

学位論文題名

Molecular characterization of the eye-specific
Om (2*D*) mutation in *Drosophila ananassae*

(アナナスショウジョウバエの複眼形態突然変異
Om (2*D*) の分子遺伝学的研究)

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突然変異 *Om* はゲノム中、22 遺伝子座に位置づけられ、レトロトランスポゾン *tom* の挿入によって生ずることが分かっている。また、多面的発現が見られない、半優性、*neomorph* であるなどの遺伝的特徴を有している。ショウジョウバエの複眼は規則的に並んだ、約 700 個の個眼から構成されている。ところが、*Om* 突然変異個体では、複眼中央部付近の個眼の欠失、配列の乱れ、形態異常などが観察される。これらの異常は個眼の発生過程が正常に進行しなかった結果と考えられる。従って、*Om* 突然変異の解析は、個眼を構成する細胞の分化決定を担う分子機構の解明に手がかりを与えるものと期待される。本研究では、*Om* 突然変異群の中でも特異的な表現型を示す *Om*(2*D*) について、*Om*(2*D*) 遺伝子の同定、*Om*(2*D*) 表現型誘導の機構解明、*Om*(2*D*) 遺伝子の機能の解析を試みた。

Om(2*D*) 遺伝子座の遺伝学的地図上の位置と *tom* 因子の細胞学的位置はよく一致することから、*tom* をプローブとして *Om*(2*D*) 突然変異系統のゲノムライブラリーをスクリーニングし、*Om*(2*D*) 遺伝子座を単離した。さらに、*Om*(2*D*) 突然変異系統及び、染色体異常を伴った復帰突然変異系統の *Om*(2*D*) 遺伝子座のゲノム構造を解析し、突然変異の原因は、*tom* 因子の *Om*(2*D*) 遺伝子近傍への挿入によること、また、*Om*(2*D*) 遺伝子は *tom* 挿入点のテロメア側に存在しているらしいことを示した。

クローニングされた *Om*(2*D*) 遺伝子座由来の DNA 断片をプローブとしてノーザン解析を行ったところ、*tom* 挿入点のテロメア側には二つの転写領域が存在しており、それぞれ 1.6 kb と 3.6 kb の転写産物をコードしていることが判った。第一章では、

1.6 kb の遺伝子が *Om(2D)* 遺伝子であるか否かについて検討した。まず、1.6 kb 遺伝子の cDNA を 3 齢幼虫期由来の cDNA ライブラリーからクローニングし、その塩基配列を遺伝子データベースで検索したところ、哺乳類のオルニチンアミノトランスフェラーゼ (OAT) プリカーサーと高いホモロジーを示すことが判明した。この遺伝子が本当にショウジョウバエの OAT をコードしているかどうかを確かめるために、cDNA を発現ベクターに組み込み大腸菌内で発現させ、得られたタンパク質に対する抗体を作成した。この抗体はショウジョウバエの OAT 活性を阻害することから 1.6 kb 遺伝子はショウジョウバエ OAT をコードしていると結論した。もし、OAT 遺伝子が *Om(2D)* 遺伝子であるとすれば、*Om(2D)* 突然変異系統と野性型系統の間で 3 齢幼虫期の複眼原基の OAT 活性に差があると考え、両者で活性を比較したが、顕著な差は見られなかった。さらに、OAT cDNA に *hsp70* 遺伝子のプロモーターを結合したキメラ遺伝子を P 因子を用いた形質転換法によってキイロショウジョウバエに導入した。熱ショックによって人為的に OAT 遺伝子を発現させたところ、OAT 活性は上昇したにも関わらず、複眼の形態に異常は認められなかった。これらの結果から、OAT 遺伝子は *Om(2D)* 遺伝子ではないと結論した。

第二章では、もう一方の 3.6 kb 遺伝子に関する解析結果について述べる。この遺伝子が *Om(2D)* 遺伝子であるかどうか確かめるために、まず、この遺伝子の cDNA 及び、ゲノムクローンの塩基配列を決定し、エクソン-イントロン構造を明らかにした。さらに、復帰突然変異系統の *Om(2D)* 遺伝子座ゲノム構造を詳しく調べたところ、復帰突然変異系統では、この遺伝子のエクソンの一部を欠いていることが明らかとなった。従って、この遺伝子こそが *Om(2D)* 遺伝子そのものであると結論した。次に、*Om(2D)* の複眼形態異常の誘導メカニズムについて調べた。*Om(2D)* 遺伝子は野性型幼虫の複眼原基ではまったく発現していないのに対し、*Om(2D)* 突然変異個体の複眼原基では、個眼への分化が開始されている付近で強く帯状に発現しているのが観察された。また、*Om(2D)* 遺伝子が過剰に発現している領域では野性型では見られない細胞死が観察された。さらに、*Om(2D)* cDNA を人為的に 3 齢幼虫期に全身で発現させると、成虫の複眼にのみ形態異常が現れた。これらの結果から以下の事柄が示唆される。

(1) *tom* 因子は近傍の遺伝子の転写を促進する作用を持ち、しかもその作用は幼虫期の複眼原基の中心付近で有効である。(2) 本来は *Om(2D)* 遺伝子は複眼原基において機能していないが、*tom* の作用によって、複眼原基で強く発現させられた結果、個

眼の分化が妨げられ複眼形態の異常となる。(3) しかも、*Om(2D)*遺伝子産物発現の影響が複眼原基に限られていることから、*Om(2D)*タンパク質と相互作用する複眼原基特異的因子の存在が想定される。

第三章では、*Om(2D)*遺伝子の本来の機能について解析を試みた。*Om(2D)*遺伝子の塩基配列を決定したところ、ヒスチジンとプロリンの繰り返し配列より成る、PRDリピートモチーフを持っていたが、遺伝子データベースには高いホモロジーを示すものではなく、まったく新しい遺伝子であることが判った。PRDリピートの機能はいまだ明らかではないが、ホメオプロテインを含む多くの転写因子に存在するモチーフであることから、*Om(2D)*遺伝子も転写因子である可能性が考えられる。*Om(2D)*タンパク質に対する抗体を用いたイムノプロット実験では、*Om(2D)*タンパク質は細胞質分画に加えて核分画にも存在していることが分かった。このことは、*Om(2D)*タンパク質が転写因子である可能性を示唆している。さらに、*Om(2D)*遺伝子の発現の様子を調べたところ、(1) *Om(2D)*遺伝子は胚発生の時期を通して、胚域全体に渡って発現していること、(2) 3 齢幼虫期の成虫原基のうち、翅原基及び平均棍原基の特徴的領域で発現していること、これらの領域は両原基で相同な位置を占め、将来翅の付け根付近の前縁部を構成する細胞へと分化するものであること、(3) さらに、3 齢幼虫期中腸では点状に散在した多数の細胞で発現していることから、それらは成虫の腸を形成する原基細胞であることなどが分かった。従って、*Om(2D)*遺伝子は上記の細胞群の発生分化に関わる転写因子ではないかと推定される。

研究当初、*Om*遺伝子は複眼発生に関与する遺伝子群ではないかと考えられていた。ところが、本研究によって、*Om(2D)*遺伝子は個眼分化ではなく、他の組織の分化に働く遺伝子であることが示唆された。従って、本来の機能とは関係なく、*tom*の作用によって複眼原基で過剰発現し、個眼分化を妨げてしまうことが*Om*遺伝子としての資質であると考えられ、他の*Om*突然変異の解析は様々な細胞の分化に関与する遺伝子の発見につながると期待される。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 吉 田 廸 弘

副 査 教 授 堀 浩

副 査 教 授 木 村 正 人

学 位 論 文 題 名

Molecular characterization of the eye-specific
Om (2*D*) mutation in *Drosophila ananassae*

(アナナスショウジョウバエの複眼形態突然変異

Om (2*D*) の分子遺伝学的研究)

アナナスショウジョウバエの複眼形態突然変異 *Om* は、レトロトランスポゾン *tom* の挿入によって生ずることが知られている。*tom* により誘発される突然変異が一つの例外を除いてすべて複眼形態異常のみであることから *Om* は複眼形態形成に関与する一群の遺伝子ではないかと考えられる。もしそれが事実であれば、*tom* をプローブとしてこれら遺伝子のクローニングが可能であり、それらの機能解析は形態形成の分子遺伝学的研究に多大の貢献をなすものと期待される。このような観点に立って、申請者は *Om* 突然変異の一つである *Om* (2*D*) 遺伝子の同定とその機能の解析を行った。

まず、*Om*(2*D*) 遺伝子を含むと思われる領域をクローニングし、その構造解析およびノーザン解析からこの領域には1.6kbと3.6kbのRNAをコードする二つの転写領域が存在することを認め、それらのcDNAの構造解析から前者はOrnithine aminotransferase (*OAT*) 遺伝子、後者はPRD反復配列を持つ未知の遺伝子であることを明らかにした。

次に、*OAT* 遺伝子が *Om* (2*D*) 遺伝子であれば、野生型と変異系統で三令幼虫複眼原基の*OAT* 活性に差があると考え、両者の活性を比較したところなんら差異は認められなかった。さらに、このcDNAに熱ショック遺伝子プロモーターを結合したキメラ遺伝子を作成し、これをキイロショウジョウバエに導入し、熱ショックにより *OAT* 遺伝子的人為的発現を誘発させたが、複眼にも他の器官にも異常は起こらな

かった。

次に、3.6kb RNAをコードする領域のゲノム構造の解析と数種の復帰突然変異系統のゲノム解析の結果の比較を行ったところ、復帰系統ではエクソンの一部に欠失があることを認めた。さらに、*in situ* hybridization によりこの遺伝子は野生型幼虫の複眼原基では発現していないが、変異個体では個眼への分化が起こるべき部分で帯状に強く発現していること、その部位では視細胞への分化が抑制されている上、野生型に見られない細胞死が観察されること、キメラ遺伝子を用いて三令幼虫期に 3.6kb RNAを人為的に全身で発現させると成虫の複眼のみに形態異常が現れることなどの知見を得、この遺伝子が *Om* (2*D*) 遺伝子であるとの結論に達した。

以上の結果より、*tom* 因子は、特定の近傍遺伝子に対し転写促進作用を持つエンハンサー機能を有するが、その作用は幼虫の複眼原基のみで有効であり、他の発生時期の他の器官では働かないこと、*Om* (2*D*) 遺伝子の複眼原基における異所的発現は個眼の分化を抑制し、細胞死を引き起こす結果複眼形態異常を誘発すると考えた。

更に、正常個体の発生過程での *Om* (2*D*) の発現を *in situ* hybridization により調べたところ、胚発生時には胚全体で、三令幼虫期では平均根、羽原基、中腸原基細胞に局在して発現していることが分かった。PRD反復配列は一般に転写因子に存在することから、この遺伝子は転写因子である可能性が考えられる。

これまで *Om* 遺伝子は複眼の形態形成に関与する遺伝子群ではないかと考えられてきたが、この研究によりその可能性は否定され、この遺伝子群の研究は今まで知られていない発生分化に関与する新しい遺伝子の発見と、器官特異的に働くエンハンサー、およびその作用機序の研究に役立つものと思われる。

参考論文は主論文の内容に直接関連した二編を含む計五編の論文よりなり、いずれも国内外の著名な学術誌に発表され、新しい知見を含むものとして高く評価されている。審査員一同は、主論文及び参考論文の内容を慎重に検討した上で、申請者が博士(理学)の学位をうくるに十分な資質をもつものと認めた。