

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 3 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2012～2015

課題番号：24570230

研究課題名(和文) 新たな領域形成における領域特異的転写因子の発現制御と細胞増殖制御の相互作用

研究課題名(英文) Integration of regulation of region-specific transcription factors and local cell proliferation in the formation of new developmental fields.

研究代表者

小嶋 徹也 (Kojima, Tetsuya)

東京大学・新領域創成科学研究科・准教授

研究者番号：80262153

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,300,000円

研究成果の概要(和文)： ショウジョウバエ成虫肢の付節形成過程では、3齢初期に隣接して発現する転写因子BarとDacが、Hippo経路の制御因子であるDsやFjの発現を制御することで局所的な細胞増殖を誘導し、それによるNubやRn、Apといった転写因子のタイムリーな発現により、BarとDacの発現が変化することで5つの付節が形成されることが明らかになった。このことは、領域特異的転写因子の発現の初期状態が設定されると、局所的に細胞増殖が制御され、それによってさらに領域特異的転写因子の発現が変化するという、領域特異的転写因子の発現制御と細胞増殖制御の間の密接な関係によって新たな領域が形成されることを示唆している。

研究成果の概要(英文)： In *Drosophila*, five tarsal segments are created by changes in expression patterns of two transcription factors, Bar and Dac. Once initial state of Bar and Dac expression patterns are set, they induce the region-specific expression of Ds and Fj, which regulates Hippo signaling and cell proliferation. Then, cell proliferation locally induced by the region-specific expression of Ds and Fj in turn induces the timely expression of other transcription factors, such as Nub, Rn and Ap, which regulate change in Bar and Dac expression patterns. Our results indicate that developmental field are newly formed by the integration of regulation on gene expression and on local cell proliferation.

研究分野：生物学

キーワード：昆虫 付属肢 発生分化 発現制御 細胞増殖制御 Hippo pathway

1. 研究開始当初の背景

高等生物の組織や器官を構成する各部位は、発生過程において、転写因子の領域特異的な発現により、組織や器官の前駆組織が性質の異なる細胞集団に区画分けされること(領域化)により形成される。しかし、この領域特異的転写因子の発現は一度に起こるのではなく、組織や器官の各部位に相当する各領域も一度に形成されるわけではない。まず、前駆組織は、少数の転写因子により少数の領域に分割される。その後、発生の進行に伴い、それぞれの領域内にさらに領域特異的転写因子の発現が新たに起こるとともに、領域同士の境界部分でも、領域特異的転写因子の新たな発現が起こる。この際、領域特異的転写因子の発現に密接に関係しながら、局所的な細胞増殖が起こり、各領域の細胞数が調節される。このようにして、前駆組織内に順次新たな領域が形成され、最終的に、組織や器官の各部位に相当する領域が形成される。この過程はインターカレーションとも呼ばれ、さまざまな生物の組織・器官の発生で知られている重要なものであるが、その分子メカニズムについては、未だほとんど明らかになっていない。

ショウジョウバエの成虫肢は、根元側から最先端部にかけて、基節、転節、腿節、脛節、付節、先付節といった分節から構成され、付節はさらに第1-第5の5つに分節化されている。ショウジョウバエは完全変態昆虫であり、成虫肢は、前駆組織である肢原基から変態期である蛹期を経て形成される。成虫肢の各分節に相当する領域は、局所的な細胞増殖を伴いながら、領域特異的転写因子をコードする遺伝子の発現が順次誘導されることにより、終齢幼虫である3齢幼虫期の後期までに決定される(for review: Kojima, *Development*, 46, 115-129, 2004)。例えば、第1-第5までの5つの付節の形成過程は以下のように進行する(図1)。3齢幼虫初期までに、将来の付節領域で、*Bar*と*dachshund*(*dac*)が隙間なく隣接して発現しており、*Bar*が遠位側、*dac*が近位側で発現する。その後、これらの発現は細胞増殖によって領域全体のサイズが大きくなるにつれて変化し、最終的に、近位側から遠位側にかけて、*dac*の発現が強い領域と弱い領域、両者を発現しない領域、*Bar*の発現が弱い領域と強い領域が形成され、それぞれ、第1-第5付節に対応する領域が形成される(Kojima et al., *Development* 127, 769-778, 2000)。このように、付節領域では、初めは多くても2つの領域しかなかったものが、細胞増殖を伴いながら新たな領域を形成し、最終的に5つの領域が形成されると考えられる。したがって、付節形成過程は、インターカレーションによる新たな領域形成について研究する上で、優れたモデル系であるといえる。

また、付節領域の分節数は昆虫種間で1つ~5つとバリエーションがある。例えば、シ

ョウジョウバエよりも進化的に起源の古い完全変態昆虫であるカイコでは、進化の過程で幼虫肢を失ったショウジョウバエとは異なり、幼虫にも成虫肢とは形態の異なる肢が存在する。カイコ成虫肢の付節は、ショウジョウバエと同様に、5つの分節から構成されているが、幼虫肢の付節は、1つの分節のみから構成される。最近になって我々は、*Bar*が付節領域すべてで発現して*dac*発現領域と隙間なく隣接した状態のまま、カイコ幼虫肢が形成されることを見出した(未発表データ)。完全変態昆虫は、発生過程を一旦停止して幼虫として孵化し、変態期に残りの発生を続けることで、成虫構造を形成するようになったものだとする仮説(for review: Truman and Riddiford, *Annu. Rev. Entomol.* 47, 467-500, 2002)に基づいて考えると、上記のことは、カイコの肢形成過程では、ショウジョウバエの3齢幼虫初期の状態で一旦発生を停止して幼虫肢を形成し、その後、ショウジョウバエでみられるような新たな領域の形成を経て、成虫肢が形成されるという可能性を示唆しており、新たな領域形成過程の調節によって幼虫肢が形成されるようになったことが推察される。

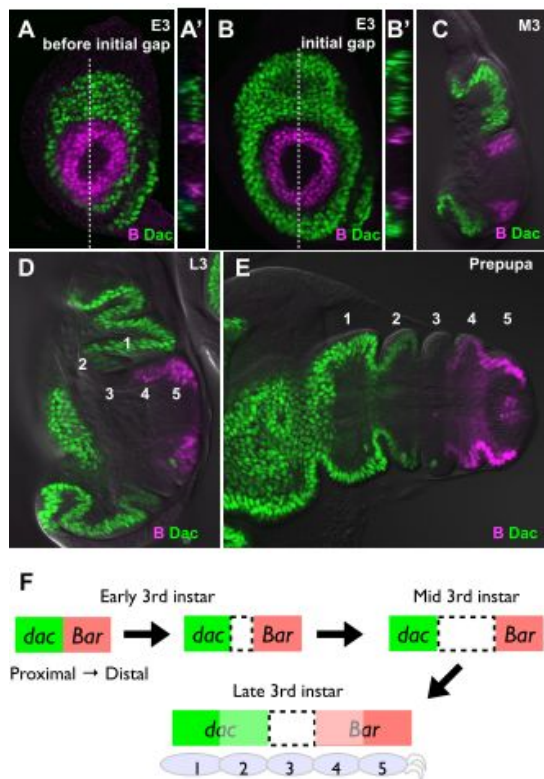


図1. *Bar*と*Dac*の発現領域の変化。
A. 3齢初期には*Bar*(紫)と*Dac*(緑)の発現領域は隣接している。B-C. 3齢初期から中期にかけて*Bar*と*Dac*の発現領域の間にギャップが生じ、その後、*Bar*の発現しない領域はさらに拡大する。
D-E. 3齢後期から前蛹期には第1付節での強い*Dac*の発現、第2付節での弱い*Dac*の発現、どちらも発現していない第3付節、第4付節での弱い*Bar*の発現、第5付節での強い*Bar*の発現が見られ、各付節と*Bar*、*Dac*の発現による領域が対応している。
F. *Bar*と*Dac*の発現変化のモデル図

2. 研究の目的

これまでの研究から、我々は、ショウジョウバエにおける付節領域での新たな領域形成過程について、この過程で一過的に発現する *spineless* (*ss*) の働きが重要であり、*ss* の変異体では、*Bar* と *dac* の発現領域は隣接したままとなり、細胞増殖も著しく低下し、第2 - 第4付節領域の形成が起こらないことを明らかにした (Kozu et al., Dev. Biol. 294, 497-508, 2006)。さらに、3 齢幼虫初期には *Bar* の発現領域全体を含む広い領域で発現している *trachealess* (*trh*) の発現が、3 齢幼虫後期には第5付節領域に限局され、この *trh* の発現によって *Bar* を強く発現する第5付節領域が形成されることも明らかにしてきた。 (Tajiri et al., Dev. Biol. 303, 461-473, 2007)。さらに最近の研究により、転写因子をコードする *nubbin* (*nub*) や *rotund* (*rn*)、*apterous* (*ap*) といった遺伝子のタイムリーな発現により *Bar* と *Dac* の発現が変化することで5つの付節が形成されること、および、これらの遺伝子の発現変化には付節領域の細胞増殖が重要な鍵を握っていることを明らかにした (Natori et al., Dev. Biol. 361, 450-462, 2012)。これらのことから、新たな領域形成の形成過程では、転写因子をコードする遺伝子間の巧妙な発現制御関係と局所的な細胞増殖の間に密接な関係があると考えられるが、新たな領域形成過程における細胞増殖の意味合いや、これら相互の制御メカニズムについても、全く不明である。

本研究では、ショウジョウバエ成虫肢の付節領域での新たな領域形成過程をモデル系として、そこに関与すると思われる領域特異的転写因子の発現制御メカニズムと細胞増殖制御メカニズムの関係について解析する。これらの研究により、付節領域の形成過程における新たな領域形成の分子メカニズムを明らかにする。

本研究で得られる知見は、組織や器官の発生過程における基本的メカニズムの、新たな領域の形成という重要な過程の理解につながると期待される。さらに、その制御による相同器官の形態の進化・多様性に関する理解のための基盤を提供することにもつながると期待される。

3. 研究の方法

近年、細胞増殖制御に関わる重要なシグナル伝達系として、Hippo 伝達系が注目されている。この系では、膜タンパク質 *Fat* (*Ft*) と *Dachsous* (*Ds*)、および、これらの分子間相互作用を調節するキナーゼ *Four-jointed* (*Fj*) が重要な役割を果たしており、隣接する細胞での *Ds* と *Fj* の発現量が異なる時に、Hippo 伝達系の転写因子である *Yorkie* (*Yki*) が活性化され、細胞増殖が誘導されることが報告されている (for review: Grusche et al., Curr. Biol. 20, R574-R582, 2010)。我々は、

これまでに、3 齢幼虫初期に *Fj* が *dac* 発現領域内の遠位側 (*Bar* 発現領域に近い側) で発現し、*Ds* が *Bar* とほぼ同じ発現領域で発現することを見出している (未発表)。このことから、*Bar* や *dac* の発現と *Ds* や *Fj* の発現が密接に関係し、これらの因子により、局所的な細胞増殖が制御されている可能性が考えられる。

そこで、以下の実験を行ない、細胞増殖制御と領域形成および領域特異的転写因子との関係を明らかにする。

(1) *Ds* や *Fj*、*Ft* の発現パターンおよびその変化を、領域特異的転写因子の発現や細胞増殖パターンと関連させて、詳細に解析する。

(2) *Ds* や *Fj*、*Ft* の活性を、強制発現系や RNAi による機能阻害の系を用いて遺伝学的手法で変化させて、その際の細胞増殖パターンや領域特異的転写因子の発現への影響を解析する。

(3) *Yki* のターゲット遺伝子の発現を指標として、野生型での肢原基における *Yki* の活性化パターンを解析するとともに、*Ds* や *Fj* の活性を変化させた場合の *Yki* の活性化パターンの変化についても解析する。

(4) 領域特異的転写因子の活性を変化させた時の、*Ds*、*Fj*、*Ft* の発現の変化を解析する。

4. 研究成果

(1) *Ds*、*Fj*、*Ft* の詳細な発現パターンの解析

Ds および *Fj* の発現パターンをエンハンサー・トラップ系統におけるレポーター遺伝子の発現を利用して詳細に解析したところ、*ds* は肢原基全体で弱く発現していること、3 齢幼虫初期から *Bar* の発現領域を含む領域で強く発現し、その近位側の境界は *Bar* の発現領域の近位側の境界と一致すること、*fj* は *ds* よりも遅れて *dac* 領域で発現し始め、その遠位側の境界は *dac* の発現領域の遠位側の境界と一致することが明らかとなった。また、*Ft* については、抗体染色によって、肢原基ではほぼ一様に発現していることも明らかとなった。

(2) 細胞増殖および成虫肢の形態に対する *Ds* および *Fj* の発現変化の影響

異所的な *Ds* や *Fj* の強制発現や、RNAi による発現の阻害により、*Ds* や *Fj* の発現量が隣接する細胞で異なる領域を人為的に誘導し、Edu により S 期の細胞をラベルしてその数をカウントしたところ、*Ds* や *Fj* の発現量が変化している境界付近で、確かに細胞増殖が著しく誘導されていることが確認された。

また、*Fj* の発現を変化させた時の成虫肢を観察したところ、新たに *Fj* の発現境界ができた分節が長くなっていることも確認された。

(3) *Yki* の活性化パターンの解析

Yki のターゲット遺伝子である *expanded* (*ex*)、*bantam* (*ban*)、*Death-associated*

inhibitor of apoptosis 1 (Diap1)の発現を指標として、野生型の肢原基での Yki の活性化パターンを解析したところ、野生型の肢原基では、*ds* の発現境界である *Bar* 発現領域の近位側の境界や *fj* の発現境界である *dac* 発現領域の遠位側の境界付近で、Yki が活性化されていることが明らかとなった。また、*Ds* や *Fj* の発現を変化させた肢原基での Yki の活性化パターンを解析したところ、細胞増殖が誘導された、*Ds* や *Fj* の発現量が隣接する細胞で異なる領域で、Yki が活性化されていることも明らかとなった。

上記(1)～(3)の解析により、肢原基の付節領域では、*Ds* や *Fj* の領域特異的な発現により、それらの発現領域の境界で Yki が活性化され、細胞増殖が誘導されていることが強く示唆された。

(4) 領域特異的転写因子による *ds* や *fj* の発現制御機構の解析

変異体や RNAi による機能障害、および、強制発現系を用いて、種々の領域特異的転写因子をコードする遺伝子の発現を変化させた時の *ds* や *fj* の発現を解析したところ、*ds* の発現は *Bar* によって正に制御されており、*fj* の発現は *dac* によって正に制御されていることが明らかとなった。

上記全ての結果と、我々のこれまでの結果を合わせて考えると、付節形成過程においては、初めに *Bar* と *dac* の発現領域がモルフォゲンによって決定されると、それらによって *ds* や *fj* の発現領域が決定され、*Ds* と *Fj* の発現境界で Yki が活性化されて細胞増殖が誘導され、その細胞増殖によって領域特異的転写因子の発現が変化し、それによってさらに *Ds* と *Fj* の発現が変化する、という領域特異的転写因子の発現制御と細胞増殖制御との相互依存的な関係によって、新たな領域が形成されることが示唆された(図2)。

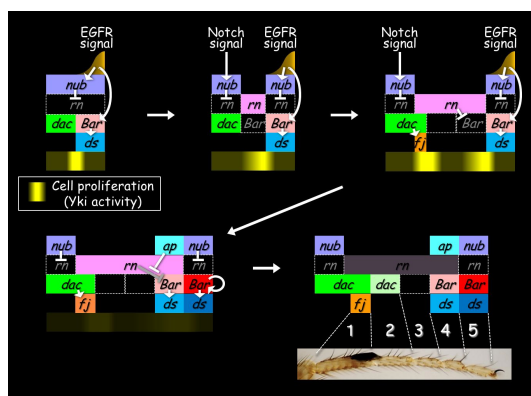


図 2. 付節形成過程における転写因子の発現制御と細胞増殖制御の相互作用。

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)

Shirai, H., Kamimura, M., Yamaguchi, J., Imanishi, S., Kojima, T. and Fujiwara, H. (2012) Two adjacent cis-regulatory elements are required for ecdysone response of ecdysone receptor (*EcR*)*B1* transcription., PLoS One 7, e49348, 査読有

〔学会発表〕(計 6 件)

Tetsuya Kojima, Creation of new developmental fields by gene regulatory interaction and tissue growth in *Drosophila* tarsal development., Joint Symposium on Integrated Biosciences between Zhejiang University and The University of Tokyo, 2016 年 3 月 15 日, 浙江(中国)

鈴木 耀, 佐藤 秀郎, 小嶋 徹也, ショウジョウバエ成虫肢の付節分節化過程における細胞増殖制御メカニズム 日本分子生物学会 第 38 回年会, 2015 年 12 月 1 日, 神戸国際展示場(兵庫県・神戸市)

Misaki Yamazaki, Takuya Tsubota, Tetsuya Kojima, Analysis of *ss^{all}*, a novel mutant allele of *spineless*., 第 11 回日本ショウジョウバエ研究会, 2014 年 6 月 6 日, 金沢歌劇座(石川県・金沢市)

Hideo Sato, Takanori Suyama, Tetsuya Kojima, Regulation of *four-jointed* expression in the *Drosophila* leg disc., 第 11 回日本ショウジョウバエ研究会, 2014 年 6 月 6 日, 金沢歌劇座(石川県・金沢市)

小嶋 徹也, 可塑的な付節の分節化を可能にするメカニズム, 日本節足動物発生学会, 2013 年 6 月 7 日, つくばグランドホテル(茨城県・つくば市)

小嶋 徹也, 可塑的かつ堅牢な昆虫肢形成を可能にするメカニズム, 日本生態学会 第 60 回大会, 2013 年 3 月 5 日, グランシップ静岡(静岡県・静岡市)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.idensystem.k.u-tokyo.ac.jp>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小嶋 徹也 (KOJIMA TETSUYA)

東京大学・大学院新領域創成科学研究科・准教授

研究者番号 : 80262153

