

# 論文の内容の要旨

## 論文題目 昆虫肢付節の分節化における転写因子の 動的な発現制御による領域の決定機構

氏 名 名取 恒平

### 序論

多細胞生物の発生の過程では、受精卵というただ一つの細胞が細胞分裂を繰り返し、特異的な遺伝子の発現により性質の異なる細胞群からなる領域に細分化することで、立体的な組織を構築する。この複雑かつ精密な過程を可能にする分子メカニズムの全体像、また、その過程のどのような変化が様々な生物種固有の形態をもたらすのかを理解することは、昔から続く、発生生物学上の興味深いテーマである。

昆虫は多細胞生物の中でも、地上の様々な環境に幅広く適応し莫大な種数を誇る分類群であり、大きな形態の多様性を持ち、形態形成の分子メカニズムとその進化の解明に適した研究対象である。昆虫の肢は体に近い部分から、基節、転節、腿節、脛節、付節、先付節と呼ばれる6つの節を持つが、このうち付節は昆虫種によって1～5の異なる数の分節に分かれており、この部分の領域分割や関節の形成を司るシステムの種特有な変更が存在すると考えられる。付節の領域分割の分子的メカニズムを明らかにすることで、多細胞生物の形態形成の単なる一つの例としてだけでなく、種間の形態的な多様性をもたらすメカニズムに迫ることができるであろう。

ショウジョウバエの成虫肢は幼虫体内の肢原基と呼ばれる一層の細胞からなる円盤状の原基から形成される。肢の先端に対応する肢原基の中心から Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) のリガンドが分泌され、EGFR シグナルの強度に応じて発現する領域特異的な転写因子の相互制御により、先付節と付節の各分節領域が決定していると考えられている。しかし実際には、肢原基は細胞分裂により成長しながら段階的に領域を分割しており、そのような単純なトップダウン式の制御だけでは付節の領域化を説明することが出来ない。ホメオドメインを持つ転写因子をコードする遺伝子 *BarH1* と *BarH2* (以下 *Bar* と総称する) は、3 齢幼虫初期には付節遠位側で発現を開始し (図 1. A)、付節近位側で発現している別の転写因子をコードする *dachshund* (*dac*) の発現領域と隣接して発現している。3 齢幼虫中期には *Bar* と *dac* それぞれの発現領域の間にどちらも発現していない領域 (ギャップ) が生じる (図 1. B-C)。その後、付節領域の成長に伴い、*Bar* の発現しない領域がさらに拡大し、肢原基の外形から各分節が区別出来る 3 齢幼虫後期には、第 1、第 2 付節で *dac* の発現が見られるが第 3 付節ではどちらも発現しておらず、第 4 付節での比較的弱い *Bar* 発現と第 5 付節の

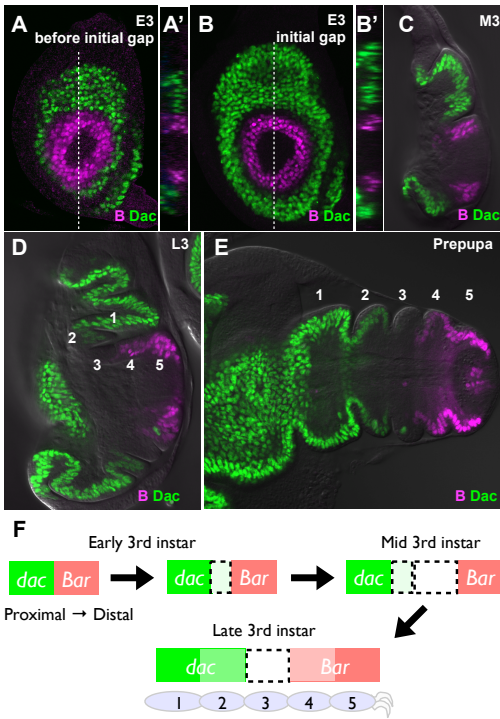


図 1. *Bar* と *dac* の発現領域の変化.

A. 3 齢初期には *Bar* (紫) と *dac* (緑) の発現領域は隣接している. B-C. 3 齢初期から中期にかけて *Bar* と *dac* の間にギャップが生じ、その後、*Bar* の発現しない領域はさらに拡大する. D-E. 3 齢後期から前蛹期には第 1 付節での強い *dac* の発現、第 2 付節での弱い *dac* の発現、どちらも発現していない第 3 付節、第 4 付節での弱い *Bar* の発現、第 5 付節で強い *Bar* の発現が見られ、各付節と *Bar*、*dac* の発現による領域が対応している. F. *Bar* と *dac* の発現変化のモデル図  
A, B: 肢原基の正面像. A', B', C-E: 肢原基の断面像. 右側が遠位側.

比較的強い *Bar* の発現という明確な 5 つの領域に分かれる (図 1. D-E、模式図 F)。この間の *Bar* の発現変化が各付節の領域化に必要なことは、*Bar* の発現を完全に失った場合は第 1 付節以外が融合し、後期における発現を失った場合は第 3～第 5 付節のみが融合することなどから示されている。しかし、このような *Bar* や *dac* の発現変化をもたらす 5 つの付節領域を形成するメカニズムは十分にわかっていなかった。

本研究は、発生と形態形成のモデル生物であるショウジョウバエの成虫肢原基を用いて、付節領域における *Bar* の発現変化を引き起こし、5 つの付節の領域を形成する分子メカニズムを解明することにより、成長しつつある組織でどのように正確な領域が決定されるのかについての知見を得ることで、昆虫種間で異なる数や大きさの付節がどのように獲得され得たのかについての示唆を得るものである。

## 結果

### ・ *rotund* による第 3 付節での *Bar* の発現消失

*Bar* の発現領域の変化に合わせて発現を変化させる遺伝子として、Zinc-finger ドメインを持つ転写因子をコードする *rotund* (以降、*rn*) に着目した。*rn* の発現をレポーター遺伝子である *LacZ* の発現で観察出来るエンハンサートラップラインを用いて、*Bar* と *rn* の発現領域の変化を免疫染色により観察したところ、*rn* は *Bar* より後に、*Bar* 発現領域に隣接した近位側の領域で発現を開始し (図 2. A)、その後徐々に発現領域を拡大し、3 齢中期からは *Bar* と重複した領域で発現することが示された (図 2. B-C)。*rn* の発現を失った変異体では 3 齢後期でも第 3 付節での *Bar* の発現は維持され (図 2. D)、また GAL4-UAS 系を用いた *rn* の強制発現によって *Bar* の発現が抑制されたことから (図 2. E)、第 3 付節での *Bar* の発現消失は *rn* によるものであり、*Bar* の発現しない領域の拡大は、*rn* の発現領域の拡大によることが分かった。(図 2. F)

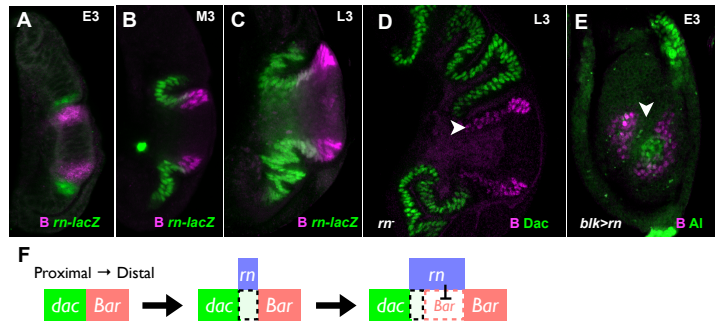


図 2. *rn* の発現領域の変化と第 3 付節における *Bar* の抑制.

A-C. *rn* (緑) は *Bar* (紫) に隣接した近位側領域で発現し始め、拡大していく. D. *rn* の変異体では *Bar* が第 3 付節でも消失しない (矢頭). E. *rn* を強制発現した領域で *Bar* が抑制される (矢頭). F. *rn* の発現拡大により *Bar* の発現が限局されるモデル図  
A-D: 肢原基の断面像. 右側が遠位側. E: 肢原基の正面像. 全てで上側が背側.

### ・ *nubbin* による *rn* の発現制御

*Bar* の発現変化に *rn* の発現変化が重要であることが分かったが、*rn* の発現変化を引き起こす原因については不明であった。POU-ホメオドメインを持つ転写因子をコードする *nubbin* (*nub*) は 3 齢幼虫後期に第 5 付節で発現しているが、*rn* の発現はちょうどこれと反対に第 4 付節まで発現が広がっており、*nub* による *rn* の発現制御が示唆された。*rn* のエンハンサートラップラインを用い、免疫染色により *nub* と *rn* の発現を詳細に

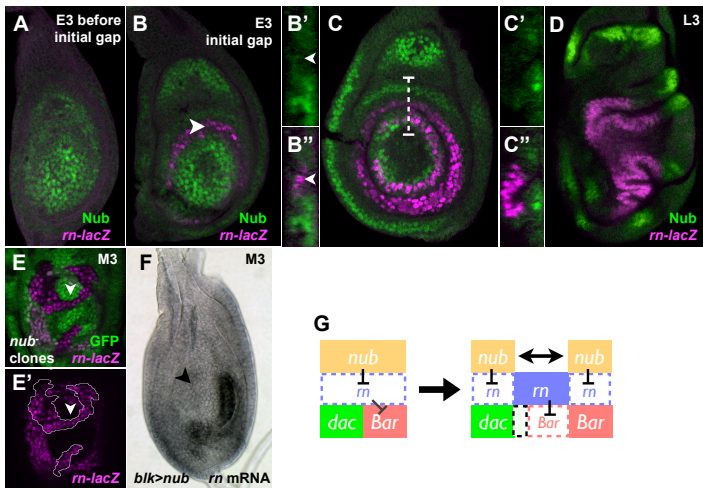


図 3. *nub* の発現変化と *rn* の抑制.

A. 3 齢初期には *nub* (緑) は付節全体を含む領域で発現している. B. *nub* の発現が消失した領域で *rn* (紫) が発現を開始する (矢頭). C-D. 付節領域の *nub* の発現領域が縮小するに伴い *rn* の発現領域が拡大する. E. *nub* を欠失したクローンでは *rn* が異所的に発現する (矢頭). F. *nub* を強制発現した領域で *rn* が抑制される (矢頭). G. *nub* の発現消失により *rn* の発現が拡大するモデル図. A, B, C, E-F: 肢原基の正面像. B', B'': B の矢頭付近を拡大した断面図. C', C'': C の点線付近を拡大した断面図. D: 肢原基の断面像. 全てで上側が背側.

観察すると、*rn* の発現が始まる前の 3 齢幼虫初期には、*nub* は *Bar* の発現領域を含む広い領域で発現していた (図 3. A)。その後ちょうど *Bar* の発現領域の外側で隙間のような発現の消失を見せ、まさにその領域で *rn* の発現が開始していた (図 3. B)。その後 *nub* の発現が第 5 付節に向かって縮小するのに伴い、*rn* の発現が拡大していった (図 3. C)。モザイク解析により *nub* を欠失した細胞では *rn* が異所的に発現し (図 3. E)、また、GAL4-UAS 系を用いた *nub* の強制発現によって *rn* の発現が抑制された (図 3. F)。これらから、*nub* の発現領域が縮小することにより *rn* が遠位側に発現を拡大し、徐々に *Bar* を抑制していくと考えられた (図 3. G)。

### ・ EGFR シグナルによる *nub* の制御

さらに *nub* の発現制御メカニズムの解明を目指した。免疫染色により観察された *nub* の発現は肢原基中央から周縁にかけて徐々に弱くなる勾配を形成しており (図 3. A)、同様の勾配を形成している EGFR シグナルによる制御が示唆された。EGFR の Dominant negative 型を GAL4-UAS 系により強制発現し、EGFR シグナルを低下させると *nub* の発現が抑制され (図 4. A)、EGFR の活性化型を flip-out システムと GAL4-UAS 系により一部の細胞群で強制発現させて EGFR シグナル活性化したところ *nub* の発現消失が抑制された (図 4. B)。これらから、3 齢幼虫初期における *nub* の発現は EGFR シグナルによる制御を

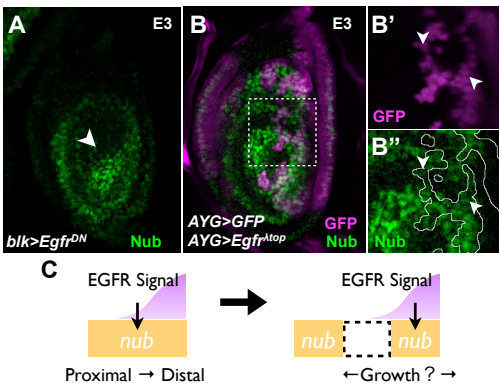


図 4. EGFR シグナルによる *nub* の発現制御.

A. EGFR シグナルの活性を強制的に落とした領域で *nub* (緑) が抑制される (矢頭). B. EGFR シグナルを強制的に上昇させた細胞 (紫) で *nub* (緑) の異所的な発現がみられる (矢頭). C. EGFR シグナルにより *nub* の発現領域が変化するモデル図. A-B: 全て肢原基の正面像. 上側が背側.

受けていることが示された (図 4. C)。

### ・ *apterous* による第 4 付節での *Bar* の発現維持

前述の通り、*nub* の発現が *Bar* の発現領域を含む付節の広い領域から、第 5 付節にまで縮小することで、*rn* が発現を拡大し、第 3 付節での *Bar* の発現を終結させることが分かった。しかし、*rn* は発現が消失する 3 齢幼虫後期までに第 4 付節にまで発現が拡大しており、第 4 付節では *Bar* と *rn* の発現が重なるため、*rn* の発現下でも *Bar* の発現を維持しうる要因があると考えられた。LIM-ホメオドメインを持つ転写因子をコードする *apterous* (*ap*) はまさにこの第 4 付節で特異的に発現する転写因子であり、*ap* 変異体の肢では第 4 付節が欠失するが、どのように第 4 付節の形成に関わっているのかは明らかでなかった。免疫染色により *ap* の発現を *Bar*、*rn* と比較して詳細に観察したところ、3 齢幼虫中期に、*rn* と *Bar* の発現領域が重複し始めるまさにその細胞で発現を開始していた (図 5. A-B)。GAL4-UAS 系を用いて *ap* をより初期から強制発現した領域では第 3 付節で見られるような *Bar* の発現消失が起らず (図 5. C)、また GAL4-UAS 系を用いて *ap* に対応す

る Inverted repeat RNA を強制発現し RNAi によるノックダウンを行うと、本来は *Bar* の発現が維持される第 4 付節でも *Bar* の発現が消失した (図 5. D)。このことから、*ap* は *rn* による *Bar* の抑制を無効にし、*Bar* の発現を維持することで第 4 付節となる領域を決定する機能を持つことが示された (図 5. F)。

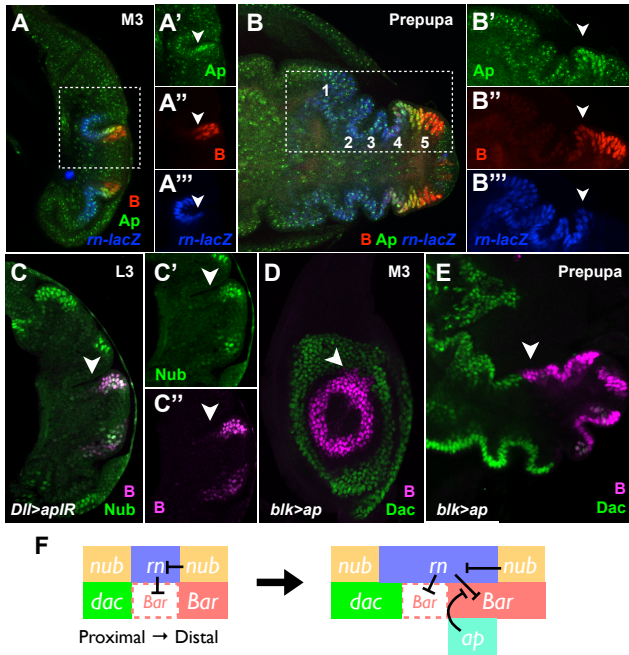


図 5. *ap* の発現領域と *Bar* の発現維持.

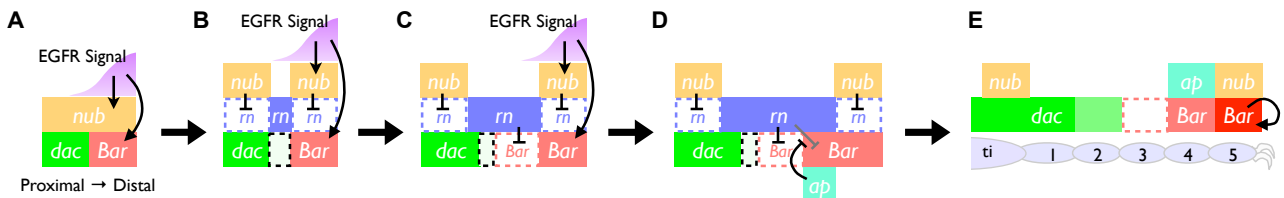
A-B. *ap* (緑) は *rn* (青) と *Bar* (赤) の発現が重複する細胞で発現する (矢頭). C. *ap* をノックダウンすると第 4 付節での *Bar* の発現が消失する (矢頭). D-E. *ap* を強制発現した領域では第 3 付節でも *Bar* の発現が消失しない (矢頭). F. *rn* による *Bar* の抑制下で *ap* が *Bar* の発現を維持するモデル図  
A-C, E: 肢原基の断面像. 右側が遠位側. D: Leg disc の正面像. 全てで上側が背側.

## 結論と考察

本研究により、EGFR シグナルの制御下にある *nub* の発現領域が縮小するのに応じて *rn* が発現を開始・拡大し、それによって *Bar* の発現領域が消失した領域が第 3 付節となり、*ap* が特定の時期に発現を開始することで *Bar* の発現が維持された領域は第 4 付節となるという過程が明らかになった。

図 6. 付節の領域決定のモデル図.

A. 3 齢幼虫初期には *Bar* と *dac* は隣接して発現しており、EGFR シグナルが到達する広い範囲で *nub* が発現している。B. 組織の成長に伴い EGFR シグナルの到達範囲から外れた領域で *nub* の発現が消失し、*rn* が発現を開始する。C. *nub* の発現を失った領域が広がるに連れ *rn* の発現領域が拡大し、近位側の *Bar* が抑制されていく。D. *ap* が発現を開始し、以降は *rn* の発現が拡大しても *Bar* が抑制されない領域が出現する。E. *rn* により *Bar* の発現が消失した領域は第 3 付節となり、*ap* により *Bar* の発現が維持された領域は第 4 付節となる。



こうして導き出された付節の領域化メカニズムはいくつかの点で興味深いものである。まず、*rn* 及び *Bar* の発現領域変化を引き起こす *nub* は EGFR シグナルの制御下にあることから、肢原基の成長により中央から分泌される EGFR リガンドが到達しない領域が生じ、*nub* の発現変化を引き起こし得る。このことは付節領域の成長自体が分節化と密接に関係している可能性を示唆する。次に *ap* の発現開始時期が、*Bar* の発現が消失する領域と維持される領域の割合を決定し、最終的な付節の分節化および各付節の大きさの決定に重要と考えられることである。このことから、付節領域の成長の度合いと *ap* の発現開始時期によって付節領域の分節化が容易に影響を受けることが予想される。本研究の結果を基礎として、他の昆虫でも本研究で重要性が明らかになった転写因子群の発現を解析することにより、昆虫種間で見られる付節の分節数やプロポーシヨンの多様性をもたらしているメカニズムについての解明が期待される。