

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¹⁾ ◆林 茂生²⁾ ◆上田 龍³⁾

1) 首都大学東京・大学院理工学研究所 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には、突然変異体の作製と解析が不可欠である。しかし、多くの生物で、遺伝子を破壊しても、明瞭な表現型を示さない場合が少なくない。これらの中には、ゲノムの中に類似の機能をもつ遺伝子によって補償されるものや、表現型の異常が軽微であるため検出が困難なものが含まれると考えられる。このような遺伝子が生命機能の最適化にどのように貢献しているかを明らかにするには、精度の高い表現型情報を取得する方法論を確立する必要がある。そこで、本研究では、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。これらの方法を用いて、変異体の体系的な作成、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入れるため、これらの技法を専門とする本領域の研究者と密接な共同研究体制をつくり、研究計画を推進する。

＜2007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。計算機を使って翅の形状をあらゆる指標を求める。翅の大きさをあらゆる指標として、前後軸方向、遠近軸方向、およびそれらの比を指標とする（本領域の東大・森下真一博士との共同研究）。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。翅の大きさに関する変異体については、インスリンシグナル経路との関連を解析する。

2) 胚発生の表現型：研究分担者（林）は、ショウジョウバエ胚の各種組織を用いて、アクチン繊維、ミオシン、カドヘリンなどの分布をタイムラプス撮影し、4次元画像のデジタル化、表現型の定量化の方法を検討する。生物試料特有の像のばらつきにより正確な解析を自動化するにはさらなる工夫が必要であることが判明したので、気管上皮の陥入過程をタイムラプス撮影で記録して手動で様々な測定を試みる。

3) ショウジョウバエゲノムの転写開始点解析：GS 系統を用いた強制発現によって生じた表現型の原因遺伝子をより正確に推定するために、ショウジョウバエゲノムの転写開始点の情報を取得する（本領域の東大・森下、菅野、橋本、遺伝研・小原との共同研究）。

＜2007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。画像データを解析し、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、少なくとも、大きさに影響を与える遺伝子の中には、インスリン/IGF シグナル系に関わる遺伝子が含まれていた。インスリンシグナルは、組織の大きさを制御するとともに、ストレス耐性や寿命とも関わっていることが知られている。そこで、遺伝子強制発現による酸化ストレス耐性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耐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、翅の大きさにどのように影響があるかを調べたところ、95% の系統において翅を小さくする方向に作用しており、体の大きさと逆相関が認められた。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、少なくともこれらの系統では、体の大きさを小さくするとともに、ストレス耐性を強化したと考えられる。

個別遺伝子の研究としては、チオレドキシンファミリーに属する 3 つの遺伝子 (*Trx-2*, *dhd*, *Trx-T*) について、機能解析をおこなった。*Trx-2* は、過剰発現で酸化ストレス耐性が上昇する遺伝子として同定した。この遺伝子の強制発現により、ショウジョウバエのパーキンソン病モデルの表現型が改善されることが判明した。また、その機能は、他の二つの遺伝子を強制発現しても同様の効果が認められた。その機能には、*Trx-2* のシャペロン活性が重要であることを示した。一方、*Trx-2* の機能欠損変異体は、酸化ストレス高感受性となるが、*dhd* および *Trx* の変異体では、ストレス耐性に変化は見られなかった。これは、二つの遺伝子の発現が主に生殖細胞に限られていることによるものと考えられる (Tsuda et al., 2007)。

2) 胚発生の表現型：ライブイメージング技術を駆使して、ショウジョウバエ胚において外胚葉と胚体外細胞層 (amnioserosa) の組織間相互作用を解析した。細胞間マトリクスレセプター インテグリンの変異体におけるタイムラプス解析から、変異体はいったん深刻な上皮の開裂が起きるがその後損傷部位の修復反応が活性化されて最終的な表現型は比較的軽度で回復することがわかった (Wada et al., 2007)。この結果はインテグリンがこれまで考えられていた外胚葉上皮の伸展運動ではなく胚体外細胞層との接着に主要な機能を持つという新しい発見につながった。ショウジョウバエ胚外胚葉から陥入した翅成虫原基が体腔内で気管に接着して後方に移動する事を見いだした。この移動には翅原基特異的なラミニンアイソフォームの発現が必要とされており、異種組織間の相互作用と細胞移動にインテグリンシグナル が関与している事を示すはじめての報告となった (Inoue and Hayashi 2007)。ショウジョウバエの気管は二次元平面である外胚葉上皮が陥入して三次元の管腔系に転換される事で開始する。我々はこの陥入プロセスを撮影し、上皮細胞の変形、細胞相互の位置変化 (cell intercalation)、そして細胞分裂のパターンを定量的に評価した。その結果陥入開始以前に気管原基内では細胞の再配列と細胞境界の平滑化がおき、その動きにはミオシン分子の細胞接着部位における濃縮が伴っていることを見いだした。ミオシン濃縮は円環状に中心から周囲に拡大し、そのパターンは EGFR シグナルの活

性の伝播パターンと一致した。この結果はEGFRが円環状の列をなして活性化することで気管原基における陥入活動を統合する事を意味する。この結果は陥入における細胞運動を制御するシグナルの伝播を可視化したはじめての仕事である (Nishimura et al., 2007)。影山裕二博士 (奈良先端大、現基礎生物学研究所) と協力して新奇遺伝子 Pri の機能解析を行った。Pri は最短で 11 アミノ酸の複数のペプチドをコードするポリシストロニックな遺伝子で進化的に保存されていた。気管と表皮分化のタイムラプス解析により Pri の機能はアクチン繊維の編成を制御する事が明らかとなった (Kondo et al., 2007)。

3) ショウジョウバエゲノムの転写開始点情報の収集: ショウジョウバエの各発生段階から RNA を調整し、オリゴキャップ法による 5' SAGE 解析、および Solexa によって取得した転写開始点タグの解析が進行中である。

<国内外での成果の位置づけ>

Gene Search 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、大規模に表現型情報を収集・データベース化する試みは他に類をみない。特に、従来の直接観察法では見逃されていた軽微な表現型異常を客観的にとらえることにより、機能未知であった多くの遺伝子について、解析の糸口を与えるものと期待される。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詳細な表現型を明らかにして新奇の遺伝子機能の解明できたと考えている。Pri ペプチドの発見は Nature Cell Biology の表紙を飾ると共に review で取り上げられ、国内の新聞でも報道された。ゲノムワイドな転写開始点の収集については、世界的に期待される情報である。本研究により、転写領域のアノテーションが一新されるものと期待される。

<達成できなかったこと、予想外の困難、その理由>

翅の形態に関するさまざまなパラメータを定義し、系統間での比較を行ったが、形態の変異と生物学的意味付けに結びつけるには至っていない。パラメータはむしろ大雑把に整理した方が生物学者の感覚でとらえやすい可能性があるため、定義を見なおす計画である。ショウジョウバエの恒温室の引っ越しがあったため、一時期系統管理が十分いきとどかず、約3ヶ月にわたって、効率的な作業ができなかった。今後ペースアップしたい。胚発生のイメージングによるデータ収集に関しては、表皮の細胞境界をコンピューター計算で自動トレースし、シグナル強度と細胞形態の定量的データを得る事を目指したがまだ精巧に至っていない。

<今後の課題>

Gene Search 系統、および RNAi 系統を用いた表現型情報の収集を継続する。翅のスクリーンに関しては、年間 2000 系統、4 万画像データの収集を目標とする。これらの解析法の改善、形態異常の分類法についても引き続き改良を検討していく。Nishimura et al.(2007) の仕事では自作した image J のプラグインで支援された手動トレースにより定量化を行った。今後は大浪修一計画班員 (理研 GSC) の協力を得て 4 次元でデジタル化し、数理解析のプラットフォームを確立すべく努力している。ショウジョウバエのゲノムの転写開始点については、引き続きデータの解析を行い、転写領域のアノテーションを見直すとともに、転写活性とゲノム構造の関連性についても検討する。

<成果公表リスト>

1) 論文/プロシーディング (主要なもの)

- 708091126 (論文)
Matsuo, T., Sugaya, S., Yasukawa, J., Aigaki, T., Fuyama, Y., Odorant-binding proteins OBP57d and OBP57e affect taste perception and host-plant preference in *Drosophila sechellia*, *PLoS Biol.*, 5, e118 (2007)
- 708091133 (論文)
Umeda-Kameyama, Y., Tsuda, M., Ohkura, C., Matsuo, T., Namba, Y., Ohuchi, Y. and Aigaki, T., Thioredoxin suppresses Parkin-associated Endothelin Receptor-like Receptor-induced neurotoxicity and extends longevity in *Drosophila*, *J. Biol. Chem.*, 282, 11180-11187 (2007)
- 801291203 (論文)
Yao, Y., Wu, Y., Yin, C., Ozawa, R., Aigaki, T., Wouda, R.R., Noordermeer, J.N., Fradkin, L.G., Hing, H., Antagonistic roles of Wnt5 and the Drl receptor in patterning the *Drosophila* antennal lobe., *Nat Neurosci.*, 10, 1423-1432 (2007)
- 801291210 (論文)
Tsuda M, Sugiura T, Ishii T, Ishii N, Aigaki T., A mev-1-like dominant-negative SdhC increases oxidative stress and reduces lifespan in *Drosophila*, *Biochem Biophys Res Commun.*, 363, 342-346. (2007)
- 708081620 (論文)
Inoue, Y., Hayashi, S., Tissue-specific laminin expression facilitates integrin-dependent association of the embryonic wing disc with the trachea in *Drosophila*, *Developmental Biology*, 304:90-101 (2007)
- 708081621 (論文)
Kondo, T., Hashimoto, T., Kato, K., Inagaki, S., Hayashi, S., Kageyama, Y., Small peptide regulators of actin-based cell morphogenesis encoded by a polycistronic mRNA, *Nature Cell Biology*, 9(6):660-665(2007)
- 708081709 (論文)
Sakurai T, K., Kojima, T., Aigaki, T., Hayashi, S., Differential control of cell affinity required for progression and refinement of cell boundary during *Drosophila* leg segmentation, *Developmental Biology*, doi:10.1016/j.ydbio.2007.07.001
- 705061734 (論文)
Chertemps, T., Dupontets, L., Labeur, C., Ueda, R., Takahashi, K., Saigo, K., and Wicker-Thomas, C., A female-biased expressed elongase involved in long-chain hydrocarbon biosynthesis and courtship behavior in *Drosophila melanogaster*, *Proc Natl Acad Sci USA*, 104(11):4273-4278 (2007)
- 708081419 (論文)
Akira Matsumoto*, Maki Ukai-Tadenuma, Rikuhiko G. Yamada, Jerry Houl, Kenichiro D. Uno, Takeya Kasukawa, Brigitte Dauwalder, Taichi Q. Itoh, Kuniaki Takahashi, Ryu Ueda, Paul E. Hardin, Teiichi Tanimura and Hiroki R. Ueda* (* corresponding authors), A functional genomics strategy reveals clockwork orange as a transcriptional regulator in the *Drosophila* circadian clock, *Genes and Development*, 21(13), 1687-1700
- 801281809 (論文)
Okamura, T, Shimizu, H, Nagao, T, Ueda R, and Ishii, S., ATF-2 regulates fat metabolism in *Drosophila*, *Mol Biol Cell*, 18(4), 1519-1529(2007)