

Title	野生型ショウジョウバエの脳で左右非対称性異常が少数個体で維持される機構の解明
Author(s)	
Citation	令和4（2022）年度学部学生による自主研究奨励事業 研究成果報告書．2023
Version Type	VoR
URL	https://hdl.handle.net/11094/90974
rights	
Note	

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

令和4年度大阪大学未来基金「学部学生による自主研究奨励事業」研究成果報告書

ふりがな 氏名	よしだ ともき 吉田 智稀	学部 学科	理学部 生物科学科	学年	2年
ふりがな 共同 研究者氏名		学部 学科		学年	年
					年
					年
アドバイザー教員 氏名	松野健治教授	所属	理学研究科		
研究課題名	野生型ショウジョウバエの脳で左右非対称性異常が少数個体で維持される機構の解明				
研究成果の概要	研究目的、研究計画、研究方法、研究経過、研究成果等について記述すること。必要に応じて用紙を追加してもよい。(先行する研究を引用する場合は、「阪大生のためのアカデミックライティング入門」に従い、盗作剽窃にならないように引用部分を明示し文末に参考文献リストをつけること。)				

研究目的

脳の左右非対称性は、様々な動物において言語機能や認知機能などの多様な脳機能に重要な役割を担っている。例えばヒトでは、脳の左右非対称性に起因すると考えられている利き手があり、90%が右利きで、10%が左利きである。そして、脳の左右非対称性と利き手の両方に関連している遺伝子が発見されている。しかし、このような遺伝子がどのように右利き、左利きの形質の違いを形成し維持するのかを明らかにすることは、非侵襲的な実験や検死しか行えないヒトでは困難である。野生型のショウジョウバエ集団にも、脳の左右非対称性の異常を示す個体が含まれる場合がある。ショウジョウバエの脳には **Asymmetric Body (AB)** という構造がある。野生型の約92%では、神経発生やシナプス形成に関わる Fasciclin 2 (Fas2) タンパク質が右側の AB のみに分布している(正常左右性と呼ぶ)。しかし、残りの約8%では AB の両側に Fas2 タンパク質が分布するなどの左右非対称性異常が見られる(異常左右性と呼ぶ)。先行研究より、ショウジョウバエに匂いと刺激を使った記憶力のテストを行ったところ、異常左右性を示す個体は正常左右性を示す個体に比べて、短期記憶には違いがないものの、長期記憶のスコアが悪化することがわかった。このことから、ABの左右非対称性は長期記憶に関連していることが予想される。しかし、ABの左右非対称性に異常が生じる分子機構はまだ明らかになっていない。さらに、ABが異常左右性を示す個体は長期記憶において不利であるにも関わらず、なぜ野生型集団内に一定数存在しているのかということも疑問である。そこで私は、ショウジョウバエの野生型集団の少数の個体で AB の左右性に多型が現れ、維持される分子機構を明らかにする 目的で研究を始めた。

研究計画

① AB の左右性を決定する要因が遺伝子であることを確かめる

野生型の少数の集団で、ABの左右非対称性が異常になる要因として考えられるのは、遺伝的要因と環境的要因の2つである。受入れ研究室での先行研究において、ABが100%の割合で正常左右

性を示すショウジョウバエ系統が存在することが分かっている。そのため、AB の異常左右性が生じる原因は、遺伝的なものであると考えられる。そこで、AB の左右性を決定する要因が遺伝子であることを確かめることにした。野生型のショウジョウバエを用いて、同一染色体由来の相同染色体を持つ個体をつくる。もし、遺伝的な要因が AB の左右非対称性異常を引き起こしているのであれば、集団内の遺伝的な多様性を減らすことで、AB の異常左右性を示す個体の割合も変化するはずである。そこで、同一染色体由来の相同染色体を持つ個体で AB の異常左右性が見られる割合を調べる。そして、野生型のショウジョウバエと比べて、AB の異常左右性を示す個体の割合が変化するか確認し、AB の左右性に多型が生じる要因が遺伝的なものであるかどうかを明らかにする。

② AB の左右性に関係する変異を探索する

様々な遺伝的多型をもつショウジョウバエ系統群を用いて、AB の異常左右性と遺伝的多型の相関を調べる。これまでの研究で、野生集団由来のショウジョウバエを 20 世代近親交配させた 205 系統が樹立されている (*Drosophila* Genetic Reference Panel : DGRP)。これらの系統では、全ゲノムが解読され、450 万以上の遺伝的な多型が同定されている。本研究では、DGRP の中でも多くの研究で使用されている 37 系統を用いて、AB の異常左右性が見られる割合を調べる。AB の異常左右性の割合と 37 系統のショウジョウバエのゲノムを比較した結果を照らし合わせることで、AB の異常左右性と相関する遺伝的な一塩基多型 (SNP) を探索する。SNP とは、ある生物種内におけるゲノム塩基配列のうちの 1 塩基の個体ごとの違いである。一塩基多型が遺伝子の機能に影響することで個体間に形質の違いが生じると考えられる。GWAS で発見された SNP が影響していると考えられる遺伝子を探索することで AB の異常左右性を引き起こす遺伝子を同定できると考えている。

③ AB の左右異常を引き起こす遺伝子を同定しその機能を調べる

②で発見された SNP は、AB の異常左右性と相関があるといえるだけであり、現時点では実際に AB の異常左右性を引き起こしているのか不明である。これらの変異は、その近傍の遺伝子の機能に影響を与えていることが考えられる。そこで、発見された SNP の近傍にある遺伝子を人為的に機能阻害する。機能阻害した遺伝子が AB の異常左右性に関係するものであれば、AB の左右性の割合に変化が現れるはずである。この手法によって、候補遺伝子の中から AB の異常左右性を引き起こす遺伝子を探索することで、AB の異常左右性を引き起こす要因となる SNP を特定する。

研究方法

① AB の左右性を決定する要因が遺伝子であることを確かめる

ショウジョウバエには 1 番染色体から 4 番染色体の 4 組の染色体が存在する。このうち 1 番染色体が性染色体で、残りの 3 組が常染色体である。AB の異常左右性の割合に雌雄差は見られないことから、野生型の 1 番染色体に存在する多型は AB の左右非対称性に影響しないと考えられる。また、4 番染色体に存在する遺伝子は非常に少ないため、4 番染色体の多型が AB の異常左右性を引き起こす可能性は低いと考えられる。したがって、本研究では 2 番染色体と 3 番染色体をそれぞれ同一由来の染色体のホモ接合にして、AB の左右非対称性に異常が見られるものの割合を野生型と比較する。AB の左右非対称性を判断するために、蛍光抗体染色を行う。Fas2 タンパク質に特異的に結合する抗体を用いて Fas2 タンパク質を標識する。そして、Fas2 タンパク質の分布を受入研究室に設置されている共焦点蛍光顕微鏡 (LSM880 ZEISS) によって観察し、AB の左右非対称性に異常

が見られるかを判別する。

② AB の左右性に関する変異を探索する

AB の左右性に関する対立遺伝子を探索するには、ゲノムワイド関連解析 (GWAS) という手法を用いる。GWAS とは、ある集団内に存在する形質の違いと塩基配列の違いとの相関関係を統計的に調べる手法である。本研究では、DGRP37 系統に含まれる遺伝的な多型と AB の異常左右性との関連を調べ、野生型集団と比べて AB の異常左右性と有意に相関する SNP を探索する。そして、発見した SNP が影響している可能性がある近傍の遺伝子を探索する。AB の左右非対称性の判断は①と同様に行う。

③ AB の左右異常を引き起こす遺伝子を同定しその機能を調べる

AB の異常左右性と相関がある候補遺伝子の全てに対して 1 つ 1 つ機能阻害を行い、AB の左右性に関する遺伝子を探索する。機能阻害には、RNAi (RNA 干渉) という手法を用いる。RNAi とは、短い二本鎖 RNA が相補的な配列をもつ標的 RNA を分解することで、特定の遺伝子の発現を抑制する手法である。ショウジョウバエでは、酵母由来の転写因子である Gal4 依存的に、様々な遺伝子に対する 2 本鎖 RNA を発現する系統が確立されている。これらを、神経系特異的に Gal4 を発現する系統と交配させることによって、次世代で神経系特異的に標的遺伝子が機能阻害された個体が生まれてくる。この子世代の AB の左右性を調べることによって、候補遺伝子が AB の左右性に影響しているかを確認し、AB の異常左右性を引き起こす遺伝子を探索する。AB の左右非対称性の判断は①と同様に行う。

研究経過

① AB の左右性を決定する要因が遺伝子であることを確かめる

2 番染色体と 3 番染色体を同一由来のものに揃えた系統をそれぞれ 2 系統ずつ用意し、AB の左右性を観察した。結果は図 1 のようになった。左端は CS という、基準となる野生型系統の結果である。2-iso1、2-iso2 は 2 番染色体を揃えた系統であり、3-iso1、3-iso2 は 3 番染色体を揃えた系統である。右側のみに Fas2 タンパク質が存在するものを“正常左右性”、左側の AB にも Fas2 タンパク質が存在するものを“異常左右性”、左右の判別ができないものを“形態異常”と判断する。さらに、異常左右性の中でも、左側の Fas2 タンパク質の分布が右側よりも大きいものを特別に“左側優位”、それ以外を“両側”という名前で分類した。この実験から、染色体を同一由来のものに揃えると、AB の左右性の割合が系統ごとに異なるという結果が得られた。

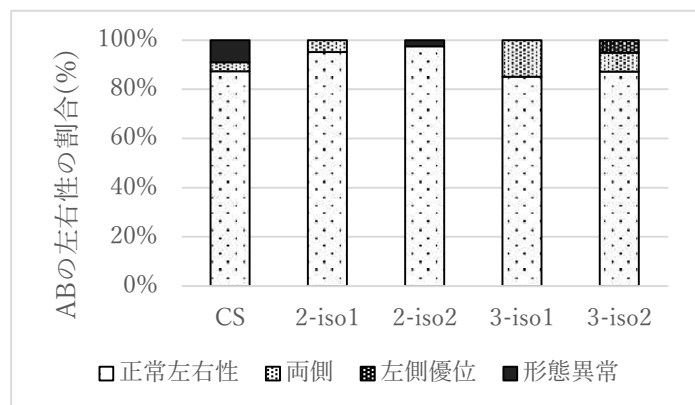


図 1 染色体を揃えた場合の AB の左右性の変化

② AB の左右性に関係する遺伝子を探索する

DGRP37 系統について異常左右性を示す個体の割合を調べたところ、約半数の個体が異常左右性を示す系統から、観察した全ての個体が異常左右性を示さない系統まで、系統ごとに異常左右性の割合が大きく異なっていることがわかった。この結果をもとに GWAS を行い、AB の異常左右性と相関のある SNP を探索した。図 2 は、GWAS の結果をもとに作成したマンハッタンプロットである。それぞれの点が SNP に対応しており、横軸は染色体上での位置を表す。縦軸は有意水準であり、図 2 中の線より上側にある SNP は AB の異常左右性と相関があると言える。GWAS の結果、AB の異常左右性と相関がある SNP が 71 個発見された。そして、これらの SNP が影響していると考えられる遺伝子は 38 個発見された。

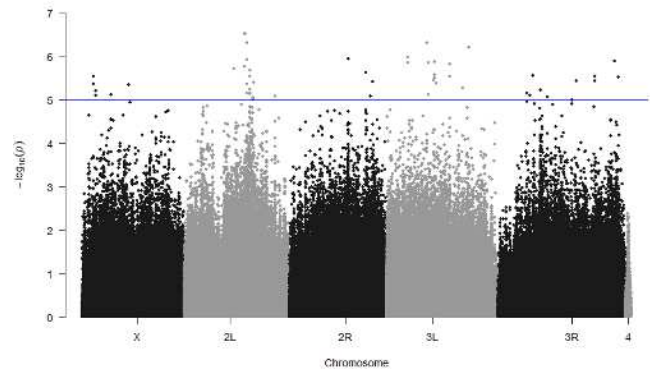


図 2 AB の異常左右性と SNP の相関

③ AB の左右異常を引き起こす遺伝子を同定しその機能を調べる

RNAi では、標的 RNA と相補的な配列をもつ短い二本鎖 RNA を転写して機能阻害をするが、標的 RNA 以外の相補的な RNA も分解して非特異的な阻害をしてしまう可能性がある。そこで、同じ遺伝子に対して異なる配列の二本鎖 RNA を転写する RNAi 系統を可能な限り 2 つ以上用いて機能阻害を行う。候補遺伝子 38 個に対して、全部で 63 系統の RNAi 系統を使用して機能阻害を行う。現在はそのうちの 4 系統の観察が完了している。

研究成果

①より、染色体を同一由来のものに揃えて遺伝的な多型を少なくすると、AB の左右性の割合が系統ごとに変化するという結果が得られた。このことから、AB の左右性を決定する要因は遺伝子であると考えられる。

そして、②より AB の左右性と相関がある SNP を 71 個発見した。さらに、これらの SNP が影響していると考えられる遺伝子を 38 個発見した。

今後は 38 個の遺伝子のそれぞれに対して機能阻害を行い、AB の左右性の割合の変化を調べることで、AB の左右性に影響する遺伝子を特定したいと考えている。