

学位論文題名

The Study of Cell Cycle and Determination : Sensory
Mother Cells of Adult Bristles are Determined
during G2 Arrest in *Drosophila melanogaster*.

(細胞周期と発生運命の決定の研究—ショウジョウバエ細胞周期

G2 停止期に起こる成虫感覚毛母細胞の決定—)

学位論文内容の要旨

多細胞生物の宿命として、個々の細胞には、細胞社会に適應した細胞周期の制御が求められる。細胞は胚発生中に分裂により増殖し、かつ、発生運命の決定も同時になされなければならない。この細胞周期と発生運命決定の関係は、古くから発生生物学の大きな問題の一つである。近年、キイロショウジョウバエ (*Drosophila melanogaster*) を用いた研究は、古典的な遺伝学の知識の蓄積に加え分子生物学の新しい知識や手法の発達之恩恵を受け、発生生物学の分野で目覚ましい進歩を遂げている。細胞周期と決定の関係を新しい観点から調査するにはハエは大変都合が良い。

ハエの成虫の中胸部背中(背楯板)には大小2種類の機械感覚毛である剛毛が存在する。これらの剛毛は、上皮性細胞から特定の感覚毛母細胞として決定を受け選び出された細胞に由来し、その母細胞は2度の分裂後感覚毛として分化する。本研究では、これらの感覚毛母細胞への決定がどのようになされるか、細胞周期の観点から解析を行ない、発生運命の決定と細胞周期の制御について考察した。

第一章：大剛毛は、背楯板上に左右11本ずつ決った位置に存在し、その母細胞は、幼虫期に成虫翅原基上に出現する。まず初めに翅原基全体の細胞周期を調べるために、DNA合成期に特異的に取り込まれるDNAの塩基のアナログであるプロモデオキシウリジン(BrdU)を用いた。BrdU溶液に切り出した翅原基を入れBrdUを取り込ませた後に抗BrdU抗体で標識し、免疫組織化学法により染色した。その結果、取り込みパターンは、翅原基全体に均一ではなく、盛んにBrdUを取り込む分裂増殖中の原基の一部に、BrdUを取り込まない分裂を停止している細胞集団(MQC)が認められた。

A101系統は、ハエの遺伝子の一部と大腸菌の遺伝子(LacZ)との融合遺伝子が導入され

た形質転換ハエの1系統であり、決定直後の感覚毛母細胞とその娘細胞でリポーター遺伝子である LacZ が発現される。LacZ の産物であるβ-ガラクトシダーゼ (β-gal) の酵素活性を利用した酵素活性染色法により母細胞を他の細胞と識別することが可能である。MQCと大剛毛の母細胞の時空間的關係を知るために、A101系統の翅原基を用いて母細胞とBrdUとの2重染色を行なった。その結果、MQCは母細胞出現前に形成され、その中から母細胞は決定を受けることが明らかとなった。また、出現した母細胞は次の分裂前にBrdUで標識されないことから、MQCはG2期で停止しており、母細胞はG2期で決定を受けていることが示唆された。母細胞の運命決定は、細胞周期の特定の時期で起き、細胞周期が停止することと密接な関係があると考えられた。

MQCの消長パターンは、剛毛形成を支配する遺伝子 achaete と scute の発現パターンとよく似ていた。そこで、MQCの形成にこれらの遺伝子が関与するかどうかを突然変異を用いて解析した。その結果、MQCはこれらの突然変異でも認められ、MQCの形成にはこれらの遺伝子とは別の遺伝子による機構が存在することが明らかとなった。

第二章：小剛毛の母細胞の出現パターンを、A101系統の蛹前期の背楯板を抗β-gal抗体を用いた免疫組織化学法で染色することにより解析した。小剛毛は、背楯板の全域にはほぼ等間隔に左右百数十本ずつ分布し、背正中域には縦5列の小剛毛が認められる。これらの小剛毛に注目し調査を行なった。小剛毛の母細胞は、縦の列を単位とし、時空間的に決まったパターンで出現した。母細胞は、胚蛹殻形成後(APF)8時間で現れはじめ12時間にはほぼ全てが出現した。各々の列内では、母細胞の出現に一定の順序は認められなかったが、早くに出た母細胞と最終的には2-3細胞の距離を保って出現することが明らかとなった。また、12時間APF以降でも既存の母細胞の間隔が、2-3細胞より広い所には、列の内外を問わず、新しく母細胞が出現することがあった。小剛毛の母細胞出現パターンは、母細胞の決定が大剛毛では細胞集団単位で行なわれるのに対し、小剛毛では列を単位に進行することを示唆している。

小剛毛の母細胞の時空間的出現パターンを把握したことは、小剛毛における母細胞の決定と細胞周期の関係を解析する上で有用な情報となった。

第三章：大剛毛で見られたような母細胞決定と細胞周期の關係が小剛毛においても認められるか、小剛毛の母細胞出現前後のBrdUの取り込みパターン、および、細胞の全ての核を標識する抗体による細胞分裂像を観察することにより解析した。

BrdUの取り込みパターンを背楯板で解析した結果、母細胞出現前では、全ての細胞でBrdUの取り込みは観察されなかった。これより、背楯板の細胞は、囲蛹殻形成後細胞分裂を停止し、小剛毛の母細胞はその停止した細胞群の中から決定を受け形成されることがわかった。母細胞として決定を受けた細胞は、BrdUを取り込まずに次の分裂に移行し、2つの娘細胞ではじめてBrdUの取り込みが観察されることから、小剛毛の母細胞への決定も大剛毛の場合と同様にG2期で起こることが示唆された。

両剛毛の母細胞の決定期には、G2期で細胞周期が停止していることが示された。このG2期で停止することが発生運命の決定に必要であるかを検証するため、母細胞出現前のG2期の細胞に強制的に分裂を誘導し、母細胞形成への影響を解析した。

胚のG2/Mを制御する遺伝子として知られる string 遺伝子と heat shock 70 遺伝子との融合遺伝子 (hs-stg) を導入された遺伝子組み換え系統を用い、熱ショックを与え、stg 遺伝子を強制的に発現させた結果、G2期で停止している細胞の分裂は誘導され、熱ショック後60分に最も多い分裂像が観察された。

そこで母細胞の決定の時期に分裂を誘導するとどのような影響があるのかを調べた結果、数と場所が不定の小剛毛では、影響が特定できなかったが、数と場所の定まっている大剛毛では、成虫の剛毛が消失することが観察された。

大剛毛の消失の原因が母細胞が形成されないことによるかどうか hs-stg と A101 を合わせ持つ系統により確かめた。熱ショックを与え、細胞分裂を誘導した後、感覚母細胞の出現を調べたところ、消失する剛毛に対応する母細胞は形成されていなかった。このことは、母細胞の決定過程において細胞周期が停止していることが必要であること、その細胞周期停止は stg 遺伝子により制御を受けていることを示唆している。

本研究では、ハエの大剛毛および小剛毛の母細胞の決定と細胞周期の関係を調べ、両者には密接な関係があることが示された。これらの感覚毛母細胞が決定を受ける過程には、複雑な遺伝子間の相互作用および細胞間コミュニケーションが関与している。一方、細胞分裂は遺伝子の転写を中断し、その結果遺伝子の転写可能な長さや遺伝子の産物量に制限を与え、また、細胞膜の構造やその裏うち構造を一時的に変化させ、細胞間コミュニケーションや細胞内情報伝達機構に影響を与える。発生運命の決定期に細胞がG2期で停止することは、複雑な発生運命の決定のプロセスを保証する細胞周期の制御機構の1つであると考えられる。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 片 桐 千 明
副 査 教 授 堀 浩
副 査 教 授 浦 野 明 央
副 査 助 教 授 栃 内 新

学 位 論 文 題 名

細胞周期と発生運命の決定の研究：ショウジョウバエ細胞周期

G2停止期に起こる成虫感覚毛母細胞の決定

(The Study of Cell Cycle and Determination: Sensory Mother Cells of Adult Bristles are Determined during G2 Arrest in *Drosophila melanogaster*.)

多細胞生物の発生過程では、細胞は分裂により増殖する一方で、運命決定の選択を行い、分化していく。この細胞周期と発生運命決定、分化の関係は、古くから発生生物学の大きな問題の一つである。申請者は、遺伝学の知識が豊富に蓄積され、さらに分子生物学の新しい手法が利用可能なキイロショウジョウバエ (*Drosophila melanogaster*) を用い、細胞周期と決定の関係について新しい観点から解析を加えた。ショウジョウバエ成虫の中胸部背板には大小2種類の剛毛が存在する。これらの剛毛は、幼虫期から蛹期にかけて上皮性細胞から感覚毛母細胞として決定を受け選び出された細胞に由来する。本論文は、これら2種類の感覚毛母細胞の運命決定過程に注目し、決定は制御された細胞周期のもとで進行することを述べている。

第一章では、大剛毛について、その母細胞の決定と細胞周期の関係を解析している。DNA塩基のアナログであるプロモデオキシウリジン (BrdU) を用い、免疫組織化学の方法により、翅原基全体の細胞周期活性を調査した。その結果、盛んに BrdU を取り込む分裂増殖中の原基の一部に、BrdU を取り込まない分裂を停止している細胞集団 (MQC) を見いだした。MQC と大剛毛の母細胞形成の時空間的關係を知るために、決定直後の感

覚毛母細胞でリポーター遺伝子 LacZ を発現する形質転換系統 A101 の翅原基を用いて、母細胞と BrdU との 2 重染色を行った。その結果、母細胞は G2 期で停止した MQC の中から決定を受け、形成されることを示した。

第二章では、この決定と細胞周期の関係の調査を、小剛毛の母細胞決定過程に発展させるための基礎として、小剛毛母細胞の出現様式を A101 系統を用いて解析している。中胸背板の全域にはほぼ等間隔に左右百数十本ずつ分布する小剛毛の母細胞は、縦の列を単位とし、時空間的に決まったパターンで出現することを明らかにした。

第三章では、小剛毛における母細胞の決定と細胞周期の関係を調査している。小剛毛の母細胞出現前後の BrdU の取り込みパターン、および細胞分裂像を観察することにより、小剛毛の母細胞も蛹期に細胞周期を G2 期で停止した細胞群の中から決定を受け形成されることを明らかにした。

続いて、G2 期で細胞周期が停止することが発生運命の決定に必要であるかどうかを実験的に検証している。まず、G2/M 期を制御する string 遺伝子と heat shock 70 遺伝子との融合遺伝子 (hs-slg) を導入した系統に熱ショックを与え、slg 遺伝子を強制的に発現させることにより、幼虫期および蛹期の G2 期で停止している細胞の分裂を誘導することができることを確認している。この系統を用い、母細胞の決定の時期に強制的に分裂を誘導することにより、母細胞形成が起こらず、成虫の大剛毛が消失することを明らかにし、母細胞の決定過程における細胞周期停止の重要性を示した。

申請者は、本研究によりハエの大剛毛および小剛毛の母細胞の決定と細胞周期の関係を調べ、両者には密接な関係があることを明らかにした。これらの感覚毛母細胞が決定を受ける過程には、複雑な遺伝子間の相互作用および細胞間コミュニケーションが関与している。一方、細胞分裂は遺伝子の転写を中断し、その結果遺伝子の転写可能な長さや遺伝子の産物量に制限を与える。また、細胞膜の構造やその裏うち構造を一時的に変化させ、細胞間コミュニケーションや細胞内情報伝達機構に影響を与える。申請者が明らかにした発生運命の決定期に細胞が G2 期で停止することは、複雑な発生運命の決定のプロセスを保証する細胞周期の制御機構の 1 つであると考えられ、発生生物学における細胞周期と決定機構に関わる新しい側面を明らかにしたものである。参考論文 3 篇もすべて査読付き国際誌に掲載され、高い評価を受けている。よって、審査員一同は申請者が博士(理学)の学位に十分な資格があると認めた。