

体系的RNAiによるショウジョウバエゲノムの機能解析

●上田 龍¹⁾ ◆西郷 薫²⁾

1) 国立遺伝学研究所系統生物研究センター 2000～2002年度公募分担、2003～2004年度計画代表
2) 東京大学大学院理学系研究科 2000～2002年度公募代表、2003～2004年度計画分担

＜研究の目的と進め方＞

RNAiは二本鎖RNAを用い、標的遺伝子の発現 (mRNA) をノックダウン (分解) する新技術である。ゲノム計画により明らかにされた遺伝子の系統的な機能解析にきわめて適している。本特定研究の初期に公募研究として3年間おこなわれた本研究の目的は1) 逆方向反復配列からなるRNAを発現させるDNA (IR-cDNAコンストラクト) を系統的に作成し、それをP因子導入法でショウジョウバエ個体に導入した変異体ライブラリを系統的かつ網羅的に作成する技術を開発すること、および2) 1,000系統からなる初期的な変異体ライブラリを実際に作成し、発生分化の機構解明に利用することにあつた。

しかしながら公募研究の第3年度 (2002年度) には、それまでに開発された技術を実際に適用し、全ゲノムの14,000遺伝子をターゲットとして誘導型RNAi変異体ライブラリを構築するプロジェクトを開始した。その後、計画研究として引き続き2年間の研究をおこなつた。大規模なライブラリ構築の目的は、個々の遺伝子の機能解析はもとより、体系的な遺伝子ネットワーク解析を可能とすることにある。しかしながらこの長期にわたるライブラリ構築期間中にこれらの機能解析研究をも独自に実行することは困難である。もとよりこのライブラリはショウジョウバエ変異体を材料とする多様な遺伝学研究に応用されることに意義がある。そこで作出されたハエ個体を使用する上の有効性や問題点の評価も含めて、遺伝子機能解析研究についてはそれぞれの分野のエキスパートである国内外の多くの研究者と共同研究体制を組んでおこなうこととした。

＜研究開始時の研究計画＞

- 1) ショウジョウバエにおいては改変遺伝子を組織特異的に発現させるためにGAL4-UASバイナリーシステムが利用できる。このシステムを利用してcDNA断片の逆方向反復配列 (IR) を強制的に発現すればヘアピン型二本鎖RNAが産生し、RNAiが誘導される。そこでまず、pUAST形質転換用ベクターにIRコンストラクトをHigh Throughputに作成するベクター (IRベクター) を考案する。RNAiを効率的に誘導するため、IRの長さや向き、ループ部分の構造などを検討する。また真に効率的なRNAiを誘導するにはそのメカニズムを解明しなければならない。このためRNAi遺伝子の同定を試みる。
- 2) 上記の検討後、全遺伝子を視野に入れた大規模なベクターの構築と形質転換をおこない、変異体ライブラリの構築を試みる。
- 3) ライブラリ作成と並行して、国内外の研究者と変異体システムを用いた個々の遺伝子の機能解析をおこなう。

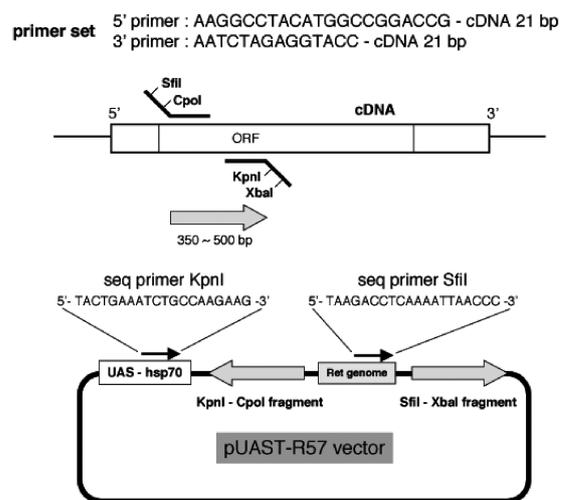
＜研究期間の成果＞

1) 【ベクターの開発】

当初SfiIやCpoI等の方向性を限定できる制限酵素を用いて逆方向反復配列を組み込むIR-ベクターを考案した。

これを用いて115コンストラクトを作成し、形質転換をおこなつた。しかしながらこの方法では大量にコンストラクトを作成する上でコストが嵩むため、2年度目にはPCRプライマーの制限酵素サイトを2重にし、クローニングサイトを改良したベクターを作成することにより、より容易で安価なIR作成を可能にした (図1)。

図1 IRコンストラクト作成の概念図



一方、初期のコンストラクトを用いた実験から

- a) IRコンストラクトを強制発現すると、表現型においてもまたmRNA量においても、loss-of-function変異をGAL4ドライバー依存的に誘導できること (文献1, 3, 5)。
- b) IRコンストラクトはhead to headにアレンジした方がより効率的であること。
- c) ORFの方がUTRよりもRNAi効果が高いこと。
- d) IRコンストラクトの断片長を100～600bpまで4段階に変えて効率を検討したところ、400bp以上が望ましいこと。
- e) さらに、ループ部分にイントロンを含むゲノム配列を挿入するとノックダウン効率が高くなるという報告 (Kalidas, S. and Smith, D. P. 2002) を受けて、複数のイントロン配列を検討し、ハエret遺伝子のイントロン5と6を含む断片がもっとも効果的であることを明らかにした (文献10)。

【RNAi遺伝子の探索】

RNAiメカニズムそのものに関わる遺伝子の探索を目的として、RNAi変異のmodifierスクリーンを試みた。

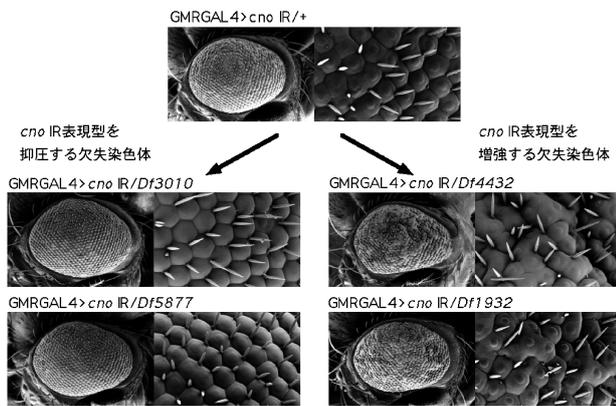
まずemc遺伝子を例としてGAL4 transgeneとemc-IR transgeneを共に持ち、(RNAiによって) 体表の感覚器である剛毛が増加する変異体を樹立する。このハエと染色体欠失を持つハエとを交配し、F1における異常表現型が抑圧されるかあるいは増強されるかを計測する。ショウジョウバエでは欠失染色体系統がセットとして利用でき、

染色体のほとんどをカバーすることができる。このgene dose titration analysisによって幾つかの染色体領域がemc遺伝子あるいはRNAiメカニズムと相互作用することが判明した。

次にcanoe遺伝子についても同様に、個眼の配列が乱れてrough eye表現型をもつ変異体を作成し、上記の染色体領域がこの異常に対してどのような影響を及ぼすかを検討した(図2)。すなわち両遺伝子の変異表現型を共通して増強あるいは抑圧する染色体領域を探索したところ、第3染色体上にそれぞれ2カ所の領域が特定できた。

このうちひとつの染色体領域に存在する65の遺伝子について、培養細胞でのルシフェラーゼ・アッセイを利用して、RNAiにおよぼす影響を検討した。ホタル・ルシフェラーゼのIRコンストラクトを染色体に導入したショウジョウバエS2細胞にこれらの遺伝子の二本鎖RNAをトランスフェクトし、ルシフェラーゼRNAiに対する効果を計測した。65遺伝子中、2種の遺伝子がRNAiに必要であるとの結果を得ているがまだそれらの詳細な解析にはいたっていない。

図2: canoe遺伝子RNAiのrough eye表現型を増強・抑圧する染色体領域の探索



【RNAiメカニズムの解明】

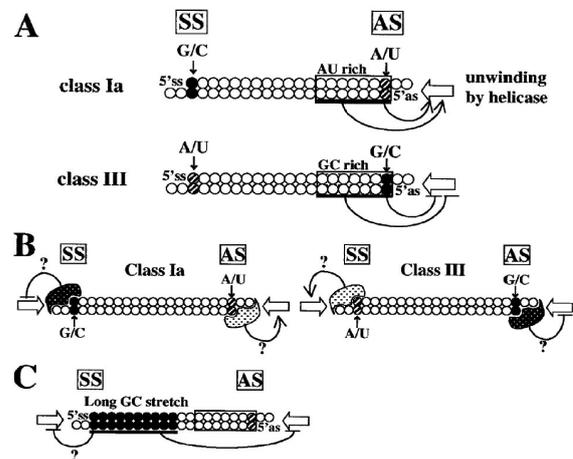
本研究ではショウジョウバエを材料とし、RNAi技術を応用してゲノムワイドな遺伝子機能解析を目指すものである。しかしながら研究発足当初はRNAiのメカニズムそのものほとんど知られていない状況であり、哺乳類培養細胞とルシフェラーゼ・アッセイという簡便で正確な手法をもちいてRNAiの分子機構にアプローチすることも試みた。

哺乳類においてはハエと異なり、長い二本鎖RNAによってRNAi (RNA干渉) が誘導できる細胞種は限られているが、一方、in vitroで合成した21-23bpのsiRNAを使えば広範囲の細胞種にRNAiを効果的に誘導できることが知られている。下等真核生物では、長い二本鎖RNAを分解するRNaseIII様の酵素Dicerやある種のPIWIファミリータンパク質がこのRNAiに働いていることがわかっているが、siRNAが誘導するRNAiの分子メカニズムについては殆ど知られていなかった。本論文(文献4)では哺乳類培養細胞において、DicerとPIWIファミリーに属する翻訳開始因子eIF2CがこのsiRNAが誘導するRNAiに重要な役割を果たしていることを明らかにした。ヒトおよびマウス細胞においてはDicerとeIF2C1あるいはeIF2C2が複合体を形成し、さらにその複合体形成にはPIWI domainが不可欠であることが免疫沈降実験で明らかとなった。

一方、上記研究において、哺乳類におけるsiRNAを用いたRNAiはその配列により効果が著しく変わることが判

明した。遺伝子にもよるが、およそ1-20%の配列しか意味のあるRNAiを引き起こさない。従って、ゲノムワイドの遺伝子機能破壊を引き起こすためには、どのような配列を持ったsiRNAが有効かを素早く特定できるようにする事が極めて重要である。本論文(文献8)では、極めて高い確率(ほぼ100%)で配列を特定する規則が初めて示されている。4種類の外来性遺伝子および2種の内在性遺伝子について、62種類のsiRNAを作成し、3種の哺乳類培養細胞(ヒト、マウス、チャイニーズハムスター)とショウジョウバエ培養細胞、及びニワトリ胚においてその効果を検討した。その結果、siRNAが、4つの配列条件(詳細は文献8参照)を満たすと、哺乳類細胞で高効率(ほぼ100%)の遺伝子発現抑制効果をもたらすことができることが分かった。siRNAのデザインルールを明らかにした今回の報告により、哺乳類のfunctional genomicsを体系的におこなうことが可能となるであろう。

図3: 哺乳類細胞におけるsiRNAを介したRNAiのモデル。siRNA末端のGC/AU塩基対とunwindingとの関係(詳細は文献参照)



また本研究期間中にもRNAi技術の急速な発展により、種々の哺乳類細胞でも一時的あるいは持続的なRNAiが可能となってきた。文献10ではショウジョウバエと哺乳類の培養細胞、およびショウジョウバエ個体を用い、効率的なRNAi誘導の条件を探った結果を纏めてある。ヘアピン型二本鎖RNAを発現するためのIRコンストラクトにおいてはIR断片の長さ、およびループ部分の配列とその長さがRNAi効率を左右した。培養細胞のトランスフェクションにおいては二本鎖RNAがIRコンストラクトよりも遙かに効率的であったが、細胞を観察すると後者においてヘアピン型二本鎖を作るべきRNAの蓄積が観察され、siRNA産生不全が示唆された。ハエ個体においてはemc遺伝子を例として、GAL4-UASシステムにおけるRNAi誘導の最適条件を決めた。体系的にRNAiハエ変異体バンクを構築するための基礎である。

2) 【変異体ライブラリの体系的作成】

ベクターの基本構造が確定した2002年度よりゲノムワイドな変異体の作成を開始した。まず、IR断片をPCRクローニングするためのプライマーの設定をおこなった。本研究期間中にハエゲノムのアノテーションは3回の大きな変更/改善をみている。Release2.0のデータを用いて約半数のプライマーを計算し、Release3.0のデータで残りを取得した。ゲノムデータベースには現在coding

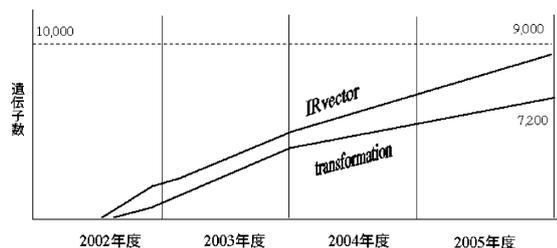
sequenceとしてsplicing variantも含めて約18,000個の配列が存在する。至適プライマーを計算すると、450bp以上の長さが取れるORF配列は15,000個であった。350bpまでを許容範囲としてさらに1,000の配列を加え、その中から各遺伝子に対応するプライマー1種類を手作業で選んだ。14,000遺伝子中、約11,000の遺伝子(tRNAや転移因子を除く)に対するプライマーが設定できた。

当初ORF断片はESTクローンを鋳型としてPCR取得することを検討した。2002年にはゲノムプロジェクトにより分離されたESTクローンのセット(Drosophila Gene Collection rel.1約5,500クローン)が利用可能であったが、実際のセットでは大腸菌に増幅のわからないものやプレートへの配置に誤りもあり、High Throughputには適しないことがわかった。そこで計画を変更し、cDNA混合物より断片取得を行う条件設定を行った。ESTクローンの得られていない遺伝子にも対応可能と考えられた。各種発生時期の個体より抽出したmRNAの混合物からRT-PCRにより調製したcDNAに対して、上記プライマーを用いたPCRをおこなったところ、成功率は平均95%を越え、大規模な種類の断片クローニングにも適用できると考えた。実際の作業はベクターに対して2回のsubcloningをおこなうものである。分注ロボットを導入して高速化を図ったが、多くの部分は人手を要する行程であり、完全な自動化は不可能であった。

ベクター構築の過程でもっとも困難だったのは2回目のsubcloningである。大腸菌内で増幅する過程でプラスミド自体の消失、IRの構造変化(欠失/挿入)が高頻度で生じた。組換えを抑制した大腸菌ホストの選択によっても完全に防ぐことはできない。このため、形質転換に使用する直前のベクターサンプルでシークエンスによるIRコンストラクトの構造確認が必須となった。(構造を確認後にプラスミドを増幅すると構造異常が生じるため。)シークエンス反応自体もIR構造により著しく減弱するため、注意深い条件設定によって対処した。

このようにベクター構築作業は多くの人手と時間を要するものであったが2002年の10月に現行のベクター(pUAST-R57)を用いたライブラリ構築を開始してから2004年度末までに約7,000遺伝子分まで作成した。2005年度末までには9,000遺伝子に対応したものを構築できる予定である(図3)。

図3: ベクター構築とハエ形質転換システム作出



一方、これらのベクターをハエ個体に導入して系統化する作業も並行しておこなった。2001年度までの初期実験では1種類のベクターで10系統ほどの形質転換システムを作出し、RNAiの効果を検討した。ショウジョウバエの形質転換においては導入遺伝子の発現が染色体位置効果を受けるため、系統間に発現量の差が観察される。RNAi系統においても同様に系統間で遺伝子ノックダウンの効果に差が生じてくる。

初期のベクターで1,000遺伝子のRNAiシステムを作出し、

全細胞でRNAiを誘導したときの致死性によってその効果を検討したところ、確率的には2系統を作ればそのどちらかで致死性が観察されることがわかった。そこで、現行ベクターでの形質転換においてはそれぞれのベクターで2系統を作出した。

3) 【RNAi変異体システムを用いた遺伝子機能解析】

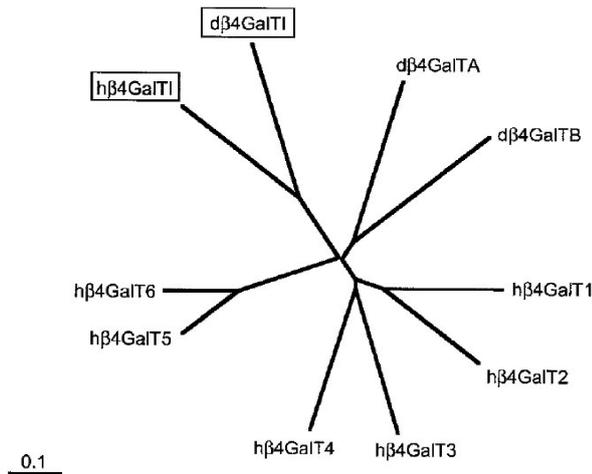
本研究期間の初期からこのRNAi変異体システムを利用し、遺伝子機能を体系的に解明するための共同研究を開始した。主要なテーマの一つは糖鎖機能を遺伝学的に解明する研究であり、もう一つは免疫機構を解明する研究である。これらの研究の特色はゲノム全体を対象としているところである。共に関係する遺伝子は多数におよぶ。それらを全体的にHigh Throughputで解析することにより、それぞれの現象におけるゲノムの関与を明らかにすることを目指している。もとより、数年の単位で目標に到達できるものではないが、研究遂行の過程で得られた研究成果について、以下、文献に即して述べる。

【糖鎖機能の解明】

糖鎖機能について、本変異体ライブラリを利用した解析は主に創価大学・西原教授と共同でおこなった。糖鎖はヒトの疾病や個体発生において重要な役割を担っているが、多様な糖鎖が個体レベルでどのような役割を果たしているかは、ほとんどわかっていない。糖鎖の基本機能の全容を個体レベルで明らかにするために遺伝学的アプローチが考えられ、その点からショウジョウバエは有用な材料である。糖鎖関連遺伝子はヒトで約300種と予想され、すべてに対するターゲットマウスの作製は短期間では困難である。ショウジョウバエではそのうち約90種が進化的に保存され、大部分は基本的な糖鎖構造を作るために必要なものである事を確認した。つまり、ハエをモデル系にしてヒトの基本的な糖鎖機能を解析できると考えられる。例えばヒト糖転移酵素にオルソログとして対応する75種のハエ遺伝子を単離同定し、網羅的RNAi変異体の作製と解析をおこなっている。また、糖転移酵素遺伝子のハエパラログや糖ヌクレオチド輸送体、レクチンや糖蛋白質のコア蛋白質、さらに分解酵素などの候補遺伝子を含めると糖鎖機能に関連する遺伝子群は260個になる。このような多数の遺伝子を網羅的に機能解析する上で本変異体ライブラリはきわめて有用である。

具体的な研究例をあげる(文献5)。ヒト糖転移酵素遺伝子をクエリーとしてハエゲノムを調べると、ヒトで7種知られているガラクトース転移酵素遺伝子は、ハエでは3種が存在することがわかる。これらのうち、ヒトβ4GalTIとハエβ4GalTIは進化的に非常に良く保存され、その機能としても保存されていることが推定される(図4)。

図4：ヒトおよびハエのガラクトース転移酵素遺伝子群のClustalWアラインメント

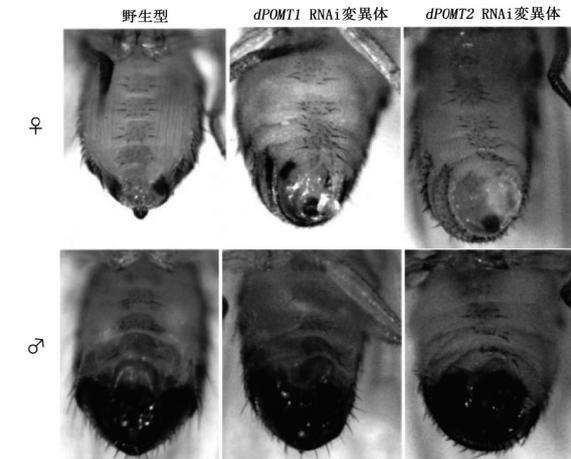


実際にハエβ4GalTI蛋白質をin vitroで発現してその基質特異性調べると、まさにこの遺伝子がヒトβ4GalTIのオルソログであることがわかった。ハエのβ4GalTI遺伝子をノックダウンするために発生期を通じて全細胞でRNAiを誘導すると致死となり、この遺伝子の機能が発生に重要な役割を果たしていることがわかった。この研究を通じて、表現型の強度（致死性）が遺伝子発現阻害（RNAi効果）の程度に依存すること（致死性を示さない系統ではRNAi効果が低い）、また本手法ではRNAiはターゲット遺伝子の発現阻害を特異的に誘導し、配列のよく似たファミリー遺伝子には影響を及ぼさないことなどが初めて確認された。

ハエとヒトの研究が同時期に発表されることもある。糖鎖の硫酸化に働くPAPSの輸送体遺伝子については殆ど知られていないが、本研究でPAPS輸送体をコードするヒトの新規遺伝子（PAPST1）を同定し（文献6）、その情報を元にショウジョウバエのオルソログを同定した。同時期にUdo HackerらはショウジョウバエではWgやHhシグナル伝達系に必須な遺伝子としてPAPS輸送体遺伝子を同定し、slalom (sll) と名付けた。ハエとヒト両遺伝子産物のアミノ酸配列は48.1%の相同性を示し、hydropathy analysisからtype III transmembrane proteinと推定される。実際、このPAPST1をSW480細胞で発現すると産物がゴルジ膜に局在することが確かめられた。また機能的にも、PAPST1およびSLLを酵母細胞で発現することによりPAPSのゴルジ膜内への取り込みが著しく増大することがわかった。PAPST1は胎盤、脾臓で高発現しており、大腸、心臓では殆ど発現が認められない。PAPSの合成に関与する幾つかの遺伝子で遺伝病が知られており、ハエsllのRNAi変異体でも致死となることから、その詳細な遺伝学的解析がPAPSの輸送および翻訳後硫酸化修飾の重要性に新しい知見をもたらすことが期待された。ヒトではマンノース転移酵素遺伝子（POMT1）の変異は筋萎縮などWalker-Warburg症候群を発症する。ハエのホモログ遺伝子rotated abdomen (rt) の変異体は成虫腹部がねじれる表現型を示す。ヒトにはPOMT2も存在することが知られているが、文献13ではこれら両遺伝子のRNAiによる解析をおこなった。ハエPOMT2のノックダウンでは、rt変異体と全く同様の表現型が観察され（図5）、両遺伝子が遺伝学的に相互作用することも判明した。一方、培養細胞で発現させた蛋白質の活性測定では両酵素の共発現でのみdystroglycanへのマンノース転移活性が現れた。ハエ個体でも同様に、それぞれの変異体ではターゲット

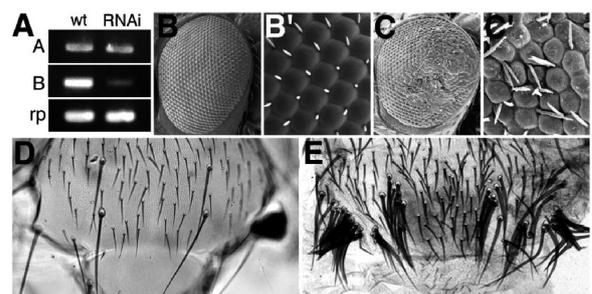
特異的にmRNAが減少するにもかかわらず、POMT活性は両変異体とも全く検出されなかった。すなわち、これらの酵素はin vitroでもin vivoでも協調して酵素活性を発揮することにより、正常な筋肉の形成／維持に働いていることが明らかとなった。

図5：ショウジョウバエマンノース転移酵素遺伝子変異体では腹部がねじれる表現型を示す



ヘパラン硫酸プロテオグリカン（HSPG）は細胞表面での様々な分子認識に働いており、結合蛋白質の特異性はHSの硫酸化パターンに依存することが知られている。文献11ではショウジョウバエHS 3-OH sulfotransferase-b (Hs3st-B) がNotchシグナル伝達に関係する新規因子であることを示した。RNAi変異体で組織特異的にHs3st-Bをノックダウンすると、いわゆるneurogenicな種々の異常が生じる。Notchシグナルのターゲット遺伝子発現も阻害される。エピスタシスの分子的解析および抗Notch抗体での組織学解析から、Hs3st-BはNotch蛋白質の安定性／細胞内輸送を調節していることが示唆された。

図6：Hs3st-B遺伝子ノックダウンによるneurogenic表現型。RNAiのターゲット特異性も示してある。



セラミド化合物がアポトーシスの重要なmediatorであることが知られている。平林らはGlycosylceramide synthase (GlcT-1) がglycosphingolipidの主要な構造であるglycosylceramide生成を通じて細胞内のセラミド量を調節していることを明らかにしているが、文献14ではショウジョウバエをモデルとして、GlcT-1のin vivoでの役割を検討した。実際にGlcT-1強制発現により酵素活性の欠損細胞株でもglycosphingolipid合成が誘導される。遺伝子発現は全発生期を通じてユビキタスである。生体に於いてはRNAiによる遺伝子発現のノックダウンによりアポトーシスが増加し、強制発現ではgrimやreaper欠損により生じるアポトーシスの部分的抑圧が観察され、セラ

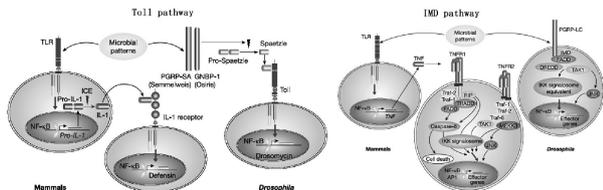
ミド生成が細胞死シグナル伝達に機能していることが示唆された。

糖蛋白質のムチンはその巨大な糖鎖により細胞表面の最も遠くを覆っている成分である。分泌されるとECMとなり、さらに組織の潤滑やあるいは昆虫に於いては体内でバクテリアの捕捉など多様な機能を有している。文献9ではエクダイソンにより発現誘導されるムチンとして同定したgp150のコア蛋白質がEig71Eeであることをその発現パターンやEig71EeのRNAiによるgp150の減少によって証明した。

【先天性免疫機構の解明】

ショウジョウバエにおける先天性免疫機構の解明ではフランス・CNRSのB.Lemaitre博士と共同研究をしている。ショウジョウバエの免疫機構では異なるクラスの感染微生物を認識してTollあるいはimmune deficiency (Imd) シグナル伝達経路を選択的に活性化することにより、病原微生物特異的な防御反応を誘導する。この二つの経路はヒトにおいても非常に良く保存された経路である (図7)。

図7：ヒトおよびハエの先天性免疫機構の比較 (A.Hoffman,2003より)



ハエではToll経路はグラム陽性菌とカビに、他方Imd経路はグラム陰性菌に対する防御反応を活性化する。文献1ではハエのImd経路の新規構成因子として哺乳類のFas-associated death domain-containing protein (FADD)が機能していることを証明した。また、dFADDは、ImdとDreddの間で機能していることが分かった。一方、感染した微生物の認識に関与するのはpeptidoglycan recognition protein (PGRP) であり、グラム陽性菌は体液中を循環するPGRP-SAによって、グラム陰性菌はおそらく膜受容体であるPGRP-LCと、PGRP-LEによって認識され、それぞれのシグナル伝達経路が活性化される。一方、Gram-negative binding protein (GNBP) はもともとカイコにおいて様々な微生物の化合物に結合能を持つものとして同定された。ショウジョウバエでは3種のGNBPと2種の近縁タンパク質遺伝子がゲノムにコードされているが、それらの機能は不明である。文献12ではRNAiを用いて、グラム陽性菌によるTollの活性化にGNBP1が必要であることを明らかにした。GNBP1二本鎖RNAの発現により、ハエはグラム陽性菌感染に感受性となり (生存率が減少する)、また抗カビペプチドをコードするDrosomycin遺伝子のグラム陽性菌感染による発現が低下する。一方、カビによるDrosomycin遺伝子の発現は影響を受けない。このGNBP1不活性化の表現型はPGRP-SAのnull変異体のそれと同じであり、さらに遺伝学的解析からはGNBP1はToll受容体のリガンド、Spatzleの上流で働くことが示唆された。以上の結果より、ショウジョウバエではグラム陽性菌の検出に2種類のパターン認識受容体、PGRP-SAとGNBP1が必要であることが明らかとなった。

文献17では、培養細胞系での大規模なRNAiスクリーンにより、このImd経路に関わる2つの新規因子を発見し報

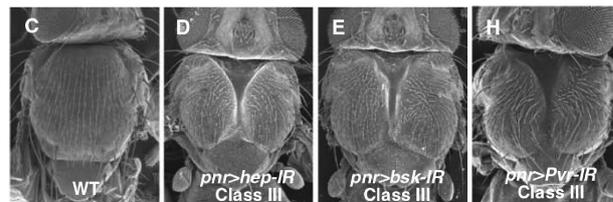
告している。inhibitor of apoptosis 2 (iap2) と transforming growth factor-activated kinase 1 (Tak1)-binding protein (TAB)である。前者は生体内でもFat Bodyにおける抗菌蛋白質の生産に必須であった。両者はImdの下流で働いており、(抗菌蛋白質の) 転写調節因子Relishの切断には関わらず、核内移行の別の機構があることを示唆している。

【その他、発生に関わる遺伝子機能の解明】

RNAi変異体ライブラリの応用は上記二つの領域に限られるわけではない。形態形成 (文献3、7、15)、アポトーシス (文献16、20)、行動 (文献18) の分野でも成果が得られている。その中から、幾つかを報告する。

PVR遺伝子とthorax closure現象についての共同研究を大阪バイオサイエンス研究所・石丸博士とおこなった。ショウジョウバエのRDGF/VEGF受容体のホモログPVRは、卵形成時におけるborder cellや胚発生時の血球細胞の移動に関わっている。また前者に於いてはMbcやRacがそのmediatorとして機能することも示されている。文献7ではRNAi変異体や生化学的な実験により、PVRが成虫形成時の組織融合 (thorax closure) にも働いており (図8)、Crk、Mbc、ELMO、RacがPVRからのシグナルをJNKの活性化に伝えていることを明らかにした。

図8：PVR-JNKシグナル伝達経路の組織融合変異表現型



味覚受容行動の共同研究は九州大学・谷村博士とおこなっている。味覚受容伝達の初期段階にG蛋白質が関係しているといわれているが、昆虫では直接的な証拠はまだない。文献18ではG蛋白質のガンマサブユニットG gamma1がショウジョウバエの甘味受容に働いていることを明らかにした。G gamma1は味覚受容器ニューロンの一つに発現している。このニューロンを種々の方法で機能低下させたところ、ハエのショ糖への反応が減弱した。RNAiで当該遺伝子をターゲットしたところ、受容ニューロンの電気生理学反応も低下した。null変異体を利用したモザイク解析でも甘味受容反応が低下し、当該遺伝子が甘味受容におけるシグナル伝達系で機能していることが明らかとなった。

Tincar遺伝子についての機能解析を慶應大学・岡野博士と共同でおこなった。Tincarはショウジョウバエの心臓の発生期にcardioblastの一部に選択的に発現する膜蛋白質であり、既知の機能ドメインを持たずかつ進化的に保存された蛋白質である。mRNA発現を調べると胚では中枢/末梢の神経系および中腸に発現が認められた。幼虫期には複眼成虫原基、なかでも分化期の光受容細胞に特に強い発現が観察され、RNAiによるノックダウンではその発生が強く阻害された (文献15)。

アポトーシスに関して、神戸大学・安達博士と共同研究している。発生場で異常な運命を選択した細胞はアポトーシスをおこして除去されるように、細胞の増殖や分化とアポトーシスは相互に関連している。この機構を調べるため、ショウジョウバエをモデルとし、翅成虫原基でspineless (ss) 遺伝子 (ダイオキシン受容体遺伝子ホモログ) を異所的に発現する系を開発した。モザイク

的にssを強制発現するとその細胞は翅から付属肢／触角へとトランスフォームする。この細胞ではJNKが活性化されアポトーシスが誘導されるが、それは原基での位置に依存して自律的あるいは非自律的となる。すなわち、これらの異常細胞を認識するために細胞間相互作用が介在していることを示唆している。文献16では上記の系でのアポトーシス誘導がFish-lipsという新規のleucine-rich repeat familyに属する膜蛋白質によって調節されていることを示した。

〈国内外での成果の位置づけ〉

本プロジェクトは網羅する遺伝子の数からして、トランスポゾン挿入変異体ライブラリを含めても変異体バンクとして世界最大級になったといえる。個別遺伝子を対象とした研究では、漸く共同研究の具体的な成果が出始めた。

当初の目的であった全遺伝子を対象とした、簡便で確実な、飽和スクリーニングおよび相互作用遺伝子スクリーニングのためにはライブラリ完成を急がなければいけないが、予備的なスクリーンを開始し、対象によっては期待を上回る成果が得られている。

本研究の初期から幾つかの研究室と始めた共同研究は、非常に大きな広がりを見せている。学会やセミナーなどで発表された成果をみて、新たな共同研究の申し込みが後を絶たない。現在では国内外100研究室におよんでいる。多くのケースでは100~300ほどの遺伝子を選択し、共同研究を申し込んでくる。その選択は様々で、マイクロアレイで候補を絞り込んだもの、gene ontology情報を参考にしたものなどが多い。これらの研究ではある程度まとまった遺伝子変異体をスクリーンして詳細研究の対象を絞り込む操作が必要であり、そこにライブラリの意義があと考えられる。

一方、期間中に同様のRNAi変異体ライブラリを作成する試みが国外2箇所ではまっている。オーストリア・Research Institute of Molecular PathologyにおいてはBarry Dickson博士が10,000遺伝子をカバーするライブラリ作成をおこなっている。IR断片が150bpと本研究でのIRコンストラクトと比較して短いとのことであり、RNAi効果が限定的ではないかと想定されるがそれなりの効果が観察されるという。またアメリカではHarvard Medical SchoolのNorvert Perrimon博士も同様のバンク作成のプロジェクトを始めた。すなわち、このようなバンクの有用性／必要性が認識されたということである。実際にバンクを使った研究では大量のハエ系統を送付する上での地理的な問題も大きく、その意味での利便性も考慮されているのかもしれない。

〈達成できなかったこと、予想外の困難、その理由〉

ゲノムワイドなライブラリの構築には2002年度より着手した。それ以前の試行段階でRNAi遺伝子の同定を並行しておこない、より効果の高い新しい技術を開発するという目標はショウジョウバエでは達成できなかった。しかしRNAiそのものに関してはsiRNAの効率的適用の技術が発見され、西郷らのゲノムネットワークプロジェクトへの展開が可能となった。

ある程度想定されたとはいえ、ベクターの構築、あるいはそのハエ個体への導入というステップでは非常に困難に直面した。新たなブレイクスルーとなる技術開発をあきらめ、通常の、ただしある程度信頼性の確立された技術を注意深く適用して規模の拡大を図ったが、やはり相当なロスがあったといわざるを得ない。当初の目標と

していた10,000遺伝子にはまだ達成していないが、ここまで拡大できたのは一重に多くの技術員の並大抵ではない努力のたまものである。

またこのような規模で作業をするとそこからの膨大な情報を整理するためにもinformaticsの助けが必要であることを痛感した。現在もデータ整理に追われているが、大規模情報処理システムの導入／強化がこのようなタイプの研究事業には必須である。

〈今後の課題〉

このライブラリを活用したゲノムワイドなwet研究を実行することが直近の課題である。幾つかの問題点も明らかになったとはいえ、遺伝子個々の機能解析には高い効果を発揮することが多くの共同研究で明らかとなった。これまでの成果、および進行中の研究から得られているデータをもとに、本ライブラリにしかできないゲノム研究を実現しなければいけない。

このような規模のライブラリを開発した結果、その維持と活用についても考慮しなければならない。漸く信頼性についてのデータもある程度得られたので、一般のショウジョウバエコミュニティに公開し、ライブラリをゲノム研究に役立ててもらえる状況となっている。この目的にはNBRPグラントの活用を考えている。ただし、これまでの共同研究申し込みの想定外の拡大とそれに対応するために費やした仕事量を考えると、一般公開に対応できる体制の構築は非常に高いハードルであると言える。

〈研究期間の全成果公表リスト〉

- 0206031219
Leulier, F., Vidal, S.S., Saigo, K., Ueda, R., and Lemaitre, B. (2002) Inducible expression of double strand RNA reveals a role of dFADD in the regulation of antibacterial response in *Drosophila*. *Curr. Biol.*, 12, 996-1000.
- 0210042032
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.
- 0203201531
Inaki, M., Kojima, T., Ueda, R., and Saigo, K. (2002) Requirements of high levels of Hedgehog signaling activity for medial-region cell fate determination in *Drosophila leg*: identification of pxb, a putative Hedgehog signaling attenuator gene repressed along the anterior-posterior compartment boundary. *Mech. Develop.*, 116, 3-18.
- 0404081815
Doi, N., Zenno, S., Ueda, R., Ohki-Hamazaki, H., Ui-Tei, K., and Saigo, K. (2003) Requirement of Dicer and eIF2C translation initiation factors for short-interfering-RNA-mediated gene silencing in mammalian cells. *Curr. Biol.*, 13, 41-46.
- 0305121934
Takemae, H., Ueda, R., Ohkubo, R., Nakato, H., Izumi, S., Saigo, K., and Nishihara, S. (2003) Proteoglycan UDP-galactose:beta-xylose beta1,4galactosyltransferase I is essential for viability in *Drosophila melanogaster*. *J. Biol. Chem.*, 278, 15571-15578.
- 0404081823

- Kamiyama, S., Suda, T., Ueda, R., Suzuki, M., Okubo, R., Kikuchi, N., Chiba, Y., Goto, S., Toyoda, T., Saigo, K., Watanabe, M., Narimatsu, H., Jigami, Y., and Nishihara, S. (2003) Molecular cloning and identification of 3'-phosphoadenosine 5'-phosphosulfate transporter. *J. Biol. Chem.*, 278, 25958-25963.
7. 0602051840
Ishimaru, S., Ueda, R., Hinohara, Y., Ohtani, M., and Hanafusa, H. (2004) PVR plays a critical role via JNK activation in thorax closure during *Drosophila* metamorphosis. *The EMBO J.*, 23, 3984-3994.
8. 0404081835
Ui-Tei, K., Naito, Y., Takahashi, F., Haraguchi, T., Ohki-Hamazaki, H., Juni, A., Ueda, R., and Saigo, K. (2004) Guidelines for the selection of highly effective siRNA sequences for mammalian and chick RNA interference. *Nucleic Acids Res.*, 32, 936-948.
9. 0602051845
Korayem, A. M., Fabbri, M., Takahashi, K., Scherfer, C., Lindgren, M., Schmidt, O., Ueda, R., Dushay, M. S., and Theopold, U. (2004) A *Drosophila* salivary gland mucin is also expressed in immune tissues: evidence for a function in coagulation and the entrapment of bacteria. *Insect Biochem Mol Biol.*, 34, 12, 1297-1304.
10. 0602051905
Ui-Tei, K., Ueda, R., Zenno, S., Takahashi, F., Doi, N., Naito, Y., Yamamoto, M., Hashimoto, N., Takahashi, K., Hamada, T., Tokunaga, T., and Saigo, K. (2004) RNA interference induced by transient or stable expression of hairpin structures of double stranded RNA in *Drosophila* and mammalian cells. *Molekulyarnaya biologiya*, 38, 2, 228-238.
11. 0602051853
Kamimura, K., Rhodes, J. M., Ueda, R., McNeely, M., Shukla, D., Kimata, K., Spear, P. G., Shworak, N. W., and Nakato, H. (2004) Regulation of Notch signaling by *Drosophila* heparan sulfate 3-O sulfotransferase. *J. Cell Biol.*, 166, 1069-1079.
12. 0404081840
Pili-Floury, S., Leulier, F., Takahashi, K., Saigo, K., Samain, E., Ueda, R., and Lemaitre, B. (2004) In vivo RNA interference analysis reveals an unexpected role for GGBP1 in the defense against Gram-positive bacterial infection in *Drosophila* adults. *J. Biol. Chem.*, 279, 12848-12853.
13. 0602051857
Ichimiya, T., Manya, H., Ohmae, Y., Yoshida, H., Takahashi, K., Ueda, R., Endo, T., and Nishihara, S. (2004) The twisted-abdomen phenotype of *Drosophila* POMT1 and POMT2 mutants coincides with their heterophilic protein O-mannosyltransferase activity. *J. Biol. Chem.*, 279, 42638-42647.
14. 0602051849
Koganeya, A. K., Sasamura, T., Oshima, E., Suzuki, E., Nishihara, S., Ueda, R., and Hirabayashi, Y. (2004) *Drosophila* glucosylceramide synthase: a negative regulator of cell death mediated by proapoptotic factors. *J. Biol. Chem.*, 279, 35995-36002.
15. 0602051820
Hirota, Y., Sawamoto, K., Takahashi, K., Ueda, R., and Okano, H. (2005) The transmembrane protein, Tincar, is involved in the development of the compound eye in *Drosophila melanogaster*. *Dev. Genes Evol.*, 215, 90-96.
16. 0602051804
Adachi-Yamada, T., Harumoto, T., Sakurai, K., Ueda, R., Saigo, K., O' Connor, M. B., and Nakato, H. (2005) Wing-to-leg homeosis by Spineless causes an apoptosis regulated by Fish-lips, a novel Leucine-Rich Repeats transmembrane protein. *Mol. Cell. Biol.*, 25, 8, 3140-3150.
17. 0602051810
Kleino, A., Valanne, S., Ulvila, J., Kallio, J., Myllymaki, H., Enwald, H., Stoven, S., Poidevin, M., Ueda, R., Hultmark, D., Lemaitre, B., and Ramet, M. (2005) Inhibitor of apoptosis 2 and TAK1-binding protein are components of the *Drosophila* Imd pathway *The EMBO J.*, 24, 3423-3434.
18. 0602051815
Ishimoto, H., Takahashi, K., Ueda, R., and Tanimura, T. (2005) G-protein gamma subunit 1 is required for sugar reception in *Drosophila* *The EMBO J.*, 24, 3259-3265.
19.
Brun, S., Vidal, S S., Spellman, P., Takahashi, K., Tricoire, H. and Lemaitre, B..The MAPKKK Mekk1 regulates the expression ofTurandot stress genes in response to septic injury in *Drosophila*. *Genes to Cells* (in press)
20.
Leulier, F., Ribeiro, S P., Palmer, E., Tenev, T., Takahashi, K., Robertson, D., Zachariou, A., Pichaud, F., Ueda, R. and Meier, P. Systematic In Vivo RNAi Analysis of Putative Components of the *Drosophila* Cell Death Machinery. *Cell Death and Differ.* (in press)