

## 論文内容の要旨

ショウジョウバエの肢分化における哺乳類のダイオキシン受容体のホモログ Spineless と ARNT のホモログ Tango の複合体による第 5 付節における *Bar* ホメオボックス遺伝子の発現の時間的制御

Temporal regulation of late expression of *Bar* homeobox genes in the tarsal segment 5 by the heterodimer of Spineless, a homolog of mammalian dioxin receptor, and Tango, a homolog of the aryl hydrocarbon nuclear translocator, during *Drosophila* leg development

高津 信太郎

多細胞生物の発生過程における正常な形態形成には、組織を特異的な領域に分割する転写因子をコードしている遺伝子の発現パターンが厳密に空間的・時間的に制御されていることが必要不可欠である。ショウジョウバエの成虫肢は根元側より、基節(coxa)、転節(trochanter)、腿節(femur)、脛節(tibia)、第 1~5 付節(tarsal segment1-5:ta1-5)、先付節(pretarsus)と分節化されている。これらの各節は幼虫期に肢原基と呼ばれる細胞が単層に並んだ上皮組織が、同心円上の領域に区画化されることにより形成される。肢原基の中心部からは成虫肢の先端部が、肢原基のより周縁部からは成虫肢のより根元側の分節が形成されるという対応関係がある。当研究室で解析を進めている、互いに機能的に冗長なホメオボックス遺伝子対 *BarH1* 及び *BarH2* (*Bar*) は、3 齢幼虫初期には肢原基の第 3 付節から第 5 付節に相当する領域で一様に発現することでこの領域を他の領域から区別している。3 齢幼虫後期になると第 3 付節での発現は消えて第 4 付節で弱く、第 5 付節で強く発現するようになる。この発現量の違いが第 3 付節から第 5 付節の各節の形成に重要な役割を果たしている。このように *Bar* の発現パターンが厳密に空間的・時間的に制御されていることが正常な成虫肢の形成に必須である。当研究室のこれまでの解析から、3 齢幼虫後期における第 5 付節における強い *Bar* の発現を制御するエンハンサー活性は約 6kb の SS6.0 領域にある事、及び SS6.0 領域の活性は *Bar* 自身により正に制御されていることがわかってきた。本研究では成虫肢形成過程における *Bar* の時間的・空間的な発現制御機構を解明するために、SS6.0 領域についてその制御機構を解析した。

*spineless* (*ss*) は bHLH-PAS タンパク質をコードしており、その機能欠損型変異体の成虫肢では、付節は第 1 付節と先端の第 5 付節と思われる分節しか形成されないことが知られていた。従って、*ss* は *Bar* の発現制御に何らかの関わりがあると考えられたため、*ss* 機能欠損型変異体の肢原基について詳細な解析を行った。野生型の肢原基では 3 齢幼虫中期以降に将来の第 3 付節に対応している領域の *Bar* の発現は消失することに対し、*ss* 機能欠損型変異体の肢原基ではこの *Bar* の発現の消失は観察されなかった。このことから *ss* 機能欠損型変異体の肢原基では、第 3 付節に対応する領域が形成されないと考えられる。次に、*ss* 機能欠損型変異体の *Bar* 発現領域において第 5 付節と第 4 付節の分節化について検証するため、*ss* 機能欠損型変異体の肢原基における SS6.0 領域の活性を解析したところ、3 齢幼虫初期から全ての *Bar* 発現細胞において活性化されていた。一方、LIM-ホメオボックス遺伝子 *apterous* (*ap*) は、野生型の肢原基では SS6.0 領域の活性化と同時期に、SS6.0 領域が活性化されていない第 4 付節で発現するよ

うになるが、*ss* 機能欠損型変異体の肢原基においても 3 齢幼虫初期には SS6.0 領域とは違い *ap* は発現していなかった。しかし、3 齢幼虫中期以降には *Bar* の発現領域の近位部側の半分で、SS6.0 領域が活性化しているにもかかわらず *ap* の強い発現が見られた。これらのことは、野生型の場合とは違い、*ss* 機能欠損型変異体における *Bar* 発現領域の近位部側の半分は第 5 付節だけでなく第 4 付節の性質も有していることを示唆している。実際、*ss* 機能欠損型変異体の成虫肢の最も先端側の付節はかなり変形している。従って、*ss* 機能欠損型変異体の肢原基において、3 齢幼虫初期の *Bar* の発現細胞は最終的には第 5 付節と第 4 付節が複合した付節へと分化すると考えられる。

3 齢幼虫初期には、*Bar* が発現しているにもかかわらず SS6.0 領域の活性は認められないことから、SS6.0 領域の活性は 3 齢幼虫初期には 1 つ (以上) の遺伝子によって抑制されているものと予想されていた。*ss* 機能欠損型変異体の肢原基における SS6.0 領域の活性は、3 齢幼虫初期から既に検出可能であり、また、2 齢幼虫後期から 3 齢幼虫初期にかけて肢原基の将来の付節にあたる領域で *ss* が一時的に発現することが知られていたため、*ss* は 3 齢幼虫初期において *Bar* の第 5 付節エンハンサーの活性の抑制に関わる遺伝子の候補の一つであると予想された。そこで *ss* の発現領域が将来の第 5 付節に相当する領域を含んでいるか否かを明確にするために、*in situ* ハイブリダイゼーションを行い *ss* mRNA の発現について詳細に調べた。予想通り *ss* は 3 齢幼虫初期において一時的に *Bar* 発現領域を含む付節領域において環状に発現していたが、3 齢幼虫中期にはその発現は消失していた。次に *Bar* の第 5 付節特異的な強い発現を制御している最小領域を決定するために SS6.0 領域を更に数種の断片に分割し、レポーター遺伝子である *lacZ* に連結し、P 因子形質転換法によりショウジョウバエのゲノムに導入し、抗体染色によりエンハンサー活性を調べた。その結果、SS6.0 領域と同様の活性を持つ領域を約 2.4Kb の BB2.4 領域にまで限定することができた。*ss* 機能欠損型変異体のクローン解析により、3 齢幼虫初期における BB2.4 領域の活性化の抑制も、SS6.0 領域の場合と同様に *ss* の機能を必要とすることが確認された。Ss タンパク質は、肢原基全体で発現する別の bHLH-PAS タンパク質である Tango(Tgo) とヘテロ二量体を形成することによって機能することが知られており、*tgo* 変異体は *ss* 変異体とほぼ同じ表現型を示すこともわかっていた。そこで、*tgo* の機能欠損型変異体クローンを導入した肢原基の 3 齢幼虫初期における BB2.4-*lacZ* の発現について調べたところ、*ss* の場合と同様に、*tgo* 変異体クローン内の *Bar* 発現領域において BB2.4 領域は細胞自律的に活性化していた。従って、3 齢幼虫初期では BB2.4 領域の活性は Ss/Tgo ヘテロ二量体によって直接的ないし間接的に抑制されるものと考えられた。

さらに BB2.4 領域を細分化して解析したところ、第 5 付節における *Bar* の発現に必須であるが 3 齢幼虫初期から活性化してしまう 667bp の BBg0.6 領域と、3 齢幼虫初期においてこの BBg0.6 領域の活性を抑制する配列という主に二つの部分により構成されることが明らかとなった。後者の配列はダイオキシン受容体(AHR)と AHR 核移行因子(ARNT)のヘテロ二量体により認識される XRE 又は DRE(Xenobiotic Response Element 又は Dioxin Response Element)と呼ばれる DNA 配列のコア配列(GCGTG)を含んでいた。Ss と Tgo はショウジョウバエにおける AHR と ARNT の相同タンパク質であり、ヘテロ二量体を形成することで XRE/DRE を特異的に認識することが示唆されている。また、この XRE/DRE コア配列が *D. virilis* 等の *D. melanogaster* の近縁種の BB2.4 領域に対応する領域にも進化的に保存されていることもわかった。故にこの配列は遺伝子の発現制御に関わるタンパク質の重要な結合部位であると予想された。次にこの BB2.4 領域内の XRE/DRE コア配列に変異を導入した B2.4mutXRE 断片をはじめとする、XRE/DRE コア配列を欠くか或いはこの配列が変異している全ての断片のエンハンサー活性を調べたところ、BBg0.6 断片と同様に、3 齢幼虫初期から活性化されていた。これに対して、BBg0.6 断片に直接 XRE/DRE コア配列を含む 8 塩基を付加させた BBg0.6+XRE 断片をはじめとする、XRE/DRE コア配列を保持している全ての断片は BB2.4 断片同様、肢原基で正常な発現パターンを示した。以上の結果から、この XRE/DRE コア配列は、BBg0.6 領域の時間的発現制御に必要十分であることが明らかになった。

最後に Ss/Tgo ヘテロ二量体が 3 齢幼虫初期の肢原基において BBg0.6 断片の活性を抑えるために BB2.4 断片の XRE/DRE コア配列に実際に結合するかどうかについて、ゲルモビリティシフトアッセイ(EMSA)を行うことでタンパク質・DNA 相互作用について調べた。その結果、Ss 或いは Tgo 単独では BB2.4 断片の XRE/DRE コア配列に結合しないことに対し、Ss と Tgo の両方を用いた場合では BB2.4 断片の XRE/DRE コア配列に結合することがわかった。

以上の結果から、*Bar* の第 5 付節特異的な強い発現の時間的な制御に関して、以下の機構が考えら

れる。3 齢幼虫初期に *Bar* の発現が肢原基の将来の第 3 付節から第 5 付節に相当する領域で始まると、*Bar* は BBg0.6 領域を活性化しようとするのだが、*Bar* 発現領域を含む領域で発現する *Ss* が *Tgo* と共にヘテロ二量体を形成して第 5 付節エンハンサー領域内に位置する XRE/DRE コア配列に結合することで、BBg0.6 領域の活性化を抑制する。発生段階の進行に伴い、3 齢幼虫中期には *ss* の発現が消失し、従って *Ss/Tgo* ヘテロ二量体も消失することでこの抑制が解除され、BBg0.6 領域が活性化される。このことによって、3 齢幼虫中期以降でのみ *Bar* の第 5 付節特異的な強い発現が起こり、最終的に第 5 付節が他の領域から区別され、正常な成虫肢の形態形成が起こるものと考えられる。