

浸透圧ストレスによるショウジョウバエの眼の色の変化

Changes of Eye Color by Osmotic Stress in *Drosophila*

Abstract

Previous research shows that application of heat shock changed the eye color of *Drosophila* (Wm4) from white to red, and osmotic pressure using high salinity feed expressed the protein to induce white genes, but the colors remained white. In this research, we soaked eggs in a saline solution in order to determine whether the colors would change. We soaked eggs of Wm4 for 30 minutes in the saline solution (0%, 0.7%, 30%). We took pictures of each eye, analyzed the data and created graphs to judge how much the colors had changed. From the results of these experiments, we found no variation in eye color.

1. はじめに

エピジェネティクスとは、後天的に与えられた環境ストレスによるDNAの塩基配列の変化を伴わない遺伝のことだが、詳しいメカニズムは明らかになっていない。先行研究としてWm4という突然変異体のショウジョウバエを用いた実験がある(文献1)。熱ストレスを与えると眼が白から赤へ変化することが分かっており、これはヘテロクロマチン内にあり不活性だったwhite遺伝子(眼を白くしない)がヘテロクロマチンの伸長により発現するからである(図1)。また、高塩分濃度の餌を与えるとも伸長を促す物質は分泌されるものの、眼の色に変化は見られないことが分かっている。

2. 目的

先行研究を踏まえて、卵の状態のWm4を様々な濃度の食塩水につけるとどのような結果になるのか疑問に思い、実験を行うことにした。直接的に浸透圧ストレスを与えると眼の色は変化するのか、するのであれば後代にそのように遺伝するのか明らかにすることを目的とした。本研究ではストレスを与えた最初の世代を0世代目とし、1世代目まで育てた。

3. 実験に使用したショウジョウバエ

本研究では京都工芸繊維大学ショウジョウバエ遺伝資源センターから譲っていただいた、野生型のOregonと逆位の突然変異体のWm4を使用した。逆位の突然変異体は、X染色体上の遺伝子の位置が入れ替わっており、white遺伝子がヘテロクロマチン領域内へ移動している(図1)。そのためwhite遺伝子の発現が抑制されて白眼になっているが、完全な白ではなく赤が混じっている個体も多い。

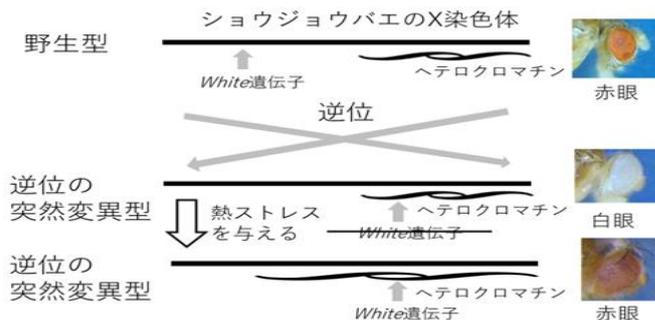


図1 眼の色が変化する原理

4. 飼育環境

餌を入れた飼育用瓶にショウジョウバエを入れ 25℃で飼育した。飼育用瓶は直径約 3 cm で平底のプラスチック製のものを使用し (図 2)、スポンジで栓をした。餌は目的に応じて二種類使用した。作り方は以下の通りである。

(1) 産卵を促進する餌 (60 本分)

- ① トウモロコシ粉 50 g、砂糖 50 g、乾燥酵母 25 g、粉末寒天 5 g を鍋に入れ、均一になるまで混ぜる。
- ② 水 180mL を加え、ダマにならないように混ぜてペースト状にする。
- ③ さらに水 420mL を加えて液状になるまで混ぜる。
- ④ 中火で沸騰するまでかき混ぜる。
- ⑤ 沸騰したら弱火に戻し、10 分間軽く沸騰させる。
- ⑥ プロピオン酸 1.8mL を加えて混ぜる。
- ⑦ 飼育用瓶に入れ一晩放置する。



図 2 餌の入った飼育用瓶

(2) 長期管理用の餌 (1 本分)

- ① 餌粉末 (富士フィルム 和光純薬株式会社製) 1.7 g、乾燥酵母適量を飼育用瓶に入れる。
- ② 滅菌水 5.0mL を加え、膨張させる。

5. 研究方法

ショウジョウバエ (Wm4、Oregon) の卵に浸透圧ストレスを与えてその影響を調べるため、以下の実験を 6 月～1 月にかけて複数回行った。

- ① 寒天培地* (リンゴジュース入り) で 20 時間交配させる (Oregon、Wm4)。容器はプラスチックカップの蓋の中央部を切り抜いてネットを挟んだものを使用し、培地の入ったシャーレに被せた (図 3)。
- ② 卵が産み付けられた培地に食塩水 (0%、0.7%、30%) を入れ、卵を 30 分間浸す。
- ③ 飼育用瓶に移して**、成虫、そして次世代まで育てる。
- ④ 眼の画像を光学実体顕微鏡で撮影し、ImageJ で彩度を測定する***。
- ⑤ Visual Basic for Applications によるプログラム****を使用し、Excel でグラフ化する。



図 3 飼育容器

寒天培地*の作り方 (シャーレ 5 個分)

- ① リンゴジュース (100%) 30mL、蒸留水 60mL、寒天 2.8 g、95%エタノール 2.0mL をフラスコに入れてかき混ぜる。
- ② 電子レンジに入れて沸騰させる。
- ③ シャーレに移して冷まし、4℃で保存する。

卵を飼育用瓶に移動させる方法**

先行研究 (文献 2) では、蒸留水を培地に入れて小筆で卵を浮かし細かい網状のもので取り出す方法がとられていたが、卵が通らない大きさの網は手に入らなかった。また、卵のついた培地を切り取って飼育用瓶に移す方法も試してみたが、カビの生えやすい環境になってしまった。そこで、滅菌水を入れて小筆で卵を浮かしたのち、スポイトで水ごととって、長期管理用の餌を作る際の 5.0mL の滅菌水のかわりに加えたところ、うまくいったためこの手法で実験を行った。

彩度の測定***

光学顕微鏡で眼の色を撮影する際に、照明によって RGB が大きく左右されるため彩度のみを測定することにした。眼の赤い部分は白色、白い部分は赤色として表されている（図 4、5）。彩度は 0～255 であり、本実験の場合 0 に近づくほど眼の色が白、255 に近づくほど赤であることを示す。

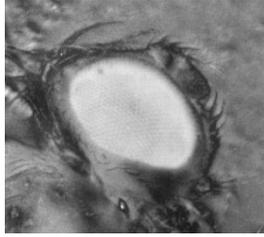


図 4 赤眼の彩度のみ

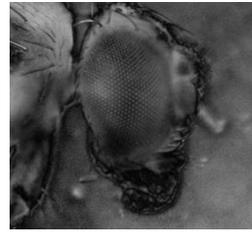


図 5 白眼の彩度のみ

Visual Basic for Applications によるプログラムの作成****

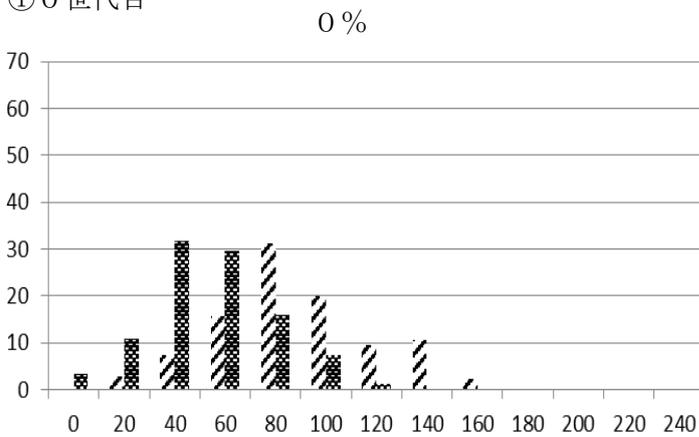
プログラムそのものは量が膨大であるためここには示さない。ImageJ で得られた全個体の彩度の度数分布表を割合に変換し、グラフ化する作業が大幅に効率化された。

6. 実験結果

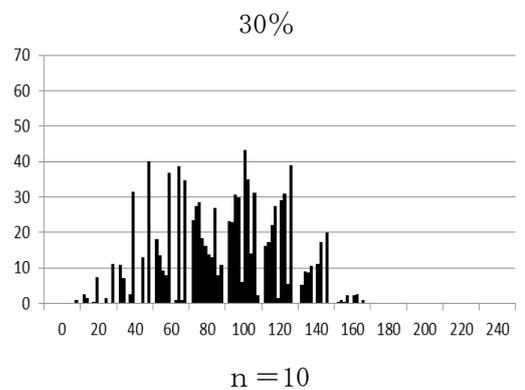
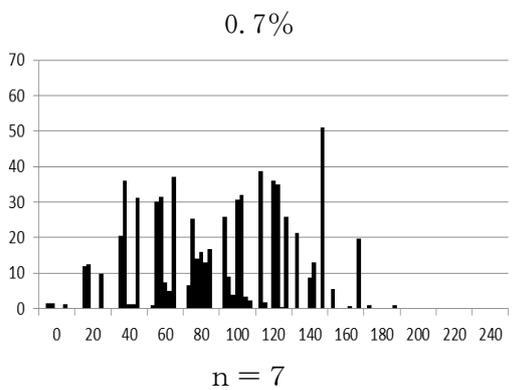
以下のグラフはいずれも横軸が彩度、縦軸が全ピクセル数に対する割合（%）を表している。

(1) Wm4

① 0 世代目

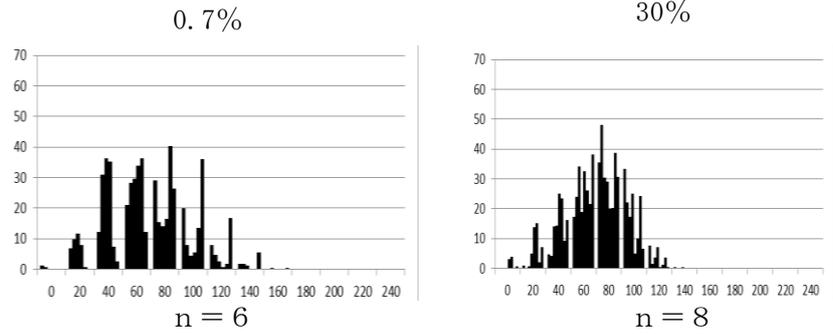


各個体の彩度のグラフを一つにまとめた。左は個体数 n = 2 であり、パターンを分けている。しかし、個体差はわずかであり重要ではないため、以後同じ色で表している。



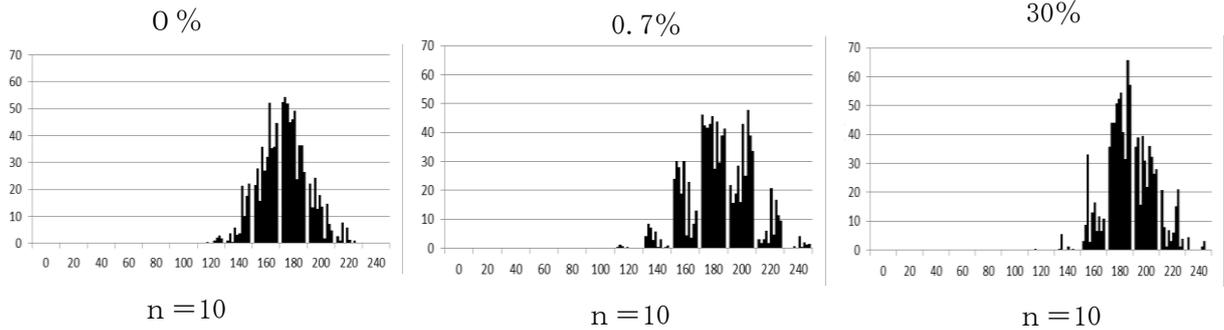
② 1 世代目

0%は0世代目がオス
2匹であったためデータ
なし

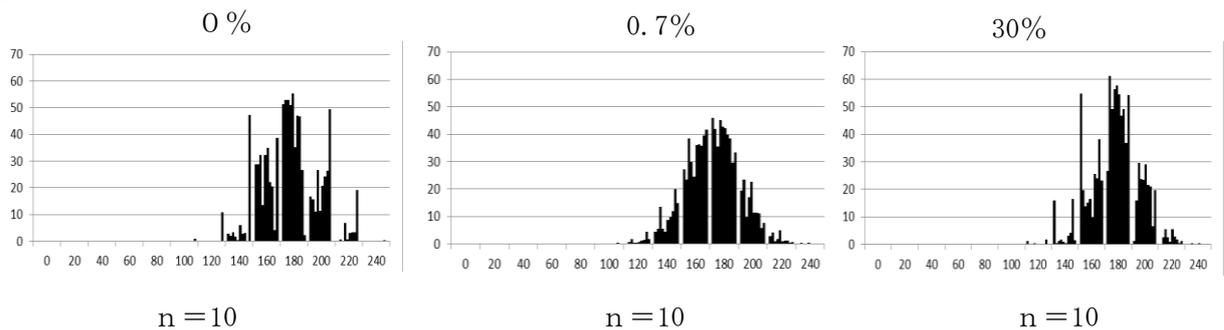


(2) Oregon (コントロール)

① 0 世代目



② 1 世代目



7. 検定と結果

0世代目のWm4の0%、0.7%、30%のグラフに大きな差は見られず、さらに1世代目のグラフでもt検定の結果、P値は $0.999916 > 0.05$ より0.7%と30%に有意差は認められなかった。

8. 考察

本研究では0%、0.7%、30%のみ扱ったが、30%という飽和食塩水でもなお影響が見られなかったため、卵に与えた浸透圧ストレスでショウジョウバエの眼の色は変化しないと言える。しかし、母数が不十分であること、系統が完全に白眼のものではなかったことなどから断定するのは難しい。また、Wm4のグラフは山が二つあり、それらの違いが起こる原因が明確にならないとグラフどうしを比較しづらいため、明確にする必要があると考える。

9. 参考文献

- 1) Ki-Hyeon Seong, Inheritance of stress induced, ATF-2-Dependent Epidemic change, Cell(145), 2011-5(p1049-1061)
- 2) Debabrat Sabat, A Protocol to Generate Germ Free Drosophila for Microbial Interaction Studies, Advanced techniques in Biology & Medicine, 2015, S1