

ショウジョウバエのパターン形成遺伝子

●多羽田 哲也 ◆佐藤 純 ◆吉田 章子

東京大学分子細胞生物学研究所

＜研究の目的と進め方＞

生物の体構造を形成する様々なシグナリングシステムが明らかにされ、それらは進化的に良く保存されていることが知られるようになった。ショウジョウバエの翅は構造が単純であるためにこれらのシグナリングシステムの解析が容易であり、分子メカニズム解明の良いモデルシステムとして、数多くの知見をもたらし、特にモルフォゲンのようなパターン形成の枠組みの決定に働くシグナル分子の作用機序の解明では中心的な役割を果たしている（成果1）。本研究ではモルフォゲンの作用機序を理解するために、遺伝子変異をゲノムワイドに解析することを目指とする。そのために突然変異を誘発し、その染色体をホモに持つ体細胞クローンを作成し、翅におけるクローンの表現型によりスクリーニングを行う。また遺伝学研究所の上田龍教授との共同研究により逆位反復RNAを翅原基特異的に発現させることによりRNA干渉を誘起し当該遺伝子のノックダウンを行いその表現型を指標にモルフォゲンの作用機序を解明する。

構造の複雑度からいって、翅と対極にあるものが脳といえる。翅の系を用いて明らかにされたシグナル分子の作用に関する知見を応用することにより、複雑な3次元構造からなる脳の形成機構の解明も可能であると考えられる。特に視覚中枢をモデルとする。ショウジョウバエの視覚中枢は脳神経回路網のモデルとなる適度に複雑な構造をもちながら、現在の技術でも個別の神経回路を研究対象にしうる冗長度にすぎず、脳の回路形成一般の謎を解く良いモデルシステムである。ショウジョウバエの複眼の発生の研究は長い歴史があり視神経の投射に関わる変異も多く知られているが、投射先の脳におけるパターン形成機構は国内外を問わずほとんど解っていない。主に視神経の投射パターンと、視神経とシナプスを形成するラミナ神経節の形成に主眼をおく。そのために、Dpp、Wg、ヘッジホッグシグナルの機能解析を行う。また上記のRNA干渉法およびエンハンサートラップ法を用いてゲノムワイドに視覚中枢形成に関わる因子の探索を行う。

＜研究開始時の研究計画＞

〔1〕新規パターン形成遺伝子の探索

（1）化学変異原による突然変異作成

EMSを用いて染色体にランダムに変異を導入し、その変異をホモに持つ体細胞クローンを翅に作成し、その表現型を指標にスクリーニングを行う。パターン形成に働く遺伝子に変異が導入されたと思われる系統について、SNPをマーカーとした相同組み換えを行い、変異の責任遺伝子を同定する。その後、クローン解析により遺伝子機能解析を通してモルフォゲンの作用機序を明らかにする。

（2）RNA干渉法による変異の作成

遺伝学研究所の上田龍教授はショウジョウバエの遺伝子転写開始点5'端付近の配列をヘアピン構造を持つRNAとして転写する構造をUAS配列下におくキメラ遺伝

子（UAS逆位反復RNA遺伝子）を作成している。個々のショウジョウバエ遺伝子に対応するこのUASキメラ遺伝子を持つ系統と翅特異的に発現するSdGal4遺伝子を持つ系統を交配することにより、翅において当該遺伝子の機能をRNA干渉により阻害することができる。この表現型解析をゲノムワイドの行うことによりモルフォゲンの機能発現に働く新規の機構を明らかにする。同定された遺伝子情報をもとにして遺伝子変異を作成し、その機能解析を行いRNA干渉の結果を確認する。

〔2〕視覚中枢の形成機構

（1）Dppの機能

Dppは脊椎動物のBMPの相同遺伝子で視覚中枢の後方2カ所で発現しているがその機能はほとんど解析されていない。このシグナルの機能を明らかに

（2）Wntの機能

脊椎動物のWnt1の相同遺伝子であるWgはDppの近傍で発現し、Dppを誘導することが知られている。他のWntファミリーの発現を調べ機能解析を行う。

（3）ヘッジホッグの機能

ヘッジホッグは複眼で発現し、視神経によりラミナに運ばれラミナ神経の分化誘導に必要であることが知られている。この分化誘導のメカニズムを明らかにする。

（4）視覚中枢形成を制御する因子の探索—RNA干渉法

上述のRNA干渉法を視覚中枢にも応用する。そのために視神経ラミナ神経、ラミナグリアで発現するGal4ドライバを用いUAS逆位反復RNA遺伝子が発現させ、視神経投射パターンの解析から、視覚中枢形成を制御する因子を探索する。

（5）視覚中枢形成を制御する因子の探索—エンハンサートラップ法

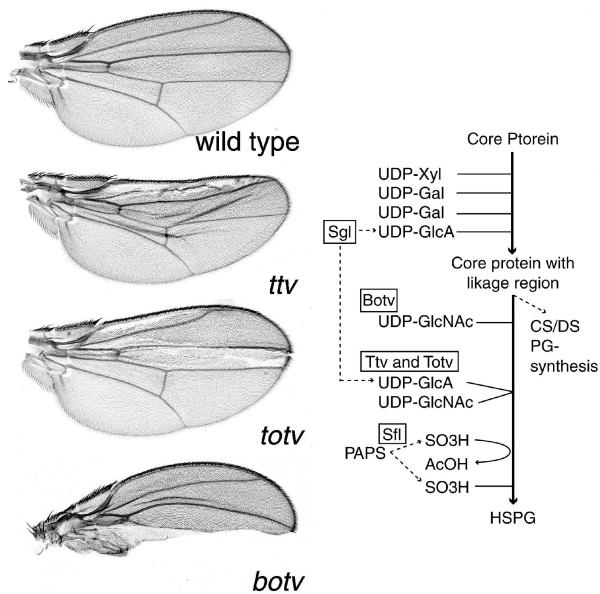
エンハンサートラップのスクリーニングにより視覚中枢に発現する遺伝子を同定し、機能解析を行う。

＜研究期間の成果＞

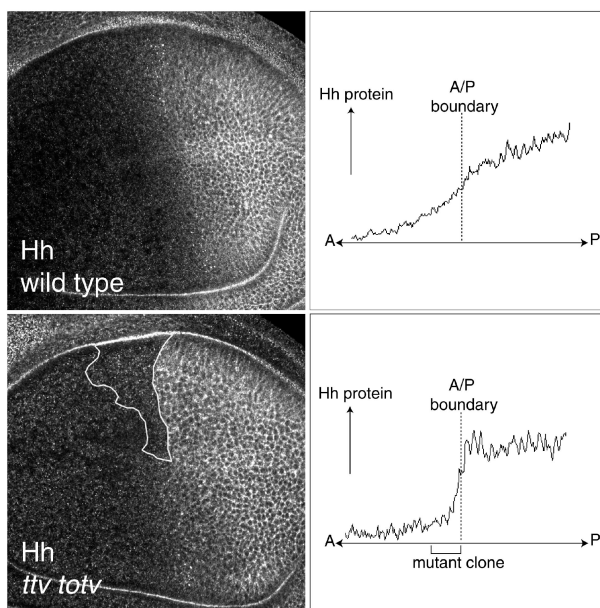
〔1〕新規パターン形成遺伝子の探索

（1）化学変異原による突然変異作成

EMSを用いて染色体に変異を導入し、2番染色体に関して体細胞クローンを形成してその表現型を指標とした変異遺伝子のスクリーニングを行った。互いに表現型が似ている変異の解析を続けると3つの異なった相補グループに分類された。遺伝子マッピングの結果、それらはそれぞれ、ヘパラン硫酸ロテオグリカン（HSPG）の糖鎖の生合成酵素（EXT）をコードする3遺伝子と同定された。ひとつは既知のtout-velu（ttv）とよばれる遺伝子で、ttvは糖転移酵素EXT1をコードしている。残りの2つの変異もそれぞれEXTに高い相同性を持つ遺伝子sister of ttv（sotv）とbrother of ttv（botv）と同定された。ttvはヘッジホッグの活性にのみ必要であると報告されていたが、3種のEXT遺伝子はヘッジホッグ、Dpp、Wg全てのモルフォゲンの活性に必要であることが解った。



クローン内での各モルフォゲンタンパク質のレベルを調べると顕著に低下しており、HSPGが無ければモルフォゲンが安定に細胞表面に維持できないことをうかがわせる。ヘッジホッグは後部コンパートメントで合成されるが、後部に形成されたEXTクローンにおいてもヘッジホッグのレベルは大きく低下する。後部にはヘッジホッグの受容体であるPtcが発現していない。故にヘッジホッグの消失は受容体との結合に始まるエンドサイトーシスによるモルフォゲンの減弱の機構とは無関係であることがわかる。EXTクローンが前後コンパートメント境界に形成されるとそれに接する後部のヘッジホッグのレベルが著しく上昇する。このことはHSPGをもたない細胞にはヘッジホッグが伝播することができず、行き場を失ったヘッジホッグが後部に溜まると解釈できる。

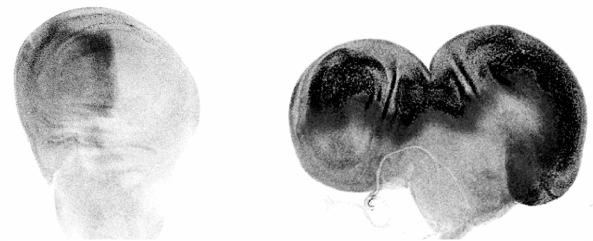


これはHSPGが細胞表面を覆うモルフォゲン伝播の足場として機能していることを示すものである。(成果2, 3)

(2) RNA干渉法による変異の作成

ショウジョウバエの翅は前後および背腹の直交する2つのコンパートメントから成り立っている。それぞれのコンパートメントに属する細胞は細胞系譜が独立で、コンパートメント境界で互いに混じり合うことはない。この境界はモルフォゲンの発現を規定しておりパターン形成において境界形成は重要である。前後コンパートメント境界の形成にはヘッジホッグシグナルが必要であることが知られているが、それ以上に詳しいことは解っていない。

超特異的に発現するGal4系統と、UAS配列下流にmRNAの5'端近傍の逆位重複配列を挿入した系統を交配するRNA干渉法（遺伝研上田龍教授との共同研究）によりコンパートメント境界形成にかかわる遺伝子の探索を行った。その結果前後コンパートメント境界の形成に関わると思われる遺伝子を得た。この遺伝子はプロテアソームの形成過程で必要とされるシャペロンに相同性がみられる。翅全体で機能をノックダウンさせると前後境界が乱れ、極端な場合は後部コンパートメントの中に前部コンパートメントが形成され原基全体の鏡像対称重複を誘導する。



野生型の翅成虫原基

RNA 干渉による鏡像対称重複

その後、成熟したプロテアソームの構成要素遺伝子のノックダウンでも同様な表現型が観察されたことからプロテアソームの形成がコンパートメント境界の形成に必須であると考え、解析を進めた。complementary cell proliferationという現象が知られている。これは、death signalが入って細胞死を起こす細胞は、死にかけの状態のときにDppやWgといったgrowth factorを発現して周りの細胞の増殖を促進してから、死んで除去され、その分が穴埋めされることによって細胞死を補う現象である。この場合、調節された細胞増殖によって、異常増殖は起こらない。しかし、この過程で細胞死を部分的に抑制すると、異常増殖が起こり、時にコンパートメントの境界が乱れることが観察されている。そこで、細胞死が起こらない変異のバックグラウンドで当該遺伝子をノックダウンすると変異が抑制された。当該遺伝子の欠失変異遺伝子のクローン解析では細胞死によりクローンが回収できない。以上のことから、RNAiのノックダウンにより引き起こされた不完全なプロテアソーム形成の障害が、広範囲な細胞死を惹起し、適切に制御されないまま、complementary cell proliferationが起こり、当該表現型が観察されるものと考えられる。しかし、本表現型は報告されているものにくらべてはるかに強いものであるために、このメカニズムについてはさらなる解析が必要である。

[2] 視覚中枢の形成機構

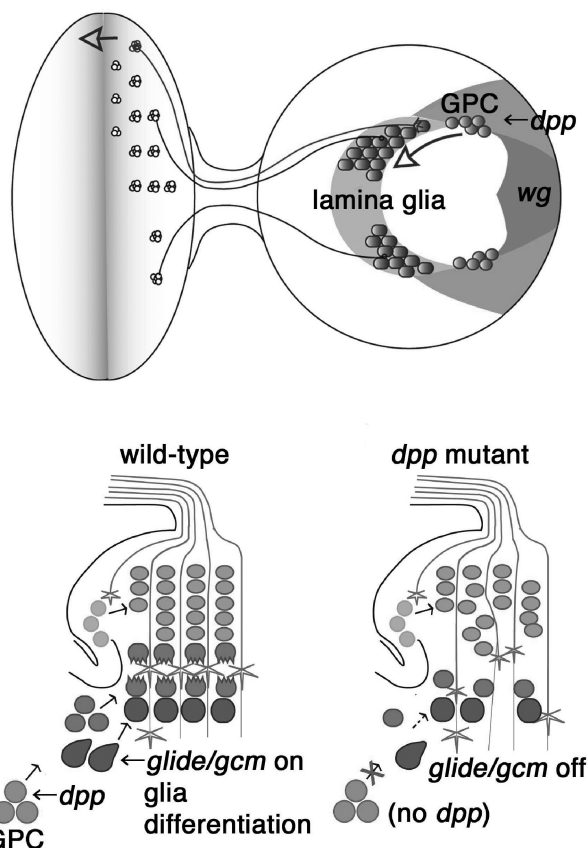
(1) Dppの機能

Dppは後部視葉皮質の背腹2か所で発現している。この領域は視葉に分布するグリア細胞の前駆細胞のプールの近傍である。グリア細胞はこの領域から前方に移動し、laminaにおいて視細胞の軸索投射のターゲットになることが知られている。Dppがグリアの形成に必要であることを明らかにした。ラミナにある3層のグリア細胞のうち2層はgcm (glial cells missing) を発現している。この細胞でRNAiによりDppシグナルをノックダウンすると、gcmの発現が消失し、細胞数が減少するとともに層形成が乱れ、それによって視細胞由来の軸索 (R-axon) の投射が阻害されるようになる。正中線に位置する成熟したグリアでDppシグナルをノックダウンしてもこのような表現型はみられないことから、グリア前駆細胞がDppシグナルを必要としているのではないかと考えた。そこでDppシグナルの細胞内信号伝達因子MadおよびMedeaのクローンを作成し、表現型を解析した。その結果、グリア前駆細胞領域を含むクローンにおいてのみこの表現型が観察された。またこのクローンではラミナの分化も異常になる。グリアはR-axonの投射に必須であり、R-Axonの投射によりラミナが分化することが知られていることから、この表現型は、Dppシグナルの直接のターゲットがグリアの分化であることで説明される。前述のようにグリア前駆細胞におけるgcmの発現はDppシグナルに依存している。異所的なDppシグナルによってgcmの発現が誘導されるが、それはグリア前駆細胞の領域周辺に限られている。このことはグリアを生み出すコンピーテンスがあり、Dppはそれのトリガーであるといえる。この系の解析によりグリアを生み出す細胞系譜の時系列にそった分化制御機構を明らかにすることができると思っている。これらのグリア細胞に接しているラミナ神経細胞もまたgcmを発現している。グリア細胞でgcmの活性を阻害すると予想通りグリアに分化できない。同様にlamina神経細胞でgcmの活性を阻害すると神経細胞の分化も阻害される。Gcmはグリアのみならず神経細胞の分化にも寄与することが示された。Laminaにおいて、グリアで発現するgcmはDppシグナルによって、神経細胞のgcmはヘッジホッグによって分化誘導され、それぞれの細胞系譜は異なっている。分化の最終段階で、両者が近接しgcmをそれぞれの分化スイッチとして使っていることは偶然なのか、あるいは何らかの共通なメカニズムが背景にあるのか、興味深いところである (成果4)。

(2) Wntの機能

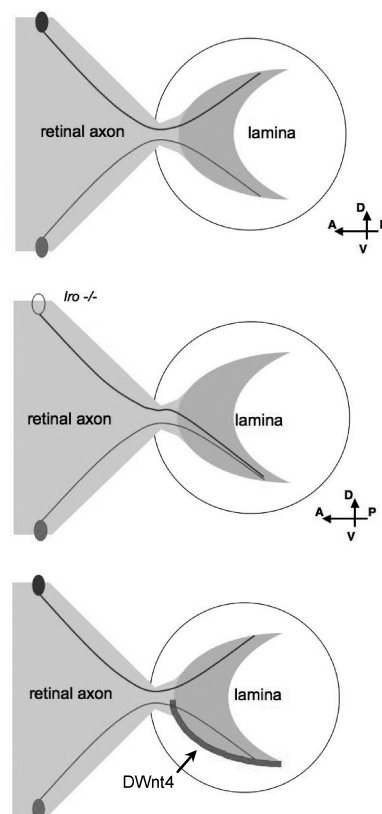
様々な生物の視覚系において眼における視神経細胞の配列は脳における投射先と正確に対応している。このような対応関係は“retinotopic map”もしくは“retinotopy”と呼ばれ、眼において受容された視覚情報を正しく解釈するために必要である。ショウジョウバエの複眼は幼虫期において複眼成虫原基から形成される。複眼は約750個の個眼からなり、個眼を形成する視神経細胞の軸索は眼柄を通して脳の視覚中枢へ投射する。視覚中枢の最も表層の領域はラミナ神経節と呼ばれ、特徴的な三日月型の構造を示す。複眼上においてより背側の視神経はラミナのより背側に、より腹側の視神経はより腹側に投射する。

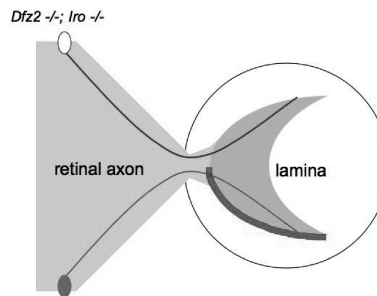
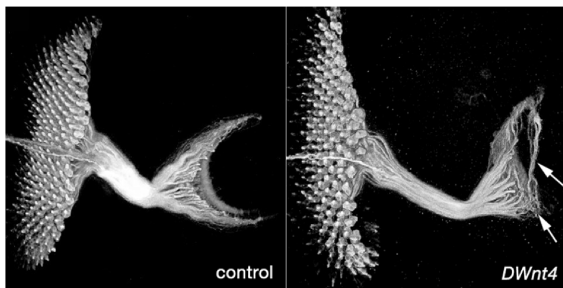
このような背腹軸方向のretinotopyを保証するための分子機構が存在すると考えられるが、ショウジョウバエにおけるretinotopyに関しての知見はこれまで非常に限られていた。今回の研究で筆者らはiroquois (iro)と呼ばれるホメオボックス遺伝子群およびWntファミリーに属する



分泌性蛋白質をコードするDWnt4による背腹軸方向の視神経投射機構について解析した。これまでの複眼発生の研究から、iroが複眼の背側の運命を決定していることが知られていた。視神経軸索の投射もiroによって制御されているのではないかと考え、iro変異体において視神経の投射を観察したところ、背側視神経の軸索が間違っラミナの腹側に投射するという表現型が見られた。従って複眼における背腹の運命が投射先の決定に関わっていると言える。投射先であるラミナにおいてもこれと呼応して働く因子が存在するはずである。様々なシグナル分子の発現を解析する過程でDWnt4がラミナの腹側特異的に発現することを見いだした。

DWnt4 mRNAとDWnt4蛋白の局在を比較したところ、興味深いことに腹側ラミナにおいて産生されたDWnt4は腹側の視神経軸索の表面上に局在している。このことはDWnt4が腹側視神経の軸索走行に関与していることを示唆する。そこでDWnt4変異体を解析したとこ

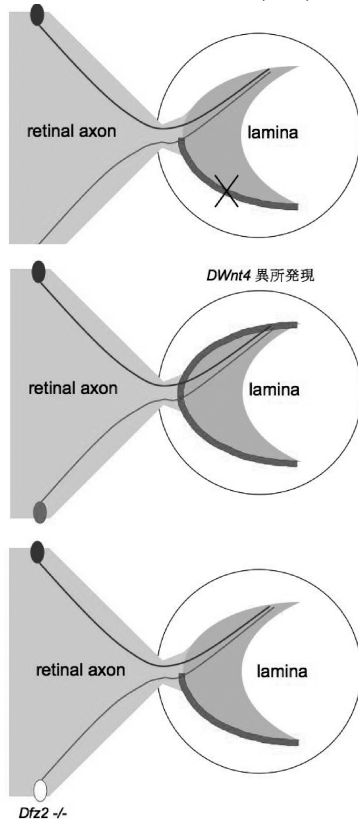




た。また、*iro*変異による背側軸索の腹側への投射は*iro* *Dfz2*二重変異によってほぼ完全に抑圧された。従って、*iro*が複眼の背側で発現することによって、背側視神経はDWnt4に反応せず、腹側視神経のみがDWnt4に反応して腹側ラミナに投射すると考えられる。

ろ、腹側視神経が間違っラミナの背側に投射する表現型が見られた。逆にDWnt4をラミナ全体で異所的に発現させると、腹側視神経軸索が異所的なDWnt4の発現によって誘引された。従ってDWnt4は腹側の視神経投射を積極的に制御していると言える。

Wnt受容体であるDfrizzled2 (*Dfz2*)およびWntシグナル伝達因子であるDishevelled (*Dsh*)の変異体においてもDWnt4



と同様な表現型が見られた。従って、*Dfz2*と*Dsh*がDWnt4シグナル伝達に関わっていると考えられる。*Dfz2*はDWnt4同様に視神経軸索上に局在していたので、DWnt4は軸索によって受け取られ、視神経側でWntシグナルを活性化すると考えられる。実際、*dsh*変異細胞を複眼特異的に誘導すると、DWnt4と同様な視神経軸索走行の表現型が見られたが、ラミナにおいて誘導してもそのような表現型は見られなかった。従って視神経に

おけるWntシグナル伝達が軸索走行を制御していると言える。

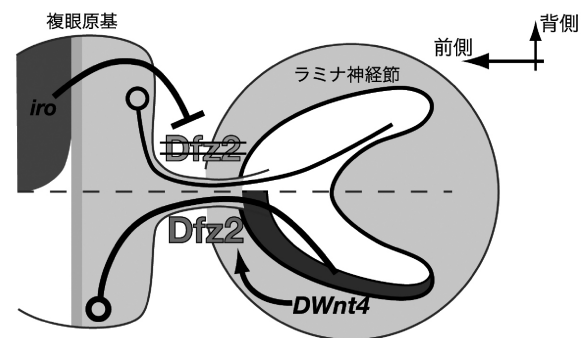
Wntシグナル伝達は β -カテニン/TCFを介して標的遺伝子の転写を制御するcanonical経路と、それらとは独立にシグナルを伝達するnon-canonical経路に分類される。複眼においてcanonical経路を活性化・不活性化しても視神経投射に異常は見られなかったが、non-canonical経路を不活性化するとDWnt4変異体と同様な表現型を示した。従って、DWnt4はnon-canonical経路を介して軸索走行を制御していると考えられる。

なぜ*iro*変異体において背側視神経が反対側の腹側ラミナに投射するのだろうか？本来はDWnt4に反応しない背側視神経が、*iro*が失われたことによってDWnt4に反応するようになったのかもしれない。*Dfz2*は背側視神経においても発現していることから、背側視神経も本来はDWnt4に対する反応性を持っていて、通常は*iro*によってその反応性が抑えているのかもしれない。実際、*iro*変異体において背側視神経軸索上にDWnt4が異所的に局在し

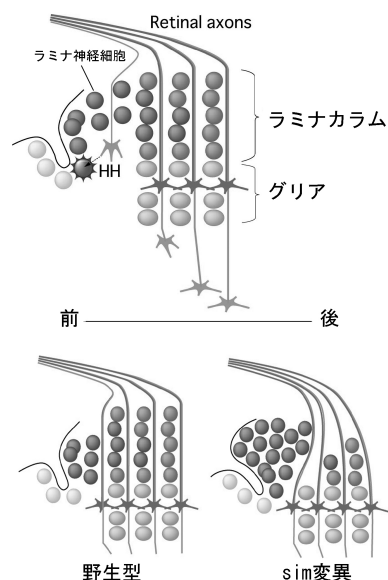
脊椎動物においてはEph/Ephrinファミリー分子によってretinotopyが制御されることが知られており4)、ショウジョウバエにおいても*iro*やDWnt4以外の様々な因子が関与していると考えられる。DWnt4の脊椎動物ホモログであるWnt9の役割は不明だが、脊椎動物においてはWnt3が背腹軸方向のretinotopyを制御することが最近報告された。脊椎動物と無脊椎動物においてretinotopyの分子機構がどのように保存されているのか、非常に興味深い問題である。(成果5)

(3) ヘッジホッグシグナルの機能

視神経 (R1-6) はラミナ神経とシナプス結合を形成す



る。発生期のラミナでは、視神経軸索を運ばれてくるヘッジホッグによりラミナ神経の分化が誘導されることが知られている。すなわちシナプス結合を作るターゲットの分化を視神経の投射が誘導することになり、retinotopic mapの形成を容易にするメカニズムと考えられている。ラミナにおいてヘッジホッグが誘導する遺伝子の探索の過程でSingle minded(Sim)を同定した。Simは



PASドメインを持つHLH型転写因子で、ショウジョウバエでもマウスでもmidlineに発現し、ショウジョウバエのmidline形成に必須の遺伝子として知られている。

ショウジョウバエのsim変異ではラミナは分化するにもかかわらず、視神経とラミナ神経が交互

に配置することなく、両者はそれぞれ乖離する表現型を示す。視神経の投射を詳しく観察すると、新たに投射する軸索は直前に投射した軸索に沿ってラミナに到達し、ラミナ神経の分化を誘導する。誘導されたラミナ神経はその両者の軸索の間に割り込むことで視神経軸索とラミナ神経が交互に配置する構造ができあがる。sim変異ではラミナ神経が軸索間に割り込むことができないと考えられる。逆にSimを生理的な条件よりも高いレベルで発現させると、ラミナ神経は野生型に比べてより早く視神経間に割り込む表現型を示すようになる。Simにより発現が制御されるターゲットがラミナ神経細胞と視神経軸索との相互作用を制御するものと思われる。(成果6)

(4) 視覚中枢形成を制御する因子の探索—RNA干渉法

視覚中枢で発現するGal4ドライバーによりRNA干渉法を行った。およそ1,000系統の解析を行った結果視神経軸索の走行を中心に約20%の系統で変異が観察されたが、個々の変異の浸透度は概ね低かった。その中でJAK/STATシグナルが機能していることを見出した。JAK/STATシグナルのリガンドと考えられているUpdはLamina前駆細胞を生成する領域で特異的に強く発現している。STATのノックダウンにおいてラミナの分化を調べるとラミナ前駆細胞のマーカーであるDachshund (Dac)の発現が失われ、より成熟した神経のマーカーであるElavの発現がみられた。本来Elavの発現は、より後期にみられるものであるが、これがラミナ神経の早期の成熟を意味するのか、あるいはラミナとは異なった神経へ分化している結果なのかを見極めるためにはより詳細な解析が必要である。

(5) 視覚中枢形成を制御する因子の探索—エンハンサートラップ法

数千系統のエンハンサートラップのスクリーニングによりNotchシグナル伝達系の因子を同定した。神経系の初期発生がNotchシグナルにより制御されていることはよく知られている。ラミナ領域においてはNotchのリガンドであるDeltaおよび活性の調節因子であるFringeが興味深いパターンで発現している。さらにNotchシグナルの活性を視覚化するとダイナミックに制御されていることが同える。ラミナにおいてNotchシグナルを抑制すると、前述のJAK/STATシグナルの項で述べたようなElavの早期発現が観察される。最近、NotchシグナルとJAK/STATシグナルの相互作用が報告されているが、この表現型の相同性はそれで説明しうるかもしれない。

〈国内外での成果の位置づけ〉

モルフォゲンの作用機序に関してはHSPGの解析も含めて、複数の国際誌からレビューの依頼をされることから評価されているものと思う。脳神経系の成果については昨年初めて成果を公表したのでまだ浸透度は低い、最新のものが国際的なレビュー誌に取り上げられるなど認知されつつあるものと考えている。

〈達成できなかったこと、予想外の困難、その理由〉

RNA干渉法によるスクリーニングではSTATシグナルのみ同定された。表現型の浸透度が低く、多くはfalse positiveであると思われる。ハウスキーピング遺伝子群などのノックアウトの結果では高い浸透度が得られるものもあるので、神経系でRNA干渉が機能しないとは一概に言えない。はっきりしたことは不明である。

〈今後の課題〉

STATおよびNotchシグナルの解析の過程で、細胞非自律的な表現型が観察された。これは今まで知られてNotchシグナルの機能を示しているとともに神経幹細胞の分化における新知見をもたらすものと考え解析を急いでいる。

〈研究期間の全成果公表リスト〉

1) 論文

1. 0202271659

Tabata, T. Genetics of morphogen gradients. Nature Reviews Genetics, 2, 620-630, 2001.

2. 0402101053

Takei, Y., Ozawa, Y., Sato, M., Watanabe, A. and Tabata, T. Three Drosophila EXT genes shape morphogen gradients through synthesis of Heparan Sulfate Proteoglycans. Development, 131 (1), 73-82, 2004.

3. 0402101104

Tabata, T. and Takei, Y. Morphogens, their identification and regulation. Development, 131 (4), 703-712, 2004.

4.

Yoshida, S., Soustelle, L., Giangrande, A., Umetsu, D., Murakami, S., Yasugi, T., Awasaki, T., Ito, K., Sato, M. and Tabata, T. DPP signaling controls development of the lamina glia required for retinal axon targeting in the visual system of Drosophila. Development 132 (20) 4587-4598, 2005

5.

Sato, M., Umetsu, D., Murakami, S., Yasugi, T. and Tabata, T. DWnt4 regulates the dorsoventral specificity of retinal projections in the Drosophila visual system. Nature Neuroscience, 9 (1) 67-75, 2006

6

Umetsu, D., Murakami, S., Sato, M. and Tabata, T. Highly ordered assembly of retinal axons and their synaptic partners is regulated by Hedgehog/Single-minded in Drosophila visual system. Development, 133 (5) 791-800, 2006