

博士論文

論文題目 ショウジョウバエOr42b神経の加齢に伴う細胞死メ
カニズムの解明

氏 名 竹内 健一

目次

目次.....	1
1 緒論.....	3
1.1 老化が神経系に与える影響.....	3
1.2 加齢に伴う神経回路の変化と神経機能低下.....	3
1.3 ショウジョウバエ Or42b 神経の加齢に伴う細胞死.....	4
1.4 加齢に伴う神経細胞死の機構.....	5
1.5 本研究の概要.....	7
2 実験材料と方法.....	8
2.1 キイロショウジョウバエ系統及び飼育.....	8
2.2 遺伝子組み換え系統の作製.....	10
2.3 Or42b 変異体(Or42b ^{l9} , Or42b ²³).....	11
2.4 寿命の測定.....	12
2.5 定量的 RT-PCR による遺伝子発現解析.....	12
2.6 ショウジョウバエ成虫脳中のカスパーゼ活性の観察.....	14
2.7 ショウジョウバエ触覚中における蛍光タンパク質の観察.....	14
2.8 ショウジョウバエ成虫の大腸菌感染.....	15
2.9 ショウジョウバエ触覚の免疫組織化学.....	15
2.10 ショウジョウバエ成虫脂肪体中における蛍光タンパク質の観察.....	16
2.11 ショウジョウバエ三齢幼虫脂肪体の免疫組織化学.....	16
2.12 ショウジョウバエ触覚の蛍光 <i>in situ</i> hybridization.....	16
2.13 Two-choice assay によるショウジョウバエ誘引行動の観察.....	18
2.14 G-CaMP を利用した匂い刺激時の嗅覚受容体神経の神経活動の観察.....	19
2.15 ショウジョウバエ餌の組成.....	20
2.16 使用したプライマー及びオリゴ DNA 配列.....	21
2.17 使用した抗体.....	24
3 結果.....	25
3.1 免疫関連遺伝子変異体では Or42b 神経の細胞死が抑制される.....	25
3.2 Drosocin の過剰発現によって Or42b 神経細胞死が誘導される.....	25
3.3 Or42b 神経の細胞死は Or42b 神経以外の細胞における自然免疫応答の亢進によ って誘導される.....	26
3.4 触覚において自然免疫応答の亢進を示す細胞種の探索.....	27

3.5 食餌制限により Or42b 神経の機能低下が抑制される	28
3.6 Or42b 受容体が Or42b 神経の細胞死に与える影響の解析	28
4 考察.....	30
4.1 加齢に伴う自然免疫応答の亢進を示す細胞種とそのメカニズム	30
4.2 自然免疫応答の亢進が Or42b 神経の細胞死を誘導するメカニズム	31
4.3 Or42b 神経の加齢に伴う細胞死と Or42b 受容体及び神経活動の関与	31
4.4 Or42b 神経とタンパク質恒常性維持機構.....	33
4.5 Or42b 神経の加齢に伴う細胞死の生理的意義.....	34
4.6 Or42b 神経細胞死とヒト嗅覚系の老化の関連性.....	35
5 図.....	37
6 参考文献.....	60
謝辞.....	67

1 緒論

1.1 老化が神経系に与える影響

加齢に伴い我々の神経系の機能は衰え、生活の質が低下する。例えばヒトの嗅覚系は加齢に伴い衰え(Doty et al., 1984)、生活の質を低下させるのみならず、栄養失調を引き起こすことが知られている(Miwa et al., 2001)。しかし、加齢に伴う嗅覚系低下のメカニズムについて良く研究が行われているものの(Mobley et al., 2014)、嗅覚系の老化の治療法の確立には至っていないのが現状である。また老化はアルツハイマー病、パーキンソン病、ハンチントン等の神経変性疾患のリスクファクターであることが知られている(Niccoli and Partridge, 2012)。特にパーキンソン病の90%を占める原因遺伝子が特定されていない孤発性パーキンソン病は、発症に環境因子大きく関わると考えられることから(Barzilai and Melamed, 2003; Surmeier et al., 2010)、老化に伴い神経系においてどのような変化が生じるか理解することが重要である。

1.2 加齢に伴う神経回路の変化と神経機能低下

現在までに、加齢に伴う神経回路の変化と神経機能を結びつける研究が多くなされている。その例として、哺乳類あるいはショウジョウバエを用いた加齢に伴う記憶学習能力低下のメカニズムに迫る研究が挙げられる(Barnes, 1994) (Tonoki and Davis, 2012)。これらの研究の成果により、加齢に伴う神経可塑性の低下や神経活動の低下が神経機能の低下に関わることが明らかになっている(Burke and Barnes, 2006)。

また神経細胞死と神経機能の低下を結びつける研究もなされている。例として、ドーパミン作動性ニューロンの研究が挙げられる。黒質緻密部のドーパミン作動性ニューロンは加齢に伴い減少することが知られ、孤発性パーキンソン病患者においては特に顕著に減少する(McGeer et al., 1988)。孤発性パーキンソン病におけるドーパミン作動性ニューロン細胞死の原因については多くの研究がなされており、現在特定されていない遺伝的な要因と環境要因が複合的に関与していると考えられている(Barzilai and Melamed, 2003; Surmeier et al., 2010)。このように神経変性疾患では、しばしば特定の神経の細胞死により重篤な症状が引き起こされることから(Mattson, 2000)、その他の正常な老化に伴う神経機能低下も同じ枠組みによって引き起こされる可能性が考えられる。従って、正常な老化に伴いどの神経細胞が、どのようなメカニズムによって神経変性及び細胞死を示し、行動にどのような影響を与えるかを解析することは、正常老化に伴う神経機能の低下を理解する上で非常に重要である。しかし、いくつかの脳の領域で加齢に伴う細胞死について記述がなされているものの、正常老化に伴う神経細胞死と神経機能の低下が結びつけられている報告はない(Burke and Barnes, 2006; Pollack et al., 2002)。

1.3 ショウジョウバエ Or42b 神経の加齢に伴う細胞死

所属研究室におけるショウジョウバエを用いた先行研究により、加齢に伴いカスパーゼが高頻度に活性化する神経細胞を同定し、更にその神経細胞の加齢に伴う細胞死が加齢に伴う個体の行動の変化に関与することを示した(Chihara et al., 2014)。以下にカスパーゼ活性化を示す神経細胞同定までの経緯を記載する。

先行研究ではモデル生物としてショウジョウバエを用いている。ショウジョウバエを用いる利点として遺伝資源が充実している、寿命が比較的短く迅速に研究を進めることが出来る等が挙げられる。また、哺乳類と同様に、カスパーゼと呼ばれるシステインプロテアーゼによって細胞死が実行することが知られている(図 1a) (Riedl and Shi, 2004)。このことからショウジョウバエを用いて明らかになったことがヒトを含む哺乳類においても役に立つことが期待される。

ショウジョウバエ成虫脳におけるカスパーゼ活性化部位の同定のためには、膜結合型プローブ mCD8::PARP::Venus を用いた(Williams et al., 2006)。mCD8::PARP::Venus は、マウス CD8 (mCD8)の細胞外膜貫通部位と蛍光蛋白質 Venus が、ヒト Poly ADP ribose polymerase (PARP)中のカスパーゼ 3 切断部位を含む配列で結合された構造を持つ。活性化型カスパーゼは mCD8::PARP::Venus を PARP 内の切断配列において切断し、切断によって生じたネオエピトープは抗 cleaved PARP 抗体によって特異的に認識される。この cleaved PARP シグナル (cPARP シグナル) を観察することにより、細胞内のカスパーゼ活性化をモニターできるようになる(図 1b)。mCD8::PARP::Venus は遺伝子にコードされたプローブであるため、Gal4/UAS システムを用いてその発現を組織特異的に行うことにより、特定の組織/細胞におけるカスパーゼ活性の検出が可能になる。

当研究室における先行研究では、この mCD8::PARP::Venus プローブを用いてショウジョウバエ成体脳においてカスパーゼ活性を示すいくつかの神経細胞を同定し、中でも嗅覚受容神経において高頻度にカスパーゼ活性化が観察されることを見出した。嗅覚受容神経 (olfactory receptor neuron, ORN) はショウジョウバエ嗅覚系の一次ニューロンであり、嗅覚器官である触角(antenna)またはマキシラリーパルプに存在し、嗅覚刺激を受容する (図 2a)。この神経は脳内の触角葉と呼ばれる部位に軸索を投射し、二次ニューロンである投射神経の樹状突起とシナプスを形成して、嗅覚情報をより高次の嗅覚中枢に伝達する。触角葉は約 50 個の糸球体から構成されており、嗅覚受容神経はそのサブタイプごとに特定の糸球体に軸索を投射する。各糸球体は、その大きさ、形、相対的な位置関係などによって判別することが可能である。また嗅覚受容神経はサブタイプごとに特定の種類の嗅覚受容体 (odorant receptor, OR) を発現しており、この嗅覚受容体によって応答する嗅覚刺激の特異性が決定されている。

どの嗅覚受容神経サブタイプにおいてカスパーゼの活性化が見られるか調べた結果、Or42b 神経において高い頻度でカスパーゼの活性化が観察されることが分った(図 2b)。

このカスパーゼの活性化により、Or42b 神経の数が失われることも明らかとなった。Or42b 神経はショウジョウバエの餌となる酵母の匂いによって刺激されることが知られている(Stökl et al., 2010)。また Or42b 神経は誘引行動に必要十分であることが知られている(Semmelhack and Wang, 2009)。これらの知見と Or42b 神経の加齢に伴う消失から予想される通り、老齢の個体では Or42b 神経を刺激する匂い物質への誘引行動が低下する。さらに、Or42b 神経を含む嗅覚受容神経において、カスパーゼ活性化による細胞死を抑制する因子である p35 (図 1a)を発現することにより、加齢に伴う誘引行動の低下が抑制される。従ってこの研究は、加齢に伴う特定の神経の細胞死と、加齢に伴う個体の行動の変化と結びつける例となった。

1.4 加齢に伴う神経細胞死の機構

では Or42b 神経の細胞死はどのようなメカニズムによって起こると考えられるだろうか。酸化ストレス、DNA 損傷、タンパク質の凝集等は加齢に伴い蓄積することが知られ、神経変性疾患に関与することが知られている(Mattson and Magnus, 2006; Yankner et al., 2008)。また近年では、免疫系の亢進(Heneka et al., 2014; Lucin and Wyss-Coray, 2009)、神経活動(Dong et al., 2009; Xanthos and Sandkuhler, 2014)も神経変性疾患に関わりうるものが指摘されている。このように神経変性疾患に関与する現象は数多く知られており、Or42b 神経の細胞死誘導に関わり得る現象は多岐にわたる。本研究では免疫系の亢進、神経活動、タンパク質恒常性維持機構について検討を行ったのでこれらについて説明する。

免疫系は、外来生物の感染に対する宿主の生体防御反応である。ショウジョウバエの自然免疫、特に体液性免疫は、Toll 経路と Imd 経路の 2 つの主要な経路によって制御されている(図 3)。これらの経路が細菌の構成物質によって活性化されると、抗菌ペプチド(Antimicrobial peptide, AMP)の発現が上昇する(Buchon et al., 2014)。AMP は細菌特異的に作用するタンパク質であり、細菌の細胞膜に穴を開けることにより抗菌作用を示すことが知られている(Matsuzaki, 2009)。また感染のみならず、加齢に伴い自然免疫応答が亢進し AMP の発現が上昇することが知られている(Pletcher et al., 2002) (Chen et al., 2014b)。近年では、変異体を用いた解析により自然免疫系亢進と神経変性の関係性について検討がなされている。*ataxia telangiectasia mutated (ATM* または *telomere fusion, tefu*) は、DNA 損傷の認識修復に関わる遺伝子であるが(Rong, 2008)、この変異体で若齢における自然免疫応答の亢進と神経変性が観察される(Petersen et al., 2012)。別の遺伝子、*Dnr1* は Imd 経路の構成因子、*Dredd* のネガティブレギュレーターであり、*Dnr1* 変異体では若齢においても自然免疫応答が亢進する(Guntermann et al., 2009)。この変異体でも神経変性が若齢においても観察されることから、自然免疫応答の亢進と神経変性の関与が指摘されている(Cao et al., 2013)。この報告ではまた、神経細胞あるいはグリア細胞に

における AMP の発現によって、若齢個体で神経変性を誘導できることを示している。このように、加齢に伴い自然免疫応答が亢進すること、そして自然免疫の亢進する変異体において神経変性が亢進することが独立に示されている。これらのことから、加齢に伴う神経変性が自然免疫応答の亢進によって誘導されることが予想されるが、そのような報告はないのが現状である。

ショウジョウバエは酵母の含まれている餌を用いて維持されていること(2.1.3 「ショウジョウバエの老化」及び2.15 「ショウジョウバエ餌の組成」を参照)、そして Or42b 神経は酵母の匂いによって刺激されることから(Stökl et al., 2010)、Or42b 神経は実験環境下において常に活性化された状態にあると考えられる。このことから Or42b 神経の細胞死に神経活動が関わるのではないかと考えた。神経活動は、神経細胞が活性化された時に生じる膜電位の変化であり、神経細胞の機能において重要なものである。神経細胞が過剰に活性化されると、興奮毒性(excitotoxicity)と呼ばれる細胞毒性を示し、神経細胞死を誘導することが知られている(Wang and Qin, 2010)。ショウジョウバエにおいても神経活動が亢進する変異体において神経変性が亢進することが知られている(Fergestad et al., 2006)。最近では、神経活動によるストレスの蓄積によって誘導される炎症が神経変性に関わる可能性についても指摘されている(Xanthos and Sandkuhler, 2014)。また、神経活動の低下もまた神経変性に関わることが知られている。Orco (または Or83b)はショウジョウバエの多くの嗅覚受容神経において発現する嗅覚受容体の共受容体であり、Orco 変異体の嗅覚受容神経では神経活動が失われる(Larsson et al., 2004)。この Orco 変異体の嗅覚受容神経は神経変性を示し、神経活動を亢進することによって回復することが知られている(Chiang et al., 2009)。このように、過剰な神経活動、神経活動によるストレスの蓄積、神経活動の消失によって神経変性が誘導されることが知られているが、このような現象が実際に正常老化において生じるかについては明らかにされていない。

神経変性疾患であるアルツハイマー病ではアミロイドβタンパクの凝集、パーキンソン病ではαシヌクレインの凝集、ハンチントン病ではハンチンチン(ポリグルタミン)の凝集が観察される(Mattson and Magnus, 2006)。またショウジョウバエにおける神経変性疾患モデルの多くは異常タンパク質の発現によるものである(Hirth, 2010; Sang and Jackson, 2005)。これらのことから異常タンパク質の蓄積と神経変性の間に大きな関わりがあることが分る。タンパク質恒常性維持機構は異常タンパク質の蓄積を防ぐ細胞内機構であり、この機構の破綻は神経変性を誘導し、この機構の亢進は神経変性を防ぐことが知られている(Labbadia and Morimoto, 2015)。ショウジョウバエを用いた研究でも、タンパク質恒常性維持機構と神経変性の関わりについて明らかとなってきた。プロテアソーム系はユビキチン化されたタンパク質を分解する機構であるが、加齢に伴い低下することが知られている。プロテアソームの構成因子の一つである Rpn11 の過剰発現によって、加齢に伴うプロテアソーム活性の低下が抑制されること、そしてポリグルタ

ミン過剰発現による神経変性が抑制されることが明らかとなっている(Tonoki et al., 2009)。また小胞体関連分解(Endoplasmic reticulum-associated degradation, ERAD)は小胞体ストレス応答の一種であり、小胞体においてミスフォールドしたタンパク質を認識し、このミスフォールドしたタンパク質のユビキチン化を行う機構である(Vembar and Brodsky, 2008)。ERAD 経路の破綻により神経変性がおきることが知られている(Hetz and Mollereau, 2014)。ショウジョウバエを用いた研究では、異常タンパク質の過剰発現によって引き起こされる retinal degeneration が、ERAD 経路を亢進する操作を行うことにより抑制されることが明らかとなっている(Kang and Ryoo, 2009)。以上のことからショウジョウバエにおいてもタンパク質恒常性維持機構は神経変性に関与することが分る。

1.5 本研究の概要

私は本学修士課程において、Or42b 神経の細胞死機構の解明にアプローチするために触角における加齢に伴う遺伝子発現の変化を調べた。その結果、加齢に伴い触角でショウジョウバエの主要な自然免疫経路が活性化することを明らかにした。そこで本研究では Or42b 神経の細胞死に自然免疫経路の活性化が関わるか調べた。自然免疫応答に関わる遺伝子の変異体を用いた解析の結果、加齢に伴う自然免疫応答の亢進を抑制することにより Or42b 神経の加齢に伴う細胞死が抑制されることを明らかにした。また Or42b 神経やそれ以外の細胞における自然免疫応答の操作を行った結果、Or42b 神経の加齢に伴う細胞死は Or42b 神経自身ではなく、Or42b 神経以外の細胞における自然免疫応答経路の活性化によって誘導されることを明らかにした。さらに加齢に伴い低下する Or42b 神経を介した誘引行動が、自然免疫応答亢進の抑制によりレスキューされることが明らかとなった。自然免疫応答の亢進が、正常老化において特定の神経細胞の細胞死を誘導し、加齢に伴う行動の変化にも関わる例はこれまで知られていないことから、本研究は正常老化に伴う神経機能の低下のメカニズムの一端を明らかにしたと言える。また、本研究では神経活動や嗅覚受容体の発現、そしてタンパク質恒常性維持などの観点からも Or42b 神経細胞死メカニズムの解明についてアプローチしており、その結果についても議論したい。

2 実験材料と方法

2.1 キイロシヨウジヨウバエ系統及び飼育

2.1.1 キイロシヨウジヨウバエ系統

実験には以下の系統を用いた。実験に用いる際には、全て X chromosome が w^{1118} の系統を用いた。

2.1.1.1 変異体系統

w^{1118} (X)

J4 (II) (Meng et al., 1999)

Rel^{E20} (III) (Hedengren et al., 1999)

Toll^{10B} (III) (Erdelyi and Szabad, 1989)

Orco² (*Or83b²* と同じ) (III) (Larsson et al., 2004)

Or42b^{EY14886} (II) (Bellen et al., 2004)

Bc/ CyO[Δ2-3] (II) (京都ストックセンターより分与)

Or42b¹⁹ (II) (本研究)

Or42b²³ (II) (本研究)

Or42b^{attP} (II) (本研究)

Or10a^{attP} (X) (本研究)

Or47a^{attP} (II) (本研究)

Or42b^{Or10a} (II) (本研究)

Or42b^{Or47a} (II) (本研究)

Or42b^{Or10a} (II) (本研究)

Or10a^{Or42b} (X) (本研究)

Or47a^{Or42b} (II) (本研究)

2.1.1.2 Gal4 系統

Or42b-Gal4 (II) (Fishilevich and Vosshall, 2005)

FB-Gal4 (II) (Gronke et al., 2003)

r4-Gal4 (III) (Lee and Park, 2004)

w; Or10a-Gal4 (II) (Fishilevich and Vosshall, 2005)

2.1.1.3 UAS 系統

UAS-CD8::PARP::Venus (III) (Williams et al., 2006)

UAS-H2B::ECFP (III) (Shu Kondo より分与)

UAS-Drosocin (III) (Tzou et al., 2002)
UAS-Sp^{act} (II) (Ligoxygakis et al., 2002)
UAS-Toll^{10B} (II) (Hu et al., 2004)
UAS-Toll-RNAi (P{TRiP.GL00474}attP2) (III) (Bloomington Stock Center より分与)
UAS-MyD88-RNAi (P{TRiP.HMS00183}attP2) (III) (Bloomington Stock Center より分与)
UAS-Imd-RNAi (P{TRiP.HMS00253}attP2) (III) (Bloomington Stock Center より分与)
UAS-GFP (III) (Bloomington Stock Center より分与)
UAS-miRNA-Or42b#(1 - 10) (II または III) (本研究)
UAS-shaker-DN (II) (Mosca et al., 2005)
UAS-eag-DN (II) (Broughton et al., 2004)
UAS-rpr (II) (Zhou et al., 2009)
UAS-p35 (II) (Bruce Hay より分与)
UAS-G-CaMP 3.5 (II) (Richard Axel より分与)
UAS-G-CaMP 3.5 (III) (Richard Axel より分与)

2.1.1.4 レポーター系統

Drosocin-GFP (II) (Tzou et al., 2000)

2.1.2 飼育条件

ショウジョウバエは餌の入ったバイアルに入れ、25°C、湿度 60%、明暗 12 時間:12 時間 12 時間サイクルに保ったインキュベータ中で通常餌を用いて飼育・交配し、常温でハンドリングした。また特記しない限り、実験には オスの個体を用いて実験を行った。餌の組成は 2.15 「餌の組成」に記載した。

2.1.3 老化

ショウジョウバエは餌の入ったバイアルに入れ、25°C、湿度 60%、明暗 12 時間:12 時間のサイクルを保ったインキュベータ内で維持した。餌は週に 2 回新しいものにかえた。餌は通常コーンミールを含んだ一般的な餌を用いた。但し、食事制限の実験を行った際には非食餌制限餌(15% SY, sugar and yeast)、食餌制限餌(5% SY)を用いた。餌の組成は 2.15 「餌の組成」に記載した。

匂い刺激を行いながらの老化は酵母の場合、ショウジョウバエを維持するためのバイアルに用いるスポンジ栓にドライイースト (オリエンタル酵母) を水で練ったものを塗り込み、メッシュ生地で覆い、このスポンジ栓で栓をしたバイアルにショウジョウバエを入れ老化させた。Methyl salicylate の場合、約 30 cm × 30 cm × 8 cm (縦×横×高さ) のプラスチック容器内に Methyl salicylate (Sigma-Aldrich, M6752)を充満させ、その中に

バイアルごとショウジョウバエを入れ老化を行った。

2.2 遺伝子組み換えショウジョウバエ系統の作製

以下に示す通りプラスミドを作製し、ショウジョウバエ染色体に導入した遺伝子組み換え系統を BestGene Inc. (Chino Hills, CA, USA) で作製した。

2.2.1 UAS-miRNA-Or42b 系統の作製

Or42b 遺伝子から 22 塩基 (5'-TCA CTC CAG GTG TGC ATT AAT G-3') を選び、その 22 塩基を一部変換した配列とその相補的な配列を含む約 250 塩基からなる DNA 配列を設計した(Chen et al., 2007)。この DNA 配列を 2 つ含む DNA フラグメントを得、さらにこのフラグメントを *NotI*、*EcoRI* で切断し *pUAST* ベクターに導入した。

2.2.2 *Or42b^{attP}*、*Or10a^{attP}*、*Or47a^{attP}* 系統の作製

CRISPR/Cas9 システムを用いた遺伝子ターゲティング技術を利用し、嗅覚受容体遺伝子(*Or42b*, *Or10a*, *Or47a*)の Coding Sequence (CDS)を欠損し、その欠損させた領域に attP 配列の挿入を行った。そのためにターゲット部位への相補的な配列を持つ *pHD-DsRed-attP* プラスミド(Gratz et al., 2014)を一種類、ターゲットを特異的に切断するための short guide RNA を発現する *U6b-sgRNA* プラスミド(Ren et al., 2013)を 2 種類の計 3 種類のプラスミドをそれぞれの標的遺伝子について作製した。

pHD-DsRed-attP プラスミドを *NotI* で切断し、PCR によって増幅した嗅覚受容体遺伝子 CDS 5'側の相補的配列を挿入した。さらにこのプラスミドを *SpeI* で切断し、PCR によって増幅した嗅覚受容体遺伝子 CDS 3'側の相補的配列を挿入した。この時の相補的配列はショウジョウバエゲノム DNA を鋳型として得た。*U6b-sgRNA* プラスミドは、元のプラスミドを *BbsI* で切断し、切断サイトに対応する DNA オリゴを挿入することによって作製した。

Or42b^{attP} を作製するために、*pHD-DsRed-attP-Or42b*、*U6b-sgRNA-Or42b#1*、*U6b-sgRNA-Or42b#2* を作製した。*Or10a^{attP}* を作製するために、*pHD-DsRed-attP-Or10a*、*U6b-sgRNA-Or10a#1*、*U6b-sgRNA-Or10a#2* を作製した。*Or47a^{attP}* を作製するために *pHD-DsRed-attP-Or47a*、*U6b-sgRNA-Or47a#1*、*U6b-sgRNA-Or47a#2* を作製した。作製に使用したプライマーおよび DNA オリゴの配列は 2.16「使用したプライマーおよびオリゴ DNA 配列」に記載した。

2.2.3 *Or42b^{Or10a}*、*Or42b^{Or47a}*、*Or10a^{Or42b}*、*Or47a^{Or42b}* の作製

Or42b^{attP}、*Or10a^{attP}*、*Or47a^{attP}* 系統に、それぞれの嗅覚受容体遺伝子の cDNA 配列を挿入した *RIV^{white}* (Baena-Lopez et al., 2013)を導入することにより *Or42b^{Or10a}*、*Or42b^{Or47a}*、

Or10a^{Or42b}、*Or47a^{Or42b}* 系統を作製した。

Or42b^{Or10a} を作製するために、触角の cDNA から *Or10a* を PCR によって増幅し、*EcoRI* で切断した *RIV^{white}* に挿入し *RIV^{white}-Or10a* を作製した。

Or42b^{Or47a} を作製するために、触角の cDNA から *Or47a* を PCR によって増幅し、*EcoRI* で切断した *RIV^{white}* に挿入し *RIV^{white}-Or47a* を作製した。

Or10a^{Or42b}、*Or47a^{Or42b}* を作製するために、触角の cDNA から *Or42b* を PCR によって増幅し、*EcoRI* で切断した *RIV^{white}* に挿入し *RIV^{white}-Or42b* を作製した。

作製に使用したプライマーおよび DNA オリゴの配列は 2. 16 「使用したプライマーおよびオリゴ DNA 配列」に記載した。

2. 3 *Or42b* 変異体 (*Or42b¹⁹*, *Or42b²³*) の作製

2. 3. 1 *Or42b^{EY14886}* 変異体からのトランスポゾン P 因子の不正確切り出し

Or42^{EY14886} 系統と *y, w; Bc/CyO[Δ2-3]* 系統を交配し、その子孫を一個体ずつ系統化した。

2. 3. 2 ゲノム PCR による *Or42b* 変異体の遺伝子型の決定

一つの PCR チューブに一個体の成虫ショウジョウバエを回収し、ゲノム DNA の抽出を行うまで -20°C で保存した。Squishing buffer (10 mM Tris-HCl (1000 mM Tris-HCl (Tris (WAKO, 016-18313), pH 8.0 by HCl (WAKO, 080-01066)) を希釈), 1 mM EDTA (Dojindo, 345-01865), 25mM NaCl (WAKO, 191-01665), 200 μg/mL Proteinase K (Nakarai tesque, 29442-14)) を 50 μL 加え、黄チップを用いて約 10 秒間ショウジョウバエをすりつぶした。その後 37°C で 30 分、94°C で 2 分インキュベートし、ゲノム DNA 抽出液とした。

ゲノム DNA 抽出液 1 μL、ExTaq (TaKaRa, RR001A) 0.125 μL、10×Buffer 2.5 μL (ExTaq 付属)、2.5 mM dNTP 2 μL (ExTaq 付属)、10 μM の Forward、Reverse プライマー混合液 5 μL、滅菌蒸留水 12.5 μL を混ぜ、PCR (94°C 5 分の後、94°C 30 秒、62°C 30 秒、72°C 45 秒または 7 分を 35 サイクル、72°C 5 分) を行った。その後 10×Loading buffer (TaKaRa, 9157) 0.5 μL を PCR 済み試料 5 μL に加え、アガロースゲル電気泳動を行った。この時 PCR 済み試料とともに 1 Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen, 10787-018) も同時にアガロースゲル電気泳動を行った。その後エチジウムブロマイド (Nakarai tesque, 146-03) を用いてゲルを染色し、UV トランスイルミネーターと CCD カメラを用いて撮影した。使用したプライマーは 2. 16 「使用したプライマーおよびオリゴ DNA 配列」に記載した。

2. 3. 3 RT-PCR による *Or42b* 変異体の評価

ショウジョウバエ成虫をエッペンチューブに 10 匹入れ、直ちに液体窒素を用いて凍結した。試料は RNA 精製に用いるまで -80°C で保存した。

RNAの精製は以下の手順で行った。試料の入った破砕チューブに TRIzol (Invitrogen, 15596018) 200 μ L 加えペレットミキサー (Treff Lab, 96.07339.9.03) を用いて試料の破砕を行った。TRIzol 800 μ L 加え、破砕チューブ内の試料を 1.5 mL チューブへ移し、その後クロロホルム (WAKO, 038-02606)、2-プロパノール (Nakarai tesque, 29113-53)、エタノール (WAKO, 057-00451) を用いて、TRIzol 製造元の説明書に従い Total RNA の精製を行った。Total RNA の溶解には Diethylpyrocarbonate (DEPC, Nakarai tesque, 12311-86) 処理水 50 μ L を用いた。

Reverse Transcription (RT, 逆転写) は次の通り行った。Total RNA 1 μ g, 0.1 M DTT 2 μ L (M-MLV Reverse Transcriptase 付属)、5 \times First-Strand buffer 4 μ L (M-MLV Reverse Transcriptase 付属)、500 μ g/mL Oligo (dT)₁₂₋₁₈ primers (Invitrogen, 18418-012) 1 μ L、10 mM dNTP mix (Invitrogen, 18427-013) 1 μ L を混ぜ、DEPC 処理済水で 18.9 μ L となるように調製した。この試料を 65°C 5 分反応し、氷上で M-MLV Reverse Transcriptase (Invitrogen, 28025-013) 0.5 μ L、RNasin Ribonuclease inhibitors (Promega, N251A) 0.6 μ L を加え 37°C で 90 分反応させ、cDNA を合成した。cDNA は使用するまで -20°C で保存した。

cDNA 1 μ L、ExTaq (TaKaRa, RR001A) 0.125 μ L、10 \times Buffer 2.5 μ L (ExTaq 付属)、2.5 mM dNTP (ExTaq 付属) 2 μ L、10 μ M の Forward、Reverse プライマー混合液 5 μ L、滅菌蒸留水 12.5 μ L を混ぜ、PCR (94°C 5 分の後、94°C 30 秒、62°C 30 秒、72°C 45 秒を 35 サイクル、72°C 5 分) を行った。その後 10 \times Loading buffer (TaKaRa, 9157) 0.5 μ L を PCR 済み試料 5 μ L に加え、アガロースゲル電気泳動を行った。この時 PCR 済み試料とともに 1 Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen, 10787-018) も同時にアガロースゲル電気泳動を行った。その後エチジウムブロマイド (Nakarai tesque, 146-03) を用いてゲルを染色し、UV トランスイルミネーターと CCD カメラを用いて撮影した。使用したプライマーは 2.16 「使用したプライマーおよびオリゴ DNA 配列」に記載した。

2.4 寿命の測定

図 18 で用いた *Orco*²、*Or42b-Gal4*、*UAS-rpr*、*UAS-p35* の系統は、すべて *w¹¹¹⁸* を用いて 8 回バッククロスを行うことにより、遺伝的背景を統一している。ショウジョウバエは羽化後 48 時間以内に二酸化炭素により麻酔し、餌の入ったバイアルに 20 匹ずつ入れた。維持は 25°C、湿度 60%、明暗 12 時間:12 時間のサイクルを保ったインキュベーター内で行った。3-4 日に一回新しい餌に移す際、死んだショウジョウバエの数を記録することにより寿命を測定した。得られたデータは Prism (GraphPad) を用いて統計処理を行った。

2.5 定量的 RT-PCR による遺伝子発現解析

2.5.1 触角からの RNA 精製

実体顕微鏡下でショウジョウバエ頭部から触角を切り離し、空のエッペンドルフチューブ (丸底) に 20 個入れ、直ちに液体窒素を用いて凍結した。試料は RNA 精製に用いるまで-80°C で保存した。

RNA の精製は以下の手順で行った。ペレットミキサー(Treff Lab, 96.07339.9.03), QIAshredder (QIAGEN, 79654)を用いて試料を破碎した。破碎した試料を触角 40 個/サンプルとなる様に調節し、RNeasy Micro Kit (QIAGEN, 74004) を用いて製造元の説明書に従い Total RNA を精製した。RNA の溶出には RNase free water (RNeasy Micro Kit 付属) 14 μ L を用いた。逆転写反応に用いるまで RNA は-80°C で保存した。

2.5.2 全身からの RNA 精製

ショウジョウバエ成虫を破碎用チューブ(安井機械, ST-0250F-0) に 10 匹入れ、直ちに液体窒素を用いて凍結した。試料は RNA 精製に用いるまで-80°C で保存した。

RNA の精製は以下の手順で行った。試料の入った破碎チューブに氷冷したメタルコーン (安井機械, MC0214R) 及び TRIzol (Invitrogen, 15596018) 200 μ L を加えマルチビーズショッカー (安井機械, MB755U) を用いて (1.5K rpm 15 sec + off time 5 sec) を 3 サイクル行い、試料を破碎した。スピンドウン後、TRIzol 800 μ L 加え、破碎チューブ内の試料を 1.5 mL チューブへ移し、その後クロロホルム (WAKO, 038-02606)、2-プロパノール (Nakarai tesque, 29113-53)、エタノール (WAKO, 057-00451) を用いて、TRIzol 製造元の説明書に従い Total RNA の精製を行った。RNA の溶解には RNase free water (RNeasy Micro Kit 付属) 40 μ L を用いた。その後、NanoDrop (Thermo Scientific, NanoDrop 2000c)を用いて RNA 濃度を測定し、1 μ g を用いて次の逆転写反応を行った。逆転写反応に用いるまで RNA は-80°C で保存した。

2.5.3 逆転写反応

ゲノム DNA の分解及び逆転写反応には PrimeScript RT reagent Kit with gDNA Eraser (Perfect Real Time) (TaKaRa, RR047A)を用いた。RNA 溶液 7 μ L に 5 \times gDNA Eraser Buffer(PrimeScript RT reagent Kit with gDNA Eraser (Perfect Real Time)付属)を 2 μ L、gDNA Eraser (PrimeScript RT reagent Kit with gDNA Eraser (Perfect Real Time)付属)を 1 μ L 添加し、42°C で 2 分処理することにより RNA 溶液中に含まれるゲノム DNA の分解を行った。試料に 5 \times PrimeScript Buffer 2 (for Real Time) (PrimeScript RT reagent Kit with gDNA Eraser (Perfect Real Time)付属)を 4 μ L、PrimeScript RT Enzyme Mix I (PrimeScript RT reagent Kit with gDNA Eraser (Perfect Real Time)付属)を 1 μ L、RT Primer Mix を 1 μ L、RNase Free water (RNeasy Micro Kit 付属)を 4 μ L 添加し、37°C で 15 分、85°C で 5 秒処理することにより cDNA 試料を得た。cDNA 試料は定量的 PCR に用いるまで-20°C で保存した。

2.5.4 定量的 PCR

SYBR Green I を用いたインターカレータ法によって実施した。LightCycler 480 multiwell plate 96 white (Roche Applied Science, 04729692001) 中で cDNA 試料を 1 μ L、SYBR Premix Ex Taq II (Tli RNaseH Plus) (TaKaRa, RR820) を 10 μ L、Forward and Reverse プライマー混合溶液 (10 μ M each) を 0.8 μ L、滅菌蒸留水を 8.2 μ L 混合した。次に LightCycler 480 (Roche Applied Science) を用いてターゲット遺伝子の発現量を調べた。PCR 反応は 95°C で 30 秒、(95 °C で 5 秒、55 °C で 25 秒) を 45 サイクルで行い、各サイクルの終了時に蛍光を測定した。また、反応終了時に融解曲線の測定を行った。得られた各試料のデータは、使用プライマーによる増幅産物を段階希釈して作製した検量線と、各試料の内部標準遺伝子(*rpl32*) の発現データを元に相対定量を行った。これらの解析は LightCycler software (Roche Applied Science) を用いて行った。Prism (GraphPad) を用いて得られたデータの統計解析を行った。使用したプライマーとプライマーの設計方法は 2.16 「使用したプライマーおよびオリゴ DNA 配列」に記載した。

2.6 ショウジョウバエ成虫脳中のカスパーゼ活性の観察

2.6.1 成虫脳の解剖

0.3% Triton X-100 (Nakarai tesque, 35501-15)/ PB (PBT) 中でショウジョウバエ成虫脳を摘出し、氷冷した 4% paraformaldehyde (Merck, 104005)/ PBT 中に静置した。

2.6.2 免疫組織化学

4% PFA/ PBT で室温 20 分間固定した。その後 PBT で、室温 20 分間 3 回洗浄した。更に 5% Normal Goat Serum (NGS)/ PBT で室温 60 分間ブロッキングし、PBT で適当な濃度に希釈した一次抗体溶液を加え、4°C で一晩抗体反応させた。その後、PBT で室温 20 分間 3 回洗浄し、PBT で適当な濃度に希釈した二次抗体溶液を加え、遮光し 4°C で一晩反応させた。反応後、PBT で室温 20 分間 3 回洗浄し、SlowFade Gold antifade reagent (Invitrogen, S36936) 50 μ L を加え脳が沈むまで静置した。使用した抗体、使用希釈倍率は 2.17 「用いた抗体」に記載した。

2.6.3 組織の観察

TCS-SP5 共焦点顕微鏡 (Leica)を使用して組織を観察し、共焦点画像を取得した。

2.7 ショウジョウバエ触角中における蛍光タンパク質の観察

2.7.1 触角のマウント・観察

PBT 中でショウジョウバエの頭部から触角を切り離し、Focus ClearTM (CeExplorer

Labs Co., FC-101)とともにスライドガラス上にマウントした。マウント後 15 分以内に TCS-SP5 共焦点顕微鏡 (Leica)を使用して組織を観察し、共焦点画像を取得した。

2.7.2 触角中の嗅覚受容体神経の細胞体数測定

UAS-H2B::ECFP 系統を用いて触角中の嗅覚受容体神経の細胞体数を測定する場合には以下の手順で行った。取得した共焦点画像から、ImageJ 1.46r (<http://rsb.info.nih.gov/ij>) ソフトウェアの Cell Counter プラグインを用いて、細胞数を測定した。統計解析には、Prism (GraphPad) を用いた。

2.8 ショウジョウバエ成虫の大腸菌感染

2.8.1 大腸菌懸濁液の作製

大腸菌 (DH5 α) を 5 mL の LB 培地 (Invitrogen, 12780-052) で一晩 37°C で培養し、遠心分離 (8300 G \times 5 分, 4°C) を行い、上清を捨て、500 μ L の PBS に懸濁し大腸菌懸濁液とした。

2.8.2 針の作製

ガラスキャピラリー (Narishige, GD-01) を、プーラー (Narishige, PC-10) を用いて、重り 3 個 (25 g \times 2、100 g \times 1 の計 150 g)、ヒーター66.5°C、一段引きの条件で引き延ばし作製した。

2.8.3 感染

感染実験には特記しない限りオスの成虫 5 日齢を用いた。針を 70%エタノールで消毒した後に大腸菌懸濁液につけ、CO₂ 麻酔下のショウジョウバエ腹部表皮に刺した。感染実験は常温で行った後、25°C のインキュベータで維持した。感染 8 時間後に回収を行い、次の実験に用いた。

2.9 ショウジョウバエ触角の免疫組織化学

2.9.1 触角の凍結切片の作製

ショウジョウバエを二酸化炭素によって麻酔し、頭を固定した状態で O.C.T compound (Tissue-Tek, 4583) によってみたされた包埋皿 (クリオモルドー号, Tissue-Tek, 4565) に入れ、直ちにドライアイスを用いて凍結した。凍結した試料は、切片を作製するまで -80°C に保存した。試料は凍結ミクロトーム (Leica, CM3050S) により 14 μ m に薄切し、MAS コートスライドガラス (松浪ガラス, S9441) に張付ののち、室温で乾燥させた。

2.9.2 免疫組織化学

凍結切片を PBT により室温で 2 回再水和した。ついで 4% paraformaldehyde (Merck, 104005)/PBT で室温 30 分間固定し、PBT で室温 5 分 3 回洗浄した。更に 5% NGS/PBT で室温 60 分ブロッキングして、それぞれの実験において PBT で適当な濃度に希釈した一次抗体溶液と、4°C で一晩抗体反応させた。その後 PBT で室温 10 分間 3 回洗浄し、PBT で適当な濃度に希釈した二次抗体及び Hoechst 溶液と、遮光して室温で 2 時間反応させた反応後、PBT で室温 10 分間 3 回洗浄し、SlowFade Gold antifade reagent とともに封入した。使用した抗体、使用希釈倍率は 2.17「使用した抗体」に記載した。

2.9.3 組織の観察

TCS-SP8 共焦点顕微鏡 (Leica) を使用して組織を観察し共焦点画像を取得した。

2.10 ショウジョウバエ成虫脂肪体中における蛍光タンパク質の観察

PBS 内で消化管組織等を取り除くことにより腹部表皮組織の単離を行った。直ちに蛍光顕微鏡 (Leica, CTR5000) と CCD カメラ (Leica, DC300FX) を用いて組織の観察と蛍光画像の取得を行った。

2.11 ショウジョウバエ三齢幼虫の脂肪体の免疫組織化学

2.11.1 脂肪体の摘出

PBS 中でショウジョウバエ三齢幼虫から脂肪体を摘出し、氷冷した PBS 中に静置した。

2.11.2 免疫化学染色

4% paraformaldehyde (Merck, 104005)/PBS で室温 25 分間固定した。その後 PBT で室温 5 分間 3 回洗浄した。更に 5% NGS / PBT で室温 60 分間ブロッキングし、PBT で適当な濃度に希釈した一次抗体溶液を加え、4°C で一晩抗体反応させた。その後、PBT で室温 5 分間 5 回洗浄し、PBT で適当な濃度に希釈した二次抗体溶液を加え、遮光し室温で 2 時間反応させた。反応後、PBT で室温 5 分間 5 回洗浄し、SlowFade Gold antifade reagent 12 μ L を加え、直ちに組織の観察を行った。使用した抗体、使用希釈倍率は 2.17「使用した抗体」に記載した。

2.11.3 組織の観察

TCS-SP8 共焦点顕微鏡 (Leica) を使用して組織を観察し、共焦点画像を取得した。

2.12 ショウジョウバエ触角における蛍光 *in situ* hybridization

2.12.1 ジゴキシゲニン標識アンチセンス RNA プローブの作製

老齡触角由来の cDNA から *Orco* cDNA あるいは *Drosomyacin* cDNA を増幅し、Target Clone -Plus- (TOYOBO, TK-201) を用いて *pTA2* vector へ導入し、*pTA2-Orco*、*pTA2-Drosocin* を作製した。*Orco*、*Drosomyacin* cDNA の増幅に用いたプライマー配列は 2.16 「使用したプライマー配列」に記載した。*pTA2-Orco* を *XbaI* で切断することによって得られる DNA 鎖 1 μg 、T7 RNA polymerase (Roche, 10881767001) 2 μL 、10 \times T7 Reaction Buffer (T7 RNA polymerase 付属) 2 μL 、DIG Labeling Mix (Roche, 11277073910) 2 μL 、RNasin Ribonuclease inhibitors (Promega, N251A) 0.5 μL を全量 20 μL で 37 $^{\circ}\text{C}$ 3 時間反応させることによりジゴキシゲニン標識 *Orco* アンチセンス RNA プローブの合成を行った。また、*pTA2-Drosomyacin* を *HindIII* で切断することによって得られる DNA 鎖 1 μg 、T3 RNA polymerase (Roche, 11031163001) 2 μL 、10 \times T3 Reaction Buffer (T3 RNA polymerase 付属) 2 μL 、DIG Labeling Mix 2 μL 、RNasin Ribonuclease inhibitors 0.5 μL を全量 20 μL で 37 $^{\circ}\text{C}$ 3 時間反応させることによりジゴキシゲニン標識 *Drosomyacin* アンチセンス RNA プローブの合成を行った。合成したジゴキシゲニン標識 RNA プローブは以下の手順に従い精製した。20 μL の反応液に 0.5 M EDTA (Dojindo, 345-01865)、5 M LiCl (Nakarai tesque, 206-24)、エタノール (WAKO, 057-00451) 75 μL を加え-80 $^{\circ}\text{C}$ で一晩放置した。その後 4 $^{\circ}\text{C}$ 15K rpm で 15 分間遠心分離を行い、上精を捨てた。さらに 70% エタノールを加え、4 $^{\circ}\text{C}$ 15K rpm で 5 分間遠心分離を行い、上精を捨て、風乾し、精製プローブとした。精製したプローブは 50% formamide (WAKO, 066-02301) に溶解し、使用するまで-80 $^{\circ}\text{C}$ で保存した。

2.12.2 Fluorescein チラミドの作製

NHS-fluorescein (Thermo Scientific, 46410) 40 mg を N,N-DMF (Sigma-Aldrich, 227056) 4 mL に溶かし、N,N-DMF 1.4 mL に triethylamine (Sigma-Aldrich, T-0886) 14 μL 、tyramine hydrochloride (Sigma-Aldrich, T2879) 14 mg を溶解したものと混合し、2 時間室温インキュベートすることにより fluorescein チラミドを作製した。これに等量のエタノール (WAKO, 057-00451) を添加し、使用するまで-20 $^{\circ}\text{C}$ で保存した。

2.12.3 蛍光 *in situ* hybridization

2.9.1 「触角の凍結切片の作製」のように作製した触角の凍結切片を 4% paraformaldehyde (Merck, 104005)/ PBS で 10 分固定し、PBS で室温 3 分 3 回洗浄した。無水酢酸 (Nakarai tesque, 00226-15) 1.25 mL を 0.1 M TEA バッファー(0.1M triethanolamine (Nakarai tesque, 34726-15), pH 8.0 by HCl (WAKO, 080-01066)) 150 mL に加えた溶液を用いて室温で 10 分間アセチル化を行った。PBS で室温 3 分 3 回洗浄し、風乾した後、ハイブリダイゼーションバッファー(50% formamide (WAKO, 066-02301), 5 \times SSC (20 \times SSC (3000mM NaCl (WAKO, 191-01665), 300 mM sodium citrate (WAKO, 191-01785),

pH7.0 by HCl (WAKO, 080-01066))を希釈), 0.5 mg/mL herring sperm DNA (Promega, D181A), 250 μ g/mL yeast tRNA (Roche, 10109495001), 5 \times Denhardt's Reagent (50 \times Denhardt's Reagent (WAKO, 043-21871)を希釈), 0.1% Tween-20 相当品 (WAKO, 166-21115), 2.5 mM EDTA (Dojindo, 345-01865), 0.25 mM CHAPS (Dojindo, 347-04723), 50 μ g/mL heparin (WAKO 081-00136)) 100 μ L を用いて 65°C で一時間プレハイブリダイゼーションを行った。次に、ジゴキシゲニン標識アンチセンス RNA プローブ 0.5 μ g 加え、85°C で 5 分処理したハイブリダイゼーションバッファー 100 μ L を用いて 65°C で一晩ハイブリダイゼーションを行った。その後 0.2 \times SSC (20 \times SSC を MilliQ 水で希釈して作製) で 65°C 20 分 3 回、さらに TN buffer (100 mM Tris-HCl (Tris (WAKO, 016-18313), pH 7.0 by HCl (WAKO, 080-01066)), 150 mM NaCl (WAKO, 191-01665))を用いて室温 5 分洗浄した後に、TNB buffer (TN Buffer に 0.05% Tween-20 相当品と 0.5% Blocking Reagent (Roche, 11096176001)を加えたもの)で室温 30 分間ブロッキングした。TNB buffer で 1000 倍に希釈した anti-DIG POD (Roche, 11207733910)と 4°C 一晩反応させた。TNT buffer (TN Buffer に 0.05% Tween-20 相当品を加えたもの)を用いて室温で 3 分 3 回洗浄し、TNB buffer を用いて 333 倍希釈した Fluorescein チラミドと室温で 30 分反応させた。TNT buffer で室温 5 分 3 回洗浄し、TNB buffer で適当な濃度に希釈した Hoechst 溶液と室温で 2 時間反応させた。TNT buffer で室温 5 分 3 回洗浄し、最後に SlowFade Gold Antifade reagent とともに封入した。使用したプローブ 使用希釈倍率は 2. 17「使用した抗体」に記載した。

2. 12. 4 組織の観察

TCS-SP8 共焦点顕微鏡 (Leica) を使用して組織を観察し、共焦点画像を取得した。

2. 13 Two-choice assay によるショウジョウバエ誘引行動の観察

2. 13. 1 測定を行うフィールド及びトラップの作製

測定を行うフィールドは 1 L ビーカー (Corning, 1000-1L) と 150 mm Dish (IWAKI, 1030-150) を用いて作製した。150 mm Dish は 35 mm 大の穴を 3 個開け、メッシュでシールドした。測定する際には 1 L ビーカーの上部を Dish で覆い、紙テープを用いて固定した。隙間はセロハンテープで塞いだ。

トラップは黄色チップ (イナオプティカ, 703Y)、スポンジ栓 (チヨダサイエンス, WCS200)、規格瓶 (37.5mL, アズワン, 5-130-03) を用いて、以下の手順に従い作製した。スポンジ栓を等分し、その中心に黄色チップを刺した。黄色チップの先は直径 3 mm 程になる様に切った。黄色チップの直径が小さい側が規格瓶の内部に入る様にスポンジ栓をしめ、トラップとした。測定の際には匂い物質を 500 μ L 入れた。

2. 13. 2 匂い物質

匂い物質として、Apple cider vinegar (ACV, 純リンゴ酢, ミツカン) を用いた。匂い物質の希釈には MilliQ 水を用いた。

2.13.3 ショウジョウバエの絶食

匂い物質による誘引効果を高める目的で、誘引行動を測定する直前までショウジョウバエを絶食させた。バイアル (チヨダサイエンス, KFB38II) に MilliQ 水で湿らせたキムワイプを一枚入れ良く水を切った。ショウジョウバエをバイアル内へ入れ、スポンジ栓を閉め、インキュベータ (25°C, 60% humidity, 明暗 12 時間:12 時間サイクル) で特筆しない限り 24 時間維持した。

2.13.4 誘引行動の測定

誘引行動の測定は暗いインキュベータ内 (25°C, 60% humidity) で行った。1 L ビーカー内に匂い物質の入ったトラップ、コントロールとして MilliQ 水の入ったトラップを配置し、1 L ビーカーの中心にショウジョウバエを 100 匹程度放し、素早く 150 mm Dish で蓋をし、インキュベータ内で静置した。2 時間後、1 L ビーカーを回収し、トラップに存在する個体の数、トラップの外に存在する個体の数を数えた。

2.13.5 Preference index の算出

以下の計算式に従って Preference index (PI) を算出した。

$$\text{Preference Index (PI)} = \frac{\# \text{ flies in odor vial} - \# \text{ flies in control vial}}{\text{total \# of flies}}$$

この際、測定中に死んだ個体は除外した。得られたデータは Prism (GraphPad) を用いて統計処理を行った。

2.14 G-CaMP を利用した匂い刺激時の嗅覚受容体神経の神経活動の観察

2.14.1 ショウジョウバエの準備

ショウジョウバエを自作の台に固定し、頭部を Wilson's saline (103 mM NaCl (WAKO, 191-01665), 3 mM KCl (WAKO, 163-03545), 5 mM TES (Dojindo, GB18), 10 mM trehalose dihydrate (WAKO, 204-18451), 10 mM glucose (WAKO, 049-31165), 7 mM sucrose (WAKO, 196-00015), 26 mM NaHCO₃ (Nakarai tesque, 31213-15), 1 mM NaH₂PO₄ (WAKO, 192-02815), 1.5 mM CaCl₂ (Nakarai tesque, 06731), 4 mM MgCl₂ (WAKO, 135-00165), pH 7.25 by HCl (WAKO, 080-01066))によってみたした。その後、頭部のクチクラ、脂肪体などを除き、触角葉を露出した。

2.14.2 匂い物質

匂い物質として、Apple cider vinegar (ACV, 純リンゴ酢, ミツカン) を用いた。匂い物質の希釈には MilliQ 水を用いた。

2.14.3 匂い刺激時の嗅覚受容体神経における G-CaMP シグナルの観察及び記録

顕微鏡 (Leica, DM6000FS) と CCD カメラ (浜松ホトニクス, ImagEM EM-CCD C9100-13) を用いて L5 フィルターのシグナルを 10 秒間観察、記録した。この際測定開始 3 秒から 5 秒の間に匂い物質の飽和蒸気をショウジョウバエ触角へ向けて送った。

2.14.4 データの解析

ImageJ ソフトウェアの Measurement 機能を用いて Region of interest (ROI) におけるシグナル強度の経時変化を抽出した。このデータから各時点における変化率 ($\Delta F/F$) の計算を行い、Prism (Graphpad) を用いてプロットした。 $\Delta F/F$ は以下の通り計算した。

$$\Delta F/F (\%) = \frac{F_i - F_0}{F_0} \times 100$$

この時 F_0 は画像取得開始時におけるシグナル強度、 F_i は各時点におけるシグナル強度を示す。

2.15 ショウジョウバエ餌の組成

通常エサ		非食餌制限		食餌制限
水 (L)	1	水 (L)	1	1
イースト (g)	40	イースト (g)	150	50
コーンミール (g)	40	スクロース (g)	150	50
グルコース (g)	100	アガー (g)	20	20
アガー (g)	8	プロピオン酸 (mL)	3	3
プロピオン酸 (mL)	3	Methyl 4-dihydroxy	20	20
パラ安息香酸メチル (10% w/v) (mL)	5	benzoate (15% w/v) (mL)		

イースト (ドライイースト, オリエンタル酵母), コーンミール (コーンフラワー, 日清製粉), グルコース (WAKO, 042-31177), アガー (岸田化学, 260-01705), プロピオン酸 (WAKO, 163-04726), パラ安息香酸メチル (WAKO, 132-02635), スクロース (WAKO, 190-00013), Methyl 4-dihydroxybenzoate (Sigma-Aldrich, H5501) .

2.16 使用したプライマー及びオリゴ DNA 配列

使用したプライマーおよび DNA オリゴは全てユーロフィンジェノミクス株式会社 (東京) で作製した。

2.16.1 プラスミド作製用

2.16.1.1 *pHD-DsRed-attP* 作製用プライマー (2.2.2 「*Or42b^{attP}*、*Or10a^{attP}*、*Or47a^{attP}* 系統の作製」参照)

<i>pHD-DsRed-attP</i>			プライマー配列
<i>Or42b</i>	5'	Forward	5'-ATT CTT GCA TGC TAG CCG GTG CTC CTT GGA CAC AGT GCT C-3'
		Reverse	5'-GTC CGC GGC CGC TAG CTC GGC GTT ATT GTG CGC ACT GCT C-3'
	3'	Forward	5'-ATA GAA GAG CAC TAG GGT GGA TGG ATA CCT TTT TTG TC-3'
		Reverse	5'-GGA GAT CTT TAC TAG CCA TCT AGT CGT GCC GGT CCC AAT TG-3'
<i>Or10a</i>	5'	Forward	5'-TGC ATG CTA GCG GCC GGG TAG AGG GGT TGA GGT CTT TCC AAG-3'
		Reverse	5'-CAT ATG TCC GC GGC CGA TGG ATA TAA CTA TGT GAA CGA CAT CCT G-3'
	3'	Forward	5'-ATA GAA GAG CAC TAG ATT GGT AAT AAA TAT AAA GTG CTA GTA TTT TC-3'
		Reverse	5'-GGA GAT CTT TAC TAG CAC CGG GTC TCA GAC CAT CCA TCT C-3'
<i>Or47a</i>	5'	Forward	5'-TGC ATG CTA GCG GCC GGA GGC AAG TGT TTG GCC TGT AG-3'
		Reverse	5'-CAT ATG TCC GCG GCC GTC GAC AAG GGT TAA TTC GGC CTC ACA C-3'
	3'	Forward	5'-ATA GAA GAG CAC TAG ATG TGG TTT GAC CAC AAG GCT TTG GAT TG-3'
		Reverse	5'-GGA GAT CTT TAC TAG CAA CTC CTT CGA CGC GAA CGC GGT G-3'

2. 16. 1. 2 *U6b*-sgRNA 作製用 DNA オリゴ (2. 2. 2 「*Or42b^{attP}*, *Or10a^{attP}*, *Or47a^{attP}* 系統の作製」参照)

<i>U6b</i> -sgRNA		オリゴ配列
<i>Or42b#1</i>	Sense	5'-TTC GGG GTG CAG AGT ATC CAA TAA-3'
	Antisense	5'-AAA CTT ATT GGA TAC TCT GCA CCC-3'
<i>Or42b#2</i>	Sense	5'-TTC GTG CGC ACA ATA ACG CCG AGA-3'
	Antisense	5'-AAA CTC TCG GCG TTA TTG TGC GCA-3'
<i>Or10a#1</i>	Sense	5'-TTC GCG CCC TGA TCT ATG GAC AAG-3'
	Antisense	5'-AAA CCT TGT CCA TAG ATC AGG GCG-3'
<i>Or10a#2</i>	Sense	5'-TTC GCA TTA TGT CTA AAC TCA AGC-3'
	Antisense	5'-AAA CGC TTG AGT TTA GAC ATA ATG-3'
<i>Or47a#1</i>	Sense	5'-TTC GCA TGT CGA CAA GGG TTA ATT-3'
	Antisense	5'-AAA CAA TTA ACC CTT GTC GAC ATG-3'
<i>Or47a#2</i>	Sense	5'-TTC GCC GTG CGA ACA ATC TAA AAA-3'
	Antisense	5'-AAA CTT TTT AGA TTG TTC GCA CGG-3'

2. 16. 1. 3 *U6b*-sgRNA 作製用プライマー (2. 2. 3 「*Or42b^{Or10a}*, *Or42b^{Or47a}*, *Or10a^{Or42b}*, *Or47a^{Or42b}* の作製」参照)

<i>RIV^{white}</i>		
<i>Or10a</i>	Forward	5'-GCG TAC TCC ACG AAT ATG TCC GAG TGG TTA CGC TTT CTG AAA CGC GAT C-3'
	Reverse	5'-CCG CTC CGG AGA ATT TTA CTG AAA GGA CTT AAC CAG CGC AAT TAT GGA ACC CGA AG-3'
<i>Or47a</i>	Forward	5'-GCG TAC TCC ACGA ATA TGG ACA GTT TTC TGC AAG TAC AGA AGA GCA C-3'
	Reverse	5'-CCG CTC CGG AGA ATT TTA GGA GAA TGA TC TCA GCA TTG TGA TG-3'
<i>Or42b</i>	Forward	5'-GCG TAC TCC ACG AAT ATG GTC TTC GAG CTA ATA CGT CCC GCT C-3'
	Reverse	5'-CCG CTC CGG AGA ATT TTA GTC CGT CTT AAA TTT GTC AGC TAT ATT C-3'

2. 16. 2 genome DNA PCR, RT-PCR 用プライマー (2. 3 「*Or42b* 変異体 (*Or42b*¹⁹, *Or42b*²³) の作製」参照)

プライマーセット#		プライマー配列
1	Forward	5'-CTG GGT GGA TGC CAG TCG TCG CTA C-3'
	Reverse	5'-GCA AAC TTT GCC ACC TAG TGA TGG GG-3'
2	Forward	5'-AGT ACT GTC CTC CGG CAA GGC GGA G-3'
	Reverse	5'-GAC GAC TGG CAT CCA CCC AGT TGG AC-3'
3	Forward	5'-TTT GGA GAC TCC GAA GTC GGG GGT C-3'
	Reverse	5'-TCA ACG GTT TCC ATG GCT CTG CCG G-3'
4	Forward	5'-TTG AGG GGG TTG TTG GGG GTA GAG G-3'
	Reverse	5'-ATA GAC CCC CGA CTT CGG AGT CTC C-3'
5	Forward	5'-AGC TAA TAC GTC CCG CTC CGC TCA C-3'
	Reverse	5'-AAG GGA TTG TAC AGC TGC CAG GGC G-3'

2. 16. 3 定量的 RT-PCR 用プライマー (2. 5 「定量的 RT-PCR による遺伝子発現解析」参照)

定量的 RT-PCR に用いたプライマーは Universal Probe Library Assay Design Center (Roche) を用いて設計した。すべてのプライマーは増幅産物の融解曲線分析によってターゲット配列を特異的に増幅することを確認している。以下に使用したプライマーの配列を記す。

ターゲット		プライマー配列
<i>rpl32</i>	Forward	5'-CGG ATC GAT ATG CTA AGC TGT-3'
	Reverse	5'-CGA CGC ACT CTG TTG TCG-3'
<i>Drosomycin</i>	Forward	5'-TAC TTG TTC GCC CTC TTC G-3'
	Reverse	5'-GTA TCT TCC GGA CAG GCA GT-3'
<i>Diptericin B</i>	Forward	5'-AAT CTG CAG CCT GAA CCA CT-3'
	Reverse	5'-AGG CTC AGA TCG AAT CCT TG-3'
<i>Or42b</i>	Forward	5'-TGG ACC ACA AGC TCA TTC TAA G-3'
	Reverse	5'-TGT CTG AGA AGA AAA ACA CGT TG-3'

2. 16. 4 プラスミド作製用 プライマー (2. 12 「触角における蛍光 *in situ* hybridization」参照)

<i>pTA2-</i>		プライマー配列

<i>Orco</i>	Forward	5'-ATG ACA ACC TCG ATG CAG CCG AG-3'
	Reverse	5'-TTA CTT GAG CTG CAC CAG CAC-3'
<i>Drosomycin</i>	Forward	5'-AAG TAG TGG AGA GCT AAA CG-3'
	Reverse	5'-GAA ATC ATT TAC CAA GCT CCG-3'

2. 17 使用した抗体

2. 17. 1 免疫染色で用いた一次抗体

抗体名	動物種	作製	希釈倍率
anti-mCD8a	ラット	Invitrogen, MCD0800	1:100
anti-cleaved PARP antibody	ラビット	Abcam, ab32561	1:100
anti-Bruchpilot	マウス	DSHB, nc82	1:40
anti-Dorsal	マウス	DSHB, 7A4	1:50
anti-GFP	ラット	Nakarai tesque, 04404-26	1:500

2. 17. 2 免疫染色で用いた二次抗体

抗体名	作製	希釈倍率
anti-rat Alexa488	Molecular probes, A-11006	1:250
anti-rabbit Cy3	Jackson ImmunoResearch, 711-155-152	1:1000
anti-mouse Alexa 647	Molecular probes, A-21236	1:1000
anti-mouse Alexa 488	Molecular probes, A-11017	1:250

2. 17. 3 その他プローブ

抗体/プローブ名	作製	希釈倍率
Hoechst 33342	Invitrogen	終濃度 4 μ M

3 結果

私は、本学修士課程において、触角における加齢に伴う遺伝子発現変化を明らかにするために DNA マイクロアレイ解析を行った。その結果、ショウジョウバエの主要な自然免疫応答経路である Toll 経路及び Imd 経路が加齢に伴い活性化することを明らかにした。本研究では自然免疫応答経路が Or42b 神経の加齢に伴う細胞死に関わるか検討を行った。

3.1 免疫関連遺伝子変異体では Or42b 神経の細胞死が抑制される

Or42b 神経の加齢に伴う細胞死が自然免疫応答の亢進によって誘導されるか明らかにするため、まず加齢に伴う自然免疫応答の亢進が現弱する変異体を用いて解析を行った。加齢に伴う自然免疫応答が現弱する変異体は知られていないことから、まず自然免疫経路の変異体の評価から行った。*J4* 変異体は Toll 経路の 2 つの転写因子である DIF と Dorsal の欠損変異体であり(図 4a)、DIF と Dorsal を介する自然免疫応答が完全に抑制されることが知られている(Meng et al., 1999)。この *J4* のヘテロ接合変異体を調べるために、個体の寿命と、Toll 経路活性化の指標として Toll 経路下流の免疫応答遺伝子の一つである *Drosomycin* の発現を、Imd 経路活性化の指標として Imd 経路下流の免疫応答遺伝子である *Diptericin B* の触角における発現を調べた。その結果、寿命は野生型と変わらないが加齢に伴う Toll 経路と Imd 経路の亢進が抑制されることが明らかとなった(図 4 b-d)。この *J4* ヘテロ接合変異体では Or42b 神経におけるカスパーゼ活性化が抑制され、加齢に伴う細胞体の減少も抑制された(図 4 e, f)。このことから免疫応答の亢進が Or42b 神経のカスパーゼ活性化及び細胞死に関わる可能性が示唆された。次に Imd 経路の転写因子である *Relish* の変異体について評価を行った。*Rel^{E20}* は *Relish* のプロモーターを欠損した変異体であり、Imd 経路を介した免疫応答が抑制されることが知られている(Hedengren et al., 1999)。この *Rel^{E20}* ヘテロ接合変異体においても加齢に伴う Toll 経路と Imd 経路の亢進が抑制される傾向にあることが分った(図 5a, b)。老齢個体における Or42b 神経のカスパーゼ活性化及び細胞死をしらべた結果、抑制される傾向にあるが、その効果は *J4* ヘテロ接合変異体よりも微弱であることが分った(図 5c, d)。その理由として、*Rel^{E20}* ヘテロ接合変異体による自然免疫応答の抑制効果が *J4* ヘテロ接合変異体のそれより弱いためと考えられる。これらの結果から加齢に伴う Or42b 神経の細胞死には自然免疫応答の亢進が関与することが示唆された。

3.2 *Drosocin* の過剰発現によって Or42b 神経細胞死が誘導される

ショウジョウバエの自然免疫応答の亢進によって起きる現象の一つとして抗菌ペプチド遺伝子の発現上昇がある(Buchon et al., 2014)。本研究で自然免疫応答の指標として

用いている *Drosomycin* や *Diptericin B*, *Drosocin* 等も抗菌ペプチド遺伝子である。抗菌ペプチドは本来細菌特異的に作用するが、細菌の報告では神経変性に関与していることを示す報告がなされている(Cao et al., 2013; Petersen et al., 2012)。そこで Or42b 神経の加齢に伴う細胞死に抗菌ペプチドが関与するか調べた。Or42b 神経において *Drosocin* の過剰発現をすると触角内において *Drosocin* mRNA の発現量が上昇することが確認された(図 6a)。野生型において Or42b 神経のカスパーゼ活性化及び細胞死の程度が弱い 30 日齢において調べると、*Drosocin* の過剰発現によりカスパーゼ活性化および細胞死が誘導されることが明らかとなった(図 6d, e)。これらの結果から、Or42b 神経の加齢に伴う細胞死に抗菌ペプチド遺伝子の発現が関与する可能性が示唆された。

3.3 Or42b 神経の細胞死は Or42b 神経以外の細胞における自然免疫応答の亢進によって誘導される

次に自然免疫応答の亢進によって Or42b 神経の細胞死が亢進するか検討した。自然免疫応答の亢進を行う為に、活性化型 Spatzel (Spz^{act})あるいは活性化型 Toll ($Toll^{10B}$)を Or42b 神経で過剰発現した。Spatzel は分泌性の Toll リガンドであり、その活性化型の発現により Toll 経路が亢進することが知られている(Jang et al., 2006)。また $Toll^{10B}$ は Toll の活性化型変異体であり、 $Toll^{10B}$ の発現によって Toll 経路が亢進することが知られている(Lemaitre et al., 1997)。 Spz^{act} と $Toll^{10B}$ の効果を確認する目的で、ショウジョウバエの主要な免疫器官である脂肪体特異的に発現する Gal4 ドライバー *FB-Gal4* を用いて過剰発現を行った。その結果 *Drosomycin* 発現が上昇し Toll 経路の亢進が確認された(図 6b)。そこで Spz^{act} と $Toll^{10B}$ を Or42b 神経において発現させたときのカスパーゼ活性化及び細胞死を調べた。まず Or42b 神経において Spz^{act} と $Toll^{10B}$ を発現した時の触角における *Drosomycin* の発現を調べたところ、 Spz^{act} では上昇する傾向が見られたが $Toll^{10B}$ では上昇が見られなかった(図 6c)。次に、野生型ではカスパーゼの活性化及び細胞体数の減少が観察されない 30 日齢においてカスパーゼの活性化と細胞体数の変化を調べた。その結果、 Spz^{act} の過剰発現ではカスパーゼの活性化及び細胞死が亢進することが分った(図 6d-e)。一方で $Toll^{10B}$ の過剰発現ではカスパーゼの活性化は亢進せず、細胞体数の減少は観察されるものその効果は微弱であった。(図 6d, f)。これらのことから分泌型のリガンドである Spz^{act} によって細胞死が誘導される一方で、Or42b 神経における Toll 経路の活性化は Or42b 神経の細胞死には関与しないことが示唆された。従って Or42b 神経以外の細胞における自然免疫応答の亢進が Or42b 神経の細胞死において重要であることが示唆された。

Or42b 神経における免疫経路の活性化が細胞死に関わらない可能性についてさらに検討を行う目的で、Or42b 神経において自然免疫経路の構成因子のノックダウンを行った。まず、ノックダウンに用いる *UAS-RNAi* 系統の確認をおこなった。Toll 経路の RNAi

系統の確認は、脂肪体特異的に発現する *r4-Gal4* を用いて *Spz^{act}* を発現させたときに同時に RNAi を発現させたときの *Drosomycin* の発現を調べることによって行った。Imd 経路の確認は、グラム陰性菌である *E. coli* の感染によって上昇する *Drosocin* の発現が、脂肪体における RNAi の発現によって抑制されるか調べることによって行った。その結果、Toll と MyD88 に対する RNAi 系統、Imd に対する RNAi 系統において自然免疫応答を抑制する効果があることが確認された(図 7a, b)。これらの RNAi を Or42b 神経において発現しても加齢に伴う細胞体数の減少は抑制できないことが明らかとなった(図 7c)。これらの結果は Or42b 神経における免疫応答経路が Or42b 神経の細胞死に関与しないことを支持する結果である。したがって Or42b 神経の細胞死の誘導には Or42b 神経以外の細胞における自然免疫応答の亢進が重要であることが明らかとなった。

3.4 触角において自然免疫応答の亢進を示す細胞種の探索

加齢に伴う Or42b 神経以外の細胞における自然免疫応答の亢進が Or42b 神経の細胞死に関わることから、どの細胞種において自然免疫応答が亢進しているか調べた。*Drosocin*-GFP 系統は *Drosocin* プロモーターの制御下で GFP を発現するレポーター系統である。この系統を用いてどの細胞で GFP が発現するか調べることで、自然免疫応答の亢進している細胞を同定しようと試みた。しかし触角における GFP シグナルは加齢に伴って変化しなかった(図 8a-b')。このレポーター系統が自然免疫応答レポーターとして機能するか確認するために、ショウジョウバエの主要な免疫組織である脂肪体における GFP シグナルを観察した(図 8c-d')。*Drosocin* は Imd 経路によって制御される自然免疫応答遺伝子であることから、グラム陰性菌である *E. coli* による感染を行い、Imd 経路の活性化を行った。その結果 *E. coli* の感染により脂肪体における GFP シグナルの増強が見られた(図 8e-f')。一方で、加齢に伴い脂肪体において Imd 経路が亢進することが報告されているため(Chen et al., 2014b)、45 日齢において GFP のシグナルが強くなることが予想されたが、そのようなシグナルの増強は観察されなかった(図 8g, g')。これらの結果から *Drosocin*-GFP 系統は感染による *Drosocin* 発現上昇は反映するが、老化による *Drosocin* の発現上昇は反映しないことが考えられ、そのため老齢の触角においては GFP シグナルが観察されなかった可能性が考えられる。

GFP レポーター以外に自然免疫応答が亢進している細胞を検出する手法として Dorsal の核局在化がある。Dorsal は Toll 経路の転写因子であり、通常は細胞質に存在するが、Toll 経路が活性化すると核に局在することが知られている(Reichhart et al., 1993)。実際に *Toll^{10B}* (活性化型 Toll) 変異体の三齢幼虫脂肪体では Dorsal の核局在が観察された(図 9a-b'')。そこで、触角における Dorsal の免疫組織化学を行ったが、加齢に伴う Dorsal 発現の変化は観察されなかった(図 9c-d')。

過去に三齢幼虫脂肪体において *in situ hybridization* によって *Drosomycin* mRNA の検出

が行われた報告がある(Becker et al., 2010)ことから、蛍光 *in situ* hybridization による *Drosomycin* mRNA の検出を試みた。まず触角において発現していることが知られている、嗅覚受容体の共受容体である *Orco* の検出を行った(Larsson et al., 2004)。その結果、*w¹¹¹⁸* では *Orco* の発現が観察されるが *Orco* の coding sequence (CDS)を欠いている *Orco²* ホモ接合変異体では観察されなかった(図 10a-b')。従って、触角における蛍光 *in situ* hybridization による mRNA 検出の系は確立したといえる。しかし、*Drosomycin* の発現を調べたところ、若齢と老齢の間に差は見られなかった(図 10c-d')。以上の様に *Drosocin*-GFP レポーター、*Dorsal* の核局在、*Drosomycin* mRNA 発現の検出によって自然免疫応答の亢進する細胞を見つけることが出来なかった。

3.5 食餌制限により Or42b 神経の機能低下が抑制される

Or42b 神経が刺激されることによってショウジョウバエは誘引行動を示す(Semmelhack and Wang, 2009)。また、過去の報告において加齢に伴う Or42b 神経の細胞死により、Or42b 神経を介した誘引行動が低下することが示された(Chihara et al., 2014)。今回は、食餌制限によって Or42b 神経を介した誘引行動の低下を抑制できるか調べた。食餌制限により加齢に伴う様々な変化が抑制されることが知られており(Fontana et al., 2010)、私も本学修士課程において、食餌制限を行うことにより触角における自然免疫応答が抑制され、Or42b 神経の細胞死も抑制されることを明らかにしている。ショウジョウバエの食餌制限は餌の濃度をコントロールすることによってなされ、本研究では 15%SY 餌を対照餌、5%SY を食餌制限餌として用いている(SY, sugar and yeast)。

食事制限によって Or42b 神経を介した誘引行動の低下が抑制されるか検証するために、ショウジョウバエの誘引行動を調べる実験系である two-choice assay を行った(Larsson et al., 2004; Potter et al., 2010)。実験条件を決定するために若齢の個体を用いて、絶食時間と Or42b 神経を刺激する誘引物質である Apple cider vinegar (ACV)の濃度について検討を行った。その結果 24 時間絶食の後に 25% ACV に強く誘引されることが明らかとなった(図 11a, b)。従ってこの条件で老齢個体を用いた実験を行った。それぞれの餌の条件で老化させたところ、15%SY で老化させた群は 25% ACV に対する誘引行動が低下するが 5%SY で老化させた群は若齢と比較して差が無いことが分った(図 11c)。従って、食餌制限により加齢に伴う Or42b 神経の機能低下を抑制出来ることが明らかとなった。またこのことから自然免疫応答の亢進を抑制することによって Or42b 神経の機能低下を抑制できることが示唆された。

3.6 Or42b 受容体が Or42b 神経の細胞死に与える影響の解析

これまでの結果から、加齢に伴う神経細胞死は、加齢に伴う自然免疫応答の亢進のよって誘導されることが明らかとなった。しかし約 50 のサブタイプが存在する嗅覚受

容神経の中で、何故 Or42b 神経のみにおいて高頻度にカスパーゼ活性化と細胞死が観察されるか明らかにされていない。これを明らかにするために、*Or42b* のノックダウン、そして *Or42b* 変異体を用いた解析を行うことにより、Or42b 神経において発現している Or42b 受容体の関与を検討した。まず *Or42b* に対する micro RNA (miRNA-*Or42b*) を設計し *UAS-miRNA-Or42b* 系統を作製した(2. 2. 1 「*UAS-miRNA-Or42b* 系統の作製」参照)。挿入位置の異なる 10 の系統が得られたため、それぞれの系統の *Or42b* 遺伝子の発現を抑制する能力を調べた。Or42b 神経において miRNA-*Or42b* を発現した結果、いくつかの系統において効率良く *Or42b* の発現を抑えられることが分った(図 12a)。そこでノックダウン効率の良かった #1 と #6 の系統について更に解析を進めた。Or42b 神経におけるカスパーゼの活性化を調べた結果、*Or42b* のノックダウンにより 15 日齢及び 30 日齢においてカスパーゼの活性化が亢進することが明らかになった(図 12b)。このことから *Or42b* のノックダウンにより Or42b 神経は早期にカスパーゼ活性化を示すことが分った。

次に *Or42b* 変異体を作製し、解析を行った。*Or42b* 変異体は P 因子挿入系統 *Or42b^{EY14886}* を元に不正確切り出し(imprecise excision)によって作製した(2. 3. 1 「*Or42b^{EY14886}* 変異体からのトランスポゾン P 因子の不正確切り出し参照」)(Robertson et al., 1988)。その結果 *Or42b¹⁹* 変異体と *Or42b²³* 変異体を得た(図 13a, b)。genomic DNA を用いた PCR と RT-PCR、そして DNA sequence の結果から *Or42b¹⁹* と *Or42b²³* 変異体は *Or42b* 遺伝子の一部を欠く変異体であることが明らかとなった(図 13c, d)。更なる検討には *Or42b¹⁹* のみを用いた。*Or42b¹⁹* 変異体は *Or42b* 遺伝子の CDS の大半を欠いているが、残っている Exon 2 の一部と Exon 3 が発現していることが RT-PCR から分った(図 13c)。しかし嗅覚受容体が七回膜貫通構造をとることや、exon 2 と exon 3 間のスプライシングを受けていないことから *Or42b¹⁹* 変異体は機能的な Or42b 受容体を発現しないと考えられる。*Or42b¹⁹* 変異体における Or42b 神経のカスパーゼ活性化を調べたところ、ヘテロ接合変異体、ホモ接合変異体共に 15 日齢から非常に高い頻度で Or42b 神経におけるカスパーゼ活性化が観察された(図 14)。従って *Or42b* 変異体では早期にカスパーゼの活性化を示すことが明らかとなった。

4 考察

本研究では Or42b 神経の加齢に伴う細胞死と自然免疫応答との関わりについて解析を行った。加齢に伴う免疫応答の抑制される変異体において Or42b 神経の細胞死は抑制されることを明らかにした。また Or42b 神経自身ではなく、Or42b 神経以外の細胞における自然免疫応答の亢進によって細胞死が誘導されることを見出した。さらに、加齢に伴い低下する誘引行動が、自然免疫応答を抑制する食餌制限を行った個体において低下しないことを示した。これらのことから、加齢に伴う Or42b 神経細胞の細胞死が、加齢に伴う自然免疫応答の亢進によって誘導されることを明らかにした(図 15)。一方でどの細胞における自然免疫応答の亢進が Or42b 神経の細胞死に関わるかなど Or42b 神経の加齢に伴う細胞死については不明瞭な点が多い。Or42b 神経細胞死と神経活動、あるいはタンパク質恒常性維持機構との関連等もあわせて考察する。

4.1 加齢に伴う自然免疫応答の亢進を示す細胞種とそのメカニズム

本研究で見られる加齢に伴う自然免疫応答の亢進は、以下に示す様に、細菌の感染によって引き起こされる自然免疫応答とは異なることが示唆されている。本研究では *J4* ヘテロ接合変異体において加齢による自然免疫応答の亢進が完全に抑制されたが(図 4c, d)、細菌感染では *J4* ヘテロ接合変異体では自然免疫応答が亢進することが知られている(Meng et al., 1999)。また DIF と Dorsal は Toll 経路の転写因子であるにもかかわらず、*J4* ヘテロ接合変異体において Imd 経路の加齢に伴う自然免疫応答の亢進が抑制される点も、感染の場合と異なる。また *J4* ヘテロ接合変異体と同様に、*Relish*^{E20} ヘテロ接合変異体においても自然免疫応答の抑制効果を示し、Imd 経路の転写因子であるにも関わらず Toll 経路の活性化も抑制した(図 5a, b)。これらの現象に関わるメカニズムとして以下の様なことが考えられる。通常 Toll 経路、IMD 経路の転写因子はホモダイマーとして機能するが、Relish と DIF がヘテロダイマーを形成し Toll, Imd 経路下流の制御に関わることを示す報告があることから(Tanji et al., 2010)、本研究で見られる自然免疫応答の亢進は Relish と DIF のヘテロダイマーが主体となって AMP 遺伝子の転写制御に関わる可能性が考えられる。また 3.1.4 「触角において自然免疫応答の亢進を示す細胞種の探索」の Drosocin-GFP を用いた実験から、このレポーターは感染による自然免疫応答の亢進は反映されるものの、老化による自然免疫応答は反映されないことが示された。これらのことから、加齢に伴う自然免疫応答の亢進は、感染に伴う自然免疫応答の亢進と同じ制御系を介するが、異なる調節機構を持っている可能性が考えられる。

加齢に伴い自然免疫応答が亢進する細胞種の候補としては、脂肪体が最も有力であると考えている。脂肪体は感染時の免疫応答において主要な働きをすることが知られている(Buchon et al., 2014)。最近では、加齢に伴う脂肪体における自然免疫応答亢進のメ

カニズムに関する報告がある(Chen et al., 2014b)。この報告によると、加齢に伴い脂肪体におけるヘテロクロマチン領域が失われることにより Imd 経路の構成因子の発現量が上昇した結果、自然免疫応答が亢進することが示されている。触角における自然免疫応答の亢進もこのようなメカニズムによって生じている可能性が考えられる。

4.2 自然免疫応答の亢進が Or42b 神経の細胞死を誘導するメカニズム

ショウジョウバエでは自然免疫応答の亢進により、AMP の発現、活性酸素種(Reactive oxygen species, ROS)の産生が起きることが知られている(Buchon et al., 2014)。これらの現象が Or42b 神経の細胞死に関わる可能性について考察する。

AMP は本来細菌特異的に作用するタンパク質だが、AMP を脳神経系で過剰発現することにより神経変性が誘導されることが報告されている(Cao et al., 2013; Petersen et al., 2012)。従って AMP が Or42b 神経に作用するのではないかと考えている。AMP は陽イオン性であり、細菌の細胞膜が陰イオン性であるため細菌特異的に作用する(Matsuzaki, 2009)。従って、Or42b 神経の細胞膜が陰イオン性を持っているため、AMP が Or42b 神経にも選択的に作用し細胞死を誘導するのではないかと考えている。

腸管において自然免疫応答が亢進すると、ROS の産生に関わる酵素である Nox、Duox の発現が上昇することが知られている(Buchon et al., 2014)。酸化ストレスによって神経細胞死が誘導されることが知られていることから(Yankner et al., 2008)、触角における Nox、Duox の発現、そして ROS の産生が Or42b 神経の細胞死に関わる可能性が考えられる。

一方で、自然免疫経路が亢進した細胞において、細胞死経路が亢進することが報告されている(Meyer et al., 2014)。このことから Or42b 神経自身の自然免疫経路が亢進することによって細胞死が誘導される可能性がある。しかし、Or42b 神経において Toll^{10B} の過剰発現を行っても細胞死が誘導されないことから(図 6d, f)、Or42b 神経における自然免疫応答の亢進によって Or42b 神経の細胞死が誘導される可能性は否定されたと考えている。

4.3 Or42b 神経の加齢に伴う細胞死と Or42b 受容体及び神経活動の関与

およそ 50 種類ある嗅覚受容神経サブタイプの中で、Or42b 神経においてのみ高い割合でカスパーゼの活性化及び細胞死が見られる(Chihara et al., 2014)。嗅覚受容神経は機能的に良く似た神経であるにもかかわらずこのような差が生まれるのは何故か。この問題を解くことによって、正常老化によって細胞死を示す細胞と示さない細胞を区別することが出来るようになる可能性がある。そこで嗅覚受容体の神経活動や匂いに対する応答性の関与についても検討を行った。

Orco は嗅覚受容体の共受容体であり嗅覚受容神経の神経活動に必須である(Larsson

et al., 2004)。このことから *Orco* ヘテロ接合変異体では神経活動が低下することが考えられる。そこで *Orco* 欠失変異体である *Orco*² 変異体のヘテロ接合変異体を用いて検討を行った(図 16 a-c)。その結果 *Orco*² ヘテロ接合変異体では加齢に伴う Or42b 神経のカスパーゼ活性化及び細胞死が抑制されることが明らかとなった(図 16b, c)。従って嗅覚受容神経における神経活動の低下により加齢に伴う Or42b 神経のカスパーゼ活性化及び細胞死が抑制されることが示唆された。一方で、*Orco* の存在自体がショウジョウバエの寿命や代謝状態に寄与する報告があることから(Libert et al., 2007)、この点に留意した更なる検討が求められる。また、*Or42b*¹⁹ ヘテロ接合変異体では若齢においてカスパーゼが活性化されるのに対して、*Orco* ヘテロ接合変異体では逆の表現型が観察された点は興味深い(図 14, 図 16b)。*Orco* の欠失変異体では嗅覚受容神経の神経活動が失われ(Larsson et al., 2004)、若齢で嗅覚受容神経が変性することが知られている(Chiang et al., 2009)。このことから、*Or42b*¹⁹ ホモ、ヘテロ接合変異体における Or42b 神経のカスパーゼ活性化は Or42b 神経の発現を低下しすぎたことが原因であると考えられる。*Orco* と Or42b いずれの受容体も Or42b 神経における神経活動に必要であるが、表現型が異なることから、Or42b 神経の神経活動に対する寄与が異なる可能性が考えられる。

また Or42b 神経の神経活動の亢進が Or42b 神経のカスパーゼ活性化及び細胞死にどのような影響を与えるか検討した。そのために Or42b 神経において shaker dominant negative (sh-DN) 及び eather a go-go dominant negative (eag-DN) の発現を行った。sh と eag はいずれもカリウムチャンネルであり、この 2 つのドミナントネガティブ体を過剰発現することにより神経活動を亢進出来ることが知られている(Hartwig et al., 2008)。sh-DN と eag-DN を Or42b 神経において発現させたところ、カスパーゼ活性化は 30 日齢において亢進する一方で、細胞死は抑制される傾向にあった(図 17a, b)。

次に匂い刺激が嗅覚受容神経におけるカスパーゼ活性化に与える影響についても検討を行った。Or42b 神経は yeast の匂いによって刺激され、(Stökl et al., 2010) Or10a 神経は Methyl salicylate によって刺激されることが知られている(de Bruyne et al., 2001)。それぞれの匂いの刺激によってそれぞれの嗅覚受容神経において 45 日齢におけるカスパーゼ活性化が亢進するか調べたが、亢進は見られなかった(図 17c, d)。これらの結果からは神経活動が Or42b 神経の細胞死に関与するか明らかにすることが出来なかった。

このように Or42b 神経の加齢に伴う細胞死と Or42b 受容体、そして Or42b 神経の神経活動の関係について明確な答えを出すことが出来なかった。これには以下の 2 点を満たすことが出来なかったためであると考えている。①嗅覚受容神経の神経活動を測ること②嗅覚受容体の発現の操作を行う際に生理的な範囲内の神経活動を維持すること、という点である。

①「嗅覚受容神経の神経活動を測ること」が必要な理由は、*Orco*² 変異体や sh-DN, eag-DN 過剰発現系統において、本当に Or42b 神経の神経活動が変化しているか調べる

ことが出来ない点である。神経活動の強度を調べる方法の一つとして G-CaMP を利用するものがある。G-CaMP は cpEGFP (circularly permuted enhanced green fluorescent protein) と M13 ペプチド、カルモジュリンの融合タンパク質であり、カルシウムイオン濃度依存的に蛍光強度が変化する(Nakai et al., 2001)。ショウジョウバエでは嗅覚系の神経特異的に G-CaMP を発現させ、匂い刺激を行ったときの G-CaMP のシグナルを観察することによって、嗅覚刺激時の神経活動を調べることが出来る(Wang et al., 2003)。そこで G-CaMP を利用して、Or42b 神経の神経活動を調べる系を立ち上げた(図 18a, b)。この系を活用することにより、Or42b 神経の加齢に伴う細胞死と Or42b 神経の神経活動の関係性についてより深く議論することが可能になると考えている。

②「嗅覚受容体の発現の操作を行う際に生理的な範囲内の神経活動を維持すること」が必要な理由は、3.2.1 「Or42b のノックダウン、Or42b 変異体において Or42b 神経は早期にカスパーゼ活性化を示す」で示されている。極端な嗅覚受容体の発現操作は嗅覚受容神経の維持に必要な神経活動に影響を与えていると考えられる。そのために嗅覚受容体と Or42b 神経の加齢に伴う細胞死の関係について調べることが出来ないからである。「嗅覚受容体の発現の操作を行う際に生理的な範囲内の神経活動を維持すること」を満たす方法として、CRISPR/ Cas9 システムを利用した嗅覚受容体遺伝子の入れ替えがある(図 19a, b)。例えば Or42b^{Or10a} 変異体は Or42b 遺伝子をノックアウトすると同時に内在性の Or42b プロモーターを用いて Or10a 遺伝子を発現することが出来る。この方法であれば Or42b 神経は生理的なレベルの嗅覚受容体を発現するため、若齢におけるカスパーゼ活性化及び細胞死を避けることが出来る。従って発現する受容体や匂い物質に対する応答性が Or42b 神経の細胞死に与える影響について検討することが可能である。実際に図 19b に示す様な変異体を既に作製しており、細胞死及びカスパーゼ活性化を調べる予定である。

4.4 タンパク質恒常性維持機構が Or42b 神経の加齢に伴う細胞死に与える影響

タンパク質恒常性維持機構は加齢に伴って低下し、神経変性疾患を引き起こすことが知られている(Labbadia and Morimoto, 2015)。本学修士課程において私は、プロテアソームの構成分子の一つである Rpn11 を Or42b 神経において過剰発現することにより Or42b 神経の加齢に伴うカスパーゼの活性化及び細胞死を抑制することが出来ることを見出した。Rpn11 の過剰発現により加齢に伴うプロテアソーム活性の低下を抑制することが出来ることが報告されている(Tonoki et al., 2009)。このことから、Or42b 神経におけるタンパク質恒常性維持機構の破綻が Or42b 神経の加齢に伴う細胞死を惹起しているのではないかと考え、この可能性について検討を行った。まず修士課程において得られた知見の再現実験を行った。Rpn11 の過剰発現を行うことにより 45 日齢における Or42b 神経のカスパーゼの活性化及び細胞死は抑制された(図 20a-b', f-g', k)。次に UAS-RNAi

系統を用いて *Rpn11* のノックダウンを行った結果、45 日齢における *Or42b* 神経軸索の *mCD8* のシグナルが消失することが明らかとなった(図 20c, c', g, g')。一方で細胞体の数は 45 日齢の時点でコントロールと大きな差がなかった(図 20k)。 *Rpn11* の過剰発現の効果は高いものの、 *Rpn11* のノックダウンにより細胞死は亢進しないことからプロテアソーム系の低下は加齢に伴う *Or42b* 神経の減少に関与しないと考えている。

ERAD 経路は小胞体ストレス応答の一種であり、この経路の破綻は神経変性を引き起こすことが知られている(Hetz and Mollereau, 2014)。そこで ERAD 経路関連分子である *Hrd1*、スプライシングを受けた形の *Xbp1* (*Xbp1-RB*)の過剰発現を行い、*Or42b* 神経において ERAD 経路を亢進したときのカスパーゼ活性化と細胞死を調べた。その結果、 *Hrd1*、 *Xbp1-RB* の過剰発現により 45 日齢における *Or42b* 神経軸索の *mCD8* のシグナルが消失した(図 20d-e', i-j')。一方で細胞死は *Xbp1-RB* の過剰発現により抑制され、 *Hrd1* の過剰発現によっては抑制されなかった(図 20k)。これらの一貫しない表現型から、 *Or42b* 神経における ERAD 経路は *Or42b* 神経の加齢に伴う細胞死に関与しないと結論した。

これらの結果からタンパク質恒常性維持機構は *Or42b* 神経の細胞死に関与しないと考えている。一方で、今回の実験で得られた結果の中で興味深い現象として、 *Rpn11* のノックダウン、 *Hrd1* の過剰発現、 *Xbp1-RB* の過剰発現を *Or42b* 神経において過剰発現することによって老齢での *mCD8* シグナルが消失することがある(図 20)。 *Rpn11-RNAi* の過剰発現によってプロテアソーム活性が低下しユビキチン化タンパク質が蓄積することが考えられる(Tonoki et al., 2009)。また *Hrd1* の過剰発現、 *Xbp1-RB* の過剰発現によって ERAD 経路が亢進するが、これもユビキチン化タンパク質の量を増加させる方向に働くことが考えられる(Vembar and Brodsky, 2008)。*mCD8* シグナルが消失する一方で、老齢個体においても細胞体が存在することから(図 20k)、ORN 軸索のみが変性した可能性、または *mCD8::PARP::Venus* の発現が抑制される可能性が考えられる。これらのことから、ユビキチン化タンパク質の蓄積によって *Or42b* 神経の軸索変性が誘導される可能性、ユビキチン化タンパク質の蓄積によって膜タンパク質の発現が *Or42b* 神経において抑制されている可能性を考えている。

4.5 *Or42b* 神経の加齢に伴う細胞死の生理的意義

加齢に伴う *Or42b* 神経にはどのような生理的意義があるか調べるために、まず *Or42b* 神経の細胞死を亢進、あるいは抑制したときの個体の寿命を調べた。 *Orco* は *Or42b* 神経を含む多くの嗅覚受容神経において発現している受容体であり(Larsson et al., 2004)、 *Orco* 変異体では嗅覚受容神経の機能が損なわれ、個体の寿命が伸長することが知られている(図 21a)(Libert et al., 2007)。この寿命の伸長効果が *Orco* の発現するいずれかの嗅覚受容神経サブタイプの消失によって再現できる可能性が考えられるが、現在のところ

明らかになっていない。そこで今回 Or42b 神経の存在が個体の寿命に影響するか検討を行った。Or42b 神経の細胞死誘導には reaper (rpr) を、Or42b 神経の細胞死の抑制には p35 を用いた(図 1a)。Or42b 神経において rpr を発現した結果個体の寿命に影響しないことが明らかとなった(図 21b)。また、p35 を Or42b 神経で発現させた場合、Or42b-Gal4/+ よりも寿命が伸長したが、UAS-p35/+ よりも寿命が短いことが明らかになった(図 21c)。実験材料と方法の 2.4 「寿命の測定」で示した通り、Or42b-Gal4、UAS-p35、UAS-rpr 系統については *w¹¹¹⁸* 系統を用いてバッククロスを行っており、遺伝的背景を統一している。従って Or42b 神経で p35 を発現した系統における寿命の伸長効果は、Or42b 神経の加齢に伴う細胞死が抑制されたことに由来しているのではなく、UAS-p35 の挿入位置に由来していると考えている。これらの結果から Or42b 神経の有無は実験条件下における個体の寿命に関与しないと結論した。

Or42b 神経の有無は個体の寿命に影響しないことから、Or42b 神経細胞死の生理的意義を議論する際には、Or42b 神経の持つ機能が重要では無いかと考えた。Or42b 神経はショウジョウバエの餌となる酵母の匂いによって刺激され(Stökl et al., 2010)、また、誘引行動に必要十分であることが知られている(Semmelhack and Wang, 2009)。Or42b 神経の細胞死は、餌の匂いに対する誘引行動を低下させることから(Chihara et al., 2014)、Or42b 神経の細胞死は野生における生存において不利と考えられる。これらのことから次の様に考えた(図 22)。自然免疫応答の亢進が起きている個体として、老化した個体(Chen et al., 2014b; Pletcher et al., 2002)、細菌に感染した個体(Buchon et al., 2014; Lemaitre and Hoffmann, 2007)が考えられる。また自然免疫経路の変異体(Guntermann et al., 2009; Lemaitre et al., 1997)、細胞死経路の変異体(Ming et al., 2014)、DNase 遺伝子の変異体(Mukae et al., 2002)など自然免疫応答が亢進する様な変異を持った個体も考えられる。このような個体は、ショウジョウバエの種の存続の観点から言えば集団から排除されるべき存在である。このように Or42b 神経の細胞死は、自然免疫応答の亢進した不健康な個体を集団から排除するための機構であると考えている。

4.6 Or42b 神経細胞死とヒト嗅覚系の老化の関連性

ショウジョウバエの嗅覚受容神経は入れ替わることが無いのに対し、ヒトを始めとする哺乳類の嗅覚受容神経は一定の期間で入れ替わることが知られている(Leung et al., 2007)。このような違いはあるものの、ヒトにおいても嗅上皮(嗅覚受容神経の存在する領域)における炎症が嗅覚障害を引き起こすと考えられていることから(Wolfensberger and Hummel, 2002)、自然免疫応答の亢進による Or42b 神経の細胞死はヒトの嗅覚障害のメカニズムを解明する上で良いモデルとなると考えられる。また嗅覚障害は、アルツハイマー病やパーキンソン病等の神経変性疾患の初期症状であることが知られている(Doty, 2012)。また、神経変性疾患と免疫系や炎症の亢進には密接な関係があることか

ら(Amor et al., 2014; Heneka et al., 2014; Lucin and Wyss-Coray, 2009)、嗅覚系は免疫系や炎症の亢進に対して脆弱である可能性が考えられる。ショウジョウバエのパーキンソンモデルにおいても嗅覚系に障害が生じる報告があることや(Chen et al., 2014a; Poddighe et al., 2013)、加齢に伴ってカスパーゼの活性化する神経細胞は主に嗅覚系の神経細胞であることから(Chihara et al., 2014)、ヒトとショウジョウバエで起きる現象に類似点が見出せる。これらのことから、今回の成果は加齢そして神経変性疾患におけるヒト嗅覚障害の病態の理解に役立つと考えられる。

5 図

図 1 から図 22。

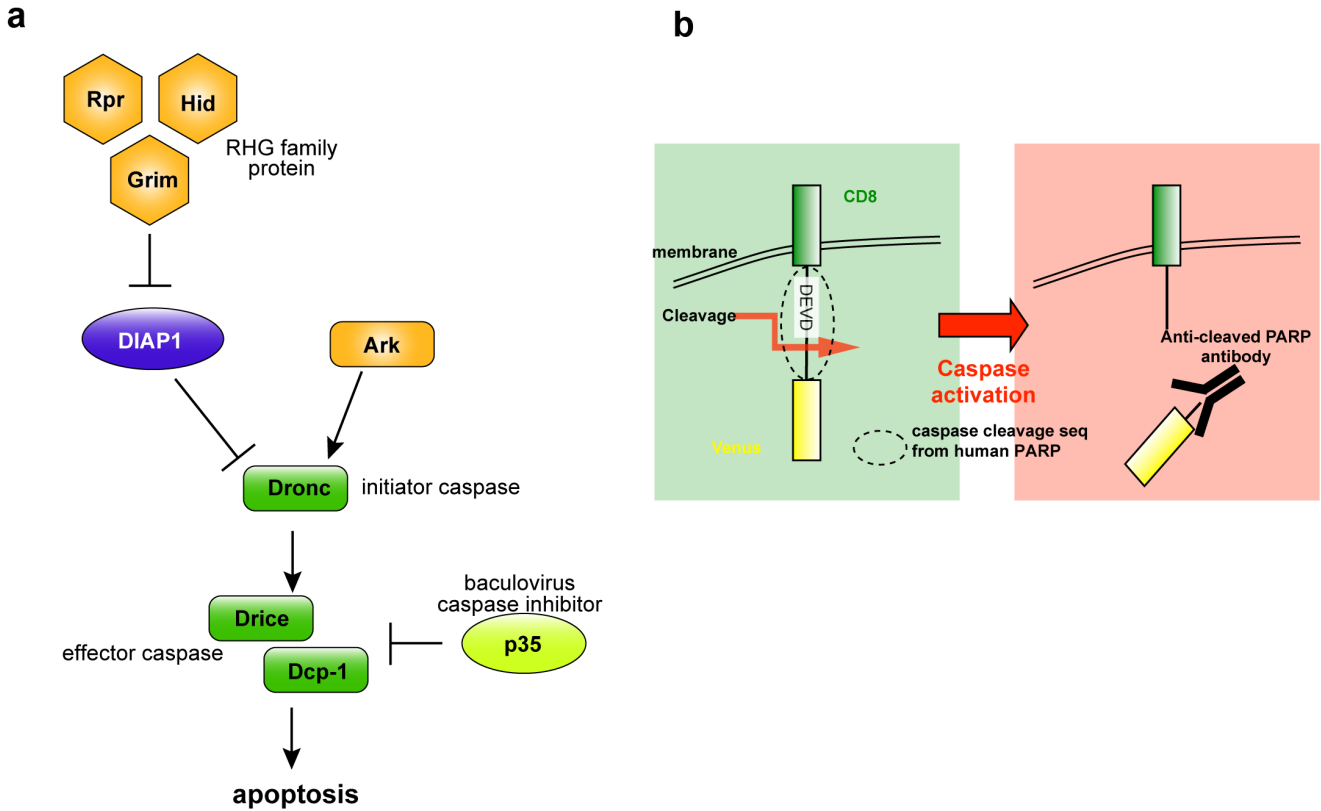


図 1 ショウジョウバエの特定の神経におけるカスパーゼ活性化の検出

(a) ショウジョウバエにおけるアポトーシス制御経路。ショウジョウバエにおいては、Droncと呼ばれるイニシエーターカスパーゼが、カスパーゼ3ホモログであるDriceやDcp-1などのエフェクターカスパーゼを活性化し、アポトーシスが実行される。DroncはArkとともにアポトソームを形成することによって活性化されるが、通常DIAP1によって抑制されている。Rpr、Hid、GrimはDIAP1に結合し、分解を促進することで、カスパーゼの活性化を引き起こす。またp35はウイルス由来の因子で、エフェクターカスパーゼを阻害する機能を持つ。

(b) mCD8::PARP::Venusによるカスパーゼ活性化の検出。mCD8::PARP::Venusは、マウスCD8の細胞外領域および膜貫通領域と蛍光タンパク質Venusを連結した構造を持つ。連結部位にはヒトPARPのカスパーゼ3による切断配列を含み、活性型カスパーゼによって切断される。切断によって生じたネオエピトープは、抗cleaved PARP抗体によって特異的に認識される。Williams et al., 2006の図を改変。

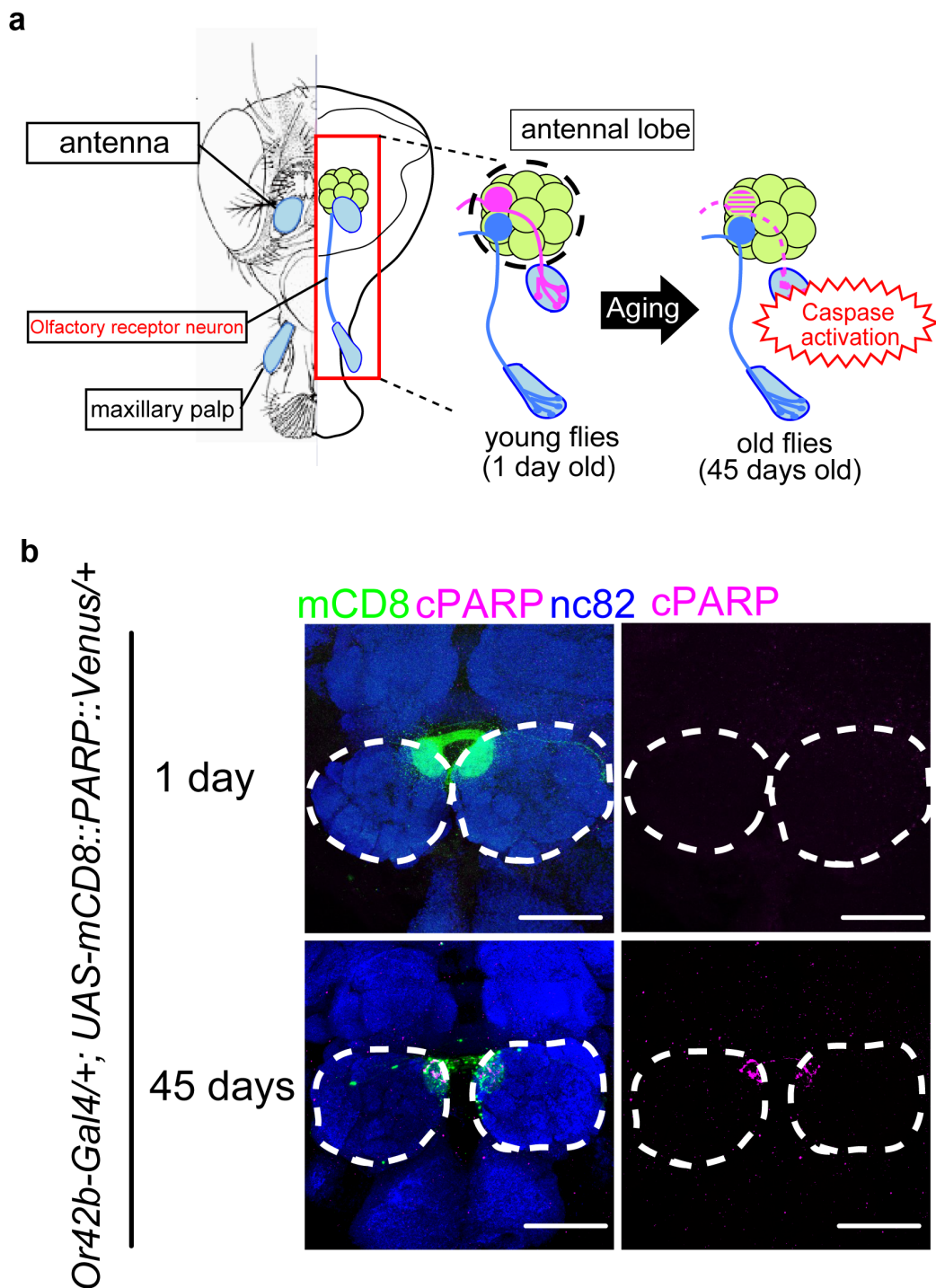


図2 嗅覚受容体神経における加齢依存的なカスパーゼ活性化

(a) ショウジョウバエ脳の模式図、嗅覚受容体神経は触角またはマキシラリーパルプに存在し、サブタイプごとに特定の糸球体に軸索を投射する。Or42b神経を含む特定のサブタイプの嗅覚受容体神経では加齢依存的にカスパーゼが活性化される。

(b) Or42b神経における加齢依存的なカスパーゼ活性化。緑がmCD8、マゼンタがcPARP、青がnc82前シナプスの染色を示す。スケールバー：50 μ m.

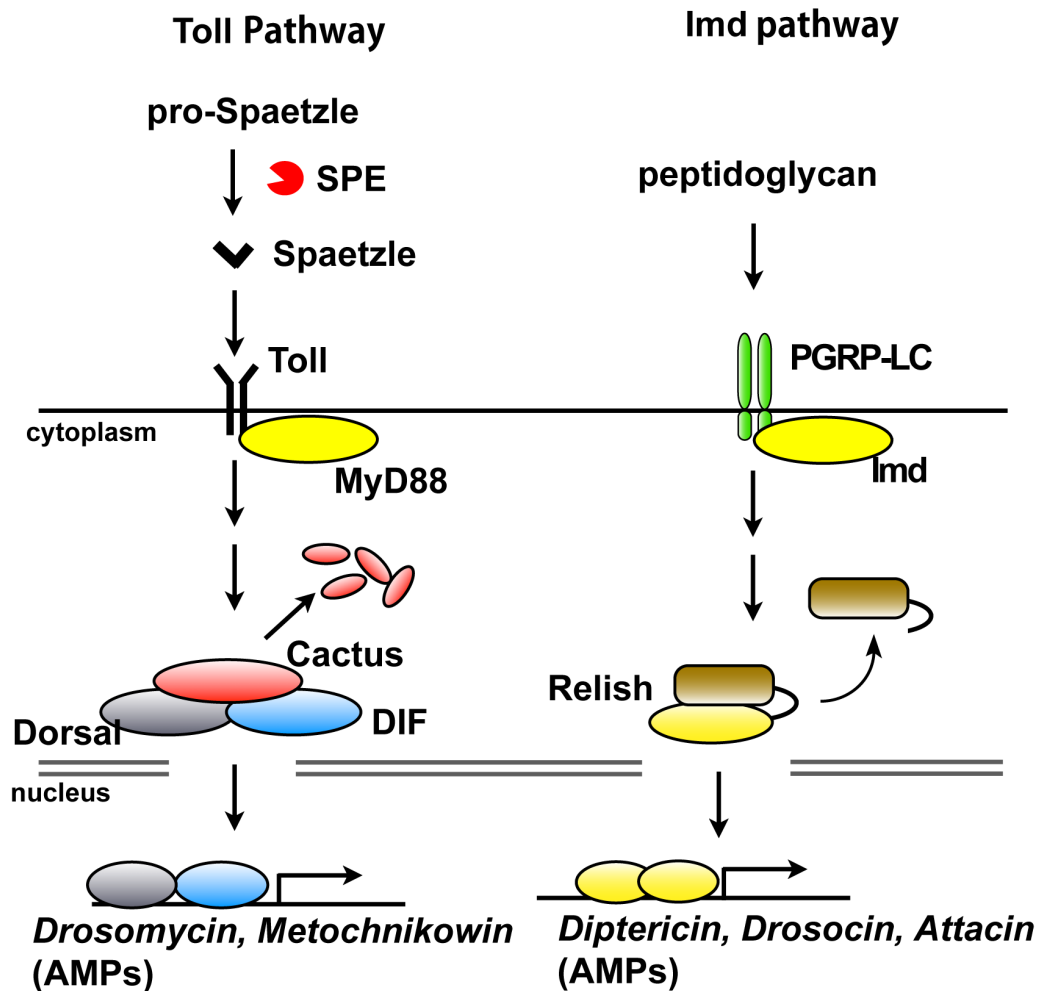


図3 Toll経路とImd経路の概略図

左：Toll経路の概略図。Tollのリガンドであるspaetzleは前駆体で存在するが免疫反応が起こるとSPEによって切断され、Tollに結合することが出来るようになる。Toll経路が活性化すると、Cactus (IκB)が分解され、転写因子であるDorsal、DIF(NFκB protein)が核に移行し、標的遺伝子の転写を活性化する。

右：Imd経路の概略図。レセプターであるPGRP-LCが菌由来のペプチドグリカンを認識するとImd経路が活性化する。最後にRelish (NFκB)がリン酸化、切断をうけ核に移行し、標的遺伝子の転写を活性化する。

AMP, antimicrobial peptide.

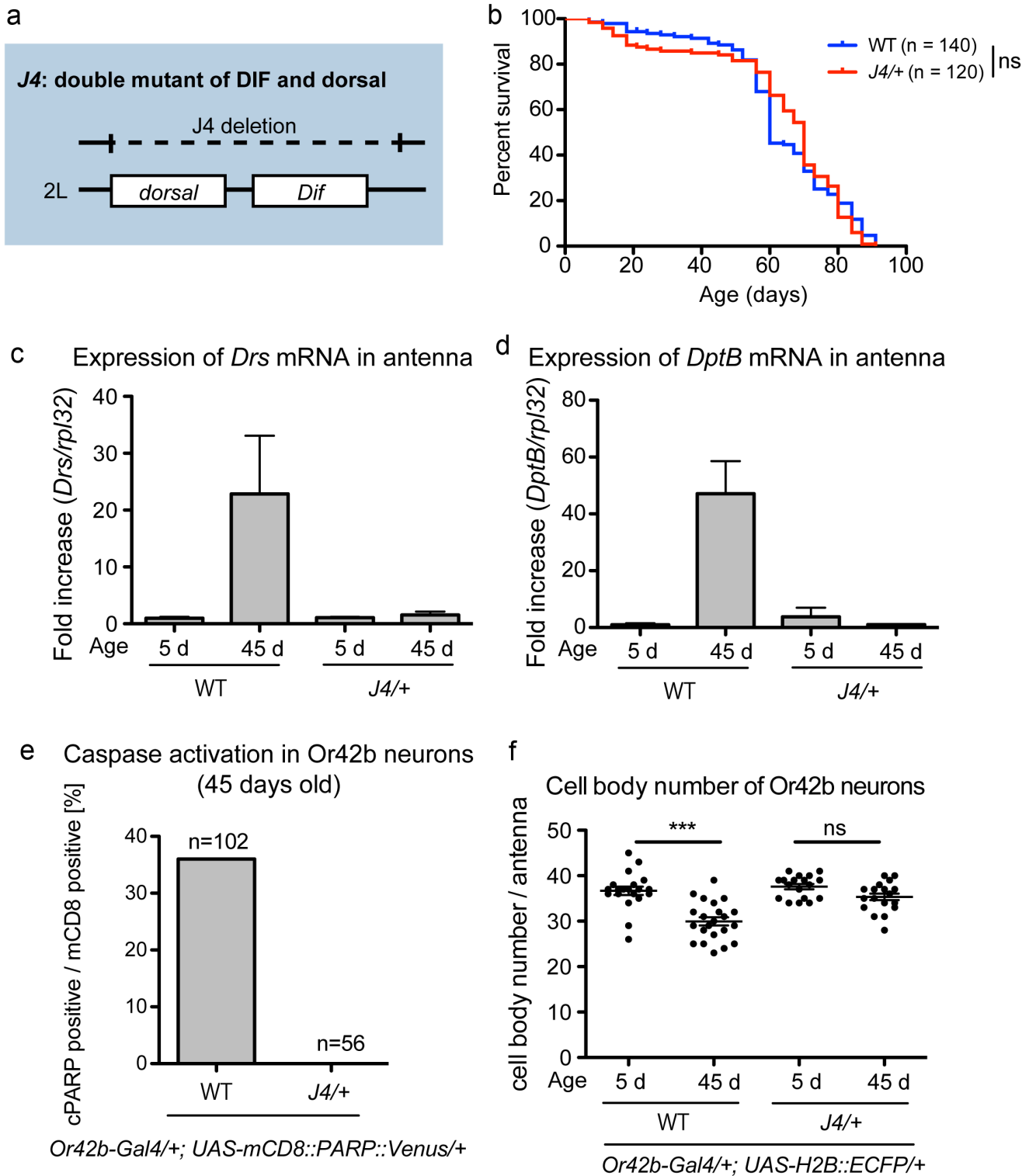


図4 *J4*ヘテロ接合変異体ではOr42b神経における加齢に伴う細胞死が抑制される

(a) *J4*変異体は*dorsal*と*Dif*の欠損変異体である。

(b) *J4*ヘテロ接合変異体と野生型の寿命。ns: not significant. Log-rank test.

(c-d) *J4*ヘテロ接合変異体の触角における(b) *Drosomycin*, (c) *Diptericin B* mRNAの加齢に伴う発現の変化。n = 4-3. mean + SEM.

(e) *J4*ヘテロ接合変異体の45日齢におけるOr42b神経のカスパーゼ活性化。

(f) *J4*ヘテロ接合変異体におけるOr42b神経細胞体数の加齢に伴う変化。Mean ± SEM. ***p<0.001. ns: not significant. One-way ANOVA with Tukey's post-hoc test.

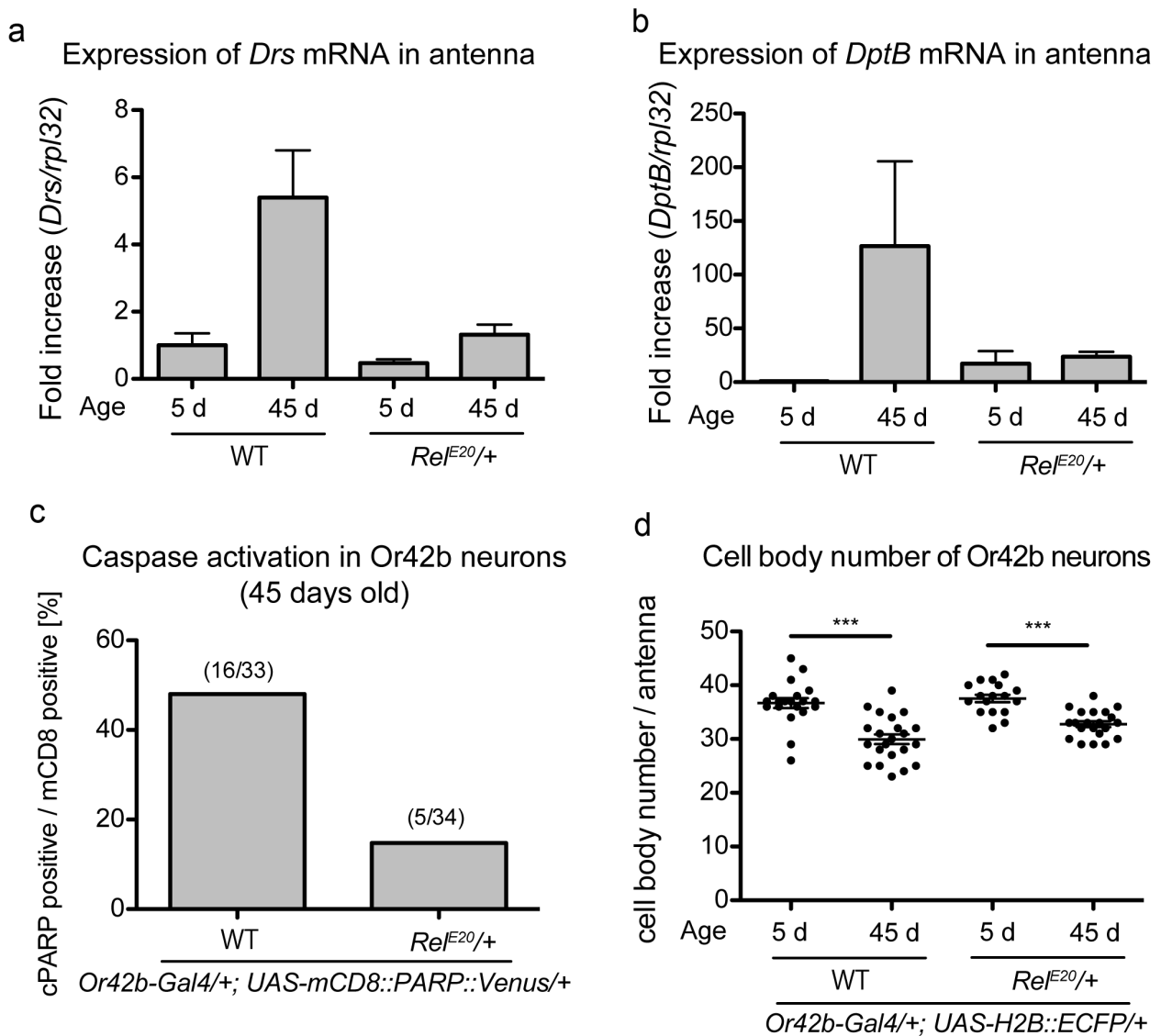


図5 *Rel^{E20}*ヘテロ接合変異体ではOr42b神経における加齢に伴う細胞が抑制される傾向にある (a-b) *Rel^{E20}*ヘテロ接合変異体の触角における(a) *Drosomycin*, (b) *Diptericin B* mRNAの加齢に伴う発現の変化。n = 4. mean + SEM.

(c) *Rel^{E20}*ヘテロ接合変異体の45日齢におけるOr42b神経のカスパーゼ活性化。

(d) *Rel^{E20}*ヘテロ接合変異体におけるOr42b神経細胞体数の加齢に伴う変化。mean±SEM.

***p<0.001. One-way ANOVA with Tukey's post-hoc test.

Drs; *Drosomycin*, *DptB*: *Diptericin*.

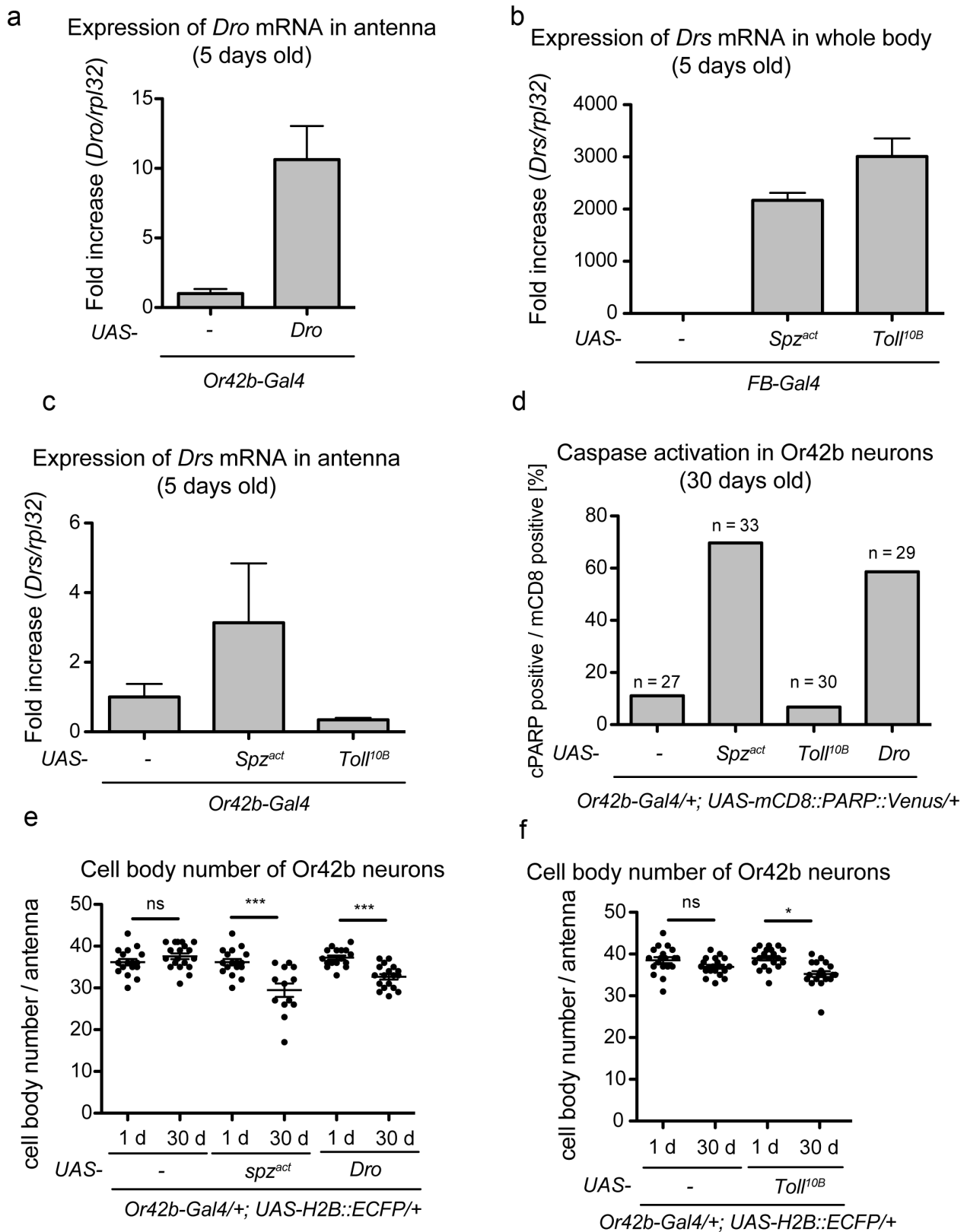


図6 Or42b神経における活性化型spatzel、Drosocinの過剰発現によって細胞死が誘導されるが、活性化型Tollによっては誘導されない

(a, b, c) (a) 触角における*Drosocin* mRNA (b) 全身における*Drosomycin* mRNA (c) 触角における*Drosocin* mRNAの発現。 n = 4. mean + SEM.

(d) Or42b神経におけるカスパーゼ活性化。

(e, f) Or42b神経細胞対数。 mean ± SEM. *p<0.05, ***p<0.001, ns: not significant. One-way ANOVA with Tukey's post-hoc test.

Spz^{act}: active-Spatzel, *Drs*: *Drosomycin*, *Dro*: *Drosocin*.

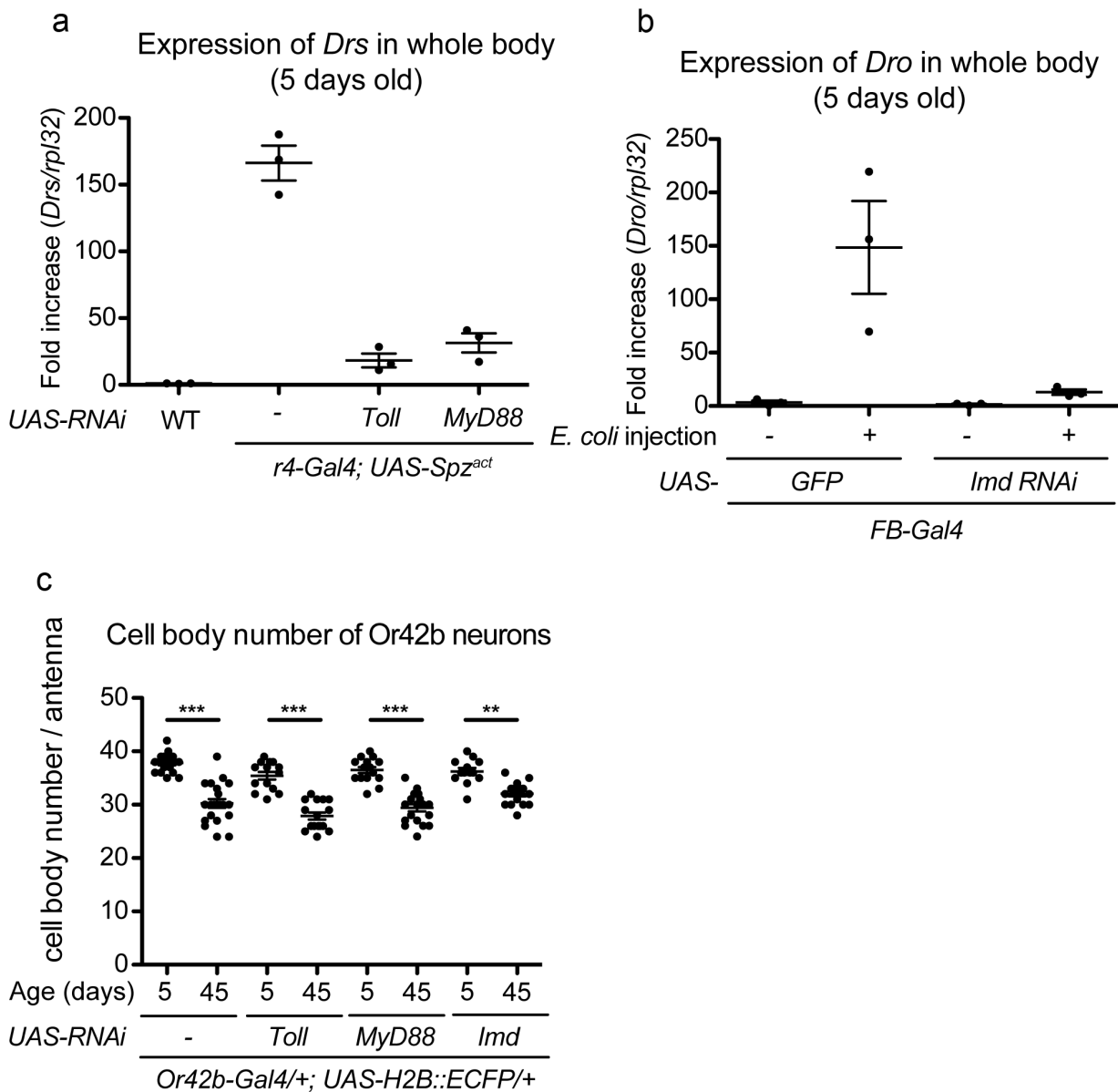


図7 Or42b神経における免疫経路の抑制によってOr42b神経の加齢に伴う細胞死は抑制されない

(a, b) 全身における(a) *Drosomycin*, (b) *Drosocin* mRNAの発現。n = 3. mean ± SEM.

(c) Or42b神経細胞体数。mean ± SEM. **p<0.01, ***p<0.001. One-way ANOVA with Tukey's post-hoc test.

Spz^{act}: active-Spaetzle, *Drs*: *Drosomycin*, *Dro*: *Drosocin*.

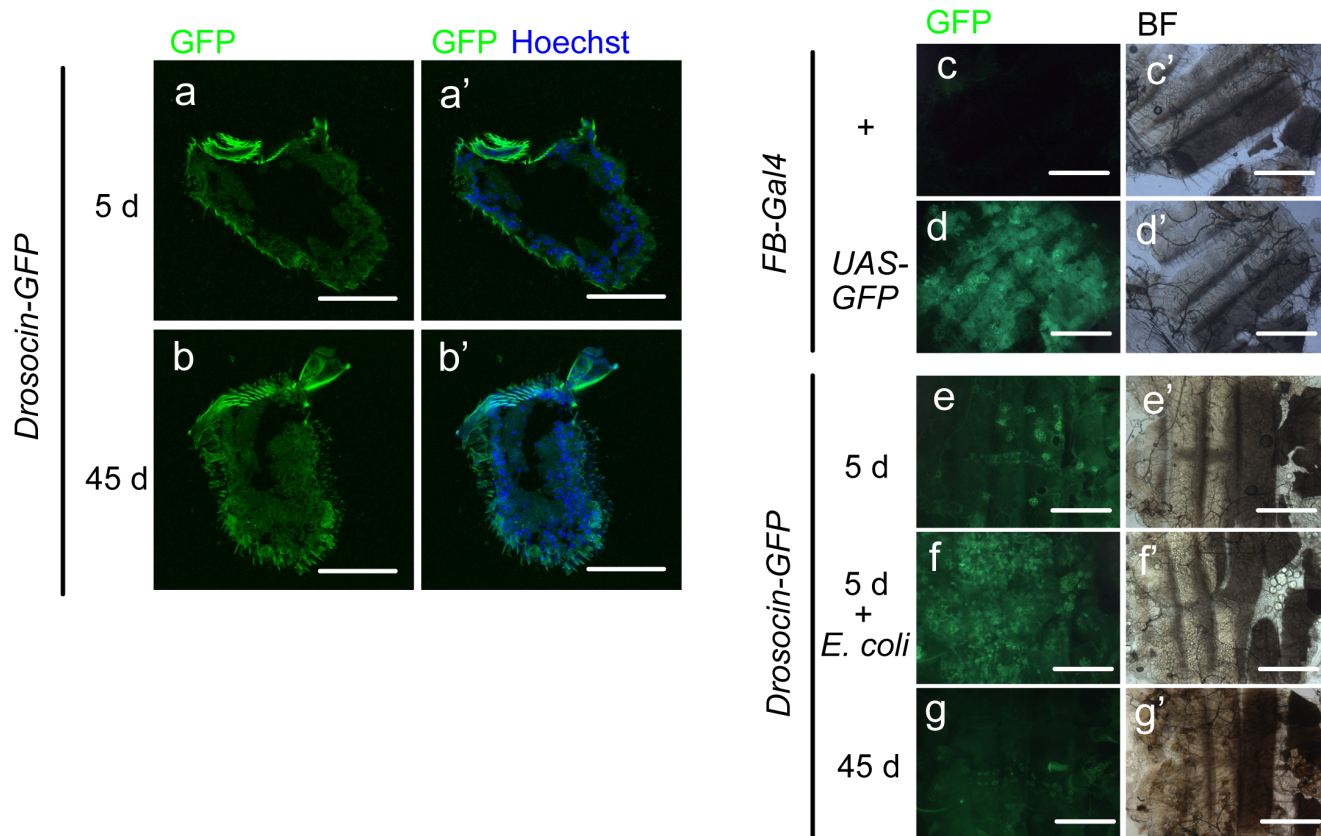


図8 加齢に伴う *Drosocin-GFP* シグナルの上昇は触角においてみられない。
 (a-b') 触角における *GFP* の免疫組織化学。緑: *GFP*、青: Hoechst による核染色を示す。スケールバー: 50 μm 。
 (c-g') 腹部における *GFP* のシグナル。スケールバー: 200 μm 。

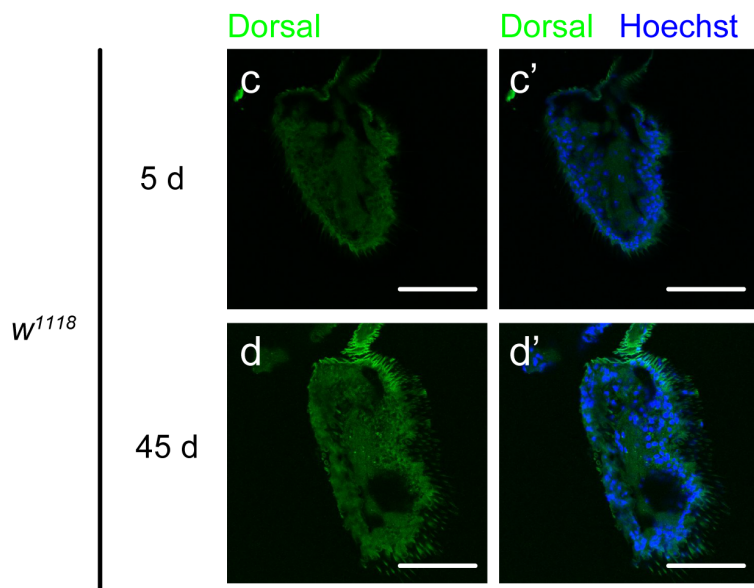
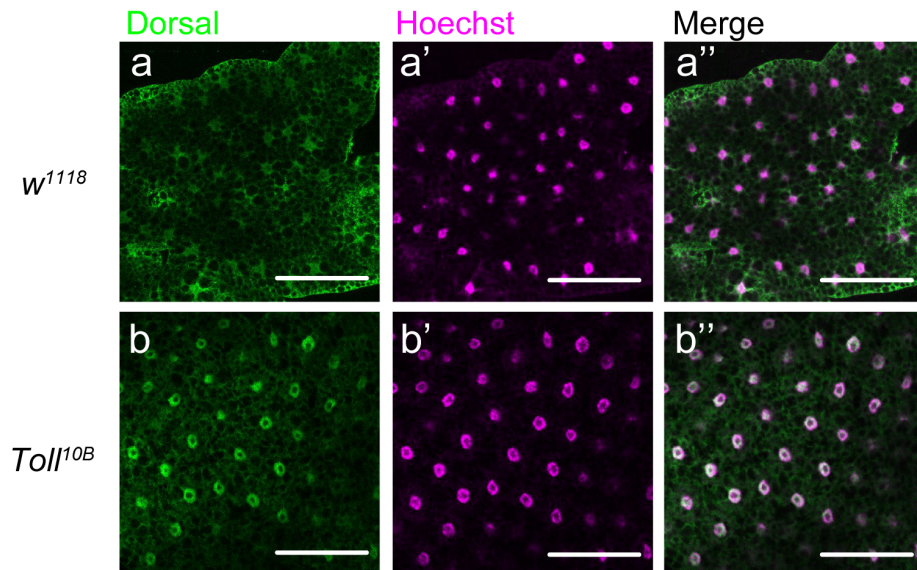


図9 加齢に伴う触角におけるDorsalの核移行は観察されない

(a-b'') 三齢幼虫の脂肪体におけるDorsalの免疫化学染色。緑: Dorsal、マゼンタ: Hoechstによる核染色。スケールバー: 100 μm 。

(c-d') 触角におけるDorsalの免疫化学染色。緑: Dorsal、青: Hoechstによる核染色。スケールバー: 50 μm 。

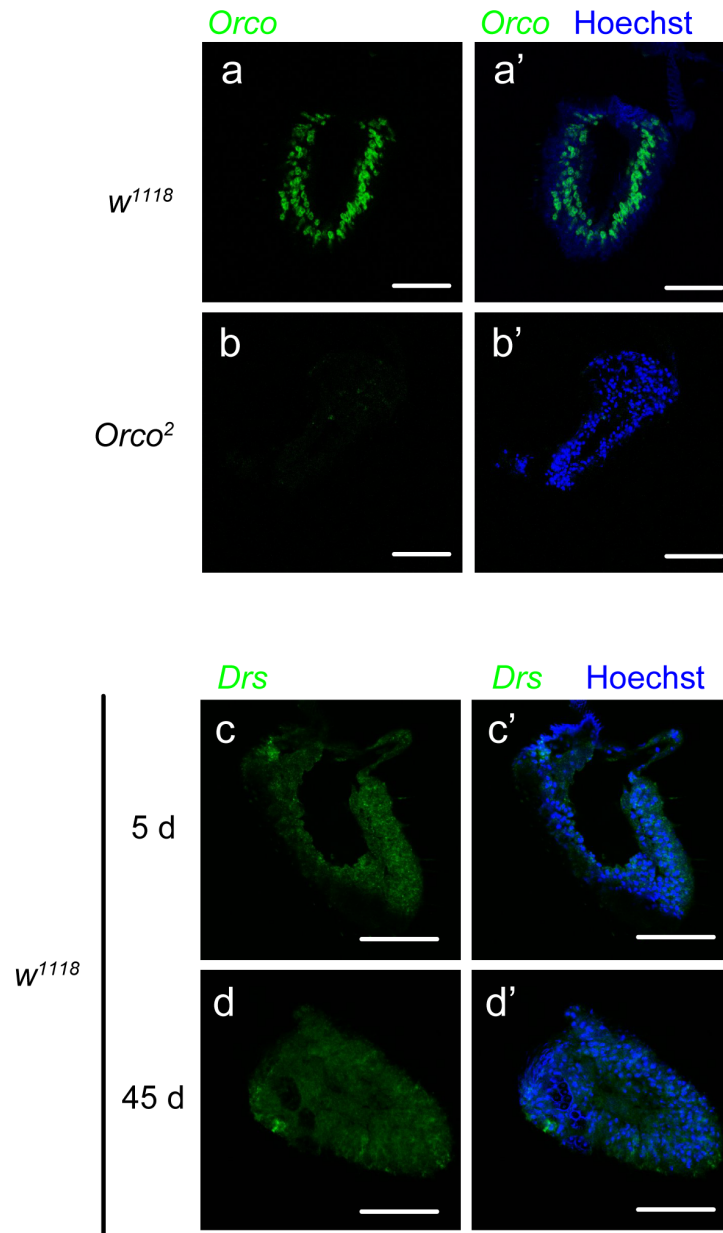


図 1 0 加齢に伴う触角における *Drosomycin* mRNA の発現上昇は蛍光 *in situ* hybridization によって観察されない

(a-b') 触角における *Orco* mRNA の検出。緑: *Orco* mRNA, 青: Hoechst による核染色。

触角における *Drosomycin* mRNA の検出。緑: *Drosomycin* mRNA, 青: Hoechst による核染色。

スケールバー: 50 μm 。 *Drs*: *Drosomycin*.

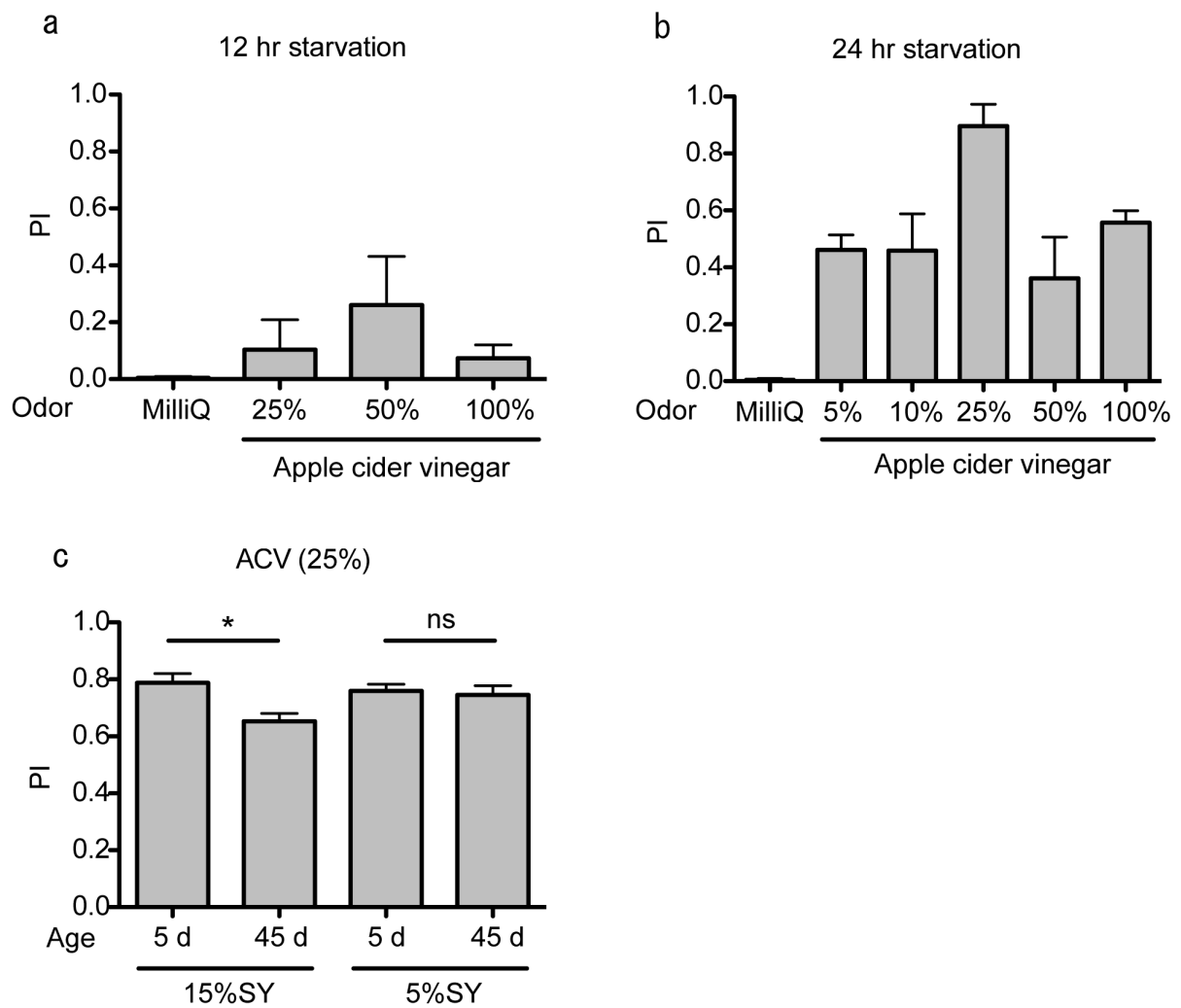


図11 加齢に伴うApple cider vinegarに対する誘引行動の低下は食餌制限によってレスキューされる。

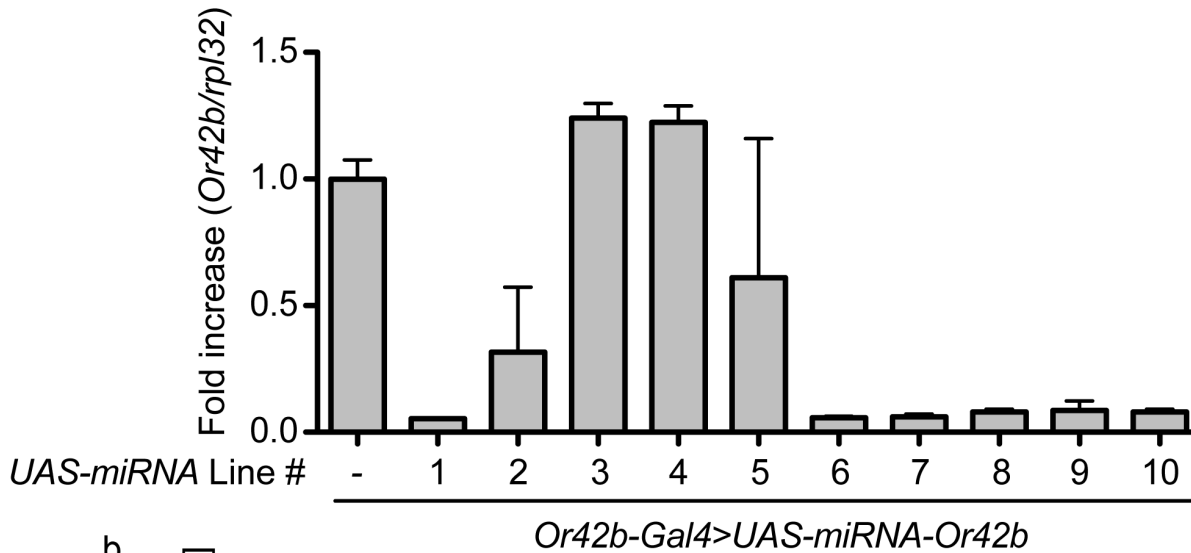
(a, b) (a) 12時間 (b) 24時間絶食後の5日齢 w^{1118} のApple cider vinegarに対する誘引行動。Two-choice assayによる。オスとメスを混合。n = 3. mean + SEM.

(c) 24時間絶食後のオス w^{1118} の25% Apple cider vinegarに対する誘引行動。Two-choice assayによる。n = 7-9. mean + SEM. * $p < 0.05$. ns: not significant. One-way ANOVA with Tukey's post-hoc test.

ACV: Apple cider vinegar (リンゴ酢), SY: Sugar and yeast (15%SYが対照餌、5%SYが食餌制限餌。)

a

Expression of *Or42b* mRNA in antenna (5 days old)



b

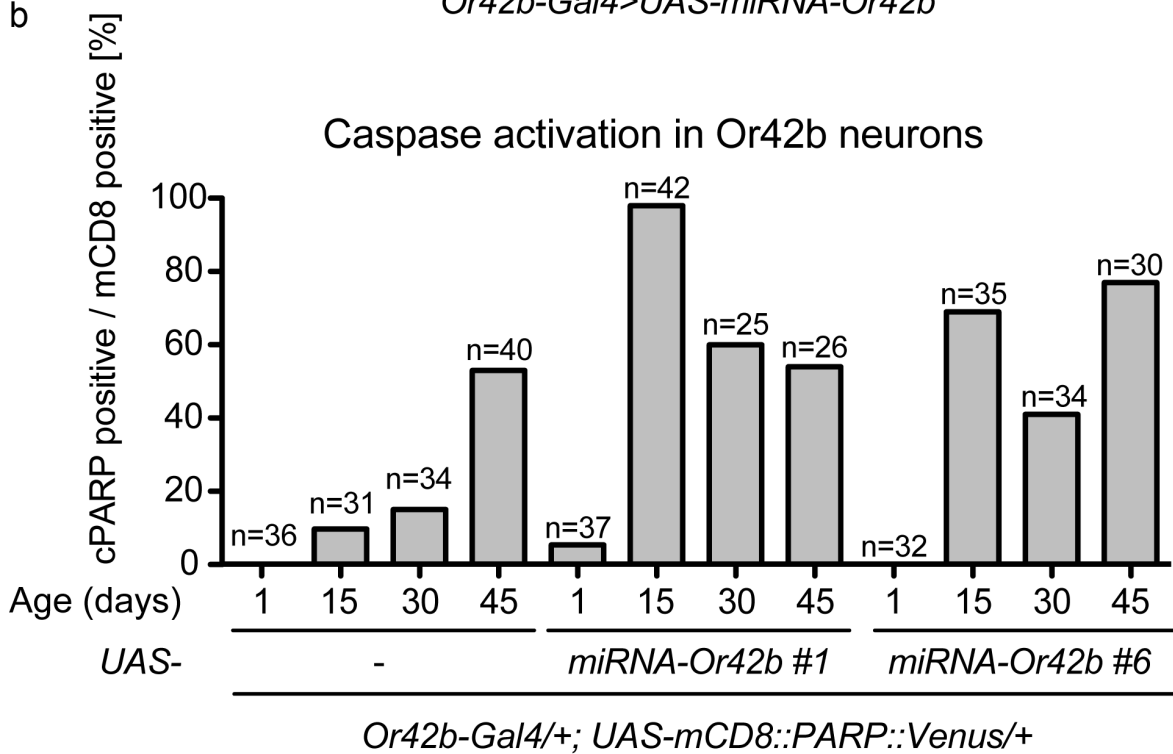


図12 *Or42b*のノックダウンにより*Or42b*神経は若齢においてカスパーゼ活性化を示す

(a) 触角における*Or42b* mRNAの発現。n = 3. mean + SEM.

(b) *Or42b*神経におけるカスパーゼ活性化。

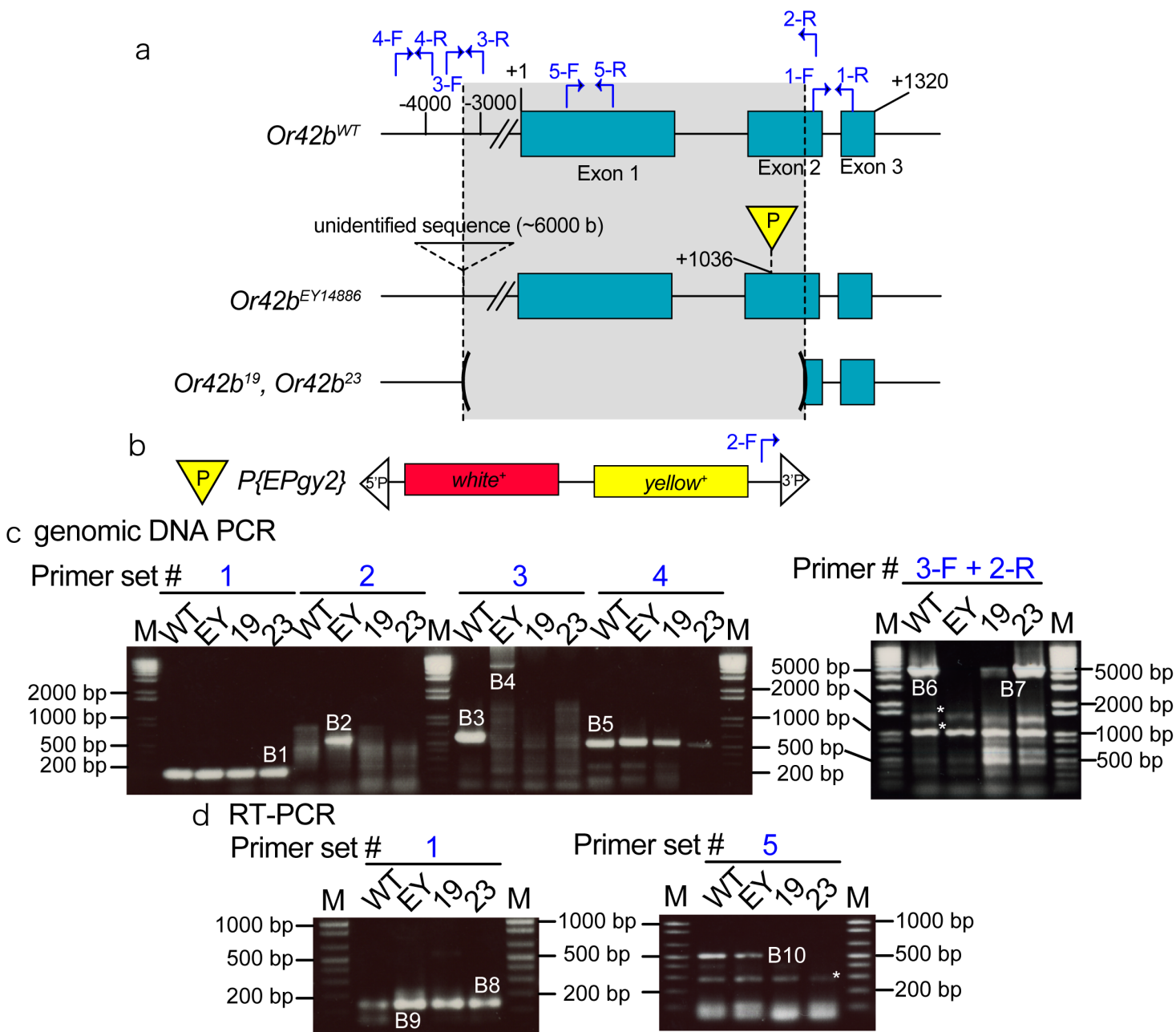


図13 *Or42b¹⁹*は*Or42b*遺伝子のコーディングシーケンスの一部を欠く変異体である

(a) *Or42b*野生型、*Or42b^{EY14886}*、*Or42b¹⁹*、*Or42b²³*のゲノム構造。Pは*Or42b^{EY14886}*に挿入されているP因子*P{EPgy2}*の挿入箇所を示す。またゲノムPCRの結果より*Or42b^{EY14886}*は*Or42b*遺伝子上流3000 b周辺に未知の配列(unidentified sequence)の存在が確認されたのでその位置を示す。1-F- 5-Rは後のPCRで用いるプライマーの位置を示す。2-Fは*P{EPgy2}*の配列に対応するプライマーであるので(b)を参照。

(b) *Or42b^{EY14886}*に挿入されているP因子の*P{EPgy2}*の構造を示す。*P{EPgy2}*の全長は約11 kbである。2-Fは後のPCRで用いたプライマーの位置を示す。

(c) genome DNAとそれぞれのプライマーセットを用いたPCRによって得られたバンド。B1: Primer set#1の領域の存在を示す。B2: *P{EPgy2}*の存在を示す。B3: Primer set #3の領域の存在を示す。B4: Primer set #3の領域に7000 bほどの配列が挿入されていることを示す。B5: Primer set #4の領域の存在を示す。B6: Primer #3-FとPrimer #2-Rの領域の存在を示す。B7: Primer #3-FとPrimer #2-Rの領域の存在を示す。長さはB6と同じであるが、Sequenceにより B7にはunidentified sequenceの一部が含まれていること、*Or42b*の配列が一部かけていることが確認された。19と23の配列は確認できる限り同一であった。

(d) cDNAとそれぞれのプライマーセットを用いたPCRによって得られたバンド。B8: Primer set #1の領域(unspliced RNA)の存在を示す。B9: Primer set#1の領域(spliced RNAと考えられる)の存在を示す。B:10 Primer set #5の領域の存在を示す。

WT: *w¹¹¹⁸*, EY: *Or42b^{EY14886}*, 19: *Or42b¹⁹*, 23: *Or42b²³*, M: DNA ladder.

*: non-specific band.

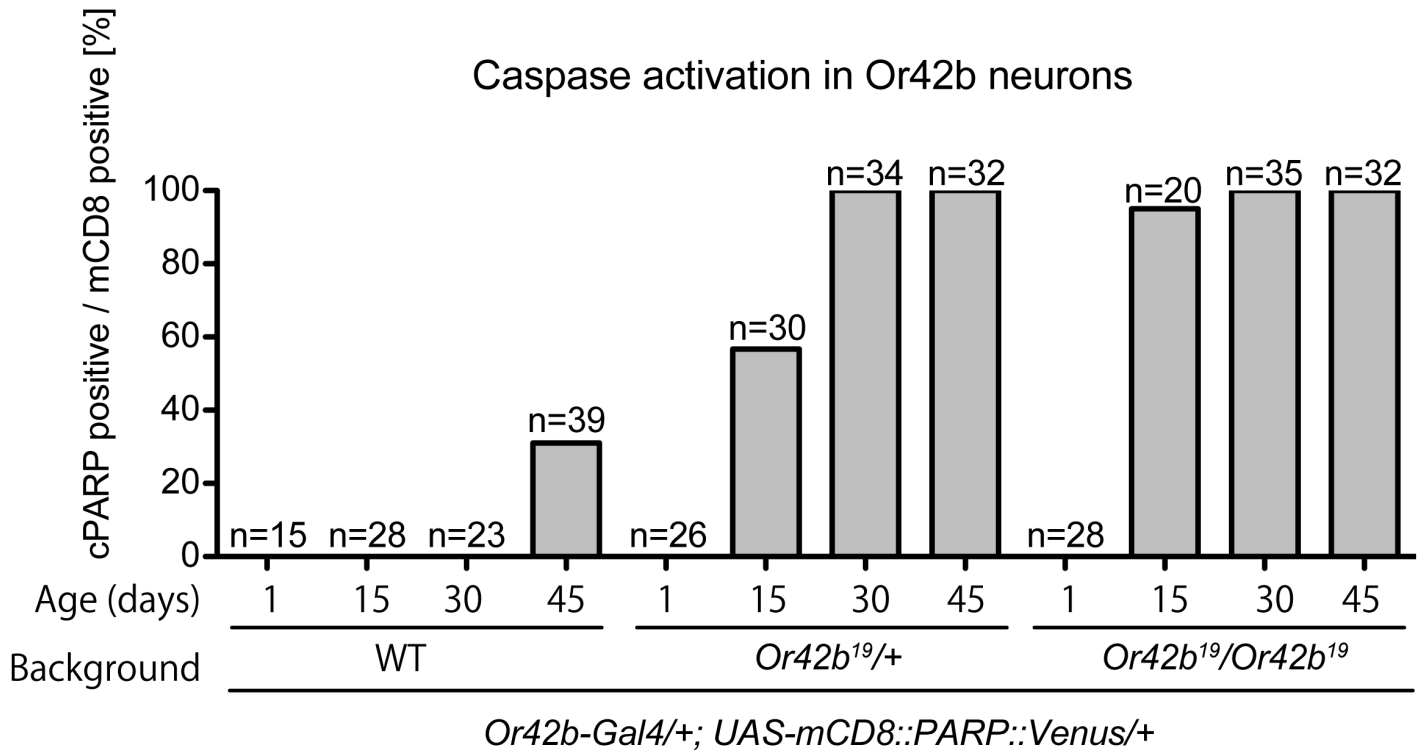


図14 *Or42b¹⁹*ヘテロ接合、ホモ接合変異体では若齢においてOr42b神経においてカスパーゼが活性化する
Or42b神経においてカスパーゼの活性化が観察される脳の割合。

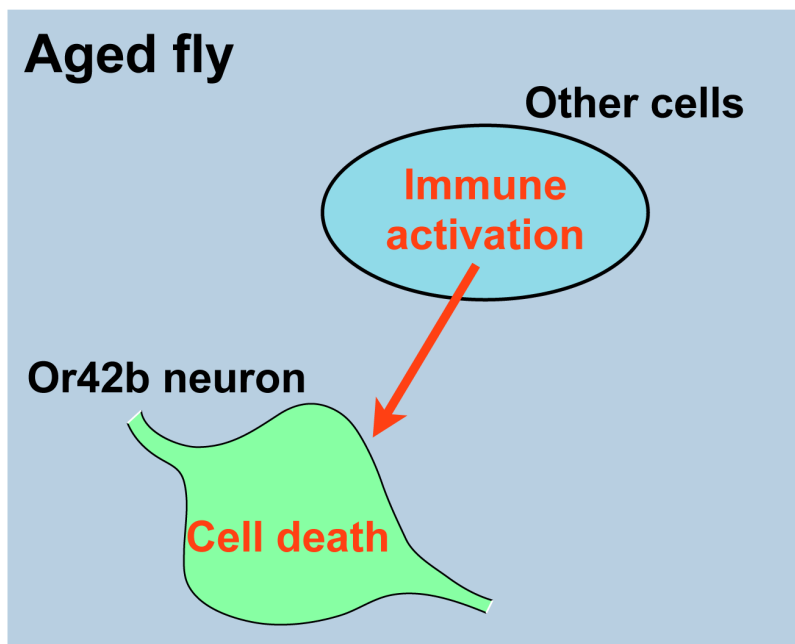


図15 加齢に伴うOr42b神経細胞死のメカニズム

加齢に伴いOr42b神経以外の細胞において自然免疫応答が亢進し、その結果Or42b神経において細胞死、カスパーゼ活性化が観察される。

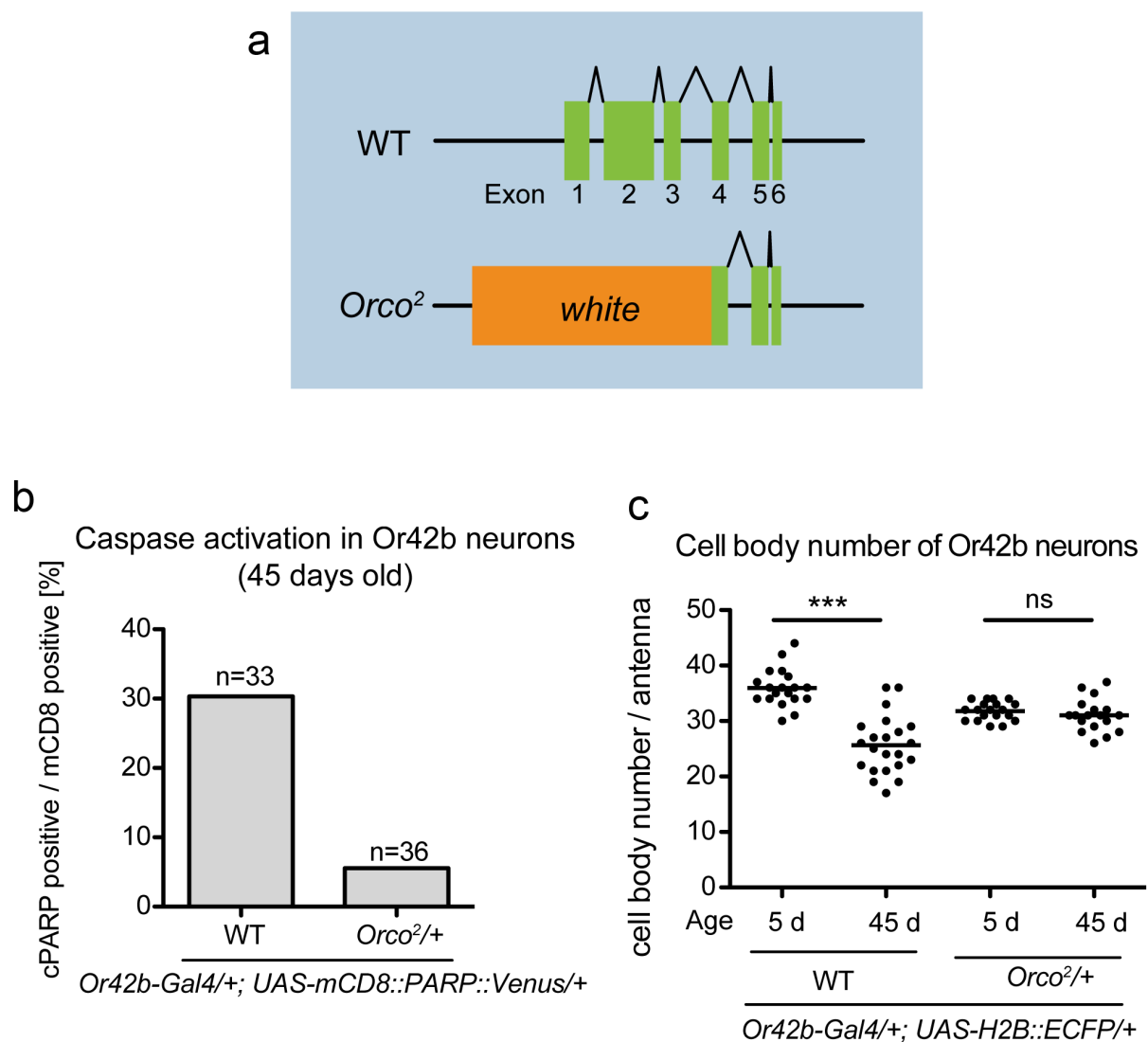


図16 *Orco*²ヘテロ接合変異体ではOr42b神経の加齢に伴う細胞死が抑制される

(a) *Orco*²変異体は*Orco*のプロモーター部分とExon 1-3部分を欠損し、*white*遺伝子を挿入した変異体である。

(b) 45日齢において、Or42b神経においてカスパーゼ活性化の見られる脳の割合。

(c) Or42b神経細胞体数。mean ± SEM. ****p*<0.001. ns: not significant. One-way ANOVA with Tukey's post-hoc test.

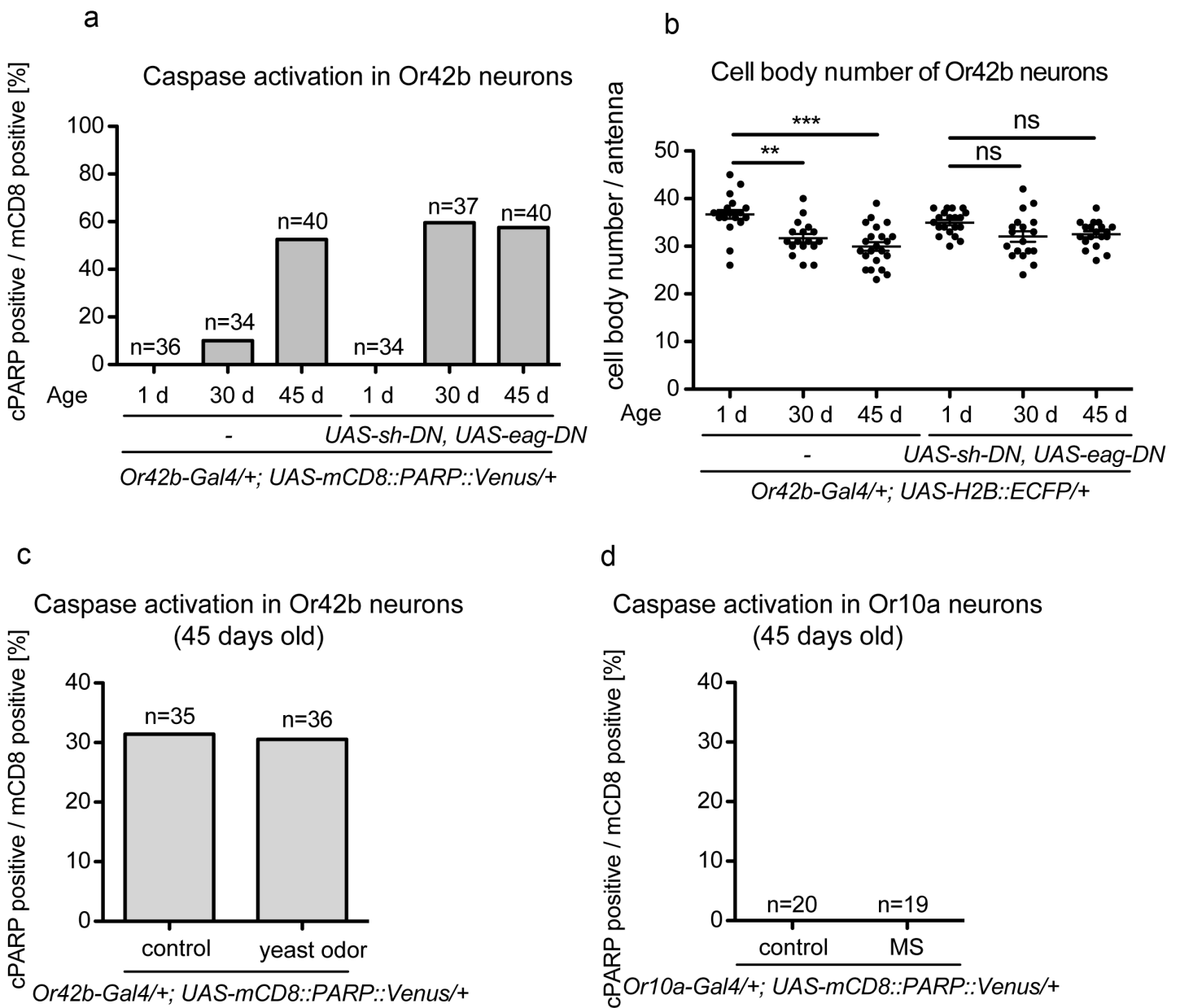


図17 神経活動を亢進する操作によって嗅覚受容体神経の細胞死は誘導されない

(a) Or42b神経においてカスパーゼ活性化の見られる脳の割合。

(b) Or42b神経細胞体数。mean \pm SEM. ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$. ns: not significant. One-way ANOVA with Tukey's post-hoc test.

(c) 45日齢におけるOr42b神経においてカスパーゼ活性化の見られる脳の割合。

(d) 45日齢におけるOr10a神経においてカスパーゼ活性化の見られる脳の割合。

sh-DN: *shaker dominant negative*, *eag-DN*: *eather a go-go dominant negative*, MS: Methyl salicylate.

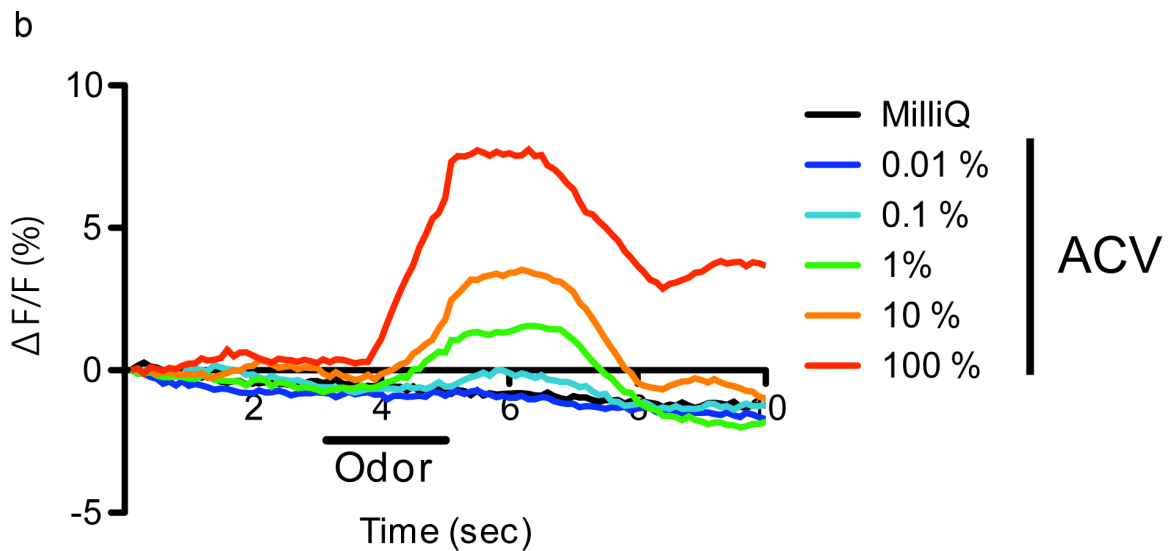
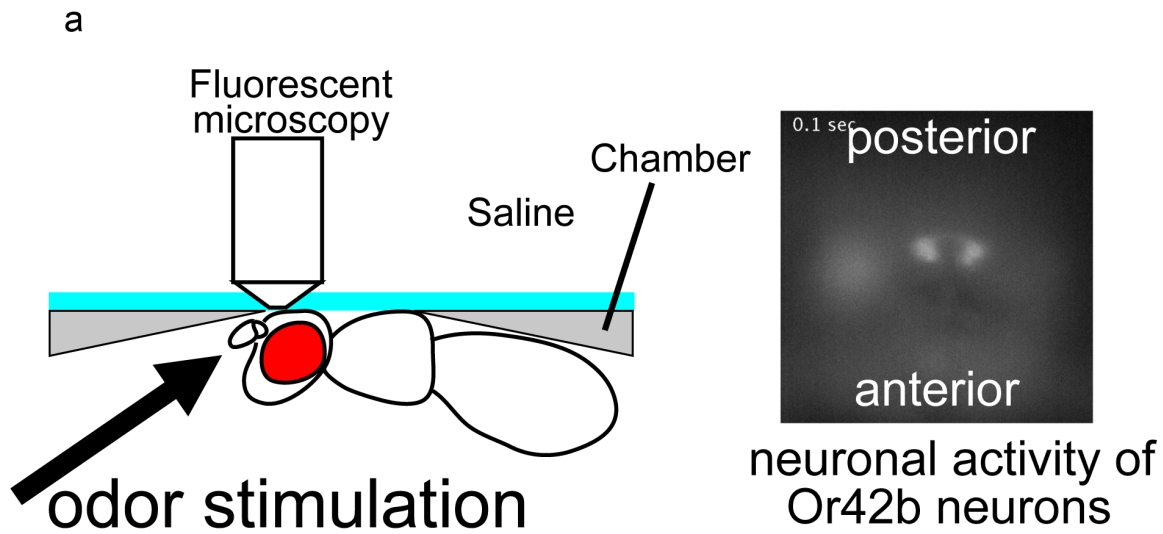


図18 GCaMPカルシウムイメージングを利用した匂い物質刺激時の嗅覚受容体神経における神経活動の測定

(a) 左: 測定時のショウジョウバエのセットアップ。右: 蛍光顕微鏡によって得られる像。中央の白く見えるものがOr42b神経の軸索。

(b) 様々な濃度で刺激をしたときのOr42b神経の神経活動。

fly: 5 days old male, w; *Or42b-Gal4*, *UAS-GCaMP/+*; *UAS-GCaMP/+*

ACV: Apple cider vinegar.

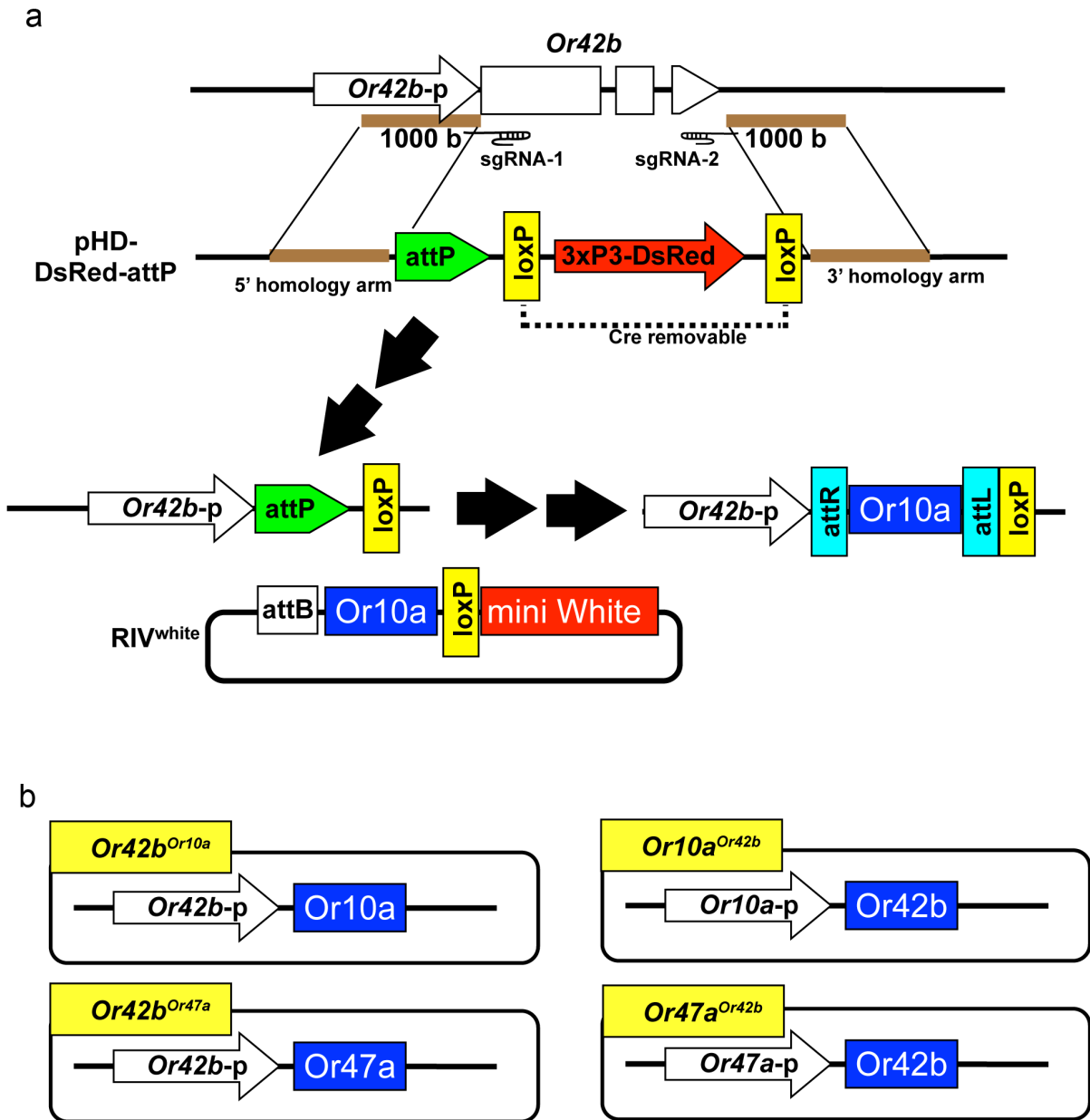


図19 CRISPR/Cas9システムを利用した嗅覚受容体遺伝子の入れ替え

(a) CRISPR/Cas9システムを利用した嗅覚受容体遺伝子の入れ替えの戦略を示す。まずCRISPR/Cas9システムを用いて、*Or2b*遺伝子のコーディングシーケンスとattPサイトを含む配列の入れ替えを行う。次にattB配列と*Or10a* cDNAの配列を持つ配列を用いてattP - attB配列を用いた特異的な組み替えを行い、*Or10a* cDNA配列の導入を行う。

(b) (a)で示した戦略により、ここに示す組み合わせの遺伝子組み換えショウジョウバエを作製し、それぞれの嗅覚受容体神経における細胞死及びカスパーゼ活性化の検出を行う。

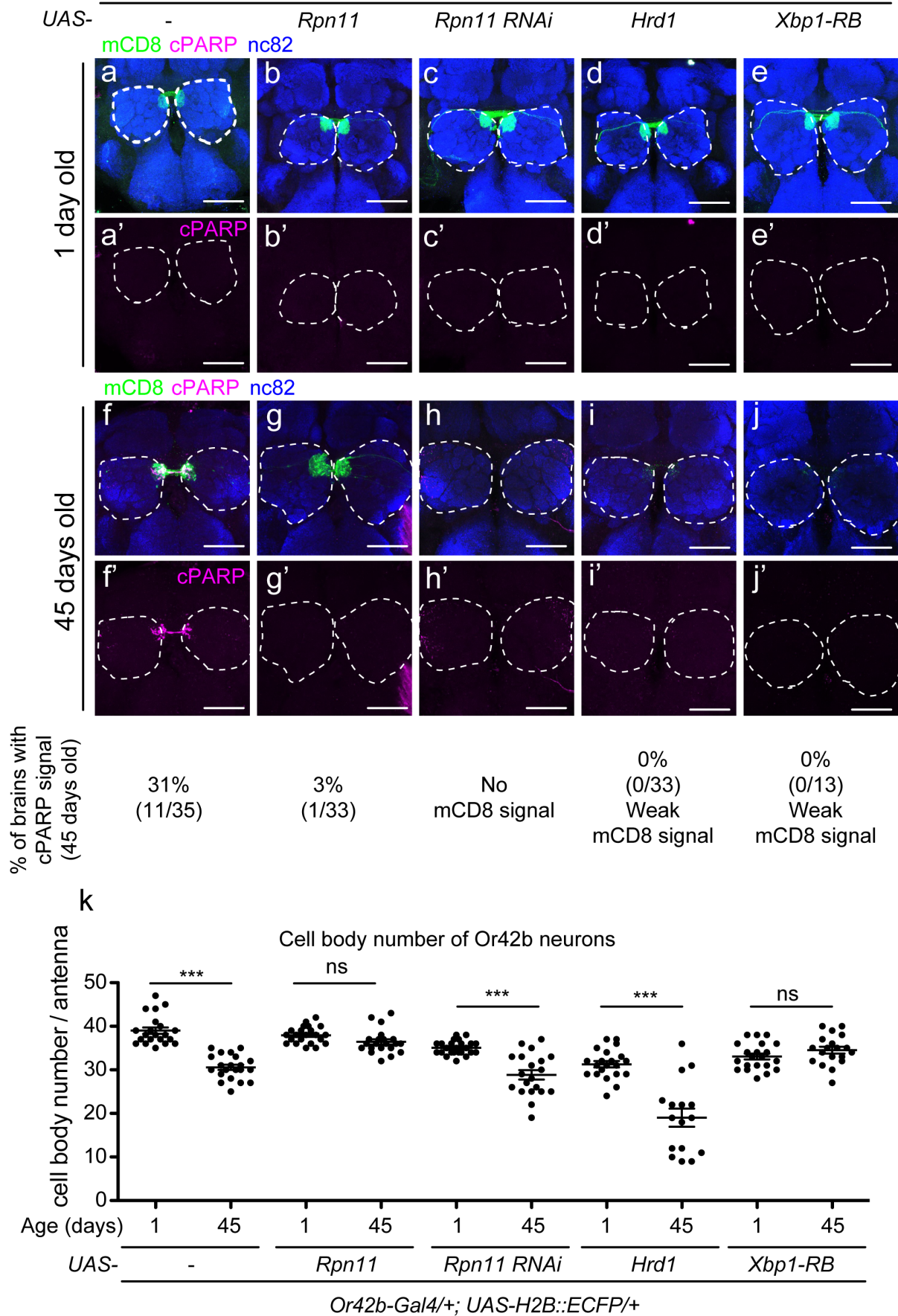


図20 プロテアソーム系及び小胞体関連分解経路がOr42b神経の細胞死に関わる可能性の検討
 (a-j) 1日齢あるいは45日齢の個体のOr42b神経軸索とカスパーゼ活性化。緑: mCD8, マゼンタ: cPARP, 青: nc82による前シナプス染色。スケールバー: 50 μ m。
 (k) Or42b神経細胞対数。mean \pm SEM. *** p <0.001. ns: not significant. One-way ANOVA with Tukey's post-hoc test.

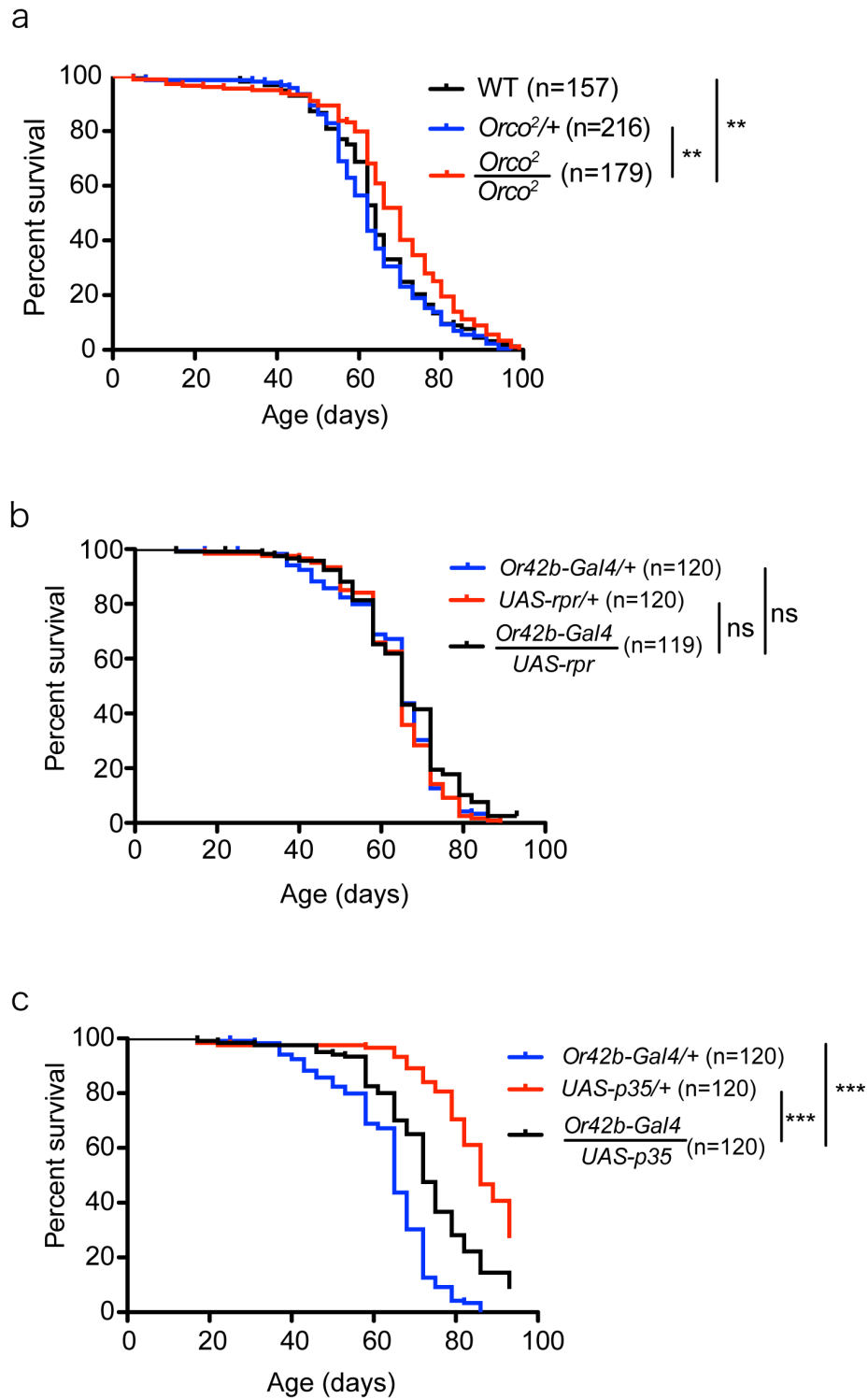


図21 Or42b神経の有無は個体の寿命に関与しない

(a) *Orco*変異体における寿命。

(b) Or42b神経の細胞死を誘導した個体の寿命。

(c) Or42b神経の細胞死を抑制した個体の寿命。

** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$. ns: not significant. Log-rank test.

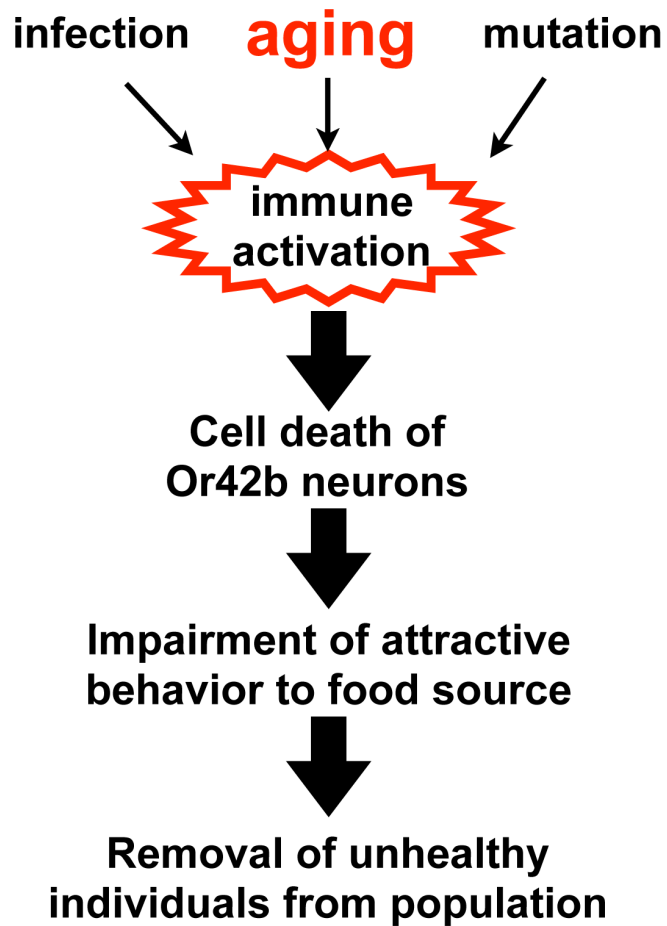


図 22 加齢に伴うOr42b神経細胞死の意義

Or42b神経細胞死が個体の生存に不利に働くことが考えられる。また自然免疫応答の亢進によってOr42b神経の細胞死が誘導される。これらのことから、Or42b神経細胞死は、ショウジョウバエの種の存続の観点で集団から除外すべき個体をセレクションする機構ではないかと考えている。

6 参考文献

- Amor, S., Peferoen, L.A., Vogel, D.Y., Breur, M., van der Valk, P., Baker, D., and van Noort, J.M. (2014). Inflammation in neurodegenerative diseases--an update. *Immunology* *142*, 151-166.
- Baena-Lopez, L.A., Alexandre, C., Mitchell, A., Pasakarnis, L., and Vincent, J.P. (2013). Accelerated homologous recombination and subsequent genome modification in *Drosophila*. *Development* *140*, 4818-4825.
- Barnes, C.A. (1994). Normal aging: regionally specific changes in hippocampal synaptic transmission. *Trends in neurosciences* *17*, 13-18.
- Barzilai, A., and Melamed, E. (2003). Molecular mechanisms of selective dopaminergic neuronal death in Parkinson's disease. *Trends in molecular medicine* *9*, 126-132.
- Becker, T., Loch, G., Beyer, M., Zinke, I., Aschenbrenner, A.C., Carrera, P., Inhester, T., Schultze, J.L., and Hoch, M. (2010). FOXO-dependent regulation of innate immune homeostasis. *Nature* *463*, 369-373.
- Bellen, H.J., Levis, R.W., Liao, G., He, Y., Carlson, J.W., Tsang, G., Evans-Holm, M., Hiesinger, P.R., Schulze, K.L., Rubin, G.M., *et al.* (2004). The BDGP gene disruption project: single transposon insertions associated with 40% of *Drosophila* genes. *Genetics* *167*, 761-781.
- Broughton, S.J., Kitamoto, T., and Greenspan, R.J. (2004). Excitatory and inhibitory switches for courtship in the brain of *Drosophila melanogaster*. *Curr Biol* *14*, 538-547.
- Buchon, N., Silverman, N., and Cherry, S. (2014). Immunity in *Drosophila melanogaster*--from microbial recognition to whole-organism physiology. *Nature reviews Immunology* *14*, 796-810.
- Burke, S.N., and Barnes, C.A. (2006). Neural plasticity in the ageing brain. *Nature reviews Neuroscience* *7*, 30-40.
- Cao, Y., Chtarbanova, S., Petersen, A.J., and Ganetzky, B. (2013). Dnr1 mutations cause neurodegeneration in *Drosophila* by activating the innate immune response in the brain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *110*, E1752-1760.
- Chen, A.Y., Xia, S., Wilburn, P., and Tully, T. (2014a). Olfactory deficits in an alpha-synuclein fly model of Parkinson's disease. *PloS one* *9*, e97758.
- Chen, C.H., Huang, H., Ward, C.M., Su, J.T., Schaeffer, L.V., Guo, M., and Hay, B.A. (2007). A synthetic maternal-effect selfish genetic element drives population replacement in *Drosophila*. *Science* *316*, 597-600.

- Chen, H., Zheng, X., and Zheng, Y. (2014b). Age-associated loss of lamin-B leads to systemic inflammation and gut hyperplasia. *Cell* *159*, 829-843.
- Chiang, A., Priya, R., Ramaswami, M., Vijayraghavan, K., and Rodrigues, V. (2009). Neuronal activity and Wnt signaling act through Gsk3-beta to regulate axonal integrity in mature *Drosophila* olfactory sensory neurons. *Development* *136*, 1273-1282.
- Chihara, T., Kitabayashi, A., Morimoto, M., Takeuchi, K., Masuyama, K., Tonoki, A., Davis, R.L., Wang, J.W., and Miura, M. (2014). Caspase inhibition in select olfactory neurons restores innate attraction behavior in aged *Drosophila*. *PLoS genetics* *10*, e1004437.
- de Bruyne, M., Foster, K., and Carlson, J.R. (2001). Odor coding in the *Drosophila* antenna. *Neuron* *30*, 537-552.
- Dong, X.X., Wang, Y., and Qin, Z.H. (2009). Molecular mechanisms of excitotoxicity and their relevance to pathogenesis of neurodegenerative diseases. *Acta pharmacologica Sinica* *30*, 379-387.
- Doty, R.L. (2012). Olfactory dysfunction in Parkinson disease. *Nature reviews Neurology* *8*, 329-339.
- Doty, R.L., Shaman, P., Applebaum, S.L., Giberson, R., Siksorski, L., and Rosenberg, L. (1984). Smell identification ability: changes with age. *Science* *226*, 1441-1443.
- Erdelyi, M., and Szabad, J. (1989). Isolation and characterization of dominant female sterile mutations of *Drosophila melanogaster*. I. Mutations on the third chromosome. *Genetics* *122*, 111-127.
- Fergestad, T., Ganetzky, B., and Palladino, M.J. (2006). Neuropathology in *Drosophila* membrane excitability mutants. *Genetics* *172*, 1031-1042.
- Fishilevich, E., and Vosshall, L.B. (2005). Genetic and functional subdivision of the *Drosophila* antennal lobe. *Curr Biol* *15*, 1548-1553.
- Fontana, L., Partridge, L., and Longo, V.D. (2010). Extending healthy life span--from yeast to humans. *Science* *328*, 321-326.
- Gratz, S.J., Ukken, F.P., Rubinstein, C.D., Thiede, G., Donohue, L.K., Cummings, A.M., and O'Connor-Giles, K.M. (2014). Highly specific and efficient CRISPR/Cas9-catalyzed homology-directed repair in *Drosophila*. *Genetics* *196*, 961-971.
- Gronke, S., Beller, M., Fellert, S., Ramakrishnan, H., Jackle, H., and Kuhnlein, R.P. (2003). Control of fat storage by a *Drosophila* PAT domain protein. *Curr Biol* *13*, 603-606.
- Guntermann, S., Primrose, D.A., and Foley, E. (2009). Dnr1-dependent regulation of the *Drosophila* immune deficiency signaling pathway. *Developmental and comparative immunology* *33*, 127-134.
- Hartwig, C.L., Worrell, J., Levine, R.B., Ramaswami, M., and Sanyal, S. (2008). Normal

- dendrite growth in *Drosophila* motor neurons requires the AP-1 transcription factor. *Developmental neurobiology* 68, 1225-1242.
- Hedengren, M., Asling, B., Dushay, M.S., Ando, I., Ekengren, S., Wihlborg, M., and Hultmark, D. (1999). Relish, a central factor in the control of humoral but not cellular immunity in *Drosophila*. *Molecular cell* 4, 827-837.
- Heneka, M.T., Kummer, M.P., and Latz, E. (2014). Innate immune activation in neurodegenerative disease. *Nature reviews Immunology* 14, 463-477.
- Hetz, C., and Mollereau, B. (2014). Disturbance of endoplasmic reticulum proteostasis in neurodegenerative diseases. *Nature reviews Neuroscience* 15, 233-249.
- Hirth, F. (2010). *Drosophila melanogaster* in the study of human neurodegeneration. *CNS & neurological disorders drug targets* 9, 504-523.
- Hu, X., Yagi, Y., Tanji, T., Zhou, S., and Ip, Y.T. (2004). Multimerization and interaction of Toll and Spatzle in *Drosophila*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101, 9369-9374.
- Jang, I.H., Chosa, N., Kim, S.H., Nam, H.J., Lemaitre, B., Ochiai, M., Kambris, Z., Brun, S., Hashimoto, C., Ashida, M., *et al.* (2006). A Spatzle-processing enzyme required for toll signaling activation in *Drosophila* innate immunity. *Developmental cell* 10, 45-55.
- Kang, M.J., and Ryoo, H.D. (2009). Suppression of retinal degeneration in *Drosophila* by stimulation of ER-associated degradation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106, 17043-17048.
- Labbadia, J., and Morimoto, R.I. (2015). The biology of proteostasis in aging and disease. *Annual review of biochemistry* 84, 435-464.
- Larsson, M.C., Domingos, A.I., Jones, W.D., Chiappe, M.E., Amrein, H., and Vosshall, L.B. (2004). Or83b encodes a broadly expressed odorant receptor essential for *Drosophila* olfaction. *Neuron* 43, 703-714.
- Lee, G., and Park, J.H. (2004). Hemolymph sugar homeostasis and starvation-induced hyperactivity affected by genetic manipulations of the adipokinetic hormone-encoding gene in *Drosophila melanogaster*. *Genetics* 167, 311-323.
- Lemaitre, B., and Hoffmann, J. (2007). The host defense of *Drosophila melanogaster*. *Annual review of immunology* 25, 697-743.
- Lemaitre, B., Reichhart, J.M., and Hoffmann, J.A. (1997). *Drosophila* host defense: differential induction of antimicrobial peptide genes after infection by various classes of microorganisms. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94, 14614-14619.
- Leung, C.T., Coulombe, P.A., and Reed, R.R. (2007). Contribution of olfactory neural stem

- cells to tissue maintenance and regeneration. *Nat Neurosci* *10*, 720-726.
- Libert, S., Zwiener, J., Chu, X., Vanvoorhies, W., Roman, G., and Pletcher, S. (2007). Regulation of *Drosophila* life span by olfaction and food-derived odors. *Science* *315*, 1133-1137.
- Ligoxygakis, P., Pelte, N., Hoffmann, J.A., and Reichhart, J.M. (2002). Activation of *Drosophila* Toll during fungal infection by a blood serine protease. *Science* *297*, 114-116.
- Lucin, K.M., and Wyss-Coray, T. (2009). Immune activation in brain aging and neurodegeneration: too much or too little? *Neuron* *64*, 110-122.
- Matsuzaki, K. (2009). Control of cell selectivity of antimicrobial peptides. *Biochimica et biophysica acta* *1788*, 1687-1692.
- Mattson, M.P. (2000). Apoptosis in neurodegenerative disorders. *Nature reviews Molecular cell biology* *1*, 120-129.
- Mattson, M.P., and Magnus, T. (2006). Ageing and neuronal vulnerability. *Nature reviews Neuroscience* *7*, 278-294.
- McGeer, P.L., Itagaki, S., Akiyama, H., and McGeer, E.G. (1988). Rate of cell death in parkinsonism indicates active neuropathological process. *Annals of neurology* *24*, 574-576.
- Meng, X., Khanuja, B.S., and Ip, Y.T. (1999). Toll receptor-mediated *Drosophila* immune response requires Dif, an NF-kappaB factor. *Genes & development* *13*, 792-797.
- Meyer, S.N., Amoyel, M., Bergantinos, C., de la Cova, C., Schertel, C., Basler, K., and Johnston, L.A. (2014). An ancient defense system eliminates unfit cells from developing tissues during cell competition. *Science* *346*, 1258236.
- Ming, M., Obata, F., Kuranaga, E., and Miura, M. (2014). Persephone/Spatzle pathogen sensors mediate the activation of Toll receptor signaling in response to endogenous danger signals in apoptosis-deficient *Drosophila*. *The Journal of biological chemistry* *289*, 7558-7568.
- Miwa, T., Furukawa, M., Tsukatani, T., Costanzo, R.M., DiNardo, L.J., and Reiter, E.R. (2001). Impact of olfactory impairment on quality of life and disability. *Archives of otolaryngology--head & neck surgery* *127*, 497-503.
- Mobley, A.S., Rodriguez-Gil, D.J., Imamura, F., and Greer, C.A. (2014). Aging in the olfactory system. *Trends in neurosciences* *37*, 77-84.
- Mosca, T.J., Carrillo, R.A., White, B.H., and Keshishian, H. (2005). Dissection of synaptic excitability phenotypes by using a dominant-negative Shaker K⁺ channel subunit. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *102*, 3477-3482.
- Mukae, N., Yokoyama, H., Yokokura, T., Sakoyama, Y., and Nagata, S. (2002). Activation of the innate immunity in *Drosophila* by endogenous chromosomal DNA that escaped

- apoptotic degradation. *Genes & development* *16*, 2662-2671.
- Nakai, J., Ohkura, M., and Imoto, K. (2001). A high signal-to-noise Ca(2+) probe composed of a single green fluorescent protein. *Nature biotechnology* *19*, 137-141.
- Niccoli, T., and Partridge, L. (2012). Ageing as a risk factor for disease. *Curr Biol* *22*, R741-752.
- Petersen, A.J., Rimkus, S.A., and Wassarman, D.A. (2012). ATM kinase inhibition in glial cells activates the innate immune response and causes neurodegeneration in *Drosophila*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *109*, E656-664.
- Pletcher, S., Macdonald, S., Marguerie, R., Certa, U., Stearns, S., Goldstein, D., and Partridge, L. (2002). Genome-wide transcript profiles in aging and calorically restricted *Drosophila melanogaster*. *Curr Biol* *12*, 712-723.
- Poddighe, S., Bhat, K.M., Setzu, M.D., Solla, P., Angioy, A.M., Marotta, R., Ruffilli, R., Marrosu, F., and Liscia, A. (2013). Impaired sense of smell in a *Drosophila* Parkinson's model. *PloS one* *8*, e73156.
- Pollack, M., Phaneuf, S., Dirks, A., and Leeuwenburgh, C. (2002). The role of apoptosis in the normal aging brain, skeletal muscle, and heart. *Annals of the New York Academy of Sciences* *959*, 93-107.
- Potter, C.J., Tasic, B., Russler, E.V., Liang, L., and Luo, L. (2010). The Q system: a repressible binary system for transgene expression, lineage tracing, and mosaic analysis. *Cell* *141*, 536-548.
- Reichhart, J.M., Georgel, P., Meister, M., Lemaitre, B., Kappler, C., and Hoffmann, J.A. (1993). Expression and nuclear translocation of the rel/NF-kappa B-related morphogen dorsal during the immune response of *Drosophila*. *Comptes rendus de l'Academie des sciences Serie III, Sciences de la vie* *316*, 1218-1224.
- Ren, X., Sun, J., Housden, B.E., Hu, Y., Roesel, C., Lin, S., Liu, L.P., Yang, Z., Mao, D., Sun, L., *et al.* (2013). Optimized gene editing technology for *Drosophila melanogaster* using germ line-specific Cas9. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *110*, 19012-19017.
- Riedl, S.J., and Shi, Y. (2004). Molecular mechanisms of caspase regulation during apoptosis. *Nature reviews Molecular cell biology* *5*, 897-907.
- Robertson, H.M., Preston, C.R., Phillis, R.W., Johnson-Schlitz, D.M., Benz, W.K., and Engels, W.R. (1988). A stable genomic source of P element transposase in *Drosophila melanogaster*. *Genetics* *118*, 461-470.
- Rong, Y.S. (2008). Telomere capping in *Drosophila*: dealing with chromosome ends that most

- resemble DNA breaks. *Chromosoma* 117, 235-242.
- Sang, T.K., and Jackson, G.R. (2005). *Drosophila* models of neurodegenerative disease. *NeuroRx : the journal of the American Society for Experimental NeuroTherapeutics* 2, 438-446.
- Semmelhack, J.L., and Wang, J.W. (2009). Select *Drosophila* glomeruli mediate innate olfactory attraction and aversion. *Nature* 459, 218-223.
- Stökl, J., Strutz, A., Dafni, A., Svatos, A., Doubsky, J., Knaden, M., Sachse, S., Hansson, B., and Stensmyr, M. (2010). A deceptive pollination system targeting drosophilids through olfactory mimicry of yeast. *Curr Biol* 20, 1846-1852.
- Surmeier, D.J., Guzman, J.N., Sanchez-Padilla, J., and Goldberg, J.A. (2010). What causes the death of dopaminergic neurons in Parkinson's disease? *Progress in brain research* 183, 59-77.
- Tanji, T., Yun, E.Y., and Ip, Y.T. (2010). Heterodimers of NF-kappaB transcription factors DIF and Relish regulate antimicrobial peptide genes in *Drosophila*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107, 14715-14720.
- Tonoki, A., and Davis, R.L. (2012). Aging impairs intermediate-term behavioral memory by disrupting the dorsal paired medial neuron memory trace. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109, 6319-6324.
- Tonoki, A., Kuranaga, E., Tomioka, T., Hamazaki, J., Murata, S., Tanaka, K., and Miura, M. (2009). Genetic evidence linking age-dependent attenuation of the 26S proteasome with the aging process. *Molecular and cellular biology* 29, 1095-1106.
- Tzou, P., Ohresser, S., Ferrandon, D., Capovilla, M., Reichhart, J.M., Lemaitre, B., Hoffmann, J.A., and Imler, J.L. (2000). Tissue-specific inducible expression of antimicrobial peptide genes in *Drosophila* surface epithelia. *Immunity* 13, 737-748.
- Tzou, P., Reichhart, J.M., and Lemaitre, B. (2002). Constitutive expression of a single antimicrobial peptide can restore wild-type resistance to infection in immunodeficient *Drosophila* mutants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99, 2152-2157.
- Vembar, S.S., and Brodsky, J.L. (2008). One step at a time: endoplasmic reticulum-associated degradation. *Nature reviews Molecular cell biology* 9, 944-957.
- Wang, J.W., Wong, A.M., Flores, J., Vosshall, L.B., and Axel, R. (2003). Two-photon calcium imaging reveals an odor-evoked map of activity in the fly brain. *Cell* 112, 271-282.
- Wang, Y., and Qin, Z.H. (2010). Molecular and cellular mechanisms of excitotoxic neuronal death. *Apoptosis : an international journal on programmed cell death* 15, 1382-1402.
- Williams, D.W., Kondo, S., Krzyzanowska, A., Hiromi, Y., and Truman, J.W. (2006). Local caspase activity directs engulfment of dendrites during pruning. *Nat Neurosci* 9, 1234-1236.

- Wolfensberger, M., and Hummel, T. (2002). Anti-inflammatory and surgical therapy of olfactory disorders related to sino-nasal disease. *Chemical senses* 27, 617-622.
- Xanthos, D.N., and Sandkuhler, J. (2014). Neurogenic neuroinflammation: inflammatory CNS reactions in response to neuronal activity. *Nature reviews Neuroscience* 15, 43-53.
- Yankner, B.A., Lu, T., and Loerch, P. (2008). The aging brain. *Annual review of pathology* 3, 41-66.
- Zhou, S., Stone, E.A., Mackay, T.F., and Anholt, R.R. (2009). Plasticity of the chemoreceptor repertoire in *Drosophila melanogaster*. *PLoS genetics* 5, e1000681.

謝辞

本論文の完成まで、始終ご指導ご鞭撻を賜りました東京大学大学院薬学系研究科遺伝学教室の三浦正幸先生に深い尊敬と感謝の念を表します。

東京大学大学院薬学系研究科遺伝学教室の千原崇裕准教授に心より感謝致します。千原准教授には本研究の遂行において直接の実験指導熱心に、また根気強くして頂きました。

北海道大学創成研究機構の田中暢明博士に心より感謝します。ショウジョウバエを用いた *in vivo* カルシウムイメージングのご指導のみならず貴重な実験材料の分与を頂きました。

ショウジョウバエシステムを提供して下さいました、R. Axel 博士(Columbia University)、L. Vosshall 博士、the Bloomington *Drosophila* Stock Center、the Kyoto *Drosophila* Genetic Resource Center に感謝致します。

そして、始終暖かい励ましとご協力、活発な議論を賜りました東京大学大学院薬学系研究科の皆様にお礼申し上げます。特に同じ研究グループの皆様には多くの実験指導をしていただき、ご助言を多く賜りました。心から感謝の意を伝えたいと思います。