

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 14 日現在

機関番号：11301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25670019

研究課題名(和文) ショウジョウバエの器官改変頻度を上昇させる simjang の機能

研究課題名(英文) Function of simjang that enhances transdetermination of Drosophila imaginal discs

研究代表者

倉田 祥一郎 (KURATA, Shoichiro)

東北大学・薬学研究科(研究院)・教授

研究者番号：90221944

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：ショウジョウバエを用いて同定した器官改変頻度を上昇させる遺伝子 simjang の機能を解析したところ、Simjang が Mi-2/NuRD 複合体を介して複眼から翅への器官改変頻度を上昇させていることが明らかとなった。さらにその際、Simjang は、未分化状態の維持ではなく「発生プログラム」の初期化を行うことで、器官改変頻度の上昇をもたらしていることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：The function of gene, simjang, that enhances transdetermination of Drosophila imaginal discs was analyzed in this study. Simjang enhanced the eye to wing transdetermination through Mi-2/NuRD complex. Furthermore, Simjang was suggested to enhance the transdetermination by re-programing of developmental program.

研究分野：生物系薬学

キーワード：発生・分化 再生

1. 研究開始当初の背景

完全変態昆虫の成虫構造は、既に幼虫体内に存在している成虫原基から形成される。各々の成虫原基の「発生プログラム」は既に「決定」されている。例えば、複眼原基は複眼を形成し翅などの他の成虫構造は形成しない。成虫原基の移植実験により、時としてこの成虫原基特異的な「決定」状態が別の「発生プログラム」へ転換することが示されている。この「決定転換」と呼ばれる現象の分子機構は未だに不明である。研究代表者は、ショウジョウバエ個体を用いて、複眼原基で Notch シグナルを活性化すると共に遺伝子発現の状況を変化させると、「決定転換」と類似の状況を作り出すことができ、複眼を翅、肢、触角という別の器官に改変できることを見いだした (PNAS 2000)。これまでに、この系を用いて複眼と触角、あるいは翅の発生プログラムの違いを生み出す機構を解析し (Genes & Dev 2001, Development 2004, 2008)、同様の機構が脊椎動物の器官形成過程にも存在することを示唆してきた (PNAS 2004)。これらの結果を踏まえ、器官改変機構を明らかにするために、この系を利用したゲノムワイドスクリーニング法を確立した (PNAS 2005)。そして、およそ 1 万系統に及ぶ解析から、器官改変頻度を著しく上昇させる遺伝子 *simjang* を同定した。国内外を問わず、器官改変機構の解明へ遺伝学的にアプローチした唯一の研究であり、これ以外に器官改変頻度を上昇させる遺伝子の報告はない。そこで、*simjang* がどのように働くことで器官改変頻度が上昇するのかを明らかにすることとした。

2. 研究の目的

研究代表者は、ショウジョウバエの複眼原基で、人為的に Notch シグナルを活性化すると共に遺伝子発現状況を変えることで、複眼をほぼ完全な形態を示す翅、肢、触角に改変できることを見いだしている (PNAS 2000)。そして、この系を用いたゲノムワイドスクリーニング法を確立し (PNAS 2005) およそ 1 万系統の解析から器官改変頻度を著しく上昇させる遺伝子 *simjang* を同定した。本研究では、*simjang* がどのように働くことで器官改変頻度が上昇するのかを明らかにすることを目的とした。これにより、「発生プログラム」の書き換えと捉えることのできる器官改変を誘導する分子機構の一端が明らかになる。そして、三次元的な器官構築を伴った再生医療を効率よく行うための新たな手法の開発に手がかりが得られるものと期待できる。

3. 研究の方法

本研究では次の 2 点を明らかにすること

にした。

(1) *Simjang* 蛋白質は、ヒト p66 のホモログであり、ヒストン脱アセチル化酵素を含む Mi-2/NuRD 複合体の構成因子である。これまでに Mi-2/NuRD 複合体は、クロマチンリモデリングや転写の不活性化に関与することが示されている。そこで、*Simjang* が器官改変頻度を上昇させる際に、Mi-2/NuRD 複合体を介して作用しているのかどうかを明らかにする。

(2) *simjang* は、単独の強制発現では複眼から翅への器官改変を誘導することはない。しかしながら、Notch シグナルの活性化と共にホメオティック遺伝子である *Antennapedia (Antp)* を発現させる、あるいは翅のマスター制御遺伝子である *vestigial (vg)* を単独で発現させることによる複眼から翅への器官改変頻度を著しく上昇させる。このことは、*simjang* が複眼の「発生プログラム」を初期化し、それにより器官改変頻度が上昇したという魅力的な仮説を支持している。そこで、*simjang* が「発生プログラム」の初期化に関わるのかどうかを明らかにする。

そのために、次のように研究を進めた。

(1) *simjang* は、Notch シグナルの活性化と *Antp* による翅への複眼から翅への器官改変頻度と、*vg* による翅への複眼から翅への器官改変頻度を著しく上昇させる (下表: 35% から 75%、6% から 64%)。これに呼応して、*simjang* のヘテロ変異体では、Notch シグナルの活性化と *Antp* による翅への改変頻度が 35% から 15% へと低下する (下表)。そこで、

| 人為的な操作 | 複眼から翅への改変頻度 (%) |
|---|-----------------|
| Notchの活性化と共に <i>Antp</i> を発現 | 35% (n=132匹) |
| Notchの活性化と共に <i>Antp</i> と <i>simjang</i> を発現 | 75% (n=167匹) |
| <i>simjang</i> のヘテロ変異体でNotchの活性化と共に <i>Antp</i> を発現 | 15% (n=127匹) |
| <i>vg</i> を発現 | 6% (n=68匹) |
| <i>vg</i> と <i>simjang</i> を発現 | 64% (n=70匹) |

Simjang が器官改変頻度を上昇させる際に、Mi-2/NuRD 複合体を介して作用しているのかどうか明らかにするために、Mi-2/NuRD 複合体の構成因子である MBD3, Mi-2, MTA1 のそれぞれについて RNA-i により発現抑制を行い、*Simjang* による器官改変頻度の上昇が低下するのかどうか調べる。

(2) ショウジョウバエの複眼原基細胞では、マスター制御遺伝子 *ey* の発現により「発生プログラム」が規定されており、その後、形態形成溝の移動に伴い細胞分化し ELAV などの分化マーカーが発現する。その後、Mitotic Band (MB) を経た細胞は、細胞分裂能を失う。したがって、ELAV-Gal4 もしくは GMR-Gal4 など、分化マーカー遺伝子の発現調節領域を利用して分化した

後の細胞でのみ人為的な遺伝子発現を誘導できる。そこで、ELAV-Gal4 と GMR-Gal4 を用いて、*simjang* を複眼原基の分化した細胞で発現させ、分化状態を抗 ELAV 抗体を用いた免疫染色により調べる。さらに、MB 後の細胞分裂の有無を、分裂期細胞のマーカーであるリン酸化ヒストンに対する抗体を用いた免疫染色により調べる。*simjang* の発現により分化マーカーが消失し、リン酸化ヒストンにより新たな細胞分裂が検出されたならば、*simjang* が「発生プログラム」の初期化を行うか、もしくは未分化状態の維持を行うことが示される。次に、*simjang* が「発生プログラム」の初期化を行うか、もしくは未分化状態の維持を行うのか、そのどちらなのかを明らかにする目的で、複眼原基で *simjang* を発現し、それにより誘導される遺伝子発現の変化をゲノムワイドに DNA マイクロアレイを用いて解析する。

4. 研究成果

(1) Simjang が器官改変頻度を上昇させる際に、Mi-2/NuRD 複合体を介して作用しているのかが明らかにするために、Mi-2/NuRD 複合体の構成因子である MBD3, Mi-2, MTA1 のそれぞれについて RNA-i により発現抑制を行ったところ、いずれにおいても Simjang による器官改変頻度の上昇が低下することが明らかとなった。この結果は、Simjang が器官改変頻度を上昇させる際に、Mi-2/NuRD 複合体を介して作用していることを示している。

(2) *simjang* を複眼原基の既に分化した細胞で発現させ、分化マーカーの発現と細胞分裂の有無を調べたところ、*simjang* の発現により分化マーカーが消失し、リン酸化ヒストンにより新たな細胞分裂が検出され、*simjang* が「発生プログラム」の初期化を行うか、もしくは未分化状態の維持を行うことが示された。そこで次に、複眼原基で *simjang* を発現させて、遺伝子発現の変化をゲノムワイドに調べた。その結果、複眼の形成に必要な遺伝子の発現が一斉に抑制されている一方で、生殖細胞系列で特異的に発現している遺伝子群の異所的な発現が誘導されていた。さらに、これらの生殖細胞系列遺伝子の発現が、*simjang* による器官改変頻度の上昇に必要であることが明らかとなった。これらの結果は、Simjang が、未分化状態の維持ではなく「発生プログラム」の初期化を行うことで、器官改変頻度の上昇をもたらしていることを示唆している。

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 1件)

Noriko Tsurui-Nishimura, Thanh Quang Nguyen, Tomonori Katsuyama, Tatsuro Minami, Hirofumi Furuhashi, Yoshiteru Oshima, and Shoichiro Kurata

Ectopic Antenna Induction by Overexpression of *CG17836/Xrp1* Encoding an AT-hook DNA Binding Motif Protein in *Drosophila*.

Biosci. Biotechnol. Biochem. 査読有、**77**, 339-344, 2013.

DOI:http://dx.doi.org/10.1271/bbb.120756

[学会発表](計 7件)

Keita Masuko, Eriko Numao, Hirofumi Furuhashi, Shoichiro Kurata

The Organ Identity Specification Factor WGE Interacts with Histones and Participates in Epigenetic Regulation in *Drosophila*

2nd Asia-Pacific *Drosophila* Research Conference (APDRC). May 13-16, 2013, Seoul, South Korea

増子恵太、沼尾恵利子、木村宏、古橋寛史、倉田祥一郎

The Organ Identity Specification Factor Winged Eye Participates in Epigenetic Regulation in *Drosophila melanogaster*
第85回日本遺伝学会、2013年9月19日、東京

増子恵太、沼尾恵利子、木村宏、古橋寛史、倉田祥一郎

ショウジョウバエの器官改変を誘導する因子 Winged Eye によるエピジェネティック制御機構の解析

第12回次世代を担う若手ファーマ・バイオフォーラム2013、2013年9月14日、東京

増子恵太、沼尾恵利子、木村宏、古橋寛史、倉田祥一郎

ショウジョウバエの器官改変を誘導する因子 Winged Eye によるエピジェネティック制御機構の解析

第36回日本分子生物学会年会、2013年12月6日、神戸

駒場加奈枝、沼尾恵利子、増子恵太、古橋寛史、倉田祥一郎

器官特異性決定に関与する WGE タンパク質と相互作用する因子の解析

第36回日本分子生物学会年会、2013年12月6日、神戸

寺西達、Nguyen Thanh Quang、古橋寛史、倉田祥一郎

ショウジョウバエ器官改変系を用いた

Mi2/NuRD 複合体の機能解析
第 13 回次世代を担う若手ファーマ・バイオフォーラム 2014、2014 年 9 月 21 日、富山

小澤奈央，古橋寛史，沼尾恵利子，倉田祥一朗
器官形成に関わる WGE の核内構造体における機能を介した染色体構造制御機構の解明
第 87 回日本生化学会大会、2014 年 10 月 15-18 日、京都

〔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
http://www.pharm.tohoku.ac.jp/~seimei/seimei_original.html

6. 研究組織

(1) 研究代表者

倉田 祥一朗 (KURATA Shoichiro)
東北大学・大学院薬学研究科・教授
研究者番号：90221944

(2) 研究分担者

なし ()
研究者番号：

(3) 連携研究者

なし ()
研究者番号：