

## 論文の内容の要旨

論文題目 ショウジョウバエ内臓性中胚葉パラセグメントの細分化とその胚葉分化における役割

氏名 細野千恵

高等生物の組織は周期的な単位（セグメント）から構成される。セグメントのパターン形成はショウジョウバエの表皮において詳細に解析されてきた。本研究ではショウジョウバエの内臓性中胚葉（trunk visceral mesoderm : VM）をモデルとして、その周期単位（VM-prasegment : VMパラセグメント）の細分化とその役割を解析した。

ショウジョウバエのVMは外側を覆う外胚葉と内側に位置する内胚葉に挟まれている。このためVMの形態形成の研究は、外胚葉での解析では得られなかった胚葉間の相互作用に関する知見をもたらす。実際、外胚葉からの分泌シグナルがVMの形成と分化を制御し、VMからのシグナルは内胚葉の形態形成を制御することが知られている。

中胚葉は、胚発生の初期に胚の腹側の細胞が陥入してできる。この時期、中胚葉で分節化遺伝子が外胚葉のパラセグメント(ectodermal parasegment)に対応した周期(mesodermal parasegment : 中胚葉パラセグメント)で発現し、中胚葉を分節化する。さらに外胚葉の内側に沿って背側に広がる時に、外胚葉

由来の Decapentaplegic (Dpp), Wingless (Wg), Hedgehog (Hh) などの分泌シグナルとともに、中胚葉パラセグメントの領域化がおこる。その結果、1つの中胚葉パラセグメントは4つの領域に区画化され、VM、心臓、体壁中胚葉、脂肪体の原基が特定される。

VM の原基は各中胚葉パラセグメントの背側前方領域に周期的に決定される。各原基は胚の内部に陥入しながら後方に広がり、隣同士と融合する。こうしてできた帯状のVMからは、後に中腸の外側を覆う筋肉が造られる。

原基の融合直後のVMでは、細胞接着分子 Connectin (Con) が外胚葉のパラセグメントに対応した周期で発現することが知られている。VMパラセグメントはこのConの発現によって少なくとも2つのドメインに分けられ、この領域化に外胚葉由来の Hedgehog (Hh) 及び Wingless (Wg) が関与することが知られている。

本研究でまず私は、我々の研究室で *hh* もまた VM で周期的に発現することが見いだされたことに端を発し、既に知られている周期的な発現遺伝子 (*con*, *tinman*, *bagpipe*, *branchless*) との位置関係を詳細に調べた。その結果、これら周期遺伝子の発現の違いから VM-パラセグメントは胸側で5個、腹側で6個の小領域に細分されることを見出した。各 VM-パラセグメントの前側で *hh* 及び *con* が発現する。*branchless (bnl)/tinman/bagpipe* は VM-パラセグメントの前側と後側の同じ領域で発現していた。すなわち1つの発現パッチは VM パラセグメント境界をまたいでいることになる。

次にこれら遺伝子発現上で見られる VM パラセグメント内の細胞分化がどのようにして起こるかを検討した。VM の発生は、VM 原基の決定と VM パラセグメントの細分化の2段階で起こり、それぞれに外胚葉から分泌された Hh と Wg が働くであろうと提唱されている。すなわち、VM の原基の形成は Hh によって促進され、Wg によって抑えられる。次に、VM での Con の発現が Hh によって正に、Wg によって負に制御される。

私は、*hh* 及び *wg* の温度感受性変異体を用いて VM の原基の形成に必要な時期 (stage 10 以前) と VM 周期遺伝子の発現制御に必要な時期 (stage 10~11) を明確に分離した。stage 10 以前のそれぞれの活性をなくした場合、VM の細胞の形成において影響が見られるが、VM 周期遺伝子は発現する。一方、stage 10 以降の活性をなくした場合、VM の細胞数で見た限り、VM の原基の

形成は正常だが、VM 周期遺伝子の発現は変化する。

*hh* 及び *wg* の欠失変異体及び異所発現における VM 周期的遺伝子の発現変化を調べたところ、それぞれの温度感受性変異体を用いた実験と一致する結果が得られた。すなわち、VM 周期的遺伝子の発現の initiation は外胚葉由来の Hh 及び Wg シグナルの、遺伝子毎に異なる効果に依拠していることが分かった。VM での *hh* の発現は Hh と Wg を必要とする。一方、*bnl/tinman/bagpipe* の発現は Wg のみを必要とした。*hh* と *wg* の発現は胚発生の一時期、互いに依存し合うことが知られている。私は、*hh* 欠失変異体において *wg* を異所発現させる及び、その逆の実験を行い、VM 周期的遺伝子の発現制御に *hh* と *wg* が独立に働くことを確認した。

stage 10~11 にかけての時期は、VM の原基が胚の内部には入り込みながら後方に広がる時期に相当する。この時期、*hh* と *wg* の VM での発現は見られないが、VM 原基の真上に位置する外胚葉層のパラセグメント境界で双方は発現している。したがって、VM 周期遺伝子は stage 10~11 の外胚葉由来の分泌シグナルによって以下の通りに発現制御を受けると説明できる。

VM での *hh* は、外胚葉から分泌された Hh と Wg の両方のシグナルを受けとる VM パラセグメントの前側で発現する。*bnl/tinman/bagpipe* は VM のパラセグメントの前側と後側で発現するが、それらの発現は外胚葉のパラセグメント境界で隣接して発現している Wg によって連続的に誘導を受ける。後側の *bnl/tinman/bagpipe* の発現領域は、初め Wg の分泌領域から離れているが、VM 原基が移動してから隣りの Wg によって制御される。stage 10~11 の前半の Wg の活性をなくすと後側のみでそれらの発現が見られ、後半の活性をなくすと前側のみで発現が観察された。

VM では、表皮の毛 (denticle) のパターンのような明確な構造的特徴は見られないため、周期パターンの生物学的な機能について、これまでのところ不明であった。私は *bnl* と *hh* の役割に関してその一端を明らかにした。

*bnl* は FGF ホモログをコードし、気管細胞の chemoattractant であると考えられている。しかし VM に向かって伸びる一部の気管 (visceral branch) に関して、*bnl* が実際に chemoattractant として働くかどうかの詳しい解析はなかった。私は、幾つかの条件下で VM の *bnl* の発現領域を変化させ、visceral branch の伸長がその変化に対応するか調べた。その結果、VM での

*bnl*の発現領域が visceral branch の伸長方向を規定することが分かった。

*patched (ptc)* は、*hh* シグナルのターゲット遺伝子である。VM で *hh* と相同なパターンで誘発されることは VM での *hh* が機能していることを強く示唆する。実際に VM で *ptc* は、*hh* が発現したしばらく後にほぼ同じ領域で誘発されていた。VM で *hh* が発現する時期の *hh* の活性をなくした場合、*ptc* の発現も見られなかった。*hh* と *con* は発生後期まで周期的な発現が維持されている。*ptc* と同様な実験を行ったところ *hh* と *con* の発現の維持にも VM の *hh* が必須なことが明らかとなった。また VM の *hh* の発現には、それ自身の活性をより長い時間必要としていた。

現在のところ、これら *hh* と *con* の発生後期まで見られる周期的な発現が実際に何をしているかは不明である。しかし発生後期中腸を解析している途中で *hh* が胃嚢 (gastric caecum) の発生にも関与することが分かった。gastric caecum は中腸の前端にある突起物である。gastric caecum の原基は VM の一部 (VM-PS3) とその内側の内胚葉を含む領域からできる。左右の背側と腹側に1つずつ、計4本のチューブ状の構造物が胚発生の最終期 (stage 17) に伸長して現れる。VM で *hh* が発現する時期の *hh* の活性をなくしたところ、stage 17の胚において gastric caecum はなくなっていた。また *hh* シグナルの下流で働く *cubitus interruptus (ci)* の抑制化型を中胚葉全体で異所発現させた場合、外胚葉の *hh* は変わらないが VM での *hh* の発現はなくなる。この条件下でも、同様に gastric caecum は欠失していた。VM の *hh* は VM-PS3 の前側で発現していることから、gastric caecum の形成に VM で発現する *hh* が関与することが強く示唆された。

以上の解析より、私は VM の細分化について以下のことを明らかにした。

VM は連続した外胚葉からの位置情報に基づいて創られる。初めに Hh、Wg 等の分泌シグナルによって中胚葉は分割化され、その一部から VM の原基が決定される。さらに VM の原基は Hh 及び Wg の影響を受ける。その結果、Hh 及び Wg の異なる制御機構の組み合わせによって VM のパラセグメントは5-6個の領域に細分化される。外胚葉の情報を基にして創られた VM の周期的なパターンの一部は VM 自身の制御機構を介して発生後期まで維持される。また外胚葉 (気管細胞) 及び内胚葉 (gastric caecum) のパターン形成にも関わるということが分かった。