

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 17 日現在

機関番号：63801

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2014

課題番号：23770258

研究課題名(和文)生物個体における組織の相対的なサイズを制御する分子メカニズム

研究課題名(英文)relative size regulation in the developing organism

研究代表者

林 貴史(Hayashi, Takashi)

国立遺伝学研究所・系統生物研究センター・特任研究員

研究者番号：50553765

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：生物の相対成長の仕組みに関する研究を行った。具体的には成長を制御する普遍的な転写制御因子Ykiと相互作用する因子の探索、成長に関わるmicro RNAであるbantamとinsulin/IGFシグナルの成虫原基間における活性の違いを定量的に調べるシステムの構築、インシュリン/インシュリン様成長因子と協調的に働くimaginal disc growth factors(IDGFs)の機能解析の3点を主要な研究課題として実験を行った。

研究成果の概要(英文)：We studied the mechanism of relative growth of organisms. In particular, we focused on (i) the identification of new factors that interact with the universal growth-regulating transcription factor Yki, (ii) construction of systems that quantify the strength of the activities of the growth-controlling microRNA bantam and the insulin / IGF signals in tissues and (iii) the functional study of imaginal disc growth factors (IDGFs), which are supposed to interact with the insulin / insulin-like growth factors and regulate imaginal disc proliferation.

研究分野：発生生物学

キーワード：ショウジョウバエ 相対成長 yki bantam idgf RNAi

1. 研究開始当初の背景

生物の形態を決定する際には個体の各部位間の相対サイズの決定が本質的な役割を果たしている。例えばゾウの形態の特徴は長い鼻であるが、それが人目を引くのは鼻がその手足や頭、胴体と比較して相対的に大きい(長い)ためである。そしてこのような特殊な例を持ち出すまでもなく、一般的に陸棲生物は力学的な理由から体が大きくなるほど相対的に太い手足を持つことはよく知られているが、これもまた「相対サイズ」に関係する重要な事例である。このような考察から、個体の各部位の相対サイズという問題は生物の形態の決定に深く関わっていることが明らかとなる。

ところで一般的に動物の各部位は生まれた時点における相対サイズを一生にわたり維持するわけではなく、むしろ成長の過程においてさまざまに変化させるのが普通である。例えばヒトの場合、生まれたばかりの赤ん坊は相対的に頭が大きく手足は短い。ところがその赤ん坊が成長する際には、頭部は比較的ゆっくりと成長する一方で胴体や手足はより速く成長するため、結果としてヒトの大人は赤ん坊と比べて相対的に頭が小さく手足は長くなる。このような現象が意味するところは、生物の形態の問題は相対サイズと深く関係しており、また相対サイズの決定それ自身には成長制御が本質的な役割を果たしているということである。従って、動物の形態の仕組みを理解するには生物個体を構成する体の各部位の成長制御機構を理解する必要がある。

相対成長(allometry)という問題は長年にわたり生物学の中心的な研究課題であり続けている。例えば Sir Julian S. Huxley は 1932 年に *Problems of Relative Growth* というこの分野における古典的な著書を発表しており、また科学エッセイで有名な古生物学者 Stephen J. Gould はアロメトリーの専門家でもあり、この題材に関しても数編のエッセイを発表している。しかしながら成長(あるいは増殖)といった問題の基礎となる細胞周期や増殖因子研究の目覚ましい発展にもかかわらず、今なお相対成長のメカニズムの本質は明らかとなっていない。一般に多細胞生物の細胞増殖にはホルモンや成長因子等の液性因子を介した細胞間シグナル伝達が重要な役割を演じていることから、相対成長の問題に関してもこれらによる制御が本質的であると予想される。そして相対成長それ自身はシグナル因子に対する組織の応答性により調節されていることはほぼ確実であると思われるが、現在まで相対成長の具体的な調節機構は全く謎のままである。従って増殖シグナルに対する組織の応答性がどのように決定され、最終的な組織の「相対サイズ」が決定されているのか、その機構を明らかにすることは非常に意義深いことであるに違いない。

2. 研究の目的

ゾウやキリン、テナガエビやシオマネキといった生物の外見的特徴について考えると、生物の形態というものは大まかに手足や頭、胴体といった体の要素間の相対サイズを調節することにより決定されていることがわかる。人間の顔も同様であり、目、鼻、口といった各要素の相対的な大きさは、顔の大まかな特徴を決定する上で本質的な役割を果たしている。本研究の目的は、個体における各組織・器官の相対サイズがどのようにして決定されているのか、そのメカニズムを明らかにすることである。そこでショウジョウバエを用いてこの過程に関わる因子を同定し、そのサイズ決定に関する機能を明らかにすることにより、生物の形態決定過程の本質へと迫りたい。ショウジョウバエは完全変態昆虫であり、その成虫構造は成虫原基という幼虫体内に存在する組織が蛹期に急速に分化することにより形成される。成虫原基には翅原基や肢原基、複眼触角原基等があり、それぞれが幼虫期には体液中を浮かびながら増殖している。そして成虫構造の最終的な相対サイズは幼虫期における成虫原基の領域面積に対応している。このような「成虫原基間における相対サイズ」は一体どのような仕組みで決定されているのであろうか? そのメカニズムを解明することが本研究の第一の目的である。

ところで個々の成虫原基は基本的には一層の細胞層からなる二次元的な組織であるが、その内部はいくつかの区画(背側、腹側、前、後など)へと細分化されている。そして例えば翅原基ではこれらの区画は成虫の翅や胸背板、小盾板などといった特定の構造と対応している。ところで各成虫原基がそれぞれ固有の相対サイズを有するのと同様に、成虫原基内の個々の区画もまた固有の相対サイズを有している。成虫原基は体液中で増殖するため、各成虫原基の生育環境(栄養条件等)は原基の種類によらず一定と考えられることから、異なる成虫原基間の相対的なサイズや各成虫原基内における区画間の相対サイズは栄養条件等の外的要因ではなく、それぞれの原基やその内部区画に備わった内在性の性質として決定されていると考えられる。このように成虫原基の発生における相対サイズの問題としては、成虫原基間の相対サイズと個々の成虫原基内における区画間の相対サイズの問題があるが、この両者は全く別々の機構により制御されているわけではなく、むしろ共通の機構により制御されている可能性が高い。そしてこの共通の制御機構として、増殖制御に関わる Yorkie(Yki)とよばれる転写因子の機能が重要であると考えられた。Yki は DNA 結合ドメインを持たない転写制御因子であり、DNA 結合性の転写因子と結合することによりその機能を発揮する。ところで興味深いことに Yki 自身は普遍的な増殖制御因子である一方で、その結合

パートナーは領域特異的な発現を示すことが知られているのである。現在までに Yki と相互作用する因子としては Scalloped(Sd)と Homothorax (Hth)が知られているが、この二者は共に組織特異的な因子であり、Sd は主に翅原基の将来翅になる領域で発現している一方で、Hth は翅原基や複眼原基の一部の Sd とは重ならない領域で発現している。しかしこの二つの遺伝子だけでは成虫原基全体はカバーされない。従って他の成虫原基、例えば肢原基においては、Yki はこれら以外の第三の転写因子(TF)と複合体を形成し、細胞増殖を制御している可能性が考えられる。そしてこの Yki-TF 間の相互作用の強さや TF の標的 DNA への結合力はそれぞれの転写因子に応じて異なると考えられることから、Yki-TFs 間の相互作用は相対成長を決定するメカニズムの一つである可能性が考えられる。そこで本研究ではまず Yki と相互作用する新規の転写因子を同定し、その後、これら Yki-TF 複合体の相対サイズの決定における機能を、Yki の下流因子である bantam micro RNA の発現制御機構を指標として調べる予定である。

また成虫原基の成長には Yki が関わる fat シグナル以外に、いくつかの細胞間シグナル伝達系の関与が知られている。その中でも特に insulin/IGF シグナルは組織の成長に不可欠であり、相対サイズ決定に重要な役割を果たしているに違いない。そこで insulin/IGF のサイズ決定における役割についても調べる予定である。Yki/bantam と insulin/IGF の作用機構の単純な仮説として、成虫原基の最終的なサイズは Yki/bantam と insulin/IGF のシグナル強度と相関しているという可能性が考えられる。そこでこの可能性を検証するために bantam および insulin/IGF の成虫原基におけるシグナル強度を定量化するシステムの構築を試みる。また insulin/IGF シグナル伝達系と協調的に働き、成虫原基の成長を制御する因子として同定された成虫原基成長因子 (Imaginal disc growth factors: IDGFs) に関して、その機能を明らかにするための実験を行う。

3. 研究の方法

(1) Yki と相互作用する転写因子の探索

Sd や Hth と同様に成虫原基において領域特異的な発現を示し、機能的に重要な役割を果たしていることが知られている転写因子をリストアップし、それらと Yki との間のタンパク質間の相互作用を調べる。具体的には Distalless, Dachshund, Tracheialess, Spinless, Nubbin, Rotund, Aristaless, Sine oculis, Eyes absent, Chinmo, Bunched の 10 種類のタンパク質を Yki パートナーの候補として選び、これらに HA または FLAG タグを付加した後に赤血球抽出液由来の無細胞合成系で合成し、同様の手法で合成した FLAG /HA タグ付きの Yki タンパクと

の間の相互作用を免疫沈降法により検証する。またコントロールとしては同様の手法で合成した HA/FLAG ラベルの Sd タンパク質を用いる。免疫沈降反応では市販の抗 HA 抗体および抗 FLAG 抗体が agarose に結合した、anti-HA-agarose および anti-FLAG-agarose を用い、検出は HA 抗体(anti-FLAG-agarose で沈降した場合)および抗 FLAG 抗体(anti-HA-agarose で沈降した場合)を用いて行う。

(2) bantam および insulin/IGF の成虫原基間における活性の違いを定量的に調べるシステムの構築

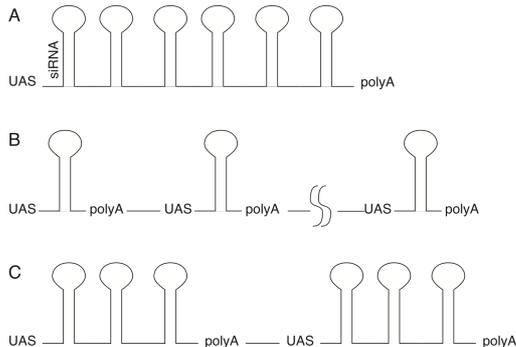
bantam に関しては、普遍的なプロモーターである tublin プロモーターの下流に GFP と polyA 配列をつなげる。そしてこの polyA 配列に bantam の標的配列を含ませる (tub-GFP-polyA(bantam sites))。その一方で、GFP に 50 アミノ酸程度の余分な配列(今回は 2xV5+3xFLAG タグ(以後 V5FLAG と呼ぶ))を使った)と polyA 配列をつなげた融合遺伝子を作り、これ(tub-GFP-V5FLAG -polyA)と tub-GFP-polyA(bantam sites)の2つのコンストラクトを gypsy insulator 配列をまたぐ形で一つのプラスミドとして繋げ、ハエのゲノムに組み込む。この遺伝子組換えバエから成虫原基を取り出し、ウエスタンブロッティング法で GFP を検出する。GFP はメンブレン上で本来の GFP に対応するシグナルと、GFP-V5FLAG に対応するシグナルが2本のバンドを形成するはずであるが、本来の長さの GFP は bantam による翻訳抑制を受け、発現量が低下するはずである。そこでこの2本のバンドのシグナルを定量し、その比を求めることにより bantam の翻訳抑制活性を定量化する。

insulin/IGF に関しては insulin シグナルの下流でリン酸化されることが知られている FOXO タンパク質のリン酸化部位周辺の 16-24 アミノ酸配列を取り出し、それを3回繰り返した 3xFOXO(S/T)を GFP と融合し、tub-GFP-3xFOXO(S/T)-polyA というコンストラクトを作る(negative control として FOXO(S/T)の Ser/Thr を Ala に置換した FOXO(A)も作る)。これらのコンストラクトをショウジョウバエ卵に注入し、遺伝子組換えバエを作成する。この遺伝子組換えバエから成虫原基を取り出し、ウエスタンブロッティング法で GFP を検出する。するとメンブレン上ではリン酸化されていない GFP のシグナルと FOXO 配列の Ser/Thr 配列がリン酸化された GFP に対応するシグナルに対応する2本(またはそれ以上)のバンドが検出されるはずである。そこでこれらのバンドのシグナル比を定量することにより insulin/IGF のシグナル強度を定量化する。

(3) インシュリン/インシュリン様成長因子と関係する imaginal disc growth

factors (IDGFs) の機能の解析

6つのIDGF様遺伝子に対するRNAiベクターを作成し、遺伝子組換えバエを作成することにより、ショウジョウバエ個体においてIDGFsの機能をノックダウンし、その効果を調べる。多数(今回は6個)のsiRNAを同時に発現させるため、酵母の転写因子GAL4の結合配列であるUAS配列の下流に21bp程度のinverted repeat(IR)を配置したコンストラクトを6個配置するが、その方法として、図のA,B,Cのような方法が考えられる。



AではUASの下流で転写される一つのRNA分子に6種類のIR全てが組み込まれている。Bでは一つのUASの下流に一種類のIRを配置し、そのようなUAS/IR対を直列に6つ配置している。そしてCでは一つのUASの下流に3種類のIRを配置し、それを2つ直列に並べている。これらがどの程度有効に機能するかは事前に予想できないため、まずはこれら3種のコンストラクトを作成し、それぞれをショウジョウバエに導入してその効果を調べる。もしこれらがIDGFsを効率的にノックダウンする場合、その表現型を調べ、またレスキュー実験によりoff target効果の可能性を除外する。レスキュー実験に関してはRNAiのターゲットとなる21bp内に3つのアミノ酸置換を伴わないサイレント変異を導入することにより、RNAiの作用を受けないIDGFsを作成し、それをバエに戻すことを行う。また上記の3種のコンストラクトのいずれも期待したような効果を示さない場合は、さらにRNAiベクターの設計を工夫し、同様の実験を繰り返す。

4. 研究成果

(1) Yki と相互作用する転写因子の探索

SdやHthと同様に成虫原基において領域特異的な発現を示し、機能的に重要な役割を果たしていることが知られている10種類のタンパク質とYkiとの間のタンパク質間相互作用を赤血球抽出液由来の無細胞合成系で合成したタンパク質を用いた免疫沈降法により検証した。その結果コントロールのSdとYkiの間の相互作用は確認されたが、それ以外の10種類のどのタンパク質もYkiとの強い結合は確認できなかった。そこでSd以外にYkiと結合することが報告されているHthについても同様の手法を用いて検証を行

ったところ、HthとYkiの間の相互作用はこの手法では再現できなかった。HthとYkiとの間の相互作用を報告した論文を詳しく調べたところ、Hth-Yki間の相互作用はSd-Yki間の相互作用と比較して非常に弱く、通常のin vitro実験ではなく、培養した細胞において大量にタンパク質を発現させることにより相互作用を検出していた。そのためin vitro合成系を利用した今回の実験系では、この種の弱い相互作用を検出するのは困難である可能性が考えられた。現時点では今回選んだ10種類のタンパク質のいずれかがYkiと弱く相互作用をしている可能性は否定出来ないが、その一方で普遍的な因子であるMadがYkiと相互作用するという報告もあることから、翅原基以外の領域ではYkiはMadとのみ相互作用して成長を制御している可能性も考えられる。そこでこのYkiと相互作用するタンパク質の探索は当初の予想通りには進行しなかったが、この時点で終了することとした。

(2) bantam と insulin/IGF の成虫原基間における活性の違いを定量的に調べるシステムの構築

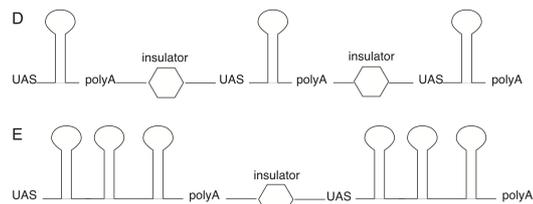
bantam microRNAとinsulin/IGFは成虫原基において細胞増殖を制御することが知られており、成虫原基の相対サイズの決定に関与している可能性が考えられる。そこでinsulin/IGFとbantamの成虫原基間における活性の違いを定量化するために普遍的なtubulinプロモーターとGFP、bantam標的配列およびFOXOリン酸化部位用いたアッセイシステムを構築した。bantamアッセイシステムに関しては標的配列としてbantamと完全に相補的な31bp配列を1回(1xbantam)および2回(2xbantam)繰り返した人工的なターゲットと、bantamの標的配列としてすでに知られているhid(head involution defective)の3'UTRに存在するbantam結合配列(5つ存在する)の3番目を持つhid(3)、2番目と3番目の2箇所を持つhid(2+3)、および4番目と3番目を持つhid(4+3)の3つの、合計5つの配列に対応するコンストラクトを作成し、遺伝子組換えバエを作成した。ウエスタンブロッティング法でこれらの発現を調べたところ、bantam標的配列を持たないコントロールと比較して、標的配列と組み合わせたGFPの発現量は予想通り激減していた。さらに驚くべきことに、同数の標的配列同士を比較した場合、bantamと完全に相補的な1xbantamや2xbantamよりもhid(3)やhid(2+3)およびhid(4+3)の方が翻訳抑制効果が明らかに強かった。このことは完全に相補的な配列よりも、ミスマッチやスペーサー配列を含む場合の方がmicroRNAの翻訳抑制効果は強くなるという可能性を示唆しており、非常に興味深い。insulin/IGFのアッセイシステムに関してはFOXO配列と融合させたGFPはコントロールと比較し、その発現が

抑制されていた。FOXO はリン酸化を受けた後にユビキチン化されプロテアソームで分解を受けることから、この FOXO 融合型の GFP を作成する際に用いた 16-24 アミノ酸の中にユビキチン化情報が含まれており、細胞内で速やかに分解されたのかもしれない。本実験では FOXO リン酸化部位として3つのこととなった領域 (2つはショウジョウバエの FOXO 配列、1つはヒトの FOXO4 の配列) を用いたが、そのいずれも発現が抑制されていた。そこで FOXO のかわりに他の insulin/IGF のターゲットであるリボゾーム S6 キナーゼとリボゾーム S6 を選び、そのリン酸化サイトの周辺配列を用いて同様のアクセシシステムを構築した。今後はこれらのアクセシシステムを利用して、成虫原基間の bantam および insulin/IGF の活性の違いを定量化し、成虫原基間の大きさの違いを生み出す機構について調べたい。現在までに bantam や insulin/IGF は組織の成長に不可欠であることは示されているが、そのシグナル強度と成長の関係については何もわかっていない。そこでシグナル強度と成長の間の相関関係を定量化することは、組織の成長メカニズムを理解する上で本質的に重要なことである。

(3) インシュリン/インシュリン様成長因子 (IGF) と協調的に作用する imaginal disc growth factors (IDGFs) の機能の解析

ショウジョウバエでは imaginal disc growth factors (IDGFs) というキチナーゼと相同性を持つ因子が血中に分泌され、インシュリンと協調的に作用することにより成虫原基の成長を制御しているという可能性が 1999 年に報告されている。しかしショウジョウバエゲノムには 6 つの IDGF 様遺伝子が存在し、おそらくそれらが機能的に冗長 (redundant) であることから、IDGFs の機能はほとんど不明のままであり、1999 年の報告以降はその機能に関して新たな情報はほとんど何も無い。そこでこの IDGFs の生体内における機能を明らかにするために全ての IDGFs を欠失させた際の表現型を調べた。そのためにショウジョウバエで広く利用されている GAL4/UAS システムを用いた RNAi 法を応用し、多数の遺伝子を同時に knock down する方法を開発した。まず「研究の方法」で述べたように、A, B, C 3 種類のコンストラクトを作成し、それらの効果を調べた。するとこの 3 種類のいずれも期待したような効果を示さなかった。そこでその原因を調べたところ、A については IR の周囲の配列が繰り返されているために、生体内で細胞毒性を持つ可能性が示唆された。また、B および C では直列につなげた UAS に関して、2 番目以降のもの発現が抑制されていることが示された。そこでこれらの知見をふまえ、さらにトランスポゾンの一つである gypsy のインシュレーター配列を組み込んだ改良型のコンストラクト D, E を作成した。D は B の改訂版で

あり、それぞれの UAS-RNAi コンストラクトの間に gypsy インシュレーターを挿入したものである。E は C の改良版で、2 つの UAS-RNAi コンストラクトの間に gypsy インシュレーターを挿入している。



D の場合は 6 つのコンストラクトを直列に並べるのが困難であったため、3 つの UAS-RNAi コンストラクト直列に並べたコンストラクトを 2 種 (それぞれ IDGF1,2,3 と IDGF4,5,6 に対応するもの) を作った。これらのコンストラクトについても遺伝子組換えバエを作成し、その効果を調べた。すると D, E 両方の場合について、インシュリン/IGF 欠損の場合と類似した幼虫の成長抑制が観察された。ところで RNAi 実験は off target 効果と呼ばれる非特異的な影響を引き起こす場合があり、その表現型の解釈には注意が必要である。実際、最初に作成したコンストラクト A においても D や E と似た成長抑制効果が認められたが、さらなる解析からそれは A の細胞毒性に起因する成長抑制であることが明らかになったのである。そこでコンストラクト D および E により引き起こされた成長抑制が IDGFs の欠損の結果であることを確認するためにレスキュー実験を試みた。コンストラクト E の存在下で RNAi の影響を受けない IDGF2 または IDGF6 を発現させた。するとこれらの八工は、野生型の八工と同様の速度で成長し、特に目立った表現型を示さなかった。以上の結果から、IDGFs RNAi によって引き起こされた成長抑制は off target 効果ではなく、真に IDGFs のノックダウンにより引き起こされた表現型であることが示された。そこでさらに全ての IDGFs にレスキュー活性があるか否かを調べるために、IDGF1,3,4,5,6 についてもそれぞれレスキューベクターを作成し、形質転換バエを作成した。また 6 つの IDGFs のうちの 4 つまたは 5 つの IDGFs を標的とする E タイプの RNAi コンストラクトを多数作成し、ショウジョウバエに導入したところ、これらは顕著な表現型を示さなかった。この結果は 6 つの IDGFs が互いに機能的に冗長であり、6 つの遺伝子のうちのどれか 1 つが正常であれば発生は正常に進行することを示唆している。この点に関しては今後さらにレスキュー実験とあわせてくわしく調べたい。IDGFs がインシュリンシグナル伝達型との間の相互作用についても今後くわしく調べる予定である。この研究はインシュリン/IGF シグナル伝達系の新規の構成因子の機能解明だけでなく、冗長な遺伝子の機能解析に有効な手法を開発したという意味でも非常に意義深い。冗長な遺伝子ファミリーの存在は遺

伝学的な解析にとっては厄介な問題であり、その機能の解明は困難を伴うが、今回利用した遺伝子組換え型 RNAi 手法を応用することにより、その機能解明が一気に進展することが期待される。

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 0 件)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

出願年月日：

国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

出願年月日：

取得年月日：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

林 貴史 (HAYASHI Takashi)

国立遺伝学研究所・系統生物研究センター・特任研究員

研究者番号：50553765

研究者番号：50553765

(2)研究分担者

()

研究者番号：

(3)連携研究者

()

研究者番号：