

学 位 論 文 要 旨

氏 名 河野 剛

題 目 キイロショウジョウバエが持つ乾燥ストレス耐性の分子機構に関する研究
(Studies on the molecular mechanism of desiccation tolerance of *Drosophila melanogaster*)

陸上に生息する小型動物は、生命を維持する上で体表面からの水分蒸散が極めて重要な問題となる。本研究ではその代表とも言える昆虫に着目した。キイロショウジョウバエを用い、まずは幼虫の乾燥ストレス抵抗性に関与する遺伝子の解析に着手した。

キイロショウジョウバエの幼虫は、孵化後、餌となる水分に富む発酵果実内部で成長し、3 齢幼虫中期に摂食を停止した後、蛹化に適する乾燥した場所を求めて探索行動 (Wandering) を開始する。こうした行動に伴う環境の変化は、幼虫に対して乾燥ストレスとなるはずであるが、ショウジョウバエ幼虫での乾燥耐性の分子機構に関する解析例は皆無に近い。そこで、私は急激な乾燥状態を経験する Wandering 期に注目し、この時期の幼虫真皮細胞で発現量が上昇する遺伝子の探索を行った。その結果、機能未知の遺伝子 *CG14686* を発見した。*CG14686* は 2 齢幼虫 (摂食期幼虫) の真皮細胞においても、乾燥条件下で発現量の増加が確認された。さらに、*CG14686* RNAi によってこの遺伝子発現を抑制した場合、乾燥条件下での幼虫生存率は顕著な低下を見せた。この時、*CG14686* RNAi 処理幼虫の体重がコントロール幼虫に比べ有意な減少を示したことから、*CG14686* はショウジョウバエ幼虫に対して乾燥条件下で体表からの水分の蒸散を防ぐ生理機能を付与するものと結論付けた。こうした一連の解析結果に基づき、この遺伝子を *Desiccate (Desi)* と命名した。

その後の研究によって、*Desi* の遺伝子発現は、真皮細胞のみならず、幼虫、成虫の味覚器官にも及ぶことを確認した。すなわち、幼虫の口器、成虫の唇弁、付属肢末端 (ふ節)、翅といった全ての味覚器官で *Desi* 発現が観察された。より詳細な解析によって、唇弁の感覚子における *Desi* 発現が感覚神経細胞よりはむしろそれを取り囲むアクセサリー細胞であることを突き止めた。さらに、*Desi* RNAi による唇弁での局所的発現抑制によって、味物質に対する神経細胞の活動電位の消失、それに伴う摂食量の激減を確認した。

Desi 発現抑制による成虫感覚子の機能低下、さらに、幼虫体表からの水分蒸散の増加の事実より、*Desi* が細胞間の結合に関与する細胞接着因子であると予想した。この予想は、免疫電子顕微鏡観察による真皮細胞間隙での *Desi* の局所的発現の証明によって部分的ではあるが立証された。

一連の本研究によって、昆虫には乾燥ストレスによって特異的に発現上昇する新規遺伝子 *Desi* が存在し、幼虫期には体表からの水分の蒸散を防止し、さらに、幼虫-成虫期を通して味覚感覚器官の感覚神経の正常な機能を支えていることを証明した。さらに、*Desi* が細胞間の結合を強固にする新規細胞接着因子である有力な証拠を掴んだ。

学 位 論 文 要 旨

氏 名	Takeshi Kawano
題 目	Studies on the molecular mechanism of desiccation tolerance of <i>Drosophila melanogaster</i> (キイロショウジョウバエが持つ乾燥ストレス耐性の分子機構に関する研究)

The conservation of body water is a fundamental prerequisite for all animals to adapt to the terrestrial environment. In particular, small arthropods such as insects with an extremely large surface-to-volume ratio are fated to a danger of desiccation by evaporation through the integument. Insects must therefore evolve certain physiological mechanisms to survive desiccation stress. One of them is thought to be a cuticular wax layer coating the external surface of the integument. However, it is largely unknown whether other protective mechanisms serve for their survival especially under dry conditions. Here we tried to clarify this question in the *Drosophila melanogaster* larvae and adults.

When *Drosophila* larvae are in the foraging stage, they feed on moist food. However, an essential transition from foraging to wandering behavior occurs at the midthird instar stage that forces them to leave moist food to search for dry pupation sites. We investigated the mechanism by which *Drosophila* larvae protect themselves from desiccation after initiation of the wandering stage. *Desiccate* (*Desi*) was discovered as a candidate gene requisite for protection from desiccation stress. *In situ* hybridization showed that it expressed in the epidermis. Elevation of *Desi* expression in the integuments was observed in foraging larvae placed in dry conditions and also in wandering larvae. *Desi* RNAi larvae lost more weight under dry conditions, and subsequently their mortalities significantly increased compared with control larvae.

Following study showed that also vigorously expresses in larval mouth region and adult gustatory organs such as labella, tarsi, and wings. More precise morphological analysis of *Desi* expression located its expression in the outer accessory cells rather than neurons of the sensilla on the adult labella. We then demonstrated that *Desi* expression in the labellum was significantly elevated by dry conditions. Further, knockdown of *Desi* expression in the gustatory sensilla of *Drosophila* adults reduced their feeding activities due to a drastic decrease in the sensitivities of the sensilla for all of tested tastants such as water, glucose, NaCl, and caffeine. The *Desi* RNAi-induced desensitization of the labial sensilla was found to be attributed chiefly to the decrease in water concentration in the sensillum lymph surrounding the sensory neurons. Immunoelectron microscopic analysis using anti-*Desi* IgG illustrated the localization of *Desi* in the cell-cell occluding junction sites, indicating that *Desi* contributes to sealing the adjacent cells in the integuments and gustatory sensilla. The molecular function of *Desi* as a cell adhesion protein was partially confirmed by *Desi* RNAi-induced repression of water concentration in the lymph of labial sensilla. These data suggest that *Drosophila* possess a system previously unknown that enforces the sealing of adjacent cells by *Desi* in the taste sensory organs and epidermis, especially under dry conditions.

学位論文審査結果の要旨

学位申請者 氏名	河野 剛
審査委員	主査 佐賀 大学 早川 洋一
	副査 佐賀 大学 野間口 眞太郎
	副査 鹿児島 大学 杉元 康志
	副査 佐賀 大学 渡邊 啓一
	副査 鹿児島 大学 津田 勝男
審査協力者	
題 目	Studies on the molecular mechanism of desiccation tolerance of <i>Drosophila melanogaster</i> (キイロショウジョウバエが持つ乾燥ストレス耐性の分子機構に関する研究)
<p>陸上に生息する小型動物は、生命を維持する上で体表面からの水分蒸散を防ぐことが極めて重要となる。本研究ではその代表とも言える昆虫に着目した。キイロショウジョウバエを用い、まずは幼虫の乾燥ストレス抵抗性に関与する遺伝子の解析に着手した。</p> <p>キイロショウジョウバエの幼虫は、孵化後、餌となる水分に富む発酵果実内部で成長し、3齢幼虫中期に摂食を停止した後、蛹化に適する乾燥した場所を求めて探索行動(Wandering)を開始する。こうした行動に伴う環境の変化は、幼虫に対して乾燥ストレスとなるはずであるが、ショウジョウバエ幼虫での乾燥耐性の分子機構に関する解析例は皆無に近い。そこで、申請者は急激な乾燥状態を経験する Wandering 期に注目し、この時期の幼虫真皮細胞で発現量が上昇する遺伝子の探索を行った。その結果、機能未知の遺伝子 <i>CG14686</i> を発見した。<i>CG14686</i> は2齢幼虫(摂食期幼虫)の表皮細胞においても、乾燥条件下で発現量の増加が確認された。さらに、<i>CG14686</i> RNAi によってこの遺伝子発現を抑制した場合、乾燥条件下での幼虫生存率は顕著な低下を見せた。この時、<i>CG14686</i> RNAi 処理幼虫の体重がコントロール幼虫に比べ有意な減少を示したことから、<i>CG14686</i> はショウジョウバエ幼虫に対して乾燥条件下で体表からの水分の蒸散を防ぐ生理機能を</p>	

付与するものと結論付けた。こうした一連の解析結果に基づき、この遺伝子を *Desiccate* (*Desi*) と命名した。

その後の研究によって、*Desi* の遺伝子発現は、真皮細胞のみならず、幼虫、成虫の味覚器官にも及ぶことを確認した。すなわち、幼虫の口器、成虫の唇弁、付属肢末端（ふ節）、翅といった全ての味覚器官で *Desi* 発現が観察された。より詳細な解析によって、唇弁の感覚子における *Desi* 発現が感覚神経細胞よりはむしろそれを取り囲むアクセサリ一細胞であることを突き止めた。さらに、*Desi* RNAi による唇弁での局所的発現抑制によって、味物質に対する神経細胞の活動電位の消失、それに伴う摂食量の激減を確認した。

Desi 発現抑制による成虫感覚系の機能低下、さらに、幼虫体表からの水分蒸散の増加という事実より、*Desi* が細胞間の結合に関与する細胞接着因子であると予想した。この予想は、*Desi* RNAi 系統の成虫唇弁感覚系内への塩化コバルト溶液侵入量の増加や免疫電子顕微鏡観察による真皮細胞間隙での *Desi* の局所的発現の証明によって部分的ではあるが立証された。

以上のように、本研究では、キイロショウジョウバエ幼虫を研究対象とし、その体表真皮細胞にこれまで知られていなかった乾燥耐性機構が備わっていること、そして、そこに関与する主要細胞膜タンパク質をコードする遺伝子を特定し *Desiccate* と命名した。また、成虫期の *Desiccate* は、主要味覚感覚器官である唇弁の感覚子アクセサリ一細胞（感覚系神経細胞を囲みその機能を補助する細胞）で特異的に発現することを突き止めた。さらに、幼虫真皮細胞と成虫唇弁感覚子アクセサリ一細胞のそれぞれの役割から共通する *Desiccate* 遺伝子産物の分子としての機能を抽出し、それを細胞接着因子と推測した。この作業仮説は2種類の形態的観察により間接的ながらも実証する事に成功した。こうした一連の研究は昆虫の基礎生理学的意義のみならず、新たな殺虫剤のターゲット分子の特定という応用面での有効利用にも資するものであり、審査委員一同は、本論文が博士（農学）の学位論文として十分な価値のあるものと認定した。

最終試験結果の要旨	
学位申請者 氏名	河野 剛
審査委員	主査 佐賀 大学 早川 洋一
	副査 佐賀 大学 野間口 眞太郎
	副査 鹿児島 大学 杉元 康志
	副査 佐賀 大学 渡邊 啓一
	副査 鹿児島 大学 津田 勝男
審査協力者	
実施年月日	平成23年 1月 27日
試験方法 (該当のものを○で囲むこと。) <input type="checkbox"/> 口答・筆答	
<p>主査及び副査は、平成23年1月27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、関連事項についての試問を行った。具体的には別紙のような質疑応答がなされ、いずれの質問に対しても満足できる回答を得た。</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学力ならびに識見を有すると認めた。</p>	

学位申請者 氏名	河野 剛
-------------	------

[質問1] *Desiccate*の細胞質領域で同定された幾つかのドメインは乾燥ストレスを細胞内に伝えるシグナル伝達に関与する可能性があるという説明であったが、このシグナル伝達機能と*Desiccate*の細胞接着因子としての機能に矛盾はないか。

[回答1] インテグリン等の細胞接着に関与するタンパク質においても細胞質ドメインには複数のシグナル伝達に関与するドメインが存在する。したがって、多くの細胞接着に関与する細胞膜タンパク質は、単に、細胞間を密に保つ機能のみならず、細胞間あるいは細胞外からの情報を細胞内へ伝達する機能があり、*Desiccate*に見つかったドメインはそうした機能を担っているものと考えられる。

[質問2] *Desiccate*の細胞外領域にはその機能を推測できるようなドメインは存在しないか。

[回答2] 種々のドメイン検索あるいはホモロジー検索によっても、細胞外領域には意味のありそうなドメインは同定できていない。

[質問3] *Desiccate*-RNAi系統のショウジョウバエ幼虫の真皮細胞層には、例えば、細胞間隙が広がるといった形態異常は見出せないか？

[回答3] 電子顕微鏡観察は目下も勢力的に進めている段階であり、今後そうした形態異常が見つければ願ってもないことである。

[質問4] 絶食などの他の生物学的、あるいは、物理的ストレスによって*Desiccate*の転写レベルの変化はあるか。また、乾燥ストレスによって発現上昇するのは*Desiccate*のみで他の遺伝子発現に変動はないか。

[回答4] 低温や高温といった温度ストレス、あるいは、忌避物質への暴露によっても*Desiccate*発現レベルの上昇は観察できる。乾燥ストレスによって発現変動する遺伝子が*Desiccate*のみとは考えておらず、事実、複数の遺伝子において発現レベルの変化は観察できる。ただ、今回はその中でも最も変化の大きかった*Desiccate*について詳細な解析を進めた。

[質問5] Wandering期に入った幼虫の食欲は落ちるか。

[回答5] 一般的に、摂食期を過ぎWandering期に入った幼虫は、再び摂食を行うことなく絶食状態に入る。

[質問6] 乾燥ストレスにおかれた幼虫において*Desiccate*が顕著な発現変動を示したということであるが、その下流で他の遺伝子発現に影響はないか。

[回答6] もちろん、*Desiccate*の発現上昇は他の遺伝子発現に影響を及ぼしていると考えている。今後、*Desiccate*の強制発現形質転換ショウジョウバエ幼虫でDNAアレイ解析等を行い、そうした*Desiccate*の影響下で発現変動する遺伝子の解析も進めたいと考えている。

[質問7] *Desiccate*の発現している細胞は、本当に、幼虫の真皮細胞と味覚器官に存在する感覚子のアクセサリ細胞に限定されるのか。

[回答7] 今回の研究で作成した*Desiccate*プロモーター-Gal4系統は、転写開始点から上流約1,000bpという比較的短いプロモーター領域の塩基配列を持つ系統である。その為、たまたま味覚感覚子での発現が観察された訳で、もしも、さらに上流の配列、あるいは、イントロン内の配列を含むプロモーター-Gal4系統で解析すれば、他の組織での発現を同定できる可能性はある。

[質問8] *Desiccate*の発現と湿度の関係を示したグラフはほぼ直線に載るあまりにも綺麗なグラフであるが、なぜ、それほど綺麗な相関が得られたと考えるか。

[回答8] 実験に用いたキイロショウジョウバエの系統は全く同一のDNA配列を持つほぼ均一な実験動物であり、しかも、各プロットは10数個体の平均値を示していることが大きく寄与しているものと考えている。

[質問9] 味覚感覚器官の神経細胞内遺伝子発現に*Desiccate*は影響を及ぼしていないか。

[回答9] 調査した味覚感覚子神経細胞内で発現する数種類の遺伝子レベルへの*Desiccate* RNAiの影響はなかった。*Desiccate*発現が抑制され、その結果、味覚感覚子の機能が低下するのは、感覚子アクセサリ細胞で保持されている神経細胞周辺のリンパ液の減少によるものと考えている。

[質問10] 乾燥条件下のRNAi系統幼虫では炭水化物濃度が減少するもののATP濃度に変化はないということはどういうことか。

[回答10] 乾燥状態に置かれたRNAi系統幼虫では水分の蒸散が激しいため、積極的にATPを生産して生理状態の恒常性を維持に努めている。しかし、ATP合成も、炭水化物濃度がある一定値以下になるまで低下してしまうと不可能となり最終的に個体死を迎えるのではないかと考えている。RNAi系統の幼虫がコントロールに比べ、乾燥条件下での生存率が顕著に低いのはそうした原因と考えられる。