

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 6 月 6 日現在

機関番号：16101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2010～2011

課題番号：22770057

研究課題名（和文） 形質転換コオロギを用いた脚再生に関わる機能性 RNA と標的遺伝子の網羅的解析

研究課題名（英文） Analyses of functional RNAs and target genes involves in leg regeneration using transgenic cricket, *Gryllus bimaculatus*

研究代表者

中村 太郎 (NAKAMURA TARO)

徳島大学・産学官連携推進部・講師

研究者番号：80548834

研究成果の概要（和文）：

本研究は、組織再生時に形成される再生芽細胞において遺伝子発現調節機構に転写後調節として関わる microRNA とその標的遺伝子群の働きを明らかにすることを目的として行った。発生、再生過程の組織由来の miRNA ライブラリーから候補 miRNA を取得し、それらの発現時期、部位を調べた。その結果、現在までに数 10 種類の miRNA とその発現様式が明らかとなった。それらには、Wnt 関連遺伝子を標的とすることが知られている miR-8 が含まれていた。また、miRNA の機能解析を詳細に行うために、トランスジェニックコオロギの作成とそれを利用した細胞追跡実験法を確立できた。さらに miRNA の機能解析系として開発している ZFNs, TALENs を用いた遺伝子ターゲティング法を確立でき、いくつかの遺伝子においてノックアウト効果が観察された。

研究成果の概要（英文）：

We cloned several miRNAs from libraries of embryonic and regenerating tissues and observed these expressions in the embryos. We revealed expression patterns of cloned miRNAs. We found miR-8, which is a target of Wnt component gene in our miRNAs libraries. Moreover, to analyze the function of miRNA and its target genes, we established cell trajectory analysis using the transgenic cricket. Furthermore, we established gene-targeting systems using zinc finger nucleases (ZFNs) and transcription activator-like (TAL) effector nucleases (TALENs). Using these systems, we are now trying to investigate the function of the miRNA involves in the leg regeneration in cricket.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2011 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：基礎生物学・形態・構造

キーワード：形態形成、組織再生、機能性 RNA、形質転換技術

1. 研究開始当初の背景

再生現象は、既に構築されている形態から失われた部分のみを再構成する点が発生現象と異なっている。組織・器官の損傷後に形成される再生芽領域では、残った組織

の急速な崩壊、移動、増殖による未分化細胞群の形成と集積、その未分化状態の維持、そして各組織への分化といった、複雑な現象が観察できる。この過程において、Wnt, Bmp, FGFs などのシグナル分子の発現が素早く時空間的に変化し再生が進行する(reviewed in

Brockes, 2008 など)。再生過程で観察される急速な遺伝子発現調節機構には、microRNA (miRNA) の転写後調節による働きも考えられる。機能性非コード RNA の 1 つである miRNA は、細胞の発生、増殖、分化、そして細胞周期を調節する重要な制御因子として多くの分野で研究されている。近年、ゼブラフィッシュの組織再生過程において miRNA が、再生芽細胞の増殖に関与する mps1 遺伝子の転写後調節を行うことが報告された (Yin et al., 2008)。しかし、miRNA を介した再生メカニズムの全容はまだ十分明らかになっていない。本研究では、脚再生モデル動物の 1 つであるコオロギを用いて、遺伝子導入技術を利用し miRNA の機能解析を行い、新規の再生メカニズムを解析することを目標とする。

2. 研究の目的

損傷を受けた組織・器官・四肢の再生過程では、未分化細胞群が集合した再生芽を形成する。その再生芽では、未分化細胞の集積、増殖、維持、分化といった再生過程の重要なイベントが観察され、シグナル分子の素早い時空間的な発現調節が行われている。本研究では、この急速な遺伝子発現調節機構に転写後調節として microRNA が関与していると考え、脚再生のモデル動物であるコオロギを材料とし遺伝子導入技術を用いて、再生過程における分子メカニズムを解析することを目標とする。

3. 研究の方法

本研究では、再生研究のモデル動物であるコオロギの実験系を用いて、再生過程に関与する機能性 RNA の同定とその機能解析を行い、新規再生メカニズムを解明する。また、その過程において、再生研究で用いることのできる遺伝子改変技術を確立する。

2010 年度

再生に関与する機能性 RNA のスクリーニング

(1) 候補 miRNA とその標的遺伝子の解析

応募者らは、これまでにコオロギ発生過程において、miRNA の探索とその発現解析を進めてきている。その知見を利用し、コオロギの再生過程における miRNA の網羅的機能解析を行う。さらに、miRNA 機構に関わる因子の遺伝子をコオロギ EST データベースより探索する。すでに、Argonaute ファミリー、Loquacious, Piwi などいくつかの候補遺伝子のクローンは準備できている。

1) 再生芽より抽出した miRNA 配列を決定する。次世代型高速シーケンサーを用いることも可能である。コオロギ EST データベース

などから miRbase などの予測プログラムを用いて標的遺伝子も探索する。2) 得られた miRNA, 標的遺伝子に関して、miRNA アンチセンス法や、再生依存的 nymphal RNAi などを用い、再生過程での網羅的機能解析を行う。3) 得られた miRNA が標的遺伝子の発現調節に関与するか、レポーター遺伝子 (GFP など) の 3' UTR に miRNA の標的部位を含んだトランスジェニックコオロギを作成し、miRNA の転写後抑制による GFP の消失を解析する (GFP-sensor assay)。4) miRNA 候補とその標的遺伝子について、発現パターン解析を in situ hybridization などにより解析し、再生過程での発現時期、部位の関係を調べる



図 3. miRNA, 標的 mRNA のスクリーニングの流れ

遺伝子形質転換技術の確立 (1) 異所性発現系の確立

上記スクリーニングと並行して、コオロギの遺伝子異所性発現系を開発する。コオロギでは、一過性ではあるが Gal4/UAS 系が働く (未発表データ)。Gal4 を再生組織特異的にドライブするプロモーターは、再生芽で高発現する Distal-less 遺伝子を考えている。コオロギ D11 遺伝子のゲノム領域の解析は現在行われている。その他にも、再生過程で領域特異的なパターンで発現する遺伝子のシステマを単離する。また、エンハンサートラップ法と Gal4 を組み合わせ脚切断時に Gal4 遺伝子が活性化するようなトラップ系統の開発も目指す。

2011 年度

再生に関与する機能性 RNA のスクリーニング

(2) 未知因子の同定

候補 miRNA と標的遺伝子以外の miRNA と EST クローンについても、網羅的に解析を進め、再生過程に関与する未知の因子も同定する。

遺伝子形質転換技術の確立 (2) 部位特異的遺伝子改変技術の開発

Zinc-finger nuclease (ZFN) 系を開発する。まず、ポジティブコントロールとして GFP/RFP 共発現コオロギを用い、GFP に対する ZFN 配列を用いることで GFP の消失を観察する。ZFN 系が働くことが分かれば、候補 miRNA もしくは、標的遺伝子の miRNA 結合配列に対応した任意の ZFN 配列を用いて、ノックアウトコオロギを作成する。

再生に関与する遺伝子の機能獲得型解析

前年度開発した Gal4/UAS 系を用い、機能性 RNA スクリーニングで得られた再生に関与する miRNA と標的遺伝子について、時空間的な異所性発現による再生過程での機能解析

を行う。

これらの系を利用し、再生に關与する miRNA とその標的配列の転写後抑制調節機構を明らかにし、他の実験結果と統合し、新規の再生分子メカニズムを解明する。

4. 研究成果

損傷を受けた組織・器官・四肢の再生過程では、未分化細胞群が集合した再生芽を形成する。その再生芽では、未分化細胞の集積、増殖、維持、分化といった再生過程の重要なイベントが観察され、シグナル分子の素早い時空間的な発現調節が行われている。この急速な遺伝子発現調節機構に転写後調節として microRNA が関与していると考え、コオロギ脚の再生をモデルとし、再生に關与する miRNA とその標的遺伝子群の働きを明らかにし、新規の再生機構を解明することを目的に本研究を行った。発生、再生過程の組織由来の miRNA ライブラリーから候補 miRNA を取得し、それらの発現時期、部位を調べた。その結果、現在までに数 10 種類の miRNA とその発現様式を明らかにした (図 1)。それら miRNA のすべての標的遺伝子はまだ明らかとなっていないが、我々の miRNA ライブラリーから miR-8 を見出した。miR-8 は近年、Wnt

MicroRNA	Sequence	Size
Gbi-miR-8	UAAUACUGUCAGGUAAGAUGUC	23
Gbi-miR-87	GUGAGCAAAGUUUCAGGUGUGUA	23
Gbi-miR-252	UAAGUACUAGUGCCGAGGAG	21
Gbi-miR-275	AGGUACCUAAGUAGCGCGCG	21
Gbi-miR-276a	UAGGAACUUCUACCGUGUCUCU	22
Gbi-miR-306	CAGGUACUGAGUCUCUGAG	21
Gbi-miR-317	UGAACACAGCUGGUGUAUCUCA	23

図 1 miRNA の配列データの一部

Gbi-miR-8 UAAUACUGUCAGGUAAGAUGUC
 Dme-miR-8 UAAUACUGUCAGGUAAGAUGUC
 Ame-miR-8 UAAUACUGUCAGGUAAGAUGUC
 Aga-miR-8 UAAUACUGUCAGGUAAGAUGUC
 Bmo-miR-8 UAAUACUGUCAGGUAAGAUGUC
 Sme-miR-8 UAAUACUGUCAGGUAACGAUGCC
 ***** **

signaling において負の調節因子として知られている (Kenel et al., 2008)。コオロギ脚再生において canonical Wnt signaling は、傷修復後の再生芽形成と伸長に重要であることが我々の研究において報告されている。そこで、miR-8 の機能解析のためトランスジェニックコオロギや、遺伝子ターゲティング技術の開発を行った。

まず、トランスジェニック技術による遺伝子異所性発現解析の系を確立させるために、Gal4/UAS 系統の作成を試みた。様々な試行錯誤の結果、コオロギの内在性プロモーターの使用により、Gal4 遺伝子が発現することが分かった。しかし、UAS-GFP 系統と掛け合わせを行ったところ、GFP の発現を観察することができなかった。現在のところ、コードンの最適化と、位置効果を打ち消すためのインシュレーターの使用を考えさらなる実験を行っている。その代わりに、FLP/FRT による、部位特異的組み替えが働くことが分かったので、その系を利用できる系統の作成を行った。

また、miRNA の機能解析系として開発している zinc finger nucleases (ZFNs) や transcription activator-like (TAL) effector nucleases (TALENs) を用いた遺伝子ターゲティング法が確立でき、いくつかの遺伝子においてノックアウトコオロギの作成に成功した。

本研究により技術開発段階で見出されたトランスジェニックコオロギを用いたコオロギ胚形成に関する新規の知見は、Current Biology 誌に掲載された。さらに開発した技術を用いた、詳細な miRNA の機能解析結果は順次報告予定である。

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 8 件)

1. Takagi, A., Kurita, K., Terasawa, T., Nakamura, T., Bando, T., Moriyama, Y., Mito, T., Noji, S., and Ohuchi, H. (2012) Functional analysis of the role of *eyes absent* and *sine oculis* in the developing eye of the cricket *Gryllus bimaculatus*. 54. 227-240. [査読有] doi: 10.1111/j.1440-169X.2011.01325.x.
2. Mito, T., Shinmyo, Y., Kurita, K., Nakamura, T., Ohuchi, H., and Noji, S. (2011) Ancestral functions of Delta/Notch signaling in the formation of body and leg segments in the cricket *Gryllus bimaculatus*. 138. 3823-3833. [査読有]

doi: 10.1242/dev.060681

3. Dabour, N., Bando, T., Nakamura, T., Miyawaki, K., Mito, T., Ohuchi, H., and Noji, S. (2011) Cricket body size is altered by systemic RNAi against insulin signaling components and epidermal growth factor receptor. 53. 857-869. [査読有] doi: 10.1111/j.1440-169X.2011.01291.x.
4. Bando, T., Hamada, Y., Kurita, K., Nakamura, T., Mito, T., Ohuchi, H., and Noji, S. (2011) Lowfat, a mammalian Lix1 homologue, regulates leg size and growth under the Dachous/Fat signaling pathway during tissue regeneration. 240. 1440-1453. [査読有] doi: 10.1002/dvdy.22647.
5. Bando, T., Mito, T., Nakamura, T., Ohuchi, H., and Noji, S. (2011) Regulation of leg size and shape: involvement of the Dachous/Fat signaling pathway. Dev. Dyn. 240. 1028-1041. [査読有] doi: 10.1002/dvdy.22590.
6. Nakamura, T., Yoshizaki, M., Ogawa, S., Okamoto, H., Shinmyo, Y., Bando, T., Ohuchi, H., Noji, S., and Mito, T. (2010) Imaging of transgenic cricket embryos reveals cell movements consistent with a syncytial patterning mechanism. Curr. Biol. 20, 1641-1647. [査読有] doi: 10.1016/j.cub.2010.07.044
7. Mito, T., Nakamura, T., and Noji, S., (2010) Evolution of insect development; to the hemimetabolous paradigm. Curr. Opin. Genet. Dev. 20, 355-361. [査読有] doi: 10.1016/j.gde.2010.04.005
8. Mito, T., Nakamura, T., Bando, T., Ohuchi, H., and Noji, S., (2010) The advent of RNA interference in Entomology. Entomological Science 14. 1-8. [査読有] doi:10.1111/j.1479-8298.2010.00408.x

[学会発表] (計 6 件)

1. Nakamura, T. Regulation of orthodenticle and Wnt/Cad signaling pathway in anterior-posterior axis patterning during cricket early embryogenesis. 第 45 回日本発生生物学学会年会. 2012.5.31. 神戸国際会議場 (兵庫)
2. Nakamura, T., Involvement of Wnt and

BMP signaling pathways in the regional specification of early blastoderm in the cricket *Gryllus bimaculatus*. The 2nd international conference on the Cricket / RNAi symposium for medicine-agriculture-engineering collaboration project (joint meeting). 2012.3.22. 徳島大学 (徳島県・徳島市)

3. Nakamura, T., Regulation of Wnt signaling pathway in anterior-posterior axis patterning in the cricket *Gryllus bimaculatus*. 6th International *Tribolium* Meeting. 2011.6.8. Marriott on the Country Club Plaza (Kansas city, USA)
4. Nakamura, T., Imaging of transgenic cricket embryos reveals cell movements consist with a syncytial patterning mechanism. 第 44 回日本発生生物学学会年会. 2011.5.19., 沖縄コンベンションセンター (沖縄)
5. Nakamura, T., Dynamic control of positional specification in a primitive mode of insect segmentation. 3rd EuroEvoDevo Conference. 2010.7.8. パリ第 7 大学 (パリ)
6. 中村 太郎, 祖先的な昆虫における体節形成のダイナミックな制御. 第 43 回日本発生生物学学会年会. 2010.6.22., 国立京都国際会館 (京都府)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中村 太郎 (NAKAMURA TARO)

徳島大学・産学官連携推進部・講師

研究者番号: 80548834

(2) 研究分担者

()

研究者番号:

(3) 連携研究者

()

研究者番号: