

ショウジョウバエ付属肢形成における遺伝子ネットワークの解析

●小嶋 徹也

東京大学大学院新領域創成科学研究科

<研究の目的と進め方>

真核多細胞生物の発生過程における基本的なステップの1つは、モルフォゲンによって与えられる位置情報によっていくつかの転写因子が領域特異的に発現することである。この領域特異的転写因子がそれぞれにさまざまなターゲット遺伝子の発現を制御することで、組織や器官の最終的な形質が形成される。モルフォゲン情報が領域特異的転写因子の発現に変換されるまでの過程については、これまでに様々な生物の様々な組織・器官の発生過程において研究されてきた。しかし、領域特異的転写因子の発現の後、それぞれの転写因子がどのようなターゲット遺伝子の発現を制御し、それぞれのターゲット遺伝子がどのように機能することで組織の最終的な構造や機能が実現されるのかについては、ほとんど解明されておらず、未だに発生生物学上の重要な課題の1つである。これは領域特異的転写因子の下流で働くターゲット遺伝子は多種多様であるためであり、また、そもそも組織の最終的な構造が形作られる過程にはどのようなプロセスが存在するのかということについても不明な点が多いためであると考えられる。

これらの問題に迫るには、単発的な遺伝子の解析ではなく、多数のターゲット遺伝子の同定・機能解析をゲノムワイドに行うことによる遺伝子ネットワークの総合的な理解が必要である。また、生物の形作りの理解はもちろんのこと、そのシステムの理解や生物の進化・多様性の理解のためにも、この遺伝子ネットワークの総合的理解はきわめて重要である。

本研究では、ショウジョウバエの成虫肢形成過程をモデル系として、成虫肢の各分節領域を決定する領域特異的転写因子のターゲット遺伝子と予想される遺伝子について網羅的な機能解析を行い、領域特異的転写因子と最終形態を結ぶ遺伝子ネットワークの全貌に迫ることを目指す。

<2008年度の研究の当初計画>

我々はショウジョウバエの成虫肢の各分節領域を決定する領域特異的転写因子のターゲット遺伝子を網羅的に同定することを目的として、分節特異的に発現する遺伝子のcDNAマイクロアレイを用いた網羅的な探索を行い、これまでに約1000の候補遺伝子を見出し、整理・分類をしてきた。近年、ショウジョウバエでは、ゲノム上の各遺伝子についてGAL4/UAS系を用いた掛け合わせによりRNAiを誘導してその遺伝子の機能を阻害することができるRNAiシステムのライブラリが整備されている。上記約1000遺伝子に対するRNAiシステムをDil-GAL4系統と掛け合わせることで成虫肢前駆組織である肢原基特異的にRNAiによる機能破壊を行い、それらの表現型を解析することで、網羅的に機能解析を行う。また、同時にin situハイブリダイゼーションなどによる詳細な発現解析する。これらの結果を分類・整理することにより、ショウジョウバエ成虫肢の最終形態が形成されるときに働く遺伝子の発現・機能カタログを作成し、領域特異的転写因子の下流に、どの

ようなプロセスが存在し、どのような遺伝子が、どのように働いているのか、その遺伝子ネットワークを明らかにすることを目指す。

<2008年度の成果>

1. RNAiを用いた機能阻害によるスクリーニング

これまでに約200の遺伝子についてRNAiによる機能阻害による表現型の観察を行なった結果、約30%の61遺伝子について、明確な表現型が見出された。

表現型としては、剛毛形成不全、分節間のジョイントの形成不全、分節の長さや太さの異常、特定の分節内での異常な構造の形成などが、それぞれ独立に別々の遺伝子について見られた。さらに、ジョイント形成不全では、それぞれジョイント構造の一部に限定した表現型を示していたり、剛毛に関しても、特定の種類の剛毛のみに異常が生じたり、特にSex combと呼ばれる特別な剛毛では、その剛毛だけで先端部の構造のみに異常が生じたりなど、予想外に微細な表現型が多数観察された。領域特異的転写因子をコードする遺伝子の変異体では分節全体の構造が影響を受けるのに対し、これらの表現型は分節の特定の性質に影響が限定されていることから、確かに領域特異的転写因子下流の最終形態形成過程での遺伝子機能を反映していると考えられ、最終形態の形成プロセスはこれら微細な構造形成プロセスに細分化されていることが示唆される。

特に、分節の長さや太さが別々の遺伝子の機能阻害によって影響を受けていることは興味深く、これらの形質は別々のプロセスによって制御されていることを示唆しているのかもしれない。また、それぞれの表現型は完全に独立というわけではなく、遺伝子によって異なる組み合わせで現れていた。このことから、最終形態を決定する複数のプロセスが互に関連性をもって働いていることが想像される。

また、明確な表現型を示した遺伝子には、リボソームの構築に関わるタンパク質やRNAの転写・伸長に関わるタンパク質をコードする遺伝子など、基本的な細胞活動に重要であると考えられる遺伝子が含まれていた。特にタンパク質の合成に関わる遺伝子では、複数のもので、成虫肢の最先端部であり爪の形成など他の分節とは構造が著しく異なる先付節に、同様の異常な構造が形成されるという表現型を示した。このことは、タンパク質合成の何らかの制御が先付節に特有の最終形態の形成に必須であることを示していると思われる。これらのことから、最終形態の形成ステップには基本的な細胞活動の調節も重要なプロセスであるということを示しているのかも知れない。

他には、脂質代謝や糖鎖関連の酵素をコードする遺伝子も含まれ、これまで考えられてこなかった新しいプロセスやメカニズムの存在が示唆された。

2. *Cdc25* ホモログ *string* (*stg*) の解析

表現系得られた約 60 遺伝子には、細胞周期の調節に重要な役割を果たすことが知られている *string* (*stg*) が含まれており、すべての分節にわたって剛毛の消失や分節が細くなるなどの表現型の他に、先付節において、爪等の構造の欠損という表現型を示した。領域特異的転写因子による領域の決定と組織の形態に大きく関与する細胞分裂の制御との関係が明らかになることを期待し、*stg* に関してはより詳細な解析を行った。

stg は酵母からヒトまで保存されている *Cdc25* のホモログをコードしている。細胞周期の制御に関する *Cdc25* の機能はこれまでよく研究されてきており、*Cdc25* は Ser/Thr phosphatase 活性を持ち、Cdk1 を脱リン酸化することで活性化し、細胞周期を G2 期から M 期へと移行させる。ショウジョウバエにおいては、*stg* は G2 に発現し始め、M 期に移行すると消失することが知られている。

成虫肢の前駆組織である肢原基での *stg* の発現パターンを *in situ* ハイブリダイゼーションにより詳細に解析したところ、ショウジョウバエの終齢幼虫である 3 齢幼虫初期までは、他の組織で観察されているのと同様に細胞が分裂するのに合わせた *stg* のランダムな発現が観察された。しかし、興味深いことに、3 齢幼虫中期からは先付節領域で領域特異的に恒常的な発現がみられ、それは蛹期初期に一斉に消失することがわかった。BrdU やリン酸化型ヒストン H3 の抗体を用いて細胞分裂の様子について解析したところ、*stg* の先付節での発現が表れる 3 齢幼虫中期以降、ここでは細胞分裂が起こっていないことが示唆され、*stg* のこの発現は細胞分裂とは無関係であることが示唆された。さらに、GAL4-UAS 系の温度感受性を利用して RNAi を誘導する時期をさまざまに変化させたところ、先付節構造の正常な形成過程に *stg* の機能が必要な時期は先付節での領域特異的かつ恒常的な発現がみられる時期であった。爪になる細胞のマーカー遺伝子の発現を観察したところ、3 齢幼虫後期には既にこのマーカー遺伝子の発現が観察されなかった。これらのことは、細胞周期の制御に重要な役割を果たしている *stg* (*Cdc25*) が、細胞周期の制御とは別の何らかの機構で先付節の発生に関与しているという、全く新しい機能の存在を示唆している。

上記の様に、今まで知られていなかったプロセスの一端が示唆されており、さらに RNAi による機能阻害実験を進めることで、新たなプロセスの存在やそれに関わる遺伝子の発見が期待される。

<国内外での成果の位置づけ>

最近、RNAi を用いた遺伝子の網羅的な機能解析に関する報告が出始めている。しかし、ほとんどのものは、全遺伝子を対象に解析をしているため、あまり詳細な観察はできておらず、表現型の分類も大雑把なものになりがちであり、最終的に得られている遺伝子数は期待するほど多くない。また、他の研究では、最終構造の形成というよりも、まだまだ途中段階の部分に注目しており、本研究の様に最終的に形態が出来上がるまでのプロセスに注目したものはない。

<達成できなかったこと、予想外の困難、その理由>

これまでの解析では、ジョイント構造の微細な異常や剛毛の配置や構造の微細な異常など当初考えていた以上に細かい表現型

が、多くの遺伝子について観察された。これらの異常を認識・分類するのに時間がかかり、結果的に当初予定していたよりも解析数が少なくなってしまった。また、上述した様に、表現型が観察された遺伝子には意外なものも多かった。それらは今まで知られていない発生プロセスやメカニズムを示唆するもので、非常に興味深いものではあるが、逆に、情報が少ないために遺伝子ネットワークを考えにくい。細かい表現型の原因としては、まず、RNAi の効率が完全でないために遺伝子機能の阻害が不完全であるために生じる可能性が考えられる。この点に関しては、RNAi の効果を増強する *Dicer* を同時に発現させることで改善できるだろう。また、それぞれの遺伝子で表現型が表れる部分が限定していることから、単純にこのことだけによるものとは考えにくく、むしろ、最終形態の形成プロセスが本質的にそのような微細なプロセスの積み重ねであることを示唆していると考えられる。このことについては、さらに解析数を増やすことで明確になると予想される。また、予想外の遺伝子についても、例えばタンパク質合成に関与する複数の遺伝子で同様の表現型が得られたことから、タンパク質合成の何らかの制御が重要であることが示唆されたように、解析数を増やすことで、ネットワークについてもより明確に議論できるようになるだろう。

本研究で対象とした遺伝子はマイクロアレイで分節特異的に発現しているものとして得られたものであるが、表現型は多くの遺伝子ですべての分節で観察され、マイクロアレイの結果との相違がみられた。しかし、マイクロアレイでは遺伝子の発現の有無ではなく量比を見ているため、遺伝子の発現量が分節ごとに異なっていることが考えられる。また、マイクロアレイでの解析はひとつのステージに限られているので、発現時期がそれぞれの分節で異なるということも考えられる。実際、いくつかの遺伝子については、上記二つの考えが当てはまるような発現パターンを確認している。

<今後の課題>

まずは解析数を増やすことが必要である。これまでの解析から、どのような表現型を観察すればよいのかなどについてはわかってきたので、今後はよりスピーディーに解析を進められるだろう。さらに、表現型の見られた遺伝子については、その発現を領域と時期、発現量などに注目して詳細に検討し、領域特異的転写因子によるターゲット遺伝子の発現制御がどの様なものであるか、明確にする必要がある。また、*stg* の様に、これまで知られていない機能の存在が示唆されるものもあるので、それらについては、強制発現系や種々の突然変異体系統を用いた詳細な機能解析をすることで、新規の機能を明らかにする。*stg* については、実際にどの様なメカニズムで働いているのかについて、さらに詳細な解析が必要である。

<成果公表リスト>

1) 論文/プロシーディング (査読付きのものに限る)

1. 0901151907

Tsubota, T., Saigo, K. and Kojima, T.: *Hox* genes regulate the same character by different strategies in each segment, *Mech. Dev.*, 125, 894-905 (2008).

2) データベース/ソフトウェア
なし