



# 論文内容要旨

個体発生の分子機構が明らかになるにつれて、それを再生医療として応用できる可能性が指摘されている。器官構築には、近年明らかになりつつある細胞分化の問題に加え、分化した細胞がその器官の特異性に従い機能的に統合される必要がある。しかし、このような細胞分化の上位で器官のアイデンティティを決定する機構はほとんど理解されていない。本研究ではショウジョウバエをモデルに、この器官アイデンティティがどのように決定されるかという問題を解明することを目的とした。この問題に対して、ショウジョウバエの成虫原基（幼虫体内に存在し、将来成虫のどの器官になるかということが決定している体細胞組織）は有意義な系を提供する。

これまでに我々は、複眼原基において、Notch シグナリングの活性化と共に、人為的に遺伝子発現を操作することにより、その細胞集団が本来有する複眼としてのアイデンティティをリプログラムさせ、複眼を触角や翅、肢といった別の成虫器官へ改変できることを見出している (Fig.1)。

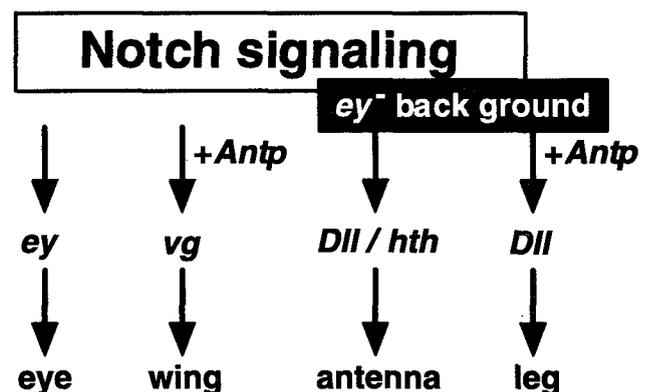


Fig.1 Notch シグナリングを中心とした異所的な器官改変系

本研究ではまず、この系において器官特異性の発現に関わる *Antennapedia* (*Antp*) 遺伝子に着目し、その分子機構の解明を行うことから始めた。*Antp* は翅と中肢のある胸部第二節の特異性を与えるホメオティック (*Hox*) 遺伝子であり、上記の系においては複眼から翅、触角から中肢への器官改変を引き起こす。しかし、体の前後軸に沿った位置 (体節) の特異性を決める *Hox* 遺伝子が、その体節に由来して発生する器官の特異性決定にどのように関与するのかについてはこれまで明らかにされていない。

そこで本研究では変異型 ANTP 蛋白を用いて、器官特異性決定に関わる機能ドメインの解析を行った。その結果、ANTP 蛋白をはじめ多くの HOX 蛋白で保存されている YPWM モチーフが、触角から中肢の誘導には関与しないが、複眼から翅への改変に不可欠であることが明らかとなった。さらにこのとき、ANTP 蛋白は YPWM モチーフを介して、これまでに知られていたコファクター *extradenticle* 蛋白とではなく、基本転写因子 TFIID の構成因子である TAF<sub>II</sub>155 (BIP2 蛋白) と相互作用し、翅の誘導に関わることが明らかとなった。これらの結果は、HOX 蛋白が機能ドメインを介してコファクターを選択し、体節に付属する器官のアイデンティティ決定に関与していることを示唆する最初の例である。

続いて、この系において器官特異性決定に関わる新たな遺伝子の探索を目的として、ショウジョウバエゲノム中に存在する約 14000 の遺伝子を任意に強制発現できる系統を用いた、ゲノムワイドなスクリーニング系を確立した。そして 9710 系統の解析の中から複眼を翅へと改変させる新規遺伝子を同定し、*winged eye* (*wge*) と命名した。

*wge* を複眼原基で過剰発現させた個体では、複眼に翅の基部側の構造から先端まで前後・背腹といった軸形成を伴う翅が誘導されることが明らかとなった (Fig.2)。これまでの翅形成プログラムに関わる遺伝子発現を上位で支配していることが知られている遺伝子、*vestigial* (*vg*) を同様に発現させた場合でも、このように三次元的なパターンの整った翅構造が誘導されることはなく、*wge* が翅の特異性決定の鍵となる重要な遺伝子である可能性が示唆された。そして *wge* を強制発現させた複眼原基では、VG 蛋白の異所的な発現が誘導されることが分かった。

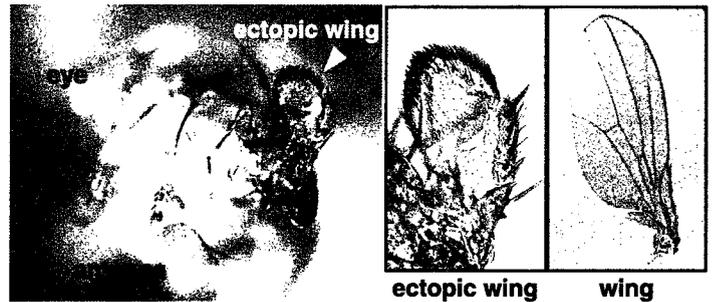


Fig.2 *wge* の過剰発現により誘導される翅

次に、*wge* により複眼から翅への器官改変が引き起こされるときに、もともと複眼原基細胞が示している複眼形成プログラムに対しどのように作用しているのか調べた。その結果、複眼のアイデンティティ決定に重要な役割を担う *eyes absent* (*EYA*) 蛋白の発現が *wge* を発現させた細胞において細胞自律的に抑えられることが明らかとなった。これらの結果より、*wge* による複眼から翅への器官改変過程において、*wge* は *vg* の発現を誘導して翅形成プログラムを立ち上げるだけでなく、本来の複眼形成プログラムを停止させていることが示唆された。

ところで、*wge* の遺伝子産物である WGE 蛋白 (1658aa) には、機能未知の bromo adjacent homology (BAH) ドメインと核移行シグナル (929-946aa, 1369-1386aa) が存在する。BAH ドメインは、酵母からヒトにまで保存された ORC1 蛋白やショウジョウバエの ASH1 蛋白などクロマチンリモデリングに関わることが知られている蛋白に存在する。また ASH1 蛋白は *trithorax* グループ (*trxG*) に分類され、その過剰発現により *Hox* 遺伝子の発現を誘導し器官改変を引き起こす。したがって WGE 蛋白も同様に染色体上に局在し、クロマチン修飾を介して遺伝子発現調節に関わる可能性が示唆された。

そこで、*wge* の遺伝子産物である WGE 蛋白 (1658aa) には、機能未知の bromo adjacent homology (BAH) ドメインと核移行シグナル (929-946aa, 1369-1386aa) が存在する。BAH ドメインは、酵母からヒトにまで保存された ORC1 蛋白やショウジョウ

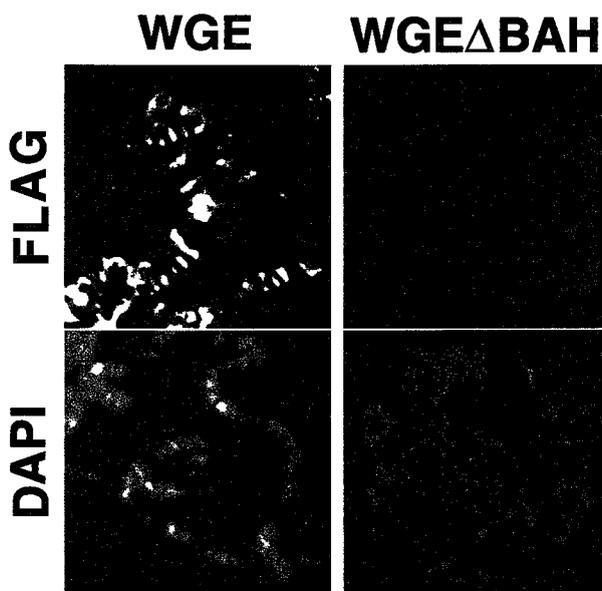


Fig.3 FLAG-WGE 融合蛋白 (左) と FLAG-WGE $\Delta$ BAH 融合蛋白 (右) の染色体上局在。

バエの ASH1 蛋白などクロマチンリモデリングに関わることが知られている蛋白に存在する。また ASH1 蛋白は *trithorax* グループ (*trxG*) に分類され、その過剰発現により *Hox* 遺伝子の発現を誘導し器官改変を引き起こす。したがって WGE 蛋白も同様に染色体上に局在し、クロマチン修飾を介して遺伝子発現調節に関わる可能性が示唆された。

そこで、細胞内における WGE 蛋白の局在と WGE 蛋白における BAH ドメインの役割を調べるために、N 末に FLAG タグを付けた FLAG-WGE 融合蛋白および BAH ドメインを欠いた FLAG-WGE $\Delta$ BAH 融合蛋白を、それぞれ多糸染色体を有する唾腺において過剰発現させ免疫染色を行った。その結果、FLAG-WGE 融合蛋白は核に局在し、さら

に染色体上において特徴的な局在を示すことが分かった (Fig.3 左)。このような局在パターンは *trxG* に属する蛋白などクロマチンの構造変換を介して遺伝子発現を調節する蛋白が示すものと類似している。一方、FLAG-WGE $\Delta$ BAH 融合蛋白は核に局在するものの染色体上には局在しないことが分かった (Fig.3 右)。したがって、WGE 蛋白は BAH ドメインを介して染色体上の特異的な位置に局在することが明らかとなった。また、複眼から翅への器官改変も WGE 蛋白の BAH ドメインに依存することが分かった。

次に、WGE 蛋白も ASH1 蛋白のように Hox 遺伝子の発現誘導を介して器官改変を誘導しているのかどうか検証した。その結果、*wge* による複眼から翅への器官改変は、この系において唯一複眼から翅への器官改変を引き起こすことのできる Hox 遺伝子、*Antp* の作用に依存しないことが示された。したがって、*wge* は Hox 遺伝子により体節の特異性が決定された後に器官の特異性を決定する過程に関与することが示唆された。またこれらの結果は、器官アイデンティティの決定においても、クロマチンの再構築あるいはそれに関連するゲノムレベルでの転写制御が重要な役割を担っていることを示唆するものであった。

続いて、*wge* の機能欠失型変異体を作製し機能解析を行った。その結果、*wge* の完全欠失変異体では、幼虫時に発生が停止し、致死となることが分かった。したがって *wge* は発生過程の様々な局面で重要な働きをしている遺伝子であることが示唆された。そしてこのことは内在性 *wge* の発現パターンからも支持された。すなわち、幼虫期から蛹期にかけて、*wge* は発生ステージにおいて一様に発現しており、また翅原基だけではなく複眼原基やその他の様々な器官で一様に発現していることが分かった。

そこで、翅形成など成虫器官形成における *wge* 欠失の影響を調べるために、*wge* の変異体細胞集団 (*wge* 変異体クローン) をモザイク状に有する個体を作製して解析を行った。その結果、翅原基における *wge* 変異体クローンにおいて、VG 蛋白の発現が抑制されることが分かり、翅の正常発生において *vg* の発現に *wge* が必要であることが分かった。一方、複眼原基における *wge* の過剰発現により抑制された EYA 蛋白の発現は *wge* 変異クローンにおいて脱抑制されることはなく、*wge* 変異体クローンにおいては EYA 蛋白の発現も抑制されることが分かった。また *wge* 変異体クローンを誘導した成虫個体では、翅や複眼だけでなく様々な形態形成の異常が認められた。これらの結果から、*wge* は翅の特異性決定のみならず状況に応じて様々な器官形成過程を制御していることが明らかとなった。

器官の特異性は発生過程の非常に早い段階で決定される。このとき、その器官特異性は同等の性質を有する細胞集団の中から生み出されなければならない。今回同定した *wge* は一様に発現しており、器官特異性決定に関与する。したがって *wge* はまさにそのような局面で働いていることが予想される。さらに *wge* は染色体上の特異的な位置に局在し、状況に応じて様々な遺伝子の発現を制御する。したがって WGE 蛋白は状況に応じて染色体上の様々な遺伝子座に局在しクロマチン修飾を介したゲノムレベルでの遺伝子発現調節を行っていることが考えられる。さらに本研究では、ヒトやマウスにおいても *wge* ホモログ遺伝子を見出し、種を越えて同様の器官アイデンティティ決定機構の存在が示唆された。今後、WGE 蛋白とクロマチンとの関わりをゲノムレベルで網羅的に解析することで、相同な細胞集団から器官の特異性がどのように決定されるのかについてその全容が初めて浮き彫りになると考えられる。

## 審査結果の要旨

発生生物学の進展に伴い、体づくりの分子機構を再生医療として応用する可能性が論じられ始めている。しかし、機能的に統合された器官構築を約束する器官のアイデンティティーがどのように決定されるのかについては、ほとんど理解されていない。本研究は、ショウジョウバエの成虫原基をモデルに、器官特異性決定の分子機構を解明することを目指したものである。

本研究では、まず *Antennapedia* (*Antp*) 蛋白の器官特異性決定に関わる機能ドメインの解析を行った。*Antp* 遺伝子は、翅と中肢のある胸部第二節の特異性を与えるホメオティック (*Hox*) 遺伝子である。その結果、*ANTP* 蛋白は、多くの *HOX* 蛋白で見られる *YPWM* モチーフを介して、これまで知られていたコファクターとではなく、基本転写因子 *TF II D* の構成因子 *TAF<sub>II</sub>155* と相互作用し、翅の特異性決定に関わることを明らかにした。この結果は、*HOX* 蛋白が機能ドメインを介してコファクターを選択し、体節に付随する器官の特異性決定に関わることを初めて示唆する結果である。

次に本研究では、器官特異性決定に関わる遺伝子をゲノムワイドに同定できるスクリーニング系を確立し、複眼を翅へと改変する新規遺伝子 *winged eye* (*wge*) を同定した。*wge* 遺伝子によって誘導された異所的な翅は、三次元的な軸形成を伴っており、*wge* 遺伝子が翅の特異性決定に重要な働きを果たしていることが示唆された。*WGE* 蛋白は、クロマチンのリモデリングに関わる蛋白に見られる *BAH* ドメインを有しており、*BAH* ドメインを介して染色体の特徴的な位置に局在した。これらの結果は、*WGE* 蛋白がクロマチンの構造変換を介して翅の特異性決定に必要な遺伝子発現を制御していることを示唆している。実際、*WGE* 蛋白は、複眼を翅へと改変する際に、複眼原基において翅の形成に必要な *vestigial* (*vg*) 遺伝子の異所的な発現を誘導し、複眼の形成に必要な *eyes absent* (*eya*) 遺伝子の発現を抑制することが示された。

さらに本研究では、*wge* 遺伝子の欠失変異体を作成し、*wge* 遺伝子が翅原基での *vg* 遺伝子の発現に不可欠であることを確認すると共に、*wge* 遺伝子が複眼原基での *eya* 遺伝子の発現にも必要とされることを発見した。さらに、*wge* 遺伝子が、翅や複眼だけでなく様々な成虫器官の構築に必要であることを明らかにした。この結果は、*wge* 遺伝子が状況に応じて様々な器官形成を制御していることを示唆している。この知見は、*wge* 遺伝子が普遍的に発現していることから支持された。これらの結果は、様々な器官のアイデンティティーの決定に、普遍的に発現する *wge* 遺伝子が関与することを示唆しており、個体発生の過程で、均一な細胞集団から器官の特異性が生じる過程を初めて説明する。

以上のように本研究で得られた知見は、この分野の研究に新たな視点を与えるものである。よって、本論文は博士（薬学）の学位論文として合格と認める。