

論文内容の要旨

論文題目

ショウジョウバエ成虫肢の分節化に関わる遺伝子の

網羅的探索と機能解析

(Screening and functional analysis of genes involved in segmentation of the *Drosophila* leg)

氏名 田尻 怜子

発生の初期過程ではモルフォゲンの活性勾配に従った転写因子群の領域特異的発現により組織が区画化される。モルフォゲンによる標的遺伝子の発現制御機構は様々な系で解明されているが、それらの標的遺伝子にコードされる転写因子が組織を正確に区画化する機構は完全には理解されていない。さらにそれらの転写因子の下流でどのような遺伝子が各区画の最終的な形態や性質を制御するのかはほとんど調べられていない。これらの過程に関与する遺伝子は区画特異的に発現すると考えられることから、本研究ではショウジョウバエ肢形成過程をモデル系としてそのような遺伝子の網羅的同定を目的としたマイクロアレイ解析を行った。この解析の結果を実験的かつ系統的に検証することで、実際に区画特異的に発現する多数の遺伝子を同定した。次にその中の一遺伝子について詳細な機能解析を行い、これが既知の因子とは異なる機構によって正確な区画化に必須の役割を果たすことを見出した。この発見は、解析が比較的進んでいるとされる区画化の過程についても解明すべき点はまだ多く残されていることを示唆している。

ショウジョウバエ成虫肢で分節特異的に発現する遺伝子の網羅的探索

ショウジョウバエ成虫肢の前駆器官である肢原基は図1に示すような転写因子群の領域特異的発現により遠近軸方向の複数の区画に分割され、各区画は成虫肢の分節構造と明確に対応する。

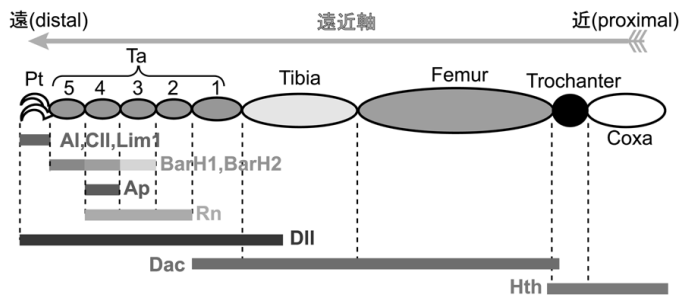


図1. 肢原基で領域特異的に発現する転写因子群と、それらにより規定される区画と成虫肢の分節の対応。Pt, 先付節(pretarsus); Ta, 付節(tarsal segments); Rn, Rotund; Dll, Distal-less; Dac, Dachshund; Hth, Homothorax

特に先端の付節領域 (Ta1-5 と Pt) についてはホメオボックス遺伝子 *aristaleless (al)*, *clawless (cll)*, *BarH1/2 (Bar)*, *apterous (ap)*などにコードされる転写因子群による区画化の機構が詳しく解析されてきた。本研究ではこの領域に注目して区画特異的に発現する遺伝子を探した。まず、分節間の境界が明視できる蛹初期の肢原基から、

Distal (Di) : Pt, Ta5,4、 Central (Ce) : Ta3,2、 Proximal (Pr) : Ta1。

の3つの部分を切り出し、各部分から抽出したRNAを用いて蛍光標識プローブを作製して、EST クローン約1万個(全遺伝子数の約7割)を載せたマイクロアレイを用いて相互に発現プロファイルと比較した。

この解析からこれらの部分の間で発現量に差のある確率が高いと判定された1000強の遺伝子のうち、9割近くはDiで特異的に発現量が異なる(Diのみで強く発現する、もしくはDiのみで発現が弱い)と予想された。それらの遺伝子のDi-Ce間およびDi-Pr間の発現量の比は様々な値を示した。これらの値について恣意的に閾値を設定するのではなく、各遺伝子の実際の発現パターンとどのように相関しているのかを実験的に検証することにした。

様々な発現量比の遺伝子について *in situ* ハイブリダイゼーション(ISH)を行ったところ、上述の発現量比の平均値が大きいほど実際に予想通りの発現パターンを示す率が高かった(図2)。

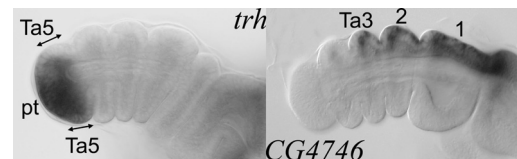
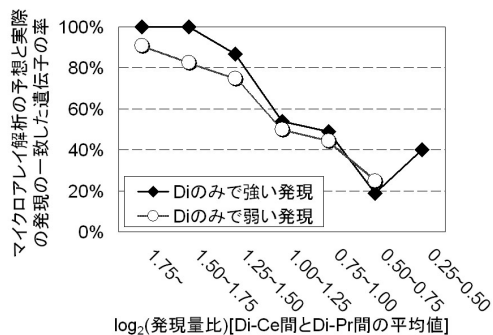


図2. (左) Di-Ce間およびDi-Pr間の発現量のlog比の平均値と、予想通りの発現パターンを示した遺伝子の率の関係。(右) 予想通りの分節特異的発現がISHで確かめられた遺伝子の例。

この正の相関から、マイクロアレイ解析における発現量比は実際の発現パターンを反映していると考えられる。また、この相関に基づき、実際にDiで特異的に発現量が異なる遺伝子の総数は約400と見積もられた。同様の検証から、CeおよびPrで特異的に発現量の異なる

る遺伝子はほとんど無いことも示唆された。

成虫肢において類似した基本構造を持つ Ta1-5 とは異なり Pt には爪などの特異的な構造が見られることから、Di で特異的に発現する遺伝子の数の多さは Pt の発現プロファイルの特異性に由来する可能性が考えられた。これを裏付けるように、ISH で Di のみでの強い発現が確認された遺伝子の大部分が確かに Pt で特異的に発現していた。一方、Ta5 或いは Ta4 で特異的に発現する遺伝子の数は Pt より少ないが、Ta1-3 のいずれかで特異的に発現する遺伝子数の見積もりと比べて顕著に多かった。即ち、Ta5, 4 は形態上は Ta1-3 と似ているが、特異的な発現プロファイルを持つ可能性が高い。Tarsal segments の数は昆虫の進化の過程で順次増えてきたとされており、現存の昆虫でも種によってその数は 1~5 の間で異なる。ショウジョウバエの Ta4,5 の発現プロファイルの特異性から、Ta1-3 が元は一つの分節に由来し Ta4,5 は各々それとは独立に獲得されたという可能性が推測される。

ISH で実際に分節特異的な発現が確認された遺伝子群の機能は様々に異なるが、その中で転写因子を含む核酸結合タンパク質をコードするものの割合はマイクロアレイ上の全遺伝子と比べて有意に少なく、逆にシグナル伝達関連遺伝子やクチクラ構成タンパク質をコードする遺伝子の割合が大きかった。即ち、他の遺伝子の発現制御を介さず直接的に最終的な形態を制御する可能性の大きい遺伝子が高い率で含まれると考えられる。

以上のように、マイクロアレイ解析と大規模な *in situ* ハイブリダイゼーションの組み合わせにより、区画特異的な発現を示す遺伝子を多数同定できた。この網羅的な解析の成果として Ta5,4 が特異的な発現プロファイルを持つことも見出した。これらの結果は、成虫肢形成の最終過程の遺伝子レベルでの解析の基礎になるとともに、昆虫の進化発生学にも重要な示唆を与えるものと考えられる。

成虫肢の先端の 2 分節の形成における *tracheless(trh)* 遺伝子の役割

器官形成過程の初めにはモルフォゲンの活性勾配に従った転写因子の領域特異的な発現により組織が区画化される。それらの転写因子が続いて各領域で特異的な細胞の運命や形質を司ることから、正常な器官形成にはそれらの転写因子の発現領域の正確な決定が重要であると考えられる。しかし、一般的に単一のモルフォゲンの勾配だけでそれを実現するのは難しく、領域の正確な決定にはそれらの転写因子どうしの発現制御が重要である。特に、隣接する 2 つの領域が各々を規定する転写因子の間の相互抑制によって正確に分割される例が多く知られている。

上述の肢の区画化を担う転写因子をコードする遺伝子のうち *al*, *cll* は Pt で、*Bar* は隣の Ta5-3 で特異的に発現し、各分節の性質を決定する。これらの発現領域は 3 齢幼虫初期に EGF 受容体シグナルの遠近軸方向の勾配により大まかに決められた後、中期までに重複が無くなり明確に分割されるが、これには *al*, *cll* と *Bar* の間の相互抑制が必要であることが知られている。また、3 齢幼虫中期以降 *Bar* は Ta5 において自身の発現を正に制御するが、それにより Ta5 と Ta4 の間に生じる *Bar* の発現強度の差違がそれらの 2 領域の分別に重要であ

る。

本研究の前半で、bHLH-PAS 型転写因子をコードする *trh* が Pt と Ta5 で特異的に発現することを見出した (図 2)。転写因子の相互抑制により分割される 2 領域にまたがって発現する転写因子は珍しく、*trh* がこの 2 領域の区画化に未知の機構で関与する可能性に興味を持って詳しい解析を行った。

3 齢幼虫初期の Pt 内の *trh* 変異クローンでは、*al, cll* が正常に発現しているにも関わらず *Bar* が完全には抑制されず、本来の発現領域(Ta5-3)より弱いレベルでクローン全体で発現していた。同時期の *al* 或いは *cll* の変異体の Pt では Ta5-3 と同程度の強さで *Bar* が発現することをふまえると、*trh* 無しでも *al, cll* はある程度 *Bar* を抑制するのだが完全な抑制には *trh* の働きが必要である、と考えられる。3 齢幼虫後期の *trh* 変異クローンでは一部の細胞で *Bar* が強く発現し *al, cll* の発現が見られなかったが、残りの細胞では逆に *Bar* の発現が見られず *al, cll* が正常に発現していた。後期のこのような *Bar* と *al, cll* の相補的な発現は、初期に弱く発現した *Bar* と正常に発現した *al, cll* が互いの発現を抑制し合った結果だと推測された。従って、両者の相互抑制そのものには *trh* は必要ないと考えられる。一方、Ta5 の *trh* 変異クローンでは *Bar* の発現が低下していたが、これは *Bar* の自己誘導を媒介する Ta5 エンハンサーの活性の低下によることが示唆された。*trh* 単独の異所発現ではこのエンハンサーは活性化されないが、*Bar* と *trh* を共発現させると *Bar* のみを発現させた場合よりも著しく強い活性化が見られた。以上より、*trh* は単独では *Bar* の発現に影響を与えないが、Pt では *al, cll* による *Bar* の抑制を促進し、逆に Ta5 では *Bar* の自己誘導を促進する (図 3)。

Pt, Ta5 領域は *al, cll, Bar* の間の単純な発現制御によって決定されたと考えられてきたが、両方の領域で発現する *trh* が *al, cll* 或いは *Bar* 自身と協調して *Bar* の発現をこのように各領域で逆向きに制御することがその正確な区画化に必須である。このような様式で区画化に関与する因子はこれまで知られておらず、本研究は区画化の過程について新たに重要な機構を提示したと言える。

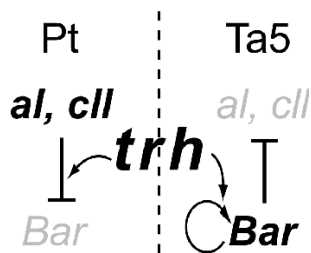


図 3. *trh* の機能。Pt では *Bar* の完全な抑制に必要であり、一方 Ta5 では *Bar* の自己誘導を促進する。