

脊椎動物の翻訳調節因子である *NAT1/DAP5/p97* の  
ショウジョウバエ相同遺伝子 *dNAT1* は、  
胚のジャームバンド伸長と  
変態期に必須である

吉兼 奈美

奈良先端科学技術大学院大学

バイオサイエンス研究科 分子神経分化制御学

(中島 欽一 教授)

2009年12月21日

## 緒言

### 1. 翻訳開始について

真核生物にとって翻訳調節は、遺伝子発現の制御において基本的な機構である。真核生物の翻訳は核外で起こり、翻訳開始反応はループを形成する。電子顕微鏡による観察では、mRNAにリボソームがビーズ状に連なって結合している様子が報告されている(図1)。

多くの真核生物において転写産物の翻訳開始には、3量体たんぱく質のキャップ構造(m7GpppN)への結合と、mRNAの5'末端への結合が必要である(1)。3量体たんぱく質は、3つのサブユニットであるeIF-4E, eIF-4A, とeIF-4G(1)からなる。eIF-4Eサブユニットはキャップ構造(2)を認識して結合し、eIF-4AはATP依存的なRNAヘリケースであり、5'非翻訳領域の二次構造を解きほぐし、40Sリボソームサブユニットの結合を可能にする。eIF4GサブユニットはeIF-4A(3)とeIF-4E(2)の両方に結合し、翻訳開始複合体の骨格として機能する。このようにしてeIF-4Gを中心とする翻訳開始複合体がmRNAのキャップ構造に結合することによって、40SリボソームユニットはmRNAのスキャンを開始し、ATG(開始)コドンを読み取る。ATGコドンが読み取られると、60Sサブユニットが40Sサブユニットに結合してキャップ依存的な翻訳を開始する。最近の報告はeIF4ファミリーが様々な真核生物種において保存されておらず、従来考えられてきたよりも多様なたんぱく質合成がなされていることを明らかにした(4)。

### 2. NAT1について

eIF-4GファミリーのひとつであるNAT1/p97/DAP5は、新規翻訳調節因子として同定された。NAT1はRNAエディティング酵素であるAPOBEC-1を過剰発現した際にターゲットとなる(5)。NAT1は他の2グループによっても報告されており、1グループは分子量からp97(6)として、もう1グループは細胞死促進因子であることからDAP5 (death associate protein 5) (7)として報告されている。NAT1とeIF-4GとはNICドメイン、MAドメイン、W2ドメインを共通して有する結果、カルボキシル末端のアミノ酸は67%

の相同性を有する。NAT1はeIF-4Aとの結合サイトは有するが、eIF-4Eとの結合との結合サイトを欠く点がeIF-4Gとは異なる（図2）。eIF-4Gがキャップ依存的な翻訳に関与するのに対し、NAT1はキャップ依存的な翻訳にも、キャップ非依存的な翻訳にも抑制的に機能することを示している(5, 6)。しかしながら、NAT1は全般的なタンパク質合成において正に機能するという報告もなされている(8)。さらに、IRES依存的な翻訳（キャップ非依存的）たとえば、c-Myc, XIAP, Apaf-1(9), そして HIAP2 (10)を促進するという報告もある。これらの結果は異なることを報告しており、NAT1が翻訳反応においていかなる役割を担っているのかは現在のところ不明である。

*NAT1*のノックアウトマウスは、E7.5からE9.5にかけて、中胚葉誘導異常を引き起こして致死となる。NAT1は初期発生に必須であるばかりでなく、細胞分化にも必須である可能性が示された。また、*NAT1*<sup>-/-</sup>のES細胞に細胞分化を誘導するホルモンであるレチノイン酸を処理する実験では、*NAT1*<sup>+/-</sup>のES細胞が分化したのに対し、*NAT1*<sup>-/-</sup>のES細胞はレチノイン酸に応答せず、未分化状態を保った(11)。

NAT1は進化的にも保存されたタンパク質であり、相同遺伝子はさまざまな脊椎動物だけでなく無脊椎動物やホヤにも保存されている(12)。また、*NAT1*遺伝子は脊椎動物ではATGではなくGTGを翻訳開始点とすることが保存されている。一方、ホヤ、ショウジョウバエには翻訳開始点と思われるGTGコドンが保存されていない。ショウジョウバエゲノムプロジェクトが命名した遺伝子、*CG3845*は*mNAT1*のショウジョウバエ相同遺伝子（dNAT1）である(<http://flybase.bio.indiana.edu/>)。

### 3. エクダイソンシグナルについて

エクダイソンは昆虫の変態、脱皮を制御するステロイドホルモンである。レチノイン酸同様に核内に2量体のレセプター（*EcR*, *USP*）をもつ。核内レセプターによって直接転写される遺伝子群を一次応答遺伝子、一次応答遺伝子によって転写される遺伝子群を2次応答遺伝子群と呼ぶ。一次応答遺伝子には*E75A*, *E75B*, *E93*, *BR-C*, *E74A*などがある。二次応答遺伝子群には *βFTZ-F1*, *L71-6*などがある。このうち、*βFTZ-F1*は*E75B*によって転写さ

れ、*XIAP*の相同遺伝子である*diap2*を誘導し、細胞死を抑制する。一方、E74Aはショウジョウバエカススペースの一つである*rpr*を誘導し、細胞死を誘導するといわれている。また、E75は直接エクダイソン生合成系へ働きかけ、ネガティブフィードバックをかけ、エクダイソンの分泌を止める。

エクダイソンはショウジョウバエの幼虫の脳のそばにある前胸腺において生合成される。変体期近傍でのエクダイソンサージ（エクダイソンの短期的な分泌）は、およそ蛹形成前4時間ほどにおこり、続いて蛹形成後10～12時間頃に起こる。最初のサージでは蛹化が起こり、2番目のサージでは幼虫組織の分解と成虫原基の分化・増殖が起こる。このように、ショウジョウバエの変体はエクダイソンシグナルによって制御されていると考えられている。また、今までにエクダイソンシグナルとNAT1との関係を報告した論文はない。

#### 4 本研究の目的

本研究の目的は、*NAT1*のショウジョウバエ相同遺伝子である*CG3845* (*dNAT1*) の機能を明らかにすることである。そのために我々は、*NAT1*の変異体を何系統か単離し、表現系の解析を行った。

## 材料と方法

### 黄色ショウジョウバエの飼育

黄色ショウジョウバエは、培地 {40mg/ml 乾燥酵母エビオス、50mg/ml コーンミール、100mg/ml D (+) -グルコース、0.7% 寒天粉末、0.4% プロピオン酸、0.4% ボーキニン (10% p- ヒドロキシ安息香酸ブチル、70%エタノール) } を入れたボトルまたはバイアルを用いて 24°Cで飼育した。培地は、乾燥酵母とコーンミールと水を混合した溶液と D (+) -グルコースと寒天粉末と水を混合した溶液とをそれぞれ加熱沸騰させた状態で両液を混合して作成した。加熱処理後プロピオン酸とボーキニンを加え、冷ました後ボトルあるいはバイアルに分注した。

### ストック、ジャームライントランスフォーメーション

二つの P 因子挿入系統  $1(2)01424^{01424}/Cy0$  ( $dNAT1^{P1}$  とする) と  $1(2)01424^{BG02338}$  ( $dNAT1^{P2}$  とする) は Bloomington ストックセンターから入手した。 $1(2)01424^{PBss}$  ( $dNAT1^{PBss}$  とする) は R. Mann' s 氏から入手した。我々はまた、P 因子が dNAT1 の翻訳領域に挿入された GS2099 ( $dNAT1^{GS1}$  とする)を相垣氏から入手した(13, 14)。P 因子の除去による変異体作成には  $dNAT1^{P2}$  系統と、P 因子トランスポゼース( $\delta 2-3$ )をトランスに持ち、P 因子に供給する系統、いわゆるジャンプスターターをかけ合わせることにによって作製した。P 因子内のマーカーである w 遺伝子が欠損した系統のうち、14 系統はホモ接合体で致死性を示した。我々は、ゲノムが 1.7 kb 欠けた  $dNAT1^{ex1}$  変異体を確認した。PCR の確認の際に使用したプライマーは、下記の通りである。5' プライマー gcagctccagctgagccgaaca; 3' プライマー, ggggtcgaggttgcgcccagcg. 増幅したDNAを PCR2.1-TOPO ベクター(Clontech)にクローニングし、配列を確認した。 $dNAT1$  3' の非翻訳領域を含む 3 つのゲノム断片を次のプライマーセットで増幅した。dNAT1-1-1-s, 5'-TCCGGTGTGGTTGTTGGGTTGTTGGTT; dNAT1-as(6317), 5' -TGGGCCTGCAATAATGTAGTCTTTCGTG; dNAT1-s(5163), 5' -GTTGACGTTGCCCGCTGCCTTGGCTTGA; dNAT1-

as(9430), 5' -CCGCCAGGCTGGATATTCAGATGGAAAC; dNAT1-s(9809), 5' -AGGGCAAAGAGCTGATGAACCAGTACTT. 断片は pCR2.1 ベクターにサブクローニングし、ライゲーションにより完全な 13 kb のゲノミック DNA を得た。コーディング領域の配列はシーケンスにより確認した。13 kb のゲノム DNA 断片は KpnI サイトによって *pP[CaSpeR-4]* にサブクローニングし、*w* 胚へのトランスフォーメーションを行い（選別に *w* 遺伝子を使うため）*pP[CaSpeR-4-dNAT1-13kb]* と命名した。cDNA 断片 (11-5121 および 1187-4918) は pUAST ベクターへサブクローニングし、*UAS-dNAT1-full* もしくは *UAS-dNAT1Δ 5'* 系統として樹立された。P 因子によるトランスフォーメーションは標準的なプロトコールによって行った (16, 17)。

### ***In situ* ハイブリダイゼーション、タイムラップス、組織学**

*dNAT1* の cDNA (2.5 kb、SacII-XhoI) 断片を *pBlueScript KS(-)* ベクターへサブクローニングし、センス鎖もしくはアンチセンス鎖のディグオキシゲニンラベルされた RNA プローブとして使用した。RNA プローブは、{H<sub>2</sub>O 13 μl、10×transcription buffer 2 μl、10×DIG-RNA labeling mixture 2 μl、RNase inhibitor 1 μl、RNA polymerase 1 μl} を 37°C で 2 時間かけて転写反応させた後、{RNase free DNase 1 μl、tRNA(10 μg/μl in DEPC H<sub>2</sub>O) 2 μl、RNase inhibitor 1 μl} を加え、37°C で 30 分加熱してテンプレート DNA を除去した。ステージングされた胚もしくは 3 齢幼虫の解剖によって取り出された組織の *In situ* ハイブリダイゼーションはディグオキシゲニンラベルされた RNA プローブによって行い、以前報告のあるアルカリホスホダーゼ (BM パーブル) (Boehringer Mannheim) にて検出した (18)。尚、検出時間は 30 分、室温と固定した。サンプルはすべて野生型 (Oregon R) である。胚のタイムラップス記録は以前の報告に従った (19)。胞胚葉の胚をスライドグラス上に置き、ハロカーボンオイル 27 を滴下し、光ファイバーライトをタイムラップスビデオを作製する間照射した。野生型の胚はこの方法で通常に発生し、孵化した。25°C の条件下で唾液腺を個体の様々な蛹形成後の発生ステージ (hours after puparium formation

(APF))から抽出した。セミシンセクションによる光学顕微鏡下での観察のため、唾液腺を 2.5%グルタルアルデヒド-0.1Mリン酸溶液 (pH 7.0) 4°Cで16時間固定し、PBS 溶液 4°Cで1時間洗浄し、溶液をエタノールからキシレンへ置換し、頭部のビテリン膜に穴をあけ、パラフィンに埋没した (2hr×3、60°C)。余分なパラフィンを除去し、ミクロトームで薄切し、スライドガラスに固定し、キシレン洗浄にて脱パラフィンを行い、溶液をエタノールから親水 (PBS 系) へと置換し Gill's Haematoxylin and Eosin Y 試薬にて染色し、Zeiss Axiophot OII 顕微鏡で観察した。

### *RT-PCR*

トータルRNAを発生段階ごとの幼虫もしくは蛹から抽出した。幼虫、もしくは蛹を-80°Cで凍結し、クロロホルム溶液中ですり潰し遠心分離によって組織片を除去する。その後イソプロパノールを加えて遠心分離し上層のみを取り出し、氷上で10分放置した後に、遠心分離によって溶液を除去、70%エタノールリンスを数回を行い、DEPC水に溶かして-80°Cで保存した。そのRNAを用いて以前の報告に従ってRT-PCRを行った(20)。逆転写反応は {RNase free H<sub>2</sub>O 10 μl、5×RT Buffer 4 μl、dNTP mixture 2 μl、RNase inhibitor 1 μl、Origo (dT) Primer 1 μl、RNA 1 μl、Rever Tra Ace 1 μl} を混合した溶液を30°Cでプレインキュベートし、42°C20分、90°C5分、4°C5分のサイクルで行った。サイクル数は1である。

特異的なプライマーを用いたRT-PCRによって各mRNAの発現を検出した。プライマーとPCRサイクル数は下記のものを用いた。

dNAT1, TGTTTAGCGGACTGAGTGTTACGG, TCCTTACTACCCAGCAGCTGATTG, 27;

Actin, ATGACGCACCGCGTGCAGTT, GAGTTGTAGGTGGTCTCGTGAATG, 25;

E74A, CTTCTCCGAGAGCAACTTCGAGAT, GACATTAGCTTCTCGACGAGAAGG, 27;

BFTZ-F1, CGAGGATGAGTTCGGTCTGGAAAT, CTCGAACAGGTGCTTGAAGTCGAT, 29;

E75, AGCGACTGGACTCCTCCCAA, CCGGAATCATGCCGCAAA, 30;

4EBP, GAACCCTCTACTCCACCACT, GGGTCAATATGACCGAGAGAAC, 24;

L71-6, CTGCAATGTCAAAAATTCTGGT, as-CATAGTTACTATGCACGAGGCTT, 21;

E93, GTGTGGATGCACCGCTCGATCTTA, CCCTTGCAAACCTGCCGGATACA, 27

mRNA の発現強度は、*Actin42A*の発現強度にて平均化した。

### クチクラ標本の作製

産卵後 20–24 時間程度の孵化直前の胚を回収し、50%ハイターを用いてコリオンを除去した。次に、キシレン：メタノール 1：1 の溶液に胚を入れ、激しく混合してビテリン膜を除去した後にメタノールで胚を数回洗浄した。最後に胚をスライドガラス上に置き、75%乳酸でマウントし、65°Cで2時間以上放置した。*NATI* 変異体は腸などの形成不全など表現型が顕著であったため、それを目印とした。また、胚の選別の際に *NATI<sup>GSI</sup>/SM1·DC-7* (GFP の挿入されたバランサー染色体) を用い、GFP ネガティブを *dNATI* 変異体とした。



## 結果

### *dNAT1* 変異体の単離

ショウジョウバエ相同遺伝子 *dNAT1* の cDNA 配列は、既に報告済みである (12)。 *dNAT1* cDNA は4つまたは5つのエキソンをコードし、転写産物は異なる第1エキソン (IaおよびIb) を有することから、 *dNAT1* mRNA は二つの型を有する (図 3A) (*dNAT1-a*, *dNAT1-b*)。しかしオープンリーディングフレーム (ORF) は共通するエキソンに存在しており、二つの mRNA の転写産物は同一のたんぱく質を生成する。ESTシーケンスデータの検索から、 *dNAT1* と考えられる25配列の中で、22配列が *dNAT1-a* であることがわかった (FlyBase, <http://flybase.bio.indiana.edu/>)。また、すべてのESTクローンは胚由来の cDNA ライブラリーから単離されていた。

*dNAT1* の変異体を単離するために、我々はショウジョウバエデータベース上で *dNAT1* 翻訳領域近くもしくは ORF 内部にトランスポゾンの挿入した系統を探した。その結果、3つのP因子挿入系統 *1(2)01424<sup>01424</sup>*, *1(2)01424<sup>BG02338</sup>*, *GS-2099* と、piggyback (トランスポゾン内にEGFPをもつもの) の挿入した系統、 *1(2)01424<sup>PBss</sup>* が見つかった (図 3A)。我々はこれらの系統をそれぞれ *dNAT<sup>P1</sup>*, *dNAT<sup>P2</sup>*, *dNAT<sup>GS1</sup>* および *dNAT<sup>PBss</sup>* と名づけた。*dNAT<sup>P2</sup>* のトランスポゾンの除去によって作成したゲノム欠失変異体 (*dNAT<sup>ex1</sup>*) は、*dNAT1* の転写調節領域を含む 1.7 kb のゲノムを欠いている (図 3A)。*dNAT<sup>ex1</sup>* 変異体は 胚生期から蛹期までの間に致死となり、ホモ個体の 16% が胚生期で (n=67)、60% が蛹期に死ぬことがわかった (n=52) (図 3B)。*NAT1* には3つの保存されたドメインをもち、それぞれ NIC ドメイン、MA ドメイン、W2 ドメインと名づけられている。NIC ドメインは広く翻訳因子に保存されており、MA ドメインは eIF4A との相互作用に必要とされるが、W2 ドメインの機能は不明である。

*dNAT<sup>P1</sup>* はもともと致死の変異体として同定されたもの (BDGP) であるが、野生型の個体とバッククロスをした後には *dNAT<sup>P1</sup>* の致死性は低下した。致死を免れて成虫として羽化したホモの *dNAT<sup>P1</sup>* 見かけ上は野生型と変わらず、正常であった。

*dNAT1<sup>PBSS</sup>* 変異体では、piggybackトランスポゾンにGFPコーディング領域を有し、イントロンIaのスプライシングアクセプター領域に挿入しているため、*dNAT1-a*による転写のレポーター遺伝子として機能する(21)。*dNAT1<sup>PBSS</sup>*ヘテロの胚でのGFPの発現はユビキタスであり(21)、*dNAT1-a*のユビキタスな転写を示唆している。*dNAT1<sup>PBSS</sup>*変異体は蛹期の辺りで致死となった。

*dNAT1<sup>GS1</sup>*は、トランスポゾンが*dNAT1*翻訳領域に挿入した唯一の系統である。P因子はエクソン3に挿入し、その結果dNAT1たんぱく質はw2ドメインに入る直前のアミノ酸850番の後で途切れる。*dNAT1<sup>GS</sup>*のホモ個体は胚生致死であった(n=79, 図3B)。

トランスポゾンの挿入した系統と、ゲノム欠失変異体とのアレル間関係を調べるために相補性テストを行った(図3C)。相補性テストとは、2つの突然変異が対立遺伝子かどうかを調べるテストである。これは同一のシストロン内に生じた突然変異同士へのヘテロ接合は、通常相補性がみられず突然変異の表現型を示すことを利用している。その結果、*dNAT1<sup>P2</sup>*を除くすべての系統が致死性に基づくアレル間関係を示し、致死性のレベルはGS1 > ex1 > PBSS > P1のようになった。13-kbの*dNAT1*ゲノム領域を増幅した外来遺伝子は*dNAT1<sup>ex1</sup>*と、*dNAT1<sup>GS1</sup>*の致死性を完全にレスキューし(図3E)、これらの変異体で観察されている致死性はdNAT1の機能喪失によるものであることを確認した。また、この外来遺伝子によってレスキューされた成虫は、見かけ上は正常で変異を持たなかった。

### ***dNAT1* の発現**

胚発生期の時空間的な*dNAT1* mRNA発現パターンをin situハイブリダイゼーションによって検出した(図4A)。胚の表面に1層の細胞が形成されつつあるシンシチウム胞胚期(ステージ3)以前において高レベルな染色が確認され、卵割前の胚であることから母性mRNAの供給が確認された。*dNAT1*の発現はステージ4において顕著に低下し、その後、ユビキタスな発現を胚発生を通して維持していた。ユビキタスな*dNAT1* mRNAの発現は、胚発生のみではなく幼虫遊走ステージ(蛹化直前)の羽成虫原基、ア

イーアンテナ成虫原基、唾液腺、脳でも確認された。発生を通しての絶え間ない発現は RT-PCR によっても確認された(図 4B)。 *dNAT1* mRNA レベルは *dNAT1<sup>ex1</sup>* ホモ個体の 3 齢幼虫では検出感度以下まで減少した(図 3D)。

### *dNAT1* の翻訳

我々はこれまでに、脊椎動物の NAT1 は翻訳開始コドンとして GTG を使用していることを明らかにした(12)。*dNAT1* の最初のインフレームの ATG コドンはヌクレオチド 2162 に現れ NIC ドメインの中に存在する。このドメインは脊椎動物の NAT1 や eIF4G においても保存されており、eIF-4A との相互作用に重要である。*dNAT1* は eIF-4A と結合することから、*dNAT1* の開始コドンはヌクレオチド 2162 よりも上流に存在することが予想された。

N 末端の *dNAT1* タンパク質の配列を同定し、翻訳開始点を明らかにするために、他のショウジョウバエ近縁種の第 2 エキソンと *dNAT1* の第 2 エキソンとをアライメントした(図 5A)。第 2 エキソンは 5' UTR の大部分と仮の翻訳開始点を含んでいると考えられる。我々は 5 つのショウジョウバエ近縁種 (*D. erecta*, *D. persinilis*, *D. virilis*, and *D. grimshawi*) の第 2 エキシソンの配列をデータベース検索によって入手した(FlyBase <http://flybase.bio.indiana.edu/blast/>)。その結果、予想されるアミノ酸配列はファーストメチオニンの上流においても高度に(アミノ酸レベルで 97~100%)保存されていることがわかった。特に、セレオニン残基(図 5C)の下流 48 アミノ酸は完全に保存されている。一方、この配列よりも上流は顕著に相同性が低下している。上記のことは、ショウジョウバエ *NAT1* の翻訳開始点がセレオニン残基の近傍に存在することを強く示唆している。このセレオニンはショウジョウバエでは ACC コドンによってコードされているが、ACC コドンによる翻訳開始は他のいかなる種においても報告がない。*dNAT1* の翻訳開始点を正確に決定するためには、翻訳開始点と予想される部位を GGG 等に変え、タンパク質が合成されるかを試す必要がある。

我々はまた、核酸 1021~1185 (*dNAT1* cDNA) に高度に保存された領域を見出し、*dNAT1* Conserved Sequence (DNCS) と命名した。この領域は種間で 78% の相同性を示し、mRNA の二次構造が保存されていると予測される(図 5B)。脊椎動物 *NAT1* 遺伝子はショウジョウバエ *NAT1* 遺伝子に比べて相対的に短い 5' 非翻訳領域を有し、翻訳領域の 5' 領域に保存された二次構造を有する。対照的に、*dNAT1* は長い 5' 非翻訳領域 (*dNAT1-Ia* の場合、1925 bp) を有する。この長い 5' 非翻訳領域は、DNCS を中心に、翻訳において重要な役割を果たしていると考えられ、おそらく非 ATG コドンによる翻訳に関係していると思われた。

この可能性を検証するため、私はほぼ全長の *dNAT1* cDNA (*UAS-dNAT1-full*) と、最初の 1~1786 塩基を欠損したもので、インフレームのファーストメチオニンを含む (*UAS-dNAT1Δ 5'*) とを GAL4-UAS システム(15)によって過剰発現させた。*UAS-dNAT1-full* の *dpp-GAL4* による羽成虫原基の前後軸における過剰発現は、背側の異常をきたし、末端神経組織である、剛毛の数が減少した(図 5D)。*Scabulous-GAL4* を用いて神経前駆細胞において過剰発現させた場合も同様に、剛毛の数が減少した。一方、*UAS-dNAT1Δ 5'* を *dpp-GAL4* や *Scabulous-GAL4* を用いて神経前駆細胞において過剰発現させても決して背側に異常が現れたり、剛毛が増減することはなかった。これらの結果は *dNAT1* の 5' 非翻訳領域 が遺伝子発現に直接的に関与していること、また、翻訳開始点がメチオニンではないことを示している。

### 胚発生期の *dNAT1* 変異体の表現型

*dNAT1<sup>GS1</sup>* は今回調べた変異体のうちで最も強い対立遺伝子であり、ホモ個体は胚発生の途中で致死となる。この表現型をもっと詳細に観察するために、*dNAT1<sup>GS1</sup>/CyO·DC-7* から生まれる胚のタイムラプスイメージングを行った。ヘテロ個体とホモ個体は balancer 染色体由来の GFP の発現に基づいて識別した。図 6A はステージ 5 から 12 の野生型と *dNAT1<sup>GS1</sup>* 個体の側方図を示している。野生型では、胚帯の伸長は頭部側に溝の形成されるステージ 6 の直後に起こる(19)。そして、ステージ 10 では胚帯

は頭部側の溝近傍まで完全に伸長する。*dNAT1<sup>GS1</sup>* 個体では、胚帯の伸長はほぼ正確な時間に開始する (AEL180 分付近)。しかし、胚帯の伸長の先端は頭部側の溝の方向へと動くが (AEL190 分)、途中で伸長は停止し、縮退を開始する (AEL205 分)。変異体はさらに異常に深い頭部側の溝を形成し、背側の溝はほぼ胚の背側に到達している。初期胚発生のこのような重大な異常にも関わらず、*dNAT1<sup>GS1</sup>* 変異体はクチクラを形成する (図 6B)。しかしながら、変異体の樹状突起は数が減少し、体節形成に異常が生じたことを示している (図 6B は野生型の 8 本の樹状突起の隣に変異体の 4 本の樹状突起を示している)。樹状突起の平均は野生型が 8 本 (n=39) に対し、*dNAT1<sup>GS1</sup>* 変異体は 3.8 (n=39) であった (図 6C)。

#### ***dNAT1* 変異体は蛹期に致死となる**

*dNAT1<sup>ex1</sup>* 変異体は *dNAT1<sup>GS1</sup>* 異体と比較して相対的に穏やかな表現型を有する。*dNAT1<sup>ex1</sup>* は *dNAT1* の転写調節領域とエクソン Ib を、そしてエクソン 2 の 5' 末端を 123 bp 除去されている。しかしながら翻訳領域は完全に残っているものと推定される。*dNAT1* mRNA の発現は 3 例幼虫の段階で RT-PCR レベルで顕著に低下している (図 3D)。しかし、*dNAT1<sup>ex1</sup>* はハイポモルファリルである。*dNAT1<sup>ex1</sup>* 変異体の大多数は変体期に致死となり (図 3C)、蛹からの羽化に失敗する。蛹期後期のファレートアダルトを解剖して蛹から取り出し、図 7A に示す。約 50% の変異体が頭部、胸部、腹部を有すが (図 7A-B)、それらの占める比率は異常である。腹部は幼虫期のように伸長したまま残り、相対的に頭部領域と胸部領域が狭くなっている。最も顕著な変異体では頭部領域の形成は確認できない (図 7A-C)。

さらに *dNAT1<sup>ex1</sup>* 変異体において過剰な感覚器官 (ES) の形成も確認された。野生型の個体では、成虫の胸部背側領域 (ノータム) は感覚器官によって覆われている (22)。これらの感覚器官は、形状や位置によって他とは区別されている (22)。2 つの大きな ES 器官は頭部側盾板剛毛 (ASC) と呼ばれ、尾側盾板剛毛 (PSC) は半体節に存在する (図 7B)。私は頻繁に *dNAT1<sup>ex1</sup>* 変異体は過剰な SC 剛毛を有することを観察し

た(図 7B)。同様の表現型は RNAi による *dNAT1* 機能欠失型変異体においても報告されている(23)。*dNAT1* の仮の翻訳領域の最初の 500 塩基に相当する二本鎖 RNA を *dpp-GAL4* もしくは *Scabrous-GAL4* を用いて SC 剛毛の形成される領域に発現させた。*dpp-GAL4* << *UAS-[dNAT1-dsRNA]* 個体の表現型は、*dNAT1<sup>ex1</sup>* 変異体と同様、剛毛が増加するという表現型であった(図 7B-C)。これらの結果は、*dNAT1* を同領域で過剰発現した結果ともよく整合しており、*dNAT1* が成虫の感覚器官(S C剛毛)の形成に直接関与しているということを示している。

我々はさらに、*dNAT1<sup>ex1</sup>* 変異体では、唾液腺の分解が抑制されていることを見いだした。幼虫由来の唾液腺の分解は、蛹初期の段階でエクジステロイドホルモンであるエクダイソンがトリガーとなっておこる(24)。高濃度のエクダイソンは唾液腺を自食作用様の反応を通して細胞死を引き起こす(24)。その過程は、まず核内 DNA の分解が生じる。この分解にはカスペーシの働きが必須であるとされるが、TUNEL 染色にネガティブであり、電気泳動してもラダー状の特徴的な像を得ることはできない。続いて、細胞質の分解が起こるが、一説ではオートファジーによる貪食作用によるものとされている。実際に細胞質では貪食作用に関わるタンパク質、crq が高レベルで観測されている。*dNAT1<sup>ex1</sup>* 変異体では、唾液腺の構造は蛹形成後 24 時間 (APF24) 経過しても完全である(図 7C)。そして、*dNAT1* はおそらくエクダイソンシグナリングか、オートファジーのシグナルか、貪食作用に関与していると考えられた。

この可能性を検証するために、我々はエクダイソンターゲット遺伝子の発現レベルを RT-PCR によって確認した(図 7D)。野生型と *dNAT1<sup>ex1</sup>* 変異体は Fletcher' s のプロトコール(25)によってステージングした。青く着色した餌を幼虫に食べさせ、餌を出て遊走し始めた 3 齢幼虫を APF-18hr、腸が半分だけ青く残りは空になったものを APF-8hr、腸が 1/4 だけ青いものを APF-4hr とした。時間 0 は蛹を形成し始めた時である。*E93* と *E74A* はエクダイソンの直接のターゲットであり、野生型の転写はエクダイソンの放出によるサージを直接に反映して、APF0 に転写が起こる(25)。私達は *E93* と *E74A* の転写が蛹形成 8 時間前 (BPF) に変異体では起こることを確認した。さ

らに、エクダイソンの二次応答遺伝子である  $\beta$  *FTZ-F1* が蛹期形成以前によく転写されていることも確認した(図 7D)。これらの結果は、エクダイソンサージが変異体では 18~8 h BPF に起こり、かつそれが蛹の形成に結びつかないことを強く示唆している。

*E75* はエクダイソンの直接のターゲットであり、かつループによって負に制御されている(25)。私は野生型でエクダイソンサージの後、4~8 h APF の *E75* 遺伝子の顕著な転写レベルの低下を確認した(図 7D)。この一過的な *E75* 遺伝子の発現パターンは *dNAT1<sup>ex1</sup>* 変異体ではランダムとなり、蛹形成後 4~8 h APF ではなく、18~4 BPF に発現が見られる(図 7D)。対照的に、エクダイソンの二次応答遺伝子である *L71-6* はカスペースを誘導し唾液腺の核の断片化を引き起こすと言われており(24)、野生型も変異体も 4 h BPF に発現している(図 5 D)。エクダイソンシグナルとは独立している *4EBP* 遺伝子の転写レベルは変異体と野生型とではほぼ同じであった。以上から、*dNAT1* は一過的なエクダイソンターゲット遺伝子の制御に必要であることが明らかとなった。

## 考察

### *dNAT1* 変異体の単離

本研究において、4つのトランスポゾン挿入系統(染色体4 9 E 1)を分析し、ゲノム欠失変異体をトランスポゾンの除去によって作成した。これらのうち4つははっきりと対立遺伝子の関係を示した(図1 G)。*dNAT1<sup>P1</sup>*はエクソンI aの転写調節領域に挿入しているため、転写産物はエクソンI bに由来する対立遺伝子であると結論づけた。*dNAT1<sup>P2</sup>*はエクソンI aとエクソン2の間のイントロンに挿入しているが、驚いたことに相補性テストで致死性が低下しないことから、エクソンI a、I bの両方から十分量の転写が起こっていることを示唆し、対立遺伝子ではないと結論づけた。*dNAT1<sup>PBss</sup>*はエクソンI bの転写調節領域の下流に挿入したジーントラップ系統であり、転写産物はすべてエクソンI aに由来する対立遺伝子であると結論づけた。*dNAT1<sup>P2</sup>*からトランスポゾン除去して作成した*dNAT1<sup>ex1</sup>*は、共通したエクソン2のスプライシングアクセプター領域も欠損しているため、mRNA量は検出感度以下の対立遺伝子であると結論づけた。また、野生型では時期、組織的にユビキタスに発現している*dNAT1* mRNAレベルは*dNAT1<sup>ex1</sup>*変異体の3齢幼虫では顕著に低下した(図2 C)。さらに、*dNAT1*転写調節領域を含む外来遺伝子によるレスキュー実験では1コピーの*dNAT1*ゲノム断片によって*dNAT1<sup>ex1</sup>*変異体も*dNAT1<sup>GSI</sup>*変異体も完全にレスキューされた。

変異体による解析はdNAT1の機能が、生化学的な実験により予測されたものと同様であることを明らかとした。すなわち、胚と蛹の*dNAT1*変異体の異常は*dNAT1*が翻訳調節において全般的な翻訳調節ではなく、より特定の機能を有することを示唆している。eIF-4AやeIF-4Bといった翻訳調節因子の変異体の大多数は特定の幼虫期に細胞の生存や増殖に異常をきたす点が共通している(26, 27)。本研究では、dNAT1変異体の胚帯の伸長、唾液腺等、幼虫組織の分解、成虫の感覚器の形成において異常を認めしたが、全般的な翻訳に対する影響、つまり特定の幼虫期に細胞の生存や増殖に異常をきたす現象は観察されなかった。



*dNAT1* 変異体のある異常は変体期のエクダイソンシグナリングカスケードに含まれる (28)。エクダイソンシグナルの変異体は典型的には L1/L2 期および L2/L3 期に致死となる点が、*dNAT1* 変異体とは異なる。我々はエクダイソンシグナルの遺伝子発現が変異体ではランダムになっていることを見出した。この表現型はエクダイソンターゲット遺伝子の変異体と類似し、*dNAT1* はエクダイソンターゲット遺伝子の正常な発現に重要で、おそらく翻訳のレベルで関与していると考えられる。

特にエクダイソンの一次応答遺伝子である *E74A* は開始コドンとして CUG と AUG を選択して使用するとされており、その切り替えが組織依存的なのか、発生ステージ依存的なのかは明らかにされていない。また、*E74A* は 2kb 近くもの長い 5' UTR をもつ。*NAT1* はこの *E74A* のいずれかを翻訳開始点とするタンパク質合成に関与しているのではないかと予測している。また、長い 5' UTR は従来考えられてきた IRES (internal ribosomal entry site) ではなく、eIF-4E のキャップ構造への結合を阻害する結果、キャップ依存的な翻訳 (eIF4G による翻訳) から免れていると推測される。これを検証するためには変態期において *NAT1* タンパク質に *E74A* mRNA が結合しているかを確認する必要がある。さらに、CUG コドンか AUG コドンかを区別するのは、CUG コドンが複数 AUG コドンの上流に近接して存在するため、難しいかもしれない。

### 胚帯伸長異常の表現型

最も早い時期に観測された *dNAT1* の表現型は異常に深い頭部側の溝と胚帯の伸長異常であった。さらに、樹状突起の数は、野生型のほぼ半分にまで減少した (図 4 D)。胚帯伸長は胚発生を通して最も動的な細胞移動である。胚帯の長さが増加すると細胞分裂が停止し、細胞の形態が変化する。とりわけ、胚帯の外肺葉は背腹軸の長さを増すためにコンバージェントエクステンションと呼ばれる運動をする。遺伝子は胚帯伸長を分類された 4 つの母性効果遺伝子 (dorsal, anterior, posterior, そして terminal グループ) によって調整され、2 つの遺伝子グループ (ギャップ遺伝子群 と

ペアルール 遺伝子群)によっても影響を受ける。背側のグループを除き、これらすべての遺伝子は頭尾軸の形成に寄与し、胚の体節を形成する。したがって *dNAT1<sup>GS1</sup>* 変異体の樹状突起の減少は体節形成の異常を示している。また、*dNAT1<sup>GS1</sup>* 変異体が最初に異常を示すのは、中胚葉誘導起こるのステージである。*NAT1* ノックアウトマウスが中胚葉誘導異常を示して致死となったことから、ショウジョウバエでも *NAT1* は中胚葉誘導異常を引き起こす可能性がある。中胚葉が作られなかった場合、当然、中胚葉に隣接する外胚葉は移動することができず、結果的に胚帯伸長は不十分となることが予想される。この可能性を確かめるには *Goosecoid* や *Chordin* といった中胚葉マーカーの発現を確認する必要がある。

最近、eIF4E 相同遺伝子である 4EHP が *hunchback* (*hb*) や *caudal* (*cad*) の mRNA の適切な翻訳に関与していることが明らかとなった (29, 30)。eIF-4E と同様にキャップ構造に結合するたんぱく質 d4EHP は、deIF4G や d4E-BP たんぱく質とは結合せず、*Bicoid* がキャップ構造に結合して翻訳を阻害するのと同様に、*hb* や *cad* mRNA の翻訳を阻害する (29, 30)。これらの結果は、従来にはない翻訳制御が初期胚の体節形成に重要な役割を果たしていることを示している。

我々は、*deIF4E* のアクチンドライバーによる過剰発現の表現型が、樹状突起の減少を引き起こすことを見出した。*dNAT1* の変異体でも同様の表現型が見られることから、*dNAT1* は *deIF4E* によるキャップ依存的な翻訳を抑制している可能性がある。

### **dNAT1 の翻訳制御**

脊椎動物 *NAT1* 遺伝子は保存された GTG スタートコドンから翻訳される (12)。我々は non-ATG による翻訳開始はショウジョウバエ種間においても保存されていることを示した。いずれのショウジョウバエ近縁種もインフレームのファーストメチオニンの上流が高度に保存されている。さらに、いずれのショウジョウバエ近縁種もインフレームのストップコドンは高度に保存された領域よりも上流にしか存在しなかったため、そこが ORF 内部であることを示唆している。塩基配列データは *dNAT1* の翻訳が最初のインフレ

ームの ATG コドンの約 230 塩基上流で起こることを強く示唆している (図 3 B)。この領域には ATG コドンもストップコドンも存在せず、翻訳開始点はセレオニンである可能性がある (図 3 C)。我々の分析はまた、*dNAT1*-5' UTR 配列が機能的なたんぱく質の発現に重要であることを示している。特に DNCS 配列は 特異的な mRNA 二次構造をとることから、DNCS に直接結合する因子が non-ATG による *dNAT1* の翻訳に必須である可能性が考えられた。 *In vivo* の解析では、*UAS-dNAT1-full* を用いた過剰発現では変異が現れたのに対し *UAS-dNAT1-Δ5'* を用いた過剰発現ではインフレームのファーストメチオニンを有するにもかかわらず変異は認められなかった (図 5 D)。この事実は、*dNAT1* の翻訳開始点がインフレームのファーストメチオニンよりも上流から翻訳が行われている可能性と、DNCS 配列の喪失によって *dNAT1* mRNA が翻訳されなかった可能性を示している。

### **dNAT1 と結合する因子**

*dNAT1<sup>ex1</sup>* 変異体と *dNAT1<sup>ex1</sup>*, *deIF4AIII* および *dNAT1<sup>ex1</sup>*, *deIF4E* のダブルミュータントとの間に表現型の変化が見られないか検討した。その結果、3 種類の変異体はいずれも類似した表現型を示し、ダブルミュータントは表現型がシビアにもマイルドにもならなかった (*deIF4AIII*, *deIF4E* は複数の系統を使用した)。この理由としては、以下の 2 点が考えられる。いずれの変異体も明確な発生途上の致死点をもたない (だらだらと死んでいく) ため、ダブルミュータントを作成しても表現型に顕著な違いが認められなかった。二つ目は、eIF4a と NAT1 が結合するのであって、eIF4AIII と NAT1 は結合しない。そのため、ダブルミュータントは NAT1 と結合しない eIF4E と同じく表現型に差異が認められなかったという可能性である。この可能性をさらに詳しく解析するにはプルダウンアッセイを行えばよいと考えられる。

### **唾液腺細胞死**

ショウジョウバエの変体期における唾液腺の細胞死は自食による細胞死だといわれている。唾液腺は蛹形成後 12 時間過ぎから分解を開始する。まず最初に核が断片化され、続いて細胞質内に空胞が現れ、続いて細胞質が分解される。この細胞死は TUNEL 染色によって検出されない。通常の自食と異なるのは、核の分解にカスパーズ (*DRONC*) の働きが必須である点である。細胞質の分解にはファゴサイトーシスに必須な遺伝子 (*crq*) が必要と考えられている。*dNAT1* 変異体では核の分解は確認されたため、カスパーズは正常に発現していると考えられる。しかし、それに続く細胞質の分解が起こらなかったため、*crq* の発現が誘導されていない可能性が考えられた。

## 変体期の表現型

*dNAT1<sup>ex1</sup>* 変異体では頭部、胸部が小さく、成虫として羽化することはなかった。これは、成虫原基の変体期における増殖能が低いことを示している。実際に、孵化直後から増殖を続ける成虫原基は 3 齢幼虫の時点で野生型と比較して小さかった。*NAT1<sup>-/-</sup>* の ES 細胞が増殖に影響しないこととは異なる結果である。また、ショウジョウバエにおいては、剛毛や複眼などは正常に分化しており、分化能に影響があるとはいえなかった。

また、蛹は野生型は縮んで形成されるのに対し、*dNAT1<sup>ex1</sup>* 変異体では伸びたまま形成された。野生型では起こる頭部の器官であるトラキアの反転も *dNAT1<sup>ex1</sup>* 変異体では起こらなかった。これらは、エクダイソンシグナルの異常を強く裏付けるものである。

## エクダイソンシグナル

*dNAT1* 変異体では、エクダイソンの一次応答遺伝子である *E93*, *E74A*, *E75* が蛹形成前 8 時間に発現している。この発現は野生型には見られないものであり、エクダイソンサージ (一時的な分泌) があることを示している。しかし、このサージは蛹形成に結びつかない。また、エクダイソンターゲット遺伝子は発現パターンがランダムになっており、シグナルの乱れを反映している (*E75*,  *$\beta$ FTZ-F1*)。また、ショウジョウバエのカスパーズである *rpr* を誘導する *E74A* の発現は、組織の分解が始まる蛹形成後 12 時間で野生型は発現す

るのに対し、*dNAT1* 変異体では発現はほとんど見られない。これは、*dNAT1* 変異体において幼虫組織が分解されずに残っていた表現型とも一致した。

### *dNAT1* が RNA エディティングされる可能性

マウスでは APOBEC-1 を過剰発現した場合に、APOBEC-1 が基質特異性を失ってアポリポ蛋白の mRNA だけでなく *NAT1* mRNA をターゲットとすることが知られている。この際の塩基置換はシトシンからウラシルである。Hb ショウジョウバエにおいても APOBEC-1 は保存されていることから、APOBEC-1 を過剰発現した際に同様に *dNAT1* がハイパーエディティングされる可能性はある。我々はその他の RNA エディティング酵素について、*dNAT1* を基質としうるかどうか、検証した。Adenosine deaminase acting on RNA (ADAR) はプレ RNA の二本差 RNA を認識し、アデノシンからイノシンへ RNA エディティングを行う (31)。イノシンは翻訳時にはグアノシンとして認識されることがわかっている。ADAR による RNA エディティングはイオンチャネルなどで知られているが、*dNAT1* mRNA も高度な 2 次構造を有することが予想され、その基質となる可能性は否定できない。また、アデニンからグアニンへの成虫の *4f-rnp* 遺伝子での RNA editing も報告されており (32)、特別な editing 酵素の認識サイトを有さないことから、*dNAT1* が基質にならないとは言い切れない。

## 謝辞

この研究は中島欽一教授、上野直人教授、山中伸弥教授、中村真助手の指導の下で行いました。また、市川真理子さんがショウジョウバエの系統維持をしてくださいました。また、相垣先生、変異体系統を分与してくれたBloomington ストックセンターに感謝します。最後に、ともにディスカッションをしてくれた、上野研究室、山中研究室のみなさんに感謝します。

## 図の説明

### 図 1 真核生物の翻訳

真核生物では翻訳はループを形成して進行する。リボソームは mRNA にビーズ状に連なっている。

### 図 2 NAT1 と eIF4G

NAT1 は eIF4G には結合する PABP, EIF4E とは結合しない。

### 図 3 *dNAT1* 遺伝子座と単離した *dNAT1* 変異体

(A) *dNAT1* ゲノム領域。トランスポゾン挿入位置は三角形で示してある。*dNAT1* のイントロンとエクソン、転写産物が示してある。二つの転写開始点 (Ia and Ib) が *dNAT1* 遺伝子には存在する。1.7 kb のバーは *dNAT1<sup>ex1</sup>* 変異体のゲノム欠失領域を示している。下のバーはレスキュー実験の形質転換に用いた 12kb のゲノム領域を示している。(B) *dNAT1<sup>GS1</sup>* の致死性 (赤) と *dNAT1<sup>ex1</sup>* 変異体 (青) の様々な発生ステージでの致死性。(胚, 1 齢幼虫 (L1), L1-L2 移行期 (L1/L2), 2 齢幼虫 (L2), L2-L3 移行期 (L2/L3), 3 齢幼虫 (L3) そして蛹)。(C) *dNAT1* アリル間での相補性テスト。棒は成虫として羽化した個体をジェノタイプごとにパーセントで示している。(完全に成虫になった場合を 100%とする)。(D) 野生型 (*OR*) と *dNAT1<sup>ex1</sup>* の RT-PCR 結果。*dNAT1<sup>ex1</sup>* では *NAT1* の発現強度は検出感度以下となっている。(E) *dNAT1<sup>GS1</sup>* と *dNAT1<sup>ex1</sup>* のレスキュー実験。棒はレスキューコンストラクトである *P[dNAT1-12kb]* を 1 コピー持った個体の生存率を示している。両アリル共に 1 コピーの *dNAT1* 外来遺伝子によって完全にレスキューされた。

### 図 4 *dNAT1* mRNA はユビキタスに様々な発生ステージで発現している

(A) *dNAT1* のアンチセンスプローブによる *in situ* ハイブリダイゼーション。ステージ 3-13 の胚、羽成虫原基 (wd) アイアンテナ成虫原基 (ead)、唾液腺 (sg)、3 齢幼虫の

脳 (brain) を示す。 *dNAT1* の発現はほぼユビキタスである (深い紫)。同条件化でセンスプローブでは染色されない。(B) *dNAT1* と *Actin42A* (ポジティブコントロール) による野生型の様々な発生ステージの RT-PCR。 *dNAT1* mRNA の発現強度は胚から成虫まで安定している。

#### 図 5 *dNAT1* cDNA 構造とショウジョウバエ近縁種で保存された 5' 非翻訳領域

(A) *dNAT1* cDNA の 5' 非翻訳領域の保存された配列の比較と対応するショウジョウバエ近縁種 (*melanogaster*, *erecta*, *persimilis*, *willistoni*, *virilis*, *grimshawi*) の cDNA 配列。 ショウジョウバエの配列の左側の数字は完全長の *dNAT1* cDNA 配列中の位置を示す。高度な相同性を有する領域が相同性の低い領域である 750~930 ヌクレオチド (角括弧内の数字参照) によって隔てられている。 *dNAT1* cDNA の最初のインフレームの ATG コドンは (M) と記され、仮の翻訳開始点 (セレオニン) は (I) と記されている。(B) 保存された *dNAT1* 5' 非翻訳領域の仮の mRNA 二次構造 (cDNA 1021-1185)。(C) *dNAT1* の最初のインフレームの ATG コドン上流のアミノ酸配列と対応するショウジョウバエ近縁種のアミノ酸配列。配列の上の数字は最初の保存されたセレオニンからの番号を示す。保存されたアミノ酸は赤で示してある。アスタリスクはインフレームの最初のメチオニンを示す。(D) 野生型成虫の胸部背側の小板、 *dpp-GAL4* << *UAS-dNAT1-full* 個体、 *dpp-GAL4* << *UAS-dNAT1Δ 5'* 個体。小板の剛毛は矢印で示してある。 *dNAT1-full* を過剰発現させた個体は剛毛が減少する表現型を示し、小板の縁も異常である。

#### 図 6 *dNAT1<sup>GS1</sup>* 変異体の表現型

(A) 様々な発生ステージ (左側に図示) の野生型 (OR) と *dNAT1<sup>GS1</sup>* 変異体の胚の側方図。背側の溝の位置を赤い矢頭で示し、胚帯の先端を青い矢頭で示す。(B) 野生型 (OR) *dNAT1<sup>GS1</sup>* 変異体の胚のクチクラ構造。(C) 棒は野生型と *dNAT1<sup>GS</sup>* 変異体の樹状突起の帯の数 (底面) における個体の割合を示している。



## 図 7 *dNAT1* 変異体の変体期における表現型

(A) 野生型 (A) と *dNAT1<sup>ex1</sup>* (B, C) フェレートアダルト (APF 3 日) の背側から見た図。*dNAT1<sup>ex1</sup>* 変異体は小さな頭部 (B) をもつか、もしくは頭部がない (C)。 (B) 野生型 (A), *dNAT1<sup>ex1</sup>* (B), and *dppGAL4* >> *UAS-dNAT1-IR* (C) の小板。頭部側の剛毛 (ASC) と尾側の剛毛 (PSC) を示した。 *dNAT1<sup>ex1</sup>* (II) と *dppGAL4* >> *UAS-dNAT1-IR* 個体の小板の剛毛の位置を矢印で示した。 (C) 上部の 5 つの写真は野生型と *dNAT1<sup>ex1</sup>* 変異体からの唾液腺を図示した時間に解剖して取り出したものである。下部の写真は唾液腺のパラフィンセクションを HE 染色したものである。スケールバーは 60  $\mu\text{m}$  である。唾液腺の細胞質は青く染色され、核は矢印で示してある。核は 14 h APF に断片化を始める。14 h APF 以降、大きな空胞様の構造 (矢頭で図示) が変異体では頻繁に見られる。

(D) 直接もしくは間接的なエクダイソンターゲット遺伝子と、エクダイソンシグナルから独立したな遺伝子の RT-PCR。 mRNA の量は *Actin42A* の発現強度が一定になるように調節した。

## 図 8 *dNAT1* の機能

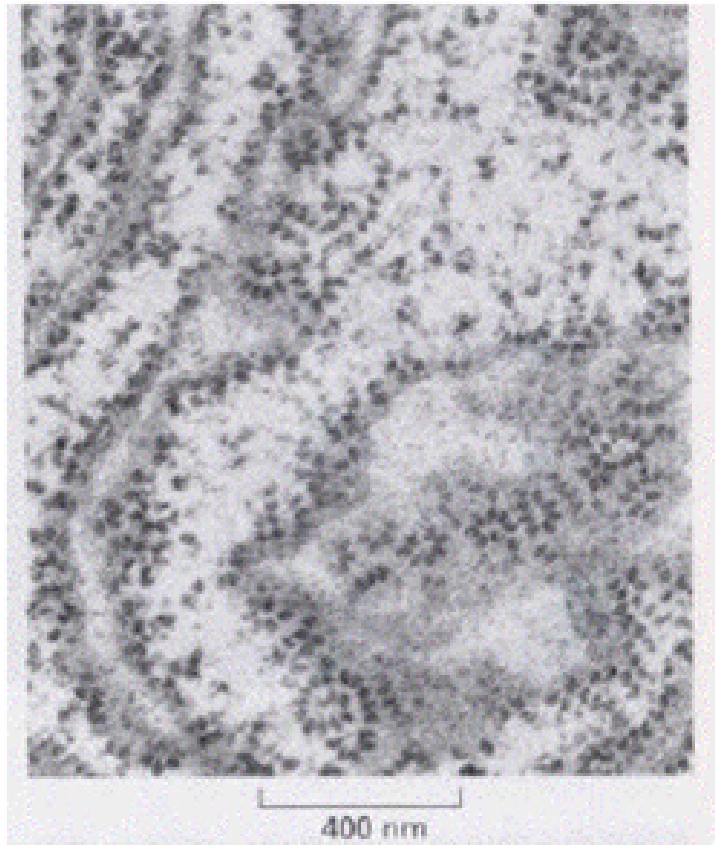
*dNAT1* は特定の deIF4E の翻訳 (キャップ依存的な翻訳) を抑制している可能性がある。

## Reference

1. Gingras, A. C., RATGht, B., and Sonenberg, N. (1999) *Annu Rev Biochem* **68**, 913-963
2. Haghghat, A., and Sonenberg, N. (1997) *J Biol Chem* **272**(35), 21677-21680.
3. Imataka, H., and Sonenberg, N. (1997) *Mol Cell Biol* **17**(12), 6940-6947
4. Hernandez, G., and Vazquez-Pianzola, P. (2005) *Mech Dev* **122**(7-8), 865-876
5. Yamanaka, S., Poksay, K. S., Arnold, K. S., and Innerarity, T. L. (1997) *Genes Dev* **11**(3), 321-333
6. Imataka, H., Olsen, H. S., and Sonenberg, N. (1997) *Embo J* **16**(4), 817-825
7. Levy-Strumpf, N., Deiss, L. P., Berissi, H., and Kimchi, A. (1997) *Mol Cell Biol* **17**(3), 1615-1625.
8. Lee, S. H., and McCormick, F. (2006) *Embo J* **25**(17), 4008-4019
9. Henis-Korenblit, S., Strumpf, N. L., Goldstaub, D., and Kimchi, A. (2000) *Mol Cell Biol* **20**(2), 496-506
10. Warnakulasuriyarachchi, D., Cerquozzi, S., Cheung, H. H., and Holcik, M. (2004) *J Biol Chem* **279**(17), 17148-17157
11. Yamanaka, S., Zhang, X. Y., Maeda, M., Miura, K., Wang, S., Farese, R. V., Jr., Iwao, H., and Innerarity, T. L. (2000) *Embo J* **19**(20), 5533-5541
12. Takahashi, K., Maruyama, M., Tokuzawa, Y., Murakami, M., Oda, Y., Yoshikane, N., Makabe, K. W., Ichisaka, T., and Yamanaka, S. (2005) *Genomics* **85**(3), 360-371
13. Toba, G., Ohsako, T., Miyata, N., Ohtsuka, T., Seong, K. H., and Aigaki, T. (1999) *Genetics* **151**(2), 725-737

14. Aigaki, T., Ohsako, T., Toba, G., Seong, K., and Matsuo, T. (2001) *J Neurogenet* **15**(3-4), 169-178
15. Brand, A. H., and Perrimon, N. (1993) *Development* **118**(2), 401-415
16. Spradling, A. C., and Rubin, G. M. (1982) *Science* **218**(4570), 341-347
17. Rubin, G. M., and Spradling, A. C. (1982) *Science* **218**(4570), 348-353
18. Tomoyasu, Y., Ueno, N., and Nakamura, M. (2000) *Mech Dev* **96**(1), 37-49
19. Irvine, K. D., and Wieschaus, E. (1994) *Development* **120**(4), 827-841
20. Bialecki, M., Shilton, A., Fichtenberg, C., Segraves, W. A., and Thummel, C. S. (2002) *Dev Cell* **3**(2), 209-220
21. Bonin, C. P., and Mann, R. S. (2004) *Genetics* **167**(4), 1801-1811
22. Tomoyasu, Y., Nakamura, M., and Ueno, N. (1998) *Development* **125**(21), 4215-4224
23. Ueda, R. (2001) *J Neurogenet* **15**(3-4), 193-204
24. Thummel, C. S. (2001) *Bioessays* **23**(8), 677-682
25. Fletcher, J. C., D'Avino, P. P., and Thummel, C. S. (1997) *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**(9), 4582-4586
26. Galloni, M., and Edgar, B. A. (1999) *Development* **126**(11), 2365-2375
27. Hernandez, G., Vazquez-Pianzola, P., Zurbriggen, A., Altmann, M., Sierra, J. M., and Rivera-Pomar, R. (2004) *Eur J Biochem* **271**(14), 2923-2936
28. Lee, C. Y., and Baehrecke, E. H. (2001) *Development* **128**(8), 1443-1455
29. Cho, P. F., Poulin, F., Cho-Park, Y. A., Cho-Park, I. B., Chicoine, J. D., Lasko, P., and Sonenberg, N. (2005) *Cell* **121**(3), 411-423
30. Cho, P. F., Gamberi, C., Cho-Park, Y. A., Cho-Park, I. B., Lasko, P., and Sonenberg, N. (2006) *Curr Biol* **16**(20), 2035-2041
31. Mary Y. Ryan., Rachel Maloney, Robert Reenan, and Richard Horm (2008) *Channels* **2**(3), 202-209

32. Jane P. Petscheck, Matthew J. Mermer, Mark R. Scheckeloff, Angila A. Simon and Jack C. Vaughn. (1996) *J. Mol. Biol.* **259**, 885-890



(写真提供：George Palade)

図1 真核生物の翻訳

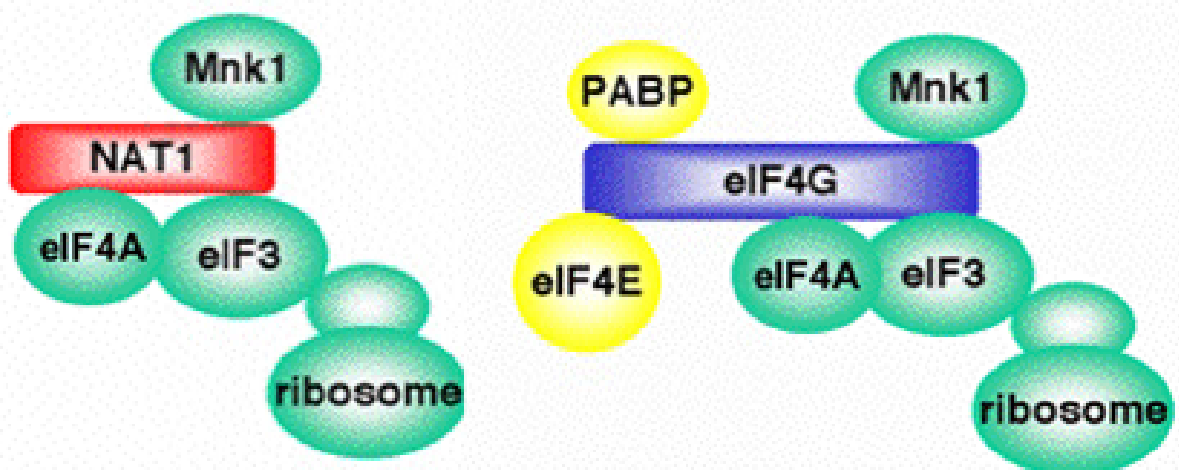


図2 NAT1とeIF4G

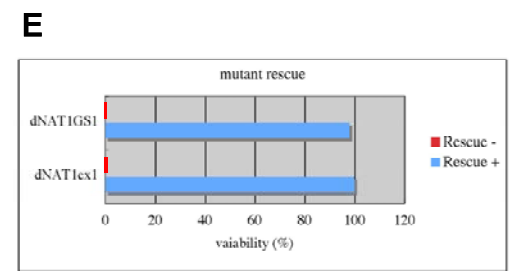
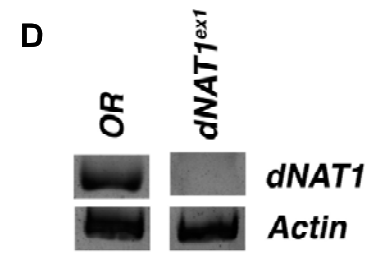
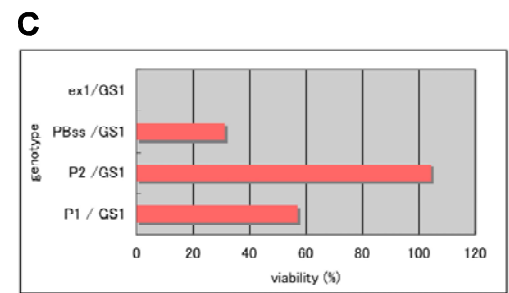
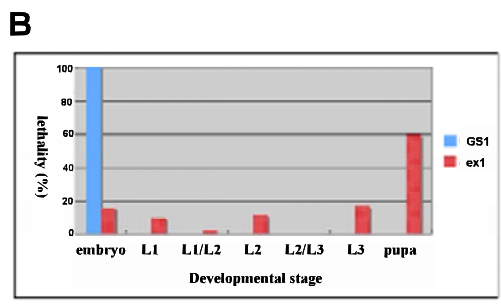
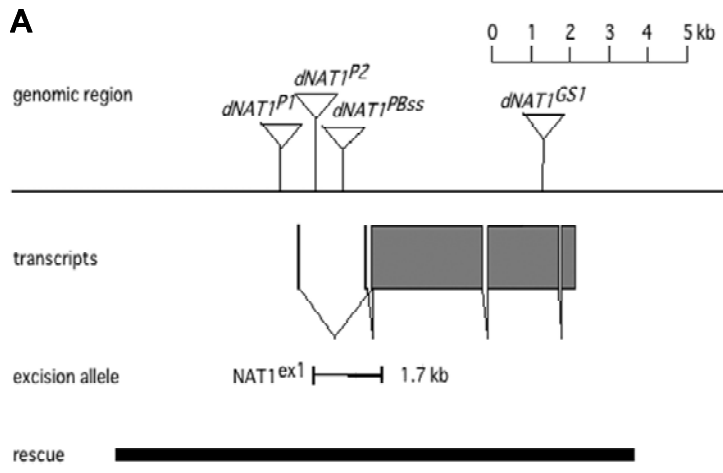


図1dNAT1遺伝子座

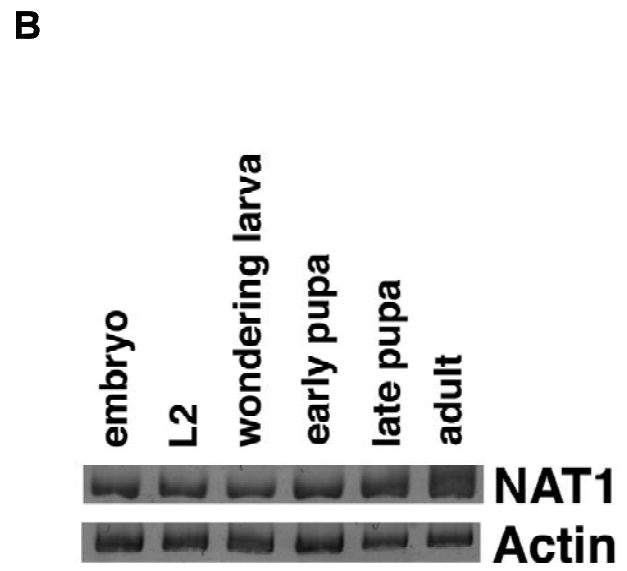
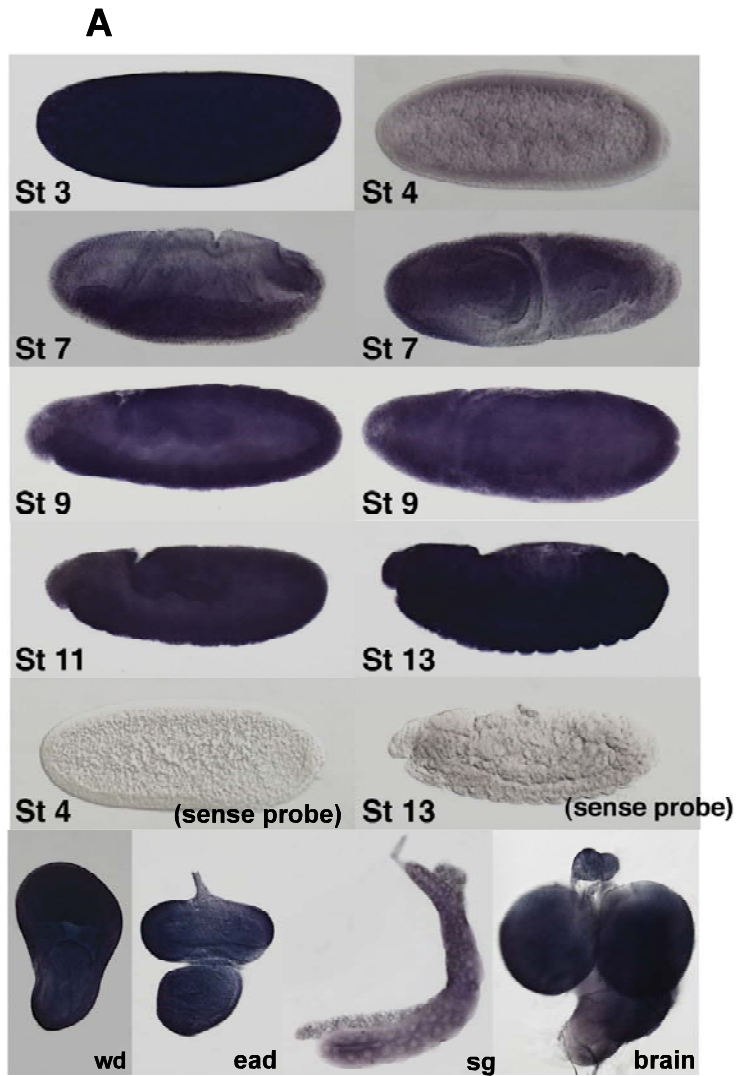
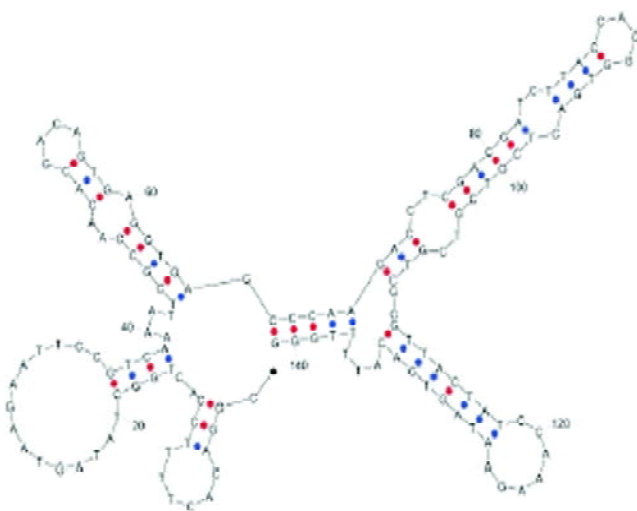


図4 野生型のdNAT1mRNAはユビキタスに様々な発生ステージで発現している

A

<i>nelanogaster</i>	1	gtggatcagtcaggacac tttccac tggc t atag taagaat tccg tcaaaa t tggc caac	60
<i>erecta</i>	1	gtggatcagtcaggacac tttccac tggc t atag taagaat tccg tcaaaa t tggc caac	60
<i>persimilis</i>	1	gtggatcagtcaggacac tttccac tggc t atag taagaat tccg tcaaaa t tggc caac	60
<i>willistoni</i>	1	caaat t tggcaggacac tttccac tggc t atag taagaat tccg tcaaaa t tggc caac	60
<i>virilis</i>	1	caaat t tggcaggacac tttccac tggc t atag taagaat tccg tcaaaa t tggc caac	60
<i>grinshawi</i>	1	gtggatcagtcaggacac tttccac tggc t atag taagaat tccg tcaaaa t tggc caac	60
<i>nelanogaster</i>	61	acgatcagtgagg tggccccagacc tggacgata tttaccagggtgac tegtctgtctgt	119
<i>erecta</i>	61	acgatcagtgagg tggccccagacc tggacgata tttaccagggtgac tegtctgtctgt	119
<i>persimilis</i>	61	acgatcagtgagg tggccccagacc tggacgata tttaccagggtgac tegtctgtctgt	119
<i>willistoni</i>	61	acgatcagtgagg tggccccagacc tggacgata tttaccagggtgac tegtctgtctgt	119
<i>virilis</i>	61	acgatcagtgagg tggccccagacc tggacgata tttaccagggtgac tegtctgtctgt	119
<i>grinshawi</i>	61	caaat t cggac tggccccagacc tggacgata tttaccagggtgac tegtctgtctgt	120
<i>nelanogaster</i>	120	---ggttactatcacaagaaatagtgacattttgggtccaggcttagggg-(759)-gcaac	175
<i>erecta</i>	120	---ggttactatcacaagaaatagtgacattttgggtccaggcttagggg-(759)-gcaac	175
<i>persimilis</i>	120	---ggttactatcacaagaaatagtgacattttgggtccaggcttagggg-(815)-tccg	175
<i>willistoni</i>	120	---ggttactatcacaagaaatagtgacattttgggtccaggcttagggg-(883)-gcaac	175
<i>virilis</i>	120	---ggttactatcacaagaaatagtgacattttgggtccaggcttagggg-(901)-gcaac	175
<i>grinshawi</i>	121	cgattactatcacaagaaatagtgacattttgggtccaggcttaggggata-(829)-gcaac	178
<i>nelanogaster</i>	176	cgatcagtgagg tggatcaccacac tegt tggc tccacagca tggc tccac caaggc	235
<i>erecta</i>	176	cgatcagtgagg tggatcaccacac tegt tggc tccacagca tggc tccac caaggc	235
<i>persimilis</i>	176	cgatcagtgagg tggatcaccacac tegt tggc tccacagca tggc tccac caaggc	235
<i>willistoni</i>	176	cgatcagtgagg tggatcaccacac tegt tggc tccacagca tggc tccac caaggc	235
<i>virilis</i>	176	cgatcagtgagg tggatcaccacac tegt tggc tccacagca tggc tccac caaggc	235
<i>grinshawi</i>	179	cgatcagtgagg tggatcaccacac tegt tggc tccacagca tggc tccac caaggc	238
<i>nelanogaster</i>	236	caagacagcagcagc tctccaggctgttgagggg tttttgacacagc taacgcccagga	295
<i>erecta</i>	236	caagacagcagcagc tctccaggctgttgagggg tttttgacacagc taacgcccagga	295
<i>persimilis</i>	236	caagacagcagcagc tctccaggctgttgagggg tttttgacacagc taacgcccagga	295
<i>willistoni</i>	236	caagacagcagcagc tctccaggctgttgagggg tttttgacacagc taacgcccagga	295
<i>virilis</i>	236	caagacagcagcagc tctccaggctgttgagggg tttttgacacagc taacgcccagga	295
<i>grinshawi</i>	239	caagacagcagcagc tctccaggctgttgagggg tttttgacacagc taacgcccagga	298
<i>nelanogaster</i>	296	aat tccaggga tggcagatgcaac tttggcagc tggatc tttac tctatttctt ttttga	355
<i>erecta</i>	296	aat tccaggga tggcagatgcaac tttggcagc tggatc tttac tctatttctt ttttga	355
<i>persimilis</i>	296	aat tccaggga tggcagatgcaac tttggcagc tggatc tttac tctatttctt ttttga	355
<i>willistoni</i>	296	aat tccaggga tggcagatgcaac tttggcagc tggatc tttac tctatttctt ttttga	355
<i>virilis</i>	296	aat tccaggga tggcagatgcaac tttggcagc tggatc tttac tctatttctt ttttga	355
<i>grinshawi</i>	299	aat tccaggga tggcagatgcaac tttggcagc tggatc tttac tctatttctt ttttga	358
<i>nelanogaster</i>	356	caagcagcagc ttttgc tgaat tctggacacagcc tttggcagcagc aggtac tegtctctgt	414
<i>erecta</i>	356	caagcagcagc ttttgc tgaat tctggacacagcc tttggcagcagc aggtac tegtctctgt	414
<i>persimilis</i>	356	caagcagcagc ttttgc tgaat tctggacacagcc tttggcagcagc aggtac tegtctctgt	414
<i>willistoni</i>	356	caagcagcagc ttttgc tgaat tctggacacagcc tttggcagcagc aggtac tegtctctgt	414
<i>virilis</i>	356	caagcagcagc ttttgc tgaat tctggacacagcc tttggcagcagc aggtac tegtctctgt	414
<i>grinshawi</i>	359	caagcagcagc ttttgc tgaat tctggacacagcc tttggcagcagc aggtac tegtctctgt	417

B



C

<i>nelanogaster</i>	1	HSQQQERS <b>1</b> AGASIPPPITGRHIPPSLRPOHGLTQSEKNDVFRVR
<i>erecta</i>	1	YSQQHQRS <b>1</b> AGASIPPPITGRHIPPSLRPOHGLTQSEKNDVFRVR
<i>persimilis</i>	1	QQQQSQRGGT <b>1</b> NTPPPI TGRHIPPSLRPOHGLTQSEKNDVFRVR
<i>willistoni</i>	1	ISSHASSS <b>1</b> AVP <b>1</b> SAIPPPITGRHIPPSLRPOHGLTQSEKNDVFRVR
<i>virilis</i>	1	TTTVRGGC <b>1</b> QQQQQQQQ <b>1</b> TGRHIPPSLRPOHGLTQSEKNDVFRVR
<i>grinshawi</i>	1	GGATGGAC <b>1</b> QQQQQQQQ <b>1</b> TGRHIPPSLRPOHGLTQSEKNDVFRVR
<i>nelanogaster</i>	50	DILNKLTPKFOELSD <del>ELL</del> KL <del>DLNS</del> <b>1</b> ILKGVILLIFOKALDEPKVSSH
<i>erecta</i>	50	DILNKLTPKFOELSD <del>ELL</del> KL <del>DLNS</del> IVILNGVILLIFOKALDEPKVSSH
<i>persimilis</i>	50	DILNKLTPKFOELSD <del>ELL</del> KL <del>DLNS</del> IVILNGVILLIFOKALDEPKVSSH
<i>willistoni</i>	50	DILNKLTPKFOELSD <del>ELL</del> KL <del>DLNS</del> IVILNGVILLIFOKALDEPKVSSH
<i>virilis</i>	50	DILNKLTPKFOELSD <del>ELL</del> KL <del>DLNS</del> IVILNGVILLIFOKALDEPKVSSH
<i>grinshawi</i>	50	DILNKLTPKFOELSD <del>ELL</del> KL <del>DLNS</del> <b>1</b> ILNGVILLIFOKALDEPKVSSH

D



図5 dNAT1cDNA 構造とショウジョウバエ近縁種で保存された5' 非翻訳領域



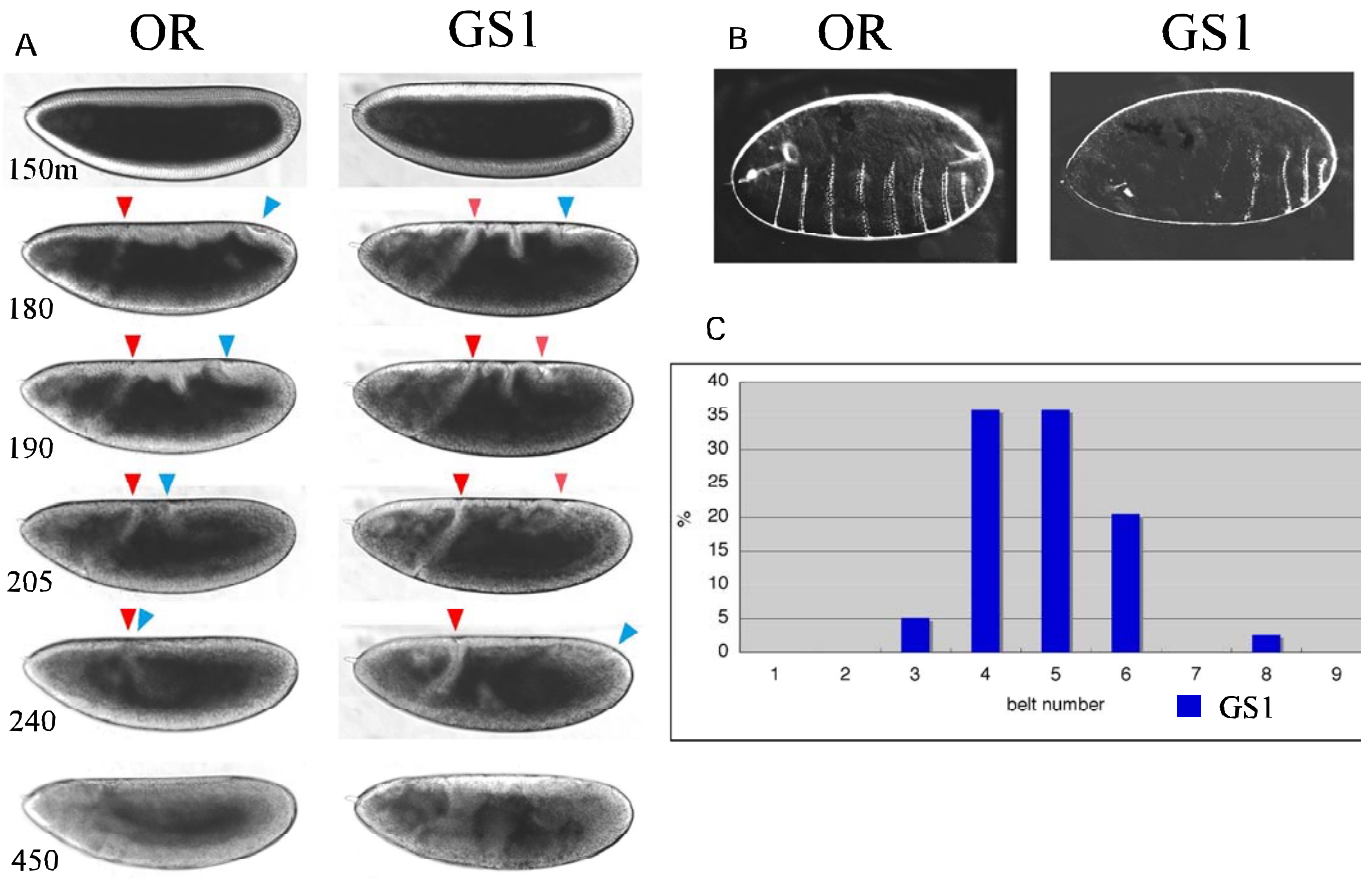
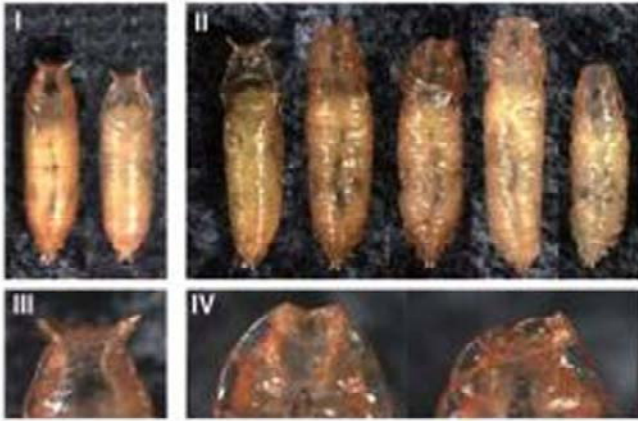


図6 dNAT1GS1 変異体の表現型

野生型

dNAT1ex1

A



野生型

dNAT1ex1

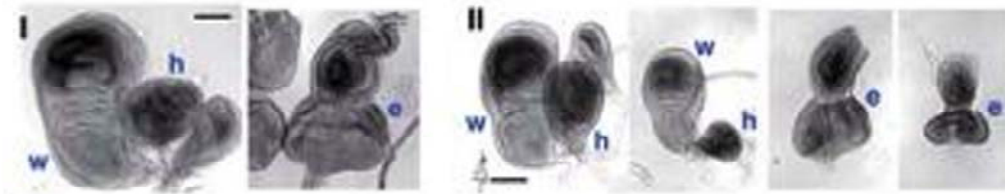


図7 dNAT1 3 齢幼虫および蛹野生型

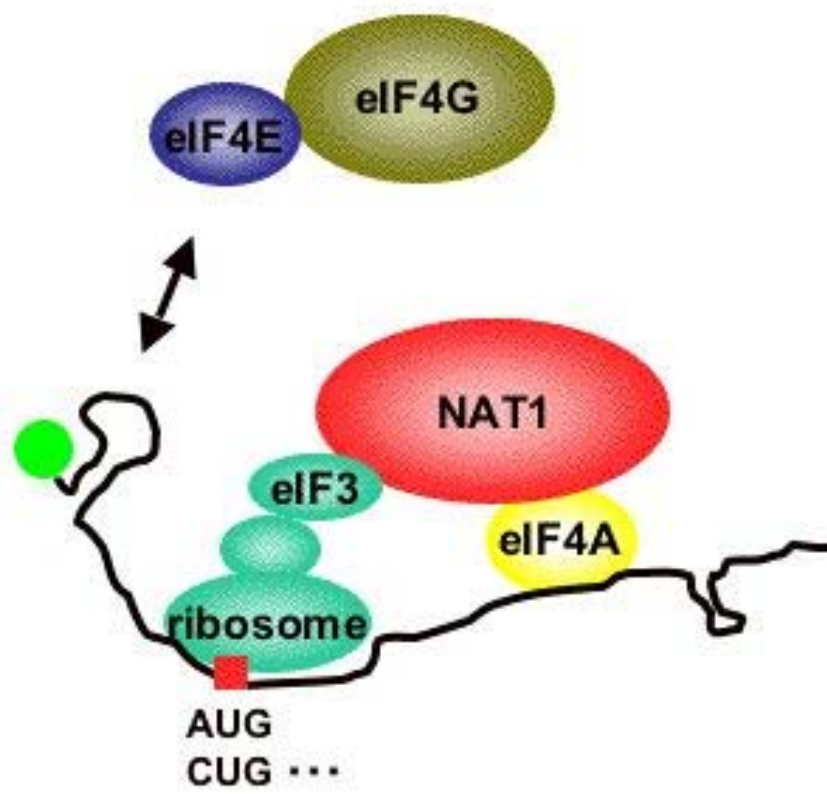


図8 dNAT1の機能