 万種以上存在しているとされる(Nakasuji et al,2000)。その昆虫は全動物種の 75%以上を占めるといわれる。昆虫は、極地や熱帯、高山、平地、氷上、砂漠、陸上はもとより水中にも、さらには塩田、40 度以上の温泉、動植物の体内にも生息分布し、極めて多様な環境に適応し繁殖している。ここまで昆虫が適応放散してきたは脱皮、および変態があげられる

変態とは、一般に生殖的に未成熟な形態から成熟した形態へ変化する期間の脱皮サイクルをさす。変態により幼虫から成虫への形態や生活様式が著しく変化する。幼虫は栄養摂取をして成長と脱皮を繰り返す期間であり、蛹は生理的には劇的な変化を遂げる幼虫と成虫の間に存在する活動休止期であり摂食や移動は行なわない。そして、成虫は生殖に特化した期間である。このように、昆虫は変態を行い、形態の変化に合わせ生活様式を変えることで、効率よく周囲の環境に適応している。変態の様式により、幼虫→蛹→成虫の経過をたどる完全変態昆虫(holometabolous)、蛹期をもたない不完全変態昆虫(hemimetabolous)、および蛹期を欠くばかりでなく成虫の無翅で形態は、ほとんど幼虫を変わらない無変態昆虫に大別される(Elzing,1978)。この変態様式は無変態→不完全変態→完全変態へと進化してきたとされる(Truman et al,2002)。変態という特性の獲得によって昆虫が得た最大のメリットは翅を得たことによる移動能力の飛躍的な向上である。また、昆虫は陸棲化に適した外骨格という進化形態をとり、乾燥、高温、低温などに耐性をもつこととなった。しかし、外骨格は成長に関しては不利である。それは、外骨格が非常に硬いクチクラで構成され、伸縮性を欠いているため、成長に限界点を持つ。そこで、小さくなってしまったクチクラを新しいクチクラに取りかえる脱皮をおこなうことでその問題を

解決した。これら脱皮・変態によって、環境の広域かつ多角的な利用を可能にし、昆虫の現在の繁栄につながったと考えられる(L.I.Gilbert et al,1996)。

昆虫の脱皮・変態はエクジソン(Ecdysone)と幼若ホルモン(Juvenile Hormone、JH)によって制御されている(Sehnal,1989;Riddiford,1993)ということが定説となっている(図 1)。昆虫の脱皮・変態に関するホルモンの基礎を築いた実験は、Kopeć (1917,1922)による結さつや移植による実験であった。脳から脱皮・変態に関わるホルモンが出ることが示され、これを「脳ホルモン」と名付けた。後に、この脳ホルモンは、エクジソン分泌を制御する前胸腺刺激ホルモン(PTTH)であることが突き止められている(Kawakami et al,1990)。さらに、Fukuda(1940)は、カイコ *Bombyx mori* の終齢幼虫で、さまざまな時期に結さつや脳の移植・除去を行い、前胸腺から出るホルモンが脱皮ホルモンであることを確かめた。この脱皮ホルモンは、後にエクジソンと名付けられた。エクジソンはカイコから Butenandt と Karlson(1954)によって単離され、1960 年代 Karlson らによってその構造が決定された。エクジソンは前胸腺から放出され、エクジソンは水酸化を受け、20 ヒドロキシエクジソン(20-hydroxyecdysone,20E)の形となってより活性のある形で働く(Feldllauffer,1989)。エクジソンは脱皮前に分泌され、体液を介して運ばれ、表皮細胞に働きかけ、一連の脱皮行動である apolysis、細胞分裂、古いクチクラの除去、そして新しいクチクラの分泌を引き起こさせる(Nijhout,1994)。

JH の発見は 1930 年代にさかのぼる。アラタ体内分泌の機能が Wigglesworth(1934)によって示された。オオサシガメ *Rhodnius prolixus* においてアラタ体を切除すると成虫へ早熟変態し、アラタ体の再移植が若虫への脱皮を引き起こした。アラタ体は若虫期に活性があり、若虫が成熟すると活性を失うことをみつけた。その後、アラタ体によって産生される内分泌因子は幼若ホルモン(JH)と名付けられ、さらに Roller ら(1967)によって JH の構造が決定され、セスキテルペノイド骨格をもつ脂質性ホルモンであることが分かった。1967 年に Roller ら によって JH の 1 分子種 JH I の構造が決定され、セスキテルペノイド骨格をも

った脂質性ホルモンと報告されて以来、現在まで少なくとも 9 種類の JH 分子種が報告されている (Riddiford,1994;Tohara,1995)(図 2)。昆虫で最も一般的な分子種は JHⅢである。JH0、JHⅠ、JHⅡ、4-methyl-JHⅠは主に鱗翅目で働いている。ショウジョウバエなど高等双翅目では、アラタ体で JHⅢ、JHⅢ-bisepoxide(JHB3)の 2 種類が合成されているが、機能解析が進んでいるのは JHⅢであり、JHB3は成熟したアラタ体で主に産生されている。ファルネセン酸メチルエステル(methyl farnesoate,MF)はゴキブリの JH 分子種である。MFは甲殻類でも JHとして機能しているとされる。また、JHの前駆体や分解産物とされていた JHⅡ酸にもホルモン活性があり、タバコスズメガで成虫の卵形成でピテロジェニン合成に関わる (Ismail et al.,1998,2000)。2 種類の JHⅢの水酸化産物がトノサマバッタから報告され、12'-OH JHⅢには活性があることが示された (Darrouzet et al.,1997;Couillaud et al.,1998)。

Wigglesworth の古典的な実験以来、JHは昆虫で多面的な機能を担っている非常に重要な内分泌調節因子であり多くの報告がされている。JHはあらゆる表現形質や生理現象、発生過程に影響を与えている。JHが関連する現象としては胚発生、成虫原基の増殖、脱皮、変態、器官のルーピング、卵巣発育、性成熟、フェロモン産生、運動性、交尾行動、休眠、渡り、相変異、社会性昆虫のカースト分化、神経構造の形成、記憶、学習、免疫機能、寿命などが知られる (Zera,2001,2004;Gilbert et al,1996;Nighout,1994;Dingle et al,1997;Wheeler and Nijhout et al,2003;Segal,1993;Riddiford,1993,1994;Emlen,2003;Wyatt and Davey,1996;Tatar,2001)。現在まで幅広い生理現象の基礎研究から、JHによく似た活性を持つ JH 類似物(JH analog,JHA;methoprene,pyriproxyfen,fenxycarb など)の昆虫成長制御剤としての利用(Kamei et al,1993;Bortolotti et al,2000)や抵抗性系統作出(Li et al.,1997;Zhang et al.,1998)など応用に至るまで世界中で JH に関する様々な実験が行われてきた。

しかし、細胞レベルあるいは生化学・分子生物学レベルでの JH の作用機構の解明はほとん

ど進まなかった(Gilbert et al,1996)。もうひとつの重要な昆虫ホルモン Ecdysone の解析がキイロショウジョウバエ *Drosophila melanogaster* の分子遺伝学的手法、突然変異体による解析によって詳細に解析されているのは対照的である(Thummel,1995;Riddiford and Truman,2000)。JH の分子レベルでの解析が進まなかった理由としては、JH が強い疎水性であり厳密な定量実験を行うことが難しい、光学異性体が存在し一方にしか生物活性がない、近年まで比活性の高い放射性ラベル体が合成できなかったことがまず挙げられる(Riddiford,1994)。さらに、キイロショウジョウバエをもちいた分子遺伝学的な解析に適した JH に関する突然変異体の作出がほとんどされなかったことにある。

分子レベルの JH 作用機構の理解は乏しいが、JH は体内のホルモンや遺伝的な内的因子と温度、栄養状態、光周性のような外的要因に応答し、遺伝子群を制御し、多様な表現型をもたらすと考えられる(Finch et al,1995; Zera 2001;Hartfelder,2000;Nijhout,1982、1994)

脱皮・変態において、エクジソンは脱皮を誘導・調節しているが、脱皮後の形態は JH によって決定される(Williams,1961;Riddiford,1985)。JH はタバコスズメガ *Manduca sexta* では後胚期から幼虫期を通して存在するが、各脱皮期近くで増加し、幼虫期の終わりに従って減少する(図 1-1,1-2)。血中での JH は終齢幼虫までに減少して、検出されないまでになる(Granger and Bollenbacher,1982)。つまり、幼虫脱皮のタイミングはエクジソンに決定され、JH が存在すると幼虫から脱皮後、もう一度幼虫のステージを繰り返す。幼虫から成虫へと変態が進むのは JH が欠如している時に 20E が作用する時だけである。このことから JH は脱皮時の 'status quo' 機能を果たしているとされている(Riddiford,1996)。変態直前にアラタ体は JH の産生を停止し、血中や JH の標的組織では JH エステラーゼなどによって JH の分解が進む。クリティカルウェイトに達し、JH の血中レベルが下降すると、脳から前胸腺刺激ホルモン(prothoracicotropic hormone,PTTH)分泌され(Westbrook and Bollenbacher,1990)、前胸腺からエクジソンの分泌を誘導する。エクジソンは摂食行動を

停止させ、ワンダリングや蛹化を開始させる。蛹脱皮後、再びエクジソンが上昇し成虫へと脱皮する。多くの昆虫で人工的に JH を幼虫期に過剰に与えると変態時期が送れ、一方で JH を実験的に除いてやると早熟変態することが報告されている(Nijhout,1994)。ショウジョウバエでは、外因性の JH は幼虫から蛹への変態を阻害しない(Riddiford1993)。しかし、発育期間の延長、神経や筋肉系の変態や腹部の分化を阻害し、羽化も抑制される。また、変態開始後、JH タイターが上昇し、幼虫の脂肪体を最終的に分解して変態を細かく制御していることが報告されている。(Riddiford1993,1994)(図 1-3)

JH は生殖にも様々な面で役割を果たしている(Nijhout,1994;Riddiford,1993;Wyatt and Davey,1996;Wilson,2003;Gillot,2003;Kubli,2003;Bownes M.,1982,1989)。ショウジョウバエのメスで、JH は卵母細胞の成熟と生殖の活性化を行っている(Shirras et al,1989)。ショウジョウバエのオスでは JH は精子形成に影響しないが、付属腺におけるタンパク合成を促進している(Wilson,2003;Gillot,2003)。交尾時オスの精液に含まれる sex peptid はメスのアラタ体における JH 合成を促進し、最終的に産卵を増進させる(Kubli,2003)。JH は脂肪体や濾胞細胞での yolk protein(YP;YP1,YP2 and YP3)の合成と分泌、卵母細胞への YP の取り込みなどの卵黄形成に関わっている(Riddiford,1993;Ownes,1982)。飢餓状態にして生殖が休止している個体や YP の発現レベルが低い腹部に 20E や JHA のメソプレンを投与すると YP の転写がアップレギュレートされ、JH 阻害剤プレコセン(precocene)を投与すると卵母細胞の卵黄形成が阻害された(Wilson,1983)。JH は YP の卵母細胞への取り込みも制御している。卵巢で卵黄形成ができないことによって不妊となる *apterous(ap)* 突然変異体は、アラタ体での JH 合成に欠損がある。*ap* 突然変異体にメソプレンを投与してやると卵黄形成能が回復した(Altaratz,1991;Dai,1993;Postlethwait,1973,1978)。また *ap^d* 突然変異体へのメソプレン投与から YP の卵母細胞への取り込みに JH が関わっていることが示された(Postlethwait,1973)。JH は卵形成期の遺伝子発現にも関わっている。*JhI-21* と *minidiscs(mnd)* はメソプレン処理によって発現が誘導され、*JhI-21* タンパク質と *mnd* タン

パク質が卵巣に蓄積する(Dubrvsky,2002)。ap 突然変異体では *JhI-21* と *mnd* の発現レベルが低い、メソプレン処理でレスキューされた。

近年、キイロショウジョウバエやカイコ、タバコスズメガを用いて JH の分子作用機構の解明が少しずつされるようになって来たものの JH の分子レベルでの作用機構に関して十分に理解が進んでいない。とりわけシグナル伝達系と JH 受容体は JH の構造が決定されて以来、現在も特定されていない。JH 受容体は古くから複数あると予想され、膜型受容体と核内型受容体の細胞内で局在の違う受容体が存在すると考えられているが、膜型についてはほとんど解明が進んでいない。現在、核内型受容体には 2 種類の受容体候補遺伝子が報告されている。

ひとつは核ホルモン受容体遺伝子 *ultraspiracle(usp)* である。USP はエクジソンシグナル伝達系で重要な役割を果たしていることが示されている。エクジソンシグナル伝達に関する初期の実験で、Clever らはエクジソンによって引き起こされるユスリカ *Chironomus tentaus* の唾腺多糸染色体の puff パターンを視覚的に捉え、エクジソンが遺伝子活性化を開始することを示した(Clever and Karlson,1960;Clever1965)。puff は染色体を構成するクロマチンが、ゆるんでみられるコンフォメーションの変化で、局所的に遺伝子が盛んに転写される。ショウジョウバエの変態は幼虫 3 齢(終齢)の終わりの急激なエクジソンタイターの上昇によって調節される(図 1-3)。そして、エクジソンタイターの上昇は、多糸染色体の数箇所では 'early' puff を引き起こして、わずかな初期の調節遺伝子(*E74*, *E75*, *BR-C* など)の発現を誘導する。それらの遺伝子の翻訳されたタンパク質が自身の発現を抑制するとともに多くの 'late' puff を引き起こして、多くの後期の標的遺伝子を誘導することがホルモンの作用モデルとして示されている(Ashburner,1974)。さらに、late puff はエクジソンの制御において、2 つの段階に分けられている(Ashburner,1978)。そのひとつの 'early-late puff' はホルモンの付加後、対照的に急速に誘導されるもので、ecdysone が継続的に存在することが必要であることが、'early puff' と共通する。もうひとつは 'late-late puff' と

され、対照的にさらに後に誘導され、ecdysone の効果がなくなったもとの誘導されるものであり、ecdysone によって抑制される(Negative feedback)。ecdysone は脂溶性リガンドとして細胞内に侵入し、ecdysone 受容体 (EcR) と結合する。ecdysone レセプター(EcR)は、脊椎動物での RXR retinoine X receptor に対応する USP (ultra spiracle)とヘテロダイマーを形成する。このヘテロダイマーは転写因子として作用し、特定の遺伝子発現を促進することが報告され(Fujiwara and Kamimura ,1998;Riddiford,2000)、USP のエクジソンシグナル伝達における機能が理解されている。USP は脊椎動物のレチノイン酸受容体(RXR)と相同性があり、JH が RXR のリガンドであるレチノイン酸と非常に似た構造をしており、メソプレレン酸が RXR に結合し標的遺伝子の転写を誘導することから、USP が JH の受容体である可能性が示された。キイロショウジョウバエ USP(dUSP)は JH との結合試験の結果、タンパク質蛍光強度が変化することから JH と USP が結合することによって立体構造の変化が見られることが報告された。dUSP は JHⅢ、JHB3、JH 酸との結合が見られたが、JH と構造の似た JH 活性のない化合物ファルネソルとは結合しなかった。USP は JH と結合することでダイマーからオリゴマーとなることが示された。さらにメソプレレンが USP と結合することが示された(Harmon et al.,1995)。JH-USP 複合体が AGGTCA-12bp-AGGTCA のダイレクトリピート配列(DR12)を解してレポーター遺伝子の転写を誘導した。また、DR12 への点突然変異の導入によって、レポーター遺伝子の転写が誘導できなくなった(Jones et al,2001;Xu et al,2002)。オオタバコガ *Heliothis verescens* とキイロショウジョウバエの USP のリガンド結合ドメインの結晶構造が解析されたが、JH より非常に大型のリン脂質が USP のリガンドであることが示され、JH が USP のリガンドとなることは不確かと考えられた(Billas,2001;Clayton,2001)。

もうひとつの JH 受容体候補遺伝子は X 染色体連鎖型遺伝子 *Methoprene-tolerant*(*Met*) である。キイロショウジョウバエ *Met* の突然変異体はメソプレレン処理に耐性を持つ個体として作出された。*Met* 変異系統は JHⅢやメソプレレン以外の JH 類似物にも耐性を示すが、

他の殺虫剤に対する耐性はなく、JH 関連化合物に対する感受性だけが低いことがわかった (Wilson and Fabian,1986)。Met 変異体の JH の体内への浸透性や分解能力、排出能力などを野生型と比較した結果、細胞抽出物の JH 結合能のみが低くなっていることが分かった (Shemshedini and Wilson,1990)。このことから Met 変異体は JH 結合タンパク質あるいは JH 受容体の変異することで JH に対する感受性が低くなっていることが示された。Met は basic helix-loop-helix(bHLH)-PAS 遺伝子ファミリーの転写因子であった (Ashok et al,1998)。しかし、Met の完全欠失変異系は JH 感受性が低くなる以外に影響がない (Wilson and Ashok,1998)。つまり Met を介する JH シグナル伝達系は発生や性成熟等に必須でなく機能的に redundant な遺伝子があるかもしれない。SP と MET は両方ともに JH 受容体の候補として問題がある。このことから JH は既存のホルモン受容体モデルとは違ったものであるかもしれない。

本研究では分子レベルでの JH の作用機構を明らかとするために DNA マイクロアレイを用いて JH に応答する遺伝子を探索と解析を行った。

【実験方法】

○材料

・細胞培養、培養細胞 S2(Shneider's Drosophila Line 2)の継代

血球系細胞由来 S2 細胞はキイロショウジョウバエ *Drosophila melanogaster* の Oregon-R 系統の孵化直前の卵から Schneider によって樹立された細胞で東京大学大学院理学系研究科生物化学専攻 程久美子助教授より分与していただいた。細胞培養は 10cm dish(SUMILON 社)を用いて 25°C のインキュベータ内でおこなった。培地は Drosophila Schneider's Medium(GIBCO 社)に非働化した 10% foetal bovine serum(Sigma 社)と 1% Penicillin-Streptomycin(GIBCO 社)を加えたものを用いた。細胞は 100% コンフレントに達した状態で継代を行った。dish に付着している細胞をピペッティングではがし、1/5 に培地で希釈して新しい 10cm dish に播きなおし継代した。

・キイロショウジョウバエ(*Drosophila Melanogaster*)

キイロショウジョウバエの野生型として、研究室で継代している Oregon-R を用いた。キイロショウジョウバエの飼育は 16L:8D の光周期条件下で 25°C インキュベータで行った。餌はコーンミール(オリエンタル酵母社)、乾燥酵母(田辺製薬社)、小麦胚芽(日本製粉社)、D-グルコース(Nakarai 社)を 10 : 8 : 25 の割合で配合したものを与えた。

○方法

§ DNA マイクロアレイによるメソプレレン応答遺伝子の網羅的解析

・S2 細胞へのメソプレレン添加と培養方法

S2 細胞を 3 枚の 5cm dish(CORNING 社)にまき、25°C インキュベータ内で 48 時間培養静置した後、実験に用いた。幼若ホルモン(Juvenile Hormone, JH)と同様に活性持つ JH 類

似物メソプレン(Methoprene) (Dr.Ehrenstorfer GmbH)を使用した。培地中での終濃度 100 μ M になるようメソプレンを S2 細胞へ添加し、S2 細胞の培養を 25°C インキュベータにて行った。S2 細胞にメソプレン添加後 0 時間・2 時間・8 時間で totalRNA を抽出した。totalRNA の抽出は以下の通り行った。

・ total RNA の抽出

ホルモンを添加・培養した S2 細胞から培地を除き、ホルモンを除去するため 2mlPBS で 2 度洗った。5cm dish の S2 細胞に対して、TRIzol Regent(Invitrogen 社)を 1ml 加え、ピペッティングしてよくホモジナイズした。1.5ml チューブに移して、ボルテックス後 5 分間氷上で静置。TRIzol Regent 1ml に対して 200 μ l のクロロホルム(Wako 社)を加えボルテックスし、15 分間遠心(4°C、14000rpm)した。上清を回収し、上清と等量 2-プロパノール(Wako 社)を加えボルテックスし、15 分間遠心(4°C、14000rpm)した。上清を除き 1ml 70%エタノールの加え、5 分間遠心(4°C、14000rpm)した。上清を除き、抽出した totalRNA の沈殿を軽くドライアップして 18 μ l DEPC-処理水で溶解した。ゲノム DNA のコンタミネーションを防ぐため、1 μ l RQ1 DNase、2 μ l 10 \times RQ1 DNase buffer を加え、37°C で 30 分間インキュベーションし DNase 処理を行った。DNase を除去するためフェノール/クロロホルム処理を行い、エタノール沈殿によって totalRNA の沈殿を得た。適量の DEPC-処理水で溶解し、total RNA の濃度を分光光度計で測定した。抽出された RNA はすぐに使用されるか -80°C にて保存された。

・ DNA マイクロアレイによる解析

DNA マイクロアレイには AFFYMETRIX 社の Gene Chip 遺伝子解析システムを用いた。Gene Chip プロブアレイには Drosophila melanogaster 由来の 13,000 以上の遺伝子の発現解析を行うためのプロブセットが搭載されている Drosophila Genome Array を用いた。

抽出した total RNA から Gene Chip のための cRNA 調整、Gene Chip プローブアレイへのハイブリダイズ、洗浄と染色、スキャニング、Affmetrix Software によるデータ解析の一部を AFFYMETRIX 社に委託した。

Gene Chip から得られたデータからホルモン処理によって遺伝子発現が有意に増減していると考えられる遺伝子を選択し、Web 上の the Gene ontology database(URL: <http://www.geneontology.org/>)および GO 解析ソフト GO Miner を用いて解析を行った。

§ S2 細胞へのメソプレレン添加による遺伝子発現変化

・ S2 細胞へのメソプレレン添加・培養と RNA の抽出

10 枚の 5cm dish に S2 細胞を播き、48 時間 25°C でインキュベータ内で培養した。メソプレレン 100 μ M (終濃度) を 5 枚用意した S2 細胞に添加した。メソプレレンはエタノール溶解していることから、残りの 5 枚の S2 細胞にエタノールを添加しネガティブコントロールとした。メソプレレンおよびエタノールを添加し、S2 細胞をそれぞれ 5 分間、15 分間、30 分間、2 時間、8 時間培養し total RNA の抽出を行った。total RNA の抽出は上記同様の操作で行われた。

・ RT-PCR による遺伝子発現変化の解析

次に以下の反応溶液組成で逆転写反応を行い cDNA を合成した。

各サンプルから 100ng total RNA を量りとり、4 μ l DEPC-処理水、2 μ l の 2.5mM dNTP mixture (Takara 社)、0.5 μ l の 500 μ g/ml Oligo d(T)₁₈-Not を加え、65°C で 5 分間インキュベーションして RNA を変性させ、氷上で 2 分間静置した。さらに、2 μ l 5× First Strand buffer、0.5 μ l 0.1M DTT、0.5 μ l Super Script III、0.25 μ l RNase inhibitor (Amersham) を加え、50°C で 1 時間逆転写反応を行った。逆転写後、酵素反応をとめるために 70°C で 15 分間インキュベートした。残った RNA を除去するために 0.5 μ l RNase H (Invitrogen 社)

を加えて RNase 処理を行った。c DNA は-20°Cで保存した。

RT-PCR には合成した c DNA を 1/20 に希釈して template とした。各遺伝子のプライマーを Web サイト上のプライマー作成ソフト Primer3 を使用して各遺伝子 ORF 内に設計した (URL: http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi)。また、PCR によってゲノム DNA の増幅を区別するために、プライマーはイントロンを挟んで設計された。各プライマーの配列は表 1 に示した。

RT-PCR の反応溶液組成と反応条件は以下の通り行われた。コントロールとして、リボソームタンパク質をコードしているハウスキーピング遺伝子 *rp49* を指標にした。

RT-PCR 反応溶液組成	
10× EX Taq buffer(TAKARA)	1 μ l
2.5mM dNTP Mixture(TAKARA)	1 μ l
sense primer(10pmol/μ l)	0.325 μ l
antisense primer(10pmol/μ l)	0.325 μ l
EX Taq polymerase	0.05 μ l
Template cDNA	1 μ l
DW	6.2 μ l
	10 μ l

RT-PCR 反応条件	
94°C	5min
94°C	30sec
60°C	30sec
72°C	30sec
72°C	7min

} 26~34cycle

§ S2 細胞へのメソプレレンとエクジソン添加による遺伝子発現への協調効果

・ S2 細胞へのホルモン添加・培養、RNA 抽出、cDNA 合成、RT-PCR

メソプレレンの添加実験同様に操作を行った。15 枚用意した 5cm dish に S2 細胞を播き、48 時間 25°C で培養後、ホルモンを添加した。5 枚にエクジソン 1 μ M (終濃度)(Sigma 社)、5 枚にエクジソン 1 μ M(終濃度)+メソプレレン 100 μ M(終濃度)、残り 5 枚をネガティブコントロールとしてエタノールを添加した。S2 細胞にホルモン添加後、それぞれ 5 分間、15 分間、30 分間、2 時間、8 時間培養し total RNA を抽出した。さらに cDNA を合成し、同様に RT-PCR をおこなった。

§ キイロシヨウジョウバエの胚期から成虫期までの発育過程に沿った遺伝子発現変化

・ハエのステージング、RNA 抽出、cDNA 合成、RT-PCR

産卵から 12h おきにキイロシヨウジョウバエを回収し、胚期から 3 齢幼虫期まで、蛹期から成虫までは前蛹を基準に 12 時間ごとに正確にステージングを行った。各ステージにおいて 6~10 個体を回収して、TRIzol で totalRNA を抽出し、上記同様に cDNA を合成し、RT-PCR をおこなった。

§ S2 細胞への JHIII 光学異性体添加による遺伝子発現変化の比較

・順相 HPLC (high-performance liquid chromatography) による JHIII 光学異性体の分離

市販されている化学合成された幼若ホルモン(Sigma 社)は光学異性体であり、天然型(10R)-JHIII(*trans*-epoxy isomer,R 体)と生物活性のない非天然(10S)-JHIII(*cis*-epoxy isomer S 体)が存在している。幼若ホルモンの異性体を分離するために、順相 HPLC (Hewlett-Packard)で解析した。Chiralpak AS column (250×4.6-mm) (ダイセル化学工業)を使用し、移動層はヘキサン:2-プロパノール(99.5:0.5)で、流速は 1ml/min で行い 220nm の波長でモニターし、検出されたピークのフラクションを分取した。

・ GC-MS(Gas chromatography-mass spectrometry)による成分分析

順相 HPLC で複数検出されたピークに含まれるフラクション成分が JH III であるかを確認するために島津 GC-2010 システム GC-MS(SHIMAZU)で解析を行った。DB-5HT column(30m×0.25mm×0.25 μ m)(Agilent Technologies 社)を使用し、ヘリウムガスを carrier gas とした。GC オープン温度は 60°C で 1 分間保持し、180°C まで 30°C/min で昇温、230°C まで 10°C/min で昇温し、230°C で 1 分間保持するプログラムを使用した。インジェクター温度は 280°C、Mass spectra のイオン化電圧 70eV、Mass reange は m/z40 から 300 で行った。

・ S2 細胞への JH 光学異性体添加による遺伝子発現変化の解析

GC-MS を用いて分取した JH 光学異性体の濃度を測定した。10 枚の 5cm dish に S2 細胞を播き、48 時間 25°C で培養した。R 体と S 体にそれぞれ JH 光学異性体を 10nM、100nM、1 μ M、10 μ M(終濃度)になるように S2 細胞に添加した。ネガティブコントロールとして S2 細胞にエタノールを添加した。以下上記と同様に total RNA を抽出し、c DNA を合成して RT-PCR を行った。

【結果】

§ DNA マイクロアレイを用いた幼若ホルモン応答候補遺伝子の探索

○DNA マイクロアレイを用いた S2 細胞へのメソプレレン添加による遺伝子発現変化の解析
JH に応答する遺伝子を同定することを目的として、まずはじめに DNA マイクロアレイを用いた幼若ホルモン(Juvenile Hormone,JH)応答候補遺伝子の探索を行った。

マイクロアレイの条件検討を行うため S2 細胞に幼若ホルモンと同等の活性をもつ幼若ホルモン類似物(Juvenile Hormone,JHA)であるメソプレレン(Methoprene)を投与し、JH 誘導遺伝子と報告されている *JHI* と *mnd*(Dubrovsky et al.,2002)の遺伝子発現が調べられた。メソプレレンを 0nM、500nM、5 μ M、10 μ M、50 μ M、100 μ M、250 μ M、500 μ M、1mM(終濃度)でそれぞれ S2 細胞に添加し、添加から 8 時間後に RNA を抽出し、ノーザンブロットで *JHI* と *mnd* のメソプレレン用量依存的な遺伝子発現の変化がみられた。結果、遺伝子の発現は用量依存的に終濃度 100 μ M まで遺伝子の発現が増加し、終濃度 250 μ M 以上添加すると遺伝子の発現量は減少し、顕微鏡下で S2 細胞を確認すると細胞死を起こしているように見られた。つぎに S2 細胞に終濃度 100 μ M でメソプレレンを添加し、添加後 0 時間、2 時間、4 時間、6 時間、8 時間、10 時間、12 時間、24 時間の 8 時点で RNA を抽出し、*JHI* と *mnd* の経時的な遺伝子発現変化をノーザンブロットで調べられた。*JHI* と *mnd* はメソプレレン添加 2 時間後から発現が上昇し始め 10 時間後に発現量が最大となり、その後徐々に発現量が減少した。以上の条件検討は当研究室の本田によって行われた(data not shown)。以上の結果から S2 細胞にメソプレレンを終濃度 100 μ M で添加し、添加 0 時間後(コントロール)、2 時間後、8 時間後 RNA を抽出して DNA マイクロアレイのサンプルにした。

Affymetry 社 Gene Chip Drosophila Genome Array を用いて DNA マイクロアレイを行った。Gene Chip Drosophila Genome Array には 13,966 のアレイプローブがスポットされており、約 13,000 個のキイロショウジョウバエ遺伝子を網羅的に解析した。DNA マイクロアレイにより S2 細胞へメソプレレン添加後 0 時間と 2 時間、および 0 時間と 8 時間で約

13,000 遺伝子の発現量変化を比較した。発現解析には Affimetrix 社の遺伝子解析ソフトを用いた。解析より遺伝子発現のシグナル強度(0 時間、2 時間、8 時間の各時間における遺伝子発現の絶対量)、各時間に遺伝子が発現しているかどうかの有意確率(存在確率)[A(Absent, 発現していない) < M(Merge, 不確か) < P(Present, 発現している)の 3 つの記号で表された]、0 時間に対して、2 時間および 8 時間で遺伝子発現量が変化したかどうかの有意確率(変化確率)[I(Increase, 増加) > MI(Mild Increase, 軽微増加) > NC(No Change, 変化なし) > MD(Mild Decrease, 軽微減少) > D(Decrease, 減少)の 5 つの記号で表された]を調べ、メソプレレン添加後 0 時間に対する 2 時間の遺伝子発現の変化量、および 0 時間に対する 8 時間の遺伝子発現の変化量を求めた(その一部の例が表 3)。メソプレレン添加後、2 時間の時点で存在確率が **P** で変化確率が **I** である 0 時間から比較して遺伝子発現が増加した遺伝子は 790 個(うち 2.0 倍以上に発現が増加した遺伝子は 120 個)、2 時間の時点で存在確率が **P** で変化確率が **D** である 0 時間から比較して遺伝子が減少した遺伝子は 247 個(うち 0.60 倍以下に発現が減少した遺伝子は 36 個)であった(図 3-1)。一方、メソプレレン添加後、8 時間の時点で存在確率が **P** で変化確率が **I** である 0 時間から比較して遺伝子発現が増加した遺伝子は 782 個(うち 2.0 倍以上に発現が増加した遺伝子は 161 個)、8 時間の時点で存在確率が **P** で変化確率が **D** である 0 時間から比較して遺伝子が減少した遺伝子は 473 個(うち 0.6 倍以下に発現が減少した遺伝子は 66 個)であった(図 3-2)。これら 2 時間と 8 時間の時点で遺伝子発現量変化の違いがみられる遺伝子はすべて一致しているわけではない。

○メソプレレン添加によって S2 細胞で遺伝子発現変化を示した遺伝子群の GO 解析

次に、DNA マイクロアレイの遺伝子発現データと the Gene ontology(GO) database [<http://www.geneontology.org/>] および GO 解析ソフト GO Miner を利用して、S2 細胞において JH が S2 細胞系全体でどのような役割を果たしているか推定した。

S2 細胞に JH 添加後 2 時間で遺伝子発現が増加している遺伝子を system

molecular_function でカテゴリーを分類すると、motor activity(13)、catalytic activity(189)、signal transducer activity(70)、structural molecular activity(41)、transporter activity(42)、binding(283)、molecular function unknown(7)、antioxidant activity(1)、enzyme regulator activity(25)、transcription regulator activity(81)、translation regulator activity(5)のカテゴリーに分類できた(図 4-1) [()括弧内の数字はカテゴリーに含まれる遺伝子数]。さらに細かくカテゴリーを再分類し、S2 細胞系全体でそのカテゴリーの遺伝子群がメソプレンに応答して有意に増加しているかを Fisher の正確確率検定で求めた。カテゴリーbinding の中で、さらに分類される nucleic acid binding(129)、protein binding(119)、nucleotide binding(79)、chromatin binding(12)カテゴリーの遺伝子群の発現は S2 細胞系全体の中で有意に増加していた(図 4-1,表 2(A))。さらに nucleic acid binding のカテゴリーをさらに分類すると、DNA binding(83)のカテゴリーに属する遺伝子の発現が有意に増加していた(図 4-1,表 2(A))。カテゴリーprotein binding をさらに分類すると cytoskeletal protein binding(28)、enzyme binding(8)、activin binding(2)、transcription factor binding(11)に属するカテゴリーの遺伝子群の発現が有意に増加していた(図 4-1,表 2(A))。カテゴリーtranscription regulator activity をさらに分類すると transcription factor activity(38)、RNA polymerase II transcription factor activity(31)、transcription cofactor activity(10)、transcription repressor activity(10)に属するカテゴリーの遺伝子群がの発現が有意に増加していた(図 4-1,表 2(A))。

一方、S2 細胞で JH 添加後 2 時間で遺伝子発現が減少している遺伝子を system molecular_function についてカテゴリーを分けると、catalytic activity(65)、structural molecule activity(44)、transporter activity(34)、binding(71)のカテゴリーに多くの遺伝子が属していた(図 4-2)。さらに細かくカテゴリーを分類し、S2 細胞系全体でそのカテゴリーの遺伝子群がメソプレンに応答して有意に減少しているかを Fisher の正確確率検定で求めた。カテゴリーcatalytic activity 中にあるカテゴリーoxidoreductase activity(29)に属して

いた遺伝子群の発現はS2細胞系全体の中でメソプレレン添加によって有意に減少が見られた(図 4-2, 表 2(B))。カテゴリー transporter の中にあるカテゴリー carrier activity(25), electron transporter activity(18), ion transporter activity(24)に属する遺伝子群で発現の減少が有意にみられた(図 4-2, 表 2(B))。binding の中にあるカテゴリー nucleic acid binding(50)の遺伝子群の発現で減少が有意にみられ、nucleic acid binding のカテゴリーをさらに分類したカテゴリー RNA binding の減少が有意にみられた(図 4-2, 表 2(B))。

また、system biological function についても解析した。cell development(50)、oogenesis(41)、reproduction(58)、laval or development(46)などのカテゴリーをはじめ多くの生理機能に関わっている遺伝子群の発現が有意に増加していることが分った(表 2(C))。一方で phosphorylation(30)、phosphate metabolism(30)、phosphorus metabolism(30)、RNA processing(13)、RNA splicing(9)、macromolecule metabolism(81)、superoxide metabolism(2)などのカテゴリーの属する遺伝子群はメソプレレン添加によって有意に減少していた(表 2(D))。

○S2細胞へのメソプレレン添加による遺伝子発現変化とマイクロアレイの検証

DNA マイクロアレイの解析データの通りメソプレレンに反応して遺伝子発現が変化するかを検証した。メソプレレン添加後 2 時間および 8 時間での遺伝子発現量が、0 時間と比較して変化量の大きい遺伝子をピックアップした(表 3-1, 3-2)。一方で、遺伝子発現がメソプレレン添加によって抑制される遺伝子の発現変化の検証は明確でなかった。

S2細胞に終濃度 100 μ M でメソプレレンを添加後、5 分、15 分、30 分、2 時間、8 時間で RNA を抽出し、RT-PCR を用いてメソプレレン反応候補遺伝子の発現変化を経時的に追ってみた。また、メソプレレンはエタノールに溶けており、DNA マイクロアレイではエタノールの反応する遺伝子が含まれる可能性がある。そこで、コントロールとしてエタノールを S2細胞に添加、5 分、15 分、30 分、2 時間、8 時間で RNA を抽出し、RT-PCR を行い、メソ

プレレン添加と比較し、エタノールに応答している遺伝子をメソプレレン応答候補遺伝子から除いた。

メソプレレン添加後2時間で遺伝子発現量が増加するとDNAマイクロアレイで示された遺伝子のうち、*MED26*, *CG2865*, *Nipped-A*, *plexB*, *zfh1*, *CG18213*, *GATAd*, *CG5830*, *CG1516*, *CG8414*, *CG11727*, *E75*, *Pten*, *Kr-h1*, *Cyp6a20*メソプレレン添加によって2時間で遺伝子発現の増加が確認された(図 5-1,5-2)。同様にメソプレレン添加後8時間で、*MED26*, *CG2865*, *Nipped-A*, *zfh1*, *CG18213*, *GATAd*, *CG2118*, *CG1516*, *E75*, *Kr-h1*, *Hsp26*, *Dgp-1*, *Cyp6a8*, *GstD2*, *Cyp6a20*の遺伝子発現の増加が確認された(図 5-1,5-2)。これらの遺伝子の中でエタノール添加とメソプレレン添加による遺伝子発現変化を比較すると、*Hsp26*と*CG2118*はエタノールでも8時間で強く誘導されており、エタノール応答遺伝子であると判断した(図 5-2)。これらの結果、*MED26*, *CG2865*, *Nipped-A*, *plexB*, *CG3690*, *zfh1*, *CG18213*, *GATAd*, *CG5830*, *CG1516*, *CG8414*, *CG11727*, *E75*, *Pten*, *Kr-h1*, *Cyp6a8*, *Cyp6a20*, *Dgp-1*, *GstD2*はメソプレレン応答候補遺伝子であり、JH 応答候補遺伝子であるとした。また、メソプレレン添加後2時間より早い時間に遺伝子発現が誘導されている直接的にJHに制御されていると考えられている遺伝子について注目した。*kr-h1*, *CG2865*, *GATAd*は30分で、*E75*のスプレイスバリエント*E75D*、*Cyp6a20*は15分で遺伝子発現が増加した(図 5-1,5-2)。*E75*のスプレイスバリエント*E75A*はメソプレレン添加後2時間から遺伝子発現が誘導され、*E75B*、*E75C*に関してはS2細胞での遺伝子発現が確認できなかった。

§ JHⅢ光学異性体の添加による遺伝子発現変化の比較

JH 応答候補遺伝子がJHの生物活性に応答しているものか、JHの薬理的な効果に応答しているのかは分らない。JHには光学異性体が存在し、光学異性体の違いによる生物活性

の違いはカイコ *Bombyx mori*(Sakurai et al.,1990)、ハチノスツヅリガ *Galleria mellanella*、ハイイロゴキブリ *Nauphoeta cinerea*(Kindle et al.,1988)で確かめられている。

JHⅢは天然型の(10R)-JHⅢ〔methyl(2E,6E,10R)-10,11-epoxy-3,7,11-trimethyl-2,6-dodeccadienoate〕と非天然型の(10S)-JHⅢ〔methyl(2E,6E,10S)-10,11-epoxy-3,7,11-trimethyl-2,6-dodeccadienoate〕が存在する。カイコでは(10S)-JHⅢの生物活性は全く示されず、ハチノスツヅリガでは(10R)-JHⅢは(10S)-JHⅢの 5240 倍、ハイイロゴキブリでは 250 倍以上の生物活性の違いがある。JHⅢの光学異性体を分離し、S2細胞に添加することで生物活性の違いから遺伝子発現に差が生じると考え、DNA マイクロアレイの結果から得られた JH 応答候補遺伝子の遺伝子発現変化の違いを検証する。

○キラルカラム AS-H を用いた順相 HPLC による JHⅢ光学異性体の分離

JHⅢ光学異性体を分離するために、光学異性体を分離できる AS-H キラルカラムを用いて順相 HPLC を行った。結果、検出時間 6 分 40 秒、8 分、8 分 45 秒、10 分のそれぞれにピークが確認された(図 6-1)。ピークは(10R)-JHⅢと(10S)-JHⅢの 2 つではなく、4 つ検出された理由としては購入した JHⅢの化学合成品は純度 75%であり、不純物が含まれていると考えられた。これらのピークが検出されたフラクションをそれぞれ分取した。

○GC-MS による 4 つのフラクションの成分分析

どのフラクションに JHⅢにあたるかを知るために分取したフラクションの成分を GC-MS で分析した。GC の結果、peak1 のフラクションからは検出時間 7.075 分に大きなピーク (peak1-1)が見られた(図 6-2)。同様に peak2、3、4 のフラクションを GC で解析した結果、peak2 のフラクションからは検出時間に 7.333 分に大きなひとつのピーク (peak2-1)が検出された(図 6-2)。peak3 のフラクションからは検出時間 6.1 分、7.075 分、7.308 分に 3 つのピーク (peak3-0、3-1、3-2)が検出された(図 6-2)。peak4 のフラクションからは検出時間 7.075

分にひとつのピーク(peak4-1)が検出された(図 6-2)。さらに、これら peak1-1、2-1、3-1、3-2、4-1 の MS を解析し、molecular ion と fragmentation patterns を比較した(図 6-3)。fragmentation patterns をそれぞれのピーク間と JHⅢ で比較検討すると、peak1-1 と peak3-1 が同じ成分であり、peak2-1 と peak4-1 が同じ成分であった(図 6-3)。peak3-2 は検出時間こそ 2-1、4-1 と同じものの全く JHⅢ と異なった分子であることがわかった(図 6-3)。fragmentation patterns において 114 と 121 のスペクトルの比率から 2-1、4-1 が JHⅢ であると判断された(図 6-3)。順相 HPLC でⅢを分離すると、(10R)-JHⅢが(10S)-JHⅢよりも先に検出できる(Cusson et al.,1997)ことから、順相 HPLC で分取した peak2 のフラクションが(10R)-JHⅢ、peak4 のフラクションが(10S)-JHⅢであると判断した。最終的に、キロショウジョウバエ個体に分取した JHⅢの光学活性体を塗布して、生物検定を行った。白蛹期に 25ng/1 個体~200ng/1 個体で(10R)-JHⅢを塗布した個体は羽化不全をおこし、成虫まで生存できなかったのに対し、(10S)-JHⅢを塗布した個体は正常に成虫まで発育が確認された。このことからショウジョウバエ JHⅢの光学異性体にも R 体と S 体で生物活性に差があることを確認した。

○S2 細胞への JH 光学異性体の添加による遺伝子発現変化の比較

順相 HPLC で分取した(10R)-JHⅢと(10S)-JHⅢを終濃度 0nM、10nM、100nM、1 μ M、10 μ M で S2 細胞に添加し、添加後 2 時間における濃度勾配による遺伝子発現の変化の差をみた。この方法によって、DNA マイクロアレイからメソプレレン応答遺伝子として得られた遺伝子が JH 応答性を示すかと、JH の生物活性に反応するかを判別した。結果、*plexB* にみられるように(10R)-JHⅢには反応せず、非天然型の(10S)-JHⅢにのみ反応している遺伝子の存在が明らかになった(図 7-1,7-2)。これらは(10S)-JHⅢを生体内で異物として認識し、薬理的な効果に反応しているものと考えられる。だが、多くのものは濃度依存的に(10R)-JHⅢと(10S)-JHⅢに反応していた(図 7-1,7-2)。メソプレレン応答遺伝子の中で、*E75D*

は 10nM、100nM の濃度で添加したときに、天然型(10R)-JHIIIにのみ遺伝子発現が誘導された(図 7-1,7-2)。光学異性体による遺伝子発現の違いを DNA マイクロアレイを用いて今後解析し、JH の生物活性特異的に応答している真の JH 応答遺伝子を探索することを検討中。

§ S2 細胞へのメソプレレン+エクジソン、およびエクジソン添加による遺伝子発現の変化

昆虫の脱皮・変態はエクジソンと JH に協調的に制御されている。しかし、エクジソンと JH がどのように分子レベル、遺伝子レベルで脱皮・変態を制御するかの報告は少なくはっきりしない。JH はエクジソンによって活性化される遺伝子の発現を調整すると考えられる。そこで、DNA マイクロアレイから得られた JH 応答候補遺伝子についてエクジソンの効果、および JH とエクジソンによる協調効果を調べた。S2 細胞に終濃度 1 μ M でエクジソン、および終濃度 1 μ M のエクジソンに終濃度 100 μ M メソプレレンと一緒に添加して、経時的に遺伝子発現変化を調べた。ネガティブコントロールには、エタノールを S2 細胞へ添加した。

E75A、*E75D*、*Kr-h1*はエクジソン誘導遺伝子であり、エクジソンに対して 15 分で誘導された(図 8-2)。*E75A*は 30 分で遺伝子発現が最大となり 8 時間まで発現が維持されたのに対し、*E75D*は 30 分で遺伝子発現が最大になり以降ダウンレギュレーションされた(図 8-2)。*Kr-h1*は 15 分で発現が弱く誘導され、そのレベルで発現が 8 時間まで維持された(図 8-2)。また、エクジソンとメソプレレンをともに添加すると、*E75A*では 15 分から発現が増加して 30 分で最大となり、8 時間でやや減少した(図 8-2)。一方、*E75D*は 30 分で遺伝子発現が急激に増加し、ダウンレギュレーションした(図 8-2)。*Kr-h1*は 30 分以降に強く発現が誘導されて 8 時間までその発現レベルが維持された(図 8-2)。*Thor*では添加後 8 時間で、エタノール添加(コントロール)に比較してエクジソン、エクジソン+メソプレレン添加で遺伝子発現が増加した。また、メソプレレン+エクジソン添加は、エクジソンのみ添加した場合よりも発現が増大した(図 8-2)。*Cyp6a8*ではメソプレレン+エクジソンでのみ 2 時間から発現が増加し 8 時間で最大となった(図 8-2)。*Cyp6a20*でもメソプレレン+エクジソンのみで発現

の変化がみられ 8 時間で増加した(図 8-2)。GstD2 でもメソプレレン+エクジソンのみで添加後 8 時間で発現が増加した(図 8-2)。Dgp1 はメソプレレン+エクジソンの添加で 8 時間で遺伝子発現が増加しているようであったが、エタノールやエクジソンのみ添加後の 5 分から 30 分でみられる遺伝子発現が抑えられているようであった(図 8-2)。CG1516 ではエクジソン+メソプレレン添加後 2 時間に発現が増加していた(図 8-2)。

§ キイロショウジョウバエにおける JH 応答候補遺伝子の発現

S2 細胞へのメソプレレン添加、エクジソン添加、エクジソン+メソプレレン添加の実験から遺伝子発現の変化パターンがユニークであった遺伝子 *E75A*、*E75D*、*CG1516*、*Cyp6a8*、*Cyp6a20*、*kr-h1*、*Thor*、*Dgp1*、*GstD2*、*Hsp26* に注目し、キイロショウジョウバエ個体で胚期から成虫期までの遺伝子発現変化を調べた(図 9)。*E75A*、*E75D* は胚期後半から 3 齢幼虫初期までと蛹期 24 時間から 48 時間にかけて強く発現していた(図 9)。*Cyp6a8*、*Cyp6a20*、*GstD2*、*CG1516* では胚期と 3 齢幼虫期後半から蛹期 84 時間にかけての発現が低かった(図 9)。*Thor* は胚期前半と蛹期 24 時間から蛹期 84 時間にかけて発現が低かった(図 9)。*Dgp1* では 1 齢幼虫期後半から 2 齢幼虫期前半と 3 齢中期で発現が低かった(図 9)。*Kr-h1* は蛹期 36 時間で強く発現された。*Hsp26* は蛹期 72 時間から成虫期で発現が低かった(図 9)。

【考察】

昆虫の脱皮・変態はエクジソンと JH によって協調的に制御されており、変態に関連した形態的、生理的变化はホルモンに制御された遺伝子発現によって引き起こされていると考えられる。それぞれの発育ステージで、決まった時期に特異的な遺伝子を発現する (O'Connor, 1985, Riddiford, 1985, Sehnal, 1989, Riddiford, 1994)。エクジソン分子レベルでの作用機構は遺伝学や分子生物学を用いて現在、多くのことが理解されてきた。だが、分子レベルでの JH 作用機構は未だにはっきりとしておらず、JH 応答遺伝子に関する報告も少ない。JH の分子的な作用には 2 種類考えられる。ひとつはエクジソンシグナルカスケードの調節を担い、エクジソン活性化遺伝子の発現を制御する作用。もうひとつは遺伝子の発現を直接制御して、遺伝子発現を促進あるいは抑制する作用である。そこで本研究ではまず DNA マイクロアレイを用いて JH 応答遺伝子の探索を網羅的に行った。

§ S2 細胞における JH 応答

S2 細胞はキイロショウジョウバエ野生型 Oregon-R 系統の孵化直前の卵から樹立された細胞である。JH は不完全変態昆虫の直翅目で胚期に若虫のクチクラ形成など胚発生に関わっているとされるが、完全変態昆虫の高等双翅目で JH が作用している報告はなく、正確な JH タイターも測定されていない問題があり、S2 細胞が JH 応答遺伝子の探索に利用できるかを検討する必要性があった。S2 細胞に JH 類似物メソプレンを添加後、2 時間における遺伝子発現の変動について DNA マイクロアレイを行い the Gene Ontology database と GO Miner を用いて S2 細胞系で JH がどのような働きをしているかを解析した(表 2, 図 4)。GO の system biological_process についてみると、reproduction、oogenesis、cell development、cell cycle などをはじめとする個体での JH 作用が報告されている生理現象に関わる遺伝子群のカテゴリーが有意に変化していた。このことから S2 細胞においても、幼虫期や成虫期における JH 応答性がみられる。また、phosphorylation、phosphate

metabolism、phosphorus metabolism などのタンパク質リン酸化に関わる遺伝子群のカテゴリが有意に減少していることから、JH がシグナル伝達系でタンパク質のリン酸化を制御するかもしれない(表 2)。JH の直接的な標的であると報告された数少ない例のひとつに、トウヒシントメハマキガ *Choristoneura fumiferana* の *Jhe*(*Juvenile hormone esterase*) 遺伝子がある。トウヒシントメハマキガ細胞の *Jhe* の上流プロモーター領域が解析され、JH 応答配列(JHRE)が同定された。JHRE には AGATTANNNAGATTA のダイレトリピートが重要な役割をしており、JH を細胞に添加後 3 時間で JHRE と核抽出物が結合することが示され、リン酸化された核抽出物には結合しないことが示された。このことから、JH は核タンパク質の脱リン酸化をひき起こし、JHRE との結合を促進しているかもしれないと仮説が立てられた(D.R.Kethidi et al,2004)。この仮説に従うなら、Davey らが報告するようにショウジョウバエの付属腺やオオサシガメの濾胞細胞における JH がもつ膜介在性の効果は protein kinase C 活性化を介しておこること(K.G.Davey、2000)とむすびつく。GO 解析の結果から JH の脱リン酸化に加え、リン酸化制御遺伝子の抑制によるリン酸化制御をしている可能性がある。

また、RNA processing、RNA splicing のカテゴリーに含まれる遺伝子群も有意に発現が減少していた(表 2)。このことから、体液中でのホルモンのタイターに従って時期特異的に発現するスプライスバリエントが異なること(Riddiford et al,2003;Zhou X et al,2004;Ijiro and Fujiwara,2005)が知られる遺伝子(例えば *Broad-Complex* など)(図 1-3)の発現制御を介して変態を制御しているかもしれない。

GO 解析で system molecular_function について調べた結果、遺伝子発現がメソプレンによって誘導された遺伝子群の属するカテゴリーでは binding、catalytic activity をはじめ全体としてさまざまな遺伝子群が誘導されていることが分ったが、中でも DNA 結合や転写因子活性に関わるカテゴリーが有意に変化していることから JH が転写制御をおこなう可能性が考えられる。一方でメソプレンによって遺伝子発現が減少した遺伝子群には

oxidoreductase activity や RNA binding などのカテゴリーに属する遺伝子群が有意に減少していた。メソプレンの添加は通常、生体内の不要あるいは有害物質の代謝に役割を果たす酸化還元酵素 oxidoreductase の発現上昇をひき起こすと考えられるが、この結果から 2 時間ではこれらが減少していることから、メソプレンの薬理的効果がみられない。このことからメソプレンは JH の生物活性をもって細胞に働いていると考えられる。また、メソプレンを添加後 2 時間で superoxide dismutase(SOD) activity のカテゴリーが有意に減少していることから、JH の寿命への効果が反映されているかもしれない。ショウジョウバエで SOD 過剰発現個体は寿命の延長効果が報告された (Parkes et al,1998 Sun and Tower ,1999)。寿命の延長効果をもたらすインスリン受容体遺伝子(*InR*)変異体のいくつかで JH 合成能の欠損がみられ、JH は生存と生殖のトレードオフを厳密に制御する因子とされた(Tatar et al,2001,2003)。そして、長寿で JH 合成能が欠損した変異ショウジョウバエにメソプレンを処理すると寿命の長さが野生型と近くなったことから、JH には寿命を調節する効果が示された(Tatar et al,2001,2003)。このことから、SOD と *InR* 制御に JH 作用の関連が考えられ、S2 細胞系を用いて、寿命を制御する JH の作用機構の解明が行えるかもしれない。

§ JH 応答遺伝子

○ *E75* 遺伝子

E75 遺伝子はエクジソンシグナル伝達におけるエクジソン初期誘導遺伝子であると知られている(図 1-3)。ゲノム上で *E75* の遺伝子座は 100kb におよび、8 つのエクソン、4 つの異なるプロモーター領域と 2 つのポリアデニル化領域からなる (Segraves and Hogness, 1990)。選択的スプライシングによって、4 つのタンパク質アイソフォーム *E75A*、*E75B*、*E75C*、*E75D* をコードする mRNA が転写される。これらの遺伝子は発現時期が異なり、担う機能が違うと考えられるが、詳細な解析はまだ行われていない。これらのタンパク質は

DNA 結合ドメインとリガンド結合ドメインから核ホルモン受容体スーパーファミリーに属するオーファンレセプターと報告されている。

DNA マイクロアレイの結果から *E75* はメソプレレン添加後、2 時間で 2.5 倍、8 時間で 1.77 倍に遺伝子発現が増加していた。DNA マイクロアレイの結果を細かく検証すると *E75A* はメソプレレン添加後 2 時間で、*E75D* は 15 分で遺伝子発現が増加していた。また、JH の光学異性体を用いた実験では *E75D* において 10 nM、100 nM の濃度において生物活性のある(10R)-JH III でのみ強く発現が誘導されていた。このことから、*E75D* は JH に早い時間帯で直接的に応答し、生物活性によって誘導される有力な JH 応答遺伝子であると考えた。*E75* 遺伝子発現におけるエクジソンと JH の協調効果を調べたところ、メソプレレン+エクジソンを添加した細胞において *E75A* ではメソプレレンのみ添加した細胞よりも 15 分という早い段階で誘導され、8 時間でダウンレギュレーションがかかっていることがわかった。また、エクダイソンのみ添加した細胞では *E75A* は 15 分で遺伝子発現が増加しはじめメソプレレン+エクジソン添加細胞同様に 30 分で遺伝子発現が増加したが、そのまま遺伝子発現のレベルが維持された。*E75D* ではメソプレレン+エクジソン添加細胞では 30 分で急速に遺伝子発現が誘導されたのに対して、エクジソンのみ添加した S2 細胞では 15 分から遺伝子発現が誘導された。このようにエクジソンとメソプレレン添加による協調効果によって、*E75* の遺伝子発現は細かく制御されているかもしれない。そして、*E75* のキイロショウジョウバエ個体における発育過程にしたがった遺伝子発現の変動パターンをみると、3 齢幼虫期から蛹初期にかけて発現が低いことがわかる。特に 3 齢中期にキイロショウジョウバエで JH タイターが低く、*E75* は何らかの形で遺伝子発現が負の制御を受け、変態開始(蛹化コミットメント)が制御されている可能性が考えられる。しかし、*E75* は JH のみに応答して誘導されているわけではなく、エクジソンにも誘導され、発現の制御機構を理解することは難しい。また、JH のターゲットとなる組織、細胞について、遺伝子発現を解析する必要がある。さらにシグナル伝達レベルでの詳細な解析が必要である。

○*Cyp6a8*, *Cyp6a20*, *GstD2*, *Hsp26*

Cyp6a8 や *Cyp6a20* の機能は酸化還元酵素、水酸化酵素、モノオキシゲナーゼ、*GstD2* の機能はグルタチオントランスフェラーゼ、*Hsp26* の機能は熱ショックや化学物質などストレス応答であり、いずれもメソプレンによる薬理的な効果であると考えられた。しかし、S2 細胞へのメソプレン添加実験、エクジソン添加およびエクジソン+メソプレン添加実験、ショウジョウバエ個体の発育過程にそった遺伝子発現の変動からこれらの遺伝子が薬理的な効果によって誘導されていないのではないかと判断した。メソプレン添加やエクジソン添加による遺伝子発現変化をエタノール添加時と比較した結果、*Hsp26* はエタノールによって誘導されることがわかった。実際、熱ショックタンパク質はエタノールによっても誘導されることが報告されている。しかし、一方で *Cyp6a8*, *Cyp6a20*, *GstD2* はエタノールの効果ではなく、メソプレンによって遺伝子発現が誘導されており、エクジソンのみでは発現は誘導されないことから、メソプレン特異的に誘導されていることが考えられる。これらの遺伝子はキイロショウジョウバエ個体の発育過程にそった遺伝子発現パターンをみると、JH タイターが低下するとされる 3 齢幼虫期後半から蛹期にかけて遺伝子発現が低かった。これらの遺伝子はメソプレンの薬理的効果ではなく JH 活性に応答しているかもしれない。*Cyp6a8* や *Cyp6a20* はモノオキシゲナーゼとしてステロイド代謝に関わっている機能も示されており、*GstD2* もグルタチオントランスフェラーゼが解毒酵素としての役割以外に、ステロイドホルモンのイソメラーゼとして働くことが知られていることから、JH 存在時にエクジソンの効果を制御しているかもしれない。

○*Kr-h1*

Kr-h1 は S2 細胞へメソプレン添加によって 30 分、2 時間、8 時間で遺伝子発現が弱く誘導され、エクジソン添加時には添加後 15 分以降に遺伝子発現が弱く誘導された。一方、メソ

ブレンとエクジソンを添加すると添加後 30 分以降に強く発現誘導されることが分った。*Kr-h1* 変異体は胚期、幼虫期までは正常な発育をするが変態過程で必要不可欠な head eversion が正常に行えず前蛹期で致死となる(Pecasse et al, 2000)。また、ゲノム構造から *Kr-h*にはプロモーターの異なる 2 つのスプライスバリエント *Kr-h1*, *Kr-h2*が転写される。*Kr-h1* のプロモータ領域への P 因子挿入変異は前蛹致死となり、*Kr-h2* プロモータ領域への P 因子挿入変異は胚性致死、あるいは幼虫致死となる(Pecasse et al, 2000)。3 齢幼虫および前蛹期の野生型の唾液腺を培養し、エクジソンを加えると遺伝子発現が誘導された(Pecasse et al, 2000)。*Kr-h1*, *Kr-h2*はそれぞれエクジソンに応答して、変態開始時と胚期でエクジソン応答性の遺伝群と協調してはたらいっていると報告された(Beck et al, 2004)。このことと S2 細胞を用いた実験から、*Kr-h1*はエクジソンだけではなく、JH にも制御され、JH ホルモンタイターの低い 3 齢幼虫期から前蛹期にかけてエクジソン応答によって変態開始が制御されているかもしれない。細胞においてエクジソン+メソブレンによって強く誘導される効果は何であるか、また細胞で得られた結果が本当に個体で反映されるかは今後、更なる解析が必要である。

以上の JH 応答遺伝子と考えられる遺伝子を DNA マイクロアレイで探索し、S2 細胞を用いてスクリーニングを行ってきたが、JH 応答遺伝子であると確定するには生体での JH 応答性を検証しなくてはならない。今後、変異体を用いた遺伝学的な解析やプロモータ領域の解析をはじめとした遺伝学的、分子生物学的な手法による機能解析の必要性が十分にある。

【図表】

- p34 図 1-1 タバコズズメガ *Manduca sexta* におけるエクジソンと JH タイターの変動
- p34 図 1-2 カイコ *Bombyx mori* におけるエクジソンと JH タイターの変動
- p35 図 1-3 キイロショウジョウバエ *Drosophila melanogaster* におけるエクジソンと JH
タイターの変動
- p35 図 2 JH 分子種の構造と JH 類似物(JH analog, JHA)メソプレレン(Methoprene)の構造
- p36 図 3-1 S2 細胞へメソプレレン添加後 2 時間での遺伝子発現変化の解析
- p36 図 3-2 S2 細胞へメソプレレン添加後 8 時間での遺伝子発現変化の解析
- p37 図 4-1 メソプレレン添加によって S2 細胞で遺伝子発現が増加した遺伝子群の GO 解析
- p38 図 4-2 メソプレレン添加によって S2 細胞で遺伝子発現が減少した遺伝子群の GO 解析
- p39 図 5-1 S2 細胞へのメソプレレン添加による遺伝子発現の変化
- p40 図 5-2 S2 細胞へのメソプレレン添加による遺伝子発現の変化
- p41 図 6-1 JHⅢ光学異性体のキラルカラムを用いた順相 HPLC による分離
- p42 図 6-2 順相 HPLC によって分取したフラクションの GC による解析
- p43 図 6-3 GC の解析でみられたピークの成分を MS によって解析
- p44 図 7-1 S2 細胞へ JHⅢ光学異性体添加における遺伝子発現変化の比較
- p45 図 7-2 S2 細胞へ JHⅢ光学異性体添加における遺伝子発現変化の比較

p46 図 8-1 S2 細胞へのメソプレレン+エクジソン添加、およびエクジソン添加による
遺伝子発現の変化

p47 図 8-2 S2 細胞へのメソプレレン+エクジソン添加、およびエクジソン添加による
遺伝子発現の変化

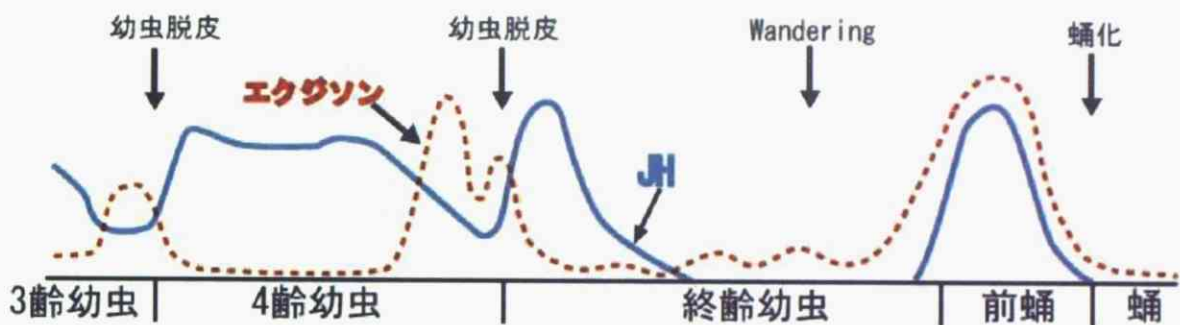
p48 図 9 キイロショウジョウバエ個体の胚期から成虫期にいたる遺伝子発現の変化(発現
プロファイル)

p49 表 1 RT-PCR に用いたプライマーセット

p50-59 表 2 GO Miner によるメソプレレン応答遺伝子の解析

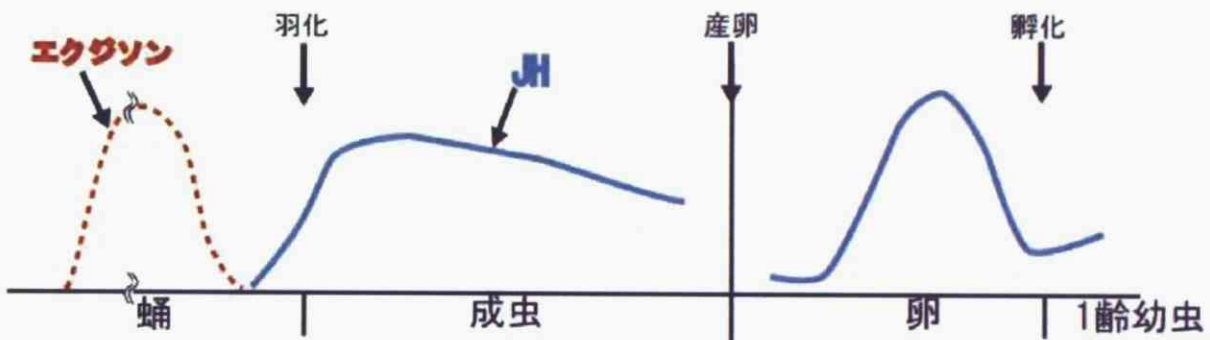
p60 表 3-1 S2 細胞へのメソプレレン添加による遺伝子発現変化を DNA マイクロアレイで
解析

p61-63 表 3-2 DNA マイクロアレイの解析からピックアップしたメソプレレン応答遺伝子の
機能と GO term



(Touhara 1994から引用)

図1-1 タバコスズメガ *Manduca sexta* におけるエクジソンとJHタイター変動
終齢幼虫Wandering期にJHの非存在下で、エクジソンが蛹化への変態進行を決定する。
JH ——— エクジソン - - - - -



エクジソン

羽化

JH

産卵

孵化

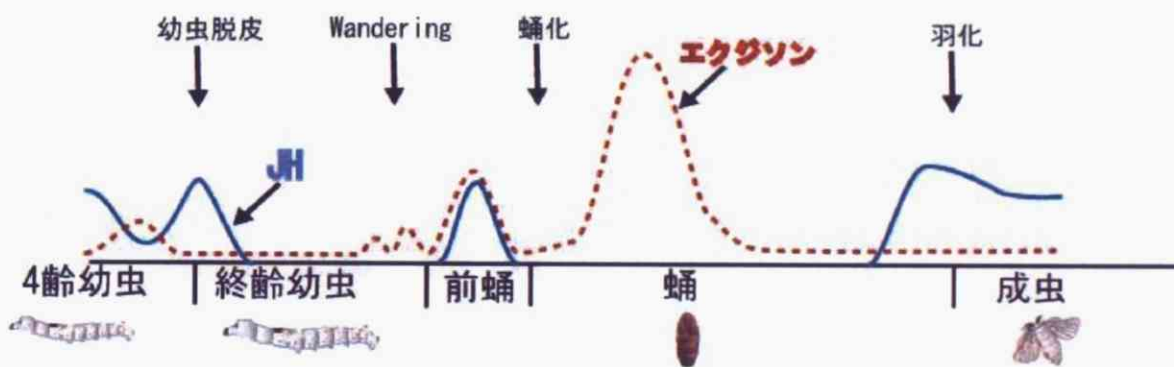
蛹

成虫

卵

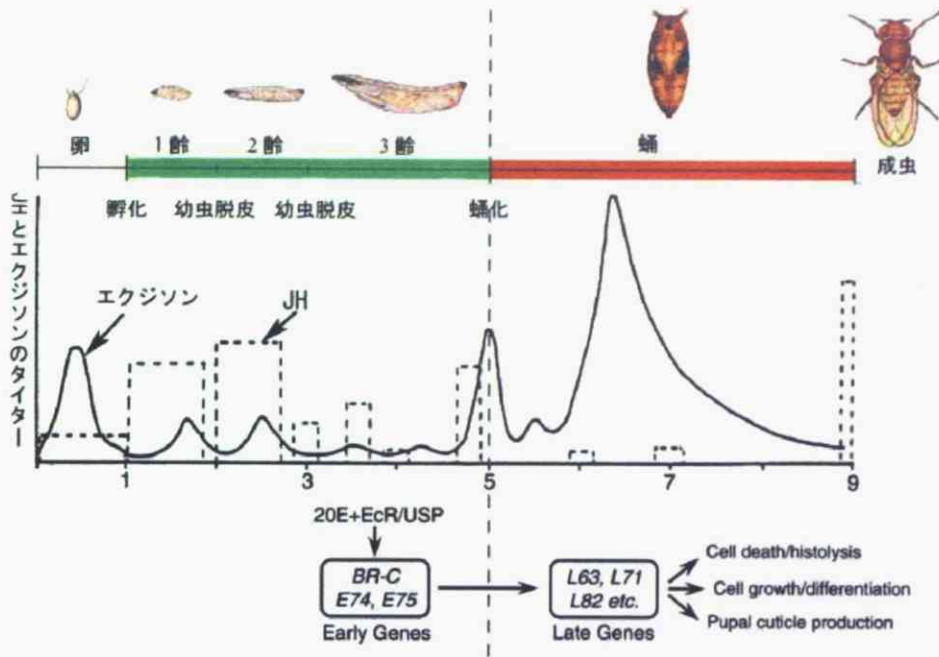
1齢幼虫

JH ——— エクジソン - - - - -



(Matsumoto et al. 1978から引用)

図1-2 カイコ *Bombyx mori* におけるエクジソンとJHタイターの變動
終齢幼虫Wandering期にJHの非存在下で、エクジソンが蛹化への変態進行を決定する。
JH ——— エクジソン - - - - -



(Riddiford et al. 1994から引用)

図1-3 キロシヨウジョウバエにおけるエクジソンとJHタイター変動

ホルモンタイター変動パターンはタバコスズメガ同様にみられ、脱皮・変態がホルモン制御を受けている。エクジソンはエクジソンレセプター(EcR)とUSPを介して結合する。エクジソンに初期応答する遺伝子BR-C, E74, E75は転写因子をコードしており、エクジソンに後期応答する遺伝子を活性化させ変態が進行する。

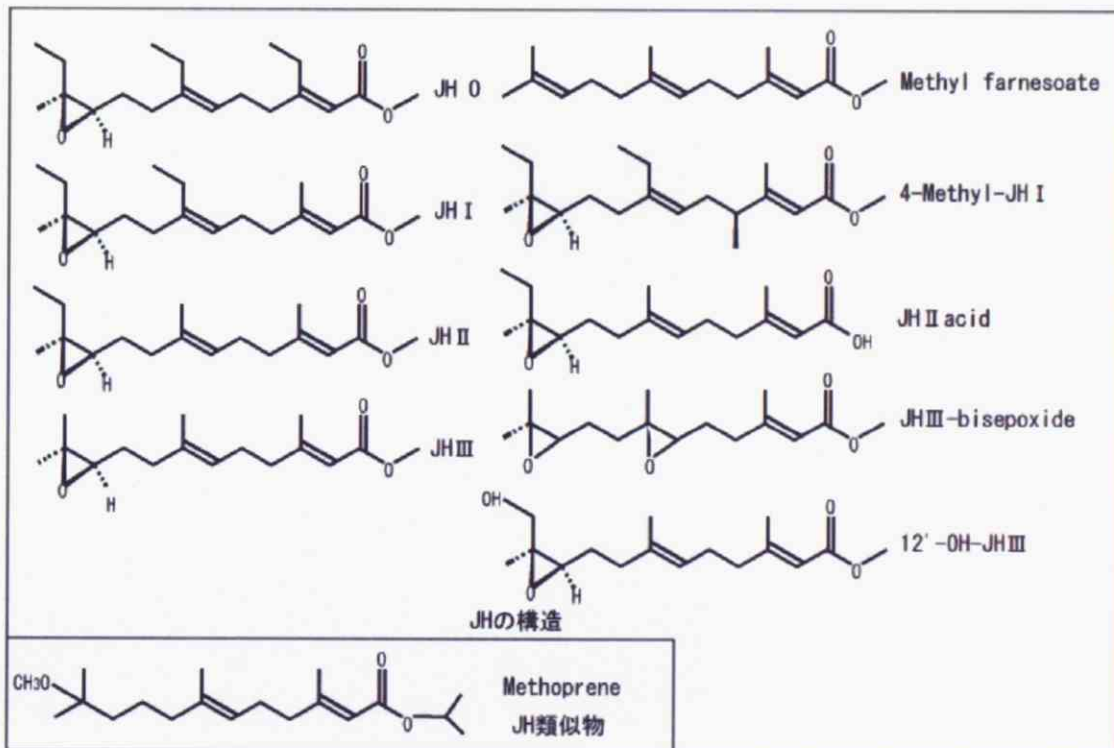
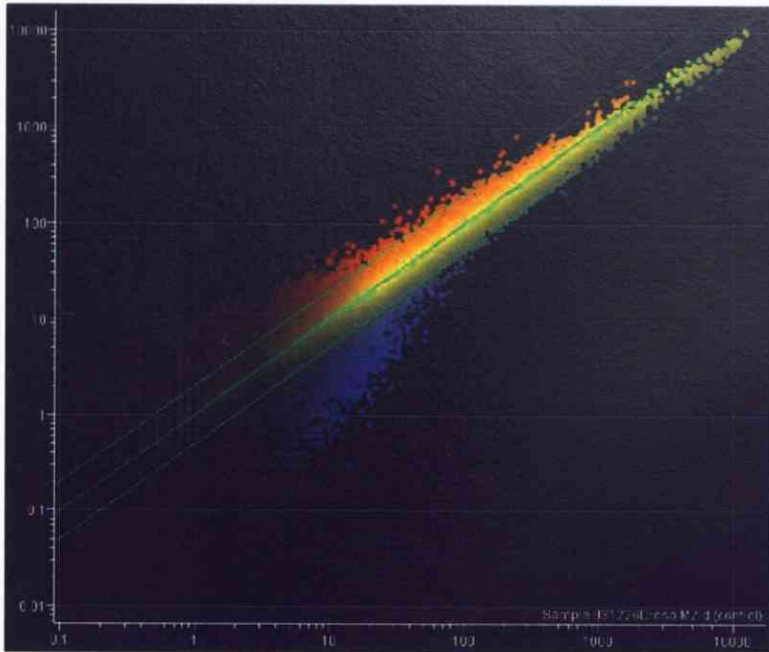


図2 JH分子種の構造とJH類似物(JH analog, JHA)メソプレン(Methoprene)の構造

カイコやタバコスズメガではJH I、II、キロシヨウジョウバエではJH III、JHB III-bisepoxideが生体内で重要な役割を果たすとされる。

メソプレ
ン添加
後2時
間での



メソプレ
ン添加
後0時
間での
シグナル
強度

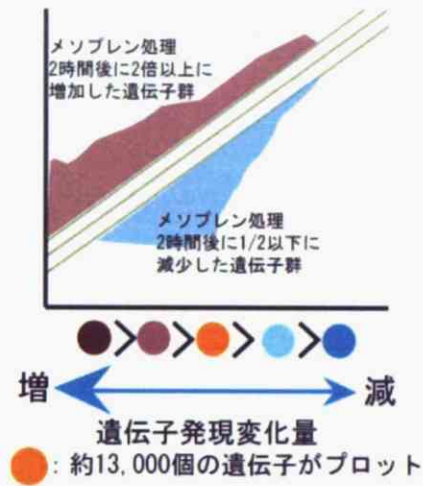
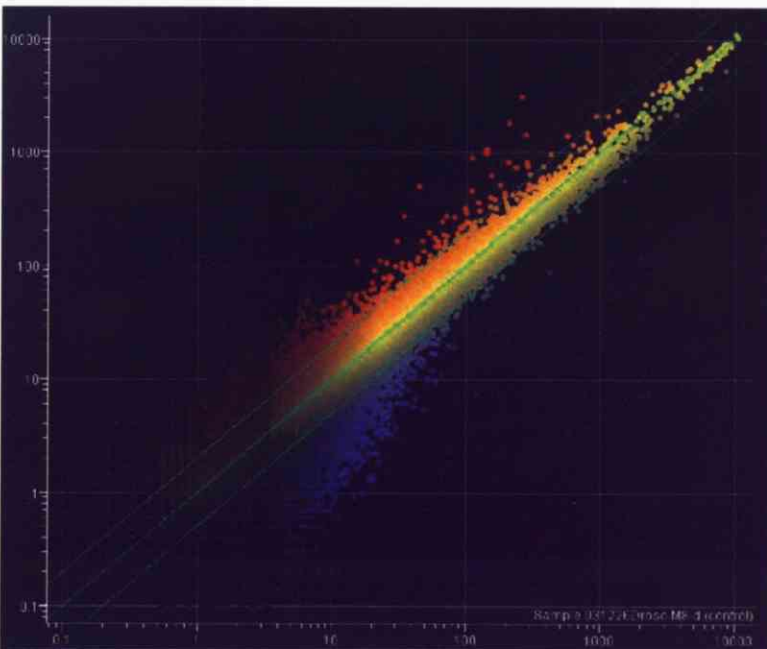


図3-1 S2細胞へメソプレ
ン添加後2時間での遺
伝子発現変化の解析

DNAマイクロアレイにより約13,000個の遺
伝子を解析した。横軸を0時間でのシ
グナル強度(遺伝子発
現量)、縦軸を2時間でのシ
グナル強度(遺伝子発
現量)をして全ての遺
伝子をプロットした。結果、全
ての遺伝子発現の増減が示
された。

メソプレ
ン添加
後8時
間での



メソプレ
ン添加
後0時
間での
シグナル
強度

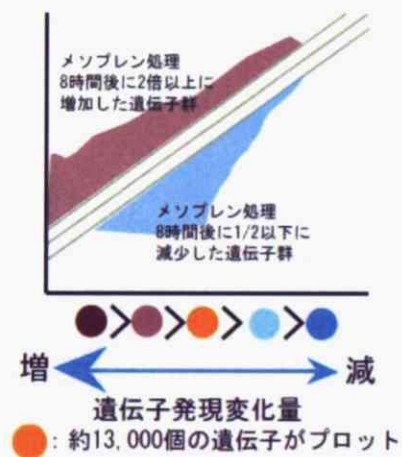


図3-2 S2細胞へメソプレ
ン添加後8時間での遺
伝子発現変化の解析

メソプレ
ン添加
後2時
間と同
様に、
8時間
での遺
伝子発
現の増
減が示
された。

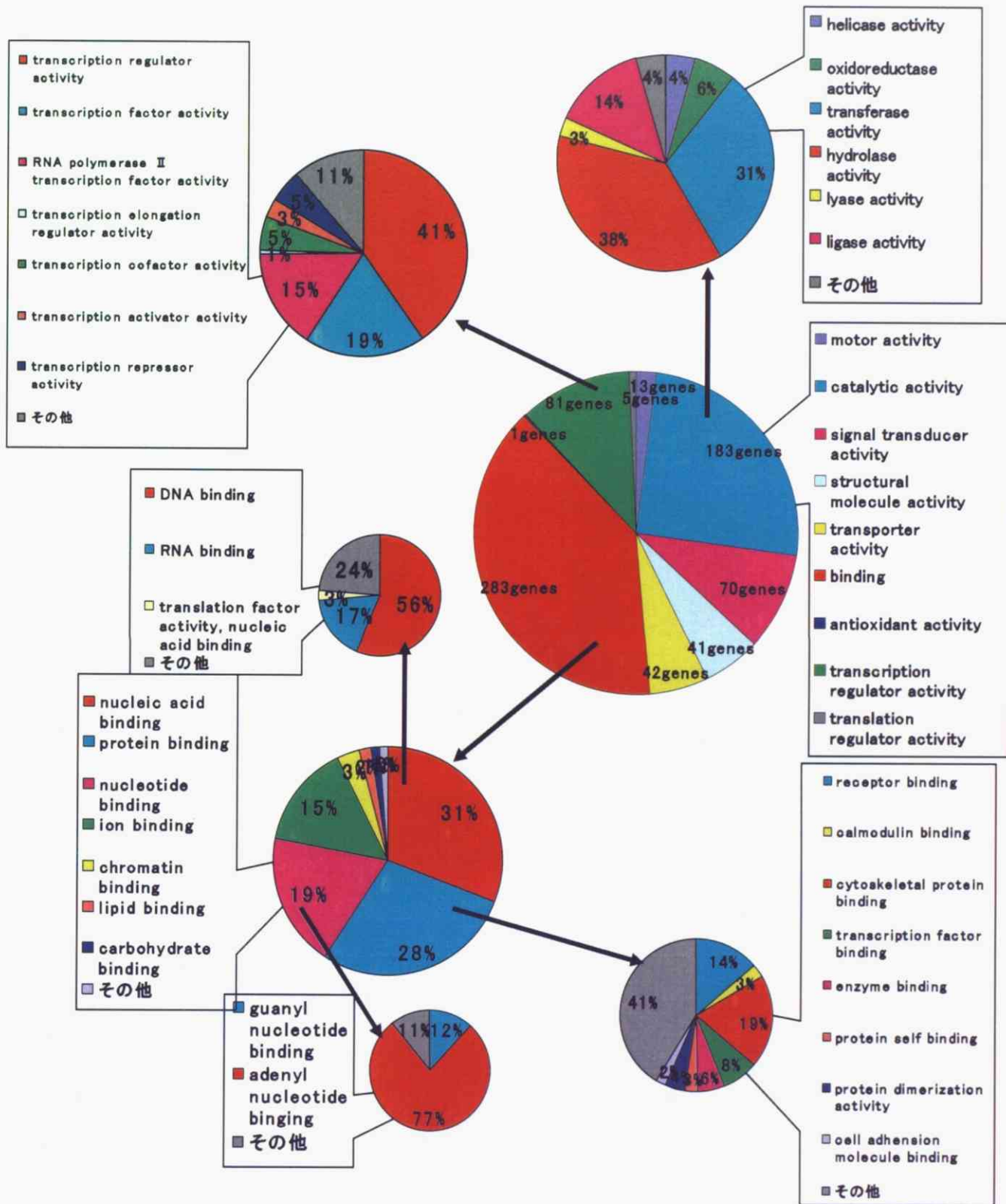


図4-1 メソプレレン添加によってS2細胞で遺伝子発現が増加した遺伝子群のGO解析

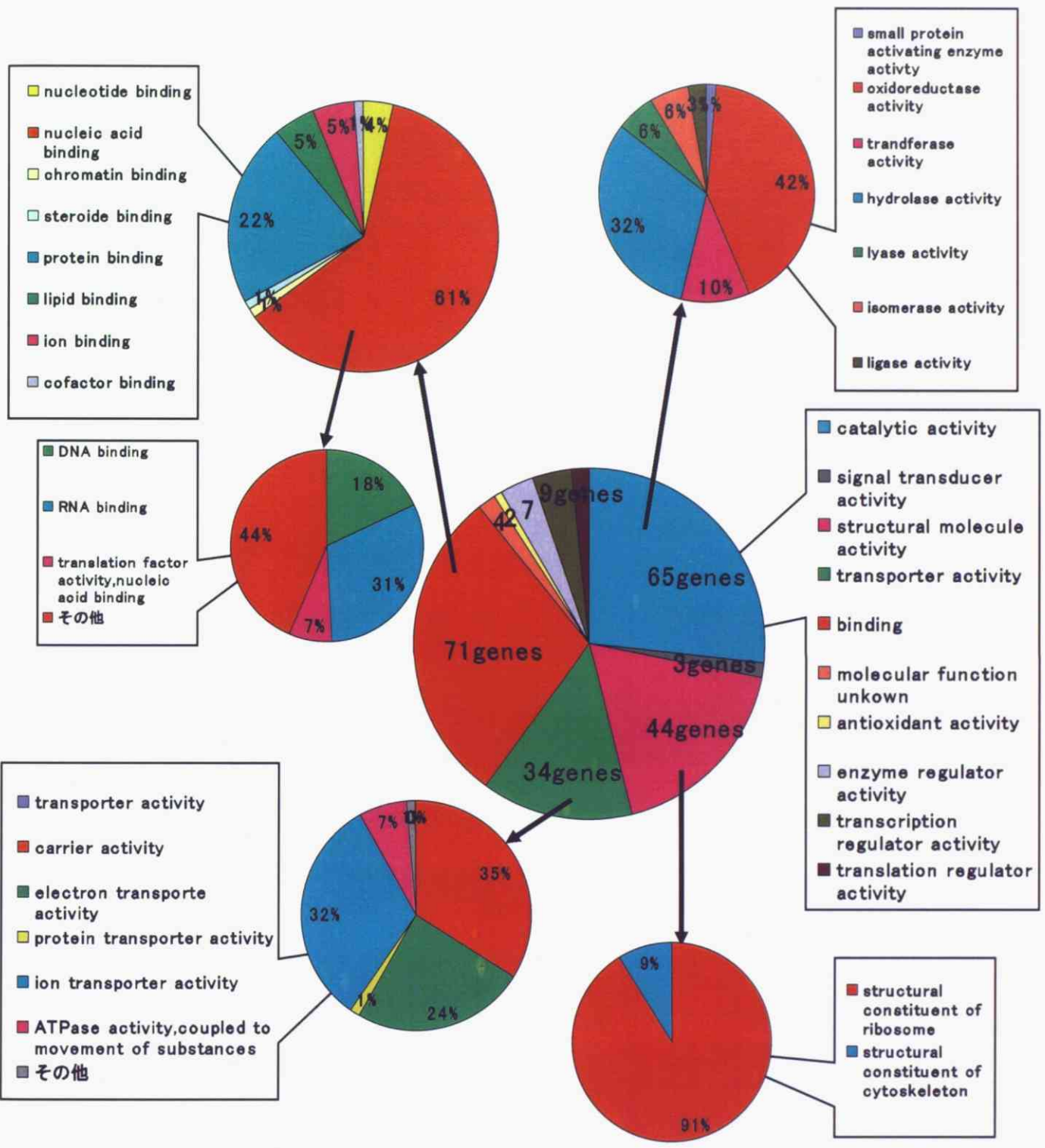


図4-2 メソプレレン添加によってS2細胞で遺伝子発現が減少した遺伝子群のGO解析

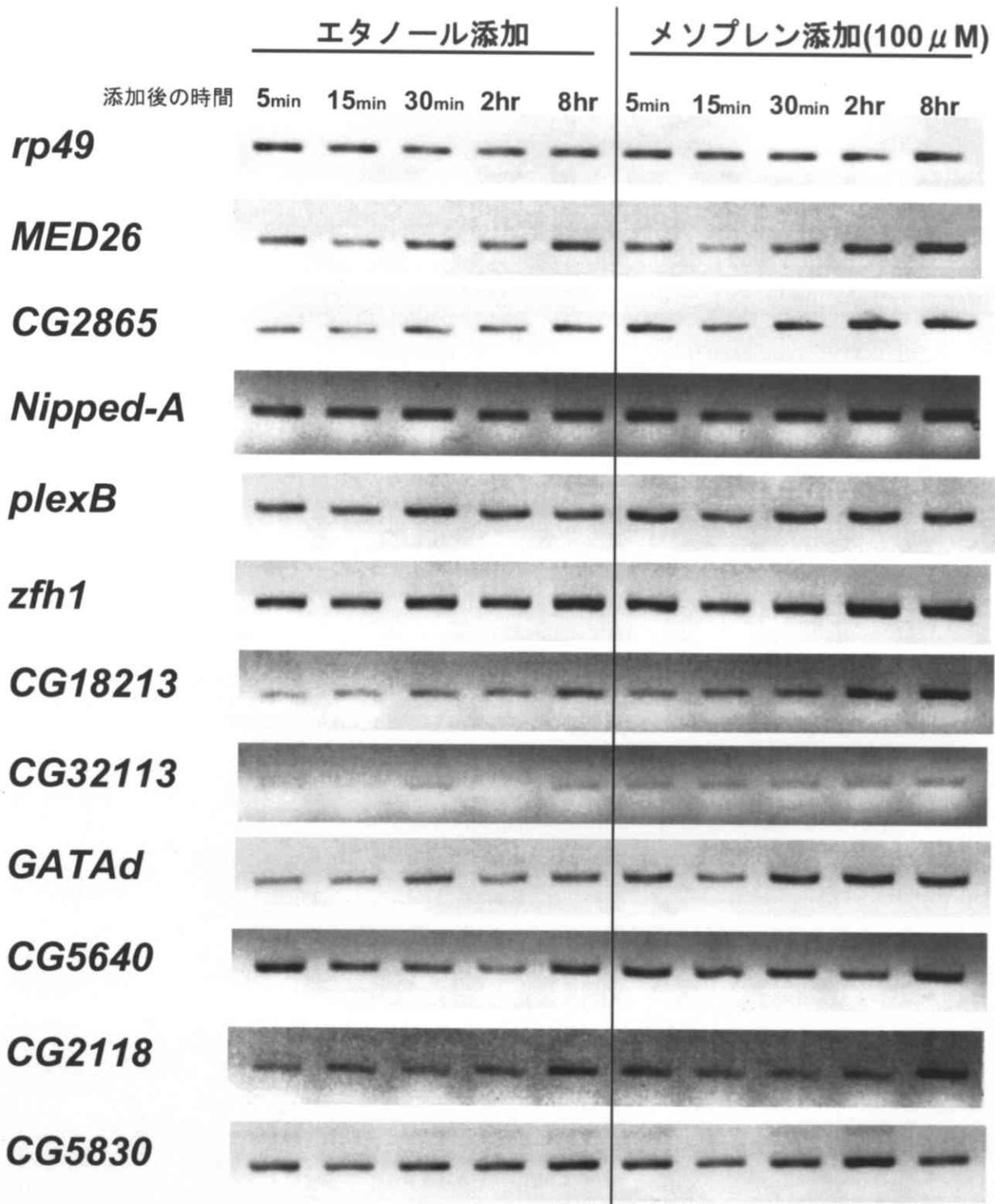


図5-1 S2細胞へのメソプレレン添加による遺伝子発現の変化

S2へメソプレレン(終濃度100 μ M)を添加後、5分、15分、30分、2時間、8時間での遺伝子発現変化を調べた。コントロールとしてエタノールを添加、同様に経時的な遺伝子発現の変化をみた。リボソーマルタンパク質をコードするハウスキーピング遺伝子*rp49*の遺伝子発現を指標とした。

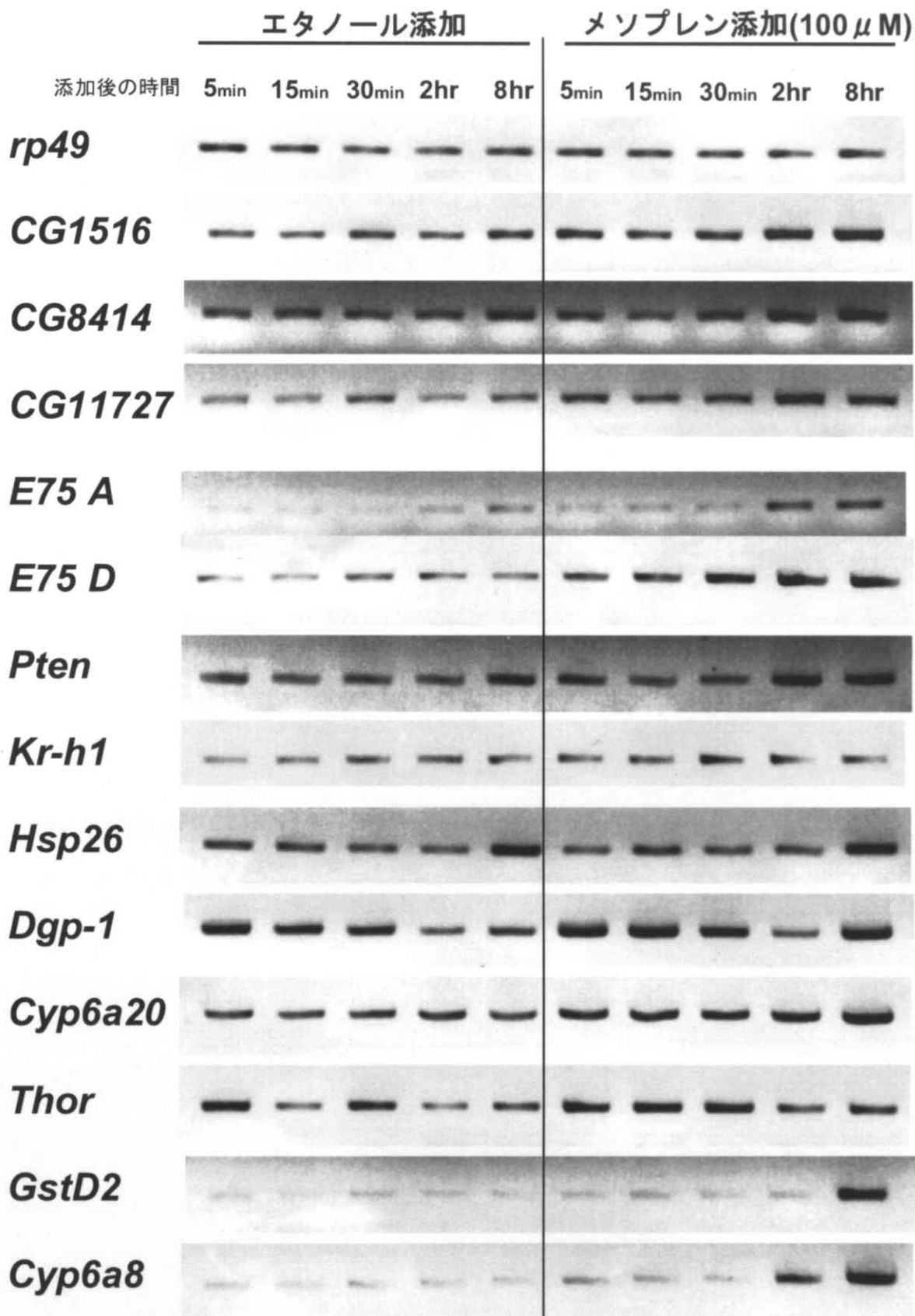


図5-2 S2細胞へのメソプレレン添加による遺伝子発現の変化

図5-1同様に遺伝子の発現変動を調べた。

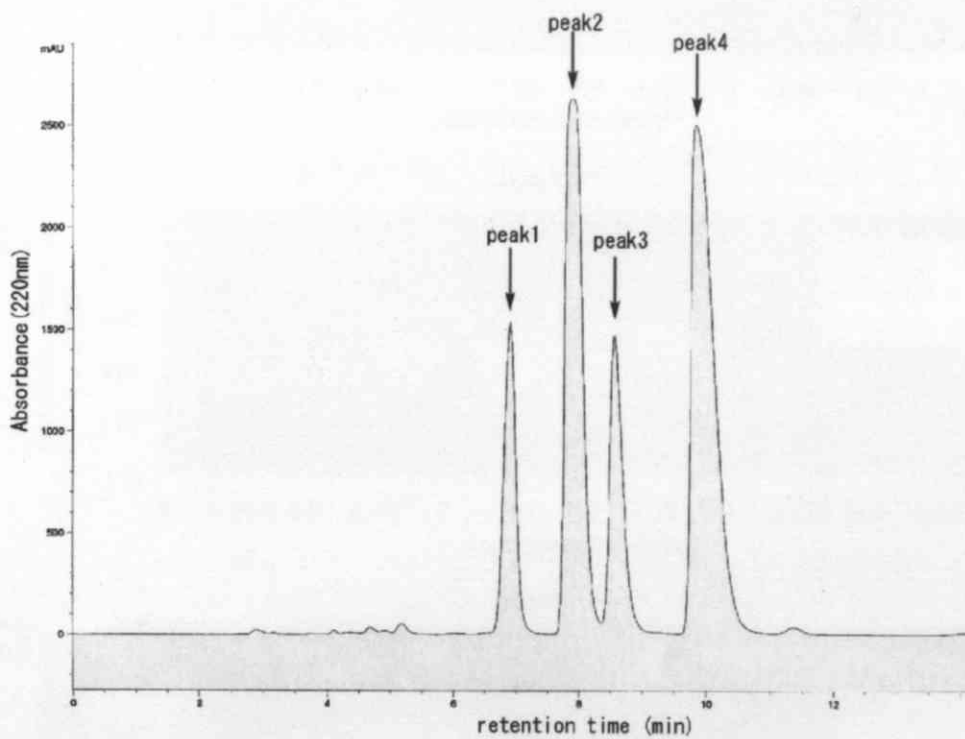


図6-1JHⅢ光学異性体のキラルカラムを用いた順相HPLCによる分離

人工合成された純度75%の幼若ホルモンを順相HPLCを用いて分画した。結果、4つのピークが得られた。この4つのピークに対応したフラクションを分取した。

カラムAS-H(4.6Φ×250mm)

ヘキサン：2-プロパノール=99.5:0.5

流速 1ml/min

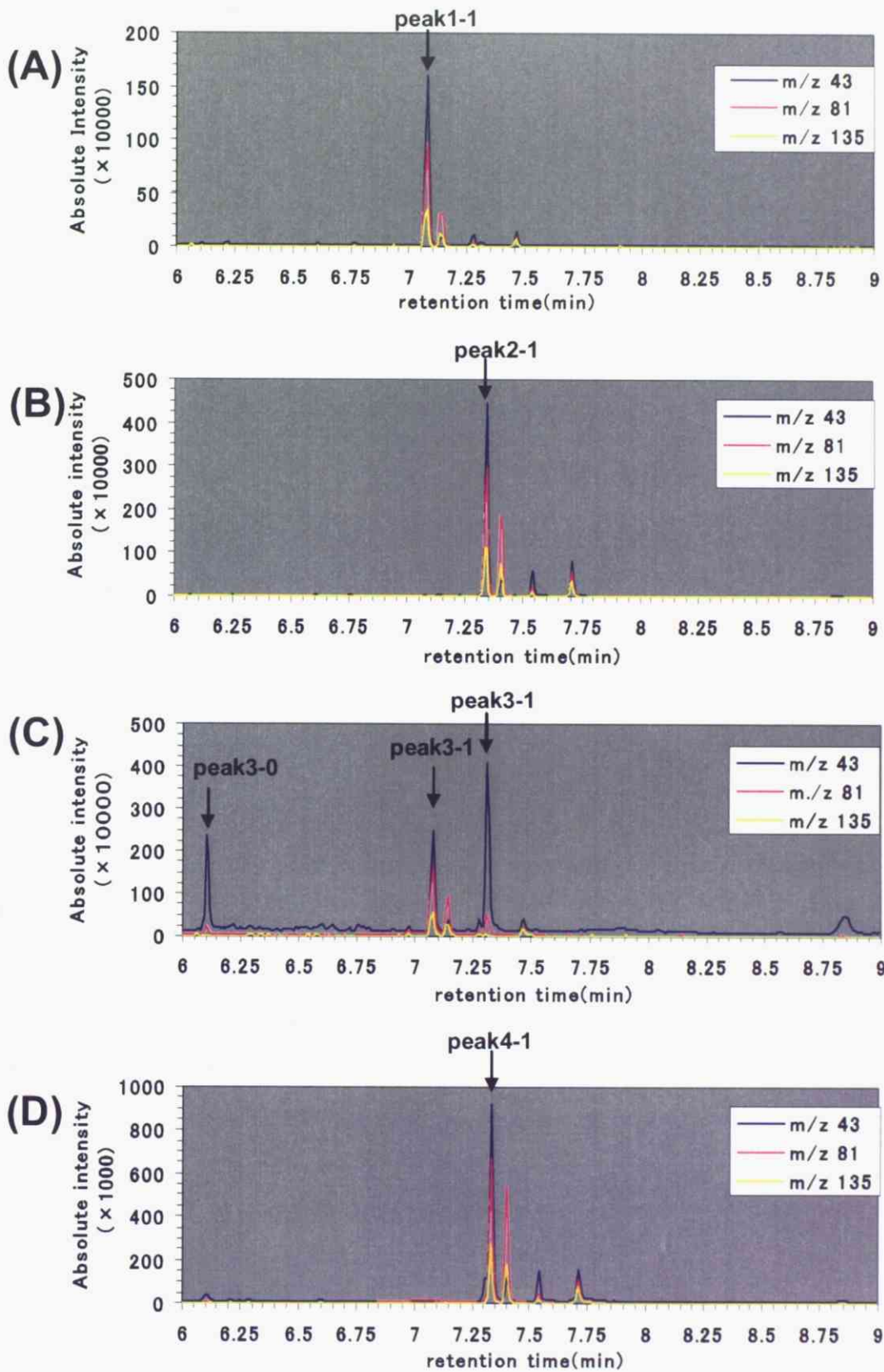


図6-2 順相HPLCによって分取したフラクションのGCによる解析

(A)peak1のGCによる解析(B)peak2のGCによる解析(C)peak3のGCによる解析
 (D)peak4のGCによる解析

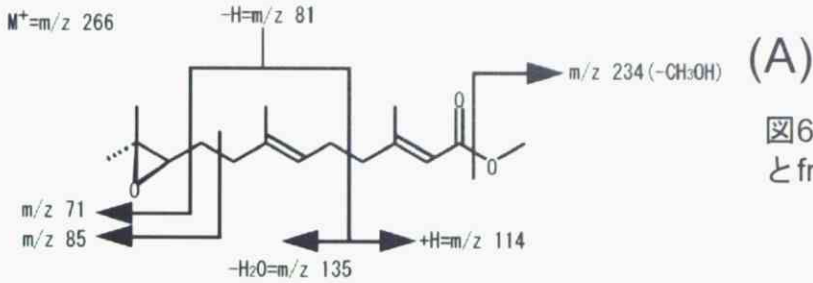


図6-3(A) JHIIIのmolecular ionとfragmentation pattern

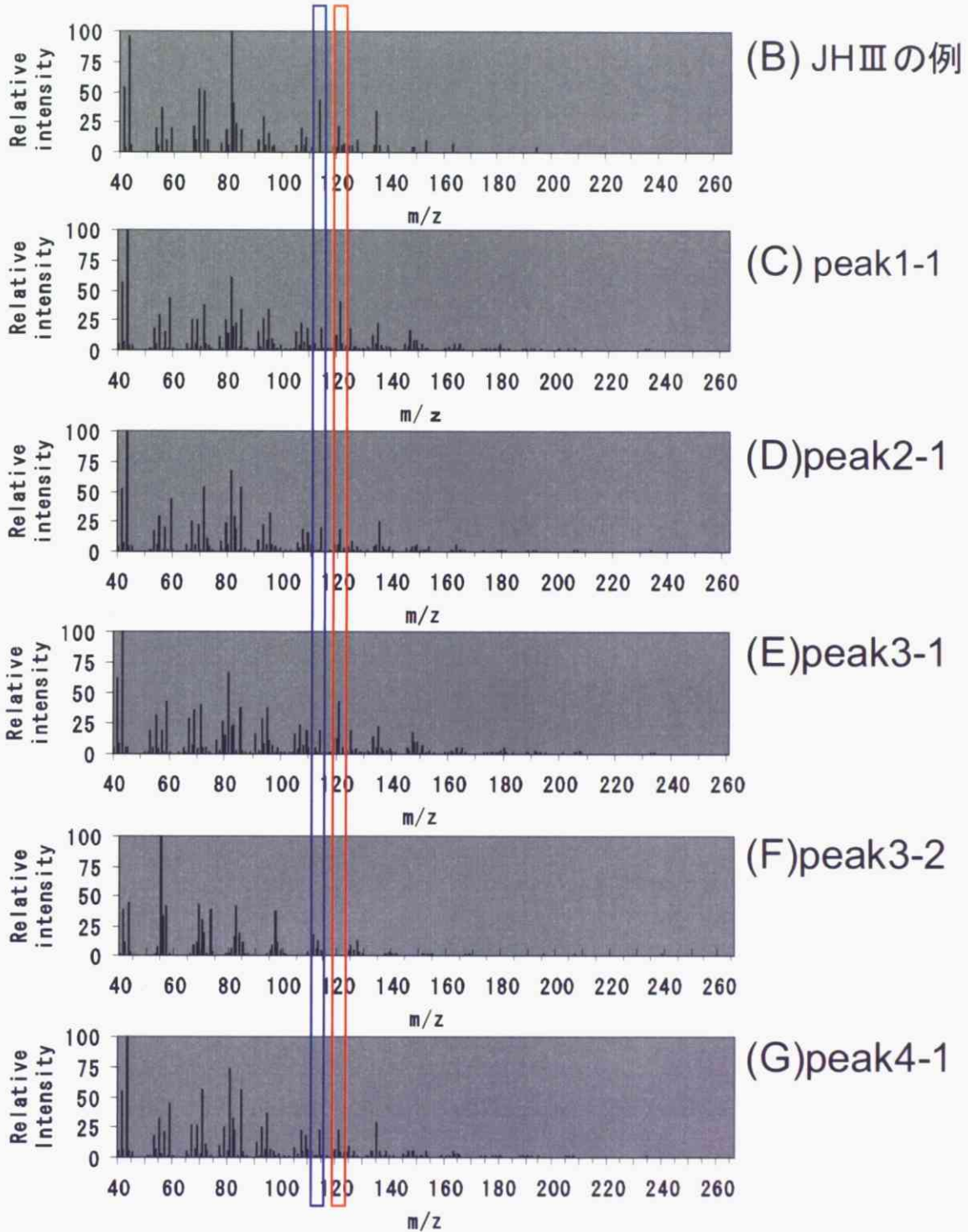


図6-3(B)~(G) GCの解析でみられたピークの成分をMSIによって解析

fragmentation patternの違いによってJHIIIが順相HPLCから得られたどのフラクションに含まれる調べた。□: m/z 114 □: m/z 121

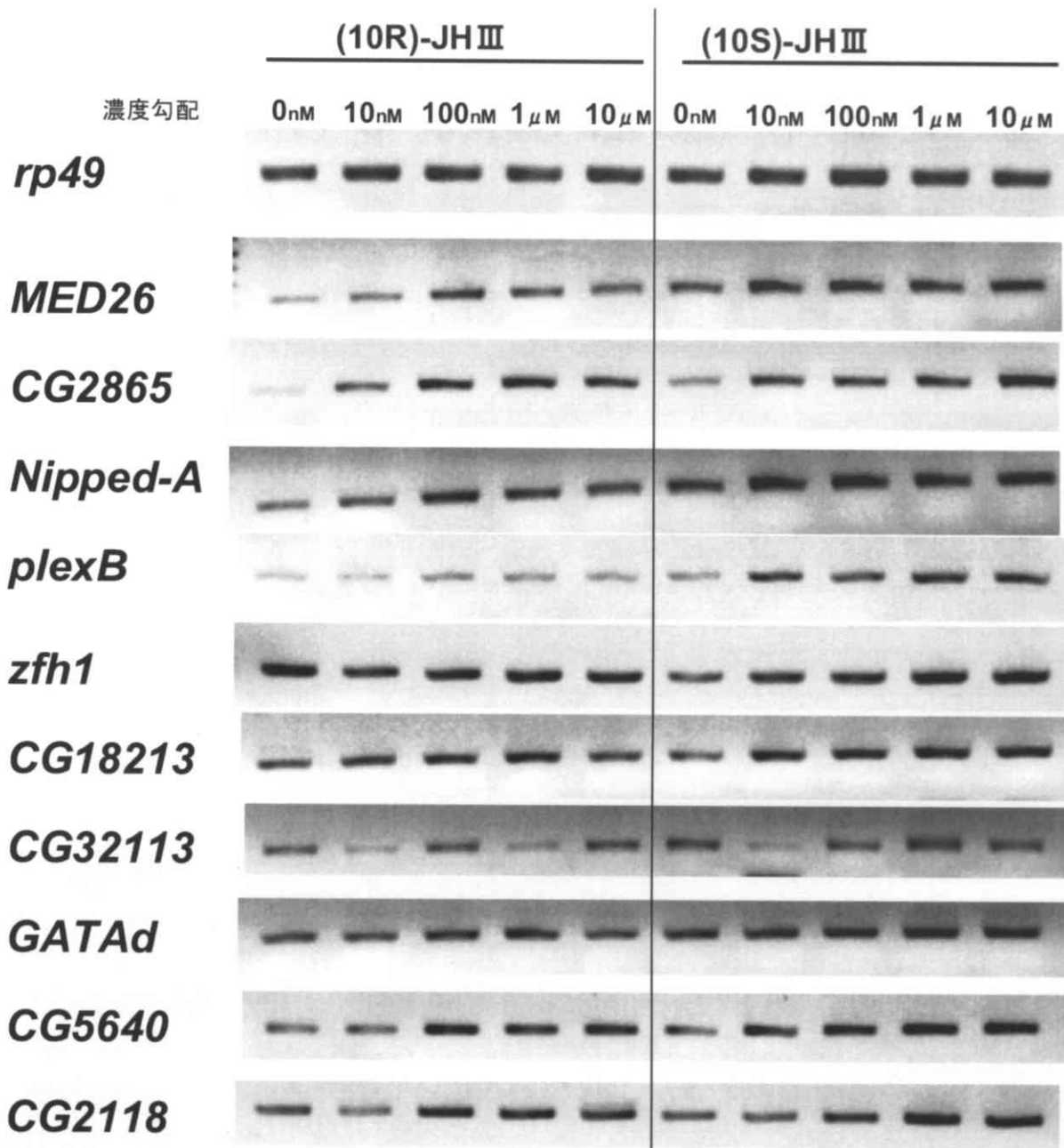


図7-1 S2細胞へJHⅢ光学異性体添加における遺伝子発現変化の比較

分離したJH光学異性体(10R)-JHⅢ、(10S)-JHⅢを0nM、10nM、100nM、1μM、10μMと濃度をふってS2細胞に添加し、2時間における遺伝子発現の変化を(10R)-JHⅢと(10S)-JHⅢの比較した。

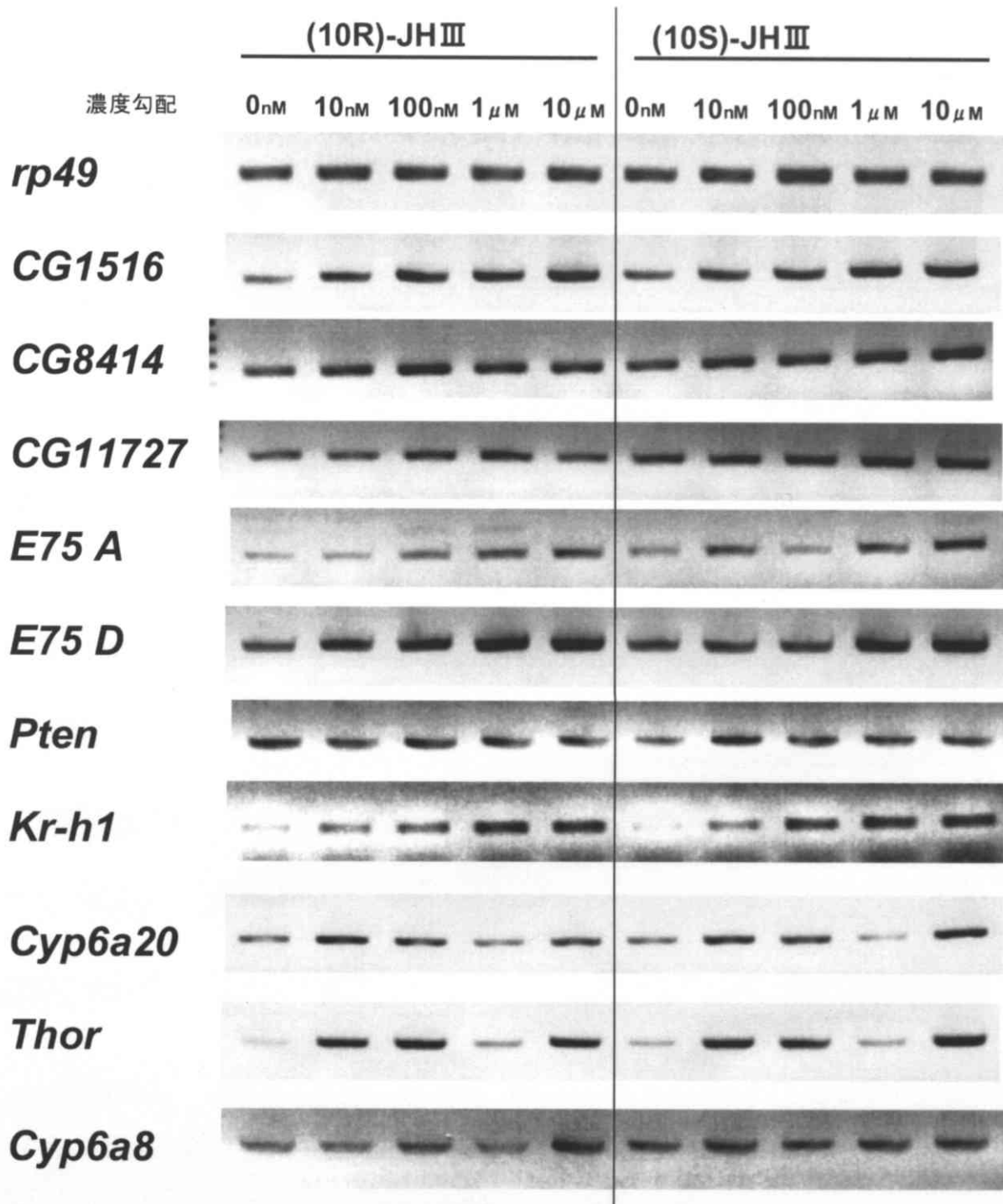


図7-2 S2細胞へJHⅢ光学異性体添加における遺伝子発現変化の比較

図7-1同様に光学異性体間の遺伝子変化の違いを比較した

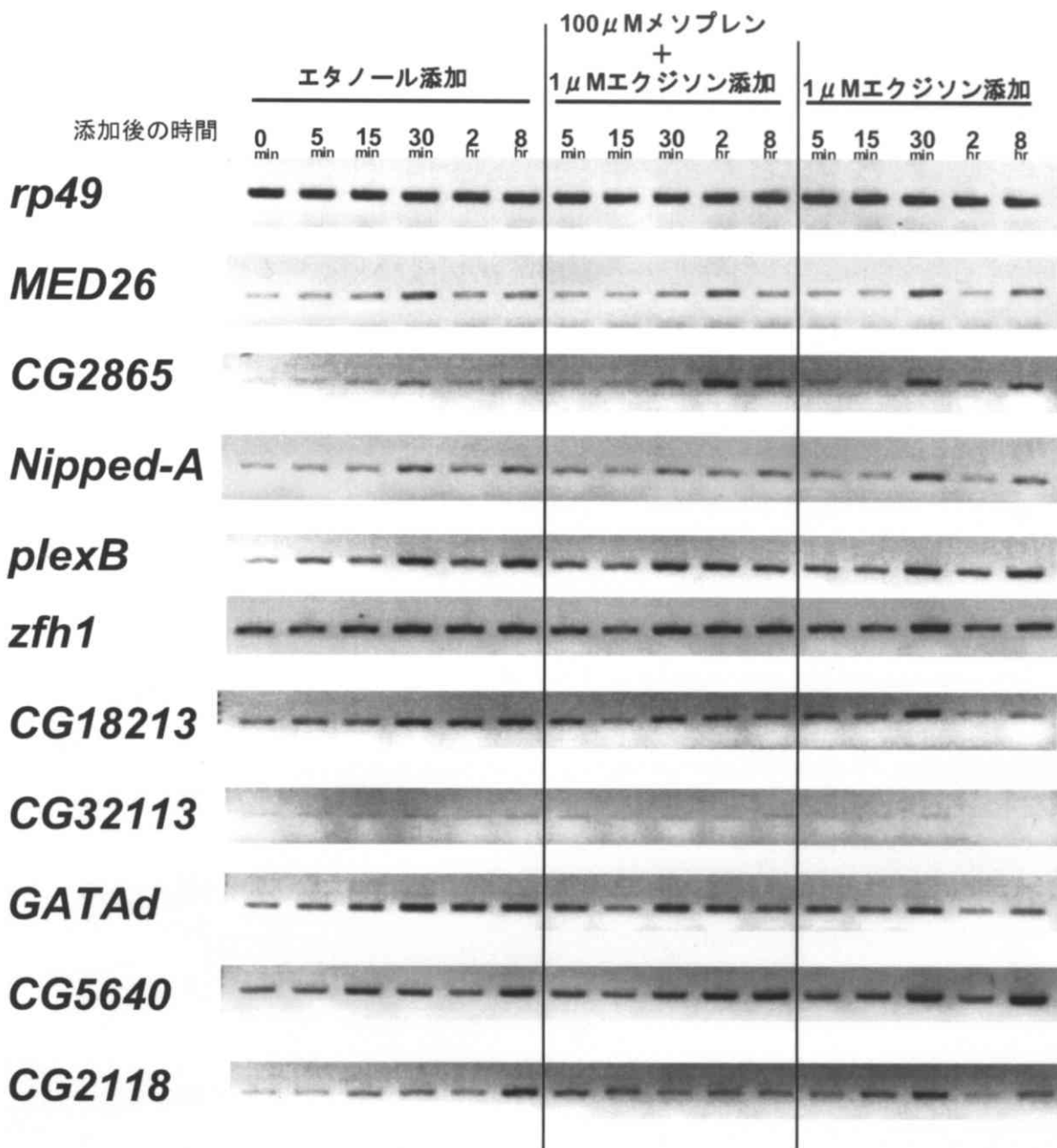


図8-1 S2細胞へのメソプレン+エクジソン添加、およびエクジソン添加による遺伝子発現の変化

S2へメソプレン(終濃度100 μ M)+エクジソン(終濃度1 μ M)、およびエクジソン(1 μ M)のみを添加後、5分、15分、30分、2時間、8時間での遺伝子発現変化を調べた。コントロールとしてエタノールを添加、同様に0時間から8時間まで経時的な遺伝子発現の変化をみた。リボソーマルタンパク質をコードするハウスキーピング遺伝子*rp49*の遺伝子発現を指標とした。

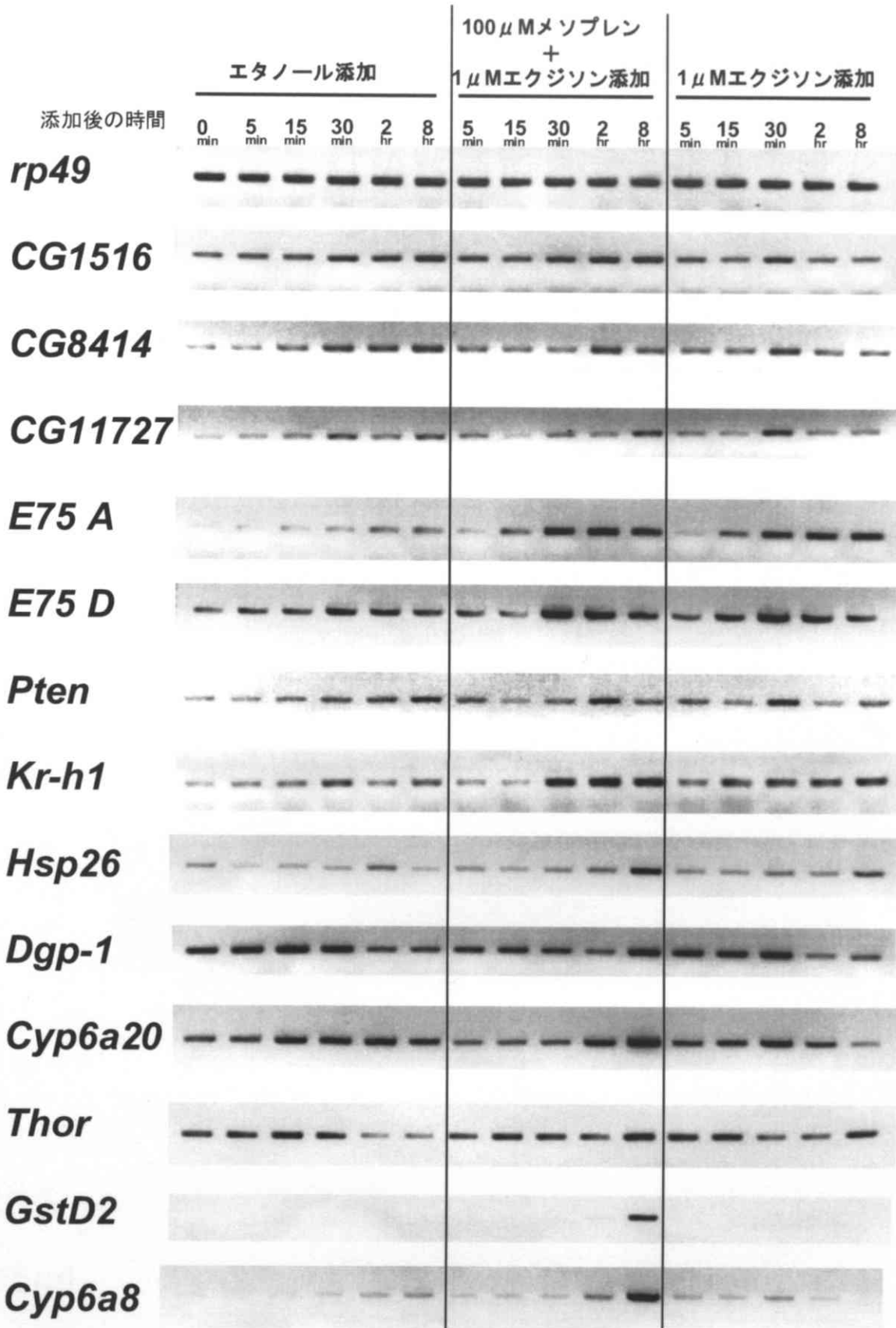


図8-2 S2細胞へのメソプレン+エクジソン添加、およびエクジソン添加による遺伝子発現の変化

図8-1同様に遺伝子発現の変化を調べた。

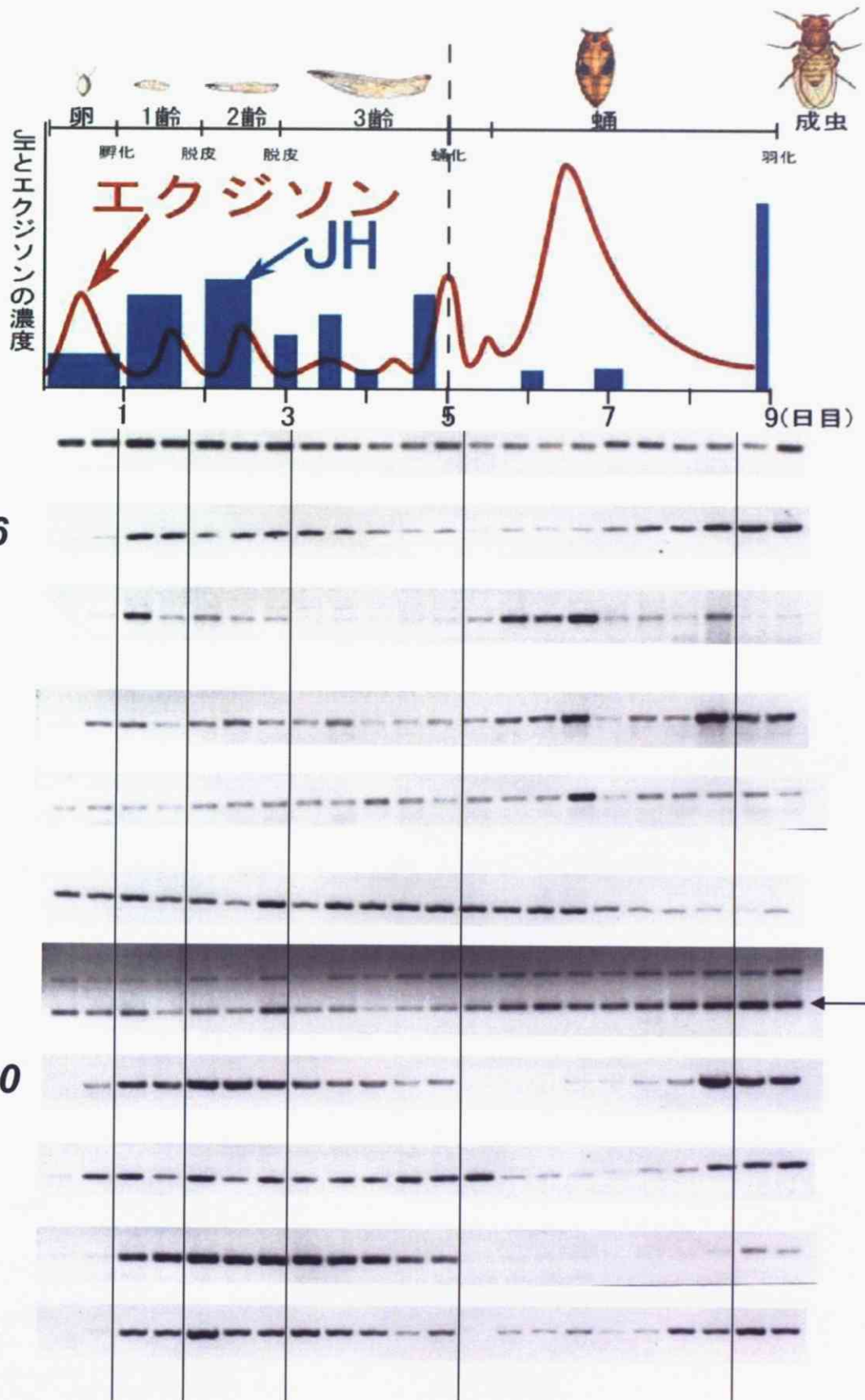


図9 キイロシヨウジョウバエ個体の胚期から成虫期にいたる遺伝子発現の変化(発現プロファイル)

表1 RT-PCRに用いたプライマーセット

プライマーリスト

遺伝子名		配列
Cyp6a20	sense primer	5'-CCAGTTCGACCACAATGGGATTTGC-3'
Cyp6a20	antisense primer	5'-CCGATGCAGTTCCTAGGACCATCAC-3'
Cyp6a8	sense primer	5'-CTGGCTTTGAGACATCCTCCTCCAC-3'
Cyp6a8	antisense primer	5'-GTCCAATGCGAGCCTGCATCTGTCC-3'
Dgp-1	sense primer	5'-GAAGATATGCGAGAACTCAGCCAAG-3'
Dgp-1	antisense primer	5'-GGGATTTGAGCATCTTAAAGAGCAG-3'
E75A	sense primer	5'-AGGTGTGACCATGGCGAGTTCTTCG-3'
E75A	antisense primer	5'-GATGTGGGTGGTGCTGAAGGTGATG-3'
E75D	sense primer	5'-CAGTTGCCAGCAGTAACTACACC-3'
E75D	antisense primer	5'-CAACCACTCAGTTGAGCTTGC-3'
GATAd	sense primer	5'-CCGGTTCGTCGACAGTACATTTAC-3'
GATAd	antisense primer	5'-AGGGTGCCACAATTCGAACATGA-3'
GstD2	sense primer	5'-TGGAGAAGTACGGCAAGGATGACTA-3'
GstD2	antisense primer	5'-CCTCCAGGAAGGTGTCGAGAAATC-3'
Hsp26	sense primer	5'-ACTCTGCTTTCGCTTGTGGATGAAC-3'
Hsp26	antisense primer	5'-GTTGAGCTCACTGGGCTTGAAGTG-3'
Kr-h1	sense primer	5'-TCAGCGATCTAGCGGCTAAC-3'
Kr-h1	antisense primer	5'-AACGTCCGGATTGGGTAGAG-3'
MED26	sense primer	5'-GATTCAACAATGAAGCTGCCATCAC-3'
MED26	antisense primer	5'-TGTTTCGGAAATGTTATCACACAGC-3'
mnd	sense primer	5'-CTCGATGGAGTGGCCATCATCGTTG-3'
mnd	antisense primer	5'-TGCCCGTAAAGATGTCCGTCACACG-3'
Nipped-A	sense primer	5'-TGCTGTCAAAGTATGCAGTTGACT-3'
Nipped-A	antisense primer	5'-TGAAGGTACATCATATCCGCATTCAG-3'
PlexB	sense primer	5'-CACCTGCCGTTAAATGGCTCTTTG-3'
PlexB	antisense primer	5'-TTCCTGGTCGCTTATTTGTGGAAGC-3'
PTEN	sense primer	5'-AGGTGTGACAATCCCATCTCAG-3'
PTEN	antisense primer	5'-GTAACTGTTCCATCGGACTCG-3'
rp49	sense primer	5'-GCGGGTGGCGTTGTTTCGATCC-3'
rp49	antisense primer	5'-CCAAGGACTTCATCCGCCACC-3'
Thor	sense primer	5'-ATGATCACCAGGAAGGTTGTCATCT-3'
Thor	antisense primer	5'-GTCCTCAATCTTCAGCGACTTGGT-3'
zfh-1	sense primer	5'-GGACCAACACAGAAGAAGAAAGCAG-3'
zfh-1	antisense primer	5'-TGGCCAAATTGGAATGATCTTGTAG-3'
CG1516	sense primer	5'-ACAAGCTGGACACTCGCATCTTCC-3'
CG1516	antisense primer	5'-TTCACGCGGATATCGATGACAGTTC-3'
CG2118	sense primer	5'-CGAGTTGCAGGCAGCCTTTAGGAAC-3'
CG2118	antisense primer	5'-GGAGCCACTATGCGAGACCCAACCTG-3'
CG2865	sense primer	5'-AGCGTCTGCATCAACAACACCTAC-3'
CG2865	antisense primer	5'-GTTGATTCTCCAGGGAGCAAATTC-3'
CG5640	sense primer	5'-TCAATCAACATCAACATCGGTCCTG-3'
CG5640	antisense primer	5'-GCAGTCAAGGGTCCAACATTCCAC-3'
CG5830	sense primer	5'-GGGCGGGACCTTCAGAAGATTGTC-3'
CG5830	antisense primer	5'-GTTGTTGTTGCTGCTGTTGGAGCTG-3'
CG8414	sense primer	5'-CCAATCTTCTGGCACGTCTCAGTTC-3'
CG8414	antisense primer	5'-TGCTGGCACCAGGTATAACTCCTTG-3'
CG11727	sense primer	5'-AGCTCGAGGAGGAGCTGATGACCA-3'
CG11727	antisense primer	5'-CGTTTGGCTTTGCTCGGTGAATTT-3'
CG18213	sense primer	5'-TGCCAACTGATCGTATAAGCGCAAA-3'
CG18213	antisense primer	5'-CAGCTGGCAACGTTGTGATGTGTTA-3'
CG32113	sense primer	5'-TGTTACCTTCGCCAAGAAGAATGC-3'
CG32113	antisense primer	5'-AACTCCACCGGCAACTTTGAAGAAG-3'

表2 GO Minerによるメソプレシニ応答遺伝子の解析

S2細胞へメソプレシニ添加後2時間増減する遺伝子群をSystem(molecular function, biological process, cellular component)でグループ分けし、それぞれのSystem内でCategoryによってグループをわけた。LHはCategoryの中で変動した遺伝子数、LTはSystemの中で変動した遺伝子数、PHはCategoryに含まれる全ての遺伝子数、PTはSystemに含まれる全ての遺伝子数。

(A) system Molecular_function メソプレシニ添加後2時間で遺伝子発現が増加したカテゴリー

GO ID	Category	LH	LT	PH	PT	Fisherの正確検定
5488	binding	283	399	3292	6161	<0.0001
3676	nucleic acid binding	129	399	1421	6161	<0.0001
5515	protein binding	119	399	975	6161	<0.0001
3677	DNA binding	83	399	672	6161	<0.0001
30528	transcription regulator activity	81	399	668	6161	<0.0001
166	nucleotide binding	79	399	700	6161	<0.0001
17076	purine nucleotide binding	75	399	678	6161	<0.0001
30554	adenyl nucleotide binding	65	399	545	6161	<0.0001
5524	ATP binding	65	399	528	6161	<0.0001
16301	kinase activity	41	399	320	6161	<0.0001
16773	phosphotransferase activity, alcohol group as acceptor	40	399	284	6161	<0.0001
4672	protein kinase activity	36	399	235	6161	<0.0001
8092	cytoskeletal protein binding	28	399	185	6161	<0.0001
16881	acid-amino acid ligase activity	21	399	122	6161	<0.0001
4842	ubiquitin-protein ligase activity	21	399	110	6161	<0.0001
15631	tubulin binding	15	399	68	6161	<0.0001
8017	microtubule binding	15	399	57	6161	<0.0001
16772	transferase activity, transferring phosphorus-containing groups	46	399	403	6161	0.0001
3702	RNA polymerase II transcription factor activity	31	399	233	6161	0.0001
4674	protein serine/threonine kinase activity	24	399	164	6161	0.0001
16879	ligase activity, forming carbon-nitrogen bonds	22	399	143	6161	0.0001
4702	receptor signaling protein serine/threonine kinase activity	21	399	138	6161	0.0002
4896	hematopoietin/interferon-class (D200-domain) cytokine receptor activity	4	399	6	6161	0.0002
3700	transcription factor activity	38	399	327	6161	0.0003
5200	structural constituent of cytoskeleton	29	399	228	6161	0.0003
19199	transmembrane receptor protein kinase activity	10	399	43	6161	0.0003
16564	transcriptional repressor activity	10	399	47	6161	0.0007
3774	motor activity	13	399	74	6161	0.0008
16874	ligase activity	29	399	241	6161	0.0009
8138	protein tyrosine/serine/threonine phosphatase activity	6	399	19	6161	0.0009
8046	axon guidance receptor activity	3	399	4	6161	0.001
3682	chromatin binding	12	399	67	6161	0.0011
8270	zinc ion binding	48	399	485	6161	0.0019
5057	receptor signaling protein activity	23	399	187	6161	0.0022
17048	Rho GTPase binding	3	399	5	6161	0.0025
5024	transforming growth factor beta receptor activity	3	399	5	6161	0.0025
16303	phosphatidylinositol 3-kinase activity	3	399	5	6161	0.0025
19899	enzyme binding	8	399	38	6161	0.0026
3779	actin binding	15	399	104	6161	0.0027
1727	lipid kinase activity	4	399	10	6161	0.0027
3712	transcription cofactor activity	10	399	56	6161	0.0029
3777	microtubule motor activity	8	399	41	6161	0.0042
51018	protein kinase A binding	2	399	2	6161	0.0042
17154	semaphorin receptor activity	2	399	2	6161	0.0042
48185	actinin binding	2	399	2	6161	0.0042
17002	actinin receptor activity	2	399	2	6161	0.0042
30507	spectrin binding	2	399	2	6161	0.0042
4714	transmembrane receptor protein tyrosine kinase activity	6	399	25	6161	0.0044
35004	phosphoinositide 3-kinase activity	3	399	6	6161	0.0047
8134	transcription factor binding	11	399	70	6161	0.0051
4725	protein tyrosine phosphatase activity	6	399	26	6161	0.0055

(A)の続き

GO ID	Category	LH	LT	PH	PT	Fisherの正確検定
4871	signal transducer activity	70	399	817	6161	0.0078
16307	phosphatidylinositol phosphate kinase activity	3	399	7	6161	0.0078
19901	protein kinase binding	3	399	7	6161	0.0078
46914	transition metal ion binding	49	399	540	6161	0.0093

(B) system Molecular_function メソプレレン添加後2時間で遺伝子発現が減少したカテゴリー

GO ID	Category	LH	LT	PH	PT	Fisherの正確検定
5198	structural molecule activity	44	153	620	6161	<0.0001
3735	structural constituent of ribosome	41	153	161	6161	<0.0001
16491	oxidoreductase activity	29	153	518	6161	<0.0001
5386	carrier activity	25	153	425	6161	<0.0001
8324	cation transporter activity	24	153	341	6161	<0.0001
15399	primary active transporter activity	23	153	133	6161	<0.0001
15077	monovalent inorganic cation transporter activity	22	153	99	6161	<0.0001
15078	hydrogen ion transporter activity	22	153	98	6161	<0.0001
5489	electron transporter activity	18	153	191	6161	<0.0001
16651	oxidoreductase activity, acting on NADH or NADPH	14	153	38	6161	<0.0001
3954	NADH dehydrogenase activity	14	153	31	6161	<0.0001
46873	metal ion transporter activity	13	153	48	6161	<0.0001
15081	sodium ion transporter activity	11	153	25	6161	<0.0001
16655	oxidoreductase activity, acting on NADH or NADPH, quinone or similar compound	11	153	25	6161	<0.0001
50136	NADH dehydrogenase (quinone) activity	11	153	25	6161	<0.0001
8137	NADH dehydrogenase (ubiquinone) activity	11	153	25	6161	<0.0001
15075	ion transporter activity	24	153	413	6161	0.0001
15002	heme-copper terminal oxidase activity	4	153	12	6161	0.0001
16676	oxidoreductase activity, acting on heme group of donors, oxygen as acceptor	4	153	12	6161	0.0001
16675	oxidoreductase activity, acting on heme group of donors	4	153	12	6161	0.0001
4129	cytochrome-c oxidase activity	4	153	12	6161	0.0001
31202	RNA splicing factor activity, transesterification mechanism	5	153	22	6161	0.0002
16531	copper chaperone activity	2	153	2	6161	0.0006
16530	metallochaperone activity	2	153	2	6161	0.0006
3723	RNA binding	17	153	297	6161	0.0009
8553	hydrogen-exporting ATPase activity, phosphorylative mechanism	5	153	33	6161	0.0011
3676	nucleic acid binding	50	153	1421	6161	0.0028
5375	copper ion transporter activity	2	153	4	6161	0.0034
4784	superoxide dismutase activity	2	153	5	6161	0.0056
16721	oxidoreductase activity, acting on superoxide radicals as acceptor	2	153	5	6161	0.0056
15662	ATPase activity, coupled to transmembrane movement of ions, phosphorylative r	5	153	51	6161	0.0077
16846	carbon-sulfur lyase activity	2	153	6	6161	0.0083
16681	oxidoreductase activity, acting on diphenols and related substances as donors, c	2	153	6	6161	0.0083
8121	ubiquinol-cytochrome-c reductase activity	2	153	6	6161	0.0083

(C) system Biological process メソブレン添加後2時間で遺伝子発現が増加したカテゴリー

GO ID	Category	LH	LT	PH	PT	Fisherの正確検定
9987	cellular process	386	405	5337	5413	<0.0001
50875	cellular physiological process	367	405	4962	5413	<0.0001
7275	development	171	405	1216	5413	<0.0001
50789	regulation of biological process	161	405	1209	5413	<0.0001
50794	regulation of cellular process	151	405	1114	5413	<0.0001
16043	cell organization and biogenesis	149	405	1099	5413	<0.0001
50791	regulation of physiological process	138	405	1088	5413	<0.0001
51244	regulation of cellular physiological process	138	405	1057	5413	<0.0001
7154	cell communication	137	405	1218	5413	<0.0001
6139	nucleobase, nucleoside, nucleotide and nucleic acid metabolism	127	405	1432	5413	<0.0001
43283	biopolymer metabolism	127	405	1335	5413	<0.0001
7165	signal transduction	115	405	1032	5413	<0.0001
19222	regulation of metabolism	103	405	837	5413	<0.0001
9653	morphogenesis	99	405	536	5413	<0.0001
31323	regulation of cellular metabolism	98	405	810	5413	<0.0001
6350	transcription	94	405	787	5413	<0.0001
6351	transcription, DNA-dependent	89	405	751	5413	<0.0001
19219	regulation of nucleobase, nucleoside, nucleotide and nucleic acid metabolism	89	405	740	5413	<0.0001
6996	organelle organization and biogenesis	86	405	609	5413	<0.0001
45449	regulation of transcription	86	405	689	5413	<0.0001
43412	biopolymer modification	83	405	710	5413	<0.0001
48513	organ development	81	405	523	5413	<0.0001
6355	regulation of transcription, DNA-dependent	80	405	658	5413	<0.0001
6464	protein modification	80	405	678	5413	<0.0001
48731	system development	77	405	509	5413	<0.0001
6366	transcription from RNA polymerase II promoter	71	405	587	5413	<0.0001
30154	cell differentiation	66	405	420	5413	<0.0001
7166	cell surface receptor linked signal transduction	66	405	543	5413	<0.0001
7399	nervous system development	62	405	411	5413	<0.0001
8104	protein localization	61	405	450	5413	<0.0001
6357	regulation of transcription from RNA polymerase II promoter	59	405	474	5413	<0.0001
51649	establishment of cellular localization	59	405	507	5413	<0.0001
51641	cellular localization	59	405	508	5413	<0.0001
7010	cytoskeleton organization and biogenesis	58	405	398	5413	<0.0001
3	reproduction	58	405	402	5413	<0.0001
19953	sexual reproduction	56	405	365	5413	<0.0001
7049	cell cycle	55	405	368	5413	<0.0001
9790	embryonic development	55	405	296	5413	<0.0001
902	cellular morphogenesis	54	405	293	5413	<0.0001
7276	gametogenesis	54	405	358	5413	<0.0001
9887	organ morphogenesis	53	405	285	5413	<0.0001
15031	protein transport	52	405	414	5413	<0.0001
45184	establishment of protein localization	52	405	417	5413	<0.0001
7242	intracellular signaling cascade	52	405	411	5413	<0.0001
9888	tissue development	51	405	337	5413	<0.0001
6886	intracellular protein transport	51	405	406	5413	<0.0001
48468	cell development	50	405	276	5413	<0.0001
9791	post-embryonic development	47	405	298	5413	<0.0001
2165	larval or pupal development (sensu Insecta)	46	405	291	5413	<0.0001
7444	imaginal disc development	45	405	241	5413	<0.0001
7292	female gamete generation	42	405	262	5413	<0.0001
48477	oogenesis	41	405	244	5413	<0.0001
48518	positive regulation of biological process	39	405	171	5413	<0.0001
9993	oogenesis (sensu Insecta)	39	405	232	5413	<0.0001
48519	negative regulation of biological process	39	405	235	5413	<0.0001
46698	morphogenesis (sensu Insecta)	38	405	218	5413	<0.0001
7552	metamorphosis	38	405	220	5413	<0.0001
48522	positive regulation of cellular process	37	405	155	5413	<0.0001
48523	negative regulation of cellular process	37	405	212	5413	<0.0001
16265	death	36	405	245	5413	<0.0001
7560	imaginal disc morphogenesis	36	405	208	5413	<0.0001
51242	positive regulation of cellular physiological process	35	405	138	5413	<0.0001
43119	positive regulation of physiological process	35	405	139	5413	<0.0001
7167	enzyme linked receptor protein signaling pathway	35	405	145	5413	<0.0001
6468	protein amino acid phosphorylation	35	405	233	5413	<0.0001
9792	embryonic development (sensu Metazoa)	34	405	169	5413	<0.0001
7389	pattern specification	34	405	217	5413	<0.0001
279	M phase	34	405	234	5413	<0.0001
7155	cell adhesion	34	405	238	5413	<0.0001
12501	programmed cell death	32	405	206	5413	<0.0001
8219	cell death	32	405	207	5413	<0.0001

(C)の続き1

GO ID	Category	LH	LT	PH	PT	Fisherの正確検定
7498	mesoderm development	32	405	173	5413	<0.0001
278	mitotic cell cycle	31	405	211	5413	<0.0001
7017	microtubule-based process	29	405	150	5413	<0.0001
6605	protein targeting	29	405	188	5413	<0.0001
904	cellular morphogenesis during differentiation	28	405	154	5413	<0.0001
6512	ubiquitin cycle	28	405	153	5413	<0.0001
7067	mitosis	28	405	189	5413	<0.0001
87	M phase of mitotic cell cycle	28	405	190	5413	<0.0001
45165	cell fate commitment	27	405	170	5413	<0.0001
7422	peripheral nervous system development	26	405	104	5413	<0.0001
2009	morphogenesis of an epithelium	25	405	107	5413	<0.0001
6915	apoptosis	25	405	153	5413	<0.0001
16477	cell migration	25	405	153	5413	<0.0001
1654	eye development	25	405	149	5413	<0.0001
1700	embryonic development (sensu Insecta)	24	405	110	5413	<0.0001
7456	eye development (sensu Endopterygota)	24	405	144	5413	<0.0001
7243	protein kinase cascade	23	405	98	5413	<0.0001
51276	chromosome organization and biogenesis	22	405	125	5413	<0.0001
48598	embryonic morphogenesis	22	405	85	5413	<0.0001
7455	eye-antennal disc morphogenesis	22	405	131	5413	<0.0001
35214	eye-antennal disc development	22	405	133	5413	<0.0001
7424	tracheal system development (sensu Insecta)	21	405	94	5413	<0.0001
48667	neuron morphogenesis during differentiation	21	405	118	5413	<0.0001
48666	neuron development	21	405	118	5413	<0.0001
31175	neurite morphogenesis	21	405	118	5413	<0.0001
48737	appendage development (sensu Endopterygota)	21	405	108	5413	<0.0001
35114	appendage morphogenesis (sensu Endopterygota)	21	405	108	5413	<0.0001
30182	neuron differentiation	21	405	125	5413	<0.0001
48736	appendage development	21	405	112	5413	<0.0001
35107	appendage morphogenesis	21	405	112	5413	<0.0001
43067	regulation of programmed cell death	20	405	105	5413	<0.0001
7476	wing morphogenesis	20	405	88	5413	<0.0001
7472	wing disc morphogenesis	20	405	90	5413	<0.0001
7169	transmembrane receptor protein tyrosine kinase signaling pathway	20	405	102	5413	<0.0001
35220	wing disc development	20	405	100	5413	<0.0001
30707	ovarian follicle cell development (sensu Insecta)	20	405	110	5413	<0.0001
1709	cell fate determination	20	405	102	5413	<0.0001
165	MAPKKK cascade	19	405	78	5413	<0.0001
9966	regulation of signal transduction	19	405	82	5413	<0.0001
7059	chromosome segregation	19	405	98	5413	<0.0001
16331	morphogenesis of embryonic epithelium	18	405	62	5413	<0.0001
40007	growth	18	405	73	5413	<0.0001
226	microtubule cytoskeleton organization and biogenesis	17	405	66	5413	<0.0001
7391	dorsal closure	17	405	59	5413	<0.0001
50793	regulation of development	17	405	66	5413	<0.0001
43068	positive regulation of programmed cell death	16	405	68	5413	<0.0001
12502	induction of programmed cell death	15	405	63	5413	<0.0001
7178	transmembrane receptor protein serine/threonine kinase signaling pathway	14	405	46	5413	<0.0001
7507	heart development	14	405	58	5413	<0.0001
40008	regulation of growth	13	405	49	5413	<0.0001
7179	transforming growth factor beta receptor signaling pathway	12	405	26	5413	<0.0001
45893	positive regulation of transcription, DNA-dependent	11	405	38	5413	<0.0001
45595	regulation of cell differentiation	11	405	37	5413	<0.0001
7293	egg chamber formation (sensu Insecta)	11	405	37	5413	<0.0001
9968	negative regulation of signal transduction	11	405	41	5413	<0.0001
45596	negative regulation of cell differentiation	9	405	18	5413	<0.0001
51093	negative regulation of development	9	405	24	5413	<0.0001
7265	Ras protein signal transduction	8	405	20	5413	<0.0001
9996	negative regulation of cell fate specification	7	405	13	5413	<0.0001
42659	regulation of cell fate specification	7	405	16	5413	<0.0001
46907	intracellular transport	53	405	491	5413	0.0001
48699	neurogenesis	23	405	154	5413	0.0001
48592	eye morphogenesis	20	405	122	5413	0.0001
7001	chromosome organization and biogenesis (sensu Eukaryota)	19	405	112	5413	0.0001
35282	segmentation	19	405	111	5413	0.0001
1745	compound eye morphogenesis (sensu Endopterygota)	19	405	110	5413	0.0001
48749	compound eye development (sensu Endopterygota)	19	405	110	5413	0.0001
7409	axonogenesis	18	405	101	5413	0.0001
7281	germ cell development	17	405	97	5413	0.0001
42981	regulation of apoptosis	17	405	95	5413	0.0001
30036	actin cytoskeleton organization and biogenesis	16	405	82	5413	0.0001
30029	actin filament-based process	16	405	82	5413	0.0001

(C)の続き2

GO ID	Category	LH	LT	PH	PT	Fisherの正確検定
7411	axon guidance	15	405	75	5413	0.0001
8360	regulation of cell shape	15	405	74	5413	0.0001
7163	establishment and/or maintenance of cell polarity	13	405	60	5413	0.0001
43065	positive regulation of apoptosis	13	405	57	5413	0.0001
9893	positive regulation of metabolism	12	405	54	5413	0.0001
31325	positive regulation of cellular metabolism	12	405	54	5413	0.0001
45935	positive regulation of nucleobase, nucleoside, nucleotide and nucleic acid r	12	405	52	5413	0.0001
45941	positive regulation of transcription	12	405	51	5413	0.0001
7254	JNK cascade	10	405	39	5413	0.0001
31098	stress-activated protein kinase signaling pathway	10	405	39	5413	0.0001
48589	developmental growth	9	405	31	5413	0.0001
51656	establishment of organelle localization	8	405	25	5413	0.0001
7051	spindle organization and biogenesis	8	405	24	5413	0.0001
43297	apical junction assembly	6	405	14	5413	0.0001
6928	cell motility	28	405	209	5413	0.0002
51674	localization of cell	28	405	209	5413	0.0002
48748	eye morphogenesis (sensu Endopterygota)	19	405	117	5413	0.0002
6917	induction of apoptosis	12	405	55	5413	0.0002
35239	tube morphogenesis	12	405	55	5413	0.0002
51640	organelle localization	8	405	26	5413	0.0002
7043	intercellular junction assembly	6	405	15	5413	0.0002
51225	spindle assembly	5	405	10	5413	0.0002
51058	negative regulation of small GTPase mediated signal transduction	4	405	6	5413	0.0002
51056	regulation of small GTPase mediated signal transduction	4	405	6	5413	0.0002
40011	locomotion	28	405	214	5413	0.0003
7268	synaptic transmission	26	405	195	5413	0.0003
51726	regulation of cell cycle	23	405	161	5413	0.0003
74	regulation of progression through cell cycle	23	405	161	5413	0.0003
9892	negative regulation of metabolism	19	405	122	5413	0.0003
51301	cell division	19	405	121	5413	0.0003
6325	establishment and/or maintenance of chromatin architecture	17	405	104	5413	0.0003
6323	DNA packaging	17	405	104	5413	0.0003
16481	negative regulation of transcription	16	405	93	5413	0.0003
45892	negative regulation of transcription, DNA-dependent	15	405	84	5413	0.0003
7528	neuromuscular junction development	6	405	16	5413	0.0003
7582	physiological process	377	405	5413	5413	0.0004
16310	phosphorylation	41	405	369	5413	0.0004
48489	synaptic vesicle transport	13	405	69	5413	0.0004
8150	biological_process	405	405	5935	5413	0.0005
16337	cell-cell adhesion	16	405	97	5413	0.0005
7350	blastoderm segmentation	15	405	89	5413	0.0005
16055	Wnt receptor signaling pathway	10	405	45	5413	0.0005
9611	response to wounding	8	405	30	5413	0.0005
7446	imaginal disc growth	6	405	17	5413	0.0005
45216	intercellular junction assembly and/or maintenance	6	405	17	5413	0.0005
48284	organelle fusion	4	405	7	5413	0.0005
42059	negative regulation of epidermal growth factor receptor signaling pathway	4	405	7	5413	0.0005
8283	cell proliferation	29	405	235	5413	0.0006
45934	negative regulation of nucleobase, nucleoside, nucleotide and nucleic acid	16	405	100	5413	0.0006
46530	photoreceptor cell differentiation	14	405	81	5413	0.0006
7126	meiosis	13	405	71	5413	0.0006
51327	M phase of meiotic cell cycle	13	405	71	5413	0.0006
51321	meiotic cell cycle	13	405	71	5413	0.0006
122	negative regulation of transcription from RNA polymerase II promoter	10	405	46	5413	0.0006
6968	cellular defense response	5	405	12	5413	0.0006
40014	regulation of body size	5	405	12	5413	0.0006
35264	body growth	5	405	12	5413	0.0006
42058	regulation of epidermal growth factor receptor signaling pathway	5	405	12	5413	0.0006
6796	phosphate metabolism	50	405	487	5413	0.0007
6793	phosphorus metabolism	50	405	487	5413	0.0007
9880	embryonic pattern specification	17	405	110	5413	0.0007
1751	eye photoreceptor cell differentiation (sensu Endopterygota)	12	405	64	5413	0.0007
1558	regulation of cell growth	6	405	18	5413	0.0007
19226	transmission of nerve impulse	35	405	310	5413	0.0008
7431	salivary gland development	15	405	92	5413	0.0008
35272	exocrine system development	15	405	92	5413	0.0008
7467	photoreceptor cell differentiation (sensu Endopterygota)	13	405	74	5413	0.0008
42386	hemocyte differentiation (sensu Arthropoda)	7	405	25	5413	0.0008
16192	vesicle-mediated transport	29	405	241	5413	0.0009
51243	negative regulation of cellular physiological process	23	405	175	5413	0.0009
45927	positive regulation of growth	6	405	19	5413	0.0009
7052	mitotic spindle organization and biogenesis	5	405	13	5413	0.0009

(C)の続き3

GO ID	Category	LH	LT	PH	PT	Fisherの正確検定
48545	response to steroid hormone stimulus	5	405	13	5413	0.0009
35075	response to ecdysone	5	405	13	5413	0.0009
9798	axis specification	19	405	134	5413	0.001
1754	eye photoreceptor cell differentiation	12	405	66	5413	0.001
7143	female meiosis	8	405	33	5413	0.001
48754	branching morphogenesis of a tube	7	405	26	5413	0.001
16049	cell growth	7	405	26	5413	0.001
7249	I-kappaB kinase/NF-kappaB cascade	4	405	8	5413	0.001
51653	spindle localization	4	405	8	5413	0.001
51293	establishment of spindle localization	4	405	8	5413	0.001
7429	secondary tracheal branching (sensu Insecta)	3	405	4	5413	0.001
48096	chromatin-mediated maintenance of transcription	3	405	4	5413	0.001
35155	negative regulation of terminal cell fate specification	3	405	4	5413	0.001
45815	positive regulation of gene expression, epigenetic	3	405	4	5413	0.001
51246	regulation of protein metabolism	16	405	105	5413	0.0011
9889	regulation of biosynthesis	12	405	67	5413	0.0011
31326	regulation of cellular biosynthesis	12	405	67	5413	0.0011
31324	negative regulation of cellular metabolism	17	405	116	5413	0.0012
48732	gland development	15	405	96	5413	0.0012
7611	learning and/or memory	10	405	50	5413	0.0012
8587	wing margin morphogenesis	6	405	20	5413	0.0013
7097	nuclear migration	5	405	14	5413	0.0014
9725	response to hormone stimulus	5	405	14	5413	0.0014
30716	oocyte fate determination	5	405	14	5413	0.0014
43118	negative regulation of physiological process	23	405	182	5413	0.0015
16567	protein ubiquitination	14	405	88	5413	0.0015
7267	cell-cell signaling	40	405	382	5413	0.0016
30097	hemopoiesis	10	405	52	5413	0.0016
7015	actin filament organization	10	405	52	5413	0.0016
48534	hemopoietic or lymphoid organ development	11	405	61	5413	0.0017
8361	regulation of cell size	7	405	28	5413	0.0017
9994	oocyte differentiation	12	405	71	5413	0.0018
40023	establishment of nucleus localization	5	405	15	5413	0.002
7173	epidermal growth factor receptor signaling pathway	7	405	29	5413	0.0021
1763	morphogenesis of a branching structure	7	405	29	5413	0.0021
6417	regulation of protein biosynthesis	11	405	63	5413	0.0022
35265	organ growth	6	405	22	5413	0.0022
46620	regulation of organ size	6	405	22	5413	0.0022
44238	primary metabolism	266	405	3656	5413	0.0024
7264	small GTPase mediated signal transduction	14	405	93	5413	0.0025
9605	response to external stimulus	14	405	93	5413	0.0025
7309	oocyte axis determination	11	405	64	5413	0.0025
7344	pronuclear fusion	3	405	5	5413	0.0025
741	karyogamy	3	405	5	5413	0.0025
16350	maintenance of oocyte identity (sensu Insecta)	3	405	5	5413	0.0025
35154	terminal cell fate specification	3	405	5	5413	0.0025
46580	negative regulation of Ras protein signal transduction	3	405	5	5413	0.0025
46578	regulation of Ras protein signal transduction	3	405	5	5413	0.0025
8101	decapentaplegic receptor signaling pathway	3	405	5	5413	0.0025
6259	DNA metabolism	32	405	295	5413	0.0027
51647	nucleus localization	5	405	16	5413	0.0027
45610	regulation of hemocyte differentiation	5	405	16	5413	0.0027
8586	wing vein morphogenesis	5	405	16	5413	0.0027
7308	oocyte construction	11	405	66	5413	0.0032
8356	asymmetric cell division	9	405	48	5413	0.0033
48599	oocyte development	11	405	67	5413	0.0036
8258	head involution	5	405	17	5413	0.0036
7398	ectoderm development	23	405	196	5413	0.0039
7475	apposition of dorsal and ventral wing surfaces	4	405	11	5413	0.004
45448	mitotic cell cycle, embryonic	4	405	11	5413	0.004
7098	centrosome cycle	4	405	11	5413	0.004
915	cytokinesis, contractile ring formation	4	405	11	5413	0.004
912	cytokinesis, formation of actomyosin apparatus	4	405	11	5413	0.004
51297	centrosome organization and biogenesis	4	405	11	5413	0.004
51261	protein depolymerization	4	405	11	5413	0.004
30718	germ-line stem cell maintenance	4	405	11	5413	0.004
31032	actomyosin structure organization and biogenesis	4	405	11	5413	0.004
45611	negative regulation of hemocyte differentiation	2	405	2	5413	0.0042
7396	suture of dorsal opening	2	405	2	5413	0.0042
7111	cytokinesis after meiosis II	2	405	2	5413	0.0042
51227	mitotic spindle assembly	2	405	2	5413	0.0042
31122	cytoplasmic microtubule organization and biogenesis	2	405	2	5413	0.0042

(C)の続き4

GO ID	Category	LH	LT	PH	PT	Fisherの正確検定
42690	negative regulation of crystal cell differentiation	2	405	2	5413	0.0042
16191	synaptic vesicle uncoating	2	405	2	5413	0.0042
48747	muscle fiber development	7	405	33	5413	0.0045
48741	skeletal muscle fiber development	7	405	33	5413	0.0045
48637	skeletal muscle development	7	405	33	5413	0.0045
7517	muscle development	13	405	89	5413	0.0046
7461	restriction of R8 fate	3	405	6	5413	0.0047
35153	tracheal epithelial cell type specification	3	405	6	5413	0.0047
6445	regulation of translation	10	405	60	5413	0.0048
42221	response to chemical stimulus	22	405	188	5413	0.0049
9952	anterior/posterior pattern formation	15	405	111	5413	0.0051
7224	smoothened signaling pathway	6	405	26	5413	0.0055
7349	cellularization	6	405	26	5413	0.0055
7269	neurotransmitter secretion	13	405	91	5413	0.0056
45055	regulated secretory pathway	13	405	91	5413	0.0056
910	cytokinesis	11	405	71	5413	0.0056
50770	regulation of axonogenesis	4	405	12	5413	0.0057
59	protein import into nucleus, docking	4	405	12	5413	0.0057
31023	microtubule organizing center organization and biogenesis	4	405	12	5413	0.0057
8589	regulation of smoothened signaling pathway	4	405	12	5413	0.0057
8045	motor axon guidance	4	405	12	5413	0.0057
1505	regulation of neurotransmitter levels	14	405	102	5413	0.0059
6461	protein complex assembly	13	405	92	5413	0.0061
43062	extracellular structure organization and biogenesis	7	405	35	5413	0.0064
42051	eye photoreceptor development (sensu Endopterygota)	7	405	35	5413	0.0064
48565	gut development	9	405	53	5413	0.0065
6606	protein import into nucleus	7	405	36	5413	0.0075
17145	stem cell division	7	405	36	5413	0.0075
42462	eye photoreceptor cell development	7	405	36	5413	0.0075
6333	chromatin assembly or disassembly	11	405	74	5413	0.0077
16333	morphogenesis of follicular epithelium	5	405	20	5413	0.0077
8407	bristle morphogenesis	5	405	20	5413	0.0077
6997	nuclear organization and biogenesis	4	405	13	5413	0.0078
30706	oocyte differentiation (sensu Insecta)	4	405	13	5413	0.0078
45705	negative regulation of salivary gland determination	3	405	7	5413	0.0078
45704	regulation of salivary gland determination	3	405	7	5413	0.0078
7425	tracheal epithelial cell fate determination (sensu Insecta)	3	405	7	5413	0.0078
7390	gem-band shortening	3	405	7	5413	0.0078
45570	regulation of imaginal disc growth	3	405	7	5413	0.0078
45467	R7 development	3	405	7	5413	0.0078
45186	zonula adherens assembly	3	405	7	5413	0.0078
40001	establishment of mitotic spindle localization	3	405	7	5413	0.0078
30258	lipid modification	3	405	7	5413	0.0078
51170	nuclear import	7	405	37	5413	0.0087
19221	cytokine and chemokine mediated signaling pathway	6	405	29	5413	0.0096
48488	synaptic vesicle endocytosis	6	405	29	5413	0.0096
7286	spermatid development	6	405	29	5413	0.0096
48515	spermatid differentiation	6	405	29	5413	0.0096
42078	germ-line stem cell division	5	405	21	5413	0.0096

(D) system Biological_process メソプレレン添加後2時間で遺伝子発現が減少したカテゴリー

GO ID	Category	LH	LT	PH	PT	Fisherの正確検定
8152	metabolism	126	144	4049	5413	<0.0001
44237	cellular metabolism	125	144	3745	5413	<0.0001
9058	biosynthesis	46	144	687	5413	<0.0001
44249	cellular biosynthesis	46	144	636	5413	<0.0001
9059	macromolecule biosynthesis	39	144	418	5413	<0.0001
6412	protein biosynthesis	38	144	395	5413	<0.0001
6796	phosphate metabolism	30	144	487	5413	<0.0001
6793	phosphorus metabolism	30	144	487	5413	<0.0001
6091	generation of precursor metabolites and energy	30	144	423	5413	<0.0001
16310	phosphorylation	30	144	369	5413	<0.0001
6119	oxidative phosphorylation	28	144	109	5413	<0.0001
6118	electron transport	25	144	293	5413	<0.0001
42773	ATP synthesis coupled electron transport	20	144	51	5413	<0.0001
42775	ATP synthesis coupled electron transport (sensu Eukaryota)	20	144	50	5413	<0.0001
6120	mitochondrial electron transport, NADH to ubiquinone	14	144	30	5413	<0.0001
44267	cellular protein metabolism	63	144	1713	5413	0.0001
6123	mitochondrial electron transport, cytochrome c to oxygen	4	144	10	5413	0.0001
19538	protein metabolism	63	144	1729	5413	0.0002
44260	cellular macromolecule metabolism	63	144	1770	5413	0.0004

(D)の続き

GO ID	Category	LH	LT	PH	PT	Fisherの正確検定
43170	macromolecule metabolism	81	144	2466	5413	0.0005
19430	removal of superoxide radicals	2	144	2	5413	0.0006
6461	protein complex assembly	8	144	92	5413	0.0017
6396	RNA processing	13	144	212	5413	0.0019
245	spliceosome assembly	3	144	12	5413	0.0027
9132	nucleoside diphosphate metabolism	2	144	4	5413	0.0034
398	nuclear mRNA splicing, via spliceosome	9	144	129	5413	0.0041
377	RNA splicing, via transesterification reactions with bulged adenosine as nu	9	144	129	5413	0.0041
375	RNA splicing, via transesterification reactions	9	144	129	5413	0.0041
8380	RNA splicing	9	144	132	5413	0.0048
9206	purine ribonucleoside triphosphate biosynthesis	5	144	47	5413	0.0055
9205	purine ribonucleoside triphosphate metabolism	5	144	47	5413	0.0055
9201	ribonucleoside triphosphate biosynthesis	5	144	47	5413	0.0055
9199	ribonucleoside triphosphate metabolism	5	144	47	5413	0.0055
9145	purine nucleoside triphosphate biosynthesis	5	144	47	5413	0.0055
9144	purine nucleoside triphosphate metabolism	5	144	47	5413	0.0055
6801	superoxide metabolism	2	144	5	5413	0.0056
9142	nucleoside triphosphate biosynthesis	5	144	48	5413	0.006
9141	nucleoside triphosphate metabolism	5	144	48	5413	0.006
6397	mRNA processing	10	144	168	5413	0.0078
8535	cytochrome c oxidase complex assembly	2	144	6	5413	0.0083
6510	ATP-dependent proteolysis	3	144	18	5413	0.0089
6818	hydrogen transport	5	144	53	5413	0.0091
15992	proton transport	5	144	53	5413	0.0091
50875	cellular physiological process	134	144	4962	5413	0.0096

(E) system Cellar_component メソプレレン添加後2時間で遺伝子発現が増加したカテゴリー

GO ID	Category	LH	LT	PH	PT	Fisherの正確検定
5575	cellular_component	316	316	4202	4202	<0.0001
5623	cell	300	316	3698	4202	<0.0001
5622	intracellular	238	316	2652	4202	<0.0001
43226	organelle	202	316	2180	4202	<0.0001
43229	intracellular organelle	202	316	2178	4202	<0.0001
43227	membrane-bound organelle	172	316	1880	4202	<0.0001
43231	intracellular membrane-bound organelle	172	316	1877	4202	<0.0001
5634	nucleus	146	316	1252	4202	<0.0001
5856	cytoskeleton	31	316	220	4202	<0.0001
5694	chromosome	25	316	146	4202	<0.0001
15630	microtubule cytoskeleton	23	316	138	4202	<0.0001
5875	microtubule associated complex	17	316	89	4202	<0.0001
30054	cell junction	13	316	50	4202	<0.0001
5912	adherens junction	11	316	37	4202	<0.0001
16327	apicolateral plasma membrane	11	316	28	4202	<0.0001
5911	intercellular junction	10	316	34	4202	<0.0001
5815	microtubule organizing center	10	316	27	4202	<0.0001
43296	apical junction complex	9	316	24	4202	<0.0001
5813	centrosome	9	316	22	4202	<0.0001
5913	cell-cell adherens junction	8	316	18	4202	<0.0001
793	condensed chromosome	6	316	11	4202	<0.0001
43232	intracellular non-membrane-bound organelle	60	316	572	4202	0.0001
43228	non-membrane-bound organelle	60	316	572	4202	0.0001
151	ubiquitin ligase complex	17	316	95	4202	0.0001
5819	spindle	8	316	24	4202	0.0001
796	condensin complex	4	316	5	4202	0.0001
5635	nuclear envelope	11	316	49	4202	0.0002
5886	plasma membrane	48	316	446	4202	0.0003
45177	apical part of cell	6	316	18	4202	0.0007
46930	pore complex	8	316	33	4202	0.001
5643	nuclear pore	8	316	33	4202	0.001

(F) system Cellar_component メソプレレン添加後2時間で遺伝子発現が減少したカテゴリー

GO ID	Category	LH	LT	PH	PT	Fisherの正確検定
5575	cellular_component	135	135	4202	4202	<0.0001
5623	cell	129	135	3698	4202	<0.0001
5622	intracellular	128	135	2652	4202	<0.0001
43226	organelle	115	135	2180	4202	<0.0001
43229	intracellular organelle	115	135	2178	4202	<0.0001
43234	protein complex	104	135	1305	4202	<0.0001
5737	cytoplasm	93	135	1192	4202	<0.0001
43227	membrane-bound organelle	89	135	1880	4202	<0.0001
43231	intracellular membrane-bound organelle	89	135	1877	4202	<0.0001
43232	intracellular non-membrane-bound organelle	60	135	572	4202	<0.0001
43228	non-membrane-bound organelle	60	135	572	4202	<0.0001
5739	mitochondrion	54	135	384	4202	<0.0001
30529	ribonucleoprotein complex	50	135	270	4202	<0.0001
5840	ribosome	41	135	162	4202	<0.0001
43233	organelle lumen	36	135	359	4202	<0.0001
31974	membrane-enclosed lumen	36	135	359	4202	<0.0001
31090	organelle membrane	31	135	242	4202	<0.0001
15934	large ribosomal subunit	31	135	87	4202	<0.0001
31975	envelope	29	135	221	4202	<0.0001
31967	organelle envelope	29	135	221	4202	<0.0001
5740	mitochondrial envelope	29	135	172	4202	<0.0001
31966	mitochondrial membrane	29	135	158	4202	<0.0001
19866	organelle inner membrane	29	135	150	4202	<0.0001
5743	mitochondrial inner membrane	29	135	145	4202	<0.0001
5829	cytosol	23	135	155	4202	<0.0001
5759	mitochondrial matrix	22	135	122	4202	<0.0001
31980	mitochondrial lumen	22	135	122	4202	<0.0001
5830	cytosolic ribosome (sensu Eukaryota)	22	135	83	4202	<0.0001
5746	mitochondrial electron transport chain	20	135	59	4202	<0.0001
5761	mitochondrial ribosome	19	135	63	4202	<0.0001
313	organellar ribosome	19	135	63	4202	<0.0001
5762	mitochondrial large ribosomal subunit	16	135	41	4202	<0.0001

(F)の続き

GO ID	Category	LH	LT	PH	PT	Fisherの正確検定
315	organellar large ribosomal subunit	16	135	41	4202	<0.0001
5842	cytosolic large ribosomal subunit (sensu Eukari	15	135	46	4202	<0.0001
45271	respiratory chain complex I	14	135	32	4202	<0.0001
5747	respiratory chain complex I (sensu Eukaryota)	14	135	32	4202	<0.0001
15935	small ribosomal subunit	11	135	60	4202	<0.0001
16282	eukaryotic 43S preinitiation complex	10	135	53	4202	<0.0001
30532	small nuclear ribonucleoprotein complex	8	135	53	4202	<0.0001
5730	nucleolus	8	135	46	4202	<0.0001
5732	small nucleolar ribonucleoprotein complex	8	135	15	4202	<0.0001
16283	eukaryotic 48S initiation complex	7	135	37	4202	<0.0001
5843	cytosolic small ribosomal subunit (sensu Euka	7	135	37	4202	<0.0001
45259	proton-transporting ATP synthase complex	5	135	16	4202	<0.0001
45255	hydrogen-translocating F-type ATPase compl	5	135	16	4202	<0.0001
5753	proton-transporting ATP synthase complex (s	5	135	16	4202	<0.0001
276	proton-transporting ATP synthase complex, c	4	135	6	4202	<0.0001
45263	proton-transporting ATP synthase complex, c	4	135	6	4202	<0.0001
5681	spliceosome complex	9	135	80	4202	0.0001
45277	respiratory chain complex IV	4	135	12	4202	0.0001
5751	respiratory chain complex IV (sensu Eukaryot:	4	135	12	4202	0.0001
5688	snRNP U6	3	135	8	4202	0.0007
502	proteasome complex (sensu Eukaryota)	6	135	49	4202	0.0011
5839	proteasome core complex (sensu Eukaryota)	4	135	20	4202	0.0012
31981	nuclear lumen	14	135	231	4202	0.0015
5763	mitochondrial small ribosomal subunit	4	135	23	4202	0.0021
314	organellar small ribosomal subunit	4	135	23	4202	0.0021
5852	eukaryotic translation initiation factor 3 compl	3	135	12	4202	0.0027
16469	proton-transporting two-sector ATPase comp	5	135	47	4202	0.0055

表3-1 S2細胞へのメソレン添加による遺伝子発現変化をDNAマイクロアレイで解析

(A)メソレン添加後2時間で遺伝子発現が大きく誘導された遺伝子(B)メソレン添加後8時間で遺伝子発現が大きく誘導された遺伝子 C:メソレン添加後0時間(コントロール)、M2:メソレン添加後2時間、M8:メソレン添加後8時間
存在確率A<M<P(0.2,8時間でS2細胞で発現しているかどうかA.存在しない.M.存在が不確か.P.存在する)。変化確率NC(コントロールと比較して変化なし)、I(遺伝子発現が誘導され増加率はメソレン添加後2時間及び8時間での遺伝子発現量をコントロールの発現量で割ったもの)。

(A)

アレイ番号	存在確率			遺伝子発現量			変化確率		増加率		FlyBase symbol	gene name
	C	M2	M8	ctr 強度	M2強度	M8強度	M2	M8	M2/C	M8/C		
153799 at	P	P	P	30.2	111.1	101.8	I	I	3.68	3.37	FB:FBgn0039922 /sym=MED26 Arc70	Mediator complex subunit 26
153060 at	M	P	P	43.2	147.8	91.8	I	I	3.42	2.13	FB:FBgn0023526 /sym=CG2865	CG2865
154924 at	P	P	P	63.5	215	138.3	I	I	3.39	2.18	FB:FBgn0033013 /sym=Nipped-A Tra1	Nipped-A
144090 at	A	P	A	6.4	20.4	13.5	I	NC	3.19	2.11	FB:FBgn0025740 /sym=plexB	plexin B
141676 at	P	P	P	149.4	461.6	366.7	I	I	3.09	2.45	FB:FBgn0004606 /sym=zfh1	zinc finger homeodomain 1
150044 at	M	P	P	12.4	38.2	35.4	I	I	3.08	2.85	FB:FBgn0038470 /sym=CG18213	CG18213
148672 at	P	P	P	41	113.4	56	I	NC	2.77	1.37	FB:FBgn0036308 /sym=CG32113	CG32113
151920 at	P	P	P	29	79.8	56.4	I	I	2.75	1.94	FB:FBgn0032223 /sym=CG5034	GATA4
142553 at	P	P	P	16	43.4	19.6	I	NC	2.71	1.23	FB:FBgn0032207 /sym=CG5640	CG5640
153355 at	P	P	P	14.9	38.1	43.7	I	I	2.56	2.93	FB:FBgn0039877 /sym=CG2118	CG2118
148839 at	P	P	P	22.2	56.5	50.3	I	I	2.55	2.27	FB:FBgn0036556 /sym=CG5830	CG5830
152059 at	P	P	P	138.9	353.2	379.8	I	I	2.54	2.73	FB:FBgn0027580 /sym=BcDNA;GH06348	CG1516
147278 at	P	P	P	35.1	89	69.6	I	I	2.54	1.98	FB:FBgn0034073 /sym=CG8414	CG8414
144875 at	A	P	M	10.5	26.4	21.2	I	NC	2.51	2.02	FB:FBgn0030299 /sym=CG11727	CG11727
153197 at	P	P	P	48	120	85.1	I	I	2.5	1.77	FB:FBgn0000568 /sym=Eip75B	Ecdysone-induced protein 75B
144125 at	A	P	P	8.8	21.9	19.6	I	I	2.49	2.23	FB:FBgn0026379 /sym=Pten	Pten
154607 at	P	P	P	10.7	25.9	35.3	I	I	2.42	3.3	FB:FBgn0028420 /sym=Kr-h1	Kruppel homolog 1

(B)

アレイ番号	存在確率			遺伝子発現量			変化確率		増加率		FlyBase symbol	gene name
	C	M2	M8	ctr 強度	M2強度	M8強度	M2	M8	M2/C	M8/C		
153731 at	P	P	P	191	156	1719	NC	I	0.82	9	FB:FBgn0001225 /sym=Hsp26	Heat shock protein 26
144194 at	P	P	P	132	330	1011	I	I	2.5	7.66	FB:FBgn0027836 /sym=Dgp-1	Dgp-1
142189 at	A	A	P	14	21	105	NC	I	1.5	7.5	FB:FBgn0013772 /sym=Cyp6a8	Cytochrome P450-6a8
153432 at	P	P	P	127	266	952	I	I	2.09	7.5	FB:FBgn0022073 /sym=Thor	Thor
149756 at	M	A	P	28	31	157	NC	I	1.11	5.61	FB:FBgn0038021 /sym=GstD2	Glutathione S transferase D2
141583 at	P	P	P	31.6	47.6	261.3	I	I	1.51	8.27	FB:FBgn0033980 /sym=Cyp6a20	Cyp6a20

表3-2 DNAマイクロアレイの解析からピックアップしたメソプレレン応答遺伝子の機能とGO term

(A)system Molecular function|におけるGOterm、(B)system Biological_process|におけるGO term、(C)system Cellular_component|におけるGO term

(A)

gene name	GO:Molecular function
<i>Mediator complex subunit 26</i>	transcription factor activity; RNA polymerase II transcription mediator activity; structural molecule activity; motor activity;
<i>CG2865</i>	--
<i>Nipped-A</i>	transcription regulator activity; receptor signaling protein serine/threonine kinase activity; protein kinase activity; transcription cofactor activity
<i>plexin B</i>	transmembrane receptor protein tyrosine kinase activity; semaphorin receptor activityaxon guidance
<i>zinc finger homeodomain 1</i>	DNA binding; RNA polymerase II transcription factor activity; transcription factor activity; zinc ion binding;
<i>CG18213</i>	--
<i>CG32113</i>	--
<i>GATA4</i>	general RNA polymerase II transcription factor activity; transcription factor activity;
<i>CG5640</i>	transcriptional repressor activity
<i>CG2118</i>	ATP binding; methylcrotonoyl-CoA carboxylase activity; biotin binding;
<i>CG5830</i>	--
<i>CG1516</i>	ATP binding; pyruvate carboxylase activity; biotin binding;
<i>CG8414</i>	--
<i>CG11727</i>	small GTPase regulator activity
<i>Ecdysone-induced protein 75B</i>	DNA binding; ligand-dependent nuclear receptor activity; specific RNA polymerase II transcription factor activity; transcription factor activity; steroid hormone receptor activity; thyroid hormone receptor activity;
<i>Pten</i>	actin binding;protein tyrosine/serine/threonine phosphatase activity; non-membrane spanning protein tyrosine phosphatase activity; protein tyrosine phosphatase activity; phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphate 3-phosphatase activity; phosphoprotein phosphatase activity; serine-type endopeptidase inhibitor activity;
<i>Kruppel homolog 1</i>	transcription factor activity; zinc ion binding;
<i>Heat shock protein 26</i>	--
<i>Dgp-1</i>	GTP binding; hydrolase activity, acting on acid anhydrides, in phosphorus-containing anhydrides;
<i>Cyp6a20</i>	electron transporter activity; oxidoreductase activity; monooxygenase activity;
<i>Thor</i>	eukaryotic initiation factor 4E binding;
<i>Glutathione S transferase D2</i>	glutathione transferase activity; glutathione peroxidase activity
<i>Cytochrome P450-6a8</i>	electron transporter activity; oxidoreductase activity; monooxygenase activity; fatty acid (omega-1)-hydroxylase activity;

(B)

gene name	GO:Biological process
<i>Arc70 Mediator complex subunit 26</i>	ciliary or flagellar motility; transcription initiation from RNA polymerase II promoter
<i>CG2865</i>	--
<i>Nipped-A</i>	DNA repair; cytokinesis; protein amino acid phosphorylation; regulation of progression through cell cycle; regulation of transcription; regulation of transcription from RNA polymerase II promoter
<i>plexin B</i>	ectoderm development; motor axon guidance; negative regulation of Rac protein signal transduction; positive regulation of Rho protein signal transduction; protein amino acid phosphorylation; transmembrane receptor protein tyrosine kinase signaling pathway
<i>zinc finger homeodomain 1</i>	central nervous system development; ectoderm development; germ cell migration; gonad development; heart development; mesoderm development; muscle development; nervous system development; pole cell migration; regulation of transcription from RNA polymerase II promoter
<i>CG18213</i>	--
<i>CG32113</i>	vesicle-mediated transport
<i>GATA4</i>	regulation of transcription, DNA-dependent
<i>CG5640</i>	regulation of transcription from RNA polymerase II promoter
<i>CG2118</i>	fatty acid biosynthesis; leucine metabolism
<i>CG5830</i>	development; mesoderm development
<i>CG1516</i>	fatty acid biosynthesis; gluconeogenesis; pyruvate metabolism
<i>CG8414</i>	--
<i>CG11727</i>	cell cycle; chromosome segregation; mitosis; regulation of progression through cell cycle
<i>Ecdysone-induced protein 75B</i>	cell proliferation; cell-cell signaling; ecdysis (sensu Insecta); ecdysone-mediated induction of salivary gland cell autophagic cell death; intracellular signaling cascade; molting cycle (sensu Insecta); oogenesis (sensu Insecta); regulation of ecdysteroid metabolism; regulation of transcription from RNA polymerase II promoter; regulation of transcription, DNA-dependent
<i>Pten</i>	actin filament organization; apoptosis; autophagy; cell adhesion; cell proliferation; cellular physiological process; cytoskeleton organization and biogenesis; insulin receptor signaling pathway; negative regulation of growth; negative regulation of insulin receptor signaling pathway; negative regulation of organ size; negative regulation of progression through cell cycle; organ morphogenesis; phosphoinositide dephosphorylation; protein amino acid dephosphorylation; regulation of body size; regulation of cell shape; regulation of cell size; regulation of organ size; response to starvation; tissue development; tracheal epithelial cell fate determination (sensu Insecta)
<i>Kruppel homolog 1</i>	cell proliferation; metamorphosis (sensu Insecta); metamorphosis; regulation of transcription; regulation of transcription from RNA polymerase II promoter; response to ecdysone
<i>Heat shock protein 26</i>	defense response; determination of adult life span; protein folding; response to heat
<i>Dgp-1</i>	protein biosynthesis
<i>Cyp6a20</i>	electron transport; steroid metabolism
<i>Thor</i>	antibacterial humoral response (sensu Protostomia); defense response; immune response; negative regulation of cell size; negative regulation of translational initiation; regulation of cell growth; response to stress
<i>Glutathione S transferase D2</i>	defense response; response to toxin
<i>Cytochrome P450-6a8</i>	electron transport; insecticide metabolism; lauric acid metabolism; steroid metabolism

(C)

gene name	GO:Cellular component
<i>Mediator complex subunit 26</i>	flagellum (sensu Bacteria);mediator complex
<i>CG2865</i>	--
<i>Nipped-A</i>	SAGA complex; histone acetyltransferase complex
<i>plexin B</i>	membrane
<i>zinc finger homeodomain 1</i>	nucleus
<i>CG18213</i>	--
<i>CG32113</i>	--
<i>GATAd</i>	nucleus
<i>CG5640</i>	--
<i>CG2118</i>	mitochondrial matrix
<i>CG5830</i>	--
<i>CG1516</i>	mitochondrial matrix
<i>CG8414</i>	--
<i>CG11727</i>	--
<i>Ecdysone-induced protein 75B</i>	nucleus
<i>Pten</i>	--
<i>Kruppel homolog 1</i>	nucleus
<i>Heat shock protein 26</i>	--
<i>Dgp-1</i>	cellular component unknown
<i>Cyp6a20</i>	membrane; microsomal
<i>Thor</i>	--
<i>Glutathione S transferase D2</i>	--
<i>Cytochrome P450-6a8</i>	membrane; microsomal

【参考文献】

投稿論文

Ijiro T, Urakawa H, Yasukochi Y, Takeda M, Fujiwara Y.(2004) cDNA cloning, gene structure, and expression of Broad-Complex (BR-C) genes in the silkworm, *Bombyx mori*. *Insect Biochem Mol Biol*. 2004 Sep;34(9):963-9.

参考文献

Ashburner M.,C.Chihara,P.Meltzer and G.Richards.,(1974)Temporal control of puffing activity in polytene chromosomes.,*Cold Spring Harbor Symp.Quant.Biol.*38.

Ashburner M.and H.D.Berendes.,(1978)Puffing of polytene chromosomes.In *The Genetics and Biology of Drosophila* ed.M.Ashburne and T.R.F Wright,Vol.2b,1978

Ashok M,et al(1998)Insect juvenile hormone resistance gene homology with the bHLH-PAS family of transcriptional regulators.*Proc Natl Acad Sci U S A*Mar 17;95(6):2761-6.

Altaratz,M.(1991)Regulation of juvenile hormone synthesis in wild-type and apterous mutants *Drosophila*.*Mol Cell Endocrinol* 81,205-216

Beck et al., (2004)Kruppel-homolog is essential for the coordination of regulatory gene hierarchies in early *Drosophila* development. *Dev. Biol.* 268(1): 64--75

Billas IM et al,(2001) Crystal structure of the ligand-binding domain of the ultraspiracle protein USP, the ortholog of retinoid X receptors in insects.*J Biol Chem*.Mar 9;276(10):7465-74. Epub 2000 Oct 26.

Bortolotti,L.et al.(2000) Ovicidal action of fenoxycarb on a predator,*Chrysoperla carnea*(Neuroptera:Chrysopidae).*Appl.entomol.Zool.*35:265-270

Bownes,M.(1982)Hormonal and genetic regulation of vitellogenesis in *Drosophila**Quart Rev Biol* 57:247-271

Bownes,M(1989)The roles of juvenile hormone,ecdysone and the ovary in the control of

Drosophila oogenesis. J Insect Physiol 35 409-413

Butenand, A., and P. Karlson. (1954) Über die Isolierung eines Metamorphose-Hormone der Insekten Form. Z. Naturforsch. 9b, 389-391

Clayton GM, et al (2001) The structure of the ultraspiracle ligand-binding domain reveals a nuclear receptor locked in an inactive conformation. Proc Natl Acad Sci U S A. Feb 13; 98(4):1549-54

Clever, U., and Karlson, P. (1960) Induktion von Puff-Veränderungen in den Speicheldrüsen Chromosomen von *Chironomus tentans* durch Ecdyson. Exp. Cell. Res. 20:623-626

Clever U. (1965) Chromosomal changes associated with differentiation. Brookhaven Symp Biol. 18:242-253.

Couillaud F et al. (1998) The Release of Isoprenoids by Locust Corpora Allata in vitro. J Insect Physiol. Feb; 44(2):103-111.

Cusson, M. (1997) Characterization of Antibody 444 Using Chromatographically Purified Enantiomers of Juvenile Hormones I, II, and III: Implications for Radioimmunoassays. Anal Bio. 249, 83-87

Dai, J.-D. (1993) An ultrastructural and developmental analysis of the corpus allatum of juvenile hormone deficient mutant of *Drosophila melanogaster*. Rho's Arch Dev Biol 202, 85-91

Davey, K.G. (2000), The modes of action of juvenile hormones: some questions we ought to ask, Insect Biochem. Mol. Biol. 30, 663-669.

Darrouzet E et al (1997) Hydroxy juvenile hormones: new putative juvenile hormones biosynthesized by locust corpora allata in vitro., Biochem Biophys Res Commun. Nov 26; 240(3):752-8.

Dubrovsy EB, Dubrovskaya VA et al (2002) Juvenile hormone signaling during oogenesis in *Drosophila melanogaster*. Insect Biochem Mol Biol. Nov; 32(11):1555-65.

Dingle H et al.(1997)Juvenile hormone as a mediator of plasticity in insect life histories.Arch Insect Biochem Physiol 35:359-373

Elzinga R.J. (1978)Fundamentals of Entomology.Prentice Hall of India, Private Limited, New Delhi, 324 p

Emlen,D.(2003)JGenotype to Phenotype: Physiological Control of Trait Size and Scaling in Insects ,Integr. Comp. Biol. 43: 617-634

Feldlaufer,M.F.(1989)Diversity of molting hormones in insects.,In Ecdysone:From Chemistry to Mode of Action ,ed.J.Koolman,pp.308-312.Thieme-Verlag,Stugart.

Finch,C.E.et al(1995)Hormones and the physiological architecture of life history evolution.Quart Rev Biol70:1-52

Fukuda,S.(1940).Induction of pupation in silkworm by transplanting the prothoracicgland. Proc. Imp. Acad. Japan. 16: 417-20

藤原 晴彦,神村 学(1998)昆虫ステロイドホルモンの受容と情報伝達,ホルモンの分子生物学-8 無脊椎動物のホルモン(日本比較内分泌学会)学会出版センターp105-126

Gilbert,L.I.,Tata,J.R.,Atkinson,B.G.(1996)Metamorphosis:Postembryonic reprograming of Gene Expression in Amphibian and Insect Cells (Cell Biology),Academic Press 4-58

Gillot C.(2003)Male accessory gland secretion;modulators of female reproductive physiology and behavior.Ann Rev Entomol48;163-181

Granger NA and Bollenbacher WE. (1982)Juvenile hormone synthesis in vitro by larval and pupal corpora allata of *Manduca sexta*.Mol Cell Endocrinol.Nov-Dec;28(3):587-604.

Harmon,M.A.et al(1995)Activaton of mammalian retinoid X receptor by the insect growth regulator methoprene.Proc.Natl.Acad.Sci.USA 92:6157-6160

Hartfelder K.(2000) Insect juvenile hormone: from "status quo" to high society. Braz J Med Biol Res. Feb;33(2):157-77.

Ismail SM et al(1998)Juvenile hormone acid: evidence for a hormonal function in

induction of vitellogenin in larvae of *Manduca sexta*.,Arch Insect Biochem Physiol. 37(4):305-14

Ismail SM et al.(2000) Juvenile hormone acid and ecdysteroid together induce competence for metamorphosis of the Verson's gland in *Manduca sexta*.J Insect Physiol. 2000 Jan;46(1):59-68.

Jones G et al(2001) Juvenile hormone III-dependent conformational changes of the nuclear receptor ultraspiracle.Insect Biochem Mol Biol. Dec;32(1):33-49.

Kamei,M. et al.(1993)Laboratory and field evaluation of methoprene and its slow-release formulation,Altosid(R)10F,against the sprinkler sewage filter fly,*Psychod alternate* Say(Diptera:Psychodidae).Appl.Entomol.Zool.28:19-25

Kawakami et al(1990)Molecular cloning of the *Bombyx mori* prothoracicotropic hormone. Science. Mar 16;247(4948),1333-5

Kethidi,D.R. et al. (2004), Identification and characterization of a juvenile hormone (JH) response region in the JH esterase gene from the spruce budworm, *Choristoneura fumiferana*, J. Biol. Chem. 279, 19634–19642

Kindle,H. et al.(1988) Relationship between the absolute configuration and the biological activity of juvenile hormone III. Experimentia45, 356-360

Kopeć S. (1917) Badania do wiadczałne nad przeobra eniem owadów (Experiments on metamorphosis of insects) Rozprawy Wydziału mat.-przyr. Akademii Umiej tno ci w Krakowie, 57 B, 15-62 (in Polish).

Kopeć S. (1917) Experiments on metamorphosis of insects. Bull. int. Acad. Sci. Cracoviae (B),57-60

Kopeć,S.(1922)Studies on the necessity of the brain for the inception of insect metamorphosis.,Biol.Bull.142:323-342

Kubli E.(2003)Sex-peptides:seminal peptides of the *Drosophila* male.Cell Mol Life Sci 60:1698-1704

Li,Z. et al.(1997)Toxicities of pyriproxifen to susceptible and resistant strains of

houseflies. *Appl. Entomol. Zool.* 32:373-378

松本義明 高橋信孝 吉武成美,1978 : 昆虫の科学 朝倉書店

中筋房夫 内藤親彦 石井実 藤崎憲治 甲斐英則 佐々木正己,2000 : 応用昆虫学の基礎
朝倉書店

Nijhout H.F.(1991)*Insect hormone*. Princeton.Princeton University Press.

Nijhout,H.F.et al.(1982)Juvenile hormone and the physiological basis of insect
polymorphisms.*Quart.Rev.Biol* 57:109-133

O'Connor,J.D.,(1985)Ecdysteroid action at the molecular level.In *Comprehensive Insect
Physiology,Biochemistry and Pharmacology*,ed.G.A.Kekut and L.I.Gilbert,vol.8,pp.85-98

Parkes et al., (1998) Extension of *Drosophila* lifespan by over-expression of human
SOD1 in motorneurons, *Nat. Genet.* 19 , pp. 171–174.

Pecasse et al.,(2000)Kruppel-homolog, a stage-specific modulator of the prepupal
ecdysone response, is essential for *Drosophila* metamorphosis. *Dev. Biol.* 221(1): 53--67

Postlethwait,J.H.et al(1973)Vitellogenesis induced by juvenile hormone in the female
sterile mutant apterous-four in *Drosophila melanogaster*.*Nature New Biol* 244,284-285

Postlethwait,J.H etal.(1987)Nonvitellogenic female sterile mutants and the regulation
of vitellogenesis in *Drosophila melanogaster*.*Dev Biol* 67,202-213

Riddiford,L.M.,(1985)Hormone action at the cellular level. In *Comprehensive Insect
Physiology,Biochemistry and Pharmacology*,ed.G.A.Kekut and L.I.Gilbert,vol.8,pp.37-84

Riddiford,L.M(1993)Hormones and *Drosophila* development.in *The Development of
Drosophila melanogaster*. ed. M Bate & AM Arias. pp.899-939. Cold Spring Harbor
Laboratory Press

Riddiford,L. M.(1994) Cellular and molecular actions of juvenile hormone I. General
considerations and premetamorphic actions, *Adv. Insect Physiol.* 24: 213—274.

Riddiford LM.(1996) Juvenile hormone: the status of its "status quo" action.
Arch Insect Biochem Physiol. 32(3-4):271-86

Riddiford LM, Cherbas P, Truman JW.(2000) Ecdysone receptors and their biological actions.Vitam Horm. 60:1-73.

Riddiford,L.M. et al (2003) Insights into the molecular basis of the hormonal control of molting and metamorphosis from *Manduca sexta* and *Drosophila melanogaster*., Insect Biochem Mol Biol. Dec;33(12):1327-38

Roller, H.et al(1967) The structure of juvenile hormone. Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 6,. 179-89.

斎藤哲夫 松本義明 平嶋義弘 久野英二 中島敏夫：新応用昆虫学 朝倉書店

Sakurai,S et al.(1990) Biological activity of enantiomerically pure forms of insect juvenile hormone I andIII in *Bombxy mori*. Experienta46,220-221

Segal D.(1993) Prospects of using *Drosophila* for insect neuroendocrine research.
Arch Insect Biochem Physiol. 22(1-2):199-231.

Segraves WA, Hogness DS.(1990)The E75 ecdysone-inducible gene responsible for the 75B early puff in *Drosophila* encodes two new members of the steroid receptor superfamily.Genes Dev.Feb;4(2):204-19.

Sehanl, F (1989)Hormonal role of ecdysteroids in insect larvae and during metamorphosis In Ecdysone. Ed. Koolman, J. Georg Thieme Verlag. Stuttgart. Pp.271-278.

Shemshedini L, Wilson TG.(1990) Resistance to juvenile hormone and an insect growth regulator in *Drosophila* is associated with an altered cytosolic juvenile hormone-binding protein.Proc Natl Acad Sci U S A. 1990 Mar;87(6):2072-6.

Shirras,A et al(1989)Cricket-a locus regulating a number of adult function of *Drosophila melanogaster*.Proc Nat Acad Sci USA 86 4559-4563

Sun,J. and Tower,J.(1999), FLP recombinase-mediated induction of Cu/Zn superoxide dismutase transgene expression can extend the life span of adult *Drosophila melanogaster* flies, *Mol. Cell. Biol.* 19 , 216–228.

Tatar et al., (2001) A mutant *Drosophila* insulin receptor homolog that extends life-span and impairs neuroendocrine function, *Science* 292 , 107–110

Tatar M et al.,(2001) Slow aging during insect reproductive diapause: why butterflies, grasshoppers and flies are like worms.*Exp Gerontol.*Apr;36(4-6):723-38.

Thummel CS.(1995) From embryogenesis to metamorphosis: the regulation and function of *Drosophila* nuclear receptor superfamily members.*Cell.* 1995 Dec 15;83(6):871-7.

Touhara,K.(1994)Regulation of insect growth and metamorphosis-Recent progress of juvenile hormone reseach.*Kagaku to Seibutsu* 32:13-22

Truman JW,Riddiford LM.(2002)Endocrine insights into the evolution of metamorphosis in insects.,*Annu Rev Entomol.*47:467-500.

Westbrook AL, Bollenbacher WE. (1990)The development of identified neurosecretory cells in the tobacco hornworm, *Manduca sexta*.*Dev Biol.* Aug;140(2):291-9.

Wheeler DE, Nijhout HF.(2003) A perspective for understanding the modes of juvenile hormone action as a lipid signaling system. *Bioessays.* Oct;25(10):994-1001.

Wilson,T.G.et al(1983)Precocene I and II inhibition of vitellogenic oocyte development in *Drosophila* ovaries and fat body by 20-hydroxy ecdysone and a juvenile hormone analog.*Dev boil* 80 225-234

Wilson TG, Fabian J.(1986)A *Drosophila melanogaster* mutant resistant to a chemical analog of juvenile hormone.*Dev Biol.* 1986 Nov;118(1):190-201.

Wilson TG, Ashok M.(1998)Insecticide resistance resulting from an absence of target-site gene product.*Proc Natl Acad Sci U S A.* Nov 24;95(24):14040-4.

Wilson,T.G., DeMoor S, Lei J.(2003)Juvenile hormone involvement in *Drosophila melanogaster* male reproduction as suggested by the Methoprene-tolerant(27) mutant phenotype.*Insect Biochem Mol Biol.* Dec;33(12):1167-75.

Wigglesworth,V.B.(1934)The physiology of the copus allatum in the growth and reproduction of *Rhodnius prolixus*.,*Quant.J.Microsc.Sci.*77;191-222

Wyatt,G.R.and Davey,K.G.(1996)Cellular and molecular actions of juvenile hormone. II .Roles of juvenile hormone in adult insects.*adv.Insect Physiol.*26:1-155

Xu Y et al(2002)Activation of transcription through the ligand-binding pocket of the orphan nuclear receptor ultraspiracle.,*Eur J Biochem.*Dec;269(24):6026-36. Erratum in: *Eur J Biochem.* 2003Feb;270(3):565.

Zera, A. J et al(2001) Physiology of life history trade-offs in animals *Annual Review of Ecology and Systematics* 32:95-106.

Zera ,A.J.et al(2004)The endocrine regulation of wing polymorphism in insects:state of the art,recent surprise, and future directions.*Intergr Comp Biol* 73,607-616

Zhang,L. et al.(1998)Cross resistance to insect growth regulators in pyproxifen-resistant housefly.*Appl. Entomol.Zool.*33:195-197

Zhou X et al(2004)Overexpression of broad: a new insight into its role in the *Drosophila* prothoracic gland cells. *J Exp Biol.* Mar;207:1151-61

【謝辞】

本研究は東京大学院新領域創成科学研究科先端生命科学専攻分身認識科学分野において行われました。

片岡宏誌教授、ならびに東原和成助教授には研究者として恵まれた環境を提供していただき、また日々ご指導賜りましたこと深く感謝申し上げます。

東京大学理学部生物情報科学学部教育特別プログラム 程久美子特任助教授、京都大学大学院生命科学研究科多細胞構築学講座細胞認識学分野 上村匡教授、島田裕子様には貴重な細胞を分与いただき心より感謝いたしております。

東京大学農学部寄附講座 機能性食品ゲノミクス寄附研究講座 松本 朗客員助教授にはDNA マイクロアレイの解析を適切に指導いただき深くお礼申し上げます。

研究生生活において、分子認識科学研究室の諸先輩や後輩には様々な面で研究を支えていただきありがとうございました。

研究においても、大学院生活においても心の支えとなってくださいました、同級生の皆様には心より感謝いたしております。

多くの方々の支えにより、有意義な研究生生活を送ることができました。ありがとうございます。

シヨウジョウバエ S2 細胞を用いた幼若ホルモン応答遺伝子の探索と解析

分子認識科学分野

学生証番号 46503

飯代 智之

【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イロシヨウジョウバエ 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、遺伝子発現が正あるいは負の制御をうける遺伝子。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、キイロシヨウジョウバエ 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 473 個、うち 66 遺伝子の

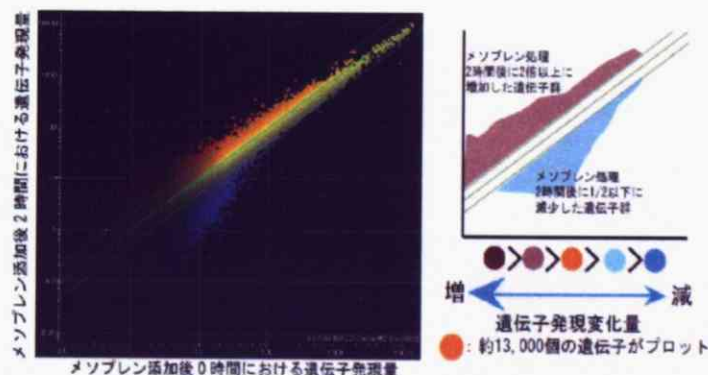


図 1 DNA マイクロアレイを用いて、S2 細胞へのメソプレン添加後 2 時間における遺伝子発現変化を網羅的に解析。

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ン誘導遺伝子に注目し、真の JH 応答遺伝子を選別するため以下の実験を行った。まず、S2 細胞にメソプレンを添加し、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 III と非天然型 10S-JH III 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。

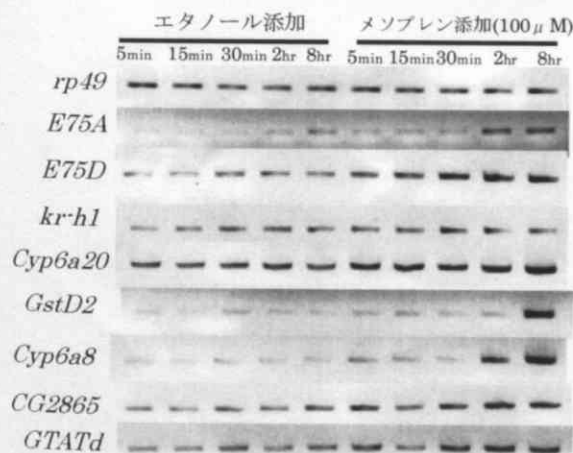


図 2 S2 細胞へのメソプレン添加による遺伝子発現変化
rp49 はハウスキーピング遺伝子

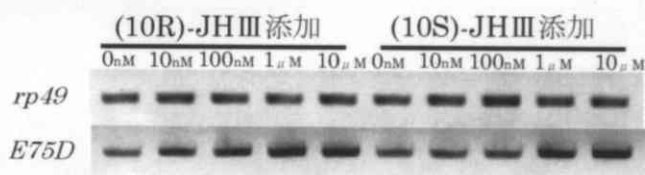


図 3 S2 細胞への JH 光学異性体添加による遺伝子発現変化の比較



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