

ショウジョウバエGAL4エンハンサートラップシステムのマッピングと発現情報の統合データベース構築

◆林 茂生

独立行政法人 理化学研究所 発生・再生科学総合研究センター

〈研究の目的と進め方〉

ゲノム機能の解明には遺伝子発現のパターンを把握し、その上で遺伝子発現を人為的に改変してその生体機能への影響をアッセイするアプローチが有効であり、この目的のためにはGal4-UASシステムが適している。発現を制御するための組織特異的なドライバーについては昨年度までに4615系統のGAL4エンハンサートラップ系統の発現パターンと挿入位置の解析をおこなった。引き続き相垣らが作成しているGS系統セットの解析をおこない、これらの結果を基盤にして遺伝子機能の網羅的解析を進める。

〈研究開始時の研究計画〉

- Gal4エンハンサートラップ系統セットの確立、マッピングとデータベースの公開。
- GS系統セットを用いた新規遺伝子機能の探索
GS系統を用いて様々な組織において遺伝子を強制発現させるスクリーニングを行った。対象とした組織は、A) 複眼の形態形成、B) 脚の近遠軸と分節化、C) 気管の細胞移動、上皮形成、D) ユビキチン結合蛋白Ebiと相互作用する遺伝子の探索、である。
- ゲノム情報に基づいた新規遺伝子機能の探索
GSデータベースを利用して遺伝子配列情報に基づいた予備的な候補遺伝子の絞り込みを行いスクリーニングの効率化を試みた。
- 点突然変異の効率的な分離法の開発
化学変異源により誘導される点突然変異はタンパク質の構造と機能を理解するために必要である。GS因子の挿入株をもとにした変異蛋白分離法の確率を目指す。

〈研究期間の成果〉

1) Gal4エンハンサートラップ系統セットの確立、マッピングとデータベースの公開。
発生と生体維持に関わる遺伝子の多くは時間・空間的に厳密な転写制御を受けている。従って遺伝子の特異的転写制御は多細胞生物のゲノム機能の発現にとって重要な問題である。転写のエンハンサーは種間での相同性があまり高く保持されておらず、まあ遺伝子から遠く離れても機能する。従ってゲノムの塩基配列の検索のみではエンハンサーの同定は困難である。エンハンサートラップ法は染色体のエンハンサー配列をゲノム構造の改変を最小にとどめつつ検出方法として優れている (Bellen et al., 1989; Bier et al., 1989; O' Kane and Gehring, 1987)。従ってショウジョウバエのエンハンサートラップ系統をその発現パターンとゲノム上の位置と共に記載したデータベースはきわめて有用であると考えられる。これまでP-lacZ因子を元にしたエンハンサートラップ系統1045系統のデータが報告されている (Spradling et al., 1999)。我々はNPコンソーシアムがP{GawB} 因子 (Brand and Perrimon, 1993) を元に作成した4,615の独立なGal4エンハンサートラップ系統の胚、幼虫、成虫における遺伝子の発現パターン、とゲノム上への挿入位置を決定し、画像

データを含めたデータベース (GETDB) を作成、公開した。系統は国立遺伝学研究所と京都工芸繊維大学の系統保存センターにおいて維持され研究者に配布されている (ナショナルバイオリソースプロジェクトの援助による)。

図1 Gal4エンハンサートラップ法の原理

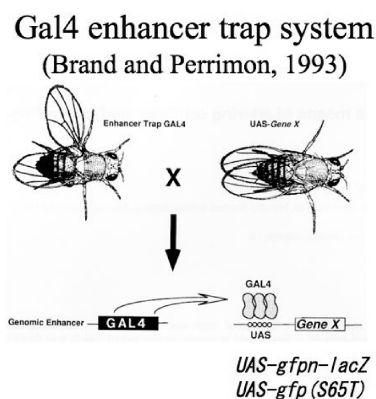


図2 エンハンサートラップのゲノム上への挿入頻度分布

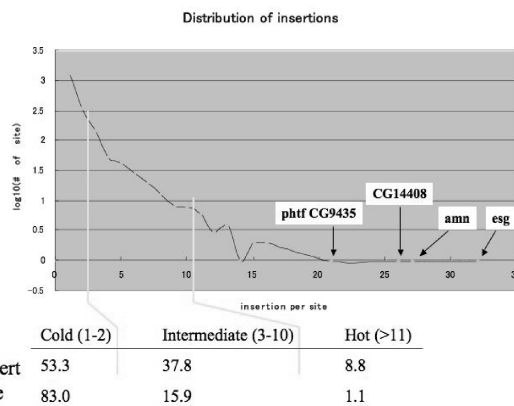


図3 エンハンサートラップデータベース (GETDB)

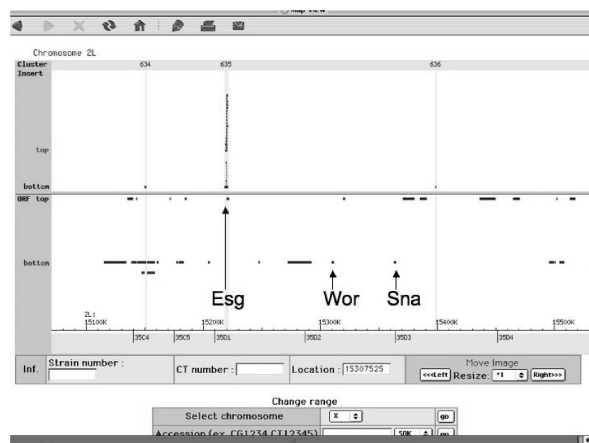
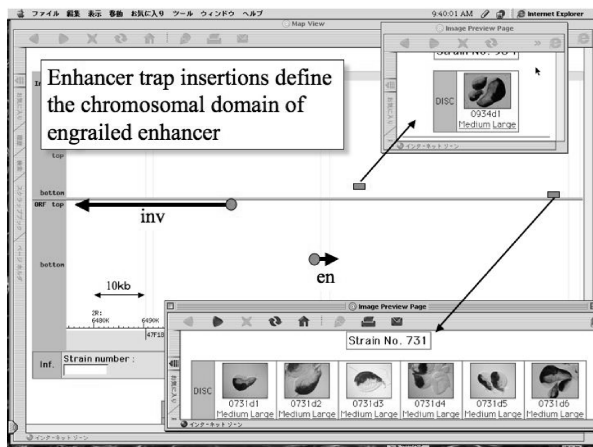


図4 エンハンサートラップの発現パターン



2) 昆虫と甲殻類の間でのAntp遺伝子の機能分化

ホメオティック遺伝子機能の進化は動物のボディプランの進化において重要な役割を果たしてきたと考えられる。特に節足動物の分節性を持った付属肢は系統によって多彩な形態分化を遂げ、その形態進化メカニズムは興味深い。しかしその形態進化に直接関わる遺伝子の変化は未だ発見されていなかった。甲殻類の仲間であるオオミジンコの第一脚は第二-第四脚に見られる顕著な腹側の分岐を持たない。我々はこの第一脚の形成時において脚の遠位部形成に重要な役割を果たす遺伝子Dllの発現が他の脚に比べ減少しており、その代わりにホメオティック遺伝子Antpが強く発現していることを見いだした。ショウジョウバエではDllの発現はAntpには影響を受けず、Antpの後方で発現するUbxによる転写抑制を受けることが知られている。しかしオオミジンコのAntpをショウジョウバエ胚において発現させるとDllの上流に存在するエンハンサーに作用してDllの転写を抑制することがわかった。ショウジョウバエAntpとの機能比較実験によってオオミジンコとショウジョウバエAntpのDll抑制に対する違いを決める蛋白質領域はホメオドメインではなくN末端側の部分であることが明らかとなった。従ってホメオティック遺伝子はその蛋白質の機能を変化させることで標的特異性を変化させ、オオミジンコAntpの場合、脚の形態進化に重要な役割を果たしてきたと考えられる。この発見はゲノム上の形態形成遺伝子の進化を考える上で重要なアイデアを提起する。

図1 ミジンコの脚の構造

Dll expression correlates with distal limb outgrowth

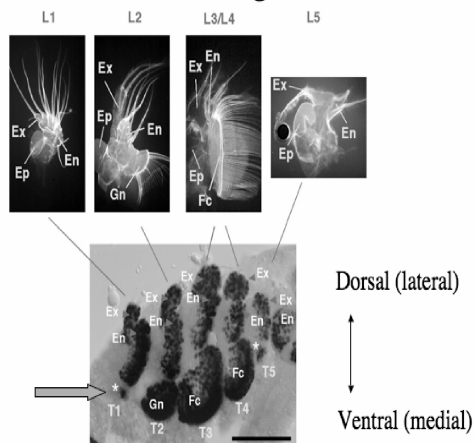
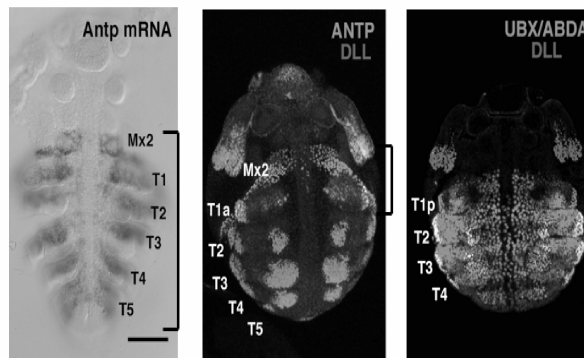


図2 ミジンコAntp遺伝子の発現

Post-transcriptional regulation limits the domain of Antp expression

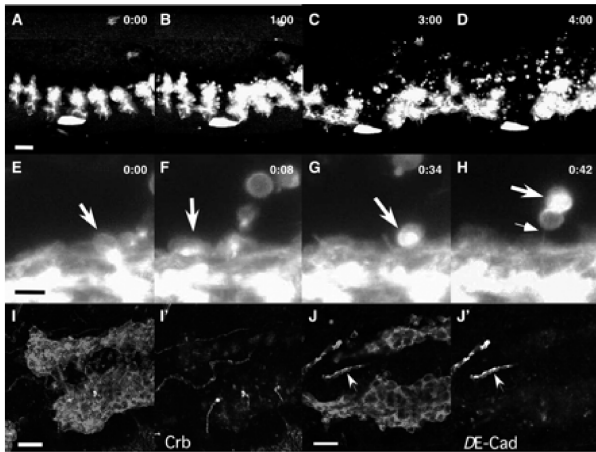


3) 低分子量GTP結合蛋白質Racは上皮細胞再配列を促進する

ゲノムが多細胞体の複雑な形態形成を制御するためにはゲノム上の情報が細胞間相互作用を司るロジックに転換されなくてはならない。細胞間相互作用の制御因子である低分子量GTP結合蛋白質と細胞間接着因子カドヘリンをモデルとして細胞間接着の制御回路の解明を試みた。具体的にはRacの発現における働きを調べるために気管細胞を用いたライブイメージング解析をGETDBで発見されたGal4系統を用いて行った。

上皮細胞の再配列はEカドヘリンを介した細胞間接着構造の急速な解離と再編成を伴い、上皮の形態形成に重要な役割を果たす。低分子量GTP結合蛋白質RACは細胞間接着の制御因子であることが様々な培養細胞での実験結果から示唆されていた。しかし個体発生での上皮形態形成における役割は不明であった。我々はショウジョウバエの気管系を実験モデル系として用いてRACの細胞再配列における働き、特にカドヘリン依存的な接着に対する働きを調べた。RACの活性が低下した胚においてはアドヘレンスジャンクション構造は拡張し、それに伴いEカドヘリンの量が増大していた。しかしE-カドヘリンmRNAの量は増えていなかったことから、E-カドヘリンの転写後調節機構の存在が示唆された。そのような胚では上皮のダイナミックな再配列が阻害されていた。一方で、RAC活性を上昇させると新規合成されたE-カドヘリン分子の細胞間接着構造への取り込みが阻害され、上皮構造は崩壊した。従って気管系においてはRAC活性の適切な制御は上皮細胞間接着のスムーズな再配列の進行に必須であることがわかった。RACは細胞移動の制御能力も知られている。このようなRACの機能は上皮のシートを管に変換する際に重要だと考えられた。

図1 racの恒常的活性化による上皮細胞接着の破壊。とカドヘリン分子の発現低下。



4) 昆虫胚での脚原基形成におけるWgシグナルの役割

細胞間相互作用のロジック解明のもう一つの系として付属肢形成に関わるシグナル分子Wgの役割について研究した。節足動物や脊椎動物の付属肢の発生においては近位部と遠位部との相互作用が増殖とパターン形成に重要である。ショウジョウバエの脚の近遠部は胚発生の時期に出現する転写因子Esgを発現する近位部とDllを発現する遠位部として出現する。脚の原基は翅・脚を共通に生ずる原基として出現する。我々はシグナル分子Wgが脚原基の初期パターンの決定に重要な役割を果たすことを見いだした。まず脚原基は背側近位部、腹側近位部そして遠位部に分けることができ、Wgの作用する時期、シグナルの量に応じてこれらの領域は異なる応答をする。これまで幼虫期の脚原基での研究では脚近位部でWgは作用しないとされていたので胚ではWgは成虫原基と異なる作用メカニズムを有していると考えた。次にWgの発現の抑制は翅・脚共通の原基から翅原基が生ずることに必須であった。さらにDIIは近遠軸上の脚延期の領域化に必須であることが判明した。胚の外胚葉が段階的に脚への運命を辿るためにはWgの多彩な役割が重要であることが示された。

図1 脚原基の構造

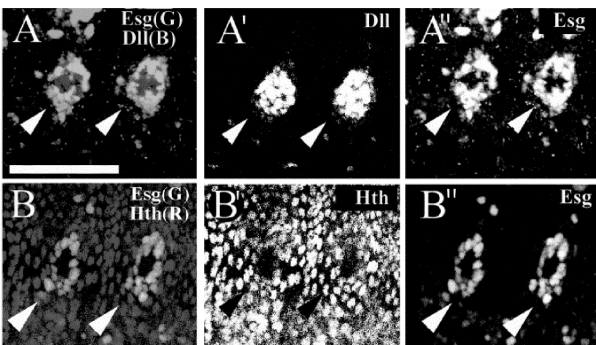
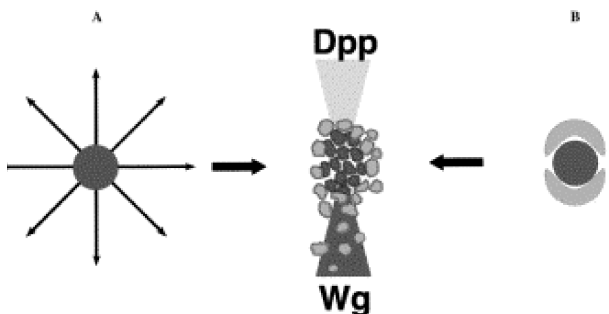


図2 脚原基形成のモデル



5) ショウジョウバエの2つのクラスの感覚神経の樹状突起形成における特徴的な発生・生理的性質

GETDBの画像データを元に神経細胞の樹状突起形成に関わる遺伝子をスクリーンした。

6) Formin3はショウジョウバエ気管系においてF-actinの集合と管状上皮の発生を制御する

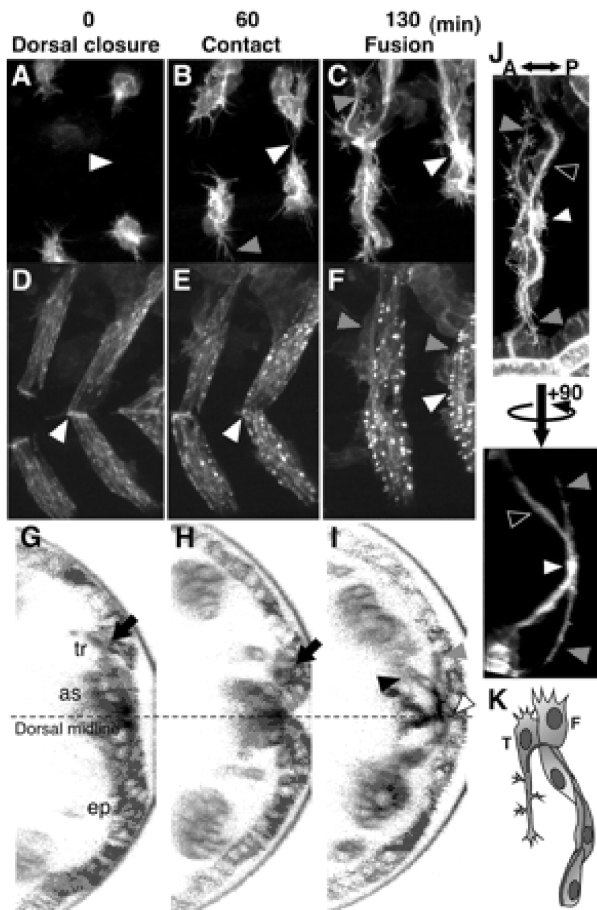
相垣らのGS系統を用いて行われた遺伝子探索の結果、神経細胞の形成を破壊する分子としてformin3が同定された。その発現は気管細胞に局限し、気管形成に必須の因子であった。

7) ヘッジホッグとデカペンタプレジックシグナルによる気管細胞突起進展の制御機構

細胞突起がどのようにして決まった報告に進展できるかという細胞生物学の根本的な問題をショウジョウバエ個体を用いた解析で研究した。GETDBに登録されている系統ush-Gal4が用いられた。

細胞の運動と突起形成は周辺環境に由来するシグナルによって制御されている。分泌性のシグナル分子はモルフォゲンとして濃度依存的に転写調整を行うがガイダンス分子としても働くことが知られている。我々はショウジョウバエモルフォゲン分子ヘッジホッグ(Hh)とデカペンタプレジック(Dpp)のガイダンス機能をショウジョウバエ気管系において研究した。気管枝の末端にはterminal branches (TB)と呼ばれる単一細胞に由来する細胞突起が見られる。TBは表皮外胚葉の内側に沿って枝を一方方向に進展させる。HhはTBの進展を促進させ、一方でDppはその進展を阻害する。HhとDppは外胚葉上では直交するストライプ状に発現しており、TBはこのパターンを読みとって一方方向への極性を持った進展を行うものと考えられた。この機構は気管による呼吸の補助が外胚葉パターンに適応して効率的に行われることを保証する機構だと考えられる。

図1 気管系dorsal branchの形成プロセス。



の膜蛋白に存在するPPXYモチーフに作用してエンドサイトーシスを制御する。Deltexはring finger型ユビキチンリガーゼでNotchシグナルの正の制御因子である。我々はショウジョウバエNedd4がNotchのPPSYモチーフに作用してNotchをユビキチン化し、不安定化させることを見いだした。Nedd4変異体はNotchとDeltexの変異体と強い遺伝的相互作用を示し、Nedd4の活性化はNotchシグナルを抑制した。培養細胞中ではNedd4の活性を阻害することでNotchがリガンド非依存的に活性化された。Nedd4はまたNotch依存的にDeltexの分解を誘導した。従ってNedd4はNotchとDeltexを分解経路に導くことでNotchシグナルを阻害する因子であると結論された。このようなNedd4の作用は定常状態でNotchが不用意に活性化されてしまうことを防ぐ防御機構として働いていると考えられた。

図1 Nedd4の構造とNotchシグナルに対する遺伝的影響。

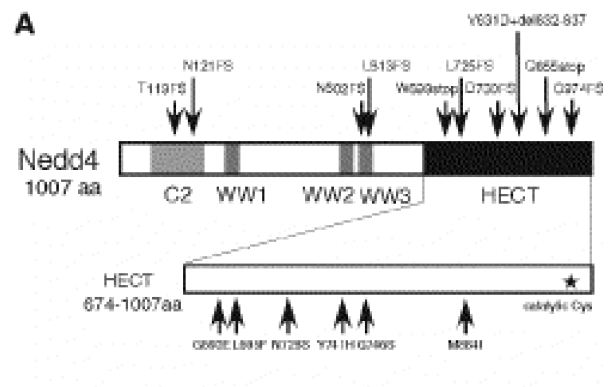
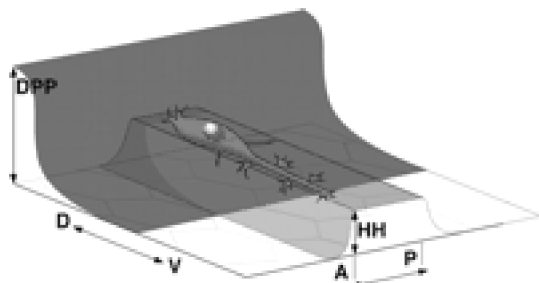


図2 ヘッジホッグとデカペンタプレジックシグナルによる気管突起進展のガイダンス機構



8) ショウジョウバエNedd4はNotch分子のエンドサイトーシスを制御し、そのリガンド非依存的活性化を抑制する。

相垣らと協力して遺伝子の異所発現の表現型を指標としたスクリーニングを行った。6000系統のGS系統をマップし、データベース化して原因遺伝子を同定した。Nedd4は膜蛋白質の移動に関わる分子として知られており酵母からヒトに至るまで広く保存されている分子である。また点突然変異の化学変異源による効率的な分離法の開発し、Nedd4変異体の分離に利用した。

細胞膜上のシグナル受容体Notchのリガンド依存的な切断とエンドサイトーシスはNotchシグナル活性化のキーステップである。リガンド非依存的なNotchのエンドサイトーシスは頻繁に見られるが通常はシグナル活性化につながらない。これら二種類のエンドサイトーシス機構の違いがどのように決まっているのかはわかっていなかった。Nedd4はHECT型ユビキチンリガーゼで数多く

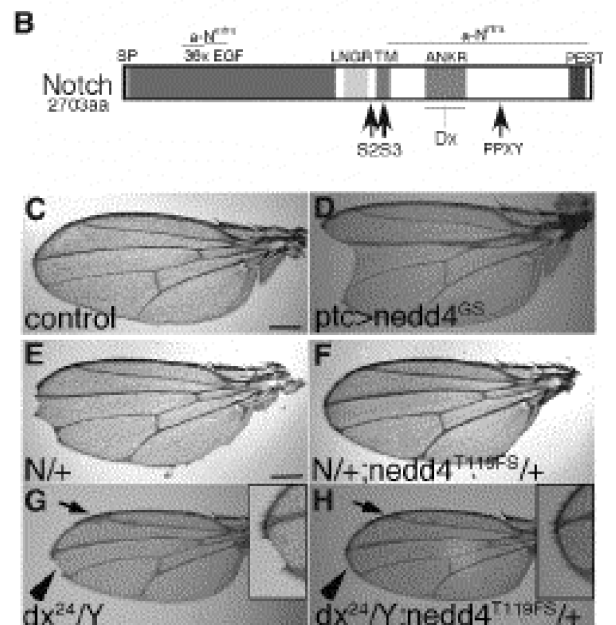
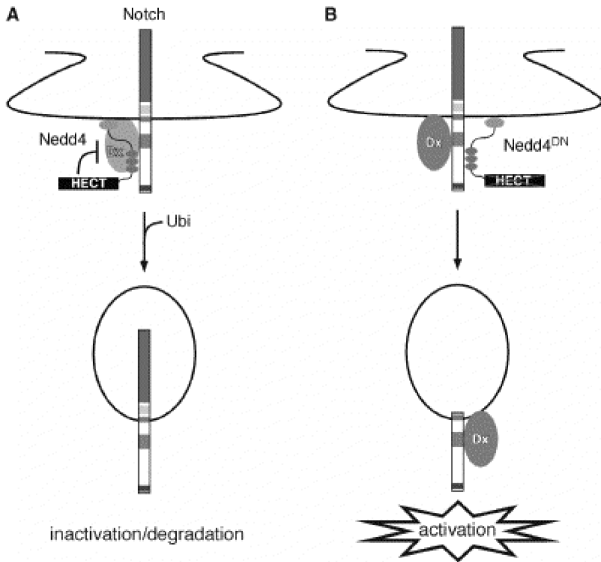


図2 Nedd4, DeltexがNotchシグナルを制御するモデル



9) 赤色蛍光蛋白質レポーターを持つエンハンサートラップベクターの開発

エンハンサートラップ法の用途を広げるために新たなレポーター蛋白質としてDsRedを用いたベクターを作成した。これを用いて既存のP因子挿入株を用いて迅速にマーカー系統を作成することができることを示した。ショウジョウバエで用いられているエンハンサートラップ法はゲノム上の転写エンハンサーを検出し、細胞・領域特異的なマーカーを得ることに貢献している。我々はP因子にもとづいて核移行シグナルをつけた赤色蛍光蛋白質DsRedをレポーターとするエンハンサートラップベクターを開発した。このベクターは既存のP因子挿入株を用いて容易にベクターの入れ替えが可能であり、この方法を用いて成虫原基の各領域を標識する系統を確立した。DsRedが蛍光を獲得する時間は約22.5時間と推定された。緑色蛍光蛋白質GFPと併用することでショウジョウバエの生体組織の二重蛍光標識が可能となった。

図1 エンハンサートラップベクターの構造

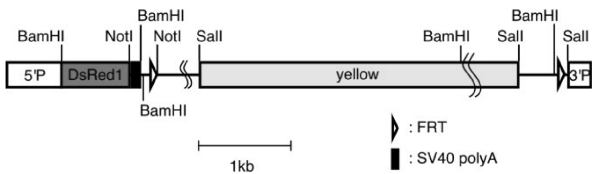


図2 エンハンサートラップの発現パターン
hh ptc tsh ap

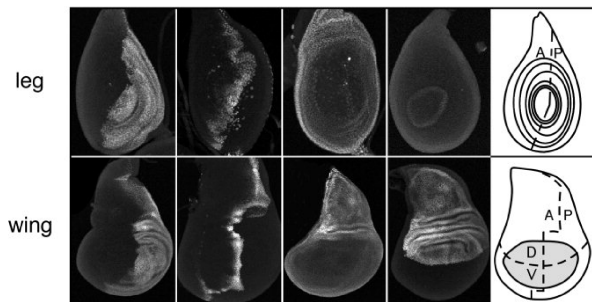
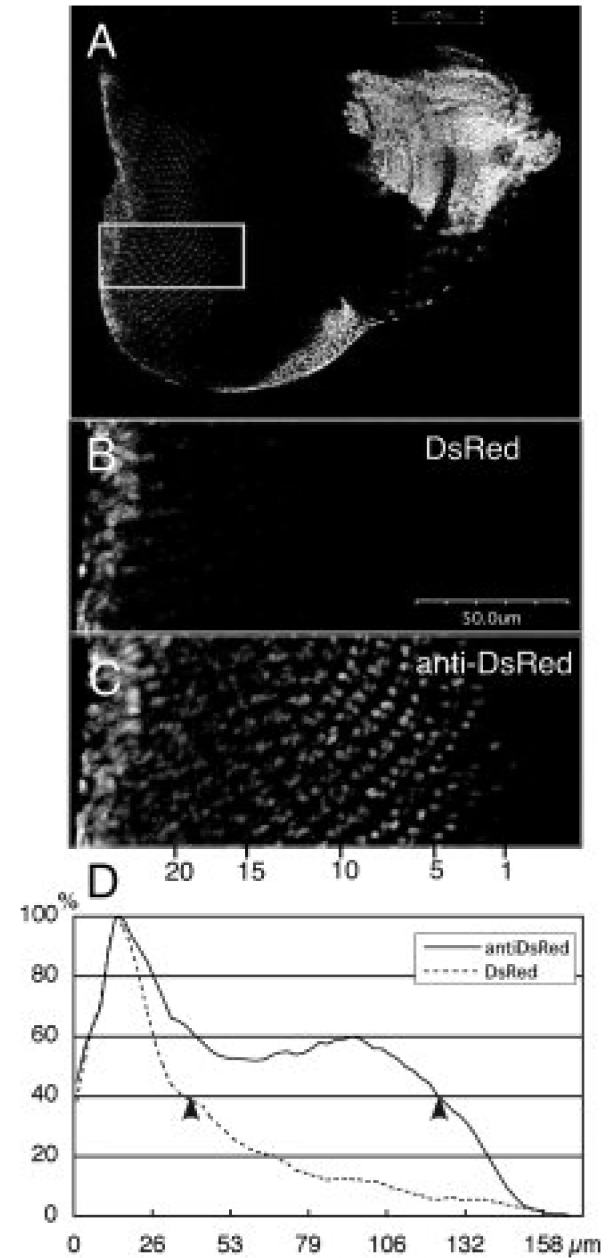


図3 DsRedの蛍光発現時間の推定。



<その他の進展状況>

G S系統を用いて様々な組織において遺伝子を強制発現させるスクリーニングを行った。対象とした組織は、A) 複眼の形態形成、B) 脚の近遠軸と分節化、C) 気管の細胞移動、上皮形成、D) ユビキチン結合蛋白Ebiと相互作用する遺伝子の探索、である。これまでに約6,000系統をスクリーンし、これらの組織の形成に関わる有力な候補遺伝子を同定し、詳細な解析を進めている。

細胞外に分泌され、形態形成を制御する新規分子を同定することを目指してデータベース上でアノテーションがなされているショウジョウバエの全ORFよりN末端シグナルペプチドを持つORFを抽出した。これらのGS挿入株について脚原基での強制発現スクリーニングを行い細胞膜レセプターCapsを同定した。

3) GS系統を元にして、化学変異原を用いた効率的な点突然変異の分離を試みた。Dnedd4を用いたテスト実験では約1ヶ月半の期間で17系統の変異体を得て、そのすべてでDnedd4のORFに点突然変異を同定した。同様な方法でCaps、DNRSFなどの遺伝子について点突然変異を得て

機能-構造相関に関する有益なデータが得られている。

〈国内外での成果の位置づけ〉

Gal4系統セットは世界的に見て最大の規模でありデータベースの参照と系統の請求を数多く受けている。G S系統についても世界最大規模の系統数を目指す相垣らのプロジェクトを補完し遺伝子機能を統括的に把握するための系統と情報の発信源となっている。

〈達成できなかったこと、予想外の困難、その理由〉

G S系統での挿入位置の決定は強制発現で効果を来す遺伝子の同定にきわめて有効であった。しかし多数の候補系統から少数の最重要な遺伝子に絞り込むためには2次的、3次的な表現型解析が必要であった。さらに機能獲得型表現型に加えて機能欠損型の表現型データを得ることに時間を費やしている。

〈今後の課題〉

GS系統をもとにした点突然変異分離法の効率をさらにあげて多数の遺伝子について点突然変異による機能欠損型と機能獲得型の変異を効率よく収集することが必要である。

GS因子の挿入により蛋白をコードする全遺伝子を飽和するレベルに近づくためにはG S系統のマッピングを進め、相垣らが達成目標としている2万系統すべての挿入位置決定を早急に進める必要がある。

さらに遺伝子機能の推定の精度を上げるためには表現型の定量的かつ網羅的な測定法を開発し、発生生物学者が使える形で提示するアプローチを考える必要がある。そのためにも光学イメージングとコンピューターを用いた画像解析技術の向上を図る必要がある。

〈研究期間の全成果公表リスト〉

- 1) 0303291705
Hayashi, S., Ito, K., Sado, Y., Taniguchi, M., Akimoto, A., Takeuchi, H., Aigaki, T., Matsuzaki, F., Nakagoshi, H., Tanimura, T., Ueda, R., Uemura, T., Yoshihara, M., and Goto, S. (2002) GETDB, a database compiling expression patterns and molecular locations of a collection of Gal4 enhancer traps *Genesis* 34: 58-61.
- 2) 0303261028
Shiga, Y., Yasumoto, R., Yamagata, H., Hayashi, S., (2002) Evolving role of Antennapedia protein in arthropod limb patterning. *Development*, 129: 3555-3561.
- 3) 0303261136
Chihara, T., Kato, K., Taniguchi, M., Ng, J., Hayashi, S. (2003) Rac promotes epithelial cell rearrangement during tracheal tubulogenesis in *Drosophila*. *Development* 130: 1419-1428
- 4) 0303261145
Kubota, K., Goto, S., Hayashi, S. (2003) The role of Wg signaling in the patterning of embryonic leg primordium in *Drosophila*. *Developmental Biology* 257: 117-126.
- 5) 0303261149
Sugimura, K., Yamamoto, M., Niwa, R., Satoh, D., Goto, S., Taniguchi, M., Hayashi, S., Uemura, T. (2003) Distinct developmental modes and lesion-induced

reactions of dendrites of two classes of *Drosophila* sensory neurons. *Journal of Neuroscience* 23

- 6) 0601201345
Tanaka, H., Takasu, E., Aigaki, T., Kato, K., Hayashi, S., Nose, A. (2004) Formin3 is required for assembly of the F-actin structure that mediates tracheal fusion in *Drosophila*. *Developmental Biology* 274:413-425.
- 7) 0502161717
Kato, K., Chihara, T., Hayashi, S., (2004) Hedgehog and Decapentaplegic instruct polarized growth of cell extensions in the *Drosophila* trachea. *Development* 131:5253-5261.
- 8) 0502242013
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. *Current Biology* 14:2228-2236.
- 9) 0508111436
Akimoto, A., Wada, H., Hayashi, S. (2005) Enhancer Trapping With a Red Fluorescent Protein Reporter in *Drosophila*. *Developmental Dynamics* 233:993-997.
- 10) 0601201345
Shinza-Kameda, M., Takasu, E., Sakurai, K., Hayashi, S. and Nose, A. (2006) Regulation of Layer-Specific Targeting by Reciprocal Expression of a Cell Adhesion Molecule, Capricious. *Neuron* 49,205-213