

栄養依存的な神経突起発達を調節する  
組織間シグナル伝達の研究

金岡 泰哲

# 目次

論文要旨 .....	4
略語表.....	6
<b>第1章 序論</b> .....	<b>8</b>
1.1. 栄養環境に応じた神経系の発達.....	8
1.2. ショウジョウバエ幼虫の C4da neuron.....	9
1.3. C4da neuron をモデル系として、細胞自律的または非自律的な樹状突起の形態形成メカニズムが明らかにされてきた.....	9
1.4. C4da neuron の樹状突起は低栄養状態で複雑な形態になる .....	10
1.5. 本研究の概要 .....	11
<b>第2章 結果</b> .....	<b>13</b>
2.1. 突起数増加表現型はビタミン・金属イオン・コレステロールの不足により引き起こされる .....	13
2.1.1. 突起数増加表現型の定量的な評価方法の検討 .....	13
2.1.2. アミノ酸の不足は突起数増加表現型の主な原因ではない .....	13
2.1.3. ビタミン・金属イオン・コレステロールを LYD へ同時に添加すると、突起数増加表現型が減弱する .....	14
2.1.4. 発生の遅延は突起数増加表現型を引き起こす主要な原因ではない.....	15
2.2. 突起数増加表現型に寄与するシグナル伝達機構の解析.....	17
2.2.1. 栄養感知に働くシグナル伝達経路に属する神経細胞内因子の探索 .....	17
2.2.2. 細胞外からのシグナルを受け取り、低栄養依存的に突起数増加表現型に寄与する受容体の探索 .....	18
2.2.3. LYD 条件下では筋肉由来の Wg が C4da neuron の樹状突起の分岐を促進する .....	20
2.2.4. Wg-Ror 経路による Akt の活性化が突起数増加表現型を引き起こす .....	21
2.2.5. C4da neuron 以外の da neuron における Akt の活性化を伴う突起数増加表現型の有無の検証 .....	23
2.2.6. 筋肉における JAK/STAT 経路が Wg の発現と突起数増加表現型の抑制に寄与する.....	24

2.3. C4da neuron の突起数増加表現型に伴う生理学的な影響の追究 .....	26
2.3.1. LYD で飼育した幼虫の C4da neuron では青色光に対しての反応性が低下する .....	26
2.3.2. LYD で飼育した幼虫は光忌避行動を示す頻度が減少する .....	26
<b>第3章 考察</b> .....	<b>28</b>
3.1. 突起数増加表現型の原因となる栄養素の探索から得られた展望 .....	28
3.2. Wg-Ror-Akt 経路が他の樹状突起形態形成のメカニズムと協調して突起数増加表現型に寄与する可能性について .....	29
3.3. 筋肉は栄養状態を感知し、末梢の組織への情報伝達を仲介する組織である .....	30
3.4. C4da neuron の突起数増加表現型と個体・神経機能の栄養依存的な変化 .....	31
<b>第4章 材料と方法</b> .....	<b>33</b>
4.1. ショウジョウバエ系統 .....	33
4.2. 実験室餌の調製 .....	33
4.3. da neuron の画像取得と樹状突起末端数の計測 .....	34
4.4. 成長を遅延させた幼虫のサンプリング .....	35
4.5. 抗体染色 .....	35
4.6. シグナル強度の定量 .....	36
4.7. 電気生理学的解析 .....	36
4.8. Light/Dark choice assay .....	37
4.9. RNA-sequencing (RNA-seq) 解析 .....	38
4.10. 統計解析 .....	38
<b>図</b> .....	<b>39</b>
<b>表</b> .....	<b>105</b>
<b>引用文献</b> .....	<b>121</b>
<b>注釈</b> .....	<b>132</b>
<b>謝辞</b> .....	<b>133</b>

## 論文要旨

個体を取り巻く栄養環境は神経系の発達に影響を与える。これまで、神経幹細胞の分裂が調節される仕組みは比較的研究されてきた一方、分裂・分化を終えた神経細胞の発達に栄養状態が作用する分子メカニズムについては、知見が少ない。以前の研究から、酵母量の少ない低栄養の餌 (low-yeast diet; LYD) においてショウジョウバエ幼虫を飼育すると、意外なことに、高栄養の餌 (high-yeast diet; HYD) に比べて、感覚神経細胞の一つである C4da neuron の樹状突起の分岐が盛んになる表現型 (突起数増加表現型) が見出されていた。本研究では、この表現型をモデル系とし、どの栄養素の摂取量の違いが、どのように神経細胞へ伝わるのか、また、栄養条件依存的に神経・個体機能がどのように変化するのかを追究した。

まずは、突起数増加表現型の原因栄養素を明らかにするため、LYD に添加することにより、表現型が減弱する栄養素を探索した。その結果、LYD では単一の栄養素ではなく、ビタミン・金属イオン・コレステロールが同時に不足することにより、この表現型が引き起こされることが示唆された。また、突起数増加表現型を起こすシグナリング機構を追究するために、C4da neuron 特異的な遺伝子ノックダウン実験を行い、Akt-Tor シグナリングや、その上流の因子としてチロシンキナーゼ受容体の Ror が表現型に寄与することがわかった。次に、Ror のリガンドとして知られる複数の Wnt 分子に着目した解析から、筋肉由来の Wingless (Wg) が表現型に寄与することが示唆された。そこで、抗体染色法やレポーターアッセイを用いて、これらのシグナル因子の発現や活性が栄養条件依存的にどのように制御されるかを解析した。その結果、LYD では筋肉において *wg* の遺伝子発現が上昇し、C4da neuron の Ror が筋肉由来の Wg を受容することで、細胞内の Akt が活性化され、樹状突起の分岐が促進することがわかった。また、ビタミン・金属イオン・コレステロールを LYD に添加すると、筋肉における Wg の発現量の上昇が見られなくなったことから、これらの栄養素群の不足に応じて、筋肉と神経細胞間の Wg-Ror-Akt によるシグナル伝達が突起数増加表現型を引き起こすことが明らかになった。さらに、筋肉で栄養条件依存的に *wg* の発現量を調節するシグナル伝達経路を探索した。その結果、

脂肪体や血球由来の全身性の分泌因子により活性化された JAK/STAT 経路が、高栄養の HYD において、wg の発現上昇、さらには C4da neuron の突起数増加表現型を部分的に抑制することが示唆された。

最後に、本研究に用いた栄養条件により、神経機能、そして個体の行動にどのような影響が見られるかを調べた。C4da neuron における電気生理学的な実験や幼虫の行動解析から、LYD では HYD に比べて C4da neuron および個体における光刺激への応答性が低下することが分かった。この低栄養依存的な応答性の鈍化は、幼虫がリスクを冒してでも食物を探索することを可能にする、適応的な意義を持つのではないかと推察した。

以上のように、本研究ではショウジョウバエの感覚神経細胞において、特定の栄養素群の不足に応じて、筋肉由来の組織間シグナル伝達が神経細胞の発達に作用するメカニズムを明らかにした。

## 略語表

C4da neuron	Class IV dendritic arborization neuron
da neuron	dendritic arborization neuron
HYD	High-yeast diet
LYD	Low-yeast diet
EAA	Essential amino acids
VMC	Vitamin • Metal ion • Cholesterol
<i>Akt</i>	<i>Akt kinase</i> (遺伝子名)
p-Akt	リン酸化 Akt
myr-Akt	myristoylated Akt
<i>Tor</i>	<i>Target of rapamycin</i> (遺伝子名)
RTK	Receptor tyrosine kinase
<i>Ror</i>	<i>Receptor tyrosine kinase-like orphan receptor</i> (遺伝子名)
<i>wg</i>	<i>wingless</i> (遺伝子名)
<i>fz</i>	<i>frizzled</i> (遺伝子名)
JAK/STAT	Janus kinase-signal transducer and activator of transcription
<i>hop</i>	<i>hopscotch</i> (遺伝子名)
<i>Stat92E</i>	<i>Signal-transducer and activator of transcription protein at 92</i> (遺伝子名)
<i>upd</i>	<i>unpaired</i> (遺伝子名)
<i>dome</i>	<i>domeless</i> (遺伝子名)
KD	knockdown
DN	dominant negative
OE	overexpression

GFP	Green fluorescent protein
RNA-seq	RNA-sequencing
AEL	after egg laying
L3 larva	third-instar larva

# 第1章 序論

## 1.1. 栄養環境に応じた神経系の発達

個体の遺伝学的な要因に加えて、個体を取り巻く環境、特に成長期の栄養環境は生物の体づくりに大きな影響を及ぼす。その影響は複雑であり、より高栄養条件の方が、個体、器官、細胞のサイズが大きくなるとは限らない。例えば、コガネムシ科の *Onthophagus acuminatus* は幼虫期に十分な食物を摂取すると、低栄養条件下で成長した個体に比べて、成虫期に体が大きくなるとともに、角が著しく長く発達する (図 1A-C ; Emlen, 1997)。その一方で、シロイヌナズナの根毛は、むしろ高栄養条件下で成長が抑制されることが知られている。(図 1D ; Shibata et al., 2022)。動物の神経系の発生に目を向けると、それらは神経幹細胞の分裂・分化に始まり、誕生した神経細胞は情報の入力を行う樹状突起や出力を行う軸索からなる神経突起を複雑かつ高度に制御しながら発達させ、突起間の接続により形成された神経回路が機能する。これまで、これらの過程に栄養環境が影響を及ぼすことが報告されてきた。神経幹細胞の分裂が栄養依存的に制御される仕組みは多様な動物種で研究されており、例えば、アフリカツメガエルの幼生の視蓋では、食物が得られない時には細胞分裂を止め、再び食物を摂取すると、細胞分裂が再開する (図 2 ; McKeown et al., 2016; McKeown and Cline, 2019)。一方で、分化を終えた神経細胞については、比較的研究が少ないものの、栄養環境が樹状突起や軸索の発達に影響を及ぼすことが報告されている (Shimono et al., 2014; Liu et al., 2017; Rincel et al., 2017)。例えばキイロショウジョウバエの幼虫では、低栄養条件下に比べて高栄養条件下において、セロトニン産生ニューロンが前胸腺へ投射する軸索を長く伸長し、それに伴って幼虫の生育を促すステロイドホルモンの生合成が亢進する (図 3 ; Shimada-Niwa and Niwa, 2014)。しかし、体内の栄養状態が分化を終えた神経細胞にどのように伝わり、神経突起の成長を制御するかについて、ほとんどの分子メカニズムは未知である。

食物から得られた栄養素は消化管によって吸収され、体内をめぐって、各器官に感知される。さらに、器官同士でシグナル伝達物質を受け渡すことで、全身の器官の成長が栄養状態に応じて調節される (図 4; Wang et al., 2014; Droujinine and Perrimon 2016; Texada et al., 2020)。それらの伝達物質は比較的低分子の代謝産物に加



え、水溶性のタンパク質やリポタンパク質のような高分子などが担っている。神経細胞にも、体内のアミノ酸などの栄養素を直接感知する機構があるほか、他の器官から分泌されたシグナル分子を受け取って細胞の成長を制御する仕組みが備わっている (Morton et al., 2014; Jayakumar and Hasan, 2018)。したがって、これらのメカニズムが働くことで、神経細胞が栄養状態を感知し、それに応じて神経突起が発達する可能性が考えられる。

## 1.2. ショウジョウバエ幼虫の C4da neuron

栄養依存的に神経細胞が発達する仕組みを単一細胞レベルで解析するために適した系として、キイロショウジョウバエの末梢感覚神経細胞である class IV dendritic arborization neuron (C4da neuron) が挙げられる。このニューロンは遺伝学的な操作手法が整備されている上、樹状突起は表皮と筋肉の間に二次元的に展開しており、形態観察が簡便である (図 5)。この神経細胞の樹状突起は全身をくまなく覆っており、高温、針やトゲで刺すような局所的な圧力、そして短波長の光といった侵害性刺激に応答し、個体の忌避行動を引き起こす (図 6; Tracey et al., 2003; Hwang et al., 2007; Xiang et al., 2010; Zhong et al., 2010; Guntur et al., 2015; Chin and Tracey, 2017)。また、以上の侵害性刺激への応答の他に、幼虫後期において体内のアミノ酸の欠乏を感知する役割も報告されている。具体的には、C4da neuron がアミノ酸トランスポーターを介して体内のアミノ酸の量を感じ、中枢神経系の下流の神経細胞に情報を伝達することで、幼虫が栄養ストレスに晒された場合にもそれを乗り越え、蛹に成長するのに寄与する (Jayakumar et al., 2016, 2018)。

## 1.3. C4da neuron をモデル系として、細胞自律的または非自律的な樹状突起の形態形成メカニズムが明らかにされてきた

これまで、C4da neuron を用いた遺伝学的な解析から、樹状突起の形態形成メカニズムについて神経細胞自律的、非自律的ないずれの仕組みも研究されてきた (Jan and Jan, 2010; Dong et al., 2015; Valnegri et al., 2015)。細胞自律的な仕組みとして、神経細胞種固有の樹状突起形態を生み出す転写調節因子や (Hattori et al., 2013)、アミノ酸トランスポーターの SLC36/Pathetic (Path)、および脂質合成で働く sterol

regulatory element binding protein (SREBP) などの、代謝産物の取り込みや合成に寄与する因子が、樹状突起の適切な成長に寄与することが明らかにされてきた (Meltzer et al., 2017; Ziegler et al., 2017)。一方で、細胞非自律的な仕組みとして、特に C4da neuron と、近傍の組織の一つである表皮との間の相互作用について盛んに研究が行われてきた (Tenenbaum et al., 2017; Han et al., 2012; Kim et al., 2012; Jiang et al., 2019)。例えば、表皮細胞から放出されたりガンド分子を C4da neuron が受容することで、樹状突起の伸長や細胞外基質との接着が制御され、樹状突起が体表を二次元的かつ充填的に伸長する仕組みが報告されている (図 7; Hoyer et al., 2018; Meltzer et al., 2016)。対照的に、筋肉も C4da neuron の近傍に位置する主要な組織であるが、C4da neuron との相互作用については知見が少ない (Yasunaga et al., 2010)。

#### 1.4. C4da neuron の樹状突起は低栄養状態で複雑な形態になる

C4da neuron の樹状突起は栄養状態に応じて異なる形態に発達する。餌中の酵母含有量が多い High-yeast-diet (HYD) に比べて、酵母含有量が少ない Low-yeast diet (LYD) を摂食させた幼虫では (図 8)、意外なことに C4da neuron の樹状突起が盛んに分岐し (図 9A, B; Watanabe et al., 2017; Poe et al., 2020)、HYD よりも LYD で C4da neuron の樹状突起末端、そして突起の密度が増加する (図 9C-E)。この低栄養依存的な表現型を、以降は「突起数増加表現型」と呼ぶ。しかし、酵母中のどの栄養成分の欠乏がこの表現型を引き起こしているのか、また、体内の栄養状態がどのようにして C4da neuron に伝わり、細胞内でどのようなシグナル伝達経路が働いて、樹状突起の分岐が促進されるかは不明であった。これらの問いを明らかにするためには、多様な栄養条件や遺伝学的条件についての表現型の定量的な解析が必要である。しかしながら、既存の画像解析ソフトでは突起末端の認識にエラーが多く、本研究の目的には適さなかった。そこで、私たちは多条件での表現型の定量解析を実現するため、機械学習を用いて樹状突起末端を自動で検出するプログラム DeTerm を開発した (図 10; Kanaoka et al, 2019)。

## 1.5. 本研究の概要

本研究では、栄養環境が神経突起の形態形成に作用する分子メカニズムと、それとともにどのような生理学的な変化がもたらされるのかを解明することを目指した。そのために、C4da neuron の突起数増加表現型をモデル系とし、DeTerm を利用した多条件の解析から、どの栄養素の欠乏が表現型を引き起こすのか、表現型を引き起こすシグナル伝達機構の分子的な実体は何か、そして低栄養条件下での突起数増加表現型の生理学的意義は何かの3つの問いに分けて解析を行なった (図 11)。

まず、栄養素の添加による突起数増加表現型のレスキュー実験を行い、この表現型は LYD でビタミン・金属イオン・コレステロールが同時に不足することにより、引き起こされていることが示唆された。また、低栄養依存的に表現型を引き起こすシグナル伝達経路を探索する目的で、C4da neuron 特異的な遺伝子ノックダウン実験などから、Akt キナーゼ (Akt) と、その上流で働くチロシンキナーゼ受容体の Ror が C4da neuron 内で表現型に寄与することを見出した。次に、C4da neuron に栄養状態が伝わる仕組みとして、近傍の組織が栄養状態を感知し、C4da neuron に分泌因子を伝達することで突起数増加表現型を引き起こしているのではないかと仮説を立て、検討した。その結果、LYD では体壁の筋肉で Wnt タンパク質の一つである Wingless (Wg) の発現量が上昇し、そこから分泌された Wg が C4da neuron の Ror により受容され、Akt を活性化することで表現型を引き起こす組織連関の仕組みが明らかとなった。筋肉における Wg タンパク質の増加は、少なくとも *wg* 遺伝子の転写レベルでの制御を介していることもわかった。また、ビタミン、金属イオン、コレステロールを LYD に同時に添加することにより、Wg の発現上昇が抑制されたことから、これらの栄養素の不足は Wg の発現上昇を介して表現型を生み出していることが分かった。次に、筋肉において *wg* の発現が調節される仕組みを追究した。その結果、HYD においては、脂肪体や血球細胞由来の全身性の Upd2 が筋肉における JAK/STAT 経路の活性化を経て、Wg の発現抑制に部分的に寄与していることが示唆された。

最後に、LYD では C4da neuron の突起数増加表現型とともに、神経細胞レベルや個体レベルでどのような生理学的な変化が見られるのかを解析した。この解析

から、LYD 飼育条件下では C4da neuron の青色光への応答性が鈍くなるとともに、幼虫の光忌避行動が減弱することが分かった。このような光刺激への反応性の鈍化は、個体が低栄養条件下で生存するために適した行動を選択する上で、適応的な意義を持つ可能性が考えられる。

## 第2章 結果

### 2.1. 突起数増加表現型はビタミン・金属イオン・コレステロールの不足により引き起こされる

#### 2.1.1. 突起数増加表現型の定量的な評価方法の検討

本研究では先行研究 (Watanabe et al., 2017) と同様に、HYD と LYD で成虫に卵を産ませ、幼虫期を通してその餌で飼育し、後期三齢幼虫まで成長した個体の C4da neuron を観察した (図 8C)。また、樹状突起末端の数を短時間で効率的に計測するため、突起末端自動検出プログラム “DeTerm” (Kanaoka et al., 2019) を利用して、自動的に樹状突起末端を計数した (図 9A, B)。この定量解析により、HYD よりも LYD で一細胞あたりの突起末端の数が多く、突起末端の数を受容野の面積で割った突起密度も顕著に大きい値を取ることが分かる (図 9C-E)。加えて、横軸に受容野の面積を、縦軸に末端数をとった二次元のプロットでは、餌条件間の分布が分離することが分かった (図 9F)。本研究では、突起末端の密度と、二次元プロットの餌条件間の分布がどれだけ異なるかを突起数増加表現型の指標とした。

#### 2.1.2. アミノ酸の不足は突起数増加表現型の主な原因ではない

HYD と LYD の主要な材料は糖、ペプトン、そして酵母由来の材料であり、HYD と LYD では酵母由来の材料とペプトンの量のみが異なる (図 8A)。酵母は多様な栄養素を含んでいるが、特にショウジョウバエの餌においては、アミノ酸源として捉えられることが多い。そこで、私は LYD ではアミノ酸の量が不足して突起数増加表現型が引き起こされるのではないかと考えた。この可能性を検証するため、アミノ酸を LYD に添加した餌で幼虫を飼育し、表現型が減弱するかどうかを調べた (図 12)。しかし、必須アミノ酸溶液を添加した餌では、二次元プロットの分布や突起密度は LYD と同様であり、突起数増加表現型は減弱しなかった (図 13A-D)。また、必須アミノ酸と非必須アミノ酸の両方を含むショウジョウバエの完全化学合成培地由来のアミノ酸溶液 (Piper et al., 2017) を二種類の濃度 (1x と 3x) で添加したところ、1x で添加した餌では、LYD と比べて突起密度が統計的に有意に減少したものの、二次元プロットで見ると、LYD の近傍かつ、HYD からは大きく分離して分布

しており、表現型が減弱していたとしても、その効果は限定的であった（図 13E, G, H）。また、さらに高濃度の 3x アミノ酸溶液を添加すると、幼虫の発育が悪くなり、発生速度が遅延するとともに体長も小さくなる傾向が見られた。これらの個体では、むしろ LYD に比べて突起密度が大きくなり、表現型の減弱は見られなかった（図 13F-H）。

餌を作製する工程上、これらのアミノ酸溶液は添加できる濃度に限界があり、表現型の減弱に十分な量が添加できていない可能性が考えられた。そこで、粉末状のカゼイン加水分解物のペプトンを、タンパク質含有量が HYD と同程度になるまで LYD に添加したが、この餌でも表現型に顕著な影響は見られなかった（図 13H-J）。したがって、アミノ酸の不足は表現型の中心的な原因ではなく、それ以外の酵母由来の成分が表現型の原因栄養素であることが示唆された。

### 2.1.3. ビタミン・金属イオン・コレステロールを LYD へ同時に添加すると、突起数増加表現型が減弱する

私は、アミノ酸以外の栄養素について突起数増加表現型の原因栄養素を網羅的に探索するためには、表現型を減弱しうる栄養化合物の混合物を LYD に添加し、その中から原因成分を絞りこんでいく方法が有効ではないかと考えた。そこで、この目的に適した栄養素の混合物として、ショウジョウバエの完全化学合成培地である Holidic medium に注目した。この培地は酵母に含まれる既知の主要な栄養素を参考に開発されており、ショウジョウバエはこの培地のみで幼虫から成虫にまで成長できる (Piper et al., 2014, 2017)。まずは、アミノ酸を除いた 4 つの分画、ビタミン (V)、金属イオン (M)、コレステロール (C)、そしてその他の分画 (O: 核酸、myo-イノシトール、塩化コリン) を同時に LYD へ添加した (LYD + VMCO、図 14)。LYD + VMCO で飼育した幼虫では、二次元プロットで見ると、突起末端が HYD と LYD の中間あたりに分布しており、突起密度が LYD に比べて有意に低いことから、部分的ではあるものの、突起数増加表現型が減弱することが分かった（図 15A, B, D, E）。また、LYD + VMCO にさらにアミノ酸を添加しても表現型の減弱の度合いは変化しなかった（図 15C-E）。この結果からもアミノ酸の不足は表現型に中心的には寄与しないことが示唆された。

この VMCO の中に原因栄養成分が含まれると考え、さらなる候補栄養素の絞り込みを試みた。しかし、LYD + VMCO からビタミン、金属イオン、コレステロールのどの画分を抜いても突起数増加表現型が減弱しなかった (図 16A-G)。一方で、その他の画分を抜いた添加餌 (LYD + VMC) と LYD + VMCO は表現型の減弱の度合いが同程度であった (図 16H-J)。これらの実験結果より、その他の画分に含まれる核酸、myo-イノシトール、塩化コリンの添加は表現型の減弱には関与しない一方、ビタミン・金属イオン・コレステロールを同時に LYD へ添加することで表現型が減弱することが分かった (図 17)。したがって、ビタミン・金属イオン・コレステロールが同時に不足することにより、LYD 条件下で表現型が引き起こされることが示唆された。

#### 2.1.4. 発生の遅延は突起数増加表現型を引き起こす主要な原因ではない

LYD 飼育条件下では HYD よりも幼虫の成長が遅延する (図 8C)。したがって、LYD では成長に長い時間を要したために、副次的に最終的な樹状突起の分岐が多くなる可能性が考えられた。しかし、LYD と LYD + VMC で飼育した幼虫の成長速度に顕著な違いは見られないにも関わらず、LYD + VMC では表現型が減弱した (図 12, 16H-J)。このことから、突起数増加表現型は幼虫期の延長のみが原因ではないことが示唆された。発生の遅延が突起数増加表現型を引き起こすのかをさらに検証するため、酵母由来の成分量以外の要因で幼虫の発生を遅延させ、突起数増加表現型が見られるかどうかを検証した。過剰の糖を含む餌で飼育した幼虫はインスリン抵抗性を示し、発生が遅延することが報告されている (Musselman et al., 2011)。実際に HYD にスクロースを添加した餌 (HYD + sucrose) で幼虫を飼育したところ、HYD に比べて発生が遅延した。しかし、LYD と同様のタイミングで HYD + sucrose から発生した後期 3 齢幼虫の C4da neuron を観察しても、突起数増加表現型は見られなかった (図 18A-E)。この手法に加え、遺伝学的に発生を遅延させた幼虫の C4da neuron も観察した。幼虫の翅原基で *Insulin-like peptide 8 (Ilp8)* を過剰発現すると、幼虫の発生が遅延する (Colombani et al., 2012)。この幼虫を HYD で飼育したところ、発生のタイミングが遅延したが、同様に C4da neuron の突起数増加表現型は見られなかった (図 18F-J)。以上の結果から、発生の遅延は突起数増加表現

型の主要な原因ではなく、ビタミン・金属イオン・コレステロールの不足によって、C4da neuron の樹状突起の分岐が積極的に促進される仕組みが働いている可能性が考えられた。



## 2.2. 突起数増加表現型に寄与するシグナル伝達機構の解析

### 2.2.1. 栄養感知に働くシグナル伝達経路に属する神経細胞内因子の探索

低栄養依存的な突起数増加表現型のシグナル伝達機構を明らかにするため、まずは C4da neuron の細胞内で表現型に寄与する因子を探索した。そのために、栄養を感知する機能が報告されているシグナル伝達経路の構成因子に注目し、C4da neuron 特異的にそれらの因子について遺伝子ノックダウンを行って、表現型が抑制されるかどうかを検証した (表 1、図 19-21)。各シグナル伝達経路について検証した結果、系統番号 v2902 の RNAi 系統を用いた *Akt* キナーゼ (*Akt*) のノックダウンにより、突起数増加表現型が減弱することが分かった (図 21A, B, D, E, G, I)。二次元プロットを見ると、ノックダウンした細胞で LYD の 95%信頼区間の楕円 (図 21G、青い点線) がコントロール、*Akt* ノックダウンを問わず HYD の楕円 (図 21G、赤い実線および点線) に近い場所に位置していた。また、コントロールと比べて、餌条件間の突起密度の差が *Akt* をノックダウンした細胞で小さくなった (図 21I; two-way ANOVA を用いた餌条件と遺伝子型の交互作用の有無の検定による判定)。一方で、別の RNAi 系統 (BL33615) による *Akt* のノックダウンでは、餌条件に関わらず樹状突起の末端数が減少し、突起の全長が短くなった (図 21C, F, H, J、図 22C, D)。次に、これらの *Akt* のノックダウン細胞について、リン酸化 Akt (p-Akt) の抗体染色を行ったところ、どちらの系統を用いたノックダウンでも、コントロール細胞と比べて有意に p-Akt のシグナルが減弱した。ただし、v2902 系統よりも BL33615 系統の方がその度合いが大きいことが分かった (図 23A-H)。したがって、C4da neuron におけるノックダウンの効率は v2902 に比べて BL33615 の方が高いことが示唆された。Akt は実験室標準餌での飼育で C4da neuron の樹状突起の成長に必要なことが報告されており (Parrish et al., 2009)、BL33615 系統によるノックダウンでは、通常発生でも必要な基底の Akt の活性まで阻害された一方で、v2902 系統による比較的弱いノックダウンでは、LYD における突起の分岐促進に必要な Akt の活性に選択的に影響したのではないかと考えた。

次に、Akt の下流で働くことが知られるシグナル因子を C4da neuron で機能阻害し、表現型に影響が見られるかどうかを検証した (図 24)。その結果、target of

rapamycin (Tor) または Ribosomal protein S6 kinase (S6k) について、C4da neuron で dominant negative form を強制発現し、タンパク質の機能を阻害したところ、突起数増加表現型が有意に減弱した (図 24A-C, F-H, K, L, O, P)。また、*Thor* のノックダウンでは顕著な効果は見られなかったものの (図 24E, J, N, R)、*transcription initiation factor 1A (Tif-1A)* をノックダウンした細胞でも表現型の減弱が見られた (図 24D, I, M, Q)。S6k と Tif-1A は Tor complex の下流で活性化され、S6k はタンパク質合成に、Tif1A はリボソーム RNA の合成に機能することで、細胞の成長を促進する働きを持つ (図 25; Texada et al., 2020)。以上の結果から、Akt-Tor 経路の働きが C4da neuron の突起数増加表現型に必要であることが示唆された。

### 2.2.2. 細胞外からのシグナルを受け取り、低栄養依存的に突起数増加表現型に寄与する受容体の探索

ヒトなどと同じくショウジョウバエでも、内分泌組織が栄養状態に応じて分泌因子を放出することで、全身の末梢組織におけるシグナルカスケードや遺伝子発現が調節される (Droujinine and Perrimon, 2016)。そこで、C4da neuron でも、他の組織由来の分泌因子を受容し、Akt-Tor 経路が活性化することで、低栄養依存的に突起数増加表現型が引き起こされる可能性を考えた。Akt はチロシンキナーゼ受容体 (Receptor tyrosine kinase / RTK) の下流で活性が制御される (Sopko and Perrimon, 2013)。そこで、C4da neuron 特異的に 20 遺伝子の RTK を対象にして、突起数増加表現型に寄与する受容体のノックダウンスクリーニングを行った (表 2)。まずは、一次スクリーニングとして、C4da neuron で発現する GAL4 ドライバーである *ppk-GAL4* と *Gr28b.c-GAL4* を同時に持つハエ系統を用いて RNAi を発現させ、表現型に寄与する受容体を絞り込んだ。具体的には、各条件 3~8 細胞の画像を取得し、視覚的に突起数増加表現型が抑制されているかどうかを判定した。その結果、9つの遺伝子のノックダウンで表現型が減弱した可能性があるかと判定し、それらの遺伝子を二次スクリーニングの対象とした。*Gr28b.c-GAL4* は中枢神経系の複数の細胞でも発現していることが報告されている (Xiang et al., 2010)。二次スクリーニングでは、より C4da neuron 特異的なノックダウンの効果を評価するために、*ppk-GAL4* のみを用いて各遺伝子をノックダウンし、定量解析を行った。その結果、

*Receptor tyrosine kinase-like orphan receptor (Ror)* のノックダウンにより、突起数増加表現型が抑制されることが分かった (図 26A-F)。また、ヌル変異体である *Ror<sup>d</sup>* の個体でも同様に、LYD での表現型の減弱が見られたことから、Ror が突起数増加表現型に寄与することが示唆された (図 26G-M)。Ror の他にも、*Insulin-like receptor (InR)* のノックダウンでは、1つの RNAi 系統によるノックダウンで突起数増加表現型が減弱した (図 27G-L)。しかし、*InR* に対する異なる標的配列の RNAi 系統を用いた実験では表現型の有意な減弱が見られなかった (図 27A-F)。また、Anaplastic lymphoma kinase (Alk) は、ショウジョウバエの中樞神経系で、低栄養条件下でも恒常的に神経細胞の増殖を維持する仕組みで働くことが報告されており (Cheng et al., 2011)、この受容体についても特に注目して解析を行った。その結果、*Gr28b.c-GAL4* と *ppk-GAL4* 両方を用いた *Alk* のノックダウンでは表現型が減弱したが (図 28A-F)、*ppk-GAL4* のみのノックダウンでは表現型の減弱は見られなかった (図 28G-P)。したがって、以上の実験からは、*InR* や *Alk* が表現型に寄与しているかどうかを結論づけることができなかった。これらの結果については考察セクションで議論する。

LYD で選択的に樹状突起の分岐に影響を及ぼした *Ror* のノックダウンや v2902 系統による *Akt* のノックダウンが、樹状突起の発達にどのように影響を与えるかをさらに詳細に解析した。その方法として、樹状突起の全長を計測し、これらのノックダウンによる突起伸長への影響を調べた。その結果、コントロールの細胞では樹状突起の全長についても、HYD よりも LYD で増加することが分かった (図 22)。また、v2902 系統による *Akt* のノックダウンでは、BL33615 系統のように顕著ではないものの、どちらの餌条件でも樹状突起長が減少する傾向が見られた (図 22A, B)。一方で、*Ror* のノックダウンでは、突起長の減少は LYD でのみ見られた (図 22E, F)。以上の結果を総合すると、*Akt* は餌条件に関わらず、樹状突起の成長に必要な一方で、*Ror* は低栄養条件下でのみ選択的に働くことが示唆された (図 29)。

### 2.2.3. LYD 条件下では筋肉由来の Wg が C4da neuron の樹状突起の分岐を促進する

Ror は Wnt タンパク質をリガンドとして受容し、細胞内にシグナルを伝える (Ripp et al., 2018; Amerongen and Nusse, 2009)。また、序論で記述した通り、近傍の組織、特に表皮からの分泌タンパク質が C4da neuron の樹状突起の形態形成を制御することが報告されてきた。したがって、私は、近傍の表皮または筋肉から分泌された Wnt タンパク質が低栄養依存的に C4da neuron の樹状突起の分岐を促進する可能性を考えた。この可能性を検証するため、先行研究によって Ror と結合することが示されている Wingless (Wg), Wnt2, Wnt4, そして Wnt5 をコードする遺伝子を表皮または筋肉でノックダウンした (図 30 ; Ripp et al., 2018)。その結果、筋肉で *Mhc-GAL4*、または *mef2-GAL4* を用いて *wg* をノックダウンすると、どちらの GAL4 ドライバーを用いた実験でも、LYD において C4da neuron の突起数増加表現型が減弱した (図 31)。一方で、表皮で *wg* をノックダウンしても、突起数増加表現型に有意な影響は見られなかった (図 32)。また、Wg が表現型に寄与するかを別のアプローチで検証するため、*wg* の hypomorphic なアリルと amorphic なアリルをトランスヘテロに持ち、*wg* の全身での発現量の低下が期待される個体の C4da neuron を観察した。その結果、この変異体でも表現型が減弱することが分かった (図 33)。さらに、筋肉において *wg* を過剰発現すると、餌条件に関わらず樹状突起の分岐が促進されたことから、筋肉由来の Wg は C4da neuron の樹状突起の分岐を促進することが明らかとなった (図 34)。以上の結果より、筋肉から分泌された Wg が C4da neuron の突起数増加表現型に寄与することが示唆された。

次に、餌条件に応じて筋肉での Wg の発現量がどのように異なるかを検証するため、HYD または LYD で飼育した幼虫において Wg の抗体染色を行った。その結果、HYD よりも LYD で飼育した幼虫の筋肉で、Wg のシグナル輝度が顕著に高かった (図 35A, B, D, F)。なお、筋肉で *wg* をノックダウンすると、LYD で見られた強いシグナルが減弱したことから、この実験で計測したシグナル輝度は、筋肉内在のタンパク質量を反映していると考えられる (図 35C, E, F)。次に、*wg* の発現が転写調節レベルで制御されているかどうかを検証した。その方法として、内在の *wg* のエンハンサー下で発現が誘導される *wg-GAL4* の制御下で、赤色蛍光タンパク質に核移

行シグナルが付加されたマーカー (RedStinger) を発現する幼虫個体を用いた。この個体では、wg の転写発現レベルが核における RedStinger の量に反映される (図 36A)。その結果、HYD よりも LYD で、核内の RedStinger の量を示すシグナルの強度が高かった (図 36B-D)。したがって、LYD では転写調節レベルで wg の発現上昇が引き起こされていることが分かった。さらに、2.1. で明らかにした原因栄養成分 (ビタミン、金属イオン、コレステロール) の不足が、LYD における Wg の発現上昇を引き起こすのかどうかを検証した。そのために、LYD + VMC で飼育した幼虫で Wg の抗体染色を行ったところ、LYD で見られたような筋肉での Wg の発現レベルの上昇が見られなかった (図 37A-D)。以上の結果を総合すると、LYD 条件下ではビタミン・金属イオン・コレステロールのいずれも不足することによって、筋肉で wg の発現上昇が引き起こされ、そこから分泌された Wg を C4da neuron が受容することで、突起数増加表現型が引き起こされることが明らかとなった (図 37E)。

#### 2.2.4. Wg-Ror 経路による Akt の活性化が突起数増加表現型を引き起こす

これまでの研究から、筋肉と C4da neuron の間の Wg-Ror 経路、さらに C4da neuron 内の Akt-Tor 経路が突起数増加表現型に寄与していることが分かった。哺乳類の癌細胞を用いた研究で、Ror が Akt/mTor 経路の活性化に働くことが報告されている (Liu et al., 2015; Frenquelli et al., 2020)。そこで、C4da neuron でも、Wg-Ror 経路が Akt-Tor 経路を活性化させ、LYD で樹状突起の分岐を促進するのではないかと考えた (図 38)。この可能性を検証するため、Wg-Ror 経路を遺伝学的に操作した個体で、C4da neuron での Akt の活性化レベルがどのように変化するかを解析した。p-Akt の抗体染色を行った結果、コントロールの C4da neuron では、HYD よりも LYD で細胞体における p-Akt のシグナルが強く見られた (図 39A, A', C, C', E)。一方で、Ror をノックダウンした C4da neuron では LYD での p-Akt レベルの上昇が見られず、むしろ HYD で飼育した同一遺伝子型の細胞よりもシグナルレベルが低下した (図 39B, B', D, D', E)。さらに、筋肉で wg を過剰発現し、Wg-Ror 経路を活性化した個体では、HYD において、C4da neuron の p-Akt レベルがコントロール個体に比べて上昇する傾向が見られた。その結果、同一遺伝子型の餌条件間で比較すると、HYD におけるシグナルレベルは LYD と同程度になった (図 39F-J)。なお、Akt のノックダウン

によって、p-Akt のシグナルレベルが減弱したことや (図 23A-H)、恒常活性化型である myristoylated Akt (myr-Akt) を C4da neuron で強制発現した細胞では顕著にシグナルレベルが増強したことから (図 23I, J)、この抗体による染色実験は、p-Akt の活性化レベルを特異的に反映していると考えられる。2.2.3.で述べた結果と以上の結果を総合すると、LYD では Wg-Ror 経路が HYD に比べて強く働き、さらにその下流で Akt が活性化されることで、突起数増加表現型が引き起こされることが明らかとなった (図 39K)。

一方、Ror-Akt 経路以外で、Wnt 経路として知られる細胞内因子が突起数増加表現型に寄与しているかどうかを検証した。まずは、Wnt 経路の受容体として働く *frizzled (fz)* または *fz2* を C4da neuron でノックダウンすると、*fz* のノックダウンでは表現型にわずかな影響しか見られなかったものの、*fz2* のノックダウンでは表現型が顕著に抑制された (図 40A-J)。また、*fz2* のヌル変異を持つ C4da neuron では、LYD で突起数増加表現型が見られなくなった (図 40K-P)。先行研究により、Ror は Fz2 と協調して Wnt を受容することが報告されており (Ripp et al., 2018)、以上の実験から、C4da neuron の突起数増加表現型においても、これらの受容体が協調して働くことが示唆された。さらに、Wnt 経路の canonical 経路、planar cell polarity (PCP) 経路、そして  $Ca^{2+}$  経路を構成する因子を C4da neuron においてノックダウンし、突起数増加表現型への影響を調べた (図 41)。その結果、*disheveled (dsh)* や *norpA*、または *Axin (Axn)* をノックダウンすると、HYD で突起末端や突起密度が増加するとともに、LYD で減少し、餌条件間の違いが小さくなった。また、Basket (Bsk) について dominant negative 型のタンパク質を強制発現し、機能阻害した C4da neuron でも同様の結果が見られた (図 42)。したがって、これらの因子も樹状突起の分岐の餌条件間の差異を生み出すのに必要であることが示唆された。しかし、HYD での阻害効果の違いから、これらの因子は、本研究で注目している Wg-Ror 経路とは異なる様式で樹状突起の分岐に作用している可能性が考えられる。

これまでの結果から、突起数増加表現型には、Ror 下流の Akt-Tor 経路が寄与することが分かった。一方で、Wnt 経路に属する他の経路なども Ror の制御を受けて表現型に寄与する可能性も考えられる。そこで、Akt-Tor 経路が表現型に中心的

な役割を果たすのかについて追究するため、*Ror* をノックダウンして、*Ror* の下流で働くシグナル経路の働きを阻害した上で、*myr-Akt* の強制発現による Akt の活性化だけで突起数増加表現型が見られるかを検証した (図 43A, B)。その結果、*Ror* をノックダウンした C4da neuron は LYD で表現型が抑制されるが、さらに Akt を活性化すると、コントロール個体と同程度の樹状突起末端数や突起密度になり、突起数増加表現型が見られた (図 43G-M, O)。また、HYD では *Ror* のノックダウンの有無に関わらず、Akt を活性化すると、コントロール個体よりも樹状突起末端が増加した (図 43C-F, K-N)。これらの結果は、*Ror* の下流経路において、Akt によるシグナル伝達の活性化のみで突起数増加表現型が引き起こすのに十分であることを示しており、表現型には Akt-Tor 経路が中心的に働くことが示唆された。

#### 2.2.5. C4da neuron 以外の da neuron における Akt の活性化を伴う突起数増加表現型の有無の検証

一次感覚神経である da neuron は樹状突起形態や機能の異なる 4 つのクラス (I-IV) に分類される (図 44)。Akt の活性化を介した低栄養依存的な樹状突起数の増加は、他の da neuron でも見られるのかどうかを追究するため、自己受容性感覚を担う class I da (C1da) neuron と、体表に軽く触れる機械刺激 (gentle touch) などを受容する class III da (C3da) neuron について解析を行った (Hughes and Thomas, 2007; Hwang et al., 2007; Im and Galko, 2012; Yan et al., 2013; Tsubouchi et al., 2012)。以前の研究から、C1da neuron では LYD で突起数増加表現型が見られないことが示された (図 45A-D; Watanabe et al., 2017)。p-Akt の抗体染色により、C1da neuron の 1 つである *ddaE* で Akt の活性化レベルを調べたところ、餌条件間で有意な差は見られなかった (図 45E-G)。一方で、C3da neuron に属する *ddaF* では、C4da neuron と同様に HYD よりも LYD でスパイク状の樹状突起末端が増加し、p-Akt のシグナルレベルも LYD で有意に高かった (図 46)。したがって、C4da neuron だけでなく、C3da neuron でも Akt の活性化を介した突起数増加表現型の仕組みが働くことが示唆された。

## 2.2.6. 筋肉における JAK/STAT 経路が Wg の発現と突起数増加表現型の抑制に寄与する

これまでの結果から、LYD では筋肉で *wg* が高く発現し、そこから放出された Wg が C4da neuron の突起数増加表現型を引き起こすことが分かった。そこで次に、栄養条件に応じて筋肉で *wg* の発現が調節されるメカニズムを追究した (図 47)。まずは、餌条件依存的に *wg* の発現を制御する因子の候補を得るため、HYD または LYD で飼育した幼虫の全身を用いた RNA-seq 解析を行い、餌条件間で遺伝子発現が異なる 3854 の遺伝子を得た (図 48)。私は、これらの遺伝子の中で、LYD よりも HYD で高く発現していた Janus kinase-signal transducer and activator of transcription (JAK/STAT) 経路で働く転写調節因子 Signal-transducer and activator of transcription protein at 92E (Stat92E) に着目した (図 49A, B)。また、10x STAT92E-GFP レポーターシステムを用いた解析から、筋肉において LYD よりも HYD で Stat92E の活性が高いことが分かった (図 49C-F)。ショウジョウバエを用いた先行研究から、Stat92E が *wg* の発現抑制に働き、複眼原基の形態形成を制御することが報告されている (Ekas et al., 2006)。そこで、HYD では筋肉において Stat92E が活性化し、*wg* の発現が低く抑えられることで、C4da neuron の突起数増加表現型が抑制されるのではないかと仮説を立てた (図 50A)。この仮説を検証するため、筋肉で *Stat92E* をノックダウンしたところ、HYD において、筋肉における Wg の発現量がコントロール個体に比べて増加することが分かった (図 50B-F)。さらに、*Stat92E* や、*Stat92E* をリン酸化し、活性化する JAK のホモログ *hopscotch* (*hop*) を筋肉でノックダウンした個体では、HYD 飼育条件下で、コントロール個体に比べて C4da neuron の樹状突起末端が増加した (図 51)。一方で、筋肉で *hop* を過剰発現した個体では、LYD で突起数増加表現型が抑制された (図 52A-F)。これらの結果から、JAK/STAT 経路は筋肉で *wg* の発現を抑制し、HYD 飼育条件下で突起数増加表現型を抑制することが示唆された (図 52G)。

キイロショウジョウバエでは Unpaired (Upd)、Upd2、そして Upd3 の 3 つのリガンドタンパク質が JAK/STAT 経路を活性化する。ショウジョウバエの成虫で、脂肪体由来の Upd2 が受容体の Domeless (Dome) を介してインスリン様タンパク質産生細胞に投射する GABA 作動性ニューロンに結合することで、全身の成長を制御す



る仕組みが先行研究により示された (Rajan and Perrimon, 2012)。また、血球細胞から分泌された Upd2 と Upd3 がショウジョウバエ幼虫の筋肉の Stat92E を活性化することが報告されている (Yang et al., 2015)。そこで、私は脂肪体や血球細胞から分泌される全身性の Upds が、HYD 条件下で筋肉の Dome を介して JAK/STAT 経路を活性化するのではないかと考え、これらのリガンド分子を脂肪体と血球細胞でノックダウンした個体の C4da neuron を観察した。その結果、*upd2* をノックダウンした個体において、HYD で C4da neuron の樹状突起の分岐が促進した (図 53)。このノックダウンの効果は *hop* や *Stat92E* のノックダウン、または *wg* の過剰発現の結果と同様である (図 34, 51)。一方で、他の Upd ファミリーに属する *upd* や *upd3* を脂肪体と血球細胞でノックダウンしても、HYD における樹状突起形態に顕著な変化は見られなかった (図 54)。また、筋肉で受容体の *dome* をノックダウンすると、3つの RNAi 系統のうち、1つの系統で HYD において樹状突起の分岐が促進された (図 55A-N)。Dome の寄与を結論づけるにはさらに検証が必要であるが、以上の結果から、脂肪体や血球細胞からの全身性の Upd2 が筋肉の JAK/STAT 経路を活性化することで、HYD において突起数増加表現型を抑制することが示唆された (図 55O)。

次に、2.1.2 で明らかにした原因栄養素 (ビタミン・金属イオン・コレステロール) の摂取が Stat92E の活性化に寄与しているかどうかを検証するため、LYD + VMC 餌で飼育した幼虫の筋肉で Stat92E の活性を調べた。しかし、Stat92E レポーターの蛍光強度は LYD + VMC と LYD で有意な違いが見られなかった (図 56)。したがって、HYD では VMC の摂取量に依存しない Upd2-Stat92E の経路と、VMC の摂取により調節される未知のシグナル経路が協調的に働いて、*wg* の発現を抑制し、C4da neuron の突起数増加表現型が抑制される可能性が考えられる (図 57)。

## 2.3. C4da neuron の突起数増加表現型に伴う生理学的な影響の追究

### 2.3.1. LYD で飼育した幼虫の C4da neuron では青色光に対する反応性が低下する

C4da neuron は高温、機械刺激、そして短波長の光を感知する (図 6; Chin and Tracey, 2017)。突起数増加表現型に伴い、幼虫の生理学的な機能がどのように変化するのかを追究するため、まずは、餌条件に応じて C4da neuron の神経活動に違いが見られるかを検証した。その方法として、細胞外電位記録法により C4da neuron の発火タイミングを計測し、HYD または LYD それぞれの餌条件について刺激を与えない時の自発発火と、青色光で刺激を与えたときの発火応答を調べた (図 58A)。その結果、自発発火の頻度は HYD に比べて LYD で高かった (図 58B-D)。一方で、光刺激への応答性は LYD で鈍くなることが分かった。青色光を当てた時の発火頻度は HYD よりも LYD で低下し (図 58B, C, E)、刺激のない時間 (自発発火頻度) に対する変化量や変化率で見ると、より顕著に LYD で低下していた (図 58F, G)。私は特に、光刺激への応答性が LYD 条件下で鈍化することに注目して以降の解析を行なった。

### 2.3.2. LYD で飼育した幼虫は光忌避行動を示す頻度が減少する

LYD で C4da neuron の光刺激への応答性が鈍くなったことから、個体の行動でもその影響が見られるどうかを検証した。ショウジョウバエの幼虫は有害な光や天敵から逃れるために、暗い場所を選んで移動する傾向を示す。先行研究から、この忌避行動には C4da neuron の神経活動が必要なことが報告されている (Xiang et al., 2010; Yamanaka et al., 2013)。ショウジョウバエの幼虫は、餌に潜って摂食行動を続ける "foraging" の時期を終えた後、餌から離れ、蛹化する場所に移動する "wandering" の時期を経て蛹化する。そこで、foraging と wandering の 3 齢幼虫それぞれについて、光忌避行動が餌条件間でどのように異なるかを調べた。その方法として、foraging 幼虫の検証では寒天の入ったシャーレを (図 59A 左)、wandering の幼虫の検証ではプラスチックの筒を半分遮光した装置を用意し (図 59B 左)、幼虫が明るい領域と暗い領域のどちらに移動するかを調べた (Yamanaka et al., 2013)。その

結果、どちらの発育段階の幼虫でも、HYD に比べて LYD で、暗い場所を好む傾向が有意に低下した (図 59)。さらに、C4da neuron 特異的に *Ror* をノックダウンし、突起数増加表現型を抑制した個体の光忌避行動を調べた。Foraging の幼虫では依然として LYD で光忌避行動が鈍化する傾向はあるものの、餌条件間の差がコントロール個体と比較して縮まる傾向が見られた (図 59A)。また、wandering の *Ror* ノックダウン個体では、LYD で飼育した幼虫が光忌避行動を示す頻度は HYD と同程度に高くなり、餌条件間の光忌避行動の違いが見られなかった (図 59B)。以上の結果を総合すると、低栄養条件において、幼虫の光忌避行動が鈍化しており、この行動の変化は C4da neuron の突起数増加表現型に伴うことが示唆された。

## 第3章 考察

### 3.1. 突起数増加表現型の原因となる栄養素の探索から得られた展望

本研究では、栄養素の不足に応じて、筋肉由来の Wg による組織間シグナリングが C4da neuron の樹状突起の発達を調節する仕組みを見出した (図 57)。興味深いことに、アミノ酸の不足は主な原因ではなく、ビタミン、金属イオン、コレステロールの複合的な欠乏により、C4da neuron の突起数増加表現型が引き起こされることが分かった。これまで、栄養依存的な細胞の成長に関しては、主にアミノ酸や糖に焦点が当てられていることから (Gonzalez et al., 2020; Liu and Sabantani, 2020)、本研究の結果は、栄養摂取と細胞の成長の関係を明らかにする上で新たな知見となるのではないだろうか。また、餌中の酵母の増減がショウジョウバエの発生タイミングや成長を制御する様々な生体応答を引き起こすことが報告されており (Bass et al., 2007; Okamoto and Nishimura, 2015)、本研究で用いた完全化学合成培地の分画を添加するアプローチは、どの特定の栄養素が、それらの応答を引き起こすのかを解析する上で、有用となることが期待される。ただし、LYD に VMC を添加した実験では、C4da neuron の突起末端の密度は HYD と同じ度合いまで減弱しなかった (図 16H-J)。したがって、これらの栄養素の添加量が十分ではないか、もしくはそのバランスが最適ではない可能性や、VMC 以外の未知の栄養素が表現型に影響している可能性が考えられる。

また、VMC の LYD への添加により、LYD で見られた筋肉での Wg の発現上昇が抑制された (図 37)。さらに、この制御は少なくとも転写レベルで引き起こされることが示唆された (図 36)。wg の転写制御については、発生時期及び組織損傷に依存して働くエンハンサー領域や、クロマチン制御によるエピジェネティックな仕組みが報告されている (Koshikawa et al., 2015; Harris et al., 2016)。したがって、栄養素摂取と筋肉における wg の発現制御の関係をさらに明らかにするためには、ビタミンやビタミン由来の代謝物、金属イオン、またはコレステロールがこれらの制御因子にどのように作用するかを追究するのが有効な手段かもしれない。

### 3.2. Wg-Ror-Akt 経路が他の樹状突起形態形成のメカニズムと協調して突起数増加表現型に寄与する可能性について

実験室標準餌における解析から、C4da neuron が表皮の成長に合わせて樹状突起を伸長するメカニズムが明らかにされてきた (Parrish et al., 2009; Jiang et al., 2014)。その一方で、低栄養状態においては、表皮細胞の成長が抑制されるにも関わらず、C4da neuron の樹状突起の成長能は保持されることが報告された (図 60; Poe et al., 2020)。具体的には、酵母含有量の少ない低栄養の餌において、表皮では Forkhead box, sub-group O (FoxO) が細胞の成長抑制に働く一方で、C4da neuron では *foxo* の発現量が低く、Tor シグナリングへの抑制が働かないため、樹状突起が低栄養状態でも成長を続ける。以上の先行研究の知見と合わせて考えると、低栄養状態では C4da neuron の細胞内で樹状突起の成長能を保持する仕組みが機能した上で、本研究で見出したような細胞外からのシグナル伝達が樹状突起の分岐を促進し、突起数増加表現型が引き起こされるのではないだろうか。C1da neuron も筋肉の近傍にあるにも関わらず、表現型が見られない (Watanabe et al., 2017) のは、Poe et al., 2020 で示された仕組みがこの神経細胞には備わっていないからかもしれない。

本研究から、C4da neuron において、RTK の一つである Ror が細胞外からの低栄養依存的なシグナルを受け取ることが分かった。ショウジョウバエの幼虫において、Ror は主に神経系で発現が見られる。ただし、通常条件の飼育時では、Ror のヌル変異体においても、C4da neuron を含めた神経細胞で形態的に顕著な発達の不全は見られない (Ripp et al., 2018; Nye et al., 2020)。本研究でも、HYD において、変異体や Ror をノックダウンした C4da neuron では、樹状突起形態にほとんど影響が見られなかった (図 26)。Ror は C4da neuron において樹状突起の損傷時に微小管の核生成を促し、再生に寄与する (Nye et al., 2020)。本研究で明らかになった低栄養依存的な働きと合わせて考えると、Ror は損傷や環境ストレスを感知し、神経細胞の応答を引き起こす上で重要な役割を持つ受容体であると推測できる。

また、上記の微小管形成メカニズムにおいて、Dsh や Axn が Ror の下流で働く (Nye et al., 2020)。これらの因子をノックダウンした C4da neuron では、HYD で樹状突起密度が上昇するとともに、LYD で樹状突起密度が減少する傾向が見られた (図 42B, I, O, U, F, M, S, Y)。一方で、筋肉での *wg* のノックダウンや、C4da neuron

での *Ror* のノックダウンでは、HYD では顕著な変化は見られず、LYD でのみ突起密度の減少が見られた (図 26, 31)。これらの HYD におけるノックダウンの効果の違いから、微小管形成のメカニズムは *Wg-Ror-Akt* 経路とは異なる様式で突起数増加表現型に影響している可能性が考えられる (図 57)。Ror 以外の受容体に目を向けると、幹細胞や哺乳類のがん細胞を用いた研究などから、さまざまな RTK が Akt を活性化し、細胞の成長や増殖を誘導することが明らかにされてきた (Shim et al., 2013; Butti et al., 2018)。本研究で行ったノックダウンスクリーニングでは RNAi 効率が不十分であった可能性なども考えられ、InR や Alk を含む Ror 以外の受容体が、突起数増加表現型や C4da neuron の樹状突起の発達に寄与しているかどうかについて結論を出せてはいない。これら複数の上流因子が C4da neuron で Akt の活性を制御するのか、そしてその仕組みを明らかにできれば、栄養環境依存的・非依存的な細胞外からのシグナルがどのように Akt に統合されて、樹状突起の成長を制御するのかを解き明かせるかもしれない。

### 3.3. 筋肉は栄養状態を感知し、末梢の組織への情報伝達を仲介する組織である

筋肉はエネルギーを消費する組織であるだけでなく、脳や脂肪細胞など他の組織とのシグナル伝達を通じて、全身の代謝を調節する重要な役割を担う

(Bretscher and O'Conner, 2020)。ショウジョウバエの成虫では、筋肉由来の *Wg* が脂肪体における脂質の貯蔵量を制御する (Lee et al., 2014)。本研究では、幼虫期において、低栄養依存的に筋肉由来の *Wg* が C4da neuron の発達を調節することを明らかにした。したがって、筋肉は他の末梢組織へ栄養状態を伝達する仲介の機能を果たし、Wnt リガンドは成長期および成体に限らず、この機能を果たす上で情報伝達物質として重要な役割を担う可能性が考えられる。

では、摂取した栄養の情報はどのようなメカニズムで筋肉へと伝達され、処理されるのだろうか。本研究では、この問いの手がかりを得るために、JAK/STAT 経路に焦点を当てて解析を行い、HYD では、脂肪体または血球由来の全身性の *Upd2* が筋肉における JAK/STAT 経路を活性化し、*wg* の発現を抑制することが示唆された。ただし、VMC を LYD へ添加しても、Stat92E のレポーターのシグナル強度は

LYD と有意な違いが見られなかった (図 56)。また、*Stat92E* を筋肉でノックダウンした個体では、餌条件間の差と比べると、*Wg* の発現レベルや C4da neuron の突起密度は小さい度合いでしか増加しなかった (図 50, 51)。これらの結果から、JAK/STAT 経路は VMC の摂取に非依存的であり、この経路に加えて、VMC 依存的な未知の経路が筋肉での *wg* の発現抑制に協調的に働いている可能性が考えられる (図 57 の T bar)。

### 3.4. C4da neuron の突起数増加表現型と個体・神経機能の栄養依存的な変化

本研究で明らかとなった、C4da neuron の栄養依存的な樹状突起の発達調節メカニズムは、個体の栄養適応にどのような意義を持つのだろうか。本研究では、電気生理学的解析から、LYD 飼育条件下で C4da neuron の光刺激への反応性が鈍化することを見出した (図 58)。また、HYD と比較して、LYD 飼育条件下では、明るい場所を探索する幼虫の頻度が多くなった (図 59 のコントロール)。一方で、C4da neuron において *Ror* をノックダウンして突起数増加表現型が抑制された個体では、この食餌間の探索行動の差が小さくなる傾向が見られた (図 59 の *ppk>Ror RNAi*)。これらの結果から、LYD においては C4da neuron の突起数増加表現型と同時に、光忌避行動が鈍化することがわかった。ただし、本研究の解析からは、突起数増加表現型と行動変化の因果関係は示せておらず、*Ror* のノックダウンが樹状突起数の増加とは別のメカニズムで C4da neuron の機能に影響を与えた可能性は除外できない。

ショウジョウバエの幼虫にとって、明るい場所に居続けることは、有害な光や寄生蜂などの天敵に晒され、リスクを伴う行動であると考えられる。また、多様な生物種を用いた研究で、動物が空腹時にリスクの多い行動をとることが示されてきた (図 61; Symonds et al, 2010; Filosa et al, 2016; Padilla et al, 2016; Bräcker et al, 2013)。私はこれらのことから、低栄養環境下では、幼虫の光刺激への応答性が鈍くなることで、リスクを冒してでも食物の探索行動を続けることが可能になるのではないだろうかと推察した (図 62)。最近の研究により、幼虫の光忌避行動に必要な回路が解析されたものの、C4da neuron の下流でこの行動に寄与する神経回路は同定さ

れていない (Imambocus et al., 2022)。そのような下流回路が特定されれば、栄養依存的、または、突起数増加表現型に伴って神経伝達がどのように変化するのかを解析することが可能となり、栄養条件と個体の行動変化の関係をより深く追究できるかもしれない。

C4da neuron は光刺激以外にも、熱や機械刺激に応答する。先行研究から、本研究の結果とは対照的に、酵母含有量が少ない餌で飼育した幼虫は熱刺激に対してより迅速に忌避行動を示し、反応性がより鋭敏になることが報告された (Poe et al., 2020)。この、我々の研究と一見対立する実験結果は、刺激の種類の違いに起因するのではないかと考えている。その理由として、2 齢幼虫から 3 齢幼虫にかけて熱忌避行動が亢進するのと同時に、C4da neuron の光刺激への反応性は鈍化することが報告されており (Jaszczak et al., 2022)、光刺激と熱刺激への反応性は異なる様式で制御されることが示唆されたためである。したがって、栄養条件は、侵害感覚の種類に応じた別の制御メカニズムを経て幼虫の行動に影響を及ぼす可能性が考えられる。

栄養状態と神経発達の関係は、これまで疫学的、解剖学的に記述されてきた (Prado and Dewey, 2014; Bhutta et al., 2017)。本研究では、その分子実体を解き明かすため、ショウジョウバエの感覚神経細胞をモデル系として解析を行った。そして、特定の栄養素群の不足に応じて、筋肉由来の分泌因子が神経突起の発達を調節する組織間のシグナリング機構を明らかにした。Wnt タンパク質や Akt など、このメカニズムで働くシグナル因子は広範な生物種で保存されており、本研究は他の神経細胞種、さらに他の動物種において栄養摂取と神経発達を結ぶ分子メカニズムを探索する上で基盤となることが期待される。



## 第4章 材料と方法

### 4.1. ショウジョウバエ系統

本研究で用いたショウジョウバエ系統の一覧は表3に示し、各実験で用いたショウジョウバエの遺伝子型は表4に記載した。実験室標準餌の組成は以下の通りである。水 1L あたり、コーンフラワー（日本製粉）51 g、コーングリッツ（日本製粉）26 g、乾燥酵母（アサヒフードアンドヘルスケア）44 g、グルコース（加藤化学）110 g、寒天粉末（松木寒天産業株式会社）8 g、プロピオン酸（ナカライ、#29018-55）2.9 mL、10% p-ヒドロキシ安息香酸ブチル（ナカライ #06327-02 を70% エタノールで溶解）2.9 mL から成る。特筆しない限り、処女雌の成虫と、雄の成虫を3～5日間実験室標準餌でかけ合わせたのち、HYD または LYD に移して産卵させ、そこから発生した後期3齢幼虫（Wandering L3 larvae）を実験に使用した（図8C）。また、wg の過剰発現実験では29°Cで実験を行い、それ以外の全てのショウジョウバエ系統は25 °Cで飼育し、実験を行った。

### 4.2. 実験室餌の調製

本研究で用いた HYD と LYD は semidefined medium (SDM) の組成から酵母、yeast extract、ペプトンの量を改変したレシピで作製した (Watanabe et al., 2017)。SDM のレシピは Bloomington Drosophila Stock Center のホームページ <<https://bdsc.indiana.edu/information/recipes/germanfood.html>> に記載されている。これらの餌の材料は、brewer's yeast (MPBio 2903312)、glucose (Wako 049-31165)、sucrose (Wako 196-00015)、peptone (Fluka 82303)、寒天（松木寒天）、そして防腐剤である。詳細な組成は図8Aに記した。調製方法は以下の通りである。防腐剤以外の材料をビーカーに入れて混ぜ、200ml にメスアップし、121 °C で15分間オートクレーブした後、防腐剤としてプロピオン酸とボーキニン (10% butyl p-hydroxybenzoate in 70% ethanol) を加えてよく混ぜた。作製後の餌をビーカーからバイアルに分注し、一日乾燥させてから4 °Cで保存した。

必須アミノ酸の添加実験では、50x MEM EAA 溶液 (Wako 132-15641) を40ml LYD へ添加し、最終的に200ml にメスアップした。Holodic medium (Piper et al.,

2014, 2017) のアミノ酸以外の分画の添加には、holidic medium で使用される濃度の 10 倍濃度で LYD へ添加し、Holidic medium 由来のアミノ酸溶液の添加には 1 倍または 3 倍濃度で LYD へ添加した。ペプトンの添加には、HYD と LYD の作製に用いた試薬と同一の製品を使用し、LYD へ 200ml あたり 10.9g 加えた。

### 4.3. da neuron の画像取得と樹状突起末端数の計測

C4da neuron または C3da neuron の樹状突起の画像取得は先行研究に記載されている方法を参考に以下の手順で行った (Hattori et al., 2013; Matsubara et al., 2011; Parrish et al., 2009)。Wandering L3 larvae を飼育バイアルから取り出し、PBS で幼虫体表に付着した餌を洗ったのち、スライドガラスの上に 90% glycerol を滴下し、カバーガラスをかぶせて幼虫をマウントした。この時、幼虫が潰れないように、スライドガラスにビニールテープを貼り、スライドガラスとカバーガラスの間に隙間ができるようにした。幼虫の腹部 A3-A5 体節を観察対象とし、共焦点顕微鏡 (Nikon C1) で背側に位置する C4da neuron の ddaC や C3da neuron の ddaF を撮影した。その後、取得した z 軸方向のスライス画像を最大値投影法により処理した。

樹状突起末端数の計測では、Adobe Photoshop のパスツールを用いて最外周の樹状突起末端を結び、1 細胞の樹状突起が張り巡らされている領域として region of interest (ROI) を決定した。そして、DeTerm を用いて、その ROI の内側にある樹状突起末端を自動計測した (Kanaoka et al., 2019)。また、この ROI の面積を受容野の広さとして算出した。ddaF の樹状突起末端の定量では、短いスパイク状の樹状突起の末端について、DeTerm の精度が十分ではない可能性が考えられたため、解析した画像全てについて手動での訂正を加えた。

樹状突起長の計測には、先行研究の手法を参考に行った (Poe et al., 2017)。具体的には、Fiji/imageJ の Gaussian Blur, Auto Local Threshold, Particles 4、そして Skeletonize (2D/3D)の順に樹状突起の画像を処理することで、シグナルを二値化した上で樹状突起の太さを 1 ピクセルに変換し、ROI の内側の樹状突起のピクセル数を計測した。

#### 4.4. 成長を遅延させた幼虫のサンプリング

HYD + sucrose で幼虫を飼育する実験では、Watanabe et al., 2019 で記述された手法を用いて幼虫を集めた。実験に用いる系統の親を予め3日間標準餌で飼育した後、カップに入れて、産卵用寒天培地（アップルジュースの寒天にドライイーストペーストを塗ったもの）で飼育した。カップでの飼育を始めてから3日目に、新しい産卵用培地上で24時間産卵させて胚を集め、その後約5時間産卵用培地を25°Cで培養した。培養した培地に0.7% NaCl + 0.3% Triton X-100を注ぎ、筆を用いて培地表面にある胚や幼虫を酵母ペーストごと液に混ぜた。この液をセルストレイナーで漉し、上からさらに0.7% NaCl + 0.3% Triton X-100を注いで、胚あるいは幼虫に付着した余分な酵母を洗い流す作業を数回繰り返した。洗い終わった胚と幼虫をセルストレイナー上からディスポールプ（アズワン株式会社、6-488-01）で4匙分すくい、分量がおおよそ同じになるよう各餌バイアルに移した。そして、そこから発生したwandering L3 larvaeを観察に用いた。

翅原基で *dilp8* を過剰発現し、成長を遅らせた幼虫のサンプリングでは、予め3日間標準餌で飼育した親をHYDまたはLYDに移して24時間産卵させ、そこから発生したwandering L3 larvaeを観察に用いた。

#### 4.5. 抗体染色

Wandering L3 larvaeをバイアルから取り出してPBSで洗浄し、幼虫の腹側正中線を切って体壁を広げた。そのサンプルに、3.7%ホルムアルデヒドに0.05% Triton X-100 in PBSを加えた固定液を滴下して30分静置した後、0.1%の濃度でTriton X-100をPBSに加えた溶液(PBST)で3回洗浄した。次に、PBSTに2%の濃度でウシ血清アルブミンを加えた溶液で30分間ブロッキング反応を行い、4°Cで一晩、一次抗体反応を行った。3回PBSTで洗った後、常温で1時間二次抗体反応を行い、3回PBSTで洗ってから表皮をカバーガラス側に向けて、FluorSave™ Reagent (Calbiochem)の中にマウントした。使用した抗体と希釈率は表5に記載した通りであり、一次抗体液と二次抗体液はともにブロッキング液で希釈した。ほとんど全てのデータをNikon C1で撮影し、図23A-Fの画像のみ、ZEISS LSM 800を使用した。

## 4.6. シグナル強度の定量

筋肉における染色画像やレポーター系統個体のシグナル強度を定量するため、取得した z 軸方向のスライス画像を最大値投影法により処理し、ddaC の近傍に位置する 9 番の筋肉を対象に、シグナル強度を測定した (図 35A)。Wg の抗体染色または 10x Stat-GFP を用いた実験でのシグナル強度の測定にはそれぞれ 19  $\mu\text{m}$  または 27  $\mu\text{m}$  四方の ROI を 3 カ所指定し、平均値を算出した。wg-GAL4 下で RedStinger を発現させた実験では、DAPI のシグナルによって核の位置を特定し、その内側において、 $\alpha$ -dsRed 抗体で標識された RedStinger のシグナル強度を測定した。取得した筋肉の画像には 2-7 個の核が含まれており、それらのシグナル強度の平均値を算出した。p-Akt の抗体染色では、定量の対象とした da neuron の細胞体で最もシグナルが強い z 平面の画像を 1 枚選び、核のすぐ腹部側の 1.7 $\mu\text{m}$  四方の領域のシグナル強度を測定した。ただし、ddaF における計測では、ddaF と ddaC の境界が不明瞭な場合に限り、核のすぐ背側に ROI を指定した。

## 4.7. 電気生理学的解析

本研究の電気生理学的解析では、自身は幼虫サンプルの準備を担当し、小野寺孝興博士が先行研究と同様の手法で細胞外電位記録とその後の解析を行った (Onodera et al., 2017; Terada et al., 2016)。この解析では腹部 A3-A5 体節の v'ada neuron (幼虫側面に位置する C4da neuron) を対象としている。細胞外電位記録用のガラス微小電極は、ガラス管 (外径 1.5 mm, 内径 1.1 mm, B150-110-10, Sutter Instrument) をマイクロピペットプラー (P-1000, Sutter Instrument) で引き、先端開口部をマイクロフォージ (MF-830, Narishige) で微細加工することにより作製し、先端開口部が C4da neuron の細胞体サイズと同程度のものを選別した。ガラス針電極内は細胞外生理溶液で満たした。これらの抵抗値は 800-1000 k $\Omega$ であった。筋肉除去に用いるガラスピペットも、同ガラス管をマイクロピペットプラーで引いて作製した。ガラスピペットの先端部には 0.5% (w/v) プロテアーゼ (Type XIV, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) を少量詰めた。

Wandering L3 larvae の解剖標本を作製した後に、C4da neuron の細胞体と IR レーザー照射点の直上の筋肉を除去した。プロテアーゼ入りのガラスピペットを、マ

イクロマニピレーター (PatchStar, Scientifica) で操作し、筋肉に局所的に投与した。ガラスピペットを筋肉表面へと押し当て、微量のプロテアーゼを投与すると、表面の一部が破断し、筋肉は自らの張力により自然と分断された。細胞外生理溶液を2、3回置換し、残留したプロテアーゼを除去した。ガラス微小電極で細胞体を穏やかに吸い込むと、安定した自発的な発火が記録された。青色光の照射には波長460–495 nm で強度が72 mW/mm<sup>2</sup> の光を5秒間当てた。細胞外電位はパッチクランプ用アンプ (MultiClamp 700B, Molecular Devices) の電流固定モードにて増幅し、8 kHz のローパスフィルターをかけた後、デジタイザー (Digidata 1440A, Molecular Devices) にて10 kHz で記録した。取得解析ソフトウェアはpCLAMP 10 (Molecular Devices) を用いた。

#### 4.8. Light/Dark choice assay

Light/Dark choice assay は先行研究のプロトコルに修正を加えて行なった (Yamanaka et al., 2013)。Foraging L3 larvae の実験では、HYD と LYD とともに摂食をやめて餌から出る一日前の幼虫を用いた。半分を黒いビニールテープで覆って遮光した2%アガロースプレートを用意し、遮光した部分と光が当たる部分の境界線に沿って20匹の幼虫を置いた。そのプレートをインキュベーターに入れて15分間700luxのLED白色光を当てた後、遮光部分と光が当たる部分にいる幼虫の数を数えた。1-2匹の幼虫がアガロースに潜ったトライアルがあったが、その場合は潜った幼虫を除いて dark preference index を算出した。

Wandering L3 larvae の実験では、二つのプラスチックバイアルのうち、一つを黒いビニールテープで遮光し、それぞれの入り口付近に8匹ずつ幼虫を入れて、バイアルの口同士を透明のセロハンテープで繋ぎ合わせた。この装置をインキュベーターに入れて15分間700luxのLED白色光を当てたのち、遮光部分と光が当たる部分にいる幼虫の数を数えた。

なお、いずれの実験でも dark preference index は下記の計算式で算出した。

$$([\text{遮光部分にいる幼虫の数}] - [\text{光の当たる部分にいる幼虫の数}]) / [\text{幼虫の総数}]$$

## 4.9. RNA-sequencing (RNA-seq) 解析

RNA-seq 解析は Watanabe et al., 2019 の手法を用いて、サンプル調整は共同研究者である渡辺佳織博士に、データの解析は、共同研究者である服部佑佳子博士により行われた。HYD または LYD で飼育した wandering L3 larvae を PBS で洗い、実体顕微鏡下で精巣の有無をもとにオス個体のみを選別した。幼虫全身 5 匹分から TRIzol (Invitrogen) を用いて製品プロトコルに従い、RNA を抽出した。抽出した RNA は、RNeasy Mini Kit (QIAGEN) を用いて精製し、RNA サンプルの純度を、BioAnalyzer (Agilent Technologies) により調べた。RNA-seq は、京都大学生命科学研究科ゲノミクス解析室に委託し、Illumina NextSeq 500 を用いて行われた。

## 4.10. 統計解析

本研究での統計解析には R (R core team) を用いた。有意水準は  $P < 0.05$  とした。実験に関する検定手法や  $P$  値、サンプルサイズは図の説明と表 6 に示した。突起数増加表現型が遺伝子操作により減弱するかどうかを調べる場合は two-way ANOVA test を用いて遺伝子型と餌条件の交互作用の有無を検定した。一方で、餌条件に関わらず、遺伝子操作自体が樹状突起の分岐にどのような影響を与えるかに注目した解析では (図 34F など)、t-test、または Wilcoxon-Mann-Whitney test を用いて同一餌条件下で遺伝子型間の比較を行った。

図

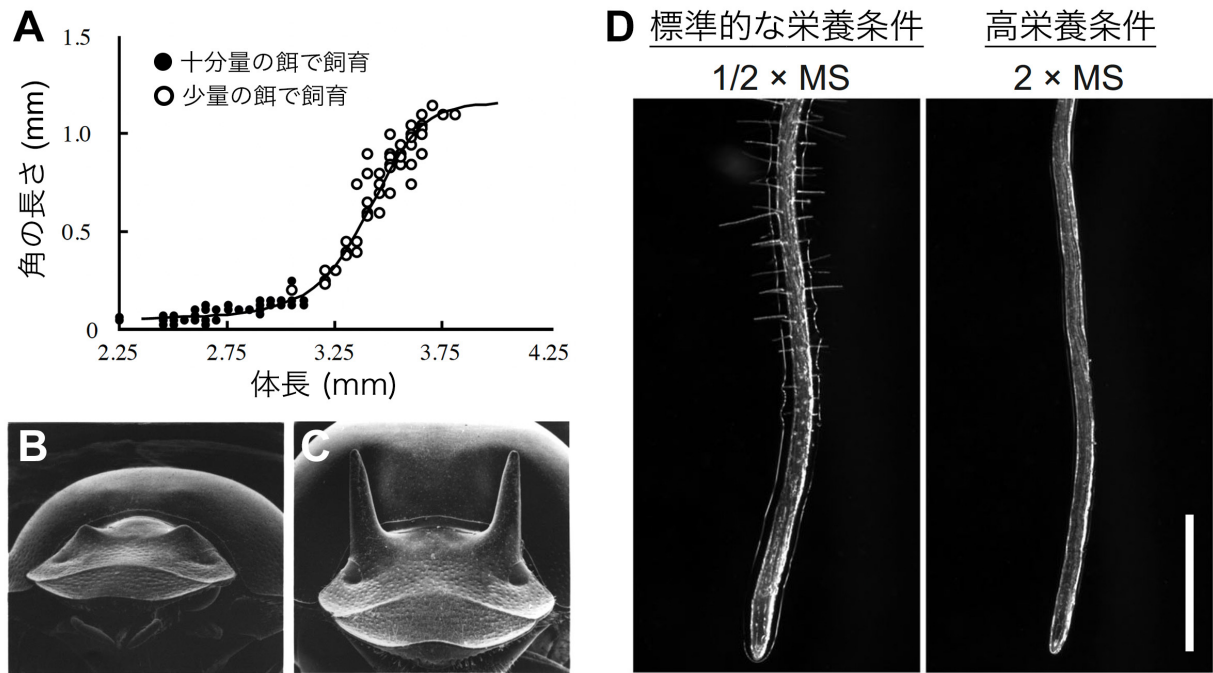


図 1. 栄養環境に応じて個体全身および器官の発達が変化する

(A-C) コガネムシ科の *Onthophagus acuminatus* は幼虫期に栄養を多く摂取すると、栄養が欠乏した個体に比べて、成虫期に体が大きくなるとともに、角が著しく長く発達する。Emlen, 1997 から図を引用し、一部改変した。(A) 横軸に体長を、縦軸に角の長さをとったグラフ。白い点が幼虫期に餌を多く与えた個体で、黒い点が少量の餌しか与えなかった個体のデータを表す。(B, C) 角が伸びなかった個体 (B) と伸びた個体 (C)。(D) 生育培地 (Murashige-Skoog medium, MS) の栄養濃度を高くすると ( $2 \times MS$ )、シロイヌナズナの根毛の成長が抑制される。Shibata et al., 2022 の図を抜粋した。

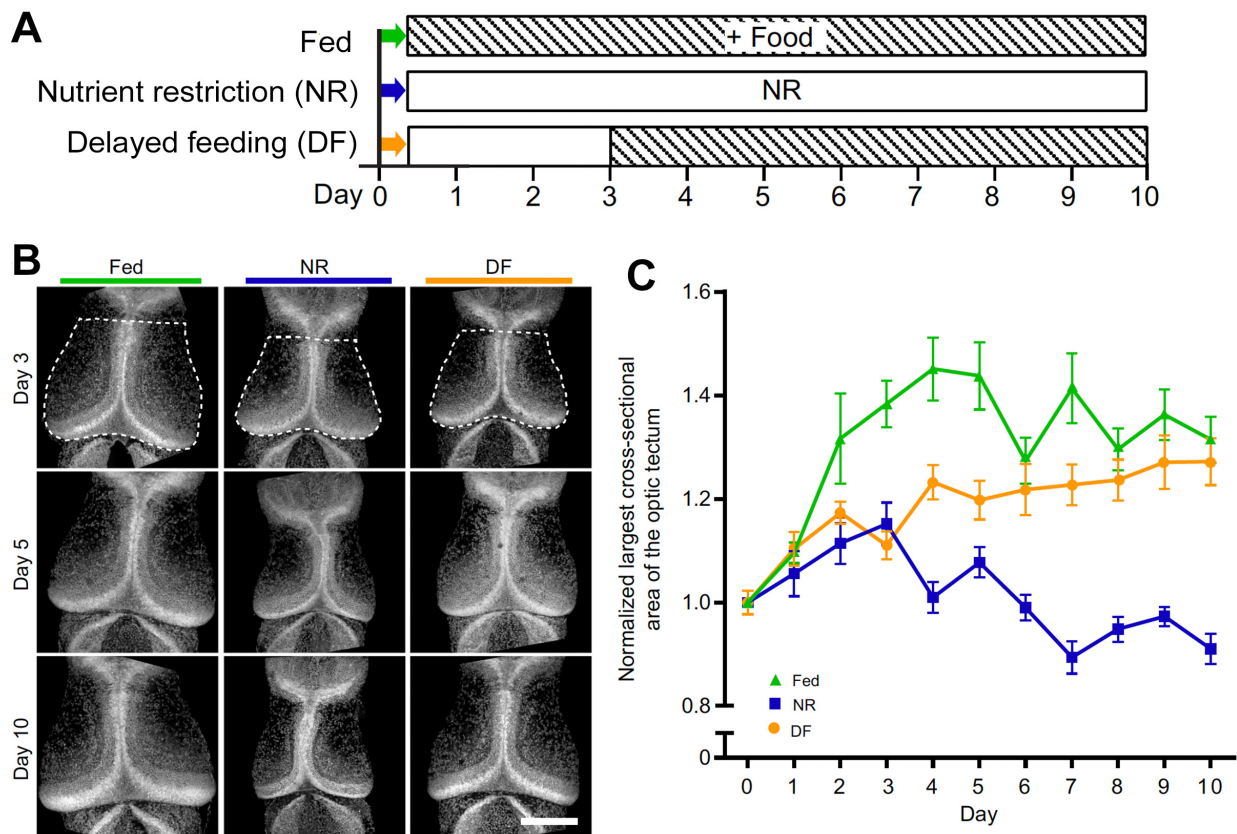


図 2. 栄養環境に応じて神経幹細胞の分裂が制御される

アフリカツメガエルの幼生の視蓋の神経幹細胞は、食物が得られない時には細胞分裂を止め、再び食物を摂取すると、細胞分裂を再開する。McKeown, 2017 から図を引用し、一部改変した。(A) 実験で用いられた食餌条件を表す模式図。Day 0 はステージ 46 である。Fed 条件では 10 日間餌を与え、NR 条件では 10 日間食餌制限を行った。そして、DF 条件では、3 日間食餌制限を行った後に、7 日間餌を与えた。(B) それぞれの食餌条件における、3 日目、5 日目、10 日目における幼生の中脳の画像。(C) それぞれの食餌条件における視蓋の大きさの推移を示すグラフ。横軸は日数、縦軸は視蓋のもっとも大きい断面の面積を、実験開始時の数値でノーマライズした値。Fed 条件と比べて、DF 条件では 3 日目までは NR と同様に視蓋の成長速度が低下するが、餌を与えられてからは盛んに細胞分裂を始め、10 日目には Fed 条件とほとんど同様の大きさになる。



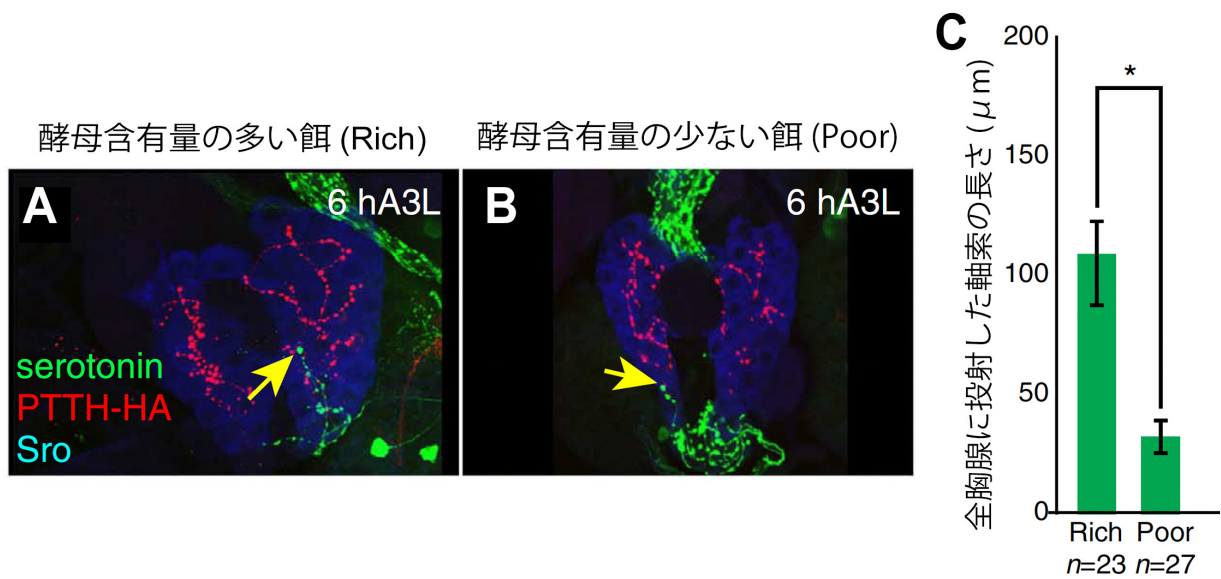


図 3. 栄養環境が神経突起の発達に影響を与える例

キイロショウジョウバエでは、低栄養条件に比べて高栄養条件において、セロトニン産生ニューロンが前胸腺へ投射する軸索を長く伸長する。Shimada-Niwa and Niwa, 2014 から図を引用し、一部改変した。(A, B) 高栄養の餌 (yeast-rich food) または低栄養の餌 (yeast-poor food) で飼育した3齢幼虫の全胸腺 (青) およびセロトニン産生ニューロン (緑) の画像。前胸腺へ投射する軸索が矢印によって示されている。(C) 各餌条件における全胸腺に投射した軸索の長さ。

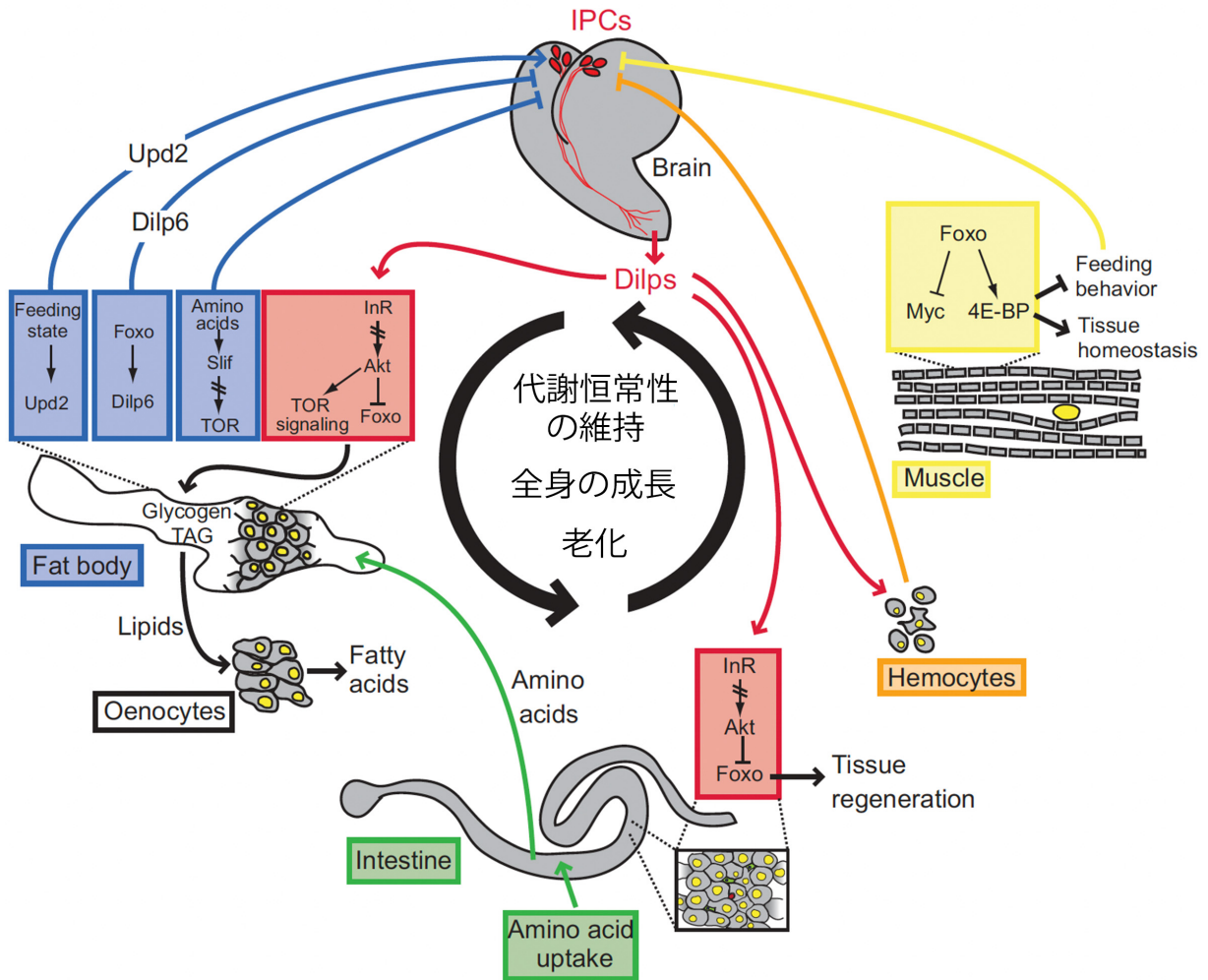


図 4. 組織間でのシグナル伝達を介した個体の栄養応答機構

ショウジョウバエにおける組織間での分泌因子の伝達を介した栄養応答機構の例。  
*Drosophila* insulin-like peptides (Dilps) は脳や末梢組織、例えば腸や脂肪体、筋肉などの組織間で分泌因子として伝達される。そして、組織での代謝や細胞増殖を制御し、栄養条件や他のストレスに対する各組織の応答を協調させる。この仕組みは全身の代謝の恒常性維持や体の成長、老化において重要な役割を果たす。Wang et al., 2014 の図を引用し、改変した。

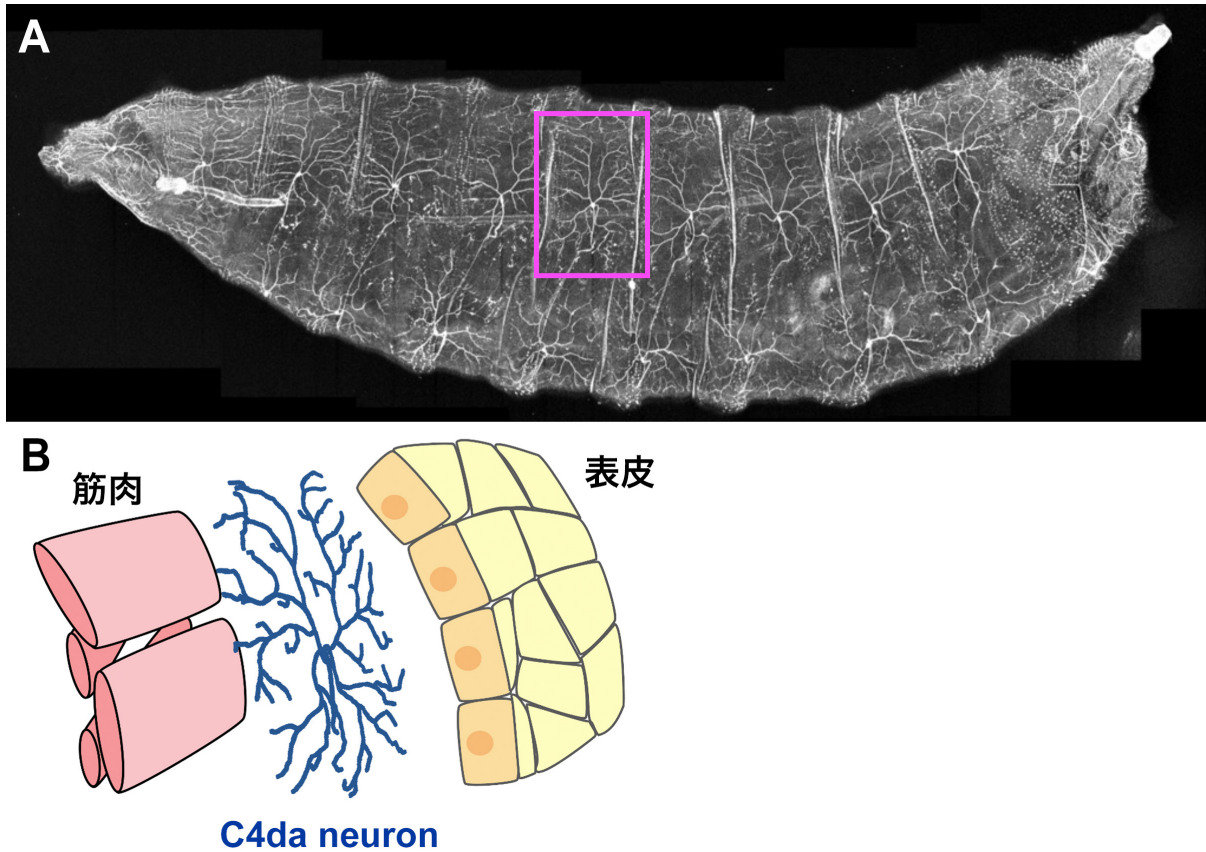


図 5. ショウジョウバエ幼虫の C4da neuron

(A) 幼虫の体表を覆う Class IV dendritic arborization neuron (C4da neuron)。この蛍光画像は C4da neuron 特異的に発現する *pickpocket* プロモーター下で GFP を発現させた 3 齢幼虫の全身である。碓井理夫博士取得画像。(B) C4da neuron と、表皮や筋肉の位置関係を表した模式図。C4da neuron は表皮と筋肉の間に樹状突起を二次元的に展開させる。Yamamoto et al., 2006 の図を抜粋し、改変した。

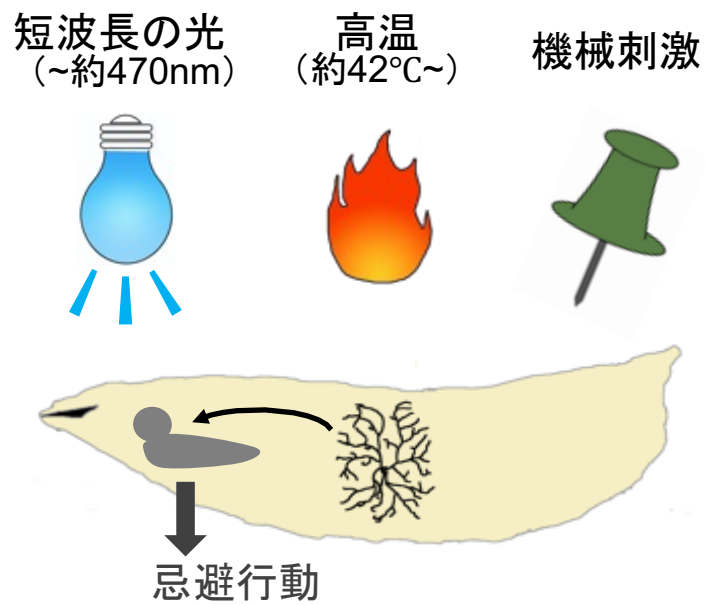


図 6. C4da neuron は痛覚に応答し、幼虫の忌避行動を引き起こす

C4da neuron は 3 種類の侵害性刺激（高温、強い機械刺激、短波長）を受容する。それらの刺激は C4da neuron を活性化させ、出力された信号が下流の神経回路へと伝達されることで、幼虫の忌避行動を引き起こす。

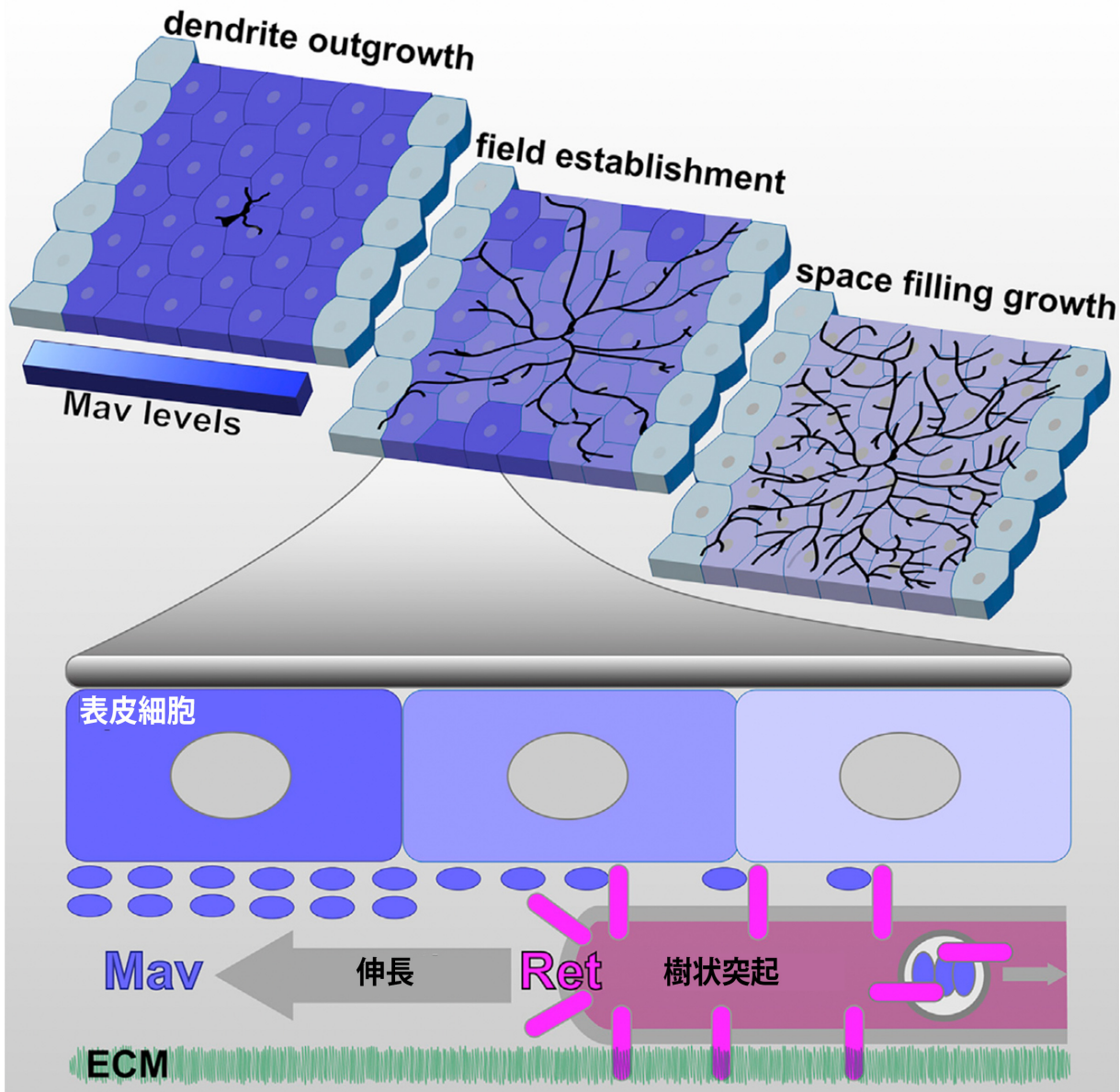


図 7. 表皮細胞との相互作用により、C4da neuron の樹状突起の形態形成が制御される例

表皮細胞から分泌された Maverick (Mav) は Ret 受容体の働きを介して、C4da neuron に取り込まれる。Mav の濃度が高い領域に向かって樹状突起が盛んに成長することで、体表を隈なく覆うことが可能となる。また、これらの分子は樹状突起の細胞外マトリックス (ECM) への接着にも寄与する。Hoyer et al., 2018 の図を引用し、改変した。

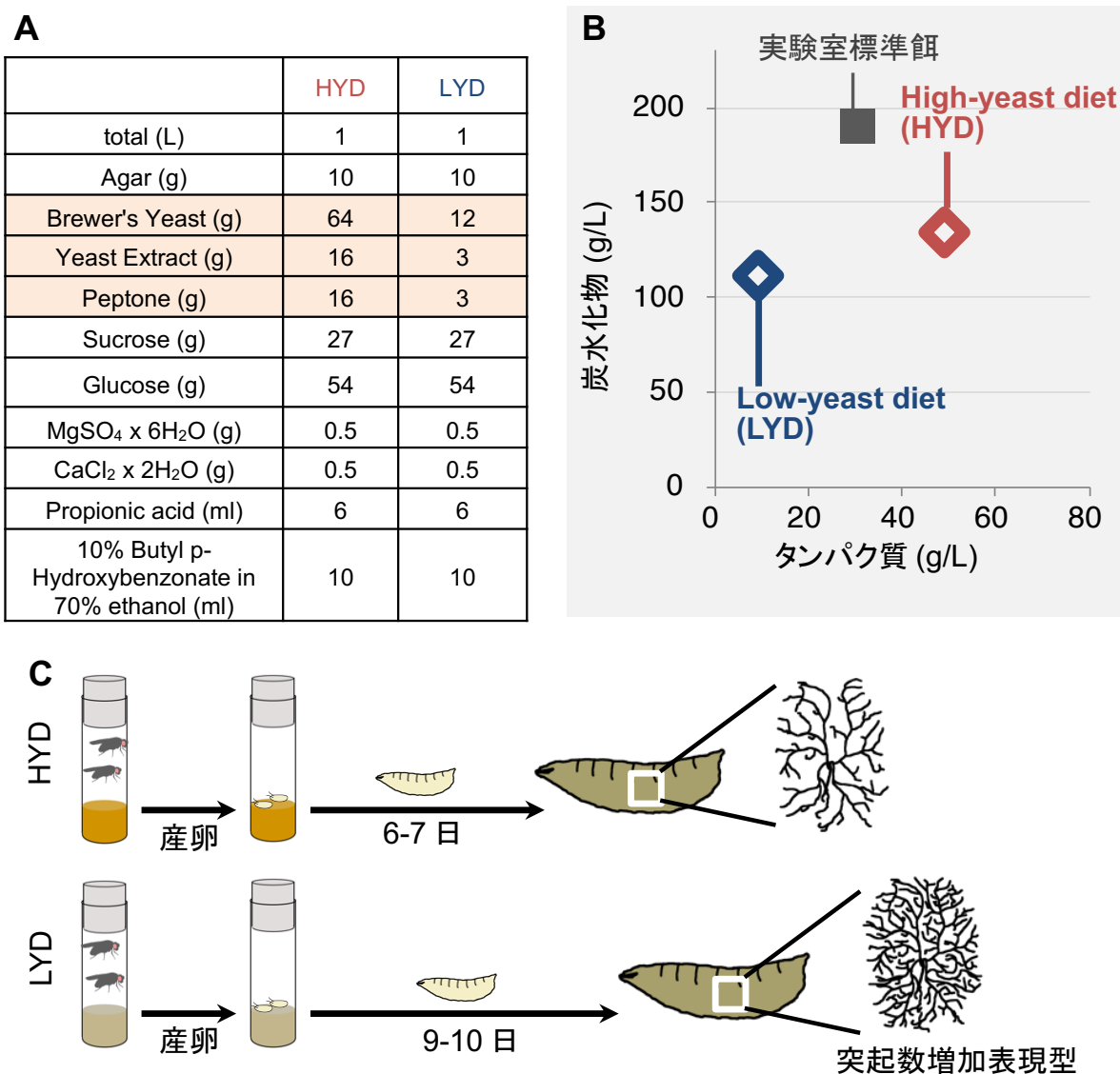


図 8. 栄養条件依存的な C4da neuron の発達機構を解析するために使用した餌と幼虫の飼育方法

(A) HYD と LYD の餌の組成。LYD は HYD に比べて、酵母由来の Brewer's Yeast と Yeast Extract、およびカゼイン由来のペプトンの含有量が少ない。(B) HYD、LYD および実験室標準餌のタンパク質と炭水化物の含有量をプロットしたグラフ。(C) 各餌条件で成長した幼虫の C4da neuron を観察するための飼育法を示す模式図。HYD または LYD において親の成虫に産卵させ、各餌で卵から後期 3 齢幼虫に成長した個体の C4da neuron を観察した。親の産卵開始から次世代の後期 3 齢幼虫が発生するまでに、HYD では 6-7 日、LYD では 9-10 日を要する。

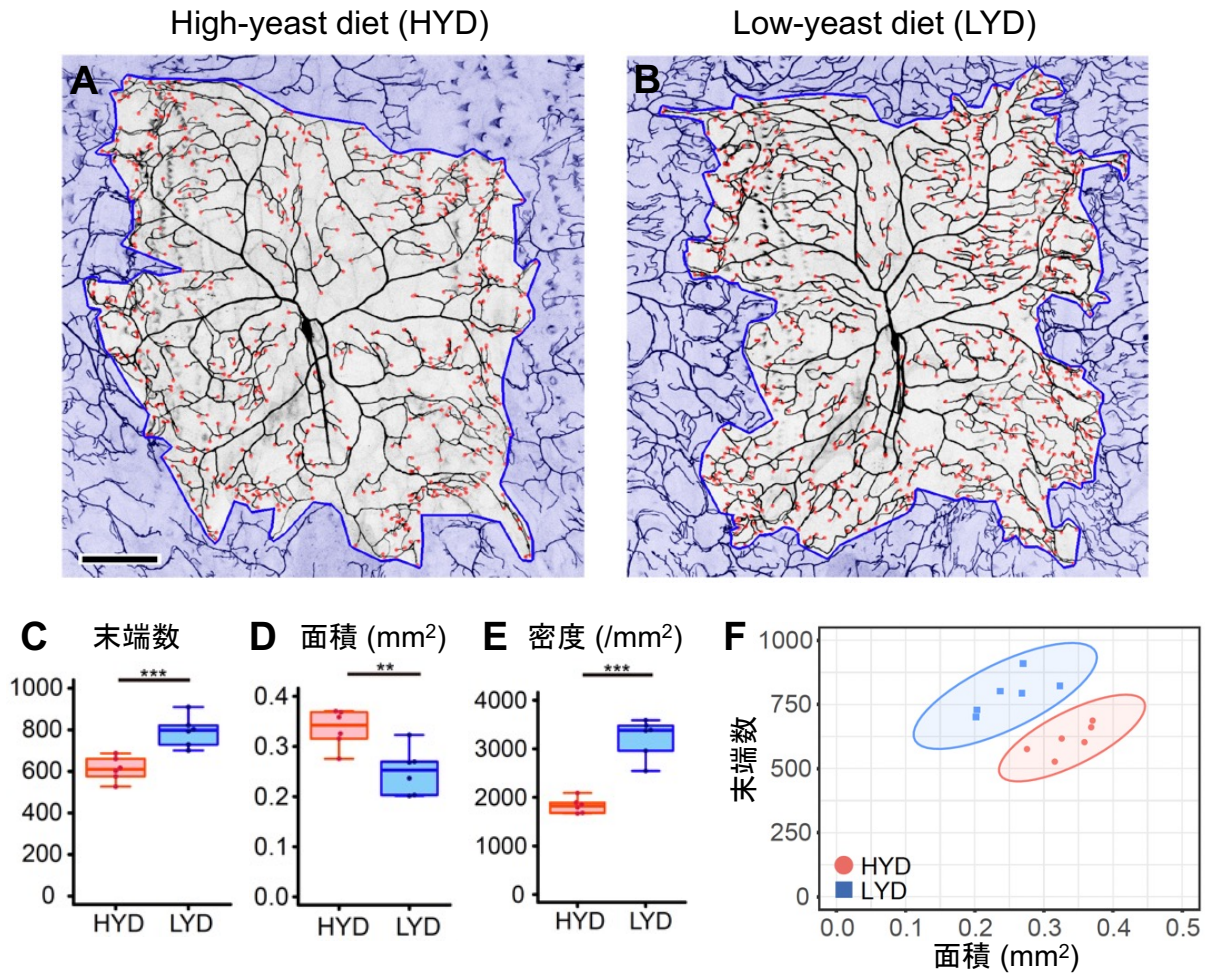


図 9. HYD と比較して LYD で飼育した幼虫で C4da neuron の樹状突起の分岐が促進される

(A, B) HYD (A) または LYD (B) で飼育した幼虫の C4da neuron。赤い点は DeTerm (図 10) によって自動検出された樹状突起末端。青い線で囲まれた内側が 1 細胞の樹状突起が占める範囲を表す。スケールバー：100 $\mu$ m。(C-E) 各餌条件における C4da neuron の樹状突起末端数 (C)、単一の C4da neuron の樹状突起が占める面積 (D)、樹状突起末端数を面積で割った値 (突起末端の密度：E)。(F) 横軸に樹状突起の面積を、縦軸に樹状突起末端数をとった二次元プロット。楕円は 95%信頼区間を表しており、その分布は HYD と LYD で分離した。\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ , Student's t-test,  $n = 6$ 。

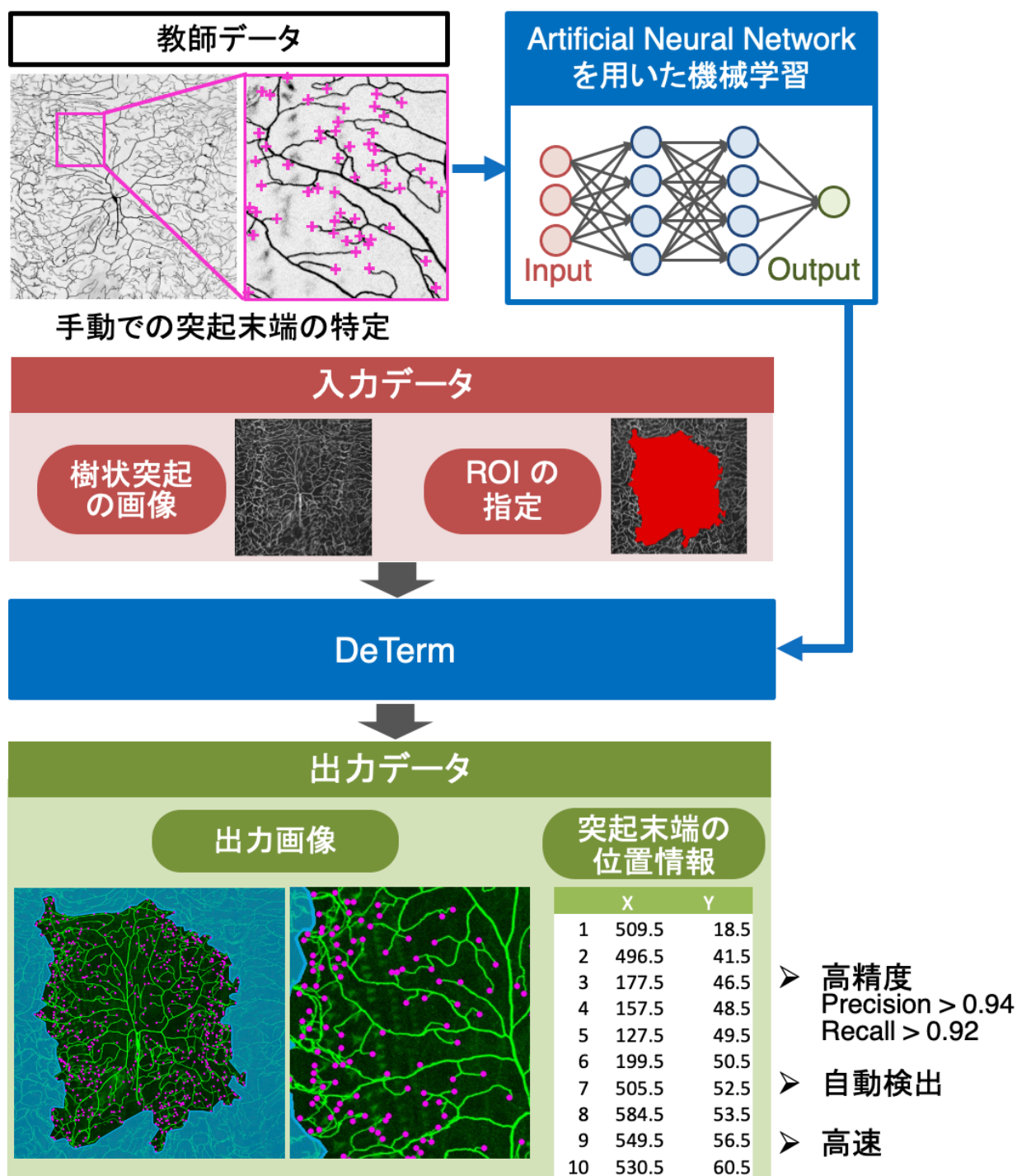


図 10. 樹状突起自動検出プログラム DeTerm

樹状突起自動検出プログラム DeTerm の概要図。このプログラムは Neural Network モデルを用いて開発されており、樹状突起末端を自動で認識する。教師データには、手動で C4da neuron の樹状突起末端を指定した画像が用いられた。プログラムに入力するデータは、C4da neuron の画像と、樹状突起が占める範囲 (ROI) を指定した画像の 2 つである。そして出力結果として、自動で認識した突起末端を点で示した画像と突起末端の位置情報や総数が記録された CSV ファイルが生成される。図は Kanaoka et al., 2019 から引用し、改変した。

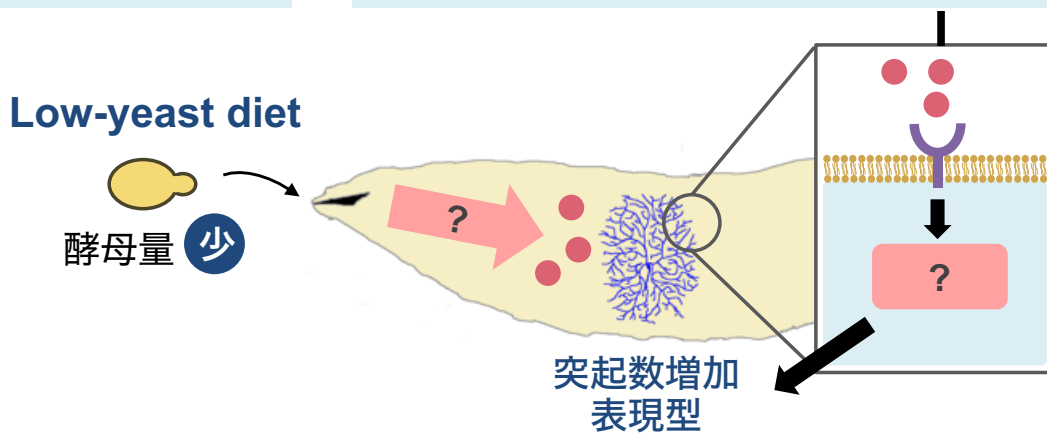


**Q1**

表現型の原因  
となる栄養素

**Q2****シグナリング機構**

- 細胞内のシグナル経路
- 神経細胞に栄養状態が伝わるメカニズム

**Q3****生理学的な意義**

- 神経活動の変化
- 個体の行動への影響

図 11. 本研究で取り組んだ問い

C4da neuron の低栄養依存的な突起数増加表現型について取り組んだ問い。食餌条件間のどの栄養素量の違いにより、表現型が引き起こされるのかを探索した (Q1)。また、表現型に寄与する細胞内のシグナリング機構、および栄養シグナルを C4da neuron に伝える細胞外からのシグナリング機構を解析した (Q2)。そして、この表現型の生理学的意義を追究するため、LYD において神経活動や個体の行動が変化するかを解析した (Q3)。

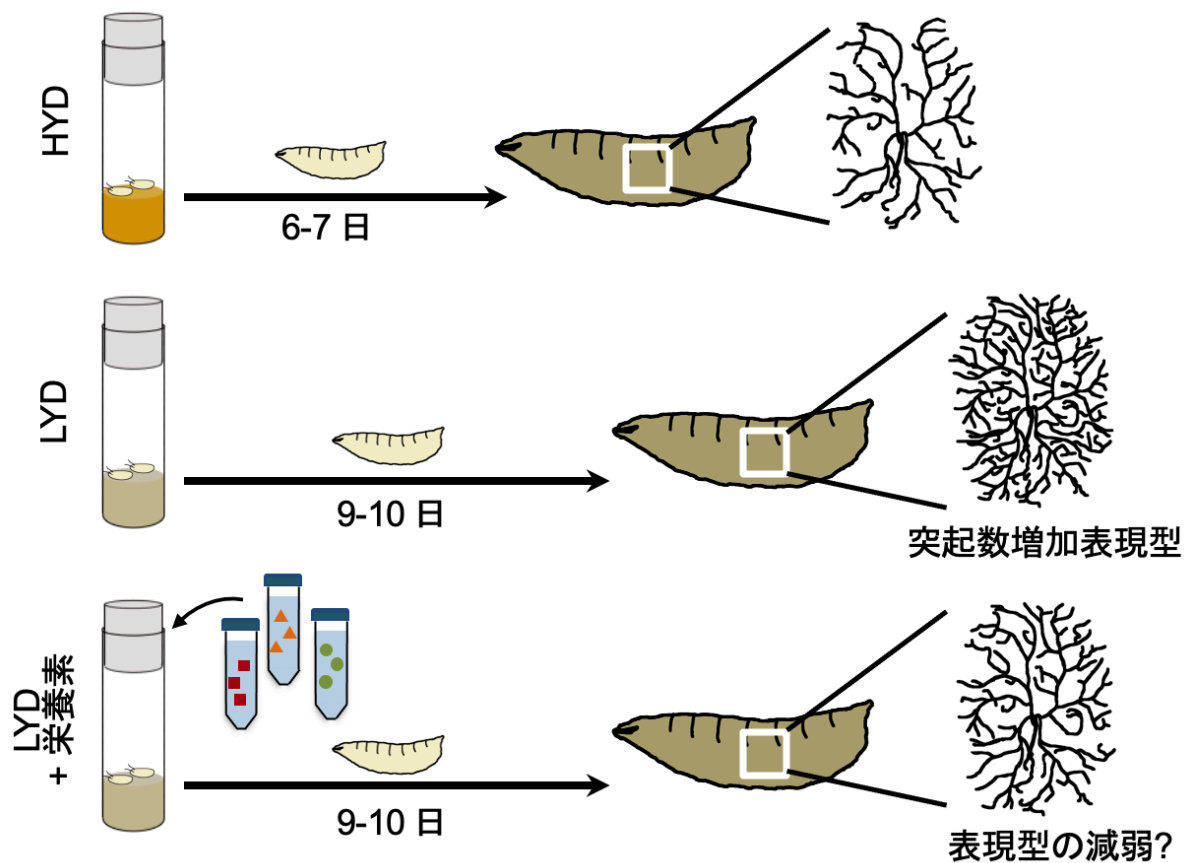


図 12. 栄養化合物の添加による表現型の原因栄養素の探索

突起数増加表現型の原因栄養成分を探索する目的で、LYD への栄養素の添加実験を行なった。LYD では、酵母およびカゼイン由来の材料に含まれる栄養成分の不足によって、突起数増加表現型が引き起こされる可能性を考えた。そこで、LYD へ添加することによって、表現型が減弱する栄養素を探索した。

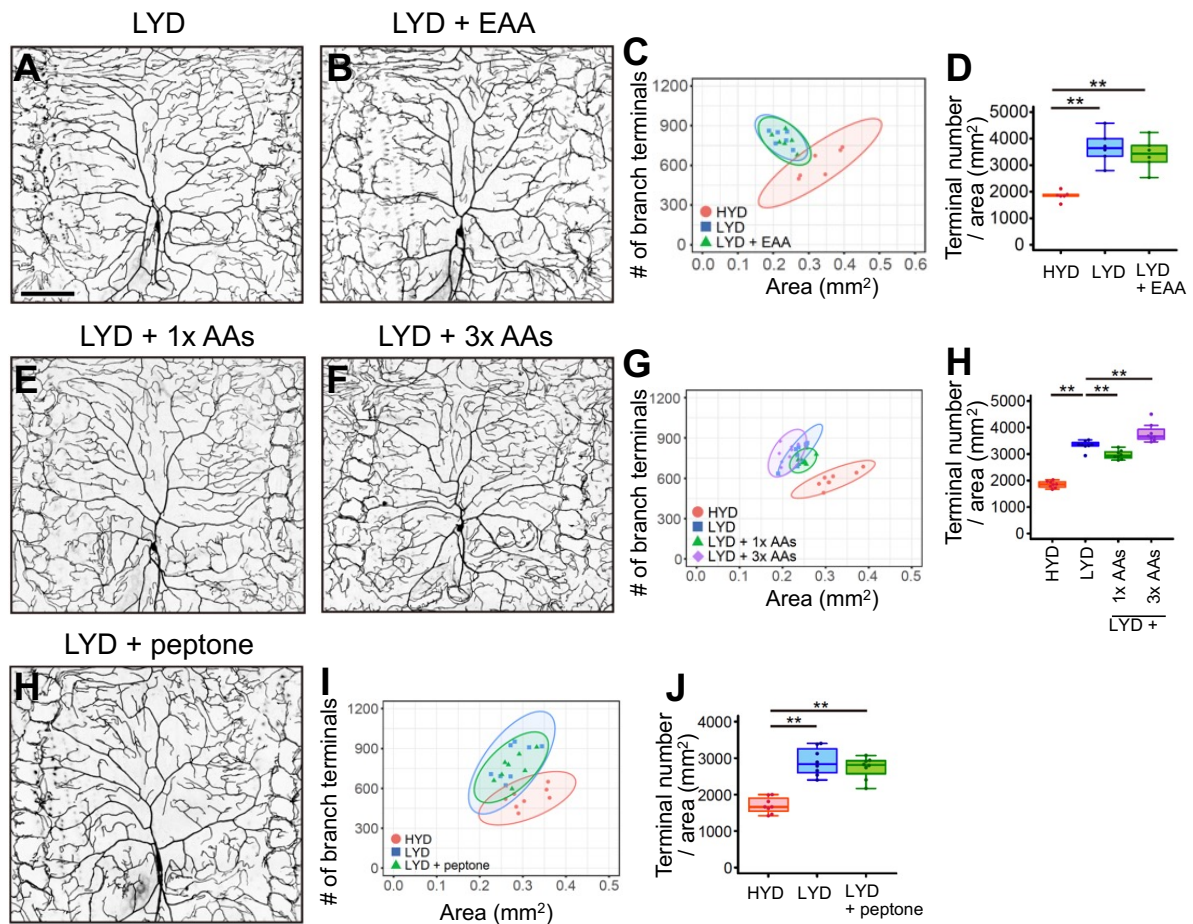


図 13. アミノ酸の添加では突起数増加表現型に顕著な違いは見られない

(A-D) LYD (A) または LYD に必須アミノ酸 (EAA) を添加した餌 (LYD + EAA; B) で飼育した幼虫の C4da neuron の画像。二次元プロット (C)、および樹状突起末端の密度 (D, one-way ANOVA and Tukey's HSD test,  $n = 6$ )。二次元プロットにおいて、LYD + EAA の 95%信頼区間の楕円は LYD の楕円とほとんど同一の場所に位置した。

(E-H) LYD に Holidic medium 由来のアミノ酸を 1 倍濃度で添加した餌 (LYD + 1x AAs; E)、または 3 倍濃度で添加した餌 (LYD + 3x AAs; F) で飼育した幼虫の C4da neuron の画像。二次元プロット (G)、および樹状突起末端の密度 (H, Steel test,  $n = 6$ )。

(I-K) LYD にペプトンを添加した餌で飼育した幼虫の C4da neuron の画像 (I)。二次元プロット (J)、および樹状突起末端の密度 (K, Steel test,  $n = 8$ )。

\*\* $P < 0.01$ 、スケールバー：100 $\mu\text{m}$ 。

## Holidic medium

(ショウジョウバエの完全化学合成培地)

Difco granulated agar
acetic acid
$\text{KH}_2\text{PO}_4$
$\text{NaHCO}_3$
sucrose

### Amino acids

L-arginine HCl
L-alanine
L-asparagine
L-aspartic acid
L-cysteine
L-glutamic acid (mono-Na salt)
L-glutamine
glycine
L-histidine
L-iso-leucine
L-leucine
L-lysine HCl
L-methionine
L-phenylalanine
L-proline
L-serine
L-threonine
L-tryptophan
L-tyrosine
L-valine

### Cholesterol

cholesterol

### Metal ion

$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$
$\text{MgSO}_4$ (anhydrous)
$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$

### Vitamin

thiamine (aneurin)
riboflavin
nicotinic acid
Ca pantothenate
pyridoxine-HCL
biotin
folic acid

### Others

choline chloride
myo-inositol
inosine
uridine

添加

LYD

図 14. 完全化学合成培地由来の栄養成分の添加による原因栄養素の探索

ショウジョウバエの完全化学合成培地である Holidic medium に含まれる栄養成分の一覧。「コレステロール」、「金属イオン」、「ビタミン」、「その他の栄養素 (コリン・イノシトール・ヌクレオシド)」の分画を組み合わせ、または個別に LYD に添加し、突起数増加表現型が減弱するかどうかを調べた。

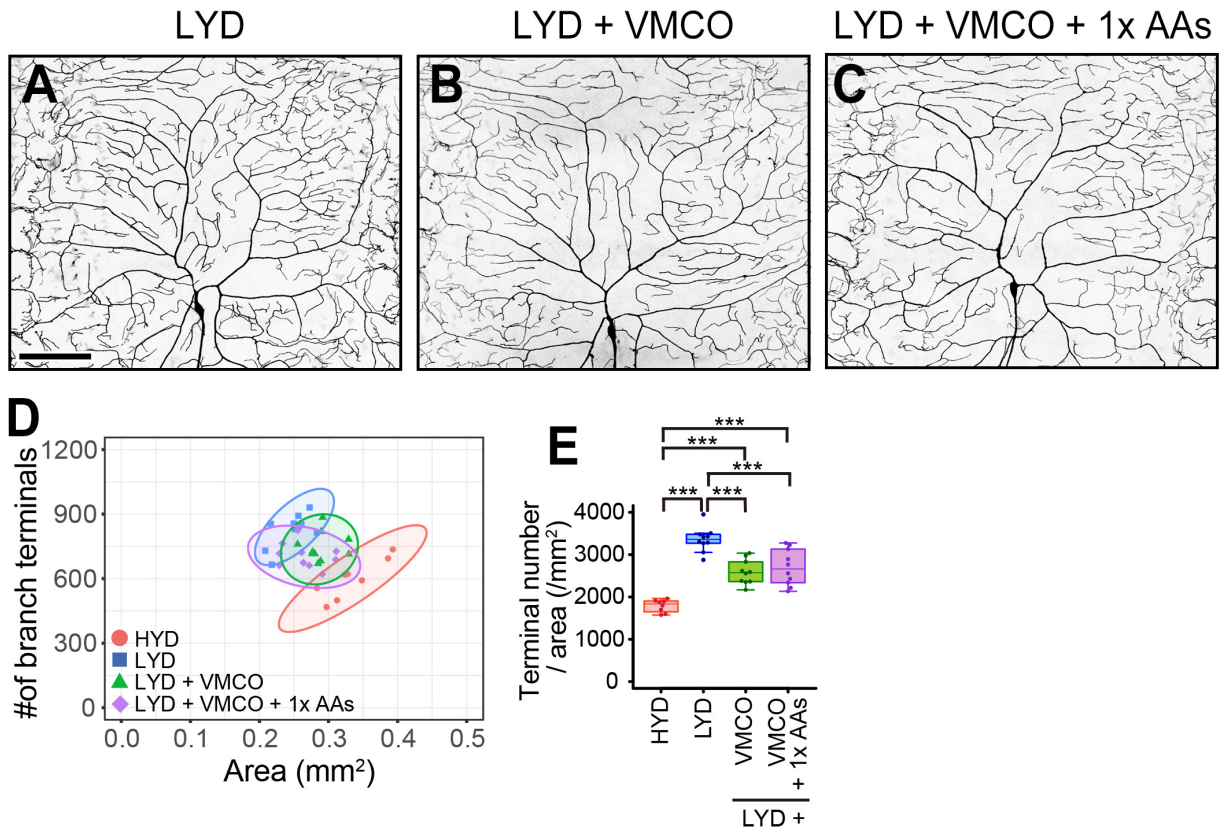


図 15. Holidic medium からアミノ酸を除いた分画を LYD に添加すると、突起数増加表現型が部分的に減弱する

(A-C) LYD (A)、LYD に「ビタミン (V)」、「金属イオン (M)」、「コレステロール (C)」、「その他の栄養素 (O)」の分画を添加した餌 (LYD + VMCO; B)、または LYD + VMCO にさらにアミノ酸の分画を添加した餌 (LYD + VMCO + 1x AAs; C) で飼育した幼虫の C4da neuron の画像。スケールバー：100 $\mu$ m。(D) 二次元プロット。LYD + VMCO および LYD + VMCO + 1x AAs の 95%信頼区間の楕円は LYD と HYD の楕円の間位置した。(E) 樹状突起末端の密度。\*\*\* $P < 0.001$  (one-way ANOVA and Tukey's HSD test,  $n = 8-10$ )。

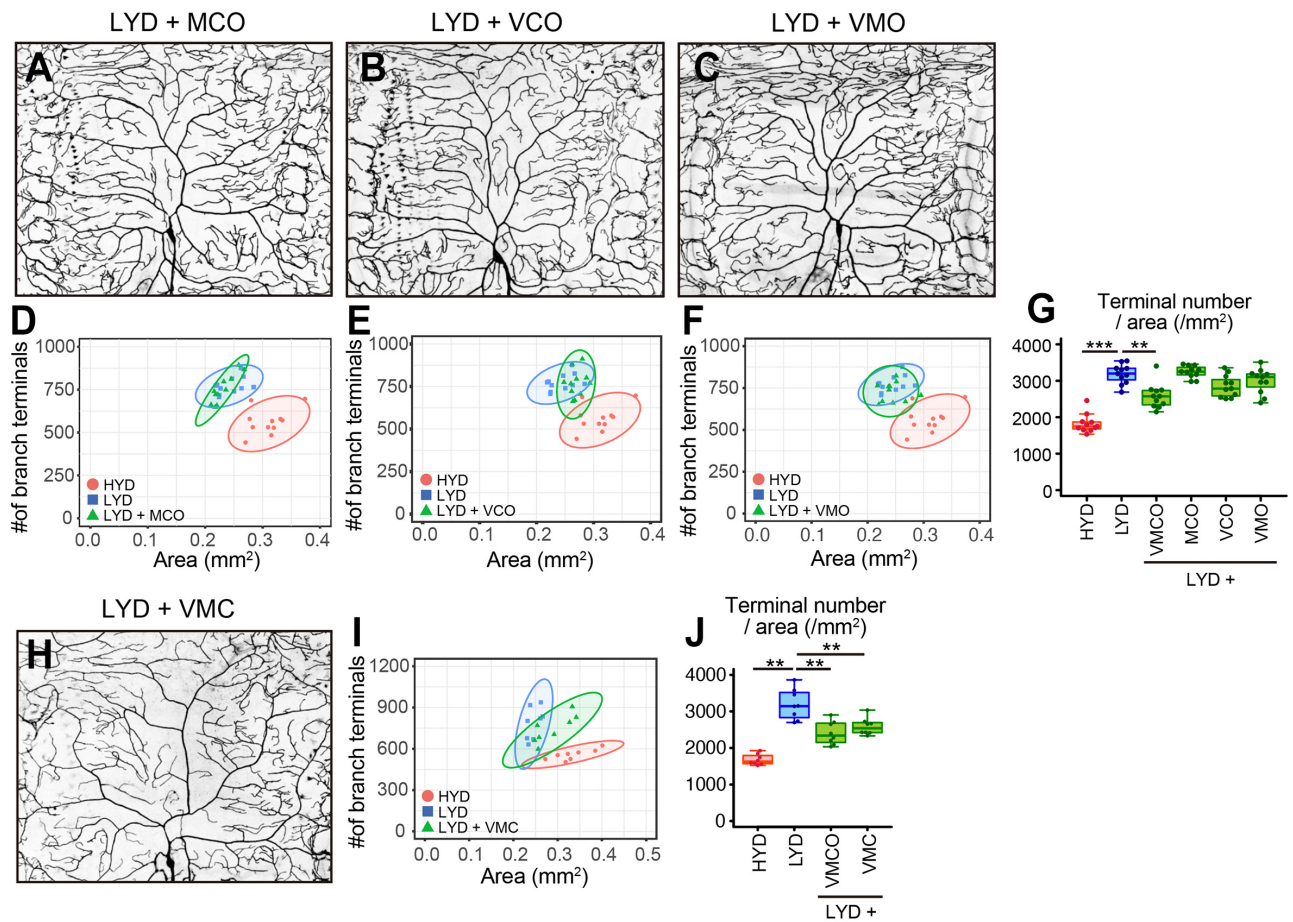


図 16. ビタミン、金属イオン、そしてコレステロールを LYD へ同時に添加すると突起数増加表現型が部分的に減弱する

(A-C) LYD + MCO (A)、LYD + VCO (B)、または LYD + VMO (C) で飼育した幼虫の C4da neuron の画像。(D-G) LYD + MCO (D)、LYD + VCO (E)、または LYD + VMO (F) についての二次元プロット、および樹状突起末端の密度 (G, Steel test,  $n = 10$ )。

(H-J) LYD + VMC で飼育した幼虫の C4da neuron の画像 (H)、二次元プロット (I)、および樹状突起末端の密度 (J, Steel test,  $n = 8$ )。

\*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ 、スケールバー：100 $\mu\text{m}$ 。

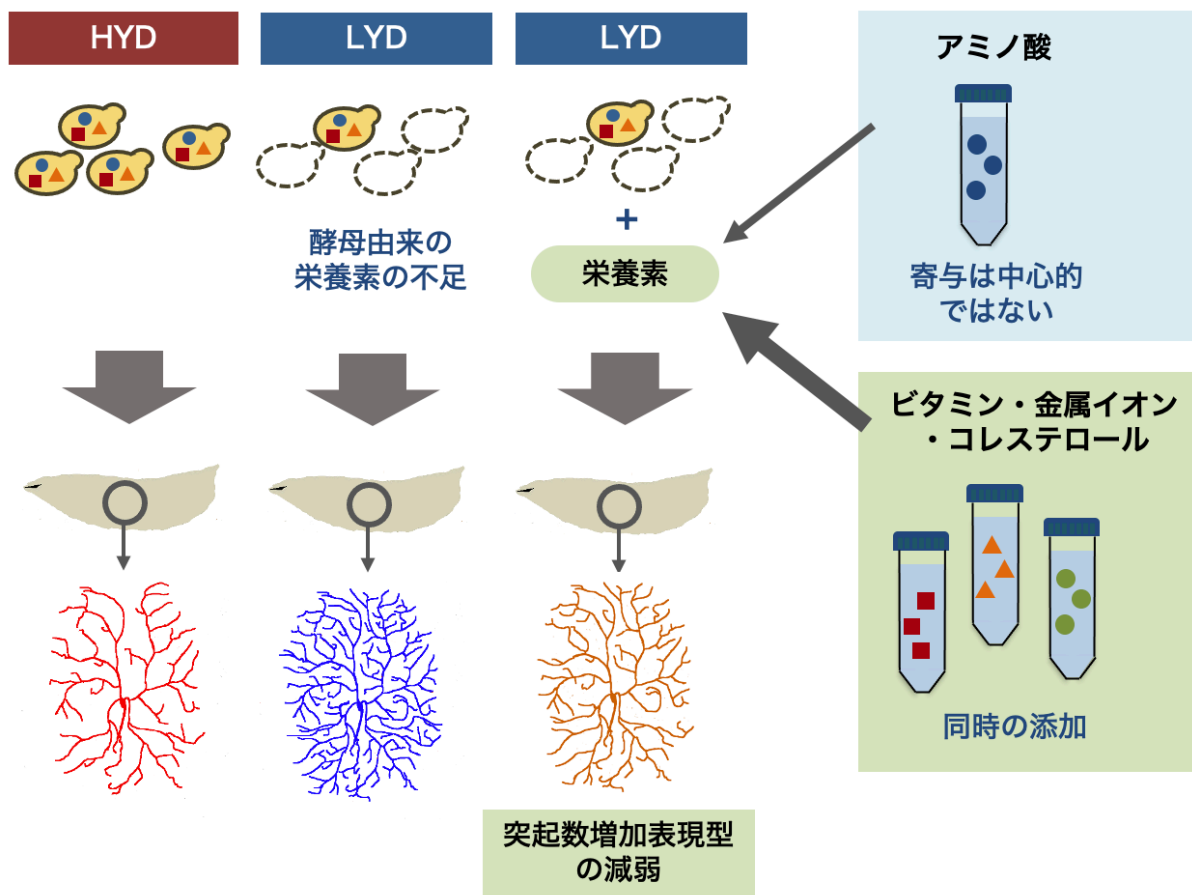


図 17. 突起数増加表現型は LYD においてビタミン・金属イオン・コレステロールが複合的に不足することにより引き起こされる

アミノ酸を LYD へ添加しても、突起数増加表現型に顕著な影響を与えない一方で、ビタミン・金属イオン・コレステロールを同時に添加すると、表現型が完全ではないものの、有意に減弱することが分かった。したがって、LYD ではこれらの栄養素が同時に不足することにより、表現型が引き起こされることが示唆された。

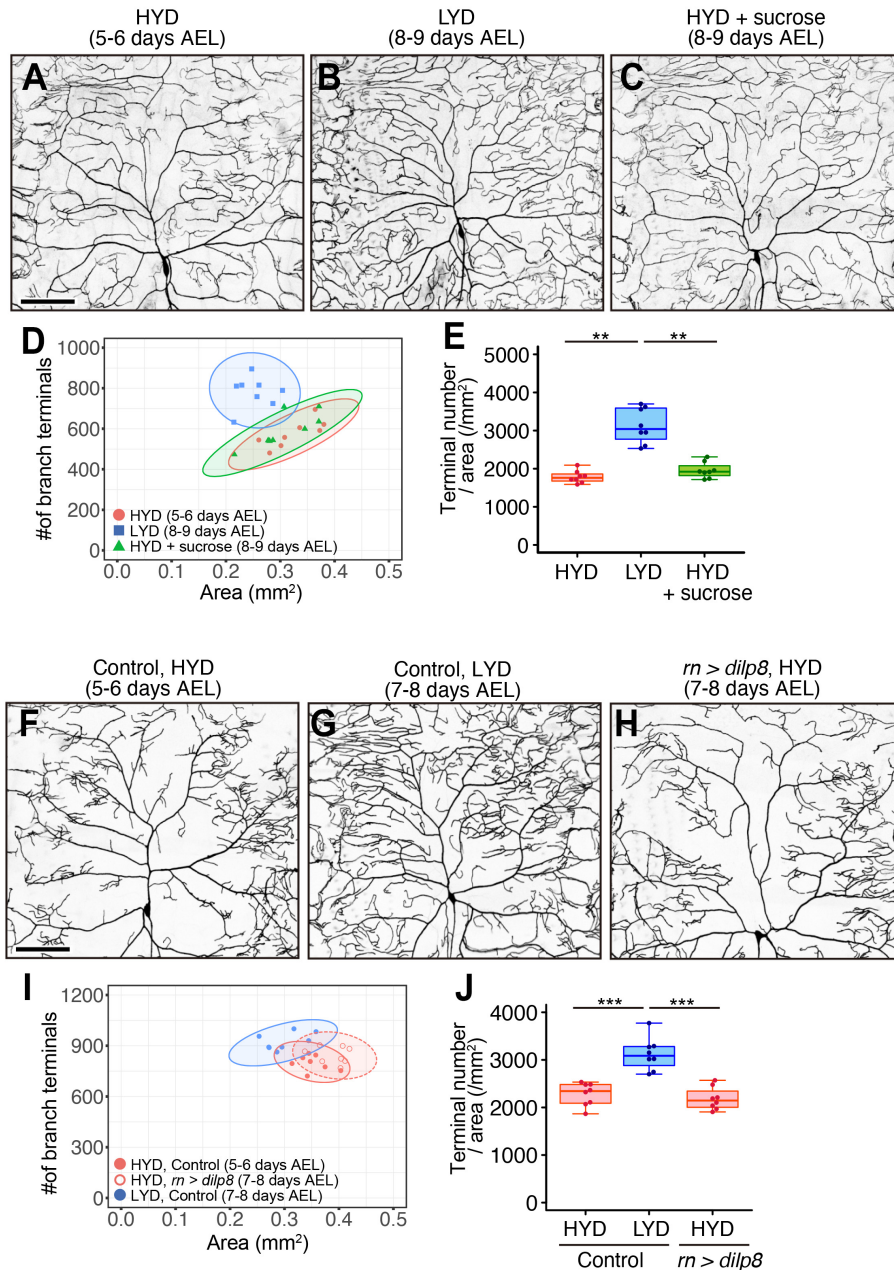


図 18. 幼虫期の延長のみが突起数増加表現型を引き起こすわけではない

(A-E) HYD (A)、LYD (B)、または HYD にスクロースを添加した餌 (HYD + sucrose; C) で飼育した幼虫の C4da neuron の画像。二次元プロット (D)、および樹状突起末端の密度 (E)。HYD 飼育条件下では産卵されてから 5-6 日後に、LYD と LYD + sucrose 飼育条件下では 8-9 日後に後期 3 齢幼虫の C4da neuron を観察した。

(F-J) HYD (F) または LYD (G) で飼育したコントロール個体、または HYD で翅原基において *dilp8* を過剰発現し、生育を遅延させた個体の C4da neuron (H) の画像。二次元プロット (I)、および樹状突起末端の密度 (J)。コントロールの HYD では産卵されてから 5-6 日後に、コントロールの LYD と *dilp8* 過剰発現個体は 7-8 日後に後期 3 齢幼虫の C4da neuron を観察した。

\*\*P < 0.01, \*\*\*P < 0.001 (One-way ANOVA and Tukey's HSD test, n = 8)、スケールバー：100μm。



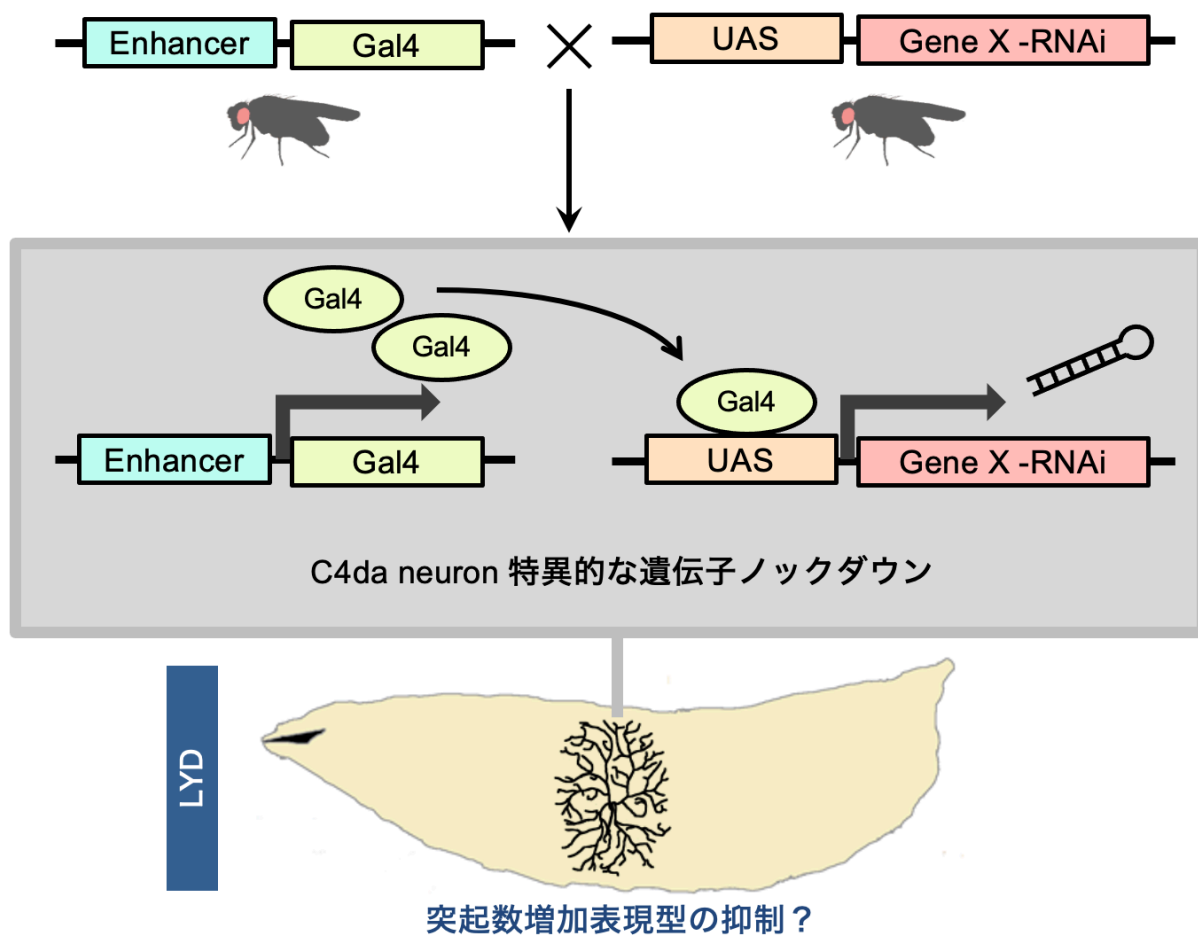


図 19. C4da neuron 特異的な遺伝子ノックダウンによる、表現型に寄与する細胞内因子の探索

表現型に寄与する細胞内因子の候補を得るため、GAL4-UAS システムを用いて C4da neuron 特異的に遺伝子ノックダウンを行い、突起数増加表現型が抑制される遺伝子を探した（図下部）。GAL4-UAS システムは、ショウジョウバエ個体内で様々な組織や発生段階にトランスジーンを強制的に発現させるための方法である（図上部）。このシステムでは以下の二つのシステムを用意する。一つは酵母の転写活性化因子である GAL4 がゲノム中の特定のエンハンサー活性の制御下で産生される系統（左側の成虫）。もう一つは GAL4 が結合する UAS 配列の下流に強制発現させたい転写産物の配列（この実験の場合は “GeneX RNAi”）を連結させたコンストラクトを持つ系統である（右側の成虫）。両者を交配すると、次世代のショウジョウバエ個体内で GAL4 と UAS-GeneX-RNAi が共存し、GAL4 が発現する時期や組織特異的に RNAi が発現することで、遺伝子がノックダウンされる。

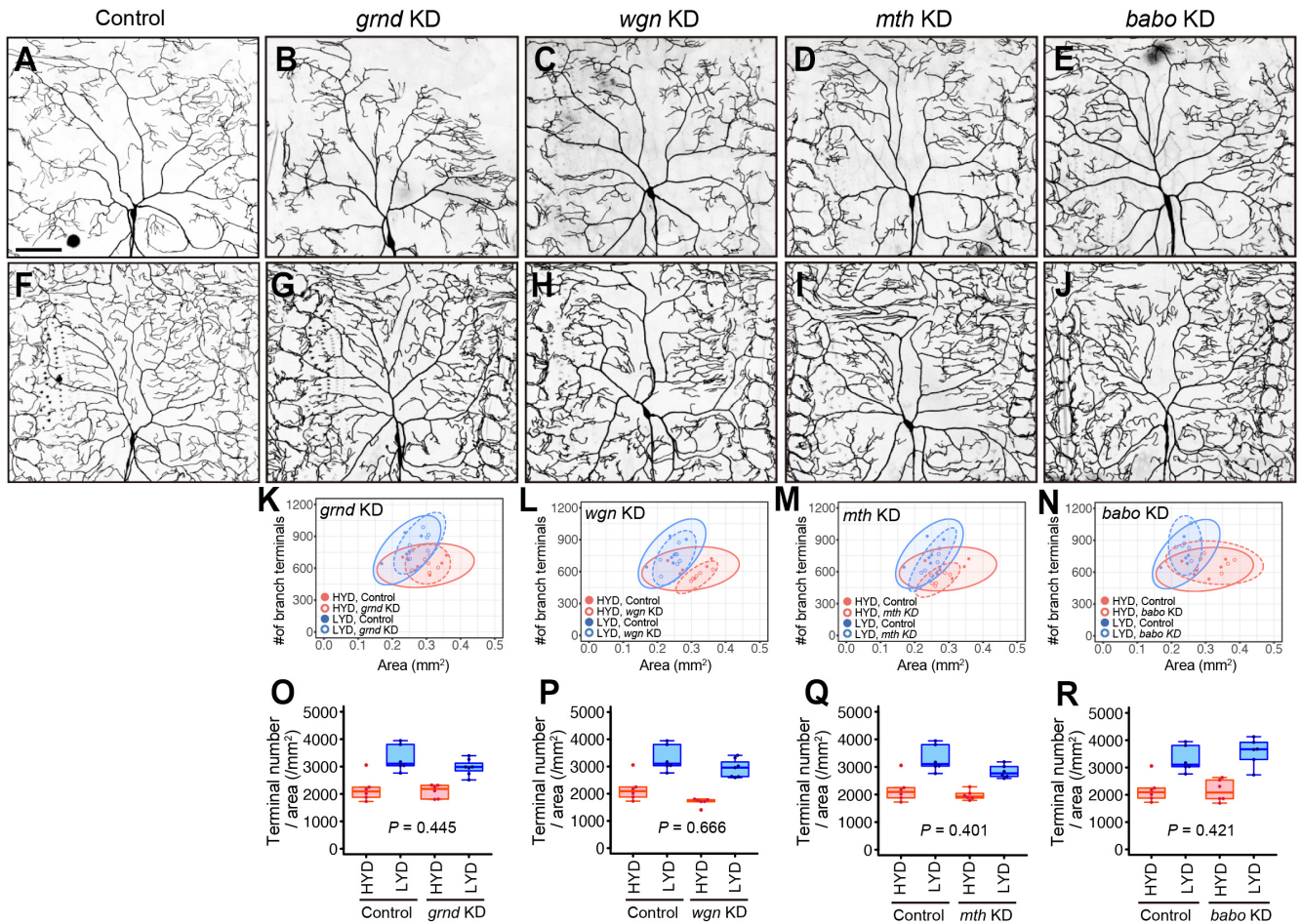


図 20. 全身性シグナル伝達経路で受容体として働く因子を C4da neuron においてノックダウンした結果

(A-J) HYD (A-E) または LYD (F-J) における、コントロール (A, F)、*grnd* (B, G)、*wgn* (C, H)、*mth* (D, I)、または *babo* (E, J) をノックダウンした C4da neuron の画像。(K-N) 二次元プロット。(O-R) 樹状突起末端の密度。コントロールにおける餌条件間の値の差と、ノックダウンした C4da neuron における餌条件間の値の差は有意に異ならなかった (two-way ANOVA,  $n=6$ )。スケールバー：100 $\mu$ m。

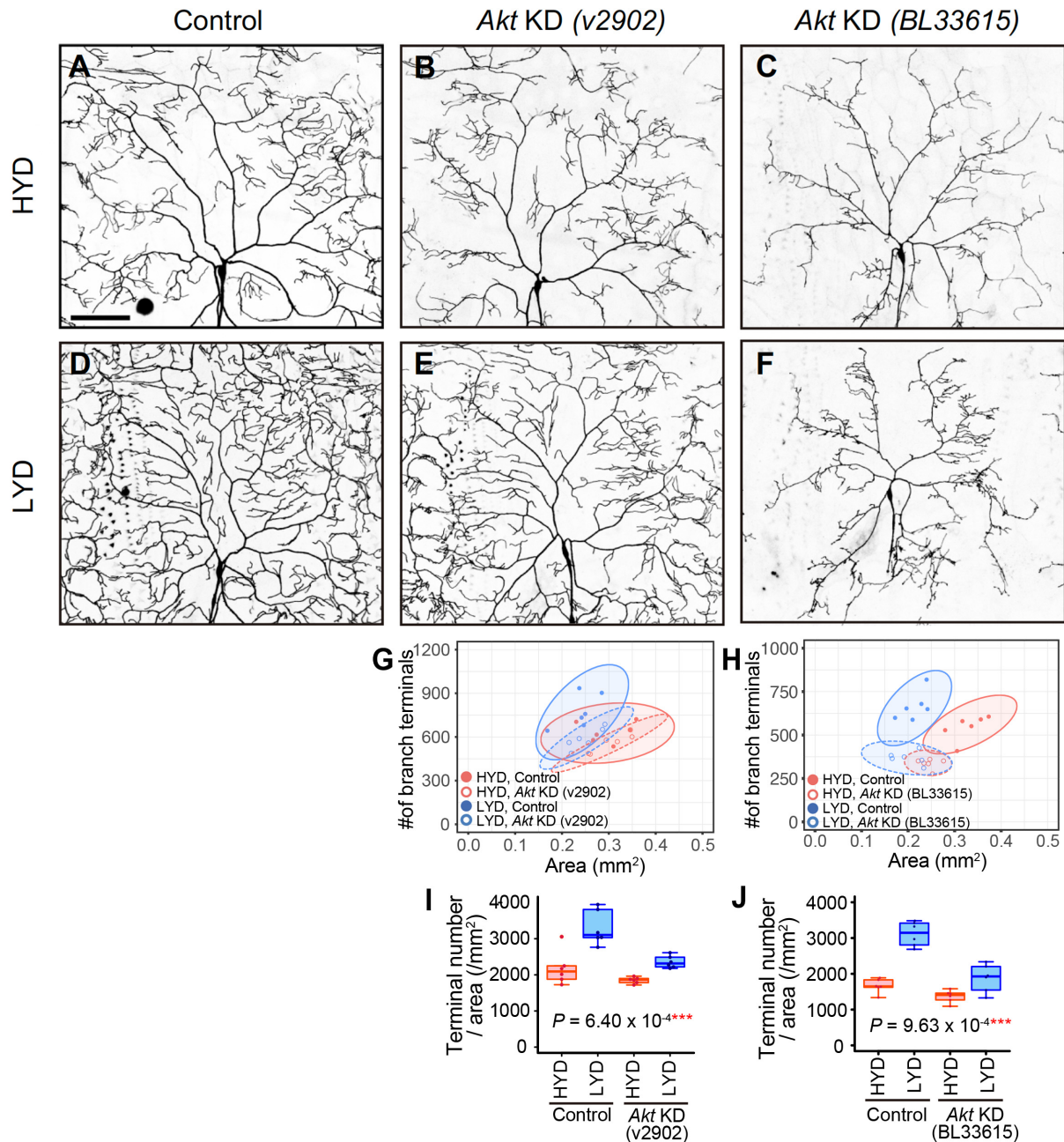


図 21. C4da neuron での Akt のノックダウンにより、突起数増加表現型が減弱する

(A-F) 各餌条件における、コントロールの C4da neuron (A, D) と、*UAS-Akt RNAi<sup>v2902</sup>* (B, E) または、*UAS-Akt RNAi<sup>BL33615</sup>* (C, F) を用いて Akt をノックダウンした C4da neuron の画像。(G, H) 二次元プロット。(I, J) 樹状突起末端の密度。いずれのノックダウンでも、餌条件と遺伝子型の間で有意な交互作用があり、コントロールにおける餌条件間の値の差に比べて、ノックダウンした C4da neuron における餌条件間の値の差が小さい (two-way ANOVA, n=6)。\*\*\* $P < 0.001$ 、スケールバー：100 $\mu$ m。

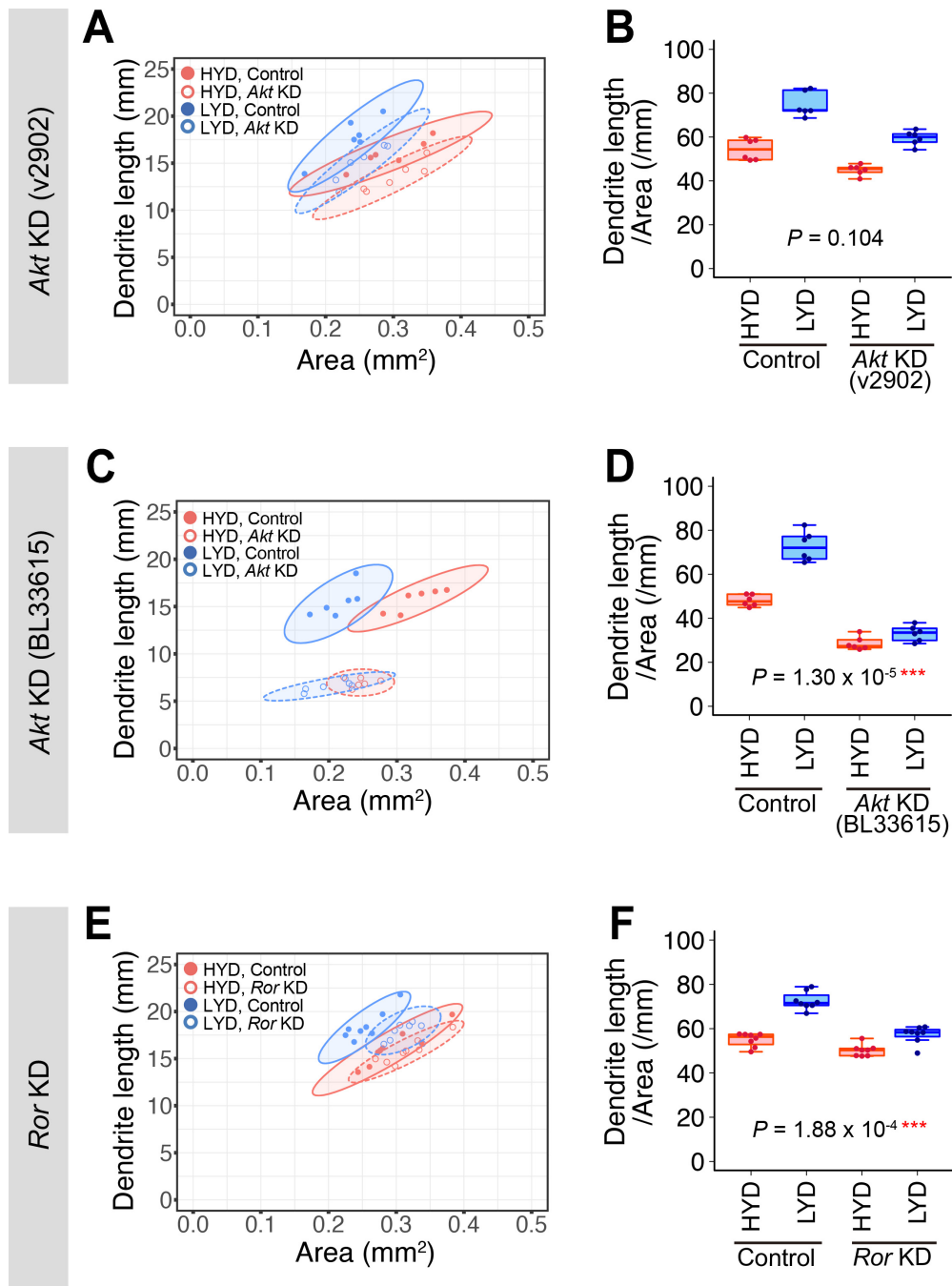
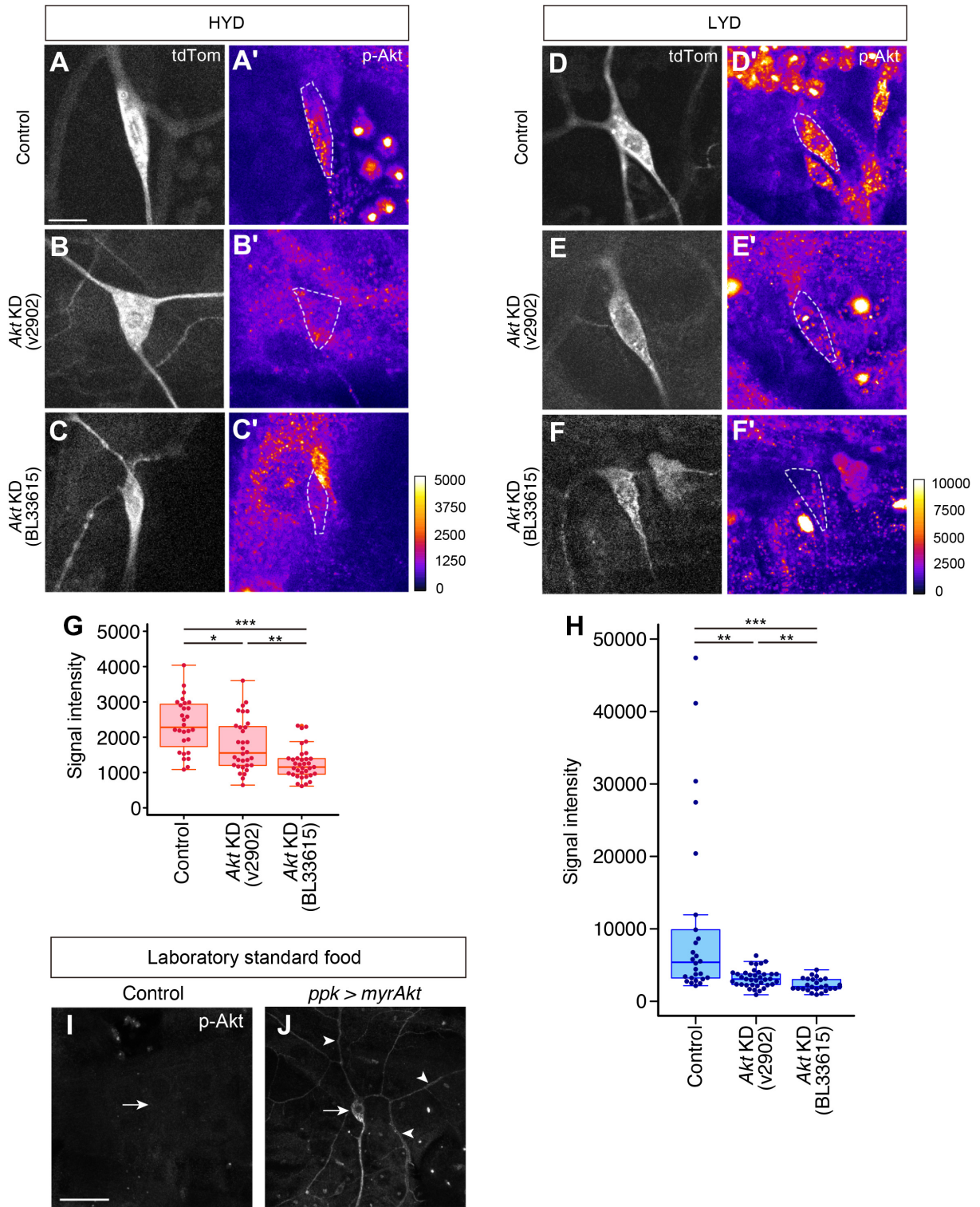


図 22. Akt または Ror をノックダウンした C4da neuron の樹状突起長の定量結果

コントロール、*UAS-Akt RNAi<sup>v2902</sup>* (A, B) または、*UAS-Akt RNAi<sup>BL33615</sup>* (C, D) を用いて Akt をノックダウンした C4da neuron、そして、*Ror* をノックダウンした C4da neuron (E, F) の樹状突起の全長の測定結果。(A, C, E) 樹状突起の面積を横軸に、樹状突起の全長を縦軸にとった二次元プロット。(B, D, F) 樹状突起末端の全長を面積で割った値。\*\*\*P < 0.001 (two-way ANOVA, n= 6)。



(図の説明は次頁)

## 図 23. Akt RNAi 系統のノックダウン効率と p-Akt 抗体の特異性の評価

(A-H) HYD (A-C) または LYD (D-F) において、コントロールの C4da neuron (A, A', D, D')、*UAS-Akt RNAi<sup>v2902</sup>* (B, B', E, E')、または *UAS-Akt RNAi<sup>BL33615</sup>* (C, C', F, F') を用いて C4da neuron で *Akt* をノックダウンした個体について p-Akt の抗体染色を行なった結果。(A-F) *ppk-CD4:tdTom* により可視化した C4da neuron。(A'-F') p-Akt のシグナル。白い点線で囲んだ領域は C4da neuron の細胞体を表す。また、各画像のシグナル輝度は、右下のカラーコードに示す色に変換した。(G, H) HYD (G) または LYD (H) での、C4da neuron の細胞体における p-Akt のシグナル強度の定量結果。\*P < 0.05, \*\*P < 0.01, \*\*\*P < 0.001 (Steel Dwass test, n = 26-37)。スケールバー：10 $\mu$ m。

(I, J) p-Akt 抗体で染色したコントロール (I) または *myrAkt* を強制発現した C4da neuron (J)。矢印は C4da neuron の細胞体を表す。*myrAkt* を強制発現した細胞では、細胞体だけでなく、樹状突起でも (矢じり)、コントロールと比べて顕著に強いシグナルが見られた。スケールバー：100 $\mu$ m。

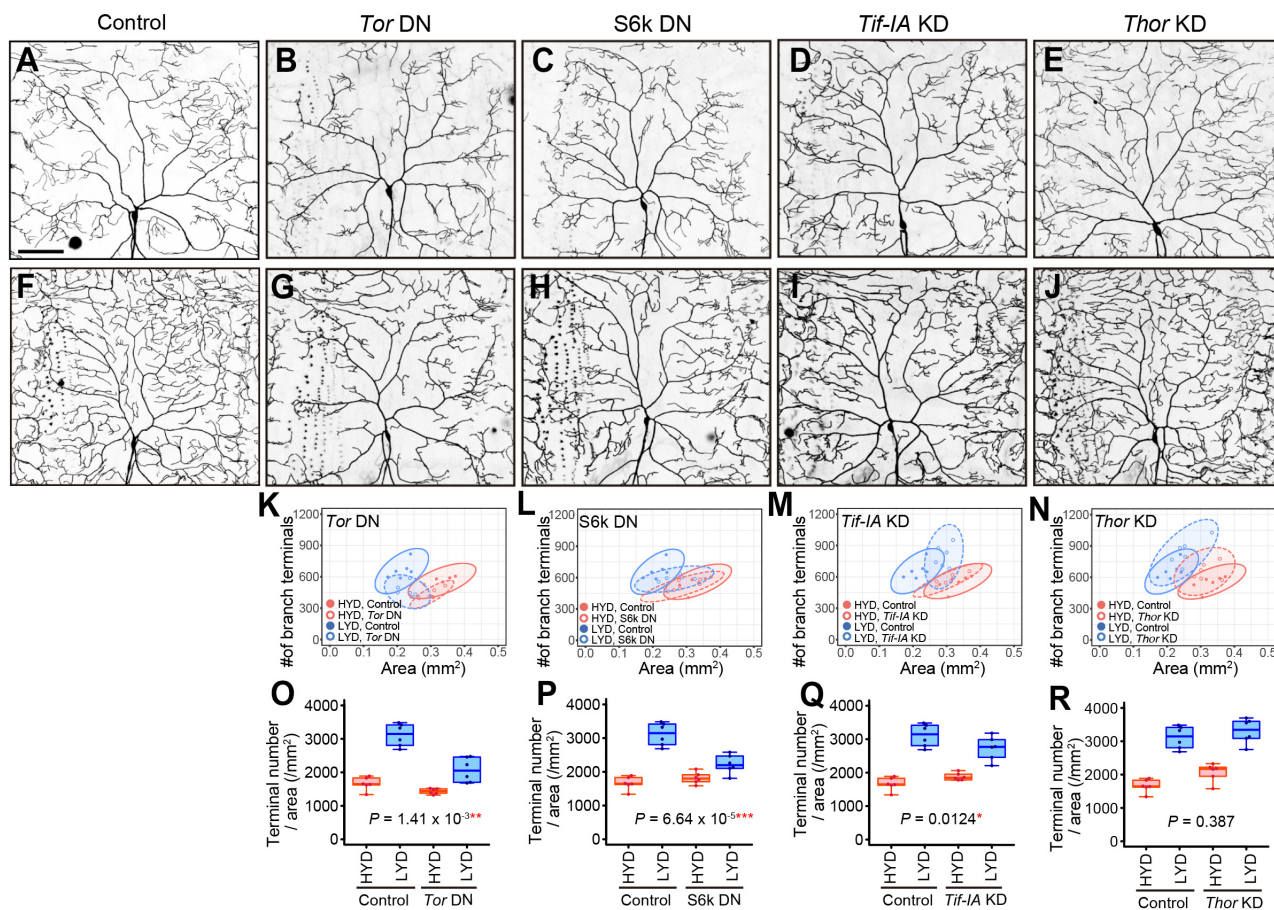


図 24. Tor signaling の構成因子のノックダウンが突起数増加表現型に及ぼす影響

(A-J) HYD (A-E) または LYD (F-J) における、コントロール (A, F)、*Tor* (B, G) または *S6k* (C, H) の dominant form を強制発現した C4da neuron、そして、*mth* (D, I) または *babo* (E, J) をノックダウンした C4da neuron の画像。(K-N) 二次元プロット。(O-R) 樹状突起末端の密度。\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$  (two-way ANOVA,  $n = 6$ )、スケールバー：100 μm。

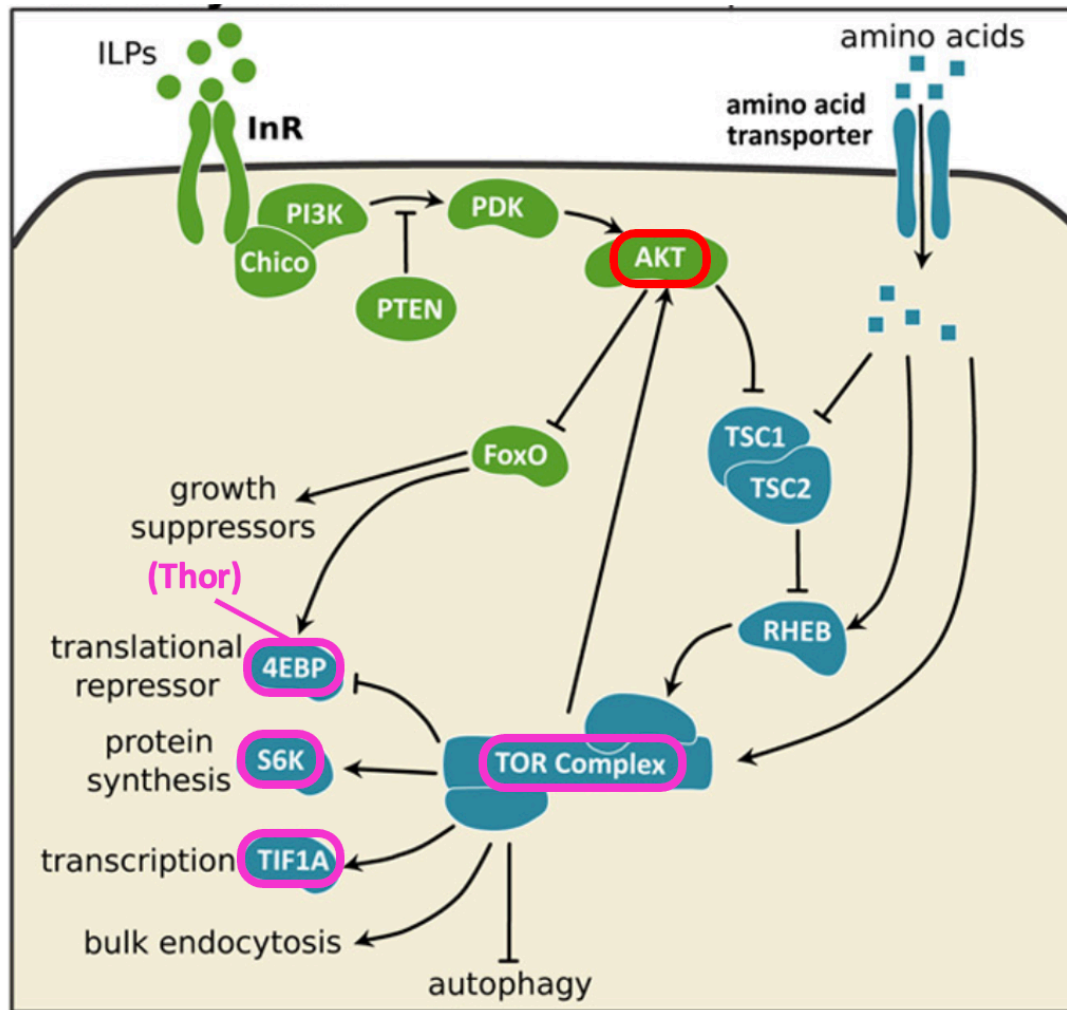


図 25. Tor signaling は Akt を経た上流経路により活性化され、細胞の成長を促進する

Akt は Target of Rapamycin (TOR) 経路を負に制御する因子を抑制し、TOR 経路の活性化に働く。TOR 経路が活性化すると、タンパク質合成を負に制御する因子である 4E-Binding Protein (4EBP/Thor) の抑制や、ribosomal protein S6 kinase (S6K) および Transcriptional Intermediary Factor 1A (TIF-1A) の活性化を介して細胞の成長が促される。本研究では、マゼンタでマークしたタンパク質を機能阻害し、突起数増加表現型に影響が見られるかどうかを検証した。Koyama et al., 2013 の図を抜粋し、改変した。



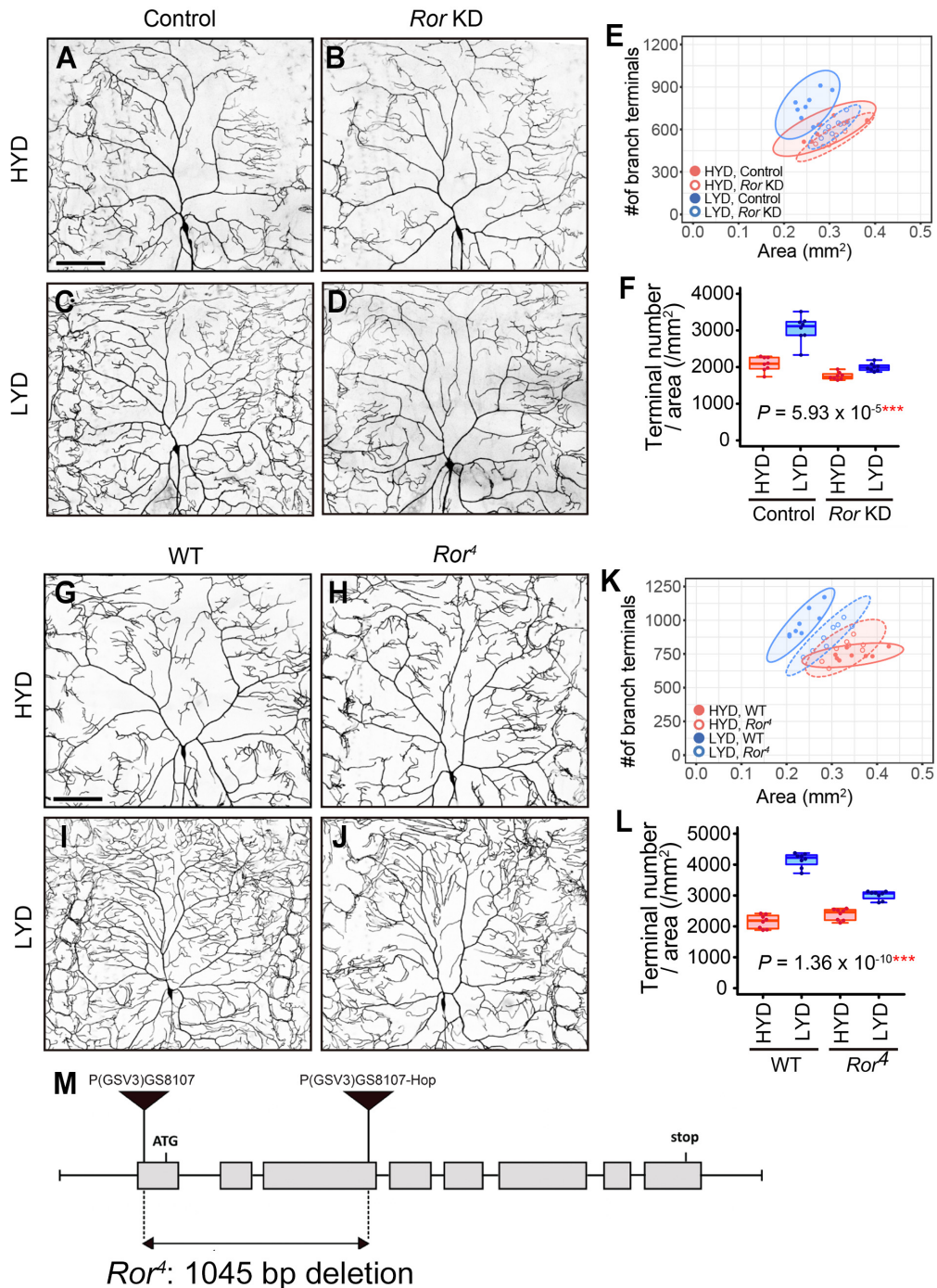


図 26. チロシンキナーゼ受容体の Ror は突起数増加表現型に寄与する

(A-F) HYD (A, B) または LYD (C, D) における、コントロール (A, C) または *Ror* をノックダウンした C4da neuron (B, D) の画像。二次元プロット (E)、および樹状突起末端の密度 (F)。(G-L) HYD (G, H) または LYD (I, J) における、コントロール (G, I) または *Ror<sup>4</sup>* 変異体の C4da neuron (H, J) の画像。二次元プロット (K) および、樹状突起末端の密度 (L)。(M) *Ror<sup>4</sup>* の変異を表す模式図。*Ror<sup>4</sup>* は開始コドンを含む 1 目から 3 目までのエクソンが欠失しており、ヌル変異であると考えられる。Ripp et al., 2018 の図を抜粋し、改変した。\*\*\* $P < 0.001$  (two-way ANOVA,  $n = 8$ )、スケールバー：100 $\mu\text{m}$ 。

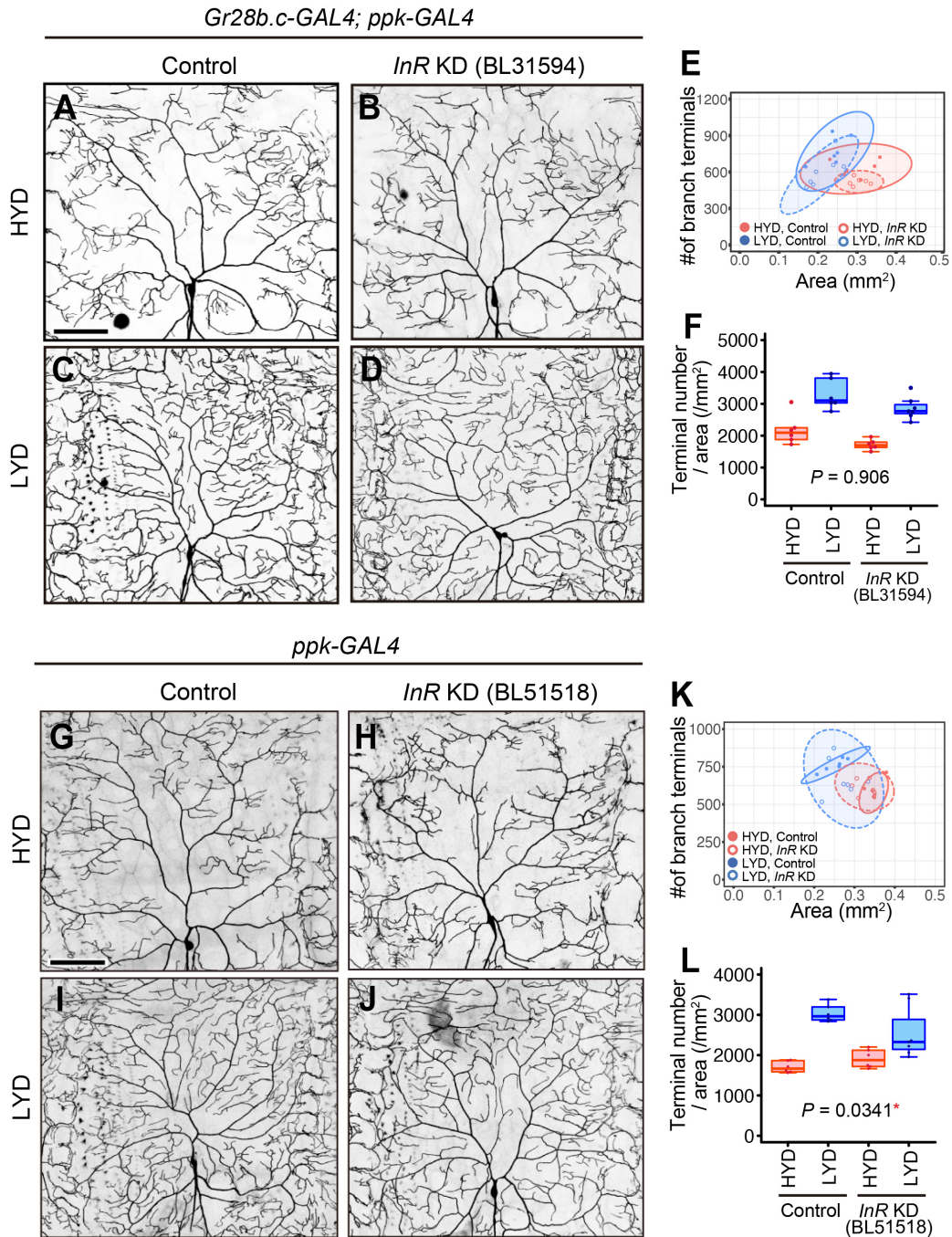


図 27. *InR* のノックダウンが突起数増加表現型に及ぼす影響

(A-F) HYD (A, B) または LYD (C, D) における、コントロール (A, C) または BL31594 系統を用いて *InR* をノックダウンした C4da neuron (B, D) の画像。二次元プロット (E)、および樹状突起末端の密度 (F, two-way ANOVA, n=6)。このノックダウン実験では、*ppk-GAL4* と *Gr28b.c-GAL4* 両方を用いて RNAi を発現させた。

(G-L) HYD (G, H) または LYD (I, J) における、コントロール (G, I) または BL51518 系統を用いて *InR* をノックダウンした C4da neuron (H, J) の画像。二次元プロット (K)、および樹状突起末端の密度 (L, two-way ANOVA, n=8)。

\* $P < 0.05$ 、スケールバー：100 $\mu\text{m}$ 。

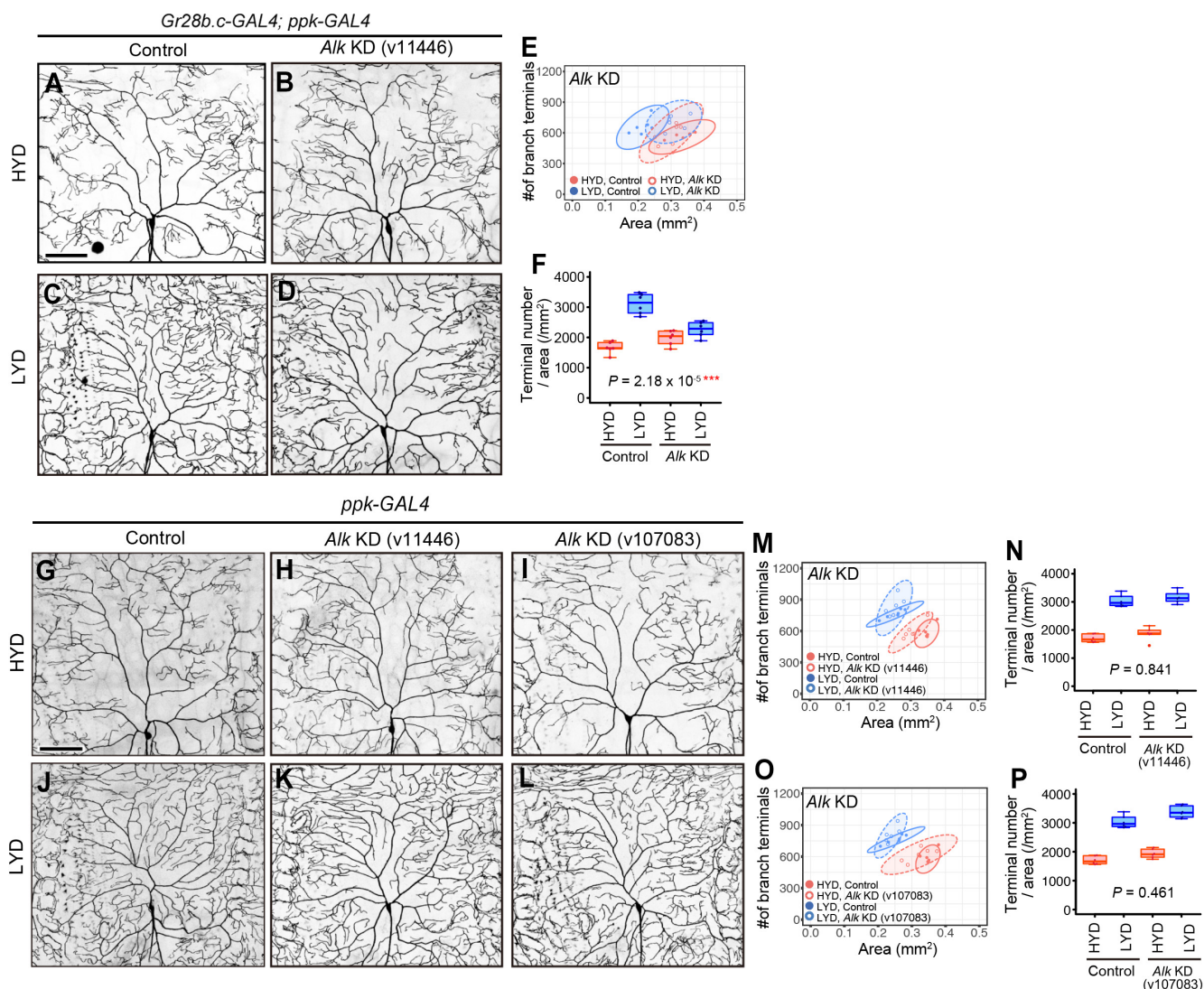


図 28. *Alk* のノックダウンが突起数増加表現型に及ぼす影響

(A-F) HYD (A, B) または LYD (C, D) における、コントロール (A, C) または v11446 系統を用いて *Alk* をノックダウンした C4da neuron (B, D) の画像。二次元プロット (E)、および樹状突起末端の密度 (F, two-way ANOVA, n=6)。このノックダウン実験では、*ppk-GAL4* と *Gr28b.c-GAL4* の両方を用いて RNAi を発現させた。

(G-P) HYD (G-I) または LYD (J-L) における、コントロール (G, J)、v11446 系統 (H, K) または v107083 系統 (I, L) を用いて *Alk* をノックダウンした C4da neuron の画像。二次元プロット (M, O)、および樹状突起末端の密度 (N, P, two-way ANOVA, n=8)。このノックダウン実験では、*ppk-GAL4* のみを用いて RNAi を発現させた。

\*\*\*P < 0.001、スケールバー：100µm。

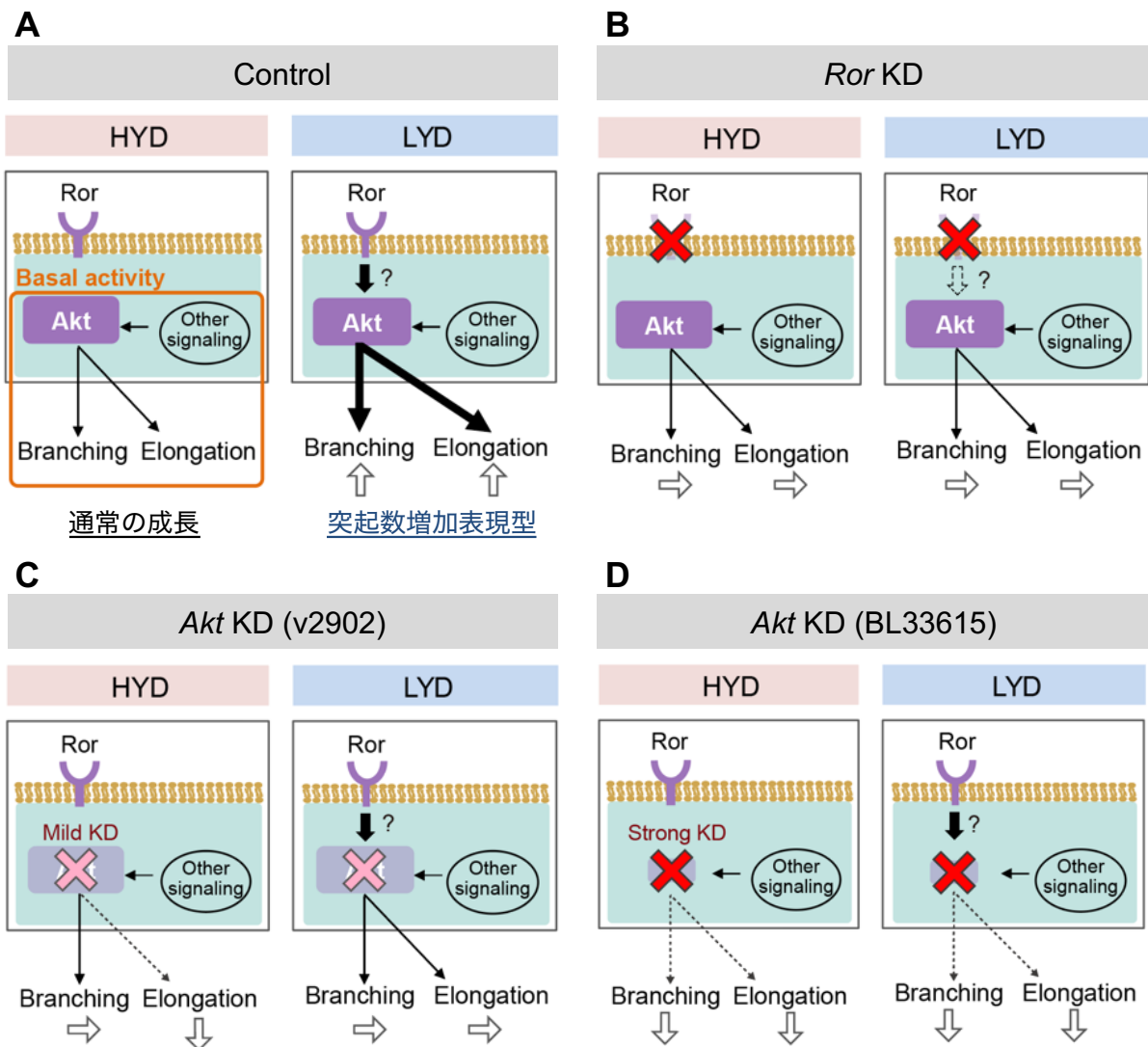
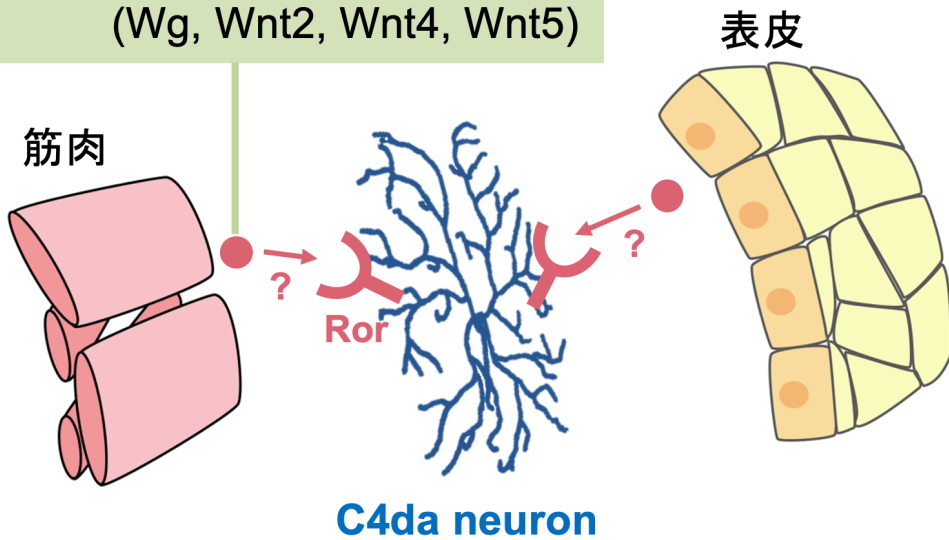


図 29. *Akt* または *Ror* のノックダウンが樹状突起の成長に与える影響

*Akt* または *Ror* のノックダウンが樹状突起の成長にどのような影響を与えたかをまとめた模式図。各図の下部の白抜き矢印は、コントロールの HYD と比較したときの樹状突起の分岐または伸長の増減を表す。(A) 各餌条件において、*Akt* や *Ror* が樹状突起の分岐や伸長にどのように働くかについて、ノックダウン実験の結果から考えられた可能性。コントロールの C4da neuron では、*Ror* に依存しない他のシグナル経路 (Other signaling) による基底レベルの *Akt* の活性が通常の樹状突起の成長に必要なものであるが (Basal activity)、LYD では *Ror* を介したシグナル経路によって *Akt* がさらに活性化され、樹状突起の分岐と伸長が促進される可能性を考えた。(B) *Ror* をノックダウンすると、LYD でのみ樹状突起の分岐や伸長が抑制された。(C, D) v2902 (C) に比べて BL33615 (D) による *Akt* のノックダウンの効果が大きく、v2902 は比較的ノックダウンの影響が LYD に限定的であったのに対し、BL33615 では餌条件に関わらず、樹状突起の分岐と伸長が顕著に阻害された。この結果は、BL33615 によるノックダウンでは通常の樹状突起の成長に必要な基底の *Akt* の活性も阻害されたからではないかと推察した。

候補分子: Wnt タンパク質  
(Wg, Wnt2, Wnt4, Wnt5)



検証方法: 表皮または筋肉での Wnt 遺伝子のノックダウン

図 30. C4da neuron に栄養状態を伝える細胞外因子の探索

C4da neuron 近傍に位置する表皮、または筋肉から分泌された Wnt タンパク質が、低栄養依存的に C4da neuron の樹状突起の分岐を制御する可能性を考えた。そこで、これらの組織で特異的に *wg*, *Wnt2*, *Wnt4*, または *Wnt5* をノックダウンして、突起数増加表現型が減弱するかどうかを検証した。

## 筋肉におけるノックダウン

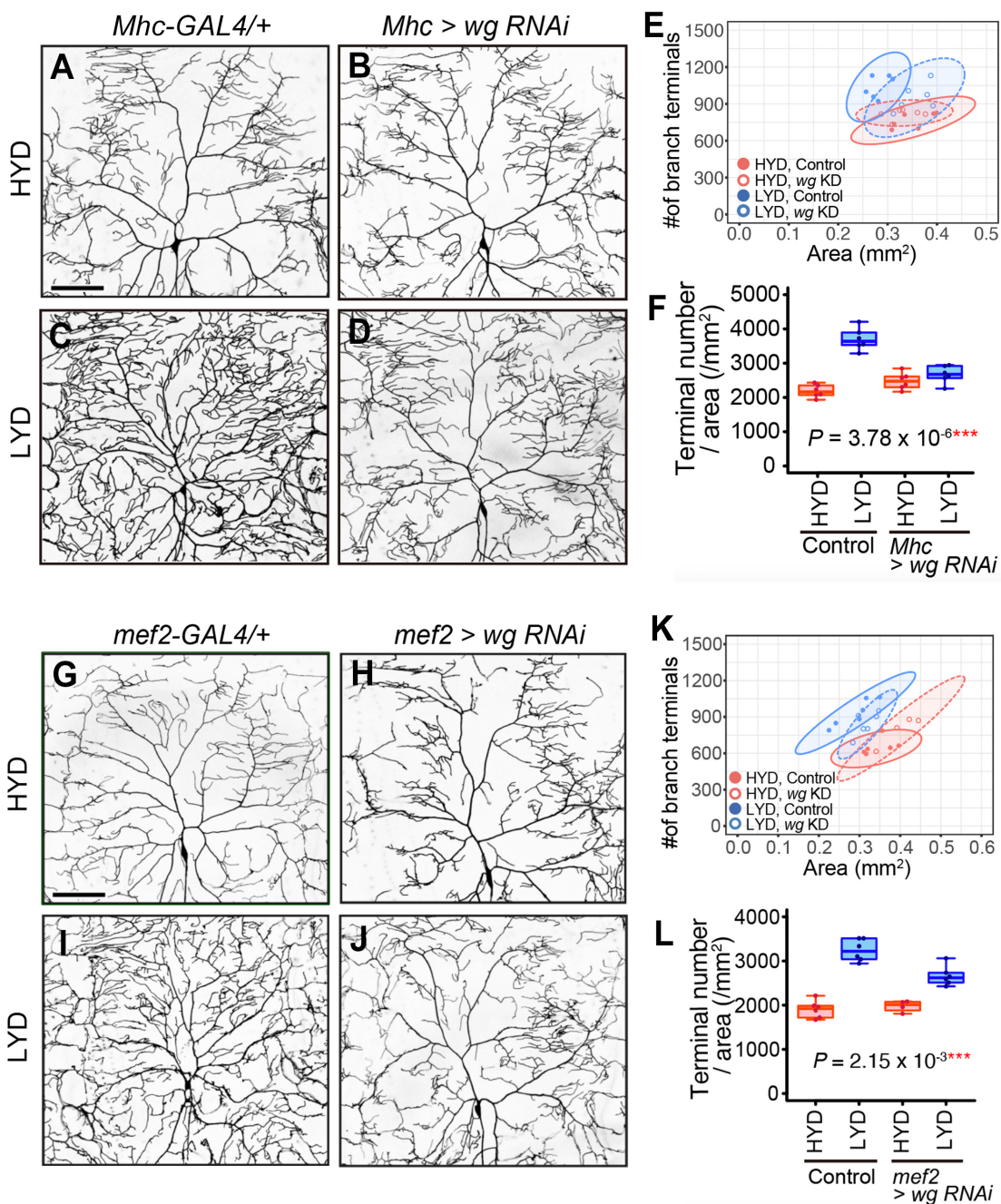


図 31. 筋肉由来の Wg が突起数増加表現型に寄与する

(A-F) HYD (A, B) または LYD (C, D) における、コントロール (A, C) または *Mhc-GAL4* を用いて筋肉で *wg* をノックダウンした個体 (B, D) の C4da neuron の画像。二次元プロット (E)、および樹状突起末端の密度 (F, two-way ANOVA, n=6)。

(G-L) HYD (G, H) または LYD (I, J) における、コントロール (G, I) または *mef2-GAL4* を用いて筋肉で *wg* をノックダウンした個体 (H, J) の C4da neuron の画像。二次元プロット (K)、および樹状突起末端の密度 (L, two-way ANOVA, n=4-6)。

\*\*\* $P < 0.001$ 、スケールバー：100 $\mu$ m。

表皮におけるノックダウン

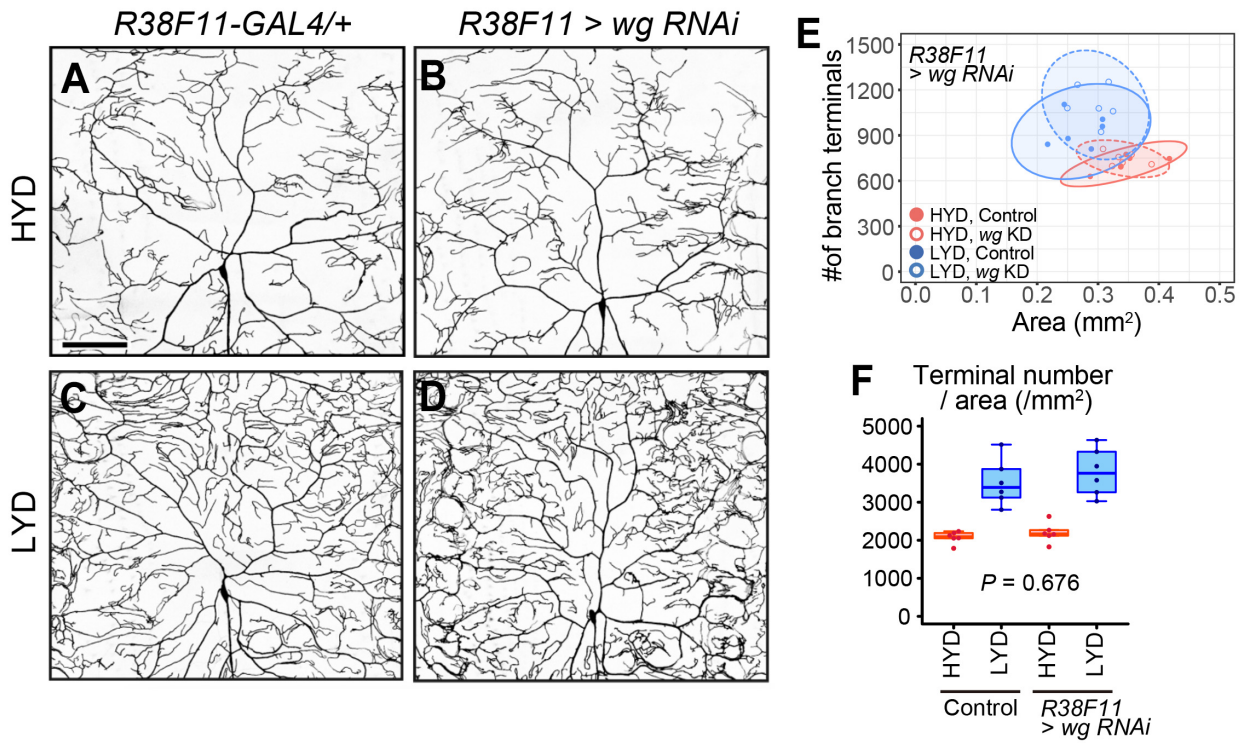


図 32. 表皮での *wg* のノックダウンは突起数増加表現型に影響しない

(A-F) HYD (A, B) または LYD (C, D) における、コントロール (A, C) または *R38F11-GAL4* を用いて表皮細胞で *wg* をノックダウンした個体 (B, D) の C4da neuron の画像。二次元プロット (E)、および樹状突起末端の密度 (F)。\*\*\* $P < 0.001$  (two-way ANOVA,  $n=6$ )、スケールバー：100 $\mu\text{m}$ 。

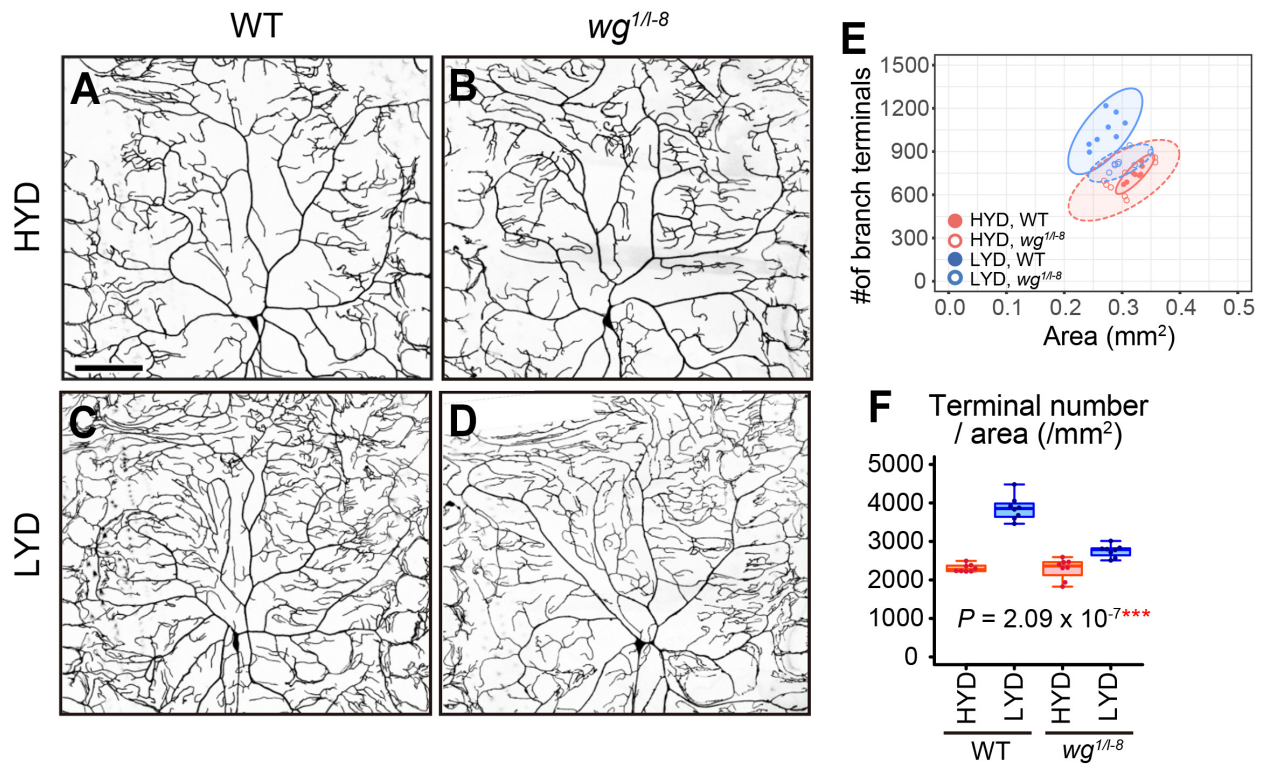


図 33. *wg* の変異体では突起数増加表現型が減弱する

(A-D) HYD (A, B) または LYD (C, D) における、コントロール (A, C) または *wg<sup>1/-8</sup>* 変異体 (B, D) の C4da neuron の画像。*wg<sup>1/-8</sup>* 変異体は hypomorphic な *wg<sup>l</sup>* と、amorphic な *wg<sup>l-8</sup>* の変異をトランスヘテロに持つ個体である。(E) 二次元プロット。(F) 樹状突起末端の密度。  
 \*\*\**P* < 0.001 (two-way ANOVA, n=8)、スケールバー：100μm。



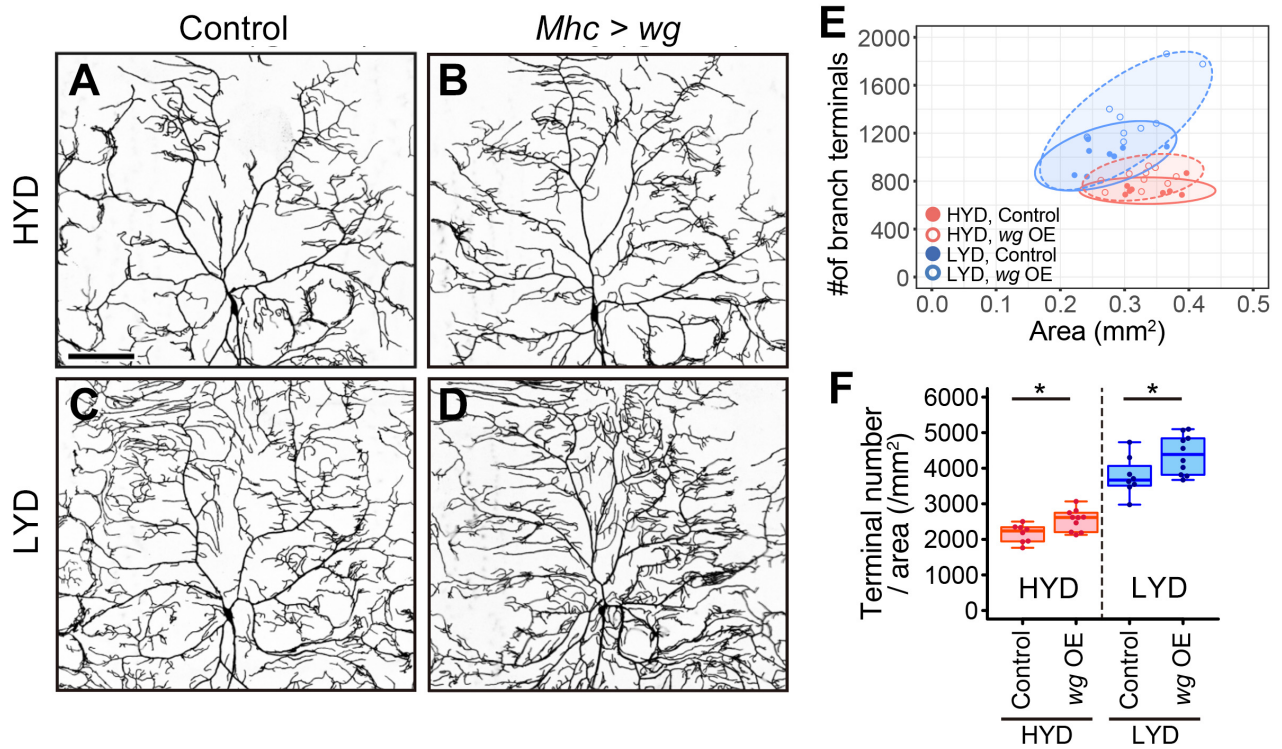


図 34. 筋肉において *wg* を過剰発現すると樹状突起の分岐が促進される

(A-F) HYD (A, B) または LYD (C, D) における、コントロール (A, C) または *Mhc-GAL4* を用いて、筋肉で *wg* を過剰発現した個体 (B, D) の C4da neuron の画像。二次元プロット (E)、および樹状突起末端の密度 (F)。\* $P < 0.05$  (Wilcoxon-Mann-Whitney test,  $n = 8-10$ ), スケールバー:  $100\mu\text{m}$ 。

**A** 幼虫の半体節にある筋肉

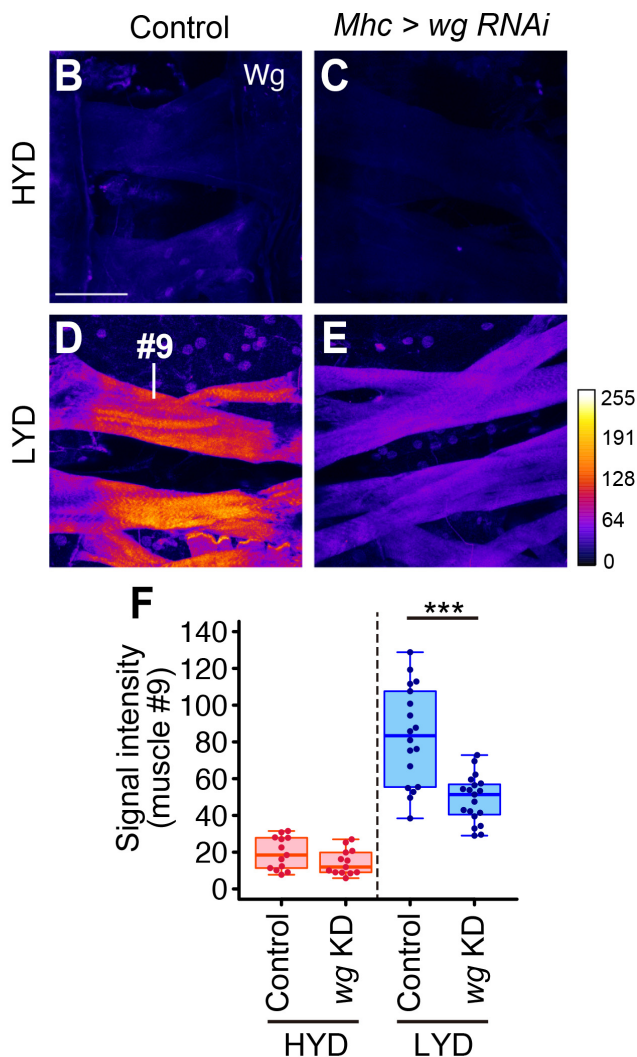
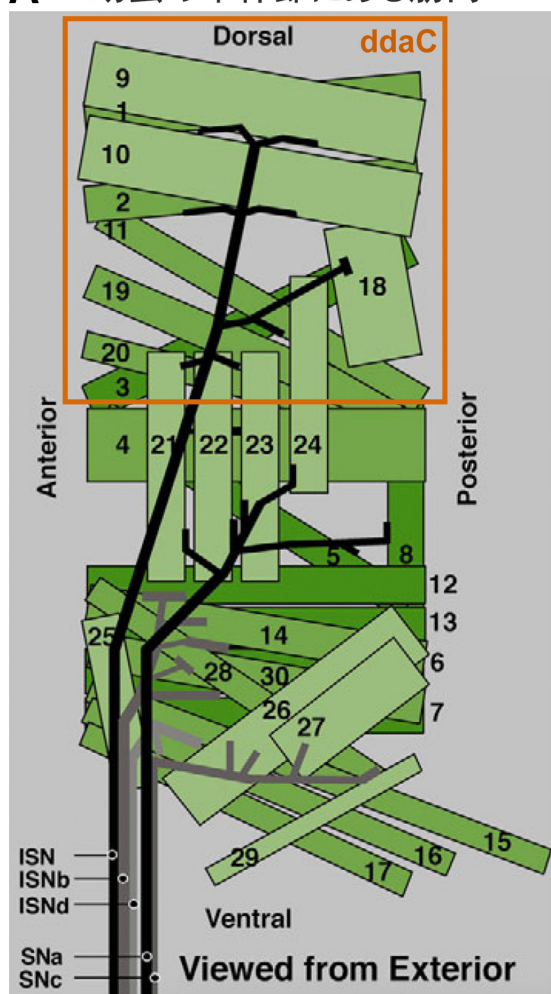


図 35. HYD よりも LYD で筋肉における Wg の発現レベルが高い

(A) 体表から見た、幼虫の半体節にある筋肉の位置関係を表す模式図。Meyer and Aberle, 2006 の図を抜粋し、改変した。本研究で観察している C4da neuron (ddaC) の樹状突起はおおよそ橙の枠で囲んだ範囲に位置する。以降の解析では、C4da neuron に近い 9 番の筋肉を対象に、筋肉における遺伝子発現レベルなどを調べた。

(B-F) 各餌条件でコントロール (B, D)、または筋肉において *wg* をノックダウンした個体 (C, E) について、Wg の抗体染色を行い、筋肉を撮像した。各画像の Wg のシグナル輝度は、右下のカラーコードに示す色に変換した。スケールバー：100 $\mu$ m。(F) 9 番の筋肉における、Wg のシグナル強度の定量結果。 \*\*\* $P < 0.001$  (Wilcoxon-Mann-Whitney test,  $n = 13-19$ ) 。

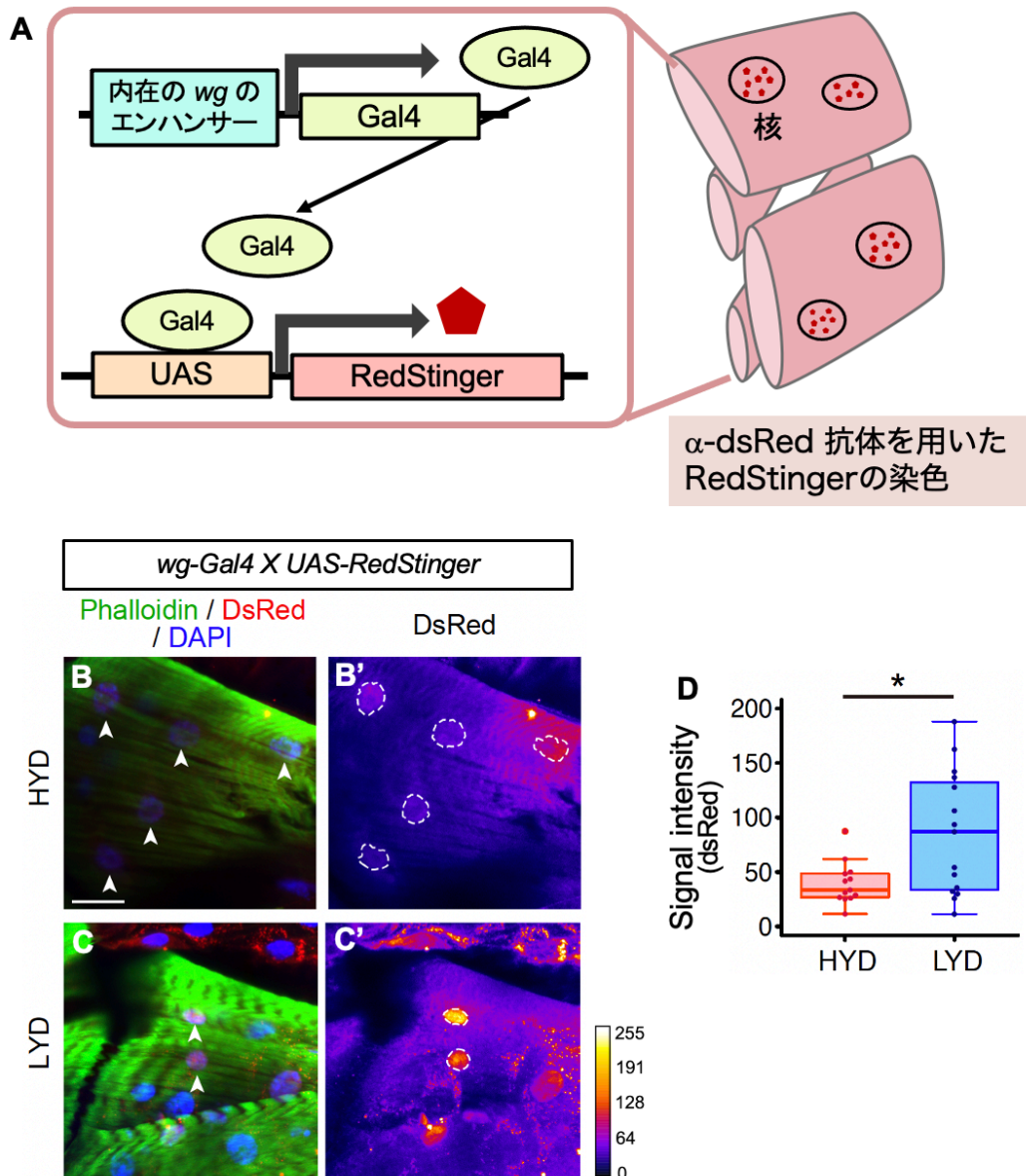


図 36. LYD における *wg* の発現上昇は転写調節レベルで見られる

(A) 転写調節レベルで *wg* の発現量を調べるために用いた実験手法を表す模式図。 *wg-GAL4* によって、内在の *wg* のエンハンサー下で GAL4 が発現する。その GAL4 が UAS 配列に結合し、下流の RedStinger の発現を誘導する。RedStinger は赤色蛍光タンパク質に核移行シグナルが付加されたマーカであり、dsRed 抗体を用いて、核に移行した RedStinger を抗体染色することで、*wg* の発現量を調べた。

(B, C) *wg-GAL4* 下で RedStinger を発現する幼虫を HYD または LYD で飼育し、DsRed (赤) で染色を行うとともに、Phalloidine で筋肉組織を (緑)、DAPI で核を可視化した (青)。(B', C') *wg* の発現レベルを反映した DsRed のシグナルの輝度を、右下のカラーコードに示す色に変換した画像。スケールバー：25 $\mu$ m。(D) 9 番の筋肉の核における、dsRed のシグナル強度の定量結果。\* $P < 0.05$  (Steel Dwass test,  $n = 13-15$ )。

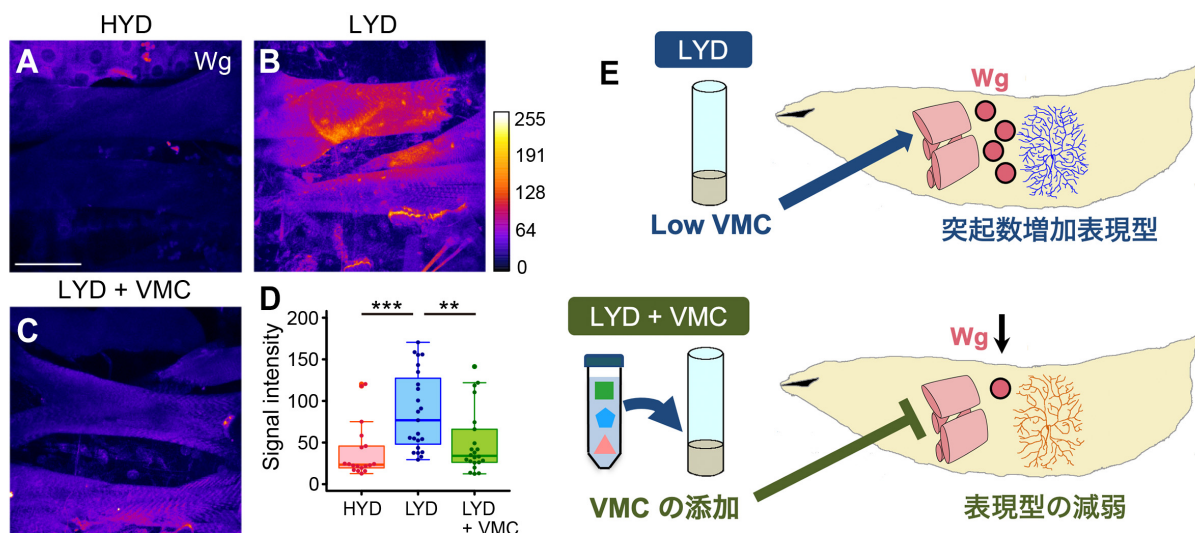


図 37. ビタミン・金属イオン・コレステロールの LYD への添加により、Wg の発現上昇が見られなくなる

(A-D) HYD (A)、LYD (B)、または LYD + VMC (C) で飼育した幼虫について Wg の抗体染色を行い、筋肉を撮像した。各画像の Wg のシグナル輝度はカラーコードに示す色に変換した。スケールバー：100 $\mu$ m。(D) 9 番の筋肉における、Wg のシグナル強度の定量結果。\*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$  (Steel Dwass test,  $n = 18-23$ )。

(E) LYD に VMC を添加すると、筋肉において Wg の発現量が低下し、C4da neuron の突起数増加表現型が減弱した。

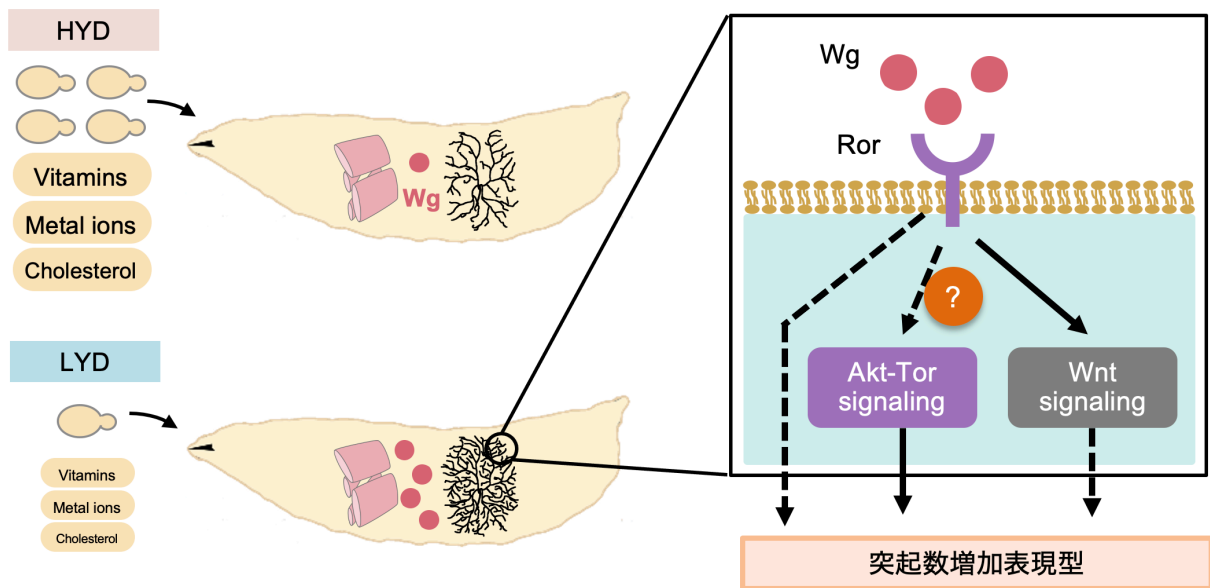


図 38. Wg-Ror 経路が C4da neuron で Akt の活性を制御しているかどうかの検証

これまでの解析から、LYD で筋肉由来の Wg-Ror 経路と C4da neuron の Akt-Tor 経路が突起数増加表現型に寄与することが示唆された。そこで、Wg-Ror 経路が C4da neuron 細胞内で Akt の活性を制御するかどうかを検証した。

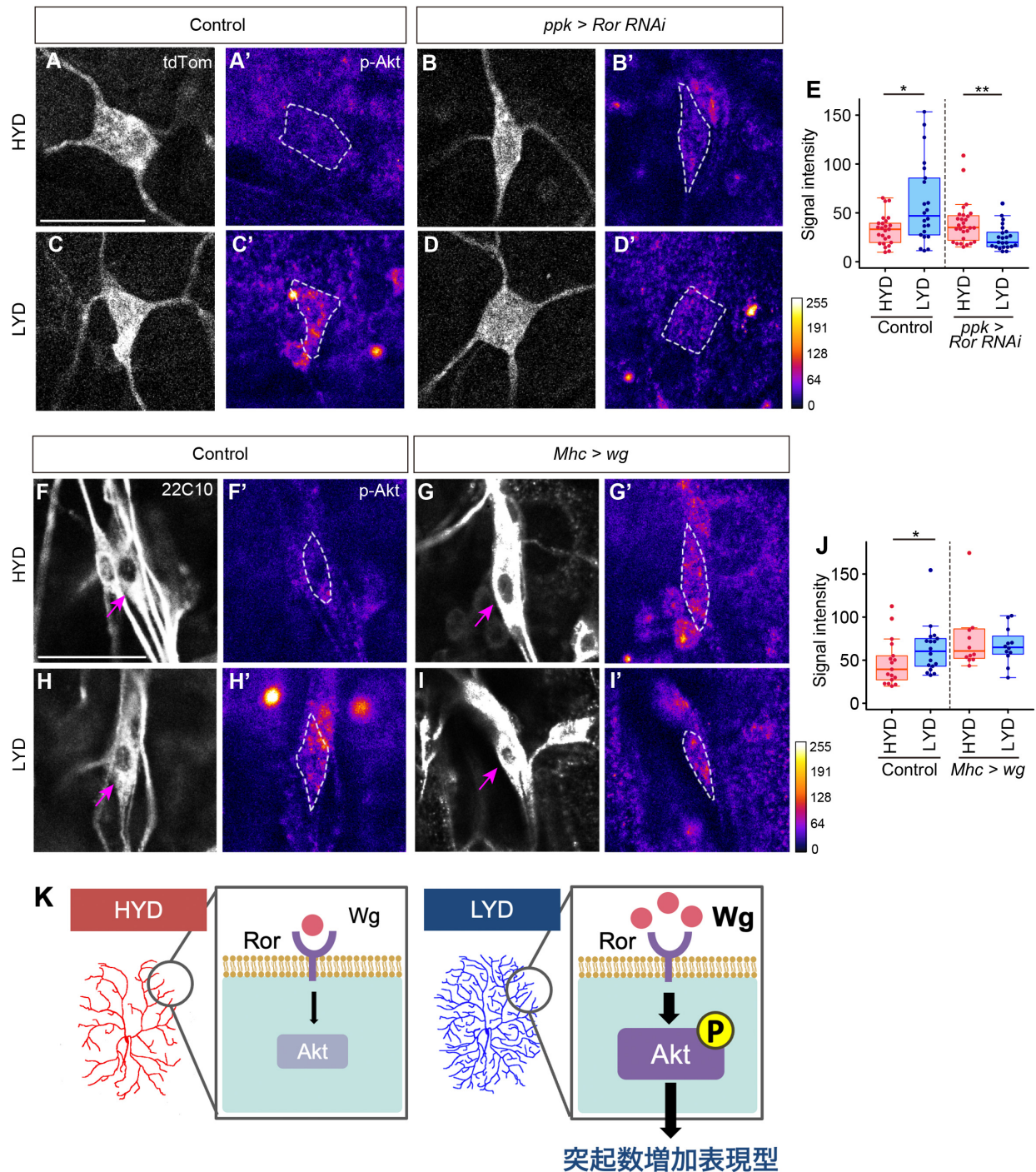


図 39. LYD 条件下で Wg-Ror 経路は C4da neuron 内の Akt の活性化に働く

(A-H) HYD (A, B) または LYD (C, D) において、コントロール (A, A', C, C') または *Ror* をノックダウンした C4da neuron (B, B', D, D') について p-Akt の抗体染色を行なった結果。(A-D) *ppk-CD4:tdTom* を用いて可視化した C4da neuron の画像。(A'-D') p-Akt のシグナル。白い点線で囲んだ領域は C4da neuron の細胞体を表す。また、各画像の p-Akt のシグナルの輝度は、右下のカラーコードに示す色に変換した。(E) C4da neuron の細胞体での、p-Akt のシグナル強度の定量結果 (Wilcoxon-Mann-Whitney test,  $n = 22-28$ ) 。

(F-J) HYD (F, G) または LYD (H, I) において、コントロール (F, F', H, H') または *Ror* をノッ

クダウンした C4da neuron (G, G', I, I') について p-Akt の抗体染色を行なった結果。(F-I) Futch の抗体 (22C10) により可視化した da neuron の画像。マゼンタの矢印は C4da neuron の細胞体を示す。(F'-I') p-Akt のシグナル。白い点線で囲んだ領域は C4da neuron の細胞体を表す。また、各画像の p-Akt のシグナルの輝度は、右下のカラーコードに示す色に変換した。(J) C4da neuron の細胞体での p-Akt のシグナル強度の定量結果 (Wilcoxon-Mann-Whitney test, n = 12-18) 。

(K) 以上の p-Akt の抗体染色の結果から、LYD において Wg-Ror シグナルが C4da neuron 細胞内の Akt を活性化することが示唆された。

\*P < 0.05, \*\*P < 0.01 (Steel Dwass test, n = 26-37)。スケールバー : 10 $\mu$ m。

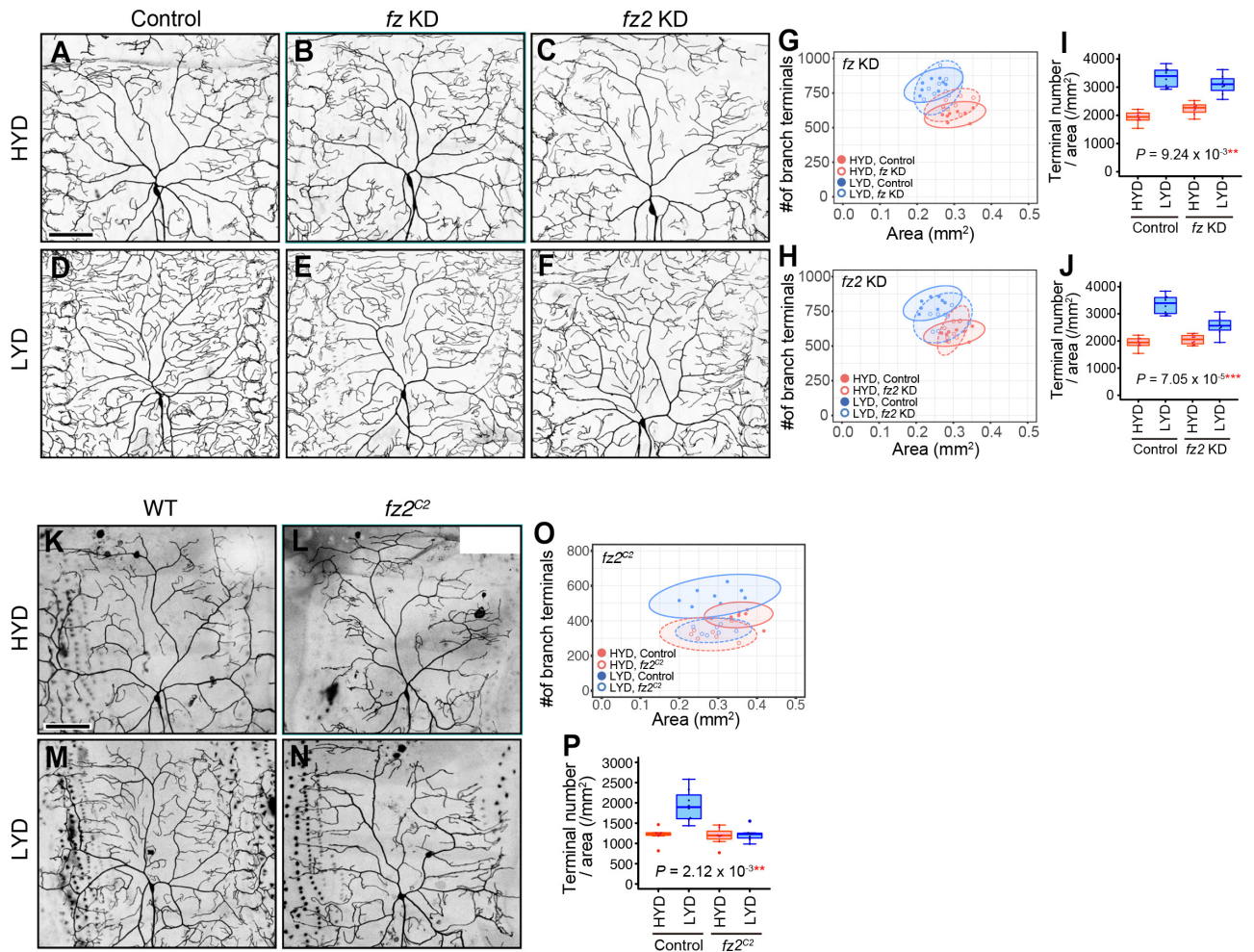


図 40. C4da neuron における *fz2* は突起数増加表現型に必要なである

(A-J) HYD (A-C) または LYD (D-F) における、コントロール (A, D)、*fz* (B, E) または *fz2* (C, F) をノックダウンした C4da neuron の画像。二次元プロット (G, H)、および樹状突起末端の密度 (I, J, two-way ANOVA,  $n=8$ )。

(K-P) HYD (K, L) または LYD (M, N) における、コントロール (K, M)、または *fz2*<sup>C2</sup> の変異を持つ C4da neuron (L, N) の画像。二次元プロット (O)、および樹状突起末端の密度 (P, two-way ANOVA,  $n=7-8$ )。

\*\*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ 、スケールバー：100μm。



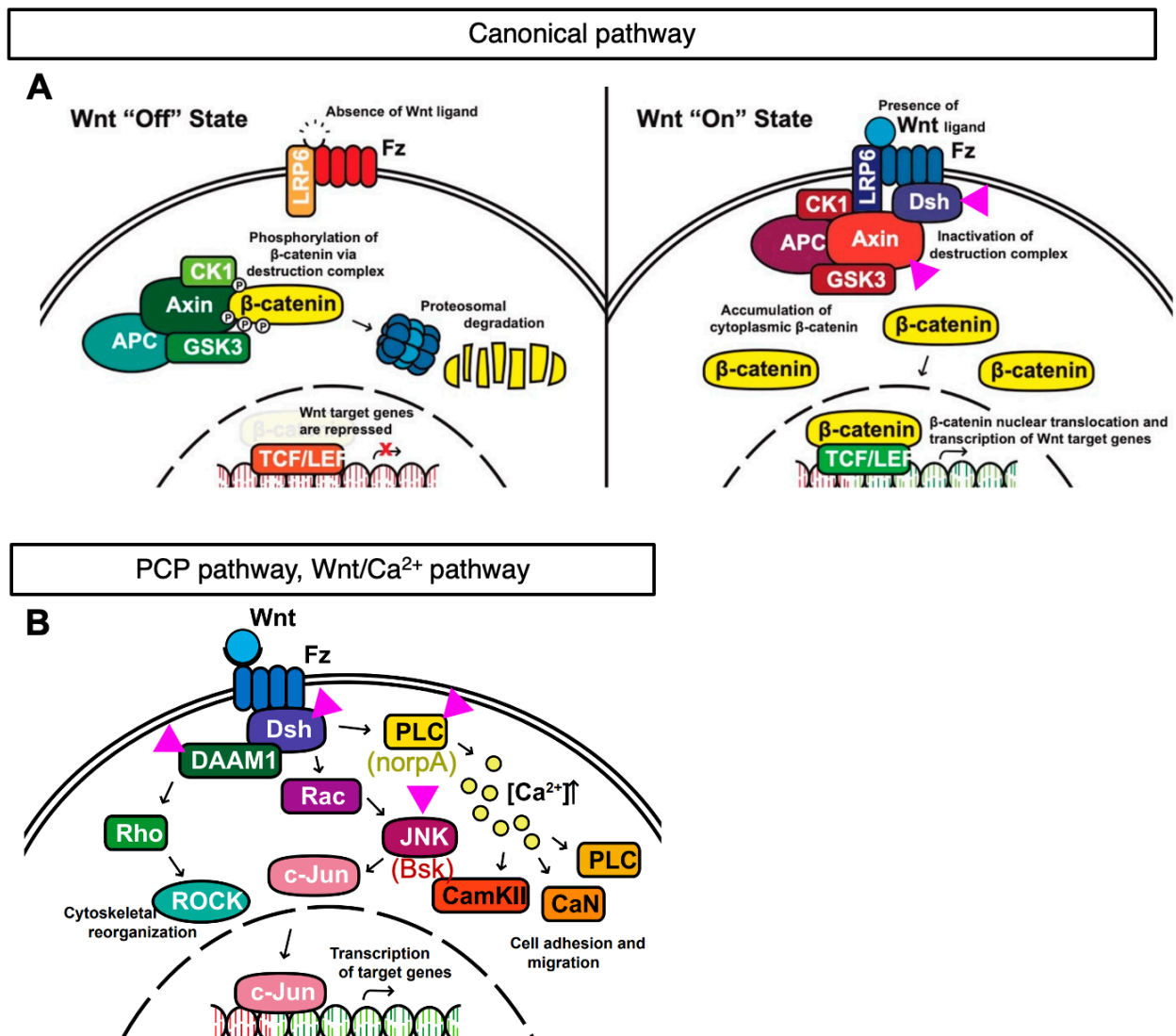
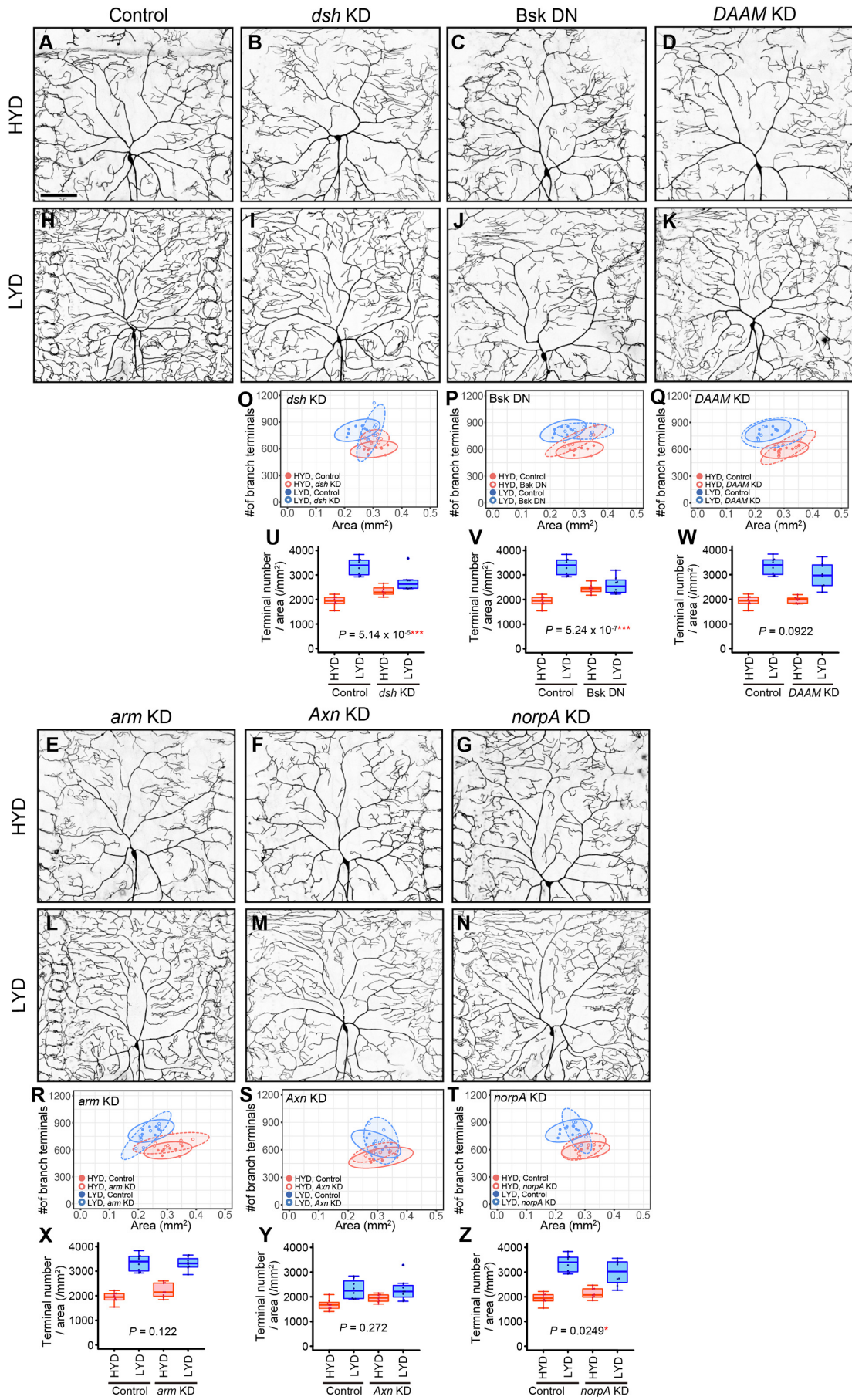


図 41. Wnt 経路で働く既知の細胞内因子

Wnt 経路の模式図。Ng et al., 2019 の図から引用し、改変した。マゼンタの矢じりで示した因子を C4da neuron において阻害し、突起数増加表現型に影響が見られるかどうかを検証した。(A) Canonical Wnt 経路。Wnt 非存在下では、Axin や GSK3 (glycogen synthase kinase 3) を含む複合体により、 $\beta$ -catenin がリン酸化され、分解される (左)。一方、Wnt が受容体に結合すると、複合体の作用が阻害され、 $\beta$ -catenin が分解されずに核内へ移行する。その結果、 $\beta$ -catenin は転写共役因子としてさまざまな遺伝子の発現を制御する (右)。

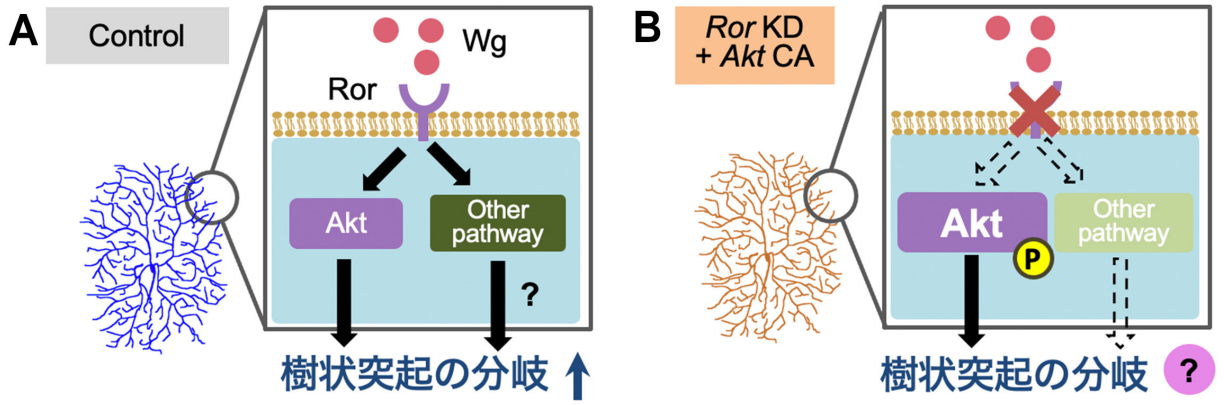
(B) Planar Cell Polarity (PCP) 経路と Wnt/ $\text{Ca}^{2+}$ 経路。PCP 経路では、DAAM1 (Disheveled-associated activator of morphogenesis 1) が Dsh (Disheveled) および Rho と複合体を形成し、ROCK (Rho-associated kinase) を活性化する経路と、Rac の活性化を介して、Jun キナーゼが活性化される経路が知られる。Wnt/ $\text{Ca}^{2+}$ 経路では、Wnt が受容体へ結合すると、Phospholipase C (PLC) などの働きを介して、細胞内にカルシウムが放出される。なお、ショウジョウバエでは JNK は Basket (Bsk)、PLC は no receptor potential A (norpA) として知られる。



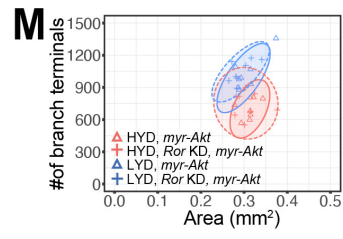
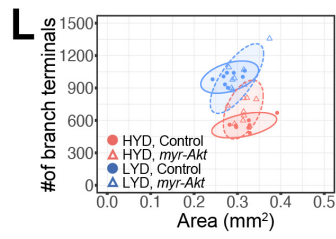
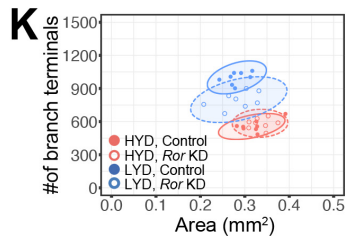
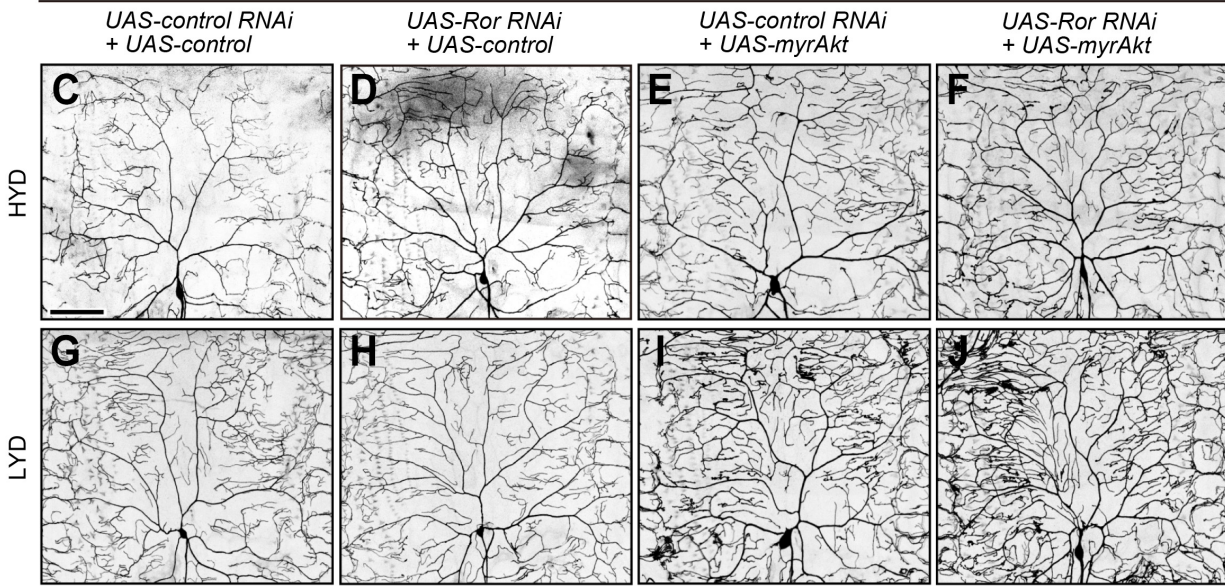
(図の説明は次頁)

## 図 42. Wnt 経路の構成因子の阻害が突起数増加表現型に及ぼす影響

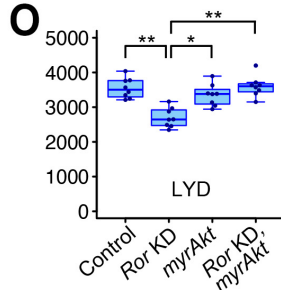
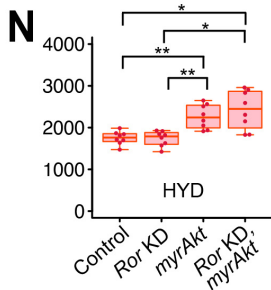
(A-N) HYD (A-G) または LYD (H-N) における、コントロール (A, H)、*dsh* (B, I) または *bsk* (C, J) の dominant form を強制発現した C4da neuron、および、*DAAM* (D, K)、*arm* (E, L)、*Axn* (F, M) または *norpA* (G, N) をノックダウンした C4da neuron の画像。(O-T) 二次元プロット。(U-Z) 樹状突起末端の密度。\* $P < 0.05$ , \*\*\* $P < 0.001$  (two-way ANOVA,  $n = 8$ )、スケールバー：100 $\mu\text{m}$ 。



*ppk-GAL4*



Terminal number/area (mm<sup>2</sup>)



(図の説明は次頁)

### 図 43. *Ror* をノックダウンした C4da neuron でも、Akt の活性化のみで樹状突起の増加が引き起こされる

(A, B) *Ror* 下流の Akt が突起数増加表現型に寄与することが分かった。一方で、Wnt 経路に属する他の経路なども *Ror* の制御下で表現型に寄与する可能性も考えられる。Akt-Tor 経路が表現型に中心的な役割を果たすのかについて追究するため、*Ror* をノックダウンして、*Ror* の下流で働くシグナル経路の働きを阻害した上で、*myr-Akt* の強制発現による Akt の活性化だけで突起数増加表現型が見られるかどうかを検証した。

(C-J) HYD (C-F) または LYD (G-J) における、コントロール (C, G)、*Ror* をノックダウンした C4da neuron (D, H)、*myr-Akt* を強制発現した C4da neuron (E, I)、そして *Ror* をノックダウンするとともに、*myr-Akt* を強制発現した C4da neuron (F, J) の画像。なお、*UAS-Ror RNAi* に対するコントロールとして、突起数増加表現型に有意な影響が見られなかった *UAS-grnd RNAi* を (図 20B, G, K, O)、*UAS-myrAkt* のコントロールとして、*UAS-CD4:tdTom* を用いた。スケールバー：100 $\mu$ m。(K-M) *Ror* をノックダウンした C4da neuron (K)、*myr-Akt* を強制発現した C4da neuron (L)、そして、*Ror* をノックダウンするとともに、*myrAkt* を強制発現した C4da neuron (M) についての二次元プロット。(N, O) HYD (N) または LYD (O) における樹状突起末端の密度。\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  (Steel Dwass test,  $n = 8-9$ )。

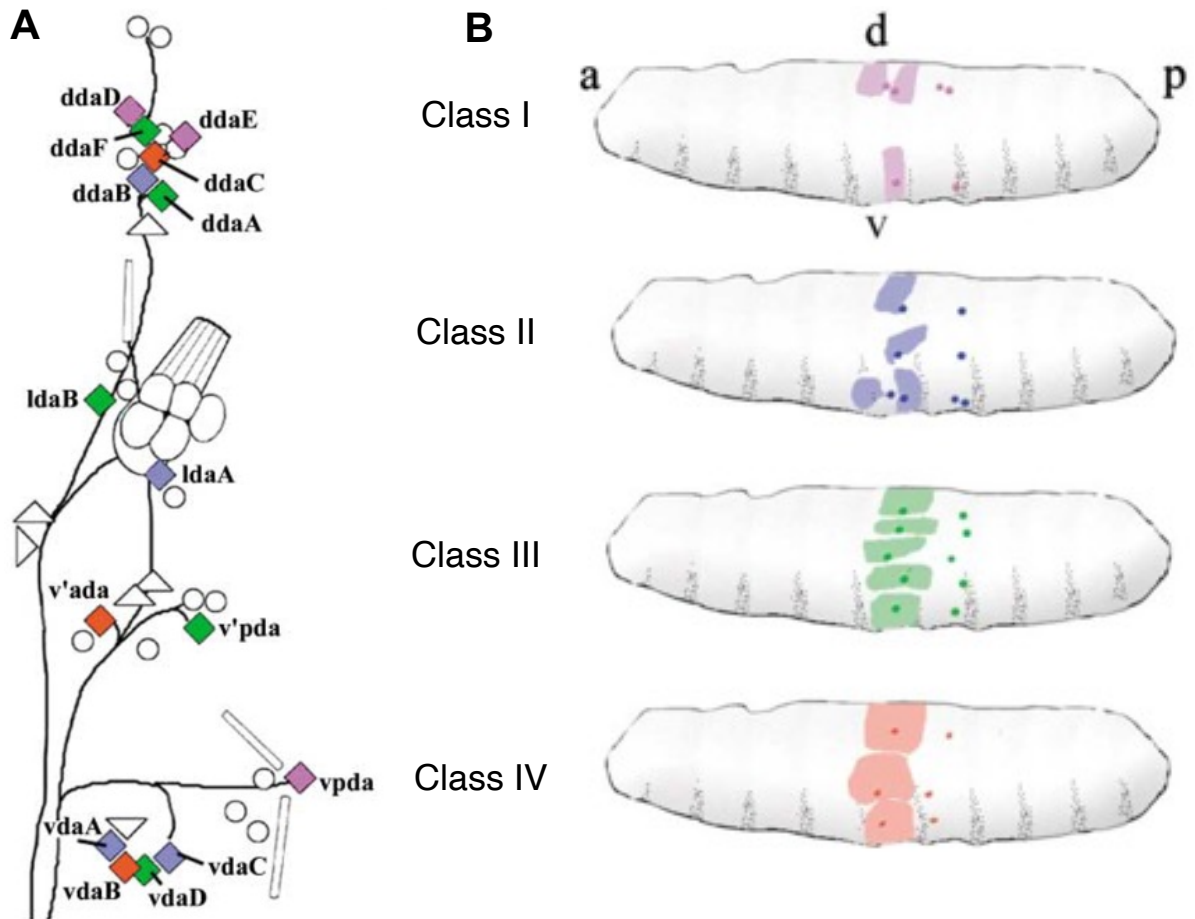


図 44. ショウジョウバエ幼虫の da neuron

幼虫における各 da neuron の位置関係。Grueber et al., 2003 の図を引用し、一部改変した。(A) 幼虫の腹部半体節にある da neuron の配置 (紫: Class I、青: Class II、緑: Class III、赤: Class IV)。(B) 腹部体節における、それぞれのクラスの da neuron の位置。da neuron は腹部体節において、おおよそ同じ位置関係で体節ごとに繰り返し存在する。図中の点は細胞体を表し、2 体節分の位置が示されている。色付きの影はそれぞれの細胞の樹状突起が占める範囲を表しており、こちらは 1 体節分のみが示されている。

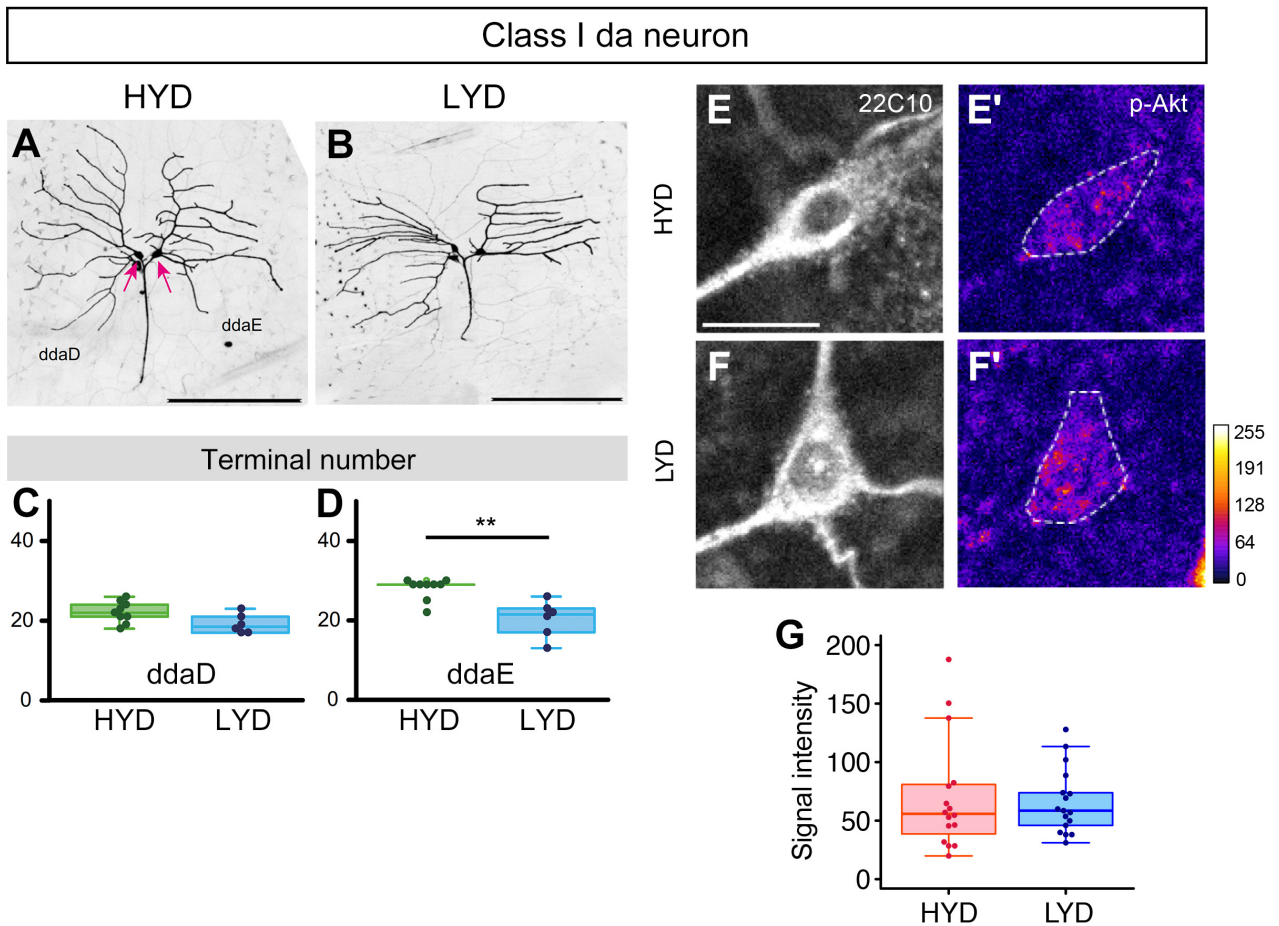


図 45. C1da neuron では、LYD において突起数増加表現型と Akt の活性化が見られない

(A-D) HYD または LYD で飼育した幼虫の C1da neuron の画像と樹状突起末端数。Watanabe et al., 2017 の図から抜粋して、一部改変した。(A, B) HYD (A) または LYD (B) における C1da neuron の ddaD と ddaE の画像。マゼンタの矢印は細胞体を表す。(C, D) ddaD (C) または ddaE (D) の各餌条件での樹状突起末端数。(E-G) HYD (E, E') または LYD (F, F') において飼育した幼虫の C1da neuron (ddaE) について、p-Akt の抗体染色を行なった結果。スケールバー：10 $\mu$ m。(E, F) Futch の抗体 (22C10) により可視化した ddaE neuron。(E', F') p-Akt のシグナル。白い点線で囲んだ領域は C1da neuron の細胞体を表す。また、各画像の p-Akt のシグナル輝度は、右下のカラーコードに示す色に変換した。(J) ddaE の細胞体での p-Akt のシグナル強度の定量結果 (Wilcoxon-Mann-Whitney test, n = 16-17)。

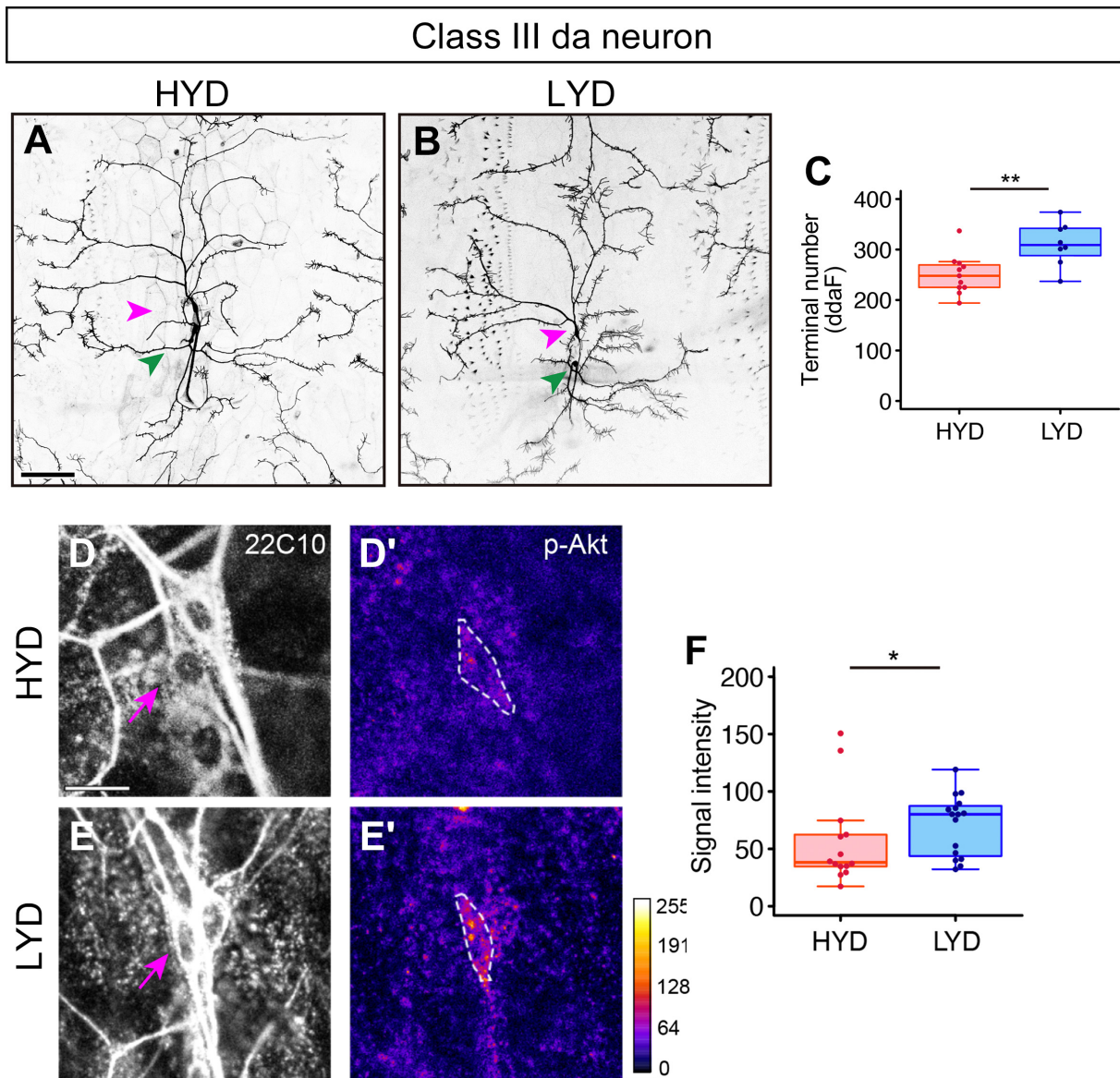


図 46. C3da neuron において、HYD に比べて LYD で樹状突起末端が増加するとともに、Akt の活性化が見られる

(A, B) HYD (A) または LYD (B) における C3da neuron の ddaF と ddaA の画像。マゼンタと緑の矢じりはそれぞれ ddaF と ddaA の細胞体を表す。スケールバー：100 $\mu$ m。(C) ddaF の各餌条件での樹状突起末端数 (\*\* $P < 0.01$ , Student's t-test,  $n = 8-11$ )。

(D-F) HYD (D, D') または LYD (E, E') において飼育した幼虫の C3da neuron (ddaF) について p-Akt の抗体染色を行なった結果。スケールバー：10 $\mu$ m。(D, E) Futsch の抗体 (22C10) により可視化した da neuron。マゼンタの矢印は ddaF の細胞体を表す。(D', E') p-Akt のシグナル。白い点線で囲んだ領域は ddaF の細胞体を表す。また、各画像の p-Akt のシグナル輝度は、右下のカラーコードに示す色に変換した。(J) ddaF の細胞体での p-Akt のシグナル強度の定量結果 ( $P^* < 0.05$ , Wilcoxon-Mann-Whitney test,  $n = 14-16$ )。



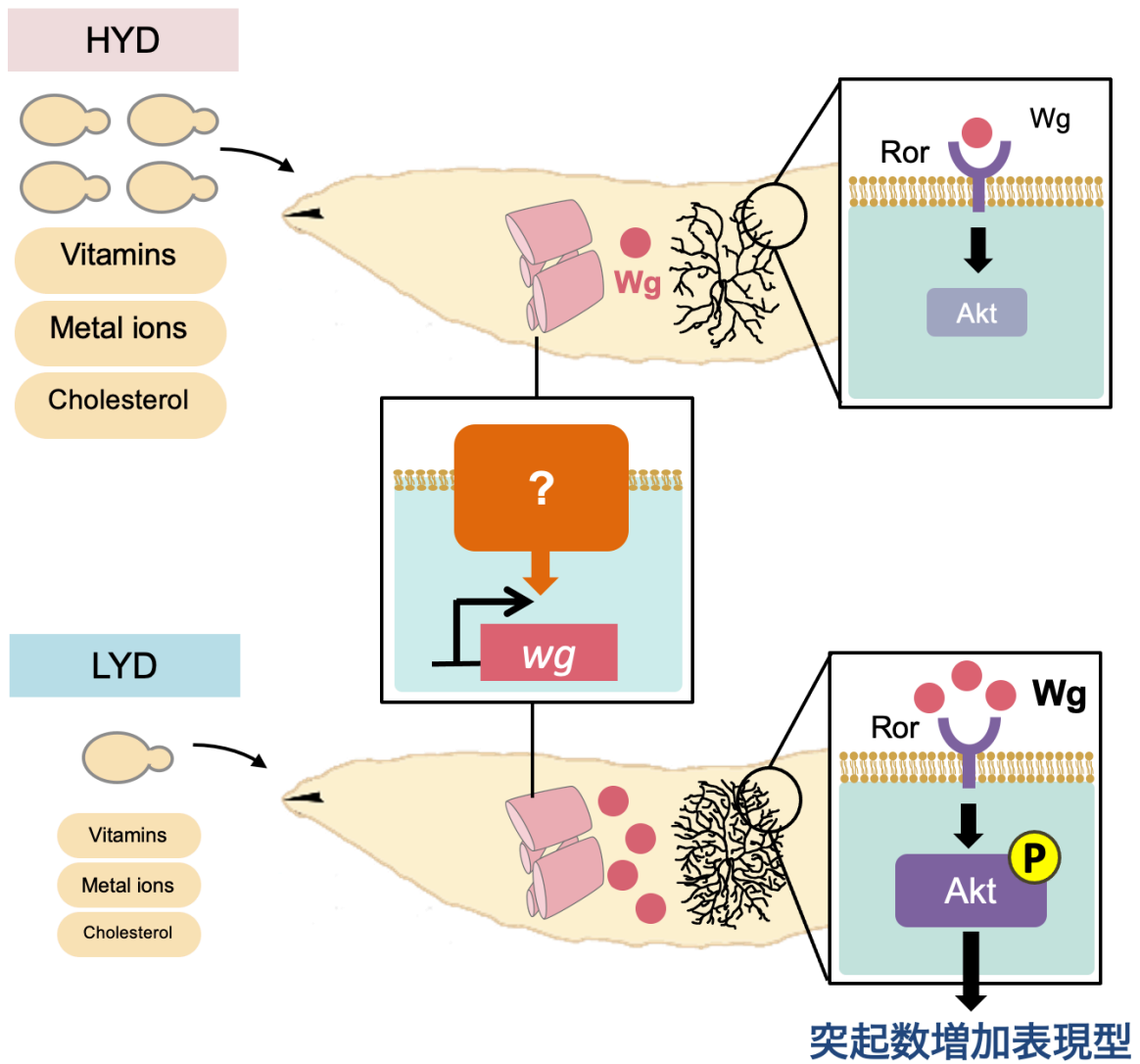


図 47. 筋肉で *wg* の発現を制御するシグナル伝達経路の探索

これまでの解析から、低栄養依存的に筋肉由来の Wg が突起数増加表現型に寄与することが分かった。次に、食餌条件に応じて *wg* の発現がどのように調節されるのかを解析した。

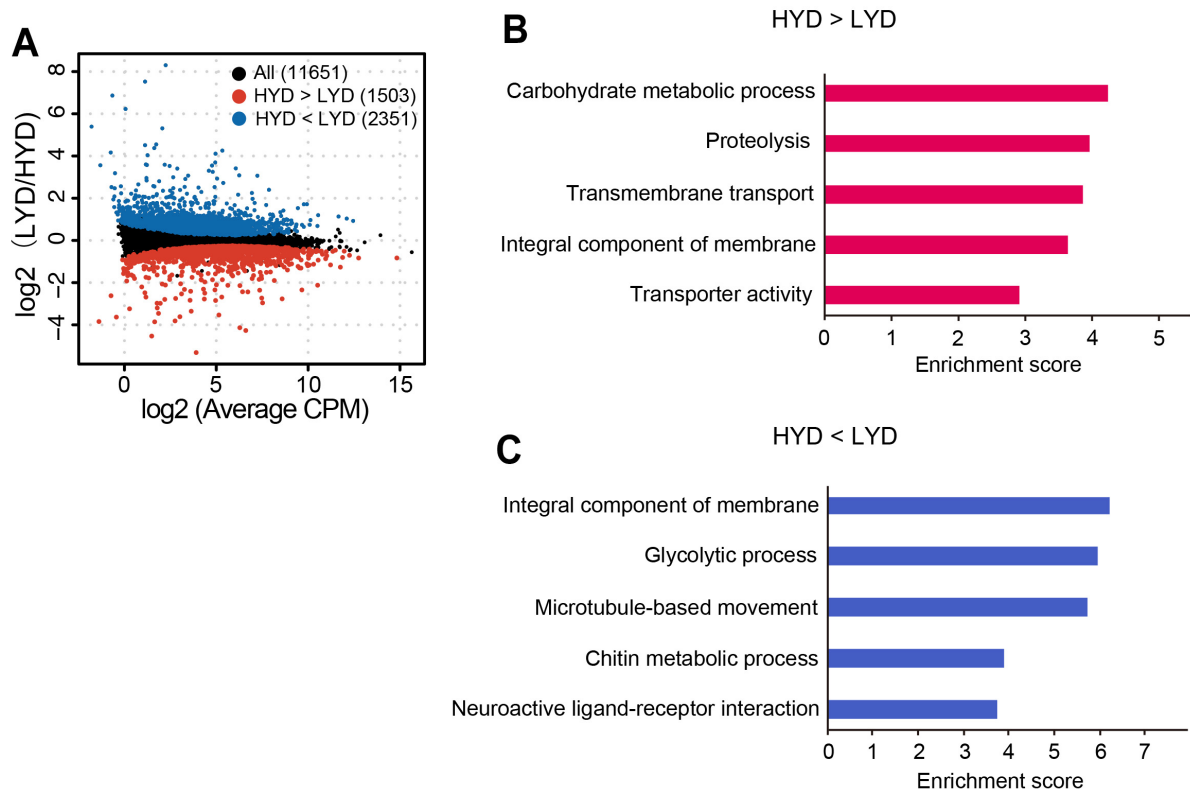


図 48. 各餌条件で飼育した幼虫の全身を用いた RNA-seq 解析

HYD または LYD で飼育した幼虫の全身を用いた RNA-seq の結果。(A) 各遺伝子について、average counts per million (CPM) を log 変換した値を横軸に、HYD に対する LYD の fold change の値を縦軸にプロットしたグラフ。False discovery rate (FDR) を 0.05 以下に設定し、LYD に比べて HYD で有意に発現量が高かった遺伝子は赤色、HYD に比べて LYD で有意に発現量が高かった遺伝子は青色の点で示した。(B, C) DAVID の “Functional Annotation Clustering” (Huang et al., 2009) により、HYD で発現が高い遺伝子 (B) または LYD で発現が高い遺伝子 (C) にどのような機能を持つ遺伝子群が濃縮していたかを調べた結果。統計的に有意だった上位 5 個の functional annotation clusters (同様の機能を持つ遺伝子群をまとめたクラスター) について、enrichment score を横軸に、それぞれの代表的な annotation term を縦軸に示した。Enrichment score は、クラスター内の各 annotation term が示す全 P 値の幾何平均をマイナス log 変換した値である。

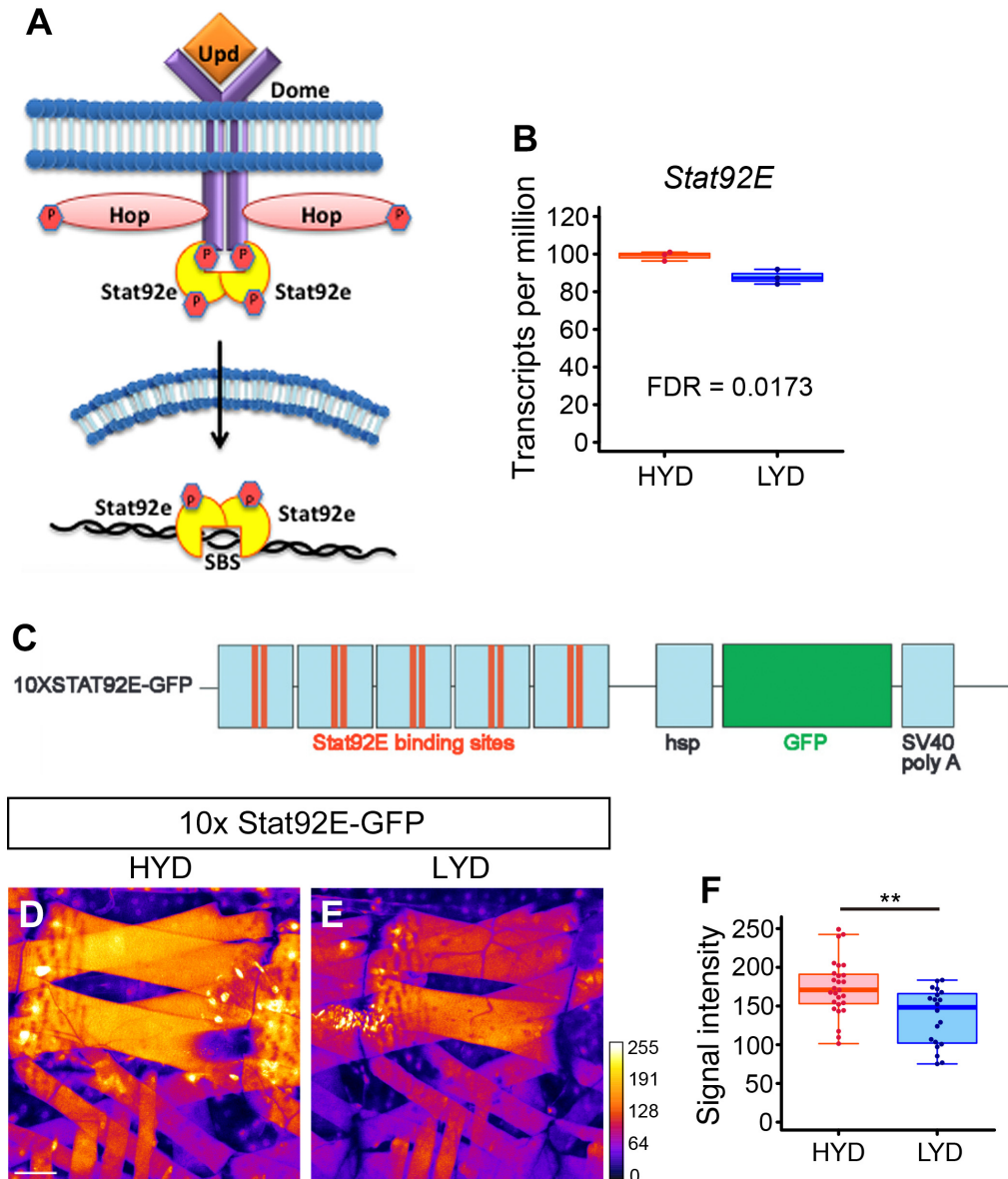


図 49. LYD よりも HYD で飼育した幼虫で Stat92E が高く発現する

(A) ショウジョウバエにおける JAK/STAT 経路の概略図。Stokes et al., 2015 から図を抜粋した。Unpaired (Upd) が Domeless (Dome) に結合すると、JAK tyrosine kinase の Hopscotch (Hop) が自身と Dome、そして Stat92E をリン酸化する。リン酸化された Stat92E は二量体を形成し、核に移行して転写因子として働く。

(B) 幼虫全身の RNA-seq 解析から得られた、各餌条件における *Stat92E* の TPM。

(C) *Stat92E* のレポーターである *10x Stat92E-GFP* のコンストラクトを表す模式図。Bach et al., 2007 から図を抜粋した。*Stat92E* の結合領域を 2 つ持つ *Socs36E* 遺伝子のイントロン領域が 5 つ GFP の上流に挿入されており、このコンストラクトを持つ個体では、*Stat92E* の存在下で GFP が発現する。

(D, E) HYD (D) または LYD (E) で飼育した *10x Stat92E-GFP* を持つ幼虫の筋肉。GFP のシグナル輝度を右下のカラーコードに示す色に変換した。スケールバー：100 $\mu$ m。 (F) 9 番の筋肉における GFP のシグナル強度の定量結果。\*\* $P < 0.01$  (Student's t-test,  $n = 8$ )。

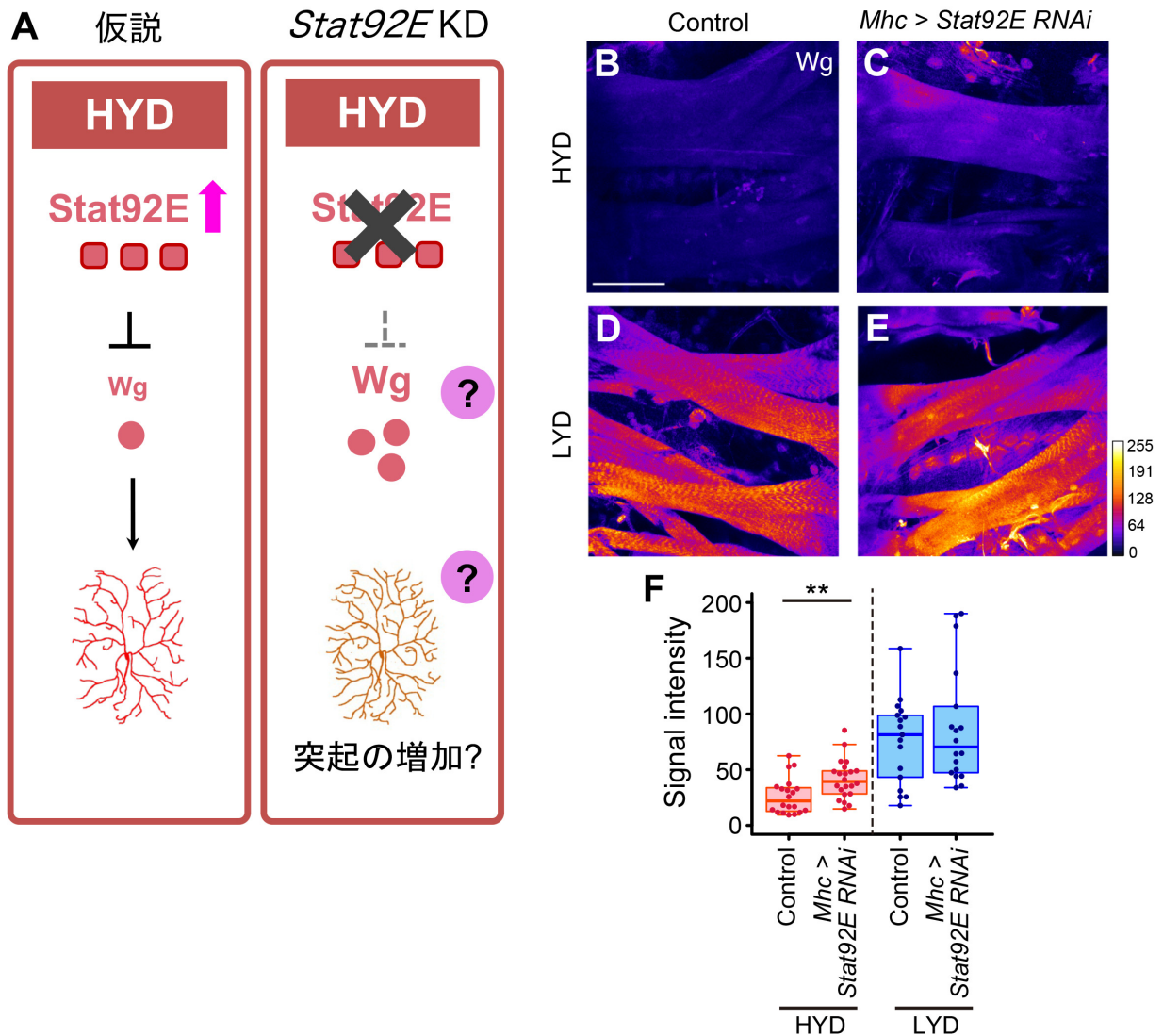


図 50. 筋肉における Stat92E は HYD で Wg の発現に抑制的に働く

(A) 筋肉において、JAK/STAT 経路が Wg の発現や突起数増加表現型の抑制に寄与しているのかを検証するため、筋肉で *Stat92E* をノックダウンした個体で、Wg の発現や C4da neuron の樹状突起形態を調べた。

(B-E) HYD (B, C) または LYD (D, E) において、コントロール (B, D)、または筋肉で *stat92E* をノックダウンした個体 (C, E) について Wg の抗体染色を行い、筋肉を撮像した。各画像の Wg のシグナル輝度は、右下のカラーコードに示す色に変換した。スケールバー：100mm。(F) 9 番の筋肉における、Wg のシグナル強度の定量結果。 \*\* $P < 0.01$  (Wilcoxon-Mann-Whitney test,  $n = 17-22$ ) 。

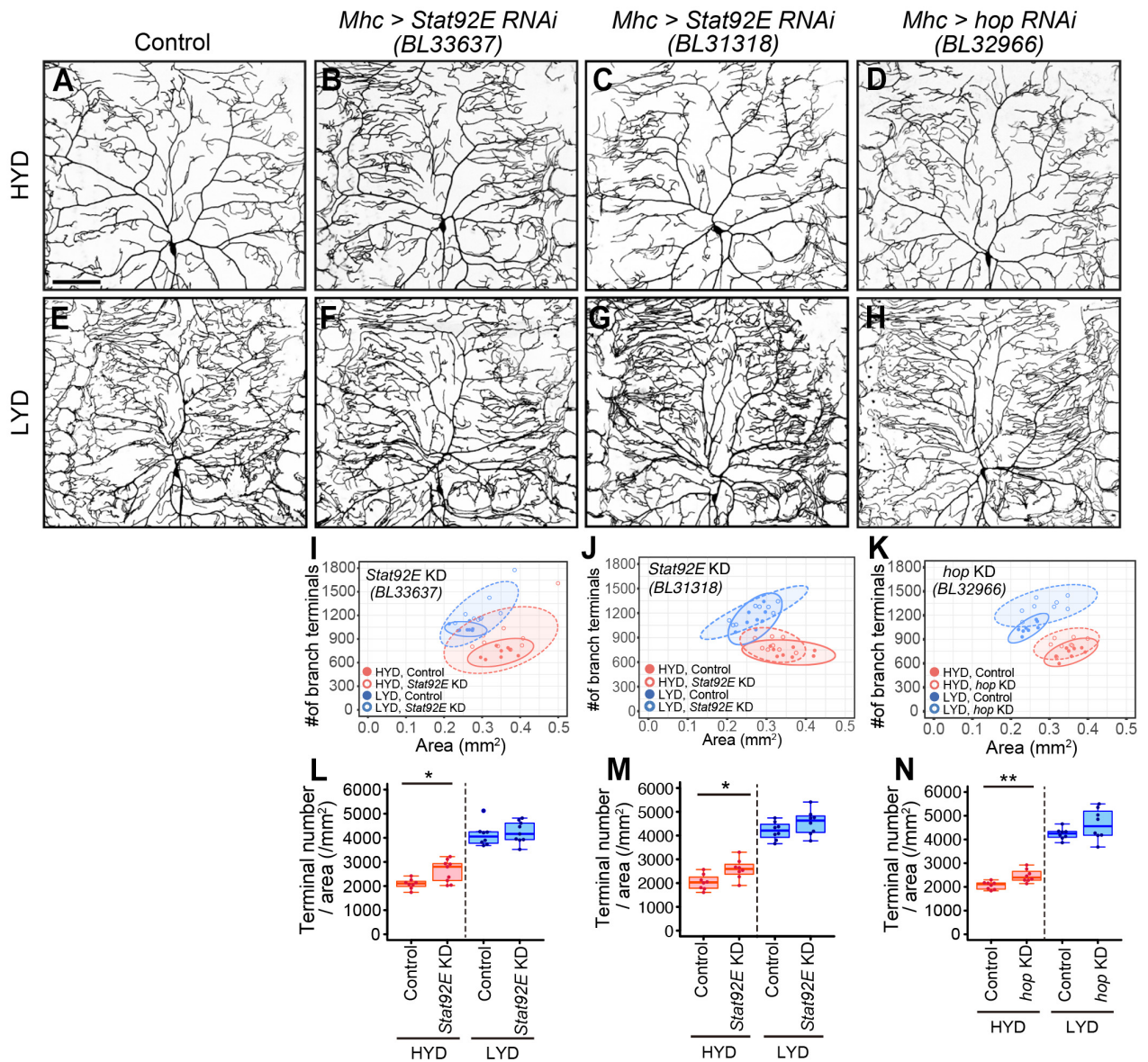


図 51. 筋肉の JAK/STAT 経路は HYD において C4da neuron の突起数増加表現型の抑制に寄与する

(A-H) HYD (A-D) または LYD (E-H) における、コントロール (A, E)、筋肉において *Stat92E* (B, C, F, G) または *hop* (D, H) をノックダウンした個体の C4da neuron の画像。スケールバー：100 $\mu$ m。(I-K) 二次元プロット。(L-N) 樹状突起末端の密度。\*P < 0.05, \*\*P < 0.01 (Wilcoxon-Mann-Whitney test, n = 8-9)。

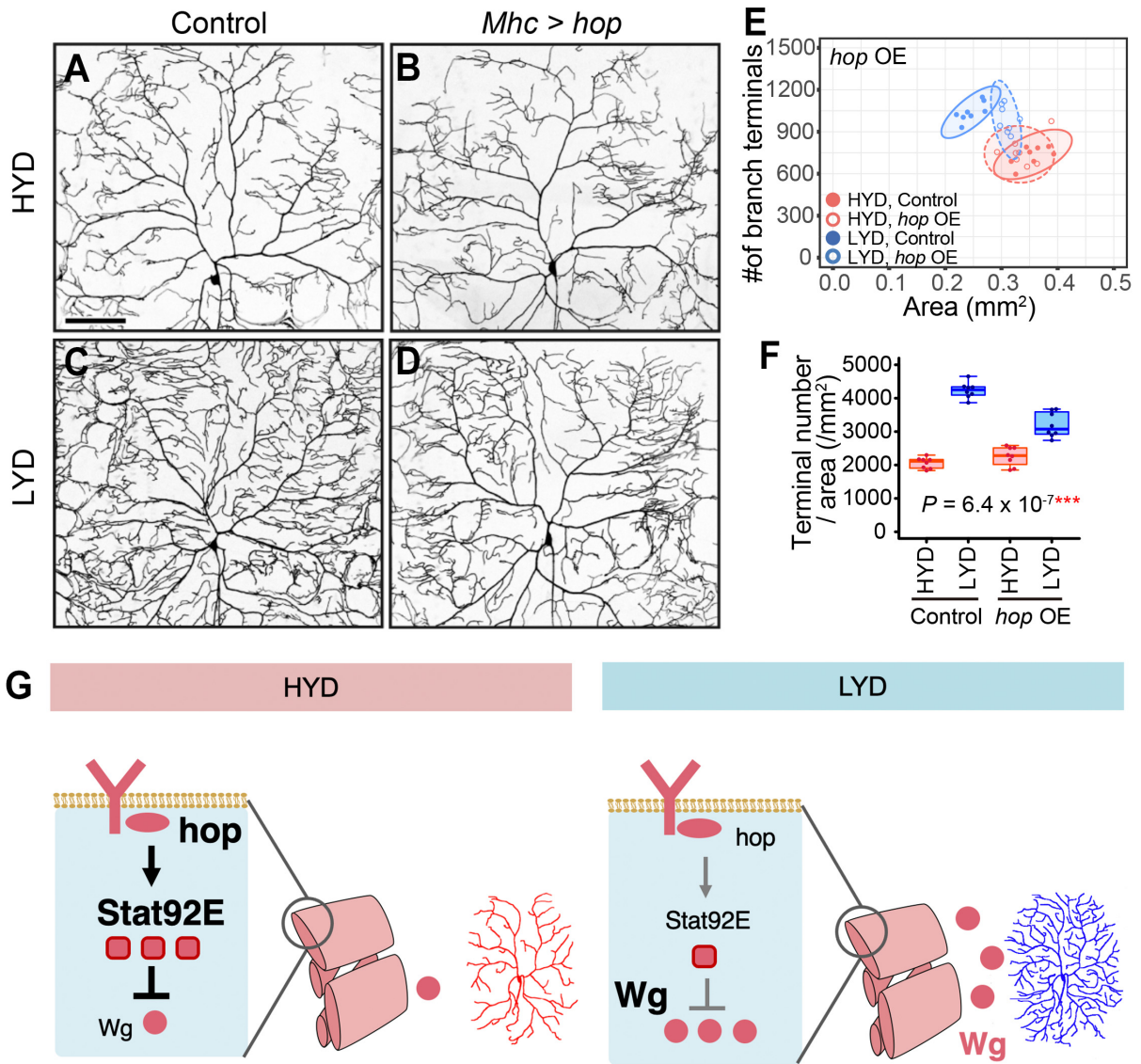


図 52. 筋肉で JAK/STAT 経路を活性化すると、C4da neuron の突起数増加表現型が減弱する

(A-F) HYD (A, B) または LYD (C, D) における、コントロール (A, C) または筋肉で *hop* を過剰発現した個体 (B, D) の C4da neuron の画像。二次元プロット (E)、および樹状突起末端の密度 (F)。\*\*\* $P < 0.001$  (two-way ANOVA,  $n = 8$ )、スケールバー：100 $\mu\text{m}$ 。

(G) HYD において、筋肉で JAK/STAT 経路が *wg* の発現を抑制し、C4da neuron の突起数増加表現型を抑制することが示唆された。

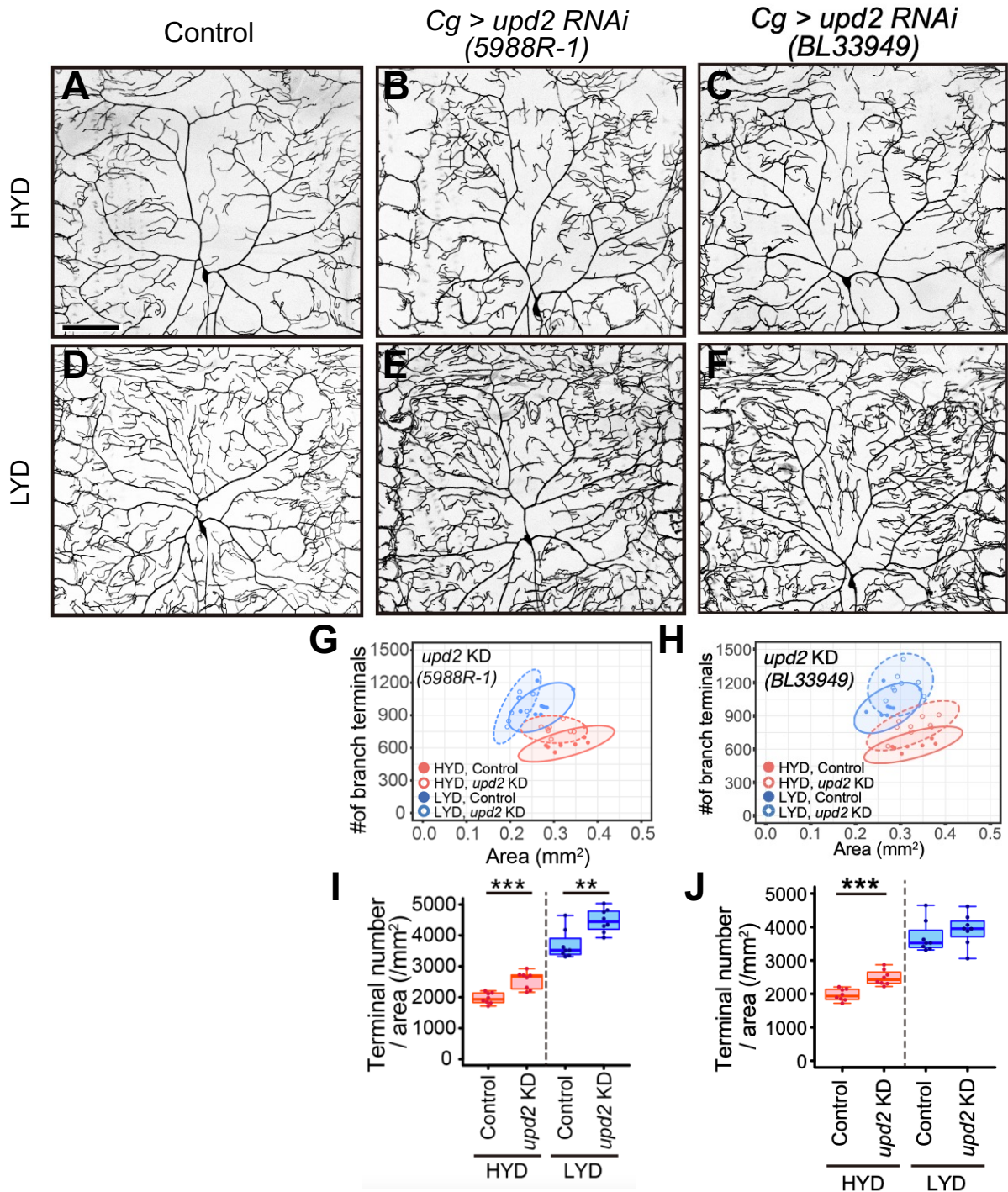


図 53. 脂肪体または血球細胞由来の *Upd2* は *C4da* neuron の突起数増加表現型の抑制に寄与する

(A-F) HYD (A-C) または LYD (D-F) における、コントロール (A, D)、または脂肪体と血球細胞において *upd2* (B, C, E, F) をノックダウンした個体の *C4da* neuron の画像。スケールバー：100 $\mu$ m。(G, H) 二次元プロット。(I, J) 樹状突起末端の密度。\*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$  (Wilcoxon-Mann-Whitney test,  $n = 8$ )。

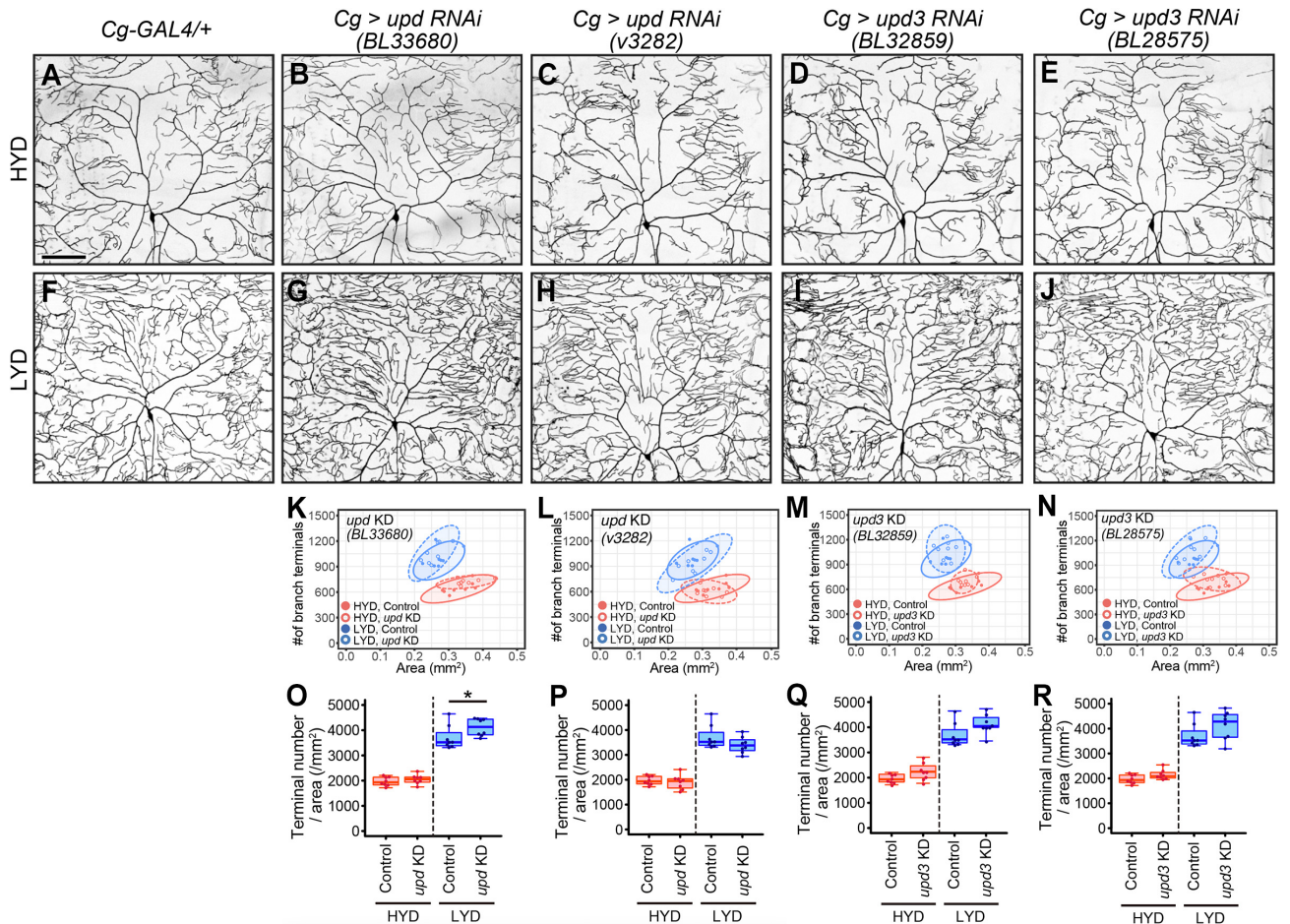


図 54. 脂肪体と血球細胞での *upd* または *upd3* のノックダウンは HYD での樹状突起の形態に顕著な影響を及ぼさない

(A-J) HYD (A-E) または LYD (F-J) における、コントロール (A, F)、脂肪体と血球細胞において *upd* (B, C, G, H) または *upd3* (D, E, I, J) をノックダウンした個体の C4da neuron の画像。スケールバー：100 $\mu$ m。(K-N) 二次元プロット。(O-R) 樹状突起末端の密度。\* $P < 0.05$  (Wilcoxon-Mann-Whitney test,  $n = 8$ )。



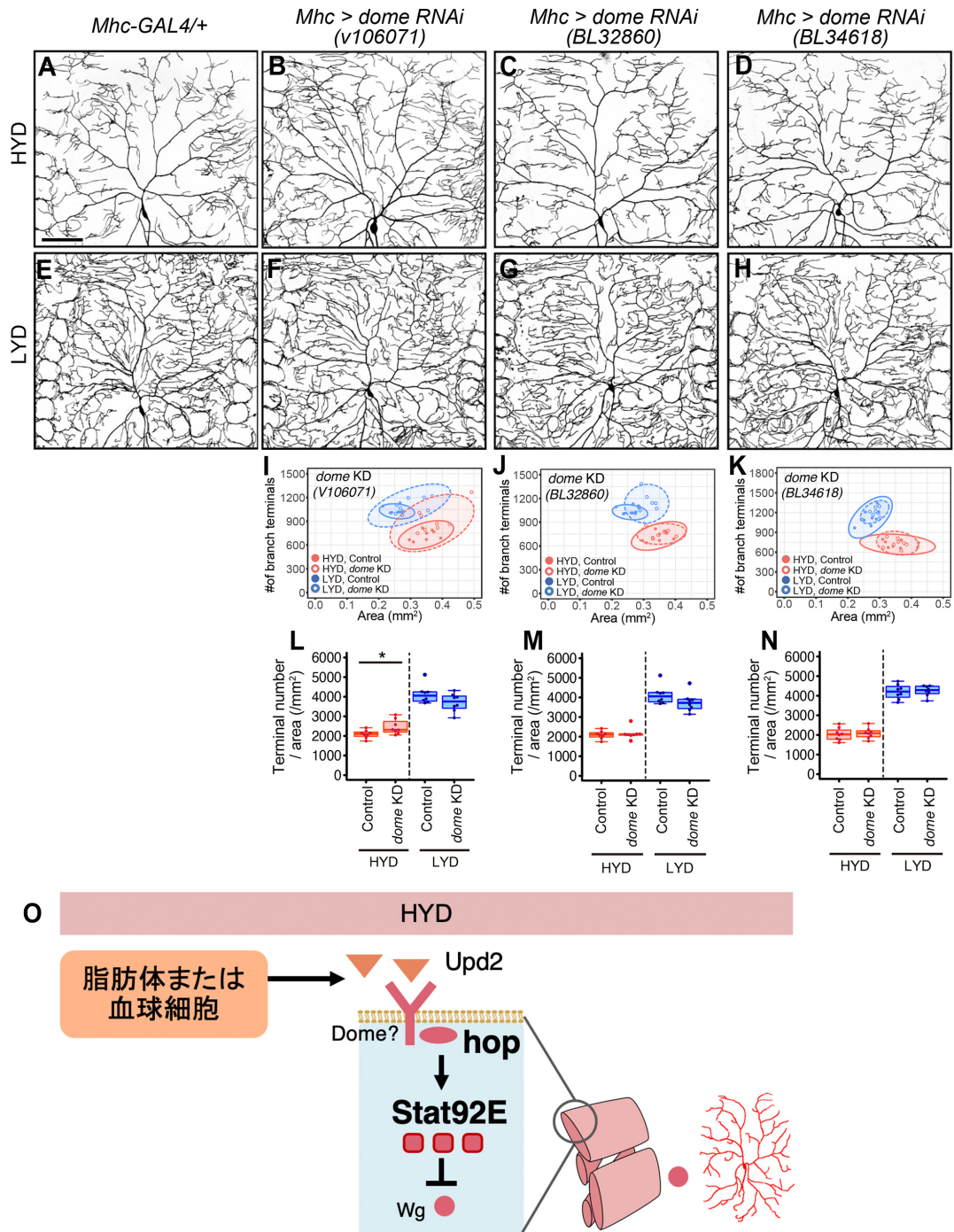


図 55. JAK/STAT 経路の受容体 *dome* の筋肉におけるノックダウンが C4da neuron の樹状突起の分岐に及ぼす効果

(A-H) HYD (A-D) または LYD (E-H) における、コントロール (A, E)、または筋肉において *dome* (B-D, F-H) をノックダウンした個体の C4da neuron の画像。スケールバー：100 $\mu$ m。(I-K) 二次元プロット。(L-N) 樹状突起末端の密度。\* $P < 0.05$  (Wilcoxon-Mann-Whitney test,  $n = 8$ )。

(O) 脂肪体や血球細胞由来の Upd2 が、筋肉の JAK/STAT 経路を活性化することで、HYD において *wg* の発現、そして C4 da neuron の突起数増加表現型を抑制することが示唆された。

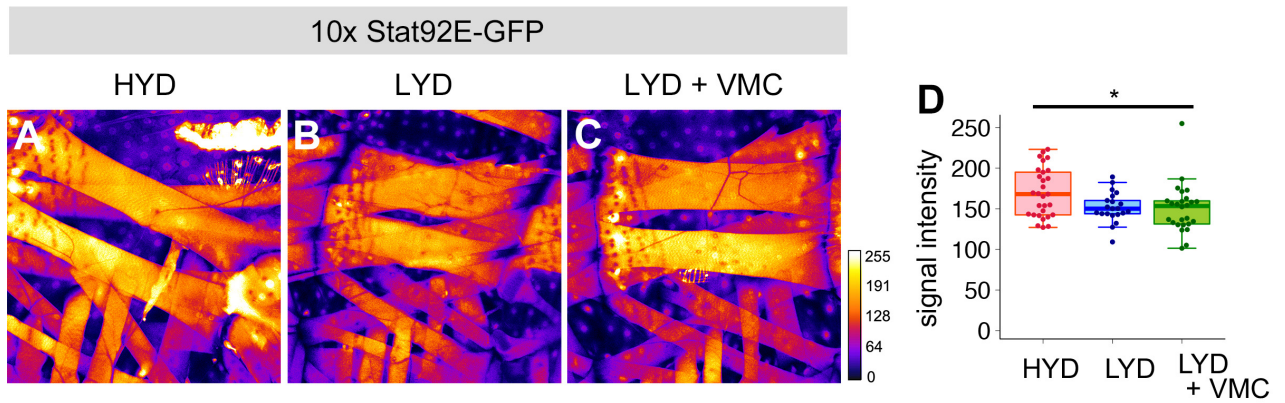


図 56. ビタミン・金属イオン・コレステロールを LYD へ添加しても Stat92E のタンパク質レベルに有意な変化は見られない

(A-C) HYD (A)、LYD (B)、または LYD + VMC (C) で飼育した Stat92E レポーター系統の幼虫の筋肉。GFP のシグナル輝度を右下のカラーコードに示す色に変換した。(F) 9 番の筋肉における GFP のシグナル強度の定量結果。 \* $P < 0.05$  (Steel Dwass t-test,  $n = 21-29$ )、スケールバー：100 $\mu\text{m}$ 。

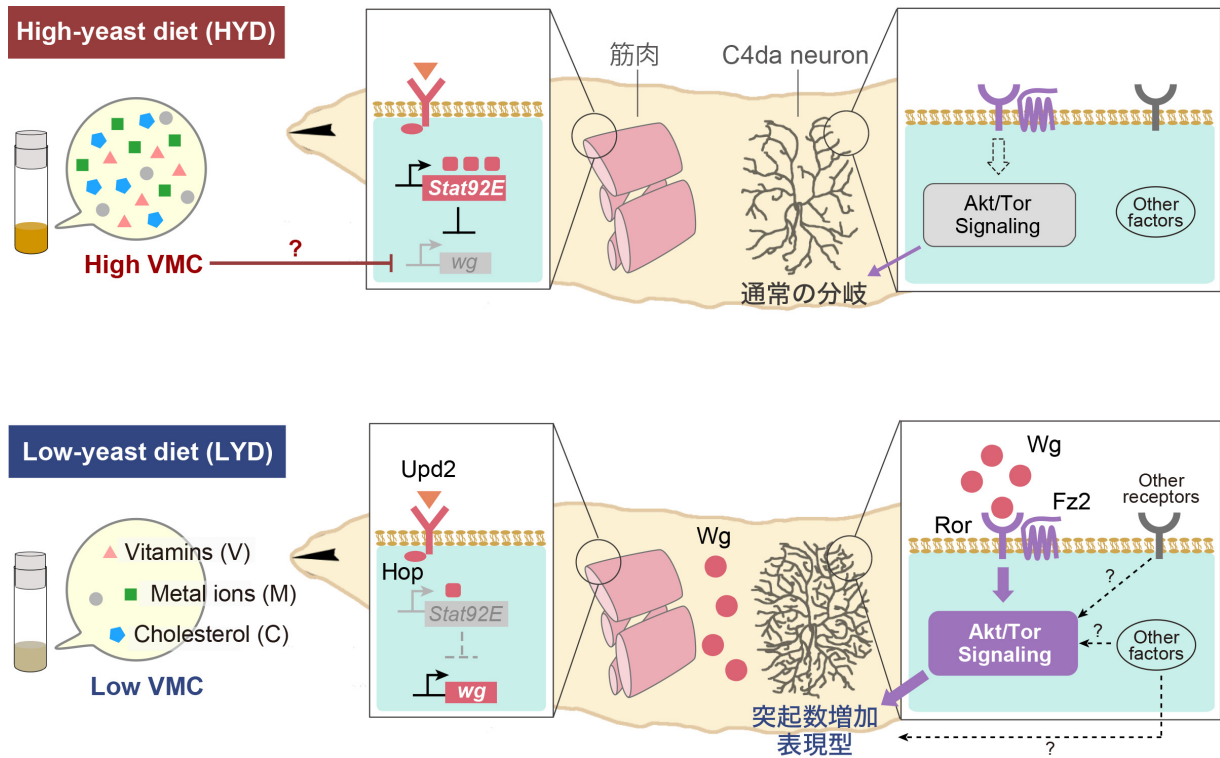


図 57. C4da neuron の突起数増加表現型を生み出す栄養条件依存的な組織連関のメカニズム

HYD 飼育条件下と比較して (上)、LYD で飼育した幼虫では (下)、ビタミン、金属イオン、コレステロールの複合的な欠乏 (Low VMC) により、C4da neuron の樹状突起の分岐が促進される (突起数増加表現型)。LYD では、HYD よりも筋肉における *wg* の発現が高く、そこから分泌された Wg が C4da neuron の Ror と Fz2 に受容され、Akt の活性化を経て、樹状突起の分岐を促進する。ただし、C4da ニューロンでは、Akt の上流で働く他の受容体 (InR や Alk など、“Other receptors”) や他の Wnt 経路の構成因子 (Dsh や Bsk など、“Other factor”) も突起数増加表現型に寄与している可能性が考えられる。一方で、HYD では Upd2-Hop-Stat92E シグナルによって部分的に *wg* の発現が抑制されることが分かった。また、その経路とは別に、VMC の摂取に依存した未知の分子機構も *wg* の発現を制御することが示唆された (赤い T バー)。

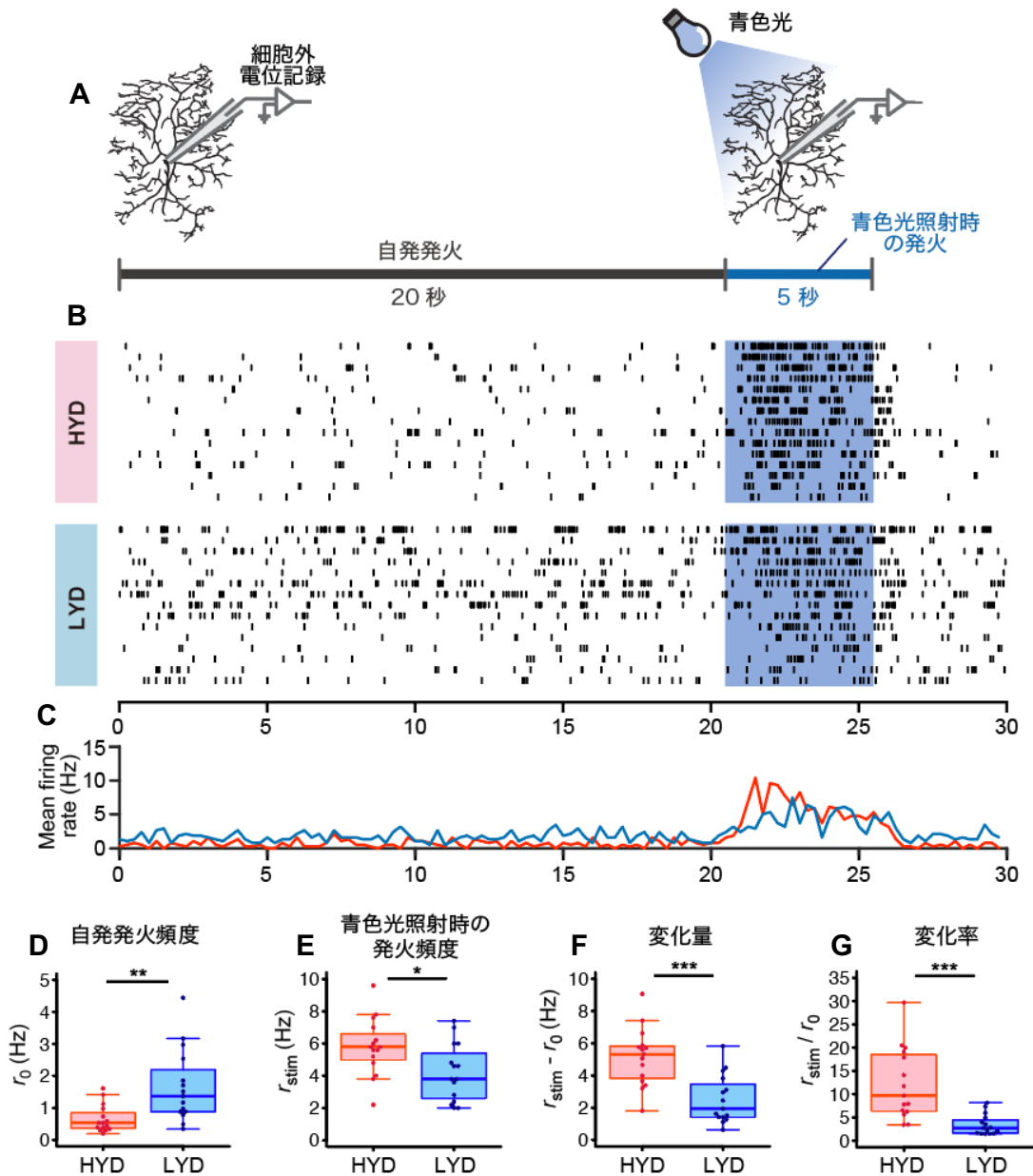


図 58. 各食餌条件における C4da neuron の自発発火と青色光照射時の発火応答の計測

(A) C4 da neuron の神経活動を解析した方法の模式図。細胞外電位記録法により、約 20 秒間刺激を与えない状態での自発発火と、青色光を 5 秒間照射したときの C4da neuron の発火のタイミングを記録した。(B) HYD または LYD 飼育条件下における C4da neuron の発火のタイミングを示すラスタプロット。神経の電位波形を簡便に示すために、発火時刻だけを短い縦線で表示する方法をラスタプロットという。青色光を照射した時間を青色の影で示した。各 1 行のプロットが 1 細胞の計測データを表す。(C) 発火頻度の推定値について、細胞間で平均をとった値の時間推移を示すグラフ。赤い線が HYD 条件下を、青い線が LYD 条件下を示す。(D) 自発発火頻度。(E) 青色光照射時の発火頻度。(F) 青色光照射時の発火頻度から自発発火頻度を差し引いた発火頻度の変化量。(G) 青色光照射時の発火頻度を自発発火頻度で割った発火頻度の変化率。

\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$  (Steel–Dwass test,  $n = 15$ )

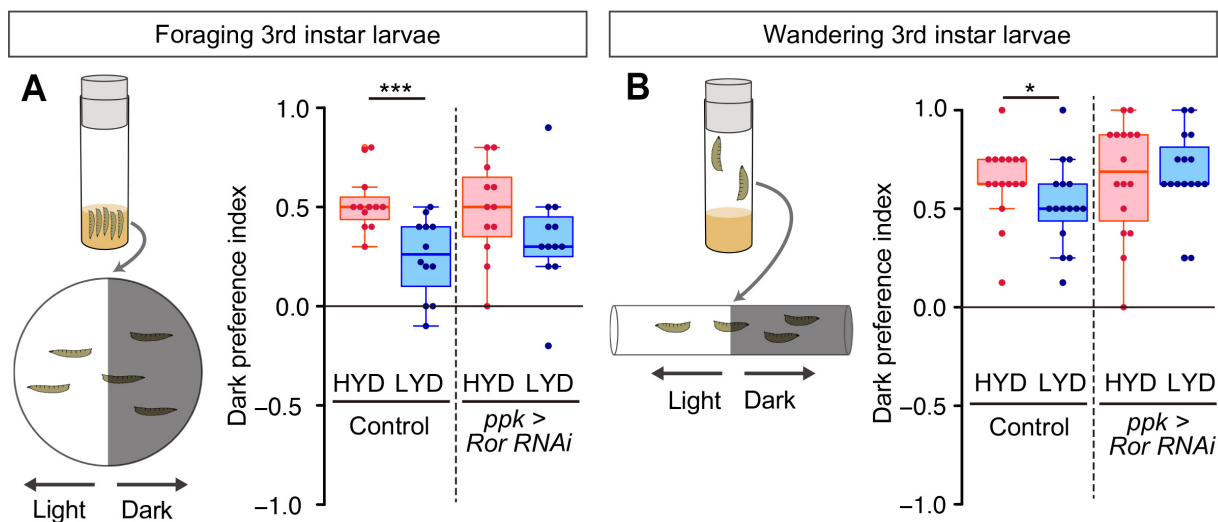


図 59. HYD に比べて LYD で光忌避行動を示す個体の割合が減少する

Foraging (A) と wandering (B) の 3 齢幼虫について、光忌避行動の評価方法 (Light/Dark choice assay) を示す模式図と、暗所に移動した幼虫の割合を示す指数 (“Dark preference index”)。HYD と LYD それぞれにおいて、コントロールの幼虫と C4da neuron で *Ror* をノックダウンした幼虫について検証した。Foraging 幼虫の検証では寒天の入ったシャーレを (A)、wandering の幼虫の検証ではプラスチックの筒を (B)、それぞれ半分遮光した装置を用意し、幼虫が明るい領域と暗い領域のどちらに移動するかを調べた。Dark preference index は以下の計算式で算出した。([遮光部分にいる幼虫の数] - [光の当たる部分にいる幼虫の数]) / [幼虫の総数]。\* $P < 0.05$ , \*\*\* $P < 0.001$  (Wilcoxon-Mann-Whitney test,  $n = 12-16$ )。

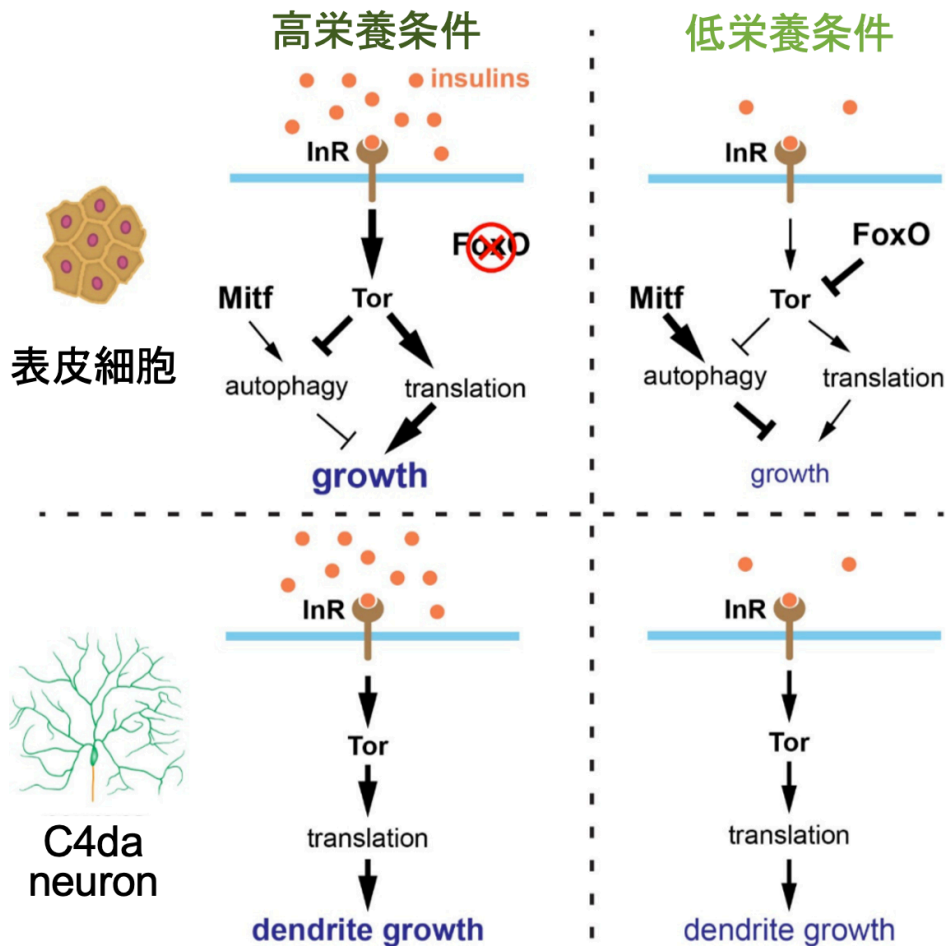


図 60. 低栄養条件でも C4da neuron の樹状突起の成長能が保持される仕組み

酵母含有量の少ない低栄養の餌において、表皮では FoxO が Tor シグナリングを抑制し、オートファジーを亢進するとともに、タンパク質翻訳などを抑制することで、細胞の成長を抑える。一方で、C4da neuron では *foxo* の発現量が表皮細胞などと比べて低く、Tor シグナリングへの抑制が働かないため、低栄養状態でも樹状突起が成長を続ける。Poe et al., 2020 の図から引用し、改変した。

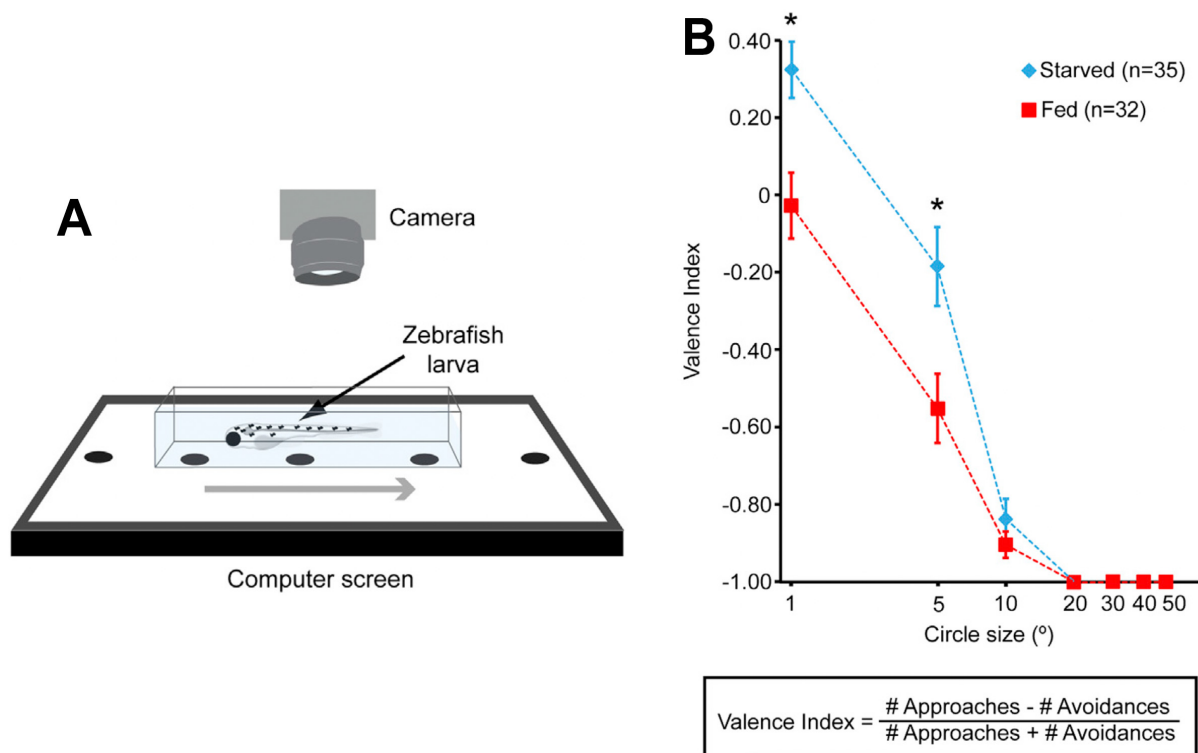


図 61. 動物は栄養不足に陥った時に、リスクの高い行動をとる傾向を示す

ゼブラフィッシュの幼生は、小さい物体には餌と認識して近づく一方で、大きい物体は捕食者と認識して逃げる傾向がある。ただし、飢餓状態になると、その逃避行動が低減する。Filosa et al., 2016 の図から引用した。(A) ゼブラフィッシュの幼生の逃避行動を評価する実験方法。ゼブラフィッシュの幼生の下にコンピュータースクリーンを置き、大きさの異なる点を動かして、幼生がその点に近づくか、逃避するかを記録する。(B) 幼生が逃避行動を示す頻度を表すグラフ。横軸は、点が幼生の真下に来た時に視覚を占める角度で、点の大きさを表している。また、縦軸の Valence index は、数値が高いほど、多くの幼生が逃避行動を示さずに点に近づいたことを意味する。例えば中ぐらいの大きさの点の 5°の結果に注目すると、摂食した個体では、大多数の個体が点から逃避する一方で、飢餓状態の個体では、その割合が有意に減少する。

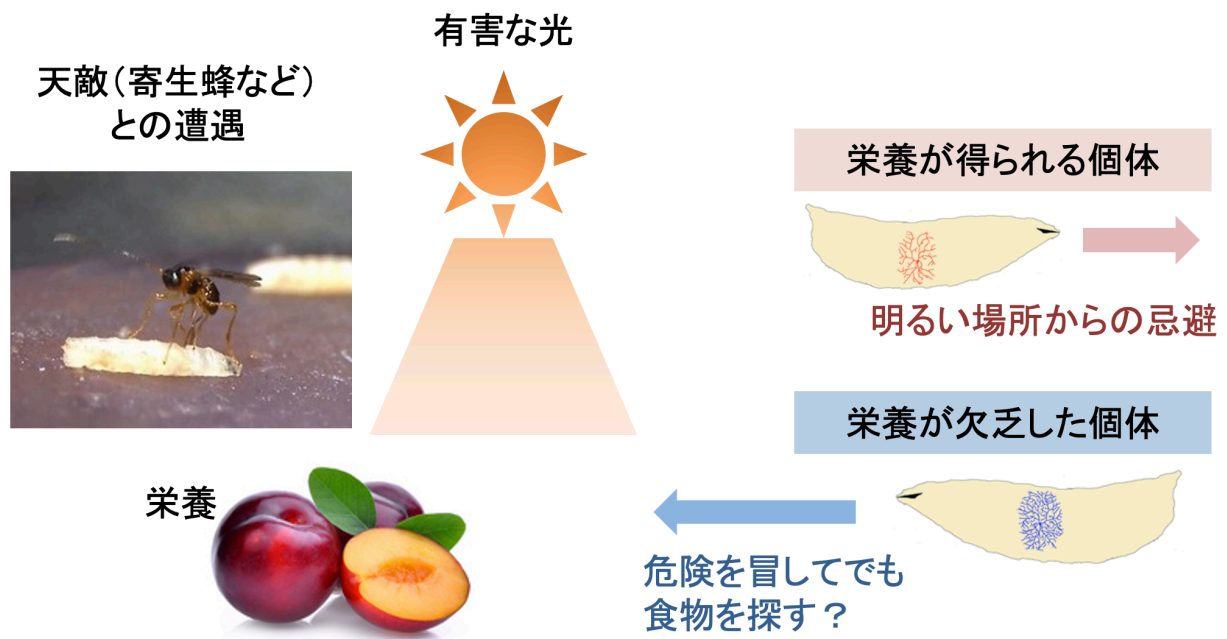


図 62. 低栄養環境下では幼虫の光への応答性が低下することで、リスクを冒してでも食物を探す行動が可能になるのではないだろうか

LYD では幼虫の光刺激への応答性が鈍化することが分かった。その適応的な意義として、栄養が欠乏した条件では、幼虫が、有害な光や天敵に晒される場所に危険を冒してでも、食物を探しに行くことが可能になるのではないかと推察した。図中の寄生蜂とプラムの画像は <https://www.sekaiwokaeyo.com/wakate/s2229/> と <https://dictionary.cambridge.org/ja/dictionary/english/plum> から抜粋した。



## 表

表 1. 突起数増加表現型を生み出す栄養条件依存的な全身性シグナル伝達経路の候補

突起数増加表現型に働く全身性分泌因子の候補と、その分泌因子の下流のシグナル経路についてまとめた表。左から、注目した全身性の分泌因子、分泌因子の他の生物種でのホモログ、ノックダウン実験を行なった遺伝子、その遺伝子のシグナル経路における機能、そして、これまでに報告されたショウジョウバエ幼虫の栄養条件への応答に果たす機能を記載した。

全身性のシグナル経路で働く分泌因子	ホモログ	ノックダウンした遺伝子	シグナル経路における機能	ショウジョウバエ幼虫の栄養条件への応答に果たす機能について、報告されている事項
Insulin-like peptide (Iip)	Insulin	<i>Insulin-like receptor (InR)</i>	受容体	栄養摂取に応じて、インスリン産生細胞と呼ばれる神経内分泌細胞で Iip が産生され、体液中に分泌される。末梢組織の InR が Iip を受容し、全身及び組織の成長やエネルギー代謝を制御する (Wang et al, 2014)。
		<i>Akt</i>	プロテインキナーゼ	
Eiger (Egr)	TNF- $\alpha$	<i>grindelwald (grnd)</i>	受容体	酵母量の少ない餌において、Egr が脂肪体から分泌され、インスリン産生細胞の Grnd により受容される。その結果、Iip の産生が抑制され、体の大きさが制御される (Agrawal et al, 2016)。
		<i>wengen (wgn)</i>	受容体	
Stunted (Sun)	ATPSyne (yeast)	<i>methselah (mth)</i>	受容体	摂食に応じて脂肪体から Sun が分泌され、インスリン産生細胞の Mth に受容される。その結果、Iip の分泌が促され、体が大きくなる (Delanoue et al, 2016)。
Dawdle (Daw)	TGF- $\beta$	<i>baboon (babo)</i>	受容体	糖の摂食に応じて、中腸の Babo が脂肪体から分泌された Daw を受容し、消化酵素の遺伝子発現抑制に働く (Chng et al., 2014)。

表 2. チロシンキナーゼ受容体を対象にしたノックダウンスクリーニングの結果のまとめ

表に示す 20 遺伝子のチロシンキナーゼ受容体について、C4da neuron 特異的なノックダウンスクリーニングを行なった。まずは一次スクリーニングとして、C4da neuron で発現する GAL4 ドライバーである *ppk-GAL4* と *Gr28b.c-GAL4* を同時に持つハエ系統を用いて RNAi を発現させ、表現型に寄与する受容体の候補を絞り込んだ。二次スクリーニングでは、絞り込んだ 9 つの遺伝子について、*ppk-GAL4* のみを用いてノックダウンし、定量解析を行った。それぞれの遺伝子ノックダウンで見られた突起数増加表現型への影響は以下の記号で表した。

B: 減弱、S: わずかに減弱、N: 変化なし、-: 検証していない、\*1: 餌条件によらず樹状突起の伸長が著しく阻害された、\*2: 樹状突起の密度が LYD で減少するとともに、HYD で増加した。

ノックダウンした遺伝子	略称	ストックセンター	系統番号	<i>ppk-GAL4</i> と <i>Gr28b.c-GAL4</i> 両方を用いたノックダウンによる突起数増加表現型への効果	<i>ppk-GAL4</i> のみを用いたノックダウンによる突起数増加表現型への効果
<i>RTK-like orphan receptor</i>	<i>Ror</i>	NIG	4926R-1	B	B
<i>Insulin-like receptor</i>	<i>InR</i>	BDSC	31594	N	-
		BDSC	51518	-	B
<i>Anaplastic lymphoma kinase</i>	<i>Alk</i>	VDRC	11446	B	N
		VDRC	107083	-	N
<i>heartless</i>	<i>htl</i>	VDRC	6692	B	*2
		BDSC	35024	-	N
<i>Epidermal growth factor receptor</i>	<i>Egfr</i>	VDRC	43267	B	N
<i>PDGF- and VEGF-receptor related</i>	<i>Pvr</i>	VDRC	13502	B	N
<i>Discoidin domain receptor</i>	<i>Ddr</i>	VDRC	29720	S	N
<i>doughnut on 2</i>	<i>dnt</i>	NIG	17559R-3	S	N
<i>derailed</i>	<i>drl</i>	BDSC	29602	S	N
<i>Eph receptor tyrosine kinase</i>	<i>Eph</i>	BDSC	28511	N	-
<i>off-track</i>	<i>otk</i>	BDSC	25790	N	-
<i>sevenless</i>	<i>sev</i>	BDSC	31274	N	-
<i>breathless</i>	<i>btl</i>	VDRC	110277	N	-
<i>Cadherin 96Ca</i>	<i>Cad96Ca</i>	VDRC	1089	N	-
<i>CG10702</i>	<i>CG10702</i>	VDRC	27052	N	-
<i>Derailed 2</i>	<i>Drl-2</i>	VDRC	40484	N	-
<i>Neurospecific receptor kinase</i>	<i>Nrk</i>	VDRC	9653	N	-
<i>Ret oncogene</i>	<i>Ret</i>	VDRC	107648	*1	-
<i>torso</i>	<i>tor</i>	VDRC	36280	N	-
<i>Tie-like receptor tyrosine kinase</i>	<i>Tie</i>	VDRC	26879	N	-

表 3. 本研究で用いたショウジョウバエ系統一覧

Fly strains	Source	Stock No.
<i>ppk-GAL4 UAS-mCD8:GFP</i>	Grueber et al., 2007	N/A
<i>Gr28b.c-GAL4 UAS-mCD8:GFP</i>	Xiang et al., 2010	N/A
<i>ppk-CD4-tdGFP<sup>1b</sup></i>	Han et al., 2011	N/A
<i>ppk-CD4-tdGFP<sup>8</sup></i>	Han et al., 2011	N/A
<i>ppk-CD4-tdTom<sup>4a</sup></i>	Han et al., 2011	N/A
<i>Ror<sup>4</sup></i>	Ripp et al., 2018	N/A
<i>ppk-GAL4</i>	Bloomington Drosophila Stock Center	32079
<i>Mhc-GAL4</i>	Schuster et al., 1996	N/A
<i>Cg-GAL4</i>	Bloomington Drosophila Stock Center	7011
<i>ap<sup>ts78j</sup> wg<sup>1</sup></i>	KYOTO Stock Center	107069
<i>wg<sup>1-8</sup> cn<sup>1</sup> bw<sup>1</sup> speck<sup>1</sup></i>	KYOTO Stock Center	107019
<i>wg-GAL4</i>	Bloomington Drosophila Stock Center	83627
<i>UAS-RedStinger</i>	Bloomington Drosophila Stock Center	8547
<i>UAS-Akt RNAi</i>	Bloomington Drosophila Stock Center	33615
<i>UAS-Akt RNAi</i>	Vienna Drosophila Resource Center	2902
<i>UAS-Ror RNAi</i>	National Institute of Genetics	4926R-1
<i>UAS-wg RNAi</i>	Vienna Drosophila Resource Center	6692
<i>UAS-Stat92E RNAi</i>	Bloomington Drosophila Stock Center	33637
<i>UAS-hop RNAi</i>	Bloomington Drosophila Stock Center	32966
<i>UAS-upd2 RNAi</i>	National Institute of Genetics	5988R-1
<i>UAS-hop</i>	Bloomington Drosophila Stock Center	79033
<i>UAS-myrAkt</i>	Bloomington Drosophila Stock Center	50758
<i>UAS-wg.H.T:HAI</i>	KYOTO Stock Center	108488
<i>10XSTAT92E-GFP</i>	Bloomington Drosophila Stock Center	26197
<i>UAS-InR RNAi</i>	Bloomington Drosophila Stock Center	31594
<i>UAS-InR RNAi</i>	Bloomington Drosophila Stock Center	51518
<i>UAS-grnd RNAi</i>	Vienna Drosophila Resource Center	43454
<i>UAS-wgn RNAi</i>	Vienna Drosophila Resource Center	9152
<i>UAS-mth RNAi</i>	Vienna Drosophila Resource Center	102303
<i>UAS-babo RNAi</i>	Bloomington Drosophila Stock Center	25933
<i>UAS-Tor.TED</i>	Bloomington Drosophila Stock Center	7013
<i>UAS-S6k.KQ</i>	Bloomington Drosophila Stock Center	6911
<i>UAS-Tif-1A RNAi</i>	Vienna Drosophila Resource Center	20336
<i>UAS-Thor RNAi</i>	Vienna Drosophila Resource Center	35439
<i>UAS-foxo RNAi</i>	Bloomington Drosophila Stock Center	32427
<i>UAS-Alk RNAi</i>	Vienna Drosophila Resource Center	11446
<i>UAS-Alk RNAi</i>	Vienna Drosophila Resource Center	107083
<i>mef2-GAL4</i>	Bloomington Drosophila Stock Center	27390

<b>Fly strains</b>	<b>Source</b>	<b>Stock No.</b>
<i>R38F11-GAL4</i>	Bloomington Drosophila Stock Center	50014
<i>UAS-fz RNAi</i>	Vienna Drosophila Resource Center	43075
<i>UAS-fz2 RNAi</i>	National Institute of Genetics	9739R-1
“ <i>GAL4<sup>5-40</sup> UAS-Venus:pm SOP-FLP#42; tubPGal80 FRT2A</i> ”	KYOTO Stock Center	109950
“ <i>w*; FRT2A</i> ”	KYOTO Stock Center	106623
“ <i>y w hs-flp; fz2<sup>C2</sup> FRT2A</i> ”	Chen and Struhl, 1999	N/A
<i>UAS-dsh RNAi</i>	Vienna Drosophila Resource Center	101525
<i>UAS-bsk.DN</i>	Bloomington Drosophila Stock Center	6409
<i>UAS-DAAM RNAi</i>	Vienna Drosophila Resource Center	24885
<i>UAS-arm RNAi</i>	Vienna Drosophila Resource Center	7767
<i>UAS-norpA RNAi</i>	Bloomington Drosophila Stock Center	31113
<i>UAS-Axn RNAi</i>	Bloomington Drosophila Stock Center	31703
<i>UAS-Stat92E RNAi</i>	Bloomington Drosophila Stock Center	31318
<i>UAS-dome RNAi</i>	Vienna Drosophila Resource Center	106071
<i>UAS-dome RNAi</i>	Bloomington Drosophila Stock Center	32860
<i>UAS-dome RNAi</i>	Bloomington Drosophila Stock Center	34618
<i>UAS-upd RNAi</i>	Bloomington Drosophila Stock Center	33680
<i>UAS-upd RNAi</i>	Vienna Drosophila Resource Center	3282
<i>UAS-upd2 RNAi</i>	Bloomington Drosophila Stock Center	33949
<i>UAS-upd3 RNAi</i>	Bloomington Drosophila Stock Center	32859
<i>UAS-upd3 RNAi</i>	Bloomington Drosophila Stock Center	28575
<i>rn-GAL4</i>	St Pierre et al., 2002	N/A
<i>UAS-dilp8</i>	Colombani et al., 2012	N/A
<i>UAS-htl RNAi</i>	Vienna Drosophila Resource Center	6692
<i>UAS-htl RNAi</i>	Bloomington Drosophila Stock Center	35024
<i>UAS-Egfr RNAi</i>	Vienna Drosophila Resource Center	43267
<i>UAS-Pvr RNAi</i>	Vienna Drosophila Resource Center	13502
<i>UAS-Ddr RNAi</i>	Vienna Drosophila Resource Center	29720
<i>UAS-dnt RNAi</i>	National Institute of Genetics	17559R-3
<i>UAS-drl RNAi</i>	Bloomington Drosophila Stock Center	29602
<i>UAS-Eph RNAi</i>	Bloomington Drosophila Stock Center	28511
<i>UAS-otk RNAi</i>	Bloomington Drosophila Stock Center	25790
<i>UAS-sev RNAi</i>	Bloomington Drosophila Stock Center	31274
<i>UAS-btl RNAi</i>	Vienna Drosophila Resource Center	110277
<i>UAS-Cad96Ca RNAi</i>	Vienna Drosophila Resource Center	1089
<i>UAS-CG10702 RNAi</i>	Vienna Drosophila Resource Center	27052
<i>UAS-Drl-2 RNAi</i>	Vienna Drosophila Resource Center	40484
<i>UAS-Nrk RNAi</i>	Vienna Drosophila Resource Center	9653
<i>UAS-Ret RNAi</i>	Vienna Drosophila Resource Center	107648
<i>UAS-tor RNAi</i>	Vienna Drosophila Resource Center	36280

<b>Fly strains</b>	<b>Source</b>	<b>Stock No.</b>
<i>UAS-Tie RNAi</i>	Vienna Drosophila Resource Center	26879
<i>Gal4<sup>19-12</sup></i>	Xiang et al., 2010	N/A

表 4. 実験で用いたショウジョウバエの遺伝子型の一覧

Figure	Genotype
9	+/y w or Y; +/+; <i>ppk-GAL4 UAS-mCD8:GFP</i> /+
13-16	+/y w or Y; +/+; <i>ppk-GAL4 UAS-mCD8:GFP</i> /+
18A-C	+/y w or Y; +/+; <i>ppk-GAL4 UAS-mCD8:GFP</i> /+
18F, G	w*/y w or Y; <i>ppk-CD4td:GFP</i> /+; <i>rn-GAL4</i> /+
18H	w*/y w or Y; <i>ppk-CD4td:GFP</i> /+; <i>rn-GAL4/UAS-dilp8</i>
20A, F	y w/y w or Y; <i>Gr28b.c-GAL4 UAS-mCD8:GFP</i> /+; <i>ppk-GAL4 UAS-mCD8:GFP</i> /+
20B, G	+/w <sup>1118</sup> or Y; <i>Gr28b.c-GAL4 UAS-mCD8:GFP/P{GD12580}v43454</i> ; <i>ppk-GAL4 UAS-mCD8:GFP</i> /+
20C, H	+/w <sup>1118</sup> or Y; <i>Gr28b.c-GAL4 UAS-mCD8:GFP</i> /+; <i>ppk-GAL4 UAS-mCD8:GFP/P{GD3427}v9152</i>
20D, I	+/+ or Y; <i>Gr28b.c-GAL4 UAS-mCD8:GFP/P{KK106399}VIE-260B</i> ; <i>ppk-GAL4 UAS-mCD8:GFP</i> /+
20E, J	+/w <sup>1118</sup> or Y; <i>Gr28b.c-GAL4 UAS-mCD8:GFP</i> /+; <i>ppk-GAL4 UAS-mCD8:GFP/P{TRiP.JF01953}attP2</i>
21A, D	y w/y w or Y; <i>Gr28b.c-GAL4 UAS-mCD8:GFP</i> /+; <i>ppk-GAL4 UAS-mCD8:GFP</i> /+
21B, E	y w/w <sup>1118</sup> or Y; <i>Gr28b.c-GAL4 UAS-mCD8:GFP</i> /+; <i>ppk-GAL4 UAS-mCD8:GFP/P{GD1361}v2902</i>
21C, F	y w/y <sup>1</sup> v1 or Y; <i>Gr28b.c-GAL4 UAS-mCD8:GFP</i> /+; <i>ppk-GAL4 UAS-mCD8:GFP/P{TRiP.HMS00007}attP2</i>
22A, B (Control)	y w/y w or Y; <i>Gr28b.c-GAL4 UAS-mCD8:GFP</i> /+; <i>ppk-GAL4 UAS-mCD8:GFP</i> /+
22A, B ( <i>Akt</i> KD)	y w/w <sup>1118</sup> or Y; <i>Gr28b.c-GAL4 UAS-mCD8:GFP</i> /+; <i>ppk-GAL4 UAS-mCD8:GFP/P{GD1361}v2902</i>
22C, D (Control)	y w/y w or Y; <i>Gr28b.c-GAL4 UAS-mCD8:GFP</i> /+; <i>ppk-GAL4 UAS-mCD8:GFP</i> /+
22C, D ( <i>Akt</i> KD)	y w/y <sup>1</sup> v1 or Y; <i>Gr28b.c-GAL4 UAS-mCD8:GFP</i> /+; <i>ppk-GAL4 UAS-mCD8:GFP/P{TRiP.HMS00007}attP2</i>
22E, F (Control)	+/y w or Y; +/+; <i>ppk-GAL4 UAS-mCD8:GFP</i> /+
22E, F ( <i>Ror</i> KD)	+/w <sup>1118</sup> or Y; <i>UAS-Ror RNAi<sup>4926</sup></i> /+; <i>ppk-GAL4 UAS-mCD8:GFP</i> /+

Figure	Genotype
23A, D	<i>y w/y w or Y; ppk-CD4:tdTom/+; ppk-GAL4/+</i>
23B, E	<i>y w/w<sup>1118</sup> or Y; ppk-CD4:tdTom/+; ppk-GAL4/P{GD1361}v2902</i>
23C, F	<i>y w/y<sup>l</sup> v<sup>l</sup> or Y; ppk-CD4:tdTom/+; ppk-GAL4//P{TRiP.HMS00007}attP2</i>
23I	<i>y w/y w or Y; +/+; ppk-GAL4/+</i>
23J	<i>y w/w* or Y; +/+; ppk-GAL4/UAS-myrAkt</i>
24A, F	<i>y w/y w or Y; Gr28b.c-GAL4 UAS-mCD8:GFP/+; ppk-GAL4 UAS-mCD8:GFP/+</i>
24B, G	<i>+/y<sup>l</sup> w* or Y; Gr28b.c-GAL4 UAS-mCD8:GFP/ P{UAS-Tor.TED}II; ppk-GAL4 UAS-mCD8:GFP/+</i>
24C, H	<i>+/w<sup>1118</sup> or Y; Gr28b.c-GAL4 UAS-mCD8:GFP/ P{UAS-S6k.KQ}2; ppk-GAL4 UAS-mCD8:GFP/+</i>
24D, I	<i>+/w<sup>1118</sup> or Y; Gr28b.c-GAL4 UAS-mCD8:GFP/+; ppk-GAL4 UAS-mCD8:GFP/P{GD9239}v20336</i>
24E, J	<i>+/w<sup>1118</sup> or Y; Gr28b.c-GAL4 UAS-mCD8:GFP/+; ppk-GAL4 UAS-mCD8:GFP/ P{GD12533}v35439</i>
26A, C	<i>+/y w or Y; +/+; ppk-GAL4 UAS-mCD8:GFP/+</i>
26B, D	<i>+/w<sup>1118</sup> or Y; UAS-Ror RNAi<sup>4926</sup>/+; ppk-GAL4 UAS-mCD8:GFP/+</i>
26G, I	<i>y w/y w or Y; +/+; ppk-CD4:tdGFP/ +</i>
26H, J	<i>+/y w or Y; Ror<sup>4</sup>/Ror<sup>4</sup>; ppk-CD4:tdGFP/+</i>
27A, C	<i>+/y w or Y; Gr28b.c-Gal4 UAS-mCD8:GFP/+; ppk-Gal4 UAS-mCD8:GFP/+</i>
27B, D	<i>+/y<sup>l</sup> v<sup>l</sup> or Y; Gr28b.c-Gal4 UAS-mCD8:GFP/+; ppk-GAL4 UAS-mCD8:GFP/P{TRiP.JF01183}attP2</i>
27G, I	<i>+/y w or Y; +/+; ppk-Gal4 UAS-mCD8:GFP/+</i>
27H, J	<i>+/y<sup>l</sup> v<sup>l</sup> or Y; P{TRiP.HMS03166}attP40/+; ppk-Gal4 UAS-mCD8:GFP/+</i>
28A, C	<i>+/y w or Y; +/+; ppk-Gal4 UAS-mCD8:GFP/+</i>
28B, D	<i>w<sup>1118</sup> P{GD42}v11446/+ or Y; Gr28b.c-Gal4 UAS-mCD8:GFP/+; ppk-Gal4 UAS-mCD8:GFP/+</i>
28G, J	<i>+/y w or Y; +/+; ppk-Gal4 UAS-mCD8:GFP/+</i>
28H, K	<i>w<sup>1118</sup> P{GD42}v11446/+ or Y; ppk-Gal4 UAS-mCD8:GFP/+</i>
28I, L	<i>+/+ or Y; P{KK102942}VIE-260B/+; ppk-GAL4 UAS-mCD8:GFP/+</i>
31A, C	<i>y w/y w or Y; ppk-CD4:tdGFP/+; Mhc-GAL4/+</i>
31B, D	<i>y w/w<sup>1118</sup> or Y; ppk-CD4:tdGFP/+; Mhc-GAL4/P{GD5007}v13352</i>
31G, I	<i>y w/y w or Y; ppk-CD4:tdGFP/+; mef2-GAL4/+</i>
31H, J	<i>y w/w<sup>1118</sup> or Y; ppk-CD4:tdGFP/+; mef2-GAL4/P{GD5007}v13352</i>

Figure	Genotype
32A, C	<i>y w/y w or Y; ppk-CD4:tdGFP/+; P{GMR38F11-GAL4}attP2/+</i>
32B, D	<i>y w/w<sup>1118</sup> or Y; ppk-CD4:tdGFP/+; P{GMR38F11-GAL4}attP2/P{GD5007}v13352</i>
33A, C	<i>w*/y w or Y; +/+; ppk-CD4td:GFP/+</i>
33B, D	<i>y w/+ or Y; ap<sup>ts78j</sup> wg<sup>1</sup>/wg<sup>1-8</sup> cn<sup>1</sup> bw<sup>1</sup> sp<sup>1</sup>; ppk-CD4:tdGFP/+</i>
34A, C	<i>y w/y w or Y; ppk-CD4:tdGFP/+; Mhc-GAL4/+</i>
34B, D	<i>y w/w* or Y; ppk-CD4:tdGFP/P{w[+mC]=UAS-wg.H.T:HA1}3C; Mhc-GAL4/+</i>
35B, D	<i>+/y w or Y; Mhc-GAL4/+</i>
35C, E	<i>+/w<sup>1118</sup> or Y; Mhc-GAL4/P{GD5007}v13352</i>
36B, C	<i>w<sup>1118</sup>/y w; Tl{RFP[DsRed.3xP3.cUa]=CRISPaint.T2A-GAL4}wg[GP06461-1]/+; P{w[+mC]=UAS-RedStinger}6/+</i>
37A-C	<i>y w/y w or Y</i>
39A, C	<i>y w/y w or Y; ppk-CD4:tdTom/+; ppk-GAL4/+</i>
39B, D	<i>y w/w* or Y ppk-CD4:tdTom/UAS-Ror RNAi<sup>4926</sup>; ppk-GAL4/+</i>
39F, H	<i>+/y w or Y; Mhc-GAL4/+</i>
39G, I	<i>+/w* or Y; P{w[+mC]=UAS-wg.H.T:HA1}3C/+; Mhc-GAL4/+</i>
40A, D	<i>+/y w or Y; Gr28b.c-GAL4 UAS-mCD8:GFP/+; ppk-GAL4 UAS-mCD8:GFP/+</i>
40B, E	<i>+/w<sup>1118</sup> or Y; Gr28b.c-GAL4 UAS-mCD8:GFP/P{GD4614}v43075; ppk-GAL4 UAS-mCD8:GFP/+</i>
40C, F	<i>+/w<sup>1118</sup> or Y; Gr28b.c-GAL4 UAS-mCD8:GFP/UAS-fz2 RNAi9739; ppk-GAL4 UAS-mCD8:GFP/+</i>
40K, M	<i>GAL45-40 UAS-Venus:pm SOP-FLP#42/w* or Y; +/+; tubPGAL80 FRT2A/FRT2A</i>
40L, N	<i>GAL45-40 UAS-Venus:pm SOP-FLP#42/y w hs-flp or Y; +/+; tubPGAL80 FRT2A/fz2C2 FRT2A</i>



Figure	Genotype
42A, H	+/y w or Y; Gr28b.c-GAL4 UAS-mCD8:GFP/+; ppk-GAL4 UAS-mCD8:GFP/+
42B, I	+/+ or Y; Gr28b.c-GAL4 UAS-mCD8:GFP/P{KK108967}VIE-260B; ppk-GAL4 UAS-mCD8:GFP/+
42C, J	w <sup>1118</sup> P{UAS-bsk.DN}2/+ or Y; Gr28b.c-GAL4 UAS-mCD8:GFP/+; ppk-GAL4 UAS-mCD8:GFP/+
42D, K	+/w1118 or Y; Gr28b.c-GAL4 UAS-mCD8:GFP/+; ppk-GAL4 UAS-mCD8:GFP/P{GD8382}v24885
42E, L	+/w <sup>1118</sup> or Y; Gr28b.c-GAL4 UAS-mCD8:GFP/+; ppk-GAL4 UAS-mCD8:GFP/P{GD1372}v7767
42F, M	+/y <sup>l</sup> v <sup>l</sup> or Y; Gr28b.c-GAL4 UAS-mCD8:GFP/+; ppk-GAL4 UAS-mCD8:GFP/P{TRiP.HM04012}attP2
42G, N	+/y <sup>l</sup> v <sup>l</sup> or Y; Gr28b.c-GAL4 UAS-mCD8:GFP/+; ppk-GAL4 UAS-mCD8:GFP/P{TRiP.JF01585}attP2
43C, G	y w/y w or Y; P{GD12580}v43454/+; ppk-GAL4 UAS-mCD8:GFP/UAS-CD4:tdTom
43D, H	y w/y w or Y; UAS-Ror RNAi <sup>4926</sup> /+; ppk-GAL4 UAS-mCD8:GFP/UAS-CD4:tdTom
43E, I	y w/y w or Y; P{GD12580}v43454/+; ppk-GAL4 UAS-mCD8:GFP/UAS-myrAkt
43F, J	y w/y w or Y ; UAS-Ror RNAi <sup>4926</sup> /+; ppk-GAL4 UAS-mCD8:GFP/UAS-myrAkt
45E, F	+/y w or Y; Mhc-GAL4/+
46A, B	y w /y w or Y; + / +; + / Gal4 <sup>19-12</sup> , UAS-mCD8GFP
46D, E	+/y w or Y; Mhc-GAL4/+
48	+/y w or Y; +/+; ppk-GAL4 UAS-mCD8:GFP/+
49D, E	w <sup>1118</sup> /w <sup>1118</sup> or Y; P{10XStat92E-GFP}1/+
50B, D	+/y w or Y; Mhc-GAL4/+
50C, E	+/y <sup>l</sup> v <sup>l</sup> or Y; Mhc-GAL4/ P{TRiP.HMS00035}attP2
51A, E	y w/y w or Y; ppk-CD4:tdGFP/+; Mhc-GAL4/+
51B, F	y w/y <sup>l</sup> v <sup>l</sup> or Y; ppk-CD4td:GFP/+; Mhc-GAL4/ P{TRiP.HMS00035}attP2
51C, G	y w/y <sup>l</sup> v <sup>l</sup> or Y; ppk-CD4:tdGFP/+; Mhc-GAL4/P{TRiP.JF01266}attP2
51D, H	y w/y <sup>l</sup> sc* v <sup>l</sup> sev <sup>21</sup> or Y; ppk-CD4td:GFP/+; Mhc-GAL4/ P{TRiP.HMS00761}attP2
52A, C	y w/y w or Y; ppk-CD4:tdGFP/+; Mhc-GAL4/+
52B, D	y w/w* or Y; ppk-CD4:tdGFP/P{UAS-hop.H}2; Mhc-GAL4/+

Figure	Genotype
53A, D	<i>y w/y w or Y; Cg-GAL4/+; ppk-CD4:tdGFP/+</i>
53B, E	<i>y w/w<sup>1118</sup> or Y; Cg-GAL4/UAS-upd2 RNAi<sup>5988</sup>; ppk-CD4:tdGFP/+</i>
53C, F	<i>y w/y<sup>l</sup> sc* v<sup>l</sup> sev<sup>21</sup> or Y; Cg-GAL4/+; ppk-CD4:tdGFP/P{TRiP.HMS00901}attP2</i>
54A, F	<i>y w/y w or Y; Cg-GAL4/+; ppk-CD4:tdGFP/+</i>
54B, G	<i>y w/y<sup>l</sup> sc* v<sup>l</sup> sev<sup>21</sup> or Y; Cg-GAL4/+; ppk-CD4:tdGFP/P{TRiP.HMS00545}attP2</i>
54C, H	<i>y w/w<sup>1118</sup> or Y; Cg-GAL4/P{GD1158}v3282; ppk-CD4:tdGFP/+</i>
54D, I	<i>y w/y<sup>l</sup> sc* v<sup>l</sup> sev<sup>21</sup> or Y; Cg-GAL4/+; ppk-CD4:tdGFP/P{TRiP.HMS00646}attP2</i>
54E, J	<i>y w/y<sup>l</sup> v<sup>l</sup> or Y; Cg-GAL4/+; ppk-CD4:tdGFP/P{TRiP.HM05061}attP2</i>
55A, E	<i>y w/y w or Y; ppk-CD4:tdGFP/+; Mhc-GAL4/+</i>
55B, F	<i>+/+ or Y; Gr28b.c-GAL4 UAS-mCD8:GFP/P{KK104700}VIE-260B; ppk-GAL4 UAS-mCD8:GFP/+</i>
55C, G	<i>y w/y<sup>l</sup> sc* v<sup>l</sup> sev<sup>21</sup> or Y; ppk-CD4:tdGFP/+; Mhc-GAL4/P{TRiP.HMS00647}attP2</i>
55D, H	<i>y w/y<sup>l</sup> sc* v<sup>l</sup> sev<sup>21</sup> or Y; ppk-CD4:tdGFP/+; Mhc-GAL4/P{TRiP.HMS01293}attP2</i>
56A-C	<i>w<sup>1118</sup>/w<sup>1118</sup> or Y; P{10XStat92E-GFP}1/+</i>
58	<i>+/y w or Y; Gr28b.c-GAL4 UAS-mCD8:GFP/+; ppk-GAL4 UAS-mCD8:GFP/+</i>
59 (Control)	<i>y w/y w or Y; +/+; ppk-GAL4 UAS-mCD8:GFP/+</i>
59 (Ror KD)	<i>y w/y w or Y; UAS-Ror RNAi<sup>4926</sup>/+; ppk-GAL4 UAS-mCD8:GFP/+</i>

表 5. 本研究で使用した抗体

一次抗体

抗体の名称	動物種	希釈率	製造番号 (製造元)
anti-Wg	マウス	1:15	4D4 (Developmental Studies Hybridoma Bank)
anti-Futch	マウス	1:20	22C10 (Developmental Studies Hybridoma Bank)
anti-phospho-Akt	ウサギ	1:100	9271S (Cell Signaling)
anti-DsRed	ウサギ	1:250	632496 (Clontech)

二次抗体

抗体の名称	希釈率	製造元
anti-mouse IgG-Alexa 488	1:1000	A11029 (Invitrogen)
anti-rabbit IgG-Alexa 488	1:1000	A11034 (Invitrogen)
anti-rabbit IgG-Alexa 546	1:1000	A11030 (Invitrogen)

表 6. 本研究で用いた統計解析の手法、*P* 値、サンプルサイズの詳細

本研究での統計解析には R を用い、有意水準は  $P < 0.05$  とした。

Figure	Test	Comparison ( <i>n</i> : exact sample size)		<i>P</i> value
9C	t-test	HYD (n = 6)	vs LYD (n = 6)	0.0008
9D	t-test	HYD (n = 6)	vs LYD (n = 6)	0.0056
9E	t-test	HYD (n = 6)	vs LYD (n = 6)	< 0.0001
13D	ANOVA HSD	HYD (n = 6)	vs LYD (n = 6)	0.0002
		HYD (n = 6)	vs LYD + EAA (n = 6)	< 0.0001
		LYD (n = 6)	vs LYD + EAA (n = 6)	0.6567
13H	Steel		vs HYD (n = 8)	0.0022
		LYD (n = 8)	vs LYD + 1 x AAs (n = 8)	0.0092
			vs LYD + 3 x AAs (n = 8)	0.0066
13J	ANOVA HSD	HYD (n = 8)	vs LYD (n = 8)	< 0.0001
		HYD (n = 8)	vs LYD + peptone (n = 8)	< 0.0001
		LYD (n = 8)	vs LYD + peptone (n = 8)	0.5417
15E	ANOVA HSD	HYD (n = 8)	vs LYD (n = 10)	< 0.0001
		HYD (n = 8)	vs LYD + VMCO (n = 10)	< 0.0001
		HYD (n = 8)	vs LYD + VMCO + 1 x AAs (n = 10)	< 0.0001
		LYD (n = 10)	vs LYD + VMCO (n = 10)	< 0.0001
		LYD (n = 10)	vs LYD + VMCO + 1 x AAs (n = 10)	0.0002
		LYD + VMCO (n = 10)	vs LYD + VMCO + 1 x AAs (n = 10)	0.8551
16G	Steel		vs HYD (n = 10)	0.0003
			vs LYD + VMCO (n = 10)	0.0066
		LYD (n = 10)	vs LYD + MCO (n = 10)	0.9843
			vs LYD + VCO (n = 10)	0.0792
			vs LYD + VMO (n = 10)	0.5488
16J	Steel		vs HYD (n = 8)	0.0022
		LYD (n = 8)	vs LYD + VMCO (n = 8)	0.0066
			vs LYD + VMC (n = 8)	0.0092
18E	Steel-Dwass	HYD (n = 8)	vs LYD (n = 8)	0.0022
		HYD (n = 8)	vs HYD + sucrose (n = 8)	0.1745
		LYD (n = 8)	vs HYD + sucrose (n = 8)	0.0022

Figure	Test	Comparison (n: exact sample size)	P value
18J	Steel-Dwass	Control HYD (n = 8) vs Control LYD (n = 8)	0.0022
		Control HYD (n = 8) vs <i>rn &gt; dilp8</i> HYD (n = 8)	0.6780
		Control LYD (n = 8) vs <i>rn &gt; dilp8</i> HYD (n = 8)	0.0022
20O	2-way ANOVA	genotype : diet (n = 6)	0.4450
20P	2-way ANOVA	genotype : diet (n = 6)	0.6660
20Q	2-way ANOVA	genotype : diet (n = 6)	0.4010
20R	2-way ANOVA	genotype : diet (n = 6)	0.4210
21I	2-way ANOVA	genotype : diet (n = 6)	0.0006
21J	2-way ANOVA	genotype : diet (n = 6)	0.0010
22B	2-way ANOVA	genotype : diet (n = 8)	0.1040
22D	2-way ANOVA	genotype : diet (n = 8)	< 0.0001
22F	2-way ANOVA	genotype : diet (n = 8)	0.0002
23G	Steel-Dwass	Control HYD (n = 28) vs <i>v2902 ppk &gt; Akt RNAi</i> HYD (n = 32)	0.0108
		Control HYD (n = 28) vs <i>BL33615 ppk &gt; Akt RNAi</i> HYD (n = 35)	< 0.0001
		<i>v2902 ppk &gt; Akt RNAi</i> HYD (n = 32) vs <i>BL33615 ppk &gt; Akt RNAi</i> HYD (n = 35)	0.0055
23H	Steel-Dwass	Control LYD (n = 26) vs <i>v2902 ppk &gt; Akt RNAi</i> LYD (n = 37)	0.0010
		Control LYD (n = 26) vs <i>BL33615 ppk &gt; Akt RNAi</i> LYD (n = 26)	< 0.0001
		<i>v2902 ppk &gt; Akt RNAi</i> LYD (n = 37) vs <i>BL33615 ppk &gt; Akt RNAi</i> LYD (n = 26)	0.0050
24O	2-way ANOVA	genotype : diet (n = 6)	0.0014
24P	2-way ANOVA	genotype : diet (n = 6)	0.0001
24Q	2-way ANOVA	genotype : diet (n = 6)	0.0124
24R	2-way ANOVA	genotype : diet (n = 6)	0.3870
26F	2-way ANOVA	genotype : diet (n = 8)	< 0.0001
26L	2-way ANOVA	genotype : diet (n = 8)	< 0.0001
27F	2-way ANOVA	genotype : diet (n = 6)	0.9060
27L	2-way ANOVA	genotype : diet (n = 6-7)	0.0341
28F	2-way ANOVA	genotype : diet (n = 6)	< 0.0001
28N	2-way ANOVA	genotype : diet (n = 6)	0.8410
28P	2-way ANOVA	genotype : diet (n = 6)	0.4610

Figure	Test	Comparison (n: exact sample size)	P value
31F	2-way ANOVA	genotype : diet (n = 6)	< 0.0001
31L	2-way ANOVA	genotype : diet (Control HYD: n = 4, Control LYD, <i>mef2</i> > <i>wg RNAi</i> HYD, <i>mef2</i> > <i>wg RNAi</i> LYD: n = 6)	0.0022
32F	2-way ANOVA	genotype : diet (n = 6)	0.6755
33F	2-way ANOVA	genotype : diet (n = 8)	< 0.0001
34F	Mann-Whitney	<i>Mhc</i> > <i>y w</i> HYD (n = 8) vs <i>Mhc</i> > <i>wg</i> HYD (n = 10)	0.0267
		<i>Mhc</i> > <i>y w</i> LYD (n = 8) vs <i>Mhc</i> > <i>wg</i> LYD (n = 10)	0.0267
35F	Mann-Whitney	<i>Mhc</i> > <i>y w</i> HYD (n = 13) vs <i>Mhc</i> > <i>wg RNAi</i> HYD (n = 13)	0.1014
		<i>Mhc</i> > <i>y w</i> LYD (n = 18) vs <i>Mhc</i> > <i>wg RNAi</i> LYD (n = 19)	< 0.0001
36D	Mann-Whitney	HYD (n = 13) vs LYD (n = 15)	0.0367
37D	Steel-Dwass	HYD (n = 18) vs LYD + VMC (n = 22)	0.3064
		LYD (n = 23) vs LYD + VMC (n = 22)	0.0046
		HYD (n = 13) vs LYD (n = 15)	0.0367
39E	Mann-Whitney	<i>ppk</i> > <i>y w</i> HYD (n = 25) vs <i>ppk</i> > <i>y w</i> LYD (n = 28)	0.0238
		<i>ppk</i> > <i>Ror RNAi</i> LYD (n = 22) vs <i>ppk</i> > <i>Ror RNAi</i> LYD (n = 23)	0.0019
39J	Mann-Whitney	<i>Mhc</i> > <i>y w</i> HYD (n = 17) vs <i>Mhc</i> > <i>y w</i> LYD (n = 18)	0.0487
		<i>Mhc</i> > <i>wg</i> HYD (n = 12) vs <i>Mhc</i> > <i>wg</i> LYD (n = 12)	1.0000
40I	2-way ANOVA	genotype : diet (n = 8)	0.0092
40J	2-way ANOVA	genotype : diet (n = 8)	< 0.0001
40P	2-way ANOVA	genotype : diet (n = 8)	0.0021
42U	2-way ANOVA	genotype : diet (n = 8)	< 0.0001
42V	2-way ANOVA	genotype : diet (n = 8)	< 0.0001
42W	2-way ANOVA	genotype : diet (n = 8)	0.0922
42X	2-way ANOVA	genotype : diet (n = 8)	0.1219
42Z	2-way ANOVA	genotype : diet (n = 8)	0.2716
42Y	2-way ANOVA	genotype : diet (n = 8)	0.0249
43N	Steel-Dwass	<i>Control</i> HYD (n = 8) vs <i>Ror KD</i> HYD (n = 8)	0.9996
		<i>Control</i> HYD (n = 8) vs <i>myrAkt</i> HYD (n = 8)	0.0088
		<i>Control</i> HYD (n = 8) vs <i>Ror KD, myrAkt</i> HYD (n = 8)	0.0321
		<i>Ror KD</i> HYD (n = 8) vs <i>myrAkt</i> HYD (n = 8)	0.0088
		<i>Ror KD</i> HYD (n = 9) vs <i>Ror KD, myrAkt</i> HYD (n = 8)	0.0321
		<i>myrAkt</i> HYD (n = 8) vs <i>Ror KD, myrAkt</i> HYD (n = 8)	0.9224

Figure	Test	Comparison (n: exact sample size)		P value	
43O	Steel-Dwass	<i>Control</i> LYD (n = 8)	vs	<i>Ror KD</i> LYD (n = 8)	0.0043
		<i>Control</i> LYD (n = 8)	vs	<i>myrAkt</i> LYD (n = 8)	0.6551
		<i>Control</i> LYD (n = 8)	vs	<i>Ror KD, myrAkt</i> LYD (n = 8)	0.9892
		<i>Ror KD</i> LYD (n = 8)	vs	<i>myrAkt</i> LYD (n = 8)	0.0173
		<i>Ror KD</i> LYD (n = 9)	vs	<i>Ror KD, myrAkt</i> LYD (n = 8)	0.0062
		<i>myrAkt</i> LYD (n = 8)	vs	<i>Ror KD, myrAkt</i> LYD (n = 8)	0.2321
45G	Mann-Whitney	HYD (n = 16)	vs	LYD (n = 17)	0.7898
46C	t-test	HYD (n = 11)	vs	LYD (n = 8)	0.0049
46F	Mann-Whitney	HYD (n = 14)	vs	LYD (n = 16)	0.0383
49F	t-test	HYD (n = 27)	vs	LYD (n = 20)	0.0011
50F	Mann-Whitney	<i>Mhc &gt; y w</i> HYD (n = 20)	vs	<i>Mhc &gt; Stat92E RNAi</i> HYD (n = 22)	0.0038
		<i>Mhc &gt; y w</i> LYD (n = 17)	vs	<i>Mhc &gt; Stat92E RNAi</i> LYD (n = 18)	0.8069
51L	Mann-Whitney	<i>Mhc &gt; y w</i> HYD (n = 8)	vs	<i>Mhc &gt; Stat92E RNAi</i> HYD (n = 9)	0.0464
		<i>Mhc &gt; y w</i> LYD (n = 8)	vs	<i>Mhc &gt; Stat92E RNAi</i> LYD (n = 9)	0.4807
51M	Mann-Whitney	<i>Mhc &gt; y w</i> HYD (n = 8)	vs	BL31318 <i>Mhc &gt; Stat92E RNAi</i> HYD (n = 8)	0.0148
		<i>Mhc &gt; y w</i> LYD (n = 8)	vs	BL31318 <i>Mhc &gt; Stat92E RNAi</i> LYD (n = 8)	0.1949
51N	Mann-Whitney	<i>Cg &gt; y w</i> HYD (n = 8)	vs	<i>Mhc &gt; hop RNAi</i> HYD (n = 8)	0.0047
		<i>Cg &gt; y w</i> LYD (n = 8)	vs	<i>Mhc &gt; hop RNAi</i> LYD (n = 8)	0.2786
52F	2-way ANOVA	genotype : diet (n = 8)			< 0.0001
53I	Mann-Whitney	<i>Cg &gt; y w</i> HYD (n = 8)	vs	<i>Cg &gt; upd2 RNAi</i> HYD (n = 8) <i>5988R-1</i>	0.0003
		<i>Cg &gt; y w</i> LYD (n = 8)	vs	<i>Cg &gt; upd2 RNAi</i> LYD (n = 8) <i>5988R-1</i>	0.0070
53J	Mann-Whitney	<i>Cg &gt; y w</i> HYD (n = 8)	vs	BL33949 <i>Cg &gt; upd2 RNAi</i> HYD (n = 8)	0.0002
		<i>Cg &gt; y w</i> LYD (n = 8)	vs	BL33949 <i>Cg &gt; upd2 RNAi</i> LYD (n = 8)	0.2786
54O	Mann-Whitney	<i>Cg &gt; y w</i> HYD (n = 8)	vs	BL33680 <i>Cg &gt; upd RNAi</i> HYD (n = 8)	0.5054
		<i>Cg &gt; y w</i> LYD (n = 8)	vs	BL33680 <i>Cg &gt; upd RNAi</i> LYD (n = 8)	0.0379

Figure	Test	Comparison (n: exact sample size)	P value
54P	Mann-Whitney	<i>Cg</i> > <i>y w</i> HYD (n = 8) vs v3282 <i>Cg</i> > <i>upd RNAi</i> HYD (n = 8)	0.6454
		<i>Cg</i> > <i>y w</i> LYD (n = 8) vs v3282 <i>Cg</i> > <i>upd RNAi</i> LYD (n = 8)	0.1605
54Q	Mann-Whitney	<i>Cg</i> > <i>y w</i> HYD (n = 8) vs BL32859 <i>Cg</i> > <i>upd3 RNAi</i> HYD (n = 8)	0.1304
		<i>Cg</i> > <i>y w</i> LYD (n = 8) vs BL32859 <i>Cg</i> > <i>upd3 RNAi</i> LYD (n = 8)	0.1304
54R	Mann-Whitney	<i>Cg</i> > <i>y w</i> HYD (n = 8) vs BL28575 <i>Cg</i> > <i>upd3 RNAi</i> HYD (n = 8)	0.0650
		<i>Cg</i> > <i>y w</i> LYD (n = 8) vs BL28575 <i>Cg</i> > <i>upd3 RNAi</i> LYD (n = 8)	0.0830
55L	Mann-Whitney	<i>Mhc</i> > <i>y w</i> HYD (n = 8) vs v106071 <i>Mhc</i> > <i>dome RNAi</i> HYD (n = 8)	0.0499
		<i>Mhc</i> > <i>y w</i> LYD (n = 8) vs v106071 <i>Mhc</i> > <i>dome RNAi</i> LYD (n = 8)	0.1949
55M	Mann-Whitney	<i>Mhc</i> > <i>y w</i> HYD (n = 8) vs BL32860 <i>Mhc</i> > <i>dome RNAi</i> HYD (n = 8)	0.8785
		<i>Mhc</i> > <i>y w</i> LYD (n = 8) vs BL32860 <i>Mhc</i> > <i>dome RNAi</i> LYD (n = 8)	0.1049
55N	Mann-Whitney	<i>Mhc</i> > <i>y w</i> HYD (n = 8) vs BL34618 <i>Mhc</i> > <i>dome RNAi</i> HYD (n = 8)	0.6454
		<i>Mhc</i> > <i>y w</i> LYD (n = 8) vs BL34618 <i>Mhc</i> > <i>dome RNAi</i> LYD (n = 8)	0.9591
56D	Steel-Dwass	HYD (n = 29) vs LYD (n = 21)	0.1766
		HYD (n = 29) vs LYD + VMC (n = 26)	0.0459
		LYD (n = 21) vs LYD + VMC (n = 26)	0.8432
58D	Mann-Whitney	Control HYD (n = 15) vs Control LYD (n = 15)	0.0019
58E	Mann-Whitney	Control HYD (n = 15) vs Control LYD (n = 15)	0.0240
58F	Mann-Whitney	Control HYD (n = 15) vs Control LYD (n = 15)	0.0003
58G	Mann-Whitney	Control HYD (n = 15) vs Control LYD (n = 15)	< 0.0001
59A	Mann-Whitney	Control HYD (n = 12) vs Control LYD (n = 12)	0.0020
		<i>ppk</i> > <i>Ror RNAi</i> HYD (n = 12) vs <i>ppk</i> > <i>Ror RNAi</i> LYD (n = 12)	0.1223
59A	Mann-Whitney	Control HYD (n = 16) vs Control LYD (n = 16)	0.0462
		<i>ppk</i> > <i>Ror RNAi</i> HYD (n = 16) vs <i>ppk</i> > <i>Ror RNAi</i> LYD (n = 16)	0.9816



## 引用文献

- Agrawal N, Delanoue R, Mauri A, Basco D, Pasco M, Thorens B, Léopold P. 2016. The *Drosophila* TNF Eiger Is an Adipokine that Acts on Insulin-Producing Cells to Mediate Nutrient Response. *Cell Metab* **23**:675–684. doi:10.1016/j.cmet.2016.03.003
- Bach EA, Ekas LA, Ayala-Camargo A, Flaherty MS, Lee H, Perrimon N, Baeg G-H. 2007. GFP reporters detect the activation of the *Drosophila* JAK/STAT pathway in vivo. *Gene Expression Patterns* **7**:323–331. doi:10.1016/j.modgep.2006.08.003
- Bass TM, Grandison RC, Wong R, Martinez P, Partridge L, Piper MDW. 2007. Optimization of Dietary Restriction Protocols in *Drosophila*. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* **62**:1071–1081. doi:10.1093/gerona/62.10.1071
- Bhutta ZA, Berkley JA, Bandsma RHJ, Kerac M, Trehan I, Briend A. 2017. Severe childhood malnutrition. *Nat Rev Dis Primers* **3**:17067. doi:10.1038/nrdp.2017.67
- Bräcker LB, Siju KP, Varela N, Aso Y, Zhang M, Hein I, Vasconcelos ML, Grunwald Kadow IC. 2013. Essential Role of the Mushroom Body in Context-Dependent CO<sub>2</sub> Avoidance in *Drosophila*. *Current Biology* **23**:1228–1234. doi:10.1016/j.cub.2013.05.029
- Bretscher H, O'Connor MB. 2020. The Role of Muscle in Insect Energy Homeostasis. *Front Physiol* **11**. doi:10.3389/fphys.2020.580687
- Butti R, Das S, Gunasekaran VP, Yadav AS, Kumar D, Kundu GC. 2018. Receptor tyrosine kinases (RTKs) in breast cancer: signaling, therapeutic implications and challenges. *Mol Cancer* **17**:34. doi:10.1186/s12943-018-0797-x
- Chen CM, Struhl G. 1999. Wingless transduction by the Frizzled and Frizzled2 proteins of *Drosophila*. *Development* **126**:5441–52. doi:10.1242/dev.126.23.5441
- Cheng LY, Bailey AP, Leivers SJ, Ragan TJ, Driscoll PC, Gould AP. 2011. Anaplastic Lymphoma Kinase Spares Organ Growth during Nutrient Restriction in *Drosophila*. *Cell* **146**:435–447. doi:10.1016/j.cell.2011.06.040
- Chin MR, Tracey WD. 2017. Nociceptive Circuits: Can't Escape Detection. *Current Biology* **27**:R796–R798. doi:10.1016/j.cub.2017.07.031

Chng WA, Sleiman MSB, Schüpfer F, Lemaitre B. 2014. Transforming Growth Factor  $\beta$ /Activin Signaling Functions as a Sugar-Sensing Feedback Loop to Regulate Digestive Enzyme Expression. *Cell Rep* **9**:336–348. doi:10.1016/j.celrep.2014.08.064

Colombani J, Andersen DS, Léopold P. 2012. Secreted Peptide Dilp8 Coordinates *Drosophila* Tissue Growth with Developmental Timing. *Science (1979)* **336**:582–585. doi:10.1126/science.1216689

Delanoue R, Meschi E, Agrawal N, Mauri A, Tsatskis Y, McNeill H, Leopold P. 2016. *Drosophila* insulin release is triggered by adipose Stunted ligand to brain Methuselah receptor. *Science (1979)* **353**:1553–1556. doi:10.1126/science.aaf8430

Dong X, Shen K, Bülow HE. 2015. Intrinsic and Extrinsic Mechanisms of Dendritic Morphogenesis. *Annu Rev Physiol* **77**:271–300. doi:10.1146/annurev-physiol-021014-071746

Droujinine IA, Perrimon N. 2016. Interorgan Communication Pathways in Physiology: Focus on *Drosophila*. *Annu Rev Genet* **50**:539–570. doi:10.1146/annurev-genet-121415-122024

Ekas LA, Baeg GH, Flaherty MS, Ayala-Camargo A, Bach EA. 2006. JAK/STAT signaling promotes regional specification by negatively regulating wingless expression in *Drosophila*. *Development* **133**:4721–4729. doi:10.1242/dev.02675

Emlen DJ. 1997. Diet alters male horn allometry in the beetle *Onthophagus acuminatus* (Coleoptera: Scarabaeidae). *Proc R Soc Lond B Biol Sci* **264**:567–574. doi:10.1098/rspb.1997.0081

Filosa A, Barker AJ, Dal Maschio M, Baier H. 2016. Feeding State Modulates Behavioral Choice and Processing of Prey Stimuli in the Zebrafish Tectum. *Neuron* **90**:596–608. doi:10.1016/j.neuron.2016.03.014

Frenquelli M, Caridi N, Antonini E, Storti F, Viganò V, Gaviraghi M, Occhionorelli M, Bianchessi S, Bongiovanni L, Spinelli A, Marcatti M, Belloni D, Ferrero E, Karki S, Brambilla P, Martinelli-Boneschi F, Colla S, Ponzoni M, DePinho RA, Tonon G. 2020. The WNT receptor ROR2 drives the interaction of multiple myeloma cells with the microenvironment through AKT activation. *Leukemia* **34**:257–270. doi:10.1038/s41375-019-0486-9

González A, Hall MN, Lin S-C, Hardie DG. 2020. AMPK and TOR: The Yin and Yang of Cellular Nutrient Sensing and Growth Control. *Cell Metab* **31**:472–492. doi:10.1016/j.cmet.2020.01.015

Grueber WB, Ye B, Moore AW, Jan LY, Jan YN. 2003. Dendrites of Distinct Classes of Drosophila Sensory Neurons Show Different Capacities for Homotypic Repulsion. *Current Biology* **13**:618–626. doi:10.1016/S0960-9822(03)00207-0

Grueber WB, Ye B, Yang CH, Younger S, Borden K, Jan LY, Jan YN. 2007. Projections of Drosophila multidendritic neurons in the central nervous system: Links with peripheral dendrite morphology. *Development* **134**:55–64. doi:10.1242/dev.02666

Guntur AR, Gu P, Takle K, Chen J, Xiang Y, Yang C-H. 2015. *Drosophila* TRPA1 isoforms detect UV light via photochemical production of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **112**:E5753–E5761. doi:10.1073/pnas.1514862112

Han C, Jan LY, Jan Y-N. 2011. Enhancer-driven membrane markers for analysis of nonautonomous mechanisms reveal neuron-glia interactions in Drosophila. *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**:9673–8. doi:10.1073/pnas.1106386108

Han C, Wang D, Soba P, Zhu S, Lin X, Jan LY, Jan YN. 2012. Integrins Regulate Repulsion-Mediated Dendritic Patterning of Drosophila Sensory Neurons by Restricting Dendrites in a 2D Space. *Neuron* **73**:64–78. doi:10.1016/j.neuron.2011.10.036

Harris RE, Setiawan L, Saul J, Hariharan IK. 2016. Localized epigenetic silencing of a damage-activated WNT enhancer limits regeneration in mature Drosophila imaginal discs. *Elife* **5**. doi:10.7554/eLife.11588

Hattori Y, Usui T, Satoh D, Moriyama S, Shimono K, Itoh T, Shirahige K, Uemura T. 2013. Sensory-neuron subtype-specific transcriptional programs controlling dendrite morphogenesis: Genome-wide analysis of abrupt and knot/collier. *Dev Cell* **27**:530–544. doi:10.1016/j.devcel.2013.10.024

Hoyer N, Zielke P, Hu C, Petersen M, Sauter K, Scharrenberg R, Peng Y, Kim CC, Han C, Parrish JZ, Soba P. 2018. Ret and Substrate-Derived TGF- $\beta$  Maverick Regulate Space-Filling Dendrite Growth in Drosophila Sensory Neurons. *Cell Rep* **24**:2261–2272.e5. doi:10.1016/j.celrep.2018.07.092

- Huang DW, Sherman BT, Lempicki RA. 2009. Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources. *Nat Protoc* **4**:44–57. doi:10.1038/nprot.2008.211
- Hughes CL, Thomas JB. 2007. A sensory feedback circuit coordinates muscle activity in *Drosophila*. *Molecular and Cellular Neuroscience* **35**:383–396. doi:10.1016/j.mcn.2007.04.001
- Hwang RY, Zhong L, Xu Y, Johnson T, Zhang F, Deisseroth K, Tracey WD. 2007a. Nociceptive Neurons Protect *Drosophila* Larvae from Parasitoid Wasps. *Current Biology* **17**:2105–2116. doi:10.1016/j.cub.2007.11.029
- Hwang RY, Zhong L, Xu Y, Johnson T, Zhang F, Deisseroth K, Tracey WD. 2007b. Nociceptive Neurons Protect *Drosophila* Larvae from Parasitoid Wasps. *Current Biology* **17**:2105–2116. doi:10.1016/j.cub.2007.11.029
- Im SH, Galko MJ. 2012. Pokes, sunburn, and hot sauce: *Drosophila* as an emerging model for the biology of nociception. *Developmental Dynamics* **241**:16–26. doi:10.1002/dvdy.22737
- Imambocus BN, Zhou F, Formozov A, Wittich A, Tenedini FM, Hu C, Sauter K, Macarenhas Varela E, Herédia F, Casimiro AP, Macedo A, Schlegel P, Yang C-H, Miguel-Aliaga I, Wiegert JS, Pankratz MJ, Gontijo AM, Cardona A, Soba P. 2022. A neuropeptidergic circuit gates selective escape behavior of *Drosophila* larvae. *Current Biology* **32**:149-163.e8. doi:10.1016/j.cub.2021.10.069
- Jan Y-N, Jan LY. 2010. Branching out: mechanisms of dendritic arborization. *Nat Rev Neurosci* **11**:316–328. doi:10.1038/nrn2836
- Jaszczak JS, DeVault L, Jan LY, Jan YN. 2022. Steroid hormone signaling activates thermal nociception during *Drosophila* peripheral nervous system development. *Elife* **11**. doi:10.7554/eLife.76464
- Jayakumar S, Hasan G. 2018. Neuronal Calcium Signaling in Metabolic Regulation and Adaptation to Nutrient Stress. *Front Neural Circuits* **12**. doi:10.3389/fncir.2018.00025
- Jayakumar S, Richhariya S, Deb BK, Hasan G. 2018. A Multicomponent Neuronal Response Encodes the Larval Decision to Pupariate upon Amino Acid Starvation. *J Neurosci* **38**:10202–10219. doi:10.1523/JNEUROSCI.1163-18.2018

Jayakumar S, Richhariya S, Reddy OV, Texada MJ, Hasan G. 2016. *Drosophila* larval to pupal switch under nutrient stress requires IP3R/Ca<sup>2+</sup> signalling in glutamatergic interneurons. *Elife* **5**:1–27. doi:10.7554/eLife.17495

Jiang N, Rasmussen JP, Clanton JA, Rosenberg MF, Luedke KP, Cronan MR, Parker ED, Kim H-J, Vaughan JC, Sagasti A, Parrish JZ. 2019. A conserved morphogenetic mechanism for epidermal ensheathment of nociceptive sensory neurites. *Elife* **8**:1–38. doi:10.7554/eLife.42455

Jiang N, Soba P, Parker E, Kim CC, Parrish JZ. 2014. The microRNA *bantam* regulates a developmental transition in epithelial cells that restricts sensory dendrite growth. *Development* **141**:2657–2668. doi:10.1242/dev.107573

Kanaoka Y, Skibbe H, Hayashi Y, Uemura T, Hattori Y. 2019. DeTerm: Software for automatic detection of neuronal dendritic branch terminals via an artificial neural network. *Genes to Cells* **24**:464–472. doi:10.1111/gtc.12700

Kim ME, Shrestha BR, Blazeski R, Mason CA, Grueber WB. 2012. Integrins Establish Dendrite-Substrate Relationships that Promote Dendritic Self-Avoidance and Patterning in *Drosophila* Sensory Neurons. *Neuron* **73**:79–91. doi:10.1016/j.neuron.2011.10.033

Koshikawa S, Giorgianni MW, Vaccaro K, Kassner VA, Yoder JH, Werner T, Carroll SB. 2015. Gain of *cis*-regulatory activities underlies novel domains of *wingless* gene expression in *Drosophila*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **112**:7524–7529. doi:10.1073/pnas.1509022112

Lee J-H, Bassel-Duby R, Olson EN. 2014. Heart- and muscle-derived signaling system dependent on MED13 and Wingless controls obesity in *Drosophila*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **111**:9491–9496. doi:10.1073/pnas.1409427111

Lin W-Y, Williams C, Yan C, Koledachkina T, Luedke K, Dalton J, Bloomsburg S, Morrison N, Duncan KE, Kim CC, Parrish JZ. 2015. The SLC36 transporter Pathetic is required for extreme dendrite growth in *Drosophila* sensory neurons. *Genes Dev* **29**:1120–1135. doi:10.1101/gad.259119.115

Liu GY, Sabatini DM. 2020. mTOR at the nexus of nutrition, growth, ageing and disease. *Nat Rev Mol Cell Biol* **21**:183–203. doi:10.1038/s41580-019-0199-y

Liu Q, Tabuchi M, Liu S, Kodama L, Horiuchi W, Daniels J, Chiu L, Baldoni D, Wu MN. 2017. Branch-specific plasticity of a bifunctional dopamine circuit encodes protein hunger. *Science (1979)* **356**:534–539. doi:10.1126/science.aal3245

Liu Y, Yang H, Chen T, Luo Y, Xu Z, Li Y, Yang J. 2015. Silencing of receptor tyrosine kinase ROR1 inhibits tumor-cell proliferation via PI3K/AKT/mTOR signaling pathway in lung adenocarcinoma. *PLoS One* **10**. doi:10.1371/journal.pone.0127092

Matsubara D, Horiuchi SY, Shimono K, Usui T, Uemura T. 2011. The seven-pass transmembrane cadherin Flamingo controls dendritic self-avoidance via its binding to a LIM domain protein, Espinas, in *Drosophila* sensory neurons. *Genes Dev* **25**:1982–1996. doi:10.1101/gad.16531611

McKeown CR, Cline HT. 2019. Nutrient restriction causes reversible G2 arrest in *Xenopus* neural progenitors. *Development* **146**. doi:10.1242/dev.178871

McKeown CR, Thompson CK, Cline HT. 2016. Reversible developmental stasis in response to nutrient availability in the *Xenopus laevis* CNS. *Journal of Experimental Biology* **220**:358–368. doi:10.1242/jeb.151043

Meltzer S, Bagley JA, Perez GL, O'Brien CE, DeVault L, Guo Y, Jan LY, Jan YN. 2017. Phospholipid Homeostasis Regulates Dendrite Morphogenesis in *Drosophila* Sensory Neurons. *Cell Rep* **21**:859–866. doi:10.1016/j.celrep.2017.09.089

Meltzer S, Yadav S, Lee J, Soba P, Younger SH, Jin P, Zhang W, Parrish J, Jan LY, Jan YN. 2016. Epidermis-Derived Semaphorin Promotes Dendrite Self-Avoidance by Regulating Dendrite-Substrate Adhesion in *Drosophila* Sensory Neurons. *Neuron* **89**:741–755. doi:10.1016/j.neuron.2016.01.020

Morton GJ, Meek TH, Schwartz MW. 2014. Neurobiology of food intake in health and disease. *Nat Rev Neurosci* **15**:367–378. doi:10.1038/nrn3745

Nye DMR, Albertson RM, Weiner AT, Ian Hertzler J, Shorey M, Goberdhan DCI, Wilson C, Janes KA, Rolls MM. 2020. The receptor tyrosine kinase Ror is required for dendrite regeneration in *Drosophila* neurons. *PLoS Biol* **18**. doi:10.1371/journal.pbio.3000657

Okamoto N, Nishimura T. 2015. Signaling from Glia and Cholinergic Neurons Controls Nutrient-Dependent Production of an Insulin-like Peptide for *Drosophila* Body Growth. *Dev Cell* **35**:295–310. doi:10.1016/j.devcel.2015.10.003

Onodera K, Baba S, Murakami A, Uemura T, Usui T. 2017. Small conductance Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channels induce the firing pause periods during the activation of *drosophila* nociceptive neurons. *Elife* **6**:1–17. doi:10.7554/eLife.29754.001

Padilla SL, Qiu J, Soden ME, Sanz E, Nestor CC, Barker FD, Quintana A, Zweifel LS, Rønnekleiv OK, Kelly MJ, Palmiter RD. 2016. Agouti-related peptide neural circuits mediate adaptive behaviors in the starved state. *Nat Neurosci* **19**:734–741. doi:10.1038/nn.4274

Palanker Musselman L, Fink JL, Narzinski K, Ramachandran PV, Sukumar Hathiramani S, Cagan RL, Baranski TJ. 2011. A high-sugar diet produces obesity and insulin resistance in wild-type *Drosophila*. *Dis Model Mech* **4**:842–849. doi:10.1242/dmm.007948

Parrish JZ, Xu P, Kim CC, Jan LY, Jan YN. 2009. The microRNA bantam Functions in Epithelial Cells to Regulate Scaling Growth of Dendrite Arbors in *Drosophila* Sensory Neurons. *Neuron* **63**:788–802. doi:10.1016/j.neuron.2009.08.006

Piper MDW, Blanc E, Leitão-Gonçalves R, Yang M, He X, Linford NJ, Hoddinott MP, Hopfen C, Soultoukis GA, Niemeyer C, Kerr F, Pletcher SD, Ribeiro C, Partridge L. 2014. A holidic medium for *Drosophila melanogaster*. *Nat Methods* **11**:100–105. doi:10.1038/nmeth.2731

Piper MDW, Soultoukis GA, Blanc E, Mesaros A, Herbert SL, Juricic P, He X, Atanassov I, Salmonowicz H, Yang M, Simpson SJ, Ribeiro C, Partridge L. 2017. Matching Dietary Amino Acid Balance to the In Silico-Translated Exome Optimizes Growth and Reproduction without Cost to Lifespan. *Cell Metab* **25**:610–621. doi:10.1016/j.cmet.2017.02.005

Poe AR, Tang L, Wang B, Li Y, Sapar ML, Han C. 2017. Dendritic space-filling requires a neuronal type-specific extracellular permissive signal in *Drosophila*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **114**:E8062–E8071. doi:10.1073/pnas.1707467114

Poe AR, Xu Y, Zhang C, Lei J, Li K, Labib D, Han C. 2020. Low FoxO expression in *drosophila* somatosensory neurons protects dendrite growth under nutrient restriction. *Elife* **9**:1–47. doi:10.7554/eLife.53351

Prado EL, Dewey KG. 2014. Nutrition and brain development in early life. *Nutr Rev* **72**:267–284. doi:10.1111/nure.12102

Rajan A, Perrimon N. 2012. *Drosophila* cytokine unpaired 2 regulates physiological homeostasis by remotely controlling insulin secretion. *Cell* **151**:123–137. doi:10.1016/j.cell.2012.08.019

Rincel M, Lépinay AL, Janthakhin Y, Soudain G, Yvon S, da Silva S, Joffre C, Aubert A, Séré A, Layé S, Theodorou V, Ferreira G, Darnaudéry M. 2018. Maternal high-fat diet and early life stress differentially modulate spine density and dendritic morphology in the medial prefrontal cortex of juvenile and adult rats. *Brain Struct Funct* **223**:883–895. doi:10.1007/s00429-017-1526-8

Ripp C, Loth J, Petrova I, Linnemannstöns K, Uleplic M, Fradkin L, Noordermeer J, Wodarz A. 2018. *Drosophila* Ror is a nervous system-specific co-receptor for Wnt ligands. *Biol Open* **7**. doi:10.1242/bio.033001

Schuster CM, Davis GW, Fetter RD, Goodman CS. 1996. Genetic Dissection of Structural and Functional Components of Synaptic Plasticity. I. Fasciclin II Controls Synaptic Stabilization and Growth. *Neuron* **17**:641–654. doi:10.1016/S0896-6273(00)80197-X

Shibata M, Favero DS, Takebayashi R, Takebayashi A, Kawamura A, Rymen B, Hosokawa Y, Sugimoto K. 2022. Trihelix transcription factors GTL1 and DF1 prevent aberrant root hair formation in an excess nutrient condition. *New Phytol* **235**:1426–1441. doi:10.1111/nph.18255

Shim J, Gururaja-Rao S, Banerjee U. 2013. Nutritional regulation of stem and progenitor cells in *Drosophila*. *Development* **140**:4647–4656. doi:10.1242/dev.079087

Shimada-Niwa Y, Niwa R. 2014. Serotonergic neurons respond to nutrients and regulate the timing of steroid hormone biosynthesis in *Drosophila*. *Nat Commun* **5**:5778. doi:10.1038/ncomms6778

Shimono K, Fujishima K, Nomura T, Ohashi M, Usui T, Kengaku M, Toyoda A, Uemura T. 2015. An evolutionarily conserved protein CHORD regulates scaling of dendritic arbors with body size. *Sci Rep* **4**:4415. doi:10.1038/srep04415



- Sopko R, Perrimon N. 2013. Receptor tyrosine kinases in *Drosophila* development. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **5**. doi:10.1101/cshperspect.a009050
- St Pierre SE, Galindo MI, Couso JP, Thor S. 2002. Control of *Drosophila* imaginal disc development by *rotund* and *roughened eye*: differentially expressed transcripts of the same gene encoding functionally distinct zinc finger proteins. *Development* **129**:1273–1281. doi:10.1242/dev.129.5.1273
- Stokes BA, Yadav S, Shokal U, Smith LC, Eleftherianos I. 2015. Bacterial and fungal pattern recognition receptors in homologous innate signaling pathways of insects and mammals. *Front Microbiol* **6**. doi:10.3389/fmicb.2015.00019
- Symmonds M, Emmanuel JJ, Drew ME, Batterham RL, Dolan RJ. 2010. Metabolic State Alters Economic Decision Making under Risk in Humans. *PLoS One* **5**:e11090. doi:10.1371/journal.pone.0011090
- Tenenbaum CM, Misra M, Alizzi RA, Gavis ER. 2017. Enclosure of Dendrites by Epidermal Cells Restricts Branching and Permits Coordinated Development of Spatially Overlapping Sensory Neurons. *Cell Rep* **20**:3043–3056. doi:10.1016/j.celrep.2017.09.001
- Terada S-I, Matsubara D, Onodera K, Matsuzaki M, Uemura T, Usui T. 2016. Neuronal processing of noxious thermal stimuli mediated by dendritic Ca<sup>2+</sup> influx in *Drosophila* somatosensory neurons. *Elife* **5**:1–26. doi:10.7554/eLife.12959
- Texada MJ, Koyama T, Rewitz K. 2020. Regulation of body size and growth control. *Genetics* **216**:269–313. doi:10.1534/genetics.120.303095
- Tracey WD, Wilson RI, Laurent G, Benzer S. 2003. *painless*, a *Drosophila* Gene Essential for Nociception. *Cell* **113**:261–273. doi:10.1016/S0092-8674(03)00272-1
- Tsubouchi A, Caldwell JC, Tracey WD. 2012. Dendritic Filopodia, Ripped Pocket, NOMPC, and NMDARs Contribute to the Sense of Touch in *Drosophila* Larvae. *Current Biology* **22**:2124–2134. doi:10.1016/j.cub.2012.09.019
- Valnegri P, Puram S v., Bonni A. 2015. Regulation of dendrite morphogenesis by extrinsic cues. *Trends Neurosci* **38**:439–447. doi:10.1016/j.tins.2015.05.003

- van Amerongen R, Nusse R. 2009. Towards an integrated view of Wnt signaling in development. *Development* **136**:3205–3214. doi:10.1242/dev.033910
- Wang L, Karpac J, Jasper H. 2014. Promoting longevity by maintaining metabolic and proliferative homeostasis. *Journal of Experimental Biology* **217**:109–118. doi:10.1242/jeb.089920
- Watanabe K, Furumizo Y, Usui T, Hattori Y, Uemura T. 2017. Nutrient-dependent increased dendritic arborization of somatosensory neurons. *Genes to Cells* **22**:105–114. doi:10.1111/gtc.12451
- Watanabe K, Kanaoka Y, Mizutani S, Uchiyama H, Yajima S, Watada M, Uemura T, Hattori Y. 2019. Interspecies Comparative Analyses Reveal Distinct Carbohydrate-Responsive Systems among *Drosophila* Species. *Cell Rep* **28**:2594-2607.e7. doi:10.1016/j.celrep.2019.08.030
- Xiang Y, Yuan Q, Vogt N, Looger LL, Jan LY, Jan YN. 2010. Light-avoidance-mediating photoreceptors tile the *Drosophila* larval body wall. *Nature* **468**:921–926. doi:10.1038/nature09576
- Yamanaka N, Romero NM, Martin FA, Rewitz KF, Sun M, O'Connor MB, Léopold P. 2013. Neuroendocrine Control of *Drosophila* Larval Light Preference. *Science (1979)* **341**:1113–1116. doi:10.1126/science.1241210
- Yan Z, Zhang W, He Y, Gorczyca D, Xiang Y, Cheng LE, Meltzer S, Jan LY, Jan YN. 2013. *Drosophila* NOMPC is a mechanotransduction channel subunit for gentle-touch sensation. *Nature* **493**:221–225. doi:10.1038/nature11685
- Yang H, Kronhamn J, Ekström J, Korkut GG, Hultmark D. 2015. JAK / STAT signaling in *Drosophila* muscles controls the cellular immune response against parasitoid infection. *EMBO Rep* **16**:1664–1672. doi:10.15252/embr.201540277
- Yasunaga K, Kanamori T, Morikawa R, Suzuki E, Emoto K. 2010. Dendrite Reshaping of Adult *Drosophila* Sensory Neurons Requires Matrix Metalloproteinase-Mediated Modification of the Basement Membranes. *Dev Cell* **18**:621–632. doi:10.1016/j.devcel.2010.02.010

Zhong L, Hwang RY, Tracey WD. 2010. Pickpocket Is a DEG/ENaC Protein Required for Mechanical Nociception in *Drosophila* Larvae. *Current Biology* **20**:429–434.  
doi:10.1016/j.cub.2009.12.057

Ziegler AB, Thiele C, Tenedini F, Richard M, Leyendecker P, Hoermann A, Soba P, Tavosanis G. 2017. Cell-Autonomous Control of Neuronal Dendrite Expansion via the Fatty Acid Synthesis Regulator SREBP. *Cell Rep* **21**:3346–3353.  
doi:10.1016/j.celrep.2017.11.069

## 注釈

本研究は、複数の共同研究者とともに行われた。特に、研究の進行や得られた実験結果の解析及び解釈については、服部佑佳子博士と上村匡教授と議論を重ねて方針を吟味した。本論文の実験データの大部分を自らが取得したが、以下の実験には共同研究者が寄与している。図 48, 49B の RNA-seq 解析では、渡辺佳織博士がサンプル調製を行い、服部佑佳子博士がデータ解析を行った。図 58 では、小野寺孝興博士が電気生理実験を行った。また、図 46A, B の C3da neuron の画像は林優作氏が取得した。

## 謝辞

学部の卒業研究生として上村研に加わってからこれまで約7年間、上村匡教授と服部佑佳子助教には、特にお世話になりました。日々の研究では、得たデータについて綿密に議論をした上で、数々の助言をいただきました。また、実験手法やデータ解析だけでなく、文書作成や学会発表の準備など、研究生活で必須のノウハウを熱心にご指導いただきました。お二方から教えていただいたことは、研究に限らず、私がこれからのキャリアを歩んで様々な仕事をする上でも生きていくと思います。心よりお礼申し上げます。また、渡辺佳織博士には、ショウジョウバエの飼育方法から分子生物学的な実験手法に至るまで、数多くの指導をしていただきました。碓井理夫講師や小野寺孝興博士には本研究（特に電気生理学的解析に関わる実験）に関して、多くの協力、助言をしていただき、参考となる文献も教えていただきました。また、他の上村研究室のメンバーの方々にも、ラボミーティングにおいて大変有意義なコメントや助言をいただきました。二股真由美さんには、ショウジョウバエの餌作りをはじめとする実験補助をしていただきました。また、秘書の沖かなえさん、森口良子さん、今井博子さんには事務手続きを補助していただきました。おかげさまで円滑に研究を進めることができました。以上の上村研究室の方々の助けがあってこそ、ここまで研究を続けることができました。本当にありがとうございました。

本研究の遂行にあたってお世話になったの方々にも感謝申し上げます。京都大学大学院生命科学研究科の James A. Hejna 教授と京都大学ヒト生物学高等研究拠点の Spyros Goulas 講師には、根拠論文の英文校正をしていただきました。京都大学大学院生命科学研究科の近藤武史助教と山銅ゆかりさんには、ライブラリ調製などを含めた RNA-seq 解析を行って頂きました。カリフォルニア大学リバーサイド校の山中直岐准教授には Light/dark choice assay の実験方法を丁寧に教えていただきました。また、筑波大学の丹羽隆介教授、島田裕子助教、岡本直樹助教には、ショウジョウバエ幼虫の成長速度を操作する方法を教えていただきました。京都大学大学院生命科学研究科の神戸大朋准教授にも本研究についてご議論いただき、栄養素の知識を

ご教授いただきました。The Pennsylvania State University の Dr. Melissa Rolls、Curie Institute の Dr. Pierre Leopold と佐奈喜裕哉博士、京都大学大学院生命科学研究科の井垣達吏教授、榎本将人助教、井藤喬夫博士、中村麻衣博士、群馬大学の西村隆史教授、秋田大学の山崎正和准教授、金沢大学の佐藤純教授には、ショウジョウバエ系統を分与して頂きました。この他にも、京都工芸繊維大学ショウジョウバエ遺伝資源センター、国立遺伝学研究所、Bloomington Drosophila Stock Center、Vienna Drosophila RNAi Center からショウジョウバエの系統を、Developmental Studies Hybridoma Bank には抗体を供与していただいた他、研究ツールや先行研究の日々の情報収集には、Flybase を活用させていただきました。また、令和2年4月から令和4年3月まで日本学術振興会の特別研究員 DC2 として研究に従事させていただきました。心より感謝申し上げます。

最後に、これまで私の研究生活を温かく見守り、支えてくださった家族や友人に厚くお礼申し上げます。

本学位論文は以下の学術論文の内容に基づいて書かれたものです。

Yasutetsu Kanaoka, Koun Onodera, Kaori Watanabe, Yusaku Hayashi, Tadao Usui, Tadashi Uemura, and Yukako Hattori

Inter-organ Wingless/Ror/Akt signaling regulates nutrient-dependent hyperarborization of somatosensory neurons.

*eLife*, **12**:e79461, 2023. doi:10.7554/eLife.79461

金岡 泰哲