

平成22年 5月31日現在

研究種目：若手研究（スタートアップ）
 研究期間：2008～2009
 課題番号：20870005
 研究課題名（和文） 発生タイミングを制御するマイクロ RNA 経路の研究：アミロイド前駆体様分子の利用
 研究課題名（英文） Study of the microRNA pathway controlling developmental timing: Utilization of the *amyloid precursor protein-like* gene
 研究代表者：
 丹羽 隆介 (NIWA RYUSUKE)
 筑波大学・大学院生命環境科学研究科・助教
 研究者番号：60507945

研究成果の概要（和文）：

多細胞生物が適切に発生して大人になるためには、未成熟なステージから成熟に向けて決まったタイムスケジュールに沿って段階的に成長する必要がある。本研究代表者はモデル動物である線虫 *Caenorhabditis elegans* を用いて、幼虫から成虫へのスイッチングを正に制御する *let-7* マイクロ RNA に着目し、*let-7* 経路に関わる新規遺伝子を探索した。その結果、進化的に保存された核内受容体遺伝子 *nhr-25* が、幼虫から成虫への発生運命のスイッチングに重要な役割を果たすことを証明した。

研究成果の概要（英文）：

The development of multicellular organisms is tightly regulated under a precise time schedule. To unravel the molecular mechanisms underlying developmental timing in multicellular organisms, I used the nematode *Caenorhabditis elegans* as the model organism. I identified and characterized genes involved in the *let-7* microRNA pathway, which is essential for the larva-to-adult transition. I found that the nuclear receptor gene *nhr-25* plays a crucial role in the developmental fate switch from larval to adult stages in *C. elegans*.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,340,000	402,000	1,742,000
2009年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,540,000	762,000	3,302,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・発生生物学

キーワード：発生・分化、発現制御、線虫、発生タイミング、マイクロ RNA、転写因子、核内受容体

1. 研究開始当初の背景

生物の発生においては、それぞれの組織のそれぞれの細胞が特定の分化を遂げ、3次元

空間の中の適切な場所に位置することが必須である。一方、こうした分化と形態形成は、3次元空間軸における決定のみならず、第4

の次元「時間」軸に沿って適切なタイミングで決定されることも重要である。発生過程において各発生ステージ毎に決まった現象が起こることの重要性は、古くから認識されてきた。例えば進化学の分野では、進化過程における発生タイミングの変化に伴って外部形態の発生時期と性的成熟を迎える時期のずれが生じ、このことが生物の小進化を促すというヘテロクロニー理論が古くから提唱されている。またヒトにおいても、発達障害や、ガンなどのヒトの病態が、発生ステージのタイミングの制御異常と関連することが解明されつつある。しかし、こうした発生のタイミングを実際にどのような遺伝子が制御しているのかについては未だ断片的な知見に留まっており、3次元空間軸における発生メカニズムの膨大な知見の蓄積に比べて大きく立ち遅れている。

研究開始当初においても、また現在においても、発生タイミングの分子的解析が最も進んでいる研究系の1つは、線虫 *Caenorhabditis elegans* (以下、単に「線虫」) の後胚発生である。線虫では、発生過程の細胞系譜のすべてが記載されており、各発生ステージごとに固有の細胞分裂と分化が観察される。この時期特異的な細胞系譜を指標として、各ステージの個性の発現タイミングに異常がある突然変異株が同定され、その原因遺伝子の正体が明らかにされつつある。

こうした遺伝子の1つ *let-7* は、成虫になるべきステージにおいても成虫形質が分化せず幼虫期の個性のままの突然変異株として同定された。*let-7* は、線虫のみならず他の多細胞動物にも高度に保存されたマイクロRNAをコードしており、他の動物においても未成熟段階から成熟段階への移行に関わることが示唆されている。さらに *let-7* は、ヒトの病気にも深く関わる可能性が示唆されている。すなわち、ヒトの原ガン遺伝子 *RAS* は *let-7* によって発現抑制されること、さらにはヒトのある種の肺ガン発症患者では *let-7* ファミリーの発現量が著しく低く、逆に *RAS* のタンパク量が顕著に上昇することが判明している。また本研究代表者は、本研究開始以前に、アルツハイマー病に関与するアミロイド前駆体タンパク質 *APP* の線虫類縁分子 *apl-1* が、成虫時に *let-7* によって機能抑制を受けることを発見した。これらの事実は、*let-7* が個体の生活史における若さや老いを反映した細胞分化と細胞分裂の特徴を規定しており、その異常はヒトの病気にもつながる可能性を提示している。

let-7 マイクロRNAは、*RAS* や *apl-1* を

含め、その下流で複数の転写因子やシグナル伝達分子の発現を制御することで、成虫成熟のスイッチとして機能する。*let-7* 依存的な発生タイミング経路の特徴は、*let-7* マイクロRNA そのものが進化的に高度に保存されているだけでなく、*let-7* の下流に位置する遺伝子およびその *let-7* 依存的な発現制御も動物界に広く保存されている点にある。こうした保存性の観点から、*let-7* 経路に作用する新規遺伝子およびそのネットワークを解明することは、動物界に共通する発生タイミングの分子基盤に迫る上で、有効なアプローチであると考えられた。

2. 研究の目的

発生のタイミングの制御機構に迫る目的で本研究代表者は、本申請研究において *let-7* マイクロRNA 依存的な発生タイミング決定経路をより詳細に解明することを目指した。*let-7* 経路に関わる遺伝子を探索するために本研究代表者は、先述した *apl-1* をレポーターとして利用した新規遺伝子の探索を行った。*apl-1* は、幼虫→成虫スイッチとして機能する *let-7* 依存的な発生タイミング経路の活性を転写レベルでモニターできる数少ない遺伝子である。そこで、*apl-1* の発現変動を指標とした二重鎖RNA干渉 (RNAi) スクリーニング、および *apl-1* の発現調節に関わるエンハンサー領域の解析に取り組み、遺伝子発現レベルから *let-7* 経路に関わる因子を探索した。この本研究代表者のアプローチによって、従来の形態指標だけでは見落とされていた発生タイミング遺伝子を見出すことが出来ると考えた。線虫は、遺伝学的ツールおよび網羅的 RNAi のためのライブラリーが良く整備されたモデル系であり、未知遺伝子を迅速に発掘するのに好適である。

3. 研究の方法

apl-1 エンハンサー領域の下流に GFP を融合させたコンストラクトを持つトランスジェニック線虫系統 (*apl-1::GFP* 系統) を利用して、以下の2つの研究手法を取った。

(方法1) *apl-1::GFP* 系統を利用した発生タイミング関連遺伝子の同定と機能解析

apl-1 の発現に影響を与える遺伝子の探索を目的として、RNAi を利用した遺伝子スクリーニングを行った。線虫は大規模な RNAi スクリーニング系が良く整備されたモデル生物であり、線虫の予想コーディング遺伝子

の大半に対する RNAi クローンライブラリーが利用可能である。本研究代表者は、特にゲノム中に 387 個予測されている転写制御因子に着目したスクリーニングを行い、*apl-1::GFP* 系統の GFP 発現レベルに変化を与える転写制御因子遺伝子を探した。

(方法 2) *apl-1* 上流領域の解析

上述した RNAi スクリーニングとは別に本研究代表者は、*let-7* 経路に関わる分子メカニズムを直接的に探究する方法として、*apl-1* のダイナミックな発現を司るエンハンサー領域の同定を目指した。*apl-1* エンハンサー領域 (約 7.0 kb) を細かく分断した後にそれぞれを GFP につなぎ、時系列にそった発現プロファイルの実現に必須の領域の探索を行った。幼虫→成虫スイッチに必須の領域を出来る限り絞り込んだ後、特徴的な転写因子結合モチーフがある場合は候補転写因子に注目し、*apl-1* の発現への関与を検討した。

4. 研究成果

(1) RNAi スクリーニングによる発生タイミング関連遺伝子の同定と機能解析

まず、転写制御因子 387 個をターゲットとした RNAi ライブラリーを利用してスクリーニングを行い、*apl-1::GFP* の発現に影響が及ぼす遺伝子を探した。その結果、*nhr-25*、*nhr-195*、*elt-2*、そして、*lin-11* の機能を RNAi によって低下させた場合に、上皮細胞における *apl-1::GFP* の発現が著しく低下することを見出した。

次いで、同定されたこの 4 つの遺伝子の機能低下線虫において、*apl-1* の発現以外の幼虫→成虫スイッチングのイベントに影響があるかどうかを調べた。その結果、これら 4 つのうち、進化的に保存された核内受容体をコードする *nhr-25* 遺伝子が、*apl-1* の発現調節のみならず、上皮細胞分裂の停止、上皮細胞の融合、成虫特異的コラーゲン遺伝子の発現など、幼虫から成虫への分化の幅広い現象に関与していることが判明した。すなわち、*nhr-25* は、新規の発生タイミング遺伝子であることを示した。さらに興味深い事に、幼虫から成虫への上記の分化現象を精緻に観察してみると、成虫特異的コラーゲンの発現に際しては *nhr-25* は成虫スイッチングを負に制御するが、上皮細胞分裂の停止や上皮細胞の融合に関しては、*nhr-25* は成虫スイッチングを正に制御する方向で働くことが分かった。つまり、*nhr-25* は、成虫化の個別の現象のそれぞれに対して、正に機能する時も負に

機能する時もあるという、多面的な機能を持ったこれまでにないタイプの発生タイミング遺伝子であることが判明した。

(2) *apl-1* 遺伝子のエンハンサー解析

RNAi スクリーニングと併行して本研究代表者は、*apl-1* のダイナミックな発現を司るエンハンサー領域を特定するエンハンサー解析を行った。その結果、*apl-1* のエンハンサー領域約 7.0 kb のうちの 201 bp 領域が、*apl-1* の時間的発現に必要十分であることを示した。また本研究代表者は、この 201 bp 領域内に、核内受容体結合モチーフがあることを見出した。さらに、上述した *nhr-25* 依存的な *apl-1* の発現制御には、この核内受容体結合モチーフが必要であることも証明した。このことから、*nhr-25* は *apl-1* の発現タイミングを直接に制御している可能性が示唆された。

(結論)

apl-1::GFP 系統を用いた RNAi スクリーニングおよびエンハンサー解析を利用した実験から、核内受容体遺伝子 *nhr-25* の発生タイミングにおける機能を明らかにすることが出来た。*nhr-25* 遺伝子はすでに様々な発生現象に必須の遺伝子として記載されていたが、発生タイミングにおける機能についてはまったく報告がなかった。これは、発生タイミングにおける *nhr-25* の役割が複合的かつ複雑であるために、表面的な形態のみを指標とした従来の突然変異株スクリーニングでは発生タイミングにおける機能を見出すことが出来なかったことに起因すると思われる。よって、今回の発見は、本研究代表者による *apl-1::GFP* 系統を利用するアイデアが新しい研究ツールとして有効であることを意味している。今回の研究では転写制御因子のみに焦点を絞ったが、今後はゲノム中にコードされているそれ以外の遺伝子についても RNAi スクリーニングを行うことで、より詳細な *let-7* マイクロ RNA タイミング経路に迫れるものと考えている。

nhr-25 は、幼虫から成虫へのスイッチングにおいて非常に多面的な機能を持つこと遺伝子であった。1 つの遺伝子が幼虫から成虫へのスイッチングにこのように複雑に機能する例はこれまでに報告がない。すなわち、*nhr-25* は、これまでにない新しいタイプの発生タイミング遺伝子であると言える。また、*nhr-25* は線虫からヒトまで進化的に高度に保存された遺伝子であることから、本成果は動物一般の発生タイミングの理解に新しい

糸口を与えるものでもありと期待できる。

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)

- ① Kazumasa Hada, Masako Asahina, Hiroshi Hasegawa, Yasunori Kanaho, Frank J. Slack, and Ryusuke Niwa (2010) The nuclear receptor gene *nhr-25* plays multiple roles in the *C. elegans* heterochronic gene network to control the larva-to-adult transition. *Developmental Biology*, 掲載決定済み. ¶ 責任著者.

[学会発表] (計7件)

- ① 丹羽隆介『脱皮動物の発生タイミングの分子機構：昆虫エクジソン生合成経路および線虫ヘテロクロニック遺伝子の研究を通じて』、第32回日本分子生物学会年会、2009年12月12日、パシフィコ横浜.
- ② Kazumasa Hada, Sora Enya, and Ryusuke Niwa 『A screen for novel heterochronic genes that regulate the *let-7* microRNA-dependent developmental timing pathway in the nematode *Caenorhabditis elegans*』、第32回日本分子生物学会年会、2009年12月11日、パシフィコ横浜.
- ③ Kazumasa Hada, Sora Enya, and Ryusuke Niwa 『Hunting for new heterochronic genes that play essential roles in the *let-7* microRNA-dependent pathway in *Caenorhabditis elegans*』、International Symposium on Cellular Signaling ~principles and functions~, 2009年11月19日、筑波大学.
- ④ Ryusuke Niwa, Kazumasa Hada, Hiroshi Hasegawa, Masako Asahina, Yasunori Kanaho, and Frank J. Slack 『The nuclear hormone receptor *nhr-25* is a heterochronic gene that has dual roles in both promoting and inhibiting *C. elegans* adult programs』、17th International *C. elegans* Meeting、2009年6月24日、カリフォルニア大学ロサンゼルス校、アメリカ合衆国.
- ⑤ Kazumasa Hada, Hiroshi Hasegawa, Yasunori Kanaho, Frank J. Slack, and Ryusuke Niwa 『Identification and characterization of novel heterochronic genes involved in the *let-7* microRNA-dependent developmental timing

pathway in *Caenorhabditis elegans*』、17th International *C. elegans* Meeting、2009年6月24日、カリフォルニア大学ロサンゼルス校、アメリカ合衆国.

- ⑥ Kazumasa Hada, Hiroshi Hasegawa, Yasunori Kanaho, and Ryusuke Niwa 『Identification and characterization of novel heterochronic genes involved in the *let-7* microRNA-dependent developmental timing pathway in *Caenorhabditis elegans*』、日本発生生物学会第42回大会、2009年5月28日、新潟コンベンションセンター朱鷺メッセ.
- ⑦ 波田一誠、長谷川潤、金保安則、Frank J. Slack、丹羽隆介『線虫 *C. elegans* の *let-7* microRNA 発生タイミング経路に関わる新規遺伝子の同定と機能解析』、日本農芸化学会2009年度大会、2009年3月27日、マリンメッセ福岡.

[その他]

ホームページ：

<http://www.biol.tsukuba.ac.jp/~rniwa/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

丹羽 隆介 (NIWA RYUSUKE)

筑波大学・大学院生命環境科学研究科・助教
研究者番号：60507945