

氏 名 亦 勝 実 穂

学位（専攻分野） 博士(理学)

学 位 記 番 号 総研大甲第330号

学位授与の日付 平成10年3月24日

学位授与の要件 生命科学研究所 遺伝学専攻

学位規則第4条第1項該当

学 位 論 文 題 目 ショウジョウバエ気管形成における転写因子Escargotと
細胞接着分子D E-cadherinの機能解析

論文審査委員 主 査 教 授 廣海 健

教 授 小川 智子

教 授 桂 勲

教 授 嶋本 伸雄

松崎 文雄（国立精神・神経センター）

博士論文の要旨

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が重要な役割を担っている(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を発現する(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の蓋のようにふるまっている。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。

融合する気管のbranchのtip cellでは、*escargot*遺伝子が発現する。*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している(Whiteley et al., 1992; Fuse et al., 1994)。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。

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きた。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

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DE-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ど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の変化を予想させる変化を示し、さらにDE-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。

論文の審査結果の要旨

生物の器官形成過程には、細胞の増殖、移動、形態変化などの複雑なプロセスが関与している。このような細胞現象がいかにして細胞運命の決定とリンクしているかを解明することは、発生生物学の重要な課題のひとつである。ショウジョウバエの気管系では、上皮細胞である気管前駆細胞が体内に移動し、細胞形態変化を行って、複雑な形状をもつ中空のネットワークを作り上げる。気管ネットワーク形成過程において重要なプロセスのひとつは、2本の管の融合である。伸長過程の気管の先端にはtip cellと呼ばれる特殊な細胞があり、気管の認識・融合・貫通の際に、顕著な細胞形態の変化を示す。この細胞ではEscargotと呼ばれる転写因子が発現しており、その働きが気管の融合に必要であることが知られていた。亦勝-田中さんは気管の融合過程におけるescargot遺伝子の機能を出発点にして、気管形成過程において、細胞形態、細胞極性、細胞接着がいかにして制御されているかを解析した。

まず、気管の枝の接触・融合・貫通過程における接着分子DE-cadherinの細胞内分布をコンフォーカル顕微鏡を用いて詳細に観察し、本来adherence junctionに存在するDE-cadherinが気管接触点に集まり、貫通に伴いリング状に再分布することを示した。次に、DE-cadherinをコードするshotgun遺伝子の突然変異個体では気管の枝の融合に異常があること、escargot突然変異個体では、気管の枝が接触してもDE-cadherinの接触点への集積が起こらないことを示した。さらに、shotgun遺伝子のプロモーター融合遺伝子を用いてDE-cadherinがtip cellにおいてEscargotの（直接あるいは間接の）ターゲットであることを証明した。またescargot突然変異個体における気管の融合異常が、DE-cadherinの強制発現で救助できることを示し、遺伝的にもDE-cadherinがescargotの下流で働くことを明らかにした。

気管の枝の融合に際してtip cellは管の先端の丸い細胞から管の途中の中空の細胞へと大きな形態変化を遂げる。亦勝-田中さんは、この過程での膜の極性マーカー蛋白の分布、微小管の分布及びその極性を検討し、気管融合に伴いtip cellではapical-basalの細胞極性が再構成されることを示唆した。さらに、微小管、DE-cadherin、及び気管管腔に分泌される抗原の分布に基づき、微小管の構成・極性の変化がDE-cadherinの接着面への輸送や細胞のapical-basal極性の再構成の原因となっている、というモデルを提唱した。

以上の研究に加え、亦勝-田中さんはtip cellにおいて低分子GTP結合蛋白が細胞運動能に及ぼす影響、及びtip cellでの様々な転写因子遺伝子発現調節機構に関しても実験を行い、興味深い予備的データを得た。

亦勝-田中さんが行ったEscargotによるDE-cadherin発現調節に関する解析は、転写因子が細胞接着・融合を制御する分子機構を解明するための重要な情報を与えた最初の例のひとつであり、既にDevelopmentの論文として発表されている。また、tip cellでのapical-basal極性の変化は細胞生物学的に貴重な記載である。以上の理由で、この論文は博士(理学)の学位論文として十分な内容を持つ、と審査員全員の意見が一致した。