

博士（地球環境科学） モニカ アコスタ エトチエバルネ

学位論文題名

Genetic and molecular characterization of a mutation
that suppresses the eye morphology defects caused
by optic morphology mutations in *Drosophila ananassae*

（アナスショウジョウバエの複眼の形態異常突然変異を
抑制する突然変異の分子遺伝学的研究）

学位論文内容の要旨

アナスショウジョウバエの複眼形態異常を示す突然変異 (*Om*) はある特定の系統から高い頻度で多数出現してくる。この現象はこの種に特徴的で、*tom* と呼ばれる転移因子（動く遺伝子）がゲノム中を動くことによって引き起こされる。ショウジョウバエの複眼は規則正しく格子状に配列した個眼から構成されているが、これら *Om* 突然変異体の多くは、個眼の数が減少し、配列も不規則になるなどの形態異常を示す。これまでの研究によれば、挿入した *tom* によって近傍のある特定の遺伝子が、複眼原基において異所的、もしくは過剰に発現し、複眼形態が異常となることが分っている。興味深いことに、この突然変異多発系統からは、*Om* 表現型を抑制する突然変異も得られている。本研究では、X 染色体連鎖の抑制突然変異のひとつである *Om(1J)Su* について分子遺伝学的解析を行なった。

第一章では、まず様々な *Om* 突然変異に対する *Om(1J)Su* の抑制効果について調べた。その結果、*Om* 突然変異ごとに抑制の程度に差は見られたが、この抑制突然変異は調べた限りすべての *Om* 突然変異に対して抑制的に働くことが分った。このことから、*Om(1J)Su* は *Om* 突然変異を特異的に抑制する突然変異であると結論した。次に、この抑制突然変異とゲノム中の *tom* の挿入位置との関連について調査した。4つの *Om(1J)Su* 系統について *tom* の挿入位置を調べたところ、10 個から 40 個程度の *tom* が真正染色質領域の様々な場所に挿入していることが分ったが、これら *tom* 挿入点のうち、たった 1 力所、X 染色体のバンド 6 C だけがすべての系統で共通していた。また、このバンドは *Om(1J)Su* の遺伝学的 地図上の位置と矛盾していないことから、抑制突然変異である *Om(1J)Su* 自身も *tom* の挿入によって生じていると結論した。

多くの *Om* 突然変異が示す複眼の形態異常は複眼原基における細胞死に由来すること、さらに *tom* 自身も複眼原基で発現していることがこれまでの研究で示されてきた。そこで、*Om* 突然変異のひとつである *Om(1D)9* と *Om(1J)Su* 両方を持つ抑制個体（複眼は野生型に近い）の複眼原基での細胞死と *tom* の発現を観察した。その結果、細胞死、*tom* の発現共に抑制個体では減少してい

ることが分った。この結果から、*Om(1J)Su* 遺伝子は *tom* の発現を調節する機能を持っていること、さらに個眼の細胞が死んでゆく過程にも関与している可能性が示唆された。

第二章では、*Om* 複眼形態異常の抑制に働く遺伝子の同定を試みた。当研究室では、これまでに *Om(1J)Su* 領域と推定される X 染色体バンド 6C から、*tom* 挿入点片側 14.5 kb、反対側 1 kb にわたるゲノムをトラスボゾンタギング法を用いてクローニングした。この領域内に *Om(1J)Su* 遺伝子の候補となる遺伝子が存在するかどうか知るために、ハエの各発生段階から RNA を抽出し、クローニングしたゲノム領域をプローブとして、ノーザン解析を行った。その結果、14.5 kb の領域内に少なくとも 3 個の遺伝子が存在することが分った。これらの遺伝子の中に *Om(1J)Su* 遺伝子があるかどうか確かめるために、復帰突然変異体を作成した。 γ -線を用いて *Om(1J)Su* *Om(1D)9* 系統（複眼は野生型に近い）に突然変異を誘発させ、*Om(1D)9* 表現型を示す個体を選抜し復帰突然変異体とした。この復帰突然変異体は *Om(1D)9* 表現型が抑制されていないことから、 γ -線によって *Om(1J)Su* 遺伝子領域に何らかの異常が生じていると予想される。この異常を見つけることによって *Om(1J)Su* 遺伝子を特定できると考え、*Om(1J)Su* 領域と推定されるゲノムの構造をサザン法によって調べた。その結果、クローニングしたゲノム領域内からはゲノム構造の異常を見出すことはできず、この方法で抑制遺伝子を特定することはできなかった。

第三章では、*Om(1J)Su* 領域と推定されるゲノム領域から見つかった 3 個の遺伝子のなかに *Om* 表現型の抑制に関与するものがあるかどうかについて、さらに調べるために、これらの遺伝子の塩基配列を決定し、複眼原基における発現パターンを調べた。これらの遺伝子の cDNA をクローニングし、塩基配列を決定、予想される機能に基づいて、各々の名前を *ruby-like*、*carbo*、*lyso* とした。塩基配列の解析から、*ruby-like* 遺伝子の産物は非クラスリン被覆小胞の再生過程に関与するシャベロンと推定された。また、*carbo* はカルボキシル化酵素、*lyso* はリゾホスホリバーゼをコードすると推定された。これらの遺伝子の発現を胚と三齢幼虫複眼原基で観察したが、*Om(1J)Su* 個体と野生型個体において発現パターンに差は見られなかった。従って、これら遺伝子は *Om* 抑制には関与していないと予想された。抑制遺伝子を特定するためには、*tom* 挿入点からわずか 1 kb しかクローニングされていないゲノム方向のクローニングと解析が必要であると考えられる。

tom 挿入点付近の塩基配列を決定したところ、*tom* 挿入点の配列は、挿入標的配列として知られている、TATAT 配列と一致していること、また *ruby-like* 遺伝子の 3' 側は *tom* 挿入によって分断されている可能性があることなどが分った。さらに、この部分には反復配列が存在しており、これがゲノムのクローニングを困難にしている原因であると考えられる。

学位論文審査の要旨

主査 教授 木村正人

副査 教授 高木信夫

副査 助教授 瀧谷重治

学位論文題名

Genetic and molecular characterization of a mutation
that suppresses the eye morphology defects caused
by optic morphology mutations in *Drosophila ananassae*

(アナスショウジョウバエの複眼の形態異常突然変異を
抑制する突然変異の分子遺伝学的研究)

アナスショウジョウバエの複眼形態異常を示す突然変異 (*Om*) はある特定の系統から高い頻度で出現してくる。この現象はこの種に特徴的で、*tom* と呼ばれる転移因子(動く遺伝子)がゲノム中を動くことによって引き起こされる。ショウジョウバエの複眼は規則正しく格子状に配列した個眼から構成されているが、これら *Om* 突然変異体の多くは、個眼の数が減少し、配列も不規則になるなどの形態異常を示す。これまでの研究によれば、挿入した *tom* によって近傍のある特定の遺伝子が、複眼原基において異所的、もしくは過剰に発現し、複眼形態が異常となることが分っている。興味深いことに、この突然変異多発系統からは、*Om* 表現型を抑制する突然変異も得られている。本研究では、X 染色体連鎖の抑制突然変異のひとつである *Om(1J)Su* について分子遺伝学的解析を行なった。

第一章では、まず様々な *Om* 突然変異に対する *Om(1J)Su* の抑制効果について調べた。その結果、*Om* 突然変異ごとに抑制の程度に差は見られたが、この抑制突然変異は調べた限りすべての *Om* 突然変異に対して抑制的に働くことが示された。このことから、*Om(1J)Su* は *Om* 突然変異を特異的に抑制する突然変異であると結論した。次に、この抑制突然変異とゲノム中の *tom* の挿入位置との関連について調査した。4つの *Om(1J)Su* 系統について *tom* の挿入位置を調べたところ、10個から40個程度の *tom* が真正染色質領域の様々な場所に挿入していることが分ったが、これら *tom* 挿入点のうち、ただ1カ所、X染色体の6C部位だけがすべての系統で共通していた。また、この部位は *Om(1J)Su* の遺伝学的図上の位置と矛盾していないことから、抑制突然変異である *Om(1J)Su* 自身も *tom* の挿入によって生じていると結論された。

多くの *Om* 突然変異が示す複眼の形態異常は複眼原基における細胞死に由来すること、さらに *tom* 自身も複眼原基で発現していることがこれまでの研究で示されてきた。そこで、*Om* 突然変異

のひとつである *Om(1D)9* と *Om(1J)Su* 両方を持つ抑制個体（複眼は野生型に近い）の複眼原基での細胞死と *tom* の発現を観察した。その結果、細胞死、*tom* の発現共に抑制個体では減少していることが明らかになった。この結果から、*Om(1J)Su* 遺伝子は *tom* の発現を調節する機能を持っていること、さらに個眼の細胞が死んでゆく過程にも関与している可能性が示唆された。

第二章では、*Om* 複眼形態異常の抑制に働く遺伝子の同定を試みた。これまでに *Om(1J)Su* 領域と推定される X 染色体 6 C 部位から、*tom* 挿入点片側 14.5 kb、反対側 1 kb にわたるゲノムがトラスボゾンタギング法を用いてクローニングされている。この領域内に *Om(1J)Su* 遺伝子の候補となる遺伝子が存在するかどうか知るために、ハエの各発生段階から RNA を抽出し、クローニングしたゲノム領域をプローブとして、ノーザン解析を行った。その結果、14.5 kb の領域内に少なくとも 3 個の遺伝子が存在することが明らかになった。これらの遺伝子の中に *Om(1J)Su* 遺伝子があるかどうか確かめるために、復帰突然変異体が作成された。 γ -線を用いて *Om(1J)Su* *Om(1D)9* 系統（複眼は野生型に近い）に突然変異を誘発させ、*Om(1D)9* 表現型を示す個体を選抜し復帰突然変異体とした。この復帰突然変異体は *Om(1D)9* 表現型が抑制されていないことから、 γ -線によって *Om(1J)Su* 遺伝子領域に何らかの異常が生じていると予想される。この異常を見つけることによって *Om(1J)Su* 遺伝子を特定できると考え、*Om(1J)Su* 領域と推定されるゲノムの構造をサザン法によって調べた。その結果、クローニングしたゲノム領域内からはゲノム構造の異常を見出すことはできず、この方法で抑制遺伝子を特定することはできなかった。

第三章では、*Om(1J)Su* 領域と推定されるゲノム領域から見つかった 3 個の遺伝子のなかに *Om* 表現型の抑制に関与するものがあるかどうかについて、さらに調べるために、これらの遺伝子の塩基配列を決定し、複眼原基における発現パターンを調べた。これらの遺伝子の cDNA をクローニングし、塩基配列を決定、予想される機能に基づいて、各々の名前を *ruby-like*、*carbo*、*lyso* とした。塩基配列の解析から、*ruby-like* 遺伝子の産物は非クラスリン被覆小胞の再生過程に関与するシャベロンと推定された。また、*carbo* はカルボキシル化酵素、*lyso* はリゾホスホリバーゼをコードすると推定された。これらの遺伝子の発現を胚と三齢幼虫複眼原基で観察したが、*Om(1J)Su* 個体と野生型個体において発現パターンに差は見られなかった。従って、これら遺伝子は *Om* 抑制には関与していないと予想された。抑制遺伝子を特定するためには、*tom* 挿入点からわずか 1 kb しかクローニングされていないゲノム方向のクローニングと解析が必要であると考えられる。

この研究は、抑制突然変異 *Om(1J)Su* の遺伝学的な性質を調べるとともに、*Om(1J)Su* の抑制作用の細胞学的特徴を明らかにし、抑制機構の理解に重要な知見をもたらした。また、*Om(1J)* 遺伝子の同定までには至らなかったが、*Om(1J)* 遺伝子の分子レベルでの解析に必要な基礎的情報を与えた。

審査員一同は、これらの研究成果を評価し、また、研究に対する姿勢も誠実かつ熱心であり、大学院課程における研鑽や取得単位なども併せ、申請者が博士（地球環境）の学位を受けるに十分な資格を有するものと判定した。