

主論文の内容の要旨

学位申請者 氏名	守屋 綾乃	ローマ字 氏名	Ayano Moriya
-------------	-------	------------	--------------

論文題名

ショウジョウバエの中腸ホルモン Dh31 抑制による附属腺の早期老化のメカニズム

内容の要旨

序論・背景

多細胞動物の体内の恒常性を維持するためには、器官同士が互いに応答し合うことが重要であり、その仕組みの一つが、血液中を循環するホルモンである。昆虫ペプチドホルモンの一つ Diuretic hormone 31 (Dh31) は 31 アミノ酸から構成される利尿ホルモンで、本研究で用いたショウジョウバエでは、中腸（哺乳類小腸に相当）後方で産生され、さまざまな生命活動に関与している。本研究室の先行研究では、中腸から産生される Dh31 を RNA 干渉法によりノックダウンすると、個体寿命が延長し、中腸老化は遅延する一方で、オスの生殖に必須の内部生殖器官である附属腺（哺乳類前立腺に相当）の老化は促進する「恒常性の乱れ」が起きることが明らかとなった (Takeda *et al.*, 2018)。その時点でこの表現型は、一般に老化を制御するインスリンシグナル (insulin/ insulin-like growth factor-like signaling; IIS) とは独立に Dh31 が働く作用を反映したものと予測されていたため、本研究はその分子メカニズムの解明を目指した。

目的-1 Dh31 抑制による附属腺の老化促進のメカニズムの解明

結果 Dh31 抑制による附属腺の老化促進にはインスリンシグナルが関与する

まず、野生型では、中腸産生 Dh31 が附属腺 Dh31 受容体を介して附属腺老化を防ぐと予想し、附属腺で Dh31 受容体をノックダウンしたが、老化促進は観察できなかった。加えて RNA-seq 解析から、Dh31 受容体は附属腺ではほとんど発現していないことが示された。従って、Dh31 ノックダウンによる附属腺の老化促進は、Dh31 による附属腺への直接作用を反映するものではないことが強く示唆された。

IIS 経路は、寿命や老化を制御する性質があることが知られている。当研究室の先行研究で、野生型の InR を附属腺で過剰発現すると、老化促進に似た症状をみせたので (2018 年度 寺島未発表)、Dh31 抑制による附属腺老化促進にも IIS 経路が関与し得ることが予想された。まず、附属腺で野生型のインスリン受容体 (insulin receptor; InR) を過剰発現すると老化は促進した。次に、Dh31 ノックダウンと同様に老化促進する *Dh31* 欠失変異体の附属腺で *InR* をノックダウンすると、老化促進は抑圧された。この結果から Dh31 抑制による附属腺の老化促進は InR が仲介している可能性が示唆された。先行研究で、Dh31 による老化促進が IIS 経路を介する可能性が低いとされていたのは、従来から IIS マーカーとして使用されてきた tGPH の応答がみられなかったためであった。そこで、より高感度で確実にインスリンシグナルを検出できるマーカーの開発も必要となった。これは二つ目の目的として後述する。

附属腺でインスリンシグナルの観測を行うために、InR を組織標本上で観察することを計画した。そこで、InR に融合したタンパク質の蛍光により InR の局在を可視化できる系統 (*InR::mCherry*) を作成し、*Dh31* 欠失変異体の附属腺細胞の観察を行った。*Dh31* 欠失変異体の附属腺では *InR::mCherry* タンパク質からの蛍光に由来する多数の顆粒が確認できたため、Dh31 抑制による附属腺の老化促進はインスリンシグナルが関与することが示唆された。

考察 Dh31 が IIS シグナルを通して器官の間の老化バランスを調節している可能性

先行研究では Dh31 抑制により、中腸の老化は抑制される一方で附属腺の老化が促進することが示されていた。二つの器官で Dh31 抑制時に老化応答が相反することから、Dh31 は個体がつ総エネルギーの各器官への割り当てに関与しているという仮説が立てられていた (Takeda et al., 2018)。本研究では *Dh31* 欠失変異体における附属腺の老化促進が IIS 経路によって仲介されることが示唆された。この結果とあわせ、Dh31 は、IIS シグナルによって制御される全身的な老化において、器官同士の間で維持されるべきである老化進行度のバランスを調節している可能性がある、その解釈が修正された。

目的-2 高感度の IIS マーカーの開発

RNA-seq 解析でコントロールと Dh31 ノックダウン個体の附属腺の遺伝子発現レベルを比較すると、*InR* mRNA は Dh31 ノックダウン個体では 7.8 倍に増加していた。この結果からも、従来使用されてきた tGPH は低レベルのインスリンシグナルを観測するには感度が十分ではないことが懸念されたので、より高感度にインスリンシグナルを観測できるツールの検討が必要となった。

結果 mCherry/EYFP 融合 InR ノックイン系統の作成と観察

附属腺で InR タンパク質の発現を可視化するために、InR コード領域の終止コドン付近に「[リンカー]–[蛍光タンパク質]–[選択マーカー]カセット」をノックインし、InR の局在を蛍光タンパク質から生じる蛍光により追跡できる系統を作成した。赤色蛍光タンパク質を改変した mCherry と融合させた系統 *InR::mCherry*、または GFP を改変した EYFP を融合させた系統 *InR::EYFP* を確立した。本研究では *InR::mCherry* を実験に使用した。

InR::mCherry は附属腺上皮細胞においては、附属腺が未成熟の段階では細胞間の細胞膜上に局在し、成熟すると細胞内領域に顆粒状に観察された。

考察 InR::mCherry の細胞内局在には二つのパターンが存在する

InR::mCherry は、附属腺上皮細胞において未成熟な段階では、細胞間の隙間をつくる細胞膜の基底膜側に局在していた。このような InR の細胞膜への局在は、細胞膜の内側で活性化することが知られている InR の下流因子の分布を反映している可能性がある。一方で、附属腺上皮細胞が成熟した段階では細胞膜上にはあまり局在せず、細胞内領域に多数の顆粒状に検出できた。さらに、この顆粒はエンドソームとリサイクリングを制御する Rab4 と共局在していることがわかった。これは、インスリンを取り込もうとするよりも、エンドサイトーシスによるリサイクリング経路が優位になる可能性を示している。以上より、蛍光タンパク質融合 InR ノックイン系統の作成により、細胞成長の程度によって InR の局在が変化し、そのために IIS シグナルの活性化を視認できるシグナルマーカーとして使用できる可能性が示された。