

ショウジョウバエゲノム機能解析により得られた器官改変を誘導する遺伝子群の解析

●倉田 祥一郎

東北大学 大学院 薬学研究科

<研究の目的と進め方>

本研究の目的は、「ショウジョウバエのゲノム機能解析により得られた器官改変を誘導する遺伝子群について、その機能を解析することにより、ある特定の細胞集団で特定の発生プログラムが決定される機構を理解し、またその決定が転換するプロセスから、発生プログラムの決定が細胞集団毎に維持される機構を理解する」ことにある。このことは、「発生プログラム」として捉えられている「特定のゲノム情報の読み出し方」を決定する機構の理解につながると考えられる。解析する遺伝子群は、細胞間の相互作用を担う Notch シグナルの活性化と共に働き、複眼を翅、肢、あるいは触角に改変する遺伝子として、ゲノム機能を利用した1万系統にも及ぶ網羅的探索により同定した遺伝子群である。このうち、特に、Winged eye (WGE) と名付けたクロマチン結合タンパク質をコードし、複眼を翅に改変する遺伝子と、AT フックを有するタンパク質をコードし、複眼を触角に改変する遺伝子を中心に解析を進める。これらの遺伝子は、いずれも前後軸、背腹軸を有するほぼ完全な構造を有する翅と触角を、それぞれ複眼の代わりに誘導する。このように、これらの遺伝子は、決定された発生プログラムを別のプログラムに書き換えることができる。したがって、これらの遺伝子の機能を解析することにより、ゲノム情報の読み出し方を上位で制御する機構が理解できると期待できる。

wge は、*eyeless* (*ey*) 遺伝子の複眼原基特異的エンハンサーの制御下に、複眼原基で過剰発現させると、前後軸、背腹軸を有するほぼ完全な翅を誘導する遺伝子として同定した (Katsuyama et al. PNAS, 2005)。他の器官改変を誘導する遺伝子が、器官改変を誘導する際に、細胞間の情報伝達系である Notch シグナルを活性化する必要のあるのに対して、*wge* は複眼を翅にするのに Notch シグナルの活性化を必要としないという特徴を持つ。Notch シグナルを活性化すると同時に、*Antennapedia* (*Antp*) 遺伝子を発現させると、複眼を翅に改変できるが、この際 *wge* は Notch シグナルと *Antp* の下流で働き、翅発生プログラムの遂行を指示する *vestigial* (*vg*) の異所的な発現を誘導する。その一方で、*wge* は、複眼発生プログラムを指示している *ey* が誘導する *eyes absent* (*eya*) の発現を抑制する。これによって、複眼から翅へと発生プログラムの転換が起きるものと推察できる。その一方で、*wge* は、複眼原基での *eya* の発現と、翅原基での *vg* の発現そのものに必要である。実際、*wge* は発生ステージ、各組織において普遍的に発現しており、クローン解析により、様々な組織の形成に必須であることが示されている。これらの結果は、WGE が状況に応じて、発生プログラムを指示する遺伝子の発現を制御していることを示唆している。さらに、WGE がクロマチンの特異的な部位に結合すること、そして、その結合部位の一部は、エピジェネティックな制御に関わるポリコム遺伝子群の1つである Posterior sex combs (PSC) が結合する部位に一致することが示されている。これらの知見は、普遍的に発現している *wge* が、状況に依存して、エピジェネティックな制御により発生プログラムの決定に関わる

ことを示唆している。

<研究開始時の研究計画>

2006年度の研究計画

2006年度は、WGE がエピジェネティックな制御を行うことを、ポリコム遺伝子群との遺伝学的な相互作用を調べることで確認することとした。さらに、そのエピジェネティックな制御における WGE の標的遺伝子は何かを明らかにするために、遺伝子発現チップアレイを用いて、ショウジョウバエの有する 14,000 の遺伝子について解析し、WGE により発現が制御されている遺伝子を同定する。その際、WGE により直接制御されている標的遺伝子を同定するために、まず、*wge* を過剰発現させ、翅プログラムを発現させた複眼原基と *vg* を異所的に発現させた複眼原基、そして野生型の複眼原基から RNA を抽出し、チップ解析を行う。*wge* の過剰発現ではその発現に変動が見られるが、*vg* の異所的発現では発現が変動しない遺伝子を同定する。そのような遺伝子は、WGE により直接制御されている遺伝子の候補となる。次に、*wge* の RNA-i による発現抑制により、*wge* の発現を抑制した翅原基と、野生型の翅原基から RNA を抽出し、チップ解析を行い、*wge* の発現抑制により、発現量が変動する遺伝子を先に選択した候補遺伝子の中から同定する。このようにして同定した遺伝子は、WGE によるエピジェネティック制御を受ける標的遺伝子の可能性が高い。AT フックを有するタンパク質をコードし、複眼を触角に改変する遺伝子については、この遺伝子を欠損した変異体が致死となることから、この致死性を回避するモザイク解析が必要である。そのために、2006年度は、Flp リコンビナーゼ/FRT を用いた体細胞組換えにより、ミュータントクローンを複製できるショウジョウバエ変異系統を作成することとした。

2007年度の研究計画

2007年度は、ポリコム遺伝子群が作用するシスエレメントであるポリコム応答領域 (PRE) を用いたエピジェネティックな遺伝子発現制御系 (Fab7) を用いて、WGE がどのようなエピジェネティックな制御を行うのか調べることにした。加えて、エピジェネティックな転写制御において、ポリコム遺伝子群と拮抗的に作用するトリソックス遺伝子群と *wge* の遺伝学的相互作用を調べる。

さらに、AT フックを有するタンパク質をコードし、複眼を触角に改変する遺伝子 (AT フック遺伝子) の解析を進める。まず、AT フック遺伝子から発現する二つの転写産物を別々に複眼原基で過剰発現させると、複眼が触角に改変するのかがどうか調べる。次に、AT フック遺伝子を複眼原基で過剰発現させ、複眼を触角に改変させた際に、複眼原基における *wingless* と *Distalless* の発現がどのように変化するか調べる。このようにして明らかとなった *wingless* と *Distalless* の発現が、AT フック遺伝子により細胞自立的にもたらされるのか、それとも細胞非自立的においてもたらされるのかどうか、モザイク状に AT フック遺伝子を複眼原

基で過剰発現させ調べる。AT フック遺伝子を複眼原基で過剰発現させると、複眼が触角に転換するが、それと同時に、複眼原基において、細胞死が誘導されることが明らかとなった。そこで、この細胞死と、複眼から触角への転換との関係を調べるために、AT フック遺伝子を複眼原基で過剰発現させる際に、P35 蛋白質を発現させ、細胞死を抑制した際に、複眼から触角への転換が誘導されるかどうかを調べる。

<研究期間の成果>

2006年度の成果

wge と *Psc* との間に遺伝学的な相互作用が見られるのかどうか、多くのポリコム遺伝子群変異体を示す *sex combs* の異所的な形成を指標に調べた。*Psc* 変異体では、通常オスの前肢のターサルセグメント 1 にのみ形成される *sex combs* が、中肢にも形成され、前後軸に沿ったトランスフォーメーションが誘導される。この *Psc* 変異体の表現型が、*wge* の変異と組み合わせると、抑制されることが分かった。一方、*wge* 変異体では、*sex combs* が、前肢のターサルセグメント 2 にも形成され、遠近位軸に沿ったトランスフォーメーションが誘導される。この *wge* 変異体の表現型は、*Psc* 変異と組み合わせると、抑制されることが分かった。すなわち、*wge* と *Psc* はお互いに拮抗することが示され、遺伝学的に相互作用することがわかった。

上述のように WGE がエピジェネティックな制御を行うことが示唆されたが、そのエピジェネティックな制御における WGE の標的遺伝子を明らかにするために、遺伝子発現チップ解析を行った。その結果、複眼原基における *wge* の過剰発現により発現量が増加する遺伝子は、1096 遺伝子存在し、*vg* の過剰発現により発現量が増加する遺伝子は、915 遺伝子存在した。このうち、470 遺伝子は、*wge* の過剰発現と *vg* の過剰発現の両方で発現量が増加していた。一方、*wge* の過剰発現では発現量が増加するが、*vg* の過剰発現では影響のない遺伝子として 581 遺伝子を同定できた。WGE により直接正に制御されている遺伝子の候補である。*wge* の過剰発現により発現量が減少する遺伝子は、1657 遺伝子存在し、*vg* の過剰発現により発現量が減少する遺伝子は、1397 遺伝子存在した。そして、*wge* の過剰発現では発現量が減少するが、*vg* の過剰発現では影響のない遺伝子として 718 遺伝子を同定できた。WGE により直接負に制御されている遺伝子の候補である。これらの遺伝子の中には複眼の形成に重要な遺伝子である *ey* なども含まれており、*wge* の過剰発現により、複眼プログラムから翅プログラムへ変更している状況が反映された解析結果となっていた。現在、これらの *wge* によって制御されている遺伝子候補の中から、直接 *wge* によってその発現が制御されている遺伝子を同定するために、抗 WGE 抗体と用いたクロマチン免疫沈降と、ゲノムタイリングアレイを組み合わせる解析し、WGE が結合している遺伝子座の同定を試みている。

AT フックを有するタンパク質をコードし、複眼を触角に改変する遺伝子については、この遺伝子を欠損した変異体が致死となることから、致死性を回避するモザイク解析を行う予定をしていた。ところが、この遺伝子のイントロンに別の遺伝子の発現を調節する領域があることが分かり、変異体の致死性が、どちらの遺伝子の変異によるものか、区別できないことが判明した。

2007年度の成果

ホメオティック遺伝子である *Abd-B* の PcG 応答エレメント (PRE) である Fab7 制御下に複眼の色が変化する系を用いて、WGE が、エピジェネティックな遺伝子発現制御に対して抑制状態の維持 (ポリコム遺伝子群様) に働くのか、遺伝子発現の活

性化状態の維持 (トリソラックス遺伝子群様) に働くのか調べた。その結果、Fab7 の制御下にある複眼の色が、ポリコム遺伝子群のヘテロ変異体のバックグラウンドでは、より赤くなり、転写の抑制状態が維持されないのに対して、*wge* のヘテロ変異体のバックグラウンドでは、複眼の色に変化はなく、WGE は、転写抑制状態の維持には関わらないことが明らかとなった。このポリコム遺伝子群のヘテロ変異体のバックグラウンドで観察された転写抑制状態の解除は、ポリコム遺伝子群と拮抗的に働くトリソラックス遺伝子群のヘテロ変異体のバックグラウンドでは見られない。これと同様に、ポリコム遺伝子である *Psc* のヘテロ変異体のバックグラウンドで観察された転写抑制状態の解除は、*wge* のヘテロ変異体のバックグラウンドでは観察されなかった。この結果は、WGE が、エピジェネティックな遺伝子発現制御に対して、活性化状態の維持 (トリソラックス遺伝子群様) に働くことを示唆している。WGE が、トリソラックス遺伝子群様に働くことが示唆されたので、*wge* とポリコム遺伝子群、ならびにそれらと拮抗的に働くトリソラックス遺伝子群との遺伝学的相互作用を調べた。その結果、*wge* は、ポリコム遺伝子群に属する *Pc* など、ならびにトリソラックス遺伝子群である *trx* に対して共に、拮抗的に働くことが分かった。これらの結果は、*wge* はエピジェネティックな遺伝子発現制御に関わるものの、これまでの、抑制状態の維持に関わるポリコム遺伝子群、あるいは活性化状態の維持に関わるトリソラックス遺伝子群といった、既存の範疇に属さない新たな制御に関わる可能性を示唆している。そこで現在、*wge* の過剰発現により複眼が翅に改変させる際に誘導される *vg* の遺伝子制御領域に存在する PRE に対して、抑制状態の維持 (ポリコム遺伝子群様) に働くのか、遺伝子発現の活性化状態の維持 (トリソラックス遺伝子群様) に働くのか調べている。

AT フック遺伝子から発現する二つの転写産物を別々に複眼原基で過剰発現させ、複眼が触角に改変するのかどうか調べたところ、いずれも触角が誘導され、二つの転写産物の機能に違いはないことが明らかとなった。次に、AT フック遺伝子を複眼原基で過剰発現させ、複眼を触角に改変させた際の、複眼原基における *wingless* と *Distalless* の発現を調べたところ、いずれも異所的に発現が誘導されることが分かった。そこで、これらの異所的な遺伝子発現誘導の細胞自立性を調べるために、モザイク状に AT フック遺伝子を複眼原基で過剰発現させ、*wingless* と *Distalless* の発現を解析した。その結果、AT フック遺伝子過剰発現させた細胞では、細胞死が誘導されることが明らかとなった。この細胞死と、複眼から触角への転換との関係を調べたところ、P35 蛋白質を発現させ細胞死を抑制すると、複眼から触角への転換が高頻度で誘導されることがわかった。この結果は、AT フック遺伝子の過剰発現により細胞死が誘導されたために、複眼から触角への転換が誘導されたのではないことを示している。

<国内外での成果の位置づけ>

wge は、ショウジョウバエ複眼原基での過剰発現により複眼が翅へと改変する遺伝子として、1 万系統にも及ぶ大規模なゲノム機能スクリーニングにより、複眼から翅への改変を誘導するとして同定された遺伝子である。本研究により、WGE は、遺伝子発現の抑制状態の維持に関わるポリコム遺伝子群、あるいはそれらと拮抗して活性化状態の維持に関わるトリソラックス遺伝子群といった、既存の範疇に属さない新たなエピジェネティック制御に関わる可能性が示唆された。このような報告はこれまでになく、本研究領域に新たな展開をもたらすものと期待できる。

<達成できなかったこと、予想外の困難、その理由>

AT フックを有するタンパク質をコードし、複眼を触角に改変する遺伝子については、この遺伝子を欠損した変異体が致死となることから、致死性を回避するモザイク解析を行う予定をしていた。ところが、この遺伝子のイントロンに別の遺伝子の発現を調節する領域があることが分かり、変異体の致死性が、どちらの遺伝子の変異によるものか、区別できないことが判明した。このことから、これまでとは異なるアレルの作成が必要となり、2年間の研究期間では達成できなかった。

<今後の課題、展望>

本研究により、恒常的に発現している *wge* が、状況に応じて、トリソックス遺伝子群のように遺伝子発現の活性化状態に維持に働く一方で、それとは全く逆にポリコム遺伝子群のように遺伝子発現の抑制状態の維持に働く事が示唆された。したがって、*wge* はこれまでに明らかにされていない新たなエピジェネティック制御に関わる可能性があり、本研究領域に新たな展開をもたらすことが期待できる。今後は、(1) WGE が、状況に応じて、遺伝子発現の活性化状態に維持に働く場合と、遺伝子発現の抑制状態の維持に働く場合で、どのような因子と共に機能するのか、(2) WGE が制御する標的遺伝子はどのようなものがあり、それがどのように制御されているのか、(3) WGE とヒストン修飾などのクロマチン制御との関係、を明らかにすることが必要である。それによって、「発生プログラム」として捉えられている「特定のゲノム情報の読み出し方」を決定する機構の一端が明らかになるものと考えられる。

<研究期間の全成果公表リスト>

1) 論文

1. 0911171820

Prince, F., Katsuyama, T., Plaza, S., Resendez-Perez, D., Berry, M., Kurata, S., and Gehring, W. J.: The YPWM-motif links Antennapedia to the basal transcriptional machinery, *Development*, 135, 1669-1679 (2008).

2. 09111711830

倉田祥一郎：ハエから夢見る再生医療，ファルマシア，44, 1059-1062 (2008).

2) 学会発表 (招待講演含む)

- 倉田祥一郎、ショウジョウバエの複眼を翅へと改変する *winged eye* によるエピジェネティック制御、日本薬学会第130年会シンポジウム、2010年3月29日岡山
- 中島瑠美、勝山朋紀、倉田祥一郎、ショウジョウバエの器官改変を引き起こす遺伝子 *winged eye* によるエピジェネティック制御、第32回日本分子生物学会、2009年12月11日横浜
- Nguyen Thanh Quang、南達郎、西村典子、勝山朋紀、大島吉輝、倉田祥一郎、ショウジョウバエの器官改変頻度を上昇させる遺伝子 *simjang* の解析、第31回日本分子生物学会年会、第81回日本生化学会大会 合同大会 2008年12月9日神戸
- R. Nakajima, T. Katsuyama, J. Terashima, Y. Oshima, S. Kurata, Epigenetic regulation of *winged eye* capable of inducing eye to wing transformation, *Frontiers in Developmental Biology*, September 13-17, 2008. Giens, France.
- 中島瑠美、勝山朋紀、寺島潤、倉田祥一郎、複眼を翅に改変する遺伝子 *winged eye* によるエピジェネティック制御、第30回日本分子生物学会・第80回日本生化学会 合同大会 2007年12月13日横浜
- S. Kurata, The role of *Winged eye*, a chromatin-associated

bromo-adjacent homology domain protein, in disc specification in *Drosophila*, *Hox Genes in Development and Evolution*, October 8-13, 2007. Fondation des Treilles, France,

- 倉田祥一郎、ショウジョウバエゲノム機能解析により得られた器官改変を誘導する遺伝子群の解析、特定ゲノム4領域・領域横断昆虫ゲノム研究会、2007年2月27日東京