

論文内容の要旨

論文題目 Dpp モルフォゲンの作用調節機構

氏名 谷本 拓

1. 序論

発生過程に見られる均一な細胞集団から特定の構造が形成される機構はパターン形成と呼ばれており、発生生物学の中心的課題である。本研究ではショウジョウバエ翅の前後軸をモデルとし、オーガナイザーによるパターン形成機構を明らかにすることを目的とした。翅の前後軸は、細胞系譜により、前部と後部の二つのコンパートメントに分けられる。翅中央部分（前後コンパートメントの境界領域）はオーガナイザー活性を持つことが明らかになっており、その分子実態は、TGF- β スーパーファミリーに属する Dpp (Decapentaplegic) による位置情報勾配である。前後コンパートメントの境界領域におけるストライプ状の dpp 遺伝子の発現は、後部コンパートメント特異的に分泌され、そこから拡散するもう一つのモルフォゲンである Hh の作用によって誘導される。

Dpp はこの細胞から分泌され拡散し、翅全体にわたって濃度勾配を形成する。このことで Dpp はコンパートメント境界領域からの位置情報を周囲の細胞に供給していると考えられていた。Dpp がモルフォゲンとして働いているという知見は、内在性の Dpp タンパク質の濃度勾配を視覚化する手段がなかったため、

ターゲット遺伝子の発現パターンの観察から得られた。また、周囲の細胞がどのように Dpp の濃度を核に伝え、遺伝子発現を誘導しているかは明らかにされていなかった。

本研究はショウジョウバエ翅において長距離モルフォゲンとして働く Dpp の組織内における活性勾配を初めて視覚化することに成功し、モルフォゲンの読みとりはリガンドの濃度に従った単純な勾配ではないことを見出した。さらに、Dpp の活性勾配は Dpp 受容体である *tkv* (*thick veins*) の発現レベルに密接に関係していることを明らかにした。

2. リン酸化された Mad の検出による Dpp シグナルの相対活性の視覚化

TGF- β ファミリーのシグナル伝達では、R-Smad と総称される細胞質に存在するタンパク質が活性化されて核移行し、ターゲット遺伝子の発現を調節する。ショウジョウバエでは、Dpp シグナルに応答して働く R-Smad として Mad が同定されている。R-Smad は最も C 末端に Ser-Ser-X-Ser というモチーフを持ち、活性化 type I 受容体によって直接リン酸化される。従って、リン酸化された R-Smad の量は受容体に結合した Dpp シグナルの量を直接反映するものである。この性質に着目し、受容体によってリン酸化された Mad タンパク質を検出することで、Dpp シグナルの強度を視覚化することを試みた。Persson らは、ヒトの Smad1, Smad5 の、リン酸化された C 末端に相当する合成ペプチド(SSVS)をエピトープとして、これに対する抗体(PS1)を作成した。この部分の配列は、ショウジョウバエの相同遺伝子である Mad のものと同じであるため、PS1 が、生体内において type I 受容体にリン酸化された Mad と交差するかどうかについて検討した。

Mad タンパク質は一様に発現していることが知られているが、培養細胞、生体内の両方において、Dpp シグナルの強度依存的に PS1 の交差が観察された。これらの結果から、PS1 はリン酸化 Mad を特異的に認識し、このシグナルは Dpp シグナルの強度の指標となることがわかった。

3. 翅成虫原基における Dpp モルフォゲンの活性勾配

次に、この抗体を用いて、翅成虫原基における Dpp シグナルの相対強度を組織染色によって視覚化した。実際、各成虫原基において、Dpp の活性勾配は

予想されていた通り *dpp* の発現部位を中心として勾配を描いていることが分かった。翅においては *dpp* 発現部位付近では急な勾配を描き、発現部位より離れるに従い緩やかな勾配を形成していることを見出した。これは周囲の細胞が Dpp シグナルを勾配として読みとっていることを直接的に示した初めての例である。

4. Hh による Dpp シグナルの負の制御

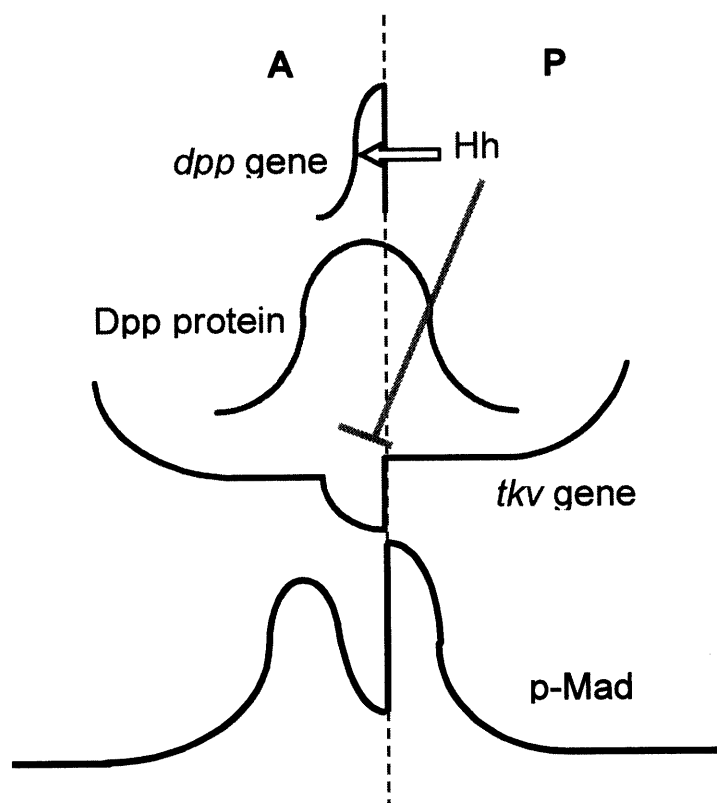
リン酸化 Mad のパターンを解析すると、翅成虫原基においてリン酸化 Mad の量は必ずしもリガンドの濃度に依存していないことに気づいた。驚いたことに、Dpp タンパク質の濃度が最も高いと思われる前後コンパートメントの境界領域でリン酸化 Mad の量が低下しており、Dpp シグナルが弱められていることを見出した。ターゲット遺伝子の発現もこのリン酸化 Mad の低下を反映して、*dpp* 発現細胞で低下している。異所的に *dpp* を過剰発現させても、リン酸化 Mad のパターンには変化が見られないため、Dpp シグナルの負のフィードバック機構が働いているわけではないことがわかった。

dpp 遺伝子の発現は Hh によって誘導されるため、私たちは別のモルフォゲンである Hh が直接 Dpp シグナルに作用し、Dpp への反応性を低下させているのではないかと考え、これを遺伝学的に証明した。Hh シグナルの受容に必須な *smo* の変異クローンを作ることで Hh シグナルを遮断すると、細胞自律的にリン酸化 Mad とターゲット遺伝子の低下が回復した。このことは Hh が直接 Dpp シグナルへの応答を低下させていることを最もよく示した実験である。

5. Hh は Dpp 受容体 *tkv* の発現を低下させることで Dpp への応答を制限している

さらに、Hh によるリン酸化 Mad の低下の制御機構を明らかにするために、Dpp 受容体 *tkv* のエンハンサーラップシステムを同定し、様々な遺伝学的条件下での *tkv* の発現制御機構を精緻に解析した。これらの実験から Hh は直接 Dpp 受容体の発現量を制御し、Dpp 感受性を制限することでリン酸化 Mad の量を低下させていることを明らかにした。また、*tkv* の発現が低下している前後コンパートメントの境界領域で *tkv* を異所的に発現させ、Hh 依存的な Dpp シグナルの低下を解除したところ、翅全体のサイズが小さくなった。この表現型は、Dpp

が外来性の Tkv によって捕獲され、拡散が阻害されたためであると考えている。



6. 結論

このように、モルフォゲン Dpp の活性勾配を視覚化することによって、Dpp のシグナルの読みとりはリガンドの濃度に依存した単純な bell-shape ではなく、複雑な制御を受けていることが分かった。さらに、Dpp の活性は受容体 *tkv* の発現レベルに大きく依存するという結論を得た。*tkv* の発現は Hh と Dpp という少なくとも二つのシグナルからの制御を受けていることがわかり、これにより独立して働くと考えられていた二つのモルフォゲンが協調して作用するという、新たなパターン形成のメカニズムを理解できたと考えている。