

論文審査の結果の要旨

氏名 高津信太郎

本論文は、イントロダクション、材料と方法、結果、および考察からなりたっており、全体として、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 の複合体が、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に重要な役割を果たしていることを示している。

多細胞生物の発生過程における正常な形態形成には、転写制御因子をコードしている遺伝子の発現を厳密に時間的、空間的に制御することが必要である。ショウジョウバエの成虫肢は、幼虫期に肢原基から形成される。また、発生の途中にある幼虫期の肢原基では、様々な転写制御因子をコードする遺伝子が、時間的に変化する同心円として発現し、遠近軸形成に重要な役割を果たしている。Bar は、ホメオボックスを持った転写制御遺伝子で、3 齢初期に、第3付節から第5付節(ta3-ta5)の前駆細胞で一様に発現する。しかし、3 齢中 - 後期には、ta3 前駆細胞での発現は消え、ta4 前駆細胞での発現は中程度に、ta5 前駆細胞での発現は強くなる。また、成虫でのモザイク分析の結果、これらの発現レベルの違いは、各付節の identity 決定に重要であることが示されている。3 齢後期の ta5 での Bar の強い発現は、ta5 特異的エンハンサーにより制御されている。このエンハンサーは、3 齢中 - 後期には、Bar により活性化されるが、3 齢初期では、Bar の存在にも拘わらず、活性化されない。本研究では、まず、この Bar エンハンサーを様々な分子解剖し、生じたエンハンサー断片をレポーター遺伝子に結合させ、P 因子法を用いて野生型ハエに戻し、トランスジェニックハエを作出し、レポーター遺伝子発現を調べた。その結果、ta5 特異的エンハンサーは、基礎活性化領域と3 齢初期に基礎活性化領域の活性化を抑制する領域の2つの領域からなることが分かった。実際、基礎活性化領域だけをレポーターアッセイすると、3 齢幼虫の初期にも Bar 発現細胞全体でレポーター遺伝子発現がみられた。このレポーター遺伝子発現は、Bar のモザイククローンで消失し、Bar の異所発現で、細胞自律的に誘発されるので、Bar により正に制御されていると考えられる。spineless 変異体では、見かけ上 ta2-ta4 を欠落している成虫肢ができる。この spineless 変異のバックグラウンドで、全長の ta5 特異的エンハンサーの活性をレポーターアッセイで調べると、野生型とは異なり、3 齢幼虫の初期から、Bar 発現細胞の全体で、レポーター遺伝子の発現が検出された。このことは、spineless が、直接あるいは間接に ta5 特異的エンハンサーの3 齢幼虫の初期における発現抑制に関わっていることを示唆している。抑制領域の塩基配列を調べたところ、そこに哺乳類でダイオキシン受容体と ARNT (aryl hydrocarbon nuclear translocator) の複合体が結合するコア配列 GTGCG (XRE/DRE) が一つ存在

することが分かった。哺乳類のダイオキシン受容体と ARNT の複合体の、ショウジョウバエのカウンターパートは、Spineless/Tango 複合体である。そこで、XRE/DRE に注目して抑制領域を分子解剖して調べたところ、GTGCG を含む 8 塩基の配列だけが存在していれば、十分な抑制効果があることが分かった。更に、GTGCG の 3 塩基を変異させると、全長の ta5 特異的エンハンサーの 3 齢幼虫の初期での発現抑制すら解除されることが分かった。このことから、XRE/DRE の存在が、抑制効果に必要十分であることが証明された。Spineless の発現は、3 齢初期では、すべての Bar 発現細胞で見られたが、中 - 後期には全く発現が消失した。更に gel retardation 実験により、Spineless/Tango 複合体は、GTGCG と結合し、その結合は、野生型 XRE/DRE オリゴヌクレオチドで阻害されたが、変異型オリゴヌクレオチドでは、全く影響を受けなかった。以上の結果、抑制領域に結合した Spineless/Tango 複合体が、3 齢初期に基礎活性化領域が Bar により活性化することを抑制し、その抑制が 3 齢後期に、Spineless の消失により解除されることで、活性化されることで、Bar 発現の時間的制御が行われていることが強く示唆された。

なお、本論文は、田尻礼子、道上達夫、辻拓也、小嶋徹也および西郷薫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。