

# 論文審査の結果の要旨

氏名 辻 拓 也

本論文は2章からなり、第1章は、LIM-ホメオボックス遺伝子 *Lim1* のショウジョウバエ成虫肢形成における機能の解析、第2章はショウジョウバエ成虫肢の遠近軸形成に関わる遺伝子 *aristless* 及び *clawless* のエンハンサー領域の解析について述べられている。

ショウジョウバエの成虫肢は遠近軸に沿って分節化されており、最も先端の先附節領域ではホメオボックス遺伝子 *aristless(al)* が、そのすぐ根元側の附節領域ではホメオボックス遺伝子 *BarH1/BarH2* (*BarH1* と *BarH2* は機能的に冗長なので以下まとめて *Bar* とする) 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、発現初期には重なり合う部分があるが後期になると厳密に分かれる。この厳密な領域分割には当初 *al* と *Bar* の相互発現抑制だけによると考えられた。実際、*Bar* は *al* の発現抑制に必要十分であることがモザイク解析と異所発現実験で示された。しかし *al* は *Bar* の発現抑制に必要であるが十分でないことが分った。このことは *al* とともに *Bar* の発現抑制に関わる他の因子の存在を示唆している。そこで本研究では候補をエンハンサートラップ法を用いて探索した。その結果 *al* の発現パターンとよく似たレポーター遺伝子発現を示すエンハンサートラップ系統 P0092 を見出し、また別の探索で *al* 変異体と同様に先付節の構造が失われる変異の原因遺伝子 *clawless(cld)* を見出した。第1章では前者の解析に主な焦点を当てている。まず、P0092 系統が脊椎動物の *Lim1* と高い相同性をもつ LIM-ホメオボックス遺伝子をトラップしていることを示した。他のグループとの共同研究でアフリカツメガエル胚の mRNA 注入実験により、ハエと脊椎動物の *Lim1* では一次構造だけでなくその機能もまた保存されていることが分った。*Lim1* 変異体を P 因子の再転移により単離した。*Lim1* 変異体には弱い *al* 変異体に類似した先付節構造の異常がみられ、*Lim1* が先付節の正常発生に必要であることが分った。さらに肢原基での遺伝子発現、モザイク解析、異所発現実験等により、*Lim1* が *al* や *Bar* よりも遅れて発現し *al* の後期の発現水準を維持している事、*Bar* は *Lim1* の発現抑制を介して *al* の発現を抑制している事、*Lim1* はその活性は弱いものの *al* と協調して *Bar* の発現抑制に働いている事が示された。しかし *al* と *Lim1* だけでも *Bar* の発現抑制に十分でないので *Bar* の抑制に関わる因子は他にも存在するであろう。

エンハンサートラップ法とは別の手法により得られた *cll* は *al* と同様の発現をし *Bar* の発現抑制に関与していることが共同研究者により示された。第1章の一連の *Lim1* に関する研究及び *cll* についての研究から *al*、*cll*、*Bar* の発現領域はその初期にそれらの相互作用により決められ、後期にはそれに *Lim1* が加わり初期とは違った様式で相互作用し、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ことが分った。第2章では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より詳細に解明するために *al* 及び *cll* のエンハンサー領域の探索及び解析が行われた。その結果 *al*、*cll* ともに初期、後期の発現を制御する領域が別々に存在することが明らかになり、上記の二段階の制御機構はエンハンサー領域の切り替えによるものであると示唆された。

最近、付節及び先付節に関しては中心から分泌される EGFR リガンドの濃度依存的な作用により遠近軸が形成されることが報告されている。しかし、本研究により Dpp、Wg のシグナルレベルが下がるクローンでは細胞自律的に *al* や *Bar* の発現が変化することが見出され、Dpp、Wg シグナルは EGFR シグナルとは独立に *al* や *Bar* の発現を制御し得ることが強く示唆された。そこで実際にこれらシグナルがエンハンサーレベルで働いているのか否かを検証する第一歩として、Dpp、Wg、EGFR シグナルの下流転写因子である Mad/Brk、dTCF、Pnt/Yan の *al* の初期エンハンサーへの結合をフットプリントにより調べた。その結果、それぞれの因子が 1~数カ所づつ結合することが分った。さらにこれらの結合部位に塩基配列変異を導入したエンハンサー断片の活性を調べたところ、少なくとも Brk 結合部位一カ所と Pnt/Yan 結合部位一カ所が生体内で機能する上で必須であることが分った。

なお、本論文は佐藤淳博士・平谷伊智朗氏・平良眞規博士・小嶋徹也博士・西郷薫博士との共同研究であるが、論文提出者が主体となって分析及び検証を行ったもので、論文提出者の寄与が十分であると判断する。

したがって、博士（理学）の学位を授与できると認める。