

## 129. 細胞単離技術を用いて模様形成機構を解明する

越川 滋行

京都大学 白眉センター

Key words : ミズタマシヨウジョウバエ, 模様形成, メラニン色素合成, 細胞解離

### 緒言

動物の模様は自然界において様々な機能を持ち、またその多様な形成メカニズムの背後には多くの生物学的原理があると考えられているが、いまだに機能、形成メカニズムの両面に関して未解明な点が多い。脊椎動物の模様形成メカニズムに関してはゼブラフィッシュ *Danio rerio* に関する研究が盛んである。昆虫ではチョウやシヨウジョウバエを用いた研究が多い。特にシヨウジョウバエは、その実験的操作のしやすさ、研究ツールの豊富さから、模様形成の機構を研究するモデルとして有用である。また模様の形成に細胞の移動が大きな役割を果たす脊椎動物と、領域パターンニングが大きな役割を果たす昆虫を比較する事で、より一般的な原理が明らかになると考えられる。

翅に大きな黒い斑紋を持つシヨウジョウバエの一種 *Drosophila biarmipes* では、転写制御因子 *Distal-less* の発現が模様形成に重要であること<sup>1)</sup>、その下流においてメラニン合成系遺伝子 *yellow* が発現することが知られている<sup>2)</sup>。翅に多くの水玉模様を持つミズタマシヨウジョウバエ *Drosophila guttifera* においては、シグナル伝達因子 *wingless* の発現が模様形成に重要であること、やはりその下流においてメラニン合成系遺伝子 *yellow* が発現することが知られている<sup>3)</sup>。また、他の種と比較して、ミズタマシヨウジョウバエで *wingless* 遺伝子の発現領域が増えており、特に翅の縦脈末端、鐘状感覚子の周辺と、胸部背板での発現に関して、cis 制御領域の進化（エンハンサー活性の獲得）が関係していることが示されている<sup>4)</sup>。また、模様の材料であるメラニン色素の合成系についてはキイロシヨウジョウバエ *Drosophila melanogaster* での研究が進んでおり、*yellow*、*ebony*、*tan*、*black* などの関与する遺伝子と、そのおおよその機能が知られている<sup>5-7)</sup>。

このようにシヨウジョウバエの翅の模様形成メカニズムについてある程度の知見はあるが、翅に模様のないキイロシヨウジョウバエにおいて、メラニン合成系遺伝子 *yellow* を過剰に発現させても模様が形成されることがわかっている<sup>2)</sup>。つまり *yellow* 遺伝子の発現のみでは模様の形成に十分ではない。そこで模様形成のメカニズムを理解するためには、これまでに知られていない模様形成に関与する遺伝子群を同定し、それらの機能を明らかにする必要がある。

### 方法および結果

#### 1. 方法の概要と計画

ミズタマシヨウジョウバエは翅に多くの黒い水玉模様を持つ。水玉は翅の横脈（翅の短軸に対して平行な翅脈）の両端、縦脈（翅の長軸に対して平行な翅脈）の末端、鐘状感覚子（縦脈上にあり、翅の振動数を感知するための機械感覚器官）の周辺に、さらに縦脈と縦脈の間には薄い黒色の着色がみられる（図 1A）。

*in situ* ハイブリダイゼーションにより、メラニン合成系の遺伝子 *yellow* が蛹期の翅で水玉状に発現することが分かっている。*yellow* 遺伝子のエンハンサーに *GFP* 遺伝子（緑色蛍光タンパク質の遺伝子）を連結してゲノム中に導入したミズタマシヨウジョウバエ系統<sup>3)</sup> では、将来水玉模様になる領域の細胞が *GFP* を発現し、緑色蛍光を持つ（図 1B）。これを指標に、セルソーターやマイクロ流路を用いて *GFP* 陽性細胞と陰性細胞を選別することを計画した。

#### 2. 実験に用いる発生ステージの検討

シヨウジョウバエの翅に含まれる組織はクチクラ層に挟まれた2層の細胞層からなり<sup>8)</sup>、細胞の解離、選別の条件検討が重要となる。

まずミズタマシヨウジョウバエの蛹のステージをキイロシヨウジョウバエのステージと比較し<sup>9)</sup>、細胞の採取に適したステージを検討した。該当ステージの蛹が多く得られ、また解剖がしやすいことから、複眼が明確な赤色になるステージである P9 を用いることとした。

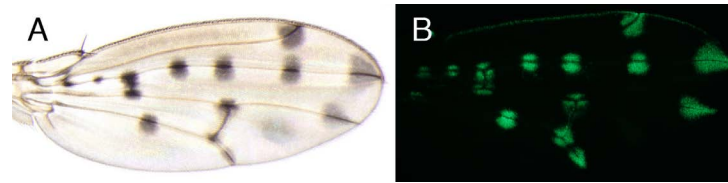


図 1. ミスタマシヨウジョウバエの成虫翅模様と、蛹での *yellow* 遺伝子の発現領域を示す GFP の発現パターン

A) ミズタマシヨウジョウバエ *Drosophila guttifera* の成虫の翅の着色パターン。B) ミズタマシヨウジョウバエの *yellow* 遺伝子のエンハンサーに *GFP* 遺伝子を連結し、ミズタマシヨウジョウバエに導入した。まだ着色が生じていない蛹期に、GFP の発現が水玉模様を示す。翅の長さは、いずれも約 2 mm。

### 3. 細胞の解離条件の検討

ステージ P9 の蛹の翅から細胞を解離するために、まず細胞層と細胞外マトリックスの結合を切断する酵素である DISPASE II (Wako)、細胞層と細胞外マトリックス、細胞間の結合を切断する酵素である TrypLE Ex (トリプシン様酵素、GIBCO)、翅のクチクラを構成する成分のひとつであるキチンを分解するキチナーゼの一種である Yatalase (Takara Bio) などの処理を試みた。細胞を一部解離させる事には成功したものの、コンスタントに十分な GFP 陽性細胞を得るに至らなかった。

次にダウンス型ホモジナイザー (Dounce Tissue Grinder, 1ml, Wheaton) やボルテックスミキサーによる機械的な方法により細胞の解離を試みた。また酵素による方法と機械的方法の組み合わせを試みた。しかし、いずれの方法によっても、コンスタントに十分な GFP 陽性細胞量を得るに至らなかった。セルストレイナー (CellTrics, Green 30 $\mu$ m, Sysmex) に細胞懸濁液を通した後、セルソーター (SH800 Cell Sorter, SONY) により GFP 陽性細胞の分取を試みたが、後述する解剖による切り出し法と比べ、得られる効率が低い結果となった。

### 4. LCM による切り出し条件の検討

顕微鏡下でレーザー光を用いて組織を切り取り分離する方法であるレーザーキャプチャーマイクロダイセクション (LCM, ARcturusXT、ビーエム機器) によって、GFP 陽性の細胞群を分離する事を試みた。この方法を用いるにあたっての課題は、ステージ P9 の蛹の翅をいかに準備して LCM に適した状態にするかである。この時期の蛹の翅は複雑に折り畳まれているために、伸展の条件が重要となる。折り畳まれている蛹の翅を低浸透圧のイオン交換水中に浸すと、内外の浸透圧の違いによりイオン交換水が翅の組織に浸透流入し、結果として翅をほぼ平らな状態にまで伸展する事ができる。その後、液をメタノールに置換する事で脱水し、スライド上で乾燥する事で LCM に適した状態の組織を準備できると考えた。

しかし実際には、蛹の翅の伸展を十分にすると、GFP 陽性細胞群と陰性細胞群との境界があいまいになることが観察された。これはおそらく表皮細胞が浸透圧で破壊されるために観察される現象であり、細胞内の RNA の保存性も下がっていることが懸念された。いっぽうで蛹の翅の伸展が不十分だと、採取用スライドに十分に固着させる事ができず、組織が浮いたり、剥がれたりするなどして、高い信頼性で組織を回収する事ができなかった。結果として、高い効率と品質を両立した形で細胞群を回収する条件を発見するに至らなかった。

### 5. 外科的に細胞群を切り出す方法の検討

これらの結果を受けて、顕微鏡下で外科手術用メス (エルプ・スカルペル、秋山製作所) によって目的細胞群を切り出す方法を取ることにした。試行錯誤の結果、GFP 陽性と GFP 陰性の細胞群を高い精度で切り分け、ある程度の細胞数を得る事に成功した (図 2)。また蛹の翅から RNeasy Micro Kit (Qiagen) により Total RNA を抽出し、その効率

からの試算により、ある一定数の水玉を切り出すことによりトランスクリプトーム解析に必要な RNA 量を確保できる見通しが立った。

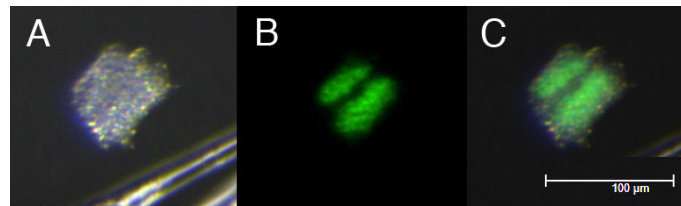


図2. 外科的方法により将来水玉をつくる細胞群を分離する

A) 外科的に切り出された組織の明視野像。B) 同じ組織の緑色蛍光チャンネル像は GFP の発現を示す。C) 明視野と緑色蛍光をマージしたもの。

## 考 察

細胞の解離が困難であることが判明し、少なくとも短期的には、外科的に目的細胞群を切り出す方法に優位性があると判断した。今後、大量に容易に GFP 陽性細胞を得るためには、より効率的に細胞を解離する条件を探索する必要がある。具体的には、今回テストしなかった様々な酵素の利用や、酵素処理の条件や順番の検討があげられる。あるいは、レーザーキャプチャーマイクロダイセクションのためのサンプル調製において、細胞にダメージを与えること無く蛹の翅を伸展させ、スライド上に固着させる条件を検討することで効率が改善する可能性がある。

今後は外科的手法によって切り出した細胞群を用いる方法を優先してトランスクリプトーム解析を進め、水玉模様の形成に関与している遺伝子群を網羅的に同定して行く予定である。

また、本研究とミズタマショウジョウバエの模様進化に関連して、エンハンサーのモジュール性が新しい形質の進化に果たす役割、および既存の形質が異所的に重複する場合において、発生制御因子に新しいエンハンサーが獲得されることが原因になる可能性についての考察を行い、論考を発表した<sup>10)</sup>。

## 共同研究者

本研究は、京都大学理学部4回生(当時)の福富雄一氏の助力により遂行する事ができました。また京都大学の阿形清和教授(当時)、船山典子准教授、基礎生物学研究所の重信秀治特任准教授、尾納隆大氏、牧野由美子氏より多くのご指導、ご助言を頂きました。本研究を遂行するにあたり、ご支援くださいました上原記念生命科学財団に深く感謝致します。

## 文 献

- 1) Arnoult L, Su KF, Manoel D, Minervino C, Magriña J, Gompel N, Prud'homme B. Emergence and diversification of fly pigmentation through evolution of a gene regulatory module. *Science*. 2013 Mar 22;339(6126):1423-6. doi: 10.1126/science.1233749. PMID: 23520110
- 2) Gompel N, Prud'homme B, Wittkopp PJ, Kassner VA, Carroll SB. Chance caught on the wing : cis-regulatory evolution and the origin of pigmentation patterns in *Drosophila*. *Nature*. 2005;433:481-487 doi: 10.1038/nature03235 PMID: 15690032
- 3) Werner T, Koshikawa S, Williams TM, Carroll SB. Generation of a novel wing colour pattern by the *Wingless* morphogen. *Nature*. 2010;464(7292):1143-8. doi: 10.1038/nature08896 PMID: 20376004
- 4) Koshikawa S, Giorgianni MW, Vaccaro K, Kassner VA, Yoder JH, Werner T, Carroll SB. Gain of cis-regulatory activities underlies novel domains of *wingless* gene expression in *Drosophila*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2015;112(24):7524-9. doi: 10.1073/pnas.1509022112. PMID: 26034272
- 5) Wittkopp PJ, True JR, Carroll SB. Reciprocal functions of the *Drosophila* yellow and ebony proteins in the development and evolution of pigment patterns. *Development*. 2002 Apr;129(8):1849-58. PMID: 11934851
- 6) True JR, Yeh SD, Hovemann BT, Kemme T, Meinertzhagen IA, Edwards TN, Liou SR, Han Q, Li J. *Drosophila tan* encodes a novel hydrolase required in pigmentation and vision. *PLoS Genet*. 2005 Nov; 1(5):e63. Epub 2005 Nov 18. PMID: 16299587

- 7) Kopp A. Metamodels and phylogenetic replication: a systematic approach to the evolution of developmental pathways. *Evolution*. 2009 Nov;63(11):2771-89. doi: 10.1111/j.1558-5646.2009.00761.x. Epub 2009 Jul 22. PMID: 19545263
- 8) Waddington, C. H. The genetic control of wing development in *Drosophila*. *Journal of Genetics*. 1940;41(1): 75-113.
- 9) Bainbridge SP, Bownes M. Staging the metamorphosis of *Drosophila melanogaster*. *J Embryol Exp Morphol*. 1981 Dec;66:57-80. PMID: 6802923
- 10) Koshikawa S. Enhancer modularity and the evolution of new traits. *Fly (Austin)*. 2015 Oct 2;9(4):155-9. doi: 10.1080/19336934.2016.1151129. PMID: 26925592