

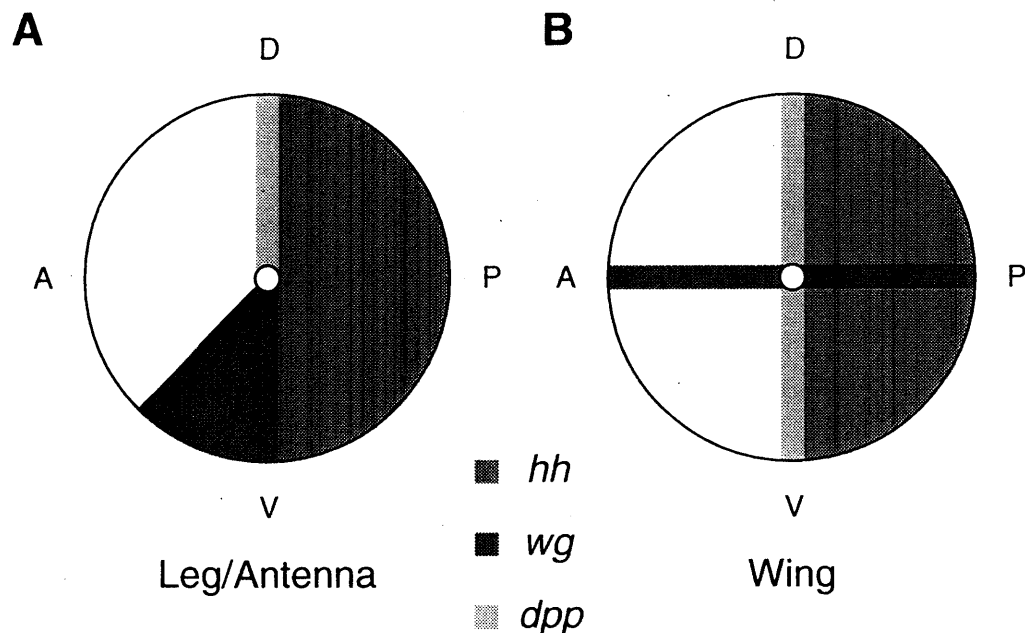
## 論文の内容の要旨

### ショウジョウバエにおける新規 Wg/Wnt 受容体遺伝子 *Dfrizzled-3* の単離と機能解析

佐藤 淳

ショウジョウバエは完全変態の節足動物であり、胚発生に始まり、幼虫期・蛹期に起きる成虫原基の分化及び形態形成を経て、成虫となる。成虫原基は、胚期に外胚葉から分化する一層の細胞群で、幼虫期において細胞分裂を繰り返すと共に位置情報の決定を行い、蛹期においては成虫の組織となるために更に細胞増殖及び形態形成を行い、幼虫の組織と入れ替わる。このような成虫原基の位置情報形成の核となる軸形成において、肢や触覚原基では、後部区画で *hedgehog (hh)* が発現し、前後部区画境界の前部側で *decapentaplegic (dpp)* の、腹側で *wingless (wg)* の発現を誘導し、*dpp* が *wg* を、*wg* が *dpp* を相互に抑制することで背側と腹側が決定される。さらに、*dpp* 及び *wg* の発現領域が接した位置を中心として第 3 の軸である遠近軸が形成される(要旨 Fig.1A)。また、翅原基においても、*hh*、*dpp*、*wg* により軸形成が行われ、位置情報が決定される(要旨 Fig.1B)。これら 3 つの遺伝子は、成虫原基だけでなく、胚発生や他の形態形成においても重要な働きを果たしていることが分かってきた。

*hh*、*dpp*、*wg* の機能を解析する上で、これらの遺伝子の下流で機能する遺伝子を探ることは不可欠である。*Hh*、*Dpp* 及び *Wg* の受容体をはじめ、シグナルを受容した細胞内でのシグナル伝達経路については、かなり解析が進んでいる(要旨 Fig.2 参照)。*Wg* シグナル伝達経路においては、*Porcupine* が *Wg* の分泌に関与し、*Dfrizzled-2 (Dfz2)* が *Wg* 受容体として機能する。*Dfz2* 以外にも、*Arrow (Arr)* というコレステロール受容体が必須であり、*Dally*、*Dally-like* といった膜結合型糖脂質も *Wg* の受容に関与していることが知られている。続いて *Dfz2* から細胞内の *Dishevelled (Dsh)* へとシグナルが伝達される。*Dsh* は *Wg* シグナルが伝達



要旨 Fig. 1 成虫原基における *hh*、*dpp*、*wg* の発現の模式図

A) 肢・触覚原基。 *hh* が後部区画で発現し、背側の *dpp* 及び腹側の *wg* の発現を誘導する。 *dpp* 及び *wg* の発現が接した領域を中心として遠近軸が形成される。 B) 翅原基。 後部区画に *hh* が、前後軸上に *dpp* が、背腹軸上に *wg* が発現する。 肢原基と同様、 *dpp* と *wg* の発現が接した領域を中心として遠近軸が形成される。

されると Casein kinase 等によりリン酸化され、活性化する。細胞質内には、DAXin と呼ばれるプラットフォームのような分子が存在し、Zeste-white 3 (Zw-3) / Shaggy (Sgg) と、Armadillo (Arm) が結合し、DAPC によりそれらの結合が安定化されている。DAXin に結合した Arm は、Zw-3 のキナーゼ活性によりリン酸化され、ユビキチン化酵素の修飾を受ける。細胞内の Arm は転写調節ではなく、このユビキチン化を経て分解されることで一定量に保たれている。Wg シグナルを受けて活性化した Dsh は Axin に結合し、Zw-3 と Arm の結合を阻害することで、Zw-3 による Arm のリン酸化を抑制する。リン酸化されていない Arm は細胞質中に集積する。細胞質中の Arm は Pangolin (Pan) / dTCF と結合し、核に移行して、転写因子として作用することが分かってきた。Hh の属する Hh ファミリーや Dpp の属する TGF- $\beta$  ファミリー、Wg の属する Wnt ファミリーなどの分泌タンパク質シグナル伝達経路は、線虫からショウジョウバエ、カエル、トリやヒトに至るまで進化的に高度に保存され、全ての生物で発生分化及び神経系形成を含む形態形成において非常に重要な働きをしていることが分かってきた。つまり、ショウジョウバエで得られた成果は、脊椎動物での Hh シグナルや TGF- $\beta$  シグナル、Wnt シグナルの機能を知る上でも重要な手がかりとなる。

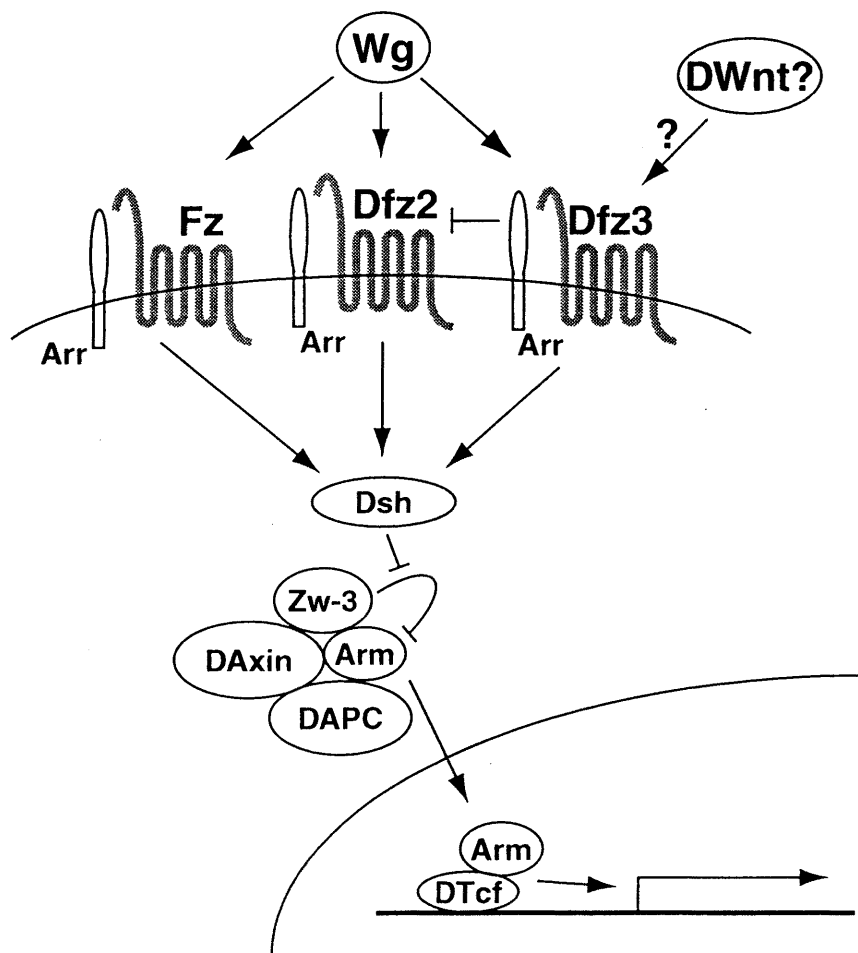
そこで、本研究では、複雑な Wg シグナルの下流構造をより明解にすることをめざし、*wg* と相同的に発現するエンハンサートラップライン J29 の解析を行った。J29 のマーカー遺伝子 *lacZ* の発現は、胚期においては *wg* 特異的な体節ごとの発現は見られなかったが、脳や腸、マルピーギ管では *wg* と同じ領域で発現していた。また、成虫原基においては *wg* より広い領域で相同な発現を示していた。J29 の P 因子挿入点近傍のゲノムを単離し、解析した結果、

新規の Fz ファミリーに属するタンパク質をコードする遺伝子 *Dfrizzled-3* (*Dfz3*) を同定した。*Dfz3* は、Fz ファミリーに特徴的なシステイン豊富領域 (CRD) 及び 7 回膜貫通領域、PDZ 結合モチーフを有していた。*wg* 変異体や異所発現系、Wg シグナル伝達経路の因子である Arm の構成的活性型の異所発現系を用いて、*Dfz3* の発現の制御を解析したところ、*Dfz2* が Wg シグナルによって転写が抑制されるのに対し、*Dfz3* の転写は逆に活性化された。このことは、*Dfz3* が今まで存在しなかった Wg シグナルの強度を推測する良いマーカーであると同時に、*Dfz2* と *Dfz3* という同じファミリーに属するタンパク質が相補的に発現していることを示しており、大変興味深いと思われた。また、内在的な *Dfz2* や *Dfz3* が発現していないことを確認した培養細胞 Schneider line 2 において、*Dfz2* もしくは *Dfz3* を発現させたところ、*Dfz3* は、*Dfz2* と同様に、Wg と直接結合できることが分かった。しかし、Wg シグナルの伝達能を Wg 依存的な Arm の安定化を指標にして測定した結果、*Dfz2* と比べ、*Dfz3* の Wg シグナル伝達能はかなり劣ると推測された。

エンハンサートラップラインから P 因子の再転移を行わせることにより、*Dfz3* の変異体を作製し、機能完全欠失変異体 *Dfz3<sup>G10</sup>* を単離した。*Dfz3* 変異体では、背中 of Dorso-Central bristle (DC bristle) の増加という表現型が見られた。DC bristle の形成には、Wg シグナルが必須であることから、*Dfz3* は Wg シグナル伝達系に関与すると考えられた。さらに *wg* 機能部分欠失変異体で見られる翅や触角が欠失するという表現型が、*Dfz3* と *wg* の二重変異体で顕著に rescue することが分かった。翅においては、*wg* 変異体では約 32% の翅で形質転換が見られたのに対し、*Dfz3* と *wg* の二重変異体では約 7% であった。触角においては、約 95% の触角が完全に欠失していたが、*Dfz3* と *wg* の二重変異体では約 13% が完全に、約 57% が部分的に rescue した。この二重変異体では、*wg* 変異体と比べ、*wg* の発現量は変化がまったく見られなかったにも関わらず、触角の形成にかかわる遺伝子である *dachshund* や *BarH1 / H2* の発現は約 10% の成虫原基で完全に、約 50% の成虫原基で部分的に rescue していた。また、これらの触覚原基において、Wg シグナルの制御を受けている *Dfz2* の発現に関しても rescue されたことから、*Dfz3* が Wg シグナルの伝達経路の過程で抑制的に機能すると考えられた。*Dfz3* の異所発現系を構築し、酵母の UAS-Gal4 システムを利用して様々な時期及び場所で *Dfz3* を異所発現させた。その結果、*Dfz3* の異所発現により DC bristle が減少するという表現型が見られ、やはり Wg シグナルを抑制する機能を持つと考えられた。しかし、翅原基において、Wg シグナルにより活性化される *Distal-less* 遺伝子の発現がわずかながら誘導された。このことは、*Dfz3* が Wg シグナルを活性化する機能も持っていることを示している。以上の結果から、*Dfz3* は Wg シグナルを正にも負にも制御する機能を持つ調節受容体であると推測された。

*Dfz3* の Wg シグナルに対する機能をより詳しく解析する上で、Wg の受容体である *Dfz2* の変異体が必要であると考えた。しかし、実験を開始した当初、*Dfz2* 変異体は存在しなかったことから、*Dfz2* 変異体を単離することを試みた。ショウジョウバエではエンハンサートラップラインのライブラリーがデータベース化され、公表されているため、*Dfz2* 領域に P 因子が挿入している系統を選び発現を調べた結果、*Dfz2* と似た発現パターンを示す P0013 系統を得た。P0013 系統の P 因子挿入点近傍のゲノム領域を解析した結果、P 因子が *Dfz2* の intron

内に挿入していることが分かり、P0013 系統が *Dfz2* のトラップラインであることを確かめた。そこで、P 因子の再転移により突然変異体を作製した。*Dfz2* の発現およびゲノム構造を解析した結果、機能完全欠失変異体 *Dfz2<sup>a28</sup>* が得られた。不妊であるという従来の報告と異なり、*Dfz2<sup>a28</sup>* 変異体はホモ接合体で妊性があり、顕著な形態的表現型は見られなかった。このことは、従来 *fz* と *Dfz2* が redundant に機能しているという考えを裏付けた。しかし、野生型の *fz* を持つ *wg* 機能部分欠失変異体には致死性は無いが、*Dfz2* 変異体との二重変異体により致死となったことから、Fz と *Dfz2* は互いに redundant に機能しているのではないという可能性が生じてきた。また、*fz* もしくは *Dfz2* 変異体と *Dfz3* 変異体の二重変異体を作製した結果、*Dfz2* と *Dfz3* では表現型は見られず、*fz* と *Dfz3* では、*fz* の極性変異のみが観察された。さらに、Wg と Fz ファミリーの結合定数を求めた実験から、*Dfz2* が Fz や *Dfz3* に比べ、約 10 倍 Wg に結合しやすく、Fz と *Dfz3* は同程度の結合能力を持っていた。以上の結果より、Wg シグナルにおいて、*Dfz2* が主要な受容体として、Fz は正のみの補助受容体として、*Dfz3* は正及び負の調節受容体として機能していると推測された(要旨 Fig.2)。



要旨 Fig. 2 Wg シグナル伝達経路

Wg シグナル伝達経路において、*Dfz2* が主要な受容体として、Fz が正のみの補助受容体として、*Dfz3* が正及び負の調節受容体として機能していると考えられた。