

博士（人間科学）学位論文

脳の性決定因子、*fruitless* 遺伝子の機能を
修飾する *Trf2* 遺伝子に関する研究

2007 年 7 月

早稲田大学大学院 人間科学研究科

嶋 誠悟

Shima, Seigo

研究指導教員： 木村 一郎

： 柴田 重信

： 山元 大輔

目次

summary	1
序論	1
第1部 Gene Search system を用いた <i>fru</i> と相互作用する遺伝子の探索	4
第1部序論	4
実験材料及び実験方法	5
結果	7
1. 複眼に強制発現した <i>fru</i> と相互作用する遺伝子のスクリーニング	7
2. P 因子挿入点決定と <i>fru</i> 抑圧遺伝子候補の同定	9
3. 2 次スクリーニングの実施	10
4. 修飾因子の作用特異性	12
5. Gene Search System で得られた遺伝子の分子生物学的機能	12
考察	13
1. 複眼における <i>fru</i> と相互作用する遺伝子の探索	13
2. <i>ttk</i> 遺伝子による抑圧効果特異性の検証	15
3. 候補遺伝子の役割について	15
4. Gene Search System による成果	17
第2部 <i>fru</i> と相互作用する遺伝子 <i>Trf2</i> の研究	18
第2部序論	18
実験材料及び実験方法	19
結果	20
1. <i>Trf2</i> 突然変異体の同定	20
2. <i>Trf2</i> 遺伝子と <i>fru</i> 遺伝子の強制発現が複眼形成に及ぼす影響	22
3. 前部気門の変態における <i>fru</i> と <i>Trf2</i> の相互作用の検討	24
4. <i>fru</i> 突然変異体のローレンス筋形成異常に対する <i>Trf2</i> 変異の作用	26
5. 腹部第5節のローレンス筋形成に対する <i>Trf2</i> 変異の作用	28
6. <i>fru</i> と <i>trf2</i> の脳における発現パターン	29
7. Fru タンパク質と <i>Trf2</i> タンパク質とが複合体を形成する可能性の検討	30
考察	31
1. <i>fru</i> と相互作用する遺伝子、 <i>trf2</i> の分離	31
2. <i>Trf2</i> 遺伝子の個体発生における役割	32
3. 複眼異常に対する <i>Trf2</i> 遺伝子の抑圧効果	34
4. 前部気門伸長異常に関する <i>Trf2</i> と <i>fru</i> の相互作用	35

5. <i>AbdB^{mcp-1}</i> 変異によって腹部第 4 節に生じるローレンス筋に対して <i>Trf2</i> 変異の及ぼす影響	35
6. <i>fru1/fru^{Aj96u3}</i> 変異体に生じる不完全ローレンス筋に対する <i>Trf2</i> 変異の影響 .	36
7. <i>Trf2</i> タンパク質と <i>Fru</i> タンパク質の複合体形成の可能性	37
総合考察	39
謝辞	40
引用文献	40

Summary

Isolation and Characterization of Trf2 as a Functional Modifier of Fruitless, a Neural Masculinization Factor in *Drosophila melanogaster*

The *Drosophila fruitless (fru)* gene was originally identified by its unique mutant phenotype, homosexual courtship among male flies. Subsequent studies have shown that the *fru* gene functions as a neural masculinizing factor, loss of which in males leads to de-masculinization of certain neurons in the central nervous system, accompanied with the altered sexual orientation in such males. The *fru* gene products are assumed to be transcription factors based on their structural features as BTB-Zn finger proteins, although no experimental support has been obtained. To elucidate the biochemical functions of the Fru proteins, I performed a genetic screen for modifiers of *fru*, with the aim at determining their cofactors and targets. The severe roughness of the compound eye induced by ectopic expression of *fru⁺* provided me with the convenient system for isolating enhancers or suppressors of this phenotype, by overexpressing a second gene in the eye disc as driven by the combination of Gene-Search (GS) P-element insertion and *GMR-Gal4*. *GMR-Gal4* is a photoreceptor-specific Gal4 expressor whereas the GS P-element carries the Gal4 target enhancer sequence *UAS*, which can induce expression of any gene downstream of it. By screening over 800 GS strains, I isolated 14 modifiers. One of such modifiers was positively identified as TATA-box-binding protein (TBP)-related factor (Trf)2 (Trf2), known as an element of the protein complex that functions in the basal transcription machinery. By genomic data base searches, 7 P-element insertions were found in the 5' region of the *trf2* gene. The fly lines with either of two such P-elements, PL28 and GS7403, revealed a reduced level of *trf2* mRNA in RT-PCR measurements, thus were verified as loss-of-function mutants of the *trf2* locus. PL28 and GS7403 were both accompanied by deficits in anterior spiracle eversion in pupae. Overexpression of *trf2⁺* via the heatshock-promoter rescued this phenotype. The failure in anterior spiracle eversion is a hallmark of mutants in the ecdysteroid signaling, implying that *trf2* and possibly *fru* are functionally related to this hormonal regulatory system. To examine whether *Trf2* affects normal functions of *fru* *in vivo*, the effects of *Trf2* mutations on a *fru* mutant phenotype was evaluated. In addition to the behavioral phenotype, *fru* mutants are accompanied with

deficits in the formation of a male specific muscle. This muscle is called the muscle of Lawrence (MOL), and exists in the 5th abdominal tergite of the adult male. In the severe loss-of-function alleles of *fru*, the MOL is absent from males. In milder loss-of-function mutants of *fru*, the MOL formed in males is undersized or present only in one side of the segment. *Trf2* mutations were found to enhance the effect of *fru* mutations in the formation of MOL: the undersized MOL in *fru* mutants was further reduced in size. These results collectively indicate that *Trf2* is an *in vivo* mediator of *fru* functions.

序論

生殖は生命体にとって自身の遺伝子の存続を支える最も重要な営みである。ショウジョウバエなど昆虫では各個体が誰から教わることなく本能的にそれを行う。これはその行動が遺伝的に規定されていることを示す。したがって性行動は、生物の行動がどのように遺伝子に影響されているのかを調べる最良の対象の一つである。本研究では、雄が雌ではなく雄に求愛するキイロショウジョウバエの変異体、*frus^{sat}*を取り上げ、その原因遺伝子である *fruitless* (*fru*) がどのような分子機構によって雄の性指向性決定にあずかるのかを解明することを目指す。その方法として、*fru* 遺伝子と遺伝学的に相互作用する遺伝子群を網羅的に同定することを試みた。

そこでまず、キイロショウジョウバエの求愛行動から説明していく。キイロショウジョウバエの性行動は次のステップからなる。(1) 雄が雌の後方に付いて追跡を始める。(2) 雄は雌の腹部を叩くタッピング行動を行う。(3) 雄は雌に斜め後方から接近して片方の翅だけを持ち上げて振動させる。次に雌の反対側に移り、それまで静止させていた側の翅だけを使って片翅運動を行う。この行動によってある固有のパターンの音が発生する。この音に同種の雌の性的受容性を高める効果があることからラブソングと言われる。(4) 雄は雌の後方に回り込み口吻で雌交尾器をリッキングする。(5) 雄が雌の翅をつかんでマウントし、交尾試行を行う。(6) 雌が受容の状態であれば膣口を開いて交尾を受け入れる。(7) 約 15 分後に雌雄が分離する (Burnet et al. 1973, Hall 1994, Yamamoto et al. 1997)

山元らは、動く遺伝子 P 因子の改造ベクターを 1 コピー、ゲノムに挿入する方法で挿入点に存在するキイロショウジョウバエの遺伝子を失活させ、突然変異誘発を行った。こうして得られた 2000 の P 因子挿入系統から、先に示した一連の行動要素に特異的な異常をもたらす突然変異体が 8 系統、スクリーニングによって分離された (Baba et al. 1999, Suzuki et al. 1997, Yamamoto et al. 1997, Yamamoto and Nakano 1998, Yokokura et al. 1995)。その中の一つ、*satori* 変異体 (以下 *frus^{sat}*) は、雄が雌に対して全く求愛行動をとらず、したがって交尾も決して行わない変異体として発見された (Ito et al. 1996)。その為当初 *frus^{sat}* は性的動因を失った変異体と考えられ、その名も *satori* (悟り) と称されることとなったが、その後の調査により雄が雄に対して求愛行動する同性愛の変異体であることが分かったものである (Ito et al. 1996)。

frus^{sat} 変異体の雄は性行動異常のほか、雄特異的に存在する筋肉、ローレンス筋 (muscle of Lawrence; MOL) (Lawrence and Johnston 1984) の欠失を示す (Gailey et al. 1991, Ito et al. 1996, Usui-Aoki et al. 2000)。この筋肉の存

否は筋肉を支配する神経の性に依存することが知られている (Lawrence and Johnston 1986, Taylor 1992)。つまり雄特異的な筋肉が存在しないということは、それを支配する神経の性が雄ではない、あるいは雌化している可能性を示唆している。また MOL 形成は、従来性決定遺伝子として知られていた *dsx* による変異の影響を受けない (Greenspan 1995, Taylor and Truman 1992, vellella and Hall 1996, Waterbury et al. 1999)。

その後 *fru* 遺伝子は山元のグループによってクローニングされ、その塩基配列が決定されている。その結果によれば、この遺伝子から少なくとも 8 種類、(現在までに 8 種類の cDNA が同定されている) おそらくそれ以上の mRNA が転写される (Usui-Aoki et al. 2000)。mRNA は 3' 末端のエクソンの相違によって、type A, B, C, D, および E に区別される。5' 側についても多型が知られている。まずプロモーターが少なくとも 4 通りあり、それぞれが非翻訳領域のみからなる固有の第一エクソンの転写を引き起こす。このうちゲノムの最も遠位側に位置するプロモーターにより転写活性化の生ずる一次転写産物では、その第 2 エクソンのスプライシングのパターンが雌雄で異なっている (Heinrichs et al. 1998, Ryner et al. 1996)。この性特異的スプライシングは、スプライシング因子の *Trasformer* (Tra) (Belote and Baker 1982, Butler and Pirotta 1986) が雌においてのみ第 2 エクソンに結合するために起きる。この性差を示す mRNA が、*fru* の性特異的機能の担い手であると考えられる。このうち type A, B, E は、C 末端側に Zn フィンガーモチーフ (Jacobs 1992, Pavletich and Pabo 1991) という特徴的なアミノ酸配列を有する。また全ての type が N 末端部に BTB ドメイン (Chen et al. 1995, Lai and Li 1999, Zollman et al. 1994) を持つ (Ito et al. 1996)。BTB ドメインはタンパク質間相互作用を媒介することが知られており、また Zn フィンガーは DNA 結合ドメインであることから、*Fru* タンパク質は 2 量体で機能する転写因子と考えられる。さらにもう一つ、注目すべきモチーフを *fru* 遺伝子は有する。5' 側非翻訳領域に Tra タンパク質結合サイトと予想される 13 塩基の反復配列が存在しているのである (Ito et al. 1996)。Tra はシヨウジョウバエの主要な雌決定因子である。*fru* 遺伝子が Tra の結合を受ける配列を有することは、*fru* が Tra の下流で働き性決定機構の一翼を担っていることを意味する (Du et al. 1998, Goodwin et al. 2000, Lee and Hall 2000)。

Tra タンパク質は、性染色体構成が XX、すなわち雌となるべき個体にのみ発現する。XY 個体は雌化因子の Tra が存在しないため雄に分化する。Tra タンパク質は RNA 結合タンパク質で、結合部位近傍でのスプライシングを促進する。その古典的ターゲットは *dsx* 遺伝子 (An et al. 1996, McRobert and Tompkins 1985) の一次転写物で、第 4 エクソンに Tra タンパク質が結合する。雌ではその結果、第 4 エクソンを含む mRNA ができる。雄では第 4 エクソンがスキップ

された mRNA が作られる。そしてこれら雄型、雌型の *dsx* mRNA から作られる転写因子の Dsx タンパク質が雄の分化、雌の分化に必要な数々の遺伝子群の転写を促進、又は抑制して雌雄の分化が起こる (Ferveur et al. 1995, Ferveur and Greenspan 1998, Finley et al. 1997, Finley et al. 1998, Greenspan 2000, Marin and Baker 1998, Yamamoto et al. 1998)。

fru は *dsx* と並ぶ Tra 標的の遺伝子として新たに認知されるに至った。*dsx* が生殖腺や外部生殖器など、多様な組織で性決定に関与するのに対して、*fru* の主要な機能サイトは脳神経系である。そのため、*fru* 遺伝子の機能が損なわれた変異体においては、生殖腺や外部生殖器には異常がみられず、性行動など脳神経に関連した機能に異常が生ずると解釈される。

Fru タンパク質の発現パターンを調べると、触角葉を含む脳内の数ヶ所と胸腹部神経節の一部の細胞で雄特異的に発現していることが分かった (Lee et al. 2000, Usui-Aoki et al. 2000)。この事から胸腹部神経節で発現している Fru タンパク質はローレンス筋を支配する運動ニューロンの、脳で発現している Fru タンパク質は性指向性に関与する介在ニューロンの、それぞれの雄性分化に働くと考えられる (Baker et al. 2001, Goodwin 1999)。

以上のように *fru* が上流の性決定カスケードの支配を受けていることは分かっている。*fru* は転写因子をコードしていることから、その下流に続く遺伝子カスケードが性分化の実質的な機能を担っているはずである。しかし、これら下流遺伝子群の実体は明らかにされていない。Fru 下流の転写標的遺伝子以外にも、*fru* 遺伝子自体の転写や転写後の修飾を制御している因子の存在も予想される。さらに、Fru タンパク質が BTB ドメインを介して何と二量体を形成するのかも分かっていない。*fru* 遺伝子の生化学的機能を理解するには、*fru* と共に働く因子群を特定することが必要である。そこで *fru* のカスケードに関わるこうした一連の遺伝子を発見するべく、生体内で *fru* と相互作用する遺伝子を探索した。

第 1 部 Gene Search system を用いた *fru* と相互作用する遺伝子の探索

第 1 部序論

fru 遺伝子は第 3 染色体 91B1-2 に位置し、全長 150kb にもわたる巨大な遺伝子である (Ryner et al. 1996)。この遺伝子はプロモーターを少なくとも 4 つ持つと考えられ、そのうち 1 つは性特異的な転写物を生産する (Anand et al. 2001)。また最終エクソンは少なくとも 5 種類異なる物があり、スプライシングによりその 1 つが選択される。ゆえに Fru タンパク質の C 末端は、最終エクソンの違いを反映して 5 つのタイプがある事になり、うち 3 タイプが Zn フィンガーモチーフを持つ (Yamamoto et al. 1996)。当然、Zn フィンガーの配列はそれぞれ異なる。

一方、Fru タンパク質の N 末端には Broad complex Tramtrack Bric-a-Brac (BTB) ドメインがある (Zollman et al. 1994)。BTB ドメインはタンパク質同士が結合して二量体を形成するのに必要なドメインである。このことから Fru タンパク質は二量体で働く転写因子であることが予想される。

また *fru* 遺伝子の雌型 mRNA には 13 塩基からなる Tra タンパク質結合配列が存在する (Heinrichs et al. 1998, Usui-Aoki et al. 2000)。この配列は *dsx* mRNA に存在するものに酷似しており雌特異的なスプライシングを引き起こす (Chandler et al. 2003)。この Tra 結合配列が *fru* mRNA に存在するという事は、*fru* 遺伝子が Tra の下流に位置する性決定遺伝子であることを示唆する。Tra タンパク質が存在しない雄では、*fru* mRNA に雄特異的なスプライシングが起こる。その結果 Fru タンパク質は、N 末端に 101 アミノ酸からなる雄特異的な配列を持つ事になる (Song et al. 2002)。

ところで、*fru* mRNA は脳でほとんど性差を示すことなく発現しているが、Fru タンパク質は雄にのみ存在する (Usui-Aoki et al. 2000)。これは雌に存在する Tra タンパク質が *fru* mRNA からの翻訳を抑制するためだと考えられる。

以上のようにして *fru* が性決定カスケードの *tra* の下位に位置し、*dsx* とは異なる経路を形成して、それが神経系の一部の性分化を支配すると推定される。しかし、*fru* は転写因子をコードしており、その下流には性分化の実質的な機能を担っている遺伝子が存在している。そこで *fru* の下流に位置する実質的な遺伝子を探索することを主目的に、また、*fru* 遺伝子自体の転写や転写後の修飾を制御している因子の探索を副目的に Gene Search System を使用してスクリーニングを行った。

Gene Search System とはショウジョウバエ染色体上の遺伝子を実験的に選択して強制発現する為のシステムである。ベクターには酵母に由来する転写因子 Gal4 の標的配列 UAS が外向きに配置されており、染色体に挿入された状態

で隣接する DNA が Gal4 依存的に強制的に転写され、その生物学的効果が表現型として現れる。その表現型を観察することにより、スクリーニングを行うシステムである。このシステムを用い、*fru* と相互作用する遺伝子の探索を試みた。

実験材料及び実験方法

1. キイロショウジョウバエの飼育と交配の環境

キイロショウジョウバエの飼育に用いたエサの組成は下記の通りである。

A.

コーンミール	400g
ビール酵母	800g
寒天	1000g
ブドウ糖	1000g
脱イオン水	10L

B. 防腐剤 (エサ 800ml あたり)

プロピオン酸	4ml
ボーキニン液	4ml
ボーキニン液の作成法	
ボーキニン (粉)	50g
エタノール	350ml
脱イオン水	500ml

A を攪拌機にいれ、加熱溶解後に分注し、低温 (4°C) で保存した。このストックは随時オートクレーブで溶解・滅菌後、B の防腐剤を加え、用途に応じて小バイアル (15mmOD X 95mm)、大バイアル (29mmOD X 104mm) に分注した。

実験で交配に用いられた雌は、羽化後 2 時間以内に雄から隔離し、3 日以上 18°C または 25°C に置いた。直接、観察の対象となる個体は 25°C で飼育した。交配に用いた個体は 18°C または 25°C で飼育した。

2. 複眼原基に *fru* を発現する個体の作成

本実験における異所発現には Gal4-UAS system を用いた。これは酵母由来の転写因子 Gal4 が、UAS (Upstream Activating Sequence) と呼ばれるターゲット

ット配列を認識して結合すると、そこからの転写を強力に促進することを利用してのものである。この *Gal4* 遺伝子を GMR (Glass Multimer Reporter) (Brand and Perrimon 1993, Ellis et al. 1993, Freeman 1996) につないだ人工遺伝子がすでに作成されている。GMR とはショウジョウバエの *rhodopsin1* 遺伝子のプロモーターに由来する配列を 5 コピー、隣接して並べたものである。複眼原基特異的転写因子 Glass (Moses and Rubin 1991) が結合することにより、GMR は下流の遺伝子の転写を促進する。つまりこれは、*Gal4* 遺伝子を GMR につなぐ事により、Gal4 転写因子を複眼特異的に発現させるようにしたものである。一方、Gal4 の作用を受けて *fru*⁺ を発現させるための人工遺伝子として *UAS-fru*⁺ が作成されている。この GMR-*Gal4* と *UAS-fru*⁺ を同一個体中に導入すると、複眼原基特異的に生じた *Gal4* によって *fru*⁺ の転写が引き起こされる。具体的には、遺伝型が GMR-*Gal4*;+/+ の個体と *UAS-fru* typeB line3-1 (以下 *UAS-fru* と略記) ;+/+ の個体を交配して GMR-*Gal4*/*UAS-fru*;+/+ を得る。その GMR-*Gal4*/*UAS-fru*;+/+ の雌を、バランス染色体を持つ雄 *CyO/Bl*;+/+ と交配して、染色体組換えにより GMR-*Gal4* *UAS-fru*/*CyO*;+/+ の個体を得た。なお、*CyO* は第 2 染色体バランスである。バランス染色体は染色体全長にわたって数ヶ所、逆位を持った染色体であり、相同染色体との組換えを起こさない。したがって、変異の乗った染色体とバランス染色体を対にしたヘテロ接合体の状態にすることにより、系統を安定に維持することができる。バランス染色体には優性可視マーカーが乗っているため、バランスを持つヘテロ接合体とそれを持たないホモ接合体は容易に区別可能である。*CyO* バランスの場合、マーカーは翅が反り返る *Cy* 変異である。

3. *fru* と相互作用する遺伝子の複眼でのスクリーニング

本実験のスクリーニングは Gene Search System (Seong et al. 2001, Toba et al. 1999) を利用して行った。このシステムでは UAS 配列を持つ P 因子をキイロショウジョウバエのゲノム中のランダムな位置に挿入し、それらの P 挿入系統を用いてスクリーニングを行う。UAS プロモーター配列の組み込まれた P 因子の近傍の遺伝子を異所的に発現させることにより、強制発現した部位の形態や機能に影響を与える未知遺伝子をスクリーニングすることができる (Kraut et al. 2001)。また、本実験のように特定の遺伝子 (例えば *fru*) と GS 系統の任意の遺伝子の共発現によりそれらの相互作用を調べることもできる。本実験では 929 種類の GS 系統の雄と GMR-*Gal4* *UAS-fru*/*CyO*;+/+ の雌を交配し、子孫を得た。この時、*fru*⁺ によって引き起こされる複眼形態異常を抑制または促進する系統をスクリーニングした。

4. GS 系統の P 因子挿入点決定

10匹の雌成虫を用意しゲノムDNAを抽出した。ゲノムDNAをHpaIIで切断した。アダプターDNA1 (CAGGATATCGGCGACCACTAAGCGTCTACCGCTGAGATCTCCCGACCA)、アダプターDNA2 (GAGGGCTGGTGC)とT₄DNAリガーゼによりDNA断片の両端にアダプターDNAを接着した。アダプター用プライマー (TAP-1:CAGGATATCGGCGACCACTAAGCC、TAP-2:ACTAAGCGTCTACCGCTGAGATC)とGS P因子用プライマー (GS3-1:TCTTGCGGCCGCGCTCGACCTG、GS3-2:CCGCGCTCGACCTGCAGCC、GS5-1:AATAGGGAATTGGGAATTCGACTAGTT、GS5-2:GGAATTGGGAATTCGACTAGTTTCAT)を用いてPCRを1X (94°C2分)、25X (94°C15秒、60°C30秒、72°C2分)、1X (72°C4分)の条件で行った。3'方向プライマー (Pry2:GAACCGGCTGCCCTGGTGGGAATACAATAA)と5'方向プライマー (GS5SQ:CACTGAATTTAAGTGTATACTTCGG)を用いてシーケンス反応を行った。CEQ8000 DNA Analysis system (BECKMAN COULTER)にて反応物の塩基配列を決定した。

5. Tramtrack (Ttk) と抑圧遺伝子候補の共発現

*fru*の強制発現効果がGSの共発現によって修飾された場合、そのGSの作用が*fru*に対して特異的に生じているか否かを決定する必要がある。そこでFruタンパク質同様、N末端にBTBドメイン、C末端にZnフィンガーモチーフを持つTtkタンパク質 (Wen et al. 2000, Fairall et al, 1992)を複眼に強制発現し、その効果に対して当該GS系統が修飾作用を示すか否かを検討した。*ttk*の強制発現には*ttk*座にGS P因子挿入の生じたGS3069系統を利用する事とした。GS3069 (UAS-*ttk*に相当)とGMR-Gal4; +/+を交配して子孫GMR-*Gal4*/+; GS3069/+を得た。この雄とダブルバランサー染色体を持つ*Bll* CyO; TM2/TM6Bの雌を交配しGMR-Gal4/ CyO; GS3069/ TM6Bを得た。この個体とGS系統をかけあわせてGMR-*Gal4*/ UAS-GS; GS3069/+を得た。

結果

1. 複眼に強制発現した*fru*と相互作用する遺伝子のスクリーニング

キイロショウジョウバエの複眼原基に*fru*は低レベルで発現している。また、複眼形成のマスターコントロール遺伝子として知られる*eyeless*遺伝子を肢原基に強制発現させると、*fru*の発現が誘導されることも判明している (Michaut et al. 2003)。しかし、複眼原基に*fru*⁺を過剰発現させると、顕著な複眼形態異常を生じる。複眼を構成する個眼の総数が減少し、その配列が不規則となると

共に複眼の厚みが無くなり、面積も狭くなる。また色素の沈着も不十分で白い小さな斑点が見られ、個眼の境界線も不明瞭になる (Fig.1-1B)。*fru*⁺強制発現によって生ずる、こうした顕著な可視的形質を利用し、*fru*⁺と同時に過剰発現したときに複眼異常を抑圧、または促進する遺伝子の探索を試みた。複眼原基特

異的に遺伝子を発現させるための駆動体として、*GMR-Gal4* を用いた。

総数 929 の GS 系統をスクリーニングした結果、成虫まで発生の進まない致死が 96、複眼の形態異常を促進するものが 66、形態異常を抑圧するものが 33 得られた。形態異常を促進する 66 の GS 系統のうち 20 系統は、*fru*⁺過剰発現によって生ずる形質のうち、剛毛異常、色素沈着の異常を特に増強した (Fig.1-1C, D)。また別の 29 系統は、*fru*⁺強制発現によって生ずる棒眼・小眼化を一層強める作用を有していた (Fig.1-1G, H)。その他の異常を示すものが 17 系統得られた。これらには、個眼表面のレンズが融合したもの (おそらくコーン細胞の異常を反映している) や、色素がほとんどなく個眼が透明となっているもの (おそらく色素細胞の異常を反映している) が含まれる。一方、*fru* 単独発現時と比較して複眼が野生型同様の厚みを持つまで回復したものや、複眼表面の個眼間の溝が深くなって個眼境界が明瞭になったもの、さらには個眼の配列の規則性が修復され、複

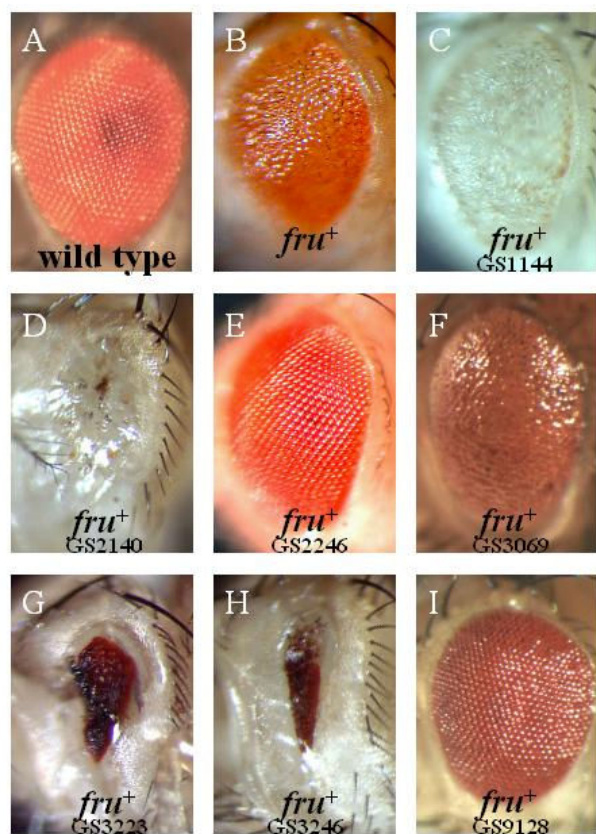


Fig.1-1. *fru*遺伝子を複眼に強制発現させたときの複眼形態の異常と、*fru*遺伝子及びGSトラップ遺伝子を共発現させたときの複眼の状態。野生型(A)。GMR-Gal4 UAS-*fru*⁺ (B)。GMR-Gal4 UAS-*fru*⁺ GS1144 (C)。GMR-Gal4 UAS-*fru*⁺ GS2140 (D)。GMR-Gal4 UAS-*fru*⁺ GS2246 (E)。GMR-Gal4 UAS-*fru*⁺ GS3069 (F)。GMR-Gal4 UAS-*fru*⁺ GS3223 (G)。GMR-Gal4 UAS-*fru*⁺ GS3246 (H)。GMR-Gal4 UAS-*fru*⁺ GS9128 (I)。

眼全体の面積が増加したものが、*fru*⁺強制発現の効果を抑圧する GS 系統に該当する (Fig.1-1E, I)。またこれらの GS 系統は、*fru*⁺強制発現による剛毛異常や色素沈着の不全会も、修復する作用を有することが多い。

fru⁺強制発現の作用を修飾するこれら 195 の GS 系統を表にまとめた (Appendix Table1-1)。Appendix Table1-1 には、スクリーニングで複眼形態異常に変化の見られた系統が全て記載されている。最左列に GS 系統番号を降順に並べ、次に表現型として、致死「lethal」、増強「enhance」、抑圧「suppress」のいずれかに分類し表記した。中央の列には、GS 系統で過剰発現が生じていると推定される遺伝子を記載した。これは P 因子挿入点に隣接し、P 因子内の UAS によって規定される転写方向の下流に位置する遺伝子である。スクリーニングに用いた GS 系統の多くは互いに逆向きに配置された 2 つの UAS を外向きに持っている。したがって、候補となる遺伝子は挿入点の両側に 2 つ存在することになるため、Appendix Table1-1 にはその 2 つを記載した。右から 2 列目には遺伝子の特徴として、当該遺伝子の分子生物学的機能 (flybase (<http://flybase.bio.indiana.edu/>)) を記載した。最右列には各遺伝子の細胞遺伝学的位置を記載した。Appendix Table1-1 に示したうち 42 系統は、P 因子挿入点についての情報を Gene Search System のホームページより検索できなかったため n.d.と表記した。

fru⁺の作用に対し、増強効果がある場合や、合成致死効果が認められる場合、2 つの遺伝子(GS により発現する遺伝子と *fru*⁺遺伝子)の単なる加算的な影響であるのか相乗効果が生じているのかを判別することは、必ずしも容易でない。そこで *fru*⁺の強制発現の作用に対し、抑圧の効果を示した系統を中心に研究を

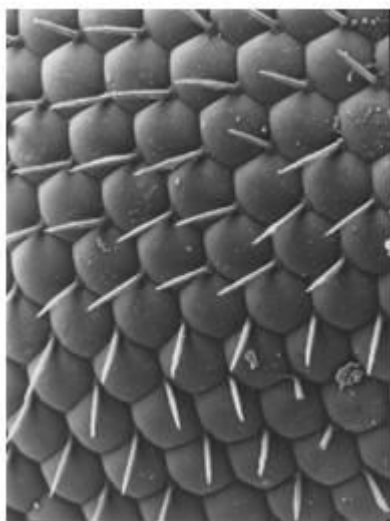


Fig. 1-2 GS2216トラップ遺伝子を単独で発現させた複眼。複眼発生に特に影響は見られなかった。

続行した。抑圧効果の認められた 33 系統のうち GS1186, GS2216, GS3007, GS3119, GS3193, 及び GS3208 は、複眼で *fru* の効果をほぼ完全に抑圧した。これらの系統では、個眼の境界線が明瞭に現れ、個眼の並び方や剛毛の生え方も整然として、野生型に近い複眼となっていた。次にこれらの GS6 系統のうち 5 系統について、Gal4 により発現誘導を受ける遺伝子が、単独で複眼形成に何らかの作用を及ぼす可能性を検討した (GS3007 は未実施)。すなわち、*fru*⁺を強制発現していない野生型の複眼に、GS 系統に挿入した UAS 配列から、隣接の遺伝子を単独で発現させた。その結果、いずれの場合も複眼の発生に大きな影響はなかった (Fig.1-2)。

2. P 因子挿入点決定と *fru* 抑圧遺伝子候補の同定

P 因子ベクター配列に隣接する宿主染色体 DNA のシーケンス決定、及び Gene Search System の挿入点に関するデータベース検索より、各 GS 系統の P 因子挿入点を同定した。その結果、GS1186 系統の P 因子挿入点の両側には GC6606 と CG6540 の 2 つの転写単位が存在することがわかり、したがって GS1186 系統では、このいずれか、または両方の発現が誘導されている可能性が

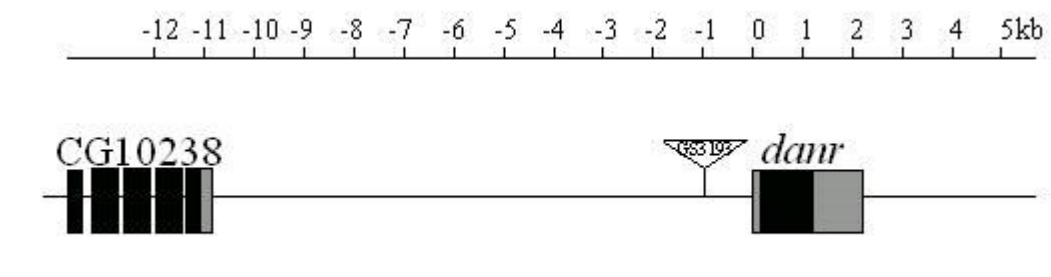


Fig. 1-3 GS3193のP因子挿入点周辺領域の物理的地図。逆向きの三角形はP因子挿入点を示す。四角はエクソンを、直線はイントロンを示す。黒四角はORFを示し、灰色四角は非翻訳領域を示す。

ある。同様に GS2216 では GH07269 と *kek2*、GS3007 では *lama* と CG4769、GS3119 では *wb* と *smi35A*、GS3193 では *danr* と CG10238、GS3208 では CG6241 と *I(3)IX-14* が、それぞれ発現の誘導がされている候補遺伝子となる (Fig.1-3)。ただし、これらのうちの一部の遺伝子は P 因子挿入点から遠く離れており、GS の P 因子内のプロモーターによって転写活性化を受ける可能性は高いとは言えない。例えば、*kek2* 遺伝子は挿入点から約 90kb 離れているため、転写活性化は受けていない可能性が考えられる。以上、ここに示した 6 系統のうち実施可能な系統に関して、同一のトラップ遺伝子を持つ他の GS 系統を用いて、抑圧能を確認した。しかし、残念ながら、全ての系統で抑圧能の再確認は出来なかった。その為、強い抑圧能を示した 6 系統以外にも範囲を広げ、2 次スクリーニングを実施する事とした。

3. 2 次スクリーニングの実施

GS6 系統の説明に記したように、*fru+* の効果を修飾した候補遺伝子は、各系統につきそれぞれ二つずつ存在する。これは Gene Search System で使用されている P 因子が挿入点の上流と下流に位置する 2 つの遺伝子に対して転写活性化する働きを持つからである。そのため、2 つの候補遺伝子のうち、どちらに抑圧能があるのかを決定する必要がある。また、それに先立ち、観察された *fru+* の作用に対する修飾効果が、着目している 2 遺伝子いずれかの過剰発現によるものであることを確かめなければならない。つまり、使用した GS 系統の P 因

子挿入点以外の領域の作用によるものでないことを検証する為に、2次スクリーニングを行った(Appendix Table1-2)。この表には1次スクリーニングで得た結果を遺伝子順に並べ替えて、2次スクリーニングの結果を記載した。Appendix Table1-2の左のカラムには、最左列に二つの候補遺伝子を併記し、その次の列に対応するGS系統番号を記載した。その次の列にはAppendix Table1-1と同様に *fru*⁺強制発現によって生ずる表現型に対する修飾作用を致死「lethal」、抑圧「suppress」、増強「enhance」に分類して記載した。最右列には2次スクリーニング実施の有無を記載した。2次スクリーニングで得られた結果はAppendix Table1-2の右のカラムに記載した。

2次スクリーニングの対象となったのは、1次スクリーニングで得られたGS6系統によって規定される12遺伝子座及び、抑圧能が弱く1次スクリーニングでの結果としてあえて示さなかった15遺伝子座の計27遺伝子座、すなわち、CG13758、CG12497、*Trf2*、CG32711、CG5445、*Fim*、*I(1)G0003*、CG15618、CG3838、*jp*、*kek2*、*coro*、*AGO1*、*NaCP60E*、CG30425、*wb*、*smi35A*、*lama*、CG4769、CG9330、CG7172、*Hph*、S-element()1217、*Atu*、*I(3)IX-14*、CG6241及び*danr*である。1次スクリーニングにおいて修飾作用が見出されたGS1193系統では、CG13758とCG12497の2つの遺伝子のいずれかが強制発現されていると考えられた為、同じくCG13758/CG12497を強制発現することが期待される2つのGS系統、GS1085とGS1209を用いて*fru*⁺による複眼異常に対する効果を調べた。しかし、これら2つのGS系統によっては、GS1193で認められた*fru*⁺効果に対する修飾作用は見られなかった。そのため、CG13758及びCG12497の2遺伝子が*fru*⁺の修飾因子である可能性は低いと判断し、それ以上の解析は行わなかった。こうした2次スクリーニングによってCG13758、CG12497、CG5445、*Fim*、*I(1)G0003*、CG15618、*jp*、*kek2*、*coro*、*AGO1*、*NaCP60E*、CG30425、*wb*、*smi35A*、*lama*、CG4769、CG9330、CG7172、*Hph*、S-element()1217、*Atu*、*I(3)IX-14*、CG6241及び*danr*の各遺伝子を*fru*⁺修飾因子の候補とすることは適切でないと判断した。同様の2次スクリーニングによって、修飾作用が認められたものはAppendix Table1-2の右カラムにsuppressとして表示し、修飾作用の認められなかったものは、no effectと表示した。

2次スクリーニングの結果、*fru*⁺強制発現の効果に対して修飾作用を及ぼす染色体領域が2カ所見出された。すなわち1次スクリーニングにおいて*Trf2*とCG32711に隣接するGS1139P挿入が抑圧効果を示した為、2次スクリーニングでGS1046の作用を検討したところ、このGS系統にも抑圧効果が認められた。更にCG32711だけを転写活性化するGS7403、*Trf2*だけを転写活性化するGS9128の作用を検討したところ、GS9128によってのみ抑圧能が再現された。

これら2つのGS系統の持つP因子ベクターはUAS配列を1つしか有しておらず、そのためその転写活性化能は、挿入点の片側に限定されている。また、1次スクリーニングでCG3838と*jp*に隣接するP挿入を持つGS2164が抑圧効果を示した為、CG3838のみを転写活性化しうるGS7015の作用を2次スクリーニングで調べたところ、非常に弱い抑圧能を示した。以上の結果より、2次スクリーニングにおいて修飾作用が見られたものは、*Trf2*の転写活性化を起こすと思われるGS9128、及びCG3838を転写活性化すると予想されるGS7015のみであった。

4. 修飾因子の作用特異性

上述した2次スクリーニングに加えて、一部の系統では *vectorette* PCR による P 因子挿入点の決定、及び *ttk* 遺伝子（材料と方法の項を参照）を用いて、候補遺伝子の *fru* 効果抑圧作用の特異性の検討を行った (Appendix Table1-3)。Ttk タンパク質と Fru タンパク質は、共に N 末端に BTB ドメインを持ち、C 末端に二つの Zn フィンガーモチーフを持つタンパク質である。そして複眼に強制発現させると複眼形態に異常が生じる事も共通である。得られた候補遺伝子が *fru*⁺強制発現によって生ずる粗眼形質のみを抑圧し、*ttk*⁺強制発現によって生ずる粗眼形質には影響を及ぼさないならば、その作用は特異的であると考えられるであろう。検討の結果、実験を行った GS1139 (*trf2*に対応する)、GS1186、GS2216、GS3007、GS3119、GS3193、GS3208 の 7 系統全てで、GS トラップ遺伝子の発現は Ttk によって誘導される複眼の異常に何の影響も及ぼさなかった。2次スクリーニングで作用の確認されたGS7015に関しては、この検証を行っていない。GS7015は2007年4月に行われたGene Search Systemのデータベースの大幅な改編によってその存在があきらかになったものであり、スクリーニング実行時にはGS2164とGS7015のトラップ遺伝子が同一であることが判明していなかった。その為、非常に弱い抑圧能しか持たないGS2164には着目せず、二次スクリーニングも行わなかった。GS7015については不明であるが、その他GS1139 (*trf2*に対応する)、GS1186、GS2216、GS3007、GS3119、GS3193、GS3208で観察された*fru*⁺強制発現体の粗眼形質を軽減させる効果は、*fru*に特異的な作用であると考えられる。にもかかわらず、これらGS系統の多くに見られた修飾効果が、2次スクリーニングにおいて近接した領域にP挿入を持つ別のGS系統では認められなかった。この原因については現在のところ不明である。

5. Gene Search System で得られた遺伝子の分子生物学的機能

Gene Search System により総数 929 の GS 系統をスクリーニングした結果、GS 挿入部隣接配列を *fru*⁺と共に強制発現させることにより、致死効果をもたら

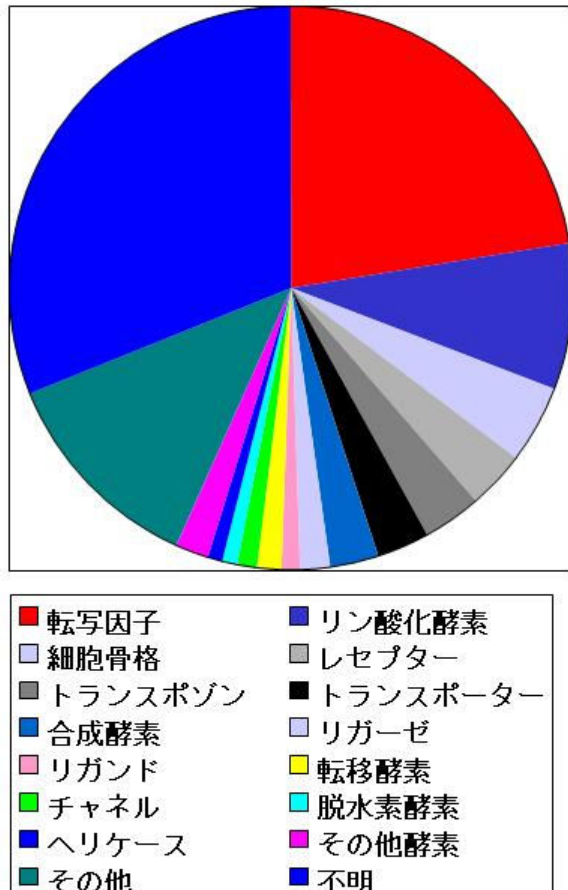


Fig. 1-4 スクリーニングにより得られた候補遺伝子の機能別頻度分布

した系統が 96 系統、複眼の形態異常を促進する系統が 66 系統、形態異常を抑圧する系統が 33 系統得られた。これらの GS 系統で転写活性化の生じている可能性のある遺伝子について、その分子生物学的機能を flyBase より検索して 16 項目に分類し、円グラフで表記した (Fig.1-4)。分子生物学的機能に基づく分類は以下の 16 通りとした。すなわち、転写因子、リン酸化酵素、細胞骨格、レセプター、トランスポゾン、トランスポーター、合成酵素、リガーゼ、リガンド、転移酵素、チャンネル、脱水素酵素、ヘリケース、その他の酵素、その他、不明、である。

各々の比率は、転写因子が 22.5%、リン酸化酵素が 8.4%、細胞骨格が 4.4%、レセプターが 3.4%、トランスポゾンが 3.4%、トランスポーターが 3.0%、合成酵素が 2.7%、リガーゼが 1.7%、リガンドが 1.3%、転

移酵素が 1.3%、チャンネルが 1.0%、脱水素酵素が 1.0%、ヘリケースが 0.7%、その他酵素が 2.0%、その他が 12.1%、機能の不明な遺伝子が 12.1%であった。円グラフには一番上から遺伝子数の多い順に表記している。スクリーニングされた遺伝子の約 5 分の 1 が転写因子という結果であった。繰り返し述べているように GS 系統を用いた転写活性化の実験では、P 因子挿入点の両側の配列が強制発現され、そのいずれが表現型の原因遺伝子であるのか不明である。従って、図 2 のグラフは、原因遺伝子ではない隣接遺伝子をも含んでいることになる。また、2 次スクリーニングにおいて効果の確認できなかった遺伝子も含まれている。そうした点を考慮しても、転写因子の比率の高さは注目してよいだろう。

考察

1. 複眼における *fru* と相互作用する遺伝子の探索

fru と相互作用する遺伝子の探索には、複眼原基に *fru* を発現させることによ

り誘導した複眼形態異常を利用した。キイロショウジョウバエの複眼は胚期に複眼原基として他から区別された 40 個程度の細胞が分裂・増殖し、その後分化して形成される(Mitashov and Koussulakos 2001)。その構造は個眼の極めて規則的な反復からなる。そのためその発生にわずかでも異変があると、複眼発生は肉眼的に識別可能な変化を引き起こす。その理由からこれまでも複眼を利用した多くのスクリーニングが行われ、様々なシグナル伝達に關与する遺伝子が分離された。このように、ショウジョウバエの複眼を用いたスクリーニングは非常に有効である。

しかし、この方法を異所的発現系として用いる時には、注意が必要である。それは、自然の状態でお互い全く関係の無い遺伝子が複眼の異所発現系で相互作用を示すものとして分離された例も報告されているからである(Karim et al. 1996)。例えば *Roughened* に影響を与える遺伝子としてこの種のスクリーニングで分離された *dacapo* は細胞周期を制御する遺伝子であることが分かったが、*Roughened* は細胞周期の制御との関連は報告されていない(Nooij et al 1996)。また *seven in absentia* のエンハンサーとしてこの種のスクリーニングで分離された *peanut* は、細胞分裂中の分裂溝の構成要素をコードするが、*seven in absentia* は細胞分裂との関連は報告されていない(Neufeld and Rubin 1994)。このように複眼を用いたスクリーニングは感度が高い反面 (Rubin 1998)、実際のシグナル伝達では直接的な関係のない遺伝子が相互作用を示す事もあるので、慎重な検討が必要である(Thomas and Wassarman 1999)。

fru は *eyeless* 遺伝子によって、発現が誘導される事が報告されている。また複眼での発現も確認されている。しかし、*fru* 変異体での複眼における異常は観察されておらず、*fru* の複眼での機能は不明である。しかし、**Fru** は転写因子であるので、その下流には形態形成や細胞の生化学機能を担っている遺伝子が必ず存在するはずである。このため *fru* を強制発現させられた複眼に生起する異常は、そうした遺伝子カスケードの異所的活性化の影響であると考えられ、その複眼異常を促進、抑圧する遺伝子は本来 *fru* が機能している細胞においても同様の作用を持つ可能性があると考えた。

実際、複眼への遺伝子の異所的発現システムを利用して、ヒトの遺伝病原因遺伝子の抑圧因子を探索する試みが一定の成功を収めており (Warrick et al. 1998, Jackson et al. 1998)、これによってもこのアプローチの有効性が確認されている。例えば、ヒトの遺伝性の神経変性疾患であるハンチントン舞踏病は、*huntintin* 遺伝子翻訳領域内の CAG リピートが伸長する事により引き起こされる (Warrick et al. 1999, Kim and Tanzi 1998) が、本実験と同様の方法によりこの神経変性を抑圧する遺伝子、促進する遺伝子が発見されている。これらの実験では、ショウジョウバエの複眼にポリグルタミンを強制発現させることに

よりハンチントン舞踏病の神経退縮のモデルを再現している。そこにEP系統(GS系統と原理上同じタイプのP因子挿入系統)を利用して、挿入点近傍の遺伝子をGMR-Gal4により複眼に共発現させ、複眼における神経退縮を促進、抑圧する遺伝子をスクリーニングした実験である(Kazemi-Esfarjani and Benzer 2000)。このスクリーニングにより、ヒートショックタンパク結合タンパク質をコードするdHJ-1遺伝子とdTPR2遺伝子が得られた。

今回のスクリーニングでは異所的に複数の遺伝子を高レベルで発現させたため、かなり高い割合で致死、半致死が引き起こされた。本来、複眼が全く形成されなくてもショウジョウバエは死に至らないはずであるが、GMR-Gal4によって様々な遺伝子を発現させるとしばしば致死となった。これは、GMR-Gal4が実は複眼にのみ発現しているのでは無く、それ以外の領域にも発現があるためと考えている。これは、GMR-Gal4 導入遺伝子が染色体上の挿入点近傍にあるエンハンサーの影響を受けて異所的に発現した結果であるかもしれない。より大きな問題は、強制発現させた未知遺伝子がfruと相互作用するものであった場合にも致死となる可能性がある点である。相互作用する遺伝子がfru機能を促進する作用を持つものであった場合、異所的に発現させたfruの効果が極端に高まり、致死性をもたらす原因となろう。

逆にfruを抑圧する遺伝子であった場合、複眼以外の領域にもそれが発現したために、生存に必要な内因性のfruの機能まで抑圧する可能性がある。fru遺伝子は、性的二型を示す転写物に加え、非性特異的な転写物を生成する。これに対応して、fruは性指向性の決定、ローレンス筋誘導という脳神経系の性分化に関連した2つの機能のほかに、生存に関わる別の機能も有している。非性特異的な転写物を欠くfruの機能喪失変異体は蛹期に致死となる。今回のスクリーニングでは相当数の遺伝子強制発現個体が致死となったが、実際にこのような内在性のfru機能の阻害が起きているかもしれない。

2. ttk 遺伝子による抑圧効果特異性の検証

複眼でのスクリーニングでは、fruと共発現させたときにfru⁺の効果をほぼ完全に抑圧し、その結果、野生型に近い構造の複眼が形成されるGS系統が7系統分離された。しかもこれらの抑圧遺伝子は、同じドメインを有するTtkが引き起こした複眼異常には全く影響しなかった。このことから、抑圧遺伝子が非特異的なタンパク質分解酵素であったり、Gal4-UAS発現システムそのものに干渉している可能性は低いと思われる。

3. 候補遺伝子の役割について

2次スクリーニングにより7系統14の遺伝子のうち、唯一Trf2遺伝子のみが

2 次スクリーニングで *fru*⁺強制発現の効果を強く抑圧した。*Trf2* については続く第 2 部で詳しく検討する。1 次スクリーニングで *fru*⁺強制発現による粗眼形質を抑圧することが見出されながら、2 次スクリーニングでは抑圧効果が認められなかった事例が相当数に上っている。こうした結果をもたらしたゲノム領域に *fru* 修飾因子がコードされている可能性は排除できない。修飾効果をもたらした P 因子挿入と、効果のなかった P 因子挿入とが近接しているとは言え、挿入点を取り巻く塩基配列は全く異なるため、その違いがそれぞれの転写活性化能に予見不能な影響を及ぼしうるからである。

そこで、*trf2* とその隣接遺伝子以外の 12 遺伝子について簡単に説明する。GS1186 において転写活性化が生じるとされる候補遺伝子は CG6606 と CG6540 である。これらの遺伝子の機能に関しては、ほとんど何も分かっていない。CG6606 タンパク質には ATP-ase 領域とカルシウム/脂質結合ドメインが存在する。また、CG6540 は核酸結合タンパク質と予想されている。GS2216 系統に挿入したベクター内の UAS 配列は、GH07269 と *kekkon-2* 両遺伝子を転写活性化している可能性があるが、挿入点からの距離の短い GH07269 が *kekkon-2* よりも有力な候補である。GH07269 はプロリンリッチ領域を持つタンパク質をコードする。プロリンリッチ領域を持つタンパク質の多くは、受容体型チロシンキナーゼのリン酸化チロシンに結合することが知られている (Okamura-Oho et al. 1999)。そのためチロシンキナーゼを介するシグナル伝達系に関与する可能性が高い。一方、*kekkon-2* は免疫グロブリンドメインとロイシンリッチリピートを持つ膜貫通タンパク質をコードする。Kekkon-2 タンパク質は Kekkon-1 タンパク質と機能的に相同であると考えられている (Ghigliione et al. 1999, Bai et al. 2001)。この *kekkon-1* は中枢神経系と卵巣に発現し、それぞれニューロンの分化と卵室の成熟に寄与するものと考えられている。GS3007 系統に挿入したベクター内の UAS 配列は、*lamina ancestor* と CG4769 両遺伝子を転写活性化しているものと考えられる。Lamina ancestor タンパク質は視葉板神経芽細胞前駆体とグリア細胞前駆体に発現し、それぞれの細胞が分化を開始するのに必要と考えられている (Perez and Steller 1996)。CG4769 はサイトクローム C ファミリーヘミ結合サイトを持つタンパク質をコードし、酸化的リン酸化に働くものと予想される。GS3119 系統の挿入 UAS 配列は *wb* と *smi35A* 両遺伝子を転写活性化すると考えられる。*wb* は細胞接着と細胞移動に関与することが報告されている。*wb* から転写翻訳されるタンパク質は EGF like リピートと G ドメインを持つ。*smi35A* は嗅覚異常を示す変異体の研究からクローニングされたセリンスレオニンプロテインキナーゼである。GS3193 系統の挿入 UAS 配列は CG10238 と *danr* 両遺伝子を転写活性化すると考えられる。CG10238 は molybdopterin 補因子の生合成に働くタンパク質に類似の

タンパク質をコードする。*danr*は複眼触角原基からの触角の分化に貢献する遺伝子として報告されている。*Danr*は *pipsqueak* ドメインを持つタンパク質である。GS3208はCG6241と *I(3)IX-14*を転写活性化すると思われる。CG6241は構造上既知のドメインを持たないため、その機能を推論するのは困難である。一方、*I(3)IX-14*は metallo endopeptidase をコードし、*Fru* 及びその下流因子の分解反応に関与する可能性が考えられる。

4. Gene Search System による成果

総数 929 の GS 系統を用いてスクリーニングを行い、*fru*により誘導された複眼異常に対して促進作用を持つ系統、抑圧作用を持つ系統並びに、致死を引き起こす系統を得た。ターゲットとして得られた遺伝子のうち、22.5%が転写因子という結果であった。この数値は特筆に価する。キイロショウジョウバエの遺伝子は、ゲノム全体で約 14000 個存在し、そのうち転写因子は 700 個、つまりわずか 5%しか存在しないことが報告されている (Rubin et al. 2000)。それにも関わらず、このスクリーニングにおいては、その 4.5 倍もの割合で転写因子が得られた。これは、対象となる遺伝子 *fru* が転写因子をコードしている為、転写因子間で相互作用を起こし、陽性反応をもたらした可能性が考えられる。その一部は、*in vivo*での相互作用を反映しているであろう。Gene Search System は非常に簡便で、また実験的に生体内の反応を模倣することができることは述べた。また感度が高い一方で、異所的発現であるために、擬似陽性のである確率も高いことも述べた。現在の Gene Search System は本実験において使用された時に比較して、データベースの整備や系統の追加等を繰り返し、より正確で、より幅広いスクリーニングが可能となっている。実験が簡便な為、数段階にわたるスクリーニングを行う事ができ、それによって擬似陽性を除外できると考えられる。また本研究のように初期のデータベースを使用していても、挿入点隣接部に由来する転写物 cDNA の塩基配列を自ら決定する事により、挿入点や対象遺伝子を決める事が可能であった。総じて、*in vivo*とも *in vitro*とも考えられるこの Gene Search System はいわばショウジョウバエの複眼という名の試験管内でスクリーニングを行うようなもので、このスクリーニング方法が無ければ、*Trf2* 遺伝子を探索する事は出来なかったであろう。そして、なにより *Trf2* 遺伝子を探索できたこの成果こそ Gene Search System の優位性を示している。第 2 部では *Trf2* 遺伝子と *fru* との相互作用について示していく。

第2部 fru と相互作用する遺伝子 Trf2 の研究

第2部序論

TATA-binding protein (TBP) は TATA 配列を含むプロモーターからの転写を制御する律速因子で、真核生物で広く、また高度に保存されている (Hernandez 1993, Roeder 1996)。TBP ファミリーには TBP の他に *Trf1* (Crowley et al. 1993)、*Trf2* (Dantonel et al. 2000)、*Trf3* (Persengiev et al. 2003)、が存在する。これまで *Trf1* と *Trf3* はそれぞれショウジョウバエと脊椎動物でしか報告されていない (Bartfai et al. 2004, Crowley et al. 1993, Persengiev et al. 2003)。対照的に *Trf2* (又は TLF, TLP, TRP、そして STUD) は、広く存在し、線虫、ショウジョウバエ、アフリカツメガエル、ゼブラフィッシュ、ニワトリ、マウス、そして、ヒトで確認されている (Berk 2000, Dantonel et al. 2000, Kaltenbach et al. 2000, Muller et al. 2001, Rabenstein et al. 1999, Teichmann et al. 1999, Veenstra et al. 2000)。

Trf2 は基本転写機構の構成要素である (Nakadai et al. 2004, Rabenstein et al. 1999, Teichmann et al. 1999)。ヒト *Trf2* は *neurofibromatosis type1 (NF1)*、*ACF*、そして *jumongi* のプロモーターに結合して転写を活性化する。またこれら *Trf2* の標的遺伝子のいくつかは TATA-less プロモーターによりコントロールされている (Chong et al. 2005)。また *Trf2* は *c-fos* のプロモーターに結合して、または TFIIA との結合により *c-fos* の転写を抑制する (Chong et al. 2005)。

ショウジョウバエにおいて *Trf2* は nucleosome remodeling factor (NURF) chromatin remodeling complex の構成要素であり、また DNA replication element (DRE) binding factor (DREF) と結合して転写を促進する (Hochheimer et al. 2002)。*PCNA* 遺伝子及び *DNA pol* 遺伝子はショウジョウバエにおいて *Trf2* のターゲットであることが確認されている (Hochheimer et al. 2002)。

分子レベルのこれらの観察にも関わらず、ショウジョウバエの個体発生における *Trf2* の役割や機能は不明であった。*Trf2* は線虫、ゼブラフィッシュ、アフリカツメガエルで胚発生に必須である一方 (Dantonel et al. 2000, Kaltenbach et al. 2000, Muller et al. 2001, Veenstra et al. 2000)、マウスにおいては生存に必須ではなく、精子形成の欠損を示すのみであった (Martianov et al. 2002, Zhang et al. 2001)。

fru 遺伝子と相互作用する遺伝子のスクリーニングにより、*Trf2* 遺伝子が見い出されたが、ショウジョウバエの個体において *Trf2* の果たす役割は判明していない。そこでまず、ショウジョウバエにおいて、この遺伝子座の変異体を同定することを試み、*Trf2* 遺伝子の 5' 側近傍に P 因子の挿入を有する二つの系統が *Trf2* の機能低下型変異体であることを発見した。本文においては、まずこの変異体の表現型について説明し、続いて *fru* 遺伝子との相互作用について述べる。

実験材料及び実験方法

1. キイロショウジョウバエ

ショウジョウバエはコーンミール、酵母、アガーの培地（第一部と同じ培地）を用いて、25℃、12L・12D の条件で飼育した。コントロールとして *Canton-Special (CS)* 系統を使用した。*PL28* 系統 (Bourbon et al. 2002) は A. Vincent より提供をうけた。GS1046、GS1108、GS7403、GS9128 (Toba et al., 1999) は首都大学東京の相垣教授に提供していただいた。

2. 表現型観察

ショウジョウバエの外部形態は、通常の双眼実体顕微鏡 (Nikon SMZ1500) により観察した。また、写真撮影は CCD カメラ (Nikon DXM1200) を用いた。観察には蛹化後 48 時間経過した蛹を用いた。

3. 分子生物学的分析

Trf2 の mRNA の相対的な量を計測する為、totalRNA を 3 齢幼虫から抽出し、RT-PCR を行った。プライマーとして、A (5'-ACAAGTCGTCGGTGGTTCATCTGGCA-3') 及び B (5'-ATGGTCGCGGGTGCTGATGTTTGGT-3') を用いた。増幅された産物をゲルから抽出しプライマー C (5'-ATCTATTGGAGGAGGAGGTCATGCAG-3')、及びプライマー D (5'-TGA CTGTTACGCT GCCGGTGGAGAA-3') を用いて、nested PCR を行い、増幅を確認した。

Trf2 形質転換体の作成のため、*Trf2* 全長 cDNA を Aor51HI で切り出し、pUAST vector へと導入した。pUAST-*Trf2* は injection バッファーで 250ng/ul の濃度になるように希釈した。*phs* π helper バッファーと共に *w¹* 変異体の胚へ注入した。pUAST-*Trf2* を注入された胚は成虫となるまで飼育し、*w¹* をマーカーとして用いて複眼の色により形質転換体を選択した。

Fru タンパク質と *Trf2* タンパク質の直接の結合を確認する為に、免疫共沈降実験を行った。ショウジョウバエ由来株化細胞の S2 細胞に FLAG タグ付きの Fru タンパク質及び HA タグ付きの *Trf2* タンパク質を発現させ、核抽出物を得た。核抽出物に proteinG セファロースを吸着させ、タンパク質を分離した。抗 FLAG 抗体により Fru タンパク質を沈降させた。沈降物を SDS-PAGE を用いて分離した。ウェスタンブロッティングを行い、抗 HA 抗体を用いてタグ付き *Trf2* タンパク質の検出を試みた。

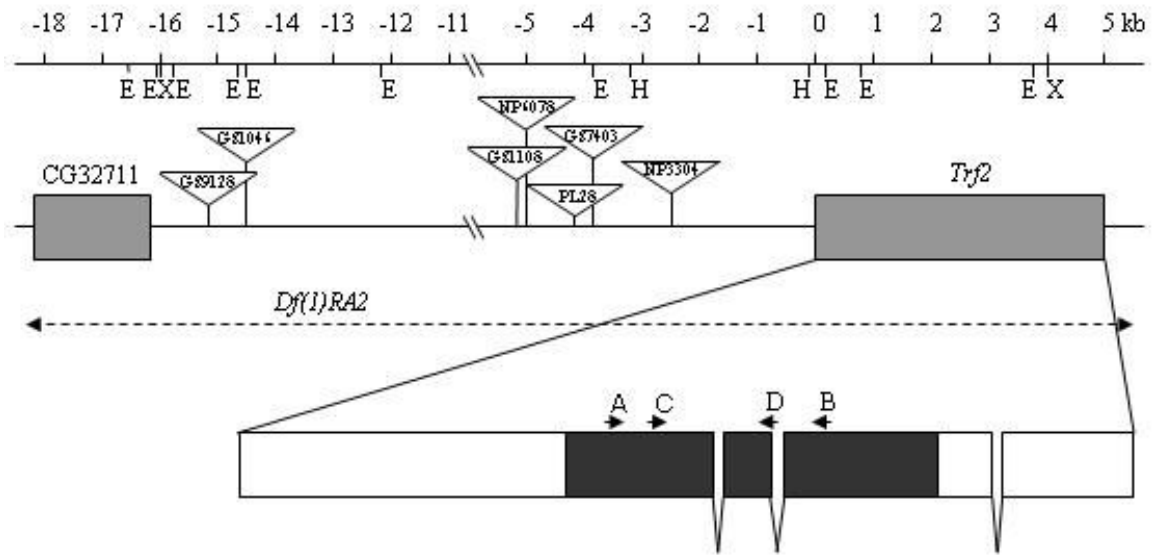


Fig. 2-1 *Trf2* 遺伝子周辺領域の物理的地図。E (*EcoRI*)、X (*XhoI*)、H (*HindIII*) は制限酵素サイトを示す。逆向きの三角形はP因子挿入点を示す。点線矢印は染色体欠失系統 *Df(1)RA2* を示す。四角はエクソンを、直線はイントロンを示す。黒四角はORFを示し、白四角は非翻訳領域を示す。A-Dの小さな矢印はPCRで用いたプライマーを示す。

結果

1. *Trf2* 突然変異体の同定

Trf2 遺伝子の細胞学的位置は、X 染色体の 7E7;7E9 である。その周辺に P 因子の挿入された系統を NP 系統のデータベース及び GS 系統のデータベースを用いて探索したところ、NP3304、GS7403、PL28、NP6078、GS1108、GS1046、GS9128 の 7 系統が見出された。また、7D10;8A4-5 を欠失し *Trf2* 遺伝子座全体を欠く *Df(1)RA2* 系統も入手した (Fig.2-1)。上記 7 系統の P 因子挿入点はいずれも *Trf2* の転写開始点の上流 14kb 以内に存在する (Fig.2-1)。このように P 因子挿入点が *Trf2* 遺伝子の推定上の調節領域に存在することから、これら 7 系統のいくつかは、*Trf2* 変異体であることが考えられた。これらの系統を掛け合わせ、それぞれの P 因子挿入をヘテロに持つダブルヘテロ接合体を作成したところ、PL28 系統と GS7403 系統のダブルヘテロ接合体のみ、成虫が羽化しなかった。そこで、これら 2 系統に関して RT-PCR により *Trf2* 転写量を計測することとした (Fig.2-2)。Fig.2-2 に示すとおり、3 齢幼虫における *Trf2* 転写量は GS7403 系統及び PL28 系統のヘミ接合体で明らかに減少していた。コントロールとして用いた *rp49* 遺伝子の mRNA は野生型と PL28 系統、GS7403 系統との間で違いは見られなかった (Fig.2-2 A)。増幅された産物はゲルから切り出し、より内側の *Trf2* 特異的プライマーを用いて nested PCR を行った。その結果、想定された分子量の PCR 産物が増幅され、Fig.2-2 A で示された PCR 増幅産物

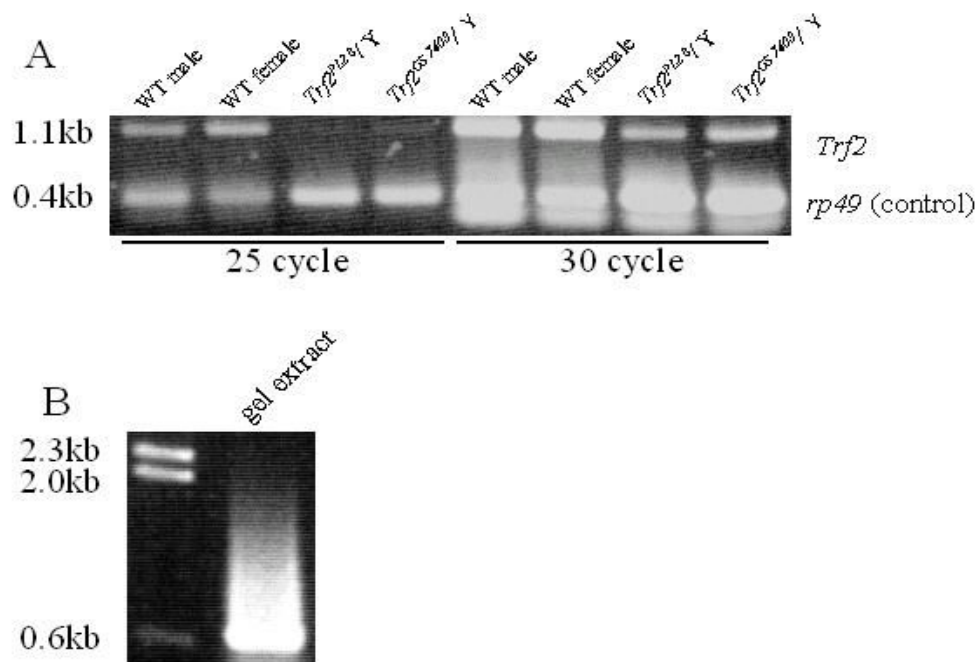


Fig. 2-2 PL28系統及びGS7403系統における *Trf2* 遺伝子発現量の減少。RT-PCRを用いてPL28及びS7403の *Trf2* 遺伝子の発現量を野生型と比較した。(A)。1.1kbが *Trf2* 遺伝子のバンド、0.4kbは *rp49* のバンドである。Aのゲルから *Trf2* バンド部分を切り取り、nested-PCRを行って増幅を確認した (B)。左列は分子量マーカーである。

は実際に *Trf2* 配列であることを確認した。(Fig.2-2 B)。それゆえ、GS7403系統と PL28 系統は *Trf2* 遺伝子座の機能低下型突然変異体であると考えられた。

Trf2 変異体の外部構造の観察により、*Trf2*^{GS7403}、*Trf2*^{PL28}それぞれのヘミ接合体、及び *Trf2*^{GS7403} のホモ接合体が、前部気門 (anterior spiracle) の伸長異常を示す事が分かった (Fig.2-3)。*Trf2*^{PL28} のホモ接合体は蛹化するより前に致死となる為、観察することはできなかった。*Trf2*^{GS7403} / *Trf2*^{PL28} の蛹も *Trf2*^{GS7403} / Y や *Trf2*^{PL28} / Y 同様に前部気門の伸長の異常を示す (Fig.2-3 E)。また、*Trf2*^{GS7403} / *Trf2*^{PL28} 及び *Trf2*^{PL28} / Y の蛹は野生型と比べて幅が細く、前後方向に長い。これは蛹化時に通常起こる“短縮” (shortening) に異常が生じたためと思われる (Fig.2-3 D, E)。*Trf2*^{GS7403} と *Trf2*^{PL28} は異なる遺伝的背景を持つ。したがって、想定していない第 2 の変異が 2 つの系統に共通して存在し、これが前部気門の異常を引き起こしている可能性は低い。一方、*Trf2*^{GS7403} 系統と *Trf2*^{PL28} 系統は共通して *Trf2* 転写量の減少を示す (Fig. 2-2)。こうした事実を総合すると、*Trf2*^{GS7403} 系統と *Trf2*^{PL28} 系統は *Trf2* 遺伝子の変異体で、この変異が前部気門の伸長異常を引き起こしたと考えられた (Shima et al. 2007)。

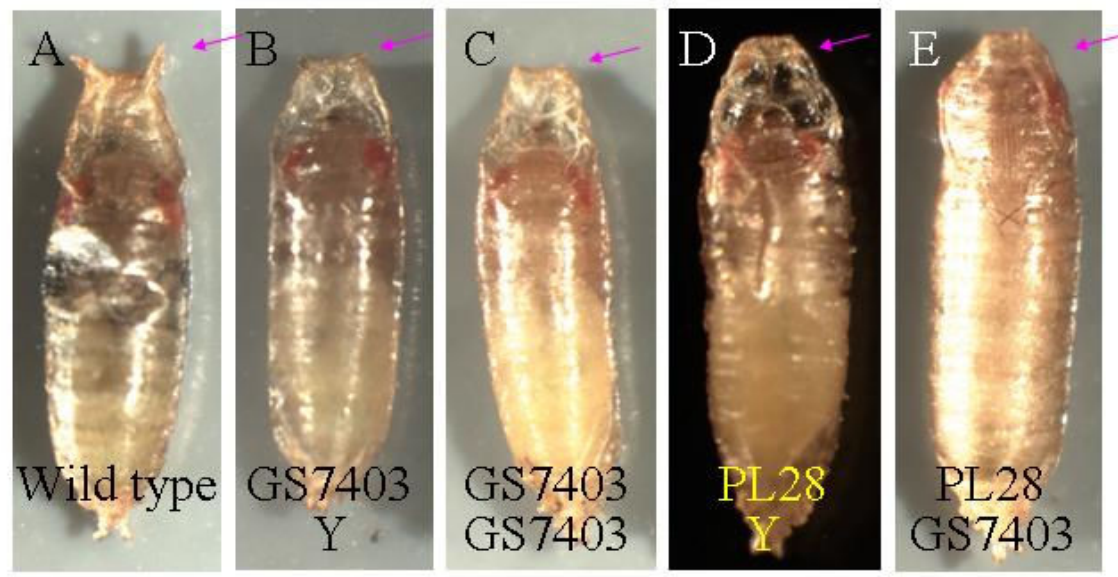


Fig. 2-3 *trf2*変異体の前部気門 伸長異常。野生型の前部気門 (A)。 *Trf2*^{GS7403}/Yヘミ接合体は前部気門の伸長異常を示す (B)。同様に *Trf2*^{GS7403}/*Trf2*^{GS7403}ホモ接合体もまた前部気門の伸長異常を示す (C)。 *Trf2*^{PL28}/Yヘミ接合体は前部気門の伸長異常を示す (D)。同様に *Trf2*^{GS7403}/*Trf2*^{PL28}ヘテロ接合体もまた前部気門の伸長異常を示す (E)。また、 *Trf2*^{PL28}/Yヘミ接合体及び *Trf2*^{GS7403}/*Trf2*^{PL28}ヘテロ接合体は、わずかに野生型よりも蛹の全長が長い (D、E)。

2. *Trf2* 遺伝子と *fru* 遺伝子の強制発現が複眼形成に及ぼす影響

以上、ショウジョウバエの発生における *Trf2* 遺伝子の役割について述べてきた。次に *fru* 遺伝子と *Trf2* 遺伝子との相互作用について、複眼発生異常を指標としたスクリーニングの結果から述べていきたい。

ショウジョウバエの複眼は約 750 個の個眼から形成され、1つの個眼は 8 個 (R1 から R8) の光受容細胞と色素細胞、コーン細胞の計 24 個の細胞から構成されている。個眼と個眼の間には剛毛と呼ばれる棘のような感覚毛が生じている。野生型の複眼では個眼と個眼の間の境界が明瞭で、個眼の並びや剛毛の生え方も整然としている (Fig.2-4 A; Fig. 2-5 A)。今回の実験では *fru*⁺と任意の遺伝子の異所発現を行うために *Gal4*-UAS system を用いた。複眼原基に遺伝子を強制的に発現させるには、*GMR-Gal4* を使うため、まず *GMR-Gal4* のみを持つショウジョウバエの複眼を観察した。*GMR-Gal4* のみを持つショウジョウバエの複眼に関しても野生型と同様に個眼や剛毛が整然と並んでおり、これ単独では複眼の発生に影響を与えないことが確認された (Fig.2-4 B)。それに対して、

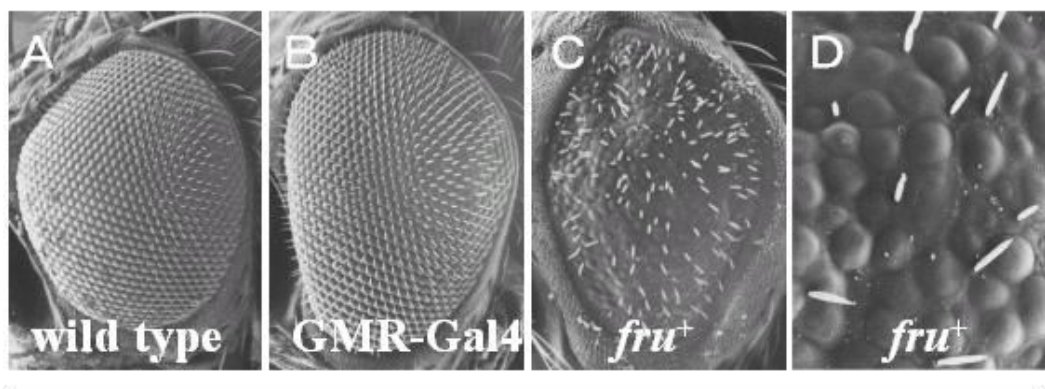


Fig. 2-4 *fru*遺伝子の強制発現による複眼異常の電子顕微鏡写真。野生型の複眼 (A)。GMR-*Gal4*のみをもつショウジョウバエの複眼 (B)。*fru*遺伝子を強制発現した異常複眼 (C)。*fru*遺伝子を強制発現した異常複眼の拡大図 (D)。

Gal4-UAS system を用い *fru*⁺遺伝子を複眼に強制発現させると複眼形成に異常を生じる。個眼の境界線は不明瞭、複眼の厚みは若干薄くなり、(Fig.2-4 C) 個眼の大きさも不均一であることが分かる。また、野生型の個眼が六角形を呈し、3本の剛毛を備えている (Fig.2-4 A; Fig.2-5 A) のに対し、*fru*⁺強制発現によって異常となった複眼は、円形に近く、剛毛は不均一でまばらとなり (Fig.2-4 D)、色素の沈着も不均一で小さな斑点が観察される (Fig.2-5 B)。染色体上に GMR-*Gal4* UAS-*fru* を持つショウジョウバエに更に第一部で説明した Gene Search System を用いて GS9128 対応遺伝子 (*Trf2*) を共発現させた複眼では、*fru* 遺伝子の過剰発現の影響はほぼ完全に抑圧され、野生型と同様に、個眼の並びや剛毛の生え方も整然としていた (Fig.2-5 C)。GS9128 における P 因子挿入

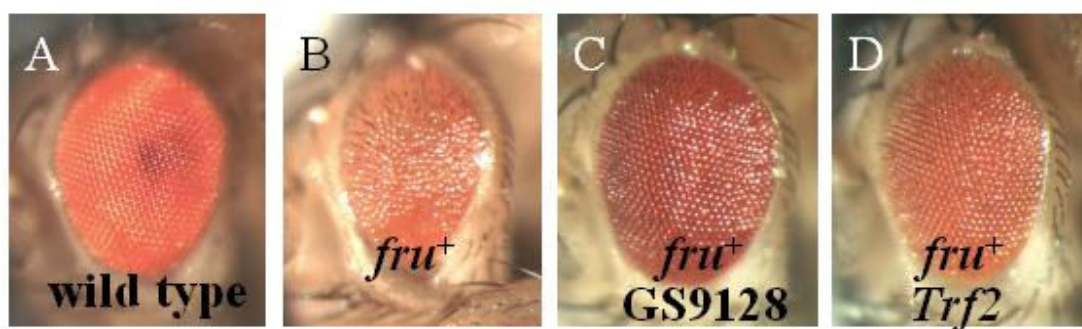


Fig. 2-5 *fru*の強制発現による複眼異常と *Trf2*の共発現による複眼異常の抑圧。野生型の複眼 (A)。GMR-*Gal4*を用いて *fru*遺伝子を異所発現させた複眼異常 GMR-*Gal4* UAS-*fru* (B)。GMR-*Gal4*及びGS9128を用いて *fru*遺伝子と *Trf2*遺伝子を共発現させた複眼 GMR-*Gal4* UAS-*fru* GS9128 (C)。GMR-*Gal4*を用いて *fru*遺伝子と *Trf2*遺伝子を共発現させた複眼 GMR-*Gal4* UAS-*fru* UAS-*Trf2* (D)。

点の位置から GS9128 で強制発現が生じている遺伝子は *Trf2* 遺伝子であることが想定された。そこで実際に *Trf2* 遺伝子が *fru* 遺伝子の効果を抑圧するか否かを調べる実験を行った。すなわち、GS9128 ではなく UAS-*Trf2*⁺を用いて、*fru*⁺によって誘導された複眼異常の抑圧が起きるかどうかを検討した。その結果、GS9128 と同様に UAS-*Trf2*⁺が *fru*⁺により誘導された複眼異常を抑圧することがわかった (Fig.2-5 D)。

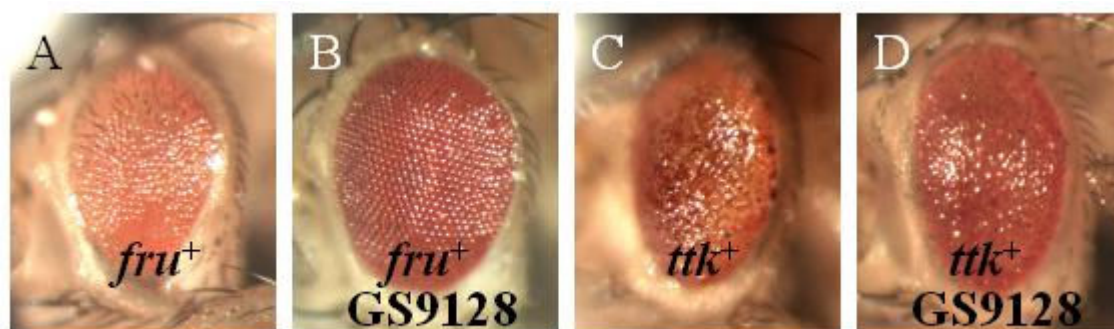


Fig. 2-6 *ttk*遺伝子を強制発現させた複眼異常と、それに対する *Trf2*遺伝子共発現の効果。 *fru*遺伝子を強制発現させた複眼異常 GMR-*Gal4* UAS-*fru* (A)。 *fru*遺伝子と *Trf2*遺伝子を共発現させた複眼 GMR-*Gal4* UAS-*fru* GS9128 (B)。 *ttk*遺伝子を強制発現させた複眼異常 GMR-*Gal4* GS3069 (C)。 *ttk*遺伝子と *Trf2*遺伝子を共発現させた複眼 GMR-*Gal4* GS3069 GS9128 (D)。

このように、*Trf2* 遺伝子と *fru* 遺伝子を共に複眼原基に強制発現させると、後者による粗眼形質の誘導を前者が抑圧した。*Trf2* 遺伝子が示した抑圧作用が *fru* に特異的であるかどうかを調べるため、*fru*⁺に代えて、*ttk*⁺を複眼に強制発現させ、それに対する *Trf2* の効果を検討した。Fru タンパク質は N 末端に BTB ドメインを持ち、C 末端に 2 つの Zn フィンガーモチーフを持つ。Ttk タンパク質も同様に BTB ドメインと 2 つの Zn フィンガーモチーフを持つ。Gene Search system を用い、*ttk* 遺伝子を複眼に強制発現させると、複眼発生に異常を生じる (Fig.2-6 C)。そこで *ttk*⁺に加え、GS9128 を用いて *Trf2* 遺伝子を複眼原基に共発現させた。その結果、*Trf2* が、Ttk によって誘導される複眼異常に何の影響も与えないことがわかった (Fig.2-6 D)。従って、複眼での *Trf2* の *fru* に対する抑圧能は特異的であると考えられた。

3. 前部気門の変態における *fru* と *Trf2* の相互作用の検討

fru 欠失変異体は、前部気門 (anterior spiracle) の伸長異常を示す事が報告されている。通常、3 齢幼虫後期になると、前部気門の内表面が外側を向くように反転を開始し、前部気門が突起様に伸長する。そして蛹化と共に前部気門も

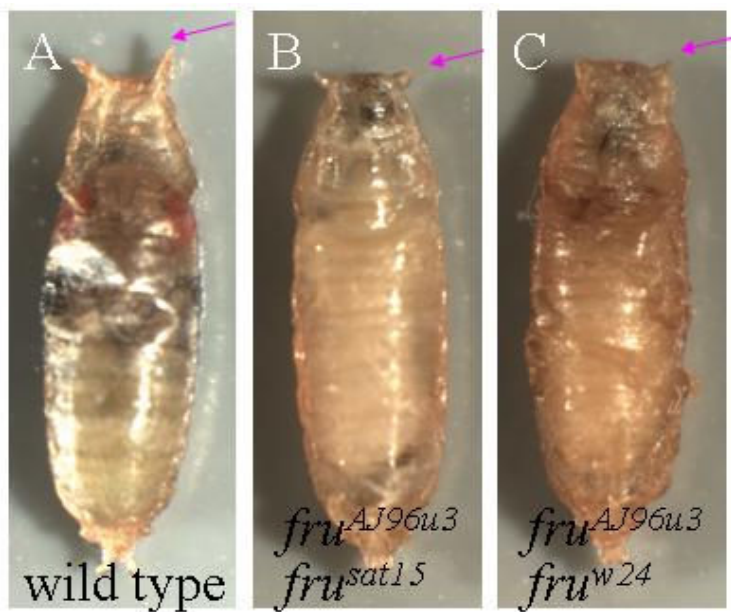


Fig. 2-7 *fru*欠失変異体の前部気門の伸長異常。野生型の前部気門 (A)。*fru*^{AJ96u3}/*fru*^{sat15}ヘテロ接合体は前部気門の伸長異常を示す (B)。*fru*^{AJ96u3}/*fru*^{w24}ヘテロ接合体もまた前部気門の伸長異常を示す (C)。

硬化していく (Fig.2-7 A)。しかし、*fru*欠失変異体では、3 齢幼虫後期から蛹化までに生ずるはずの前部気門の反転は起きず、前部気門は伸長しない。すなわち *fru*^{AJ96u3} と *fru*^{sat15} のヘテロアレル変異体 (Fig.2-7 B)、*fru*^{AJ96u3} と *fru*^{w24} のヘテロアレル変異体では共に前部気門の伸長が起きなかった (Fig.2-7 C)。

前述の通り、*Trf2* 変異体もまた、前部気門の伸長異常を示す。*Trf2* 変異体と *fru* 変異体が同じ表現型を示す事は非

常に興味深い。*fru* 欠失変異体での前部気門の伸長異常は観察した個体すべてに見られ、したがって浸透率は 100%である。一方、*fru* 欠失変異と野生型のヘテロ接合体では伸長異常の浸透率は 0%である (Table2-1)。*Trf2*^{GS7403/Y} では 27.3%、*Trf2*^{PL28/Y} で 100%の個体がこの表現型を示した。*Trf2* の 2つのアレルを組み合わせた *Trf2*^{PL28/Trf2}^{GS7403} では 89.5%の個体に前部気門の異常が見られた。*Trf2*^{PL28} と *Trf2*^{GS7403} は、全く異なる遺伝的背景を持つ。そのため、想定していない変異が偶然に共通しており、それが前部気門の伸長異常に影響を及ぼしている可能性はなさそうである。上記のように *Trf2*^{GS7403/Y} では前部気門の異常を示す個体が

Table2-1 前部気門の伸長異常の浸透率

遺伝型	X/Y (CS)	<i>Trf2</i> ^{GS7403/Y}	<i>Trf2</i> ^{GS7403} / <i>Trf2</i> ^{GS7403}	<i>Trf2</i> ^{PL28/Y}	<i>Trf2</i> ^{PL28} / <i>Trf2</i> ^{GS7403}	<i>Trf2</i> ^{GS7403/Y} ; <i>fru</i> ^{AJ96u3/+}
異常を示した 個体数	0	6	ND	27	17	0
観察した 総個体数	20	22	ND	27	19	9
浸透率	0%	27.3%	ND	100%	89.5%	0%

27.3%であったが、ここに更に *fru*^{AJ96u3} を加えると、前部気門の伸長異常を示す個体は1例も見られなくなった (Table2-1)。つまり、*fru* 変異と *Trf2* 変異は、単独では前部気門の反転不全という共通の表現型を示す一方、*fru* 遺伝子量の半減が *Trf2* 変異の表現型を抑圧するのである。その機構は不明ながら、*fru* 変異と *Trf2* 変異の間に表現型レベルでの相互作用が認められたことになる。

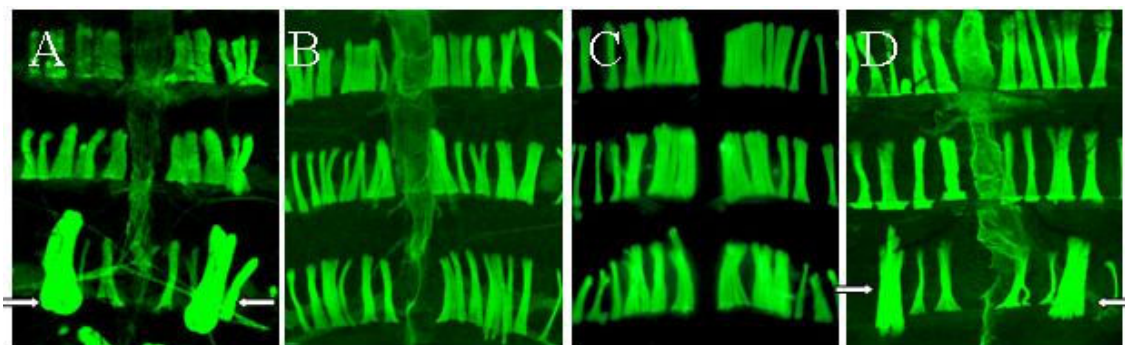


Fig. 2-8 雄特異的筋肉ローレンス筋の欠失と救済。野生型雄の腹部第5節にはローレンス筋が観察される (A)。野生型の雌 (B) や *fru*^{sat} 変異体の雄 (C) にはこの筋肉は観察されない。*fru*^{sat} 変異体の雄の運動ニューロンに Fru タンパク質を強制発現させるとローレンス筋の欠損は救済される (D)。

4. *fru* 突然変異体のローレンス筋形成異常に対する *Trf2* 変異の作用

第一部で説明したように、野生型の雄の腹部第5節には、周囲の筋肉よりも大きく付着点も異なるローレンス筋が存在するが (Fig.2-8 A)、野生型の雌 (Fig.2-8 B) や *fru*^{sat} 変異体の雄 (Fig.2-8 C) には、この筋肉はない。*fru*^{sat} 変異体の雄では、ローレンス筋は存在しないが、運動ニューロンに *fru* 遺伝子を強制発現させることにより、ローレンス筋の欠損は救済され、ローレンス筋が生じるようになる (Fig.2-8 D)。ローレンス筋形成に影響を及ぼすもう一つの変異に *Abdominal B* (*AbdB^{mcp-1}*) がある。*AbdB^{mcp-1}* 変異を持つショウジョウバエでは、腹部第4節の identity が第5節へと変わり、その結果として一定の割合で第4節にもローレンス筋が生じる (Fig.2-9 C)。*AbdB* 遺伝子はホメオボックス遺伝子の一つで腹部体節の identity を確立する働きを持つ (McGinnis and Krumlauf 1992)。この腹部第4節に生じるローレンス筋は腹部第5節に生じる野生型のローレンス筋と同様に、他の縦走筋より大きく、また付着点も異なっている。

こうして異所的に形成されるローレンス筋は、腹部第5節に存在する正常なローレンス筋と比較して不安定であり、遺伝的バックグラウンドの影響を強く受ける。このことは、*fru* 変異に対する修飾因子の作用を検討する上で、腹部第4筋のローレンス筋が特に敏感なシステムとなる可能性を暗示している。そこで *AbdB^{mcp-1}* 変異により腹部第4節に生じるローレンス筋が、*Trf2* 変異によっ

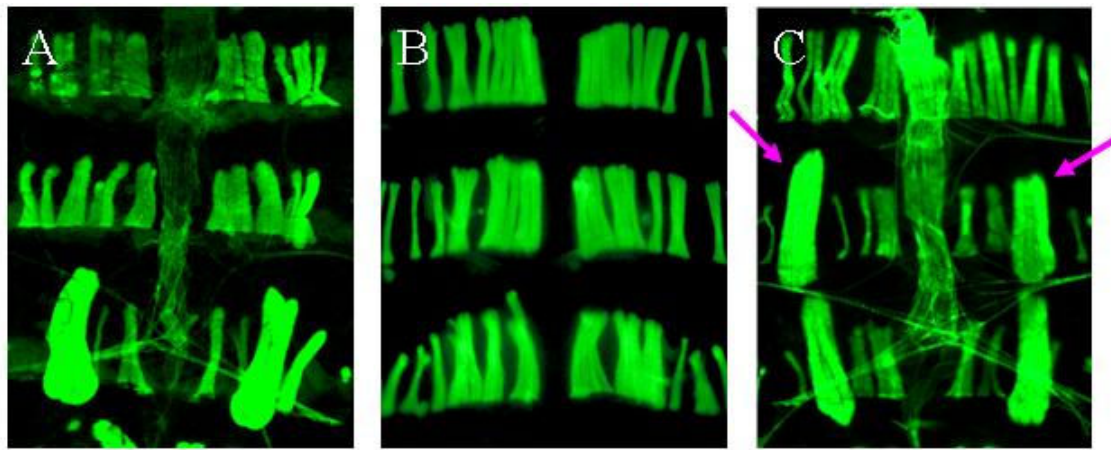


Fig. 2-9. *AbdB^{mcp-1}*変異による腹部第4節の異所的ローレンス筋の発生。野生型雄の腹部第5節にはローレンス筋が観察される (A)。 *fru^{sat}*変異体の雄 (B) にはこの筋肉は観察されない。 *AbdB^{mcp-1}*変異体では第4節にもローレンス筋が形成される (C)。

てどのような影響をうけるのかを調べた (Table2-2)。 *Trf2^{GS7403}* と X 染色体 balancer のヘテロ接合雌を *AbdB^{mcp-1}* ヘテロ接合雄と交配すると、子孫の *AbdB^{mcp-1}* ヘテロ接合雄は *Trf2^{GS7403}* の座乗する X 染色体、又は X 染色体 balancer のいずれかを持つことになる。前者を実験群、後者を対照群として比較を行い、 *Trf2^{GS740}* の存否によって *AbdB^{mcp-1}* によるローレンス筋誘導がどのように変化するかを調べた。なお、腹部第 4 節のローレンス筋形成は、そのショウジョウバエの遺伝的バックグラウンドに大きく左右されるので、対照群が持つ

Table2-2 *Trf2*変異による*AbdB^{mcp-1}*変異によって生じた異所的MOLの発生率変化

遺伝型	観察数	腹部第4節にMOLを持つハエの割合	第4節のMOLの平均数
<i>FM7c/Y; AbdB^{mcp-1}/+</i>	15	60.0%	0.87
<i>Trf2^{GS7403}/Y; AbdB^{mcp-1}/+</i>	27	11.1%	0.11
<i>FM7i-ActGFP/Y; AbdB^{mcp-1}/+</i>	22	36.4%	0.45
<i>Trf2^{GS7403}/Y; AbdB^{mcp-1}/+</i>	8	0%	0

X 染色体 balancer も *FM7c* と *FM7i-ActGFP* の二種類を使用することとした。実験の結果、 *FM7c/Y; AbdB^{mcp-1}/+* の 60.0% の個体が腹部第 4 節にローレンス筋を持ち、腹部第 4 節に形成された一匹当たりのローレンス筋の個数は平均 0.87 個であった。それに対して同じ交配で得られた *Trf2^{GS7403}/Y; AbdB^{mcp-1}/+* の個体のうち腹部第 4 節にローレンス筋を持っていたのは 11.1% にとどまり、腹部第 4 節に形成されたローレンス筋の個数は一頭当たり 0.11 個であった。一方、

*FM7i-ActGFP/Y; AbdB^{mcp-1}/+*では、その個体の 36.4%が腹部第 4 節にローレンス筋を有し、腹部第 4 節に生じたローレンス筋の個数は一頭当たり 0.45 個であった。それに対して、同じ交配で生じた *Trf2^{GS7403}/Y; AbdB^{mcp-1}/+*の遺伝子型を持つ個体では、腹部第 4 節にローレンス筋を持つものは一頭も観察されず、従って腹部第 4 節に生じたローレンス筋の個数は一頭当たり 0 個であった。このように、*AbdB^{mcp-1}*による腹部第 4 節へのローレンス筋形成に対して、*Trf2* 遺伝子は促進的に働くという結果が得られた。*fru* 遺伝子はローレンス筋形成を促進するので、ここでは *Trf2* 遺伝子が *fru* 遺伝子と協調的に作用すると言える。

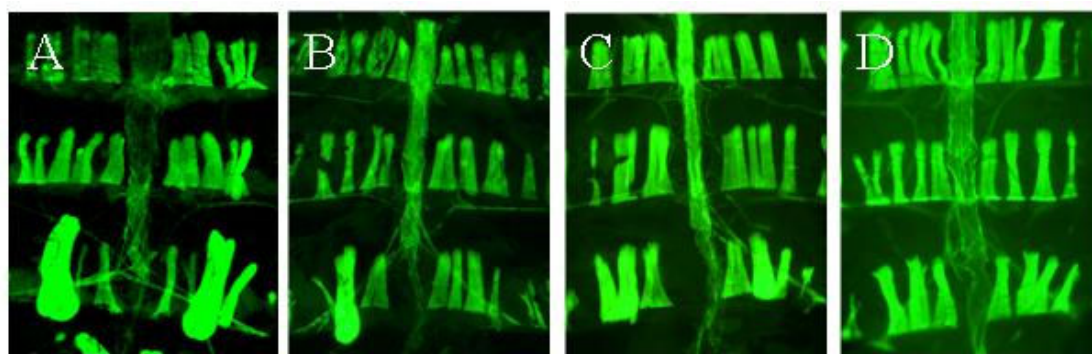


Fig. 2-10 *fru*変異体における不完全ローレンス筋の形成。野生型雄の腹部第4節に形成されたローレンス筋 (A)。 *fru^{AJ96u3}/fru¹*において片側にだけ形成された通常ローレンス筋 (B)。 *fru^{AJ96u3}/fru¹*において周りの筋肉よりもわずかに大きく形成された不完全ローレンス筋 (C)。 *fru^{AJ96u3}/fru¹*においてローレンス筋の形成されなかった腹部筋肉 (D)。

5. 腹部第 5 節のローレンス筋形成に対する *Trf2* 変異の作用

これまで述べてきたように、*frusat* 変異体の雄にはローレンス筋が全く形成されない。それに対して *fru¹* 変異体においては、不完全ながらローレンス筋が形成される。また、片側にのみローレンス筋が形成される事もある。*fru* 座に欠失を持つ *fru^{AJ96u3}* と *fru¹* のヘテロ接合体は様々なローレンス筋の異常を示す。すなわち、片側にのみローレンス筋が形成される場合 (Fig. 2-10 B)、不完全なローレンス筋を持つ場合 (Fig. 2-10 C)、ローレンス筋が全く形成されない場合 (Fig. 2-10 D) がある。なお、筋付着点の後端が周囲の縦走筋より後方に位置するものを、ここでは形成不全のローレンス筋と判断した (Fig. 2-10 C, D)。

fru^{AJ96u3} と *fru¹* のヘテロ接合体にみられる様々なローレンス筋の異常に対して、*Trf2* 変異がどのような影響を与えるのかを調査した。X染色体に *Trf2^{GS7403}* を持つ *fru^{AJ96u3}/fru¹* と FM7i バランサーを持つ *fru^{AJ96u3}/fru¹* とを同腹の兄弟集団で観察し、ローレンス筋の形成された個体 (片体節を単位とする) の割合を比較した (Table 2-3)。野生型においては、観察した 5 個体の全片体節に正常なローレンス筋が観察された。X染色体が FM7i バランサーの *fru^{AJ96u3}/fru¹* では、

Table 2-3. *fru* 変異及び *trf2* 変異による MOL 形成数の変化

遺伝型	観察数	通常の MOL	短い MOL	MOL 不形成
野生型	10	10	0	0
<i>FM7::ActGFPN_Y;;fru^{Δfru1}/fru¹</i>	20	1	10	9
<i>Trf2^{GS7403}/NY_Y;;fru^{Δfru1}/fru¹</i>	28	0	2	26

10 個体 20 片体節のうち、正常なローレンス筋が観察されたのは 1 例のみであった。通常より短い不完全なローレンス筋は 10 例観察された。そしてローレンス筋を完全に欠く片体節は 9 例であった。これに対し、*Trf2^{GS7403}* を X 染色体上に持つ *fru^{Δfru1}/fru¹* においては、観察した 14 個体 28 片体節のうち、正常なローレンス筋を有するものはなかった。不完全なローレンス筋を持つ事例もわずか 2 片体節に過ぎなかった。そして、残りの 26 片体節はローレンス筋を完全に欠いていた。以上のように腹部第 4 節の場合と同じく、*Trf2* 遺伝子は腹部第 5 節のローレンス筋の形成についても促進的に働くという結果が得られた。

6. *fru* と *trf2* の脳における発現パターン

第 1 部で述べたようにローレンス筋の成否を決定付けるのは、この筋を支配する運動ニューロンの性であり、筋肉や筋芽細胞の性ではない。Fru タンパク質の存否が運動ニューロンの性を決定し、それがローレンス筋の形成を決定している。ローレンス筋を支配する運動ニューロンの細胞体は、腹部神経節に存

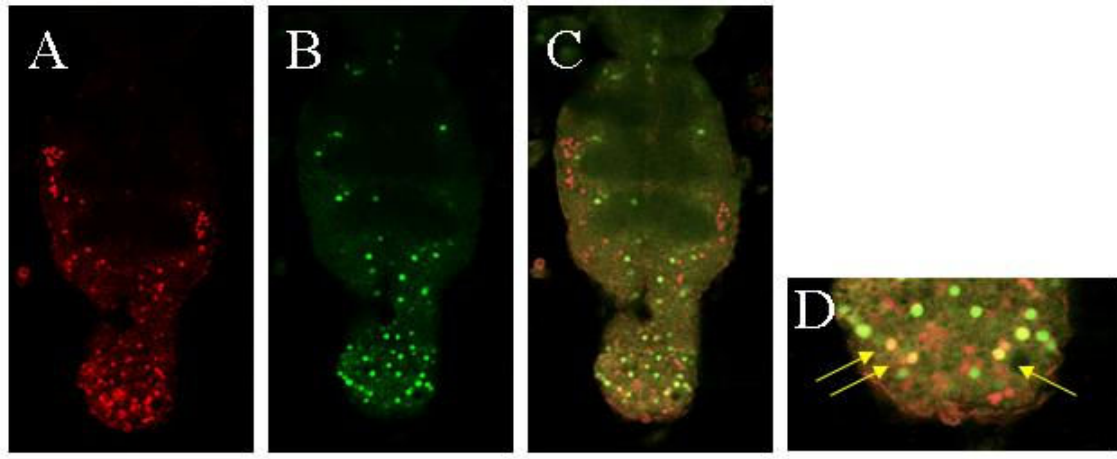


Fig.2-11 *fru* と *trf2-gal4* の発現パターン。抗 Fru 抗体を用いて、APF24h 時点でのショウジョウバエ脳の発現パターンを調査した (A)。*Trf2* 遺伝子の推定プロモーター領域 6kb を挿入した *trf2-gal4* を用い、Gal4 の発現パターンを調査した (B)。A と B の合成 (C)。C の拡大写真 (D)。

在している。*Trf2* 遺伝子が *fru* 遺伝子と相互作用してローレンス筋の形成に影響を及ぼすならば、腹部神経節の運動ニューロン細胞体で *fru* と *Trf2* は共発現しているはずである。*Trf2* の検出に用いる抗体の入手が困難であるため、*Trf2* 発現のレポーターを構築することとした。すなわち、*Trf2* 遺伝子の推定プロモーター領域を 6kb 切り取り、*pPTGal4* ベクターへ挿入し、個体への形質転換によって *Trf2-Gal4* を持つ系統を作成した。この系統での Gal4 発現様式は、*UAS-GFP* を用いて検出した。こうして可視化した *trf2* の発現パターンを *fru* のそれと比較した。蛹化 24 時間後の野生型雄の脳を摘出し、抗 Fru 抗体と抗 GFP 抗体で二重染色を行った。ローレンス筋を支配する運動ニューロンの細胞体が存在する腹部神経節には、抗 Fru 抗体陽性の神経細胞が多数存在する (Fig. 2-11 A)。また、抗 GFP 抗体に陽性反応を示す細胞も認められた (Fig. 2-11B)。いずれの抗体も核を標識した。Fig.2-11 C は A と B の図を重ねたものである。Fig.2-11 C を見ると、腹部神経節の末端部分に黄色で示された 3 つの神経細胞の核がある (共発現している) ことがわかる。この部分の拡大写真を Fig. 2-11 D に示す。この 3 つの細胞では、*Fru* と *Trf2* が共に発現していると考えられる。

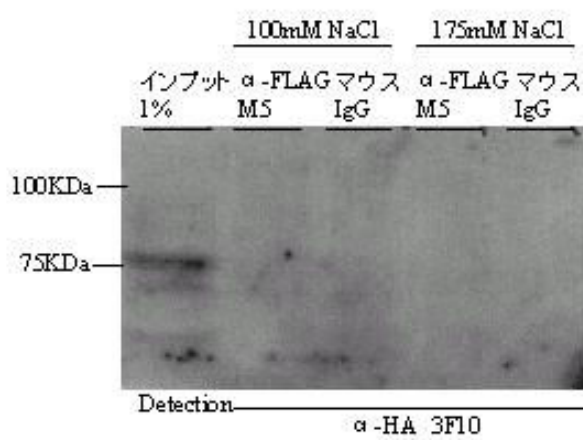


Fig. 2-12 *Trf2* と *Fru* の共免疫沈降の結果。α-FLAG M5抗体で *Fru* タンパク質を沈降させ、α-HA 3F10で検出を試みたが、検出されなかった。細胞抽出物を 1%ローディングした場合は、79KDaのバンドが検出された。

7. Fru タンパク質と Trf2 タンパク質とが複合体を形成する可能性の検討

複眼での異所発現実験やローレンス筋の観察から、*fru* 遺伝子と *Trf2* 遺伝子が遺伝的相互作用を示すことがわかった。これらの表現型レベルでの相互作用は、果たして、両タンパク質の複合体形成によって生じるのであろうか。それともいくつかの段階から構成される反応カスケードの上下にこの二つの遺伝子 (産物) が位置するのであろうか。多くの転写因子は、複数の異なるタンパク質が複合体を形成して初めて機能的なものとなる。そこで *Fru* タンパク質と *Trf2* タンパク質

が、複合体を形成する可能性を、共免疫沈降法により検討した。対象とするタンパク質の量と抗体の特異性の高さが、この種の実験の成否を左右する。そこですぐれた抗体の利用が可能な FLAG をタグとして *fru* につなぎ、このミニジ

ーンを培養細胞 S2 にトランスフェクションして、大量発現させることにした。トランスフェクションした S2 細胞のタンパク質抽出物に α -FLAG M5 (抗体) を加え、Fru タンパク質を沈降させた。沈降物中に Fru タンパク質に加え Trf2 タンパク質が含まれているか否かをウェスタンブロットティングにより検討した (Fig2-12)。塩濃度を 50mM、100mM、175mM のそれぞれに設定して実験したが、いずれの場合にも *Trf2* のバンドは検出されなかった。しかし、沈降したタンパク質ではなく細胞抽出物を 1%ローディングした場合には 79kDa の位置に *Trf2* のバンドが検出された。このように、Fru タンパク質と *Trf2* タンパク質とが複合体を形成することを示す結果は得られなかった (Fig2-12)。

考察

1. *fru* と相互作用する遺伝子、*trf2* の分離

動物の行動がどのようにして体の中で組み立てられ、コントロールされているのか、そのメカニズムの解明を目的に、行動を規定する遺伝子のスクリーニングが山元らによって行われた (Yamamoto et al., 1996)。行動を規定する遺伝子の探索は、ある特定の行動にのみ異常をきたす突然変異を分離し、原因遺伝子を特定する事により実施された。着目する行動を性行動に絞り込み、スクリーニングを行った結果、雄が雌に対して求愛しない変異体として *satori* が見出され、その原因遺伝子、*fru* の研究が始まった。*fru* 遺伝子産物は BTB ドメインと Zn フィンガーモチーフを持つ転写因子様の構造を有す (Ito et al., 1996; Ryner et al., 1996)。よって、Fru タンパク質によって転写制御を受け、性決定の実際を担っている遺伝子が *fru* の下流に存在するはずである。本研究は、その *fru* の下流遺伝子をスクリーニングする事を目的に行われた。

本研究のスクリーニングでは、*fru* 遺伝子下流に位置する遺伝子群を探知する手段として遺伝学的相互作用を利用したスクリーニングを行った。複眼原基で *fru* 遺伝子を過剰に発現させると複眼形態に異常を生じる。*fru* 遺伝子を強制発現させると隣接する個眼のレンズが融合する傾向を示し、剛毛の欠落を生じる。そこで、*fru* と同時に過剰発現した時に *fru* による複眼異常を抑圧する遺伝子をスクリーニングした。このような遺伝子は *fru* の機能を負に調節するものであると予想される。Gene Search system を用い、スクリーニングを行った結果、GS9128、GS1108 が *fru* の効果を抑圧する系統としてスクリーニングされた。GS9128、GS1108 の P 因子挿入点を塩基配列に基づいて決定したところ、当該 GS 系統がトラップしている遺伝子の有力な候補が *Trf2* であることが判明した。*fru* の抑圧遺伝子候補として *Trf2* 遺伝子が見出されたのである。*Trf2* を *fru* と複眼で共発現させた場合、複眼での *fru* の効果をほぼ完全に抑圧し、その為、個眼の境界線は明瞭に現れ、個眼の並びや剛毛の生え方も整然としていた。*fru* は

本来、複眼では機能していないと思われる。しかし複眼における、*Trf2* 遺伝子の *fru* 抑圧作用が非常に強力であることから、*fru* が機能を果たす本来の生体部位においても両者が相互作用する可能性が高いと考え、*Trf2* 遺伝子の研究を開始した。

Trf2 遺伝子は、TATA-binding protein(TBP)ファミリーの一つで、ヒト、ショウジョウバエ、線虫などで発見されている。TBP は TATA 配列を含むプロモーターからの転写を制御する律速因子で、真核生物で広く、また高度に保存されている (Hernandez 1993, Roeder 1996)。最近までは、一般的な転写機構の中心要素はこの TBP 一種類であり、転写の時間的・空間的多様性は多数の activator と repressor の組み合わせによると考えられてきた。しかし、現在では、*Trf1*、*Trf2*、*Trf3* が TBP ファミリーとして発見されており、これらが TBP と同様に転写の中心的役割を担っていると考えられている。ショウジョウバエにおいて *Trf2* は nucleosome remodeling factor (NURF) chromatin remodeling complex の構成要素であり、また DNA replication element(DRE) binding factor(DREF)と結合して転写を促進する(Hochheimer et al. 2002)。*PCNA* 遺伝子及び *DNA pol* 遺伝子はショウジョウバエにおいて *Trf2* のターゲットであることが確認されている(Hochheimer et al. 2002)。

2. *Trf2* 遺伝子の個体発生における役割

このような転写に関する研究の進捗とは裏腹に、ショウジョウバエ個体を対象とした発生の研究は全く行われていなかった。まずは、*Trf2* の発生における役割を調査する為に、*Trf2* 遺伝子座の変異体の探索を開始した。*Trf2* から比較的近くに P 因子挿入点を持つ、PL28 系統、GS7403 系統など数系統について RT-PCR を実施し、*Trf2* 遺伝子の転写量を計測した。3 齢幼虫の *Trf2* 転写量を比較したところ、PL28 系統と GS7403 系統でその減少を認めた。これにより PL28 系統及び GS7403 が *Trf2* 変異体であることが確定した。

Trf2 変異体の *Trf2^{PL28}* 及び *Trf2^{GS7403}* の外部構造の観察により、両変異体で前部気門の伸長異常が見出された。*Trf2^{PL28}*、*Trf2^{GS7403}* それぞれのホモ接合体、ヘミ接合体、そしてそれら 2 つのアリルを組み合わせたヘテロアリル変異体のいずれにおいても前部気門の伸長異常は観察された。*Trf2^{PL28}* と *Trf2^{GS7403}* は、まったく異なる遺伝的背景を持っているため、この表現型は、*Trf2* の変異に起因すると推定された。さらに野生型アリル、*trf2⁺* のミニジーンを *Trf2^{PL28}* 突然変異体に導入して強制発現させると、前部気門の異常を救済することができたことから、この表現型が *trf2* 遺伝子の機能低下によることは確実である。今回の結果により、*Trf2* が蛹変態の初期ステージに必要であることが示された。蛹化は 3 齢後期の wandering の停止に続いて始まり、幼虫の短縮化、そして、前

部気門の反転、囲蛹の硬化と続く (Riddiford 1993)。前部気門の異常は *Trf2^{PL28}* と *Trf2^{GS7403}* の両アレルに認められるが、短縮不全は *Trf2^{PL28}* にのみ認められた。これら 2 つの表現型は、エクジステロイド関連シグナルに関与する遺伝子座の変異体の特徴的に見られるものである (Bender et al. 1997, Fletcher et al. 1995)。つまり、*Trf2* はエクジステロイド活性による変態のプロセスに関与する可能性が考えられる。

一方、分子としての *Trf2* の機能については、すでいくつかの研究が行われている。すなわち免疫沈降分析によって、*Trf2* と共に複合体を形成するタンパク質が多数同定されている (Hochheimer et al. 2002)。たとえば、dISWI、NURF-55、NURF-38 が *Trf2* と共に複合体をつくる。それらは、DREF や NURF クロマチンリモデリング複合体の構成要素である (Hochheimer et al. 2002)。*Trf2* が DREF 構成要素と複合体形成をした場合には、*Trf2* は PCNA など多くの遺伝子のプロモーターに存在する DRE 結合サイトからの転写を開始する。それゆえ *Trf2* は、DRE 結合サイトを持ちエクジステロイドに反応して DNA の複製や細胞増殖を誘導するのに必要な標的遺伝子群を活性化し、それを介して変態に関与すると考えられる。*Trf2* はまた、NURF を含む複合体と協調してクロマチン再構成に関与すると予想されるが、これを支持する実験的結果はまだ報告されていない。

最近の実験により、Fru タンパク質がクロマチン構造の修飾を通じて転写を制御し、中枢神経系の性分化を実現する可能性が示唆されている (伊藤弘樹ら、未発表)。この *fru* 遺伝子の欠損もまた、前部気門の反転異常 (Anand et al. 2001) を引き起こす事は興味深い。Fru は、ある発生の段階でクロマチン再構成因子を集合させ、ニューロンの雄化を促進または抑制して性分化を調整すると考えられる。Fru はそれゆえ、状況に応じて転写を正負両方向にコントロールすると考えられる。ヒト *Trf2* もまた、転写を正負双方向に制御するのは非常に興味深い (Chong et al. 2005, Moore et al. 1999)。ヒト *Trf2* は直接 *NF1* のプロモーターに結合し転写を活性化する。一方で C-fos プロモーターからの転写を抑制する (Chong et al. 2005)。ショウジョウバエのゲノムワイドなマイクロアレイの分析から、*Trf2* の過剰発現により全体の 1.9% の遺伝子の転写が促進され、1.6% の遺伝子では転写が低下する事が示された (Hochheimer et al. 2002)。それゆえ、*Trf2* が、状況に応じて標的遺伝子の転写を促進したり逆に抑制したりしていることは十分考えられる。今回の研究で同定された *Trf2* 変異体は、分子レベル、細胞レベル、個体レベルで、*Trf2* 遺伝子の研究を加速させると考えられる。そして、発生や行動などの高次の機能がクロマチン再構成によってどのように制御されるのか、その機構を明らかにするのに役立つだろう。

3. 複眼異常に対する *Trf2* 遺伝子の抑圧効果

第 1 部でスクリーニングの結果について述べたが、ここでは、複眼の変化を中心に簡単に述べる。キイロショウジョウバエの複眼原基に *fru*⁺ は低レベルで発現している。とは言え、*fru* の機能喪失型突然変異体は複眼形態に異常を示さないことから、内在性の *fru*⁺ は複眼発生に寄与しないと思われる。しかし、複眼原基に *fru*⁺ を強制発現させると、顕著な複眼形態異常を生じる。複眼を構成する個眼の総数が減少し、その配列が不規則となるとともに複眼の厚みがなくなり、面積も狭くなる。また、色素の沈着も不十分で白い小さな斑点が見られ、個眼の境界線の不明瞭となる。*fru*⁺ の強制発現によって生じるこのような変化は、どのようにして引き起こされるのであろうか。電顕での外部観察以外には実験を行っていないが、恐らく、変化の主要因はプログラム細胞死に関係があると推察される。*fru*⁺ によって転写が引き起こされる遺伝子の実体は、未だ判明していないものの、*fru*⁺ が神経細胞においてプログラム細胞死を抑制するとの実験結果が示された。それによると、*fru*⁺ が一部の細胞の予定細胞死を抑制した結果、特定の神経の発生に性的二型が作られ、性行動の性差が生み出されるという (Kimura et al. 2005)。このプログラム細胞死の実験結果が直ちに今回の複眼異常の原因を説明するものとはならない。しかしその一方、予定細胞死を誘導する遺伝子を複眼原基に強制発現すると、*fru*⁺ 強制発現に見られるのと類似の粗眼形質が引き起こされることも事実である。こうした知見に照らして、*fru*⁺ による粗眼の形成がプログラム細胞死の誘導によると推察することは可能であろう。

fru⁺ によって誘導された複眼形態異常は、*Trf2*⁺ の共発現によって、ほぼ完全に抑圧される。では、*Trf2* 遺伝子を過剰発現した時に、複眼異常が抑圧されるのは、どのような機序によるのであろうか。*Trf2* は DREF と結合し DRE 配列を含むプロモーターからの転写を正または負の方向に制御することが報告されている。あるいは、この負の制御が働き、*fru* の下流遺伝子の転写を抑制したのかもしれない。これとは別に、ヒトの *Trf2* オルソログの *Trp* が転写を抑制する機構について興味深い報告がなされている。先に TBP の転写機構から説明を始める。TBP の転写はまず、TBP が TATA 配列に結合する事により始まる。そこへ基本転写因子である TFIIA 及び TFIIB が結合する。続いて TBP 結合タンパク質群 (TAFs) が結合し、転写が始まる。これに対し、*Trp* タンパク質はアミノ酸配列から TFIIA 及び TFIIB とは結合するが、TATA 配列とは結合しない。また、CAT assay の結果によれば、*Trp* はコンセンサス TATA 配列からの転写を強力に抑制する (Moore et al. 1999)。この結果を踏まえ、Moore らは、*Trp* が存在すると TFIIA 及び TFIIB がそれによって占拠され、TBP による転写が抑制されると推察した。そして、*Trp* が存在しない時には、TFIIA 及び TFIIB が開放されるため TBP による転写活性化が行われるのではないかと推察してい

る。*fru*⁺による粗眼形成を *Trf2* が抑圧するのも、あるいはこのような機序によるのかもしれない。

4. 前部気門伸長異常に関する *Trf2* と *fru* の相互作用

これまでの *Trf2* の研究は、転写システムの中でのその機能の解明に終始していた。それは、*Trf2* が TBP のホモログの一つとして発見されたことに起因する。TBP はほとんどあらゆる生物において転写に関与する高度に保存されたタンパク質である。そのため分子レベルでの解析が先行し、*trf2* 変異体の個体レベルの表現型は本研究で初めて明らかにされたのである。その表現型とは、前部気門の伸長異常であった。野生型において、前部気門の伸長異常を示す個体は調べた限り存在しなかった。それに対し、*Trf2*^{GS7403/Y} では 27.3%、*Trf2*^{PL28} では 100% の個体に異常が認められた。RT-PCR の結果からは、*Trf2*^{GS7403} よりも、*Trf2*^{PL28} の方が一段と機能の低下した変異体であることが示唆されている。前部気門伸長異常の出現率からみた *Trf2*^{GS7403} と *Trf2*^{PL28} の表現型の相対的強度は、RT-PCR によって検出された転写物の減少の程度と矛盾せず、この点からも、*Trf2* の変異が前部気門の伸長異常の原因である事が支持される。注目すべきことに、*fru* 座を完全に失った欠失変異体もまた、前部気門の伸長異常を示す。そこで今回、両変異を組み合わせた（ただし *fru* 座は変異ヘテロ接合）*Trf2*^{GS7403/Y;;fru^{AJ96u3}/+ について前部気門の伸長異常の出現率を調べたところ、調べた 9 個体全てが正常であった。*fru* 変異体、*Trf2* 変異体ともに前部気門の伸長異常を示す事から、両変異を組み合わせた場合、表現型の出現率はそれぞれの変異を単独で持つ場合よりも増加するのではないかと予想されたが、結果は逆であった。しかし見方を変えれば、この結果は合理的である。少なくとも複眼においては、*Trf2*⁺ の強制発現は *fru*⁺ の作用を抑圧している。このことから類推すれば、*Trf2* の機能喪失型変異が前部気門の伸長異常を引き起こす時、*fru* の機能喪失変異はそれを抑圧するはずである。いずれにせよ複眼形態形成に続き、前部気門の伸長においても、*fru* と *Trf2* の相互作用が確認できた。異所強制発現という人為的な実験系である複眼とは異なり、前部気門形成において認められた *Trf2* と *fru* の相互作用は、内在性遺伝子産物の減少の結果であり、両遺伝子が正常発生の中で特異的な関係を有するとの仮説を強く支持するものである。}

5. *AbdB^{mcp-1}* 変異によって腹部第 4 節に生じるローレンス筋に対して *Trf2* 変異の及ぼす影響

野生型においては、ローレンス筋は雄の腹部第 5 節に形成される。これに対し、*AbdB^{mcp-1}* 変異を持つショウジョウバエでは、ある割合で腹部第 4 節にもロ

ローレンス筋が生じる。腹部第 4 節にローレンス筋を持つ個体の割合と、腹部第 4 節に生じたローレンス筋の平均の数を指標として、この形質に対する *Trf2* 変異の作用を検討した結果、*Trf2* 変異がこの筋肉の形成に対して顕著な抑制効果を持つことが明らかとなった。たとえばバランサーとして *FM7i-ActGFP* を持つ対照区のショウジョウバエでは 36.4%の個体が腹部第 4 節にローレンス筋を有していたが、*Trf2^{GS7403}*を持つ実験区の個体では、ローレンス筋を腹部第 4 節に有するものは皆無であった。こうして、前部気門の如き性差のない器官の形成ばかりでなく、腹部第 4 節のローレンス筋形成という性特異的機能においても、*Trf2* と *fru* が相互作用を示すことが明らかとなった。

しかし *Trf2* 変異は、単独では腹部第 5 節に存在する本来のローレンス筋の形成には何ら影響を与える事はなかった。これは、なぜであろうか。恐らく、*Trf2* はローレンス筋形成にあたって補助的機能を果たすのみであり、このプロセスに主導的役割を演じる転写因子、たとえば *fru* が十分量存在している時には、*Trf2* の減少の影響は顕在化しないのであろう。しかし、*AbdB^{mcp-1}* 変異体においては、*fru* の活性が閾値付近にあるため、*Trf2* のわずかな変化が、腹部第 4 節へのローレンス筋の異所的形成に大きな影響を及ぼしたと考えられる。

既述の通り、複眼ならびに前部気門の形成においては、*trf2* は *fru* の効果を抑圧し、一方ローレンス筋の形成においては *trf2* が *fru* の効果を増強することが本研究によって明らかとなった。*Trf2* の *fru* に対する作用がシステムによって逆向きに現れる理由は、2 つ考えられる。一つは、*trf2* や *fru* が関与する転写因子複合体が組織によってその組成を異にし、転写促進に関わる複合体と転写抑制に関わる複合体の二通りであるという可能性である。TBP を始め、多くの転写因子は異なる複数の複合体に寄与し、転写の調整を行うことが知られている (Davidson et al. 2004)。多くの転写因子は活性化能と抑制能の両面を持ち、*Trf2* や DREF も転写の活性化因子とも転写の抑制因子ともなることが報告されている (Moore et al. 1999, kwon et al. 2003)。またもう一つの可能性は、ターゲットとなる遺伝子の違いである。*fru* 遺伝子の下流に存在し複眼異常を引き起こす遺伝子と前部気門の反転を実行する遺伝子、ローレンス筋を形成する遺伝子が異なるのであれば、その転写メカニズムも異なるはずである。また、*Trf2* と *fru* の相互作用が複数の遺伝子 (またはその産物) を仲介して生じるのであれば、その仲介因子の性質如何で、最終的に起こる現象は抑圧、増強のいずれともなりうるであろう。

6. *fru*/*fru^{Aj96u3}* 変異体に生じる不完全なローレンス筋に対する *Trf2* 変異の影響

ここでは、腹部第 5 節に形成される本来のローレンス筋に対する *trf2* 変異の影響について考察する。*Trf2* 変異は、それ単独では第 5 節ローレンス筋に影響

を与えない。これは、ローレンス筋形成の閾値を大きく越える *fru* の遺伝子量が存在する為であると考えた。しかし、腹部第5節のローレンス筋の形成に異常の生ずる *fru¹fru^{Aj96u3}* 変異を用いてここに *trf2* 変異を導入すると、ローレンス筋の形成の異常が劇的に亢進した。この結果も、ローレンス筋の形成に関しては、*trf2* が *fru* と協調的に働くことを示すものである。*AbdB^{mcp-1}* 変異体の腹部第4節に形成される異所的ローレンス筋について観察された両者の相互作用と質的に同様の結果が、腹部第5節のローレンス筋についても得られたわけである。

7. Trf2 タンパク質と Fru タンパク質の複合体形成の可能性

Trf2 遺伝子と *fru* 遺伝子がショウジョウバエの様々な組織の形成過程で相互作用する可能性が、これまでの遺伝学的実験から示された。この遺伝的相互作用が、

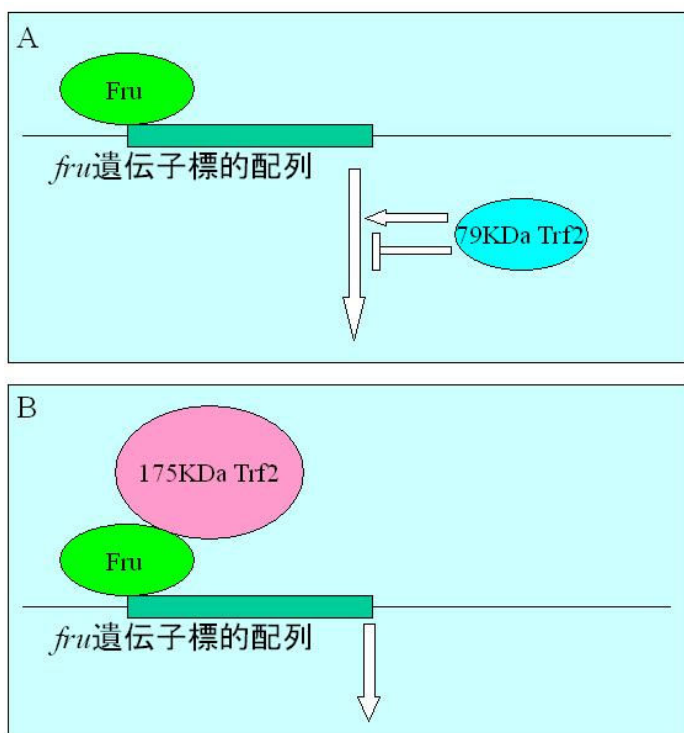


Fig.2-13 Trf2タンパク質の転写活性化メカニズムの仮説。Trf2とFruが直接結合しない場合、*fru*の転写産物以降に作用し、抑圧または促進の効果を発することが推定される (A)。Trf2とFruが直接結合する場合には、2つのタンパク質が結合して標的配列の転写制御に関係することが推定される (B)。

Trf2 タンパク質と Fru タンパク質との直接の結合、つまり複合体形成を反映したものなのか、それとも、*fru* 遺伝子のカスケードの下流に *Trf2* 遺伝子が存在し、この間接的な相互作用を反映しているのか、この点を調べる為、共免疫沈降法を行った。その結果は、二つのタンパク質の結合を証明するには至らなかった。この結果はしかし二つのタンパク質が生体内で複合体を作らず、間接的に作用する (Fig.2-13 A) ということをサポートするものとは必ずしもいえない。それは、両者がきわめて限定的な条件でのみ結合し、今回の実験条件ではそれを検出できていないかもしれないからである。Trf2 タンパク質と Fru タンパク質が直接結合する以下のモデルを考えた

(Fig.2-13 B)。Trf2 タンパク質として従来知られていたのは 79KDa のタン

パク質であるが、2006年になってこれとは異なる175KDaのアイソフォームが存在する事が報告された (Kopytova et al. 2006)。Fruに対する抑圧効果を観察した複眼を用いた実験では、79KDaのタンパク質を生成するcDNAを用いている。したがって、79KdaのTrf2タンパク質がFruと相互作用することは確認済みといえる。しかし、新たに発見された175KDaタンパク質がFruタンパク質と相互作用を示すか否かは不明である。あるいは、79KDaタンパク質には含まれず、175KDaタンパク質に含まれる未知のドメインがFruタンパク質との直接の結合に関与しているのかもしれない。

総合考察

本研究により、脳の性決定遺伝子 *fruitless* の機能修飾因子として複眼形態を指標としたスクリーニングにより *Trf2* が分離された。また、遺伝学的相互作用の実験により、*Trf2* は複眼及び前部気門の反転においては、*fru* の機能を抑圧し、ローレンス筋の形成においては逆に増強する事が判明した。*Fru* 遺伝子にはプロモーターが4つ以上あり、そのうちの一つだけが性特異的機能に関連した転写物を生み出す。その他のプロモーターによって生み出される転写物は両性に共通であり、後者の機能が失われると蛹後期にほぼ致死となる。ごくわずかに成虫が生ずるが、それらは著しい外部形態の異常を伴う。このように、*fru* 遺伝子には「性分化」に関わる機能と「(雌雄共通の) 生存」に関わる機能がある。本研究では明らかにするには至らなかったが、*fru* 遺伝子から生ずる isoform の種類に応じて、*Trf2* が異なる様式で相互作用を持ち、例えば性分化に関しては抑圧的に働き、生存に関しては増強的に働く可能性も考えられる。

Trf2 が *fru* と共同で性特異的機能を担うことが今回初めて明らかとなったが、その正確な作用点、作用様式は不明なまま残されている。最近、木村、山元らによりショウジョウバエの脳内に *Fru* を発現する性的二型ニューロンが同定された (Kimura et al. 2005)。*Trf2* がローレンス筋支配運動ニューロンに加えて、こうした脳内の性的二型ニューロンにおいても *Fru* の機能を支持しているか否か、興味を持たれる。一方、*Fru* の作用機構についてはほとんど不明であり、その解決のためには、下流遺伝子の探索が必須である。伊藤ら (私信) による最近の実験により、*Fru* タンパク質がクロマチン構造の修飾を通じて転写を制御し、中枢神経系の性分化を実現する可能性が示唆されている。また、Kopytova (2006) らの研究により、*Trf2* 遺伝子がクロマチンの構造維持、クロマチン濃縮に深く関与する事が強く示唆されている。これらの実験結果を考えると、*Fru* と *Trf2* にはクロマチン構造の修飾という共通要素があり、*Trf2* タンパク質と相互作用するクロマチン因子の結合配列の標的配列に注目するといったジェノミクス的アプローチが下流遺伝子の探索に有用であると考えられる。

今回の実験において、特定の条件でローレンス筋形成の成否に *Trf2* は非常に顕著な影響を与えた。しかし、ニューロンレベルへと掘り下げて研究するには至らなかった。本研究の最終的な目的は、ニューロン回路の性差形成の分子機構解明であり、さらにその延長線上には心の理解という未踏の分野が広がっている。果たして心を定義する遺伝子は存在するのか、心を形成するのは「氏か育ちか」。現在、これらの質問に対する科学的な解答は存在しない。キイロショウジョウバエの行動の遺伝子 *fruitless* を研究する事は、また、その修飾因子である *Trf2* を研究する事は、その疑問に答えるための第一歩として有効なアプローチであると考えられる。

謝辞

本稿を終えるにあたり、常に適切なご指導、ご助言を賜りました東北大学山元大輔教授に甚大なる謝意を表します。また、本研究の肝とも言うべき **Gene Search** 系統を提供頂きました首都大学東京の相垣敏郎教授および、その使用方法に適切にアドバイスして下さいました松尾隆嗣助手に厚く感謝いたします。更に本研究の遂行にあたり有益なるご助言を数々頂きました京都工芸繊維大学の従二直人博士に深く感謝いたします。また、ショウジョウバエの複眼の電子顕微鏡写真を撮影頂きました三菱化学生命科学研究所近藤俊三氏に御礼申し上げます。多くの助力を賜りました早稲田大学山元研究室の元メンバー及び東北大学山元研究室の諸氏に心より感謝致します。特に伊藤弘樹博士、館野実博士には、研究の方向性を左右するすどい助言を多々頂き、深く感謝いたします。また主査をお引き受けくださいました早稲田大学木村一郎教授、副査をお引き受けくださいました柴田重信教授のご指導に感謝いたします。最後に、このようなすばらしい研究生生活を長期にわたって送るにあたり、スネをかじり続けさせてくれた両親に心より厚く感謝の意を表します。

引用文献

Addison WR, Brook WJ, Querengesser LD, Tiong SYK. and Russell MA. Analysis of an enhancer trap expressed in regenerating *Drosophila* imaginal discs. *Genome* **38**, 724-736. (1995)

An W, Cho S, Ishii H and Wensink PC. Sex-specific and non-sex-specific oligomerization domains in both of the *doublesex* transcription factors from *Drosophila melanogaster*. *Mol. Cell Biol.* **16**, 3106-3111. (1996)

Anand A, Vilella A, Ryner LC, Carlo T, Goodwin SF, Song HJ, Gailey DA, Morales A, Hall JC, Baker BS and Taylor BJ. Molecular genetic dissection of the sex-specific and vital functions of the *Drosophila melanogaster* sex determination gene *fruitless*. *Genetics* **158**, 1569-1595.(2001)

Asha H, de Rooter ND, Wang MG and Hariharan IK. The *Rap1* GTPase functions as a regulator of morphogenesis in vivo. *EMBO J.*, **18** 605-615. (1999)

Ashburner M, Misra S, Roote J, Lewis SE, Blazej R, Davis T, Doyle C, Galle

R, George R, Harris N, Hartzell G, Harvey D, Hong L, Houston K, Hoskins R, Johnson G, Martin C, Moshrefi A, Palazzolo M, Reese MG, Spradling A, Tsang G, Wan K, Whitelaw K, Kimmel B, Celniker S and Rubin GM. An exploration of the sequence of a 2.9-Mb region of the genome of *Drosophila melanogaster*. *Genetics* **153**, 179-219. (1999)

Baba K, Takeshita A, Majima K, Ueda R, Kondo S, Juni N and Yamamoto D. The *Drosophila Bruton's tyrosine kinase (BTK)* homolog is required for adult survival and male genital formation. *Mol. Cell Biol.* **19**, 4405-4413. (1999)

Bai J, Chiu W, Wang J, Tzeng T, Perrimon N and Hsu J. The cell adhesion molecule Echinoid defines a new pathway that antagonizes the *Drosophila EGF* receptor signaling pathway. *Development* **128**, 591-601. (2001)

Baker BS, Taylor BJ and Hall JC. Are complex behaviors specified by dedicated regulatory genes? Reasoning from *Drosophila*. *Cell* **105**, 13-24. (2001)

Bashaw GJ and Baker BS. The regulation of the *Drosophila msl-2* gene reveals a function for *sex-lethal* in translational control. *Cell* **89**, 789-798. (1997)

Bartfai RC, Balduf C, Hilton T, Rathmann Y, Hadzhiev Y, Tora L, Orban L, Muller F. 2004 TBP2, a vertebrate-specific member of the TBP family, is required in embryonic development of zebrafish. *Curr Biol* **14**, 593–598. (2004)

BDGP Project Members, Berkeley *Drosophila* Genome Project. (2000)

Bell LR, Maine EM, Schedl P and Cline TW. *sex-lethal*, a *Drosophila* sex determination switch gene, exhibits sex-specific RNA splicing and sequence similarity to RNA binding proteins. *Cell* **55**, 1037-1046. (1988)

Belote JM and Baker BS. Sex determination in *Drosophila melanogaster*: analysis of *transformer-2*, a sex-transforming locus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **79**, 1568-1572. (1982)

Bender M, Imam FB, Talbot WS, Ganetzky B, Hogness DS. *Drosophila* ecdysone receptor mutations reveal functional differences among receptor isoforms. *Cell* **91**, 777–788. (1997)

Berk AJ. TBP-like factors come into focus. *Cell* **103**, 5–8. (2000)

Bopp D, Calhoun G, Horabin JI, Samuels M and Schedl P. Sex-specific control of *Sex-lethal* is a conserved mechanism for sex determination in the genus *Drosophila*. *Development* **122**, 971-982. (1996)

Bourbon HM, Gonzy-Treboul G, Peronnet F, Alin MF, Ardourel C, Benassayag C, Cribbs D, Deutsch J, Ferrer P, Haenlin M, Lepasant JA, Noselli S, Vincent A. A P-insertion screen identifying novel X-linked essential genes in *Drosophila*. *Mech Dev* **110**, 71–83. (2002)

Brand AH and Perrimon N. Targeted gene expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes. *Development* **118**, 401-415. (1993)

Burnet B and Connolly K. The visual component in the courtship of *Drosophila melanogaster*. *Experientia* **29**, 488-489. (1973)

Butler B, Pirrotta V, Irminger-Finger I and Nothiger R. The sex-determining gene *tra* of *Drosophila*: molecular cloning and transformation studies. *EMBO J.* **5**, 3607-3613. (1986)

Charlesworth B. The evolution of chromosomal sex determination and dosage compensation. *Curr. Biol.* **6**, 149-162. (1996)

Chen F, Barkett M, Ram KT, Quintanilla A and Hariharan IK. Biological characterization of *Drosophila Rapgap1*, a GTPase activating protein for *rap1*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**, 12485-12490. (1997)

Chen W, Zollman S, Couderc JL and Laski FA. The BTB domain of *bric a brac* mediates dimerization in vitro. *Molec. Cell Biol.* **15**, 3424-3429. (1995)

Chong JA, Moran MM, Teichmann M, Kaczmarek JS, Roeder R, Clapham DE. TATA-binding protein (TBP)-like factor (TLF) is a functional regulator of transcription: reciprocal regulation of the *neurofibromatosis type 1* and *c-fos* genes by TLF/TRF2 and TBP. *Mol Cell Biol* **25**, 2632–2643. (2005)

Crowley TE, Hoey T, Liu J-K, Jan YN, Jan LY, Tjian R. A new factor related to TATA-binding protein has highly restricted expression patterns in *Drosophila*. *Nature* **361**, 557–561. (1993)

Dantonel JC, Quintin S, Lakatos L, Labouesse M, Tora I. TBP-like factor is required for embryonic RNA polymerase II transcription in *C. elegans*. *Mol Cell* **6**, 715–722. (2000)

Davidson I, Martianov I, Viville S. TBP, a universal transcription factor? *Med Sci (Paris)*. **20**, 575-9. Review. (2004)

Du C, McGuffin ME, Dauwalder B, Rabinow L and Mattox W. Protein phosphorylation plays an essential role in the regulation of alternative splicing and sex determination in *Drosophila*. *Mol. Cell* **2**, 741-750. (1998)

Dunn KA, Bielawski JP and Yang Z. Substitution rates in *Drosophila* nuclear genes. Implications for translational selection. *Genetics* **157**, 295-305. (2001)

Ellis MC, O'Neill EM and Rubin GM. Expression of *Drosophila glass* protein and evidence for negative regulation of its activity in non-neuronal cells by another DNA-binding protein. *Development* **119**, 855-865 (1993)

Fairall L, Harrison SD, Travers AA and Rhodes D. Sequence-specific DNA binding by a two zinc-finger peptide from the *Drosophila melanogaster* *Tramtrack* protein. *J. molec. Biol.* **226**, 349-366. (1992)

Ferveur JF, Stortkuhl KF, Stocker RF and Greenspan RJ. Genetic feminization of brain structures and changed sexual orientation in male *Drosophila*. *Science* **267**, 902-905. (1995)

- Ferveur JF and Greenspan RJ. Courtship behavior of brain mosaics in *Drosophila*. *J. Neurogenet.* **12**, 205-26. (1998)
- Finley KD, Taylor BJ, Milstein M and McKeown M. dissatisfaction, a gene involved in sex-specific behavior and neural development of *Drosophila melanogaster*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **94**, 913-918. (1997)
- Finley KD, Edeen PT, Foss M, Gross E, Ghbeish N, Palmer RH, Taylor BJ and McKeown M. Dissatisfaction encodes a *tailless*-like nuclear receptor expressed in a subset of CNS neurons controlling *Drosophila* sexual behavior. *Neuron* **21**, 1363-1374.(1998)
- Fletcher JC, Burtis KC, Hogness DS, Thummel CS. The *Drosophila E74* gene is required for metamorphosis and plays a role in the polytene chromosome puffing response to ecdysone. *Development* **121**, 1455–1465.(1995)
- FlyBase, FlyBase curation. (1992)
- FlyBase available from <http://flybase.bio.indiana.edu/.bin/fbpcq.html?FBrf0131225>. (2000)
- Freeman M. Reiterative use of the EGF receptor triggers differentiation of all cell types in the *Drosophila* eye. *Cell* **87**, 651-660. (1996)
- Gailey DA and Hall JC. Behavior and cytogenetics of *fruitless* in *Drosophila melanogaster*: different courtship defects caused by separate, closely linked lesions. *Genetics* **121**, 773-785.(1989)
- Gailey DA, Taylor BJ and Hall JC. Elements of the *fruitless* locus regulate development of the muscle of Lawrence, a male-specific structure in the abdomen of *Drosophila melanogaster* adults. *Development* **113**, 879-890. (1991)
- Gatti M and Baker BS. Genes controlling essential cell-cycle functions in *Drosophila melanogaster*. *Genes Dev.* **3**, 438-453. (1989)

Ghiglione C, Carraway KL 3rd, Amundadottir LT, Boswell RE, Perrimon N and Duffy JB. The transmembrane molecule *kekkon 1* acts in a feedback loop to negatively regulate the activity of the *Drosophila* EGF receptor during oogenesis. *Cell* **96**, 847-856. (1999)

Gong F. Annotations performed at the Celera Jamboree. (1999)

Goodwin SF. Molecular neurogenetics of sexual differentiation and behaviour. *Curr. Opin. Neurobiol.* **9**, 759-765.(1999)

Goodwin SF, Taylor BJ, Vilella A, Foss M, Ryner LC, Baker BS and Hall JC. Aberrant splicing and altered spatial expression patterns in *fruitless* mutants *Drosophila melanogaster*. *Genetics* **154**, 725-745. (2000)

Greenspan RJ. Understanding the genetic construction of behavior. *Sci. Am.* **272**, 72-78. (1995)

Greenspan RJ and Ferveur JF. Courtship in *Drosophila*. *Annu. Rev. Genet.* **34**, 205-232. (2000)

Hall JC. The mating of a fly. *Science* **264**, 1702-1714. (1994)

Hamer DH, Hu S, Magnuson VL, Hu N and Pattatucci AM. A linkage between DNA markers on the X chromosome and male sexual orientation. *Science.* **261**, 321-327. (1993)

Hariharan IK, Carthew RW and Rubin GM. The *Drosophila* roughened mutation: activation of a *rap* homolog disrupts eye development and interferes with cell determination. *Cell* **67**, 717-722. (1991)

Heinrichs V, Ryner LC and Baker BS. Regulation of sex-specific selection of *fruitless* 5' splice sites by *transformer-2*. *Mol. Cell. Biol.* **18**, 450-458. (1998)

Hernandez N. TBP, a universal eukaryotic transcription factor? *Genes Dev* **7**, 1291-1308. (1993)

Hochheimer A, Zhou S, Zheng S, Holmes MC, Tjian R. TRF2 associates with DREF and directs promoter-selective gene expression in *Drosophila*. *Nature* **420**, 439–445. (2002)

Ichida K, Matsumura T, Sakuma R, Hosoya T and Nishino T. Mutation of human molybdenum cofactor sulfurase gene is responsible for classical xanthinuria type II. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **282**, 1194-1200. (2001)

Ito H, Fujitani K, Usui K, Shimizu-Nishikawa K, Tanaka S and Yamamoto D. Sexual orientation in *Drosophila* is altered by the *satori* mutation in the sex determination gene *fruitless* that encodes a zinc finger protein with a BTB domain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**, 9687-9692. (1996)

Jackson GR, Salecker I, Dong X, Yao X, Arnheim N, Faber PW, MacDonald ME and Zipursky SL. Polyglutamine-expanded human *huntingtin* transgenes induce degeneration of *Drosophila* photoreceptor neurons. *Neuron* **21**, 633-642. (1998)

Jacobs GH. Determination of the base recognition positions of zinc fingers from sequence analysis. *EMBO J.* **11**, 4507-4517. (1992)

Kaltenbach L, Horner LMA, Rothman JH, Mango SE. The TBP-like factor CeTLF is required to activate RNA polymerase II transcription during *C. elegans* embryogenesis. *Mol Cell* **6**, 705–713.(2000)

Karim FD, Chang HC, Therrien M, Wassarman DA, Laverty T, Rubin GM. A screen for genes that function downstream of *Ras1* during *Drosophila* eye development. *Genetics* **143**, 315-329. (1996)

Kazemi-Esfarjani P and Benzer S. Genetic suppression of polyglutamine toxicity in *Drosophila*. *Science* **287**, 1837-1840. (2000)

Kelley RL, Wang J, Bell L and Kuroda MI. *Sex lethal* controls dosage compensation in *Drosophila* by a non-splicing mechanism. *Nature* **387**, 195-199. (1997)

Kim TW and Tanzi RE. Neuronal intranuclear inclusions in polyglutamine diseases: nuclear weapons or nuclear fallout? *Neuron* **21**, 657-659. (1998)

Kimura K, Ote M, Tazawa T, Yamamoto D. Fruitless specifies sexually dimorphic neural circuitry in the *Drosophila* brain. *Nature*. **438**, 229-33. (2005)

Kopytova DV, Krasnov AN, Kopantceva MR, Nabirochkina EN, Nikolenko JV, Maksimenko O, Kurshakova MM, Lebedeva LA, Yerokhin MM, Simonova OB, Korochkin LI, Tora L, Georgiev PG, Georgieva SG. Two isoforms of *Drosophila* TRF2 are involved in embryonic development, premeiotic chromatin condensation, and proper differentiation of germ cells of both sexes. *Mol Cell Biol*. **26**, 7492-505. (2006)

Kraut R, Menon K and Zinn K. A gain-of-function screen for genes controlling motor axon guidance and synaptogenesis in *Drosophila*. *Curr. Biol*. **11**, 417-430. (2001)

Kwon E, Seto H, Hirose F, Ohshima N, Takahashi Y, Nishida Y, Yamaguchi M. Transcription control of a gene for *Drosophila* transcription factor, DREF by DRE and cis-elements conserved between *Drosophila melanogaster* and *virilis*. *Gene* **309**, 101-16. (2003)

Lai ZC and Li Y. *Tramtrack69* is positively and autonomously required for *Drosophila* photoreceptor development. *Genetics*. **152**, 299-305. (1999)

Lawrence PA and Johnston P. The genetic specification of pattern in a *Drosophila* muscle. *Cell* **36**, 775-782. (1984)

Lawrence PA and Johnston P. The muscle pattern of a segment of *Drosophila* may be determined by neurons and not by contributing myoblasts. *Cell* **45**, 505-513. (1986)

Lee G, Foss M, Goodwin SF, Carlo T, Taylor BJ and Hall JC. Spatial, temporal, and sexually dimorphic expression patterns of the fruitless gene in

- the *Drosophila* central nervous system. *J. Neurobiol.* **43**, 404-26. (2000)
- Lee G and Hall JC. A newly uncovered phenotype associated with the *fruitless* gene of *Drosophila melanogaster*: Aggression-like head interactions between mutant males. *Behavior Genet.* **30**, 263-275. (2000)
- Lee G, Vilella A, Taylor BJ and Hall JC. New reproductive anomalies in *fruitless*-mutant *Drosophila* males: extreme lengthening of mating durations and infertility correlated with defective serotonergic innervation of reproductive organs. *J. Neurobiol.* **47**, 121-149. (2001)
- Lee G and Hall JC. Abnormalities of male-specific FRU protein and serotonin expression in the CNS of *fruitless* mutants in *Drosophila*. *J. Neurosci.* **21**, 513-526. (2001)
- Lukacsovich T, Asztalos Z, Awano W, Baba K, Kondo S, Niwa S and Yamamoto D. Dual-tagging gene trap of novel genes in *Drosophila melanogaster*. *Genetics.* **157**, 727-742.(2001)
- Marin I and Baker BS. The evolutionary dynamics of sex determination. *Science* **281**, 1990-1994. (1998)
- Martianov I, Fimia IGM, Dierich A, Parvinen M, Sassone-Corti P, Davidson I. Late arrest of spermiogenesis and germ cell apoptosis in mice lacking the *TBP-like TLF/TRF2* gene. *Mol Cell* **7**, 509–515. (2001)
- Matsuzaki F, Koizumi K, Hama C, Yoshioka T and Nabeshima Y. Cloning of the *Drosophila prospero* gene and its expression in ganglion mother cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **182**, 1326-1332. (1992)
- McDowell TL, Gibbons RJ, Sutherland H, O'Rourke DM, Bickmore WA, Pombo A, Turley H, Gatter K, Picketts DJ, Buckle VJ, Chapman L, Rhodes D and Higgs DR. Localization of a putative transcriptional regulator (ATRX) at pericentromeric heterochromatin and the short arms of acrocentric chromosomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **96**, 13983-13988. (1999)

McRobert SP and Tompkins L. The effect of *transformer*, *doublesex* and *intersex* mutations on the sexual behavior of *Drosophila melanogaster*. *Genetics*. **111**, 89-96. (1985)

Merendino L, Guth S, Bilbao D, Martinez C and Valcarcel J. Inhibition of *msl-2* splicing by *sex-lethal* reveals interaction between U2AF35 and the 3'splice site AG. *Nature* **402**, 838-841. (1999)

Michaut L, Flister S, Neeb M, White KP, Certa U, Gehring WJ. Analysis of the eye developmental pathway in *Drosophila* using DNA microarrays. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **100**, 4024-9. (2003)

Milshina N. Annotations performed at the Celera Jamboree. (1999)

Mitashov VI, Koussulakos S. Molecular mechanisms of development and differentiation of eye structures in *Drosophila* and vertebrates *Ontogenez*. **32**, 14-28. Review. (2001)

Moore PA, Ozer J, Salunek M, Jan G, Zerby D, Campbell S, Lieberman PM. A human TATA binding protein-related protein with altered DNA binding specificity inhibits transcription from multiple promoters and activators. *Mol Cell Biol* **19**, 7610–7620. (1999)

Morales A, Hall JC, Baker BS, Taylor BJ. Molecular genetic dissection of the sex-specific and vital functions of the *Drosophila melanogaster* sex determination gene *fruitless*. *Genetics* **158**, 1569–1595. (2001)

Moriyama EN and Powell JR. Codon usage bias and tRNA abundance in *Drosophila*. *J. Mol. Evol.* **45**, 514-523. (1997)

Moses K and Rubin GM. *Glass* encodes a site-specific DNA-binding protein that is regulated in response to positional signals in the developing *Drosophila* eye. *Genes Dev.* **5**, 589-593. (1991)

Muller F, Lakatos FL, Dantonel J, Strahle U, Tora L. TBP is not universally required for zygotic RNA polymerase II transcription in *zebrafish*. *Curr Biol*

11, 282–287. (2001)

Musacchio M and Perrimon N. The *Drosophila kekkon* genes: Novel members of both the leucine-rich repeat and immunoglobulin superfamilies expressed in the CNS. *Dev. Biol.* **178**, 63-76. (1996)

Nakadai T, Shimada M, Shima D, Handa H, Tamura TA. Specific interaction with transcription factor IIA and localization of the mammalian TATA-binding protein-like protein (TLP/TRF2/TLF). *J Biol Chem* **279**, 7447–7455. (2004)

Nakano Y, Fujitani K, Kurihara J, Ragan J, Usui-Aoki K, Shimoda L, Lukacsovich T, Suzuki K, Sezaki M, Sano Y, Ueda R, Awano W, Kaneda M, Umeda M and Yamamoto D. Mutations in the novel membrane protein *spinster* interfere with programmed cell death and cause neural degeneration in *Drosophila melanogaster*. *Mol. Cell Biol.* **21**, 3775-3788. (1997)

Neufeld TP and Rubin GM. The *Drosophila peanut* gene is required for cytokinesis and encodes a protein similar to yeast putative bud neck filament proteins. *Cell* **77**, 371-379. (1994)

de Nooij JC, Letendre MA and Hariharan IK. A cyclin-dependent kinase inhibitor, *dacapo*, is necessary for timely exit from the cell cycle during *Drosophila* embryogenesis. *Cell* **87**, 1237-1247. (1996)

Okamura-Oho Y, Miyashita T, Ohmi K and Yamada M. Dentatorubral-pallidoluysian atrophy protein interacts through a proline-rich region near polyglutamine with the SH3 domain of an insulin receptor tyrosine kinase substrate. *Hum. Mol. Genet.* **8**, 947-957. (1999)

Parkes TL, Elia AJ, Dickinson D, Hilliker AJ, Phillips JP and Boulianne GL. *Drosophila* lifespan by overexpression of human *SOD1* in motorneurons. *Nature Genet.* **19**, 171-174. (1998)

Pavletich NP and Pabo CO. Zinc finger-DNA recognition: crystal structure of

a Zif268-DNA complex at 2.1 Å. *Science* **10**, 809-817. (1991)

Perez SE and Steller H. Molecular and genetic analyses of *lama*, an evolutionarily conserved gene expressed in the precursors of the *Drosophila* first optic ganglion. *Mech. Dev.* **59**, 11-27. (1996)

Persengiev SP, Zhu X, Dixit BL, Maston GA, Kittler ELW, Green MR. TRF3, a TATA-box-binding protein-related factor, is vertebrate-specific and widely expressed. *Proc Natl Acad Sci USA* **100**, 14887–14891. (2003)

Rabenstein MD, Zhou S, Lis JT, Tjian R. TATA box-binding protein (TBP)-related factor 2 (TRF2), a third member of the TBP family. *Proc Natl Acad Sci USA* **96**, 4791–4796. (1999)

Rendahl KG and Hall JC. Temporally manipulated rescue of visual and courtship abnormalities caused by a *nonA* mutation in *Drosophila*. *J. Neurogenet.* **10**, 247-256. (1996)

Rendahl KG, Gaukhshteyn N, Wheeler DA, Fry TA and Hall JC. Defects in courtship and vision caused by amino acid substitutions in a putative RNA-binding protein encoded by the *no-on-transient A* (*nonA*) gene of *Drosophila*. *J. Neurosci.* **16**, 1511-1522. (1996)

Riddiford LM. Hormones and *Drosophila* development. In: Bate M, Martinez-Arias A, editors. *The development of Drosophila melanogaster*. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press. 899–940. (1993)

Roeder RG. The role of general initiation factors in transcription by RNA polymerase II. *Trends Biochem Sci* **21**, 327–335. (1996)

Rubin GM. The *Drosophila* genome project: a progress report. *Trends Genet.* **14**, 340-343. (1998)

Rubin GM, Yandell MD, Wortman JR, Gabor Miklos GL, Nelson CR, Hariharan IK, Fortini ME, Li PW, Apweiler R, Fleischmann W, Cherry JM,

Henikoff S, Skupski MP, Misra S, Ashburner M, Birney E, Boguski MS, Brody T, Brokstein P, Celniker SE, Chervitz SA, Coates D, Cravchik A, Gabrielian A, Galle RF, Gelbart WM, George RA, Goldstein LS, Gong F, Guan P, Harris NL, Hay BA, Hoskins RA, Li J, Li Z, Hynes RO, Jones SJ, Kuehl PM, Lemaitre B, Littleton JT, Morrison DK, Mungall C, O'Farrell PH, Pickeral OK, Shue C, Voshall LB, Zhang J, Zhao Q, Zheng XH, Lewis S. Comparative genomics of the eukaryotes. *Science*. **287**, 2204-15. (2000)

Ryner LC, Goodwin SF, Castrillon DH, Anand A, Vilella A, Baker BS, Hall JC, Taylor BJ and Wasserman SA. Control of male sexual behavior and sexual orientation in *Drosophila* by the *fruitless* gene. *Cell* **87**, 1079-1089. (1996)

Seong KH, Ogashiwa T, Matsuo T, Fuyama Y and Aigaki T. Application of the gene search system to screen for longevity genes in *Drosophila*. *Biogerontology* **2**, 209-217. (2001)

Shima S, Aigaki T, Nojima T, Yamamoto D. Identification of *trf2* mutants of *Drosophila* with defects in anterior spiracle eversion. *Arch Insect Biochem Physiol*. **64**, 157-63. (2007)

Taylor BJ. Differentiation of a male-specific muscle in *Drosophila melanogaster* does not require the sex-determining genes *doublesex* or *intersex*. *Genetics* **132**, 179-191. (1992)

Taylor BJ and Truman JW. Commitment of abdominal neuroblasts in *Drosophila* to a male or female fate is dependent on genes of the sex-determining hierarchy. *Development* **114**, 625-42. (1992)

Teichmann M, Wang Z, Martinez E, Tjernberg A, Zhang F, Vollmer F, Chait BT, Roeder RG. Human TATA-binding protein-related factor-2 (hTRF2) stably associates with hTFIIA in HeLa cells. *Proc Natl Acad Sci USA* **96**, 13720–13725. (1999)

Thomas BJ and Wasserman DA. A fly's eye view of biology. *Trends Genet*. **15**, 184-190. (1999)

Thummel CS, Pirrotta V. New pCaSpeR P element vectors. *Drosophila* Information Service **71**, 150. (1992)

Toba G, Ohsako T, Miyata N, Ohtsuka T, Seong KH and Aigaki T. The gene search system: A method for efficient detection and rapid molecular identification of genes in *Drosophila melanogaster*. *Genetics* **151**, 725-737. (1999)

Usui-Aoki K, Ito H, Ui-Tei K, Takahashi K, Lukacsovich T, Awano W, Nakata H, Piao ZF, Nilsson EE, Tomida J and Yamamoto D. Formation of the male-specific muscle in female *Drosophila* by ectopic *fruitless* expression. *Nature Cell Biol.* **2**, 500-506. (2000)

Veenstra GJ, Weeks DL, Wollfe AP. Distinct roles for TBP and TBP-like factor in early embryonic gene transcription in *Xenopus*. *Science* **290**, 2312–2315. (2000)

Villella A and Hall JC. Courtship anomalies caused by *doublesex* mutations in *Drosophila melanogaster*. *Genetics* **143**, 331-344. (1996)

Warrick JM, Paulson HL, Gray-Board GL, Bui QT, Fischbeck KH, Pittman RN and Bonini NM. Expanded polyglutamine protein forms nuclear inclusions and causes neural degeneration in *Drosophila*. *Cell* **93**, 939-949. (1998)

Warrick JM, Chan HY, Gray-Board GL, Chai Y, Paulson HL and Bonini NM. Suppression of polyglutamine-mediated neurodegeneration in *Drosophila* by the molecular chaperone HSP70. *Nat. Genet.* **23**, 425-428. (1999)

Waterbury JA, Jackson LL and Schedl P. Analysis of the *doublesex* female protein in *Drosophila melanogaster*. Role in sexual differentiation and behavior and dependence on *intersex*. *Genetics* **152**, 1653-1667. (1999)

Wen Y, Nguyen D, Li Y and Lai ZC. The N-terminal BTB/POZ domain and C-terminal sequences are essential for *Tramtrack69* to specify cell fate in the

developing *Drosophila* eye. *Genetics* **156**,195-203. (2000)

Yamamoto D and Jallon JM, Komatsu A. Genetic dissection of sexual behavior in *Drosophila melanogaster*. *Annu. Rev. Entomol.* **42**, 551-585. (1997)

Yamamoto D, Fujitani K, Usui K, Ito H and Nakano Y. From behavior to development: genes for sexual behavior define the neuronal sexual switch in *Drosophila*. *Mech. Dev.* **73**, 135-146. (1998)

Yamamoto D and Nakano Y. Genes for sexual behavior. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **246**, 1-6. (1998)

Yokokura T, Ueda R and Yamamoto D. Phenotypic and molecular characterization of *croaker*, a new mating behavior mutant of *Drosophila melanogaster*. *Jpn. J. Genet.* **70**, 103-117. (1995)

Zhang D, Penttila TL, Morris PL, Teichmann M, Roeder RG. Spermiogenesis deficiency in mice lacking the *Trf2* gene. *Science* **292**, 1153–1155. (2001)

Zollman S, Godt D, Prive GG, Couderc JL and Laski FA. The BTB domain, found primarily in zinc finger proteins, defines an evolutionarily conserved family that includes several developmentally regulated genes in *Drosophila*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **91**, 10717-10721. (1994)

Appendix Table1-1

fru⁺異所発現による異常複眼原基に対するGSの効果とその候補遺伝子

GS line No.	表現型	遺伝子	遺伝子の特徴	染色体上の位置
19	lethal	CG13681 CR32360	----- tRNA gene	66B4 66B4
20	enhance	CG8223 CG9801	----- -----	85A10 85A9-10
1003	suppress	CG5445 <i>Fim</i>	----- actin binding	16A1 15F8-16A1
1004	lethal	n.d. n.d.	----- -----	----- -----
1005	lethal	CG3777 <i>ewg</i>	----- transcription factor	1A1-5 1A1
1007	lethal	CG6789 CG32767	----- transcription regulator	4F1 4E2
1013	lethal	CG3600 CG3857	----- -----	2C1 2B16
1014	enhance	CG10648 <i>Moe</i>	----- actin binding	8B7 8B4-6
1016	lethal	<i>btd</i> <i>nej</i>	transcription factor transcription regulator	8F10 8F7-9
1018	lethal	<i>peb</i> CG12684	transcription factor -----	4C10 4C8
1020	enhance	H-element 99 <i>spri</i>	transposon Ras GTPase binding	9D3 9D2-3
1023	lethal	<i>jockey 80</i> <i>CHES-1-lik</i>	transposon transcription factor	7B6 7B6
1033	lethal	n.d. n.d.	----- -----	----- -----
1035	enhance	<i>ras</i> CG32676	IMP dehydrogenase -----	9E1-2 9E1-2
1038	enhance	<i>ras</i> CG32676	IMP dehydrogenase -----	9E1-2 9E1-2

to be continued

1051	enhance	<i>Mgstl</i> CG15449	glutathione transferase -----	19E7 19E7
1052	suppress	CG2694 CG2685	----- -----	3B3-4 3B3
1068	enhance	CG8509 <i>PGRP-LE</i>	tyrosine phosphatase activator peptidoglycan receptor	13F1 13F1
1077	lethal	n.d. n.d.	----- -----	----- -----
1078	lethal	<i>btd</i> <i>nej</i>	transcription factor transcription regulator	8F10 8F7-9
1082	lethal	<i>rab3-GEF</i> CG15027	rab guanyl-nucleotide exchange factor -----	13A11-12 13A10
1084	enhance	<i>Tre</i> <i>Trel</i>	taste receptor taste receptor	5A12 5A11-12
1091	lethal	<i>Appl</i> <i>elav</i>	receptor mRNA binding	1B9-10 1B7-8
1102	lethal	n.d. n.d.	----- -----	----- -----
1107	suppress	n.d. n.d.	----- -----	----- -----
1108	suppress	<i>Trf2</i> CG32711	transcription factor -----	7E7-9 7E6-7
1120	suppress	CG32529 CG15618	DNA binding -----	18F4-19A2 18F4
1129	lethal	CG3002 CG32699	protein transporter acyltransferase	8F1 8E10
1135	enhance	<i>hang</i> <i>Anxb11</i>	nucleic acid binding actin binding	14C4 14C4
1136	lethal	CG3600 Stalker2	----- transposon	2C1 2B17
1138	lethal	<i>jockey 80</i> <i>CHES-1-lik</i>	transposon transcription factor	7B6 7B6

to be continued

1139	suppress	<i>Trf2</i> CG32711	transcription factor -----	7E7-9 7E7-9
1144	enhance	<i>ovo</i> <i>roo58</i>	transcription factor transposon	4E2 4E1
1150	lethal	CG32663 <i>Hsc70-3</i>	----- ATPase	10E6-F1 10E3-4
1155	lethal	CG10648 <i>Moe</i>	----- actin binding	8B7 8B4-6
1156	lethal	<i>ovo</i> <i>roo58</i>	transcription factor transposon	4E2 4E1
1157	enhance	<i>Act5c</i> CG3016	Structural constituent of cytoskeleton ubiquitin-specific protease	5C7 5C5-6
1159	lethal	n.d. n.d.	----- -----	----- -----
1162	lethal	n.d. n.d.	----- -----	----- -----
1163	enhance	<i>ovo</i> <i>roo58</i>	transcription factor transposon	4E2 4E1
1164	lethal	<i>ovo</i> <i>roo58</i>	transcription factor transposon	4E2 4E1
1165	enhance	n.d. n.d.	----- -----	----- -----
1166	enhance	CG32529 CG15618	----- -----	18F4-19A2 18F4
1167	lethal	n.d. n.d.	----- -----	----- -----
1172	lethal	<i>btd</i> <i>nej</i>	transcription factor transcription regulator	8F10 8F7-9
1175	lethal	CG15210 <i>sesB</i>	----- ATP-ADP antiporter	9F4 9E10-F1
1179	lethal	n.d. n.d.	----- -----	----- -----

to be continued

1183	lethal	<i>sgg</i> CG13762	serine threonine kinase calcium channel	3A8-B2 3A8
1185	lethal	CG6789 CG32767	----- transcription regulator	4F1 4E2
1186	suppress	CG6540 <i>l (1) G0003</i>	----- -----	17C7 17C6-7
1187	suppress	n.d. n.d.	----- -----	----- -----
1188	lethal	<i>btd</i> <i>nej</i>	transcription factor transcription regulator	8F10 8F7-9
1193	suppress	CG13758 CG12497	G-protein coupled receptor -----	3A4-6 3A4
1197	lethal	CG15210 <i>Imp</i>	----- mRNA binding	9F4 9F2-4
1199	enhance	<i>Tre</i> <i>Trel</i>	taste receptor taste receptor	5A12 5A11-12
1203	enhance	CG8924 <i>Ranbp16</i>	transcription regulator protein transporter	14A1 14A1
1205	lethal	<i>Pfrx</i> CG12204	6-phosphofructo-2-kinase -----	18C8 18C7-8
2003	enhance	n.d. n.d.	----- -----	----- -----
2010	enhance	CG11107 <i>costa</i>	ATP-dependent RNA helicase Microtubule binding	43B2 43B1-2
2011	lethal	<i>HmgD</i> CG30403	DNA bending DNA binding	57F10 57F10
2022	enhance	CG14030 <i>Bsg25D</i>	serine threonine kinase -----	25D3 25D2-3
2024	enhance	<i>grp</i> <i>trpgamma</i>	serine threonine kinase calcium channel	36A10 36A9-10
2032	enhance	1 (2) k01209 <i>cnk</i>	uridine kinase enzyme binding	54B11-13 54B9-11

to be continued

2036	lethal	CG13148 CG8776	----- carbon-monoxide oxygenase	49C2 49C1-3
2042	lethal	<i>HmgD</i> CG30403	DNA bending DNA binding	57F10 57F10
2048	enhance	<i>Liprin-alpha</i> <i>homer</i>	receptor binding receptor binding	27A1 27A1
2049	lethal	<i>psq</i> <i>lola</i>	transcription factor RNA polymeraseII transcription factor	47A13-B1 47A11-13
2050	lethal	<i>mio</i> CG33124	unfolded protein binding transporter	22D4 22D4
2052	enhance	<i>psq</i> <i>lola</i>	transcription factor RNA polymeraseII transcription factor	47A13-B1 47A11-13
2077	lethal	<i>esg</i> <i>nht</i>	RNA polymeraseII transcription factor general RNA pol II transcription factor	35D2 35D1
2089	enhance	<i>mir-275</i> CG5181	----- -----	27F5 27F5
2090	enhance	CG9455 <i>coro</i>	serine-type endopeptidase inhibitor actin binding	42D6 42D6
2093	enhance	<i>snRNA:UI:95Cc</i> CG33111	----- -----	95C1 95B7-C1
2094	enhance	<i>mir-278</i> <i>Flo</i>	----- receptor binding	52B3 52A13
2110	lethal	<i>Akap200</i> CG13398	protein kinase A binding -----	29C3-4 29C3
2111	enhance	<i>mir-275</i> CG5181	----- -----	27F5 27F5
2112	enhance	<i>chn</i> CG33467	transcription factor -----	51E2 51D9
2113	lethal	n.d. n.d.	----- -----	----- -----
2115	lethal	CG30152 CG9025	----- receptor signaling protein	57A10 57A9

to be continued

2119	lethal	<i>psq</i> <i>lola</i>	transcription factor RNA polymeraseII transcription factor	47A13-B1 47A11-13
2120	suppress	<i>emb</i> <i>fy</i>	protein transporter -----	29C1-3 29C1
2123	enhance	CG8920 CG13868	----- -----	56F16 56F16
2126	lethal	CG5569 <i>TBPH</i>	----- transcription regulator	60A5 60A4-5
2129	enhance	<i>grp</i> CG31807	serine threonine kinase ubiquitin-protein ligase	36A10 36A10
2131	suppress	<i>NaCP60E</i> CG30425	voltage-gated calcium channel -----	60E5 60E5
2133	lethal	<i>grp</i> CG31807	serine threonine kinase ubiquitin-protein ligase	36A10 36A10
2137	lethal	<i>HmgD</i> CG30403	DNA bending DNA binding	57F10 57F10
2140	enhance	<i>Hrb27C</i> CG32829	single stranded DNA binding -----	27C4 27C4
2145	lethal	CG8370 <i>ATPCL</i>	----- ATP citrate synthase	52D11-12 52D9-11
2146	lethal	n.d. n.d.	----- -----	----- -----
2155	enhance	<i>lig</i> CG12769	----- nucleic acid binding	44A4 44A4
2157	lethal	<i>didum</i> <i>dpld</i>	calmodulin binding transcription regulator	43D3 43C7-D1
2158	lethal	<i>DLP</i> <i>Sec 61 alpha</i>	receptor signaling protein protein transporter	26D8-9 26D7-8
2162	enhance	CG17952 CG30404	receptor -----	57F10-11 57F10
2164	suppress	CG3838 <i>jp</i>	----- -----	30B11-12 30B10-11

to be continued

2168	lethal	<i>ken</i> <i>Thiolase</i>	transcription factor acetyl-CoAC-acyltransferase	60A6-7 60A5
2169	enhance	<i>psq</i> <i>lola</i>	transcription factor RNA polymeraseII transcription factor	47A13-B1 47A11-13
2175	lethal	<i>cg</i> <i>mRpS16</i>	transcription factor structural constituent of ribosome	50E1 50E1
2183	lethal	n.d. n.d.	----- -----	----- -----
2198	suppress	CG10543 CG3221	transcription regulator -----	57B5 57B5
2210	enhance	CG31704 <i>crol</i>	serine-type endopeptidase inhibitor RNA polymeraseII transcription factor	33A3 33A1-2
2215	lethal	CG7289 CG15356	----- -----	22B8 22B8
2216	suppress	<i>GH07269</i> <i>kek2</i>	----- serine threonine kinase	33A2 33A4-5
2224	enhance	n.d. n.d.	----- -----	----- -----
2225	suppress	n.d. n.d.	----- -----	----- -----
2227	suppress	n.d. n.d.	----- -----	----- -----
2229	lethal	n.d. n.d.	----- -----	----- -----
2230	enhance	<i>psq</i> <i>lola</i>	transcription factor RNA polymeraseII transcription factor	47A13-B1 47A11-13
2235	lethal	<i>Tsp42Ee</i> <i>Tsp42Ed</i>	----- -----	42E5 42E5
2237	enhance	n.d. n.d.	----- -----	----- -----
2238	lethal	<i>HmgD</i> CG30403	DNA bending DNA binding	57F10 57F10

to be continued

2240	enhance	CG2064 <i>Gr43b</i>	oxidoreductase NOT taste receptor	43E9 43E8
2241	lethal	<i>mir-8S</i> CG15615	----- -----	53D11 53D9
2242	lethal	<i>Dcp-1</i> <i>pita</i>	caspase transcription regulator	59E3 59E3
2244	suppress	<i>didum</i> <i>dpld</i>	calmodulin binding transcription regulator	43D3 43C7-D1
2245	lethal	<i>Akap200</i> CG13398	protein kinase A binding -----	29C3-4 29C3
2249	enhance	CG9455 <i>coro</i>	serine-type endopeptidase inhibitor actin binding	42D6 42D6
2251	lethal	<i>mir-8S</i> CG15615	----- -----	53D11 53D9
2254	suppress	CG12439 CG9573	----- -----	30A1 29F7
2256	lethal	CG10321 <i>PTP-ER</i>	nucleic acid binding protein tyrosine phosphatase	57F5 57F4
2264	lethal	CG10321 <i>PTP-ER</i>	nucleic acid binding protein tyrosine phosphatase	57F5 57F4
2265	suppress	n.d. n.d.	----- -----	----- -----
2267	enhance	CG31704 <i>croI</i>	serine-type endopeptidase inhibitor RNA polymeraseII transcription factor	33A3 33A1-2
2275	suppress	CG8067 CG6701	----- DNA helicase	50C23 50C22-23
2277	enhance	CG7239 CG9171	----- N-acetyllactosaminide beta-1,6-N- acetylglucosaminyl transferase	25F5 25F4-5
2279	lethal	<i>spen</i> CG3709	transcription regulator -----	21B3-4 21B3
2280	enhance	<i>PIP5K59B</i> CG13535	1-phosphatidylinositol-4-phosphate5-kinase -----	59B4 59B3-4

to be continued

2285	enhance	n.d. n.d.	----- -----	----- -----
2290	lethal	<i>lilli</i> <i>NTPase</i>	transcription factor nucleotide phosphatase	23C1-3 23C1
2293	suppress	n.d. n.d.	----- -----	----- -----
2296	lethal	CG16852 <i>B4</i>	----- -----	34C4 34C3-4
2298	enhance	n.d. n.d.	----- -----	----- -----
2300	lethal	<i>HmgD</i> CG30403	DNA bending DNA binding	57F10 57F10
3004	enhance	CG5175 <i>Keap1</i>	----- actin binding	89E12 89E11-12
3007	suppress	<i>lama</i> CG4769	----- oxido reductase	64D2-3 64D3
3010	lethal	<i>SsII</i> <i>Chro</i>	general RNA pol II transcription chromatin binding	80B2 80B1-2
3026	enhance	<i>ttk</i> CG11550	specific RNA pol II transcription factor transporter	100D1 100D1
3036	lethal	<i>snRNA:UI:95Cc</i> CG33111	----- -----	95C1 95B7-C1
3043	enhance	CG7597 <i>SAK</i>	cyclin-dependent protein kinase protein serine threonine kinase	78D4-5 78D4
3046	lethal	n.d. n.d.	----- -----	----- -----
3052	enhance	<i>His2Av</i> <i>ball</i>	DNA binding Protein serine threonine kinase	97D3 97D3
3061	lethal	<i>Synd</i> CG17273	structural constituent of cytoskeleton adenylosuccinate synthase	93A1-2 93A1
3069	enhance	<i>ttk</i> CG11550	specific RNA pol II transcription factor transporter	100D1 100D1

to be continued

3081	suppress	<i>FB () 1698</i> <i>InR</i>	transposon insulin receptor	93E7 93E4
3083	lethal	<i>Gbeta76C</i> CG8789	GTPase protein serine threonine kinase	76C1 76B9
3085	suppress	<i>Atu</i> <i>Rga</i>	----- transcription regulator	83B6 83B5-6
3087	lethal	n.d. n.d.	----- -----	----- -----
3095	enhance	n.d. n.d.	----- -----	----- -----
3097	lethal	<i>tin</i> <i>mod (mdg4)</i>	RNA polymerase II transcription factor RNA polymerase II transcription factor	93D9 93D7-9
3101	lethal	<i>Hsc70-4</i> <i>tefu</i>	ATPase receptor signaling protein serine threonine kinase	88E4 88E3-4
3102	lethal	CG32192 <i>Eip75B</i>	----- specific RNA pol II transcription factor	75B4 75A10-B6
3106	lethal	n.d. n.d.	----- -----	----- -----
3112	lethal	<i>Hsc70-4</i> <i>tefu</i>	ATPase receptor signaling protein serine threonine kinase	88E4 88E3-4
3119	suppress	<i>wb</i> <i>smi35A</i>	receptor binding protein kinase	35A3-A5 35A1-A2
3124	suppress	CG9330 CG9231	transporter -----	76B8 76B8
3132	lethal	CG11637 CG3961	short-branched-chain-acyl-CoA dehydrogenase Long-chain-fatty-acid-CoA ligase	75E4 75E3-4
3168	suppress	<i>sra</i> <i>Bin1</i>	receptor binding transcription corepressor	89B12 89B7
3174	lethal	CG14991 CG14995	cell adhesion molecule binding -----	64A6 64A5-6
3177	enhance	n.d. n.d.	----- -----	----- -----

to be continued

3187	lethal	CG11486 CG3248	protein kinase ubiquitin-protein ligase	63A6-B1 63A5-6
3190	enhance	CG33556 CG8638	actin binding structural constituent of cuticle	65E4 65E3
3193	suppress	<i>danr</i> CG10238	DNA binding -----	96C2 96C1
3202	enhance	<i>dan</i> CG13661	DNA binding -----	96C3-4 96C2
3208	suppress	<i>l (3) IX-14</i> CG6241	metalloendopeptidase -----	85F14-15 85F14
3209	suppress	CG11486 CG3248	protein kinase ubiquitin-protein ligase	63A6-B1 63A5-6
3219	lethal	<i>dbo</i> CG6169	actin binding -----	72A2 72A1
3223	enhance	<i>Ptpmeg</i> <i>mtb</i>	protein tyrosine phosphatase G-protein coupled receptor	61C1 61C1
3242	lethal	<i>vsg</i> <i>SH3PXI</i>	----- -----	67C5 67C5
3244	suppress	<i>Hph</i> S-element () 1217	peptidyl-proline4-dioxygenase transposon	82F7-8 82F8
3245	suppress	<i>Smc5</i> CG7172	nucleic acid binding -----	78D6-7 78D6
3246	enhance	<i>MESR6</i> <i>Mkp3</i>	----- MAP kinase phosphatase	75F6 75F6
3249	lethal	n.d. n.d.	----- -----	----- -----
3251	lethal	n.d. n.d.	----- -----	----- -----
3254	enhance	<i>dally</i> CG13312	structural molecule -----	66E1-3 66D15
3257	lethal	<i>ttk</i> CG11550	specific RNA pol II transcription factor transporter	100D1 100D1

to be continued

3261	lethal	CG15383 <i>aop</i>	----- transcriptional repressor	22D1 22D1
3263	enhance	n.d. n.d.	----- -----	----- -----
3268	lethal	CG7946 CG15528	----- protein tyrosine serine threonine phosphatase	99D3 99D3
3274	enhance	n.d. n.d.	----- -----	----- -----
3289	lethal	CG13681 <i>bip1</i>	----- protein binding	66B4-5 66B3
3301	enhance	ATPalpha CG31191	sodium:potassium-exchanging ATPase -----	93A4 93A3-4
3302	lethal	n.d. n.d.	----- -----	----- -----
3303	enhance	n.d. n.d.	----- -----	----- -----
8014	lethal	n.d.	-----	-----
8015	lethal	<i>stwl</i>	RNA polymerase II transcription factor	70D6-7
8030	enhance	<i>Rab5</i>	GTPase	22E1
8033	enhance	<i>grp</i>	protein serine threonine kinase	36A10
8040	suppress	n.d.	-----	-----
8043	lethal	<i>Chro</i>	chromatin binding	80B1-2
8050	lethal	<i>mir-8S</i>	-----	53D11
8054	enhance	<i>esg</i>	specific RNA pol II transcription factor	35D2

to be continued

8055	lethal	n.d.	-----	-----
8087	suppress	<i>AGO1</i>	translation initiation factor	50C9-17
8104	lethal	<i>Gdi</i>	GDP-dissociation inhibitor	30B5
8120	lethal	n.d.	-----	-----
8127	enhance	<i>Gyc76C</i>	protein kinase	76C3-5

Appendix Table1-2

fru⁺ 異所発現による異常複眼原基に対するGSの効果とその候補遺伝子

遺伝子1/遺伝子2	GS line No.	表現型	二次試験の有無
CG3777 / <i>ewg</i>	GS1005	lethal	no
<i>Appl</i> / <i>elav</i>	GS1091	lethal	no
CG3600 / CG3857	GS1013	lethal	no
CG3600 / <i>Stalker</i>	GS1136	lethal	no
<i>sgg</i> / CG13762	GS1183	lethal	no
CG13758 / CG12497	GS1193	suppress	2nd screening
CG13758 / CG12497	GS1085	no effect	
CG13758 / CG12497	GS1209	no effect	
CG2694 / CG2685	GS1052	suppress	no
<i>peb</i> / CG12684	GS1018	lethal	no
<i>ovo</i> / <i>roo58</i>	GS1144	enhance	no
<i>ovo</i> / <i>roo58</i>	GS1156	lethal	no
<i>ovo</i> / <i>roo58</i>	GS1163	enhance	no
<i>ovo</i> / <i>roo58</i>	GS1164	lethal	no
CG6789 / CG32767	GS1007	lethal	no
CG6789 / CG32767	GS1185	lethal	no
<i>Tre</i> / <i>Tre1</i>	GS1084	enhance	no
<i>Tre</i> / <i>Tre1</i>	GS1199	enhance	no
<i>Act5c</i> / CG3016	GS1157	enhance	no
jockey80 / <i>CHES-1-lik</i>	GS1023	lethal	no
jockey80 / <i>CHES-1-lik</i>	GS1138	lethal	no
<i>Trf2</i> / CG32711	GS1108	suppress	vectorette sequence
<i>Trf2</i> / CG32711	GS1139	suppress	2nd screening
<i>Trf2</i> / CG32711	GS1046	suppress	
CG32711	GS7403	no effect	
<i>Trf2</i>	GS9128	suppress	
<i>Trf1</i>	GS10948	no effect	
CG10648 / <i>Moe</i>	GS1014	enhance	no
CG10648 / <i>Moe</i>	GS1155	lethal	no
<i>btd</i> / <i>nej</i>	GS1016	lethal	no
<i>btd</i> / <i>nej</i>	GS1078	lethal	no
<i>btd</i> / <i>nej</i>	GS1172	lethal	no
<i>btd</i> / <i>nej</i>	GS1188	lethal	no
CG3002 / CG32699	GS1129	lethal	no

to be continued

H-element 99 / <i>spri</i>	GS1020	enhance	no
<i>ras</i> / CG32676	GS1035	enhance	no
<i>ras</i> / CG32676	GS1038	enhance	no
CG15210 / <i>sesB</i>	GS1175	lethal	no
CG15210 / <i>Imp</i>	GS1197	lethal	no
CG32663 / <i>Hsc70-3</i>	GS1150	lethal	no
<i>rab3-GEF</i> / CG15027	GS1082	lethal	no
CG8509 / <i>PGRP-LE</i>	GS1068	enhance	no
CG8924 / <i>Ranbp16</i>	GS1203	enhance	no
<i>hang</i> / <i>Anxb11</i>	GS1135	enhance	no
CG5445 / <i>Fim</i>	GS1003	suppress	2nd screening
CG5445 / <i>Fim</i>	GS1103	no effect	
CG6540 / <i>l(1)G0003</i>	GS1186	suppress	2nd screening
<i>l(1)G0003</i>	GS7471	no effect	
<i>Pfrx</i> / CG12204	GS1205	lethal	no
CG32529 / CG15618	GS1120	suppress	2nd screening
CG15618	GS7485	no effect	
CG32529 / CG15618	GS1166	enhance	no
<i>Mgstl</i> / CG15449	GS1051	enhance	no
<i>spen</i> / CG3709	GS2279	lethal	no
CG7289 / CG15356	GS2215	lethal	no
<i>mio</i> / CG33124	GS2050	lethal	no
CG15383 / <i>aop</i>	GS3261	lethal	no
<i>Rab5</i>	GS8030	enhance	no
<i>lilli</i> / <i>NTPase</i>	GS2290	lethal	no
CG14030 / <i>Bsg25D</i>	GS2022	enhance	no
CG7239 / CG9171	GS2277	enhance	no
<i>DLP</i> / <i>Sec 61 alpha</i>	GS2158	lethal	no
<i>Liprin-alpha</i> / <i>homer</i>	GS2048	enhance	no
<i>Hrb27C</i> / CG32829	GS2140	enhance	no
<i>mir-275</i> / CG5181	GS2089	enhance	no
<i>mir-275</i> / CG5181	GS2111	enhance	no
<i>emb</i> / <i>fy</i>	GS2120	suppress	no
<i>Akap200</i> / CG13398	GS2110	lethal	no
<i>Akap200</i> / CG13398	GS2245	lethal	no
CG12439 / CG9573	GS2254	suppress	no

to be continued

<i>Gdi</i>	GS8104	lethal	no
CG3838 / <i>jp</i>	GS2164	suppress	2nd screeningg
CG3838	GS7015	suppress	
CG31704 / <i>cro1</i>	GS2210	enhance	no
CG31704 / <i>cro1</i>	GS2267	enhance	no
GH07269 / <i>kek2</i>	GS2216	suppress	vectorette sequence
<i>kek2</i>	GS10792	no effect	
<i>kek1</i>	GS9723	enhance	
<i>kek1</i>	GS9967	enhance	
CG16852 / <i>B4</i>	GS2296	lethal	no
<i>esg / nht</i>	GS2077	lethal	no
<i>grp / trpgamma</i>	GS2024	enhance	no
<i>grp / CG31807</i>	GS2129	enhance	no
<i>grp / CG31807</i>	GS2133	lethal	no
<i>grp</i>	GS8033	enhance	no
CG9455 / <i>coro</i>	GS2090	enhance	no
CG9455 / <i>coro</i>	GS2249	enhance	2nd screeningg
<i>coro</i>	GS7240	no effect	
<i>coro</i>	GS13244	no effect	
<i>Tsp42Ee / Tsp42Ed</i>	GS2235	lethal	no
CG11107 / <i>costa</i>	GS2010	enhance	no
<i>didum / dpld</i>	GS2157	lethal	no
<i>didum / dpld</i>	GS2244	suppress	no
CG2064 / <i>Gr43b</i>	GS2240	enhance	no
<i>lig / CG12769</i>	GS2155	enhance	no
<i>psq / lola</i>	GS2049	lethal	no
<i>psq / lola</i>	GS2052	enhance	no
<i>psq / lola</i>	GS2119	lethal	no
<i>psq / lola</i>	GS2169	enhance	no
<i>psq / lola</i>	GS2230	enhance	no
CG13148 / CG8776	GS2036	lethal	no
<i>AGO1</i>	GS8087	suppress	2nd screening
<i>AGO1</i>	GS13288	no effect	
<i>AGO1</i>	GS12930	no effect	
CG8067 / CG6701	GS2275	suppress	no
<i>cg / mRpS16</i>	GS2175	lethal	no

to be continued

<i>chn</i> / CG33467	GS2112	enhance	no
<i>mir-278</i> / <i>Flo</i>	GS2094	enhance	no
CG8370 / <i>ATPCL</i>	GS2145	lethal	no
<i>mir-8S</i> / CG15615	GS2241	lethal	no
<i>mir-8S</i> / CG15615	GS2251	lethal	no
<i>mir-8S</i>	GS8050	lethal	no
<i>l(2)k01209</i> / <i>cnk</i>	GS2032	enhance	no
CG8920 / CG13868	GS2123	enhance	no
CG30152 / CG9025	GS2115	lethal	no
CG10543 / CG3221	GS2198	suppress	no
CG10321 / <i>PTP-ER</i>	GS2256	lethal	no
CG10321 / <i>PTP-ER</i>	GS2264	lethal	no
<i>HmgD</i> / CG30403	GS2011	lethal	no
<i>HmgD</i> / CG30403	GS2042	lethal	no
<i>HmgD</i> / CG30403	GS2137	lethal	no
<i>HmgD</i> / CG30403	GS2238	lethal	no
<i>HmgD</i> / CG30403	GS2300	lethal	no
CG17952 / CG30404	GS2162	enhance	no
<i>PIP5K59B</i> / CG13535	GS2280	enhance	no
<i>Dcp-1</i> / <i>pita</i>	GS2242	lethal	no
CG5569 / <i>TBPH</i>	GS2126	lethal	no
<i>ken</i> / <i>Thiolase</i>	GS2168	lethal	no
<i>NaCP60E</i> / CG30425	GS2131	suppress	2nd screening
<i>NaCP60E</i> / CG30425	GS47	no effect	
<i>NaCP60E</i>	GS7059	no effect	
<i>NaCP60E</i>	GS10196	no effect	
CG30425	GS13239	no effect	
<i>Ptpmeg</i> / <i>mtH</i>	GS3223	enhance	no
<i>wb</i> / <i>smi35A</i>	GS3119	suppress	vectorette sequence
<i>wb</i> / <i>smi35A</i>	GS2081	no effect	2nd screening
<i>wb</i>	GS7312	no effect	
CG11486 / CG3248	GS3187	lethal	no
CG11486 / CG3248	GS3209	suppress	no
CG14991 / CG14995	GS3174	lethal	no
<i>lama</i> / CG4769	GS3007	suppress	vectorette sequence
<i>lama</i> / CG4769	GS3128	no effect	2nd screening
<i>lama</i> / CG4769	GS3167	no effect	EP lines test
CG33556 / CG8638	GS3190	enhance	no

to be continued

CG13681 / CR32360	GS19	lethal	no
CG13681 / <i>bip1</i>	GS3289	lethal	no
<i>dally</i> / CG13312	GS3254	enhance	no
<i>vsg</i> / <i>SH3PX1</i>	GS3242	lethal	no
<i>stwl</i>	GS8015	lethal	no
<i>dbo</i> / CG6169	GS3219	lethal	no
CG32192 / <i>Eip75B</i>	GS3102	lethal	no
CG11637 / CG3961	GS3132	lethal	no
<i>MESR6</i> / <i>Mkp3</i>	GS3246	enhance	no
CG9330 / CG9231	GS3124	suppress	2nd screening
CG9330	GS11650	no effect	
<i>Gbeta76C</i> / CG8789	GS3083	lethal	no
<i>Gyc76C</i>	GS8127	enhance	no
CG7597 / <i>SAK</i>	GS3043	enhance	no
<i>Smc5</i> / CG7172	GS3245	suppress	2nd screening
CG7172	GS12484	no effect	
<i>Ssl1</i> / <i>Chro</i>	GS3010	lethal	no
<i>Chro</i>	GS8043	lethal	no
<i>Hph</i> / S-element()1217	GS3244	suppress	2nd screening
<i>Hph</i>	GS10727	no effect	
S-element()1217	GS9887	no effect	
S-element()1217	GS9854	no effect	
<i>Atu</i> / <i>Rga</i>	GS3085	suppress	2nd screening
<i>Atu</i>	GS5038	no effect	
CG8223 / CG9801	GS20	enhance	no
<i>l(3)IX-14</i> / CG6241	GS3208	suppress	2nd screening
<i>l(3)IX-14</i> / CG6241	GS3277	no effect	
<i>l(3)IX-14</i>	GS12826	no effect	
CG6241	GS12126	no effect	
CG6241	GS12787	no effect	
<i>Hsc70-4</i> / <i>tefu</i>	GS3101	lethal	no
<i>Hsc70-4</i> / <i>tefu</i>	GS3112	lethal	no
<i>sra</i> / <i>Bin1</i>	GS3168	suppress	no
CG5175 / <i>Keap1</i>	GS3004	enhance	no
<i>Synd</i> / CG17273	GS3061	lethal	no
<i>ATPase</i> / CG31191	GS3301	enhance	no

to be continued

<i>tin / mod (mdg4)</i>	GS3097	lethal	no
FB()1698 / <i>InR</i>	GS3081	suppress	no
<i>snRNA:U1:95Cc / CG33111</i>	GS2093	enhance	no
<i>snRNA:U1:95Cc / CG33111</i>	GS3036	lethal	no
<i>danr / CG10238</i>	GS3193	suppress	2nd screening
<i>danr</i>	GS7150	no effect	
<i>dan / CG13661</i>	GS3202	enhance	no
<i>His2Av / ball</i>	GS3052	enhance	no
CG7946 / CG15528	GS3268	lethal	no
<i>ttk / CG11550</i>	GS3026	enhance	no
<i>ttk / CG11550</i>	GS3069	enhance	no
<i>ttk / CG11550</i>	GS3257	lethal	no

Appendix Table1-3

二次スクリーニングを行った遺伝子とその結果		
遺伝子1/遺伝子2	GS line No.	二次試験の結果
CG13758 / CG12497	GS1193	2nd screeningとして、GS1085、GS1209系統を用いて再現性を検討したが、再現性が得られなかった。
CG13758 / CG12497	GS1085	
CG13758 / CG12497	GS1209	
<i>Trf2</i> / CG32711	GS1108	2nd screeningとして、GS1046、GS7403、GS9128、GS10948系統を用いて再現性を検討した結果、 <i>Trf2</i> を強制発現した時に複眼異常の抑圧能が再現された。 vectorette sequencingを行い、P因子の挿入点を確認した。 <i>ttk</i> の強制発現による複眼異常は抑圧しなかった。
<i>Trf2</i> / CG32711	GS1139	
<i>Trf2</i> / CG32711	GS1046	
CG32711	GS7403	
<i>Trf2</i>	GS9128	
<i>Trf1</i>	GS10948	
CG5445 / <i>Fim</i>	GS1003	2nd screeningとして、GS1103系統を用いて再現性を検討したが、再現性が得られなかった。
CG5445 / <i>Fim</i>	GS1103	
CG6540 / <i>l(1)G0003</i>	GS1186	2nd screeningとして、GS7471系統を用いて再現性を検討したが、再現性が得られなかった。
<i>l(1)G0003</i>	GS7471	
CG32529 / CG15618	GS1120	2nd screeningとして、GS7485系統を用いて再現性を検討したが、再現性が得られなかった。
CG32529 / CG15618	GS1166	
CG15618	GS7485	
CG3838 / <i>jp</i>	GS2164	2nd screeningとして、GS7015系統を用いて再現性を検討した結果、CG3838を強制発現した時に複眼異常の非常に弱い抑圧能が再現された
CG3838	GS7015	
GH07269 / <i>kek2</i>	GS2216	2nd screeningとして、GS10792系統を用いて再現性を検討したが、再現性が得られなかった。 <i>kek1</i> に関しても検討したが抑圧能は得られなかった。 vectorette sequencingを行い、P因子の挿入点を確認した。 <i>ttk</i> の強制発現による複眼異常は抑圧しなかった。
<i>kek2</i>	GS10792	
<i>kek1</i>	GS9723	
<i>kek1</i>	GS9967	
CG9455 / <i>coro</i>	GS2090	2nd screeningとして、GS7240、GS13244系統を用いて再現性を検討したが、再現性が得られなかった。
CG9455 / <i>coro</i>	GS2249	
<i>coro</i>	GS7240	
<i>coro</i>	GS13244	
<i>AGO1</i>	GS8087	2nd screeningとして、GS12930、GS13288系統を用いて再現性を検討したが、再現性が得られなかった。
<i>AGO1</i>	GS12930	
<i>AGO1</i>	GS13288	

to be continued

<i>NaCP60E</i> / CG30425	GS2131	2nd screeningとして、GS47、GS7059、GS10196、GS13239系統を用いて再現性を検討したが、再現性が得られなかった。
<i>NaCP60E</i> / CG30425	GS47	
<i>NaCP60E</i>	GS7059	
<i>NaCP60E</i>	GS10196	
CG30425	GS13239	
<i>wb</i> / <i>smi35A</i>	GS3119	2nd screeningとして、GS2081、GS7312系統を用いて再現性を検討したが、再現性が得られなかった。 vectorette sequencingを行い、P因子の挿入点を確認した。
<i>wb</i> / <i>smi35A</i>	GS2081	
<i>wb</i>	GS7312	
<i>lama</i> / CG4769	GS3007	2nd screeningとして、GS3128、GS3167系統を用いて再現性を検討したが、再現性が得られなかった。 vectorette sequencingを行い、P因子の挿入点を確認した。 EP lines を用いて再現性を検討したが、再現性は得られなかった。
<i>lama</i> / CG4769	GS3128	
<i>lama</i> / CG4769	GS3167	
CG9330 / CG9231	GS3124	2nd screeningとして、GS11650系統を用いて再現性を検討したが、再現性が得られなかった。
CG9330	GS11650	
<i>Smc5</i> / CG7172	GS3245	2nd screeningとして、GS12484系統を用いて再現性を検討したが、再現性が得られなかった。
CG7172	GS12484	
<i>Hph</i> / S-element()1217	GS3244	2nd screeningとして、GS10727、GS9854、GS9887系統を用いて再現性を検討したが、再現性が得られなかった。
<i>Hph</i>	GS10727	
S-element()1217	GS9854	
S-element()1217	GS9887	
<i>Atu</i> / <i>Rga</i>	GS3085	2nd screeningとして、GS5038系統を用いて再現性を検討したが、再現性が得られなかった。
<i>Atu</i>	GS5038	
<i>l(3)IX-14</i> / CG6241	GS3208	2nd screeningとして、GS3227、GS12826、GS12126、GS12787系統を用いて再現性を検討したが、再現性が得られなかった。
<i>l(3)IX-14</i> / CG6241	GS3277	
<i>l(3)IX-14</i>	GS12826	
CG6241	GS12126	
CG6241	GS12787	
<i>danr</i> / CG10238	GS3193	2nd screeningとして、GS7150系統を用いて再現性を検討したが、再現性が得られなかった。
<i>danr</i>	GS7150	