計画研究:生命システム情報

ショウジョウバエゲノムの改変による表現型情報の統合的解析

●相垣 敏郎 □ ◆林 茂生 □ ◆上田 龍 □

1) 首都大学東京・大学院理工学研究科 2) 理化学研究所・CDB 3) 国立遺伝学研究所・系統生物研究センター

<研究の目的と進め方>

ゲノムの遺伝子機能を解明するためには、個々の遺伝子の突然 変異体を作成し、その表現型情報を取得することが不可欠であ る。しかし、遺伝子の破壊変異体を作成しても、表現型の変化が 軽微な場合には、その評価が困難である。また、対象とされる事 象が複雑な場合には、記述方法を一貫させる事が困難である。特 に形態を扱い発生学においては時間・空間的な形態の記述に加え て個体間に生ずるばらつきも考慮に入れる必要があるが、定量化 の方法論はまだ確立していない。そこで、本研究課題では、従来 の研究者の経験に基づく表現型の記述ではなく、計算機を導入し て、精度の高い表現型情報を取得する方法論を確立する。それに よって、効率的な遺伝子機能情報の収集とより精緻な解析を行う ことを目的とする。具体的には、翅画像データを使った形態計測 技術、および胚発生過程のライブイメージングによる4次元形態 計測技術を開発する。これらの技術を核として、変異体の体系的 な作製、画像情報の取得、計算機による画像処理、データベース の構築、およびデータ解析法を確立する。変異体の作製は、ショ ウジョウバエのゲノムの遺伝子を強制的に発現する Gene Search (GS) システム、および誘導 RNAi によるノックダウン法を用い る。大規模に収集した表現型情報を体系的に分類し、機能関連遺 伝子の抽出を行なう。新規の機能をもつことが推定される遺伝子 について、重点的に機能解析を行う。データ処理においては、計 算機を用いた情報科学的な手法をとりいれるため、これらの技法 を専門とする情報科学の研究者と連携して、研究計画を推進する。

<2008年度の研究の当初計画>

1) 翅の表現型: 研究代表者(相垣)と研究分担者(上田)は、それぞれ GS 系統、および RNAi 系統を用いて、標的遺伝子の強制発現、あるいは機能をノックダウンする方法で変異体を作製する。翅原基で GAL4 を発現する sd-Gal4 系統に交配し、その F1 個体の翅標本を作製し、画像データとして収集する。本領域の東大・森下班員と連携して、計算機を使った画像データの解析、データベース化を継続する。強制発現、あるいは RNAi により顕著な表現型を示した新規の遺伝子については、より詳細な解析を行なう。翅の大きさに影響を与えた遺伝子について、翅以外の組織の大きさに及ぼす影響を検討する。インスリン経路との関連、酸化ストレス耐性の表現型との関連を明らかにすることを試みる。

2) 胚発生の表現型:研究分担者(林)は、4次元画像のデジタル化、定量化をショウジョウバエ胚の各種組織を用いて検討する。生物資料特有の像のばらつきを評価するために多検体サンプルの同時撮影の系を立ちあげ、改善する。気管上皮の陥入過程をタイムラプス撮影で記録したものを素材に細胞形態の抽出の半自動化を試みた。さらに得られた定量的データを評価するためにコンピューターシミュレーションへの適用を試みる。

3) ショウジョウバエゲノムの転写開始点の解析:GS系統を用いた強制発現、および誘導型RNAi法は、何れも既存のアノテーションに基づいて、強制発現される遺伝子の予測や、ノックダウン対象遺伝子の選択をおこなっている。しかし、ゲノムのアノテーションは依然として不完全であり、特に転写開始点の情報が不足

しているのが実情である。そこで、本領域の東大・森下班員、および橋本班員との共同研究として、ショウジョウバエゲノムの転 写開始点タグをゲノムワイドに収集するとともに、発生段階、および老化に伴う転写活性の変化を解析する。

< 2008 年度の成果>

1) 翅の表現型:これまでに、GS系統、およびRNAi系統を用 いて、遺伝子強制発現、およびノックダウンしたときの翅画像の 収集を行った。2008年1月現在、GS系統約5000, RNi系統約4,000 の交配をセットし、それぞれの F1 から雌雄 1 0 個体分の翅サン プルを調製し、画像データを取得した。その一部について、画像 解析ソフトウエアを使って、翅脈の交点間の距離を測定し、各種 パラメータを取得した。翅の大きさは細胞の増殖や成長と密接な 関連にあり、多様な遺伝子が大きさに影響を与えうる。たとえば、 インスリン /IGF シグナル経路は、体のサイズを正に制御してい ることが知られている。今回、解析したサンプルの中で、インス リン受容体 (InR)や PDK1 など既知のインスリチンシグナル経路 を構成する遺伝子が含まれていたが、それ以外の多くの遺伝子が 翅のサイズに影響を及ぼした。インスリンシグナルの低下は、ス トレス抵抗性が増大することが知られているが、これらの関係が 一般化できるかどうか不明である。そこで、約3,000 の GS 系統 については、酸化ストレスに対する抵抗性について測定を行い、 それらの表現型と翅の大きさとの関連を解析した。比較的安定し たストレス抵抗性を示すものとして、約20個の遺伝子を同定し た。これらについて、翅の大きさに及ぼす影響との関係を調べた ところ、95%の系統において翅を小さくする方向に作用してい た。このことは、原因遺伝子がインスリン経路といかなる関係に あるかは不明であるが、体の大きさとストレス抵抗性の間に負の 相関関係があることを示唆した。

また、上記のスクリーニングで得られた新規遺伝子の一つについて、インスリン経路ではたらく遺伝子との相互作用を調べた。インスリンシグナルとの直接の相互作用は認められなかったが、タンパク質合成系の遺伝子との相互作用が認められた。現在その分子の性質についてより詳細な解析を進めている。その他、個別遺伝子の研究としては、RNAi系統を使って、アポトーシス関連遺伝子のスクリーニングとその機能の比較解析を行った(論文準備中)。

2) 胚発生の表現型: ライブイメージング技術を駆使して、を駆使して以下の成果を得た。

i) 原癌遺伝子 Src のショウジョウバエホモログの機能解析を行った。まず相垣班員の確立した GS 系統を用いたスクリーニングで細胞接着を不安定化する因子として Src を同定した。そして Src が細胞接着分子の動的な入れ替わりに関わる事を生体内における定量的蛍光イメージング技術 (FRAP) を用いて明らかにした。また Src が Armadillo (beta-catenin) と共同して細胞接着を維持する機構を明らかにした (Shindo et al., 2008)。この結果は Src が癌化だけではなく正常発生においても細胞接着制御に深く関わることをしめすものである。

ii) 気管の融合は球形の先端細胞がトーラス型 (ドーナッツ型)

への形態変換を起こすことで可能になる。この構造変換は細胞膜のトポロジーの変換に相当する。我々はこのプロセスにおいて特異的に発現する因子 Arl3 を同定し、これがトポロジーの変換に必須であることを示した。Arl3 は低分子量 G 蛋白質で細胞内膜系の形態制御に関わる事がわかった。これらの結果は細胞内膜系の制御により細胞膜のトポロジーを変化させうる事を示している (Kakihara et al 2008)。

- iii) 動物個体を用いたタイムラプスイメージングには蛍光の褪色、組織のランダムな動きによる ROI の移動、大量の三次元像の扱いの難しさなどの問題がある。これらの問題について議論し、解決策となりうる画像処理ツールを開発した(Kato and Hayashi, 2008)。これらのツールは理研のサイトから一般に公開されている(http://www.cdb.riken.jp/signal/)。
- iv) 細胞形態の定量的解析技術を確立するために上皮プラコードの陥入をモデルとして定量化・モデル化を行っている。気管陥入を撮影した画像データをもとに細胞境界を抽出するプログラムを開発した(生命システム班員大浪修一氏のグループとの共同研究による)。これにより細胞の頂点、面積、などの時空間的データが得られた。これらのデータをもとに三次元多面体モデルに適用し気管陥入のコンピュータモデリングを行っている(本多久夫兵庫大学教授との共同研究)。
- 3) ショウジョウバエゲノムの転写開始点の情報を収集し、その データベースを作製した。サンプル間の TSS 分布の違い、トラ ンスポゾン挿入地点と TSS の関係について解析中である。

<国内外での成果の位置づけ>

GS 強制発現系統、および RNAi 系統は研究代表者 (相垣)、および分担者 (上田) によって作成されたオリジナルコレクションであり、これらを使って、画像データを系統的に収集・データベース化する試みは他に類をみない。分担者 (林) のタイムラプス撮影技術は国際的に最高水準にあるものと考えている。その技術を活用することでこれまで固定標本では不明であったショウジョウバエの遺伝学と組み合わせた展開をさらに進めてくために不可欠の技術である。ゲノムワイドな転写開始点の収集については、転写領域のアノテーションが充実させるものである。

<達成できなかったこと、予想外の困難、その理由>

翅の画像データを使って、形態に関するさまざまなパラメータを取得して解析することが可能であるが、現時点ではサイズを制御システムに注目している、そのため、それ以外にも興味深い対象があるにもかかわらず、ほんの一部しか手がついていない。胚発生のイメージングによるデータ収集に関しては、表皮の細胞境界の自動トレーシングはさらなる自動化と大規模化への改善が必要である。またそれらのデータを扱うPCのプラットフォームの整備も必要。転写開始点の解析については、それだけでは、既存の転写単位との関連性が不明であり、そのまま、Gene modelのアノテーション変更にはつながらない。

<今後の課題>

翅のスクリーンに関しては、GS系統,RNAi系統、合わせて 10,000系統、20万枚の画像データの収集を目標としている。最終年度では、これらの目標値まで達成すると共に、全体の概要を発表し、データベースを公開する予定である。コンピューターシミュレーションはまだ始まったばかりだが数理科学者、画像解析の専門家との共同研究の場として互いに良い刺激の場となっている。このような共同研究をさらに進めていきたい。ショウジョウバエのゲノムの転写開始点データと既存のタイリングアレイデータを合わせて、新しい転写単位について予測することを行いたい。

<成果公表リスト>

1.901161031(論文)

Horiuchi J, Yamazaki D, Naganos S, Aigaki T, Saitoe M.,

Protein kinase A inhibits a consolidated form of memory in *Drosophila.*, Proc Natl Acad Sci U S A., 105,20976-20981(2008)

2.901161046(論文)

Harada E, Haba D, Aigaki T, Matsuo T., Behavioral analyses of mutants for two odorant-binding protein genes, Obp57d and Obp57e, in *Drosophila melanogaster.*, Genes Genet Syst., 83,257-264 (2008)

3.901161127 (論文)

Olivier L, Togawa T, Tsuda M, Matsuo T, Loic E and Aigaki T., Overexpression of grappa encoding a histone methyltransferase enhances stress resistance in *Drosophila*, Hereditas, in press (2009)

4.805011101 (論文)

Nishimura, M., Inoue, Y., Hayashi, S., A wave of EGFR signaling determines cell alignment and intercalation in the *Drosophila* tracheal placode, Development, 134(23):4273-4282

5.805011104(論文)

Shindo, M., Wada, H., Kaido, M., Tateno, M., Aigaki, T., Tsuda, L., Hayashi, S., Dual function of Src in the maintenance of adherens junction during epithelial morphogenesis, Development, 135(7):1355-64

6.805011106(論文)

Kakihara,K., Shinmyozu,K., Kato,K., Wada,H., Hayashi,S., Conversion of plasma membrane topology during epithelial tube connection requires Arf-like 3 small GTPase in *Drosophila*, Mechanisms of Development, 125(3-4):325-336

7.805011107(論文)

Kato,K., Hayashi,S., Practical guide of live imagining for developmental biologists, Development, Growth and Differentiation, doi:10.1111/j.1440-169x.2008.01029.x

8.801281816(論文)

Takahashi, A, Takahashi, K, Ueda, R, and Takano-Shimizu, T., Natural variation of ebony gene controlling thoracic pigmentation in *Drosophila melanogaster.*, Genetics, 177(2), 1233-1237(2007)

9.805191752 (論文)

Picot, M., Cusumano, P., Klarsfeld, A., Ueda, R., and Rouyer, F., Light Activates Output from Evening Neurons and Inhibits Output from Morning Neurons in the *Drosophila Circadian Clock.*, PLoS Biol, 5(11): e315 (2007)

10.901161118 (論文)

Yano, T., Mita, S., Ohmori, H., Oshima, Y., Fujimoto, Y., Ueda, R., Takada, H., Goldman, WE., Fukase, K., Silverman, N., Yoshimori, T., and Kurata, S., Autophagic control of listeria through intracellular innate immune recognition in *Drosophila.*, Nat Immunol., 9(8), 908-916 (2008)

11.0901131703(論文)

Urasaki, A., Mito, T., Noji, S., Ueda, R., and Kawakami, K., Transposition of the vertebrate Tol2 transposable element in *Drosophila melanogaster.*, Gene, 425(1-2), 64-68, 2008.

12.901161139(論文)

Yoshida, H., Fuwa, T., Arima, M., Hamamoto, H., Sasaki, N., Ichimiya, T., Osawa, K-I., Ueda, R. and Nishihara, S., Identification of the Drosophila core 1 β 1, 3-galactosyltransferase gene that synthesizes T antigen in the embryonic central nervous system and hemocytes., Glycobiology, 18(12), 1094-1104 (2008)