

論文の内容の要旨

論文題目

ショウジョウバエの肢の中央領域のパターン形成における Hedgehog の機能とその抑制因子 Pxb の同定

氏名 稲木（菊池）美紀子

hedgehog(hh) 遺伝子群は脊椎動物や無脊椎動物の器官形成過程において最も重要な遺伝子群の一つである。ショウジョウバエの成虫器官は幼虫期に形成される成虫原基と呼ばれる上皮組織から分化する。成虫原基は、ジンクフィンガー蛋白質をコードする *cubitus interruptus(ci)* 遺伝子を発現する前部区画と、一対のホメオボックス遺伝子 *engrailed(en)/invected(inv)* を発現する後部区画に二分化される。分泌蛋白質である Hh は後部区画で発現し分泌され、前部区画で *decapentaplegic(dpp)* や *wingless(wg)*、*patched(ptc)*、*en* などの遺伝子の発現制御を行う。翅原基や肢原基において Hh は *dpp* や *wg* の発現を誘導し、分泌蛋白質である Dpp や Wg がモルフォゲンとして働き、前部及び後部区画全体の運命決定を行い、Hh の long range の機能を担っている。近年、翅において Hh は long range の機能の他に Dpp とは独立に、直接、翅の中央領域（前後境界領域）を決める short range の機能を持つことが報告されている。3 齢幼虫中期以降の翅原基では前後境界領域で *en* や COE 転写因子をコードする *collier* 遺伝子が Hh により誘導され、それらが翅における Hh の short range の機能を媒体していることが示されている。この Hh の short range の機能については他の系ではほとんど解析されていない。

私は *hh* の温度感受性変異体 *hh^{9k}* を許容温度で飼育すると翅において中央領域のみがなくなる Hh の short range の機能が欠失したような表現型を示すことをみいだした。このハエを詳細に解析したところ肢においても先端節の腹側の hair や背側の先端の bristle といった中央領域の構造物が欠失していることがわかった。また、最高レベルの Hh シグナルのみを伝達すると言われている、serine-threonine キナーゼをコードする *fused(fu)* 遺伝子の変異体 *fu¹* のホモ接合体においても同様に中央領域の構造物が欠失する表現型がみられた。これらのことから肢の中央領域のパターン形成には最高レベルの Hh シグナルが必要であることがわかった。私はこの Hh の機能に関わる新規遺伝子を得るため、エンハンサートラップシステムのスクリーニングを行い、肢原基の前後境界領域で特異的に発現制御される遺伝子を探索した。その結果、L71 及び PXb41 という 2 系統が得られた。L71 においてリポーター遺伝子 *lacZ* は 3 齢幼虫初期の肢原基では発現はみられないが、3 齢幼虫後期以降では前後境界に沿った帯状の発現を示し、その発現領域は Ptc の強い発現の領域とほぼ重なっていた。PXb41 において *lacZ* は肢原基の前部区画特異的に発現し、3 齢幼虫中期以降は前後境界に沿って Ptc の強い発現の領域で発現が消失していた。L71-*lacZ* の発現は許容温度で飼育した *hh^{9k}* や *fu¹* の肢原基では消失していたことから最高レベルの Hh シグナルにより正に制御されていることがわかった。同様にして PXb41-*lacZ* の発現は最高レベルの Hh シグナルにより負に制御されていることを確かめた。

L71 においては *en/inv* 領域の *inv* 遺伝子の第 2 イントロンに P 因子が挿入していたことから *en/inv* の前部区画の発現のエンハンサーをトラップしていると考えられた。*en* は翅原基では 3 齢幼虫中期以降に前部区画にも発現してくるといわれているが、L71-*lacZ* の発現は肢原基においても *en* が前部区画で発現することを示唆しており、実際、幼虫期ではみられなかったが蛹期の肢原基では En が前部区画にも発現することが確かめられた。これらの結果は肢においても short range の Hh の下流で *en* が機能している可能性を示唆している。

PXb41 において P 因子は新規遺伝子 *pxb* の上流に挿入していた。Pxb 蛋白質は疎水性アミノ酸残基に富む領域を一ヶ所持つため膜貫通型蛋白質であると推察された。細胞内領域とおもわれる領域には prolin に富む領域を、細胞外領域とおもわれる領域には histidine に富む領域や糖鎖の付加部位が多数みら

れたが既知の蛋白質との相同性はみいだされなかった。*pxb* の機能を調べるため P 因子の再転移法により遺伝子欠失変異体の作製を試み、第 1 エクソンを含む領域を欠失する null 変異体と考えられる系統、*pxb*³⁷⁻² を得た。*pxb*³⁷⁻² のホモ接合体は致死性及び不妊性は正常であり、成虫肢に異常はみられなかった。そこで、Gal4-UAS システムを用いて強制発現による機能解析を行った。*pxb* を Hh により抑えられている前後境界領域で過剰発現させると肢の先端節の腹側の hair の数が減少し許容温度で飼育した *hh*^{9k} と類似した表現型を示した。このことから、Hh による *pxb* の発現の抑制が肢の中央領域の構造物の形成に必須であることが示された。また *pxb* は翅原基ではほとんど発現はみられないが、翅原基の前後境界領域で異所的に発現させると、その領域に由来する成虫の scutellum においても scutellar bristle の数の減少という *hh*^{9k} と類似した表現型を示した。これらの結果から Pxb は異なる二つの組織で Hh シグナルの減衰因子として機能することが示され、肢ではその発現を Hh が抑制することで肢の中央領域のパターン形成を行っていることが示唆された。

肢原基の前後境界領域においては *dpp* 及び *wg* も Hh により発現制御されている。それらの関与についても解析を行った。前後境界領域においてそれらは高レベルに発現していると考えられ、また、*dpp* 及び *wg* の強い変異体では肢の複製や先端領域の消失が起きてしまうため、*dpp* 及び *wg* ついても弱い変異体を観察する必要がある。そこで RNAi 法を用いてこれらの弱い変異体を作製した。RNAi 法を用いた *dpp* の変異体では翅の翅脈の、*wg* の変異体では翅の縁の消失がみられ、また両方において低頻度ながら肢の最先端にある爪の消失がみられたことから RNAi により Dpp 及び Wg の活性が低下していることが確かめられた。この *dpp* の変異体では背側の bristle の消失はみられなかったが、*wg* の変異体では腹側の hair の消失がみられた。これらの結果から肢の中央領域の腹側では Hh の下流で Wg が hair の形成に関して正に働いていることがわかった。Dpp については翅と同様に肢の中央領域のパターン形成には関与していないと考えられた。

Hh による *pxb* の制御をさらに詳細に解析するためモザイク解析を行った。Hh の受容体で Hh シグナルに拮抗して働く *ptc* の変異体のクローンでは細胞自立的に *pxb* の発現の抑制がみられた。また、Hh の下流で働く転写因子の Ci の活性化型を発現するクローンでも細胞自立的に *pxb* の発現の抑制がみられた。翅原基では Hh により *en* が前部区画で誘導され、En は様々な系で転写抑

制因子として働くことが知られている。そこで *pxb* の抑制にも *En* が機能しているかを調べた。前部区画にできた *ptc en* の二重変異体のクローンでは *ptc* の変異体のクローンと同様に *pxb* の発現が消失したため、*Hh* による *pxb* の抑制は *en* に非依存的であることがわかった。後部区画にできた *ptc en* の二重変異体のクローンの細胞は異所的に *pxb* を発現したため、後部区画の細胞では *pxb* の発現は *En* により抑制されていることがわかった。*Hh* により発現が誘導される *Wg* のシグナルの関与についても解析を行った。*Wg* の下流で正に働く *Armadillo* の活性化型を発現するクローンでは *pxb* の発現に変化がみられなかったことから、*Hh* による *wg* と *pxb* の制御は独立に行われていることがわかった。

以上の結果から最高レベルの *Hh* シグナルが肢の中央領域の正常なパターン形成に必要であり、最高レベルの *Hh* シグナルはその抑制因子として働く *pxb* の発現を抑制し、また、中央領域のパターン形成に正に働く *wg* の発現を誘導することで二重にその領域を決めていることが示された。