

機関番号：63801

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20570100

研究課題名(和文) bicoidモルフォジェンの変動に対する発生調節機構とその進化

研究課題名(英文) Mechanism and evolution of developmental robustness against perturbation of the BICOID morphogen in Drosophila embryo

研究代表者

高野 敏行 (TAKANO TOSHIYUKI)

国立遺伝学研究所・集団遺伝研究系・准教授

研究者番号：90202150

研究成果の概要(和文)：ショウジョウバエの初期胚の前後軸は、前端から後端に向かって作られるBICOIDタンパクの濃度勾配(モルフォジェン)によって形成される。一方で、BICOIDモルフォジェン濃度の変動に対し個体は調節・緩衝する能力を備えている。過剰コピー数の*bicoid*遺伝子をもった母親から生まれた胚では頭部の予定領域が拡張する。しかし、この発生予定運命の変更は頭部予定領域での細胞死によって調節される。本研究はこの調節能力はそれ自体に個体差のある能動的な働きであることを明らかにし、頭部予定領域の拡大に伴う細胞死に関わる遺伝子を同定した。

研究成果の概要(英文)：The maternal effect gene *bicoid* (*bcd*) serves as a morphogen and establishes AP axis in Drosophila. Whereas increased dosage of *bcd* causes enlargement of prospective head region in early embryogenesis, the adults have normal head size. Excessive cell death contributes to reduce the expanded head region; however, nothing is known about what triggers cell death and what kinds of genes are involved in the repair. From genetic screening and microarray experiments, we identified a candidate gene responsible for the repair, which is also involved in the response to irradiation-induced DNA damage.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2009年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物多様性・分類

キーワード：進化、発生・分化、頑健性、モルフォジェン、bicoid

## 1. 研究開始当初の背景

個体発生は、常に確率的なゆらぎや遺伝、環境要因による変動の影響を受けている。そのためシステムは正確であるとともに頑健でなければならない。例えば、遺伝子重複は冗長性を与え、頑健性に寄与する。単純な冗長性以外にも頑健性のメカニズムは存在する。

多くの遺伝子の関与する、フィードバックループなどを介した複雑なカスケードは最終産物の生産量に頑健性を与えるかもしれない。しかしこうした働きは特殊な検出法が要求され、見過ごされているものも多いと推察される。一方で、頑健性は現象に対して定義されるもので、特別なメカニズムが必要かも

定かでない。そのため頑健性自体が進化できる形質かどうかははっきりしない。

母性効果遺伝子から、ギャップ遺伝子、ペアルール遺伝子、セグメントポラリティ遺伝子へと続くショウジョウバエ初期胚の分節化は最も良く研究された発生カスケードである。なかでも母性効果遺伝子 *bicoid* は濃度依存的に働くモルフォジェンとして胚の前後軸の決定に主要な役割を果たす。モルフォジェンとしての機能を証明するために行われた *bicoid* 遺伝子のコピー数の人工改変実験は前後軸の変動に対する隠れた頑健性（ここでは調節機能と呼ぶ）も同時に明らかにした。具体的には6コピーの *bicoid* 遺伝子を持たせた母親から生まれた胚は頭部の境界を示す溝である頭褶の位置が10%ほど後端側に移動する；しかし、こうした胚での頭部の拡張はその後、細胞死によって相殺され、野生型とほぼ変わらない成体となる。残念ながら今でも、拡張した頭部で起こる細胞死がどのように誘導され、どういった遺伝子が関与するのか全くわかっていない。さらに言えば、通常条件での調節能力の意義や進化についても不明であった。こうした背景から、この *bicoid* 遺伝子数の人工改変という希少なモデル系を使って能動的な頑健性メカニズムについて解析するに至った。

## 2. 研究の目的

### (1) 発生調節能力の個体差とリスク評価。

自然集団から確立した染色体系統の調節能力の評価と調節能力に劣る系統の多面発現効果や他の弱い突然変異との複合効果の検証。

### (2) 過剰量の BICOID に対する調節メカニズムの解明。

① 複数種のスクリーニングの組み合わせ解析による、過剰量の BICOID による発生予定運命の変更に働く調節遺伝子の探索。

② 上記スクリーニングから得られた候補遺伝子の機能解析

(3) 6コピーの *bicoid* という人為淘汰による調節能力の実験室内の進化の検証。

## 3. 研究の方法

### (1) 発生調節能力の個体差とリスク評価。

自然集団由来の第二染色体系統を確立、正常な2コピーおよび過剰な6コピーの *bicoid* 遺伝子の存在下での成体までの生存力、胚の分節パターンの異常について調査した。

### (2) 過剰量の *bicoid* に対する調節のメカニズムの解明。

① 欠失染色体スクリーニングと発現解析により発生調節に関わる遺伝子の探索を行った。

スクリーニングに用いた欠失染色体は酵母

の配列特異的な組換え酵素を使って作出されたもので、欠失以外は均一で同一の遺伝的構成となっている。欠失染色体は合わせて、第2、第3染色体全体の約60%をカバーすることになる。

6コピーの *bicoid* 存在下で過剰に起こる細胞死はステージ11に始まる。2コピー、6コピーの *bicoid* 個体から生まれたステージ12-13の胚についてアレイによる遺伝子発現解析を行った。各条件について3回の反復実験を行った。

② スクリーニングで見つかった候補遺伝子について、発現量変化をリアルタイムPCR法によって、遺伝子の発現パターンを *in situ* ハイブリダイゼーション法によって調査した。また、2重鎖RNAのインジェクションによる遺伝子機能のノックダウン実験と GAL4-USA システムを用いた強制発現実験を行った。

## 4. 研究成果

### (1) 発生調節能力の個体差とリスク評価。

自然集団より40系統の第2染色体ホモ接合系統を確立、その調節能力を生存力を指標に調査した。結果、正常な2コピーの場合と比べ6コピーの *bicoid* 遺伝子存在下では生存力の平均値は約20%低下し、遺伝分散は2倍ほどに有意に増加した。さらに、6コピーの *bicoid* 遺伝子存在下で大きく、有意に生存力が低下した3系統と、逆に生存力が上昇した1系統を見いだした。これらの系統も胚の頭褶の位置は他の系統と変わらない。つまり、BICOID モルフォジェンそのものや、その読み取りではなく、その後の調節に障害があることがわかる。また、より穏やかな4コピーの *bicoid* 遺伝子の遺伝的背景においても、6コピーの場合ほど顕著ではないが、一致した傾向が観察された。

上記の結果は調節能力に遺伝的変異が存在すること、つまり頑健性は遺伝的にコントロールされていて、その能力に個体差があることを明らかにしている。言い換えれば異常な緊急時に働き、調節に特異的に関与する機構、遺伝子が存在することを強く支持する。

なお、上記の系統は今後のリスク評価等の研究材料として有用である。

### (2) 過剰量の BICOID に対する調節メカニズムの解明。

① 前述の結果を踏まえ、調節機構に特異的に働く遺伝子の探索を行った。

第2、第3染色体について欠失染色体による遺伝学的スクリーニングからコピー数依存的に調節能力を低下させる2つの領域を同定した。これらの領域はそれぞれ4個、42個の遺伝子を含んでいる。

アレイによる遺伝子発現の比較解析から

6コピーの *bicoid* 遺伝子存在下で発現量が有意に上昇する83個の遺伝子を同定した。このうち11の遺伝子は2倍以上の上昇を示した。また、45個の遺伝子が mRNA 量の有意な低下を示した。なお、6コピーの条件で *bicoid* 遺伝子の発現量は約3.7倍に上昇している、実験の妥当性は確認されている。

上記2種のスクリーニングから共通に現れる遺伝子として cg15479 を調節機構に働く候補遺伝子として同定した。

② この遺伝子については、リアルタイムPCR法によって6コピーの *bicoid* 遺伝子存在下で発現量が有意に上昇することを確認した。 *in situ* ハイブリダイゼーション法からは殊に頭部予定領域で強発現が認められた。

成虫原基を用いた強制発現によって細胞死が誘導されること、2重鎖RNA導入による遺伝子発現のノックダウンによって過剰量の BICOID 存在下で顕著にふ化率が低下することを見いだした。cg15479 が発生予定運命の調節に細胞死を通じて必須の役割を果たしていることを強く示唆する。この発見は今後、調節カスケードの全容の解明へと進む出発点となる。

(3) 6コピーの *bicoid* という人為淘汰による調節能力の実験室内の進化の検証。

発生調節能力の個体差調査に時間がかかり、人為淘汰実験を行うことができなかった。今後の課題として残った。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計8件)

- ① Takahashi, K. H., Daborn, P. J., Hoffmann, A. A., and Takano-Shimizu, T. (2011) Environmental stress-dependent effects of deletions encompassing *Hsp70Ba* on canalization and quantitative trait asymmetry in *Drosophila melanogaster*. PLoS ONE 6, e17295. 査読有
- ② Itoh, M., Nanba, N., Hasegawa, M., Inomata, N., Kondo, R., Oshima, M. and Takano-Shimizu, T. (2010) Seasonal changes in the long-distance linkage disequilibrium in *Drosophila melanogaster*. J. Hered. 101, 26-32. 査読有
- ③ Watanabe, Y., Takahashi, A., Itoh, M. and Takano-Shimizu, T. (2009) Molecular spectrum of spontaneous de

*novo* mutations in male and female germ line cells of *Drosophila melanogaster*. Genetics 181, 1035-1043. 査読有

- ④ Tanaka, K. M., Takahashi, K. R. and Takano-Shimizu, T. (2009) Enhanced fixation and preservation of a newly arisen duplicate gene by masking deleterious loss-of-function mutations. Genet. Res. 91, 267-280. 査読有
- ⑤ Takahashi, K. H., Tanaka, K., Itoh, M. and Takano-Shimizu, T. (2009) Reduced X-linked rare polymorphism in males in comparison to females of *Drosophila melanogaster*. J. Hered. 100, 97-105. 査読有
- ⑥ Inomata, N., Itoh, M., Kondo, R., Ohshima, M., Inoue, Y. and Takano-Shimizu, T. (2008) A new test for detecting ongoing selection. Genetica 133, 321-334. 査読有

[学会発表] (計14件)

- ① 田中健太郎, キイロショウジョウバエにおける遺伝的攪乱に対するロバストネスの解析, 北海道大学低温科学研究所研究集会「ショウジョウバエ研究のいまとこれから—特に, キイロショウジョウバエ以外の研究に注目して—」, 北海道大学, 札幌, 2010年9月23日.
- ② 高野敏行, 遺伝子発現を調節する細胞内環境とシス調節領域の共進化, 日本遺伝学会第82会大会, 北海道大学, 札幌, 2010年9月22日.
- ③ 田中健太郎, *bicoid* 遺伝子コピー数増加による発生予定運命の異常を修復するショウジョウバエ遺伝子の同定, 日本遺伝学会第82会大会, 北海道大学, 札幌, 2010年9月21日.
- ④ 田中健太郎, 新規に生じた重複遺伝子の運命に及ぼす有害突然変異の効果, 第12回日本進化学会, 東京工業大学, 東京, 2010年8月4日.
- ⑤ Tanaka, K. M., Hidden genetic variation in the ability of repair of fate map shift caused by 6 copies of *bcd* gene in a natural population. 51st Annual Drosophila Research Conference, Washington, DC., 2010

4/7-4/11.

- ⑥ 田中健太郎, *bicoid* 遺伝子コピー数の増加に応答する修復機構の遺伝的多様性, 日本遺伝学会第 81 回大会, 松本市, 2009 年 9 月 18 日.
- ⑦ 高野敏行, 量的形質の理解のために, 日本遺伝学会第 81 回大会, 松本市, 2009 年 9 月 17 日.
- ⑧ 高橋一男, 温度ストレス下における Hsp 遺伝子の発生過程安定化機能, 第 11 回日本進化学会大会, 北海道大学, 札幌, 2009 年 9 月 2 日-9 月 4 日
- ⑨ Tanaka, K. M., Repair system for fate map shifts caused by increased *bicoid* gene dosage. The 9th Japanese Drosophila Research Conference, Kakegawa, Shizuoka, 2009 7/6-7/8.
- ⑩ 田中健太郎, Genetic screening for mutations affecting the repair system for *bicoid* copy-number alteration in *Drosophila* embryo, 日本遺伝学会第 80 回大会, 名古屋, 2008 年 9 月 4 日.

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

高野 敏行 (TAKANO TOSHIYUKI)

国立遺伝学研究所・集団遺伝研究系・准教授

研究者番号：90202150