

シヨウジョウパニ Bar ホメオボックス遺伝子  
を中心とする形態形成関与遺伝子の構造・発現制御とその機能

道 上 達 男

①

## 学位論文

ショウジョウバエ *Bar* ホメオボックス遺伝子  
を中心とする形態形成関与遺伝子の  
構造・発現制御とその機能

平成7年3月博士（理学）申請

東京大学大学院理学系研究科  
生物化学専攻

道上 達男

## <目次>

<要旨>.....	(i)
<はじめに>.....	(iv)
第一章　ホメオボックス遺伝子 <i>BarH2</i> の構造・発現・機能と <i>Bar</i> 遺伝子産物の機能ドメイン.....	1
<序>.....	2
<材料と方法>.....	5
<結果>.....	11
<考察>.....	19
第二章 <i>BarH1/BarH2</i> 遺伝子を制御する組織特異的共エンハンサーとその機能.....	24
<序>.....	25
<材料と方法>.....	28
<結果>.....	32
<考察>.....	43
第三章　セグメントポラリティー遺伝子 <i>hedgehog</i> の構造・発現.....	46
<序>.....	47
<材料と方法>.....	49
<結果>.....	51
<考察>.....	56
<参考文献>.....	58
<論文発表>.....	66
<謝辞>.....	67
<図表>.....	68

## <要旨>

キイロショウジョウバエ *Drosophila melanogaster* の複眼は、約800個の個眼から成り立っている。*Bar*変異は、個眼数が減少し、その結果複眼の形態が棒状に細くなる変異である(Tice, 1914)。*BarH1*遺伝子は、*Bar*変異の原因遺伝子として単離された(Kojima et al. 1991)。*BarH1*遺伝子はホメオドメインを含む蛋白質をコードしており、複眼原基の光受容細胞前駆体R1/R6や胚期中枢神経系、末梢神経系で発現していることから、*BarH1*遺伝子は複眼や神経の分化に関わっていると考えられる(Higashijima et al. 1992a, Higashijima et al. 1992b)。サザン解析の結果から、*BarH1*ホメオボックスと相同性の高い領域が染色体DNA上の他のlocusにも存在することが推定された。そこでこれを含む仮想的な遺伝子を*BarH2*と名付け、*BarH1*との関係を明らかにするために、*BarH2*に対応するゲノムクローン及びcDNAクローンを単離し、それらの塩基配列を決定した(第一章)。

*BarH2*遺伝子は、アミノ酸配列上*BarH1*蛋白質と類似したホメオドメインを持つ蛋白質をコードしていることが分かった。60アミノ酸残基からなるホメオドメインのアミノ酸配列を*BarH1*、*BarH2*間で比較すると、DNAのmajor grooveと接触すると考えられているヘリックス3(Kissinger et al. 1990)を含め、56アミノ酸が同一であった。このことは、*BarH1*蛋白質と*BarH2*蛋白質が同じターゲットDNA配列を識別し、結合することを示唆している。*BarH1*遺伝子と同様、*BarH2*遺伝子は3つのエクソンからなり、エクソン-イントロンの境界構造(エクソンのコードするアミノ酸配列を基にして考える)も*BarH1*と対応していた。従って、*BarH1*と*BarH2*は進化の過程で遺伝子重複によって生じた一対のホメオボックス遺伝子であると考えられる。

*BarH1*蛋白質を三齢幼虫期に過剰発現させると、成虫の複眼の個眼数が*Bar*変異体のように減少する(Kojima et al. 1993)。そこで、*BarH2*蛋白質を三齢幼虫期に過剰発現させ、その効果を調べた(第一章)。その結果、*BarH2*蛋白質の過剰発現によっても成虫複眼の個眼数の減少が生じることが分かった。別の実験で、*BarH1*と*BarH2*は正常なシステムにおいても機能的にredundantであることが示されている(Higashijima et al. 1992b)。*BarH1/BarH2*蛋白質の共通機能ドメインを更に明確に特定するために、*D. melanogaster*の近縁種である

*Drosophila ananassae*における*BarH2*のcounterpartを単離し、コーディング領域の塩基配列を決定した(第一章)。なお、*BarH1*のcounterpart (Om(1D))の構造は既に知られている(Kojima et al.1991)。*D.melanogaster*の*BarH1*と*BarH2*、及びそれぞれの*D.ananassae*のcounterpart、合計4つの遺伝子のコードするホメオドメイン蛋白質のアミノ酸配列を比較した(第一章)。N末端付近の約16アミノ酸からなる小領域を別にすると、ホメオドメインとその下流の約65アミノ酸からなるストレッチが高い相同性を示した。また、ホメオドメインの直ぐ上流及び蛋白質のC末端付近には中性条件下でプラス、あるいはマイナスに荷電しているアミノ酸に富む領域が存在していた。種々の欠失*BarH1*蛋白質をコードする改変遺伝子を作製し、形質導入体をつくり過剰発現させ、複眼形態形成に及ぼす影響を調べた(第一章)。以下の2つの点が明らかになった。(1)ホメオドメインは、過剰発現による複眼異常の誘発に必須である。(2)荷電に富む領域は、不要である。

*BarH1*と*BarH2*遺伝子は染色体DNA上で約80kb離れて存在し、ある種の遺伝子コンプレックスを形成している(Higashijima et al.1992a)。抗*BarH1*抗体と抗*BarH2*抗体を用いた実験により、調べられた全ての発現細胞において*BarH1*と*BarH2*が共発現していることが知られている(Higashijima et al.1992a)。*BarH1*、*BarH2*間で逆位を起している変異体を用いた解析から、両遺伝子の共発現は、*BarH1*、*BarH2*遺伝子間に存在する共通のエンハンサーによって制御されている可能性が大きいことが示唆された(小嶋、修士論文)。本研究では、これらの共エンハンサーが実際に存在するの否か、もし存在しているとするほどどこに存在しているのかを調べた。*BarH1*と*BarH2*間のゲノムDNAを断片化し、各断片のエンハンサー活性を調べた(第二章)。エンハンサーアッセイに用いるためのP因子ベクターは、レポーター遺伝子として*lacZ*遺伝子を、またプロモーター配列として*BarH1*のプロモーター近傍断片を用いた。完成したベクターに、*Bar*領域のDNA断片を連結し、ショウジョウバエに戻して形質転換体を得た。得られた形質転換体の胚、及び三齢幼虫成虫原基をX-galの活性染色、あるいは抗*LacZ*抗体による抗体染色を行った。その結果、抗*BarH1*/*BarH2*抗体による実験から予測されたほとんど全ての*Bar*エンハンサーを単離・同定する事が出来た(第二章)。

エンハンサーアッセイを行う過程で、行動異常を引き起こす*BarH2*欠損株、*Df(1)BH2*株に注目した。*Df(1)BH2*株では、欠失のセントロメア側の断点が

*BarH2*遺伝子の近傍にあり、*BarH2*とその周辺配列が欠損している。ただし *BarH1*遺伝子の欠損はない。*BarH1*遺伝子と*BarH2*遺伝子の互いに機能的な redundancyを考慮すると、*Df(1)BH2*株ハエの行動異常は*BarH1/BarH2*共エンハンサーの欠損によると推察された。そこで、*BarH2*遺伝子と共に*BarH2*の近傍約8kbの断片をP因子法により*Df(1)BH2*株に導入し、成虫の行動を観察した(第二章)。エンハンサー導入株では行動異常が回復したが、*BarH2*ミニ遺伝子のみ導入株では行動異常の回復は見られなかった。従って、*Df(1)BH2*株の行動異常は、*Bar*共エンハンサーの部分欠失による*Bar*欠損変異であることが示唆される。上述のように個体レベルのエンハンサーアッセイ系が既に確立しているので、成虫脳での*BarH1/BarH2*の発現を調べることで、行動異常をつかさどる神経細胞の特定が可能となるかもしれない。

ショウジョウバエのセグメントポラリティー遺伝子*hedgehog*は胚及び成虫原基の前後方向の極性を決め、また三齢幼虫肢原基での*BarH1*、*BarH2*遺伝子の発現を調節していることが示唆されている(Kojima et al. 論文準備中)。そこで本研究の第三章では*hedgehog*の構造解析を行った(第三章)。*hedgehog*遺伝子付近にP因子が挿入したエンハンサートラップラインを用いてP因子近傍のゲノム断片をクローニングし、次いで対応するcDNAクローンを得た。全塩基配列を決定した結果、*hedgehog*はシグナルペプチドを含む471アミノ酸から成る蛋白質をコードしていることが明らかになり、*hedgehog*蛋白質が分泌性蛋白質として機能していることが示唆された。*hedgehog*のアンチセンスRNAを用いて*in situ* hybridizationを行った結果、予想通り胚期及び複眼原基の後部区画特異的に発現していた。今後、*hedgehog*蛋白質の機能と*Bar*の発現との関連について、より詳細な知見が得られることと期待される。

## <はじめに>

ある一つの遺伝子が決められた細胞内で発現するには、(1)まずそれぞれの細胞がある信号を受け取るにより位置情報を獲得し、(2)次にその信号が細胞内を伝わり、(3)対応する遺伝子に働きかけて発現を促す、というステップが必要であると思われる。位置情報決定についての解析の一つとして、ショウジョウバエの初期胚の形態形成が挙げられる (review; St Johnston and Nusslein-Volhard. 1992)。ショウジョウバエ初期胚の形態形成は、*bicoid* 遺伝子を始めとする *coordinate* 遺伝子産物が濃度勾配を形成することにより胚の前後軸、背腹軸が決定されることから始まる。次に、*segmentation* 遺伝子が前後/背腹軸に従ってある繰り返しパターンで発現することにより、胚の分節化が起こる。さらに *homeotic* 遺伝子が各体節で異なる発現を示す結果、各体節は特徴づけられる。このような一連のステップを経ることによって、胚の各細胞はそれぞれ位置情報を獲得する。位置情報決定は、初期胚だけではなく三齢幼虫期の成虫原基をはじめ、様々な領域でおこなうことが知られている。

次に、位置情報を獲得した細胞は、受け取った信号をそれぞれの細胞内に伝達する。ショウジョウバエの複眼分化に関するシグナル伝達の経路はその例である。ショウジョウバエの複眼は約800個の個眼から成り立っており (Ready et al. 1976; 図1A)、それぞれの個眼は8個の光受容細胞(R1~R8)を含んでいる(図1B)。このうち光受容細胞R7の分化に関して遺伝子産物カスケードが徐々に明らかになってきた(図2)。それによると、R7細胞の分化はまず受容体型チロシンキナーゼ遺伝子 *sevenless* (*sev*) が、隣接する R8 cell で発現する *bride of sevenless* (*boss*) 遺伝子産物を受けとめることによって始まる。*sev* 遺伝子産物を発端にし、図2に示すような遺伝子産物カスケードを経ることにより R7 細胞内で信号が次々と伝えられる。

以上のように細胞の個性が決定し、シグナルが伝えられることによって様々な遺伝子が発現する。異なる個性をもつ細胞では発現する遺伝子の種類も異なると思われる。ところが、一部を除く全ての細胞は恐らく同一の遺伝情報を備えている。従って、遺伝子発現に共通なメカニズムだけでは遺伝子発現の細胞特異性を説明することが出来ない。しかし、ある発現制御因子に特異的に応答

する遺伝子側の発現調節領域“エンハンサー”が発見された(Banerji et al.1981)。エンハンサーが存在することによって、発現制御因子の有無に依存して遺伝子発現を細胞ごとにそれぞれ規定することが可能なため、遺伝子は細胞特異性に発現することが出来る。

さらに、多くの異なる細胞で同一の遺伝子が発現する例がショウジョウバエの中で見出される。異なる位置情報を有する細胞で同じ遺伝子の発現が制御されるためには、エンハンサーの数が一つでは不都合であると思われる。この不都合は、それぞれの細胞に対応するエンハンサー（細胞特異的エンハンサー）が別々に存在することによって解消される。

エンハンサーの働きにより、それぞれの細胞で必要な遺伝子が発現し、その結果、様々な機能を持つタンパク質が作られる。これらの中には他の遺伝子発現に関わる転写制御因子も含まれる。ホメオドメインタンパク質、zinc-fingerタンパク質、helix-loop-helixタンパク質、leucine zipperタンパク質をはじめ、多くの転写制御因子が現在知られている。こうした転写制御因子が存在することによって、ある遺伝子が他の遺伝子、あるいは自分自身ををコントロールすることが可能になる。

本研究で解析したショウジョウバエの遺伝子*BarH1*と*BarH2*はホメオドメイン蛋白をコードしていることが構造解析の結果から示唆された。従って、*BarH1/BarH2*は他の遺伝子発現の調節に関わっていることが想像される。また、*BarH1/BarH2*に特異的な抗体を用いた解析から、*BarH1/BarH2*は様々な領域で発現していることが明らかになった (Higashijima et al.1992a)。よって、*BarH1/BarH2*遺伝子は一群の組織特異的なエンハンサーによって発現制御を受けていることが想像され、本研究の結果から実際に一群の組織特異的エンハンサーが存在していることが示唆された。さらに、本研究の結果、*BarH1/BarH2*が本来発現していない細胞での発現に関するエンハンサー（ectopicエンハンサー）の存在を示唆するデータを得た。これらの結果を考えると、*BarH1/BarH2*を解析することによって、ある位置情報を得た細胞内で、多様かつ複雑なエンハンサーが遺伝子の発現をどのようなメカニズムで制御し、また発現した遺伝子産物がどのようなメカニズムで他の遺伝子の発現を制御しているか、という問題を考えるモデルケースとなりうると思われる。



## 第一章

### ホメオボックス遺伝子*BarH2*の構造・ 発現・機能と*Bar*遺伝子産物の機能ドメイン

## <序>

*Bar* (*B*) は、キイロショウジョウバエ *Drosophila melanogaster* において成虫の個眼数が減少し、複眼がちょうど棒状のような形態をとる突然変異体である (Tice, 1914)。*Bar* 領域は遺伝学的解析から第一染色体 16A locus にマップされている。*B* 変異は、16A1 から 16A7 領域が染色体上で重複しているために引き起こされる変異であることが示唆されている (Bridge 1936, Satton 1943)。*B* 変異よりさらに強い表現型を示す *Bar+Bar* (*BB*) などを含めると現在までに 40 種類以上の *Bar* 関連変異体が単離されている。

*Drosophila ananassae* において、*B* 変異と同様の複眼の奇形を引き起こす一群の変異である *Om* 変異が知られている。*Om* 変異は調べられた限り、トランスポゾン *tom* の挿入に起因した変異である (Shrimpton et al. 1986)。*BarH1* 遺伝子は、当初 *D. ananassae* の *Om* (*1D*) 遺伝子の *D. melanogaster* における counterpart として単離された (Kojima et al. 1991)。唾腺染色体に対する *in situ* hybridization の結果、*BarH1* 遺伝子は 16A locus に位置し、*Bar* 変異で重複し、RNA 発現量が *B* 変異体で上昇していた。また、三齢幼虫期に外来 *BarH1* ミニ遺伝子を過剰発現させると *Bar* 変異様の複眼異常を起こすことが示された (Kojima et al. 1993)。また後述するように、*Bar* 遺伝子は発生分化の鍵をなす一種のホメオドメイン蛋白質をコードしており (Kojima et al. 1991、第一章参照)、更に全ての *Bar* 変異は *BarH1* と、そのホモログ *BarH2* の間約 80kb の間に染色体再編変異を伴っていた (Higashijima et al. 1992a、一章参照)。以上の結果を基に、*BarH1* 遺伝子は、*Bar* 変異の原因遺伝子であると推察されている (Kojima et al. 1991)。

*BarH1* 遺伝子はホメオドメインを含む 543 アミノ酸からなる蛋白質をコードしている (Kojima et al. 1991)。また、抗 *BarH1* 抗体を用いた解析から、*BarH1* 蛋白質は複眼原基上の光受容細胞前駆体 R1/R6 で特異的に発現しており、モザイク解析の結果から *BarH1* は R1/R6 の分化に必要であることも示されている

(Higashijima et al. 1992a)。更に、*BarH1* は複眼の形態形成に重要な役割を持つと示唆された。また *BarH1* は初期胚の中枢神経系及び末梢神経系を始め、他の様々な領域の細胞でも発現し、ある細胞では機能的な要求性も示されているので

(Higashijima et al.1992b)、細胞の分化に広く関わっている遺伝子かもしれない。

*BarH1*遺伝子のホメオボックス部分約0.2kbの断片 (KE81、図3bの断片A) をプローブにしてショウジョウバエのゲノムDNAの *Hind*III, *Eco*RI, *Bam*HI切断産物に対して弱い条件 (<材料と方法>参照) でサザンプロットを行うと、いずれの場合にも *BarH1*に対応する濃いバンド以外にもう一カ所薄いバンドが検出される (図3a矢印)。このことから、*D.melanogaster*には *BarH1*と相同性の高いホメオボックスを持つ配列が少なくとももう一つ存在していると推定された

(Higashijima et al.1992a)。KE81断片をプローブとし、ショウジョウバエゲノムライブラリーをスクリーニングした結果、*BarH1*領域と明らかに制限酵素地図の異なるゲノムDNAクローン、 $\lambda$ SF6と $\lambda$ SF9が単離された (図3c参照)。KE81断片をプローブとし、得られたゲノムDNAクローンをサザン解析したところ、*BarH1*ホメオボックスと高い相同性を示す部分があり、塩基配列の結果もこれを支持した (Higashijima et al.1992a)。このホメオボックス類似配列を含む仮想的な遺伝子を *BarH2*と名付けた。*BarH1*は細胞分化に広く関わる遺伝子であると推察されることから、もし *BarH2*遺伝子が存在すれば、*BarH2*もまた細胞分化に関わる遺伝子であろうと想像された。また、*BarH1*蛋白質が機能を果たすとき、類似遺伝子産物 (*BarH2*蛋白質) は *BarH1*と何らかの相互作用をするかもしれないと考えた。この仮定が正しければ、*BarH1*の機能について解析する上で *BarH2*の単離・解析は必須である。そこで、実際このような遺伝子が存在するの否か、もし存在するならどのような構造を持っているか調べるため、この章ではまずcDNAクローンの単離を試みた。

その結果 *BarH2*のcDNAクローンが得られ、*BarH2*は実際に存在していることが明らかになった (<結果参照>)。得られたcDNAクローンと対応するゲノムDNAクローンの塩基配列の解析の結果、*BarH1*と相同性の高いホメオドメインをコードしている点を初め、*BarH1*との構造上の共通点が見いだされた。また、*BarH2*蛋白質の過剰発現による影響を調べた結果、*BarH1*蛋白質と同様の影響を引き起こすことが分かった。*BarH1*蛋白質や *BarH2*蛋白質を過剰発現することによる影響の同一性が、それぞれの蛋白質のどのアミノ酸領域に由来するかを明らかにするために、第二段階として *D.melanogaster*の *BarH1*と *BarH2*とそれぞれの *D.ananassae*の counterpartがコードするアミノ酸配列を再検討し、*Bar*遺伝

子が機能するために必要な領域はどこか、過剰発現系を用いて解析することによってBarH1/BarH2蛋白質の機能共通ドメインの特定を試みた。

#### 材料と方法

酵母細胞を200mlの液体培養液に培養し、細胞を収穫し、細胞を破砕し、抽出液を調製した。

1. 細胞培養と抽出液調製: *S. cerevisiae* 細胞をYPD培地で200mlの液体培養液に培養し、細胞を収穫し、細胞を破砕し、抽出液を調製した。

2. 過剰発現系を用いた解析: 過剰発現系を用いて、BarH1/BarH2蛋白質の機能共通ドメインの特定を試みた。

3. 結果と考察: 過剰発現系を用いて、BarH1/BarH2蛋白質の機能共通ドメインの特定を試みた。

4. 結論: 過剰発現系を用いて、BarH1/BarH2蛋白質の機能共通ドメインの特定を試みた。

5. 参考文献: 過剰発現系を用いて、BarH1/BarH2蛋白質の機能共通ドメインの特定を試みた。

#### 結果と考察

##### 1. 過剰発現系を用いた解析

##### 2. 結果と考察

1. 過剰発現系を用いた解析: 過剰発現系を用いて、BarH1/BarH2蛋白質の機能共通ドメインの特定を試みた。

2. 結果と考察: 過剰発現系を用いて、BarH1/BarH2蛋白質の機能共通ドメインの特定を試みた。

3. 結論: 過剰発現系を用いて、BarH1/BarH2蛋白質の機能共通ドメインの特定を試みた。

4. 参考文献: 過剰発現系を用いて、BarH1/BarH2蛋白質の機能共通ドメインの特定を試みた。

5. 結論: 過剰発現系を用いて、BarH1/BarH2蛋白質の機能共通ドメインの特定を試みた。

##### 結論

過剰発現系を用いて、BarH1/BarH2蛋白質の機能共通ドメインの特定を試みた。

## <材料と方法>

### 使用したショウジョウバエ株

掛け合わせなどの一般的な方法はDrosophila: A laboratory manual (Ashburner, 1989)などに従った。

1. 野生株として、*Canton-S*を使用した。
2. P因子ベクターを導入するためのショウジョウバエ株として、選択マーカーにrosy断片を用いた場合には $ry^{506}$ 株、選択マーカーにvermilion断片を用いた場合には $v^{36f}; ry^{506}$ 株を用いた (<結果>参照)。
3. コンストラクトが挿入した染色体をホモに持つ株を作製するために、 $N^8/ FM7, CyO/ Sco, ry^{506}, Sb TM3 ry^{506}/ rfl0$  (以上選択マーカーにrosy断片を用いた場合)、 $N/ FM7, v^{36f}, CyO/ Sco, ry^{506}, v^{36f}; Sb TM3 ry^{506}/ rfl0$  (以上選択マーカーにvermilion断片を用いた場合) を使用した。

### 使用した大腸菌株とDNA

(A) 使用した大腸菌株は、

#### 1. プラスミド保持菌として

JM83	$F^+, ara, \Delta(lac-proAB), rpsL(\phi 80 lac\Delta M15)$
DH5 $\alpha$	$supE44, \Delta lacU169(\phi 80 lac\Delta M15) hsdR17, recA1, endA1, gyrA96, thi-1, relA1$
GM48	$F^-, thr, leu, thi, lacY, galK, galT, ara, fhuA, tsx, dam, dcm, supE44$
2. ファージの支持菌として	
LE392	$supE44, supF58, hsdR514, galK2, metB1, trpR55, lacY1$
C600hfl	$F^-, e14(mcrA^-), hsdR, supE44, thr-1, leuB6, thi-1, lacY1, fhuA21$

を用いた。

(B) スクリーニングには以下のファージライブラリーを使用した。

*D.melanogaster* genomic library(EMBL-3)  
*D.ananassae* genomic library(EMBL-4)  
*D.melanogaster* cDNA library( $\lambda$ -gt10,pupal stage)

- (C) クローニング用プラスミドベクターには、  
pUC18/19、pBluescriptIIISK<sup>+</sup>及びKS<sup>+</sup>(Stratagene社)を用いた。
- (D) 使用したP因子ベクターは、  
1.Carnegie20 ;これらは選択マーカーとして*rosy*遺伝子断片を持つ  
(Rubin and Spradling,1983)。  
2.pYC1.8 (Dr.Searlesより分与) ;選択マーカーとして*vermilion*遺伝子を持つ  
(Fridell and Searles,1991、Seales et al.1990も参照)。
- (E) ショウジョウバエの全ゲノムDNAは、Canton-Sの全ゲノムを用いた。

#### 実験全般に使用したDNAと遺伝子工学的な手法

用いた酵素は T4 DNA ligase、T4 polymerase、Klenow fragment、T4 polynucleotide kinase、Mung bean nuclease、ExoIII (以上東洋紡績社製)である。また、制限酵素は、宝酒造社、東洋紡績社、New England Biolab社のものを主に使用した。

制限酵素反応、ライゲーション反応を始めとする基本的な手順はすべてMolecular Cloning(Sambrook,1989)に従った。E.coliへのプラスミド導入は、通常CaCl<sub>2</sub>法で行った。非常に塩基数の長いプラスミド(~20kbp以上)の導入にはBio-lad社のGene Palserを使用し、エレクトロポレーション法によってプラスミド導入を行った。

DNAに対するハイブリダイゼーション(サザンプロット、ブランクハイブリダイゼーション、コロニーハイブリダイゼーション)

プロットング実験の基本的な手順はMolecular Cloning(Sambrook,1989)に従った。

フィルターへDNA、ブランク、あるいはコロニーをトランスファーする方法は、Molecular Cloning(Sambrook,1989)の方法、及び使用フィルターの添付マニュアルに従った。プローブDNAの $P^{32}$ 標識は、Dupont社のHybridization probes labelling systems、及びICN社の $\alpha$ - $P^{32}$ -dCTPを使用し、37℃で3時間反応後、セファデックスG-50(Pharmacia社)を用い未反応の $P^{32}$ -dCTPを分離することによってラベル化されたプローブを精製した。ナイロンメンブレンはアマーシャム社のHybond-Nを使用した。ハイブリダイゼーション溶液は

1M NaCl  
10mM EDTA  
50mM Tris-HCl(pH8.0)  
1×Denhardt solution  
0.2% SDS  
0.1% herring sperm DNA

の組成の溶液を使用し、65℃で1昼夜反応した。反応後のフィルターを、

- 1) 弱い条件→50℃の2×SSC、0.1%SDS溶液で数時間洗った。
- 2) 強い条件→65℃の0.1×SSC、0.1%SDS溶液で数時間洗った。

ハイブリダイズするDNAの $T_m$ 値はホモロジーが1%低下するごとに1-1.5℃下がる。 $T_m$ 値の計算式は

$$T_m(^{\circ}C) = 81.5 + 16.6(\log_{10}[Na^{+}]) + 0.41 \times (\% \text{ GC content}) - 0.63 \times (\% \text{ formamide conc}) - 600/(\text{bp probe length})$$

で表され、この式に上記の条件を当てはめると、強い条件では約80%以上の、弱い条件では約60%以上のホモロジーを示すDNAをそれぞれ検出することが可能であると思われる。

これをオートラジオグラフィ（富士フイルム社のmedical X-ray filmを使用）、あるいは富士フイルム社のバイオイメージングシステムBAS-2000を使用することによって結果を得た。

#### DNAシーケンシング

手順はMolecular Cloning(Sambrook,1989)の方法に従った。反応にはTakara社の

BcaBest sequencing kit、及び $\alpha$ -P<sup>32</sup>-dCTPを用いた。

シーケンスプライマーとしてM13-M4プライマー及びRVプライマー、T3/T7プライマーを用いた。また、必要に応じてBiosearch社のCyclone DNA synthesizerを用いて作製した合成DNAをプライマーとして使用した。得られたシーケンスデータの解析はBeckmann社のMicrogenieなどを用いて行った。また、ホモロジー解析は東京大学医科学研究所・ゲノム解析センターのスーパーコンピューター内アプリケーション、FASTA及びBLASTを使用して行った。

### RNAに対するハイブリダイゼーション

ショウジョウバエのtotal RNA抽出はGTC法を用いて行った。粉末にしたサンプルを5.5MGTCに溶解し、5.7M CsClに重層した上で36000rpm, 14hr遠心した。これによってRNAをDNAから分離した上でフェノール処理、エタノール沈殿によりtotal RNAを回収した。得たRNAはoligo(dT)セルロースによってpoly(A)<sup>+</sup>画分を抽出した。また、少量のmRNA抽出にはpharmacia社のQuickprep mRNA micro purification kitを用いた。得たmRNAは定量後、約5~20 $\mu$ gをホルマリン-アガロースゲル/MOPSに泳動し、ナイロンメンブレンにトランスファーした。以降の操作はサザンプロットと全く同じである。

変性ゲルは、	1×	MOPS buffer
	1%	Agarose
	16.2%	formaldehyde

を用いた。

### Primer extension実験

テンプレートはRNAプロットの場合と同じ方法で単離したtotal RNAを100 $\mu$ g用いた。プライマーは、Biosearch社のCyclone DNA synthesizerによって合成し、これをT4 polynucleotide kinase、および $\gamma$ -P<sup>32</sup>-ATPによって5'末端標識したものを



20000cpm分用いた。これらを、hybridization buffer中で45℃、一昼夜アニーリングした。エタノール沈殿後、逆転写酵素（Life science社製）で1時間、37℃反応させ、フェノール処理、エタノール沈殿後、アクリルアミドゲルで泳動した。

hybridization buffer:	40mM	PIPES(pH8.0)
	1mM	EDTA
	0.4M	NaCl
	80%	formamide
reverse transcriptase buffer:	50mM	Tris-HCl(pH7.5)
	60mM	KCl
	10mM	MgCl <sub>2</sub>
	1mM	each dNTP
	1mM	DTT

#### 唾腺染色体に対するハイブリダイゼーション

プローブはプラスミドから切り出した二本鎖DNAをBoehringer-Mannheim社のキットを用いて非RIラベル（ディゴキシジェニンを付加したUTPを使用）した。野生株の三齢幼虫期の頭部を解剖して得た唾腺を酢酸処理、固定、エタノール脱水し、その後プローブを混ぜたhybridization solutionに浸し、42℃で一昼夜置く。2×SSC、37℃で洗浄後、抗dig抗体中で抗体反応させ、洗浄後アルカリフォスファターゼの発色反応によりバンドを検出した。得られたサンプルは位相差顕微鏡下で観察した。

#### 抗体を用いた成虫原基の染色

この実験で用いた抗体は以下のものである。

Rabbit anti-BarH1 antibody

当研究室で作製

Rabbit anti-BarH2 antibody  
Goat biotininated anti-Rabbit IgG  
Vectastain ABC-HRP kit

当研究室で作製  
Vector 社製  
Vector 社製

PBS中で解剖して得た成虫原基を、4% paraformaldehyde/PBSで20分間固定する。0.2% Nonidet P-40/PBSによって浸透化したのち、抗体反応を (a) と同様の方法で行った。ただし、基本となる溶液はPBTではなく、0.01%サポニン/PBSを使用した。

### マイクロインジェクション

インジェクターは、成茂化学機械のマイクロマニピレーターシステム及びニコン倒立顕微鏡システムを使用した。産卵後30分以内のショウジョウバエ胚 (v,ry株、あるいはry株) を採取し、両面テープ上に50個程度整列した。整列した胚の後端部に、DNA溶液を超細ガラス管を用いて注入した。注入したDNA溶液は、

コンストラクトDNA	200~700 $\mu$ g/ml
ヘルパーDNA (prt25.7wcまたはpUChs $\Delta$ 2-3)	50~200 $\mu$ g/ml
1 $\times$ injection buffer (10 $\times$ :0.1mM NaHPO <sub>4</sub> ,5mM KCl / pH6.8)	

である。注入が済んだ胚は、25 $^{\circ}$ Cの高湿度に保たれたインキュベーター中で生育させた。成虫になった時点で、1匹ずつ別々に掛け合わせ (図53に掛け合わせの方法)、その子供の中からコンストラクト導入株を、目の色を指標にして選択した。得られた導入株は、バランス保持株 (前述) と掛け合わせ、安定化させた。

## <結果>

### *BarH2*遺伝子の構造解析

図3(b)の断片A、及び図3(c)の断片Cをプローブに用い、胚期および蛹期のmRNA由来のcDNAライブラリーをスクリーニングした。Aをプローブに使用した場合は*BarH1*のcDNAクローン1種と*BarH1*と異なるcDNAクローン3種が得られ、C断片をプローブにした場合は1つのcDNAクローンが得られた。得られた4種類の*BarH1*と異なるcDNAクローンを図4Aに示す。図のとおり、これらは全て*BarH2*に対応するcDNAと考えられた。PBH-1とBHM1-4の挿入断片の合計は3.15kbであり、ノーゼン解析の結果から推定された*BarH2*のmRNAの長さ約3.8kbよりも短かった(図10a)。PBH-1とBHM1-4についてサブクローンのシリーズを作製し(図4B)、全塩基配列を決定した。作製したサブクローンのうち、とぎれている部分(図4B矢尻)については、別のcDNAクローンまたはゲノムDNAクローンの塩基配列の結果と比較することによって確認した(図4b点線で示した矢印)。また、PBH-1及び*BarH1*のcDNAクローンをプローブにしてASF6(*BarH2*のゲノムDNAクローン)、および別途単離されているゲノムDNAクローン、GBH2-4とGBH2-8に対してサザンプロットを行ない、cDNAクローンの大まかな位置をゲノムDNAクローン上に決定した上で、cDNAクローンに対応する部分とその5'側及び3'側近傍のゲノムDNAクローンの塩基配列を決定した(図4c)。

1) cDNAクローンBHM1-4の3'側にはpoly(A)が見いだされたことから、*BarH2*mRNAの3'末端から約3.15kbのmRNA情報がcDNAとして回収されていることが分かった。次に、図5の1と2に対応する合成プライマーを作製し、野生株由来のmRNAを用いてプライマー伸長実験を行った。1のプライマーでは0.5kb以上1kb以下、2のプライマーでは約360塩基の長さのバンドをそれぞれ検出した(図5b)。これらの結果から*BarH2*mRNAは、cDNAクローンの5'末端約650塩基上流から転写されることが推定された。予想されるRNA start site(図5aの3)の塩基配列AATCTACTは、ショウジョウバエのRNA start siteのコンセンサス配列ATCA(G/T)T(C/T)(Hultmark et al.1986)と下線で示すように7塩基中4塩基が一

致しており、その上流28-34塩基付近にはTATA様配列TATATTAが存在していることから(図5aの3)、ここを*BarH2*遺伝子の転写開始点と推定した(図5a,b)。推定した転写開始点の位置から計算した*BarH2*のmRNAの長さは3.8kbであり、後述するノーザン解析の結果と矛盾しない。

2) cDNAクローン、ゲノムクロンの塩基配列を比較した結果、*BarH2*遺伝子は少なくとも3つのエクソンから構成されていることが示唆された(図6a)。各エクソンはそれぞれ、約9kb,1.6kbのイントロンによって分断されていた。図6bに示すように、*BarH2*と*BarH1*のエクソン-イントロンのjunction付近の塩基配列及び予想アミノ酸配列を比較した結果、*BarH2*のイントロン-エクソンjunctionの位置は2箇所とも*BarH1*と同一の場所であることが分かった。これらのことは、*BarH1*と*BarH2*が進化上、遺伝子重複によって生じたことを示唆している。

3) 得られたcDNAクローンは長いORFを含んでいた。最も5'側にあるMetコドン(図5cの969-971番目の塩基)の9-7塩基上流にはin flameで終止コドンが存在していた(図5cの\*印)。上記のMetコドンの下流には2つのMetコドン(図6、978-980と990-992)が存在していた。ショウジョウバエの翻訳開始点付近のコンセンサス配列、(C/A)AA(A/C)ATG (Cavener,1987)とこれら3つのMetコドン付近の塩基配列(順にACACATG、CACAATG、GGAAATG)を比較すると、1番目と2番目はATG以外の4塩基中3塩基が一致していた。一方、3番目は4塩基中2塩基しか一致していなかった。他のin flameのATGの5'側4塩基を調べたところ、3塩基以上一致しているMetコドンは*BarH2*の中で1つも見出されなかった。よって、cDNAがコードする*BarH2*遺伝子の翻訳開始点は1番目か2番目のMetコドンであると示唆され、*BarH2*は645アミノ酸、または643アミノ酸からなる蛋白質をコードしていることが推定された。なお、ゲノムDNAクロンの塩基配列では、コーディング領域中に9塩基と6塩基の欠失が存在するため、ゲノムDNAクロンの塩基配列から推定されたアミノ酸数は640、または638であった(5)を参照)。

4) 予想される*BarH2*蛋白質のアミノ酸配列を調べた。その結果、*BarH2*はホメオドメイン類似配列を持っていた。*D.melanogaster*の*BarH1*と*BarH2*、そして*BarH1*と*BarH2*の*D.ananassae*のcounterpart(*BarH2*の*D.ananassae*におけるcounterpartについては後で詳しく述べる)それぞれがコードするホメオドメイン類似配列間で全て保存されているアミノ酸は60残基中55残基である。これら55残基の保

存配列が、Barを含む計44種のショウジョウバエのホメオドメイン間でどれぐらい保存されているか検討した(図7)ところ、保存の比率が50%を越えるアミノ酸が26残基あり、4つのBarホメオドメイン以外で1つも見いだされなかったアミノ酸は3つだけだった(図7)。従って、4つのBarホメオドメイン類似配列はホメオドメインのファミリーに属すると思われる。

BarH2ホメオドメインのアミノ酸配列をBarH1のものと比較すると、60アミノ酸のうち、56アミノ酸が同一であった。特に、ターゲットDNA配列のmajor grooveと接触すると考えられている(Kissinger et al.1990)ヘリックス3のアミノ酸配列は同一だった。異なっていた30、32、36、39番目の計4アミノ酸は全て、ホメオドメインの第二ヘリックスとその周囲に位置していた(図19a)。

5) ホメオドメイン以外でBarH1とBarH2のアミノ酸配列に相同性があるかどうか調べた。ホメオドメインのC末端側64アミノ酸のうち、52アミノ酸がBarH1と一致した。ホメオドメインの上流には、両者共に中性条件下で荷電したアミノ酸に富む領域が存在した。そのほかの領域は高い相同性を示さないが、BarH1、BarH2共にアミノ酸配列の繰り返し構造を多く含んでいた(図8)。

6) cDNAクローンとゲノムDNAクローンの間で、異なる塩基が15カ所存在していた。3カ所はcDNAクローンの塩基挿入であった。うち一つは5' noncoding領域における1塩基挿入で、残り二つはcoding領域の挿入であった(図5c、1323-1331と1830-1835番目の塩基)。coding領域の挿入塩基数は3の倍数であったためフレームのずれは生じなかった。他の12カ所は塩基置換であった。このうち、塩基置換によるアミノ酸置換は二カ所であり(図4c、\*印)、残り9塩基はいずれもコドンの3番目に位置していたため、アミノ酸置換を生じなかった(図5c、塩基下に引いた短い下線)。

#### BarH2の染色体上の位置とBar変異体

得られたBarH2の染色体上の位置を決定するため、図3cの断片Bをプローブに用い、野生株canton-Sの唾腺染色体に対してin-situ hybridizationを行った。その結果BarH2は、第一染色体16Aの染色体領域に存在していることが明らかになった(図9b)。BarH1もまた16A領域に存在していることが示されているので

(Kojima et al. 1991)、*BarH2*は*BarH1*の近傍に位置していることが示唆される。なお、本実験ののち、*BarH1*と*BarH2*を両方欠く欠損株*Df(1)B<sup>263-20</sup>*株の欠損領域約200kbの詳細な構造解析の結果、染色体DNA上で*BarH2*は*BarH1*から約80kb telomere側に位置しており、*B*、*B<sup>M1</sup>*、*B<sup>M2</sup>*、*B<sup>bd</sup>*等の*B*変異体の染色体再編点はいずれも*BarH1-BarH2*間に存在していることが示された(図9a、Higashijima et al. 1992a)。また、*Df(1)B<sup>263-20</sup>*株の染色体欠損領域中には*BarH1*、*BarH2*以外に*forked*遺伝子の一部とアクチン結合蛋白質の一つをコードする*fimbrin*遺伝子が存在していた(図9a、Ishimaru et al. 1993、石丸ら、未発表)。*BarH1*の近傍T2領域にはレトロトランスポゾンの一種、297の部分配列が含まれていた(図9a、小野ら、未発表)。

#### *BarH2*の発現パターン

*BarH2*の時間的な発現を追うため、胚期、1~3齢幼虫期、蛹期、成虫期の野生株からそれぞれサンプリングした野生株の全RNAを抽出し、ノーザンブロットを行った(図10a)。その結果、*BarH2*は*BarH1*と同様(Kojima et al. 1991)、胚期、及び蛹期の初期に発現のピークが見られた。また、検出されたバンドの長さから、*BarH2*の転写産物の長さは約3.8kbであり、先に述べた*BarH2*の構造解析の結果と矛盾しない(図10a)。

*BarH2*の空間的な発現は抗*BarH2*抗体を用いて調べられた。詳しいことは第2章に譲るが、三齢幼虫後期における光受容細胞R1/R6での発現を始め、*BarH2*は、調べられた全ての組織で*BarH1*と同じ発現パターンを示すことが明らかになった(図10b)。

#### *BarH2*蛋白質の過剰発現によるショウジョウバエ個体への影響

*BarH1*遺伝子を熱ショックプロモーターを用いて三齢幼虫後期に大量発現させると、*B*突然変異体と同様に成虫複眼の個眼数が著しく減少する。そこで、*BarH2*についても同様の現象が観察されるかどうかを見るために、*BarH2*蛋白質

を体内で大量発現させた。

まず、図11に示すようなコンストラクトを作製した。プロモーター断片としてはショウジョウバエ*hsp70*遺伝子の*XhoI-BamHI*の約1.5kb断片を用いた。この断片は、熱ショック誘導に必要な領域、5' non-coding領域、及びN末端から約340アミノ酸に対するコーディング領域を含む(Palham,1982、Karch,1981)。この断片に*BarH2*のcDNAクローンのうち、*ApaI-EcoRI*約1.8kb断片をin-flameになるように連結した。この断片は、*BarH2*のコーディング領域のうち、N末端側の約20アミノ酸を欠いている。これらを、*hsp70* poly(A) 付加シグナル、及び断片挿入確認のための選択マーカーである*rosy*遺伝子断片約7.2kbを持つP因子ベクターに挿入した。完成したコンストラクトをマイクロインジェクション法によってショウジョウバエ胚に注入し、得られた成虫75ラインの中から、形質転換体を7ライン得た(表1)。

得られた各形質転換体の三齢幼虫を37℃、30分間処理し、複眼原基を抗*BarH2*抗体を用いて抗体染色した。複眼原基の全ての細胞が染色され、実際に*BarH2*が過剰発現することが確認できた(図12a)。次に、熱ショック処理した成虫の形態を観察した。すると、複眼の形態異常を示す個体が得られ、それらの大部分は*BarH1*の場合と同様、個眼数が減少し、*B*変異体様の表現型を示した(図12b中下)。それ以外に少数ではあるが、複眼の一部に溝が生じているものや(図12b左下)、複眼が8の字の様な形をしたもの(図12b右下)も観察された。このような複眼異常は*BarH1*の場合でも見られる。さらに、これもまた*BarH1*で観察されている現象ではあるが、成虫肢の節が融合が時折見られた(図12c)。以上から、*BarH2*蛋白質の過剰発現は、*BarH1*の過剰発現と同様の影響を与えることが結論された。

#### *BarH2*の*D. ananassae*におけるcounterpartのクローニング

*BarH2*蛋白質のアミノ酸配列が種間でどれほど保存されているか知るため、*D. ananassae*における*BarH2*のcounterpart、*DaBarH2*の単離・解析を行った。

*BarH2*の第三エクソンを含む、*SphI-EcoRI*0.4kb断片(図13(a)のA断片)をプローブに用い、*D. ananassae*のゲノムDNAライブラリー約5万個をスクリーン

ゲシ、2個の陽性クローン、GMA2-1、GMA2-4を得た。GMA2-1、GMA2-4（共に挿入断片長約15kb）の制限酵素地図を作製したところ、二つのクローンは制限酵素の切断パターンが同一であった。従って以降の解析にはGMA2-1のみを用いた。

図13(a)のA断片（*BarH2*の第三エクソンを含む）、B断片（*BarH2*の第二、第三エクソンを含む）及びC断片（*BarH2*の第一エクソンを含む）をプローブに用い、GMA2-1に対してサザンブロットを行った。その結果、A断片とB断片はGMA2-1の *Pst*I-*Eco*RI4kb断片と、C断片は *Eco*RI-*Pst*I6kb断片とそれぞれハイブリダイズした（図13）。*Pst*I-*Eco*RI4kb断片と *Eco*RI-*Pst*I6kb断片の詳しい制限酵素地図を作製したところ、*BarH2*の第一エクソン、第三エクソン中に存在する *Not*Iサイトが双方の断片に見いだされ、*Pst*I-*Eco*RI4kb断片中には、*Pst*Iと *Kpn*Iの約0.2kb離れた並びが存在していた。同様の酵素サイトの並びは *BarH2*の第二エクソン中にも見いだされる（図13）。そこで、GMA2-1のうち、*Not*Iサイトの周辺と *Kpn*I-*Pst*Iの領域を中心に、塩基配列を決定した（図13、14）。その結果、*Pst*I-*Eco*RI4kb断片の *Kpn*Iサイト付近にホメオドメインをコードする領域を見いだした。また、*Pst*I-*Eco*RI4kb断片と *Eco*RI-*Pst*I6kb断片双方に存在する *Not*Iサイトを中心に、長いORFが存在していた。*Eco*RI-*Pst*I6kb中のORFからは *BarH2*のMetコドン付近と相同性の高い配列が見いだされ、Metコドンの約40b上流には、in flameで終止コドンが存在していた（図14、57-59番目の塩基）。一方 *Pst*I-*Eco*RI4kb断片中のORFから *BarH2*の第三エクソンと相同性の高い配列が見いだされた。推定されるイントロン-エクソンのjunctionの配列が一致していることから（図15b）、*DaBarH2*は *BarH1*や *BarH2*と同様、3つのエクソンから成り立っており、*DaBarH2*遺伝子は最長で621アミノ酸からなる蛋白質をコードしていると推定された。*DaBarH2*蛋白質が持つホメオドメインのアミノ酸配列は *BarH2*と全て同一であった。ホメオドメインの下流約65アミノ酸のうち、60アミノ酸は *BarH2*と同一であり、N末端付近にも *BarH2*と *DaBarH2*間で相同性の高い領域が存在した。*DaBarH2*、*Om(1D)*、*BarH2*蛋白質間のアミノ酸配列の相同性は、*DaBarH2*と *BarH2*で62%、*DaBarH2*と *Om(1D)*で29%であった。

#### 4つの *Bar*蛋白質のアミノ酸配列の相同性



次に、*BarH1*、*BarH2*、*Om(1D)*[*DaBarH1*]、*DaBarH2*合計4遺伝子がコードする蛋白質のアミノ酸配列の比較を行った(図16)。結果を以下にまとめる。

- 1) 4遺伝子産物間では、2つの領域が保存されていた。N末端に近い、16アミノ酸からなる小領域 (I)、ホメオドメイン及びすぐ下流の約65アミノ酸、合計125アミノ酸からなる領域 (IV、V) である。
- 2) ホメオドメインのすぐ上流と蛋白質のC末端付近には、荷電したアミノ酸に富む領域 (III) 及び (VI) が存在していた。
- 3) 他の領域では高い相同性がなかった。単一アミノ酸の繰り返し配列が多く見られた。

#### BarH1蛋白質の機能ドメイン解析

アミノ酸配列の比較から見いだされた領域を欠く*BarH1*蛋白質を過剰発現させて影響が生じるかどうかを調べることによって、*BarH1*蛋白質のどの領域が機能的に必要であるか推定することを試みた。改変*Bar*遺伝子の産物を大量発現させたとき、もしその蛋白質が*Bar*蛋白質の機能を失っているならば、正常な*BarH1*蛋白質を過剰発現させた際観察されたような複眼異常は誘発されないと思われる。

まず、*BarH1*のcDNAクローンをを用いて図17aに示すような一連の改変*BarH1*遺伝子のシリーズを作製した(図17a)。これらをショウジョウバエ*hsp70*遺伝子のプロモーター及びコーディング領域を含むDNA断片の下流にin flameで連結し、*hsp70* polyA 付加シグナルとともにP因子ベクターに挿入した(図17b)。構築した一連のコンストラクトDNAをそれぞれショウジョウバエの胚にマイクロインジェクション法により導入し、形質転換体を得た。次に、得られた形質転換体をそれぞれ、二〜三齢幼虫期に37°Cで30分間熱ショックを与え、成虫の複眼を観察した。その結果を以下に要約する(表2参照)。

- 1) ホメオドメイン(IV)を欠いた改変*BarH1*遺伝子を過剰発現させても複眼の異常は誘発されない。

2) ホメオドメイン上流の領域 (III)を欠いた*BarH1*蛋白質を過剰発現させると複眼の個眼数が減少した。

3) C末端付近の領域(IV)を欠損させた改変*BarH1*遺伝子を過剰発現させた場合も複眼の個眼数が減少した。

以上の結果から、ホメオドメインを欠くと*BarH1*の機能が失われ、(III)や(VI)に対応する領域を欠いても*BarH1*の機能は失われないことが示唆された。

*Bar*ホメオドメインは他の多くのホメオドメインで保存されている49番目のアミノ酸残基がPheからTyrに置換している (図7)。よって、この置換は*Bar*蛋白質の機能と何らかの関係があるのではないかと考えた。そこで、ホメオドメインのTyr残基をPhe残基に換えた改変*BarH1*遺伝子を作製し、同様に形質転換体を作製して過剰発現による効果を観察した。しかし、37℃、30分の熱ショック誘導による複眼の形態異常は観察されなかった (表2)。よって、Phe残基に置換しても*BarH1*蛋白質の機能は失われないことが示唆された。

## <考察>

本実験により、BarH1と約93%の相同性をもつホメオドメイン配列を含む蛋白質をコードする遺伝子、*BarH2*の存在が明確になった。

NMR分析やX線結晶回折による立体構造解析から、engrailedや酵母Mat $\alpha$ 2ホメオドメインは3つのヘリックスから、Antennapediaホメオドメインは第三ヘリックスが二つに分かれ、4つのヘリックスから成り立っていることが示されている (Kissinger et al.1990, Otting et al.1988, Qian et al.1989)。同様のヘリックス構造をBarH1及びBarH2ホメオドメインが実際に取りうるかどうか推定する手段の一つとして、Chou-Fasman法による二次構造の予測をアミノ酸配列を用いて行ったが(Chou and Fasman 1978)、BarH1、BarH2ホメオドメインが3つあるいは4つのヘリックスをとり得るという明瞭な結果を得ることが出来なかった (図18a)。しかし、Chou-Faman法による二次構造予測をengrailed、及びAntennapediaホメオドメインについて行っても、期待される3つのヘリックス構造をとると明示出来なかった (図18a)。従ってChou-Faman法によるホメオドメインの二次構造を予測するのは困難であると結論した。engrailed、あるいはAntennapediaホメオドメインとMat $\alpha$ 2ホメオドメインのアミノ酸配列間の相同性はMata2で見られる小さな挿入を別にして25%であったが、立体構造は互いに類似していた (図18b, Kissinger et al.1990, Wolberger et al.1991)。一方、Mat $\alpha$ 2とengrailedホメオドメイン間で一致するアミノ酸配列は、1つを除き全てBarH1/BarH2と同一であった (図18b)。このうち8つのアミノ酸 (図18bの\*で示す) はバックボーンを形成し、それらのうち6つはDNAのリン酸と結合し、51番目のNはアデニンと結合する (Kissinger et al.1990)。残り二つのうち44番目のQについては、Mata2ではDNAのリン酸に結合し、engrailedについても同様の示唆が得られている (Kissinger et al.1990)。従ってBarH1/BarH2ホメオドメインも、Mat $\alpha$ 2、Antennapediaやengrailedホメオドメインと類似した立体構造をとると予想されるかもかもしれない。

立体構造解析の結果、engrailedやMat $\alpha$ 2ホメオドメインは、ヘリックス3がタ

ーゲットDNAのmajor grooveと、またN末端側に位置するいくつかの塩基性アミノ酸がminor grooveとそれぞれ接触することによってDNAに結合すると考えられていた (Kissinger et al.1990, Wolberger et al.1991)。実際、3番目と4番目に対応する塩基性アミノ酸を欠いているI-POU蛋白質はホメオドメインのためにDNA結合能を失っている (Treacy et al.1991)。また、結合するDNA配列の塩基特異性もヘリックス3やN末端側の塩基性アミノ酸によって決められていることがいくつかのホメオドメインについて調べられている (Kuziora & McGinnis.1989, Hanes & Brent.1989, Furukubo-Tokunaga et al.1993, Treacy et al.1991)。もし仮に、BarH1/BarH2ホメオドメインが*engrailed*や $Mat\alpha 2$ ホメオドメインと類似した構造を取るならば、BarH1やBarH2ホメオドメインもまたヘリックス3およびN末端側のアミノ酸が結合DNA配列の塩基特異性を決定しているかもしれない。BarH1とBarH2ホメオドメインは、*D.melanogaster*, *D.ananassae*に関わらず互いにヘリックス3に対応する部分、N末端側領域のアミノ酸配列とも同一であることから、BarH1とBarH2蛋白質が結合するDNA配列は同一であると推定されるかもしれない。なお図19(a)に示すように、Beachyらのグループは8種類のホメオドメインについて、結合DNAとの接触に関わると考えられている8つのアミノ酸残基と結合する塩基配列との対応関係を6種類に分類した(Ekker et al.1994)。BarH1/BarH2ホメオドメインはこの分類のどれにも当てはまらなかったが、Abd-Bタイプのパターンに最も近く、このパターンと、pb、Dfdのパターンとを合わせて考えると、BarH1/BarH2ホメオドメインの仮想的な結合DNA配列を(T/C)TTA?と推測することが可能である。

図7に示すように、BarH1/BarH2ホメオドメイン間の保存配列中、他のショウジョウバエのホメオドメイン配列で1つも見いだされないのは15番目のT、43番目のC、49番目のYである。特に、ヘリックス3に対応する領域中にある49番目のYは他の40種のショウジョウバエのホメオドメイン配列全てでFである (図7)。ヒトのホメオドメイン蛋白質Pit-1は、ホメオドメインの7番目のTがリン酸化されることによってDNA結合性に変化を生じることが示されている(Kapilooff et al.1991)。このことは、ホメオドメインの直接的リン酸化によりDNA結合能が調節される可能性があることを示している。Barファミリーでは49番目のF残基がY残基に置換しており、そのDNA結合性が調節される可能性が指摘されるか

もしれない。しかし、YをFに置換したBarH1蛋白質の過剰発現で複眼異常が誘発されたので、その可能性は小さいと考えられる。

立体構造解析の結果から、engrailedやAntennapediaホメオドメインのヘリックス2は、結合するDNAと反対側に位置していると考えられている (Kissinger et al.1990、Qian et al.1989、図18b参照)。ヒトのホメオドメイン蛋白質Oct-1はsimplex virusのトランスアクティベーター蛋白質であるVP16と複合体を形成する (Kristie et al.1989)。ところが、Oct1ホメオドメインのヘリックス2をOct-1類似遺伝子Oct2のホメオドメインのヘリックス2に置換すると、VP16と複合体を形成出来なくなる (Stern et al.1989)。Oct-2とOct-1ホメオドメインのヘリックス2のアミノ酸配列を比較すると、異なるアミノ酸は4箇所だけである (Stern et al.1989)。BarH1とBarH2ホメオドメイン間の相違残基4つのうち3つの残基はBarH1-BarH2間の相違残基の位置と一致していた (図19b)。図19bに示すように、大腸菌の $\lambda$ -repressor蛋白質はホメオドメインと類似したhelix-roop-helix構造を持つことが知られている (Jordan and Pabo.1988、Stern et al.1989、Klemm et al.1994)。 $\lambda$ -repressor蛋白質はその遺伝子の活性化に際してRNAポリメラーゼと相互作用する (Ptashne et al.1980)。 $\lambda$ -repressorがRNAポリメラーゼと相互作用できない変異、3種類のpc (positive control) 変異株とその復帰変異1種について、 $\lambda$ -repressor蛋白質のアミノ酸配列の変異化が知られている (Hochschild et al.1983)。変異残基の位置はホメオドメインのヘリックス2及びその周辺に対応する部分であり、4つのうち3つがBarH1-BarH2間の相違残基の位置と一致していた (図19b、Hawley et al.1983、Hochschild et al.1983)。従って、BarH1蛋白質とBarH2蛋白質が他の蛋白質とヘリックス2を介して相互作用するとすれば、BarH1蛋白質とBarH2蛋白質はそれぞれ別の蛋白質と相互作用と考えられた。BarH1遺伝子とBarH2遺伝子が同一の細胞で発現していることから、BarH1蛋白質とBarH2蛋白質はそれぞれが互いに相互作用しあっていることも考えられる。しかし、過剰発現系では、一方のBar蛋白質のみが大量にあることにより効果が出ている。また、BarH1/BarH2の両者の同じ様な発現もBarH1のみの効果と大差はなかった (未発表データ)。

ショウジョウバエにおいてBarH1/BarH2のように、互いに類似した発現パタ

ーンを示す一対のホメオドメイン蛋白質、*engrailed(en)*と*invected(inv)*、*zerknüllt1(zen1)*と*zerknüllt2(zen2)*、*lady-bird-early(lbe)*と*lady-bird-late(lbl)*、*goosberry(gsb)*と*gooseberry neuro(gsbn)*が知られている (Coleman et al.1987、Rushlow et al.1987、Jagla et al.1994)。*en*と*inv*、*zen1*と*zen2*、*lbe*と*lbl*、*gsb*と*gsbn*がコードするホメオドメインのアミノ酸配列はそれぞれ87%、72%、93%の相同性を示す(図19c)。立体構造解析の結果を基にするとこれらの対合ホメオドメインで見いだされたアミノ酸置換は、特に明確な機能が付随しているとは思えない (Kissinger et al.1990)。ヘリックス3及びN末端の塩基性アミノ酸は*zen1/2*以外では変わらないので(図19c)、少なくとも*zen1/2*を別にすると結合DNA配列は互いに同一であることが想像される。ただこれらのホメオドメイン蛋白質の発現は、*BarH1/BarH2*のように厳密には共発現しているわけではない (Coleman et al.1987)。

*BarH1*と*BarH2*が機能的に類似しているかどうかを推定する手段として、*BarH2*蛋白質の過剰発現による影響を調べ、*BarH1*の場合と比較した。コンストラクトDNAの作製において、*BarH2*蛋白質を過剰発現させるプロモーターにBarH1蛋白質を過剰発現させても複眼の異常が引き起こされること(未発表データ)から、BarH2の場合、連結したcDNAクローンは*BarH2*のN末端側コーディング領域を約20アミノ酸残基分欠いている。しかし、このcDNAクローンからつくられる*BarH2*蛋白質は実際に複眼異常を誘発したことから、*BarH2*のN末端20アミノ酸の欠如は過剰発現による複眼への影響を左右しないと考えられる。*BarH2*蛋白質の過剰発現による複眼形態への影響は、*BarH1*の場合と類似していた。従って、少なくとも過剰発現に関する限り*BarH2*蛋白質は*BarH1*蛋白質と同じ働きを果たすと示唆される。胚のes organでは、*BarH1*と*BarH2*蛋白質が互いに機能的にredundantであることが示されており (Higashijima et al.1992)、*BarH1/BarH2*間の逆位変異もほぼ正常な表現型を示すので(後述)、恐らく正常細胞でも*BarH1*と*BarH2*蛋白質は互いに機能的にredundantであると予想される。

複眼の分化はmorphogenetic furrowのposterior側からanterior側への進行を伴う。morphogenetic furrowの進行は、分化細胞で発現した*hedgehog(hh)*遺伝子産物がTGF $\beta$ のホモログである*decapentaplegic(dpp)*遺伝子の発現を誘導することによってと考えられている(Heberlein et al.1993)。また、*BarH1*が過剰発現していると考えられる(Kojima et al.1991)B変異では、*hh*のmorphogenetic furrowでの発現が抑制される。従って*BarH1/BarH2*蛋白質の過剰発現によって*Bar*様の細い眼を生ずる原因は、*BarH2*あるいは*BarH1*蛋白質の過剰発現が起こった時点でmorphogenetic furrowの進行が停止し、その結果複眼の分化が一時的に停止してしまうためであると考えている(Kojima et al.1993)。まれに溝が生じた複眼が観察されるのは、過剰発現の効果が解除される約24時間経過後でも依然として複眼の分化能が残っている場合に見られる現象で、morphogenetic furrowの進行の再開によるためと考えられている(Kojima et al.1993)。

*BarH1*と*BarH2*は、後期の三齢幼虫肢原基のtarsal segment5で強く、tarsal segment4で強く発現する(第二章参照)。モザイク解析の結果などから、*Bar*の発現は肢の節形成に必要である事が示されている(小嶋、投稿準備中)。*BarH2*の過剰発現によって肢の節が融合する原因は、*BarH2*がtarsal segment5やtarsal segment4以外で発現するために肢の節が正しく形成されないためであると考えられる。ホモオドメインを欠損した*BarH1*蛋白質を過剰発現させると、a) 個眼数の減少を引き起こす、b) 複眼の形態が変化しない。このことは*Bar*蛋白質のDNA への結合により複眼異常が誘発されることを示唆している。領域III-VI以外の他の領域が*Bar*蛋白質の機能に必要なかどうかは現在のところ不明である。

## 第二章

### *BarH1/BarH2* 遺伝子を制御する組織特異的 共エンハンサーとその機能



## <序>

エンハンサーは、遺伝子の転写活性を上昇させる遺伝子上流のDNA配列として、SV40 early gene上流の72塩基からなる繰り返し配列が最初に同定された

(Gruss et al.1981)。この繰り返し配列を含むDNA断片を $\beta$ -globin遺伝子上流に連結すると $\beta$ -globinの転写活性が実際を上昇することが示されている

(Banerji et al.1981)。その後エンハンサーは次々と発見され、エンハンサーに結合する蛋白質も同定されるようになった。例えばAP-1、CREB蛋白質は特定のエンハンサーを認識し、結合することによって下流遺伝子の転写活性を上昇させることが知られている (Curren and Freaenza.1988, Hai et al.1989)。エンハンサー結合蛋白質がエンハンサーに結合し、転写開始点付近に結合する基本転写因子群とDNAのbendingを介して相互作用することにより転写が開始されるというモデルが提唱されている (Ptashne,1988, Struhl,1991, Tjian and Maniatis,1994)。エンハンサーの特徴は、遺伝子に対して方向や距離に無関係に転写活性を上昇させる点である (ただし最近は、エンハンサー活性を抑制するシス因子が見いだされており、それらの相対的な位置関係によっては、たとえプロモーター近傍にエンハンサーが存在してもエンハンサー活性が極端に抑制される (Geyer and Corces.1992, Roseman et al.1993)。実際、sevenless遺伝子のエンハンサーはどちらの向きに挿入してもsevenless遺伝子の転写活性を上昇させることが示されている (Basler et al.1989)。また、Ultrathorax遺伝子のエンハンサーは遺伝子から約30kb離れた位置にも存在する (Qian et al.1991)。

ショウジョウバエにおいて、P因子ベクターの系を利用して仮想的なエンハンサー断片とレポーター遺伝子を直接染色体に導入することにより個体レベルでエンハンサーアッセイを行うことが可能である。この場合、導入したエンハンサーは対応する時期に対応する細胞でのみレポーター遺伝子の発現を活性化する。この様な方法によって、sevenless、decapentaplegic、Ultrathoraxなどの遺伝子のエンハンサー領域が同定された (Bowtell et al.1989, Bowtell et al.1991, Basler et al.1989, Huang et al.1993, Muller et al.1989)。sevenless遺伝子の光受容

細胞前駆体R7に関するエンハンサーがsevenless遺伝子の第二イントロン中に存在するという事実は、sevenless遺伝子とその近傍の染色体DNAを様々に分割した断片を $\beta$ -galactosidase遺伝子と共に個体に導入することにより明らかにされた (Bowtell et al.1989, Bowtell et al.1991, Basler et al.1989)。

*BarH1*と*BarH2*遺伝子は染色体DNA上で約80kbの距離を置いて存在している (Higashijima et al.1992a, 図14参照)。抗*BarH1*抗体、抗*BarH2*抗体を用いて野生株における*BarH1/BarH2*の発現を調べると、*BarH1*、*BarH2*は、胚期中枢神経系や末梢神経系に属する細胞 (図20一番上の段)、三齢幼虫複眼原基における光受容細胞前駆体R1/R6をはじめ調べられた全ての発現細胞で同一の発現パターンを示した (Higashijima et al.1992a, 図20)。*BarH1*と*BarH2*の共発現は*BarH1-BarH2*間に存在する両遺伝子共通のエンハンサー (共エンハンサー)の発現制御により起こるかもしれない。そこで、図22aに示すような作業仮説をたてた。野生株 (上段)において、共エンハンサー (白丸と黒丸で示す)は*BarH1/BarH2*両方の発現を制御し、その結果*BarH1*と*BarH2*は同じ発現パターンを示す。*BarH1*と*BarH2*遺伝子locus間に逆位を持つ変異体を考えよう。このような逆位変異株では、図22に示すように*BarH2*は再編点より*BarH1*側に存在するエンハンサー (黒丸で示したエンハンサー)と物理的に大きく引き離され、そのため制御を受けることが出来なくなる。一方、*BarH1*は再編点より*BarH2*側にあるエンハンサー (白丸で示したエンハンサー)の制御を受けることが出来なくなる。従って、逆位変異体では*BarH1*発現細胞で*BarH2*は発現出来ず、一方*BarH2*発現細胞で*BarH1*は発現できない。結果として*BarH1*発現細胞と*BarH2*発現細胞は二分される。

以上の作業仮説が正しいか否かを調べるために、逆位変異体B<sup>M2</sup>における*BarH1*、*BarH2*の発現を抗*BarH1*抗体、抗*BarH2*抗体を用いて解析した。野生株において、三齢幼虫期肢原基では、*BarH1*、*BarH2*共に将来tarsal segment 5と4になる輪状領域と将来爪になる点状領域で発現が見られる (図20の一番下段)。一方、図21A,Bに示すように逆位変異体では*BarH1*の発現は輪状領域に限定され、逆に*BarH2*の発現は点状領域に限定される胚期のCNSでは正常な*BarH1/BarH2*の発現は、mid-line付近の3細胞、そしてその両脇にある片体節当たり4細胞程度で見られる (図29下段右の矢頭参照)。一方逆位変異体では、*BarH1*の発現は真

ん中の3細胞、*BarH2*の発現はそれ以外の細胞のみに見られる(図21c,d)。同様の逆位変異に伴う*BarH1*、*BarH2*のすみ分けは他の多くの発現領域でも見られたことから、上記の作業仮説は基本的に正しいと示唆された。また、*BarH2*と*BarH1*間80kbの中に*BarH1/BarH2*を制御する様々な共エンハンサーが点在していることが推定された(小嶋修論)。

*BarH1/BarH2*の機能解析の第一歩は*BarH1*と*BarH2*遺伝子両方の同時欠損株を作製することかもしれない。ところが、上記のように*BarH1*や*BarH2*遺伝子は様々な細胞で発現している(図20)ため、*BarH1/BarH2*遺伝子の同時欠損株では全ての発現細胞で*BarH1/BarH2*の発現がなくなり、初期発現細胞を別にすると複数箇所での異常を同時に解析せざるを得なくなり、*Bar*の正確な遺伝学的解析はほとんど不可能になってしまう。この不都合を解消するためには、*BarH1/BarH2*を含む約200kbの染色体断片を欠く既存の*Df(1)B株*に、*Bar*の機能を欠損させたい細胞に対応するエンハンサー以外のすべてのエンハンサーを*BarH1*あるいは*BarH2*とともにP因子によって戻し、細胞特異的に*Bar*の機能を欠損するような変異株を作製すればよい。そのような研究の第一歩として、ここでは*Bar*共エンハンサーの全てを単離することを試みた。また、このエンハンサーアッセイの実験過程で、*Df(1)BH2株*が幸運にも*Bar*領域のある特定のエンハンサー(行動に関するエンハンサー)欠損株であることを見つけた。この変異の結果もあわせてこの章で議論する。

## <材料と方法>

### 使用したショウジョウバエ株

P因子ベクターを導入するためのショウジョウバエ株として、 $V^{36f};ry^{506}$  株を用いた（第一章の<材料と方法>参照）。また、コンストラクトが挿入した染色体をホモに持つ株を作製するために、 $N/FM7$ 、 $V^{36f};Cyo/Scor;ry^{506}$ 、 $V^{36f};Sb\ TM3\ ry^{506}/rfl0$ を使用した。P因子の再転移を行うために、 $Cyo/Sp;\Delta 2-3\ Sb/TM6$ 株を使用した。また、行動異常測定に用いた $Df(1)BH2$ 株の遺伝型は $V^{36f}\ Df(1)BH2/CLB$ である。

### コンストラクションに使用したDNA

クローニング用プラスミドベクターには、pUC18/19、pBluescriptIIKS<sup>+</sup>及びpKS<sup>+</sup>（Stratagene社）を用いた。また、P因子ベクターとして、pYC1.8を使用した（第一章の<材料と方法>参照）。pYC1.8を使用した理由は以下の二点である。

- (a) *vermilion* 遺伝子断片の長さは約1.8kbpで *rosy* 遺伝子断片長約7.2kbpよりも短いため、ベクター構築の上で *rosy* 遺伝子を用いた系よりも有利である。
- (b) *vermilion* 変異は成虫複眼の色が野生株に比べてより明るい赤色になる変異であるが、これに更に *rosy* 変異を加えると、非挿入株 (*v;ry*/オレンジ眼) → 挿入株 (*v<sup>+</sup>;ry*/暗赤色) となり、コンストラクトDNAが挿入した個体の複眼の色が識別しやすくなる。

エンハンサーアッセイに使用した  $\beta$ -galactosidase 遺伝子は Pharmacia 社製の

pMC1871 Fusion Vector に含まれている約3.0kbp断片（N末端側8アミノ酸を欠如した  $\beta$ -galactosidase 蛋白質をコードする）を用いた。また、Bar領域の染色体断片は、当研究室で単離したラムダクローンを用いた（<結果>参照）。

## 抗体を用いた染色

この実験で用いた抗体は以下のものである。

Rabbit anti-BarH1 antibody	当研究室で作製
Rabbit anti-BarH2 antibody	当研究室で作製
Rabbit anti- $\beta$ -galactosidase antibody	Cappel社製
Mouse anti- $\beta$ -galactosidase antibody Mab22C10	PROMEGA社製 三菱油化生命研 藤田博士より の分与
Goat biotinated anti-Rabbit IgG	Vector社製
Goat biotinated anti-Mouse IgG	Vector社製
anti-Mouse FITC	Jacson社製
anti-Mouse Rhodamine	Jacson社製
anti-Rabbit FITC	Jacson社製
anti-Rabbit Rhodamine	Jacson社製
Vectastain ABC-HRP kit	Vector社製

### (a) 胚の染色

採集した胚を3%次亜塩素酸ナトリウム/PBSで脱コリオン化したのち、4% paraformaldehyde/PBSで20分間固定する。メタノールの激しい浸透によりピテリン膜をはぎ、PBT(0.1% TritonX-100/PBS)に液置換する。得た固定胚を、4% Goat serum/PBSで30分ブロッキング後、抗体反応を行った。各抗体反応は室温で1時間、又は4℃で一昼夜行い、その後PBTを用い、室温で10分×3回行った。抗体反応は二段階、あるいは更にABCキットによってシグナル強度を高めた。蛍光抗体を用いた場合は直接、HRPを用いた場合はDAB発色によってシグナルを検出した。染色したサンプルは、Zeiss社のAxiophot顕微鏡によってノマルスキー微分干涉下で観察した。

### (b) 成虫原基の染色

PBS中で解剖して得た成虫原基を、4% paraformaldehyde/PBSで20分間固定する。0.2% Nonidet P-40/PBSによって浸透化したのち、抗体反応を(a)と同様の方法

で行った。ただし、基本となる溶液はPBTではなく、0.01%サポニン/PBSを使用した。

#### X-galを用いた活性染色

PBS中で解剖した成虫原基を、2% glutaraldehyde/PBSで3分間固定した後、X-gal working solution中で37℃、数時間反応させ、PBSによって反応を停止し、顕微鏡下で観察した。

##### X-gal working solution:

10mM	NaHPO <sub>4</sub>
3.1mM	K <sub>4</sub> (Fe[II][CN <sub>6</sub> ])
3.1mM	K <sub>4</sub> (Fe[III][CN <sub>6</sub> ])
150mM	NaCl
1mM	MgCl <sub>2</sub>
0.2%	X-gal

#### マイクロインジェクション

第一章に記述したのと同様の方法を使用した。

#### 活動性測定（成虫の行動測定）

直径1cmのガラス管を用意し、片端をラップでおおった。原則として20匹の（やむを得ない場合は出来るだけ多くの）、エーテル麻酔により眠らせたショウジョウバエ成虫をガラス管内にいれ、ラップによって蓋をして、約30分間放置した。個体の活動再開を確認後、ガラス管の片端を下に向け、軽くたたくことにより個体を寄せ、水平に清置した。その瞬間を0として、個体の活動の経時変化を追った。ガラス管の中央付近（片端から約10cm）に線を引き、一定時間経過後その線を越えた個体数をカウントした（図53）。

光刺激は、約75Wの光ファイバースコープランプ（オリンバス社製）をガラ

ス管の片端から照射することによって与えた。活動性の測定は上記と同様である。

## <結果>

### エンハンサーアッセイ用コンストラクトの作製

*BarH1/BarH2*の共エンハンサーを単離して染色体上に同定するために、*BarH1-BarH2*間の染色体DNA80kbを断片化、その全ての断片にエンハンサー活性があるかどうか検討した。エンハンサーアッセイ用のDNAコンストラクトを作製法を示す(図23)。まず、P因子ベクターpYCl.8の*SaII*サイト(〈材料と方法〉参照)に、ショウジョウバエ*hsp70*遺伝子のpoly(A)付加シグナルを含む断片(*XhoI-SaII* 0.25kb断片)を挿入し、#23を作製した。次いで*hsp70*polyA付加シグナルの上流の*NotI-SaII*サイトにエンハンサーの有無をはかるレポーター遺伝子として、*lacZ*遺伝子を含む*NotI-SaII*3.0kb断片を挿入し、#44とした。なお*NotI-SaII*3.0kb断片は、別途作製したコンストラクト中から、両端に合成リンカーを含む形で取り出したため、断片を挿入した結果*Nod*と*SaII*サイトの位置が逆になる(図23参照)。*lacZ*遺伝子コーディング領域上流側*SaII/NotI*に *BarH1*のN端側のコーディング領域を含む*BarH1*プロモーター断片(*SaII-NotI* 4.4kb断片、図23下図)。なお、この断片は*BarH1*蛋白質のN末端側約80アミノ酸残基分のコーディング領域を含む)を挿入し、in flameになるように連結して#200とした。

*BarH1-BarH2*間の染色体領域は7つのλクローンによって完全にカバーされている(Higashijima et al.1992a、図24)。これらを13個の*SaII-SaII*約1kb~約15kb断片(図24の数字をつけた太線)に分解し、それぞれをpUC19にサブクローニングした。得られたプラスミドDNAから断片を切り出し、これらをそれぞれ、#200の*SaII*サイト(#200を*SaII*で処理すると、ここだけで切断される)に挿入し、一連のコンストラクトDNAを完成させた(図23)。この染色体断片挿入のステップは非常に困難であり(最も長い場合で完成したプラスミドの全長は約30kb)、効率の悪いCaCl<sub>2</sub>法ではなく、エレトロポレーション法により*E.coli*の形質転換を行い、更にコロニーハイブリダイゼーション法を用いて目的のクローンを得た。(以下、#X断片を挿入したDNAコンストラクトを#X/200と呼ぶ。)



### トランスジェニックフライの単離

得られた各DNAコンストラクトを、別々にショウジョウバエ胚 (*v;ry*変異体、前項参照) にマイクロインジェクションした。得られたG0世代の成虫に*v;ry*株を掛け合わせ、次世代の成虫についてコンストラクトDNAの挿入株をスクリーニングした。コンストラクトDNAが長くなればなるほど挿入株の獲得効率が下がるため(図 )、長いコンストラクトに関する導入株を得る場合は、通常の4~5倍のスクリーニングを行った。この結果図26に示すように、各コンストラクトDNAについて最低一株、合計21株のコンストラクトDNA挿入株を得た。獲得効率は、全長13.5kbの時は約5%、全長28.5kbの時では0.6%であった。

### エンハンサー非挿入株、BZ1.22の解析

*lacZ*遺伝子を発現させるプロモーターとして使用した*BarH1*断片は、予想される転写開始点から約2.5kb上流までを含んでおり、それ自体がエンハンサー活性を持つと考えられたため、エンハンサー断片を連結していない#200をショウジョウバエに導入した株、BZ1.22株を作製し、BZ1.22株における*lacZ*の発現を調べた。X-galによる活性染色、及び抗*lacZ*抗体による解析の結果、この断片にエンハンサー活性が存在していた(図27)。胚期においては、antenna-maxillary complexの一部、そして背中側の体節境界面での筋状の発現が見られた(図27a)。発現時期と領域は、抗*BarH1*抗体や抗*BarH2*抗体を用いて調べた結果と同様であった。ただ、antenna-maxillary complex付近の*BarH1/BarH2*の発現細胞の数は*lacZ*発現細胞数よりも多く、恐らく#200中に存在するエンハンサーはantenna-maxillary complexに関するエンハンサーの一部しか制御しないと思われる。また、BZ1.22では、腹側で各体節につき数細胞の規則的な発現が見られた。しかし、*BarH1/BarH2*の発現細胞とは異っており、恐らくエンハンサートラップによるものであると思われる(図27a)。また、三齢幼虫期における発現も同様に

観察したところ、翅原基において*BarH1/BarH2*遺伝子の発現と同様の、*notum* region (将来背中になる領域)での発現が見られた(図27c)。

以上の結果、ベクター構築時に用いた*BarH14.4kb*断片自体に、*BarH1/BarH2*の発現を制御するエンハンサーが部分的に存在していることが示唆された。

#### 胚での発現を制御するエンハンサー

得られた各コンストラクト挿入株について、胚期における発現を抗*lacZ*抗体を用いて調べた(図28)。#11/200導入株ではCNSで、#14/200導入株ではPNSでの発現が新たに観察された。

図29に示すとおり、#11/200導入株の一つ#2017株では、mid-line付近の3細胞を除くCNS細胞で*lacZ*の発現が見られた(b)。*lacZ*発現細胞が*BarH1/BarH2*発現細胞と同一であるか否かを調べるために、抗*BarH1*抗体と抗*lacZ*抗体を用いた二重染色を行った(図29a)。その結果、*BarH1*発現細胞(図29(a)i)の緑で染色された細胞)と*lacZ*の発現細胞(図29(a)iiiの赤で染色された細胞)が重なって検出される(図29(a)ii)ことから、これらの発現細胞が一致していることが示唆された。ただ、サンプルによっては*BarH1*発現細胞1個に対し、*lacZ*を発現する細胞が時折2つ観察された。*LacZ*蛋白質は比較的安定であるため、*Bar*の発現が終了した細胞において分解されていない*LacZ*蛋白質を検出した可能性が考えられる。さらに、抗*lacZ*抗体と神経特異的抗体であるMab22C10との二重染色を行い、抗*BarH1*抗体との二重染色の結果と比較した(図29(b)ii~iii)。この結果からも、*lacZ*を発現する細胞の位置が*BarH1*発現細胞の位置と同じであることが示唆された。

次に二つの#14/200導入株14-80株と14-266株について抗*LacZ*抗体を用いて抗体染色を行った。PNSで*BarH1/BarH2*同様の発現が観察された(図30(a))。*BarH1*蛋白質は細胞核に存在しているため丸い発現が観察されるが、*LacZ*蛋白質は細胞質にも存在するようであり、従って*BarH1*に比べて検出される発現細胞の領域が大きい(図30矢印)。発現細胞によっては、神経束を取り囲むような形状が観察された。*lacZ*発現細胞の数は、*BarH1/BarH2*発現細胞とほぼ同じで

あることから、#14エンハンサーがPNSでの*BarH1/BarH2*発現に関するエンハンサーを大部分カバーしているものと思われる。ただ、#19/200導入株における*lacZ*の発現を調べると、弱くPNSでの発現が観察されることから、この部分にもPNSに関するエンハンサーの一部が存在しているものと考えられる。ただ、発現が弱いため現時点で詳細な発現細胞の同定は出来ていない。

#14/200導入株の一つ14-80株について、抗LacZ抗体とMab22C10との二重染色を行い、抗BarH1抗体とMab22C10との二重染色で得られる結果を比較した(図30)。この場合も*BarH1*発現細胞と*lacZ*発現細胞の位置は一致していた。

#### 肢原基に関する*Bar*エンハンサー

ショウジョウ成虫肢は、付け根から順にCoxa, Trochanter, Femur, Tibia, Tarsus, Clawからなる。さらにTarsusは5つのセグメントに分かれている(図38-1c)。これらの構造は、三齢幼虫期の肢原基がくびれた結果でできる輪状の領域とそれぞれ対応している(図38-1a参照)。二つの#18/200導入株BM24とBM25の三齢幼虫肢原基をX-galを用いて活性染色したところ、いずれも輪状の染色が見られた(図31(b),(c))。*BarH1/BarH2*は、tarsal segment 5で強く、4で弱く発現しているが、BM24, BM25株の蛹初期の肢をXgalで活性染色し、肢原基の横側から観察するとtarsal segment 5だけが染色されたこと(Data not shown)から、#18DNA断片はtarsal segment 5に関するエンハンサーであると思われる。BM25株では強い輪状発現のさらに外側に弱い少数の点状発現が観察される(c)。しかし、この発現はBM24株では観察されないことから(b)、この点状発現はエンハンサートラップによるものであると考えられる。

二つの#11/200導入株#2017及び#2017j-5株の三齢幼虫肢原基をX-galで染色すると、いずれの場合も将来肢のclawに対応していると思われる二つの点状領域で*lacZ*の発現が観察された(図31(d), (e))。従って#11DNA断片には、肢のclawに関するエンハンサーが含まれていると思われる。また、#2017及び#2017j-5株双方で、本来の*BarH1/BarH2*発現領域とは異なる領域での*lacZ*の小さい点状発現が観察された((d), (e)の矢印)。もしかすると#11断片中にはこの点状発現に関

するエンハンサーが存在しているかもしれない。また、もしそうだとすれば #11以外の染色体DNA断片中にこの3領域の発現を抑制するサイレンサーが存在していると考えられる。

#13/200導入株である#13-55株の肢原基をX-galで染色したところ、中央付近でブロードな発現が観察された(図31(f))。抗LacZ抗体の染色を行うと、三齢幼初期のみにLacZの一過的な発現が見られることから(小嶋による)、#13断片には三齢幼虫初期の肢原基での発現に関するエンハンサーが存在しているかもしれない。しかし、#13/200導入株は一種類しかないため、lacZの発現はエンハンサートラップによるものかもしれない。

二つの#16/200導入株16-113及び16-131株ではいずれも、肢原基のごく一部の領域だけでlacZの発現が観察された((g), (h))。16-113株におけるlacZの発現は少し弱い、二種の株で類似していた。図32(a)にあるように、同様の発現は進化的に肢と関係が深いと考えられている触角原基でも見られた。従って、肢及び触角の発現領域に関するエンハンサーが#16DNA断片中に存在しているかもしれない。ただし、抗BarH1抗体では、この様な局所的な発現があるかどうかはtarsal segment 5に関するエンハンサーに隠れて確認できない。

#### 複眼・触角原基に関するエンハンサー

二つの#16/200導入株16-113株と16-131株、および二つの#17/200導入株17-24株と17-46株の三齢幼虫複眼原基をX-galで活性染色した結果、いずれの場合にも複眼原基の分化領域と思われる領域が染色された(図32a)。X-galの染色では解像度が悪く、細かい染色パターンを得ることができなかったため、これら4つの株について、抗LacZ抗体を用いて抗体染色を行った結果、分化領域で点状に規則正しくlacZの発現が観察された(17-24株の結果のみを図32(b)に示す)。野生株におけるBarH1の発現パターンを比較した結果、これらは光受容細胞前駆体R1/R6に対応する細胞群であると思われた(図32(b))。よって、#16、#17断片の重複領域(図32(e)参照)に光受容細胞前駆体R1/R6に関するエンハンサーが含まれている可能性が高い。

第一色素細胞と bristle group の1個眼上での位置及び形態を示した模式図を図38-2b)に示す。複眼上では個眼が規則正しく整列しているため、第一色素細胞や bristle group もまた整列して見える。16-113株および16-131株の蛹初期の複眼を抗LacZ抗体を用いて抗体染色を行った結果、いずれも第一色素細胞と思われる細胞群で lacZ の発現が観察された (16-113株の結果のみを図32(c)に示す)。2つの#17/200導入株ではいずれも lacZ の発現が見られなかったことから、第一色素細胞に関するエンハンサーは#16DNA断片中、#17DNA断片と重複していない領域に存在していると思われる (e)。野生株の *BarH1* の発現に比べ、16-113株における lacZ の発現が大きく見られるのは、*BarH1* の発現が細胞核で見られるのに対し、lacZ の発現は細胞質で観察されるためであると思われる (図38-2b参照)。一方、17-24株と17-46株の蛹初期の複眼をLacZ抗体を用いて染色した結果、両株とも bristle group に属すると思われる細胞群で *BarH1* と類似した lacZ の発現が観察された (17-24株の結果を図32(d)に示す)。2つの#17/200導入株ではいずれも lacZ の発現が見られなかったことから、bristle group に関するエンハンサーは#17DNA断片中、#16DNA断片と重複していない領域に存在していると思われる (e)。

3) 三齡幼虫複眼原基の運命予想図を図38-2a)に示す。これによると、将来単眼になる領域は複眼原基と触角原基の境目付近に存在していることが分かる (Ocと書かれた領域)。二つの#14/200挿入株14-80と14-266株の三齡幼虫複眼原基をX-galを用いて活性染色したところ、いずれも将来単眼になると予想される領域を含む発現が観察された (図33上段の矢頭)。従って、#14DNA断片には単眼領域に関するエンハンサーが存在しているかもしれない。ただ、染色領域はいずれも *BarH1/BarH2* 本来の発現領域に比べて広がった (図20上から二段目参照)。また、矢頭の発現以外に、これらの株では本来 *BarH1/BarH2* が発現していない領域での lacZ の発現が見られた (図33上段)。両者の発現パターンは互いに類似していることから、#14DNA断片中にはこれらの発現に関するエンハンサーが存在しているかもしれない。従って、これらの発現を抑えるサイレンサー領域が#14DNA断片以外に存在していると推定される。

3) 二つの#18/200導入株BM24とBM25株で、双方ともに触角原基の一部で筋状の発現が見られた (図33中段)。この領域では本来の *BarH1/BarH2* の発現は全

く見られないことから（図20参照）、#18DNA断片中にこの発現に関するエンハンサーが含まれており、他の染色体断片中にこの発現を抑えるサイレンサーが存在していると考えられる。

4) 二つの#11/200導入株2017株と21017j-5株で双方ともに複眼の分化領域の、光受容細胞前駆体の下側に位置すると思われる領域での*lacZ*の発現が見られた（2017株の結果のみを図33右下に示す）。この領域は本来の*BarH1/BarH2*の発現領域であると考えられることから、#11DNA断片にはこの領域に関するエンハンサーを含んでいると推定できる。

5) #12-1/200導入株192a株では、三齢幼虫触角原基の*alista*になる領域付近で輪状の*lacZ*の発現が見られた（図33左下、図38-2aの模式図も参照）。この領域も本来*BarH1/BarH2*が発現している領域である。しかし、そのすぐ外側に同じく輪状に本来*BarH1/BarH2*では見られない発現が観察され、しかも#12-1/200導入株は複数ライン得られていないことから、*alista*に関するエンハンサーの候補として考えるにとどめざるを得ない。

#### 脳に関する*Bar*エンハンサー

#11/200導入株2017株及び21017j-5株における三齢幼虫期のbrain hemisphereをX-galを用いて染色したところ、*BarH1*と類似した輪状の*lacZ*の発現が観察された（図34右に2017株の結果を示す）。#11DNA断片中にはこの発現に関するエンハンサーが含まれていると思われる。

#### エンハンサートラップについて

同じコンストラクトDNA導入株であるにも関わらず、異なる染色パターンを示すものも存在した。#17/200導入株において、一方（17-24株）では中央付近でわずかに染色が観察され（恐らくsensory organ）、もう一方（17-42株）では肢原基のかなり広範にわたり、発現が観察される（図35のa,b）。翅原基においても、wing marginやventral hingeに対応する領域で発現が見られ、これらも、同

じコンストラクトDNA導入株であるにも関わらず発現パターンが異なる (図35のc,d)。これらに共通な点は本来の*BarH1*や*BarH2*の発現パターンとは異なる点である。#12-1/200導入株である192-a株では、ブロードな発現が観察される。しかし、一見発現パターンが輪状に見えるものの、*BarH1*や*BarH2*の発現領域より広い。更に、17-42株、あるいは5630株 (#20/200導入株)の胚においても本来の*Bar*の発現とは異なる発現パターンを示した (図35)。コンストラクトに挿入した染色体断片とは無関係の発現制御によって*lacZ*が発現してしまうのは、恐らくコンストラクトの挿入位置の近傍に存在する別の遺伝子に働きかけるエンハンサーをトラップしてしまっていると考えられる。

#### エンハンサー領域の細かい限定

#16及び#17では三齢幼虫期における光受容細胞前駆体R1/R6での発現を制御するエンハンサーが、また、#18では同じく三齢幼虫期において肢原基の将来 tarsal segment#5になる領域での*Bar*遺伝子の発現を制御するエンハンサーがそれぞれ単離できた。それぞれのエンハンサー断片の長さは各4.6kb、6.0kbと長い。ため、このままでは蛋白質結合配列の同定が困難であり、またこの様なエンハンサーをツールとして用いるにも不便である。そこで、これらのエンハンサー領域の限定を行った。まず、それぞれの断片を数種の制限酵素で分割し、それらをそれぞれ#200に挿入した。この際、ベクター側のunique siteは*SaI*しか存在しないので、まず、マルチクローニングサイトの両端に*XhoI*サイトを導入したpBluescript、pSKXを作製し、分割したエンハンサー断片をpSKXに挿入した。pSKXに挿入した断片を*XhoI*処理し、これを#200に挿入した。こうして完成した一連のコンストラクトDNAをそれぞれショウジョウバエに導入し、トランスジェニックフライを得た。得られた株をそれぞれX-galの活性染色、あるいは抗*LacZ*抗体によって抗体染色した。

(1) 光受容細胞前駆体R1/R6に対応するエンハンサー断片、#16-17についての結果は以下の通りである。図36aの1、2、3についてはR1/R6での発現が見られた。よってエンハンサー領域は*HindIII-XbaI*内に存在すると思われた。ところ

が、領域をHindIII-PstI、PstI-XbaIと分割すると、R1/R6での発現が見られなくなった。従って、光受容細胞前駆体R1/R6に対するエンハンサーは恐らく図36aのPstIサイトにまたがって約1.8kb以内に存在しているものと思われる。

(2) tarsal segment5に対応するエンハンサー断片、#18についての結果は以下の通りである。#18の断片を7つの領域に分割し、それらについてそれぞれエンハンサー活性の有無を調べたところ、図36bの#2.5断片(BglII-BamHI 0.6kb断片)で、輪状の明瞭な発現が見られた。従って、この領域約1.6kb中にエンハンサーの主要部分が存在しているものと思われる。また、#2.3及び#2.4で微弱なシグナルが検出された。BglII-BamHI0.6kbについては、全塩基配列を決定した。29塩基のpurine-pyrimidineの繰り返しが見つかったが、現時点ではそれ以外の分子結合的配列は見いだされていない。

*Df(1)BH2*変異体はBarエンハンサーの部分欠失変異株である

*Df(1)BH2*は*BarH2*とその近傍領域を欠損した変異株であり(図40(a))、以下の特徴を持つ。

(1) 成虫の形態的な異常は殆ど観察されないが、*forked*が*Df(1)BH2*欠損領域中に存在しているため、剛毛がちじれたような表現型をとる。

(2) *Df(1)BH2*は、雌のホモ接合体が不妊である(雄は生殖能力を持つ)。

(3) *Df(1)BH2*のホモ接合体及びヘミ接合体の活動性はとも活動性低下する。

*Df(1)BH2*株の欠損領域中には*BarH2*のほか、*forked*(上記)、*D-fimbrin*が存在している(図40(a))。*forked*変異体は20種類近くのアリルが存在するが、それらはすべて行動異常を示さない。また、*D-fimbrin*は、アクチン結合蛋白質をコードしており、行動異常に関わるとはすぐに期待されないかもしれない。

*Df(1)BH2*欠損領域中には、*forked*、*D-fimbrin*、*BarH2*以外の転写単位としては蛋白質をコードしていない0.8kbRNAがあるが、それも行動異常につながることは考えにくい。

このような考察を基に、(3)で示した*Df(1)BH2*株の行動異常は*BarH2*、あるいはその近傍領域の欠損に惹起されたと推定した。別の実験から、*BarH2*の欠損は*BarH1*により機能的に補うことが出来ることが示されている。(Higashijima et



al.1992b)。従って、*Df(1)BH2*株の行動異常は単なる*BarH2*遺伝子のみ欠失でも説明できない。しかし、*BarH2*近傍配列に*BarH1/BarH2*の神経あるいは筋肉などに特異的な共エンハンサーが含まれていれば、*Df(1)BH2*株の行動異常は説明できるかもしれない。この考えが正しいとすると、*BarH2*あるいは*BarH1*と予想されるエンハンサー断片とを連結して*Df(1)BH2*変異株に導入することにより行動異常は回復すると考えられる。そこで、*BarH2*遺伝子近傍の染色体DNA領域約8kb断片（エンハンサーアッセイで用いた#11断片；*Df(1)BH2*株で欠損している）を*BarH2*遺伝子と共に*Df(1)BH2*株に導入することを試みた。なお、エンハンサーアッセイの結果から#11断片には三齢幼虫期の脳と肢原基のclaw、胚期のCNSに関するエンハンサーの一部が存在していることが分かっている（図39）。

まず、基本となるベクターを構築した（図40(b)）。*BarH2*遺伝子のうち、第一エクソンの途中ApaIサイトまではゲノムDNA断片、それより下側は*BarH2*のcDNA断片を連結したミニ*BarH2*遺伝子を作製し、*BarH2*のpoly(A)付加シグナルを連結したのちP因子ベクターpYC1.8に挿入して基本ベクターを完成させた（図40(b)、BH2CRV#12）。このベクターのSalIサイトに、*BarH2*近傍のSalI-SalI8kb断片を挿入し、DNAコンストラクト(BH2CRV#12/Sal8)を得た。作製したDNAコンストラクトを*v.rj*変異株のショウジョウバエ胚にマイクロインジェクションし、ひとつのBH2CRV#12/Sal8導入株（1541株）を得た。また、*BarH2*遺伝子のゲノムDNAクローンとして用いた断片中にエンハンサーが存在し、そのためにベクターDNA自体に行動回復の能力が存在する可能性が否定できなかったため、BH2CRV-12も同様にショウジョウバエ染色体に導入し、三つの導入株

（#4034,4016,4031）を得た。3ラインのうち、以下の実験には#4034を用いた。

まず、*Df(1)BH2*の活動性を測定した（図42、測定法は<方法>及び図53参照）。*Df(1)BH2*株は*vermilion*変異を同時にもつため、コントロールとして*v.rj*株を用いた。すると、*v.rj*株は40秒ではほぼ均一にガラス管内に分布するようになり、その後定常状態になった（図42黒線）。ところが、*Df(1)BH2*株では120秒を経過しても中央線を通過する個体は殆どいなかった（図51青線）。次に#1541及び#4034株について図41に示すような掛け合わせを行い、コンストラクトが挿入した染色体を持つような*Df(1)BH2*株を作製した。これらについて、それぞれ同様のアッセイにより活動性を測定した。その結果、

1) #1541を導入した*Df(1)BH2*株は活動性が回復し、ほぼ正常株 (*v,ry*株) と同じ値を示した (図42赤線)。

2) #4034を導入した*Df(1)BH2*株は殆ど活動性が回復しなかった (図42緑線)。

1) と 2) の結果から、*Df(1)BH2*の活動性低下は、#11断片に相当する染色体DNAの欠損によって引き起こされていることが示唆される。ただし、

*BarH2CRV#12/Sal8*導入株は、現時点では一つ (1541株) しか得られていないので、1541株による変異の抑制が*BarH2*遺伝子のectopicな発現 (挿入点近傍のエンハンサーによる) による可能性はまだ完全には排除されていない。

更に、強い光刺激によって*Df(1)BH2*株の活動性が変化するかどうか検討した (図43)。*Df(1)BH2*、及びコントロールとしての*v,ry*株について光刺激を与えたときの活動性を測定した (<方法>及び図53参照)。その結果、光刺激時の*Df(1)BH2*株の活動性 (図43bの赤線) は*v,ry*株の光非刺激時程度に上昇した (図43aの黒線)。よって、*Df(1)BH2*株は正常株並の活動性を示す運動能力を備えており、*Df(1)BH2*株の活動性低下が肢や筋肉の欠損により引き起こされている可能性は小さいと示唆された。光学顕微鏡のレベルで、*Df(1)BH2*株と野生株との成虫肢の形態を比較しても特徴的な差異は見出だされなかった。

## <考察>

エンハンサーアッセイの結果から推定された一連のBarエンハンサーの存在位置を図37にまとめた。各エンハンサーの位置は、逆位変異体を用いた解析結果と基本的に矛盾しなかった(図22参照)。一部の例外を除き、離れた距離に同一細胞での発現に関するエンハンサーは同定されなかった。従って逆位変異体の結果ともあわせ、*BarH1*と*BarH2*が共発現するのは基本的には組織特異的の共エンハンサーが別々に存在し、それぞれが*BarH1*と*BarH2*を同時に制御しているためではないかと推測された。*BarH1/BarH2*の組織特異的共エンハンサーはほぼ全て単離・同定できたと思われるが、一部のエンハンサーの同定が困難であった。例えば、*arista* やCNSのmid-line付近の3細胞に関するエンハンサーは未だ特定できていない。これらの未特定エンハンサーは*BarH1-BarH2*の外側に位置しているか、あるいはここでアッセイできなかったDNA断片の境界にまたがって存在しているかもしれない。特定されたBarエンハンサーが本当に正しいものであることを証明するには、抗*BarH1/BarH2*抗体と抗*lacZ*抗体を用いた二重染色による解析が必要である。本実験ではCNS細胞においてのみこの検討を行ったが(図29)、結果は予想通り同一であった。

エンハンサーアッセイを行った結果、当初予期していなかったことではあるが、同じコンストラクトを導入した複数のラインで本来*BarH1/BarH2*が発現していないと思われた領域で類似した*lacZ*の発現がしばしば観察された(図31~33)。このうち、二つの#18/200導入株BM24とBM25はコンストラクトが挿入した染色体が異なる(BM24:2番染色体、BM25:3番染色体)ため、同じ染色体DNA領域にコンストラクトが挿入している可能性はない。従って、#18DNA断片には本来*BarH1/BarH2*が発現していない領域特異的なエンハンサー(ectopicエンハンサー)が存在しており、正常なBar領域染色体上では、ectopicエンハンサーの活性を抑えるシス領域(サイレンサー)が調べた断片外もしくは断片境界に存在していると考えられる。この推定を明らかにするためには、単離したエンハンサー断片に別の染色体DNA断片を更に連結し、発現が消失するかどうかを検討するサイレンサーアッセイが必要であると思われる。

*BarH1/BarH2*間の染色体DNA領域では、一連のectopicエンハンサーやそれらに特異的なサイレンサーと本来の*BarH1/BarH2*発現に関するエンハンサーとが入れこに存在していると想像される(図44)。サイレンサーがどのような機構で対応するectopicエンハンサーの働きを抑制し、本来の*Bar*エンハンサーの働きを抑制しないのか、という問題もまた興味深いと思われる。

ectopicエンハンサーによる発現とは別に、同じコンストラクトを導入した複数の導入株間で異なるlacZの発現が見られる場合もあった(図35)。また逆に、発現すべきコントロールエンハンサー活性が消失してしまう場合もあった。この理由は、導入したlacZ遺伝子が異なるコンストラクト挿入点近傍にある別のエンハンサーあるいはコントロールエンハンサーに特異的なサイレンサーをトラップしたためであると考えられる。これらの影響を防ぐ手段の一つは、コンストラクトの両端をインシュレーター配列ではさみ、lacZ遺伝子が他のエンハンサーの影響を受けないようにすることもかもしれない。

序で述べたように*Bar*エンハンサーを単離した目的のひとつは、*BarH1/BarH2*同時欠損株に欠損させたい細胞に対応する以外の全てのエンハンサー断片を*Bar*遺伝子と共に戻すことにより細胞特異的な*Bar*変異株を作製したい、ということである。ところが、ectopicエンハンサーとサイレンサーの存在が予想されたため、エンハンサーを含む断片だけを単純に連結すると*Bar*本来の発現とは異なる発現を誘発し、正しい*Bar*の発現を再現することが出来なくなる可能性が出てきた。エンハンサーと*Bar*遺伝子を*BarH1/BarH2*同時欠損株に導入する際、サイレンサーも同時に考慮する必要が出てくるかもしれない。最終的に導入するDNA断片のサイズが出来ただけ大きくならないようにするために、本実験で得られた*Bar*エンハンサー領域をさらに限定する必要があると思われる。従って図36で示したようなエンハンサーの限定実験を行うことが急務である。また、エンハンサー領域限定をより効率よく行うための1つの手段として、*D.melanogaster*の近縁種*D.ananassae*における*Bar*エンハンサーのcounterpartを単離し両者の塩基配列を決定し、その相同性から必要領域を保存領域として限定することが考えられる。

エンハンサーアッセイの結果特定された様々な組織特異的エンハンサーは、予想されるサイレンサー、ectopicエンハンサーいずれも、様々な遺伝子の発現

を活性化させるon/offスイッチとして利用できると思われる。また、実際にエンハンサーアッセイを行うことは、隠されたエンハンサー単離への道を開き、将来的な“エンハンサー工学”の展開のためにも意義あるものであると考えられた。

様々の組織特異的共エンハンサーが*BarH1/BarH2*間約80kbに点在していることが分かった。進化の過程でこの様な一連の“Bar”エンハンサーがどのようにして生じたかという問題は興味深い。可能性の一つとしてエンハンサー重複が考えられる。*BarH1/BarH2*間に存在するエンハンサー領域のヌクレオチドの決定と、各エンハンサー間の比較から何らかのヒントが得られるかもしれない。

エンハンサーアッセイの過程で、*BarH2*とその近傍DNA領域を欠損している変異株 (*Df(1)BH2*株)の行動異常がBarエンハンサーの欠損によるものであることを示した。*Df(1)BH2*株の行動異常が、レスキュー断片 (8kb)のどの部分に依拠しているのかは現時点では不明である。より細かく分子解剖し行動回復実験を繰り返す必要がある。行動回復に必要な最低限のエンハンサー断片が特定されれば、*lacZ*遺伝子に連結して個体に戻し、発現細胞が脳神経特異的であるか否かの特定が可能になる。

この文脈においては、*ccb*(central complex broad) 変異が注目に値する。*ccb*変異の位置は染色体上で*Bar* (57.0)のごく近傍近傍56.7である (Heisenberg et al.1985)。*ccb*もまた*Df(1)BH2*と同様に行動異常を引き起こすことが知られている (Strauss and Heisenberg,1993)。*ccb*変異株では、成虫脳の中で情報を統合する役割を果たすcentral complexの形態が変化する (Strauss and Heisenberg,1993、図44参照)ので、もし仮に*ccb*変異と*Df(1)BH2*変異が同一エンハンサー欠失(又は変化)ならば、*Df(1)BH2*株でもcentral complexの形態異常が起こっていると想像される。今後成虫脳における*BarH1/BarH2*の発現と脳の形態異常との関連を解析する必要がある。

### 第三章

## セグメントポラリティー遺伝子 *hedgehog*の構造解析

## <序>

*hedgehog* (*hh*) 変異体はNusslein-Volhardらのグループによって単離された変異株である (Jurgens et al.1984)。*hh*変異株の幼虫では、各体節の後部区画に存在するnaked regionが欠失し、またventral denticleの前後極性が失われている (Mohler.1988)。従って、*hedgehog*遺伝子はセグメントポラリティー遺伝子の一つであると考えられる。セグメントポラリティー遺伝子は体節の前後極性に変異を引き起こす一群の遺伝子であり、*hedgehog*の他に*engrailed(en)*、*patched(pte)*、*wingless(wg)*、*fused(fu)*、*gooseberry(gsb)*など、現在までに10数種類が知られている (Poole et al.1985、Hooper and Scott.1989、Rijsewijk et al.1987、Preat et al.1990、Baker et al.1987)。Inghamらは、胚期における体節の極性決定が*hh*を含む一群のセグメントポラリティー遺伝子産物の細胞間コミュニケーションによって決定されるというモデルを提唱した (Ingham et al.1991)。

セグメントポラリティー遺伝子は、胚だけでなく肢原基などの成虫原基でも、前後極性を含む位置情報を決定しているだろうと考えられている (Bryant.1993)。第2章で述べたとおり、*BarH1*や*BarH2*は、肢原基や複眼原基などで発現している (第二章;小嶋ら未発表)。三齢幼虫肢原基における*BarH1/BarH2*の輪状発現は、セグメントポラリティー遺伝子などによって決められていると思われる肢原基上の位置情報に従って誘発されると考えられている (小嶋ら未発表)。従って、*hedgehog*遺伝子を含むセグメントポラリティー遺伝子を解析することは、肢原基における*BarH1/BarH2*遺伝子の発現制御機構を理解する上で役立つのではないかと考えた。また、*hedgehog*変異株の一つである*bar-3*変異株では、*B*変異同様の複眼の個眼数減少が観察される。複眼原基上でのmorphogenetic furrow進行は、分化細胞で*hedgehog*遺伝子が発現し、decapentapregic遺伝子の発現を誘発することが原動力になっている (Heberlein et al.1994)。また、*B*変異ではmorphogenetic furrowでの*hedgehog*の発現が抑制されることが示されている (Heberlein et al.1994、Ma et al.1994)。従って、*hedgehog*は複眼原基上でも機能しているかもしれない。もしそうならば、正常な複眼形成においても*BarH1/BarH2*と*hedgehog*との間に何らかの関係があることは否定できない。また、*B*変異での複眼異常の機能解析においても*hedgehog*遺伝子の解析が役立つ

に違いない。このような理由から、本研究では*hedgehog*遺伝子の単離と解析を行った。

*hedgehog*遺伝子の単離は、まず、*Drosophila melanogaster*のゲノムデータベース（FlyBase）から、*hedgehog*遺伝子の塩基配列を入手した。

次に、この塩基配列をGenBankに登録した。そして、この塩基配列を、GenBankに登録している他の*hedgehog*遺伝子の塩基配列と比較し、同源性を確認した。

結果として、*Drosophila melanogaster*の*hedgehog*遺伝子の塩基配列と、*Drosophila obscura*の*hedgehog*遺伝子の塩基配列との同源性は、約90%であった。

以上から、*Drosophila melanogaster*と*Drosophila obscura*の*hedgehog*遺伝子の塩基配列は、非常に類似していることがわかった。

したがって、本研究では、*Drosophila melanogaster*の*hedgehog*遺伝子の塩基配列を、GenBankに登録した。

GenBank登録番号: *hedgehog* (Accession No. F01234)

GenBank登録番号: *hedgehog* (Accession No. F01235)

GenBank登録番号: *hedgehog* (Accession No. F01236)

GenBank登録番号: *hedgehog* (Accession No. F01237)

GenBank登録番号: *hedgehog* (Accession No. F01238)



## <材料と方法>

### 使用したショウジョウバエ株

hedgehogのエンハンサーをトラップしたラインとして、当研究室で単離されたライン、Q50株を使用した。Q50株はホモ接合体が致死であるため、実際にはQ50/TM3 Ser を実験に用いた。相補性テストを行うために用いたhh欠損変異株はhh を使用した。

正常なhedgehogの発現パターンの解析にはCanton-Sを用いた。また、P因子ベクターを導入するためのショウジョウバエ株として、ry<sup>506</sup> 株を用いた。コンストラクトが挿入した染色体をホモに持つ株を作製するために、N<sup>8</sup>/FM7、CyO/Sc<sup>+</sup> ry<sup>506</sup>、Sb TM3 ry<sup>506</sup>/rf10 を使用した。

### 使用した大腸菌株とDNA

スクリーニングには以下のフェージライブラリーを使用した。

*D.melanogaster* genomic library(EMBL-3)

*D.melanogaster* cDNA library(λgt10,3-12 embryonic stage)

また、クローニング用プラスミドベクターには、pUC19、pBluescriptIIKS<sup>+</sup>及びpKS<sup>+</sup>(Stratagene社)を用いた。ショウジョウバエの全ゲノムDNAは、特に記述しない限り、Canton-Sの全ゲノムを用いた。

DNAに対するハイブリダイゼーション (サザンプロット、コロニーハイブリダイゼーション)

プロットング実験の基本的な手順はMolecular Cloning(Sambrook,1989)に従った。また、その他の手法は第一章で述べた方法を用いた。

## DNAシーケンシング

手順はMolecular Cloning(Sambrook,1989)の方法に従った(第一章の<材料と方法>参照)。

## RNAに対するハイブリダイゼーション・Primer extension実験

第一章の<材料と方法>の方法による。

## 胚に対するin situ ハイブリダイゼーション

手順はTautz and Pfeifle(1989)に記述された方法に従った。

## <結果>

### エンハンサートラップラインQ50株

当研究室で単離したエンハンサートラップラインの一つの致死ラインQ50株におけるlacZの発現パターンをX-galを用いた活性染色で調べたところ、図46に示すようにセグメントポラリティー遺伝子の一つである*engrailed*遺伝子の発現パターンと類似していた。しかし、Q50変異は*engrailed*のlocusの乗っていない染色体上にマップされた (*engrailed*は第2染色体、Q50は第3染色体)。従ってQ50株におけるlacZの発現は、*en*とは異なる遺伝子のエンハンサーに依拠すると推定された。また、P因子を再転移させると致死性が回復したことから、Q50の劣性致死はP因子ベクターの挿入によって生じていると考えられ、*en*と同様後部区画のアイデンティティー確立に重要な役割を果たしていると推定される。遺伝学的解析から、後部区画のアイデンティティー獲得には、*engrailed*の他*hedgehog*が重要であることが推定されていた (Ingham et al.1991)。そこで、Q50致死変異株と*hedgehog(hh)*欠損変異株とを用い相補性テストを行ったところ、互いに相補しなかった。即ち、Q50株の致死は、*hedgehog*遺伝子近傍にP因子ベクターが挿入し*hedgehog*マイナスにしたことによると結論された。そこで*hedgehog*遺伝子を得るために、P因子ベクター挿入点近傍の染色体DNAの単離を行った。P因子ベクター中にはpBluescriptSKが含まれているので、pBluescriptSK断片をプローブに使い、Q50株のゲノムDNAを用いて作製したゲノムDNAライブラリーからP因子ベクター挿入点の近傍領域を含むクローン、P401を単離した (図46a)。さらにP401をプローブに用いて、野生株のゲノムライブラリー由来のゲノムDNAクローン、B2-2、ES7.8、E4.0を得た。染色体DNA上の相対的な位置関係を図47に示す。

cDNAクローン、*chh12*およびC3の単離

ゲノムDNAクローンSE7.8とE4.0をプローブに用い胚期の全RNAに対してノーザン解析を行ったところ一本のバンドの検出が確認された(田代修論参照)。同じプローブを用いショウジョウバエの3~12時間胚由来のcDNAライブラリーを約70万個スクリーニングし一つの陽性クローンchh12を得た。更にchh12をプローブに用いゲノムDNAライブラリーを再スクリーニングしたところ、ES7.8、ES4.0でカバーされない新たなゲノムDNAクローンG23を得た(図47A)。つぎに、図48aに示すようなサブクローンのシリーズを作製し、これらを用いてchh12挿入断片、約1.9kbの全塩基配列を決定した(図48b)。また、chh12とその近傍に対応する領域のゲノムDNAクローンの塩基配列を決定した。chh12の3'末端にはpoly(A)が附加されておらず、典型的なpoly(A)附加シグナルも含まれていなかった。そこで、更なる3'側を調べるため、G23の一部をプローブに用い、cDNAライブラリーを再スクリーニングしたところ、cDNAクローンC3を得た。C3の塩基配列を決定したところ、C3とchh12はオーバーラップしており、3'末端にpoly(A)が見出された。従って、対応するcDNAの3'末端が決定した。chh12とC3をあわせ、得られたcDNAクローン長は合計2.0kbであった。287-306番目の塩基に対応する合成プライマーを用いてプライマー伸長実験を行ったところ、約70塩基のバンドを3本検出した。また、cDNAクローンの上流200塩基のゲノムDNA配列中には、スプライシングのアクセプターコンセンサス配列は存在しなかった。従って、cDNAの5'末端はcDNAS'末端から約200塩基上流にあることが推定された(図48)。これらの結果から推測されるmRNAの全長は約2.2kbであり、ノーザン解析の結果から推測されるmRNAの長さ約2.3kbとくらべて大きな矛盾はなかった。

得られたcDNAクローンとゲノムDNAクローンとの塩基配列を比較した結果、chh12-C3転写産物は少なくとも3つのエクソンから成り立っていることが示唆された。第一イントロンは約8kbと推測された。第二イントロンをカバーするゲノムDNAクローンは未同定のため正確な長さは分からなかったが、サザンブロットの結果から第二イントロン長は15kb以上であることが推定された。また、挿入されたP因子の一部をもつクローンの塩基配列を行い、ゲノムDNAクローンの塩基配列と比較した。その結果、P因子挿入コンセンサス配列(GGCCAGAC)と8塩基中4塩基が一致した塩基配列(GGCCTAGG)に続いてP

因子の塩基配列が予想転写開始点の約230塩基上流に存在した。従ってQ50株はこの位置にP因子が挿入していることが明らかになった(図48)。またP因子挿入点のすぐ上流側に、G塩基とT塩基からなる繰り返し構造(ZDNA)が見出された(図48)。ZDNAはしばしばエンハンサー中に見出されることから

(Norheim and Rich.1984)、P因子挿入点のすぐ上流側に見出されたZDNAもまた、得られた遺伝子の転写制御に何らかの役割を果たしているかもしれない。

#### hedgehog遺伝子の同定とhedgehog蛋白質の予想アミノ酸配列

もし単離した遺伝子がhedgehog遺伝子ならば、得られたゲノムDNAクローン中に、hhの欠失変異株における欠失領域が含まれているはずである。そこで、hh欠失変異株における欠失DNA領域(Mohler and Vani.1992)と単離した染色体DNA構造を比較したところ、hh<sup>HL3</sup>、hh<sup>HL2</sup>、bar-3の染色体欠損領域が単離した遺伝子の第一イントロン内に存在することが明らかになった(図46)。これは、cDNAとして回収した遺伝子がhedgehog遺伝子であることの強い根拠である。

chh12-C3の塩基配列から、hedgehog蛋白質のアミノ酸配列を推定した。最も上流にあるMetコドンの6塩基上流にはin frameで終止コドンが存在していた。したがって、hedgehog蛋白質は最も長い場合で471アミノ酸からなると考えられる。次に、Kyte and Doolittle法(Kyte and Doolittle.1982)によってhedgehog蛋白質の疎水性を計算したところ、75番目のアミノ酸付近を中心にして広がる疎水性領域を見出した(図49矢印)。この領域に対応するアミノ酸配列はhedgehog蛋白質中のどこに存在するか検討したところ、64-82番目に疎水性アミノ酸残基の連なりを見出した(図48b)。

一般的にシグナル配列は、膜貫通に必要な12アミノ酸以上の疎水性アミノ酸が連なり(多くの場合は17-24アミノ酸である; Rao and Argos.1986)、最もC末端側にAlaなど非電荷の小さい側鎖を持つアミノ酸が位置する(Watson.1984, Rao and Argos.1986)。また、シグナル配列の上流5アミノ酸残基以内に塩基性アミノ酸が見出される場合が多い(Watson.1984, Rao and Argos.1986)。hedgehog蛋白質中に見出された疎水性アミノ酸領域は、これらの条件を全て満たしていたことから、可能性の一つとしてこの疎水性領域はシグナル配列であると考えられ

た。シグナル配列は一般的に蛋白質の最もN末端側に位置することが多いので (Watson et al.1984)、もしこの疎水性領域がシグナル配列として機能するならば、hedgehog蛋白質の開始コドンは51番目のMetコドンが使用されることも否定できない (図48(b))。この疎水性領域がシグナル配列でない場合、別の可能性としてこの疎水性領域は膜貫通ドメインとして機能することが考えられる。一般に疎水性領域が膜貫通ドメインとして機能するためには、Kyte and Doolittle法によって計算した疎水性領域のピークが1.13以上必要であると考えられている

(Rao and Argos.1986)。この疎水性領域は以上の条件も満たしているので、膜貫通ドメインとしても機能しうる可能性は排除できない。膜貫通ドメインを持つ蛋白質は、そのN末端側にシグナル配列を持つ場合が多いことから (Watson et al.1984)、この疎水性アミノ酸領域が膜貫通ドメインとしてとして働くことと仮定した場合、hydropathy plotでこの疎水性領域の更にN末端側に見られるピークに対応する領域がシグナル配列として機能すると考えざるを得ない。

なお、hedgehog蛋白質の予想アミノ酸配列と類似した配列をもつ蛋白質が他に存在するかどうか検索するために、Genbankに登録されているアミノ酸配列データとの相同性検索を行ったが、hedgehog蛋白質のアミノ酸配列全体にわたって類似するようなアミノ酸配列は見出せなかった。

### hedgehog遺伝子の位置、及び発現

hedgehog遺伝子の染色体上の位置を同定するため、ゲノムDNAクローンSE7.8を用いて唾腺染色体に対する *in situ* hybridization を行なった。その結果、第三染色体の94D~Eの領域にハイブリダイズしたバンドを確認した (図46b)。従って、hedgehog遺伝子は94D/E領域に存在していることが示唆された。この領域は以前から遺伝学的分析により知られていたhedgehog遺伝子座、94D10-E5と一致する。

次にhedgehog遺伝子の時間的な発現パターンを調べるため、chh11断片をプローブに使い、胚、幼虫、蛹、成虫からそれぞれ得た約5 $\mu$ gのpoly(A)RNAに対してプロベティングを行った。その結果、胚期、幼虫期、蛹期について約2.3kbの

バンドを一本検出した。胚期、蛹期について更に細かくステージを分け同様にノーザン解析を行ったところ、6~12時間胚の時期、及び蛹化後0~24時間に濃いバンドを検出した(図47)。従って、もし*hedgehog* mRNAの安定性にステージ依存性がなければ、*hedgehog*のmRNAはこれらの時期に最も多く転写されると思われる。

また、空間的な*hedgehog*遺伝子の発現パターンを調べるために、*in situ* hybridizationを行った。プローブには*chh11*をテンプレートに用い*in vitro*転写によって作製したアンチセンスRNAプローブを用いた。*hedgehog*の発現は、まず胚期の細胞胚期(ステージ5)初期に胚の前部と後部に数本のストライプとして観察される(図51左上)。ステージ5の後期には各体節ごとの発現が始まり、最終的に合計17本程度のストライプが見えるようになる(図51左中)。これらの発現は胚帯伸長期(ステージ8~11)にピークを迎える(図51右上)。胚帯の伸長が完了するステージ12の頃、*hedgehog*のストライプ状の発現は各体節のposterior区画に限定される(図51右中)。その後、*hedgehog*のストライプ状の発現は胚期の間続く。ただ、発現量はステージ15の頃に減少する。この結果は、Q50株の*lacZ*の発現と一致していた(田代修論)。また、この発現パターンは、ステージ13~14において中枢神経系での発現が認められない(図48右下)以外は、*engrailed*の発現パターンと類似していた(Kornberg et al.1985)。

## <考察>

*hedgehog*のcDNAクローンchh11を単離して塩基配列を決定した。ほぼ同時に他の3つのグループが独立して*hedgehog*遺伝子の塩基配列を発表した(Mohler and Vani,1992、Lee et al.1992、Tabata et al.1992)。うち2グループの発表した*hedgehog*遺伝子のアミノ酸配列は本実験から得られた結果と全く同一であった(Lee, et al.,1992、Tabata,et al.,1992)。第二イントロン長に関して他のグループは約8kbであると報告しており(Lee, et al.,1992、Tabata,et al.,1992)、本実験の結果と異なる。この相違が生じた理由の一つとして、本実験で使用したゲノムDNAライブラリーの作製に用いたショウジョウバエ株が、他のグループが用いたゲノムDNAライブラリーのものとは異なるということが考えられる。もしそうならば、本実験で(あるいは他のグループが)得たゲノムDNAクローンの第二イントロン中に何らかの挿入/欠失が生じ、その結果イントロン長が変化しているという可能性は否定できない。また、*hedgehog*mRNAの5'末端の位置も、他のグループの結果と異なった。原因は不明だが、もしかすると転写量の多い他のmRNAをとらえてしまっているのかもしれない。

塩基配列の解析及びhydropathy plotの結果から、*hedgehog*蛋白質のN末端付近に持つ疎水性領域は、シグナルペプチドあるいは膜貫通ドメインとして機能するかもしれないと推定された。*hedgehog*蛋白質は実際に疎水性領域のC末端側付近でプロセシングされることを強く示唆するデータが得られた(織原ら未発表、Lee et al.1992)ことから、この疎水性領域は、膜貫通ドメインではなくシグナルペプチドとして機能すると考えられた。なお、その後の解析結果により、*hedgehog*蛋白質は疎水性領域のC末端側以外に、260番目のアミノ酸残基付近もプロセシングを受けることが示された(織原ら未発表、Lee et al.1994)。さらに、C末端側約60アミノ酸を欠損した*hedgehog*蛋白質は260番目のアミノ酸残基付近のプロセシングを受けないことから、*hedgehog*蛋白質は(プロセシング部位のC末端側に恐らく存在する)*hedgehog*蛋白質自身のプロテアーゼ活性によってプロセシングされることが推測された(織原ら未発表、Lee et al.1994)。今後、どの分解産物がプロテアーゼ活性を持つかという問題を始め、より詳細が明らかになるものと思われる。



*hedgehog*遺伝子が*BarH1/BarH2*遺伝子の発現制御にどのような影響を与えるかを調べる第一歩として、*hedgehog*のectopicな発現による*BarH1/BarH2*の発現の変化について解析を試みた。そのために、*chh11*(*hedgehog*のcDNAクローン)をhsp70プロモーターに連結した断片を持つP因子ベクターを構築し、マイクロインジェクション法によって個体に導入した。しかし、単純した導入株では、熱ショックによって*hedgehog*遺伝子のectopicな発現が誘導されなかったが大きな形態変化には繰り返した熱ショックが必要であった(Kojima et al.1994)。この場合、*patched*遺伝子のdoseを減らすことにより*hedgehog*の効果は大きくなった(Kojima et al.1994)。一つのラインh9D株では、*hedgehog*が未同定の翅エンハンサーでコントロールされており、その発現により翅の前部区画構造が重複されることが示された(Kojima et al.1994)。また、*hedgehog*のectopicな発現によりA/P境界と同様の*decapentaplegic*、*patched*の発現が誘発された(Kojima et al.1994)。これらの結果から、*hedgehog*は前部区画に働きかけ、A/P境界を形成するのではないかと推定された(Kojima et al.1994)。

ショウジョウバエ*hedgehog*遺伝子の単離後約2年の間に、様々な解析が進んだ。*hedgehog*遺伝子のマウス、ニワトリ、ゼブラフィッシュのcounterpartが単離され(Riddle et al.1993、Echelard et al.1993、Krauss et al.1993)、ニワトリのcounterpartの一つ(*Sonic hedgehog*)は、limbの分化にあたりモルフォゲンとなっており、ショウジョウバエの場合と同様に遠近軸の形成に実際に機能していることが示された(Riddle et al.1994)。このことは、進化的に無関係なヒトの足と、ハエの肢が同一の分子メカニズムでコントロールされていることを示唆しており、形態形成進化を考える上で極めて興味深いことである。将来*BarH1/BarH2*の脊椎動物におけるcounterpartが単離されれば、*BarH1/BarH2*と*hedgehog*との機能的な関わりを脊椎動物においても解析することが可能になるかもしれない。

## <参考文献>

- Akimaru, H., and Saigo, K. (1991).  
DNA binding activity of the BarH1 homeodomain of *Drosophila*.  
*Nucl. Acid. Res. symp. ser.* 25, 29-30.
- Ashburner, M. (1989).  
*Drosophila: a laboratory manual*. CSH press.
- Baker, N.E. (1987).  
Molecular cloning of sequences from wingless, a segment polarity gene in *Drosophila*: the spatial distribution of a transcript in embryo. *Development* 101, 1-22.
- Banerji, J., Rusconi, S., and Schaffner, S. (1981)  
Expression of  $\beta$ -globin gene is enhanced by remote SV40 DNA sequences.  
*Cell* 27, 299-308.
- Basler, K., and Hafen, E. (1988).  
Control of photoreceptor cell fate by the sevenless protein requires a functional tyrosine kinase domain. *Cell* 54, 399-311.
- Basler, K., Siegrist, P., and Hafen, E. (1989).  
The spatial and temporal expression pattern of sevenless is exclusively controlled by gene-internal elements. *The EMBO Journal* 8, 2381-2386.
- Basler, K., and Struhl, G. (1994).  
Compartment boundaries and the control of *Drosophila* limb pattern by hedgehog protein. *Nature* 368, 208-214.
- Bate, M., and Arias, A.M. (1993).  
The development of *Drosophila melanogaster*. CSH press.
- Baumgartner, S., Bopp, D., Burri, M., and Noll, M. (1987).  
Structure of two genes at the gooseberry locus related to the paired gene and their spatial expression during *Drosophila* embryogenesis. *Genes Dev.* 1, 1247-1267.
- Bowtell, D.D.L., Simon, M.A., and Rubin, G.M. (1988).  
Nucleotide sequence and structure of the sevenless gene of *Drosophila melanogaster*.  
*Genes Dev.* 2, 620-634.
- Bowtell, D.D.L., Kimmel, B.E., Simon, M.A., and Rubin, G.M. (1989).  
Regulation of the complex pattern of sevenless expression in the developing *Drosophila* eye. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86, 6245-6249.
- Bowtell, D.D.L., Lila, T., Michael, W.M., Haclett, D., and Rubin, G.M. (1991).  
Analysis of the enhancer element that controls expression of sevenless in the developing *Drosophila* eye. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88, 6853-6857.
- Bridges, C.B. (1936).  
The "Bar" gene a duplication. *Science* 83, 210-211.
- Brunner, D., Oellers, N., Szabad, J., Biggs, W.H., III, Zipursky, S.L. (1994).  
A gain of function mutation in *Drosophila* MAPkinase activates multiple receptor tyrosine kinase signaling pathways. *Cell* 76, 875-888.

- Bryant, P.J. (1993).  
the polar coordinate model goes molecular. *Science* 259, 229-335.
- Cathew, R.W. and Rubin, G.M. (1990).  
Seven in absentia, a gene required for specification of R7 cell fate in the *Drosophila* eye. *Cell* 63, 561-577.
- Cavener, D.R. (1987)  
Comparison of the consensus sequence flanking translational start sites in *Drosophila* and vertebrates. *Nuc. Acid. Res.* 15, 1353-1361.
- Chan, S.-K., and Mann, R.S. (1993)  
The segment identity functions of Ultrabithorax are contained within its homeo domain and carboxy-terminal sequences. *Genes Dev.* 7, 796-811.
- Chou, P.Y., and Fasman, G.D. (1978)  
*Adv. Enzymology*, 45-148.
- Coleman, K.G., Poole, S.J., Weir, M.P., Soeller, W.C., and Kornberg, T. (1987)  
The inverted gene of *Drosophila*: sequence analysis and expression studies reveal a close kinship to the engrailed gene. *Genes Dev.* 1, 19-28.
- Curran, T., and Franza, B.R., Jr. (1988).  
Fos and Jun: the AP-1 connection. *Cell* 55, 395-397.
- Echelard, Y., Epstein, D.J., St-Jacques, B., Shen, I., Mohler, J., McMahon, J.A., and McMahon, A.P. (1993).  
Sonic hedgehog, a member of a family of putative signaling molecules, is implicated in the regulation of CNS polarity. *Cell* 75, 1417-1430.
- Ekker, S.C., Jackson, D.G., von Kessler, D.P., Sun, B.I., Young, K.E., and Beachy, P.A. (1994).  
The degree of variation in DNA sequence recognition among four *Drosophila* homeotic proteins. *EMBO J.* 13, 3351-3560.
- Fridell, Y., W.C., and Searles, L.L. (1991).  
Vermilion as a small selectable marker gene for *Drosophila* transformation. *Nucl. Acid Res.* 19, 5082.
- Furukubo-Tokunaga, K., Flister, S., and Gehring, W.J. (1993)  
Functional specificity of the Antennapedia homeodomain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90, 6360-6364.
- Geyer, P.K., and Corces, V.G. (1992).  
DNA position-specific repression of transcription by a *Drosophila* zinc finger protein. *Genes Dev.* 6, 1865-1873.
- Hai, T., Liu, F., Coukos, W.J., and Green, M.R. (1989).  
Transcription factor ATF cDNA clones: an extensive family of leucine zipper proteins able to selectively form DNA-binding heterodimers. *Genes Dev.* 3, 2083-2090.
- Hanes, S.D., and Brent, R. (1989).  
DNA specificity of the bicoid activator protein is determined by homeodomain recognition helix residue 9. *Cell* 57, 1275-1283.

- Hart, A.C., Kramer, H., Van Vactor, Jr., D.L., Paidhungat, M., and Zipursky, S.L. (1990). Induction of cell fate in the *Drosophila* retina: the bride of sevenless protein is predicted to contain a large extracellular domain and seven transmembrane segments. *Genes Dev.* 4, 1835-1847.
- Hawley, D.K., and McClure, W.R. (1983). The effect of a lambda repressor mutation on the activation of transcription initiation from the lambda P<sub>RM</sub> promoter. *Cell* 32, 327-333.
- He, X., Treacy, M.N., Simmons, D.M., Ingraham, H.A., Swanson, L.W., and Rosenfeld, M.G. (1989). Expression of a large family of POU domain regulatory genes in mammalian brain development. *nature* 340, 35-42.
- Heisenberg, m., Borst, A., Wagner, S., and Byers, D. (1985). *Drosophila* mushroom body mutants are deficient in olfactory learning. *J. neurogen.* 2, 1-30.
- Herbstein, U., Wolff, T., and Rubin, G.M. (1993). The TGF $\beta$  homolog *dpp* and the segment polarity gene *hedgehog* are required for propagation of a morphogenetic wave in the *Drosophila* retina. *Cell* 75, 913-926.
- Higashijima, S., Kojima, T., Michiue, T., Ishimaru, S., Emori, Y., and Saigo, K. (1992a). Dual Bar homeobox genes of *Drosophila* required in two photoreceptor cells, R1 and R6, and primary pigment cells for normal eye development. *Genes Dev.* 6, 50-60.
- Higashijima, S., Michiue, T., Emori, Y., and Saigo, K. (1992b). Subtype determination of *Drosophila* embryonic external sensory organs by redundant homeo box genes *BarH1* and *BarH2*. *Genes Dev.* 6, 1005-1018.
- Hochschild, A., Irwin, N., and Ptashne M. (1983). Repressor structure and the mechanism of positive control. *Cell* 32, 319-325.
- Hooper, J.E., and Scott, M.P. (1989). The *Drosophila* patched gene encodes a putative membrane protein required for segmental Patterning. *Cell* 59, 751-765.
- Huang, J.-D., Schwyter, D.H., Shirokawa, J.M., and Courey, A.J. (1993). The interplay between multiple enhancer and silencer elements defines the pattern of decapentaplegic expression. *Genes Dev.* 7, 694-704.
- Hultmark, D., Klemenz, R., and Gehring, W.J. (1986). Translational and transcriptional control elements in the untranslated leader of the heat-shock gene *hsp22*. *Cell* 44, 429-438.
- Ingham, P.W., Taylor, A.M., and Nakano, Y. (1991). Role of the *Drosophila* patched gene in positional signalling. *Nature* 353, 184-187.
- Ingraham, H.A., Flynn, S.E., Voss, J.W., Albert, V.R., Kapiloff, M.S., Wilson, L., and Rosenfeld, M.G. (1990). The POU-specific domain of Pit-1 is essential for sequence-specific, high affinity DNA binding and DNA-dependent Pit-1-Pit-1 interaction. *Cell* 61, 1021-1033.

Ishimaru,S.,and Saigo,K.(1993).

The Drosophila forked gene encodes two major RNAs, which, in gypsy or springer insertion mutants, are partially or completely truncated within the 5'-LTR of the inserted retrotransposon. *Mol.Gen.Genet.* 241,647-656.

Jagla,K.,Stanceva,I.,Dretzen,G.,Bellard,F.,and Bellard.M.(1994)

A distinct class of homeodomain proteins is encoded by two sequentially expressed Drosophila genes from the 93D/E cluster. *Nuc.Acid.Res.* 22,1202-1207.

Jordan,S.R.,and Pabo,C.O.(1988)

Structure of the Lambda complex at 2.5A Resolution: details of the repressor-operator interaction. *Science.* 242,893-899.

Jurgens,G.,Wieschaus,E.,and Nusslein-Vorhard,C.(1984).

Mutations affecting the pattern of the larval cuticle in Drosophila mealnogaster.II.

Zygotic loci on the third chromosome. *Roux's Arch.Dev.Biol.* 193,283-295.

Kalderon,D.,Roberts,B.L.,Richardson,W.D.,and Smith,A.E. (1984)

A short amino acid sequence able to specify nuclear location. *Cell* 39, 199-509.

Karch,F.,Torok,I.,and Tissieres,A.(1981).

Extensive regions of homology in front of the two hsp70 heat-shock variant genes in Drosophila melanogaster. *J.Mol.Biol.* 148, 219-230.

Kissinger,C.R.,Liu,B.,Martin-Blanco,E.,Kornberg,T.B.,and Pabo,C.O.(1990).

Crystal structure of an engrailed homeodomain-DNA complex at 2.8 Å resolution: A framework for understanding homeodomain-DNA interactions. *Cell* 63, 579-590.

Klemm,J.D.,Rould,M.A.,Aurora,R.,Herr,W.,and Pabo,C.O.(1994)

Crystal Structure of the Oct-1 POU domain bound to an octamer site: DNA recognition with tethered DNA-binding modules. *Cell* 77, 21-32.

Kojima,T.,Ishimaru,S.,Higashijima,S.,Takayama,E.,Akimaru,H.,Sone,M.,Emori,Y., and Saigo,K.(1991).

Identification of a different-type homeobox gene,BarH1, possibly causing Bar(B) and Om(1D) mutations in Drosophila. *Proc.Natl.Acad.Sci. USA* 88, 4343-4347.

Kojima,T.,Sone,M.,Michiue,T. and Kaoru Saigo.(1993).

Mechanism of induction of Bar-like eye malformation by transient overexpression of Bar homeobox genes in Drosophila melanogaster. *Genetica* 88,85-91.

Kojima,T.,Michiue,T.,Orihara,M., and Kaoru Saigo. (1994).

Induction of a millor-image duplication of anterior wing structures by localized hedgehog expression in the anterior compartment of Drosophila melanogaster wing imaginal discs. *Gene* 148,211-217.

Kornberg,T.Siden,I.,O'Farrell.P.,and Simon,M.(1985)

The engrailed locus of Drosophila: In situ localization of transcripts reveals compartment-specific expression. *Cell* 40,45-53.

Kuziora,M.A., and McGinnis,W.(1989)

A homeodomain substitution changes the regulatory specificity of the Deformed protein in Drosophila Embryos. *Cell* 59,563-571.

- Krauss, S., Concordet, J.-P., and Ingham, P.W. (1993).  
A functionally conserved homolog of the *Drosophila* segment polarity gene *hh* is expressed in tissues with polarizing activity in Zebrafish embryos.  
*Cell* 75, 1431-1444.
- Kristie, T.M., LeBowitz, J.H., and Sharp, P.A. (1989)  
The octamer-binding proteins from multi-protein-DNA complexes with the HSV  $\alpha$ TF regulatory protein. *EMBO J.* 8, 4229-4238.
- Kyte, J., and Doolittle, R.F. (1982).  
A simple method for displaying the hydrophobic character of a protein.  
*J. Mol. Biol.* 157, 105-132.
- Lee, J.J., von Kessler, D.P., Parkes, S., and Beachy, P.A. (1992).  
Secretion and localized transcription suggest a role in positional signaling for products of the segmentation gene *hedgehog*. *Cell* 71, 33-50.
- Lee, J.J., Ekker, S.C., von Kessler, D.P., Porter, J.A., Sun, B.I., and Beachy, P.A. (1994)  
Autoproteolysis in *hedgehog* protein biogenesis. *Science* 266, 1528-1537.
- Lindsley D.L., and Zimm, G.G. (1992).  
The genome of *Drosophila melanogaster*. Academic press.
- Ma, C., Zhou, Y., Beachy, P.A., and Moses, K. (1993).  
The segment polarity gene *hedgehog* is required for progression of the morphogenetic furrow in the developing *Drosophila* eye. *Cell* 75, 927-938.
- McGinnis, W., Garber, R.L., Wirz, J., Kuroiwa, A., and Gehring, W.J. (1984).  
A homologous protein-coding sequence in *Drosophila* homeotic genes and its conservation in other metazoans. *Cell* 37, 403-408.
- Mohler, J. (1988).  
Requirements for *hedgehog*, a segmental polarity gene, in patterning larval and adult cuticle of *Drosophila*. *Genetics* 120, 1061-1072.
- Mohler, J., and Vani, K. (1992).  
molecular organization and embryonic expression of the *hedgehog* gene involved in cell-cell communication in segmental patterning of *Drosophila*.  
*Development* 115, 957-971.
- Muller, J., Thuringer, F., Biggin, M., Zust, B., and Bienz, M. (1989).  
Coordinate action of a proximal homeoprotein binding site and a distal sequence confers the Ultrabithorax expression pattern in the visceral mesoderm. *EMBO J.* 8, 4143-4151.
- Norris, E., Sanders, M., Crumey, V., and Tsubota, S.I. (1992).  
The identification of the *Bs* breakpoint and of two possible *Bar* genes.  
*Mol. Gen. Genet.* 233, 106-112.
- O'Hare, K., and Rubin, G.M. (1983).  
Structures of P transposable elements and their sites of insertion and excision in the *Drosophila melanogaster* genome. *Cell* 34, 25-35.
- O'Neill, E.M., Revay, L., Tjian, R., and Rubin, G.M. (1994).  
The activities of two ets-related transcription factors required for *Drosophila* eye development are modulated by the Ras/MAPK pathway. *Cell* 78, 137-147.

- Otting, G., Qian, Y. Q., Muller, M., Affolter, M., Gehring, W., and Wutrich, K. (1988)  
Secondary structure determination for the Antennapedia homeodomain by nuclear magnetic resonance and evidence for a helix-turn-helix motif. *EMBO J.* 7, 4305-4309.
- Palham, H.R.B. (1982).  
A regulatory upstream promoter element in the *Drosophila* hsp70 heat-shock gene. *Cell* 30,517-528.
- Poole, S.J., Kauver, L.M., Drees, B., and Kornberg, T. (1985).  
The engrailed locus of *Drosophila*: Structural analysis of an embryonic transcript. *Cell* 40,37-43.
- Preat, T., Therond, P., Lamour-Isnard, C., Limbourg-Bouchon, B., Tricare, H., Erk, I., Mariol, M.-C. and Busson. (1990).  
A putative serine/threonine kinase encoded by the segment polarity fused gene of *Drosophila*. *Nature* 347,87-89.
- Ptashne, M., Jeffrey, A., Johnson, A.D., Maurer, R., Meyer, B.J., Pabo, C.O., Roberts, T.M., and Sauer, R.T. (1980)  
How the  $\lambda$  repressor and cro work. *Cell* 19,1-11.
- Ptashne, M. (1986).  
Gene regulation by proteins acting nearby and at a distance. *Nature* 332,697-701.
- Qian, Y. Q., Billeter, M., Otting, G., Muller, M., Gehring, W.J., and Wutrich, K. (1989)  
The structure of the Antennapedia homeodomain determined by NMR spectroscopy in solution: comparison with prokaryotic repressors. *Cell* 59, 573-580.
- Qian, S., Capovilla, M., and Pirrotta, V. (1991)  
The bx region enhancer, a distant cis-control element of the *Drosophila* Ubx gene and its regulation by hunchback and other segmentation genes. *EMBO J.* 10,1415-1425.
- Rao, J.K.M., and Argos, P. (1986)  
A conformational preference parameter to predict helices in integral membrane proteins. *Biochim. Biophys. Acta.* 869,197-214.
- Ready, D.F., Hanson, T.E., and Benzer S. (1976).  
Development of the *Drosophila* Retina, a Neurocrystalline Lattice. *Dev. Biol.* 53,217-240.
- Riddle, R.D., Johnson, R.L., Laufer, E., and Tabin, C. (1993).  
Sonic hedgehog mediates the polarizing activity of the ZPA. *Cell* 75,1401-1416.
- Rijsewijk, F., Schuermann, M., Wagenaar, E., Parren, P., Weigel, D., and Nusse, R. (1987).  
The *Drosophila* homolog of the mouse mammary oncogene int-1 is identical to the segment polarity gene wingless. *Cell* 50,649-657.
- Rogge, R.D., Karlovich, C.A., and Banerjee, U. (1991).  
Genetic dissection of a neurodevelopmental pathway: Son of sevenless functions downstream of the sevenless and EGF receptor tyrosine kinases. *Cell* 64,39-48.
- Roseman, R.R., Pirrotta, V., and Geyer, P.K. (1993).  
The su(Hw) protein insulates expression of the *Drosophila* melanogaster white gene from chromosomal position-effects. *EMBO J.* 15,435-442.

- Rubin,G.M.,and Spradling,A.C.(1983).  
Vectors for P element-mediated gene transfer in *Drosophila*.  
*Nuc. Acid. Res.* 11,6341-6351.
- Rushlow,C.,Doyle,H.,Hoey,T.,and Levine,M.(1987)  
Molecular characterization of the zerknullt region of the Antennapedia gene complex in *Drosophila*. *Genes Dev.*1,1268-1279.
- Samblook,J.,Fritsch,E.F.,and Maniatis,T.(1989).  
Molecular cloning: a laboratory manual.(2nd ed.) CSH press.
- Searles,L.L.,Ruth,R.S.,Pret,A.M.,Friedll,R.A.(1990).  
Structure and Transcription of the *Drosophila melanogaster* vermilion gene and several mutant alleles. *Mol. Cel. Biol.* 10,1423-1431.
- Simon,M.A.,Bowtell,D.D.,Dodson,G.s.,Laverly,T.R.,Rubin,G.M.(1991).  
Ras1 and a putative guanine nucleotide exchange factor perform crucial steps in signaling by the sevenless tyrosine kinase. *Cell* 67, 701-716.
- Spradling,A.C.,and Rubin,G.M.(1983).  
Transposition of cloned P elements into *Drosophila* germ line chromosomes.  
*Science*,218.341-347.
- Stern,S.,Tanaka,M.,and Herr,W.(1989).  
The Oct-1 homeodomain directs formation of a multiprotein-DNA complex with the HSV transactivator VP16. *Nature* 341,624-630.
- Strauss,R. and Heisenberg,M.(1993).  
A high control center of locomoter behavior in the *Drosophila* brain.  
*J. Neurosci.* 13,1852-1861.
- Struhl,K.(1991).  
Mechanisms for diversity in gene expression patterns. *Neuron* 7,177-181.
- Sutton,E.(1943).  
Bar eye in *Drosophila melanogaster*:A cytological analysis of some mutations and reverse mutations. *Genetics* 28,97-107.
- Tabata,T.,Eaton,S.,and Kornberg,T.B.(1992). The *Drosophila* hedgehog gene is expressed specifically in posterior compartment cells and is a target of engrailed protein. *Genes Dev.* 6,2635-2645.
- Tanaka,M.,and Herr,W.(1990).  
Differential transcriptional activation by Oct-1 and Oct-2: interdependent activation domains induce Oct-2 phosphorylation. *Cell* 60, 375-386.
- Tashiro,S.,Michiue,T.,Higashijima,S.,Zenno,S.,Ishimaru,S.,Takahashi,F.,Orihara,M.,Kojima,T. and Saigo,K. (1993).  
Structure and expression of hedgehog, a *Drosophila* segment polarity gene required for cell-cell communication. *Gene* 154, 183-189.
- Tice,S.C. (1914).  
A new sex-linked character in *Drosophila*. *Biol Bull* 26.,221-230.
- Tjian,R. and Maniatis,T.(1994).  
Transcriptional activation: a complex puzzle with few easy pieces. *Cell* 77,5-8.



- Tomlinson, A. and Ready, D.F. (1987a).  
Neuronal Differentiation in the *Drosophila* Ommatidium. *Dev. Biol.* 120, 366-376.
- Tomlinson, A. and Ready, D.F. (1987b).  
Cell fate in the *Drosophila* Ommatidium. *Dev. Biol.* 120, 264-275.
- Treacy, M., He, X., and Rosenfeld, M.G. (1991)  
I-POU: a POU-domain protein that inhibits neuron-specific gene activation. *Nature* 350, 577-584.
- Tsubota, S.I., Rosenberg, D., Szostak, H., Rubin, D., and Schedl, P. (1989).  
The cloning of the Bar region and the B breakpoint in *Drosophila melanogaster*:  
evidence for a transposon-induced rearrangement. *Genetics* 122, 881-890.
- Tsuda, L., Inoue, Y. H., Yoo, M.-A., Mizuno, M., Hata, M., Lim, Y.-M., Adachi-  
Yamada, T., Ryo, H., Masamune, Y., and Nishida, Y. (1993).  
A protein kinase similar to MAP kinase activator acts downstream of the raf kinase in  
*Drosophila*. *Cell* 72, 407-414.
- Watson, M.E.E. (1984).  
Complication of published signal sequences. *Nuc. Acid. Res.* 12, 5145-5164.
- Wolberger, C., Vershon, A.K., Liu, B., Johnson, A.D., and Pabo, C.O. (1991).  
Crystal Structure of a MAT $\alpha$ 2 homeodomain-operator Complex suggests a general  
model for homeodomain-DNA interactions. *Cell* 67, 517-528.

織原美奈子 (1994).

東京大学大学院理学系研究科修士論文

小嶋徹也 (1992).

東京大学大学院理学系研究科修士論文

田代茂樹 (1992).

東京大学大学院理学系研究科修士論文

東島真一 (1994)

東京大学大学院理学系研究科博士論文

堀田凱樹、岡田益吉 編著 (1989) .

シヨウジョウバエの分子遺伝学 (丸善出版)

三宅 端、西郷 薫、柴 忠義、上田 龍 編著 (1984)

昆虫のバイオテクノロジーマニュアル (講談社)

## < 発表論文 >

本学位論文の内容について、第一章の前半の内容については、

Shin-ichi Higashijima\*、Tetsuya Kojima\*、Tatsuo Michiue\*、Satoshi Ishimaru\*、  
Yasufumi Emori and Kaoru Saigo.

Dual Bar homeo box genes of *Drosophila* required in two  
photoreceptor cells, R1 and R6, and primary pigment cells for normal eye development  
*Genes & Development* (1992) 6:50-60

及び

Tetsuya Kojima\*、Masaki Sone\*、Tatsuo Michiue\*、and Kaoru Saigo.

Mechanism of induction of Bar-like eye malformation by transient overexpression of Bar  
homeobox genes in *Drosophila melanogaster*

*Genetica* (1993) 88:85-91 に、

第三章の内容については、

Shigeki Tashiro\*、Tatsuo Michiue\*、Shin-ichi Higashijima、Shuhei Zenko、Satoshi  
Ishimaru、Fumitaka Takahashi、Minako Orihara、Tetsuya Kojima and Kaoru Saigo.

Structure and expression of hedgehog, a *Drosophila* segment-polarity gene required for  
cell-cell communication

*Gene* (1993) 124:183-189

にそれぞれ発表した。なお、\*印は筆頭著者との共著である。

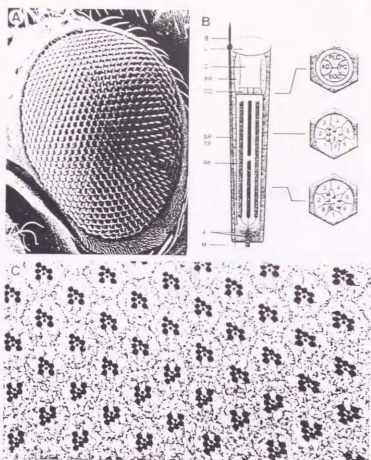
第一章の後半、及び第二章の内容については投稿準備中である。

## <謝辞>

本研究は多くの共同研究から成り立っています。Barのエンハンサーアクセイは当研究室の小嶋徹也助手、林 貴史、松崎政紀氏との、hedgehogの解析は現理研つくばライフサイエンスセンターの田代茂樹氏、石丸 聡助手、国立岡崎共同研究機構・基礎生物研究所助手の東島真一博士、チッソ（株）横浜研の善野修平氏、当研究室の石丸 聡助手、小嶋徹也助手及び高橋史峰氏、織原美奈子氏との共同研究です。また、BarH2遺伝子の構造・解析は、当研究室の榎森康文助教授及び石丸聡助手に実験面で助力を頂きました。

ここに感謝の意を表明したいと思います。同学年として公私ともに有意義なdiscussionをしてくれた、当研究室の小嶋徹也助手に感謝します。また、様々な面で協力していただいた、西郷研究室のみなさまに感謝します。また、9年間の長きにわたって大学での勉強を許してくれた両親に感謝したいと思います。

最後になりましたが、不出来な私をあるときは厳しく、ある時は優しくご指導していただきました、西郷 薫教授に深く感謝したいと思います。



(D)

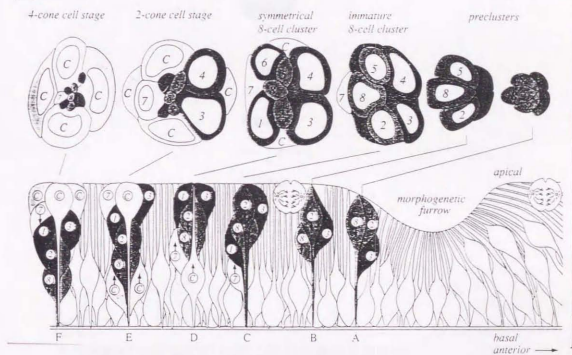


図1.  
 複眼の構造と光受容細胞の分化 (The  
 DEVELOPMENT of *Drosophila melanogaster*より抜粋)

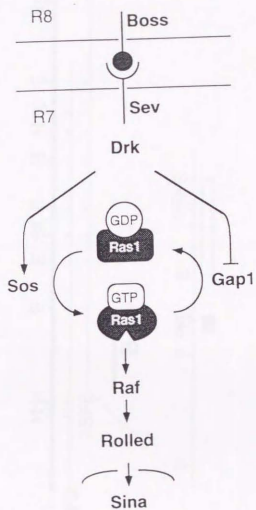


図 2.  
 光受容細胞前駆体R7の分化に関わる遺伝子産物の  
 カスケード (The DEVELOPMENT of *Drosophila melanogaster* より  
 抜粋)。

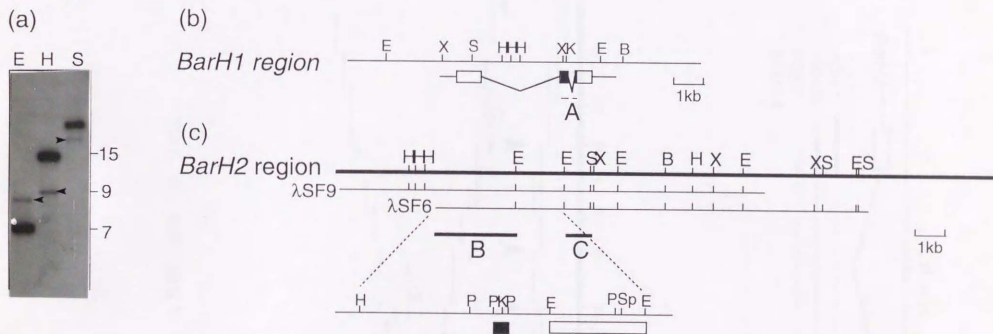
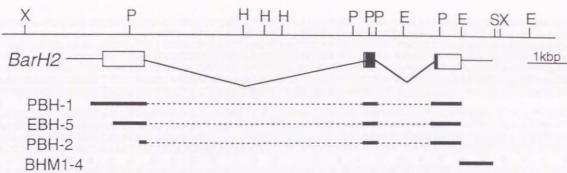


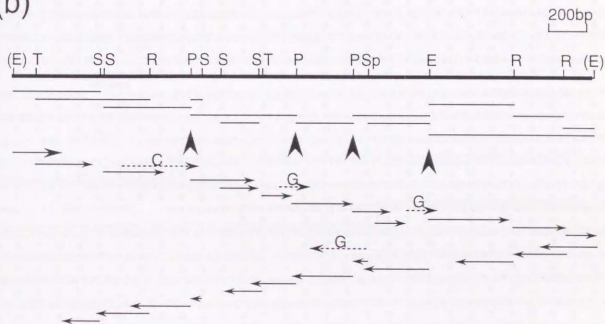
図3.

(a) *BarH1* のホメオボックス部分 (b) の断片 A をプローブに用いてショウジョウバエ全ゲノムに対して行ったサザンプロット。各レーンともに、強いバンド以外にもう一本、やや弱めのバンド (矢頭) が検出される。(b) *BarH1* 領域の構造と (c) 得られた *BarH2* 領域のゲノムクローン。明らかに制限酵素地図が異なっている。断片 A は *BarH2* 単離のために用いられたプローブ、断片 B は唾腺染色体に対する *in situ* hybridization に用いたプローブ領域、断片 C は *BarH2* の cDNA クローン単離のために用いたプローブ領域を示す。また、(b) において黒箱 (■) は *BarH1* ホメオボックスと、白箱 (□) は *BarH1* の第三エクソンとそれぞれ相同性の高い領域を示す。

(a)



(b)



(図4(a)、(b). 説明は2頁後ろに示す)

(c)

ATAA TACTCGCTATTATAAAAAAGTTTACCATTAAACACTGTTCAAATTTTGTTTGAAGAGCAGTAAAAAATAATGAAATAACCAACTGACCCCTA 96  
AGCACTAATTTAAACCCCTAAAGTACCGAAGACGCTTTTTTGTTCAGATTTATAGAAATCAAATAGTACAATAACCTTTTTATATAAATGGACAG 192  
ACTTAATAAACCTTACTGATAAATACCTTATTATTAAAGTATGAAAGTAAATGCAATACTTTTTGTGGGTTTTAGTTCGAAACAGCCAA 288  
ACTCCACACCGTGCATAAAATAAACCTTAGCAGTCGGGGCATTGGCCGGAAAGTCCAGCAGCCCGCCACTGACTCCCTGATTTGAAGC 384  
CTATGAATGTCAATTCGCCCAATTACGACCAATAAGTCGGGGCAATAAATGTGGCCAGCCCTGGGTGGCAGGACGAGGCACTCACGGGGCCAA 480  
GAGGAGAAACTCACCCACCGCCCACTGGCCAGGTCAATGAGCGGAAAAAAGAGCAGCACAGCAGCGTGTGGGAGCAGCTGAGGAAGCGGTGGCTCAACTG 576  
TTTGTGCTCGTCTTGTGTGTGCTGCTGTCGGCGTCTGCTGTTGTGCTGCTGCTGCTGCCATTTGCTGTCGGCAGCAAGTTCACTGTT 672  
-----A-----  
GTTGCAAGGAAAAGGCGGAGCGGTGGTTGTCGCGCTATTGAACATCACAAAAGTGGCCCACTCACCGACATTTGCGGTAAAAACCAAGTTGGGC 767  
CAAGAAGACTTAACCAAGCCAGGACCAATCGAAAGCCGAGTTCAGAGACTGTGCAAGTTTAAAGAATAAGTGGAGGACCTACCCACCAATTAAT 853  
GAAAGAAGTGTCAAAAACCTCGCTCACCCATAACATACATAGCTGTTTTGTTTTTTTCGGTCCAAGTGGAGGTGCAGCAGCGGACTTCCTGGC 959  
TAACCCACACATGACCACAATGCCACCGGAAATGTCCGCAACAGCCGCACTCCCTGGGAGTGCAGCCAGTGCCACCGCTCATCATCCGCGCTCG 1055  
GTCCGGCCGGGATTCGGCGTCCCGTCCCACTCCCAACCTCGGCAGCAACAGCACAGCCACCGCCCAACCGGCCAGCCCTGCTTCCTATTAGTC 1151  
VGGGGMNP RPAS PAVG S N T T A T A T T A T R S R F M I 61  
ACCATATTTTTGGAGAGCCCGGCCGATCGCCGGCCGAGCAGCCGCGCCGCTTGGCAGCCGCTCTCCGGCGGTGGGCGTGGCAGT 1247  
T D I L A G A A A A S A A A A A A A A L A A A S S G G G R G R S 93

caccgcgac

CCGAGGACTCGGAGCGGAGCAACTCGTGGTCCCGCACTCACCCATCACAGCAGCAGCAACACCGACTCATCACCA-----GAG 1334  
P T D S E R E Q Q S L V A Q H H H H H H H Q Q Q Q Q H H H H Q (Q Q Q Q) 122  
CAGCACCASCTCAGGAGGTCGCCCTGCAAGCACTCATGTCGCAACAGCAGCAATTTGCTGGCTTTGAGCGGGAAAGGGAGGCGGCGGAG 1400  
Q Q Q H I D A A L Q Q T I V Q Q Q L L R E R E R E R E R E R E R 154  
GTATTTATAGGAGAGCAATTCGGCCGTGGCCCAATCCCTATCCCGACCCCACTGGCCCGCCACTGTGCCCACTTTCCGGCCGGCCCG 1526  
E H Y R E R H S P P N N P Y A H L H P M P P H L L H A F F P A R 186  
TACCGCTCTCGACGAGCAGCAACAGCAACAGCAGCAACCAACATCCCCACCGCATCAGTCCGACCTGAGAGGGAAGCTTTGAGGCGACTG 1922  
Y A V L Q Q Q Q Q Q Q Q Q Q Q Q H P H P H H L Q L E R E R L E A L 218  
CATCGGCATGCCCGGGCTCCGGGTACTCTCCGACCACTTGAGCCACTTAAGCCCTGAGCCAGCAGCAGCAGCAGCAGCTCGCATAT 1718  
H R H G H R M L Q P P P A Q H L S H L S H H Q Q H H P P L R H H 520  
CCATACAGCTGAGCGATCCCGCTCCACCGTGTACTGCTCAACAAATTTGGCGGTAAAGTGGCAATAACAACAACAAACAGCAGCAGT 1814  
P M H D E R S R S P L M L Q L G L G N G N N N N N N N N N N S S S 282

saccac

GCCAGTAAACAACAC-----ACACAACAACAGTCTACTGCCACAAGCAACATCATCACGGCAACAGCAGCAGCAGCAACAACAATAATGCAT 1904  
A S N N N (N N) N N S S A S A N S N I I S G N S S S S S N N N G S 312  
GGCAAGCGCAACATGTCGTGGAGGACCCGCGCAGCAGCATTAGTGGCGATCAAGCCAGCAACATCGACGACAGGCAAGCGATGATTCGGTaaag 1995  
G N G N M L L G P G P S S I S D D Q A S T I D D S S D D C 342  
tcg. (.6.kb INTRON). . . . . tccgagctggcaaaagcagcagatggggatgacagatgaaaaaacggcagctggcgaacggcgacactctctctg 2063  
G G K D D D G D P S N K G G S A N G P S S 365  
CACTTGACCTGAACTGAGCAACAGGAGAAAGCGGCTTACCGCTTCACGGTACACCAGTGCAGACGCTGGAAAGCTTTGAGCGGCA 2159  
H L S L M \* N S K K L Q R K A R T A F T D H Q L T D H L E K S F R Q 397  
AAGTACCTCAGCTGAGGATGCGATGCGATGGCCCAACAGCTGGAGCTGAGCGACTGCCAGTGGAGCACTGTGACAGAAATCGCAAGTgagcgc 2248  
K Y L S V Q D R M L E L A N K L E L S D C Q V Y K Q N R R 427  
kaccg... (1.3kb INTRON) . . . . . ttaattgcagaaacaaatggaagcctgacagccggcttggcttggaaactctggccagggctggaatact 2309  
T K W K K R Q T A V G L E L L A E A G N Y 447  
CGCGCTTCACCGGGTTCAGCGGGTCCACGGCTATTGAGCCGCTGGCCATACGGTCGGCCGCTGGCCCAATGCCCCACGGCCGACG 2405  
A A F F Q R T L Y G G A T P Y L S A W P Y A A A A A A A A S P H G A T 479  
CGTGGCGGATCGATGTATTACCGCCAGGACCGCTGACCGGCCATGCAAAAGCTTCCTCCCGCCCTCGTACCGGATGTATCAATGAAGC 2501  
P S A I D I Y V R Q A A A A A A N Q K P S L P A S Y R M Y Q S S 511  
ATACCCCGGGATGTGGCTACCGGATTCGGCCCTCCCGCCACCAGCCACTGCTCAGGGGTACTATTCCCGCTGCTCGGGCAGC 2597  
I P P G M S L L G M P A P P P P G A A P M L S Y A A A A A A A A 543  
CGCGCATCCCGCGTCCCAACAGCAGCAGCAACAGCCGCGCAGTCTCCGGTCCCGCAGCAGCAGCGCCCAATAGGAGACGGCGACT 2693  
A A A A G A Q Q Q Q Q Q P P A S R S A S G A S A N S E A D C 575  
GAGCGCACAGCAGCAGCTCCCGCCGCTGATACGCTCCCGCCTAATCCGCGGAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAG 2789  
E R T S S S S S R Q L I T P S P P L N P G S S P P H R I N E 587  
GAGCAGCGGAGCGGAGCAGGAGCAGACATCGACCGGGAGCCGGAAGGGGAACGAGGAGGAGGAGATGAGGAGGAAGCACTGGCCCTGGAG 2605  
E D R E R E D E R I E R E R E R E R E R E D E D E E L A L E 639  
GTCTGAGAAATTCGGAGAGAAATCAACCCCTCCTATGTTGATCTCACACAATGTTCTAAGAAATAAAGGAAGTGGTGTTGTATTGAGAAC 2981  
V \* 640

TATGAAATTTGGTGAACACTTTTCAAAGAAAAATTTGGAACACATTTTTTTTTTAACTTTTAAAGTGGCAACAATAAATTAATACAGATAGGCA 3077  
TAGTACCGTTTAAAGTATATCAAGAGGTTTAAAGTAAAGGTTTTAAATATATCTATGTTTCTCAAGATTTGCAAGCTTTTAAAGATTA 3173  
TGTAAGAACTTTTCCCTCTATCAAAATCCAGCAAGACTACAAATAAATTAACATTAATAATCAACCTTTAACGCCAATCAAAAATCA 3269  
TACTATTAAGATTTCCACTTATGTTACCAATTTTTGACACAGCTGTAGTAAAGCCTGTCTGTCAAAAATAAACACTAAAATGATCTGCT 3365  
ACTCCACTGAAAATGTTATTGAAAAGATGTGTGTTAAACTAAATAAATTTCTATAAATTCGACGAAAAGATTAACATAGATAAACCAAAAT 3461  
GTACAGATTTAGCACTCCCACTGTACCTGTTCCAGAAATAACCCCAAGTATGTTGGAACAATAAACAATCTATATAAATCTTTTTT 3557  
TTTCTATATTTAACTTAAACCTAGCTATAGATGCAATTTGTAATTTTTTGTAAATGATTTTTATACATACGAGCAGCCCAACAATAGGCAC 3653  
ACGATTTTTTTTCCAAACAATATAGTATTTTTTTTTTCAAAATTTTTTTGTGCTGACTGCTAAAGTCTGCTATTGTTGTAGTAAATATAAG 3749  
AGAAAATAAAAGCAATCC

b

図4(c). 説明は次頁に示す。



図4.

(a)得られた*BarH2*のcDNAクローンのシリーズ。このうち、塩基配列の決定にはPBH-1及びBHM1-4を用いた。E:EcoRI、H:HindIII、P:PstI、S:SauI、X:XhoIサイトをそれぞれ示す。

(b)シーケンスを行うために作製したサブクローンのシリーズ（制限酵素地図下の線）と実際に行ったシーケンス（矢印）。矢尻の部分は作製したサブクローンでは通過を確認できなかったため、他のcDNAクローンから得られた塩基配列やゲノムDNAクローンの塩基配列から通過を確認した（点線の矢印、ゲノムクローン由来のものはG、cDNAクローン由来のものはCで示す）。E:EcoRI、H:HindIII、P:PstI、S:Sau3AI、Sp:SphI、T:TaqI、R:RsaI、X:XhoIサイトをそれぞれ示す。

(c)*BarH2*遺伝子の全塩基配列。エクソンの配列は大文字、イントロンの配列は小文字で示してある。aはcDNA (pBH-1)の5'末端、bは予想されるpolyA付加シグナル、cはpolyAの付加位置である。囲みはホメオドメイン。また、塩基の下に引いた短い下線はゲノムクローンとcDNAで異なる塩基配列であり、塩基置換によりコードするアミノ酸が代わるものは\*をつけてある。ゲノムクローンで欠失している塩基は-で示し、cDNAクローンの塩基をその上に示した。

(a)

gltatgataaacgaagttaattgaagaaacataagatgcatgcatgacatcatatcttctaat -1

4

atataatgtgacatcttaataaagtctaaccaatcaaccctgtccaattcttgtttgaaagcagctaaanaa 70

3

ttatgaaataaccaactgaaccccaagactatcttaaccctcaagataaacgacaacagctctcttgca  
 ttatagataatcaataaagatacaataaactcttctatctatctatgaaatctgaaataaacctatctatc  
 taagatacaagaacttaacttgcaactctcttctgttgcgttgatctgaaatcagccatctccacaactgyc  
 ctaaaaataaamcgtttagacgttgccgacttgccggcggaaagttccacaacccggcaacttgatctccc 350

2

ctgattctgaagccatagaatgcatcttgcctgccaattacgaccacaatgaagtgcggcgaataaattgtg  
 gctgtgggtgacgagtcgagagcagactcaaggcgccagacgagagaggaatactcaccacacccgcacttgcca  
 gttcaatggcgaaaanaagagacgacgaacagtggcagctgcaatgggaagcgggtgcctcaacttgctcttgc  
 tgcctcttggttgttgcctgctgcgcgcgtcgtctgtttgctcctgctgctgctggcagattgctgttgc 630  
 gggcagcaagtttgacttcgctgcaagaagcagaagcggctgcttgcctcgcctatgaaatcacaag 700

cDNA

atctctgcacactcaagccagacattctgctttaaaaaccgcttgggccaagaaaacatttaaccaagcagaag 770

1

caatcgaagaagcggactcgaagaacttgcctcaagcttgaagaataaagtcggagcagcttacaacaatctaact  
 gaagaaatgcttaaaaactcggctcacccatcacatcacaatcaatagcctgtcttcttcttcttcggtgcaagat  
 gcaaggtgcaagcagagagagctcgtcgtctaaaccacacacaccatgccaatgccaacaggaaatgtccggacaac 910  
 Met 980

Met

ggcagctccccttgctgcagtcgaccgagtgccaccacgctcatalctcccgcctgcctcggcggcggatcgg 1050

(b)

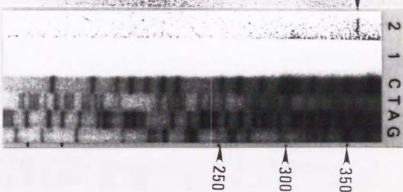


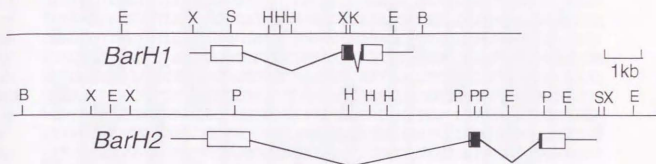
図5.

アラバイナー伸長実験による *BurH2* の5'末端の決定。

(a) *BurH2* の5' non coding region の塩基配列。Met、cDNAの5'末端、予想される転写開始点 (3) とTATA box (4)、及び実験に用いたアラバイナー(1、2)を示した。

(b) アライナーを用いた実験の結果。アラバイナーから約350bpの位置にバンドを検出した。なお、lane1はアラバイナー未添加のコントロールである。

(a)



(b)

	1st exon	2nd exon
BarH2	S D D C G	G K D D
BarH1	AGCGATGATTGCGgtaagtc.....ttcgcagGTGGCAAGACGAC	
BarH2	G T T T G T A G C A A T G g t g a g g t.....c t t t c a g G C G G T A A A G A T G A C	G K D D
BarH1	V C S N G	G K D D
	2nd exon	3rd exon
BarH2	Y Q N R R	T K W K R
BarH1	TACCAGAATCGCAGgtgagcggcagcag...ttaattgcagAACCAAATGGAAGCGT	
BarH2	T A C C A A A C C G C A G g t g g g t t t t a a c...c a t t t t g c a g A A C C A A A T G G A A G C G T	T K W K R
BarH1	Y Q N R R	T K W K R

図6.

(a) *BarH1*と*BarH2*の構造比較。箱はcoding region、水平な線はnon-coding regionをそれぞれ示す。黒く塗った部分はホメオボックスに対応する領域を示す。

(b) *BarH1*、*BarH2*のintron-exon junction付近の塩基配列、アミノ酸配列の比較。大文字で示した塩基はエクソン、小文字はイントロンを示す。この図から、junctionの位置が全て同じであることが分かる。

aBH2	QRKARTAFTHDHLQLTLEKSPFERQKYLVSQDRMELANKLELSDCQVKTWYQNRRTKWKRRQT
aBH1	QRKARTAFTHDHLQLTLEKSPFERQKYLVSQERQELAHKLDLSDCQVKTWYQNRRTKWKRRQT
aBH2	QRKARTAFTHDHLQLTLEKSPFERQKYLVSQDRMELANKLELSDCQVKTWYQNRRTKWKRRQT
aBH1	QRKARTAFTHDHLQLTLEKSPFERQKYLVSQERQELSHKLDLSDCQVKTWYQNRRTKWKRRQT
Antp	RKRGRQTYTRYQTLELEKEPHFNRYLTRRRRIETIAHALCLTERQIKIWFQNRMMKWKEN
abdA	RKRGRQTYTRYQTLELEKEPHFNRYLTRRRRIETIAHALCLTERQIKIWFQNRMMKWKEL
pb	PRRLRTAYTNTQLLELEKEPHFNRYLTRRRRIETIAASDLTERQVQVWFQNRMMKHKRQT
ftz	SKRTRQTYTRYQTLELEKEPHFNRYLTRRRRIDIANALSLSERQIKIWFQNRMMKSKDR
Scr	TKRQRTSYTRYQTLELEKEPHFNRYLTRRRRIETIAHALCLTERQIKIWFQNRMMKWKKEH
Ubx	RRRGRQTYTRYQTLELEKEPHFNRYLTRRRRIETIAHALCLTERQIKIWFQNRMMKWKKEI
Dfd	PKRQRTAYTRHQILELEKEPHFNRYLTRRRRIETIAHTLVLSERQIKIWFQNRMMKWKDN
lab	NNSGRNTFNKQLTELEKEPHFNRYLTRARRIETIANTLQENETQVQIWFQNRMMKQKRRV
abdB	VRKRRKPYSKFQTELEKEFLFNAYVSKQKRWELARNLQLTERQVQIWFQNRMMKKNKS
eve	VRYRTAFTRDQGRLEKEFYKENYVSRPRRCELAAQNLNPESTIKVWFQNRMMKDKRQR
en	EKRPRTAFSSQELARLKRFPENRYLTERRRQQLSSELGNEAQIKIWFQNRRAKIKKST
inv	DKRPRTPASGTQLARLKHFPENRYLTERRRQQLSSELGNEAQIKIWFQNRRAKIKKSS
BSH4	QRRSRTTFTABQLEALERAFSRQYQVYVYTRRELAQTTALTEARIQVWFQNRRAKIKKSS
BSH9	QRRSRTTFTABQLEALERAFSRQYQVYVYTRRELAQTTALTEARIQVWFQNRRAKIKKSS
prd	QRRCRTTESASQLDELEERAFERQYQVYVYTRRELAQTTALTEARIQVWFQNRRAKIKKQL
I-POU	KK--RTSIAAPEKRSLEAYFAVQPRPSGKIIAAIAEKLDLKKNVVVRVWFCNORQOKRIV
TIPOU	KKRKRITSIAAPEKRSLEAYFAVQPRPSGKIIAAIAEKLDLKKNVVVRVWFCNORQOKRIV
Cf1a	LRLLRITSIEVSVKGALEQHPHKQPKPSAQEITSLADSLQLEKEVVRVWFCNRRQOKRIM
zen1	VKLKRRTAFTSVQLVELENEFKSNMYLYRTRRIETIAQRLSLCERQVQIWFQNRMMKFKKDI
zen2	SKRSRTAFSSQLLELEERFHLNKYLARTRIETISQRLALTEQVQIWFQNRMMKFKKST
lbe	KKRSRRTAFNQIFELEKRFYLYQKYLSPADRDEIAAGLGLSNAQVITWFQNRRAKIKKDI
lbt	KKRSRRTAFNQIFELEKRFYLYQKYLSPADRDEIAAGLGLSNAQVITWFQNRRAKIKKDM
93Ba1	RKRPRTSFRITQVALEKRFHKQKYLASAERAAALARGLKMTDAQVKTWYQNRRTQAEERE
S59	PRRARTACTIVEQLVLSLENKFKTTRYLSVCERLNALSLSETQVQIWFQNRRTKWKQN
bap	KKRSRAAHSHAQVLELERRFAQQRYLSPHERSEMAKSLRLTETQCKIWFQNRRTKTKRQ
tin	KKRPRVLESAQVLELECRFLKRYKTGAEREITAQKLNLSATQVQIWFQNRRTKSKRGD
NK2	KKRPRVLESAQVLELECRFLKRYKTGAEREITAQKLNLSATQVQIWFQNRRTKSKRGD
bcd	PRRTRTTFSSQIAELBQHLQGRYLTAAPRLADLSAKLALGTAQVQIWFQNRRTKHKIQS
cad	KDKYRVVYTDQFQRLLEKEKYCTSRYITIRKSELAQTLSELSEQVQIWFQNRRAKERTSN
cut	SKKQVLESEBQKALRALFALDPYPNVGTIEFLANELGLATRTITNWFHNRMLRQOV
ro	QRQRTTFTSTEQTLRLEVEFHRNEYISRSRFELAEITLRLSETQIKIWFQNRRAKRRIE
vilro	QRQRTTFTSTEQTLRLEVEFHRNEYISRSRFELAEITLRLSETQIKIWFQNRRAKRRIE
otd	RRRRTTFTRAQLDVLEALFGKTRYPDIFNREVALRIMLPSERVQVWFQNRRAKCRQQL
ems	PKRIRRTAFSPSLLKLEHAPESNQYVGAERKALAQNLNLSSETQVQVWFQNRRTKHKRMQ
E5	PKRVRTAESPTQLLKEHAPEGNHVYVGAERKALAQGLSLTETQVQVWFQNRRTKHKRMQ
H2.0	RSWSRVAVGSNLQRKGLTIQFQQQKYITKPRDRKLAARLNLTDQVQVWFQNRMMKWRHTR
D11	MRKPRTIYSSLLQLQNRFRQRTQYLLALPERAELAAALGLTQVQIWFQNRRTSKYKMM
zfh-1	KVVRVTAINEEQQLLQKQYSLNARPSRDEFRMIARLQDLDPVQVQVWFQNRMSREKRMQ
zfh-2	KRANRTRTDTYQIKVLQEFENNNSYPKSDSLEYLSKLLLSPRVIVVWFQNRRAKQKRYI
exd	KRNFQKASEILNEYFYSHLSNPYPSEEAKEELARKCGITVSQVSNWFQNRRTKRYKKN

図7.

ショウジョウバエのホメオドメイン配列の比較。シャドウをつけたアミノ酸は BarH1/BarH2間で保存されているアミノ酸と一致しているアミノ酸残基を示す。アスタリスク(\*)はBarH1/BarH2間の保存配列のうち、他のホメオドメインから一つも見出されぬアミノ酸を示す。

```

BarH1 ---MKDSMSILRQTSEPNAAHPQLRHHHLSTLQQQHQQHHLHYGLQ----PAAVAHSIH 52
BarH2 MTTTPPEMSATIAAVVGSAPSATA-HPPAAVGGG-----MPRPASPAV----- 42

BarH1 STTTMSSGSSSTTASGIGKPNRSREMLNDILAGSRAAFY----- 92
BarH2 -----SSNVTATATTATRSREMLDILAGAAAASAAAAAAAALAAASSGGGRGS 93

BarH1 -----KQQC-HHQQQLH--HNNNNNS-GSSGGSSPA----- 119
BarH2 PTDSEREQLVAHHHHHQQQCCHHHQQQQQQQAALQQTIVQQQLLRFERERERER 152

BarH1 -----HSNNNNNING 129
BarH2 EREHYRERHSPGNNPYAHHPMPHLLAHPFAHYAVLQQQQQQQQQHPHHLQLER 210

BarH1 DNCRA-SNVAQVGLVLP-ALHPQPHPTPHPTHE--HALMHP-HGKLGHPPTAGGGL 184
BarH2 ERLRAL-HRRHGGLPGDPAQLSHLSHLSQQRHEHLHPHMDERSRSLPMLLQQLSGNG 261

BarH1 NVAQYAAAMQOHYAAAAAAARNNAAAAAARAAAAAGVAAPPVGGVGVGGLAPPA 244
BarH2 NNNNNNNSSASNNNNNNSASASNNIISGN---SSSNNNNNGSGNGNMLLGGPSSSI-- 326

BarH1 GGDLLDSDDYHEENEDCDS--GMDDHSVCSNGGKDDDG-NSVKSST--SMSCG---- 368
BarH2 -----SGDQASTIDDSDSDC-----GGKDDDDDSVMKNSSANGCSSHLSL 359

BarH1 -ESKKORKARTAEHDHQLTLEKSFERRQKYLVCVCRQELAKLDSDCQVKTWYQNRRT 353
BarH2 NLSKKORKARTAEHDHQLTLEKSFERRQKYLVCVCRVELANKLELSDCQVKTWYQNRRT 429

BarH1 WKRCVAVGHEHLEAAGNFAARQRLYGC-SPYLCAWPYAAAAKA--AHGATHTNIDLYVE 410
BarH2 WKRCVAVGHEHLEAAGNFAARQRLYGGATPMLCAWPYAAAAAQAQSPHGATE-SALDLYVE 486

BarH1 QAAAAA-MOKPELPYNLYAGVPSVGVGVGVG--PAHFSHLSASSSLSSSSYYQAAAA 467
BarH2 QAAAAA-MOKPSLPASLRM-YQSSIPFMSLPGMPAHPPPPGAAP----MSSCYAAAAAA 541

BarH1 SASGAQQQQQPPAAR--GSPPSGLVKPIPAHREBA-----SPP----PRPPS 512
BarH2 SASANPGGPHVAAPPPCGG-----SPATROANSEADCERTSSSSRQLR---IQ 588

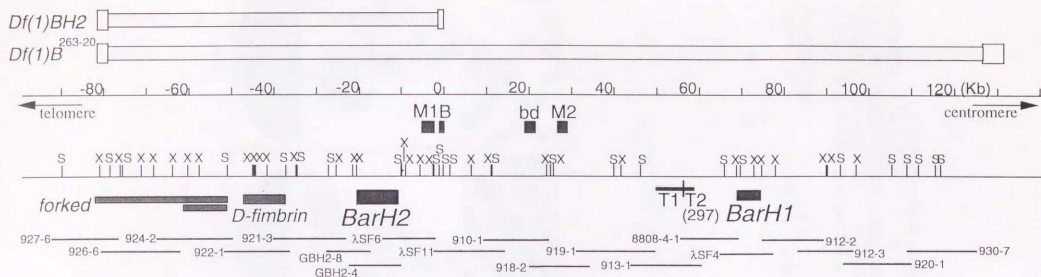
BarH1 PSPTNEGSPPCRISVSDSCS-----QSDDEDQIQV* 543
BarH2 PSPTNEGSPPHRERINEEEDRERDEERDIERERERERERDEDEDELALAV* 640

```

☒8.

BarH1とBarH2がコードする蛋白のアミノ酸配列の比較。  
 シャドウをつけたアミノ酸はBarH2とBarH1間で一致する  
 アミノ酸を示す。囲みはホメオドメイン配列。ハイフン  
 (ー)はギャップを示す。

(A)



(B)

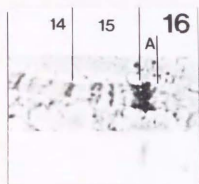


図9.

(a) *Bar*領域全体をカバーするλクローンのシリーズと遺伝子の配置、制限酵素地図、及び *Bar* 変異体の染色体再編点あるいは欠損領域。T1, T2 はトランスポゾン 297 の一部挿入領域、M1, M2, B, bd はそれぞれ *B*, *B*<sup>M1</sup>, *B*<sup>M2</sup>, *B*<sup>bd</sup> 変異体の染色体再編点を示す。

(b) *BarH2* 領域をプローブに用いて行った唾腺染色体に対して行った *in situ* hybridization.

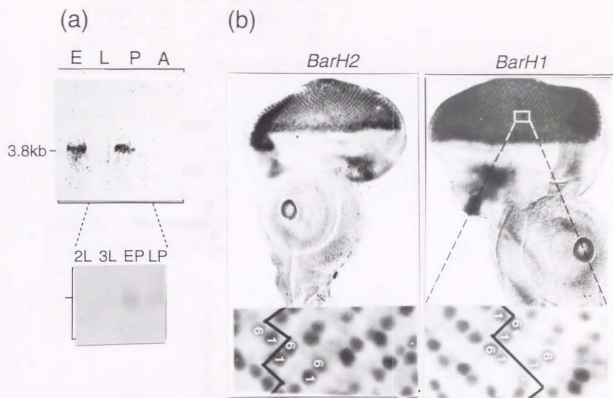


図10.

(a) *BarH2*の時間的な発現の変化をノーザン解析により調べた結果。いずれも total RNA を約5 $\mu$ g 使用した。上段左から胚期(E)、幼虫期(L)、蛹期(P)、成虫(A)、下段は左から幼虫期のうち2齢(2L)及び3齢(3L)、蛹期のうち前期(EP)、後期(LP)のパターンを示している。約3.8kbの位置にバンドが一本検出される。

(b) *BarH2*の空間的な発現パターンを抗*BarH2*抗体で調べた結果。ここでは一例として三齢幼虫期の複眼原基を示し、*BarH1*のパターンと比較した。下は拡大図。*BarH2*は、*BarH1*と同様光受容細胞前駆体R1/R6(拡大図中に数字で示した)で発現している。また、両者ともに、単眼領域及び触角原基のaristaに対応する領域での発現も見られる。

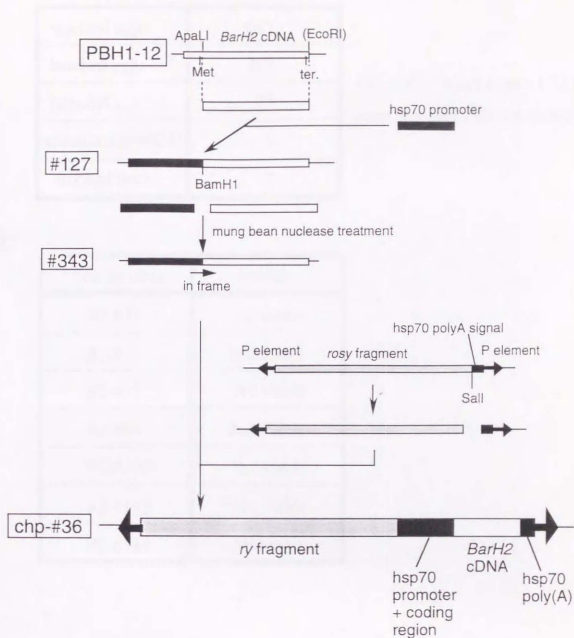


図11.

*BarH2*を生体内で過剰発現させるために導入するコンストラクトDNAの作製手順（本文参照）。合計3回のステップを踏んでいる。



a

injected eggs	863
hatched eggs	252
G0 adults	75
transformants(G1)	9
stocked lines	7

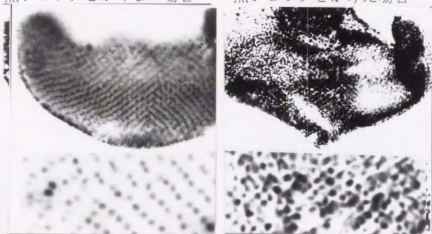
G0 adults/ inject eggs =1/11.5  
transformants / G0 adults=1/8.3

b

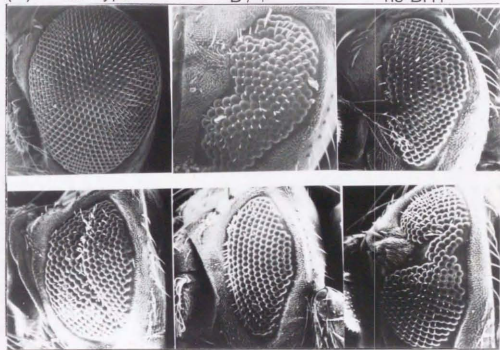
line number	linkage
B2-#45	1st viable
B2-#49	2nd viable
B2-#71	3rd viable
B2-#98	2nd viable
B2-#106	3rd viable
B2-#112	3rd viable
B2-#114	1st viable

表1. (a)hs-BH2株作製のために行ったマイクロインジェクション実験のまとめ。(b)得られた導入株の種類とそのlinkage.

(a) 熱ショックをかけない場合      熱ショックをかけた場合



(b) wild type      B/+      hs-BH1



hs-BH2

(c) 熱ショックをかけない場合      熱ショックをかけた場合

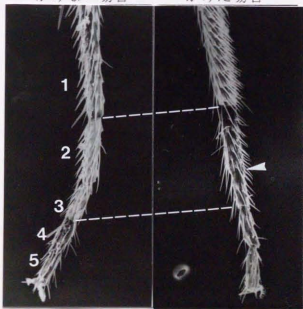


図12.

(A)chp#36(hsBarH2)導入株の一つB2-98株について、熱ショック誘導後30分の成虫原基を抗BarH2抗体で染色し(右)、熱ショックをかけなかった場合(左)と比較した結果。拡大図で分かるように、本来発現していない場所でBarH2が発現している。

(B)熱ショックを与えたB2-98株の成虫複眼形態を走査型電子顕微鏡によって観察した結果。(左上)wild type、(中上)Barのヘテロ接合体、(右上)hs-BarH1、(下)hs-BarH2の結果。図のように、BarH2を過剰発現させるとBarH1を過剰発現させた場合、あるいはB変異と同様の形態が観察される(中下)。また、少数ではあるが、溝が生じている複眼、8の字型をした複眼も観察される(左下、右下)。

(C)熱ショックを与えたB2-98株の成虫肢の形態。数字はtarsal segmentの番号を示している。図のようにtarsal segment 2と3との間が融合する(矢頭)。

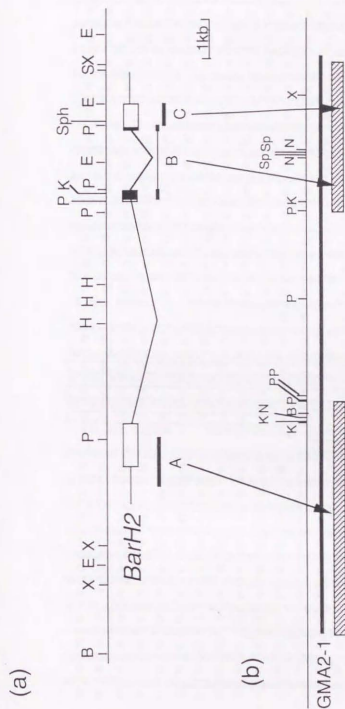


図13. (a) *D. melanogaster*のBarH2遺伝子の構造。A~Cはスクリーニング及び  
 サザン解析に用いたプロンプ断片。B: BamHI, E: EcoRI, H: HindIII, K: KpnI,  
 P: PstI, Sp: SphI, X: XhoIサイトを示す。黒く塗った領域はホモオドメインをコ  
 ードする領域。  
 (b) 得られた *D. BarH2* のゲノムDNAクローンGMA2-1とその制限酵素地図。制限  
 酵素サイトの略記は(a)と同じ。斜線で塗った箱( )は(a)のA, B, C断片と相  
 同性が高かった領域を示す。

```

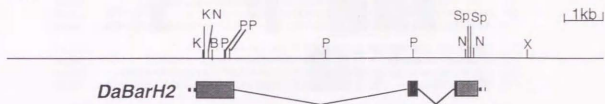
AAAAAAAAAATATACAGATACCAAGTCTACTTACTATCTGGTACACAGCCACGTGAA 60
TTTTTTTCGAGTGCATAACGGTGTGTGAGGACCAACACATGACCAAAATGCCACCGGAAA 120
M T T M P P E 180
TGTCCGAGCAACGCGCAATCCGTTTTCGGTACCGCCAGTGGCGGCGAGCGGTACCA 8
S A A T A N T P V C T A S A P T S G T N 28
ACGATCCGCGCGCGCGCGCGTGGCCCGAGTTCGGGCGCTCCCGCGCGCGTGGCT 240
H P A A V V G G G A R L R L R D S P P G A L 48
TGC CGCGCAATGCCAGCGGAGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCA 300
P A A M P A G A A A A A A A V A A T T T 68
CCACACCCACCCAGCGCCACCGGATCCCGGTTCAATGATCCAGGATATCTGGCCGGAG 360
T T T T Q A T R S R F M I T D I L A G A 88
CAGCGCGCGTTCGGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCG 420
A G S A L A L A A A A A A A A A A A A A A A A A A A A A A A A A A A A 108
CGATGCCAGTCCCGCAGGACAGGACAGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCG 480
S P Q D P Q D R D Q A L H H H H H H H H H H H Q 128
AGCAGCAGCAGCAACAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAG 600
Q Q Q Q Q H H H Q H Q Q Q Q Q A A L Q Q Y I 148
TCGTGCAACAGCAGCAACTGCTGCTCGCTCGAGAGGGAGGGGAAAGGAGGAGGGGCGGG 660
V Q Q Q Q L L R F R E R E R E R E R E R E R E R E R E R E R E R E R E R E 168
ACGCTGAGAGGGGCGCGAGAGGGGACAGGGGAGTCCGATCCACCCAGCAGCTCCCTCCAC 720
E R E R E R E H H P H P H P H P H P H P H P H P H P H P H P H P H P H P H 188
CGATGCTGACCACTTCCGCGCGCCACCTAGCGGCTCGCAGCACTGCTGAGCCACATC 780
M L H H F P P A H Y G L Q H S L S H H P 208
CGCACCACTGACCAATGGAGGGAGCGCGCTGGAGCGCTCCACCGCCAGCGCTGCG 840
H H L Q Q M E R D R L E A V H R H G L P 228
CCCTGGAGCAGTCCAGCCACCAACAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAG 900
L E Q S H H H H Q Q Q Q Q Q Q Q Q Q Q Q Q Q Q Q Q Q Q Q Q Q Q Q Q Q Q 948
AGCAACAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAG 968
Q H Q Q Q Q H L N H Q Q H P S H H D 268
ACGAGCGGTCAAGTCCGCGCTCATGTTGCAACAATTGGTGGTGGTCAAAATGCCAACA 1020
E R S R S P L M L Q Q L G G A N N N N 288
ACAATAACAATAAGTAGTAGCAACAACAACAACAATAATGTTCAAGTGGCAACA 1080
N N N N G S S S N N N N N N N V S S G N N 308
ACACAGCAACACCAATGCGAGCATACTGCTAGTGGGAGGAACACATTCAGTGGGA 1140
N N N N G S I L L G Q Q E H I S A F 328
TCAGGCGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGAT 1194
R P V R S I D S D T D D C G 342
(4.6kb intron) ...tctatTTTTAGTGGCAGGAGGATGATGCGAGGAGCAGTT 1236
G K D D D G E D S L 352
TGAAGAATGGCAGTCCCGCAACGGGACTCCTCGTCCATTGAGTCTCAGCAAGAAGC 1296
K N G S S A N G D S S S H L S L S K K 372
AGCGGAGGCGCAGGACCGCTTCCAGCGCATTACAGTCCAGACCTTGGAGAAGTCCCTTC 1356
R K A E T A A T T H Q L N T L E K T F 392
AGCGCGAAGTATCTGAGGCTCCAGGACGCAATGAGCTGGCAATAGCTGAGCAGTA 1416
R Q K Y L S V Q D R M E L A N K L E L S 412
GCGACTGCCAGSAGAGACTGCTACCGAAACCGCAGTgagagggcgcttctatgccc. 1475
D C U V K E W Y Q N K R 424
...(1.2kb intron) ...tatttttatcttgagGACCAAGTGGAGCGCCAAACGG 1514
E K W K R Q T A 432
CTGTGGTCTGAGACTCTCCGCGAGCGCGGGAATCCACCGCTCTCAGAGGCTCTATG 1574
V G L E L L A E A G N Y A A F Q R L Y G 452
GCGGTGCCAGCCCTACTTGAAGCGCTGGCCCTATGCGCGTGGCGCGTGGCCAGTCCG 1634
G A T P Y L S A W P Y A A A A A V A Q S P 472
CCACGGCGCGCGCGCTCCCGCATGACATCTACTACCGCCATGGCGCGCGCGCGCGCG 1694
H G A P P S P I D I Y Y R H A A A A A A 492
CCCTCCAGAAACCGCGCTGCGCGCTCTCTACCGCATCCCGTATCCGTGGAGATGCGCG 1754
L K F A P A S H P S H P S H P S H P S H P S H P S H P S H P S H P S H P 512
CGCGATGGGCTACCGCGATGCTGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCG 1814
G M A L P G M P A P P P P G A A P M L S 532
GCGGCTACTATGCGCGCGCGCGCTGCGCGCGCTCCGCTCGCGCTGCGCGCTGCGCGCG 1874
G Y Y A A A A A A A A S A S A S A S A 552
CGCGCCAGCGCTGAGCGCTGCGCGCGGACCTCGCAGAGCGCCACAGCAGAACCGACT 1934
A Q P L S R P A T S Q S A N S R T D C 572
GCGAGCGCGCGCGCGCGCTACCGCTGGAATCGCGAGTCCGCGCGCGCGCGCGCGCTAC 1994
E A P S P R L P T G S P R L V L A 592
CGAGGAGAGGACGAGGCGGAGGAGGAGCGCGGAGGAGCGGAGCGCTGAGGAGG 2054
E E E D Q E R E R E R E R E R E R E R E 612
AGGAGGAGGAGGACTGGCGCTGAGGCTTAAGTAGCAATCGGCATCTCAAGTGGATCT 2113
E D E E L G L E V * 621

```

図14.

DaBarH2遺伝子の塩基配列と予想されるアミノ酸配列。大文字の塩基はエクソン、小文字はイントロンの配列を示す。囲みはホメオドメイン配列。

(a)



(b)

	1st exon	2nd exon
DaBarH2	ACCGACGACTGCCGgtgagtt.....t	tttttagGTGGCAAGGACGAT
	T D D C G	G K D D
	S D D C G	G K D D
BarH2	AGCGATGATTGCGgtaagtc.....t	tcgcagGTGGCAAAGACGAC
BarH1	GTTTGTAGCAATGgtgaggt.....c	tttcagGCGGTAAGATGAC
	V C S N G	G K D D
	V C S N G	G K D D
Om (1D)	GTTTGTAGCAATGgtgaggt.....c	tttttagGCGCAAGGACGAT
	2nd exon	3rd exon
DaBarH2	TACCAGAACC	CGCAGgtgagcggcgcc...tatc
	Y Q N R R	T K W K R
	Y Q N R R	T K W K R
BarH2	TACCAGAATCGCAGgtgagcggca	cg...ttaaattgcagAACCAATGGAAGCGT
BarH1	TACCAAAACCGCAGgtgggtttta	ac...cattttgcagAACCAATGGAAGCGC
	Y Q N R R	T K W K R
	Y Q N R R	T K W K R
Om (1D)	TACCAGAACAGGAGgtgcgtctca	ac...cctttt-tagGACCAATGGAAGCGA

図15.

(a) *DaBarH2* の遺伝子構造。制限酵素サイトの略記は図13と同じ。箱はコーディング領域、水平の線はノンコーディング領域を示す。黒く塗った領域はホメオドメインをコードする領域。

(b) intron-exon junction 付近の塩基配列とアミノ酸配列を4つの *Bar* 遺伝子間で比較したもの。全て同じ場所に junction があることが推察される。

Om (1D)	--KDSKILKCRSETPAHSQ--LSELSHHHPALHHHPVLQHHYSLQQQHQQQQ	55
BarH1	--KDSKILKCRSEPMHAPQ--LSELSLSTLQQHQHQH--LHYGLQ-----	43
BarH2	MTTTPPFAATAAVGEASATA--HHPAAVGGQ-----	33
DaB2	MTTTPPFAAALANVCGTASPTSGTNPAAVGGGARLSDSPGGALPA-----	51
I		
Om (1D)	QQPPAPPAVA---TTVVNMSGTAA-NLKPMSRFAINDILAGAAAFAV-----	104
BarH1	----PAAVHSHSTTTMSGSTFASGIGKPNRFRMNDILAGAAAFAV-----	92
BarH2	MFRPASPVA-----GSNFTATATATSRFMTDILAGAAAFAAAAAAAA	80
DaB2	MFAGAAAPAAVA-----TTTTQATRSFMTDILAGAAAFAAAAAAAA	100
II		
Om (1D)	-----KQCCQKSHHSHHNNNNHGGSSGGGQ	133
BarH1	-----KQCC-HRQCLH-HHNNNNH-SGSSGGSS	117
BarH2	ALAAASGGGRGSPDTSERQSLVACHHHHHQKQKSHHQQHQHQQAALQOTIVQOQ	140
DaB2	ALAAAGRSPQDPQO---DRDQALHHHHHHHQKQKSHHQQHQHQ---AALQQIVQOQO	153
III		
Om (1D)	FT-----	135
BarH1	PA-----	119
BarH2	LLRFEREREREREREHYRERHSPGNNYAHHPMPHLLAHFPAHYVLQOQQOQQOQO	200
DaB2	LLRFERERERERERERERERERESHHP-RHPYHPML-RHFPPAHYG-LQHSL-----	S 205
IV		
Om (1D)	--HNNNN--GEGFPFSGGAGAGAAAAPP-PLRHLHQ-----SHPHSHHSHHP	184
BarH1	--HNNNNHNDNCEA-SNVAIVGV---LPS-ALH-----HPQHPFPFPH	160
BarH2	QHPPHMLQLERELAL-HRHRLGL---PGDPAQH-----LSHLSHLHQHQ	244
DaB2	HHPH-HLQQMDRLEAV-HRHRL-FLQSGHHHHHQOQOQOQOQHHLN-HQ	262
V		
Om (1D)	HH--ALVLP-PAKLA--AGGGAANGLVVAQYAAHQYHAAAAAARARAAAAAAA	239
BarH1	HH--ALVLP-HKRLGHPPTAGQKLVVAQYTAAMQYHAAAAAARARAAAAAAA	217
BarH2	HH--ALVLP-DESRSPMLQQLGGK--NNNNNNHSSASNNNSASASNTTSGN-	302
DaB2	HH--S--DESRSPMLQLGGANGNNNNNNHSSG---NNNNNNHSSGNNN-	310
VI		
Om (1D)	-----AAAAAAGGGGGGLTGGG-PAGALDDSDYHENEEDSDSEAAARRRGGSNH	296
BarH1	RAAAAAGVAAFPVGGVDCVGLAPPAGGLDSDYHENEEDSDS-----GN	265
BarH2	-----SSSNNNNSGNGNMLQPSSTI-----KQASATIDSSSDC-----	342
DaB2	-----NNNGS-----LLGCG-SHI-----SATRPVRSISLSDC-----	345
VII		
Om (1D)	MDSHVCSDQKRLA--LSELSST--SLSSG---SLSDRKRATFDHQLQSLSS	348
BarH1	MDSHVCSDQKRLA--LSELSST--SLSSG---SLSDRKRATFDHQLQSLSS	317
BarH2	-----DQKDDDDKNGKNSANGSSSHLSLNSKDKRATFDHQLQSLSS	393
DaB2	-----DQKDDDDKNSANGSS--SLSSSLSDRKRATFDHQLQSLSS	390
VIII		
Om (1D)	FSRQYVSVGVR--RSHSHLSDSQVQVYQRRHTWRQAVGLRDLAAGNFAKQGH	408
BarH1	FSRQYVSVGVR--RSHSHLSDSQVQVYQRRHTWRQAVGLRDLAAGNFAKQGH	377
BarH2	FSRQYVSVGVR--RSHSHLSDSQVQVYQRRHTWRQAVGLRDLAAGNFAKQGH	453
DaB2	FSRQYVSVGVR--RSHSHLSDSQVQVYQRRHTWRQAVGLRDLAAGNFAKQGH	450
IX		
Om (1D)	YGG-SFLGMPVALLAGGAAAAAAGTHTSTSDIYRQAAAA-MQKPLPYNLAGV	466
BarH1	YGG-SFLGMPVAAAAGG-----RSGTHTSTSDIYRQAAAA-MQKPLPYNLAGV	429
BarH2	YGG-SFLGMPVAAAAGG-----QSPHGA-P-SPIDIYK-AAAAALDKPLPASVATP	507
DaB2	YGG-SFLGMPVAAAAGG-----QSPHGA-P-SPIDIYK-AAAAALDKPLPASVATP	505
X		
Om (1D)	PNVGVGVGVG--PQFTHLSLSSLSLSDSYQSAALAAANPQGGPPHVPFSSGGG	524
BarH1	PNVGVGVGVG--PQFTHLSLSSLSLSDSYQSAALAAANPQGGPPHVPFSSGGG	487
BarH2	YGSSTPMSLPGMSPFPFPAAP---MSQFAAADAASAGAQOQQQCPAAAS-	561
DaB2	YPSMFPALPGMSPFPFPAAP---MSQFAAADAASAGASAQAQEL-ER-	558
XI		
Om (1D)	GTGGSPSPSGGLKPLRAAFVAVMPHHFSRPSA-SPLPLPLARPSTPSPSLNPQST	583
BarH1	GSPPS---GLVKPI---PMSRSA---SPP---FRPSTPSPSLNPQST	524
BarH2	-----SPTSOSA-NSEADCERTSSSRQL---ITPSPSLNPQST	598
DaB2	-----SPTSOSA-NSEADCERTSAPSPS---SPTSPSLNPQST	586
XII		
Om (1D)	QKSVDSCEQA-----QSDDEQIQG*	604
BarH1	QKSVDSCEQ-----QSDDEQIQG*	543
BarH2	FRERINERDERDEERDIERERERERERERERERERERERERERERERER	640
DaB2	FRERVAEEDQREEREE---REREREREED--EELGLSN*	621

図16.

*D.melanogaster*のBarH1とBarH2、*D.ananassae*におけるBarH1とBarH2のcounterpart (それぞれOm(1D)、DaB2と表記)がコードするアミノ酸配列の比較。ハイファン(ー)はギャップである。4つすべて一致しているアミノ酸を濃く、4つのうちいずれか3つが一致しているアミノ酸をうすく網掛けした。また、一致するアミノ酸を多く含む領域(II,IV+V)、4つとも荷電したアミノ酸を多く含む領域(III,VI)を大まかに囲んだ。なお、領域IVはホモドメイン配列である。

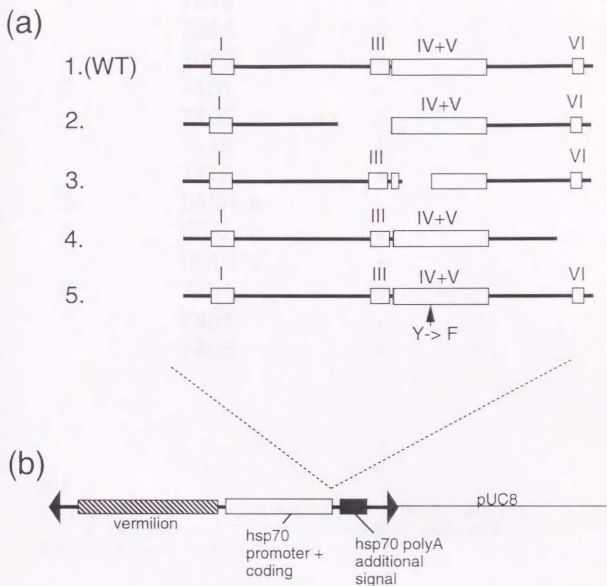


図17.

改変BarH1蛋白を過剰発現させるために作製した一連のコンストラクト。

(a)合計4種類の改変BarH1遺伝子を、主に制限酵素によってDNA領域を欠損させることによって作製した。具体的なstrategyはここでは省略する。白箱は図16で見出したBar遺伝子共通の特徴的領域。

(b) 作製した改変BarH1遺伝子を挿入するために作製したP因子ベクター。hsp70プロモーターとコーディング領域を含むDNA断片 (□) とhsp70遺伝子のpoly(A)付加シグナルを含む断片 (■) とを選択マーカーであるvermilion遺伝子断片 (▨) を含むP因子ベクター (pYCl.8) に挿入した。

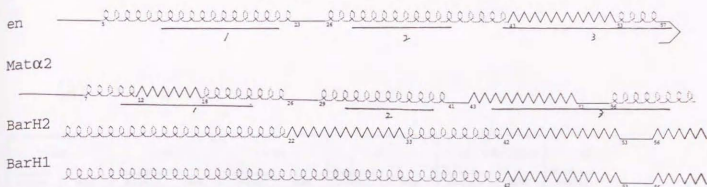


construct	line number	adult eye malformation
1	7019	+
	7024	+
	7029	+
2	7101	+
	7103	+
	7115	+
	7116	+
3	04/01-a	-
4	06-01-a	+
	06/01-c	+
5	7401	+
	7404	+
	7405	+

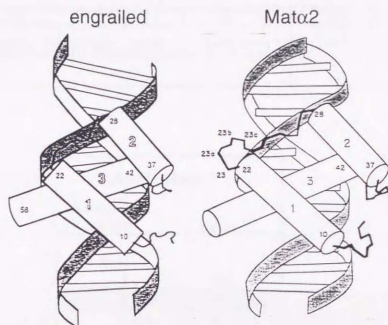
表 2.

改変BarH1蛋白の過剰発現による複眼の形態変化。得られた各導入株について三齢幼虫期に熱ショックを与え、成虫複眼の形態を観察した。変化が生じたものを+、生じなかったものを-で示す。

(a)



(b)



(c)

```

en  EKRPRTAFSSEOLARLKREFNEN---RYLTERRROOLSSSELGLNEAQIKIWFONKRAKIKKST
Mat  KPYRGHREFTKENVRILESWFAKNIENPYLDTKGLENLKMKNTSLSRIOIKNWVSNRRRKEKTIT
mBH2 QRKARTAFTDHQLQTLEKSFERQ---KYLSVQDRMELANKLELSDCQVKTWYQNRRTKWKRQT
mBH1 QRKARTAFTDHQLQTLEKSFERQ---KYLSVQERQELAHKLLDSDCQVKTWYQNRRTKWKRQT

```

図18.

(a)Chou and Fasman法による二次構造予測の結果。既に三次構造が決定されているengrailed、Mat $\alpha$ 2ホメオドメインの結果をBarH2、BarH1とともに示す。なお、下線は3つのヘリックスに対応する領域。

(b)engrailed、Mat $\alpha$ 2ホメオドメインの三次構造 (Kissinger et al.1990、Wolberger et al.1991より転載)。

(c)engrailed、Mat $\alpha$ 2、BarH2、BarH1ホメオドメインのアミノ酸配列。シャドウをつけたアミノ酸はengrailed、Mat $\alpha$ 2間で一致するアミノ酸。矢頭をつけたアミノ酸以外は全てBarH1、BarH2のアミノ酸と一致する。\*はDNA-protein複合体を形成するために必要であると考えられているアミノ酸を示す。engrailed、Mat $\alpha$ 2の配列のしたに引いた線は、3つのヘリックスに対応するアミノ酸領域を示す。

(a)

<i>lab</i>		<i>pb</i>		• <i>Dfd</i>		<i>Scr</i>		• <i>Antp</i> / • <i>Ubx</i> / <i>abd-A</i>		• <i>Abd-B</i>	
Recognition Residues	Bases	Recognition Residues	Bases	Recognition Residues	Bases	Recognition Residues	Bases	Recognition Residues	Bases	Recognition Residues	Bases
(T6 A7)	?	(T6 A7)	T/C	(T6 A7)	T/C	(T6 A7)	?	(Q6 T7)	?	(R6 P7)	T
R5	T	R5	A	R5	A	R5	T	R5	A	R5	T
E3	T	E3	A	E3	A	E3	A	E3	A	E3	T
N51	A	N51	A	N51	A	N51	A	N51	A	N51	A
T47	A	T47	?	T47	T	T47	T	T47	T	T47	T
Q50 <sup>T54</sup>	G or T G or A	Q50 <sup>T54</sup>	G or T G or A	Q50 <sup>T54</sup>	G/T A/G	Q50 <sup>T54</sup>	G or T G or A	Q50 <sup>T54</sup>	G/T G/A	Q50 <sup>T54</sup>	G/T G/A
								?	C	?	C
								?	C	?	C

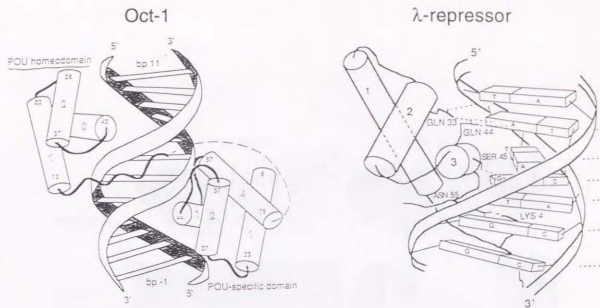
(b)

<i>BarH1/BarH2</i>	
Recognition Residues	Bases
(T6 A7)	T / C
R5	T
K3	T
N51	A
T47	?
Q50 <sup>T54</sup>	?
	?

図19a.

ホメオドメインのDNA結合性に関与しているといわれている8つのアミノ酸残基の違いによってホメオドメインが認識するターゲットDNA配列を分類した表（上段、Egger et al. 1994 から転載）。これらの結果から、BarH1/BarH2蛋白のターゲット配列を推定した（下段）。

(a)



(b)

BarH1	QRKARTAF <b>T</b> TDHQLQ <b>T</b> LEK <b>S</b> FERQK <b>Y</b> LSVQ <b>E</b> RQ <b>E</b> L <b>A</b> HK <b>L</b> DLSDCQV <b>T</b> W <b>Y</b> Q <b>N</b> RR <b>T</b> K <b>W</b> K <b>R</b> Q <b>T</b>
BarH2	QRKARTAF <b>T</b> DHQLQ <b>T</b> LEK <b>S</b> FERQK <b>Y</b> LSVQ <b>D</b> R <b>M</b> ELANK <b>L</b> ELSDCQV <b>K</b> TW <b>Y</b> Q <b>N</b> RR <b>T</b> K <b>W</b> K <b>R</b> Q <b>T</b>
Oct1	RRKK <b>R</b> TS <b>I</b> ET <b>N</b> IRVALEK <b>S</b> FL <b>E</b> NQ <b>K</b> PT <b>S</b> EE <b>I</b> IT <b>M</b> IAD <b>Q</b> L <b>N</b> MEKEV <b>I</b> RV <b>W</b> FC <b>N</b> RR <b>Q</b> KE <b>K</b> R <b>I</b> N
Oct2	RRKK <b>R</b> TS <b>I</b> ET <b>N</b> IRVALEK <b>S</b> FL <b>A</b> NQ <b>K</b> PT <b>S</b> EE <b>I</b> LL <b>I</b> A <b>Q</b> L <b>H</b> MEKEV <b>I</b> RV <b>W</b> FC <b>N</b> RR <b>Q</b> KE <b>K</b> R <b>I</b> N

1
2
3

pc-3   pc-2   pc-2R   pc-1

en	EKR <b>R</b> PTAF <b>S</b> SE <b>Q</b> LAR <b>L</b> K <b>R</b> EF <b>N</b> EN <b>R</b> Y <b>L</b> TE <b>R</b> RR <b>Q</b> LS <b>S</b> EL <b>G</b> L <b>N</b> EA <b>Q</b> I <b>K</b> I <b>W</b> F <b>Q</b> N <b>K</b> R <b>A</b> K <b>I</b> K <b>K</b> S <b>T</b>
inv	DK <b>R</b> PTAF <b>S</b> SG <b>T</b> QLAR <b>L</b> K <b>H</b> EF <b>N</b> EN <b>R</b> Y <b>L</b> TE <b>K</b> RR <b>Q</b> LS <b>G</b> EL <b>G</b> L <b>N</b> EA <b>Q</b> I <b>K</b> I <b>W</b> F <b>Q</b> N <b>K</b> R <b>A</b> L <b>K</b> K <b>S</b> S

zen1	V <b>K</b> L <b>R</b> TAF <b>T</b> SV <b>Q</b> L <b>V</b> EL <b>E</b> NE <b>F</b> K <b>S</b> N <b>M</b> Y <b>L</b> Y <b>R</b> TR <b>R</b> IE <b>I</b> A <b>Q</b> RL <b>S</b> L <b>C</b> ER <b>Q</b> V <b>K</b> I <b>W</b> F <b>Q</b> N <b>R</b> RM <b>F</b> PK <b>K</b> D <b>I</b>
zen2	S <b>K</b> RS <b>R</b> TAF <b>S</b> SL <b>Q</b> L <b>I</b> E <b>L</b> ER <b>E</b> PH <b>L</b> N <b>K</b> Y <b>L</b> AR <b>T</b> RR <b>I</b> E <b>I</b> S <b>Q</b> RL <b>A</b> L <b>T</b> ER <b>Q</b> V <b>K</b> I <b>W</b> F <b>Q</b> N <b>R</b> RM <b>L</b> K <b>K</b> S <b>T</b>

lbe	K <b>R</b> K <b>S</b> R <b>T</b> AF <b>T</b> N <b>Q</b> Q <b>I</b> FE <b>L</b> E <b>K</b> R <b>P</b> LY <b>Q</b> K <b>Y</b> LS <b>P</b> ADR <b>D</b> E <b>I</b> A <b>A</b> S <b>L</b> GL <b>S</b> NA <b>Q</b> V <b>I</b> T <b>W</b> F <b>Q</b> N <b>R</b> RA <b>K</b> Q <b>K</b> R <b>D</b> I
lbl	K <b>R</b> K <b>S</b> R <b>T</b> AF <b>T</b> N <b>Q</b> Q <b>I</b> FE <b>L</b> E <b>K</b> R <b>P</b> LY <b>Q</b> K <b>Y</b> LS <b>P</b> ADR <b>D</b> E <b>I</b> AG <b>L</b> GL <b>S</b> NA <b>Q</b> V <b>I</b> T <b>W</b> F <b>Q</b> N <b>R</b> RA <b>L</b> K <b>R</b> D <b>M</b>

gsb	Q <b>R</b> RS <b>R</b> T <b>T</b> F <b>S</b> N <b>D</b> Q <b>I</b> D <b>A</b> L <b>E</b> R <b>I</b> F <b>A</b> R <b>T</b> Q <b>Y</b> P <b>D</b> V <b>Y</b> T <b>R</b> E <b>L</b> A <b>Q</b> S <b>T</b> G <b>L</b> T <b>E</b> A <b>R</b> V <b>Q</b> V <b>W</b> F <b>S</b> N <b>R</b> R <b>A</b> R <b>L</b> R <b>K</b> Q <b>L</b>
gsbn	Q <b>R</b> RS <b>R</b> T <b>T</b> F <b>T</b> A <b>E</b> Q <b>L</b> E <b>A</b> L <b>E</b> R <b>A</b> F <b>S</b> R <b>T</b> Q <b>Y</b> P <b>D</b> V <b>Y</b> T <b>R</b> E <b>L</b> A <b>Q</b> T <b>A</b> L <b>T</b> E <b>A</b> R <b>I</b> Q <b>V</b> W <b>F</b> S <b>N</b> R <b>R</b> A <b>R</b> L <b>K</b> H <b>S</b>

### 図19b.

(a) Oct-1 ホームオドメインと λ-リプレッサーの三次構造 (Jordan and Pabo, 1988, Klemm et al. 1994 より転載)。互いに類似した構造を取っていることが分かる。

(b) (上段) BarH1 と BarH2、Oct-1 と Oct-2 ホームオドメインのアミノ酸配列。下線は対応する 3 つのヘリックスの位置。BarH1 と BarH2、Oct-1 と Oct-2 間で異なるアミノ酸残基にシャドウをつけた。pc-1 ~ 3、pc-2R は大腸菌 λ-リプレッサーの positive-control 変異及び変異復帰株の変異アミノ酸残基の位置を示す。(下段) engrailed(en) と invected(inv)、zerknullt-1(zen1) と zerknullt-2(zen2)、lady-bird-early(lbe) と lady-bird-late(lbl)、gooseberry(gsb) と gooseberry-neuro(gsbn) のホームオドメイン配列。二者を比較して異なるアミノ酸にシャドウをつけた。

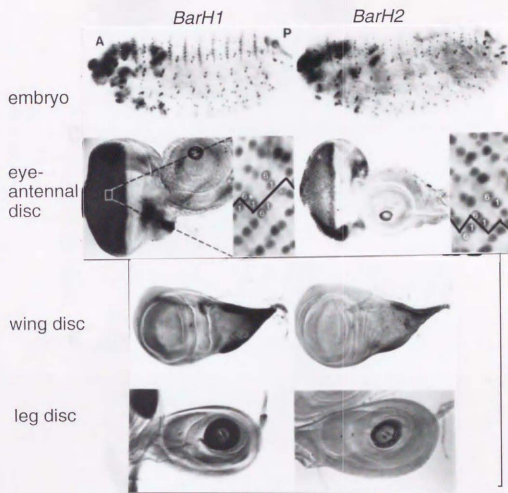


図20.

胚及び成虫原基におけるBarH1とBarH2の発現パターンの比較。  
 このように観察される発現パターンが全く同一である。

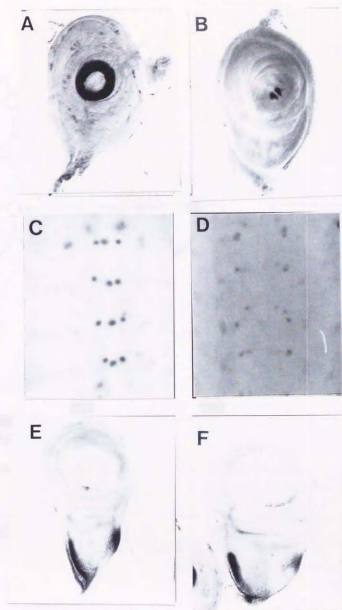


図21.

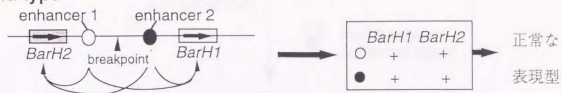
逆位変異体における *BarH1*、*BarH2* の発現の変化。

a,c,eは *BarH1*、b,d,eは *BarH2* の、*B<sup>M2</sup>* における発現パターンを示す。

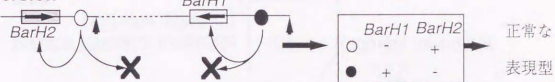
a,b:肢原基、c,d:胚期のCNS、e,f:翅原基。

(a)

wild type



inversion



(b)

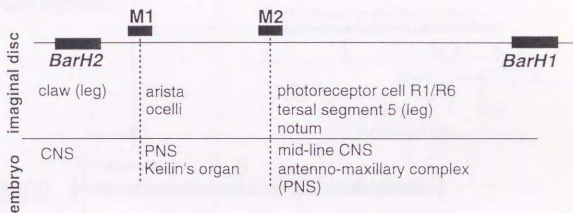


図22.

(a) 共エンハンサーと二つのBar遺伝子のco-expression. 逆位変異体の染色結果からこのような作業仮説が得られる。

(b) 二種類の逆位変異体を用いることによって大まかに分類したエンハンサーの位置. M1, M2はそれぞれ $B^{M1}$ 、 $B^{M2}$ の染色体再編点の位置を示す。

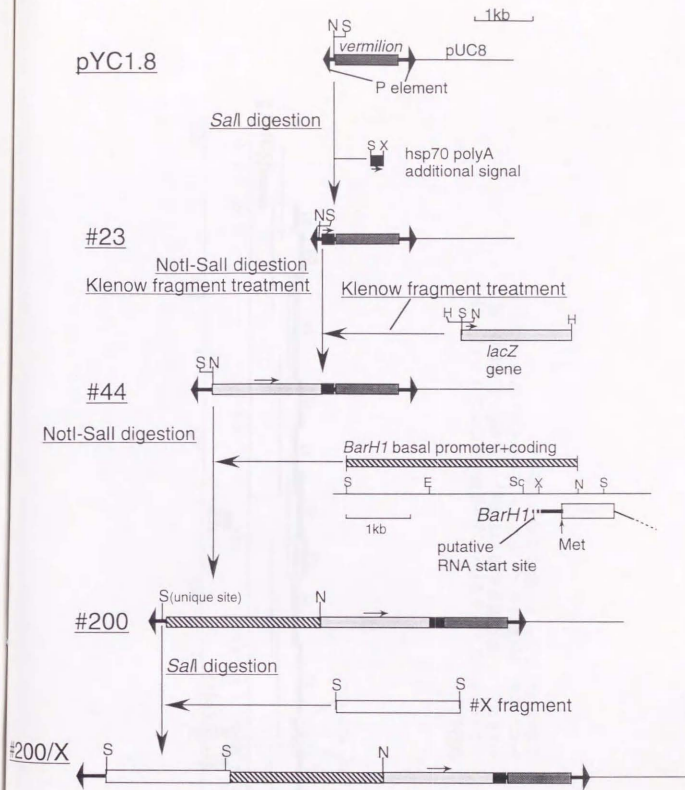


図23.

エンハンサーアッセイ用ベクターDNAの作製。作製途中で出来た一連のコンストラクトを並べた。また、プロモーターとして使用した*BarH1*断片の位置を示す。(影)。)



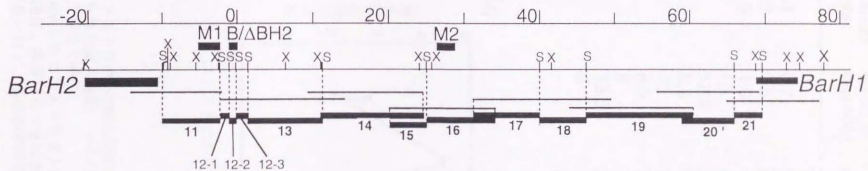


図24.

エンハンサーアッセイを行った*Bar*領域の断片のシリーズ。一連のλクローン（制限酵素地図下の細線）の*Sa*I断片を基本的に用いた。なお、#21断片はエンハンサーアッセイ用ベクターに用いた*BarH1*のプロモーター断片と同じである。

(a)

enhancer number	enhancer length(kb)	screened G0	transformants
11	8	104	1
12-1	0.7	50	1
12-2	0.8	36	1
12-3	1.0	43	1
13	10	40	1
14	13.5	311	2
15	6.5	78	3
16	11	136	2
17	8.5	71	2
18	6	90	4
19	13.5	327	3
20	9	120	1
21	-	91	4

(b)

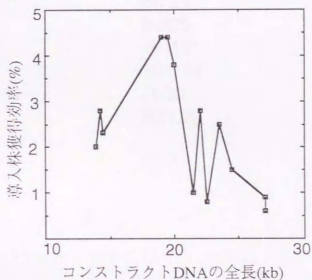


図25.

(a)各コンストラクトDNAにおいてスクリーニングしたライン数と得られた導入株数。エンハンサー長はベクター部分を差し引いた長さである。

(b)injectionしたコンストラクトDNAの長さで導入株の獲得効率との関係。多少ばらつきはあるものの、コンストラクトDNAが長いほど、獲得効率は低くなる傾向があることが分かる。

fragment (#)	strain number
11	2017
	2017j-5
12-1	192-a
12-2	191-a
12-3	198-a
13	13-55
14	14-80
	14-266
15	15-11
	15-19
	15-49
16	16-113
	16-131
17	17-24
	17-42
18	BM24
	BM25
19	19-121
	19-174
20	5630
21	BZ1.22

図26.

以下の実験に用いた導入株のリスト。各コンストラクトあたり最低1ライン、出来る限り複数ライン用意した。

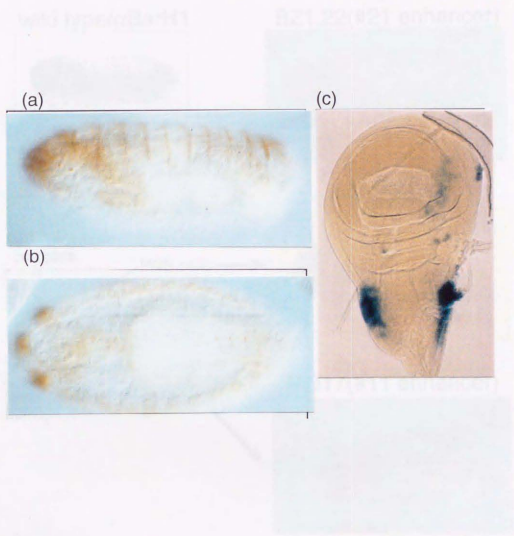


図27.  
 エンハンサーアッセイ用ベクター、#200導入株  
 BZ1.22の胚(a,b)、及び翅原基(c)における $\beta$ -galactosidaseの発現。

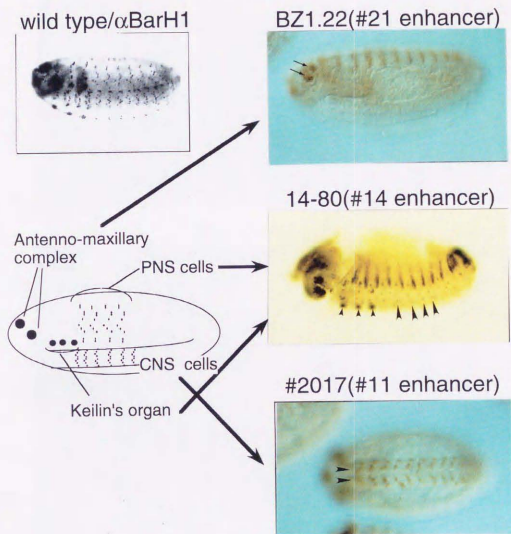
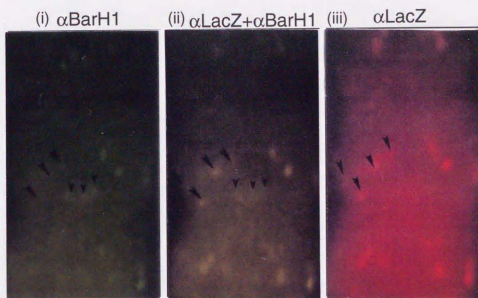


図28.

胚期におけるBarH1/BarH2の発現を制御するエンハンサー。  
 #21はAntenno-maxillary complexの一部とdorsal側の各体節境界  
 (前述)、#14はKeilin's organとPNS、#11はCNSの、それぞれ  
 BarH1/BarH2の発現をenhanceしている。

(a)



(b)

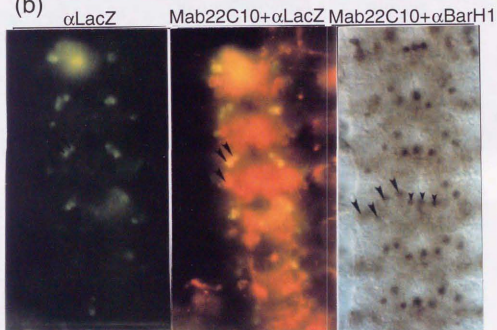


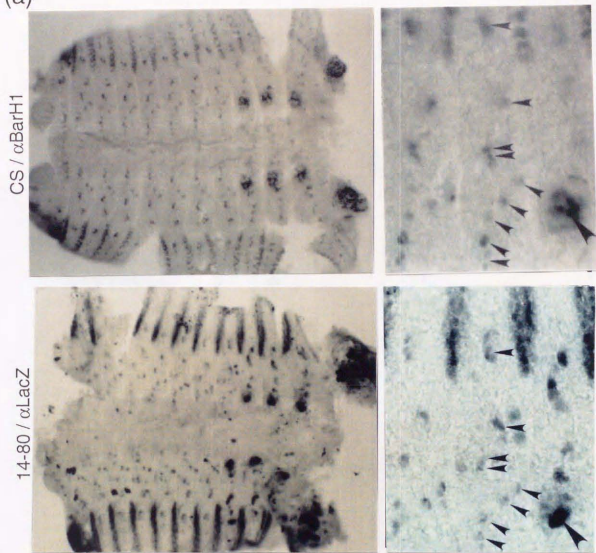
図29.

2017株 (#11エンハンサー導入株)におけるLacZの発現。この発現は導入したエンハンサーによる機能発現を反映している。

(a)抗LacZ抗体と抗BarH1抗体との二重染色。発現細胞が一致していることが分かる。

(b)抗LacZ抗体、あるいは抗BarH1抗体とMab22C10との二重染色。

(a)



(b)

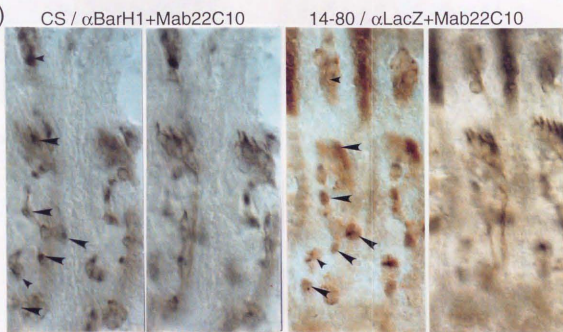


図30.

14-80株 (#14エンハンサー導入株)におけるLacZの発現をBarH1の発現パターンと比較したもの。

(a)抗LacZ抗体又は抗BarH1抗体による染色パターン。

(b)抗LacZ抗体又は抗BarH1抗体とMab22C10との二重染色。

二カ所のフォーカス面を示してある。

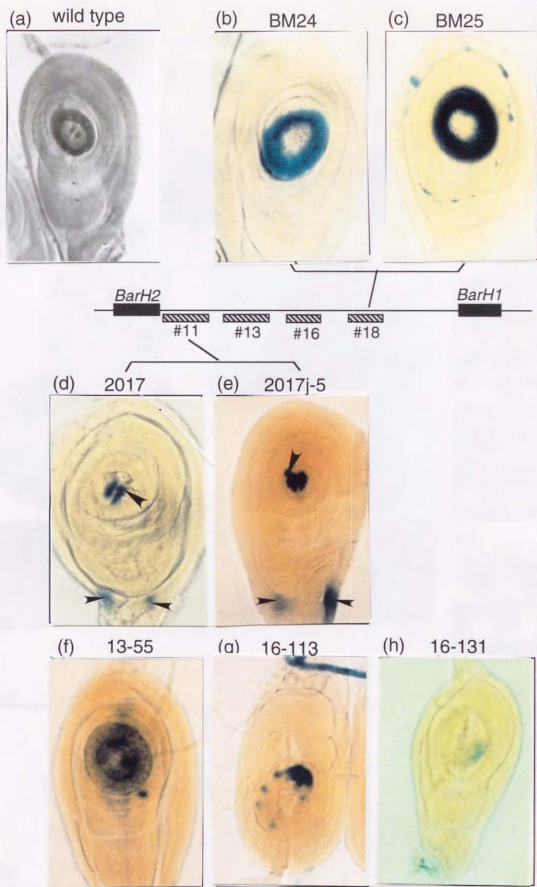
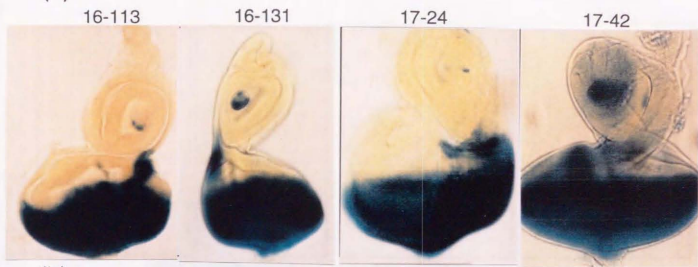


図31.

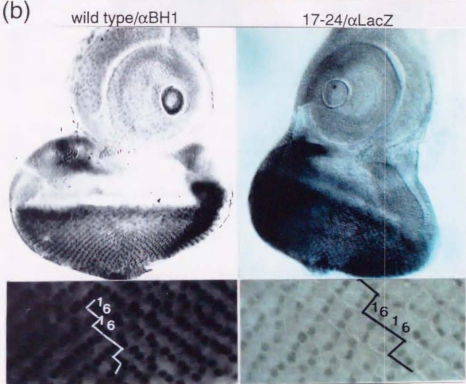
肢原基における *BarH1/BarH2* の発現を制御するエンハンサー。  
 BM24/25(#18/200導入株)、2017,2017j-5(#11/200導入株)、13-55 (#13/200導  
 入株)、16-113/16-131(#16/200導入株)の肢原基をX-galで活性染色した。



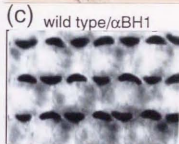
(a)



(b)



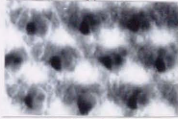
(c)



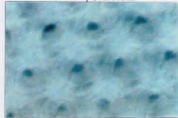
16-113/αLacZ



(d) wild type/αBH1



17-24/αLacZ



(e)

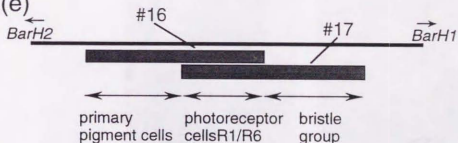


図32.

(a)16-113,16-131(#16/200導入株)、17-24,17-42(#17/200導入株)の複眼原基をX-galで活性染色したもの。(b)17-24株の複眼原基を抗LacZ抗体で染色し、野生株のBarの発現パターンと比較したもの。(c),(d)17-24,16-113株の複眼を抗LacZ抗体で染色し、野生株のBarの発現と比較したもの。(e)複眼原基に関するBarエンハンサー領域の位置関係。

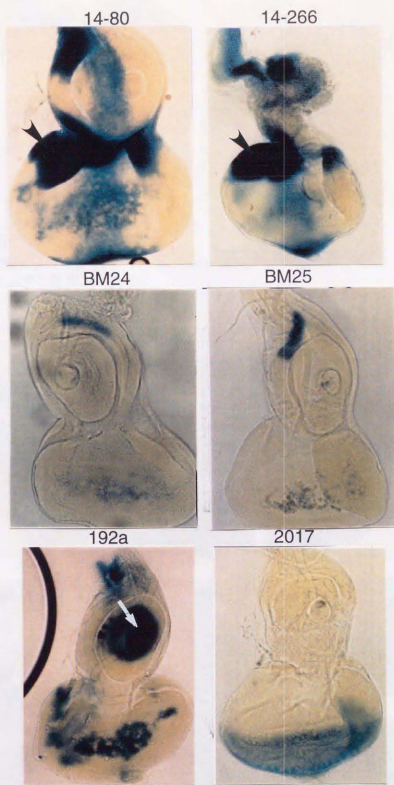


図33.

複眼・触角原基に関するエンハンサー。14-80、14-266 (#14/200 導入株)、BM24,25(#18/200導入株)、192a(#12-1/200導入株)、2017 (#11/200導入株) をX-galで活性染色した。



図34.  
2017(#11エンハンサー導入株)のbrain hemisphereでの  
LacZの発現。

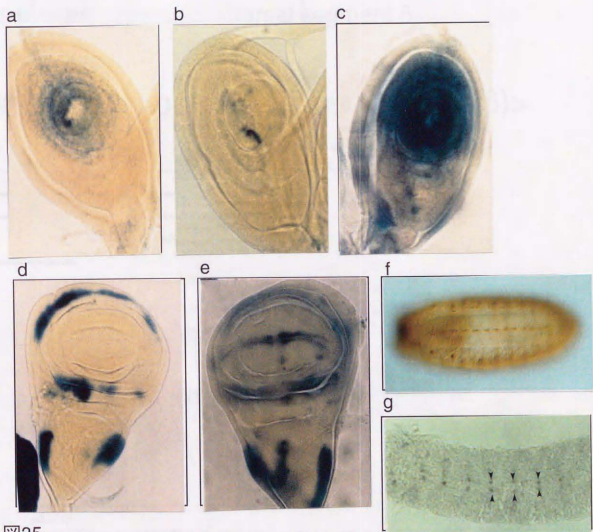
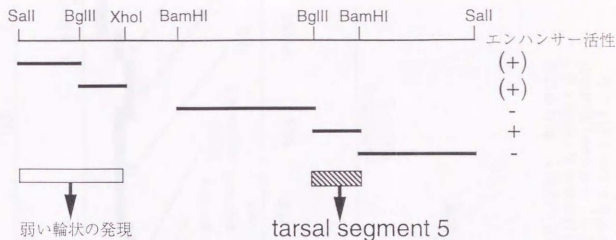


図35.  
コンストラクトDNAの挿入位置によって生ずる他の  
遺伝子のエンハンサートラップの例。  
a.17-24株、b.17-42株、c.192-a株(#12-1/200導入株)の  
肢原基におけるLacZの発現。d.17-24株、e.17-42株  
の翅原基におけるLacZの発現。f.17-42株、g.5630株  
(#20/200導入株)の胚におけるLacZの発現。

### <#18 region (tarsal segment 5)>



### <#16-17 region(photoreceptor R1/R6)>

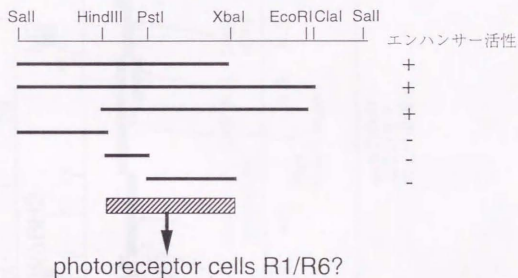
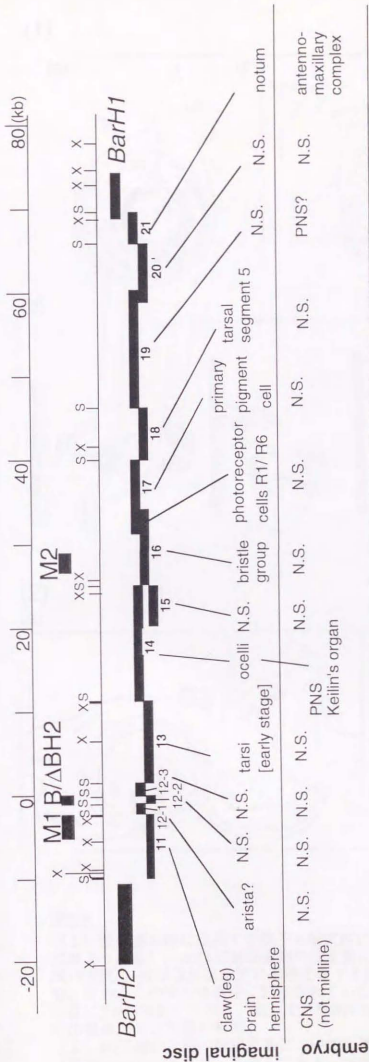


図36.

#18及び#16と#17の重なり部分について行ったエンハンサー領域の限定。測定した断片を線で示してある。

エンハンサー活性のあったもの（導入株が同様の染色パターンをしめたもの）を+、そうでないものを-で表した。

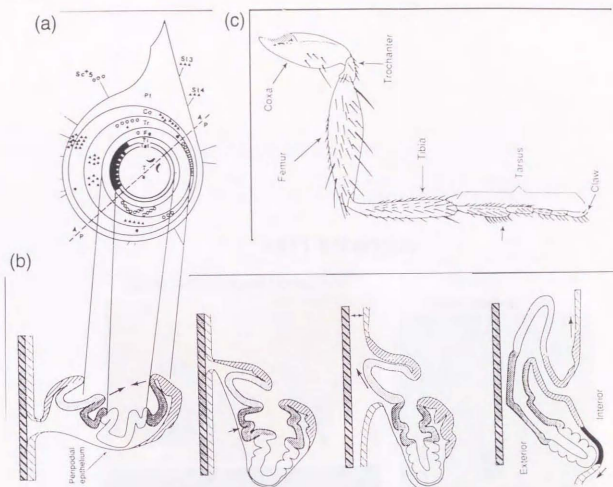


ectopic  
 肢原基の3領域  
 胞出以外の  
 複眼原基上  
 の広い領域  
 觸角/肢原基  
 の点状領域  
 複眼原基の  
 morphogenetic  
 furrowの前方領域  
 觸角原基の  
 筋状発現

図37.

エンハンサーアッセイのまとめ。BarH1/BarH2間のDNA断片の位置と、断片中に見出された組織特異的なエンハンサーの種類を示した。上段は成虫原基で機能するエンハンサー、下段は胚で機能するエンハンサーである。また、本来BarH1/BarH2が発現していない領域に関するectopicエンハンサーの存在位置を合わせて示す。なお、N.S.は染色の結果、lacZの発現が見られなかったことを示す。

(1)



(2)

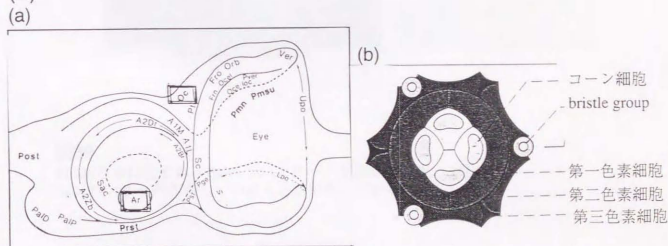


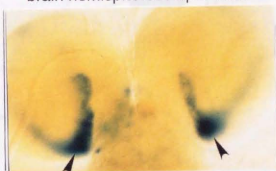
図38.

(1) 肢原基が肢に成長する様子を模式的に表したものの (Bate et al.1993;第13、14、22章より転載)。(a)は三齢幼虫期の肢原基についての運命予定図。Cl(clawになる領域)を囲む。(b)は肢原基が肢に形態変化する様子。時間経過は上から下に向かって進む。なお、この図では明確に記述されていないが、一番上の時点でtarsi(白い部分)は既に5つの区画にくびれ、従って形態的にtarsal segment1から5までを区別することが出来る。(c)成虫肢の形態。

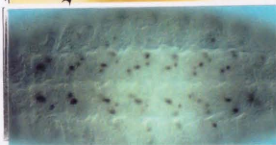
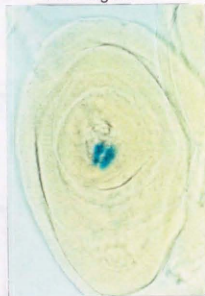
(2) (a)三齢幼虫期の複眼原基についての運命予定図。Oc(単眼になる領域)及びAr(将来aristaになる領域)を囲んである。(b)成虫個眼のうち、最も表面に近い部分の細胞群について示した模式図。

<#11 enhancer>

brain hemispheres / optic lobe



claw region



embryo / CNS cells

図39.

#11断片中に含まれる*Bar*エンハンサー。現時点で最低、3種類のエンハンサーが存在していることが分かっている。

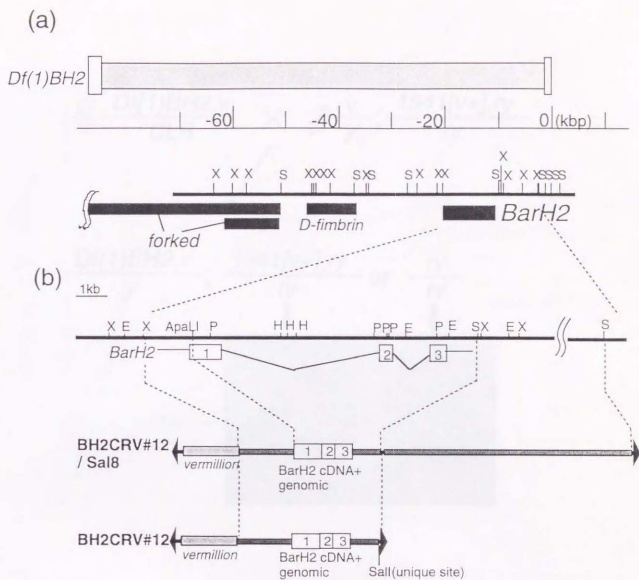


図40.

(a) *Df(1)BH2*変異株の染色体欠損領域。(b)表現型復帰実験に用いたコンストラクトDNA。1はcDNAクローン由来の断片、██████はゲノムクローン由来の断片。



♀  $\frac{Df(1)BH2,v}{CLB}$  × ♂  $\frac{v}{y}; \frac{1541[v+],ry}{ry}$

$\frac{Df(1)BH2,v}{y}; \frac{1541[v+],ry}{ry}$  or  $\frac{ry}{ry}$



図41.

コンストラクト導入株を  $Df(1)BH2$  バックグラウンドにする掛け合わせ。複眼の色によって導入株かどうかを選択する。

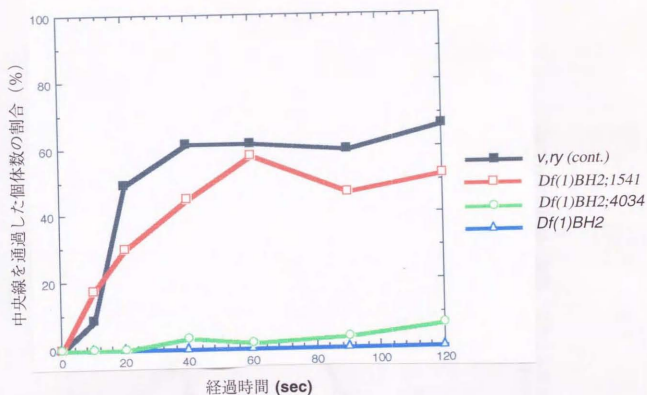


図42.

v,ry(control)、Df(1)BH2、Df(1)BH2;1541株 (BarH2+#11エンハンサー導入株)、Df(1)BH2;4034株 (BarH2導入株) の活動性 (測定法は材料と方法参照)。  
縦軸に経過時間後測定線を通じた個体の全体に対する割合、横軸に経過時間 (秒) をとった。

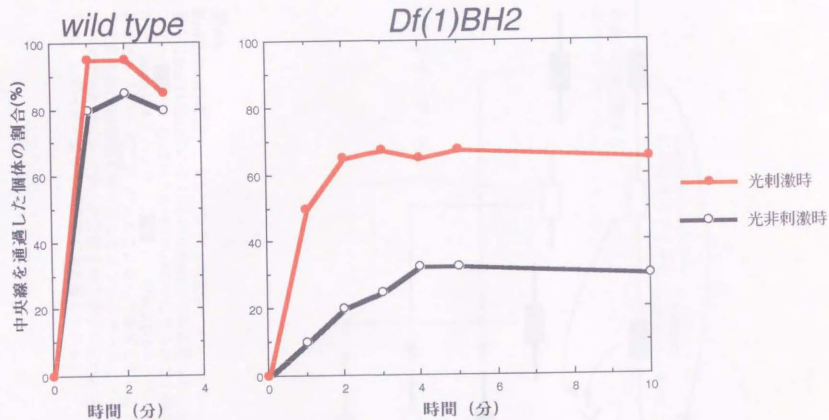


図43.

強い光照射時の $wild$ 株と $Df(1)BH2$ 株の活動性の変化。  
光照射前を黒線、光照射時を赤線で示した。縦軸、横軸は図42と同じ。

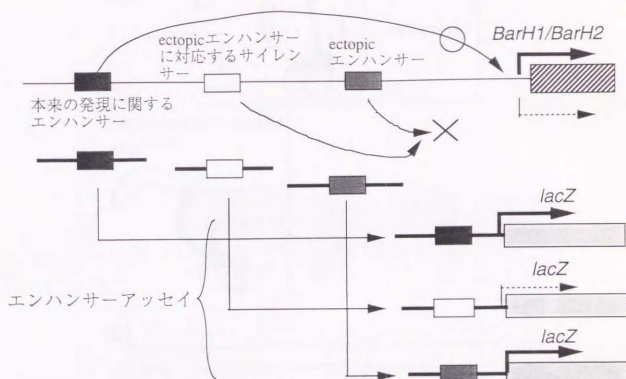


図44.

BarH1/BarH2遺伝子とエンハンサーの関係とエンハンサーアッセイ。  
 恐らくBarH1/BarH2には (1)BarH1/BarH2で本来見られる発現に関するエンハンサー(■)、(2)本来のBarH1/BarH2では見られない発現に関するエンハンサー(ectopicエンハンサー; ■)、(3)ectopicエンハンサーの働きを抑制するサイレンサー(□)が入れこになって存在していると思われる。このような染色体DNA領域を断片化してエンハンサーアッセイを行うと、ectopicエンハンサーとサイレンサーが分断された場合にectopicエンハンサーが活性化され、レポーター遺伝子が発現すると考えられる。

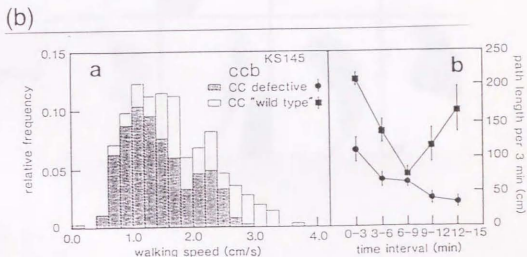
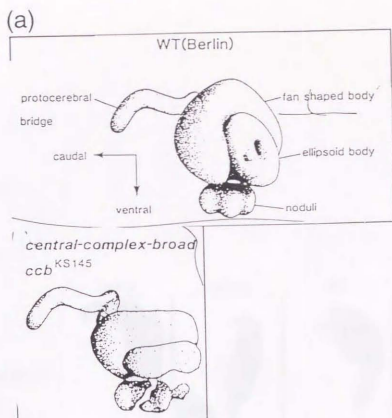


図45.

*central complex broad(ccb)*変異体の構造、行動的性質(Strauss et al.1993より抜粋)。

(a)wild typeとccb変異株におけるcentral complexの構造。ccbではfan shaped body, ellipsoid bodyの構造が左右方向に伸びた形になっている。

(b)ccb変異体の活動性。wild typeに比べて活動性が低下しているのが分かる。



図46.  
 en-LacZ (上段)とQ50株(hh-LacZ、下段)におけるLacZの発現。  
 後部区画で*engrailed*同様の発現パターンを示すことが分かる。

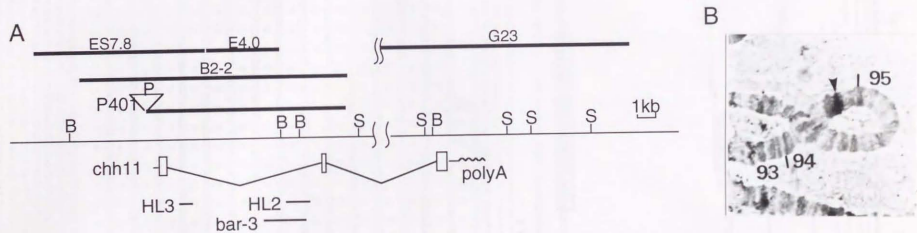
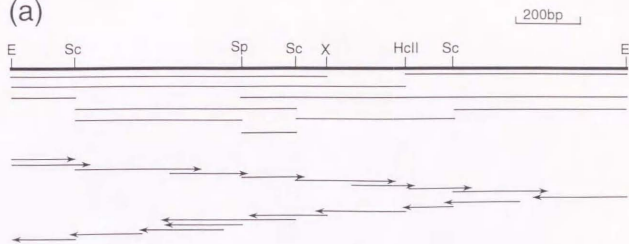


図47.

(A)得られた*hedgehog*遺伝子のゲノムクローン (ES7.8,E4.0,B2-2,P401,G23) 及びcDNAクローン、*chh11*の構造。HL3,HL2,bar-3は3種類のhh変異体の染色体再編点の位置を示す。  
 (B)ゲノムクローンを用いて行った唾腺に対する*in situ* hybridization.

(a)



(b)

ctcagagcgaatctctggtgctgctggtgtggtttgtctgctgctaaaggacctaggtctctgttcttgaagaacacctctgctgactcgtactcatt	90
P insertion	
actctgcatcttgattctgctgctgactcgtactcgtcgaactctgctgctgcaactctgctgctcagcagatactccgctgcgaaagtccaatttgtccaacta	180
yy	
cgctggcggcgcaacgctgtccgaacccgagacgtactgctcgtctcagcgggagcaacgttaagaccctagtttaagtccgttgggaccctg	270
cgattctggcggcaccgagatttccgaatttagcactttaaatccaaataatcacataaattccaataacaaacgtgctgccccaaataagcgt	360
ctgtctgtgcccagaagtgaaatgaatcaataacccaasaaataatataaaaaaatttaagggagatgcaaaatccacaaatcaagaagaacagcga	450
aacaacagagctcttagatataactagatgaccacacagctcaotgctctggtgcccagtgcccagtgctcaactctctctcctgagatgccccaa	540
ⓐ	
atgcccacagttccagttccagctccagctccaatcccgacggagctccatctccgccaattcccgcaagaagaagggcaaacgagtgcccga	630
chsssssssksaaassissaiipqeetq	720
cattgcccatagaccagcgttcctcagcaaggatgacatctcgtggcgccctctctgtgctgtgtgttgccaagtctcttagaccggcctca	810
iahtqrcqlsr	900
cagctgcgctctggcgaggatggctgtctatagggccggcaacctgatatccctgctctccagcagacaattcccactatccccga	990
scgpgdrgldgrhrabnllvplvlkkqtipnlse	1080
gtacagaaacaccgctccgagctctggagggtgtgatccctgggattcccccataatcgaagacctctgtgcccactcaaacaggga	1170
ytnsaszgplqevirrdsppkfkldlvfnynrd	1260
catctctctcgctgacgagaaagccagcggagcggatccctgatgagcaagcctgcaaggagaagctaaagctagctgcccactctcgt	1350
ilfrdeedeggtgadrlmsfrfcrcklknvlaysv	1440
gatgaacatattgcccgcacccctgctgctcagcagagcctgggacgagactacctcagggccagagatcctccactacgaggg	1530
mnwdfqitllvlteswdeedyhgqeslhwe	1620
ccagccggtagacattgcccactccgaccagctccaatagcgcctctcctcctcgccctgagccctggagctgattgattggatt	1710
ravtiatstdrdqskrygmlarlaveagfdvw	1800
ctctctctcagcagggcccacatctactgctccctcaagtccagttcctgagtcagctcctccacgcgctctctcaaccggagag	1890
svysrrhhlycsvksdsissishvhgcfp	1980
cacagccctcctggagatggactccagaccctctggccagctctctatcggagatcgtgtttgagcatgacggccacagcagcagc	2070
qvlvrsdvetgplrpqrvvkvvgsvrsesgv	2160
ctctcagcgaagtatctctcttagcaccgcaactcggagcagatgcaaaacttgtgcagctgcaacagccagctggagcaagt	2250
vysevilfmdrnleqmfnfvqlhtdggav	2340
cagcgtgacccggcctcaccctggtttggcagccggagcagagaactcagcgtttgtgctggagtcgcactcagggagagaa	2430
tvtvtpahlvsvwqpessqlkltfvfadrreekn	2520
ccgctctctcagcgaatggagacgagcagccgagctgagggcccacgagctcctcaagctggcagctgctgcccattagggctgctgccc	2610
qlvrsdvetgplrpqrvvkvvgsvrsesgv	2700
ccgctcagcccggggccacattggtgtcaactcgtgcccggcagtgctatccggtgatcaacagtcaatcgtgcccactgggg	2790
plrtregtinvnsavaascyavinsvqlahw	2880
actgctcccacgcctcctctgcccagctggagccctggctcccggccagaggagcagttgccaactgcccgaagctgctgagcctggcc	2970
lpmrllstleawlpakeqlhssppkvvss	3060
cgagcagcagatggcatgatggatgccaatggccctcaacaggtcagagactcagctgctcggcagagctggggccagcagattgaga	3150
qqqnqhikhwvnyannalykvyvlpqvswrh	3240
tgaaattcgtggagaagccgactcctgatccccagcatcctgatttgatatttatctctgtagttatgatatgcctaatgatgatgatattc	3330
aattgctgaatctcttaaatcgatcagatactatttattaccaccaaaatcaaaaaccacacacaaagccaccccccaacggca	3420
tgaagcaaaagccaaatgattgaattcaaaaacagatggaaaagaaatgaaaacactcgttaattcctctgactattgttttggcaaa	3510
cattttactgtagtgaactcttcggccagatccttaattctctgagaaaatcaatggcgaacctcccggagaacacagcagcctg	3600
ttactgattatactagaaatgaaatgcaatattttagctgcccggcagattcaggcccttgatatactatactctactct	3690
gtatatagagaacacattatagtactgaattcttatgtaattgtatataataactaattacttacttcctgcttatatacttaaat	3780
ttaatggaattataagaaattgttttgataaaaaaa	3870



図48.

(a)chh11(cDNAクローン)のシーケンスを行うために作製したサブクローンのシリーズ(細線)と実際に行ったシーケンスの範囲(矢印)。  
(b)hedgehog遺伝子の全塩基配列。大文字の塩基はcDNAクローンにより、小文字はゲノムクローンによってそれぞれ決定した。色付きの箱(13~39)はZDNA、下に向けた矢印は予想転写開始点、5'non-coding領域中に下線で示した塩基はプライマー伸長実験に用いた合成プライマーに対応する領域、○で囲ったアミノ酸は可能性のある翻訳開始点、四角の囲みはシグナル配列、2450番目付近の4本の細線は推定されるpoly(A)付加シグナルの位置をそれぞれ示す。

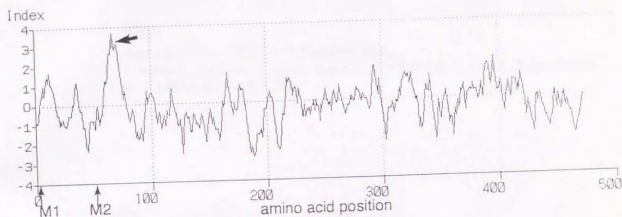


図49.

*hedgehog*遺伝子産物のhydropathy plot。Kyte&Doolittleの計算法による。indexの数値が高いほどより疎水性であることを示す。M1,M2は可能性のある二つの翻訳開始点、矢印はシグナル配列付近の位置を示す。

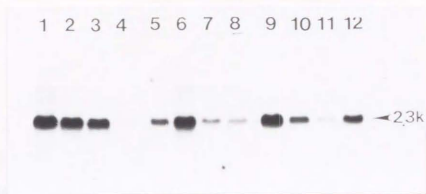


図50.

chh11をプローブに用いたNorthern blot。

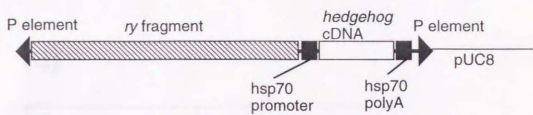
1:embryo、2:larva、3:pupa、4:adult、5~8:0-6,6-12,12-18,18-24 時間胚、  
9~12:蛹化後1~4日の蛹。



図51.

chh11をプローブにプローブに用いた *in situ* hybridization.

(a)



(b)

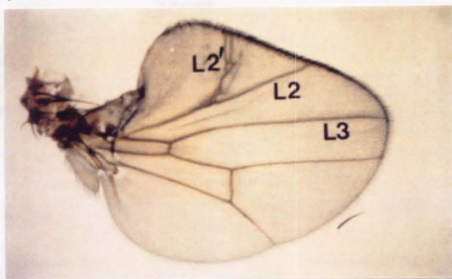
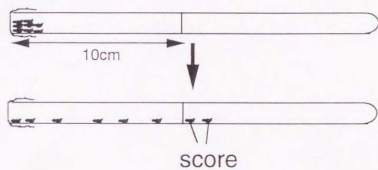


図52.

(a) *hedgehog* 蛋白質を過剰発現させるためのコンストラクト。  
(b) 得られたコンストラクト導入株の一つ、h9D株の成虫翅。

(a)



(b)

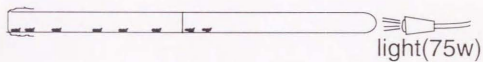
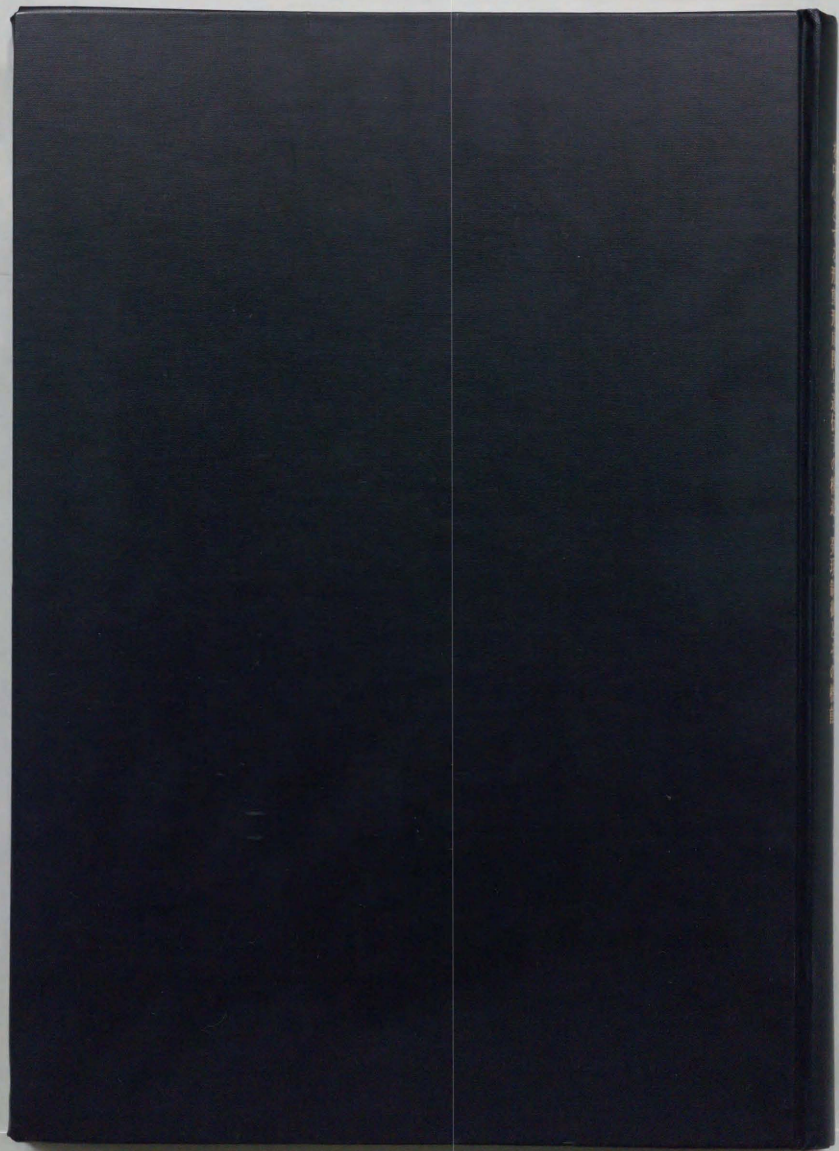


図53.

活動性測定法。(a)個体を左端に寄せ、その瞬間を0として  
単位時間後、中央線を通過した個体数を測定する。

(b)走光性測定の場合は右端から強い光を照射して同様の測定を行う。





Blue

Cyan

Green

Yellow

Red

Magenta

White

3/Color

Black

Kodak Gray Scale

C Y M

A 1 2 3 4 5 6 M 8 9 10 11 12 13 14 15 B 17 18 19

© Kodak, 2007 TM Kodak