

論文審査の結果の要旨

氏名 田中 宏昌

本研究では、ショウジョウバエの新規遺伝子 *formin3(form3)* の気管形成における役割を探ることを目的として、*form3* 遺伝子を単離し、これを解析する事に成功した。

論文提出者は、まず、能瀬助教授から供与された GS-G6 系統を用い、中枢神経系における未知遺伝子の異所発現の表現型の原因が新規遺伝子 *form3* の異所発現によるものであることを突き止めた。中枢神経系で *form3* 遺伝子を異所発現させると、中枢神経系の軸索走行のパターンが乱れる。*form3* 遺伝子の完全長 cDNA をクローニングし、ORF を解析したところ *form3* 遺伝子は 1644 アミノ酸からなる新規 FH タンパク質をコードしていた。Form3 の配列の解析を行ったところ、FH タンパク質で高度に保存されたドメイン FH2 のほか、FH3、FH1 ドメインをもっていた。ショウジョウバエゲノム上で FH タンパク質をサーチしたところショウジョウバエには 6 つの FH タンパク質が存在した。6 つの FH タンパク質と他種の FH タンパク質の FH2 ドメインをもとに分子系統樹を作成したところ、Form3 は新しいサブファミリーの FH タンパク質に属していた。

form3 mRNA がショウジョウバエの胚発生過程でいつどこで発現しているのかを調べるために RNA *in situ* を行った結果、胚発生過程において、*form3* mRNA は主に気管系で発現していた。ステージ 14 までには気管細胞全体で発現が見られるようになった。ステージ 15 になると発現がフュージョンセルなどの一部の細胞に限られるようになった。ステージ 16 には気管系での発現は見られなくなった。気管系での発現は、*form3* が気管系で重要な役割を果たしていることを示唆している。

Form3 の機能を調べるために、論文提出者は *form3* の機能欠失体を作成した。モノクローナル抗体 mAb 2A12 を用い気管のルーメン形成過程を調べた結果、*form3* 機能欠失胚において、気管系で最も太い管を構成するドーサルトランクのルーメンの融合箇所いくつかで融合が起きなかったり遅れたりしていた。この表現型はドーサルトランク細胞で *form3* を強制的に発現させることによりレスキューされた。以上の結果は *form3* 遺伝子は気管のルーメンの融合に必要であることを示している。ドーサルトランクルーメン以外のブランチのルーメンの融合にも異常が見られた。

緑色蛍光タンパク質 GFP を気管細胞全体で発現させることにより気管細胞の発生過程をきたままにタイムラプスで観察した。その結果、*form3* 機能欠失胚においてルーメンの融合に異常が生じた箇所でもフュージョンセル同士は正常に接触するが、その接触を安定化することができなかつた。また、ステージ14以降、正常胚に比べ、多くの気管細胞が気管ネットワークからはがれてゆくのが観察された。

FH タンパク質は一般にアクチン細胞骨格を制御する。また、フュージョンセル内にはルーメン融合に必要なアクチンフィラメントに富んだトラックが形成されることが知られている。このトラック形成における Formin3 の役割を調べるために論文提出者は GFP-moesin を用い気管細胞内のアクチンフィラメントに富む領域を可視化し、ライブ解析を行った。その結果、*form3* 機能欠失胚においてルーメンの融合に異常が生じた箇所で、フュージョンセル内にまたがりルーメン形成を媒介するアクチンフィラメントに富んだトラックが安定に形成されなかつた。この結果は、気管のルーメンの融合過程において重要と考えられているアクチンフィラメントの集積において Form3 が役割を果たしていることを示唆している。

気管のルーメン融合の最近の研究で細胞接着分子 E-cadherin がフュージョンセルにおいて重要な役割を果たすことが知られていた。また GFP を用いたライブ解析で Form3 が細胞接着に関与している可能性が示唆されたので、論文提出者は *form3* 機能欠失胚における E-cadherin の局在を調べた。その結果、*form3* 機能欠失胚において、ルーメン結合の初期の段階に見られる特徴的な E-cadherin のライン構造は形成されているが、ルーメンが融合した後に形成される E-cadherin の三重リング構造が形成されないことから、Form3 は E-cadherin のリング構造の形成に必要であることが分かった。

以上要約すると、本研究では、Formin3 (Form3) と名づけたショウジョウバエにおける新規 FH タンパク質の気管のルーメン融合における役割を明らかにした。特にフュージョンセル内でルーメン融合に必要なとされているアクチンフィラメントに富むトラックを安定に形成するのに *form3* 遺伝子が必要であることを明らかにした。新規 FH タンパク質の気管発生における役割を明らかにしたという点で、細胞生物学上かつ発生生物学上有意義な貢献をしたものと認められる。よって審査委員一同、博士 (理学) にふさわしい研究と判断した。