OUKA
The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	Elucidating the role of ecdysteroid in embryogenesis of the branchiopod crustacean Daphnia magna
Author(s)	Adhitama, Nikko
Citation	大阪大学, 2021, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.18910/81914
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

The University of Osaka

Form 3

Abstract of Thesis

Name (Nikko Adhitama)	
Title	Elucidating the role of ecdysteroid in embryogenesis of the branchiopod crustacean *Daphnia magna* (オオミジンコの胚発生におけるエクジステロイドの役割の解析)

The success of arthropods for being the most abundant species in ecosystem is partly owed to their remarkable endocrine system, which facilitate their diverse range of life strategies. Molting hormone ecdysteroid (Ec) is one of arthropod endocrine hormone and known to regulate growth, and development. Functional analysis in model animals such as insect had demonstrated its vital role in postembryonic development. However, our understanding about Ec role in other arthropod species outside insect remains scarce due to lack of suitable model organisms. The branchiopod crustacean *Daphnia magna* is an emerging model organism for Ec study because: 1) its close evolutionary relationship with insect, 2) short life cycle and easily reared, and 3) only crustacean with a sequenced genome with various gene editing method developed. Therefore, this study aimed to elucidate the role of Ec in non-insect arthropod by using *D. magna* embryogenesis as model, and investigate its interaction with another hormone during embryo growth and development.

Firstly, to understand the role of Ec in *Daphnia*, I clarify its biosynthesis pathway during embryogenesis. Here, I focused on *D. magna* ortholog of *Spook* (*Spo*) which is known as rate-limiting enzyme in Ec biosynthesis. Temporal gene expression pattern analysis revealed the fluctuating level of *Spo* transcript throughout embryogenesis: highly expressed during early (0-6 h) embryogenesis, and dropped at shortly after hatch (22-24 h). To determine its role in embryogenesis, siRNA mediated knock down combined with hormonal rescue was perfomed. Depletion of *Spo* transcript resulting in early developmental arrest at the onset of gastrulation (6-8h). Supplementing hormone analog 20-hydroxyecdysone could partially resume the development which indicate that *Spo* may responsible for *de novo* Ec biosynthesis in *D. magna* and subsequently embryogenesis progression.

Fluctuation of *Spo* transcript during embryogenesis suggest the presence of regulatory mechanism. Sesquiterpenoid hormone is known to coordinate Ec action in insect. Thus, I aimed to elucidate possible role of sesquiterpenoid in regulating embryonic Ec biosynthesis in *D. magna*. Here, I focused on *Juvenile hormone acid o-methyltransferase* (*Jhamt*), the rate-limiting genes in sesquiterpenoid biosynthesis. Temporal expression analysis showed that *Jhamt* activated specifically at 24 h time point which coincide with *Spo* expression drop. Silencing *Jhamt* and sesquiterpenoid receptor, *Methoprene tolerant* (*Met*) at this timepoint resulted in de-repression of *Spo* which indicate *Jhamt* via sesquiterpenoid signaling regulates Ec biosynthesis during *D. magna* embryogenesis.

To further understand the role of Ec in embryo, I generated a transgenic *Daphnia* which allow spatio-temporal visualization of Ec. A plasmid containing four tandem repeats of Ecdysone Response Elements (EcREs) followed by *mCherry* gene was stably integrated into *D. magna* genome. The resulted transgenic *Daphnia* could visualize Ec activity via mCherry signal in embryos as early as 12 hours after ovulation (HAO). At 12-24 h, I observed localization of mCherry signal in developing thoracic appendages which migrated from posterior toward anterior section of embryo, which may suggest novel roles of ecdysteroid in embryonic posterior growth regulatory signaling. In addition, when transgenic embryos were exposed to Ec hormone analog, there was enhanced expression of mCherry signal, suggesting this system may also be used as a biosensor for detecting insecticides with ecdysteroidal activity.

Taken all together, I elucidated the role of Ec in *D. magna* embryogenesis. *Spo* is essential for *de novo* Ec biosynthesis. In addition, fluctuation level of *Spo* is necessary for developmental progression. I found this fluctuation is likely to be regulated by of another hormone, sesquiterpenoid. Thus, this finding suggests the cross-talk between two hormones in regulating Ec biosynthesis during embryonic development. Finally, by utilizing genome editing technique, I developed an Ec reporter transgenic *Daphnia*. This transgenic reveals Ec activity in spatio-temporal manner, and add new knowledge about Ec role in embryogenesis. In addition, this transgenic may also contribute to development of biosensor which could be useful to detect presence of Ec hormone analog in aquatic environment. All in all, I anticipate that my findings would contribute to further understanding the evolution and diversity of endocrinology in the ecologically and economically important arthropod species.

様式 7

論文審査の結果の要旨及び担当者

氏　名	（　NIKKO ADHITAMA　）		
		(職)	氏　名
論文審査担当者	主 査	教授	渡邉　肇
	副 査	教授	藤山　和仁
	副 査	教授	福﨑　英一郎
	副 査	教授	内山　進
	副 査	教授	村中　俊哉
	副 査	教授	紀ノ岡　正博
	副 査	教授	大政　健史
	副 査	教授	本田　孝祐
	副 査	教授	永井　健治
	副 査	教授	栗栖　源嗣

論文審査の結果の要旨

本論文は無脊椎動物において重要な機能をになっているエクジステロイドについて、甲殻類でるミジンコの胚発生における機能を解明したもので、5章から構成される。

第 1 章の序論の後、第 2 章ではミジンコにおけるエクジステロイドの役割を理解するために、まず、胚発生におけるエクジステロイドの生合成経路を明らかにしている。ここでは、エクシステロイド生合成の律速酵素として知られる Spook (Spo)の D. magna オルソログに着目し、時間的な遺伝子発現パターンを解析している。また胚発生における Spo の役割を決定するために、siRNA 技術を用いて遺伝子のノックダウンを行っている。 その結果、Spo の減少により発生開始後 6-8 時間で胚発生が停止し、Spo が胚形成に必須であることを示している。さらにこの表現型はヒドロキシエクジゾンを添加することで部分的に回復することを示している。

第 3 章では、エクジステロイドと拮抗して機能することが知られているセスキテルペノイドについて解析を行っている。セスキテルペノイド生合成の律速段階にある Juvenile hormone acid methyltransferase (Jhamt)遺伝子に着目し、機能解析をおこない Jhamt がセスキテルペノイド生合成に関与していることを確認している。また経時発現解析の結果、Jhamt は発生開始後 24 時間で発現が急増することを示し、この時期に Jhamt の発現を抑制するといくつかのエクジステロイド合成関連遺伝子が抑制さることを示し、D. magna の胚発生期において Jhamt/Sesquiterpenoid シグナルがエクジステロイド合成をも制御していることを示唆している。

第 4 章では遺伝子工学的手法を用いてエクシステロイドの活性を時空間的に可視化している。ショウジョウバエ由来のエクシステロイド応答エレメント(ECREs)の 4 つのタンデムリピートと mCherry 赤色蛍光遺伝子を含むプラスミドを、CRISPR(Clustered Regularly Interspaced Palindromic Repeats)/Cas ゲノム編集技術を用いて、ゲノムに安定的に組み込むことに成功している。これは内在性のエクジステロイドに応答するのみならず、胚をアナログに曝露しても蛍光を発したことから、エクシステロイド活性を有する殺虫剤を検出するためのバイオセンサーとしても利用できる可能性が示唆された。

第 5 章では論文を総括し、今後の展望について述べている。

以上のように、本論文は遺伝子工学的手法を用いて、無脊椎動物における発生や成長を制御する重要なホルモンについてのクロストークを明らかにし、バイオセンサーとしての有用性も提示している。

よって本論文は博士論文として価値あるものと認める。