

博士論文

ショウジョウバエ中腸ホルモン
AstA/Dh31 による中腸組織老化と
個体寿命の拮抗的制御

Antagonism between Allatostatin A and Diuretic hormone 31 for
regulation of midgut senescence and adult lifespan in *Drosophila*

平成 29 年 10 月

学習院大学大学院 自然科学研究科
生命科学専攻

武田晃司

目次

1.要旨	p.1
2.序論	p.2-7
3.実験方法と実験材料	p.8-13
4.結果	p.14-24
5.考察	p.25-28
6.図	p.29-66
7.謝辞	p.67
8.参考文献	p.68-71

1. 要旨

消化管は消化・吸収を行う器官であるが、さらに摂取した食物の情報を感知するとともに、その情報に応答する独自の神経系や免疫系の機能も有している。そこでの感知には自由神経終末だけでなく、消化管全体に散在する内分泌細胞が重要な役割を果たしていると考えられている(Raybould, 2010)。消化管内分泌細胞は、消化管の上皮に散在し、ペプチドホルモンを産生する細胞で、哺乳類から昆虫まで広く保存されている。産生されたホルモンは血液中へ放出され、脳や他器官に作用し、個体の恒常性維持に関与する。

ショウジョウバエを用いた研究では、中腸内分泌細胞には産生するホルモンの種類によってサブタイプが存在し(Ohlstein and Spradling, 2006)、また中腸の領域によって発現が異なることが報告されている(Marianes and Spradling, 2013)。しかし、領域特異的な発現をする各種の中腸ホルモンが腸自身や他器官や全身へどのように影響しているのか不明な点が多い。そこで我々は、これらの中腸ホルモンの中腸組織老化や個体の寿命に対する影響について解析を試みた。

本研究では、ショウジョウバエ成虫の中腸後方部において内分泌細胞の異なるサブタイプで産生される Allatostatin-A(AstA)と Diuretic hormone 31(Dh31)の2つのペプチドホルモンに着目した。まず、両サブタイプの分布を観察したところ、両者の密度は中腸後方部内の前後軸に沿って逆位相の勾配を作っていた。さらに実験の結果、AstA をノックダウンした場合は寿命が短命化し、その個体の中腸では早期老化症状が観察された。他方で、Dh31 ノックダウンでは寿命が延び、中腸の老化は遅延した。また、両ホルモンの受容体のそれぞれを中腸でノックダウンした場合には、組織老化は同様の表現型が見られたが、個体寿命については効果が得られなかった。従って両者のホルモンの中腸への作用は直接的であるが、寿命への効果は中腸の老化とは独立であることが示唆された。その一方で、中腸以外の老化への効果を調べた結果、雄の内部生殖器の一部である附属腺に対しては、Dh31 をノックダウンした場合に中腸とは逆に老化の促進が観察された。

以上の結果から、正常な中腸では AstA は直接的に老化を抑えるホルモンで、反対に Dh31 は直接的に老化を促進するホルモンであることが示唆された。さらに、附属腺の老化が中腸での応答と異なることから、両ホルモンは、液性因子であるインスリンのような各組織の老化に対して一義的に機能するのではなく、組織特異的な効果を与える性質があると考えられる。以上から、中腸において産生細胞の局在性を異にする2種のホルモンが、拮抗的な性質を見せる機能＝寿命老化制御を組織特異的に果たしていることが明らかとなり、これはインスリンに代表されるような全身性の仕組みとは異なる、新しい寿命老化制御の仕組みであると考えられる。

2.序論

消化管の主要な役割は、摂食した食物を消化・吸収することである。しかしながら体内で最も多くの外来生物（腸内細菌）が共生する特殊な臓器でもあり、それらが人体に及ぼす多大な影響を鑑みて、健康寿命や予防医学の観点からも注目を浴びている器官である。例えば、多くの大学・企業において腸内フローラやプロバイオティクス（いわゆる善玉菌）の研究が進められ、他方では腸の環境を更新し続けて安定化させる組織幹細胞の研究や恒常性維持機構の研究も数多く進められている。さらに近年では、過敏性腸症候群などの疾病が増加傾向であり、腸自身が内腔や上皮の状態を感知し、全身の器官に情報を伝達することで、生体内の恒常性を保っていることの重要性に改めて焦点が当てられている。

生体内の恒常性を維持するための一つのしくみが、血液中を循環するホルモンによる制御である。腸はヒト体内で最大のホルモン産生場である事が示されており (Ahlman and Nilsson, 2001)、その全身性制御の可能性から第二の脳とも呼ばれ、注目されている (Gershon, 1999)。その際、単に腸が脳に次ぐ第二の中樞になっているのではなく、腸と脳は共通の情報伝達物質と受容体を介し双方向的なネットワーク「脳腸相関」を形成していると考えられている。しかし、そのような腸の全身性機能を果たす仕組みの全容は十分に解明されていない。

さらに、腸上皮に散在してホルモンを産生する内分泌細胞が、内腔側の状態を感知することで腸の状態を全身へ伝えているのではないかと推察されている (Raybould, 2010)。腸ホルモンが生体内へ影響する事例として、例えば、ヒトの小腸において GIP (glucose-dependent insulintropic polypeptide) と GLP-1 (glucagon-like peptide-1) はインクレチンと総称される腸ホルモンであり、食事摂取に応答して小腸内分泌細胞から分泌され、膵臓 β 細胞に作用してインスリン分泌を促進する機能が知られている。しかしながら、腸内環境因子を受容してホルモン分泌を制御するメカニズムは未だに不明点が多い。

そこで私は、ショウジョウバエにおいて、消化管内環境因子を受容してホルモンを分泌する腸内分泌細胞 2 種とそれらが作り出す脳腸ホルモンの腸産生画分に関する機能に着目した。

モデル生物であるショウジョウバエの消化管においても、哺乳類と同様に、ホルモンを産生する内分泌細胞の存在が示されている(Ohlstein and Spradling, 2006)。ショウジョウバエの消化管は主に3つの領域に大別され、口側から前腸-中腸-後腸と続き肛門へ至り、それぞれヒトの胃-小腸-大腸の機能を果たしている(Apidianakis and Rahme, 2011)。このうち、ヒトの小腸に相当する器官である中腸には組織幹細胞が存在し、幹細胞から分化細胞への Notch シグナル等を介した比較的単純な細胞系譜が知られている(Micchelli and Perrimon, 2006) (Ohlstein and Spradling, 2006)。まず、中腸幹細胞(Intestinal stem cell ; ISC)が自己複製を伴った非対称分裂を行うことで、「ISC および腸芽細胞(Enteroblast ; EB)」または「ISC および腸内分泌細胞(Enteroendocrine cell ; EE cell)」が生まれる(ただしこの非対称分裂は、神経幹細胞に認められるような、物質の明確な非対称性分布や分裂面の偏りを伴うものではない)。この腸芽細胞(EB)は分裂せず、栄養吸収細胞(Enterocyte ; EC)へと分化する。EC は、核・細胞サイズともに非常に大きな細胞で、腸管組織の多くの面積を占めている平均して8倍体の多倍体細胞である(Zielke et al., 2014)。もう一方の中腸内分泌細胞(EE)はホルモンを産生している細胞で、ISC や EB と同様の二倍体細胞であり、腸組織内で2つずつ近い位置に存在することが多い(図 1. D、補足図 1. A, B)(Ohlstein and Spradling, 2006)。この2つ近接した EE は、産生するホルモンによって二種類のサブタイプに分類されている(図 1. A, A', B)(Ohlstein and Spradling, 2006)。成虫の中腸後方領域において、EE の対の一方では Allatostatin A(AstA)が発現し、他方では Tachykinin(Tk)が発現している (Ohlstein and Spradling, 2006)。さらに、Tk を発現する EE では Diuretic hormone 31(Dh31)も発現していることが明らかとなっている(Veenstra et al., 2008)。

このような背景のもとで、私は以下のような研究を進めてきた。まず、中腸内分泌細胞(EE)が2つのサブタイプに分かれることに着目し、その分化に関するような遺伝子を探索するため、トランスポゾンによるレポーター遺伝子のゲノム内転移を人為的に誘発し、エンハンサートラップした系統を得る実験を行った。そこで、*CG32234* 遺伝子上流に挿入された系統において、対になっている EE のみでレポーター遺伝子の発現が見られた(補足図 2. A 黄色楕円)。対になっている EE は AstA/Dh31 のどちらかのサブタイプと考えられる。この *CG32243* レポーター遺伝子発現と Prospero 抗体による2重標識を行うと、周囲の EE から離れた単独で存在する EE の存在を視認することができた(補足図 2.A 白矢頭)。この細胞は MDF4 (ゴキブリ由来でショウジョウバエ AstA サブタイプのマーカーとなる(未発表))に対する抗体や Dh31 抗体では染色できず、またその存在率は中腸後方領域に存在する EE 中1割以下であること

が観察からわかった。これらの結果から、これまでに知られていない新規のサブタイプである可能性が示唆された（以上、2011年第44回発生生物学会、第1回アジア太平洋ショウジョウバエ研究会にて発表）。

続いてこの *CG32243* 遺伝子発現と Notch シグナルとの関係について調べた。中腸幹細胞(ISC)において *Notch* を阻害すると ISC と EE の両者のみが過剰に増えること（腫瘍化）が報告されていたことから、*CG32243* レポーター系統において Notch シグナルのノックダウン実験を行い、レポーター遺伝子の発現を調べた。その結果、*Notch* ノックダウンでは *AstA/Dh31* を発現する中腸内分泌細胞(EE)の腫瘍も当然ながら観察される一方で、単独で存在する EE (*CG32243* 非発現 EE)が増加していた（補足図 2.B 白破線）。以上から Notch は、中腸幹細胞(ISC)/腸芽細胞(EB)/栄養吸収細胞(EC)/中腸内分泌細胞(EE)といった細胞タイプの分化を制御するのに加えて、EE のサブタイプ分化にも関与しているが、それは従来の知られていたシグナルの ON/OFF での分化制御ではなく、シグナルの強度によって制御するものであることを示唆する結果となった。これについては、その後他の研究者から報告がある (Beehler-Evans and Micchelli, 2015)。

次に、サブタイプ分化制御の延長として、Notch シグナル低下により腫瘍化した中腸内分泌細胞(EE)腫瘍内で *AstA/Dh31* サブタイプ分化に与える影響について研究を行った。その結果、腫瘍化した EE は分化異常となり、サブタイプ特異的発現をするはずのホルモンを共発現してしまう集団(*AstA* and *Dh31*) (補足図 3. A 白色破線)、共に発現が消失してしまう集団(補足図 3. A 緑色破線)、腫瘍化しても各サブタイプのみを発現を見せる集団(*AstA* or *Dh31*)に分かれることが判明した。さらにこれらの異常は腫瘍化が悪化すれば、より顕著にみられる症状であった。

このようなサブタイプ分化の異常は、正常状態なら起こりえない細胞の凝集によって引き起こされたのではないかと考え、腫瘍を解離させれば、サブタイプ分化を正常な EE に近づけることができるのではないかと考えた。そこで、当研究室で行った実験を参考にし(Maeda et al., 2008)、腫瘍細胞集団で *E-cadherin* の阻害を行えば、凝集化した細胞を散在させることができるのではないかと考えた。実験の結果、腫瘍化した EE を解離させることに成功した（補足図 4.B）。しかし、野生型のように *AstA/Dh31* サブタイプが対をなし、それぞれの細胞タイプ特異的なホルモンの産生を観察することはできなかった。その原因は、腫瘍化した細胞を解離させても、*Notch* の突然変異

体であるために、正常な分化状態にはなれない可能性や、*E-cadherin* の抑制状態にあるので細胞の形態や細胞極性が保てずにアイデンティティを失ってしまった可能性、またそもそも細胞タイプは分化初期に決定していて、あとから変更することができなくなっている可能性が考えられた。また、解離させた EE 数が野生型や解離前の個体に比べ少なくなったことから、阻害による *E-cadherin* タンパク量の減少が周囲の細胞との接着を弱め、解離できたはずの EE が腸管内腔側に排除されてしまった。いくつかの実験手法的問題点はあったが、EE は腫瘍化すると分化異常が起こすことから、それが散在して存在する意義が明らかになった（以上、2012 年第 35 回日本分子生物学会にて発表）。

その後、本研究では、消化管内環境因子を受容してホルモンを分泌する中腸内分泌細胞(EE)2種とそれらが作り出す脳腸ホルモンの腸産生画分に関する機能にも着目した。上記のように、ショウジョウバエの消化管で産生されている内分泌ホルモンは脳でも産生されている脳腸ホルモンである(Ohlstein and Spradling, 2006; Hergarden et al., 2012; Vanderveken and O'Donnell, 2014)。特に本研究で着目した Allatostatin-A は 8 から 13 アミノ酸からなるペプチドホルモンで、昆虫の脱皮や変態を制御するアラタ体抑制ホルモンとしてゴキブリの一種 *Diploptera punctata* において初めて同定された(Woodhead et al., 1989; Stay et al., 1992)。しかし、近年の研究において、ショウジョウバエでは脱皮・変態への効果はなく、摂食や睡眠、飢餓に対する耐性を制御しているという報告がある(Hergarden et al., 2012) (Kunst et al., 2014)。Dh31 は、同じゴキブリから見つかった 31 個のアミノ酸からなる利尿性ペプチドホルモンで、ショウジョウバエにおいてはマルピーギ管での水分の再吸収を制御していると報告されている(LaJeunesse et al., 2010) (Vanderveken and O'Donnell, 2014)。

本研究では、以下の結果を得ることができた。

まず、AstA 産生細胞と Dh31 産生細胞という 2 つのサブタイプが、今まで報告されてきたような対をなす特徴的な分布パターンを必ずしももたず、中腸後方領域内で対照的な勾配分布を見せていることに着目し、それらの機能的な対立を検証した (図 1. 2.)。

特に、これらのホルモンの作用のうち、今回新たに発見した全身性機能、すなわち組織-個体それぞれの老化に与える影響を調べた。その結果、中腸産生 AstA を特異的に阻害した場合は寿命が短縮し (図 3)、中腸の老化が早まり (図 4. B)、さらに AstA のレセプターを消化管上皮特異的に阻害した場合にも中腸の老化が早まり (図 5.)、このホルモン作用は EE から腸自身へ直接的にもたらされると考えられた。対照的に、腸産生 Dh31 を阻害した場合には寿命が延び (図 3)、加齢個体においても中腸の老化症状は観察されなかった (図 4.F)。また、Dh31 受容体の阻害でも、中腸老化の遅延を観察することができた (図 6)。しかし、生殖器官であるオス附属腺など、他の組織の老化に対する二つのホルモンの効果は、必ずしも中腸と同様ではなかった (図 7)。

本研究から以下の考察を考えた。

近年の研究では、老化により消化管自身の消化・吸収の機能低下は起きにくいと考えられている。具体的には、ラットにおいてD-キシロースの吸収実験を行ったところ、年齢による差は認められなかったという報告がある(Geokas et al., 1985)。また、哺乳類では小腸における食物の通過時間も若齢者と老齢者で差がないと報告されている(Geokas et al., 1985)。しかし、動物実験においてポリエチレングリコールを用いてその吸収を検討したところ、分子量の大きなものに対する透過性は老化個体において増加しており、年を取ると本来吸収しないはずの物質まで吸収してしまい、生体にとって不利な方向に傾くのではないかと考えられている(Geokas et al., 1985)。

これらのことから、ショウジョウバエ中腸においてAstAを阻害すると腸管内の糞便が滞留し、細菌や毒素によるダメージにより消化管が早期に老化することにより、異物の侵入を許してしまい、個体の寿命を短くしたのではないかと考えられた。また、Dh31阻害時には消化管が膨れていたことから、腸管内の水分量が上昇し、糞便に含まれる毒素の濃度低下による消化管へのダメージの低下から、個体の寿命は延びたのではないかと考えられた。

このように中腸において、産生細胞の局在性を異にする2種のホルモンが、逆の性質を見せる全身性機能＝寿命老化制御を組織特異的に果たしていることが明らかとなり、これはインスリンに代表されるような、各組織に共通する既知の仕組みとは異なる、新しい寿命老化制御の仕組みであると考えられる。

3. 実験方法と実験材料

ショウジョウバエ系統

*w*¹¹¹⁸,

esg-GAL4^{NP6267} (Hayashi et al., 2002),

NPI-GAL4 (*MyoIA-GAL4*) (Jiang et al., 2009),

how^{24B} (#1767.24B-*GAL4*) (Michelson, 1994),

ex-lacZ (#102189) (Karpowicz et al., 2010),

puc-lacZ^{E69} (Ring and Martinez Arias, 1993),

*tGPH*² (#8163) (Britton et al., 2002),

Act5c>y⁺>GAL4 (Ito et al., 1997),

Tub-GAL80^{ts.7},

UAS-GFP^{S65T}, *UAS-RFP*^{nl5}

UAS-Dh31R RNAi (#25925),

以上は、Bloomington Stock Center (University of Indiana)より取り寄せた。

UAS-AstA RNAi (v103215),

UAS-Dh31 RNAi (v37764 and v50296),

UAS-AstA-R1 RNAi (v101395)

以上は Vienna *Drosophila* RNAi Center より取り寄せた。

GBE + Su(H)m8-lacZ (Zeng et al., 2010) は S. Bray (University of Cambridge)、

Delta-GAL4 (Zeng et al., 2010)は Steven X. Hou (National Institutes of Health)、

prospero (pros)^{VI}-*GAL4* (Balakireva et al., 1998)は Jean-François Ferveur(University of

Burgundy)、*pros-lacZ*^{E-6-3-7}は V. Hartenstein (University of California Los Angeles)

midgut expression 1(mex1)-GAL4^{12.3} は Thomas Graham (University Park)

以上はそれぞれの方々から頂いた。

upd3-Redstinger は、当研究室の谷口喜一郎助教が作成したものを使用した。

作成方法は、*upd3* のエンハンサー領域(Jiang et al., 2011)を PCR で増幅し、*Bgl* II / *Xho* I 制限酵素で切断した *pRed-H-stinger* vector にクローニングした。作成した vector を p-因子挿入系統にインジェクションにより導入し、形質転換を行った。

組織・細胞特異的強制発現 < GAL4 / UAS システム >

GAL4/UAS システムは任意の遺伝子を組織・細胞特異的に強制発現可能なシステムである(Brand and Perrimon, 1993)。この手法では、出芽酵母の転写因子 GAL4 を任意の時空間的パターンで発現可能な系統と、GAL4 の標的 DNA 配列 UAS (upstream activation sequences) の下流に発現させたい遺伝子を連結した系統とを掛け合わせることで、次世代において遺伝子発現を誘導することが可能である。

本実験で用いた *esg-GAL4* は ISC/EB、*pros-GAL4* は EE、*NPI-GAL4* は EC、*delta-GAL4* は ISC、*24B-GAL4* は中腸を取り巻く環状筋で特異的に発現する GAL4 系統である。

時期特異的な遺伝子強制発現 < TARGET システム >

上記の GAL4/UAS システムに、GAL4 の働きを阻害する GAL80 の温度感受性変異体 GAL80^{ts} を加えた実験系を用いた(TARGET システム(McGuire et al., 2003))。GAL80^{ts} は、18°C では GAL80 の活性があるため GAL4 の UAS への結合を抑制するが、29°C では GAL80 の活性が失われるために GAL4/UAS システムが働く。

成虫で時期特異的に強制発現させる場合は、掛け合わせの時期から 18°C で飼育し、羽化後の成虫を 29°C の飼育環境下にシフトした。

RNA 干渉法

二本鎖 RNA が特定の mRNA を分解させる現象を利用した遺伝子抑制手法。標的とする遺伝子と同じ塩基配列を片方の鎖にもつ二本鎖 RNA を細胞内に導入すると、RNase の一種 Dicer によって部分分解され、低分子の siRNA となる。この siRNA がタンパク質複合体である RISC に結合しつつ、標的 mRNA を捕捉し、この mRNA が特異的に分解されて翻訳が抑制される。

この RNA 干渉実験においてショウジョウバエで多用される方法では、GAL4/UAS システムの UAS に特定の遺伝子の逆位反復配列(inverted repeat)を繋いで発現させ、その mRNA がヘアピン型二本鎖を形成することによって RNA 干渉をひき起こし、任意の遺伝子抑制が出来る。

クローン解析 (<Flip out 法>,<MARCM>)

<Flip out>

GAL4-Flip out 法(Ito et al., 1997)を用いて、遺伝子強制発現クローンを成虫中腸に作成した。羽化後、成虫に 37°C 熱ショックを 20 分間与えて、Flip out を誘導し、その後 7 日間~14 日間飼育し、クローンを成長させ、解剖を行い観察した。

<MARCM> (Lee et al., 1999)

MARCM (Mosaic Analysis with a Repressible Cell Marker)は、突然変異ヘテロ接合体の相同染色体間を組換えて作成された突然変異ホモ接合体クローンのみを GFP で標識するなど、変異体クローン内において GAL4/UAS システムによる遺伝子強制発現を可能にする手法である。

目的の遺伝子型個体では、FLP(組換え酵素)/FRT(FLP 標的組換え DNA)システムによって、体細胞分裂直前 (G2 期) に姉妹染色分体間かつ相同染色体間の組換えを誘発すると、野生型ホモクローンと突然変異体ホモクローンを二つの娘細胞のそれぞれに発生させられる。このとき、同じ染色体腕上に Tub-GAL80 をあらかじめ導入しておくことによって、突然変異体ホモクローン内では Tub-GAL80 が存在せず、GAL4 を活性化できるので、UAS 下流に繋いだ遺伝子の強制発現が温度依存的に可能となる。

<Transmission electron microscopy (TEM)>

成虫の中腸を解剖し、2%グルタルアルデヒド/0.1M リン酸バッファーで前固定し、その後 2%OsO₄/0.1M リン酸バッファーで後固定を行った。固定後、Quetol-812 resin (Nisshin-EM) で包埋し、70nm の超薄切片を作成した。染色には酢酸ウランを使用し、観察には JEM-1200EX (JEOL)透過型電子顕微鏡を電圧 80kV で使用した (東海電子顕微鏡解析社による)。

<semi Reverse Transcription- Polymerase Chain Reaction (semi RT-PCR)解析>

AstA/Dh31 ノックダウン効果の検証

羽化後7日目の雌(5匹)を氷上で解剖し、脳と腸をそれぞれ摘出し、NucleoSpin RNA XS Kit (TaKaRa)を用いて mRNA を抽出した。PrimeScript RT-PCR Kit (TaKaRa)を使い mRNA から oligo(dT) プライマーで逆転写した。得られた全 cDNA 各サンプルを鋳型として、Rp49 cDNA をリファレンスとして各々増幅させて合成量を測り、全 cDNA 各サンプル間の cDNA 濃度を、希釈によって揃えた。具体的には、以下の手順で行った。Extaq HS(TaKaRa)を使い、各鋳型 cDNA に対して、98°C-10 秒、55°C-1 分、72°C-1 分の PCR 温度条件で、Rp49 プライマーで 24,26,28,30,32 サイクル時の PCR 産物を取り出し、アガロースゲルに泳動し EtBr 染色したゲルのバンドの濃さを Image-J を用いて計測し、グラフを作成し、検量線を引いた。そのグラフの傾きから鋳型 cDNA の相対的濃度を計算してサンプル間で比較し、濃度合せを行った。

Rp49-Fwd, ATCGGTTACGGATCGAACAA;

Rp49-Rev, GACAATCTCCTTGCGCTTCT;

濃度調整した鋳型 cDNA を用いて、*AstA*, *Dh31* の発現量を脳と腸それぞれで比較した。

AstA-Fwd, TGTC AACGTGCCACAGG;

AstA-Rev, CACTCTGTAGTCGATCTCGTTG;

Dh31-Fwd, TGCAGTCAGCAGCAGTAACG;

Dh31-Rev, TGCGATGTTTCGCCTCCTG.

upd1, 2, 3 の若齢個体の中腸での検出

成虫の雌雄それぞれ2匹(合計4匹分)の中腸を解剖して摘出し、上記の方法により mRNA 抽出、cDNA 合成、cDNA 濃度調整を行った。濃度調整した鋳型 cDNA を用いて、*upd1*, *upd2*, *upd3* の発現量比較を行った。

upd1-Fwd, TCAGCTCAGCATCCCAATCAG;

upd1-Rev, ATAGTCGATCCAGTTGCTGTTCCG;

upd2-Fwd, TGCTATCGCTGAGGCTCTCG;

upd2-Rev, GACTCTTCTCCGGCAAATCAGA;

upd3-Fwd, AAATTGAATGCCAGCAGTACG;

upd3-Rev, CCTTGCTGTGCGTTTCGTTTC.

<寿命測定>

羽化した成虫を、羽化した日ごとに分け、25°Cのインキュベーターで飼育した。2～3ごとに新しい餌のバイアルに移し替え、死亡した成虫の数を数えた。生存曲線のグラフは初めのバイアルに入れた成虫の数を100%として、生存率を5日ごとにまとめたものである。

<老化細胞の検出>

Senescence β -Galactosidase Staining Kit (Cell Signaling Technology Inc.)を用いて、羽化後7日（若齢個体）と28日目（老齢個体）に解剖して取り出した附属腺とマルピーギ管を染色した。

<抗体標品名、由来および組織染色使用時の希釈濃度>

1次抗体：

Mouse anti-dpERK (Invitrogen, 1:100),

Mouse anti- β -galactosidase (Promega, 1:200),

Chicken anti- β -galactosidase (Abcam, 1:500)

Mouse anti-Rat CD2 antibodies (Serotec, 1:200),

Mouse anti-Prospero (DSHB, 1:100),

Mouse anti-AstA(DSHB,1:10),

Mouse anti-Armadillo (DSHB, 1:100),

Mouse anti-Delta (DSHB, 1:100),

Rat anti-GFP (nakalai tesque, 1:500)

Chicken anti-mCherry (EnCor, 1;1000)

Rabbit anti-DH31 (1:500, Dr Jan Veenstra より譲渡).

Rabbit anti-MDF4 (1:200, 神戸大学 竹田真木生 教授 (当時) より譲渡)

2次抗体：

Donkey anti-mouse IgG Cy5-conjugated,

Donkey anti-mouse IgG Alexa Fluor 555-conjugated,

Donkey anti-rat IgG Alexa Fluor 488-conjugated

Donkey anti-chicken IgG DyLight649-conjugated

Donkey anti-rabbit IgG Alexa Fluor 647-conjugated

(以上の2次抗体はすべて Jackson ImmunoResearch 社由来),

<免疫蛍光染色>

二酸化炭素で麻酔をかけた成虫の頭と翅と肢を取り去り、残りの胴体を解剖皿中の1×PBSに移し、先尖ピンセット (Fontax No.5) を使って首の穴から肛門まで腹側を裂き、脂肪体や生殖巣を取り除き、消化管のみを採り出して、固定液 (4%パラホルムアルデヒド、1×PBS) で40分固定した。固定後、固定液を除去しPBT (0.1% Triton-X、1×PBS)で洗った(液交換3回→15分静置→液交換3回)。PBTを除去後、消化管を1次抗体溶液に浸け、室温で2時間(または4℃一晩)反応させた。1次抗体除去後PBTで洗い(同上)、2次抗体溶液で室温1時間反応させた。2次抗体除去後、PBTで洗い(同上)、共焦点レーザー顕微鏡 (Nikon “ECLIPSE TE2000-U” with “Digital ECLIPSE C1 & C1Si”) で蛍光像を観察した。

4. 結果

中腸後方部における内分泌細胞のサブタイプ分化

ショウジョウバエ中腸には組織幹細胞が存在し、シンプルな細胞分化経路もわかっている。(図 1.A) (Ohlstein and Spradling, 2007)。中腸組織は、図 1. B で示すような ISC/腸芽細胞(EB)/栄養吸収細胞(EC)/中腸内分泌細胞(EE)が構成する単層上皮と基底膜(灰色線)とこれらを取り巻く環状筋(オレンジ楕円)から構成されている(Micchelli and Perrimon, 2006) (Ohlstein and Spradling, 2006)。中腸後方部(PMG: posterior midgut)の中腸内分泌細胞(EE)は、2個ずつが近接するペアとなって分布することが多く(図 1.E,E', 補足図.1)、ペアのそれぞれは AstA を発現するサブタイプと Dh31 を発現するサブタイプであるといわれてきた(Ohlstein and Spradling, 2006) (Beehler-Evans and Micchelli, 2015)。しかし、詳細な観察の結果、そのようなヘテロな対をなすペアは、PMG の中央部(領域 4-6)に多い(図 2.中段)だけで、その他の領域では必ずしもそうでないことを明らかにした。即ち、各サブタイプの密度は逆位相の勾配を作り、例えば、図 1.C の写真左側の方(前方部)では Dh31 サブタイプが多く、右側(後方部)に行くにしたがってその密度が減る。一方、AstA サブタイプの密度は Dh31 サブタイプのそれとは逆の勾配を示す(図 1.C)。詳細な AstA/Dh31 の細胞分布の解析は図 2。

しかし、これらの EE のサブタイプ頻度は常に一定であるわけではなく、老化に伴ってどちらでもないサブタイプの数が増えるなど、変化が生じることが分かっていた(補足図 5) (鈴木絵理佳 2013 年度卒業論文)。EE 以外においても、加齢に伴い ISC が過剰に増殖し、上皮層の多層化や腸全体の短縮化が起こることが当研究室の過去の結果から明らかとなっている(Biteau et al., 2008; Choi et al., 2008; Okumura et al., 2014)。

さらに、*AstA* や *Dh31* の突然変異体では、睡眠時間の変化や摂食、飢餓に対する耐性に変化を及ぼすことが報告されている(Hergarden et al., 2012) (Kunst et al., 2014) (Hentze et al., 2015)。しかしながら、両ホルモンともに中枢神経系と消化管とに産生細胞がある、いわゆる脳-腸ホルモンであり、これらの機能は主に脳産生画分の機能であると考えられるため、中腸から産生されるホルモンの機能については、明らかになっていなかった。そこで、これらホルモンの成虫中腸での機能を調べる目的で、GAL4/UAS システムを用いて、成虫中腸の内分泌細胞(EE)特異的にホルモンの産生をノックダウンする実験を試みた。

まず、成虫中腸の中腸内分泌細胞(EE)で特異的に発現する GAL4 系統である *pros^{VI}-GAL4* (Balakireva et al., 1998) (以下 *pros-GAL4*) に *UAS-GFP* を掛け合わせ、25°C の環境下で飼育し、羽化後 7 日目の個体の中腸を摘出し、組織免疫染色法を用いて *AstA* 抗体と *Dh31* 抗体による共染色を行い、共焦点レーザー顕微鏡で観察した。中腸後方部において全 EE で GFP が発現し、そのうちの一部で *AstA* が、残り *Dh31* が発現している (図 1. D, E)。ここで *UAS-AstA^{IR}* を *UAS-GFP* と共発現させた場合には、*AstA* のみが検出されなかった (図 1. F, G)。また、*UAS-Dh31^{IR}* を共発現させた場合には、*Dh31* のみ検出できなくなり (図 1. H, I)、各ホルモンの遺伝子特異的ノックダウンが成功していることが確認できる。さらに、これらの系統の中腸を解剖して、mRNA を抽出し、RT-PCR を行い、*AstA* と *Dh31* の発現量が低下していることを確認した(補足図 6.B)。また、脳では *pros-GAL4* の発現パターンと *AstA/Dh31* 発現神経が一致しない。さらに *pros>AstA^{IR}*, *pros>Dh31^{IR}* 個体の脳を抗体免疫染色したところ、脳でのホルモン産生細胞(neurosecretory cells : NSC)ではコントロール個体(*pros>GFP*)と比較してもノックダウンの効果は見られなかった(補足図 6. A-C)。神経伝達物質として働く *AstA* や *Dh31* に関しては検出が困難であったために明確には言えないが、RT-PCR の結果から脳でのノックダウンはほとんど効果がなかった(補足図 6.D)と言え、*pros-GAL4* を用いた当実験では、EE 特異的ノックダウンに成功したと考えられる。

また、本実験を行う前に、*tub-GAL80^{ts}* を組み合わせて、幼虫時期では *UAS-AstA^{IR}* や *UAS-Dh31^{IR}* の発現を抑制し、成虫時期にのみホルモン産生ノックダウンをひき起こす遺伝子型を作成し、同様の観察を行った結果、図 1 に示した結果と同様の結果が得られた (データ未掲載)。そのため、以下に掲げる実験では、*tub-GAL80^{ts}* を用いない実験で統一している。

AstA と Dh31 ノックダウンによる個体の寿命変化

AstA の突然変異体では飢餓に対する抵抗性が低下し、また Dh31 突然変異体では睡眠時間が伸びることが報告されていた(Kunst et al., 2014) (Hentze et al., 2015)。このような飢餓耐性や睡眠時間の変化は、最終的には寿命の変化につながると考えた。そこで、中腸においてホルモンの特異的なノックダウンした場合の寿命の計測を行った。飼育条件として、25°Cのインキュベーター内で2-3日毎に餌を替え、5日毎の成虫の数を計測した。また、GAL4 系統と UAS 系統との掛け合わせで得た F1 個体のグループ(original)と、さらに F1 を w^{1118} と戻し交配して得た F2 のグループ(backcrossed)を用意し、それぞれの寿命を測定した。戻し交配を行うことで系統間の遺伝的バックグラウンドの差から生じる寿命への影響を減らすことができる。

コントロールとして、*pros-GAL4* で GFP のみを強制発現させた系統を使用した (図 3. A 緑線: original と緑破線: backcrossed)。コントロール系統の 50%生存率は 46 ± 1.45 日(*pros>GFP* original)あるいは 48 ± 4.38 日(*pros>GFP* backcrossed)であった。それに対し、AstA をノックダウンした場合は、50%生存率が 34 ± 1.00 日(*pros>AstA^{IR}* original)あるいは 32 ± 5.11 日(*pros>AstA^{IR}* backcrossed)であり、有意に短命化した (図 3. A 赤線及び赤破線)。一方、Dh31 をノックダウンした場合は 50%生存率が 64 ± 4.70 日(*pros>Dh31^{IR}* original)あるいは 62 ± 1.49 (*pros>Dh31^{IR}* backcrossed)であり、有意に長命化した (図 3. A 青線及び青破線)。

AstA ノックダウンにより腸の老化は促進、*Dh31* ノックダウンにより腸の老化が遅延

脳において *AstA* 発現神経の興奮は摂食行動を抑制し(Hergarden et al., 2012)、*Dh31* 発現神経の興奮は睡眠時間が短縮する(Johnson et al., 2005)ことで、成虫の寿命に影響が出ると考えられている。しかし、中腸内分泌細胞(EE)の周囲には神経は隣接していないため(補足図 6.E)、これらのホルモンによる寿命への効果は、神経ネットワークでの制御とは異なる現象であると考えられた。最も可能性が考えられた単純なしくみは、EE で発現したこれらのホルモンが血液中に放出され、体内を循環の後、標的器官に作用することであった。

そこでまず、中腸で産生されたホルモンは中腸自身に作用し、中腸の老化を制御すると仮定して、寿命の変化とともに中腸細胞の老化に影響があるかを検証した。老齢個体や早期老化した個体では *Delta* の発現細胞の増加や凝集、また本来 *Delta* が発現しないはずの栄養吸収細胞(EC)での異所的発現が報告されていた(Biteau et al., 2008) (Choi et al., 2008) (図 4.E)。中腸特異的 *AstA/Dh31* ノックダウン系統の羽化後 7 日と 21 日目の個体をそれぞれ解剖し、中腸幹細胞(ISC)マーカーである *Delta* 抗体染色を行い、観察した。

羽化後 7 日目のコントロールと *AstA* ノックダウン、*Dh31* ノックダウン個体間で比較したところ、差は観察されなかった(図 1.D, F, H)。しかし 21 日目では、コントロール個体の *Delta* 陽性細胞である中腸幹細胞(ISC)が散在するのに対し、*AstA* ノックダウン個体では ISC が集まる腫瘍化が観察され、さらに栄養吸収細胞(EC)のような核が倍加した細胞でも *Delta* の異所的発現が観察された(図 4. B)。一方で、*Dh31* をノックダウンした場合は、ISC の散在性は失われなかった(図 4. C)。この系統を 28 日目まで飼育した場合でも老化症状は観察されず(図 4. F)、より加齢にした 42 日目の個体では *Delta* の異所的発現が観察された(図 4. G)。

加えて、M 期マーカーである pH3 抗体染色を行い、PMG あたりの M 期細胞の数を計測した結果をグラフにまとめた(図 4. D)。成虫中腸後方部における pH3 陽性細胞数を t 検定を用いて解析した。グラフからも 21 日目の *AstA* ノックダウン個体では、M 期細胞が過剰に出現しており、加齢に伴う ISC の過剰増殖と同様の様子を示した(図 4. D マゼンタ)。一方、コントロールに比べ *Dh31* ノックダウン系統は、若い個

体でも M 期細胞の出現がコントロールよりも減少し、老化制御とは別に、ISC の増殖を抑えていると考えられた (図 4. D シアン)。

先行研究において *AstA* と *Dh31* の消化管での機能は、摂食や利尿作用に関して拮抗して働くことが示されていた(Veenstra, 2009; Vanderveken and O'Donnell, 2014)。そこで、中腸で発現する *AstA* と *Dh31* の拮抗性を検証するために、*AstA* と *Dh31* を同時にノックダウンする実験を行った。この場合は、多くの個体で *AstA* 単独ノックダウン時にみられるような、腫瘍化や異常な *Delta* の発現は観察されず、*Dh31* ノックダウンの表現型が優先的に表れた (補足図 9)。この意義については、後に考察する。

また、*Dh31* の機能として利尿作用を促進することから、リガンドである *Dh31* ノックダウン個体では腸内の水分調節に何らかの影響が生じていると考えられた。その為、*pros>Dh31^{IR}* 個体の腸の全体を観察し、中腸の太さを計測したところ、28 日目の個体ではコントロールに比べて極めて太くなっていた(補足図 10.D)。

中腸における AstA/Dh31 受容体は腸の老化を制御している

リガンドである AstA/Dh31 が中腸幹細胞(ISC)の増殖に関与しており、ホルモンの標的細胞は中腸上皮に存在することが示唆された。また、他の研究グループの先行研究において、中腸の各領域の RNA-seq 解析を行って、発現遺伝子の領域特異性が報告がされている(Marianes and Spradling, 2013) (Veenstra and Ida, 2014)。これによれば、AstA の受容体である *AstA-RI* の発現はリガンドである AstA と同様のパターンで発現している。その為、中腸におけるホルモンの受容体細胞の探索を行った。

まず、中腸の各細胞種やそれを取り巻く環状筋で特異的に発現している GAL4 系統を用いて、AstA 受容体と Dh31 受容体のそれぞれのノックダウン実験を行った。

AstA 受容体をノックダウンし、羽化後 14 日目の個体を観察したところ、腸芽細胞(EB)特異的にノックダウンした場合に、リガンドである AstA をノックダウンした時と同様の ISC 腫瘍化や倍加細胞での Delta の異所的発現を観察し(図 5. C, F 黄色矢頭)、統計的にも有意な差が見られた(図 5, H)。このことから、AstA の受容体は EB に存在すると考えられる。それでも AstA 受容体をノックダウンしたいずれの系統でも、寿命短縮効果は生じなかった(図 5G)。

Dh31 受容体をノックダウンした場合には、加齢個体においても過剰な細胞増殖を起こりにくくさせると予測し、羽化後 28 日目の個体をそれぞれ観察した。28 日の自然老化個体として図 4.E をポジティブコントロールとする。その結果、*esg-GAL4*, *Dl-GAL4*, *Su(H)+GBE-GAL4*, *NPI-GAL4* で Dh31 受容体をノックダウンした場合に、過剰な中腸幹細胞(ISC)の増殖や腫瘍化が抑制され(図 6D-G)、統計的な解析を行った結果(図 6, H)も中腸幹細胞(ISC)/腸芽細胞(EB)、栄養吸収細胞(EC)に Dh31 受容体が存在することを示唆している。

附属腺とマルピーギ管の老化に対する影響

中腸に対する老化制御は、*AstA* ノックダウンでは促進し、*Dh31* ノックダウンでは抑制に働き、寿命制御と対応することが示唆された。そこで、これらの中腸ホルモンが他の組織の老化に対しても同様に作用するかどうか検証を試みた。まずは、中腸と後腸の境目に接続し、哺乳類の腎臓に類似した浸透圧調整器官として働く、マルピーギ管に着目した。先行研究では、*Dh31* の受容体はマルピーギ管に存在し、水分の再吸収を制御していることが報告されている(Vanderveken and O'Donnell, 2014)。次に、雄の内部生殖器の一つで、細胞死耐性や老化耐性を持つ臓器であることが知られている(谷口ら未発表)附属腺にも着目することにした。附属腺は、栄養状態に依存して成長する組織であることが示されており(Wigby et al., 2009)、中腸とは密接なつながりがあると考えられた。中腸において *AstA/Dh31* をノックダウンした場合の、これら二つの器官の老化状態を、Senescence β -Galactosidase Staining Kit (Cell Signaling Technology Inc.) を用いて検証した。

羽化後 7 日目と 28 日目の成虫雄を解剖して附属腺とマルピーギ管を取り出し、Senescence β -Galactosidase を発現する老化細胞(青)を検出した。なお、附属腺に隣接した輸精管(ed)の部分では、老化した細胞と関係なく、濃い青色の染色が検出されやすい(図 7. A-F)。観察の結果、中腸で *AstA* をノックダウンした場合には、コントロールと比較しても有意な差は見られなかった(図 7. C, D)。中腸で *Dh31* をノックダウンした個体の附属腺では、28 日目の個体において老化細胞が数多く観察され、コントロールよりも老化が早まっていることがわかった(図 7. F, F')。一方、マルピーギ管においては、コントロールと比較して老化細胞の出現頻度に差は見られなかった(図 7. G-L)。これらの事実は、中腸ホルモンによる器官の老化制御は、器官の種類によって大きく異なり、逆の効果をもたらす場合すらあるという意外な事実を示している。

インスリンシグナル非依存的な老化

昆虫を含め、多くの高等多細胞動物の寿命を決める最大の液性因子はインスリンあると考えられている。例えば、インスリンシグナル経路上のインスリン受容体基質である *chico* の突然変異体では、個体の寿命が野生型に比べ、141%も長寿化することが知られている(Clancy et al., 2001)。

AstA/Dh31 それぞれをノックダウンした場合に、器官の間で異なった老化効果が生じることは、これらの制御に液性因子のインスリンが関与していないことを示唆している。そこで、これらのホルモンのノックダウンの際の、インスリンシグナル活性を検証することを試みた。もしも、インスリンシグナルが関与しているのだとしたら、*AstA* ノックダウン個体ではインスリンシグナル強度が上昇し、他方で *Dh31* ノックダウン個体ではインスリンシグナル強度が上昇しにくくなっていると考えられた。インスリンシグナル強度の検出には、インスリンシグナルの活性化に応答して細胞膜局在する *steppke /Grp1* の PH ドメインと GFP を融合した tGPH を用いた (補足図 8)。PH ドメインをもつタンパクはインスリンシグナル活性化時に PI3K によって細胞膜に輸送され、細胞膜に局在することが知られている。しかし、*AstA/Dh31* ノックダウン個体はコントロールと比較してもインスリンシグナルに関する応答性に違いは見られなかった (補足図 8. B, C)。このことは、*AstA* と *Dh31* ノックダウンが引き起こす寿命の変化は、インスリンシグナル非依存的であり、老化を制御する新しいしくみの発見である可能性がある。上述のように、これらのホルモンによる制御は、中腸と附属腺に対して効果が逆になることから、インスリンを介したような一律的な制御ではないことが興味深い。

極度な腸の機能低下は寿命を短命化させる

腸が老化することで中腸幹細胞(ISC)などの未分化細胞が増え、そのことで栄養吸収細胞(EC)が減り、栄養の吸収率が低下し短命化が起きることが予測されたため、腸の極端な機能低下をひき起こしているかどうか検証する目的から、先行研究においてISCの増殖とECの成熟に必要であることが判明している転写因子 *GATAe* に着目した(Okumura et al., 2016)。

esg-GAL4 を用いて、胚発生初期から *GATAe* をノックダウンすることで、成虫の中腸が短くなる(Okumura et al., 2016)。ノックダウンの強度により、ECの分化・成熟マーカーである *Pdm1*(補足図 7.B' 黄矢頭)を発現する細胞は一部に留まり、成熟しきれていないECが増加する(補足図 7.B' 白矢頭)。補足図 7.D ではこのような個体の寿命を測定した。*GATAe* ノックダウン個体(黒線)では、おそらくは腸の栄養吸収機能が著しく低下することにより、コントロール(緑線)に比べて寿命が短縮した。

しかし、図 5.C, F のように、*AstA* 受容体のノックダウンで中腸の老化は促進されているが、寿命に変化が無かった(図 5.G)ことを考えると、*AstA* ノックダウンによる腸の早期老化に伴う機能不全だけでは、寿命の短縮に与えるほどの影響は引き起こさないと考えられる。

AstA ノックダウンは、**JNK** シグナル活性化、**Upd3** を介した **JAK/STAT** シグナル活性化、**Hippo** シグナルを不活性化させることで、幹細胞の過剰な増殖を引き起こし、早期老化症状を誘発させる

自然老化時に中腸では中腸幹細胞(ISC)マーカーである *Delta* の発現が異所的になり、分裂細胞の割合が上昇し、多層化やISCの凝集が起こることが報告されている(Biteau et al., 2008; Choi et al., 2008)。それらは、中腸にストレスを与えた場合にも見られる傾向であり、その際にはJNKシグナル(Biteau et al., 2008)、JAK/STATシグナル(Jiang et al., 2009)、Hippoシグナル(Karpowicz et al., 2010)が関与していることが報告されている。特に、ストレスを受けた腸では未分化な栄養吸収細胞(early-EC)からUpdファミリーのタンパク質性リガンドが放出され、ISCのJAK/STATシグナルが活性化することで、ISCの増殖を誘導すると報告されている(Jiang et al., 2009; Okumura et al., 2014)。本実験ではFLP-out法を用いて、羽化後にAstA受容体をノックダウンし、早期老化細胞クローンを誘導して、上記の各シグナル応答がここでも起きているのかどうかについて検証を試みた。

まずは、JNKシグナル活性に応じて発現するレポーター遺伝子である *puc-lacZ* の発現を観察した結果、ISC/EBにおいてJNKシグナルの活性化が観察された(補足図 11. B マゼンタ)。また、JNKの活性化は細胞非自律的であることが観察された(補足図 11. B 黄色矢頭)。従って、JNKの活性化を周囲に伝播していくシグナルが存在することが示唆され、先行研究において報告があるレプチン様リガンドUpd1、2、3を介したJAK/STATに着目した(Karpowicz et al., 2010)。

先行研究では Upd ファミリーのタンパク質性リガンドが中腸上皮の損傷を伝える際に主要な役割を果たすと報告されていた。まず、そのリガンドが、Upd ファミリーメンバーである Upd1、2、3 のいずれであるか検証した。AstA をノックダウンした個体での各種 *upd* 発現量を検出した (補足図 11.B)。その結果、コントロールと比較して *upd3* の発現上昇が明らかとなった。さらに、flip-out 法を用いて、成虫中腸内に *AstA-R1* をノックダウンしたクローンを作りだし、*upd3* のレポーター系統の発現を観察したところ、細胞自律的かつ非自律的に発現が観察された (補足図 11.C)。

また、同様に Hippo シグナル強度に相反した発現を示すレポーター系遺伝子である *ex-lacZ* の発現を観察したところ、これについても、細胞自律的かつ非自律的に発現が観察された (補足図 11.D)。

5. 考察

AstA/Dh31 の中腸における逆位相勾配の意義

国外の研究者によるこれまでの研究により、中腸幹細胞(ISC)から連続して2つの中腸内分泌細胞(EE)が作られ、一方が AstA を発現し、もう一方が Dh31 を発現するようになると考えられてきた(Ohlstein and Spradling, 2006)。しかし、本研究の初期段階において、この現象が起こっているのは中腸後方領域の中央部付近だけであることを示唆する結果を得た。それはつまり、前後軸に沿って AstA と Dh31 が逆位相の細胞分布勾配を形成しており、肛門側では AstA がより多く、前の方に行くにしたがって Dh31 がより多くなるため、上述した ISC からの分裂・分化制御では、逆位相勾配の中央付近しか説明できないことを意味している(図 1.C, 図 2)。

中腸内分泌細胞(EE)の散在性は、中腸の口側-中央-肛門側の全領域において違いは見られない。そして、産生されるホルモンも一定量の発現である。しかしながら、なぜ AstA と Dh31 の産生細胞は逆位相の勾配を形成しているのか。先行研究において、AstA も Dh31 も体内の水分調節を制御するホルモンであることが示されている。もし仮に、これらのホルモンが同一細胞から機械的に産生・分泌される場合は、精密な調節性の分泌経路を使わない限り、相反する機能を持つホルモンが同時に放出される可能性がある。それよりも、前後軸に沿って異なる分布を示す異なるサブタイプから放出される方が、内腔から受けた刺激に対する応答をより正確に発揮でき、個体にとっては適切だと考えられる。

実際に AstA/Dh31 の発現パターンは、PMG において前側で Dh31 が多く (図 1.C, 図 2.)、これは、Dh31 が腸内の水分量を下げること新鮮な栄養を腸に吸収させようとしている為だと考えられる。一方、後側では AstA が多く、こちら側では不要になった糞便が溜まることから、腸管内容物がこの領域に進んでくると水分量を増やし、内腔の堆積物を積極的に排泄しようと AstA が機能していると考えられる。

個体寿命と組織老化に対して AstA と Dh31 の間にある拮抗的制御

本研究において、中腸が産生する AstA と Dh31 が、個体の寿命に対して拮抗して働くことがわかった (図 3.A)。これまでも、この 2 つのホルモンは摂食や利尿作用、腸の蠕動運動、消化酵素の放出を拮抗的に制御していることが、多くの昆虫を用いた研究から示されていた(Duve and Thorpe, 1994; Audsley et al., 2008)(Furuya et al., 2000)。腸ホルモンに対するこれらの知見は、腸ホルモンが腸自身に対して作用することを示唆しているが、その作用が直接なのか間接なのか、さらに直接なら腸上皮のいずれの細胞種を標的としているのか調べられた研究はこれまでになかった。本研究では、それぞれの中腸ホルモンの受容体をノックダウンする実験から、これらの作用は神経を介するような間接的なものではない直接的なものであることが示され、また、AstA の標的細胞は腸芽細胞(EB)で、Dh31 の標的細胞は中腸幹細胞(ISC)/EB/栄養吸収細胞(EC)であることを特定した (図 5.5.)。

しかしながら、中腸の EB において AstA 受容体をノックダウンし中腸老化を促進させた場合では、リガンドである AstA のノックダウンの実験とは異なり、寿命は短縮しなかった (図 6.G)。このことは、AstA ノックダウンによる中腸の老化制御=個体の寿命制御ではないことを示唆する。

しかし、老化による中腸の著しい機能低下は、個体の寿命を短縮させないということは考えにくいので、AstA ノックダウンによる早期老化との比較を行う目的で、中腸の著しい機能低下を対照実験として作出してみた。この場合、ISC 維持や EC の分化と成熟に必須の転写因子である *GATAe* を、*esg-GAL4* を用いることにより ISC/EB においてノックダウンし、寿命を測定した (補足図 7)。その結果、寿命が極端に短くなった (補足図 7.D)。その要因は中腸全体に渡って栄養吸収細胞(EC)の成熟が遅れ、中腸全体が短くなり、栄養吸収が極端に悪くなったことであると考えられる。AstA 受容体ノックダウンでは過剰な中腸幹細胞(ISC)の出現や分化異常は起きるが、栄養吸収細胞(EC)が極端に減少することはなかった (補足図 8)。これらのことが示唆するのは、AstA ノックダウンによる老化促進の場合、著しい栄養吸収の不足は起きないということを示唆する。

老化に対する効果の組織間における違い

本研究では、中腸ホルモンによる腸-他組織間の応答の異同を調べるため、雄内部生殖器官の一つである附属腺の老化に対する効果についても調べた。その結果、Asta/Dh31 ノックダウン時の中腸と附属腺の老化応答は、逆の方向であった (図 5.)。

昆虫の雄において中腸と附属腺の生理的活動には、どちらも多くのエネルギーが必要である。例えば、栄養状態 (エネルギー摂取量) と附属腺の活性化には相関関係がある。よりたくさんの栄養を摂取できるほど、附属腺は性ペプチドをよりたくさん作ることができ、雄は子孫を残しやすくなると報告されている (Wigby et al., 2009)。これはつまり、附属腺に多くのエネルギー投資をできれば、個体として他の雄よりも優位に立てるので、雄は余剰のエネルギーをすべて附属腺に投資するであろうという仕組みの存在に基づいている。

Dh31 をノックダウンした場合には中腸自身の老化は遅延したが、附属腺の老化は促進した。なぜ、2つの組織間で応答が異なるのか考えると、個体のもつ総エネルギーの各組織への分配が関与するのではないかと考えられる。つまり、上述したような理由から、中腸と附属腺の間でエネルギー投資率のトレードオフが起きていると推察される。Dh31 をノックダウンした場合には、腸の利尿作用が減り、腸内の水分量が増すことで中腸上皮に接する食物 (糖やタンパク質) の濃度が下がる。これがあたかも低栄養状態と同じになり、腸の生理的活動に対するエネルギー投資率は低くなる。そして、余剰なエネルギーの投資先が附属腺なり、附属腺の活動が活発になることで、附属腺の老化はより促進されたと考えられる。

また、Dh31 ノックダウンの腸は野生型の腸と比較しても、インスリンシグナル活性の差が見られないことも、腸-附属腺間のエネルギー分配トレードオフを示唆している (補足図 8.)。もし仮に、腸でインスリンシグナル活性が下がると、血液中を循環するインスリンの影響により、附属腺のインスリンシグナルも同時に低下するはずなので、附属腺の早期老化は見られないと予測できる。

同様に、AstA ノックダウンでは、ISC 増殖が促進されたことから、中腸に対してエネルギー投資が過剰になり、附属腺の活動は低下しているのではないかと予測している。このことに関しては、今後さらなる研究が必要である。

これらの理由から、腸ホルモンは個体のもつエネルギー分配を制御することで、腸-附属腺に対するエネルギー分配のトレードオフをもたらす新しい概念を創出する可能性がある。

6. 図

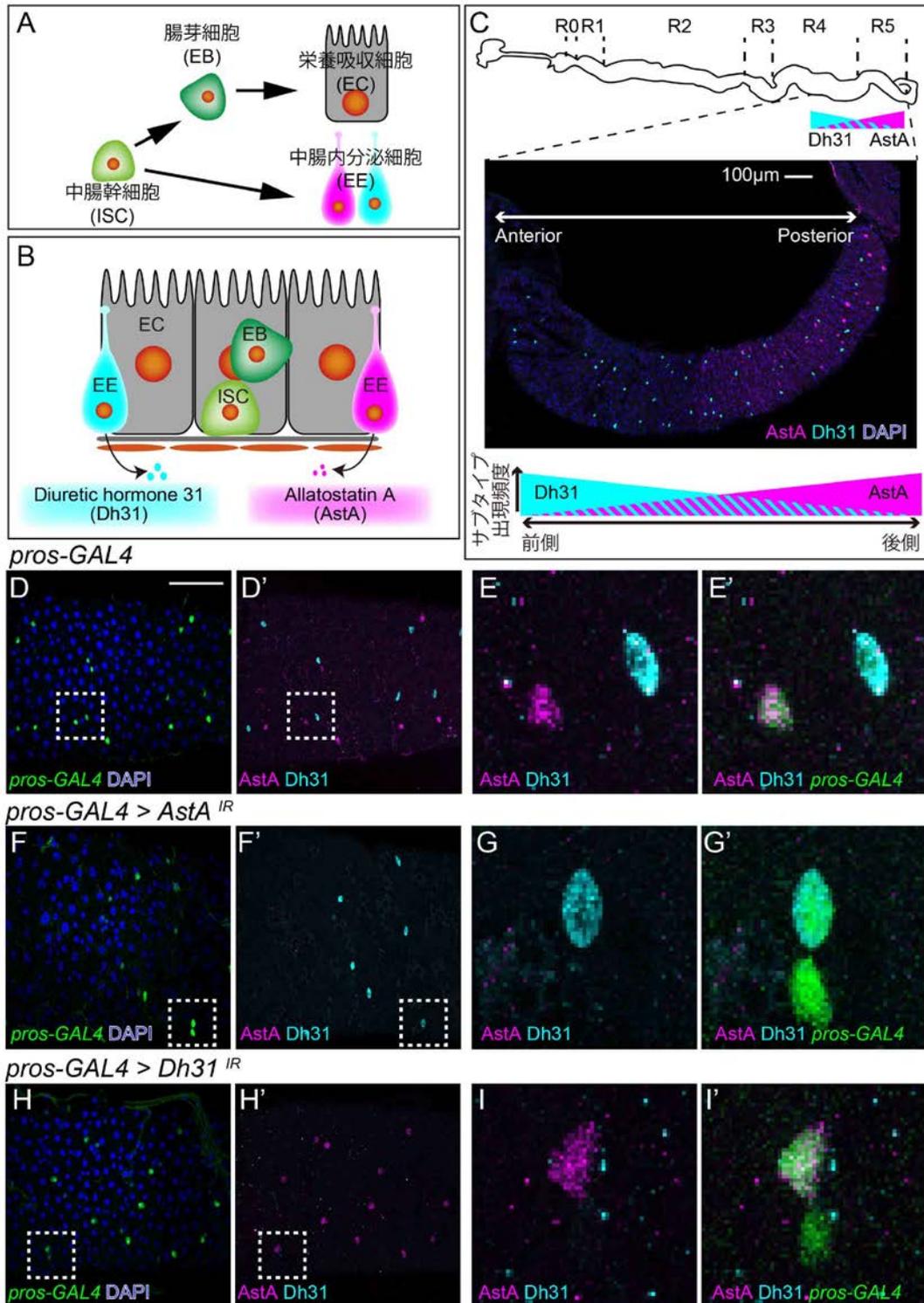


図 1. 成虫中腸における AstA / Dh31 の発現パターンと特異的ノックダウン

図 1. 成虫中腸における AstA / Dh31 の発現パターンと特異的ノックダウン

- A) 成虫中腸の組織幹細胞(ISC)から分化細胞を作る細胞系譜のモデル図を示す。中腸幹細胞(ISC)から腸芽細胞(EB)または内分泌細胞(EE)が作られる。腸芽細胞(EB)はその後、成熟し栄養吸収細胞(EC)へと成長する。内分泌細胞(EE)は成熟し、ホルモンを産生するようになると、産生するホルモンの種類によってサブタイプが分かれる。ここでは AstA (マゼンタ) と Dh31 (シアン) のそれぞれのホルモンを産生する 2 つのサブタイプを示す。
- B) 中腸上皮を構成する細胞種のモデル図を示す。上が頂端側 (内腔側)、下が基底側 (筋肉-体内側) を示す。AstA (マゼンタ) や Dh31 (シアン) は基底側に放出される。
- C) 上段は、中腸全体を(Marianes and Spradling, 2013) を参考に領域分けし、AstA/Dh31 の発現勾配パターンを示した。中段は、中腸後方部における AstA (マゼンタ) と Dh31 (シアン) の抗体染色の写真を示す。同時に DAPI による核染色 (青) を示す。スケールバーは 100 μ m である。写真左側の方 (前方部) が Dh31 の発現細胞数が多く、右側 (後方部) に行くにしたがって減る。一方、AstA 産生細胞の密度は、Dh31 産生細胞のそれとは逆の勾配を示す。領域ごとの細胞数の増減をまとめた結果を、図 2 に示す。下段は、AstA と Dh31 の勾配をモデル化した図を示す。
- D-I) *pros-gal4* の発現を *UAS-GFP*(緑)を用いて標識している。E、G、IはD、F、Hそれぞれの白枠部分の拡大写真である。AstA (マゼンタ) と Dh31 (シアン) の抗体染色を行い、標識した。スケールバーは 50 μ m である。
- F) 中腸 EE 特異的に *AstA* をノックダウンした。
- H) 中腸 EE 特異的に *Dh31* をノックダウンした。
C-I の個体は、羽化後 7 日目の成虫から解剖して取り出した中腸を観察している。

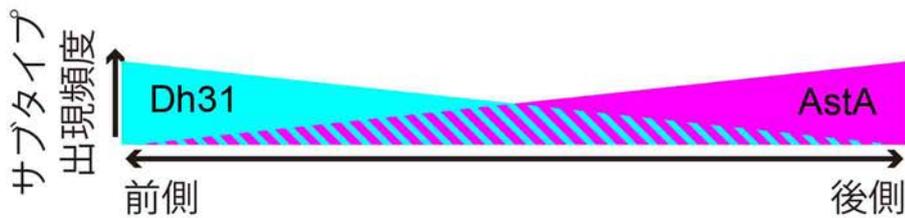
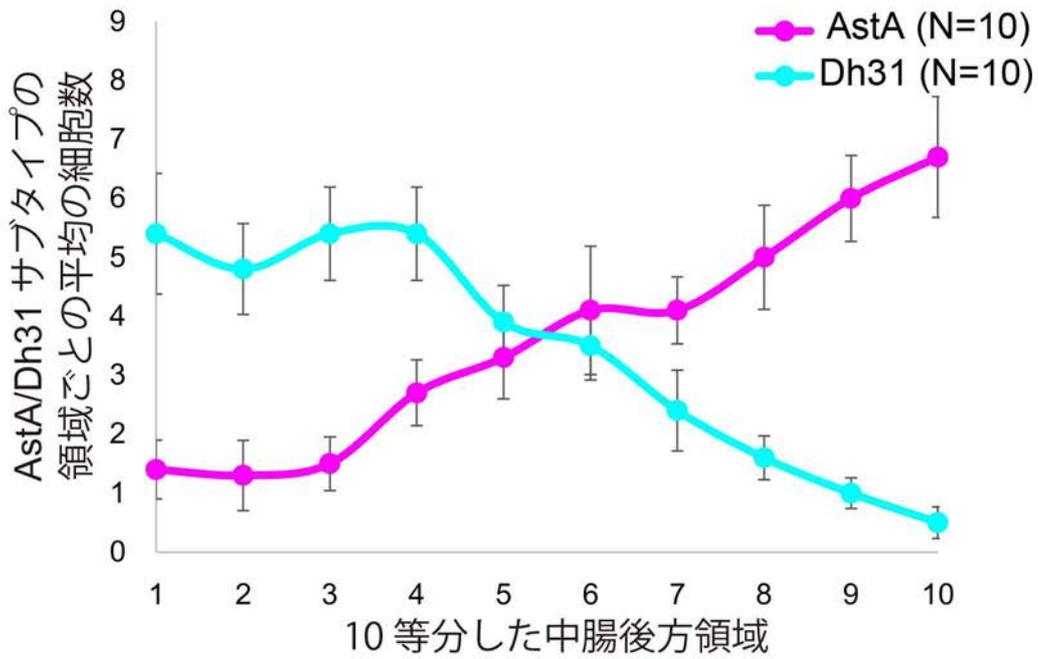
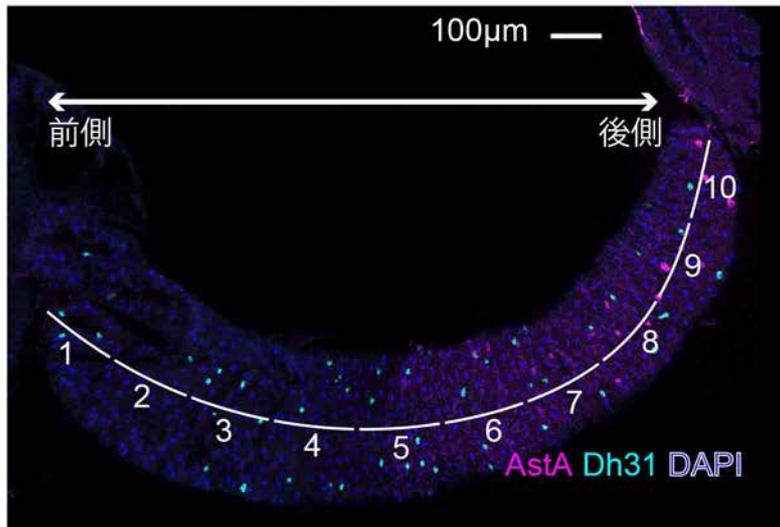
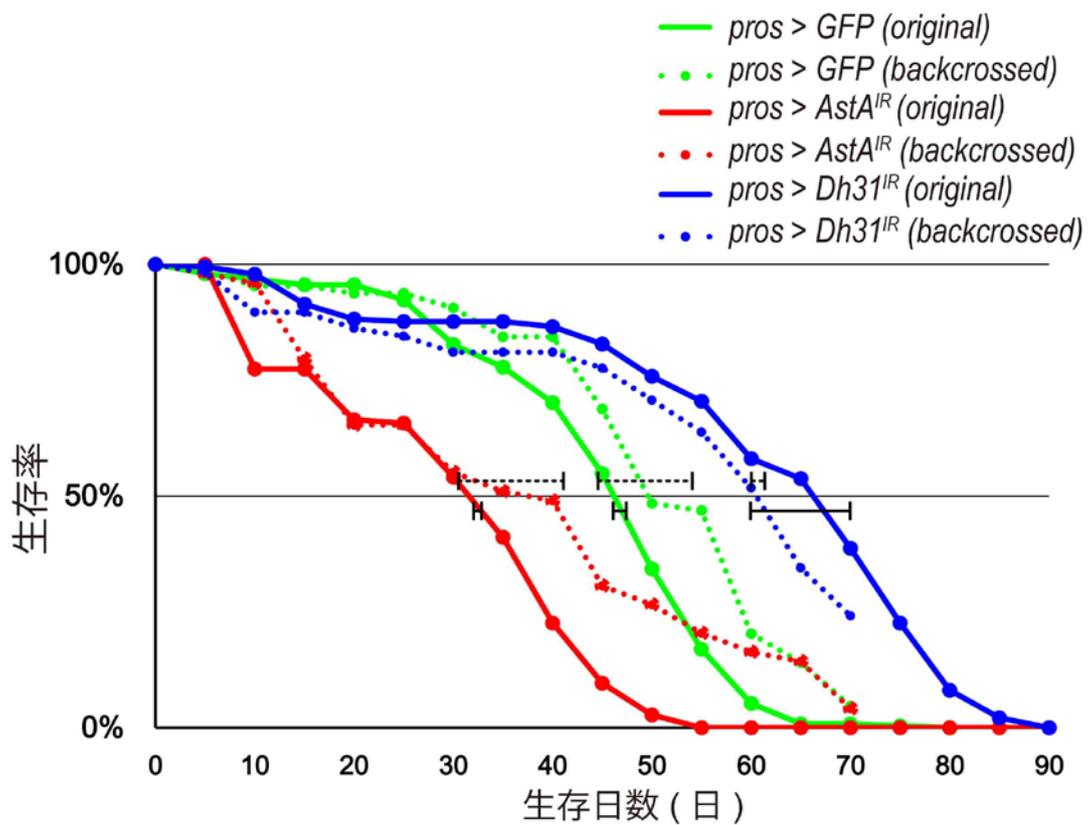


図 2. 成虫中腸後方領域における AstA/Dh31 の発現勾配パターン

図 2. 成虫中腸後方領域における AstA/Dh31 の発現勾配パターン

上段は、中腸後方領域において中心線に沿って長さを測定し 10 等分した写真を示す。各領域の AstA/Dh31 の発現細胞を計測し、その数を中段のグラフにまとめた。各グラフの点は N=10 で算出し、エラーバーは標準誤差を示す。

下段に、AstA/Dh31 の発現勾配パターンのモデル図を示す。測定の結果、写真左側の方（前方部）が Dh31 の発現細胞数が多く、右側（後方部）に行くにしたがって、減っている。一方、AstA 産生細胞の密度は、Dh31 産生細胞のそれとは逆の勾配を示した。



Genotype	N (n)	Median Lifespan	p-values
<i>pros > GFP (original)</i>	3 (248)	46±1.45	-
<i>pros > GFP (backcrossed)</i>	5(64)	48±4.38	-
<i>pros > AstA^{IR} (original)</i>	3 (146)	34±1.00 **	0.002
<i>pros > AstA^{IR} (backcrossed)</i>	4(49)	32±5.11 *	0.046
<i>pros > Dh31^{IR} (original)</i>	3 (186)	63±4.70 *	0.039
<i>pros > Dh31^{IR} (backcrossed)</i>	4(48)	62±1.49 *	0.032

図 3. *AstA*、*Dh31* ノックダウン個体の寿命の計測と統計解析

図 3. *AstA*、*Dh31* ノックダウン個体の寿命の計測と統計解析

- A) コントロールとして *pros>GFP* (緑線) を用い、*AstA^{IR}* (赤線) と *Dh31^{IR}* (青線) とを比較した。*pros-GAL4* 系統と *UAS-AstA^{IR}*, *UAS-Dh31^{IR}* を掛け合わせたそれぞれの F1 世代の生存曲線を original (実線) として表す。
また、各 F1 (*pros>GFP*, *pros>AstA^{IR}*, *pros>Dh31^{IR}*) を *w¹¹¹⁸* を戻し交配した F2 の生存曲線を backcrossed (破線) として表した。縦軸は生存率、横軸は生存日数である。各生存曲線に重なる水平な黒の線分は、50%死亡率におけるエラーバーを示す。
- B) 各遺伝子型の寿命の測定は 3-5 回行った(N=3~5)。死亡した個体の数を数え、その合計数を n とした。50%死亡率は表のようになり、コントロールと比較して t 検定を行った結果、*AstA^{IR}* の original と backcrossed の寿命は、P 値がそれぞれ 0.002 と 0.046 となって有意な差が見られ、寿命が短縮したことがわかった。一方、*Dh31^{IR}* では同様に P 値が 0.039 と 0.032 となってこちらも有意な差が見られ、寿命が延びていることがわかった。P 値の強さの表示は、*<0.05, **<0.01, ***<0.005 とした。

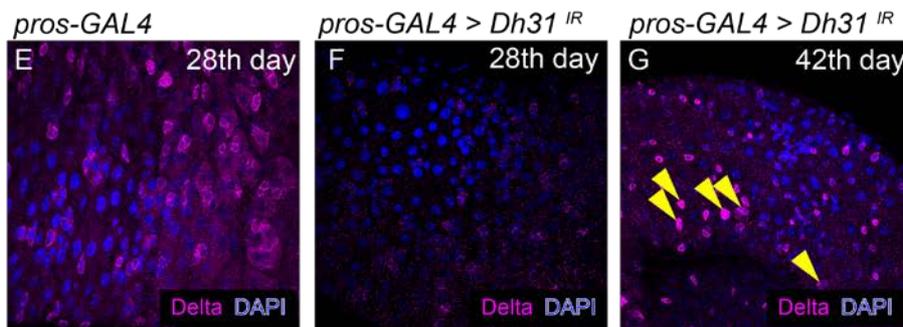
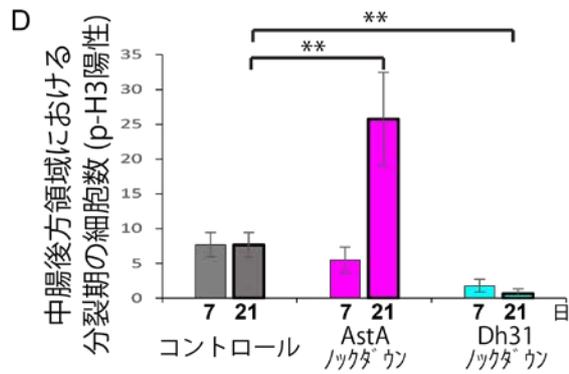
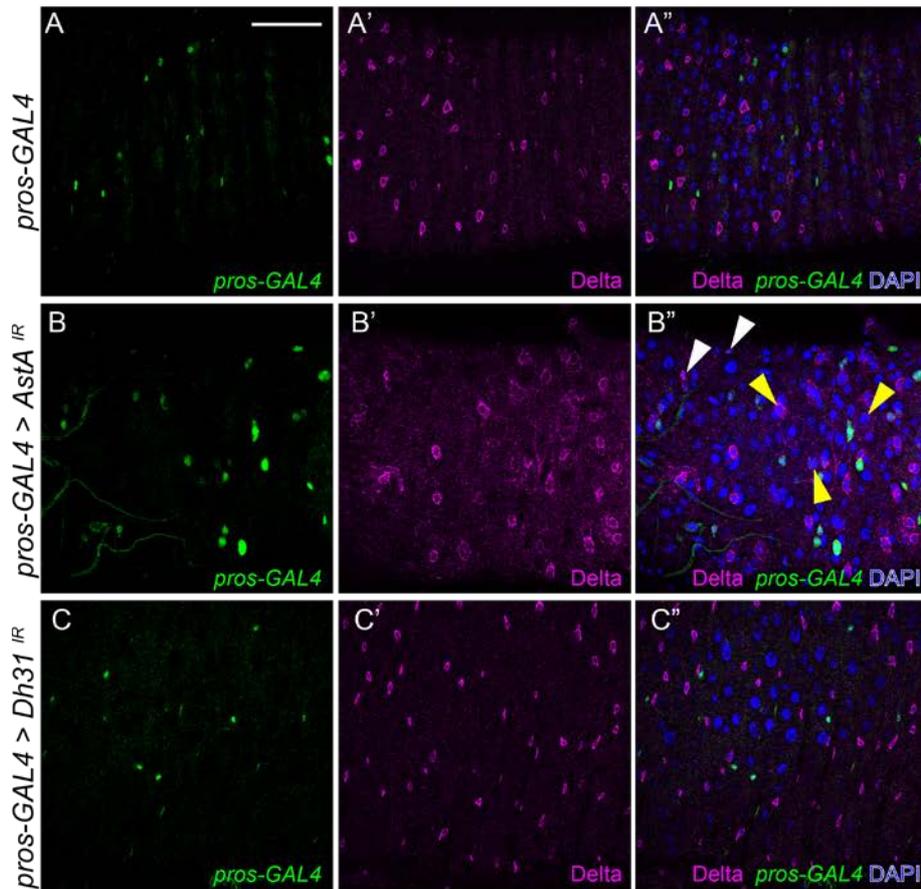


図 4. *AstA* / *Dh31* ノックダウン時の中腸の老化

図 4. *AstA / Dh31* ノックダウン時の中腸の老化

A-C,E-G) *pros-gal4* の発現は *UAS-GFP*(緑)を用いて、ISC は Delta 抗体 (マゼンタ) を用いて、核染色は DAPI (青) を用いて検出している。スケールバーは 50 μ m である。A-C) 羽化後 21 日目、E, F) 羽化後 28 日目、G) 羽化後 42 日目の個体の中腸を観察した。

- A) コントロールでは、ISC は散在し、2 倍体の細胞のみで Delta 発現が観察された。
- B) *AstA* ノックダウン個体では白矢頭で示すような ISC の他に、ISC の散在性が失われ、黄矢頭で示す 4~8 倍体のような成長した細胞で Delta の異所的発現が観察され、E に示すような老齢個体の症状と一致した。
- C) *Dh31* ノックダウン個体ではコントロールと同様に、ISC は散在し、Delta 発現細胞の倍数化も見られない。
- D) ISC の増殖率を比較するために、pH3 抗体を用いて M 期細胞を染色し、細胞数を計測した結果をグラフにまとめた。コントロールでは、7 日目 (若齢個体)、21 日目においても ISC の増殖率は変わらない。*AstA* ノックダウンでは、21 日目の個体で幹細胞の過剰増殖が起きている。*Dh31* ノックダウンでは、若齢個体でも ISC の増殖率が落ちている(t 検定の結果、* $p < 0.05$)。P 値の強さの表示は、* < 0.05 , ** < 0.01 , *** < 0.005 とした。
- E) コントロールの 28 日目 (老齢個体) の中腸では、ISC の凝集や倍数化細胞における Delta の異所的発現が起きやすくなっている。
- F, G) *Dh31* ノックダウン個体では 28 日目 (老齢個体) の中腸の老化症状は遅延しており、42 日目頃から Delta の異所的発現が観察される(黄色矢頭)。

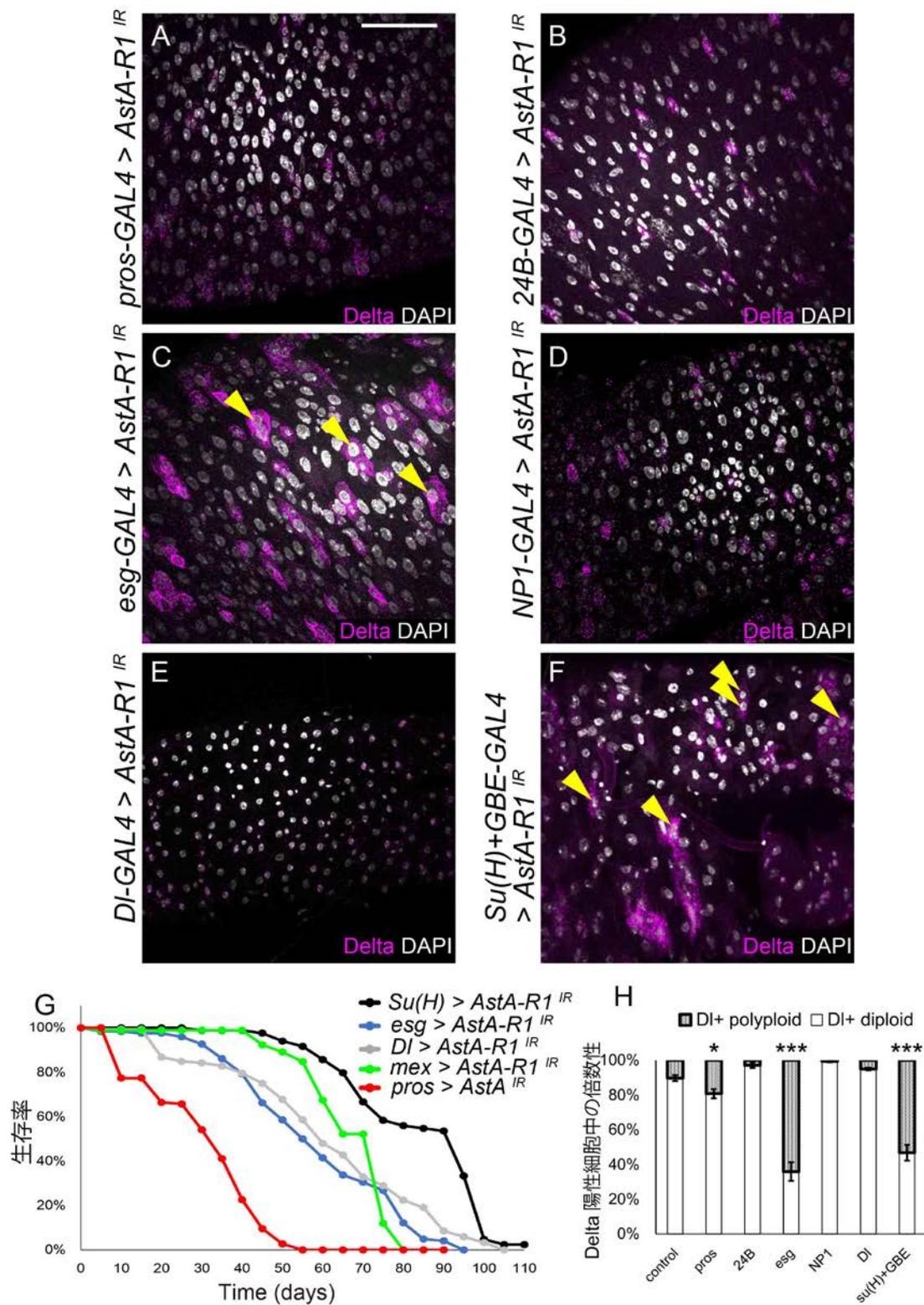


図 5. 中腸における AstA 受容体の阻害効果

図 5. 中腸における AstA 受容体の阻害効果

A-F) AstA 受容体を細胞種特異的にノックダウンした場合の、中腸組織老化に及ぼす影響を観察した。羽化後 21 日目の中腸において、ISC については Delta 抗体（マゼンタ）を用いて、核染色については DAPI（白）を用いて標識している。スケールバーは 50 μ m である。

各 GAL4 系統は、以下の細胞種に特異的な発現をする：*pros-gal4* は EE (A)、*24B-GAL4* は環状筋 (B)、*esg-GAL4* は ISC と EB (C)、*NPI-GAL4* は EC (D)、*DI-GAL4* は ISC (E)、*Su(H)+GBE-GAL4* は EB (F)。C、F) *esg-GAL4* と *Su(H)+GBE-GAL4* で受容体をノックダウンした場合には、リガンド AstA のノックダウン時と同様に、老化症状である倍数化した細胞での異所的な Delta の発現を示した。

G) 中腸の各細胞種において AstA 受容体をノックダウンした場合の寿命の測定結果を示す。*esg>AstA-R1^{IR}*（青線）、*Su(H)+GBE>AstA-R1^{IR}*（黒線）と *DI>AstA-R1^{IR}*（灰色線）*mex > AstA-R1^{IR}*（緑線）を示す。リガンドである AstA をノックダウンした系統（赤線）と同様な寿命短縮を見せる系統はいなかった。

H) A-F までの個体の Delta 陽性細胞の数を、2 倍体と 4 倍体以上に分けて測定し、その出現頻度をグラフにまとめた。各グラフの N 数は 5 である。コントロールと比較した t 検定の結果、P 値は *pros > AstA-R1^{IR}* が 0.03、*esg > AstA-R1^{IR}* が 0.0001、*Su(H)+GBE > AstA-R1^{IR}* が 0.0002 となり、有意な差が見られた。P 値の強さの表示は、* <0.05 , ** <0.01 , *** <0.005 とした。

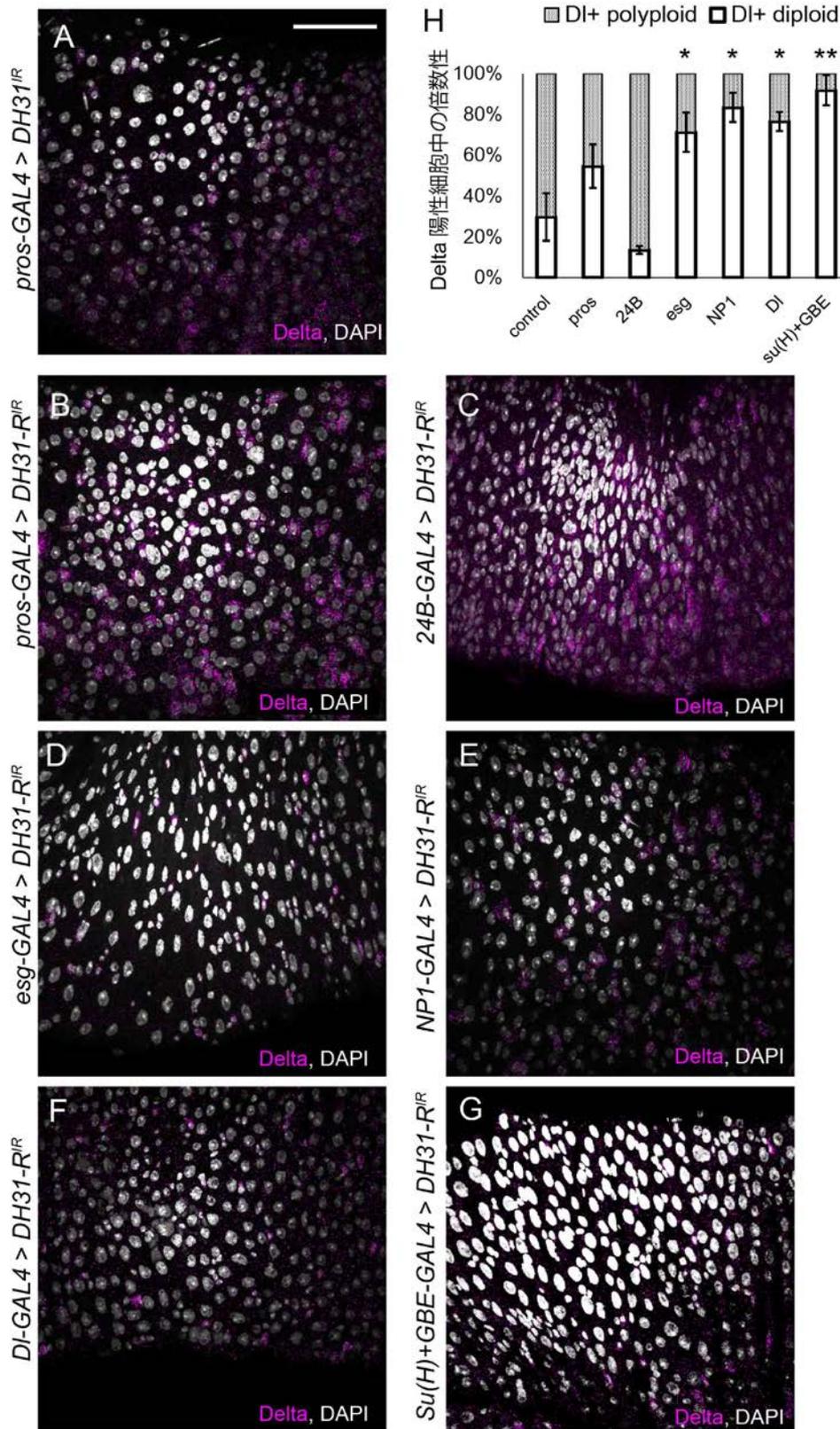


図 6. 中腸における Dh31 受容体の阻害効果

図 6. 中腸における Dh31 受容体の阻害効果

A-G) Dh31 受容体を細胞種特異的に阻害した場合の、中腸組織老化に及ぼす影響を観察した。羽化後 28 日（老齢個体）の中腸において、図 5 と同様に、ISC については Delta 抗体（マゼンタ）を用いて、核染色については DAPI（白）を用いて標識している。スケールバーは 50 μ m である。

同様に、各 GAL4 系統は、以下の細胞種に特異的な発現をする：*pros-gal4* は EE(A と B)、*24B-GAL4* は環状筋(C)、*esg-GAL4* は ISC と EB(D)、*NP1-GAL4* は EC(E)、*Dl-GAL4* は ISC(F)、*Su(H)+GBE-GAL4* は EB(G)。

A) リガンドである Dh31 をノックダウンした 28 日個体では、ISC は散在し、老化症状が現れていない。

D-G) Dh31 受容体をノックダウンした場合の老化症状の遅延は、ISC/EB、EC でノックダウンを行った場合に現れた。

H) B-G までの個体の Delta 陽性細胞の数を、2 倍体と 4 倍体以上に分けて測定し、その出現頻度をグラフにまとめた。各グラフの N 数は 5 である。コントロールと比較した t 検定の結果、P 値は *esg* > *Dh31-R^{IR}* が 0.03、*NP1* > *Dh31-R^{IR}* が 0.014、*Dl* > *Dh31-R^{IR}* が 0.02、*Su(H)+GBE* > *Dh31-R^{IR}* が 0.009 となり、有意な差が見られた。P 値の強さの表示は、* < 0.05, ** < 0.01, *** < 0.005 とした。

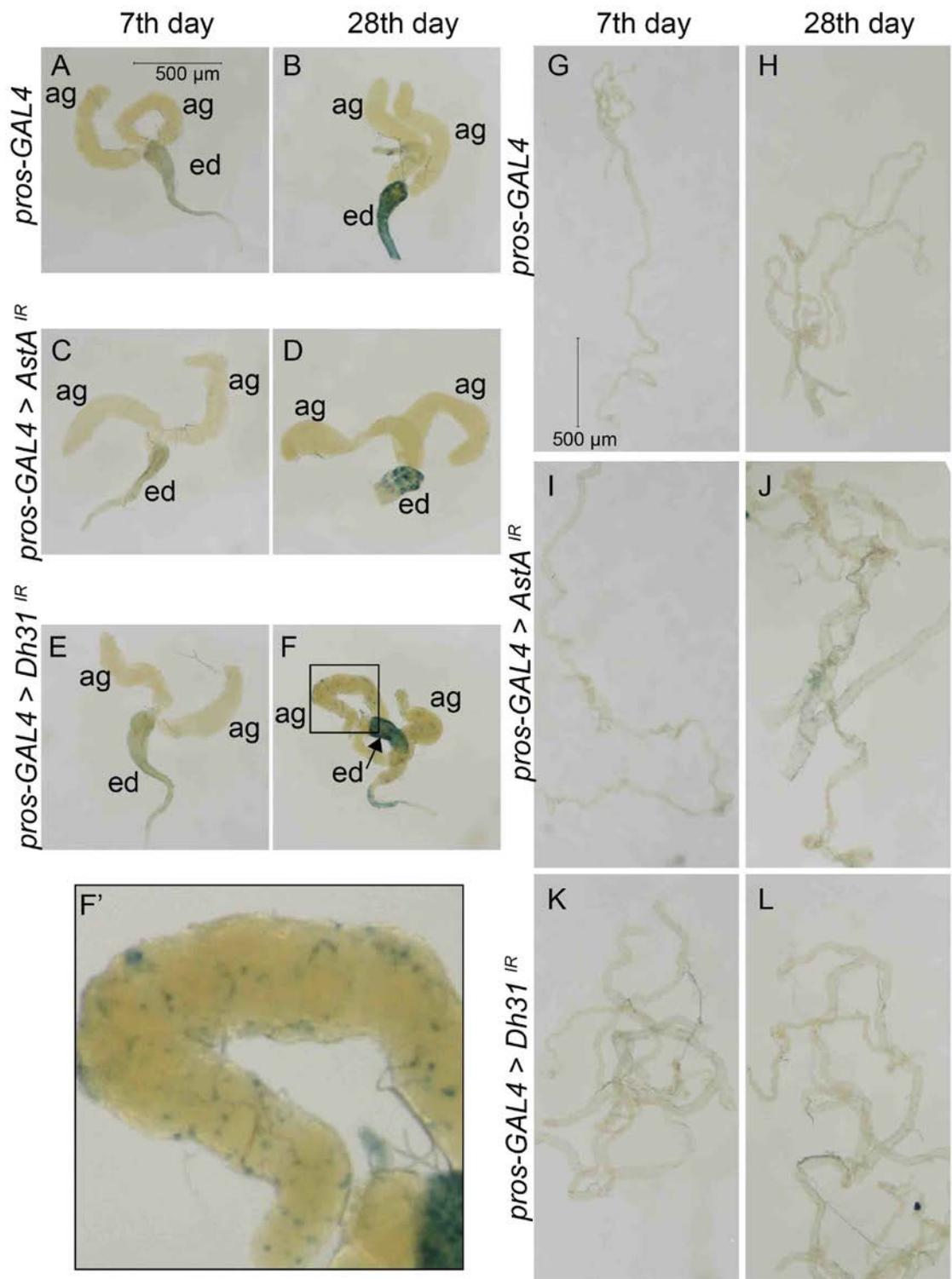
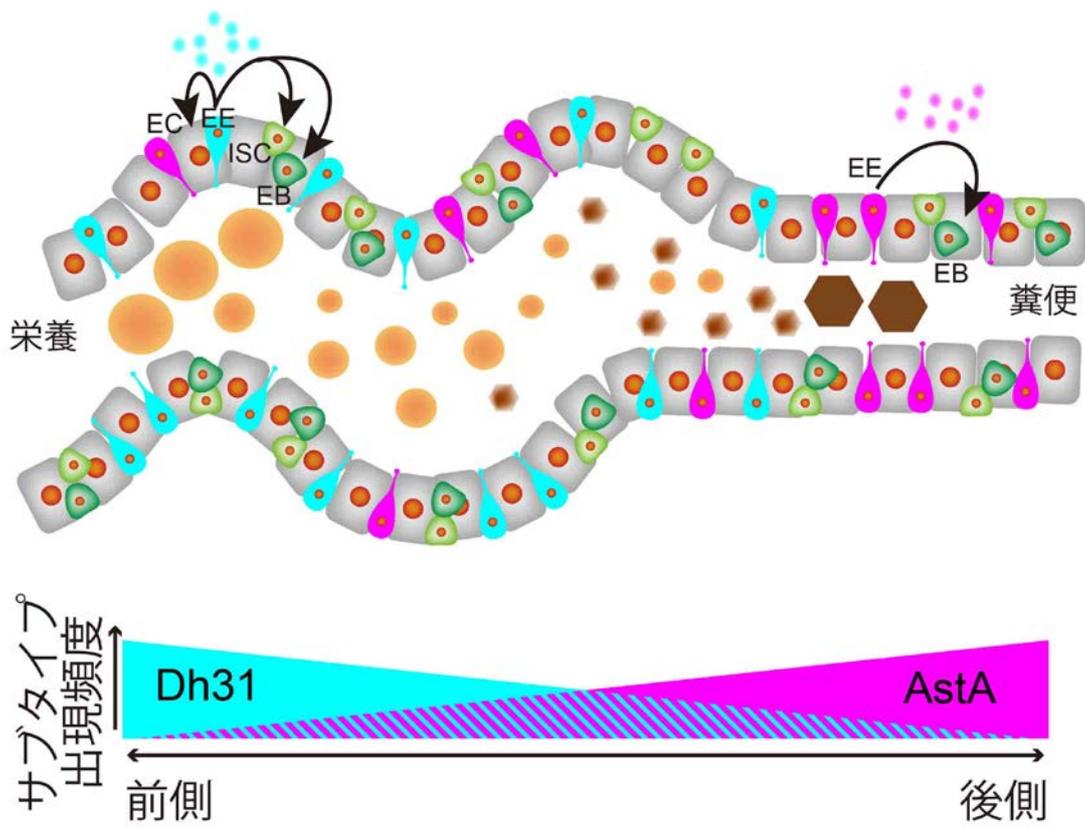


図7. 附属腺、マルピーギ管における老化細胞の検出

図 7. 附属腺、マルピーギ管における老化細胞の検出

- A-L) 羽化後 7 日目と 28 日目の成虫雄を解剖し、附属腺とマルピーギ管を取り出し、Senescence β -Galactosidase 活性による老化細胞検出（青）を試みた。スケールバーは 500 μ m である。
- A-F) 雄の内部生殖器の一つである附属腺(accessory gland =ag)1 対と射精管(ejaculatory duct=ed)を示す。射精管の部分では、老化した細胞と関係なく青色の染色が検出されやすい。
- F) 中腸で *Dh31* をノックダウンした個体の附属腺では、28 日目の個体において老化細胞が数多く観察された。
- F') F の囲み部分の拡大図を示す。
- G-L) マルピーギ管においては、コントロールと比較して老化細胞の出現頻度に差は見られなかった。



- | | |
|------------------|-------------------|
| ↑ 中腸幹細胞 (ISC) 増殖 | ↓? 中腸幹細胞 (ISC) 増殖 |
| ↑ 中腸組織老化 | ↓ 中腸組織老化 |
| ↓ 成虫の寿命 | ↑ 成虫の寿命 |
| ↑ 利尿作用 | ↓ 利尿作用 |

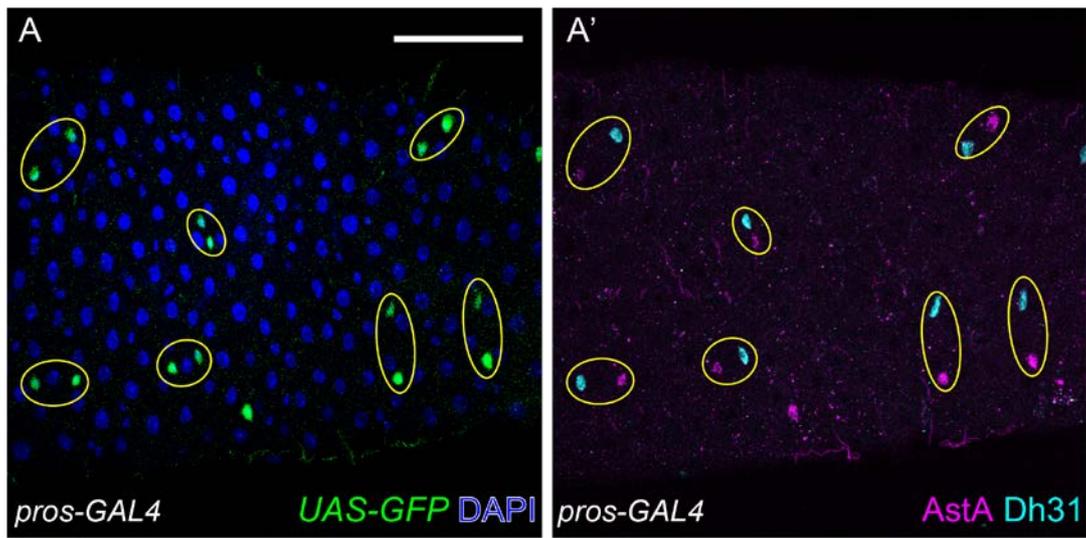
図 8. AstA と Dh31 の中腸に対する作用のモデル図

図 8. AstA と Dh31 の中腸に対する作用のモデル図

中腸後方部における AstA 産生細胞（マゼンタ）と Dh31 産生細胞（シアン）の分布、およびホルモン産生細胞の密度勾配を示す。

内分泌細胞(EE)から産生された Dh31 は、中腸幹細胞(ISC)・腸芽細胞(EB)・栄養吸収細胞(EC)に存在する受容体に作用して、ISC の増殖や腸の老化を進めている。

一方、AstA は腸芽細胞(EB)に存在する受容体を介して、腸の老化を抑えている。

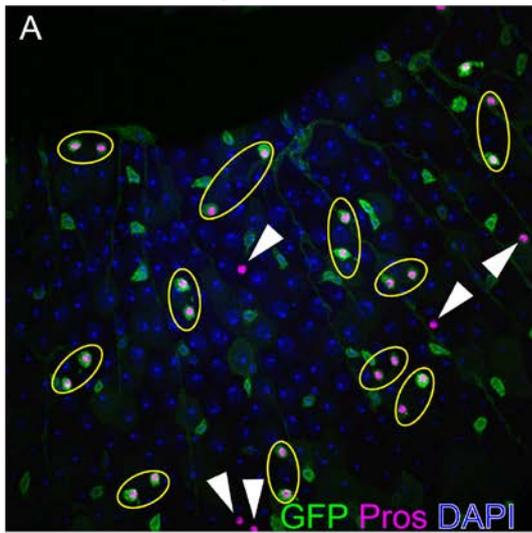


補足図 1.中腸内分泌細胞は *AstA* と *Dh31* のそれぞれのサブタイプがペアを作る

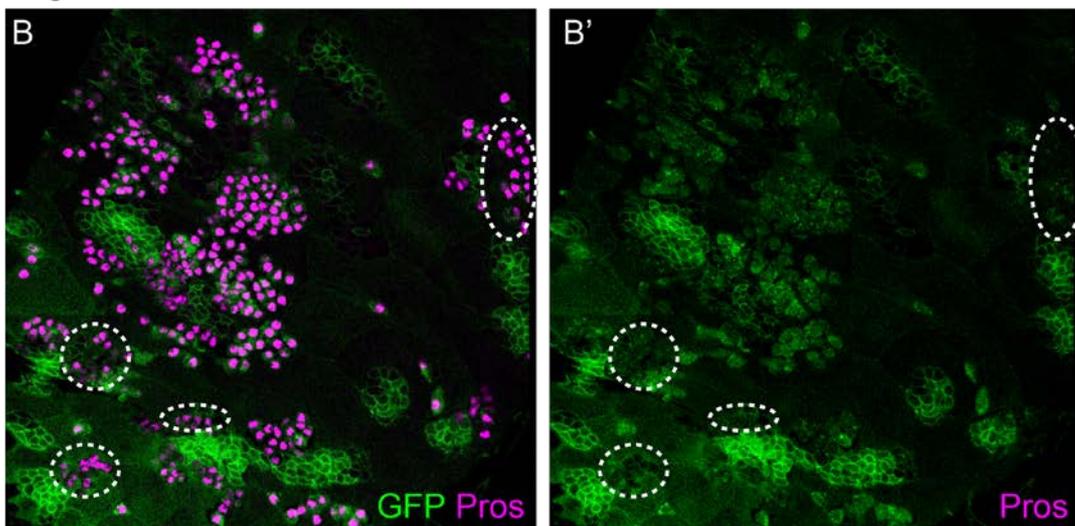
補足図 1. AstA と Dh31 の対をなす中腸内分泌細胞

A) 図 1.D を改変。 *pros-gal4* の発現を *UAS-GFP*(緑)を用いて標識している。 AstA (マゼンタ) と Dh31 (シアン) の抗体染色を行い、標識した。スケールバーは 50 μ m である。 AstA と Dh31 が対をなすペアを黄色楕円で示す。

CG32243-QF, QUAS-mCD8-GFP



CG32243-QF, QUAS-mCD8-GFP
esg-GAL4, UAS-Notch^{RNAi}, tub-GAL80^{ts}



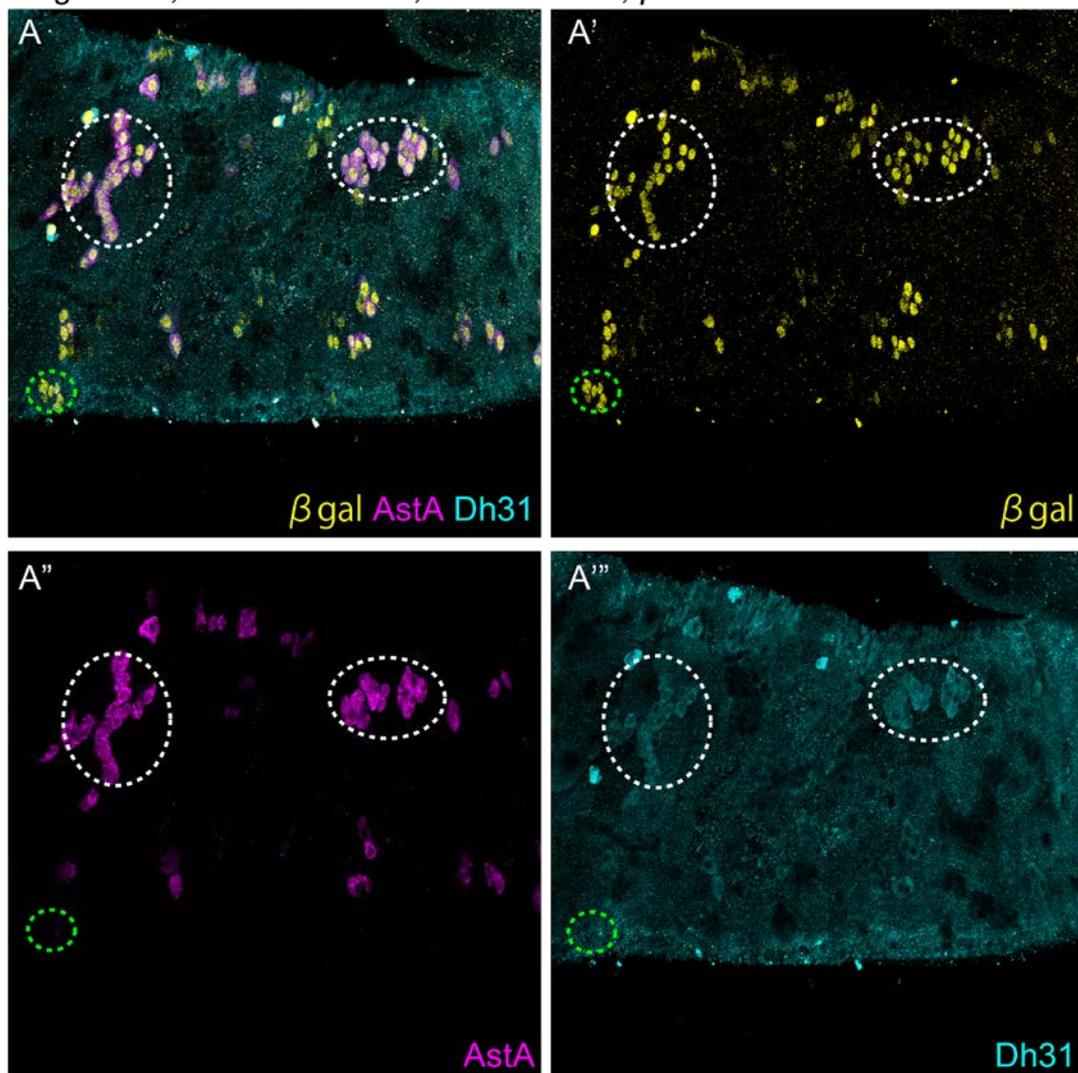
補足図 2. 新規作成 QF エンハンサートラップ系統 (2013 年度 武田 修士論文を改変)

補足図 2. 新規作成 QF エンハンサートラップ系統 (2013 年度 武田 修士論文を改変)

A) *CG322443-QF* 系統で、*QUAS-GFP* を強制発現させた。青は全細胞の核(DAPI 染色)を示す。*CG322443-QF* 系統は全ての腸幹細胞、全ての腸芽細胞、多くの内分泌細胞で発現する遺伝子のエンハンサーをトラップしていることが、*QUAS-GFP*(緑)の発現からわかる。すべての内分泌細胞を Pros (マゼンタ)で示している。対をなす内分泌細胞を黄色楕円で示した。白矢頭で示すように、一部の内分泌細胞では *CG322443-QF* は発現しない。

B) *esg-GAL4,UAS-Notch^{IR}, tub-GAL80^{ts}* 系統を用いて、羽化するまで 18°C で飼育し、羽化後 29°C に移し 7 日間飼育し (発現期間 : 7 日間)、中腸に幹細胞/内分泌細胞腫瘍を形成した。さらに *CG322443-QF* 系統で、*QUAS-GFP* を強制発現させた(緑)。白破線で示した内分泌細胞腫瘍では *CG322443-QF* は発現しない。

esg-GAL4, UAS-Notch^{RNAi}, tub-GAL80^{ts}, pros-lacZ



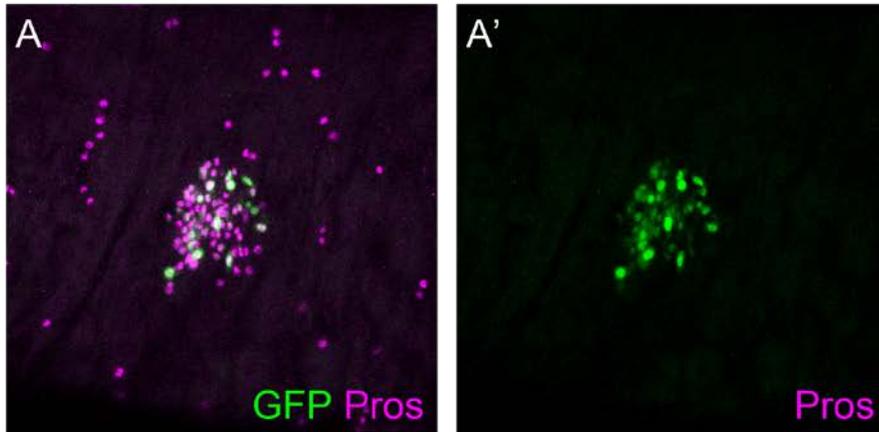
補足図 3. 腫瘍化細胞集団のホルモン産生異常 (2013 年度 武田 修士論文を改変)

補足図 3. 腫瘍化細胞集団のホルモン産生異常 (2013 年度 武田 修士論文を改変)

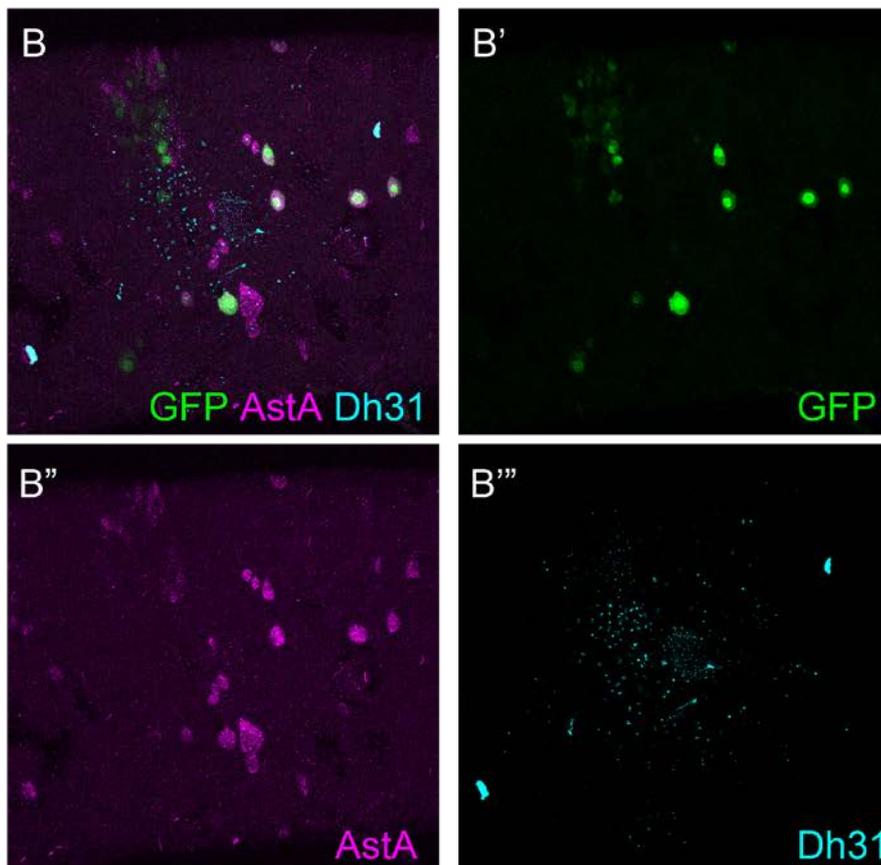
羽化するまで 18℃で飼育し、羽化後 29℃に移し 7 日間飼育し (発現期間 : 7 日間)、中腸に幹細胞/内分泌細胞腫瘍を形成した。AstA(マゼンタ)、Dh31(シアン)、*pros-lacZ* を β gal 染色することで全ての内分泌細胞を検出(黄色)。

A) 内分泌細胞腫瘍が多数出現し、両ホルモン共に発現する腫瘍(白破線)や、両ホルモンの発現が消失する腫瘍(緑破線)が観察された。

*hs-FLP,FRT19A,tub-GAL80 / FRT19A,Notch^{55e11} ;
+ / + ; pros-GAL4,UAS-GFP^{S65T}/ tub-GAL80^{ts}*



*hs-FLP,FRT19A ,tub-GAL80 / FRT19A,Notch^{55e11} ;
UAS-Ecad^{RNAi} / + ; pros-GAL4,UAS-GFP^{S65T}/ tub-GAL80^{ts}*

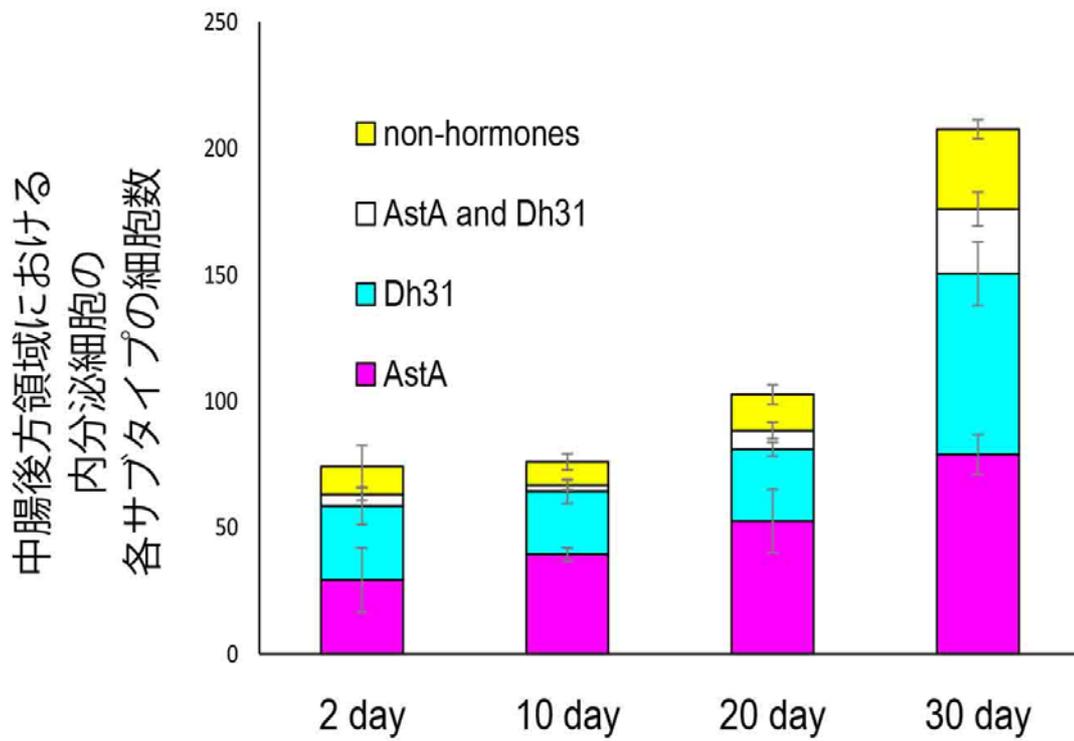


補足図 4. 内分泌細胞腫瘍の細胞解離 (2013 年度 武田 修士論文を改変)

補足図 4. 内分泌細胞腫瘍の細胞解離 (2013 年度 武田 修士論文を改変)

A) MARCM 法を使用し、Notch の内分泌細胞腫瘍を作り出した。作成された内分泌細胞クローン (腫瘍) は緑色, 野生型を含めた全内分泌細胞は Pros 染色(マゼンタ)を行い検出した。

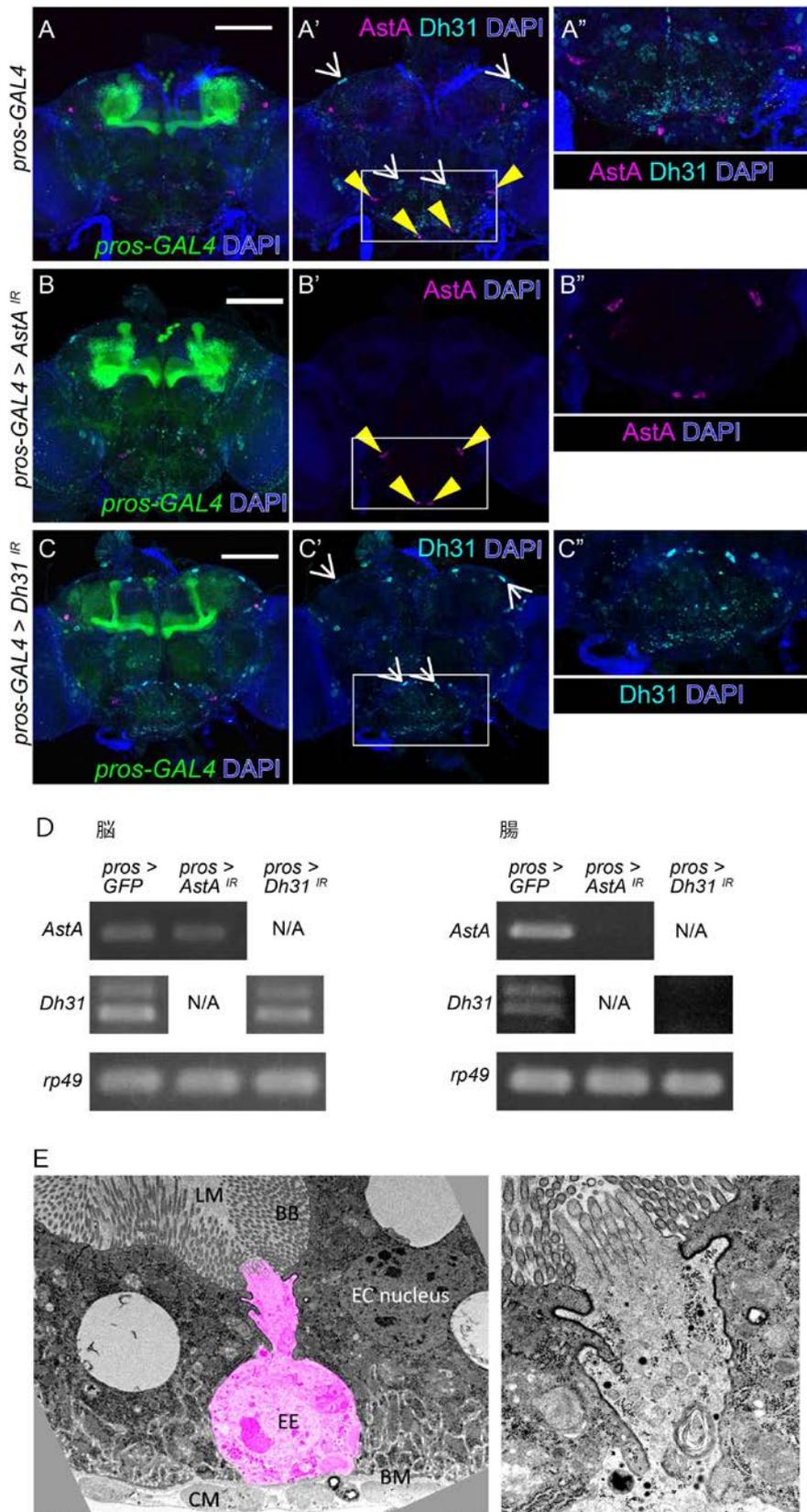
B) 内分泌細胞クローン内で、さらに E-cadherin 阻害を行い、内分泌細胞腫瘍の解離を行った。A と同様に、内分泌細胞クローンは緑色, AstA をマゼンタ、Dh31 をシアンで示した。



補足図 5. 加齢時における内分泌細胞の増加

補足図 5. 加齢時における内分泌細胞の増加と中腸特異的ノックダウン結果

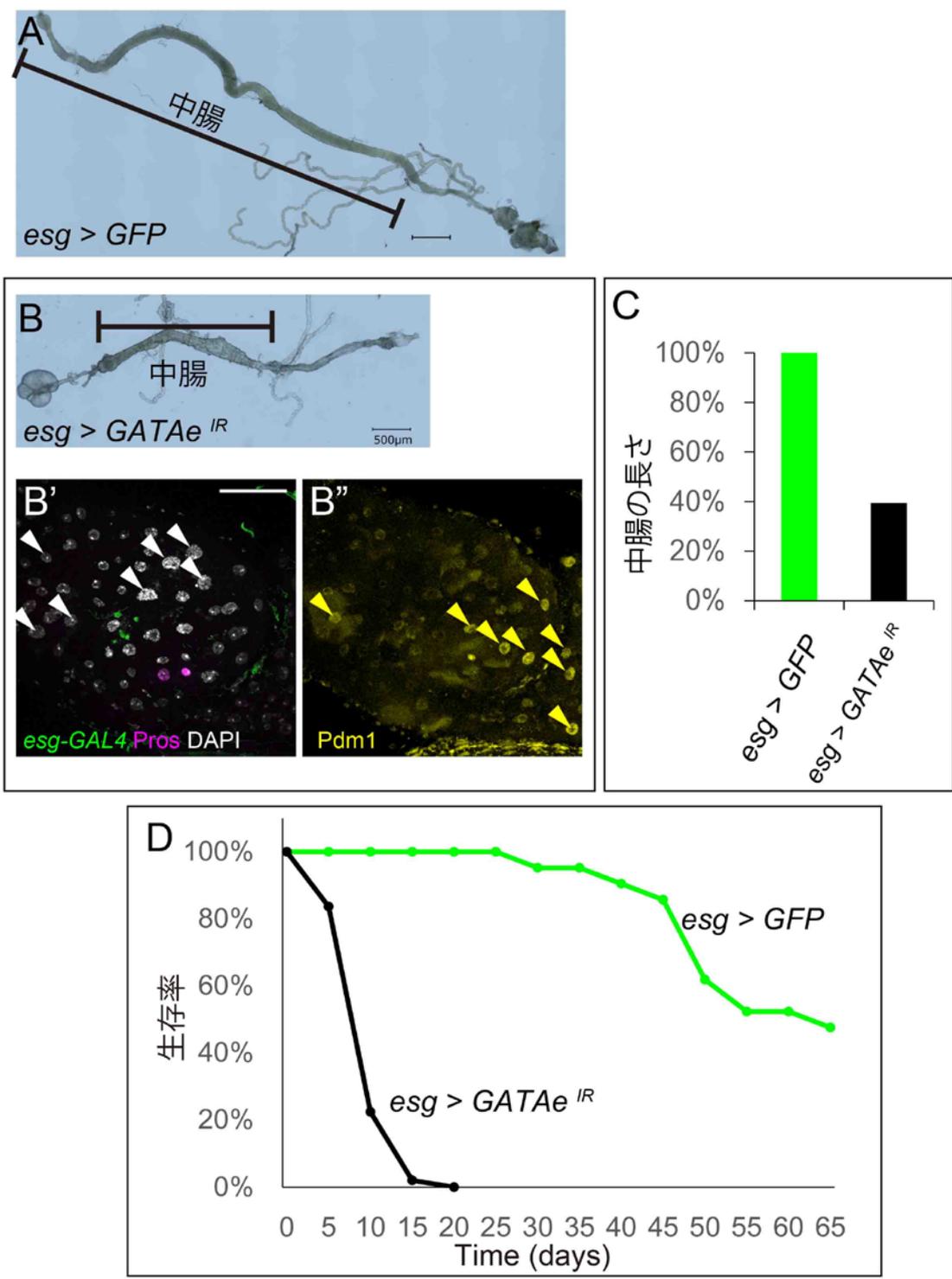
2013 年度 鈴木絵理佳卒研データを再編集した。*pros-lacZ* 系統の成虫雌を 2-30 日間飼育し、中腸を摘出し、 β -Galactosidase, AstA, Dh31 の三重染色を行い、加齢に伴う中腸 EE 数と各サブタイプ細胞数を計測した。AstA 単独陽性細胞数（マゼンタ）、Dh31 単独陽性細胞数（シアン）、AstA/Dh31 二重陽性細胞数（白）、 β -Galactosidase のみが染まる AstA/Dh31 陰性細胞数（黄色）を示す。加齢に伴い、AstA/Dh31 の共発現・非発現を見せる異常な EE が増加していることがわかった。



補足図 6. 脳における AstA と Dh31 の発現パターンと内分泌細胞の電子顕微鏡写真

補足図 6. 脳における AstA と Dh31 の発現パターンと内分泌細胞の電子顕微鏡写真

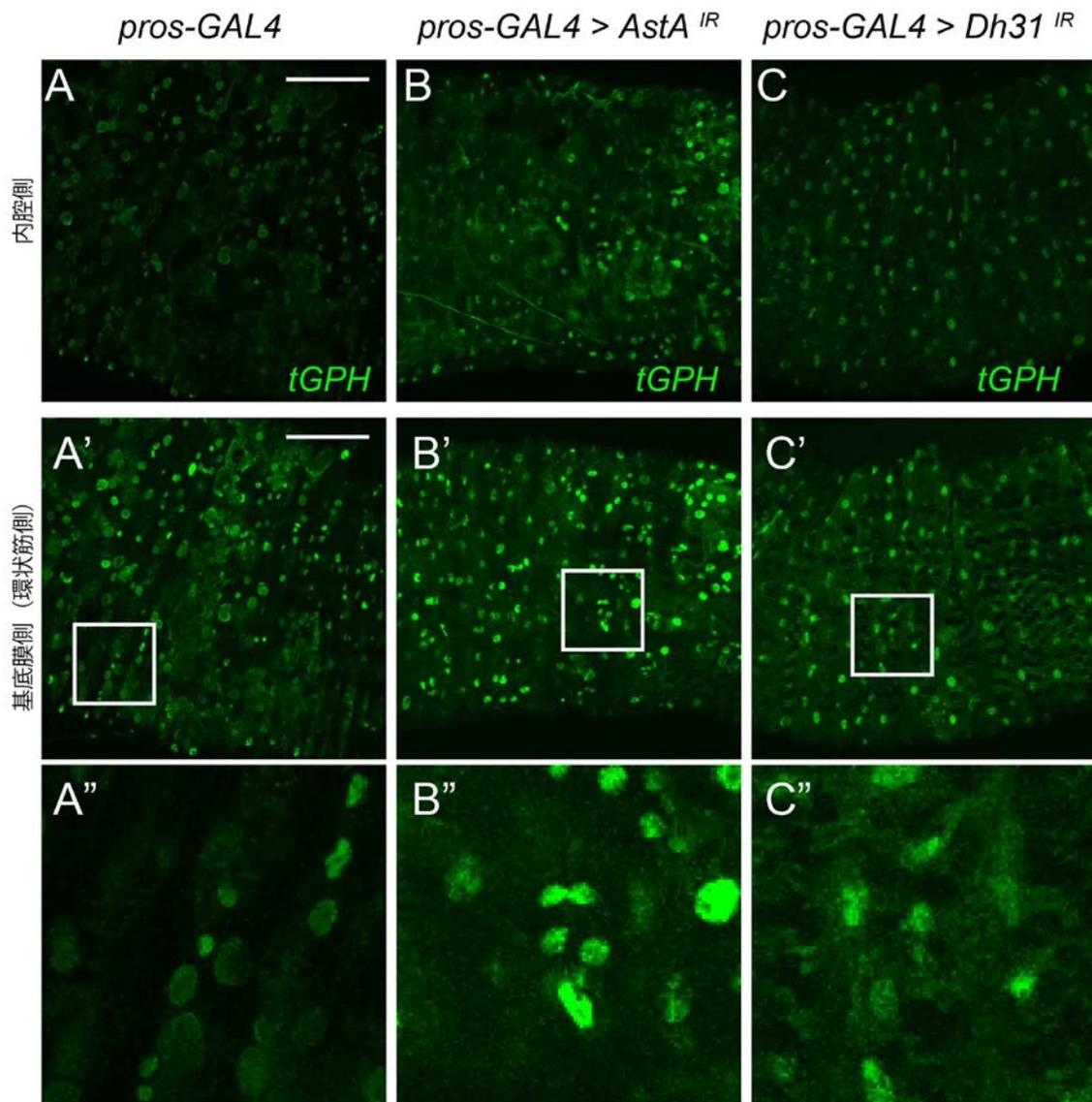
- A-C) *pros-GAL4* の発現は *UAS-GFP*(緑)を用いて、AstA (マゼンタ) と Dh31 (シアン) の発現は抗体染色を用いて、核は DAPI 染色 (青) を用いて、それぞれ検出された。スケールバーは 50 μ m である。
- A) EE で発現する *pros-GAL4* は、成虫脳において AstA (黄矢頭) や Dh31 (白矢印) を発現する神経分泌細胞では発現していない。
- B,B') *pros-GAL4* を用いて *AstA* をノックダウンした場合には、コントロールと比較して、脳内 AstA の発現パターンが変化しない。
- C,C'') *pros-GAL4* を用いて *Dh31* をノックダウンした場合には、コントロールと比較して、脳内 Dh31 の発現パターンが変化しない。
- D) *pros>GFP*, *pros>AstA^{IR}*, *pros>Dh31^{IR}* の 7 日目の個体の脳を摘出後に mRNA を抽出し、RT-PCR による発現量比較を行った。
左側-脳における発現量比較) *pros>AstA^{IR}*, *pros>Dh31^{IR}* のどちらにおいても、*AstA* および *Dh31* のバンドはそれぞれ確認され、脳でのノックダウンの効果はないか、あっても低いと考えられる。
右側-中腸における発現量比較) *AstA* ノックダウンにおける *AstA*, *Dh31* ノックダウンにおける *Dh31* のどちらもバンドは確認されず、中腸ではノックダウンがよく効いていると考えられる。(N/A: Not Applicable)。
- E) 中腸上皮を縦断した超薄切片の透過型電子顕微鏡写真を示す。マゼンタで EE を示す。右のパネルは内腔側に突出した EE の頂端側の拡大写真を示す。頂端、基底側どちらにも神経細胞などが隣接してはいない。



補足図 7. 中腸の構造・機能を極端に阻害した個体の寿命の測定

補足図 7. 中腸の構造・機能を極端に阻害した個体の寿命の測定

- A-B) 野生型中腸の全体写真。スケールバーは 500 μ m である。
- B) ISC の増殖と EC の成熟に必要な転写因子 *GATAe* を、*esg-GAL4* によりノックダウンした。胚発生初期から *GATAe* がノックダウンされたことで、成虫の中腸が短くなった。ノックダウンの強度により、EC の分化・成熟マーカーである *Pdm1*(B'' 黄矢印)を発現する細胞は一部に留まり、成熟しきれていない EC が増加した(B' 白矢印)。
- C) 中腸の長さ。中腸の 80%を占める EC が減り、中腸の長さが野生型の約 4 割まで短くなった。
- D) 生存曲線。 *GATAe* ノックダウン個体 (黒線) は、おそらく腸の栄養吸収機能が低下することにより、コントロール (緑線) に比べて寿命が短縮した。

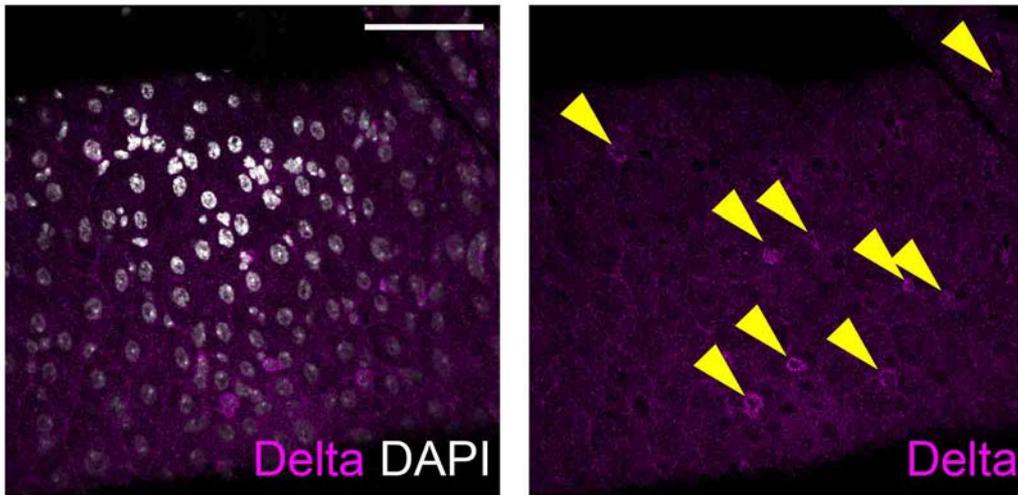


補足図 8. AstA/Dh31 ノックダウン時におけるインスリンシグナルの検出

補足図 8. AstA/Dh31 ノックダウン時におけるインスリンシグナルの検出

- A-C”) インスリンシグナル分子である PI3K の活性化に応答して、細胞膜に局在する GRP1 と GFP との融合タンパク質を発現する系統である tGPH を用いて、インスリンシグナルに対する応答を検出した。スケールバーは 50 μ m である。
- A-C) 内腔側（細胞頂端側）の tGPH の検出。内腔側では EC の核が観察される位置に焦点面を合わせている。A'-C') 環状筋側（細胞基底側）の tGPH の検出。ここでは、ISC や EB、EE が観察される。
- A''-C'') A'-C' の白枠を拡大した。A, A') コントロールとして tGPH と *pros-GAL4* が発現する系統を用いた。コントロールにおける GFP の局在は、主として核内であった。
- B, B') EE において AstA をノックダウンした時の中腸上皮における tGPH の局在も、主として核内であった。
- C, C') EE において Dh31 をノックダウンした時の中腸上皮における tGPH の局在も、主として核内であった。いずれのノックダウン個体も、コントロールと比較して、tGPH の細胞内局在性に違いは見られない。

pros-GAL4 >AstA^{IR}+ Dh31^{IR} at 28th day

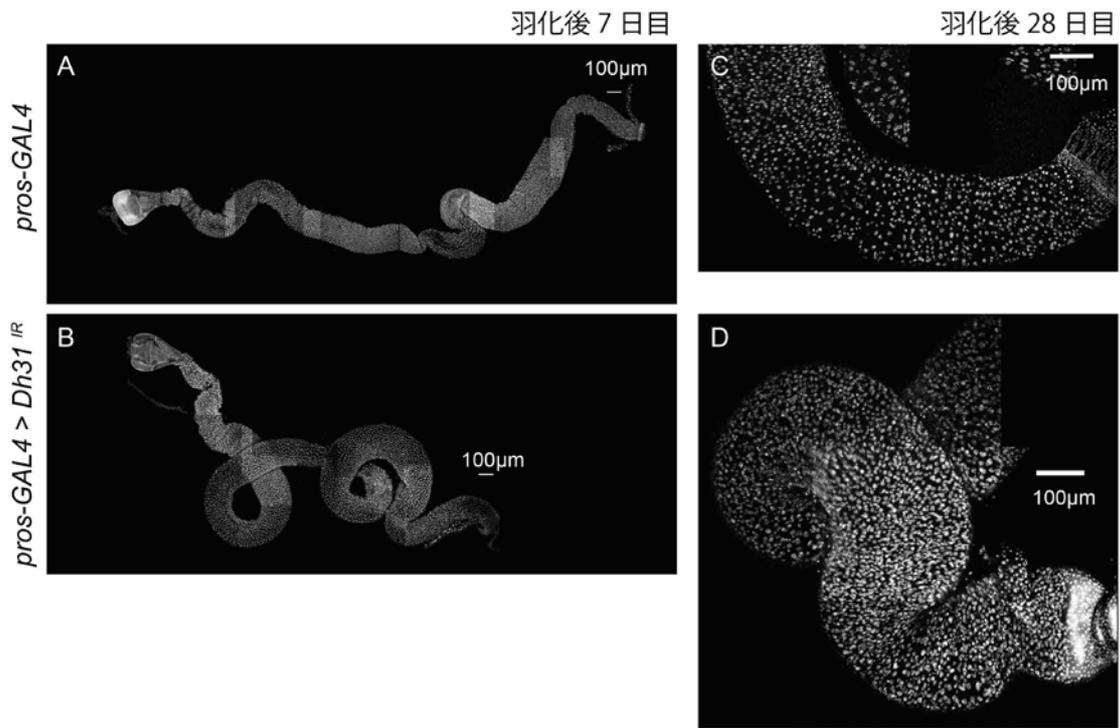


補足図 9. *AstA* と *Dh31* の同時ノックダウンが中腸上皮の老化に及ぼす効果

補足図 9. AstA と Dh31 の同時ノックダウンが中腸上皮の老化に及ぼす効果

pros-GAL4 を用いて、*AstA* と *Dh31* を同時にノックダウンし、腸の老化に対する表現型を観察した。羽化後 28 日目の個体において、ISC は Delta 抗体（マゼンタ）を用いて、核染色は DAPI（白）を用いて、それぞれ検出している。

黄色矢頭で示す散在した 2 倍体の細胞（ISC）でのみ Delta の染色が見られたので、老化は遅延していると考えられた。スケールバーは 50 μ m である。



補足図 10. Dh31 の利尿作用に対する効果

補足図 10. Dh31 の利尿作用に対する効果

pros-GAL4 を用いて *Dh31* をノックダウンし、腸の太さを観察した。

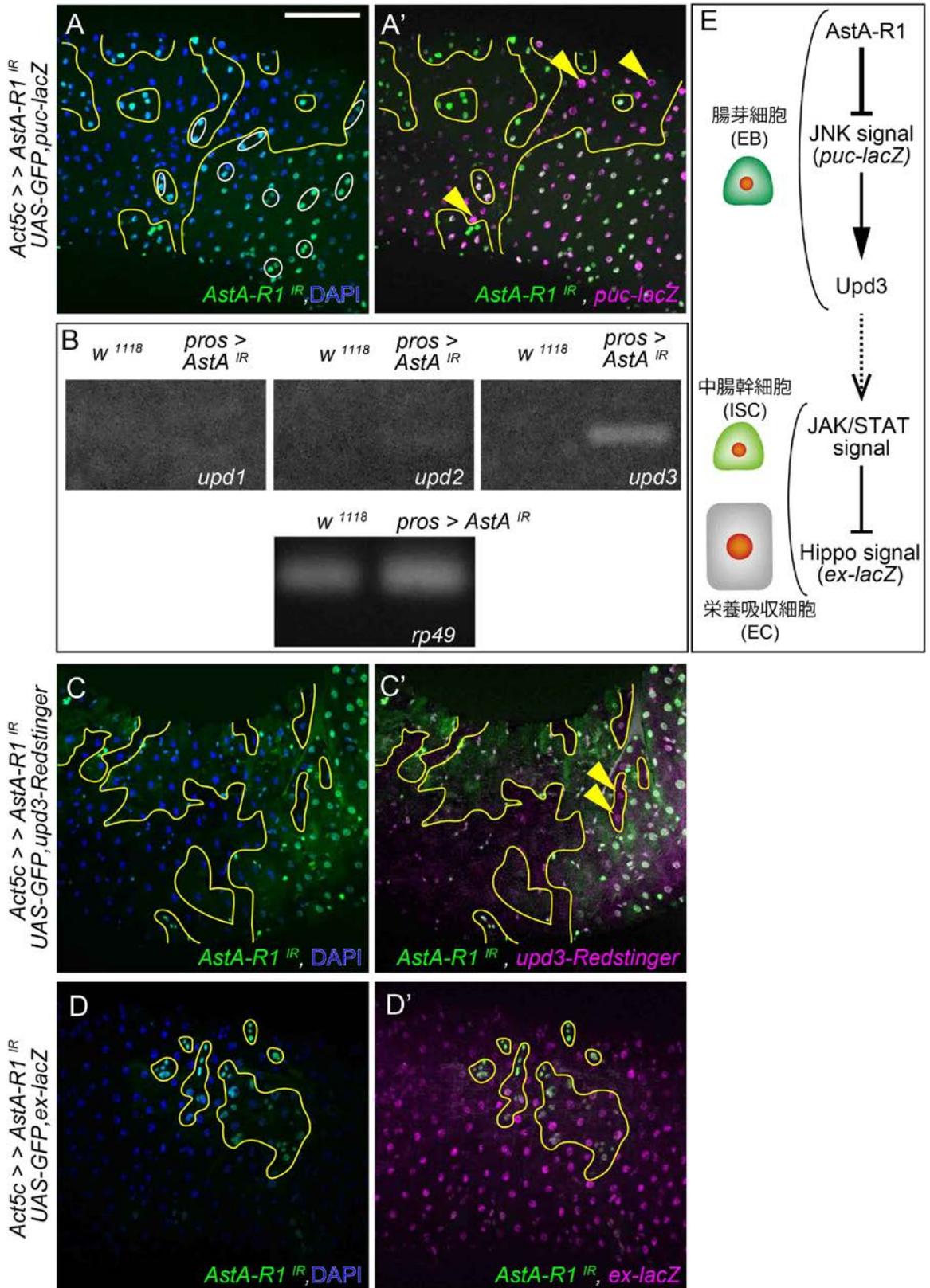
A,B) 羽化後 7 日目の中腸の全体写真。

C, D) 羽化後 28 日目の PMG の写真。

A,C) コントロールとしての *pros>GFP*。

B,D) *pros>Dh31^{IR}*。いずれの観察日においても、*Dh31* ノックダウンではコントロール (231 μ m) よりも腸管が膨満しており(295 μ m)、利尿のための液体分泌 (水吸収) が正常に進んでいないことが分かる。

核を DAPI 染色 (白) を用いて検出している。スケールバーは 100 μ m である。



補足図 11. AstA ノックダウンが引き起こす早期老化症状を誘導するシグナルの探索

補足図 11. AstA ノックダウンが引き起こす早期老化症状を誘導するシグナルの探索

A,C,D) FLP-out 法を用いて、羽化後に *AstA-R1* ノックダウンクローン (黄色の囲い) を誘導して GFP で標識している(緑)。核染色は DAPI により、(青) で示す。スケールバーは 50 μ m である。

A、A') JNK シグナルのレポーター系統である *puc-lacZ* の発現を β -gal 抗体 (マゼンタ) により検出した。代表として 3 つの JNK 活性化 EC の核を指し示す(黄色矢頭)が、広範囲の EC 核に染色が認められる。

B) *w¹¹¹⁸* (コントロール) と *pros>AstA^{IR}* の個体の 21 日目の中腸における Upd1、Upd2、Upd3 (JAK/STAT シグナルのリガンド) の各遺伝子発現量を、RT-PCR 法を用いて検出した。コントロールと比較して、*upd3* 遺伝子が顕著に発現していた。

C) *upd3* のレポーター遺伝子系統である *upd3-redstinger* の発現パターンを観察した (マゼンタ)。AstA 受容体ノックダウンクローンの内部に加えて、外側でも細胞非自律的に *upd3-redstinger* の発現が現れた(黄色矢頭)。

D) Hippo シグナル活性と相反する発現を見せるレポーター遺伝子系統である *ex-lacZ* の発現を β gal 抗体 (マゼンタ) により検出した。クローン細胞集団の内外の広範囲に渡って *ex-lacZ* の発現が観察され、細胞自律性がない。

E) AstA 受容体下流のシグナル伝達経路のモデル図を示す。正常時には腸芽細胞 (EB) に存在する AstA 受容体は JNK シグナルを抑制している。JNK シグナルが活性化すると、*upd3* が転写され、Upd3 が細胞外に放出される。細胞外リガンドである Upd3 は、中腸幹細胞 (ISC) にある受容体を介し JAK/STAT シグナルを活性化させることで細胞増殖抑制シグナルである Hippo シグナルの不活性化を導く。また、より広範囲に Hippo シグナルの不活性化が広がることで、中腸の老化が広範囲に広がっていくと考えられる。しかし、それぞれの因子の間には、ポジティブフィードバック機構が存在していると考えられ、下流側の因子でも早期に活性化する可能性がある。

7.謝辞

本研究で使用したショウジョウバエ系統および抗体を譲渡して下さった、Volker Hartenstein 博士(University of California Los Angeles)、Sarah Bray 博士(University of Cambridge)、Steven X. Hou 博士 (National Institutes of Health)、Jean-François Ferveur 博士(University of Burgundy)、Thomas Graham 博士(University Park)、Jan A. Veenstra 博士(Université de Bordeaux 1)、竹田真木生教授 (神戸大学 (当時))、Bloomington *Drosophila* Stock Center (UAS)、Vienna *Drosophila* RNAi Center (Austria)、*Drosophila* Genetic Resource Center (Japan)、Developmental Studies Hybridoma Bank (UAS)に深く感謝いたします。

学習院大学理学部生命科学科の岡本治正教授および阿形清和教授には博士論文の執筆に関して様々なご助言を賜り、さらには学位論文審査の労をお執り頂きました。この場を借りて御礼申し上げます。

学習院大学理学部生命科学科の安達卓教授には博士論文の執筆に加え、学部時代から現在まで様々な御助言や御激励を賜り、深く感謝しております。

また、谷口喜一郎助教と奥村高志博士には貴重な系統を譲っていただき、さらには研究の初歩からご指導いただきました。両氏にも深く感謝しております。

ミネソタ大学の竹村昌彦博士には、研究に関することだけでなく研究生活についてのアドバイスも賜りました。この場を借りて御礼申し上げます。

最後に、快適な研究・学習環境を提供して下さった学習院大学と安達研究室の皆様
に感謝いたします。

8.参考文献

- Ahlman H, Nilsson (2001) The gut as the largest endocrine organ in the body. *Ann Oncol* 12 Suppl 2:S63-68
- Apidianakis Y, Rahme LG (2011) *Drosophila melanogaster* as a model for human intestinal infection and pathology. *Dis Model Mech* 4:21-30
- Audsley N, Matthews HJ, Price NR, Weaver RJ (2008) Allatoregulatory peptides in Lepidoptera, structures, distribution and functions. *J Insect Physiol* 54:969-980
- 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
- Beehler-Evans R, Micchelli CA (2015) Generation of enteroendocrine cell diversity in midgut stem cell lineages. *Development* 142:654-664
- Biteau B, Hochmuth CE, Jasper H (2008) JNK activity in somatic stem cells causes loss of tissue homeostasis in the aging *Drosophila* gut. *Cell Stem Cell* 3:442-455
- Brand AH, Perrimon N (1993) Targeted gene expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes. *Development* 118:401-415
- 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
- Choi NH, Kim JG, Yang DJ, Kim YS, Yoo MA (2008) Age-related changes in *Drosophila* midgut are associated with PVF2, a PDGF/VEGF-like growth factor. *Aging Cell* 7:318-334
- 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
- Duve H, Thorpe A (1994) Distribution and functional significance of Leu-callatostatins in the blowfly *Calliphora vomitoria*. *Cell Tissue Res* 276:367-379
- Geokas MC, Contreas CN, Majumdar AP (1985) The aging gastrointestinal tract, liver, and pancreas. *Clin Geriatr Med* 1:177-205
- Gershon M (1999) *The Second Brain: A Groundbreaking New Understanding of Nervous Disorders of the Stomach and Intestine*, HarperCollins

- Hayashi S, Ito K, Sado Y, Taniguchi M, Akimoto A, Takeuchi H, Aigaki T, Matsuzaki F, Nakagoshi H, Tanimura T, Ueda R, Uemura T, Yoshihara M, Goto S (2002) GETDB, a database compiling expression patterns and molecular locations of a collection of Gal4 enhancer traps. *Genesis* 34:58-61
- Hentze JL, Carlsson MA, Kondo S, Nassel DR, Rewitz KF (2015) The Neuropeptide Allatostatin A Regulates Metabolism and Feeding Decisions in *Drosophila*. *Sci Rep* 5:11680
- Hergarden AC, Tayler TD, Anderson DJ (2012) Allatostatin-A neurons inhibit feeding behavior in adult *Drosophila*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109:3967-3972
- Ito K, Awano W, Suzuki K, Hiromi Y, Yamamoto D (1997) The *Drosophila* mushroom body is a quadruple structure of clonal units each of which contains a virtually identical set of neurones and glial cells. *Development* 124:761-771
- Jiang H, Grenley MO, Bravo MJ, Blumhagen RZ, Edgar BA (2011) EGFR/Ras/MAPK signaling mediates adult midgut epithelial homeostasis and regeneration in *Drosophila*. *Cell Stem Cell* 8:84-95
- Jiang H, Patel PH, Kohlmaier A, Grenley MO, McEwen DG, Edgar BA (2009) Cytokine/Jak/Stat signaling mediates regeneration and homeostasis in the *Drosophila* midgut. *Cell* 137:1343-1355
- Johnson EC, Shafer OT, Trigg JS, Park J, Schooley DA, Dow JA, Taghert PH (2005) A novel diuretic hormone receptor in *Drosophila*: evidence for conservation of CGRP signaling. *J Exp Biol* 208:1239-1246
- Karpowicz P, Perez J, Perrimon N (2010) The Hippo tumor suppressor pathway regulates intestinal stem cell regeneration. *Development* 137:4135-4145
- 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
- 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
- Lee T, Lee A, Luo L (1999) Development of the *Drosophila* mushroom bodies: sequential generation of three distinct types of neurons from a neuroblast. *Development* 126:4065-4076

- Maeda K, Takemura M, Umemori M, Adachi-Yamada T (2008) E-cadherin prolongs the moment for interaction between intestinal stem cell and its progenitor cell to ensure Notch signaling in adult *Drosophila* midgut. *Genes Cells* 13:1219-1227
- Marianes A, Spradling AC (2013) Physiological and stem cell compartmentalization within the *Drosophila* midgut. *Elife* 2:e00886
- McGuire SE, Le PT, Osborn AJ, Matsumoto K, Davis RL (2003) Spatiotemporal rescue of memory dysfunction in *Drosophila*. *Science* 302:1765-1768
- Micchelli CA, Perrimon N (2006) Evidence that stem cells reside in the adult *Drosophila* midgut epithelium. *Nature* 439:475-479
- Michelson AM (1994) Muscle pattern diversification in *Drosophila* is determined by the autonomous function of homeotic genes in the embryonic mesoderm. *Development* 120:755-768
- Ohlstein B, Spradling A (2006) The adult *Drosophila* posterior midgut is maintained by pluripotent stem cells. *Nature* 439:470-474
- Ohlstein B, Spradling A (2007) Multipotent *Drosophila* intestinal stem cells specify daughter cell fates by differential notch signaling. *Science* 315:988-992
- Okumura T, Takeda K, Taniguchi K, Adachi-Yamada T (2014) betanu integrin inhibits chronic and high level activation of JNK to repress senescence phenotypes in *Drosophila* adult midgut. *PLoS One* 9:e89387
- Okumura T, Takeda K, Kuchiki M, Akaishi M, Taniguchi K, Adachi-Yamada T (2016) GATAe regulates intestinal stem cell maintenance and differentiation in *Drosophila* adult midgut. *Dev Biol* 410:24-35
- Raybould HE (2010) Gut chemosensing: interactions between gut endocrine cells and visceral afferents. *Auton Neurosci* 153:41-46
- Ring JM, Martinez Arias A (1993) puckered, a gene involved in position-specific cell differentiation in the dorsal epidermis of the *Drosophila* larva. *Dev Suppl*:251-259
- Stay B, Chan KK, Woodhead AP (1992) Allatostatin-immunoreactive neurons projecting to the corpora allata of adult *Diploptera punctata*. *Cell Tissue Res* 270:15-23
- Vanderveken M, O'Donnell MJ (2014) Effects of diuretic hormone 31, drosokinin, and allatostatin A on transepithelial K(+) transport and contraction frequency in the midgut and hindgut of larval *Drosophila melanogaster*. *Arch Insect Biochem Physiol* 85:76-93

- Veenstra JA (2009) Peptidergic paracrine and endocrine cells in the midgut of the fruit fly maggot. *Cell Tissue Res* 336:309-323
- Veenstra JA, Ida T (2014) More *Drosophila* enteroendocrine peptides: Orcokinin B and the CCHamides 1 and 2. *Cell Tissue Res* 357:607-621
- Veenstra JA, Agricola HJ, Sellami A (2008) Regulatory peptides in fruit fly midgut. *Cell Tissue Res* 334:499-516
- 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
- Woodhead AP, Stay B, Seidel SL, Khan MA, Tobe SS (1989) Primary structure of four allatostatins: neuropeptide inhibitors of juvenile hormone synthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86:5997-6001
- Zeng X, Chauhan C, Hou SX (2010) Characterization of midgut stem cell- and enteroblast-specific Gal4 lines in *Drosophila*. *Genesis* 48:607-611
- Zielke N, Korzelius J, van Straaten M, Bender K, Schuhknecht GF, Dutta D, Xiang J, Edgar BA (2014) Fly-FUCCI: A versatile tool for studying cell proliferation in complex tissues. *Cell Rep* 7:588-598