

ショウジョウバエ気管形成における転写因子 Escargot と
細胞接着分子 DE-cadherin の機能解析

Control of tracheal morphogenesis by the transcription factor
Escargot and the cell adhesion molecule DE-cadherin in
Drosophila

亦勝 実穂

博士（理学）

総合研究大学院大学
生命科学研究科
遺伝学専攻

平成九年度
(1997)

要旨

生物の形態形成において細胞運動と細胞接着は、複雑な組織や器官を構築するため重要な役割を担う。さらに、細胞運動と細胞接着が協調して作用することが、ターゲットの認識、細胞移動のガイダンス、機能に応じた細胞形態の変化など、形態形成の一面を担っている。

ショウジョウバエの気管系は上皮細胞が管状に配列したネットワーク構造である。気管形成過程において特定の気管の枝(branch)どうしが接触、融合する。融合する branch の先端には特殊な細胞 (tip cell) が同定されている。Zinc フィンガー型の転写因子 *Escargot* は、全ての tip cell で特異的に発現し、*escargot* 変異体では、branch の融合がおきないことがわかっていた。また細胞接着分子 *DE-cadherin* をコードする *shotgun* 遺伝子は全ての気管細胞で発現し、*shotgun* 変異体においては、branch の融合に異常が観察されることが報告されていた。

私は、正常型の branch の融合過程において、tip cell の細胞形態と *DE-cadherin* の局在パターンを詳細に観察した。球型の tip cell は branch 融合直前に filopodia を伸長させ互いに接触しあう。Tip cell の形態は最終的にリング状に変化した。*DE-cadherin* は、接触したターゲット branch の tip cell 間に新たに局在し、その局在パターンは線状からリング状へ変化した。また tip cell の接触にともなって、*shotgun*(*DE-cadherin*) 遺伝子の転写活性の上昇がみられた。*escargot* 変異体の branch の融合過程では、tip cell はターゲットの tip cell と接触するが、*shotgun*(*DE-cadherin*) 遺伝子の転写活性の上昇はみられず、tip cell の接触面に *DE-cadherin* は局在しない。接着構造を形成できなかった tip cell が filopodia を異常伸長させたことから、細胞の運動能が増大していると考えられた。以上の結果から、転写因子 *Escargot* は *shotgun*(*DE-cadherin*) 遺伝子の転写活性化と、細胞運動能の抑制に関係していることが示唆された。

次に、branch 融合過程において球型からリング状に形態変化する tip cell の apical-basal cell polarity の変化を microtubule と microtubule 上のモータータンパク質である Nod の lacZ fusion タンパク質の局在パターンを指標にして解析した。細胞骨格である microtubule は branch 融合過程において細胞内の分布パターンが変化した。複数の microtubule filament の一部は Nod-lacZ で強く標識される。Nod-lacZ で強く標識された microtubule は、将来の apical 側に位置することが lumen に移動する vesicle の分布パターンから明らかになった。また、*DE-cadherin* は通常、

細胞の apical 側に近い lateral に局在する細胞接着分子である。しかし branch 融合過程の tip cell において *E-cadherin* は、まず *Nod-lacZ* で強く標識された microtubule に沿って細胞内に線状に分布し、次に basal 側の特性をもつ細胞膜領域に移動し、最後に tip cell とうしの接触面に蓄積することが明らかとなった。以上の結果から、microtubule は、細胞の apical-basal cell polarity の変化を予想させ、さらに *E-cadherin* が tip cell の basal 側に向かって輸送される足場となっていることが示唆された。

融合する branch の先端で、Escargot を発現する tip cell は 1 個に限定されている。DorsalBranch で Escargot 発現を tip cell のみに限定させるために、Ets ドメインタンパク質 Pointed、Anterior open による転写抑制が働いていることを示した。

本研究の結果、気管ネットワーク形成過程において、tip cell は気管の branch の融合を担うために重要な役割を果たしていることが示された。

Summary

Cell adhesion and cell migration processes play essential roles in the embryogenesis of multicellular organisms. The cellular mechanisms underlying adhesion and migration of cells include path finding, target tissue recognition and cell shape changes.

The *Drosophila* trachea is a network of tubular ectodermal epithelia. This network is formed by branching, migration and fusion of epithelial sheets. At the tip of migrating branches, specialized tip cells are located.

In tip cells, the *escargot* gene is expressed. *escargot* is a zinc-finger type DNA binding protein that acts as a transcriptional regulator. The cell adhesion molecule *DE*-cadherin, encoded by the gene *shotgun*, is expressed in all tracheal cells. I analyzed the fusion of tracheal branches by following molecular marker expression and the cell morphology in the tip cells. In wild type embryos, tip cells extended filopodia to contact each other and accumulated the cell adhesion molecule *DE*-cadherin at the site of contact. Later on, tip cells changed to the shape of a seamless ring. In *escargot* mutants, tip cells failed to accumulate *DE*-cadherin upon contact, and extended long filopodia. I found that *DE*-cadherin transcription is regulated positively by *Escargot*. These results indicate that *Escargot* regulate *DE*-cadherin expression and tip cell mortality during the branch fusion.

I next analyzed distribution of microtubule and localization of *DE*-cadherin during tip cell contact. *DE*-cadherin normally localizes to apical-lateral surface of tracheal cells, but sorts out to the basal surface during tip cell contact. I found that the microtubular cytoskeleton drastically change its array in tip cells during contact in a way that predict the change in *DE*-cadherin distribution. Furthermore, position of the bundle of microtubule correlate with a future apical surface of tip cells. These results suggest that the microtubule may direct *DE*-cadherin to the basal surface as opposed to the normal apical-lateral localization in preparation of the tip cell contact.

Furthermore I show that expression of *escargot* on the tip

of Dorsal Branch is regulated by several transcriptional regulators.

These studies demonstrated that tip cell plays important roles in tracheal branch fusion during tracheal network formation.

序論

生物の形態形成は、細胞増殖、細胞運動、細胞の形の変化など、細胞レベルでの変化が基盤となっている。上皮細胞層の形態形成においては細胞層を壊すことなく、細胞の配置を変えることで、複雑な組織や器官が構築される (Gumbiner, 1992)。この形態形成運動には、分子レベルでは細胞接着分子とくに cadherin が重要な役割をになっている (Takeichi, 1991, 1995)。また、細胞骨格も細胞の移動や生物の形態形成に、直接関与する重要なタンパク繊維である。細胞は、細胞質全体に張りめぐらされた細胞骨格の複雑な網目状構造によって細胞接着と運動とを協調させている (Mitchison and Cramer, 1996)。

ショウジョウバエの気管系は上皮細胞が管状に配列したネットワーク構造である。気管形成は胚側面の表皮上皮が各体節ごとに袋状に貫入することによって開始する。貫入した気管前駆細胞は上皮細胞としての apical-basal polarity を保持し続けている。次に気管前駆細胞は決まった方向に枝状に分岐、伸長し、上皮の融合がおこる (Manning and Krasnow, 1993)。融合する枝の先端には、特殊な細胞 tip cell があり、転写因子 Escargot が発現する (Hartenstein and Jan, 1992; Samakovlis et al., 1996)。気管前駆細胞は各体節ごとに貫入した袋のため、袋の内部は個体にとって外界である。tip cell は枝 (branch) の伸長の際には、袋の内部の外界と、体腔の内界が混じりあわないように、あたかも branch の蓋のようにふまっていると考えられる。しかし、気管のネットワークを形成するには、融合する branch どうしが接触した後、tip cell は管の一部となるように形態を変化させる必要がある。

私は、気管ネットワーク形成において、tip cell の挙動に着目することで、細胞移動のガイダンス、細胞の運動能の制御、ターゲットの認識、機能に応じた細胞形態の変化など、生物の形態形成における重要な問題を理解する手がかりが得られると考えた。また、近年、気管形成を担う遺伝子が次々と報告されている。例えば、転写因子をコードする *tracheless* 遺伝子は、表皮上皮から貫入する細胞の決定に関わっている (Isaac and Andrew, 1996; Wilk et al., 1996)。primary branch の伸長の誘導には、FGF をコードする *branchless* 遺伝子が関与している (Sutherland et al., 1996)。また、気管細胞が胚表面の細胞層から貫入し、次に branch を伸ばすには、個々の細胞の運動が必須であるが、運動能の制御因子の一つとして *tracheal defective* 遺伝子が報告された (Eulenberg and Schuh, 1997)。

escargot 遺伝子は融合する branch の先端に位置する tip cell でのみ発現する。*escargot* は C2H2 Zn finger type DNA-binding protein をコードし、特異的なターゲット遺伝子の転写を調節する (Whiteley et al., 1992; Fuse et al., 1994)。すでに *escargot* は成虫細胞の 2 倍体の維持に不可欠であり (Hayashi et al., 1993; Fuse et al., 1994; Hayashi, 1996)、胚発生期に翅の原基細胞の決定に必要であることが示されている (Fuse et al., 1996)。しかし、気管系での *Escargot* の機能は不明であった。*escargot* 変異体では、気管の branch の融合がおきない。私は、*Escargot* が tip cell を介した branch の融合過程で重要な機能を持つのではないかと考え、気管融合過程の細胞形態の変化や細胞接着分子の分布を詳細に観察し、転写因子 *Escargot* の機能解析をおこなった。

本論文では気管形成の問題を 2 部に分けて考察する。1 ; 気管の branch 融合過程における *Escargot* の機能解析、2 ; tip cell の apical-basal cell polarity の再構成の解析、である。さらに付録として、1 ; *Escargot* による細胞運動能の制御、2 ; *escargot* の発現調節機構、についても述べる。

第一部は、気管 branch の融合において、転写因子 *Escargot* は、tip cell どうしの接着に必要な細胞接着分子 *E-cadherin* の *de novo* の転写を正に調節することを示す。第二部では、tip cell と terminal cell は、気管形成過程において、あらかじめ保持していた apical-basal cell polarity を再構成し、細胞内に apical 特性である lumen 構造を形成することを示す。また、付録の第一部で *Escargot* は気管細胞の運動能を調節する機能をもつこと、第二部で気管ネットワークを形成するためには *escargot* が tip cell でのみ発現するように調節されていることを示す。

本研究の結果、気管ネットワークを形成するために、branch の先端の tip cell は形態形成に重要な機能を担っており、転写因子 *Escargot* がその機能に不可欠であることが明らかとなった。

materials and method

実験材料

実験に用いたキイロショウジョウバエ *Drosophila melanogaster* は、標準イースト寒天培地で 25 度で飼育した。用いた系統は、*escargot*^{G66B} (null; Whiteley et al., 1992), *escargot*^{VS8} (hypomorphic allele; Fuse et al., 1994), *Df(2L)A48(escargot* の deficiency; Ashburner et al., 1982), *shotgun*^{F2370} (enhancer trap line), *shotgun*^{E17B} (hypomorphic allele; Uemura et al., 1996), *shotgun*² (hypomorphic allele; Uemura et al., 1996), *pruned-lacZ* (enhancer trap line; Guillemain et al., 1996), *pointed(P1)-lacZ* (enhancer trap line; Samakovils et al., 1996), *anterior open(yan)* (Lai et al., 1992) *branchless-lacZ* (enhancer trap line; Sutherland et al., 1996), *breathless* (Oh10 null; Ohshiro et al., 1997)。救済実験に用いた系統は、Hs-*escargot* (Fuse et al., 1994), Hs-*escargot* Δ ZF (Fuse et al., 1994), Hs-cadE (Uemura et al., 1996)。GAL4-UAS system に用いた GAL4 系統は、*breathless-GAL4* (Shiga et al., 1996) である。UAS 系統は、気管細胞をトレースするために UAS-GFPS65T (細胞質と核を識別 from Brand; 2nd chromosome homo line), UAS-GFP-N-lacZ (核を識別; Shiga et al., 1996) を用いた。細胞極性の観察には、UAS-Kinesin-lacZ (Kinesin-lacZ fusion construct; 2nd chromosome; Clark et al., 1997), UAS-NZ-lacZ (Nod-lacZ fusion construct; 2nd chromosome; Clark et al., 1997) を用いた。細胞運動能の実験には、UAS-*escargot* (3rd chromosome; Fuse et al., 1994), UAS-*DEcadherin* (from Uemura; 3rd chromosome homo line #7) を用い、低分子量 GTP 結合タンパク質の変異型の強制発現には、UAS-*RhoLN25* (dominant negative; Murphy et al., 1996)、UAS-*Dcdc42V12* (constitutively active, lineV12.2; Luo et al., 1994)、UAS-*Dcdc42N17* (dominant negative, lineN17.3; Luo et al., 1994)、UAS-*Drac1V12* (constitutively active, lineV12.1; Luo et al., 1994)、UAS-*Drac1* (wild type, lineWT.3; Luo et al., 1994)、UAS-*Drac1N17* (dominant negative, lineN17.1; Luo et al., 1994)、UAS-*Drac1L89* (dominant negative, lineL89.6; Luo et al., 1994)、UAS-*Drac1L89* (dominant negative, lineL89.32; Luo et al., 1994) を用いた。

embryo collection、固定、抗体染色法

ショウジョウバエ胚は25度の温度条件下で apple juice-agar plate で集めた。50% 次亜得塩素酸ナトリウム溶液 (bleach) に5分浸して卵殻をとりのぞき、BroWash (0.9% NaCl, 0.1% Triton X-100) で洗浄した。heptan 750 μ l と4% Paraformaldehyde (in PBS) 750 μ l の入った2ml の eppendorf tube に胚を移し、室温で40分間 shaker で激しく振とうして固定した。下層の4% Paraformaldehyde solution を除き、MeOH を500 μ l 加えて15秒間 vortex 処理をした。下層の胚を新しい1.5ml tube に移してMeOH でリンスした。 α -tubulin, β -tubulin, γ -tubulin 染色は、PBS に交換し、homogenizer (TAITEC VP-5S ; out put 6) で10秒間超音波処理した。この条件では、ほとんどの胚は dorsal midline または ventral midline で裂け、表皮の tubulin 染色はこの処理をしなかったものと変化はない。抗体染色用の胚は Embryo Wash (20mM Tris-HCl [pH7.5], 130mM NaCl, 1mM EDTA, 0.1% TritonX-100, 0.2% BSA) で30分間 Blocking をした後、1次抗体を反応させた。抗体反応は4℃で胚が左右に動く程度に振とうした。1次抗体は1晩反応させ、Embryo Wash で10分間 \times 5回ローターで回転させて胚を洗浄し、2次抗体反応以下も同様におこなった。反応はすべて4℃で2次抗体は5~6時間、3次蛍光抗体は1~2時間おこなった。

抗体染色のシグナル増強には TSA Tyramide Signal Amplification kit (NEN) を使用した。Biotin conjugate の2次抗体の次に kit の streptavidin-HRP を500倍希釈で2時間4℃で反応させた。次に TNT (0.1M Tris [pH7.5], 0.15M NaCl, 0.05% Tween20) で10分 \times 4回洗浄し、使用直前に2 \times diluent (kit):DDW=1:1 に TSA-indirect (biotinconjugate;kit) を100倍希釈した。*D*E-cadherin 抗体の場合は3分間、Escargot 抗体と 2A12 lumen 抗体の場合は10分間反応させた。反応後ただちに反応液をとりのぞき、TNT で10分 \times 4回洗浄して次の抗体反応のステップに進んだ。

用いた1次抗体は、rat-anti-escargot 抗体 (Fuse et al., 1994)、rat-anti-*D*E-cadherin 抗体 (Oda et al., 1994)、rat-anti-*D* α -catenin 抗体 (DCAD1, DCAD2; Oda et al., 1993)、mouse-anti-Crumbs 抗体 (Tepass et al., 1990)、mouse-anti-Fas III 抗体 (Brower et al., 1980)、mouse-anti-Collagen4 抗体 (Murray et al., 1995)、rabbit-anti-Laminin α β γ complexes 抗体 (Fessler et al., 1987)、rabbit-anti- β -galactosidase 抗体 (Cappel)、mouse-anti- α -tubulin 抗体 (SIGMA)、mouse-anti- β -tubulin 抗体 (Amersham)、mouse-anti- γ -tubulin 抗体 (SIGMA)、rabbit-anti- γ -tubulin 抗体 (Zheng et al., 1991)、mouse-anti-DSRF 抗体

(Affolter et al., 1993)、rat-anti-PP2A 抗体(Shiomi et al., 1994)、lumen specific antibody 2A12(Samakovlis et al., 1996)、lumen specific antibody #55(Klambt et al., 1992)、rabbit-anti-actin 抗体(BTI)は lumen を標識した。2 次抗体蛍光抗体には以下を用いた。FITC-conjugated-guinea pig IgG(Jackson Laboratory)、Cy3-conjugated-anti-rabbit-IgG(Chemicon)、biotin conjugated-anti-mouse IgG(Jackson Laboratory)、biotin-cojugated-anti-mouseIgM(Jackson Laboratory)、biotin conjugated-anti-rat-IgG(Jackson Laboratory)、biotin conjugated-anti-rabbit-IgG(Jackson Laboratory)、FluoroLink Cy2-Streptavidin(Amersham)。抗体染色した胚は共焦点レーザー顕微鏡(Zeiss LAM410)を使用して顕鏡した。

Heat-shock 実験

25℃の温度条件で stage12 から 13 に相当する胚を apple juice-agar plate で集めた。apple juice-agar plate を 1 mm の厚さにスライスし、プラスチック皿に置き、パラフィルムでシールした。Heat-shock は、37℃の water bath に 15 分間浮かべ、直ちに 25℃で 30 分間インキュベートして胚を加齢させた。このステップを複数回くりかえし、stage16 に相当するまで加齢した。胚は固定、抗体染色をおこなった。1 齢幼虫の観察には、25℃で加齢後、70%の glycerol にマウントし、明視野顕微鏡下で観察した。western analysis は、胚を SDS sample buffer(3%SDS, 10% glycerol, 65mM Tris-HCl (pH6.8), 5.25% 2-mercaptoethanol, 0.2nM PMSF, 1 μ g/ml aprotinin, 10 μ g/ml chymostatin, 2 μ g/ml leupeptin, 1 μ g/ml pepstatin) 中でホモジェナイズした。protein 濃度は Bradford assay(Bio-Rad Laboratories)で測定した。Protein サンプルは 7.5% SDS-PAGE によって分離させ、Sambrook et al. (1989)の方法にしたがって blotting をおこなった。Detection には chemiluminescence kit(NEN)を用い、フィルターの reprobing は添付取扱説明書にしたがった。フィルターは、densitometric analysis software(Quantity One, PDI)を用いて強度の測定をした。

GAL4 construction

tip cell で、強制発現をおこなう目的で、*escargot* 上流エンハンサー領域

をもつ GAL4 系統の作製をおこなった。そのためにマルチクローニングサイトとプロモーターをもつ GAL 4 vector を作製した。まず、GaTB (Brand and Perrimon, 1993) vector を *Pst* I で部分分解し、6Kbp の断片を回収し、さらに *Bam*H I で完全分解し 6Kbp 断片を回収した。また、プロモーターには、*hs70* 遺伝子の 43bp 上流の untranslated leader sequence の (*hs43* promoter) (Garabedian et al., 1986) を使うため CaSpeR *hs43 lacZ* (Qian et al., 1992) を *Bam*H I と *Pst* I で完全分解後、180bp の断片を回収した。各々の断片を ligate し、*hs43-GaTB* を作製した。さらに *Bam*H I と *Spe* I で完全分解し、3.4Kbp の *hs43-gal4-hsp70* 3' を含む断片を回収した。PCaSpeR4 vector を *Bam*H I と *Xba*I で完全分解し、この 3.4Kbp 断片を ligate した。Yagi (未発表データ) によって *escargot* 上流エンハンサー領域のうち 10kbp に tip cell で発現する領域があることが同定されている。この 10kbp の領域を *Kpn* I - *Spe* I の 7Kbp の領域、*Eco*R I - *Sal* I の 2Kbp の領域、*Eco*R I - *Bam*H I の 600bp の断片に分けた。*Kpn* I - *Spe* I の 7Kbp の断片を、作製した GAL4 vector に ligate した。DNA construct は、*yDf(1)w^{67c}* ショウジョウバエ胚に inject して、トランスジェニック系統を作製した。エンハンサーのチェックは、UAS-GFP^{S65T} 系統を交配して確認した。2Kbp の領域は気管細胞全て、7Kbp の領域は tip cell で GFP が観察された。600bp では GFP が弱く、詳しい同定は不可能であった。

第1部：転写因子 Escargot による DE-cadherin 発現調節

ショウジョウバエの気管系は、上皮細胞が管状に配列したステレオタイプなネットワークである。気管細胞のネットワークは、胚発生期に胚の表層から体節ごとに陥入した少数の上皮性細胞から構成される (Figs 1A, 1E-1)。これら気管前駆細胞は、上皮細胞としての apical-basal の cell polarity を保ち続け、しかも細胞分裂を行うことなく、細胞の配置をアレンジすることで枝状に伸展する (Figs 1B, 1E-2)。特定の気管の枝 (branch) どうしが接触、融合することによって空気を循環させるための気管ネットワークが形成される (Figs 1D, 1E-3, 2A)。

ショウジョウバエ胚の気管系では、1 個体あたり branch が融合するポイントは全部で 50 カ所ある。胚の背側中央 (dorsal midline) には Dorsal Branch (Fig. 2A; [DB]) の融合ポイントが 10 カ所、Cerebral Branch の融合ポイントが 1 カ所がある。 (Fig. 1D; [DB, CB fusion point])。胚の片側側面には、Dorsal Trunk (Fig. 2A; [DT]) と Lateral Trunk (Fig. 2A; [LT]) の融合ポイントがそれぞれ 9 カ所ずつある (Figs 1C; [DT fusion point], 1D; [LT fusion point])。腹側中央 (Ventral midline) には、Ventral Branch の融合ポイントが 3 カ所ある (Fig. 1D [VB fusion point])。

融合する branch の先端には特殊な細胞 (tip cell) が同定されており (Hartenstein and Jan, 1992; Samakovlis et al., 1996a)、tip cell は気管形成において、branch の伸展、融合するターゲットの branch の認識、branch の融合に重要な役割を担っていると考えられる。Zinc フィンガー型の転写因子 Escargot は、全ての tip cell で特異的に発現し、escargot の機能欠失型の変異体では、気管の branch の融合が起きない。

上皮細胞からなる気管は、細胞側面で、接着構造を介して隣接する細胞と密接に接着している。接着を担う分子には、Septate Junction (SJ) に局在する Fasciclin III (Fas III; Patel et al., 1987) や、Adherence Junction (AJ) に局在する DE-cadherin (Oda et al., 1994) がある。DE-cadherin の細胞外ドメインでは、隣接する細胞の DE-cadherin のそのドメインとホモフィリックな結合をして、細胞間の接着を強固にする。また、細胞内ドメインは、Armadillo (Arm; β -catenin の *Drosophila* homolog Peifer, 1995) と $D\alpha$ -catenin (Oda et al., 1993) を介して actin filament と結合している。気管の管の内腔 (lumen) は個体にとって外部環境である。branch の融合過程では、外部環境と胚体腔の内部環境が混じりあわないように、tip cell どうしは接触すると速やかに接着構造を形成し、管の一部となるように細胞形態を変化させなければならない。近年、ショウジョウ

バエで細胞接着分子 *DE-cadherin* をコードする *shotgun* 遺伝子が同定された (Nusslein-Volhard et al., 1984; Tepass et al., 1996; Uemura et al., 1996)。 *shotgun* (*DE-cadherin*) は全ての気管細胞で発現し、 *shotgun* 変異体では branch の融合に異常が観察される。

そこで、 branch の融合過程における、 tip cell の細胞形態の変化と細胞接着分子 *DE-cadherin* の細胞内局在パターンを詳細に観察し、気管形成での転写因子 *Escargot* と *shotgun* (*DE-cadherin*) の発現制御と役割について解析を行った。

結果

気管融合における tip cell の細胞形態と細胞接着分子 *DE-cadherin* の局在パターンの観察

正常胚の branch 融合過程での tip cell の細胞形態と細胞接着分子 *DE-cadherin* の局在パターンを抗体染色により観察した。 tip cell の細胞形態をトレースするために、 *escargot*^{G66B}-*lacZ* のヘテロ接合体を用いた。この胚は正常に発生し、発現する *lacZ* は tip cell の細胞質と核を標識する。*DE-cadherin* 抗体は *DE-cadherin* の細胞外ドメインに対する抗体を用いた。

branch 融合過程で、 tip cell の細胞形態と *DE-cadherin* の局在パターンは激しく変化し、その過程を経時的に 5 段階に分類した。 Lateral Trunk の場合； branch の融合前は、 branch 先端に位置する tip cell は球形である。*DE-cadherin* は tip cell と branch の接触面にのみ観察される (stage 0; Fig2. B0)。 Tip cell は融合するターゲットの branch の tip cell にむかって互いに filopodia を伸長させる。*DE-cadherin* は filopodia の接触部分に新たに線状に局在した (stage 1; Fig2. B1)。接触した tip cell どちらかは filopodia を収縮させる。*DE-cadherin* は接触部分に dot 状に蓄積する (stage 2; Fig2. B2)。 Tip cell はさらに細胞間の距離をせばめ、*DE-cadherin* は dot 状から ring 状に変化した (stage 3; Fig2. B3)。 Tip cell は指輪状 (ドーナツ型) に細胞形態を変化させ (Fig. 7D)、*DE-cadherin* は気管の管の直径まで ring を拡張させた (stage 4; Fig2. B4)。 Dorsal Trunk の場合； Lateral Trunk の場合とほぼ同様に融合が進行するが、 tip cell の filopodia 伸長は観察されない (stage 2; Fig2. C1)。次に、 Dorsal Branch の 10 番目の融合ポイント (DB10) で、 lumen を認識する抗体と *DE-cadherin* 抗体染色を行った。*DE-cadherin* が線状に局在する stage 2 では、 tip cell 細胞質中に

lumen 抗原は観察されない (Fig. 3B)。stage 3 において *DE*-cadherin が ring 状に局在すると、lumen 抗原は tip cell 細胞質中と *DE*-cadherin の ring を貫通して観察された (Fig. 3C)。また、*D* α -catenin、Fas III、Crb の局在パターンを Dorsal Trunk の tip cell で観察した。*D* α -catenin の場合は、*DE*-cadherin と明らかな違いは認められず、tip cell の形態変化にしたがった局在パターンの変化が観察された (Fig2.D0-D4)。Fas III は、stage 3 で tip cell どうしの接触面にあらわれた (stage 4; Fig2.E3)。また、ショウジョウバエの上皮細胞の最も apical 側に局在し、細胞の apical-basal polarity の維持に関与している Crb は、stage 4 になってから tip cell 間に観察された。以上の観察の結果、branch 融合の過程で tip cell 間には、Fas III、Crb に先だて、Adherence Junction のコンポーネントである *DE*-cadherin と *D* α -catenin が stage 1 の tip cell の filopodia に局在することが示された。

DE-cadherin の気管形成過程での機能

branch 融合過程での *DE*-cadherin の機能を調べるため、*shotgun* (*DE*-cadherin) 変異体での気管融合を観察した。*shotgun* (*DE*-cadherin) 変異体の気管系での異常は Uemura et al. (1996) により示されている。正常型と機能欠損型の中間的な表現型を示す変異体 (hypomorph) では、不完全な気管の融合が観察される。そこで、hypomorph 変異体での *DE*-cadherin 局在を抗体染色で確認した。*shotgun*^{E17B} では、気管細胞の *DE*-cadherin の局在が lateral と basal にもあらわれる。branch 融合部分では、*DE*-cadherin の ring の拡張が不完全であり、tip cell は接触しているが接触部分の *DE*-cadherin 局在が観察されない部分も認められる (Fig. 4A)。*shotgun*^{E17B} では、branch 融合の stage 3 以降の進行が阻害されていると考えられた。*shotgun*² では *DE*-cadherin は、気管細胞の細胞質内にみとめられ、また、ほとんどの気管細胞の形態が丸く変型していることから細胞間の接着能が低下していると考えられる。*shotgun*² の branch 融合はほとんどの部分で阻害され、tip cell の接触も観察されなかった (Fig. 4B)。また、*shotgun*² は *DE*-cadherin タンパク質が不安定になることがすでに示されている (Uemura et al. 1996)。*shotgun*² では branch 融合の stage 0 以降の進行が阻害されていると考えられた。以上から、*DE*-cadherin は branch 融合の際の細胞接着と lumen の拡張に必要であることが示された。

escargot 変異体の示す branch 融合異常とその表現型の救済

escargot 変異体の 1 齢幼虫を観察すると、Dorsal Branch、Lateral Trunk、Ventral Branch において、branch が融合していない (Figs 5, 6B)。そこで、*escargot*^{G66B}-lacZ のホモ接合型胚の DB10 において、tip cell の挙動と *DE*-cadherin の局在パターンを観察した。tip cell は融合のターゲット branch の先にある tip cell に向かって互いに filopodia を伸長させ、接触することが認められた。しかし、tip cell の filopodia には *DE*-cadherin の新たな局在は観察されず、次に接触していた tip cell とうしは離れた (Fig. 6B')。その結果、*escargot* 変異体の 1 齢幼虫で branch 融合異常が観察された。また Dorsal Trunk の場合、branch 融合はほとんど正常であるが、ごくまれに融合部分がくびれているものが観察される (Fig. 5B)。これは lumen の拡張が不完全になったためだと考えられる。

次に気管での *escargot* 変異体の救済を試みた。*escargot*^{G66B}-lacZ と、heat shock promoter に *escargot* の coding 領域を繋いだ transgene (Fuse et al. 1994) をあわせもつ胚に対して 7 回 Heat-shock をかけた。その結果、DB10 では tip cell の接触部分に *DE*-cadherin の局在が認められ、さらにその局在が ring 状に変化することも観察された (Fig. 6C')。これらの胚をさらに加齢させた 1 齢幼虫では、DB10 の 26.7% (n=105) で、branch の融合を救済することができた (Fig. 6C)。Heat-shock 処理は branch の伸長、融合に相当する時期に行い、Heat-shock 処理の回数が 5 回以下の場合、branch 融合は検出できなかった。

escargot 変異体の tip cell では細胞運動能が異常亢進する

escargot 変異体胚において、Dorsal Branch 2~9、Lateral Trunk、Ventral Branch で tip cell の細胞形態の変化を追跡すると、細胞仮足 (filopodia) の異常伸長が認められた (Fig. 7A)。Lateral Trunk の tip cell は最大 25 μ m まで filopodia を伸長させた (Fig. 7C)。また、Dorsal Trunk では branch の融合はほぼ正常であるが、tip cell に複数の細胞突起 (lamellipodia-like) が認められた (Fig. 7E)。これらの branch の tip cell で filopodia の異常伸長や複数の細胞突起が形成される現象は、*shotgun* (*DE*-cadherin) 変異体や *breathless* 変異体 (*bt1*^{G-*81a*}) など、気管の branch 融合が阻害される他の変異体では観察されず、*escargot* 変異体 に

のみ観察される (Fig. 7B *shotgun* はデータ示さず)。

escargot 変異体の 1 齢幼虫を観察すると、Dorsal Branch の tip cell は、さまざまな方向に filopodia を伸長させ、細胞内部にクチクラが分泌されている (Fig. 5B')。Samakovlis らによって *escargot* 変異体の、Dorsal Branch の tip cell では、本来 terminal cell で発現し filopodia 伸長機能をもつ DSRF が tip cell で発現することが報告された (Samakovlis et al. 1996)。そこで、*escargot* 変異体において DSRF の抗体染色をおこなったところ、Dorsal Branch の DB2 から DB9 までの tip cell は DSRF を発現していることを確認した。しかし、Dorsal Branch の DB1 と DB10、さらに Dorsal Trunk や Lateral Trunk の tip cell では DSRF の過剰発現は観察されないことを明らかにした。以上の結果から、*escargot* 変異体の Dorsal Branch の DB2 から DB9 では、tip cell で DSRF が異所的に発現することで細胞運動能が異常亢進することが明らかとなった。また、Dorsal Branch の DB1 と DB10、Dorsal Trunk と Lateral Trunk の tip cell の表現型から、Escargot が tip cell の細胞運動の制御に参与する可能性が示唆された。

Escargot による *shotgun* (*DE-cadherin*) 遺伝子の転写調節

escargot 変異体の tip cell では、接触部分に *DE-cadherin* の局在が認められなかった。そこで、*shotgun* の転写活性を遺伝学的に検討した。*shotgun* エンハンサートラップ系統 (*shotgun-lacZ*; 10469) は、レポーター *lacZ* が *shotgun* 遺伝子の 5' 非翻訳領域に挿入されているため、*shotgun* プロモーター活性を *lacZ* 抗体染色によってモニターすることが可能である。*shotgun-lacZ* ヘテロ接合体の胚では、tip cell が接触後、全ての tip cell で *lacZ* の染色強度が他の気管細胞に比較して上昇した (Figs 8A, B)。*escargot*^{vs8} 変異体では、*shotgun-lacZ* の *lacZ* の染色強度の上昇はみとめられなかった (Fig. 8C)。以上の結果は、*escargot* 変異体において tip cell 接触後 *DE-cadherin* の転写が上昇しないことを示唆している。このことから、正常な branch 融合過程では *DE-cadherin* の転写を上昇させるために Escargot が作用していることが示唆された。

次に、ウエスタンブロットング実験で HS-*escargot* の *shotgun-lacZ* と *DE-cadherin* の発現に及ぼす効果について検討した。Heat-shock 処理によって *escargot* を強制発現させると *shotgun-lacZ* の β -galactosidase と *DE-cadherin* の発現レベルが上昇した (Fig. 9A, B, D)。*D* α -catenin と protein phosphatase 2A (PP2A; Shiomi et al., 1994) は、*escargot* を強制

発現させても変化は生じなかった(Fig. 9C.D)。Heat-shock 後の *DE-cadherin* のレベル変化を同様にウエスタンブロッティング実験で検討すると、Heat-shock 処理後 30 分で *DE-cadherin* のレベルが最も高く、その後低下する。以上の結果から、*Escargot* は気管 tip cell 以外においても、*DE-cadherin* の転写を positive に調節することが示唆された。

escargot 変異体の branch 融合異常は、*DE-cadherin* の強制発現によって救済される

escargot 変異体の branch 融合異常は、*DE-cadherin* の欠損によるものであるか検討した。*escargot*^{G66B}-lacZ 系統と HS-*DECH* 2-3 系統(Uemura et al. 1996) の染色体組換えで、*escargot* 変異体に HS-*DE-cadherin* の transgene を組み換えた。これらの胚に対して Heat-shock 処理によって *DE-cadherin* を強制発現させた。37 度、30 分の Heat-shock 処理を 2 回行った後の胚の *DE-cadherin* 抗体染色では、全ての細胞の細胞質中に *DE-cadherin* が検出された(データ示さず)。この条件において、DB10 の融合が救済された(26.7%, n=101; Fig. 6D)。Heat-shock 処理の条件をマイルドにし(32 度、15 分、一回の処理)、その後の胚の *DE-cadherin* 抗体染色では、Dorsal Trunk の気管細胞に dot 状に *DE-cadherin* が検出された(Fig. 6E)。DB10 の tip cell では、接触前の filopodia の先に *DE-cadherin* が観察され(Fig. 6F)た。また、tip cell が接触している状態では、その接触部分に *DE-cadherin* dot の局在が観察された(Fig. 6G)。以上の結果から、tip cell の filopodia の接触部分に *DE-cadherin* が局在することで、tip cell 間の接着構造が形成され、DB10 の branch 融合が救済されたことが示唆された。さらに、branch 融合が救済された胚では lumen 分泌など *DE-cadherin* 局在後の branch 融合のステップが進行したことから、*DE-cadherin* を介した tip cell の接着が branch の融合の律速段階であることを示している。

考察

気管の branch の融合過程では、外部環境と胚体腔の内部環境が混じりあわないように、tip cell どうしは接触すると速やかに接着構造を形成し、管の一部となるように細胞形態を変化させなければならない。この過程に

は細胞接着分子と細胞の運動能の調節が重要な役割を担うと考えられる。本研究の結果、tip cell では、Escargot により *DE-cadherin* の転写が調節され、さらに Escargot は細胞の運動能を抑制的に調節することが示された。また、気管の branch 融合には *DE-cadherin* による細胞間の接着構造形成が必須の過程であることも明らかにした。

tip cell の細胞形態と極性

気管の branch の融合過程では、branch 先端の tip cell は、融合前の細胞質のつまった丸い形の細胞から、内腔をもった指輪型（ドーナツ型）に形態変化する。また、branch の融合過程の tip cell 間に最初に局在する細胞接着分子は Adherence Junction の構成分子の *DE-cadherin* であった。Septate Junction の構成分子である Fas III は、lumen が貫通した後に局在が観察された。また、細胞の apical 特性を維持する機能をもつ Crb は Fas III の局在からさらに次のステージになって観察された。また、branch 融合には、*DE-cadherin* が必須の接着分子であることが示された。

さらに、branch の融合過程の tip cell では、細胞形態と接着分子の局在パターンから、特徴的な上皮細胞の保持している apical-basal cell polarity が branch の融合前後で、変化することが予想された。根拠は、stage 0 の tip cell では basal 側に接着分子は観察されないが、branch 融合が完了すると、apical-basal cell polarity に沿った新たな接着分子の局在が観察されることである。また、branch 融合が完了すると、tip cell 内に上皮細胞の apical 特徴である lumen をもつことである。branch 融合過程の tip cell における apical-basal cell polarity の変化については第 2 部でさらに詳しく検討する。

Escargot は tip cell の運動能を調節する

escargot 変異体において tip cell の細胞形態を追跡すると、filopodia の伸長が認められた。Dorsal Branch の DB2 から DB9 までの tip cell は、DSRF が過剰発現することで、filopodia の異常な伸長が生じたが、DB1 と DB10、Dorsal Trunk や Lateral Trunk の tip cell では DSRF 非依存的に tip cell の filopodia や lamellipodia が伸長した。この結果は、Escargot が tip cell の *DE-cadherin* の転写調節と独立に細胞の運動能を抑制するこ

とを示唆する。近年、低分子量 GTP 結合タンパク質の Rho、Rac、Cdc42 は、細胞運動、細胞接着において、actin filament 細胞骨格系を調節していることが報告されている (Hall, 1994; Mackay et al., 1995)。Rac や Cdc42 によって filopodia や lamellipodia 形成が制御される (Nobes and Hall, 1995) ことから、tip cell では、低分子量 GTP 結合タンパク質を介して branch 融合が調節されていることも予想される。この問題は付録第 1 部で検討する。

Escargot と DE-cadherin の転写調節

本研究で、Escargot は DE-cadherin の転写を positive に調節していることを明らかにした。気管の branch の融合過程においては、融合を担う tip cell で *de novo* の DE-cadherin の発現が転写因子 Escargot によって制御され、その DE-cadherin が tip cell 間の接触部分に局在することが、branch の融合の条件である。また、*shotgun*(DE-cadherin)変異体の *hypomorph* では lumen の不完全な拡張を示すため、DE-cadherin が十分量供給されることが、気管の lumen の拡張をへて branch の融合を正常に進行させるための必要条件である。しかし tip cell での *escargot* の発現は、branch の融合以前の stage12 から branch 融合が完了するまで維持されている。抗体染色の感度を上げると (TSA system; NEN) branch の融合前の Dorsal Branch の tip cell で、filopodia の先にごく弱く DE-cadherin のシグナルが観察されることから、branch の融合前からすでに Escargot は DE-cadherin の転写を担っていると考えられる。branch の融合以前の *escargot* の発現は、それ以外の機能をもつ可能性も考えられる。

Dorsal Trunk の branch 融合での *escargot* の機能

escargot 変異体では、Dorsal Trunk の融合はほとんど正常である。DE-cadherin は気管の branch に必須の接着分子で、*escargot* 変異体の場合も DE-cadherin は観察される。DE-cadherin は、全ての上皮細胞で発現していることから、Escargot 非依存的に転写を活性化するメカニズムの存在が予想される。最近、wingless signaling によって DE-cadherin の転写活性が上昇することがショウジョウバエの培養細胞系で示された (柳川 1998 年分子生物学会)。wingless 変異体、armadillo 変異体でも気管の伸長

融合に異常が観察される (Uemura et al., 1996)。以上のことを考慮すると、Dorsal Trunk の融合には、他のメカニズムによって E-cadherin の転写調節がなされているのではないかと予想される。

第2部：branch 融合過程での tip cell の apical-basal cell polarity の変化

ショウジョウバエの気管系は、上皮細胞が管状に配列し、内腔側にクチクラ層を有したネットワークである。

個々の気管細胞は、apical-basal の cell polarity を保持している。内腔 (lumen) 側が apical、基底膜 (basal lamina) 側が basal、細胞-細胞間の接触面が lateral である。細胞膜の adherence junction (AJ) に局在する細胞接着分子の E-cadherin、または Crumbs の局在パターンを目印にすると、気管形成過程をつうじて、気管細胞は上皮細胞としての apical-basal cell polarity を保持し続けていることがわかる (Oda et al., 1994; Tepass et al., 1990; Wodarz et al., 1995)

気管ネットワークは、胚発生において、体節ごとに 10 箇所から袋状に貫入した、気管前駆細胞が、細胞分裂をすることなく枝状に分枝、伸展し、決まった枝 (branch) どうしが融合することで形成される (Manning and Krasnow, 1993)。ネットワークの形成には、個々の細胞の移動と、branch 単位のグループとしての細胞の動きを必要とする。細胞骨格は、細胞の移動や組織の形態形成に直接関与する重要なタンパク繊維である。細胞骨格を形成している多量体のなかに、microtubule がある。microtubule は、核の近くから細胞質全体にフィラメントを放射状にのびし、小胞や膜でできられた小器官が移動する道筋となったり、また、細胞の形、細胞運動、細胞の分裂方向を調節していると考えられている。

ショウジョウバエの気管の融合する branch の先端には、融合機能を担う特殊な細胞 (tip cell) が同定されている (Hartenstein and Jan, 1992; Samakovlis et al., 1996a)。これまでの解析から、融合する branch の tip cell は、典型的な上皮細胞と異なった性質をもつことが予想された (Escargot による E-cadherin の発現調節の項参照)。すなわち、tip cell の細胞形態は、融合前には細胞質のつまった丸い細胞が、完成した気管系では内腔をもった指輪型 (ドーナツ型) になる。branch の融合過程に限って、tip cell は、あらかじめ保持していた apical-basal cell polarity を変化させるのではないかと考えられた。

apical-basal cell polarity の変化を検証するために、branch の融合過程における tip cell での細胞骨格 microtubule の分布と細胞表面の膜タンパク質に着目して解析を行った。

結果

細胞膜タンパク質と basal lamina 構成タンパク質の局在パターン

tip cell の apical-basal cell polarity の変化をモニターするために、上皮細胞の apical-basal cell polarity に従って局在する既知のタンパク質で、その局在パターンに consensus の得られているものをマーカーに選んで、branch の融合過程における局在の変化を調べた。

上皮細胞の細胞膜に分布する膜タンパク質として、*E-cadherin* (Oda et al., 1994)、*Fasciclin III* (*Fas III*; Patel et al., 1987)、*Crumbs* (*Crb*; Tepass et al., 1990) の分布を調べた。basal 局在を示す膜タンパク質の *Integrin* に対する抗体 (BG1; Hirano et al., 1991) も試みたが、気管細胞ではシグナルが弱く、不適當であった。そこで、basal 局在をモニターするために、basal lamina の構成タンパク質の *Collagen 4* (Fessler et al., 1987) と *Laminin $\alpha\beta\gamma$ complex* (Murray et al., 1995) に対する抗体を用いた。

以上の抗体染色を、*escargot^{G66B}* (*esg^{G66B}*) のヘテロ接合体の胚に対して行い、コンフォーカル顕微鏡によって観察した。

すでに示した branch 融合過程の 5 つの段階において、*Collagen 4* と *Laminin $\alpha\beta\gamma$ complex* の局在パターンを検討した結果、stage 0 では、*Collagen 4* と *Laminin $\alpha\beta\gamma$* は tip cell と trachea cell を体腔側から取り囲んでいる (Fig. 10 B0)。stage 2 では、*Collagen 4* と *Laminin $\alpha\beta\gamma$* は tip cell の接触面からは失われつつある (B2)。さらに stage 4 で 2 個の tip cell を取り囲んだ (B4)。*Fas III*、*Crumbs* の局在パターンからも (Fig. 2)、stage 4 で tip cell の apical-basal の極性が確立されたと考えられる。*Collagen 4* と *Laminin $\alpha\beta\gamma$ complex* の局在パターンから考えると stage 1 において *E-cadherin* が体腔側 (本来の basal 側) に局在することが明らかになった。

tip cell の apical-basal cell polarity 変化を細胞内から観察する

細胞膜レベルでは、branch 融合過程で tip cell の apical-basal cell polarity が変化していることが示唆された。そこで細胞骨格系の変化をモニターするために、*GAL4 / UAS system* (Brand and Perrimon, 1993; Shiga et al., 1996) を用いて *Kinesin* または *Nod* の β -galactosidase 融合タンパク質を気管細胞で発現させてマーカーとした。

Kinesin と Nod はそれぞれ細胞骨格 microtubule 上のモータータンパク質である。microtubule は tubulin の + 末端と、- 末端をもつが、Kinesin は - から + に、Nod は + から - に移動する。これらのモータードメインと β -galactosidase 融合タンパク質は microtubule に局在し、その極性を反映した分布を示すことが報告されている (Clark et al., 1997)。

stage16 の気管の Dorsal Trunk で、Kinesin-lacZ、Nod-lacZ の細胞内分布を観察した。Kinesin-lacZ は細胞核近くの apical 面に染色強度の強い dot 状の局在と、細胞質中に染色強度の弱いブロードな分布が認められた (Fig. 11A, A')。Nod-lacZ は細胞の apical 面近くに filament 状に局在した (Fig. 11B, B')。以上から、形態形成を完了した気管細胞では、Nod-lacZ の filament 状の局在と、Kinesin-lacZ の dot 状の局在はともに apical 側に位置していることが示された。

tip cell での Kinesin-lacZ、Nod-lacZ の局在パターンの観察

形態形成を完了した気管細胞では、Kinesin-lacZ の dot 状の局在と Nod-lacZ の filament 状の局在は細胞の apical-basal polarity を反映した局在パターンを示す結果が得られた。次に、伸長する Dorsal Branch の tip cell で分布パターンを観察した。

Kinesin-lacZ の dot 状の局在と Nod-lacZ の filament 状の局在はともに tip cell において、branch 伸長から、気管の融合の完了まで、局在パターンの変化が観察された。第一部で示した 5 段階分類に従うと、以下の 4 段階の特徴的な変化がみられた。stage 0; primary branch は形成されているが、branch の先端に位置する細胞は伸長方向に lamellipodia を出していない状態。stage 1; branch の先端に位置する細胞は伸長方向に lamellipodia を出している状態。stage 2; tip cell が互いに接触した状態。stage 4; branch は融合し、tip cell は細胞形態変化を完了した状態。

Kinesin-lacZ の場合、stage 0 では先端に位置する細胞で、気管細胞側で dot 状に局在した (Fig. 12 A1; white arrow)。stage 1 ではこの dot は局在位置を核に対して反対側に移動した (A2; white arrow)。stage 2 では dot は消失し、細胞質に局在したブロードな分布が認められたが、(A3) stage 4 では apical 側に dot が局在した (A4; white arrow)。

Nod-lacZ の場合、stage 0 から stage 1 までは branch の伸長する方向にそって、filament 状に伸長する (B1, B2; white arrow)。stage 2 で

tip cell の apical 側に Nod-lacZ が filament 状に観察された (B3)。stage 4 に tip cell の apical 領域を取り囲んで、ring 状に局在することを確認した (B4; white arrow)。

以上の結果から、Kinesin-lacZ、Nod-lacZ の局在パターンは branch の tip cell で特徴的に変化することがわかった。

胚の気管細胞での microtubule と Nod-lacZ の分布関係

Kinesin-lacZ、Nod-lacZ はそれぞれ Kinesin と Nod のモータードメインと lacZ の fusion protein である。Nod-lacZ の場合、細胞内に filament 状に認められるので、endogenous な microtubule 分布の一部を反映していると考えられる。そこで、次に microtubule と Nod-lacZ の分布関係を明らかにすることを試みた。

breathless-GAL4 /UAS-Nod-lacZ の胚に対して、microtubule を構成する α -tubulin と β -tubulin それぞれの抗体染色を行った。

通常のショウジョウバエ胚のホールマウント抗体染色方法では、tubulin 抗体は表皮細胞のみで反応し、内部組織の抗体反応は不可能であった。そこで、胚を固定後、ソニケーション処理して ventral midline と dorsal midline の接着をメカニカルに壊し、内部組織を露出させ、抗体反応を行った。

気管細胞では、 α -tubulin、 β -tubulin とともに同様の分布パターンを示した。stage 16 の Dorsal Trunk の細胞では apical から basal に放射状に多数の filament が伸びていた (Fig. 13A)。この場合、Nod-lacZ の局在は microtubule filament が細胞の apical に面した領域で重なって観察された。tip cell や terminal cell など branch 先端に位置する細胞では、複数存在する microtubule filament の 1 本または 2 本と Nod-lacZ の filament 状の局在が重なって観察された (Fig. 13B)。この結果、Nod-lacZ の filament 状の局在は複数存在する microtubule の一部を標識していることが示された。

Kinesin-lacZ の dot 状局在と γ -tubulin の局在パターン比較

Kinesin-lacZ の dot 状局在は branch が伸長する際に局在位置が核に対して 180 度変化した。移動する前の dot の位置は、 α -tubulin、 β -tubulin

の抗体染色の結果から、microtubule organizing center (MTOC) と考えられる。移動した dot は、MTOC の位置が変化したことを示唆しているのか検討した。

centrosome の構成因子の 1 つである γ -tubulin に対する抗体染色を行った。cellular blastoderm では細胞の apical 側に 1 細胞あたり 1 個の dot が認められた。embryo の気管細胞では、primary branch が形成された stage 12 頃まではいくつかの細胞内に dot として観察され、apical に位置した (Fig. 14A)。しかし stage 13 以降 (B) では細胞質中にブロードなシグナルとしてあらわれ、tip cell で MTOC を特定する目的には適さなかった。

本研究で対象としている伸長中の branch で気管細胞が激しく運動し細胞骨格系や apical-basal cell polarity を再構成しているような状態では、 γ -tubulin は分布パターンを激しく変化させていると考えられ、MTOC の同定はできなかった。

Nod-lacZ と lumen antigen の局在パターン

以上の結果より、Nod-lacZ の filament 状の局在は、細胞の polarity に従って apical 側に分布することを確認し、細胞の apical マーカーとしての利用が可能であると判断した。しかし、融合過程の tip cell での Nod-lacZ の filament 状の局在は何を意味するか不明である。そのため、apical マーカーとして 2A12 抗体を利用し、tip cell の Nod-lacZ の局在パターンについて検討した。

2A12 は、stage 17 の胚では、気管の lumen に存在する抗原を認識する。しかし、stage 17 以前では、気管細胞の細胞質中に多数の vesicle 状に確認される。そこで、まず、2A12 がどのような局在変化を示すマーカーか検討した。

すでに lumen 空間のはっきりしている Dorsal Trunk を構成している細胞で、2A12 の抗体染色を行った。embryo は *breathless-GAL4 / UAS-Nod-lacZ* を用い、2A12 抗体と lacZ の double staining を行った。その結果、2A12 の vesicle は、stage 14 から stage 16 にかけて、核周辺の細胞質 \rightarrow apical 面に近い細胞質 \rightarrow lumen、に vesicle が最も多く分布する領域が変化した (Fig. 15 A-C)。2A12 の vesicle は細胞質から apical の lumen に移動するマーカーであると考えた。

以上をふまえて、細胞内に新たに管を形成する tip cell および terminal cell での Nod-lacZ の filament 状の局在パターンと 2A12 vesicle の挙動

を明らかにした。第一部で示した5段階分類に従うと、2A12 vesicleの分布は以下の4段階の特徴的な変化がみられた。

Stage0;Nod-lacZ filamentが伸長し、2A12 vesicleは認められない状態。

Stage1;Nod-lacZ filamentと、核周辺に2A12 vesicleの観察される状態。

Stage2;Nod-lacZ filamentに沿って2A12 vesicleが並ぶ状態。

Stage4;2A12はlumenにのみ分布し、Nod-lacZ filamentがlumen周辺を囲む状態。

この結果から、tip cellおよびterminal cellでのNod-lacZのfilament状の局在は、細胞内に空間としてのlumenが認められない時期から、将来のapicalの位置に局在していると考えられた。

Nod-lacZのfilament状の局在とDE-cadherinの局在パターンの関係

Dorsal Trunkのtip cellが接触し、接触面にDE-cadherinが線状に局在、蓄積することはすでに示した。通常の方法ではDE-cadherinはある程度蓄積しなければ検出は困難だが、抗体反応の過程で、Tyramid signal amplification system(TSA;NEN)を使って測定感度を上げると、細胞質内のより低レベルのDE-cadherinを検出することが可能である。このシステムを用い、DE-cadherinの局在パターンを再度観察し、第一部で示した5段階分類に従うと、Stage0からStage1の期間で、Fig.17のAからDに示す4段階の特徴的な変化がみられた。すなわち、DE-cadherinがtip cell接触面に検出されるのに先立って、tip cell内部に長い線状のパターンとして検出され、次第にtip cellの接触ポイントに向かって蓄積が観察された。さらに、この線状DE-cadherinはNod-lacZのfilament状の局在と重なった(Fig.19)。

考察

細胞接着因子DE-cadherin、basal laminaの構成タンパク質のCollagen 4とLaminin $\alpha\beta\gamma$ complexの抗体染色によって、branchの融合過程のtip cellでは、tip cellのbasal側にDE-cadherinを輸送する機構が存在することが示唆された。tip cell内部の変化をNod-lacZ、2A12 lumen抗体、DE-cadherin抗体を用いてモニターすると、全ての局在パターンはbranchの融合過程を通じて、ドラステティックに変化した。この結果から、tip cell

は branch の融合過程で、細胞内の apical-basal cell polarity を再構成していると考えられる証拠を得た。

2A12 vesicle と *DE*-cadherin の局在パターンは Nod-lacZ の filament 状の局在と重複する

オタマジャクシの尾部やウサギの耳では、毛細血管の新生過程に、新しい毛細血管をつくる内皮細胞が既存の毛細血管の側面から filopodia を伸ばし出芽するように成長してくること、さらに、出芽した内皮細胞ははじめは、細胞質が詰まっているが、やがて中身を失って管にかかわることが示されている (Alberts et al., 1994)。また、内皮細胞を培養すると、管形成の最初の徴候に細胞内部に空胞があらわれ、隣接する細胞にも空胞が生じ、空胞が縦に並んで細胞から細胞へと連なった空胞となり、最後に毛細血管となる (Folkman and Haudenschild; 1980) ことが知られている。

本研究では、シヨウジョウバエ気管の tip cell および terminal cell でも、細胞内部に lumen に存在する抗原を認識する 2A12 vesicle が並ぶことを示した。さらに、2A12 vesicle が並ぶ以前に、Nod-lacZ の filament 状の局在が将来の lumen を示す位置にあらわれ、その filament 状の局在に沿って 2A12 vesicle が並ぶことを明らかにした。Nod-lacZ の filament 状の局在は、2A12 vesicle が並び、つぎに細胞内部に管状空間 (lumen) が形成される以前に、細胞内に新たな lumen の apical 領域を配置する動きが始まっていることを示唆する。

さらに、tip cell では Nod-lacZ の filament 状の局在上に *DE*-cadherin の vesicle が並ぶという観察結果は、Nod-lacZ によって識別されている microtubule は、細胞接着分子の *DE*-cadherin を、tip cell 間の接着面にダイレクトに輸送するレールとしても作用する可能性を示している。接着に必要な分子を目的の場所に向かってダイレクトに輸送するレールの存在は、気管の branch の速やかな融合をサポートすると考えられる。

Kinesin-lacZ の dot 状の局在

Kinesin-lacZ の dot 状の局在が、形態形成の完了した Dorsal Trunk の細胞では apical 附近に位置したことから、apical を指示するマーカーと考えられる。さらに、branch 伸長の際に、tip cell または terminal cell

に分化する細胞では、dot の位置が核に対して 180 度変化した。また、Kinesin-lacZ は気管細胞の filopodia の先にも蓄積していることを見つけている。そこで、Kinesin-lacZ の dot の位置変化は、何らかの分子を輸送する方向性が存在することを示唆するのではないだろうか。

本研究で示唆された重要な結果は、融合する気管の branch の tip cell 内部では、Nod-lacZ の filament 状の局在が tip cell の細胞内部に 2A12 が蓄積して将来 lumen を形成する場所と β -cadherin の輸送の進路を標識していることである。この結果は Nod-lacZ で識別される共通の microtubule のレールを介することで tip cell の接着面すなわち lumen が細胞膜上に開口する位置と、細胞内部に lumen が形成される場所が正確にカップルされている可能性を示している。

この仮説を検証するためには、Nod-lacZ で識別される microtubule の機能を阻害し、気管形成に及ぼす効果を検討することが肝要だと考えられる。そのためには、以下の方法が考えられる。

1、tubulin の重合を特異的に阻害する薬剤処理 (Haraguthi et al., 1997) や温度シフト (Nemhauser et al., 1983) による microtubule の破壊による効果の検討。

2、tip cell でのみ、dominant negative form の tubulin (Fackenthal et al., 1995) を強制発現させて、microtubule の重合を阻害する効果の検討。

3、mammal の MARK serine / threonine kinase MARK は microtubule associated protein の tau、MAP2、MAP4 を hyper phosphorylate する。培養細胞で強制発現を行うと、microtubule の重合が阻害される (Drewes et al., 1997)。MARK もしくはその類似分子を tip cell でのみ強制発現させることで tubulin 重合を阻害できるかどうかを検討する。

これらのアプローチから、branch の融合過程の tip cell において、apical-basal cell polarity の再構築と β -cadherin の輸送に microtubule がどのような機能を担っているか理解が深まると考えられる。

付録

第1部：細胞運動能の制御

気管ネットワークを構築するためには、気管前駆細胞の貫入や branch を伸長させる過程で、気管細胞自身の運動能を調節することが不可欠である。

細胞骨格は、細胞の移動や組織の形態形成に直接関与する重要なタンパク繊維であり、細胞質全体に張りめぐらされたタンパク繊維の複雑な網目状構造によって、細胞は統一のとれた方向性のある運動をすることができる。細胞骨格を形成している多量体のなかに、actin filament と microtubule がある。actin filament は、動物細胞では盛んに動く細胞の表面の突起に多く含まれ、細胞が移動したり形をかえたりするときによく観察される。microtubule は、核の近くから細胞質全体にフィラメントを1本ずつ放射状にのばしている。microtubule は小胞や、膜でしきられた小器官が移動する道筋となったり、細胞の形、細胞運動、細胞の分裂方向を調節している。

近年、低分子量 GTP 結合タンパク質の Rho、Rac、Cdc42 (Rho ファミリーと総称される) は、細胞運動、細胞接着、細胞形態の維持、細胞分裂などの様々な生命現象において、actin filament 系の形態を調節している証拠が報告されてきている (Hall, 1994; Mackay et al., 1995)。例えば、Rac によって、細胞の辺縁に微小突起 (microspike) やシート状の細胞突起の葉状仮足 (lamellipodia) がめくれあがったかのように波打つ膜ラフリングが制御される (Ridley et al., 1992)。また、Cdc42 によって糸状仮足 (filopodia) 形成が制御される (Nobes and Hall, 1995)。さらに、Hall らのグループは、培養細胞に、Rho、Rac、Cdc42 それぞれの活性化型および機能阻害型タンパク質もしくは Rho、Rac の機能を阻害する C3 毒素を微量注入し、細胞骨格の変化を観察することで Rho、Rac、Cdc42 の細胞骨格に対する作用の階層性を示した (Nobes and Hall, 1995)。しかし Rho、Rac、Cdc42 の *in vivo* の機能については、まだあまり知られていない。

ショウジョウバエの気管系の細胞を観察すると、特徴的な2種類の細胞が認められる。細胞を高度に枝分かれ (branching) させた terminal cell と branch の融合をになう tip cell である (Hartenstein and Jan, 1992; Samakovlis et al., 1996a)。ともに、接着構造なしに、細胞内に内腔 (lumen) を形成する。

気管形成過程での、terminal cell や tip cell のダイナミックな細胞運

動と形態変化をみると、ショウジョウバエ気管形成過程は、Rhoファミリーを介した細胞接着と細胞運動を研究するモデルとなりうると考えられる。

私は、すでに気管の融合過程で、転写調節因子 Escargot は細胞接着分子 E-cadherin の発現を調節していることを明らかにしている (Escargot による E-cadherin の転写発現調節の項参照)。また、escargot 変異体での先端細胞の運動性の異常亢進は、Escargot が細胞運動能の制御に関与することを予想させる。一つの仮説として、Escargot は気管 branch の融合時に特定の低分子量 GTP 結合タンパク質 (Rho ファミリー) を不活性化させる。escargot 変異体ではその低分子量 GTP 結合タンパク質の活性が上昇したままで運動能の異常亢進を招くといったことが考えられる。

この仮説を検証する第一歩として、気管細胞で、転写調節因子 Escargot または、細胞接着分子 E-cadherin を強制発現させ、細胞運動の異常についてより詳細な観察をおこなった。さらに、気管形成過程の tip cell で、低分子量 GTP 結合タンパク質 (Rho ファミリー) の変異型 (Luo et al., 1994) を強制発現させ、気管形成、特に branch 融合に影響があるかどうかを検討した。

結果

Escargot の強制発現

GAL4 / UAS system を利用し、*breathless-GAL4(2nd)* / UAS-*escargot(3rd)* の組み合わせで、正常胚の全ての気管細胞で Escargot を強制発現させた。lumen antigen を認識する 2A12 抗体染色の結果、primary branch は形成されるが、branch の伸長と Terminal Branch 形成に異常が認められた。

各 branch を観察すると、Dorsal Branch は、融合が予定される領域まで、branch が伸長しない (Fig. 19 C)。Dorsal Trunk は、管の直径が正常の場合に比べ、不均一であり、さらに Dorsal Trunk の融合部分では tip cell 内の lumen がくびれていた (Fig. 19 C)。Lateral Trunk は一見正常であった (Fig. 20 D)。また、正常胚では、Ganglionic Branch は胚の ventral に向かって伸長する branch であるが、Escargot の強制発現の結果、この Ganglionic Branch 形成が阻害され、branch を認めることができなかった (Fig. 19 D)。

Terminal Branch は 1 個の細胞からなる branch である。正常胚の

hemisegmentあたり、Terminal Branchを伸長させる細胞をFig. 20 Bに示す。Escargotの強制発現の結果、これらの細胞は、Terminal Branchを伸長させていないことが観察された(Fig. 19 D)。

次に、Escargotの強制発現の胚にDE-cadherin抗体染色をおこなった。気管細胞全面にわたって、細胞個々の伸長が正常胚の場合と異なっていることが観察された(Fig. 19E, F)。

DE-cadherinの強制発現

EscargotがDE-cadherinの転写をpositiveに調節することはすでに明らかにされている(EscargotによるDE-cadherinの転写調節の項参照)。breathless-GAL4 / UAS-escargotを用いて、気管細胞全てで、Escargotを強制発現した場合あらわれたbranch伸長の異常は、細胞間接着を担うDE-cadherinが量的に増加し、細胞間の接着が強固になったため生じたものかもしれない。その可能性を検討するため、breathless-GAL4(2nd)を用いて、全ての気管細胞で、DE-cadherinの強制発現をおこなった。UAS-DE-cadherin系統は、#4, #7, #8, #19の4種類を用いた。DE-cadherin抗体染色の結果、全ての気管細胞の細胞膜全体にシグナルが検出されたが、気管形成は正常であった(Fig. 19 G)。いずれの系統においても、強制発現の胚は正常に発生し、蛹を形成した。

Rhoファミリー低分子量GTP結合タンパク質を全ての気管細胞で強制発現させた効果

GAL4 / UAS systemを利用し、全ての気管細胞で低分子量GTP結合タンパク質の変異型を強制発現させた。

強制発現実験には、breathless-GAL4(2nd)系統を用いた。UAS系統UAS-RhoLN25(dominant negative; Murphy et al., 1996)、UAS-Dcdc42V12(constitutively active, lineV12.2)、UAS-Dcdc42N17(dominant negative, lineN17.3)、UAS-DracV12(constitutively active, lineV12.1)、UAS-Drac1N17(dominant negative, lineN17.1)、UAS-Drac1L89(dominant negative, lineL89.6)、UAS-Drac1L89(dominant negative, lineL89.32)を用いた。

強制発現の処理をした胚は、気管融合への影響を検討するために、DE-

cadherin 抗体染色をおこなった。その結果すべての場合で気管の branch の伸長に異常が観察され、本来の融合ポイントまで、branch が伸長しなかった (Fig. 20 A, B)。これらの結果は気管が正常に伸長するには Rho, RhoL, Rac, Cdc42 の活性が適切に制御されなければならないことを示している。

Rho ファミリー低分子量 GTP 結合タンパク質を tip cell でのみ強制発現させた効果

tip cell での Rho ファミリー低分子量 GTP 結合タンパク質の機能を調べるため、GAL4 / UAS system を利用し、tip cell で低分子量 GTP 結合型タンパク質変異型と正常型を強制発現させた。この目的のために、tip cell でのみ強制発現実験のおこなえる系統を作成した (materials and methods 参照) この GAL4 系統を、tip cell-GAL4 と呼ぶ。

tip cell-GAL4 を用いて、UAS-*RhoLN25* (dominant negative; Murphy et al., 1996)、UAS-*Dcdc42V12* (constitutively active, lineV12.2)、UAS-*Dcdc42N17* (dominant negative, lineN17.3)、UAS-*Drac1V12* (constitutively active, lineV12.1)、UAS-*Drac1* (wild type, lineWT.3)、UAS-*Drac1N17* (dominant negative, lineN17.1)、UAS-*Drac1L89* (dominant negative, lineL89.6)、UAS-*Drac1L89* (dominant negative, lineL89.32) を強制発現させ、気管融合への影響を検討した。

2A12 抗体を用いて気管の lumen を観察した結果、UAS-*Drac1V12* (constitutively active, lineV12.1)、UAS-*Drac1* (wild type, lineWT.3) を強制発現させた場合に気管の融合不全が認められた。その他の低分子量 GTP 結合型タンパク質 (Rho ファミリー) の変異型の強制発現では 2A12 抗体で lumen を観察する限りにおいては、顕著な異常は観察されなかった。

Drac の活性化の度合で、融合不全の程度が分類でき、constitutively active form > wild type \geq dominant negative form = normal という結果が得られた (Fig. 20 C)。

また、UAS-*Drac1V12* (constitutively active, lineV12.1) を tip cell で強制発現した場合の表現型は、*DE*-cadherin をコードする *shotgun* の機能欠損型の表現型とよく似ていた (Fig. 20 D)。

考察

気管ネットワークを構築するためには、気管細胞個々の運動能を調節し、気管上に正しく配置させる必要がある。本研究によって、気管の branch 融合を担う転写因子 Escargot と細胞運動能の調節について今後検討するための予備的な実験結果が得られた。

Escargot と細胞運動能調節

Escargot を気管細胞全てで強制発現させる実験の結果、Terminal Branch を伸長させる細胞では、Terminal Branch の伸長が阻害された。また、Ganglionic Branch の伸長も阻害された。よって、Escargot は気管細胞の運動能を阻害したと考えられる。この場合、primary branch 形成は正常であった。おそらく、強制発現に用いた *breathless-GAL4* では *breathless* のエンハンサーの作用し始める時間を反映したこと、さらに Escargot が発現し、細胞に効果が現われるまでの遅れのためではないだろうか。

また、*E-cadherin* の強制発現とは効果が異なるため、Escargot による気管細胞の運動能抑制は、*E-cadherin* の発現調節とは独立に起こることが示唆された。

以上の結果から、Escargot は強制発現されると多くの気管細胞の運動能を抑制することが示唆された。通常 Escargot は、tip cell でのみ発現している。branch を融合させるためには、tip cell の接触後に細胞の運動能を抑制することが気管ネットワークの構築に必要なのではないだろうか。

低分子量 GTP 結合タンパク質 (Rho ファミリー) と気管形成

低分子量 GTP 結合タンパク質 (Rho ファミリー) は、細胞骨格系の actin filament を調節することで、細胞の移動や組織の形態形成に関与すると考えられている。細胞は統一のとれた方向性のある運動をするために、細胞質全体に張りめぐらされたタンパク繊維をアレンジする。Ridley らの研究によると、Rac は葉状仮足 (lamellipodia) を激しく伸展、吸収させるラップリングを制御することが報告されている (Ridley et al., 1992)。また、低分子量 GTP 結合タンパク質は、細胞の接着をも制御することが報告されている (Ridley and Hall, 1992)。

Tip cell で Rac の活性化型タンパク質を強制発現させた結果、branch の融合が阻害された。正常の場合は、細胞の運動能を低下させなければいけない時期の tip cell で、ラフリングが活性化されたため、branch の融合が阻害されたのではないだろうか。また、Rac の効果によって、細胞の接着が阻害された可能性も考えられる。これら2つの可能性を厳密に区別するためには、Rho ファミリータンパク質を強制発現させた胚の気管系で、細胞骨格系と細胞接着分子の分布を観察することが、必要な条件であると考えられる。

以上の予備的な結果をうけて、細胞運動能に関する Escargot の機能をさらに検証するため、次の方法が考えられる。

1、気管細胞の actin filament の挙動を branch 融合過程を通じて詳細に記載する。escargot、pruned(DSRF)、shotgun(ΔE-cadherin) 変異体の場合や、低分子量 GTP 結合タンパク質の強制発現の場合でも細胞内 actin filament の挙動を示し、正常の場合と比較検討する。

2、UAS-Drac(dominant negative、wild type、constitutive active)強制発現下で、ΔE-cadherin の転写活性に変化が生じるかどうか検討する。

3、escargot 変異体の tip cell では細胞の運動能の活性化がみられるが、低分子量 GTP 結合タンパク質(Rho ファミリー)のどれかが活性化された結果かもしれない。Escargot と低分子量 GTP 結合タンパク質(Rho ファミリー)を結び付ける検証方法として次の仮説が考えられる。低分子量 GTP 結合タンパク質(Rho ファミリー)の機能抑制型変異タンパク質を escargot 変異体の tip cell において発現させることによって、細胞運動の活性化を抑制できることが期待される。Rac は第一の候補と考えられる。もし、このような結果が得られれば、Escargot の機能の一つは、低分子量 GTP 結合タンパク質(Rho ファミリー)のどれかの活性抑制を標的としていると推定できる。

本研究では、転写因子 Escargot は、ΔE-cadherin の転写調節とは独立に、気管細胞の運動能調節に関与する可能性が示唆された。今後、さらに低分子量 GTP 結合タンパク質との関係を追及することで、気管ネットワーク形成を担う細胞の運動能調節機構に重要な知見を与えることが期待される。

付録

第2部：Dorsal Branchでの遺伝子発現調節

胚発生の stage16 の Dorsal Branch では、branch の先端に、特別な機能を担うために分化した細胞が2個位置している。一つは各体節由来の気管前駆細胞が気管ネットワークを形成するために、branch-branch 間の融合を担う tip cell である。他方は、terminal cell と呼び、空気を gut や表皮など組織の細胞に送るため、激しく分枝して組織に入り込む Terminal Branch を形成する (Samakovlis et al, 1996a)。

stage16 の胚で遺伝子の発現パターンを観察すると、tip cell では転写因子 *escargot* が発現し (Hartenstein and Jan, 1992; Samakovlis et al, 1996a)、terminal cell では *pruned*(DSRF) が発現している (Guillemin et al, 1996)。また、Dorsal Branch では、*pointed* が発現している (Samakovlis et al, 1996a)

escargot 変異体では気管の融合が阻害され (Escargot による *DE-cadherin* の発現調節の項参照)、*pruned*(DSRF) 変異体では terminal branch 形成がおこらない (Guillemin et al, 1996)。*pruned*(DSRF) は DNA-binding protein をコードし転写調節に関与していると考えられている (Affolter et al. 1994)。

Dorsal Branch の先端付近に位置する近接した2個の細胞ではそれぞれ異なる遺伝子が発現して、異なった機能を担う細胞形態に変化すると考えられる。従って、Dorsal Branch の先端付近では、細胞特異的な遺伝子を発現させる調節機構の存在が予想された。そこで、気管形成過程での細胞の形態変化を記載し、遺伝子の時間的な発現パターンの変化について解析した。

結果

気管の枝の先端附近の細胞の形態変化

胚発生の各 stage の、Dorsal Branch の先端附近の2個の細胞の形態を、*breathless-GAL4 / UAS-Nod-lacZ* を利用し詳細に観察した。

stage 13-14 の primary branch の先端には2個の細胞が並列に並んでいる (Samakovlis et al, 1996a)。これら2個の細胞は branch の進行方向である dorsal 側に向かって葉状仮足 (lamellipodia) をだす (Fig. 12. B1)。stage

14 から 15 にかけて片方の細胞のみ、ventral 方向にも lamellipodia を出し始める (Fig. 12 B2)。stage15 以降は、branch の先端には、ventral 方向に filopodia を伸長させる細胞と、dorsal 方向に lamellipodia を出す細胞が観察された (Fig. 12 B3)。filopodia を形成した細胞は terminal cell で、他方は tip cell である (Samakovlis et al, 1996a)。terminal cell は、filopodia を高度に伸長、分枝させ、Terminal Branch を形成する。Terminal Branch は細胞内に接着構造なしに lumen を形成した tracheole である (Guillemin et al, 1996)。

Dorsal Branch での *pointed*、DSRF と *escargot* の発現パターン

正常胚の Dorsal Branch で発生段階にそって、*pointed*、DSRF と *escargot* の発現パターンの変化を再検討した。

pointed の発現パターン同定には *pointed*(P1)-lacZ(1(2)07825) を用いた。stage 13 から Dorsal Branch のほとんど全ての細胞 (5 から 7 個) で発現するが (Fig. 21 A1)、stage14 late から stage15 early にかけて、先端の 2 個以外はレポーター lacZ の発現が弱くなった (Fig. 21 A2)。lacZ 発現の強い 2 個の細胞は位置的に判断すると tip cell または terminal cell になる細胞である。さらに、stage15 late 以降 *pointed*-lacZ が強く検出されるのは、terminal cell のみになった (Fig. 21 A3)。

pruned (DSRF) 発現パターン同定には、抗 DSRF 抗体 (Affolter et al., 1994) を用いた。stage 13 から Dorsal Branch のほとんど全ての細胞 (5 から 7 個) で発現するが (Fig. 21 B1)、stage14 late から stage 15 early にかけて、先端の 2 個になることが新たにわかった (Fig. 21 B2)。Stage 15 late 以降は terminal cell のみで発現する (Fig. 21 B3) (Guillemin et al., 1996)。この発現パターンは *pointed*-lacZ の発現パターン変化の場合と同じである。

また、*escargot* の発現パターンは、*escargot*^{G66B}-lacZ と *escargot* 抗体染色ともに、気管形成過程を通じて tip cell のみ検出された (Fig. 21 C1-3)。

FGF signal と *escargot* の発現調節

気管系では *Drosophila* FGF homologue (*branchless*) が同定され、primary

branching、secondary branching、terminal branching を誘導することが報告された (Sutherland et al. 1996) 。tip cell は secondary branch の一部とも考えられるため、FGF signaling と、*escargot* の発現調節に関係があるかどうか検討した。正常胚の trachea placode では、Escargot を発現する細胞は 5 個である (Fig. 22A)。

branchless 変異体、*breathless* 変異体 ($\Delta 10$; null, FGF receptor homolog; Ohshiro et al., 1997) では、Escargot 発現細胞が Dorsal Branch 部分に 4 個認められた (Fig. 22B)。しかし、primary branch が形成されないため相対位置から tip cell を識別することは不可能である。

branchless 変異体では、Escargot を発現する細胞の数に変化はなかった (Fig. 22C)。

以上の結果は、*escargot* の発現開始は、FGF signaling に依存しないことを示している。*breathless* 変異体で Escargot 発現細胞の数が増加した原因は不明である。

tip cell 以外での *escargot* の発現は *pointed* と *anterior open (yan)* によって抑制される

pointed (P1) 変異体では、primary branch が形成されるため、tip cell の branch での相対位置を知ることができる。stage14 の Dorsal Branch の先端附近で Escargot を発現する細胞が 3 個に増加する (Samakovlis et al, 1996a)。stage15 で観察すると、terminal cell と tip cell が Escargot を発現していることが認められた (Fig. 22D)。

pointed は、正常胚の tip cell で stage14 までは発現する。従って、Pointed の *escargot* 発現の抑制能は stage15 以降にあらわれるのではないかと考えられる。そこで、stage14 以前に tip cell 以外の細胞で、*escargot* 発現を抑制する因子の存在が予想された。

anterior open (yan) は、*pointed* と同じく Ets protein をコードし、Dorsal Branch では tip cell 以外の細胞で発現する (Ohshiro; personal communication)。*anterior open (yan)* の機能欠損型 (*aop*(1); null allele; Lai and Rubin, 1992) の胚の場合、tip cell 以外の細胞で過剰な *escargot* の発現が認められた (Fig. 22E)。

DSRF と *escargot* の遺伝学的関係

Dorsal Branch において *escargot* と *pruned*(DSRF) の遺伝学的な epistasis を検討した。 *pruned*(DSRF) 変異体の場合、 *filopodia* の伸長が不完全なままで停止し、長く分枝した Terminal Branch の形成はおこらない。 *pruned*(DSRF) の遺伝子産物は、細胞の *filopodia* をさらに伸長させる機能をもつ (Guillemin et al, 1996)。 *pruned*(DSRF) 変異体では、 *escargot* の発現パターンに変化はなかった。 *escargot* 変異体では、 *tip cell* で *filopodia* の伸長が観察される。 *escargot* 変異体の胚で抗 DSRF 抗体染色を行うと、本来は *escargot* を発現する細胞が、 DSRF を発現していた (Fig. 22F, G) (Samakovlis et al, 1996b)。

escargot (*escargot*^{G66B}-lacZ) と *pruned*(DSRF) の 2 重変異体を染色体組換えによって作成した。 2 重変異体では、気管の branch の融合がおこらず、過剰な Terminal Branch は観察されない (Fig. 22H)。また、 *terminal cell* では Terminal Branch が観察されない。この結果、 2 重変異体の表現型は *escargot* と *pruned* の表現型をあわせたものであった。

考察

Dorsal Branch の先端に位置する 2 個の細胞は *stage13* 以前は細胞形態的に変化は認められない。 *stage14* 以降では、細胞形態の違いが現われ、 2 個の細胞の区別が可能である。

気管の先端に位置する 2 個の細胞の形態を指標に、遺伝子の発現パターンを追跡した結果、 *escargot* は *stage12* から *tip cell* でのみ発現を維持し続ける。 *pruned*(DSRF) は branch で発現する細胞の数を減少させ、細胞が *filopodia* を ventral に伸ばす *stage15* 以降は *terminal cell* でのみ発現する。

tip cell と *terminal cell* それぞれの遺伝子発現制御のモデルを Fig. 24 に示す。

1、正常胚の場合 (Fig. 23A) *terminal cell* では *pointed* と *pruned*(DSRF) が発現するが、 *escargot* の発現は Anterior open (Aop, Yan) と *Pointed* によって抑制される。 *tip cell* では *pointed* と *pruned*(DSRF) が *stage14* までは発現するが、それ以降の発現は *Escargot* により阻害され、 *escargot* の発現のみが維持されると考えられる。

2 *pruned*(DSRF) 変異体の場合 (Fig. 23B) *terminal cell* では *pruned*(DSRF)

欠損のため *pointed* 発現のみ観察される。tip cell では影響はない。

3、*pointed* 変異体の場合 (Fig. 23C) terminal cell で *escargot* 発現の抑制因子が欠損したため、*escargot* が発現する。

4、*anterior open (yan)* 変異体の場合 (Fig. 23D) terminal cell では *escargot* 発現の抑制因子が欠損したため、*escargot* が発現する。tip cell では通常 *anterior open (yan)* の発現はないので、影響はない。

5、*escargot* 変異体の場合 (Fig. 23E) terminal cell では通常 *escargot* 発現はないので、影響はない。tip cell で *pointed* と *pruned (DSRF)* が発現する。

さらに、*escargot* の発現調節は、2段階に分けることができると考えられる。

1、initiation activator は分からないが、FGF ではない。

2、maintenance *pointed*、*anterior open (yan)* によって抑制される。activator については分からない。

また、*escargot* が発現しなければ、branch の先端部分の細胞は、*branchless / breathless signal* をうけて terminal cell への分化の経路をたどるのではないかと考えられる。

以上の結果から、Dorsal Branch では、気管形成過程をつうじて、1個の細胞でのみ *Escargot* を発現させるための調節機構の一側面が示唆された。気管の branch の融合のためには、Dorsal Branch の tip cell で *Escargot* が発現するように調節することが、branch 融合に、重要な過程であると考えられる。

謝辞

本研究の指導をしていただいた、林茂生助教授に感謝いたします。また、研究室の皆様にも感謝いたします。

參考論文

Affolter, M., Montagne, J., Walldorf, U., Groppe, J., Kloter, U., LaRosa, M., and Gehring, W.J. 1994 The *Drosophila* SRF homolog is expressed in a subset of tracheal cells and maps within a genomic region required for tracheal development. *Development*. 120:743-753

Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. and Watson, J. 1994 *Molecular Biology of the Cell*. third edition. Garland publishing.

Ashburner, M., Tbot, S. and Woodruff, R.C. 1982 The genetics of a small chromosome region of *Drosophila melanogaster* containing the structural gene for alcohol dehydrogenase. *Scutoid*, an antimorphic mutation. *Genetics*. 102:401-420.

Brand, A.H. and Perrimon, A. 1993 Targeted gene expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes. *Development*. 118:401-415.

Brower, D.L., Smith, R.J. and Wilcox, M. 1980 A monoclonal antibody specific for diploid epithelial cell in *Drosophila*. *Nature*. 285:403-405.

Brunner, D., Dicker, K., Oellers, N., Hafen, E., Scholz, H and Klämbt, A. 1994 The ETS domain protein pointed-P2 is a target of MAP kinase in the *Sevenless* signal transduction pathway. *Nature*. 370:386-389.

Campos-Ortega, J.A. and Hartenstein, V. 1985 *The Embryonic Development of Drosophila melanogaster*. Springer-Verlag, Berlin, Germany.

Clark, I.E., Jan, L.Y., and Jan, Y.N. 1997 Reciprocal localization of Nod and kinesin fusion proteins indicates microtubule polarity in the *Drosophila* oocyte, epithelium, neuron and muscle. *Development*. 124:461-470.

Drewes, G., Ebner, A., Preuss, U., Mandelkow, E-V. and Mandelkow, E.

1997 MARK, a novel family of protein kinases that phosphorylate microtubule-associated proteins and trigger microtubule disruption. *Cell*.89:297-308.

Eulenberg, G.K. and Schuh, R. 1997 The *tracheae defective* gene encodes a bZIP protein that controls tracheal cell movement during *Drosophila* embryogenesis. *The EMBO Journal*. Vol.16., No.23:7156-7165.

Fackenthal, J.D., Hutchens, J.F., Turner, F.R. and Raff, E.C. 1995 Structural analysis of mutations in the *Drosophila* β 2-tubulin isoform reveals regions in the β -tubulin molecule required for general and tissue-specific microtubule function. *Genetics*.139:267-286.

Fessler, L.I., Campbell, A.G., Duncan, K.G. and Fessler. 1987 *Drosophila* laminin: characterization and localization. *The Journal of Cell Biology*.105:2383-2391.

Folkman, J. and Haudenschild, C. 1980 Angiogenesis in vitro. *Nature*.11:551-556.

Fuse, N., Hirose, S. and Hayashi, S. 1994 Diploidy of *Drosophila* imaginal cell is maintained by transcriptional repressor encoded by *escargot*. *Genes & Development*.8.2270-2281.

Fuse, N., Hirose, S. and Hayashi, S. 1996 Determination of wing cell fate by the *escargot* and *snail* genes in *Drosophila*. *Development*.122:1059-1067.

Garabedian, M.J., Shepherd, B.M. and Wensink, P.C. 1986 A tissue-specific transcription enhancer from the *Drosophila* york protein 1 gene. *Cell*.45:859-867.

Gellon, G., Herding, W. K., McGinnis, N., Martin, M.M., and McGinnis, W. 1997 A genetic screen for modifiers of Deformed homeotic function identifies novel genes required for head development. *Development*. 124;3321-3331

Giniger, E., Wells, W., Jan, L. Y., and Jan, Y. N. 1993 Tracing neurons with a kinesin- β -galactosidase fusion protein. *Roux's Arch Dev Biol*, 202:112-122.

Grawe, F., Wodarz, A., Lee, B., Knust, E., and Skaer, H. 1996 The *Drosophila* gene *crumb* and *stardust* are involved in the biogenesis of adherens junctions. *Development*. 122:951-959.

Guillemin, K., Groppe, J., Ducker, K., Treisman, R., Hafen, E., Affolter, and Krasnow, M. 1996 The *pruned* gene encodes *Drosophila* serum response factor and regulates cytoplasmic outgrowth during terminal branching of the tracheal system. *Development*. 122:1353-1362

Gumbiner, B. M. 1992 Epithelial morphogenesis. *Cell* 69:385-387

Hall, A. 1994 Small GTP-binding proteins and the regulation of the actin cytoskeleton. *Annu. Rev. Cell Biol.* 10:31-54.

Haraguchi, T., Kaneda, T. and Hiraoka, Y. 1997 Dynamics of chromosomes and microtubules visualized by multiple-wavelength fluorescence imaging in living mammalian cell: effects of mitotic inhibitors on cell cycle progression. *Genes to cells*, 2:369-380.

Hartenstein, V. and Jan, Y. N. 1992 Studying *Drosophila* embryogenesis with P-lacZ enhancer trap lines. *Roux's Arch Dev Biol*. 201:194-220.

Hayashi, S., Hirose, S., Metcalf, T. and Shirras, A. 1993 Control of imaginal cell development by the escargot gene of *Drosophila*. *Development*. 118:105-115.

Hayashi, S. 1996 A cdc2 dependent checkpoint maintains diploidy in *Drosophila*. *Development*. 122:1051-1058.

Hirano, S., Ui, S., Miyake, T., Uemura, T. and Takeichi, M. 1991 *Drosophila* PS integrins recognize vertebrate vitronectin and function as cell-substratum adhesion receptor in vitro. *Development*. 113:1007-1016.

- Issac,D.D. and Andrew,D.J. 1996 Tubrogenesis in *Drosophila* : a requirement for the tracheless gene product. *Genes & Development*. 10:103-117.
- Klämbt,C.,Glazer,L. and Shilo,B.-Z. 1992 *beathless*, a *Drosophila* FGF receptor homolog, is essential for migration of tracheal and specific midline glial cells . *Genes & Development*.6:1668-1678.
- Knust,E.,Tepass,U., and Wodarz,A. 1993 *crumb* and *stardust*,two genes of *Drosophila* required for the development of epithelial cell polarity.*Development*.Supplement.261-268.
- Knust,E.1994 Control of epithelial cell polarity in *Drosophila*. *TIG*.10:275-279.
- Lai,Z. and Rubin,G.M. 1992 Negative control of photoreceptor development in *Drosophila* by the product of the *yan* gene, an ETS domain protein.*Cell*.70:609-620-
- Luo,L.,Liao,Y,J.,Jan, L.Y., and Jan, Y.N. 1994 Distinct morphogenetics functions of similar small GTPases:*Drosophila* *Drac1* is involved in axonal outgrowth and myoblast fusion.*Genes & Development*.8:1787-1802.
- Mackay,D.J.P.,Nobes,C.D., and Hall,A.1995 The Rho's progress:a potential role during neurogenesis for the Rho family of GTP ases. *TINS*.18:496-501.
- Manning,G. and Krasnow,M.A. 1993 Development of the *Drosophila* tracheal system. In *The Development of Drosophila melanogaster*. (ed. M.Bate and A.Martinez-Arias).pp609-685.Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Mithiston,T.J., and Cramer,L.P. 1996 Actin-based cell motility and cell locomotion.*Cell*.84:371-379.

Murphy,A.M., and Montell,D.J.1996. Cell type-specific roles for cdc42, rac, and rhoL in *Drosophila* oogenesis. *The Journal of Cell Biology*. 133:617-630.

Murry,M.A., Fessler,L.I. and Palka,J. 1995 Changing distribution of extracellular matrix components during early wing morphogenesis in *Drosophila*. *Developmental Biology*.168:150-165.

Nardi,J. 1990 Expression of surface epitope on cells that link branches in the tracheal network of *Manduca sexta*. *Development*. 110:681-688.

Nemhauser,I., Joseph-silverstein,J. and Cohen,W.D. 1983 Centrioles as microtubule-organizing centers for marginal bands of *Molluscan Erythrocytes*. *The Journal of Cell Biology*.96:979-989.

Nobes,C.D., and Hall,A.1995 Rho,Rac,cdc42 GTPases regulate the assembly of multimolecular focal complexes associated with actin stress fibers,lamellipodia,and filopodia. *Cell*.81:53-62.

Nüsslein-Volhard,C., Wieschaus,E. and Kluding,H. 1984 Mutations affecting the pattern of the larval cuticle in *Drosophila melanogaster*. Zygotic loci on the second chromosome. *Wilhelm Roux's Arch Dev. Biol*. 193:267-282.

Oda,H., Uemura,T., Shiomi,K., Nagafuchi,A., Tsukita,S. and Takeichi,M.1993 Identification of a *Drosophila* homologue of *D* α -catenin and its association with the armadillo protein. *The Journal of Cell Biology*.121:1133-1140.

Oda,H., Uemura,T., Harada,Y., Iwai,Y and Takeichi,M. 1994 A *Drosophila* homolog of cadherin associated with Armadillo and essential for embryonic cell-cell adhesion. *Developmental Biology*. 165:716-726.

Oshiro,T. and Saigo,K. 1997 Transcriptional regulation of *breathless* FGF receptor gene by binding of TRACHEALESS/dARNT heterodimers

to three central midline elements in *Drosophila* developing trachea. *Development*.124:3975-3986.

Patel,N.,Snow,P.M. and Goodman,C.S. 1987 Characterization and cloning of fasciclin I :a glycoprotein expressed on a subset of neurons and axon pathway in *Drosophila*. *Cell*.48:975-988.

Peifer,M. 1995 Cell adhesion and signal transduction :The Armadillo connection. *TIG*.5:224-229.

Qian,S.,Varjavand,B. and Pirrotta,V. 1992 Molecular analysis of the *zeste-white* interaction reveals promoter-proximal element essential for distant enhancer-promoter communication. *Genetics*.131:79-90.

Ridley,A.J., and Hall,A. 1992 The small GTP-binding protein rho regulates the assembly of focal adhesion and actin stress fibers in response to growth factors. *Cell*.70:389-399.

Ridley,A.J., Paterson,H.F.,Johnson,C.L.,Diekmann,D.,and Hall,A. 1992 The small GTP-binding protein rac regulates growth factor-induced membrane ruffling. *Cell*.70:401-41

Samakovilis,C.,Hacohen,N.,Manning,G.,Sutherland,D.,Guillemin,K. and Klasnow,M.1996aDevelopment of the *Drosophila* tracheal system occurs by a series of morphologically distinct but genetically coupled branching events. *Development* .122:1395-1407.

Samakovilis,C., Manning,G.,Steneberg,P.,Hacohen,N.,Cantera,R.,and Klasnow,M.A. 1996b Genetic control of epithelial tube fusion during *Drosophila* tracheal development. *Development*.122:3531-3536.

Sambrook,J.,Fritsch,E.F. and Maniatis,T. 1989 *Molecular Cloning:a laboratory manual*.(Cold Spring Harbor,New York:Cold Spring Harbor Press).

Scholz,H.,Deatrick,J.,Klaes,A., and Klämbt,A. 1993 Genetic dissection

of *pointed*, a *Drosophila* gene encoding two ETS-related proteins. *Genetics*,135:455-468.

Shiomi,K.,Takeichi,M.,Nishida,Y. and Uemura,T. 1994 Alternative cell fate choice induced by low-level expression of regulator of protein phosphatase 2A in *Drosophila* peripheral nervous system. *Genes & Development*.

Shishido,E.,Higashijima,S.,Emori,Y. and Saigo,K. 1993 Two FGF-receptor homologues of *Drosophila*: one is expressed in mesodermal primordium in early embryos. *Development*,117:751-761.

Snow,P.M.,Bieber,A.J., and Goodman,C.S. 1989 Fasciclin III : A novel homophilic adhesion molecule in *Drosophila*. *Cell*.59:313-323.

Sutherland,D., Samakovilis,C.,Krasnow,M., 1996 *branchless* encodes a *Drosophila* FGFhomolog that control tracheal cell migration and the pattern of branching. *Cell*,87:1091-1101.

Takeichi, M. 1991 Cadherin cell adhesion receptors as a morphogenic regulator. *Science*. 251:1451-1455

Takeichi, M. 1995 Morphogenetic roles of classic cadherins. *Curr.Opin. Cell Biol.* 7:619-627

Tepass,U.,Theres,C.,and Knust,E. 1990 *crumbs* encodes an EGF-like protein expressed on apical membranes of *Drosophila* epithelial cells and required for organization of epithelia. *Cell*.61:787-799.

Tepass,U.,and Knust,E.1993 *crumbs* and *stardust* act in a genetic pathway that controls the organization of epithelia in *Drosophila melanogaster*.*Developmental Biology*.159.311-326.

Tepass, U. 1996 Crumbs,a component of the apical membrane, is required for zonula adherence formation in primary epithelia of *Drosophila*. *Developmental Biology*. 177;217-225

Tepass,U.,Gruszynski-DeFeo,E.,Haag,T.,Omatyar,L.,Brök,T., and Hartenstein ,V.1996 *shotgun* encodes *Drosophila* E-cadherin and is preferentially required during cell rearrangement in the neurectoderm and other morphogenetically active epithelia. *Genes & Development*. 10:672-685.

Uemura,T.,Oda,H.,Kraut,R.,Hayashi,S.,Kataoka,Y.,and Takeichi,M.1996 Zygotic *Drosophila* E-cadherin expression is required for processes of dynamic epithelial cell rearrangement in the *Drosophila* embryo. *Genes & Development*.10:659-671.

Wodarz,A.,Hinz,U.,Engelbert,M., and Knust,E.1995 Expression of crumbs confers apical character on plasma membrane domain of ectodermal epithelia of *Drosophila*. *Cell*.82:67-76.

Zheng,Y.,Jung,M.K and Oakley,B.R. 1991 Gamma-tubulin is present in *Drosophila melanogaster* and *Homo sapiens* and is associated with the centrosome. *Cell*.65:817-823.

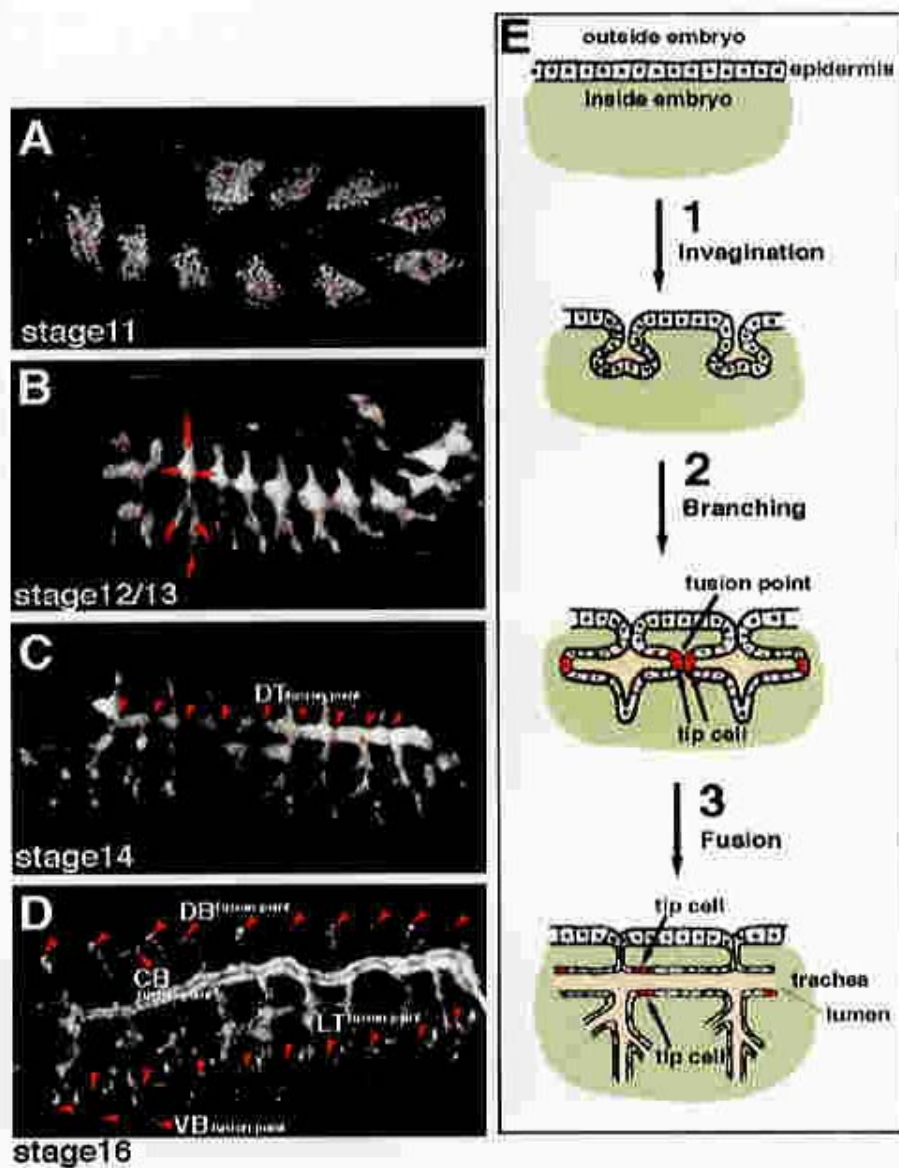


Fig. 1 気管形成過程

AからDの stageにしたがって、気管のネットワーク形成過程を *breathless*-GAL4 / UAS-GFP で標識している。*breathless* は全ての気管細胞で発現する。*breathless*-GAL4 系統を用いることで、GFPを発現させ気管細胞を観察する。Red arrow はそれぞれの branch の融合ポイントを示す。(E) 胚の表層の細胞が各体節ごとに貫入し(1)、気管前駆細胞は分枝、伸展し(2)、融合する(3)。

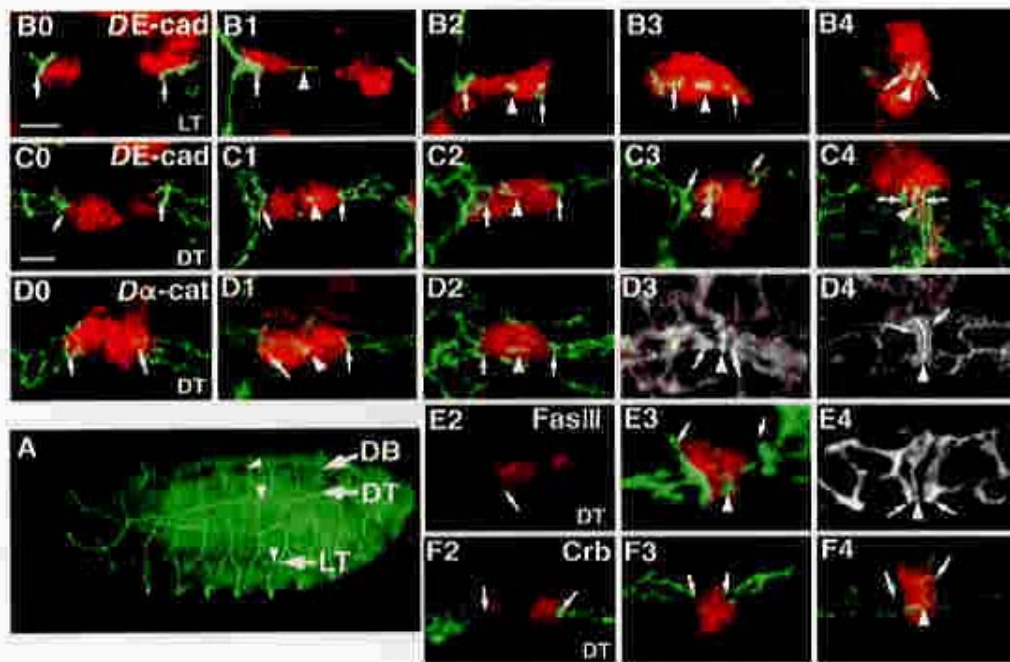


Fig. 2 branch 融合過程での tip cell の細胞形態変化と細胞膜マーカーの局在パターンの変化

(A) lumen を認識する抗体染色による気管ネットワーク

(B~F) tip cell の細胞形態変化と細胞膜マーカーの局在パターンの変化を stage 0 から stage 4 に分類する。 Laterel Trunk の場合は B0~B4 に、Dorsal Trunk の場合を C0~C4、 D0~D4、 E2~E4、 F2~F4 に示す。

tip cell の細胞形態は、 *escargot⁶⁰⁶⁰-lacZ* によってトレースする (red)。細胞膜マーカーの *DE-cadherin* (B, C)、 *Dα-catenin* (D)、 *Fas III* (E)、 *Crb* (F) (green) は、 tip cell の細胞形態変化とともに局在パターンが変化する。(fusion point を arrowhead で、 tip cell と気管細胞の接着部分を arrow で示す) Bar 5 μ m

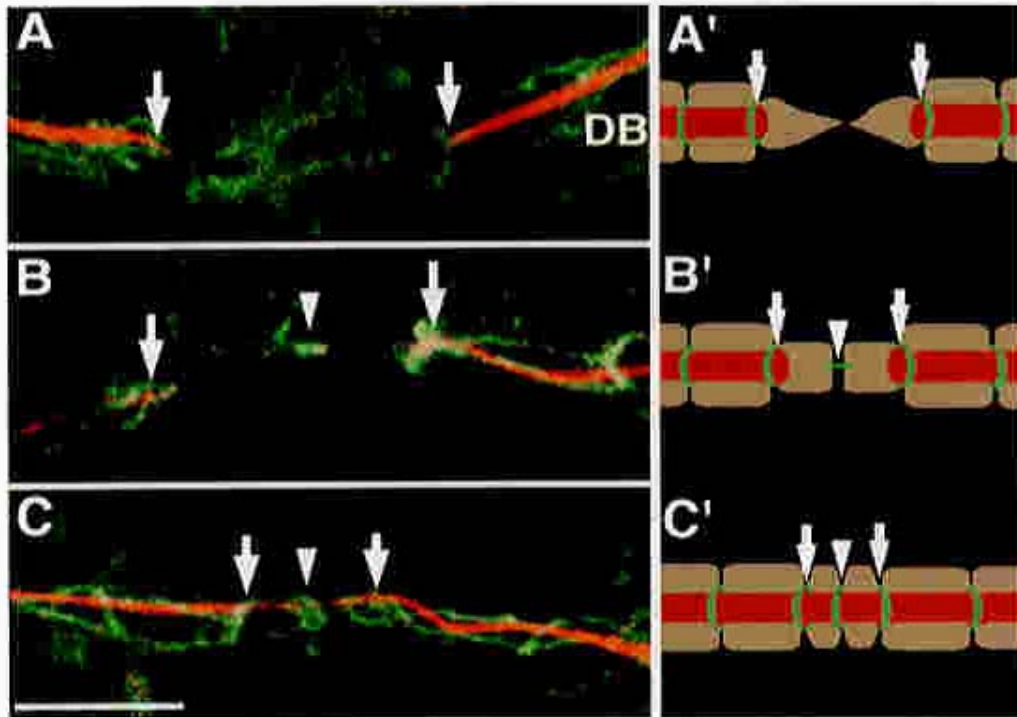


Fig. 3 DE-cadherin の ring が形成されると lumen が貫通する
 (A~C) Dorsal Branch 10 を lumen 抗体 (red) と DE-cadherin 抗体 (green) で染色した。気管の lumen は tip cell 内には観察されない (A; stage 0)。Tip cell の接触面に DE-cadherin の局在が観察される (B; stage 2)。DE-cadherin の ring が形成されると lumen が貫通する (C; stage 3)。(A~C) に模式図で示す。(fusion point を arrowhead で示す) Bar 10 μ m

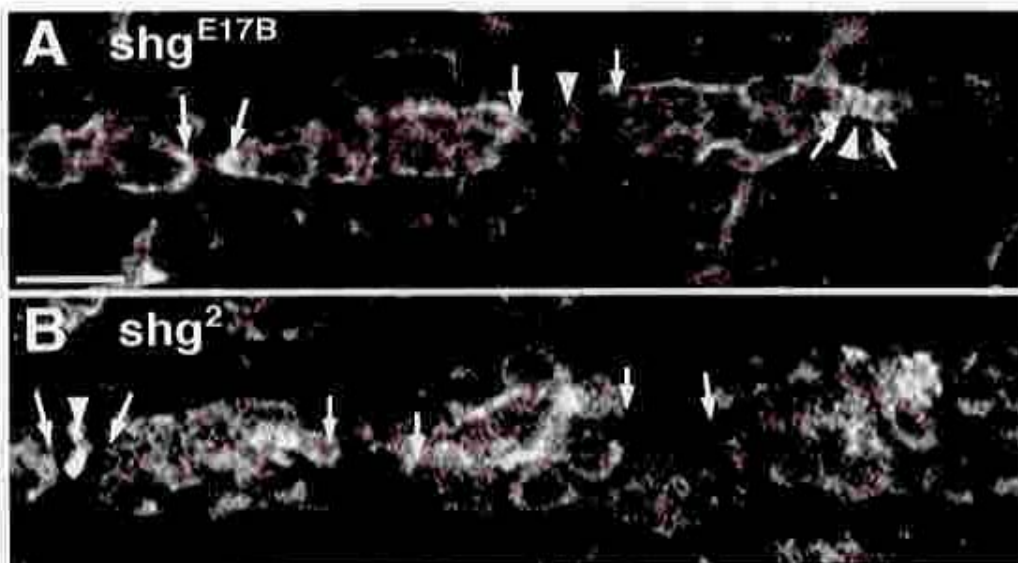


Fig. 4 *shotgun*(DE-cadherin) 変異体の気管系での異常
 (A) *shotgun*^{E17B} (hypomorph) 変異体の気管融合部分では、DE-cadherin の ring の拡張が不完全になる (右の arrowhead)。また、tip cell は接触しているが DE-cadherin の ring 状局在の観察されない fusion point も存在する (左の 2 本の arrow で示した fusion point)。 (B) *shotgun*² 変異体の気管融合は、ほとんどの部分で阻害され、tip cell の接触も観察されない。(fusion point を arrowhead で示す) Bar 10 μ m

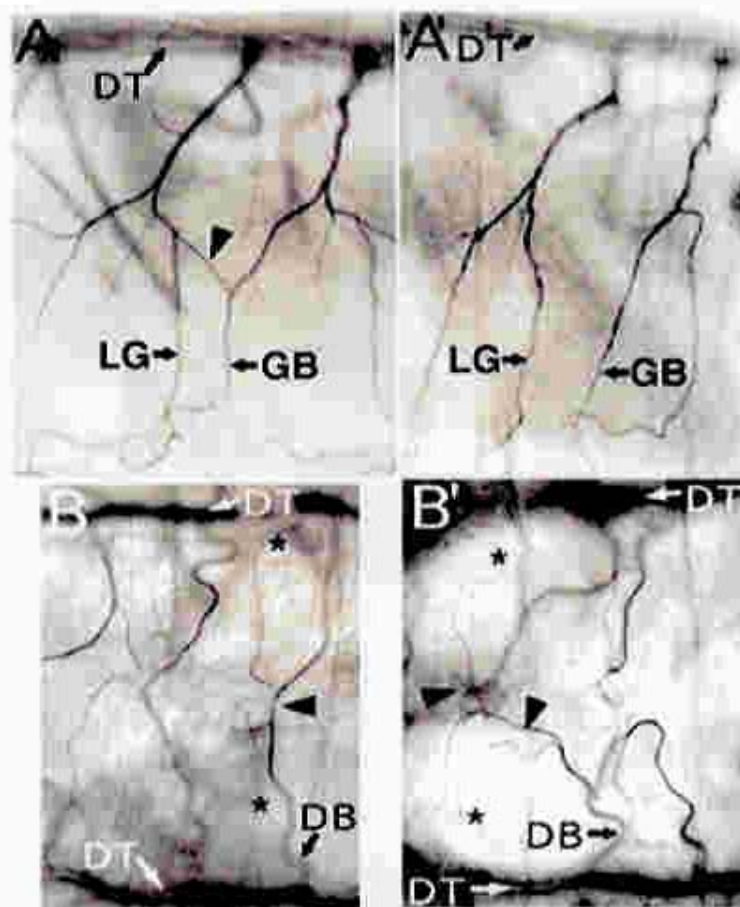


Fig. 5. *escargot* 変異体での branch 融合の異常

(A, B)は正常型の1齢幼虫の気管を示す。(A', B')は *escargot*^{DBR} 変異体を示す。(A) Lateral Trunkの fusion point (arrowhead)は(A')では観察されない。融合しなかった branch は体腔内に伸長しこの写真ではみえない。(B) Dorsal Branchの fusion point (arrowhead)は(B')では観察されない。長く伸びた branch が観察される。

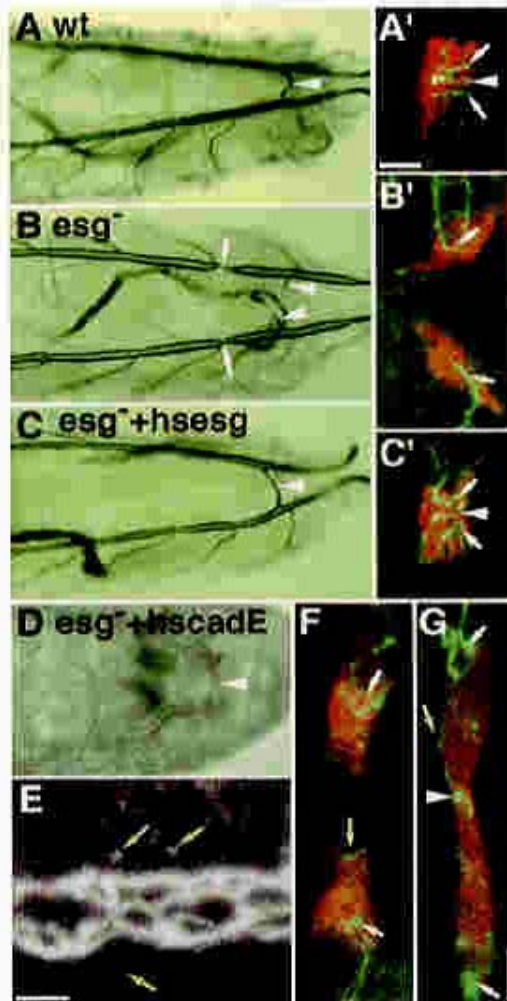


Fig. 6 *escargot* 変異体の tip cell の表現型とその救済実験
 (A~C) 1 齢幼虫の気管系。(A'~C', F, G) 胚の DB10 を Δ -cadherin 抗体染色 (green)、 β -galactosidase 抗体染色 (*escargot*⁶⁰⁰⁰-lacZ; red) した。
 (A, A') は正常型。(B, B') *escargot* 変異体の DB10 は tip cell が接触しない。
 (C, C') *escargot* 変異体は、HS-*esg* の 7 回の Heat-shock 処理により救済された。 Δ -cadherin が tip cell の接触部分に ring 状に観察される (C)。lumen にはクチクラが分泌されている (C)。(D) *escargot* 変異体の HS- Δ -cadherin による DB10 の救済。37 度、30 分の Heat-shock 処理を 2 回おこなった場合。(E) 32 度、15 分、一回の Heat-shock 処理では Dorsal Teuk の気管細胞に Δ -cadherin が dot 状に検出された (yellow arrows)。(F) DB10 接触前の tip cell の filopodia の先に Δ -cadherin が観察された。(G) tip cell が接触すると接触部分に Δ -cadherin の dot が局在した。
 Bar 5 μ m

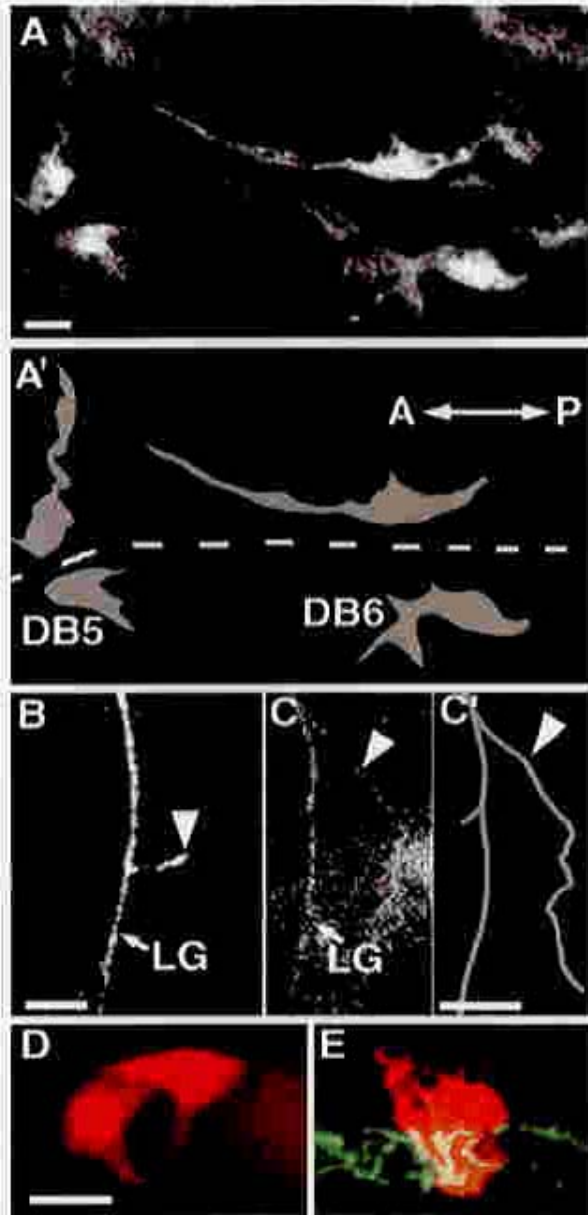


Fig. 7 *escargot* 変異体の tip cell は細胞運動能が異常亢進する (A, A') *escargot^{GH14}-lacZ* の Dorsal Branch の tip cell は細胞仮足 (filopodia) の異常伸長が認められた。 (B) *breathless* 変異体 (*bt1^{G-11a}*) の Lateral Trunk の branch (arrowhead)。 (C, C') *escargot* 変異体の Lateral Trunk の branch (arrowhead) は (B) と比較して明らかに伸長している。 (D) 正常型の Dorsal Trunk tip cell の ring。 (E) *escargot* 変異体の Dorsal Trunk tip cell. 複数の細胞突起 (lamellipodia-like) が認められた。

Bar 5 μ m

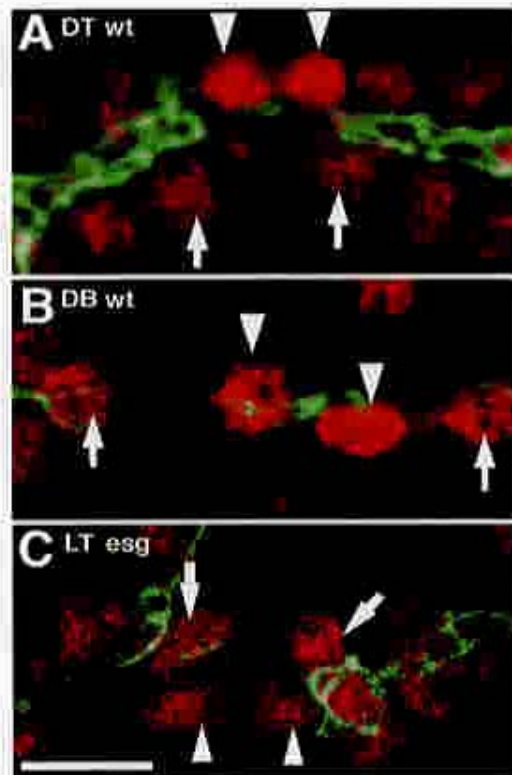


Fig. 8 tip cellが接触すると *shotgun* プロモーター活性が上昇する。
shotgun-lacZ の発現を red, *E-cadherin* を green で示す。(A) Dorsal Trunk
 (B, C) Lateral Trunk の furion point を示す。(A, B) *escargot⁶⁰⁶⁰/shotgun*
 の正常型胚では、tip cellが接触後、全ての tip cellで *lacZ* の染色強度
 が、他の気管細胞に比較して上昇した。(C) *escargot^{55A}shotgun*
 /Df (2L) A48 *shotgun* 胚では、*lacZ* の染色強度の上昇はみとめられない。
 (Arrowhead; tip cell, arrow; trachea cell) Bar 5 μ m

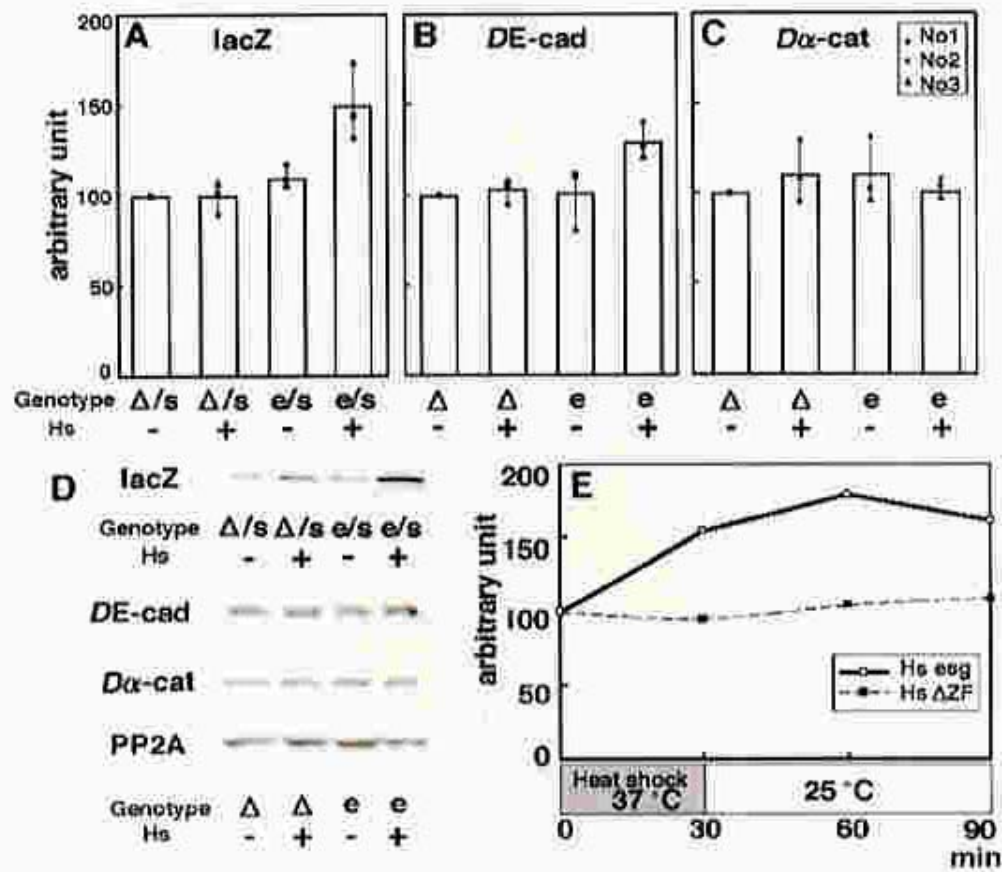


Fig. 9 *shotgun* プロモーターと *DE-cadherin* の発現は HS-*escargot* によって活性化される

サンプルの胚の heat-shock 処理は救済実験と同じ条件である。Δ; HS-*esg* ΔZF (*escargot* coding の zinc finger を欠いた系統)、e; HS-*esg*, s; *shotgun-lacZ*。(A, B, C) β-galactosidase, *DE-cadherin*, *Dα-catenin* の相対量の変化。Heat-shock 処理をしなかった場合や、HS-*esg* ΔZF では変化は観察されなかった。3回独立に実験を行い、データを平均化した。(D) autoradiogram の結果。(E) Time-course assay, 37°C, 30分の heat-shock で1回処理した。その後必要な時間まで 25°C でインキュベートした。

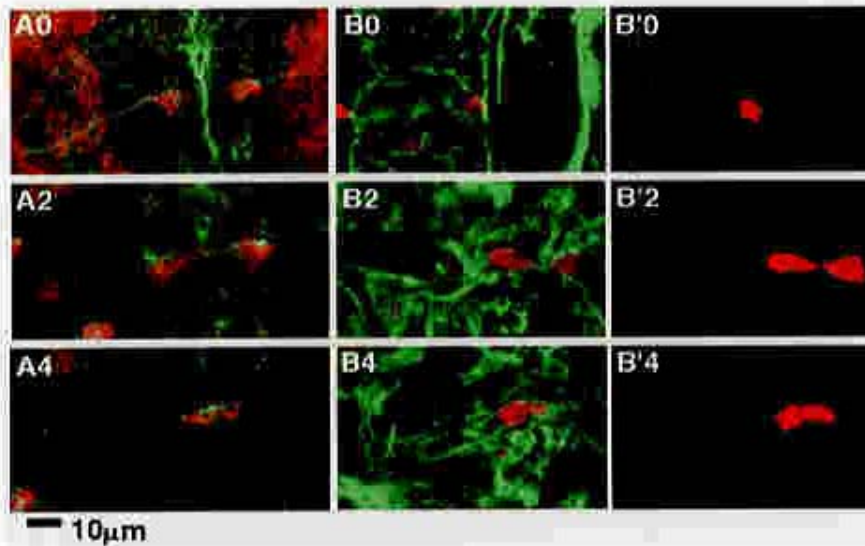


Fig. 10 tip cellが接触すると basal 側に αE -cadherin が局在すると同時に basal lamina の構成成分が消失する。

(A, B, B') (Fig2) の分類にしたがって tip cell の細胞形態変化と細胞膜マーカーの局在パターンの変化を示す。

tip cell の細胞形態は、*escargot^{GGN}-lacZ* によってトレースする (red)。Dorsal Branch での細胞膜マーカーの (A) αE -cadherin 抗体 (B) laminin $\alpha \beta \gamma$ complex を認識する抗体染色のパターン (green)。 (B0) laminin は tip cell と気管細胞全体を取り囲んで Basal 側に局在している。 (B1) tip cell の接触面で laminin の消失が始まる。 (B4) 融合の完了した branch を laminin が取り囲む。 Tip cell の接触部分に laminin は局在しない。 (B') は (B) をトレースしたもの。 Fas III, Crb の場合は (Fig2) を参照。 Bar: 10 μ m

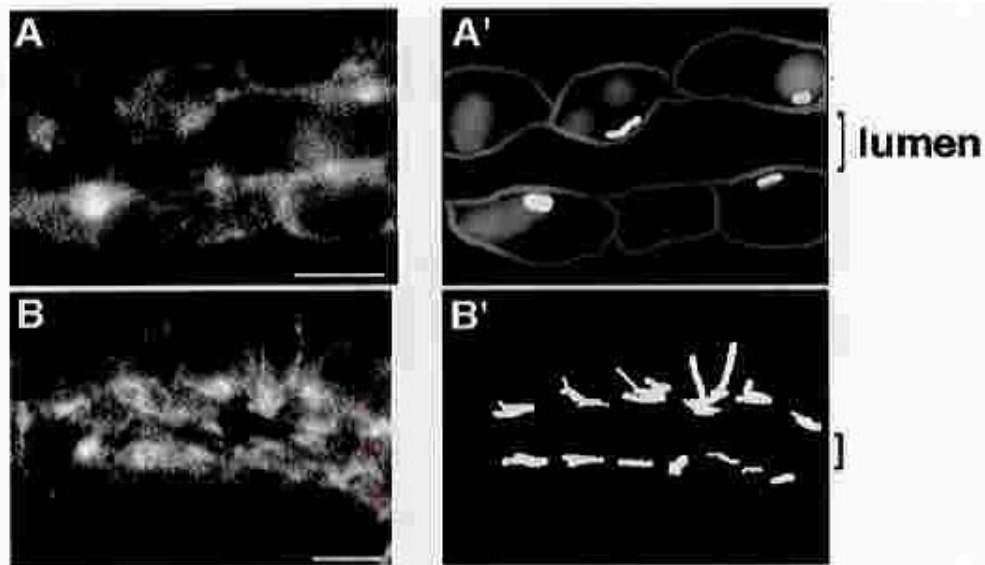


Fig. 11 cell polarity を kinesin-lacZ, Nod-lacZ でモニターする試み。細胞極性の変化をモニターするために、Clark et al. (Development 1997) に報告されている kinesin (A, A'), Nod (B, B') 各々の lacZ fusion protein を気管細胞で発現させた。Dorsal Trunk の場合、stage15 embryo の気管細胞において、kinesin-lacZ は Apical 側に dot 状に局在し、Nod-lacZ は Apical 側に filament 状に局在した。Bar: 5 μ m

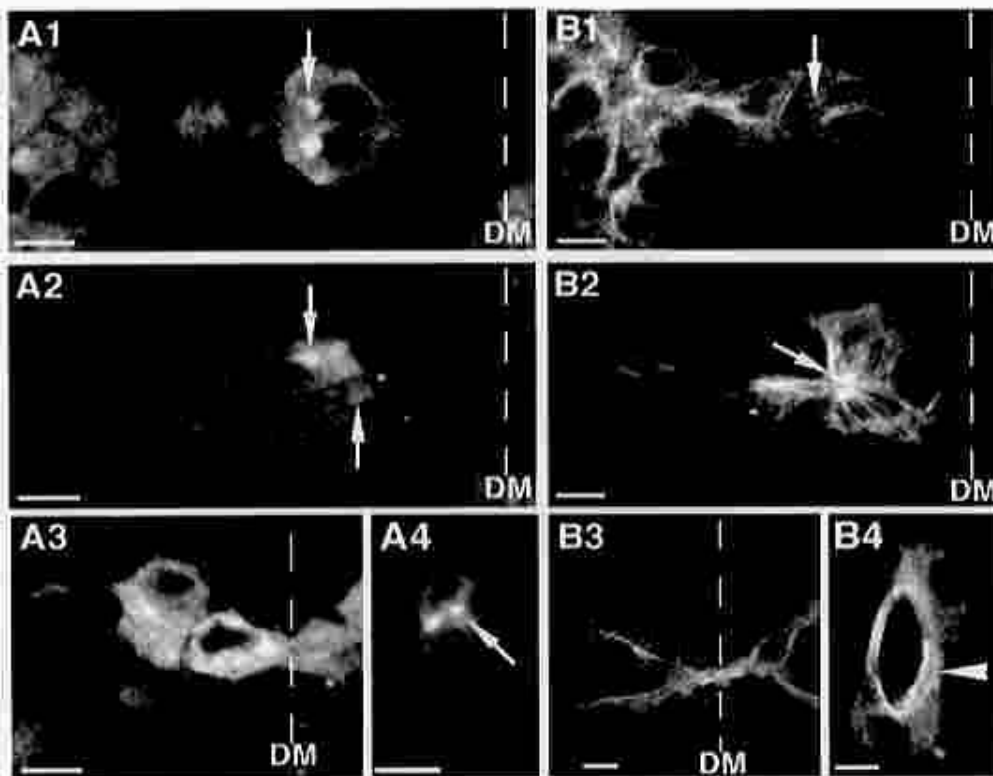


Fig. 12 tip cellでの kinesin-lacZ, Nod-lacZ の局在パターン。
 (A1-A3) Dorsal Branch が融合のターゲット branch に向かって伸長する過程で、枝の先端に位置する tip cell では kinesin-lacZ の dot 状の局在が Ventral 側から Dorsal 側に移動した。(A4) Dorsal Trunk の tip cell, kinesin-lacZ の dot を white arrow で示す。
 (B1-B3) Nod-lacZ は white arrow の部分をコアにして branch の伸長方向にしたがって filament 状に伸長する。(B4) Dorsal Trunk の tip cell, Ring にそって Nod-lacZ filament も ring 状に観察される (white arrowhead), Tip cell と terminal cell を破線で囲む。 Bar: 5 μ m

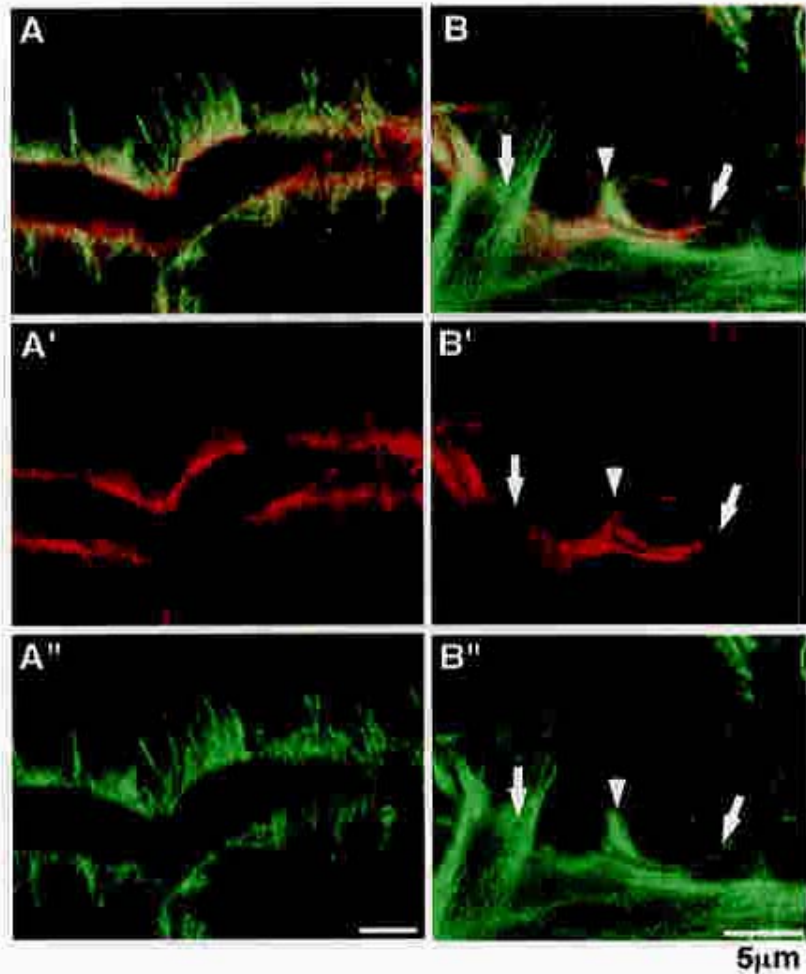


Fig. 13 Nod-lacZ filamentはmicrotubuleの一部と colocalizeする。
 (A) Dorsal Trunk (B) tip cell。(A'-B')は Nod-lacZ filament (A''-B'')は α -
 tubulin 抗体染色を示す。(A-B)は重ね合わせ画像である。Dorsal Trunk
 では Nod-lacZ filamentは apical に局在し、 α -tubulinは apical から
 basal にむかって filament を伸ばす。Apical 領域では Nod-lacZ filament
 と重なる(A)。tip cellでも Nod-lacZ filamentは microtubuleと
 colocalizeした(B) fusion pointを arrowheadで、tip cellと気管細胞の
 接着部分を arrowで示す Bar:5 μ m

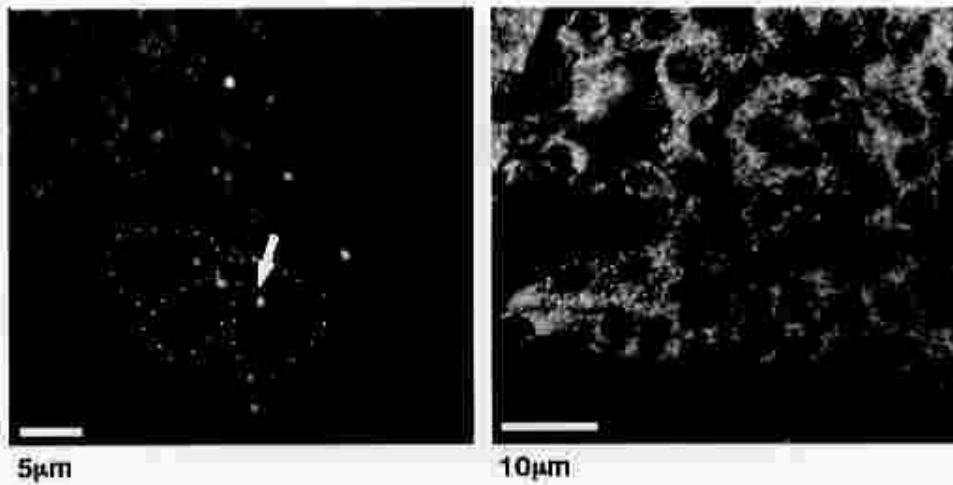


Fig14 γ -tubulinの局在パターン。

(A) stage 11 から 12 の気管細胞での γ -tubulin 抗体染色。点線で囲んだ細胞 1 個あたり、1 個の dot 状の γ -tubulin のシグナルが認められた。

(B) stage 14 の気管細胞では dot 状の γ -tubulin のシグナルは観察されない。

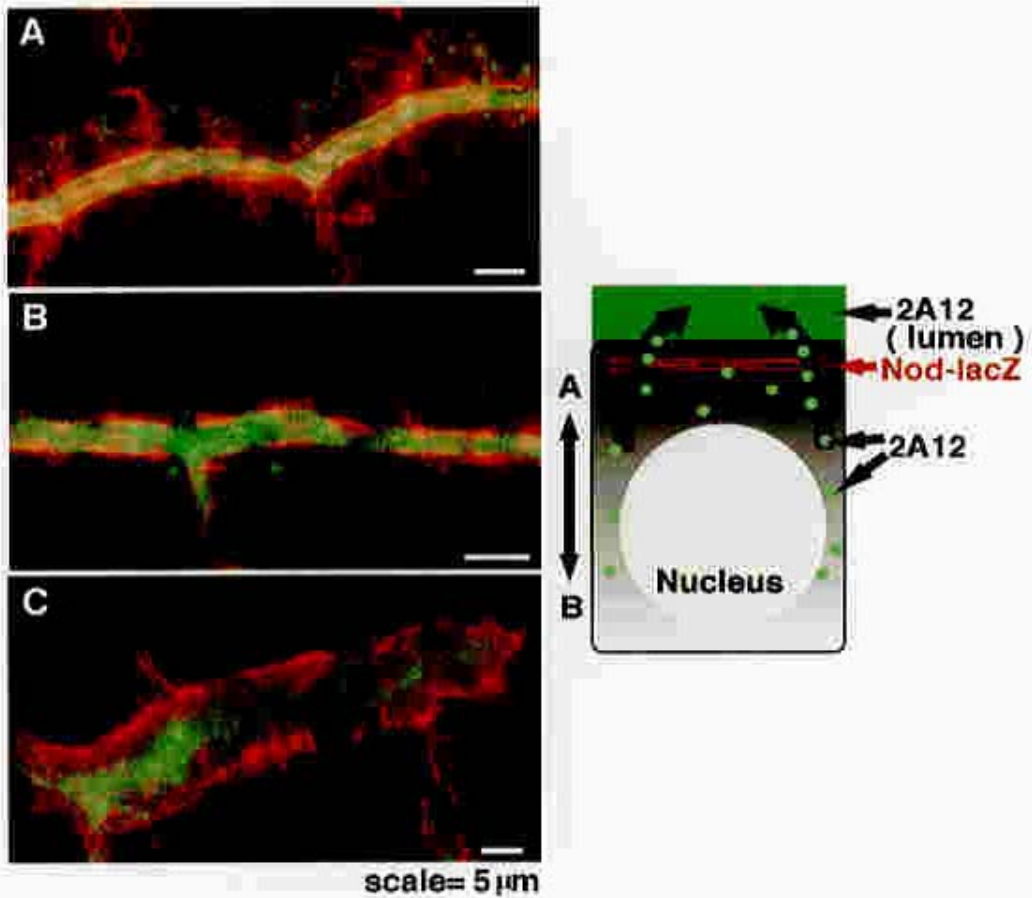


Fig15 2A12 vesicleはapicalに移動する。
 気管のDorsal Trunkでは、Apical側に抗体2A12により認識されるlumen成分が分泌される(green)。分泌顆粒は気管細胞質からlumenに移動し(A, B)。st16以降のDorsal Trunkではlumenにのみ観察される(C)。Nod-lacZ filament (red)は気管細胞のApical側に沿ってfilament状に局在している。Bar:5 μm

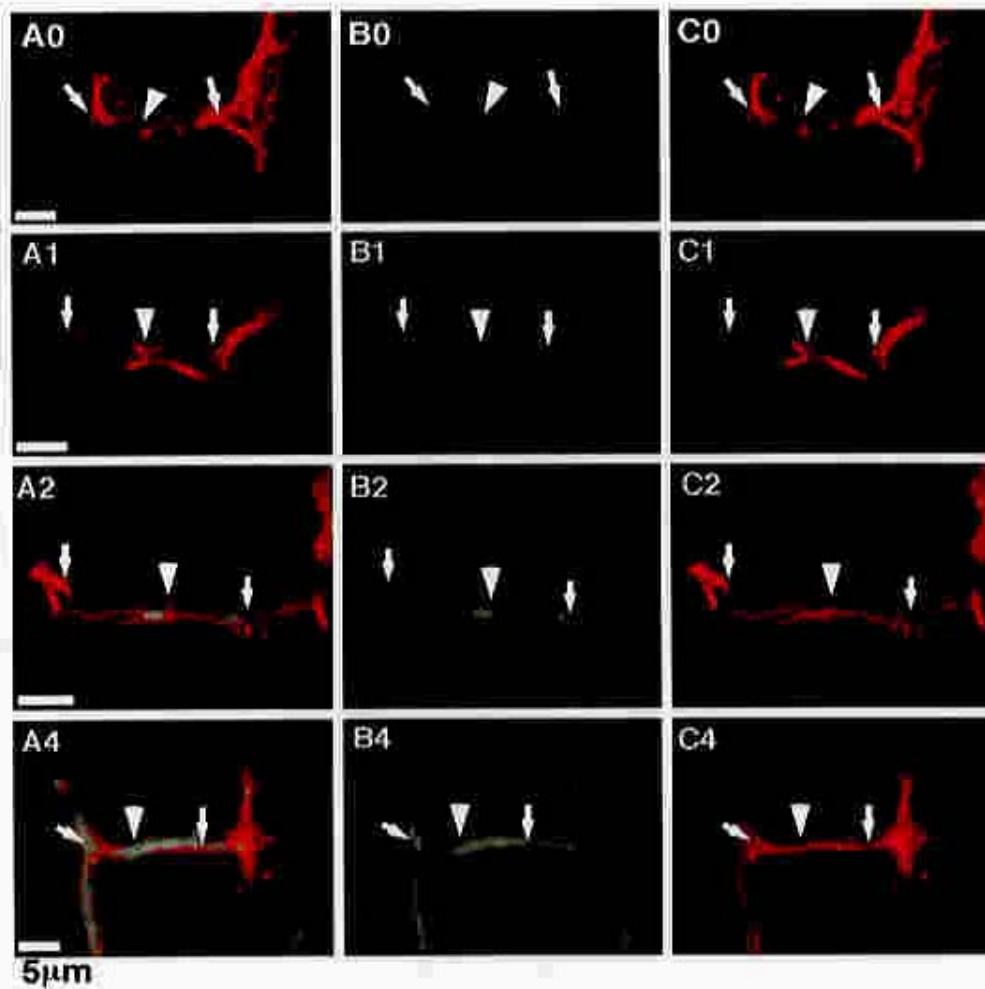


Fig16 tip cellでの Nod-lacZ filament (red) と 2A12 vesicle (green) の関係。

Fig2 で示した stage にしたがって分類すると、まず Nod-lacZ filament が観察された。filament に沿って、分泌顆粒が並ぶことが示された。

(B0-B4) 2A12 lumen 抗体染色、(C0-C4) Nod-lacZ filament、(A0-A4) 重ね合せ画像をしめす。fusion point を arrowhead で、tip cell と気管細胞の接着部分を arrow で示す。Bar: 5 μ m

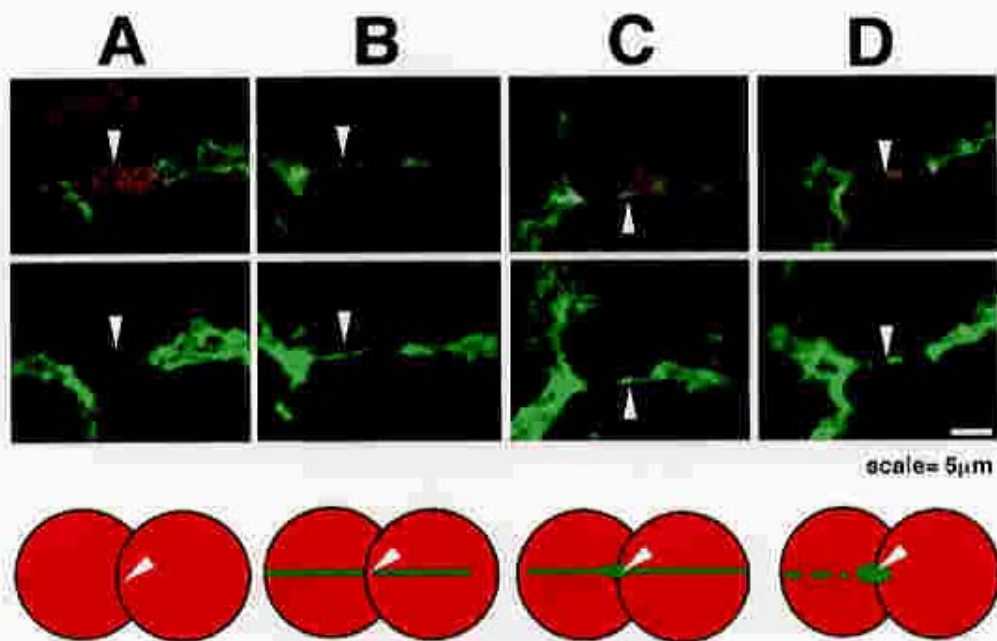


Fig17 tip cell 接触面へ E-cadherin が蓄積する。
tip cell 接触から、Fig2, C 1 の状態に移るまでに、E-cadherin が tip cell を貫く 1 本の線として検出された。
(A) tip cell 接触。(B) E-cadherin が線状に観察されるが、tip cell 接触面には認められない。(C) tip cell 接触面にも E-cadherin が局在する。(D) 接触面に E-cadherin が残り、1 本の線状の E-cadherin は消失していく。Tip cell (red), E-cadherin (green)。

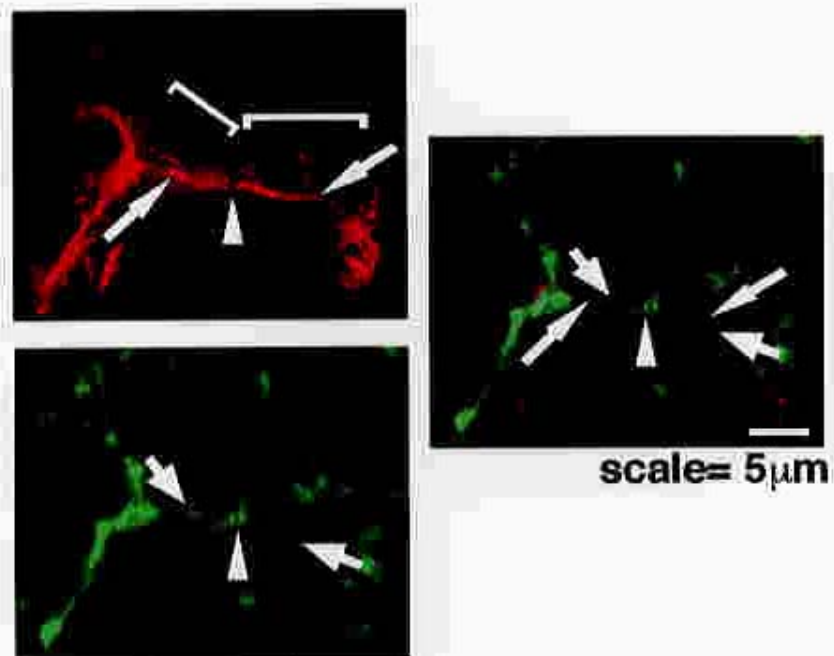


Fig18: E-cadherinの局在パターンと Nod-lacZ filament。
 融合の初期にある tip cell 内の 2 本の Nod-lacZ filament に沿って、
 E-cadherin が線状に分布していた。 Nod-lacZ filament (red), E-
 cadherin (green)。

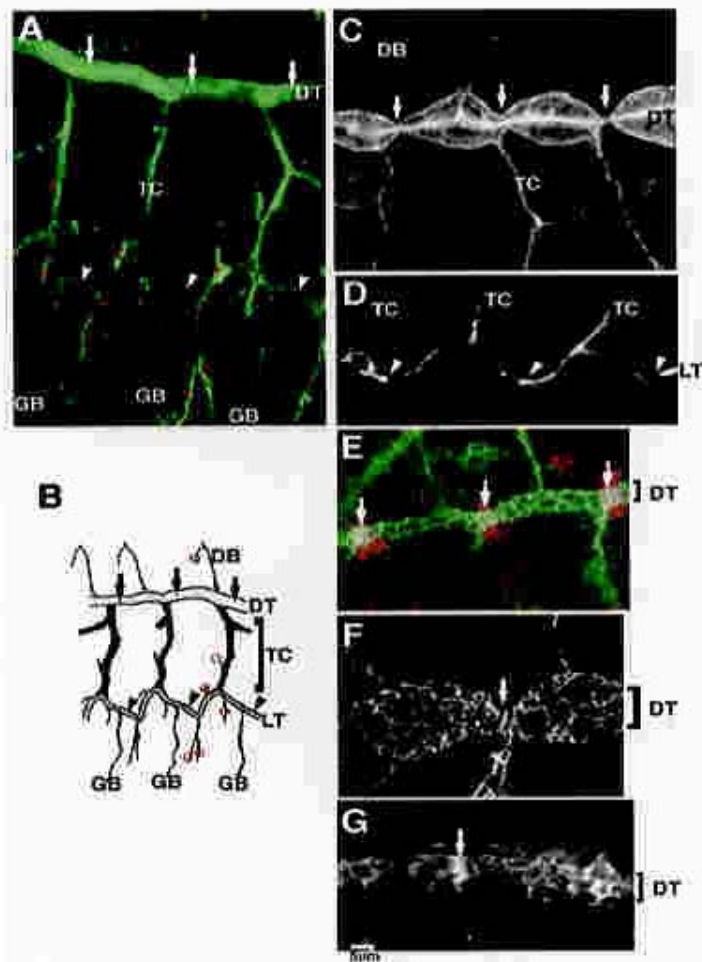


Fig. 19 全ての気管細胞での *Escargot* の強制発現の結果気管融合の異常が現われた。

(A, E) 正常型、(C, D, F) *breathless-GAL4(2nd) / UAS-escargot(3rd)* 胚、(G) *breathless-GAL4(2nd) / UAS- Δ E-cadherin* 胚。(A, C, D,)は 2A12 lumen 抗体染色、Bの模式図では Terminal Branch を伸長させる pruned (DSRF) を発現する細胞を丸で囲む (red)、(E, F, G) Δ E-cadherin 抗体、(E) tip cell (red)、Dorsal Branch (C)、Dorsal Trunk (A, C, E, F)、Ganglionic Branch (A, D) で気管伸長が阻害された。*Escargot* は DSRF を発現する細胞の filopodia の hyper extension を抑制し (A, B, D)、かつ細胞の migration 不全を起こすと考えられた。(G) Δ E-cadherin の強制発現の結果、全ての気管細胞の細胞膜全体に Δ E-cadherin のシグナルが検出されたが気管形成は正常であった。(Dorsal Trunk fusion point を arrows で、Lateral Trunk fusion point を arrowheads で示す。)

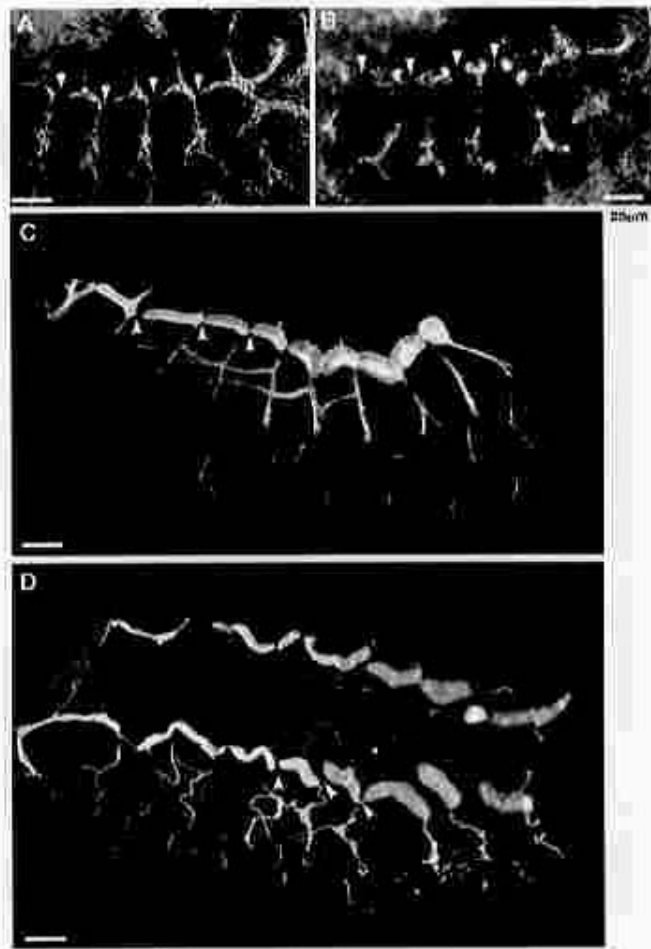


Fig. 20 Rhoファミリー低分子量GTP結合タンパク質を気管細胞で強制発現させた効果。

(A) 正常型 (B) *breathless-GAL4* (2nd) / UAS- *Dcdc42V12* (constitutively active, lineV12. 2) (C) *tip-cell-GAL4* / UAS- *Drac1* (constitutively active, lineV12. 1) (D) *shotgun*²

(A, B) は DE-cadherin 抗体染色 (C, D,) は 2A12 lumen 抗体染色。

(B) では branch の伸長が阻害され、DE-cadherin の局在パターンにも異常が観察される。(C) 融合した branch は観察できない。(fusion point を arrowheads で示す。)

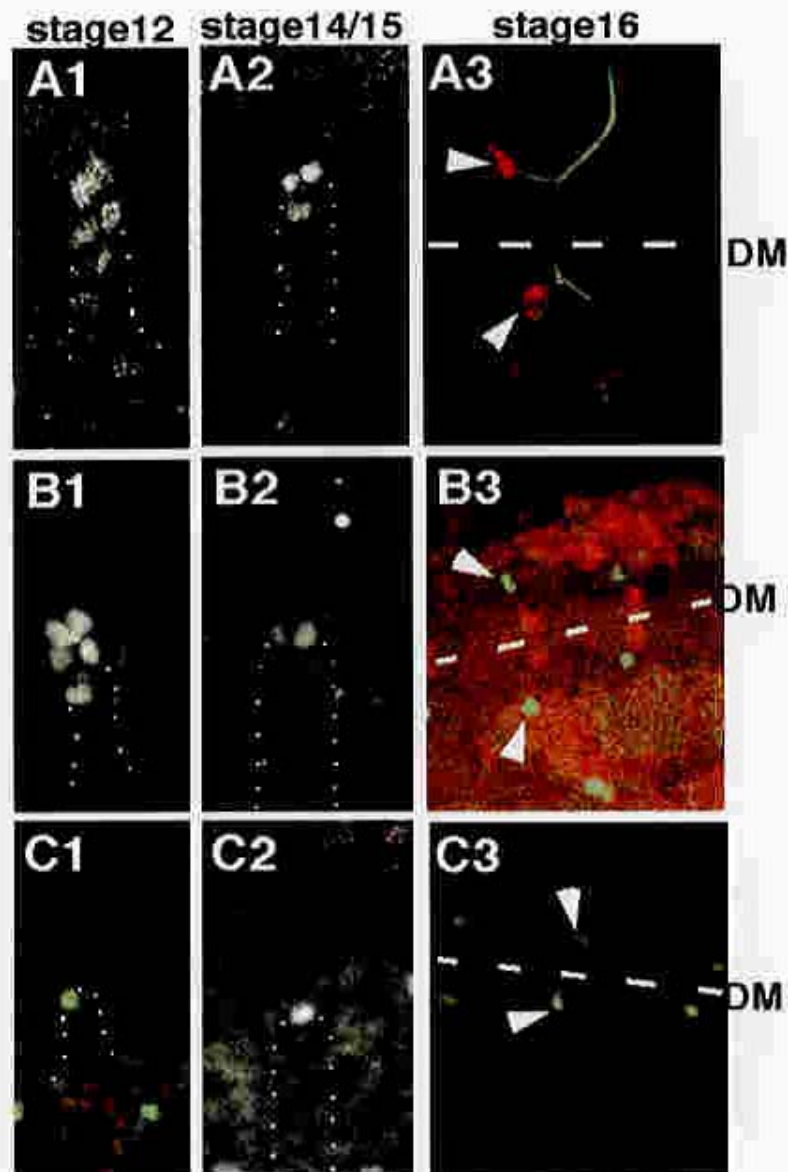


Fig. 21 Dorsal Branchでの *pointed*, *DSRF*, *escargot* の発現パターン。
 (A1-A3) *pointed-lacZ*, *lacZ* 抗体染色 (B1-B3) *DSRF* 抗体染色 (C1-C3) *escargot* 抗体染色を示す。(A3) *pointed-lacZ* (red) を発現している細胞が terminal cell である。(green) 2A12 lumen 抗体染色。
 (B3) *escargot^{GMR}-lacZ* (red) を発現する細胞が tip cell である。*DSRF* 抗体 (green) で terminal cell を標識する。(DM ; Dorsal midline)

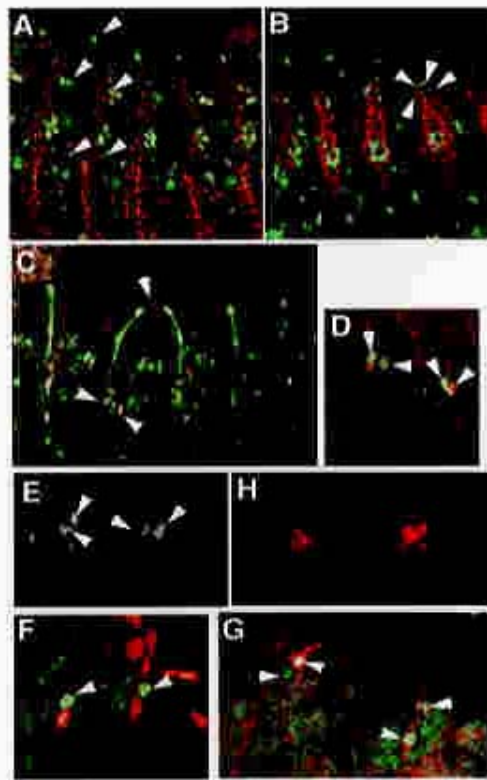
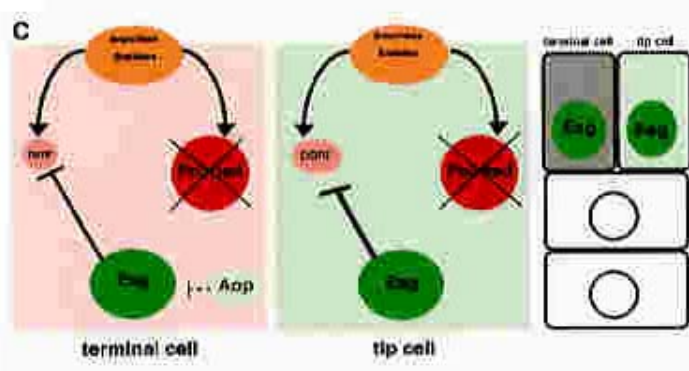
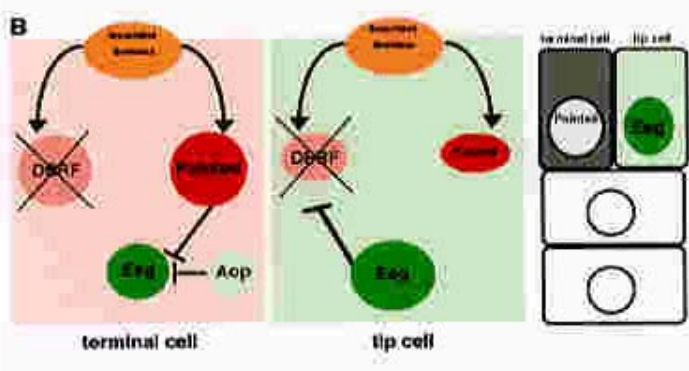
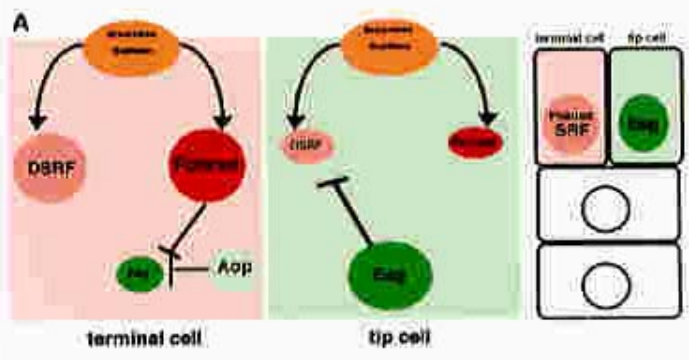


Fig. 22 変異体での遺伝子発現パターンの変化。

(A) 正常胚, *breathless*^{+/Δ10}ヘテロ接合体では全ての気管細胞が *lacZ* によって標識される (red)。Green は *escargot* 抗体染色で認識される tip cell を示す (white arrowheads)。 (B) *breathless*(Δ10)変異体は branch の伸長がおこらない。気管細胞が *lacZ* によって標識される (red)。 *escargot* 抗体染色では dorsal 側で *escargot* を発現する細胞数が増加する (green; white arrowheads)。 (C) *branchless* 変異体の場合も branch の伸長がおこらない。気管の lumen を green で示す。 *escargot* を発現する細胞数は変化しない (red; white arrowheads)。 (D) *pointed*(P1) 変異体は、Dorsal Branch で *escargot* を発現する細胞が増加する (green; *escargot* 抗体染色, red; *pointed-lacZ*; white arrowheads)。 (E) *anterior open*(*van*) 変異体でも Dorsal Branch で *escargot* を発現する細胞が増加する (white arrowheads)。 (F) *escargot*^{COOH}ヘテロ接合体での DSRF 抗体染色では、terminal cell でのみ DSRF が発現する (red; *escargot*^{COOH}, green; DSRF 抗体染色 white arrowheads)。 (G) *escargot*^{COOH}変異体では、tip cell で DSRF が発現する (red; *escargot*^{COOH}, green; DSRF 抗体染色 white arrowheads)。 (H) *escargot*^{COOH}*pruned* (DSRF) 二重変異体。Tip cell の filopodia の伸長は観察されない (tip cell を破線で囲む)。



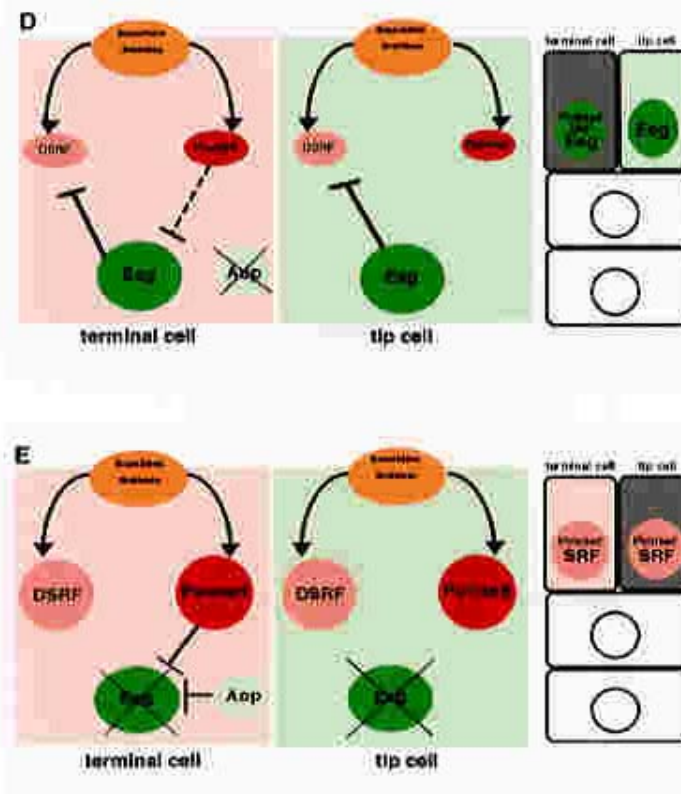


Fig. 23 tip cell と terminal cell での遺伝子発現制御のモデル
 terminal cell では *pointed* と *anterior open (yan)* によって *escargot* の発現が抑制されていると考えられる。