

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メカニズムの1つは、モルフォゲンの濃度や活性の勾配により形成される位置情報に基づき、領域特異的に転写因子の発現が誘導され、均一な細胞集団がそれぞれ性質の異なるいくつかの細胞集団に分割されること（領域化）である。実際、ここ20年の分子生物学的な研究の目覚ましい成果により、モルフォゲンとして働く分子やシグナル伝達系、それによって領域特異的に発現が誘導される転写因子の実体が明らかになってきた。しかしながら、領域特異的転写因子のターゲット遺伝子については、ごく限られた例しか報告されておらず、モルフォゲンによる位置情報が領域特異的転写因子の発現に変換された後、どの様にして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、未だに発生生物学上の重要な課題の1つである。

その理由の1つは、個々の領域特異的転写因子は非常に多彩なターゲット遺伝子の発現を制御しているからだと考えられる。ゲノム規模の解析が可能になった近年、ようやくマイクロアレイなどを用いた領域特異的転写因子のターゲット遺伝子の網羅的探索が行われるようになり、いくつかの転写因子に関しての知見が報告されている。それでもなお、領域特異的転写因子のターゲット遺伝子候補の羅列に留まっており、個々のターゲット遺伝子の機能解析を行ったとしても、限られた数の遺伝子についての解析に留まっている。したがって、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が重要である。

もう1つの問題点としては、組織の領域化は、最終的な構造に対応する細かな領域が一度に形成されるのではなく、初めは複数の領域にまたがる大きな領域が決定され、それが徐々に細分化されて、最終的な領域が形成されることである。多くの場合、よく解析されている領域特異的転写因子は、大きな領域の決定に働くものであり、最終的な構造・機能との間にはまだいくつもの細分化ステップがあり、このことも領域特異的転写因子と最終的な構造や機能の実現の間のギャップを埋めるための障害となっており、できるだけ最終構造の決定に近いところで働く転写因子とそのターゲット遺伝子に注目する必要がある。

ショウジョウバエ成虫肢の先端部分は根元に近い方から順に第1-第5の5つの付節および、最も先端部分の先付節から成り立っているが、我々はこれまでに、これら付節と先付節の領域を決定する領域特異的転写因子の同定と機能や発現領域制御機構の詳細な解析を行ってきた。これらの領域特異的転写因子は、各分節それぞれを規定するように発現するものが多く、最終的な構造・機能と非常に近いところで働いているものである。さらに、ショウジョウバエではRNAiにより簡便に遺伝子機能阻害を行うシステムが確立してきた。これらを踏まえ、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システムとして、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総合的な理解を目指

す。

<研究開始時の研究計画>

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、cDNA マイクロアレイを用いて、分節特異的に発現する遺伝子の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。また、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Dll-GAL4システム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、それらの表現型を詳細に解析することで、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を行う。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過程で、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。

<研究期間の成果>

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。それらは、大きく分けて、①剛毛形成不全、②分節間のジョイントの形成不全と分節の融合や③分節の長さや太さの異常、④先付節構造の異常、⑤その他の異常などに分類することができた。

①剛毛形成不全

剛毛は外部感覚器であり、大別すると機械刺激を受容するものと化学刺激を受容するものに分けられ、さらにそれぞれの中でも形態の異なる数種類のものがあり、それぞれが分節特異的に、あるいは、分節内の位置特異的に形成される。剛毛形成に関する異常は、34遺伝子について観察され、剛毛の長さが短くなるもの、剛毛が欠失するもの、剛毛の向きに異常が生じるもの、剛毛の形が異常であるもの、特定の種類の剛毛のみ影響を受けるものなどがあった。特に、Sex combと呼ばれる、オスの第1付節のみに存在する大型の特殊な剛毛に関しては、Sex combの形成には異常を生じるが他の剛毛は正常であるものが21遺伝子もあり、その中の一つでは、先端部分が二股に分岐するといった微小な表現型のみを示すものもあり、大型で特殊な剛毛形成は単に他の剛毛形成を巨大化したものではなく、形成に関わるプロセスも特異的で、多くの遺伝子を必要とするものであることがうかがえる。一方、他の剛毛に異常を生じるがSex combは正常である遺伝子も2遺伝子存在し、機械刺激を受容する剛毛には異常が生じるが化学刺激を受容する剛毛は正常であるものもあったことから、それぞれの剛毛の特徴を実現するためには、やはりそれぞれに別々の

プロセスが存在することが考えられる。遺伝子としては、細胞周期制御に関わる *string* (*stg*) やアクチンやアクチン結合タンパク質、チューブリンなど細胞骨格に関連する遺伝子などの通常剛毛形成に関わることが予想されるものだけでなく、ゲラニルゲラニル化やファルネシル化に重要なメバロン酸経路で働くホスホ・メバロン酸キナーゼをコードする遺伝子や糖鎖関連の遺伝子など、意外なもので表現型が観察された。

②分節間のジョイントの形成不全と分節の融合

各分節の間はジョイントといわれるフレキシブルな構造でつながれており、この部分が可動することで肢を曲げることがことができる。ジョイントは、ボール・アンド・ソケットと呼ばれる特別な構造をしているが、ジョイント構造全体が著しく矮小化するものやソケット構造のみが短縮するもの、ジョイントの色に異常を示すもの、異所的にジョイントが形成されるものなど 25 遺伝子について表現型が観察された。ジョイントは分節と分節の境界なので、多くの場合は分節の融合を伴っていたが、8 遺伝子に関してはジョイント構造にのみ表現型が観察されたことから、これらの遺伝子は、ジョイントになる細胞群の決定というよりは、それらの細胞群が最終的な構造をつくる場所で働いているものと考えられる。

③分節の長さや太さの異常

7 遺伝子について、分節の長さや太さが異常になる表現系が観察された。興味深いことに、その中には、長さ方向には正常だが太さ方向にのみ異常が現れるものと、その逆に、太さは正常だが長さ方向に異常が生じているものがそれぞれ 2 遺伝子ずつあった。このことは、分節の最終的な大きさを決定するプロセスの中に、長さや太さに関して別々の制御メカニズムが存在することを示唆している。細胞周期制御に関する遺伝子である *string* (*stg*) の機能阻害では、分節の長さはほぼ正常だが太さが細くなっていたが、細胞周期制御は剛毛の形成にも必須であり、*stg* の機能阻害では実際に剛毛の欠損という表現型が見られるので、分節が細くなっている一つの原因は剛毛の細胞が欠損したことによるものと考えられる。しかし、その際に影響が太さ方向にのみ現れるということは、剛毛形成が始まる前に長さは決められており、剛毛形成に伴い細胞が増えた分は、すべて太さ方向に反映されるような何らかのメカニズムが存在することを示唆していると考えられる。また、Ras や Rho などの情報伝達関連タンパク質のゲラニルゲラニル化やファルネシル化に重要なメバロン酸代謝経路で働くホスホ・メバロン酸キナーゼをコードする遺伝子の機能阻害も、*stg* と同様に剛毛の形成不全と分節の長さは正常で太さが細くなる異常を示すことから、少なくともメバロン酸代謝経路の一部が細胞

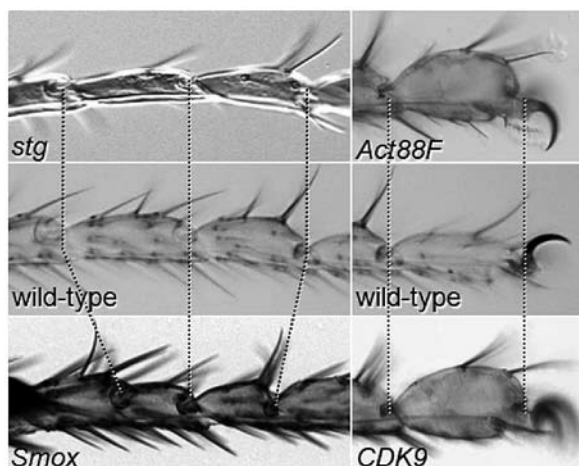


図 1. 分節の長さや太さの一方のみが異常なもの

周期の制御に重要な役割を担っていることが考えられる。一方、Activin シグナル伝達経路で働く因子の一つ Smox (*Smad2*) をコードする遺伝子の機能阻害では、太さはほぼ正常だが各分節の長さが著しく短くなっていた。このことは、Activin シグナルが分節の長さの制御に関与していることを示唆している。興味深いことに、Activin シグナル経路の変異体では成虫原基の増殖が野生型に比べて 3 割程度悪くなることから、Activin シグナルは成虫原基での細胞増殖に関与していることが示唆されている。したがって、Activin シグナルは、分節の長さの決定に関わる方向の細胞増殖を特異的に制御している可能性が考えられる。

④先付節構造の異常

先付節は成虫肢の最先端部分で、爪や褥盤、爪間盤といった特異的な構造が形成されている。18 遺伝子に関して先付節に異常が見られ、その表現型を大別すると、先付節特異的な構造が欠損するものが 13 遺伝子で、異常な構造が形成されるものが 5 遺伝子であった。異常な構造はすべて爪の根元から突出しており形態的にはよく似通っており、先付節の形成過程では、このような構造の形成を積極的に抑制していると考えられる。先付節特異的な構造が欠損する遺伝子としては、細胞周期制御に関わる *stg* を始めとし、セピアプテリン還元酵素やグルタチオン S 転移酵素などの酵素類をコードする遺伝子や、脂質の代謝に関連する遺伝子について、表現型が見られた。これらの遺伝子が特定の構造の形成に重要な役割を示すことはほとんど知られておらず、非常に興味深い。先付節に特異的な異常な構造を形成したものうち、3 つはリボソームの生合成に関わるタンパク質や翻訳開始複合体の構成因子をコードする遺伝子だったことから、タンパク質合成の領域特異的な制御が、先付節での特異的な構造の形成に重要であることが示唆された。また、4 遺伝子に関しては先付節での異常のみが観察されたが、これは、先付節の構造は先付節に特異的な特殊な構造であるために表現型が現れやすいか、または、先付節特異的な構造の形成のみに働く遺伝子であるからだと考えられる。

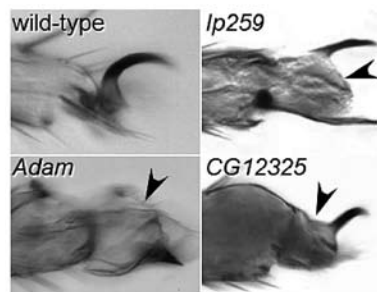


図 2. タンパク質合成関連遺伝子の先付節での異常

⑤その他の異常

7 遺伝子に関しては、分節内に異所的なクチクラが形成されるものや、先付節・付節領域が大きく欠損するものなど上記のどれにも分類されない表現型を示した。先付節・付節領域が大きく欠損するものは 5 遺伝子あったが、その中にはメバロン酸代謝経路で働く HMGCoA 還元酵素をコードする遺伝子が含まれており、ここでも、最終構造の形成に対するメバロン酸代謝経路の重要性が示唆される。

このように、成虫肢の最終的な構造は、個々の細かいプロセスの積み重ねにより形成されると考えられる。多くの場合、一つの遺伝子は複数の分類の表現型を示すが、興味深いことに、その分類の組み合わせは遺伝子ごとに異なっていた。このことから、最終的なそれぞれの構造の形成には、同じような遺伝子が機能することも多いが、その組み合わせが構造ごとに異なっていることが考えられる。また、タンパク質合成などの、細胞の基本的な活動に必要であると従来考えられてきたプロセスが、領域あるいは構

造特異的に調節をうけることも、最終的な構造の形成に重要であることも示唆された。さらに、メバロン酸代謝経路や脂質代謝、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

細胞の分裂は、組織の最終的な形態の形成に非常に大きな影響を及ぼすが、領域特異的転写因子による領域の決定と細胞分裂制御の関係については、あまりよくわかっていない。Ser/Thr/Tyr dual-phosphatase 活性を持つ *Cdc25* は、酵母からヒトまでよく保存されている細胞周期制御因子の一つで、*Cdc2* 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 期へと移行させることが知られている。この *Cdc25* のホモログをコードしている *string* (*stg*) の機能阻害により、すべての分節にわたって剛毛の消失や分節が細くなるという表現型を示した。さらに、先付節においては、爪等の先付節特異的な構造も欠損した。領域特異的転写因子による領域の決定と細胞分裂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。

まず、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。ショウジョウバエの他の組織においては、*stg* は G2 期の細胞で発現し始め、その細胞が M 期に移行すると消失することが知られている。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、肢原基全体に渡ってランダムなドット状の発現がみられたが、これは、個々の細胞の細胞周期に合わせた発現と考えられる。興味深いことに、3 齢幼虫中期になると、ランダムなドット状の発現に加え、先付節領域のすべての細胞で一斉に *stg* の強い発現が始まり、この発現はその後恒常的に続き、蛹期初期に一斉に消失することがわかった。

次に、先付節での領域特異的かつ恒常的な *stg* の強い発現と先付節構造の正常な形成の関係を調べるために、先付節構造の正常な形成に *stg* が必要とされる時期の同定を試みた。GAL4-UAS 強制発現系では、高温で飼育するほど強制発現量が増大し、低温で飼育するほど強制発現量は低下するので、こ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、先付節構造の形成に及ぼす影響を観察した。その結果、*stg* が先付節で領域特異的かつ恒常的に発現している時期に *stg* の機能が阻害されると先付節の構造が欠損することが分かり、この *stg* の先付節特異的かつ恒常的な発現が、先付節特異的な構造の正常な形成に必須であることが示唆された。

さらに、この先付節での領域特異的かつ恒常的な *stg* の強い発現が、実際に領域特異的転写因子によって制御されているのかどうかを、先付節領域の決定に関わる転写因子をコードする遺伝子の強制発現系や変異体を用いて解析した。*clawless* (*cll*) と *Lim1* は先付節特異に発現し、*Bar* は先付節に隣接する付節領域で特異的

に発現し、これらの遺伝子によって、先付節領域が正確に決定される。これらの遺伝子を強制発現した肢原基や変異体の肢原基での *stg* の発現を *in situ* ハイブリダイゼーションによって解析したところ、*cll* と *Lim1* の変異体の肢原基では *stg* の発現は著しく減少しており、*cll* を強制的に先付節以外の領域で異所発現すると、それに合わせて *stg* の強い発現が異所的に誘導された。また、*Bar* を先付節で強制的に異所発現したところ、*stg* の先付節での発現が抑制された。これらのことから、*stg* の先付節での領域特異的かつ恒常的な強い発現は、確かに領域特異的転写因子によって制御されていることが示された。

以上のことから、先付節を決定する領域特異的な転写因子の下流で *stg* が先付節特異的に発現し、それによって先付節特異的な構造が形成されることが明らかになったが、その過程における *stg* の機能を解析するために、先付節での領域特異的かつ恒常的な *stg* の発現と先付節での細胞分裂の関係を解析した。BrdU の取り込みによる S 期の細胞の標識やリン酸化型ヒストン H3 の抗体を用いた M 期の細胞の標識により、さまざまな時期の細胞分裂の様子について解析したところ、*stg* の先付節での領域特異的かつ恒常的な発現が始まっていない 3 齢幼虫初期までは、分裂している細胞が肢原基全体に渡ってまんべんなく散在して見られたが、驚いたことに、*stg* の先付節での発現が始まる 3 齢幼虫中期以降には、先付節での細胞分裂はほとんど起こっていないことが示唆された。このことから、*stg* は、通常の細胞周期制御とは異なるメカニズムによって、先付節特異的な構造の形成に関与していることが示唆された。

Stg の細胞周期制御における主要な機能は、*Cdc2* の脱リン酸化により *Cdc2* を活性化することであることであり、*stg* の突然変異体でも *cdc2* の突然変異体でも、同様に、細胞周期が G2 期で停止して M 期に移行できなくなることが知られている。*cdc2* の温度感受性変異体を用いて、先付節で *stg* の領域特異的かつ恒常的な発現が起こる時期に *cdc2* の活性をなくして細胞周期を停止させた時の表現型を観察したところ、*stg* の機能阻害の時と同様に、すべての分節に渡って剛毛の消失や分節が細くなるという表現型を示した。しかし、先付節特異的な構造の欠損は起こらず、先付節の形成は正常であった。このことから、先付節特異的な構造の形成における *stg* の機能は、単なる細胞周期制御とは異なるものであることが示唆された。

3 齢幼虫後期の肢原基では、いくつかの遺伝子が先付節内で細胞特異的に発現するようになる。*Bar* もそのうちのひとつで、3 齢幼虫後期の肢原基では、付節領域での発現に加えて先付節内の将来爪になる細胞群で発現するようになる。*stg* の機能を阻害した 3 齢幼虫後期の肢原基での *Bar* の発現を抗体染色により調べたところ、*Bar* の爪になる細胞での発現は観察されなかった。このことは、*stg* の機能阻害により爪が形成されなくなることと一致しており、なおかつ、*stg* が先付節で特異的に発現している時期から

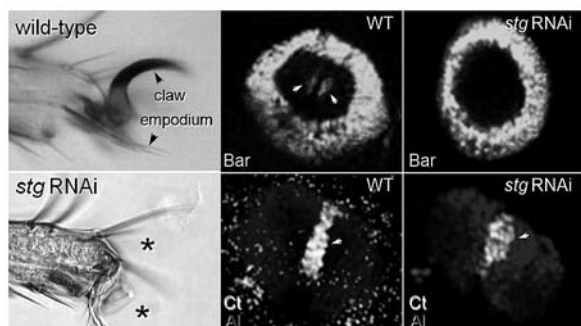


図 3. *stg* の機能阻害時の表現型

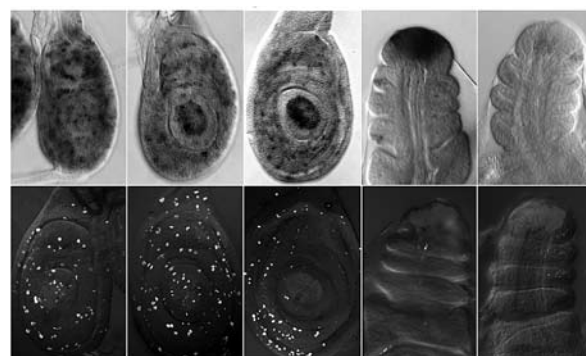


図 4. *stg* の発現パターン (上) と細胞分裂パターン (下)

既に異常が生じていることを示している。一方、*Bar*を発現する細胞群の間の細胞（爪の間の細胞に相当する）で特異的に発現する*cut*の発現についても抗体染色により観察したところ、*stg*の機能を阻害した肢原基でも野生型の肢原基と同様に発現していた。したがって、*stg*の先付節での機能阻害により先付節構造が形成されなくなるのは、単に細胞周期制御の異常により先付節での遺伝子発現が全体的に影響を受けたからではないこと、および、正常な先付節構造の形成過程では*stg*によって遺伝子特異的に発現制御が行われていることが考えられる。さらに、*cdc2*の温度感受性変異体を用いて、先付節で*stg*の領域特異的かつ恒常的な発現が起こる時期に*cdc2*の活性をなくした肢原基での*Bar*の爪になる細胞群での発現を観察すると、発現は正常に見られ、*cdc2*の機能欠損による細胞周期の停止では先付節構造は正常に形成されることとよく一致する結果が得られた。

以上のことを総合して考えると、領域特異的転写因子の下流で細胞周期制御因子の一つである*Stg*の発現が領域特異的に誘導され、それが通常の細胞周期制御とは異なる機能を果たすことで、先付節特異的な構造が形成されると考えられる。

<国内外での成果の位置づけ>

本研究の結果から、分節の大きさの決定するプロセスが長さ方向の制御と太さ方向の制御にわかれていることや細胞周期制御因子*Cdc25*が領域特異的に細胞周期制御とは異なる機能を果たしていることなど、細胞の分裂や増殖に関する新たな知見が得られた。パターン形成と細胞の分裂や増殖の制御が統合されて組織や器官、ひいては生物の形が決定されるメカニズムの解明は、最近の発生生物学の主要な課題の一つであり、本研究はそこに新たな視点を導入するものである。また、哺乳類の*Cdc25*についても、EGF受容体やMAPキナーゼ経路の因子などの脱リン酸化を介してシグナル伝達に関わり得ることが報告されており、*Cdc25*が細胞周期制御以外の機能を果たしている可能性が指摘されている。しかし、これはすべて培養細胞の系で検証されており、その生体内での機能、特に発生過程における役割については、依然、不明のままである。今後、先付節形成における*Stg*の機能がいかなるものであるのかを詳細に検討することによって、*Cdc25*が本来生体内で果たしている機能を明らかにできることが期待され、それに伴い、細胞周期制御とパターン形成との新たな接点を見出すきっかけになることが期待される。

また、最終的な構造が形成されるためには、完全に特異的に発現する遺伝子のみでは実現するのは難しいだろうことを考えると、どこかの段階でそれほど特異的ではない一般的なプロセスの調節が重要になると予想されるが、本研究では、実際にタンパク質合成などの細胞の活動に必須な一番基本的なプロセスが領域・構造特異的に調節されることが重要であることが示唆された。今後、ここを出発点として、特異的な遺伝子発現から一般的なプロセスの制御という過程をより深く理解することができると期待される。

さらには、メバロン酸代謝経路で働く因子や脂質代謝に働く因子、その他いくつかの酵素など、これまで発生過程における役割が不明だったもので明確な表現型が得られたことから、これらの表現型について詳細な解析を行うことで、これらの因子の発生過程における機能の理解につながると考えられる。

本研究の成果は、今後、発生メカニズムの理解を目指した研究をさらに発展させるにあたっての、新たな視点、新たな種を提供するものである。

<達成できなかったこと、予想外の困難、その理由>

当初の計画では、マイクロアレイで見出してきた約1000の候補遺伝子のうち、RNAiシステムが存在する約800の遺伝子についてRNAiによる機能解析を行うで、現在もスクリーニングを継続中であるが、まだすべてを行うまでに至っていない。これは、表現型が予想外に微小なものであったり、その組み合わせであったりするために、表現型の分類に予想外の時間を要したことによる。また、表現型自身が当初予想していたよりも細かいものも多く、新たな表現型が見出されたところで、今まで観察したものを再度見直すなどの繰り返しが必要となってしまった。スクリーニングの効率化は、今後さらに改善すべき問題点である。さらに、RNAiの表現型は個体ごとにぶれが大きかったことも、観察時の時間を大幅に増加させた原因となっている。RNAiを誘導した時の個体差をなるべく抑える工夫についても必要だろう。

また、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、展望>

本研究により、成虫肢構造が最終的に形成されるまでのプロセスの一端が少しずつ明らかになってきた。ここで得られた知見をもとに、それぞれのプロセスや遺伝子の機能の詳細を検討していくことで、領域特異的転写因子による領域化がどのように最終的な構造の形成につながるのかの理解を深めることにつながると考えられる。特に、細胞の活動に基本的な一般的なプロセスの調節や細胞周期制御因子の新しい機能、メバロン酸代謝経路や資質代謝経路など、これまで発生過程を理解する上で論じられてこなかったことについて研究を進展することで、発生過程の真の理解に繋がっていくと期待される。

<研究期間の全成果公表リスト>

1) 論文

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) 学会発表

1. 大野晴美、名取恒平、藤原晴彦、小嶋徹也：ショウジョウバエ成虫肢の形成過程に関わる遺伝子の網羅的解析、第31回日本分子生物学会年会、平成20年12月9日-11日、神戸
2. 小嶋徹也、西郷薫、坪田拓也：異なる*Hox*遺伝子による異なるメカニズムを介した複数の体節間で共通する特徴の制御、第31回日本分子生物学会年会、平成20年12月9日-11日、神戸
3. Harumi Ohno, Tetsuya Kojima: Analysis of *Drosophila* leg development using UAS-RNAi library, The 3rd Insect Genomes Research Meeting, March 11-March 12, 2009, Kobe.
4. Harumi Ohno, Tetsuya Kojima: Analysis of *Drosophila* leg development using UAS-RNAi library, The 9th Japanese *Drosophila* Research Conference, July 6 - July 8, 2009, Shizuoka.