

# *fickle* 変異体の解析から同定されたショウジョウバエ Bruton's tyrosine kinase (Btk) ホモログの構造と機能

遺伝子構造解析グループ 従二 直人、竹下 綾、馬嶋 景

雄の交尾持続時間が野生型に比して短くかつ不規則な分布を示す変異として分離された *fickle* (*fic*) 変異を分子遺伝学的、組織学的に解析した。その結果、原因遺伝子としてショウジョウバエの *Btk* 遺伝子ホモログを同定し、*fic* 変異はその発現が阻害されることによって起こることを証明した。変異形質を詳細に調べた結果、*fic* 変異体雄の交尾行動異常は、雄性内部生殖器の形態異常によることが明らかになった。また、*Btk* 遺伝子の発現阻害によりショウジョウバエ成虫の寿命が短縮することがわかった。

## 1. はじめに

Bruton's Tyrosine Kinase (Btk) ファミリーは、Btk, Itk, Tec などを含む非レセプター型チロシンキナーゼの1グループである。このグループは SH3 ドメイン、SH2 ドメインおよびキナーゼドメインからなる、Src チロシンキナーゼファミリーと共通する基本構造の N 末端側に、PH ドメインおよび TH ドメインと呼ばれる比較的長いペプチド配列を持つことが特徴である。この特徴的な N 末端構造は、他のタンパク質との相互作用や細胞膜脂質との結合性に関与し、これによってチロシンキナーゼとしての機能が調節されることが示唆されている<sup>1,2</sup>。

一般に、チロシンキナーゼは広範な発現部位や生理機能を持つことが多いが、Btk ファミリーのメンバーにはそれぞれ組織特異性があることが多い。例えば、このグループを代表する Btk は、ほ乳類では遺伝性免疫不全症の一つである X 染色体連鎖無 $\gamma$ グロブリン血症（ヒト XLA、マウス Xid）の原因遺伝子として同定されたが、事実、B リンパ球の前駆細胞のみに発現し、その分化に関与していることが知られている<sup>1,2</sup>。

私たちは、ショウジョウバエ雄が交尾行動の異常を示す変異 *fickle* (*fic*) の原因遺伝子を探索した結果、これがショウジョウバエの *Btk* 遺伝子ホモログであることを見いだした。また、この遺伝子の生理機能を究明するため、*fic* 変異体における遺伝子発現の異常、形質の異常の詳細な調査を行った。

## 2. 研究の内容

### 2.1. *fic* 変異の原因遺伝子座のクローニングと転写単位の探索

*fic* 変異体は、ゲノム中のランダムな座に1コピーの P 因子（トランスポゾンの1種）挿入を持つ約 2000 系統の中から、雄の交尾持続時間が野生型に比して短くかつ不規則な分布を示す変異として分離された（後述）。P 因子プローブを唾腺染色体にハイブリダイズすることにより、*fic* は第2染色体 29A 領域に位置する P 因子挿入変異であることがわかった。P 因子の挿入位置を指標にすれば原因遺伝子座のクローニングが容易である。この方法により、私たちは P 因子挿入近傍のクローニングに成功した（図 1-a）。

P 因子近傍のゲノム DNA をプローブとしてノーザンブロット解析を行ったところ、

P 因子挿入の下流側に単一の転写単位が見つかった。この転写単位は、胚から成虫に至るすべての発生段階で、3 kb と 4 kb の 2 種の mRNA を発現していた (図 1-c)。対応する cDNA のクローニングとシークエンス解析を行ったところ、3 kb の cDNA が得られ、これがショウジョウバエの *src* ホモログとして報告されていた *Dsrc29A* のものであることがわかった<sup>3</sup>。また、ゲノムシークエンスと cDNA シークエンスを照合することによって、エクソン・イントロン構造を決定したところ、*fic* 変異体では、報告されていた *Dsrc29A* の転写開始点の約 5 kb 上流に P 因子挿入を持つことがわかった (図 1-a)。

しかしながら、私たちは、(1) *fic* 変異体において、転写開始点から約 5 kb も離れた P 因子挿入が遺伝子発現に影響をあたえることは不可能ではないにしても考えにくいこと、(2) ノーザン解析の予備実験から、*fic* 変異体において発現が阻害される転写産物と影響を受けない転写産物があることがうかがわれたことの 2 点から、この遺伝子には既知の転写産物 (Type 1) に加え、第二の転写産物 (Type 2) が存在し、その転写開始点は P 因子挿入点よりさらに上流にあると予想した。そこで、さらに上流域を注意深くノーザン解析により探索したところ、実際にそのような転写産物があることが証明された。私たちは、Type 2 に対応する数種の cDNA のクローニングにも成功し、そのシークエンスからこの遺伝子のエクソン・イントロン構造の全体像を明らかにした。これによると、Type 1 と Type 2 は、異なる転写開始点と 5' 末端側配列を持つが、3' 末端側配列は共通であった (図 1-a)。

## 2.2. Type 2 転写産物はショウジョウバエ *Btk* ホモログをコードする

cDNA 配列から導き出された、Type 2 転写産物にコードされるアミノ酸配列は、ほ乳類 *Btk* と高い相同性を示した (図 1-b)。その相同性は全体として 67.7% である。各機能ドメイン (PH, TH, SH3, SH2, kinase) のコンセンサス配列も非常によく保存されている。一方、異なる 5' 末端配列を持つ Type 1 転写産物にコードされるアミノ酸配列は、PH および TH に相当するドメインを欠いており、かわりに短い N 末端配列が付いている。この N 末端配列には既知のタンパク質との有意な相同性は見いだされていない。このことが、永くこの遺伝子がショウジョウバエ *src* ホモログとして認知されてきた理由であるが、私たちの結果から、*Btk* ホモログとすべきであることは明らかである。私たちは、この遺伝子をショウジョウバエ *Btk* とするよう提唱している<sup>4</sup>。

## 2.3. *fic* 変異体では Type 2 転写産物が失われている

*fic* 変異が *Btk* 遺伝子の発現に与える影響を、成虫頭部および胸腹部の polyA<sup>+</sup>RNA のノーザン解析によって調査した。特異的プローブ (probe A, 図 1-a) で Type 1 転写産物のみを検出すると、野生型では 3 kb の転写産物が頭部、胸腹部ともに認められた (図 1-d)。Type 1 転写産物の発現に関しては、*fic* 変異体に異常は認められなかった。一方、Type 2 特異的なプローブ (probe B, 図 1-a) で検出を行った場合、野生型では頭部、胸腹部ともに認められる 3 kb 転写産物と、頭部特異的な 4 kb 転写産物が認められた (図 1-e)。cDNA の分析により両者は 3' 非転写領域の長さの違いによって生じることが示されている (図 1-a)。それに対して *fic* 変異体では、頭部、胸腹部ともに 3 kb 弱の転写産物のみが検

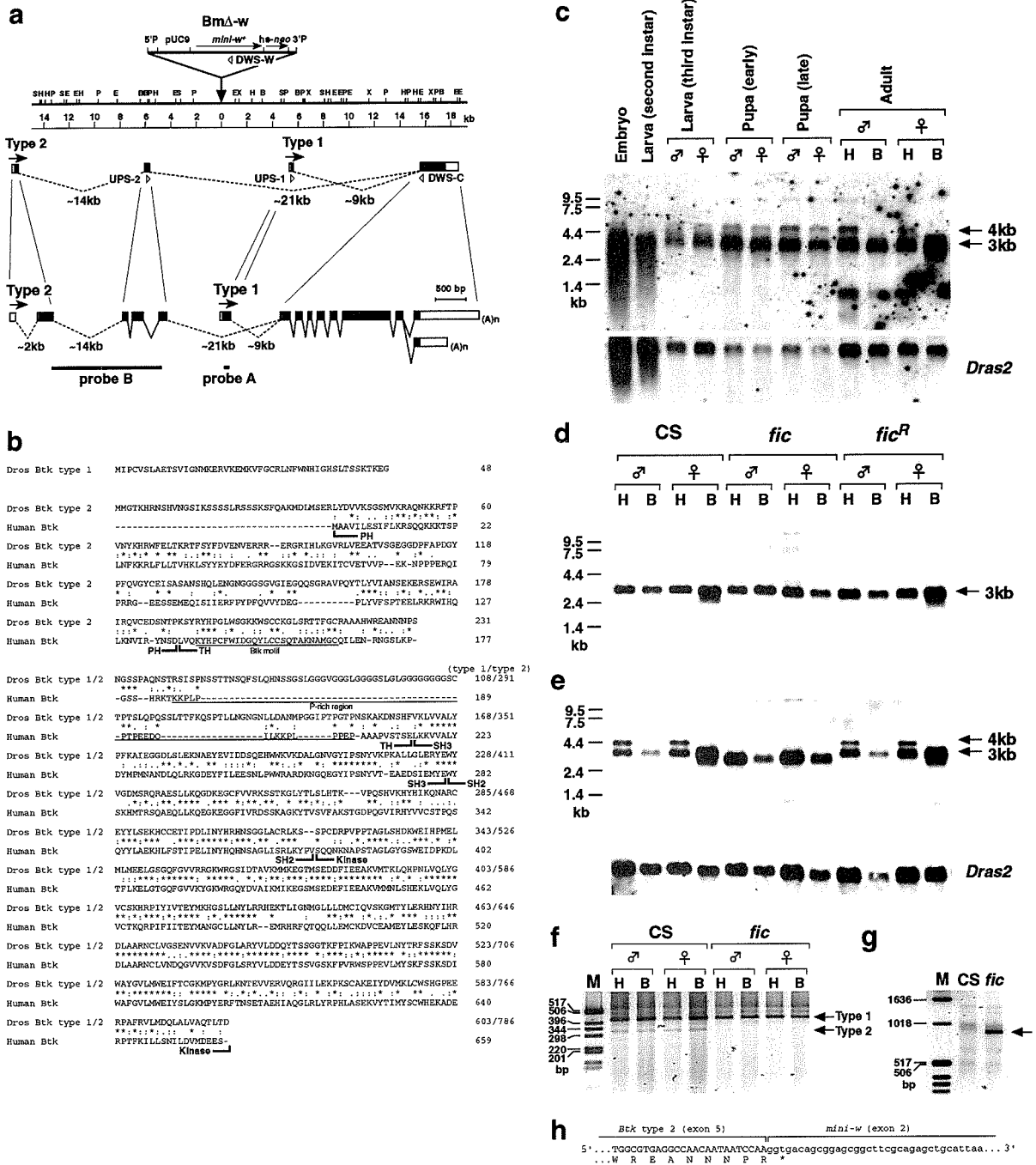


図1. ショウジョウバエ *Btk* 遺伝子の分子遺伝学的解析

- a. *Btk* 遺伝子の制限酵素地図とエクソン・イントロン構造。逆三角形で示されているのは、*fic* 変異体における改変型 P 因子 (*BmΔ-w*) の挿入。エクソンを表すボックスのうち塗りつぶされた部分が翻訳領域。実験で用いたプローブ (probe A, probe B) および PCR プライマー (UPS-1, UPS-2, DWS-C, DWS-W) の位置を図中に示した。
- b. Type 1 および Type 2 転写産物にコードされるアミノ酸配列とヒト *Btk* タンパクとの比較。一致するアミノ酸を\*、同義的アミノ酸置換を:または. (:の方がより同義性が強い) で表した。
- c. 各成長段階における *Btk* 転写産物のノーザンブロット。成虫については頭部 (H)、胸腹部 (B) 別に解析した。対照実験として *Dras2* の転写産物を検出した。
- d, e. 野生型 (CS)、*fic* 変異体、および復帰変異体 (*fic<sup>R</sup>*) 成虫の頭部 (H) および胸腹部 (B) における *Btk* 転写産物のノーザンブロット。(d) probe A で検出された Type 1 転写産物。(e) probe B で検出された Type 2 転写産物。対照実験として *Dras2* の転写産物を検出した。
- f, g. RT-PCR による転写産物の検出。(f) Type 1 および Type 2 転写産物の検出。共通領域の下流プライマー (DWS-C) に対し、Type 1 特異的上流プライマー (UPS-1) と Type 2 特異的上流プライマー (UPS-2) を同時に加えて PCR をおこなった。(g) Type 2 特異的上流プライマー (UPS-2) と *mini-w<sup>+</sup>* 特異的下流プライマー (DWS-W) を用いた RT-PCR の結果。レーン M はサイズマーカー。
- h. (g) で *fic* 変異体から検出された PCR 産物のシーケンスの一部とその翻訳。Type 2 転写産物の途中で *mini-w<sup>+</sup>* のエクソン 2 にスプライシングされるため、異所的な終止コドン (\*) が生じる。

出された。これは Type 2 転写産物が P 因子挿入により中断されて生じたものであると予想された。このことは、P 因子の離脱による復帰変異体 *fic<sup>R</sup>* で、Type 2 転写産物が野生型と同じサイズに戻ることも支持された。

この考えを裏付けるため、Type 1・Type 2 それぞれの転写産物を RT-PCR (Reverse Transcription-mediated Polymerase Chain Reaction) で検出する実験を行った。Type 2 転写産物を検出するためのプライマーのセットは、P 因子挿入点を挟むようにデザインした (図 1-a)。この結果、Type 1 転写産物由来の PCR 産物は野生型、*fic* 変異体ともに検出されたのに関わらず、Type 2 転写産物由来のものは野生型にしか認められなかった (図 1-f)。さらに、Type 2 特異的上流プライマー (UPS-2) と P 因子内に組み込まれている *mini-w<sup>+</sup>* 遺伝子特異的な下流プライマー (DWN-W) の組み合わせで RT-PCR を行ったところ、*fic* 変異体からは、Type 2 配列と *mini-w<sup>+</sup>* 配列が融合した PCR 産物が得られた (図 1-g)。以上の結果から、*fic* 変異体では、Type 1 転写産物は影響を受けないが、Type 2 転写産物は P 因子内の *mini-w<sup>+</sup>* 遺伝子に誤ってスプライシングされるため、機能的な遺伝子産物が作られないことがわかった (図 1-h)。

#### 2.4. *fic* 変異は雄性交尾器の異常と寿命の短縮をおこす

野生型のショウジョウバエでは、交尾持続時間は 10 分から 17 分の間で非常に安定しており、その平均は 15 分間である (図 2-a)。それとは対照的に、*fic* 変異体の雄と野生型の雌をペアにすると、交尾持続時間が不安定で、極端に短くなる傾向が認められる (図 2-b)。*fic* 変異と野生型のヘテロ接合体の雄や、P 因子の離脱による復帰変異体 *fic<sup>R</sup>* の雄では、交尾持続時間の分布は野生型と変わらない (図 2-c, d)。以上のことから、*fic* 変異は雄の交尾持続時間の短縮をもたらす劣性の P 因子挿入変異であると考えられた。

生殖器官を詳細に調べた結果、このような *fic* 変異体雄の交尾行動の異常が、雄性交尾器の形成異常によってもたらされることが示唆された。走査型電子顕微鏡で外部雄性交尾器を観察した限りでは、野生型 (図 3-a, b) と *fic* 変異体 (図 3-c, d) とで形態上の差異は認められなかった。しかし、内部雄性交尾器を観察したところ、*fic* 変異体には apodeme (ペニスと筋肉をつなぐ腱のような器官) に顕著な異常があることがわかった。野生型の apodeme は中央に 1 本存在しているが (図 3-e)、*fic* 変異体ではそれが左右に分かれて 2 本になっている (図 3-f)。

以上の変異形質が、先に示した *Btk* 遺伝子の発現阻害によるものであることを確認するため、熱刺激によりヒートショックプロモーターから Type 1 または Type 2 の転写産物を個体全体で強制発現できるように設計した形質転換体を作成し、これによって *fic* 変異形質が救済されるかどうかを調べた。3 時間間隔で 1 時間の強制発現を蛹期を通じて行ったところ、*fic* 変異体の交尾持続時間、apodeme の形態ともに救済の効果が認められた (図 2-f, 3-h)。この結果により、*fic* 変異体の原因遺伝子が *Btk* であることが立証された。意外なことに、*fic* 変異体で失われている Type 2 転写産物の強制発現ばかりでなく、Type 1 転写産物の強制発現でも同程度の効果があった。このことから、Type 1 と Type 2 は、コードしているタンパク質としては同等の生理活性を持っているが、発現の時期特異性や組織特異性の違いで機能分担をしている可能性が考えられる。

強制発現の期間を短く区切り、救済の効果が現れる時期、つまり *Btk* 遺伝子の発現が要求される時期を調べたところ、それが蛹化期から蛹初期であることがわかった。また、交尾持続時間および *apodeme* 形態ともに、救済効果の現れる *Btk* 発現時期が一致したことからも、前者の要因が後者であることが支持される。

交尾持続時間・雄性交尾器の異常に加え、*fic* 変異体は野生型に比べ羽化後の寿命が短くなることも発見された (図 2-g)。*fic* 変異体の寿命の短縮に関して、Type 1 および Type 2 の転写産物の強制発現が、同程度の救済効果を示した。しかしながら、発現要求時期は三齢幼虫後期から蛹初期であり、先に述べた交尾持続時間・雄性交尾器の場合より若干早いという傾向が認められた。

## 2.5. ショウジョウバエ *Btk* 遺伝子は、生殖原基・中枢神経系に発現する

救済実験で明らかになった発現要求時期に、実際にどのような組織で *Btk* 遺伝子が発現しているかを、*in situ* ハイブリダイゼーションで調べた。*fic* 変異形質の現れる雄性交尾器の原基では、Type 1 転写産物、Type 2 転写産物ともに蛹化直後に発現が認められたが、発現している場所は互いに異なっていた (図 3-i, j)。Type 1 転写産物は、内部雄性交尾器の予定域の一部である前方中央部で発現していた。それに対し Type 2 転写産物は、ペニスとその周辺器官を含む雄性交尾器の主要な部分の予定域である内腔側の縁辺部に強い発現が認められた。

この他に、*Btk* 遺伝子の転写産物が豊富に認められたのは中枢神経系であった。Type 2 転写産物の強い発現は、蛹化直後のキノコ体予定領域 (図 3-k, o) および蛹中期の触角葉とキノコ体に認められた (図 3-m, p, n)。それ以外の中枢神経系内の広範な領域では、Type 1 の転写産物が主として検出された (図 3-l)。とりわけ腹髄神経節のミッドライングリアに特徴的な発現が認められた。このように、ここでも Type 1 と Type 2 との発現領域の差違が明らかになった。

以上の結果は、Type 1 と Type 2 の転写産物が組織特異的発現によって機能を分担しているのではないかという先の仮説を支持するものである。また、*Btk* 遺伝子の主要な発現の場が中枢神経系であることから、私たちは、*fic* 変異体の寿命の短縮は、中枢神経系における *Btk* 遺伝子の発現阻害が原因ではないかと考えている。

## 2.6. まとめ

*fic* 変異は内部雄性交尾器の形態異常と成虫の寿命の短縮をおこすこと、その原因遺伝子がショウジョウバエの *Btk* ホモログであることが明らかになった。この遺伝子の産物として、典型的な PH ドメインおよび TH ドメインを持つ Type 2 と、それらを持たない Type 1 の 2 種が見いだされたが、*fic* 変異体では前者の発現のみが完全に阻害されていた。しかし、Type 1 または Type 2 どちらの強制発現でも *fic* 変異形質は救済されうることから、両者の生理活性は同等であるが、発現の時期特異性や組織特異性を異にすることによって機能を分担している可能性が示唆された。このことは、Type 1 と Type 2 がそれぞれ特有の発現部位を持つことから支持された。なお、私たちは以上の研究成果をまとめ学術誌に発表しているので参照されたい<sup>4</sup>。

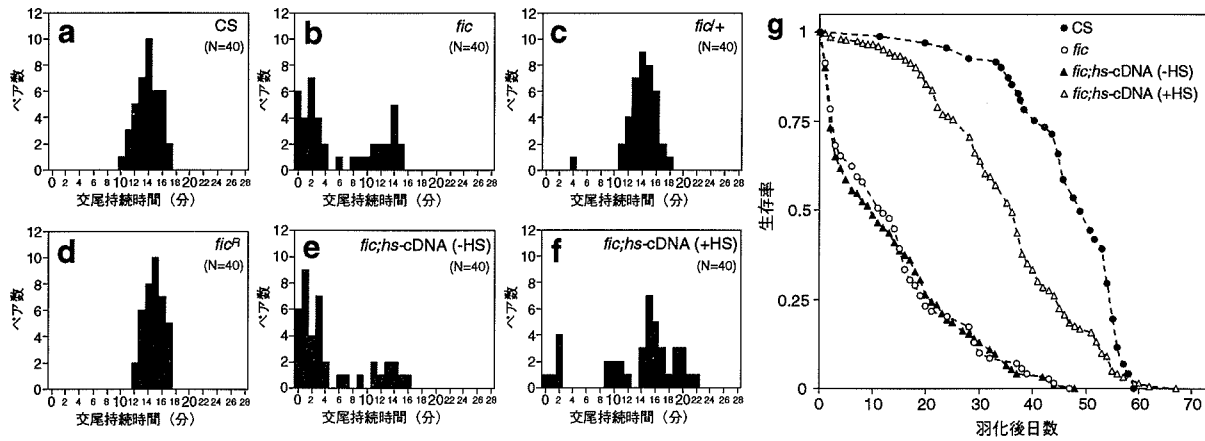


図 2. 雄の交尾持続時間と成虫の寿命

a-f. 雄の交尾持続時間の分布を示すヒストグラム。(a) 野生型 (CS)、(b) *fic* 変異体、(c) ヘテロ接合体 (*fic*+)、(d) 復帰変異体 (*fic*<sup>R</sup>)、(e, f) ヒートショックプロモーターに *Btk* cDNA をつないだ遺伝子を導入した *fic* 変異体 (*fic*; *hs-cDNA*)、(e) 強制発現なし (-HS)、および (f) 強制発現あり (+HS)。  
g. 羽化後の生存曲線。

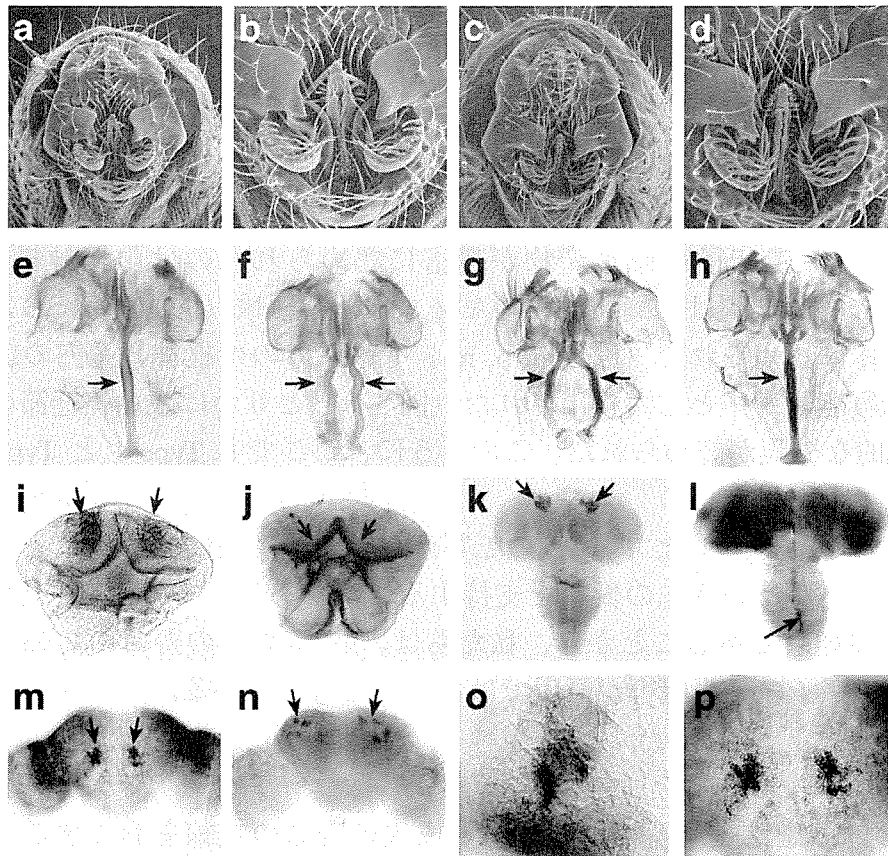


図 3. 雄性交尾器の形態および *Btk* 転写産物の組織特異的発現

a-d. 走査型電子顕微鏡で観察された外部雄性生殖器。(a, b) 野生型、(c, d) *fic* 変異体。(b) と (d) はそれぞれ (a) と (c) の強拡大図。  
e-f. 内部雄性交尾器の形態。apodeme を矢印で示す。(e) 野生型、(f) *fic* 変異体、(g, h) ヒートショックプロモーターに *Btk* cDNA をつないだ遺伝子を導入した *fic* 変異体、(g) 強制発現なし、(h) 強制発現あり。  
i, j. 蛹初期の雄性交尾器原基における *Btk* 遺伝子の発現。(i) Type 1 転写産物、(j) Type 2 転写産物。発現部位を矢印で示す。  
k-p. 中枢神経系における *Btk* 遺伝子の発現。(k) 蛹化期における Type 2 転写産物の発現。強い発現が認められるキノコ体予定域を矢印で示す。(o) は、その強拡大図。(l) 蛹前期における Type 1 転写産物の発現。ミッドライングリアでの発現を矢印で示す。(m, n) 蛹中期の Type 2 転写産物の発現。強い発現の認められる触角葉 (m)、キノコ体 (n) を矢印で示す。(p) は (m) の強拡大図。

### 3. 今後の展望

*Btk* 遺伝子の発現阻害で、雄性交尾器の形態異常、寿命の短縮が起こることがわかったが、その分子レベル、細胞レベルのメカニズムの解明はこれからの課題である。また、*Btk* タンパク質の作用メカニズムを明らかにするためには、このタンパク質が関わる反応経路に参加する他のタンパク質やその遺伝子を探索することも必要である。ショウジョウバエの強みである遺伝学的・組織学的手段を駆使すれば達成の実現性はあると思われる。またこのような研究が、まだ充分解明の進んでいない、ほ乳類の *Btk* タンパク質の作用メカニズムの理解に役立つということも期待できる。

ショウジョウバエ *Btk* 遺伝子が Type 1 と Type 2 の 2 種の転写産物を発現することは非常に興味深い発見である。ほ乳類 *Btk* と Type 2 とは、配列上の相同性だけでなくエクソン・イントロンの構成までかなりよく保存されており、共通の祖先遺伝子から進化してきたものであることは間違いない。しかし、Type 1 特異的 5' 末端には、その系統関係や類縁関係を示唆するような相同性は見つかっておらず、今のところ、ショウジョウバエ *Btk* 遺伝子が独自に獲得した構造であると考えられる。

Type 2 転写産物の発現阻害による *fic* 変異形質が、Type 1 転写産物の過剰発現でも救済されうることから、Type 1 にコードされているタンパク質は、その N 末端が典型的な PH ドメイン・TH ドメインではないのかかわらず、Type 2 にコードされるタンパク質と同等の生理活性を持っていることがうかがわれる。しかし逆に、Type 2 転写産物がなくなると、たとえ Type 1 転写産物が存在していても、*fic* 変異形質を示すということから、Type 1 と Type 2 には生理的な機能分担があることは明白である。ショウジョウバエ独自に見られる Type 1 転写産物を生じる遺伝子構造がどのようにして成立し、Type 1 と Type 2 遺伝子産物が、どのように機能の分化を起こしてきたかを追究すれば、進化の過程で遺伝子やタンパク質がいかにして多様化してきたかということについて新しい知見が得られるかもしれない。

### 参考文献

- 1) 塚田 聡 (1994). X 染色体連鎖 B 細胞不全と Bruton's tyrosine kinase. 実験医学 12, 42-48.
- 2) Mattsson, P. T., Vihinen, M., and Smith, C. I. E. (1996). X-linked agammaglobulinemia (XLA): a genetic tyrosine kinase (*Btk*) disease. *BioEssays* 18, 825-834.
- 3) Vincent, W. S., Gregory, R. J., and Wadsworth, S. C. (1989). Embryonic expression of a *Drosophila src* gene: alternative forms of the protein are expressed in segmental stripes and in the nervous system. *Genes & Development* 3, 334-347.
- 4) Baba, K., Takeshita, A., Majima, K., Ueda, R., Kondo, S., Juni, N., and Yamamoto, D. (1999). The *Drosophila* Bruton's tyrosine kinase (*Btk*) homolog is required for adult survival and male genital formation. *Molecular and Cellular Biology* 19, 4405-4413.