

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 1 日現在

機関番号：16101

研究種目：新学術領域研究(研究領域提案型)

研究期間：2010～2014

課題番号：22124003

研究課題名(和文) Dachshous/Fatシグナリング系を介した位置情報決定メカニズムの解明

研究課題名(英文) Mechanisms underlying determination of positional information through Dachshous/Fat signaling system

研究代表者

野地 澄晴 (Noji, Sumihare)

徳島大学・本部・理事

研究者番号：40156211

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 75,900,000円

研究成果の概要(和文)：昆虫の脚再生の分子メカニズムを、再生依存的RNA干渉を利用して研究した。結果から、脚再生においては、次のプロセスで、再生されると予想した。1. 脚切断により、マクロファージ様細胞が活性化。2. マクロファージ様細胞が産生するサイトカインが未分化細胞による再生芽形成を誘導。3. 再生芽において、Wnt/BMPシグナルがEGFを誘導。エピジェネティクスを制御する遺伝子が活性化。4. EGFはdachshund/Distal-lessの発現およびDachshous/Fatシグナル系の発現制御することにより脚のパターンおよびサイズが決定。このサイズ決定機序を改変Steepnessモデルにより説明した。

研究成果の概要(英文)：We have investigated molecular mechanisms underlying insect leg regeneration by means of regeneration-dependent RNA interference. Our results suggested that leg regeneration occurs as follows:

(1) Activation of macrophage-like cells by amputation at the amputated site, (2) Cytokines produced by the macrophage-like cells induce formation of a blastema consisting of undifferentiated cells, (3) In the blastema, EGF (epidermal growth factor) is induced by cross-talk of Wnt/BMP signaling pathways. Furthermore, genes involved in epigenetic regulations such as Enhancer of Zeste and Utx are activated, (4) EGF induces expressions of dachshund/Distal-less and regulates expression of Dachshous/Fat signaling systems, which then determine re-patterning of the leg and its size. We speculated that the leg size regulation may be related to the number of Dachshous/Fat molecules in each cell membrane with a proximodistal gradient. This was simulated with our modified steepness model.

研究分野：再生生物学

キーワード：脚再生 Dachshous/Fat Wnt/BMP/EGF dachshund/Distal-less マクロファージ Enhancer of zeste/Utx ゲノム編集 ノックイン

1. 研究開始当初の背景

近年、再生医療が注目されており、特に iPS 細胞を用いた様々な研究が行われ、その成果が期待されている。一方、再生のメカニズムはまだ解明がすすんでおらず、今後の医療応用を行ううえでも、再生の原理を解明しておくことは安全性の面からも必要不可欠であると考えられている。我々は、再生原理は基本的には、脊椎動物も無脊椎動物も同じであるとのコンセプトのもとに、原理を解明するのであれば、より単純な系の研究から出発するほうが、目標に早く到達できるとの考えから、19世紀から着目されている昆虫の脚の再生の系に着目し、その研究をスタートした。

その研究による成果の一つに、コオロギの脚の長さを決めるメカニズムの解明がある。細胞の極性の決定などに関与することがショウジョウバエで知られているプロトカドヘリン分子に着目し、その機能をコオロギにおいて RNA 干渉 (RNAi) を用いて研究した。この研究成果は、海外の発生生物学の教科書にも紹介されている。この成果をさらに発展することをこのプロジェクトでは試みた。

2. 研究の目的

コオロギの脚の各節には、独自の位置情報があることが、切断した脚の移植実験から証明されている。つまり、脚の一部を切断した後に繋ぎあわせると、失われた部位のみが再生するのである。この実験から位置情報という概念が提唱されてきた。どのような分子が位置情報を担っているのかは、位置情報の概念が提唱された 1960 年代から謎であり、未だに明確な答えは得られていない。そこで、われわれは、その実体が Dachous/ Fat プロトカドヘリンではないか、あるいはその分子が関与していると仮定して、研究を行った。

3. 研究の方法

(1) 実験方法の開発

分子レベルで遺伝子の機能を解明するために、再生依存的 RNAi (rdRNAi) およびゲノム配列の決定とその情報に基づいたゲノム編集の技術を同時に開発した。さらにゲノム編集技術を用いたノックイン法を開発し、マーカー遺伝子を標的遺伝子の一部にノックインすることにより、得られたタンパク質の発現挙動をリアルタイムで観測できるようにした。

(2) 遺伝子機能解析方法

再生芽形成初期の組織における遺伝子発現パターンの網羅的解析の結果、Jak/Stat 系およびエピジェネティクに関係した遺伝子発現が活性化されていることがわかった。そこで、rdRNAi を用いて、その機能を解析した。

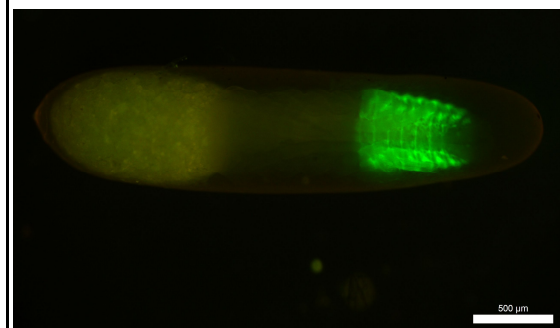
4. 研究成果

(1) コオロギのゲノム解析

次世代シーケンサーによるフタホシコオロギ (ゲノムサイズ推定 1.7Gb) の全ゲノムシーケンス解析を実験室維持系統 (白眼変異体系) を用いて行った。1 個体から抽出したゲノム DNA からインサートサイズ 375bp、および 500bp のライブラリを作製し、イルミナ HiSeq2000 によるシーケンス解析を行った (伊藤武彦教授 (東工大) との共同研究)。その結果、コオロギの遺伝子サイズはショウジョウバエやトリボリウムなど他の昆虫と比較して顕著に大きいことがわかった。また、Wnt ファミリーの一部の遺伝子にクラスター構造のシンテニーが示唆された。ゲノム情報の充実により、遺伝子数や遺伝子構造の情報が容易に得られるようになり、再生に関わるゲノム機能解析の基盤が向上した。本ドラフトシーケンスをもとに全ゲノムにわたるアノテーションとゲノムデータベースを構築する予定である。

(2) コオロギにおけるゲノム編集実験

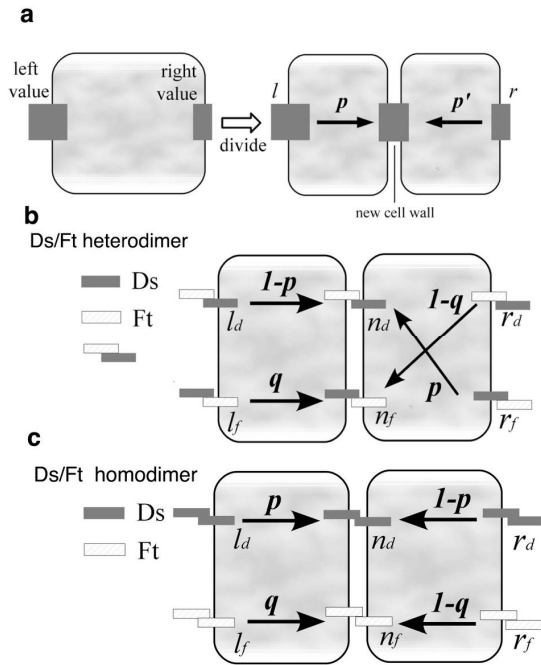
発生・再生研究を進める上で遺伝子のノックアウト実験や標的的特異的へのノックイン技術は必要不可欠である。そこで人工制限酵素である Zinc Finger Nuclease (ZFN) 及び TAL effector Nuclease (TALEN) を用いてコオロギへの遺伝子改変技術の開発を行った (広島大学・山本卓教授らと共同研究)。その研究成果は、2012 年に Nature Communication 誌に発表した。さらに、この度は、遺伝子改変の方法として、CRISPR/Cas (clustered regularly interspaced short palindromic repeats/CRISPR-associated) 法を導入した。CRISPR/Cas 法による lacase2 (lac2) への変異導入及びノックアウト系統の作製をおこなった。コオロギ lac2 に対する CRISPR/Cas 法を用いて変異導入及びノックアウト系統の作製を試みた。CRISPR のガイド RNA および Cas9 をコオロギ内に導入した結果、ふ化した白い幼虫が観察され、高効率で両アレルに変異が導入された。高効率に変異を導入することができるため、今後コオロギにおいてもゲノム編集の主役になると期待される。さらにノックインの方法を検討し、eGFP 遺伝子を標的



のゲノムの位置に導入することが可能となった。上図は *Gb' abd-A* に導入した例を示す。胚の腹部体節に特異的に蛍光を観察できることから、ロックインが成功したと考えられる。

(3) 脚の長さの決定メカニズム: Steepness モデルについて

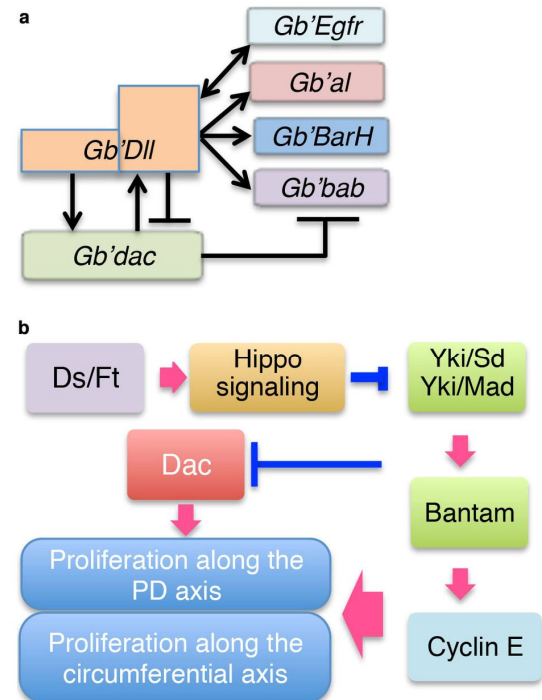
Peter A. Lawrence は生物のサイズの決定メカニズムとして、Steepness モデルを提案した。当初は形原の濃度勾配を想定していたが、最近では Dachsous/Fat の勾配を想定している。例えば、成長段階で脚の長さが短い時は、勾配が大きい、脚が長くなるとそれにより勾配が小さくなり、ある閾値を超えると成長が止まるとの考えである。この考えを実際に下図に示すように、細胞膜の Dachsous/Fat 分子が再配分される簡単なモデルでシミュレーションした。その結果、勾配が線形でなくても同様な現象が生じることを示すことができた。



(4) Distal-less と dachshund の再生における機能

コオロギなどの昆虫の脚の発生において、脚の形態形成に Distal-less と dachshund が関与していることが良く知られている。脛節で脚を切断した場合には、これらの遺伝子が発現し、再生脚の形態形成に関与する。そこで、これらの遺伝子と再生との関係調べた。Distal-less は第 2、3 附節の形成及び dachshund の発現制御を介し、附節の形成に関与する遺伝子を制御し、附節の脚成長に関与することを見出した(下図 a)。興味あることに、dachshund 遺伝子の RNAi により脚が短

くなった。これはまさに遺伝子の名前のとおりである。同様な現象は Dachsous/Fat のロックダウンによっても得られることから、そのシグナル系と関係があることが示唆された。下図 b にその予想図を示す。Dachsous または Fat ロックダウン後の dachshund 発現を解析した結果、Dachsous/Dachsous (homophilic) が dachshund の発現に必要であることが明らかとなった。これまでに、dachshund は dpp シグナル伝達因子 Mad と複合体を形成し、dpp シグナルに対し抑制的に機能することが報告されている。そこで我々は、Mad と抑制型 Mad である dad に着目し、RNAi 法により再生脚での機能解析を行った。Mad RNAi では附節の欠損と脛節先端が遠位側にシフトするのに対し、dad RNAi では脛節先端が近位側にシフトする結果が得られた。dpp シグナルが位置情報の形成に関与することが示唆された。以上の結果から、脛節の近位側では Dachsous/Dachsous (hemophilic) により正に制御される dachshund が Mad と複合体を形成することで dpp シグナルを負に制御し、遠位側では Dachsous/Fat (heterophilic) による dachshund の負の発現制御に伴う機能的 Mad の細胞死誘導による分節形成、さらに Hippo pathway を介した細胞増殖抑制によって遠近軸に沿った位置情報が決定されると考察され、今後さらに解析を進める予定である。



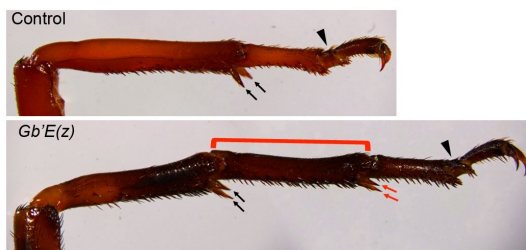
(5) コオロギ再生芽における JAK/STAT シグナルの機能

再生芽細胞で発現上昇していたコンティグには、初期発生や細胞増殖に関連する JAK/STAT シグナル分子が含まれていたことから、これらの機能を解析し、すでに報告し

た。特に、SOCS2(RNAi)により JAK/STAT シグナルを恒常的に活性化するとサイクリン E の発現は 1.7 倍に上昇し、再生脚の長さは通常よりも長くなった。以上の結果より、再生芽において、JAK/STAT シグナルが重要であることがわかった。

(6) コオロギ再生芽におけるエピジェネティック因子の機能

再生芽細胞は分化細胞が脱分化した多分化能を持つ細胞で、増殖能が高い。分化細胞と再生芽細胞では様々な遺伝子の発現が変化していると考えられ、エピジェネティック因子は再生芽細胞への脱分化過程で遺伝子発現を変化させるキーと考えられてきたが、再生過程における機能解析の報告はほとんど無かった。再生過程に働くエピジェネティック因子を同定するため、既知の 37 種類のエピジェネティック因子のコオロギホモログをクローニングし、RNAi により機能的スクリーニングを行った。ヒストンのメチル化やアセチル化を制御する 11 因子に対する RNAi により再生不能や再生脚の形態異常の表現型が得られた。また次世代シーケンサーを用いた比較トランスクリプトーム解析から、分化細胞と比較して再生芽細胞で発現が 2 倍以上に上昇したエピジェネティック因子が 24 種類同定された。ヒストン H3 27 番目のリジン残基(H3K27)の脱メチル化に働く Utx の発現は約 9 倍、またヒストン H3K27 のメチル化に働く Enhancer of zeste (E(z)) の発現は 2.2 倍、メチル化ヒストン H3K27 に結合する Polycomb (Pc) の発現は 4.5 倍に上昇しており、ヒストン H3K27 のメチル化状態が器官再生に重要であることが示唆された。E(z) や Utx に対する RNAi を行ったところ、E(z) (RNAi) 個体は再生脚の脛節と付節の間に脚節が 1 つ過剰に形成された(下図参照)。Utx(RNAi) 個体は再生脚の付節第 1 節と第 2 節の関節が融合する形態異常の表現型を示した。抗メチル化ヒストン H3K27 抗体を用いた免疫染色から、E(z) (RNAi) 個体ではヒストン H3K27 のメチル化は消失しており、Utx(RNAi) 個体ではメチル化が亢進していた。これら RNAi 個体の再生脚では、形態異常を示した領域において脚のパターン形成を促進する遺伝子群の異所的な発現誘導や発現の消失が観察され、脚再生過程においてパターン形成遺伝子群の再発現にヒストン H3K27



のメチル化を介したエピジェネティックな発現制御機構が働いていることを明らかにした。論文は現在 revise 中である。

(7) おわりに

この研究により、切断された脚は、次のプロセスで、再生されると予想している。脚切断により、マクロファージ様細胞が活性化。

マクロファージ様細胞が産生するサイトカインが未分化細胞による再生芽形成を誘導。再生芽において、Wnt/BMP シグナルが EGF を誘導。エピジェネティクスを制御する遺伝子が活性化。EGF は dachshund/Distal-less の発現および Dachshund/Fat シグナル系の発現制御することにより脚のパターンおよびサイズが決定。さらに、脚サイズの決定に関する改変勾配モデルを提案した。

昆虫の脚の再生といえども、遺伝子カスケードが複雑に制御され、感動的な再生がおこなわれることがわかった。この研究でかなりの情報が得られたが、全体の再生過程のほんの一部を垣間みたに過ぎないであろう。この新学術領域の研究は日本の強みであり、世界唯一であり、追従を許さない研究がおこなわれてきた。今後、さらに発展させるべき領域であるが、これで終了するのはまったく残念である。

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 13 件)

Matsuoka Y, Bando T, Watanabe T, Ishimaru Y, Noji S, Popadić A, Mito T. Short germ insects utilize both the ancestral and derived mode of Polycomb group-mediated epigenetic silencing of Hox genes. Biol Open. 2015 May 6. pii: bio.011064. doi: 10.1242/bio.201411064.

Ishimaru Y, Nakamura T, Bando T, Matsuoka Y, Ohuchi H, Noji S, Mito T. Involvement of dachshund and Distal-less in distal pattern formation of the cricket leg during regeneration. Sci Rep. 2015 Feb 11;5:8387. doi: 10.1038/srep08387.

Watanabe T, Noji S, Mito T. Gene knockout by targeted mutagenesis in a hemimetabolous insect, the two-spotted cricket *Gryllus bimaculatus*, using TALENs. Methods. 2014 Aug 15;69(1):17-21. doi: 10.1016/j.jymeth.2014.05.006.

Yasue A, Mitsui SN, Watanabe T, Sakuma T, Oyadomari S, Yamamoto T, Noji S,

Mito T, Tanaka E. Highly efficient targeted mutagenesis in one-cell mouse embryos mediated by the TALEN and CRISPR/Cas systems. *Sci Rep*. 2014 Jul 16;4:5705. doi: 10.1038/srep05705.

Yoshida H, Bando T, Mito T, Ohuchi H, Noji S. An extended steepness model for leg-size determination based on Dachous/Fat trans-dimer system. *Sci Rep*. 2014 Mar 11;4:4335. doi: 10.1038/srep04335.

Bando T, Ishimaru Y, Kida T, Hamada Y, Matsuoka Y, Nakamura T, Ohuchi H, Noji S, Mito T. Analysis of RNA-Seq data reveals involvement of JAK/STAT signalling during leg regeneration in the cricket *Gryllus bimaculatus*. *Development*. 2013;140(5): 959-964. DOI:10.1242/dev.084590

Watanabe T, Ochiai H, Sakuma T, Horch HW, Hamaguchi N, Nakamura T, Bando T, Ohuchi H, Yamamoto T, Noji S, Mito T. Non-transgenic genome modifications in a hemimetabolous insect using zinc-finger and TAL effector nucleases. *Nat Commun*. 2012;3:e1017. DOI:10.1038/ncomms2020

Takagi A, Kurita K, Terasawa T, Nakamura T, Bando T, Moriyama Y, Mito T, Noji S, Ohuchi H. Functional analysis of the role of eyes absent and sine oculis in the developing eye of the cricket *Gryllus bimaculatus*. *Dev Growth Differ*. 2012 Feb;54(2):227-240. DOI:10.1111/j.1440-169X.2011.01325.x

Mito T, Shinmyo Y, Kurita K, Nakamura T, Ohuchi H, Noji S. Ancestral functions of Delta/Notch signaling in the formation of body and leg segments in the cricket *Gryllus bimaculatus*. *Development*. 2011 Sep;138(17):3823-3833. DOI:10.1242/dev.060681

Dabour N, Bando T, Nakamura T, Miyawaki K, Mito T, Ohuchi H, Noji S. Cricket body size is altered by systemic RNAi against insulin signaling components and epidermal growth factor receptor. *Dev Growth Differ*. 2011 Sep;53(7):857-869. DOI:10.1111/j.1440-169X.2011.01291.x

Bando T, Hamada Y, Kurita K, Nakamura T, Mito T, Ohuchi H, Noji S. Lowfat, a mammalian Lix1 homologue, regulates

leg size and growth under the Dachous/Fat signaling pathway during tissue regeneration. *Dev Dyn*. 2011 Jun; 240(6): 1440-1453. DOI:10.1002/dvdy.22647

Bando T, Mito T, Nakamura T, Ohuchi H, Noji S. Regulation of leg size and shape: involvement of the Dachous-fat signaling pathway. *Dev Dyn*. 2011 May;240(5):1028-1041. Select item 21261610

DOI:10.1002/dvdy.22590
Nakamura T, Yoshizaki M, Ogawa S, Okamoto H, Shinmyo Y, Bando T, Ohuchi H, Noji S, Mito T. Imaging of transgenic cricket embryos reveals cell movements consistent with a syncytial patterning mechanism. *Curr Biol*. 2010 Sep 28;20(18):1641-1647. DOI:10.1016/j.cub.2010.07.044

[学会発表](計17件)

Bando T, Ishimaru Y, Mito T, Ohuchi H, Noji S. Mechanisms underlying regeneration of the cricket leg, based on an extended steepness model. The molecular and cellular basis of regeneration and tissue repair(招待講演) 2014年09月07日~2014年09月10日. Sant Feliu de Guixols, (Girona, Spain).

Watanabe, T., Matsuoka, Y., Noji S, and Mito T. Targeted genome editing in the cricket, *Gryllus bimaculatus*, using CRISPR/Cas9 system. FASEB SRC on Genome Engineering- Cutting- Edge Research and Applications, 2014年06月22日, (ナッソー, パハマ国)

Matsuoka Y, Bando T, Watanabe T, Noji S, Mito T. Functions of Polycomb group gene in regulation of Hox gene expression in a primitive mode of insect embryogenesis in the cricket *Gryllus bimaculatus*. 2014年05月27日, ウィンク愛知(愛知県名古屋市)

Hamada Y, Bando T, Mito T, Tomioka K, Noji S, Ohuchi H. Epigenetic regulation of gene expressions via methylation on histone H3 27th lysine residue during leg regeneration. 2014年05月27日, 第47回日本発生生物学会, ウィンク愛知(愛知県名古屋市)

Watanabe T, Matsuoka Y, Mito T, Noji S. Targeted gene disruption in the cricket, *Gryllus bimaculatus*, using CRISPR/Cas9 system. 2014年05月27

日、第47回日本発生生物学会。ウインク愛知(愛知県名古屋市)
板東哲哉、コオロギに学ぶ器官再生の分子メカニズム(招待講演)第119回日本解剖学会総会、2014年3月27日、自治医科大学(栃木県下野市)
Hamada Y, Bando T. Epigenetic regulation of gene expressions via methylation on histone H3K27 during leg regeneration in the cricket *Gryllus bimaculatus*, CDB Symposium 2014 Regeneration of Organs: Programming and Self-Organization, 2014年3月10日~12日、理化学研究所発生再生総合研究センター(兵庫県神戸市)
板東哲哉、器官再生において再生芽細胞の細分化を制御するエピジェネティックな機構、第36回日本分子生物学会年会、2013年12月5日、神戸国際展示場(兵庫県神戸市)
板東哲哉、再生を制御する普遍的分子機構の解明:昆虫の脚再生からヒト器官再生を目指して、日本解剖学会第68回中国・四国支部学術集会、2013年10月19日、鳥取大学医学部(鳥取県米子市)
Watanabe T, Ochiai H, Sakuma T, Nakamura T, Mito T, Yamamoto T, Noji S. Generation of knockout crickets using ZFNs and TALENs, 第35回日本分子生物学会年会、2012年12月11~14日 福岡国際会議場・マリノメッセ福岡(福岡県福岡市)
Bando T, Ishimaru Y, Kida T, Mito T, Ohuchi H, Noji S. Molecular mechanism of regulation of blastemal cell proliferation during leg regeneration in *Gryllus bimaculatus* 第35回日本分子生物学会年会、2012年12月11~14日 福岡国際会議場・マリノメッセ福岡(福岡県福岡市)
Watanabe T, Ochiai H, Sakuma T, Horch H, Hamaguchi N, Nakamura T, Bando T, Ohuchi H, Yamamoto T, Noji S, Mito T. Gene knockout in a hemimetabolous insect *Gryllus bimaculatus* by nontransgenic genome modification with zinc-finger and TALE nucleases Asia-Pacific Developmental Biology Conference, 2012年10月5~8日 Taipei Innovation City Convention Center (Taipei, Taiwan)
渡辺 崇人, 中井 綾, 三戸 太郎, 野地 澄晴 ZFN/TALEN を用いたフタホシコオロギにおける遺伝子変化について、第2回ゲノム編集研究会、2012年9月20日、岡崎コンファレンスセンター(愛知県

岡崎市)
Watanabe T, Ochiai H, Sakuma T, Nakamura T, Mito T, Yamamoto T, Noji S. Efficient production of knockout crickets using custom designed nucleases ZFNs and TALENs, FASEB Science Research Conferences: Genome Engineering; Research & Applications 2012年9月2~7日 Il Ciocco Resort and Spa (Barga, Italy)
Nakamura T, Mito T, Bando T, Noji S. Role of Wnt and BMP signaling pathways in the regional specification of early blastoderm in the cricket *Gryllus bimaculatus*, 24th International Congress of Entomology 2012年8月19~25日 The Exco-Daegu Convention Center (Daegu, Korea)
Bando T, Hamada Y, Nakamura T, Mito T, Ohuchi H, Noji S. Dachous/Fat signaling via Hippo/Salvador/Warts pathway regulates cell proliferation and pattern formation during leg regeneration in the cricket, 24th International Congress of Entomology 2012年8月19~25日 The Exco-Daegu Convention Center (Daegu, Korea)
Mito T, Nakamura T, Bando T, Watanabe T, Noji S. Exploring mechanisms of embryonic patterning in *Gryllus bimaculatus*, a hemimetabolous insect model system, [Symposium: From embryo to metamorphosis: Genes for insect development. (Organizers: Sumihare Noji and Martin Klingler)], 24th International Congress of Entomology 2012年8月19~25日 The Exco-Daegu Convention Center (Daegu, Korea)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

- ・野地 澄晴 (NOJI SUMIHARE)
徳島大学・本部・理事
研究者番号: 40156211

(2) 研究分担者

- ・大内 淑代 (OHUCHI HIDEYO)
岡山大学・医歯(薬)学総合研究科・教授、研究者番号: 00253229
- ・三戸 太郎 (MITO TARO)
徳島大学・大学院リサーチサイエンス研究部・助教、研究者番号: 80322254
- ・板東哲哉 (BANDO TETSUYA)
岡山大学・医歯(薬)学総合研究科・助教、研究者番号: 60423422
(2013年度から研究分担者)