

論文内容の要旨

論文題目 ショウジョウバエ発生における *Src42A* と *armadillo*、*shotgun* の
遺伝的相互作用の重要性

(Requirements of genetic interactions between *Src42A*, *armadillo* and *shotgun*,
a gene encoding E-cadherin, for normal development in *Drosophila*)

氏名 高橋麻裕子

脊椎動物における非受容体型チロシンキナーゼの Src は、最初に同定された癌原遺伝子にコードされており、9つのメンバーから成る Src サブファミリーのうちの一つである。Src サブファミリーに属するチロシンキナーゼは、アミノ末端のミリスチン酸結合サイトである SH4 領域、proline rich region と相互作用すると考えられている SH3 領域、及びリン酸化チロシン残基を含むペプチドと結合する SH2 領域、キナーゼ領域、キナーゼ領域中の自己リン酸化サイト、カルボキシル末端のキナーゼ活性抑制サイトを、特徴的な構造として保持する。この Src キナーゼは、アクチン細胞骨格の制御、細胞の形態変化や細胞移動に重要な役割を果たしていると考えられている。活性化型 Src キナーゼによる繊維芽細胞の形質転換は、アクチン-細胞骨格の破壊のみならず、細胞-基質間や細胞間に存在する多くの細胞骨格関連タンパク質のチロシンリン酸化を引き起こすことが知られている。細胞の形態や移動を制御する因子としての Src キナーゼの重要性は、Src サブファミリーのメンバーを欠失したマウス由来の繊維芽細胞を用いた研究からも示唆されている。

脊椎動物の Src は、FAK (Focal adhesion kinase) と結合して細胞-基質間接着に局在するタンパク質のチロシンリン酸化を促進する。Src のパートナーである FAK が欠失

すると、細胞-基質間接着の数、強度が共に増大する。最近の報告では Src が、細胞末端における接着のターンオーバーに重要な役割を担っていることが示唆されており、細胞-基質間接着の形成、成熟、分離の制御に、Src の活性が関与していると考えられる。

カドヘリンは代表的な接着因子の一つであり、同種親和性のカドヘリンの相互作用は、脊椎動物及び無脊椎動物における細胞間接着に重要な働きをしている。E-カドヘリンの細胞質領域には β -カテニンが結合し、更に β -カテニンを介して細胞骨格と結びつけられており、一般にこのような構造はアドヘレンス・ジャンクション (adherens junction) と呼ばれている。細胞骨格・細胞間接着を制御する過程において、特に β -カテニンが重要な働きをしていることが示されている。 β -カテニンのチロシンリン酸化が増強されると、カドヘリン-アクチンの相互作用は弱められ、結果として細胞接着は失われる。*v-src* によって形質転換した細胞では、上皮細胞分化の異常、浸潤性の獲得、カドヘリンを介した接着の分離が、全て E-カドヘリン/ β -カテニンのチロシンリン酸化と協調して観察される。さらに、c-Src タンパク質は、 β -カテニン組み換えタンパク質のチロシン残基を *in vitro* でリン酸化し、E-カドヘリンに対する β -カテニンの親和性に影響を与える。従って、培養細胞系や *in vitro* 系において、脊椎動物の c-Src が β -カテニンのチロシンリン酸化を担うチロシンキナーゼの一つである可能性が示唆されている。

脊椎動物における個々の Src ファミリーキナーゼの正確な機能とその役割については、解析の余地が多く残されている。9 つの Src ファミリーキナーゼ間で機能が部分的に重複しており、機能欠失型変異体の表現型のみからその機能を厳密に明らかにすることは困難だからである。一方、ショウジョウバエにおいては、*Src42A* と *Src64* の 2 つのみが Src 関連遺伝子として存在する。よってこのショウジョウバエ系は、発生過程における Src の機能を解析する上で、より簡明なモデルであると言える。

ショウジョウバエの *Src64* 変異体は正常に発生し、生存能力自体は野生型のそれと比べて大きな違いはない。しかし、この変異体の雌の卵形成においては、哺育細胞の融合と、哺育細胞-卵母細胞をつなぐ細胞質架橋であるリング・カナル (ring canal) の発達の異常、リング・カナルにおける抗リン酸化チロシン抗体の染色シグナルの減少等が観察される。ショウジョウバエにおける非受容体型チロシンキナーゼ、Btk ホモログをコードする *Tec29* の変異は優性的に *Src64* 変異体のリング・カナルにおける表現型を増強

し、*Tec29* ホモ変異体では、*Src64* の機能欠失時と同等の表現型がみられる。*Tec29* は、リング・カナルに局在し、その細胞内局在は、*Src64* のキナーゼ活性に依存する。これは、*Tec29* が *Src64* の下流の標的因子であることを示唆している。

Src42A は、ショウジョウバエにおいて、脊椎動物の *c-src* に最も近縁な *src* 関連遺伝子である。*Src42A* のドミナント・ネガティブ型あるいは活性化型変異体を強制的に発現させることによって、*Src42A* が個眼発生における細胞骨格の構築や細胞間接触の制御に関与していることが示唆されている。また、様々なスクリーニングにおいて単離された *Src42A* 変異体の解析から、*Src42A* が受容体型チロシンキナーゼの情報伝達経路に対する負の制御因子として、また JNK (Jun amino-terminal kinase) 情報伝達経路に対する正の制御因子として機能していることが示唆されている。

上述のショウジョウバエにおける 2 つの *Src* 関連遺伝子、*Src42A* と *Src64* は、脊椎動物の *Src* サブファミリーのケースと同様、部分的に重複した機能を持っている可能性があると考えられるが、実際にこの機能的重複性は、ショウジョウバエ胚期の背部閉鎖 (dorsal closure) においてのみ示されていた。

本研究において、我々はまず *Src42A* に対する特異的な抗体を作製し、胚の発生過程でその発現パターンを詳細に観察した。すると、細胞膜における *Src42A* タンパク質の強い発現がみられ、その局在が細胞内外で動的に変化していた。また、アドヘレンス・ジャンクションにおいては、ショウジョウバエにおける E-カドヘリンホモログ、(D) E-カドヘリンと共局在していた。さらに、*Src42A* の完全機能欠失型変異体を単離したところ、*Src42A* 変異体は、胚発生における背部上皮の閉鎖過程に僅かな異常を示し、これは *Src42A* の発現パターンを反映するものであった。この表現形は、ショウジョウバエにおけるもう一つの *Src* ホモログである *Src64* の変異を導入することにより強められ、さらに加えて *Src42A* と *Src64* の二重変異体では胚帯伸長や、神経、気管、生殖細胞等の組織の発生にも著しい異常がみられた。以上のことは、*Src42A* と *Src64* 間の機能的重複性を強く示唆するものであった。さらに本研究では、ショウジョウバエの複眼原基で過剰発現させた *Src42A* のドミナント・ネガティブ型変異体を用いて、*Src42A* と遺伝学的に相互作用する因子のスクリーニングを行い、E-カドヘリン及びショウジョウバエにおける β -カテニンホモログ、アルマジロとの遺伝的相互作用を確認した。実際、

E-カドヘリン遺伝子あるいはアルマジロ遺伝子への変異の導入により、前述の Src42A 完全機能欠失型変異体の胚期における表現形は著しく強められた。さらに、Src42A と Src64 の二重変異体では、背部上皮の閉鎖過程において E-カドヘリンとアルマジロ、及び F-アクチンの発現が減少していた。また、胚上皮で Src42A の様々な変異体を強制発現すると、Src42A の活性に伴い E-カドヘリンとアルマジロの分布に影響がみられた。以上のことは、Src と E-カドヘリン、アルマジロ間の発生過程における機能的相互作用を示唆するものであった。そこで、我々は、Src42A による E-カドヘリンやアルマジロの機能制御のメカニズムを調べるために、生化学的手法を用いてさらに詳細な解析を行った。まず、免疫沈降法と Pull-down アッセイを用いて Src42A が、E-カドヘリンやアルマジロと物理的に相互作用していることを確認し、E-カドヘリン/アルマジロが細胞膜において Src42A と複合体を形成していることが示した。さらに、RNA 干渉の手法を用いて培養細胞で Src42A と Src64 をノックダウンしたところ、アルマジロのチロシンリン酸化量が減少し、アルマジロのチロシンリン酸化に Src42A と Src64 が必要であることが示唆された。

以上の結果から、ショウジョウバエの Src が発生の様々な局面において重要な役割を担っており、特に胚期の背部閉鎖中の上皮先端細胞において、E-カドヘリンとアルマジロを含めた Src42A の複合体が F-アクチンの蓄積等の細胞骨格の制御に必要であることが示唆された。

今後は、幅広い組織にわたる Src42A と Src64 二重変異体の表現形、及び細胞内でのドミナント・ネガティブ型/活性化型 Src42A の挙動、Src42A とアルマジロの結合構造等の詳細な解析を通して、生体内におけるより精確な Src の機能が明らかになると考えられる。