

博士論文

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

令和 5 年度

学習院大学大学院

自然科学研究科 生命科学専攻 博士後期課程

守屋綾乃

目次

1.要旨	p. 1
2.序論	p. 2-5
3.実験材料と方法	p. 6-12
4.結果	p. 13-22
5.考察	p. 23-30
6.図と表	p. 31-49
7.補足図	p. 50-62
8.謝辞	p. 63
9.参考文献	p. 64-69

1. 要旨

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。

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。一方、従来用いられてきた IIS マーカー tGPH によるシグナル検出の感度が乏しいことがわかり、Dh31 抑制による附属腺の老化促進に IIS が関与するかどうかを再び検証する必要性が生じた。

附属腺でインスリン受容体 (insulin receptor; InR) を過剰発現すると、老化促進が示された。また、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。以上の結果から *Dh31* 抑制による老化促進には、InR を介して IIS 経路が関与することが示唆された。また、より高感度の IIS マーカーの開発を目指し、InR 局在を融合蛍光タンパク質の蛍光によって追跡できるノックイン系統 (*InR::mCherry*, *InR::EYFP*) を確立した。それらの附属腺における InR::mCherry 蛍光を観察した結果、老化促進を示す *Dh31* 変異体の附属腺細胞では、多数の活性化した InR::mCherry が顆粒状に確認でき、IIS の関与が明確に示された。

以上の結果から、*Dh31* 抑制による附属腺の老化促進には IIS 経路が関与し、Dh31 は多くの器官の間で IIS 作用のバランスを保つ働きをすることが示された。また、ショウジョウバエでは確実に InR の発現・活性を観察できる方法が確立されていなかったが、今回作成した系統により、いくつかの器官で InR の確実な観察が初めて可能となった。

2. 序論

多細胞動物の体内の恒常性を維持するためには、各器官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。例えば、各器官の老化を、それぞれのはたらきが加齢と共に徐々に衰えてゆくものと考え、ある器官だけの老化が異常に早まったり、逆に老化が起きなかったりすると、全身の器官の間に活動性のアンバランスが生じて、様々な機能不全がもたらされることが想像される。すなわち、各器官の間には老化のバランスを保つ恒常性が存在していることが予想される。

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、ゴキブリの一種 *Diploptera punctata* で初めて同定された (Furuya et al., 2000)。このペプチドホルモンはさまざまな種の昆虫 (Dictyoptera 網翅上目、Diptera 双翅目、Hymenoptera 膜翅目) において進化保存され (Coast et al., 2001)、また脊椎動物ではカルシトニンと構造が類似することから、重要な生理機能をもつと考えられてきた。本研究で使用したキイロショウジョウバエで初めて行われた研究は、哺乳類の腎臓に相当するマルピーギ管での活性検定である。相同性検索によってアミノ酸配列が予測され、合成された Dh31 が、cAMP を介して、マルピーギ管細胞頂端膜にあるプロトンポンプ V-ATPase を活性化することで、排尿を促すことがわかった。この実験から、Dh31 は構造だけでなく、その利尿作用も進化的に保存されていることが確かめられた (Coast et al., 2001)。Dh31 は、ショウジョウバエでは中腸と呼ばれる、哺乳類の小腸に相当する器官の後方領域 ((Buchon et al., 2013) で示されている R4 中ほどから R5 にかけての領域) の内分泌細胞 (Park and Kwon, 2011) と中枢神経系の限られたニューロン (Kunst et al., 2014; Goda et al., 2016) で産生されており、個体の発生段階や産生される場所の違いによって、さまざまな機能を制御していることがわかっている。例えば、幼虫の腸で Dh31 を抑制すると、腸の収縮回数が減少する (LaJeunesse et al., 2010)。つまり、Dh31 はぜん動運動を制御しており、この機能のために、腸内の細菌を素早く排出することもできる (Benguettat et al., 2018)。また、中枢神経系で産生される Dh31 についても多くの研究が行われている。Dh31 は、睡眠や覚醒の制御に関わることが知

られている DN1 ニューロン (Dorsal Neuron 1) で発現しており、睡眠の維持を負に制御し、夜明けが近づくと覚醒させる機能をもつ(Kunst et al., 2014)。同じ中枢神経系でも、温度選択リズムの主要な時計としてはたらく DN2 ニューロン(Dorsal Neuron 2)では、Dh31 は温度選択に重要な役割を果たすことがわかっている(Goda et al., 2016; Goda and Hamada, 2019)。最近では、脳からアラタ体に作用する神経が産生する Dh31 を、アラタ体にある Dh31 受容体が受け取ると、幼若ホルモンが抑制されてメスの生殖休眠が引き起こされることや(Kurogi et al., 2023)、Dh31 がオクトパミン作動性ニューロンを介して記憶形成に関与することも調べられている(Lyu et al., 2023)。一方で、成虫の中腸で産生される Dh31 はアミノ酸やタンパク質によって活性化され(Park et al., 2016)、エサが豊富にある状態だと交尾行動を誘発させるはたらきをもつ(Lin et al., 2022)。このように、Dh31 は非常に多くの器官にはたらきかけ、多様な機能を発揮するホルモンであり、今後もさらに新しいはたらきが見つかるものと考えられる。

本研究室の先行研究では、中腸から産生される Dh31 を RNA 干渉法により中腸内分泌細胞で特異的にノックダウンすると、寿命が 37%延長し、さらに中腸の老化症状出現も遅延した。一方で、哺乳類の前立腺に相当し、オスの生殖に必須の内部生殖器官である附属腺では、老化症状出現が促進されてしまうことが明らかとなった(Takeda et al., 2018)。Dh31 ノックダウンによる中腸と附属腺の老化応答が相反したことは、体内の恒常性が乱れたことを示している。また、これまでは、Dh31 ノックダウンによる中腸老化の遅延は、老化を制御するシグナル経路として一般的に受け入れられているインスリンシグナルとは独立に引き起こされると考えられていた。なぜなら、インスリンシグナル活性の検出に、インスリン受容体 (InR) の下流で機能する PI3K の活性マーカーである tGPH (Britton et al., 2002)を用いても、野生型との間に応答の差異がなかったためである。そして、この中腸の老化遅延と同様に、附属腺の老化促進もインスリンシグナル経路とは独立して起こると考えられていた(Takeda et al., 2018)。

この背景から、野生型では Dh31 が附属腺の Dh31 受容体 (Dh31-R) を介して附属腺に直接作用し、老化を防止していると予想した。そこで、附属腺で Dh31-R をノックダウンしたが、附属腺老化は促進しなかった。加えて、上述の附属腺が老化促進する Dh31 ノックダウンにおいて、RNA-seq 解析により附属腺 *Dh31-R* mRNA の発現量を測定したが、発現がほとんど検出されなかった一方、*InR* mRNA については、発現量が 7.8 倍に増加していた (武田 未発表)。さらに、本研究室の別の先行研究から、附属腺で野生型 *InR* を過剰発現すると、老化促進に似た症状をみせることがわかっていた (2018 年度 寺畠未発表)。これらの結果から、Dh31 抑制による附属腺の老化促進にインスリンシグナルが関与するかどうか、再び検証することにした。

インスリン/インスリン様成長因子シグナル (insulin/insulin-like growth factor-like signaling; IIS) 経路は、多細胞生物において進化的に広く保存されており、哺乳類から無脊椎動物にまで存在している (Skorokhod et al., 1999)。IIS 経路は、細胞や全身の成長 (Brogiolo et al., 2001; Butler and Le Roith, 2001; Ikeya et al., 2002; Hafen, 2004)、発生や変態 (Nijhout and McKenna, 2018; Pan et al., 2021)、生殖器官の成熟 (Partridge and Gems, 2002)、糖の取り込みから始まるエネルギー代謝 (Saltiel and Kahn, 2001)、細胞や全身の老化 (Giannakou and Partridge, 2007) など、様々な機能を制御している。さらに IIS は、複数の細胞間シグナル伝達経路と相互作用していることもわかっている (Chowański et al., 2021)。また、IIS 経路の老化を制御する性質はセンチュウ *Caenorhabditis elegans* のインスリン受容体を指令する *daf-2* 遺伝子の変異体によってはじめて発見され (Kenyon et al., 1993; Kimura et al., 1997)、その後、ショウジョウバエ *Drosophila melanogaster* (Clancy et al., 2001; Tatar et al., 2003) やマウス *Mus musculus* (Blüher et al., 2003; Holzenberger et al., 2003) においても同様の性質があることが明らかにされ、老化が IIS 経路に制御されることの普遍性が認められている。これまでの研究で、様々な老化の過程で IIS の強度がどのように変化するかや、IIS がどのように老化症状に影響をもたらすかはよく調べられてきたものの (Serrano et al., 2005;

Ismail et al., 2015; Augustin et al., 2017; Tanabe et al., 2017; Haroon et al., 2020)、さまざまな器官の細胞レベルでの InR の発現や局在の変化は解明されていない。本研究では上記の問題に取り組むために、これらを明らかにする必要性が生じた。

一方、IIS シグナルの最上流に位置するリガンドについても、老化に伴う発現量の変化が調べられている。ショウジョウバエでは8つのインスリン様ペプチド (*Drosophila* insulin-like peptides; Dilps) が同定されている (Brogiolo et al., 2001; Okamoto et al., 2009; Grönke et al., 2010; Colombani et al., 2012) が、例えば、脳の神経分泌細胞の Dilp3 タンパク質の発現レベルは老化に伴い低下することが示されている (Tanabe et al., 2017)。Dilps のほとんどが、一つの遺伝子である *InR* の産物を通じて作用する。

本研究で、Dh31 ノックダウンによる附属腺の老化促進には InR が関係していることが示された。また、このことを明確にするため、より高感度で確実に IIS を検出できるマーカーの開発を目指した。これまでもショウジョウバエの幼虫の脳を中心とし、InR の免疫染色が行われてきたが (Luo et al., 2013; Slankster et al., 2020; Odell et al., 2022)、その正確性は十分に検証されていなかった。それは、InR がユビキタスかつ少量でしか発現しないため、その検出をすることが難しかったからである。そこで、内在性 InR の局在を融合タンパク質の蛍光を通じて確実に追跡できる、蛍光タンパク質標識 *InR* ノックイン系統を、CRISPR-Cas9 によるゲノム編集技術により作成した (*InR::mCherry*, *InR::EYFP*)。この *InR::mCherry* 系統と *Dh31* 変異体を組み合わせた二重ホモ接合体の附属腺を観察すると、Dh31 抑制による附属腺の老化促進は、InR を介して IIS が関与していることが明確に示された。これにより、Dh31 の組織老化への関与は、IIS と独立に起きているのではなく、各組織の間で適切な IIS のバランスをもたらし、老化の恒常性を維持することにある、と修正されるべきであることがわかった。さらに、上記の蛍光標識 InR ノックイン系統により、附属腺の他にも、いくつかの器官の細胞レベルでの確実な InR 観察が初めて可能となり、これらは今後の IIS 研究のために重要なツールとなることが期待されるものである。

3. 実験材料と方法

シ ヨ ウ ジ ヨ ウ バ エ 系 統

$P\{ry^{+t7.2}=hsFLP\}^l w^{1118}$ (#6),

w^* ; $P\{w^{+mC}=UAS-GFP.S65T\}eg^{T10}$ (#1522)

w^* ; $P\{w^{+mW.hs}=GAL4-prd.F\}^{RG1}/TM3, Sb^l$ (#1947)

$y^l w^*$; $P\{w^{+mC}=AyGAL4\}25 P\{w^{+mC}=UAS-GFP.S65T\}Myo31DF^{T2}$ (#4411)

$y^l w^{1118}$; $P\{w^{+mC}=UAS-InR.Exel\}^2$ (#8262),

$y^l v^l$; $P\{y^{+t7.7} v^{+t1.8}=TRiP.JF01945\}attP2/TM3, Sb^l$ (#25925) (*UAS-Dh31-R-RNAi*)

$y^l v^l$; $P\{y^{+t7.7} v^{+t1.8}=TRiP.HMS03166\}attP40$ (#51518) (*UAS-InR-RNAi*)

$y^l M\{GFPE.3xP3=vas-Cas9.RFP-\}^{ZH-2A} w^{1118}$ (#55821)

$y^l w^{1118}$; $TI\{TI\}Rab4^{EYFP}$ (#62542)

以上は Bloomington *Drosophila* Stock Center から取り寄せた。

Canton-S (#105666),

$y^l w^{67c23} P\{y^{+mDint2}=Crey\}^{lb}; D^*/TM3, Sb^l$ (#106097)

w^* ; $P\{ry^{+t7.2}=neoFRT\}82B P\{w^{+mC}=Ubi-GFP.D\}83$ (#108090)

以上は KYOTO *Drosophila* Stock Center から取り寄せた。

w^{1118} ; $P\{GD104\}v991/TM3$ (v991) (*UAS-InR-RNAi*)

w^{1118} ; $P\{GD4601\}v37763$ (v37763) (*UAS-Dh31-RNAi*)

以上は Vienna *Drosophila* Resource Center から取り寄せた。

prospero^{V1}-*GAL4* (Balakireva et al., 1998) は Jean-François Ferveur 博士から譲渡。

$y^2 cho^2 v^l$; *Dh31*^{SK1}/*CyO*、 $y^2 cho^2 v^l$; *Dh31*^{SK2}/*CyO* は近藤周博士が CRISPR-Cas9

ゲノム編集技術により作成したものを譲渡(Kondo and Ueda, 2013)。

蛍光タンパク質標識 *InR* ノックイン系統の作成

・ mCherry 標識 *InR* ノックイン系統

mCherry 標識 *InR* ノックイン系統を作成するために、「リンカー－mCherry－選択マーカー」を内在性 *InR* コード領域の 3'末端付近に挿入した。まず、guideRNA (gRNA)となる領域を挿入したプラスミド（プラスミド A とする）と「リンカー－mCherry－選択マーカー」を挿入したプラスミド（プラスミド B とする）の二つを用意した。プラスミド A を作成するためのベクターには *pU6-BbsI-chiRNA* を使用した。まず、*InR* の protospacer adjacent motif (PAM)となる配列の 1 塩基上流から 5'側に向かって 20 塩基と相同な配列に、*pU6-BbsI-chiRNA* の Bbs I 制限酵素サイトに挿入するための Bbs I による切断配列を付加して、下記のように DNA 両鎖を合成した（Merck、両鎖の会合部 20 塩基に下線）。

鋳型鎖配列；

5'-CTTCCAATGGATTCATCGGAAGGG-3'

非鋳型鎖配列；

5'-AAACCCCTTCCGATGAATCCATTG-3'

これを、Bbs I で制限酵素処理をしたベクターに挿入し、プラスミド A を作成した。プラスミド B を作成するためのベクターには *pDsRed-attP* を使用した。まず、*mCherry* を増幅するためのプライマーを設計した。forward プライマーには 5'末端側に EcoR I と Bgl II の切断配列と認識配列、10 アミノ酸で構成されるリンカーの塩基配列を加えている。reverse プライマーには両端に Xba I の配列を加えた。

forward プライマー（下線部=EcoR I サイト）；

5'-ATCGGAATTCGGAGGCAGATCTGGAGGTGGGAGTGGCGGAAGCG
GTGGGGGCGATGGTGAGCAAGGGCGAGG-3'

reverse プライマー（下線部=Xba I サイト）；

5'-ATCGTCTAGACTACTTGTACAGCTCGTCCATGCC-3'

Ay-GAL4,UAS-mCherry::CD8 のゲノム DNA を鋳型として、合成したプライマーで mCherry コード領域を増幅した。EcoR I と Xba I で、この PCR 産物の制限酵素処理を行い、*pUAST-attB* の EcoR I /Xba I 制限酵素サイトに挿入した。これを *pUAST-attB+mCherry* と名付けた (直井陸 2021 年度修士論文)。次に、ノックインを行う系統である *vas-Cas9* のゲノム DNA 配列を鋳型とし、相同組換えに必要な配列を取得するために二つの homology arm を PCR 法により増幅した。ここでは *InR* の終止コドンから 3-5 塩基上流の AGG を PAM 配列として使用した。PAM 配列の 2 塩基上流から 5'末端に向かって 1002 塩基対を left homology arm (LHA) とし、下記のプライマーで PCR により増幅した。

5'末端に EcoR I の切断配列 (下線部) を加えた forward プライマー；

5'-CGATGAATTCAGTACTGGCGGTGGAAAAC-3'

5'末端に Bgl II の切断配列 (下線部) を加えた reverse プライマー；

5'-CGATAGATCTCCTTCCGATGAATCCATTGGG-3'

また、PAM 配列の 3 塩基上流から 3'末端に向かって 1000 塩基を right homology arm (RHA) とし、両プライマーの 5'末端側に Sap I の認識配列 (下記の下線部) と切断配列を加え、PCR により増幅した。

forward プライマー；

5'-CGATGCTCTTCATATGGGAGGCGTAATCGTTACG-3'

reverse プライマー；

5'-CGATGCTCTTCAGACTGCTGTTTTGTTTTGTATTGCTTG-3'

LHA は EcoR I /Bgl II で処理し、*pUAST-attB + mCherry* の EcoR I /Bgl II 制限酵素サイトに挿入した。これを *pUAST-attB + mCherry + InR LHA* と呼ぶ。RHA は Sap I で処理し、*pDsRed-attP* の Sap I 制限酵素サイトに挿入した。これを *pDsRed-attP + InR RHA* と呼ぶ。最後に、*pDsRed-attP + InR RHA* の二つの Aar I 制限酵素サイトの間に、Aar I で制限酵素処理した *pUAST-attB + mCherry + InR LHA* を挿入した。*pU6-Bbs I -chiRNA* (#45946)、*pDsRed-attP* (#51019)、*pUAST-attB* (DGRC

Stock 1419 ; <https://dgrc.bio.indiana.edu//stock/1419> ; RRID:DGRC_1419) は *Drosophila* Genomics Resource Center (DGRC, NIH Grant 2P40OD010949) から取り寄せた。完成した配列では、*pUAST-attB+mCherry* に *InR* LHA を挿入する際に Bgl II で制限酵素処理したために、*InR* の C 末端の二つのアミノ酸が変更されているが、*InR* の機能には影響を与えていない (図 6A)。また、完成したプラスミドコンストラクト中に存在する *UAS*、*attB* 配列は、作成したノックインシステムのゲノムには挿入されない。*InR::mCherry* 由来の蛍光観察は、選択マーカー *DsRed* を Cre/loxP 相同組換えにより取り除いた後に行っている。この除去は、*3xP3-DsRed* による複眼の蛍光の消失と PCR により確認した。

・ EYFP 標識 *InR* ノックイン系統

上記と同様に、EYFP 標識 *InR* ノックイン系統を作成するために、「リンカー-EYFP-選択マーカー」を内在性 *InR* コード領域の 3'末端付近に挿入した。上述と同じプラスミド A (gRNA となる領域を挿入したプラスミド) と「リンカー-EYFP-選択マーカー」を挿入したプラスミド (プラスミド C とする) の二つを用意した。プラスミド C の作成には上述の *pDsRed-attP + InR RHA* を使用した。「*InR* LHA-リンカー-EYFP」をこの順に並べた配列の両端に、*pDsRed-attP + InR RHA* の挿入したい位置の両側 15 塩基と相補的な配列を加え、DNA の化学合成を行った (Integrated DNA Technologies)。こちらは、*InR::mCherry* の場合とは違い、*InR* の C 末端の 2 アミノ酸を変更せずにリンカーと結合させる設計となっている。*InR* コード領域内に存在した回文構造や、全合成 DNA 配列中に 8 か所存在した「GAGCT」という配列が化学合成に不具合を生じさせるため、同じアミノ酸を指令する別のコドンに置き換えた。その結果、合計 14 の同義変異が *InR* のコード領域内にある (詳細は補足図 2 C に記載)。合成された DNA は *In-Fusion* クローニングにより上述の *pDsRed-attP + InR RHA* に挿入した。*pDsRed-attP + InR RHA* の必要部分は PCR により増幅した。

forward プライマー ; 5'-GTAGTGCCCCAACTGGGGTAACCTTTGAGT-3'

reverse プライマー ; 5'-GCGAAGGGCGACACCCCATAATTAGCCCGG-3'

固定組織の免疫染色

リン酸緩衝液 (phosphate-buffered saline; PBS) 中で解剖し、4%ホルムアルデヒドで40分固定した。その後0.1%のTriton-X100を含んだPBSで洗浄し、染色を行った。

- ・一次抗体（製造元名称, 希釈倍率）

mouse anti-Coracle (DSHB, 1:50)

chicken anti-mCherry (EnCor, 1:1000)

mouse anti-Lamin-B (DSHB, 1:100)

- ・二次抗体（製造元名称, 希釈倍率）

DyLight 488-conjugated anti-chicken IgY

Alexa Fluor 555-conjugated anti-mouse IgG

Alexa Fluor 647-conjugated anti-mouse IgG

(Jackson ImmunoResearch, 1:100)

核は4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI, SIGMA, 1 ng/ml)で染色した。

F-actin は Alexa Fluor 647-Phalloidin (Thermo Fisher Scientific, 1:100)で染色した。

senescence-associated β -galactosidase 活性による老化検出

老化するとリソソーム内で特異的に発現が上昇する senescence-associated β -galactosidase を Senescence β -Galactosidase Staining Kit (Cell Signaling Technology Inc.) (Goldstein, 1990; Dimri et al., 1995)により検出した。

顕微鏡下での観察

染色した組織や器官は TC-1000 digital microscope (株式会社佐藤商事)やレーザー共焦点顕微鏡 Digital Eclipse C1Si (Nikon) 、同 FV3000 (OLYMPUS) で撮影した。

RNA-seq 解析

コントロール (*pros > GFP*) と中腸内分泌細胞産生 Dh31 ノックダウン個体 (*pros > Dh31^{IR}*) からそれぞれ 10 匹ずつ、射精管が付いた状態で附属腺を摘出し、NucleoSpin RNA-XS kit (Macherey-Nagel) を使用して mRNA を抽出した。mRNA から合成した cDNA で、NovaSeq 6000 System (Illumina, San Diego, CA) により 100 bp (マクロジェン・ジャパン) のペアードエンド・シーケンスを行った。p 値の算出は R software version 4.0.2 (R-Core-Team, 2020) を用いて行った。

定量リアルタイム PCR (qRT-PCR)

コントロール (*Canton-S*) と *Dh31^{SK1/SK2}* 変異体の羽化後 10 日目、28 日目から上述と同じ方法で mRNA を抽出した。1 サンプルに 3 匹分の附属腺を使用し、それぞれ 3 サンプルずつ用意した。抽出した RNA は Deoxyribonuclease (RT Grade) for Heat Stop (ニッポン・ジーン) で DNase の失活を行い、PrimeScript 1st strand cDNA Synthesis Kit (タカラバイオ株式会社) でランダムプライマーを使用して cDNA を合成した。遺伝子の発現レベルの測定には PowerUp SYBR Green Master Mix (ThermoFisher Scientific) を使用した。設計したプライマーは以下のとおりである。

InR forward (5'-TCCGGCTGCTGACTTCAAC-3')

InR reverse (5'-CAGGAACGCTAGGCCGATTC-3')

4E-BP forward (5'-TCCGAGATGACAACCTTCCTG-3')

4E-BP reverse (5'-CTTCAGCGACTTGGTCTGCT-3')

RpL32 forward (5'-CCAAGATCGTGAAGAAGCGC-3')

RpL32 reverse (5'-GACGCACTCTGTTGTCGATAC-3')

測定には StepOnePlus Real-Time PCR System (ThermoFisher Scientific) を使用した。

それぞれの遺伝子発現量は内在性コントロール遺伝子 *RpL32* で標準化した。

4. 結果

4-1-1. Dh31 受容体をノックダウンしても附属腺老化は促進しない

先行研究で、中腸内分泌細胞から産生される Dh31 を RNA 干渉法でノックダウンすると、附属腺上皮細胞の老化が促進することが明らかにされている (Takeda et al., 2018)。この研究では、老化した細胞のリソソーム内で特異的に発現が上昇する β -ガラクトシダーゼ (senescence-associated β -galactosidase ; SA- β -gal) を検出することで、細胞老化の検証を行っていたため、本研究でもその指標を適用した。

まずは、Dh31 が Dh31 受容体 (Dh31-R) を介して附属腺に直接的に作用するのかについて調べた。もし作用が直接的ならば、附属腺上皮細胞で Dh31-R をノックダウン (*prd > Dh31-R^{IR}*) すれば中腸内分泌細胞から産生される Dh31 をノックダウンしたときと同様に、附属腺の老化が促進すると期待した。しかし、SA- β -gal の発現レベルを比較しても老化している様子は確認できなかった (図 2)。加えて RNA-seq 解析の結果からも、Dh31-R は附属腺ではほとんど発現していないことがわかった (表 1A)。この結果から、Dh31 抑制による老化促進は、附属腺の Dh31 受容体を介していないということが強く推察された。

4-1-2. Dh31 抑制による附属腺の老化促進は InR をノックダウンすると抑圧される

インスリンとその細胞内シグナル経路 (insulin/insulin-like signaling; IIS) 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。さらに本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。

ここからは、細胞老化を検出するために、核膜を裏打ちするタンパク質である Lamin-B の免疫染色を行った。Lamin-B 染色は若齢時には核膜に沿って環状に検出されるが、老化した細胞では「staining-gaps」と呼ばれる Lamin-B 染色の部分的な消失が起こる。この現象が、細胞の老化の指標として使用されている (Chen et al., 2014)。中腸内分泌細胞から産生される Dh31 をノックダウン (*pros>Dh31^{IR}*) すると、Lamin-B 染色の staining-gaps が観察できた (図 3A、A'、B、B')。これにより、SA- β -gal と同様に Lamin-B 染色でも附属腺上皮細胞の老化の検出が可能であることが示された。

次に、附属腺で野生型インスリン受容体を過剰発現 (*prd>InR^{Exel}*) させ、staining-gaps が観察できるか検証した。羽化後 2 週目で、Dh31 ノックダウン時の附属腺と同様に、staining-gaps の早期出現がみられたので (図 3C、C'、D、D')、附属腺の老化は促進したとみなされる。Dh31 抑制による附属腺老化促進と InR の発現に関係性があるのかを検証するため、Dh31 が抑制された状態で InR をノックダウンすることが必要であった。この目的のため、Dh31 ノックダウン個体と同様に、寿命延長や附属腺の老化が促進する *Dh31* 欠失変異体を使用した (ここで用いる二種の対立遺伝子、*SK1* および *SK2* は東京理科大学の近藤周博士によって、CRISPR-Cas9 を用いたノックアウト法により、新たに作成されたものである。ここでは両者のトランスヘテロ接合体 *Dh31^{SK1/SK2}* を使って老化検定を行い、それを、以下 *Dh31^{SK1/SK2}* 変異体と表記する。本変異体は、成虫の中腸肥大および寿命延長など、中腸内分泌細胞における *Dh31* ノックダウンとほぼ同様の表現型を見せた)。 *Dh31^{SK1/SK2}* 変異体 (*Dh31^{SK1/SK2}; prd-GAL4/+*) の附属腺でも、羽化後 2 週目で staining-gaps が観察された (図 3E、E')。この変異バックグラウンド下に

において、附属腺で InR をノックダウン($Dh31^{SKI/SK2}; prd > InR^{IR}$) したところ、staining-gaps が減り、Lamin-B 染色は環状に観察された (図 3F、F')。この結果から、*InR* をノックダウンすることで *Dh31* 抑制による附属腺の老化促進が抑圧されることがわかった。

4-1-3. *Dh31* 抑制により老化が促進した附属腺では InR の発現量が高い

先行研究では、インスリンシグナル活性強度の測定に、インスリンシグナルが活性化すると局在が細胞質中から細胞膜付近に変化する GFP 融合マーカーである tGPH(Britton et al., 2002)が使用された。中腸内分泌細胞で *Dh31* をノックダウンしても、栄養吸収細胞などの老化発症が遅れる中腸細胞での tGPH の局在は変化しなかったため、中腸の老化遅延がインスリンシグナルを介する可能性は低いと結論づけられていた(Takeda et al., 2018)。同様に、中腸内分泌細胞における *Dh31* のノックダウンにより老化が促進した附属腺を観察しても、tGPH の局在にコントロールとの差異はなかった。しかし、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、他にも、哺乳類の炎症性サイトカインとして知られるインターロイキンのホモログである *unpaired*などの老化関連遺伝子の発現が上昇していることがわかった(表 1A)。よって、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。

そこで、附属腺で発現する InR を組織標本上で観察することを計画したが、InR は多くの組織でユビキタスにかつ低レベルで発現するため、抗体染色で検出してもバックグラウンドとの区別がつきにくく、そのために、明確に InR を観察することは従来困難であった。そこで、融合タンパク質により内在性 InR の局在を追跡できる蛍光タンパク質標識 InR ノックイン系統の作成を計画し、2 系統を確立した (*InR::mCherry*、*InR::EYFP*)。これらの系統の詳細については後述する。*InR::mCherry* をホモ接合でもつ *Dh31^{SK1/SK2}* 変異体 (*Dh31^{SK1/SK2}; InR::mCherry*) の附属腺上皮細胞では、コントロール (*InR::mCherry*) と比較して、より多くの Lamin-B の staining-gaps が観察された(図 4A-A'、4C-C')。さらに、*InR::mCherry* の蛍光は、*InR::mCherry* をホモ接合でもつ *Dh31^{SK1/SK2}* 変異体の細胞では、*InR::mCherry* 顆粒がより強い蛍光で広範囲に分布していた(図 4B-B'、4D-D')。InR は活性化に伴って、細胞膜からリサイクリングエンド

ソームに局在を変えるとされており、この場合の顆粒もリサイクリングエンドソームへの局在を示すと考えられる（これについては後述する）。これらの結果から、老化が促進した *Dh31^{SK1/SK2}* 変異体の附属腺では、活性化した InR の発現量が高いということがわかり、IIS 経路は活性化していると考えた。

しかし、異なる種類の細胞からの知見ながら、IIS シグナル因子 Akt の標的である転写因子 FOXO が InR の転写を抑制する (Puig et al., 2003; Okamoto et al., 2013; Mirth et al., 2014) ということに基づいて考えると、上記の *Dh31* ノックダウンにおける *InR* mRNA 量の増加は、IIS シグナルの減少を示唆しているという見方もできる。そこで、InR シグナルにより同様に転写誘導されることが知られる別の因子＝翻訳調節因子 *4E-BP*（ショウジョウバエでは *Thor* とも呼ばれる）の mRNA 量についても、*InR* mRNA と併せて定量測定を行った。定量リアルタイム PCR の解析によると（表 1B）、羽化後 28 日目の附属腺では、*InR* の mRNA 量はコントロールと比較して 1.8 倍高く、*4E-BP* の mRNA 量は 2.7 倍高かった。これは、老化が促進した *Dh31^{SK1/SK2}* 変異体においては IIS シグナル活性が弱い可能性があることを示唆している。これらの相反する結果については考察で述べる。

4-2-1. *mCherry*/*EYFP*融合 *InR* ノックイン系統の作成

上記のように、インスリン受容体 (*InR*) の局在を調べるために CRISPR-Cas9 によるゲノム編集技術を利用して、サンゴの一種 *Discosoma* sp. に由来する赤色蛍光タンパク質を改変した *mCherry* と、オワンクラゲ *Aequorea victoria* に由来する GFP の変異体である *EYFP* (Enhanced Yellow Fluorescent Protein) を、それぞれ内在性 *InR* に融合させた系統を確立した (それぞれ *InR::mCherry*、*InR::EYFP*)。それらの作成過程を、*InR::mCherry* を代表例として以下に示す。

InR::mCherry 系統を作成するために、まず「リンカー—*mCherry*—選択マーカー カセット」が *InR* コード領域の終止コドン付近に挿入された状態のプラスミドクローンを得た。この「選択マーカーカセット」は「*loxP*-*3xP3*-*hsp70*-*DsRed*-*loxP*」という構造で、成虫複眼で発現誘導する *3xP3*-*hsp70* プロモーターの下流に *DsRed* が組み込まれているので、このコンストラクトがノックインされた成虫の複眼は赤く光る。*mCherry* と *InR* の両タンパク質ドメインが、フォールディング干渉を起こさずに本来の機能を維持できるように適切な長さで柔軟性をもつリンカーを設計し、*mCherry* と *InR* の間に挿入した。二種類のタンパク質を繋ぐリンカーは 2~10 アミノ酸が適切であり、グリシンを使用するとペプチド鎖が柔軟になるためによく使用されている。加えて、セリン残基によりポリ-グリシン鎖の溶解性が増すことが知られている (Miyawaki et al., 2003; Snapp, 2005)。ポリ-グリシン鎖の中にセリンを散在させるリンカーが最も広く使用されているので、グリシンとセリンで構成される 10 アミノ酸のリンカー、GGGSGGSGGG が設計された (2021 年度 直井陸 修士論文)。本研究で作成したノックイン系統は、生殖系列で Cas9 を発現するショウジョウバエ系統 (*vas-Cas9*) の胚に、「guideRNA を発現する配列」をもつプラスミドと、LHA と RHA の間に「ノックイン配列と選択マーカーカセット」が挿入されたプラスミドを共にインジェクションし、ゲノム編集技術 CRISPR-Cas9 により作成した (図 5A) (詳細は 3.実験材料と方法の項目に記載)。インジェクションされた個体の次の世代で、複眼の *DsRed* 蛍光が選択マーカーとなり、生殖細胞に変異が入った個体を選別できる。このノックイン系統が作成され

た後、選択マーカースセットは Cre/loxP 組換えシステムにより取り除いた (図 5B)。
DsRed と mCherry が同じ波長の放出光を発してしまい、また、成虫の複眼以外の組織
にも *3xP3-hsp70-DsRed* 発現が弱く漏れ出てしまうため、この選択マーカースセット
の除去作業は必要であった。

4-2-2. *InR::mCherry* 系統が利用可能かの検証

InR::mCherry 系統はホモ接合体が成虫まで問題なく発生し、成虫も生存可能で体のサイズは正常(*InR* の部分機能欠損変異体は小型となる)、妊性も問題ないため、このノックインは *InR* 遺伝子の機能に大きな問題を与えていないと考え、さらなる実験に使用した。*InR* に *mCherry* を融合しても、本来の *InR* の機能が影響を受けないかを細胞レベルでも確認するため、FLP/FRT 相同組換えシステムを使用して、相同染色体間の体細胞組換えをひき起こす twin-spot 法により遺伝的モザイクを誘導した。これにより、*InR::mCherry* ホモ接合細胞 (*InR::mCherry/InR::mCherry*)、*InR::mCherry* ヘテロ接合細胞 (*InR::mCherry/InR⁺*)、野生型 *InR* ホモ接合細胞 (*InR⁺/InR⁺*) の三種類の遺伝子型の細胞を、一つの附属腺上皮組織内に同時に存在させることができる。各細胞が上記の遺伝子型のどれであるかは、GFP 蛍光の強さ (蛍光なし、暗い緑、明るい緑の 3 通り) により区別できる。附属腺で *InR* をノックダウンすると、上皮細胞は小さくなるので (図 6B)、*mCherry* が *InR* の機能に影響を与えていれば、*InR::mCherry* ホモ接合細胞では細胞が小さくなると予想した。しかし、*InR::mCherry* ホモ接合細胞と野生型 *InR⁺* ホモ接合細胞とでは、細胞の大きさに差異はなかった (図 6A)。この観察から、*InR* に融合した *mCherry* は *InR* 遺伝子の機能に影響を与えていないことが示された。

附属腺での *InR* の発現は細胞成長において重要であるが (Taniguchi et al., 2012)、発現量は低いことがわかっている (web site Flybase: Gelbart and Emmert, 2013)。そこで、*InR::mCherry* の蛍光をより強めるため、*InR::mCherry* がホモ接合の状態、附属腺上皮細胞における *InR::mCherry* の細胞内局在を観察した。しかし、このようなホモ接合体においても *InR::mCherry* の蛍光は非常に弱く、*InR::mCherry* の蛍光とバックグラウンドの蛍光を確実に見分けることは困難であった。この問題を解決するために、*InR::mCherry* 蛍光そのものの波長に加えて、*mCherry* タンパク質を異なる波長でも検出できるよう、anti-*mCherry* 抗体で染色した (図 6C、D)。これにより、真の *InR::mCherry* は二つの色 (*InR::mCherry* と anti-*mCherry*) が重なった箇所となる一方で、バックグラウンドは一色のみ (*InR::mCherry*) で観察される箇所となり、バックグラウンドと

InR::mCherry を区別できる可能性が増す。しかし、全ての anti-mCherry 抗体による染色が InR::mCherry による蛍光と必ずしも重なるわけではないこともわかった。この詳細については考察で述べる。

4-2-3. InR::mCherry タンパク質の細胞内局在には二つのパターンがある

附属腺上皮細胞を観察すると、InR::mCherry の局在には二つのパターンがあることがわかった。未成熟な附属腺では、InR::mCherry は細胞間の細胞膜上に局在する傾向があり、特に3つ、またはそれ以上の上皮細胞が接する tricellular 領域や multicellular 領域で mCherry の蛍光が強かった (図 6C)。一方で成熟した附属腺では、ほとんどの InR::mCherry は細胞内領域に多数の顆粒状に観察できた (図 6D)。InR::mCherry が細胞膜に沿って線状に観察できる発生段階のときには、上皮細胞の頂端-基底軸に沿った縦断面において、基底側だけに明瞭な線状の InR::mCherry が確認できた (図 6F 中段、下段)。その局在は、セプテートジャンクション (脊椎動物のタイトジャンクションに類似) (図 6E) には到達していない (図 6F)。以上の観察から InR::mCherry は、はじめは細胞間の細胞膜上の基底側に局在することで、細胞が成長段階にある間は血リンパ中からインスリンの取込みを行う。そして、細胞が成長するのに伴ってエンドサイトーシスを通じて細胞質に入り込み、この結果、細胞内領域に InR::mCherry の顆粒の数が増えると仮定した。この仮説を検証するために、InR::mCherry と Rab タンパク質の局在を比較した。Rab は InR のエンドサイトーシス輸送や小胞の細胞膜への融合を制御することが知られている。観察の結果、成熟した附属腺の細胞質に局在する InR::mCherry の一部の顆粒は、Rab4::EYFP と重なることがわかった (図 6G)。Rab4 は、初期エンドソームから細胞膜へのタンパク質輸送やリソソームによる分解を制御することが知られている (Chen et al., 2019)。このことから、成熟した附属腺上皮細胞の細胞質に局在する InR::mCherry の顆粒は、エンドサイトーシスのリサイクリング過程にあることが考えられる。この結果もあわせ、今回作成した *InR::mCherry* 系統は InR タンパク質の追跡を可能にしたツールとなった。しかし、蛍光が弱いためにバックグラウンドが強く検出されてしまうという欠点もある。そこで、mCherry に比べて蛍光が強い EYFP を InR に融合させた、*InR::EYFP* も作成した (補足図 2C)。まだ詳細な実験を行っていないが、*InR::EYFP* では EYFP に対する抗体を使用せずに、十分な蛍光強度で観察を行うことができた (補足図 2A、B)。

5. 考察

5-1-1. 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* ノックダウンにより中腸の老化が抑制される一方で、附属腺の老化は促進することが示されていた。これらの二つの器官の間で相反する老化応答は、個体がもつ総エネルギーの各器官への割り当てと関連しているという仮説が立てられた(Takeda et al., 2018)。昆虫のオスでは、腸と附属腺の両器官が生理活動を行うためのエネルギーを必要としている。附属腺でより多くの性ペプチドを合成してメスに送り込むことは、オスの生殖成功率を向上させるため(Wigby et al., 2009)、オスは可能な限り多くの性ペプチドを附属腺内で合成および蓄積することが予想できる。先行研究では、*Dh31* ノックダウンによる利尿活性の低下が、中腸内の水分量増加と腸に吸収される栄養の濃度低下をもたらし、中腸老化を遅らせると予測していた。これは低栄養環境に近い状態となり、その結果、腸が生理活動を行うために必要とするエネルギーも減少する。本来は腸に割り当てられるはずであったエネルギーが体内に余り、これが附属腺に投資されることで、附属腺は過剰に活性化してしまい、老化が促進したと考えられていた(Takeda et al., 2018)。

本研究では、*Dh31*^{SK1/SK2}変異体における附属腺の老化促進を IIS 経路が仲介することが示された。*Dh31*^{SK1/SK2}変異体の上皮細胞(図 4B-B'、4D-D')では、InR::mCherry 顆粒が広範に分布しており、これはエンドサイトーシスによる InR のリサイクリングが盛んに行われていることを示唆している。例えば、血中のインスリン量が正常よりも高い、ヒトの高インスリン血症の場合、InR のエンドサイトーシスが促進されることが知られている(Hall et al., 2020)。この報告と同様に、通常は腸で消費されるはずの Dilps が血リンパ中に余り、附属腺上皮細胞が過剰に活性化される可能性がある。正常な状態では、*Dh31* は IIS シグナルに依存せずに老化を調節しているのではなく、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(図 8)。

5-1-2. InR::mCherry タンパク質の量と IIS シグナル強度の関係性

*Dh31^{SK1/SK2}*変異体では細胞内領域で InR::mCherry の顆粒が増加し、*InR* のノックダウンにより老化促進が抑制された一方で、IIS シグナルによる転写応答では IIS シグナル強度が減少していると予測される結果は矛盾している。この矛盾を説明するために、三つの仮説を考えた。一つ目に、IIS シグナルが最も強いときに *InR* の mRNA 量が最も低くなるのは説明をつけがたく思える。もし *InR* mRNA の量が InR タンパク質の量と完全に相関があるのなら、この現象はありえない。したがって、*InR* mRNA の量とシグナル強度の負の相関は、これから mRNA より翻訳されるタンパク質量と、観察時まですでに機能しているタンパク質量との時間差を考慮した、負のフィードバック機構と考えるべきである。IIS シグナル強度が頻繁に変動するような状況では、mRNA とタンパク質の量の間に一見不合理な不一致が生じる可能性もある。しかし、このような推測は、IIS シグナル強度が頻繁に変動する場合にのみ考えるべきである。この場合、羽化後 10 日目の若い附属腺でも同様の転写応答が観察された（表 1B、ただし p 値はそれほど低くない）。二つ目に、負のフィードバックは、IIS シグナル強度が閾値に達したときにのみはたらくはずである。逆に、IIS シグナルの強さが閾値を下回る場合、IIS シグナルの強さと *InR* mRNA の発現量には相関関係がある可能性がある。三つ目に、*Dh31^{SK1/SK2}*変異体は IIS シグナルに対する転写応答の感受性が高まっている可能性がある。言い換えれば、野生型では弱い IIS シグナルに反応して強い転写応答が起こるが、*Dh31^{SK1/SK2}*変異体では未知のメカニズムにより、さらに強い転写反応が起こる可能性がある。これらの仮説を解明するためには、InR タンパク質/*InR* mRNA の半減期、時間経過に伴うシグナル強度の変化、シグナル強度の変化に対する転写の違い、そしてこれらの因子に対する *Dh31* 変異の影響を理解することが重要であり、これらは今後の研究課題となる。

5-2-1. *InR::mCherry* や *InR::EYFP* で内在性 InR の追跡が可能となった

ショウジョウバエの InR はユビキタスに発現していることが知られているが、発現量は多くの細胞で一般的に低いとされている (web site Flybase: Gelbart and Emmert, 2013)。発現量の低い遺伝子でも測定ができるようにレポーター遺伝子によるエンハンサートラップ系統、mRNA の局在観察のための *in situ* ハイブリダイゼーション、定量的 RT-PCR、次世代シーケンサー (NGS) を利用しての RNA-seq 解析など、様々な技術が開発されてきた。一方で、様々なタンパク質と mRNA の量的関係において、両者の量が必ずしも相関しないことも、様々な先行研究によって示されてきた (Futcher et al., 1999; Gygi et al., 1999; Ideker et al., 2001; Griffin et al., 2002; Becker et al., 2018)。IIS シグナル強度の評価においても、直接影響を与えるタンパク質の発現量を測定する方が、遺伝子発現を測定するのに比べて、より適している。このために最も広く行われている方法は、標的となるタンパク質に特異的に結合する抗体を使用し、染色を行うことである。しかし、これまでのショウジョウバエの研究で使用されてきた InR に対する抗体は *Aedes aegypti* ネットアイシマカやヒトのインスリン受容体に対して作成された抗体であり、その結合特異性は必ずしも厳密には検証されてこなかった (McLeod et al., 2010; Root et al., 2011; Slankster et al., 2020; Odell et al., 2022)。

IIS シグナル活性を視覚化する別の方法は、InR シグナリング因子の活動に応答するトレーサーを開発することである。例えば、IIS 経路の下流の因子であるリン酸化 Akt に対する抗体では、InR の活性を検出できるといわれている (Kockel et al., 2010)。ただし、Akt は IIS シグナル以外のシグナル入力によっても活性化されることがよく知られている。別のトレーサーである *tGPH* は、GFP の細胞内局在の変化を通じて IIS 経路の下流の因子である PI3K 活性を視覚化することができ、貴重なツールとして使用されている (Britton et al., 2002)。ただし、このトレーサーは IIS シグナル強度が高い場合には効果的に利用できるが、低レベルの IIS シグナル強度の微細な変化を検出するには限度があった (Takeda et al., 2018)。今回作成した *InR::mCherry* は、*InR* の mRNA 発現量が比較的低い附属腺上皮細胞であっても (web site Flybase: Gelbart and Emmert,

2013)、InR::mCherry の蛍光が増加した様子を *Dh31^{SK1/SK2}* 変異体で観察することができた (図 3B-B", 3D-D")。InR::mCherry における問題点の一つは、レーザー共焦点顕微鏡での観察時の、内在性 InR の発現が低いことに起因するバックグラウンド蛍光の存在であった。これに対処するため anti-mCherry 抗体を使用して観察を行った。その結果、真の InR::mCherry 検出の正確性を高めることはできたが、InR::mCherry と anti-mCherry による蛍光のすべては完全には重ならなかった。考えられる理由の一つは、InR::mCherry が蛍光を発するには、タンパク質の正確なフォールディングが必要であることに対し、anti-mCherry 抗体はフォールディングの進行途中にある mCherry や、分解のための小胞輸送の過程にある不正確な折りたたみの分子やタンパク質断片にも結合する可能性があることである。バックグラウンドが強く検出されてしまうということに対処するため、mCherry よりも明るい蛍光タンパク質である EYFP を InR に融合させた InR::EYFP を作成した。この結果、EYFP に対する抗体は必要とせず十分な観察が可能となった。InR::EYFP を使った実験はまだ多くが進められていないが、この系統も InR::mCherry 系統と同様に、ホモ接合体が成虫まで問題なく発生し、成虫も生存可能で体のサイズは正常であり、妊性も問題ないので、InR の機能を損なわずに InR の追跡ができる系統として、今後の実験への使用が期待できる (補足図 2)。

5-2-2. インスリン受容体の局在変化は哺乳類でも観察できる普遍的な現象である

InR::mCherry 系統の様々な器官の観察を行うまで、InR はリガンドである Dilps が存在する血リンパに接するように、細胞膜の基底側(附属腺の場合は上皮細胞の基底側)に均一に広がっていると予想していた。しかし予想とは違い、*InR::mCherry* の局在には事前に予想し切れなかった二つのパターンがあった(図 6C、D)。羽化後 0~3 日目の未成熟な附属腺上皮細胞では、*InR::mCherry* は主に上皮細胞間の基底側の溝の部分に局在していた。この発生段階では細胞は成長中で、まだ成熟した細胞の大きさに達していない(図 6C)。このように細胞と細胞の狭い隙間にわざわざ局在する理由は不明であるが、上皮細胞の基底側の表面は附属腺の環状筋に覆われているため、Dilps が常にはアクセスできない可能性がある。一方で、基底側の細胞間の隙間には血リンパが停留し、Dilps へアクセスしやすくなる可能性もある。また、血リンパが細胞頂端側に拡散するのを防ぐ役割をするセプテートジャンクションよりも基底側にのみ、この *InR::mCherry* 蛍光が観察された(図 5F)。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されることが知られている PI3K や Akt のような、InR の下流因子の分布を反映している可能性もある(Ceresa et al., 1998)。一方で、羽化後 10 日目の、細胞成長が完了し成熟した附属腺上皮細胞では、*InR::mCherry* は細胞内領域に小さな顆粒として多数検出され、これらはエンドソームとリサイクリングを調節する Rab4 と共局在していた(図 5F)(van der Sluijs et al., 1992; Pereira-Leal and Seabra, 2001; Zerial and McBride, 2001)。InR タンパク質はエンドサイトーシスリサイクリングを介して活性化されることが、主として哺乳類細胞における研究から知られており、今回の観察結果はこれを反映しているものと思われる(Podlecki et al., 1987; Trischitta and Reaven, 1988; Trischitta et al., 1989)。*InR::mCherry* 顆粒の中には、ある狭い空間に集まっているものがあり、これらはおそらく、InR が蓄積することが知られている細胞膜上の構造 = カベオラに由来する小胞内にあるとも考えられる(Fagerholm et al., 2009)。*InR::mCherry* の細胞膜上から細胞内部への局在の変化は突発的ではなく、徐々に進行していくことが観察されたが、同じ日齢の附属腺の間でも *InR::mCherry* の局在には個

体間で差があるため、細胞成長の程度と InR::mCherry の局在の関係性を明らかにするには更なる検証が必要である。これ以降の発生ステージでは、InR::mCherry は細胞膜上にはあまり局在していない。これは、新たに Dilps 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。以上の現象は、これまでショウジョウバエでは観察されていなかったが、以下に示す哺乳類のインスリン受容体の細胞内局在観察から、ショウジョウバエにおいても共通する普遍的な現象であると考えられる。

哺乳類のインスリン受容体 (Insulin receptor; IR) の細胞内局在性については、培養細胞を用いての研究が盛んで、抗 IR 抗体による内在性 IR の免疫染色、蛍光タンパク質融合 IR の観察、両者を併せての観察が既に行われている。CHO (Chinese hamster ovary) 細胞 (卵巣上皮細胞株) においてヒトインスリン受容体 (IR) を過剰発現させ、抗 IR 抗体で IR の細胞内分布の変化を観察すると、通常状態では細胞膜に局在していた IR がインスリン刺激に応じて膜から離れ、点状のクラスターが観察されることが初めて示された (Kwon et al., 2003)。この研究結果は IR を過剰発現させているという状況下ではあるが、本研究で観察した InR::mCherry の細胞内局在の二つのパターンが、この先行研究と同様の結果を示したといえる。蛍光タンパク質融合 IR の観察は、Ins1 細胞 (ラット膵β細胞インスリノーマ細胞株) や HIT-T15 細胞 (Syrian golden hamster の膵臓ランゲルハンス島β細胞株) において既に行われている (Leibiger et al., 2001; Uhles et al., 2003)。これらの研究では、IR の C 末端の 23 アミノ酸を欠失させて蛍光タンパク質を融合した IR を過剰発現させて細胞内分布を観察しているので、正常な生理的状況下とはいえないが、これらの研究でも IR が細胞膜上に局在している様子が観察されていた。また、本研究のようにリンカーを介して蛍光タンパク質を融合させる研究も行われていた (Romsicki et al., 2004)。さらに、抗 IR 抗体と蛍光タンパク質融合 IR を併せた研究では、通常状態では細胞膜に局在している IR が、インスリンの作用後には顆粒状となって細胞内に移行することが明確に示されている。加えて、二型糖尿病患者では、もともと細胞膜上の IR が乏しいことも示されている (Choi et al., 2016; Choi et al., 2019;

Dall'Agnese et al., 2022)。これらの先行研究と併せると、本研究で観察したような、InR が Dilps を必要とするときに細胞膜上に存在し、Dilps の刺激を受けるとエンドサイトーシスにより細胞内に広がるという現象は、哺乳類でも観察される普遍的な事実であるといえる。しかし、培養細胞で行われてきたようなインスリン受容体の過剰発現をショウジョウバエの附属腺で行うと、老化促進などの異常がもたらされるので、過剰発現下の局在観察では、必ずしも IR 分子の正常な動きを観察できているかどうかはわからなかった。よって、本研究の融合タンパク質のノックインにより、初めて正常発現量の InR が観察できたといえる。さらに、本研究では InR が細胞膜上に局在するときには、セプテートジャンクションよりも基底側に局在することが示された。哺乳類の培養細胞を用いた実験では、細胞の頂端側にのみインスリン受容体が存在すると考えられていた (Kwon et al., 2003)。これは、細胞が培養されている状態では、インスリンが投与され、取り込むことができるのは常に頂端側であったためだと考えられるが、昆虫生体内の全ての上皮細胞は血リンパから基底面を介してインスリンを受け取るはずである。本研究により生体内中における InR の局在観察が可能になったことで、少なくともショウジョウバエの附属腺上皮細胞では、本来の局在は基底側であることがわかったが、原理的に多くの上皮細胞でも同様の局在であると予想される。また哺乳類でも、血液に直接接触する血管内皮細胞を除いて、他の上皮組織（特に管腔器官）は基底面からインスリンを受け取るものが多いであろうと想像される。また、本研究で作成した蛍光タンパク質融合 InR は、ホモ接合体個体や細胞において何の異常も認められなかったことから、C 末端にリンカーを介して蛍光タンパク質を融合しても、本来の InR の機能を損なうことなく、内在性 InR と同様のはたらきを行うことが確認できたため、今後多くの組織や器官における内在性インスリン受容体の観察を可能にするツールとなることが期待できる。

この InR::mCherry 蛍光の他器官への適用性を展望するために、様々な器官を代表例としてピックアップし、観察した。その結果、幼虫の複眼原基、蛹の網膜 (retina)、幼虫の翅原基、幼虫の中枢神経系、幼虫の環状腺、成虫の精巣などの様々な組織と発達段

階で示すように（図 6、補足図 1）、InR::mCherry の発現や局在は発生（加齢）段階や細胞のタイプによって大きく変化していくことが予想された。特に、成長中の細胞や IIS シグナルが活性化されていると考えられる細胞では、多数の顆粒状 InR::mCherry が観察される。しかし、消化管などのバックグラウンドが高い器官では、InR::mCherry/EYFP の局在を観察することは困難であった。InR::mCherry/EYFP の、真の蛍光の検出感度の向上や、器官を長期に培養できるシステムが確立されれば、生細胞イメージングを行い、InR が細胞内でどのように局在や発現を変化させるのかを、より詳細に理解できると期待している。

6. 図と表

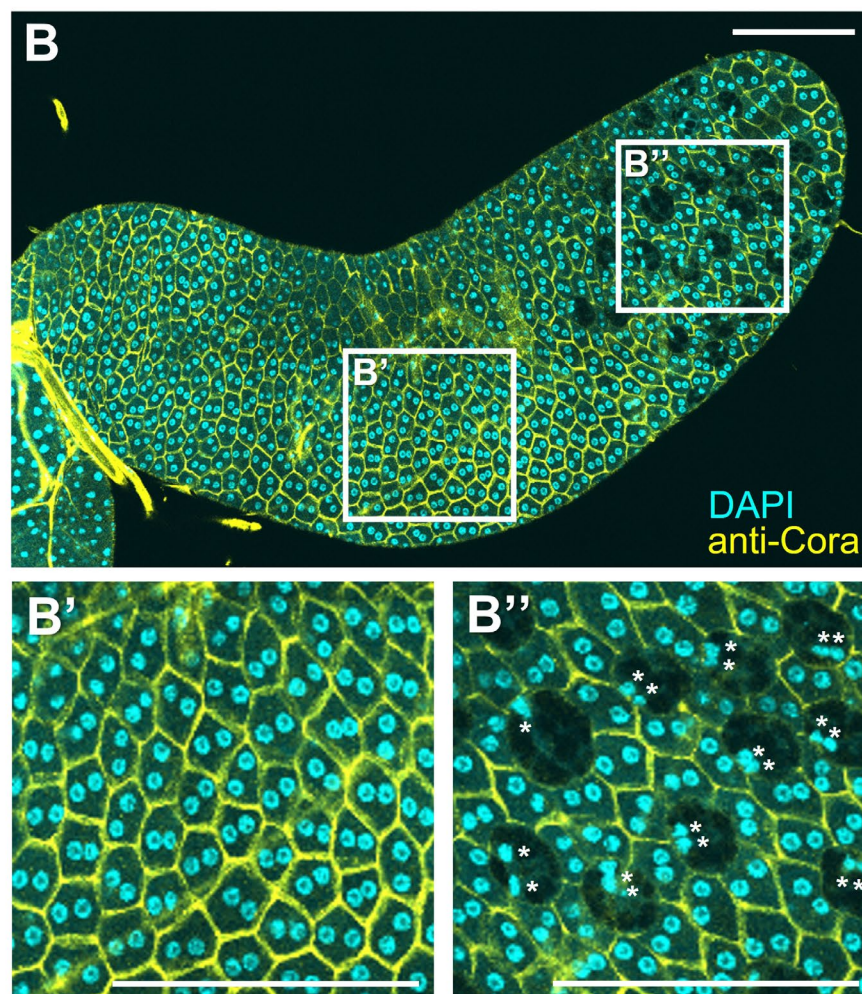
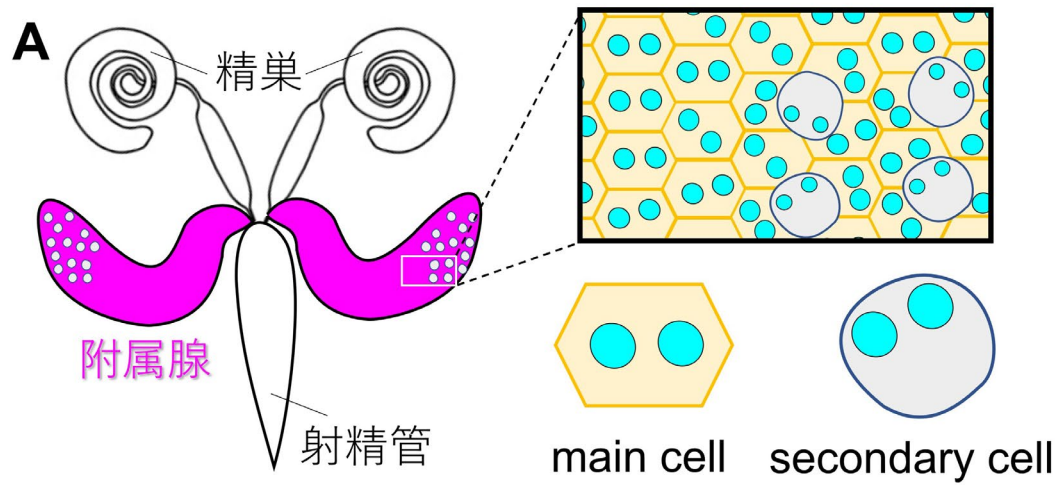


図 1. オスの内部生殖器官：附属腺

図 1. オスの内部生殖器官：附属腺

(A) ショウジョウバエのオス内部生殖器官のイメージ図。附属腺はマゼンタで示している器官である。オスは交尾時に、うずまき状の精巣で作られる精子と附属腺で作られる性ペプチドを、射精管を通じてメスと一緒に送り込む。附属腺は、基部から中央にかけて分布している約 1000 個の main cell と、先端部に分布する約 40～60 個の secondary cell の二種類の細胞で構成されている。(B-B'')附属腺を共焦点顕微鏡で撮影した写真。核 (DAPI、シアン)、細胞膜 (anti-Cora、黄色)、スケールバーは 100 μm 。(B', B'')はそれぞれ(B)の四角で囲まれた領域である。(B') は main cell のみの領域、(B'') は secondary cell も散在する領域。secondary cell の二つの核を (**) で示している (このコンフォーカルセクションでは核が一つしか見えていない細胞もある)。

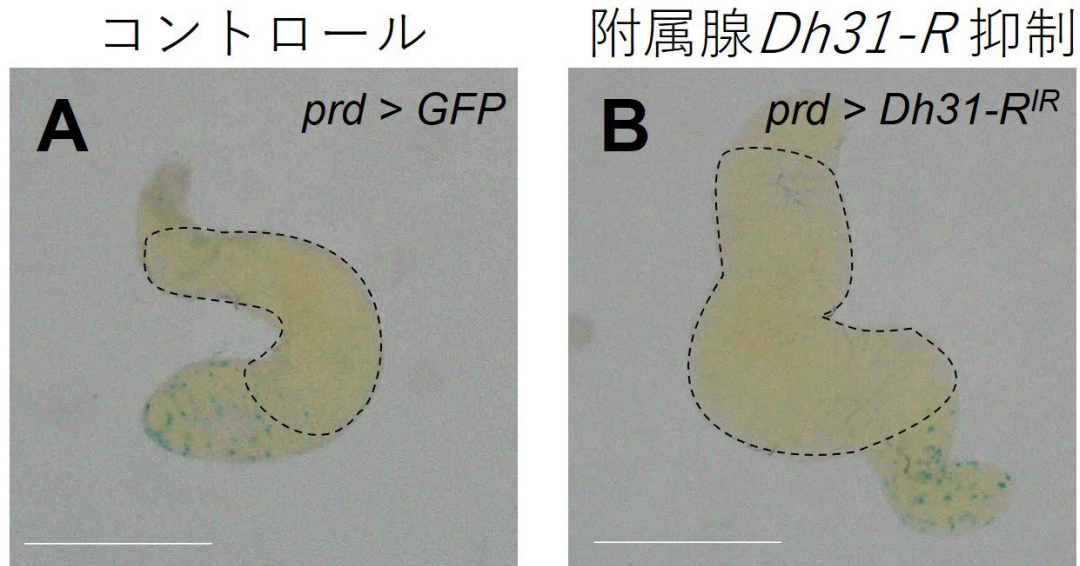


図 2. SA-β-gal 活性による付属腺の老化検出

羽化後 4 週目の (A) コントロール (*prd>GFP*) と、(B) 付属腺の Dh31 受容体ノックダウン (*prd>Dh31-R^{IR}*) 個体の付属腺の老化状態を観察した。老化した細胞のリソソーム内で特異的に発現が上昇する β-ガラクトシダーゼを、青色で検出している。ただし、老化とは関係なく付属腺の先端部 (画像の下方領域) は青色に染色されてしまうので、着目するのは基部から中央の領域とした (点線で囲まれた領域)。その領域では、どちらの付属腺も青色に染色されている箇所がないので、老化症状は見られないと判断した。スケールバーは 500 μm。

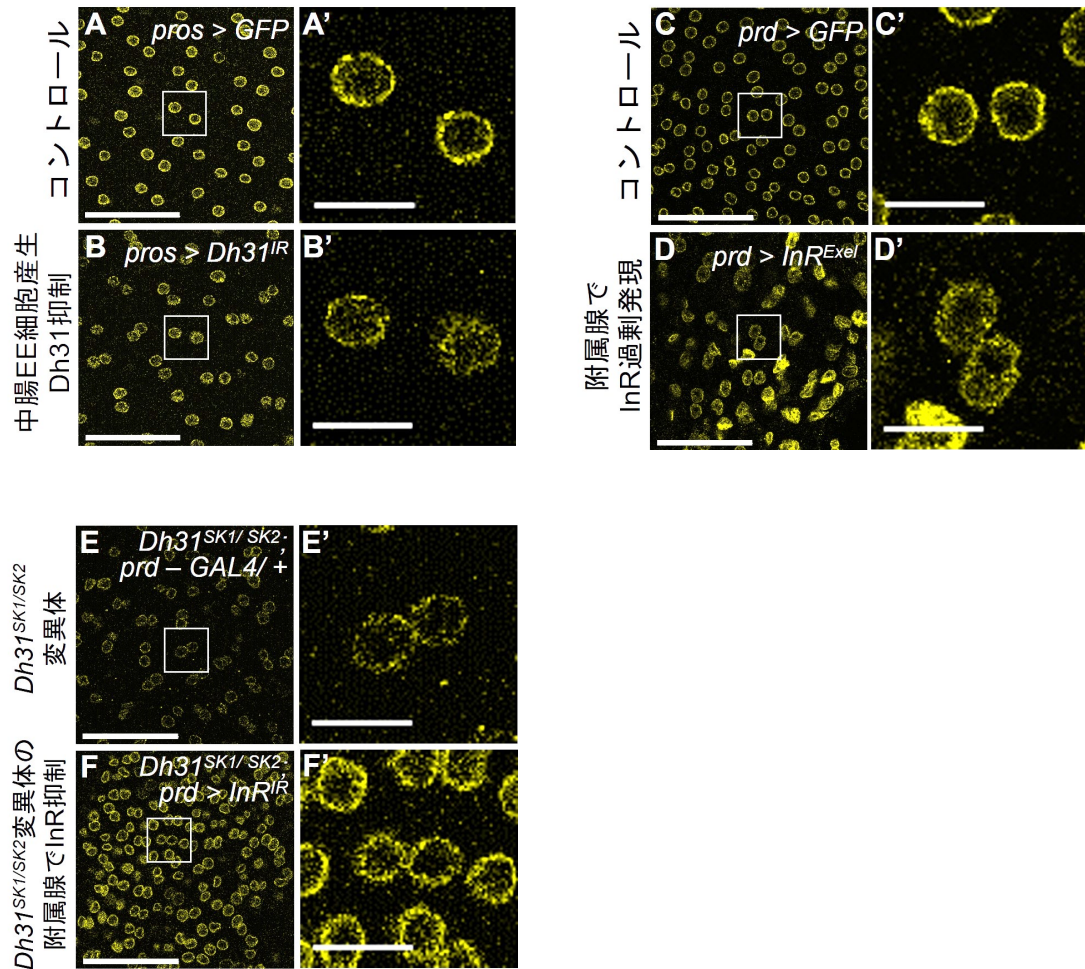


図 3. anti-LaminB 抗体による付属腺の老化検出

付属腺の老化検出に anti-LaminB 抗体（黄色）を用いて、羽化後 2 週目の付属腺上皮細胞を観察した。(A、A') コントロール(*pros > GFP*)、(B、B') 中腸内分泌 (enteroendocrine; EE)細胞産生 Dh31 ノックダウン(*pros > Dh31^{IR}*)、(C、C') *Dh31^{SK1/SK2}*変異体 (*Dh31^{SK1/SK2}; prd-GAL4*)、(D、D') *Dh31^{SK1/SK2}*変異体の付属腺で *InR* ノックダウン(*Dh31^{SK1/SK2}; prd > InR^{IR}*)、(E、E') コントロール(*prd > GFP*)、(F、F') 付属腺で野生型 *InR* 過剰発現(*prd > InR^{Exel}*)。 (A-F) のスケールバーは 50 μm 。(A'-F') はそれぞれ (A-F) の白い四角形で囲まれた部分の拡大図である。スケールバーは 10 μm 。老化が促進する *Dh31^{SK1/SK2}*変異体の付属腺で観察された Lamin-B の staining-gaps は、*InR* をノックダウンすると抑圧された。

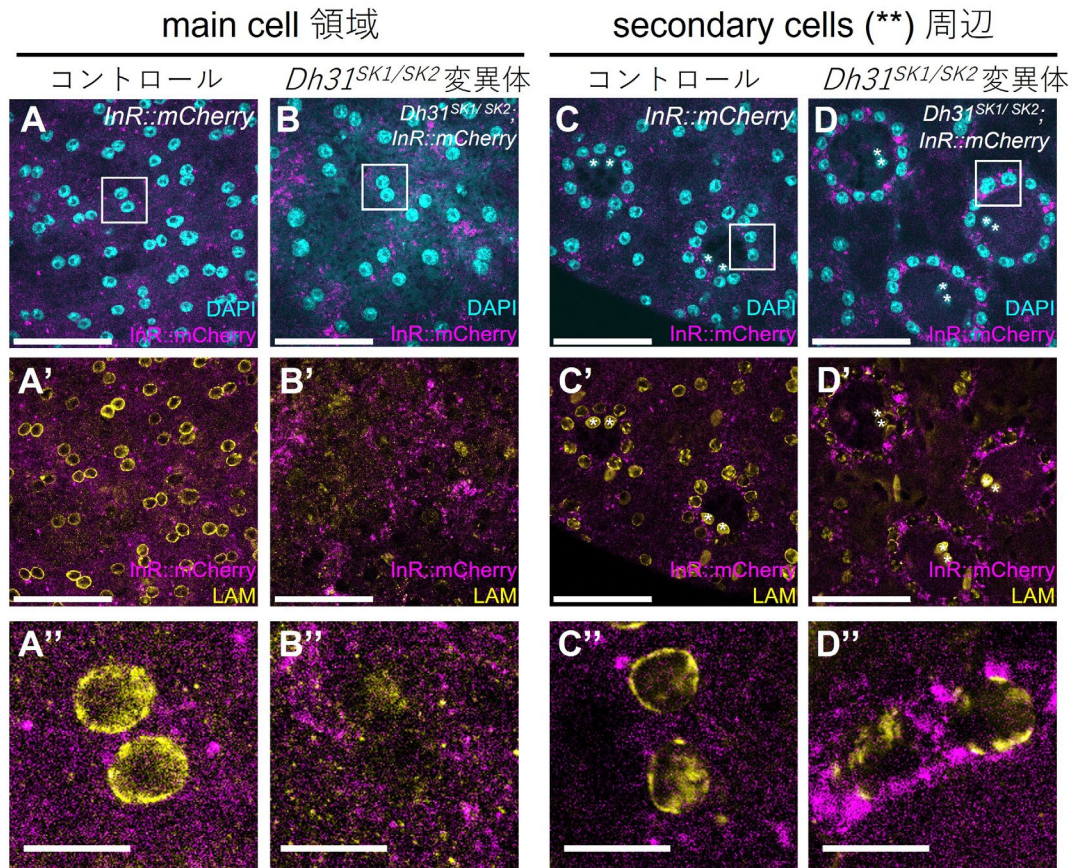


図 4. 附属腺上皮細胞における InR::mCherry の局在と発現

main cell 領域の画像は羽化後 6 週目、secondary cell 周辺の画像は羽化後 5 週目である。核 (DAPI) (シアン)、InR::mCherry (マゼンタ)、anti-LaminB 抗体 (黄色) で示す。(C''-D'') のアスタリスク (**) は secondary cell の二つの核を示している。(A''-D'') はそれぞれ(A-D)の白い四角で囲まれた部分の拡大図である。(A-A'', C-C'') コントロール(InR::mCherry)、(B-B'', D-D'') *Dh31^{SK1/SK2}* 変異体(*Dh31^{SK1/SK2}; InR::mCherry*)、(A-D') のスケールバーは 50 μm 、(A''-D'') のスケールバーは 10 μm 。*Dh31^{SK1/SK2}* 変異体では anti-LaminB 染色の staining-gaps は減少し、顆粒状の InR::mCherry は増加している(B-B'', D-D'')。

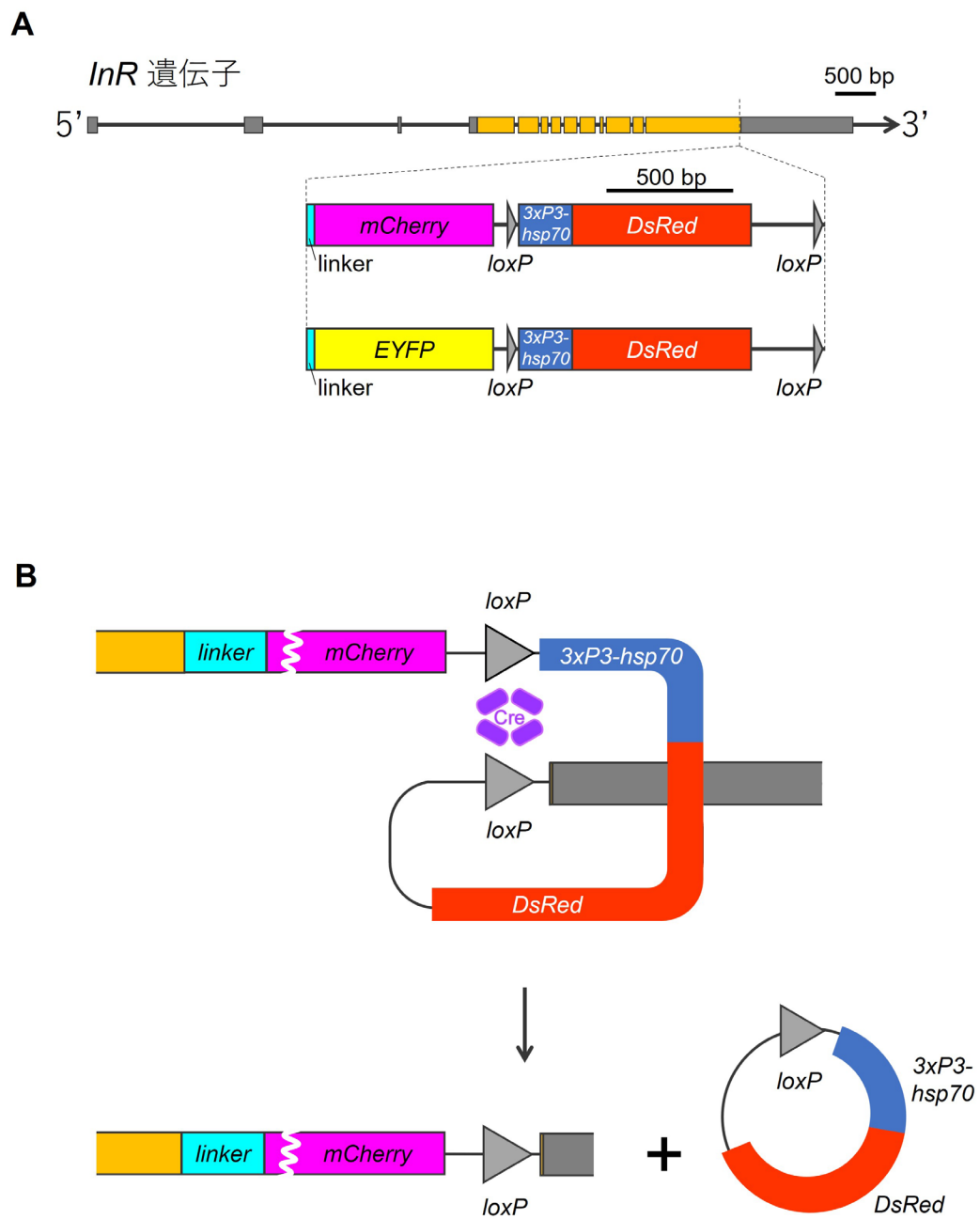


図 5. 蛍光タンパク質標識 *InR* ノックイン系統の作成

図 5. 蛍光タンパク質標識 InR ノックイン系統の作成

(A) *InR::mCherry*、*InR::EYFP* の遺伝子構造の模式図。最上部の右向き矢印は、内在性 *InR* 遺伝子領域とその転写方向を示している。太い部分はエキソンを示しており、灰色の部分は非翻訳領域、濃い黄色の部分は翻訳領域である。アミノ酸配列 GGGSGGSGGG で構成されるリンカー（シアン）、*mCherry*（マゼンタ）および *EYFP*（明るい黄色）、選択マーカーカセット（*3xP3-hsp70*（青）と *DsRed*（赤）を二つの *loxP*（灰色の三角形）で挟んだもの）を CRISPR-Cas9 ゲノム編集技術により *InR* の終止コドン付近にノックインした。*InR::mCherry* の場合、このノックインにより、C 末端の 2 アミノ酸が削除されたが、この 2 アミノ酸は双翅目昆虫全体では保存されていない。また、*InR* の機能に影響を与えていないことが実験結果からもわかる（図 2A）。*InR::EYFP* の場合は、内在性 *InR* と全く同じ 2144 アミノ酸配列の C 末端にリンカーを介して *EYFP* が融合している。(B) Cre/*loxP* 組換えシステムによる選択マーカーカセットの除去のイメージ図。Cre（4 つの丸みを帯びた紫色の四角形）は *hsp70* プロモーターによって発現誘導でき、二つの *loxP* 配列に結合する。二つの *loxP* 配列間で組換えが生じると、選択マーカーカセット *3xP3-hsp70-DsRed* と一つの *loxP* が環状化されて切り取られる。ここでは *InR::mCherry* のみを示しているが、*InR::EYFP* の場合も同様である。

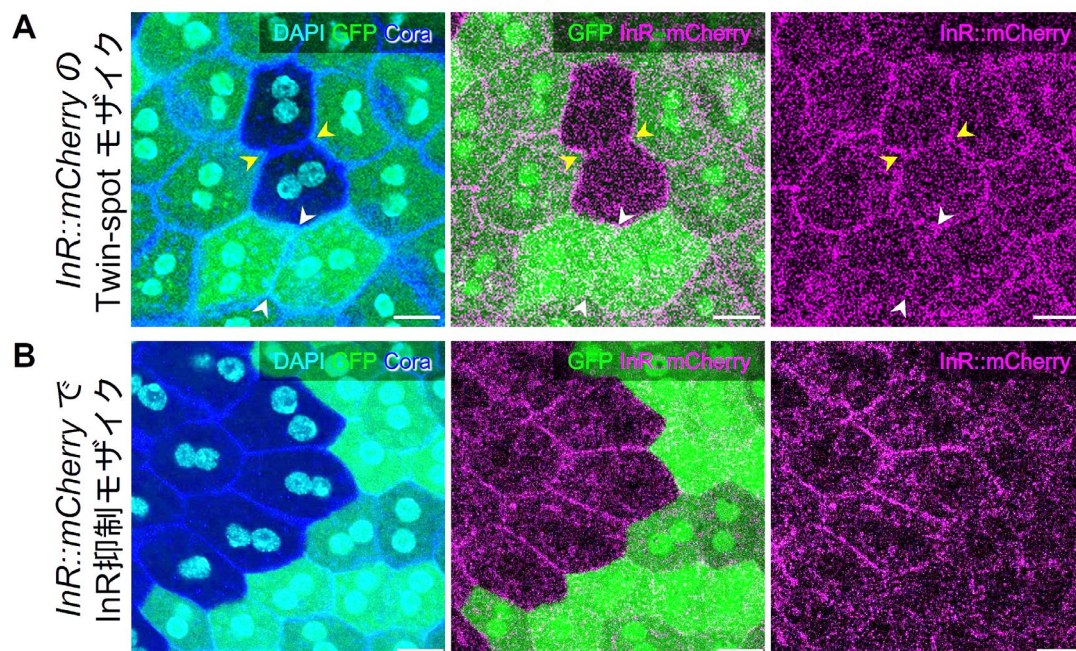
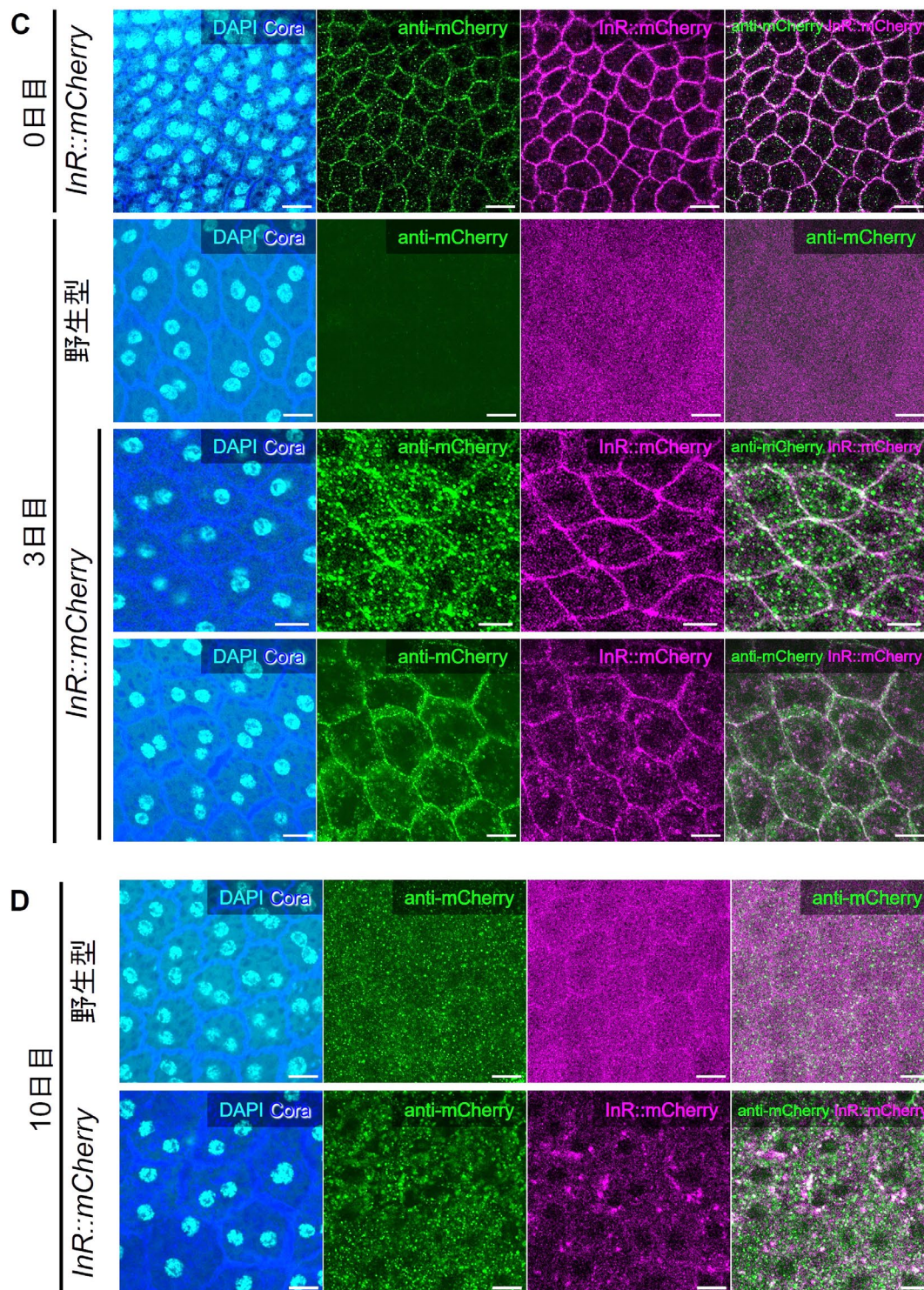


図 6. 附属腺上皮細胞での *InR::mCherry* の細胞内局在

核 (DAPI、シアン)、*InR::mCherry* (マゼンタ)、細胞膜 (anti-Cora、青)、スケールバーは 10 μ m。(A) *InR::mCherry* で twin-spot 法により遺伝的モザイクを誘導した (*hs-FLP;; FRT82B, InR::mCherry/FRT82B, ubi-GFP*)。緑は GFP の発現を示している。黄色の矢頭は *InR::mCherry* ホモ接合の二細胞 (GFP の蛍光なし) の間の細胞膜を、白色の矢頭で野生型 *InR*⁺ ホモ接合の二細胞 (明るい GFP) の間の細胞膜を示している。*InR::mCherry* ホモ接合細胞と野生型 *InR*⁺ ホモ接合細胞の大きさに差異はない。*InR::mCherry* の蛍光は *InR::mCherry* ホモ接合細胞と *InR::mCherry/InR*⁺ ヘテロ接合細胞でははっきりと観察できるが、野生型 *InR*⁺ ホモ接合細胞では観察できない。*InR*⁺ ホモ接合細胞でかすかに観察される *InR::mCherry* 顆粒は、組換え前に *InR::mCherry/InR*⁺ ヘテロ接合の母細胞から持ち越されたものであると考えている。(B) *InR::mCherry* において *InR*-RNAi モザイクを誘導した (*hs-FLP; Actin>CD2>GFP/ UAS-InR^{IR}; InR::mCherry*)。緑は GFP の発現を示しており、この細胞では *InR* がノックダウンされているため、細胞のサイズも小さい。*InR* をノックダウンすると、*InR::mCherry* の蛍光が減少したため、mCherry の蛍光は *InR* の発現を反映していることがわかる。

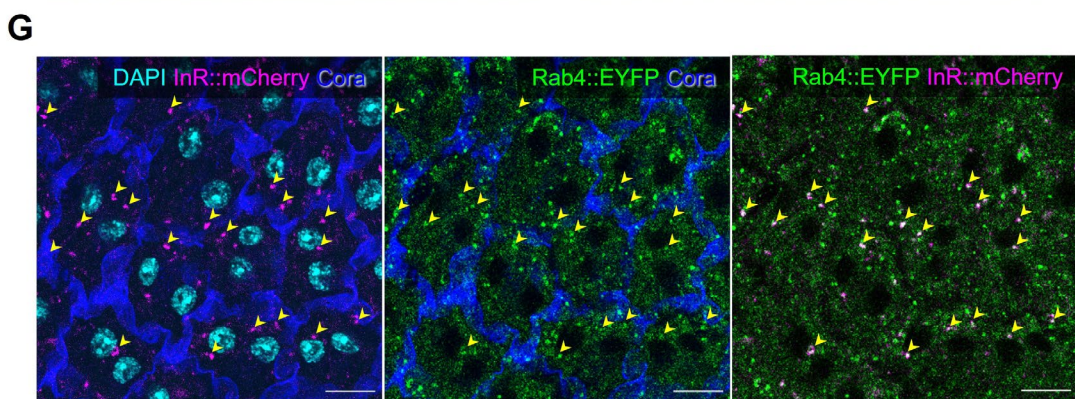
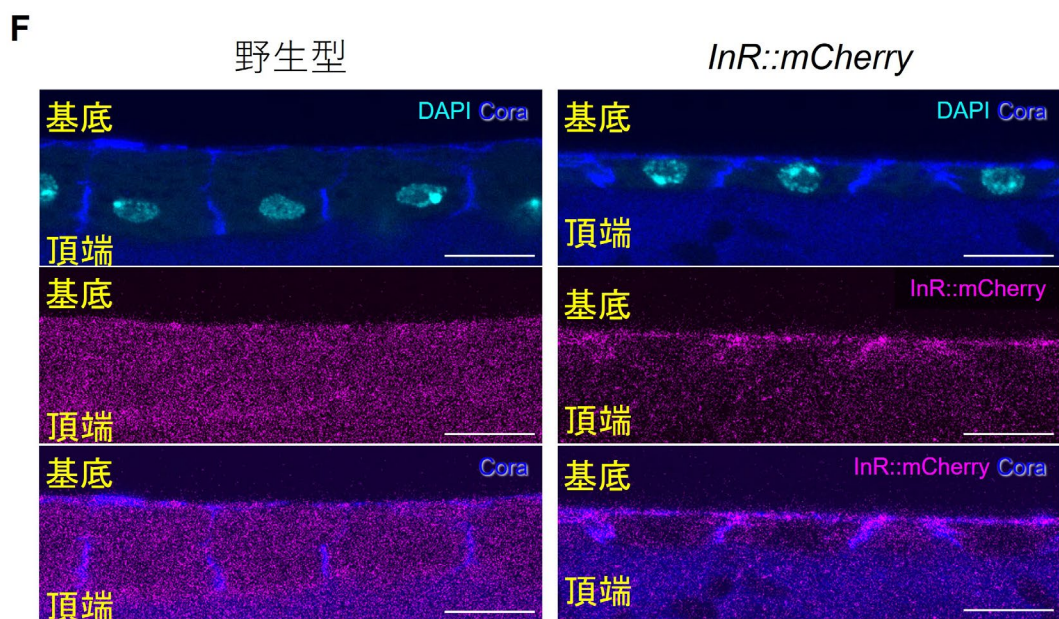
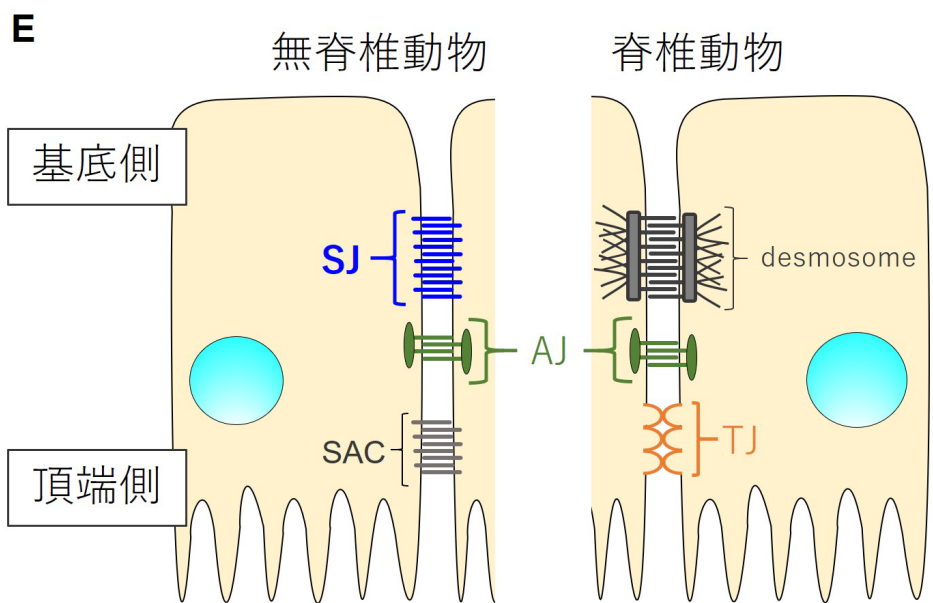


(続き) 図 6. 附属腺上皮細胞での *InR::mCherry* の細胞内局在

(続き) 図 6. 附属腺上皮細胞での InR::mCherry の細胞内局在

野生型 (*Canton-S*) (C の上から二段目、D の上段) と *InR::mCherry* (C の上から一、三、四段目、D の下段) の附属腺の画像。核 (DAPI、シアン)、InR::mCherry (マゼンタ)、mCherry (anti-mCherry、緑)、細胞膜 (anti-Cora、青)、スケールバーは 10 μ m。

(C)羽化後 0、3 日目。(D)羽化後 10 日目。緑(anti-mCherry)とマゼンタ(InR::mCherry)が重なり、白く見える点が InR::mCherry による真の蛍光である。二例の羽化後 3 日目の *InR::mCherry* (C の上から三、四段目) では、四段目の細胞で、二つの核が附属腺の基部-先端軸に対して水平方向に並んでいるので、三段目の細胞よりも成長していることがわかる。羽化後 0、3 日目の早い発生段階では、InR::mCherry が細胞と細胞の間の細胞膜上に局在する傾向にあったが (C)、羽化後 10 日目の成熟した細胞では、InR::mCherry が細胞内領域に顆粒状に局在している様子がわかる (D)。



(続き) 図 5. 附属腺上皮細胞での *InR::mCherry* の細胞内局在

(続き) 図 6. 附属腺上皮細胞での InR::mCherry の細胞内局在

(E) 上皮細胞間の結合構造のイメージ図。下方が頂端側、上方が基底側である。左に無脊椎動物の細胞を、右に脊椎動物の細胞を示している。シアンの円は核を示している。脊椎動物ではタイトジャンクション (Tight junctions; TJ) と呼ばれるジッパーのような構造が、隣り合う細胞同士を密着させ、分子の通過を制限している。無脊椎動物は、このタイトジャンクションに似た、セプテートジャンクション (Septate junctions; SJ) と呼ばれる構造をもつ。アドヘレンスジャンクション (Adherens junctions; AJ) は、ほとんどすべての多細胞動物に存在する。無脊椎動物の AJ より頂端側は subapical complex(SAC)と呼ばれている。脊椎動物はデスモソーム (desmosome) と呼ばれる細胞間接着構造体をもつ。(F)羽化後 3 日目の附属腺上皮細胞の頂端-基底軸に沿った縦断面の画像。上方が基底側、下方が頂端側。左の列は野生型 (*Canton-S*)、右の列は *InR::mCherry* である。核 (DAPI、シアン)、InR::mCherry (マゼンタ)、細胞膜 (anti-Cora、青)、スケールバーは 10 μm 。InR::mCherry は頂端側ではなく、anti-Cora 抗体で示されるセプテートジャンクションよりも基底側でのみ、細胞膜上に観察された。

(G) Rab4::EYFP と InR::mCherry の局在を調べた (*Rab4::EYFP/InR::mCherry*)。Rab4::EYFP(緑)、InR::mCherry (マゼンタ)。Rab4::EYFP と重なる InR::mCherry 顆粒は黄色の矢頭で示されている。スケールバーは 10 μm 。

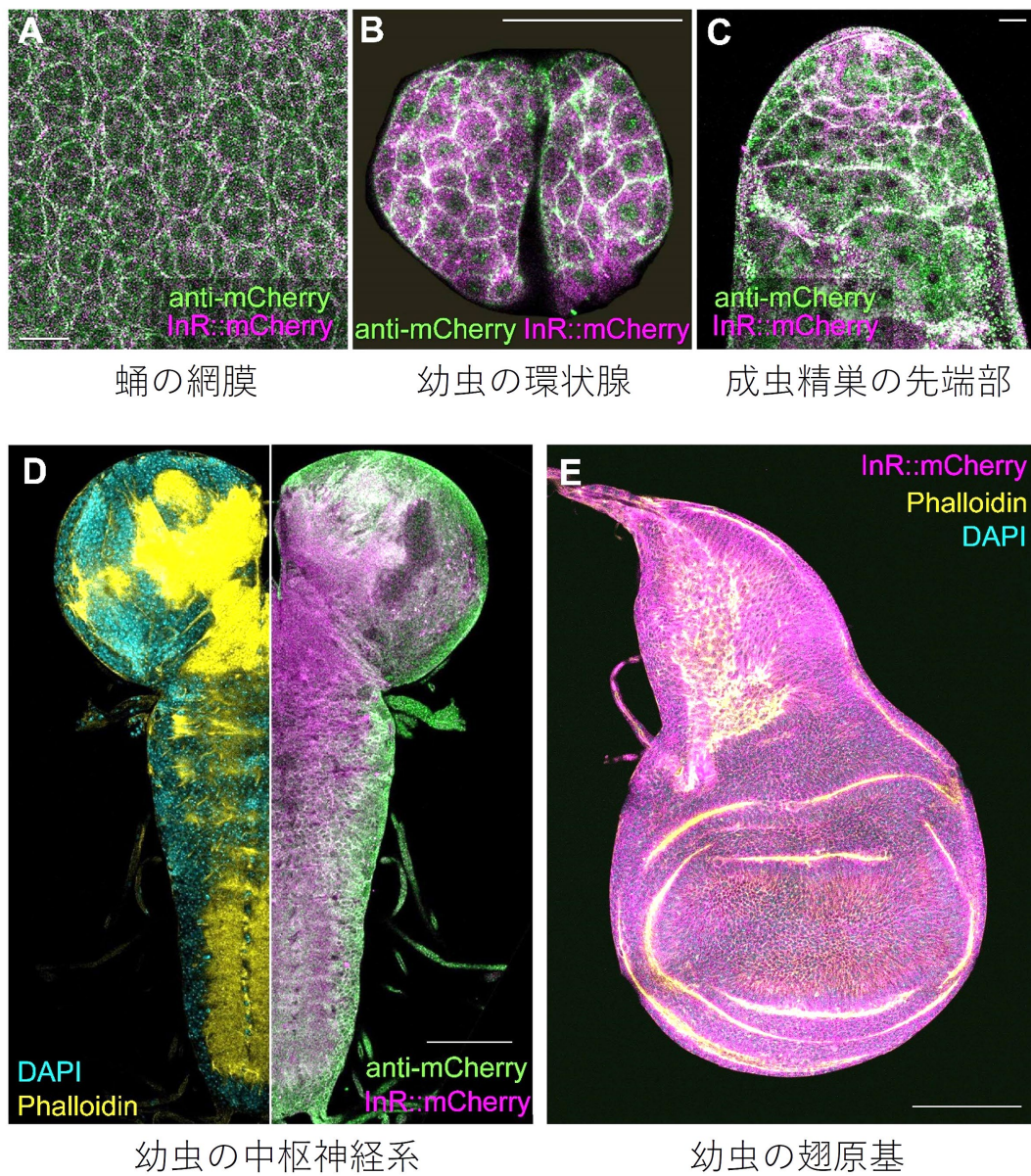


図 7. InR::mCherry 蛍光を示す様々な器官の代表例

図 7. InR::mCherry 蛍光を示す様々な器官の代表例

InR::mCherry ホモ接合体における様々な器官の代表的な画像。詳細は補足図に記載する。核 (DAPI、シアン)、InR::mCherry (マゼンタ)、anti-mCherry 抗体 (緑)、細胞膜 (Phalloidin、黄色)。(A) 蛹の網膜 (retina)。スケールバーは 10 μm 。InR::mCherry の蛍光強度は細胞の種類によって異なる。(B) 3 齢幼虫の環状腺。スケールバーは 100 μm 。InR::mCherry 蛍光は細胞膜と細胞内領域の両方で観察できる。(C) 成虫の精巢の先端部。スケールバーは 10 μm 。細胞膜上の InR::mCherry の蛍光強度は、細胞の種類により異なる。大きなシスト細胞では、蛍光の強い多数の顆粒状 InR::mCherry が細胞内領域で観察できる。(D) 3 齢幼虫の中枢神経系 (Central Nervous System; CNS)。スケールバーは 100 μm 。画像は右半分の同じ領域を、異なるチャンネルで検出し、左側に鏡像対称化して並べた画像である。各細胞の細胞膜上に InR::mCherry 蛍光が観察できる。また、一部では InR::mCherry が凝集している様子も観察できる。これは InR::mCherry が、軸索上のコブ状の膨らみである varicosity などの特定の構造に局在している可能性を示している。(E) 3 齢幼虫の翅原基。スケールバーは 100 μm 。InR::mCherry 蛍光は主に細胞膜で広くみられる。

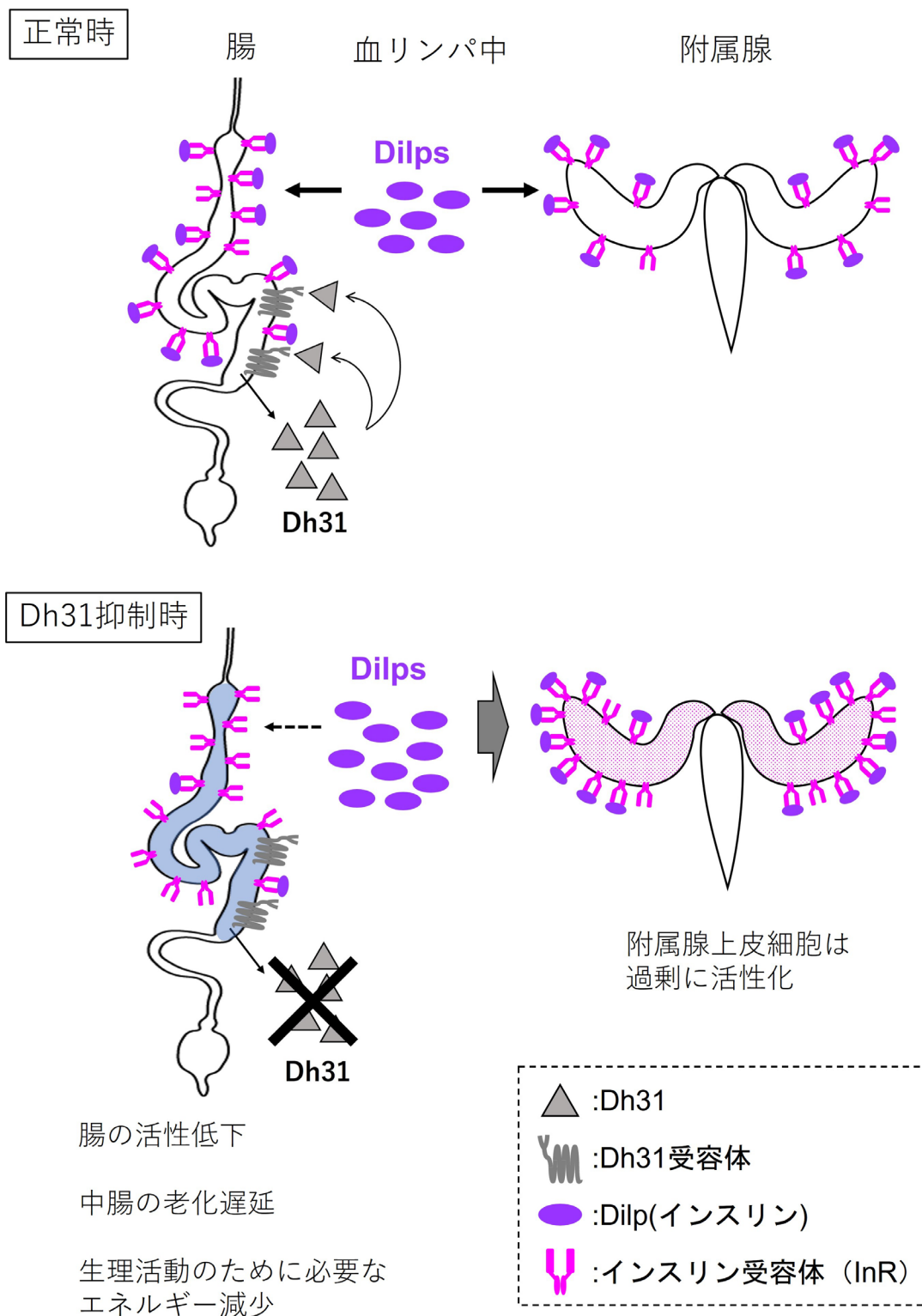


図 8. Dh31 抑制による附属腺老化促進機構のイメージ図

図 8. Dh31 抑制による附属腺老化促進機構のイメージ図

画像の左側から腸と附属腺を、血リンパ中を間に挟んで並べ、Dh31 (灰色の三角形)、Dh31 受容体 (灰色のジグザグ線)、Dilp (紫色の楕円)、インスリン受容体 (マゼンタ) を示した。正常時は、血リンパ中の Dilps が各器官に適切に分配されており、IIS シグナルによって制御される老化は、器官同士の間でバランスが取れている。しかし、中腸内分泌細胞から産生される Dh31 をノックダウンすると、利尿作用が低下して中腸内の水分量が増え、栄養吸収が低下して老化は遅延する。この結果、本来は腸が栄養吸収を行うために必要とする IIS リガンド (≡Dilps) が減少し、血リンパ中に過剰に余る。生殖成功のために多くのエネルギーを必要とすると考えられる附属腺は、血リンパ中の Dilps の量が増加したことを感知し、附属腺上皮細胞で InR の発現量を高め、Dilps を盛んに取り込もうとする。この結果、附属腺は正常時に比べ、過剰に活性化してしまい、老化が促進する。この時の InR の発現量の上昇と、血リンパ中の Dilps 量の増加に起因するエンドサイトーシスとリサイクリング経路の活性化が、附属腺上皮細胞の細胞内領域に観察された多数の InR::mCherry 顆粒に反映されていたと考えている。

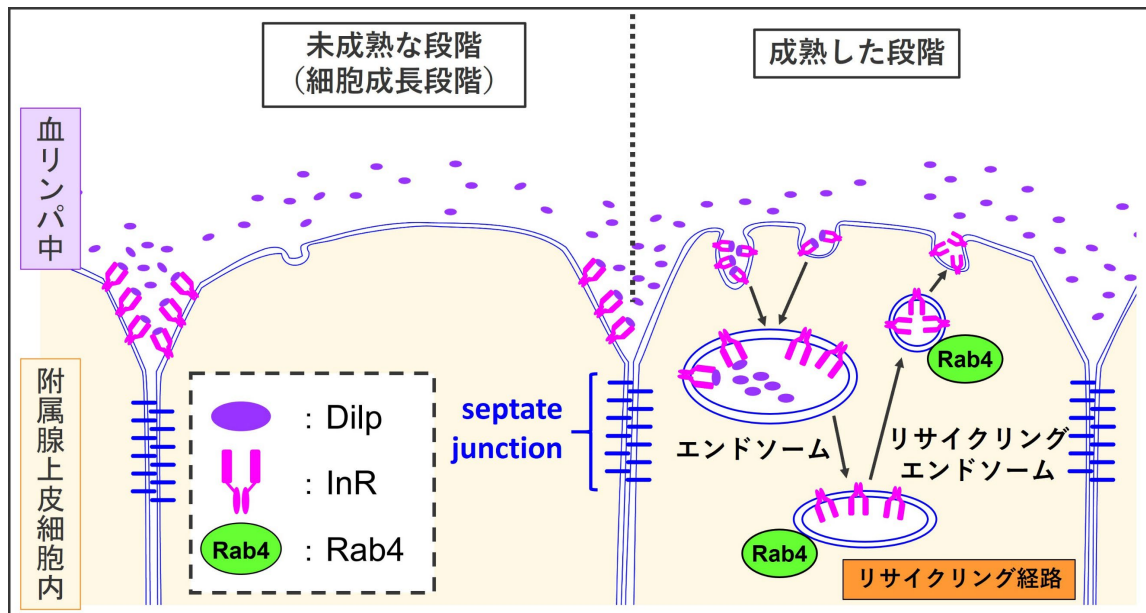


図 9. InR 局在の二種類のパターンのイメージ図

図では、上方が細胞の基底側、下方が頂端側である。InR::mCherry は、附属腺が未成熟な若齢時では、細胞と細胞の間の細胞膜上で、かつセプテートジャンクションよりも基底側に局在している。一方で、細胞が成熟した段階では、細胞内領域に顆粒状に観察でき、一部は Rab4 と共局在していた。これは、InR がエンドサイトーシスリサイクリング経路にあることを反映していると考えられる。顆粒の中でも特に強い蛍光で検出されたのは、狭い空間に集まっている InR::mCherry であり、これは InR が蓄積していると考えられているカベオラに由来する小胞内にあるものかも知れない。

A	RNA-seq		<i>pros>GFP</i>		<i>pros>Dh31^{IR}</i>		Fold changes	
	Category	Gene symbol	Read count	TPM	Read count	TPM	Read count	TPM (<i>p-value</i>)
	Dh31 signal	<i>Dh31-R</i>	0	0.00	12	0.07	uncountable	uncountable
	Insulin signal	<i>InR</i>	489	0.81	3383	6.31	6.92	7.83 (0.74)
		<i>4E-BP</i>	111307	2654.41	202529	5512.19	1.82	2.08 (0.59)
		<i>S6k</i>	1262	4.57	3621	15.09	2.87	3.30 (1.00)
	Senescence markers	<i>upd2</i>	133	1.18	400	4.03	3.01	3.40 (1.00)
		<i>upd3</i>	531	4.22	1871	16.84	3.52	3.99 (0.75)
		<i>Mmp1</i>	3138	17.45	9801	62.92	3.12	3.61 (0.69)
	Accessory gland exocrine peptides	<i>Acp54A1</i>	625127	45512.07	166003	13655.67	0.27	0.30 (4.13×10^{-7})
		<i>Acp98AB</i>	71709	7249.37	14797	1690.15	0.21	0.23 (3.05×10^{-5})
		<i>Acp63F</i>	266276	14776.10	59850	3620.45	0.22	0.25 (4.13×10^{-5})
		<i>Acp95EF</i>	625127	45512.07	166003	13655.67	0.27	0.30 (1.41×10^{-4})
		<i>SP</i>	76489	6068.15	24395	2186.69	0.32	0.36 (4.14×10^{-4})
	Internal control	<i>RpL39</i>	34993	2149.56	30025	2083.96	0.86	0.97 (0.06)
		<i>RpL29</i>	29436	1470.81	26445	1485.30	0.90	1.01 (0.07)
		<i>RpL32</i>	27177	905.22	69300	2578.30	2.55	2.85 (0.96)

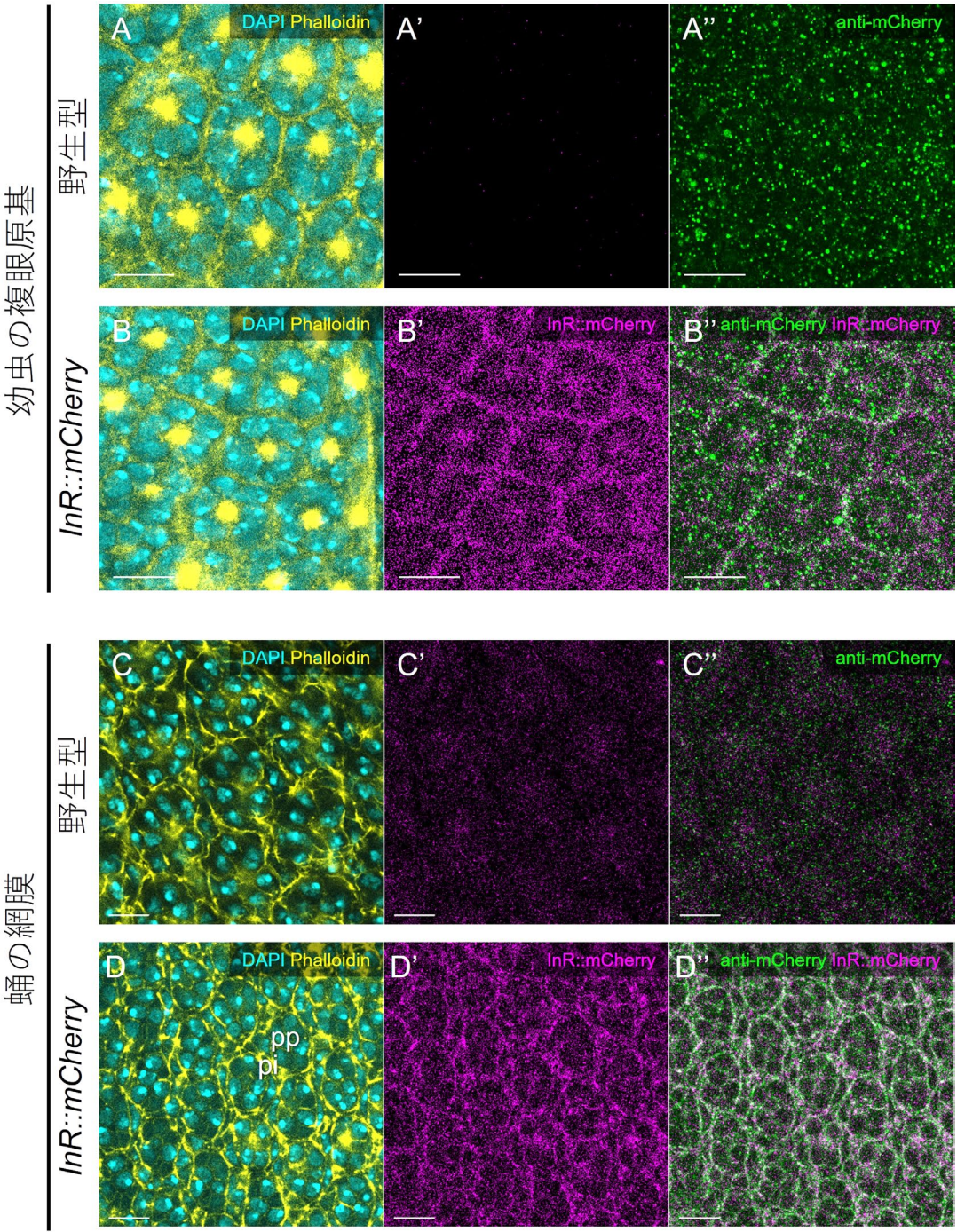
B	qRT-PCR		<i>Canton-S</i>		<i>Dh31^{SK1/SK2}</i>		Fold changes (<i>p-value</i>)	
	Category	Gene symbol	10-days	28-days	10-days	28-days	10-days	28-days
	Insulin signal	<i>InR</i>	1.02	1.03	1.79	1.88	1.75 (0.201)	1.83 (0.100)
		<i>4E-BP</i>	1.00	1.12	2.83	3.02	2.82 (0.122)	2.69 (0.033)

表 1. Dh31 抑制により老化が促進した附属腺の RNA-seq 解析、qRT-PCR 解析

表 1. Dh31 抑制により老化が促進した附属腺の RNA-seq 解析、qRT-PCR 解析

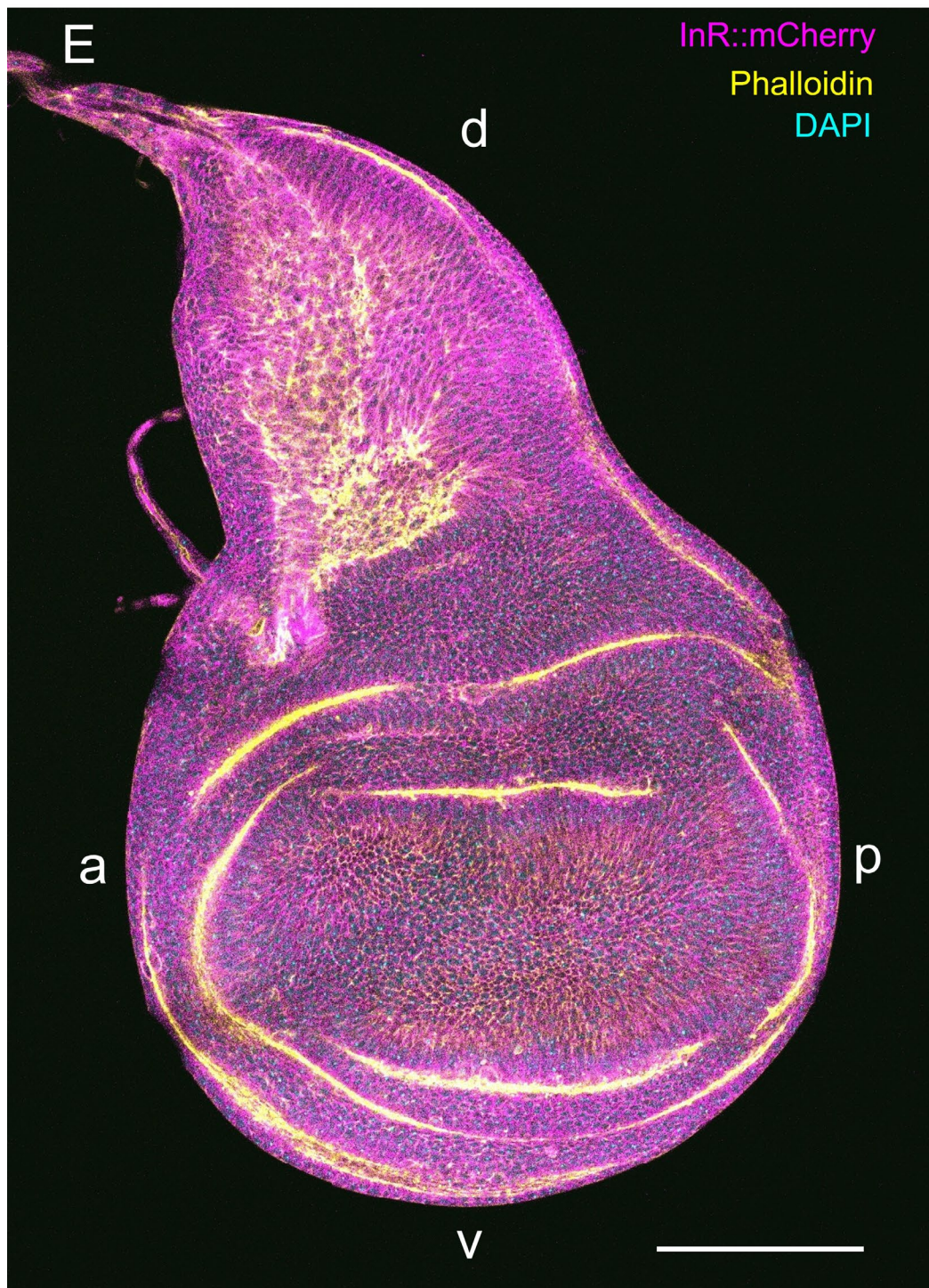
(A) コントロール (*pros>GFP*) と、中腸内分泌細胞における Dh31 ノックダウン (*pros>Dh31^{IR}*) の附属腺の、いくつかの遺伝子の RNA-seq 解析によるデータの比較。表は各遺伝子のリードカウント、TPM (transcripts per million) 値、Fold change を示す。解析した遺伝子は、*diuretic hormone 31-receptor; Dh31-R*, *insulin receptor; InR*, *eIF-4E-binding protein; 4E-BP* (ショウジョウバエでは *Thor* と呼ばれる), *ribosomal protein S6 kinase; S6k*, *unpaired 2; upd2*, *unpaired 3; upd3*, *matrix metalloproteinase 1; Mmp1*, *Accessory gland protein 54A1; Acp54A1*, *Accessory gland protein 98AB; Acp98AB*, *Accessory gland protein 63F; Acp63F*, *Accessory gland protein 95EF; Acp95EF*, *sex peptide; SP*, *ribosomal protein L39; RpL39*, *ribosomal protein L29; RpL29*, *ribosomal protein L32; RpL32*。Dh31-R はいずれの条件下でも、附属腺ではほとんど発現していなかった。*InR* は Dh31 ノックダウン個体 (*pros>Dh31^{IR}*) で発現量が増加した。SASP (senescence-associated secretory phenotype; 細胞老化関連分泌形質) の代表的な遺伝子として知られる *upd2*, *upd3*, *Mmp1* は、Dh31 ノックダウン個体 (*pros>Dh31^{IR}*) で発現が増加していたため、中腸内分泌細胞から産生される Dh31 をノックダウンすると附属腺の老化が促進されることが示された。交尾時にメスに送り込まれる性ペプチドの中で発現量が高い 5 遺伝子は、Dh31 ノックダウン個体 (*pros>Dh31^{IR}*) で発現量の低下を示し、これも、附属腺の老化促進を支持する結果となった。*RpL39*, *RpL29*, *RpL32* は内在性コントロール遺伝子として用いた。(B) 野生型 (コントロールとした *Canton-S*) と *Dh31^{SK1/SK2}* 変異体の間での、附属腺での *InR*, *4E-BP* の qRT-PCR によるデータの比較。*InR*, *4E-BP* の発現量は、羽化後 28 日目で *Dh31^{SK1/SK2}* 変異体はコントロールと比較して、*InR* は約 1.8 倍、*4E-BP* は約 2.7 倍に増加した。内在性コントロール遺伝子として *RpL32* を用いた。

7. 補足図

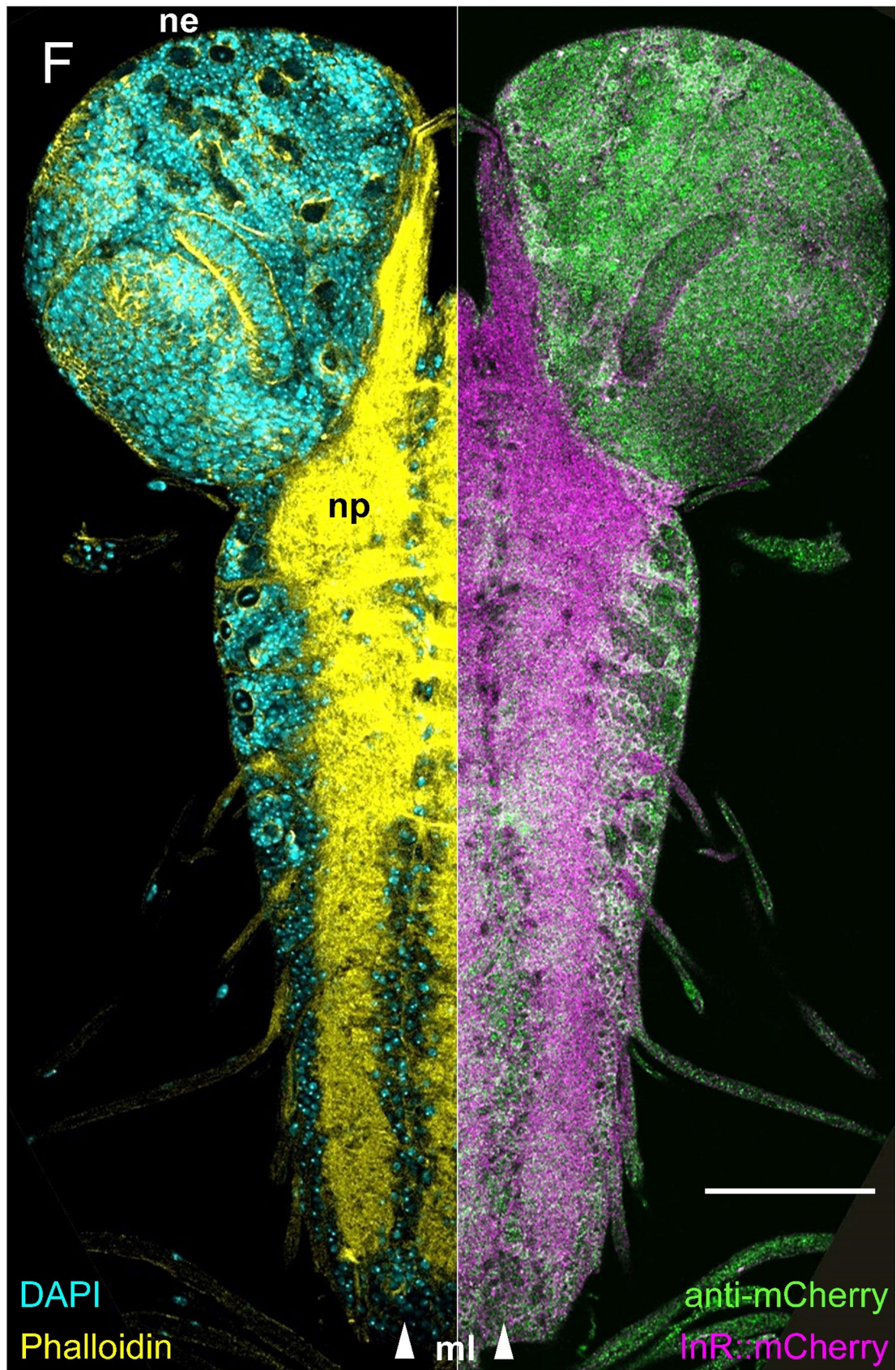


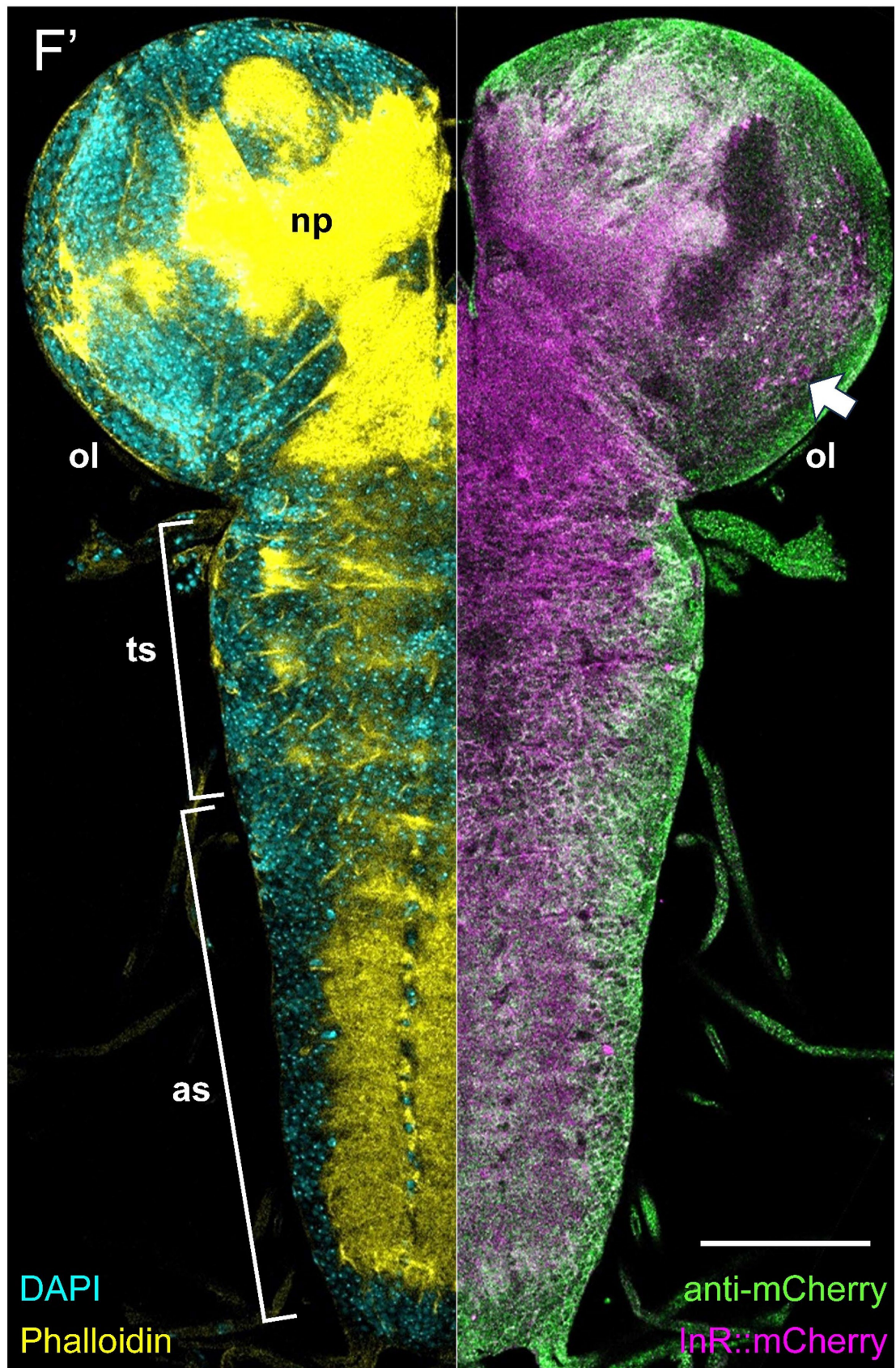
補足図 1. InR::mCherry 蛍光を示す様々な器官

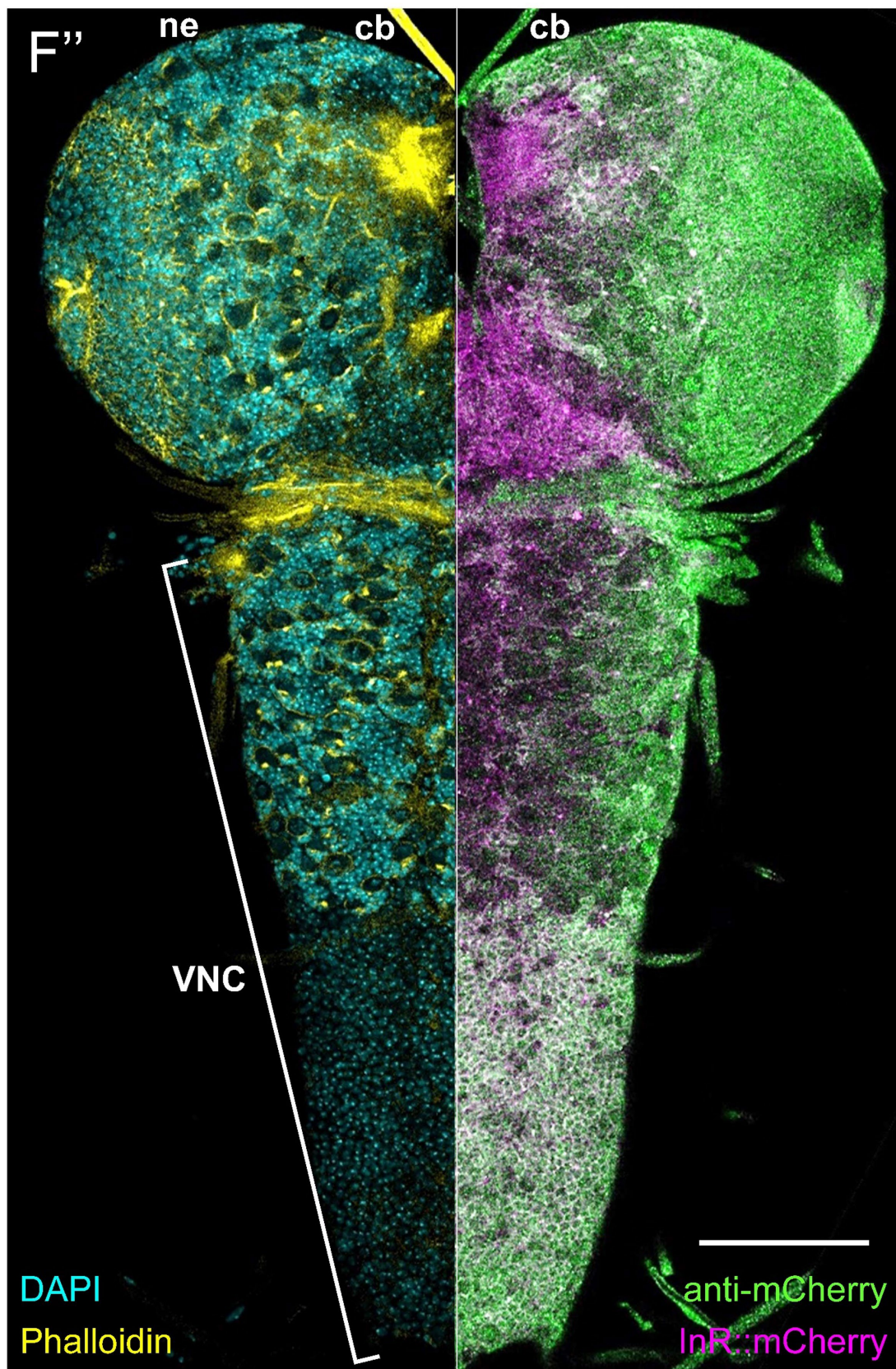
核 (DAPI、シアンまたは青)、InR::mCherry (マゼンタ)、anti-mCherry 抗体 (緑)、細胞膜 (Phalloidin、黄色) で示している。(A-A”、B-B”) 3 齢幼虫の複眼原基で、形態形成溝 (morphogenetic furrow) の後方に集合している分化途上の個眼の細胞を観察した。スケールバーは 10 μm 。多数の InR::mCherry が個眼の細胞膜上に観察できる。(C-C”、D-D”) 蛹の網膜 (retina)。スケールバーは 10 μm 。anti-mCherry 抗体による染色と InR::mCherry の蛍光が所々重なっている。InR の発現レベルは後に光受容体となる細胞 (photoreceptor precursor cell; pp) に比べ、色素細胞 (pigment cell; pi) で高かった。スケールバーは 10 μm 。



(E) 3 齢幼虫の翅原基。InR::mCherry の蛍光は Phalloidin で染色される細胞膜全体に広がっている。a は anterior、p は posterior、d は dorsal、v は ventral をそれぞれ示す。スケールバーは 100 μm 。



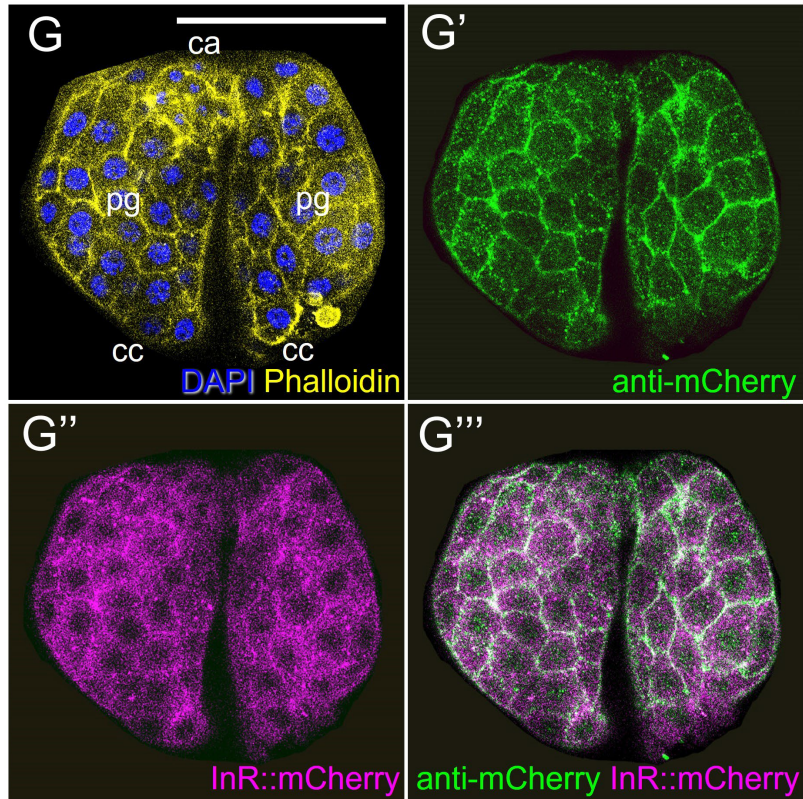




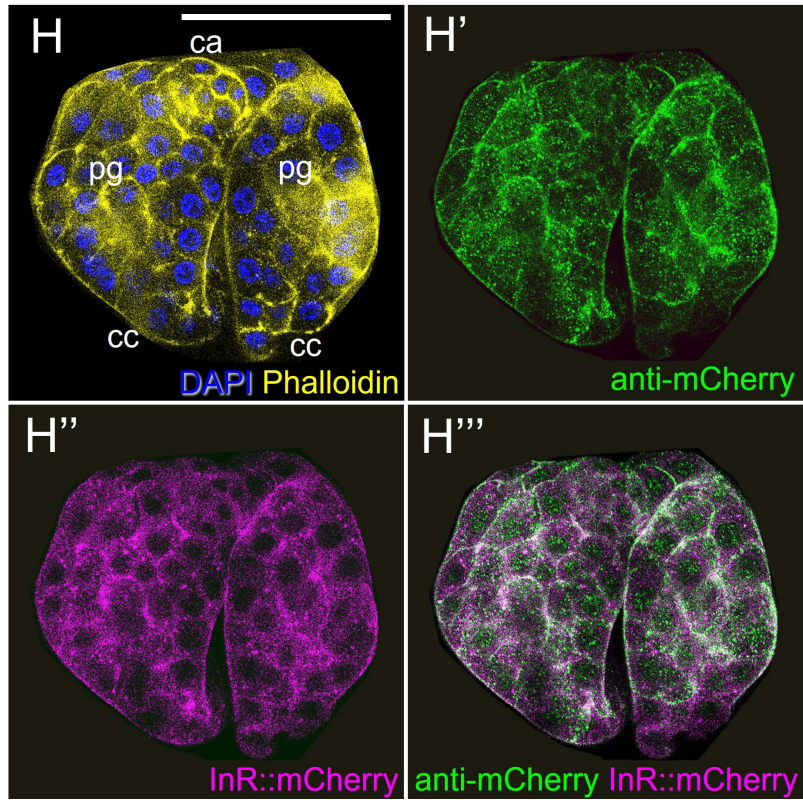
(F-F'') 3 齢幼虫の中樞神経系 (Central Nervous System; CNS) を三つの異なる深度で撮影した。スケールバーは 100 μm 。中樞神経系の正中線から右半分の同じ位置を異なるチャンネルで検出し、左側に鏡像対称化して並べた画像。全ての深度で InR::mCherry は細胞膜上に局在している様子がわかる。球状の視葉 (optic lobe; ol) の中ほどでは、InR::mCherry が細胞膜に局在するのに加えて、ところどころ凝集している (矢印)。これは InR::mCherry が、軸索上のコブ状の膨らみである varicosity などの特定の構造に局在している可能性を示している。この凝集は、(F'') の cb 領域 (central brain regions) や VNC (ventral nerve cord) にも散在している。他の略号は、ne (neuroectoderm)、np (neuropile)、白い矢頭の ml (midline)、ts (thoracic segments)、as (abdominal segments)。スケールバーは 100 μm 。

3齡幼虫の環状腺

Surface section

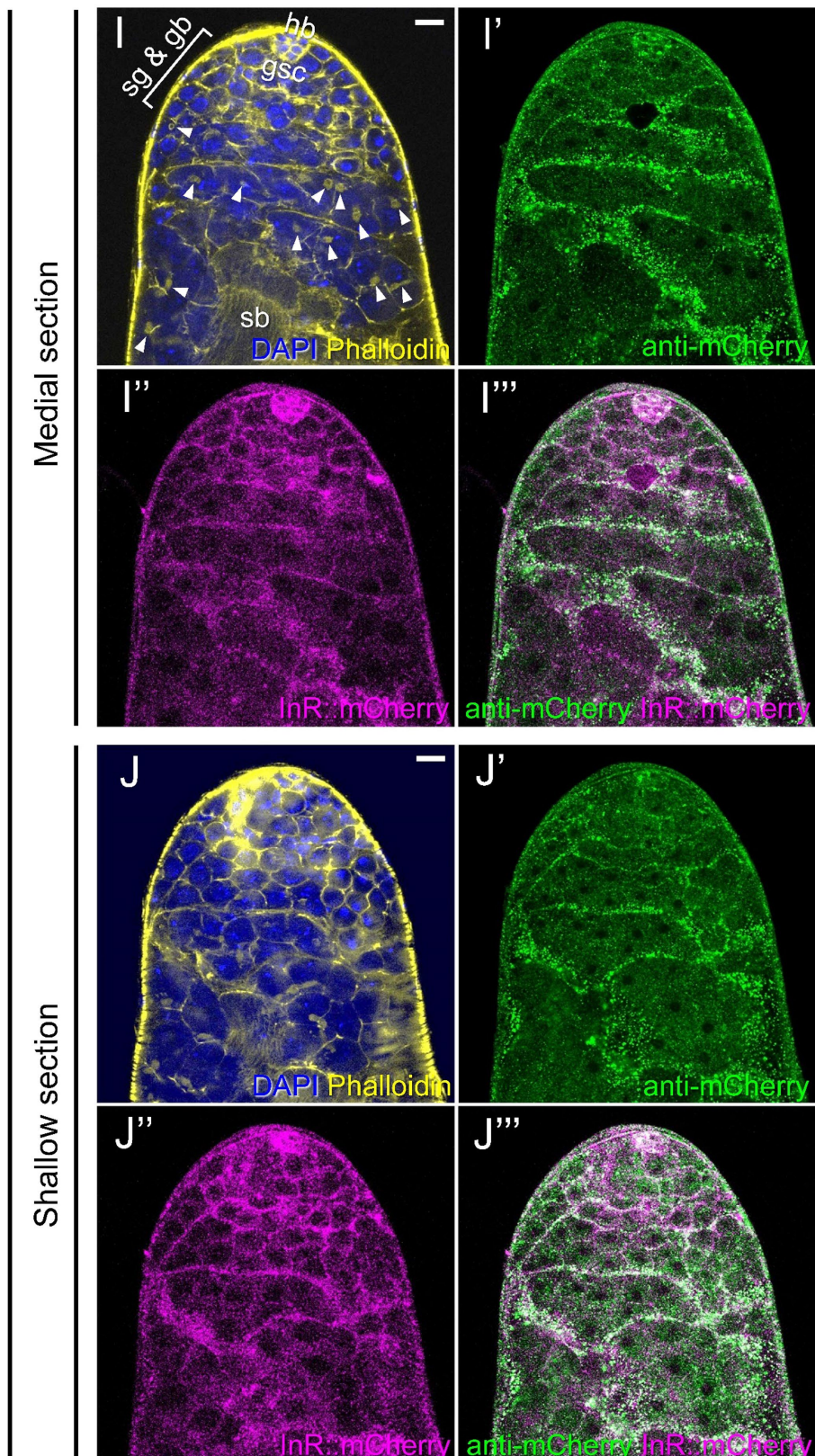


Sallow section

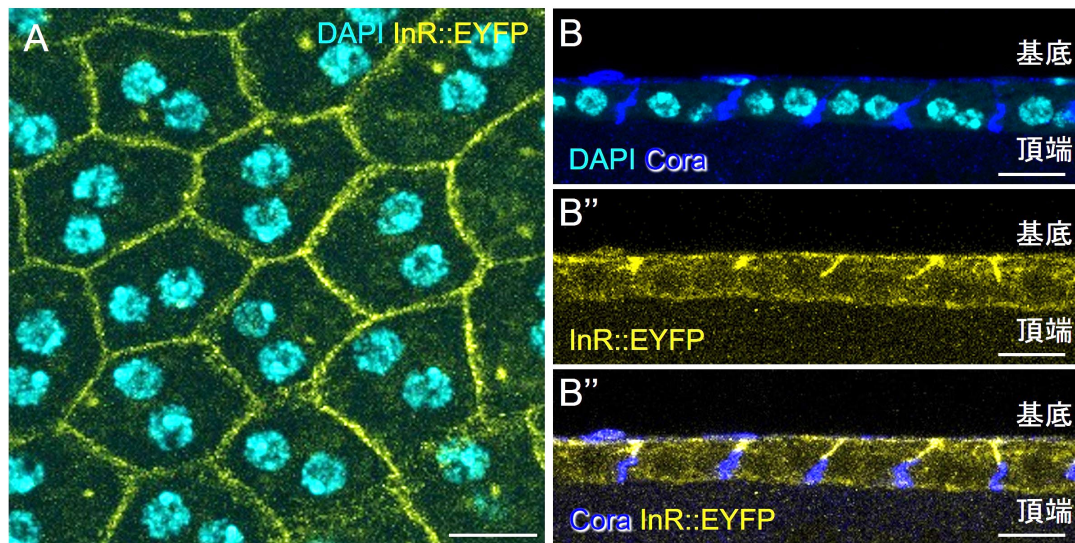


3 齢幼虫の環状腺と呼ばれる内分泌器官。(G-G'')は表面部分、(H-H'')は少し深い部分を撮影した。環状腺では前胸腺 (prothoracic gland; pg) 細胞が Dilps に影響を受けることが知られている (Pan et al., 2021)。核が小さいアラタ体 (corpora allata; ca) の細胞と、環状腺の底部に位置する側心体 (corpora cardiaca; cc) の細胞は、前胸腺細胞と比較して相対的に InR の発現レベルが低い。環状腺に注目するため、画像に写りこんだ周辺の別の組織は、画像のトリミングにより除去している。InR::mCherry の蛍光は、前胸腺細胞の細胞膜 (線状) と細胞内領域 (点状) の両方で観察できる。スケールバーは 100 μm 。

成虫の精巢の先端部



成虫の精巣の先端部。(I-I''')は中ほど、(J-J''')表面から少し深い部分を撮影した。幹細胞ニッチを形成することで知られている精巣の先端部に位置するハブ細胞 (hub cell; hb) の集団は、Phalloidin で強く染色されている。ハブ細胞は、一列の生殖幹細胞 (germline stem cells; gsc) に囲まれ、さらにその周りをゴニアルブラスト (gonialblasts; gb) が、そしてその外側を精原細胞 (spermatogonia; sg) が囲んでいる。これらよりも外側 (図の下方) にあるシスト前駆細胞では、細胞同士を連絡させる、生殖細胞特異的な構造である fusome が、Phalloidin により太く染色されている (白い矢頭)。画像のさらに下方には、精子束 (sperm bundle; sb) の末端部が観察できる。InR::mCherry の細胞膜での蛍光はハブ細胞で最も強く、生殖幹細胞、ゴニアルブラスト、精原細胞で最も弱い。細胞成長のために InR シグナルに応答することが知られているシスト細胞では (Amoyel et al., 2016)、細胞内領域に強い蛍光で多数の InR::mCherry 顆粒が観察できる。これは、InR::mCherry がエンドサイトーシスによるリサイクリング過程にあることを示唆している。スケールバーは 10 μ m。



補足図 2. InR::EYFP の細胞内局在と合成 DNA 配列

羽化後 2 日目の *InR::EYFP* 附属腺上皮細胞。頂端-基底軸に対して (A) は垂直方向の断面図、(B) は水平方向の断面図。(A) *InR::EYFP* の蛍光は、主に細胞間に面する細胞膜表面に局在している。(B) 細胞膜上の *InR::EYFP* の蛍光は、*InR::mCherry* で見られたように、細胞の頂端側ではなく、anti-Cora 抗体 (青) で染色されているセプテートジャンクションよりも基底側でのみ観察できる。スケールバーは 10 μm 。

(C)

```
GGTGTGCGCCCTTCGCAGTACAGGCGGTGGAAAACCTCAGCGGAGAACACATTTGCTGCCAAGAAAGGTCGCCAGCCTACCATCATGAGCAGTTCGATGC
CAGATGATGTCATCGGTGGGTCTCTACTGCAACCCCTCGACTGCGTCAGCAGGCAGTTCTAATGCCAGTTCGCACACAGGACGCCAAGTCTGAAGAAAAC
AGTGGCGGATTTCGTTTCGCAATAAGGCAAACTTCATTAATCGCCACCTATTTAACCACAAGCGAACGGGCAGCAATGCCAGCCACAAGAGCAATGCCTCC
AATGCTCCGAGTACCAGCAGTAACACCAACTTGACAAGTCACCCAGTGGCTATGGGCAATCTTGGAATATCGAGAGTGGTGGCAGTGGTTCGGCTGGTA
GTTATACTGGAACACCCCGCTTCTATACTCCATCAGCGACGCCCTGGAGGAGGCAGCGGTATGGCCATTAGCGACAATCCTAACTACAGACTACTAGACGA
GTCAATAGCCAGCGAACAGGCCACCATCCTAACGACTAGCAGCCCCAATCCCAACTACGAGATGATGCATCCACCAACCAGTCTGGTCAGTACCAATCCG
AACTATATGCCCATGAATGAGACTCCAGTGCAGATGGCGGGTGTGACCATTAGCCATAATCCGAATTACCAGCCATGCAGGCGCCGTGAATGCACGCC
AAAGCCAAAGTAGCAGCGCAGGAGACAACGAGCAGGAGGAGGACGATGAGGATGAGGACGACGACGTGGACGATGAGCATGTGGAGCACATCAAGATGGA
GCGCATGCCATTGAGTCGGCCCGAGGCAAGAGCGTTGCCAGCAAGACGACGCCCTCGCAGTCGCAGCGTCAGCCAAACGAGAAAATCTCTACGAAT
CCCAACTCCGGAATCGGAGCGACAGGAGCCGGAACCGATCCAACCTTGCTTAAAGAGAATGGCTGCGACCGGCAGTACGCCAAGGCCTCCACCACCA
ATGGATTTCATCGAAGGGAAGCGCGAGGTGGGAGTGGCGAAGCGGTGGGGGCATGGTGAGCAAGGGCGAGGAATGTGTTACCGGGGTGGTGCCATCCT
GGTCGAGTTGGACGGCGACGTAACGCCACAAGTTTACGCGTGTCCGCGAGGGCGAGGGCGATGCCACCTACGGCAAGCTGACCCCTGAAGTTCATCTGC
ACCACCGGCAAGCTGCCCGTGCCCTGGCCACCCCTCGTGACCACCTTCGGCTACGGCTGCAATGCTTCGCCCGCTACCCCGACCATGAAGCAGCAGC
ACTTCTTCAAGTCCGCCATGCCGAAGGCTACGTCCAGGAGCGCACCATCTTCTTCAAGGACGACGGCAACTACAAGACCCGCGCCGAGGTGAAGTTCGA
AGGCGATACCCCTGGTGAACCGCATCGAGCTGAAGGGCATCGACTTCAAGGAGGACGGCAACATCCTGGGGCACAAGCTGGAGTACAACATAACAGCCAC
AACGCTTATATCATGGCCGACAAGCAGAAGAACGGCATCAAGGTGAACCTTCAAGATCCGCCACAACATCGAGGACGGCAGCGTGCAACTCGCCGACCACT
ACCAGCAGAACACCCCATCGGCGACGGCCCCGTGCTGCTGCCGACAACCACTACCTACCTTACCAGTCCGCCCTGAGCAAAGACCCCAACGAGAAGCG
CGATCATCATGGTCTGCTGGAGTTCTGTGACCGCGCCGGGATCACTCTCGGCATGGACGAAATTGTACAAGTAAAGTAGTGCCCCAACTG
```

(C) EYFP 標識 *InR* ノックイン系統の作成のために、化学合成した DNA の全塩基配列。
一行に 100 塩基で示している。

下線部

AGCT

A

G

C

T

A

: In-fusion のための末端 15 塩基

: InR コード領域の 3'末端を含む LHA 配列

: 10 アミノ酸のリンカー配列

: EYFP コード配列

: 全配列中に 8 か所存在した「GAGCT」を避けるために変更した塩基

: gRNA が PAM 配列を繰り返し認識するのを防ぐための同義置換

8. 謝辞

東京理科大学の近藤周准教授には *Dh31^{SK1}*、*Dh31^{SK2}* 系統をご譲渡いただきました。深く感謝申し上げます。

学習院大学理学部生命科学科の嶋田透教授、柳茂教授には学位論文の審査をお引き受けいただきました。誠にありがとうございます。

学習院大学理学部生命科学科の安達卓教授には、学部時代から今日に至るまで、研究生活のあらゆる場面で多大なるご指導いただきました。深く感謝申し上げます。大塚慧助教には研究でご指導いただくのと共に、データや論文の読み取り方などを学ばせていただきました。誠にありがとうございました。国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構の武田晃司博士には、ショウジョウバエを使っての実験を基礎から全てご指導いただきました。研究以外にも、たくさんのご助言とご支援を賜りましたことを御礼申し上げます。

附属腺でインスリン受容体を過剰発現すると老化が促進することは、本研究室卒業生の寺畠麻由さんにご助言いただきました。*InR::mCherry* 系統作成時のリンカーの開発とコンストラクトの設計は、同じく卒業生の直井陸さんにお力をいただきました。本研究は、お二人の研究が重要なポイントとなり遂行することができました。深く御礼申し上げます。

快適な研究環境をご提供くださりました学習院大学と、研究室を居心地の良い場所にしてくださった、これまでの安達研究室の皆さまに深く感謝しております。研究を開始した学部4年次から今日に至るまで、本研究についてご意見をくださりました皆さまから、たくさん刺激をいただき、実験を進めることができました。誠にありがとうございました。

9. 参考文献

- Amoyel M, Hillion KH, Margolis SR, Bach EA (2016) Somatic stem cell differentiation is regulated by PI3K/Tor signaling in response to local cues. *Development* 143:3914-3925
- Augustin H, McGourty K, Allen MJ, Madem SK, Adcott J, Kerr F, Wong CT, Vincent A, Godenschwege T, Boucrot E, Partridge L (2017) Reduced insulin signaling maintains electrical transmission in a neural circuit in aging flies. *PLoS Biol* 15:e2001655
- Balakireva M, Stocker RF, Gendre N, Ferveur JF (1998) Voila, a new *Drosophila* courtship variant that affects the nervous system: behavioral, neural, and genetic characterization. *J Neurosci* 18:4335-4343
- Becker K, Bluhm A, Casas-Vila N, Dinges N, Dejung M, Sayols S, Kreutz C, Roignant JY, Butter F, Legewie S (2018) Quantifying post-transcriptional regulation in the development of *Drosophila melanogaster*. *Nat Commun* 9:4970
- Benguettat O, Jneid R, Soltys J, Loudhaief R, Brun-Barale A, Osman D, Gallet A (2018) The DH31/CGRP enteroendocrine peptide triggers intestinal contractions favoring the elimination of opportunistic bacteria. *PLoS Pathog* 14:e1007279
- Blüher M, Kahn BB, Kahn CR (2003) Extended longevity in mice lacking the insulin receptor in adipose tissue. *Science* 299:572-574
- Britton JS, Lockwood WK, Li L, Cohen SM, Edgar BA (2002) *Drosophila*'s insulin/PI3-kinase pathway coordinates cellular metabolism with nutritional conditions. *Dev Cell* 2:239-249
- Brogiolo W, Stocker H, Ikeya T, Rintelen F, Fernandez R, Hafen E (2001) An evolutionarily conserved function of the *Drosophila* insulin receptor and insulin-like peptides in growth control. *Curr Biol* 11:213-221
- Buchon N, Osman D, David FP, Fang HY, Boquete JP, Deplancke B, Lemaitre B (2013) Morphological and molecular characterization of adult midgut compartmentalization in *Drosophila*. *Cell Rep* 3:1725-1738
- Butler AA, Le Roith D (2001) Control of growth by the somatotropic axis: growth hormone and the insulin-like growth factors have related and independent roles. *Annu Rev Physiol* 63:141-164
- Ceresa BP, Kao AW, Santeler SR, Pessin JE (1998) Inhibition of clathrin-mediated endocytosis selectively attenuates specific insulin receptor signal transduction pathways. *Mol Cell Biol* 18:3862-3870
- Chen H, Zheng X, Zheng Y (2014) Age-associated loss of lamin-B leads to systemic inflammation and gut hyperplasia. *Cell* 159:829-843
- Chen Y, Huang L, Qi X, Chen C (2019) Insulin Receptor Trafficking: Consequences for Insulin Sensitivity and Diabetes. *Int J Mol Sci* 20

- Choi E, Zhang X, Xing C, Yu H (2016) Mitotic Checkpoint Regulators Control Insulin Signaling and Metabolic Homeostasis. *Cell* 166:567-581
- Choi E, Kikuchi S, Gao H, Brodzik K, Nassour I, Yopp A, Singal AG, Zhu H, Yu H (2019) Mitotic regulators and the SHP2-MAPK pathway promote IR endocytosis and feedback regulation of insulin signaling. *Nat Commun* 10:1473
- Chowański S, Walkowiak-Nowicka K, Winkiel M, Marciniak P, Urbański A, Pacholska-Bogalska J (2021) Insulin-Like Peptides and Cross-Talk With Other Factors in the Regulation of Insect Metabolism. *Front Physiol* 12:701203
- Clancy DJ, Gems D, Harshman LG, Oldham S, Stocker H, Hafen E, Leevers SJ, Partridge L (2001) Extension of life-span by loss of CHICO, a *Drosophila* insulin receptor substrate protein. *Science* 292:104-106
- Coast GM, Webster SG, Schegg KM, Tobe SS, Schooley DA (2001) The *Drosophila melanogaster* homologue of an insect calcitonin-like diuretic peptide stimulates V-ATPase activity in fruit fly Malpighian tubules. *J Exp Biol* 204:1795-1804
- Colombani J, Andersen DS, Léopold P (2012) Secreted peptide Dilp8 coordinates *Drosophila* tissue growth with developmental timing. *Science* 336:582-585
- Dall'Agnese A, Platt JM, Zheng MM, Friesen M, Dall'Agnese G, Blaise AM, Spinelli JB, Henninger JE, Tevonian EN, Hannett NM, Lazaris C, Drescher HK, Bartsch LM, Kilgore HR, Jaenisch R, Griffith LG, Cisse, II, Jeppesen JF, Lee TI, Young RA (2022) The dynamic clustering of insulin receptor underlies its signaling and is disrupted in insulin resistance. *Nat Commun* 13:7522
- Dimri GP, Lee X, Basile G, Acosta M, Scott G, Roskelley C, Medrano EE, Linskens M, Rubelj I, Pereira-Smith O, et al. (1995) A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92:9363-9367
- Fagerholm S, Ortegren U, Karlsson M, Ruishalme I, Strålfors P (2009) Rapid insulin-dependent endocytosis of the insulin receptor by caveolae in primary adipocytes. *PLoS One* 4:e5985
- Furuya K, Milchak RJ, Schegg KM, Zhang J, Tobe SS, Coast GM, Schooley DA (2000) Cockroach diuretic hormones: characterization of a calcitonin-like peptide in insects. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:6469-6474
- Futcher B, Latter GI, Monardo P, McLaughlin CS, Garrels JI (1999) A sampling of the yeast proteome. *Mol Cell Biol* 19:7357-7368
- Gelbart WM, Emmert DB (2013) FlyBase High Throughput Expression Pattern Data, URL: <https://flybase.org/reports/FBgn0283499> Accessed 8 July 2023. In:
- Giannakou ME, Partridge L (2007) Role of insulin-like signalling in *Drosophila* lifespan. *Trends Biochem Sci* 32:180-188
- Goda T, Hamada FN (2019) *Drosophila* Temperature Preference Rhythms: An Innovative Model

- to Understand Body Temperature Rhythms. *Int J Mol Sci* 20
- Goda T, Tang X, Umezaki Y, Chu ML, Kunst M, Nitabach MNN, Hamada FN (2016) *Drosophila* DH31 Neuropeptide and PDF Receptor Regulate Night-Onset Temperature Preference. *J Neurosci* 36:11739-11754
- Goldstein S (1990) Replicative senescence: the human fibroblast comes of age. *Science* 249:1129-1133
- Grönke S, Clarke DF, Broughton S, Andrews TD, Partridge L (2010) Molecular evolution and functional characterization of *Drosophila* insulin-like peptides. *PLoS Genet* 6:e1000857
- Griffin TJ, Gygi SP, Ideker T, Rist B, Eng J, Hood L, Aebersold R (2002) Complementary profiling of gene expression at the transcriptome and proteome levels in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Proteomics* 1:323-333
- Gygi SP, Rochon Y, Franza BR, Aebersold R (1999) Correlation between protein and mRNA abundance in yeast. *Mol Cell Biol* 19:1720-1730
- Hafen E (2004) Cancer, type 2 diabetes, and ageing: news from flies and worms. *Swiss Med Wkly* 134:711-719
- Hall C, Yu H, Choi E (2020) Insulin receptor endocytosis in the pathophysiology of insulin resistance. *Exp Mol Med* 52:911-920
- Haroon, Ma X-M, Li Y-X, Zhang H-X, Liu Q, Su X-H, Xing L-X (2020) Transcriptomic evidence that insulin signalling pathway regulates the ageing of subterranean termite castes. *Scientific Reports* 10:8187
- Holzenberger M, Dupont J, Ducos B, Leneuve P, Gélœn A, Even PC, Cervera P, Le Bouc Y (2003) IGF-1 receptor regulates lifespan and resistance to oxidative stress in mice. *Nature* 421:182-187
- Ideker T, Thorsson V, Ranish JA, Christmas R, Buhler J, Eng JK, Bumgarner R, Goodlett DR, Aebersold R, Hood L (2001) Integrated genomic and proteomic analyses of a systematically perturbed metabolic network. *Science* 292:929-934
- Ikeya T, Galic M, Belawat P, Nairz K, Hafen E (2002) Nutrient-dependent expression of insulin-like peptides from neuroendocrine cells in the CNS contributes to growth regulation in *Drosophila*. *Curr Biol* 12:1293-1300
- Ismail MZBH, Hodges MD, Boylan M, Achall R, Shirras A, Broughton SJ (2015) The *Drosophila* insulin receptor independently modulates lifespan and locomotor senescence. *PLoS One* 10:e0125312
- Kenyon C, Chang J, Gensch E, Rudner A, Tabtiang R (1993) A *C. elegans* mutant that lives twice as long as wild type. *Nature* 366:461-464
- Kimura KD, Tissenbaum HA, Liu Y, Ruvkun G (1997) *daf-2*, an insulin receptor-like gene that regulates longevity and diapause in *Caenorhabditis elegans*. *Science* 277:942-946

- Kockel L, Kerr KS, Melnick M, Brückner K, Hebrok M, Perrimon N (2010) Dynamic switch of negative feedback regulation in *Drosophila* Akt-TOR signaling. *PLoS Genet* 6:e1000990
- Kondo S, Ueda R (2013) Highly improved gene targeting by germline-specific Cas9 expression in *Drosophila*. *Genetics* 195:715-721
- Kunst M, Hughes ME, Raccuglia D, Felix M, Li M, Barnett G, Duah J, Nitabach MN (2014) Calcitonin gene-related peptide neurons mediate sleep-specific circadian output in *Drosophila*. *Curr Biol* 24:2652-2664
- Kurogi Y, Imura E, Mizuno Y, Hoshino R, Nouzova M, Matsuyama S, Mizoguchi A, Kondo S, Tanimoto H, Noriega FG, Niwa R (2023) Female reproductive dormancy in *Drosophila* is regulated by DH31-producing neurons projecting into the corpus allatum. *Development* 150
- Kwon YK, Jang HJ, Kole S, He HJ, Bernier M (2003) Role of the pleckstrin homology domain of PLCgamma1 in its interaction with the insulin receptor. *J Cell Biol* 163:375-384
- LaJeunesse DR, Johnson B, Presnell JS, Catignas KK, Zapotoczny G (2010) Peristalsis in the junction region of the *Drosophila* larval midgut is modulated by DH31 expressing enteroendocrine cells. *BMC Physiol* 10:14
- Leibiger B, Leibiger IB, Moede T, Kemper S, Kulkarni RN, Kahn CR, de Vargas LM, Berggren PO (2001) Selective insulin signaling through A and B insulin receptors regulates transcription of insulin and glucokinase genes in pancreatic beta cells. *Mol Cell* 7:559-570
- Lin HH, Kuang MC, Hossain I, Xuan Y, Beebe L, Shepherd AK, Rolandi M, Wang JW (2022) A nutrient-specific gut hormone arbitrates between courtship and feeding. *Nature* 602:632-638
- Luo J, Liu Y, Nässel DR (2013) Insulin/IGF-regulated size scaling of neuroendocrine cells expressing the bHLH transcription factor Dimmed in *Drosophila*. *PLoS Genet* 9:e1004052
- Lyu S, Terao N, Nakashima H, Itoh M, Tonoki A (2023) Neuropeptide diuretic hormone 31 mediates memory and sleep via distinct neural pathways in *Drosophila*. *Neurosci Res* 192:11-25
- McLeod CJ, Wang L, Wong C, Jones DL (2010) Stem cell dynamics in response to nutrient availability. *Curr Biol* 20:2100-2105
- Mirth CK, Tang HY, Makohon-Moore SC, Salhadar S, Gokhale RH, Warner RD, Koyama T, Riddiford LM, Shingleton AW (2014) Juvenile hormone regulates body size and perturbs insulin signaling in *Drosophila*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 111:7018-7023
- Miyawaki A, Sawano A, Kogure T (2003) Lighting up cells: labelling proteins with fluorophores. *Nat Cell Biol Suppl*:S1-7
- Nijhout HF, McKenna KZ (2018) The distinct roles of insulin signaling in polyphenic

- development. *Curr Opin Insect Sci* 25:58-64
- Odell SR, Clark D, Zito N, Jain R, Gong H, Warnock K, Carrion-Lopez R, Maixner C, Prieto-Godino L, Mathew D (2022) Internal state affects local neuron function in an early sensory processing center to shape olfactory behavior in *Drosophila* larvae. *Sci Rep* 12:15767
- Okamoto N, Nakamori R, Murai T, Yamauchi Y, Masuda A, Nishimura T (2013) A secreted decoy of InR antagonizes insulin/IGF signaling to restrict body growth in *Drosophila*. *Genes Dev* 27:87-97
- Okamoto N, Yamanaka N, Yagi Y, Nishida Y, Kataoka H, O'Connor MB, Mizoguchi A (2009) A fat body-derived IGF-like peptide regulates postfeeding growth in *Drosophila*. *Dev Cell* 17:885-891
- Pan X, Connacher RP, O'Connor MB (2021) Control of the insect metamorphic transition by ecdysteroid production and secretion. *Curr Opin Insect Sci* 43:11-20
- Park JH, Kwon JY (2011) Heterogeneous expression of *Drosophila* gustatory receptors in enteroendocrine cells. *PLoS One* 6:e29022
- Park JH, Chen J, Jang S, Ahn TJ, Kang K, Choi MS, Kwon JY (2016) A subset of enteroendocrine cells is activated by amino acids in the *Drosophila* midgut. *FEBS Lett* 590:493-500
- Partridge L, Gems D (2002) Mechanisms of ageing: public or private? *Nat Rev Genet* 3:165-175
- Pereira-Leal JB, Seabra MC (2001) Evolution of the Rab family of small GTP-binding proteins. *J Mol Biol* 313:889-901
- Podlecki DA, Smith RM, Kao M, Tsai P, Huecksteadt T, Brandenburg D, Lasher RS, Jarett L, Olefsky JM (1987) Nuclear translocation of the insulin receptor. A possible mediator of insulin's long term effects. *J Biol Chem* 262:3362-3368
- Puig O, Marr MT, Ruhf ML, Tjian R (2003) Control of cell number by *Drosophila* FOXO: downstream and feedback regulation of the insulin receptor pathway. *Genes Dev* 17:2006-2020
- Romsicki Y, Reece M, Gauthier JY, Asante-Appiah E, Kennedy BP (2004) Protein tyrosine phosphatase-1B dephosphorylation of the insulin receptor occurs in a perinuclear endosome compartment in human embryonic kidney 293 cells. *J Biol Chem* 279:12868-12875
- Root CM, Ko KI, Jafari A, Wang JW (2011) Presynaptic facilitation by neuropeptide signaling mediates odor-driven food search. *Cell* 145:133-144
- Saltiel AR, Kahn CR (2001) Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism. *Nature* 414:799-806
- Serrano R, Villar M, Martinez C, Carrascosa J, Gallardo N, Andres A (2005) Differential gene expression of insulin receptor isoforms A and B and insulin receptor substrates 1, 2 and 3

- in rat tissues: modulation by aging and differentiation in rat adipose tissue. *Journal of molecular endocrinology* 34:153-161
- Skorokhod A, Gamulin V, Gundacker D, Kavsan V, Müller IM, Müller WE (1999) Origin of insulin receptor-like tyrosine kinases in marine sponges. *Biol Bull* 197:198-206
- Slankster E, Kollala S, Baria D, Dailey-Krempel B, Jain R, Odell SR, Mathew D (2020) Mechanism underlying starvation-dependent modulation of olfactory behavior in *Drosophila* larva. *Sci Rep* 10:3119
- Snapp E (2005) Design and use of fluorescent fusion proteins in cell biology. *Curr Protoc Cell Biol* Chapter 21:21.24.21-21.24.13
- Takeda K, Okumura T, Terahata M, Yamaguchi M, Taniguchi K, Adachi-Yamada T (2018) *Drosophila* Peptide Hormones Allatostatin A and Diuretic Hormone 31 Exhibiting Complementary Gradient Distribution in Posterior Midgut Antagonistically Regulate Midgut Senescence and Adult Lifespan. *Zoolog Sci* 35:75-85
- Tanabe K, Itoh M, Tonoki A (2017) Age-Related Changes in Insulin-like Signaling Lead to Intermediate-Term Memory Impairment in *Drosophila*. *Cell Rep* 18:1598-1605
- Taniguchi K, Kokuryo A, Imano T, Minami R, Nakagoshi H, Adachi-Yamada T (2012) Binucleation of *Drosophila* Adult Male Accessory Gland Cells Increases Plasticity of Organ Size for Effective Reproduction. In:
- Tatar M, Bartke A, Antebi A (2003) The endocrine regulation of aging by insulin-like signals. *Science* 299:1346-1351
- Trischitta V, Reaven GM (1988) Evidence of a defect in insulin-receptor recycling in adipocytes from older rats. *Am J Physiol* 254:E39-44
- Trischitta V, Wong KY, Brunetti A, Scalisi R, Vigneri R, Goldfine ID (1989) Endocytosis, recycling, and degradation of the insulin receptor. Studies with monoclonal antireceptor antibodies that do not activate receptor kinase. *J Biol Chem* 264:5041-5046
- Uhles S, Moede T, Leibiger B, Berggren PO, Leibiger IB (2003) Isoform-specific insulin receptor signaling involves different plasma membrane domains. *J Cell Biol* 163:1327-1337
- van der Sluijs P, Hull M, Webster P, Mâle P, Goud B, Mellman I (1992) The small GTP-binding protein rab4 controls an early sorting event on the endocytic pathway. *Cell* 70:729-740
- Wigby S, Sirot LK, Linklater JR, Buehner N, Calboli FC, Bretman A, Wolfner MF, Chapman T (2009) Seminal fluid protein allocation and male reproductive success. *Curr Biol* 19:751-757
- Zerial M, McBride H (2001) Rab proteins as membrane organizers. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2:107-117