

## 論文内容の要旨

論文題目 ショウジョウバエ翅パターン形成における新規遺伝子  
*master of thickveins* の機能解析

氏名 船越陽子

### 序

多細胞生物は発生段階において、各々の細胞がその位置に応じた位置情報価を元にして分化することによって形作られる。その機構の一つは、モルフォゲンモデルで説明されている。オーガナイザーから分泌された可溶性のモルフォゲン分子の濃度勾配により、位置情報の元となるシグナル強度の勾配が形成されると考えられている。私は本研究において、キイロショウジョウバエの翅のパターン形成をモデルとして、この系で前後軸方向のモルフォゲンである、TGF- $\beta$ スーパーファミリーに属する Decapentaplegic (Dpp) の情報勾配の形成機構に関与している新規遺伝子 *master of thickveins* (*mtv*) を見だし、その詳細な機能解析を行った。本研究により、当遺伝子が Dpp の受容体である *thickveins* (*tkv*) の転写を制御して *tkv* の発現パターンを形成し、それを通じて Dpp 情報伝達系のシグナル強度の勾配を形成していることを明らかにした。また、当遺伝子が翅パターン形成に重要な他の情報伝達系に関与していることを示した。

### 1. *master of thickveins* のクローニング

エンハンサートラップラインのスクリーニングにより、新規パターン形成遺伝子に P 因子が挿入されたラインを得た。このマーカー遺伝子の翅成虫原基における発現パターンは、将来成虫の翅になる部分において *tkv* の転写パターンやリン酸化型 Mothers against Dpp (Mad) (p-Mad) の勾配とほぼ相補的であった (Fig.1)。このエンハンサートラップラインからプラスミドレスキュー法により挿入部位の近辺のゲノム DNA 断片を得、これを利用して cDNA ライブラリーより目的の遺伝子をクローニングした。そして、後述する機能から、*master of thickveins* (*mtv*) と名付けた。

*mtv* は、その予想されるアミノ酸配列より、2310 アミノ酸からなる巨大なタンパク質であることが示唆された

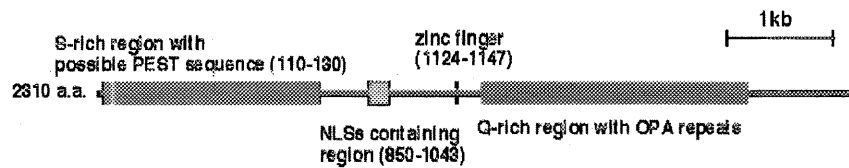


Fig. 1 Mtv の構造

(Fig.1)。そして、これは最近報告された、ショウジョウバエ視神経のラミナへの投射に必須である *brakeless* や、幼虫の正常な運動に重要な *scribbler* と同じ遺伝子であることが判明した。他の既知のタンパク質との顕著なホモロジーは見いだされなかったが、核移行シグナル、zinc finger motif、セリンに富む領域、グルタミンに富む領域の存在から、核に局在する因子であることが予想された。また、これに対する抗血清で成虫原基を染色したところ、核局在を示唆する染色像が得られた。

## 2. *mtv* による *tkv* の転写制御

### 2.1 *mtv* による *tkv* の抑制

*mtv* の変異体細胞クローン内における *tkv* の転写量を観察したところ、*tkv* の転写レベルが上昇、それに伴い、Dpp 情報活性を示すリン酸化型 Mad や標的遺伝子のレベルが上昇していた。*mtv* は *tkv* のレベルを負に制御することにより Dpp 情報活性の勾配を形作っていることが判明した (Fig. 2)。このことは、変異型クローンの示す表現型と野生型 *tkv* の異所的な発現による表現型との間に共通性があることから示された。

さらに、ここで明らかになった機構の生物学的な位置づけについて考察するために、翅の前後軸の位置情報値の決定に重要な因子である *hedgehog* (*hh*)、*engrailed* (*en*) との関係性を調べた。

### 2.2 *mtv* を通じた *hh* による *tkv* の制御

最近、Hh 情報伝達系により、前後コンパートメント境界付近において *tkv* が転写抑制を受け、その Dpp 情報伝達系のレベルが低く押さえられていることが報告された。そこで *mtv* がこの経路に関わっているかどうかについて検討した。

*mtv* は、前後コンパートメントの境界において高いレベルで転写されているが、これが Hh 情報に

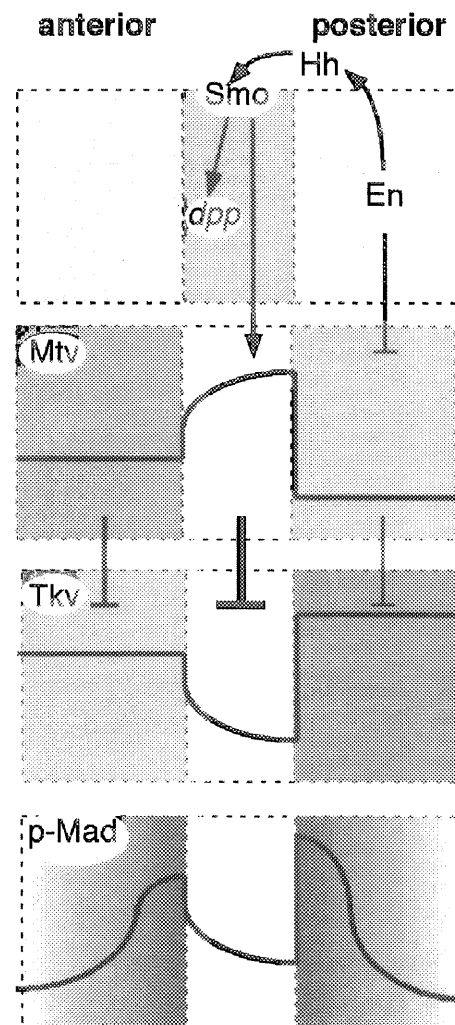


Fig. 2 パウチにおける *en* と *hh* による *mtv* の制御と *mtv* による *tkv* の制御の流れ (図中の実線は、それぞれの因子の量を表す。

より誘導されたものであるかどうか検討した。Hh の受容体である *smoothened (smo)* の変異クローン内部において *mtv* の転写レベルは低くなっており、また、*pka* の変異クローン、*cubitus interruptus (ci)* の異所的発現クローン内において *mtv* の転写レベルが上昇していたことより、*mtv* は Hh 情報により誘導されていることが示された。

次に、Hh 情報との遺伝学的な上下関係を調べるために、Hh 情報を抑制している *patched (ptc)* と *mtv* の二重変異体クローン内部での *tkv* の転写レベルを調べた。その結果、*mtv* の単独のクローンと同様に *tkv* の転写レベルの上昇が検出された。このことより、*mtv* は、Hh 情報を受けてコンパートメント境界部で高いレベルで誘導され、その領域において *tkv* をより強く抑制していることが明らかになった。

### 2.2 *mtv* を通した *en* による *tkv* の制御

*en* によって、後部コンパートメントにおいて *mtv* は抑制を受けており、逆に *tkv* はその転写活性が増強されていることがわかった。*en* と *mtv* の二重変異クローン内において、*tkv* は *mtv* 単独の変異クローンと同じように脱抑制を受けていたことから、*en* は *mtv* を抑制することによって *mtv* の *tkv* の抑制を解除していることが判明した。

以上より、*mtv* は、En と Hh 両方の情報による転写制御を受けて *tkv* の転写レベルを制御していることが判明した。すなわち、ショウジョウバエの翅パターン形成過程において、Dpp 情報活性の勾配は従来報告されていたような、単純拡散によるリガンドの量の勾配のみで形成されているのではなく、Dpp の転写を誘導する *en* や *hh* により、*mtv* による *tkv* の抑制を通じて詳細に制御を受けていることが明らかになった (Fig. 2)。

## 3. ショウジョウバエの翅パターン形成に関するその他の機能

*mtv* の変異体細胞クローンを誘導すると、Dpp 情報以外が関わっていると考えられる表現型も見いだされた。そこで、*mtv* による *tkv* 以外の遺伝子の制御について検討し、その他の機能についても考察した。

### 3.1 翅前後コンパートメント境界の保持

翅の前後軸は細胞系譜により前部、後部の二つのコンパートメントに分けられる。モルフオゲンである Dpp が正しくパターンを誘導するためには、Dpp の転写されている領域がコンパートメント境界に限定されている必要がある。そこで、以前からこの過程には前後コンパートメントの境界をまっすぐに保つ機構が重要であると考えられてきた。そして、この機構は、前後コンパートメント間における細胞の親和性の違いで説明されてきた。

本研究で着目されている *mtv* はその変異クローンが通常の体細胞クローンとは異なり、クローンの周囲がなめらかで、周囲の細胞との接触面積を少なくするような機構が働いていることが想像された (Fig. 3)。また、*mtv* のクローンは、パウチ領域にお

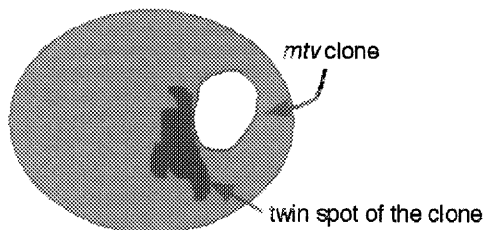


Fig. 3 *mtv* の変異クローンと twin spot の形の比較 (模式図)

いてどこに形成された場合でもクローンの周囲がなめらかであった。境界にまたがるように存在、あるいは、前後両方のコンパートメント由来のクローンがコンパートメント境界において融合した場合、そのクローン内部において、コンパートメント境界が直線にならず曲がったり野生型細胞集団における境界線とずれを生じたりしていた。境界における親和性の違いは Hh 情報の強度によることがすでに報告されており、*mtv* はコンパートメント境界において高いレベルで誘導されていることから、*mtv* がこの親和性の違いに関与している可能性が示唆された。

### 3.2 Hh 情報伝達系の制御

*mtv* 単独の変異クローン内部において Hh 情報伝達系の強度に顕著な低下は見られない。また、Hh 情報伝達系の因子である *fused (fu)* の変異体の成虫原基において Hh 情報の強度は低下するものの、大幅に下がるわけではない。しかし、*mtv* と *fu* の二重変異体クローンの内部、あるいは *fu* の変異をバックグラウンドとして持つ成虫原基に誘導した *mtv* のクローン内部で Hh 情報により誘導される遺伝子である *dpp* の転写活性がマーカー遺伝子の発現がほぼ検出されない程度に顕著に低下していた。これは、恐らく *mtv* が *fu* に平行な経路において Hh 情報伝達系の制御に関与していることを示唆している。

### 3.3 翅脈の形成

2 番の翅脈の位置情報の決定に、*kni* が *sal* により誘導を受けることが重要であることが報告されている。*mtv* の変異クローンの内部で *kni* の発現を調べたところ、*sal* の発現していない領域全面において発現が見られた。一方、野生型 *tkv* の異所的発現クローン内部では、*sal* の発現領域に隣接した領域のみでしか *kni* の異所的な発現が見られなかった。このことから、*mtv* には、*tkv* に非依存的な経路を通した *kni* の転写の制御があると考えられた。

また、翅脈の形成において EGFR 情報伝達系が重要な役割を果たしていることが示されている。蛹化前の成虫原基において、Dpp 情報と EGFR 情報伝達系との直接的な関わりはないが、その時期において *mtv* の変異クローン内部で EGFR 情報の強度を示唆する抗リン酸化 MAPK 抗体による染色強度が増強されていた。このことより、*mtv* は、*tkv* に非依存的に EGFR 情報伝達系に関わっている可能性が考えられた。

以上のことより、*mtv* は、*kni* や EGFR 情報伝達系を通した翅脈形成機構に関与していることが示唆された。

### まとめ・今後の展望

以上より、*mtv* は、*tkv* の転写制御の他、いくつかの情報伝達系路を通してショウジョウバエの翅パターン形成において重要な役割を果たしていることが判明した。今後はこのような *mtv* の多機能性を分子レベルで明らかにしてゆくことが必要である。