

学位論文題名

Studies on the *Om* (1*E*) locus of
Drosophila ananassae[アナナスショウジョウバエの *Om* (1*E*) 遺伝子座の研究]

学位論文審査の要旨

自然突然変異の多くはトランスポゾンの挿入によってひきおこされる。その大部分は、調節領域や転写領域の構造を破壊することによって遺伝子の機能に阻害的な効果をおよぼす。しかしながら、トランスポゾンの挿入が、近傍の遺伝子の発現を活性化する突然変異の例がいくつか知られている。遺伝学的な解析をする上で、このような突然変異は、優性で分離が容易であること、劣性の突然変異を起こした場合は、同義遺伝子の存在や致死性のために認識しにくい遺伝子も認識し得ること、原因となる遺伝子をトランスポゾンタッキングで比較的容易にクローニングできることなどの利点がある。

アナナスショウジョウバエには、レトロトランスポゾン *tom* の挿入が、近傍の遺伝子の発現を複眼原基特異的に活性化することによって、複眼特異的に形態異常をおこすと考えられている一群の突然変異 *Om* (*Optic morphology*) がある。すくなくとも22遺伝子座の *Om* 突然変異があり、それぞれが遺伝子座に特有の形質を示す。*Om* 突然変異体では、過剰または異所的な *Om* 遺伝子の発現によって、複眼の分化が攪乱されることから、それぞれの *Om* 遺伝子は、本来なんらかの分化プロセスに携わっていると予想される。したがって、*Om* 突然変異の調査から、分化プロセスの遺伝子支配に関する知見を得ることが期待できる。本研究では、*Om* 突然変異の中で特にユニークな形質を持つ *Om*(1*E*) 突然変異に注目して、原因となる遺伝子を同定、解析し、その機能を探ることを目的とした。

第1章では、*Om*(1*E*) 突然変異体の外部および内部形質を記載した。他の遺

伝子座の *Om* 突然変異がすべて個眼の減少をおこすのに対し、*Om(1E)* 突然変異は複眼が増大する特異な形質を示す。*Om(1E)* 突然変異体の複眼は、正常の1.2~1.7倍の個眼を持ち、背側後方にふくらんでいる。しかし、個眼の配列や、個眼内部のパターン形成は基本的に正常である。複眼原基における個眼の分化の様子を観察した結果、*Om(1E)* 突然変異体における個眼数の増加は、個眼分化の頻度が高まったからではなく、分化に先だって上皮が過剰に増殖したためであると示唆された。複眼の増大に加え、成虫の視覚中枢にも体積の増加が認められたが、これは、個眼数の増加によって誘導された二次的な変化であると考えられる。

第2章では、*Om(1E)* 遺伝子座の分子遺伝学的解析について述べた。*Om(1E)* 突然変異体のゲノムライブラリーを、*tom* をプローブとしてスクリーニングし、*Om(1E)* 領域と思われるものをクローニングした。3つの*Om(1E)* 突然変異系統は、すべてクローニングした領域内に *tom* 挿入を持っており、ガンマ線で誘発した復帰突然変異体は、この領域のゲノム構造に変化を起していた。このことから、クローニングした領域が *Om(1E)* 突然変異に関係することが示唆された。一方、ノーザン解析により、*Om(1E)* 突然変異体の *tom* 挿入点近傍に2つの転写領域、t1 および t2 が見つかった。それらの複眼原基での発現を *in situ* ハイブリダイゼーションで調べたところ、t2 は、3つの *Om(1E)* 突然変異系統すべてで過剰発現していたが、t1 を過剰発現していたのは1系統だけであった。t1 および t2 のcDNA を、それぞれ *Hsp70* (heat shock protein 70) 遺伝子のプロモーターにつなぎ、キイロショウジョウバエに導入し、ヒートショックするか、またはプロモーター上流に組み込んだ *tom* LTR (long terminal repeat) によって発現を誘導すると、t2 cDNA を導入された形質転換体でのみ、個眼の増加がみられた。以上のことから t2 が *Om(1E)* 遺伝子であると同定された。

Om(1E) cDNA の塩基配列から推定される遺伝子産物は、530残基または464残基で分子量約55 kDaの、今までに知られていないタンパクであった。このタンパクは、全体的には親水性だが、膜貫通ドメインと推定される2つの顕著な疎水性領域を持つ。推定される細胞外ドメインは、スレオニン/セリンに富んでおり、細胞間コミュニケーションに関わる膜タンパクにみられる糖鎖付加 (O-glycosylation) 部分と類似している。一方、細胞内ドメインは、グルタミン

に富むドメインと、数カ所の顕著な塩基性アミノ酸クラスターをもつ。

第3章では、*Om(1E)* 遺伝子の発現領域の調査と、過剰発現／発現抑制の効果について述べた。

Om(1E) 遺伝子の機能が必要とされる組織や器官を推定するために、胚と成虫器官の原基に注目して、*Om(1E)* の転写産物とタンパクの空間的分布を、それぞれ、*in situ* ハイブリダイゼーションと免疫染色で調べた。抗*Om(1E)*抗体は、cDNA 配列の一部を大腸菌内で発現させて得られたタンパクを抗原として作成した。胞胚期以降の胚と3齢幼虫の成虫原基において、*Om(1E)* の転写産物とタンパクは、すべての細胞に均一に検出された。3齢幼虫の中樞神経系では、*Om(1E)* 転写産物は、表層全体に検出されたが、その中で特に視葉板（成虫視覚中枢の第一神経節）の前駆細胞に、きわめて顕著な発現が認められた。一方、抗*Om(1E)*抗体は、表層よりもニューロパイルに強く反応した。これは、神経細胞で発現した *Om(1E)* タンパクが、軸索に集積することをしめしている。

Om(1E) 遺伝子産物の生理的機能を推定するため、キイロシヨウジョウバエの形質転換体をつかって、*Hsp70* プロモーターの支配下で *Om(1E)* 遺伝子の人為的過剰発現をおこし、その影響を観察した。*Om(1E)* 遺伝子の過剰発現を、3齢幼虫期初期に誘導すると、背板の形態形成に異常が起こり、3齢幼虫期後期から蛹期初期に誘導すると、感覚剛毛が過剰に生じた。逆に、*Om(1E)* 遺伝子の活性を抑制するために、*Om(1E)* のアンチセンス RNA を、*Hsp70* プロモーターの支配下で、3齢幼虫期後期から蛹期初期に過剰発現させたところ、感覚剛毛の形成が阻害された。

以上の結果から、*Om(1E)* 遺伝子は、胚発生期や成虫発生期に、広い役割を持つことが示唆された。予想される *Om(1E)* 遺伝子産物のおもな機能は、未分化細胞の増殖の促進、視葉板の初期分化への関与、外部感覚器官の分化への関与である。これらの機能は、*Om(1E)* 遺伝子産物が、細胞間の情報交換に関与する膜タンパクであるという予想と矛盾しない。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 堀 浩
副 査 教 授 吉 田 廸 弘
副 査 助 教 授 木 村 正 人

学 位 論 文 題 名

Studies on the *Om* (1*E*) locus of *Drosophila ananassae*

[アナナスショウジョウバエの *Om* (1*E*) 遺伝子座の研究]

アナナスショウジョウバエには、動く遺伝子 *tom* の挿入により近傍遺伝子の発現が複眼原基特異的に、しかも異所的に活性化することによって、複眼形態異常が起ると考えられる一群の突然変異 *Om* が知られている。これらの遺伝子は、本来何らかの細胞分化過程に関与しているものであり、それらの本来の機能を知ることは分化の分子機構の研究にとって極めて重要であると考えられる。

申請者は、他の多くの *Om* 突然変異が個眼の減少を引き起こすのに対し、個眼の増加をもたらす極めてユニークな特徴を示す *Om* (1*E*) に注目して、その原因遺伝子の同定、構造及び機能解析を試みた。

まず第一に、対立遺伝子系統の個眼数、配列などの電子顕微鏡観察および複眼原基における個眼分化の形態的観察から、個眼数の増加は本来個眼以外の細胞に分化すべき細胞を個眼分化に転用した結果によるものではなく、未分化の上皮細胞を過剰に増殖させた結果によると推定した。

次に、変異系統のゲノムライブラリーより *Om* (1*E*) と思われる領域をクローニングした。三つの対立遺伝子系統全てこの領域内に *tom* 挿入を持っており、ガンマ線で誘発した復帰突然変異体ではゲノム構造に変化が見られた。また、この領域には挿入した *tom* の近傍に二つの転写領域 (*t1* および *t2*) が存在しており、それらの複眼原基における発現を調べたところ、*t2* は三つの対立遺伝子系統全てで過剰に発現していたが、*t1* を過剰発現していたのは一系統のみであった。さらに、*t1* および

t2 cDNA をHsp 遺伝子のプロモーターにつなぎ、キイロショウジョウバエに導入し、熱ショックするか、プロモーター上流に組み込んだ tom LTR により発現を誘導すると、t2 を導入したときのみ個眼の増加が認められた。以上より t2 が Om (1E) 遺伝子であると結論された。

次に、cDNA の構造解析を行い、推定される遺伝子産物が 530 または 464 残基からなる分子量約 55 kDa の未知の蛋白であり、全体として親水性であるが、膜貫通ドメインと思われる二つの疎水性領域を持つこと、推定される細胞外領域はスレオニン/セリンに富み、細胞間情報伝達に関わる膜蛋白にみられる糖付加部分と類似していること、細胞内部分はグルタミンに富む部分と塩基性アミノ酸クラスターを持つことを明らかにした。

更にこの遺伝子の生理的機能を推定するために、胚と成虫原基における転写産物と蛋白の分布を *in situ hybridization* 及び免疫染色により調べ、胚と三令幼虫の成虫原基では全ての細胞で発現しているが、三令幼虫の中樞神経系では特に視葉板の前駆細胞に極めて顕著な発現が見られることを明らかにした。更にキイロショウジョウバエを用いた形質転換実験により、Om (1E) の過剰発現を三令幼虫で誘起すると背板形成の異常や過剰な感覚剛毛が誘発されること、それとは逆にアンチセンス RNA を発現させると感覚剛毛の形成阻害が起こることを見出した。

以上の結果から、Om (1E) 遺伝子は未分化細胞の増殖促進、視葉板や外部感覚器の分化などに関与していることが想定されるが、これは遺伝子産物が細胞間の情報交換に関わる膜蛋白であるとの想定と矛盾しない。

本論文の内容は、外国の学術誌に発表された参考論文と共に未知の遺伝子の機能に関する極めて興味あるものであり、高く評価される。よって審査員一同は申請者が博士 (理学) の学位をうくるに十分な資質を有するものと認めた。