

学 位 論 文 題 名

Retrotransposon-Induced Tissue-Specific Ectopic
Expression of the *Om* Gene causes the Eye
Morphology Mutation in *Drosophila ananassae*

(レトロトランスポゾンにより誘発される組織特異的な
Om 遺伝子の異所的発現により引き起こされる
アナナスショウジョウバエの複眼形態突然変異)

学位論文内容の要旨

アナナスショウジョウバエの複眼形態 (*Om*) 突然変異は、マーカー系統 (*ca;px* 系統)、より高頻度に生じる、半優性の、複眼形態のみに異常を生じるネオモルフ突然変異である。*Om* 突然変異は、少なくともゲノム中に散在する 22 の異なった遺伝子座に位置付けられ、各 *Om* 遺伝子座は、その近傍にレトロトランスポゾン *tom* の挿入を伴っており、*tom* の挿入が *Om* 突然変異の原因の一つであると考えられている。この特徴的な突然変異誘発系は、レトロトランスポゾンによる突然変異誘発現象や、複眼形態形成機構の研究において興味ある研究対象である。実際に、*Om* 突然変異誘発系について知るためには、できるだけ多くの *Om* 遺伝子座に関して、各 *Om* 遺伝子座のクローニング及び各 *Om* 遺伝子の同定、さらに各突然変異体における変異機構の解明を行い、これらの結果を比較することが必要であると考えられる。本研究では、多数ある *Om* 突然変異の中から、X 染色体上に位置付けられる *Om* (1A) 突然変異を選び、*Om* (1A) 遺伝子座のクローニングおよび *Om* (1A) 遺伝子の同定、さらに *Om* (1A) 突然変異体がどのように複眼形態形成の異常を引き起こすかを調べ変異機構の解明を行った。また、同時にレトロトランスポゾン *tom* がどのようにして *Om* 突然変異をひき起こすのかについての解析を行った。これらの解析結果は以下の三つの章に分けて記した。

第一章では、*Om* (1A) 突然変異の遺伝学的解析と *Om* (1A) 遺伝子座のクローニングについて報告した。まずはじめに、*Om* (1A) 突然変異は、細胞遺伝学的に X 染色体左腕の端、

cut突然変異とほぼ同じ場所に位置付けられているので、既にクローニングされているキイロショウジョウバエのcut領域の一部をプローブに、アナナスショウジョウバエのca:px系統より作製したゲノムライブラリーをスクリーニングしcut遺伝子座の一部と思われる約100kbの領域をクローニングした。次に、クローニングした領域において、0m(1A)突然変異のallele系統のゲノム構造を調べ、3つのallele系統においてcut転写領域の付近にtomと思われる挿入配列があることを明かにした。また、この3つの系統より偶然生じた復帰突然変異体および極端型突然変異体のゲノム構造を調べた結果、これらの派生系統においては、挿入したtomの欠失や新たな挿入が、それぞれ複眼形態異常の復帰および極端型派生と関係あることが示された。さらに、 γ 線の照射により0m(1A)突然変異の復帰突然変異体を誘発し、これを解析した結果、得られた復帰突然変異体が、cut突然変異と相補しないこと、およびcutの転写領域に切断点を持っていることが示された。以上の結果より0m(1A)突然変異は、cut遺伝子座にtomが挿入することにより引き起こされること、0m(1A)突然変異は、cut相補グループに属する突然変異であることが分かった。

第二章では、0m(1A)突然変異を発生学的に調べると共に、0m(1A)突然変異とcut遺伝子の関係について調べた。まずはじめに、0m突然変異体における複眼形成過程を免疫化学的手法を用いて解析し、0m突然変異体では、3齢幼虫の複眼原基において異常な細胞死が起こること、個眼を形成する細胞の分化の核となる光受容細胞の分化が部分的に抑制されていることを明かにした。また、cutタンパクに対する抗体を用いて0m(1A)突然変異体におけるcutの発現様式を調べ、3齢幼虫期の複眼原基においてcutタンパクが異所的に発現していることを明かにした。そこで、cutの異所的発現の複眼形成に及ぼす影響を調べるために、ヒートショックタンパク遺伝子のプロモーター領域の下流にcutのcDNAをつないだ複合遺伝子を導入したキイロショウジョウバエを用いて、3齢幼虫期にヒートショックを与えることにより人工的にcutタンパクを異常発現させ、複眼原基を観察した。その結果、異常な細胞死と光受容細胞の分化の抑制が観察された。同様にcutの異常発現を誘導した幼虫を成虫まで飼育し、その複眼形態を観察したところ、個眼の部分的欠失により生じたと思われる、個眼配列の乱れが見られた。以上の結果より、0m(1A)突然変異体で見られる複眼形態の異常は、3齢幼虫期の複眼原基におけるcut遺伝子の異所的発現による、異常な細胞死や、光受容細胞の分化の抑制

により生じると結論した。キイロショウジョウバエにおいて、cut遺伝子は発生過程において様々な組織で発現し、特に外部感覚器の発生においては、発生運命選択に関わる遺伝子の一つであることが知られている。よって、0m突然変異体では、このような細胞の分化決定に重要な役割を持つ遺伝子の異常な発現が、個眼を形成する細胞の分化決定時期に影響を及ぼし、異常な細胞死や、光受容細胞の分化の抑制を引き起こしているのではないかと考えられる。

第三章では、0m遺伝子座近傍に挿入したレトロトランスポゾンtomが、どのようにして、3齢幼虫の複眼原基で0m遺伝子の異所的発現を導くのか、その機構について調べた。現在までに知られているレトロトランスポゾンおよびこれと構造的に似たレトロウイルスにおいて、ロングターミナルリピート(LTR)部位に、組織特異的な転写に関与するエンハンサー配列が含まれていることが知られている。よって、0m突然変異体で観られる、0m遺伝子の異所的発現は、tomLTRに存在する組織特異的エンハンサー配列によりもたらされると推測される。そこで、tomLTRの下流にリポーターとなるlacZ遺伝子をつないだ複合遺伝子を導入したキイロショウジョウバエを作り、リポーター遺伝子の発現を観察した。その結果、確立した16系統全ての3齢幼虫の複眼原基においてリポーター遺伝子の発現が観察された。またリポーター遺伝子の発現様式は、系統により様々であり、この系統間の違いは、複合遺伝子が挿入した染色体上の位置の違いにより生じると考えられた。以上の結果より、tomのLTRは、3齢幼虫の複眼原基において特異的に働くエンハンサー配列を含み、そのエンハンサーの活性はtomの挿入した染色体上の位置に影響され活性様式が変化すると結論した。

以上三つの章の結果より以下の2つのことを推論した。1) アナナスショウジョウバエの0m突然変異体では、0m遺伝子座近傍に挿入したtomのLTRに含まれる3齢幼虫複眼原基特異的なエンハンサー配列の働きにより0m遺伝子の3齢幼虫複眼原基での異所的な発現が誘導される。2) 0m遺伝子は、3齢幼虫期において異所的に発現することにより複眼形成機構に影響を与える遺伝子群であり、各0m遺伝子は、本来、細胞分化の決定に関与していると思われる。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 堀 浩
副 査 教 授 高 木 信 夫
副 査 助 教 授 木 村 正 人

学 位 論 文 題 名

Retrotransposon-Induced Tissue-Specific Ectopic Expression of the Om Gene causes the Eye Morphology Mutation in *Drosophila ananassae*

(レトロトランスポゾンにより誘発される組織特異的な
Om 遺伝子の異所的発現により引き起こされる
アナナスショウジョウバエの複眼形態突然変異)

アナナスショウジョウバエの複眼形態突然変異 (Om) は、複眼形態異常のみを引き起こす半優性、ネオモルフ突然変異で、ゲノム中 22 の異なった遺伝子座に存在し、レトロトランスポゾン tom の挿入によって生ずると考えられている。この特徴的な突然変異は、動く遺伝子による突然変異誘発機構や複眼形態形成機構の分子遺伝学的研究に格好の材料である。申請者は、数多い Om 突然変異系統の中より、X 染色体上に位置付けられる Om (1A) を選び、遺伝子の同定と機能解析および tom による変異機構の解明を目的として実験を行った。

まず第一に、Om (1A) が遺伝的に cut とほぼ同じ位置に存在することを利用して、既にクローニングされているキイロショウジョウバエの cut 領域の一部をプローブとしてゲノムライブラリーをスクリーニングし、約 100 kb の領域をクローニングした。次に、対立遺伝子系統数種におけるこの領域の構造を調べたところ、三つの系統において cut 転写領域と思われる付近に tom の挿入が認められた。また、偶発復帰およびガンマ線誘発復帰突然変異を調査したところ、これらが cut と相補しないこと、cut 転写領域と思われる部位に切断点を有することが分かり、Om は cut 相補グループに属すると結論された。

次に、変異体における複眼形成過程の調査を行った。その結果、三令幼虫の複眼原基において異常な細胞死が起こること、光受容細胞の分化が部分的に抑制されていること、cut 蛋白が本来発現しないところに異所的に発現していることが分かった。さらに、熱ショック蛋白遺伝子プロモーターの下流に cut cDNA を繋いだキメラ遺伝子をキイロショウジョウバエに導入し、熱処理により cut の異所的発現を人工的に誘導したところ、三令期幼虫では異常な細胞死と光受容細胞の分化抑制が観察され、成虫においては個眼の部分欠失による個眼配列の乱れなどが観察された。キイロショウジョウバエでは、cut は発生過程において様々な組織で発現し、特に外部感覚器においては発生運命の選択に関わっていると考えられている。従って、Om (1A) では、幼虫複眼原基におけるその異所的発現が細胞の分化決定の異常を引き起こすものと推定した。

次に、tom の作用機序を解明するために、tom LTR の下流にリポーターとして lacZ 遺伝子を繋いだ遺伝子をキイロショウジョウバエに導入し、lacZ の発現を観察した。その結果、16 の形質転換系統全ての三令幼虫複眼原基において lacZ の発現が認められ、tom LTR が複眼原基に特異的に働くエンハンサー機能を有することが証明された。

本研究は、Om (1A) 突然変異の生成機構を分子遺伝学的に解明したものであり、その成果は形態形成の分子機構の研究に多大の貢献をなすものであり、高く評価される。審査員一同は、参考論文をも含め申請者の研究業績を慎重に審議した結果、申請者が博士（理学）の学位をうくるに十分な資質を有するものと判定した。