

学位申請論文

dAGO1 遺伝子の発生過程における役割と分子機能の追及

京都大学大学院 理学研究科
生物科学専攻 生物物理学系

片岡 陽平

目次

1・論文の要旨	… 1
2・序論 Wg シグナル伝達系に関わる新遺伝子の探索にむけて	… 2
3・新遺伝子の探索と同定	
3-1・遺伝学的スクリーニング	… 4
3-2・遺伝子のクローニング	… 6
3-3・考察	
3-3-1・スクリーニング方法の問題点	… 7
3-3-2・遺伝的に複雑な <i>l(2)04845</i> 遺伝子座	… 7
4・AGO1 遺伝子ファミリーについて	
4-1・dAGO1 分子と類似分子の構造比較	… 9
4-2・分子進化系統樹の解析	… 11
4-3・AGO1 遺伝子ファミリーの機能予測	… 12
5・dAGO1 遺伝子の機能解析	
5-0・序	… 15
5-1・dAGO1 mRNA の発現パターンと分子の細胞内局在	… 15
5-2・dAGO1 と <i>DE-cad</i> の共過剰発現による相互作用の検討	… 16
5-3・dAGO1 変異胚の表現型	
5-3-1・変異胚のクチクラパターンの観察	… 18
5-3-2・変異胚の神経系の観察	… 19
5-4・dAGO1 の過剰発現による表現型	
5-4-1・翅後部細胞の形質の前方化	… 24
5-4-2・翅脈のパターン形成の異常	… 25
5-4-3・肢の節形成異常	… 26
5-4-4・過剰発現実験のまとめ	… 27
5-5・dAGO1 分子の生化学的扱い	
5-5-1・dAGO1 分子の性質	… 28
5-5-2・dAGO1 分子の RNA 結合能の検証	… 28
6・総合議論	
6-1・dAGO1 と Wg シグナル伝達系の関係について	… 30
6-2・AGO1 ファミリーの働き	… 31
補・Yeast Two-Hybrid 法を用いたdAGO1 結合分子の探索	
補-1・Yeast Two-Hybrid スクリーニングにむけて	… 34
補-2・スクリーニングの方法	… 34
補-3・候補クローンの選抜	… 34
補-4・候補遺伝子の Df 系統と dAGO1 過剰発現系統の相互作用の検討	… 35
補-5・考察	… 36
材料と方法	… 37
付録	… 43
引用文献	… 47
謝辞	… 51
参考資料	
主論文の基礎となる論文	

1・論文の要旨

ショウジョウバエの翅の形態形成過程に着目した Wingless (Wg) シグナル伝達系に関わる遺伝子の探索の結果、シロイヌナズナの葉の形態形成に関わる AGO1 遺伝子のショウジョウバエホモログ *dAGO1* 遺伝子をその候補として同定した。AGO1 類似遺伝子は、ほとんどの真核生物において同一種内に複数存在し、大きな分子ファミリー (AGO1 遺伝子ファミリー、AGO1 ファミリー) を成す。近年、この AGO1 ファミリーに属するいくつかの遺伝子は、幹細胞の自己再生分裂や二本鎖 RNA 干渉、翻訳開始反応に関与することが示唆された。この分子ファミリーに属する分子はカルボキシル末端付近に高度に保存された領域を持つが、その分子機能は明らかにされていない。そこで我々は、*dAGO1* 遺伝子の発生過程における役割と分子機能の解明に向けて、ショウジョウバエの分子遺伝学的手法を駆使した解析を開始した。

dAGO1 遺伝子は、*DE-cad* との共過剰発現実験の結果から、Wg シグナル伝達系に正に働く因子と予想された。しかし、*dAGO1* 遺伝子の変異胚は、Wg シグナル関連遺伝子の変異胚に特徴的な体節極性形成 (segment polarity formation) の異常を示さなかった。この結果は、少なくとも胚期において *dAGO1* は Wg シグナル伝達系に関与していない可能性を示唆する。一方、その変異胚は神経系に激しい異常が生じて致死となる。中枢神経系及び末梢神経系において神経細胞とグリア細胞の著しい減少が観察され、ニューロblastやグリオblastの細胞分裂に異常が生じていると考えられた。しかし、この表現型と Wg シグナル伝達系との関係は明らかではない。また、*dAGO1* の全長分子や改変分子を翅で過剰発現させたところ、翅の形態や翅脈形成に異常が生じた。この結果は、*dAGO1* 遺伝子が翅のパターン形成過程において何らかの機能を果たしている可能性を示唆する。そこで、これらの表現型について、遺伝学的相互作用の検討や免疫組織染色法により *dAGO1* が作用しているシグナル伝達経路の特定を試みた。しかし、Wg シグナル伝達系だけでなく、その他のシグナル伝達系についても、*dAGO1* の関与を示す有力な手がかりは得られなかった。

分子機能の特定を目的とした生化学的実験の結果、*dAGO1* は RNA 分子に結合可能な事が明らかになった。この発見は分子機能の解明に向け重要な手がかりとなると期待された。しかし、その結合には機能的中心と予想された保存領域は必要ないことが確認され、*dAGO1* の RNA 分子への結合が機能的な結合であるのか、また、RNA 分子への結合が AGO1 ファミリー共通の機能であるかは確認できていない。

この論文では、*dAGO1* 遺伝子の発見から機能解析に至る研究成果を報告する。総合議論では、AGO1 遺伝子ファミリーの働きについて、近年同定された様々な類似遺伝子の解析の結果や機能予測も交えて議論する。

2・序論 Wg シグナル伝達系に関わる新遺伝子の探索にむけて

多細胞動物の初期発生や形態形成において重要な役割を果たす Wingless (Wg)/Wnt ファミリーは、良く保存された分泌性糖タンパクであり、細胞の分化や位置情報、細胞極性等を制御する事が知られる。ショウジョウバエでは、その変異体の一つの表現型から Wingless の名が付けられたように、翅の形成過程に深く関わっているほか、体節極性形成や内臓器官の形成などの様々な現象を制御している。脊椎動物においても、中脳の形成や体節中胚葉の誘導、内臓器官の形成などの多くの現象に関与することが、そのノックアウトマウスの解析から示されている (reviewed in 高田, 2000)。

Wg/Wnt は Frizzled レセプター群を介してシグナルを細胞内へ伝える。レセプターへの結合により引き起こされる細胞内情報伝達にはいくつかの経路が知られているが、中でも特に重要であり解析が進んでいるのが Wg/Armadillo (Arm) (Wnt/ β -catenin) シグナル伝達経路である。Wg/Arm シグナル伝達経路は、いくつかのステップを経て Arm/ β -catenin の細胞質内への蓄積を引き起こし、それに伴う Arm の核移行により下流遺伝子の転写発現を誘導する (図2B)。 β -catenin は細胞接着構造体 (Adherens junction) の構成分子として発見されたが、後にショウジョウバエの Arm がホモログであることが判明し、Wg/Wnt シグナル伝達系においては転写調節因子として働くことが明らかになった (reviewed in Peifer & Polakis, 2000)。この Wg/Arm シグナル伝達経路 (以下、単に Wg シグナル伝達) の解明には、ショウジョウバエを用いた遺伝学的アプローチが中心的な役割を演じてきた。特に胚のクチクラパターンを指標とした大規模な突然変異スクリーニングによって、現在知られている Wg シグナル伝達系の主要な遺伝子が発見された (Nusslein-Volhard & Wieschaus, 1980)。これらの遺伝子の変異胚は、胚の体節極性形成に異常を示す共通の表現型を持ち、セグメントポラリティー遺伝子群として分類された。例えば Wg や Arm の機能喪失変異ホモ接合体は、胚の体節極性形成に異常が生じ、腹側の歯状突起帯 (denticle belt) が鏡像対称に重複する (図1)。そして、その遺伝子群の遺伝学的解析により、遺伝子がクローニングされる以前に、Wg シグナル伝達系の大筋は明らかにさ

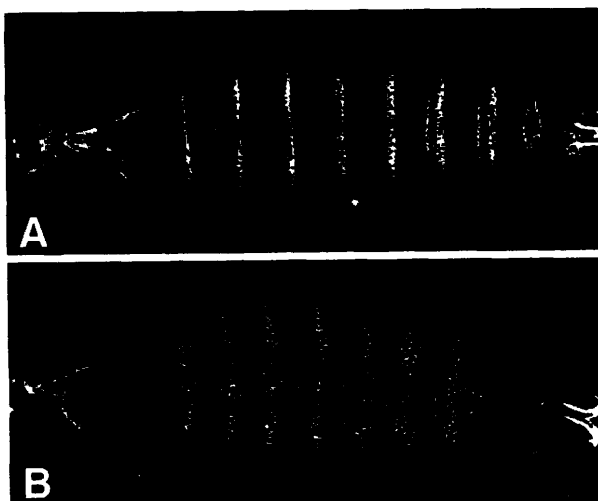


図1、セグメントポラリティー異常

セグメントポラリティー遺伝子群の変異体に特徴的な表現型。(A) 野生型胚の腹側を暗視野顕微鏡により撮影。白い帯状に見えるのが歯状突起帯。(B) *arm* 変異の一つの表現型。歯状突起帯が鏡像対称に重複している。

れた (図2A)。この遺伝学的解析の結果が、現在の Wg/Wnt シグナル伝達系に対する理解の基礎となっている。

しかし、この胚を用いた遺伝学的解析には限界がある事が指摘されてきた。胚発生初期に母性由来の mRNA が多量に存在している遺伝子の変異体は、接合子由来の mRNA が減少しても正常に発生する場合がある (この現象を母性効果と呼ぶ)。その為、母性効果の大きい遺伝子は、過去に行われた胚のクチクラパターンを指標とした変異体スクリーニングにおいて、見逃されていた可能性が高い。私の研究開始時には、X染色体上の遺伝子の母性効果についてしか詳しく解析されていなかった (Perrimon et al., 1989)。従って、Wg シグナル伝達に必要なではあるが、母性効果の大きい遺伝子は未知のままであると考えた。

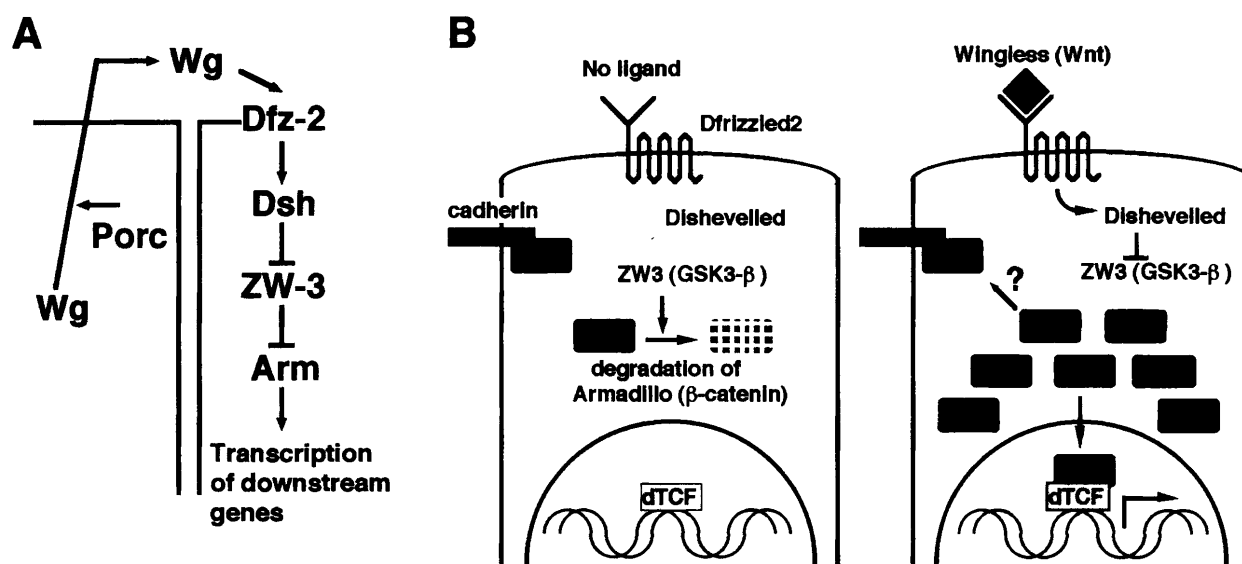


図2、Wg シグナル伝達系の模式図

(A) Wg シグナル伝達系の簡単な模式図。(B) Wg シグナル伝達のイメージ図。Wg シグナルが無い時、細胞質中の Arm は Zeste-White3 (ZW3) の作用を受け、プロテオソーム系蛋白質分解機構により分解される。Wg シグナルが細胞内へ伝わると、Dishevelled により ZW3 の働きが抑えられ、細胞質中に Arm が蓄積する。蓄積した Arm の一部は核内へ移行し、DNA 結合分子 dTCF に結合し、Wg シグナル伝達系の下流遺伝子の転写を誘導する。

そこで、私は母性効果の及ばない成虫の翅の形態形成過程に着目した変異体探索 (スクリーニング) を考えた。着目したのは、カドヘリン細胞接着と Wg シグナル伝達系の双方に独立に働く Arm の機能的二面性である (Orsulic & Peifer, 1996)。Arm とその細胞内領域で直接結合する細胞接着分子 DE-cadherin (DE-cad) の過剰発現は Wg シグナル伝達系を阻害出来る事が確認されている (Sanson et al., 1996; 片岡 参考資料)。例えば、翅の一部の領域で DE-cad を過剰発現させると、翅の縁 (Wing Margin, WM) や感覚毛が欠失し、*wg* 変異体のアレルの一つと同様の表現型を示す (図3A)。DE-cad を過剰発現した細胞内では、過剰な DE-cad が Arm に結合することでその核移行を阻害し、Wg シグナルの伝達を抑制していると考えられる。もしこの状態で Wg シグナル伝達に携わる分子の量がさらに減少し、Wg シグナルの強さが変動すれば、翅の表現型にも変化が現れると予想した。つまり、Wg シグナル伝達を正に伝える因子が減少すれば、DE-cad 過剰発現による表現型はより強くなり (エンハンサー)、負の因子が減少すれば表現型はより弱くなる (サブプレッサー) と予想した。そこで、この翅の表現型に変化を及ぼす変異の探索により、Wg シグナル伝達に関わる未知の遺伝子を同定することが出来ると考えた。また、胚発生期と翅の形態形成過程では Wg シグナル伝達系の転写標的遺伝子が異なる事から、翅特異的な Wg シグナル伝達系の因子が見つかることも期待された。

3・新遺伝子の探索と同定

3-1・遺伝学的スクリーニング

ショウジョウバエの翅で領域特異的に *DE-cad* を過剰発現させるため、GAL4/UAS system (Brand & Perrimon, 1993) を用いた。発現誘導に用いる GAL4 系統として、神経前駆細胞群で GAL4 を発現する *scabrous-GAL4* (*sca-GAL4*; Klaes et al., 1994) と、WM の周縁部で GAL4 を発現する *vestigial-GAL4* (*vg-GAL4*; Morimura et al., 1996) を用いた。*sca-GAL4* で *DE-cad* を過剰発現させた系統 (*ScaDE*) では、WM の感覚毛の減少が観察された。*sca-GAL4* は翅以外でも GAL4 を発現しており、*DE-cad* を発現させた成虫では、翅に限らず背部や腹部などでも感覚毛の減少が観察された。これらの感覚毛の減少が観察される場所は、Wg シグナル伝達系が機能する場所に一致する。また、*vg-GAL4* で *DE-cad* を過剰発現させた系統 (*VgDE*) は、WM が部分的に欠損した表現型を示す。これら二系統の表現型は、Arm の共過剰発現により回復することから、過剰な *DE-cad* により Wg シグナル伝達系が阻害された為に生じると考えられた (図 3A)。

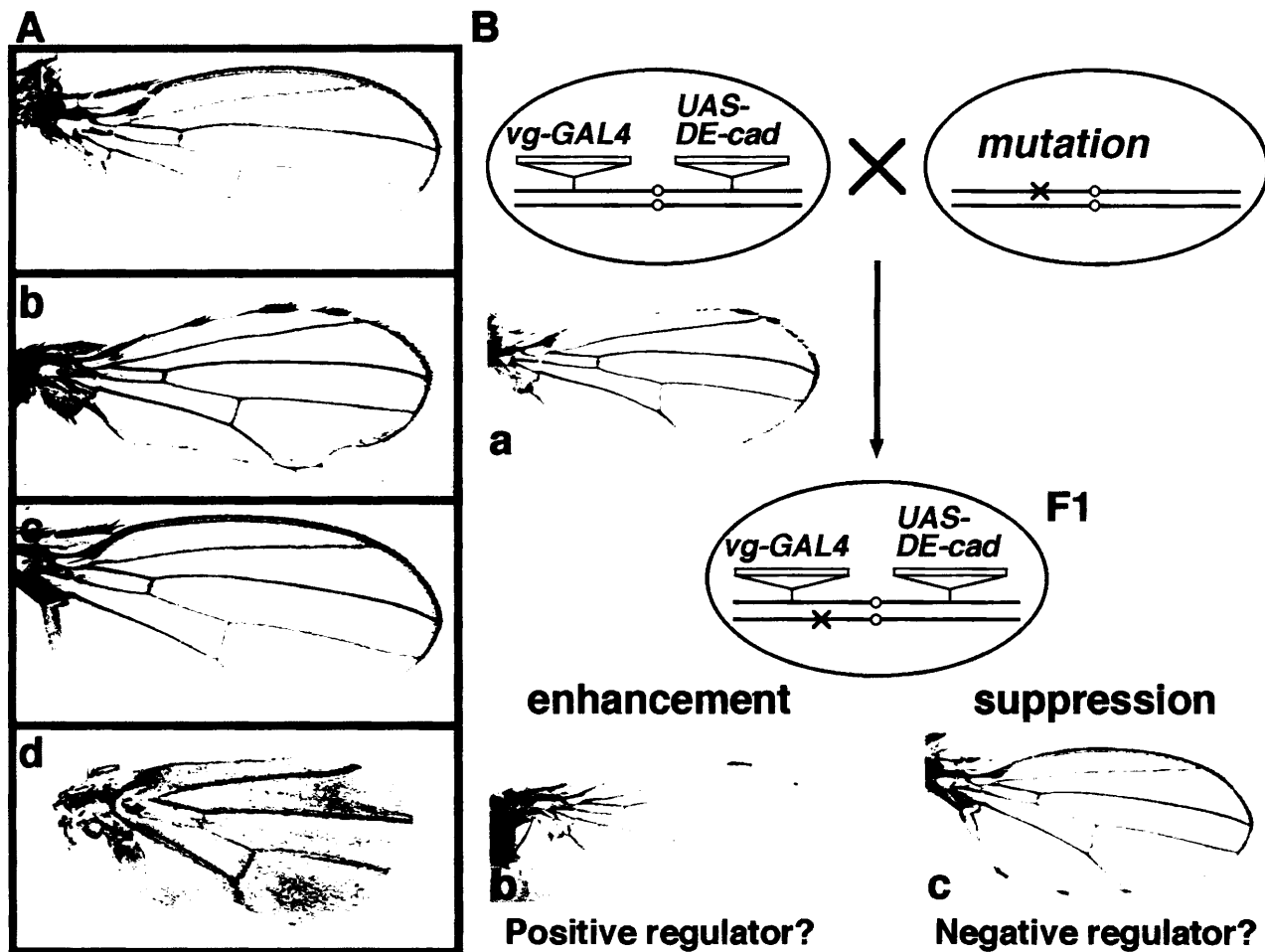


図 3、*DE-cad* 過剰発現による翅の表現型と変異体スクリーニングの模式図

(A) *DE-cad* 過剰発現による翅の表現型と *wg* 温度感受性変異体の翅の比較。(a) 野生型の正常な翅。(b) *vg-GAL4* 系統を用いた *DE-cad* 過剰発現による翅の縁 (WM) の部分的欠失。(c) *Arm* の共過剰発現による表現型の回復。(d) 三令幼虫期に制限温度下においた *wg* 温度感受性変異体の翅 (Couso et al., 1994)。WM が全く形成されていない。

(B) 変異体スクリーニングの模式図。様々な *Df* ヘテロバックグラウンドで表現型に生じる変化を指標に候補領域を絞り込んだ。欠失した遺伝子が Wg シグナル伝達系の正の因子なら表現型は強められ (b)、負の因子なら弱められる (c)。(a) スクリーニングの指標とした WM の表現型。(b, c) はこのスクリーニングの過程で観察された例。

スクリーニングの予備実験として、まず、既知の変異体との遺伝的相互作用を検討した。その結果、*arm* 変異は *ScaDE* 系統と *VgDE* 系統の表現型を増強し、*DE-cad* 変異は抑制した。よって、二つの過剰発現系統の表現型は *DE-cad* と *Arm* のコピー数に応じて変化することが確認された。そこで、翅の表現型を指標にして、*Wg* シグナル伝達系に関わる未知の遺伝子の変異体を見つけることが可能であると判断し、スクリーニングを開始した。後に他のグループも、我々と同様に *DE-cad* 過剰発現による翅の表現型を利用した変異体スクリーニングを行い、論文を発表した (Greaves et al., 1999)。

まず、染色体上に欠失を持つ系統 (Deficiency, Df) に *ScaDE* 系統あるいは *VgDE* 系統を交配し、翅の表現型に変化を引き起こす染色体領域の特定を試みた。もし、欠失領域に *Wg* シグナル伝達系に関係のある遺伝子が含まれていれば、その分子の量が半減していることにより表現型に変化が現れる事が期待された。例えば、細胞質内の *Arm* の量を増加させる働きを持つ分子の量が半減すれば、*Wg* シグナル伝達系はさらに抑制されて表現型が強められると予想した (図 3B)。このスクリーニングに用いる Df 系統として、国立遺伝学研究所から約 175 系統のコレクションを分与して頂いた。このコレクションは比較的広い領域を欠く Df 系統で構成され、すべての Df 系統の欠失領域を合わせると、X 染色体を除いた染色体 (第 2、第 3、第 4) の約 80% 以上の領域の遺伝子欠失を確認できる。

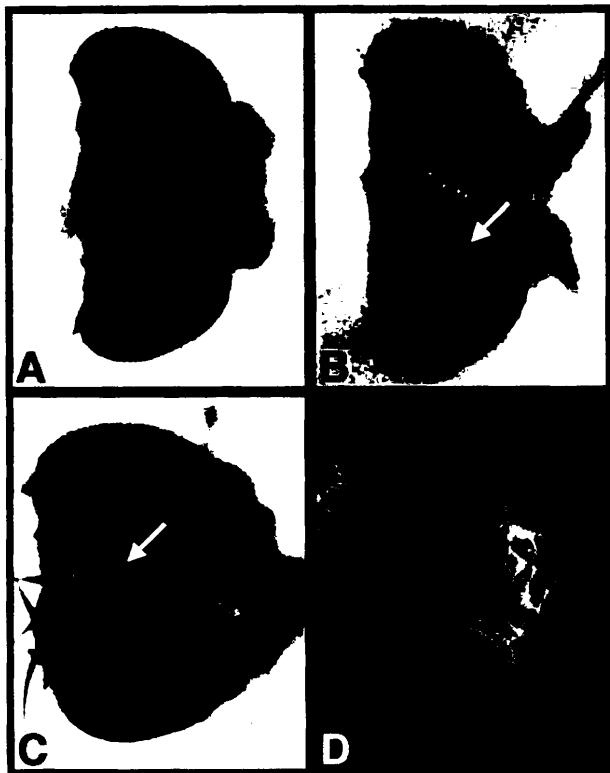


図 4、遺伝的相互作用により観察された複眼の異常 P1388、P1045 変異のヘテロバックグラウンドで、*sca-GAL4* により *DE-cad* を過剰発現した時に、高い頻度で観察される複眼の異常 (B,C)。正常な複眼 (A)。矢印で示した所に異所的な個眼や複眼が生じている (B,C)。これらの異常は、P1388 の場合 30%、P1045 の場合 35%、野生型では 6% と、二つの変異バックグラウンドでは野生型に比べてはるかに出現頻度が高い。同様な表現型は *wg* 温度感受性変異体においても観察される事が報告されている (D; Ma and Moses, 1995)。

この Df 系統に対するスクリーニングの結果、*ScaDE* 系統と *VgDE* 系統の双方と相互作用する候補領域を 9 つ選んだ。その染色体領域は、染色体バンド 29、30、43、50、63、85、95、98、99。このうちエンハンサー候補は 29、30、63、85、95、98、99。サプレッサー候補は 43、50。次にこれらの候補領域に含まれる P 因子挿入変異系統 (約 60 系統) をストックセンターから取り寄せ、同様に遺伝学的相互作用の検討を行った。その結果、5 系統のエンハンサーが得られた。この中でも特に P1045 系統と P1388 系統を *ScaDE* 系統と交配した時、それぞれ通常ではほとんど異常の観察されない複眼に、高い頻度で異常が観察された。複眼から離れたところに眼が形成されたり、複眼が異常に広がる場合もあった (図 4BC)。これらの表現型の頻度は、双方の系統で 30% 程度、コントロールでは 10% 以下と有意な差を示した。

wg 変異体のアレルの一つでも同様な複眼の異常が観察されることから (図 4D)、この複眼の異常は *Wg* シグナルが弱められることによって生じたと考えられた。そこで、他の 3 系統に比べて強い遺伝的相互作用を示すこの 2 系統に注目し、これらの系統において破壊された遺伝子を同定する試みを開始した。しかし、この選び出した 2 系統は、いずれもサプレッサー候補領域に含まれる P

因子挿入変異系統であり、Df 系統に対するスクリーニングの結果と食い違いを見せた。この問題点についてはこの項の考察で詳しく述べる。

3-2・遺伝子のクローニング

P 因子挿入点付近のゲノム DNA を P 因子レスキュー法により回収し、P1045 系統から 2.8 kb、P1388 系統から 4.8 kb のゲノム DNA クローンを得た。これらのゲノムクローン内の転写単位の有無を調べるために、ゲノムクローンを鋳型として RNA プロブを作製し、胚に対する mRNA *in situ* hybridization 染色を行った。その結果、P1388 系統由来のプロブを用いた場合に胚の上皮にシグナルが観察され、このゲノムクローンに何らかの遺伝子の転写単位が含まれることがわかった。P1045 系統由来のプロブではシグナルは観察されず、このゲノムクローンには転写単位が含まれないと判断した。そこで、P1045 系統については解析を中断し、P1388 系統の解析を優先して進めた。

データベースの情報によると P1388 系統では、P 因子は染色体バンド 50C 付近に挿入し、*l(2)04845* 遺伝子を破壊している。回収した P1388 系統の P 因子挿入点付近 4.8 kb のゲノムクローンが、正しくバンド 50C 付近のゲノム塩基配列であることは、唾腺染色体に対する chromosome *in situ* hybridization 染色で確認した。ゲノムクローンの部分塩基配列を決定し、その配列データを用いて BDGP (Berkrey *Drosophila* Genome Project) の EST (Expression Sequence Tag) データベースを検索した結果、この領域から転写されたと考えられる cDNA クローン (LD09501) を発見した。この cDNA クローンの全塩基配列決定後、ORF (Open Reading Frame) の位置予測から、この cDNA クローンは完全長 mRNA を含むと予想された。また、この cDNA クローンと P 因子挿入点付近の塩基配列の比較から、P1388 系統において P 因子は cDNA クローン LD09501 の 5' 端の上流 132 bp に挿入していることが分かった。しかし、P1388 系統は P 因子の再転移による致死性の回復が認められず、また、サザンプロットの結果から複数の P 因子が挿入していることが判明した。さらに、私が最初に同定した P 因子は配列が部分的に壊れていて、再転移できないことも明らかになった (図 5)。BDGP により明らかにされたもう一つの P 因子挿入地点は、cDNA クローン LD09501 の 5' 端の上流 2896 bp であった (図 5)。このように P1388 系統は遺伝的に複雑であり、変異体の解析には不向きであった。後にデータベースの検索から、この遺伝子領域に新たな P 因子挿入変異 *l(2)k08121* と *l(2)k16601* を発見した。そのいずれの系統においても P 因子は、cDNA クローン LD09501 の 5' 端の 5 bp 下流 (転写単位内

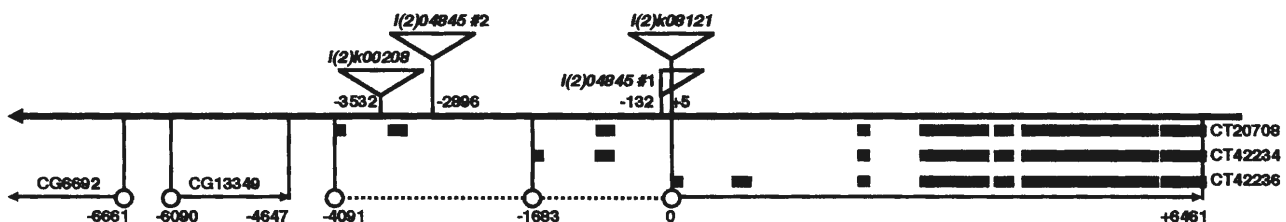


図 5、*l(2)04845* 遺伝子座のゲノム構造

l(2)04845 遺伝子座のエクソン・イントロンの配置と P 因子挿入位置の模式図。CT20708 と CT42234 はゲノムシーケンスから予測された転写単位。私が同定した cDNA は CT42236。CT20708 と CT42234 からは同一な 984 アミノ酸、CT42236 からは 950 アミノ酸の翻訳産物が予測される。*l(2)04845* #1 は私が同定した P1388 系統の P 因子挿入位置。*l(2)04845* #2 はデータベースに登録された P 因子挿入位置。*l(2)08121* 系統では転写単位 CT42236 の 5' 端から 5 bp 下流に P 因子が挿入している。

の非翻訳領域)に挿入していた(図5)。I(2)k08121 変異については、P 因子の再転移により致死性が回復し、また cDNA クローン LD09501 をヒートショックプロモーターの下流に繋いだトランスジーンを導入と発現により、その致死性を回復することができた。この結果から、我々はこの I(2)k08121 系統を目的遺伝子の変異体としてより詳細な解析に用いた。

3-3・考察

3-3-1・スクリーニング方法の問題点

今から考えるとこの遺伝学的スクリーニングには問題があった。まず、Df 系統に対するスクリーニングの結果に従って候補領域を絞り込んだが、その候補領域に含まれる P 因子挿入系統にのみ注目した為、取りこぼしが多かったと考えられる。P 因子挿入系統が存在しない領域があったことや、存在してもごく少数であったこと等、その領域に含まれる全ての遺伝子に P 因子が挿入されている訳ではないからである。より網羅的なスクリーニングの為には、突然変異誘発剤による点突然変異スクリーニングを行うべきだったと考える。その理由は以下の通りである。ショウジョウバエの点突然変異スクリーニングは、一人の労力ではなかなか困難な仕事量であるが、一本の染色体のみに集中すれば網羅的な探索も不可能ではない。また、P 因子の挿入による変異は機能喪失変異のみしか得られないが、突然変異誘発剤により生じる点突然変異なら部分機能喪失変異や優性変異も得られる。遺伝子のクローニングの労力は、P 因子挿入変異の場合に較べて格段に大変であるが、近年のゲノムプロジェクトの進行により、その困難さは以前ほどではない。

結果として、Df 系統に対するスクリーニングと P 因子挿入変異に対するスクリーニングの結果が食い違った。その原因は、用いた Df 系統が比較的広い領域を欠き、多くの遺伝子の欠失を伴っていた事から、複数の遺伝子との相互作用を見ていた為と考えられる。また、Df 系統は X 線照射により作製されることから、Df 領域以外のゲノム上の傷(変異)が多く、欠失領域以外の変異の影響も考えられる。この影響を少しでも無くす為に、少なくとも欠失を持つ染色体以外の染色体について、各系統の遺伝的バックグラウンドを揃える必要があった(具体的には、Df 系統を野生型にバッククロスして、Df 染色体以外の染色体を入れ替える)。P 因子挿入系統に絞ったスクリーニングを行うのであれば、Df 系統に対するスクリーニングを行わず、最初から P 因子挿入変異に対するスクリーニングを行う方が混乱が少ないと考える。しかしこの場合、P 因子挿入変異系統が膨大な量に及び、それを全てストックセンターから取り寄せる事には困難が予想されるので、あまり現実的とは言えない。

3-3-2・遺伝的に複雑な I(2)04845 遺伝子座

スクリーニングの結果、I(2)04845 遺伝子座に P 因子が挿入した P1388 系統を候補系統として同定し、その P 因子の挿入位置から、cDNA クローン LD09501 に含まれる遺伝子が我々の目的の遺伝子と考えられた。そして、この cDNA クローンの塩基配列から、この遺伝子座に存在する別の P 因子挿入変異 (I(2)k08121 と I(2)k16601) を発見した。しかし、これらの二つの系統は P1388 系統の致死性を相補してしまうことが分かった。つまり、P1388 系統と I(2)k08121 系統では破壊されている遺伝子が異なると考えられた。そして、新たに見つかった二つの P 因子挿入系統は、DE-cad 過剰発現系統との間に明確な遺伝的相互作用を示さなかった。この結果は、cDNA クローン LD09501 に含まれる遺伝子が我々の目的の遺伝子でない事を意味する。

新遺伝子の探索と同定

さらに、ゲノムプロジェクトによるショウジョウバエの全ゲノム塩基配列決定の結果、*I(2)04845* 遺伝子座には、我々が同定した転写単位 (CT42236) とは別に二つの転写単位が存在することが明らかになった (図5 CT20708, CT42234)。それぞれ、我々が同定した転写開始地点よりも上流から転写をスタートし、3番目のエクソン以降は我々が同定した転写単位と同じエクソンを共有する。より長い二つの転写単位からは984アミノ酸の翻訳産物が予想され、我々が同定した950アミノ酸の翻訳産物の8アミノ酸目からアミノ酸配列を共有する。P1388 系統の二つ目のP因子挿入位置は、この長い転写単位内のイントロン領域に存在する (図5 *I(2)04845 #2*)。そして、その近くにもう一つ新たなP因子挿入系統 *I(2)k00206* も見つかった。しかし、*I(2)k00206* 系統は、そのP因子挿入が致死の変異と予想されるにも関わらず、P1388 系統と *I(2)k08121* 系統の双方の致死性を相補した。原因は分からないが、*I(2)k00206* 系統にも複数のP因子が挿入している可能性があり、報告されたP因子挿入位置は致死的是で無いのかもしれない。また、*I(2)k08121* 系統におけるP因子の挿入位置からすると、三つの転写単位を全て破壊していると予想される。しかし、トランスジーンによる950アミノ酸の翻訳産物 (cDNA クローン LD09501) の発現により *I(2)k08121* 系統の致死性を回復できたことから、984アミノ酸の翻訳産物の働きは少ないと考えられる。

このように *I(2)04845* 遺伝子座は非常に複雑であり、P因子挿入系統と *DE-cad* 過剰発現系統との間の遺伝的相互作用の結果は曖昧なものとなってしまった。しかし、この cDNA クローン LD09501 の過剰発現は *DE-cad* 過剰発現系統との間に相互作用を示し、*Arm* と同様に *Wg* シグナル伝達に正に働く因子と予想された (後述)。そこで、我々は *dAGO1* 遺伝子を目的の遺伝子として機能解析を継続した。

4・AGO1 遺伝子ファミリーについて

Wg シグナル伝達に関わる遺伝子の探索の結果、我々は一つの候補遺伝子を発見した。この項では、次項においてこの遺伝子の機能解析の結果を報告する前に、この遺伝子がコードする蛋白質の分子的特徴や現在までに報告された類似遺伝子の機能について議論する。

4-1・dAGO1 分子と類似分子の構造比較

cDNA クローン LD09501 の第294塩基に翻訳開始点と予想されるメチオニンのコドン (ATG) があり、その直前の配列 (AAACATG) は、ショウジョウバエの翻訳開始点の共通配列 (A/CAAA/CATG, Cavener, 1987) に一致した。この cDNA クローン LD09501 の翻訳産物としては 950 アミノ酸の新規蛋白質が予想された。そのアミノ酸配列からは特に疎水性に富んだ領域は見つからず、核移行シグナルも見出されないことから、この分子は細胞質分子と予想された。データベースをホモロジー検索したところ、シロイヌナズナの AGO1 遺伝子産物と全長にわたって高い相同性を持つことが分かった。AGO1 遺伝子は葉や花卉が細くなる変異体の原因遺伝子として同定されたが、分子機能は明らかにされていなかった (図 8A; Bohmert et al., 1998)。そこで、我々はこの遺伝子を dAGO1 遺伝子 (*drosophila* AGO1) と名付けた。

AGO1 と dAGO1 のアミノ酸配列を較べたホモロジープロットから、これらの分子には良く保存された二つの領域があることが分かった (図 6A)。特にカルボキシル末端側の保存領域 (C region、C 領域) に含まれる 86 アミノ酸 (AGO1 box と命名) は非常に相同性が高く (図 6BC)、この領域にホモロジーを持つ遺伝子が多数存在することがデータベースの検索により明らかになった。我々が dAGO1 遺伝子をクローニングした時点 (1997 年) では、データベースから 10 個程の類似分子が見つかった。しかし、これらのほとんどはゲノムプロジェクトにより報告された予測遺伝子で、機能が明らかにされている遺伝子はなかった。その後、現在に至るまでに、類似遺伝子のクローニングの報告や、ゲノムプロジェクトの進行の結果、AGO1 box を持つ遺伝子は大きな遺伝子ファミリー (AGO1 遺伝子ファミリー、AGO1 ファミリー) を形成している事が明らかになってきた。AGO1 遺伝子ファミリーに属する遺伝子はほとんど全ての真核生物から見出される。しかし、出芽酵母からは、全ゲノム配列が決定されているにも関わらず見つからない。また、原核生物からも見つからない。ゲノムプロジェクトによる予測遺伝子も含めると、線虫には 20 個以上、ショウジョウバエには 5 個の AGO1 遺伝子ファミリーに属する遺伝子が存在する。一方、アミノ末端側の保存領域 (N region、N 領域) の中には、二つの特に良く保存された核 (N1、N2 配列) が見出され、分裂酵母からヒトまで高い相同性が保たれている (図 6BC)。しかし、この N 領域については保存されていない分子も存在する。例えばショウジョウバエの PIWI (Cox et al., 1998) や線虫の RDE-1 (Tabara et al., 1999) にはこの N 領域は見出されない (図 6BC)。これらの二つの保存された領域は、生物種を越えて高い相同性が保たれていることから、非常に重要な機能を担うと予想される。しかし、これらの領域は既知の機能ドメインとは全くホモロジーが無く、その分子機能は明らかにされていない。

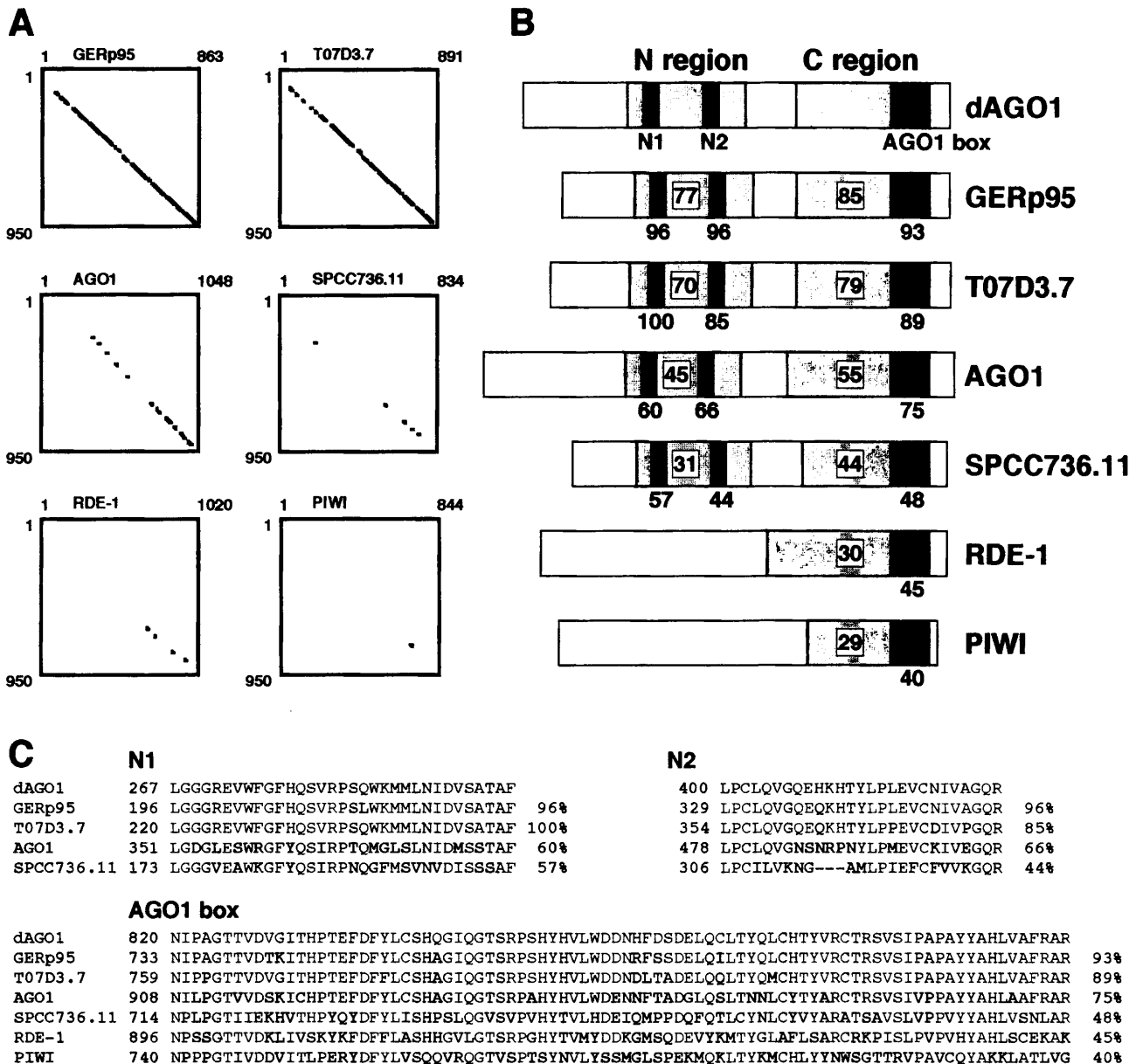


図6、dAGO1 と類似分子の構造比較

(A) dAGO1 と類似分子のホモロジープロットによるアミノ酸配列比較。一つのドットは10アミノ酸あたり7つのアミノ酸が相同な領域を示す。GERp95 (ラット) や T07D3.7 (線虫) との比較では、ほぼ全長に渡って非常に相同性が高いことが分かる。AGO1 (シロイヌナズナ) との比較により、二つの保存領域の存在が明らかになった。(B) dAGO1 と類似分子の一次構造比較。二つの保存領域、N領域とC領域はそれぞれ赤色と青色で示した。四角で囲まれた数字がN領域とC領域全体の相同性 (%)。各領域の核と考えられる特に相同性の高い領域 (N1, N2, AGO1 box) を濃色で示し、その下に相同性 (%) を記した。(C) それぞれの保存領域の核 (N1, N2, AGO1 box) のアミノ酸配列比較。N1 は33残基、N2 は27残基、AGO1 box は86残基。各配列の先頭の数字は最初の残基の番号、最後の数字 (%) は相同性を示す。

4-2・分子進化系統樹の解析

現在までにクローニングが報告された遺伝子や、ゲノムプロジェクトにより発見された遺伝子の全長アミノ酸配列を比較して分子系統樹を作製すると、AGO1 ファミリーは大きく分けて二つのサブファミリーに分けられる事が明らかになった(図7)。一つは dAGO1 を含む AGO1 サブファミリー、もう一つは PIWI 類似分子を中心とする PIWI サブファミリーである。AGO1 サブファミリーに含まれる分子は生物種を越えて非常に相関性が高い。N1、N2、AGO1 box の三つの保存配列の保存度から推定すると、AGO1 サブファミリーは分裂酵母ホモログ (SPCC736.11) までと考えられる。二つのサブファミリー間の一歩大きな差はN領域の有無と考えられる。しかし、二つのサブファミリー間では、AGO1 box の後半部分も配列が多少異なり(図6C)、AGO1 box のみの比較により計算した分子進化系統樹は、全長アミノ酸配列を較べた場合とほとんど同じ結果になった。この事から、AGO1 box が果たす分子機能についても、二つのサブファミリー間で差があると考えられる。dAGO1 のN領域のアミノ酸配列を用いて Blast サーチをかけると、PIWI や AUBERGINE (Wilson et al., 1996; Schmidt et al., 1999) がスコアは低いながらヒットしてくる。しかし、明確な保存領域 (N1 や N2 配列) は見出されない事から、一つの祖先遺伝子が二つに分かれ、N領域を必要とした AGO1 サブファミリーと必要としなかった PIWI サブファミリーに進化していったと予想される。また、RDE-1、QDE2 (Cogoni & Macino, 1997)、CG7239 (予想遺伝子) の三つの分子は、系統樹の位置からすると AGO1 サブファミリーに近いが、N領域の保存度が低い。QDE-2 と CG7239 には N2 配列しか保存されておらず、RDE-1 では両配列共に保存度が低い。このN領域の保存度の低さがどれだけ分子機能に差を与えるかは不明だが、高度に保存された AGO1 サブファミリーとは明らかに機能的な差を持っていると予想される。従って、これらの遺伝子は二つのサブファミリーのいずれにも属していないと考えられる。

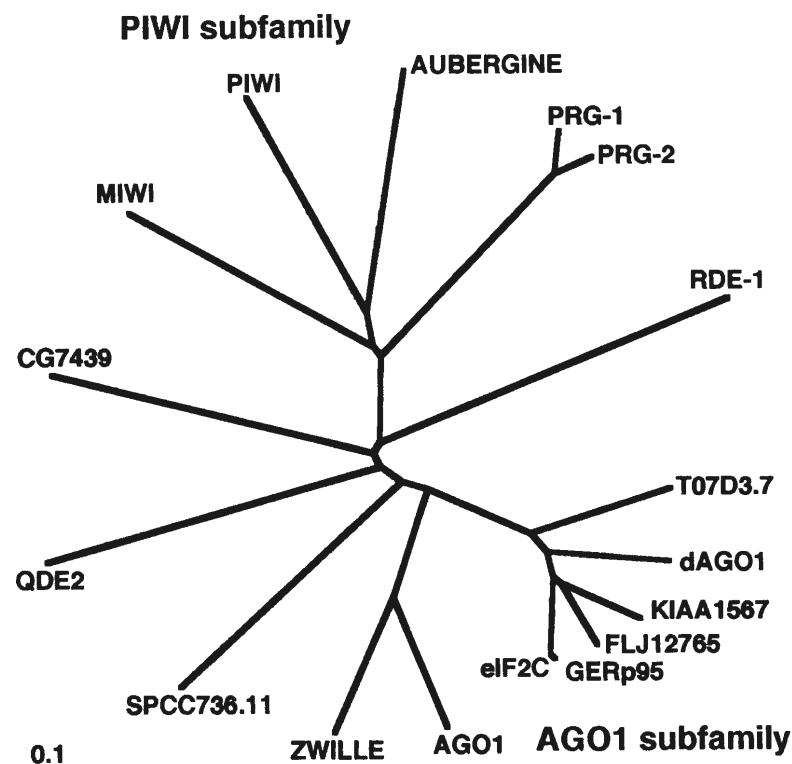


図7、AGO1 遺伝子ファミリーの分子進化系統樹

AGO1 遺伝子ファミリーに属する遺伝子を17個選び、全長のアミノ酸配列を用いて分子進化系統樹を作製した。AGO1 遺伝子ファミリーは大きく分けて二つのサブファミリーに分けられる。AGO1 サブファミリー(赤線)と PIWI サブファミリー(青線)。また、どちらにも属しないと考えられる Orphans (黒線)も存在する。用いた遺伝子は以下の通り; FLJ12765 (ヒト)、KIAA1567 (ヒト)、GERp95 (ラット)、eIF2C (ウサギ)、dAGO1 (ショウジョウバエ)、T07D3.7 (線虫)、ZWILLE/PINHEAD (シロイヌナズナ)、AGO1 (シロイヌナズナ)、SPCC736.11 (分裂酵母)、CG7439 (ショウジョウバエ)、RDE-1 (線虫)、QDE-2 (アカパンカビ)、PIWI (ショウジョウバエ)、AUBERGINE/STING (ショウジョウバエ)、MIWI (マウス)、PRG-1/D2030.6 (線虫)、PRG-2/C01G5.2 (線虫)。系統樹は CLUSTALW (Thompson et al., 1994) により計算し、TreeView (Page, 1996) を用いて描写した。

4-3・AGO1 遺伝子ファミリーの機能予測

我々が *dAGO1* 遺伝子をクローニングした1997年の時点では、まだ論文として発表されていた類似遺伝子はなかったが、AGO1 遺伝子の報告を皮切りに *piwi*, *ZWILLE*, *aubergine* 等、現在までに約10個の遺伝子が報告された(表1)。ここでは、それらの論文中で報告されたAGO1ファミリーに属する分子の役割と分子機能の予測について論じる。

現在までに報告されたAGO1ファミリーの属する分子に関わる生物学的現象は、二種類の現象に分類される。一つ目は、「幹細胞再生」と呼ばれる現象である。幹細胞再生とは、幹細胞が不等分裂により新しい幹細胞と分化する細胞を生み、分化細胞を増産するメカニズムである。ショウジョウバエの生殖細胞を例にあげると、生殖系列幹細胞(Germline stem cell, GSC)は、非対称分裂(自己再生分裂、Self-renewal division)により新しい幹細胞と卵に分化する細胞の二種類の細胞を生む。新しい幹細胞は同様な分裂をして、卵へ分化する細胞を次々と生み出していく(reviewed in Lin, 1998)。ショウジョウバエの *piwi* 変異体の GSC はこの自己再生分裂が正常に行えず、生殖系列幹細胞は増えることなくそのまま卵へと分化してしまう(図22A p.31; Cox et al., 1998)。その結果、*piwi* 変異体では非常に少数の卵しか形成されない。線虫の *piwi* 類似遺伝子の *prg-1/2* (*piwi* related gene)も、その遺伝子機能を押さえた時に、成熟卵の数が減少する表現型を示す事が確かめられている(Cox et al., 1998)。また、線虫の *T0.7D3.7* 遺伝子の場合、その遺伝子機能を押えると体全体のサイズが減少することから、生殖系列の細胞だけでなく体細胞の数も減少していると予想される(Cikaluk et al., 1999)。一方、植物においても幹細胞の自己再生分裂の異常が、シロイヌナズナの *ZWILLE* 変異体で報告されている。植物の場合、その体作りの方法は動物とは異なり、構造体のほとんど全てが成長点と呼ばれる分裂組織から連続的に生み出される(reviewed in Christensen & Weigel, 1998; Doerner, 1999)。成長点は分裂の盛んな未分化な細胞集団であり、未分化な細胞と分化する細胞を分ける非対称分裂が起きている。*ZWILLE* 変異体では茎頂の成長点が未分化な状態を保てず、分裂をしない細胞へと分化してしまう(図8B; Moussian, 1998)。この *ZWILLE* の働きとして興味深いのは、*ZWILLE* は成長点では発現しておらず、成長点の周囲の細胞で発現していることである(Lynn et al., 1999)。つまり、*ZWILLE* は細胞内分子にも関わらず、非細胞自律的(non-cell autonomous)に機能している。これは何らかの細胞外情報伝達系を細胞内で調節している事を示唆する。同じシロイヌナズナの *AGO1* 変異体では葉や花弁が細くなる表現型が観察される

表1、AGO1 遺伝子ファミリーの仲間

生物種	遺伝子名	変異体の表現型やその他の情報
アカパンカビ	<i>qde-2</i>	gene quelling の異常 (cogoni et al., 1997)
シロイヌナズナ	<i>AGO1</i>	葉や花弁の形成異常 (Bohmert et al., 1998) PTGS の異常 (Fagard et al., 2000)
線虫	<i>ZWILLE</i>	茎頂成長点の自己再生分裂異常 (Moussian et al., 1998; Lynn et al., 1999)
	<i>rde-1</i>	二重鎖 RNA 干渉 (RNA interference, RNAi) の異常 (Tabara et al., 1999)
	<i>prg-1/2</i>	生殖細胞の減少 (Cox et al., 1998)
ショウジョウバエ	<i>T07D3.7</i>	生殖細胞の減少と個体サイズの縮小 (Cikaluk et al., 1999)
	<i>piwi</i>	生殖細胞の自己再生分裂の異常 (Cox et al., 1998 & 2000)
	<i>aubergine/sting</i>	<i>osker</i> 遺伝子の翻訳異常 (Wilson et al., 1996) <i>stellate</i> 遺伝子の mRNA スプライシング異常 (Schmidt et al., 1999)
ウサギ	<i>eIF2C</i>	eIF2 複合体の mRNA への結合を促進する分子として同定 (Zou et al., 1998)
ラット	<i>GERp95</i>	小胞体やゴルジ体の表面分子として同定 (Cikaluk et al., 1999)
ヒト	<i>eIF2C1</i>	Wilms tumor 関連ゲノム領域に存在 (Koesters et al., 1999)

(図 8A; Bohmert et al., 1998)。この表現型の原因は定かでないが、AGO1 は ZWILLE にアミノ酸配列が非常に似通っており、成長点では機能的に重複していることが示されている (Lynn et al., 1999)。動物と植物ではまったく体作りのメカニズムが違うにも関わらず、幹細胞の自己再生分裂という同様な現象に同じファミリーに属する分子が関わっていることは興味深い。真核生物の幹細胞で起きている自己再生分裂は、進化的に高度に保存された機構を保持し、そのメカニズムの一端を AGO1 ファミリーが担っていると期待される (reviewed in Benfey, 1999)。

もう一つは、mRNA の転写後抑制にかかわる現象である。植物の PTGS (Post Transcriptional Gene Silencing) や、アカパンカビの Quelling と呼ばれる mRNA の分解を伴う翻訳抑制現象は、近年、線虫で最初に確認された二重鎖 RNA 干渉 (RNA interference, RNAi) と呼ばれる現象と同一のメカニズムを介している事が分かってきた (reviewed in Cogoni & Macino, 1999; Morel & Vaucheret, 2000)。RNAi とは、ある遺伝子の mRNA を二重鎖にして線虫にインジェクションすると、その遺伝子の機能が押さえられ、変異体と同じ表現型を示す現象である (Fire, 1999)。現在では多くの生物種で働くことが確認されている。この RNAi が働かなくなる線虫の変異体の原因遺伝子として同定されたのが、AGO1 ファミリーのメンバーの一つ、*rde-1* 遺伝子であった (Tabara et al., 1999)。同様にアカパンカビでは、Quelling が働かなくなる変異体として *qde-2* 遺伝子が同定された (Cogoni & Macino, 1997; Fagard et al., 2000)。AGO1 変異体でも PTGS が働

かなくなるという報告がなされた (Fagard et al., 2000)。また、転写後抑制との関わりは定かでは無いが、ショウジョウバエの *sting* 変異体 (後に *aubergine* と同一遺伝子であることが判明) では、雄の生殖細胞で発現する *stellate* 遺伝子の mRNA スプライシングに異常が見つかっている (Schmidt et al., 1999)。以上のように、様々な生物で確認されてきた mRNA の転写後抑制現象

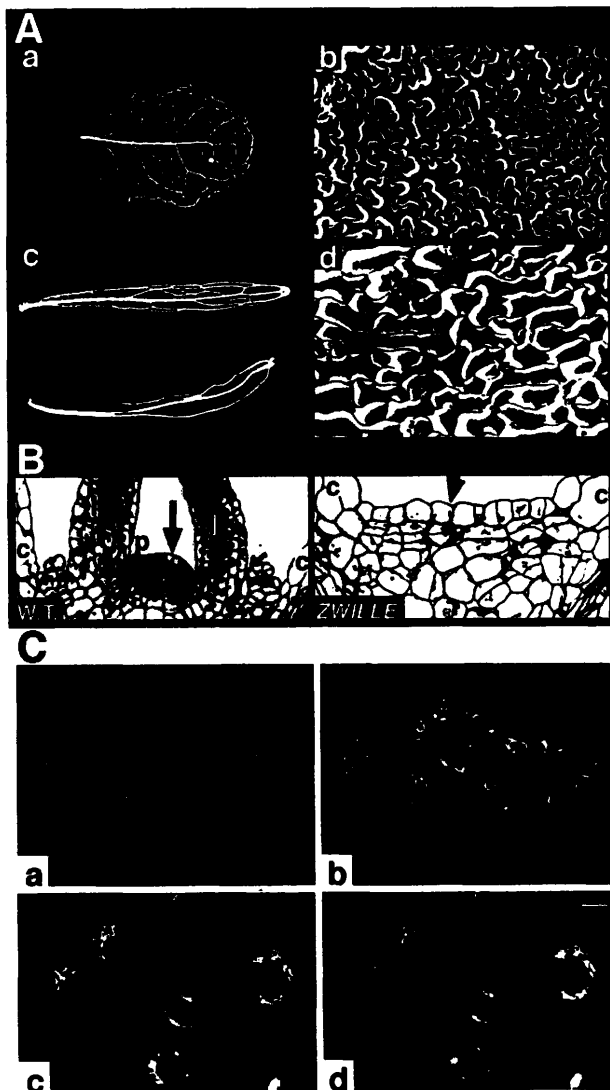


図 8、AGO1, ZWILLE 変異体を示す表現型と GERp95 の細胞内局在

(A) シロイヌナズナ・AGO1 変異体を示す表現型 (Bohmert et al., 1998)。(a,b) 野生型の正常なロゼット葉の葉脈標本 (a) とロゼット葉の表面の走査電顕像 (b)、(c,d) AGO1 変異体。AGO1 変異体のロゼット葉は細長くなり (c)、表面の細胞も野生型のように複雑な形ではなく (b)、単純な形となっている (d)。(B) シロイヌナズナ・ZWILLE 変異体を示す表現型 (Moussian et al., 1998)。野生型 (W.T.) の成長点は小さな細胞が密集して盛り上がっているが、ZWILLE 変異体においては、その様な細胞は存在せず、細胞も大きくなっている。(C) ラット・GERp95 の細胞内局在 (Cikaluk et al., 1999)。抗 GERp95 抗体による染色 (a,c) とゴルジ体マーカーによる染色 (b,d) の比較。(a,b) ラットの脾臓の切片、(c,d) NRK52E 細胞。GERp95 はこれらの細胞でゴルジ体に強く濃縮している事が分かる。しかし、全ての細胞種でゴルジ体に濃縮している訳ではなく、異なった分布を示す細胞種もある (Cikaluk et al., 1999)。

AGO1 遺伝子ファミリー

は同一のメカニズムを有しており、そのメカニズムの機能の一端を担うのが AGO1 ファミリーに属する分子であることが明らかになってきた。

他の情報としては、AGO1 サブファミリーに属するラットの GERp95 分子の細胞内局在が詳しく解析されている。GERp95 は細胞種によって異なるのだが、ゴルジ体や小胞体の表面に濃縮していることが確認された (図 8C; Cikaluk et al., 1999)。それとは逆に PIWI は核内への濃縮が確認されている (Cox et al., 2000)。この違いは二つのサブファミリーの機能的差を反映しているのかもしれない。また、ウサギの eIF2C は、リボソーム・eIF2 複合体の mRNA への結合を促進する分画に含まれる分子として近年クローニングされた (Roy et al., 1988; Zou et al., 1998)。しかし、実際にクローニングされた eIF2C 分子にその活性があるかどうかは調べられておらず、未だ検討の余地を残している。ショウジョウバエの *aubergine* 遺伝子が胚において *osker* 遺伝子の翻訳促進に関わることが示されているが (Wilson et al., 1996)、翻訳開始現象に関わっているかどうかは確かめられていない。

以上の情報をまとめると、この遺伝子ファミリーのメンバーは常に mRNA の周囲で機能している可能性が考えられる。そして、その分子機能の生理学的な役割として、幹細胞の自己再生分裂の制御や、幹細胞を未分化な状態に保つ働きをしている事が予想される。

5・dAGO1 遺伝子の機能解析

5-0・序

我々は Wg シグナル伝達系に関わる新遺伝子の同定を目的とした遺伝学的スクリーニングの結果、その候補として dAGO1 遺伝子を発見した。この遺伝子は大きな遺伝子ファミリーの一員であるが、分子機能は全く明らかにされていなかった。そこで、我々はショウジョウバエの分子遺伝学的手法を用いて、dAGO1 遺伝子と Wg シグナル伝達系の関係を追及すると共に、発生過程における働きについても解析を行った。また、dAGO1 の分子機能をショウジョウバエの系で追及する試みも行った。次項の総合議論では、これらの実験の結果と前項で示した類似遺伝子の解析の結果を参考にして、dAGO1 遺伝子の働きについて議論する。

5-1・dAGO1 mRNA の発現パターンと分子の細胞内局在

遺伝子の機能を調べる上で、その遺伝子が機能する場と時期を調べる事が重要と考え、まず mRNA *in situ* hybridization 染色により dAGO1 mRNA の発現パターンを検討した。初期胚には多量の母性由来 mRNA が存在し、細胞性胞胚化 (cellularization) 後にシグナルは弱くなる。胚の体節 (germ band) が伸長を始めると再び胚全体で発現が強くなり、そのまま胚発生後期まで発現が維持される (図 9A)。ステージ 16 頃から上皮における発現量は低下してゆくが、将来成虫原基となる領域の細胞には強い発現が残る (図 9Ae)。同時期中枢神経系にも所々強いシグナルが観察されるが、細胞種は確認していない (図 9Af)。3 令幼虫期の成虫原基には、全体的に弱い発現が認められた (データ未掲載)。以上の観察の通り、dAGO1 mRNA の発現パターンに細胞特異性や組織特異性はなく、ほぼ全ての細胞に存在していることが分かった。ただ、分裂を停止した細胞では発現は弱く、盛んに分裂をしている細胞では発現が強い印象を受けた。

我々はさらに、dAGO1 蛋白質 (以後、単に dAGO1) の分子機能を推定する為に重要な情報となる細胞内局在を調べることを目的として、dAGO1 を特異的に認識する抗体を作製した。作製した C 末 19 アミノ酸含

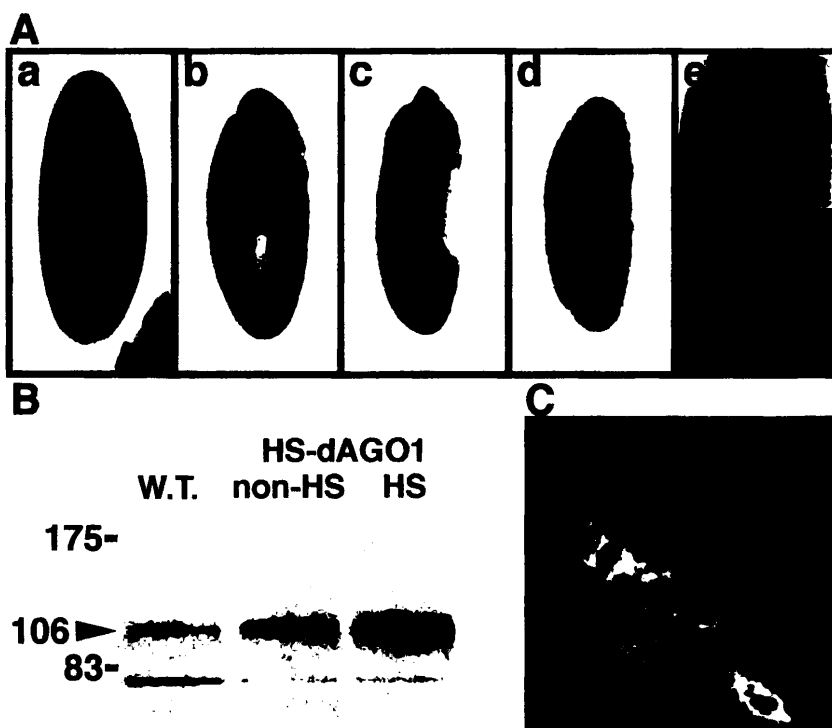


図 9、dAGO1 mRNA の

発現パターンと分子の細胞内局在 (A) 胚発生過程における dAGO1 mRNA の分布。細胞性胞胚 (a)、ステージ 10 (b)、ステージ 13 (c)、ステージ 16 (d)。ステージ 16 の頭部付近の上皮の拡大像 (e) と神経系の拡大像 (f)。wd (wing disc; 翅成虫原基)、hd (halter disc; 平均棍原基)、中枢神経系の一部の細胞において強い発現が認められる。(B) 抗 dAGO1 抗体によるウェスタン・ブロット。野生型とヒートショックプロモーターにより発現誘導可能なトランスジェニックフライの比較。レーン W.T. は野生型、レーン non-HS は未誘導、HS は誘導後。成虫の抽出液は各レーンあたり 0.5 匹分泳動した。矢尻で示した 106 kD が dAGO1 を示す。(C) 成虫原基の一部の細胞で過剰発現させた時の dAGO1 の細胞内局在。細胞質への蓄積が観察される。

dAGO1 遺伝子の機能解析

成ペプチドに対するウサギ抗血清の特異性を確かめる為、野生型個体とヒートショックにより dAGO1 を発現誘導できるトランスジェニックフライについて、ウェスタンブロットを行った。その結果、dAGO1 の予想される分子量 106 kD 付近に強いバンドを検出した。このバンドは dAGO1 を発現誘導した場合にシグナルが強くなることから、この抗体は正しく dAGO1 を認識していると判断した (図 9B)。この結果、この抗血清は、若干の非特異的バンドを検出するが、十分に強く dAGO1 を認識できることが分かった。

この抗血清を用いて野生型の胚や成虫原基を染色したが、シグナルが弱く、ショウジョウバエの細胞が小さいこともあり、dAGO1 の明確な細胞内局在は確認できなかった。そこで、成虫原基の表面を覆う Peripodial epithelium と呼ばれる薄い上皮状細胞の一部に dAGO1 を過剰発現させ、細胞内における分子の局在を抗血清による染色で観察した。その結果、dAGO1 のシグナルは細胞質に観察され、核や細胞内小胞、細胞境界への濃縮は認められなかった (図 9C)。また、GFP 融合分子を作製し、唾腺細胞における融合分子の局在を GFP の発する蛍光により観察したが、細胞質に存在すること以上の情報は得られなかった (データ未掲載)。過剰発現による結果なので正確な情報では無いが、核や細胞境界に優先的に輸送される分子では無いことが明らかになった。この結果は、dAGO1 のアミノ酸配列に対して行った細胞内局在予測プログラム (PROST II) の結果に一致する。

5-2・dAGO1 と DE-cad の共過剰発現による相互作用の検討

mRNA の発現パターンや分子の細胞内局在からは、dAGO1 の組織特異性や分子機能を強く示唆する情報は得られなかった。そこで、dAGO1 と Wg シグナル伝達系との関係や分子機能の追及には、変異体の解析や過剰発現実験などの分子遺伝学的手法を駆使した解析が必要と考えた。

まず、dAGO1 と Wg シグナル伝達系の関連を調べる為、dAGO1 と DE-cad を同時に発現させ (co-overexpression、共過剰発現)、DE-cad の過剰発現による表現型に及ぼす dAGO1 の影響を検討した。Wg シグナル伝達系において正に働く Arm を DE-cad と共発現させると、表現型は回復して正常な翅が形成される (図 10C)。これは、過剰な DE-cad によって奪われた細胞質中の Arm が、共過剰発現により補われた為と考えられる。そこで、同様な手法で dAGO1 と Wg シグナル伝達系の関係を確認できると考え、vg-GAL4 を用いて dAGO1 と DE-cad を共過剰発現する実験を行った。その結果、dAGO1 を同時に発現させた場合、表現型は回復して翅の縁はほぼ正常に形成された (図 10D)。dAGO1 と GFP の融合分子についても同様に表現型の回復が確認された (データ未掲載)。この結果、dAGO1 は Arm と同様に Wg シグナル伝達系の正の因子であることが期待された。

次に、この表現型の回復には AGO1 ファミリーに保存された二つの領域のいずれかが必要ではないかと考えた。その検証の為、二つの保存領域をそれぞれ部分的に破壊した分子 (ΔN , ΔC ; 図 10) を、同様に DE-cad と共過剰発現させた。その結果、N 領域を部分的に欠失した ΔN 分子は、DE-cad 過剰発現による表現型を回復させることが出来ず、むしろ表現型を昂進することが分かった。WM の削れ方は大きくなり、翅の幅も減少した (図 10E)。 ΔN と GFP の融合分子を用いた場合も同様に、表現型の昂進が観察された (データ未掲載)。C 領域の一部を欠き、AGO1 box を完全に欠失した ΔC 分子については、全長分子程ではないが表現型を回復させることが出来た (図 10F)。以上の結果から、DE-cad 過剰発現による表現型の回復に必要なのは、dAGO1 の機能的中心と予想した共通保存配列 AGO1 box ではなく、意外にも N 領域の方であるこ

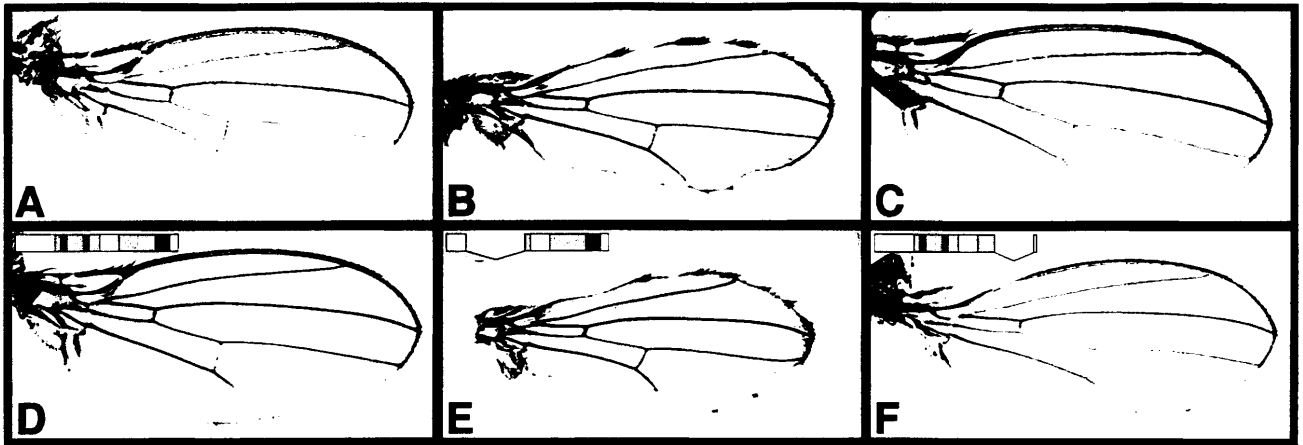


図 10、dAGO1 と DE-cad の共過剰発現が示す相互作用

(A)野生型の正常な翅。(B) *vg*-GAL4 による DE-cad 過剰発現が引き起こす翅の表現型。(C) Arm の共過剰発現による表現型の回復。(D-F) dAGO1 全長分子及び改変分子の共過剰発現が示す相互作用。それぞれの図の左肩に共過剰発現させた分子の模式図を記した。(D) 全長分子、(E) Δ N分子、(F) Δ C分子。詳細は本文。

とが分かった。そして、N領域を持たない Δ N分子はドミナント・ネガティブ的に働くことが示唆された。

しかし、この共過剰発現の結果が示した相互作用は、非特異的な現象かもしれないと考えた。つまり、GAL4/UAS 法による過剰発現のメカニズム自体に干渉している可能性が考えられた。その確認として、Decapentaplegic (Dpp) シグナル伝達系の細胞内シグナル伝達因子である Mad 又は Dad を、dAGO1 と共過剰発現させた時の影響を検討した。しかし、Mad と Dad を単独で過剰発現させた時に生じる表現型は (Tsuneizumi et al., 1997)、dAGO1 の共過剰発現の影響を受けなかった (データ未掲載)。この結果は、dAGO1 過剰発現の作用が非特異的でないことを示唆する。しかし、その作用が Wg シグナル伝達系に特異的であるかどうかは現段階では分からない。

5-3 · dAGO1 変異胚の表現型

5-3-1 · 変異胚のクチクラパターンの観察

dAGO1 と DE-cad の共過剰発現実験の結果から、dAGO1 は Wg シグナル伝達系において正のシグナルを伝える因子と予想された。Wg シグナル伝達系で機能する分子なら、その機能喪失変異のホモ接合体は体節極性形成に異常を示すことが期待された(図 1)。ところが、dAGO1 機能喪失変異 (*l(2)k08121*) のホモ接合体は胚性致死ではあるが、歯状突起のパターンや他の形態に明確な表現型を示さなかった。mRNA *in situ* hybridization 染色の結果、初期胚には母性由来の mRNA が大量に存在することが確認された事から(図 9A, 11A)、ホモ接合体は母性効果によって明確な表現型を示さなかったと考えられた。そこで、生殖系列モザイク法により、母性効果を除いた変異胚を観察する必要があると考えた。生殖系列モザイク法とは、染色体組換えにより雌の生殖母細胞(Germline Stem Cell)に変異クローンを誘導し、変異クローン由来の卵を観察する技術である。生殖母細胞の非対称分裂により生じた卵原細胞はさらに4回の分裂を経て、15個の濾胞細胞(nurse cell)と1個の卵細胞(ovary)を形成する。母性由来の mRNA はこの濾胞細胞から Ring canal を通じて卵細胞へ供給される。つまり、母細胞の段階で変異クローンとなれば濾胞細胞も変異クローンとなり、その遺伝子の母性効果が減少することが期待される。この組換えを誘導した雌に変異系統、又は Df 系統を交配することで、生殖系列変異クローンの変異ホモ接合体が得られる。我々が使った FLP-DFS (Dominant Female Sterile) 生殖系列モザイク法は、変異クローン由来の細胞のみ卵に分化出来るように工夫された特に効率の良い方法である(Chou & Perrimon, 1996)。この方法に従い、生殖系列変異クローン dAGO1 変異ホモ接合体の胚(以後、単に dAGO1 変異胚と記す)を作出し、dAGO1 mRNA の存在量を調べたところ、母性

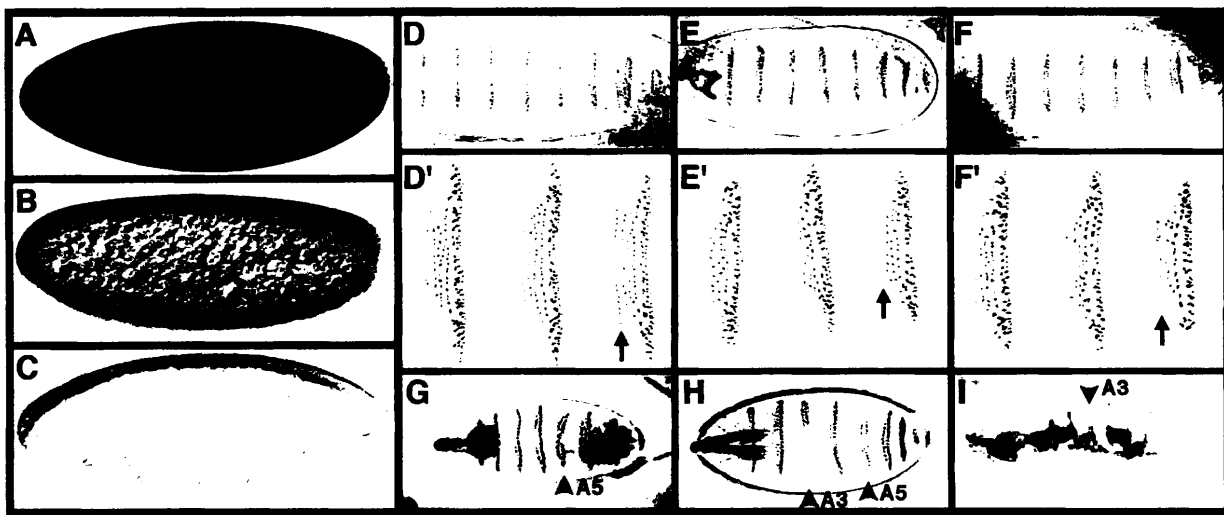


図 11、dAGO1 変異胚が示す歯状突起パターンの異常

(A-C) 野生型胚と dAGO1 変異生殖系列クローンにおける、dAGO1 mRNA 存在量の比較。(A) 野生型、(B) dAGO1 変異生殖系列クローン。dAGO1 変異生殖系列クローンでは野生型に比べ、dAGO1 mRNA は90%近く減少している。(C) センスプローブによるコントロール。各写真の左が胚の前部。

(D-I) dAGO1 変異胚が示す歯状突起パターンの異常。(D,D') 野生型胚の正常な歯状突起パターン。(E,E') dAGO1 変異胚、(F,F') hs-dAGO1 トランスジーンにより dAGO1 を発現誘導した dAGO1 変異胚。dAGO1 変異胚では歯状突起の全体的な減少が観察されるが、特に各歯状突起帯の最前列で顕著である(E' 矢印)。この異常は hs-dAGO1 トランスジーンによる dAGO1 の発現誘導により回復した(F' 矢印)。(G-I) 生殖系列変異クローン変異ヘテロ接合体の末期胚と1令幼虫。一部の体節の歯状突起帯が消失する異常が生じ、孵化した1令幼虫の40%(42/104)にこの異常が観察された。各体節の異常の頻度は、腹部 A3 (9%)、A5 (90%)、A6 (7%)。腹部体節 A5 に異常が生じる頻度が高い。各写真左が胚前方。

由来の mRNA に約 90% の大幅な減少が観察された (図 11B)。この dAGO1 変異胚は、その内臓の形態からステージ 15 程度で発生が止る考えられるが、上皮の歯状突起 (denticle) は形成される。その形成された歯状突起を観察したところ、dAGO1 変異胚には体節極性形成の異常は生じておらず、ただ全体的に歯状突起が減少するという異常が観察された (図 11E'E')。特に歯状突起帯 (denticle belt) の最前列の突起の減少が顕著である (図 11D'-E' 矢印)。この異常は、ヒートショックプロモーターによる dAGO1 トランスジーンが発現により回復することから、dAGO1 遺伝子の機能喪失により生じていることが確かめられた (図 11FF')。歯状突起が減少する詳しい原因は分からないが、類似遺伝子の機能解析の結果も考慮に入れると、変異胚全体の細胞数が減少している可能性が考えられる。実際、変異胚の大きさは野生型に較べて小さい (図 11E)。

一方、生殖系列変異クローンの変異ヘテロ接合体では、腹部体節 A3 と A5 に限って歯状突起の減少や消失が観察された (図 11G-I 矢尻)。この異常はいわゆる Pair-rule 遺伝子群の変異体に生じる異常によく似ている。この表現型は孵化した一令幼虫の約 40% に観察された。しかし、この表現型はより強い変異体であるはずの生殖系列変異クローン変異ホモ接合体では全く観察されない。いくつかの野生型系統と交配して調べたが、どの場合もこの表現型は観察される為、dAGO1 変異以外の別の変異が原因になっている可能性は低いと考えられた。母性由来 mRNA による dAGO1 の発現と、接合子由来 mRNA による dAGO1 の発現量のバランスの崩れがこの異常を引き起こすと予想されるが、そのメカニズムは全く不明である。また、この生殖系列変異クローン変異ヘテロ接合体は、体節に異常を示すにも関わらず、その多くが成虫まで成長する。この事は、dAGO1 の母性由来 mRNA は必ずしも胚発生に必須ではないことを示している。

以上の結果の通り、dAGO1 変異胚の表現型は Wg シグナル伝達系との関係に肯定的な結果を示さず、少なくとも胚期において、dAGO1 は Wg シグナル伝達を正に伝える働きをしていない事が示唆された。しかし、他の組織、特に翅形成過程で特異的に Wg シグナル伝達系に関与している可能性は残されていると考える。

5-3-2・変異胚の神経系の観察

生殖系列変異クローン変異ホモ接合体 (dAGO1 変異胚) の致死の原因を調べていたところ、神経系に大きな異常を発見した。その異常は決して通常の変異ホモ接合体や生殖系列変異クローン変異ヘテロ接合体では観察されなかった。神経繊維の全体を標識する抗体 (BP102) による染色の結果、中枢神経系の梯子状神経節に大きな異常が見つかった (図 12)。胚の前後軸方向に延びる 2 本の平行な神経束 (longitudinals) には、形成途中 (ステージ 14) から神経束の伸長方向の異常が生じ、梯子状神経節がほぼ完成するステージ 16 においても十分な接続が出来ていない神経束が観察された (図 12 矢印)。また、2 本の longitudinals を結ぶ、各体節ごとに 2 本ある神経束 (commissures) の形成も異常になった。平行に走るはずの 2 本が、途中で繋がってしまったり、最初から 1 本しか形成されていない場合も観察された (図 12 矢尻)。中枢神経系の形成過程を遡ると、神経繊維が伸長をはじめた神経系形成初期から染色パターンに異常が観察された (データ未掲載)。また、末梢神経を中心に標識する抗体 (22C10) による染色では、末梢神経系で神経細胞の数が明らかに減少している事が明らかになった (図 13)。例えば、各ヘミセグメントに特徴的な 5 細胞のクラスターを作る伸展感覚細胞 (図 13A' 矢印) は、変異胚では 1, 2 細胞しか存在せず、クラスターは観察されない (図 13B' 矢印)。

以上の観察の結果から、dAGO1 変異胚の神経系には激しい異常が生じていることが明らかになった。この

dAGO1 遺伝子の機能解析

神経系の表現型と Wg シグナル伝達系との関係は未知数であったが、*dAGO1* 遺伝子の真の役割を確かめる為にも、より詳しい観察を行った。

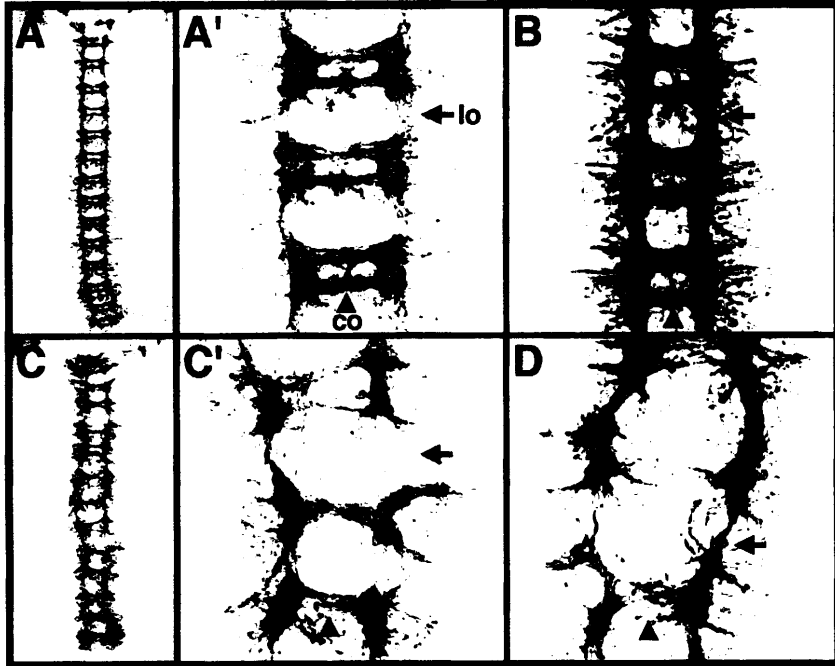


図 12、変異胚の中樞神経系の異常
神経繊維全体を標識する抗体 (BP102) による染色。(A,A',B) 野生型の正常な梯子状神経節 (中枢神経系) と、(C,C',D) *dAGO1* 変異胚。ステージ 14 (A,A',C,C'), ステージ 16 (B,D)。 *dAGO1* 変異胚では、前後軸方向に繋がる二本の longitudinal (lo 矢印) とそれらを繋ぐ commissures (co 矢印) の双方の神経束の形成に著しい異常が観察された (C,C')。その異常はステージが進むほど顕著となる (D)。各写真上方が胚前方。

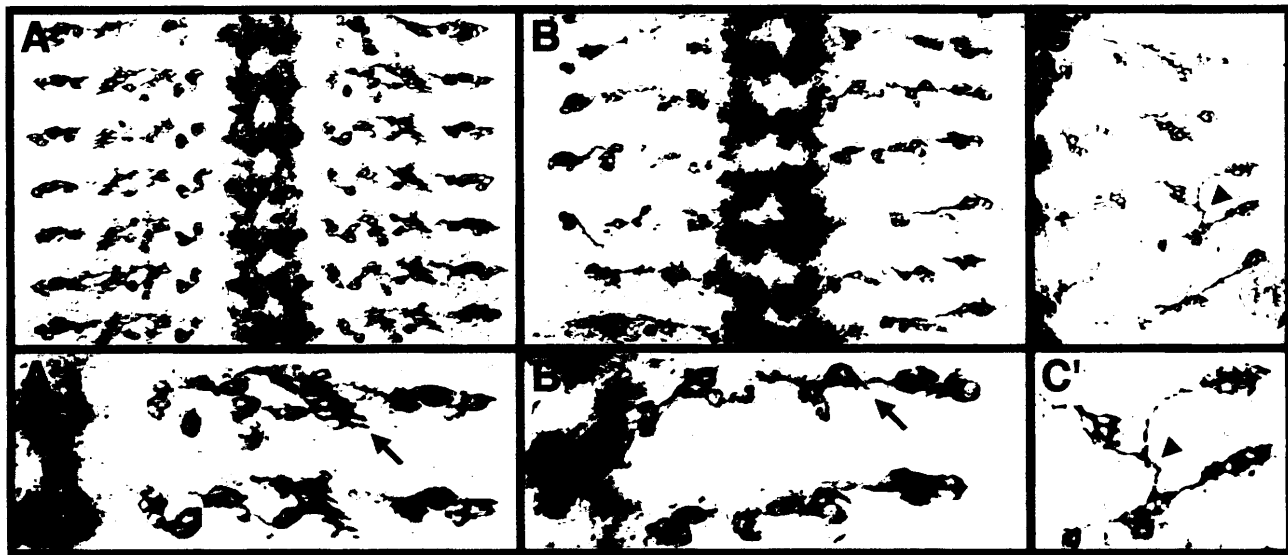


図 13、変異胚の末梢神経系の異常

末梢神経を中心に標識する抗体 (22C10) による染色。(A,A') 野生型の正常な末梢神経細胞体の分布パターン。(B,B',C,C') *dAGO1* 変異胚。ステージ 14 (A,A',B,B'), ステージ 16 (C,C')。 *dAGO1* 変異胚では、全体的に末梢神経の細胞数が減少している。各半体節に一組存在する伸展細胞のクラスターは5つの細胞で構成されるが (A' 矢印)、 *dAGO1* 変異胚ではそれらの細胞が減少し、クラスターが観察されない (B' 矢印)。よりステージの進んだ *dAGO1* 変異胚において、セグメント境界を越えて異常に伸長した神経繊維が観察されることがある (C,C' 矢印)。各写真上方が胚前方。

dAGO1 変異胚の末梢神経系では神経細胞の数が減少していることから、中枢神経についても同様に神経細胞の数が減少しているかを調べた。中枢神経系の一部の細胞の核を標識する抗体 (抗 even-skipped 抗体) による染色の結果、中枢神経系においても神経細胞の数が減少していることが確認された (図 14AB 矢印)。次に、神経細胞が減少していることから、グリア細胞への発生運命転換が生じているのでは無いかと考え、グリア細胞を特異的に標識する抗体 (抗 Repo 抗体) による染色でその可能性を検討した。Glial cells missing (GCM) 遺伝子を過剰発現させた神経系では、神経細胞がグリア細胞に発生運命転換し、その結果、神経細胞が減少してグリア細胞が増加する (Hosoya et al., 1995)。そこで、dAGO1 変異胚でも同様な現象が起きているのではないかと考えた。しかし、dAGO1 変異胚の中枢神経系と末梢神経系の双方で、神経細胞だけでなくグリア細胞も大幅に減少していることが確認された (図14CD)。これらの表現型は発生運命転換の結果としては説明出来ず、最終分化の手前の段階で細胞数の減少が生じていると予想された。また、細胞の位置関係を明確にして、減少しているグリア細胞の細胞種特異性を調べるために、抗 Engrailed (En) 抗体と抗 Repo 抗体による二重染色を行った (図 14EF)。dAGO1 変異胚では全体的なグリア細胞の減少が目につくが、まずその位置が特徴的な細胞に注目してみたい。腹部各体節には

2個1組の、胸部各体節には4個1組の正中線グリア細胞 (mid-line glia) が存在する (図 14E 矢印)。この細胞に着目すると、dAGO1 変異胚では各体節に1細胞のみの場合が多いが、正常に形成されている場合もある (図 14F 矢印)。それに対し、抗 En 抗体と抗 Repo 抗体により二重にラベルされる細胞 (図14E 矢尻) は、dAGO1 変異胚では全く観察されない (図 14F 矢尻)。この結果から、グリア細胞の減少には影響を受けやすい細胞種が存在すると考えられた。

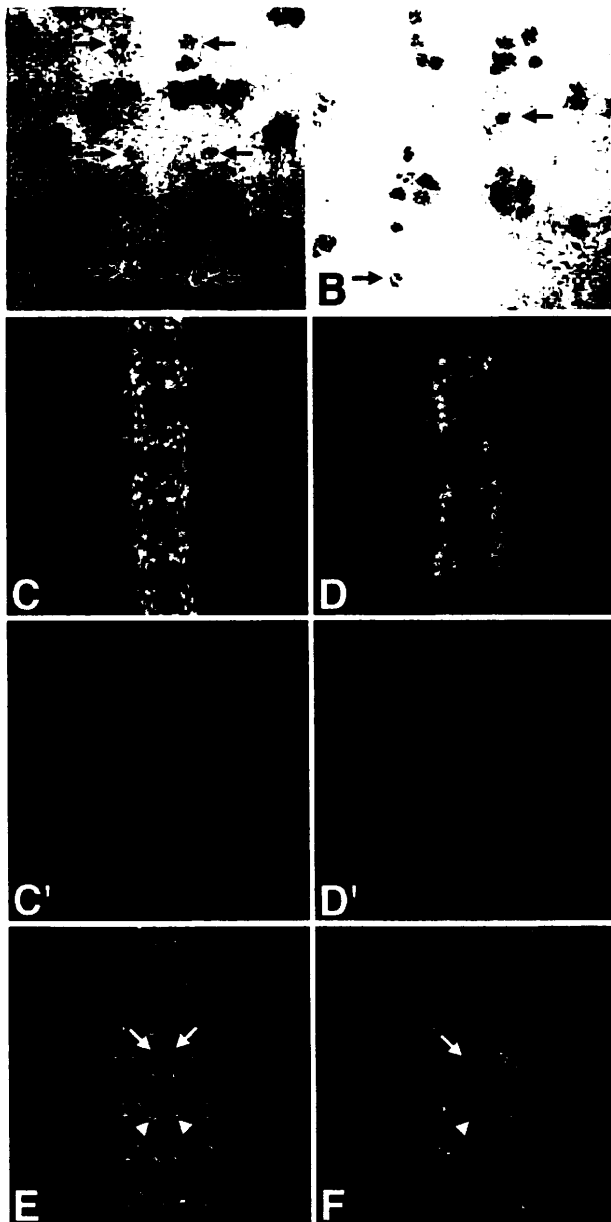


図 14、dAGO1 変異胚における

神経細胞とグリア細胞の減少

中枢神経系の一部の細胞の核を標識する抗体 (抗 Even-skipped 抗体) とグリア細胞の核を標識する抗体 (抗 Repo 抗体) による染色。野生型 (A,C,C',E)、dAGO1 変異胚 (B,D,D',F)。 (A,B) ステージ 14 胚の抗 even-skipped 抗体による染色。矢印で示した RP2 ニューロンと呼ばれる神経細胞が、dAGO1 変異胚では減少している。 (C,D) ステージ 14 胚の抗 Repo 抗体による染色 (赤)。緑色は BP102 による神経繊維の染色。dAGO1 変異胚では野生型に比べて著しいグリア細胞の減少が観察された (D)。 (E,F) ステージ 13 胚の抗 Repo 抗体 (赤) と抗 Engrailed 抗体 (緑) の二重染色。正中線グリア細胞 (矢印) と二重ラベルされる細胞 (矢尻) に注目 (詳細は本文)。各写真の上方が胚前方。

dAGO1 遺伝子の機能解析

では、どのレベルで細胞が減少をしているのだろうか？私は3つの可能性を考えた。

- (1) 最初からニューロblastやグリオblastが少なかった。
- (2) 分裂プログラムに異常が生じて、細胞が十分な数まで増えなかった。
- (3) ニューロblastやグリオblastの最終分裂後に細胞死が生じている。

まず(1)の可能性を検証した。初期胚のニューロblastを標識する抗体として抗 Hunchback 抗体を用い、グリオblastについては抗 Repo 抗体によって標識される一部の細胞 (LGB、Lateral glioblast) に着目した。その結果、dAGO1 変異胚において、ニューロblastとグリオblastの数に異常は観察されず、(1)の可能性は否定された(図 15AB, EH)。次に(3)の可能性の検証として、TUNEL 染色による細胞死の検出を行った。その結果、ステージ15頃の神経系において dAGO1 変異胚では野生型に比べてより多くの細胞死が観察された(図 15CD)。もしステージ15以降で細胞死が増加しているのなら、それは個体の発生が停止したことによる二次的な影響も考えられる。残念ながら、それ以前のステージでは実験の再現性が悪く確証のある結果は得られていない。神経系の表現型は形成初期(ステージ12頃)から観察されることから、少なくとも

もこのステージ15における細胞死は、神経系の異常の原因では無いと考えられる。(2)の可能性の検証として、一部のグリア細胞の系譜を追跡して観察した。抗 Repo 抗体と抗 Prospero (Pros) 抗体の二重染色で、一部のグリア細胞 (longitudinal glia の一部の細胞) の細胞系譜を追跡す

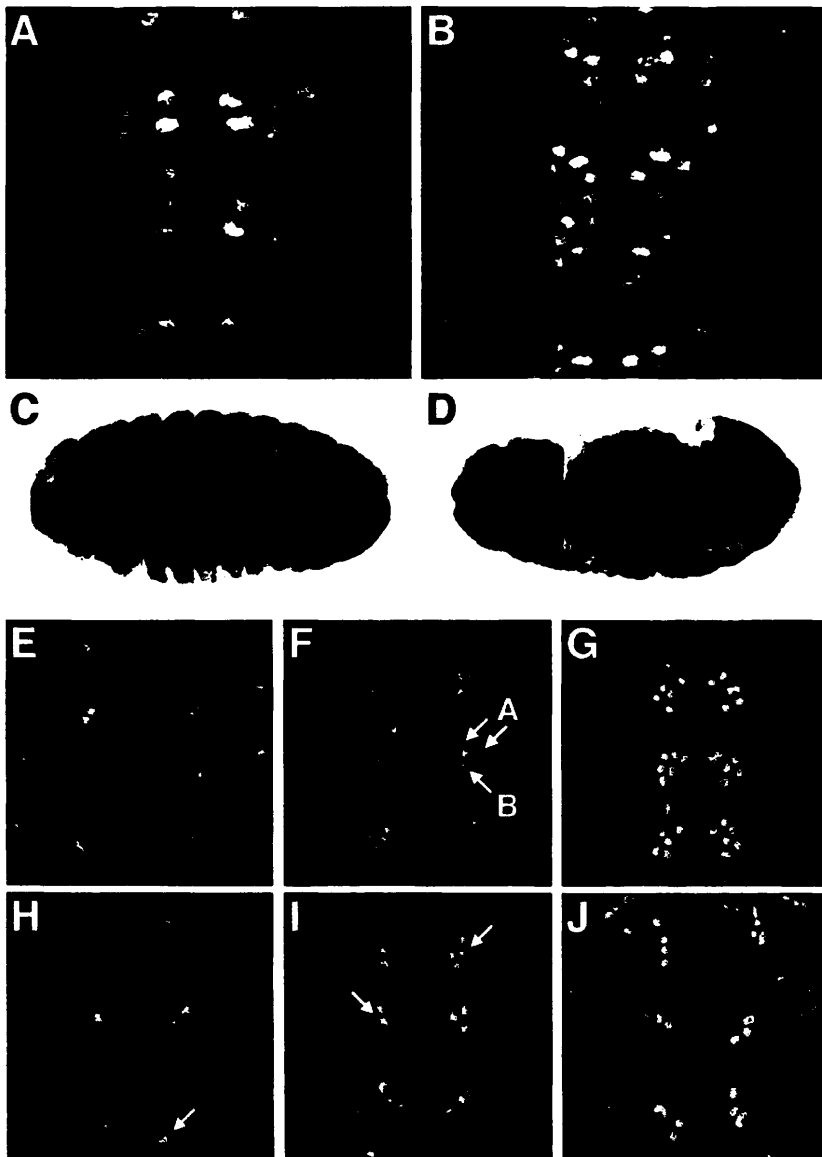


図15、神経母細胞、細胞死の比較とグリア細胞の細胞系譜追跡 (A,B) 抗 Hunchback 抗体によるステージ9胚の神経母細胞の標識。野生型 (A) と dAGO1 変異胚 (B) で、神経母細胞の数に差は見られない。(C,D) ステージ15 胚において生じている細胞死の TUNEL 染色による検出。(C) 野生型、(D) dAGO1 変異胚。dAGO1 変異胚では野生型に比べてラベルされた細胞が著しく増加している。(E-J) 抗 Repo 抗体 (赤) と抗 Prospero 抗体 (緑) の二重染色。longitudinal グリア細胞の一部の系譜の細胞が二重標識される。(E-G) 野生型胚、(H-J) dAGO1 変異胚。ステージ11~12 (E,H)、ステージ12~13 (F,I)、ステージ15 (G,J)。各写真上方が胚前方。詳細は本文。

ることが出来る (図 15E-J; Buescher & Chia, 1997)。まず各半体節に1つの Repo & Pros ポジティブな細胞 (Lateral glioblast) が現れ、この細胞が2回の分裂を経て4つの Repo & Pros ポジティブ細胞になる (仮にこれらの細胞をA細胞と呼ぶ、図 15F)。この細胞の分裂に伴って、さらに2つの Repo & Pros ポジティブ細胞が現れ (B細胞、この2つの細胞の由来は良く分かっていない、図 15F)、最終的に各半体節に6つの Repo & Pros ポジティブな細胞が現れる (図 15G)。dAGO1 変異胚では、最終的に2つから4つの Repo & Pros ポジティブ細胞しか現れない (図 15J)。ステージを遡って見ると、最初の2つのA細胞は確認できる。しかし、1回目の分裂ですでに同調していないA細胞が観察される (図 15H 矢印)。2回目の分裂を終えている時期に観察しても、まだA細胞が2細胞にしかなくなっていない場合がある (図 15I 矢印)。これらの途中観察と最終的な結果からすると、dAGO1 変異胚では、A細胞が4つに増えない場合とB細胞が出現してこない場合の両方があると考えられる。この観察結果から、私は (2) の分裂プログラムの異常説が、神経系の表現型の有力な原因と考えた。もちろん、この結果は細胞死が原因とする説の可能性を否定していないが、グリア細胞の分化の過程でランダムに細胞死が生じているとしたら、それも分裂プログラムの異常と考えて良いのではなかろうか。

以上の観察結果の通り、dAGO1 変異胚の神経系では神経細胞とグリア細胞の双方が減少している事が明らかになった。グリア細胞は、神経回路網形成の際に、神経束の伸長方向や経路を規定するガイドポスト的役割を担っている事が知られる。つまり、正しい位置に正しい数のグリア細胞が存在しなければ、神経束は精密な回路網を形成することが出来ない。よって、dAGO1 変異胚で観察された梯子状神経節の形成異常は、神経細胞の減少も一つの原因であるが、グリア細胞の大幅な減少がより直接の原因ではないかと考える。そして、その神経細胞やグリア細胞の減少の原因は、母細胞の細胞分裂の早期停止ではないかと考えている。この推論については、類似遺伝子の機能解析の結果も踏まえて、総合議論で詳しく述べる。

5-4・dAGO1 過剰発現による表現型

変異体の解析に加えて過剰発現による効果も検討した。ショウジョウバエでは、組織特異的又は時期特異的に解析したい遺伝子を発現させる事が出来る GAL4/UAS 法が確立されている (Brand & Perrimon, 1993)。この方法を用いて dAGO1 を翅や肢で領域特異的に過剰発現させた結果、様々な形態形成の異常が観察された (表 2)。

5-4-1・翅後部細胞の形質の前方化

vg-GAL4 系統により WM 周辺細胞で dAGO1 を過剰発現すると、翅の後方に限って過剰に成長する異常が観察された (図 16A)。翅前部の WM 周辺細胞でも dAGO1 は過剰に発現しているが、この過剰成長は翅後部に限って生じた。この過剰成長した部分を詳しく観察すると、翅前部の WM に特有な感覚毛が生えている事が分かった。また、過剰成長を伴わずに前部特有な感覚毛が生えている場合もあった (図 16B)。ショウジョウバエの翅は、前部と後部の二つの細胞集団 (コンパートメント) に分けられる。前後の細胞は互いに混じり合わない一直線な境界を形成し、その境界は第 4 翅脈 (L4) のすぐ前方に位置する (図 16A)。後部コンパートメントの細胞は、成虫原基の形成過程を通じて発現を続ける Engrailed (En) によって、そのアイデンティティーが決定されると考えられている (Tabata et al., 1995; Guillen et al., 1995; Simmonds et al., 1995)。つまり、En の発現の有無が翅の前部と後部の細胞の性質の隔てていると言える。この dAGO1 の過剰発現による表現型は、後部コンパートメントに属する細胞が、発生運命転換により前部コンパートメントの形質を持ったと考えられた。その予想を確かめる為、抗体染色により En の発現パターンを検討した (図 16C-F)。その結果、翅後部の dAGO1 を強く発現する細胞では、En の発現が低下していることが分かった (図 16EF 矢尻)。en 機能喪失変異のモザイク解析でも、dAGO1 過剰発現の結果と同様な前方化を伴った過剰成長が観察されることが報告されている (Tabata et al., 1995; Zecca et al., 1995)。また、dAGO1 を強く発現していると予想される成虫原基の過剰成長した領域には、成長因子 Decapentaplegic (Dpp) の異所的な発現が観察された (図 16H 矢尻)。Dpp は En にその発現を抑制され、また、成虫原基の成長 (細胞増殖) に関わるモルフォゲンとして働くことが示されている (Tabata et al., 1995; Zecca et al., 1995; Nellen et al., 1996)。よって、dAGO1 の発現の強い細胞で Dpp の発現が観察されるのは、En の発現が低下した為と考えられた。以上の観察から、この表現型が生じたメカニズムとして、En の発現低下による細胞の前方化に引き続き、Dpp の異所的な発現が過剰成長を引き起こした、と考えられた。この En の発現低下が、転写レベルで生じているのか、タンパク質の翻訳や安定性のレベルで引き起こされているのかは確認できていない。

表 2、dAGO1 の過剰発現による様々な異常

GAL4 系統	全長分子	Δ N 分子	Δ C 分子
vg-GAL4	翅後部の異常成長 (図 16)	翅後部WMの部分的欠失	no phenotype
ptc-GAL4	ACV 形成異常 (図 17B)	ACV 形成異常 (図 17C)	ACV 形成異常 (図 17D)
en-GAL4	翅脈形成異常 (図 18A)	翅のサイズの減少 (図 18B)	わずかな翅脈形成異常 (図 18C)
dll-GAL4	肢の節形成異常 (図 18E)	肢の節形成異常 (図 18F)	no phenotype
sca-GAL4	感覚毛の短縮	no phenotype	no phenotype

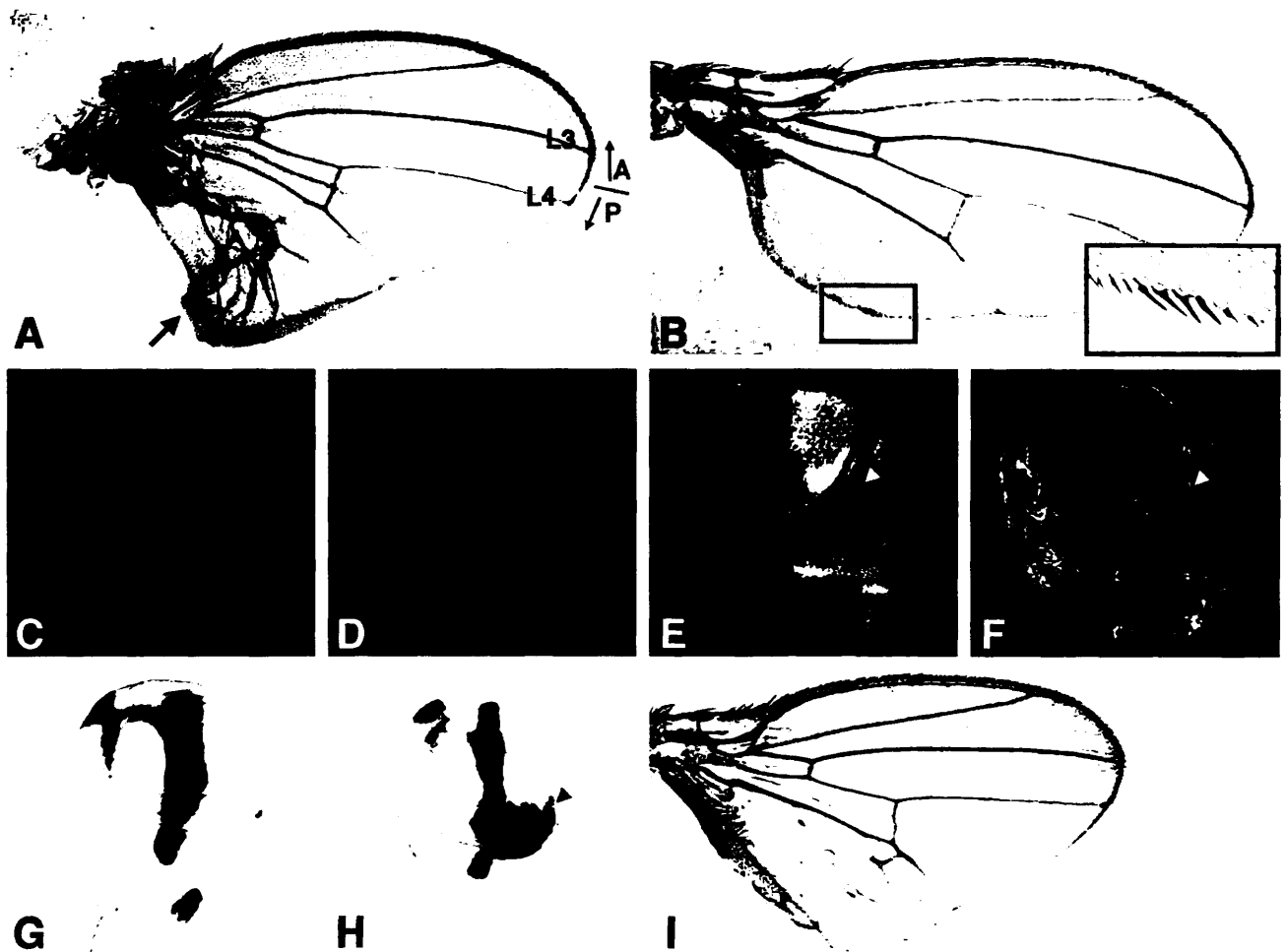


図 16、dAGO1 の過剰発現による翅後部細胞の前方化とそれに伴う翅後部の過剰成長

(A,B) dAGO1 を *vg-GAL4* により翅の縁に沿った細胞で過剰発現させた時に生じた表現型。異常に成長した翅の後部部分には前部特有の感覚毛が観察された (A 矢印)。過剰成長を伴わない場合でも、後部コンパートメント内に前部特有の感覚毛が観察されることがある (B)。(C-F) 三令幼虫期の翅成虫原基の抗体染色。Engrailed (赤)、dAGO1 (緑)。(C) 野生型の翅成虫原基における正常な En 分子の分布。(D) A の様な翅を形成すると予想される成虫原基。dAGO1 の発現の強い細胞で、En の発現量の低下が観察される (E,F 矢尻)。(G,H) *dpp-lacZ* 系統を用いた Dpp の発現パターンの観察。(G) 野生型、(H) A の様な翅を形成すると予想される成虫原基。D,E において En の発現量が低下していると予想される位置に Dpp の異所的な発現が観察された (H 矢尻)。(I) *vg-GAL4* により Mad を過剰発現させた結果生じる表現型。dAGO1 過剰発現の場合と同様に、後部コンパートメントにのみ過剰成長が生じた。また、この過剰成長した領域には、同様に前部特有の感覚毛が観察される。

5-4-2・翅脈のパターン形成の異常

ptc-GAL4 系統や *en-GAL4* 系統を用いて過剰発現した時には、翅脈のパターン形成に異常が観察された。これらの系統は肢や複眼の成虫原基でも GAL4 を発現しているが、異常が観察されたのは翅のみであった。*ptc-GAL4* 系統を用いた場合、第3翅脈と第4翅脈を繋ぐ Anterior Cross Vein (ACV) の形成に顕著な異常が生じた。dAGO1 全長分子を過剰発現すると、ACV の消失や第3-4翅脈間の間隔の減少が観察された (図 17BB')。ΔN 分子の時は第3-4翅脈間が極めて狭くなり、第3-4翅脈が丁度 ACV の位置で融合してしまう (図 17CC')。ΔC 分子では第3-4翅脈の間隔は変わらないが、ACV が消失した (図 17DD')。このように、二つの保存領域のいずれか一方を欠失した改変型分子を過剰発現させた場合、それぞれ異なる表現型が生じることから、二つの保存領域がそれぞれ独立の機能を持つと予想された。また、この ACV 形成の分子メカニズム

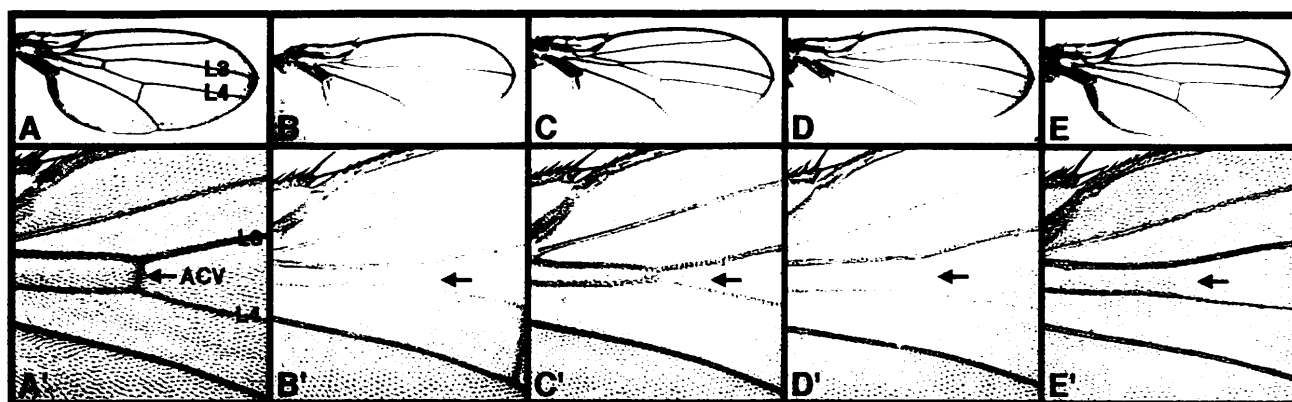


図 17、dAGO1 の過剰発現による翅脈のパターン形成異常

(A,A') 野生型の正常な翅の全体像と ACV (Anterior Cross Vein) 付近の拡大図。(B-D) *ptc*-GAL4 により第3翅脈 (L3) と第4翅脈 (L4) の間で dAGO1 全長分子及び改変分子を過剰発現させた時の表現型。発現させた分子により程度は異なるが、ACV の消失や L3-4 間隔の減少が生じた。(B,B') 全長分子、(C,C') ΔN 分子、(D,D') ΔC 分子。(E,E') *ptc*-GAL4 による *Ptc* 過剰発現。詳細は本文。

はいまだ明らかされていないが、*ptc*-GAL4 系統で Hedgehog (Hh) シグナル伝達系の抑制因子 Patched (*Ptc*) を過剰発現した時に ACV が消失する事から、ACV 形成に Hh シグナル伝達系が関与している可能性が高い (Johnson et al, 1995; 図 17EE')。よって、dAGO1 は ACV 形成過程において、Hh シグナル伝達系に作用している可能性が考えられた。

後部コンパートメントに一樣な強い発現を誘導することが出来る *en*-GAL4 系統を用いた場合、翅のより広範囲に異常が観察された。全長分子と ΔN 分子の双方で、後部コンパートメントのサイズが小さくなり、特に Posterior Cross Vein (PCV) の長さが短くなった (図 18AB 矢印)。一方、 ΔC 分子では、まれに第5翅脈の先端部が消失したが、後部コンパートメントのサイズには異常を示さなかった (図 18C 矢尻)。全長分子と ΔN 分子の場合に観察された後部コンパートメントの縮小の原因は、翅の表面に生える毛の間隔が前部と後部で変わらないことから、細胞が小さくなった為ではなく、細胞数が減少した為と考えられた。さらに、全長分子の場合、 ΔN 分子の場合には見られない翅脈の消失や乱れも生じた。先に述べた ACV の形成不全や消失、第5翅脈が翅の縁まで届かない表現型を示した (図 18A 矢尻)。余談ではあるが、*en*-GAL4 系統の発現領域に含まれるのは ACV の半分程であるにも関わらず、ACV の完全な消失が観察されることから、ACV 形成には後部コンパートメントからの働きかけが重要な事が示唆された。一方、*en*-GAL4 系統を用いた場合、*vg*-GAL4 系統を用いたときに見られた後部細胞の前方化は観察されなかった。この違いは、*en*-GAL4 系統と *vg*-GAL4 系統の発現開始の時期や、発現量の差が影響していると考えられる。

5-4-3・肢の節形成異常

distalless (*dll*)-GAL4 系統を用いた場合には肢に異常が観察された。*dll*-GAL4 系統では翅でも GAL4 が発現しているが、異常が現れたのは肢だけであった。野生型個体の正常な肢と較べると、dAGO1 を過剰発現させた個体の肢には、節の一部が欠失したと考えられる異常が観察された (図 18D-F)。 ΔN 分子の場合、肢先端の爪は不完全ながら形成されていることから、欠失しているのは先端から2番目と3番目の節ではないかと予想される (図 18F)。さらに、全長分子の場合、肢の節構造により激しい異常を引き起こす。特に末端から

2番目の節の異常がひどく、節がうまく形成されず瘤のようになっていた肢も観察された(図18E)。dll-GAL4では先端5節よりさらに肢の付け根側まで GAL4 を発現する領域があるはずだが、実際に異常が生じるのは先端4節付近までに限られる。この領域にのみ dAGO1 が作用するのか、それとも、dll-GAL4 系統はこの領域で特に強く GAL4 を発現しているのかは確認できていない。

5-4-4・過剰発現実験のまとめ

以上、dAGO1 を様々な GAL4 系統を用いて過剰発現させた時に生じる様々な表現型を観察した結果、dAGO1 が翅肢の成虫原基のパターン形成過程に関わっている可能性が強く示唆された。そして、全長分子や二つの保存領域を欠く改変分子による表現型はそれぞれ異なることから、それぞれの保存領域は独立した機能を持つ事が予想された。そこで、抗体染色などによる組織学的な検討や、成虫原基のパターン形成に関わる既知の遺伝子の変異と dAGO1 過剰発現による表現型との間の遺伝的相互作用を検討をしたが、これらの表現型の原因の特定するには至らなかった(データ未掲載)。この為、過剰発現により観察されたいくつかの異常が、一つの形態形成メカニズム(シグナル伝達系)を乱した為に生じたのか、それとも、複数のシグナル伝達系に干渉しているのかを判断することは出来なかった。さらに、dAGO1 変異を用いたモザイク解析を行ったが、変異クローンが大きくなり(変異クローンは周囲の正常細胞に比べて成長が遅いと考えられる)、パターン形成への影響は確認できなかった(データ未掲載)。少なくとも、成虫の翅に出来た小さな変異クローンに異常は観察されなかった。変異クローンが大きくならなかったのは、変異胚の観察結果と過剰発現の結果から考えると、dAGO1 が細胞増殖に関わっている為と考えられる。同様に *arm* 変異クローンも大きく成長しないことが確かめられている(Couso et al., 1994)。現段階では dAGO1 の分子機能は明らかになっておらず、この過剰発現が引き起こす形態形成異常のメカニズムについて、これ以上理解することは出来ない。理解を進める為には、dAGO1 結合分子の同定や分子機能の特定が必須と考えられた。

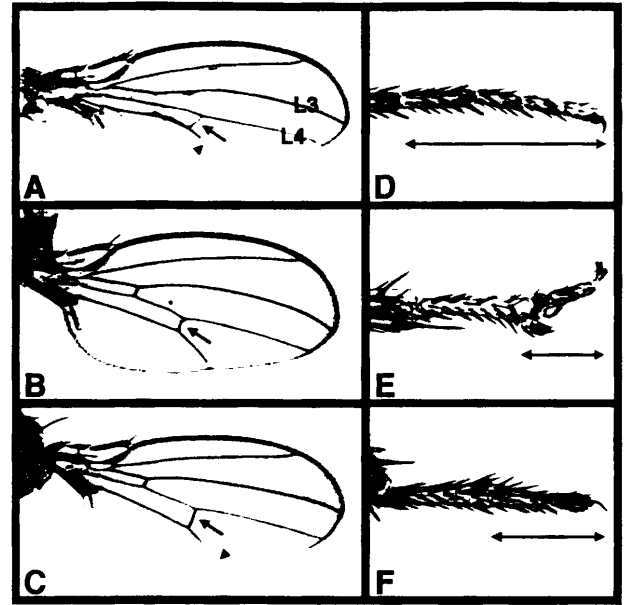


図 18、過剰発現によるその他の異常

(A) en-GAL4 により全長分子を過剰発現させた時に生じる翅脈形成の異常と後部コンパートメントの縮小。(B) ΔN 分子の場合、翅脈形成に異常は生じないが、後部コンパートメントが小さくなる。(C) ΔC 分子の場合、後部コンパートメントのサイズは正常であり、まれに第5翅脈の先端が WM に届かない表現型を示した(矢尻)。

(D-F) dll-GAL4 による過剰発現で生じる肢の表現型。各写真の矢印は、先端4節分の領域を示す。(D) 野生型の正常な肢。(E) 全長分子を過剰発現させた時に生じる肢の異常。野生型に比べ、先端の4節が顕著に短くなり、瘤のような節形成異常も生じている。(F) ΔN 分子の場合も、先端の4節が顕著に短くなる。爪は形成されることから、先端から2番目と3番目の節が欠失しているのではないかと考えられる。

5-5・dAGO1 分子の生化学的扱い

5-5-1・dAGO1 分子の性質

dAGO1 の共過剰発現により VgDE 表現型が回復する分子メカニズムの一つとして、dAGO1 と DE-cad または Arm が直接結合している可能性を考えた。その検証の為、抗 dAGO1 抗体による免疫沈降を行い、DE-cad または Arm が dAGO1 と共沈するか調べる実験を考えた。しかし、DE-cad を可溶化する為の免疫沈降用抽出バッファーにより dAGO1 は不溶化してしまうことが分かった (図 19)。逆に、界面活性剤の入っていない PBS で抽出すると dAGO1 は可溶分画に存在するが (図 19)、この時 DE-cad は不溶化してしまう。この結果から、dAGO1 は PBS 中で界面活性剤感受性な状態、おそらくは膜小胞に付随して可溶化していると予想された。他グループの結果からも、dAGO1 類似分子の GERp95 は細胞内小胞表面に付随したプロテアーゼ耐性を持つ複合体を形成していることを示している (Cikaluk et al., 1999)。抽出バッファーに PBS を用いた場合も抗 dAGO1 抗体による免疫沈降抗はうまくいかなかった。そこで逆に、抗 DE-cad 抗体や抗 Arm 抗体による免疫沈降を行い、その免疫沈降物中に dAGO1 が存在するか調べたが、検出することは出来なかった (データ未掲載)。免疫沈降用の抽出バッファーに対する挙動の違いや、抗 DE-cad 抗体と抗 Arm 抗体による免疫沈降実験の結果から、dAGO1 と DE-cad または Arm が直接結合している可能性は低いと考えられた。

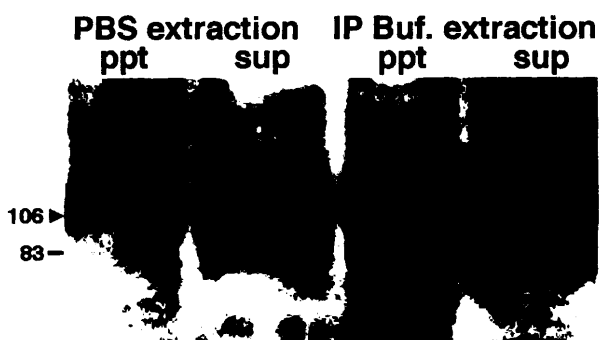


図 19、蛋白抽出液の違いによる dAGO1 分子の挙動の違い

成虫からの蛋白質抽出に、界面活性剤を含まない抽出液 (PBS) と含む抽出液 (IP buffer; TBS with 1% NP40 and 1% TritonX-100) を用いた時の、dAGO1 分子の挙動の違いをウェスタン・プロットにより検出した。ppt (沈殿)、sup (上清)。PBS により細胞膜を破壊しない条件で抽出すると、dAGO1 分子は可溶分画に主に存在するが、界面活性剤により膜構造を破壊して抽出すると dAGO1 分子は可溶化せず、不溶分画に存在する (矢尻が dAGO1 分子のシグナル)。

5-5-2・dAGO1 分子の RNA 結合能の検証

dAGO1 遺伝子のウサギホモログは eIF2C として報告されたことや、*rde-1* 遺伝子が二重鎖 RNA 干渉 (RNAi) に深く関わっているとの報告から、このファミリーに属する分子は常に RNA の周辺で機能している可能性が考えられた。そこで、RNA との結合を直接検証する事を目的として、まず dAGO1 組換え蛋白質の精製を試みたが、大腸菌で発現させた組換え蛋白質は不溶化してしまい精製することは出来なかった。そこで別の方法として、野生型またはトランスジーンを持った成虫の抽出液を用いた実験法を考えた。成虫の抽出液と Poly(U) や Poly(A) を共有結合した RNA 結合ビーズを混合し、ビーズを洗浄後、dAGO1 のビーズへの結合をウェスタンプロットにより検出した。この実験の結果、成虫抽出液中の dAGO1 は Poly(U) 又は Poly(A) Sepharose 4B ビーズと結合し、RNA 分子を結合していない Sepharose 4B ビーズには結合しなかった (図 20A)。また、Poly(U) ビーズと Poly(A) ビーズを較べると、dAGO1 は Poly(U) ビーズにより親和性が高いと考えられた (図 20A)。コントロールとして確認した GFP や $D\alpha$ -catenin はビーズへの結合は認められず、RNA ビーズへの蛋白質の結合は非特異的な現象では無いことが確認された (図 20A)。さらに、結合に必

要な領域を調べる事を目的として、dAGO1 改変分子を発現誘導可能なトランスジェニックフライを用いて同様の実験を行った。その結果、 ΔN と ΔC 分子の両方とも RNA ビーズに結合した(図 20B)。以上の結果から、dAGO1 は RNA に結合出来ることが示唆され、その結合には二つの保存領域以外の領域が関わっていると予想された。しかし、dAGO1 が非特異的に RNA ビーズに結合している可能性も否定できない。dAGO1 は塩基性に富んだ蛋白質であり、全長分子で pI (等電点) = 9.35、 ΔN 分子 pI = 8.86、 ΔC 分子 pI = 9.88。塩基性に富んだ分子は酸性度の高い RNA 分子に非特異的に結合する可能性が考えられるが、dAGO1 の酸性度が RNA に非特異的に結合してしまう程のレベルかどうかは定かではない。また、AGO1 ファミリーに属する分子は一様に塩基性に富んでおり、何らかの保存された分子機能を反映していると考えられる。AGO1 pI = 9.54、ZWILLE pI = 9.54、GERp95 pI = 9.54、PIWI pI = 9.54、AUBERGINE pI = 9.54、RDE-1 pI = 9.54 (以上の等電点の予測は DNASIS により行った)。

我々の実験で確認された RNA ビーズへの結合が、直接であるか否か、また、細胞内で実際に mRNA やその他の RNA 分子と結合しているかどうか、の結論を下すにはさらなる解析が必要である。その方法としては、より詳細なドメイン解析や結合分子を同定する試みが考えられる。

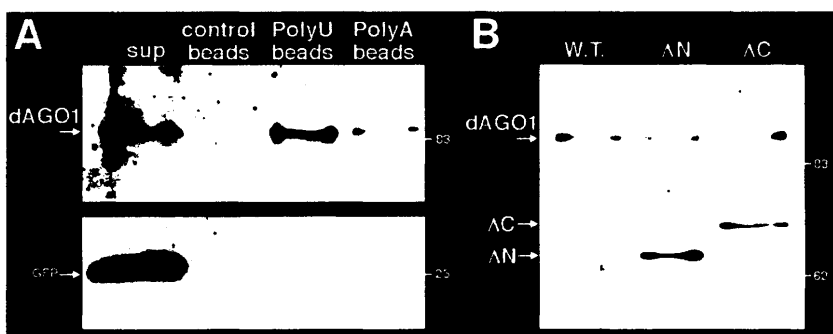


図 20、dAGO1 分子の RNA 結合能の検証

RNA 結合ビーズによる dAGO1 分子の RNA 結合能の検証。(A) 成虫の抽出液中の dAGO1 分子は RNA 結合ビーズ (Poly(U) beads, Poly(A) beads) に結合するが、RNA を結合していない control beads には結合しない (A 矢印 dAGO1)。また、GFP 分子はいずれのビーズにも結合しない (A 矢印 GFP)。レーン "sup" には抽出液を成虫 0.5 匹分、各ビーズのレーンには成虫 4 匹分に相当するサンプルを泳動した。

(B) ΔN 分子と ΔC 分子の RNA 結合能の検証。各分子を発現するトランスジェニックフライの抽出液と RNA 結合ビーズ (Poly(U) beads) を混合し、各分子の結合能を調べた。レーン "W.T." が野生型、レーン " ΔN " が ΔN 分子を発現するトランスジェニックフライ、レーン " ΔC " が ΔC 分子を発現するトランスジェニックフライ。どちらの改変分子も RNA 結合ビーズと結合した (B 矢印 ΔN と矢印 ΔC)。

6・総合議論

6-1・dAGO1 と Wg シグナル伝達系の関係について

我々は、Wg シグナル伝達系に関わる遺伝子の探索の結果、dAGO1 遺伝子を同定した。しかし、dAGO1 変異胚の観察の結果から、dAGO1 は、少なくとも胚の体節極性の決定メカニズムにおいて、Wg シグナル伝達系の主要な因子では無いことが示唆された。また、結果には示さなかったが、Wnt シグナル伝達系に関する研究で多く使われてきたアフリカツメガエル胚での過剰発現実験も試みた。Wnt シグナル伝達系の因子の mRNA をアフリカツメガエル卵の腹部にインジェクションすると、背腹軸決定に異常が生じて頭部の重複などが生じる (Heasman et al., 1994)。この系を用いて、より感度が高い実験が出来ると考えたが、dAGO1 mRNA をインジェクションした場合、野生型に較べて若干目が小さくなる異常を示す程度で、体軸形成には異常を示さなかった (橋本主税博士との共同研究)。唯一、dAGO1 と Wg シグナル伝達系の関係に肯定的な結果を示した実験は、翅の縁形成過程に注目した共過剰発現実験であった。この実験では、dAGO1 が DE-cad 過剰発現による翅の表現型を回復出来たことから、Arm 同様に Wg シグナル伝達に正に働く因子と期待された。そこで、我々は、dAGO1 が DE-cad 過剰発現による表現型を押さえるメカニズムとして、三つのモデルを考えた。

一つ目のモデルは、過剰な dAGO1 が Arm と DE-cad の結合を阻害するモデル (図 21a)。生化学的な実験の結果は、dAGO1 は Arm と DE-cad に直接結合しない事を示唆しているが、間接的な方法で過剰な dAGO1 が非特異的に二分子の結合を阻害している可能性は考えられる。この場合、過剰な dAGO1 が Wg シグナル伝達系とは無関係に働いている可能性もありえる。

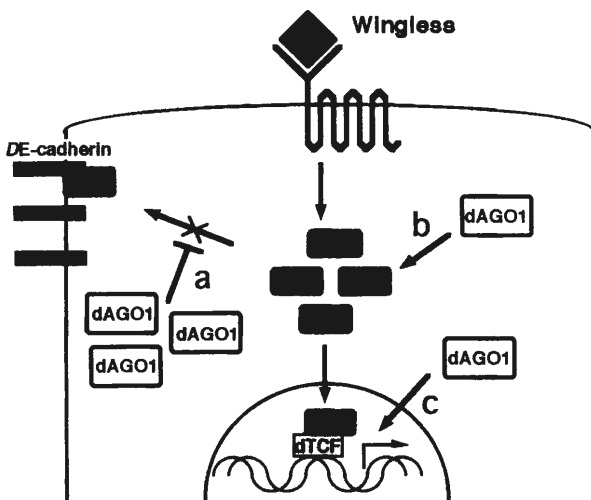


図 21、モデル・dAGO1 の作用点

DE-cad 過剰発現による Wg シグナル伝達系の阻害における dAGO1 の作用点モデル。(モデルa) 過剰な dAGO1 は、Arm の DE-cad への結合を阻害する。(モデルb) 細胞質の Arm を増加させる働きをする。この場合、dAGO1 の働きとして、Arm の翻訳の増進か、Arm の分解の抑制が考えられる。(モデルc) Arm や DE-cad とは無関係に Wg シグナル伝達系の転写標的遺伝子の転写を昂進する。

二つ目は、dAGO1 が細胞質内の Arm を増加させる働きがあるとするモデル (図 21b)。この場合、dAGO1 の働きとして、Arm の翻訳増進や分解抑制、あるいは DE-cad の発現抑制などが考えられる。特に、AGO1 ファミリーには翻訳系との関わりが示唆される遺伝子があることから、Wg シグナル伝達系の構成因子の翻訳調節に影響を与えている可能性が考えられた。しかし、dAGO1 を過剰発現させた細胞では、Arm の発現量の増加や DE-cad の発現量の低下は観察されず、dAGO1 の作用はこれらの分子の発現量とは無関係と考えられた (データ未掲載)。

三つ目は、Arm や DE-cad とは無関係に、dAGO1 が Wg シグナル伝達系の標的遺伝子の発現を昂進するモデル (図 21c)。つまり、dAGO1 は Arm をスキップして Wg シグナルを伝えることが出来るとするモデルである。このモデルについても、実験結果は否定的な結果を示した。Wg シグナル伝達系の転写標的遺伝子であ

る Vestigial (Vg)分子に対する抗体染色の結果、その発現パターンは dAGO1 の過剰発現には左右されなかった (データ未掲載)。他の標的分子を誘導している可能性もあるが、少なくとも過剰な dAGO1 が Vg を発現誘導できないことは確かである。

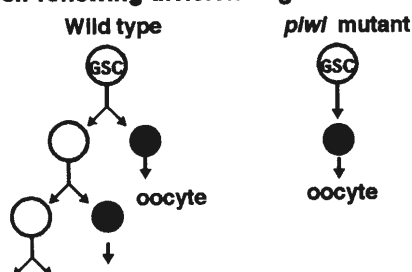
以上の三つのモデルはどれも決定的な証拠はなく、現段階ではどのモデルが正しいかを定めることは出来ない。現在までに行った様々な過剰発現系での解析の結果から、dAGO1 が翅の形態形成過程に関わっていることを示唆する結果は得られたが、Wg シグナル伝達系との関わりについての答えを導き出すことは出来なかった。そこで、研究をさらに進める為には、より多面的な解析が必要と感じている。具体的には、やはり分子機能の特定が先決と考える。分子機能が明らかになれば、過剰発現による相互作用や表現型の意味も自ずから明らかになると期待される。

6-2・AGO1 ファミリーの働き

ショウジョウバエと植物では体作りのメカニズムは全く異なり、進化的に見ても非常に離れた生物であるにも関わらず、体作りの元になる細胞 (植物では成長点、動物では生殖細胞) の自己再生分裂という現象に、同じファミリーに含まれる遺伝子が関わっていることは非常に興味深い (図22AB)。これは幹細胞の自己再生分裂という現象が、生物種を問わず共通に保存されたメカニズムであることを示唆している。この幹細胞の自己再生分裂の視点から dAGO1 変異体の神経系の表現型も説明することができる。ニューロブラストは非対称分裂により、新しいニューロブラストと神経やグリア細胞に分化する細胞をつくる。グリオブラストは何回か分裂して複数のグリア細胞を生む。dAGO1 変異体においては、ニューロブラストやグリオブラストの未分化

な状態が保たれず、分化が先行してしまったため成熟した細胞の数が減少した、と考えると表現型をうまく説明出来る (図22C)。これが事実ならば、AGO1 ファミリーが、生殖系列の幹細胞の維持だけでなく、一般的な体細胞の幹細胞 (母細胞) の維持にも関わっていることが期待される。線虫の *T07D3.7* 遺伝子を RNAi により機能喪失した個体に生じる個体サイズの縮小や (Cikaluk et al., 1999)、dAGO1 変異胚の個体サイズの縮小も同様

A: Self-renewing division of germ-line stem cells



B: Self-perpetuating of shoot meristem



C: Does dAGO1 also act on the self-renewing division of neuroblasts or glioblasts?

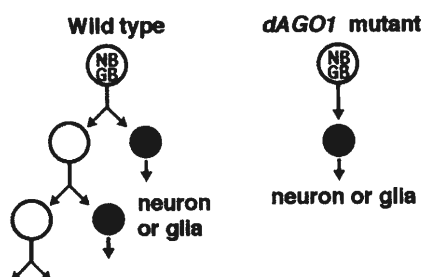


図 22、モデル・幹細胞再生分裂と dAGO1 変異胚の神経系の表現型

(A) *piwi* 変異体が示す表現型の模式図。 *piwi* 変異体においては生殖母細胞 (Germline stem cell, GSC) が自己再生分裂 (Self-renewal division) を出来ずに、そのまま分化してしまう。(B) *ZWILLE* 変異体が示す表現型の模式図。野生型では成長点 (shoot meristem, sm) は未分化な状態に保たれ増殖を続けるが、*ZWILLE* 変異体では未分化な状態を保てず、post-mitotic な細胞に分化してしまう。(C) *dAGO1* 変異胚における神経やグリア細胞の減少を説明するモデル。 *piwi* 変異体や *ZWILLE* 変異体と同様に、未分化な細胞である神経母細胞 (neuroblast, NB) やグリア母細胞 (glioblast, GB) が、十分に増殖する前に分化していると考えられる。

に説明することが出来る。もちろん、AGO1ファミリーに属する全ての分子が幹細胞再生に関わっている訳ではないだろう。線虫の *rde-1* 遺伝子は RNAi 現象の主要因子であり、RNA 分解メカニズムに関わっていると予想されるが、*rde-1* 変異体は正常に発生して生殖細胞の分裂や形態に異常は観察されない (Tabara et al., 1999)。

同じファミリーに属する分子が同じ生物学的現象に関わっているとすると、そこには同じ分子メカニズムが存在すると考えられる。AGO1ファミリーの場合、その分子メカニズムとして何らかの RNA の制御が予想される。先に述べたように、いくつかのホモログの研究から、AGO1ファミリーに属する分子は RNA の周辺で機能していることが示唆されている。例えば、ショウジョウバエの *sting* 変異体 (後に *aubergine* と同一遺伝子であることが判明) では、雄の生殖細胞で発現する *stellate* 遺伝子の mRNA スプライシングに異常が見つかり (Schmidt et al., 1999)、*rde-1* 遺伝子は RNA interference との関わりで注目されている (Tabara et al., 1999)。また、まだ予備的な結果ではあるが、我々の実験結果は dAGO1 が RNA に結合できること示唆した。これらの状況証拠から、未だ推論の域は出ないが、AGO1ファミリーが RNA 分子に何らかの作用を及ぼしていると予想される。

では、幹細胞再生という生理現象に、どのような形で RNA 分子の制御という分子機能が関わっているのだろうか。私は、翻訳レベルでの分化因子の発現抑制がその意味ではないかと予想する。そのモデルは以下の通りである。

「幹細胞の中には常に分化に必要な分子 (分化因子) の mRNA は発現しているが、RNAi や PTGS と同じ分子メカニズムにより分解されることで、蛋白質への翻訳は押さえられている。この分化因子の翻訳抑制の結果、幹細胞 (母細胞) は未分化な状態に保たれている。非対称分裂などにより分化が決定されると、翻訳抑制は解除され、分化因子は速やかに発現して細胞分化プログラムをスタートする。」

この幹細胞 (母細胞) における分化因子翻訳抑制モデルは、細胞の速やかな分化を保証するシステムと考える事ができる。そして、AGO1ファミリーはそのシステムに関わっている事が期待される。しかし、全ての mRNA の翻訳を押さえるのではなく、分化に必要な因子の mRNA だけをどのように認識しているか、という特異性の問題が考えられる。複数の mRNA を特異的に認識出来ると考えるのは余り現実的ではない。もしかしたら、分化をスタートさせる鍵となる分子は、どの幹細胞にも共通なたった一つの、あるいはごく少数の分子であり、その翻訳が押さえられているのかもしれない。そして、その分子の mRNAこそが AGO1ファミリーの標的かもしれない。

補・Yeast Two-Hybrid 法を用いた dAGO1 結合分子の探索

補-1・Yeast Two-Hybrid スクリーニングにむけて

変異体や過剰発現による表現型の観察からは、dAGO1 の分子機能に結びつく有力な手がかりは得られなかった。そこで、より直接に dAGO1 の分子機能を明らかにすることを目的として、Yeast Two-hybrid 法による dAGO1 結合分子の探索を行った。N領域が DE-cad 過剰発現による表現型の回復に必要なことが示唆されていることから、まずは N 領域に結合する分子の探索に重点をおいた。ショウジョウバエに存在する他の 4 つの dAGO1 類似分子にこの N 領域は保存されておらず、dAGO1 特異的な分子機能を解明する為にも、この N 領域を用いることに意味があると考えた。さらに、AGO1 ファミリー共通の機能を解明することを目的として、C 領域に結合する分子の探索も行った。

補-2・スクリーニングの方法

Yeast Two-hybrid 法に用いるベクターや菌体には、CLONTECH 社の MATCHMAKER Two-Hybrid System 3 kit を用いた。このシステムの利点は、AH109 菌体を用いることで、4 つのポジティブ選択マーカーを使えることである。スクリーニングに用いる Bait には、PCR 法により増幅した N 領域と C 領域をそれぞれ含むような複数の cDNA 断片を pGBKT7 ベクターに挿入して作製した(図23)。このベクターは ADH1 プロモーターにより、GAL4 DNA 結合部位と挿入した cDNA 断片から翻訳されるペプチド鎖の融合蛋白質を高レベルで発現する。その発現は融合蛋白質中の Myc 標識により検出が可能である。スクリーニングには、強い発現が確認された N 領域を完全に含む #2 ベクターと C 領域の一部と AGO1 box を含む #6 ベクターを使用した。また、スクリーニングに使用するライブラリーには、CLONTECH 社のショウジョウバエ胚由来ライブラリー (CAT. #: IL4003AH) を使用した。

補-3・候補クローンの選抜

それぞれの Bait ベクターにつき 100 万独立クローン以上をスクリーニングし、その結果、いくつかの候補を選抜した。この選抜では、ネガティブスクリーニングも行った。ポジティブスクリーニングだけでは、栄養要求性マーカーがあるにも関わらず、制限培地下でも疑陽性クローンが非常に多く生えてくる。これは Bait

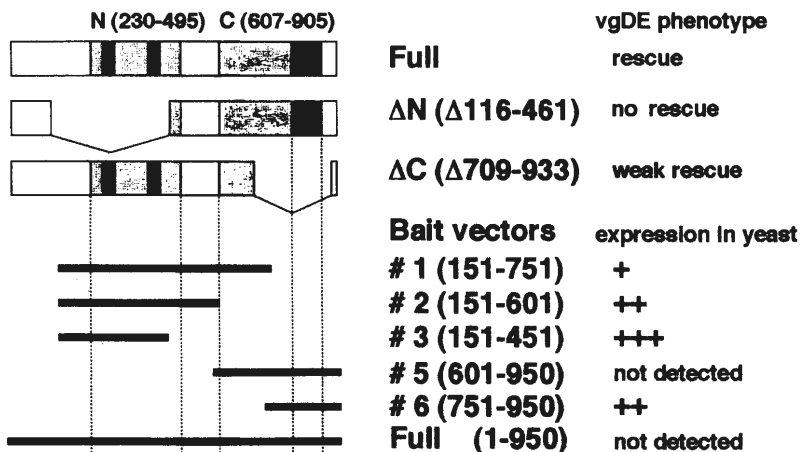


図 23、Yeast Two-hybrid スクリーニングに用いたコンストラクトの模式図

Yeast Two-hybrid スクリーニングに用いたコンストラクトの模式図。作製した Bait ベクターと ΔN 分子、ΔC 分子との比較。各ベクターの酵母での発現の確認は、発現する融合蛋白質中の Myc 抗原に対する抗体によるウエスタンブロットにより確認した。

への結合とは無関係にマーカー遺伝子の発現を誘導してしまうためと考えられる。そこで、ポジティブスクリーニングで得られた候補ベクターから、偽 Bait ベクターと共発現させた場合も生えてくるベクターを除き、残ったクローンを候補として選抜した (表3)。それらの候補クローンは、まず塩基配列の決定により融合蛋白質と cDNA の翻訳フレームが適合しているか調べた。いくつかの候補クローンはフレームがずれており、候補から外れた (表3)。次に、ライブラリー用のベクターから Bait 用ベクターに挿入 cDNA を移し替え、Bait とベクターを入れ替えた場合も検討した。もし、真に Bait に結合する分子なら、ベクターを入換えても結果はポジティブのはずである。その結果、ライブラリーベクターの制限酵素部位の破損などで候補クローンの一部についてしか確認できなかったが、一つのクローン (#6, 3-1-43) だけがポジティブな結果を示した (表3)。

補-4・候補遺伝子の Df 系統と dAGO1 過剰発現系統の相互作用の検討

ベクターの入換え等の酵母における検証に平行して、変異体 (Df 系統) を用いた遺伝的相互作用による検証も行った。それぞれの候補ベクターに含まれる遺伝子の Df 系統 (変異体がある場合はそれも) と、dAGO1 過剰発現系統、Sca-dAGO1 や Vg-dAGO1 との遺伝的相互作用を検討した。その結果、候補の Df 系統のほとんどは、その Df ヘテロバックグラウンドにおいて、dAGO1 過剰発現による表現型に変化を起さなかった (表3)。唯一、#6,1-2-10 クローンの遺伝子 RpS3 (リボソーム構成因子) の優性変異 M(3)95A のみが表現型を昂進したが、このクローンはフレームがずれており、非特異的な相互作用と考えられた (表3)。

現在の所、Nurf-38 や eIF-2B gamma subunit (CG8190) を有力候補と考えるが、候補クローンについて、これ以上の解析は進んでいない。

表3・Two-hybrid スクリーニングにより得られた候補遺伝子

#2 bait screen result

clone No.	フレーム	遺伝子	ホモロジー	ベクター入換え	遺伝的相互作用
#1, 4, 53	○	<i>elbow B</i>	zing finger, transcription factor	n.d.	n.d.
#8	○	<i>CG9083</i>	no homology	n.d.	-
#28	○	<i>Hrb27C</i>	RNA binding protein	n.d.	n.d.
#14, 16, 18	○	<i>CG18294</i>	cuticle protein ?	n.d.	n.d.

#6 bait screen result

1-2-10	X(+2)	<i>RpS3</i>	Ribosomal protein S3	X	enhance
3-1-43	○	<i>Nurf-38</i>	Nucleosome remodeling factor	○	-
3-1-45	X(+2)	<i>RpS3</i>	iso-clone of 1-2-10	X	enhance
3-2-4	X(+2)	<i>trithorax</i>	Zinc-fingerr, transcription factor	n.d.	n.d.
3-2-27	?	<i>CG8863</i>	DNAJ homolog	n.d.	-
3-2-31	○	<i>CG8190</i>	eIF-2B gamma subunit	n.d.	n.d.
3-2-33	?		no predicted gene, in 4th	X	n.d.
3-3-16	X(+2)	<i>Bigbrain</i>	transmembrane channel like	n.d.	n.d.
3-3-30	○	<i>CG9165</i>	porphobilinogen deaminase like	n.d.	-
3-3-37	X(+3)	<i>CG6478</i>	no homology	n.d.	n.d.
3-3-38	○	<i>CG9471</i>	Flavin reductase like	X	-

n.d. = no data

補-5・考察

Yeast Two-hybrid 法は難しいというのが正直な感想である。転写を介したマーカー遺伝子の発現を指標にしているかぎり、大量の疑陽性クローンは避けて通れない。そこで、疑陽性クローンを効率的に除く方法に途中から切り替えたが、私が行った100万独立クローンのスクリーニングでは規模が小さかったと考える。ライブラリーに含まれる独立クローンは300万と予想されるので、少なくとも各 Bait につき、300万独立クローンのスクリーニングが必要であった。また、このライブラリーにも問題があった。このライブラリーは Oligo (dT) プライマーにより cDNA から逆転写されて作製されている。その結果、ライブラリーに含まれる cDNA は 3' 側の平均 700bp 程であった。CLONTECH 社はそのデータシートで、平均 1.3kbp の cDNA クローンを含むと明記しているが、平均長は明らかにもっと短かった。この為、もし比較的長い蛋白質のアミノ末端側に dAGO1 結合部位があったとしても、このスクリーニングでは決して獲ることが出来ない。より完全なスクリーニングを行うためには、ランダムプライム法によりライブラリーを自作する必要があると考えられた。

得られた候補については、私が行った検証のレベルではほとんどがネガティブであった。もちろん、過剰発現系統との相互作用による検証の感度が低かった可能性もある。それぞれの候補遺伝子の変異体と dAGO1 変異体の二重変異体を作製する方法もあるが、dAGO1 遺伝子が接合子変異ホモだけでは表現型を示さないことや、交配の複雑さから多数の候補に対して行うのは困難と予想される。スクリーニングの規模を大きくすることも重要だが、得られたクローンを効率的に確認できる系の必要性を強く感じる。

材料と方法

材料と方法-1・ショウジョウバエの系統

ショウジョウバエ (*Drosophila melanogaster*) は、25℃または17℃で飼育した。Oregon-Rを野生型 (Wild Type, WT) として成虫の翅や抗体染色の比較の対象とした。スクリーニングの親株として用いた ScaDE#4 と VgDE#8 は、それぞれ sca-GAL4 と vg-GAL4 を UAS-DE-cad と同じ染色体上に組み替え、CyO でバランスする事により作製した。スクリーニングに使用した Df 系統のコレクション (第2染色体93系統と第3染色体82系統のあわせて計175系統) は国立遺伝学研究所から取り寄せた。P因子挿入変異系統は Bloomington Drosophila Stock Center より取り寄せた。dAGO1 変異として P 因子挿入変異 *l(2)k08121* を用いた。dAGO1 変異を相補しない染色体欠失系統 (Deficiency) として、*Df(2R)CX1* と *Df(2R)50C-45*、*Df(2R)50C-102* (Bloomington Drosophila Stock Center) を用いた。過剰発現に用いた系統は以下の通り。vg-GAL4-1407 (Morimura et al., 1996)、sca-GAL4 (Klaes et al., 1994)、ptc-GAL4 (Hinz et al., 1994)、HS-GAL4 (N421、基生研)、UAS-Ptc B1 (Johnson et al., 1995)、UAS-Dad (Tsuneizumi et al., 1997)、その他 UAS-Arm、UAS-Mad、en-GAL4、dll-GAL4 等を使用した。

材料と方法-2・塩基配列の決定

塩基配列の決定には model 4000L シークエンサー (LI-COR 社) を使用した。赤外蛍光ラベルしたプライマーを用いた PCR 反応には、SequiTherm Long-Read Cycle Sequencing Kit-Lc (EPICENTRE TECHNOLOGIES 社) と DNA THERMAL CYCLER 480 (PERKIN ELMER 社) を用いた。P 因子挿入点付近のゲノム DNA (4.8 kb) を制限酵素によりいくつかの断片に切断し、pBS SK(-) にサブクローニングした。そのクローンを鋳型として、T3 または T7 プライマーを用いて PCR 反応を行い、塩基配列を決定した。dAGO1 遺伝子の全長 cDNA を含むと予想されたクローン pBS LD09501 は制限酵素によりいくつかの断片に切断し、pBS SK(-) にサブクローニングした。そのクローンを鋳型として、T3 または T7 プライマーを用いて PCR 反応を行い、全長塩基配列を決定した。シークエンスの結果は、ゲノムプロジェクトにより公開された全ゲノム塩基配列を部分的に参照して確認をした。

材料と方法-3・ホモロジー検索、コンピューター解析

塩基配列とアミノ酸配列のデータベースのホモロジー検索はインターネット上で行った。塩基配列の場合は検索プログラムに blastn を用いて、BDGP の EST データベースまたは GenBank のデータベースを検索した。アミノ酸配列の場合は FASTA や blastp、tblastn を用いて、SwissProt や nr-aa などのデータベースを検索した。ホモロジープロットには DNASIS (HITACHI 社) に含まれるプログラムを使用した。系統樹は、CLUSTALW (Thompson et al., 1994) により計算し、TreeView (Page, 1996) を用いて描画した。

材料と方法

材料と方法-4・サザンブロット解析

各系統の成虫 5 匹分のゲノム DNA を各制限酵素で一晩切断した。0.7%アガロースゲルで泳動、酸処理 (10分間)、アルカリ処理 (1時間)、中和 (1時間) を行った後、ナイロン膜 (Hybond-N⁺, Amersham 社) にブロッティングし、UV 架橋により DNA を膜に共有結合させた。プローブには Dig 標識した DNA 又は RNA プローブを用いた。RNA プローブは、pBS SK(-) にサブクローニングしたゲノム DNA 断片または cDNA 断片を鋳型として、T3 または T7 RNA polymerase により作製した。ハイブリダイゼーションは 50%ホルムアミド、5X SSC、42℃で12時間以上行った。0.5X SSC, 0.1%SDS (65℃) で1時間洗浄後、アルカリフォスファターゼを結合した抗 Dig 抗体で1時間標識した。シグナルの検出にはアルカリフォスファターゼの発色基質である NBT+X-phosphate (Boehringer Mannheim 社) または発光基質である BCIP (Boehringer Mannheim 社) を用いた。

材料と方法-5・mRNA *in situ* hybridizaion 染色

mRNA *in situ* hybridizaion 染色の方法は、胚の場合は *Drosophila melanogaster*: Practical Uses in Cell and Molecular Biology, p.575 (Lehmann & Tautz, 1994) 記載の方法に従い、成虫原基の場合は立井博士の方法 (私信) に従った。プローブは pBS SK(-) にサブクローニングした各ゲノム DNA 断片または LD09501 BanIII 断片サブクローンを鋳型として、T3 および T7 RNA polymerase (Boehringer Mannheim 社) を用いて作製した。胚及び成虫原基の固定は4%パラホルムアルデヒド、PBS pH7.2で行った。プロテアーゼK処理は、胚の場合は10 μg/ml で3分間、成虫原基の場合は1~5 μg/ml で3分間行った。ハイブリダイゼーションは50℃で8時間以上行った。シグナルの検出にはアルカリフォスファターゼを結合させた抗 Dig 抗体 (Boehringer Mannheim 社) を用いた。染色した胚及び成虫原基は、脱水して Entellan Neu (Merck 社) でマウントするか、70% グリセロールでマウントした。

材料と方法-6・抗体の作製

保存領域内でも特に高く保存された領域 (833~852) と C 末 (931~950) の20アミノ酸のペプチドを合成し、各2羽のウサギに免疫した。3回の免疫後全血を採取し、血清を得た。#5, 6が保存領域のペプチドに対する血清、#7, 8がC末のペプチドに対する血清。#7については ProteinA 精製及び、ペプチド精製を行った。以上の作業は全て宝酒造に依頼した。ウェスタンブロットには#7proteinA 精製を1000倍で使用した。組織染色には#7および#8の血清を1000倍で使用した。

材料と方法-7・過剰発現に用いた dAGO1 改変分子の作製

・pUAST dAGO-full・・・pBS LD09501 を NotI と XhoI で切断し、その断片を pUAST ベクターの NotI 部位と XhoI 部位の間に挿入した (pUAST dAGO-full)。

・pUAST dAGO-ΔN・・・pBS LD09501 を BssHIII で切断し、ベクター側断片の5'突端を MBN により平滑化し、セルフライゲーションした (pBS dAGO-ΔN)。シーケンスにより確認したところ、予想以上に塩基が削られ116番目のロイシンがプロリンへと置換された結果となった。しかし、フレームは適合していることから、このベクターをそのまま使用した (この事実はトランスジェニックフライが完成した後に

材料と方法

材料と方法-9・成虫原基のホールマウント抗体染色

固定液は4%ホルムアルデヒド、PBSを用い、氷上で15～30分(蛹期の成虫原基の場合は1時間～一晚)固定した。抗体は1%BSA (PENTEX 社) 入りのPBTに希釈し、一次抗体は4℃で一晚、二次抗体と三次抗体は室温で1～2時間インキュベーションした。蛍光標識をした場合、標本は退色防止剤(0.01%パラフェニレンジアミン)入りの90%グリセロールで封入し、コンフォーカルレーザー顕微鏡(Zeiss社またはBiorad社)を用いて写真を撮った。発色基質にDABを用いてシグナルを検出した場合、標本は脱水、透徹後にEntellan Neu (Merck 社)で封入し、ノマルスキー顕微鏡(Zeiss 社)を用いて写真を撮った。

用いた1次抗体は以下の通りである。

rat anti-*DE*-cadherin DCAD2 (mono, Oda et al., 1994) 1:20～50

rat anti-*D α* -catenin DCAT1 (mono, Oda et al., 1993) 1:20

mouse anti-Armadillo 7A1 (mono, Peifer et al., 1993) 1:20～50

mouse anti-Cut (mono, Blochlinger) 1:20

rat anti-Wingless (poly, R. Nusse) 1:200

rabbit anti-Vestigial (poly, Williams et al., 1991) 1:200

rabbit anti-HRP (poly, Cappel 社) 1:200

rabbit anti-Beta-galactosidase (poly, Cappel 社) 1:300～500

mouse anti-Engrailed, 4D9 (mono, Patel et al., 1989) 1:10

rabbit anti-Repo (poly, Halter et al., 1995) 1:100

mouse mab 22C10 (mono, Fujita et al., 1982) 1:100

mouse mab BP102 (mono, Seeger et al., 1993) 1:100

rat anti-Even skipped (poly, Kosman et al., 1998) 1:200

mouse anti-Prospero, MR1A (mono, Spana & Doe, 1995) 1:10

rat anti-Hunchback (poly, Kosman et al., 1998) 1:200

2次、3次抗体にはAmersham社製かJackson社製の抗体を用いた。

材料と方法-10・その他の染色法

・X-gal染色・・・固定液は0.5%グルタルアルデヒド、カコジル酸緩衝液pH 7.3。氷上で30分固定した。PBTで洗浄後、0.2% X-gal (nacalai 社), Fe/NaP Bufferで発色した。発色は37℃で1時間～一晚行った。

・TUNEL法による細胞死の検出・・・TUNEL法は木村博士の方法(私信)に従った。胚はブリーチで卵殻膜を除去後、固定液に4%ホルムアルデヒド、PBSを使用して15分間へプタンを用いた界面固定。固定後、へプタンとメタノールによりピテリン膜を除き、PBST(0.1% Triton X-100, PBS)でメタノールを置換。数回の洗浄後、TdT緩衝液+0.1% Triton X-100に置換し、10分間振盪。TdT反応液に置換し、37℃で3時間以上反応。反応後、PBSTで途中何度か液交換をして1時間洗浄。標識された核酸の検出にはVectastain ABC kit (Vector 社)を使用した。ABC反応液で1時間振盪した後、PBSTで1時間洗浄。発色基質はDABを用いて、標識された核のシグナルを検出した。

材料と方法-11・生殖系列モザイク法による *dAGO1* 変異胚の作出

生殖系列モザイク法による *dAGO1* 変異胚の作出には FLP-DFS technique (Chou & Perrimon, 1996) を用いた。この方法は、優性雌不妊変異 (DFS) を用いて、効率良く生殖系列変異クローンを作出する方法である。交配スキームは以下の通り。

$$y w FLP / Y ; FRTG13 \text{ ovo}^D / CyO [y^+] \text{ ♂♂ } \times \text{ ♀♀ } y w ; FRTG13 \text{ I}(2)k08121 / CyO [y^+]$$

この交配により生まれてきた幼虫にヒートショックを与え、雌の生殖系列の細胞で組み替えを誘導する。羽化した成虫から y^- の雌を選ぶ。 $y w FLP / y w ; FRTG13 \text{ ovo}^D / FRTG13 \text{ I}(2)k08121$ この雌が生む卵が生殖系列 *dAGO1* 変異クローン。

この雌に Df 系統の雄、 $y w / Y ; Df(2R)50C-45 [y^+] / Cyen^{II}$ を交配し、 y^+ または lacZ の発現の有無でホモとヘテロを見分け、*dAGO1* 変異胚を選ぶ。hs-*dAGO1* トランスジーンによるレスキュー実験の場合は、 $y w p[\text{hs-}dAGO1] / Y ; Df(2R)50C-45 [y^+] / Cyen^{II}$ を交配し、この交配により産み落とされた卵 (0~12時間) に37℃30分のヒートショックを与え、 y^+ の発現の有無でホモとヘテロを見分け、表現型の回復を確認した。

材料と方法-12・胚のクチクラパターンの観察

胚のクチクラパターン観察用のプレパラートの作製は、*Drosophila a practical approach* p.215 (IRL press) に記載の方法に従った。アッププレート上から回収した胚はブリーチで卵殻膜を除き、良く洗浄した後、グリセリン：酢酸 (1:4) 固定液中で65℃、1時間固定。固定後、1滴のホイヤー封入液でスライドグラスに封入。60℃中に一晩放置して透明化。観察には微分干渉顕微鏡 (AxioPhoto, Zeiss 社) を使用した。

材料と方法-13・Poly U & A pull down assay

Polynucleotide 結合ビーズは Poly(U) or (A) Sepharose4B beads (Amersham 社) を用い、コントロールには Sepharose4B beads (Amersham 社) を用いた。ハエ成虫を10ul/1fly の PBS 中ですり潰し、3回遠心をした上清を抽出液とした。抽出液を各ビーズに加え、25℃で60分インキュベーション。十分量の Cold PBS でビーズを3回洗い、量に応じたサンプルバッファーを加え、65℃で15分。遠心して SDS-PAGE を行った。*dAGO1* 分子または *dAGO1*+GFP 融合分子の検出には、anti-*dAGO1*#7 (ProteinA purified) または、anti-GFP (FL, Snta Cruz 社) を用いて、Western blotting を行った。HRP 結合二次抗体には Amersham 社製を使用。発光基質は ECLplus (Amersham 社)、X-ray film には MXJP-1 (Kodak 社) を用いてシグナルを検出した。

材料と方法

材料と方法-14・Yeast Two-hybrid 法

基本的な方法は MATCHMAKER System 3 (CLONTECH 社) のマニュアルに従った。しかし、通常の方法では疑陽性が非常に多く出現するため、False を除くことに重点を置いた方法を考えた(下記)。Bait ベクターには pGBKT7、AD (Activation Domain, 転写活性部位) 融合ベクターには pGAD424 又は pGADT7 を用いた。インサートは PCR 法により制限酵素切断部位を導入し、EcoRI と XhoI により各ベクターへ挿入した。酵母のトランスフォーメーションとコンピテントセルの作製には frozen-EZ Yeast Transformation Kit (ZYMO RESEARCH 社) を使用。酵母からのプラスミド抽出には Zymoprep, Yeast Plasmid Miniprep Kit (ZYMO RESEARCH 社) を使用した。

・ False を除くことに重点を置いた方法

- 1, Bait を既に導入してある AH109 株にライブラリーをトランスフォーメーション後、
HIS⁻ 選択培地に plating。
- 2, 3 日後、コロニーが見えてきたら蒸留水でスクレイプ。希釈して HIS⁻ADE⁻ 選択培地に再 plating。
(この時の希釈度は、HIS⁻ADE⁻ 選択培地上でコロニーが分離する程度に)
- 3, さらに 3 日後、コロニーが十分育ったら蒸留水でスクレイプして集菌。エッペンチューブに集めた菌体からプラスミドを抽出。
- 4, 抽出したプラスミドをエレクトロポレーションにより大腸菌に導入。
- 5, 生えてきたコロニーの出来るだけ多くをミニプレップへ。
- 6, 大腸菌から得られたプラスミドで、既に偽 Bait を導入してある酵母のコンピテントセルをトランスフォーメーションし、HIS⁻ 選択培地に plating。
- 7, 2~3 日後、白金楊枝により HIS⁻ADE⁻ 選択培地に再 plating。
- 8, 生えて来なかったクローンを選択。確認作業にまわす。
- 9, 選択したクローンを #2 Bait, #6 Bait, 全長 Bait のそれぞれと co-transformation。
偽 Bait で生えてこないクローンをシーケンスに回す。

付録・dAGO1 の cDNA 配列とアミノ酸配列

付録-1・dAGO1 cDNA の塩基配列と ORF

```

5' TG GAC GTC CAG TGT GTG GCT GCT GTG GGA AAA GCT GAA GAA AAT TGC ATT TTT TGC 56
ATA ATG CGC GGC GTG AAA AGC TAA CAA AAT GTG ATA AGC AAA AGG CTG AAA TCA 110
AAA ACA AAA AAA AAA ACA AAA TAA TTA GTA GAA AAC CAA AAG CAA AGG CAA CAA 164
CAA ATA CAA CAA CAA CAA AGA AAC AAA CAA TCA ATT ACA TTT TAC ACC AAA ACA 218
CGA AAA GCA AAC ACG GGC CAA CAT TTT TTA CAT TAA TTA TTT TTC TTA AAC CAA 272
AAC CTA ACT TAG TGC AAA AAC ATG TAT CCA GTT GGA CAA CAG TCA CAG TGG ACC 326
M Y P V G Q Q S Q W T
CCC TCG CCC ACT CGG CCT CAG AGT CCC TCT CAG GCG CAG ACT AGC TTC GAC ACG 380
P S P T R P Q S P S Q A Q T S F D T
CTC ACA TCA CCA CCA GCG CCC GGC TCG TCG GTC AAT CCC ACC GCC GTC ACC AGC 434
L T S P P A P G S S V N P T A V T S
CCA AGT GCC CAG AAT GTG GCC GCT GGT GGA GCA ACT GTG GCC GGT GCA GCA GCA 488
P S A Q N V A A G G A T V A G A A
ACT GCC GCC CAG GTG GCC TCC GCC TTG GGT GCC ACC ACC GCC AGC GTG ACG CCA 542
T A A Q V A S A L G A T T G S V T P
GCA ATT GCC ACC GCA ACG CCA GCC ACG CAG CCG GAT ATG CCC GTC TTT ACG TGT 596
A I A T A T P A T Q P D M P V F T C
CCA CGA CGC CCG AAT CTC GGA CGA GAG GGT CGC CCG ATT GTG CTG CGC GCC AAT 650
P R R P N L G R E G R P I V L R A N
CAC TTC CAG GTG ACA ATG CCG CGT GGC TAT GTG CAT CAC TAT GAC ATC AAT ATA 704
H F Q V T M P R G Y V H H Y D I N I
CAG CCG GAC AAG TGT CCG CGA AAG GTG AAC CGT GAG ATT ATC GAG ACT ATG GTG 758
Q P D K C P R K V N R E I I E T M V
CAT GCC TAT AGC AAG ATC TTC GGA GTG CTC AAG CCG GTG TTC GAT GGT CGC AAC 812
H A Y S K I F G V L K P V F D G R N
AAT CTG TAT ACC CGC GAT CCC CTG CCC AIT GGC AAC GAG CGT CTA GAG CTG GAG 866
N L Y T R D P L P I G N E R L E L E
GTT ACT CTA CCC GGC GAG GGC AAA GAT CGA ATC TTT CGC GTG ACG ATC AAG TGG 920
V T L P G E G K D R I F R V T I K W
CAG GCT CAG GTC TCG CTC TTC AAT TTG GAG GAA GCT CTC GAA GGC CGC ACG CGG 974
Q A Q V S L F N L E E A L E G R T R
CAG ATA CCC TAT GAT GCC AIT TTG GCG CTC GAT GTG GTC ATG CGC CAT CTG CCC 1028
Q I P Y D A I L A L D V V M R H L P
AGC ATG ACG TAC ACG CCA GTG GGA CGT AGC TTC TTC AGT TCC CCG GAG GGT TAC 1082
S M T Y T P V G R S F F S S P E G Y
TAC CAT CCC CTG GGT GGT GGA CGC GAG GTT TGG TTC GGT TTC CAT CAG AGC GTA 1136
Y H P L G G G R E V W F G F H Q S V
AGG CCC TCG CAG TGG AAG ATG ATG CTC AAT ATC GAT GTC TCG GCC ACC GCT TTC 1190
R P S Q W K M M L N I D V S A T A F
TAC AAG GCT CAA CCA GTC ATT GAC TTC ATG TGC GAG GTG CTG GAC ATT CGC GAC 1244
Y K A Q P V I D F M C E V L D I R D
ATC AAC GAG CAG CGC AAA CCG CTC ACC GAT TCG CAG CGC GTC AAG TTC ACG AAG 1298
I N E Q R K P L T D S Q R V K F T K
GAG ATC AAG GGT TTG AAG ATC GAG ATC ACC CAC TGC GGC CAG ATG CGT CGC AAG 1352
E I K G L K I E I T H C G Q M R R K
TAT CGT GTG TGC AAC GTC ACT CGC CGC CCC GCT CAG ATG CAA TCA TTC CCA CTG 1406
Y R V C N V T R R P A Q M Q S F P L
CAG CTG GAG AAC GGA CAG ACC GTA GAG TGC ACC GTG GCC AAG TAC TTC CTG GAC 1460
Q L E N G Q T V E C T V A K Y F L D
AAG TAC CGC ATG AAA TTG CGC TAC CCG CAC TTG CCC TGC CTG CAG GTT GGC CAA 1514
K Y R M K L R Y P H L P C L Q V G Q
GAG CAC AAG CAC ACT TAC CTG CCT CTA GAG GTG TGC AAC ATT GTG GCC GGA CAG 1568
E H K H T Y L P L E V C N I V A G Q
CGG TGC ATT AAA AAG CTG ACC GAT ATG CAG ACG TCG ACC ATG ATC AAG GCC ACA 1622
R C I K K L T D M Q T S T M I K A T
GCT CGT TCA GCT CCG GAT CGT GAG CGT GAG ATT AAC AAC TTG GTA AAG CGC GCC 1676
A R S A P D R E R E I N N L V K R A

```

GAC TTC AAC AAC GAT TCG TAT GTG CAA GAG TTT GGC CTG ACC ATC TCC AAT TCG 1730
 D F N N D S Y V Q E F G L T I S N S
 ATG ATG GAG GTA CGA GGA CGC GTC TTG CCT CCT CCC AAG CTT CAG TAT GGG GGA 1784
 M M E V R G R V L P P P K L Q Y G G
 CGT GTG TCT ACC GGC CTC ACC GGC CAG CAG CTG TTC CCG CCA CAG AAC AAG GTG 1838
 R V S T G L T G Q Q L F P P Q N K V
 AGC TTG GCC TCG CCC AAC CAG GGT GTA TGG GAT ATG CGA GGC AAG CAG TTC TTC 1892
 S L A S P N Q G V W D M R G K Q F F
 ACT GGC GTC GAG ATC CGC ATC TGG GCC ATC GCC TGT TTT GCC CCA CAG CGC ACG 1946
 T G V E I R I W A I A C F A P Q R T
 GTG CGC GAG GAT GCG CTG CGT AAT TTC ACC CAG CAG CTG CAG AAG ATC TCA AAC 2000
 V R E D A L R N F T Q Q L Q K I S N
 GAT GCA GGC ATG CCG ATA ATT GGA CAG CCG TGC TTC TGT AAG TAC GCC ACC GGG 2054
 D A G M P I I G Q P C F C K Y A T G
 CCG GAT CAA GTG GAA CCC ATG TTC CGT TAC CTG AAG ATC ACC TTC CCC GGC CTG 2108
 P D Q V E P M F R Y L K I T F P G L
 CAA CTC GTC GTG GTT GTG CTG CCC GGC AAG ACT CCA GTA TAC GCC GAG GTG AAG 2162
 Q L V V V V L P G K T P V Y A E V K
 CGT GTA GGT ACC GTC CTG GGT ATG GCC ACC CAG TGT GTG CAG GCC AAG AAC 2216
 R V G D T V L G M A T Q C V Q A K N
 GTG AAC AAG ACA TCG CCA CAG ACG CTC TCT AAT CTG TGT CTG AAG ATC AAC GTC 2270
 V N K T S P Q T L S N L C L K I N V
 AAG TTG GGC GGC ATC AAT TCA ATT CTG GTC CCC TCC ATT CGG CCA AAG GTC TTC 2324
 K L G G I N S I L V P S I R P K V F
 AAT GAG CCG GTC ATC TTT TTG GGT GCC GAT GTG ACA CAC CCA CCA GCT GGC GAC 2378
 N E P V I F L G A D V T H P P A G D
 AAC AAG AAA CCA TCG ATT GCC GCC GTC GTG GGC TCC ATG GAT GCC CAT CCA TCG 2432
 N K K P S I A A V V G S M D A H P S
 CGG TAT GCC GCC ACC GTT CGC GTA CAG CAG CAC CGA CAG GAG ATC ATC CAG GAG 2486
 R Y A A T V R V Q Q H R Q E I I Q E
 CTG AGC AGC ATG GTG CGC GAG CTG TTG ATC ATG TTC TAC AAG TCG ACG GGC GGC 2540
 L S S M V R E L L I M F Y K S T G G
 TAC AAG CCC CAC CGC ATC ATA CTC TAT CGT GAC GGA GTC TCC GAG GGA CAA TTC 2594
 Y K P H R I I L Y R D G V S E G Q F
 CCA CAT GTC CTG CAA CAC GAA TTG ACC GCC ATT CGC GAG GCC TGC ATT AAG CTA 2648
 P H V L Q H E L T A I R E A C I K L
 GAG CCA GAG TAT CGG CCG GGC ATC ACA TTC ATT GTG GTG CAG AAG CGC CAT CAC 2702
 E P E Y R P G I T F I V V Q K R H H
 ACT CGA CTC TTC TGC GCG GAG AAG AAG GAG CAG AGC GGC AAA TCG GGC AAT ATT 2756
 T R L F C A E K K E Q S G K S G N I
 CCC GCA GGC ACC ACC GTC GAT GTG GGC ATC ACA CAT CCC ACC GAA TTT GAT TTC 2810
 P A G T T V D V G I T H P T E F D F
 TAT CTA TGC AGC CAT CAG GGC ATC CAG GGC ACC AGT CGC CCC TCG CAC TAC CAC 2864
 Y L C S H Q G I Q G T S R P S H Y H
 GTT CTG TGG GAC GAC AAT CAC TTT GAC TCG GAC GAG CTG CAG TGC CTC ACG TAT 2918
 V L W D D N H F D S D E L Q C L T Y
 CAG CTA TGC CAT ACG TAC GTG CGC TGC ACC CGA TCC GTC AGT ATA CCG GCG CCA 2972
 Q L C H T Y V R C T R S V S I P A P
 GCC TAC TAC GCC CAT TTA GTG GCC TTC CGT GCC AGA TAT CAT CTG GTG GAG AAG 3026
 A Y Y A H L V A F R A R Y H L V E K
 GAG CAC GAT TCG GGC GAG GGT TCG CAC CAG AGC GGC TGC TCA GAG GAT CGT ACC 3080
 E H D S G E G S H Q S G C S E D R T
 CCA GGT GCC ATG GCC AGG GCC ATC ACT GTG CAC GCG GAT ACC AAG AAG GTC ATG 3134
 P G A M A R A I T V H A D T K K V M
 TAC TTT GCC TAA AAA GTA TCG CCC CTC CCC AAT ACC AAC ACC AAA AAG CTA AAG 3188
 Y F A *
 AAT ACA AAA TCA GTT TCG AAT TTC GAT TCG AAT AAG CAA CTC CCC ACT TCC TTC 3242
 CCT CAA ATC AGA AAG CGG AAA GCG GAT GAA AGC CAA GCA TAG AAG TTT AGA ATT 3296
 AAG TTA CGT TTT ACG TTG AGA GAG CCC GGA TGG GTG GAA AAA CCA ATC AGA ATA 3350
 CGA AGA TCT TGC ATG CAT TAG TTT CGT ACC CGT ACA TAT ATA GTA AGC AGA GTA 3404
 ATG AAA ATC CCA CAA ACA CCA TCC ACA CAC TCA CTC ATC CAC ACA CAC ACA AAT 3458
 CAG ATA GCC ACA CAG TGA GAA ATG ATA ACT AAT CGA ATG TCA GGC ACA AGT TTG 3512
 CGA AAT CAA AGA AAT GTG AGA ATT CTC AAA AAC AAG CGT AGC AAA CAA ATT GAA 3566
 AGC AAA TAG GAA ATC AAA AA 3'

付録-2・dAGO1のアミノ酸配列と保存領域

1 MYPVGQQSQW TSPSTRPQSP SQAQTSFDTL TSPAPGSSV NPTAVTSPSA
 51 QNVAAGGATV AGAAATAAQV ASALGATTGS VTPAIATATP ATQPDMPVFT
 101 CPRRPNLGRE GRPIVLRANH FQVTMPRGYV HHDINIQPD KCPRKVNREI
 116(LtoP)ΔN(116-461)
 151 IETMVHAYSK IFGVLKPVFD GRNNLYTRDP LPIGNERLEL EVTLPGEGKD
 201 RIFRVTIKWQ AOVSLFNLEE ALEGRTRQIP YDAILALDVV MRHLPSMTYT
 N region(230-495)
 251 PVGRSFFSSP EGYHPLGGG REVWFGFHQS VRPSQWKMLL NIDVSATAFY
 N1(267-299)
 301 KAQPVIDFMC EVLDIRDINE QRKPLTDSQR VKFTKEIKGL KIEITHCGQM
 351 RRKYRVCNVT RRPAQMOSFP LQLENGQTV CTVAKYFLDK YRMKLRYPHL
 401 PCLQVGQEHK HTYLPLEV CN IVAGQRCIKK LTDMQTSTMI KATARSAPDR
 N2(400-426) 437(S)ΔM(437-740)
 451 EREINNLVKR ADFNND SYVQ EFGLTISNSM MEVRGRVLP PKLQYGRVS
 461(A)ΔN
 501 TGLTGQQLFP PQNKVSLASP NQGVWDMRGK QFFTGVEIRI WAIACFAPQR
 551 TVREDALRNF TQQLQKISND AGMPIIGQPC FCKYATGPDQ VEPMFRLKI
 601 TFPGLQLVVV VLPGKTPVYA EVKRVGDTV L GMATQCVQAK NVNKTSPQTL
 C region(607-905)
 651 SNLCLKINVK LGGINSILVP SIRPKVFNEP VIFLGADVTH PPAGDNKKPS
 701 IAAVVGSMDA HPSRYAATVR VQOHRQEI IQ ELSSMVRELL IMFYKSTGGY
 709(D)ΔC(709-933) 740(L)ΔM
 751 KPHRIILYRD GVSEGFPHV LQHELTAIRE ACIKLEPEYR PGITFIVVQK
 801 RHHTRLFCAE KKEQSGKSGN IPAGTTVDVG ITHPTEFDY LCHQGIQGT
 AGO1 box(817-905)
 851 SRPSHYHVLW DDNHFDSE L QCLTYQLCHT YVRCTRSVSI PAPAYYHLV
 901 AFRARYHLVE KEHDSGEGSH QSGCEDRTP GAMARAITVH ADTKKVMYFA
 933(M)ΔC

- ・下線で示した配列が二つの保存領域。その核と予想される保存配列は二重下線と斜体で示した。
- ・実験に用いた dAGO1 改変分子において欠失する領域の最初と最後のアミノ酸の番号を示した。

引用文献

- Benfey, P. N. (1999) Stem cells: A tale of two kingdoms. *Curr Biol* **9**, R171-172.
- Bohmert, K., Camus, I., Bellini, C., *et al.* (1998) *AGO1* defines a novel locus of *Arabidopsis* controlling leaf development. *Embo J* **17**, 170-180.
- Brand, A. H. & Perrimon, N. (1993) Targeted gene expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes. *Development* **118**, 401-415.
- Buescher, M. & Chia, W. (1997) Mutations in *lottchen* cause cell fate transformations in both neuroblast and glioblast lineages in the *Drosophila* embryonic central nervous system. *Development* **124**, 673-681.
- Cavener, D. R. (1987) Comparison of the consensus sequence flanking translational start sites in *Drosophila* and vertebrates. *Nucleic Acids Res* **15**, 1353-1361.
- Chou, T. B. & Perrimon, N. (1996) The autosomal FLP-DFS technique for generating germline mosaics in *Drosophila melanogaster*. *Genetics* **144**, 1673-1679.
- Christensen, S. & Weigel, D. (1998) Plant development: the making of a leaf. *Curr Biol* **8**, R643-645.
- Cikaluk, D. E., Tahbaz, N., Hendricks, L. C., *et al.* (1999) GERp95, a membrane-associated protein that belongs to a family of proteins involved in stem cell differentiation. *Mol Biol Cell* **10**, 3357-3372.
- Cogoni, C. & Macino, G. (1997) Isolation of *quelling-defective (qde)* mutants impaired in post-transcriptional transgene-induced gene silencing in *Neurospora crassa*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 10233-10238.
- Cogoni, C. & Macino, G. (1999) Homology-dependent gene silencing in plants and fungi: a number of variations on the same theme. *Curr Opin Microbiol* **2**, 657-662.
- Couso, J. P., Bishop, S. A. & Martinez Arias, A. (1994) The wingless signalling pathway and the patterning of the wing margin in *Drosophila*. *Development* **120**, 621-636.
- Cox, D. N., Chao, A., Baker, J., *et al.* (1998) A novel class of evolutionarily conserved genes defined by *piwi* are essential for stem cell self-renewal. *Genes Dev* **12**, 3715-3727.
- Cox, D. N., Chao, A. & Lin, H. (2000) *piwi* encodes a nucleoplasmic factor whose activity modulates the number and division rate of germline stem cells. *Development* **127**, 503-514.
- Doerner, P. (1999) Shoot meristems: Intercellular signals keep the balance. *Curr Biol* **9**, R377-380.
- Fagard, M., Boutet, S., Morel, J. B., Bellini, C. & Vaucheret, H. (2000) AGO1, QDE-2, and RDE-1 are related proteins required for post-transcriptional gene silencing in plants, quelling in fungi, and RNA interference in animals [In Process Citation]. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 11650-11654.
- Fire, A. (1999) RNA-triggered gene silencing. *Trends Genet* **15**, 358-363.

引用文献

- Fujita, S. C., Zipursky, S. L., Benzer, S., Ferrus, A. & Shotwell, S. L. (1982) Monoclonal antibodies against the *Drosophila* nervous system. *Proc Natl Acad Sci U S A* **79**, 7929–7933.
- Greaves, S., Sanson, B., White, P. & Vincent, J. P. (1999) A screen for identifying genes interacting with armadillo, the *Drosophila* homolog of β -catenin. *Genetics* **153**, 1753–1766.
- Guillen, I., Mullor, J. L., Capdevila, J., *et al.* (1995) The function of engrailed and the specification of *Drosophila* wing pattern. *Development* **121**, 3447–3456.
- Halter, D. A., Urban, J., Rickert, C., *et al.* (1995) The homeobox gene *repo* is required for the differentiation and maintenance of glia function in the embryonic nervous system of *Drosophila melanogaster*. *Development* **121**, 317–332.
- Heasman, J., Crawford, A., Goldstone, K., *et al.* (1994) Overexpression of cadherins and underexpression of β -catenin inhibit dorsal mesoderm induction in early *Xenopus* embryos. *Cell* **79**, 791–803.
- Hinz, U., Giebel, B. & Campos-Ortega, J. A. (1994) The basic-helix-loop-helix domain of *Drosophila* lethal of scute protein is sufficient for proneural function and activates neurogenic genes. *Cell* **76**, 77–87.
- Hosoya, T., Takizawa, K., Nitta, K. & Hotta, Y. (1995) *glial cells missing*: a binary switch between neuronal and glial determination in *Drosophila*. *Cell* **82**, 1025–1036.
- Johnson, R. L., Grenier, J. K. & Scott, M. P. (1995) patched overexpression alters wing disc size and pattern: transcriptional and post-transcriptional effects on hedgehog targets. *Development* **121**, 4161–4170.
- Klaes, A., Menne, T., Stollewerk, A., Scholz, H. & Klambt, C. (1994) The Ets transcription factors encoded by the *Drosophila* gene pointed direct glial cell differentiation in the embryonic CNS. *Cell* **78**, 149–160.
- Koesters, R., Adams, V., Betts, D., *et al.* (1999) Human eukaryotic initiation factor *EIF2C1* gene: cDNA sequence, genomic organization, localization to chromosomal bands 1p34-p35, and expression. *Genomics* **61**, 210–218.
- Kosman, D., Small, S. & Reinitz, J. (1998) Rapid preparation of a panel of polyclonal antibodies to *Drosophila* segmentation proteins. *Dev Genes Evol* **208**, 290–294.
- Lehmann, R. & Tautz, D. (1994) *In situ* hybridization to RNA. *Methods Cell Biol* **44**, 575–598.
- Lin, H. (1998) The self-renewing mechanism of stem cells in the germline. *Curr Opin Cell Biol* **10**, 687–693.
- Lynn, K., Fernandez, A., Aida, M., *et al.* (1999) The *PINHEAD/ZWILLE* gene acts pleiotropically in *Arabidopsis* development and has overlapping functions with the *ARGONAUTE1* gene. *Development* **126**, 469–481.

- Ma, C. & Moses, K. (1995) Wingless and patched are negative regulators of the morphogenetic furrow and can affect tissue polarity in the developing *Drosophila* compound eye. *Development* **121**, 2279–2289.
- Morel, J. B. & Vaucheret, H. (2000) Post-transcriptional gene silencing mutants. *Plant Mol Biol* **43**, 275–284.
- Morimura, S., Maves, L., Chen, Y. & Hoffmann, F. M. (1996) decapentaplegic overexpression affects *Drosophila* wing and leg imaginal disc development and wingless expression. *Dev Biol* **177**, 136–151.
- Moussian, B., Schoof, H., Haecker, A., Jurgens, G. & Laux, T. (1998) Role of the *ZWILLE* gene in the regulation of central shoot meristem cell fate during *Arabidopsis* embryogenesis. *Embo J* **17**, 1799–1809.
- Nellen, D., Burke, R., Struhl, G. & Basler, K. (1996) Direct and long-range action of a DPP morphogen gradient. *Cell* **85**, 357–368.
- Nusslein-Volhard, C. & Wieschaus, E. (1980) Mutations affecting segment number and polarity in *Drosophila*. *Nature* **287**, 795–801.
- Oda, H., Uemura, T., Shiomi, K., *et al.* (1993) Identification of a *Drosophila* homologue of α -catenin and its association with the armadillo protein. *J Cell Biol* **121**, 1133–1140.
- Oda, H., Uemura, T., Harada, Y., Iwai, Y. & Takeichi, M. (1994) A *Drosophila* homolog of cadherin associated with armadillo and essential for embryonic cell-cell adhesion. *Dev Biol* **165**, 716–726.
- Orsulic, S. & Peifer, M. (1996) An *in vivo* structure–function study of armadillo, the β -catenin homologue, reveals both separate and overlapping regions of the protein required for cell adhesion and for wingless signaling. *J Cell Biol* **134**, 1283–1300.
- Page, R. D. (1996) TreeView: an application to display phylogenetic trees on personal computers. *Comput Appl Biosci* **12**, 357–358.
- Patel, N. H., Martin-Blanco, E., Coleman, K. G., *et al.* (1989) Expression of engrailed proteins in arthropods, annelids, and chordates. *Cell* **58**, 955–968.
- Peifer, M. (1993) The product of the *Drosophila* segment polarity gene *armadillo* is part of a multi-protein complex resembling the vertebrate adherens junction. *J Cell Sci* **105**, 993–1000.
- Peifer, M. & Polakis, P. (2000) Wnt signaling in oncogenesis and embryogenesis—a look outside the nucleus. *Science* **287**, 1606–1609.
- Perrimon, N., Engstrom, L. & Mahowald, A. P. (1989) Zygotic lethals with specific maternal effect phenotypes in *Drosophila melanogaster*. I. Loci on the X chromosome. *Genetics* **121**, 333–352.

引用文献

- Roy, A. L., Chakrabarti, D., Datta, B., Hileman, R. E. & Gupta, N. K. (1988) Natural mRNA is required for directing Met-tRNA(f) binding to 40S ribosomal subunits in animal cells: involvement of Co-eIF-2A in natural mRNA-directed initiation complex formation. *Biochemistry* **27**, 8203-8209.
- Sanson, B., White, P. & Vincent, J. P. (1996) Uncoupling cadherin-based adhesion from wingless signalling in *Drosophila*. *Nature* **383**, 627-630.
- Schmidt, A., Palumbo, G., Bozzetti, M. P., *et al.* (1999) Genetic and molecular characterization of *sting*, a gene involved in crystal formation and meiotic drive in the male germ line of *Drosophila melanogaster*. *Genetics* **151**, 749-760.
- Seeger, M., Tear, G., Ferres-Marco, D. & Goodman, C. S. (1993) Mutations affecting growth cone guidance in *Drosophila*: genes necessary for guidance toward or away from the midline. *Neuron* **10**, 409-426.
- Simmonds, A. J., Brook, W. J., Cohen, S. M. & Bell, J. B. (1995) Distinguishable functions for *engrailed* and *invected* in anterior-posterior patterning in the *Drosophila* wing. *Nature* **376**, 424-427.
- Spana, E. P. & Doe, C. Q. (1995) The prospero transcription factor is asymmetrically localized to the cell cortex during neuroblast mitosis in *Drosophila*. *Development* **121**, 3187-3195.
- Tabara, H., Sarkissian, M., Kelly, W. G., *et al.* (1999) The *rde-1* gene, RNA interference, and transposon silencing in *C. elegans*. *Cell* **99**, 123-132.
- Tabata, T., Schwartz, C., Gustavson, E., Ali, Z. & Kornberg, T. B. (1995) Creating a *Drosophila* wing *de novo*, the role of engrailed, and the compartment border hypothesis. *Development* **121**, 3359-3369.
- Thompson, J. D., Higgins, D. G. & Gibson, T. J. (1994) CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res* **22**, 4673-4680.
- Tsuneizumi, K., Nakayama, T., Kamoshida, Y., *et al.* (1997) Daughters against dpp modulates dpp organizing activity in *Drosophila* wing development [see comments]. *Nature* **389**, 627-631.
- Williams, J. A., Bell, J. B. & Carroll, S. B. (1991) Control of *Drosophila* wing and haltere development by the nuclear *vestigial* gene product. *Genes Dev* **5**, 2481-2495.
- Wilson, J. E., Connell, J. E. & Macdonald, P. M. (1996) *aubergine* enhances *oskar* translation in the *Drosophila* ovary. *Development* **122**, 1631-1639.
- Zecca, M., Basler, K. & Struhl, G. (1995) Sequential organizing activities of engrailed, hedgehog and decapentaplegic in the *Drosophila* wing. *Development* **121**, 2265-2278.
- Zou, C., Zhang, Z., Wu, S. & Osterman, J. C. (1998) Molecular cloning and characterization of a rabbit eIF2C protein. *Gene* **211**, 187-194.
- 高田 慎治 (2000) Wnt シグナルによる形態形成とその分子メカニズム 細胞工学 19, 1598-1602.

謝辞

研究を進める上でお世話になった全ての人にお礼を申し上げたいと思います。特に、私が勝手に始めたテーマであったのにも関わらず、最後までバックアップして頂いた上村匡教授にはたいへん感謝しております。本当にありがとうございました。また、竹市雅俊先生には、研究への厳しい助言をして頂き、研究の何たるかを教えて頂きました。竹市研究室で研究を行えた数年間を、私の中の小さな誇りとして、これからの人生の中で大切に生かしていきたいと思います。

修士課程では日本育英会、博士課程では日本学術振興会に援助をうけ、研究に専念することが出来ました。しかし、ここまで援助して頂いたのに、結果として私自身が研究を止めてしまう事をととても申し訳なく思います。私の研究成果が少しでも将来の生命科学の発展の基礎になれば、僅かながらの恩返しになるのではないかと思い、今後の AGO1 ファミリーの研究の発展を切望しております。

そして、常に私を支えてくれた両親と妻・洋子に、誰よりも感謝しています。

片岡 陽平

参考資料・翅のパターン形成における DE-cad の役割の追求

参-1. 結果・*shg^p*変異体の解析

参-1-1. はじめに

DE-cad の変異体である *shotgun* (以下 *shg*) 変異体の多くのアレルは、ホモ接合体で胚性致死となるが、P 因子挿入変異アレル (*shg^p*) のホモ接合体の一部は成虫まで生存することが分かった。そしてそのホモ接合体は翅の縁 (wing margin、以下 WM) の前部 (anterior wing margin、AWM) が欠ける表現型を示す。*wingless* 変異体もこの様に WM が欠損する表現型を示す変異体の一つとして知られている。但し *wg* 変異体の場合、その異常は AWM に限らず WM 全域に及ぶ。このように表現型に若干の違いはあるものの、*shg^p* ホモ接合体の表現型は *wingless* 変異体の表現型に共通点があり、DE-cad と Wg シグナル伝達との間に何か関係があるのではないかと期待された。そこでこの *shg^p* ホモ接合体の表現型のくわしい解析を始めた。

参-1-2. *shg^p* のホモ接合体の表現型

shg^p ホモ接合体は AWM が欠ける表現型を示す (図2-1B 矢印)。この表現型の浸透度は85%である。欠けるのは翅脈 L1 上で、L2 との交点 (図2-1B 矢尻) を越えることはない。特に機械感覚毛 (図2-1C 小矢印b) の欠失が目立ち、表現型が強く大きく欠けた時には化学感覚毛 (図2-1C 小矢印a) も欠失する。機械感覚毛の方が化学感覚毛に較べて欠失しやすいが、選択的に機械感覚毛だけが無くなるわけではない。

参-1-3. *shg^p* の P 因子挿入位置の決定と復帰変異体の分離

shg^p の P 因子挿入位置を決定するためにプラスミドレスキュー法 (方法2-4-2) により P 因子挿入点付近のゲノム DNA を回収した。その挿入点付近の塩基配列を決定したところ、P 因子は DE-cad 遺伝子の転写単位内の翻訳開始点の421塩基上流に挿入していることが分かった (図2-2)。この P 因子の挿入の結果、DE-cad 遺伝子の転写が異常になっていると予想された。次に、*shg^p* ホモ接合体の翅の表現型は P 因子の挿入により引き起こされていることを確かめるために、P 因子を再転移させて表現型が復帰するか調べた (方法2-4-3)。その結果、P 因子が再転移したと考えられる24系統のうち、11系統が野生型に復帰し、残りの13系統はホモ接合体で胚性致死となった。P 因子は正確に切り出されると1塩基の狂いも無く野生型に復帰する。しかし、ある程度の確率で付近のゲノム領域が同時に切り出されたり、P 因子が部分的に残るために野生型に復帰しないことがある (方法2-4-3 図)。そこで、野生型に復帰した11系統について、P 因子挿入点付近のゲノム構造をサザンブロット法により調べた。プローブには、制限酵素 HindIII でゲノム DNA を切断したときに P 因子内の切断部位で4.5kbp と2.0kbp に分断される6.5kbp を用いた (方法2-4-4)。このプローブを用いると *shg^p* ヘテロ接合体では2.0kbp と4.5kbp、6.5kbp の三本のバンドが検出される。このゲノム構造解析の結果、11系統中8系統は表現型だけでなくゲノム構造も野生型に復帰していることがわかった (図2-3A)。一方、胚性致死となった13系統には、2.0kbp のバンドが低分子量側にシフトするという共通の異常が見られた (図2-3B)。2.0kbp のバンドは転写単位を含むので、転写単位が割れることにより DE-cad の転写か翻訳のどちらかが影響を受け、胚性致死になったと考えられる。以上の結果から、

shg^d ホモ接合体の翅の表現型は P 因子の挿入が原因である事が確認された。

参-1-4. 翅成虫原基における DE-cad の発現様式

shg^d ホモ接合体では翅の特定の領域に表現型が現れることから、まず正常な翅成虫原基における DE-cad の発現様式を調べた。*shg^d* に挿入している P 因子には lacZ (β -galactosidase, β -gal) 遺伝子が組み込まれており、その発現は DE-cad のエンハンサーに制御されていることが期待できた。そこで *shg^d* の lacZ 遺伝子の発現パターンと mRNA の *in situ* hybridization 染色の比較を行った。この結果、二つの染色は同様のパターンを示したので、*shg^d* の lacZ 遺伝子の発現パターンは DE-cad のエンハンサーを正確に反映していると考えられた。3 令幼虫期の翅成虫原基で、DE-cad の発現は部分的に昂進しており、WM 周辺や翅の脈、神経前駆細胞群で強く発現していることが分かった (図2-4A,B)。そこで特に、将来翅の縁となる WM 周辺の発現パターン (図2-4B 黒矢尻) に注目し、WM となる細胞のマーカー (Cut) と *shg^d* の lacZ 遺伝子の二重染色を行った。その結果、WM 周辺の発現は WM のすぐ両側であることが分かった (図2-5A,B)。Cut と同様に WM となる細胞で発現している Wg との二重染色も同様のパターンを示す (図2-5C)。しかし、DE-cad は WM 全域で発現しているわけではない。*shg^d* ホモ接合体で表現型が現れる AWM 領域では、正常な成虫原基でもその発現レベルは周囲に比べ低いことが分かった (図2-4 矢印)。

次に、抗体染色で DE-cad 分子の局在を調べた。DE-cad 分子は、成虫原基では胚と同様にアドヘレンス・ジャンクションに局在しており、細胞境界が網の目の様に染色される (図2-4C,2-6A)。DE-cad 分子が多く存在する領域は、リポーター遺伝子や *in situ* hybridization 染色で強いシグナルが認められる領域に一致した分布を示した。非常に強く発現している細胞ではアドヘレンス・ジャンクションだけではなく、細胞質にも DE-cad のシグナルが観察される (図2-6B)。この DE-cad の発現パターンは既知の *Delta* 遺伝子の発現パターンに良く似ていることが分かった (図2-7)。*Delta* 遺伝子は AWM 領域で発現量が少なくなることはないが、その他の領域では DE-cad の発現パターンと非常に良く似た発現パターンを示すことから、同様の転写調節を受けていることが予想された。

参-1-5. *shg^d* 変異体の翅成虫原基の観察

shg^d ホモ接合体とヘテロ接合体の 3 令幼虫期の翅成虫原基を抗 DE-cad 抗体で染色し比較した。その結果、*shg^d* ホモ接合体では野生型に比べ DE-cad 分子の量が大幅に減少していることが確認された (データは示さず)。さらに、ホモ接合体では将来 AWM となる領域に、穴が空いたように DE-cad 抗体で細胞境界が染色されない細胞群が観察された (図2-8B 矢印)。この領域は DE-cad の発現量の少ない領域に一致する (図2-8D 矢印)。ヘテロ接合体ではこのような穴は観察されない (図2-8A,C)。このことから、この穴状の異常が表現型に関係していると考えられた。DE-cad と同様な分布を示す α -カテニンと β -カテニンに対する抗体染色や、F-アクチンに対するファロイジン染色でも同様に細胞境界が見えない細胞集団が観察された。また、核染色をすると、DE-cad 抗体で染色されない細胞群の核は密度が粗で、位置も細胞の頂部に寄り異常となっていることが分かった (図2-9 矢印)。

次に、蛹期の *shg^d* ホモ接合体の翅成虫原基を観察した。蛹化後 4 時間においても DE-cad 抗体で細胞境界が染色されない細胞群が確認できた (図2-10A 矢印)。その領域をノマルスキー顕微鏡で観察すると、細

胞は存在するが細胞表面は周囲の細胞に比べ凸凹していた(図2-10C 矢印)。さらに蛹化後7時間の成虫原基をWM細胞のマーカーで染色すると、AWMの一部でWMのシグナルが見られない領域が観察された。WMのシグナルが無くなっている領域の基部側には、WMマーカーを発現する細胞の塊が見られる(図2-11C 矢印a)。この時期の図2-11Cのaの位置に対応する成虫原基の切片を観察すると、WMマーカーを発現する細胞の塊が成虫原基から剥がれ落ちそうになっていることが分かる(図2-11C'a)。図2-11Cの矢印bの位置に対応する切片では化学感覚毛のシグナルしか見られない(図2-11C'b)。蛹化後40時間になると *shg^d* ホモ接合体の蛹の翅前部に褐色に変色した細胞塊が観察される(図2-12)。この時期には pupal cuticle の中で翅はほぼ完成しており、褐色の細胞塊が付いている翅はAWM領域が欠けている事が分かった。よって、この細胞塊は本来AWMになる細胞が剥がれ落ち、細胞が死んだために褐色化していると考えられた。また、この褐色の細胞塊はAWM領域以外では観察されなかったことから、この細胞の脱落がまさに *shg^d* ホモ接合体の表現型の原因と判断した。この細胞塊は羽化の時に pupal cuticle と共に剥がれ落ちてしまい、成虫の翅には残らないことが確認できた。以上の観察結果から、まず *shg^d* ホモ接合体では *DE-cad* の発現量が大幅に減少している事が分かった。そして蛹期の成虫原基の観察から、*shg^d* ホモ接合体の表現型は、正常発生において *DE-cad* 遺伝子の発現量の少ないAWM領域の細胞が脱落することによって起きると考えられた。

参-1-6. *shg* 変異体を用いたモザイク解析

shg^d ホモ接合体における細胞の脱落は、正常発生において *DE-cad* 遺伝子の発現量の少ないAWM領域にのみ観察されることから、*DE-cad* 分子による細胞接着の喪失により引き起こされると考えた。そこで翅の他の領域でも、*DE-cad* が無くなれば細胞が脱落すると予想された。この事を証明するために、FLP/FRT systemを用いたモザイク法(方法2-4-9)により *DE-cad* 喪失クローンを作製し、その細胞の挙動を観察した。その結果、AWM領域以外のWM領域でも細胞が脱落し、WMが欠けることが確認できた(図2-13A,B)。データは示さないが、*shg^d* ホモ接合体と同様、蛹期には茶色の細胞塊が観察された。また、*DE-cad* 喪失クローンが小さい場合、細胞が脱落しない例も観察される(図2-13C,D)。これはクローンを誘導した時期が3令幼虫期の後期であり、この時期以降はWM領域の細胞はあまり盛んに分裂をしないことから、*DE-cad* 喪失クローン内の細胞にも *DE-cad* 分子がわずかに残っていて、その残っていた *DE-cad* 分子により脱落を免れたと考えられる。実際、クローンが大きくなるに従って異常が観察される(図2-13E)。翅のWMより内側の領域には成虫の翅で異常は観察されなかったが、蛹期にその領域で茶色の細胞塊が観察されることから、WMと同様に細胞が脱落が起きていると考えられる。このモザイク解析の結果から、翅のどの領域でも *DE-cad* が無くなれば細胞が脱落することが示された。

参-2. 結果・Wgシグナル伝達と DE-cad の関係の追究

参-2-1. はじめに

ここまでの実験から *shg^l* 変異体の表現型は細胞接着の異常だけで説明でき、Wgシグナルとは直接関係はなさそうであると考えた。しかし、WM付近での DE-cad の発現パターンに関しては、WM細胞で発現する Wgシグナルによって誘導されている可能性がある。また、ゼノパスを用いた実験から、カドヘリンの過剰発現は細胞質内の β -カテニンの量を減少させることにより Wntシグナルを抑制できることが報告されている。これらの背景から、「DE-cad は Wgシグナルによって発現を誘導され、かつ Wgシグナルの伝達を抑制することで、WM近傍の細胞に Wgシグナルの負のフィードバックをかけている」という仮説を考えた。この仮説を検証するために以下の実験を行った。

参-2-2. Wgシグナルによる DE-cad の発現誘導

WM細胞のマーカーと *shg^l* の lacZ 遺伝子の発現を二重染色により検出すると、WM細胞のすぐ両側で DE-cad が発現している領域があることが分かった (図2-5A,B)。WM細胞のすぐ両側というのは Wg発現細胞のすぐ両側という事でもある (図2-5C)。この発現パターンから Wgシグナルによって DE-cad の発現が誘導されているのではないかと予想した。そこで、Wgシグナルと DE-cad の発現の関係を調べるために、*wg* 温度感受性変異体を用い、制限温度下で Wg を不活化した時の DE-cad 遺伝子の発現パターンの時間的変化を調べた。その結果、Wg を不活化して 12 時間後から WM 付近の DE-cad の発現量の減少が観察され (図2-14D,E 矢印)、24 時間後には明らかに発現量が減少していた (図2-14G,H 矢印)。しかし、その発現に Wg の活性を必要としないと考えられる細胞では発現の減少は観察されなかった (図2-14E,H 矢印)。発現維持に Wg の活性を必要としている Cut の発現の減少が観察されることから、この実験で確かに Wg の活性が無くなっていることが確かめられた (図2-14F,I)。この結果から、翅成虫原基の WM 付近の細胞 (AWM 領域は除く) では、Wgシグナルによって DE-cad 遺伝子の発現が正に誘導されていることが分かった。

参-2-3. カドヘリンの発現量の増大は Wgシグナル伝達を抑制出来る

カドヘリンの発現量の増大が Wgシグナル伝達に与える効果を見るために、DE-cad 分子の過剰発現を行い、成虫の翅の形態と幼虫期の翅成虫原基における Wgシグナル標的遺伝子の発現パターンの変化を観察した。その結果、カドヘリンの発現量の増加は Wgシグナル伝達を負に制御できる事を示唆する結果を得た。GAL4/UAS system (方法2-4-8) を用いて WM 周辺の領域で DE-cad を過剰発現すると、Wg 変異体と同様に成虫の翅で WM が欠失した (図2-15A,C)。この DE-cad の過剰発現の効果は、アルマジロを同時に過剰発現させることで打ち消された (図2-15B, D)。この結果から、過剰量の DE-cad がアルマジロと結合し、Wgシグナル伝達に必要なアルマジロの量を減少させると考えられた。また、細胞外領域を大きく欠く DE-cad や、ショウジョウバエのもう一つのクラシックタイプカドヘリンである DN-カドヘリンを過剰発現したときも同様の表現型が観察された (図2-16A,B)。次に、翅成虫原基のより狭い領域で DE-cad を過剰発現させ、周囲の細胞と Wgシグナル標的遺伝子の発現レベルを比較する実験を行った。その方法として FRT-GAL4/UAS system (方法2-4-8) を利用し、DE-cad を過剰発現するクローンを作製した。その結果、

DE-cad を過剰発現しているクローン内において、Wgシグナル標的遺伝子 *ventigial* (Vg) の発現が減少もしくは消失している細胞が観察された (図2-17 矢印)。

参-2-4. DE-cad のWM両側の強い発現はWgシグナルを抑制している

上の結果は、DE-cad を過剰発現させた条件下で得られた結果である。今度は、正常発生で見られる DE-cad のWM両側の強い発現が、Wgシグナルを負に制御しているかを検証するため、FLP/FRT system を用いたモザイク法 (方法2-4-9) により DE-cad 分子を発現しないクローン (DE-cad 喪失クローン) を作製し、クローン内におけるWgシグナル標的遺伝子 (Vg) の発現レベルを観察した。その結果、WM近傍に出来た DE-cad 喪失クローン内では、周囲の細胞に比べVgの発現レベルが上昇することが確認された。DE-cad 喪失クローンは抗 DE-cad 抗体染色で、染色されない細胞群として正常な細胞と区別できる (図2-18B,E 矢印)。WM近傍で DE-cad のシグナルが無くなっている細胞の核では、Vgのシグナルが周囲に比べ強くなっている (図2-18 矢印a,c,d)。それに対してWMから離れたところに生じた DE-cad 喪失クローンでは、Vgの発現レベルの上昇は観察されなかった (図2-18 矢印b,e)。このことは、DE-cad の発現が無くなった場合、Wgシグナルをより強く受けている細胞ほど、Vgの発現レベルが大きく上昇することを示している。WMから離れた細胞でVgの発現レベルに変化が起きないのは、もとよりWgシグナルの影響が少ないためと考えらる。DE-cad 喪失クローンを正常な細胞と区別する別の方法として、抗Myc抗体染色も用いた。この方法では DE-cad 喪失クローンは、Mycシグナルの無い細胞として正常な細胞と区別できる。この染色方法でも同様の結果が得られた (図2-19)。また、DE-cad 喪失クローン内におけるCutの発現レベルには変化が無かった (図2-20)。Cutはその発現維持にWgシグナルを必要としているが、Wgシグナルの直接のターゲットではないと考えられている (Micchelli et al, 1997; de Celis et al, 1997)。そのため、DE-cad の量はCutの発現レベルに影響しないと考えられた。

以上の結果から、DE-cad のWM両側の強い発現が、実際にWgシグナルを負に制御していることが示唆された。

参-3. 考察

参-3-1. *shg^p* 変異体の表現型

shg^p ホモ接合体の表現型は *DE-cad* 遺伝子の発現量の少ない領域の細胞が脱落することによって起きると判断した。その理由を以下に挙げる。

- ・ *DE-cad* 遺伝子の発現量の少ない領域で表現型が観察される。
- ・ 蛹期に脱落しそうな細胞が観察され、その細胞では抗体染色で *DE-cad* 分子がほとんど検出されない。
- ・ モザイク解析の結果、*DE-cad* 喪失細胞はその翅上の位置によらず脱落する。
- ・ 蛹期の翅成虫原基が伸張するときに、細胞は再配列運動をされると考えられる。ダイナミックな再配列運動に *DE-cad* が必要であることは、*shg^p* 変異体の胚におけるマルピーギ管の異常の解析から明らかになっている (Uemura et al., 1996; Tepass et al., 1996)。このことから *shg^p* ホモ接合体の表現型も同様に細胞の再配列運動の異常と捉えることが出来る。

以上の理由から、*shg^p* ホモ接合体の表現型の原因は細胞の脱落という物理的な異常であり、その細胞の脱落は *DE-cad* 分子による細胞接着の喪失により引き起こされると判断した (図2-21)。この表現型の解析を通じてカドヘリンの新しい機能的側面が明らかになることを期待したが、結果はいままでの概念で説明できることであった。疑問なのは *DE-cad* 遺伝子の発現レベルがAWMの一部の領域で低下していることである。*DE-cad* 遺伝子に似た発現パターンを示すDeltaは、AWM領域でもWMの両側で発現している。他にもWMの両側で発現している遺伝子はいくつかあるが、*DE-cad* 遺伝子の様にAWMの一部の領域で発現量が少なくなるものは無い。ではなぜ *DE-cad* 遺伝子に限ってAWMで発現量が少ないのだろうか？再配列運動をしながら伸長する成虫原基の、特に伸びていく縁となるWM付近には大きな力がかかり、周囲よりもむしろ多くの *DE-cad* 分子が必要と思われる。それにも関わらず、AWMで発現量が少ないのは疑問である。AWMの領域でのみ *DE-cad* 分子の発現レベルが低下していることが必要なのだろうか？

2-3-2. Wgシグナルによる *DE-cad* の発現誘導

翅成虫原基のWM周囲の細胞において、*DE-cad* の発現はWgシグナルにより誘導されている可能性が考えられた。このことは *wg* 温度感受性変異体を用いた実験により確かめることが出来た。似た現象が *Wnt-1* ノックアウトマウスの解析から報告されている (Shimamura et al, 1994)。マウスの胚期の脳において、*Wnt-1* は正中線上の細胞で発現し、E-カドヘリンはその周囲の細胞で発現している。このE-カドヘリンの発現パターンが *Wnt-1* ノックアウトマウスでは変化するのである。このことから、Wg/Wntシグナルがカドヘリンの発現を誘導するという現象は普遍的であるのかもしれない。Wgシグナルによる *DE-cad* の発現誘導は、直接的 (ArmとdTCFによって転写調節されている) であるかそれとも間接的 (他のシグナル伝達経路を介して) であるかの二つの可能性が考えられる。LEF-1/TCFの結合配列がマウスのE-カドヘリンの転写調節領域にあることが示されていること (Huber et al, 1996) から、Wg/Wntシグナルによるカドヘリンの直接的な発現誘導が動物種を越えて広く保存されている可能性がある。また、間接的に発現誘導を受けている可能性の根拠としては次のことが挙げられる。Wgを不活化した24時間後でも、*DE-cad* を周囲より強く発現する細胞はWM付近に一本の線として残る。このことから、Wgシグナル以外にも *DE-cad* の発現

を誘導するメカニズムがあると考えられた。私はそのメカニズムの候補として、Delta/Notchシグナル伝達系を考えた。その理由は、Deltaは正常な翅成虫原基において DE-cad に良く似た発現パターンを示すが、Wgを不活化した時にも DE-cad の発現パターンと同様な変化を見せる事である。また、Wgシグナルによって活性化したDsh分子がNotchシグナル伝達系と相互作用する事からもその可能性は高いと考えている。以上の事から、DE-cad はWgシグナルによって直接的にも間接的にも発現誘導を受けているのではないかと考えられた(図2-22)。今後、DE-cad の転写調節領域の解析が進めば明らかにされるだろう。そして、Wg/Wntシグナルがカドヘリンの発現を誘導するという現象の生理的意義が明らかにすることが今後の課題である。

2-3-3. DE-cad によるWgシグナル伝達のネガティブフィードバックモデル

DE-cad を翅で過剰発現すると *wg* 変異体様の表現型が観察された。細胞外領域を大きく欠き接着活性が無い DE-cad 分子を過剰発現したときも、同様の表現型が観察されることから、この表現型はカドヘリンの細胞接着分子としての機能とは無関係であると考えられた。また、この表現型はArmを同時に過剰発現させることでレスキューすることが出来た。このことから、この表現型はArm分子の量の減少によって起きると考えられた。過剰な DE-cad はArmを吸着し、Wgシグナル伝達に必要な細胞質のArmのプールを減少させる。その結果、Armの核への移行が妨げられ、Wgシグナル伝達が阻害されると考えられた。この結果はカドヘリンに結合しているArmはWgシグナル伝達に参加出来ないことを示している。以上のことから、過剰な DE-cad はArmを奪うことによりWgシグナル伝達を抑制することが出来ると考えた。この考えは既にゼノパスを用いた実験の結果から提唱されており、ショウジョウバエを用いて確かめることが出来た。同様な結果は、別のショウジョウバエ研究グループからも報告されている (Sanson et al., 1997)。

この実験を始めるにあたって立てた仮説は、WMの両側で発現している DE-cad がWgシグナル伝達を負に制御しているのではないかというものである。ここまでの実験で DE-cad を強制発現させることでWgシグナル伝達を阻害出来ることは分かった。では、WMの両側の強く DE-cad を発現している細胞では、実際にWgシグナル伝達が抑制されているのだろうか。その答えはイエスであった。カドヘリン変異体を用いたモザイク解析で、DE-cad 喪失クローン内ではWgシグナル標的遺伝子 *vestigial* の発現量が増加していた。*vestigial* はWg分子の濃度に依存して発現量が変化することが知られている (Zecca et al., 1996; Neumann and Cohen, 1997)。このことから、WM付近の DE-cad 喪失クローン内ではWgシグナルがより効率良く伝わっていると解釈できた。すなわち、正常発生においてWMの両側の細胞では、DE-cad によってWgシグナル伝達が負に制御されていると考えられる。WM付近の DE-cad はWgシグナルによって発現誘導されているので、この DE-cad によるWgシグナル伝達の負の制御は、Wgシグナルが過度に伝わる事を防ぐネガティブフィードバック機構と言える(図2-23)。クローンの観察数を増やして結果を再確認する必要があるが、この発見は、カドヘリンが接着分子としてだけでは捉えられない、新しい機能的側面を持つことを示唆する点で興味深い。

ただ、このネガティブフィードバック機構の生理的意義は未だ明らかになっていない。Wgシグナルが過度に伝わる事を防ぐためと予想されるが、Wgシグナルが過度に伝わった時にどのような問題が生じるかは不明である。モザイク解析では、DE-cad 喪失クローンが蛹期中に接着の問題で脱落してしまうため、成虫ま

でクローンを追跡できない。そのため *DE-cad* の有無が分化に与える影響を確認することが出来なかった。*DE-cad* の発現していないAWM領域では、このネガティブフィードバック機構は働いていないと考えられる。そこで、AWM領域とそれ以外の *DE-cad* が強く発現するWM領域を較べれば、ネガティブフィードバック機構が働いていない領域と働いてる領域を比較できると考えた。実際、AWM領域とそれ以外のWM領域では成虫の翅で若干の構造上の違いがあり、AWM領域は3列の感覚毛が生えていて、それ以外のWM領域では1列か2列である。もしかしたら、この違いが *DE-cad* の有無で生じているのかもしれない。今後この仮説を検討してみる予定である。

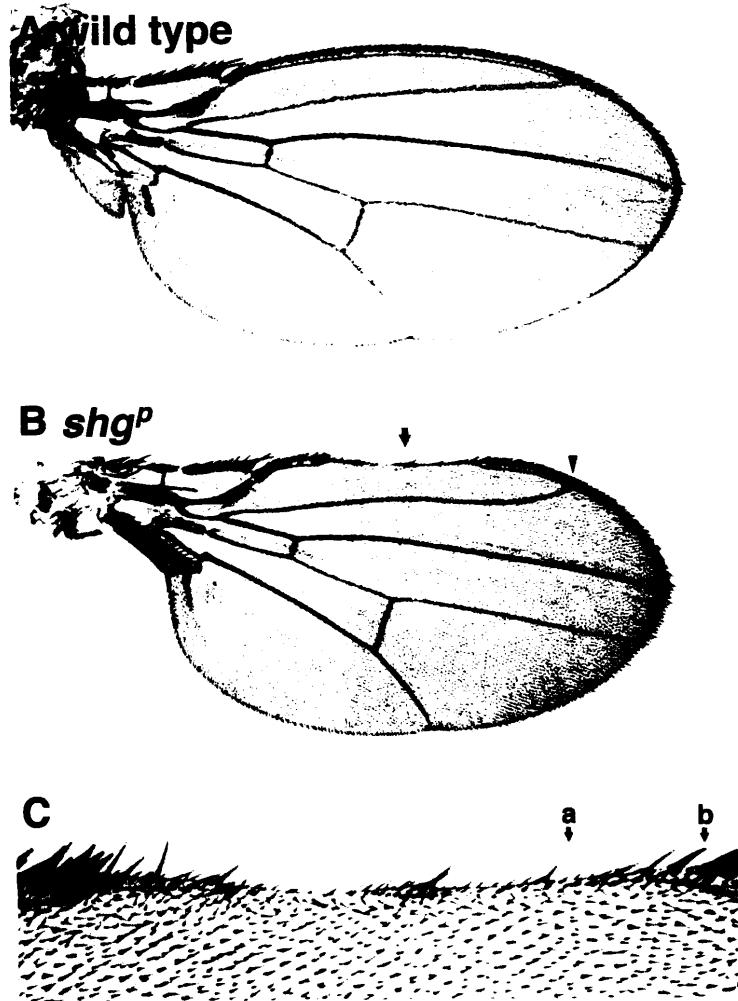
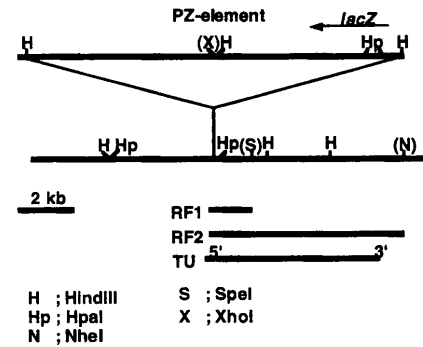


図2-1. *shg^P*ホモ接合体の翅の表現型

野生型 (A) と *shg^P*ホモ接合体 (B) の成虫の翅。 *shg^P*ホモ接合体は翅前部の縁 (AWM) が欠ける表現型を示す (B 矢印)。欠ける領域は翅脈L1とL2の交点 (B 矢尻) よりも前部に限られる。欠けている領域を拡大すると、化学感覚毛 (C 小矢印a) に較べて機械感覚毛 (C 小矢印b) が多く失われていることが分かる。写真上方が前側。

図 2-2. *shg^P* 系統における P 因子挿入位置

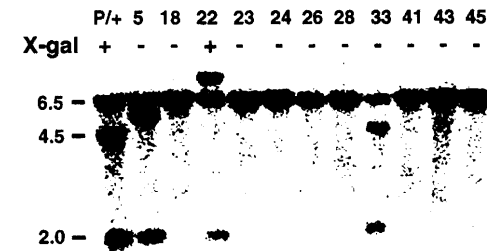


shg^P 系統において P 因子は、DE-カドヘリン転写単位 (TU) 内の翻訳開始点上流 421 塩基上流に挿入されている。プラスミドレスキューにより回収したゲノム DNA 断片 (RF1 と RF2) の塩基配列を決定することにより確認した。

図 2-3. *shg^P* 系統と復帰変異体の P 因子挿入点付近のゲノム構造解析

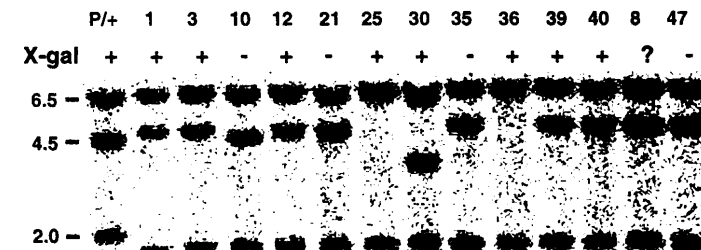
P 因子が転移したと考えられる系統の P 因子挿入点付近のゲノム構造の変化をサザンプロット法を用いて確認し、P 因子中の *LacZ* 遺伝子が残存しているかどうかを X-gal 染色により検討した。

野生型復帰系統



表現型が消失して野生型に復帰したと考えられる 11 系統の内、8 系統でゲノム構造が野生型に復帰していることが確認された。それ以外の 3 系統 (#5, 22, 33) については、表現型は野生型に復帰しているが、ゲノム構造に異常が残っていることが確認された。特に、#22 系統は X-gal 染色陽性であることから、P 因子の一部がまだ残っていると考えられる。

胚性致死系統



胚性致死となったすべての系統で、2.0kbp のバンドが低分子量側にシフトする共通の異常が観察された。短くなっているのは、P 因子挿入点から 200~300 塩基程なので、翻訳開始点は残っていると考えられる。



図2-4. 3令幼虫期の翅成虫原基におけるDE-カドヘリンの発現パターン

in situ hybridizationによるmRNAの分布 (A) とX-gal染色による *shg*⁺ヘテロ個体の *LacZ*遺伝子の発現パターン (B)、抗DE-カドヘリン抗体染色 (C) の比較。WMの両側の細胞 (B 黒矢尻) や神経前駆細胞群 (B 白矢尻a)、翅脈の前駆細胞 (B 白矢尻b) で強く発現していることが分かる。また、どの染色でも将来AWMとなる領域で、DE-カドヘリンの発現量の低下が観察される (A,B,C 矢印)。

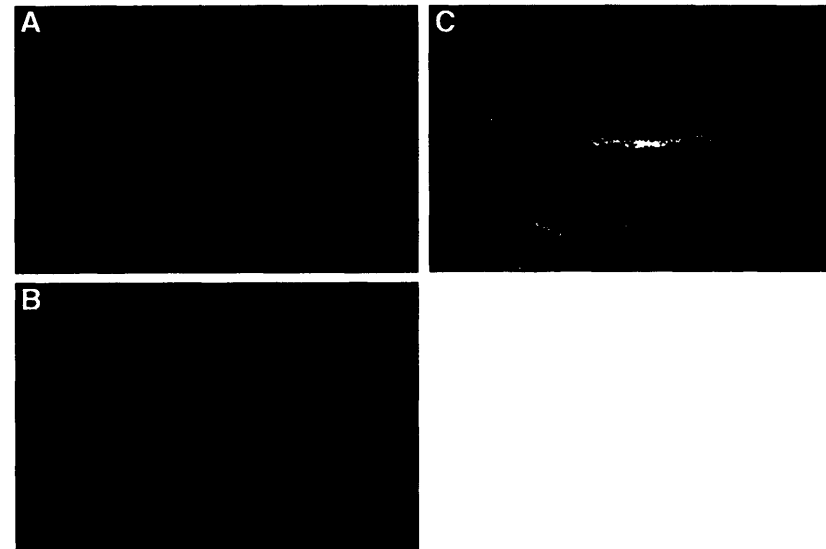


図2-5. WM細胞とDE-カドヘリン発現細胞の位置関係

(A, B) WM細胞マーカーCutとDE-カドヘリン発現細胞を示すβ-galの抗体染色による発現細胞の比較。中央付近ではCut (緑) とβ-gal (赤) のシグナルが同じWM細胞に見られるが、その前後のWM細胞にはβ-galのシグナルは見られない。(C) はWg (緑) とβ-gal (赤) の発現パターンの比較。写真左が前方。 *shg*⁺ヘテロ接合体の翅成虫原基に対して染色を行った。

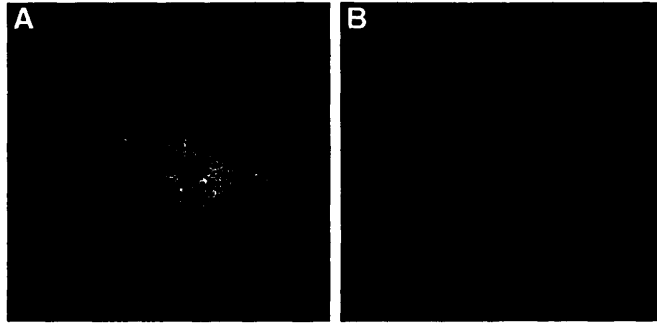


図2-6. DE-カドヘリン分子の細胞内局在

野生型に対する抗DE-カドヘリン抗体染色。焦点を(A)頂端側に合わせた場合と、(B)より深い深度に合わせた場合。(B)発現の盛んな細胞では、頂部細胞境界のアドヘレンスジャンクションだけでなく、細胞質にもDE-カドヘリン分子が多く存在している。

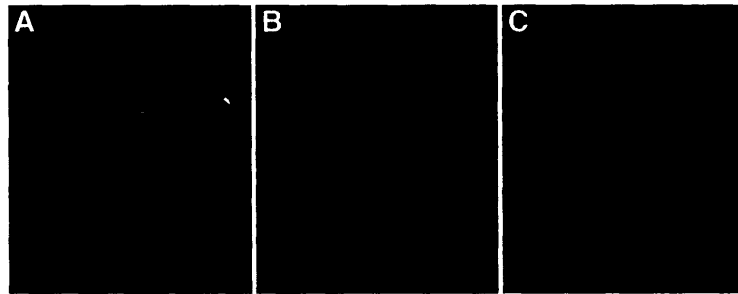


図2-7. DE-カドヘリンとDeltaの発現パターンの比較

野生型に対する(B)抗DE-カドヘリン抗体染色(赤)と(C)抗Delta抗体染色(緑)。(A)は(B)と(C)の重ね合わせ。(C)DeltaもDE-カドヘリンと同様に、WMの両側や神経前駆細胞群、翅脈の前駆細胞で強いシグナルが観察される。しかし、DE-カドヘリンと異なり、AWM領域で発現量は低下していない。

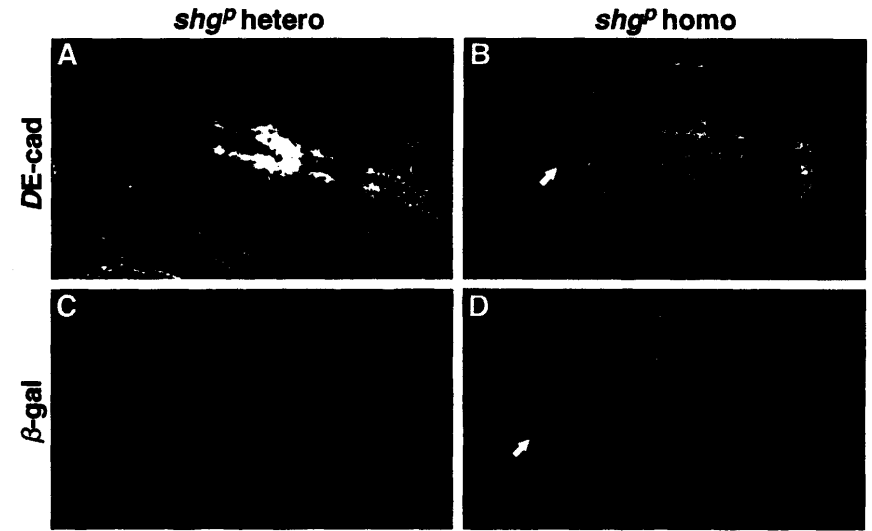


図2-8. 3令幼虫期のshg^Pホモ接合体の翅成虫原基

(A,C) shg^Pヘテロ接合体と(B,D)ホモ接合体の3令幼虫期の翅成虫原基を比較した。抗DE-カドヘリン抗体染色で、ホモ接合体のAWM領域に細胞境界が染色されない細胞群が見られる(B矢印)。これらの細胞は、DE-カドヘリン遺伝子のリポーターであるβ-galの発現レベルが低い細胞であることが分かる(D矢印)。ヘテロ接合体ではβ-galの発現レベルが低い領域でも、抗DE-カドヘリン抗体で染色されない細胞群はない(A,C)。ホモ接合体ではヘテロ接合体に較べてDE-カドヘリンのシグナルが弱い、写真AとBではシグナルの強さをそろえている。

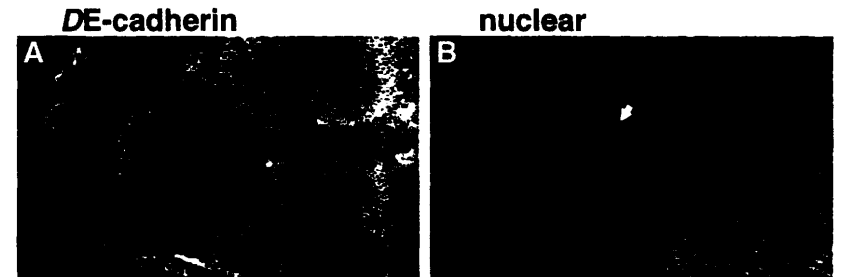


図2-9. 抗DE-カドヘリン抗体で染色されない細胞群の核位置の異常
shg^Pホモ接合体の翅成虫原基の(A)抗DE-カドヘリン抗体染色と(B)核染色。抗DE-カドヘリン抗体染色で染色されない細胞群(A矢印)の核は、周囲の細胞に較べて密度が粗になっている(B矢印)。また、この写真では示されていないが、この細胞群の核は周囲の細胞に較べて、その位置が頂部へ偏っている。

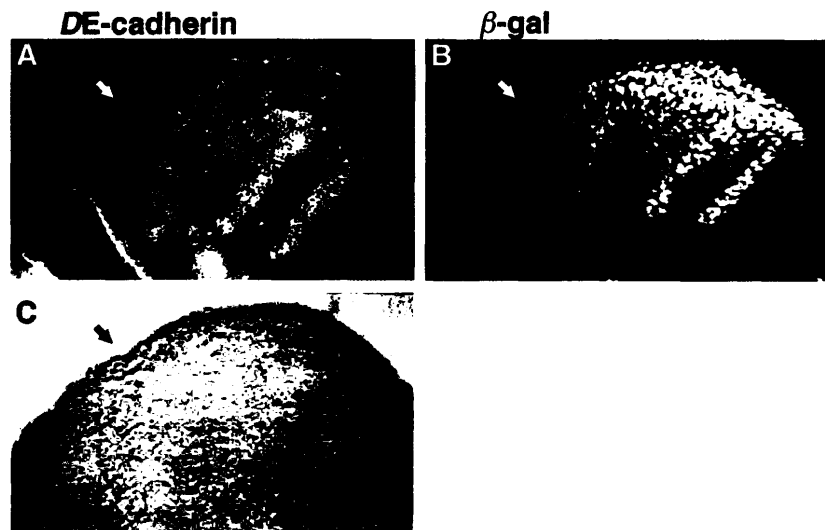


図2-10. 蛹化後4時間の shg^P ホモ接合体の翅成虫原基

(A) 抗DE-カドヘリン抗体染色 (B) 抗 β -gal抗体染色 (C) ノマルスキー顕微鏡写真。抗DE-カドヘリン抗体染色で細胞境界が染色されない細胞群 (A 矢印) は、DE-カドヘリン遺伝子のリポーターである β -galの発現レベルが低い細胞に一致している (B 矢印)。また、ノマルスキー顕微鏡写真では、それらの細胞の表面が凸凹していることが分かる (C 矢印)。

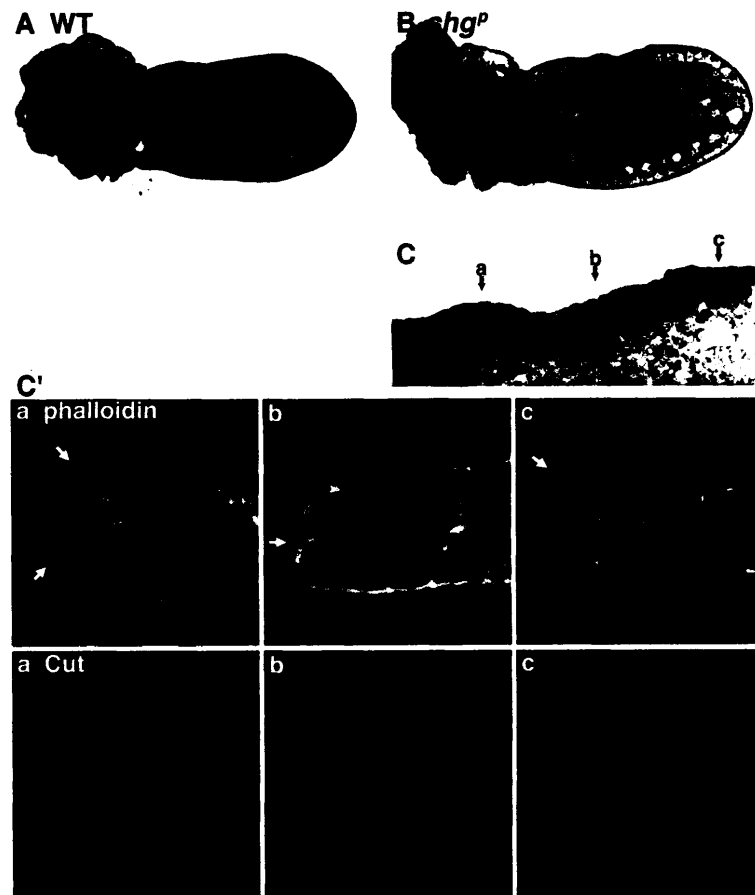


図2-11. 蛹化後7時間の shg^P ホモ接合体の翅成虫原基

(A) 野生型と (B, C) shg^P ホモ接合体の抗Cut抗体染色。野生型では翅成虫原基の一番外周を取り巻くWM細胞とその内側の化学感覚毛前駆細胞のシグナルが観察される (A)。それに対して、 shg^P ホモ接合体では翅前部の一部でWM細胞のシグナルがなくなっている (C)。(C')は(C)のa,b,cに対応すると思われる位置の凍結切片。上段がファロイジンによるF-actinの染色、下段が抗Cut抗体染色。aの位置ではCut陽性のWM細胞の両側に隙間があり (C' a 矢印)、その周囲の細胞も凸凹している。bの位置ではCut陽性のWM細胞がなく、化学感覚毛前駆細胞のシグナルのみ認められる。cの位置は正常と思われる。(A,B,C)では写真上方が翅前方。(C')では左が翅前方。



図2-12. 蛹化40時間後に観察される褐色の細胞塊

蛹化40時間後になると、*shg*⁺ホモ接合体で特異的に、翅の前部に褐色の細胞塊が観察される(矢印)。この褐色の細胞塊は蛹期に分泌されるpupal cuticleに付いており、羽化の際にはずれ、成虫の翅には残らない。

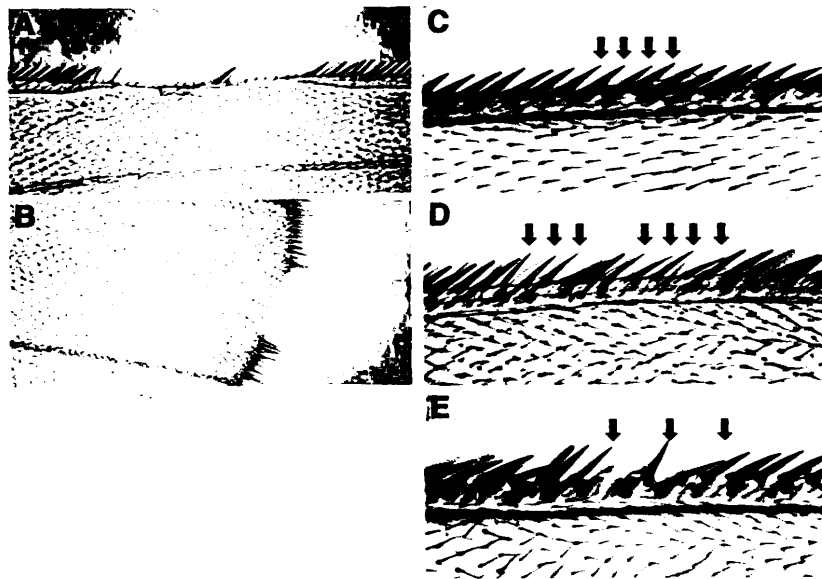


図2-13. *shg*変異体を用いたモザイク解析

(A, B) 比較的大きなDE-カドヘリン喪失クローンが生じた場合と、(C, D, E) 小さなDE-カドヘリン喪失クローンが生じた場合。(A, B) の場合、DE-カドヘリン喪失細胞は成虫の翅まで残らない。クローンが小さい場合は、DE-カドヘリンを喪失している細胞(C, D, E 矢印、色の薄い毛)が観察される。(C, D) では異常は見られないが、少し大きなクローンの(E) では感覚毛の欠損や乱れが見られる。

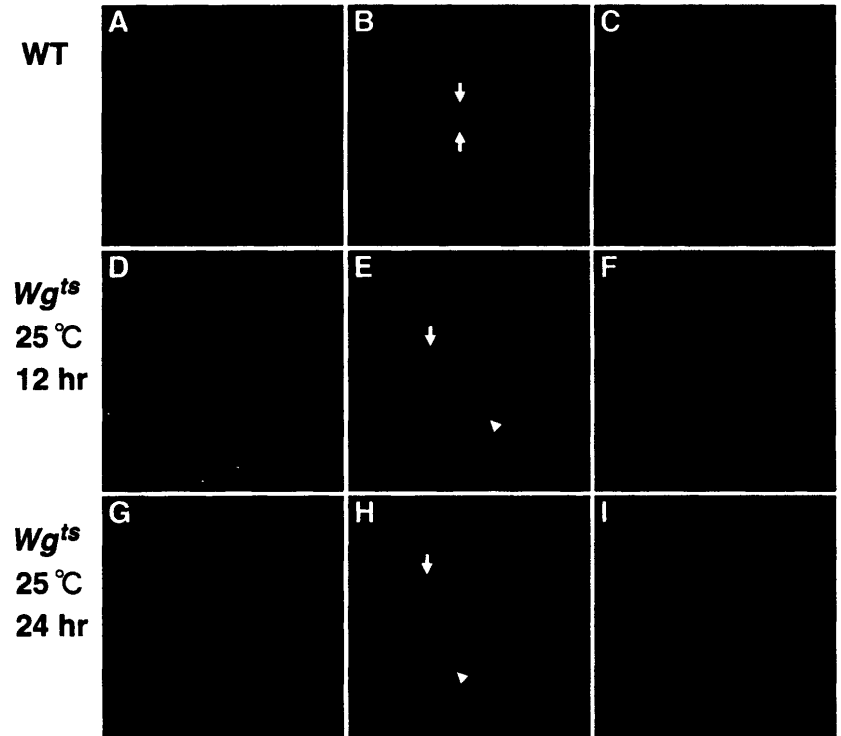


図2-14. *wg*温度感受性変異体を用いてWgシグナルを不活化した時のDE-カドヘリンの発現パターンの変化

(A, B, C) *shg*⁺ / +、(D, E, F) *wg*^{ts} *shg*⁺ / *wg*^{ts} 制限温度下12時間、(G, H, I) *wg*^{ts} *shg*⁺ / *wg*^{ts} 制限温度下24時間。DE-カドヘリン遺伝子のリポーター-β-galのWM両側の二本線の強い発現(B 矢印)は、制限温度下12時間ですでに減少が見られ一本線となっている(E 矢印)。制限温度下24時間後ではさらにその発現レベルは低下し、弱い一本線の発現がわずかに残る(H 矢印)。しかし、Wgシグナルに関係ないと考えられる翅脈の前駆細胞や神経前駆細胞での発現は変化をうけていない(E, H 矢印)。Cutのシグナルも同様に12時間後から減少を始め(F)、24時間後ではWM付近の発現は完全になくなっていく(I)。

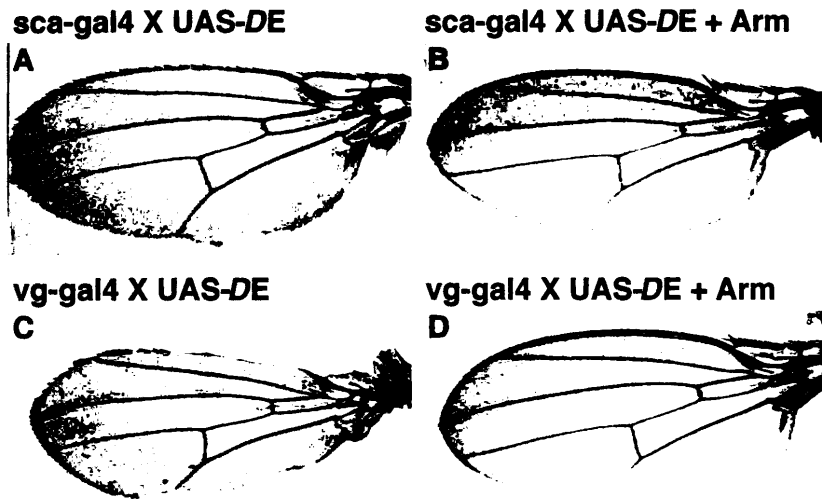


図2-15. DE-カドヘリンの過剰発現による翅の表現型

(A, B) *sca-GAL4*と (C, D) *vg-GAL4*を用いて、(A, C) DE-カドヘリンのみ、または (B, D) DE-カドヘリンとArmを同時に過剰発現した時の翅の表現型。*sca-GAL4*でDE-カドヘリンのみを過剰発現させた場合、WMの機械感覚毛の減少が目立つ (A)。*vg-GAL4*を用いた場合は、WMが大きく欠ける (B)。どちらのGAL4系統を用いた場合も、Armを同時に過剰発現することで表現型はレスキューされた (B, D)。

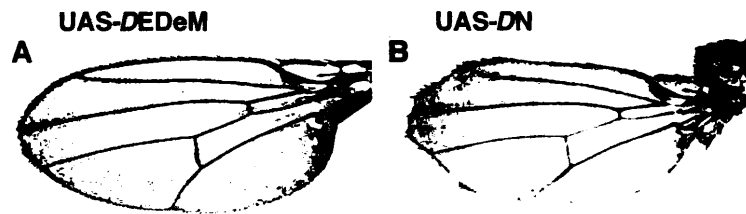


図2-16.

*sca-GAL4*を用いて、DE-カドヘリンの細胞外領域を大きく欠き接着活性を持たない分子DEDeM (A)とDN-カドヘリン (B)を過剰発現した時の翅の表現型。どちらの場合もDE-カドヘリンを過剰発現したときと同様に、WMの感覚毛の減少が観察される。

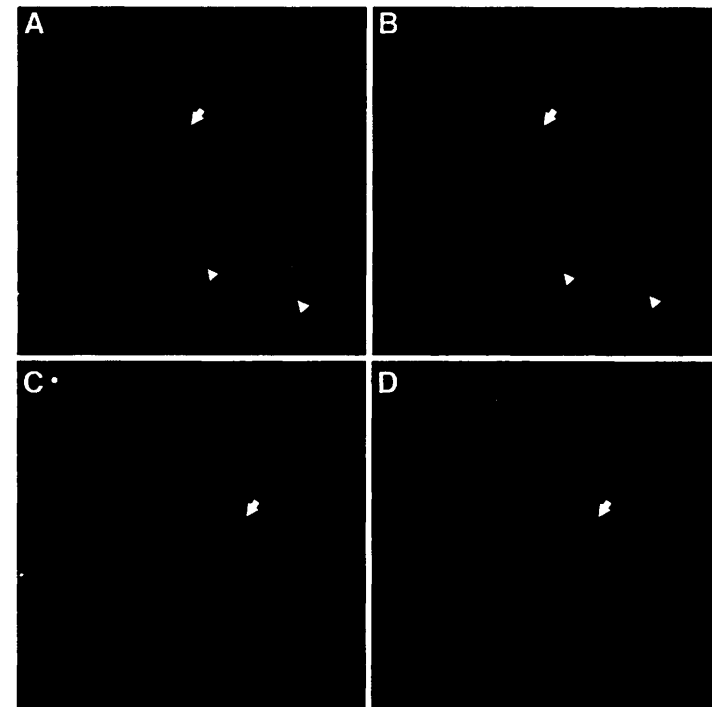


図2-17. DE-カドヘリンの過剰発現によるVestigialの発現の抑制

(A, C 赤) 抗DE-カドヘリン抗体染色、(緑) 抗Vg抗体染色。DE-カドヘリンを過剰発現している細胞では、細胞自律的にWgシグナル標的遺伝子Vgの発現レベルが非常に低くなっていることが分かる (C, D 矢印)。また、普段Vgを発現していない領域で、DE-カドヘリン過剰発現細胞の周囲にVgが異所的に発現しているのが観察される (A, B 矢尻)。このVg異所的発現のメカニズムについては現在のところ不明である。

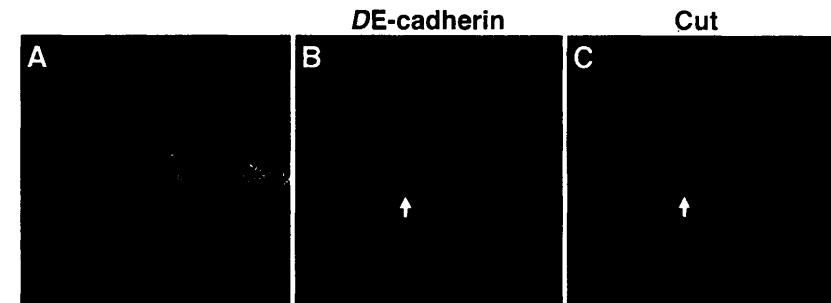


図2-20. DE-カドヘリン喪失細胞のCut発現レベルは変化しない

(B) 抗DE-カドヘリン抗体染色、(C) 抗Cut抗体染色。DE-カドヘリン喪失細胞と周囲の正常な細胞を較べても、Cutの発現レベルに変化はない。

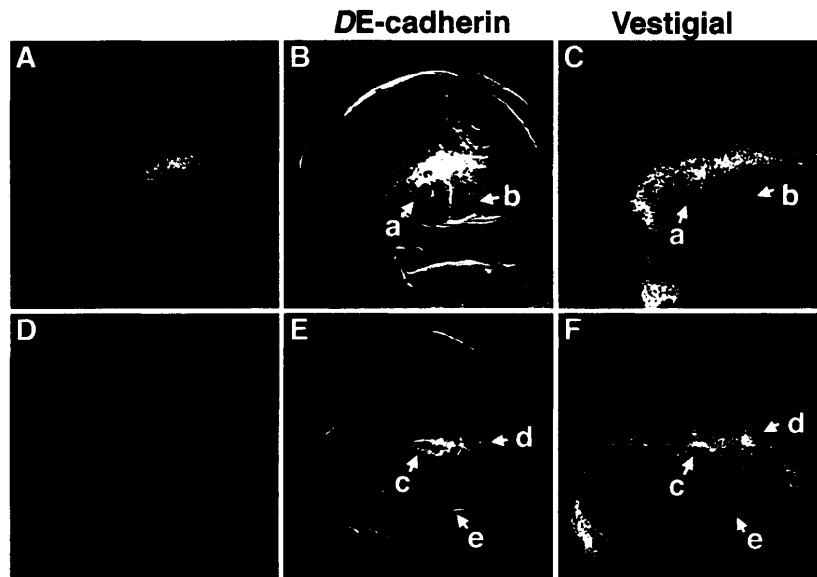


図2-18. DE-カドヘリンの喪失によるVestigialの発現量の増加

(B, D) 抗DE-カドヘリン抗体染色、(C, F) 抗Vg抗体染色。(A, D) はそれぞれBとC、DとFの重ね合わせ。DE-カドヘリン (赤)、Vg (緑)。異なる二つの翅成虫原基を示す (A, B, CとD, E, F)。DE-カドヘリン喪失細胞は、抗DE-カドヘリン抗体染色で染色されない細胞群として、周囲の正常細胞と区別できる (B, E 矢印 a~e)。これらのDE-カドヘリン喪失クローンのうち、WM近傍のクローンではVgの発現レベルが増加していることが分かる (C 矢印 a, D 矢印 c,d)。WMから離れたところに生じたクローンでは、Vgの発現レベルに変化はみられなかった (C 矢印 b, D 矢印 e)。

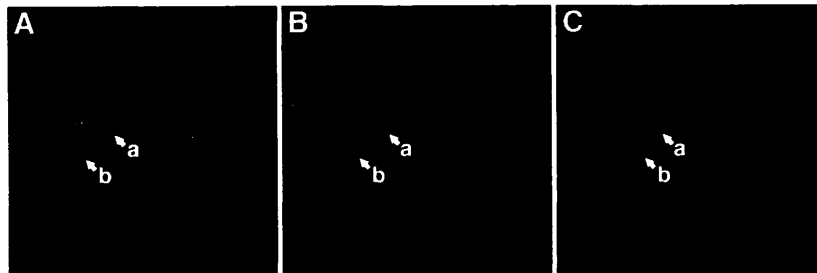
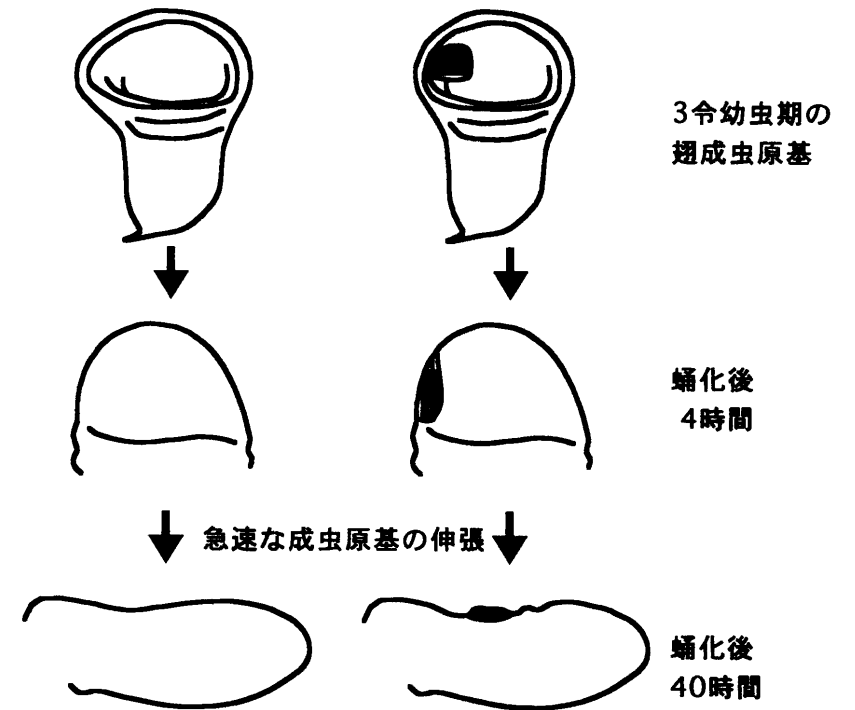


図2-19. DE-カドヘリン喪失細胞のMycマーカーによる検出

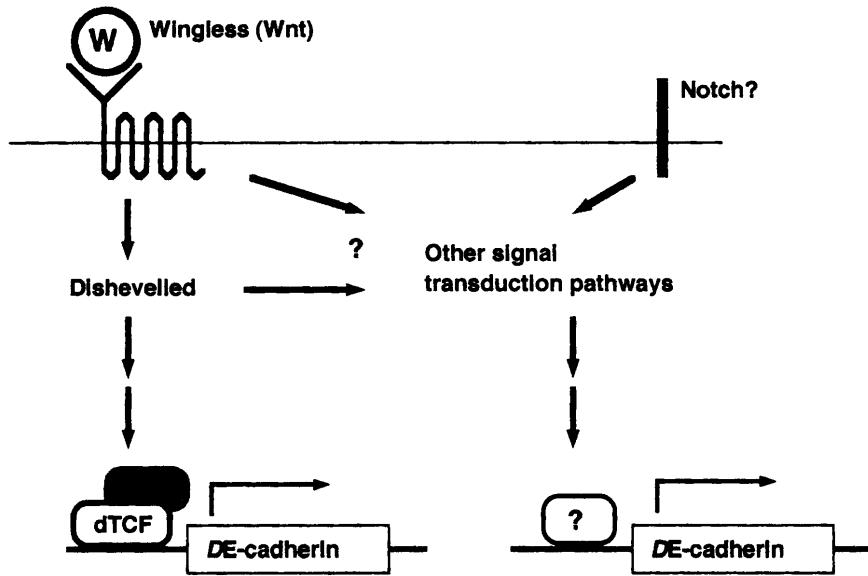
(B) 抗Myc抗体染色、(C) 抗Vg抗体染色。(A) はBとCの重ね合わせ。DE-カドヘリン喪失細胞は、抗Myc抗体染色で染色されない細胞群として周囲の正常細胞と区別できる (B 矢印 a,b)。原理は方法2-4-9を参照。この方法でも図2-18と同様に、WM近傍のDE-カドヘリン喪失細胞ではVgの発現レベルが増加し (C 矢印 a)、WMから離れたところに生じたクローンでは、Vgの発現レベルに変化はみられなかった (C 矢印 b)。

図2-21. *shgP* ホモ接合体の翅の表現型の解釈



P因子の挿入によりDE-カドヘリンの発現量が低下し、正常な翅発生においても発現量の少なかった領域 (上図、赤色領域) の細胞は、正常な細胞接着を行うことが出来なくなる。そして、蛹期の成虫原基の急速な伸張の際に、DE-カドヘリンの不足により細胞接着の弱くなった細胞は、周囲の正常な細胞の動きについていくことが出来ず、最終的に剥がれ落ちてしまう。

図2-22. Wgシグナルによる
DE-カドヘリンの発現誘導モデル



モデル1・直接的な
DE-カドヘリンの発現誘導

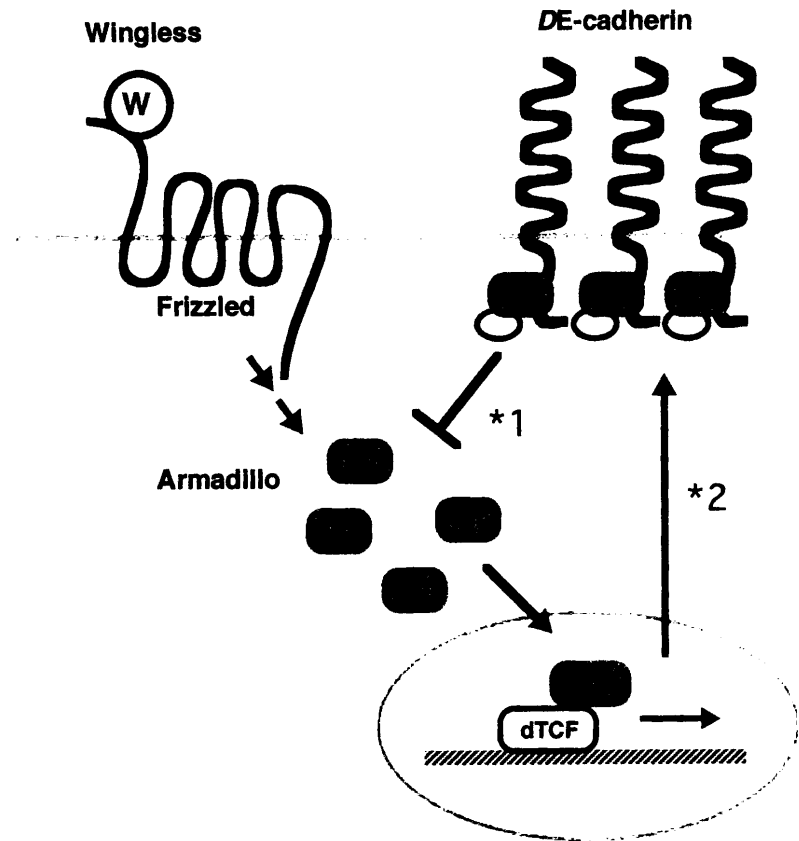
DE-カドヘリン遺伝子の転写調節領域にdTCFの結合領域があり、Armにより直接転写誘導を受ける。

モデル2・間接的な
DE-カドヘリンの発現誘導

Wgシグナルが相互作用するシグナル伝達経路により、DE-カドヘリンの発現が誘導される。その候補として、Notchシグナル伝達経路が考えられる(2-3-2.)。

モデル3・DE-カドヘリンの直接的な発現誘導と、間接的な発現誘導が同時に平行して起きている。

図2-23. カドヘリンを介したWgシグナル伝達の
ネガティブフィードバック・モデル



*1) DE-カドヘリン分子の増加は、WgシグナルによるArmの細胞質プールの増加を抑える。

*2) WgシグナルによるDE-カドヘリンの発現誘導は直接的と間接的が考えられる(図2-22)。