

## 論文の内容の要旨

論文題目 *Lim1* の機能解析を中心としたショウジョウバエ成虫肢における  
領域の決定機構の解析

氏名 辻 拓也

多細胞生物の発生過程における基本的なメカニズムの一つは、最初均一であった細胞集団が、モルフォゲンと呼ばれる分泌性因子の濃度又は活性に依存して領域特異的に転写因子を発現することにより性質の異なる領域に分割されることである。ショウジョウバエの成虫肢は遠近軸に沿って根元側から基節、転節、腿節、脛節、第1～5付節、先付節と呼ばれる節から構成されている。この成虫肢は単層の細胞からなる肢原基から生じる。肢原基の中心領域は成虫肢の先端部分に対応し、より周辺の領域は成虫肢のより根元側の部分に対応している。よって成虫肢の遠近軸に沿ったパターン形成に関わる遺伝子の多くは肢原基上では同心円状に異なる領域で発現している。成虫肢の最も先端の節である爪の存在する先付節に対応する領域ではホメオボックス遺伝子である *aristalless(al)* が、そのすぐ根元側の付節に対応する領域には同じくホメオボックス遺伝子である *BarH1/BarH2(Bar)* が発現し、これらの節の決定に関わっている。*al* と *Bar* の発現領域は、発現初期の頃には一部重なり合う部分があるが、後になると厳密に分かれる。この厳密な領域分割には *al* と *Bar* の相互発現抑制が必要であることが当研究室のこれまでの解析によりわかってきた。このことから、モルフォゲンによっておおまかに領域が決定され、その後、転写因子同士の相互作用によって領域が厳密に決定されると考えられる。

本研究では、この厳密な領域分割に関与する新たな遺伝子の解析を目的として、レポーター遺伝子の発現が *al* と非常によく似ているエンハンサートラップ系統 P0092 の解析を行った。P0092 の P 因子挿入点近傍のゲノムを単離し、解析した結果、P0092 は脊椎動物

の *Lim1* と非常に高い相同性をもつ LIM-ホメオボックス遺伝子をトラップしていた。アフリカツメガエル胚での mRNA インジェクションによる解析において、このショウジョウバエの *Lim1* は、脊椎動物の *Lim1* と同様に、LIM-ホメオドメインタンパク質のコファクター *Ldb1* 依存的に二次軸を誘導することができた。このことより、ショウジョウバエの *Lim1* と脊椎動物の *Lim1* では、アミノ酸配列だけでなく、その機能もまた保存されていることが明らかとなった。P0092 から P 因子の再転移により、*Lim1* の機能完全欠失変異体 *Lim1<sup>7B2</sup>* を単離した。*Lim1* 変異体は蛹期致死であり、口器、肢、触角の形態に異常がみられた。肢の先端部分では、*al* の強い変異体では先付節の構造が完全に失われるのに対し、*Lim1* の変異体では先付節の構造の一部のみが欠失していた。この *Lim1* の変異体の表現型は *al* の弱い変異体の表現型とよく似ている。次に肢原基での解析を行った。*Lim1* は *al* や *Bar* よりも遅れて発現し始め、発現開始時からすでに *Bar* の発現領域とは重なる部分はなかった。*al* を強制発現させたところ、*Lim1* の発現に変化はみられなかったが、*al* 変異体では *Lim1* の発現は完全に失われた。しかし、このとき同時に *Bar* の発現が先付節でおこっており、さらに *Bar* を強制発現させると *Lim1* の発現が非常に強く抑制されたことから、*al* 変異体で *Lim1* の発現が失われるのは異所的に発現した *Bar* による二次的な効果であると考えられた。また、*Lim1* を強制発現させると *al* の発現が誘導され、*Lim1* 変異体を用いたモザイク解析では *Lim1* 変異体の細胞で *al* の発現レベルが下がった。これらのことより *Lim1* は *al* の正常レベルの発現に必要なことがわかった。*Lim1* 変異体でも *Lim1* を強制発現させても *Bar* の発現に変化がみられなかったことから *Lim1* は *Bar* の発現抑制には直接的には関係ないことがわかった。また *Lim1* の異所発現では *al* の発現が誘導されるにもかかわらず、*Bar* の発現が抑制されないことから、*Lim1* と *al* だけでは *Bar* の発現抑制には不十分であることも示唆された。

*Lim1* 変異体および *al* の弱い変異体単独では付節-先付節間の境界はほとんど正常であったが、これらの二重変異体では、この境界が顕著に乱れた。また、細胞間接着因子 *Fasciclin2(Fas2)* が *al* 発現領域内の *Bar* 発現領域に接する一列の細胞で発現しており、*Bar* によって発現が正に制御されているのだが、*Lim1* 変異体と *al* の弱い変異体の二重変異体ではこの発現が著しく減少した。これらのことより *Lim1* と *al* は *Fas2* の発現、及び付節-先付節境界の確立に必要なことが明らかになった。

また *Lim1* はより根元側の脛節、腿節、基節に対応する領域でも発現している。*Lim1* 変異体では基節の大部分が失われ、腿節の大きさが減少した。*al* もこれらの領域で発現しており、*Lim1* 変異体では *al* の腿節、基節の発現が欠失し、脛節の発現が減少することから、これらの場所でも *Lim1* は *al* の正常な発現に必要なことが明らかになった。しかし、*al* 変異体では脛節、腿節、基節は正常なので、*Lim1* は *al* 以外の別の遺伝子の発現制

御を介してこれらの節の発生を制御していると思われる。

背側の腿節領域には弦音器官(chordotonal organ)と呼ばれる感覚器官が存在する。弦音器官は表皮上にある proneural cluster 内の細胞が下に落ち込み SOP(sensory organ precursor)を形成し、SOP が proneural cluster 内の細胞をさらに次々と SOP へとリクルートすることにより形成される。*Lim1* はこの SOP において発現がみられた。弦音器官の proneural gene である *atonal(ato)* は SOP 及び proneural cluster で発現しているが、*Lim1* 変異体では SOP での *ato* の発現は正常であるが、proneural cluster での *ato* の発現は失われた。このことから、*Lim1* は SOP が proneural cluster 内の細胞を SOP へとリクルートするためのシグナルの制御に関わっていることが示唆された。

上記の研究と並行して当研究室で行われていた研究により、先付節-付節の領域決定の過程にはホメオボックス遺伝子 *clawless(cll)* がさらに必要とされることが明らかになった。*cll* は先付節領域において *al* と同様に発現し *al* とともに *Bar* の発現を抑制している。これらの一連の研究により、初期に *al*、*cll*、*Bar* が相互作用することによってそれぞれの発現領域が決められ、後期に *al*、*cll*、*Bar*、*Lim1* が初期とは違った様式で相互作用することによってそれぞれの発現領域が維持されるという二段階の制御機構が働いているということがわかってきている。本研究ではさらにこのような制御機構が実際に分子レベルでどのように働いているのかを解明するために、*al* 及び *cll* のエンハンサー領域の探索及び解析を行った。それぞれのゲノム領域を断片化し、各断片をレポーター遺伝子 *lacZ* につないだものをもつ形質転換体を作製し *lacZ* の発現を調べた。*al* については、転写開始部位の上流領域に存在する 6.1kb の断片に肢原基でのエンハンサー活性があり、このうち 0.5kb の断片には初期の、残りの 5.6kb の断片には後期の発現を制御する活性があった。*cll* については転写開始部位の上流領域に存在する 6.8kb の断片に後期の発現を制御する活性があり、終止コドンの下流領域に存在する 2.1kb の断片に初期の発現を制御する活性があった。このように初期エンハンサーと後期エンハンサーが別々に分かれて存在することは、上で述べた二段階の制御機構という考え方とよく一致している。

従来、成虫肢の遠近軸は前後区画境界背側から分泌される Decapentaplegic(Dpp)と、前後区画境界腹側から分泌される Wingless(Wg)が濃度依存的に協調作用することにより形成されると考えられてきたが、最近、付節及び先付節に関しては中心から分泌される EGFR のリガンドの濃度依存的な作用によって遠近軸の形成がおこる、すなわち *al* や *Bar* などの遺伝子の発現誘導がおこるとということが報告された。しかしながら、Dpp、Wg のシグナルレベルが下がるクローンをつくると、細胞自律的に *al* や *Bar* の発現が変化するので、Dpp、Wg シグナルが EGFR シグナルとは独立に *al* や *Bar* の発現を制御しているということが示唆された。そこで実際にこれらシグナルが働いているのか、また、どのよう

に働いているのかを調べるために、Dpp、Wg、EGFR シグナルの下流転写因子である Mad・Brk、dTCF、Pnt・Yan が *al* の初期エンハンサーに結合するかどうかを DNaseI フットプリント法により調べた。その結果、それぞれ数カ所ずつに結合することがわかった。これらの結合部位が生体内で実際に機能しているのかどうかを調べるため、これらの結合部位に変異を導入した断片のエンハンサー活性を調べた。その結果、少なくとも Brk 結合部位一カ所と Pnt・Yan 結合部位一カ所に関しては実際に機能していることが明らかになった。