

氏名 布施直之

学位（専攻分野） 博士（理学）

学位記番号 総研大甲第141号

学位授与の日付 平成7年3月23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 ショウジョウバエ成虫発生におけるescargotの役割

論文審査委員 主査 教授 杉山 勉
教授 桂 勲
教授 瀬野 悍 二
助教授 小原 雄 治
教授 西田 育 巧（名古屋大学）

論文内容の要旨

ショウジョウバエの脚や翅などの成虫構造は、成虫原基やヒストブラストと呼ばれる細胞群(成虫細胞)から形成される。幼虫細胞のゲノム含量が多倍体化するのに対して、成虫細胞は2倍体を維持することによって、変態時に増殖し分化を行なうことができる。

escargot (esg) 遺伝子は胚発生の時期からほとんどの成虫細胞で発現し、成虫の体の構築のために必要である。また、*esg* 遺伝子産物はZn fingerドメインを持ち、転写因子と考えられている。突然変異の表現型の解析から、*esg* は成虫細胞の倍数性の維持に関与していることが示唆されている。この*esg* の機能をさらに検証するために、*loss of function* や*gain of function*の影響とDNA結合活性について調べた。

はじめに、*esg* の生体内における役割について調べた。本来2倍体のヒストブラストが多倍体化し、成虫の腹部表皮が欠失する*esg* の変異系統において、*hsp70* プロモーターによって*esg* を体全体で発現させると、表現型の部分的な回復が見られた。回復の程度は、発現誘導の回数に依存していた。これらの結果は、本来2倍体のヒストブラストが多倍体化する表現型は、*esg* の*loss of function*が原因であることを強く示している。また、1つの*esg* 変異で、翅成虫原基の一部の細胞の多倍体化と幼虫細胞への形質転換が観察された。この結果から、*esg* が、ヒストブラストのみならず、成虫原基の倍数性と性質の維持にも関与することが示唆された。

さらに、*esg* を本来発現していない幼虫細胞で持続的に発現させたときの影響を調べた。酵母の転写因子Gal4を唾腺細胞で発現するトランスジェニック系統を用いて、Gal4にตอบสนองするプロモーターの制御下で*esg* を発現させた。唾腺細胞における*esg* の異所的発現は、唾腺の多倍体化に至る*endo-replication* (細胞分裂を伴わないDNA複製)を阻害した。

次に、ゲルシフト法とPCR法を用いて、*esg* 蛋白質は、DNA上のA/GCAGGTG配列に特異的に結合することを明らかにした。この配列は*daughterless (da)* や*scute (sc)* などのbHLH蛋白質が結合する配列(E2 Box)と同じである。実際、培養細胞内で*da / sc* によるE2 Boxを介したレポーター遺伝子の転写活性化を*esg* は抑制した。また、生体内で、*da / sc* などが決定している感覚毛の形成を*esg* は阻害した。この結果は、生体内において、*esg* が、転写を活性化するbHLH蛋白質に対する抑制因子として機能し得ることを示唆した。*esg* のZn fingerドメイン内の1アミノ酸の置換は生体内で強い*loss of function*の表現型を示すとともに、このE2 Boxへの結合活性を著しく低下させた。このことは、*esg* の特異的なDNA結合活性は生体内の*esg* の機能に重要であることを示している。

これらの結果から、*esg* は、未同定のbHLH蛋白質の機能を阻害し、特定の遺伝子の転写を負に調節することによって、成虫細胞の倍数性を維持していることが示唆された。

審査結果要旨

出願者布施直之君は、ショウジョウバエの *escargot(esg)* 遺伝子の機能について解析を行った。

従来の研究により、*esg* 遺伝子は、ショウジョウバエ幼虫の成虫原器とヒストブラストで発現され、変異体においてはヒストブラスト細胞のDNA含量が増加（多倍体化）するため、幼虫組織中の成虫細胞のゲノム二倍体性の維持に関与すると推定されていた。また *esg* 遺伝子がコードするタンパクは、Zn finger 領域を持ち、転写因子であると考えられていた。

布施君は、これらの推定を実証するために、まず *in vivo* 実験において、*esg* 遺伝子を強制発現させ、変異体においてはヒストブラスト細胞の表現型が回復されること、正常系統においては幼虫唾腺細胞の細胞分裂を伴わないDNA複製（*endo-replication*）が抑制されることを示した。

また *in vitro* 実験においては、大腸菌発現タンパクを使用し、*esg* タンパクが A/GCAGGTG (E2 Box) 配列と特異的に結合すること、この結合が Zn finger 領域内1アミノ酸置換で失われることを示した。

これらの結果は、*esg* 遺伝子が転写制御因子をコードし、この因子が E2 Box を持つ未知特定遺伝子の発現を制御し、この制御により成虫細胞の二倍体性が維持されることを強く支持する。

布施君の研究はショウジョウバエ発生研究の分野にあって、着実な一成果を築いたものであり、学位論文として充分ふさわしいと判断した。