

頑健な組織形態形成を支える分子基盤の
遺伝学的解析

和田弥生

目次

| | |
|---|----|
| 要旨 | 03 |
| 略語表 | 04 |
| 第一章 序論 | 06 |
| 1.1. リボソームタンパク質遺伝子のヘテロ変異による発生異常 | 06 |
| 1.2. ショウジョウバエ <i>Minute</i> 変異体 | 07 |
| 1.3. 組織発生を制御する Hippo シグナル伝達経路 | 07 |
| 1.4. カスパーゼ依存的細胞死とアポトーシス阻害因子 | 08 |
| 1.5. ストレス応答時に活性化する JNK シグナル伝達経路 | 11 |
| 1.6. 本研究の意義 | 13 |
| 第二章 実験材料と実験方法 | 14 |
| 2.1. ショウジョウバエ系統 | 14 |
| 2.2. 遺伝学的スクリーニング | 14 |
| 2.3. 免疫化学染色 | 15 |
| 2.4. データの定量化 | 16 |
| 2.4.1. 成虫翅の面積測定 | 16 |
| 2.4.2. 死細胞/増殖細胞の定量比較 | 17 |
| 2.4.3. 翅原基における JNK シグナル活性の定量比較 | 17 |
| 2.4.4. 翅原基における DIAP1 発現レベルの定量比較 | 17 |
| 2.5. 統計解析 | 18 |
| 2.6. RT-qPCR | 18 |
| 2.7. 遺伝子型 | 19 |
| 第三章 結果 | 23 |
| 3.1. <i>Yki</i> はショウジョウバエ <i>Minute</i> 変異体の正常な翅発生に必要である | 23 |
| 3.2. <i>yki</i> ⁺ , <i>RpS3</i> ⁺ 変異体は翅原基における異所性細胞死によって発生異常を 起こす | 26 |
| 3.3. <i>yki</i> ⁺ , <i>RpS3</i> ⁺ 変異体は翅原基における JNK シグナル活性の上昇によって 異所性細胞死を引き起こす | 29 |
| 3.4. <i>yki</i> ⁺ , <i>RpS3</i> ⁺ 変異体の翅原基において DIAP1 の発現が下方制御される | 34 |
| 3.5. <i>yki</i> ⁺ , <i>RpS3</i> ⁺ 変異体の翅の形態異常は <i>diap1</i> の下方制御に起因する | 37 |
| 第四章 考察 | 40 |
| 4.1. 頑健な組織発生の制御因子としての <i>Yki</i> の位置付け | 40 |
| 4.2. 組織の形態を制御する JNK シグナル活性 | 40 |

| | |
|------------------------------------|----|
| 4.3. リボソームタンパク質遺伝子のヘテロ接合性と表現型..... | 41 |
| 4.4. 翅の表現型についての考察 | 45 |
| 参考文献 | 47 |
| 謝辞 | 54 |

要旨

個体発生は、環境変化や遺伝子変異、物理的損傷等の攪乱の存在下でも常に決まった形態の組織・器官を構築する、頑健なシステムである。しかし一方で、リボソームタンパク質遺伝子のヘテロ変異は、ダイヤモンド・ブラックファン貧血や孤発性先天性無脾症といった重度の発生異常を引き起こす。リボソームタンパク質遺伝子の量が半減した際にヒト発生異常が引き起こされる分子機構については、未だ不明な点が多い。興味深いことに、ショウジョウバエのリボソームタンパク質遺伝子ヘテロ変異体 (*Minute* 変異体と総称される) は、発生遅延や成虫剛毛の縮小が見られるものの、概して野生型と同様の形態の組織・器官を形成する。このことから、*Minute* 変異体はリボソームタンパク質遺伝子のヘテロ変異によって生じ得る発生異常を何らかの仕組みにより抑え込んでいると考えられる。そこで本研究では、*Minute* 変異体での組織発生を解析することで、個体発生において頑健な形態形成を支える分子基盤の解明に迫った。まず初めに、*Minute* 変異体が正常な形態形成を行うために必要な因子を遺伝学的に探索したところ、がん抑制経路 Hippo 経路の転写共役因子 Yki の遺伝子量がショウジョウバエ全身で 1 コピー欠損すると、*Minute* 変異体の翅に重度の形態形成異常が起こることがわかった。この結果は、*Minute* 変異体の正常な翅形成に Yki 活性が重要であることを示している。さらなる遺伝学的解析の結果、リボソームタンパク質遺伝子の一つ *RpS3* と *yki* の二重ヘテロ変異体 (*yki/+*, *RpS3/+*) の翅の形態形成異常は、幼虫期の翅原基における Eiger/TNF シグナルを介した c-Jun N-terminal kinase (JNK) 依存的細胞死の亢進に起因することがわかった。また、この JNK シグナルの活性化には、開始型カスパーゼである Dronc が必要であることが明らかになった。さらに、*yki* 遺伝子のコピー数を半減させると、翅原基において Yki の標的遺伝子 DIAP1 の発現レベルが低下することがわかった。DIAP1 はカスパーゼを不活性化するタンパク質であることから、DIAP1 の発現レベル低下によって Dronc 活性が上昇すると考えられた。さらなる解析により、Dronc と JNK は正のフィードバックを形成し、JNK 活性化により増幅された Dronc 活性が大量の細胞死を誘導することで翅の形態形成異常が引き起こされることがわかった。以上から、*Minute* 変異体の翅原基では JNK シグナルの活性化を Yki およびその標的遺伝子である DIAP1 が抑え込むことで、正常な形態形成が実現されていると考えられた。本研究により、Hippo 経路や Yki の活性が個体発生において頑健な組織形態形成を支える重要な因子として機能している可能性が示唆された。

略語表

AP-1; Activator Protein-1
BIR; *Baculoviral IAP Repeat*
BIRC5; *Baculoviral IAP Repeat Containing 5*
bsk; *basket*
Casp3; cleaved caspase-3
CARD; Caspase Recruitment Domain
cDcp-1; cleaved Drosophila Dcp-1
ci; *cubitus interruptus*
CRH; *Corticotropin-Releasing Hormone*
CTGF; *Connective Tissue Growth Factor*
CYR61; *Cysteine-rich angiogenic inducer 61*
DAPI; 4',6-diamidino-2-phenylindole
Dcp-1; Death caspase-1
DIAP1; Drosophila Inhibitor of Apoptosis Protein 1
Dcr2; Dicer.2
DN; Dominant Negative
Drice; Death related ICE-like caspase
Dronc; Death regulator Nedd2-like caspase
egr; *eiger*
en; *engrailed*
GFP; Green Fluorescent Protein
Grnd; Grindelwald
hep; *hemipterous*
hid; *head involution defective*
Hpo; Hippo
IAP; Inhibitor of Apoptosis Protein
IR; Inverted Repeat
JNK; c-Jun-N-terminal-kinase
Jra; Jun-related antigen
Kay; Kayak
MAPK; mitogen-activated protein kinase
Mats; Mob1 as tumor suppressor
Mdm2; Murine double minute 2

Mob; Mps1-binder-related
Msn; Misshapen
MMP; Matrix Metalloproteinase
mmp1; *matrix metalloproteinase 1*
MST; Mammalian STE20-like Protein Kinase
nub; *nubbin*
PH3; phospho histon H3
ptc; *patched*
Puc; Puckered
RNAi; RNA interference
ROS; Reactive oxygen species
RpL; Ribosomal protein Large subunit
RpS; Ribosomal protein Small subunit
rpr; *reaper*
rRNA; ribosomal RNA
RT-qPCR; Reverse Transcriptional-quantitative Polymerase Chain Reaction
Sd; Scalloped
TAB; TGF-Beta Activated Kinase 1 (MAP3K7) Binding Protein
TAZ; Transcriptional coactivator with PDZ-binding motif
th; *thread*
TNF; Tumor-Necrosis Factor
TNFR; Tumor-Necrosis Factor Receptor
TRAF; TNF receptor associated factor
TRE; tetradecanoylphorbol acetate response element
UAS; Upstream Activating Element
Wgn; Wengen
Wg; Wingless
wt; *wild-type*
Wts; Warts
YAP; Yes-Associated Protein
Yki; Yorkie

第一章 序論

1.1. リボソームタンパク質遺伝子のヘテロ変異による発生異常

動物の発生は、温度や湿度といった環境変化、遺伝子の突然変異、物理的損傷といった内的・外的攪乱に対して頑健であり、常に決まった形態を有する組織・器官を形成し、生じてくる個体は一定の表現型を示す。ところが、ヒトにおいてリボソームタンパク質遺伝子のヘテロ変異が存在すると、頑健な形態形成が破綻することが知られている。

リボソームタンパク質はリボソーム RNA (rRNA) とともにリボソームを構成し、タンパク質合成を行うことで生命維持の中心的な役割を果たしている。真核生物のリボソームは 18S rRNA と 33 種のリボソームタンパク質から成る小 40S サブユニットと、28S rRNA、5S rRNA、5.8S rRNA、そして 47 種のリボソームタンパク質から成る大 60S サブユニットとの複合体である。リボソームタンパク質遺伝子にヘテロ変異が入ると、リボソーム生合成、そしてタンパク質合成の過程が損傷を受けると考えられる。1999 年にダイヤモンド・ブラックファン貧血の患者において *RPS19* をコードする遺伝子のヘテロ変異が発見されて以来、今日に至るまで様々なリボソームタンパク質遺伝子のヘテロ変異が発生異常の原因遺伝子として同定されてきた (Draptchinskaia et al., 1999)。一連の疾患はリボソーム病と称される。これまでに、*RPS19* のほか *RPS17* (Cmejla et al., 2007) や *RPS26* (Doherty et al., 2010)、*RPS27* (Wang, R. et al., 2015) を含む 19 種類のリボソームタンパク質遺伝子のヘテロ変異がダイヤモンド・ブラックファン貧血の原因遺伝子として同定されている (Aspesi and Ellis, 2019)。また、*RPS14* のヘテロ変異は 5q-症候群の原因遺伝子として (Ebert et al., 2008)、*RPSA* のヘテロ変異は孤発性先天性無脾症の原因遺伝子として同定されている (Bolze et al., 2013)。これらの疾患は共通して骨髄機能不全による貧血症状を呈するが、とりわけダイヤモンド・ブラックファン貧血患者においては低身長や、上肢、頭部、顔部の奇形など骨格形成異常、場合によっては腎泌尿器系の奇形や先天性心疾患も認められる。こうした組織・器官形成の異常はヒトだけでなくマウスにおいても報告されている。例えば、*RPL24*/+変異体は腹部の白斑や指や眼、尻尾の形態異常を示し (Oliver et al., 2004)、*RPL38*/+変異体は指や体軸骨格の形態異常 (Kondrashov et al., 2011)、*RPS19*/+変異体や *RPS20*/+変異体は体色の暗化 (McGowan et al., 2008)、*RPS7*/+変異体は眼や尻尾、体軸骨格の形態異常を示す (Watkins-Chow et al., 2013)。このように、リボソームタンパク質遺伝子の遺伝子量が減少すると組織・器官の形態形成に異常が生じる。しかしながら、どのようにして発生異常が起こるのか、その分子機構については不明な点が多い。

1.2. ショウジョウバエ *Minute* 変異体

ショウジョウバエにおいて、リボソームタンパク質遺伝子にヘテロ変異を有する一連の変異体は *Minute* と称される。*Minute* 変異体はホモ接合体で致死性を示し、野生型よりも成虫の剛毛が細く、発生遅延（幼虫期や蛹期の延長）を示す (Brehme, 1939; Kongsuwan et al., 1985; Marygold et al., 2007)。重要なことに、*Minute* 変異体は本質的には野生型と同様の組織をもって正常に発生し子孫を残す。このことは、リボソームタンパク質遺伝子量の減少によって生じる発生異常が、*Minute* 変異体では何らかの分子機構によって抑制されていることを示唆している。そこで本研究では、この *Minute* 変異体がいかにして正常に発生し得るのかを調べることで、リボソームタンパク質遺伝子量の減少によって引き起こされる発生異常の分子機構の解明に迫ろうと考えた。

1.3. 組織発生を制御する Hippo シグナル伝達経路

個体発生において、組織成長を制御する重要なシグナル伝達経路の一つとして Hippo シグナル伝達経路がある。Hippo 経路はショウジョウバエから哺乳類まで進化的に保存された経路であり、がん抑制経路としても知られている (Davis and Tapon, 2019; Moya and Halder, 2018)。Hippo 経路は最終的に転写因子の活性を制御するリン酸化カスケードである (図 1)。ショウジョウバエを例にとると、Hippo 経路は主に Ste-20 ファミリーのセリン/スレオニンキナーゼ Hippo (Hpo; 哺乳類 MST1/2 のホモログ)、NDR ファミリーキナーゼ Warts (Wts; 哺乳類 LATS1/2 のホモログ)、転写共役因子 Yorkie (Yki; 哺乳類 YAP/TAZ 複合体のホモログ) の三つから構成される。Hpo (MST1/2) や Wts (LATS1/2) はそれぞれ、アダプタータンパク質 Salvador (Sav; 哺乳類 Sav1 のホモログ) や足場タンパク質 Mob1 as tumor suppressor (Mats; 哺乳類 MOB1A/B のホモログ) と結合して働く。Hippo 経路が活性化されると Hpo (MST1/2) が Wts (LATS1/2) をリン酸化して活性化し、Yki (YAP/TAZ) をリン酸化する。リン酸化された Yki (YAP/TAZ) は 14-3-3 タンパク質と結合し、細胞質中に留められる。細胞質から核内への移行抑制と同時に細胞質に集積した Yki (YAP/TAZ) の細胞質への移行の促進が起こる。一方、Hippo 経路が不活性化されるとリン酸化カスケードが動かないため、Yki (YAP/TAZ) はリン酸化を免れ核内へ移行する。核内に移行した Yki (YAP/TAZ) は、TEA ドメイン転写因子 Scalloped (Sd; 哺乳類 TEAD1/2/3/4 のホモログ) を介して標的遺伝子の DNA 配列に結合し、転写を促進する。標的遺伝子には細胞成長や細胞増殖、幹細胞分化、組織構築に関わる遺伝子が含まれる。ショウジョウバエでは細胞増殖因子やがん原遺伝子として知られる *dMyc* (哺乳類 *MYC* のホモログ) や、細胞周期・細胞増殖を制御する *cyclinE* (*cycE*)、*e2f1*、また細胞死を抑制する *Drosophila inhibitor of apoptosis protein 1* (*diap1*) が挙げられる。哺乳類で

は、増殖因子の *Connective Tissue Growth Factor (CTGF)* や血管新生に重要な *Cysteine-rich angiogenic inducer 61 (CYR61)*、細胞死を抑制する *Baculoviral IAP Repeat Containing 5 (BIRC5)* が挙げられる。このように、Hippo 経路は Yki (YAP/TAZ) の活性を介して細胞増殖や細胞死、組織成長に関わる因子の発現を調節し、組織・器官の正常発生を制御している。

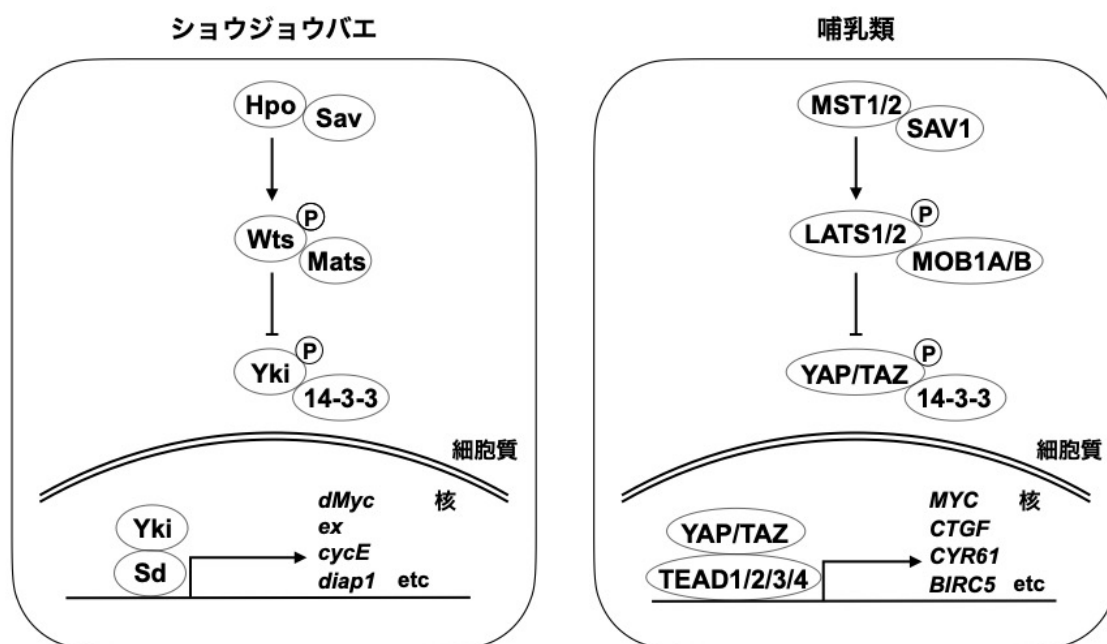


図 1. Hippo シグナル伝達経路

ショウジョウバエと哺乳類における Hippo シグナル伝達経路を示す。それぞれ Hpo、Wts、Yki、あるいは MST1/2、LATS1/2、YAP/TAZ を中心としたリン酸化カスケードから成る。リン酸化を免れた Yki あるいは YAP/TAZ は核内に移行し、DNA 結合因子 Sd あるいは TEAD1/2/3/4 を介して標的遺伝子の DNA 配列に結合し、その転写を促進する。それぞれの代表的な標的遺伝子を図中に示す。

1.4. カスパーゼ依存的細胞死とアポトーシス阻害因子

先述した DIAP1 や BIRC5 は、各種カスパーゼを不活性化することで細胞死を抑制する (T. Hellwig et al., 2011)。カスパーゼとは活性部位にシステイン残基をもつ一群のシステインプロテアーゼであり、細胞死を誘導するシグナル伝達経路を構成する。カスパーゼ依存的細胞死はアポトーシスと呼ばれ、DNA 損傷や小胞体ストレス、酸化ストレス、有糸分裂中の細胞不良といった内的刺激や、細胞膜受容体を介する外的刺激によって誘導される。カスパーゼは開始型カスパーゼと実行型カスパーゼに大別される。哺乳類の開始型カスパーゼとして Caspase-2/8/9/10、実行型カスパーゼとして Caspase-3/6/7 が知られている。一方、ショウジョウバエの開始型カスパーゼとしては Dronc (哺乳類 Caspase-9 のホモ

ログ)、実行型カスパーゼとして Drice や Dcp-1 (哺乳類 Caspase-3/6/7 のホモログ) がよく研究されている。開始型カスパーゼは Caspase Recruitment Domain (CARD) と酵素活性に必要な大サブユニット、小サブユニットを持つ (図 2A) (T. Hellwig et al., 2011)。Dronc (Caspase-9) は二量化して Dark (哺乳類 Apaf-1 のホモログ) を含むタンパク質複合体 (アポトソームと呼ばれる) に取り込まれ、活性化される。このとき CARD を介して開始型カスパーゼと Dark (Apaf-1) が相互作用する。Dronc (Caspase-9) が活性化されると、Drice や Dcp-1 (Caspase-3) が切断、活性化され、細胞内の標的タンパク質を分解することで細胞死が実行される (図 2B) (Berthelet and Dubrez, 2013)。

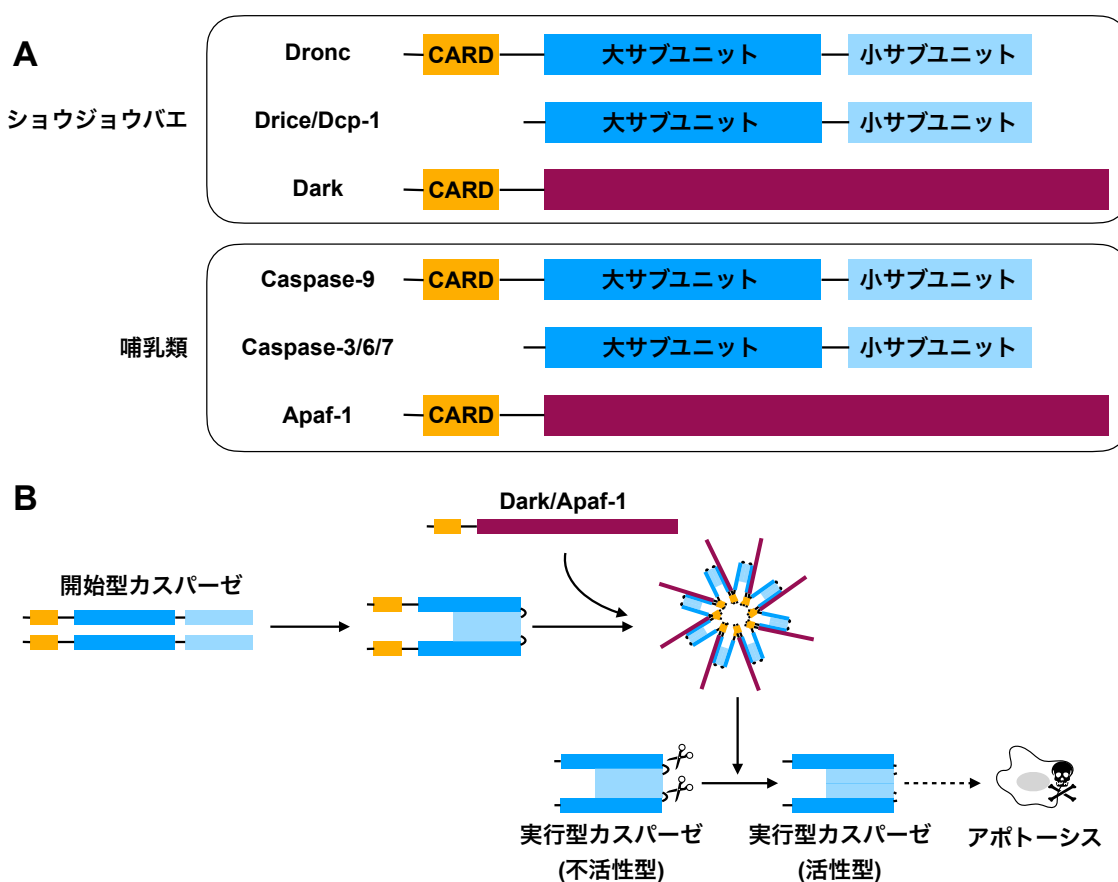


図 2. カスパーゼ依存的細胞死

(A) ショウジョウバエと哺乳類における代表的なカスパーゼと関連分子の構造を示す。Dronc, Caspase-9 (開始型カスパーゼ) と Dark, Apaf-1 は Caspase Recruitment Domain (CARD) を持つ。各種カスパーゼは酵素活性に必要な大サブユニットと小サブユニットを持つ。

(B) カスパーゼ依存的細胞死の発生機序を示す、Dronc (Caspase-9) は二量体を形成し Dark (Apaf-1) を含むタンパク質複合体アポトソームに取り込まれ活性化される。活性化された Dronc (Caspase-9) によって Drice/Dcp-1 (Caspase-3) が切断、活性化され、細胞内の標的タンパク質を分解することで細胞死が実行される。

これらカスパーゼは、アポトーシス阻害因子 (Inhibitor of Apoptosis Protein; IAP) による制御を受ける (図 3A)。IAP はカスパーゼとの相互作用に必要な baculovirus IAP repeat (BIR)ドメインを一つから三つ持ち、加えて E3 ユビキチンリガーゼとして働くものは RING ドメインを持つ (図 3B)。ユビキチン化反応は、まず E1 ユビキチン活性化酵素が ATP とともにユビキチンと結合し、ATP を消費してユビキチンを E2 ユビキチン結合酵素に受け渡すことから始まる。ユビキチンと結合した E2 ユビキチン結合酵素は基質と結合した E3 ユビキチンリガーゼと相互作用し、ユビキチンが基質へ転移することでユビキチン化が行われる (図 3C)。ショウジョウバエにおいては主に DIAP1 が、哺乳類では XIAP がよく研究されたアポトーシス阻害因子であり、Hippo 経路の標的遺伝子である BIRC5 もその一つである (Berthelet and Dubrez, 2013)。ショウジョウバエを例にとると、細胞死が誘導される時、DIAP1 は RING ドメインを介して自身をユビキチン化し、プロテアソーム分解へと導く。そのため、カスパーゼは阻害されることなくその活性を発揮する。一方、細胞死が抑制される時、DIAP1 は Dronc や Drice、Dcp1 をユビキチン化して分解して不活性化、あるいは分解せずに不活性化する (Bergmann, 2010; Ditzel et al., 2008; Lee et al., 2011)。

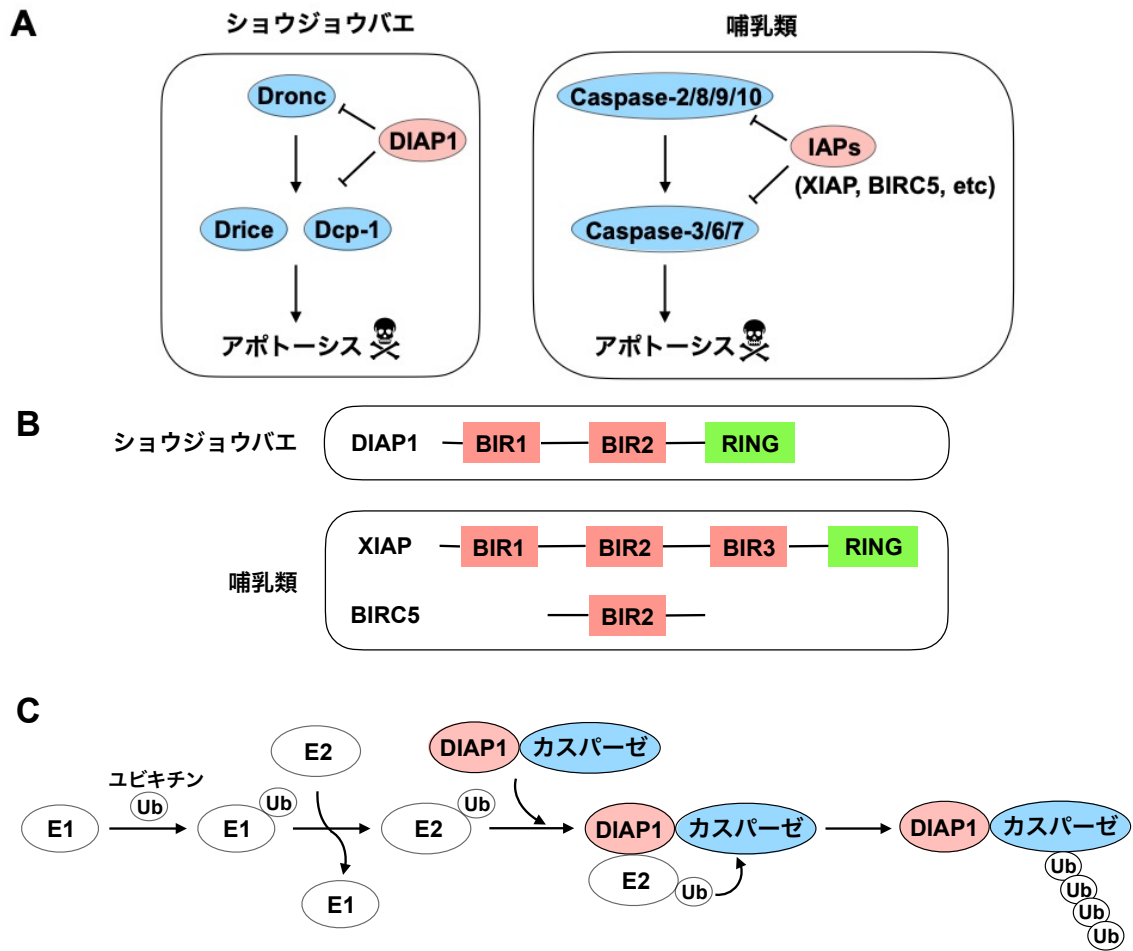


図 3. アポトーシス阻害因子 (IAPs) の構造と作用機序

(A) ショウジョウバエと哺乳類においてアポトーシス阻害因子 (IAPs) が各種カスパーゼの働きを阻害し、細胞死を抑制するモデル図を示す。

(B) ショウジョウバエと哺乳類における代表的な IAP の構造を示す。いずれもカスパーゼを認識する BIR ドメインを持つ。DIAP1 と XIAP は E3 ユビキチンリガーゼとしても機能するため RING ドメインをもつ。

(C) DIAP1 による各種カスパーゼのユビキチン化反応を示す。ユビキチン活性化酵素(E1)はユビキチンと結合し ATP を消費してユビキチン結合酵素 (E2) にユビキチンを受け渡す。カスパーゼと結合した DIAP1 (E3) が E2 を呼び込み、カスパーゼのユビキチン化を行う。

1.5. ストレス応答時に活性化する JNK シグナル伝達経路

細胞死を誘導するシグナル伝達経路の一つに、c-Jun N-terminal kinase (JNK) シグナル伝達経路が挙げられる。JNK シグナル経路は mitogen-activated protein kinase (MAPK) 経路の一つであり、Hippo 経路同様、リン酸化カスケードから成る進化的に保存された経路である (Igaki, 2009)。リン酸化カスケードを介して最終的に

Basket (Bsk; 哺乳類 JNK1/2/3 のホモログ) (Riesgo-Escovar et al., 1996) が転写因子をリン酸化し、標的遺伝子の転写を制御する。代表的な転写因子として Kayak (Kay; 哺乳類 FOS のホモログ) と Jun-related antigen (Jra; 哺乳類 JUN のホモログ) が挙げられる。FOS ファミリーと JUN ファミリーは Activator Protein-1 (AP-1) 複合体と呼ばれる二量体を形成し、標的遺伝子の DNA 配列に結合する (Perkins et al., 1990)。ショウジョウバエの標的遺伝子には細胞死を誘導する *head involution defective (hid)* や *reaper (rpr)*、*matrix metalloproteinase 1 (mmp1)*、Bsk を脱リン酸化し JNK シグナル活性を抑制する *puckered (puc)* が含まれる。また哺乳類においても、ストレス時の内分泌調節に働く *Corticotropin-Releasing Hormone (CRH)* や *MMPs*、*PUC* が含まれる。JNK をリン酸化する上流は多様であり、JNKK として Hemipterous (Hep) (Glise et al., 1995) と MAP kinase kinase 4 (Mkk4; 哺乳類 MKK4/7 のホモログ) (Wang et al., 1996)、JNKKK として dMEKK1 (哺乳類 MEKK1 のホモログ) (Ryabinina et al., 2006)、Slipper (Slp; 哺乳類 MLK のホモログ) (Polaski et al., 2006)、Wallenda (Wnd; 哺乳類 DLK のホモログ) (Ma et al., 2015)、dTAK1 (哺乳類 TAK1 のホモログ) (Mihaly et al., 2001)、Ask1 (哺乳類 ASK1 のホモログ) (Santabárbara-Ruiz et al., 2019) がある。JNKKK が活性化される方法は複数あるが、よく知られているのがリガンド Tumor-Necrosis Factor (TNF) の一つである Eiger (Egr) (Igaki et al., 2002) と、その受容体 Tumor-Necrosis Factor Receptor (TNFR) の一つである Grindelwald (Grnd) または Wengen (Wgn) (Andersen et al., 2015; Kanda et al., 2002) を介した活性化である。Egr が受容体に結合すると、TRAF4 や TRAF6、TAB2、Misshapen (Msn) を介して dTAK1 が活性化されることが知られる。他にも、JNKKK は発生プログラムによる内因性シグナルや染色体不安定による ROS 産生、極性損傷、低酸素などの外因性ストレス刺激によって活性化されることが報告されている。

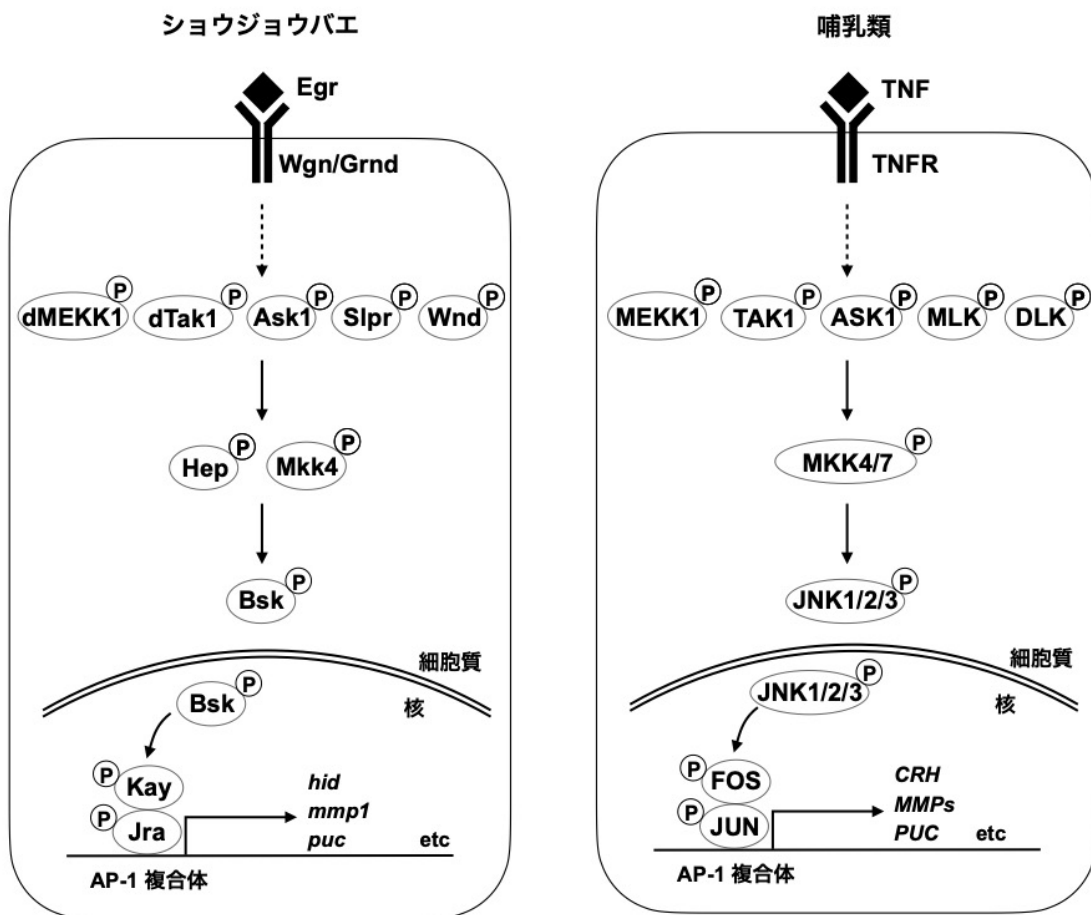


図 4. JNK シグナル伝達経路

ショウジョウバエと哺乳類における JNK シグナル伝達経路を示す。JNKKK や JNKK、JNK、転写因子によるリン酸化カスケードから成る。リン酸化された Kay と Jra、あるいは FOS と JUN ファミリータンパク質は AP-1 複合体を形成し、標的遺伝子の転写を制御する。それぞれの代表的な標的遺伝子を図中に示す。

1.6. 本研究とその意義

本研究は、ショウジョウバエ *Minute* 変異体の全身において *yki* の遺伝子が 1 コピー減少すると、翅の発生異常が起こることを発見し、その分子機構を明らかにした。*Minute* 変異体の翅原基において JNK シグナルが潜在的に活性化しており、JNK と *Dronc* による正のフィードバックによって大量の異所性細胞死が誘導され、発生異常が引き起こされ得る状態にあるが、*Yki* を介した *DIAP1* の発現によって細胞死とそれによる発生異常が抑制されていると考えられる。本研究によって、*Yki* 活性が異所性細胞死を抑制し、頑健な組織形成を成し遂げるという分子機構が提示された。

第二章 実験材料と実験方法

2.1. ショウジョウバエ系統

使用したショウジョウバエ系統とその由来は以下の通りである。

the Bloomington *Drosophila* stock center (BDSC): *RpS3^{Plac92}* (#5627), *RpS17⁴* (#6358), *TRE-dsRed* (#59012), *UAS-DIAP1* (#6657), *bsk¹* (#3088), *hep^{r75}* (#6761), *UAS-Dcr.2* (#24650), *UAS-Dcr.2* (#24651), *th⁴* (#5053), *puc^{E69}* (#6762)

the *Drosophila* Genomics and Genetic Resources: *RpS26^{KG00230}* (#114620), *M(3)96C²* (#101668), *M(2)39F¹* (#107282)

the National Institute of Genetics: *UAS-diap1 RNAi* (#12284R-2)

the Vienna *Drosophila* Resource Center: *UAS-Grnd RNAi* (#v43534), *UAS-Grnd RNAi* (#v104538), *UAS-yki RNAi* (#v104523)

yki^{B5} (Duoja Pan 博士より分与)、*egr¹* (三浦正幸博士より分与)、*UAS-CD8-PARP-Venus* (広海健博士より分与)、*UAS-Dronc^{DN}* (Sharad Kumar 博士より分与)、*UAS-Puc* (Enrique Martin-Blanco 博士より分与)、*nub-Gal4* (BDSC)、*ci-Gal4* (Robert Holmgren 博士より分与)、*en-Gal4* (倉永英里奈博士より分与)、*ptc-Gal4* (BDSC)、*UAS-RpS3* (Akai *et al.*, 2018 にて作製)、*UAS-GFP* (BDSC)、*dTak1¹* (Bruno Lemaitre 博士より分与)、*w¹¹¹⁸* (BDSC)。全てのショウジョウバエ系統はコーンミール、グルコース、酵母を含む標準的な試料のもと 25°C で飼育された。ただし図 10B-10C の実験は例外的に 18°C で交配・飼育された。野生型 (*wild-type*) として *w¹¹¹⁸* を用いた。

2.2. 遺伝学的スクリーニング

遺伝学的スクリーニングは、the Bloomington *Drosophila* stock center より入手した一連の 2 番および 3 番染色体欠失系統と、それらによってカバーされない領域にある突然変異系統 (合わせて 322 系統) を *RpS3/+* 変異体と交配させることで行われた。得られた F1 世代の成虫の表現型を観察し、組織に何らかの形態学的異常を示す変異系統を探索した (図 5)。このスクリーニングは大澤志津江博士によって行われた。

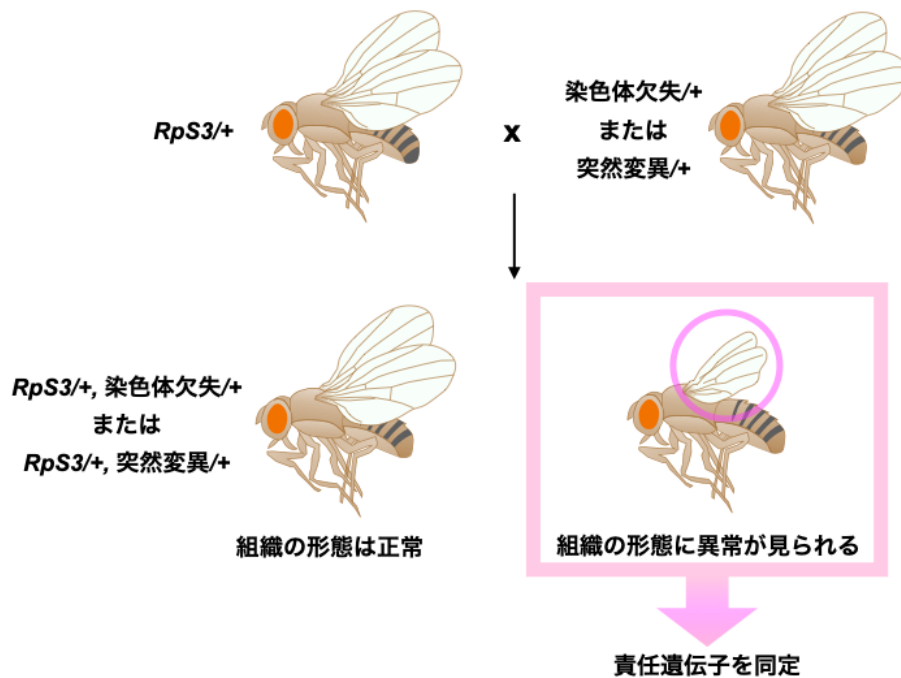


図 5. *RpS3/+*変異体の正常発生に必要な因子の遺伝学的探索

*RpS3/+*変異体と一連の 2 番あるいは 3 番染色体欠失系統、そして突然変異系統を交配させた。生まれてくる F1 世代の成虫を観察し、組織に何らかの形態学的異常を示す変異系統を探索し、その責任遺伝子の同定を試みた。

2.3. 免疫化学染色

幼虫組織の免疫化学染色は、彷徨している三齢幼虫を解剖することで行った。解剖した幼虫は 4% paraformaldehyde 溶液で 20 分間室温固定したのち、0.1% Triton X-100 溶液で 1 時間透過処理を施した。続いて 5% のロバ血清を含む 0.1% Triton X-100 溶液を用いて 1 時間ブロッキング処理 (非特異的結合の抑制) を行い、4°C で一晩一次抗体反応を行わせた。その後 0.1% Triton X-100 溶液で 30 分間×4 回洗浄し、再びブロッキング処理を施したのち室温で 2 時間二次抗体反応を行わせた。最後に 0.1% Triton X-100 溶液で 30 分間×4 回洗浄し、4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI)を含む SlowFade Gold Antifade Reagent (Invitrogen) を用いて封入した。

使用した一次抗体と二次抗体、それらの希釈倍率と提供元は以下の通りである。

一次抗体：

chicken anti- β -Galactosidase (1:1000; Abcam #9361)

mouse anti-DIAP1 (1:100 で 21 時間; Bruce Hay 博士より分与)

mouse anti-MMP1 (1:100; from 1:1:1 cocktail of 3A6B4, 3B8D12 and 5H7B11; DSHB)
mouse anti-phospho histon H3 (Ser10) (6G3) (1:100; Cell signaling #9706S)
mouse anti-Wg (1:500; DSHB)
rabbit anti-cleaved caspase-3 (D175) (1:100; Cell signaling #9661S)
rabbit anti-cleaved Drosophila Dcp-1 (Asp216) (1:100; Cell signaling #9578S)
rabbit anti-phospho histon H3 (Ser10) (1:100; Cell signaling #9701S)

二次抗体：

Alexa Fluor 488-, 546-, または 647-conjugated secondary antibodies (1:250; Invitrogen)
染色された幼虫組織の観察・撮影は共焦点顕微鏡 (TCS-SP5; Leica Microsystems
または LSM880 with Airyscan; Carl Zeiss) を用いて行った。

2.4. データの定量化

実験によって得られたデータは以下のように定量化した。

2.4.1. 成虫翅の面積測定

成虫翅の面積測定は各遺伝子型の雌を用いて行った。成虫翅は Leica FireCam software を搭載した Leica DFC 310 FX camera で倍率 4.0 倍のもと撮影された。そして成虫翅のブレード領域を NIH ImageJ software の polygon tool を用いて手動選択し、その面積を測定した (図 6A)。野生型 (w^{1118}) の翅面積の平均値を 1.0 としたときの相対値を各遺伝子型において算出した。各遺伝子型において相対値が 0.6 未満、0.7 未満、0.8 未満、0.9 未満、0.9 以上の割合をそれぞれ算出し、各図の棒グラフに図示した。参考のため、 $yki/+$, $RpS3/+$ 変異体において相対値がおおよそ 0.6、0.7、0.8、0.9、1.0 に相当する翅の写真を以下に示す (図 6B)。

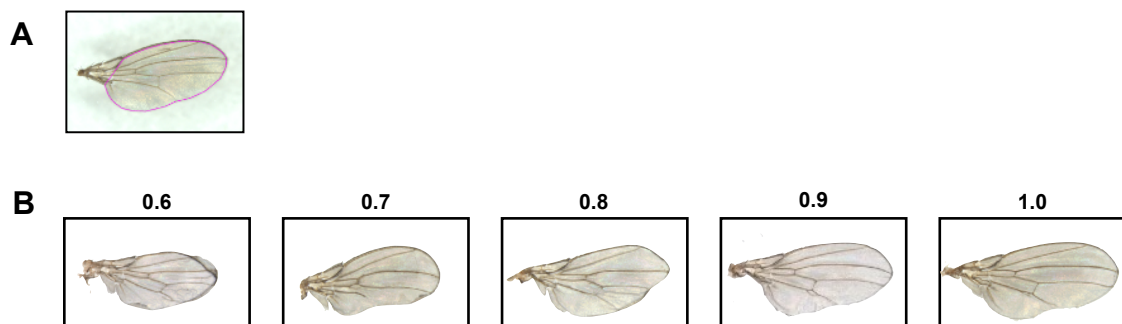


図 6. 成虫翅の面積測定

(A) ImageJ の polygon tool で手動選択されるブレード領域をマゼンタで示す。

(B) *yki*+, *RpS3*+変異体の成虫翅の中で、面積 (野生型の平均値に対する相対値) が 0.6、0.7、0.8、0.9、1.0 の翅を示す。

2.4.2. 死細胞/増殖細胞の定量比較

死細胞の検出には anti-cleaved *Drosophila* Dcp-1 抗体または anti-cleaved caspase-3 抗体を用いた。サンプル当たりシグナルが最も多く見える焦点面の単一画像を用いて死細胞の数を数えた。増殖細胞の検出には細胞分裂 M 期の細胞を標識する anti-phospho histon H3 抗体を用いた。焦点位置を変えて積み重ねた画像を用いて増殖細胞の数を数えた。Wg の共染色や GFP または CD8-PARP-Venus の *nub-Gal4* ドライバー下での発現、または DAPI 染色から pouch 領域を決定し、その領域内の死細胞/増殖細胞の数を NIH ImageJ software を用いて数えた。

2.4.3. 翅原基における JNK シグナル活性の定量比較

JNK シグナル活性の検出には、anti-MMP1 抗体や TRE-dsRed レポーター、*puc-lacZ* レポーターを用いた。TRE-dsRed は AP-1 複合体が結合する DNA 配列 (tetradecanoylphorbol acetate response element; TRE) を合成し、dsRed の基本プロモーター上流に挿入したものである (Chatterjee and Bohmann, 2012)。サンプル当たりシグナルが最も多く見える焦点面の単一画像を用いて MMP1 陽性細胞の数を数えた。GFP の *nub-Gal4* ドライバー下での発現または DAPI 染色から pouch 領域を決定した。TRE-dsRed レポーターまたは *puc-lacZ* レポーターのシグナル強度を評価する際も同様に、サンプル当たりシグナルが最も多く見える焦点面の単一画像を用いた。DAPI 染色から pouch 領域を決定し、その領域内の平均蛍光強度と周囲の hinge 領域内の平均蛍光強度を NIH ImageJ software を用いて計測した。そして pouch 領域内の平均蛍光強度と hinge 領域内の平均蛍光強度の比を算出した (図 7)。

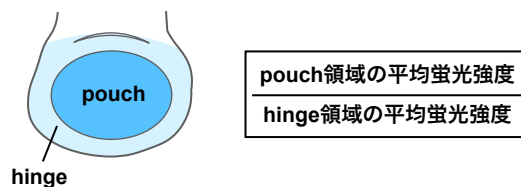


図 7. TRE-dsRed レポーターまたは *puc-lacZ* レポーターを用いた JNK 活性の評価方法

(左) 翅原基内の pouch 領域 (青) とその周囲の hinge 領域 (薄青) を示す。

(右) pouch 領域内の平均蛍光強度と hinge 領域内の平均蛍光強度の比を求める計算式を示す。

2.4.4. 翅原基における DIAP1 の発現レベルの定量比較

DIAP1 の発現レベルの評価には anti-DIAP1 抗体を用いた。各遺伝子型において単一の共焦点画像を用いて翅原基の前区画と後区画における発現レベルを比較した。各区画における平均蛍光強度を NIH ImageJ software を用いて計測し、その比を算出した。また翅原基背腹軸に沿った発現レベルの比較においても、同様に各遺伝子型において単一の共焦点画像を用いた。NIH ImageJ software を用いて背腹軸に沿った平均蛍光強度プロファイルを取得し、各遺伝子型における平均蛍光強度を図示した。前後軸は前区画特異的な発現を示す *ci-Gal4* ドライバー下で GFP 発現させ、その位置を決定した。

2.5. 統計解析

全ての統計解析は R (version 3.5.2) software を用いて行った。統計学的評価の詳細やサンプル数は各図の凡例に示す。

2.6. RT-qPCR

翅原基における *mmp1* の発現レベルを比較するにあたり RT-qPCR 法を用いた。彷徨している三齢幼虫を解剖して 10 枚の翅原基を取り出し、NucleoSpin RNA XS キット (Machery-Nagel) を用いて翅原基中の全 RNA を抽出した。抽出された RNA を 20 μ l の RNase-free water で溶出し、SuperScript IV Reverse Transcriptase (Thermo Fisher Scientific) によって逆転写反応を行わせ、cDNA を得た。合成した DNA と THUNDERBIRD SYBR qPCR Mix (TOYOBO) を混合し、StepOnePlus Real-Time PCR System (Applied Biosystems) にて PCR を行った。PCR 反応に際し、95°C で 60 秒間静置した後 95°C 15 秒間と 60°C 30 秒間のサイクルを 40 回繰り返した。遺伝子発現レベルを比較するために、*rpl32* を参照遺伝子とし、比較 Ct 法を用いて各遺伝子型における *mmp1* の RQ 値 (以下の計算式を参照) を算出した。

$$\begin{aligned} RQ &= \frac{2^{\Delta Ct(mmp1)}}{2^{\Delta Ct(rpl32)}} \\ &= 2^{\{\Delta Ct(mmp1) - \Delta Ct(rpl32)\}} \\ &= 2^{\{(Ct(mmp1, wt) - Ct(mmp1, other genotype)) - (Ct(rpl32, wt) - Ct(rpl32, other genotype))\}} \end{aligned}$$

この RQ 値を比較することで *mmp1* の発現レベルの定量比較を行った。使用した Primer の配列 (5'-3') とその引用元は以下の通りである。

rpl32 (Willis et al., 2010)

Forward: ccaagatcgtgaagaagcg

Reverse: gttgggcacatcagatactgtc

mmp1 (Toggweiler et al., 2016)
Forward: gaaggctcggacaacgagt
Reverse: gtcgttggactggtgatcg

2.7. 遺伝子型

☒ 6.

- (A) *w¹¹¹⁸*
- (B) *yki^{B5}/+; FRT82B, UbiGFP, RpS3^{Plac92}/+*

☒ 8.

- (A-A') *w¹¹¹⁸*
- (B-B') *yki^{B5}/+; +/+*
- (C-C') *+/+; FRT82B, UbiGFP, RpS3^{Plac92}/+*
- (D-D') *yki^{B5}/+; FRT82B, UbiGFP, RpS3^{Plac92}/+*

☒ 9.

- (A) *M(2)39F¹/+; +/+*
- (A') *yki^{B5}/M(2)39F¹; +/+*
- (B) *RpS17⁴/+; +/+*
- (B') *yki^{B5}/RpS17⁴; +/+*
- (C) *RpS26^{KG00230}/+; +/+*
- (C') *yki^{B5}/RpS26^{KG00230}; +/+*
- (D) *+/+; M(3)96C²/+*
- (D') *yki^{B5}/+; M(3)96C²/+*

☒ 10.

- (A) *nub-Gal4, UAS-GFP /+*
- (B) *nub-Gal4 or nub-Gal4, UAS-GFP/FRT40A, yki-RNAi^{v104523}; TM6B/+ or Sb*
- (C) *nub-Gal4/FRT40A, yki-RNAi^{v104523}; Sb/RpS3^{Plac92}*

☒ 11.

- (A) *nub-Gal4/yki^{B5}; UAS-RpS3/RpS3^{Plac92}*
- (B) *en-Gal4, UAS-GFP/yki^{B5}; UAS-RpS3/RpS3^{Plac92}*

☒ 12.

(A, F) w^{1118}

(B, G) $yki^{B5}/+; +/+$

(C, H) $+/+; RpS3^{Plac92}/+$

(D-D'', I-I'') $yki^{B5}/ptc-Gal4, UAS-GFP; RpS3^{Plac92}/+$

☒ 13.

(A) $nub-Gal4/yki^{B5}; UAS-GFP, UAS-Dronc^{DN}/RpS3^{Plac92}$

☒ 14.

(A) $nub-Gal4/+; +/UAS-CD8-PARP Venus$

(B) $yki^{B5}/nub-Gal4; +/UAS-CD8-PARP Venus$

(C) $nub-Gal4/+; RpS3^{Plac92}/UAS-CD8-PARP Venus$

(D) $nub-Gal4/yki^{B5}; RpS3^{Plac92}/UAS-CD8-PARP Venus$

☒ 15.

(A) $TRE-dsRed/+; +/+$

(B) $yki^{B5}/TRE-dsRed; +/+$

(C) $TRE-dsRed/+; RpS3^{Plac92}/+$

(D-D'') $yki^{B5}/TRE-dsRed; RpS3^{Plac92}/+$

(F) w^{1118}

(G) $yki^{B5}/+; +/+$

(H) $+/+; RpS3^{Plac92}/+$

(I-I'') $yki^{B5}/ptc-Gal4, UAS-GFP; RpS3^{Plac92}/+$

(K) Adv or $CyO.AG/+; puc-lacZ/+$

(L) $yki^{B5}/Adv; puc-lacZ/+$

(M) Adv or $CyO.AG/+; RpS3^{Plac92}/puc-lacZ$

(N) $yki^{B5}/Adv; FRT82B, UbiGFP, RpS3^{Plac92}/puc-lacZ$

(P) 左から順に

w^{1118}

$yki^{B5}/+; +/+$

$+/+; RpS3^{Plac92}/+$

$yki^{B5}/+; RpS3^{Plac92}/+$

☒ 16.

- (A, I) *nub-Gal4/yki^{B5}; UAS-puc/RpS3^{Plac92}*
(B, J) *bsk^l/yki^{B5}; RpS3^{Plac92}/+*
(C, K) *hep^{r73}/yki^{B5}; RpS3^{Plac92}/+*
(D, L) *tak1^l/X or Y; yki^{B5}/+; RpS3^{Plac92}/+*
(E, M) *nub-Gal4, yki^{B5}/UAS-Grnd IR^{v43534}; UAS-Dcr.2/RpS3^{Plac92}*
(F, N) *nub-Gal4, yki^{B5}/UAS-Grnd IR^{v104538}; UAS-Dcr.2/RpS3^{Plac92}*
(G, O) *egr^l/yki^{B5}; RpS3^{Plac92}/+*

☒ 17.

- (A) *nub-Gal4/yki^{B5}; UAS-puc/RpS3^{Plac92}*
(B) *bsk^l/yki^{B5}; RpS3^{Plac92}/+*
(C) *hep^{r73}/yki^{B5}; RpS3^{Plac92}/+*
(D) *tak1^l/X; yki^{B5}/+; RpS3^{Plac92}/+*
(E) *nub-Gal4, yki^{B5}/UAS-Grnd IR^{v43534}; UAS-Dcr.2/RpS3^{Plac92}*
(F) *nub-Gal4, yki^{B5}/UAS-Grnd IR^{v104538}; UAS-Dcr.2/RpS3^{Plac92}*
(G) *egr^l/yki^{B5}; RpS3^{Plac92}/+*

☒ 18.

- (A) *nub-Gal4/yki^{B5}; UAS-GFP, UAS-Dronc^{DN}/RpS3^{Plac92}*

☒ 19.

- (A-A') *ci-Gal4, UAS-GFP/+*
(B-B') *yki^{B5}/ci-Gal4, UAS-GFP; +/+*
(C-C') *ci-Gal4, UAS-GFP/+; RpS3^{Plac92}/+*
(D-D') *yki^{B5}/ci-Gal4, UAS-GFP; RpS3^{Plac92}/+*

☒ 20.

- (A, D-D') *nub-Gal4/yki^{B5}; UAS-DIAP1/RpS3^{Plac92}*
(B, E-E') *en-Gal4, UAS-GFP/yki^{B5}; UAS-DIAP1/RpS3^{Plac92}*

☒ 21.

- (A) *+/+; th⁴/+*
(B) *+/+; th⁴/RpS3^{Plac92}*
(C) *nub-Gal4, UAS-Dcr.2, UAS-GFP/diap1-RNAi^{l2284R-2}; +/TM6B*

- (D) *nub-Gal4, UAS-Dcr.2, UAS-GFP/diap1-RNAi^{12284R-2}; +/RpS3^{Plac92}*
 (E,) *en-Gal4, UAS-GFP/diap1-RNAi^{12284R-2}; UAS-Dcr.2/+*
 (F) *en-Gal4, UAS-GFP/diap1-RNAi^{12284R-2}; UAS-Dcr.2/FRT82B, UbiGFP, RpS3^{Plac92}*
 (G) *ci-Gal4, UAS-GFP/diap1-RNAi^{12284R-2}; UAS-Dcr.2/+*
 (H) *ci-Gal4, UAS-GFP/diap1-RNAi^{12284R-2}; UAS-Dcr.2/RpS3^{Plac92}*

☒ 22.

- (A-A') *+/Kr or CyO; th⁴/+*
 (B-B') *+/+; th⁴/RpS3^{Plac92}*
 (C-C') *nub-Gal4, UAS-Dcr.2, UAS-GFP/diap1-RNAi^{12284R-2}; +/TM6B*
 (D-D') *nub-Gal4, UAS-Dcr.2, UAS-GFP/diap1-RNAi^{12284R-2}; +/RpS3^{Plac92}*
 (E-E') *en-Gal4, UAS-GFP/diap1-RNAi^{12284R-2}; UAS-Dcr.2/+*
 (F-F') *en-Gal4, UAS-GFP/diap1-RNAi^{12284R-2}; UAS-Dcr.2/FRT82B, UbiGFP, RpS3^{Plac92}*

第三章 結果

3.1. Yki はショウジョウバエ *Minute* 変異体の正常な翅発生に必要である

リボソームタンパク質遺伝子のヘテロ変異体が、どのようにして頑健な形態形成を成し遂げているのかを調べるために、大澤志津江博士は *Minute* 変異体の一つである *RpS3/+* 変異体を用いて遺伝学的スクリーニングを行った。具体的には、*RpS3/+* 変異体と染色体の一部を欠失した染色体欠失系統または突然変異系統とを交配し、F1 世代の成虫を観察し、組織において何らかの形態異常が見られるような変異系統を探索した。*RpS3/+* 変異体と交配させた 322 変異系統のうち 15 の染色体欠失系統と 2 つの突然変異系統で翅の一部が欠損する表現型が見られた。中でも、Hippo 経路の転写共役因子である *yki* のヘテロ変異を *RpS3/+* 変異体の全身に導入したときに最も重度の表現型が認められた (図 8D-8D', 8A-8A' と比較', 8E にて定量)。ただし、*yki/+* 変異体や *RpS3/+* 変異体は正常な翅を形成する (図 8B-8C', 8E にて定量)。以上から、*yki* と *RpS3* との間に遺伝学的相互作用があることが示された。

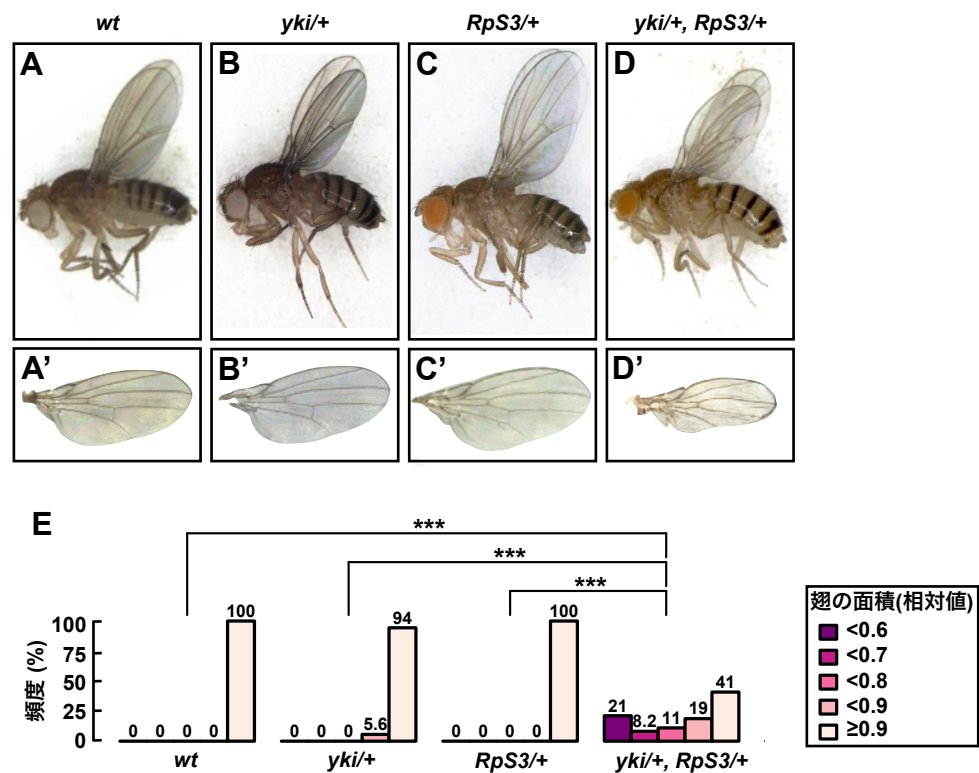


図 8. *yki* のヘテロ変異は *RpS3/+* 変異体において成虫翅の形態異常を引き起こす

(A-D と A'-D') 各遺伝子型の成虫全体 (A-D) と成虫翅 (A'-D') を示す。*yki/+* 変異体 (B-B') と *RpS3/+* 変異体 (C-C') は野生型 (*wild-type*; wt) (A-A') と同様、正常な翅を形成するが、一方で

yki+/, *RpS3*+/変異体は後部分を欠損した翅を生じる (D-D')。 *yki*+/, *RpS3*+/変異体における組織の形態異常は翅にのみ認められた。

(E) 各遺伝子型における翅面積 (相対値) の頻度分布 (%) を示す。統計学的解析は Fisher's exact test を用いて行われた (***) $p < 0.001$; n は左から順に 75, 142, 52, 208)。

また、*yki* のヘテロ変異は *RpL21*+/や *RpS17*+/、*RpS26*+/、*RpS27*+/といった他の *Minute* 変異体においても翅の形態異常を引き起こした (図 9A-9D と 9A'-9D', 9A''-9D'')にて定量)。

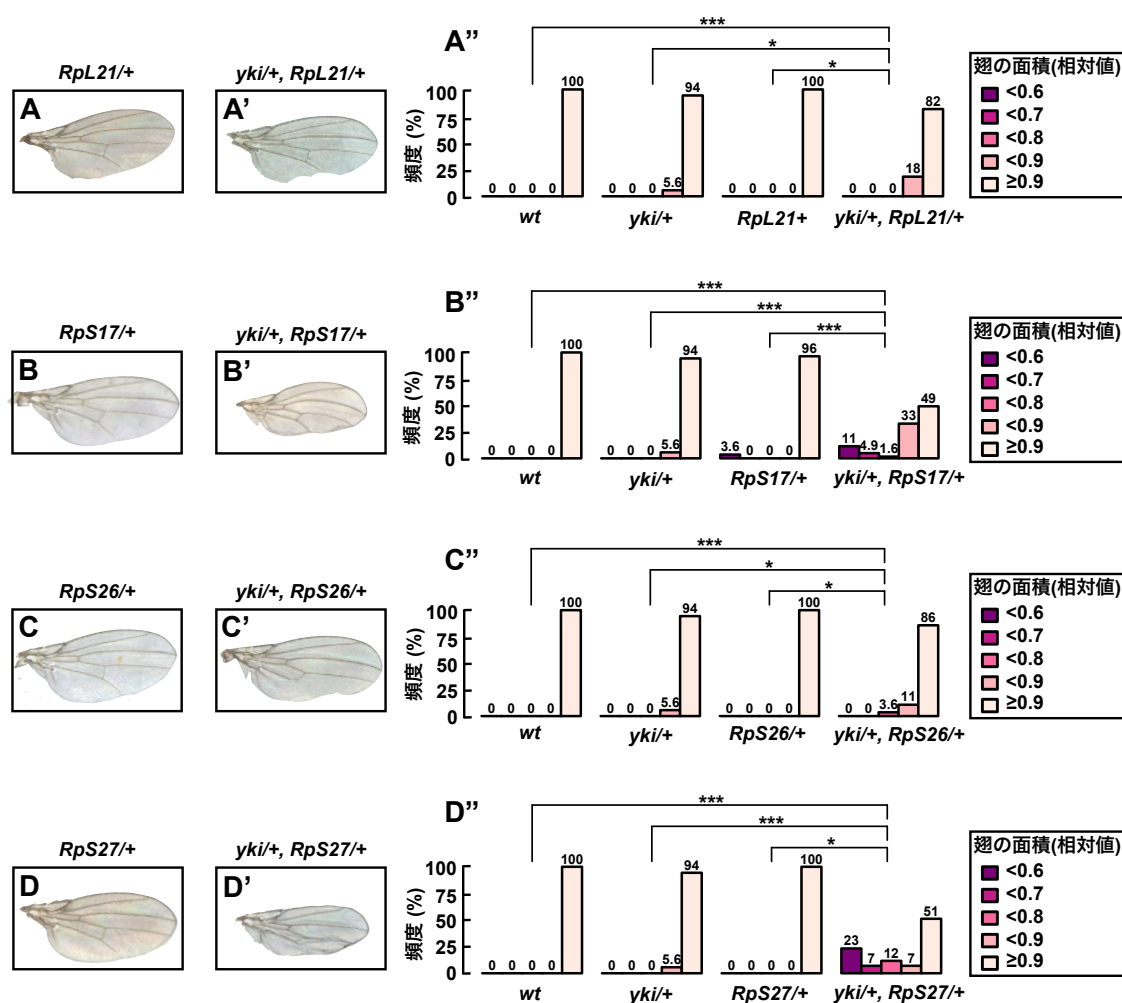


図 9. *yki* のヘテロ変異は様々な *Minute* 変異体において成虫翅の形態異常を引き起こす

(A-D と A'-D') 各遺伝子型の成虫翅を示す。

(A''-D'') 各遺伝子型における翅面積 (相対値) の頻度分布 (%) を示す。統計学的解析は Fisher's exact test を用いて行われた ((A'') $*p < 0.05$, (***) $p < 0.001$; n は左から順に 75, 142, 26, 49, (B''))

*** $p < 0.001$; n は左から順に 75, 142, 28, 61, (C'') * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$; n は左から順に 75, 142, 44, 56, (D'') * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$; n は左から順に 75, 142, 17, 43)。

一方で、*RpS3* のヘテロ変異によって *yki* のノックダウンによる翅面積への減少効果が増大した (図 10A-10C, 10D にて定量)。

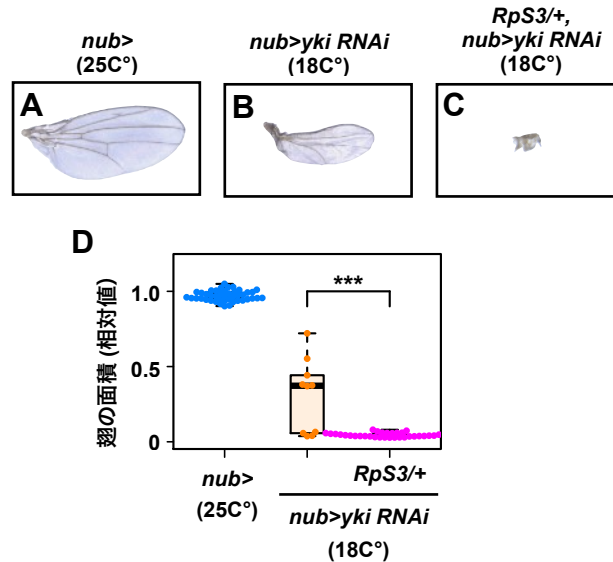


図 10. *RpS3* のヘテロ変異は *yki* のノックダウンによって縮小した翅面積をさらに縮小する

(A-C) 各遺伝子型の成虫翅を示す。

(D) 各遺伝子型における翅面積 (相対値) の分布を示す。各点は個々のデータ、箱の下端および上端は第 1 四分位数と第 3 四分位数、ひげの下端および上端はデータの最小値と最大値、線は中央値を示す (以下同様)。統計学的解析は Mann-Whitney *U* test を用いて行われた (** $p < 0.001$; n は左から順に 43, 10, 35)。

こうした結果から、*Yki* 活性が *Minute* 変異体の翅の発生に必要であることが示唆された。ここで、翅原基の *pouch* 領域 (成虫翅のブレード領域となる部分) に遺伝子を発現させる *nub-Gal4* ドライバーや翅原基の後区画に遺伝子を発現させる *en-Gal4* ドライバーを用いて *RpS3* を過剰発現させると、*yki/+*, *RpS3/+* 変異体の翅の形態異常は有意に回復した (図 11A-11B, 11C にて定量)。このことから、*yki/+*, *RpS3/+* 変異体の翅の形態異常は主に翅原基の後区画での攪乱によって引き起こされていることが示唆された。

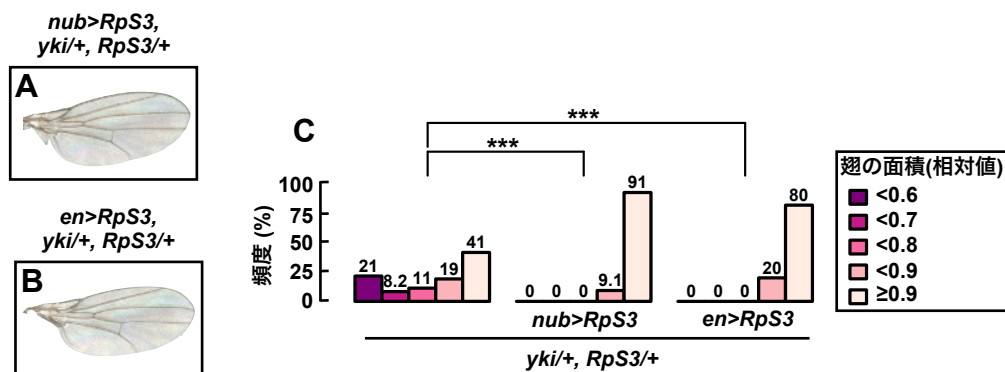


図 11. *yki/+; RpS3/+* 変異体の翅の形態異常は翅原基の後区画における攪乱に起因する

(A-B) 各遺伝子型の成虫翅を示す。

(C) 各遺伝子型における翅面積 (相対値) の頻度分布 (%) を示す。統計学的解析は Fisher's exact test を用いて行われた (***) $p < 0.001$; n は左から順に 208, 22, 56)。

3.2. *yki/+; RpS3/+* 変異体は翅原基における異所性細胞死によって発生異常を起こす

次に、*yki/+; RpS3/+* 変異体の翅の形態異常がどのようにして引き起こされているのかを調べるために、翅原基において細胞死を調べた。ショウジョウバエの実行型カスパーゼ Dcp-1 の切断型を認識する anti-cleaved Drosophila Dcp-1 抗体を用いて死細胞の有無を調べたところ、野生型と *yki/+* 変異体の翅原基ではわずかに死細胞が見えた (図 12A-12B, 12E にて定量)。一方で、*RpS3/+* 変異体では翅原基の背腹軸に沿って死細胞が検出された (図 12C, 12E にて定量) (Akai et al., 2021)。そして *yki/+; RpS3/+* 変異体の翅原基では翅原基の前後軸に沿って多くの死細胞が検出された (図 12D, 12E にて定量)。この前後軸に沿った死細胞は、anti-cleaved caspase-3 抗体を用いた免疫染色でも同様に検出された (図 12F-12I, 12K にて定量)。Anti-cleaved caspase-3 抗体はショウジョウバエの開始型カスパーゼ Dronc によって切断されたエピトープを認識し Dronc 活性を可視化する (Fan and Bergmann, 2010)。この結果から、*yki/+; RpS3/+* 変異体において Dronc が翅原基の前後軸に沿って活性化され異所性細胞死が引き起こされていることが示唆された。

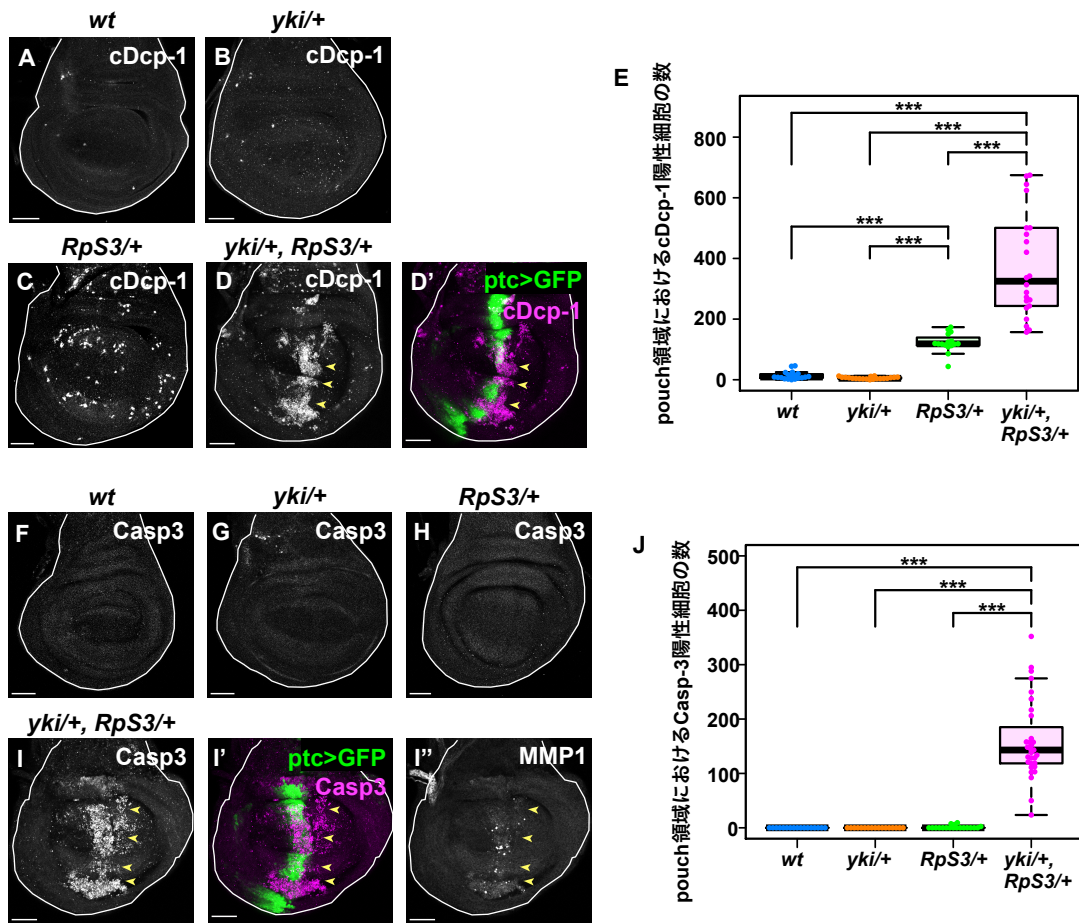


図 12. *yki/+*, *RpS3/+* 変異体の翅原基の前後軸に沿って異所性細胞死が誘導されている

(A-D) 各遺伝子型の三齢幼虫の翅原基を示す。Anti-cleaved *Drosophila* Dcp-1 抗体 (白) を用いて免疫染色を行なった。異所性細胞死を黄色の矢尻で示す。スケールバー: 50 μ m

(D-D') *ptc-Gal4* ドライバー下で GFP (緑) を発現させた *yki/+*, *RpS3/+* 変異体の翅原基を示す。異所性細胞死 (マゼンタ; 黄色の矢尻) が前後軸に沿って後区画に誘導されている (D')。スケールバー: 50 μ m

(E) 各遺伝子型の翅原基 pouch 領域における cleaved Dcp-1 陽性細胞数の分布を示す。統計学的解析は Steel-Dwass test を用いて行われた (** $p < 0.001$; n は左から順に 19, 20, 16, 22)。スケールバー: 50 μ m

(F-I) 各遺伝子型の三齢幼虫の翅原基を示す。Anti-cleaved caspase-3 抗体 (白) を用いて免疫染色を行なった。異所性細胞死を黄色の矢尻で示す。スケールバー: 50 μ m

(I-I'') *ptc-Gal4* ドライバー下で GFP (緑) を発現させた *yki/+*, *RpS3/+* 変異体の翅原基を示す。異所性細胞死 (マゼンタ; 黄色の矢尻) が前後軸に沿って後区画に誘導されている (I')。死細胞の局在は JNK 活性化細胞 (白) と一致する (I'')。スケールバー: 50 μ m

(J) 各遺伝子型の翅原基 pouch 領域における cleaved caspase-3 陽性細胞数の分布を示す。統計学的解析は Steel-Dwass test を用いて行われた ($***p<0.001$; n は左から順に 17, 17, 19, 31)。スケールバー: 50 μ m

そこで、Dronc のドミナントネガティブ体を翅原基の pouch 領域で強制発現し細胞死を抑制したところ、*yki/+*, *RpS3/+*変異体の成虫翅の形態異常が有意に抑制された (図 13A, 13B にて定量)。こうした結果から、Dronc を介した異所性細胞死が翅原基で起こることで *yki/+*, *RpS3/+*変異体の発生異常が引き起こされていることが示唆された。

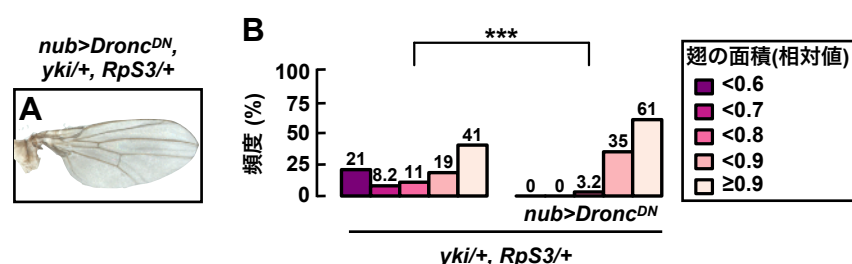


図 13. *yki/+*, *RpS3/+* 変異体の翅の形態異常は翅原基における異所性細胞死に起因する

(A) Dronc のドミナントネガティブ体を翅原基 pouch 領域に強制発現した *yki/+*, *RpS3/+*変異体の成虫翅を示す。

(B) 各遺伝子型における翅面積 (相対値) の頻度分布 (%) を示す。統計学的解析は Fisher's exact test を用いて行われた ($***p<0.001$; n は左から順に 208, 93)。

また、anti-phospho-histone H3 抗体を用いて M 期の増殖細胞を翅原基で可視化したところ、*RpS3/+*変異体の翅原基 pouch 領域では増殖細胞が有意に増加し細胞増殖が促進していた。これは背腹軸に沿った細胞死によって代償性増殖が起きていることを示している (Akai et al., 2021; Ryoo and Bergmann, 2012) (図 14A-14D, 14E にて定量)。しかしながら、*yki/+*, *RpS3/+*変異体の翅原基 pouch 領域では増殖細胞が減少していたことから、*yki/+*, *RpS3/+*変異体の翅の形態異常は細胞死を代償する細胞増殖能が減少したことに起因することが示唆された。

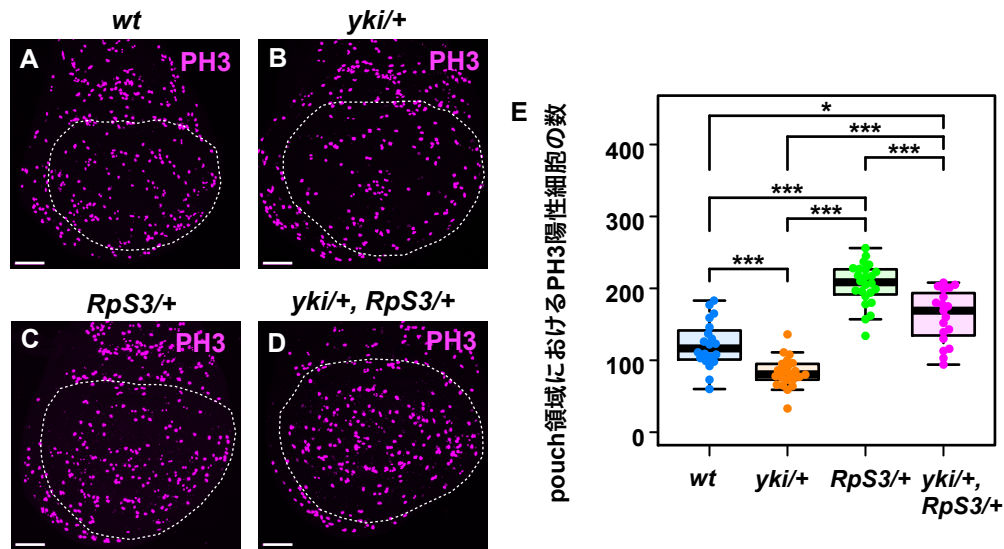


図 14. *yki/+*, *RpS3/+* 変異体の翅の形態異常は翅原基の代償性増殖能の低下に起因する

(A-D) 各遺伝子型の三齢幼虫の翅原基を示す。Anti-phospho histon H3 抗体 (マゼンタ) を用いて免疫染色を行なった。Pouch 領域を点線 (白) で示す。スケールバー: 50 μ m

(E) 各遺伝子型の翅原基 pouch 領域における phospho histon H3 陽性細胞数の分布を示す。統計学的解析は Steel-Dwass test を用いて行われた (* p <0.05, *** p <0.001; n は左から順に 22, 24, 20, 19)。スケールバー: 50 μ m

3.3. *yki/+*, *RpS3/+*変異体は翅原基における JNK シグナル活性の上昇によって異所性細胞死を引き起こす

続いて、*yki/+*, *RpS3/+*変異体の異所性細胞死を誘導する上流の機構を調べた。JNK シグナル経路は様々な細胞環境下において活性化し、細胞死を誘導することが知られている (Igaki, 2009)。JNK 活性を可視化する TRE-dsRed レポーターの発現を翅原基で観察したところ (Chatterjee and Bohmann, 2012)、野生型や *yki/+* 変異体の翅原基と比べて、*RpS3/+*変異体の翅原基で中程度 JNK シグナルが活性化し、*yki/+*, *RpS3/+*変異体の翅原基でさらに強く JNK シグナルが活性化しているのが観察された (図 15A-15D, 15E にて定量)。この結果を確かめるため、JNK 経路の下流で発現する MMP1 (Uhlirva and Bohmann, 2006) の発現を anti-MMP1 抗体と RT-qPCR で、JNK 活性を可視化する *puc-lacZ* レポーターの発現を調べたところ、同様に *RpS3/+*変異体の翅原基で中程度 JNK シグナルが活性化し、*yki/+*, *RpS3/+*変異体の翅原基でさらに強く JNK シグナルが活性化していることが確認された (図 15F-15I と 15K-15N, 15J と 15O にて定量, 図 15P)。*yki/+*, *RpS3/+*変異体の JNK 活性化は異所性細胞死が観察された場所と一致する(図 17D' と 17I')

ことから、翅原基 pouch 領域の前後軸に沿った異所性細胞死は JNK 活性化によって誘導されることが示唆された。

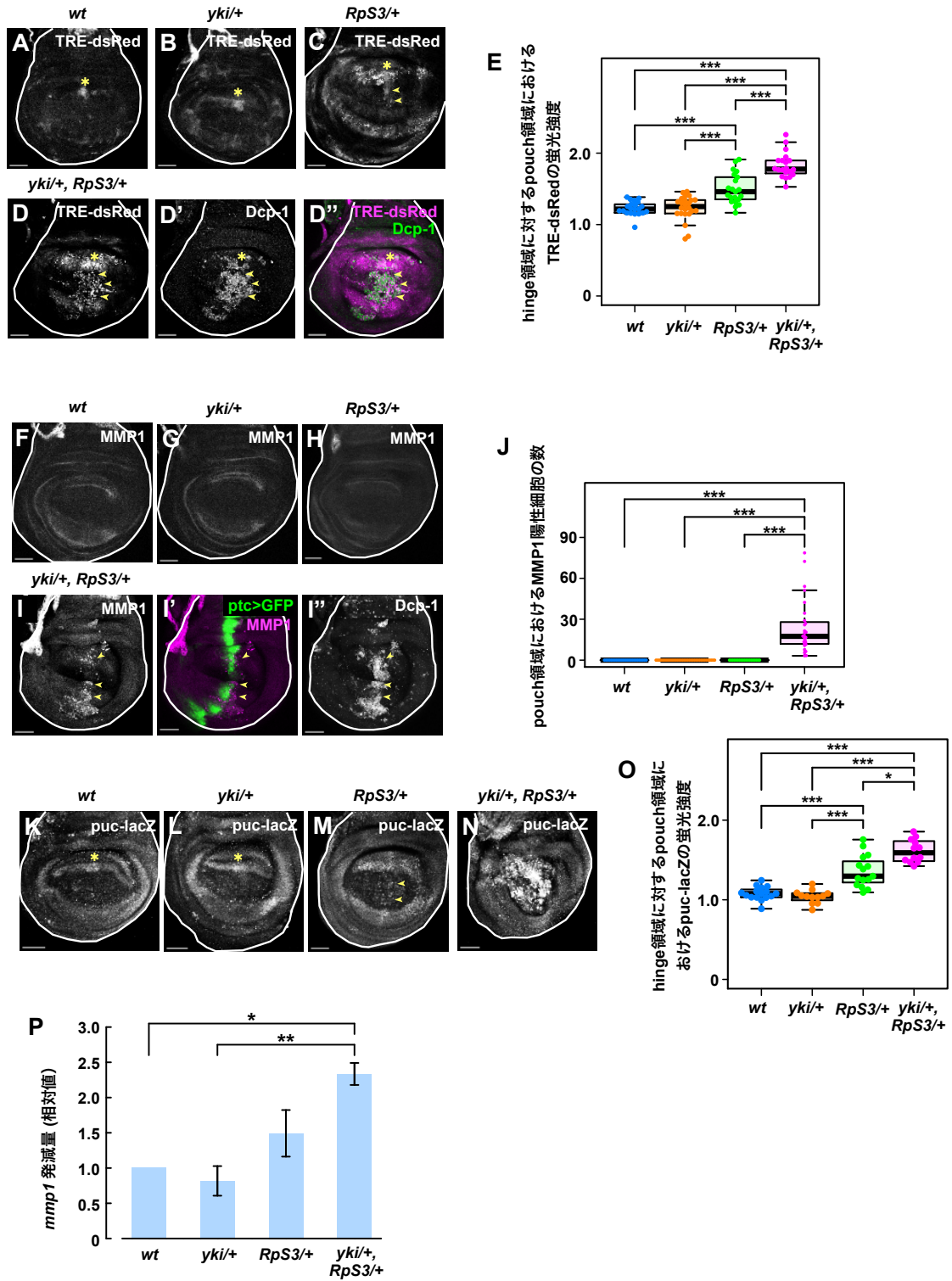


図 15. *yki/+*, *RpS3/+* 変異体の翅原基で JNK シグナルが強く活性化している

- (A-D) 各遺伝子型の三齢幼虫の翅原基を示す。TRE-dsRed レポーターの発現 (白) を観察した。内在性の JNK 活性を黄色のアスタリスクで示す。前後軸に沿った JNK 活性化を黄色の矢尻で示す (C-D)。スケールバー: 50 μ m
- (D'-D'') TRE-dsRed レポーター (マゼンタ) を発現させた *yki/+*, *RpS3/+*変異体の翅原基を示す。JNK 活性化細胞の局在は死細胞 (緑) と一致する (I'')。スケールバー: 50 μ m
- (E) 各遺伝子型の翅原基 hinge 領域内の平均蛍光強度に対する pouch 領域内の TRE-dsRed レポーターの平均蛍光強度 (比) の分布を示す。統計学的解析は Steel-Dwass test を用いて行われた (** p <0.001; n は左から順に 21, 24, 21, 20)。スケールバー: 50 μ m
- (F-I) 各遺伝子型の三齢幼虫の翅原基を示す。Anti-MMP1 抗体 (白) を用いて染色した。前後軸に沿った JNK 活性化を黄色の矢尻で示す (C-D)。スケールバー: 50 μ m
- (I'-I'') *ptc-Gal4* ドライバー下で GFP (緑) を発現させた *yki/+*, *RpS3/+*変異体の翅原基を示す。JNK 活性化細胞の局在は死細胞 (白) と一致する (I'')。スケールバー: 50 μ m
- (J) 各遺伝子型の翅原基 pouch 領域内の MMP1 陽性細胞数の分布を示す。統計学的解析は Steel-Dwass test を用いて行われた (** p <0.001; n は左から順に 26, 36, 19, 27)。スケールバー: 50 μ m
- (K-N) 各遺伝子型の三齢幼虫の翅原基を示す。puc-lacZ レポーターの発現 (白) を観察した。内在性の JNK 活性を黄色のアスタリスクで示す。前後軸に沿った JNK 活性化を黄色の矢尻で示す (N-O)。スケールバー: 50 μ m
- (O) 各遺伝子型の翅原基 hinge 領域内の平均蛍光強度に対する pouch 領域内の puc-lacZ レポーターの平均蛍光強度 (比) の分布を示す。統計学的解析は Steel-Dwass test を用いて行われた (* p <0.05, ** p <0.001; n は左から順に 17, 12, 15, 12)。スケールバー: 50 μ m
- (P) RT-qPCR による *mmp1* mRNA の発現量 (*rpl32* を用いて標準化) を示す。エラーバーは 3 回の生物学的反復実験の標準誤差 (SEM) を示す。各実験で 10 枚の翅原基を用いた。統計学的解析は Tukey-Kramer test を用いて行われた (* p <0.05, ** p <0.01)。
-

続いて、JNK の脱リン酸化酵素 Puc (Martín-Blanco et al., 1998) の過剰発現や *bsk* (*JNK*) (Riesgo-Escovar et al., 1996)、*hep* (*JNKK*) (Glise et al., 1995)、または *dTak1* (*JNKKK*) (Mihaly et al., 2001) のヘテロ変異の導入によって JNK シグナル活性化を抑制したところ、*yki/+*, *RpS3/+*変異体の異所性細胞死が有意に減少した (図 16A-16D と 16I-16L, 16H と 16P にて定量)。さらに、*egr* (Igaki et al., 2002) のヘテロ変異の導入や *grnd* (Andersen et al., 2015) のノックダウンによって TNF シグナル伝達を阻害した場合も、*yki/+*, *RpS3/+*変異体の翅原基において異所性細胞死が有意に減少した (図 16E-16G と 16M-16O, 16H と 16P にて定量)。

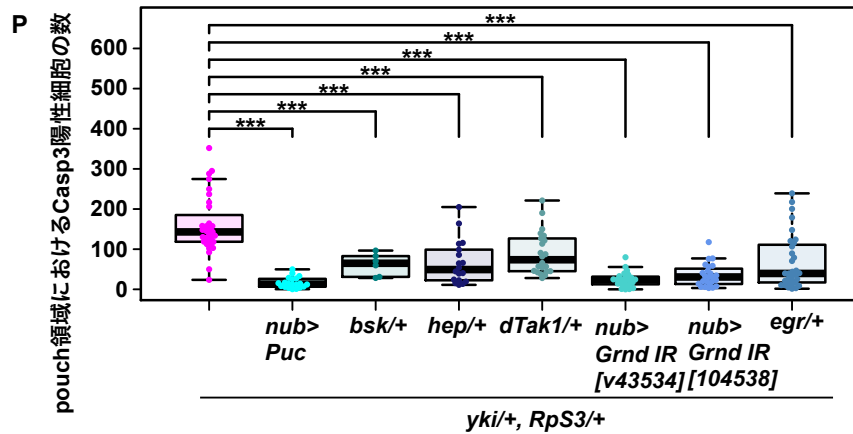
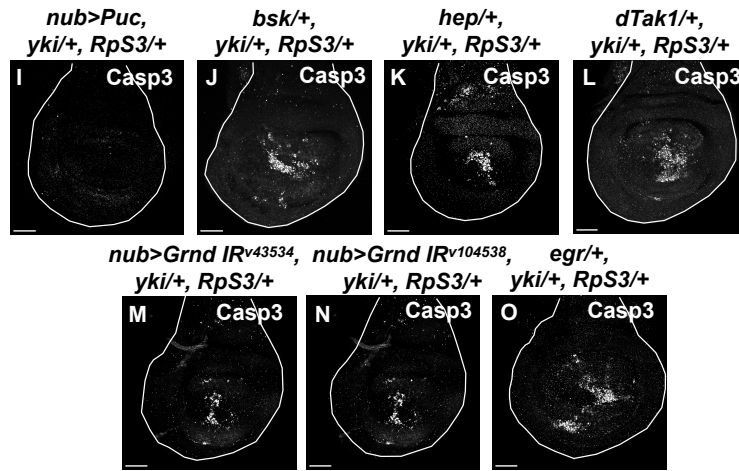
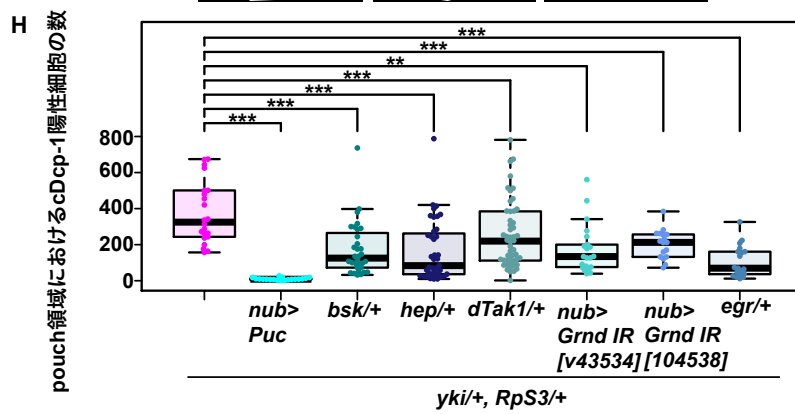
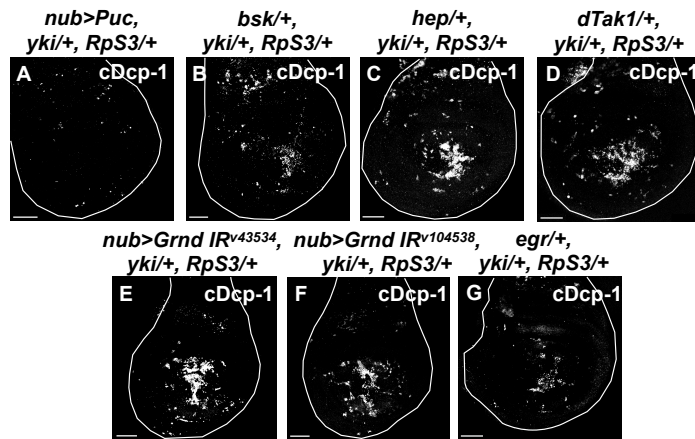


図 16. *yki/+*, *RpS3/+* 変異体の翅の形態異常は翅原基の JNK 活性化に起因する

(A-G) 各遺伝子型の三齢幼虫の翅原基を示す。Anti-cleaved Drosophila Dcp-1 抗体 (白) を用いて染色した。スケールバー: 50 μ m

(H) 各遺伝子型の翅原基 pouch 領域内の cleaved Dcp-1 陽性細胞数の分布を示す。統計学的解析は Steel-Dwass test を用いて行われた (** p <0.01, *** p <0.001; n は左から順に 22, 22, 19, 32, 39, 50, 21, 19)。

(I-O) 各遺伝子型の三齢幼虫の翅原基を示す。Anti-cleaved caspase-3 抗体 (白) を用いて染色した。スケールバー: 50 μ m

(P) 各遺伝子型の翅原基 pouch 領域内の cleaved caspase-3 陽性細胞数の分布を示す。統計学的解析は Steel-Dwass test を用いて行われた (** p <0.001; n は左から順に 31, 20, 6, 18, 22, 23, 24, 32)。

またこの時、いずれの場合でも *yki/+*, *RpS3/+* 変異体の翅の形態異常が有意に抑制された (図 17A-17G, 17H にて定量)。以上から、*yki/+*, *RpS3/+* 変異体の成虫翅の形態異常は前後軸に沿った JNK 活性化に起因することが示された。

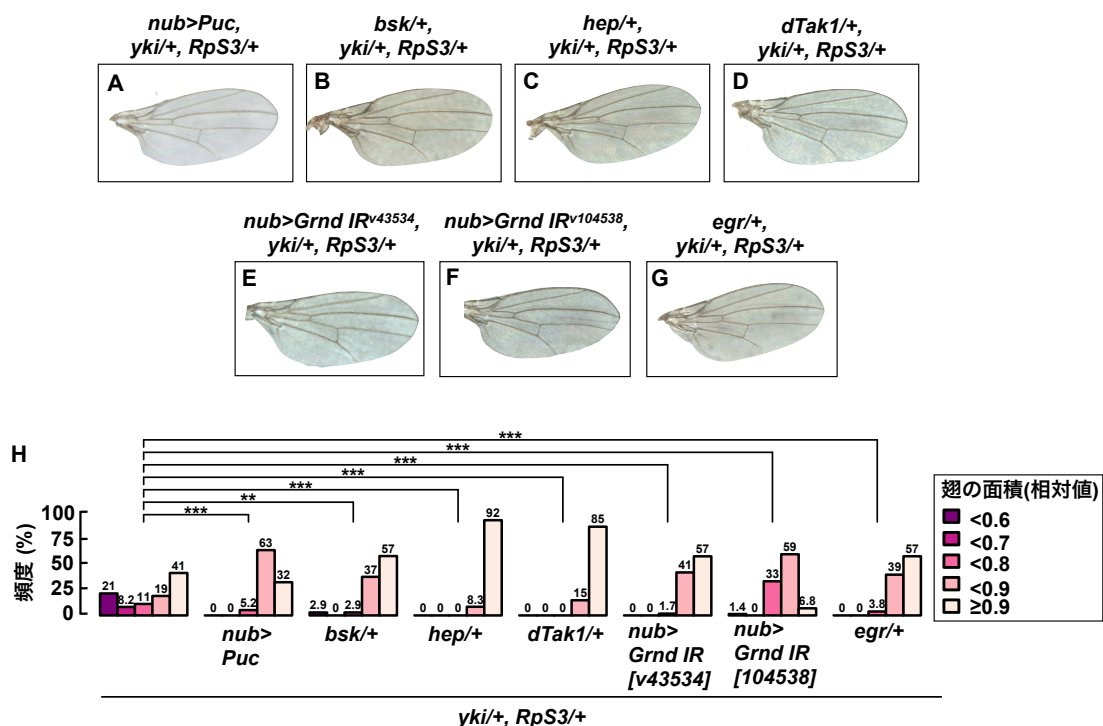


図 17. *yki/+*, *RpS3/+* 変異体の翅の形態異常は JNK シグナル活性化を抑制することで回復する

(A-G) 各遺伝子型の成虫翅を示す。

(H) 各遺伝子型における翅面積(相対値)の頻度分布 (%) を示す。統計学的解析は Fisher's exact test を用いて行われた (** p <0.01, *** p <0.001; n は左から順に 208, 97, 35, 60, 178, 58, 73, 79)。

ここで、*Dronc* のドミナントネガティブ体を翅原基の *pouch* 領域で強制発現し細胞死を抑制した場合でも、*yki/+*, *RpS3/+*変異体の翅原基において JNK シグナル活性が有意に抑制されることを見出した (図 18A, 18B にて定量)。このことは、*Dronc* と JNK が互いに正のフィードバック関係にあることを示唆している (Shlevkov and Morata, 2012) (図 18C)。

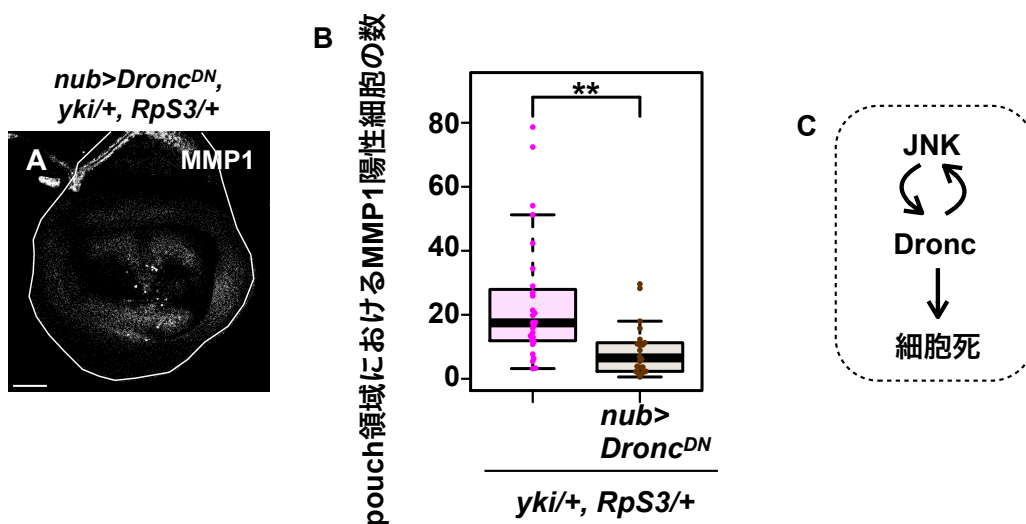


図 18. JNK と *Dronc* は正のフィードバックを形成している

(A) *Dronc* のドミナントネガティブ体を翅原基 *pouch* 領域に強制発現した *yki/+*, *RpS3/+*変異体の三齢幼虫の翅原基を示す。Anti-MMP1 抗体 (白) を用いて染色した。スケールバー: 50 μ m

(B) 翅原基 *pouch* 領域内の MMP1 陽性細胞数の分布を示す。統計学的解析は Mann-Whitney *U* test を用いて行われた (** $p < 0.01$; n は左から順に 27, 22)。

(C) *yki/+*, *RpS3/+*変異体の翅原基において JNK と *Dronc* が正のフィードバックを形成し、細胞死を誘導している。

3.4. *yki/+*, *RpS3/+*変異体の翅原基において DIAP1 の発現が下方制御されている

続いて、Yki の標的遺伝子の中から *yki/+*, *RpS3/+*変異体の翅の形態異常の原因遺伝子を特定しようと試みた。強力な候補の一つは、*Dronc* を含むカスパーゼを不活性化する DIAP1 である。そこで anti-DIAP1 抗体を用いて翅原基における DIAP1 の発現パターンを観察した。DIAP1 は翅原基全体に発現しており (図 19A-A'), *yki/+*変異体や *RpS3/+*変異体は野生型と同様の発現パターンを示した (図 19A'-19A', 19E-19F にて定量)。ところが、*yki/+*, *RpS3/+*変異体の翅原基後区画において、DIAP1 の発現レベルが前区画の発現レベルよりも有意に低下していた (図 19D-19D', 19E-19F にて定量)。

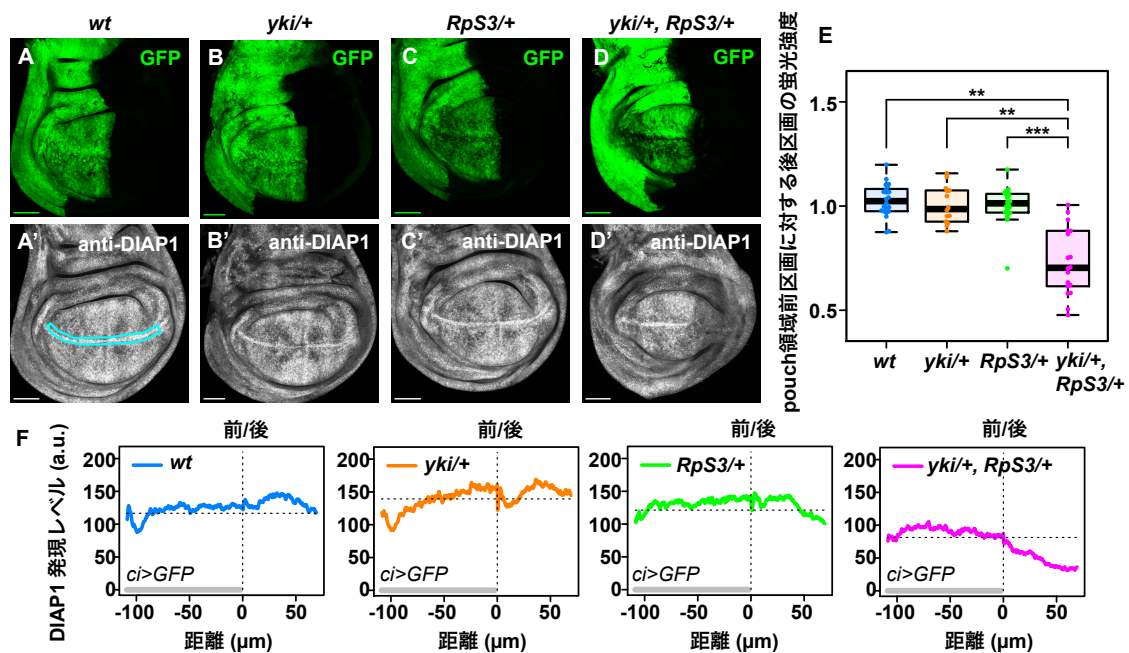


図 19. *yki/+*, *RpS3/+* 変異体の翅原基後区画において DIAP1 の発現が低下している

(A-D と A'-D') 各遺伝子型の三齢幼虫の翅原基を示す。Anti-DIAP1 抗体 (白) を用いて染色した (A'-D')。翅原基の前後軸を特定するために *ci-Gal4* ドライバー下で GFP (緑) を発現させた (A-D)。スケールバー: 50 μ m

(E) 各遺伝子型の翅原基 pouch 領域における、前区画内の平均蛍光強度に対する後区画内の平均蛍光強度 (比) の分布を示す。統計学的解析は Steel-Dwass test を用いて行われた (** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$; n は左から順に 22, 14, 20, 18)。

(F) 各遺伝子型の翅原基における背腹軸に沿った平均蛍光強度を示す。測定された領域をシアン (A') で示す。x 軸方向の点線は各遺伝子型における前区画の平均蛍光強度を示す。y 軸方向の点線 (0 μ m) は前後軸の位置を示す。*yki/+*, *RpS3/+*変異体の後区画において DIAP1 の発現が低下している。n は左から順に 22, 14, 20, 18。

この後区画での DIAP1 の発現低下が、*yki/+*, *RpS3/+*変異体翅原基での前後軸に沿った異所性細胞死の原因ではないかと考えられた。実際、DIAP1 を翅原基の pouch 領域全体または翅原基の後区画に過剰発現すると、*yki/+*, *RpS3/+*変異体の翅原基で異所性細胞死 (図 20D-20E, 20F にて定量) や JNK 活性化 (図 20D'-20E', 20F' にて定量) が抑制され、成虫翅の形態異常も有意に抑制された (図 20A-20B, 20C にて定量)。

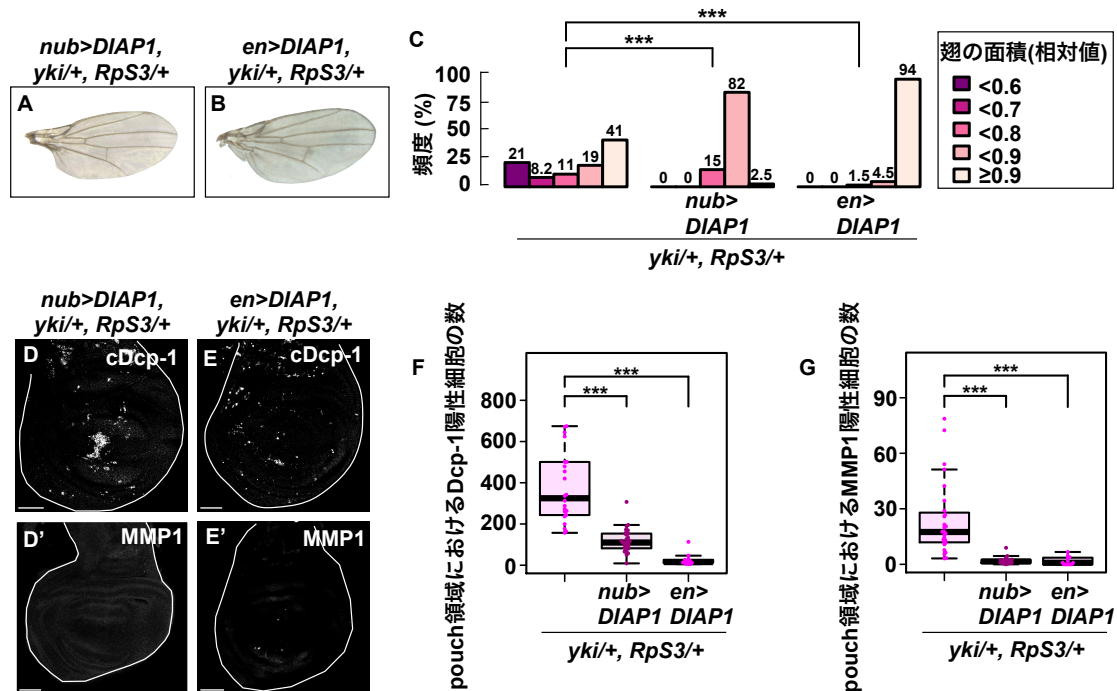


図 20. *yki+/+, RpS3/+*変異体の翅の形態異常は後区画における *DIAP1* の発現低下に起因する

(A-B) 各遺伝子型の成虫翅を示す。

(C) 各遺伝子型における翅面積 (相対値) の頻度分布 (%) を示す。統計学的解析は Fisher's exact test を用いて行われた (** $p < 0.001$; n は左から順に 208, 40, 66)。

(D-E) 各遺伝子型の三齢幼虫の翅原基を示す。Anti-cleaved Drosophila Dcp-1 抗体 (白) を用いて染色した。スケールバー: 50 μ m

(D'-E') 各遺伝子型の三齢幼虫の翅原基を示す。Anti-MMP1 抗体 (白) を用いて染色した。スケールバー: 50 μ m

(F) 各遺伝子型の翅原基 pouch 領域内の cleaved Dcp-1 陽性細胞数の分布を示す。統計学的解析は Mann-Whitney *U* test を用いて行われた (** $p < 0.001$; n は左から順に 22, 28, 13)。

(G) 各遺伝子型の翅原基 pouch 領域内の MMP1 陽性細胞数の分布を示す。統計学的解析は Mann-Whitney *U* test を用いて行われた (** $p < 0.001$; n は左から順に 27, 19, 12)。

3.5. *yki+/+, RpS3/+*変異体の翅の形態異常は *diap1* の下方制御に起因する

最後に、*diap1* を下方制御した場合に *yki* のヘテロ変異と同様、*RpS3/+*変異体において翅の形態異常を引き起こすかどうかを調べた。*RpS3/+*変異体において *diap1* (*thread; th*) のヘテロ変異を導入、あるいは *diap1* の翅原基の pouch 領域全体または後区画において *diap1* をノックダウンしたところ、成虫翅は形態異常を示した (図 21A-21F, 21I にて定量)。一方で、*diap1* を翅原基の前区画においてノックダウンした場合には、成虫翅は形態異常を示さなかった (図 21G-21H, 21I にて定量)。

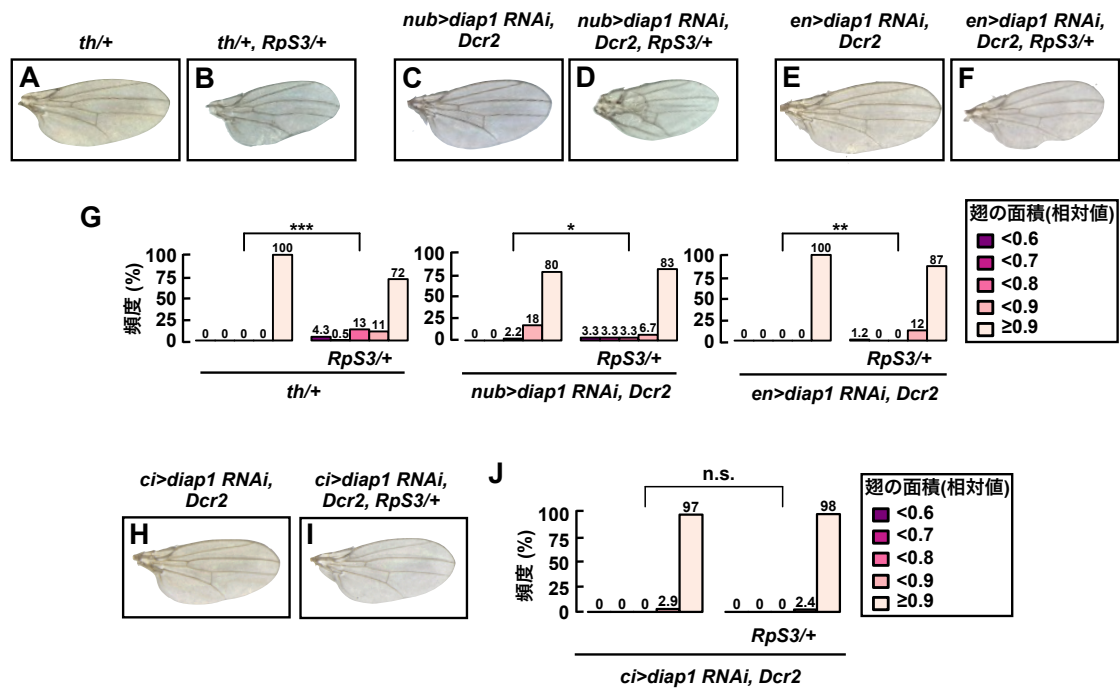


図 21. *diap1* 発現の下方制御は *RpS3/+* 変異体において成虫翅の形態異常を引き起こす

(A-F) 各遺伝子型の成虫翅を示す。

(G) 各遺伝子型における翅面積(相対値)の頻度分布(%)を示す。統計学的解析は Fisher's exact test を用いて行われた (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$; n は左から順に 131, 342, 90, 120, 82, 84)。

(H-I) 各遺伝子型の成虫翅を示す。

(J) 各遺伝子型における翅面積 (相対値) の頻度分布 (%) を示す。統計学的解析は Fisher's exact test を用いて行われた (n.s.: not significant; n は左から順に 69, 84)。

こうした結果から、翅原基後区画での *diap1* の発現が *RpS3/+* 変異体の正常な翅発生において重要であることを示された。*RpS3/+* 変異体において *diap1* (*thread*) のヘテロ変異を導入、あるいは *diap1* を翅原基の pouch 領域全体や後区画においてノックダウンした場合、いずれの場合でも異所性細胞死と JNK 活性化が検出された (図 22A-22F と 22A'-22F', 22G と 22H にて定量)。

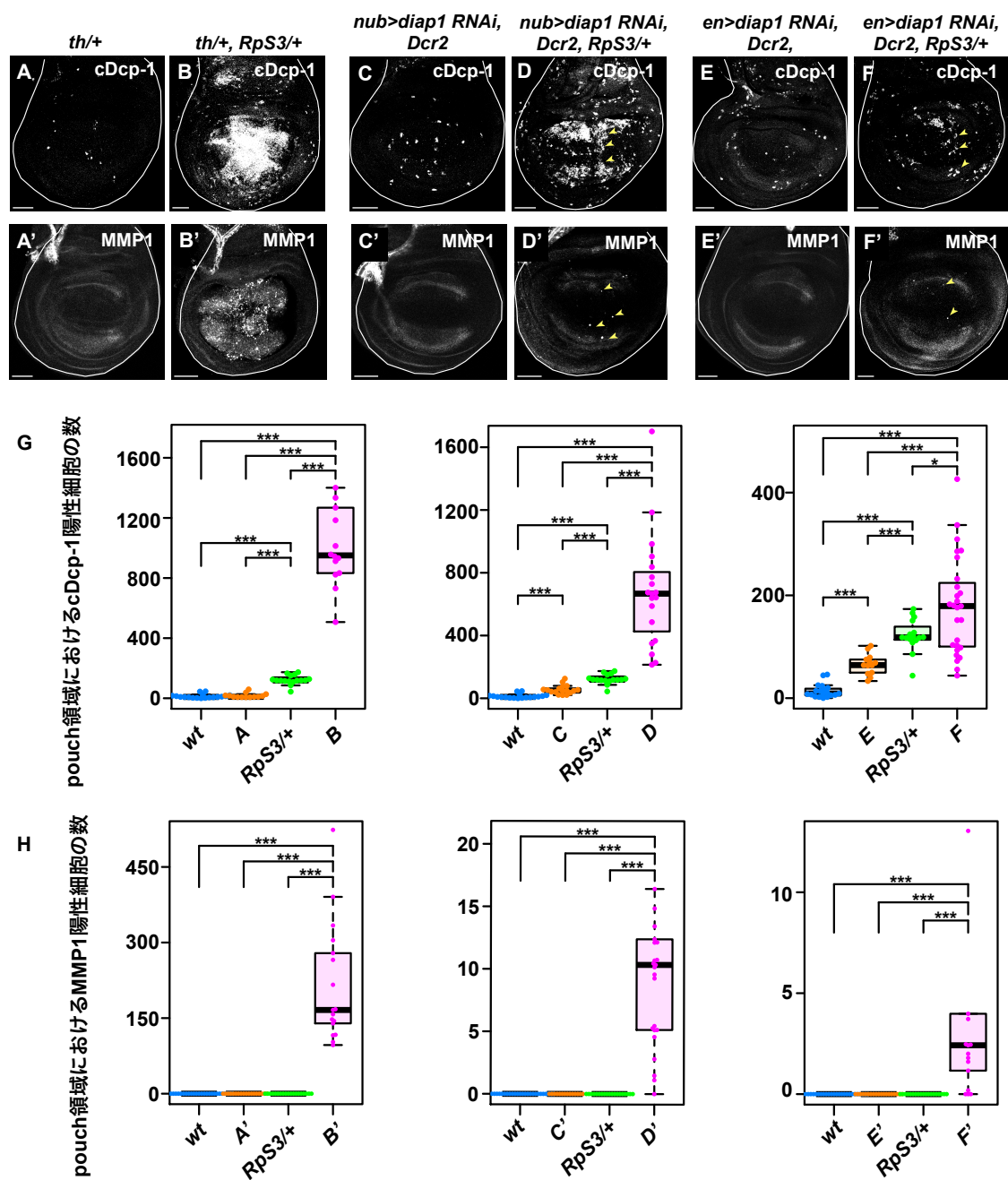


図 22. *diap1* 発現の下方制御は *RpS3/+* 変異体において異所性細胞死と JNK 活性化を引き起こす (A-F) 各遺伝子型の三齢幼虫の翅原基を示す。Anti-cleaved Drosophila Dcp-1 抗体 (白) を用いて染色した。異所性細胞死を黄色の矢尻で示す (D-F)。スケールバー: 50 μ m (A'-F') 各遺伝子型の三齢幼虫の翅原基を示す。Anti-MMP1 抗体 (白) を用いて染色した。JNK 活性化を黄色の矢尻で示す (D'-F')。スケールバー: 50 μ m (G) 各遺伝子型の翅原基 pouch 領域内の cleaved Dcp-1 陽性細胞数の分布を示す。統計学的解析は Steel-Dwass test を用いて行われた (* $p < 0.05$, *** $p < 0.001$; n は左から順に 19, 13, 16, 14, 19, 17, 16, 19, 19, 13, 16, 27)。

(H) 各遺伝子型の翅原基 pouch 領域内の MMP1 陽性細胞数の分布を示す。統計学的解析は Mann-Steel-Dwass test を用いて行われた (** $p < 0.001$; n は左から順に 26, 18, 19, 17, 26, 14, 19, 25, 26, 19, 19, 17)。

以上の結果から、*RpS3/+*変異体において *yki* を 1 コピー欠損した場合、DIAP1 の発現が翅原基の後区画で低下し、それが *Dronc*-JNK の正のフィードバックを引き起こし異所性細胞死を誘導することが示唆された (図 23)。

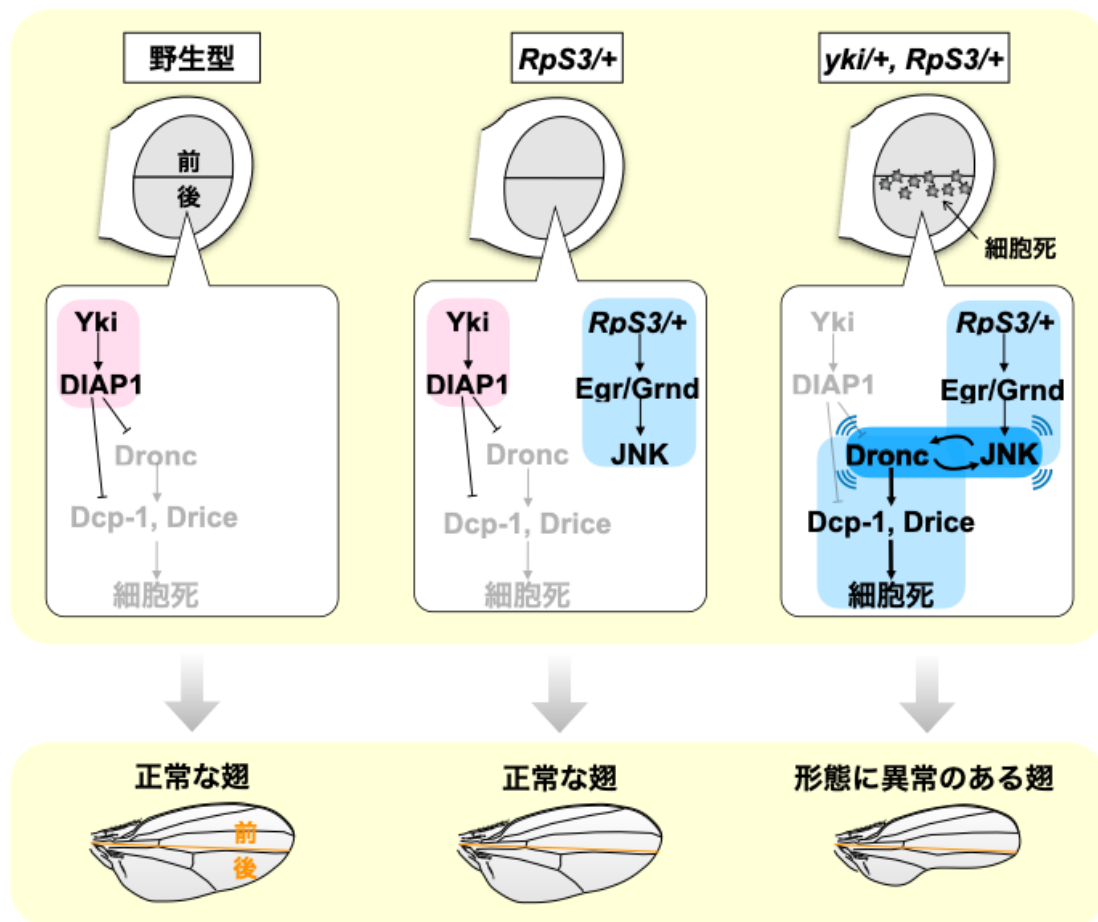


図 23. *RpS3/+*変異体は *Yki*-*DIAP1* を介して頑健な形態形成を実現する

*RpS3/+*変異体の翅原基において、JNK シグナルは前後軸に沿って潜在的に活性化しているが、*DIAP1* の発現によって JNK-*Dronc* の正のフィードバックが抑制されるため、増幅されることはない。ところが *yki/+; RpS3/+*変異体の翅原基では *DIAP1* の発現低下により、JNK-*Dronc* の正のフィードバックが強化され、異所性細胞死を誘導する。その結果、成虫翅に形態異常が生じる。

第四章 考察

本研究は、ショウジョウバエのリボソームタンパク質遺伝子変異体において、Hippo シグナル経路の転写共役因子 Yki が頑健な組織形成を制御する分子機構を明らかにした。*RpS3/+*変異体の翅上皮組織において、内在性の Yki 活性はその標的遺伝子 DIAP1 の発現を介し、Dronc-JNK を介した前後軸に沿った異所性細胞死を防ぐことで、正常な成虫翅の形成を可能にしている (図 23)。

4.1. 頑健な発生を制御する因子としての Yki の位置付け

これまで Yki の個体発生における役割は広く研究されており、組織成長や器官形成において重要な役割を担うことが知られてきた。組織・器官のサイズ制御をはじめとして、ショウジョウバエ複眼原基における網膜分化 (Wittkorn et al., 2015) や、卵子形成時の濾胞前駆細胞の運命決定 (Chen et al., 2011) においても Yki 活性が重要であることが指摘されている。本研究の結果は、Yki 活性が頑健な形態形成を制御することを示したという点で新しい。

4.2. 組織の形態を制御する JNK シグナル活性

yki/+, *RpS3/+*変異体の成虫翅の形態異常は JNK 依存的細胞死に起因することが示された。本研究のデータから、*yki/+*, *RpS3/+*変異体の翅原基において JNK シグナルの活性化は Egr-Grnd の相互作用を介して誘導される。Egr-Grnd の相互作用が強化される分子機構は未だ不明な点も多いが、Egr が翅原基で発現上昇するのは翅原基自身 (Igaki et al., 2009) の発現が上昇したか、脂肪体 (Agrawal et al., 2016) または血球細胞 (Cordero et al., 2010) に由来する Egr が移動してきた結果ではないかと考えられる。また Grnd はエンドサイトーシスの促進によって細胞膜上への発現が上昇した可能性が考えられる (Igaki et al., 2009; Palmerini et al., 2021)。さらには、*RpS3/+*変異体の翅原基において潜在的に JNK 活性が上昇することが示唆された。その理由として、*RpS3* のヘテロ接合性に起因する可能性が考えられる。あるリボソームタンパク質の遺伝子量が半減した時、細胞内の遊離リボソームは減少すると考えられる。mRNA の翻訳は遊離リボソームがどれだけあるかによって規定されると仮定すると (Lodish, 1974)、あるリボソームタンパク質遺伝子がヘテロ接合を示す時、全身においてリボソームによる全タンパク質の合成能が低下すると考えられる。この考えに則ると、*RpS3/+*変異体では全身において全タンパク質の合成能が低下すると考えられ、タンパク質レベルの低下に対する細胞のストレス応答として JNK シグナルの活性化が生じた可能性が考えられる。詳細を明らかにするためにはさらなる研究が必要とされる。また、Yki は *dMyc* の発現を正に制御し (Ziosi et al., 2010)、*dMyc* はリボソーム RNA の

合成を高める方向に働くことが報告されている (Grewal et al., 2005)。このことが *RpS3/+* 変異体においても当てはまるとすると、*yki/+*, *RpS3/+* 変異体における異所性細胞死はリボソーム生合成が全体的に低下したことで誘導された可能性も考えられる。興味深い点として、*yki/+*, *RpS3/+* 変異体の翅原基において JNK 活性化は前後軸の後区画側の細胞だけでなく前区画側の細胞にも見られる(図 15)。先行研究によると、前後軸の前区画側の領域における JNK 活性化が翅の成長制御に重要な役割を担っている (Willsey et al., 2016)。この考えに基づくと、前後軸付近の JNK シグナル活性の調節が頑健な形態形成に関与する可能性がある。

4.3. リボソームタンパク質遺伝子のヘテロ接合性と表現型

リボソームタンパク質遺伝子のヘテロ接合性は、ヒトにおいてリボソーム病の原因として知られている。リボソーム病の特徴として、組織特異的な表現型を示すことが挙げられるが、興味深いことに、*yki/+*, *RpS3/+* 変異体においても組織の形態異常は成虫翅に顕著に見られるという共通点がある。また、いくつかの *Minute* 変異体において組織特異的な表現型が報告されている。例えば、*RpS6/+* 変異体はリンパ腺において異常増殖が見られ (Watson et al., 1991)、*RpL5/+* 変異体や *RpL38/+* 変異体では成虫翅の面積が増大することが報告されている (Marygold et al., 2005)。このように、全身でリボソームタンパク質遺伝子 (と *yki*) のヘテロ変異を有するにも関わらず、なぜ特定の組織において影響が見られるのだろうか。その理由について、これまでの研究成果を踏まえながら考察していきたい。

組織特異的な表現型を示す理由の一つとして、組織によって成長制御の仕組みが異なることで特定の組織のみに影響を与える可能性が考えられる。先に述べたように、リボソームタンパク質遺伝子にヘテロ変異を有する時、全身においてリボソームによる全タンパク質の合成能が低下すると考えられる。全身で一様にタンパク質レベルが低下した時、タンパク質要求性の高い組織が影響を受けることは想像に難くない。例えば、*RpS3/+* 変異体の翅原基では大量の細胞死とそれを代償する活発な細胞増殖が起こっている (Akai et al., 2021)。こうした細胞のターンオーバーが活発な組織においては、タンパク質合成能の低下によって組織成長に影響を受けたとしても不思議ではなく、実際に、*yki/+*, *RpS3/+* 変異体において組織特異的な表現型を示す理由の一つと考えられる。これまでの研究から、タンパク質合成が活発な組織において表現型が見られることの説明として、p53 シグナル伝達経路の関与が考えられている。p53 は転写因子であり、DNA 損傷や低酸素、リボソームストレスや酸化ストレスなど様々なストレスを受けた際に活性化する。活性化すると標的遺伝子の DNA 配列に結合し、細胞周期や DNA 修復、アポトーシス、抗酸化作用や代謝経路などに関わる分子の発現制御

を行う (図 24) (Vousden and Lane, 2007)。

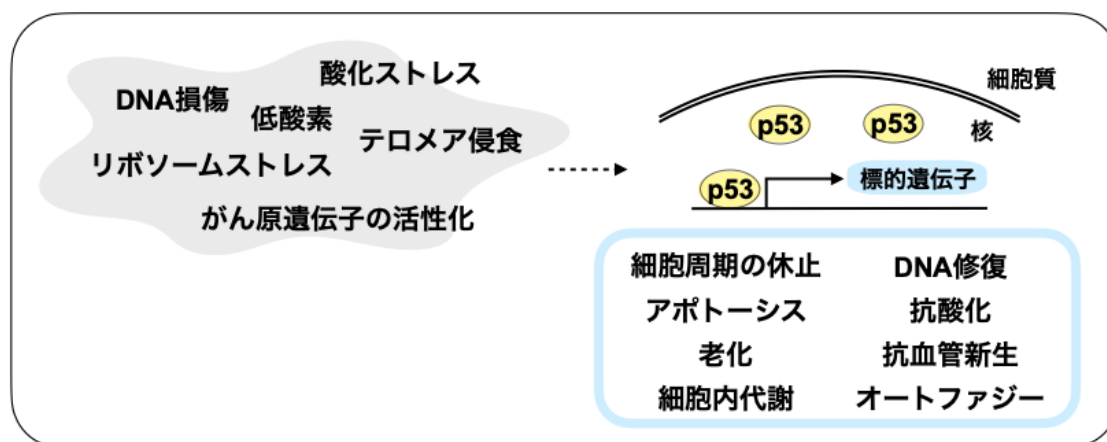


図 24. ストレス応答としての p53 の役割

細胞内ストレス時の p53 活性化による応答反応を示す。DNA 損傷や酸化ストレス、低酸素、リボソームストレス、テロメア侵食、がん原遺伝子の活性化といったストレスが発生すると、転写因子 p53 が活性化され、標的遺伝子の転写を促進し細胞周期の休止や DNA 修復、アポトーシスや老化を誘導するほか、抗酸化作用や抗血管作用、細胞内代謝の変化、オートファジーを誘導する。

この p53 の活性を制御するのが Murine double minute 2 (Mdm2) である。細胞がストレスを受けていない状態では、p53 は Mdm2 を介した制御を受ける。一つは、Mdm2 が E3 ユビキチンリガーゼとして働き、p53 をユビキチン化することでプロテアソーム分解へと導く。もう一つは、p53 の N 末端に直接結合し、ポリメラーゼ II 複合体との相互作用を阻害し p53 の転写活性を妨げる (図 25) (Wang, W. et al., 2015)。

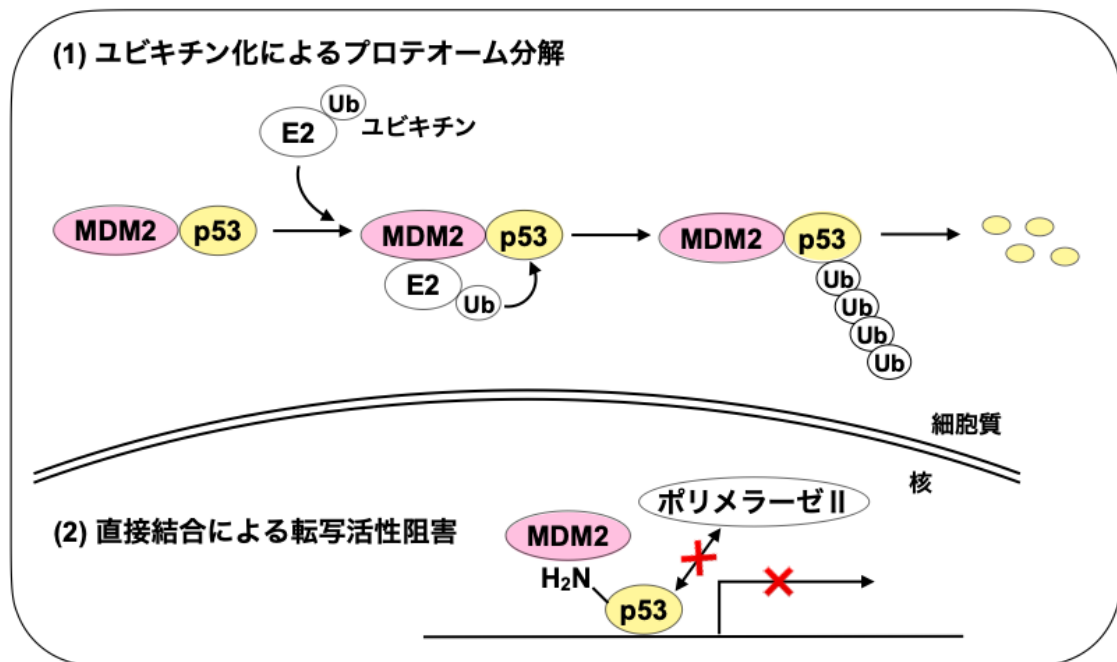


図 25. Mdm2 による p53 活性化の阻害

Mdm2 による p53 活性化阻害の作用機序を示す。Mdm2 は p53 を結合し複合体を形成する。Mdm2 は E3 ユビキチンリガーゼとして機能し、p53 をユビキチン化することでプロテアソーム分解へと導く (1)。また、p53 の N 末端に結合しポリメラーゼ II との相互作用を阻害することで p53 による転写誘導を阻害する (2)。

近年、遊離リボソームタンパク質が p53-Mdm2 複合体の形成を阻害することが報告されている (Zhang and Lu, 2009)。リボソーム生合成の損傷によりリボソームストレスが生じると、遊離リボソームタンパク質は核小体から核質に放出され、Mdm2 と直接結合する。p53-Mdm2 複合体の形成が阻害されると p53 は Mdm2 によるユビキチン化や活性阻害を免れ、標的遺伝子の転写を促進する。このようにして、リボソームタンパク質遺伝子量が減少すると p53 を安定化しその転写活性を上昇させる (図 25)。タンパク質合成が活発な組織では多量の遊離リボソームが存在し、一定以上の p53 活性上昇を起こすと考えられる。それにより標的遺伝子の転写誘導を介して細胞周期の休止やアポトーシスが起り、組織特異的な表現型を示すのではないかと考えられている (Mills and Green, 2017)。

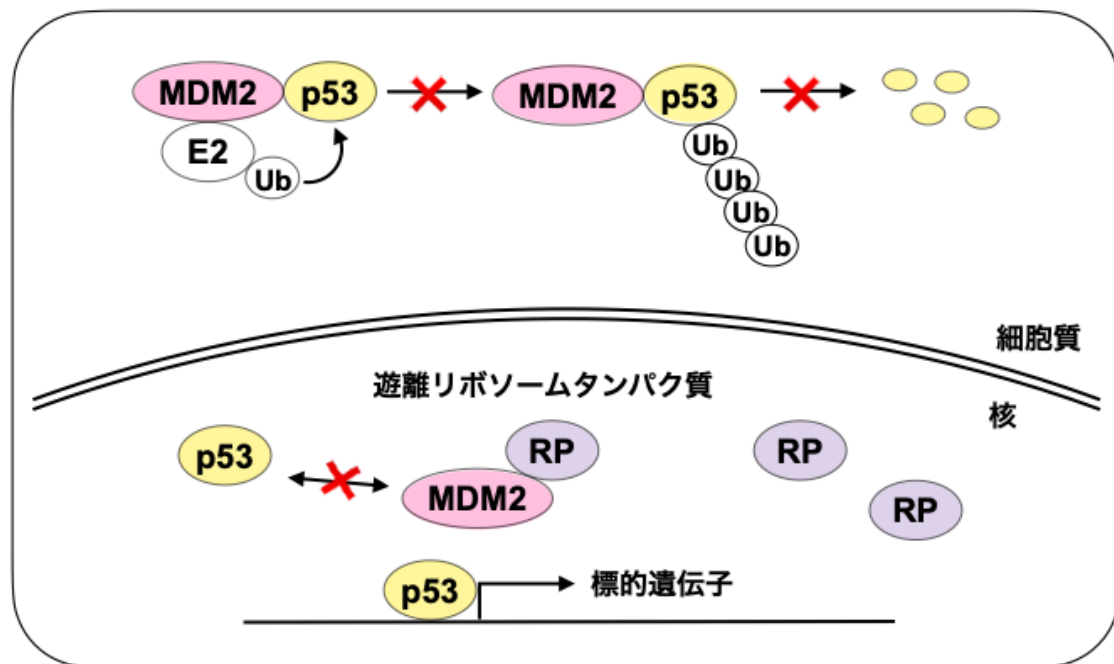


図 25. 遊離リボソームタンパク質による p53 活性化

遊離リボソームタンパク質は Mdm2 と結合し、p53-Mdm2 複合体の形成を阻害する。これにより Mdm2 を介した p53 のユビキチン化や活性阻害は行われなくなり、p53 は活性化し標的遺伝子の転写を促進する。

実際に、いくつかの研究において p53 の活性化を抑制するとリボソーム病の表現型が回復することが報告されている (Wang, W. et al., 2015)。残念ながら、*yki/+*, *RpS3/+*変異体では p53 のノックダウンを翅原基 pouch 領域で行っても形態異常が抑制されなかったが、p53 の活性化も組織特異的な表現型に寄与しているのかもしれない。

二つ目の理由として、リボソームタンパク質遺伝子のヘテロ接合性によって特定の mRNA の翻訳が影響を受ける可能性が考えられる。リボソーム病の一つであるダイヤモンド・ブラックファン貧血に関して、リボソームタンパク質遺伝子のヘテロ変異によって特定の遺伝子 (群) の発現が低下することが報告されている (Khajuria et al., 2018; Ludwig et al., 2014)。一例を挙げると、リボソームタンパク質遺伝子の発減量を低下させると転写因子 *GATA1* の mRNA 翻訳が選択的に低下する (Ludwig et al., 2014)。*GATA1* の発現が選択的に低下する理由として、*GATA1* の翻訳開始には他の遺伝子と比較して多くの mRNA 量が必要であると考えられている (図 26)。このことから、全体のリボソーム機能の低下で特定の遺伝子の翻訳過程が阻害されること、そして特定の遺伝子の mRNA 量が減少している状態と全体で翻訳活性が低下した状態が重なると、その遺伝子の発現レベ

ルが選択的に低下する可能性が示唆された。これらを踏まえると、*yki* のヘテロ変異によって *diap1* mRNA 量が低下すると仮定すると、*RpS3* のヘテロ変異によって個体全体で翻訳活性が低下し、選択的に *diap1* の発現を低下させた可能性が考えられる。

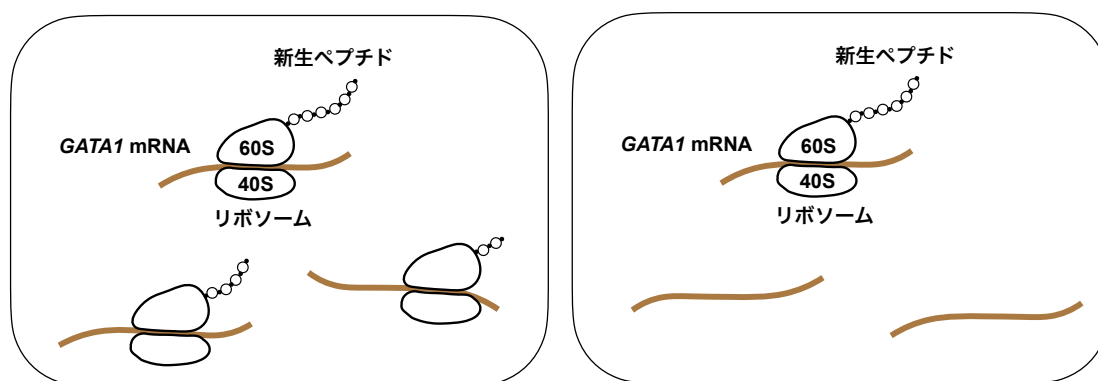


図 26. リボソーム生合成損傷時の *GATA1* mRNA 翻訳

(左) リボソームタンパク質が十分量存在しリボソームが十分量合成されているとき、*GATA1* mRNA は十分量翻訳され組織内で役割を果たす。

(右) リボソームタンパク質が不足するなどして十分な量のリボソームが合成されないとき、*GATA1* mRNA は十分量翻訳されず組織で役割を果たすだけのタンパク質が作られない。

本研究で特定された Hippo シグナルや JNK シグナル、カスパーゼ依存的細胞死の経路に関わる分子はショウジョウバエからヒトに至るまで進化的に保存されている。したがって、*Yki* を介した頑健な形態形成はリボソームタンパク質遺伝子変異体における発生異常を防ぐための進化的に保存されたプログラムかもしれない。リボソームタンパク質遺伝子のヘテロ変異に起因する発生異常の解明に役立つことが期待される。

4.4. 翅の表現型についての考察

yki+/+, *RpS3*+/+変異体の成虫翅の形態異常は主に翅の後部分に見られるが、翅原基における異所性細胞死は前後軸に局在している。こうした事実から、翅原基において大量の細胞死が誘導されるのとは別に、幼虫から蛹期を経て成虫翅が形成される過程で何らかの非自律的作用が生じていると考えられる。一方で、*yki*+/+, *RpS3*+/+変異体の翅の形態異常が後区画において高頻度で観察される点は興味深い。適応進化の観点から考えると、翅の形態は昆虫の生存戦略に重要であり、翅の形状や構造は飛行能力や求愛行動、そして新たな生息地の探索、開拓に寄与している (Beldade et al., 2011)。生息環境の異なるショウジョウバエ集団において翅の面積変化を比較した研究によると、翅の前部分に比べて後部分はより柔軟

に変化することが指摘されている (Imasheva et al., 1995)。これを踏まえると、本研究が見出した内在性の Yki 活性を介した頑健な形態形成の制御機構は、昆虫が新しい環境に適応する際の可塑的な翅の形状変化に対する機構的説明となるかもしれない。

参考文献

Agrawal, N., Delanoue, R., Mauri, A., Basco, D., Pasco, M., Thorens, B., and Léopold, P. (2016). The *Drosophila* TNF Eiger Is an Adipokine that Acts on Insulin-Producing Cells to Mediate Nutrient Response. *Cell Metabolism* 23, 675–684.

Akai, N., Ohsawa, S., Sando, Y., and Igaki, T. (2021). Epithelial cell-turnover ensures robust coordination of tissue growth in *Drosophila* ribosomal protein mutants. *PLOS Genetics* 17, e1009300.

Andersen, D.S., Colombani, J., Palmerini, V., Chakrabandhu, K., Boone, E., Röthlisberger, M., Toggweiler, J., Basler, K., Mapelli, M., Hueber, A.O., et al. (2015). The *Drosophila* TNF receptor Grindelwald couples loss of cell polarity and neoplastic growth. *Nature* 522, 482–486.

Aspesi, A., and Ellis, S.R. (2019). Rare ribosomopathies: insights into mechanisms of cancer. *Nature Reviews Cancer* 19, 228–238.

Beldade, P., Mateus, A.R.A., and Keller, R.A. (2011). Evolution and molecular mechanisms of adaptive developmental plasticity. *Molecular Ecology* 20, 1347–1363.

Bergmann, A. (2010). The role of ubiquitylation for the control of cell death in *Drosophila*. *Cell Death and Differentiation* 17, 61–67.

Berthelet, J., and Dubrez, L. (2013). Regulation of Apoptosis by Inhibitors of Apoptosis (IAPs). *Cells* 2, 163.

Bolze, A., Mahlaoui, N., Byun, M., Turner, B., Trede, N., Ellis, S.R., Abhyankar, A., Itan, Y., Patin, E., Brebner, S., et al. (2013). Ribosomal protein SA haploinsufficiency in humans with isolated congenital asplenia. *Science* 340, 976–978.

Brehme, K.S. (1939). A Study of the Effect on Development of ‘Minute’ Mutations in *Drosophila Melanogaster*. *Genetics* 24, 131–13161.

- Cmejla, R., Cmejlova, J., Handrkova, H., Petrak, J., and Pospisilova, D. (2007). Ribosomal protein S17 gene (RPS17) is mutated in Diamond-Blackfan anemia. *Human Mutation* 28, 1178–1182.
- Cordero, J.B., Macagno, J.P., Stefanatos, R.K., Strathdee, K.E., Cagan, R.L., and Vidal, M. (2010). Oncogenic ras diverts a host TNF tumor suppressor activity into tumor promoter. *Developmental Cell* 18, 999–1011.
- Davis, J.R., and Tapon, N. (2019). Hippo signalling during development. *Development* 146, dev167106.
- Ditzel, M., Broemer, M., Tenev, T., Bolduc, C., Lee, T. V., Rigbolt, K.T.G., Elliott, R., Zvelebil, M., Blagoev, B., Bergmann, A., et al. (2008). Inactivation of Effector Caspases through Nondegradative Polyubiquitylation. *Molecular Cell* 32, 540–553.
- Doherty, L., Sheen, M.R., Vlachos, A., Choessel, V., O'Donohue, M.F., Clinton, C., Schneider, H.E., Sieff, C.A., Newburger, P.E., Ball, S.E., et al. (2010). Ribosomal Protein Genes RPS10 and RPS26 Are Commonly Mutated in Diamond-Blackfan Anemia. *American Journal of Human Genetics* 86, 222–228.
- Draptchinskaia, N., Gustavsson, P., Andersson, B., Pettersson, M., Willig, T.N., Dianzani, I., Ball, S., Tchernia, G., Klar, J., Matsson, H., et al. (1999). The gene encoding ribosomal protein S19 is mutated in Diamond-Blackfan anaemia. *Nature Genetics* 21, 169–175.
- Ebert, B.L., Pretz, J., Bosco, J., Chang, C.Y., Tamayo, P., Galili, N., Raza, A., Root, D.E., Attar, E., Ellis, S.R., et al. (2008). Identification of RPS14 as a 5q - syndrome gene by RNA interference screen. *Nature* 451, 335–339.
- Fan, Y., and Bergmann, A. (2010). The cleaved-Caspase-3 antibody is a marker of Caspase-9-like DRONC activity in Drosophila. *Cell Death and Differentiation* 17, 534–539.
- Glise, B., Bourbon, H., and Noselli, S. (1995). hemipterous encodes a novel drosophila MAP kinase kinase, required for epithelial cell sheet movement. *Cell* 83, 451–461.

- Grewal, S.S., Li, L., Orian, A., Eisenman, R.N., and Edgar, B.A. (2005). Myc-dependent regulation of ribosomal RNA synthesis during *Drosophila* development. *Nature Cell Biology* 7, 295–302.
- Igaki, T. (2009). Correcting developmental errors by apoptosis: lessons from *Drosophila* JNK signaling. *Apoptosis* 14, 1021–1028.
- Igaki, T., Kanda, H., Yamamoto-Goto, Y., Kanuka, H., Kuranaga, E., Aigaki, T., and Miura, M. (2002). Eiger, a TNF superfamily ligand that triggers the *Drosophila* JNK pathway. *EMBO Journal* 21, 3009–3018.
- Igaki, T., Pastor-Pareja, J.C., Aonuma, H., Miura, M., and Xu, T. (2009). Intrinsic Tumor Suppression and Epithelial Maintenance by Endocytic Activation of Eiger/TNF Signaling in *Drosophila*. *Developmental Cell* 16, 458–465.
- Imasheva, A.G., Bubli, O.A., Lazebny, O.E., and Zhivotovsky, L.A. (1995). Geographic differentiation in wing shape in *Drosophila melanogaster*. *Genetica* 96, 303–306.
- Kanda, H., Igaki, T., Kanuka, H., Yagi, T., and Miura, M. (2002). Wengen, a member of the *Drosophila* tumor necrosis factor receptor superfamily, is required for Eiger signaling. *The Journal of Biological Chemistry* 277, 28372–28375.
- Khajuria, R.K., Munschauer, M., Ulirsch, J.C., Fiorini, C., Ludwig, L.S., McFarland, S.K., Abdulhay, N.J., Specht, H., Keshishian, H., Mani, D.R., et al. (2018). Ribosome Levels Selectively Regulate Translation and Lineage Commitment in Human Hematopoiesis. *Cell* 173, 90–103.
- Kondrashov, N., Pusic, A., Stumpf, C.R., Shimizu, K., Hsieh, A.C., Xue, S., Ishijima, J., Shiroishi, T., and Barna, M. (2011). Ribosome-mediated specificity in Hox mRNA translation and vertebrate tissue patterning. *Cell* 145, 383–397.
- Kongsuwan, K., Yu, Q., Vincent, A., Frisardi, M.C., Rosbash, M., Lengyel, J.A., and Merriam, J. (1985). A *Drosophila* Minute gene encodes a ribosomal protein. *Nature* 317, 555–558.

Lee, T. V., Fan, Y., Wang, S., Srivastava, M., Broemer, M., Meier, P., and Bergmann, A. (2011). *Drosophila* IAP1-Mediated Ubiquitylation Controls Activation of the Initiator Caspase DRONC Independent of Protein Degradation. *PLoS Genetics* 7, e1002261.

Lodish, H.F. (1974). Model for the regulation of mRNA translation applied to haemoglobin synthesis. *Nature* 1974 251:5474 251, 385–388.

Ludwig, L.S., Gazda, H.T., Eng, J.C., Eichhorn, S.W., Thiru, P., Ghazvinian, R., George, T.I., Gotlib, J.R., Beggs, A.H., Sieff, C.A., et al. (2014). Altered translation of GATA1 in Diamond-Blackfan anemia. *Nature Medicine* 20, 748–753.

Ma, X., Xu, W., Zhang, D., Yang, Y., Li, W., and Xue, L. (2015). Wallenda regulates JNK-mediated cell death in *Drosophila*. *Cell Death and Disease* 6, e1737.

Martín-Blanco, E., Gampel, A., Ring, J., Virdee, K., Kirov, N., Tolkovsky, A.M., and Martinez-Arias, A. (1998). puckered encodes a phosphatase that mediates a feedback loop regulating JNK activity during dorsal closure in *Drosophila*. *Genes and Development* 12, 557–670.

Marygold, S.J., Roote, J., Reuter, G., Lambertsson, A., Ashburner, M., Millburn, G.H., Harrison, P.M., Yu, Z., Kenmochi, N., Kaufman, T.C., et al. (2007). The ribosomal protein genes and Minute loci of *Drosophila melanogaster*. *Genome Biology* 8, R216.

McGowan, K.A., Li, J.Z., Park, C.Y., Beaudry, V., Tabor, H.K., Sabnis, A.J., Zhang, W., Fuchs, H., De Angelis, M.H., Myers, R.M., et al. (2008). Ribosomal mutations cause p53-mediated dark skin and pleiotropic effects. *Nature Genetics* 40, 963–970.

Mihaly, J., Kockel, L., Gaengel, K., Weber, U., Bohmann, D., and Mlodzik, M. (2001). The role of the *Drosophila* TAK homologue dTAK during development. *Mechanisms of Development* 102, 67–79.

Mills, E.W., and Green, R. (2017). Ribosomopathies: There's strength in numbers. *Science* 358.

Moya, I.M., and Halder, G. (2018). Hippo–YAP/TAZ signalling in organ regeneration and regenerative medicine. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 20:4 20, 211–226.

Oliver, E.R., Saunders, T.L., Tarlé, S.A., and Glaser, T. (2004). Ribosomal protein L24 defect in belly spot and tail (Bst), a mouse Minute. *Development (Cambridge, England)* 131, 3907–3920.

Palmerini, V., Monzani, S., Laurichesse, Q., Loudhaief, R., Mari, S., Cecatiello, V., Olieric, V., Pasqualato, S., Colombani, J., Andersen, D.S., et al. (2021). *Drosophila* TNFRs Grindelwald and Wengen bind Eiger with different affinities and promote distinct cellular functions. *Nature Communications* 12, 1–12.

Perkins, K.K., Admon, A., Patel, N., and Tjian, R. (1990). The *Drosophila* Fos-related AP-1 protein is a developmentally regulated transcription factor. *Genes & Development* 4, 822–834.

Polaski, S., Whitney, L., Barker, B.W., and Stronach, B. (2006). Genetic analysis of slipper/mixed lineage kinase reveals requirements in multiple Jun-N-terminal kinase-dependent morphogenetic events during *Drosophila* development. *Genetics* 174, 719–733.

Riesgo-Escovar, J.R., Jenni, M., Fritz, A., and Hafen, E. (1996). The *Drosophila* jun-N-terminal kinase is required for cell morphogenesis but not for DJun-dependent cell fate specification in the eye. *Genes and Development* 10, 2759–2768.

Ryabinina, O.P., Subbian, E., and Iordanov, M.S. (2006). D-MEKK1, the *Drosophila* orthologue of mammalian MEKK4/MTK1, and Hemipterous/D-MKK7 mediate the activation of D-JNK by cadmium and arsenite in Schneider cells. *BMC Cell Biology* 7, 1–10.

Ryoo, H.D., and Bergmann, A. (2012). The role of apoptosis-induced proliferation for regeneration and cancer. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 4.

Santabábara-Ruiz, P., Esteban-Collado, J., Pérez, L., Viola, G., Abril, J.F., Milán, M., Corominas, M., and Serras, F. (2019). Ask1 and Akt act synergistically to promote ROS-dependent regeneration in *Drosophila*. *PLoS Genetics* *15*, e1007926.

Shlevkov, E., and Morata, G. (2012). A dp53/JNK-dependant feedback amplification loop is essential for the apoptotic response to stress in *Drosophila*. *Cell Death and Differentiation* *19*, 451–460.

T. Hellwig, C., Passante, E., and Rehm, M. (2011). The molecular machinery regulating apoptosis signal transduction and its implication in human physiology and pathophysiology. *Current Molecular Medicine* *11*, 31–47.

Toggweiler, J., Willecke, M., and Basler, K. (2016). The transcription factor Ets21C drives tumor growth by cooperating with AP-1. *Scientific Reports* *6*, 1–10.

Uhlirova, M., and Bohmann, D. (2006). JNK- and Fos-regulated Mmp1 expression cooperates with Ras to induce invasive tumors in *Drosophila*. *The EMBO Journal* *25*, 5294–5304.

Vousden, K.H., and Lane, D.P. (2007). p53 in health and disease. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* *8*, 275–283.

Wang, R., Yoshida, K., Toki, T., Sawada, T., Uechi, T., Okuno, Y., Sato-Otsubo, A., Kudo, K., Kamimaki, I., Kanazaki, R., et al. (2015a). Loss of function mutations in *RPL27* and *RPS27* identified by whole-exome sequencing in Diamond-Blackfan anaemia. *British Journal of Haematology* *168*, 854–864.

Wang, W., Nag, S., Zhang, X., Wang, M.H., Wang, H., Zhou, J., and Zhang, R. (2015b). Ribosomal proteins and human diseases: Pathogenesis, molecular mechanisms, and therapeutic implications. *Medicinal Research Reviews* *35*, 225–285.

Wang, X.S., Diener, K., Jannuzzi, D., Trollinger, D., Tan, T.H., Lichenstein, H., Zukowski, M., and Yao, Z. (1996). Molecular cloning and characterization of a novel protein kinase with a catalytic domain homologous to mitogen-activated protein kinase kinase kinase. *The Journal of Biological Chemistry* *271*, 31607–31611.

Watkins-Chow, D.E., Cooke, J., Pidsley, R., Edwards, A., Slotkin, R., Leeds, K.E., Mullen, R., Baxter, L.L., Campbell, T.G., Salzer, M.C., et al. (2013). Mutation of the Diamond-Blackfan Anemia Gene *Rps7* in Mouse Results in Morphological and Neuroanatomical Phenotypes. *PLoS Genetics* 9, e1003094.

Willis, D.K., Wang, J., Lindholm, J.R., Orth, A., and Goodman, W.G. (2010). Microarray Analysis of Juvenile Hormone Response in *Drosophila melanogaster* S2 cells. *Journal of Insect Science* 10, 1–14.

Willsey, H.R., Zheng, X., Pastor-Pareja, J., Willsey, A.J., Beachy, P.A., and Xu, T. (2016). Localized JNK signaling regulates organ size during development. *ELife* 5, e11491.

Zhang, Y., and Lu, H. (2009). Signaling to p53: ribosomal proteins find their way. *Cancer Cell* 16, 369–377.

Ziosi, M., Baena-López, L.A., Grifoni, D., Froidi, F., Pession, A., Garoia, F., Trotta, V., Bellosta, P., Cavicchi, S., and Pession, A. (2010). dMyc Functions Downstream of Yorkie to Promote the Supercompetitive Behavior of Hippo Pathway Mutant Cells. *PLoS Genetics* 6, e1001140.

謝辞

本研究を行うにあたり多くのご指導、ご協力をいただきました井垣達吏教授(京都大学大学院生命科学研究科)と大澤志津江教授(名古屋大学大学院理学研究科)に対し、深く感謝申し上げます。実験材料として、ショウジョウバエ系統を分与していただいた Duojia Pan 博士 (The University of Texas Southwestern Medical Center, USA)、Jin Jiang 博士 (University of Texas Southwestern Medical Center, USA)、Sharad Kumar 博士 (University of South Australia, Australia)、三浦正幸博士 (東京大学、日本)、広海健博士 (国立遺伝学研究所、日本)、Enrique Martin-Blanco 博士 (IBMB - Molecular Biology Institute of Barcelona, Spain)、Robert Holmgren 博士 (Northwestern University, USA)、倉永英里奈博士 (東北大学、日本)、Bruno Lemaitre 博士 (EPFL, Switzerland)、the Bloomington Stock Center (USA)、the Vienna *Drosophila* RNAi Center (Austria)、the National Institute of Genetics Stock Center (日本)、the *Drosophila* Genomics and Research Center (日本)、そして anti-DIAP1 抗体を分与していただいた Bruce Hay 博士 (The California Institute of Technology, USA) に対し、この場を借りて厚く御礼申し上げます。井垣研究室の方々には、研究活動や日々の生活など様々な面でサポートしていただいたこと、心より感謝申し上げます。また、これまでの生活を支援していただいた家族に対し、深く感謝申し上げます。

本学位論文は、以下の学術論文の内容に基づいて書かれたものである。

Yayoi Wada, Shizue Ohsawa, Tatsushi Igaki

Yorkie ensures robust tissue growth in *Drosophila* ribosomal protein mutants

Development (2021) 148 (14): dev198705