

学 位 論 文 題 名

Climatic Adaptations in *Drosophila*

(ショウジョウバエの気候適応)

学位論文内容の要旨

多くの生物は熱帯に起源し、そこから温帯、寒帯へと進出してきたものと考えられている。この過程において低温耐性の獲得は必須である。しかしどのような過程で温帯に適応してきたのか、またいかにして低温耐性を獲得してきたのかについてはほとんど知られていない。

比較的近い過去に熱帯から温帯へと進出してきた昆虫の例として、キイロショウジョウバエ種群が挙げられる。この種群は 12 の種亜群に分けられ、そのうちのタカハシショウジョウバエ、トラフショウジョウバエ、オウトウショウジョウバエ、イチジクショウジョウバエの 4 種亜群において温帯への進出が起こった。ここで興味深い点は、タカハシショウジョウバエ及びトラフショウジョウバエ種亜群には亜熱帯高地に適応した種も見られるということである。このことから、これらの種亜群においては熱帯・亜熱帯低地から一度高地に適応し、その後温帯に進出したという可能性が考えられた。そこでこれらの種亜群に属する亜熱帯低地種、亜熱帯高地種、暖温帯種、冷温帯種について分子系統学的解析を行った。その結果、タカハシショウジョウバエ種亜群については、それぞれの遺伝子間で、またそれらの遺伝子をまとめた配列との間で類推される系統関係が異なり、この種亜群の進化についてははっきりしなかったが、トラフショウジョウバエ種亜群に関しては上記の仮説が支持された。

次に、低温耐性獲得のメカニズムについて研究を行った。低温耐性獲得のメカニズムについては様々な側面から研究が行われているが、熱帯種から冷温帯種まで共通に見られるメカニズムとしては、ストレスタンパク質（ヒートショックタンパク質：HSP）の発現、そして低温順化が挙げられる。温帯種はこうしたストレス応答や低温順化の機能を強化し、高い低温耐性を獲得したという可能性がある。そこで、ストレス耐性獲得とストレスタンパク質の関係、及び低温順化に関わる遺伝子について研究を行った。

HSP は様々なストレスによってその発現が誘導される。HSP の中でも特に HSP70 は最も多量に発現するタンパク質で、ストレス下でのタンパク質の保持・修復・分解に役立っていると考えられている。本研究ではまず、トラフショウジョウバエ種亜群に属する 3 種、*D. watanabei* (亜熱帯低地種)、*D. trapezifrons* (亜熱帯高地種)、*D. triauraria* (温帯種) の高温・低温条件下での HSP70 mRNA の発現パターンを調べた。その結果、高温に強く低温に弱い *D. watanabei* は高温・低温ストレスの両者において、他の 2 種よりも

高い温度で *HSP70* mRNA を発現し始めた。このことは転写開始温度と温度耐性との相関を示唆する。しかし *D. trapezifrons* と *D. triauraria* では温度耐性が異なるにも関わらず、高温・低温ストレスによる転写開始温度は変わらなかった。よってこれら3種間では発現誘導温度と温度耐性との相関は従来考えられているほど厳密ではないことが明らかになった。この問題については、今後さらにタンパク質レベルで検討する必要がある。

多くの温帯種は短日条件で生殖休眠に入る。休眠に入った個体は低温だけでなく、高温、乾燥にも耐性を示す。このように多岐にわたるストレスへの耐性の獲得には *HSP70* の関与が考えられる。そこでストレス下での *HSP70* mRNA の発現を、*D. triauraria* の休眠・非休眠個体間で比較した。その結果、高温及び低温による *HSP70* mRNA の発現には休眠・非休眠個体間で大きな差は見られず、また乾燥条件下では *HSP70* mRNA の発現自体が見られなかった。したがって、休眠個体におけるこれらのストレスに対する耐性の獲得には、*hsp70* 遺伝子の転写調節以外のシステムが関与していることが示唆された。

次に低温順化に関わる遺伝子の探索を行った。多くの外温動物は低温順化によってしだいに低温耐性が増すことが知られているが、その分子メカニズムについてはほとんど分かっていない。

本研究ではキイロショウジョウバエを材料に、25°C で羽化後 14 日間飼育した個体から抽出した mRNA、及び 15°C で 1 日間順化させた個体の mRNA を用い、サブトラクション法により 15°C に順化した個体で発現量が增大している遺伝子の同定を行った。その結果 8 つの遺伝子が得られ、それらの塩基配列を調べたところ新規の遺伝子と思われるものがいくつか見られた。そのうちの発現量の増大が著しいもの（以後、*Dca* 遺伝子；*Drosophila cold acclimation gene*）について解析を進めた。ノーザンブロット解析では、*Dca* 遺伝子は低温順化 24 時間以内に発現量が增大し、48 時間後には減少することが明らかとなった。また、卵から 15°C で飼育した個体でも発現量の増大が確認された。よって、*Dca* 遺伝子は低温順化に何らかの役割を担っていると考えられた。次に RACE 法により *Dca* 遺伝子の全長のクローニングを行い、その全塩基配列を決定した。塩基配列から予想されるアミノ酸配列から、*Dca* 遺伝子はヒト、マウス及びラットでクローニングされている senescence marker protein-30 (SMP30) 遺伝子と相同であると結論づけられた。このタンパク質はカルシウム結合タンパク質であり、細胞内のカルシウム濃度のホメオスタシスに関与していると考えられている。低温ストレスや低温順化によって細胞内カルシウムのホメオスタシスが維持できなくなることが様々な生物で知られており、*Dca* 遺伝子はそのような危機に対して何らかの役割を担っている可能性がある。また、哺乳類の SMP30 は老齢個体でその発現が減少することが知られているが、ショウジョウバエでは加齢に伴いその発現が増大していた。このことから *Dca* 遺伝子は SMP30 遺伝子とは異なる転写制御下にあると考えられた。そこで、*Dca* 遺伝子の上流域のクローニングを行い、その塩基配列を決定した。*Dca* も SMP30 と同様にその上流に AP-1 (SMP30 の転写因子) の結合部位を保持していた。また、*Dca* 遺伝子の上流には stress response element (STRE) が存在し、*Dca* がストレス応答性の遺伝子であることが示唆された。

低温耐性獲得のメカニズムについてはまだ不明な点が多い。しかし本研究、特に *Dca* 遺伝子を得ることができたことにより、この分野での新たな展開が望める。また本研究

及びこれまでの研究から、低温耐性の獲得には多数の複雑なメカニズムが関与していると考えられ、それ故、温帯への進出には大きな遺伝的・生理学的変化が必要であり、熱帯、亜熱帯から温帯への適応はそれほど容易ではなかったと考えられた。

# 学位論文審査の要旨

主 査 教 授 木 村 正 人  
副 査 教 授 高 木 信 夫  
副 査 教 授 戸 田 正 憲  
副 査 助 教 授 鈴 木 仁

学 位 論 文 題 名

## Climatic Adaptations in *Drosophila*

(ショウジョウバエの気候適応)

多くの生物は熱帯に起源し、そこから温帯、寒帯へと進出してきたものと考えられている。この過程において低温耐性の獲得は必須である。しかしどのような過程で温帯に適応してきたのか、またいかにして低温耐性を獲得してきたのかについてはほとんど知られていない。申請者は、まず、比較的近い過去に熱帯から温帯へと進出してきたと考えられている、キイロショウジョウバエ種群に属する亜熱帯低地種、亜熱帯高地種、暖温帯種、冷温帯種について分子系統学的解析を行い、少なくとも、本種群のトラフショウジョウバエ種亜群においては、熱帯・亜熱帯低地から一度高地に適応し、その後温帯に進出したという可能性を示した。

次に、申請者は、低温耐性獲得のメカニズムについて研究を行った。これまでに、低温耐性獲得のメカニズムについては様々な側面から研究が行われており、熱帯種から冷温帯種まで共通に見られるメカニズムとして、ストレスタンパク質（ヒートショックタンパク質：HSP）の発現、低温順化が知られている。したがって、温帯種はこうしたストレス応答や低温順化の機能を強化し、高い低温耐性を獲得した可能性がある。申請者はこのことについて生理学的、分子生物学的に検討した。

申請者は、まず、トラフショウジョウバエ種亜群に属する3種、*D. watanabei*（亜熱帯低地種）、*D. trapezifrons*（亜熱帯高地種）、*D. triauraria*（温帯種）の高温・低温条件下でのHSP70 mRNAの発現パターンを調べ、これら3種間では発現誘導温度と温度耐性との相関は従来考えられているほど厳密ではないことを明らかにした。また、*D. triauraria*は短日条件で生殖休眠に入るが、休眠個体は低温だけでなく、高温、乾燥にも耐性を示すことが知られている。申請者は、このように多岐にわたるストレスへの耐性の獲得には

HSP70 が関与していると考え、ストレス下での HSP70 mRNA の発現を休眠・非休眠個体間で比較した。その結果、高温及び低温による HSP70 mRNA の発現には休眠・非休眠個体間で大きな差は見られないことが明らかになった。これらの結果から、申請者は、温帯種、また休眠個体は *hsp70* 遺伝子の発現を調節し低温耐性を獲得している訳ではないと結論している。

申請者は次に低温順化に関わる遺伝子の探索を行った。これまでに、外温動物では低温順化によってしだいに低温耐性が増すことが知られているが、その分子メカニズムについてはほとんど分かっていない。申請者は、キイロショウジョウバエを材料に、サブトラクション法により、低温に順化した個体で発現量が増大している遺伝子の探索を行った。その結果、8つの遺伝子を得ることができ、そのうちの発現量の増大が著しいもの (*Dca* 遺伝子: *Drosophila cold acclimation gene*) について、RACE 法により全長のクローニングを行い、その全塩基配列を決定した。そして、塩基配列から予想されるアミノ酸配列から、*Dca* 遺伝子は哺乳類で知られている senescence marker protein-30 (SMP30) 遺伝子と相同であることを示した。このタンパク質はカルシウム結合タンパク質であり、細胞内のカルシウム濃度のホメオスタシスに関与していると考えられている。低温ストレスや低温順化によって細胞内カルシウムのホメオスタシスが維持できなくなることが様々な生物で知られており、*Dca* 遺伝子はそのような危機に対して何らかの役割を担っている可能性が示唆された。そこで、申請者は *Dca* 遺伝子の上流域のクローニングを行い、その塩基配列を決定した。その結果、*Dca* の上流には stress response element が存在し、*Dca* がストレス応答性の遺伝子であることが示唆された。

低温耐性獲得のメカニズムについてはまだ不明な点が多い。しかし本研究、特に *Dca* 遺伝子を得ることができたことにより、この分野での新たな展開が可能になった。また、熱帯から温帯への進出の経路を推定した研究はこれまでほとんどなく、本研究は極めてユニークである。このように、これら一連の研究は非常に独創性に富んだものであり、また、生物の多様性の緯度による変化といった現象を理解する上でも極めて有用である。

よって審査員一同はこれらの成果を高く評価し、また研究者として誠実かつ熱心であり、大学院課程における研鑽や取得単位などとも併せ、申請者が博士 (地球環境科学) の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。