

シヨウジヨウバエの転写因子、
FTZ-F1強制発現による発生への影響

村田 武英

博士（理学）

総合研究大学院大学

生命科学研究所

遺伝学専攻

平成5年度

（1993年）

ショウジョウバエの転写因子、FTZ-F1強制発現の発生への影響

総合研究大学院大学遺伝学専攻

村田 武英

目次	・・・	1
要旨	・・・	2
序論	・・・	8
材料と方法	・・・	12
結果		
第一部 FTZ-F1の発現パターン	・・・	20
1. 抗体の検定	・・・	20
2. 胚におけるFTZ-F1の発現パターン	・・・	21
3. 幼虫におけるFTZ-F1の発現パターン	・・・	22
4. 前蛹および蛹におけるFTZ-F1の発現パターン	・・・	23
第二部 FTZ-F1強制発現系	・・・	25
1. 遺伝子導入と強制発現の検査	・・・	25
2. 強制発現の時期特異的影響	・・・	27
3. 強制発現による致死	・・・	32
考察	・・・	36
謝辞	・・・	45
引用文献	・・・	46
図表		

ショウジョウバエの転写因子、FTZ-F1強制発現の発生への影響

総合研究大学院大学 遺伝学専攻

村田 武英

要旨

FTZ-F1は、ショウジョウバエ *fushi tarazu* (*ftz*) 遺伝子の発現調節領域に塩基配列特異的に結合する因子であり、ステロイドホルモンレセプターと類似のアミノ酸配列を持つ。トランスジェニックフライおよび *in vitro* 転写系の実験から、*ftz* の発現にポジティブに働く可能性が示されているが、そのほかの機能は明らかではない。そこでFTZ-F1の生体内での機能を明らかにするためにFTZ-F1の発現パターンおよびトランスジェニックフライでのFTZ-F1の強制発現による影響を調べた。

FTZ-F1は胚、幼虫、蛹および成虫に存在し、 α FTZ-F1および β FTZ-F1の、少なくとも二つのアイソフォーム (isoform) が存在することがゲルシフトアッセイの結果から明らかになっている。胚では産卵後4時間までに α FTZ-F1が、また、産卵後13時間以降に β FTZ-F1がそれぞれ存在するが、発現部位は不明であった。そこで抗FTZ-F1抗血清を用いた組織染色を行った結果、FTZ-F1は、初期胚ではステージ8 (産卵後3.75-4.5時間)まで極細胞を除く胚全体で発現しその後消失すること、後期胚ではステージ14 (産卵後11.5-13時間)からふたたび胚全体で発現することがわかった。初期胚および後期胚ともに抗体による染色は主に核に存在した。

1齢幼虫から3齢幼虫でのFTZ-F1の発現をウエスタンブロッティングによって調べたところ、産卵後42-51時間および69-75時間に β FTZ-F1の発現を観察した。この時期はそれぞれ1-2齢幼虫脱皮および2-3齢幼虫脱皮の時期にあたる。1-2齢幼虫脱皮頃の幼虫を抗FTZ-F1抗血清によって染色したところ、唾腺、前胃、脂肪体、トラキア (trachea)、リンググランド (ring gland) およびマルピギー氏管 (Malpighian tubules) など多くの組織で核に染色が観察された。

ワンダリング幼虫および囲蛹殻形成後0から20時間の前蛹および蛹で

のFTZ-F1の発現をウエスタンブロッティングによって調べたところ、囲蛹殻形成後6時間から12時間に β FTZ-F1の発現が観察された。

以上の結果から、FTZ-F1は時期特異的に多くの組織で発現すること、いずれの組織の発現でも主に核に存在することがわかった。また、FTZ-F1は転写因子であることから、時期特異的なFTZ-F1の発現によって標的遺伝子の発現時期を調節していることが考えられた。また、幼虫および前蛹期では、それぞれ脱皮および蛹化の直前から発現しはじめることから、ショウジョウバエの脱皮や変態に関与する遺伝子群の発現調節を担っていることが予想された。

ところで、これまでにFTZ-F1遺伝子の突然変異体は得られていない。そこで、ショウジョウバエ*hsp70*遺伝子プロモーター領域をもつFTZ-F1融合遺伝子 (*hsFTZ-F1*)を作成し、*P*-elementにより*white*系統に導入することによって*hsFTZ-F1*系統 (*hs α 227*系統、*hs α 338*系統および*hs β 332*系統)を得た。このトランスジェニックフライは、熱ショックによってFTZ-F1を発現できる。

まず熱ショックによってFTZ-F1が誘導されるかをウエスタンブロッティングで調べた。*hs α 227*系統と*hs α 338*系統では38°C60分の熱ショックによって誘導されるFTZ-F1タンパクのレベルは熱ショック終了後2時間で最高に達し、内在性FTZ-F1のレベルに比べ2から3倍であり、その半減期は約1時間であった。*hs β 332*系統では38°C60分の熱ショックによって10倍以上の発現があり、32°Cでは、内在性のレベルに比べ約2倍であった。

つぎに、FTZ-F1の時期特異的な強制発現による影響を調べるために、バランス染色体とheterozygousにした*hsFTZ-F1*系統を*white*系統とかけあわせ、得られたF1世代のショウジョウバエに熱ショックを与え、FTZ-F1を強制的に発現させた。強制発現の影響はバランスされた (コントロール)成虫の出現数に対するバランスされていない (*hsFTZ-F1*)成虫の出現数の比を求めることにより調べた。3時間ごとにステージ分けした産卵後24-108時間の幼虫 (25°Cで飼育)に対して熱ショック (38°C60分)を与えたところ、産卵後36-42時間の1齢幼虫および、57-69時間の2齢幼虫でいずれの*hsFTZ-F1*系統の成虫出現比も0近くにまで減少した。この時期には

ウエスタンブロットリング法で調べた限りFTZ-F1は検出されず、本来FTZ-F1が発現する直前にあたる。この実験から、FTZ-F1の強制発現の影響をうける時期に特異性があることが示され、FTZ-F1は時期特異的に発現することが重要な因子であると考えられた。一方、1齢幼虫初期（産卵後24-33時間）、2齢幼虫初期（産卵後51-54時間）、3齢幼虫期前半（産卵後75-108時間）では、FTZ-F1が本来発現していないにもかかわらず、FTZ-F1の強制発現の影響が認められないことがわかった。これらの時期にFTZ-F1の強制発現の影響が少なかったことに対して、FTZ-F1が転写因子として機能できなかった可能性と、FTZ-F1は転写因子として機能したが、誘導された標的遺伝子産物が発生に影響を及ぼさなかった可能性が考えられた。前者に関しては、FTZ-F1が機能するためには、何らかの要因、例えばFTZ-F1による転写活性化に必要なリガンドやmodifierあるいはcofactorなどが必要であり、それらが時期特異的に存在している可能性が考えられた。

FTZ-F1強制発現による致死がどのように引き起こされるかを調べるために、産卵後57-60時間の2齢幼虫中期に38°C60分の熱ショックを与え、その後、25°Cでの発生を観察した。*white*系統ではほとんどが3齢幼虫を経て蛹まで発生を続けたのに対し、*hsFTZ-F1*系統の多くが3齢幼虫特有のアンテリアスピラクル (anterior spiracle)の構造を示さないまま死んだ。熱ショック後48時間の幼虫の形態をくわしく観察すると、*white*系統では3齢幼虫の形態を示していたが、*hsFTZ-F1*系統はマウスフック (mouth hook)およびスピラクルを二組もっており、その形態は2齢および3齢幼虫のそれぞれの特徴をもっていた。さらにトラキアは二重化していた。この形態から考えて、*hsFTZ-F1*系統は3齢幼虫への脱皮の準備はできているが、脱皮はしていないと考えられた。

この実験結果からFTZ-F1がショウジョウバエの脱皮にかかわっており、正確な脱皮のためにはFTZ-F1の時期特異的な発現が必要であることが示唆された。遺伝子の差次的な発現調節に関して、エクジステロイドによる遺伝子発現調節機構のモデルが、Ashburnerら (1974)によって提唱されている。20-OH-ecdysone処理に対する75CDパフの反応の観察および、FTZ-F1の発現時期から、FTZ-F1はエクジステロイドによる差次的な遺伝子発現のうち比較的おそい時期に発現する因子であることが推測される。FTZ-F1

の強制発現は、FTZ-F1の標的遺伝子を本来発現しない時期に誘導し、エクジステロイド (ecdysteroids)によって誘導される脱皮のための遺伝子群の発現順序を乱すことが推測された。FTZ-F1の発現時期、FTZ-F1強制発現による致死の時期特異性および致死幼虫の形態から、FTZ-F1は、時期特異的に発現することが重要でそれによってショウジョウバエの脱皮や変態にかかわる遺伝子の時期特異的な発現の調節を行っている因子であると推測された。

Ectopic expression of FTZ-F1 affects larval
development in *Drosophila melanogaster*.

Takehide MURATA

Department of Genetics

The Graduate University for Advanced Studies

ABSTRACT

FTZ-F1, a member of the steroid receptor superfamily, has been implicated in the activation of the homeobox segmentation gene *fushi tarazu* in early embryogenesis of *Drosophila*. However, function of this factor in the post embryonic development remained to be elucidated.

To investigate the function of FTZ-F1, temporal and spatial expression patterns of FTZ-F1 during larval and prepupal development were analyzed. Western blotting analysis revealed that FTZ-F1 is only expressed at around first and second larval ecdysis and before pupation. Anti FTZ-F1 antiserum stains the nuclei of almost all tissues so far examined: e.g. salivary gland, fat body, ring gland, gut, proventriculus, trachea and Malpighian tube. However, the staining was only observed in each larval molting and cryptocephalic pupa. The nuclear localization of FTZ-F1 is consistent with the fact that FTZ-F1 acts as a transcription factor. The temporally restricted expression of FTZ-F1 suggests that FTZ-F1 is involved in larval molting and/or ecdysis, and pupation.

To study *in vivo* function of FTZ-F1, I established transgenic flies carrying the *hsp70* promoter-*FTZ-F1* cDNA fusion gene (*hsFTZ-F1*) capable of ectopic expression of FTZ-F1 by heat shock. In these *hsFTZ-F1* lines, FTZ-F1 was expressed 3- to more than 10-fold over the endogenous FTZ-F1 level by heat treatment at 38 °C for 60 minutes. *hsFTZ-F1* lines were heat shocked at different developmental stages of larva and emergence of adult were counted. When larvae aged 36-42 hours or 57-69 hours after egg laying (AEL) were heat shocked at 38 °C for 60 minutes, these animals died before adult, although non heat shocked larvae of these lines or heat shocked larvae of wild type developed normally to the adult stage. Both of these heat sensitive periods are slightly before endogenous FTZ-F1 expression. Wild type larvae heat shocked at the mid second instar (57-60 hours AEL) became

third instar larvae at 48 hours after heat treatment. However, the larvae expressed FTZ-F1 ectopically at 57-60 hours AEL were arrested at the second-third transition as indicated by the presence of both second- and third-instar mouth hooks and anterior spiracles. These results suggest that temporally restricted expression of FTZ-F1 is important for the development of larva, and that FTZ-F1 regulates genes associating with ecdysis.

序論

完全変態昆虫は、幼虫脱皮を繰り返し、幼虫から蛹になる変態期を経て成虫になる。この脱皮過程 (molting) や変態 (metamorphosis) に関わるホルモンとしてエクジステロイド (ecdysteroids) が知られている。

昆虫の幼虫においてこのホルモンは、一連の脱皮過程で差次的に起こる数多くの生理学的あるいは生化学的過程の制御に関わっている。例えば、幼虫期のエクジステロイドは摂餌の終了あるいはガットパージ (gutpurge) といった脱皮過程の準備段階を制御している。また、脱皮過程の始まりであるアポリシス (apolysis) や、上皮細胞の成長、新しいクチクラ (cuticle) 層の分泌、古いクチクラの消化あるいは新しい表皮の硬化など、直接、脱皮過程に関わる過程はいうまでもなく、古いクチクラの黒化の開始にもエクジステロイドは関わっており、最終的に古い皮をぬぎすてる脱皮 (ecdysis) をおこす。

変態期においてエクジステロイドは、ガットパージ、ワンダリング (wandering) の終了、まゆを紡ぐことといった変態の準備段階を制御している。さらに、アポリシスや幼虫組織のヒストリシス (hystolysis)、成虫組織の再構成や成虫原基 (imaginal disc) の伸長など、多くの生理学的あるいは生化学的過程の開始もエクジステロイドが引金となっている (Bownes, 1990; Koolman, 1990)。

現在、このエクジステロイドの作用として、遺伝子の活性化あるいは抑制が示されており、エクジステロイドは、脱皮過程や変態期に起こるこれらの反応を触媒する酵素や生体の構成成分をコードしている遺伝子群の差別的な発現を調節するシグナルとなっていると考えられる (reviewed by Richards, 1992)。

エクジステロイドによる遺伝子発現の調節機構の解析における初期過程において、パフ (puff) の消長の観察は重要な役割を果たしてきた。つまり、いくつかの昆虫で、多糸染色体のパフが観察され、その結果、多くのパフが組織特異的に活性化されることおよび、パフフィンギングパターン (puffing pattern) は発生に伴って変化すること (Beermann, 1956) が明らかになり、パフの活性化はその位置にある遺伝子が実際に活性化されていることを示すという考え方が生まれた (reviewed by Ashburner, 1990)。Becker (1959) は、ショウジョウバエの前蛹期頃の唾腺におけるパフフィンギングパターンの経時的変化を詳細に示し、これらの変化はエクジステロイドによって引き起こされるのではないかという可能性を示した。

Ashburnerらは器官培養したショウジョウバエの唾腺を用いて、20-OH-ecdysoneとパフの消長についてさらに実験を重ねることにより、エクジステロイドによる遺伝子発現調節に対して一つのモデルを提唱した (Ashburner *et al.*, 1974)。それによると、エクジステロイドと結合したエクダイソンレセプター (ecdysone receptor) は、intermoltパフおよびlateパフに存在する遺伝子 (late遺伝子) を抑制する一方で、earlyパフに存在する遺伝子 (early遺伝子) を活性化する。生じたearly遺伝子産物がearly遺伝子を抑制する一方、late遺伝子を活性化する (Ashburner *et al.*, 1974)。early遺伝子は、このようにしてlateパフの差次的発現を指揮することによって、エクジステロイドシグナルを伝えたり増幅したりする調節因子として働くと考えられた (Andres and Thummel, 1992)。さらにRichards (1976a, 1976b)により、earlyパフおよびlateパフの発現に引続き、前蛹期中期以降にmid prepupalパフおよび、late prepupalパフが発現されることが示されている。

最近、パフの位置にコードされている転写因子（塩基特異的DNA結合タンパク）がクローニングされてきており、Ashburnerらの提唱したモデルが分子生物学のレベルで証明されつつある。すなわち、Broad-Complex (DiBello *et al.*, 1991), *EcR* (Koelle *et al.*, 1991), *E74* (Burtis *et al.*, 1990; Janknecht *et al.*, 1989), *E75* (Feigl *et al.*, 1989; Segraves and Hogness, 1990), *E78* (Stone and Thummel, 1993), *DHR3* (Koelle *et al.*, 1992), *FTZ-F1* (Lavorgna *et al.*, 1991, 1993)である。これらの遺伝子の多くが複数のプロテインアイソフォーム (protein isoform)をコードしている。*EcR*では組織特異的に異なるプロテインアイソフォームが発現していることが示された (Talbot *et al.*, 1993)。このように、エクジステロイドによって発現調節される数多くの転写因子が存在し、さらに複数のプロテインアイソフォームをコードする場合は、これらの遺伝子産物がエクジステロイドによる遺伝子発現の複雑な制御を媒介する役割を担っていることを示唆する (Richards, 1992; Segraves, 1991)。

*FTZ-F1*は、ショウジョウバエ *fushi tarazu (ftz)* 遺伝子の転写開始点の上流-280bpのところに塩基特異的に結合する因子として見いだされた (Ueda *et al.*, 1990)。この*FTZ-F1*には、ゲルシフトでの移動度の違いから、 α *FTZ-F1*および β *FTZ-F1*の少なくとも二つのプロテインアイソフォームが存在することが示されている (Ueda *et al.*, 1990)。 α *FTZ-F1*は、*ftz*が発現する胞胚期頃に存在することおよび、*FTZ-F1*結合部位に α *FTZ-F1*が結合できなくなった*ftz*遺伝子を持つトランスジェニックフライを用いた実験から、生体内で*ftz*の発現にポジティブに働く可能性が示唆されて

いる (Ueda *et al.*, 1990)。一方、 β FTZ-F1は、後期胚、幼虫、蛹および、成虫にも存在することが明らかにされている (Ueda *et al.*, 1990)が、この時期には *ftz* の発現が報告されておらず、その機能は不明であった。その後の遺伝子解析から FTZ-F1 はステロイドホルモンレセプター (steroid hormone receptor) に属する転写因子であることが明らかにされている (Lavorgna *et al.*, 1991, 1993)。また、FTZ-F1 cDNA をプローブに用いた唾腺染色体への *in situ* ハイブリダイゼーションの結果、FTZ-F1 遺伝子は 75CD に位置することが明らかになった (Lavorgna *et al.*, 1991)。この 75CD には mid prepupal パフに属するパフが存在し、このパフは 20-OH-ecdysone のパルスを与えた後に活性化されることが明らかになっている (Richards, 1976b)。

FTZ-F1 に相当するカイコの因子 BmFTZ-F1 が見出されており、BmFTZ-F1 が、幼虫脱皮、蛹化、羽化の直前に発現し、20-OH-ecdysone のパルスによって誘導されることが観察されている (Sun *et al.*, 1994)。また、*ftz* 遺伝子を鋳型とした *in vitro* 転写系で、BmFTZ-F1 は *ftz* の転写にポジティブに働く因子であることが示された (Li *et al.*, 1994)。

以上のような解析にも関わらず、*ftz* の発現に関わる可能性以外、FTZ-F1 の機能は明らかではない。そこで FTZ-F1 の生体内での機能を明らかにするためにショウジョウバエの FTZ-F1 の発現パターンおよびトランスジェニックフライでの FTZ-F1 の強制発現による生体への影響を調べた。

材料と方法

系統

遺伝子導入のホストおよびコントロール系統の *y Df (1)w67C1* (以下、*white* 系統と呼ぶ)、バランサー系統の *y Df (1)w67C1 ; Cy0 / Gla* (以下、*Cy0 / Gla*) および、バランサー系統の *y Df (1)w67C1 ; TM3, Sb Ser / Pr e* (以下、*TM3 / Pr*) は、林茂生博士 (国立遺伝学研究所) から頂いた。

飼育

飼育温度はインキュベーターによって25℃に保った。特に断わりのない場合はすべて25℃で飼育した。系統の作成、維持および、熱ショック後の幼虫の飼育のためには、標準培地 (0.6% 寒天、5.5% コーンミール、3.3% ドライイースト、8% グルコース) を用いた。幼虫の形態を観察する場合には Instant *Drosophila Medium* (Carolina Biological Supply Company) を用いて飼育した。

幼虫および前蛹のステージ分け

1齢から3齢までの幼虫は産卵後の経過時間でステージを分けた。生育速度にばらつきが生じるため、3齢後期幼虫 (産卵後102-117時間) は、摂食期の幼虫とワンダリング期の幼虫が混在するようになる。そこで、餌の中において摂食行動をしていたものを摂食期幼虫と判断し、飼育びんの内壁を歩いていた幼虫をワンダリング期幼虫と判断し区別して扱った。

ワンダリング期幼虫のステージ分けは Karim and Thummel (1992) の方法に従って行なった。つまり、初期3齢幼虫を 0.05% bromophenol blue (Wako) を含む培地に置きこの餌を食べさせた。すると、摂食期の幼虫は bromophenol blue の入った餌を食べるため、腸が青くなる。しかし、幼虫がワンダリングし始めると餌を食べなく

なり、外から透けて見える腸の青色の染色は徐々に薄くなる。そこで、青い腸を見せ活発に飼育びんの壁を登っているワンダリング幼虫は、囲蛹殻形成の12時間以上前である (-12)とし、完全に腸の青色が消えた幼虫は囲蛹殻形成前3-1.5時間である (-3)とした。

前蛹および蛹期初期のステージ分けは、囲蛹殻を形成したwhite prepupaを集めることで発生段階をそろえ、その後25℃で発生させ、経過時間を変えることよって行なった。

上記のようにステージ分けしたワンダリング幼虫、前蛹および、蛹は-70℃で保存し、以下の解析に用いた。

ウエスタンブロッティング

抗FTZ-F1ウサギ抗血清T233および免疫前血清はCarl Wu博士 (NIH, USA)からいただいた。

-70℃に保存してあった幼虫、前蛹および蛹2mgに対して5 μ lの2x Laemmli sample buffer (5% SDS、100mM Tris-HCl, pH6.8、100mM DTT、0.05% bromophenol blue、20% グリセロール)を加え、Eppendorf tube中でホモジナイズした。ホモジナイズ後、95℃で5分間加熱し、Laemmli sample bufferと同量の水を加え電気泳動用サンプルとした。なお、余ったサンプルは-70℃で保存した。

タンパクの電気泳動は、Laemmli法で行なった。通常、8% SDS ポリアクリルアミドゲルを用い、各レーン当り生体重量1.2mg相当のサンプルをLaemmli泳動バッファー (192mM グリシン、25mM トリス2-アミノ-2-ヒドロキシメチル-1,3-プロパンジオール、0.1% SDS)で電気泳動した。

泳動したタンパクのニトロセルロース膜への転写は、トランスファーバッファー (25mMトリス2-アミノ-2-ヒドロキシメチル-1,3-プロパンジオール、192mMグリシ

ン、20%メタノール)中で10時間以上(電圧60Vで0°Cに保って)、電氣的に行なった。

転写後のニトロセルロース膜は、直ちにTBST (10mM Tris-HCl, pH8.0、150mM NaCl、0.05% Twin20)で洗浄し、5% skim milkを含むTBSTでブロッキングした。その後、ニトロセルロース膜を10000倍に希釈した抗FTZ-F1抗血清T233または10000倍に希釈した免疫前血清および、5% skim milkを含むTBST中で室温で2時間インキュベートした。TBSTで3回洗浄後、7500倍希釈anti-rabbit IgG alkaline phosphatase conjugate (ProtoBlot, Promega)および、5% skim milkを含むTBSTでインキュベートした。TBSTで3回洗浄後、Alkaline phosphatase反応溶液 (100mM Tris-HCl, pH9.5、100mM NaCl、5mM MgCl₂)で1回洗浄後、0.33 mg/ml nitro blue tetrazolium (ProtoBlot, Promega)および、0.165 mg/ml 5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate (ProtoBlot, Promega)をふくむAlkaline phosphatase反応溶液中で発色させた。発色反応は、蒸留水で洗浄することにより終了させた。

抗体組織染色

特に断らない限り以下の作業は室温で行なった。

胚の免疫染色：産卵後、一定時間25°Cで保温した胚は、50%ブリーチ(次亜塩素酸ソーダ)によってchorionを除き、水で洗浄した後、4%パラフォルムアルデヒドを含むPBS (10mM NaH₂PO₄, pH7.1、130mM NaCl)およびヘプタン中で穏やかに浸透しながら20分間固定した。固定した胚はヘプタンおよびメタノール中で洗浄することによってvitellin membraneを除いた。0.1% H₂O₂を含むメタノールで2分間インキュベートした後、メタノールで2回洗浄した。その後、PBS:メタノール(1:1)溶液で洗浄し、さらにPBSで洗浄後、TBS-TB (20mM Tris-HCl, pH7.5, 130mM NaCl, 1mM EDTA, 0.1% triton X-100, 0.2% BSA)で3回洗浄した。ブロッキングはTBS-TB中で3時間インキュベートすることにより行なった。一次抗体による反応は、2000倍希釈した抗

FTZ-F1抗血清T233を含むTBS-TB中で10時間以上インキュベートすることにより行なった。TBS-TBで6回洗浄後、二次抗体による反応を、400倍希釈したanti-rabbit IgG biotin conjugateを含むTBS-TB中で2時間インキュベートすることにより行なった。TBS-TBで6回洗浄後、Vectastain Elite ABC kitを用い、0.5mg/ml 3,3'-diaminobenzidine、100mM Tris-HCl, pH7.5、0.003% H₂O₂の条件下で染色した。発色反応の停止はTBSTで2回洗浄することにより行なった。この後、染色した胚は80%グリセロールでマウントし、光学顕微鏡下で観察した。胚のステージ分けは、Campos-Ortega and Hartenstein (1985)に従った。

幼虫組織の免疫染色：PBS中で解剖した幼虫組織を組織固定溶液（2% パラフォルムアルデヒド、10mM NaIO₄、7.5mM リジン塩酸、37mM NaH₂PO₄, pH7.1）中で40分間固定し、0.5% NP40を含むPBSで15分間インキュベートした。次に、0.5% skim milk および0.1% NP40をふくむPBS中で5分づつ3回洗浄した。一次抗体による反応は、2000倍希釈した抗FTZ-F1抗血清T233、0.5% skim milk、0.1% sodium azide および0.1% NP40をふくむPBS中で10時間以上インキュベートすることにより行なった。次に、0.5% skim milk および0.1% NP40をふくむPBSで3回洗浄後、二次抗体による反応を400倍希釈したanti-rabbit IgG HRP、0.5% skim milk および0.1% NP40をふくむPBS中で2時間インキュベートすることにより行なった。その後、0.5% skim milk および0.1% NP40をふくむPBSで3回洗浄した。発色反応は0.5mg/ml 3,3'-diaminobenzidine、100mM Tris-HCl, pH7.5、0.003% H₂O₂中で行なった。発色反応の停止は0.1% Tween20を含むPBSで2回洗浄することにより行なった。この後、染色した幼虫組織は80%グリセロールでマウントし、光学顕微鏡下で観察した。

融合遺伝子の作成

hsαFTZ-F1 : オリゴDNAフラグメント、5'-AGCTTGAATTCAACATGGATACCTTCAATGT-3' と

5'-ACATTGAAGGTATCCATGTTGAATTCA-3'を合成し、両フラグメントをハイブリダイズしてアダプターを作成した。このアダプターは、*EcoRI*サイト（下線）、ショウジョウバエの翻訳開始点コンセンサス（イタリック, Cavener, 1987)および、 α FTZ-F1の最初のメチオニンから6番目のバリンの位置にある*RsaI*サイトの切断位置（二重下線, Lavorgna *et al.*, 1991)までを含む。一方、FTZ-F1翻訳開始点付近を含むゲノムDNAクローンpH1を制限酵素*RsaI*と*SaI*で消化し、 α FTZ-F1の7番目のプロリンから246番目のセリンを含む約700bpのフラグメントを得た。これと合成したアダプターを*RsaI*サイトでライゲーションした。ライゲーションしたこのフラグメントを*HindIII*および*SaI*で消化したクローニングベクターpTZ18RにつなぎpH1HSを得た。次に、 α FTZ-F1の214番目のロイシンからストップコドンに続く80bpの非翻訳領域 [poly (A)付加シグナルは含まない, Lavorgna *et al.*, 1991] までを含むcDNAクローンpC2を*XbaI*で完全消化した後、*SaI*で部分消化し、2.5Kbのフラグメントを得た。このフラグメントを*SaI*および*XbaI*で消化したpH1HSにつなぎ α FTZ-F1全長をコードするクローンpEFCを得た。翻訳開始点付近の塩基配列はdideoxy法で確かめた。次に、pEFCを制限酵素*EcoRI*で消化し、3.2Kbのフラグメントを得た (Fig. 5A)。このフラグメントは翻訳開始点コンセンサス、 α FTZ-F1コーディング領域全長および、ストップコドンに続く80bpの非翻訳領域を含む。このフラグメントをpCaSpeR-hsベクター (C. S. Thummel 博士より提供された)のポリリンカーにある*EcoRI*サイトに置き、p α FTZ-F1を得た (Fig. 5C)。挿入された断片の向きは制限酵素地図を作成して決定した。

pCaSpeR-hsベクターは*P*-elementベクターであり、ショウジョウバエ*hsp70*プロモーター領域（転写開始点-245から+207、翻訳開始点は含まない）、ポリリンカー、*hsp70* 3'隣接領域（ストップコドンとpoly (A)付加シグナルを含む）、mini *white*遺伝子および*P*-elementのターミナルリピート配列を持つ。

hsβFTZ-F1 : オリゴDNAフラグメント、5'-TCGAGGAATTCAACATGTTATTAGAAATG-3' と 5'-CAGCTGCATGCTGAACGGCGAT-3' とを合成し、これをプライマーとして用い、polymerase chain reaction (Saiki *et al.*, 1988)を行なった。テンプレートにはβFTZ-F1翻訳開始点付近を含むゲノムDNAクローンp32e20を用いた。これによって95bpのフラグメントを得、このフラグメントをクローニングベクターpBluescriptIISKのEcoRVサイトに挿入し、pLateRISphIPCRを得た。このクローンは、EcoRIサイト (下線)、ショウジョウバエの翻訳開始点コンセンサス (イタリック, Cavener, 1987) および、βFTZ-F1の最初のメチオニンから24番目のセリンの位置にあるSphIサイト (二重下線, Lavorgna *et al.*, 1993)までを含んでいることをdideoxy法で塩基配列を決定することによって確かめた。一方、p32e20をSphIおよびXhoIで消化し1Kbフラグメントを得た。このフラグメントはβFTZ-F1特異的配列 (1番目から173番目のアミノ酸) およびそれに続く共通配列 (174番目から816番目)を含む (Lavorgna *et al.*, 1993)。このフラグメントをpLateRISphIPCRのSphIおよびXhoIサイトに挿入し、pLateEXを得た。次に、cDNAクローンpC2をEcoRIおよびXhoIで消化して得た1.5Kbフラグメントおよび、pLateEXをEcoRIおよびXhoIで消化して得た1KbフラグメントをpBluescriptIISKのEcoRIサイトに挿入し、βFTZ-F1全長をコードするクローンpLFCを得た。pLFCを制限酵素EcoRIで消化し、2.6Kbのフラグメントを得た (Fig. 5B)。このフラグメントは翻訳開始点、βFTZ-F1コーディング領域全長および、ストップコドンに続く80bpの非翻訳領域 [poly (A)付加シグナルは含まない] を含む。このフラグメントをpCaSpeR-hsベクターポリリンカーのEcoRI siteに置き、p β FTZ-F1を得た (Fig. 5C)。挿入された断片の向きは制限酵素地図を作成して決定した。

トランスジェニックフライの作成

インジェクションバッファー (5mM KCl, 0.1mM NaH₂PO₄, pH6.8)に溶かした p α FTZ-F1 (300 μ g / ml)またはp β FTZ-F1 (50 μ g / ml)とhelper DNA p π 25.7wc (50 μ g / ml)とを極細胞形成前の卵にマイクロインジェクションによって注入した (Spradling and Rubin, 1982)。この卵を18°Cで成虫まで育て、G0世代のショウジョウバエを得た (Fig.6)。G0世代の成虫はw; Cy0 / Glaと交配し、交配の結果得たG1世代の雄を眼の色 (w⁺)および羽の形 (Cy)によって選別した。選別したG1雄 (w⁺かつCy)は第2染色体のバランスー系統w; Cy0 / Glaおよび第3染色体のバランスー系統w; TM3 / Prと交配した。次世代 (G2)で、全ての雄が白眼であった場合はhsFTZ-F1がX染色体に挿入されたと判断し、一方、眼色と性別がリンクしなかった場合は常染色体上に挿入されたと判断した。hsFTZ-F1が常染色体上に挿入されたと判断した場合、w⁺とCyかつGlaの表現型が分離した場合は第2染色体上に挿入されたと判断し、w⁺かつCyの表現型を示すG2世代同士をかけあわせてhsFTZ-F1 homozygous系統を得た。一方、w⁺とCyかつGlaの表現型が分離しなかった場合はX染色体にも第2染色体にも挿入されなかったと判断し、G1雄をTM3 / Prと交配したG2を解析することによって、hsFTZ-F1の入った染色体を決定した。つまりw⁺かつTM3, Sb Serの表現型を示すG2世代をTM3, Sb Ser / Prと交配しG3世代のハエを得た。w⁺とTM3, Sb SerかつPrの表現型が分離した場合は第3染色体上に挿入されたと判断し、w⁺かつTM3, Sb Serの表現型を示すG3世代同士をかけあわせてhsFTZ-F1 homozygous系統を得た。もとのG0を異にする系統同士あるいはG0が同じでもhsFTZ-F1の挿入された染色体が異なる系統同士のみを遺伝的に独立なhsFTZ-F1系統であると判断した。

本実験に用いたhs α 227系統は第2染色体上に、hs α 338系統およびhs β 332系統は

第3染色体上に $hsFTZ-F1$ 融合遺伝子を持つ。本実験に用いた $hs\alpha227$ 系統、 $hs\alpha338$ 系統および $hs\beta332$ 系統は互いに遺伝的に独立である。 $hs\alpha227$ 系統と $hs\alpha338$ 系統は、最初にインジェクションをしたG0が異なり、 $hsFTZ-F1$ の挿入された染色体も異なる。3系統ともに、homozygous個体および、heterozygous個体の外部形態にwhite系統との違いはみられなかった。

熱ショック処理

熱ショックは、綿栓をした飼育びんを綿栓の位置まで恒温水槽中に沈めることにより与えた。成虫出現数を調べた実験では、熱ショック後、この飼育びんを25℃のインキュベータ内に置いた。幼虫各齢の個体数を数えた実験では、熱ショック処理後、幼虫を絵筆を用いてびんの中から取りだし、個体数を数えた後、Drosophila Instant Foodの入った飼育びんに移して、25℃のインキュベータ内に置いた。その後、一定時間経過毎に、再び幼虫を飼育びんから取りだし個体数を数えた後、新しいInstant Drosophila Mediumの入った飼育びんに移した。

形態観察

幼虫および、蛹の頭部形態は、幼虫をPBS中で解剖し、分離した頭部をスライドガラスの間に挟んで押しつぶし標本を作ることにより、光学顕微鏡下で観察した。

結果

第一部 FTZ-F1の発現パターン

FTZ-F1は、胚、幼虫、蛹および成虫に存在することが、ゲルシフトアッセイによってすでに明らかにされている (Ueda *et al.*, 1990)。この観察では、胚におけるFTZ-F1の時差的発現が詳しく調べられ、産卵後1.5-4時間の胚 (胞胚期頃)に α FTZ-F1が、産卵後13時間以降に β FTZ-F1がそれぞれ存在することが示されている。しかし、幼虫および蛹では、 β FTZ-F1の発現が観察されているものの発生過程のどの時期に発現するのか、詳しくは示されていなかった。また、発現部位については、すべての発生段階において全く解析されていなかった。そこで、胚では抗体組織染色を、幼虫および蛹ではウエスタンブロッティングと抗体組織染色を行なうことにより、発現時期と発現する組織を詳しく調べることにした。

1. 抗体の検定

まず、抗FTZ-F1抗血清T233の有効性を確かめるために、 β FTZ-F1が発現していると思われる囲蛹殻形成後9時間および、発現していないと思われる囲蛹殻形成後3時間の前蛹 (Lavorgna *et al.*, 1993)の全SDS可溶性タンパクについてウエスタンブロッティングを行なった (Fig. 1)。 β FTZ-F1は、ショウジョウバエ後期胚より精製され、SDS-PAGEによって95kDaであることが示されている (Ueda *et al.*, 1990)。T233を用いた時、囲蛹殻形成後9時間のサンプルに95kDaのバンドを検出し (lane 2)、このバンドは免疫前血清を用いたときには検出されなかった (lane 4)。そこで、このバンドは β FTZ-F1を検出しているものと判断した。なお、予想通り、

95kDaのバンドは、囲蛹殻形成後3時間のサンプルからは検出されなかった (lane 1)。Lane 1と lane 2に観察される76kDaのバンドは免疫前血清を用いた場合にも観察された。また、T233を用いたときに検出される38kDaのバンドは、どの時期の胚の全SDS可溶性タンパクからも検出されたが、胚の核抽出物の全SDS可溶性タンパクからは検出されなかった (data not shown)。従って、38kDaのタンパクは核には存在しないと推定した。

2. 胚におけるFTZ-F1の発現パターン

胚でのFTZ-F1の発現部位を調べるために、抗FTZ-F1抗血清T233を用い、胞胚期および後期胚の*white*系統の組織染色をおこなった (Fig. 2)。まず、胞胚期 [産卵後2.5-3.25時間、胚のステージと産卵後の時間の対応はCampos-Ortega and Hartenstein (1985)に従った] には、極細胞を除く表層の細胞核と卵黄核に強い染色が存在した (Fig. 2A)。この発現パターンはステージ8 (産卵後3.75-4.5時間)まで続き、その後、ステージ13 (産卵後10.5-11.5時間)までの胚では観察されなかった。後期胚ではステージ14 (産卵後11.5-13時間)から再び染色がみられ、ステージ16 (産卵後15時間)頃まで胚全体の核で染色が観察された (Fig. 2B)。また、唾腺の核では他の組織に比べ強い発現が観察された。なお、核での染色が観察された時期が、ゲルシフトアッセイで示されたFTZ-F1の発現パターン (Ueda *et al.*, 1990)とよく一致したことおよび、免疫前血清ではいずれの時期の胚でも核での染色は観察されなかったこと (data not shown)から、核に観察された染色はFTZ-F1を検出していると判断した。

胚においては、ここで観察した限り、いずれの発現時期でも極細胞と唾腺を除いて、細胞による発現量の違いは観察されなかった。

3. 幼虫におけるFTZ-F1の発現パターン

ショウジョウバエの胚は、産卵後約22時間で孵化して幼虫となり、産卵後約118時間に囲蛹殻を形成し前蛹になる（25℃）[Roberts, 1986. ただし、この時点では6時間程度、生育速度にばらつきが生ずる (Ashburner, 1989)]。幼虫期のFTZ-F1の発現を調べるため、産卵後に24時間から117時間まで3時間毎にステージ分けした幼虫 (hs β 332/+)の全SDS可溶性タンパクを用い、ウエスタンブロッティングを行なった (Fig. 3A)。なお、生育速度にばらつきがあるため、産卵後102時間以上の幼虫は、餌を食べていた幼虫 (F)とワンダリング幼虫 (W)とに分けた。

ウエスタンブロッティングの結果、産卵後42-51時間および69-75時間に β FTZ-F1であると考えられる95kDaのバンドを観察したが、それ以外のステージでは β FTZ-F1は検出されなかった (Fig. 3A)。同様の発現パターンは *white* 系統を用いた場合にも観察された (data not shown)。また、調べた範囲内では α FTZ-F1であると考えられるバンドは検出できなかった。産卵後102時間以降に現れる76kDaのバンドは免疫前血清を用いた場合にも観察された。また、38kDaおよび110kDaのバンドは、どの時期の胚の全SDS可溶性タンパクからも検出されたが、胚の核抽出物の全SDS可溶性タンパクからは検出されなかったバンドと同一であると判断した (data not shown)。

ショウジョウバエの幼虫の脱皮過程は、脱皮 (ecdysis)の約12時間前 (25℃)にクチクラ層がその下にある上皮細胞から離れること (apolysis)によって始まる (Kaznowski *et al.*, 1985)。1齢幼虫から2齢幼虫への脱皮および2齢幼虫から3齢幼虫への脱皮は産卵後約46時間およ

び約70時間 (25°C, Roberts, 1986)である。ここで観察した2回のβFTZ-F1の発現時期は、いずれも幼虫-幼虫アポリシスの後であり、脱皮の直前にあたる。従って、幼虫期のFTZ-F1はショウジョウバエの脱皮過程における遺伝子発現調節を担うことが予想された。

発現部位を調べるために、ウエスタンブロッティングでβFTZ-F1の発現が観察された産卵後44-46時間 (Fig. 3A)の1齢幼虫 (*white*系統)をT233抗血清によって組織染色した (Fig. 4)。その結果、唾腺、前胃および中腸、盲のう (*gastric ceaca*)、後腸、脂肪体、トラキア (*trachea*)、リンググランド (*ring gland*)およびマルピギー氏管 (*Malpighian tubules*)など観察しやすい全ての組織で核に強い染色がみられた (Fig. 4)。また、胚の時期と同様に組織特異的発現は観察できなかった。この時期の幼虫を免疫前血清を用いて染色したところ、核での染色は観察されなかった (*data not shown*)。産卵後60-63時間の2齢幼虫をT233抗血清によって組織染色した結果、盲のうを除く観察しやすい全ての組織で核での染色はみられなかった (*data not shown*)。

4. 前蛹および蛹におけるFTZ-F1の発現パターン

ワンダリング幼虫および囲蛹殻形成後0から24時間の前蛹および蛹 (*hsβ332/+*)でのFTZ-F1の発現を抗FTZ-F1抗血清T233を用いたウエスタンブロッティングによって調べた。その結果、囲蛹殻形成後6-12時間においてのみβFTZ-F1と考えられる95kDaのバンドが観察され (Fig. 3B)、ワンダリング幼虫、囲蛹殻形成後0-6時間の前蛹および囲蛹殻形成後12時間以降の蛹では、βFTZ-F1の発現は観察されなかった。このβFTZ-F1の発現開

始時期は、75CDパフが出現する時期および、 β FTZ-F1 mRNAが出現する時期 (Lavorigna *et al.*, 1993)とよく一致した。また、 α FTZ-F1の発現は、この時期には観察されなかった。76kDaのバンドは免疫前血清を用いた場合にも観察された。また、38kDaおよび110kDaのバンドは、どの時期の胚の全SDS可溶性タンパクからも検出されたが、胚の核抽出物の全SDS可溶性タンパクからは検出されなかったバンドと同一であると判断した (data not shown)。white系統でも同様に、囲蛹殻形成後6-12時間においてのみ β FTZ-F1と考えられる95kDaのバンドが観察された (data not shown)。

前蛹期のショウジョウバエでは、囲蛹殻形成後4-6時間に幼虫-蛹アポリシスがおこり (Fraenkel and Bhaskaran, 1973)、脱皮行動をおこさないまま囲蛹殻形成後12時間に、前蛹 (cryptocephalic pupa)から蛹 (phanerocephalic pupa)への蛹化が囲蛹殻の中で起こる (Bainbridge and Bownes, 1981)。ここで観察した β FTZ-F1の発現時期は、幼虫-蛹アポリシスの約0-2時間後にあたり、蛹化の直前にあたる。

第二部 FTZ-F1強制発現系

遺伝子の機能を解析するにあたり、その遺伝子の突然変異株を解析することは有力な手段である。しかし、これまでにFTZ-F1遺伝子の突然変異体は得られていない。また、FTZ-F1遺伝子およびその周辺のいくつかの遺伝子を含む大きな領域を欠失した系統は存在するが、FTZ-F1遺伝子が存在する75CD領域のみを欠失した系統は得られていない。そこでFTZ-F1を熱ショックによってectopicに発現することができるトランスジェニックフライ、*hsFTZ-F1*系統を作成した。

1. 遺伝子導入と強制発現の検査

まず、ショウジョウバエ *hsp70* 遺伝子プロモーター領域にFTZ-F1 cDNAを結合したFTZ-F1融合遺伝子 (*hs α FTZ-F1*および*hs β FTZ-F1*; Fig.5)を作成した。この*hsFTZ-F1*をP-elementで媒介した遺伝子導入法 (Spradling and Rubin, 1982)を用いて*white*系統に導入することにより、*hsFTZ-F1*を持つトランスジェニック系統 (*hsFTZ-F1*系統)を3系統確立した (Fig.6および、材料と方法)。すなわち、熱ショックによって α FTZ-F1 (Lavorgna *et al.*, 1991, 1993)を発現する*hs α FTZ-F1*系統として*hs α 227*と*hs α 338*を、また、熱ショックによって β FTZ-F1 (Lavorgna *et al.*, 1993)を発現する*hs β FTZ-F1*系統として*hs β 332*を確立した。*hs α 227*系統は第2染色体上に、*hs α 338*系統と*hs β 332*系統は第3染色体上に*hsFTZ-F1*を持ち、それぞれ互いに遺伝的に独立な系統である。

導入したFTZ-F1が熱ショックによって誘導されるかを調べるためにFTZ-F1の発現が観察されない囲蛹殻形成後1から2時間の個体に60分間の熱

ショックを与え、ウエスタンブロッティングによってFTZ-F1の消長を観察した (Fig. 7)。

宿主系統である *white* 系統および、三つの *hsFTZ-F1* 系統では、熱ショックを与えず 25°C で飼育した場合、内在性 β FTZ-F1 が検出され始める囲蛹殻形成後約 6 時間まで FTZ-F1 の発現は観察されなかった (data not shown)。

white 系統に、32°C (Fig. 7A) あるいは 38°C (Fig. 7B) で熱ショックを与えた場合、熱ショック終了直後には FTZ-F1 であると考えられるバンドは検出されなかった。なお、32°C の熱ショックの場合、処理後 5 時間 (囲蛹殻形成後 7 時間; Fig. 7A, lane 8) から観察される 95kDa のバンドがあるが、分子量および、25°C で飼育した場合に囲蛹殻形成後 6 時間から β FTZ-F1 が観察されたこと (data not shown) から、このバンドは内在性の β FTZ-F1 を検出していると考えた。

次に、*hs α FTZ-F1* 系統の *hs α 227* 系統および *hs α 338* 系統では、熱ショックを 30 分間与えた時点 (Figs. 7C and D, lane 2) 以降に分子量 (Lavorgna *et al.*, 1993) から α FTZ-F1 と考えられる 130kDa のバンドを検出した。どちらの系統も、38°C の熱ショック処理によって誘導された α FTZ-F1 の発現量は、熱ショック後 1 時間の時点で最高に達し (lane 4)、その発現量は内在性 β FTZ-F1 の発現量に比べ 2 から 5 倍であった。誘導された α FTZ-F1 は、約 1 時間の半減期をもって減少した。

hs β FTZ-F1 系統、*hs β 332* 系統では、熱ショックを 30 分間与えた時点 (Figs. 7E and F, lane 2) 以降に分子量 (Lavorgna *et al.*, 1993) か

らも β FTZ-F1と考えられる95kDaのバンドを検出した。この系統では、38℃の熱ショック後2時間 (Fig. 7E、lane 5)に発現が最高レベルに達した。このとき内在性 β FTZ-F1のレベル (lane 10)に比べ10倍以上の発現があった。処理後6時間 (lane 9)でも数倍の発現があった。32℃の熱ショックでは、熱ショック終了直後 (Fig. 7F、lane 3)に発現が最高レベルに達し、そのレベルは内在性 β FTZ-F1 (lane 10)と同程度であった。その後、熱ショック処理終了後2時間 (lane 5)には検出できなくなった。処理後4時間 (囲蛹殻形成後6時間)からふたたび95kDaのバンドが観察されるが、発現時期と分子量から内在性 β FTZ-F1と考えられた (lanes 7-9)。

3系統の*hsFTZ-F1*系統すべてで、熱ショックを与えない場合に囲蛹殻形成後3時間にはFTZ-F1は検出されなかった (data not shown)。

以上の結果から、各*hsFTZ-F1*系統で、導入した*hsFTZ-F1*融合遺伝子は熱ショックによって十分量誘導されることが明らかとなり、以下の解析に用いることにした。

2. 強制発現の時期特異的影響

幼虫期ではFTZ-F1が時期特異的に発現していることがわかった (Fig. 3A)。そこで、確立した*hsFTZ-F1*系統を用いてFTZ-F1の時期特異的な強制発現による発生への影響を調べることにした。

*hs α 227*系統は第2染色体上に*hs α FTZ-F1*を持つのでdominant markerを持つ第2染色体のバランサーCy0を用い、交配によって*hs α 227/Cy0*を得た。これと*white*系統とかけあわせることによってF1世代のショウジョウバエを得た (Fig. 8A)。また、*hs α 338*系統および、

hs β 332系統は第3染色体上にそれぞれhs α FTZ-F1あるいはhs β FTZ-F1を持つのでdominant markerを持つ第3染色体の balancer-TM3を用い、交配によってhs α 338/TM3および、hs β 332/TM3を得、white系統とかけあわせることによってF1世代のショウジョウバエを得た (Fig. 8A)。これらのF1世代の幼虫のさまざまな時期に熱ショックを与えることにより発生の特定の時期にFTZ-F1を強制発現させた。強制発現の影響は、 balancer (dominant marker) を持った成虫 (Balancer/+) の出現数に対する balancer をもたない成虫 (hsFTZ-F1/+) の出現数の比 ($[hsFTZ-F1/+]$ / $[Balancer/+]$) で求めた。二つのF1世代の間で熱ショックによって受ける影響の差がないとき、成虫出現比は1が期待されるが、hsFTZ-F1を持った成虫の出現数が低下した場合、成虫出現比は1より小さくなる。コントロールとして balancer 染色体のみを持ったショウジョウバエ (+/Cy0または+/TM3) と white 系統との交配で得たF1世代に熱ショックを与え、 balancer を持った成虫 (Balancer/+) の出現数に対する balancer をもたない成虫 (+/+) の出現数の比 ($[+/+]$ / $[Balancer/+]$) を求めた (Fig. 8B)。

処理を加えず25℃で飼育した場合の成虫出現比は、 $[+/+]$ / $[Cy0/+]$ (計735匹) では1.11、 $[+/+]$ / $[TM3/+]$ (計883匹) では1.09であり、 $[hs\alpha 227/+]$ / $[Cy0/+]$ (計327匹) では1.10、 $[hs\alpha 338/+]$ / $[TM3/+]$ (計760匹) では0.97、 $[hs\beta 332/+]$ / $[TM3/+]$ (計348匹) では1.16であった (Fig. 9, untreated)。この結果から、いずれの系統においても熱処理をしない場合、期待値から大きく外れない比率で成虫が羽化し、hsFTZ-F1融合遺伝子の導入、あるいは balancer 染色体の導入による羽化率への影響はないと考えられた。

FTZ-F1の時期特異的な強制発現により成虫出現比への影響がでる時期を調べるために、産卵後24-108時間の幼虫を3時間ごとにステージ分けして(約100匹ずつ)熱ショックを与えた(Fig.9)。まず、 balancerのみをもったコントロールの場合、 $[+ / +] / [Cy0 / +]$ では成虫出現比は最大1.33(産卵後63-66時間)、最小0.74(産卵後45-48時間)であり、 $[+ / +] / [TM3 / +]$ では最大1.18(産卵後48-51時間)、最小0.77(産卵後96-99時間)で、どの時期の熱ショックでも期待値から大きく外れない比率であった。このことは、 balancer染色体を導入された個体と導入されなかった個体の間に、熱ショックにより受ける影響に違いが見つからないことを示しており、各々の遺伝子型の個体の出現数の比によって、FTZ-F1を強制的に発現させたことによる生体への影響を計ることができると判断した。

*hsFTZ-F1*系統においては、3系統で一致して*hsFTZ-F1*融合遺伝子を持ったハエの羽化率に低下が認められる、熱ショック感受性の時期が存在した。まず、1齢幼虫では、*hsαFTZ-F1*系統の $[hsα227 / +] / [Cy0 / +]$ で産卵後36-39時間に0.57まで、 $[hsα338 / +] / [TM3 / +]$ では産卵後39-42時間に0.22まで、それぞれ成虫出現比が低下し、また、*hsβFTZ-F1*系統、 $[hsβ332 / +] / [TM3 / +]$ では産卵後39-42時間に0.05まで成虫出現比が低下した。一方、2齢幼虫では、*hsαFTZ-F1*系統の $[hsα227 / +] / [Cy0 / +]$ で産卵後57-60時間に0.12まで、 $[hsα338 / +] / [TM3 / +]$ では産卵後57-60時間に0.25まで、 $[hsβ332 / +] / [TM3 / +]$ では産卵後60-63時間に0.00にまで成虫出現比が減った。

*hsβFTZ-F1*系統を用いたときにFTZ-F1の強制発現によって発生に影響

が出る時期は、*hsαFTZ-F1*系統に比べより発生段階の遅い時期まで広がった。この理由の一つとして、*hsαFTZ-F1*系統に比べ*hsβFTZ-F1*系統で誘導されるFTZ-F1の量が多かった (Fig. 7)ことから、強制的に発現させたFTZ-F1の発現量が多いことにより、*hsβFTZ-F1*系統では本来FTZ-F1が発現しているにもかかわらず致死率が高くなったことが考えられた。そこで、*hsβFTZ-F1*系統で、1齢幼虫後半から2齢幼虫にかけて、32℃で熱ショックを与えることにより、38℃の熱ショックによるβFTZ-F1発現量より少ない量のβFTZ-F1を発現させ成虫出現比を求めた。32℃の熱ショックにおける成虫出現比の変動は38℃の時より小さく、最も成虫出現比が下がった時期は産卵後57-60時間で0.46であった (Fig. 10)。また、この温度条件下では、βFTZ-F1が観察された産卵後69-72時間での強制発現による発生への影響は少ないことが示された。この結果、予想されたように、βFTZ-F1の発現量によって成虫出現比に影響を及ぼす程度が変わる可能性があることがわかった。

38℃で処理した*hsα227*系統と*hsα338*系統および32℃で処理した*hsβ332*系統の3系統ともに強制発現の影響が最も大きい時期は一致しており、産卵後57-60時間であった。これらの3系統で一致して*hsFTZ-F1*融合遺伝子を持ったハエの出現数が低下した時期は産卵後36-42時間および57-69時間であった。この時期にはウエスタンプロットティング法で調べた限り内在性のFTZ-F1は検出されなかった (Fig. 3)。一方、産卵後24-33時間、51-54時間および、75-108時間では、同様にFTZ-F1の検出されない時期であるにもかかわらず強制発現の影響は少ないことが示された。これらのこ

とから、FTZ-F1の発現とその影響に関して少なくとも三つの時期が存在すると考えた：(1)内在性FTZ-F1が検出されずFTZ-F1強制発現の影響がある時期（産卵後36-42時間および57-69時間）、(2)内在性FTZ-F1が検出されずFTZ-F1強制発現の影響がない時期（産卵後24-33時間、51-54時間および、75-108時間）、(3)内在性FTZ-F1が検出されFTZ-F1強制発現の影響がない時期（産卵後42-51時間および、69-75時間）。なお、産卵後48-51、51-54、60-63、72-75および、78-81時間の*hsFTZ-F1*系統幼虫に熱ショック（38℃30分）を与え、その後30分以内に組織を固定し抗体染色を行ったところ、発現させたFTZ-F1は観察できる限り全ての組織で核に存在することが確認された（data not shown）。

ここまでの実験から、FTZ-F1の強制発現がショウジョウバエの発生に影響を与えることがわかった。内在性の発現がある時期にFTZ-F1は多くの組織で観察されたことから、*hsFTZ-F1*系統での強制発現によって、組織特異性無くFTZ-F1が発現されたことが、ハエの発生に影響した可能性は低いと考えられた。この可能性は内在性FTZ-F1が発現している時期にFTZ-F1を強制発現させても影響はないことから支持される。むしろ、ここまでの結果は、強制発現の時期がいつであったかが重要であることを示している。*hsFTZ-F1*系統でのFTZ-F1強制発現の影響があった時期は、FTZ-F1が本来発現していない時期であることから、FTZ-F1は時期特異的に発現することが重要であると考えられた。しかしながら、FTZ-F1の発現が観察されない時期におけるFTZ-F1の強制発現によってもハエの発生におよぼさない時期があることもわかった。このことから、FTZ-F1の強制発現によって致死を引き起こすためには、さらに何らかの要因が存在することが推測され

た。

3. 強制発現による致死

幼虫期でのFTZ-F1の強制発現による成虫出現数の低下に時期特異性が存在することが分ったが、熱ショックによりFTZ-F1を強制発現させられた幼虫がその後、成虫までのどの時点で致死になるのかが不明であった。そこで、熱ショックによるFTZ-F1強制発現の発生への影響が最も大きい産卵後57-60時間（2齢幼虫中期にあたる）の幼虫に38℃60分の熱ショックを与え、その後、25℃で飼育し、熱ショック後の2齢幼虫、3齢幼虫、蛹および死んだ個体の数の割合の変化を観察した（Fig. 11）。2齢幼虫から3齢幼虫になったかどうかは、実体顕微鏡下でアンテリアスピラクルの形態を観察し判定した（Ashburner, 1989）。2齢幼虫ではスピラクル先端のパピラ（papillae）が発達していないが（Fig. 12A）、3齢幼虫ではパピラが発達し先端が開いている（Fig. 12B）。そこで、パピラが発達していた個体は3齢幼虫になったと判断した。また、幼虫が囲蛹殻を形成したかどうかは、表皮の硬さと色とを観察し、表皮が硬化し茶色に着色したものを囲蛹殻を形成したと判断した。幼虫の生死は幼虫を絵筆の先で触ることによって確認し、触っても動かない場合を死んだと判断した。

まず、熱ショックをかけず25℃で飼育した場合（Fig. 11B, D, F, H）、*white*系統でも、3系統の*hsFTZ-F1*系統（*hsα227*, *hsα338*および*hsβ332*）でも観察24時間後には3齢幼虫へと脱皮し、さらに、観察72時間後には囲蛹殻を形成した。このことから、2齢幼虫から初期蛹において融合遺伝子を導入したことそのものによる発生への影響はないと考えられた。

*white*系統では38℃60分の熱ショックを与えた場合も24時間後には3

齡幼虫へと脱皮し、処理後72時間には熱ショックを与えた幼虫の85%が囲蛹殻を形成した (Figs. 11A and 13A)。この発生状況は熱ショック処理をせず25℃のまま飼育した場合 (Fig. 11B)と大きな違いは見られず、この時期に熱ショックを与えることによる発生への影響は少ないと考えられた。

3系統の*hsFTZ-F1*系統において、熱ショック処理をした後36時間に観察したところ、3齡幼虫へと脱皮した個体の割合は、*hsα227*系統で24%、*hsα338*系統で17%、*hsβ332*系統で0%であった (Fig. 11C, E, G)。その後 (熱処理後144時間)、3齡で死んでいた幼虫はほとんど観察されなかった (Table 1)。このことから、3齡幼虫へと脱皮した個体は、囲蛹殻形成段階まで発生が進んだと考えられた。しかし、熱処理をした*white*系統では3齡幼虫になっていた時期において (Fig. 11A)、熱処理をした*hsFTZ-F1*系統のうち大半の個体が、3齡幼虫特有のアンテリアスピラクルの構造を示さず、外見上、2齡幼虫特有のアンテリアスピラクルを保ったまま生きていた (熱処理後24時間、*hsα227*系統で92%、*hsα338*系統で94%、*hsβ332*系統で90%)。この形態からこれらの幼虫は2齡幼虫のまま留まっていると判断した (Fig. 11C, E, G)。その後、幼虫形態のまま死んだ個体が増加するが、これらの大半 (*hsα227*系統で59%、*hsα338*系統で69%、*hsβ332*系統で60%) は2齡幼虫の形態のまま死んだものであった (Table 1)。

2齡幼虫のまま死んだ個体の発生状況を調べるために、*white*系統と*hsFTZ-F1*系統で熱ショック後48時間に死んでいた個体を解剖した。コントロールの*white*系統幼虫は3齡幼虫特有の形態を示すアンテリアスピラクルおよび、マウスフックを持っていた (Fig. 12B)。*hsFTZ-F1*系統はマウスフックを二組持っており (Fig. 12C)、これらのマウスフックはそれぞれ野

生型幼虫の2齢 (Fig. 12A) と、3齢 (Fig. 12B) の両方の形態的特徴を示していた。アンテリアスピラクルも二組もっており、それらは野生型幼虫の2齢と3齢のそれぞれの形態的特徴を示していた (Fig. 12C)。さらにトラキアは二重化していた。これらのことから、熱ショック処理により致死になった *hsFTZ-F1* 系統の幼虫は2齢幼虫から3齢幼虫への脱皮をしていないものと考えられた。これらの2齢のまま留まったと判断した幼虫を解剖したとき、幼虫のクチクラはその下にある *hypodermis* から簡単に離れたことから、アポリシスは起こっていたと考えられた。

熱ショックを与えた *hsFTZ-F1* 系統において、通常の蛹よりも小さい蛹 (Fig. 13B) が、*hsα227* 系統で6個体、*hsα338* 系統で1個体、*hsβ332* 系統で17個体、観察された (Table 1)。これらの蛹は、熱処理後24時間の時点で2齢幼虫のままの形態を示していた個体 (*hsα227* 系統46個体、*hsα338* 系統で45個体、*hsβ332* 系統で43個体) のうち、2-3齢幼虫脱皮し正常な蛹になった個体 [(*hsα227* 系統で12個体 (26%)、*hsα338* 系統で12個体 (27%)、*hsβ332* 系統で0個体 (0%)] と2齢幼虫のまま死んだ個体 [*hsα227* 系統で27個体 (59%)、*hsα338* 系統で31個体 (69%)、*hsβ332* 系統で26個体 (60%)] の残りであると推測した。この蛹を詳しく観察すると、熱処理によって致死になった幼虫同様にマウスフックおよびアンテリアスピラクルを二組もっていた (Fig. 13D, E)。このことから、この蛹は2齢幼虫から3齢幼虫への脱皮をしていなかった幼虫のうち、さらに発生の進んだものが2齢幼虫から3齢幼虫への脱皮をしないまま蛹になったと考えた。今後、このような蛹を2齢蛹と呼ぶ。一方、熱ショックを与えなかった全ての系統および、熱ショックを与えた *white* 系統では2齢蛹は観察されなかった

(Table 1)。この2齢蛹から成虫が羽化することはなく、おおよそ囲蛹殻形成12-13.5時間後に相当する蛹のステージP4iiからP5i (Bainbridge and Bownes, 1981)までで発生が止まっていた (data not shown)。野生型では、ステージP4以降では成虫原基が伸長し、囲蛹殻の外側から脚の形が確認できるが (Bainbridge and Bownes, 1981)、この2齢蛹においても、伸展した脚の形態に関して異常は認められなかった (data not shown)。

以上の観察から、産卵後57-60時間の幼虫に熱ショック処理によってFTZ-F1を強制的に発現させた個体の大半 (hs α 227系統で74%、hs α 338系統で73%、hs β 332系統で98%)は、3齢幼虫への脱皮をしていないと考えられた。ただし、2齢幼虫のまま死んだ個体の観察から、脱皮に先立つアポリシスは起こっていたものと考えられた。これらのことから、FTZ-F1はショウジョウバエのエクジステロイドによって誘導される脱皮過程のうち、特に脱皮過程の後期における遺伝子発現調節に関わる脱皮に影響を及ぼすことが推測された。

考察

FTZ-F1の発現パターンとエクジステロイド

この度の観察から、 β FTZ-F1は各幼虫脱皮時期（産卵後42-51時間および69-75時間）および前蛹期後半（囲蛹殻形成後6-12時間）に存在することが明らかとなった。この幼虫脱皮時期における β FTZ-F1の発現は、エクジステロイドのピーク（産卵後33時間および54時間、Kraminsky *et al.*, 1980）の後、脱皮（産卵後46時間および70時間、Roberts, 1986）の直前である。一方、Lavorgnaら（1993）は、前蛹期では囲蛹殻形成後6-8時間に β FTZ-F1 mRNAが存在することを示している。この β FTZ-F1が検出された囲蛹殻形成後6-12時間は、蛹化の直前（Bainbridge and Bownes, 1981）にあたり、囲蛹殻形成時に存在するエクジステロイドのピークの後である（Andres and Thummel, 1992）。また、FTZ-F1に相当するカイコの因子BmFTZ-F1のmRNAは幼虫脱皮、蛹化、羽化の直前に発現しており、これらの発現時期はいずれもエクジステロイドのピークの直後である。さらに、カイコ5齢幼虫の後部絹糸腺を器官培養した場合、BmFTZ-F1 mRNAは、20-OH-ecdysoneのパルスによって誘導されることが観察されている（Sun *et al.*, 1994）。

ショウジョウバエの前蛹において β FTZ-F1が検出される頃、FTZ-F1遺伝子が存在する唾腺染色体上75CD（Lavorgna *et al.*, 1991）にあるパフが活性化される。このパフはmid prepupalパフに属し、囲蛹殻形成後6-10時間に活性化される（Becker, 1959）。このパフは、囲蛹殻形成時の唾腺をエクジステロイドを含まない培地で培養すると、培養3時間後から誘導され、また、パフステージPS1の唾腺（囲蛹殻形成時に存在するおよそ

10^{-7} Mのエクジステロイドのピーク前の唾腺)を、20-OH-ecdysone (2.4×10^{-6} M)を含む培地で6時間培養したあと20-OH-ecdysoneを含まない培地に移した場合に誘導される (Richards, 1976a, 1976b)。

これらのことはFTZ-F1がエクジステロイドのパルスによって誘導される転写因子であることを支持し、そこから、エクジステロイドで誘導される一連の転写制御の後期に発現する遺伝子の発現調節にFTZ-F1が関わっていることが推測される。

前蛹期のショウジョウバエでは、パッシングパターンの観察 (Becker, 1959)から、エクジステロイドの放出によってearly遺伝子が発現され、それに続いてlate遺伝子が発現される (Ashburner *et al.*, 1974)という差次的な遺伝子発現調節によってエクジステロイドシグナルが遺伝子発現カスケードに変換されることが考えられている (Richards, 1992)。幼虫の脱皮も、エクジステロイドによって調節されると考えられることから、変態期と同様にエクジステロイドによる差次的な遺伝子発現調節が、幼虫脱皮期にも存在することが推測される。幼虫期のFTZ-F1が脱皮の直前に発現することから考えると、FTZ-F1はエクジステロイドの関与する幼虫脱皮期の差次的な遺伝子発現調節機構に属し、その中でも比較的遅い時期に発現する因子群に属すると推測される。

FTZ-F1の細胞内局在

cDNAから予想されるアミノ酸配列 (Lavorgna *et al.*, 1991, 1993)からFTZ-F1は核内レセプタータイプの転写因子であり、DNAおよびリガンドに結合することが予測された。DNAへの結合性については、精製したFTZ-F1あるいは、大腸菌で発現させたrecombinant FTZ-F1がDNAに

塩基特異的に結合することが示されている (Ueda *et al.*, 1990, 1992)。抗体組織染色の結果 (Figs. 2, 4)、FTZ-F1は発現時期ではいずれの組織でも核に存在していることがわかった。また、 β FTZ-F1が発現している時期の唾腺染色体上の150以上の特定の位置で、抗体によりFTZ-F1が検出されている (Lavorgna *et al.*, 1993)。これらのことは、FTZ-F1は転写因子として核内でDNAに塩基特異的に結合することにより機能していることを支持する。一方、FTZ-F1のリガンドはまだ同定されていない。一群のステロイドホルモンレセプターでは、リガンドに依存した核移行調節が知られている (Fuxe *et al.*, 1985; Guiochon-Mantel *et al.*, 1989; Picard and Yamamoto, 1987; Wikström *et al.*, 1987)が、本来FTZ-F1が発現していない時期に熱ショックによって発現させたFTZ-F1も核に局在することから、リガンドが常に存在しているか、あるいは、リガンドに依存した核移行調節は働いていない可能性が考えられる。

FTZ-F1 の生体内での機能

熱ショックによるFTZ-F1強制発現によって幼虫が致死になる時期のうち、用いた $hsFTZ-F1$ 系統3系統で一致していた時期は、産卵後36–42時間と(1齢幼虫中期)57–69時間(2齢幼虫中期)である (Fig. 9)。いずれの時期も内在性FTZ-F1の発現の直前であり、さらにエクジステロイドのパルス (Kraminsky *et al.*, 1980)から3–6時間後である。エクジステロイドパルスが存在する時期と比較的近い時期でのFTZ-F1の強制発現によって致死が引き起こされることから、FTZ-F1の強制発現による致死の誘導の可能性として、この時期に特異的に発現する転写因子との相互作用が考えられる。つまり、前蛹期の遺伝子発現調節のモデル (Ashburner *et al.*,

1974)に相当する、エクジステロイドによる遺伝子発現調節機構が、幼虫脱皮期にも存在することが推測され、FTZ-F1はその発現時期から考えて、この差次的な遺伝子発現調節の中で、最も遅い時期に発現すると推測される。そこで、FTZ-F1の強制発現は、エクジステロイドシグナルによって作られる脱皮過程に関わる遺伝子群の差次的な発現を乱したのではないかと考えられる。たとえば、エクトピックなFTZ-F1の発現がearly遺伝子の転写を阻害した可能性、early遺伝子産物の結合するDNA配列にFTZ-F1が結合した可能性、FTZ-F1が転写因子間のダイマー (dimer)形成を阻害したり間違っただペアを作った可能性、あるいは、early遺伝子の標的遺伝子の産物とFTZ-F1の標的遺伝子の産物が同時に存在した可能性などが考えられる。今後、エクジステロイドによって調節されるパフ上の遺伝子 (Karim and Thummel, 1992)の発現および、本来FTZ-F1が発現した後に発現される遺伝子の発現をFTZ-F1強制発現後に、観察していく必要があると思われる。

幼虫期ではFTZ-F1の強制発現によって致死になる時期に特異性があることがわかった。その時期は、本来FTZ-F1が検出されない時である。しかしながら、FTZ-F1が検出されない産卵後24-33時間、51-54時間、75-108時間では、FTZ-F1の強制発現によるショウジョウバエの発生への影響は観察されなかった。内在性FTZ-F1の検出されない時期で、FTZ-F1強制発現の影響が認められなかった時期があることから、FTZ-F1が転写因子として機能できなかった可能性と、FTZ-F1は転写因子として機能したが標的遺伝子の産物が発生に影響しなかった可能性が考えられる。前者に関しては、FTZ-F1が機能するためには何らかの要因、例えばFTZ-F1に対するリガン

ドやmodifierあるいはco-factorが必要であり、それらが時期特異的に出現することが考えられる。

FTZ-F1の役割と脱皮

FTZ-F1強制発現により脱皮ができなかったhsFTZ-F1幼虫では、容易にクチクラがはがれたことから、アポリシスは起こっていたと考えられた。また、この幼虫はマウスフック (mouth hook) およびアンテリアスピラクル (anterior spiracle) を2組持っており、それらの形態は正常であると考えられた。これらのことから、hsFTZ-F1幼虫では古い皮を脱ぎ捨てる行為としての脱皮はできないが、脱皮の過程はある程度まで正常に進行していたことが推測される。さらに、2齢中期幼虫でのFTZ-F1強制発現の結果、脱皮ができない幼虫から2齢蛹が現れるが、この蛹はステージP4またはP5まで生き残る。このステージは成虫原基が伸長し、囲蛹殻の外側から脚の形が確認できるのが特徴 (Bainbridge and Bownes, 1981) である。このように、FTZ-F1を強制発現させたhsFTZ-F1で成虫原基の伸長が確認されることから、この時期のFTZ-F1の強制発現は成虫原基の発生に影響を及ぼしていないことが考えられる。以上のことから、FTZ-F1は脱皮過程において、特に脱皮に関与する遺伝子群の発現調節を担っていることが推測される。

FTZ-F1の標的遺伝子

EDG78およびEDG84はショウジョウバエのクチクラを構成するタンパクをコードしていると考えられている遺伝子である。これらの発現時期は囲蛹殻形成後8-12時間であり、発現開始時期はFTZ-F1発現開始時期の約2時間後である。成虫原器を器官培養した場合、培養液のエクジステロイド

濃度を一旦上げた後、下げた場合にこれらの発現が誘導される。さらに、これら二つの遺伝子は、それぞれのプロモーター領域にFTZ-F1が認識する塩基配列をもっている (Apple and Fristrom, 1990)。これらのことから、EDG78およびEDG84はFTZ-F1のターゲット遺伝子である可能性があった。そこで、EDG78、EDG84およびFTZ-F1が発現していない囲蛹殻形成後2-3時間にFTZ-F1を強制発現させ、ノーザンブロットイングによってEDG78およびEDG84の発現を検出することによって、FTZ-F1の強制発現がEDG78およびEDG84の発現に影響するかを調べたところ、EDG84で発現の誘導が観察された (data not shown)。本来、この時期に発現していないEDG84の発現が強制発現させたFTZ-F1によって誘導されたことから、EDG84はFTZ-F1のターゲット遺伝子の一つである可能性がある。また、FTZ-F1を強制発現させることによって本来発現時期ではない遺伝子の発現を誘導できたことから、FTZ-F1の強制発現は、遺伝子の差次的な発現調節機構を乱し、その結果、幼虫が致死になったと推測される。

FTZ-F1の標的遺伝子の一つとしてアルコール脱水素酵素 (Adh) 遺伝子が挙げられている (Ayer and Benyajati, 1992; Ayer *et al.*, 1993)。Adh遺伝子は、2種類の転写開始点を持っている。それぞれのプロモーターはproximal (larval)プロモーターおよびdistal (adult)プロモーターと呼ばれ、それぞれ時期特異的にmRNAが転写される。Distalプロモーターは、部分的にはadultエンハンサーによって調節されている。そのadultエンハンサー内にFTZ-F1の認識する塩基配列 (CACAAAGGTC)を含んでおり、Adhを発現していない細胞へのAdh adultエンハンサーをもったレポーターDNAおよびFTZ-F1 DNAのcotransfection実験の結果、FTZ-

F1はAdhのadultエンハンサーに働くポジティブレギュレーターである可能性が示されている (Ayer *et al.*, 1993)。

しかしながら、今回の私の観察から、Adhのdistalプロモーターから転写されるAdh mRNA (distal mRNA) の発現時期とFTZ-F1の発現時期との間に、ずれがあることがわかった。Adhのdistal mRNAは、初期胚ではステージ2まで存在し、ステージ3には減少し、ステージ4には検出されない。後期胚では、distal mRNAはステージ14から15にのみ存在している (Lockett and Ashburner, 1989)。これに対しFTZ-F1は、初期胚ではステージ8まで存在し、後期胚ではステージ14からステージ16まで存在している。一方、幼虫では、Adh distalプロモーターから転写されるdistal mRNAは3齢初期まで検出されず、3齢中期から急激に上昇、同期にピークを迎え、その後、次第に減少するが蛹まで存在する (Savakis *et al.*, 1986)。これに対し、FTZ-F1は1齢から2齢および、2齢から3齢への脱皮の頃に発現し、その後、囲蛹殻形成後6時間までは検出されないが、6時間から12時間まで存在し、蛹化後、徐々に減少する。生体内でのAdhとFTZ-F1の発現パターンを比べた結果、後期胚ではFTZ-F1が存在する時期とAdh distal mRNAの発現時期が一致していると考えられるが、幼虫期以降、前蛹までの範囲では、Adh distal mRNAの発現時期に、FTZ-F1が直接にAdh distal mRNAの発現をポジティブに調節しているとは考えにくい。

脱皮にかかわる突然変異体との関係

これまでにショウジョウバエにおいて、脱皮ができない突然変異体として*lethal (3) discs overgrown (dco)*、*ultraspiracle (usp)*および*lethal (3) dre4 (dre4)*が報告されている (Jursnich *et al.*,

1990; Perrimon *et al.*, 1985; Sliter and Gilbert, 1992; Szabad *et al.*, 1991)。*dco*のhypomorphic alleleである*dco*¹⁸の homozygoteあるいはhemizygoteは、多くが2-3齢脱皮の時点で死ぬ。また、運よく3齢になっても成虫原基が小さい (Jursnich *et al.*, 1990; Szabad *et al.*, 1991)。このことから、*dco*は脱皮の過程と成虫原基の成長に関わると考えられている。*usp*のhemizygote, *usp/Y*は1-2齢脱皮の前で致死になり、ポステリアスピラクル (posterior spiracle)が二組観察される。このとき、幼虫のextra filzkorperはaperturesに届いる場合といない場合の両方が観察されることから、*usp*遺伝子産物はスピラクルの形成時に必要であり、脱皮の過程において必要とされると考えられる (Perrimon *et al.*, 1985)。*dre4*ミュータントは1-2齢幼虫脱皮ができないで1齢幼虫のまま2-4日以上生きる (Sliter and Gilbert, 1992)。さらに、温度感受性突然変異*dre4*^{e55}を31℃飼育し脱皮ができなかった幼虫では、アポリシスが起こっていない。以上、ここに挙げた三つの遺伝子は、突然変異体の表現型から、いずれも脱皮過程の早い段階に必要とされることが示されている。一方、FTZ-F1は脱皮過程の中で比較的遅い時期に遺伝子の発現調節をすると推測されることから、これら三つの遺伝子がFTZ-F1のターゲットであることは、考えにくい。

Conclusion

以上の結果から、FTZ-F1は時期特異的に多くの組織で発現すること、いずれの組織の発現でもFTZ-F1は核に存在することがわかった。FTZ-F1は比較的短い時間帯に発現しており、FTZ-F1の自身の時期特異的な発現によって標的遺伝子の発現時期を調節していることが推測された。また、発

現時期が脱皮時期であったこと、および、FTZ-F1強制発現によって脱皮に影響を及ぼしたことから、FTZ-F1はショウジョウバエの脱皮にかかわる遺伝子の時期特異的な発現の調節を行なっている因子であると推測された。

謝辞

本研究の指導をしてくださった広瀬進教授、京都工芸繊維大学渡辺隆夫教授、上田均博士、および、多くの貴重なアドバイスをいただいた林茂生博士と孫冠誠博士に心から感謝いたします。また、御協力をしてくださった無脊椎動物保存研究室、遺伝子合成研究室、形質遺伝研究室の皆さんに深く感謝いたします。

引用文献

- Andres, A. J. and C. S. Thummel (1992) Hormones, puffs and flies: the molecular control of metamorphosis by ecdysone. *TIG* 8: 132-138.
- Apple, R. T. and J. W. Fristrom. (1990) Regulation of pupal cuticle gene expression during metamorphosis in *Drosophila melanogaster*. In *Molting and Metamorphosis*, Ohnishi, E. and H. Ishisaki, eds. (Japan Sci. Soc. Press, Tokyo/ Springer-Verlag, Berlin), pp 107-120.
- Ashburner, M. (1989) Developmental biology. 1. Normal development. In *Drosophila, A Laboratory Handbook* (Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York), pp 140-206.
- Ashburner, M. (1990) Puffs, genes, and hormones revisited. *Cell* 61: 1-3.
- Ashburner, M., C. Chihara, P. Meltzer, and G. Richards (1974) Temporal control of puffing activity in polytene chromosomes. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* Vol. XXXVIII 655-662.
- Ayer, S., and C. Benyajati (1992) The binding site of a steroid hormone receptor-like protein within the *Drosophila Adh* adult enhancer is required for high levels of tissue-specific alcohol dehydrogenase expression. *Mol. Cell. Biol.* 12: 661-673.
- Ayer, S., N. Walker, M. Mosammaparast, J. P. Nelson, B.-Z. Shilo, and C. Benyajati (1993) Activation and repression of *Drosophila* alcohol dehydrogenase distal transcription by two steroid hormone receptor superfamily members binding to a common response element. *Nucl. Acids Res.* 21: 1619-1627.
- Bainbridge, S. P. and M. Bownes (1981) Staging the metamorphosis of *Drosophila melanogaster*. *J. Embryol. exp. Morph.* 66: 57-80.
- Becker, H. J. (1959) Die Puffs der Speicheldrüsenchromosomen von *Drosophila melanogaster*. I. Mitteilung: Beobachtungen zum Verhalten des Puffmusters im Normalstamm und bei zwei Mutanten, giant und lethal-giant-larvae. *Chromosoma (Berl.)* 10: 654-678.
- Beermann, W. (1956) Nuclear differentiation and functional morphology of chromosomes. *Cold Spr. Harb. Symp. quant. Biol.* 21: 217-232.
- Bownes, M. (1990) The nature and origin of ecdysteroids during *Drosophila* metamorphosis. In *Molting and Metamorphosis*, Ohnishi, E. and H. Ishisaki, eds. (Japan Sci. Soc. Press, Tokyo/ Springer-Verlag, Berlin), pp 107-120.
- Burtis, K. C., C. S. Thummel, C. W. Jones, F. D. Karim, and D. S. Hogness (1990) The *Drosophila* 74EF early puff contains E74, a complex ecdysone-inducible gene that encodes two ets-related proteins. *Cell* 61: 85-99.
- Campos-Ortega, J. A. and V. Hartenstein (1985) The embryonic development of *Drosophila melanogaster*. (Springer-Verlag, Berlin).
- Cavener, D. R. (1987) Comparison of the consensus sequence flanking translational start sites in *Drosophila* and vertebrates. *Nuc. Acids Res.* 15: 1353-1361.

DiBello, P. R., D. A. Withers, C. A. Bayer, J. W. Fristrom, and G. M. Guild (1991) The *Drosophila* Broad-Complex encodes a family of related proteins containing zinc finger. *Genetics* 129: 385-397.

Feigl, G., M. Gram, and O. Pongs (1989) A member of the steroid hormone receptor gene family is expressed in the 20-OH-ecdysone inducible puff 75B in *Drosophila melanogaster*. *EMBL* 7167-7178.

Fraenkel, G. and G. Bhaskaran (1973) Pupariation and pupation in cyclorrhaphous flies (Diptera): terminology and interpretation. *Ann. ent. Soc. Amer.* 66: 418-422.

Fuxe, F., A. C. Wikström, S. Okret, L. F. Agnati, A. Härtstrand, Z. Y. Yu, L. Granholm, M. Zoli, W. Vale, and J. A. Gustafsson (1985) Mapping of glucocorticoid receptor immunoreactive neurons in the rat tel- and diencephalon using a monoclonal antibody against rat liver glucocorticoid receptor. *Endocrinology* 117: 1803-1812.

Guiochon-Mantel, A., H. Loosfelt, P. Lescop, S. Sar, M. Atger, M. Perrot-Appianat, and E. Milgrom (1989) Mechanisms of nuclear localization of the progesterone receptor: Evidence for interaction between monomers. *Cell* 57:1147-1154

Janknecht, R., W. Taube, H. J. Ludecke, and O. Pongs (1989) Characterization of a putative transcription factor gene expressed in the 20-OH-ecdysone inducible puff 74EF in *Drosophila melanogaster*. *Nucl. Acids Res.* 17: 4455-4464.

Jursnich, V. A., S. E. Fraser, J. Lewis I. Held, J. Ryerse, and P. J. Bryant (1990) Defective gap-junctional communication associated with imaginal disc overgrowth and degeneration caused by mutations of the *dco* gene in *Drosophila*. *Dev. Biol.* 140: 413-429.

Karim, F. D. and C. S. Thummel (1992) Temporal coordination of regulatory gene expression by the steroid hormone ecdysone. *EMBO J.* 11: 4083-4093.

Kaznowski, C. E., H. A. Schneiderman, and P. J. Bryant (1985) Cuticle secretion during larval growth in *Drosophila melanogaster*. *J. Insect Physiol.* 31: 801-813.

Koelle, M. R., W. S. Talbot, W. A. Segraves, M. T. Bender, P. Cherbas, and D. S. Hogness (1991) The *Drosophila* EcR gene encodes an ecdysone receptor, a new member of the steroid receptor superfamily. *Cell* 67: 59-77.

Koelle, M. R., W. A. Segraves, and D. S. Hogness (1992) DHR3: A *Drosophila* steroid receptor homolog. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 6167-6171.

Koolman, J. (1990) Ecdysteroids. *Zool. Sci.* 7: 563-580.

Kraminsky, G. P., W. C. Clark, M. A. Estelle, R. D. Gietz, B. A. Sage, H. D. O'Connor, and R. B. Hodgetts (1980) Induction of translatable mRNA for dopa decarboxylase in *Drosophila*: An early response to ecdysterone. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77: 4175-4179.

Lavorgna, G., H. Ueda, J. Clos, and W. C. (1991) FTZ-F1, a steroid hormone receptor-like protein implicated in the activation of fushi tarazu. *Science* 252: 848-851.

- Lavorgna, G., F. D. Karim, C. S. Thummel, and C. Wu (1993) Potential role for a FTZ-F1 steroid receptor superfamily member in the control of *Drosophila* metamorphosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 3004-3008.
- Li, F.-Q., H. Ueda, and S. Hirose (1994) Mediators of activation of fushi tarazu gene transcription by BmFTZ-F1. *Mol. Cell. Biol.*, in press.
- Lockett, T. J. and M. Ashburner (1989) Temporal and spatial utilization of the alcohol dehydrogenase gene promoters during the development of *Drosophila melanogaster*. *Dev. Biol.* 134: 430-437.
- Perrimon, N., L. Engstrom, and A. P. Mahowald (1985) Developmental genetics of the 2C-D region of the *Drosophila* X chromosome. *Genetics* 111: 23-41.
- Picard, D. and K. R. Yamamoto (1987) Two signals mediate hormone-dependent nuclear localization of the glucocorticoid receptor. *EMBO J.* 6: 3333-3340.
- Richards, G. (1976a) Sequential gene activation by ecdysone in polytene chromosomes of *Drosophila melanogaster*. IV. The mid prepupal period. *Dev. Biol.* 54: 256-263.
- Richards, G. (1976b) Sequential gene activation by ecdysone in polytene chromosomes of *Drosophila melanogaster*. V. The late prepupal puffs. *Dev. Biol.* 54: 264-275.
- Richards, G. (1992) Switching partners? *Curr. Biol.* 2: 657-659.
- Roberts, D. B. (1986) Basic *Drosophila* care and techniques. In *Drosophila: a practical approach*, Roberts, D. B., ed. (IRL Press, Oxford, England), pp 1-38.
- Saiki, R. K., D. H. Gelfand, S. J. Stoffel, R. Higuchi, G. T. Horn, K. B. Mullis, and H. A. Erlich (1988) Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239: 487-491.
- Savakis, C., M. Ashburner, and J. H. Willis (1986) The expression of the gene coding for alcohol dehydrogenase during the development of *Drosophila melanogaster*. *Dev. Biol.* 114: 194-207.
- Segraves, W. A. (1991) Something old, some things new: the steroid receptor superfamily in *Drosophila*. *Cell* 67: 225-228.
- Segraves, W. A. and D. S. Hogness (1990) The E75 ecdysone-inducible gene responsible for the 75B early puff in *Drosophila* encodes two new members of the steroid receptor superfamily. *Genes Dev.* 4: 204-219.
- Sliter, T. J. and L. I. Gilbert (1992) Developmental arrest and ecdysteroid deficiency resulting from mutation at the *dre4* locus of *Drosophila*. *Genetics* 130: 555-568.
- Spradling, A. C. and G. M. Rubin (1982) Transposition of cloned P elements into *Drosophila* germ line chromosomes. *Science* 218: 341-347.

Stone, B. L. and C. S. Thummel (1993) The *Drosophila* 78C early late puff contains E78, an ecdysone-inducible gene that encodes a novel member of the nuclear hormone receptor superfamily. *Cell* 75: 307-320.

Sun, G.-C., S. Hirose, and H. Ueda (1994) Intermittent expression of BmFTZ-F1, a member of the nuclear hormone receptor superfamily during development of the silkworm *Bombyx mori*. *Dev. Biol.*, in press

Szabad, J., V. A. Jursnich, and P. J. Bryant (1991) Requirement for cell-proliferation control genes in *Drosophila* oogenesis. *Genetics* 127: 525-533.

Talbot, W. S., E. A. Swyryd, and D. S. Hogness (1993) *Drosophila* tissues with different metamorphic responses to ecdysone express different ecdysone receptor isoforms. *Cell* 73: 1323-1337.

Ueda, h., S. Sonoda, and C. Wu (1990) A sequence-specific DNA-binding protein that activates fushi tarazu segmentation gene expression. *Genes Dev.* 4: 624-635.

Ueda, H., G.-C. Sun, T. Murata, and S. Hirose (1992) A novel DNA-binding motif abuts the zinc finger domain of insect nuclear hormone receptor FTZ-F1 and mouse embryonal long terminal repeat-binding protein. *Mol. Cell. Biol.* 12: 5667-5672.

Wikström, A. C., O. Bakke, S. Okret, M. Brönnegard, and J. A. Gustafsoon (1987) Intracellular localization of the glucocorticoid receptor evidence for cytoplasmic and nuclear localization. *Endocrinology* 120: 1232-1242.

Table 1. 熱ショックが $hsFTZ-F1$ 系統の発生の進行に与える影響。各系統の幼虫に熱ショックを与え、その後144時間経過時における各発生の進行段階にある個体数を数えた。

strain	treated				untreated			
	P2	P3	D2	D3	P2	P3	D2	D3
white	0	42	0	8	0	47	0	1
$hs\alpha 227$	6	12	31	1	0	48	2	0
$hs\alpha 338$	1	12	34	1	0	29	1	0
$hs\beta 332$	17	0	31	1	0	41	0	4

treated:産卵後57-60時間の幼虫に38℃60分の熱ショックを与えた後、25℃で飼育した場合； untreated:熱ショックを与えず25℃で飼育した場合； P2:2齢蛹の個体数； P3:正常（3齢）蛹の個体数； D2:2齢幼虫致死個体数； D3:3齢幼虫致死個体数。

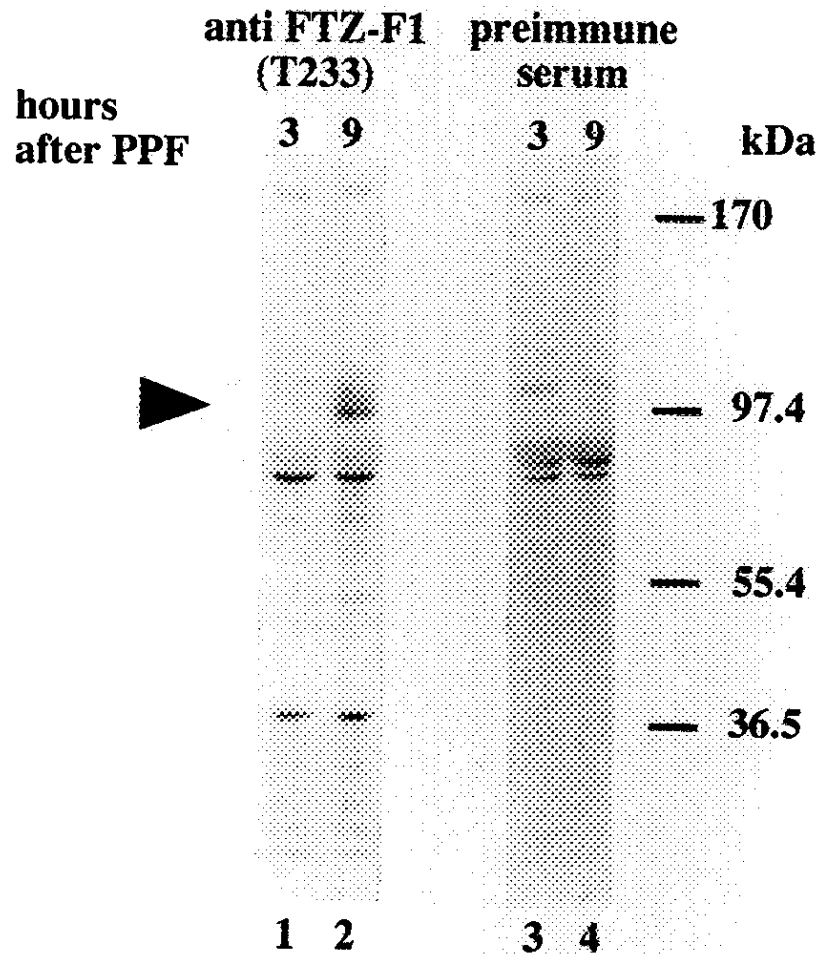


Fig.1 Western blottingによるFTZ-F1の検出。囲蛹殻形成後3時間 (lanes 1,3)および、囲蛹殻形成後9時間 (lanes 2,4)の前蛹の全SDS可溶性タンパクを8% SDS-ポリアクリルアミドゲルにて電気泳動の後、ニトロセルロース膜に転写した。その後、抗FTZ-F1抗血清T233 (lanes 1,2)または免疫前血清 (lanes 3,4)と反応した。矢じりは β FTZ-F1のバンド位置を示す。T233を用いたときに現れる76kDaのバンドは免疫前血清を用いたときにも現れた。38kDaのバンドはどの時期の胚の全SDS可溶性タンパクからも検出されたが、胚の核抽出物の全SDS可溶性タンパクからは検出されなかった (data not shown)。

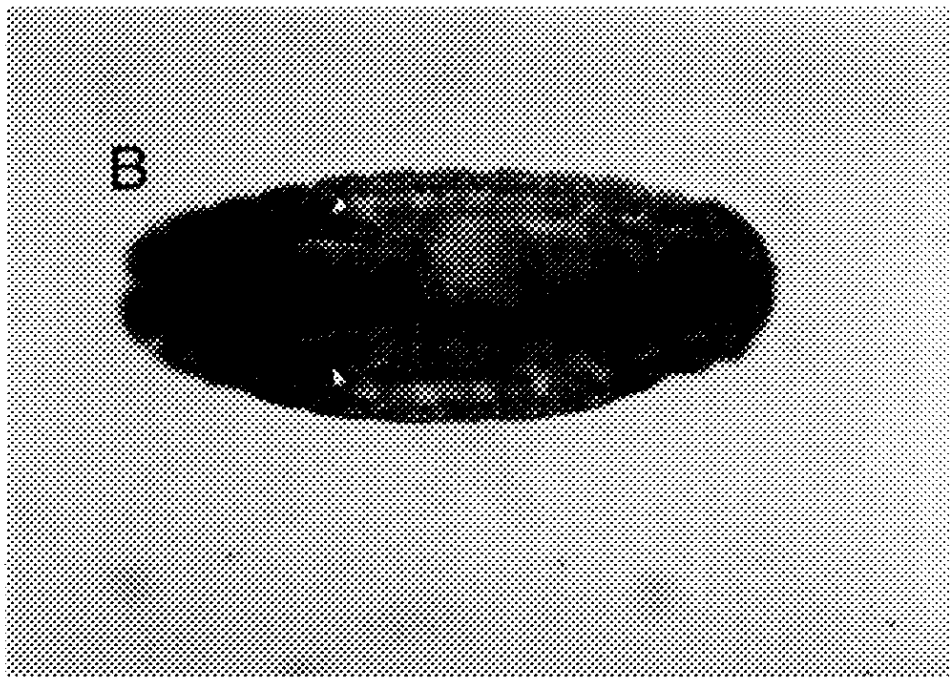
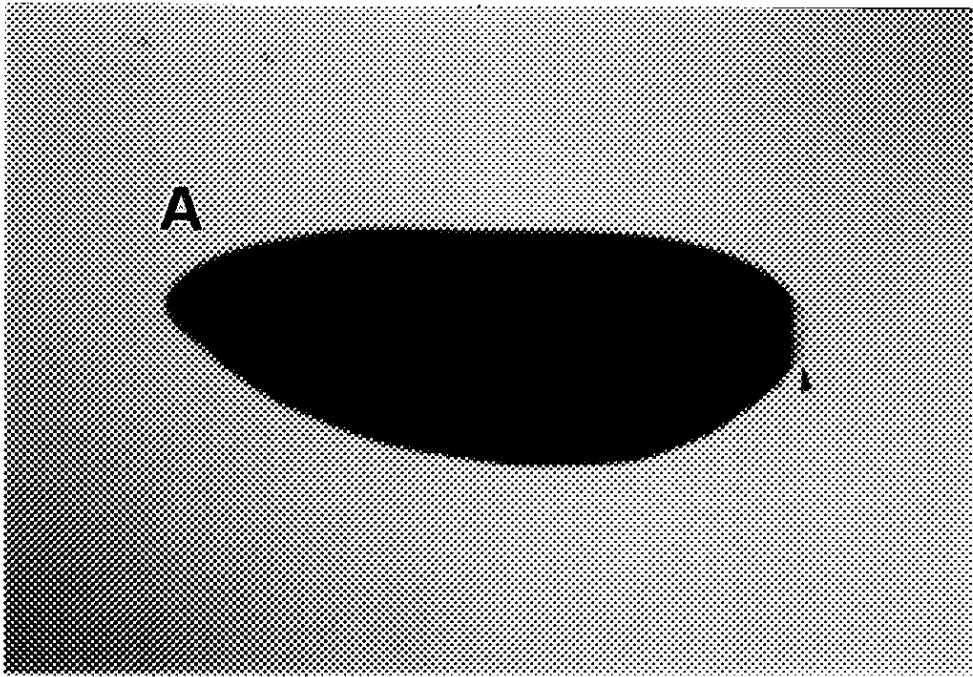


Fig.2 抗FTZ-F1抗血清T233を用いた胚の抗体組織染色。染色後、光学顕微鏡下で観察した。T233による染色(茶色)は主に核に存在した。A. ステージ4(胞胚期、産卵後1.5-2.5時間)の胚。矢じりは極細胞を示す。B. ステージ16(産卵後15時間)の胚。矢じりは唾腺を示す。免疫前血清ではいずれの時期の胚でも核での染色は観察されなかった(data not shown)。

Fig. 3 幼虫期から蛹期におけるFTZ-F1の発現パターンのWestern blottingによる解析。A. 1齢幼虫から3齢幼虫。各レーンの上の数字は産卵後の時間を示す。産卵後の時間と幼虫の各ステージの対応はRoberts (1986)に従った。産卵後102時間以上の幼虫は、摂食期幼虫(F)とワンダリング幼虫(W)とに分けた。B. ワンダリング幼虫から蛹。各レーンの上の数字は囲蛹殻形成後の時間を示す。囲蛹殻形成前のワンダリング幼虫のステージ分けは、摂食した着色餌が腸に残っているかどうかを肉眼で行なった(材料と方法)。囲蛹殻形成後の時間と各ステージの対応はBainbridge and Bownes (1981)に従った。産卵後102時間以降に現れる76kDaのバンドは免疫前血清を用いた場合にも観察された。また、38kDaおよび、110kDaのバンドはどの時期の胚の全SDS可溶性タンパクからも検出されたが、胚の核抽出物の全SDS可溶性タンパクからは検出されなかった(data not shown)。従って、これらのバンドはFTZ-F1のアイソフォームではないと判断した。

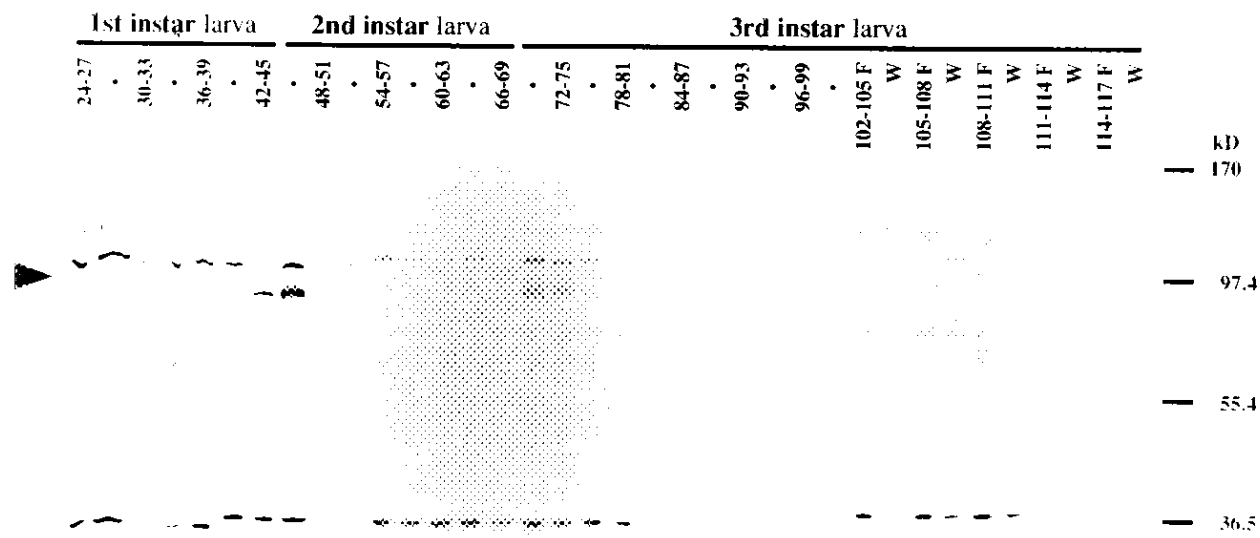


Fig. 3A

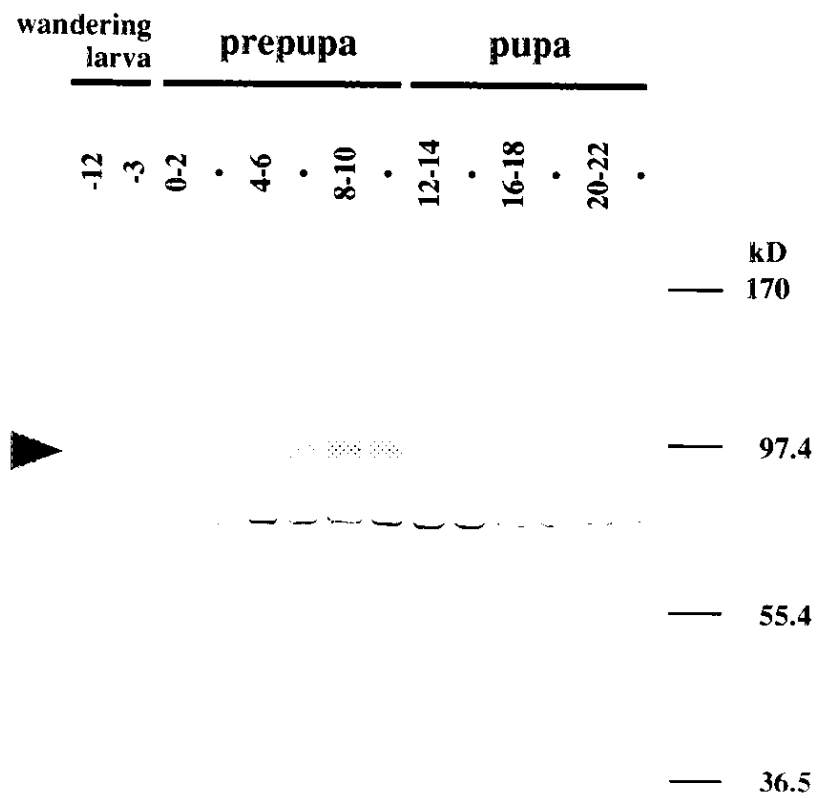


Fig. 3B

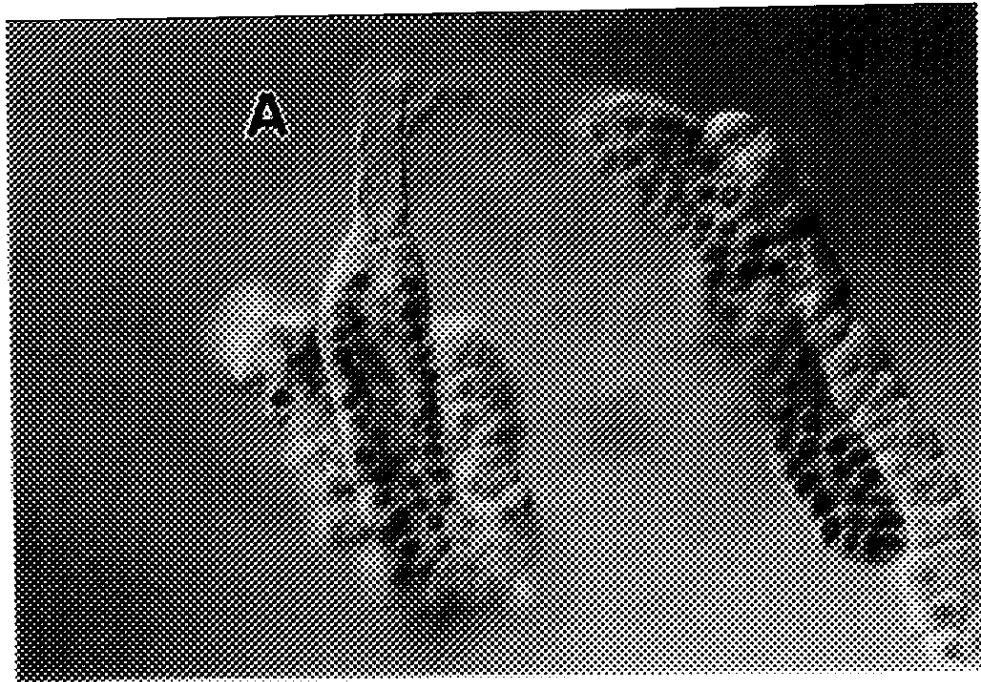


Fig.4 抗FTZ-F1抗血清T233を用いた産卵後44-46時間の1齢幼虫の抗体組織染色。幼虫を解剖し、染色した後、光学顕微鏡下で観察した。T233による染色(茶色)は主に核に存在した。A. 唾腺および脂肪体。B. 胃。C. トラキア。免疫前血清を用いて染色したところ、核での染色は観察されなかった(data not shown)。

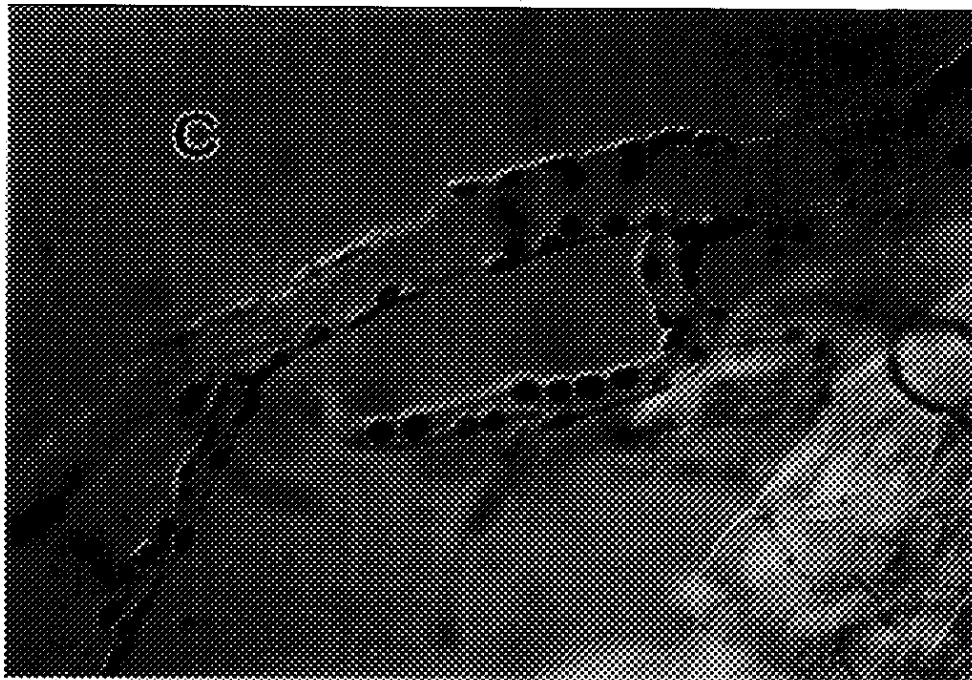


Fig. 4 (continued)

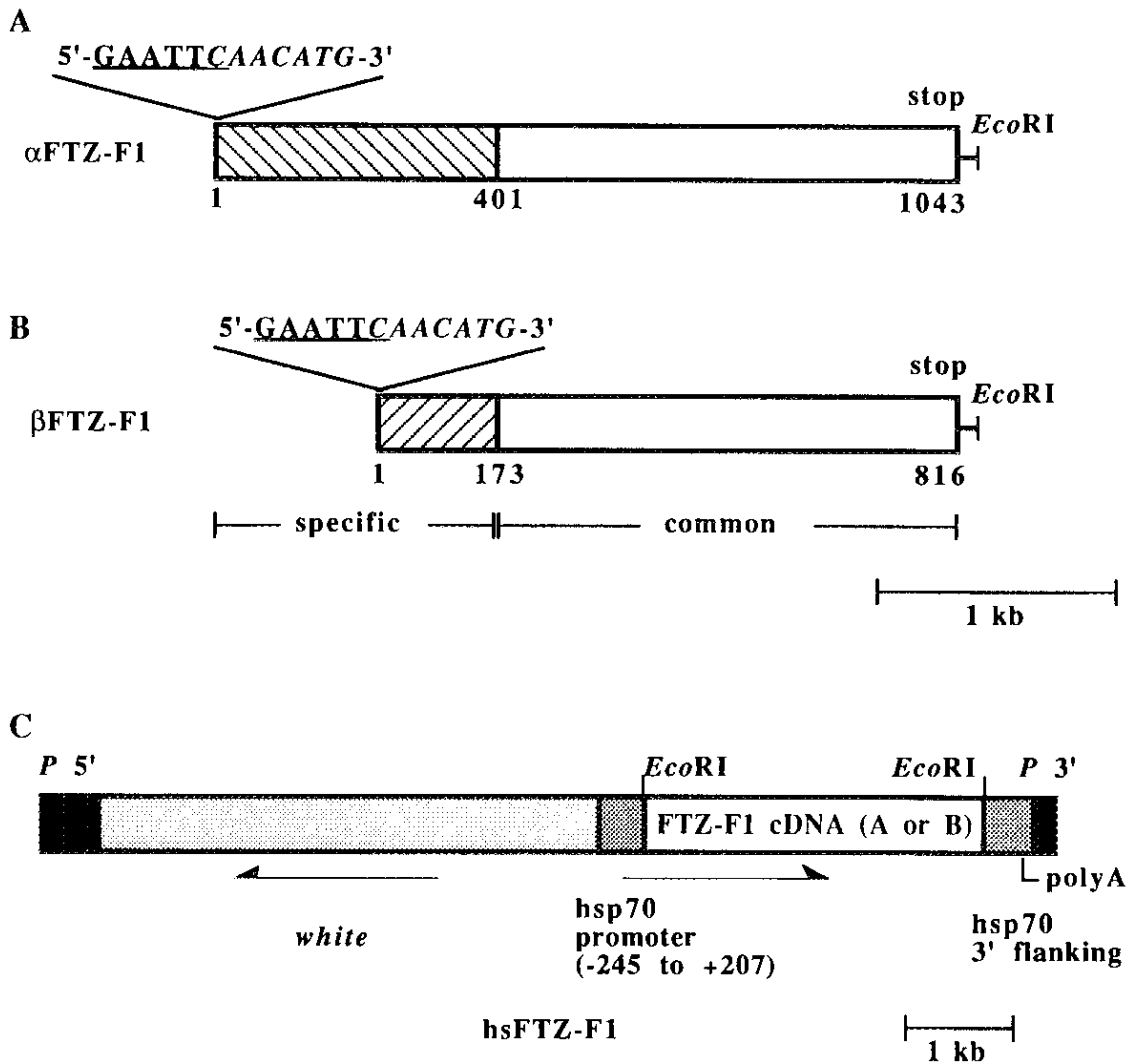


Fig.5 導入した*hsFTZ-F1*遺伝子。 *α FTZ-F1* cDNA (A)あるいは β FTZ-F1 cDNA (B)のcoding領域全長を含むフラグメントをP-element vector, pCaSpeR-hs(C.S.Thummel博士より提供)のheat shock promoter下流のEcoRIサイトにつないだ。 *α FTZ-F1* cDNA(A)あるいは β FTZ-F1 cDNA(B)の5'側にはEcoRIサイト(下線)およびシヨウジョウバエの翻訳開始点コンセンサス(イタリック、Cavener, 1987)を含む。 *α FTZ-F1* (A)あるいは β FTZ-F1 (B)の下の数字はそれぞれ α FTZ-F1 および、 β FTZ-F1のアミノ酸番号(Lavorgna et al., 1991, 1993)を示す。

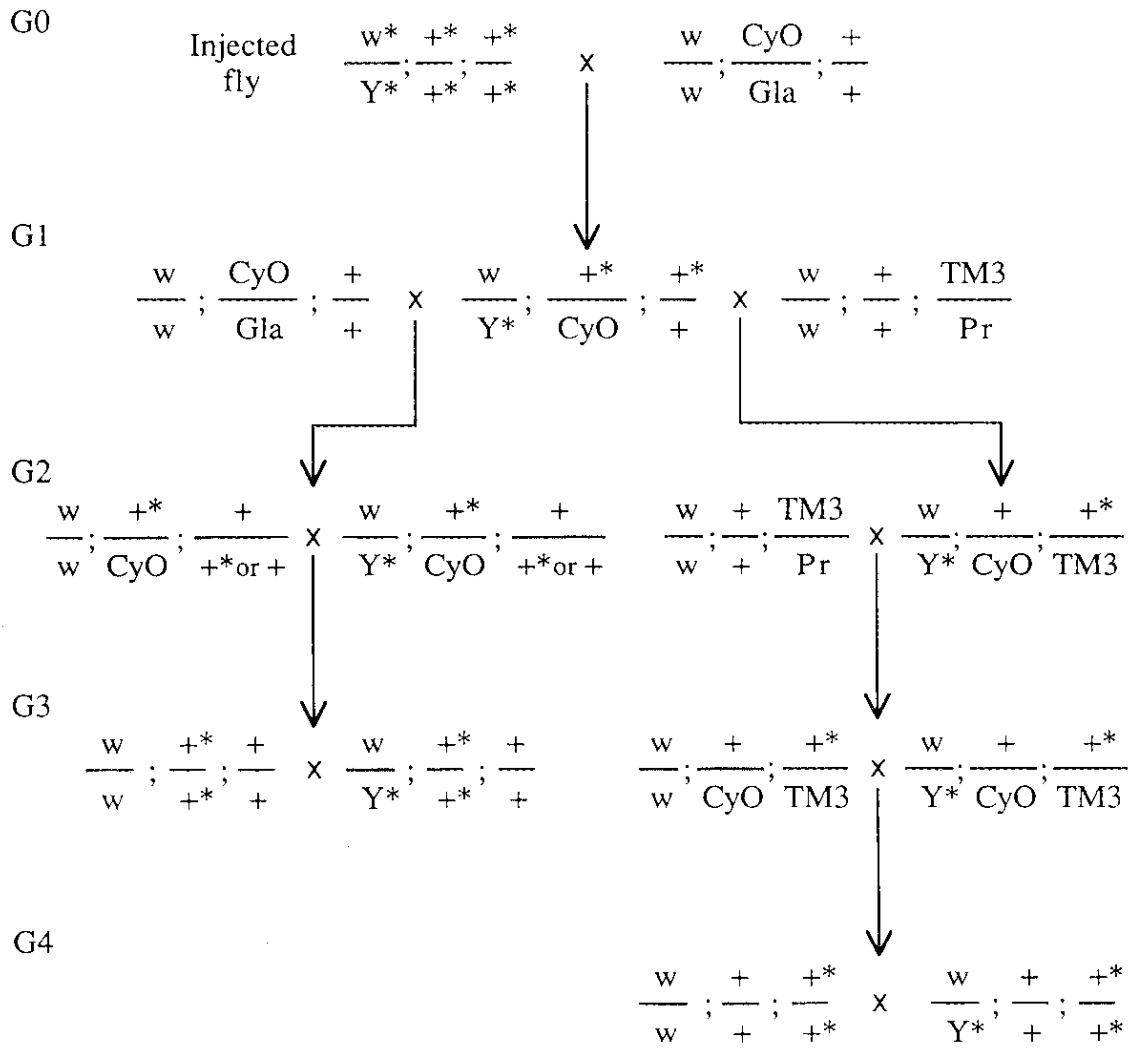


Fig.6 遺伝子導入と導入後の $hsFTZ-F1$ 遺伝子導入系統の確立のための交配（材料と方法参照）。 Y^* および $+^*$ は $hsFTZ-F1$ を導入したG0個体由来の染色体を示す。

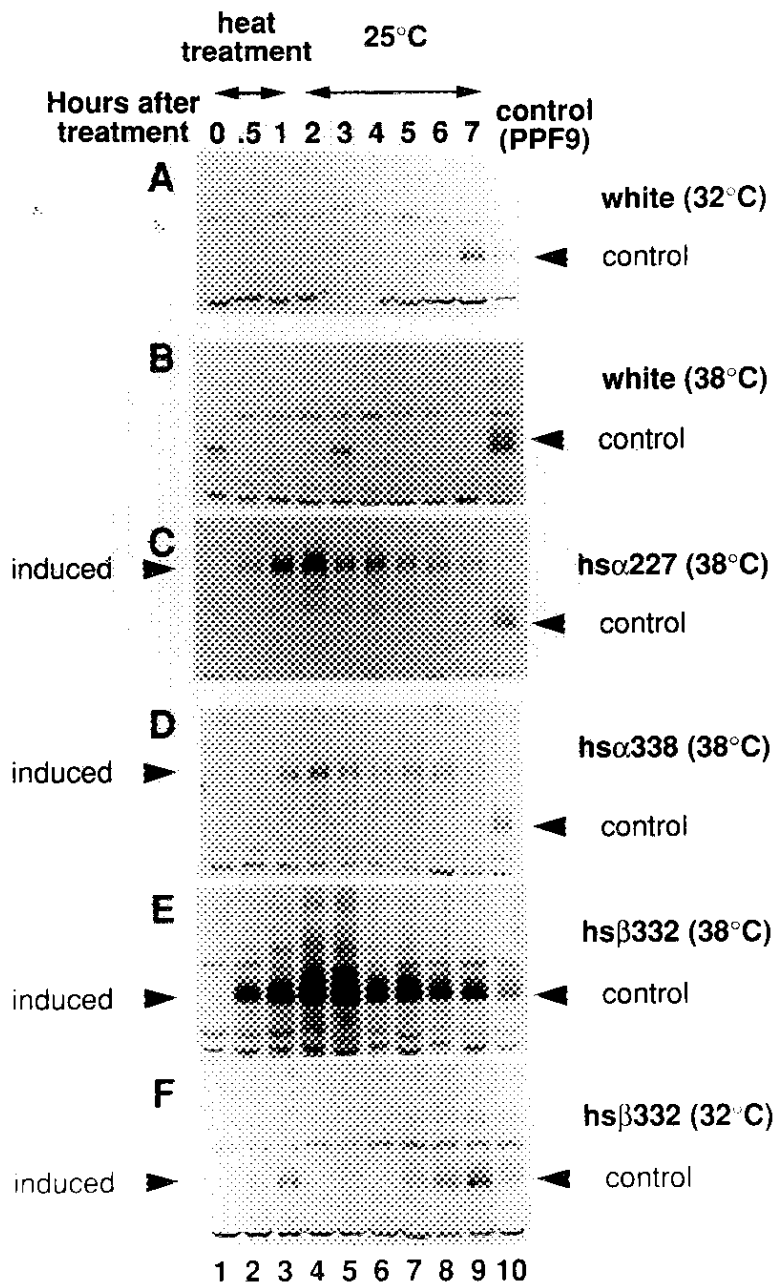


Fig. 7 *hsFTZ-F1*遺伝子導入系統でのFTZ-F1の誘導。*white*系統(A, B)、*hsα227*系統(C)、*hsα338*系統(D)、*hsβ332*系統(E, F)の囲蛹殻形成後1時間の前蛹(lane 1)に32°C(A, F)あるいは38°C(B, C, D, E)の熱ショックを60分間与え、抗FTZ-F1抗血清T233を用いたWestern blottingにより発現したFTZ-F1を検出した。矢じりは誘導したFTZ-F1および、内在性βFTZ-F1のバンド位置を示す。lane 1, 熱ショック開始直前。lane 2, 熱ショック開始後30分。lane 3, 熱ショック開始後60分。lanes 4-9, 熱ショック後1から6時間。lane 10, 熱ショック処理をしない囲蛹殻形成後9時間の前蛹。パネルBのlanes 1および5に現れる95kDa付近のバンドは免疫前血清でも検出される。*white*系統および、三つの*hsFTZ-F1*系統では、熱ショックを与えず25°Cで飼育した場合、内在性βFTZ-F1が検出され始める囲蛹殻形成後約6時間までFTZ-F1の発現は観察されなかった(data not shown)。

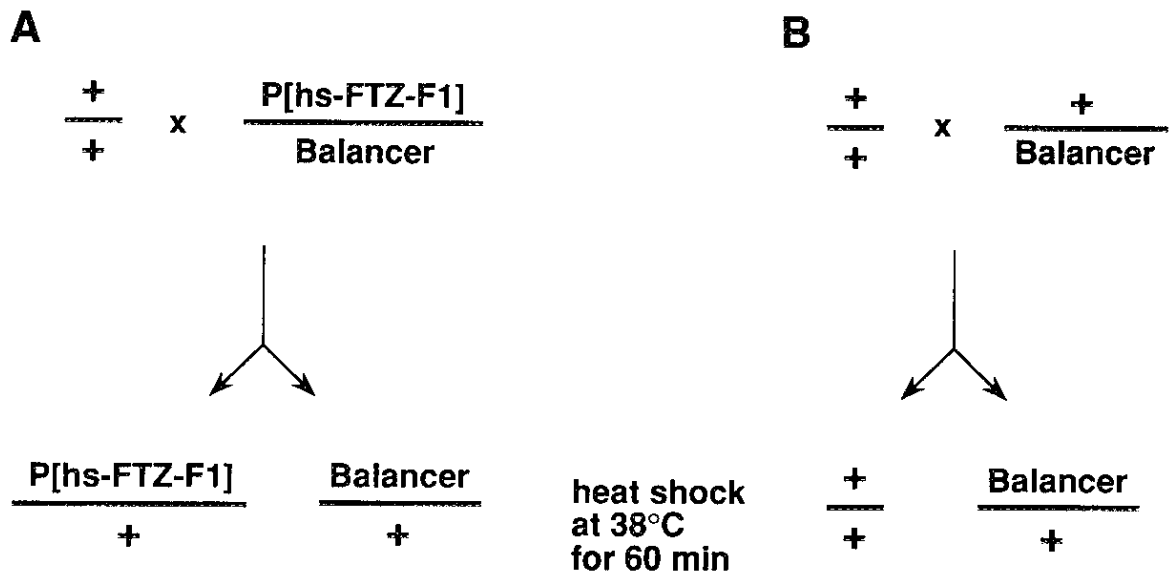


Fig. 8 FTZ-F1の時期特異的な強制発現による成虫出現率の変化。A. バランサー染色体とheterozygousにしたtransformant (*hsFTZ-F1* / Balancer) と*white*系統 (+ / +) とをかけあわせ、F1世代の幼虫の様々な発生時期に熱ショック (38°C60分) を与えFTZ-F1を強制的に発現させた。その後、成虫になった時点で*hsFTZ-F1*を持ったハエ (*hsFTZ-F1* / +) およびバランサーを持ったハエ (Balancer / +) の個体数を数えた。B. バランサー染色体のみをheterozygousに持ったハエ (+ / Balancer) と*white*系統 (+ / +) とをかけあわせ、Aと同様に熱ショック (38°C60分) を与えバランサーを持ったハエ (Balancer / +) と持たないハエ(+ / +) の個体数を数えた。

Fig.9 幼虫時に時期特異的にFTZ-F1を発現させたことによる成虫出現比の変化。熱ショックは3時間ごとのageに区切って与えた。横軸に熱ショック(38°C 60分)を与えた発生上の時期を産卵後の時間で示し、それぞれの時期に対応する幼虫のステージもあわせて示した。縦軸に羽化した成虫の比 [hsFTZ-F1を持ったハエ(*hsFTZ-F1 / +*)の個体数をBalancerを持ったハエ(*Balancer / +*)の個体数で割った値] を示した。

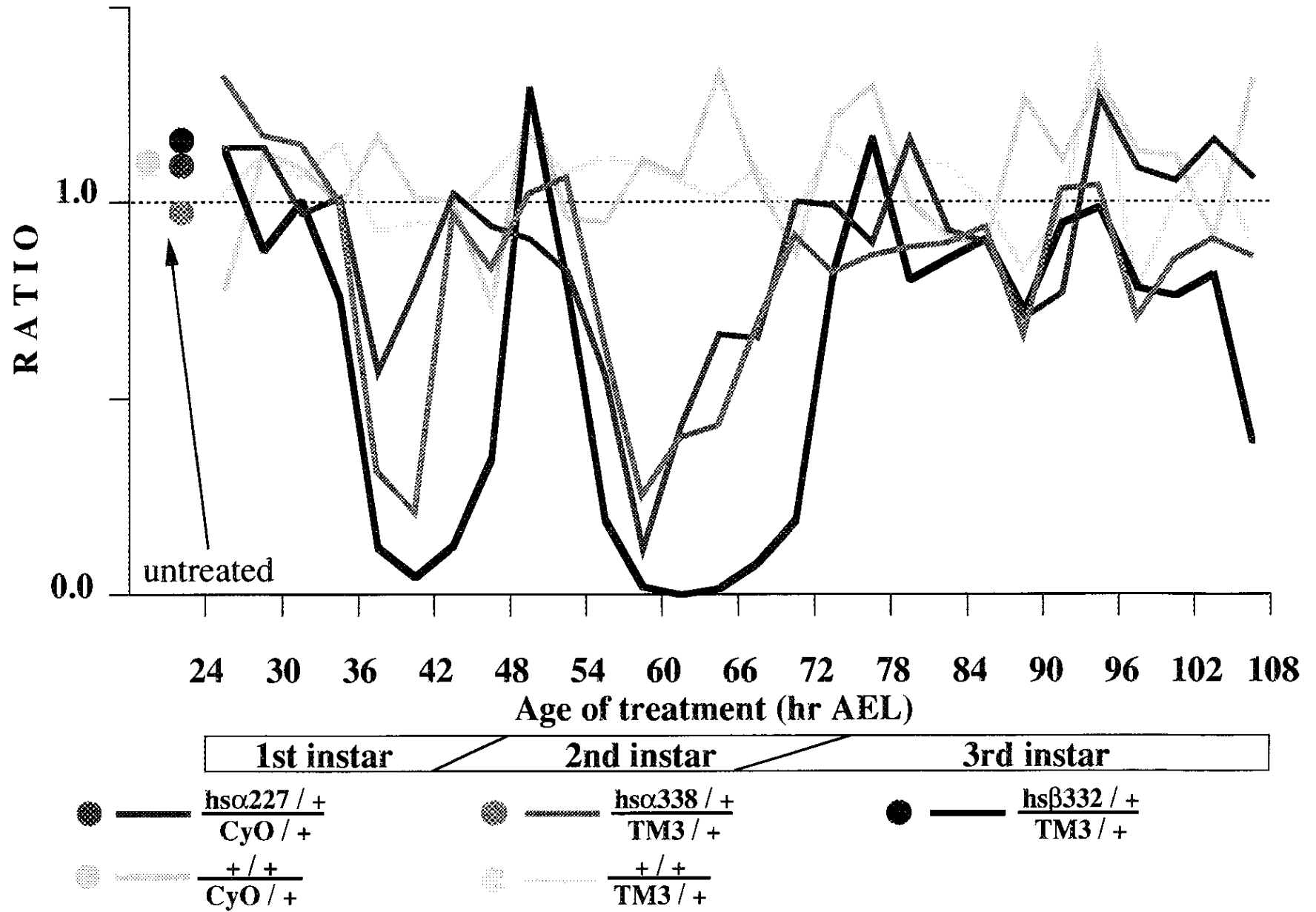


Fig. 9

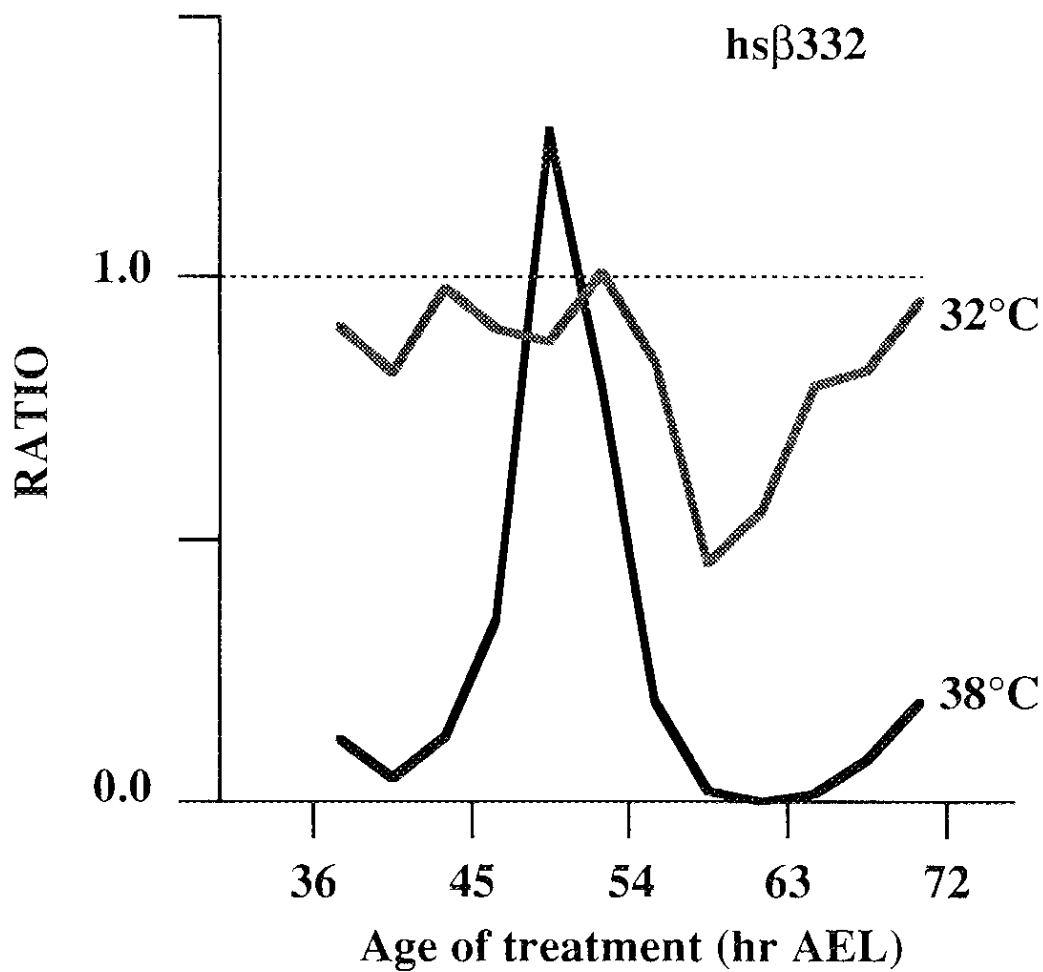


Fig.10 熱ショックの温度の違いによる成虫出現比の変化。hsβ332系統を用いて、32℃または38℃の熱ショック（60分）を与えた。横軸に熱ショック（38℃60分）を与えた発生上の時期を産卵後の時間で示した。縦軸に羽化した成虫の比 [hsFTZ-F1を持ったハエ (hsFTZ-F1 / +) の個体数を balancer を持ったハエ (Balancer / +) の個体数で割った値] を示した。

Fig.11 2齢中期幼虫にFTZ-F1を強制発現させた場合のその後の発生状況の経時的観察。A, C, E, Gは産卵後57-60時間の2齢幼虫（熱ショックで羽化率が低下する時期、Fig.9）に38℃60分の熱ショックを与え、その後、25℃で飼育し、2齢幼虫、3齢幼虫、蛹および致死になった幼虫の個体数の変化を調べた。B, D, F, Hは熱ショックを与えず、25℃で飼育し、2齢幼虫、3齢幼虫、蛹および致死になった幼虫の個体数の変化を調べた。A, Bは *white* 系統。C, Dは *hsα227* 系統。E, Fは *hsα338* 系統。G, Hは *hsβ332* 系統。縦軸は2齢幼虫、3齢幼虫、蛹および致死になった幼虫の個体数の割合、横軸は熱ショック処理終了後の経過時間。

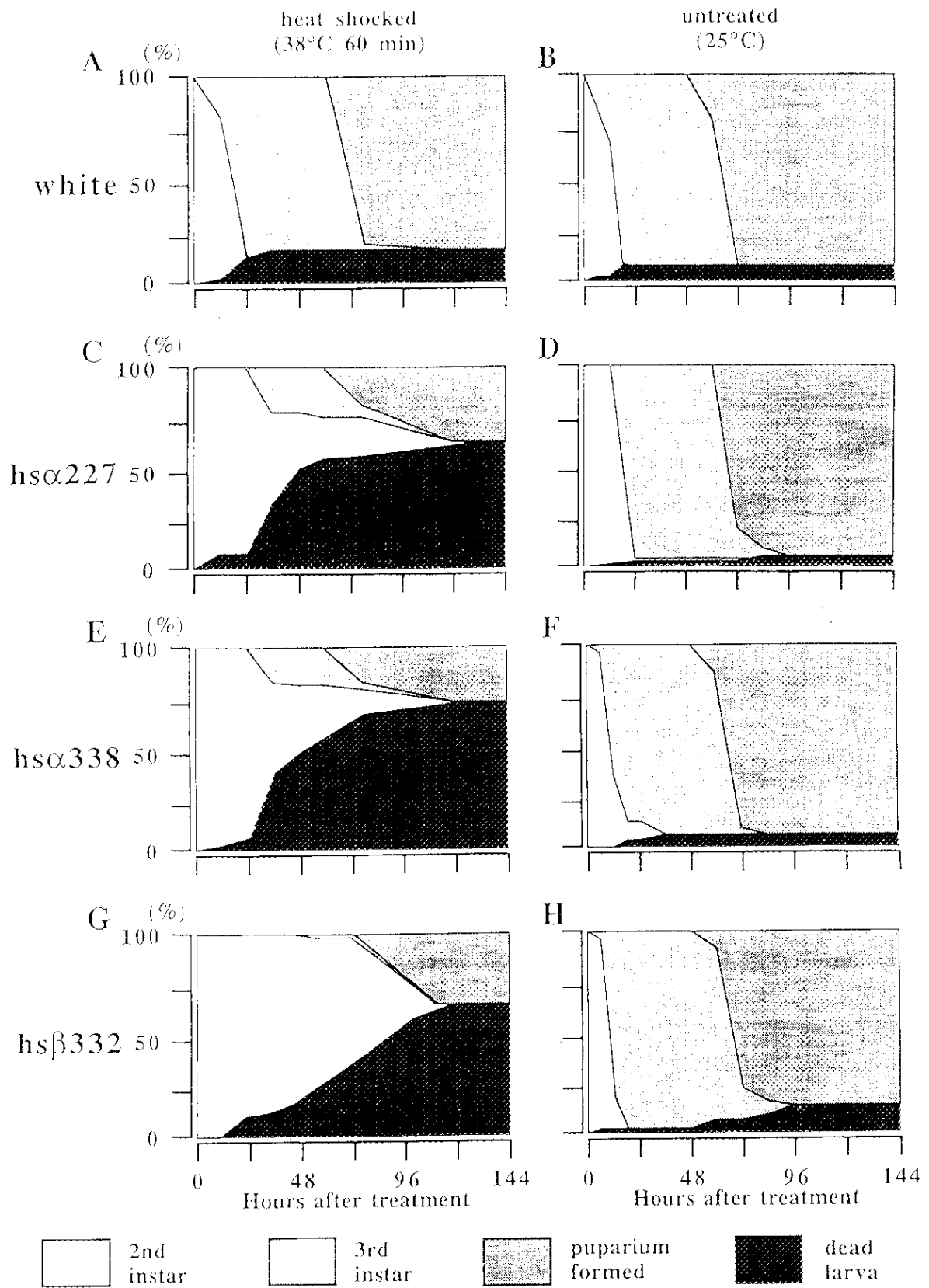


Fig. 11

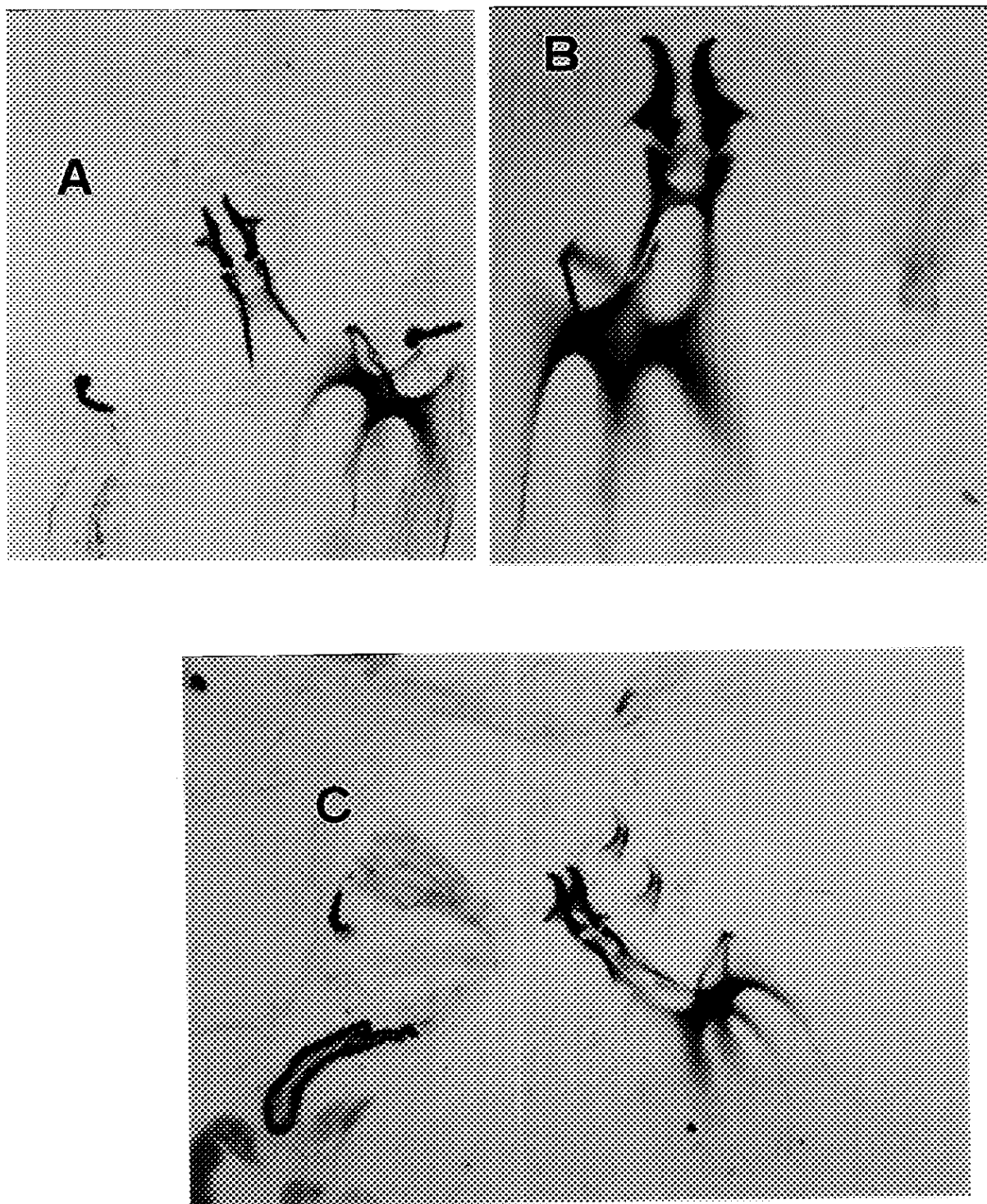


Fig.12 2 齡中期幼虫にFTZ-F1を強制発現させた個体の形態異常。熱ショック (38℃60分) は産卵後60-63時間に与えた。A. 正常発生した2 齡幼虫 (*white*系統、熱ショック無し) の頭部の形態。B. 処理後48時間の *white*系統3 齡幼虫の頭部の形態。C. 処理後48時間の *hsα338*系統幼虫の頭部の形態。

Fig.13 2 齡中期幼虫にFTZ-F1を強制発現させた個体の形態異常。A：*white*の蛹（熱ショックあり）。B：*hs α 338*（熱ショックあり）。蛹まで発生の進んだ個体（熱処理をしたtransformantsの一部は蛹まで発生が進む）は*white*系統よりも小さな蛹をつくった（2齡蛹）。C：*white*系統の蛹の頭部。D：*hs α 338*系統の蛹の頭部。E：*hs α 338*系統のanterior spiracle付近の強拡大。（D）と同一個体。

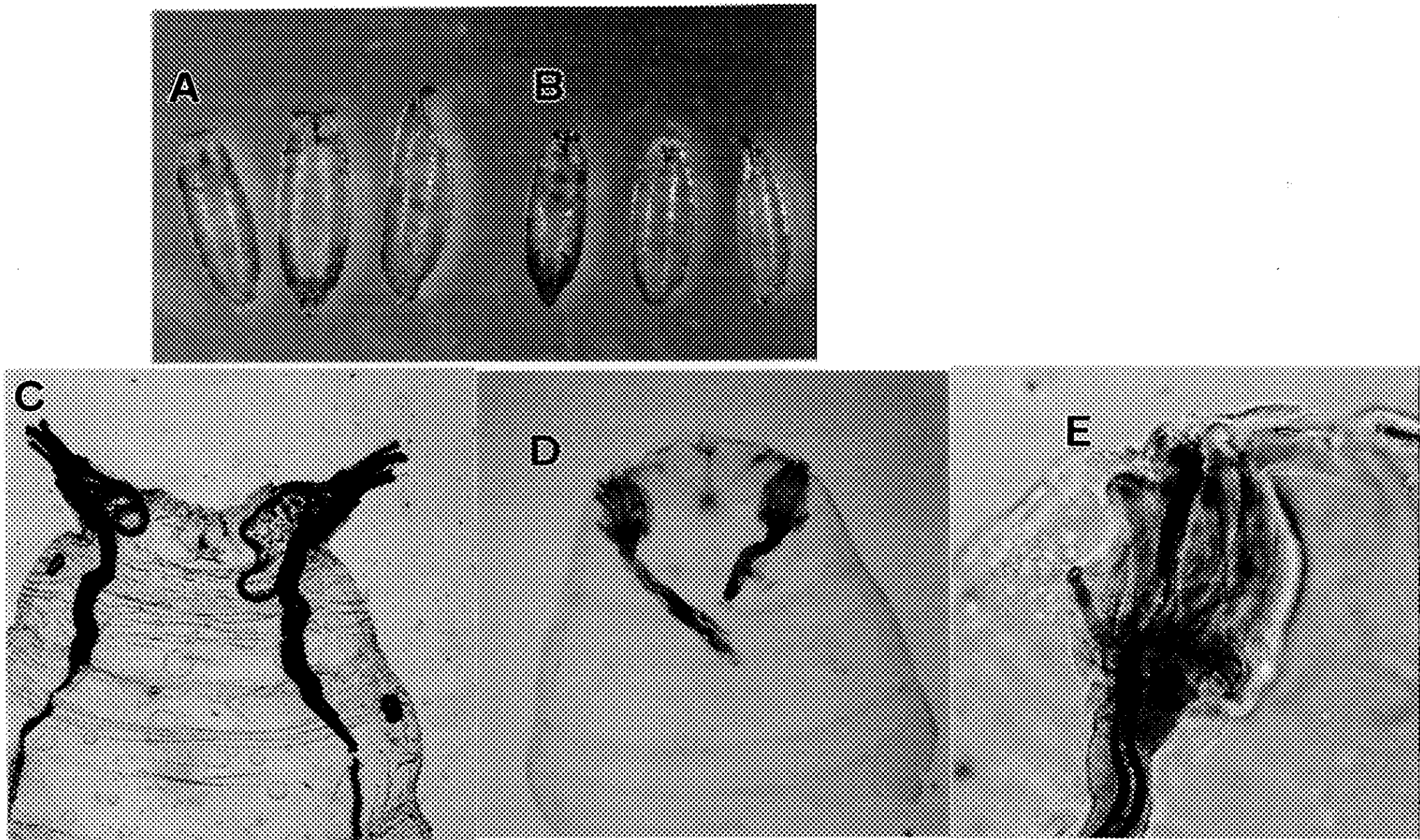


Fig. 13