

論文内容の要旨

論文題目 *spineless (ss)* 遺伝子の解析を中心としたショウジョウバエ
付属肢及び体節の特異性決定機構の解析

(Requirements of *spineless (ss)* for appendage and segment specificity
determination in *Drosophila*)

氏名 坪田 拓也

高等動物の形態は前後軸に沿って多様化しており、この形態的多様性は、*Hox* 遺伝子群と呼ばれる生物種間で高度に保存された一群のホメオボックス遺伝子によって制御されている。*Hox* 遺伝子は、各々が前後軸に沿った特異的な領域で発現し、それぞれの領域の形態的な特徴を決定している。したがって、前後軸に沿った形態的多様化の基本的メカニズムは高等動物の間で共通であると考えられており、*Hox* 遺伝子の解析を中心として、様々な生物で盛んに研究されてきた。しかしながら、その完全な理解のためには、未だ解明すべき点が多く残されている。

ショウジョウバエにおいても、前後軸に沿った形態的多様性決定メカニズムについて数多くの研究がなされており、触角（頭部体節の付属肢）と肢（胸部体節の付属肢）の特異性決定メカニズムの解析からは、*Hox* 遺伝子が別の転写制御因子をコードする *spineless (ss)* の機能を介して働いていることが明らかにされている。本研究では、前後軸に沿った形態的多様性形成メカニズムのより深い理解を目指し、*ss* を制御する遺伝子や *ss* によって制御される遺伝子についての詳細な解析を行った。

1) *ss* の下流で触角の特異性決定に働く *distal antenna (dan)*/*distal antenna-related (danr)* の解析

ショウジョウバエは完全変態昆虫であり、触角や肢などの成虫構造は、幼虫期の触角原

基や肢原基と呼ばれる組織から形成される。*ss* は 3 齢幼虫期（終齢幼虫期）に触角原基及び肢原基の両方で発現するが、触角原基では強く継続的に発現するのに対して肢原基の将来肢になる領域では、3 齢初期に弱く一過的にしか発現しない。肢原基での一過的な弱い発現は、肢の付節の分節化に重要であるが、触角と肢の区別には関係しない。一方、触角原基での継続的な強い発現により、触角の特異性が決定される。

ss 下流遺伝子の単離を目的としたエンハンサー・トラップ系統の探索の結果、レポーター遺伝子が、触角原基では *ss* と同様のパターンで発現するが肢原基では発現しない系統を見出した。この系統の解析の結果、レポーター遺伝子の挿入点近傍に互いに相同的で機能が重複する 2 つの遺伝子を見出し、*ss* がこれら 2 つの遺伝子の発現制御を介して触角の特異性を決定していることを、これらの遺伝子について発表した他の 2 つのグループと同時期に、独立に見出した。以下、これらの遺伝子を *dan* 及び *danr* と呼ぶ。

Dan 及び *Danr* タンパク質それぞれに特異的な抗体を作成し、それぞれの発現パターンを詳細に解析した結果、調べたすべての組織において、両者共にレポーター遺伝子と同様の発現パターンを示した。*Dan/Danr* の発現は、触角原基における *ss* の変異クローンでは消失し、*ss* を肢原基で強制的に大量発現させると細胞自律的に誘導された。また、*dan* 及び *danr* の機能欠損では触角が肢様の構造に変化した。両方を同時に欠損した場合に、より顕著に表現型がみられた。各々を肢原基で強制発現すると、肢に触角特異的な構造が形成され、これらの強制発現により、触角が肢に変換する *ss* 変異体の表現型がレスキューされた。さらに、*dan* 又は *danr* を肢原基で強制発現すると、3 齢初期に弱く一過的に *ss* を発現していた領域で、3 齢後期でも *ss* の発現が維持されていた。これらのことから、*ss* は互いに重複した機能を持つ *dan/danr* の発現制御を介して、自身の発現の維持及び触角特異性の決定を行っていることが示唆された。

Dan/Danr は、DNA 結合領域である PSQ 領域とコリプレッサー CtBP との予想結合領域を持ち、抗体染色では核に局在していたことから、DNA 結合性の転写制御因子であると予想された。*Dan/Danr* の機能をさらに明らかにするために、辻拓也博士（現・国立遺伝学研究所）との共同研究で、以下の実験を行った。SELEX 解析の結果、*Dan* 及び *Danr* は共に、A に富んだ配列を挟む二つの CGCG 配列に強固に結合することがわかった。ゲルシフト解析の結果、A に富んだ領域の長さが 6-26 塩基対であれば結合できることや、PSQ 領域のみでも単量体として上記配列に弱く結合可能であるが、*Dan* では C 末端領域、*Danr* では中央の領域を介してホモ二量体を形成することが強固な結合に必須であること、*Dan* の場合は PSQ 領域と C 末端領域のみで強固な DNA 結合には十分であることが示唆された。様々な領域を欠損させた *Dan* を肢原基で強制発現させたところ、全長の強制発現でみられた肢から触角への変換が、PSQ 領域を欠損したものや PSQ 領域と C 末端領域のみのもものではまったく見られず、C 末端領域の欠損したものでは非常に弱くしか見られなかった。これらのことから、少なくとも *Dan* については、二量体形成を介した強固な DNA 結合が、触角特異性決定に重要であること、及び、PSQ 領域と C 末端領域以外の部分にも DNA 結合以外の機能的に重要な活性があることが示唆された。

2) *ss* の特殊な変異体 *ss^{am}* とそれに特異的な抑制変異体 *Su(ss^{am})* の解析

本研究の過程で、触角が肢に変換するものの肢の分節化は正常である新たな *ss* の変異体 *ss^{AM}* と、この表現型を優性に抑制する致死変異体 *Su(ss^{AM})* を見出した。*Su(ss^{AM})* は、*ss^{AM}* と同様の表現型を示す *ss^a* とは相互作用しなかったため、*ss^{AM}* と *Su(ss^{AM})* の間には特別な関係があり、これらについて解析することで、*ss* の機能や触角特異性決定メカニズムに関して新たな知見が得られると期待された。

ss^{AM} における *ss* の翻訳領域の塩基配列や mRNA の触角原基と肢原基での発現は正常だったので、抗 Ss 抗体を作成して Ss タンパク質の発現を調べたところ、Ss タンパク質の発現量が触角原基では著しく減少していたものの肢原基での発現は正常だった。また、RNA スプライシングに関わる U5snRNP の構成因子をコードする *prp8* の変異体が、*Su(ss^{AM})* の致死性を相補せず、*ss^{AM}* の表現型を優性に抑制したことや、*Su(ss^{AM})* のホモ接合体の胚で *prp8* の発現が消失していたことから、*Su(ss^{AM})* は *prp8* の変異体であることが強く示唆された。さらに、タンパク質合成に関与する遺伝子の変異体 (*Minute* 変異体) や RNA スプライシングに関わる他の遺伝子の変異体も、*ss^{AM}* と遺伝学的相互作用を示した。これらの結果から、触角と肢との間で異なる Ss タンパク質の合成もしくは分解の制御及びそれに対する RNA スプライシングの関与という、新たなメカニズムの存在が予想される。

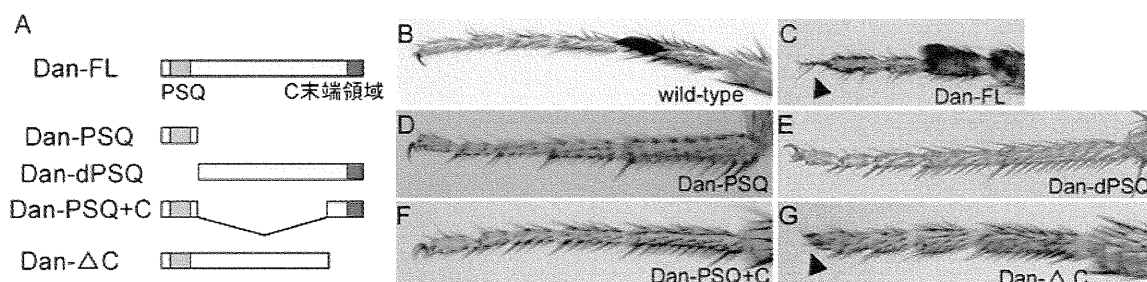
3) 腹胸側剛毛 (sternopleural bristle: SB) の形成における *ss* の機能と *Hox* 遺伝子による SB 形成制御に関する解析

ショウジョウバエにおいては、*Hox* 遺伝子である *Antennapedia (Antp)* によって決定される第 2 胸部体節 (T2) の形態が胸部体節の基底状態と考えられており、第 1 胸部体節 (T1) では *Sex combs reduced (Scr)* が、第 3 胸部体節 (T3) では *Ultrabithorax (Ubx)* といった *Hox* 遺伝子により、この基底状態が修飾されることで、それぞれの体節の特徴が決定される。*ss* 変異体の表現型を解析する過程で、腹胸側剛毛 (SB) と呼ばれる感覚器官が *ss* の完全機能欠失変異体において欠損することを見出した。SB は T2 特有の構造で、T1 及び T3 では *Scr* 及び *Ubx* によりその形成が抑制されている。そこで、SB 形成における *ss* の機能を調べ、それと *Hox* 遺伝子の機能との関連を探ることで、胸部体節における特異性決定メカニズムに関する重要な知見が得られると考えた。

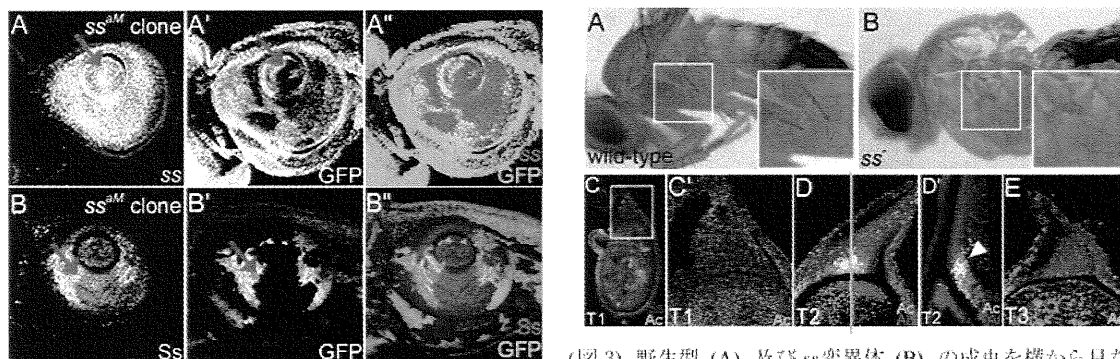
SB は、T2 肢原基の将来体壁に分化する領域内で、proneural 遺伝子 *achaete (ac)* を発現する一群の細胞からの感覚器前駆細胞 (sensory organ precursor: SOP) の選択を経て形成される。*ss* 変異体におけるこの *ac* の発現は、発現の初期から著しく減少しており、最終的には消失してしまった。このことから、*ss* は SB 形成において、*ac* の発現誘導・維持に重要であることが示唆された。SB 形成には、ホメオボックス遺伝子 *aristaless (al)* が必須であることも知られていたため、*ss* と *al* の発現パターンを比較すると、両者は一部重なりを持ちながら隣り合って発現しており、その重なり部分でのみ、*ac* が発現していた。*ss* 変異体のモザイク解析や *ss* の強制的な大量発現からは、*ss* は *al* の発現を抑制する活性を持っており、この抑制と正の発現調節のバランスによって *ss* 発現領域側の *al* の発現領域の境界が決定されており、それによって、SB 形成に必要な *ac* の発現領域を決定していることが示唆された。

SB が形成されない T1 の肢原基では、*ss* の体壁領域での発現は見られず、*Scr* 変異体のモザイク・クローン内で *ac* の発現を伴って異所的に発現したことや、*ss* の強制発現によって

も *ac* が異所発現したことから、*Scr* は、少なくとも *ss* の発現抑制を介して、T1 での SB 形成を抑制していることが示唆された。これに対して、T3 の肢原基では *ss* は T2 と同様に発現しており、*Ubx* は *ss* の発現とは無関係であったことから、*Ubx* は、*Scr* とは別の方法で、T3 での SB 形成を抑制していることが示唆された。これらのことは、隣接する領域での似通った形態を、異なる *Hox* 遺伝子が異なるメカニズムで制御していることを示唆しており、*Hox* 遺伝子による前後軸に沿った形態の多様性形成の新たなメカニズムを提唱するものである。



(図1) Dan のドメイン解析。(A) は強制発現に用いた construct の模式図を示す。(B-G) ハエの成虫肢の写真。(B) 野生型の肢。(C) *Dll-Gal4* による *dan* 全長の強制発現では肢は触角に変換する(矢頭)。PSQドメインのみ(D)、PSQドメインを欠損したもの(E)、PSQドメイン+C末端(F)の強制発現では特に表現型は観察されない。(G) C末端を欠損した *dan* の強制発現では、全長の強制発現と比較して弱い表現型を示す個体の割合が高い。矢頭はC末端を欠損した *dan* の強制発現による肢の先端の一部の欠失を示す。



(図2) *ssSM* のモザイク解析。触角原基における *ssSM* のクローンでは *ss* mRNA の発現は変化しないのに対し(A,A',マゼンタ)、Ssタンパク質の発現は低下する(B,B',マゼンタ)。クローンは GFP のシグナル(緑)の喪失により特定される。(A''), (B'') はそれぞれ(A)と(A'), (B)と(B')を重ね合わせたもの。

(図3) 野生型(A)及び *ss* 変異体(B)の成虫を横から見た写真。それぞれ白枠の部分の拡大図を右下に示してある。野生型で見られる sternopleural bristle (SB)(A)が、*ss* 変異体では欠失している(B)。(C-E) 野生型の T1、T2、T3 肢原基の、将来体壁に分化する領域における Ss (赤)、Achaete (Ac, 緑) 及び Aristaless (Al, 青) の発現。(C) は C の白枠の部分の拡大。(D') は (D) を緑の線で切った断面図。SBのない T1 では Ss、Ac 共に発現していないが(C,C')、SBの形成される T2 では Ss と Ac の発現が見られる(D)。Al は Ss と一部重なって発現し、その部分で Ac の発現が見られる(D', 矢頭 Ss、Ac、Al のシグナルが重なって白く見える) 一方 SBのない T3 では Ss は発現しているが Ac の発現は見られない(E)。