

氏名 村 田 武 英

学位（専攻分野） 博士（理学）

学位記番号 総研大甲第87号

学位授与の日付 平成6年3月24日

学位授与の要件 生命科学研究科 遺伝学専攻
学位規則第4条第1項該当

学位論文題目 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

論文審査委員 主 査 教 授 中 辻 憲 夫
教 授 杉 山 勉
教 授 柱 勲
助教授 小 原 雄 治
教 授 渡 辺 隆 夫

（京都工芸繊維大学）

論文内容の要旨

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。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には少なくとも二つの 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12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おこなった結果、初期胚では embryonic stage 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 embryonic stage 13 (産卵後10.5-11.5時間)からふたたび胚全体で発現することがわかった。

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ト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。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発現をウエスタンブロット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核に局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、FTZ-F1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考えられた。また、幼虫および前蛹期の発現から、ショウジョウバエの脱皮や変態にかかわると予想された。

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FTZ-F1の生体内での機能を明らかにするために、熱ショックでFTZ-F1を発現できるトランスジェニックフライ (*hsFTZ-F1* 系統) を作成した。ショウジョウバエ *hs p70* 遺伝子プロモーター領域をもつFTZ-F1融合遺伝子を作成し、P-elementにより *white* 系統に導入することによって *hsFTZ-F1* 系統を得た。

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トティングで調べた。*hs α 227* 系統と *hs α 338* 系統では38℃60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倍であった。その後、約1時間の半減期をもって減少し、4時間後には検出できなくなった。*hs α 332* 系統では38℃60分の熱ショックによって10倍以上の発現があり、32℃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、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

(h s F T Z - F 1) 成虫の出現数の比で求めた。

3時間ごとに agingした産卵後24-108時間の幼虫に対して熱ショック (38℃ 60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h s F T Z - F 1系統の出現数が最低0.0にまで減った。この時期にはウエスタンプロットィング法で調べた限りF T Z - F 1は検出されず、本来F T Z - F 1が発現する直前にあたる。この実験から、F T Z - F 1の強制発現の影響をうける時期に特異性があることがわかった。その時期はF T Z - F 1が本来発現していない時期であることから、F T Z - F 1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。また、F T Z - F 1が本来発現していない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齢幼虫初期(産卵後75-108時間)ではF T Z - F 1の強制発現の影響が少ないことがわかった。F T Z - F 1が本来発現していないにも関わらずF T Z - F 1の強制発現の影響が少なかったことに対して、F T Z - F 1が転写因子として機能できなかった可能性と、F T Z - F 1は転写因子として機能したが、標的遺伝子産物が発現に影響を及ぼさなかった可能性が考えられた。

F T Z - F 1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齢幼虫に38℃ 60分の熱ショックを与え、その後、25℃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、h s F T Z - F 1系統の多くが3齢幼虫特有の 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、h s F T Z - F 1系統は mouth hook および spiracle 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 trachea は二重化していた。この形態から考えて、h s F T Z - F 1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。脱皮ができないために致死になるかどうかは不明であるが、この実験結果からF T Z - F 1がショウジョウバエの脱皮にかかわっていることが示唆され、正確な脱皮のためには ecdysteroids によって誘導される一群の遺伝子の発現順序が重要であることが考えられた。

論文の審査結果の要旨

村田武英君の博士論文の発表会と審査会は1月24日に行なわれ、約40分間の公開研究発表会の後に、審査委員5名による審査が行なわれた。

村田君の博士論文は、ショウジョウバエの転写調節因子FTZ-F1が幼虫の発育過程などにおいてどのような機能を果たしているかの研究に関するものである。まず、FTZ-F1に対する抗体を用いて、遺伝子産物の発現パターンを調べたところ、初期胚では極細胞以外の胚全体で発現しており、その後の幼虫でも唾腺を始めとする殆どの組織において発現していることが分かった。さらに発現量の増減をウエスタンブロット法によって調べたところ、幼虫においては脱皮直前に発現量が増加することが明らかとなった。

このような研究をふまえて、これまで突然変異体で得られていないFTZ-F1について個体レベルでの機能を解析するために、トランスジェニックハ工作成による強制発現系を用いた実験を行なったのが当博士論文の主要な内容である。つまり、熱ショック蛋白質遺伝子のプロモーター領域にFTZ-F1遺伝子を繋いだものをP-エレメントにより導入したショウジョウバエ系統を作成し、熱ショックによって導入したFTZ-F1が発現することを確認したのちに、幼虫の様々な時期での熱ショックによる効果を解析した。

まず、熱ショックによって幼虫の発育が阻害されて成虫出現以前に死亡することが起きるが、この致死となる率は熱ショックを与える時期によって大きく変動することが分かった。つまり、脱皮の準備を行なっている時期で内在遺伝子が発現していない時期の強制発現によって致死となる他に、致死とならない時期が存在していた。これら致死となる幼虫の状態を調べたところ、2齢幼虫から3齢幼虫への脱皮の準備が進行しているにもかかわらず、脱皮が行なわれていないことが明らかとなった。これらの結果より、強制発現により致死となる原因としては、脱皮直前に内在遺伝子が発現を開始するより以前の、脱皮準備の時期にFTZ-F1が強制発現された場合には、変態と脱皮の進行が異常となって、脱皮が阻害されるとともに致死になると考えられた。この結果、FTZ-F1によってこの時期に発現量が調節される標的遺伝子の解析が今後の課題となった。

以上の内容についての審査委員による審議のなかで、突然変異体で得られない遺伝子についての、個体レベルでの遺伝子機能解析としては、ここで行なわれた強制発現系が適切な方法であり、FTZ-F1の機能解析に関しての興味ある結果を得ることに成功していると同時に、今後の研究方向を設定するうえで意義が大きい研究であるとの合意が得られた。従って、論文の文章表現やデータの表現と配置、それに関する考察についてはいくつかの点で改良の余地があるが、村田君の研究の内容は十分に博士論文に値するものであるとの結論を得た。