

## 学 位 論 文 要 旨

氏 名	龍田 勝輔
題 目	キイロショウジョウバエの摂食を調節する未知遺伝子の探索および機能解析 (Analysis of novel gene regulates food intake of <i>Drosophila melanogaster</i> )

昆虫の食性（摂食）を制御する遺伝子を探索するため、餌選択アッセイ系の確立、および餌選択異常変異体ショウジョウバエの選抜を行った。その結果、野生型ショウジョウバエ幼虫はコーンとダイズの餌組み合わせ条件でダイズを選択し、さらに餌選択異常を示す変異型 *GS1189* 系統の選抜に成功した。さらに、*GS1189* 系統は味覚・嗅覚異常を示し、これらの異常によって正常な餌選択ができないことを発見した。また、*GS1189* 系統の幼虫は摂食量の低下、発育遅延を示した。

*GS1189* 系統は *GS* ベクター (P[GS]) の挿入により、Acyl-CoA binding protein + Ankyrin repeats (ACBP+ANK) 領域をコードする *CG33071* 遺伝子の発現量が低下していた。復帰変異体である  $\Delta P$  *GS1189* 系統は、*CG33071* 遺伝子の発現が正常に回復し、表現型もコントロール系統と同じであることから、P[GS]が挿入された *CG33071* 遺伝子の発現異常が *GS1189* 系統の表現型の原因であると判明した。*CG33071* 遺伝子の発現部位は、中枢神経系 (central nervous system: CNS) の触角葉、食道下神経節、味覚・嗅覚受容器官、味覚・嗅覚受容器官から投射する軸索であった。よって、*GS1189* 系統は味覚・嗅覚に関わる神経系での *CG33071* 遺伝子の発現量抑制によって、神経伝達に異常を持つことが判明した。

*GS1189* 系統では、*CG33071* 遺伝子とともにインスリン様受容体遺伝子 (*InR*) の発現量が激減していた。よって、*GS1189* 系統の摂食量低下及び発育遅延には、*InR* の発現量低下によるインスリンシグナル伝達異常が関与していると予想した。さらに、マイクロアレイ解析を用いて絶食に伴う脳内の遺伝子発現パターンを調べた結果、コントロール系統では、絶食時にトリアシルグリセロールリパーゼをコードする *CG6271*、*CG6277* 遺伝子、および、JH binding protein モチーフを持つ *CG7953* 遺伝子の発現量の増加を確認した。しかし、*GS1189* 系統では、絶食時にもこれらの遺伝子の発現に変化は見られなかった。よって、*GS1189* 系統は絶食による生体内栄養シグナルの異常、もしくは、CNS での味覚・嗅覚情報受容・処理に異常を来とし、絶食条件を認識できないと予想された。

以上の結果より、*CG33071* 遺伝子は、コードしている ACBP + ANK を介してインスリンシグナル伝達を調節し、味覚・嗅覚からの情報を中枢神経系で統合することにより、摂食行動調節に関与していると解釈することができる。*CG33071* 遺伝子は新規の摂食行動調節遺伝子であること、さらに *InR* 遺伝子の発現調節への関与の事実は、この遺伝子の基礎から応用に至る広範囲での重要性を示唆し、本研究成果の重要性を物語るものと結論付けられる。

## 学 位 論 文 要 旨

氏 名	Masasuke Ryuda
題 目	Analysis of novel gene regulates food intake of <i>Drosophila melanogaster</i> (キイロシヨウジョウバエの摂食を調節する未知遺伝子の探索および機能解析)
<p>In order to search novel gene regulating food preference and intake behavior of <i>Drosophila melanogaster</i>, I made a simple assay plate containing two types of artificial diets. Control <i>y w</i> strain larvae clearly preferred soybean when they were allowed to choose between corn and soybean diets. To identify the gene responsible for controlling their food selection, I attempted to find the mutant strain with food preference different from the control strain. We found one mutant strain, <i>GS1189</i>, that did not show any preference for either of the tastants. Moreover, the <i>GS1189</i> strain showed a reduction of food intake and dysfunction of olfactory and gustatory sensation, which caused retardation of larval development. The <i>P[GS]</i> insertion site in the <i>GS1189</i> strain was in the ORF region of the <i>CG33071</i> gene. The original <i>CG33071</i> gene encodes two ORFs: one protein with RNA recognition motif and other protein with Acyl-CoA binding protein (ACBP) and ankyrin repeats (ANK) domains. Northern and Western blot analyses indicated that <i>CG33071</i> gene was expressed as a ACBP+ANK protein only in the <i>y w</i> strain but not in the <i>GS1189</i> strain. I established the revertant strain, <math>\Delta P</math> <i>GS1189</i>, in which a <i>P[GS]</i> element had been precisely removed by introducing a genomic transposase source, and demonstrated that the feeding phenotype of <math>\Delta P</math> <i>GS1189</i> strain flies was completely reverted.</p> <p>To determine the <i>CG33071</i> gene expression patterns in the <i>Drosophila</i> taste and odor systems, I generated transgenic flies in which the <i>CG33071</i> promoter drives expression of a GFP reporter gene using the Gal4/UAS system. The transgenic fly showed that the <i>CG33071</i> gene was expressed in the antennal lobe, subesophageal ganglion, gustatory and olfactory organ and gustatory and olfactory sensory neuron, thus indicating that the expression of the <i>CG33071</i> gene is distributed in cephalic chemosensory organs as well as the central neuroendocrine organs.</p> <p>Furthermore, I also found the down-regulation of Insulin receptor (<i>InR</i>) gene expression in the brain of the <i>GS1189</i> strain larva. The <i>InR</i> knockdown mutant strain showed the reduction of food intake which is the phenotype similar to that of the <i>GS1189</i> strain. Overexpression of the <i>CG33071</i> gene elevated the expression of the <i>InR</i> gene. These results suggest the possibility that the <i>InR</i> gene is a key downstream gene of the <i>CG33071</i> gene that controls the food intake in <i>Drosophila</i> larvae; thereby, down-regulation of these genes results in the abnormal feeding behavior in <i>GS1189</i> strain larvae.</p> <p>Based on these data, it is reasonable to conclude that the <i>CG33071</i> gene expressed in the central nervous system (CNS) should mediate a normal signal transduction of nutrient information from olfactory and gustatory organs to the CNS which regulates food preference and intake in <i>Drosophila</i> larvae.</p>	

学位論文審査結果の要旨	
学位申請者 氏名	龍田 勝輔
審査委員	主査 佐賀大学 教授 早川 洋一
	副査 佐賀大学 教授 大島 一里
	副査 鹿児島大学 教授 杉元 康志
	副査 鹿児島大学 教授 津田 勝男
	副査 佐賀大学 教授 鈴木 信彦
審査協力者	
題目	キイロショウジョウバエの摂食を調節する未知遺伝子の探索 および機能解析 (Analysis of novel gene regulates food intake of <i>Drosophila melanogaster</i> )
<p>多くの昆虫は植食性であり、しかも加害される植物は多様と言える。繁殖時期や生育環境の影響によって、同種でも食性が大きく異なる昆虫は珍しくない。こうした昆虫の食性は、農業害虫による食害を防ぐ上からも重要な因子と言えるが、その分子レベルあるいは遺伝子レベルでの昆虫食性調節機構は未だに明らかになっていない。本研究では、昆虫の食性（摂食）を制御する遺伝子を探索するため、単純で正確な餌選択アッセイ系を確立し、さらに、餌選択異常変異体ショウジョウバエの選抜を行った。その結果、野生型ショウジョウバエ幼虫はコーンとダイズの餌組み合わせ条件でダイズを選択し、さらに餌選択異常を示す変異型GS1189系統の選抜に成功した。さらに、GS1189系統は味覚・嗅覚異常を示し、これらの異常によって正常な餌選択ができないことを証明した。また、GS1189系統の幼虫は摂食量の低下、発育遅延を示した。</p> <p>GS1189系統はGSベクター（P[GS]）の挿入により、Acyl-CoA binding protein + Ankyrin repeats（ACBP+ANK）領域をコードするCG33071遺伝子の発現量が</p>	

低下していた。復帰変異体である  $\Delta P GS1189$  系統は、 $CG33071$  遺伝子の発現が正常に回復し、表現型もコントロール系統と同じであることから、 $P[GS]$ が挿入された  $CG33071$  遺伝子の発現異常が  $GS1189$  系統の表現型の原因であると判明した。 $CG33071$  遺伝子の発現部位は、中枢神経系 (central nervous system: CNS) の触角葉、食道下神経節、味覚・嗅覚受容器官、味覚・嗅覚受容器官から投射する軸索であった。よって、 $GS1189$  系統は味覚・嗅覚に関わる神経系での  $CG33071$  遺伝子の発現量抑制によって、神経伝達に異常を持つことが判明した。

$GS1189$  系統では、 $CG33071$  遺伝子とともにインスリン様受容体遺伝子 ( $InR$ ) の発現量が激減していた。よって、 $GS1189$  系統の摂食量低下及び発育遅延には、 $InR$  の発現量低下によるインスリンシグナル伝達異常が関与していると予想した。さらに、マイクロアレイ解析を用いて絶食に伴う脳内の遺伝子発現パターンを調べた結果、コントロール系統では、絶食時にトリアシルグリセロールリパーゼをコードする  $CG6271$ 、 $CG6277$  遺伝子、および、JH binding protein モチーフを持つ  $CG7953$  遺伝子の発現量の増加を確認した。しかし、 $GS1189$  系統では、絶食時にもこれらの遺伝子の発現に変化は見られなかった。よって、 $GS1189$  系統は絶食による生体内栄養シグナルの異常、もしくは、CNS での味覚・嗅覚情報受容・処理に異常を来し、絶食条件を認識できないと予想された。

これらの結果より、 $CG33071$  遺伝子は、コードしている ACBP+ANK を介してインスリンシグナル伝達を調節し、味覚・嗅覚からの情報を中枢神経系で統合することにより、摂食行動調節に関与していると解釈することができる。 $CG33071$  遺伝子は新規の摂食行動調節遺伝子であること、さらに  $InR$  遺伝子の発現調節への関与の事実は、この遺伝子の基礎から応用に至る広範囲での重要性を示唆し、本研究成果の重要性を物語るものと結論付けられる。

以上の一連の研究で明らかになったショウジョウバエ幼虫の摂食調節機構は、農業害虫を含む広く多くの昆虫においても基本的にほぼ同様と考えられる。こうした昆虫の摂食行動や食欲を調節する遺伝子の構造及び発現に関わる諸性質は、害虫による農業作物の食害への対策を講じる上でも有用な知見と言え、応用的価値も高い。よって、本論文は博士 (農学) の学位論文として十分に価値のあるものと判断した。

最終試験結果の要旨	
学位申請者 氏 名	龍田 勝輔
審査委員	主査 佐賀大学 教授 早川 洋一
	副査 佐賀大学 教授 大島 一里
	副査 鹿児島大学 教授 杉元 康志
	副査 鹿児島大学 教授 津田 勝男
	副査 佐賀大学 教授 鈴木 信彦
審査協力者	
実施年月日	平成 20年 7月 30日
試験方法 (該当のものを○で囲むこと。) <span style="float: right;">(口答) 筆答</span>	
<p>主査及び副査は、平成20年7月30日の公開審査会において学位申請者に対して、学位申請論文の内容について説明を求め、関連事項について試問を行った。具体的には別紙のような質疑応答がなされ、いずれも満足できる回答を得ることができた。</p> <p>以上の結果から、審査委員会は申請者が博士（農学）の学位を受けるに必要な十分の学力ならびに識見を有すると認めた。</p>	

学位申請者 氏名	龍田 勝輔
<p>[質問 1] 本研究で同定したキイロショウジョウバエ新規遺伝子CG33071にコードされるacylCoA binding protein + ankyrin repeats (ACBP + ANK)領域は転写調節因子としての報告はあるか？</p> <p>[回答 1] 転写調節因子としての活性報告はない。しかしながら、今回紹介した一連の実験結果及び今回は紹介できなかったショウジョウバエ培養細胞S2を用いたRNAiの予備実験結果からインシュリンレセプター(InR)様遺伝子の転写調節に直接的あるいは間接的に関与していることは間違いない。</p> <p>[質問 2] CG33071遺伝子の5'側のRNA recognition motifを有するタンパク質をコードする領域(RRM)は生体内で機能していないのか？</p> <p>[回答 2] RRM領域とACBP+ANK領域は一繋がりmRNAとして転写されるが、翻訳されることがない。したがって、タンパク質としての機能のないものと考えられる。</p> <p>[質問 3] CG33071遺伝子の変異体であるGS1189系統幼虫脳内において、RT-PCRの結果はACBP + ANK遺伝子領域の発現が確認されている。この結果は、どのように解釈するのか？</p> <p>[回答 3] GS1189系統では、トランスポゾンP因子を含むGSベクターはCG33071遺伝子のRRM領域に挿入されて、その結果この遺伝子発現が阻害されている。しかし、約5kbpのGSベクター自体並びにその下流領域はmRNAに転写されている。しかしながら、Western blottingによってACBP + ANKの翻訳産物は検出できなかったことから、翻訳過程で発現は異常を来すものと解釈できる。</p> <p>[質問 4] 味覚異常変異体GS1189系統では、ショウジョウバエのインシュリンレセプター(dInR)遺伝子のみならず、7種類存在するインシュリン様ペプチド (Dilp) 遺伝子の幾つかについて、やはり、発現阻害が検出されている。こうしたDilpの発現抑制がショウジョウバエ幼虫の味覚や摂食行動の異常を誘起している可能性はないのか？</p> <p>[回答 4] その可能性は十分にあり得る。今回の研究で、確かに、GS1189系統におけるCG33071遺伝子発現阻害の影響で、dInR遺伝子が最も発現阻害を受けていることが明らかになった。ただ、幾つかのDilp遺伝子の発現</p>	

についても明らかに抑制効果が検出されているので、リガンド、レセプター遺伝子双方の発現が低下し、その結果、インシュリンシグナルが低下した結果、摂食行動の異常を誘起したものと解釈している。この点については、dInR遺伝子のRNAiによって、その正当性を証明した。

[質問5] 幼虫の絶食の影響は、dInRやDilp遺伝子の発現レベルで検出されているか？

[回答5] 分析は何度か試しているが、一貫性のある結果は得られていない。恐らく、絶食による効果に加えて他の生理的状況もこれらの遺伝子発現レベルに寄与しているものと解釈できる。

[質問6] GS1189系統は摂食異常、食欲低下を示すことは示されたが、終齢幼虫後期には、やはり、活発に摂食し体重も増加して蛹化するはずである。この幼虫後期には、dInR遺伝子の発現は回復しているのか？

[回答6] 測定はしていないが、恐らく、dInR遺伝子の発現に変動はなく、低いままだと予想される。コントロールに比べ、2日間遅れるということは、正常な全幼虫期間がたった4日間のショウジョウバエにとってかなり大きな影響と言える。幼虫期間が1.5倍に増えた分、ゆっくりと摂食し蛹変態に十分な体重まで押し上げているものと解釈できる。

[質問7] コントロールyw幼虫では、絶食などによる食欲の上昇に伴って、CG33071遺伝子の発現上昇は起こっているか？

[回答7] 何度か測定を試みているが、傾向としては、やはり増加しているように思われる。ただ、現段階では数値のバラツキも大きいため、さらに、測定を繰り返し確証を得る必要がある。