

ショウジョウバエゲノムの遺伝子機能の体系的解明

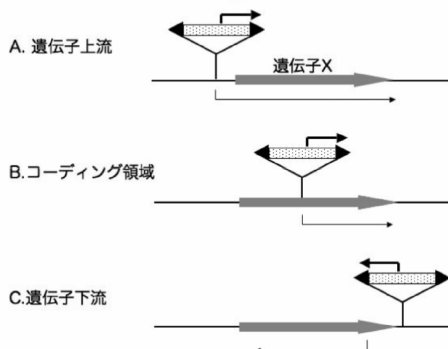
●相垣 敏郎

首都大学東京都市教養学部理工学系生命科学コース

〈研究の目的と進め方〉

本研究がスタートした2000年に、米国のBDGPとCelera社によって進められてきたショウジョウバエの全ゲノム配列の概要が発表された。当初推定された遺伝子総数は13,601個であった（最新版であるRelease4.2では、遺伝子総数は14,715となった）。次に必要なのは、配列から予測された遺伝子の機能情報を取得することである。ゲノム配列が決定されたことにより、表現型から原因遺伝子にたどり着くまでの道のりは、以前に比べると容易なものになったが、この方法で扱えるのは、突然変異体が明瞭な表現型を示すものだけである。ショウジョウバエのゲノムに存在する全遺伝子のうち、機能破壊によって明らかな表現型を示すものは約3分の1に過ぎないと推定されている。その理由として、遺伝子の機能が欠損しても他の遺伝子によって補完されてしまう可能性や、表現型の異常はあっても、それが容易に検出できるものではないことが考えられる。機能的冗長性を含む複雑な生命システムを理解するには、ゲノムの3分の2を占める遺伝子についても、その機能を解析していくアプローチが必要となる。その一つが遺伝子の強制発現による変異体作成である。機能喪失変異にくらべると、強制発現変異体は表現型の異常を引き起こす頻度が高い。細胞死を誘導する遺伝子、器官形成のマスター遺伝子、あるいはストレス耐性遺伝子などは、機能喪失変異よりもむしろ機能獲得変異として検出されやすい。特定の組織や発生段階で発現されるプロモーターに任意の遺伝子をつないで強制発現変異体を作製することもできるが、ショウジョウバエでは、酵母の転写活性化因子GAL4とその標的配列であるUASエンハンサー（Upstream activating sequence）を組み合わせて、遺伝子の強制発現を誘導するバイナリーシステムが確立されている。このシステムでは、任意の遺伝子XをUASの下流につないだものをゲノムに導入した系統を作製し、GAL4タンパク質を発現する系統と交配して、そのF1でGAL4の発現パターンに従って遺伝子Xが強制発現される。特定の組織で発現するGAL4系統を用いれば、強制発現変異体の表現型が表れる組織や発生段階を限定して解析することができる。

図1. ベクター挿入地点と強制発現の効果



研究代表者は、P-エレメントの内部にUASとhsp70由来のコアプロモーターを外向きに挿入したGene Search (GS) ベクターを構築し、強制発現変異体を大規模に作製できるGene Search システムを開発した。GSベクターをショウジョウバエのゲノムに導入した系統を、トランスポゾン転移酵素（トランスポゼース）を発現するジャンプスターター系統に交配すると、ベクターが新たな挿入位置に転移したハエを容易に作製することができる。GSベクター挿入系統をGAL4発現系統に交配して得られるF1個体において、ベクター挿入サイトに隣接するゲノムDNAの強制転写が誘導される。その効果は、ベクター挿入サイトが遺伝子の5'側ならば完全長mRNA、遺伝子内部ならばアンチセンスRNAや部分的mRNA、3'側ならばアンチセンスRNAの転写が起り、それらの産物の生物学的作用が表現型として現れる（図1）。

本研究では、GSシステムを用いて、機能獲得変異体を大規模に作成し、ショウジョウバエゲノムから遺伝子機能情報を体系的に取得することを目的とした。その目的を達成するために、1) 多機能をもつGene Search (GS) ベクターの開発とベクター挿入系統の大規模作製、2) GSベクター挿入サイトのマッピングと挿入特性の解析、3) GSベクター挿入系統の情報データベースの構築、4) GS系統を用いた網羅的な表現型情報の収集と分類、および5) 表現型スクリーニングによって同定した新規遺伝子の機能解析、の5項目について研究を行なう。挿入サイトのマッピング、データベース構築、および表現型のスクリーニングについて、分担者の林と連携して効率よく進める。

〈研究開始時の研究計画〉

1) Gene Searchベクターの開発とベクター挿入系統の大規模作成

一種類のベクターだけを用いると、挿入位置の偏りが生じることが予想されるため、UASエンハンサーとhsp70プロモーターのユニットをPエレメントの両側に組み込んだもの、あるいは片側のみに組み込んだベクターを複数作成する。これらをPエレメント形質転換法によりショウジョウバエゲノムに導入した後、トランスポゼース発現系統と交配してゲノム内の異なる位置に転移させ、系統当たり1個のベクター挿入をもつものを多数作成する（GS系統）。作製の規模は、年あたり約2,000系統、5年間で1万系統作製を目標とする（3年目に2万系統にアップした）。

2) GSベクター挿入サイトのマッピングと挿入特性の解析

大規模に作製したGSベクター挿入系統について、挿入サイトのゲノム配列を決定し、迅速にマッピングする。Pエレメントトランスポゾンの挿入サイトマッピング法としてすでに確立されているinverse-PCR法を用いて行なう。多数の系統を効率よく処理するために、96穴プレートを使ったゲノムDNAの抽出法を最適化する。また、

Inverse-PCRによってえられた配列データから、ベクター配列の削除、BLASTサーチ、それに基づく挿入位置のマッピングまでの過程については、実際に得られる結果を評価しながら最適化する。ベクター挿入サイトのゲノム内分布、遺伝子内領域での分布等を調べ、GSベクターの挿入特性を明らかにする

3) GSベクター挿入系統の情報データベースの構築

各GS系統に挿入されているベクターの種類、ゲノム上の挿入サイト、強制発現が誘導される方向、近傍の遺伝子とその転写方向など、有用な系統情報を整理し、効率よく検索できるデータベースを構築する。特に、これまでにない試みとして、GAL4を交配したときの表現型の情報を収集する。また、研究代表者や分担者以外の研究者がGS系統のスクリーニングを行なった場合に、それらの表現型データをデータベースに登録し、検索できるようにする。

4) GS系統を用いた網羅的な表現型情報の収集と分類

GS系統とGAL4発現系統を交配したときに得られる表現型情報を網羅的に取得するために、いくつかのGAL4系統を用いて、大規模なスクリーニングを行なう。用いるGAL4としては、複眼で強制発現の効果を検出できるey-GAL4、同じく複眼の神経細胞で発現されるGMR-GAL4を用いて、致死、および形態異常をスコアする。全身の神経特異的に発現されるAppl-GAL4を用いて、致死、形態、および行動における異常を調べる。また、全身で温度依存的に発現を制御できるhs-GAL4を用いて、成虫特異的に発現を誘導して、寿命および酸化ストレス感受性を調べる。これらの表現型はテキストで記述するとともに、必要に応じてデジタル画像として保存し、データベースに登録する。

5) 表現型スクリーニングによって同定した新規遺伝子の機能解析

上記のGS系統の表現型を網羅的に収集する一方で、特定の表現型を示した系統に注目し、原因遺伝子の同定と機能の詳細な解析を行なう。注目した表現型は、複眼で強制発現したときに、細胞死を引き起こす効果をもつ遺伝子、寿命を延長する作用をもつ遺伝子、免疫系を活性化する遺伝子、異所的に器官を形成する遺伝子である。それらについて、強制発現の表現型を確認すると共に、機能破壊変異体を作製して、遺伝子本来の機能についても明らかにする。

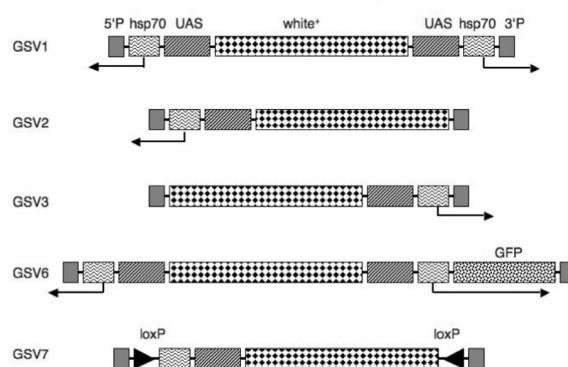
<研究期間の成果>

1) Gene Searchベクターの開発とベクター挿入系統の大規模作成

ショウジョウバエのゲノムに挿入して遺伝子の強制発現を誘導できる複数のGSベクターの開発を行ない(図2)、ベクター挿入系統を樹立した。強制転写の方向はGSV1では両方向、GSV2とGSV3はそれぞれ5' P側、および3' P側の方方向、GSV6はGSV1と同様に両方向に転写しうが、3' P側にあるUASはP末端との間にGFPとSV40ターミネーターが挿入されているため、隣接するゲノムDNAの強制転写がおこるのは5' P側のみである。このGFPはGAL4の発現領域の変化をモニターする発現レポーターとして利用できる。例えば、遺伝子の強制発現によって、発現細胞の増殖、細胞死や運命変更などがおこる場合、そのパターンが変化するため、容易に検出できる。また、分担者の林はGS系統の強制発現によって

致死となる表現型を利用して、その抑制変異体の効率的な分離法を確立した。この方法は、標的遺伝子ノックアウトや下流シグナルの遺伝子における変異体を分離する優れた方法である。抑制変異体はEMSなどの化学変異源をもちいて誘発するが、その際、強制発現が起こっていることをGFPの発現でモニターすることができ。GSV7においては、Cre組換え酵素の標的であるloxPサイトがPエレメント末端配列の内側に導入されており、GSV7挿入系統をCre発現系統と交配すると、そのF1でUASを含む内部配列の反転が起こり、それを系統化することができる。ゲノムへのベクターの挿入方向はベクターの挿入方向は基本的にランダムなので、近傍の遺伝子本来の転写方向と一致しないことが50%の確率でおこる。すなわち、目的の遺伝子近傍にベクターが挿入されていても、転写が逆方向ならば強制発現変異体を作製することができないのである。ゲノムの中には、挿入が極めてまれにしか起こらない多数の遺伝子座が存在する。GSV7ベクターの挿入系統をCre組み換え酵素発現系統に交配して、反転させることにより、強制発現系統として利用できる。従って、このベクター挿入系統は、実質的に2倍の系統数に匹敵する。これらの各種GSベクターを用いて、合計16,000系統を樹立した(成果: 3、7、29、30)。

図2. GSベクターの構造



2) GSベクター挿入サイトのマッピングと挿入特性の解析

ベクター挿入サイトを決定するために、各GS系統からゲノムDNAを抽出し、Inverse-PCR法(図3)、およびLigation-mediated PCR法を改良したベクターPCR法(図4)を用いて、挿入サイトに隣接するゲノム配列を決定した。前者の方法では、ベクター配列と隣接DNAを含むDNA断片を環状化する。このとき、ベクター隣接配列はベクターの内部配列と結合される。PCR増幅したあとシークエンスを行ない、隣接部位の配列を読み取る。しかし、隣接DNA上の制限酵素サイトがP末端に近い場合、環状化したDNAの中で、隣接DNAに続くベクター内部が読まれ、その結果、そこに含まれるwhite遺伝子やhsp70遺伝子に誤ってマップされることがおこる。後者の方法では、環状化する必要がないので、Inverse-PCRでは避けられなかったエラーを解決した。得られた隣接DNAの配列をBLASTサーチにかけて、ゲノムの挿入位置を決定した。マッピングを試みた約16,000系統のうち、約11,000系統について、高い信頼性で挿入位置を決定することができた(成果: 3、7、29、31)。

図3. Inverse-PCRによる挿入サイトの決定

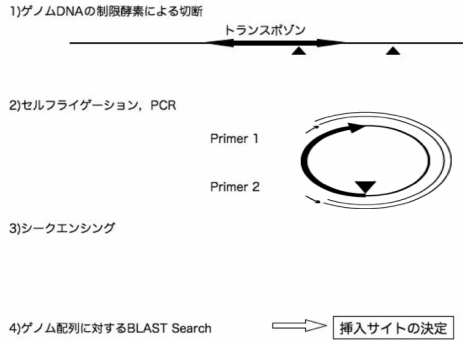
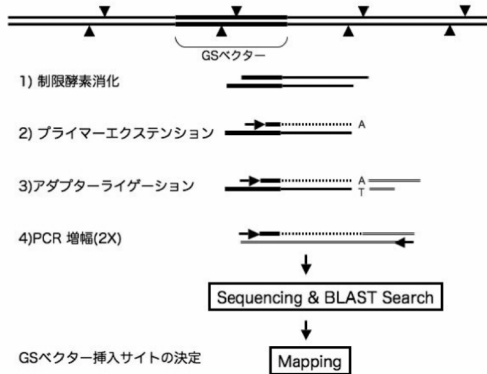


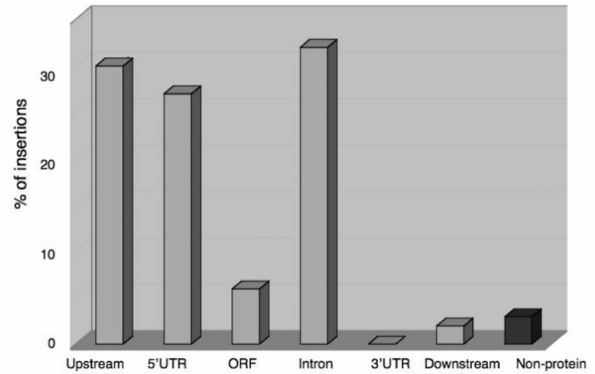
図4. ベクターPCR法による挿入サイトの決定



トランスポゾンの挿入は完全にランダムではなく、高頻度に起こるホットスポットや、逆にほとんど起こらないコールドスポットが存在することが知られている。ショウジョウバエのゲノムはコンパクトにできており、平均的遺伝子密度は高いが、詳細にみると、領域によってかなり異なっている。ベクターの挿入頻度を遺伝子密度と対応させると、比較的良好に対応していた(図5)。ベクターの種類によって挿入サイトの嗜好性はやや異なるが、遺伝子を効率よくヒットする性質があるといえる。個々の遺伝子座に注目すると、挿入頻度が最も高いホットスポットの一つは、転写因子をコードする *lola* 遺伝子座である。この遺伝子は4つの転写開始点をもち、選択的スプライシングにより合計80種類の転写産物を産生する。*lola* 遺伝子座における挿入位置を詳細にみると、複数ある転写開始点の近傍に集中している。ホットスポットに限らず、ベクター挿入頻度は遺伝子の転写開始点近傍において最も高く、転写開始点±200bpの範囲に含まれる挿入が全体の半数を超える(図6)。このことは、完全長の遺伝子産物がGAL4依存的に強制発現される可能性が高いことを意味する。ただし、ベクターの挿入方向はランダムなので、強制転写の方向が遺伝子本来の転写方向と一致しないことも50%の確率でおこる。挿入されたベクターをその場で反転させることができるGS7ベクターはコールドスポットにおいて極めて有効であると考えられる。

一方、遺伝子の両端から500塩基の範囲内に挿入があるものについて、領域ごとの挿入頻度を比較した(図7)。Upstreamと5' UTRを合計すると50%をこえ、イントロンを加えると85%に達する。すなわち、遺伝子の後半部や下流に挿入される頻度は相対的に低いことがわかる。そのメカニズムは不明であるが、おそらくクロマチンの構造のゆるみと関係している可能性が高い。(成果：3、7、15、29、31)。

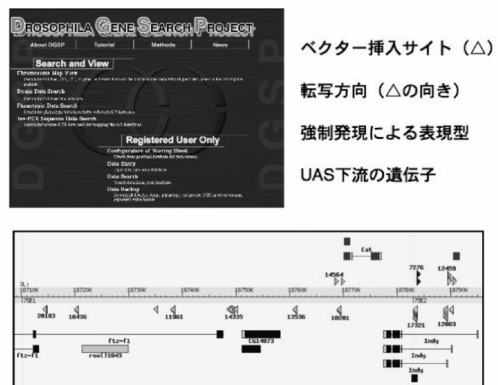
図7. 遺伝子内ベクター挿入頻度



3) GSベクター挿入系統の情報データベースの構築

マッピング情報をはじめとして、個々のGSベクター挿入系統に関する大規模なデータを効率的に抽出、表示、利用するためのデータベースGSDBを構築した(図8)(<http://gsdb.biol.metro-u.ac.jp/%7Edclust/>)。具体的には、マッピングの際に取得したベクター隣接配列、GAL4存在下で強制発現されると予測される遺伝子(センスあるいはアンチセンス)の情報、および後述する表現型情報である。ベクターの種類や、強制発現の方向が一目でわかるように表示し、また周辺の遺伝子の情報について、FlyBaseを参照できるようにしてある。強制発現される遺伝子はベクター挿入サイトに最も近い遺伝子である場合がほとんどであるが、遺伝子の配置が複雑なゲノム領域では、影響を受ける遺伝子をマップ情報だけで推定するのは困難である。個々の遺伝子について本格的な研究に入る場合には、原因候補遺伝子が強制発現されていることをRT-PCRで確認する必要がある。表現型データの入力については、GSシステムを利用している研究者がみずから入力してデータベースを利用できるようにした(成果：3、7、29、31)。

図8. Gene Search系統情報のデータベース

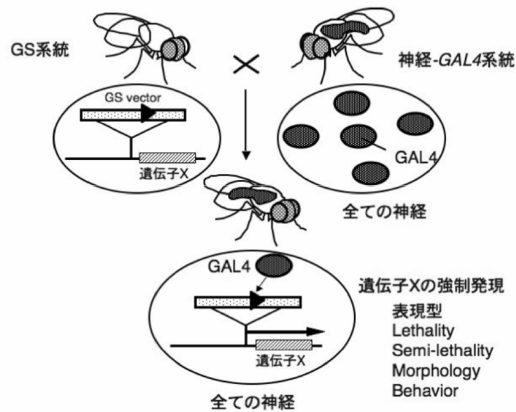


4) GSシステムを用いた網羅的な表現型情報の収集と分類

全身の神経細胞で発現されるAppl-GAL4系統とGS系統との交配によって生まれるF1個体の表現型情報を収集した(図9)。8075系統について調べた結果、致死性(13.8%)、半致死性(4.8%)、幼虫や蛹の形態異常(1.6%)、成虫の形態異常(2.4%)、行動の異常(4.8%)など、多様な表現型を生じた。これらの表現型と既知の遺伝子機能との関連を調べるために、まず挿入サイトの情報から、GAL4によって強制発現される遺伝子の予測を行なった。それらの遺伝子について、FlyBaseでアノテートされた遺伝子機能に対応させ、強制発現による表現型との関連性が見出されるかどうかを検討した。最も単純な基準の一

つとして、遺伝子機能が“Neuron”という遺伝子オントロロジー用語との関連性を検討した。母集団におけるその割合は5.3%であるが、致死となった表現型カテゴリーにはいるものでは12%、半致死となるカテゴリーでは11%であった。このことは、神経機能関連遺伝子の神経系における重要性を暗示しているものと考えられる（成果：4、17、18、25、29）。

図9. 神経特異的強制発現スクリーニング



5) 表現型スクリーニングによって同定した新規遺伝子の機能解析

a) 神経系における強制発現によるNMJ形態制御遺伝子の探索

ショウジョウバエの幼虫の筋神経系は、シナプスの形成および機能のために必要な遺伝子を研究するためのモデルとなる。ショウジョウバエの幼虫の神経において、NSF2の優性機能欠損型(NSF2-DN)を強制発現すると、シナプス伝達に異常が発生する。放出可能なシナプス小胞のプールのサイズが縮小され、シナプス疲労を増大させるとともに、神経筋接合部(NMJ)の劇的な過剰成長を引き起こす(STEWARTら、2002)。シナプス伝達を同様なレベルに低下させるsyntaxinやn-synaptobrevinの変異体では、このようなNMJの過剰成長は見られないことから、シナプス伝達の阻害による二次的な影響ではなく、NSFがNMJの形成に何らかの役割を果たしていることを示唆する。

GS系統を用いた強制発現によって生じる神経筋接合部位シナプス形態の変化に注目してスクリーニングを行った。GS系統を神経特異的にGAL4およびNSF2-DNを発現する系統に交配して、そのF1幼虫のNMJ形態の異常を回復するものを特定した。逆PCRによるGS要素挿入サイトの解析し、挿入部位に隣接するDNAシーケンスとショウジョウバエのゲノム配列との比較から、89系統について近傍に存在する遺伝子を明らかにした。これらの遺伝子機能として予測されているものには、転写調節因子、細胞骨格の要素、ubiquitin経路のコンポーネントおよびいくつかのシグナル分子が含まれていた。神経筋接合部の過剰成長は最終的に細胞骨格に影響を及ぼすことは想像に難くないが、抑制遺伝子として細胞骨格の構成成分や細胞骨格のダイナミクスを制御する可能性のある酵素をコードする遺伝子が多数同定された。構造遺伝子としては、Actin5c、moesin、fimbrin、syntrophin-like2、Myosin結合サブユニット、Ptpmeg、CG3960、CG30337、CG5740である。細胞骨格を制御する可能性のある酵素活性を備えたタンパク質をコードするのは、RhoBTBとRhoGap18B遺伝子の2つである。Actin5cはショウジョウ

ウバエの2つの細胞質のアクチンのうちの1つであり、発生過程をとおして多くの組織で高レベルに発現される。具体的には、精子形成や胚のDorsal closureを含む多くの発生過程に関わることが知られている。神経系では、剛毛数の異常な変異体としても同定されている他、グリア細胞における機能も知られている。Moesinは、アクチンを細胞膜に結合させるアクチン結合蛋白質Ezrin-Radixin-Moesin (ERM)ファミリーのメンバーである。これまで神経におけるショウジョウバエmoesinの役割は報告されていないが、他種の神経系では成長円錐の運動性にかかわっており、最近では、光受容体感桿分子の発生における役割も示されている。これらの遺伝子のシナプス形成における役割を解明するには、今後機能破壊変異体を用いた解析が必要となる。NSF2と相互作用するものを含めて、新規のシナプス形成制御分子の実体が明らかになるものと期待される（成果：25、29、31）。

図10. GSの強制発現によるNMJ形態異常の抑制

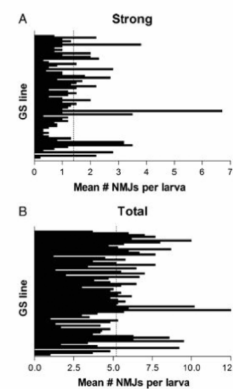
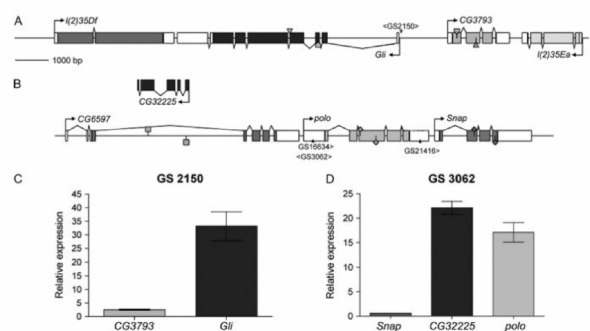


図10には、スクリーニングの際にNSF2-DNの表現型をレスキューする度合いによって2つのグループに分類した。Strong rescueのグループでは、体壁筋におけるNMJの数が劇的に抑えられている。

GSベクターに最も近い下流にある遺伝子が原因遺伝子と考えられる。しかし、スプライシングがおこるばあいもあり、また、特にGSV1ベクターの場合、両方向に強制転写がおこることが期待される。強制発現によってどの程度発現が上昇するのか、調べてみた(図11)。

図11. 定量PCRによる強制転写産物の同定

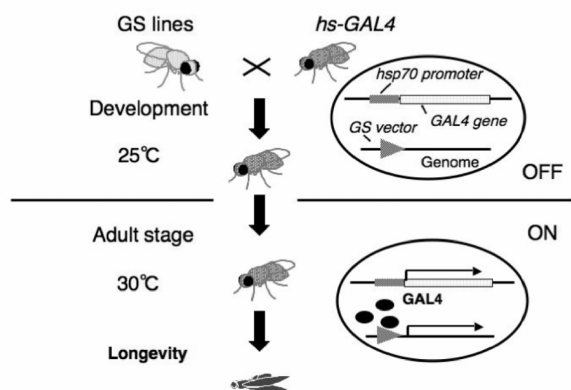


b) 寿命を延長する遺伝子の探索

老化や寿命の形質は長い時間をかけて決定されるため、ある突然変異が発生過程に影響を与えているのか、老化のプロセスそのものに影響を与えているのかを区別することが困難である。特に、発生段階で致死になるものについては、老化の過程でその遺伝子の影響を調べることが不可能である。そこで、GSベクター挿入株を温度感受性変異体として利用した。すなわち、GS系統をhsp70-

GAL4系統（熱ショックプロモーターで制御できるGAL4遺伝子）と交配してF1を作出し、成体になるまでの発生過程は25℃で、成虫期以後は30℃で飼育して、ベクター挿入地点にある遺伝子を強制的に発現させた(図12)。約1,000のGS系統をhsp70-GAL4系統に交配して、F1個体の成虫寿命を30℃において測定したところ、用いたGS系統によって寿命が大きく異なった。

図12. 長寿命遺伝子のスクリーニング



これまで知られている長寿命変異体はパラコート耐性（活性酸素抵抗性）も上昇することが知られている。GS系統による寿命の差違が活性酸素に対する抵抗性と相関するかを調べるために、合計30系統をランダムに抽出してパラコート耐性を調べた。その結果、両者の間に有為な正の順位相関があることが判明した。

変異体の中で、野生型に比べて有意に長寿命を示したものについて、強制転写産物の5'側部分配列をRT-PCR法により決定した。比較的長命であった25系統について調べたところ、7系統では既知遺伝子の配列に、16の挿入系統は18種のESTに合致した（2つの系統では隣接する2種類の異なる遺伝子に由来する産物を生じていた）。このことは、全て機能的な遺伝子座にGSベクターが挿入され、強制発現を引き起こしていることを示した。既知遺伝子7個のうちの6個、EST相同遺伝子18個のうち16個は遺伝子の転写開始点上流にベクターの挿入が起こっており、これらにおいては、完全長の遺伝子産物が過剰発現されていることを示唆した。

7個の既知遺伝子のうち、3個（hsp26、nla、DmGST2）はストレス応答、または酸化還元バランスに関与しているものであった。Hsp26は分子シャペロンとして機能することが知られている。nlaはヒトダウン症候群に関与する染色体領域の配列と類似する遺伝子であり、かつストレス誘導性タンパクであるAdapt78と類似している。また、DmGST2は解毒酵素であり、酸化還元バランスに関与している。その他の遺伝子については、寿命の決定といかなる関連になるのか不明である。ESTに対応する遺伝子で生物学的機能が示唆されているものが6個存在した。そのうちの3個（ほ乳類のTRX、GILT、POSHに相同）はストレス抵抗性、あるいは酸化還元バランスに関与する遺伝子として知られている。これらの結果は、老化や寿命の機構において酸化ストレス抵抗性が重要な要素であることを強く示唆した。

寿命延長効果を示した遺伝子の中で、POSH遺伝子に注目した。POSHタンパクは、N末にRING-finger motifをもち、4つのSH3ドメインをもつユニークな構造をしている。ほ乳類では、培養細胞でPOSHを過剰発現するとJNK/SAPKストレス応答経路を活性化し、細胞死を引き起こすことが報告されている。ショウジョウバエでも、

UAS-POSHを作製して、成虫での強制発現させたときの寿命を測定したところ、GS系統の場合と同様に、野生型に比べて有意に長寿命を示した。一方、興味深いことに、発生過程で過剰発現すると、複眼の形態異常や、翅の極性以上、生殖器の形成異常、あるいは翅脈の欠如を引き起こす。このような表現型はJNK経路の活性化を強く示唆する。そこで、JNKカスケードのターゲットであるpuckardの遺伝子座にlacZレポーターが挿入された系統を用いて、POSHの過剰発現とJNK経路の活性化の関係をしらべた。よさうどおり、POSHを強制発現させた部位で、lacZの活性が検出された。このことは、POSHの強制発現がJNK経路を活性化することを強く示唆した。さらに、JNK経路の変異体であるhep(JNKK)やbsk(JNK)の機能喪失変異体をヘテロで組み合わせると、POSHの過剰発現による形態異常が抑制された。このことは、POSHの過剰発現がJNKを活性化させる作用を持っていることを強く示唆した。ストレス応答経路に関連する遺伝子には他にも見つかってきており、生命機能最適化機構において主要な役割を演じているものと推察される。また、同遺伝子を発生過程で強制発現すると、細胞死を引き起こす。このことは、細胞の増殖や成長が中心となる発生過程と生命機能を維持することが重要な老化の過程とで、同一の遺伝子が違った機能をもつことを意味する。遺伝子が文脈依存的な機能を発揮するのは一般的であり、時期を限定した遺伝子強制発現法の有効性を示唆するものである。その後、他の研究グループによって、JNK経路の適度な活性化が寿命の延長を引き起こすことが報告されている。（成果：1、2、3、7、13、19、29、30、31）。

c) 自然免疫の制御に関わる遺伝子POSH

先にGS系統を用いた寿命のスクリーニングにより同定した遺伝子POSHは、いかなるメカニズムで寿命に影響を与えているのか不明であった。そこで、POSHの本来の機能を解明することを試みた。Pエレメントの挿入系統を再度トランスポゼース発現系統と交配して、挿入部位に隣接するゲノムDNAを欠失する機能破壊変異体を作製した。変異体は、一見正常に発生し、妊性もあり、異常は認められなかったが、細菌の感染に対して感受性が高く短命になることが判明した。大腸菌などのグラム陰性菌をショウジョウバエに注入すると、自然免疫系（Imd経路）が活性化され、Diptericinなどの抗菌ペプチド遺伝子や転写因子Relish（NF- κ B）が活性化と、JNK経路の活性化がおこる。Relishは他の抗菌ペプチドの発現を誘導する。JNK経路の活性化は、傷の修復に関わっていると考えられている。この2つの経路の活性化にかかわるコンポーネントは、脊椎動物のTNF経路に類似しており、進化の観点からも興味深い。POSHの機能破壊変異体は、大腸菌に感染した後の免疫反応が野生型とことなっていた。野生型では一過性の反応であるが、POSH変異体では、一旦活性化されるとその状態が持続する。さらにPOSHの作用機構を解明するために、まず、POSHがユビキチンリカーゼ活性をもち、JNK経路の活性化にかかわるTAK1（JNKKK）に結合して分解する作用をもつことを明らかにした。さらに、培養細胞をつかって、peptideglycan刺激による免疫応答（JNK）の活性化にPOSH発現レベルがどのように影響するかをしらべた。RNAiをつかってPOSHの発現を抑えると、JNKの活性化も減少するが、比較的長く活性化された。一方POSHを過剰発現させた細胞では、JNKの活性化が一過性に高く上昇し、すぐにもとのレベルに戻った。RING-fingerに変異をいれたユビキチンリカーゼ活性を欠く変異体では、

活性化は野生型と同様におこるが、そのあとともにもどるまで時間を要した。これらの結果は、POSHがJNKの活性化と不活性化の両方に関わっていることを示唆する。POSHがTAK1と結合してJNKシグナルをとす一方で、活性化されたTAK1を分解するという複雑な機能を担っているものと考えられる。POSHのRING-ginger変異体もちいて、個体においても、同様なメカニズムが機能していることを確認した（成果：1、2、3、23）。

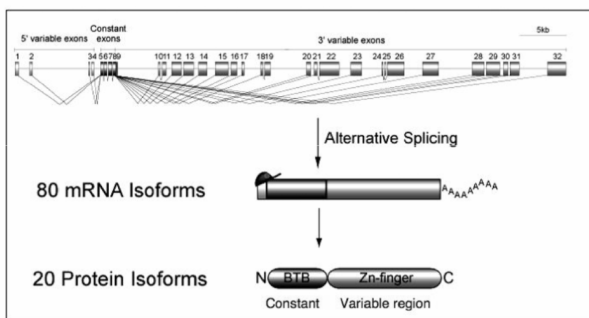
自然免疫に関しては、hs-GAL4とGS系統を交配して、過剰発現スクリーニングによりPGRP-LEを同定した（6）。そして、それが細菌表面抗原に認識する受容体としてはたらくことを明らかにした。また、複眼で発現するGMR-GAL4を使って、複眼の細胞死を引き起こす遺伝子として、TNF α スーパーファミリーEiger（8）、およびSec61alpha translocon（21）を同定した。また、ey-GAL4をつかって、異所性に器官形成を行なう遺伝子の探索を行ない、翅の器官アイデンティティに関わるwinged eye遺伝子を同定し、その機能を明らかにした（22）。その他にも、ショウジョウバエのGSシステムを利用して、さまざまな新規の遺伝子、あるいは新規の機能を見出し、機能解析を行なった（成果：5、9、14、16、20、24、26、27）。

d) 選択的スプライシングによる遺伝子機能の多様性の解明

GS系統を用いた強制発現によるスクリーニングの過程で、ホットスポットの一つであるlola (longitudinals lacking) 遺伝子座への挿入系統が、致死、半致死、触角に脚ができるアンテナペディアなど、系統によって極めて多様な表現型の異常を引き起こすことがわかった。lola遺伝子は神経軸索ガイダンスに関わっていることは知られていたが、その多様な機能については不明であった。その原因を探るために、lola遺伝子のゲノム構造、転写産物の構造について研究を行った。

lolaの転写産物を調べたところ、80種類のmRNAバリエーションを産生することを見出した。これらは合計20種類のBTB-Znフィンガーファミリーの転写因子をコードする。遺伝子全体は32個のエクソンからなり、全長は60kbを超える（図13）。

図13. lola遺伝子の構造と転写産物



5'側の4個のエクソンはいずれも転写開始点を含み、5'側非翻訳領域に相当する。エクソン5から8までは全てのバリエーションに含まれ、その配列はN末側にあるBTBドメインを含む定常領域をコードする。mRNAの3'側はC末側可変領域をコードし、エクソン9-32のうちの1個または2個のエクソンが使われる。合計20種類の可変領域の配列のうち17種類がZnフィンガーを含むが、類似性はほとんどない。一方、他のショウジョウバエD. pseudoobscuraの相同遺伝子の配列と比較すると、BTB

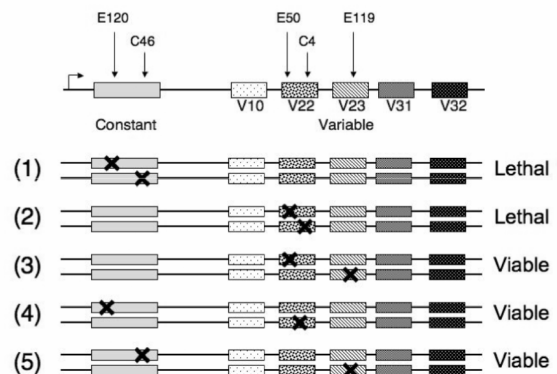
ドメインや可変領域の配列はよく保存されている。特にZnフィンガー配列の保存性は極めて高く、97%以上の同一性を示した。系統学的に遠いハマダラカの1種Anopheles gambiaeにおいても、7種類のバリエーションでZnモチーフが保存されていた。これらのことは、個々のLolaアイソフォームが進化的に保存された固有の機能を担っていることを強く示唆する。選択的スプライシングは多細胞真核生物において広範にみられる。それによって生まれる遺伝子機能の多様性は、神経系をはじめとする高次機能の確立に重要な役割を果たしているものと考えられている。

lola遺伝子は発生過程を通して成虫まで全てのステージで発現されているが、個々のアイソフォームの発現レベルは発生段階によって異なる。神経系に限定して発現されるもの以外に、中胚葉組織に全般に発現されるものなど、複雑な発現パターンを示す。可変領域のエクソン内に点突然変異をもつ複数の変異体が分離されており、いずれもホモ接合体致死となる。これらの事実は、各アイソフォームがもつ固有の機能がショウジョウバエの発生に必須であることを意味する。

この複雑な遺伝子座の選択的スプライシングはどのように制御されているのであろうか。可変領域をコードする選択的エクソンの多くはmRNAの最終エクソンとなるため、エクソン内に転写を終了させるためのターミネーションシグナルが存在する。その数は少なくとも20箇所ある。従って、特定のエクソンだけが使われるようにするためには、それより上流にある全ての可変領域エクソンのスプライスサイトとターミネーションサイトを完全にマスクする機構が必要である。たとえば、最も下流にあるエクソン32を含むmRNAを産生するには、その上流にある19個のターミネーションシグナルを全てスキップしなければならない。しかも同一の細胞内で複数のアイソフォームが発現されることがわかっており、mRNAに含まれる可変領域を1種類だけに限定するためには、極めて複雑な機構を想定しなければならない。

そのメカニズムを解明するために、複数のlola突然変異体アレル（致死）を用いて遺伝学的相補性テストを行なった（図14）。

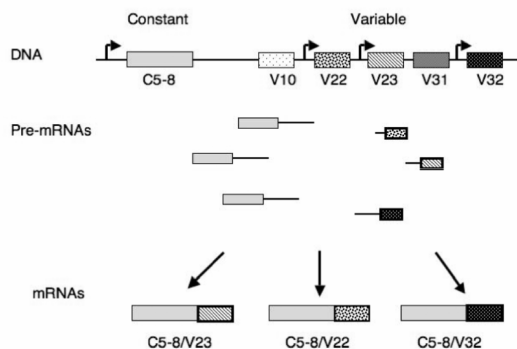
図14. lola突然変異体の相補性テスト



定常領域に変異があるもの同士（図中の番号1）や同じ可変領域に変異をもつ変異体同士（同2）では相補しないが、異なる可変領域に変異をもつもの（同3）は相補する。これは2つのアレルが互いに相手側に欠損しているアイソフォームを補完し合うことができることによるものであり、予想されたことである。驚くべきことに、定常領域に変異をもつものと可変領域に変異をもつもの（同4、5）が相補した。常識的には、定常領域に異常をもつアレルが機能的なアイソフォームを産生する

ことは不可能である。従って、もう一方のアリルの可変領域エクソンに異常があると、そのアイソフォームを欠損するために致死になると予想される。ところが、生まれてきたF1個体では、欠損しているはずのアイソフォームが発現されており、その配列は定常領域、可変領域ともに野生型であった。このことは、DNAあるいはRNAのレベルで組み換えが起こっている可能性を示唆するが、体細胞モザイク解析の結果はDNAレベルのジーンコンバージョンの可能性を否定した。そこで、RNAレベルの組み換えが起こるかどうかを検討した。mRNAが由来する相同染色体を同定するために、定常領域および可変領域のSNPマーカーを同定し、F1個体のmRNAをRT-PCRによって増幅した後、定常領域、可変領域の由来を調べたところ、二つの相同染色体に由来するキメラmRNAが高頻度に発現されていることが判明した。この事実は、定常領域と可変領域がmRNA前駆体として独立に転写されたあと、トランススプライシングによって組み換えを起こすことを意味する(図15)。トランススプライシングは、可変領域をコードする多数のターミナルエクソン候補の中から1種類だけを選択するための極めて合理的なメカニズムといえる。同様なスプライシング機構は同じくBTB-Znフィンガー転写因子をコードするショウジョウバエのmod(mdg4)遺伝子座でも起こっている可能性が示唆されている。また、同じファミリーに属する遺伝子は広く生物界に存在しており、ショウジョウバエ以外の生物でも起こっている可能性がある。(成果:10、11、12、28)。

図15. *lola*遺伝子座における選択的Trans-splicing



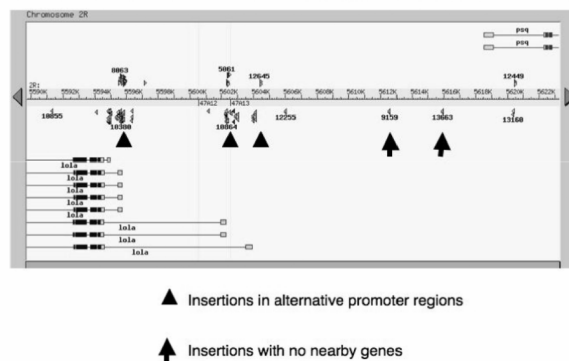
e) ショウジョウバエゲノムの構造の複雑さとGSシステムの有用性

変異体の表現型とゲノムの遺伝子とを関連づけるためには、ベクター挿入サイトを決定し、その周辺にある遺伝子のレイアウトと照らし合わせて、最も可能性が高いものを原因遺伝子として推定する。たとえば、ベクターが遺伝子Xの上流に挿入されていて、強制発現の方向と遺伝子の転写方向が一致していれば、遺伝子Xが強制発現されたと考えてよい。しかし、実際にベクター挿入サイトを決めていくと、必ずしもわかりやすい状況ばかりではない。ショウジョウバエ(*Drosophila melanogaster*)はコンパクトなゲノムをもつ代表的な生物の一つである。FlyBaseのアノテーションでは、イントロン内に別の遺伝子が存在する場合や、二つの遺伝子がオーバーラップしている場合などは決して少なくない。コーディングは重なっていない場合でも、遺伝子間距離が極めて短いため、制御配列が複数の遺伝子で共有されていることもありうる。実際に、non-coding領域の配列にはどの程度の機能的制約があるのかを推定するために、*D. melanogaster*の近縁種である*D. sechellica*と*D. simulans*のゲノムの相同領域をシーケンスして、3種の間で比較解析を行な

った。その結果、non-coding領域の配列は置換速度がおそく、何らかの機能的制約をうけていることを支持した。遺伝子が複雑に入り組んでいる領域では、挿入サイトのわずかな違いでも、全くことなった表現型になることが予想される。また、*lola*遺伝子のように単一の遺伝子座であっても、複数のプロモーターが使われ、複雑なスプライシングが起こるものでも、同様なことがいえる(図16)。幸運なことに、4種類のプロモーターの全てについて、GSベクターの挿入がおこなわれている。このような複数の挿入系統は、それぞれに独自の作用をもっているものと考えられる。

一方、ベクター挿入サイトの近傍にはアノテートされた遺伝子が見当たらないケースもあった。しかし、現在のところ本当に遺伝子がないとは断言できない。転写領域はESTクローンによってアノテーションされたものが大部分であり、すべての転写領域が捕捉されているわけではない。ベクター挿入と遺伝子の転写開始点の相関が高いことを考えると、これらの領域に未同定の転写開始点が存在する可能性がある

図16. 複数のプロモーターに対応するベクター挿入



〈国内外での成果の位置づけ〉

トランスポゾン挿入による変異体作製はすでに米国や欧州で先行して、比較的大規模な系統作製が行われている。国内では、GAL4エンハンサートラップ系統が作成され、その発現パターンとマッピングが分担者の林を中心に行われた。GS系統についても、独自開発の強制発現ベクターを用いており、そのマッピング情報と表現型情報が統合されたデータベースはこれまでにない有用なものである。Gal4系統と共にデータベースの参照と系統のリクエストを国内外から数多く受け、提供している。ショウジョウバエの研究者からは、データベースが大変わかりやすいとの評価を得ている。

大学・研究所などのアカデミアだけでなく、欧米の企業からも注目された。基礎研究の範囲内ということで、米国ノバルティスに無償でいくつかの系統を提供した。最近では、フランスのFovia-Pharaceuticalsから問い合わせがあり、首都大学東京知的財産部門が窓口になって、有償の譲渡契約を行なった。

〈達成できなかったこと、予想外の困難、その理由〉

表現型情報の網羅的収集はきわめて時間を要する作業であり、多大な時間を費やしたが多数のGS系統をスクリーニングできたのは限られたGAL4系統のみであった。表現型の記述は一方でできるだけ正確に記述することが重要であるのだが、それによって多大な時間を要することになるという矛盾がある。また、表現型の記述に関しては、複雑になればなるほど、その評価が微妙になってくる。複数の観察者でスクリーニングを進めざるをえない

ため、その経験と用いた顕微鏡の見え方など、個人差を生じる。たとえば軽微な複眼形態の異常は、観察者によって正常と判定されてしまう場合があった。当初、表現型のプロファイル比較による機能未知遺伝子の機能推定プログラムを作成したが、表現型のデータ量が少ないため、意味のあるプロファイル比較にはならなかった。

ベクター挿入サイトの決定は、データの整合性をとることが最も難題であった。人手による作業ステップがあるため、サンプル番号の違いなどがあり、それに気がつくまでに、大変な苦勞をした。また、inverse-PCRのデータから自動マッピングのソフトを最適化するのにも多大な時間を要した。データそのものに問題がある場合もあり、作業段階で発生する全ての問題を当初予測できなかつたため、後追い状態になってしまった。さらに、ゲノム配列のアップデートにあわせた対応にも時間を要した。特に、アノテーションの量が増えたため、GSのinsertionの位置から推定される強制発現遺伝子を特定するアルゴリズムを変更する必要が生じた。

GS系統の作製は、3年目までは極めて順調に進み、当初計画の1万系統を倍増して、2万系統を目指した。しかし、マッピングの整合性の問題が発生したため、その技術改良と、表現型のデータ収集のために、総数は2万系統には至らなかった。ただし、転写方向を反転できるGSV7の開発で、実質的にはほぼ2万系統に相当する。

〈今後の課題〉

ゲノムの遺伝子の機能を理解するためには、変異体を作製して表現型を明らかにしていく作業は不可欠である。その重要性は今後もかわらない。強制発現システムは、従来の突然変異誘発法に比べて、はるかに高い頻度で表現型を誘発するため、情報は多くなるが、機能未知遺伝子の機能を予測するのに使えるだけの情報を蓄えるのは容易ではない。遺伝子の機能は一義的に決まっている訳ではなく、発現量と表現型の関係は必ずしも単純ではない。非線形部分があることは疑いないが、その理解はほとんど進んでいない。表現型をどのように解明して、生命システムの理解につなげるかが今後の大きな課題である。そのためには、表現型の評価法を再検討して、客観性、高精度、定量性のあるデータが不可欠である。また、データを様々な手法でかつ高速で処理できることが重要である。そのためには、計算機をつかって表現型情報を収集、処理できるシステムを確立する必要がある。ショウジョウバエの翅は、その目的に合致する理想的な器官である。すなわち、2次元構造であるため、画像データとして記録することができ、明瞭なパターンをもっているため、それをランドマークとして形態情報を数値化することが可能である。また、翅の形態形成には、ほ乳類を含めた多くの生物に共通のシグナル伝達系が関与している。今後は、ショウジョウバエの翅に焦点をあて、重点的に表現型情報を収集し、その形態を制御するシステムの解明に挑戦する。

〈研究期間の全成果公表リスト〉

論文

1) 0202271236

Seong, K.-H., Matsuo, T., Fuyama, Y. and Aigaki, T. (2001) Neural specific overexpression of DPOSH, *Drosophila* Plenty of SH3s, extends the longevity of adult flies. *Biogerontology* 2, 271-281

2) 0202261812

Seong, K.-H., Ogashiwa, T., Matsuo, T., Fuyama, Y. and Aigaki, T. (2001) Application of the gene search system to a screen for longevity gene in *Drosophila*. *Biogerontology* 2, 209-217

3) 0602110012

Aigaki, T., Ohsako, T., Toba, G., Seong, K.-H. and Matsuo, T. (2001) The gene search system: its application to functional genomics and a screen for longevity genes in *Drosophila melanogaster*. *J. Neurogenet.* 15, 1-10

4) 0202271246

Ejima, A., Nakayama, S. and Aigaki, T. (2001) Phenotypic association of spontaneous ovulation and sexual receptivity in virgin females of *Drosophila melanogaster* *Behav. Genet.* 31, 437-444

5) 0303291726

Hayashi, S., Ito, K., Sado, Y., Taniguchi, M., Takeuchi, H., Aigaki, T., Matsuzaki, F., Nakagoshi, H., Tanimura, T., Ueda, R., Uemura, T., Yoshihara, M., Goto, S. (2002) GETDB, a database compiling expression patterns and molecular locations of a collection of Gal4 enhancer traps. *Genesis*, 34, 58-61

6) 0303291634

Takehana, A., Katsuyama, T., Tamaki, Y., Oshima, Y., Takada, H., Aigaki, T. and Kurata, S. (2002) Overexpression of a pattern-recognition receptor, peptidoglycan-recognition protein-LE, activates imd/relish-mediated antibacterial defense and prophenoloxidase cascade in *Drosophila* larvae. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 99, 13705-13710

7) 0303291647

Aigaki, T., Seong, K.H., Matsuo, T. (2002) Longevity determination genes in *Drosophila melanogaster*. *Mech.Age.Dev.* 123, 1531-1541.

8) 0303291700

Igaki, T., Kanda, H., Goto, Y., Kanuka, H., Kuranaga, E. Aigaki, T. and Miura, M. (2002) Eiger, a TNF superfamily ligand that triggers the *Drosophila* JNK pathway. *EMBO J.* 21, 3009-3018

9) 0202271251

Umemiya, T., Takasu, E., Takeichi, M., Aigaki, T. and Nose, A. (2002) Forked end: a novel transmembrane protein involved in neuromuscular specificity in *Drosophila* identified by gain-of-function screening. *J. Neurobiol.*, 51, 205-214

10) 0404080235

Horiuchi, T., Giniger, E., and Aigaki, T. (2003) Alternative trans-splicing of constant and variable exons of a *Drosophila* axon guidance gene, *lola*. *Genes Dev.* 17, 2496-2501

11) 0404080527

Goeke, S., Greene, E.A., Grant, P.K., Gates, M.A.,

- Crowner, D., Aigaki, T. and Giniger, E. (2003) Alternative splicing of *lola* generates 19 transcription factors controlling axon guidance in *Drosophila*. *Nat. Neurosci.* 6, 917-924
- 12) 0303291807
Ohsako, T., Horiuchi, T., Matsuo, T., Komaya, S. and Aigaki, T. (2003) *Drosophila lola* encodes a family of BTB-transcription regulators with highly variable C-terminal domains containing zinc finger motifs. *Gene* 311, 59-69
- 13) 0303291812
Kaneuchi, T., Togawa, T., Matsuo, T., Fuyama, Y. and Aigaki, T. (2003) Efficient method for measurement of H₂O₂ resistance in *Drosophila*. *Biogerontology* 4, 157-165
- 14) 0303291807
Fujise, M., Takeo, S., Kamimura, K., Matsuo, T., Aigaki, T., Izumi, S. and Nakato, H. (2003) Dally regulates Dpp morphogen gradient formation in the *Drosophila* wing. *Development* 130, 1515-1522
- 15) 060201923
Kawahara, Y., Matsuo, T., Nozawa, M., Shin-I, T., Kohara, Y. and Aigaki, T. (2004) Comparative sequences analysis of a gene-dense region among closely related species of *Drosophila melanogaster*. *Gen Genet. Sys.* 79, 351-359
- 16) 0602101927
Sakata, T., Sakaguchi, H., Tsuda, L., Higashitani, A., Aigaki, T., Matsuno, K. and Hayashi, S. (2004) *Drosophila* Nedd4 regulates endocytosis of Notch and suppresses its ligand-independent activation. *Curr. Biol.* 14, 2228-2236
- 17) 0602101931
Ejima, A., Tsuda, M., Takeo, S., Ishii, K., Matsuo, T. and Aigaki, T. (2004) Expression level of *sarah*, a homolog of DSCR1 is critical for ovulation and female courtship behavior in *Drosophila melanogaster*. *Genetics* 168, 2077-2087
- 18) 060201934
Tanaka, H., Takasu, E., Aigaki, T., Kato, K., Hayashi, S. and Nose, A. (2004) Formin3 is required for assembly of the F-actin structure that mediates tracheal fusion in *Drosophila*. *Devel. Biol.* 274, 413-425
- 19) 0404081036
Aigaki, T., Kaneuchi, T., Matsuo, T., Seong, K-H., and Togawa, T. (2004) Genetic Bases of Oxidative Stress Resistance and Life span in *Drosophila*. *J. Clin. Biochem. Nut.* 34, 77-83
- 20) 0404080308
Takeo S., Fujise, M., Akiyama, T., Habuchi, H., Itano, N., Matsuo, T., Aigaki, T., Kimata, K., and Nakato, H. (2004) In vivo hyaluronan synthesis by expression of mammalian hyaluronan synthase gene in *Drosophila*. *J. Biol. Chem.* 279, 18920-18925
- 21) 0601311919
Kanuka, H., Hiratou, T., Igaki, T., Kanda, H., Kuranaga, E., Sawamoto, K., Aigaki, T., Okano, H. and Miura, M. (2005) Gain-of-function screen identifies a role of the Sec61alpha translocon in *Drosophila* postmitotic neurotoxicity. *Biochim. Biophys. Acta* 1726, 225-237
- 22) 0601311915
Katsuyama, T., Sugawara, T., Tatsumi, M., Oshima, Y., Gehring, W., Aigaki, T. and Kurata, S. (2005) Involvement of winged eye encoding a chromatin-associated bromo-adjacent homology domain protein in disc specification. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 102, 15918-15923
- 23) 0601311920
Tsuda, M., Langmann, C., Harden, N. and Aigaki, T. (2005) The RING finger-scaffold protein POSH targets TAK1 to control immunity signaling in *Drosophila*. *EMBO reports*, 6, 1082-1087
- 24) 0601311936
Takeo, S., Akiyama, T., Firkus, C., Aigaki, T. and Nakato, H. (2005) Expression of a secreted form of Dally, a *Drosophila* glypican, induces overgrowth phenotype by affecting action range of Hedgehog. *Dev. Biol.* 284, 204-218
- 25) 0601311955
Lavolette, M.J., Nunes, N., Peyre, J.B., Aigaki, T. and Stewart, B. A. (2005) A Genetic screen for suppressors of *Drosophila* NSF2 neuromuscular junction overgrowth. *Genetics* 170, 779-792
- 26) 0601311927
Orihara-Ono, M., Suzuki, M., Saito, M., Yoda, Y., Aigaki, T. and Hama, C. (2005) The slender lobes gene, identified by retarded mushroom body development, is required for proper nucleolar organization in *Drosophila*. *Dev. Biol.* 281, 121-133
- 27) 0601311932
Kotani, N., Kitazume, S., Kamimura, K., Takeo, S., Aigaki, T., Nakato, H. and Hashimoto, Y. (2005). *Drosophila* orthologues of human b-secretase induce the secretion of a Golgi-resident transferase, heparan sulfate 6-O-sulfotransferase. *J. Biochem.* 137, 315-322
- 28) 0601311911
Horiuchi, T. and Aigaki, T. (2006) Alternative trans-splicing: a novel mode of pre-mRNA processing. *Biol. Cell*, 98, 135-140
- 29) データベース
<http://gsdb.biol.metro-u.ac.jp/%7Edclust/>
GSベクター挿入システムのマップ情報、挿入サイトのゲノム配列、近傍の遺伝子、強制発現される遺伝子、特定のGALAを使って強制発現を誘導した時に生じる表現

型情報が登録されている。GS系統番号、遺伝子名、あるいは染色体領域名で検索することができる。

30)特許

名称：寿命関連遺伝子の探索方法
出願番号： 特願2001-378756
公開番号： 特開2003-174887
出願日： 2001年12月12日
公開日： 平成15年6月24日
発明者：相垣 敏郎
出願人：科学技術振興機構（JST）

31)特許

名称：遺伝子探索ベクター隣接ゲノム配列の同定方法、
及び酸化ストレス感受性変異体
特許出願番号：特願2005-324980
特許出願日：2005年11月9日
発明者：相垣 敏郎
出願人：首都大学東京