

BomDH-PBAN 遺伝子の発現制御機構に関する研究

特に形質転換シヨウジヨウバエによる解析

石田 恭幸



報告番号 甲第 4758 号

①

博士論文

*BomDH-PBAN*遺伝子の発現制御機構に関する研究  
特に形質転換ショウジョウバエによる解析

名古屋大学大学院生命農学研究科

石田裕幸

2000年3月



## 目次

	頁
第I章 緒論	1
第II章 キイロシヨウジヨウバエ( <i>Drosophila melanogaster</i> )における FXPRLamideペプチド様物質の存在	6
材料と方法	8
結果	13
1. キイロシヨウジヨウバエにおける <i>DH-PBAN</i> 遺伝子の検索	13
2. FXPRLamideペプチド様物質のキイロシヨウジヨウバエ中枢神経系に おける局在性	15
3. FXPRLamideペプチド様物質の抽出と粗精製	19
4. FXPRLamideペプチド様物質のHPLCによる精製	22
考察	30
摘要	33
第III章 <i>BomDH-PBAN</i> 遺伝子- <i>lacZ</i> 形質転換シヨウジヨウバエの作製とレポーター 遺伝子の時期および細胞特異的発現	34
材料と方法	35
結果	39
1. <i>BomDH-PBAN</i> 遺伝子- <i>lacZ</i> 形質転換シヨウジヨウバエの作製	39
2. 形質転換体におけるレポーター遺伝子の発現	39
考察	46
摘要	49
第IV章 形質転換シヨウジヨウバエFXPRLamideペプチド合成神経分泌細胞に おける <i>BomDH-PBAN</i> 遺伝子発現に関わる <i>cis</i> -制御領域	50
材料と方法	51
結果	54
1. <i>BomDH-PBAN</i> 遺伝子の <i>cis</i> -制御領域の同定	54
2. <i>BomDH-PBAN</i> 遺伝子- <i>lacZ</i> 発現細胞の特定	61
考察	64
摘要	66
第V章 総合考察	67
謝辞	72
引用文献	73



## 第I章 緒論

昆虫は発掘された化石標本から今から約3-3.5億年前のデボン紀に初めて出現したといわれている。当時の昆虫は無翅昆虫類であった(斎藤ら、1988)。しかし、現在までの生息環境における選択圧によって、昆虫は生息環境に適合した多種多様な形態、生活様式を獲得してきた。その結果、昆虫は熱帯雨林、砂漠地帯、極地周辺などの動物にとって劣悪な環境を含む地球上のほとんどの環境下で生活、繁殖の可能な動物群となった。現在、この動物群は種名が明らかなものだけでも90万種といわれている(斎藤ら、1988)。しかも年々2,000種以上の新種が学会に報告されているので、今後記載されると推測される未記録種も含めると100万種以上が存在すると推察される。全動物種数の3/4~4/5を昆虫が占めること(斎藤ら、1988)から、まさに地球は「昆虫の惑星」とよばれるほどである。

地球が自転、公転することで、地上では一日の間、一年の間で光の照度、日長、気温、湿度などの気候条件が様々に変化する。極端な高温、低温、乾燥などの気候による環境圧は昆虫の生命活動の維持に致命的な打撃を与えかねない。この環境圧に対抗する能力の獲得は昆虫の種の保存さらにはその繁栄には必要不可欠であった。休眠はその劣悪環境に対抗する昆虫が獲得した手段である。それは積極的に代謝を抑制し、発育を抑制することで成育不適期間を乗り越える。休眠は昆虫の環境適応反応から進化の過程で発達した産物と推察される。そして、これまでに休眠に関する研究はいろんな角度から多面的に行われてきた(Lees, 1955; Denlinger, 1985; Yamashita and Suzuki, 1991)。

環境生態学研究では昆虫の生活環における休眠時期の特定を進めてきた。その結果、休眠に入る時期は昆虫種によって異なり、それぞれの特異発育時期で休眠が誘導されることが明らかにされてきた。そして、休眠は休眠時期によって成虫休眠、



蛹休眠、幼虫休眠、卵休眠に分類された。

環境生理学研究では休眠誘導、休眠覚醒を引き起こす環境要因の特定を進めてきた。カイコ(*Bombyx mori*)の胚休眠の誘導の場合では温度と日長の効果が明らかにされた(渡辺、1924; Kogure, 1933)。具体的には、二化性のカイコ卵を25°C長日条件で保護すると次世代の卵は休眠に入り、一方、15°C短日条件で保護すると次世代の卵は休眠せずに胚発生が進行することを明らかにした。休眠誘導、覚醒に関わるこのような環境要因はその他の昆虫種でも調査され、日長、温度、湿度、栄養条件であることが示されてきた(Sauders, 1982; 竹田、田中、1993)。休眠誘導と覚醒はこれらの条件の互いの総合作用によって支配されていると考えられている。その決定機構は光周計数機構、温度周期計数機構などのモデルが提唱されている。しかし、その実体をとらえるまでには至っておらず、現在も解明研究が続けられている。

内分泌学研究では休眠情報伝達系に関わる物質の特定を進めてきた。Williams (1946)は、発育を促進するホルモン系の不活性化が休眠誘導要因であり、そのホルモン系の活性化が覚醒要因であることをセクロピア蚕(*Hyarophora cecropia*)を用いて初めて示した。現在までにホルモンによる休眠性支配は様々な昆虫種で報告されている。

成虫休眠するコロラドハムシ(*Leptinotarsa decemlineata*)では、アラタ体の不活化により幼若ホルモン(juvenile hormone, JH)の合成が停止し、その結果、卵黄形成の停止と卵巣の退行が促進され、生殖休眠となることが知られている(De Kort, 1981)。蛹休眠する鱗翅目では、脳による前胸腺刺激ホルモン(prothoracicotropic hormone, PTTH)の分泌が抑制され、それによって前胸腺におけるエクダイソンの分泌が抑制される。その結果、蛹状態が持続することが知られている(Berry, 1981)。幼虫休眠するニカメイガ(*Chilo suppressalis*)では、JH濃度が減少せず、PTTHの分泌が妨げられ、エクダイソンの合成が抑制される。それによって幼虫状態が持続することが知られている



(Yagi, 1981)。

ところが、カイコの胚休眠は母親蛹の食道下神経節に存在する物質(休眠ホルモン)(diapause hormone, DH)によって制御されていた。これは上記のJH、PTTH、エクダイソンの内分泌系と異なる新規のホルモン系であった(Fukuda, 1951; Hasegawa, 1951)。また、DHは蛹期の発達中の卵巣においてトレハラーゼ遺伝子発現を誘導する(Su et al., 1994)。そして、血液中のトレハロースの加水分解物であるグルコースからグリコーゲンを生成し、卵巣への蓄積を促す。これによって、休眠性卵のグリコーゲン蓄積量が増加する。このグリコーゲンは休眠開始時の卵で高濃度で蓄積する多価アルコールの産生基質として利用され、冬季における卵の耐凍性の上昇に関与していると推察されている。

以上の研究から情報伝達物質であるホルモンは昆虫の休眠期間における発育や代謝を調節する制御分子としての重要性が高まった。そして、休眠研究はホルモン分子の構造決定へ進展した。その結果、JH、PTTH、エクダイソンの分子構造が明らかになった。DHは1991年に蛹から抽出された約10万個の食道下神経節から精製され、単離、構造決定された(Imai et al., 1991)。DHは24個のアミノ酸から構成されたペプチドで、C-末端構造がアミド化されている。C-末端の5個のアミノ酸配列はPhe-Gly-Pro-Arg-Leu-NH<sub>2</sub>であり、すでに報告されていたフェロモン生合成活性化神経ペプチド(pheromone biosynthesis activating neuropeptide, PBAN) (Rina et al., 1989)、myotropin (Schoofs et al., 1990)、pyrokinin (Holman et al., 1986)、melanization and reddish colouration hormone (MRCH) (Matsumoto et al., 1990)のC-末端のアミノ酸配列とGly以外のアミノ酸が同一であった。そのため、これらのペプチドをFXPRLamide族ペプチドと総称した。

DHをコードするcDNAと遺伝子はアミノ酸配列をもとに作製されたプローブで単



離された(Sato et al., 1993; Xu et al., 1995a)。この遺伝子は6個のエクソンと5個のイントロンで構成されており、興味深いことに、DH以外にPBANとC-末端がFTPKLamide、FIPRLamide、FSPRLamideの3種類の新規のペプチド( $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ -SGNP)もコードしていた。このことより、このcDNAと遺伝子をBomDH-PBANcDNAとBomDH-PBAN遺伝子と名付けられた。

BomDH-PBAN遺伝子の転写産物量は、Xuら(Xu et al., 1995b)が行ったRT-PCR法の結果では、25°Cで胚を保護した個体(休眠性)の方が15°Cで保護した個体(非休眠性)よりも胚発育期、幼虫期、蛹期で多く蓄積していた。そして、休眠卵産生結果と転写産物の蓄積量には高い相関が認められた。よって、BomDH-PBAN遺伝子発現は胚発育期で経験する環境温度刺激によって制御されると推察された。一方、BomDH-PBAN遺伝子の転写産物量は、休眠性個体、非休眠性個体とも蓄積量には差があるものの、幼虫期、蛹期でリズムをもって変動し、羽化直前でピークを示した。また、遺伝子の発現局在性は食道下神経節の12個の細胞のみで認められた(Sato et al., 1994, 1998; Xu et al., 1995b)。このことから、BomDH-PBAN遺伝子は発育分化プログラムの発現調節機構によっても制御されると推察された。

温度による遺伝子発現制御はコールドショックまたは熱ショック遺伝子発現機構で認められている(Graumann and Marahiel, 1998; Morimoto, 1998)。これらはいくつかの細胞性因子によってプロモーター活性を調節することで遺伝子発現を上昇させている。しかし、この発現に関わる温度は生物の許容範囲外のストレス温度である。カイコの胚休眠誘導のためのシグナル温度は生理学的な許容範囲内であり、ストレス温度遺伝子発現制御機構をカイコ胚休眠制御系の説明のために適用するには躊躇された。また、特異神経分泌細胞におけるBomDH-PBAN遺伝子発現は個体を構成する分化した細胞からの様々な情報統合によって調節されると推察された。



このような個体レベルで生じる*BomDH-PBAN*遺伝子発現に関わる一連の情報伝達系や発現制御系を明らかにするためには均一な培養細胞系やゲルシフトなどの*in vitro*系でそれぞれの制御因子を解析するよりも形質転換体を利用した解析系の方が有効であると推察した。そこで、外来遺伝子を形質転換するための理想的な動物として発達してきたキイロショウジョウバエを実験動物として選択した。

本研究では*BomDH-PBAN*遺伝子の新規の発現制御機構解析系の開発を試みた。第II章では、キイロショウジョウバエにおける*DH-PBAN*遺伝子とその産物であるDHの存在の可能性を知るために、ゲノミックサザン分析、抗FXPRLamideペプチド血清による免疫染色、免疫陽性物質の精製を試みた。このことより、キイロショウジョウバエは少なくともFXPRLamideペプチドを合成する装置を有していることが判明した。

そこで、第III章では*BomDH-PBAN*遺伝子の発現系を作製し、解析をした。そのために*BomDH-PBAN*遺伝子7kb上流域-*lacZ*コンストラクトを導入したショウジョウバエを作製し、レポーター遺伝子の発現局在性を時期を追って調査した。そして、レポーター遺伝子は*BomDH-PBAN*遺伝子7kb上流域制御下で神経系で時期および細胞特異的に発現することを明らかにした。

第IV章では、形質転換ショウジョウバエFXPRLamideペプチド合成神経分泌細胞における*BomDH-PBAN*遺伝子の発現に関わる*cis*-制御領域を同定するために、系統的に上流域を削除したゲノム断片を導入し、系統を作製し、腹部神経分節におけるレポーター遺伝子の発現を調査し、最小の制御領域を決定した。

第V章の総合考察では形質転換体を用いた*BomDH-PBAN*遺伝子発現制御機構の解析研究における今後の課題について述べた。



## 第II章 キイロシヨウジョウバエ(*Drosophila melanogaster*)

### におけるFXPRLamideペプチド様物質の存在

*DH-PBAN*遺伝子から産生されるFXPRLamideペプチドは*Bombyx mori*、*Mamestra brassica*、*Locusta migratoria*、*Helicoverpa zea* など多くの昆虫種で広く存在が確認されている(Raina et al., 1989; Matsumoto et al., 1990; Schoofs et al., 1990; Imai et al., 1991)。この昆虫特有の神経ペプチドの生理活性はフェロモン生合成活性化、筋収縮、色素合成、休眠誘導など多岐にわたる(Schoofs et al., 1993; Yamashita et al., 1996)。このペプチドの活性中心はC-末端のFXPRLamideであり、種間を越えた生物検定でも交差活性を示す(Nachman et al., 1986; Raina and Kempe, 1990; Kuniyoshi et al., 1992; Nachman et al., 1993)。近年、その遺伝子構造(Sato et al., 1993; Ma et al., 1994; Choi et al., 1998; Jacquin-Joly et al., 1998; Xu et al., 1999)と合成分泌細胞の局在性(Sato et al., 1994)も続々と明らかにされ、昆虫種間でのFXPRLamideペプチドをコードする遺伝子の発現が共通の制御機構で調節されている可能性が示されてきた。

キイロシヨウジョウバエは遺伝学や分子生物学の分野で多くの研究が蓄積されている昆虫種である。また、P因子形質転換技術を用いた様々な遺伝子発現検索コンストラクト導入実験により、遺伝子発現機構の解析も進んでいる。この昆虫種は*DH-PBAN*遺伝子の発現制御機構を個体レベルで解析するための有効な生物材料であると期待された。ところが、双翅目でのFXPRLamideペプチドのこれまでの知見は*Neobelieria(Sarcophaga) bullata*の成虫期の脳-食道下神経節複合体での免疫組織化学の結果のみであった(Tips et al., 1993)。

そこで、本章ではキイロシヨウジョウバエにおける*DH-PBAN*遺伝子とその産物であるFXPRLamideペプチドが存在しているか否かの検討を始めた。そのために、



BomDH-PBANcDNAをプローブとしてゲノミックサザン分析を行った。また、カイコのDHに対して作成された抗FXPRLamideペプチド血清を用いて中枢神経系を染色し、FXPRLamideペプチド様物質の局在性を発育時期を追って調査した。さらに、本抗血清に反応する免疫陽性物質をショウジョウバエ成虫から抽出、精製をし、ショウジョウバエにおけるFXPRLamideペプチドの化学的性状を検討した。



## 材料と方法

### 試供動物

試供動物はキイロシヨウジョウバエ(*Drosophila melanogaster*)の野生型(Oregon-R)である。幼虫は25°Cでコーンミール-酵母-寒天の標準飼料(Ashburner, 1989b)で飼育した。解剖には3齢ワンダリング期幼虫、蛹、成虫を用いた。また、抗FXPRLamideペプチド血清に対する免疫陽性物質の抽出、精製には124万頭の成虫を用いた。

### サザンブロット分析

分子生物学的手法はSambrook et al. (1989)に従った。プローブは以下のように調製した。BomDH-PBANcDNAクローンλCDH08(Sato et al., 1993)からDNAを調製し、*NotI*で消化後、ゲル精製してBomDH-PBANcDNA断片を調製した。Rediprime Kit (Amersham)を用いてBomDH-PBANcDNA断片を<sup>32</sup>Pで標識してプローブを作製した。このプローブを用いてキイロシヨウジョウバエのゲノムライブラリー(26万ブランク)をスクリーニングした。ハイブリダイゼーションは55°Cで行った。単離されたクローンからDNAを調製し、2.5 μgのDNAを*Sall*、*EcoRI/Sall*、*BamHI*、*BamHI/Sall*のそれぞれで一晩消化し、0.7%アガーゲルで分離した。Hybond-N+(Amersham)に転移した後、<sup>32</sup>PでラベルしたBomDH-PBANcDNA断片と反応させた。解析にはBAS2000イメージアナライザー(Fuji)を用いた。

### シーケンス

サザンブロット分析で単離されたDNA断片の塩基配列は373DNA Sequencer STRETCH(Applied Biosystems)で決定した。



## 免疫染色

免疫染色はSato et al.(1998)の方法を改良して行った。幼虫は蒸留水で洗浄後、PBS内でピンセットで胴体を前方部と後方部の二つに裂き、前方部を裏表にして、4%パラフォルムアルデヒド(PFA)を含むPBS中で室温で30分間固定した。固定後、PBS中で中枢神経系を解剖して摘出した。蛹と成虫は同固定液中で解剖して中枢神経系を摘出し、引き続き室温で30分間固定した。PBSで洗浄後、中枢神経系はPBST<sub>2</sub>(2%Tween20を含むPBS)に浸し、5°Cで一晩静置した。PBSで洗浄後、BG-PBT(2%BSA、5%ヤギ血清、0.1%Tween20を含むPBS)で1時間以上ブロッキングし、一次抗体液と5°Cで2日間反応させた。一次抗体はFXPRLamide族ペプチドのC-末端アミノ酸配列を特異的に認識する抗FXPRLamideペプチド血清(aDH#1血清)(Sato et al., 1998)を1,000倍希釈で使用した。BG-PBTで洗浄後、二次抗体液である1,000倍希釈のHRP-ヤギ抗ウサギ抗体(Zymed Laboratories)と反応させた。PBT(0.1%Tween20を含むPBS)で洗浄後、HISTOFINE SAB-PO (M) (Nichirei)を用いて発色させた。標本はエタノールシリーズで脱水し、キシレンで透明化し、Entellan(Merck)で包埋し、光学顕微鏡(Olympus)で観察した。写真はPhotoshop(Adobe)で合成した。

## 抽出と精製

抽出と部分精製の概要はFig. 5に示した。まず、70%エタノールに保存した124万頭の成虫を出発材料とし、これを1lの70%エタノールを用いて磨砕し、遠心して上清を回収した。これを4回繰り返した。回収した上清を0.5lのヘキサンで4回分配し、下層から1lの80%メタノールで1回抽出した。減圧濃縮によってメタノールを蒸発させた後、0.5lのジエチルエーテルで2回分配し、さらに0.5lの酢酸エチルで4回分配し、残った水相を0.5lのブタノールで抽出した。この操作を6回繰り返した。



減圧濃縮によってブタノールを蒸発させ、0.5lの蒸留水(0.1%トリフルオロ酢酸(TFA)を含む)に懸濁後、あらかじめ蒸留水(0.1%TFA)で平衡化したアンバーライト XAD-2オープンカラム(50mmφ×285mm)(オルガノ株式会社)に添加した。溶出は2lの蒸留水(0.1% TFA)、2lの10%イソプロパノール(0.1%TFA)、1lの20%イソプロパノール(0.1%TFA)、1lの50%イソプロパノール(0.1%TFA)、1lの100%イソプロパノール(0.1%TFA)、1lの50%アセトニトリル(0.1%TFA)、1lの100%アセトニトリル(0.1% TFA)、1lのH<sub>2</sub>O:NH<sub>4</sub>OH=200:1(0.1%TFA)により進めた。

引き続き、精製度が進行した50%イソプロパノール(0.1%TFA)溶出分画をHPLC(日本分光)を用いて分離した。分画を乾固後、10mlの蒸留水(0.1%TFA)に溶解し、あらかじめ蒸留水(0.1%TFA)で平衡化したDevelosile ODS-HG-5カラム(4.6mmφ×150Mm)(野村化学)に添加した。全ての試料は0.5ml/minの流速で分離した。

1回目の分離は以下のように行った。初めに120分かけて0%~30%アセトニトリル(0.1%TFA)の直線濃度勾配により溶出した。引き続き30分間同じ濃度により溶出し、最後に30分かけて30%~100%アセトニトリル(0.1%TFA)の直線濃度勾配により溶出した。吸光度は350nmで測定した。

活性とピークが一致した分画(1)と活性総量の高い分画(2)を分取した。(1)は以下のように分離した。初めに10分かけて0%~10%アセトニトリル(0.1%TFA)の直線濃度勾配により溶出した。引き続き30分間同じ濃度により溶出し、その後120分かけて10%~30%アセトニトリル(0.1%TFA)の直線濃度勾配により溶出した。最後に30分かけて30%~100%アセトニトリル(0.1%TFA)の直線濃度勾配により溶出した。吸光度は220nmで測定した。

(2)は以下のように分離した。初めに10分かけて0%~20%アセトニトリル(0.1%TFA)の直線濃度勾配により溶出した。引き続き30分間同じ濃度により溶出し、その後120



分かけて20%~30%アセトニトリル(0.1%TFA)の直線濃度勾配により溶出した。最後に30分かけて30%~100%アセトニトリル(0.1%TFA)の直線濃度勾配により溶出した。吸光度は280nmで測定した。

さらに(2)の分離で分取された総活性量の最も多い分画を分離した。溶出プログラムは変更せずに行った。吸光度は220nmで測定した。

#### *competitive enzyme linked immunosorbent assay (cELISA) 検出法*

粗抽出物あるいはカラム分画中の免疫陽性反応は以下の方法によって測定した。まず、試料を乾固し、これに100~50 $\mu$ lの蒸留水を加え、室温で10分間でオートミキサーを用いて懸濁し、室温で15,000rpmで5分間遠心した。その上清の10 $\mu$ lに100 $\mu$ lの2%スキムミルクPBTに加え、十分に攪拌した。また、検量曲線用の合成DHも既知の量(10pmol~1fmol)を上記と同様に調製した。

ELISAプレートは以下のように準備した。コーティングバッファー(0.1M NaHCO<sub>3</sub>-Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>、pH9.6)に750ng/ $\mu$ lの濃度で溶解した抗FXPRLamideペプチドIgGを96穴ELISA用プレートのウェルに各150 $\mu$ l添加した。そして、シーソーシェイカー上で5°Cで一晩固着させた。PBTで十分に洗浄後、ウェルに200 $\mu$ lの5%スキムミルクを含むPBTを添加し、1時間以上ブロッキングした。試料(100 $\mu$ l)をブロッキング済みのELISAプレートのウェルに添加した。続いて、2%スキムミルクPBTに2fmol/ $\mu$ lの濃度に溶解したBiotin-DHを50 $\mu$ l重層した。そして、5°Cで一晩シーソーシェイカー上で反応させた。ウェルをPBTで洗浄後、1,500倍希釈のストレプトアビジン-HRPを各ウェルに150 $\mu$ l添加した。そして、室温で4時間シーソーシェイカー上で反応させた。PBTで洗浄後、あらかじめ37°Cで保温したSuperSignalELISA溶液(Pierce)を150 $\mu$ l加え、化学発光させた。光量の定量はLumi-imager F1 Workstation(Boehringer)で測定



し、LumiAnalyst3.0で算出した(塩見、私信)。FXPRLamideペプチドの量は検量曲線のDHの量をもとにDH相当量として算定し、3区の値の平均値より算出した。



## 結果

### 1. キイロショウジョウバエにおけるDH-PBAN遺伝子の検索

徐(1995)は BomDH-PBANcDNA *EcoRI* 断片(1-362)をプローブとして用いてキイロショウジョウバエゲノムとのサザンブロット分析をした。そして、プローブとハイブリダイズするバンドを検出した。そこで、そのDNA断片を単離するために BomDH-PBANcDNAをプローブとして用いてキイロショウジョウバエゲノムライブラリーをスクリーニングした。ハイブリダイゼーションは55°Cの特異性の低い条件下で行った。その結果、強く陽性に反応するクローンを4個(#1-#4)得た。その#1クローンからDNAを調整し、同プローブを用いてゲノミックサザン分析を行った。その結果、クローン由来のDNA断片とプローブが強くハイブリダイズした(Fig. 1A)。*SalI*消化では4kbp、*BamHI*消化では5kbp、*BamHI/SalI*消化では3kbpの陽性バンドが検出された。しかし、*EcoRI/SalI*で消化したレーンでは陽性バンドは検出されなかった。この泳動パターンは他の#2-#4のクローンでも同一だった(結果省略)。そこでこのハイブリダイズしたDNA断片を特定するために、*BamHI/SalI*のDNA断片をサブクローニングし、制限酵素による消化とハイブリダイゼーションを繰り返し、最小の領域(237bp)をサブクローニングした。シーケンスを行った結果、この領域の69b-80bと88b-107bがBomDH-PBANcDNAの $\beta$ -SGNPをコードする配列の336b-347b(塩基12個のうち10個が同一)と354b-373b(塩基21個のうち19個が同一)に相同性が高いことが示された(Fig. 1B)。一方、94b-99bには*EcoRI*認識サイトが存在した。Fig. 1Aでは*EcoRI*で消化すると陽性バンドが検出できなかったことから、BomDH-PBANcDNAプローブがハイブリダイズした領域は88b-107bと結論した。しかし、この領域をもとにDrosophila genome project Blast Search(<http://www.fruitfly.org/sequence/>)で検索したところ、DH-PBAN 遺伝子のORFは確認できなかった(結果省



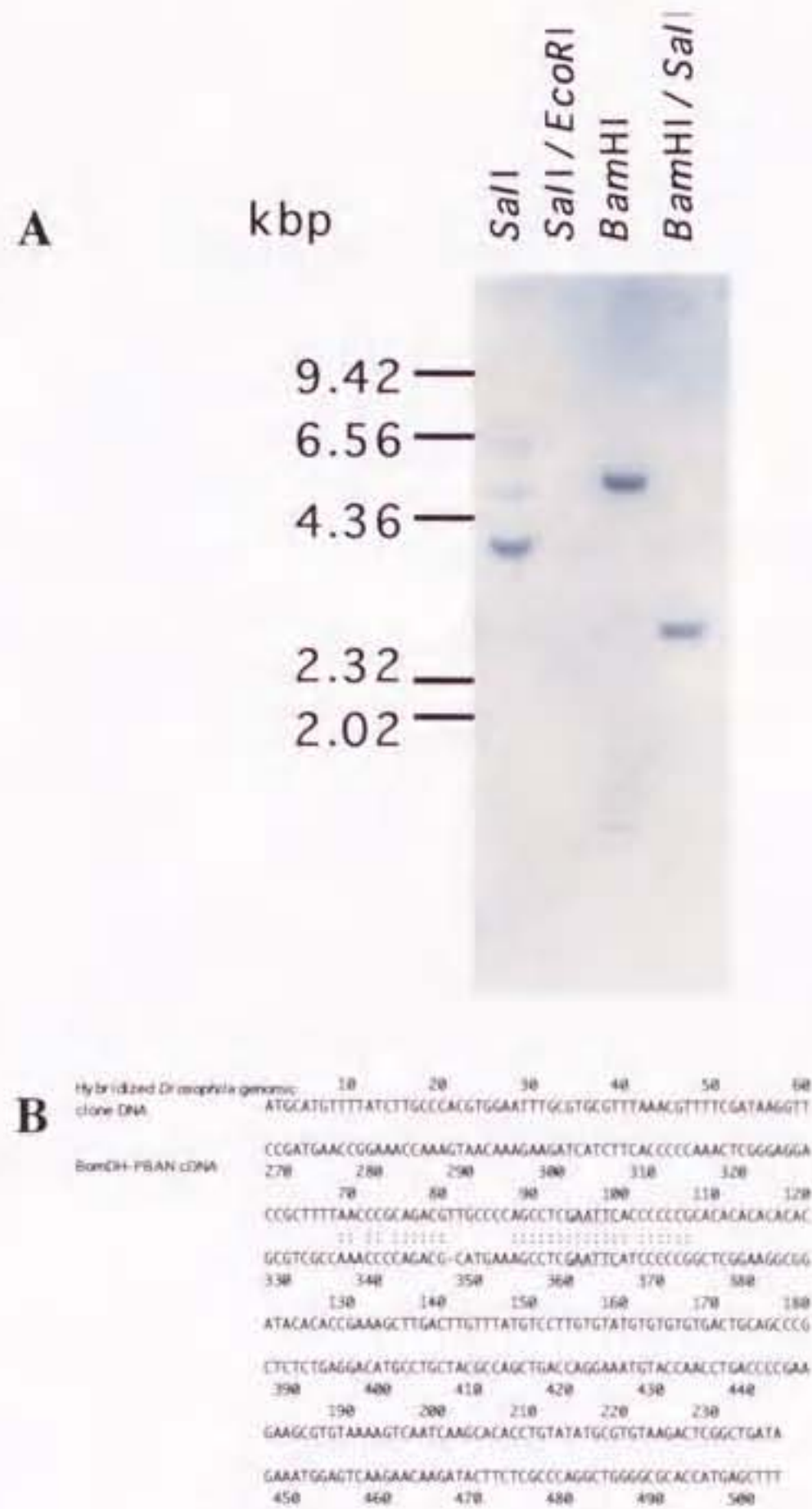


Fig. 1. Isolation of *Drosophila* genomic fragment hybridized with BomDH-PBAN cDNA. A, genomic Southern blot analysis. The DNA was prepared from the clone isolated from genomic library by hybridization using BomDH-PBAN cDNA as a probe. Each DNA (2.5  $\mu$ g) was digested with *Sal*I, *Sal*I/*Eco*RI, *Bam*HI, and *Bam*HI/*Sal*I overnight and separated with 0.7% agarose gel. After transferring on Hybond-N<sup>+</sup> membrane, hybridization was carried out. B, alignment of the hybridized *Drosophila* genomic sequence and BomDH-PBAN cDNA. Dot indicates identity of the both sequence. Underline indicates *Eco*RI recognition site.



略)。以上の結果は、単離したクローンにはキイロショウジョウバエに*DH-PBAN*遺伝子もしくは*DH-PBAN*様遺伝子が存在することを積極的に支持するものではない。

## 2. *FXPRLamide* ペプチド様物質のキイロショウジョウバエ中枢神経系における局在性

### (1) 幼虫中枢神経系における局在性

幼虫期の中枢神経系を抗*FXPRLamide*ペプチド血清(Sato et al., 1998)で染色した。その結果、脳、食道下神経分節、腹部神経分節の限られた細胞体と軸索で陽性染色が認められた(Fig. 2)。しかし、中枢神経系以外の組織での染色はバックグラウンドレベルであった。

脳では前大脳で頭頂部側方で4個以上、中央部で6個以上の細胞体が染色された(Figs. 2A and 2B)。また、食道下神経分節から前大脳頭頂部へ向かって伸長し、前大脳頭頂部から同族側方へ分かれて投射する軸索と前大脳中央部から同族側方へ分かれて投射する軸索が染色された(Figs. 2A and 2B)。

食道下神経分節ではクラスターを形成する細胞体(前方部で8個、中央部で6個、後方部で2個)が染色された(Fig. 2C)。また、腹側に局在する細胞体から食道神経環へ投射する軸索が染色された(Fig. 2D)。

腹部神経分節では6個の細胞体が染色された(Figs. 2A and 2C)。また、食道下神経分節から側方へ向かったあと後方へ向きを変えて腹部神経分節の側方部を投射する軸索(Figs. 2A, 2B, and 2C)、中央部を経由して後方へ投射する軸索(Figs. 2A and 2B)、腹側に局在する6個の細胞体から背側正中線上にあるmedian unpaired dorsal nerve (Nässel et al., 1994)に投射する軸索が染色された(Fig. 2D)。

なお、これらの細胞体と軸索は*DH*のN-末端のアミノ酸配列を認識する抗血清では



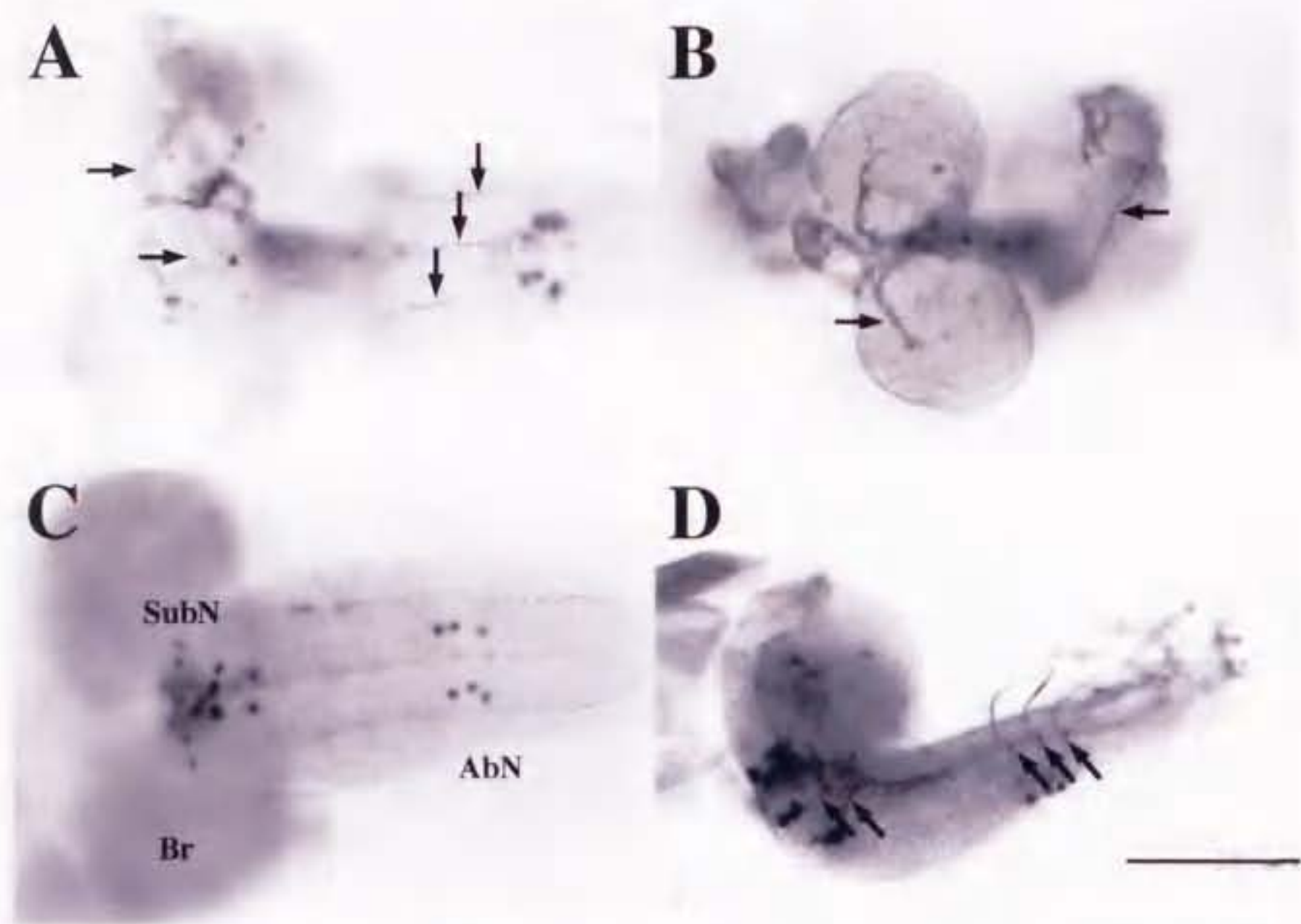


Fig. 2. Localization of FXPRLamide-like neuropeptide in *Drosophila* larval CNS. All preparations were fixed with 4% paraformaldehyde in PBS. FXPRLamide-like neuropeptide was detected by anti-FXPRLamide peptide serum. Anterior is to the left. A is a dorsal view. Arrows indicate three pairs of axons projected ipsilaterally from suboesophageal neuromere to superior and medial protocerebrum and 2 pairs of axons projected longitudinally along medial part and lateral sides of ventral ganglion from the suboesophageal neuromere. Several stained cells are observed in brain. B is a posterior view. Arrows indicate axons projected from the suboesophageal neuromere to superior protocerebrum and lateral side of ventral ganglion. C is a ventral view. There are approximately 18 stained cells in suboesophageal neuromere and 3 pair of stained cells in ventral neuromere. D is a lateral view. Axons are projected from neurosecretory cells in the suboesophageal neuromere and abdominal neuromere to the circum-oesophageal commissure and median unpaired dorsal nerve, respectively. AbN, abdominal neuromere. Br, brain. SubN, suboesophageal neuromere. Bar, 100  $\mu$ m.



染色されなかった(結果省略)。また、あらかじめ100 $\mu$ g/mlの濃度のDHのC-末端側のアミノ酸配列(LWFGPRL, DH18-24aa)で吸収した抗FXPRLamideペプチド血清でも染色されなかった(結果省略)。このことより、染色された細胞と軸索にはDHのN-末端アミノ酸配列と異なる配列をもつFXPRLamideペプチド様物質が存在すると推察された。

## (2) 蛹中枢神経系における局在性

蛹期の中枢神経系においても、抗FXPRLamideペプチド血清は脳、食道下神経分節、腹部神経分節の限られた細胞体と軸索を染色した(Fig. 3)。

脳では前大脳側方で新たに1対の細胞体が染色された(Fig. 3A)。また、食道下神経分節から伸長し、前大脳中央部を経由して前大脳頭頂部よりそれぞれ同族側方へ分かれて投射する軸索が染色された(Figs. 3A and 3B)。しかし、幼虫期で染色されたその他の細胞体と前大脳中央部で同族側方へ投射する軸索は検出されなかった。

食道下神経分節では幼虫期と同様の細胞体が染色された(Fig. 3B)。また、cervical connectiveの付け根付近に局在する一対の細胞体から食道神経環へ投射する軸索が染色された(Fig. 3A)。

腹部神経分節では幼虫期と同様に細胞体が染色された(Fig. 3C)。しかし、幼虫期の腹部神経球の側方と中央部を投射する軸索は染色されなかった。一方、これらの細胞体から新たに再構築された軸索が染色された(Figs. 3C and 3D)。3方向へ投射する軸索の内、前方部の一対の細胞体から伸長した軸索は後胸部神経分節へ投射して分岐した。中央部の一対の細胞体から伸長した軸索は背側のNeural sheathへ投射した。後方部の一対の細胞体から伸長した軸索はmedian abdominal nerveへ投射した。

## (3) 成虫中枢神経系における局在性

FXPRLamideペプチドの成虫期の中枢神経系における局在性は蛹期と類似していた



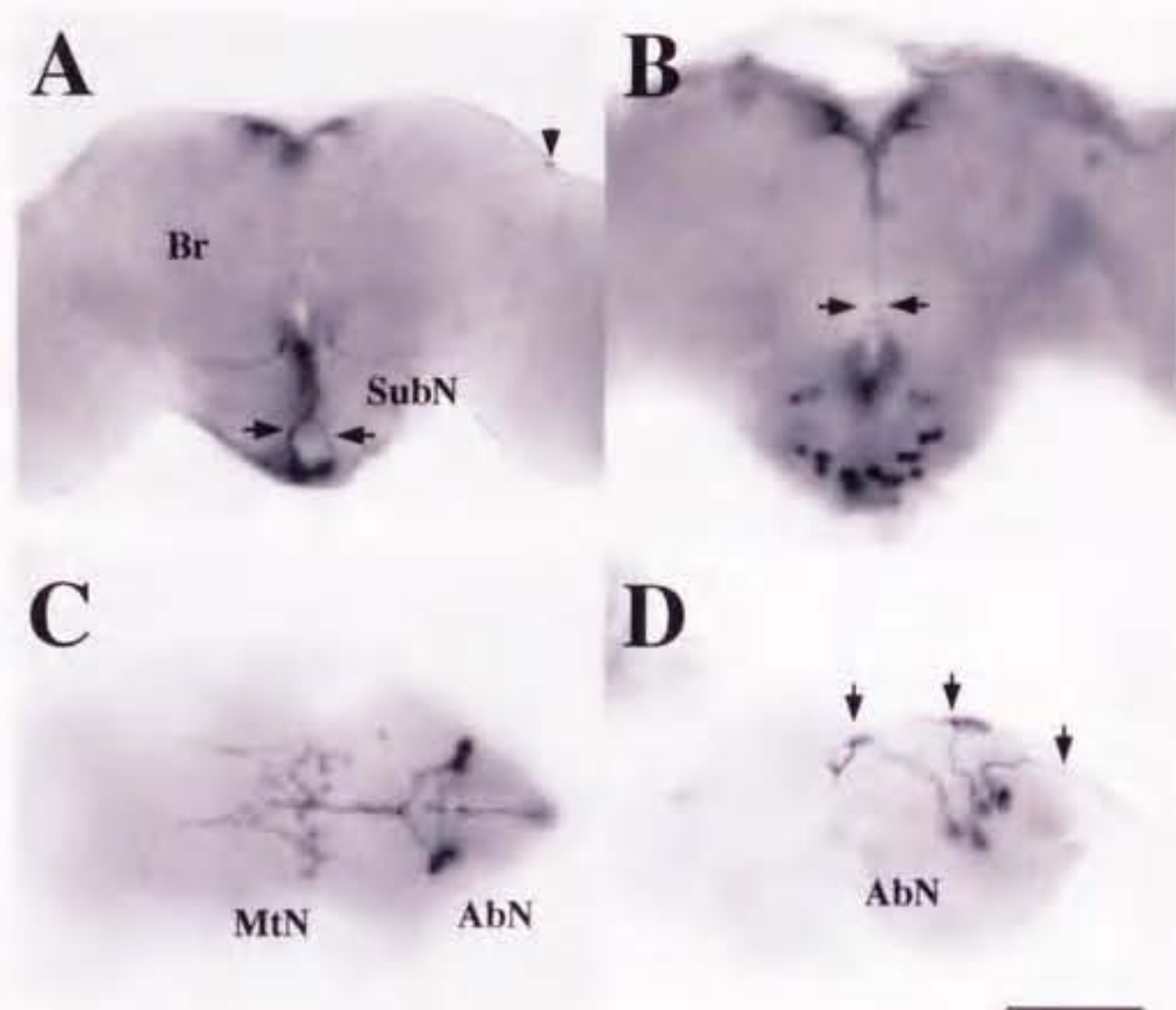


Fig. 3. Localization of FXPRLamide-like neuropeptide in *Drosophila* pupal CNS. In A and B, anterior is to the top. In C and D, anterior is to the left. A: Arrows indicate axons projected from neurosecretory cells in suboesophageal neuromere. Arrowhead indicates newly stained cells at pupal stage. B: Arrows indicate axons projected to protocerebrum. The axons arborize the terminal at the superior protocerebrum. C: Neurosecretory cells localized anteriorly in abdominal neuromere project axons to metathoracic neuromere. D: Arrows indicate three pair of neurosecretory cells project axons three parts; metathoracic neuromere, dorsal neural sheath, and median abdominal nerve, respectively. Br, brain. SubN, suboesophageal neuromere. MtN, metathoracic neuromere. AbN, abdominal neuromere. Bar, 100  $\mu$ m.



(Fig. 4)。

脳と食道下神経分節では細胞体の局在性と軸索の投射は蛹期の場合と類似していた。そして、脳の側方に局在する細胞体の濃染だけが異なる点として観察された (Figs. 4A and 4B)。

腹部神経分節では細胞体の局在性と軸索の投射は蛹期の場合と類似していた。異なる点は後胸部神経分節へ投射された軸索の分岐数がさらに増加したことと背側の neural sheath で網状構造を形成していたことであった (Figs. 4C and 4D)。

以上の結果から、キイロシヨウジョウバエには FXPRLamide ペプチド様物質が存在し、他の昆虫種 (*Bombyx mori*, *Helicoverpa zea*, *Leucophaea maderae*, *Locusta migratoria*, *Mamestra brassicae*, *Manduca sexta*, *Neobelieria (Sarcophaga) bullata*, *Periplaneta americana*) と相同な局在性 (Schoofs et al., 1992; Tips et al., 1993; Ichikawa et al., 1995; Davis et al., 1996; Ma et al., 1996; Sato et al., 1998) を示すことを明らかにした。

### 3. FXPRLamide ペプチド様物質の抽出と粗精製

免疫組織化学実験の結果から、キイロシヨウジョウバエには FXPRLamide ペプチド様物質が存在することが明らかになった。免疫陽性物質がどのような化学構造を有するかを明らかにすることが必要である。そこで、キイロシヨウジョウバエの成虫から FXPRLamide ペプチドの抽出、精製を試みた。抽出と精製の過程は Fig. 5 に示した。

FXPRLamide ペプチド様物質は 70% エタノールによる抽出物に回収された。この粗抽出物をヘキサン抽出 (70% EtOH-Hex 分画として回収) し、同分配後の下層から 80% メタノールで抽出し、減圧濃縮後、ジエチルエーテル、酢酸エチルで分配し、残りの水相からブタノールで抽出してブタノール (70% EtOH-BuOH) 分画として回収した。また、ブタノール抽出後の残りの水相は水 (70% EtOH-H<sub>2</sub>O) 分画として回収した。総活



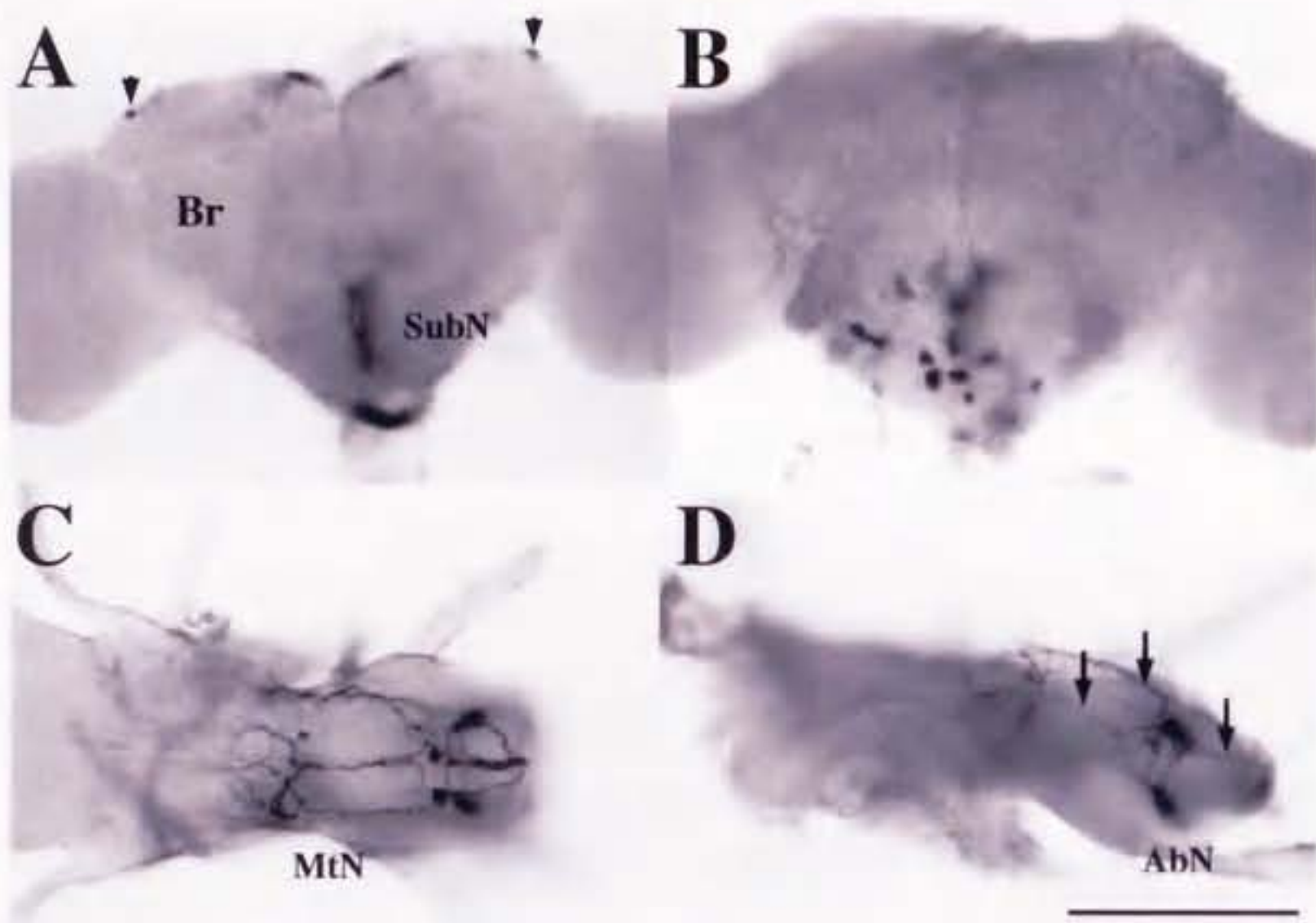


Fig. 4. Localization of FXPRLamide-like neuropeptide in *Drosophila* adult CNS. In A and B, anterior is to the top. A and B are the same pattern in Figs. 2A and B except laterally localized cells in brain were stained intensely (arrowhead). In C and D, anterior is to the left. C is a dorsal view. Axons in thoraco-abdominal ganglion at adult stage are more arbolized than at pupal stage. D is a lateral view. Arrows indicate axons projected from neurosecretory cells in abdominal neuromere. Br, brain. SubN, suboesophageal neuromere. MtN, metathoracic neuromere. Bar, 100  $\mu$ m.



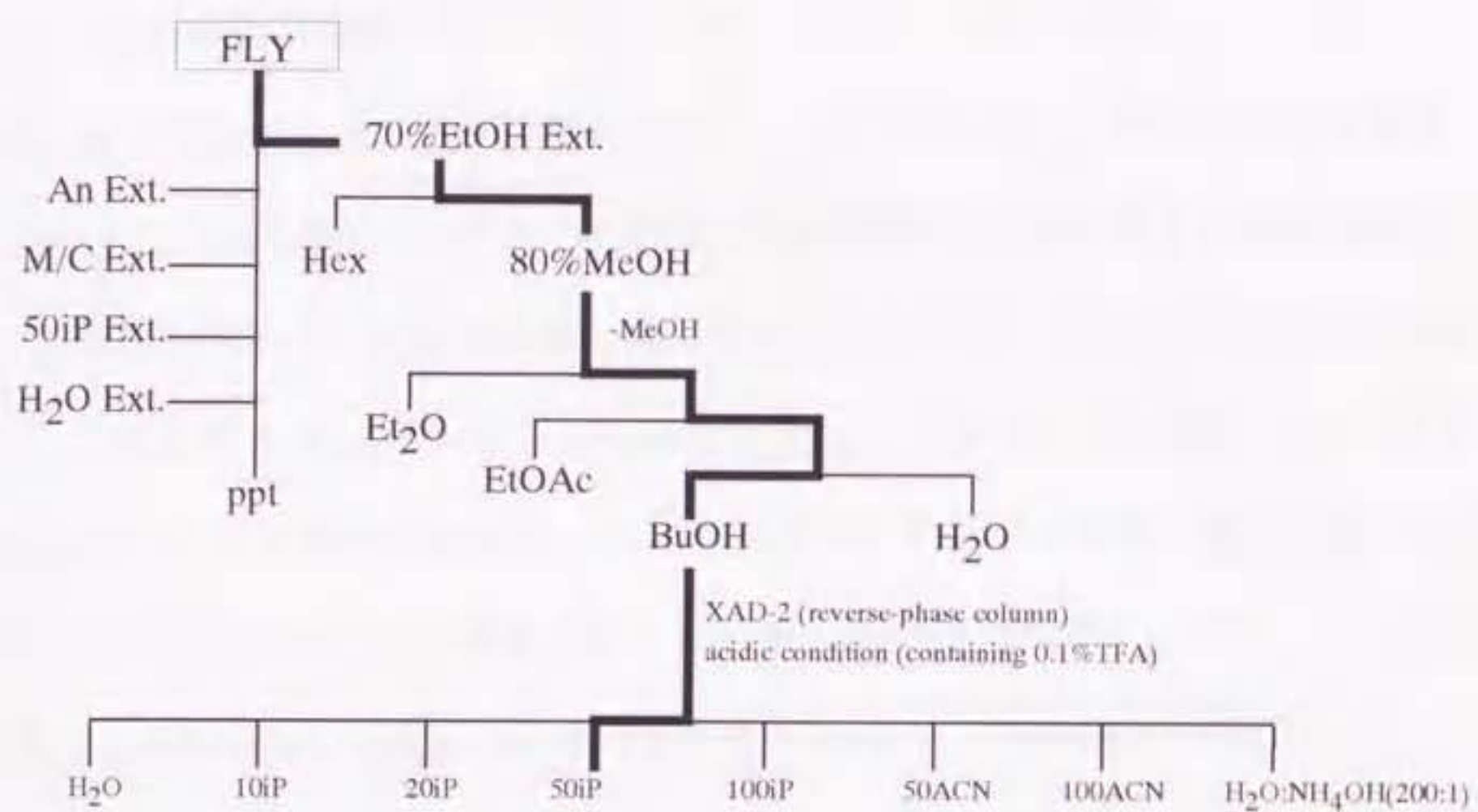


Fig. 5. Partition and partial purification steps of *Drosophila* FXPRLamide peptide. Thick line indicates partition and partial purification step of *Drosophila* FXPRLamide peptide. 70%EtOH Ext., extraction with 70% ethanol. Hex, partition with hexan. 80% MeOH, extraction with 80% methanol. -MeOH, evaporation of methanol. Et<sub>2</sub>O, partition with diethyl ether. EtOAc, partition with ethyl acetate. BuOH, extraction with butanol. 10, 20, 50, 100iPs, elution with 10, 20, 50, 100% isopropanol. 50, 100ACN, elution with 50, 100% acetonitrile. An Ext., extraction with acetone. M/C Ext., extraction with methanol:dichloromethane=1:1. 50ip Ext., extraction with 50% isopropanol. H<sub>2</sub>O Ext., extraction with distilled water.



性は70%EtOH-BuOH分画と70%EtOH-H<sub>2</sub>O分画の両方に回収された。比活性は70%EtOH-BuOH分画の方が70%EtOH-H<sub>2</sub>O分画よりも高かった(Table 1)。一方、70%EtOH-Hex分画はcELISA検出の時にスキムミルクが変性し、沈殿が確認された。このことより、70%EtOH-Hex分画の高い値は抗原抗体反応に由来する測定結果ではなく、抗体の変性によって生じた値と考えられた。そこで、70%EtOH-BuOH分画に注目し、この分画をアンバーライトXAD-2逆相カラムを用いて分離し、cELISAでFXPRLamideペプチド様物質を検出した。分取試料のタンパク質量、総活性量、比活性量はTable 2に示した。全分画を比較した結果、総活性は50%イソプロパノール(iP)溶出分画が1,164.0pmol、水(H<sub>2</sub>O)溶出分画が733.7pmol、20%iP溶出分画が551.4pmol、10%iP溶出分画の494.4pmolであった。各分画に回収された総活性が出発材料の総活性より多く算定された。これは精製度が進むことで免疫反応阻害物質の除去によるかも知れない。一方、比活性は20%iP溶出分画が5,514fmol、50%iP溶出分画が2,328fmol、H<sub>2</sub>O溶出分画が253fmolであった。そこで、特に多い値を示した20%と50%iP溶出分画に着目し、さらに逆相HPLCによる分離を進めた。

#### 4. FXPRLamideペプチド様物質のHPLCによる精製

まずアセトニトリルによる複合グラジエントプログラムを用いた逆相HPLCで分離を試みた。50%iP分画を0~30%アセトニトリルの直線濃度勾配によって分離したところ、約17個のピークが検出された。免疫活性は、多くのピークに検出されたが、保持時間42.38分~48.84分のピークと活性が重り、また、保持時間89.07分~107.75分の分画で多く検出された(Fig. 6)。この分画における総活性はそれぞれ41.7pmol、170.5pmolと算定された。一方、20%iP分画の分離では約8個のピークが検出された(結果省略)。前者の結果と比較して分離が悪いため、以後は50%イソプロパノール分



Table 1. Partition of FXPRLamide-like neuropeptide from adult *Drosophila*

fraction	total protein (g)	total immuno- reactivity (pmol)	specific activity (fmol /mg protein)
70Et-Hex	6.5	732.3	112.7
70Et-Et <sub>2</sub> O	0.2	56.1	280.5
70Et-EtOAc	0.3	30.3	101.0
70Et-BuOH	2.9	206.6	71.2
70Et-H <sub>2</sub> O	19.8	355.4	17.9
An	8.1	167.1	20.6
M/C	2.2	40.9	18.6
50ip	0.9	67.2	74.7
H <sub>2</sub> O	1.0	121.1	121.1

1,240,000 flies were used as the starting materials.  
Immunoreactivity was measured by cELISA.



Table 2. Partial purification of FXPRLamide-like neuropeptide from 70EtOH-BuOH fraction

fraction	total protein (g)	total immuno- reactivity (pmol)	specific activity (fmol /mg protein)
H <sub>2</sub> O	2.9	733.7	253
10ip	0.4	494.4	1,236
20ip	0.1	551.4	5,514
50ip	0.5	1,164.0	2,328
100ip	0.2	86.0	430
50ACN	0.1	21.8	218
100ACN	0.02	ND	ND
H <sub>2</sub> O:NH <sub>4</sub> OH(200:1)	0.5	ND	ND

Immunoreactivity was measured by eELISA.

ND: no detection



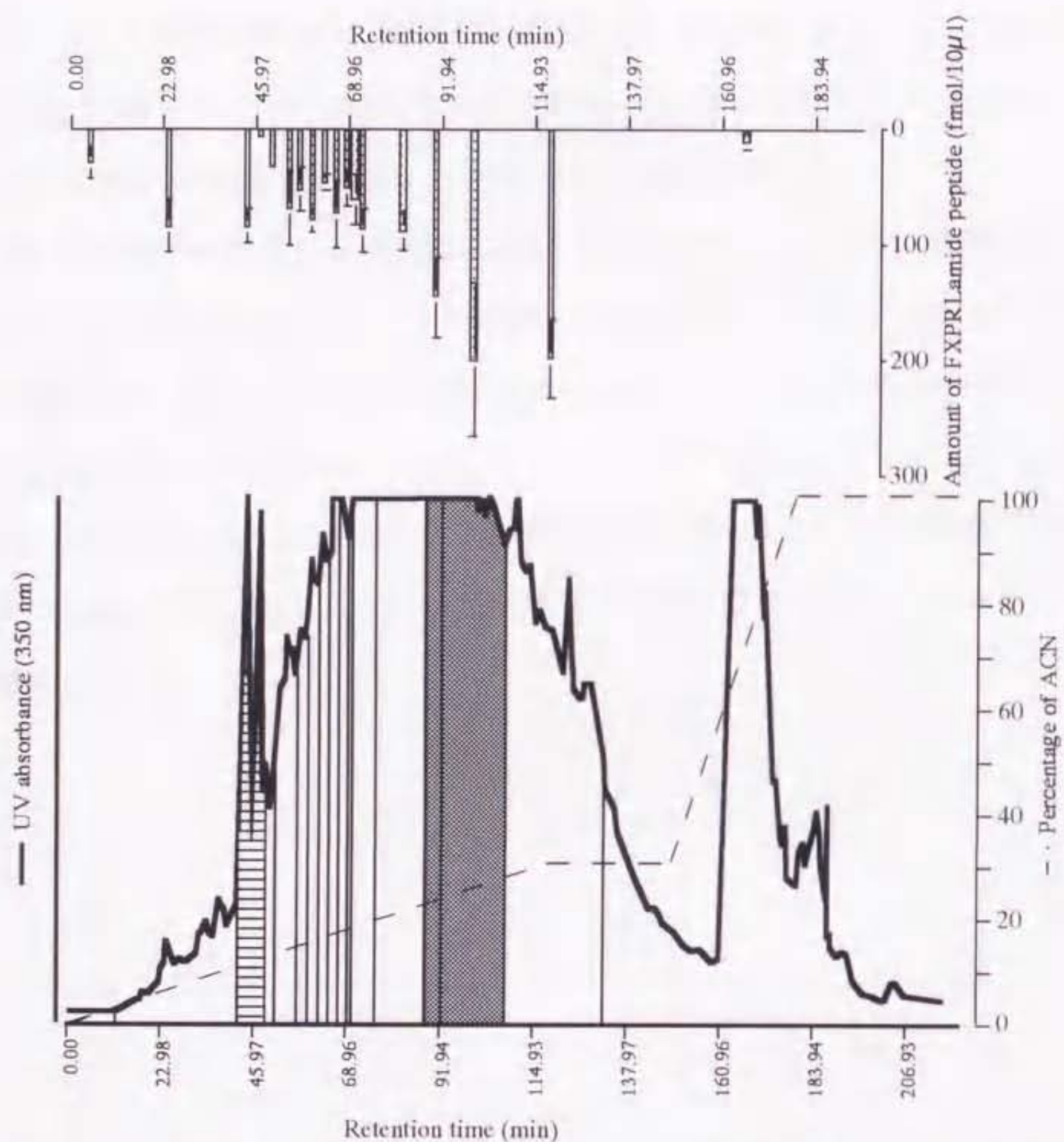


Fig. 6. The first RP-HPLC for purification of *Drosophila* FXPRLamide peptide. The fraction eluted with 50% isopropanol in Fig. 5 was separated by a complex gradient program of acetonitrile in the presence of 0.1% TFA (-----). Elution profile was monitored by UV absorption at 350 nm (——). The immunoreactivity was assayed on each fraction by cELISA. Amount of *Drosophila* FXPRLamide peptide was calculated as that of DH (stippled histogram in the upper panel). Zebra and shaded area was used for the second RP-HPLC separation.



画から分離された2種類の分画の精製を進めた。

次に、分取された保持時間42.38分~48.84分の方画を10~30%アセトニトリルの直線濃度勾配で分離した。大小17個のピークが認められ、保持時間79.80分~82.00分のピークで最も高い活性を示した(Fig. 7)。総活性は2.5pmolと算定された。

一方、保持時間89.07分~107.75分の方画を20%~30%アセトニトリルの直線濃度勾配で分離した。FXPRLamideペプチド様物質は、保持時間91.14分~94.92分の方画で最も高い活性を示した(Fig. 8)。この分画の総活性は89.98pmolと算定された。次に、分取したこの分画を再び20~30%アセトニトリルの直線濃度勾配で分離した(Fig. 9)。その結果、保持時間103.97分~106.13分の方画で最も多く検出された。この分画の総活性は17.28pmolと算定された。これらの操作により精製度はかなり高くなったが、まだ単離には到っていない。



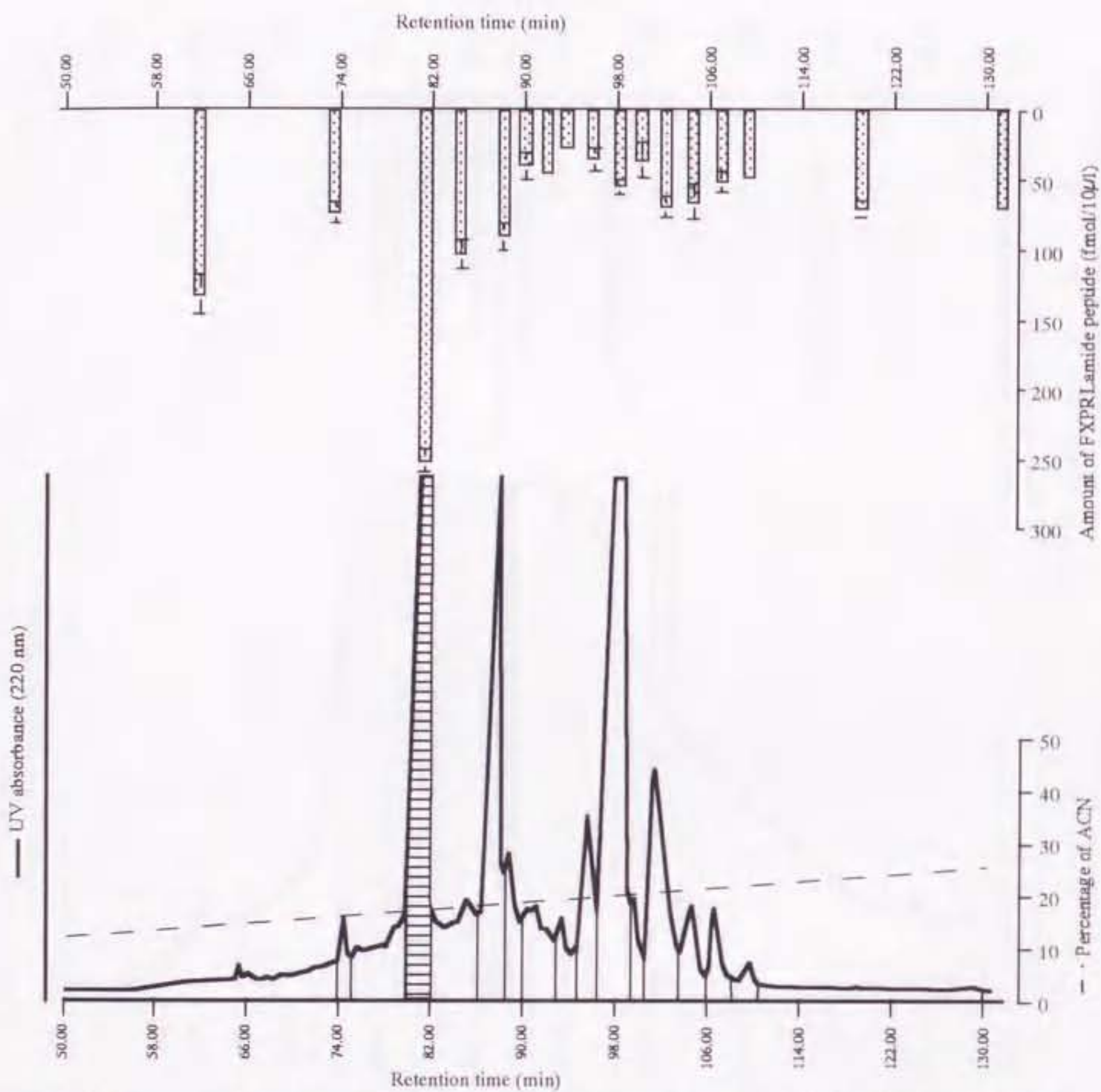


Fig. 7. The second RP-HPLC for purification of *Drosophila* FXPRLamide peptide. The fractions eluted at 42.38–48.84 min in Fig. 6 was separated by a complex gradient program of acetonitrile in the presence of 0.1% TFA (-----). Elution profile was monitored by UV absorption at 220 nm (—). The immunoreactivity was assayed on each fraction by cELISA. Amount of *Drosophila* FXPRLamide peptide was calculated as that of DH (stippled histogram in the upper panel). Zebra area indicates the fraction mostly accumulated with FXPRLamide peptide in this separation.



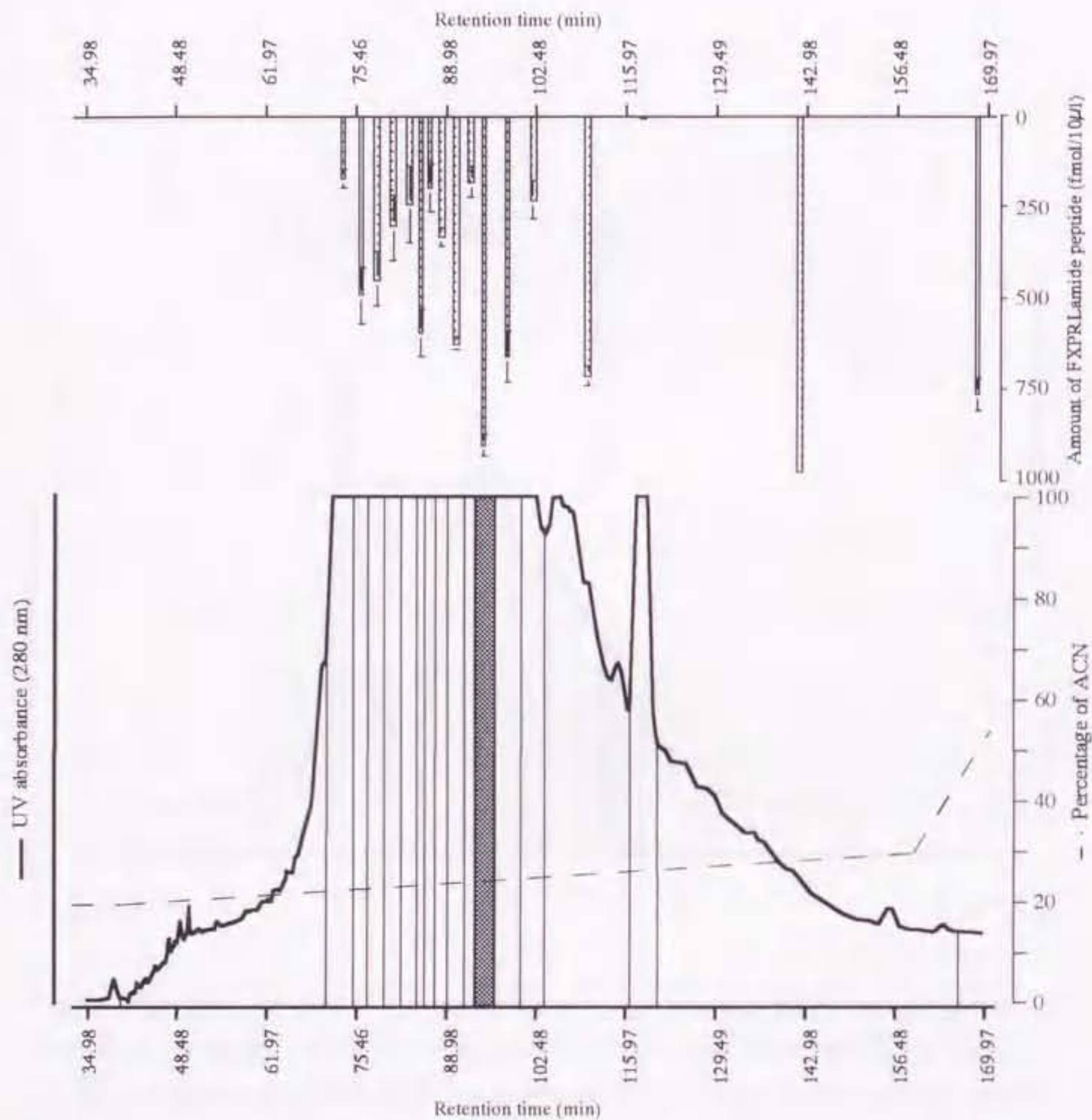


Fig. 8. The second RP-HPLC for purification of *Drosophila* FXPRLamide peptide. The fractions eluted at 89.07–107.75 min in Fig. 6 was separated by a complex gradient program of acetonitrile in the presence of 0.1% TFA (-----). Elution profile was monitored by UV absorption at 350 nm (——). The immunoreactivity was assayed on each fraction by cELISA. Amount of *Drosophila* FXPRLamide peptide was calculated as that of DH (stippled histogram in the upper panel). Shaded area was used for the third RP-HPLC separation



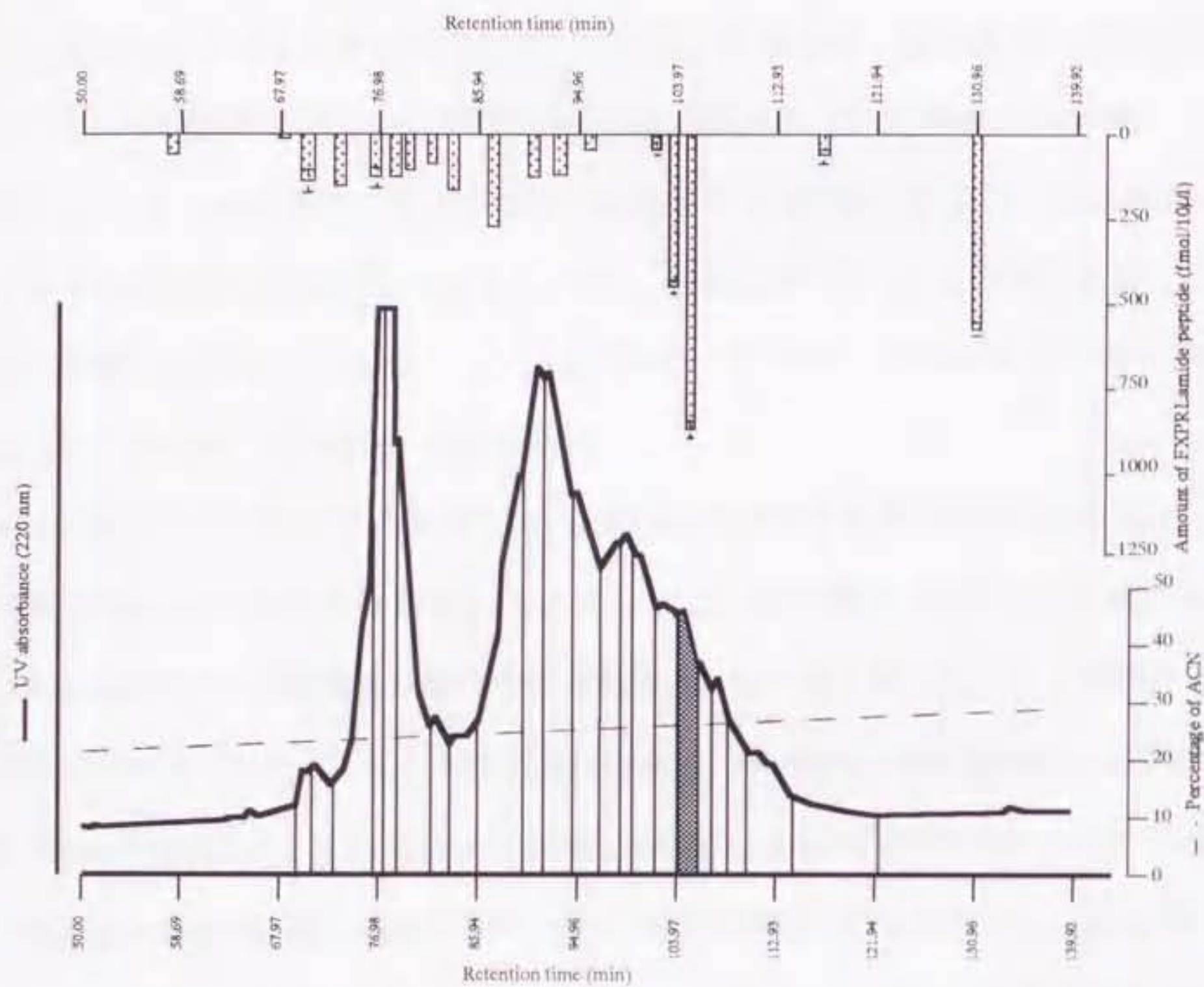


Fig. 9. The third RP-HPLC for purification of *Drosophila* FXPRLamide peptide. The fractions eluted at 91.14–94.92 min in Fig. 8 was separated by a complex gradient program of acetonitrile in the presence of 0.1% TFA (-----). Elution profile was monitored by UV absorption at 220 nm (——). The immunoreactivity was assayed on each fraction by cELISA. Amount of *Drosophila* FXPRLamide peptide was calculated as that of DH (stippled histogram in the upper panel). Shaded area indicates the fraction mostly accumulated with FXPRLamide peptide in this separation.



## 考察

*DH-PBAN* 遺伝子から産生されるFXPRLamide族ペプチドはこれまでに様々な生物検定によってフェロモン生合成活性化、筋収縮、色素合成、休眠誘導などのホルモンとしての生理活性を明らかにされてきた(Schoofs et al., 1993; Yamashita et al., 1996)。そして、免疫染色によって様々な昆虫種で中枢神経系におけるFXPRLamideペプチドの局在性を明らかにされたことで、神経伝達物質としての役割も果たしていると推察されてきた(Schoofs et al., 1992; Tips et al., 1993; Ichikawa et al., 1995; Davis et al., 1996; Ma et al., 1996; Sato et al., 1998)。

キイロショウジョウバエにおいても、FXPRLamideペプチド様物質は脳と食道下神経分節の限られた細胞体に局在していた。また、腹部神経分節の3対の細胞体でFXPRLamideペプチド様物質が検出された結果は、これまで知られている昆虫種とは異なる局在性を示した。一方、軸索はinterneuron、median unpaired dorsal nerve (幼虫期)、網状構造を形成しているneural sheath(成虫期)、median abdominal nerveへ投射していた。interneuronは脳、食道下神経分節、胸腹部神経分節で認められ、幼虫-蛹-成虫発育時期で投射も変化した。そのため、FXPRLamideペプチド様物質は胸腹部神経球で行われている高次の神経情報伝達のための伝達物質として役割を果たし、発育時期に応じて役割も変化していると推察された。腹部神経分節の背側に局在するmedian unpaired dorsal nerve(幼虫期)とneural sheathの(成虫期)はタンニン酸固定標本の電子顕微鏡による観察結果から神経ホルモン放出器官を含んでいると考えられている(Nässel et al., 1994)。このことより、FXPRLamideペプチド様物質はキイロショウジョウバエにおいても神経ペプチドホルモンとして作用すると推察された。また、median abdominal nerve (Power, 1948; Nässel et al., 1994)は後腸、直腸、rectum papillae、生殖器官へ伸びていることが知られている。このことより、FXPRLamideペプチド様



物質は神経あるいは血液を介してこれらの器官の生理作用を調節すると推察された。

以上から、キイロシヨウジョウバエのFXPRLamideペプチド様物質は他昆虫種同様、神経ホルモンと神経伝達物質の両者の役割ともつと推察された。

FXPRLamideペプチドは70%EtOH-H<sub>2</sub>O分画と70%EtOH-BuOH分画に抽出された。さらに70%EtOH-BuOH分画をアンバーライトXAD-2逆相カラムで分離すると50%iP分画、H<sub>2</sub>O分画、20%iP分画、10%iP分画の順でFXPRLamideペプチド様物質の高い総活性が検出された。この段階でキイロシヨウジョウバエにおける抗FXPRLamideIgGに反応する物質はその化学的性質から少なくとも5種類以上は存在すると推察された。もちろん抽出、分離過程での分解、修飾を含めてである。

また、50%iP分画からFXPRLamideペプチドを精製する過程はカイコの $\alpha$ -SGNP(IIFTPKL-NH<sub>2</sub>)と $\gamma$ -SGNP(TMSFSPRL-NH<sub>2</sub>)(Sato et al., 1993)の挙動ときわめて類似していることが示された。この類似した精製過程はキイロシヨウジョウバエのFXPRLamideペプチドの構造上の特性と $\alpha$ -、 $\gamma$ -SGNPの構造上の特性が近い関係にあることを示唆している。また、これまでに鱗翅目のDH-PBANcDNAのから推測されるのアミノ酸配列の比較から、昆虫種間で $\alpha$ -、 $\gamma$ -SGNPのアミノ酸配列の高い相溶性(85%以上)が示されている(Xu et al., 1999)。このことから、本章で単離を試みているキイロシヨウジョウバエFXPRLamideペプチドは $\alpha$ -および $\gamma$ -SGNPである可能性が高い。この問題を解決するためには今後さらなる精製が必要である。

ところで、ゲノミックサザン分析で確かにカイコのDH-PBANcDNA断片とハイブリダイズしたクローンは得られたが、その塩基配列はキイロシヨウジョウバエのDH-PBAN遺伝子のORF構造の中に位置づけることはできなかった。本実験に用いたゲノムライブラリーの各ファージに挿入されたゲノムDNA断片を平均50kbpとする



と、スクリーニングしたゲノム鎖長は $1.3 \times 10^{10}$ bpと算出され、キイロシヨウジョウバエゲノムの鎖長が $1.7 \times 10^8$ bp(Ashburner, 1989a)であることから十分にカバーできているはずである。このことは、キイロシヨウジョウバエのFXPRLamide族ペプチドをコードする遺伝子はカイコのDH-PBAN遺伝子と塩基レベルで異なっていることを示している。それにも関わらず、FXPRLamideペプチドの局在性は他の昆虫種と類似していた。これは昆虫種間で保存された共通の遺伝子発現制御機構によって調節されている可能性を示唆する。実際、カイコや野蚕の卵殻遺伝子の制御領域はキイロシヨウジョウバエに導入されても相同器官で遺伝子発現を調節する(Mitsialis et al., 1989)。カイコのDH-PBAN遺伝子発現制御機構を明らかにするために、キイロシヨウジョウバエを用いて形質転換体を作製し、遺伝子発現を解析することは有効であるに違いない。



## 摘要

1. カイコのDH-PBANcDNAをプローブとして用いたハイブリダイゼーションによってキイロシヨウジョウバエゲノムライブラリーから4個のクローンを単離した。しかし、このクローンの塩基配列はキイロシヨウジョウバエのDH-PBAN遺伝子のORFとは認められなかった。
2. FXPRLamideペプチド様物質はキイロシヨウジョウバエの脳、食道下神経分節、腹部神経分節に限られた数の細胞体と軸索に局在した。その局在性から神経伝達物質、神経ホルモンとしての役割を果たしていると推察した。
3. キイロシヨウジョウバエの成虫を材料として免疫陽性物質の抽出、精製を試みた。FXPRLamideペプチドは70%エタノールに可溶でブタノール分画に回収され、逆相オープンカラムクロマトグラフィーで50%イソプロパノール分画と水分画に多く回収された。
4. 逆相HPLCによりさらに精製を進め、より高度に精製した。免疫陽性物質を含む2分画を得た。これらを単離するには到らなかった。



### 第III章 *BomDH-PBAN*遺伝子-*lacZ*形質転換ショウジョウバエの 作製とレポーター遺伝子の時期および細胞特異的発現

カイコのFXPRLamideペプチドをコードする*BomDH-PBAN*遺伝子は*in situ*ハイブリダイゼーションと免疫染色実験の結果から、食道下神経節の12個の神経分泌細胞で発現することが明らかにされている(Sato et al., 1994, 1998)。他の昆虫種でもFXPRLamideペプチドは中枢神経系の限られた神経分泌細胞で発現している(Schoofs et al., 1992; Tips et al., 1993; Ichikawa et al., 1995; Davis et al., 1996; Ma et al., 1996)。前章ではキイロショウジョウバエでもFXPRLamideペプチドが中枢神経系に存在していることを明らかにし、その局在性は他の昆虫種の場合と類似していることを示した。神経分泌細胞における神経ペプチド遺伝子の転写はホルモン、ホルモン受容体、セカンドメッセンジャー、*trans*-活性化因子、*cis*-制御因子を含むいくつかの因子によって促進的あるいは抑制的に制御されることが知られている(MacArthur and Eiden, 1996; Waller et al., 1998)。*DH-PBAN*遺伝子の発現も昆虫種で広く保存された細胞特異的制御系によって調節されていると推察された。その複雑な制御機構を個体全体で解析するためには形質転換個体を用いることが有効である。キイロショウジョウバエは容易に外来遺伝子を導入できる昆虫であり、いくつかの異種昆虫遺伝子の導入例が報告されている(Mitsialis and Kafatos, 1985; Mitsialis et al., 1989; Bello and Couble, 1990; Horard et al., 1993; Xiong and Jacobs-Lorena, 1995; Skavdis et al., 1996)。

本章では、*BomDH-PBAN*遺伝子発現解析系を開発するために、*BomDH-PBAN*遺伝子の7kb5'上流域に*lacZ*を接続させたコンストラクトを作製し、P因子形質転換法によってショウジョウバエに導入した。そして、形質転換体におけるレポーター遺伝子の発現を発育時期を追って調査した。



## 材料と方法

### 供試動物

キイロシヨウジョウバエはyellow white系統(y ac w<sup>1118</sup>)、SM1, Cy, TM3/TM6を使用した。ywはDNA注射の受容系統として、他の系統はバランサー染色体として使用した。飼育方法は第II章に述べた。

### P[-7.0 DHP] コンストラクトの作製

P[-7.0 DHP]コンストラクトは以下のように調整した(Fig. 10)。分子生物学的手法はSambrook et al. (1989)の方法に準じた。pBS-9cはλEDH1(Xu et al., 1995a)のインサートをライゲーションすることで作製し、PCR反応の鋳型として使用した。*BomDH-PBAN*遺伝子の5'上流域の7kbDNA鎖を増幅するために、以下の2種類のプライマーを用いた。

(1)upDH5、5'-ATAAGAATgcggeceTACCGGGCCCCCCTCGAGG-3'(NotIの認識配列をもつ。)

(2)upDH3、5'-CGCggatceggtaecgegeceTGGAGGGCGAAGTGATACAT-3'(BomDH-PBAN遺伝子の-1bpから-20bpまでの塩基配列をもちBamHI、Asp718、NotIの認識配列をもつ。)

Taqポリメラーゼとしては正確で長いDNA断片を増幅するためにTakara LA Taq (Takara)を選択した。DNAサーマルサイクラーによるPCR反応は、94°Cで30秒間、68°Cで15分間行い、これを20サイクル行った。増幅されたDNA断片はpGEM-Tベクター(Promega)に挿入した。*BomDH-PBAN*遺伝子の5'上流域のインサートはPCR産物をサブクローンしたpGEM-TベクターからNotIで消化しゲル精製して調整した。形質転換用のP因子ベクターとしてはpCβを用いた。このベクターにはレポーター遺伝



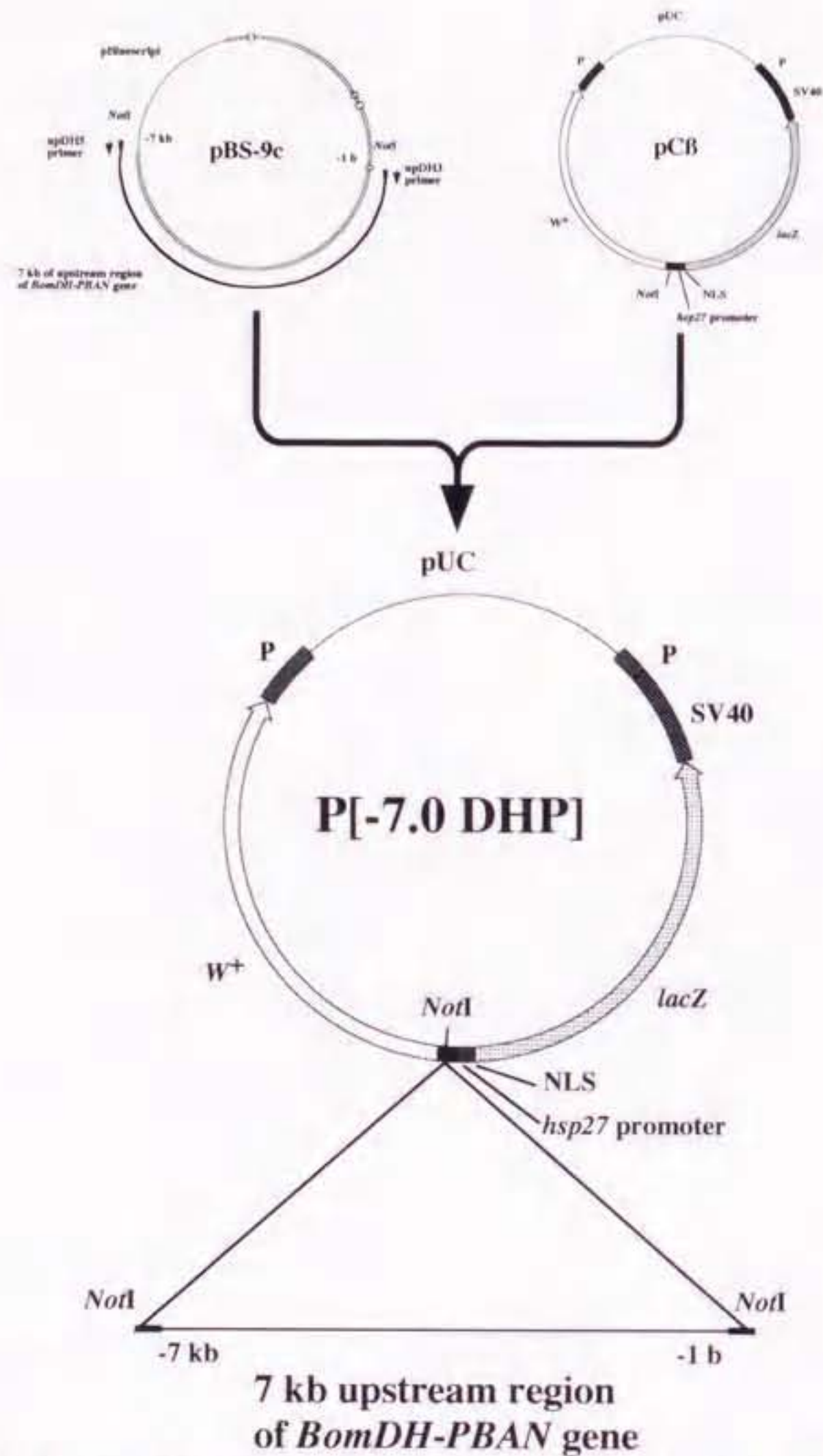


Fig. 10. Construction of P[-7.0 DHP]. pBS-9c which is containing 7 kb upstream region, 4 exons and 4 introns of the *BomDH-PBAN* gene (Xu et al., 1995a) was used as a template. The 7 kb upstream region of the *BomDH-PBAN* gene was amplified by PCR using upDH5 and upDH3 primer containing *NotI* recognition site. Amplified 7 kb upstream region of the *BomDH-PBAN* gene was used as an insert which was indicated the black line. the 7 kb upstream region of the *BomDH-PBAN* gene was ligated into *NotI* site of pCB to construct the P[-7.0 DHP] vector. P, P element sequence. SV40, SV40 polyadenylation signal. NLS, nuclear localization signal.  $W^+$ , *white* gene. *NotI*, *NotI* recognition site.



子である *lacZ* を発現させるための *hsp27* 最小プロモーター、マルチクローニングサイトの下流に核移行シグナルが付加してある。P[-7.0 DHP]コンストラクトはインサートを pC $\beta$  の *NotI* クローニングサイトに挿入して完成させた。インサートの挿入方向はシーケンスで確認した。

### P因子形質転換法

P因子形質転換法は Rubin and Spradling (1982) の方法に準じて行った。P[-7.0 DHP] (300  $\mu$ g/ml) とヘルパープラスミド p $\pi$ 25.7wc (100  $\mu$ g/ml) (Karess and Rubin, 1984) の混合液を *yw* 系統の胚に注射した。赤眼をもつ形質転換体は G1 世代で選抜し、系統維持のために バランサー と交配した。

### $\beta$ -ガラクトシダーゼ染色

胚期の発育ステージは Campos-Ortega and Hartenstein (1997) のタイムテーブルを参照して決定した。卵は 3% の次亜塩素酸水溶液で 3 分間浸し、水洗後、固定液 (50 mM PIPES, pH 6.9, 0.2 mM EGTA, 0.5 mM MgSO<sub>4</sub>, 4.6% formaldehyde, 50% n-heptan) に室温で 20 分間浸した。幼虫中枢神経系は摘出後 4% PFA を含む PBS で室温で 30 分間固定した。その後、標本を PBT<sub>1</sub> (1% Tween 20 を含む PBS) でリンスした。標本は  $\beta$ -ガラクトシダーゼ染色液 (0.2% 5-bromo-4-chloro-3-indolyl  $\beta$ -D-galactopyranoside, 10 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>-Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, pH 7.2, 150 mM NaCl, 1 mM MgCl, 3.1 mM K<sub>4</sub>[Fe<sup>II</sup>(CN)<sub>6</sub>], 3.1 mM K<sub>3</sub>[Fe<sup>III</sup>(CN)<sub>6</sub>], 0.3% Triton X-100) に浸し、37°C で 1 時間から一晩の間反応させた。染色後の標本は光学顕微鏡 (Olympus) で観察した。

### 免疫染色



免疫染色はGoriely et al. (1991)とSato et al. (1998)の方法に改良を加えて行った。胚は上記と同様に固定した後にメタノール:ヘプタン(1:1)混合液で5分間激しく攪拌した。メタノールで洗浄、PBTに置換後に胚をpermeablization液(3% Triton X-100、3% Tween20、3% sodium deoxycholate、3% NP-40を含むPBS)に浸し、90分間ゆるやかに攪拌した。幼虫、蛹および成虫の中樞神経系の免疫染色法は第II章に準じて進めた。一次抗体液は100倍希釈の抗 $\beta$ -ガラクトシダーゼモノクローナル抗体(Promega)あるいは1,000倍希釈の抗FXPRLamideペプチド血清(Sato et al., 1998)を使用した。二次抗体液には100倍希釈のHRP-標識の抗マウスIgG抗体(Zymed Laboratories)を使用した。発色にはAEC substrate kitとSG substrate kit (Vector)を使用した。



## 結果

### 1. BomDH-PBAN 遺伝子-lacZ 形質転換ショウジョウバエの作製

P因子ベクター(P[-7.0 DHP])はBomDH-PBAN遺伝子の7 kbの5'上流域をpC $\beta$ に挿入することによって作製した。このコンストラクトはトランスポゼース源のヘルパープラスミド(p $\pi$ 25.7wc)と共に胚発育ステージ2-3の時期の400頭以上の胚に注射された。注射された約25%の胚が成虫(G0)となった。そして、G1世代で赤眼の形質転換体を選抜した。形質転換系統は適当なランサー系統と交配することによって固定された。その結果、5種類の独立した形質転換系統を得られ、P[-7.0 DHP]系統と総称した(Table 3)。P[-7.0 DHP]系統#3-1と#7-2は第二染色体にP因子が挿入されており、一方、P[-7.0 DHP]系統#5-1、#6-1、#7-1は第三染色体にP因子が挿入されていた。以後の実験ではおもにP[-7.0 DHP]系統#6-1を供使した。

### 2. 形質転換体におけるレポーター遺伝子の発現

様々な発育時期におけるレポーター遺伝子の発現は $\beta$ -ガラクトシダーゼ活性染色によって観察された。酵素活性は胚発育ステージ11の胚の顎、胸部および腹部体節の両体側で初めて観察された(Fig. 11A)。ステージ13胚では顎体節の染色領域は腹側の正中線側に移動し腹部の染色領域は側方へ押し出された。しかし、胸部の染色領域はこの時期では検出されなかった(Fig. 11B)。ステージ15では頭部陥入と顎体節からantennomaxillary complex (AMC) (Singh and Singh, 1984)が形成された。これにともない顎体節の染色領域が頭部両体側に集中した。また、第八腹部体節が新たに染色された(Fig. 11C)。ステージ16ではステージ15の場合と同様の所見を与えたが染色強度は増加した(Fig. 11D)。さらに細胞レベルでレポーター遺伝子発現を観察するために、抗 $\beta$ -ガラクトシダーゼモノクローナル抗体を用いてステージ16の胚を免疫染色



**Table 1. Identification of chromosomes integrating P[-7.0 DHP] in transgenic flies**

<b>line number</b>	<b>chromosome</b>
<b>#3-1</b>	<b>2nd</b>
<b>#5-1</b>	<b>3rd</b>
<b>#6-1</b>	<b>3rd</b>
<b>#7-1</b>	<b>3rd</b>
<b>#7-2</b>	<b>2nd</b>



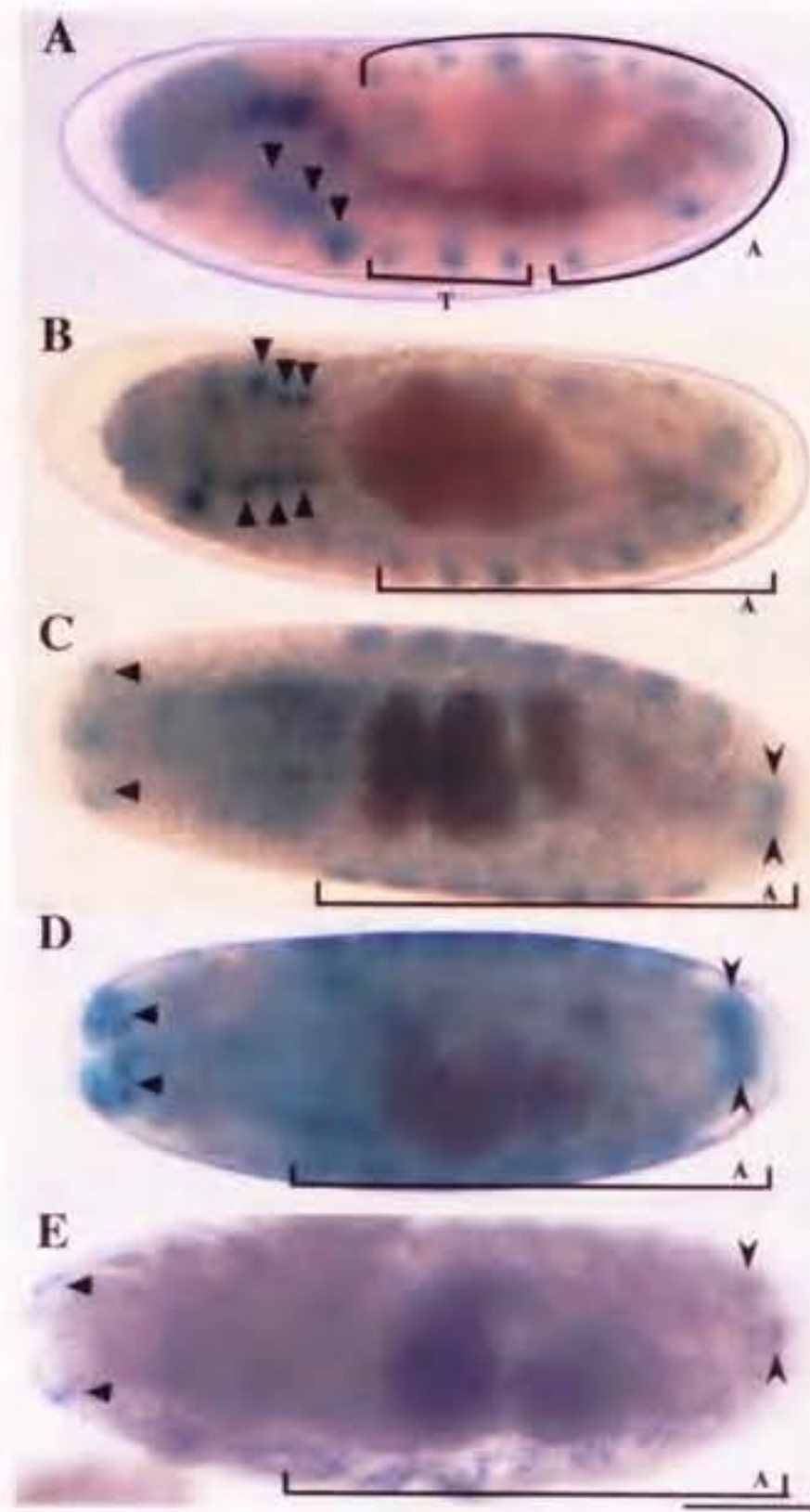


Fig. 11. Localization of the reporter gene expression in the transformed *Drosophila* (P[-7.0 DHP] line #6-1) during embryogenesis. Embryos were fixed and stained with  $\beta$ -galactosidase histochemistry and immunocytochemistry. Anterior is to the left. All panels are dorsal view, except for panel A in lateral view. Panel A, B, C, and D show, respectively, stage 11, 13, 15, and 16 embryos stained with  $\beta$ -galactosidase activity. Panel E shows a stage 16 embryo stained with anti- $\beta$ -galactosidase antibody. Triangles indicate each gnathal segment and the AMC. Arrow heads indicate positive stained regions under posterior spiracles. T, thoracic segments; A, abdominal segments. Scale bar, 100  $\mu$ m.



した(Fig. 11E)。その結果、AMC、腹部体節側方およびposterior spiracle表皮下層に限られた数の細胞体が染色された。陽性染色された細胞体の局在性は $\beta$ -ガラクトシダーゼ染色で観察された結果とほぼ同じであった。

AMCにおける $\beta$ -ガラクトシダーゼ活性は1齢幼虫から3齢幼虫のワンダリング期まで観察された(結果省略)。3齢幼虫の中枢神経系では食道下神経分節で1対、腹部神経分節で3対の細胞体がレポーター遺伝子の発現を示した(Fig. 12)。腹部神経分節の腹側の細胞体は成虫羽化まで染色が確認された(Fig. 13)。なお、中枢神経系以外の組織および器官では対照区のyw系統で認められるバックグラウンドレベルの染色であった(結果省略)。一方、*BomDH-PBAN* 遺伝子の第一イントロンから3'非翻訳領域までを含む8kbのpBS-8cのインサートを導入された形質転換ショウジョウバエでは、幼虫-蛹-成虫発育期間の中枢神経系で陽性染色が認められなかった(結果省略)。以上の結果から、得られた形質転換体は神経系の限られた細胞体でレポーター遺伝子を発現すると結論した。

ワンダリング期の幼虫の腹部神経分節には神経細胞が8,000-9,000個も存在する(Truman et al., 1993)。それにも関わらず、レポーター遺伝子は6個の細胞体だけで発現した。同様な発現パターンは他の#3-1と#7-1系統でも認められた(結果省略)。これらの6個の細胞体を部分的に特定するために、抗FXPRLamideペプチド血清を用いて免疫染色を行った。前章で観察した免疫陽性細胞が*BomDH-PBAN* 遺伝子-*lacZ* 遺伝子を発現しているかどうか確認するためである。幼虫期の腹部神経分節を $\beta$ -ガラクトシダーゼ活性染色と抗FXPRLamideペプチド血清の二重染色をした。そして、6個の細胞体で両者の発現が認められた(Fig. 14B)。しかし、本検出法では他の細胞体での陽性染色は確認できなかった(結果省略)。この結果はレポーター遺伝子が発現している6個の細胞体はFXPRLamideペプチドを合成する細胞体であることを示している。



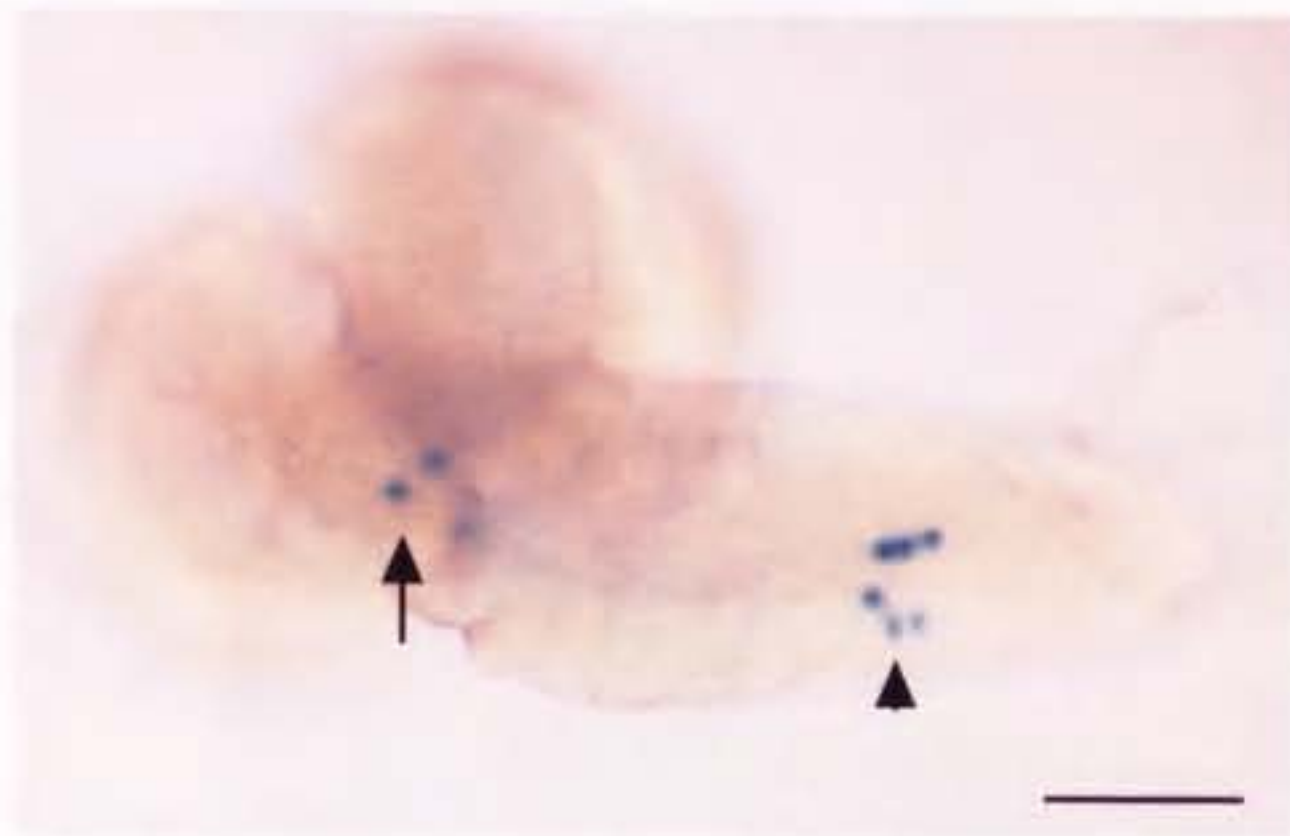


Fig. 12. Localization of reporter gene expression in the CNS of the wandering larva of the transformed *Drosophila* (P[7.0 DHP] line #6-1). Anterior is to the left. Arrow and arrow head indicate a pair of positive cells in the suboesophageal neuromere and three pairs of cells in the abdominal neuromere, respectively. Scale bar, 100  $\mu\text{m}$ .



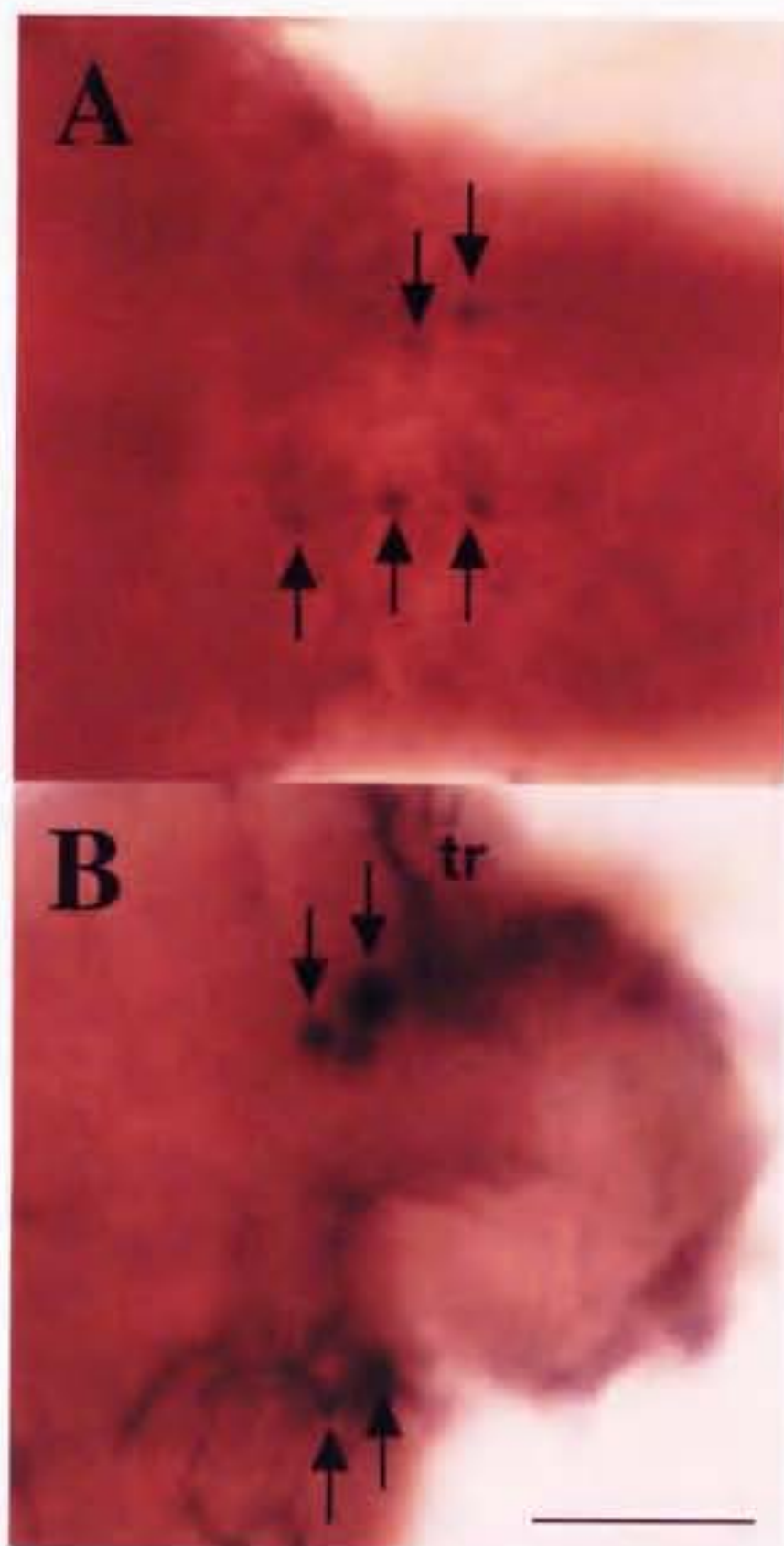


Fig. 13. Localization of the reporter gene expression in the ventromedial cells in the abdominal neuromere of the transformed *Drosophila* (P[-7.0 DHP] line #6-1) at pupal (A) and adult stage (B). The reporter gene product was detected by immunostaining. Anterior is to the left. Arrows indicate the positive stained cells. tr indicates trachea. Scale bar, 100  $\mu\text{m}$ .



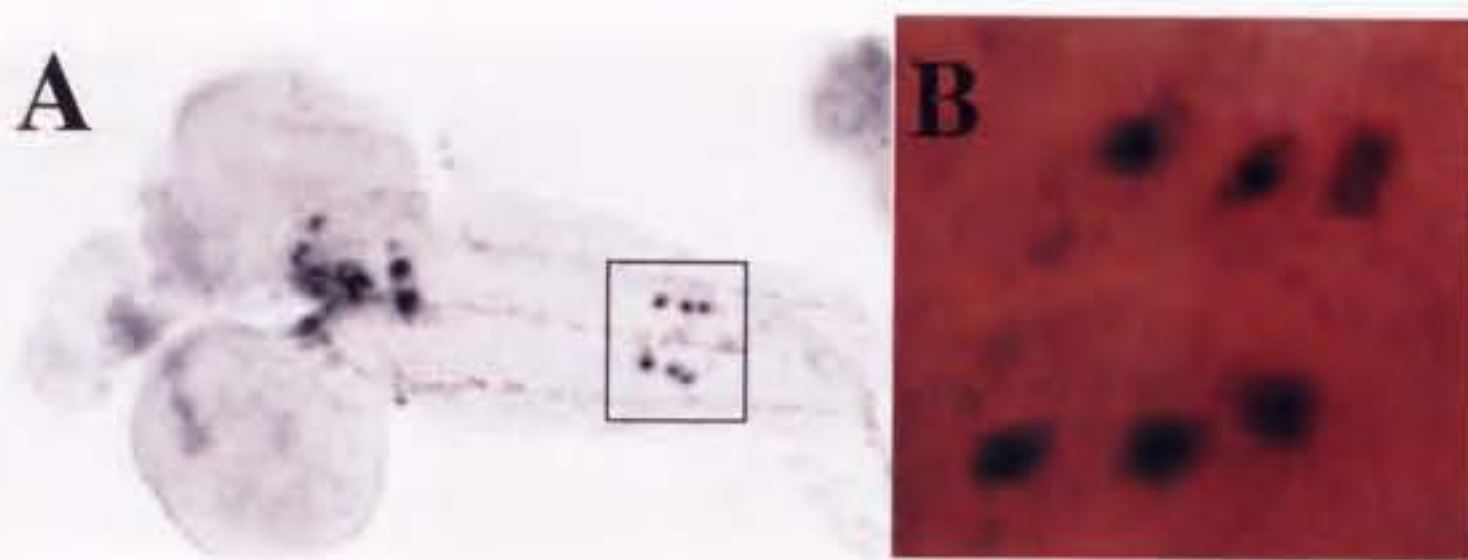


Fig. 14. Co-localization of the reporter gene product and the FXPRL-NH<sub>2</sub> neuropeptide(s) in the six ventromedial cells in the abdominal neuromere in the transformed *Drosophila* (P[-7.0 DHP] line #6-1) at third larval stage. Anterior is to the left. Panel A shows the CNS stained by immunocytochemistry using aDH#1 serum. A square enclosed 6 positive cells in the abdominal neuromere. Panel B shows 6 cells in the abdominal neuromere double-stained on the  $\beta$ -galactosidase and the FXPRL-NH<sub>2</sub> neuropeptide using aDH#1 serum.



## 考察

カイコにおける *BomDH-PBAN* 遺伝子発現は発育分化プログラムだけでなく、環境の刺激によっても調節されている (Xu et al., 1995b)。興味深いことに、*BomDH-PBAN* 遺伝子の発現は後胚発育期を 25°C で保護すると誘導される。そして、潜成虫期で次世代の胚休眠誘導に必要とされる DH が合成される。温度刺激は未同定の連続的な伝達経路を経由して休眠誘導シグナルへ変換されると推察される。

*BomDH-PBAN* 遺伝子発現誘導に関わる制御機構の基本構造を明らかにするためには、個体レベルでシグナル伝達機構の全体像が網羅できる解析系が必要である。形質転換動物による解析はこの目的を達成するために有効な手段である。キイロシヨウジョウバエは P 因子による外来遺伝子の導入実験を含む遺伝学研究と分子生物学研究によって発達したモデル昆虫である。これまでに P 因子形質転換法によって作製された形質転換シヨウジョウバエによって、カイコ卵殻遺伝子 (Mitsialis and Kafatos, 1985; Mitsialis et al., 1989) と絹フィブロイン遺伝子 (Bello and Couble, 1990) の遺伝子発現調節機構の解析実験が成功している。そこで *BomDH-PBAN* 遺伝子-*lacZ* 遺伝子を導入した検索動物の作出を試みた。

最初は pCaSpeR-AUG-*lacZ* (Thummel and Pirota, 1992) を *BomDH-PBAN* 遺伝子を形質転換するための P 因子ベクターとして使用した。しかし、形質転換体の胚期から成虫期までの全ての生活環を通して、いずれの組織および器官においてもレポーター遺伝子の発現は観察されなかった (結果省略)。この陰性の結果は *BomDH-PBAN* 遺伝子と pCaSpeR-AUG-*lacZ* の間にある *NotI* 認識配列の挿入によって生じたと推察された。そこで、この問題を解決するために、*hsp27* の最小プロモーターをもっている pC $\beta$  を P 因子ベクターとして使用した。この系を用いて、P[-7.0 DHP] を導入された 5 種類の形質転換シヨウジョウバエ系統の作製に成功した。これらの系統は生活環を通して



限られた数の細胞体でレポーター遺伝子を発現した。

胚発育期後期におけるレポーター遺伝子の発現はキイロショウジョウバエのA37エンハンサートラップ系統における細胞局在性と類似していた(Ghysen and O'Kane, 1989)。A37系統の*lacZ*遺伝子は*achaete-scute* gene complex、*daughterless*、*string*変異系統を用いた交配実験によって末梢神経系の細胞で選択的に発現することが示されている。そのため本形質転換体の胚発育期後期におけるレポーター遺伝子も末梢神経系の細胞体で選択的に発現すると推察された。幼虫期から成虫羽化まではA37系統の*lacZ*遺伝子は中枢神経系の限られた細胞体で発現した。これらの結果は導入遺伝子が末梢神経系、中枢神経系または前駆体細胞の限られた神経細胞で選択的に発現するという見解をさらに支持した。

レポーター遺伝子産物とFXPRLamideペプチドは腹部神経分節の6個の細胞体で発現した。DHとPBANを含むFXPRLamideペプチドは昆虫種間で広く分布しており中枢神経系の限られた細胞体で発現する(Schoofs et al., 1992; Tips et al., 1993; Ichikawa et al., 1995; Davis et al., 1996; Ma et al., 1996; Sato et al., 1998)。さらに、DH-PBANcDNAは5種類の鱗翅目昆虫でクローニングされ塩基配列の高い相同性が示されている(Sato et al., 1993; Ma et al., 1994; Choi et al., 1998; Jacquin-Joly et al., 1998; Xu et al., 1999)。DH-PBAN遺伝子の塩基配列が決定されたのはカイコだけであるが(Xu et al., 1995a)、同様なDH-PBANmRNAを転写する昆虫種は5'上流域に転写制御に関わるモジュールが保存されていると考えられる。それゆえ、*BomDH-PBAN*遺伝子の高度に制御された発現様式は5'上流域の7kb塩基配列にある特異制御配列に結合する細胞特異的*trans*-活性化因子によって調節されると推察される。これらの可能性はテリションコンストラクトをもつ形質転換ショウジョウバエを作製することによって各因子を明らかにできるに違いない。



AMCにおけるレポーター遺伝子の発現は形質転換ショウジョウバエが *BomDH-PBAN* 遺伝子発現解析系としての利用の有効性を示していると推察される。なぜなら、AMCは胚発育後期から環境温度を関知するための感覚器官を含んでいるからである (Singh and Singh, 1984; Campos-Ortega and Hartenstein, 1997)。*BomDH-PBAN* 遺伝子-*lacZ* 形質転換ショウジョウバエで温度刺激による遺伝子発現誘導は成功していない。しかし、本結果は生化学的研究と分子生物学的研究に加えて *BomDH-PBAN* 遺伝子発現の新しい解析系を提供するであろう。



## 摘要

1. *BomDH-PBAN* 遺伝子発現制御機構を解析するために、*BomDH-PBAN* 遺伝子-*lacZ* 形質転換ショウジョウバエの作製を試みた。そのために *BomDH-PBAN* 遺伝子7kb上流域に *lacZ* を接続したコンストラクトを作製し、P因子形質転換法によりキイロショウジョウバエに導入し、5種類の形質転換系統を得た。
2. レポーター遺伝子は、胚発育期11-16ではAMC、腹部側方の表皮下層、posterior spiracleの表皮下層の限られた細胞体で発現した。幼虫期では中枢神経系の食道下神経分節と腹部神経分節の限られた細胞体で発現した。蛹殻形成期から成虫期まででは腹部神経分節の6個の細胞体で発現した。
3. レポーター遺伝子が発現する腹部神経分節の6個の細胞体は抗FXPRamideペプチド血清によって染色された。



#### 第IV章 形質転換シヨウジョウバエFXPRLamideペプチド合成神経 分泌細胞における*BomDH-PBAN*遺伝子発現に関わる*cis*-制御領域

*cis*-制御領域の解析は遺伝子発現制御機構を解明するために最初に必要なことである。遺伝子制御下によるDHの内分泌制御のシナリオを書くために、FXPRLamideペプチド産生神経分泌細胞での*BomDH-PBAN*遺伝子の発現制御機構の解析を試みた。第III章では*BomDH-PBAN*遺伝子-*lacZ*コンストラクトを導入されたキイロシヨウジョウバエを作製することに成功した(Ishida et al., 1999)。形質転換シヨウジョウバエは腹部神経分節の6個の細胞体で発現した。この結果は*BomDH-PBAN*遺伝子の上流域に*cis*-エレメントが存在することを示している。興味深いことに、この6個の細胞体は免疫染色よりFXPRLamideペプチド産生細胞であることが同定された(第III章; Ishida et al., 1999)。この結果より、これらの細胞には本遺伝子の発現に必要な細胞性因子を保持していると推測した。そして、FXPRLamideペプチド産生細胞で*DH-PBAN*遺伝子発現を制御する*cis*-領域は形質転換体によって決定されると推察した。

本章では*BomDH-PBAN*遺伝子7kb5'上流域を系統的に削除した領域をもつ24種類のコンストラクトをキイロシヨウジョウバエに導入し、形質転換系統を作製した。得られた全122系統の腹部神経分節におけるレポーター遺伝子発現パターンを観察し、FXPRLamideペプチド産生細胞で*BomDH-PBAN*遺伝子発現を制御する最小の領域を決定した。その一連の結果をまとめ*DH-PBAN*遺伝子発現制御機構について考察を加えた。



## 材料と方法

### 供試動物

第III章で用いたキイロシヨウジヨウバエの系統を供試した。ハエの飼育法は、第II章に準じて行った。

### P因子ベクターの作製と形質転換体の作製

分子生物学的手法はSambrook et al. (1989)の方法に従った。pBS-9cクローン(第III章; Xu et al., 1995a; Ishida et al., 1999)をシーケンス反応とPCR反応の鋳型として使用した。*BomDII-PBAN* 遺伝子の7kb上流域の塩基配列は BigDye terminator cycle sequencing ready reaction kit とABI PRISM 310 genetic analyzer(Applied Biosystems)を用いて決定した(Fig. 15; accession number, AB035269)。決定された7kb上流域の塩基配列をもとに25種類のプライマーを合成した。全てのプライマーには *A.sp*718、*Bam*HI、*Not*Iの認識配列を挿入した。Takara LA taqポリメラーゼ(Takara)はPCR反応のために使用した。PCRによって系統的にデリートした*BomDII-PBAN* 遺伝子上流域を増幅した。増幅されたインサートは制限酵素で消化された後ゲル精製した。これらのDNA鎖はpC $\beta$ のクローニングサイトに挿入された。インサートの挿入方向はシーケンスで検定した。P因子による形質転換はRubin and Spradring (1982)の方法に準じて行った。

### 免疫染色

中枢神経系の解剖は第II章に準じて行った。固定液としては7%飽和ピクリン酸水溶液および4%PFAを含むPBSを使用し、5°Cで一晩固定した。一次抗体には抗 $\beta$ -ガラクトシダーゼモノクローナル抗体(Promega)、抗*Drosophila* peptidylglycine  $\alpha$ -







hydroxylating mono-oxygenase (dPHM)血清(Kolhekar et al., 1997)、抗FXPRLamideペプチド血清(Sato et al., 1998)および抗セロトニン血清(Sanbio)を使用し、それぞれ200倍、500倍、1,000倍、1,000倍に希釈したものを使用した。二次抗体はCy2-抗ウサギIgG(Amersham)あるいはCy3-抗マウスIgG(Jackson ImmunoResearch Lab.)を1,000倍希釈で使用した。標本はVectashield(Vector)で包埋した後に共焦点レーザー顕微鏡(Zeiss)で観察した。写真はLaser Sharp MRC-1024(Bio-Rad)で合成した。



## 結果

### 1. BomDH-PBAN 遺伝子の cis- 制御領域の同定

前章に述べた実験結果より、*BomDH-PBAN* 遺伝子の cis- 制御エレメントは少なくとも 7kb 上流域に存在すると結論された (Ishida et al., 1999)。P[-7.0 DHP] 形質転換体は幼虫-蛹-成虫期を通して中枢神経系の限られた細胞体でレポーター遺伝子を発現していることが示された。しかし、検鏡した全ての系統で再現性のあるレポーター遺伝子の発現が認められたのは腹部神経分節の 6 個の細胞のみであった。さらに免疫染色により、これらの細胞は FXPRLamide ペプチド産生細胞であることが示された (Ishida et al., 1999)。この結果より、この cis- 制御因子はカイコの FXPRLamide ペプチド産生細胞でもその制御機能は発揮していると推察した。

キイロショウジョウバエ FXPRLamide ペプチド産生細胞における *BomDH-PBAN* 遺伝子の発現制御領域を同定するために、7kb 上流域を系統的に削除した DNA 断片を含む 24 種類のコンストラクトを準備した (Fig. 16)。P 因子による形質転換法でこれらのコンストラクトをキイロショウジョウバエ胚に導入し、各コンストラクトに対して 1-11 頭の形質転換体を選抜し、系統化した (Table 4)。中枢神経系におけるレポーター遺伝子の発現は 3 齢幼虫のワンダリング期を中心に抗  $\beta$ - ガラクトシダーゼモノクローナル抗体を用いた免疫染色で検出した。様々なコンストラクトを導入した 122 系統の形質転換体を検鏡した結果、脳および食道下神経分節でのレポーター遺伝子の発現が認められた。しかし、その染色パターンは同じコンストラクトを導入した系統においても系統間で異なっていた (Fig. 17)。したがって、脳と食道下神経分節でのレポーター遺伝子の発現はショウジョウバエゲノムと *BomDH-PBAN* 遺伝子 5' 上流域を含む様々な因子の複合的な制御で引き起こされたと考えられた。

一方、腹部神経分節におけるレポーター遺伝子の発現は同じコンストラクトを導



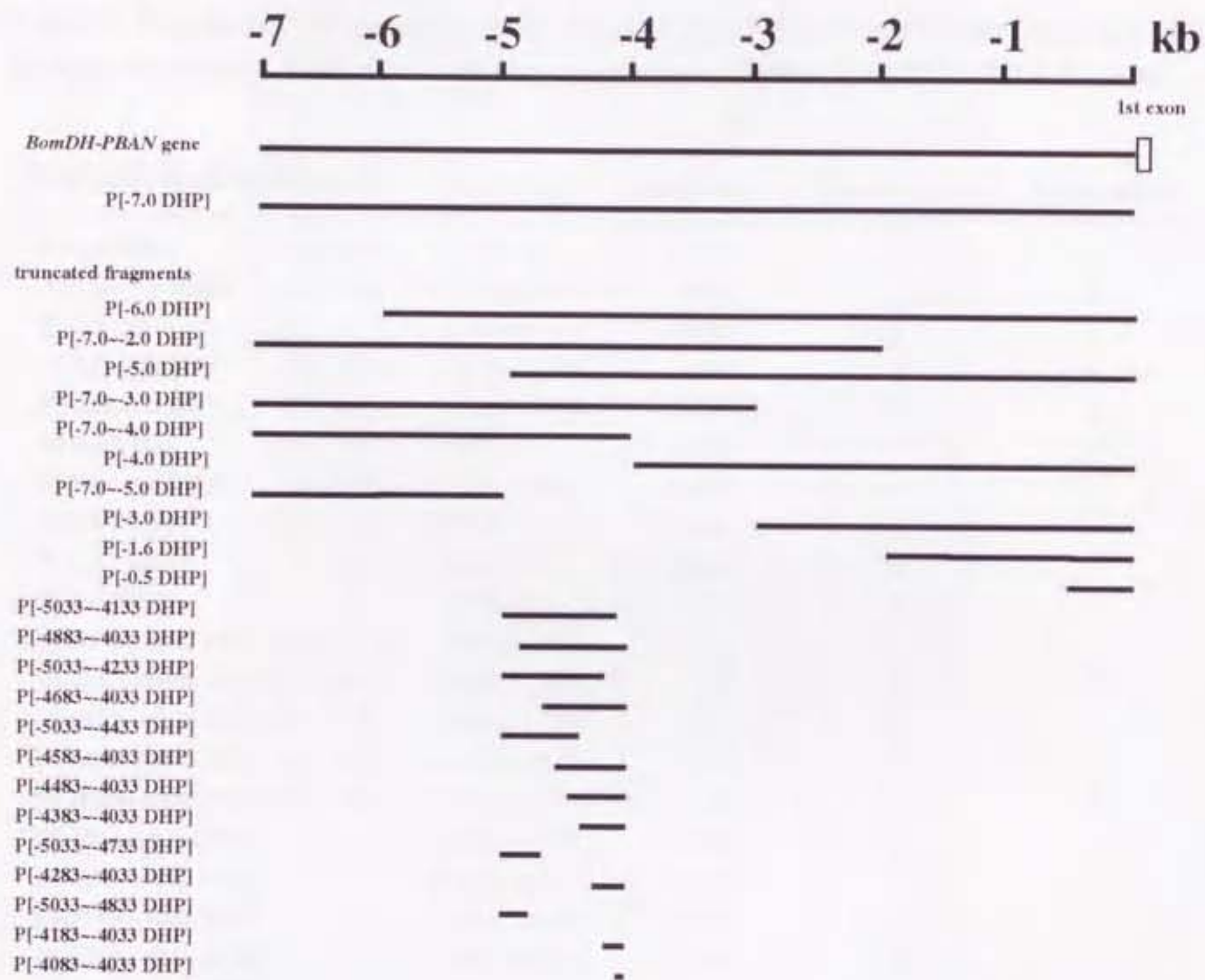


Fig. 16. Deletion constructs of 7 kb upstream region of *BomDII-PBAN* gene. Left column indicates names of each deletion construct. Horizontal bars indicate length of inserts of deletion constructs.



Table 4. Expression of reporter gene in flies transformed with constructs covering various regions of 7 kb 5'-flanking sequence of the *BomDH-PBAN* gene

Transformed constructs	Range (bp)	Length (b)	Obtained lines	Expression
P[-6.0 DHP] (Fig. 18A)	-6,033~-1	6,033	2	+
P[-7.0~-2.0 DHP] (Fig. 18B)	-7,033~-2,033	5,000	4	+
P[-5.0 DHP] (Fig. 18C)	-5,033~-1	5,033	11	+
P[-7.0~-3.0 DHP] (Fig. 18D)	-7,033~-3,033	4,000	7	+
P[-7.0~-4.0 DHP] (Fig. 18E)	-7,033~-4,033	3,000	11	+
P[-4.0 DHP] (Fig. 18F)	-4,033~-1	4,033	5	.*
P[-7.0~-5.0 DHP] (Fig. 18G)	-7,033~-5,033	2,000	4	-
P[-3.0 DHP]	-3,033~-1	3,033	5	-
P[-1.6 DHP]	-1,655~-1	1,655	6	-
P[-0.5 DHP]	-574~-1	574	7	-
P[-5033~-4133 DHP] (Fig. 19A)	-5,033~-4,133	900	5	+
P[-4883~-4033 DHP] (Fig. 19B)	-4,883~-4,033	850	8	+
P[-5033~-4233 DHP] (Fig. 19C)	-5,033~-4,233	800	5	+
P[-4683~-4033 DHP] (Fig. 19D)	-4,683~-4,033	650	4	-
P[-5033~-4433 DHP] (Fig. 19E)	-5,033~-4,433	600	4	.*
P[-4583~-4033 DHP]	-4,583~-4,033	550	8	-
P[-4483~-4033 DHP]	-4,483~-4,033	450	1	-
P[-4383~-4033 DHP]	-4,383~-4,033	350	8	-
P[-5033~-4733 DHP]	-5,033~-4,733	300	9	-
P[-4283~-4033 DHP]	-4,283~-4,033	250	2	-
P[-5033~-4833 DHP]	-5,033~-4,833	200	2	.*
P[-4183~-4033 DHP]	-4,183~-4,033	150	2	-
P[-4083~-4033 DHP]	-4,083~-4,033	50	2	-

Alphabet in parenthesis corresponds to that in Figs. 18 and 19.

\*, one line showed positive expression but the localization of the cells expressing reporter gene was different to that of the cells expressing FXPRLamide peptide.



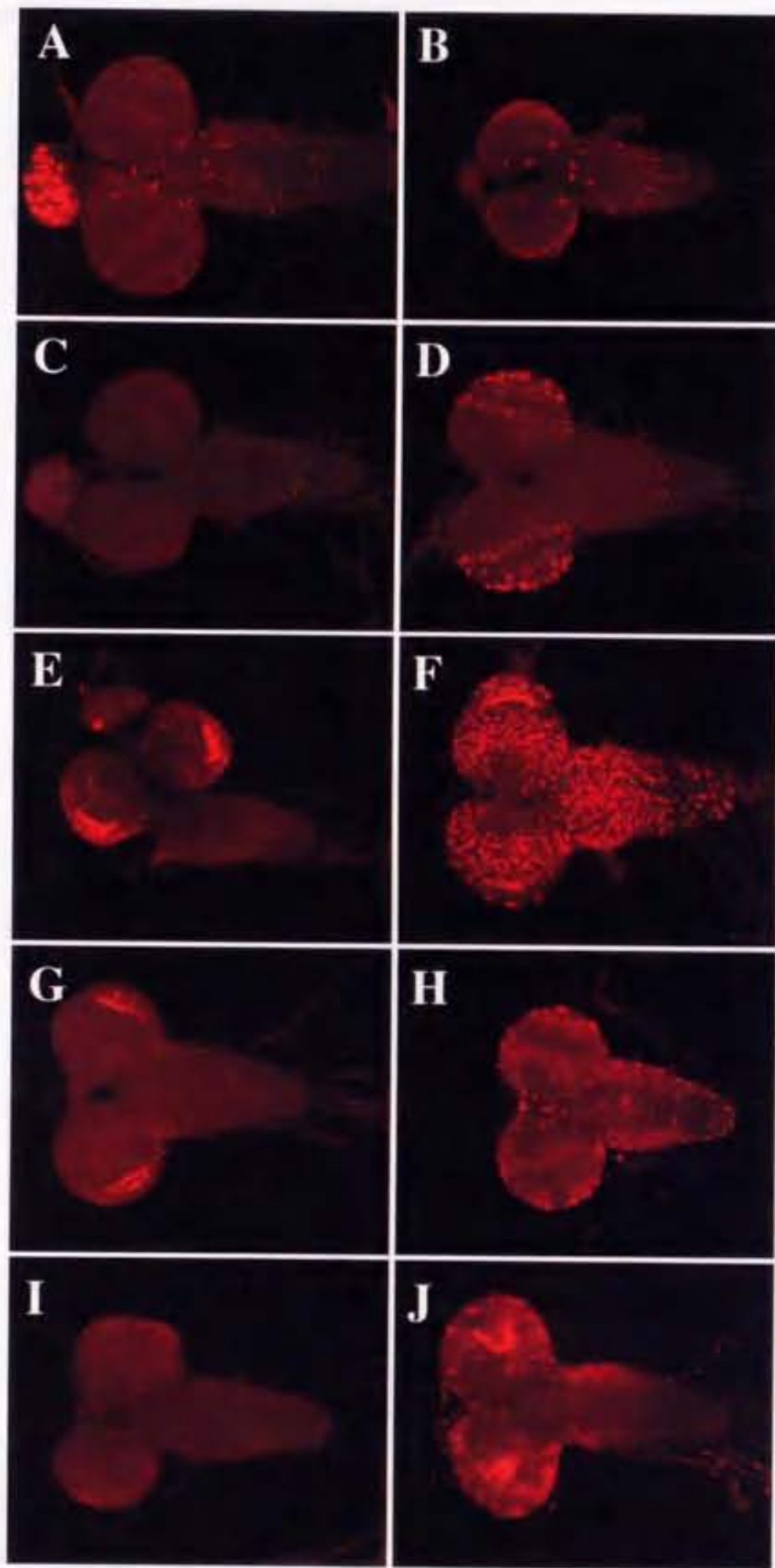


Fig. 17. Variation of the reporter gene expression in the CNS of the transformed flies. Reporter gene product was detected at wandering stage by anti- $\beta$  galactosidase antibody. A, P[-7.0~-4.0 DHP] line #21. B, P[-7.0~-4.0 DHP] line #31. C, P[-5033~-4133 DHP] line #11. D, P[-5033~-4133 DHP] line #21. E, P[-5033~-4433 DHP] line #11. F, P[-5033~-4433 DHP] line #21. G, P[-5033~-4633 DHP] line #11. H, P[-5033~-4633 DHP] line #21. I, P[-4083~-4033 DHP] line #12. J, P[-4083~-4033 DHP] line #24.



入された系統中では安定してかつ再現性があった。*BomDII-PBAN*遺伝子の5'上流域-6,033~-1からなる6.0kb領域を含むコンストラクト(P[-6.0 DHP])を導入された2系統では、腹部神経分節でレポーター遺伝子を発現した(Fig. 18A)。この染色パターンはP[-7.0 DHP]系統の場合と同じだった(Ishida et al., 1999; Fig. 20A)。これらの細胞体は抗FXPRLamideペプチド血清を用いた免疫染色によってFXPRLamideペプチド産生細胞であることが確認された(Fig. 20D参照)。同じ染色パターンは-7,033~-2,033上流域を含む5.0kbのコンストラクト(P[-7.0~-2.0 DHP])、-5,033~-1上流域5.0kbのコンストラクト(P[-5.0 DHP])、-7,033~-3,033上流域4.0kbのコンストラクト(P[-7.0~-3.0 DHP])、-7,033~-4,033上流域3.0kbのコンストラクト(P[-7.0~-4.0 DHP])を導入された系統でも観察された(Fig. 18A-E and Table 4)。しかし、-4,033~-1上流域4.0kbのコンストラクト(P[-4.0 DHP])と-7,033~-5,033上流域2.0kbのコンストラクト(P[-7.0~-5.0 DHP])を導入された系統では陽性染色は観察されなかった(Figs. 18F and 18G)。また、さらに削除した-3,033~-1上流域3.0kbのコンストラクト(P[-3.0 DHP])、-1,655~-1領域1,665bのコンストラクト(P[-1.6 DHP])、-574~-1上流域574bのコンストラクト(P[-0.5 DHP])でも陽性染色は観察されなかった(Table 4)。これらの結果を一括してTable 4にまとめた。以上からレポーター遺伝子発現に関わる制御領域は*BomDII-PBAN*遺伝子の-5,033~-4,033上流域の1.0kbの範囲内に存在することが示された。

レポーター遺伝子発現のために必要不可欠な制御領域を同定するために、-5,033~-4,033間を系統的に削除した領域をもつコンストラクトをさらに作製し、キイロシヨウジョウバエに導入した(Figs. 16 and 19, and Table 4)。レポーター遺伝子発現は-5,033~-4,133上流域を含む900bのコンストラクト(P[-5033~-4133 DHP])、-4,883~-4,033上流域850bのコンストラクト(P[-4883~-4033 DHP])、5,033~-4,233上流域800bのコンストラクト(P[-5033~-4233 DHP])を導入された系統ではいずれも安定した発現パ



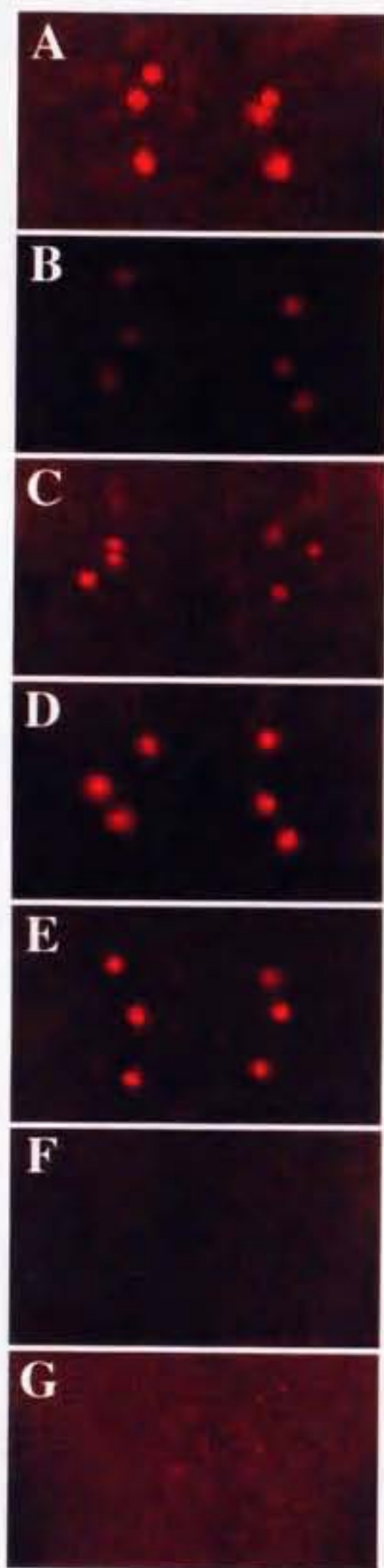


Fig. 18. Reporter gene expression in abdominal neuromere of the flies transformed with constructs covering various regions of 7 kb upstream region of the *BomDH PBAN* gene. Reporter gene product was detected at wandering stage by anti- $\beta$  galactosidase antibody. A, P[-6.0 DHP] line. B, P[-7.0~-2.0 DHP] line. C, P[-5.0 DHP] line. D, P[-7.0~-3.0 DHP] line. E, P[-7.0~-4.0 DHP]line. F, P[-4.0 DHP] line. G, P[-7.0~5.0 DHP] line.



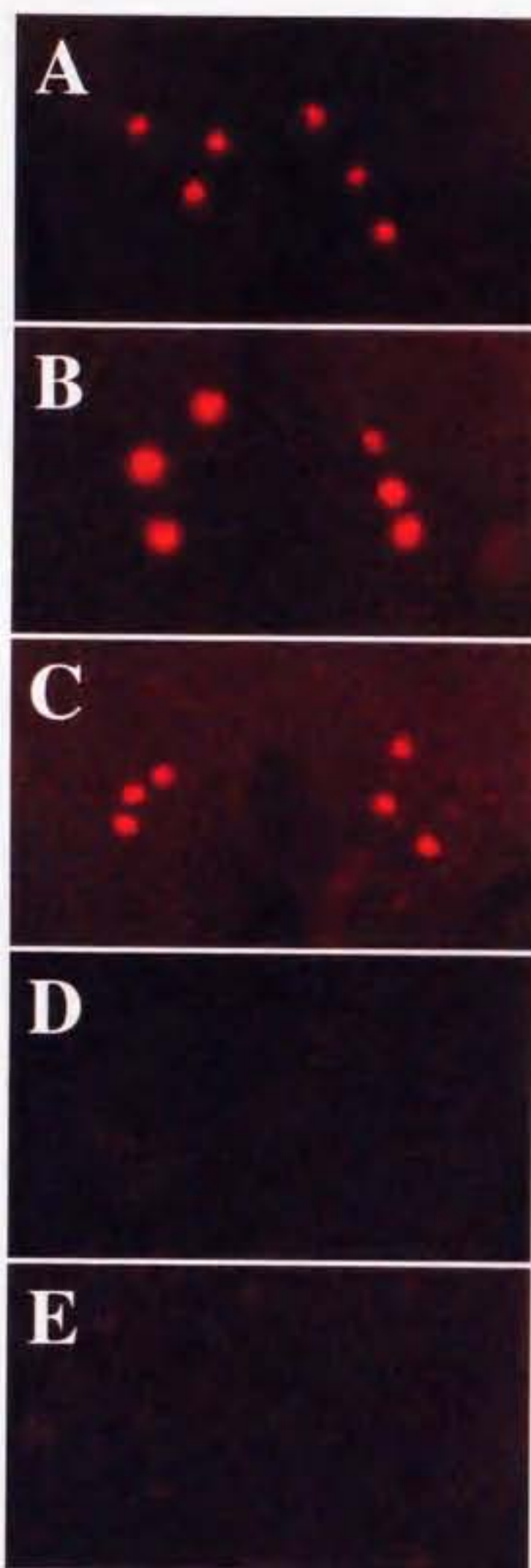


Fig. 19. Reporter gene expression in abdominal neuromere of the flies transformed with constructs covering various regions of the 1 kb upstream region of the *BomDH-PBAN* gene between -5,033 and -4,033. Reporter gene product was detected by anti- $\beta$ -galactosidase antibody. A, P[-5033~-4133 DHP] line. B, P[-4883~-4033 DHP] line. C, P[-5033~-4233 DHP] line. D, P[-4683~-4033 DHP] line. E, P[-5033~-4433 DHP] line.



ターンを示した(Fig. 19A-C)。しかし、-4,683~-4,033上流域650bのコンストラクト(P[-4683~-4033DHP])と-5,033~-4,433上流域600bのコンストラクト(P[-5033~-4433DHP])での形質転換体は陽性反応を示さなかった(Fig. 19D-E)。また、さらに削除した-4,583~-4,033上流域550bのコンストラクト(P[-4583~-4033DHP])、-4,483~-4,033上流域450bのコンストラクト(P[-4483~-4033 DHP])、-4,383~-4,033上流域350bのコンストラクト(P[-4383~-4033 DHP])、-5,033~-4,733上流域300bのコンストラクト(P[-5033~-4733 DHP])、-4,283~-4,033上流域250bのコンストラクトP[-4283~-4033 DHP]、-5,033~-4,833上流域200bのコンストラクト(P[-5033~-4833 DHP])、-4,183~-4,033上流域150bのコンストラクト(P[-4183~-4033 DHP])および-4,083~-4,033上流域50bのコンストラクト(P[-4083~-4033 DHP])でも陽性染色は観察されなかった(Table 4)。Table 4にまとめた結果より、腹部神経分節の6個の細胞体におけるレポーター遺伝子発現に関わる最小の領域は650bpからなる*BomDH-PBAN*遺伝子-4,883~-4,233上流域であると決定された。

## 2. *BomDH-PBAN* 遺伝子-*lacZ* 発現細胞の特定

キイロシヨウジョウバエに*DH-PBAN*遺伝子が存在するか否かについてはまだ未定であるが、FXPRLamideペプチドは免疫組織化学的な検索によって幼虫、蛹、成虫の腹部神経分節の6個の細胞体で局在していることが明らかにされている(Fig. 20D; 第II章)。生理活性を有するFXPRLamideペプチドはポリプロテインからエンドタンパク質分解による切断とアミド化の一連の酵素反応を通して合成されることが知られている。もし、抗FXPRLamideペプチド血清に対して陽性染色された細胞体が真のFXPRLamideペプチド合成神経分泌細胞であるならば、この細胞体はC-末端のアミノ酸の $\alpha$ -アミド化を触媒する*Drosophila* peptidylglycine  $\alpha$ -hydroxylating mono-oxygenase



(dPHM)を生合成し蓄積しているに違いない(Kolhekar et al., 1997)。この可能性を確認するために、P[-7.0 DHP]系統の幼虫の腹部神経分節を抗 $\beta$ -ガラクトシダーゼモノクローナル抗体と抗dPHM血清による二重免疫染色をした(Fig. 20A-C)。レポーター遺伝子の発現はすでに何回か述べているように腹部神経分節の6個の細胞体で確認した(Fig. 20A)。一方、dPHMの蓄積は同じ焦点面で8個の細胞体で確認された(Fig. 20B)。 $\beta$ -ガラクトシダーゼとdPHMの染色パターンの合成写真は同じ6個の細胞体で両者の抗原が共局在していることを明確に示した(Fig. 20C)。さらに第III章の結論を確認するために、同系統を抗 $\beta$ -ガラクトシダーゼモノクローナル抗体と抗FXPRLamideペプチド血清で二重染色した。そして、レポーター遺伝子発現細胞がFXPRLamideペプチド産生細胞であることを確認した(Fig. 20D)。最後にこの細胞がペプチド性ニューロンであるかあるいはアミン性ニューロンであるかを区別するために、腹部神経分節におけるセロトニン(Lundell and Hirsh, 1994)と $\beta$ -ガラクトシダーゼの局在性を調査した。セロトニンが蓄積している細胞体はこの焦点面では10個以上観察された。しかし、これらの細胞体は抗 $\beta$ -ガラクトシダーゼ抗体で染色されなかった(Fig. 20E)。したがって、腹部神経分節の6個の細胞体はアミド化されたペプチドホルモン産生神経分泌細胞であると特定された。



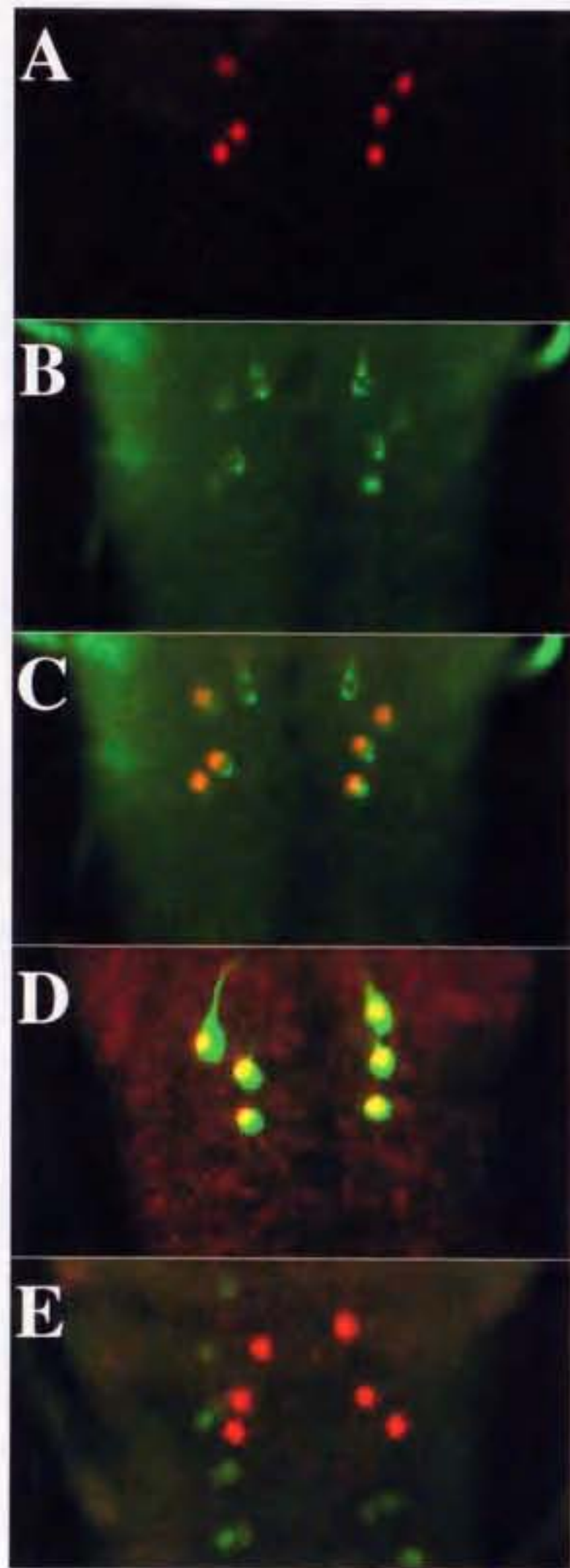


Fig. 20. Immunocytochemical observation of  $\beta$ -galactosidase, dPHM, FXPRLamide peptide, and serotonin in the abdominal neuromere of the P[-7.0 DHP] line at wandering stage. Anti- $\beta$ -galactosidase antibody (A, C, E), anti-dPHM serum (B and C), anti-FXPRLamide peptide serum (D), and anti-serotonin serum (E) are used for immunostaining. All specimen were observed at ventral side. Red indicates localization of  $\beta$ -galactosidase. Orange indicates co-localization of both proteins (C). Yellow indicates co-localization both proteins (D).



## 考察

FXPRLamideペプチドは昆虫においてフェロモン生合成、筋収縮、色素生合成、休眠などの様々な生理機能を調節する神経ホルモンとして作用する(Schoofs et al., 1993; Yamashita, 1996)。DH-PBANcDNAとDH-PBAN遺伝子はカイコから初めて単離され、5個のFXPRLamideペプチドをコードするcDNAと遺伝子として同定された(Sato et al., 1993; Xu et al., 1995a)。続いて相同なcDNAが*Bombyx mandarina* (Xu et al., 1999)、*Helicoverpa assulta* (Choi et al., 1998)、*Helicoverpa zea* (Ma et al., 1994)、*Mamestra brassicae* (Jacquin-Joly et al., 1998)で単離され、これらの昆虫種におけるFXPRLamideペプチドをコードする遺伝子であることが示された。このような鱗翅目昆虫種の広い範囲にわたるDH-PBAN遺伝子の存在から、本来ならばDH-PBAN遺伝子の名称はFXPRLamideペプチド遺伝子に変更すべきかも知れない。しかし、現在においてはこの遺伝子の名前を固定するには時期尚早であり、本章では当初に命名されたDH-PBANを使用する。

最近の10年間でFXPRLamideペプチドは免疫組織化学により様々な昆虫種で局在性を調査され、FXPRLamideペプチドが中枢神経系の限られた数の神経分泌細胞で産生されていることが示された。これらの細胞局在性が昆虫種間で保存されていることが示された(Schoofs et al., 1992; Tips et al., 1993; Ichikawa et al., 1995; Davis et al., 1996; Ma et al., 1996; Sato et al., 1998)。P[-7.0 DHP]系統の腹部神経分節における6個の $\beta$ -ガラクトシダーゼ発現細胞はdPHMとFXPRLamideペプチドを蓄積したが、セロトニンは蓄積しなかった。dPHMはC-末端のペプチジルグリシンを $\alpha$ -アミド化を触媒する酵素として作用することが知られている(Kolhekar et al., 1997)。そのためこれらの細胞体は成熟したFXPRLamideペプチドを産生する代謝機能を保持していると推察される。キイロショウジョウバエにおけるDH-PBAN遺伝子は単離されていないが、キイ



ロシヨウジヨウバエの腹部神経分節の6個の細胞体は他の昆虫種のFXPRLamideペプチド産生細胞と同じ*DH-PBAN*遺伝子発現に必須な細胞性因子を供与しているに違いない。

*BomDH-PBAN*遺伝子の5'上流域の異なる領域を導入された形質転換シヨウジヨウバエの腹部神経分節の6個の細胞体におけるレポーター遺伝子発現を検索することによって、*BomDH-PBAN*遺伝子発現に必要な不可欠な領域は-4,883--4,233上流域の650bpであると決定された。しかし、一般に*cis*-因子は約10bpの塩基配列で構成されており、遺伝子の時空間に依存した発現は複数の*cis*-因子の機能の協調によって調節されるのが通常である。この高次の制御機構下に*BomDH-PBAN*遺伝子の発現もあるに違いない。本章の実験で決定された650bpには異なる数種の*cis*-因子からなり、それらの協調によって調節されるに違いない。例えば、ほ乳類のvasoactive intestinal peptide遺伝子は神経特異的遺伝子発現のための制御領域として5個の異なる*cis*-活性化ドメインを含む1,975bp領域(425bp TSE+1.55kb上流域)を必要としている(Hahm and Eiden, 1998)。キイロシヨウジヨウバエの*dFMRamide*ペプチド遺伝子ではその発現は3個の陽性と3個の陰性の異なる因子を含む546bp*Tv*-ニューロン特異的エンハンサーによって調整されている(Benveniste and Taghert, 1999)。650bp領域における*cis*-因子の局在を明らかにする問題と同*cis*-因子の協同作用による*BomDH-PBAN*遺伝子発現調節機構を明らかにする問題が残っているが、本結果はカイコの遺伝子をシヨウジヨウバエに導入することを通して*DH-PBAN*遺伝子制御領域を最初に提供した。



## 摘要

1. カイコの *DH-PBAN* 遺伝子発現に関わる *cis*-制御領域を同定するために、本遺伝子5'上流域を系統的に削除したDNA断片に *lacZ* レポーター遺伝子を接続させた24種類のコンストラクトを作製し、キイロショウジョウバエに導入し、122種類の形質転換系統を作製した。レポーター遺伝子は腹部神経分節の6個の細胞体で安定して発現した。系統的な削除実験の結果、*BomDH-PBAN* 遺伝子発現のための最小の領域は-4,883~-4,233に属する650bpの配列と決定された。
2. レポーター遺伝子が発現する腹部神経分節の6個の細胞体の機能を推察するために、抗 $\beta$ -ガラクトシダーゼモノクローナル抗体、抗dPHM血清、抗FXPRLamideペプチド血清、抗セロトニン血清で免疫染色した。6個の細胞体にはdPHMとFXPRLamideペプチドは蓄積していたが、セロトニンは蓄積していなかった。このことから、レポーター遺伝子発現細胞はdPHMによるアミド化機能を有するFXPRLamideペプチド神経分泌細胞であることが示された。
3. 以上から、同定された *cis*-制御領域はカイコの食道下神経節のFXPRLamideペプチド神経分泌細胞においても機能を果たしていると推察した。



## 第V章 総合考察

本研究では3点を明らかにした。1点目は、キイロショウジョウバエにおいてFXPRLamideペプチド様物質が存在することを免疫組織化学的に明らかにし、本物質の化学的な同定を試み、その本体を明らかにするには到らなかったが、細胞局在性とペプチドの化学的性質が他種の昆虫種の場合と類似性がきわめて高いことから、*DII-PBAN*遺伝子の発現制御系が昆虫種間で保存されていると推測した。

2点目は、*BomDII-PBAN*遺伝子-*lacZ*形質転換ショウジョウバエを作製し、7kb上流域制御下でレポーター遺伝子が特定の発育時期の末梢神経系と中枢神経系の限られた細胞体で発現することを明らかにした。また、レポーター遺伝子が発現する腹部神経分節の6個の細胞体がFXPRLamideペプチド蓄積していることを明らかにした。このことから、この形質転換体が*BomDII-PBAN*遺伝子発現制御機構の解析系として利用できることと評価した。

3点目は、腹部神経分節の6個の細胞での遺伝子発現を制御する最小の*cis*-領域を決定した。そして、この領域は複数の*cis*-エレメントで構成されていると推察した。また、6個の細胞がFXPRLamideペプチドを生合成するために必要なアミド化酵素タンパク質を蓄積していることから、明らかにされた*cis*-領域はカイコの食道下神経節のFXPRLamideペプチド神経分泌細胞でも同様な制御機能を果たしていると予測した。

近年、カイコにおいてもCabbage looper, *Trichoplusia ni*に感染するバキュロウイルス由来の*piggyBac*ベクターを用いてカイコゲノムに外来遺伝子を挿入された形質転換体の作製に成功した(Tamura et al., 2000)。*piggyBac*ベクターはキイロショウジョウバエにも形質転換活性を保持している(Handler and Harrell II, 1999)。つまり、*piggyBac*ベクターでコンストラクトを作製すれば、同じベクターを用いてカイコとキイロ



ショウジョウバエの形質転換体を用いた遺伝子発現解析系を作出することが可能となる。この技術革新により形質転換ショウジョウバエで明らかにした知見をカイコで確認することが可能になり、また、両者を比較することによりカイコ特有の遺伝子発現調節機構も論じることが可能になった。

形質転換体は(1)*BomDH-PBAN* 遺伝子発現の上位に関わる制御機構の解明、(2)*BomDH-PBAN* 遺伝子転写産物量と休眠誘導の関係の解明および(3)FXPRLamideペプチドの休眠誘導以外の機能の解明に利用できる。以下にその概要を述べる。

#### (1)*BomDH-PBAN* 遺伝子発現に関わる上位の制御機構の解明

*BomDH-PBAN* 遺伝子はカイコの食道下神経節の3個のクラスターに分かれた12個のFXPRLamideペプチド神経分泌細胞で特異的に発現し、その発現量も環境温度、発育時期に対応して変動する(Sato et al., 1994; Xu et al., 1995b)。この特異的な発現を説明するためには、中枢神経系、中枢神経系における左右半球、食道下神経節、食道下神経節中のセグメント、セグメントにおける細胞体の位置情報である縦、横、高さ軸、時間軸、環境刺激応答、最低レベルの遺伝子発現、遺伝子転写産物量の発育時期特異的増減に関わる11種類の遺伝子発現制御要素が必要であると考えられる。

第II章および第III章の実験結果より、*BomDH-PBAN* 遺伝子-*lacZ* 形質転換ショウジョウバエでのレポーター遺伝子は発育時期および細胞特異的に発現した。また、定量実験を行って確認する必要があるが、免疫染色の染色濃度から判断して腹部神経節の6個の細胞体でのFXPRLamideペプチド量は変化がないのに対し、 $\beta$ -ガラクトシダーゼ量は蛹期以降で減少した。これらは空間的位置情報、発育時間軸情報および遺伝子発現量調節情報を伝達する上記で推測した*BomDH-PBAN* 遺伝子発現に関わる制御因子による結果と推察される。

一方、MatInspector Ver2.2(Quandt et al., 1995)による検索では*BomDH-PBAN* 遺伝子



-4,883-4,233の650bpの領域にはPOUホメオティックドメインタンパク質(Johnson and Hirsh, 1990)、*Drosophila*-STAT(Hou *et al.*, 1996; Yan *et al.*, 1996)およびfork headホメオティックドメインタンパク質であるcrocodile(Häcker *et al.*, 1995)などを含む約40個の *trans*-活性化因子を認識する配列が存在することが推定された(結果省略)。このことから *BomDH-PBAN* 遺伝子の発現は複数の転写因子で調節されていると推察できる。

また、第IV章で同定された650bpの制御領域はこれ以下の断片に削ると全ての活性を消失した。つまり制御領域は複数の *cis*-エレメントが個々に作用したのではなく同時にかつ協同的に作用していると推察される。*BomDH-PBAN* 遺伝子の発現調節機構を解明するためには制御領域の点突然変異配列をもつ形質転換体が有効な示唆を与えることになる。そして、個々の *cis*-エレメントの同定のみならず個々の *cis*-エレメントの相互作用の同定も念頭に置いて休眠誘導情報伝達ネットワークの研究を進めなければならない。

## (2) *BomDH-PBAN* 遺伝子転写産物量と休眠誘導の関係の解明

合成休眠ホルモンは3.5日齢の蛹への投与が最も高い休眠誘導活性を示す。そして、XuらのRT-PCRによる定量結果から、この時期では *BomDH-PBAN* 遺伝子の転写産物量は非休眠性個体に比較し休眠性個体の方が約3倍多く存在することが示されている(Xu *et al.*, 1995b)。しかし、現在までにこの転写産物量の差が休眠誘導に直接反映しているとする直接的な証明はされていない。この問題を明らかにするためにはヒートショックプロモーター-*BomDH-PBAN*cDNA形質転換体の利用が有効である。この形質転換体を非休眠性に運命づけた蛹期の3.5日齢でヒートショック誘導し転写産物を多量に発現させる。そして産下卵の休眠誘導が確認できれば休眠誘導は



*BomDH-PBAN* 遺伝子発現レベルで説明できることになる。この問題に対する答えは近い将来に *piggyBac* ベクターを用いることによって得られるであろう。

### (3) *FXPRLamide* ペプチドの休眠誘導以外の機能の解明

昆虫のペプチドホルモンの機能はホルモン除去(産生器官の外科的手術による摘出など)個体を作成し、生物検定によって明らかにされてきた。また、カイコでは抗 *FXPRLamide* ペプチド血清を注射することで血液中のホルモンを免疫中和し、それによって *DH* の休眠誘導作用を欠損させた個体も作出することができる(Shiomi et al., 1993)。一方、*FXPRLamide* ペプチドの神経系における神経伝達物質としての機能を検索するためには、産生細胞での合成を停止させた個体あるいは産生細胞を特異的に削除した個体の作出が必要になる。キイロショウジョウバエでは *Gal4-UAS* システム(Brand and Perrimon, 1993)が完成されており、細胞特異的ドライバがあれば特定細胞でのタンパク合成を阻害して細胞死を誘導する遺伝子 *reaper* や *head involution defective* を発現させることができる(McNabb et al., 1997)。そこで、本論文で明らかにした 650bp の -4,883--4233 *BomDH-PBAN* 遺伝子上流域をドライバとして利用し、*FXPRLamide* ペプチド神経分泌細胞で致死遺伝子を局所的に発現させれば、中枢神経系で *FXPRLamide* ペプチドを欠損させた個体を作成することができる。成虫期のキイロショウジョウバエでは腹部神経分節の *FXPRLamide* ペプチド神経分泌細胞から後胸部神経分節へ網状に投射する軸索が確認されている(第II章、Fig. 3)。そのため、この形質転換体の成虫期における行動の変化が認められるかもしれない。厳密な機能解析のためには生物検定として具体的にいつの時期、どの行動に着目しなければいけないかを確定するという最も重要な問題が残されているが、今後、この系によって徐々に *FXPRLamide* ペプチドの機能が明らかになってくるだろう。



カイコの休眠誘導機構、つまり胚期で経験した非ストレスの環境温度がいかなる機構で次世代の休眠性を支配するのか？この大きな課題に多くの研究者達が果敢に挑んできた。しかし、解明が進めば進むほど、新たな課題が山積してきた。*BomDH-PBAN* 遺伝子の形質転換体を用いた解析は始まったばかりであるが、分子と個体をつなぐ架け橋としてカイコの休眠誘導機構と *DH-PBAN* 遺伝子発現制御機構の解明に貢献するであろう。



## 謝辞

本研究の遂行にあたり、ご多忙の中、長期にわたって忍耐と熱意をもってご指導ご鞭撻下さいました名古屋大学大学院生命農学研究科生物機能分化学講座資源昆虫学研究分野、山下興亜教授に厚く御礼申し上げます。また、キイロシヨウジョウバエのFXPRLamideペプチドの部分精製を共同論文として指導していただいた三重大学生物資源学部農産物利用学研究室の今井邦雄教授、鈴木恒一氏、河合奈々氏、キイロシヨウジョウバエの形質転換法、 $\beta$ -ガラクトシダーゼ染色法のご指導をしていただいた当研究室の新美輝幸博士、解剖と免疫組織化学染色法のご指導していただいた岩手大学農学部応用生物学科生物制御講座昆虫学研究室の(故)佐藤行洋助教授、抗dPHM血清を譲渡していただいたワシントン大学医学部解剖神経生物学学科のPaul H. Taghert教授、特異性の高い抗FXPRLamideペプチド血清を譲渡され、eELISA法をご指導していただいた当研究室の塩見邦博博士、キイロシヨウジョウバエのywとバランサー系統を譲渡していただいたバーゼル大学BiozentrumのWalter J. Gehring教授、P因子ベクターのpC $\beta$ を譲渡していただいたMarkus Affolter博士、また、多くのご教示をいただいた当研究科バイオダイナミクス講座生物相関機構学研究分野、小林迪弘教授、生物機能分化学講座資源昆虫学研究分野、柳沼利信助教授、池田素子博士、そして、資源昆虫学研究室の諸先輩、後輩に感謝いたします。また、研究活動中に巻き込まれた事故による数々の大怪我から命を救ってもらい、リハビリや研究活動復帰に際して多大な援助をして下さいました医療関係者、両親、山下興亜教授、友人達に感謝いたします。



## 引用文献

- Ashburner M. (1989a): "*Drosophila*: a laboratory handbook", Cold spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Ashburner M. (1989b): "*Drosophila*: a laboratory manual", Cold spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Bello B. and Couble P. (1990): Specific expression of a silk-encoding gene of *Bombyx* in the anterior salivary gland of *Drosophila*. *Nature*, 346, 480-482.
- Benveniste R. J. and Taghert P. H. (1999): Cell type-specific regulatory sequences control expression of the *Drosophila* FMRF-NH<sub>2</sub> neuropeptide gene. *J. Neurobiol.*, 38, 507-520.
- Berry S. J. (1981): Hormones and metabolism in pupal diapause of silkmoths (Lepidoptera: Saturniidae). *Ent. Gen.*, 7, 233-243.
- Brand A. H. and Perrimon N. (1993): Targeted gene expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes. *Development*, 118, 401-415.
- Campos-Ortega J. A. and Hartenstein V. (1997): "The Embryonic Development of *Drosophila melanogaster*" (2nd ed.), Springer-Verlag, Berlin.
- Choi M. Y., Tanaka M., Kataoka H., Boo K. S., and Tatsuki S. (1998): Isolation and identification of the cDNA encoding the pheromone biosynthesis activating neuropeptide and additional neuropeptides in the oriental tobacco budworm, *Helicoverpa assulta* (Lepidoptera: Noctuidae). *Insect Biochem. Molec. Biol.*, 28, 759-766.
- Davis N. T., Homberg U., Teal P. E. A., Altstein M., Agricola H.-J., Hildebrand J. G. (1996): Neuroanatomy and immunocytochemistry of the median neuroendocrine cells of the suboesophageal ganglion of the tobacco hawkmoth, *Manduca sexta*: immunoreactivities to PBAN and other neuropeptides. *Microsc. Res. Tech.*, 35, 201-



- De Kort C. A. D. (1981): Hormonal and metabolic regulation of adult diapause in colorado beetle, *Leptinotarsa decemlinea* (Coleoptera: Chrysomelidae). Ent. Gen., 7, 261-271.
- Denlinger D. L. (1985): Hormonal control of diapause. In "Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry and Pharmacology" (Kerkut G. A. and Gilbert L. I., eds.), 8, 353-412, Pergamon, Oxford.
- Fukuda S. (1951): The production of the diapause eggs by transplanting the subesophageal ganglion in the silkworm. Proc. Japan Acad., 27, 672-677.
- Ghysen A. and O'Kane C. (1989): Neural enhancer-like elements as specific cell markers in *Drosophila*. Development, 105, 35-52.
- Goriely A., Dumont N., Dambly-Chaudière C., and Ghysen A. (1991): The determination of sense organs in *Drosophila*: effect of the neurogenic mutations in the embryo. Development, 113, 1395-1404.
- Graumann P. L. and Marahiel M. A. (1998): A subfamily of proteins that contain the cold-shock domain. Trends Biochem. Sci., 23, 286-290.
- Häcker U., Kaufmann E., Hartmann C., Jürgens G., Knöchel W., and Jäckle H. (1995): The *Drosophila fork head* domain protein crocodile is required for the establishment of head structures. EMBO J., 14, 5306-5317.
- Hahn S. H. and Eiden L. E. (1998): Five discrete cis-active domains direct cell type-specific transcription of the vasoactive intestinal peptide (VIP) gene. J. Biol. Chem., 273, 17086-17094.
- Handler A. M. and Harrell II R. A. (1999): Germline transformation of *Drosophila melanogaster* with the *piggyBac* transposon vector. Insect Mol. Biol., 8, 449-457.
- Hasegawa K. (1951): Studies on the voltinism in the silkworm, *Bombyx mori* L., with special reference to the organs concerning determination of voltinism (a preliminary note). Proc.



Japan Acad., 27, 667-671.

Holman G. M., Cook B. J., and Nachman R. J. (1986): Isolation, primary structure and synthesis of a blocked neuropeptide isolated from the cockroach *Leucophaea maderae*. *Comp. Biochem. Physiol.*, 85C, 219-224.

Horard B., Bello B., Abraham E. G., Coulon-Bublex M., Garel A., and Mounier N. (1993): A cytoplasmic actin gene from the silkworm *Bombyx mori* is expressed in tissues of endodermal origin and previtellogenic germ cells of transgenic *Drosophila*. *Insect Mol. Biol.*, 2, 175-183.

Hou X. S., Melnick M. B., and Perrimon N. (1996): *marelle* acts downstream of the *Drosophila* HOP/JAK kinase and encodes a protein similar to the mammalian STATs. *Cell*, 84, 411-419.

Ichikawa T., Hasegawa K., Shimizu I., Katsuno K., Kataoka H., and Suzuki A. (1995): Structure of neurosecretory cells with immunoreactive diapause hormone and pheromone biosynthesis activation neuropeptide in the silkworm *Bombyx mori*. *Zool. Sci.*, 12, 703-712.

Imai K., Konno T., Nakazawa Y., Komiya T., Isobe M., Koga K., Goto T., Yaginuma T., Sakakibara K., Hasegawa K., and Yamashita O. (1991): Isolation and structure of diapause hormone of the silkworm, *Bombyx mori*. *Proc. Japan Acad. Ser.*, B67, 98-101.

Ishida Y., Niimi T., and Yamashita O. (1999): The stage- and cell-specific expression of the *Bombyx mori* diapause hormone-pheromone biosynthesis activating neuropeptide (*BomDH-PBAN*) gene in the transformed *Drosophila*. *J. Seric. Sci. Jpn.*, 68, 417-427.

Jacquin-Joly E., Burnet M., François M.-C., Ammar D., Meillour P. N., and Descoins, C. (1998): cDNA cloning and sequence determination of the pheromone biosynthesis activating neuropeptide of *Mamestra bassicae*: a new member of the PBAN family. *Insect*



Biochem. Molec. Biol., 28, 251-258.

- Johnson W. A. and Hirsh J. (1990): Binding of a *Drosophila* POU-domain protein to a sequence element regulating gene expression in specific dopaminergic neurons. *Nature*, 343, 467-470.
- Karess R. E. and Rubin G. M. (1984): Analysis of P transposable element functions in *Drosophila*. *Cell*, 38, 135-146.
- Kogure M. (1933): The influence of light and temperature on certain characters of the silkworm, *Bombyx mori*. *J. Dept. Agric., Kushu Univ.*, 4, 1-93.
- Kolhekar A. S., Roberts M. S., Jiang N., Johnson R. C., Mains R. E., Eipper B. A., and Taghert P. H. (1997): Neuropeptide amidation in *Drosophila*: separate genes encode the two enzymes catalyzing amidation. *J. Neurosci.*, 17, 1363- 1376.
- Kuniyoshi H., Nagasawa H., Ando T., Suzuki A., and Nachman R. J. (1992): Cross activity between pheromone biosynthesis activating neuropeptide (PBAN) and myotropic pyrokinin insect peptides. *Biosci. Biotech. Biochem.*, 56, 167-168.
- Lees A. D. (1955): The physiology of diapause in arthropods. University Press, Cambridge.
- Lundell M. and Hirsh J. (1994): Temporal and spatial development of serotonin and dopamine neurons in the *Drosophila* CNS. *Dev. Biol.*, 165, 385-396.
- Ma P. W. K., Knipple D. C., and Roelofs W. L. (1994): Structural organization of the *Helicoverpa zea* gene encoding the precursor protein for pheromone biosynthesis-activating neuropeptide and other neuropeptides. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 91, 6506-6510.
- Ma P. W. K., Roelofs W. L., and Jurenka R. A. (1996): Characterization of PBAN and PBAN-encoding gene neuropeptides in the central nervous system of the corn earworm moth *Helicoverpa zea*. *J. Insect Physiol.*, 42, 257-266.
- MacArthur L. and Eiden L. (1996): Neuropeptide genes: Targets of activity-dependent signal



- transduction. *Peptides*, 17, 721-728.
- MacNabb S. L., Baker J. D., Agapite J., Steller H., Riddiford L. M., and Truman J. W. (1997): Disruption of a behavioral sequence by targeted death of peptidergic neurons in *Drosophila*. *Neuron*, 19, 813-823.
- Matsumoto S., Kitamura A., Nagasawa H., Kataoka H., Orikasa C., Mitsui T., and Suzuki A. (1990): Functional diversity of a neurohormone produced by the suboesophageal ganglion: molecular identity of melanization and reddish colouration hormone and pheromone biosynthesis activating neuropeptide. *J. Insect Physiol.*, 36, 427-432.
- Mitsialis S. A. and Kafatos F. C. (1985): Regulatory elements controlling chorion gene expression are conserved between flies and moths. *Nature*, 317, 453-456.
- Mitsialis S. A., Veletza S., and Kafatos F. C. (1989): Transgenic regulation of moth chorion gene promoters in *Drosophila*: tissue, temporal, and quantitative control of four bidirectional promoters. *J. Mol. Evol.*, 29, 486-495.
- Morimoto R. I. (1998): Regulation of the heat shock transcriptional response: cross talk between a family of heat shock factors, molecular chaperones, and negative regulators. *Genes Dev.*, 12, 3788-3796.
- Nachman R. J., Holman G. M., and Cook B. J. (1986): Active fragments and analogs of the insect neuropeptide leucopyrokinin: structure-function studies. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 137, 936-942.
- Nachman R. J., Holman G. M., Schoofs L., and Yamashita O. (1993): Silkworm diapause induction activity of myotropic pyrokinin (FXPRLamide) insect neuropeptides. *Peptides*, 14, 1043-1048.
- Nässel D. R., Bayraktaroglu E., and Dirksen H. (1994): Neuropeptides in neurosecretory and efferent neural systems of insect thoracic and abdominal ganglia. *Zool. Sci.*, 11, 15-31.
- Power, M. E. (1948): The thoracico-abdominal nervous system of an adult insect, *Drosophila*



- melanogaster. *J. Comp. Neurol.*, 88, 347-409.
- Quandt K., Frech K., Karas H., Wingender E., and Werner T. (1995): MatInd and MatInspector - new fast and versatile tools for detection of consensus matches in nucleotide sequence data. *Nucleic Acid Res.*, 23, 4878-4884.
- Raina A. K. and Kempe T. G. (1990): A pentapeptide of the C-terminal sequence of PBAN with pheromonotropic activity. *Insect Biochem.*, 20, 849-851.
- Rina A. K., Jaffe H., Kempe T. G., Keim P., Blacher R. W., Fales H. M., Riley C. T., Klun J. A., Ridgway R. L., and Hayes D. K. (1989): Identification of a neuropeptide hormone that regulates sex pheromone production in female moths. *Science*, 244, 796-798.
- Rubin G. M. and Spradling A. C. (1982): Genetic transformation of *Drosophila* with transposable element vectors. *Science*, 218, 348-353.
- 斎藤哲夫、松本義昭、平嶋義宏、久野英二、申島敏夫(1988):新応用昆虫学-改訂版-。朝倉書店。
- Sambrook J., Fritsch E. F. and Maniatis, T. (1989): "Molecular Cloning: A Laboratory Manual" (2nd ed.), Cold spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Sato Y., Ikeda M., and Yamashita O. (1994): Neurosecretory cells expressing the gene for common precursor for diapause hormone and pheromone biosynthesis-activating neuropeptide in the suboesophageal ganglion of the silkworm, *Bombyx mori*. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 96, 27-36.
- Sato Y., Shiomi K., Saito H., Imai K., and Yamashita O. (1998): Phe-X-Pro-Arg-Leu-NH<sub>2</sub> peptide producing cells in the central nervous system of the silkworm, *Bombyx mori*. *J. Insect Physiol.*, 44, 333-342.
- Sato Y., Oguchi M., Menjo N., Imai K., Saito H., Ikeda M., Isobe M., and Yamashita O.



- (1993): Precursor polyprotein for multiple neuropeptides secreted from the suboesophageal ganglion of the silkworm, *Bombyx mori*: characterization of the cDNA encoding the diapause hormone precursor and identification of additional peptides. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90, 3251-3255.
- Sauders D. S. (1982): Insect Clocks. (2nd ed.) Pergamon, Oxford.
- Scavdis G., Sidén-Kamos I., Müller H.-M., Crisanti A., and Louis C. (1996): Conserved function of *Anopheles gambiae* midgut-specific promoters in the fruitfly. EMBO J., 15, 344-350.
- Schoofs L., Vanden Boreck J., and De Loof A. (1993): The myotropic peptides of *Locusta migratoria*: structures, distribution, functions and receptors. Insect Biochem. Molec. Biol., 23, 859-881.
- Schoofs L., Holman G. M., Hayes T. K., Tips A., Nachman R. J., Vandesande F., and De Loof A. (1990): Isolation and identification of locustamyotropin (Lom-MT), a novel biologically active insect neuropeptide. Peptides, 11, 427-433.
- Schoofs L., Holman G. M., Hayes T. K., Nachman R. J., and De Loof A. (1991): Isolation, primary structure, and synthesis of locustapyrokinin: a myotropic peptide of *Locusta migratoria*. Gen. Comp. Endocrinol., 81, 97-104.
- Schoofs L., Tips A., Holman G. M., Nachman R. J., and De Loof A. (1992): Distribution of locustamyotropin-like immunoreactivity in the nervous system of *Locusta migratoria*. Regul. Pept., 37, 237-254.
- Shiomi K., Ishida Y., Ikeda M., Sato Y., Saito H., Imai K., Isobe M., and Yamashita O. (1994): Induction of non-diapause eggs by injection of anti-diapause hormone rabbit serum into the diapause type of the silkworm, *Bombyx mori*. J. Insect Physiol., 40, 693-699.
- Singh R. N. and Singh K. (1984): Fine structure of the sensory organs of *Drosophila*



- melanogaster* meigen larva (Diptera : Drosophilidae). Int. J. Insect Morphol. Embryol., 13, 255-273.
- Su Z.-H., Ikeda M., Sato Y., Saito H., Imai K., Isobe M., and Yamashita O. (1994): Molecular characterization of ovary trehalase of the silkworm, *Bombyx mori* and its transcriptional activation by diapause hormone. Biochim. Biophys. Acta, 1218, 366-374.
- 竹田真木生、田中誠二編 (1993) : 昆虫の季節適応と休眠。文一総合出版。
- Tamura T., Thibert C., Royer C., Kanda T., Abraham E., Kamba M., Komoto N., Thomas J.-L., Mauchamp B., Chavaney G., Shirk P., Fraser M., Prudhomme J.-C., and Couble P. (2000): Germline transformation of the silkworm *Bombyx mori* L. using a piggyBac transposon-derived vector. Nature Biotechnol., 18, 81-84.
- Thummel C. S. and Pirotta V. (1992): Technical notes: new pCasper P-element vectors. Drosophila Inf. Serv. 71, 150.
- Tips A., Schoofs L., Paemen L., Ma M., Blackburn M., Raina A., and De Loof A. (1993): Co-localization of locustamyotropin- and pheromone biosynthesis activating neuropeptide-like immunoreactivity in the central nervous system of five insect species. Comp. Biochem. Physiol., 106A, 195-207.
- Truman J. W., Taylor B. J., and Awad T. A. (1993): Formation of the adult nervous system. In "The Development of *Drosophila melanogaster*" (Bate M. and Arias A. M., eds.), 1245-1275, Cold Spring Harbor Laboratory, Plainview, New York.
- Waller S. J., Ratty A., Burbach J. P. H., and Mruphy D. (1998): Transgenic and transcriptional studies on neurosecretory cell gene expression. Cell. Mol. Neurobiol., 18, 149-171.
- 渡辺勘次 (1924) : 家蚕の化性に関する研究。蚕試報, 6, 411-455.
- Williams C. M. (1946): Physiology of insect diapause: The role of the brain in the production



- and termination of pupal dormancy in the giant silkworm, *Platysmaia cecropia*. *Bio. Bull.*, 90, 234-243.
- Xiong B. and Jacobs-Lorena M. (1995): Gut-specific transcriptional regulatory elements of the carboxypeptidase gene are conserved between black flies and *Drosophila*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 92, 9313-9317.
- 徐衛華(1995): カイコの休眠ホルモン-フェロモン生合成活性化神経ペプチド(DH-PBAN)遺伝子の構造と発現調節。名古屋大学大学院農学研究科 博士論文(農学)。第492号。
- Xu W.-H., Sato Y., and Yamashita O. (1999): Molecular characterization of the cDNA encoding diapause hormone and pheromone biosynthesis activating neuropeptide in *Bombyx mandarina*. *J. Seric. Sci. Jpn.*, 68, 373-379.
- Xu W.-H., Sato Y., Ikeda M. and Yamashita O. (1995a): Molecular characterization of the gene encoding the precursor protein of diapause hormone and pheromone biosynthesis activating neuropeptide (DH-PBAN) of the silkworm, *Bombyx mori* and its distribution in some insects. *Biochim. Biophys. Acta*, 1261, 83-89.
- Xu W.-H., Sato Y., Ikeda M. and Yamashita O. (1995b): Stage-dependent and temperature-controlled expression of the gene encoding the precursor protein of diapause hormone and pheromone biosynthesis activating neuropeptide in the silkworm, *Bombyx mori*. *J. Biol. Chem.*, 270, 3804-3808.
- Yagi S. (1981): Physiological aspects of diapause in rice stem borers and the effect of juvenile hormone (Lepidoptera: Pyralidae). *Ent. Gen.*, 7, 213-221.
- Yamashita O. (1996): Diapause hormone of the silkworm, *Bombyx mori*: structure, gene expression and function. *J. Insect Physiol.*, 42, 669-679.
- Yamashita O. and Suzuki K. (1991): Roles of morphogenic hormones in embryonic diapause.



In "Morphogenetic Hormones of Arthropods" (ed. By Gupta A. P.), 3, 81-128. Rutgers,  
Univ. Press, New Jersey.

Yan R., Small S., Desplan C., Dearolf C. R., and Darnell Jr., J. E. (1996): Identification of a  
*Stat* gene that functions in Drosophila development. *Cell*, 84, 421-430.



## 報文目録

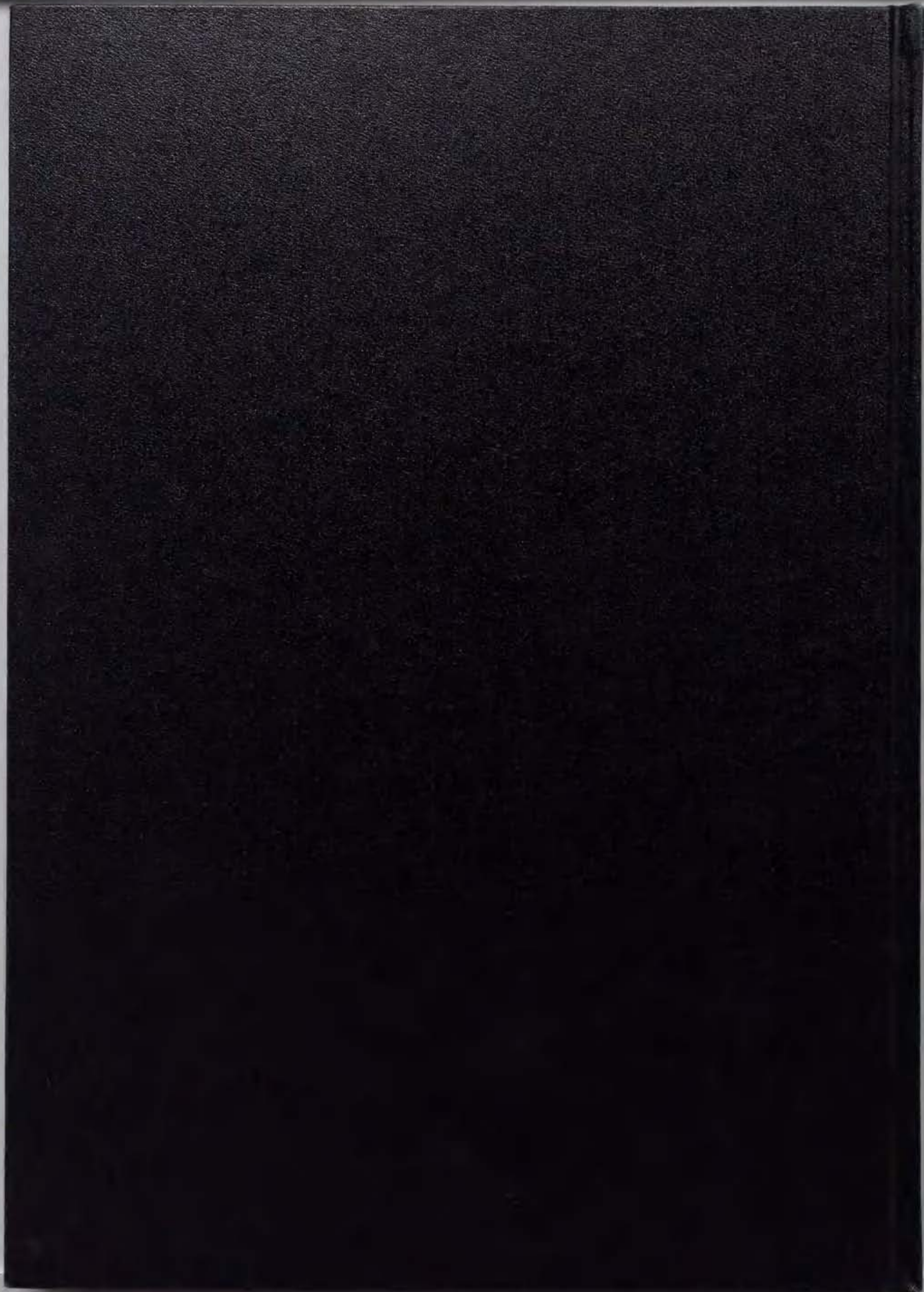
1. Ishida Y., Niimi T., and Yamashita O.  
The stage- and cell-specific expression of the *Bombyx mori* diapause hormone-pheromone biosynthesis activating neuropeptide (*BomDH-PBAN*) gene in the transformed *Drosophila*.  
J. Seric. Sci. Jpn., 68, 417-427 (1999)
2. Ishida Y., Niimi T., and Yamashita O.  
The *cis*-regulatory region responsible for the *BomDH-PBAN* gene expression in FXPRLamide peptide producing neurosecretory cells of the transformed *Drosophila*.  
J. Seric. Sci. Jpn. (in press)
3. Ishida Y., Kawai N., Suzuki K., Sato Y., Imai K., and Yamashita O.  
Immunocytochemical localization and characterization of FXPRLamide-like neuropeptide in the fruit fly, *Drosophila melanogaster*.  
(in preparation)



## 参考論文目録

1. Shiomi K., Ishida Y., Ikeda M., Sato Y., Saito H., Imai K., Isobe M. and Yamashita O.  
Induction of non-diapause eggs by injection of anti-diapause hormone rabbit serum into  
the diapause type of the silkworm, *Bombyx mori*.  
J. Insect Physiol., 40, 693-699 (1994)







inches 1 2 3 4 5 6 7 8  
cm 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19

# Kodak Color Control Patches

© Kodak, 2007 TM: Kodak



# Kodak Gray Scale



© Kodak, 2007 TM: Kodak

**A** 1 2 3 4 5 6 **M** 8 9 10 11 12 13 14 15 **B** 17 18 19

