

ショウジョウバエ GAGA 因子, p93, p130 複合体

の構造・機能解析

中山 貴博

博士（理学）

総合研究大学院大学

生命科学研究科・遺伝学専攻

平成 14 年度 (2002)

目次

ページ

1. 要旨	
2. 略語	
3. 序論	1
4. 材料および方法	6
1. 分子生物学的手法と試薬類	6
2. キイロショウジョウバエの系統	7
3. GAGA 因子組み換え体の発現ベクターの構築	7
4. p93 組み換え体発現ベクター発現ベクターの構築	11
5. p130 組み換え体発現ベクター発現ベクターの構築	16
6. GST-GAGA 因子、p93、p130 およびその欠失変異体の発現と可溶画分の調製	19
7. His-GAGA 及び His-GAGA 因子欠損変異体の精製	20
8. His-p93 および His-p93 欠損変異体の精製	20
9. Continuous gel を用いた SDS-PAGE	21
10. GST-pull down assay (His-p93 と GST-GAGA および GST-GAGA 欠損変異体)	22
11. GST-pull down assay (His-GAGA、His-GAGA 欠失変異体と GST-p93 および GST-p93 欠失変異体)	22
12. GST-pull down assay (His-p93 と GST-p130 および GST-p130 欠損変異体) His-p93 欠損変異体と GST-p130 および GST-p130 欠損変異体)	23
13. ウェスタンブロッティング法	23
14. ショウジョウバエ多糸染色体の免疫抗体染色法	24
15. トランスジェニックフライ用の発現ベクターの構築	25
16. トランスジェニックフライの作製	26
17. Position effect variegation Test	27
19. Two-hybrid screening のための酵母発現ベクター構築	28
20. Two-hybrid assay	32
21. 酵母粗抽出物の調製とウェスタンブロッティング	32
5. 結果	33
6. 考察	43
7. 謝辞	51
8. 引用文献	52
9. 図	
10. Appendix	

要旨

GAGA 因子は *Trithorax-like*(*Trl*)遺伝子によってコードされ、ホメオティック遺伝子の適切な発現に必要である。*Trl* のハイポモルフである *Trl13C* 変異は、*white* 遺伝子の転座による position effect variegation (PEV)を増強することが示されている (Farkas G et al., 1994)。そして、ショウジョウバエの *hsp26* 遺伝子のプロモーター領域と *LacZ* 遺伝子を融合させたコンストラクトをもつトランスジェニックフライの解析により、(GA)_n リピート配列を欠くと、DNaseI hypersensitivity が失われ、さらに *LacZ* 遺伝子の発現誘導も損なわれることから、プロモーター領域では GAGA 因子によって、ヌクレオソームがない状態を形成していることが示唆されている (Lu Q et al.,1992、 1993)。このように、GAGA 因子はクロマチンの高次構造の変換や機能に関与していることが示唆されてきた。

岡田らは、GAGA 因子の作用によって実際にクロマチン上で転写が行われるかどうかを検証するために、*fushi tarazu* (*ftz*)のプロモーター領域を含むプラスミド上に *in vitro* でクロマチンを再構成させ、GAGA 因子およびクロマチンリモデリング因子 NURF を含むショウジョウバエ初期胚抽出液、ATP を加えたところ、GAGA 因子依存的に転写が活性化されることを明らかにした。さらにこの反応系に、NURF の触媒サブユニットである ISWI に対する抗体を同時に反応させると、*ftz* 転写制御領域でクロマチンのリモデリングおよび転写の活性化が起こらないことが示された。しかし、当時 NURF と GAGA 因子間に直接の相互作用はみられなかったことから、GAGA と ISWI の間を仲介するファクターが存在することが予想された。その可能性を調べるために、岡田ら (1998) は、Flag タグの付いた GAGA 因子を発現するトランスジェニックフライを作成し、その初期胚核抽出液から Flag 抗体ビーズを用いて Flag-GAGA を精製したところ、GAGA 因子と複合体を形成している二つのタンパク質 p93, p130 が同定された。ペプチドシーケンスの結果、p93 は dSSRP1(*Drosophila* structure-specific recognition protein 1)、p130 は dSPT16(*Drosophila* counterpart of yeast SPT16) であることが判明した。霜島ら (2002) は、p93-p130 複合体が

ヌクレオソームに直接結合し、GAGA 因子に依存したクロマチンのリモデリングを促進することを見出した。また、p130 をコードする遺伝子の欠損変異体では、*Ubx* 変異が示す haltere の 表現型を増強すること、さらにこの表現型に関して p130 は *Trl* と遺伝学的相互作用があることが示唆された。

単離された GAGA 因子-p93-p130 複合体内で各タンパク質がどのように相互作用しているのか、さらに、GAGA 因子-p93-p130 複合体は、生体内でどのように役割を果たしているかということについては、明らかになっていない。以上のことから、本研究では、まず最初に、GAGA、p93、p130 の 3 分子間の相互作用を明らかにするために、GST プルダウンアッセイを行った。その結果、GAGA 因子は p93 と直接結合することが明らかになった。また、GAGA 因子が p93 と結合するのに十分な領域は GAGA 因子の zinc finger からそのすぐ C 末端側に至る領域であった。p93 が GAGA 因子あるいは p130 と結合するのに十分な領域はそれぞれ p93 のアミノ酸配列の 296 から 623、405 から 623 に至る領域であった。さらに、p130 が p93 に結合する領域は p130 のアミノ酸配列の C 末端側の 579 から 1037 の領域であれば十分であることが明らかになった。

次に、実際に転写が行われている間期のゲノム上で、これら 3 つのタンパク質から成る複合体がどのように分布するのか調べるために、ポリテックロモゾーム上での GAGA 因子、p93、p130 の分布を抗体染色によって調べた。その結果、GAGA 因子の結合部位の大半が p93、p130 と一致することを見出した。次に GAGA 因子-p93-p130 複合体の動態を明らかにするため、3 齢幼虫に熱ショック処理（37℃、30 分間）を施したポリテックロモゾーム上での GAGA、p93、p130 の分布を同様に抗体染色により調べた。その結果、転写が盛んに行われている熱ショックパフ上で GAGA 因子と p93、p130 が共局在していることを明らかにした。

最後に、GAGA 因子、p93、p130 複合体は、生体内でどのような役割を果たしているかについて調べるために、position effect variegation(PEV)の解析を行った。その結果、*Trl13C*

だけでなく、*p93* と *p130* の欠損変異体 ($\Delta p93/+$ または $\Delta p130/+$) においても PEV がエンハンスされていることが観察された。さらに、*Trl13C* と *p130* の二重欠損変異体 (*Trl13C*, $\Delta p130/+$) では、*Trl13C/+* より PEV がエンハンスされていることが観察された。

以上、3項目による解析により、GAGA 因子-p93-p130 がクロマチンに作用し、転写の活性化を維持し続ける働きが明らかとなった。

Abstract

The GAGA factor of *Drosophila melanogaster* is encoded by the *Trithorax -like* gene and is required for proper expression of homeotic genes (Farkas et al., 1994). *Trl 13C*, a hypomorphic allele, enhances position effect variegation (PEV) of the white gene that is brought into the vicinity of heterochromatin by chromosomal inversion.

In transgenic fly lines carrying *hsp 26* gene promoter fused to *lac Z*, lack of (GA)_n repeats in *hsp 26* promoter by deletion or substitution abolished DNase I hypersensitivity and heat-inducible *lacZ* expression, suggesting that GAGA factor has an important role in generating and/or maintaining nucleosome free regions of chromatin (Lu et al., 1992, 1993). Thus genetic and biochemical studies suggest that GAGA factor is involved in the alteration and function of higher order chromatin structure.

Okada and Hirose (1998) have shown that when a preassembled chromatin template is incubated with GAGA, an embryonic extract of *Drosophila* containing a chromatin remodeling factor NURF and ATP, the chromatin is disrupted and *ftz* transcriptional activation occurs *in vitro* but both are blocked by an antiserum against Imitation switch protein (ISWI), a catalytic subunit of NURF. However, it has not been reported that GAGA binds to ISWI directly, implying that there might exist a mediating factor between GAGA and ISWI. Okada and Hirose have constructed a transgenic fly line expressing a Flag-tagged GAGA, and found that GAGA is associated with two proteins, p93 and p130 in embryonic nuclei. Peptide sequencing revealed that p93 is dSSRP1 (*Drosophila* structure-specific recognition protein 1) and p130 is dSPT16 (*Drosophila* counterpart of yeast SPT16). Shimojima et al (2002) shows that the p93-p130 complex binds to nucleosome directly and facilitates the GAGA factor-dependent chromatin remodeling. Furthermore, in triply heterozygous flies, *Ube/+; Trl13CΔ p130/+* halteres are larger than *Ubx/+; Trl13C/+* flies, indicating genetic interaction between *Trl* and *p130*.

In this study, I analyzed protein-protein interactions among GAGA-p93-p130 complex in vitro, distribution of GAGA, p93 and p130 on polytene chromosomes and biological function of the GAGA factor -p93-p130 complex.

First, to determine which of p93 and p130 binds to GAGA factor directly, I performed GST-pull down assays using bacterially expressed recombinant proteins. GAGA factor bound to p93 directly. In order to map the regions sufficient for interactions among three proteins, I constructed GAGA factor, p93 and p130 deletion mutants and performed GST-pull down assays. These results showed that the region of GAGA factor responsible for the p93 binding was the zinc finger and its C-terminal neighboring region and that the region of p93 responsible for the interaction with GAGA factor or p130 was its amino acid sequences of 296-623 and 405-623, respectively. Furthermore, the region of p130 responsible for the interaction with p93 was its C-terminal amino acid sequence 579-1037.

Next, to examine the distribution of GAGA factor, p93 and p130 within the genome, I stained these proteins on salivary gland polytene chromosomes of third instar larvae by using monoclonal antibody against Flag peptide and polyclonal antibody against p93 or p130. These results showed that p93 and p130 colocalized with GAGA factor on euchromatin while p93 and p130 exist on centromeric heterochromatin. To analyze the dynamic state of the GAGA factor- p93 - p130 complex, I examined the distribution of these proteins on polytene chromosomes from heat-treated larvae. I observed strong signal patterns of GAGA factor, p93 and p130 on heat shock puffs. These results indicate that GAGA factor-p93-p130 complex is associated with transcriptionally active chromatin.

Finally, in order to clarify a biological function of the GAGA factor-p93-p130 complex, I examined whether the p93-p130 complex is involved in PEV. PEV was enhanced not only in heterozygous for *Trl* allele (*Trl13C/+*), but also in heterozygous for $\Delta p93$ or $\Delta p130$ allele ($\Delta p93/+$

or $\Delta p130/+$). Moreover, in flies heterozygous for *Trl* and $\Delta p130$ allele (*Trl13C. $\Delta p130/+$*), enhancement of PEV was observed stronger than that in flies heterozygous for *Trl* allele (*Trl13C/+*). These results suggest that the GAGA factor- p93-p130 complex maintains the activate state of the *white* gene by overcoming the repressing affect of heterochromatin in a clonally heritable manner.

略語

BAP	bacterial alkaline phosphatase
BSA	bovine serum albumin
DTT	dithiothreitol
EDTA	ethylenediaminetetraacetate
FACT	facilities chromatin transcription
HEPES	2-hydroxyethylpiperazine-N'-2-ethanesulfonic acid
HRP	horseradish peroxidase
IPTG	Isopropyl β -D-thio-galactopyranoside
NURF	nucleosome remodeling factor
O.D.	optical density
PAGE	polyacrylamide gel electrophoresis
PBS	phosphate-buffered saline
PCR	polymerase chain reaction
PEG	polyethylene glycol
PEV	position effect variegation
PMSF	phenylmethanesulfonyl fluoride
SDS	sodium dodecyl sulfate
TCA	trichloroacetic acid
Tris	Tris hydroxymethyl amino methane
α -Xgal	5-Bromo-4-chloro-3-Indolyl- α -D-galactopyranoside

口答発表要旨 (400 文字程度)

ショウジョウバエの GAGA 因子と相互作用するタンパク質 p93-p130 複合体について、最初に、in vitro で 3 分子間の相互作用を解析した。その結果、GAGA 因子は p93 と直接結合し、また、3 分子間での結合に十分な領域が明らかになった。次に、実際に転写が行われている唾液染色体上での GAGA 因子、p93、p130 の分布を抗体染色によって調べることで、GAGA 因子の結合部位の大半が p93、p130 と一致することを見出した。さらに、転写が盛んに行われているパフ上で GAGA 因子と p93、p130 が共局在していることが明らかになった。最後に、これら複合体の生物学的な機能を調べるため、*w^{m4}* 遺伝子による position effect variegation (PEV) の解析を行った。その結果、GAGA 因子をコードする *Trl* 変異と共に p93、p130 は PEV をエンハンスする働きがあることが明らかになった。以上、3 項目による解析により、GAGA 因子-p93-p130 複合体はクロマチンに作用し、転写の活性化を維持し続けるという働きがあることが示された。

序論

真核生物の DNA は、ヒストンタンパク質、H2A、H2B、H3、H4 がそれぞれ 2 分子からなるヒストンオクタマー（8 量体）の周囲に、146 塩基対の DNA が 1.75 回転左巻きに巻き付いたヌクレオソーム構造をとる。引き続き、ヒストン H1 により多数のヌクレオソームがより集まって 30 nm のクロマチン繊維に折り畳まれる。さらに、分裂中期には、クロマチン繊維は凝集し、染色体軸に沿ってクロマチン繊維のループ構造を形成し染色体構造をとる。このようにして長さ 1m におよぶ DNA は、直径数 μm の核の中にコンパクトに畳まれている。

Xenopus の卵母細胞抽出液を用いてプラスミド DNA から *in vitro* で再構成したクロマチンは、Hela 細胞の核抽出液を用いて転写反応を行うと、転写開始が損なわれる(Knezetic & Luse 1986)。しかし、クロマチン構造を再構成させる前に TFIID を DNA 鋳型に結合しておけば、再構成後も転写が起こる (Workman & Roeder 1987)。さらに、染色体上のヒストン H4 遺伝子を破壊し、GAL プロモーター制御下にヒストン H4 遺伝子を発現する酵母の株では、グルコース培地でヒストン H4 の遺伝子発現を抑えると、種々の遺伝子の転写活性が野生株に比べて上昇する(Han and Grunstein 1988)。このように、*In vitro*、*In vivo* の解析からヌクレオソーム構造をとる DNA は基本転写因子群が近づけず、結果として RNA ポリメラーゼ II による転写が起こらないことが示されている。クロマチンリモデリングに関わる因子が単離精製され、その機能解析が進むにつれ、2 つのグループに分けられることが明らかになっている(Kingston and Narlikar., 1999)。一つ目のグループは、ATP 加水分解によるエネルギーを利用してクロマチン構造を破壊するタンパク質複合体である。二つ目のグループは、ヒストン N 末端の特定のリジン残基にアセチル基を転移する (Histone acetyl transferase, HAT) 酵素であり、これによりヒストンタンパク質と DNA との親和性は低下する (Kornberg and Lorch., 1999)。これら二つの複合体は、単独あるいは協調して作用することが知られている。協調して作用する一つの例が、酵母 HO プロモーターの解析から示されている。アクチベーター Swi5p によって HO プロモーター上に SWI/SNF 複合体がリクルートされ、引き続き SAGA HAT 複合体がリクルートされる。さらに、Swi5p が遊離した後にも、SWI/SNF 複合体がプロ

モーター上に安定に存在し続けることが示されている(Cosma et al., 1999; Krebs et al., 1999)。その後、この持続には swi5p によって HO プロモーター上にリクルートされた SAGA あるいは NuA4HAT 複合体が必要であることが明らかになっている (Hassan AH et al., 2001)。このように、Swi5p や HAT 複合体は、SWI/SNF 複合体を配列特異的 (HO プロモーター) にリクルートさせ Swi5p や HAT 複合体が遊離後も安定に保持するエピジェネティックな働きを生み出している。このようにプロモーター上の配列特異的に結合しクロマチンリモデリング因子をリクルートする働きのある因子は、他にショウジョウバエ GAGA 因子がある。

GAGA 因子は、GA リピートに結合して *Ultrabithorax* (Ubx)の転写を活性化する因子として同定された (Biggin MD et al., 1988)。後に、GAGA 因子の結合配列は、形態形成に関わる遺伝子、熱ショック遺伝子、actin5C などのハウスキーピング遺伝子などのプロモーター領域に多数存在することが明らかになっている (Soller et al., 1993; Granok et al., 1995)。また、GAGA 因子は *Trithorax-like* (*Trl*)遺伝子によってコードされ、*Trl*のハイポモルフである *Trl13C*変異は *Ubx*変異が示す haltere の表現型を増強し、また、*white* 遺伝子の転座による position effect variegation (PEV)を増強することが示されている (Farkas G et al., 1994)。GAGA 因子は間期にはユークロマチンに局在するが、分裂期にはヘテロクロマチン領域中のサテライト DNA に局在している (Platero, J et al., 1998; Raff et al., 1994)。実際 *Trl13C* のホモ接合体では、染色体の凝集や分配に異常をきたすために核分裂が正常に起こらないことが示されている (Bhat et al., 1996)。このことは、GAGA 因子は有糸分裂期においても、染色体の凝集や分配の機能をもつタンパク質をヘテロクロマチン上へアクセスしやすいように構造変換を司っていることを示唆している。このように、GAGA 因子はクロマチンの高次構造の変換や機能に関与していることが遺伝学的に示唆されてきた。そして、ショウジョウバエの *hsp26* 遺伝子のプロモーター領域と *LacZ* 遺伝子を融合させたコンストラクトをもつトランスジェニックフライの解析により、(GA)_n リピート配列を欠くと、DNaseI hypersensitivity が失われ、さらに *LacZ* 遺伝子の発現誘導も損なわれることから、プロモーター領域では GAGA 因子によって、ヌクレオソームがない状態を形成していることが示唆されている (Lu Q et

al.,1992、 1993)。

築山らにより、*hsp 70* 遺伝子を含むプラスミド 上に、*in vitro* でクロマチンを再構成させ、それをショウジョウバエ初期胚抽出物 (S150)および GAGA 因子とインキュベートすると GAGA 因子の結合配列近傍でクロマチン構造が、GAGA 因子と ATP 依存的に破壊されることが示されている (Tsukiyama et al., 1994)。その後、S150 画分中から ATP 依存的にクロマチン構造を破壊する 4 つのサブユニットからなるタンパク質複合体 nucleosome remodeling factor (NURF)が単離された (Tsukiyama et al., 1995)。このことは GAGA 因子自体にクロマチンの構造変換を引き起こす活性はなく、GAGA 因子の結合部位に NURF をリクルートすることによって局所的なクロマチンの構造変化を引き起こすことを示している。後に NURF によるクロマチンの破壊は、ヒストンオクターマーを他の DNA 上に転移するのではなく、シスにスライディングさせる結果生じるものであることが示されている (Hamiche, A et al., 1999)。

岡田らは、GAGA 因子の作用によって実際にクロマチン上で転写が行われるかどうかを検証するために、*fushi tarazu (ftz)*のプロモーター領域を含むプラスミド上に *in vitro* でクロマチンを再構成させ、さらに NURF を含む S150 を加えたところ、GAGA 因子依存的に転写が活性化されることを明らかにした。しかし、裸(naked)の DNA では、GAGA 因子による *ftz* の転写活性化は起こらず、GAGA 因子はクロマチンを鋳型にした転写を特異的に活性化することが示されている。(Okada and Hirose 1998)

NURF は、ATPase 活性をもつサブユニット ISWI を含む。ISWI は SWI2/SNF2 のヘリカーゼドメインとホモロジーをもち (Tsukiyama et al., 1995)、NURF 以外にもショウジョウバエのクロマチンリモデリング複合体 CHRAC、ACF に共通に含まれる触媒サブユニットである。岡田らは、クロマチンリモデリングおよび転写が行われる際に、ISWI が関わっているかを調べた。*ftz* プロモーター領域を含むプラスミドを用いてクロマチン再構成系を用いて転写を行う前に、抗 ISWI 抗体を反応させると、*ftz* 転写制御領域でリモデリングがおこらず、転写の活性化が起こらないことが示されている。しかし、当時 NURF と GAGA 因子間に直接の相互作用

はみられなかったことから、GAGA と ISWI の間を仲介するファクターが存在することが予想された。その可能性を調べるために、岡田らは、Flag タグの付いた GAGA 因子を発現するトランスジェニックフライを作成し、その初期胚核抽出液から Flag 抗体ビーズを用いて Flag-GAGA を精製したところ、GAGA 因子と複合体を形成している二つのタンパク質 p93, p130 が同定された。ペプチドシーケンスの結果、p93 は dSSRP1(*Drosophila* structure-specific recognition protein 1)、p130 は dSPT16(*Drosophila* counterpart of yeast SPT16) であることが判明した。

プラスミド DNA 上にショウジョウバエ初期胚 S190 抽出液中で再構成し精製したクロマチン鋳型では、クロマチンリモデリングが起こり転写開始が行われたとしても、ヌクレオソームが障壁となって転写伸長は阻害されてしまう。Reinberg らはこの障壁を乗り越えるために必要な因子 FACT (facilities chromatin transcription) をヒト HeLa 細胞から精製した (Orpahnides et al., 1998)。FACT は、ヒストン H2A-H2B ダイマーと結合しクロマチン鋳型から H2A-H2B ダイマーを取り除くことによって、RNA polymerase II による転写の伸長を促進していると考えられている (Orpahnides et al., 1999)。また、FACT は、分子量 80K (p80)、140K(p140) のタンパク質のヘテロダイマーから成る。後に、p80 は、cisplatin により構造が変化した DNA と特異的に結合するタンパク質 SSRP1、また p140 は酵母 SPT16/CDC68 のヒトホモログであることが判明した (Orpahnides et al., 1999)。SSRP1 と SPT16 のヘテロダイマーは酵母や *Xenopus* から報告されている。FACT の出芽酵母ホモログ SPT16/CDC68-POB3(SP)複合体はそれぞれ分子量 120K と 70K のタンパク質から成る。Spt16、ヒストン H2A、H2B をコードする遺伝子の変異あるいはそれぞれ Wild type の遺伝子を多コピーベクターから過剰発現した場合、Spt-の表現型を示す (Malone et al., 1991; Clark-Adams et al., 1998)。このことは Spt16 やヒストンタンパク質の化学量論が変化することによって転写に影響を及ぼしていることを示している。また、Swi/Snf の変異株 (cf. *snf5Δ*) に、Wildtype の *Spt16* あるいは *Pob3* 遺伝子を導入すると、その表現型が抑圧される。このように SPT6-POB3 複合体は、クロマチン構造に影響を及ぼすことが遺伝学的に示されている (Brewster et al., 1998)。

Pob3 には、SSRP1 の C 末端に見られる HMG ボックスが存在しないが、HMG ボ

ックドメインをもつ Nhp6 は、SP 複合体と相互作用することが免疫沈降の解析や遺伝学的解析により示されている。また、Nhp6 とヌクレオソームは結合し Nhp6-ヌクレオソーム複合体を形成する。引き続き、Nhp6-ヌクレオソーム複合体は、SP 複合体をリクルートすることによって、SP-Nhp6-ヌクレオソーム複合体を形成し、ヌクレオソームの構造を変化させる (DNase I に対する感受性が増強する) (Formosa et al., 2001)。また、SP 複合体は、DNA Polymerase α の触媒サブユニットと相互作用することが免疫沈降の解析から示されている (Wittmeyer and Formosa., 1997) SPT16/Cdc68 の温度感受性変異株では、G1 サイクリン遺伝子 *CLN1*、*CLN2*、*CLN3* の発現が抑えられ、その結果、DNA 含量は 1C のまま変化せず、細胞周期は G1 期で拘束することが示されている (Malone et al., 1991; Rowley et al., 1991; Wittmeyer and Formosa., 1997)。

p93-p130 のホモログであるアフリカツメガエルの DUF(DNA unwinding factor) 複合体は、分子量 140K と 87K から構成されている。この複合体は Topoisomerase I 存在下で弛緩型環状 2 本差 DNA に負の超らせんを導入する活性をもつ因子である。この複合体は、DNA gyrase の様に Topoisomerase I なしに ATP 存在下で負の超らせんを導入する活性はないとされている。また、アフリカツメガエルの卵母細胞抽出液から抗 DUF140 抗体により DUF 複合体を取り除くと DNA 合成が行われなくなることが明らかになっている (Okuhara et al., 1999)。

ヒト FACT、酵母 SP 複合体や *Xenopus* DUF 複合体に関する知見を総合すると、複製の際、DNA polymerase はクロマチン構造をとった複製起点に、転写の際には RNA ポリメラーゼ II はクロマチン鑄型にリクルートされてその上を走る必要があり、これらの複合体はこれらのプロセスを促進していると考えらる。

霜島らは、p93-p130 複合体がヌクレオソームに直接結合し GAGA 因子に依存したクロマチンのリモデリングを促進することを見出した。また、p130 をコードする遺伝子の欠損変異体では、*Ubx* 変異が示す haltere の表現型を増強すること、さらにこの表現型に関して p130 は *Trl* と遺伝学的相互作用があることが示唆された。このように、p93-p130 複合体は、GAGA 因子によってリクルートされ、クロマチン構造を弛緩し続ける働きがあることが示唆されている (Shimajima et al., 2002)。

しかしながら単離された、GAGA 因子-p93-p130 複合体内で各タンパク質がどのように相互作用しているのか、また、実際に転写が行われている間期のゲノム上で、これら 3 つのタンパク質から成る複合体がどのように分布するのか。さらに、GAGA 因子、p93、p130 複合体は、生体内でどのように役割を果たしているかということについては、明らかになっていない。以上のことから、本研究では、GAGA、p93、p130 の 3 分子間の相互作用を明らかにするために、GST プルダウンアッセイを行った。続いて、3 つのタンパク質は唾腺多糸染色体でどのように分布しているかを調べるために、免疫抗体染色を行った。さらに、生体内での役割を調べる目的で、3 つのタンパク質が PEV に関わっているかどうか調べた。

分子生物学的手法と試薬類

大腸菌の取り扱いや遺伝子操作等は、Sambrook(1989)の方法に従った。

遺伝子組み換えにあたっては、大腸菌 DH5 α 株を使用し、アガロースゲル中の DNA の断片の抽出・精製は Geneclean II(フナコシ)を用いた。試薬は Wako, Dojindo, Nakaraitesque, SIGMA、抗体は、抗ポリヒスチジン 抗マウスモノクローナル抗体(SIGMA)、抗マウス IgGHRP 標識ポリクローナル抗体(#sc-2005, Santa Cruz)、抗ラビット IgGHRP 標識ポリクローナル抗体 (Jakson Immuno Research)、抗 Flag 抗マウスモノクローナル抗体(M2, KODAK)、Cy3 標識抗マウスポリクローナル抗体(Molecular Probe)、AlexA488 標識抗ラビットポリクローナル抗体(Molecular Probe)を用いた。

制限酵素は、Takara、Toyobo 社製品を使用した。修飾酵素 T4 polynucleotide kinase(Takara)、alkaline phosphatase (*E. Coli* C75, Takara)を使用した。ライゲーション反応には、ligation kit ver.2 (Takara)を使用した。大腸菌用培地成分である Bactotryptone、Bactoyeast extract は Difco 製を用いた。また、PCR に際し、酵素は ExTaq polymerase (Takara)、サーマルサイクラーは、PCR サーマルサイクラー MP (Takara)を使用した。DNA シークエンスは、Big Dye™ Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit(Perkin Elmer Applied Biosystems) を使用し、377 DNA Sequencer (ABI PRISM™)により泳動、解析を行った。

しかしながら単離された、GAGA 因子-p93-p130 複合体内で各タンパク質がどのように相互作用しているのか、また、実際に転写が行われている間期のゲノム上で、これら 3 つのタンパク質から成る複合体がどのように分布するのか。さらに、GAGA 因子、p93、p130 複合体は、生体内でどのように役割を果たしているかということについては、明らかになっていない。以上のことから、本研究では、GAGA、p93、p130 の 3 分子間の相互作用を明らかにするために、GST プルダウンアッセイを行った。続いて、3 つのタンパク質は唾腺多糸染色体でどのように分布しているかを調べるために、免疫抗体染色を行った。さらに、生体内での役割を調べる目的で、3 つのタンパク質が PEV に関わっているかどうか調べた。

分子生物学的手法と試薬類

大腸菌の取り扱いや遺伝子操作等は、Sambrook(1989)の方法に従った。

遺伝子組み換えにあたっては、大腸菌 DH5 α 株を使用し、アガロースゲル中の DNA の断片の抽出・精製は Geneclean II(フナコシ)を用いた。試薬は Wako、Dojindo、Nakarai tesque、SIGMA、抗体は、抗ポリヒスチジン 抗マウスモノクローナル抗体(SIGMA)、抗マウス IgGHRP 標識ポリクローナル抗体(#sc-2005, Santa Cruz)、抗ラビット IgGHRP 標識ポリクローナル抗体 (Jakson Immuno Research)、抗 Flag 抗マウスモノクローナル抗体(M2, KODAK)、Cy3 標識抗マウスポリクローナル抗体(Molecular Probe)、AlexA488 標識抗ラビットポリクローナル抗体(Molecular Probe)を用いた。

制限酵素は、Takara、Toyobo 社製品を使用した。修飾酵素 T4 polynucleotide kinase(Takara)、alkaline phosphatase (*E.Coli* C75, Takara)を使用した。ライゲーション反応には、ligation kit ver.2 (Takara)を使用した。大腸菌用培地成分である Bactotryptone、Bactoyeast extract は Difco 製を用いた。また、PCR に際し、酵素は ExTaq polymerase (Takara)、サーマルサイクラーは、PCR サーマルサイクラー MP (Takara)を使用した。DNA シークエンスは、Big Dye™ Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit(Perkin Elmer Applied Biosystems) を使用し、377 DNA Sequencer (ABI PRISM™)により泳動、解析を行った。

キイロショウジョウバエの系統

yw, yw; Sp/Cyo; PrDr/TM3 Ser, Sb, yw; ePrDr/TM3Ser y+,

ywm4, ras-2/Yy+Bs と *N164 y+w+; Df(2R)bw[VDe2L]Px[KR]/SM1* および

*yw; Aprt21/TM3y+*と *yw; Aprt21, Trl13c/TM3y+*は、それぞれ林博士、上田博士から譲渡していただいた。

GAGA 因子組み換え体の発現ベクターの構築

pGEX4T-3*Nde*I 発現ベクターの構築

pGEX4T-3 に *Nde* I サイトを設けるために、合成相補鎖 DNA *Bam* HI-*Nde* I- *Bam* HI ; GAT CCG GTC ATA TGA CCG (下線は *Nde* I サイトを示す) をアニーリングした後、T4 polynucleotide kinase によって 5'端をリン酸化した。これにより得られた 2 本鎖 DNA は、5'端、3'端に *Bam* HI の消化部位を形成する。この 2 本鎖 DNA と *Bam* HI によって切断しアルカリフォスタファアーゼ (BAP) 処理した pGEX4T-3 とライゲーション反応を行った。これにより、得られたベクターを pGEX4T-3*Nde*I とした。GST 融合タンパク質の発現ベクターを構築する際、このベクターを基にした (Appendix-1)。

GST-GAGA (pGEX4T-3*Nde*I GAGA)発現ベクターの構築

ショウジョウバエの GAGA 因子の cDNA(-5AA)を T7φ10 プロモーター下流に接続したベクター、pARGAGA(Soller et al.,1993)を *Nde* I、*Eco* RI によって消化した DNA 断片と *Nde* I、*Eco* RI によって切断し BAP 処理した pGEX4T-3*Nde*I を用いてライゲーション反応を行った。これにより得られたベクターを、pGEX4T-3*Nde* I-GAGA とした (Appendix-2)。

GST-N 末 1-120 欠失変異 GAGA 因子 (pGEX4T-3*Nde*I Δ1-120 GAGA)発現ベクターの構築

pARGAGA を鋳型にして 5'端プライマーΔ1-120F

AGG CATATG ACG GTT ACC AAG GAC GAC TAC (下線は *Nde*I サイトを示す)
と 3'端プライマーΔ1-120 *Nco*I reverse ATG TTG TTG GGG TCCATGGTG (下線は *Nco*I サイトを示す) を用いて増幅させた PCR 産物を TA topo vector(Invitrogen) にライゲーション反応を行った。DNA シークエンス解析により、正しい塩基配列をもつ PCR 産物が挿入されたベクターを得た。このベクターを *Nde*I、*Nco*I によって消化、切り出し精製した DNA 断片と、*Nde*I、*Nco*I によって消化した pGEX4T-3*Nde*I-GAGA とをライゲーション反応を行った。これにより、得られたベクターを pGEX4T-3*Nde*I-Δ1-120 GAGA とした (Appendix-3)。

GST-N 末 1-310 欠失変異 GAGA 因子 (pGEX4T-3*Nde*I-Δ1-310 GAGA)発現ベクターの構築

pARGAGA を鋳型にして 5'端プライマーΔ1-310F

AGGCATATG AAT ACAAGC GGCGTCCTATCC (下線は *Nde*I サイトを示す) 3'端
プライマー GAGA *Eco*RI R ; AGGGAATTCGGCTCGGCTGCTGGAGGTGGC (下線は *Eco*RI サイトを示す)を用いて増幅させた PCR 産物を TA topo vector にライゲーション反応を行った。ベクターを得た。このベクターに *Nde*I、*Eco*RI によって消化し、切り出し精製した DNA 断片と *Nde*I、*Eco*RI によって切断し BAP 処理した pGEX4T-3*Nde*I を用いてライゲーション反応を行った。これにより得られたベクターを pGEX4T-3*Nde*I-Δ1-310 GAGA とした (Appendix-4)。

GST-N 末 1-372 欠失変異 GAGA 因子 (pGEX4T-3*Nde*I -Δ1-372GAGA)発現ベクターの構築

pARGAGA を鋳型にして 5'端プライマーΔ1-372F ;

AGGCATATGAAGAAGGAGAAGAAAAGTAAGTC (下線は *Nde*I サイトを示す)
3'端プライマー GAGA *Eco*RI R ; AGGGAATTCGGCTCGGCTGCTGGAGGTGGC (下

線は *Eco* R I サイトを示す。) を用いて増幅させた PCR 産物を T vector(Novagen) にライゲーションし DNA シークエンス解析反応を行った。これにより正しい塩基配列をもつ PCR 産物が挿入されたベクターを得た。このベクターを、*Nde* I、*Eco* RI によって消化し切り出し精製した DNA 断片と *Nde* I、*Eco* RI によって消化し BAP 処理した pGEX4T-3*Nde* I を用いてライゲーション反応を行った。これにより得られたベクターを pGEX4T-3*Nde* IΔ1-372 GAGA とした (Appendix-5)。

GST-C 末 440-519 欠失変異 GAGA 因子 (pGEX4T-3*Nde* IΔ440-519GAGA)発現ベクターの構築

Sfi I、*Eco* RI によって消化し BAP 処理をした GST-GAGA (-5AA)と *Sfi* I-*Eco* RI Forward ; TG**TAG**TGAGGAGGAG (太字は終止コドン)、と *Sfi* I-*Eco* RI Reverse ; AATTCTCCTCCTCACTACAGGA の 2 本の合成 DNA をアニーリングし 5' 端をリン酸化した。これにより得られた 2 本鎖 DNA の 5'端、3'端には、それぞれ *Sfi* I および *Eco* RI の消化部位を形成する。この 2 本鎖 DNA と *Sfi* I、*Eco* RI によって消化し BAP 処理をした GST-GAGA (-5AA)を用いてライゲーション反応を行った。これにより、得られたベクターを pGEX4T-3*Nde* IΔ440-519 GAGA とした (Appendix-6)。

GST-C 末 373-519 欠失変異 GAGA 因子 (pGEX4T-3*Nde* IΔ373-519GAGA)発現ベクターの構築

Δ373-519F ; TCGAGCTGCGGCATTTTGCCAAACCCGGCGTGTGAG

Δ373-519R ; AATTCTCACACGCCGGGTTTGGCAAATGCCGCAGC の 2 本の

合成 DNA をアニーリングし 5'端をリン酸化した。これにより、得られた 2 本鎖 DNA の 5'端、3'端には、それぞれ *Xho* I と *Eco* RI の消化部位を形成する。この 2 本鎖 DNA を用いて、pAR-GAGA を *Xho* I、*Eco* RI により消化し、切り出し精製した DNA 断片を用いてライゲーション反応を行った。これにより得られたベクター pAR-Δ373-519GAGA を、*Nde* I と *Eco* RI によって消化し、切り出し精製した DNA 断片と、*Nde* I、*Eco* RI によって切断し BAP 処理した pGEX4T-3*Nde* I をライゲーション反応を

行った。これにより得られたベクターを pGEX4T-3*Nde* I-Δ373-519 GAGA とした (Appendix-7)。

GST-C 末 311-519 欠失変異 GAGA 因子 (pGEX4T-3*Nde* I-Δ311-519GAGA)発現ベクターの構築

pAR-GAGA を鋳型にして、5'端プライマーΔ311-519F=5'Sequencing for Δ1-120 ; CGGCTCTGGATCCGTCAG と 3'端プライマーΔ311-519R ;

AGGGAATTCTCAGCCGCCAGATGAGCCAGTG (下線部は *Bam* HI サイト *Eco* RI サイト、太字は終止コドンを示す) を用いて PCR 反応を行い、得られた PCR 産物を T-vector にライゲーション反応を行った。DNA シークエンス解析により、正しい塩基配列であることを確認したベクターを得た。このベクターに *Bam* HI、*Eco* RI によって消化し、切り出し精製した DNA 断片と *Bam* HI、*Eco* RI によって消化し BAP 処理した pAR-GAGA を用いてライゲーション反応を行った。これにより、得られたベクターを pARΔ311-519 GAGA とした。*Nde* I、*Eco* RI によって消化し切り出し精製し、BAP 処理した pARΔ311-519 GAGA と *Nde* I、*Eco* RI によって消化し BAP 処理した pGEX4T-3*Nde* I をライゲーション反応を行った。これにより、得られたベクターを pGEX4T-3*Nde* I-Δ311-519 GAGA とした (Appendix-8)。

GST-C 末 121-519 欠失変異 GAGA 因子 (pGEX4T-3*Nde* I-BTB/POZGAGA)発現ベクターの構築

pAR-GAGA を鋳型にして 5'端プライマー

Δ121-519F ; AGGCATATGAATTCGCTGTATTCGCTCACC (下線部は *Nde* I サイトを示す) 3'端のプライマーΔ121-519R; AGGGAATTCTCACTGCGGTGCCAGTCCCTG

(下線部は *Eco* RI サイト、太字は終止コドンを示す) を用いて PCR 反応を行い、得られた PCR 産物を T-vector にライゲーション反応を行った。DNA シークエンス解析により、正しい塩基配列であることを確認したベクターを得た。このベクターを *Nde* I によって消化し、切り出し精製した DNA 断片と *Nde* I によって切断し BAP 処理した pGEX4T-3*Nde* I を用いてライゲーション反応を行った。PCR によって正

確な方向にインサートが挿入されていることを確認し得たベクターを、pGEX4T-3*Nde*I BTB/POZGAGA とした (Appendix-9)。

GST-N 末 1-120 および C 末 440-519 欠失変異 GAGA 因子(pGEX4T-3*Nde* I-RI-D-RII-GAGA)発現ベクターの構築

GST-Δ1-120GAGA を *Nde* I、*Nco* I により消化して切り出し精製した DNA 断片と *Nde* I、*Nco* I により消化して切り出し精製した pGEX4T-3Δ440-519 をライゲーション反応を行った。これにより、得られたベクターを pGEX4T-3*Nde* I-RI-D-RII-GAGA とした (Appendix-10)。

GST-N 末 1-310 および C 末 440-519 欠失変異 GAGA 因子(pGEX4T-3*Nde* I-D-RIIGAGA)発現ベクターの構築

pAR-GAGA を鋳型にして 5'端プライマーΔ1-310F ; AGGCCATATG AAT ACAAGC GGCGTCCTATCC (下線部は *Nde*I サイトを示す)

および 3'端プライマー

Δ440-519R ; GGAGGAGGAGAAATTCCTACAGGATGGCCGGCGCC (下線部は *Eco*RI サイト、太字は終止コドンを示す) を用いて PCR 反応を行い、得られた PCR 産物を T-vector にライゲーション反応を行った。DNA シークエンス解析により、正しい塩基配列であることを確認したベクターを得た。このベクターを *Nde* I と *Eco*RI によって消化し、切り出し精製した DNA 断片と *Nde* I、*Eco*RI によって切断し BAP 処理した pGEX4T-3*Nde* I をライゲーション反応を行った。これにより、得られたベクターを pGEX4T-3*Nde* I-D-RIIGAGA とした (Appendix-11)。

p93 組み換え体発現ベクター発現ベクターの構築

pET14b-p93-*Eco*RI 発現ベクターの構築

霜島らが構築した p93 をコードする cDNA は pET14b の *Nde* I サイトにより挿入されている。p93N 末端欠損変異体を構築するには、C 末端を別の制限酵素の認識サイトに置き換える必要があると考えた。そこで、pET14b-p93 を *Bss*H II と *Eco*RI に

より消化し、切り出し精製した DNA 断片と、pET14b-p93 を鋳型にして 5'端プライマー *Bss* HII F ; CAAACCCAAGCGCGCCACC (下線部は *Bss* HII サイトを示す)

および 3'端プライマー

723-EcoRI R ; TCTCCTCCGAATTCCTAATCACTGGCCTCATCTTC

(下線部は *Eco* RI サイト、太字は終止コドンを示す) を用いて増幅した PCR 産物と *Bss* HII 及び *Eco* RI によって消化した産物を用いてライゲーション反応を行った。DNA シークエンス解析により、配列およびジャンクションの正しいベクター pET14b-p93-EcoRI を得た (Appendix-12)。

His,GST-p93 N 末端 1-405 欠失変異体 (pET14b,pGEX4T-3*Nde* I-p93Δ1-405)発現ベクターの構築

p93-pET14b を鋳型にして、5'端プライマーΔ1-405 F ;

GGAGGAGGACATATGATCGAGAAGGAGGAGTATGCC (下線部は *Nde* I サイトを示す) 3'端のプライマー *Bss* HII R ; GGTGGCGCGCTTGGGTTTG

を用いて PCR 反応を行い、得られた PCR 産物を *Nde* I、*Bss* HII により消化した。消化した産物は、*Nde* I、*Bss* HII により消化、切り出し精製して、BAP 処理した pET14b-p93-EcoRI とライゲーションを行った。これにより得られたベクターを pET14b-p93Δ1-405 とした。また、pET14b-p93Δ1-405 を *Nde* I、*Eco*RI 消化し切り出し精製した DNA 断片と *Nde* I、*Eco* RI によって消化し BAP 処理した pGEX4T-3*Nde* I をライゲーション反応を行った。これにより、得られたベクターを pGEX4T-3*Nde* I-p93Δ1-405 とした (Appendix-13)。

His,GST-p93 C 末端 623-723 欠失変異体 (pET14b,pGEX4T-3*Nde* I-p93Δ623-723)発現ベクターの構築

pET14b-p93 を鋳型にして 5'端プライマー *Bss* HII F ; CAAACCCAAGCGCGCCACC
3'端プライマーΔ623-723 *Eco*RI ;

CCTCCTCCTGAATTCCTCAAGGCTTGTAAGTTGCGCAT

(下線部は *Eco* RI サイト、太字は終止コドンを示す) を用いて PCR を行った。PCR

により増幅した産物は、*Bss* H II 及び *Eco* RI によって消化し、pET14b-p93 を *Bss* H II と *Eco* RI により消化し、切り出し精製し BAP 処理した pET14b-p93 とライゲーション反応を行った。DNA シークエンス解析により、正しい塩基配列およびジャンクションであることを確認したベクターを pET14b-p93Δ623-723 とした。また、pET14b-p93Δ623-723 を *Nde* I、*Eco* RI 消化し切り出し精製した DNA 断片と *Nde* I、*Eco* RI によって切断し BAP 処理した pGEX4T-3*Nde* I を用いてライゲーション反応を行った。これにより、得られたベクターを pGEX4T-3*Nde* I-p93Δ623-723 とした (Appendix-14)。

His,GST-p93 C 末端 547-723 欠失変異体 (pET14b, pGEX4T-3*Nde* I-p93Δ547-723) 発現ベクターの構築

pET14b-p93 を鋳型にして、5' 端プライマー

NSP V forward ; CGATCTTTCGACTTTCGAAGTG (下線部は *Nsp* V サイトを示す)

および 3' 端プライマー

Δ547-723 *Eco* RI R : CTCCTCCTGAATTCTCAGGAGGGTTTCTTTGTTCTCTC (下線部は *Eco* RI サイト、太字は終止コドンを示す) PCR により増幅した。得られた産物は *Nsp* V、*Eco* RI によって消化した。消化した PCR 産物と、*Nsp* V と *Eco* RI により消化し、切り出し精製および BAP 処理した pET14b-p93 を用いてライゲーション反応を行った。DNA シークエンス解析により、正しい塩基配列およびジャンクションであることを確認したベクターを pET14b-p93Δ547-723 とした。また、pET14b-p93 Δ547-723 を *Nde* I、*Eco* RI 消化し切り出し精製した DNA 断片と *Nde* I、*Eco* RI によって消化し BAP 処理した pGEX4T-3*Nde* I を用いてライゲーション反応を行った。これにより、得られたベクターを pGEX4T-3*Nde* I-p93 Δ547-723 とした (Appendix-15)。

His,GST-p93 C 末端 463-723 欠失変異体 (pET14b, pGEX4T-3*Nde* I-p93Δ463-723) 発現ベクターの構築

pET14b-p93 を鋳型にして 5' 端プライマー NSP V forward ;

CGATCTTTCGACTTTCCAAGTG（下線部は *Nde* I サイトを示す）および 3'端プライマーΔ463-723 *Eco*RI R；CTCCTCCTGAATTCTCA**TTCCCTCGCCTCAGCCTTG**（下線部は *Eco* RI サイト、太字は終止コドンを示す）により PCR を行った。PCR 産物を *Nsp* V と *Eco*RI により消化し、その消化断片と、*Nsp* V と *Eco* RI により消化し切り出し精製した p93-pET14b を用いてライゲーション反応を行った。DNA シークエンス解析により、正しい塩基配列およびジャンクションであることを確認したベクターを pET14b-p93Δ463-723 とした。また、pET14b-p93Δ463-723 を *Nde* I、*Eco* RI 消化し、切り出し精製した DNA 断片と *Nde* I、*Eco* RI によって切断し BAP 処理した pGEX4T-3*Nde* I を用いてライゲーション反応を行った。これにより、得られたベクターを pGEX4T-3*Nde* I-p93Δ463-723 とした（Appendix-16）。

His,GST-p93 C 末端 406-723 欠失変異体発現ベクター（pET14b、pGEX4T-3*Nde* I-p93Δ406-723)の構築

pET14b-p93 を鋳型にして 5'端プライマー *Mlu* I F；CAAGATTCCCATGGACTCGG
3'端プライマーΔ406-723 *Eco* RI R；

CCTCCTCCTGAATTCTCA**GGAGGAGAAGATGTGAACAG**（下線部は *Eco* RI サイト、太字は終止コドンを示す）を PCR を行い、増幅した産物を Tvector にライゲーション反応を行った。DNA シークエンス解析により正しい塩基配列をもつ PCR 産物が挿入されたベクターを得た。このベクターを *Mlu* I および *Eco* RI によって消化し、切り出し精製した DNA 断片と *Mlu* I および *Nde* I で消化し BAP 処理した pET14b-p93 とライゲーション反応を行った。これにより得られたベクターを pET14b-Δ406-723 とした。また、pET14b-Δ406-723 を *Nde* I、*Eco*RI 消化し切り出し精製した DNA 断片と *Nde*I、*Eco* RI によって切断し、BAP 処理した pGEX4T-3*Nde* I を用いてライゲーション反応を行った。これにより、得られたベクターを pGEX4T-3*Nde* I-p93Δ406-723 とした（Appendix-17）。

His,GST-p93 60-623 欠失変異体発現ベクター（pGEX4T-3*Nde* I-p93 60-623)の構築

pET14b-p93 を鋳型にして 5'端プライマーΔ1-60 F；

GGAGGAGGACATATG G GACTGAGGGTGTTCACCAAA（下線部は *Nde* I サイトを示す）および、3'端プライマー *Nco* I Reverse;TCGACTGTCTTTGTGGGGCAG を PCR により増幅した。得られた PCR 産物を *Nde* I および *Nco* I で消化した。この消化断片と、*Nde* I および *Nco* I で消化し BAP 処理した pET14b-Δ623-723 とライゲーション反応を行った。DNA シークエンス解析により、正しい塩基配列およびジャンクションであることを確認したベクターを pET14b-p93 60-623 とした。また、pET14b-60-623 を *Ned* I、*Eco* RI 消化し切り出し精製した DNA 断片と *Ned* I、*Eco* RI によって切断し BAP 処理した pGEX4T-3*Nde* I を用いてライゲーションした。これにより得られたベクターを、pGEX4T-3*Nde* I-p93-60-623 とした（Appendix-18）。

GST-p93 127-623 欠失変異体発現ベクター（pGEX4T-3*Nde* I-p93 127-623）の構築
pET14b-p93 を鋳型にして 5'端プライマーΔ1-127 F；

GGAGGAGGACATATGATCTTCGAGGTGCCGCTGTC（下線部は *Ned* I サイトを示す）

および 3'端プライマー *Nco* I Reverse;

TCGACTGTCTTTGTGGGGCAG を PCR により増幅した。得られた PCR 産物を *Ned* I および *Nco* I で消化し、*Ned* I および *Nco* I で消化し BAP 処理した pET14b-Δ623-723 とライゲーション反応を行った。DNA シークエンス解析により、正しい塩基配列およびジャンクションであることを確認したベクターを pET14b-p93 127-623 とした。また、pET14b-127-623 を *Ned* I、*Eco* RI 消化し切り出し精製した DNA 断片と *Ned* I、*Eco* RI によって切断し BAP 処理した pGEX4T-3*Nde* I を用いてライゲーション反応を行った。これにより、得られたベクターを pGEX4T-3*Nde* I-p93 127-623 とした（Appendix-19）。

GST-p93 175-623 欠失変異体発現ベクター（pGEX4T-3*Nde* I-p93 175-623）の構築
pET14b-p93 を鋳型にして 5'端プライマーΔ1-175 F;

GGAGGAGGACATATG GATCCTGTAGACAAGTTCCAC（下線部は *Ned* I サイトを示す） 3'端プライマー *Nco* I Reverse;TCGACTGTCTTTGTGGGGCAG を PCR により

増幅した。得られた PCR 産物を *Ned* I および *Nco* I で消化した。消化した PCR 産物は、*Ned* I および *Nco* I で消化し BAP 処理した pET14b-Δ623-723 とライゲーション反応を行った。DNA シークエンス解析により、正しい塩基配列およびジャンクションであることを確認したベクターを pET14b-p93 175-623 とした。また、pET14b-127-623 を *Ned* I、*Eco* RI 消化し切り出し精製した DNA 断片と *Ned* I、*Eco* RI によって切断し BAP 処理した pGEX4T-3*Nde* I を用いてライゲーション反応を行った。これにより、得られたベクターを pGEX4T-3*Nde* I-p93 175-623 とした (Appendix-20)。

His-p93 296-623 欠失変異体発現ベクター (pET14b-p93 296-623)の構築

p93-pET14b を鋳型にして 5'端プライマーΔ1-296 F;

GGAGGAGGACCATATGAAGTACGAGGGCAAGCTGG (下線部は *Ned* I サイトを示す)

3'端プライマー *Nsp* V R; GATGGAGGAGAAGATGTGAAC を用いて PCR により増幅した。得られた PCR 産物は、*Ned* I および *Nsp* V で消化した。消化した PCR 産物と、*Ned* I および *Nsp* V により消化し BAP 処理した pGEX4T-3*Nde* I-p93Δ623-723 を用いてライゲーション反応を行った。DNA シークエンス解析により、正しい塩基配列であることを確認したベクターを pET14b-p93 296-623 とした (Appendix-21)。

His-p93 405-623 欠失変異体発現ベクター (pET14b-p93 405-623)の構築

Ned I、*Bss* H II により消化し、BAP 処理した pET14b-p93Δ623-723 と pET14b-p93Δ1-405 を *Ned* I、*Bss* H II により消化し切り出し精製した DNA 断片とライゲーション反応を行った。これにより、得られたベクターを pET14b-p93 405-623 とした (Appendix-22)。

p130 組み換え体発現ベクター発現ベクターの構築

GST-p130 (pGEX4T-3*Nde* I-p130)発現ベクターの構築

霜島らによって構築された pET14b-p130 を *Nde* I および *Eco* RV によって消化し、

切り出し精製した DNA 断片と *Ned* I および *Sma* I により消化し、BAP 処理した pGEX4T-3*Nde* I を用いてライゲーション反応を行った。これにより得られたベクターを、pGEX4T-3*Nde* I-p130 とした (Appendix-23)。

GSTp130N 末端 1-412 欠損変異体発現ベクター(pGEX4T-3*Nde* IΔ1-412)の構築

pET14b-p130 を鋳型にして 5'端プライマー p130Δ1-412 F ;

GGAGGAGGACATATGCAGGGCACCGAGATCCTGG (下線部は *Ned* I サイトを示す)

3'端プライマー p130 Bss HIIR; CCTGCCTGGCCAGTCGATC

を用いて PCR を行った。得られた PCR 産物を *Ned* I および *Bss* HII により消化した。その消化産物と、*Ned* I および *Bss* H II により消化し、BAP 処理した pET14b-p130 を用いてライゲーション反応を行った。DNA シークエンス解析により、正しい塩基配列およびジャンクションであることを確認したベクターを pET14b-p130Δ1-412 とした。pET14b-p130Δ1-412 は、*Ned* I および *Eco* RV により消化し切り出し精製した DNA 断片と、*Ned* I および *Sma* I により消化し BAP 処理した pGEX4T-3*Nde* I を用いてライゲーション反応を行った。これにより得られたベクターを pGEX4T-3*Nde* I-p130Δ1-412 とした (Appendix-24)。

GSTp130C 末端 1-412 欠失変異体発現ベクター(pGEX4T-3*Nde* IΔ413-1032)の構築

pET14b-p130 を鋳型にして、5'端プライマー

p130 Sac II F;GAGGAGCCTACAGCCTGAAG、および 3'端プライマー p130Δ413-1032 Not I R ; TCCTCCTCCGCGGCCGCTAATCTTCTTTAGCGGTCTTCTTG

(下線部は *Not* I サイトを示す) を用いて PCR を行った。得られた PCR 産物を *Sac* II および *Not* I により消化し、その消化断片と *Sac* II および *Not* I より消化し BAP 処理した pGEX4T-3*Nde* I-p130 を用いてライゲーション反応を行った。DNA シークエンス解析により、正しい塩基配列およびジャンクションであることを確認したベクターを pET14b-p130Δ1-412 とした。また、pET14b-p130Δ1-412 を *Sac* II および *Not* I により消化し、切り出し精製した DNA 断片と、*Sac* II、*Not* I により消化し BAP 処理した pGEX4T-3*Nde* I-p130 を用いてライゲーション反応を行った。これにより、

得られたベクターを、pGEX4T-3Nde Ip130Δ413-1032 とした (Appendix-25)。

GSTp130C 末端 922-10322 欠失変異体発現ベクター(pGEX4T-3Nde IΔ922-1032)の構築

p130Stu I-Not I F ; CCTACAATCCCACCGACGCCGAATCGGATATGGC

p130Stu I-Not I R ; GGCCGCCATATCCGATTCGGCGTCGGTGGGATTGTAGG

の 2 本の合成 DNA をアニーリングし 5'端をリン酸化した。これにより得られた 2 本鎖 DNA は 5'端、3'端にそれぞれ *Stu* I および *Not* I 消化部位を形成する。この 2 本鎖 DNA と *Stu* I および *Not* I 消化し BAP 処理した pGEX4T-3Nde I-p130 を用いてライゲーション反応を行った。これにより、得られたベクターを pGEX4T-3Nde IΔ922-1032 とした (Appendix-26)。

GSTp130N 末端 1-578 欠失変異体発現ベクター(pGEX4T-3Nde Ip130Δ1-578)の構築

p130Sac I F ; TATGGGCGGCGGCGCTAGCGGAGCT

p130Sac I R ; CCGCTAGCGCCGCCGCCCA

の 2 本の合成 DNA をアニーリングし 5'端をリン酸化した。これにより得られた 2 本鎖 DNA は 5'端、3'端にそれぞれ *Sac* I および *Not* I 消化部位を形成する。この 2 本鎖 DNA と *Sac* I および *Not* I 消化し、BAP 処理した pGEX4T-3Nde I-p130 を用いてライゲーション反応を行った。これにより、得られたベクターを pGEX4T-3Nde Ip130Δ1-578 とした (Appendix-27)。

GSTp130Δ1-892 欠失変異体発現ベクター(pGEX4T-3Nde I-p130 Δ1-885)の構築

pGEX4T3-p130 を 鋳 型 に し て 、 5' 端 プ ラ イ マー p130Δ1-892 F ;
GGAGGAGGACATATGGACCCGGAATCGGGCAGCG (下線部は *Ned* I サイトを示す) および 3'端プライマー 3'pGEXsequencing primer ;

CCGGGAGCTGCATGTGTCAGAGG により PCR を行った。PCR 産物を *Ned* I および *Not* I 消化した用いて、*Ned* I および *Not* I 処理したベクター pGEX4T-3Nde I にライゲーション反応を行った。DNA シークエンス解析により、正しい塩基配列で

あることを確認したベクターは、pGEX4T-3Nde I-p130 Δ 1-885 とした (Appendix-28)。

GST-GAGA 因子、p93、p130 およびその欠失変異体の発現と可溶画分の調製

pGEX4T-3Nde I-GAGA を BL21(DE3)pLysS 株 (Stratagene) に 50 μ g/ml の Ampicillin と 34 μ g/ml の chloramphenicol を含んだ LB プレート上に形質転換し、37 $^{\circ}$ C で 1 晩インキュベートした。2% の Glucose、100 μ g/ml の Ampicillin、34 μ g/ml の Chloramphenicol を含んだ 3ml の 2 xYT 培地に数個のコロニーを爪楊枝で摘み、37 $^{\circ}$ C で対数増殖期に至るまで培養した。2 l のバッフルフラスコ中に 100 μ g/ml の Ampicillin、34 μ g/ml の chloramphenicol を含んだ 600ml の 2 xYT 存在下に、1/100 volume の前培養液を加えた。懸濁度(O.D.=600)が 0.3 に至るまで 37 $^{\circ}$ C 160rpm で振とう培養し、その後 23 $^{\circ}$ C で培養を続け、O.D.=600 が 0.5 から 0.6 に到達した時点で 1M の IPTG を 300 μ l (最終濃度 0.5mM) 加え誘導を開始し、23 $^{\circ}$ C で 160 rpm、1 時間振とう培養した。培養後、バッフルフラスコごと 10 分間氷冷した培養液は、350ml 容量のボトルに移し J-Lite™ローター(Beckman J2-HC)を用いて、4 $^{\circ}$ C、5,000 rpm、5 分間遠心し上清を分離し、大腸菌を回収した。続いて、600ml の大腸菌ペレットに対し 10ml の HEMGN バッファー (25mMHEPES-KOH(pH7.6)、500 mM KCl、0.1mM EDTA、12.5mM MgCl₂、10 % Glycerol、0.1% NP-40、1mM DTT、1mM PMSF)を加え懸濁した。パラフィルムをまいた 50ml のピーカーに大腸菌懸濁液を移し、ソニケーターおよびフラットチップ (BRANSON)を用いて、氷中で大腸菌を strength 5-6、interval 2 秒、20 秒間ソニケーションし 90 秒間氷中で静置した。この操作を 5-6 回繰り返した。破碎液は、JA17,000 ローター(Beckman J2-HC)で 4 $^{\circ}$ C、15,000rpm、20 分間遠心し上清を回収し可溶画分とした。可溶画分は小分けして液体窒素で凍結後-80 $^{\circ}$ C に凍結保存した。GST-GAGA 及び GST-GAGA 欠損変異体は、この可溶画分を直接グルタチオンセファロース(Amerasaham Pharmacia Biotech 4B)に結合させ、GST-プルダウンアッセイに用いた。GST-p93 およびその欠失変異体、GST-p130 およびその欠失変異体の可溶画分の調製について：600ml の大腸菌ペレットに対し 10ml の Buffer A(20mM Tris-HCl (pH7.9)、400mM NaCl、0.1mM EDTA、10 % Glycerol、0.05%NP-40、1mM PMSF、1mM DTT)を加えて懸濁して調製した以外、すべての操作は GST-GAGA の可容画

分を調製した場合と同様に行った。

His-GAGA 及び His- GAGA 因子欠失変異体の精製

pET28a-GAGA もしくは D-RII GAGA を BL21(DE3)pLysS 株に 50 μ g/ml の Kanamycin と 34 μ g/ml の chloramphenicol を含んだ LB プレート上に形質転換し、37 $^{\circ}$ C で 1 晩インキュベートした。100 μ g/ml の Kanamycin、34 μ g/ml の Chloramphenicol を含んだ 3ml の 2 xYT に数個のコロニーを爪楊枝で摘み、37 $^{\circ}$ C で対数増殖期に至るまで培養した。可溶画分の調製法は、GST-GAGA の場合と同じである。His-GAGA はこの可溶画分をニッケル樹脂 (Ni-NTA,QIAGEN)を用いて精製した。オープンカラム (Poly-Prep chromatography Columns, Biorad)に充填したニッケル樹脂を、HEMGN で平衡化した。可溶画分を充填し、その流出画分を再度充填した。次に、10ml の 5mM イミダゾールを含む HEMGN、10ml の 20mM イミダゾールを含む HEMGN、10ml の 60mM イミダゾールを含む HEMGN を順に加えてニッケル樹脂に非特異的に結合している夾雑物を除去した。そして 5ml の 500mM イミダゾールを含む HEMGN で溶出させた。溶出した画分は、SDS-PAGE およびクマシーブルーで染色しフラクションを確認した。イミダゾールを除去するためにメインフラクションを透析チューブ (Spectra/Por®Membrane 6 MWCO;3500 Spectrum Laboratories, Inc.) に詰め、500ml の HEMGN バッファー中で 90 分間透析した。この操作を 2 回繰り返した。透析後のタンパク質は、小分けして液体窒素で凍結後-80 $^{\circ}$ C に凍結保存した。

His-p93 および His-p93 欠失変異体の精製

pET14b-p93 を BL21Codon Plus™(DE3)-RIL 株 (Stratagene)に 50 μ g/ml の Ampicillin と 34 μ g/ml の chloramphenicol を含んだ LB プレート上に形質転換し、37 $^{\circ}$ C で 1 晩インキュベートした。100 μ g/ml の Ampicillin、34 μ g/ml の Chloramphenicol を含んだ 3ml の LB に数個のコロニーを爪楊枝で摘み、37 $^{\circ}$ C で対数増殖期に至るまで培養した。可溶画分の調製は、GST-GAGA の調製法と同じ手順で行った。オープンカラム (Biorad)に充填したニッケル樹脂を、Buffer A で平衡化し、可溶画分を充填した。続いて、その流出画分を再度充填した。次に、10ml の 5mM イミダゾールを含む

BufferA、10ml の 20mM イミダゾールを含む Buffer A を順に加えてニッケル樹脂に非特異的に結合している夾雑物を除去した。そして 5ml の 500mM イミダゾールを含む BufferA で溶出させた。溶出した画分は、SDS-PAGE そしてクマシーブルーで染色した後、メインフラクションを確認した。イミダゾールを除去するためにメインフラクションを透析チューブに詰め、500ml の Buffer A 中で 90 分間透析し、これを 2 回繰り返した。透析後のタンパク質は、小分けして液体窒素で凍結後-80℃に凍結保存した。

Continuous gel を用いた SDS-PAGE

His-p93、p130 は、スタッキングゲル (pH6.8)セパレーションゲル (pH8.8)を用いて、SDS-PAGE を行うと高分子領域にスミアリングを生じた (図 1 A)。この原因として、スタッキングゲル中で p93 および p130 が濃縮される際、アグリゲーションを引き起こした可能性が考えられた。そこでスタッキングゲルを無くした continuous ゲル(pH8.8)を使用し、SDS-loading バッファー(50mM Tris-HCl, pH6.8, 100 mM DTT, 2 % SDS, 0.1 % Bromophenol blue, 10 % Glycerol)についても Tris-HCl6.8 から pH8.8 に置き換えた。結果、高分子領域に見られたスミアリングを解消できた (図 1B)。しかし、欠点としてタンパク質は濃縮されず、ブロードなバンドとなること、また、アプライする量が多いと、泳動が遅くなりバンドの位置が変わってしまうことが観察された。そのために、SDS-loading バッファーを加えてアプライする量をできるだけ合わせるようにした。

GST-pull down assay (His-p93 と GST-GAGA および GST-GAGA 欠失変異体)

bed volume 5.0μl のグルタチオンセファロース (Amersham PharmaciaBiotech AB) をシリコナイズチューブ (Safe Seal Microcentrifuge Tubes, Sorenson™, Bioscience, Inc.) に加え、200 μl の HEMGNB(HEMGN+0.1μg/μl BSA)を加え、転倒混和し 4℃、3000 rpm 1 分間遠心し上清を注意深く取り除いた。この操作を 3 回繰り返した。続いて、グルタチオンセファロースに約 2.0μg 結合するように、GST-GAGA あるいは GST-GAGA 欠損変異体の可溶化画分を加え、ローテーター(Mini Disc RotorBc-710,

BIO CRAFT)にチューブを水平になるように差し込み 4℃で 1 時間反応させた。反応後、200 μ l の HEMGNB でグルタチオンセファロースを 1 回洗浄し、続いて 400 μ l の Reaction バッファー(20mM Tris-HCl pH7.9、200mM NaCl, 0.2mM EDTA、0.1%NP-40, 4mM MgCl₂, 20 % Glycerol, 0.1 μ g/ μ l BSA)で 2 回洗浄した。0mM reaction バッファー(20mM Tris-HCl [pH7.9]、0.1mM EDTA、0.1%NP-40, 4mM MgCl₂, 20 % Glycerol, 0.1 μ g/ μ l BSA)を用いて NaCl の最終濃度を 200mM になるように His-p93 を希釈し、50 μ l の反応系に 1.0 μ g 加えた。ローテーターにチューブを水平になるように差し込み 4℃で 1 時間反応させた。反応後、400 μ l の Reaction バッファーで 3 回洗浄し、2 \times SDS-loading Buffer (pH8.8)を加え、95℃で 5 分間熱変性させた。これらのサンプルは、8%continuous gel を用いて、SDS-PAGE を行った。

GST-pull down assay (His-GAGA、His-GAGA 欠失変異体と GST-p93 および GST-p93 欠失変異体)

bed volume 5.0 μ l のグルタチオンセファロースをシリコナイズチューブに加え、200 μ l の Buffer A+BSA(Buffer A+0.1 μ g/ μ l BSA)を加え、転倒混和し 4℃、3000 rpm 1 分間遠心し上清を注意深く取り除いた。この操作を 3 回繰り返した。続いて、グルタチオンセファロースに約 2.0 μ g 結合するように、GST-p93 あるいは GST-p93 欠失変異体の可溶化画分を加え、ローテーターにチューブを水平になるように差し込み 4℃で 1 時間反応させた。反応後、200 μ l の 200 μ l の Buffer A+BSA でグルタチオンセファロースを 1 回洗浄し、400 μ l の Reaction バッファー(20mM Tris-HCl [pH7.9]、200mM NaCl, 0.1mM EDTA、0.1%NP-40, 4mM MgCl₂, 20 % Glycerol, 0.1 μ g/ μ l BSA)で 2 回洗浄した。0mM reaction バッファー(20mM Tris-HCl [pH7.9]、0.1mM EDTA、0.1%NP-40, 4mM MgCl₂, 20 % Glycerol, 0.1 μ g/ μ l BSA)を用いて KCl の最終濃度を 200mM になるように His-GAGA を希釈し、50 μ l の反応系に 1.0 μ g 加えた。ローテーターにチューブを水平になるように差し込み 4℃で 1 時間反応させた。反応後、400 μ l の Reaction バッファーで 3 回洗浄し、2 \times SDS-loading Buffer (pH6.8)を加え、95℃で 5 分間熱変性させた。これらのサンプルは、8% discontinuous gel を用いて、SDS-PAGE を行った。

GST-pull down assay (His-p93 と GST-p130 および GST-p130 欠損変異体)

His-p93 欠損変異体と GST-p130 および GST-p130 欠損変異体

bed volume 5.0 μ l のグルタチオンセファロースをシリコナイズチューブに加え、200 μ l の Buffer A+BSA(Buffer A+0.1 μ g/ μ l BSA)を加え、転倒混和し 4℃、3000 rpm 1 分間遠心し上清を注意深く取り除いた。この操作を 3 回繰り返した。続いて、グルタチオンセファロースに約 2.0 μ g 結合するように、GST-p130 あるいは GST-p130 欠損変異体の可溶化画分を加え、ローテーターにチューブを水平になるように差し込み 4℃で 1 時間反応させた。反応後、200 μ l の 200 μ l の Buffer A+BSA でグルタチオンセファロースを 1 回洗浄し、400 μ l の Reaction バッファー(20mM Tris-HCl [pH7.9]、200mM NaCl, 0.1mM EDTA、0.1%NP-40, 4mM MgCl₂, 20 % Glycerol, 0.1 μ g/ μ l BSA)で 2 回洗浄した。0mM reaction バッファー(20mM Tris-HCl [pH7.9]、0.1mM EDTA、0.1%NP-40, 4mM MgCl₂, 20 % Glycerol+0.1 μ g/ μ l BSA)を用いて NaCl の最終濃度を 60mM になるように His-p93 を希釈し、50 μ l の反応系に 1.0 μ g 加えた。ローテーターにチューブを水平になるように差し込み 4℃で 1 時間反応させた。反応後、Reaction バッファーで 3 回洗浄し、2 \times SDS-loading Buffer (pH8.8)を加え、95℃で 5 分間熱変性させた。これらのサンプルは、8% continuous gel を用いて、SDS-PAGE を行った。

ウエスタンブロッティング法

ニトロセルロースメンブラン (PROTRAN BA83, Schleicher & Schuell) を蒸留水ですすいだ後、メンブランをトランスファーバッファー (50mM Tris, 380mM Glycine、0.1 % SDS, 20% Methanol)に浸し、続いて 45V 定電圧で、4℃、2 時間ゲル中のタンパク質をニトロセルロースメンブラントランスファーした。トランスファーしたメンブランは、ブロッキングバッファー(20mM Tris-Cl [pH8.0], 150mM NaCl, 0.05 % Tween20, 5% Skim milk)を用いて室温で 30 分間ブロッキングさせた。一次抗体は、p93 の検出については抗 p93 抗ラビットポリクローナル抗体、His-GAGA については抗ポリヒスチジン抗マウスモノクローナル抗体を用いて、それぞれ、ブロッキングバッファーで 50,000 倍、2,000 倍にそれぞれ希釈して室温で 1 時間反応させた。

反応後、メンブランは TBST(20mM Tris-Cl [pH8.0], 150 mM NaCl, 0.05 % Tween20) 中に浸し 5 分間振とうし、これを 3 回繰り返した。2 次抗体は、抗 p93 抗ラビットポリクローナル抗体については、抗ラビット Ig-HR 標識抗体、抗ポリヒスチジン抗マウスモノクローナル抗体については、抗マウス Ig-HRP 標識抗体を用いて、それぞれブロッキングバッファーで 5,000 倍、2,000 倍希釈し室温で 1 時間反応させた。反応後、メンブランは TBST 中に浸し 5 分間振とうし、これを 3 回繰り返した。ペルオキシダーゼ基質 (Super Signal, PIERCE) 液に、5 分間浸した。シグナルは、X 線フィルム(RX-U FUJI MEDICAL X-RAY FILM, FUJIFIM)を用いて検出した。

ショウジョウバエ多糸染色体の免疫抗体染色法

Flag-GAGA を発現するトランスジェニックフライ (*yw;p{w+, Flag-GAGA}*)

を 18℃で飼育し、3 齢幼虫を 0.1% NP-40 を含んだ 0.7% NaCl 液中で解剖し、唾液腺染色体を摘出した。続いて、唾液腺染色体は、0.5% NP-40 を含んだ 0.7% NaCl 液中に移し、5 分間静置した。シリコナイズ (SIGMACOTE®, SIGMA) 処理した 22mm × 22mm カバーガラス上に 30μl の Pre-Fix (1.0% Tritonx-100, 1.8% Formaldehyde を含んだ 0.7% NaCl) 液を加え、唾液腺染色体を 30 秒間浸した。直ちに、Pre-Fix 液を取り除き、15μl の Fix 液 (0.1% NP-40, 50% Acetic acid, 1.8% Formaldehyde を含んだ 0.7% の NaCl 溶液) を加え、2 分間静置した。poly-Lysine(POLY-L-LYSINE SOLUTION, SIGMA) 処理したスライドガラスを静かに被せ、Fix 液がこぼれないように注意しながら、ひっくり返した。カバーガラスに触れる程度に人差し指を載せて、横長の楕円を描くように 2-3 回転させた。その後、消しゴム付きの鉛筆のゴムの部分で叩き、唾液腺染色体をスカッシュした。液体窒素で凍結した後、剃刀でカバーガラスを外しスライドガラスを PBS 中に 15 分間リンスした後、ブロッキングバッファー(20mM Tris-Cl [pH 8.0], 150mM NaCl, 0.05 % Tween20, 5% Skim milk)を用いて室温で 30 分間ブロッキングさせた。一次抗体は、p93、p130 の検出については抗 p93 あるいは抗 p130 ラビットポリクローナル抗体、Flag-GAGA については抗 Flag マウスモノクローナル抗体 (M2, KODAK)を用いて、それぞれ、ブロッキングバッファーで 100 倍、200 希釈した後混合し 100μl 加え、カバーガラスを被せた。

これらの反応は、保湿容器中にスライドガラスを置き 4℃で1晩反応させた。反応後、スライドガラスは TBST 中に浸し 10 分間振とうし、これを 3 回繰り返した。2 次抗体の反応に際し、抗 p93, p130 ラビットポリクローナル抗体については、Alexa488 標識抗ラビット Ig ポリクローナル抗体、抗 Flag マウスモノクローナル抗体 (M2)については、Cy3 あるいは Rhodamine Red 標識マウス Ig ポリクローナル抗体を用いて、500μl のブロッキングバッファー溶液中にそれぞれの抗体を 1.0μl 加えた。混合した後 100μl ずつ滴下し、カバーガラスを被せた。これらの反応は、保湿容器中にスライドガラスを置き、遮光しながら室温で 2 時間反応させた。反応後、スライドガラスは TBST 中に浸し 10 分間振とうし、これを 3 回繰り返した。シグナルの衰退を防止し、また DNA を染色するために、VECTASHIELD®H-1200(VECTOR)液を 1 滴滴下した。カバーガラスを被せ余剰な液をキムワイプで吸い取った後、光学顕微鏡により観察した。熱処理したパフを抗体染色する際、前処理として、3 齢幼虫を 50ml のファルコンチューブに入れ、37℃恒温層の中に沈め 30 分間放置した。

トランスジェニックフライ用の発現ベクターの構築

kozak 配列および Flag ペプチドをコードする配列を含んだ 2 つの合成 DNA

XhoI-Kozak-FlagF ;

TATCCTCGAGACCATGGACTACAAGGATGACGATGACGATGACAAGGA

XhoI-Kozak-FlagR ;

TATCCTTGTCATCGTCATCCTTGTAGTCCATGGTCTCGAGGA (下線部は Kozak 配列、太字は FlagTMのアミノ酸配列 DYKDDDDK をコードする塩基配列を示す) の 2 つの合成 DNA をアニーリングし 5'端をリン酸化した。これにより、得られた 2 本鎖 DNA の両端には、Nde I 消化部位を形成する。この 2 本鎖 DNA を用いて、Nde I で消化し BAP 処理した pET14b-p93-Eco RI および pET14b-p130 とそれぞれライゲーションし、DNA シークエンス解析を行った。合成 DNA が正しい向きに挿入され、かつオリゴ DNA が重複してライゲーションされていないことを確認したベクターは、それぞれ pET14b-Flag-p93 および pET14b-Flag-p130 とした。

pET14b-Flag-p93 は、*Xho* I、*Eco* RI により消化し、切り出し精製した DNA 断片と *Xho* I および *Eco* RI により消化し、BAP 処理した pCasperHS83 を用いてライゲーション反応を行った。これにより得られたベクター pCasperHS83-Flag-p93 とした (Appendix-29)。pET14b-Flag-p130 についても同様に、*Xho* I および *Eco* RI により消化し、切り出し精製した DNA 断片と、*Xho* I および *Hpa* I により消化し、BAP 処理した pCasperHS83 を用いてライゲーション反応を行った。これにより得られたベクター pCasperHS83-Flag-p130 とした (Appendix-30)。

トランスジェニックフライの作製

アルカリ法で抽出したプラスミド DNA を RNase A 処理および PEG 沈殿後、フェノール：クロロホルム：イソアミルアルコール (25 : 24 : 1) で抽出し、水層からプラスミド DNA を 2 回エタノール沈殿した。これを 200ml の 5mMKPO₄ (pH6.8)、150 mM KCl のバッファーに溶かし、エタノール沈殿を行った。その後、95%のエタノールでリンスし、真空乾燥後、ペレットは 1×Injection バッファー (0.1mM KPO₄(pH6.8)、5 mM KCl) に溶解した。このプラスミド溶液とヘルパープラスミド (p π)を重量比 2 : 1 で混合し 300ng/ μ l になるように 1×Injection バッファーを用いて調製した。0.45 μ m の HPLC 試料用ろ過器 (Micron)に載せて、室温で 2000rpm、30 秒間遠心し、ろ液をインジェクション用に使用する DNA 溶液とした。キイロシヨウジョウバエ yw 系統を使用し、生イーストを塗布した産卵用プレート (50% apple juice、2.5 %Glucose、2.5%Agar) に 20 分間産卵させた。産卵後、0-20 分後の受精卵をカバーガラスに並べた。ニードルプラー (Model PB-7, NARISHIGE CO., LTD) を用いて芯入硝子管 (Model GD-1, NARISHIGE CO., LTD) の先端を尖らし、DNA 溶液を充填した。そして、受精卵にエタノールを滴下し、倒立顕微鏡下で DNA 溶液を注入した。注入した受精卵は、25 °C で飼育し、羽化した成虫を G0 とした。G0 の成虫は、yw;Cyo/Gla と交配した。形質転換に使用した、pCasperHS83 ベクターには、w 遺伝子を組み込んでいるため、交配の結果出現した G1 世代のうち、w+個体を形質転換体と判断した。次に Flag-p93、トランス遺伝子が第 3 番染色体に組み込まれている個体を得るために、w+個体の雄と yw; ePrDr/TM3y+ の雌と交配した。

その結果、得られた個体 *yw;+/-;p[w+;Flag-p93]/ePrDr* (or *TM3y+*)を得た。
yw;+/-;p[w+;Flag-p93]/ePrDr (or *TM3y+*)同士を掛け合わせて、ホモ接合体、*yw;+/-;p[w+;Flag-p93]/p[w+;Flag-p93]*を得た。Flag-p130 についてはトランス遺伝子が第 2 番染色体に組み込まれている個体を得るために、*w+*個体の雄と *yw; Gla/Cyoy+*の雌と交配した。その結果、得られた個体 *yw;Cyoy+(or Gla)/p[w+;Flag-p130]*を得た。
*yw;Cyoy+(or Gla)/p[w+;Flag-p130]*同士を掛け合わせて、ホモ接合体、*yw; p[w+;Flag-p130]/p[w+;Flag-p130]*を得た。

*yw; Df(2R)bw[VDe2L]Px[KR]/Cyoy; p[w+;Flag-p93]/p[w+;Flag-p93]*の作製
N164 y+w+; Df(2R)bw[VDe2L]Px[KR]/SM1 の雄と *yw; + /Gla; +/TM3sersby+*の雌を交配した。これにより 3 番染色体に balancer が導入された個体、*yw;Df(2R)bw[VDe2L]Px[KR]/Gla; +/- TM3sersby+*を得た。一方、*yw; +/-; p[w+;Flag-p93]/p[w+;Flag-p93]*の雄と *yw;+/-;Cyoy; +/TM3sersby+* の雌を交配し、2 番染色体に balancer を導入した個体 *yw;+/-;Cyoy; p[w+;Flag-p93]/ TM3sersby+*を得た。
*yw;Df(2R)bw[VDe2L]Px[KR]/Gla; +/- TM3sersby+*の雄と *yw;+/-;Cyoy; p[w+;Flag-p93]/ TM3sersby* の雌を交配し *yw; Df(2R)bw[VDe2L]Px[KR]/Cyoy; p[w+;Flag-p93]/ TM3sersby+*を得た。この個体同士を交配し *yw; Df(2R)bw[VDe2L]Px[KR]/Cyoy; p[w+;Flag-p93]/p[w+;Flag-p93]*を得た。

Position effect Variegation Test

ywm4, ras-2/Yy+Bs の雌と *yw; Aprt21/TM3y+*、*yw; Aprt21/TM3y+*、*yw; Aprt21Trl13c/TM3y+*、*y+w+; Df(2R)bw[VDe2L]Px[KR]/SM1*、*yw;P[w+, p130]; Aprt21/TM3y+*雄とそれぞれ交配し、18 度で飼育した。得られた個体

ywm4, ras-2/Yy+Bs ;Aprt 21/+;

ywm4, ras-2/Yy+Bs ;Aprt21 Trl13c/+;

ywm4, ras-2/Yy+Bs ;Df (2R)bw[VDe2L]Px[KR] /+;

ywm4, ras-2/Yy+Bs ;Df(2R) bw[VDe2L]Px[KR]/+;

*ywm4, ras-2/Yy+Bs ;P[w+, p130]; Aprt21/+*の雄をふ化後、12 時間以内に倒立顕微鏡

下で眼の表現系を観察した。

Two-hybrid screening のための酵母発現ベクター構築

pGADT7-GAGA, D-II GAGA 酵母発現ベクター 構築

*Nde*I, *Eco*RI 消化し、BAP 処理した pGADT7 ベクターと pGEX4T-3*Nde*I-GAGA および D-II GAGA を *Nde*I, *Eco*RI 消化し、切り出し精製した DNA 断片を用いてライゲーション反応を行った。これにより、得られたベクターを pGADT7-GAGA, pGADT7-GAGAD-II とした。

pGBKT7-p93(WT), p93 Δ623-723, p93 296-623 酵母発現ベクター 構築

*Nde*I, *Eco*RI 消化し、BAP 処理した pGBKT7 ベクターと pET14b-p93 *Eco*RI, pET14b-p93 Δ623, pET14b-p93 296-623 *Nde*I, *Eco*RI 消化し切り出し精製した DNA 断片を用いてライゲーション反応を行った。これにより、得られたベクターを pGBKT7-p93(WT), pGBKT7-p93 Δ623-723, pGBKT7-p93 296-623 とした (Appendix-31)。

pGBT9 *Nde*I-p93(WT), -p93 296-623 酵母発現ベクター 構築

pGBT9 ベクターに *Nde*I サイトを設けるために

pGBT9 MCS F ; AATTGCATATGGCCATGGAATTCCCGGGGCTGCA

pGBT9 MCS R ; GCGGCGGAATTCCATGGCCATATGC (下線部は *Nde*I サイトを示す) をアニーグしリン酸化した。得られた 2 本鎖 DNA には、*Eco*RI, *Pst*I の消化部位を形成する。この 2 本鎖 DNA を用いて、*Eco*RI, *Pst*I により消化し、BAP 処理をした pGBT9 とライゲーション反応を行った。これにより得られたベクターを pGBT9 *Nde*I とした。*Nde*I, *Eco*RI によって消化し BAP 処理した pGBT9 *Nde*I と pET14b-p93 *Eco*RI, pET14b-p93 Δ623, pET14b-p93 296-623 を *Nde*I, *Eco*RI によって消化し、切り出し精製した DNA 断片をそれぞれ、ライゲーション反応を行った。これにより、得られたベクターを pGBT9 *Nde*I-p93 pGBT9 *Nde*I -p93(WT), p93 Δ623, pGBT9 *Nde*I -p93 296-623 とした (Appendix-31)。

pACT 2 *Bss* H II-GAGA, D-R IIGAGA 酵母発現ベクター発現ベクターの構築

pACT2 ベクターに *Bss* H II サイトを設けるために

pACT2 5'MCS ; CATGGAGGCCGCGCGCGGATCCGAATTCGC , pACT2 3'MCS ;
TCGAGCGAATTCGGATCCGCGCGCGGCCTC (下線部は *Bss* H II サイトを示す)
の 2 本の合成 DNA の 5'端をアニーリングしリン酸化した。これにより得られた 2
本鎖 DNA の 5'端、3'端には、それぞれ *Nco* I , *Eco* RI の消化部位を形成する。こ
の 2 本鎖 DNA を用いて *Nco* I, *Eco* RI で消化し、BAP 処理した pACT2 ベクターと
ライゲーション反応を行った。得られたベクターを pACT 2 *Bss* H II とした。pAR-
GAGA を鋳型にして 5' 端 プライマー GAGA 5' *Bss* H II F ;
GAGGAGGAGGCGCGCAATACAAGCGGCGTCCTATCC (下線部は *Bss* H II サイト
を示す)

3'端プライマー GAGA *Eco* RI R ; AGGGAATTCGGCTCGGCTGCTGGAGGTGGC (下
線部は *Eco* RI サイトを示す) プライマーを用いて PCR を行い、得られた PCR 産
物を *Bss* H II および *Eco* RI で消化した。この消化した断片と *Bss* H II および *Eco* RI
で消化し、BAP 処理した pACT 2 *Bss* H II を用いてライゲーション反応を行った。
これにより、得られたベクターを pACT 2 *Bss* H II-GAGA とした。一方、5'端プラ
イ GAGAΔ1-310*Bss* H II F ; GGAGGAGGAGCGCGCATGAACTCGCTGTATTCGCTC
(下線部は *Bss* H II サイトを示す) とおよび 3'端プライマー ; GAGA *Eco* RI R を用
いて PCR を行い、得られた PCR 産物を *Bss* H II および *Eco* RI で消化した。この消
化した断片と *Bss* H II および *Eco* RI で消化し、BAP 処理した pACT 2 *Bss* H II を用
いてライゲーション反応を行った。これにより、得られたベクターを pACT 2 *Bss* H
II-D-R IIGAGA とした (Appendix-32)。

pGAD10 Nde I-GAGA, D-RII GAGA 酵母発現ベクター発現ベクターの構築

pGAD10 ベクターに *Nde*I サイトを設けるために、

Bam HI-*Nde*I- Bam HI ; GAT CCG GTC ATA TGA CCG をアニーリングし 5'端をリン酸化した。これにより得られた 2 本鎖 DNA と、*Bam* HI により消化し、BAP 処理した pGAD10 とライゲーション反応を行った。これにより得られたベクターを pGAD10 Nde I とした。*Nde*I および *Eco* RI 消化し、BAP 処理した pGAD10 Nde I と pGEX4T-3*Nde*I-GAGA および D-IIIGAGA を *Nde*I および *Eco* RI 消化、切り出し精製した DNA 断片をライゲーション反応を行った。これにより得られたベクターを、pGAD10 Nde I-GAGA および pGAD10 Nde I-D-RIIIGAGA とした (Appendix-33)。

pGADGL *Nde*I-GAGA, D-RII GAGA 酵母発現ベクター発現ベクターの構築

pGADGL ベクターに *Nde*I サイトを設けるために

pGADGL 5'MCS; GATCCCCATATGGCGCGCCCCGGGG

pGADGL 3'MCS; AATTCCCCGGGGCGCGCCATATGGG

をアニーリングし 5'端をリン酸化した。これにより、得られた 2 本鎖 DNA には、*Nde*I のサイトを新たに形成し、さらに 5'端および 3'端にそれぞれ *Bam* HI および *Eco* RI の消化部位を形成する。この 2 本鎖 DNA と *Bam* HI および *Eco* RI で消化し BAP 処理した pGADGL を用いてライゲーション反応を行った。得られたベクターを pGADGL *Nde*I とした。*Nde*I および *Eco* RI で消化し BAP 処理した pGADGL *Nde*I と pGEX4T-3*Nde*I-GAGA および D-RIIIGAGA を *Nde*I および *Eco* RI 消化、切り出し精製した DNA 断片を用いてライゲーション反応を行った。これにより、得られたベクターを pGADGL *Nde*I-GAGA, pGADGL *Nde*I-D-RIIIGAGA とした (Appendix-34)。

pGBKT7-human SSRP1(hp93)297-614、pGBKT7-hp93 297-709 酵母発現ベクターの構築

Hela cell cDNA library を鋳型にして、5'端プライマー hp93 *Nde*I forward ; GGAGGAGGACATATGGCAGAGACACTG (下線部は *Nde*I サイトを示す)

および 3' 端プライマー ; hp93 *Sma* I reverse ;

CTTCTTCCCCGGGCTACTCATCGGATCCTGACG (下線部は *Sma* I サイト、太字は終止コドンを示す) により PCR を行ったが、増幅されなかった。そこで、この PCR 反応液 (1 st PCR 反応液) を鋳型にして、human p93 の 297-614 の領域をクローニングするために、297-614 5' 端プライマー

hp93Δ 297 forward ; GGAGGAGGACATATGCGCTTTGAGGGTCGGCTCA (下線部は *Nde* I サイトを示す) および 3' 端プライマー hp93Δ614-709 *Sma* I ;

CTTCTTCCCCGGGCTAATATTCTTTCATGGCTTTTTTCATAG (下線部は *Sma* I サイト、太字は終止コドンを示す)、一方、human p93 の 297-709 の領域をクローニングするために、5' 端プライマー hp93Δ 297 forward ;

GGAGGAGGACATATGCGCTTTGAGGGTCGGCTCA および 3' 端プライマー hp93 *Sma* I reverse ; CTTCTTCCCCGGGCTACTCATCGGATCCTGACG (下線部は *Sma* I サイト、太字は終止コドンを示す) の組み合わせで PCR を行った。PCR 産物はそれぞれ *Nde* I および *Sma* I により消化した。消化した断片は、*Nde* I、*Sma* I により消化し BAP 処理した pGBKT7 ベクターとそれぞれライゲーション反応を行った。DNA シークエンス解析により、正しい塩基配列およびジャンクションであることが確認できたベクターを pGBKT7-hp93-297-614、pGBKT7-hp93-297-709 とした (Appendix-35)。

pGBKT7-hp93 1-614、pGBKT7-hp93 1-709 酵母発現ベクター発現ベクターの構築

1 st PCR 反応液を鋳型にして、5' 端プライマー hp93 *Nde* I ; foward;GGAGGAGGACATATGGCAGAGACACTG (下線部は *Nde* I サイトを示す) および 3' 端プライマー hp93 *Kpn* I reverse ; TGAGTGCCCTGCTTGGTCTC により PCR を行い、増幅した産物を *Nde* I、*Kpn* I により消化した。消化した断片を用いて、pGBKT7-hp93 297-614、pGBKT7-hp93 297-709 ベクターをそれぞれ *Nde* I、*Kpn* I により消化し、BAP 処理したベクターとライゲーション反応を行った。DNA シークエンス解析により、正しい塩基配列およびジャンクションをもつベクターを pGBKT7-hp931-614、pGBKT7-hp931-709 とした (Appendix-35)。

Two-hybrid assay

Two-hybrid assay を行うにあたり、MATCHMAKER GAL4 Two-Hybrid System 3(CLONETECH)をキットとして用いた。AH109 株(*MATa, trp1-901, leu2-3, 112, ura3-52, his3-200, gal4Δ, gal80Δ, LYS2::GAL1UAS-GALTATA-HIS3, GAL2UAS-GAL2TATA-ADE2, URA3::MEL1UAS-MEL1TATA-lacZ*)を YPD(20% Difco peptone , 10 % Yeast extract, 20 % Agar, 2 % Glucose) プレートに蒔き、30℃、一晩インキュベートした。シングルコロニーを滅菌した爪楊枝で拾い、5ml の YPD 培地で 30℃、一晩振とう培養した。翌日、50ml の YPD 培地に 2×10^6 cell/ml となるように希釈し、引き続き 30℃、3 時間振とう培養した。培養後、培養液を 50ml チューブに移し、JS4.3 ローター(Beckman J2-HC)を用いて、2,500 rpm、5 分間遠心し、上清を分離し、細胞を回収した。細胞は、10ml の LioAc で洗浄し、2,500 rpm、5 分間遠心し、上清を分離した。この操作を 2 回繰り返した後、細胞を懸濁した。懸濁した細胞 20 μ l に 14 μ l の calf thymus、0.5 μ l の形質転換用の DNA、0.5 μ l の 10 \times LioAc(1M Lithium Acetate Dehydrate, 1M Tris-HCl (pH7.5), 0.5M EDTA(pH8.0)) を加えた。この溶液に、120 μ l の PEG (44.44 % PEG #4000:10 \times LioAc=9:1)を加え、直ちにボルテックスし、30℃、30 分間インキュベートした。引き続き、42℃、15 分間インキュベートした。溶液は、室温、5,000 rpm 1 分間遠心し上清を分離し、300 μ l の TE (10 mM Tris-HCl (pH7.5), 1mM EDTA (pH 8.0))を加えて懸濁した。100 μ l の細胞懸濁液を SC/-Leu, -Trp プレートに広げ、30℃で3日間インキュベートした。SD/-Leu, -Trp プレート上に出現したコロニーを数個拾い、ポジティブコントロールとして、SD/-Leu, -Trp プレート、そして、Two-hybrid assay には SD/-Leu, -Trp,-Ade, -His+X- α -Gal プレート上にそれぞれストリークした。ベイトのタンパク質とプレイのタンパク質が相互作用した場合、青色のコロニーとして出現する。これにより、タンパク質間の相互作用の有無を判定した。

酵母粗抽出物の調製とウエスタンブロッティング

数個のシングルコロニーを滅菌した爪楊枝で拾い、5ml の SD/-Leu または SD/-Trp で 25℃一晩培養した。培養液は、 1×10^7 cells/ml となるように希釈し、5ml の SD/-

Leu または SD/-Trp 培地で 30℃、3 時間振とう培養した。培養液は JS4.3 ローターを用いて、2,500 rpm 1 分間遠心し上清を分離した。酵母のペレットは、1 ml の氷冷した Milli Q で懸濁し、1.5ml のチューブに移した。懸濁液に氷冷した YEX lysis バッファー (1.85 N NaOH, 7.5 % 2-mercaptoethanol)を加え、氷中に 10 分間静置した。引き続き、氷冷した 50% TCA を加え氷中に 10 分間静置した。静置後、チューブは、10,000 rpm、5 分間遠心し上清を分離した。50 μ l の 1×SDS-PAGE loading buffer (pH6.8)を加え、溶液が黄褐色のサンプルについては 3.6 μ l の 1 MTris-HCl (pH9.5)を加え中和した。このうち半分量を SDS-PAGE に用いた。トランスファーおよびトランスファーバッファーの条件は、ウエスタンブロッティングの項で述べた方法と同様である。一次抗体、抗 HA 抗マウスモノクローナル抗体(12CA5, BOEHRINGER MANNHEIM)あるいは抗 C-myc 抗マウスモノクローナル抗体(9E10, BOEHRINGER MANNHEIM)は、5%skim milk を含んだ TBST を用いて、それぞれ、400 倍、250 倍希釈して室温で 60 分間反応させた。二次抗体、HRP 標識抗マウスポリクローナル抗体は、5%skim milk を含んだ TBST を用いて 2000 倍に希釈して室温で 60 分間反応させた。

結果

GAGA 因子と p93-p130 の分子間相互作用

GAGA 因子、p93、p130 の 3 分子間の結合に関わる領域を決めるにあたり、最初に GAGA 因子が p93、p130 のどちらに結合するか否かを調べるために、GST タグをつけた GST-p93、GST-p130 と His タグを付加した His-GAGA を大腸菌 (GST-p93, p130 は BL21Codon Plus™(DE3)-RIL 株 His-GAGA は BL21(DE3)pLysS 株)により発現させたタンパク質を用いて GST プルダウンアッセイを行い、その結果を図 2A に示した。His-GAGA は、GST-p93 と結合し、GST-p130 とは結合しなかった。また、GST-p130、GST-GAGA、His-p93 を用いて、同様に GST プルダウンアッセイを行い、その結果を図 2B に示した。GST-p130、GST-GAGA 共に His-p93 と結合することが明らかになった。以上の結果から、GAGA 因子は、p93-p130 複合体の p93 と直接結合していることが示された。

Leu または SD/-Trp 培地で 30℃、3 時間振とう培養した。培養液は JS4.3 ローターを用いて、2,500 rpm 1 分間遠心し上清を分離した。酵母のペレットは、1 ml の氷冷した Milli Q で懸濁し、1.5ml のチューブに移した。懸濁液に氷冷した YEX lysis バッファー (1.85 N NaOH, 7.5 % 2-mercaptoethanol)を加え、氷中に 10 分間静置した。引き続き、氷冷した 50% TCA を加え氷中に 10 分間静置した。静置後、チューブは、10,000 rpm、5 分間遠心し上清を分離した。50 μ l の 1×SDS-PAGE loading buffer (pH6.8)を加え、溶液が黄褐色のサンプルについては 3.6 μ l の 1 MTris-HCl (pH9.5)を加え中和した。このうち半分量を SDS-PAGE に用いた。トランスファーおよびトランスファーバッファーの条件は、ウエスタンブロッティングの項で述べた方法と同様である。一次抗体、抗 HA 抗マウスモノクローナル抗体(12CA5, BOEHRINGER MANNHEIM)あるいは抗 C-myc 抗マウスモノクローナル抗体(9E10, BOEHRINGER MANNHEIM)は、5%skim milk を含んだ TBST を用いて、それぞれ、400 倍、250 倍希釈して室温で 60 分間反応させた。二次抗体、HRP 標識抗マウスポリクローナル抗体は、5%skim milk を含んだ TBST を用いて 2000 倍に希釈して室温で 60 分間反応させた。

結果

GAGA 因子と p93-p130 の分子間相互作用

GAGA 因子、p93、p130 の 3 分子間の結合に関わる領域を決めるにあたり、最初に GAGA 因子が p93、p130 のどちらに結合するか否かを調べるために、GST タグをつけた GST-p93、GST-p130 と His タグを付加した His-GAGA を大腸菌 (GST-p93, p130 は BL21Codon Plus™(DE3)-RIL 株 His-GAGA は BL21(DE3)pLysS 株)により発現させたタンパク質を用いて GST プルダウンアッセイを行い、その結果を図 2A に示した。His-GAGA は、GST-p93 と結合し、GST-p130 とは結合しなかった。また、GST-p130、GST-GAGA、His-p93 を用いて、同様に GST プルダウンアッセイを行い、その結果を図 2B に示した。GST-p130、GST-GAGA 共に His-p93 と結合することが明らかになった。以上の結果から、GAGA 因子は、p93-p130 複合体の p93 と直接結合していることが示された。

p93 との結合に関与する GAGA 因子の領域

次に、p93 は GAGA 因子のどの領域に結合するかを調べるために、GST タグを付加した GST-GAGA およびその欠失変異体、His-p93 を用いて GST プルダウンアッセイを行った。図 3C には、GAGA 因子の一次構造の模式図を示した。N 末端 1-120 番目のアミノ酸領域は BTB/POZ と呼ばれ、真核生物では広く保存されている (Bardwell & Treisman., 1994)。このドメインは、タンパク-タンパク相互作用に必要であり、multimer の形成に関与する領域とされている (Katsani et al., 1999, Espins et al., 1999)。そして、C 末端側にグルタミンリッチドメイン(Q ドメイン)があり、このドメインのみでも multimer を形成することが報告されている (Chris Willkins et al., 1999)。また、310-372 の領域には C2H2 タイプの Zinc finger domain が存在する (Pedone et al., 1996)。一方、120 から 310 までの領域、および、372 から 439 までの領域に関して、特徴だったモチーフをもたないことから、それぞれ Region I、Region II と便宜上称することにした。GAGA 因子の欠失変異体を作製するに当たり、以上のような構造上の特徴を基に、図 3A のように N 末端、C 末端から削った欠損変異体を作製した。GST プルダウンアッセイの結果を図 3B に示した。p93 は、N 末端 1 から 120N 末端あるいは 1 から 310 までを削った Δ 1-120、 Δ 1-310C 末端欠失変異体は Δ 440-519、 Δ 373-519、 Δ 311-519 と結合が確認された (図 3B lane 3, 4, 6)。このことから p93 と結合するドメインには、BTB/POZ、Q ドメインは必要がないことが考えられる。このことを確かめるために、両ドメインを欠いた欠損変異体、すなわち、Region I から Region II、Zinc finger から Region II に至る欠失変異体を作成し同様にアッセイしたところ、結合が確認された (図 3B lane 11, 12)。しかしながら、GST-GAGA と His-p93 との結合について、全ての GST-GAGA は 10%インプットに比べその結合が低く、結合してるかどうかを判断することが難しい欠失変異体 (特に図 3 lane 5, lane 11, lane 12 など) も存在した。そこでこの問題を解決するために、GST GAGA 因子の欠失変異体(Δ 440-519, Δ 311-519, BTB/POZ, RI-D-RII, D-RII)を His タグに置き換えたタンパク質を用いて GST-プルダウンアッセイを行った。その結果を図 4 に示した。His-RI-D-RII、His-D-RII の欠失変異体共に GST-p93 との結合が確認された (図 4 B lane 6, lane 9)。このアッセイの結果は、GST-GAGA

と His-p93 を用いた GST プルダウンアッセイの結果と一致した。以上の結果から、p93 と結合する領域は、Region I あるいは Zinc finger から region II に至る領域にそれぞれ独立に結合すると結論した。

GAGA 因子との結合に関与する p93 の領域

GAGA 因子は p93 のどの領域に結合するか調べるために、GST タグを付加した p93 およびその欠失変異体そして、His タグを付加した GAGA 因子を用いて GST プルダウンアッセイを行った。図 5A は、p93 の一次構造の模式図を示した。C 末端側には酸性アミノ酸に富む領域、そして 547 から 623 にかけて HMG タンパク質に共通に見られる HMG(High mobility group)ボックスがあり、一本鎖 DNA や RNA に対し強い親和性があるとされている (Hsu et al., 1993)。406 番目のアミノ酸残基を境に酸性アミノ酸、塩基性アミノ酸に富む領域、酸性アミノ酸、塩基性アミノ酸が混在する領域がある。以上のように、HMG ボックスとアミノ酸の電荷の特徴に基づいて、p93 の C 末端側の欠失変異体 ($\Delta 623-723$ 、 $\Delta 547-723$ 、 $\Delta 463-723$ 、 $\Delta 1-405$ 、 $\Delta 406-723$) を作製し、GST プルダウンアッセイを行った。その結果を図 5B に示した。 $\Delta 623-723$ 欠失変異体は、Wild type と同様に His-GAGA と結合したが(図 5B lane 3, lane4)、さらに C 末端を削った欠失変異体 $\Delta 547-723$ 、 $\Delta 463-723$ 、 $\Delta 406-723$ は結合しなかった(図 5B lane 5~7)。一方、N 末端 1 から 405 に至る領域を削った欠損変異体 $\Delta 1-405$ は結合しなかった(図 5B lane 8)。このことから、GAGA 因子が p93 に結合するのに必要な領域は、酸性アミノ酸に富む C 末端領域は必要でなく、また N 末端 1 から 405 までの領域は、GAGA 因子との結合に必要であることが示唆された。そこで、さらに詳細に N 末端側の領域を決めるために、623 から 723 を削った欠損変異体を基に、N 末端を削った欠失変異体(60-623, 127-623, 175-623, 296-623) を作製し、結合を検討した。その結果、4 つの欠失変異体すべて His-GAGA と結合した(図 6B)。次に、GAGA 因子、p93 のそれぞれ欠失変異体タンパク質同士で結合するかを調べた。結果を図 6C に示した。以上まとめると、GAGA 因子が p93 と結合するのに十分な領域は GAGA 因子の Region I と zinc finger から Region II に至る領域にそれぞれ独立に結合し、p93 が GAGA 因子と結合するのに十分な領

域は 296-623 に至る領域であると結論した。

p93 との結合に関与する p130 の領域

p93 が p130 のどの領域と結合するかについて調べるために、GST タグを付加した p130 およびその欠失変異体と His-p93 を用いて GST-pull down アッセイを行った。図 7A には、p130 の一次構造の模式図を示した。p130 は 1044 個のアミノ酸残基から構成され、ヒトとの比較において全体で 60%、その中でも 422-884 のアミノ酸残基にかけては 70% の高い identity を示す。また、C 末端側には、酸性アミノ酸とセリン残基に富む領域が存在する。この領域と identity に注目し、N 末端を削った欠失変異体 $\Delta 1-412$ 、 $\Delta 1-578$ 、 $\Delta 1-892$ 、C 末端を削った欠失変異体 $\Delta 413-1044$ 、 $\Delta 922-1044$ をそれぞれ GST タグに付加したタンパク質を作製し、His-p93 を用いて GST-pull down アッセイを行った。その結果を図 7B に示した。GST-p130(wild type)、GST- $\Delta 1-412$ は His-p93 と結合し、さらに N 末を削った $\Delta 1-578$ の場合においても結合した(図 7B lane 3, lane 6, lane 8)。一方、 $\Delta 413-1044$ 、 $\Delta 1-892$ および $\Delta 922-1044$ では結合が見られなかった(図 7B lane 4, lane 5, lane 7)。このことから、p130 の C 末端側、579-1032 の領域が p93 との結合に十分であることを結論した。

p130 との結合に関与する p93 の領域

p130 が p93 のどの領域に結合するかを調べるために、GST-p93 欠失変異体、および His-p130 を用いて GST-プルダウンアッセイを行うことにした。His-p130 は、400mM NaCl を含んだバッファー A では可溶化せず、600mM の NaCl を含むバッファー A で可溶化した。この画分の His-p130 を用いて、GST-p93 と結合する条件検討、すなわち 100、200、300、350、400、500、600、800mM NaCl を含む reaction buffer を用いて GST-p93 との結合を調べた。その結果、400mM 以下の NaCl では、GST においても非特異的に結合した。一方、500mM 以上では、GST、GST-p93 どちらにも結合しなかった。このため、GST-p93、His-p130 という組み合わせで GST-プルダウンアッセイを行うのは困難であると判断した。

His-p93 および GST タグを付加させた GST-p130 は 400mM NaCl 塩濃度下で容易

に可溶化することを考慮し、His-p130 ではなく GST-p130 を用いることにし、p93 についてはこれまでに作製した GST-p93 欠失変異体を His タグに置き換えたタンパク質を用いて GST- プルダウンアッセイを行った。最初に、p93 と p130 の結合する塩濃度の条件を検討した。p93-p130 複合体が 340 mM の KCl で溶出された (Shimojima et al.,2002) ことから、200 mM, 300mM, 400mM NaCl を含む反応液中で反応させた。その結果、200mM NaCl を含む反応液中でかすかに His-p93 との結合が確認された。そこで、さらに NaCl の濃度を 150、100、60mM と検討した結果、100mM、60mMNaCl 条件下で His-p93 との結合が見られた。その中でも、再現性よく His-p93 と結合した 60mMNaCl を含む反応液中で GST プルダウンアッセイを行うことにした。

GST プルダウンアッセイの結果、Wild type、 Δ 623-723 欠失変異体 では GST-p130 と結合し(図 8B lane 3, 6,), さらに C 末端を削った欠失変異体 Δ 547-723、 Δ 463-723、 Δ 406-723 は結合しなかった(図 8B lane 9, 12, 15)。一方、N 末端 1-405 を削った欠失変異体 Δ 1-405 では、Wild type にくらべ半分くらいであるが結合した(図 8B lane 18)。このことから、p130 が結合するのに必要な領域は 406 から 623 ということが示される。そこで、406-623 を作製し同様にプルダウン アッセイを行ったが、結合は確認できなかった(図 8B lane 21)。しかしながら、GAGA 因子は、p93 の N 末端 1 から 405 を削った Δ 1-405 と結合が見られなかったことを考慮すると、図 9 に示すような相互作用の模式図が表せると考えられる。すなわち GAGA 因子が結合する p93 の領域は 296 から 623 の領域であり、p130 が結合する p93 の領域は 405 から 623 の領域、そして、p93 が p130 に結合する領域は C 末端側の 579-1032 の領域であれば十分であると結論した。

ポリテックロモゾム上での GAGA 因子、p93、p130 の分布

実際に転写が行われている間期のゲノム上で、GAGA 因子、p93、p130 が相互作用しているか明らかにするために、多糸染色体上での 3 つのタンパク質の分布を調べた。岡田らによって作成された Flag-GAGA を発現するトランスジェニックフライの 3 齢幼虫からポリテックロモゾムを摘出し、GAGA 因子、p93、p130 の免

疫蛍光染色を行った。GAGA 因子については抗 Flag 抗マウス Cy3、p93、p130 については一次抗体を抗 p93 抗 p130 抗ラビット抗ポリクローナル抗体、2 次抗体を抗ラビット Ig ポリクローナル抗体 Alexa488 で染色した。GAGA 因子は多糸染色体上のユークロマチン領域に 500 箇所以上の結合サイトがあり、一方でクロマチンが高度に凝集したセントロメアヘテロクロマチン領域にはそのバンドが存在しないと報告されている(Tsukiyama et al., 1994)。Flag-GAGA を発現するトランスジェニックフライの多糸染色体を用いた場合においても、ユークロマチン上に数多くの GAGA 因子の結合バンドが観察された(図 10, A, D)。一方、セントロメアヘテロクロマチンにはその GAGA 因子の結合バンドは存在しないことが観察された。また、yw3 齢幼虫から摘出した唾腺染色体を同様に染色した場合、あるいは、抗マウス Cy3 ポリクローナル抗体を単独で用いたときには、これらのバンドは観察されなかった。

p93、p130 について、ユークロマチン上のインターバンドに多数のバンドが観察された(図 10B, E)。しかし、GAGA 因子とは異なり、p93、p130 はセントロメアヘテロクロマチン領域での存在が観察された。p93、p130 のバンドがそれぞれの抗体由来のバンドであることを確かめるために、GST-p93、GST-p130 を固定したグルタチオンセファロースに、抗 p93、抗 p130 ポリクローナル抗体を加えて一晩、4℃で反応させ、遠心分離した上清を反応に用いた場合、あるいは p93 および p130 の Pre Immune serum を用いた場合、抗ラビット Alexa488 ポリクローナル抗体単独で用いた場合、いずれの場合においても p93、p130 のバンドは観察されなかった(data not shown)。GAGA 因子のバンドと merge して観察した場合、GAGA 因子のほとんどすべてが p93、p130 のバンドと一致していることが観察された(図 10C, F)。一方、GAGA 因子の存在しないパフ上に、p93、p130 のバンドが観察された。この結果は、ゲノム上の多数の場所に、GAGA 因子と p93-p130 の 3 つのタンパク質からなる複合体が存在していることを示唆している。また、GAGA 因子以外にも p93-p130 複合体をゲノム上の特異的な場所にリクルートする因子が存在する可能性が示唆された。

P93 と p130 のポリテックロモゾーム上での局在について調べるために、Flag-p93 あるいは Flag-p130 を発現するトランスジェニックフライを作製した。それらの 3 齢幼虫からポリテックロモゾームを摘出し p93、p130 の免疫蛍光染色を行った。Flag-p93 Flag-p130 については、抗 Flag 抗マウス Rhodamine red、p93、p130 については一次抗体を p130 抗ラビット抗ポリクローナル抗体、2 次抗体を抗ラビット Ig ポリクローナル抗体 Alexa488 で染色した。その結果を図 11 に示した。Flag-p93 と p130 (図 11A, B, C)、Flag-p130 と p93 (図 11D, E, F) の分布について、ほとんどすべてのバンドが一致していた。以上の結果を総括すると GAGA 因子、p93、p130 からなる 3 つのタンパク質はゲノム上の多数の場所に、複合体として存在することを示唆している。

次に GAGA 因子-p93-p130 複合体の動態を明らかにするため、3 齢幼虫に熱ショック処理 (37℃、30 分間) を施した多糸染色体上での GAGA、p93、p130 の分布を同様に抗体染色により調べた。その結果を図 12 に示した。熱ショック応答により新たに熱ショック遺伝子座に形成されたパフ上に、GAGA 因子および p93、p130 が共局在していることが観察された (図 12、87A、87C、93D などに強く染色)。また熱ショック処理を 2 分間行った場合も同様に、熱ショック応答により新たに熱ショック遺伝子座に形成されるパフ上に、GAGA 因子および p93、p130 が共局在していることが観察された (data not shown)。これらの結果は、GAGA 因子-p93-p130 複合体が転写活性クロマチンの形成またはその維持に深く関わっていることを示唆している。

GAGA-p93-p130 複合体の position effect variegation (PEV) への影響

GAGA-p93-p130 複合体の生物学的 役割を明らかにするために PEV に関与しているかを調べた。染色体の逆位によって、*white* 遺伝子がセントロメアのヘテロクロマチン領域に移った系統 *ln(1) wm4* では、眼のところどころに白い 斑点が観察される。これは、個々の細胞によって *white* 遺伝子の置かれるクロマチン構造が異なるため、ある細胞では *white* 遺伝子が活性化され赤い色を生じ、ある細胞では不

活性化されるため白い色を生じる (図 13、Muller et al., 1930)。wm4 background に GAGA 因子の変異 *Trl13C* アリルをヘテロに導入すると、PEV がエンハンスされることが既に報告されている (Farkas et al., 1994)。p93、p130 が PEV の影響に関与しているかどうかを調べるために、p93、p130 をコードする遺伝子を含むローカスを欠いた系統 *y+w+; Df(2R)bw[VDe2L]Px[KR]/SM1(Δ p93/+)*、*yw; Aprt21/TM3y+(Δ p130/+)* をそれぞれ *ln(1)* (*wm4*) と掛け合わせて、PEV の影響を調べた。その結果を図 14 に示した。*wm4* と比較すると、*Trl13C* だけでなく、 $\Delta p93$ と $\Delta p130$ の欠失変異体 ($\Delta p93/+$ または $\Delta p130/+$) においても PEV がエンハンスされていることが観察された (図 14A と B, C, D との比較)。*Trl13C* と *p130* の二重欠失変異体 (*Trl13C, Δ p130/+*) では、*Trl13c/+* より PEV がエンハンスされていることが観察された (図 14D と E)。

系統 $\Delta p130$ は、*p130* をコードする遺伝子の他に *Aprt* 遺伝子、2 つの機能未知の遺伝子を欠いている系統である。一方、系統 $\Delta p93$ についても、*p93* をコードする遺伝子に加えて、数十個からなる機能未知の遺伝子を欠いている。したがって、これらの変異によってエンハンスされた PEV の原因が、それぞれ *p93*、*p130* をコードする遺伝子によるものかかどうかはこの結果からでは結論することができない。そこで、この問題を解決するために系統 $\Delta p130$ に *p130* 遺伝子を発現させて、観察された PEV が抑圧されるかどうか観察した。その結果を図 15 に示した。 $\Delta p130$, *Trl13C/+* に *p130* 遺伝子を導入した場合、 $\Delta p130$, *Trl13C/+* にくらべわずかに PEV が抑圧された (図 15 A, B, C)、一方、 $\Delta p130/+$ に *p130* 遺伝子を導入した場合では、調べた限り $\Delta p130/+$ にくらべて PEV の抑圧が観察されなかった (data not shown)。

以上の結果から、GAGA-p93-p130 複合体がヘテロクロマチン形成によって転写が抑制される状態に対して拮抗的に作用して転写を活性化し続ける働きがあることを示唆している。

ショウジョウバエ GAGA 因子に相当するヒトの因子の探索

p93-p130 複合体のヒトホモログである FACT には配列特異的なクロマチンリモデリングの働きはこれまでのところ報告されていない。FACT もショウジョウバエ GAGA 因子のように配列特異的に結合する因子によってリクルートされ局所的なクロマチン構造変換を行っているのではないかという予想の下で、ショウジョウバエの GAGA 因子に相当する、配列特異的に FACT をリクルートさせる役割のあるヒトの因子を単離する目的で実験を行った。その手法として酵母による Two-hybrid システムを用いることにした。スクリーニングを行う前に、ショウジョウバエ GAGA と p93 が酵母の Two-hybrid system で、結合を確認できるかどうかを調べた。pGADT7 ベクターに GAGA (-5AA)および D-RII GAGA、pGBKT7 ベクターに p93 (wild type)とその欠失変異体 ($\Delta 623$ 、296-623)を組み込んだ。これらのベクターを用いて、AH109 株を形質転換し 30°C で 3 日間インキューベートした。SD/-Leu, Trp プレートでは、すべての組み合わせで生育が見られた (図 16A)。しかしながら、SD/-Leu, Trp, Ade, His+X- α -Gal プレートでは、その生育が見られなかった (図 16B)。pGADT7-GAGA および pGBKT7-p93(wild type, $\Delta 623$ 、296-623)をそれぞれ単独で AH109 株に形質転換し、SD/-Leu プレート、SD/-Trp プレートで 30°C で 3 日間インキューベートした。その結果、pGAD T7-GAGA、D-RII GAGA を形質転換させた AH109 株は、生育阻害を示していた (図 16D)。この原因として、2つの可能性を考えた。一つは、pGADT7 ベクターの上流に組み込まれている ADH プロモーターは、強いプロモーター活性がある。Gal4 アクチベーターと VP16 を融合したタンパク質を酵母で強制発現させると生育阻害を生じることが報告されている (Keller III et al 1990, Gill & Ptashne 1988)。Gal4 アクチベーターと GAGA 因子を融合したタンパク質を発現させた場合についても、同様の現象を引き起こしている可能性が考えられた。二つ目の原因として、酵母内で GAGA 因子あるいは p93 が発現していないために、SD/-Leu, Trp, Ade, His+X- α -Gal プレートでは二つのタンパク質の相互作用を検出できなかった可能性が考えられる。まず一つ目の原因を検証するために、融合タンパク質の発現を弱くすれば、生育阻害を抑えられ適切に発現するのではないかと考えた。そこで、ADH1 プロモーターの活性が弱いベクター pACT2、

pGADGL, pGAD10 ベクターにそれぞれ GAGA および GAGA D-RII を組み込み、それぞれのベクターをと pGBKT7-p93 を用いて共形質転換した。結果を図 17 に示した。pACT2, pGADGL, pGAD10 いずれのベクターを用いた場合においても、SD/-Leu, Trp, Ade, His+X- α -Gal プレート上で、二つのタンパク質の相互作用を検出できなかった (図 17, B, E, H)。この結果から、GAGA 因子、p93 の相互作用を見い出せない原因が ADH1 プロモーター活性の強弱ではないことが示唆された。

次に二つ目の原因を検証するため、pGADT7、pACT2 ベクターと pGBKT7 ベクターを用いて形質転換した AH109 株の細胞抽出画分を調製し、ウエスタンブロッティングによりその発現を確認した。pGADT7、pACT2 ベクターについては Gal4AD の下流に HA タグが連結されているため、GAGA 因子が発現していれば、抗 HA 抗マウスモノクローナル抗体により検出できる。一方 pGBKT7 ベクターについては、Gal4BD の下流に c-myc タグが連結されているため、p93 のタンパク質が発現していれば、抗 c-myc 抗マウスモノクローナル抗体により検出できる。ウエスタンブロッティングの結果を図 18 に示した。pGADT7-GAGA および D-RII GAGA もしくは pACT2-GAGA および D-RII を形質転換した酵母の細胞抽出画分から GAGA、D-RII GAGA の発現を確認することはできなかった (図 18A, lane 14, 16; 図 18B, lane 3, 4)。一方、pGBKT7-p93 の WT, $\Delta 623$, 296-623 の発現について、 $\Delta 623$, 296-623 はその発現を確認できたが、wild type の発現を確認することはできなかった (図 18A, lane 7, 8, 9)。以上を総合すると、ショウジョウバエ GAGA 因子と p93 の相互作用を酵母の two-hybrid system で見出すことができなかったことの原因は、ADH1 プロモーター活性の強弱に関わらず、GAGA 因子は酵母で発現しないためであると結論した。

考察

本研究では、まず、GAGA 因子と p93、p130 について in vitro での分子間相互作用を解析した。これまでに、出芽酵母、*Xenopus*、ヒトで p93-p130 に相当するタンパク質複合体が報告されているが、それらの構成タンパク質分子間の相互作用を解析したという報告はなされていない。その原因は、cDNA からこれらのタンパク質を発現し精製することが困難なためである。私は種々の試行錯誤を得て p93 と p130 を安定に保存し電気泳動で解析する条件を見出し分子間相互作用の解析を行った。GST プルダウンアッセイの結果、GAGA 因子は p93 と直接結合し、また、3 分子間での結合に十分な領域を明らかにした。次に、実際に転写が行われている多糸染色体上での GAGA 因子、p93、p130 の分布を抗体染色によって調べることににより、GAGA 因子の結合部位の大半が p93、p130 と一致することを見出した。さらに、転写が盛んに行われているパフ上で GAGA 因子と p93、p130 が共局在していることを明らかにした。これらの複合体が活性クロマチン形成に関与していることを調べるため、position effect variegation(PEV)の解析を行った。その結果、GAGA 因子と共に p93、p130 が PEV を抑制する働きがあることを明らかにした。以上、3 項目による解析により、GAGA 因子-p93-p130 が活性クロマチンに作用し、転写の活性化を維持続けるというエピジェネティックな働きが明らかとなった。本研究により得られた GAGA 因子、p93、p130 の生物学的意義は大きいと思われる。

GAGA 因子、p93、p130 複合体との分子間相互作用

GAGA 因子は、N 末端 1-120 残基に BTB/POZ ドメインがあり、この領域を介してタンパク質のオリゴマーを形成し (Espins et al., 1999; Katsani et al., 1999)、プロモーター中に散在する GAGAG 配列をループ上に折り畳むことによってプロモーター領域を基本転写因子群にアクセスしやすいようにする役割があると考えられている。また、GAGA 因子の C 末端側 430-519 残基には、グルタミンに富む領域 (Q ドメイン) が存在し、このドメインを介して in vitro, in vivo で転写を活性化し (Vaquero et al., 2000)、また BTB/POZ ドメインと同様にタンパク質のマルチマーの形成に関わるとされている (Wilkins et al., 1999)。このような知見を基にすると、

p93 が GAGA 因子の BTB/POZ ドメインあるいは Q ドメインに結合すると、これらのドメインをめぐる GAGA 因子と p93 が競合してしまうと考えられる。しかし、p93 は GAGA 因子の zinc finger 領域から C 末端に隣接する領域にかけて結合することから、p93 は BTB/POZ あるいは Q ドメインを介さず結合することができ、このことは、プロモーター上の GAGA 因子結合配列に GAGA 因子がマルチマーを形成している状態や、転写の進行に伴って、p93-p130 複合体と結合しうることを示唆している。

GAGA 因子の zinc finger ドメインに隣接する領域 121-309、372-439 はランダムコイル構造をとるとされている (Agianian et al., 1999)。この領域は p93 と結合した状態では induced fit により一定の構造をとるのかもしれない。また、zinc finger ドメインを欠き、Region II から Q ドメインの領域 (Δ 1-372) では p93 と結合しなかったことを考慮するとこの領域は p93 と結合する際しっかりした構造をもつ zinc finger ドメインが核となってその隣接領域が一定の構造をとるのかもしれない。

最近クロマチンリモデリング因子 NURF の最大サブユニットである p301 と GAGA 因子が直接結合することが明らかになっており (Xiao et al., 2001)、興味深いことに、p301 が結合する領域は p93 が結合する GAGA 因子の領域と近接している (Xiao et al., 2001)。またクロマチン再構成系に、BTB/POZ ドメインおよび Q ドメインを欠いた GAGA 因子の欠損変異体を加えると、Wild type の GAGA 因子と同様にクロマチンリモデリングが起きる。このように、GAGA 因子の分子上でクロマチンリモデリングに重要な領域は BTB/POZ や Q ドメインでなく (Wilkins et al., 1998)、p93-p130 複合体や NURF が結合する zinc-finger ドメインに隣接する領域であることが明らかになった。これに関連して、SWI/SNF 複合体は EKLF と結合する際、EKLF の zinc finger ドメインに隣接した領域に結合することが示されている (Kadam et al., 2000)。

p93 は C 末端側 547-623 の領域にかけて HMG タンパク質に共通に見られる HMG Box が存在し、このドメインをもつタンパク質は、湾曲した DNA や歪んだ DNA に塩基配列非特異的に結合し、また hUBF のように HMG ドメインがタンパク質間の相互作用に関与している例も報告されている (Thomas et al., 2001; Jantzen et al.,

1992)。HMG ドメインを欠いた p93 の欠損変異体は、GAGA 因子と p130 のどちらにも結合しなかったことから、HMG ドメインは GAGA 因子および p130 との結合に重要なドメインであり、しかもヌクレオソームとの結合にも寄与しているのかもしれない。

p130 の C 末端領域は、酸性アミノ酸やセリン残基に富む領域であり他の真核生物のホモログにも広く保存されている。C 末端を削った欠損変異体 Δ 922-1032 では、p93 と結合しなかったことから、C 末端の領域は、p93 との結合に重要であることが考えられる。GST-プルダウンアッセイで得られた結果と関連して興味深い報告がある。ショウジョウバエ p93、p130 のホモログである *S.cerevisiae* の Pob3 と Cdc68 を用いた解析によると、Cdc68 の N 末端 306 残基まで欠損した変異株 Cdc68 Δ 922 の細胞抽出液から抗 Cdc68 抗体を用いて、Pob3 が免疫沈降されること (Brewster et al., 1998)。また、Cdc68 の遺伝学的な解析により、Cdc68 温度感受性変異株に、インタクトな Cdc68 遺伝子あるいは CDC68 の N 末端 6-308 残基を欠損した *cdc68* 遺伝子を導入するとそれぞれ相補できるが、C 末端 915-1032 残基を欠損した *cdc68* 遺伝子を導入した場合では相補性がないことが報告されている (Evans et al., 1998)。これらの知見は、p130C 末端の領域が p93 と結合して複合体を形成しクロマチンリモデリングを活性化するのに重要であるという本研究で得られた結果と良く一致している。

GAGA 因子が結合する p93 の領域は 296-623 で、p130 が結合する p93 の領域は 405-623 であったが、GAGA 因子および p130 が p93 に結合する領域はアミノ酸の一次構造上では一部重なっている (図 8)。霜島らによると、胚の核抽出液中で GAGA 因子と p93、p130 は 1 対 1 対 1 で結合していることが免疫沈降の解析から明らかになっている (Shimojima et al., 2002)。このため、GAGA 因子と p130 が p93 に競合して結合するとは考えられない。むしろこの領域中に、GAGA 因子、p130 の結合に重要なアミノ酸残基が散在していて、実際折り畳まれた状態では重ならないように結合しているのかもしれない。

p93 の Δ 623-723 および Δ 1-405 欠失変異体と結合することから、p130 が結合する p93 の領域は、406-623 であることを示したが、実際には p93 406-623 と p130 との

結合を確認できなかった。欠失変異体を作製して領域を絞るという方法では、結合しうる領域を備えているにも関わらず適切な構造をとらないために、結合しないことも考えられる。今後、この問題を解決するためには、297-623 領域中で、他の真核生物の p93 のホモログと比べて保存されているアミノ酸残基に注目し、点変異を導入する。そのような変異体を作製すれば、GAGA 因子、p130 が p93 と結合する際に重要となるアミノ酸残基を特定できるかもしれない。

GAGA 因子と p93、p130 の唾液腺染色体上での局在

多糸染色体上で p93、p130 の免疫抗体染色により、GAGA 因子の存在する部位にはほとんどが p93 と p130 と共局在し、さらに熱ショックによって形成される転写が活性化されたパフ上に、p93、p130 複合体は GAGA 因子と共局在していることが明らかになった。このことは、定常状態、熱ショック後のいずれの状態でも、常に GAGA 因子と p93-p130 複合体が結合していることを示唆している。この結果をさらに強く示すためには、GAGA 因子をコードする *Trl13C* のホモ接合体を用いて、定常状態、もしくは熱ショックを与えた多糸染色体上で p93-p130 複合体の局在がないことを示す必要があると考えられる。しかし、*Trl13C* ホモ接合体は 90% 以上が 3 齢幼虫に至る前に致死に至り、実際、ワンダリング期の 3 齢幼虫を得るのは困難であった。今後、*Trl13C* ホモ接合体に比べマイルドな *Trl13C* と *Trl67* のトランスヘテロ接合体を用いるか、GAGA 因子の発現を RNAi により抑えた系統を樹立させるかによって、p93-p130 の局在を調べたいと考えている。

O'Brien らによると、GAGA 因子は熱ショック前にプロモーター上の GAGA エレメントに結合し、熱ショック後には、転写反応の進行に伴って GAGA 因子は RNA ポリメラーゼ II と共に転写領域に分布することが報告されている (O'Brien et al., 1995)。今回得られた、多糸染色体上での結果とこれらの知見を考慮すると p93-p130 複合体は熱ショック以前に GAGA 因子と結合しており、熱ショック後も GAGA 因子と結合しながら、クロマチンをリモデリングを促進し、転写の進行を促していることが考えられる。熱ショック前に *hsp 70* プロモーター、熱ショック後には転写の進行に伴って転写領域全体に p93-p130 複合体が存在していることをより詳細に

示すためには、免疫抗体染色のような low resolution の解析では不十分であり、抗 p93、抗 p130 抗体を用いたクロマチン免疫沈降アッセイを行う必要がある。そのような解析を行うことにより、p93-p130 複合体が GAGA 因子と共に動的に挙動していることを示せるかもしれない。

熱ショックにより新たに形成されたパフ (87A, C, 93 D, など) には、Topo isomerase II と協調的に働いて負の超らせんを導入する super coiling factor も局在することが報告されている (Kobayashi et al., 1998)。このことは、パフなどの転写が盛んに行われている部位では転写反応をより効率的に行うために、SCF-topoisomerase II と p93-p130 複合体が協調して作用している可能性を示唆している。

p93、p130 の position effect variegation(PEV)への影響

PEV のテストの結果、シングル変異体のヘテロ ($\Delta p93/+$, $\Delta p130/+$ *Trl13C/+*) の中では GAGA 因子をコードする *Trl13C* ミュータントが PEV を最もエンハンスした。

シングル変異体の中で、なぜ *Trl13C* が最も PEV をエンハンスしたのか。おそらく、野生株に比べて GAGA 因子の結合サイトに GAGA 因子が結合している量が少なくなり、*white* 遺伝子近傍にヘテロクロマチン構造が形成されて *white* 遺伝子を不活性化したのではないかと考えられる。p93 と p130 は発現レベルが高いため、遺伝子量を半減しても *Trl* に比べてその効果は少ないのかもしれない。しかしながら、 $\Delta p93$, $\Delta p130$ の個々について、*wm4* に比べ PEV はエンハンスされており、また、*Trl13C* に比べ *Trl13C*, $\Delta p130$ はより PEV がエンハンスされていることから、p93-p130 複合体は GAGA 因子と協調的に作用し、ヘテロクロマチン状態に置かれている *white* 遺伝子に対して拮抗的に作用し、発生の初期段階から転写の活性化を維持し続けていることが示唆される。

$\Delta p130$ の PEV を増強している原因が、*p130* 遺伝子由来であることを確認するために $\Delta p130/+$ に *p130* 遺伝子を導入して PEV が抑圧するか調べた。 $\Delta p130$, *Trl13C/+* に *p130* 遺伝子を導入した場合、 $\Delta p130$, *Trl13C/+* に比べわずかに PEV が抑圧されたが、 $\Delta p130/+$ に *p130* を導入した場合、PEV の抑圧効果を確認できなかった。p93-p130 複合体は、GAGA 因子に比べ核内にアバダントに存在するタンパク質であり、

p130 の dose が半分になったとしても、GAGA 因子-p93-p130 複合体はかなり形成できる。しかし、GAGA 因子および p130 の dose が半分になった場合、GAGA 因子-p93-p130 複合体は減少する。そのため、 $\Delta p130/+$ のバックグランドに p130 遺伝子を発現させても PEV の抑制効果が見られず、一方で $\Delta p130, Trl13C/+$ バックグランドに p130 遺伝子を導入した場合には、PEV の抑制効果を観察できたのではないかと考えられる。同様な例として、wm4 のバックグランドに GAGA 因子を発現させた場合にも PEV の抑圧が起こらないことが報告されている(Granok et al., 2001)。

既知の PEV の enhancer との関係

ショウジョウバエでは、これまでに遺伝子の機能欠損により、PEV をエンハンスする変異が多数報告されている。dSSRP1 遺伝子座のある 2R60A 付近に既知の PEV エンハンサーは知られていない。一方、dSPT16 遺伝子座のある 3L62A1 付近に既知の PEV エンハンサーとして E-var(3)7 がある (Dorn et al., 1993)。E-var(37 は X 線処理によって得られた deficiency でその map position から dSPT16 遺伝子座を欠いている可能性がある。

NURF、GAGA 因子、p93-p130 複合体と活性クロマチンとの関わり

GAGA 因子は p93 および NURFp301 と結合し、p93-p130 複合体あるいは NURF を GAGA 因子の結合配列を含むプロモーター近傍にリクルートさせると考えられる。霜島らによると、胚の核抽出液中で GAGA-p93-p130 が 1 : 1 : 1 の複合体を形成していること(Shimojima et al., 2002)、本研究により多糸染色体上でほとんどの GAGA 因子は p93、p130 と共局在していること。一方、GAGA 因子と NURF のサブユニットである ISWI の多糸染色体上での分布は一致している箇所は少ない(Deuring et al., 2000)、さらに NURF と GAGA 因子は化学量論以下の結合である(Xiao et al., 2001)。これらのことから、NURF は常に GAGA 因子と結合して GAGA- NURF 複合体を形成しているというよりはむしろ、GAGA-p93-p130 複合体が常に存在し、これに NURF が結合するとクロマチンリモデリングが起きると考えられる。もしこのことが事実だとしたら、NURFp301 をコードする遺伝子の欠失変異体（あるい

は機能が低下している変異体)では、NURF は GAGA 因子によってリクルートされることがないために、クロマチンの構造は破壊されず、GAGA-p93-p130 複合体は活性クロマチンを維持することが難しくなると考えられる。このような変異体では、*Ubx* の haltere の表現型が増強され、また PEV についても *Trl13C* と同様に増強されるかもしれない。以上のように、GAGA 因子、NURF と p93-p130 複合体がどのように関わっているかについて遺伝学的に解析していくことは、クロマチンリモデリングとエピジェネティックとの関わりを明らかにする上で重要であると考えられる。

ショウジョウバエ GAGA 因子に相当するヒトの因子の探索

ショウジョウバエの GAGA 因子の様にヒトの FACT を配列特異的にリクルートする因子を Two-hybrid system を用いて探索しようと試みたが、Gal4 活性化ドメイン-GAGA 融合タンパク質を酵母で発現することができず、ポジティブコントロールが得られないため、断念した。GAGA 因子に相当する因子が、ショウジョウバエの GAGA 因子と性質が類似していた場合、アクチベーター下に組み込まれたそのタンパク質が酵母で発現すると、ショウジョウバエの GAGA 因子と同様に生育阻害を示す可能性が考えられる。そのような因子の場合、in vitro では結合するタンパク質であっても、ライブラリー中では発現しない、あるいは発現したとしても細胞内に toxic に働いて結果として相互作用を見いだせないかもしれない。

酵母の LexA の two-hybrid システムを用いて、ショウジョウバエ GAGA 因子の N 末端 1-245 をベイトにして、相互作用するタンパク質、SAP18 が単離されている (Espin et al., 2000)。このように、異なる酵母の two-hybrid システムを用いれば、GAGA 因子を発現させることができるかもしれない。あるいは、大腸菌では p93、GAGA 因子は発現が可能であったことを踏まえると、大腸菌による two-hybrid system では系が確立しスクリーニングが可能になるかもしれない。いずれの場合についても、GAGA 因子に相当するヒトの因子を同定することにより、本研究で明らかにした機能、すなわち p93-p130 複合体を特定の配列にリクルートし転写活性化を維持し続けるというエピジェネティックな働きが高等真核生物に普遍的であ

ることを示せるかもしれない。

謝辞

本研究を行うにあたり、直接御指導をいただいた国立遺伝学研究所形質遺伝学部門廣瀬進教授に深く感謝を申し上げます。

本研究に的確な助言とディスカッションをしていただいた霜島司博士ならびに上田均博士に深く感謝致します。

卒研究生の時から今日に至るまで、ディスカッションや相談を気軽に応じてくださりまた研究の取り組み方や心構えを指導していただいた前仲勝実博士に深く感謝致します。

遺伝研での3年間、実験やそれ以外の様々な面で助けていただいた、劉慶信博士、川崎陽久博士、阿川泰夫氏、萱嶋泰成氏に深くお礼を申し上げます。

日頃の雑談に気軽に応じていただいた植松こづえさん、高田祐子さん、渡辺たつのさんに深くお礼を申し上げます。

最後に、10年間の学生生活に精神的、経済的に支えてくれた両親に深くお礼を申し上げます。

引用文献

Agianian, B., Leonard, K., Bonte, E., Zandt, H.V.d, Becker, P.B., and Tucker, P.A (1999) The glutamine-rich domain of the *Drosophila* GAGA factor is necessary for amyloid fibre formation in vitrom but not for chromatin remodeling. J Mol Biol.285:527-544

Bardwell, V.J., and Treisman, R. (1994) The POZ domain: a conserved protein-protein interaction motif. Genes Dev.8: 1664-1677

Bhat, K.M., Farkas, G., Karch, F., Gyurkovics, H., Gausz, J., and Schedl, P (1996) The GAGA factor is required in the early *Drosophila* embryo not only for transcriptional regulation but also for nuclear division. Development 122:1113-1124

Biggin M.D., Tjian R. (1988) Transcription factors that activate the Ultrabithorax promoter in developmentally staged extracts. Cell 3:53, 699-711

Brewster, N.K., Johnston, G. C., and Singer, R.A. (1998) Characterization of the CP complex, an abundant dimer of Cdc68 and Pob3 proteins that regulates yeast transcriptional activation and chromatin repression. J. Biol. Chem 273:21972-21979

Bruhn, S.L., Pil, P.M., Essigmann, J.M., Housman, D.E., and Lippard, S.J. (1992) Isolation and characterization of human cDNA clones encoding a high mobility group box protein that recognizes structural distortions to DNA caused by binding of the anticancer agent cisplatin. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 89:2307-2311

Chris Willkins, R., and Lis, J.T. (1999) DNA distortion and multimerization: novel functions of the glutamine-rich domain of GAGA factor. J. Mol. Biol 285: 515-525

Clark-Adams, C.D., Norris, D., Osley, M.A., Fassler, J.S., and Winston, F. (1998) Changes in histone gene dosage alter transcription in yeast. *Genes Dev* 2:150-159

Cosma, M.P., Tanaka, T., and Nasmyth, K. (1999) Ordered recruitment of transcription and chromatin remodeling factors to a cell cycle and developmentally regulated promoter. *Cell* 97: 299-311

Deuring, R., Fanti, L., Armstrong, J.A., Sarte, M., Papoulas, O., Prestel, M., Daubresse, G., Verardo, M., Moseley, S.L., Berloco, M., Tsukiyama, T., Wu, C., Pimpinelli, S., Tamkun, W. (2000) The ISWI chromatin-remodeling protein is required for gene expression and maintenance of higher order chromatin structure in vivo. *Mol Cell* 5:355-365

Dorn, R., Szidonya, J., Korge, G., Sehnert, M., Taubert, H., Archoukieh, E., Tschiersch B., Morawietz, H., Wustmann, G., Hoffman, G. (1993) P transposon-induced dominant enhancer mutations of position-effect variegation in *Drosophila melanogaster*. *Genetics* 133:279-90

Espins, M.L., Garaci, E.J., Vaquero, A., Canudas, S., Bernus, J., and Azorn, F. (1999) The N-terminal POZ domain of GAGA factor mediates the formation of oligomers that bind DNA with high affinity and specificity. *J. Biol. Chem* 274: 16461-16469

Espins, M.L., Canudas, S., Fanti, L., Pimpinelli, S., Casanova, J., and Azorn, F. (2000) The GAGA factor of *Drosophila* interacts with SAP18, a Sin3-associated polypeptide. *EMBO J* 19:253-259

Evans D.R., Brewster, N.K., Xu, Q., Rowley, A., Atheim, B.A., Jonston, G., and Singer, R.A. (1998) The yeast protein complex containing Cdc68 and Pob3 mediates core-promoter repression through Cdc68 N-terminal Domain. *Genetics* 150:1193-1405

Farkas, G., Gausz, J., Galloni, M., Reuter, G., Gyukovics, H and karch, F. (1994) The Trithorax-like gene encodes Drosophila GAGA factor. Nature 371:806-808

Formosa, T., Eriksson, P., Wittmeyer, J., Ginn, J., Yu, Y., and J.Stillman, D. (2001) Spt16-Pob3 and HMG protein NHP6 combine to form the nucleosome-binding factor SPN. EMBO J 20:3506-3517

Gill, G. & Ptashne, (1988) Negative effect of the transcriptional activator GAL4. Nature 344:721-724

Granok, H., Leibovitch, B. A., Shafer, C.D., and Elgin, S.C.R. (1995). GA-ga over GAGA factor. Current Biology 5:238-241

Granok, H., Leibovitch, B.A., and Elgin, S.C.R. (2001) A heat-shock-activated cDNA encoding GAGA factor rescues some lethal mutations in the *Drosophila melanogaster* *Trithorax-like* gene. Genet Res Camb 78:13-21

Hamiche, A., Sandaltzopoulos, R., Gdula, D.A., and Wu, C. (1999) ATP-dependent histone octamer sliding mediated by the chromatin remodeling complex NURF. Cell 97: 833-842

Han, M., and Grunstein, M. (1988) Nucleosome loss activates yeast downstream promoters in vivo. Cell 55:1137-1145

Hassan A.H., Neely K.E., and Workman, J.L. (2001) Histone acetyltransferase complexes stabilize SWI/SNF binding to promoter nucleosomes. Cell 104:817-827

Knezetic, J.A., and Luse, D.L. (1986) The presence of nucleosomes on a DNA template prevents initiation by RNA polymerase II in vitro. *Cell* 45:95-104

Hsu, T., King D.L., Labbonne, C., and Kafatos, F. (1993) A *Drosophila* single-strand DNA/RNA-binding factor contains a high-mobility -group box and is enriched in the nucleolus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 90: 6488-6492

Jantzen, H.M., Chow, A., King, D.S and Tijian, R. (1992) Multiple domains of the RNA polymerase I activator hUBF interact with TATA-binding protein complex hSL1 to mediate transcription. *Genes Dev* 6:1950-1963

Kadaman, S., McAlpine, G.S., Phelan, M.L., Kingston, R.E., Johns, K.A., and Emerson, B.M. (2000) Functional selectivity of recombinant mammalian SWI/SNF subunits. *Genes Dev* 14:2441-2451

Karapen, G.H. (1994) Position-effect variegation and new biology of heterochromatin. *Current opinion in genetics and development* 4:281-291

Katsani, K.R., Hajibagheri, M.A.N., and Verrijzer, C.P. (1999) Co-operative DNA binding by GAGA transcription factor requires the conserved BTB/POZ domain and reorganizes promoter topology. *EMBO J* 18:698-708

Keller III, R.J., Flanagan, P.M., and Kornberg, R.D. (1992) A novel mediator between activator proteins and the RNA polymerase II transcription apparatus. *Cell* 61:1209-1215

Kingston, R.E., and Narlikar, G. (1999) ATP-dependent remodeling and acetylation as regulators of chromatin fluidity. *Genes Dev* 13:2339-2352

Kobayashi, M., Aita, N., Hayashi, S., Okada, K., Ohta, T., and Hirose, S. (1998) DNA Supercoiling factor localizes to puffs on polytene chromosomes in *Drosophila melanogaster*. Mol Cell Biol 18:6737-6744

Kornberg, R.D., and Lorch, Y (1999) Twenty-five years of the nucleosome, fundamental particle of the eukaryote chromosome. Cell 98:285-294

Krebs, J.E., Fry, C.J., Samuels, M.L., and Peterson, C.L.(1999)Cell cycle regulated histone acetylation required for expression of yeast HO gene. Genes Dev: 13, 1412-1421

Lu, Q., Wallarath, L.L., Allan, B.D., Glaser, R.L., Lis, J.T and Elgin, S.C.R. (1992) Promoter sequence containing (CT) n•(GA) n repeats is critical for the formation of the DNase I hypersensitive sites in the *Drosophila* hsp 26 gene. J. Mol. Biol 225:985-998

Lu, Q., Wallrath, L.L., Granok, H., and Elgin, A.C.R. (1993) (CT) n•(GA) n repeats and heat shock elements have distinct roles in chromatin structure and transcriptional activation of the *Drosophila* hsp26 gene.Mol Cell Biol 13:2802-2814

Malone, E.A., Clark, C.D., Chiang, A., and Winston, F. (1991) Mutation in SPT16/CDC68 suppress cis- and trans- acting mutation s that affect promoter function in *Saccharomyces cerevisiae*. Mol Cell Biol 11:5710-5717

Muller et al (1930) J.Genet. 22:299-334 (1930)

O'Brien, T., Wilkins, R.C., Giardina, C., and Lis, J.T. (1995) Distribution of GAGA protein on *Drosophila* genes in vivo. Genes Dev 9:1098-1110

Okada, M., Hirose, S. (1998) Chromatin remodeling mediated by *Drosophila* GAGA factor

and ISWI activate fushi tarazu gene transcription in vitro. Mol Cell Biol 18:2455-2461

Okuhara, K., Ohta, K., Seo, H., Shioda, M., Yamada, T., Tanaka, Y., Dohmae, N., Seyama, Y., Shibata, T., and Murofushi, H. (1999) A DNA unwinding factor involved in DNA replication in cell-free extracts of *Xenopus* eggs. Current Biology 9:341-350

Orphanides, G., Leroy, G., Chang, C.H., Luse, D.S., and Reinberg, D. (1998) FACT, a factor that facilitates transcript elongation through nucleosomes. Cell 92:105-116

Orphanides, G., Wu, W.H., Lane, W.S., Hampsey, M., and Reinberg, D. (1999) The chromatin-specific transcription factor FACT comprises human SPT16 and SSRP1 proteins. Nature 400:284-288

Pedone P. V., Ghirlando, R., Clore, G.M., Gronenborn, A. M., Felseefeld, G., and Omichinski, J. G. (1996) The single Cys2-His2 zinc finger domain of the GAGA protein flanked by basic residues is sufficient for high-affinity specific DNA binding. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93: 2822-2826

Platero, J.S., A.K.Csink, A. Quintanilla, and Heinkoff, S. (1998) Changes in chromosomal localization of heterochromatin-binding proteins during the cell cycle J.Cell Biol.140: 1297-1306

Raf, J.W., Kellum, R., and Alberts, B. (1994) The *Drosophila* GAGA transcription factor is associated with specific regions of heterochromatin throughout the cell cycle. EMBO J 13:5977-5983

Rowley , A., Singer, R., A., and Jonston, G.C. (1991) CDC68, a yeast gene that affects regulation of cell proliferation and transcription, encodes a protein with a highly acidic

carboxyl terminus. Mol Cell Biol 11:5718-5726

Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T. (1989) Molecular Cloning. 2nd Edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press

Shimajima, T., Okada, M., Nakayama, T., Ueda, H., Okawa, K., Iwamatsu, A., Handa, H., and Hirose, S. (2002) *Drosophila* FACT Is involved In the epigenetic regulation of gene expression through physical and functional interactions with GAGA factor (in press)

Soller, W. C., OH, C.E., and Kornberg, T.B. (1993) Isolation of cDNA s encoding the *Drosophila* GAGA transcription factor. Mol Cel Biol 13:7961-7970

Tsukiyama, T., Becker, P.B., and Wu, C. (1994) ATP-dependent nucleosome disruption at a heat-shock promoter mediated by binding of GAGA transcription factor. Nature 367:525-532

Tsukiyama, T., and Wu, C. (1994) Purification and properties of an ATP-dependent nucleosome remodeling factor. Cell 83:1011-1020

Tsukiyama, T., Daniel, C., Tamkun, J., and Wu, C. (1995) *ISWI*, a member of the SWI2/SNF2 ATPase family, encodes the 140 kDa subunit of the nucleosome remodeling factor. Cell 83:1021-1026

Thomas, J. O., and travers, A. (2001) HMG1 and 2, and related 'architectural' DNA-binding proteins. TRENDS in Biochemical Sciences 26: 167-174

Vaquero, A., Espins, M.L., Azorn, F., and Bernus. (2000) Functional Mapping of the GAGA factor assigns its transcriptional activity to the C-terminal glutamine-rich Domain.J

Biol Chem 275: 1946119468

Wittmeyer, J., and Formosa, T. (1997) The *Sachharomyces cerevisiae* DNA Polymerase α catalytic subunit interacts with Cdc68/Spt16 and with Pob3, a protein similar to an HMG-1 like protein. Mol Cell Biol 17:4178-4190

Workman, J.L., and Roeder, R.G. (1987) Binding of transcription Factor TFIID to the Major Late Promoter during In vitro nucleosome assembly potentiates subsequent initiation by RNA polymerase II. Cell 51:613-622

Xiao, H., Sandaltzopulos, R., Wang, H.M., Hamiche, A., Ranallo, R., Lee, K.M., Fu, D., Wu, C. (2001) Dual function of largest NURF subunit NURF301 in nucleosome sliding and transcription factor interactions. Mol Cell 8:531-543

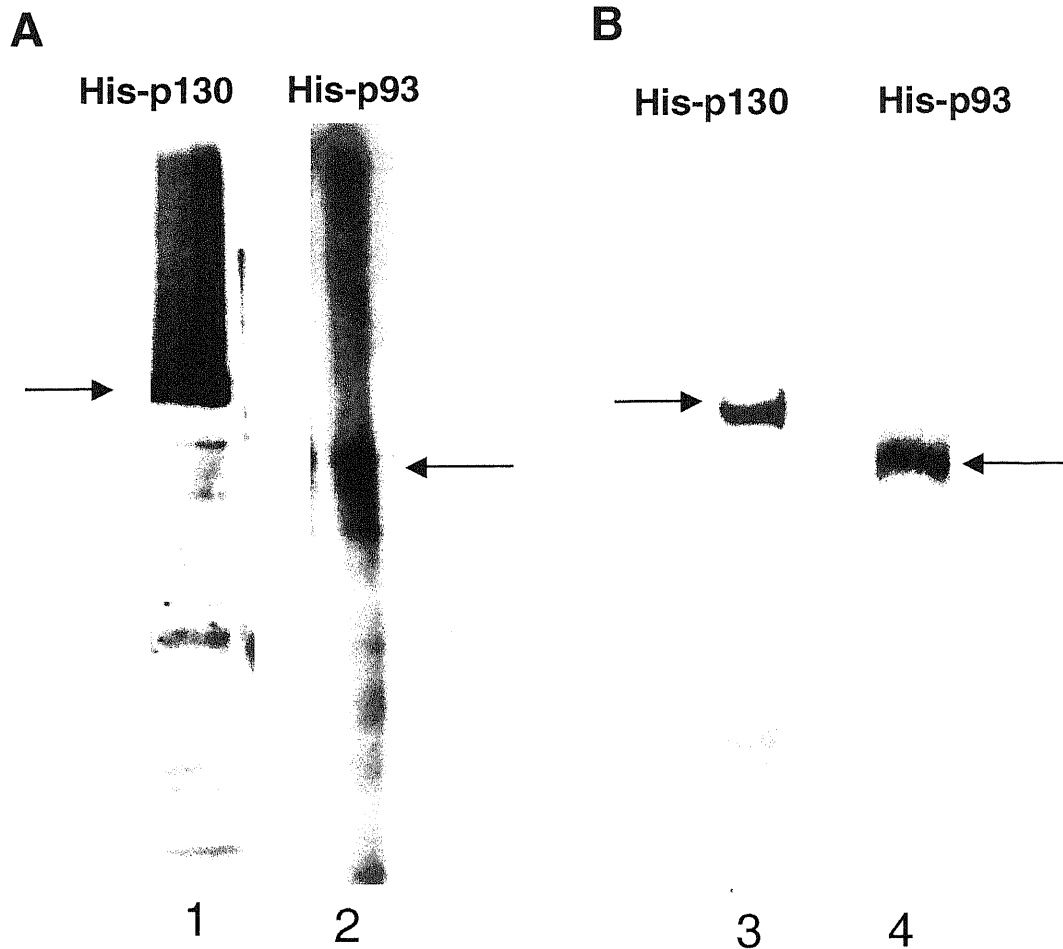


図1A. loading buffer (Tirs-HCl(pH6.8),100 mM DTT、1% SDS) を加えて、95℃5分間熱変性を行った後、スタッキングゲル付きのSDSポリアクリルアミドゲルで電気泳動を行ったHis-p130(lane 1)とHis-p93(lane 2)

図1B. loading buffer (Tirs-HCl(pH8.8),100 mM DTT、1% SDS) を加えて、95℃5分間熱変性を行った後、スタッキングゲル無しのSDSポリアクリルアミドゲルで電気泳動を行ったHis-p130(lane 3)とHis-p93 (lane 4)。電気泳動後のゲルはニトロセルロース膜に転写した。p93、p130の検出について、それぞれanti p93 ポリクローナル抗体、anti p130ポリクローナル抗体、二次抗体はanti ラビットHRPを用いて検出した。

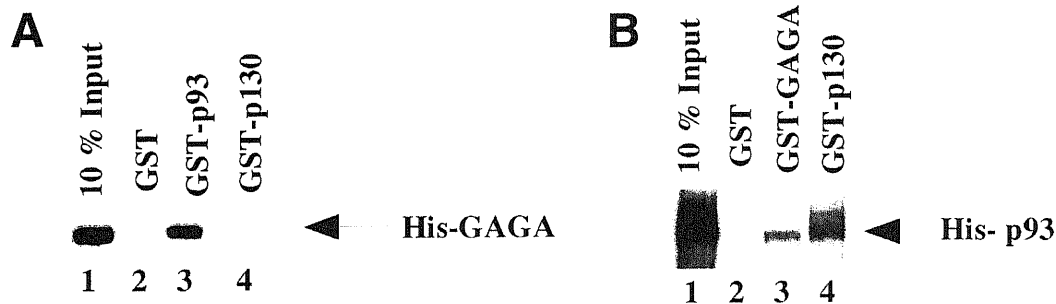


図2 GSTプルダウンアッセイ

図2A. GST-p93, GST-p130, His-GAGAを用いたGSTプルダウンアッセイ lane1; His-GAGA10% Input, lane2; GST, lane3; GST-p93, lane 4; GST-p130 結合したHis-GAGAは2×loading buffer(TrisCl[pH6.8], 200mM DTT, 2% SDS)を加えて95℃で5分間加熱しグルタチオンセファロースから溶出させた。溶出させたサンプルは8% SDSポリアクリルアミドゲルを用いて電気泳動を行い、泳動後のゲルはニトロセルロース膜に転写した。His-GAGAの検出について、一次抗体はanti Hisモノクローナル抗体、二次抗体はanti マウスHRPポリクローナル抗体により検出した。

図2B. GST-GAGA, GST-p130, His-p93を用いたGSTプルダウンアッセイ lane1; His-p93 10% Input, lane2; GST, lane3; GST-GAGA, lane 4; GST-p130 結合したHis-p93は2×loading buffer(TrisCl[pH8.8], 200mM DTT, 2% SDS)を加えて95℃で5分間加熱しグルタチオンセファロースから溶出させた。溶出させたサンプルはスタッキングゲルを欠いた8% SDSポリアクリルアミドゲルを用いて電気泳動を行い、泳動後のゲルはニトロセルロース膜に転写した。His-p93の検出について、一次抗体はanti Hisモノクローナル抗体、二次抗体はanti マウスHRPポリクローナル抗体により検出した。

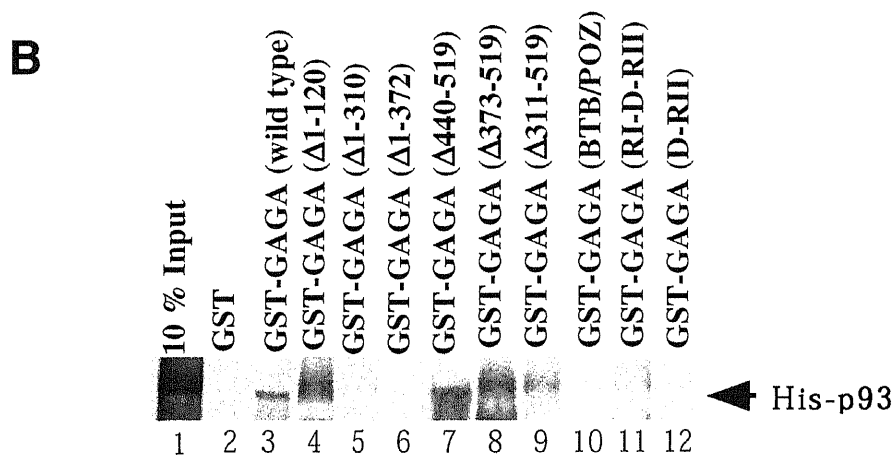
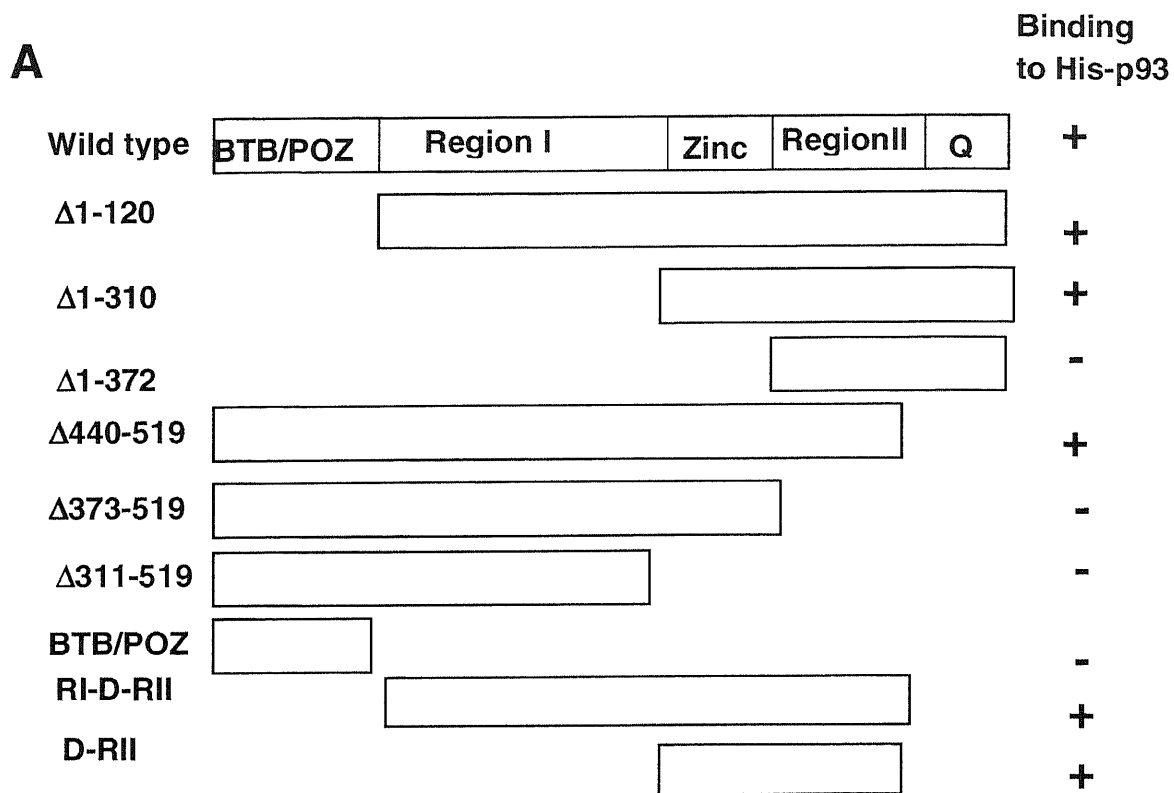


図3 p93が結合に関与するGAGA因子の領域

図3A. GAGA因子の欠損変異体の模式図.

図3B GST-GAGAおよびその欠損変異体、His-p93を用いたGSTプルダウンアッセイ ; GST-GAGAおよびその欠損変異体とHis-p93を用いてGSTプルダウンアッセイを行った。lane1. 10% Input, lane2. GST-GAGA (wild type), GST-GAGA ($\Delta 1-120$), GST-GAGA ($\Delta 1-310$), GST-GAGA ($\Delta 1-372$), GST-GAGA ($\Delta 440-519$), GST-GAGA ($\Delta 373-519$), GST-GAGA ($\Delta 311-519$), GST-GAGA (BTB/POZ), GST-GAGA (RI-D-RII), GST-GAGA (D-RII) His-p93の検出について、一次抗体はanti p93ポリクローナル抗体、二次抗体はanti マウスHRPポリクローナル抗体により検出した。

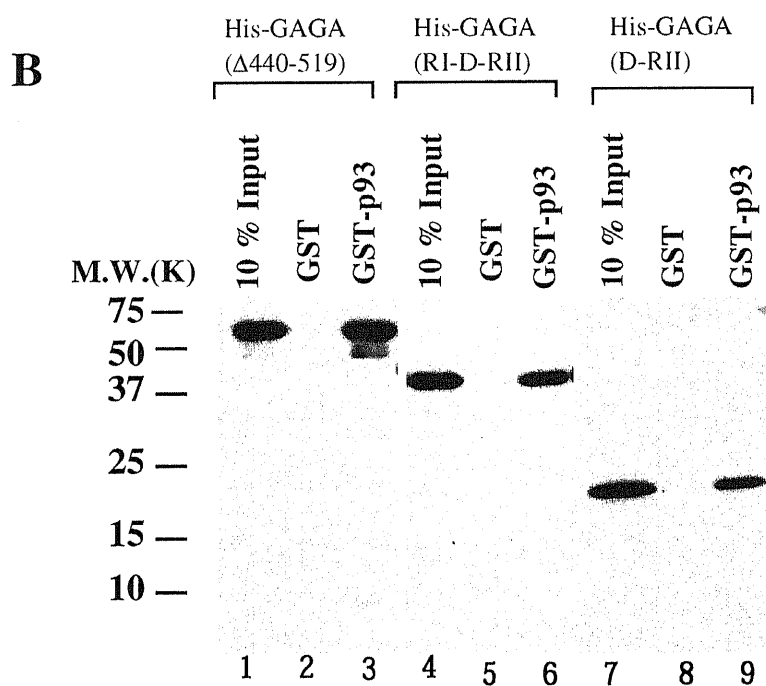
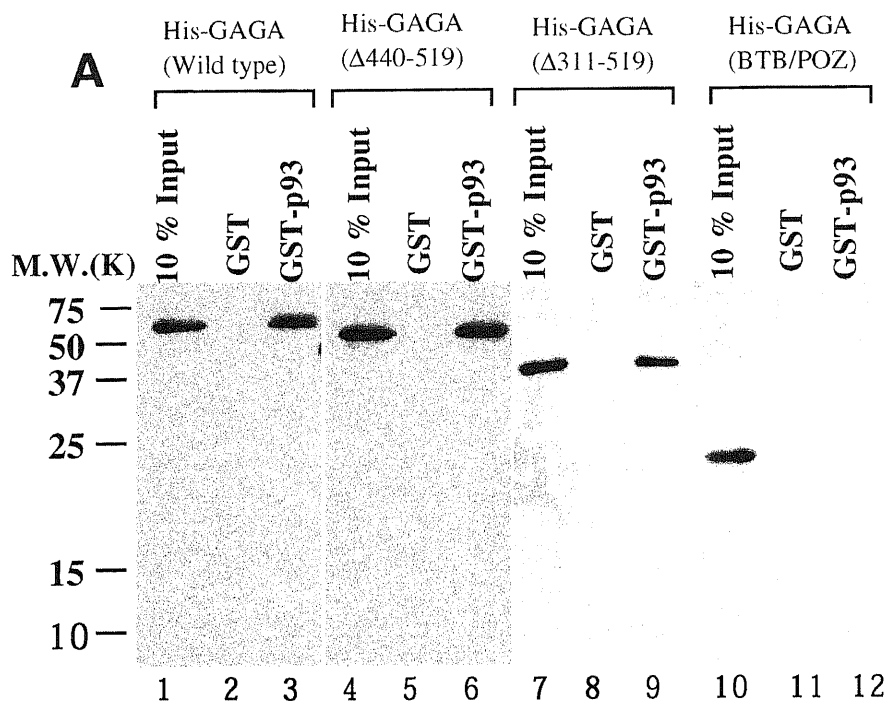


図4 p93が結合に関与するGAGA因子の領域

図4A. GST-dSSRPとHis-GAGAおよびそのC末端欠損変異体を用いたGSTプルダウンアッセイ lane 1~3; GST-p93とHis-GAGA(wild type), lane 4-6; GST-p93とHis-GAGA($\Delta 440-519$), lane 7-9; GST-p93とHis-GAGA($\Delta 311-519$), lane 10-12; GST-p93とHis-GAGA(BTB/POZ) 図3B GST-dSSRPとHis-GAGAのN末端およびC末端欠損変異体を用いたGSTプルダウンアッセイ lane 1-3; GST-p93とHis-GAGA($\Delta 440-519$) lane 4-6; GST-p93とHis-GAGA(RI-D-RII), lane 7-9; GST-p93とHis-GAGA(D-RII) 結合したHis-GAGAおよびその欠損変異体の検出について、一次抗体はanti Hisモノクローナル抗体、二次抗体はanti マウスHRPポリクローナル抗体により検出した。

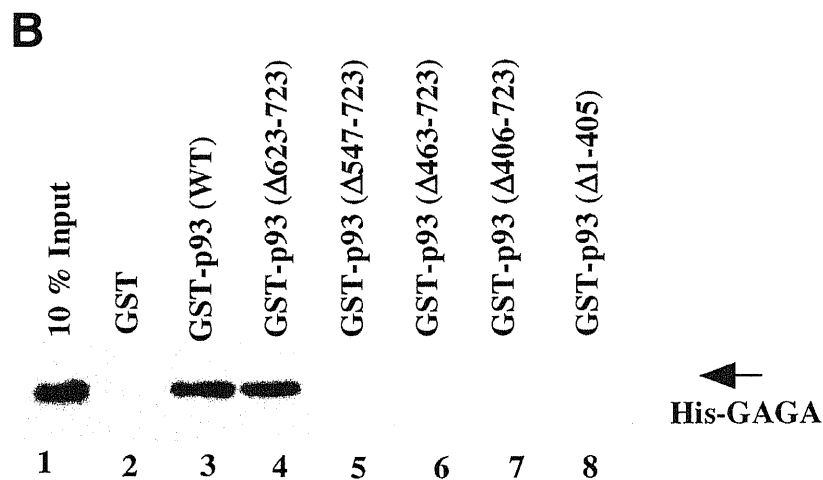
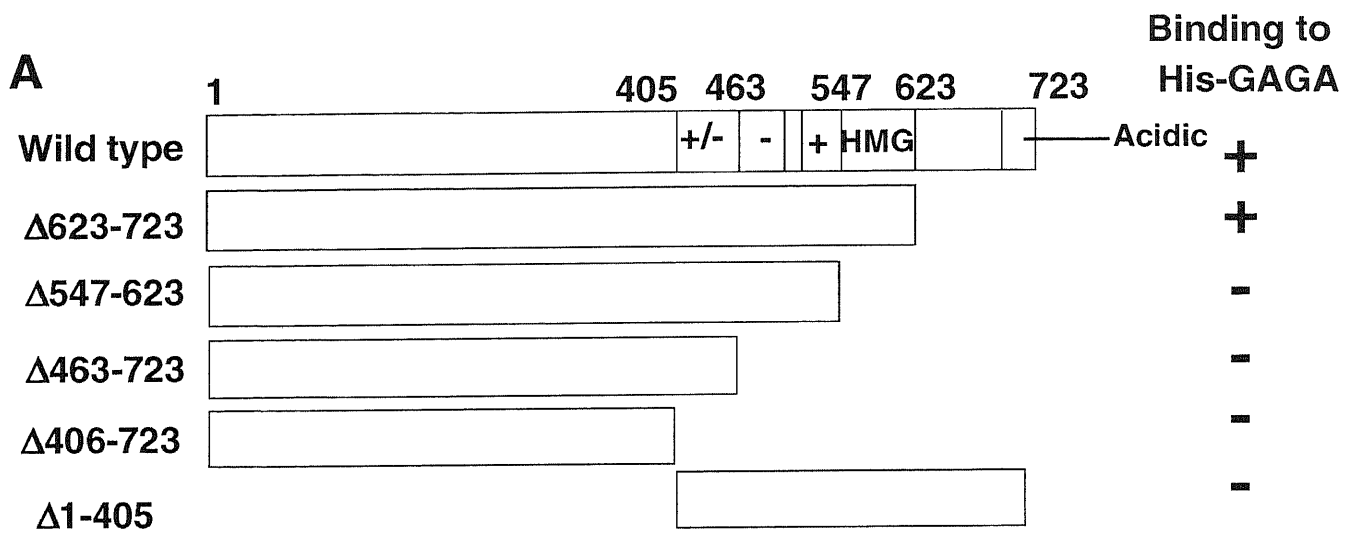


図5. GAGA因子が結合に関与するp93のC末端領域

図 5A. p93の欠損変異体の模式図. +は塩基性アミノ酸、-は酸性アミノ酸に富む領域を示す。図4B. GST-p93欠損変異体、His-GAGAを用いたGSTプルダウンアッセイ lane 1. 10% Input, lane2. GST, lane3. GST-p93 (wild type), lane 4. GST-p93($\Delta 623-723$), lane 5. GST-p93($\Delta 547-723$), lane 6. GST-p93($\Delta 463-723$), lane7. GST-p93($\Delta 406-723$), lane8. GST-p93($\Delta 1-405$) His-GAGAの検出について、一次抗体はanti His モノクローナル抗体、二次抗体は anti マウスHRPポリクローナル抗体により検出した。

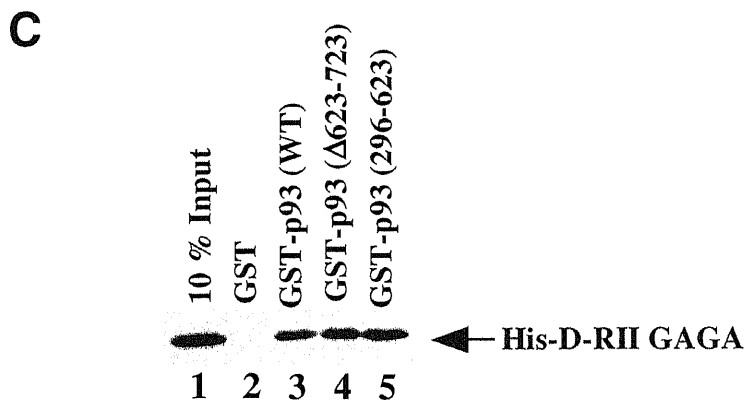
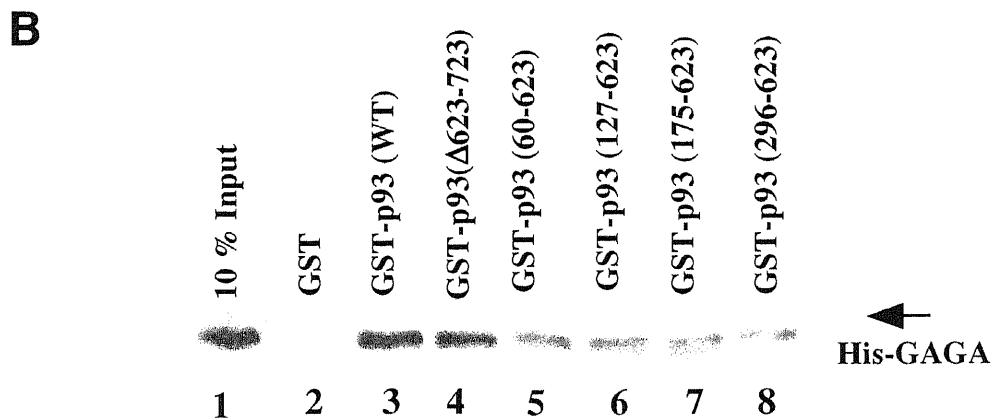
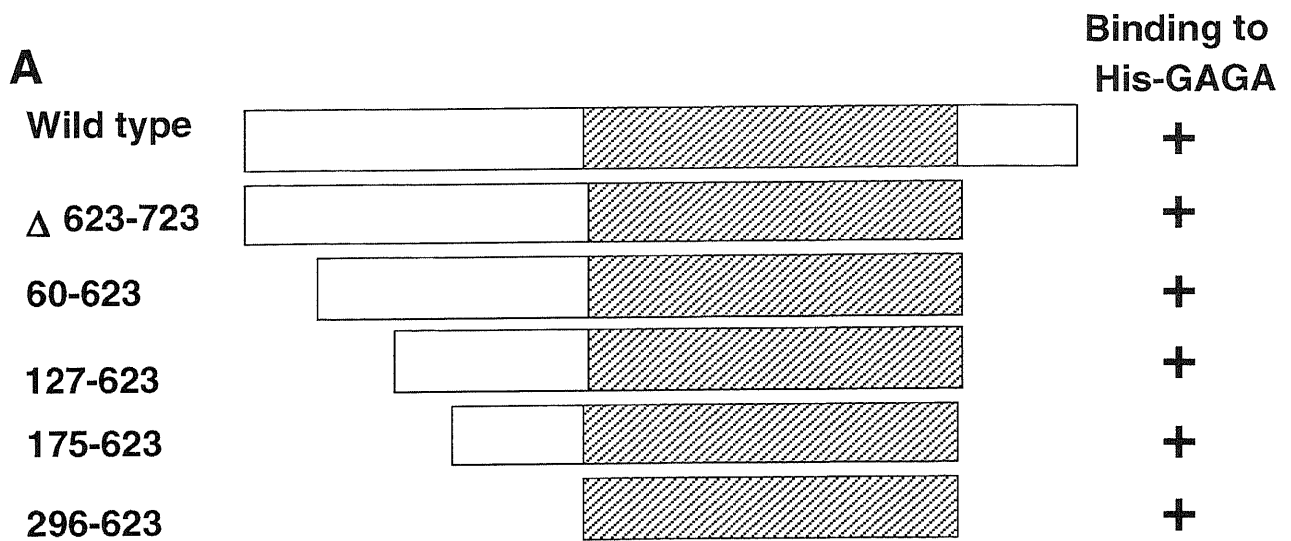


図6. GAGA因子が結合に関与するp93のN末端領域

図6A. p93の欠損変異体の模式図。斜線はGAGA因子がp93との結合に必要な領域を示す。図6B. GST-p93欠損変異体、His-GAGAを用いたGSTプルダウンアッセイ lane1. 10 % Input, lane2. GST, lane 3. GST-p93 (wild type), lane 4. GST-p93 (Δ 623-723), lane 5. GST-p93 (60-723), lane 6. GST-p93 (127-723), lane 7. GST-p93 (127-723), lane 5. GST-p93 (175-723), lane 6. GST-p93 (296-723)

図6C. GST-p93欠損変異体、His-GAGA(D-R II)を用いたGSTプルダウンアッセイ lane1. 10 % Input, lane2. GST, lane 3. GST-p93 (wild type), lane 4. GST-p93 (Δ 623-723), lane 5. GST-p93 (296-723)

His-GAGAおよび His-GAGA (D-R II)の検出について一次抗体はanti Hisモノクローナル抗体、二次抗体は anti マウスHRPポリクローナル抗体により検出した。

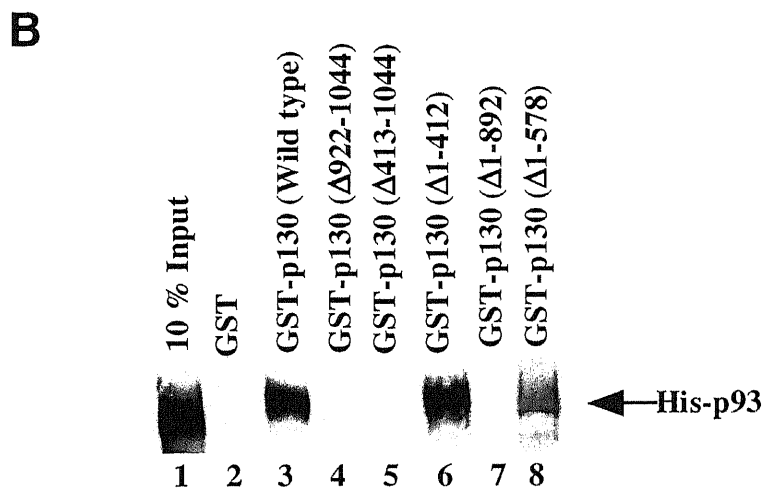
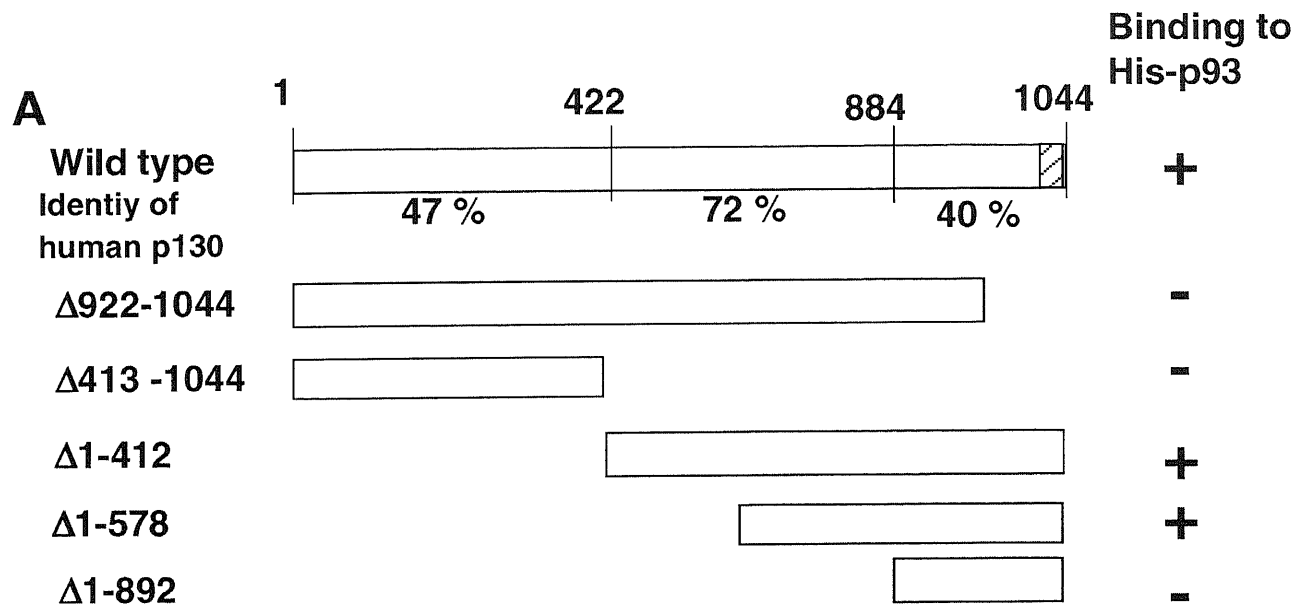


図7. p93が結合に關与するp130の領域

図7A. p130の欠損変異体の模式図。%はヒトとのidentityを示す。

斜線部は酸性アミノ酸やセリン残基に富む領域を示す。

図7B. GST-p93欠損変異体、His-p93を用いたGSTプルダウンアッセイ
lane 1. 10% Input, lane 2. GST, lane 3. GST-p130 (wild type), lane 4. GST-p130 ($\Delta 922-1044$), lane 5. GST-p130 ($\Delta 413-1044$), lane 6. GST-p130 ($\Delta 1-412$), lane 7. GST-p130 ($\Delta 1-892$), lane 8. GST-p130 ($\Delta 1-578$).

p93の検出について、それぞれanti p93 ポリクローナル抗体、二次抗体はanti ラビットHRPを用いて検出した。

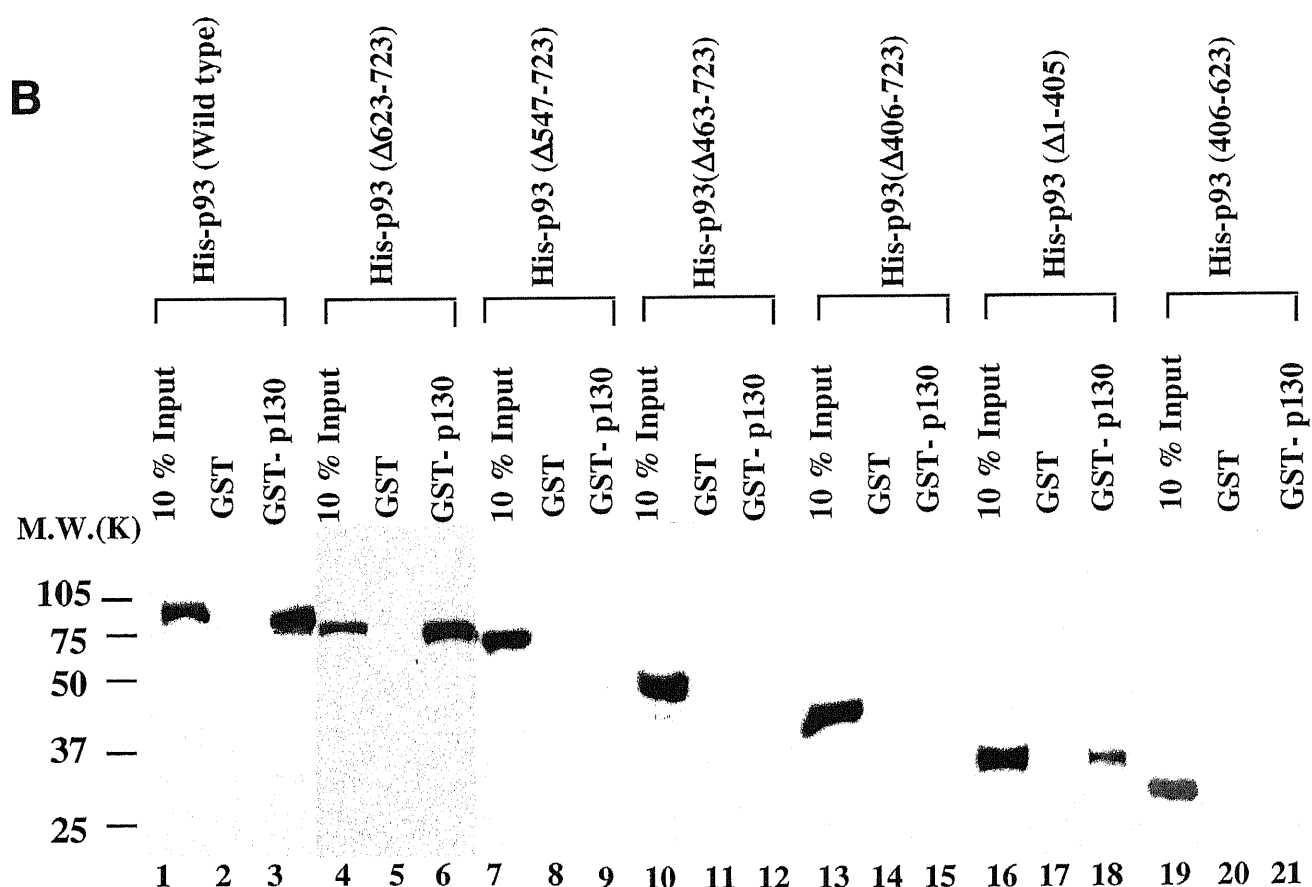
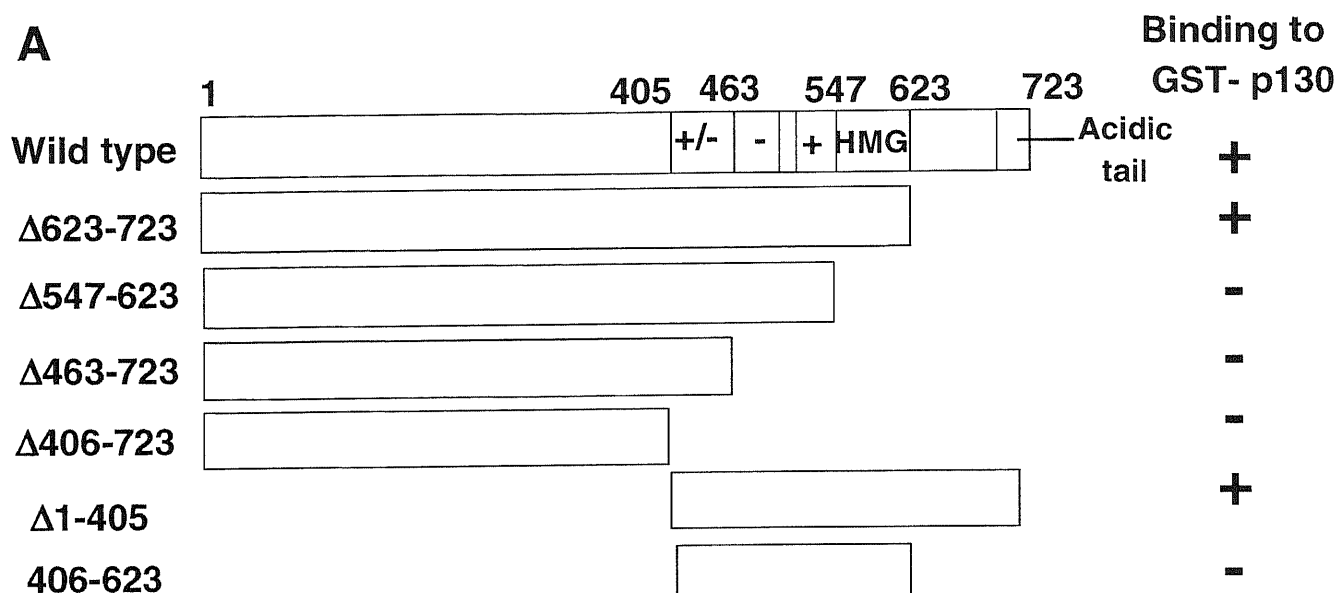


図8 p130が結合に関与するp93の領域

図 8 A. p93の欠損変異体の模式図.

図7B. His-p93欠損変異体、GST-p130を用いたGSTプルダウンアッセイ

lane1-3. GST-p130とHis-p93 (wild type), lane4-6. GST-p130とHis-p93 ($\Delta 623-723$),

lane7-9. GST-p130とHis-p93 ($\Delta 547-723$), lane10-12. GST-p130とHis-p93 ($\Delta 463-723$)

lane13-15. GST-p130とHis-p93 ($\Delta 406-723$), lane16-18. GST-p130とHis-p93 ($\Delta 1-405$)

lane19-21. GST-p130とHis-p93 (406-723) His-p93およびその欠損変異体の検出につい

て、一次抗体はanti His モノクローナル抗体、二次抗体は anti マウスHRPポリクローナル抗体により検出した。

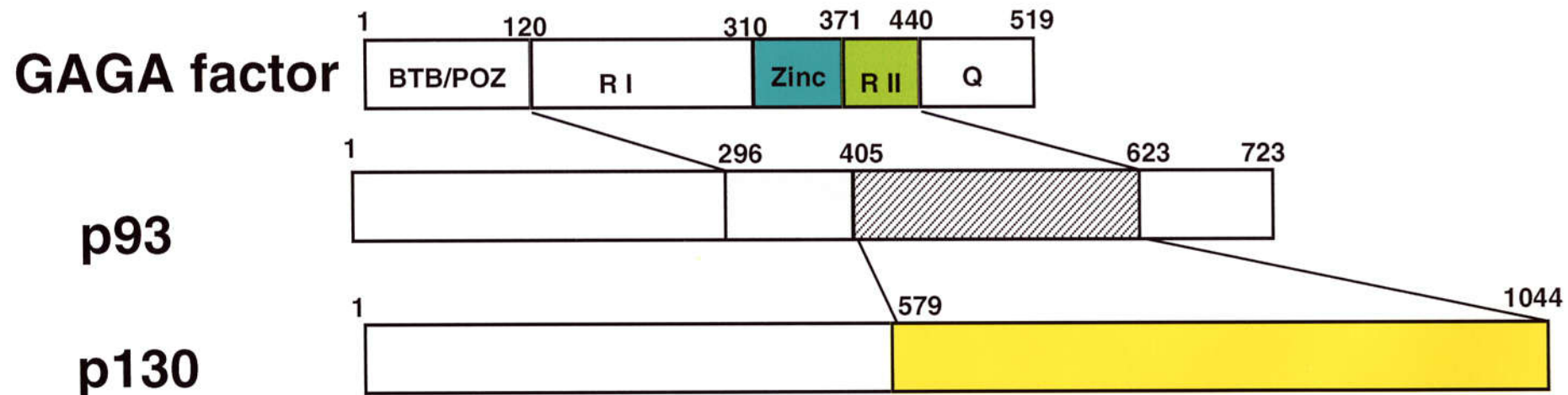


図9. GAGA因子、p93、p130の結合に必要な領域の模式図
GSTプルダウンアッセイによりGAGA因子、p93、p130の結合に必要な領域を決定した。

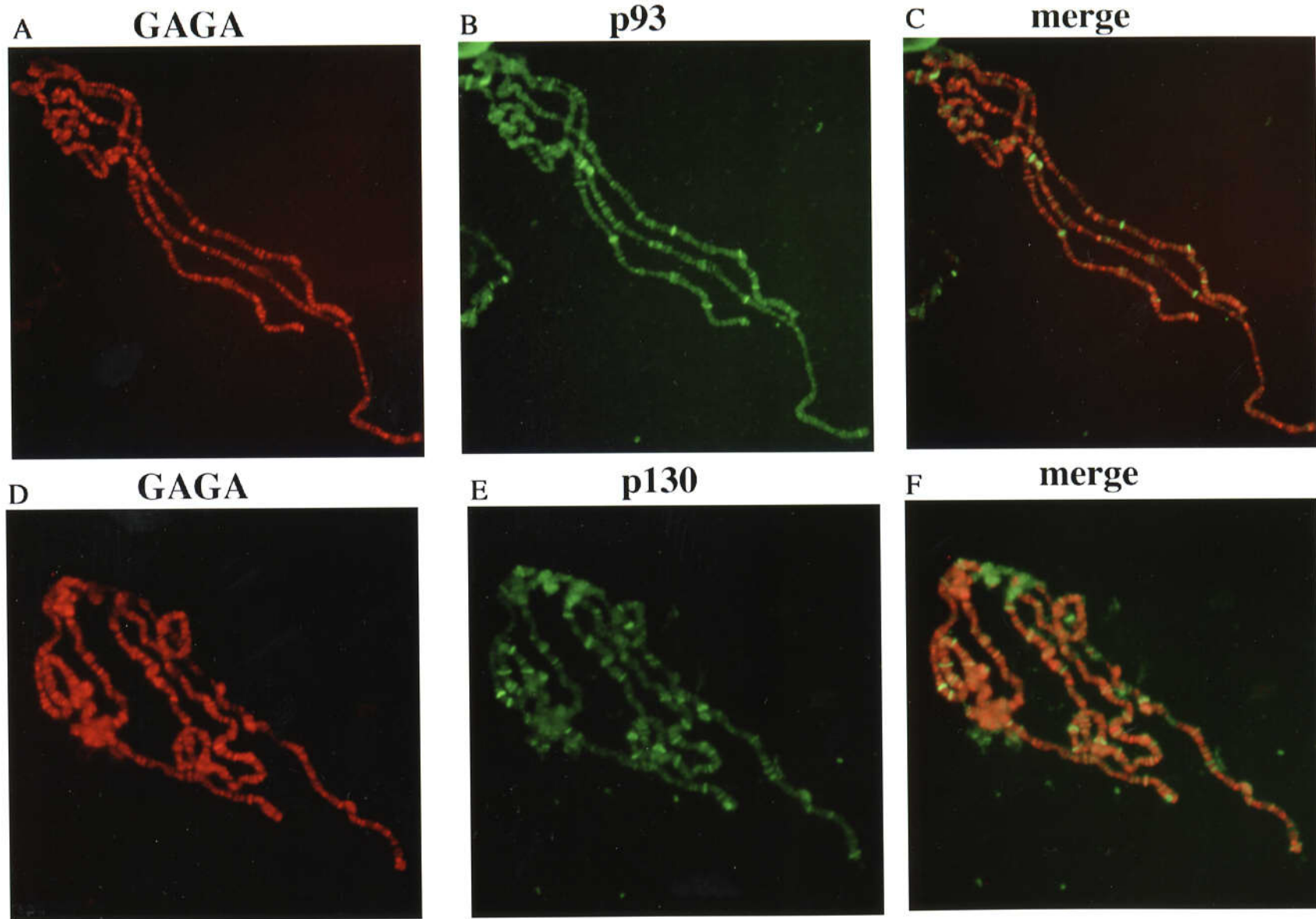


図10. 多糸染色体上でのGAGA因子、p93、p130の分布

Flag-GAGAを発現するトランスジェニックフライの3齢幼虫の唾液腺染色体を抗体染色した。一次抗体は、anti flag モノクローナルM2抗体 anti p93、anti p130ポリクローナル抗体、二次抗体はrhodamine red 標識 anti マウスポリクローナル抗体と、Alexa488標識antiラビットポリクローナル抗体を用いて染色した。GAGA因子のほとんどすべてのバンド（赤）は、p93またはp130（緑）と一致した。

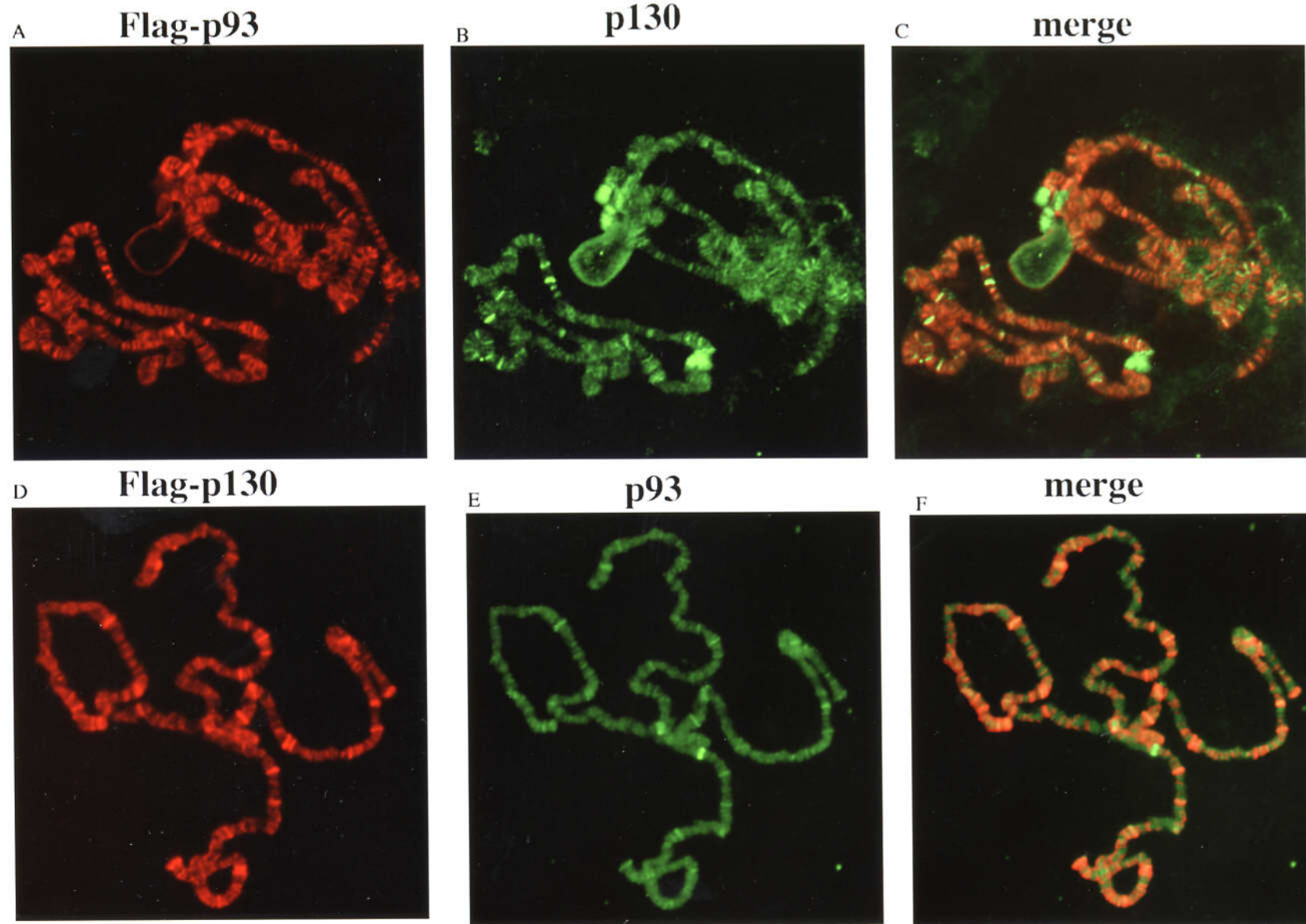
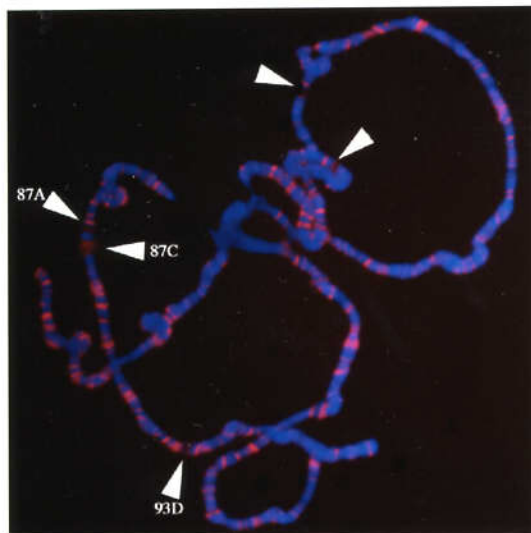
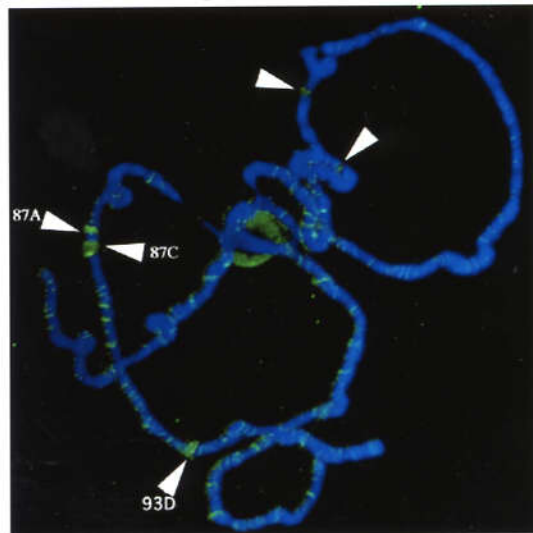


図11. 多系染色体上でのp93, p130の分布
 Flag-p93あるいはFlag-p130を発現するトランスジェニックフライの3齢幼虫の唾液腺染色体を用いて抗体染色した。一次抗体にはanti flag
 モノクローナル抗体、anti p93、anti p130ポリクローナル抗体、二次抗体はrhodamine red標識anti マウスポリクローナル抗体とAlexa488
 標識antiラビットポリクローナル抗体を用いて染色した。

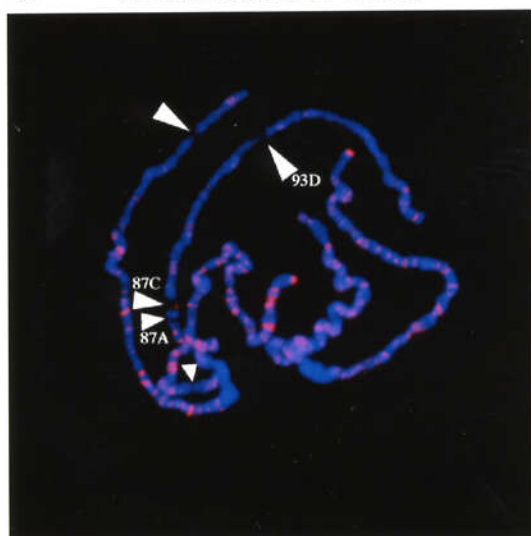
A GAGA factor & DAPI



B p93 & DAPI



C GAGA factor & DAPI



D p130 & DAPI

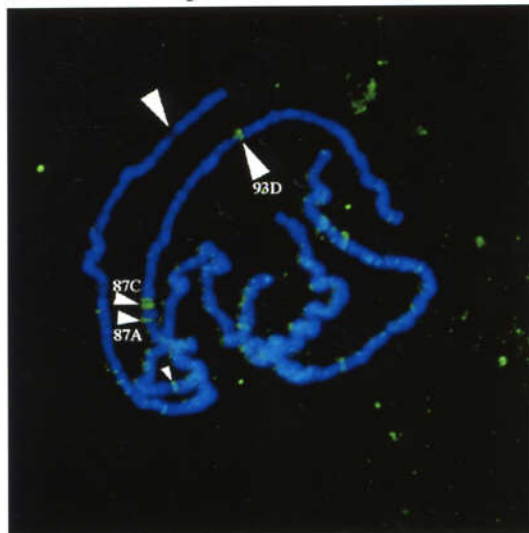


図12. heat shock 処理後の多糸染色体上での、GAGA、p93、p130の分布
 37℃、30分間処理したFlag-GAGAを発現するトランスジェニックフライの3齢幼虫の唾液染色体を摘出し、一次抗体はanti Flag モノクローナルM2抗体とanti p93、anti p130 ポリクローナル抗体、二次抗体はCy3標識antiマウスポリクローナル抗体と、Alexa488標識antiラビットポリクローナル抗体を用いて染色した。白矢印はヒートショックパフを示す。GAGA因子（赤）と p93またはp130（緑）はヒートショックパフに局在した。

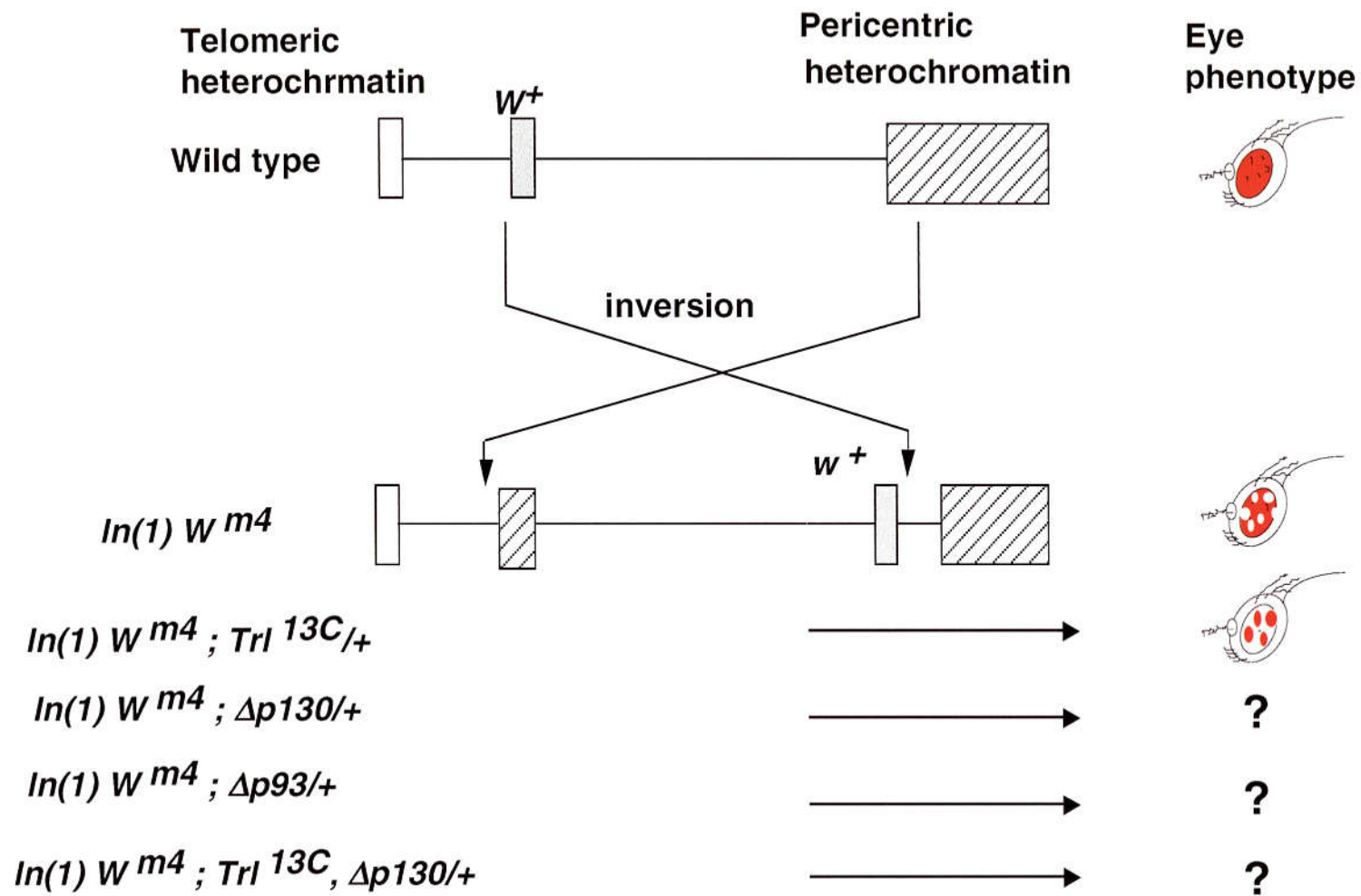


図13. Position effect variegationの模式図

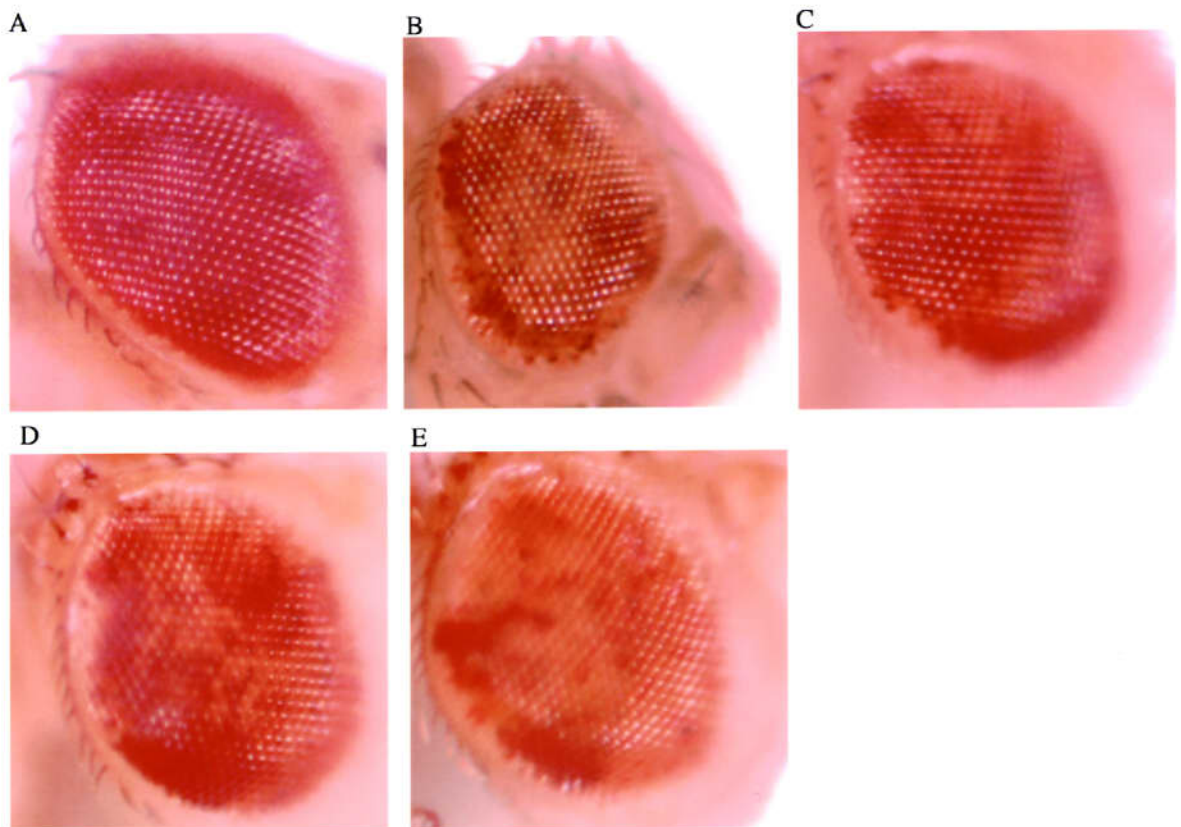


図14. p93、p130欠損変異によるPosition effect variegationの影響
 A. Wm4 B. Wm4; $\Delta p93/+$ C. Wm4; $\Delta p130/+$ D. Wm4; Trl^{13C}/ $+$
 E. Wm4; Trl^{13C}, $\Delta p130/+$ A~Eはすべて雄の眼を示した。

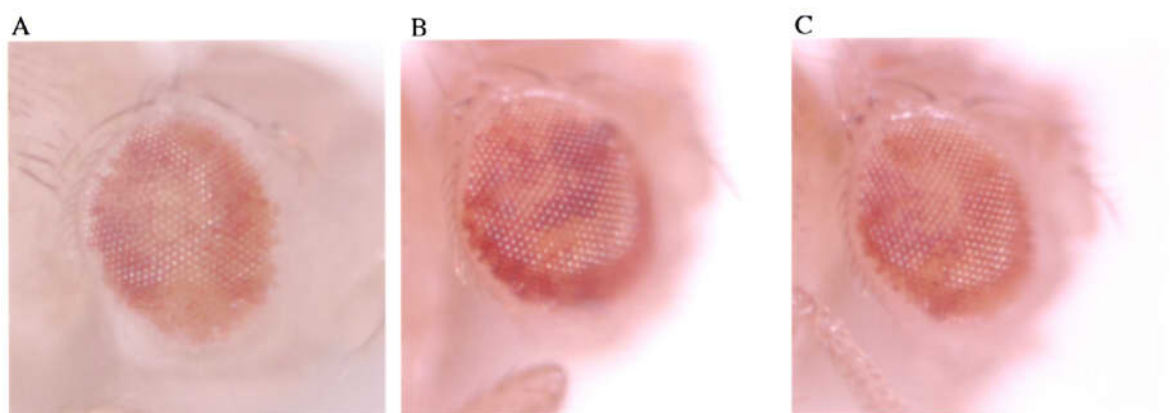


図15. p130欠損変異に遺伝子を導入した個体のPosition effect variegationの影響
 A. Wm4; Trl^{13C}, $\Delta p130/+$ B. Wm4; p130; $\Delta p130$, $\Delta p130/+$ C. Wm4; Trl^{13C}/ $+$
 A~Cはすべて雄の眼を示した。

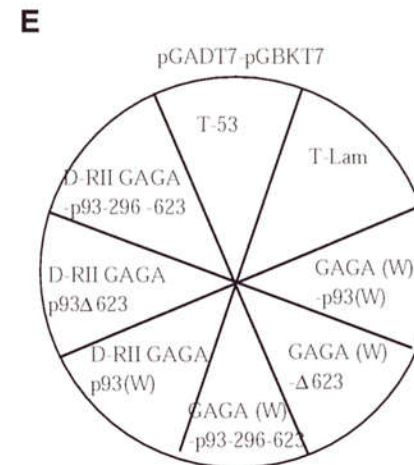
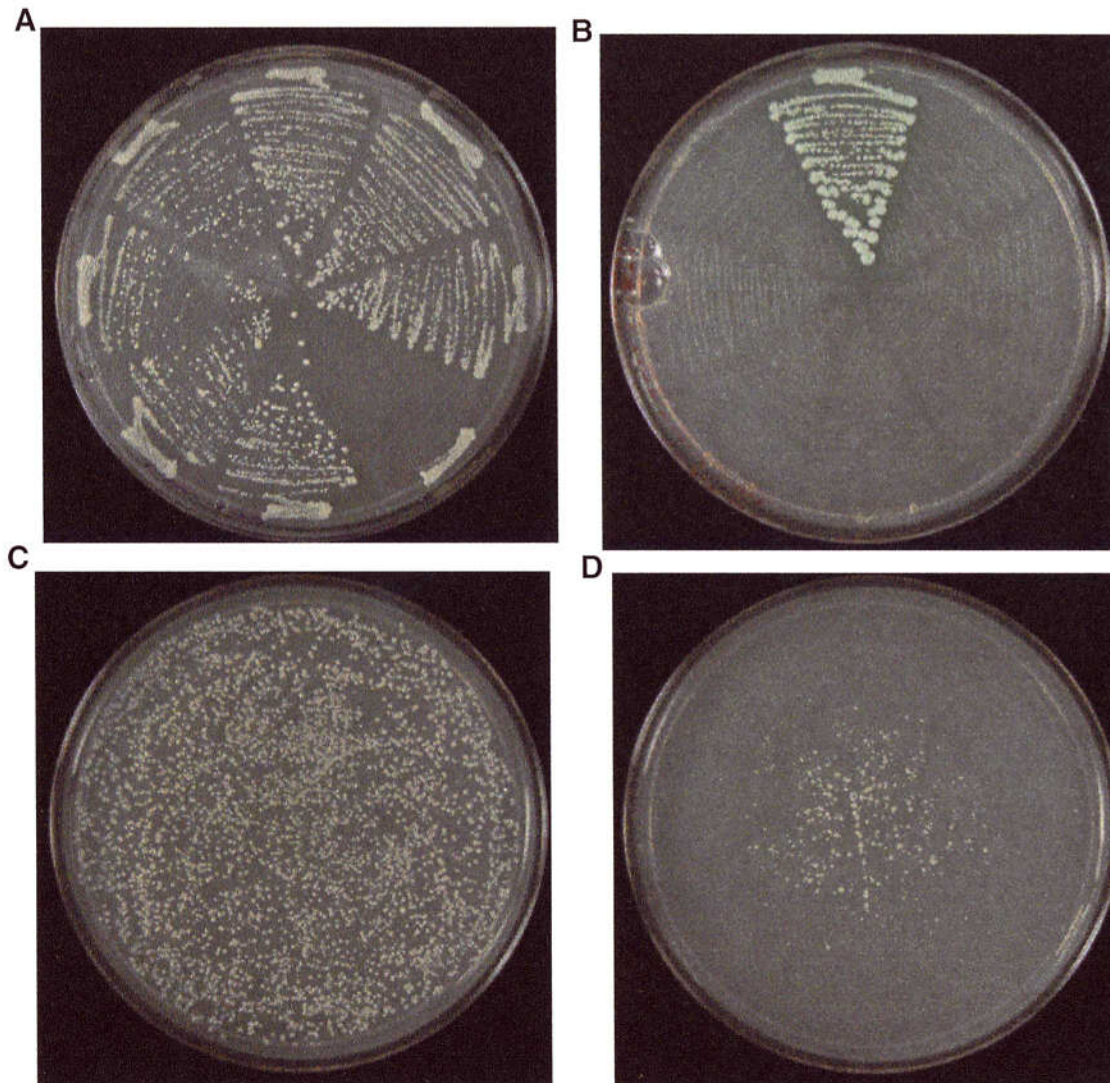


図16 two-hybrid assay

Eで示したベクターの組み合わせをAH109株にコトランスフォームし

A. SD/-Leu/-Trpプレート、B. SD/-Leu/-Trp/-Ade/-His+alphaX-Gal プレート上にストリークし30℃で3日間インキュベートした。C.pGADT7-GAGA, D.pGBKT7-p93(wild type)をそれぞれAH109株にトランスフォームしSD/-LeuあるいはSD/-Trpプレート上にストリークし30℃で3日間インキュベートした。pGADT7-GAGAをAH109株にトランスフォームすると生育阻害が観察された。pGADT7-D-RII GAGA も同様に生育阻害が観察された (data not shown)。T; SV40 large T-antigen, 53; マウスp53, ポジティブコントロールとして使用した。Lam; Lamin ネガティブコントロールとして使用した。

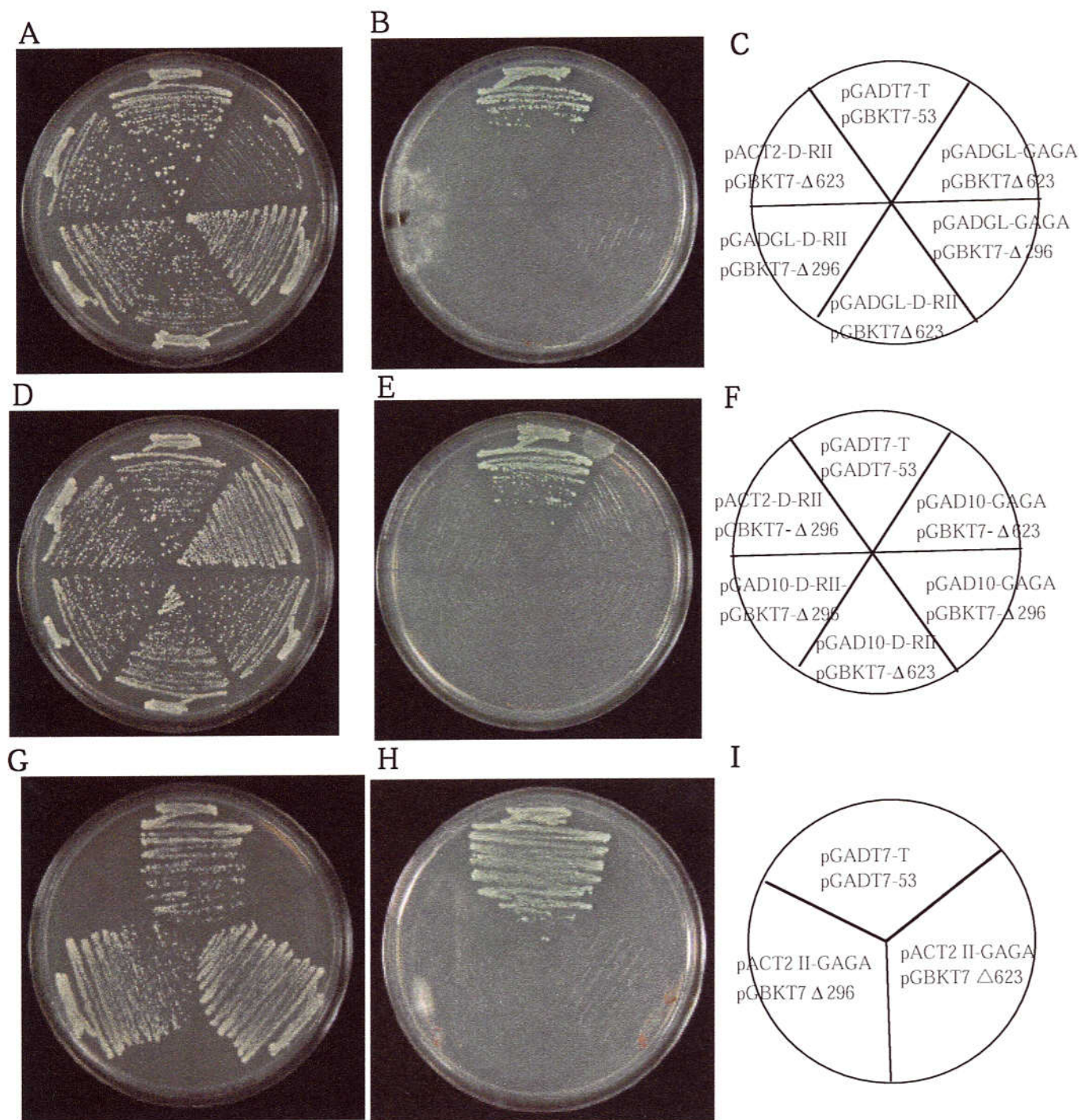


図17 two-hybrid assay

C, F, Iで示したベクターの組み合わせをAH109株にコトランスフォームしSD/-Leu/-Trpプレート(A, D, G)、SD/-Leu/-Trp/-Ade/-His+alpha X-Gal プレート(B, E, H)上にストリークし30℃で3日間インキュベートした。T; SV40 large T-antigen, 53; マウス p53, ポジティブコントロールとして使用した。Lam; Lamin ネガティブコントロールとして使用した。Δ623; p93 Δ623-723, Δ296; p93 296-623, D-RII; D-R II GAGA

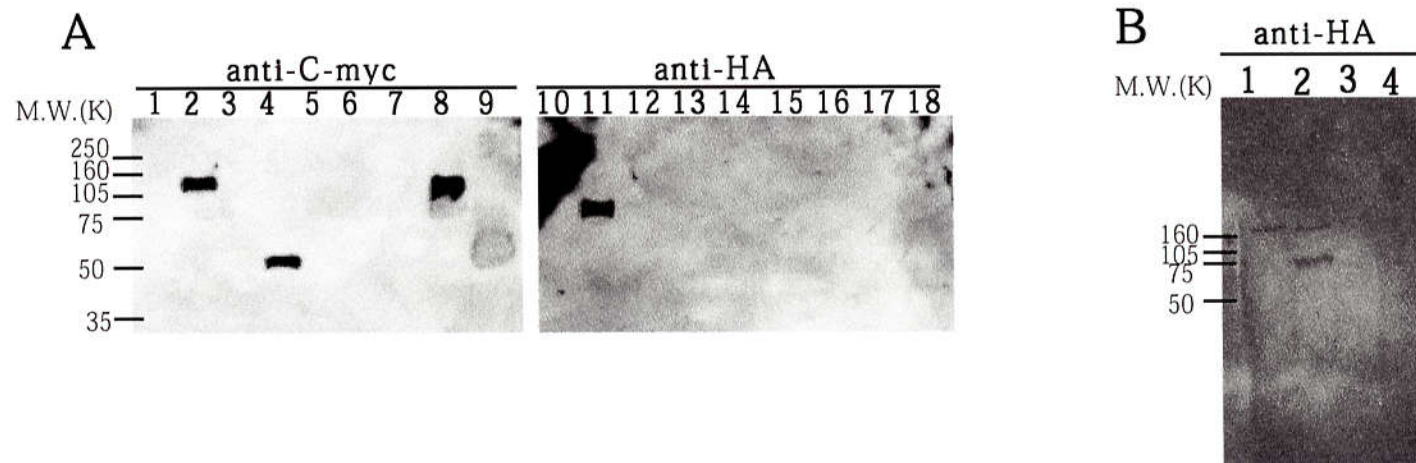


図18 酵母細胞抽出液中のGAGA因子、p93の発現

図18A. pGADT7-GAGAあるいはpGADT7-D-RII GAGAをAH109株に形質転換しその細胞抽出液を用いてGAGA因子は抗HA抗体により、p93は抗C-myc抗体により検出した。lane 1,10; N107-1(negative control), lane 2,11; W-3031A(positive control), lane 3,12; AH 109(no transformation), lane 4,13; pGADT7-T&pGBKT7-53 lane 5,14; pGADT7-GAGA, lane 6,15; pGBKT7-dSSRP (WT), lane 7,16; pGADT7-DR II GAGA &pGBKT7-p93 (WT) lane 8,17; pGADT7-D RII GAGA &pGBKT7-p93 (Δ 623), lane 9,18; pGADT7-DR II GAGA &pGBKT7-p93 (296-623)

図18B. pACT2-GAGAあるいはpACT2-DRII GAGAをAH109株に形質転換しその細胞抽出液を用いて抗HA抗体により検出した。lane 1; N107-1 (negative control), lane 2; W303-1 A (positive control), lane 3; pACT2-GAGA&pGBKT7-dSSRP(Δ 623-723), lane4; pACT2-DRII GAGA& pGBKT7dSSRP(Δ 623-723)

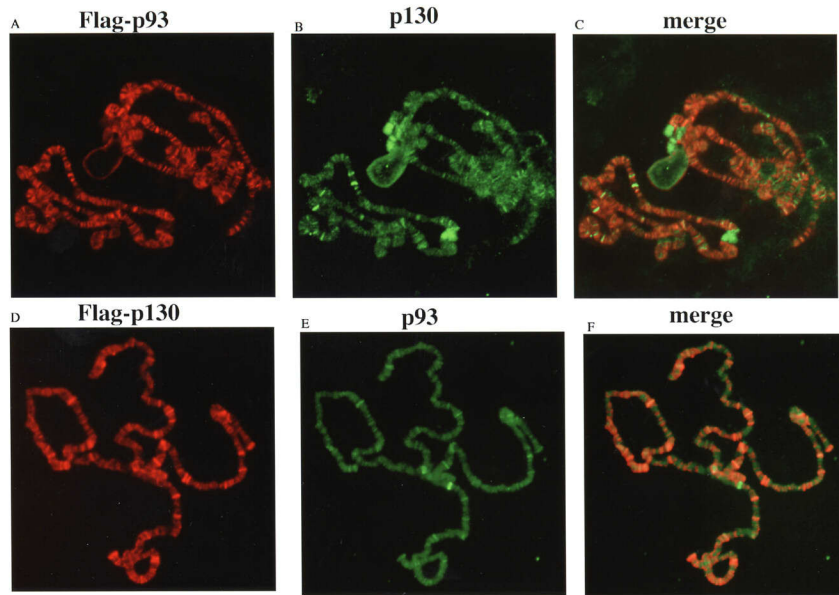
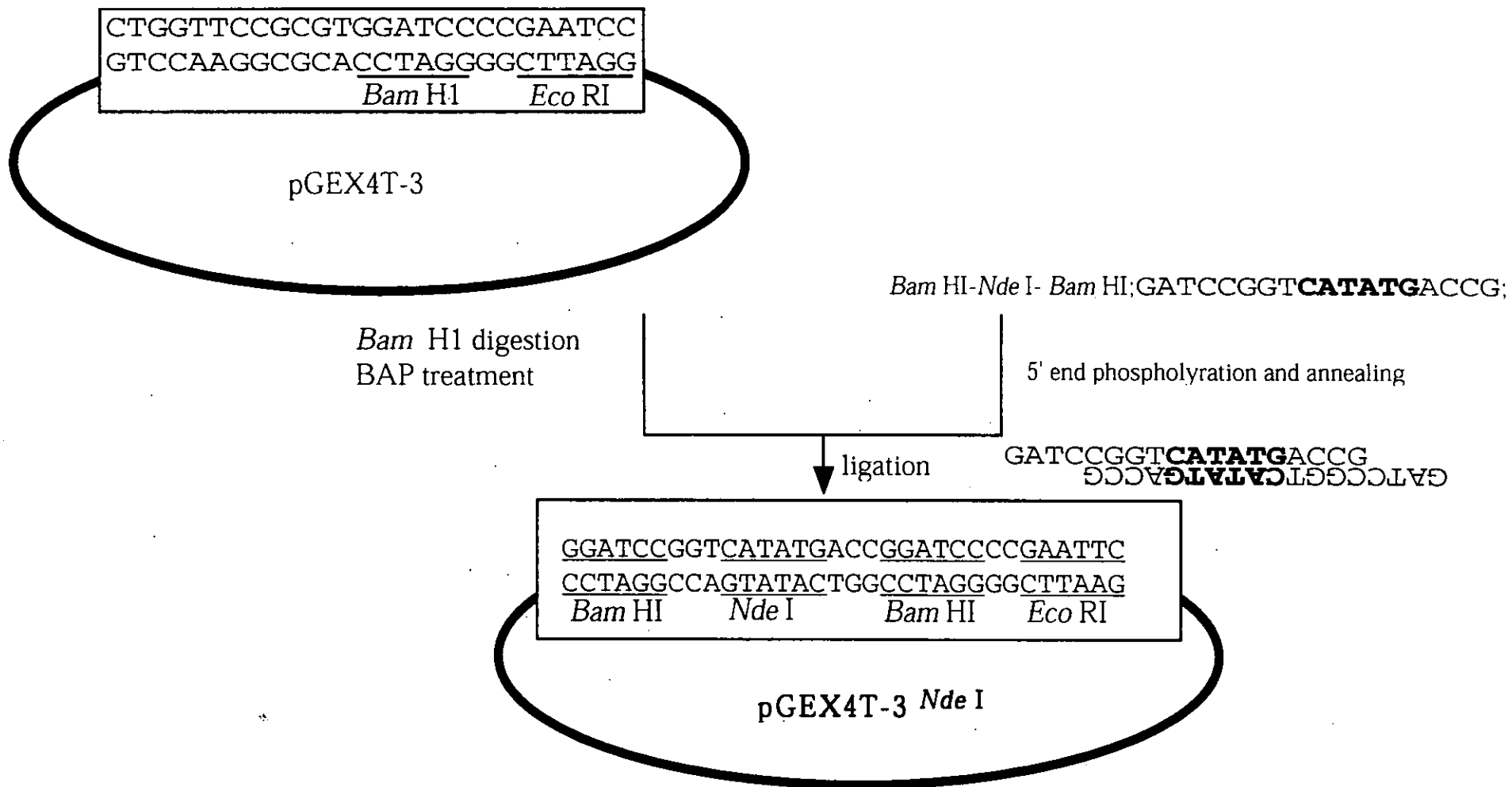
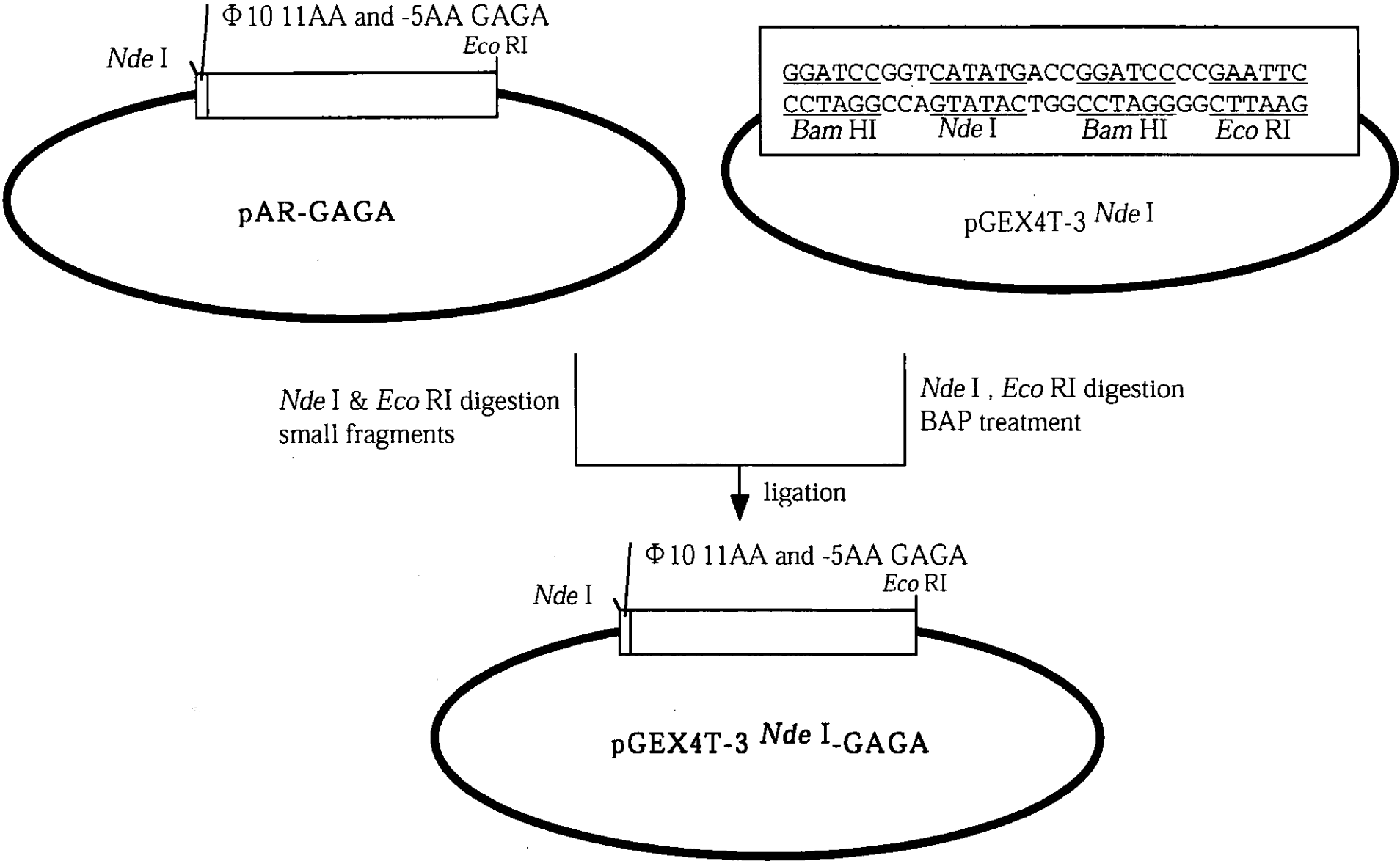


図11. 多系染色体上でのp93, p130の分布
 Flag-p93あるいはFlag-p130を発現するトランスジェニックフライの3 齢幼虫の唾液腺染色体を用いて抗体染色した。一次抗体にはanti flag
 モノクローナル抗体、anti p93、anti p130ポリクローナル抗体、二次抗体はrhodamine red標識anti マウスポリクローナル抗体とAlexa488
 標識antiラビットポリクローナル抗体を用いて染色した。

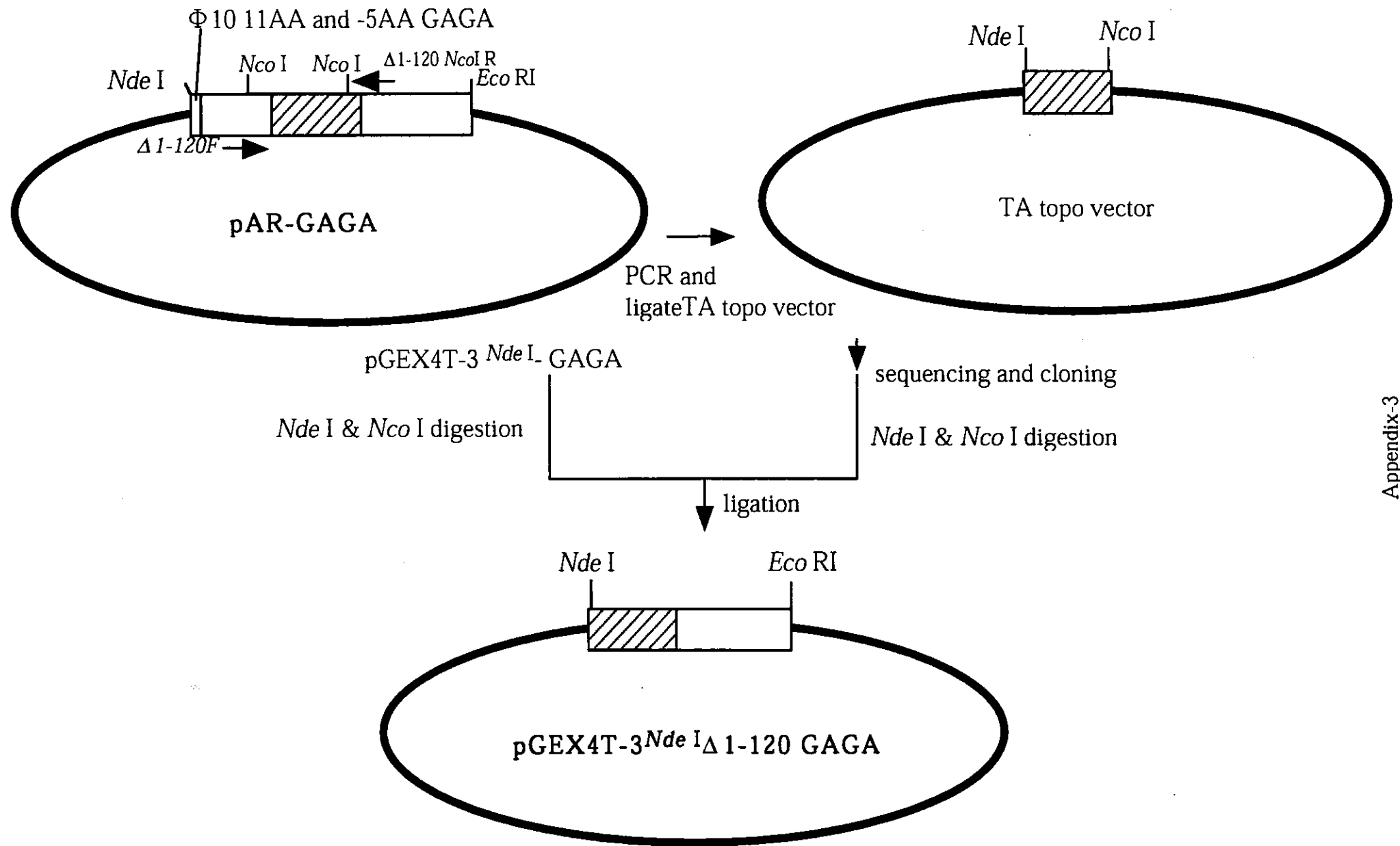
Construction of pGEX4T-3^{Nde}I



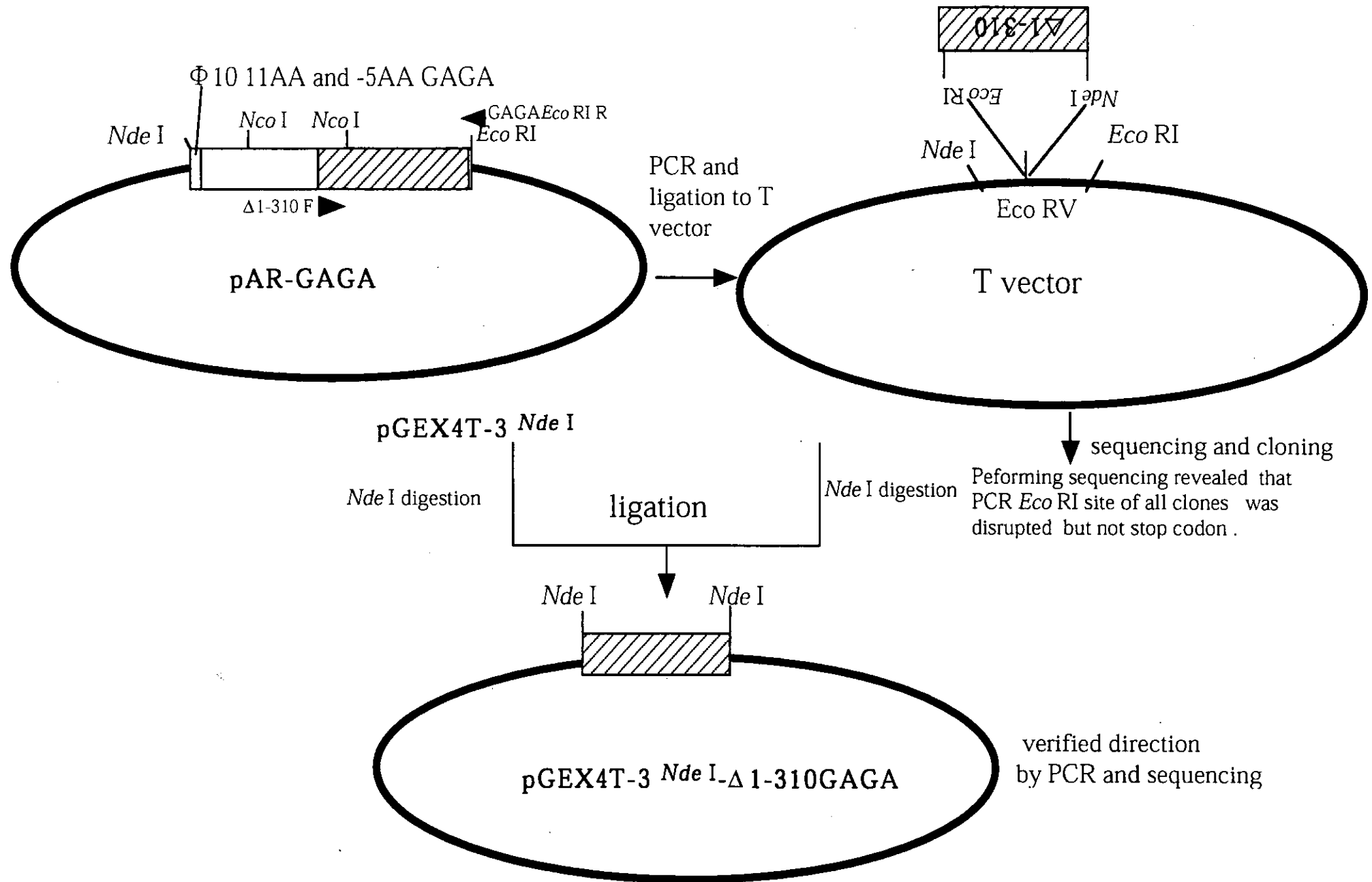
Consruction of pGEX4T-3 *Nde* I-GAGA



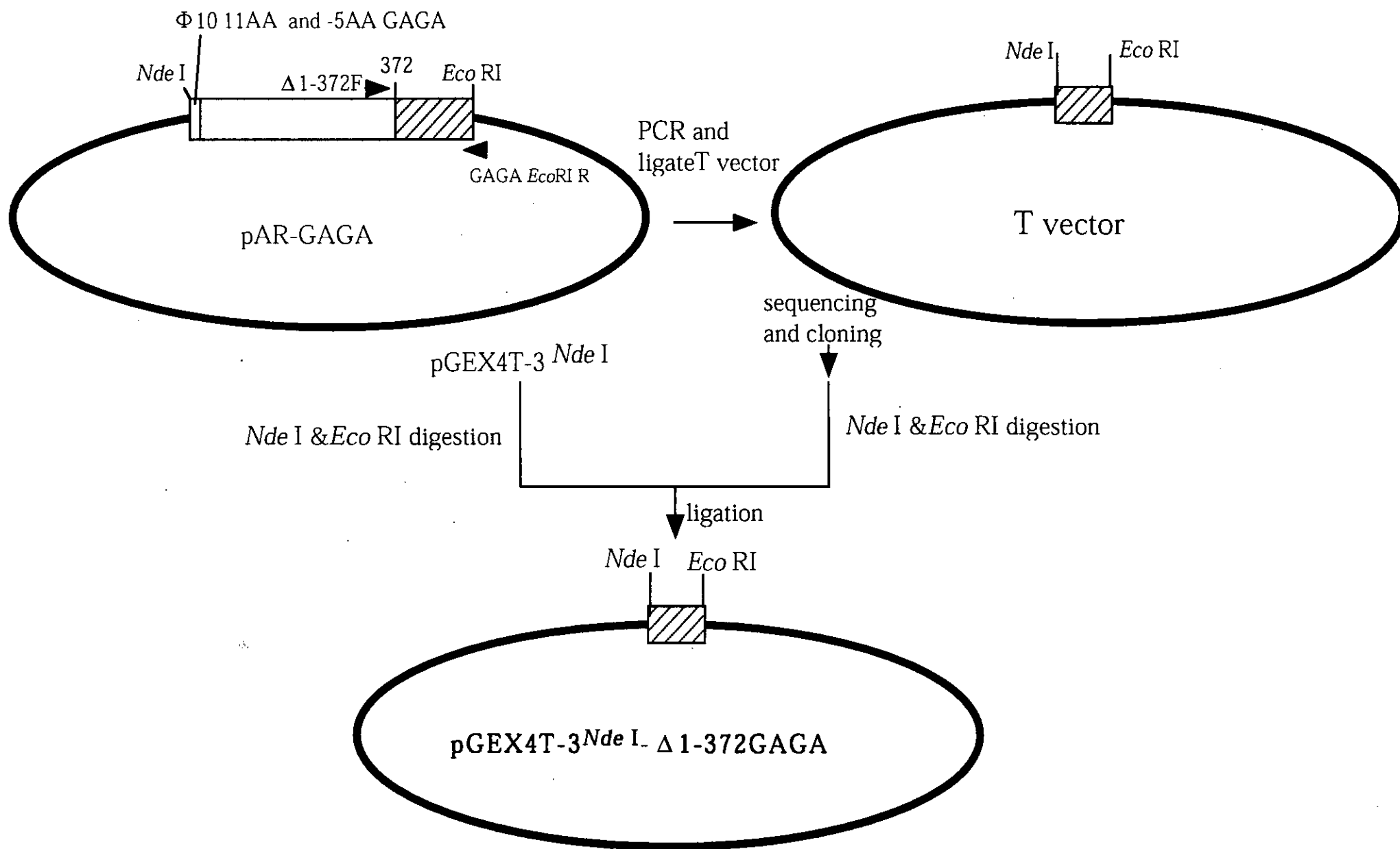
Construction of pGEX4T-3^{Nde}I Δ 1-120 GAGA



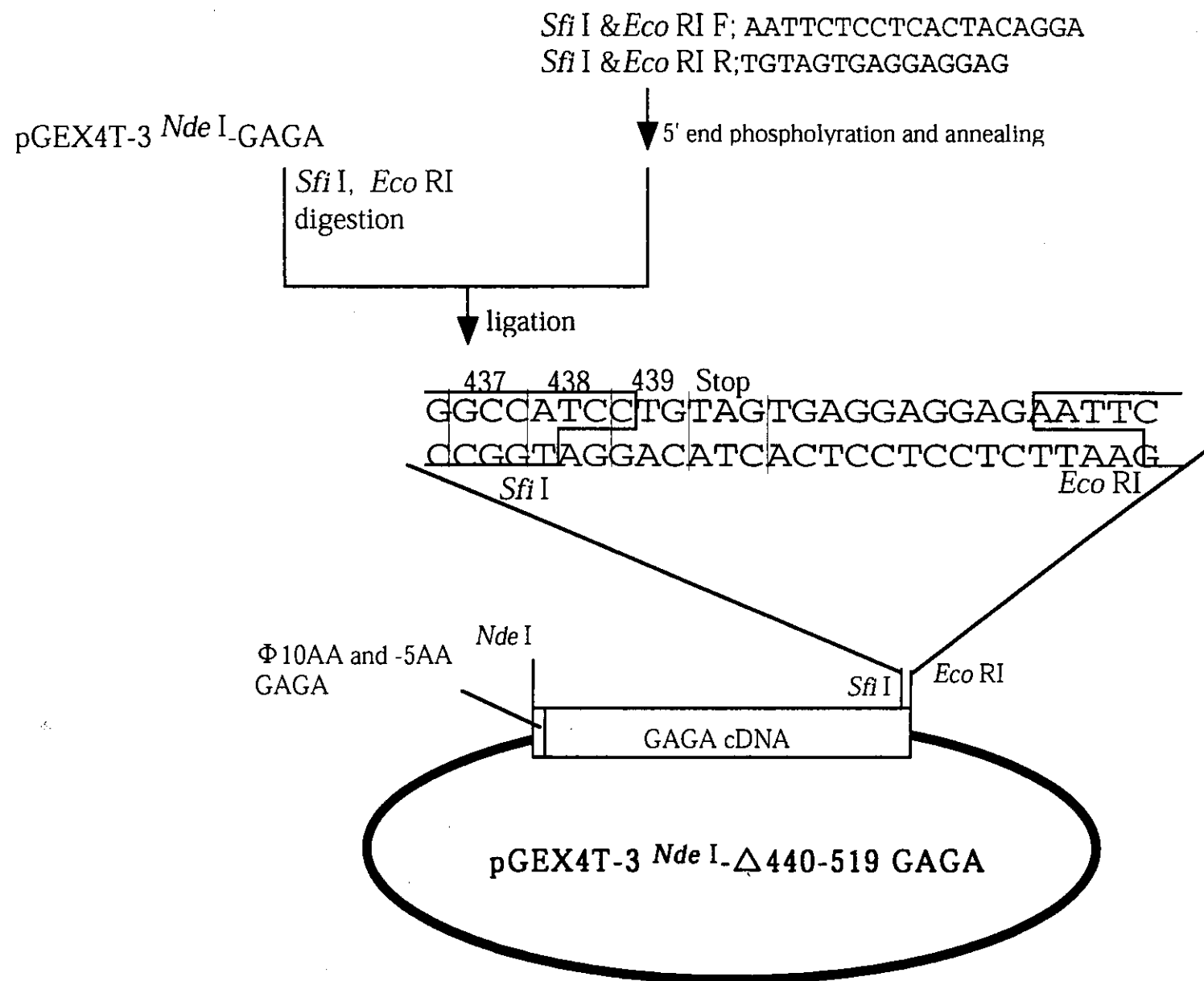
Construcction of pGEX4T-3^{Nde I}Δ 1-310 GAGA



Construction of pGEX4T-3^{Nde}I-Δ1-372GAGA



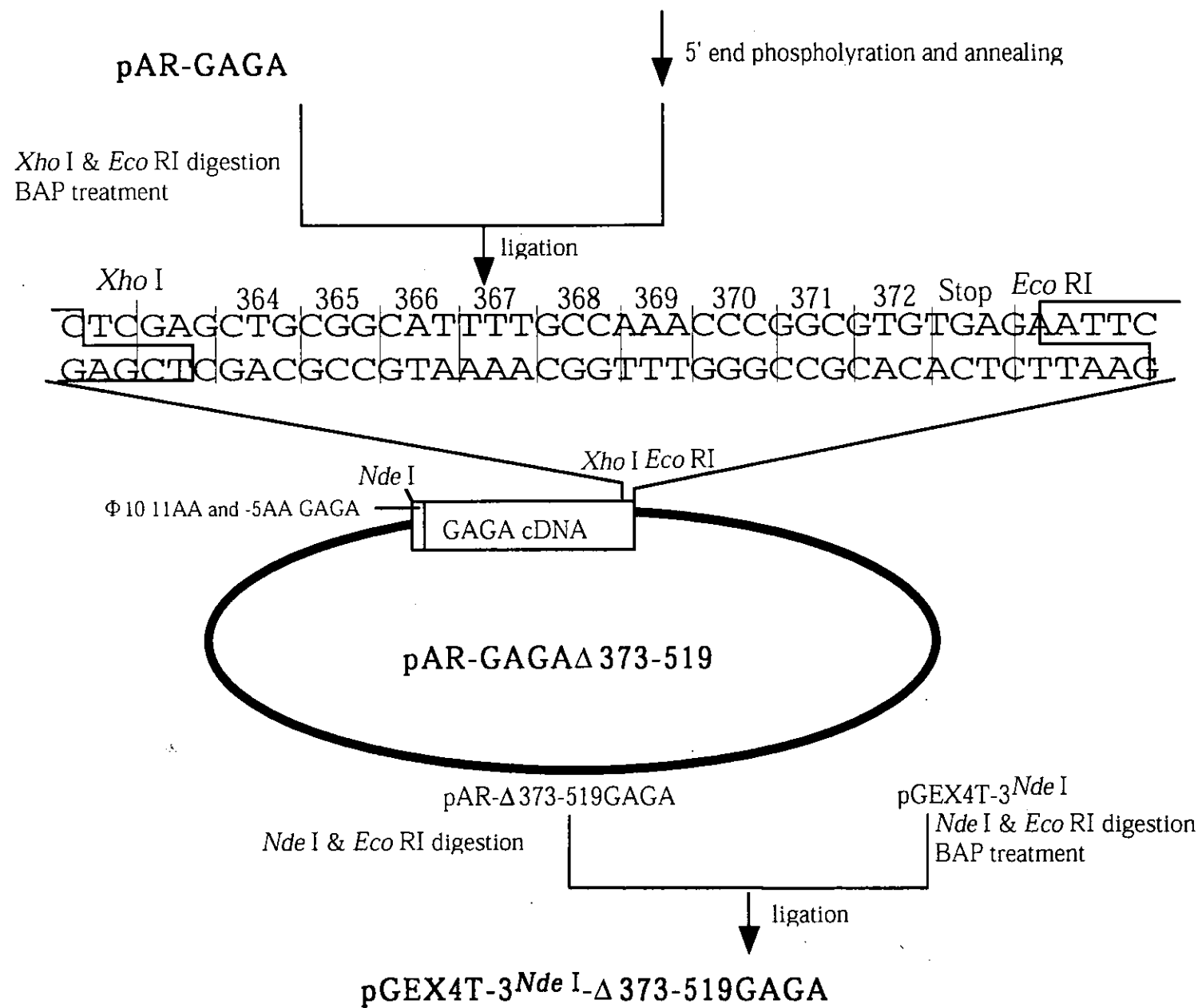
Construction of pGEX4T-3^{Nde I}-Δ440-519 GAGA



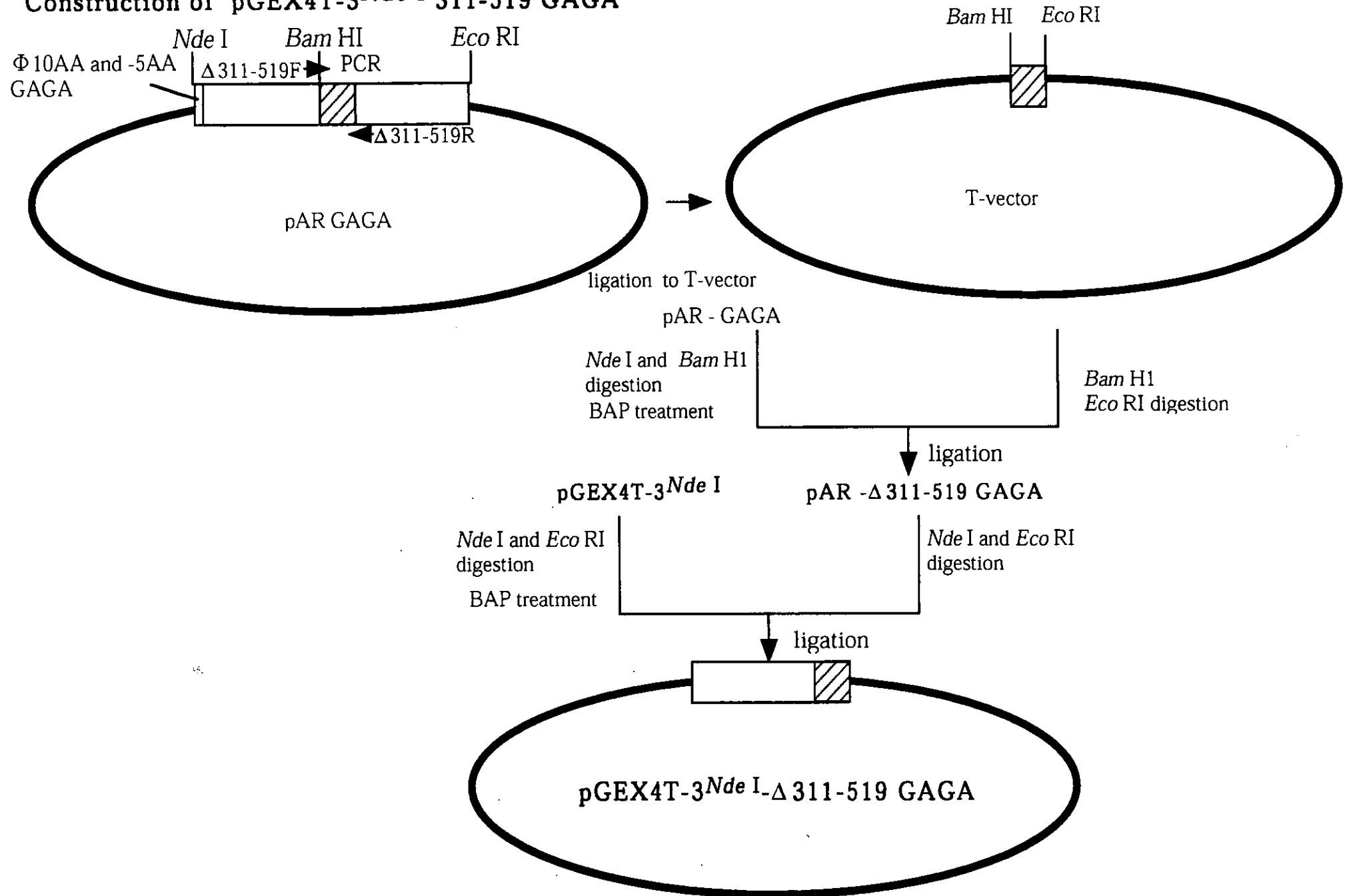
Construction of pGEX4T-3^{Nde}I-Δ373-519GAGA

Δ373-519 F; TCGAGCTGCGGCATTTT GCCAAACCCGGCGTGTGAG

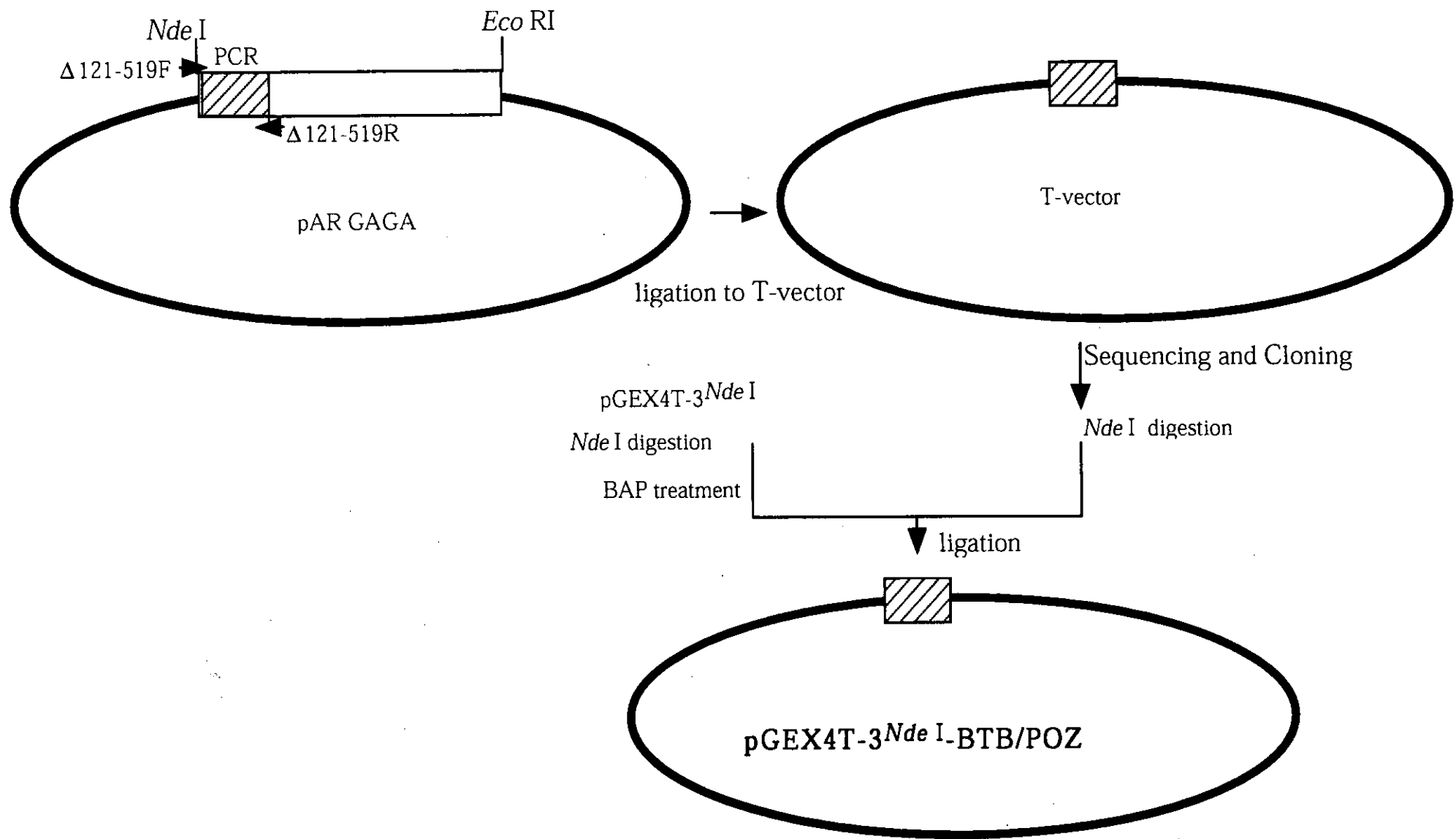
Δ373-519 R; AATTCTCACACGCCGGGTTTGGCAAATGCCGCAGC



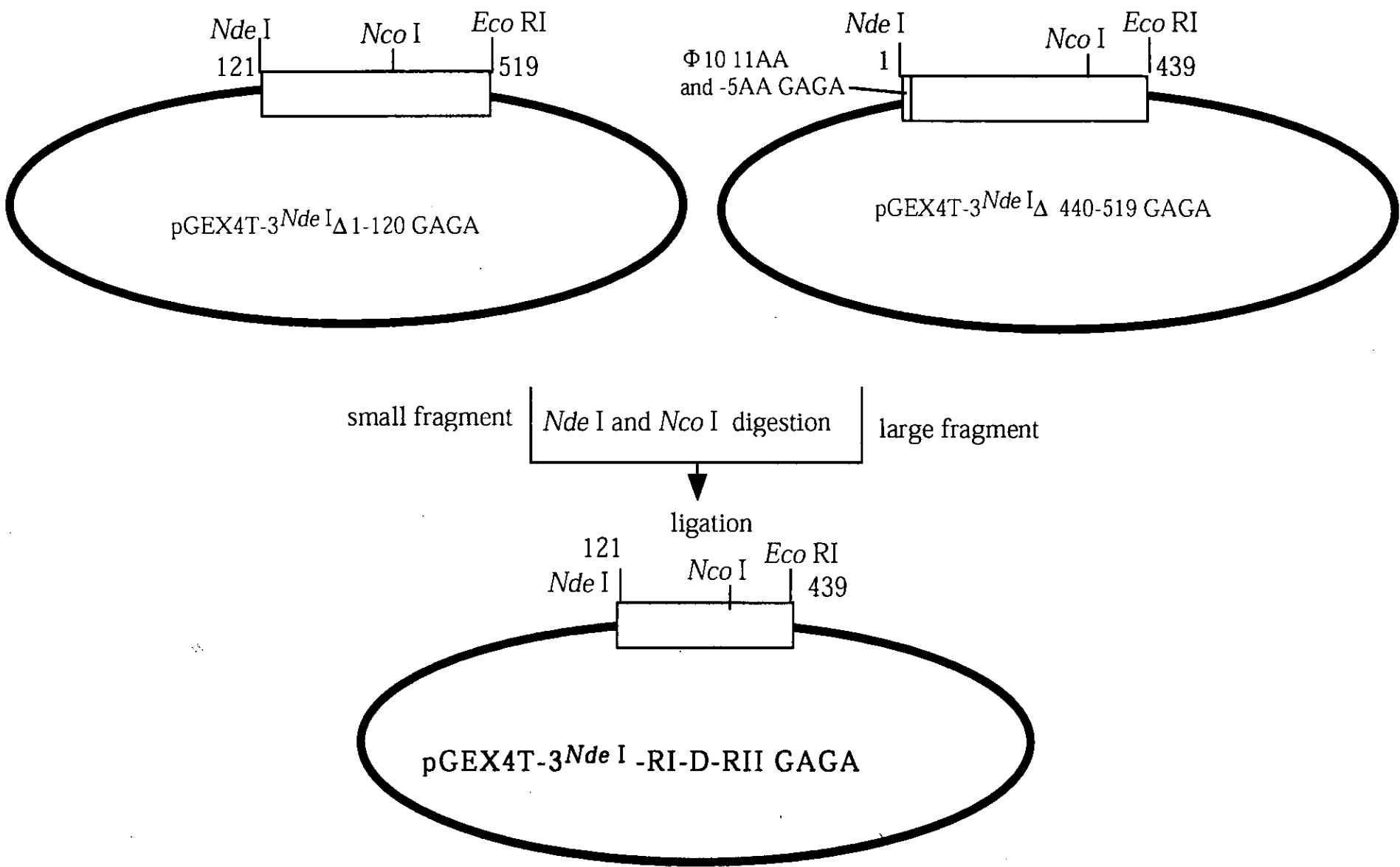
Construction of pGEX4T-3^{Nde}I 311-519 GAGA



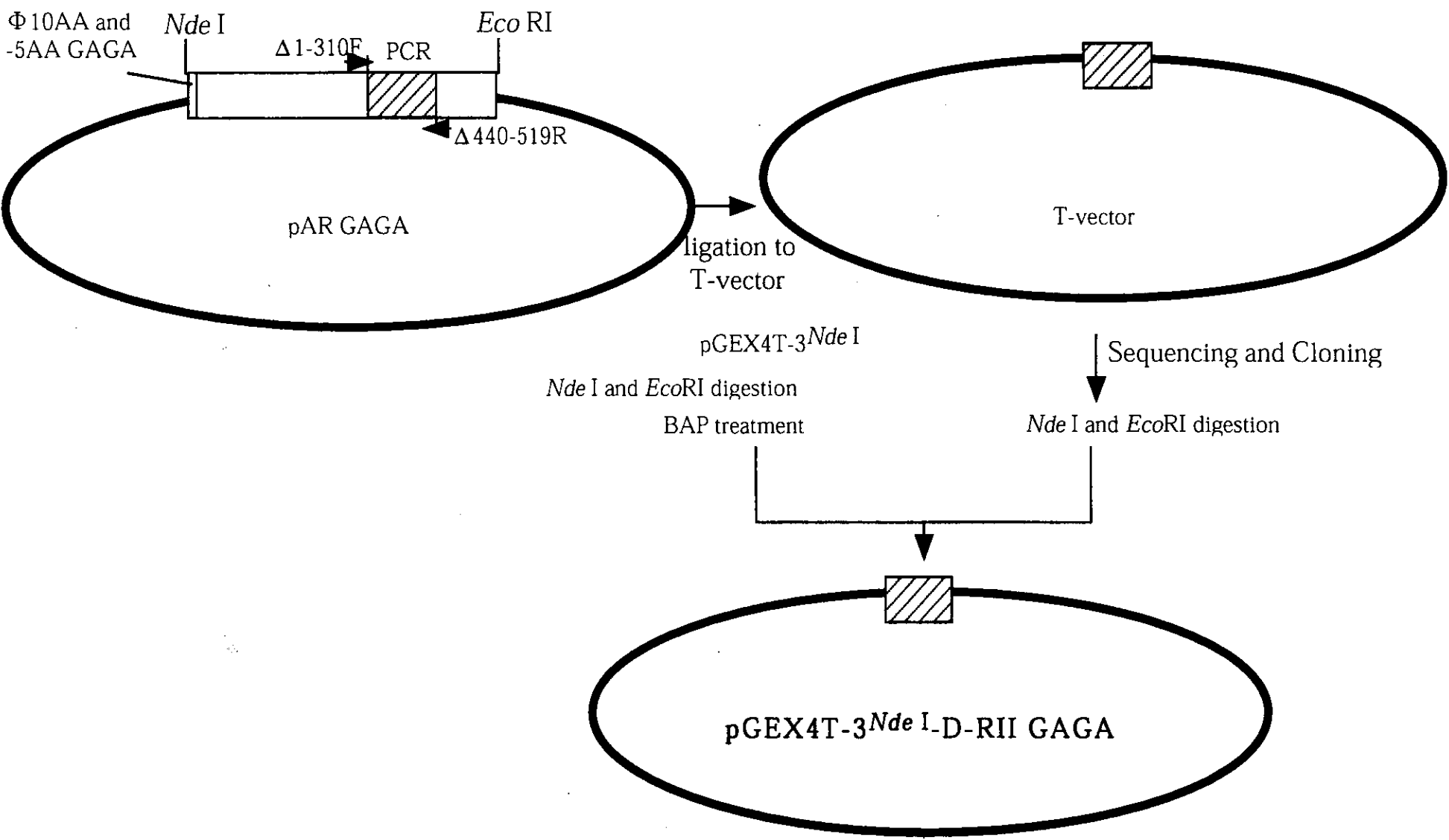
Construction of pGEX4T-3^{Nde}I-BTB/POZ



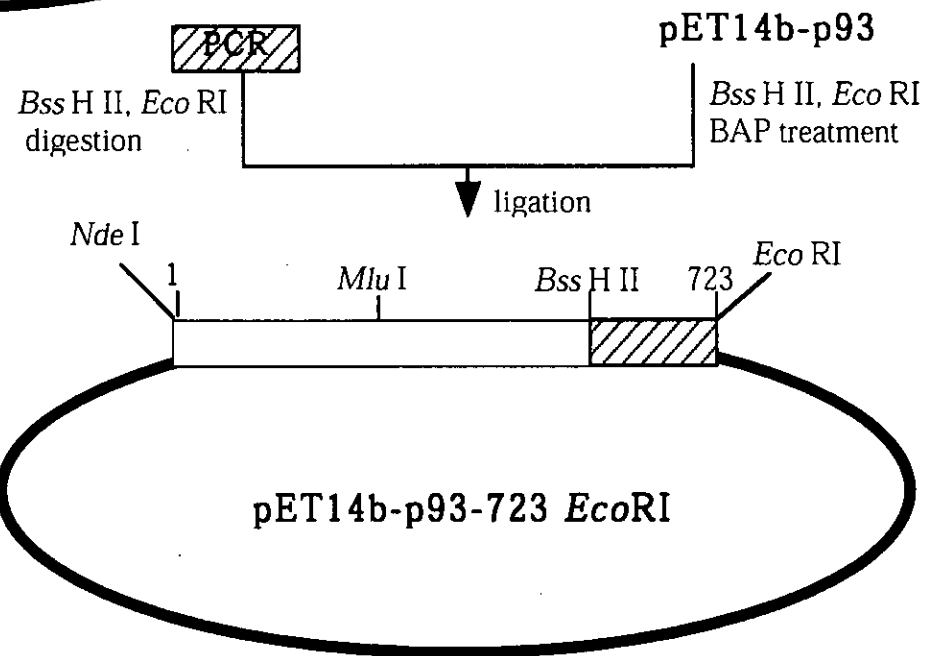
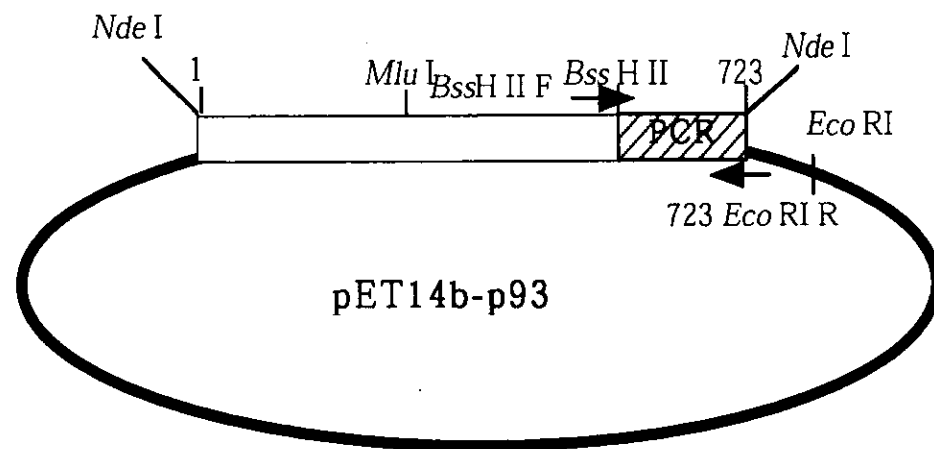
Construction of pGEX4T-3^{Nde}I-RI-D-RII-GAGA



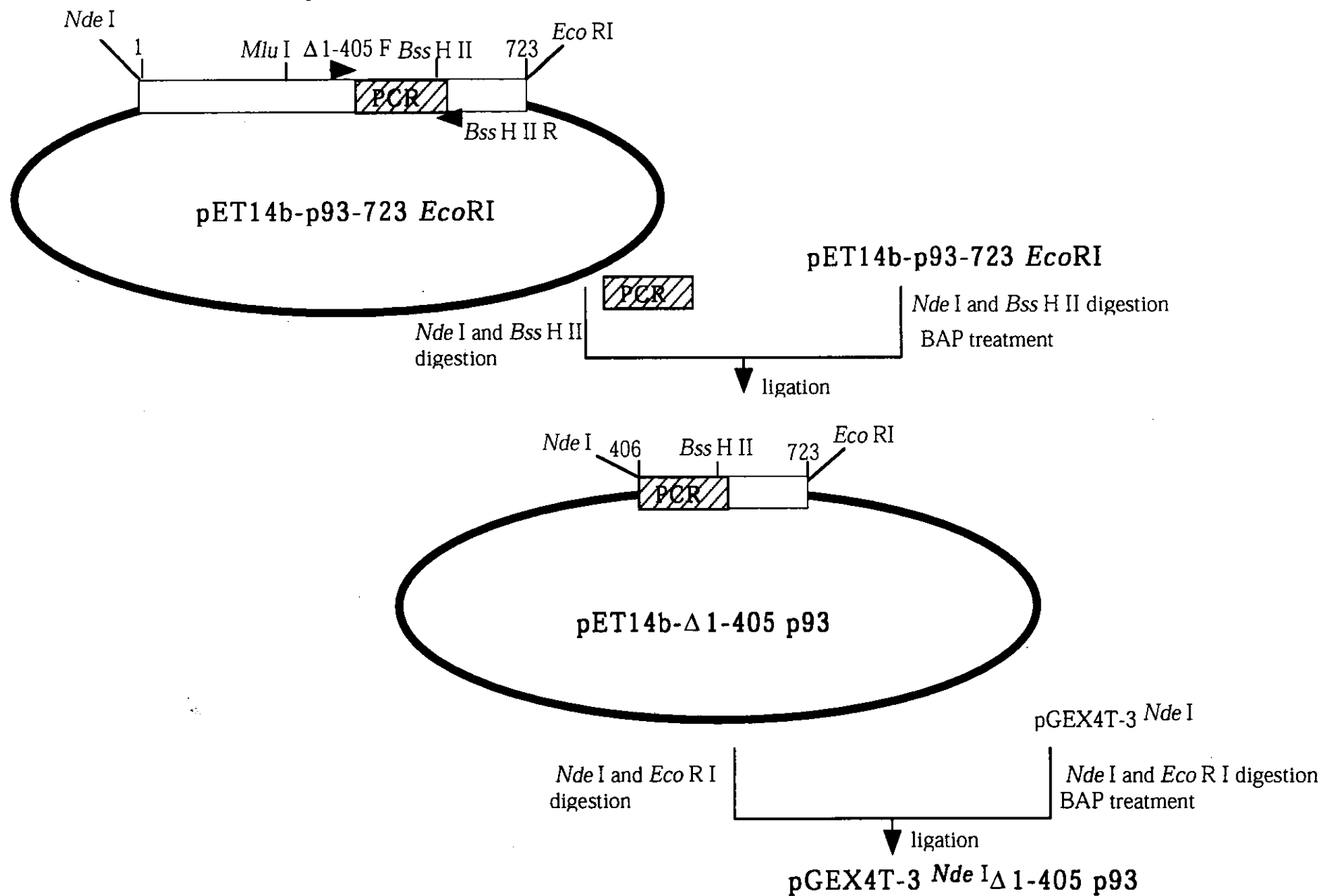
Construction of pGEX4T-3^{Nde} I-D-RII GAGA



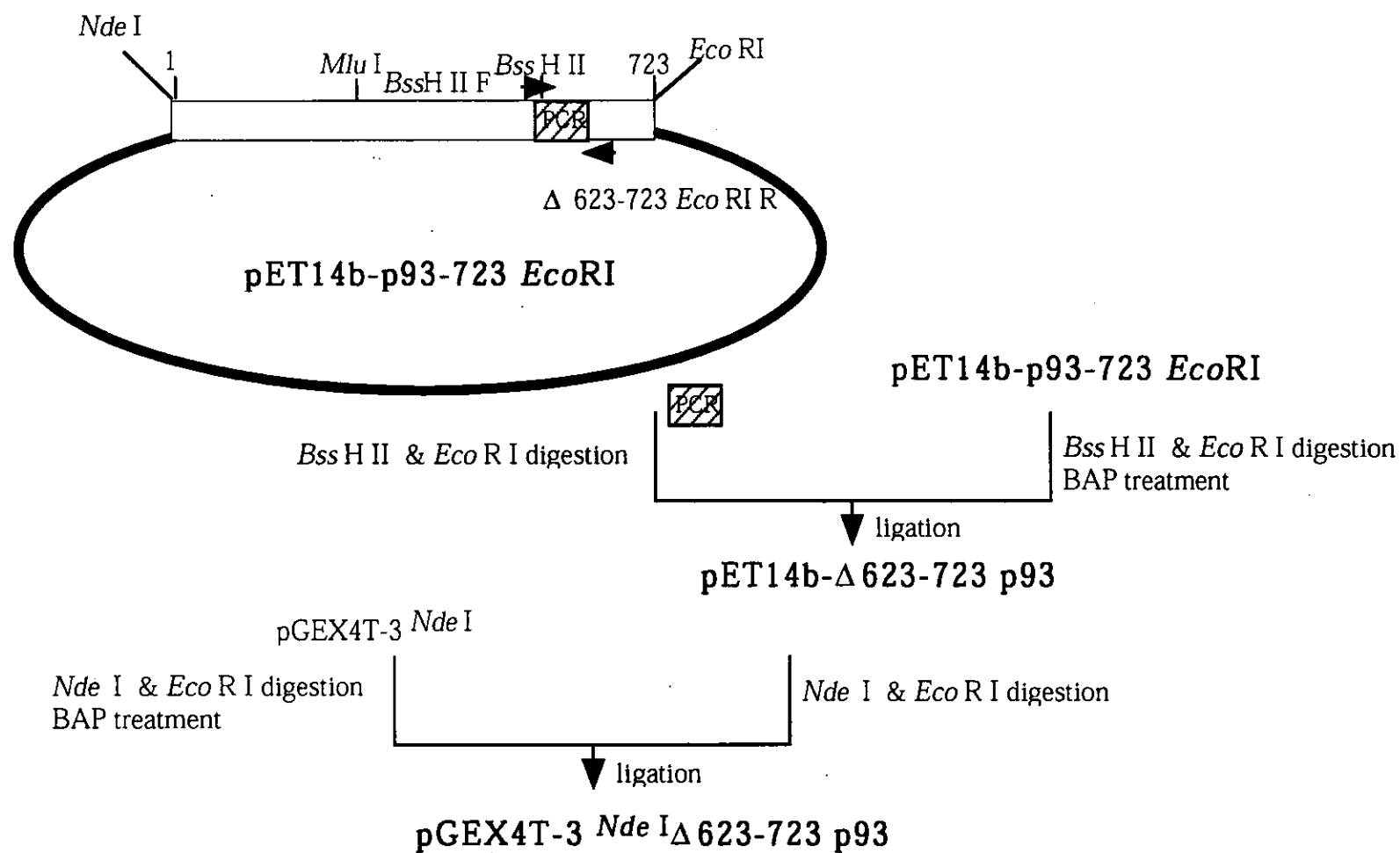
Construction of pET14b-p93-723 *Eco*RI



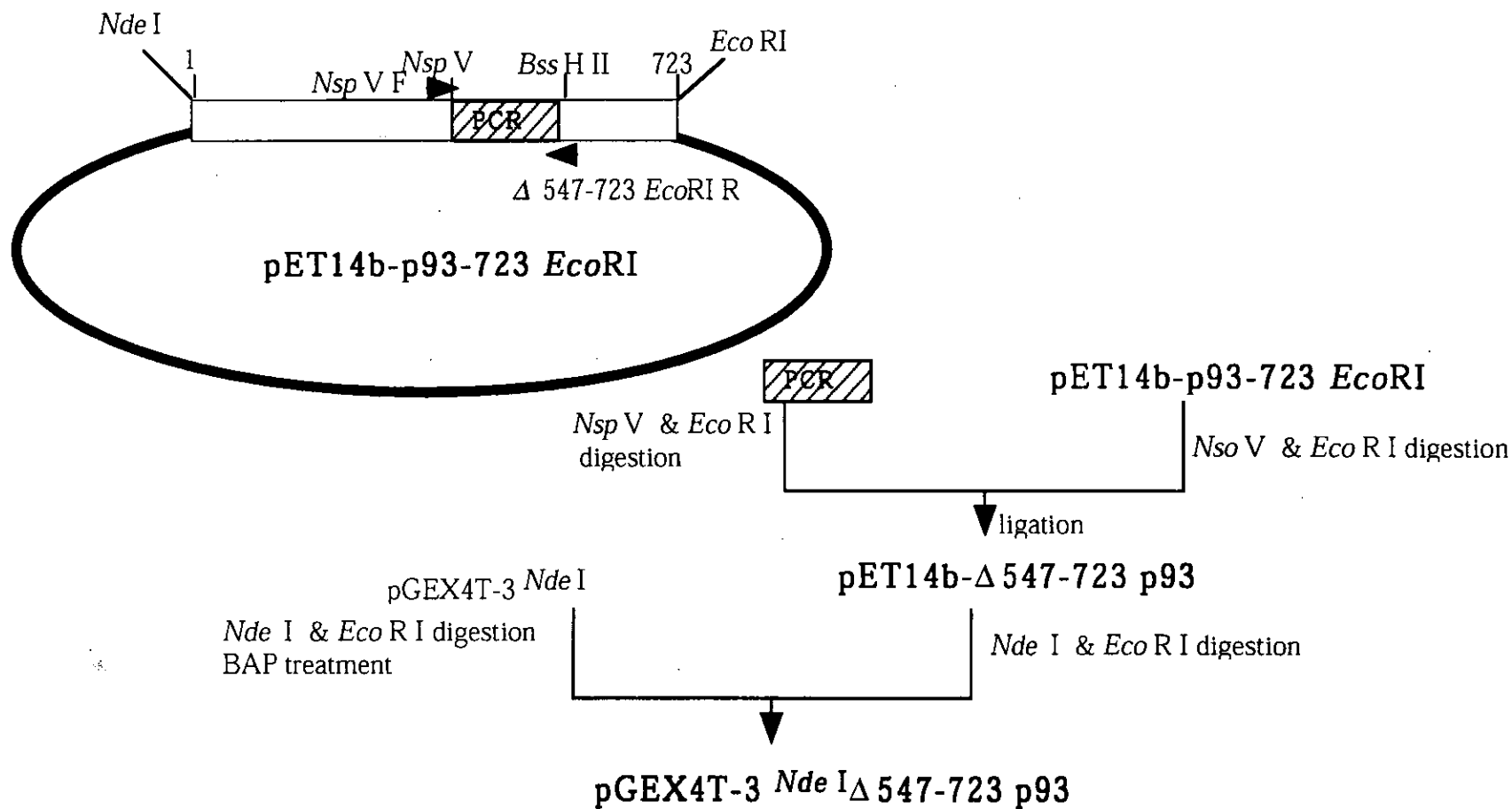
Construction of pET14b- Δ 1-405 p93 and pGEX4T-3 *Nde*I- Δ 1-405 p93



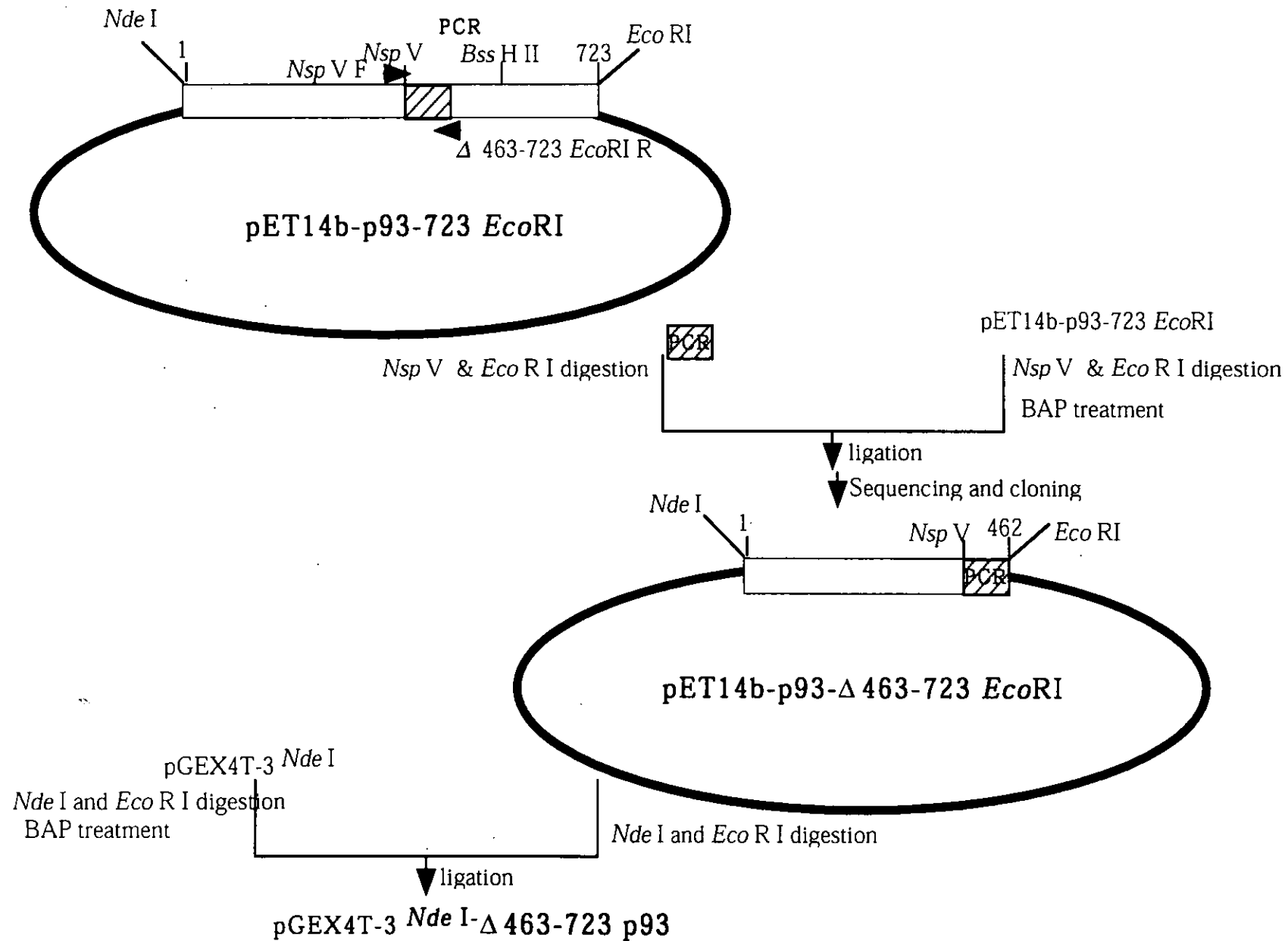
Construction of pET14b Δ 623-723 p93 and pGEX4T-3^{Nde I} Δ 623-723 p93



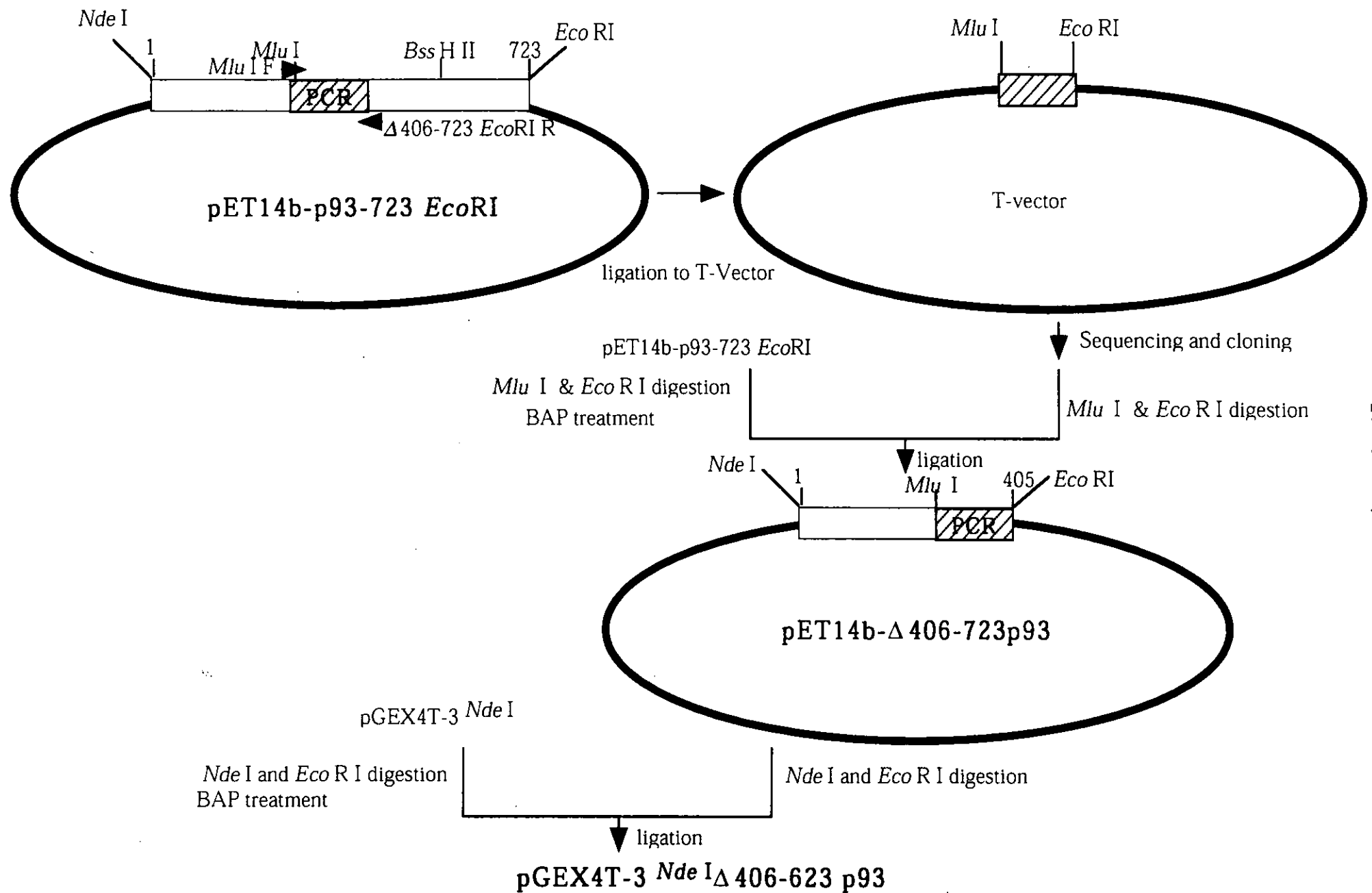
Construction of pET14b- Δ 547-723 p93 and pGEX4T-3 *Nde* I - Δ 547-723 p93



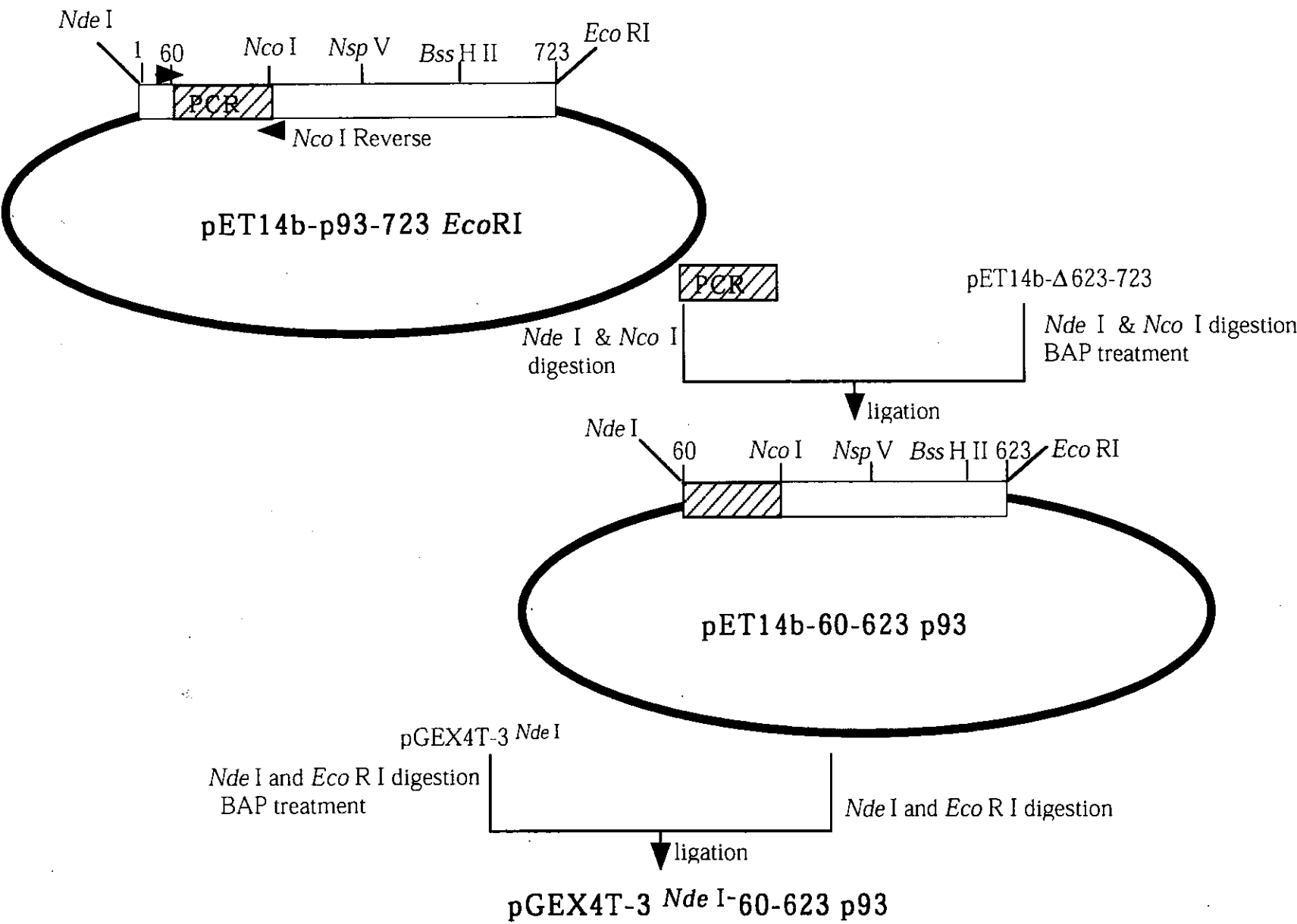
Construction of pET14b Δ 463-723 p93 and pGEX4T-3 *Nde* I- Δ 463-723 p93



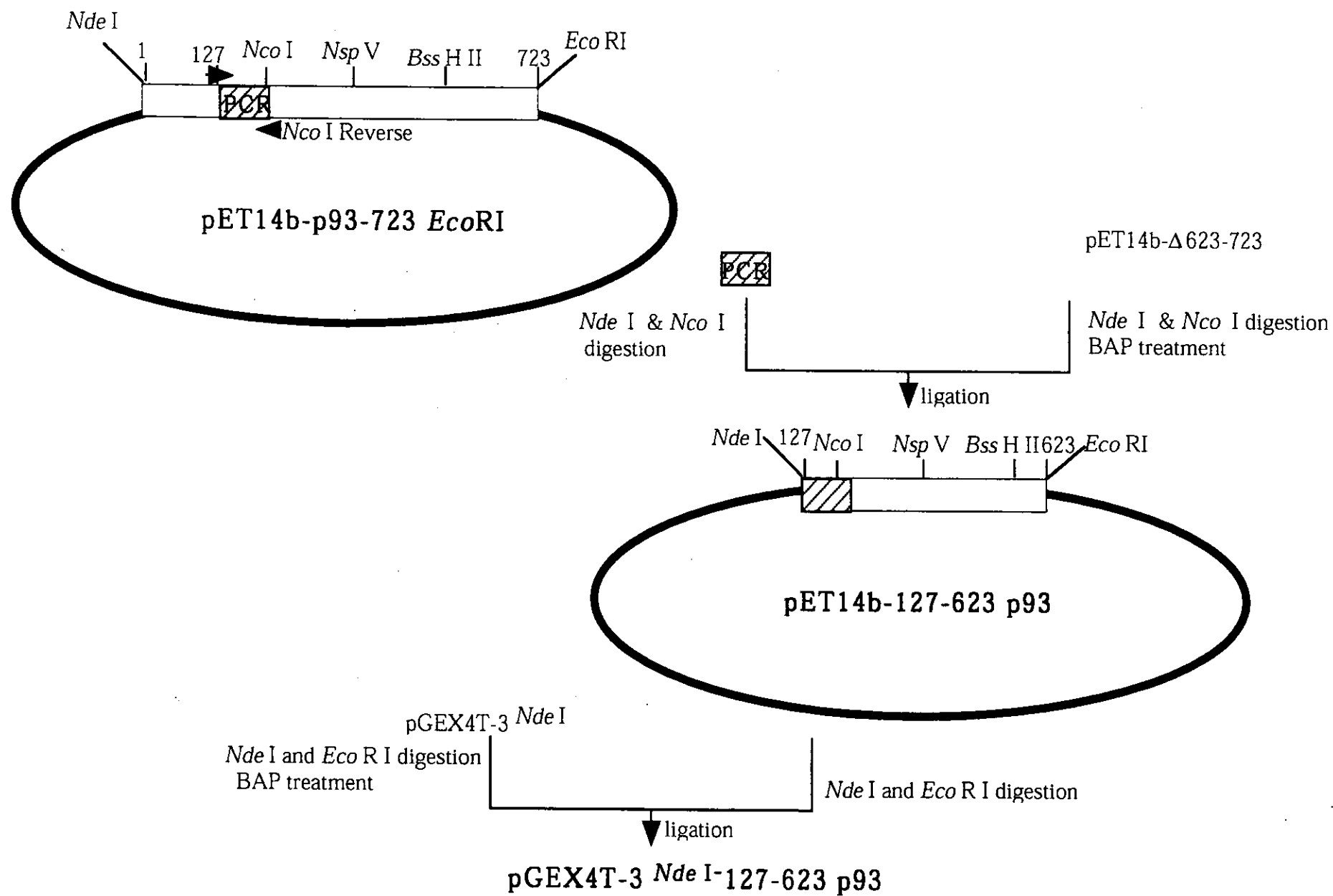
Construction of pET14b- Δ 406-623 p93 and pGEX4T-3 *Nde* I- Δ 406-623 p93



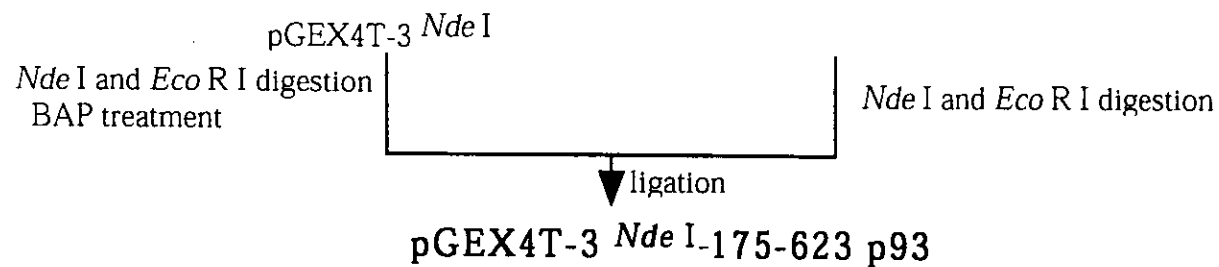
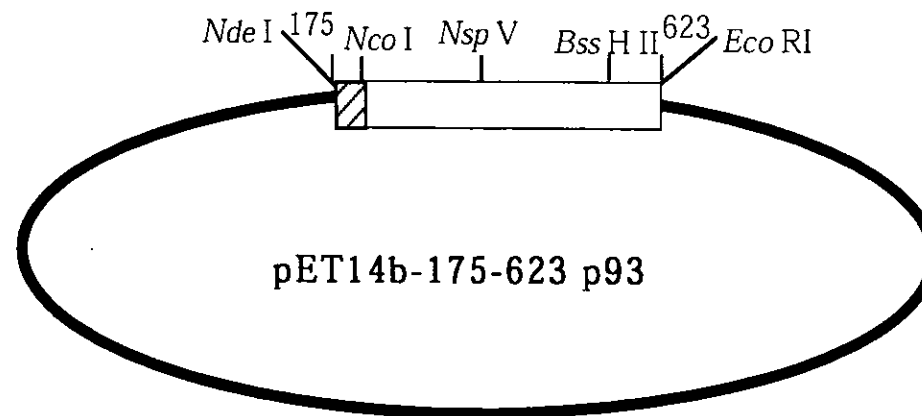
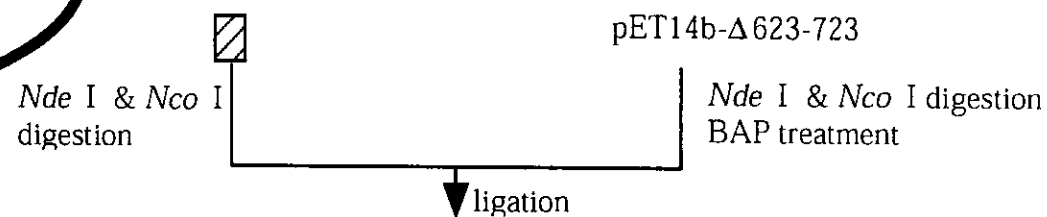
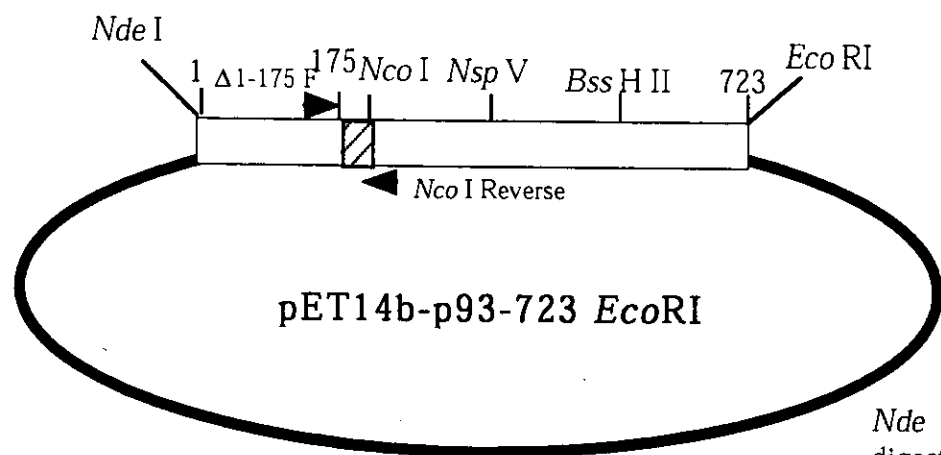
Construction of pET14b-60-623 p93 and pGEX4T-3 *Nde* I-60-623 p93



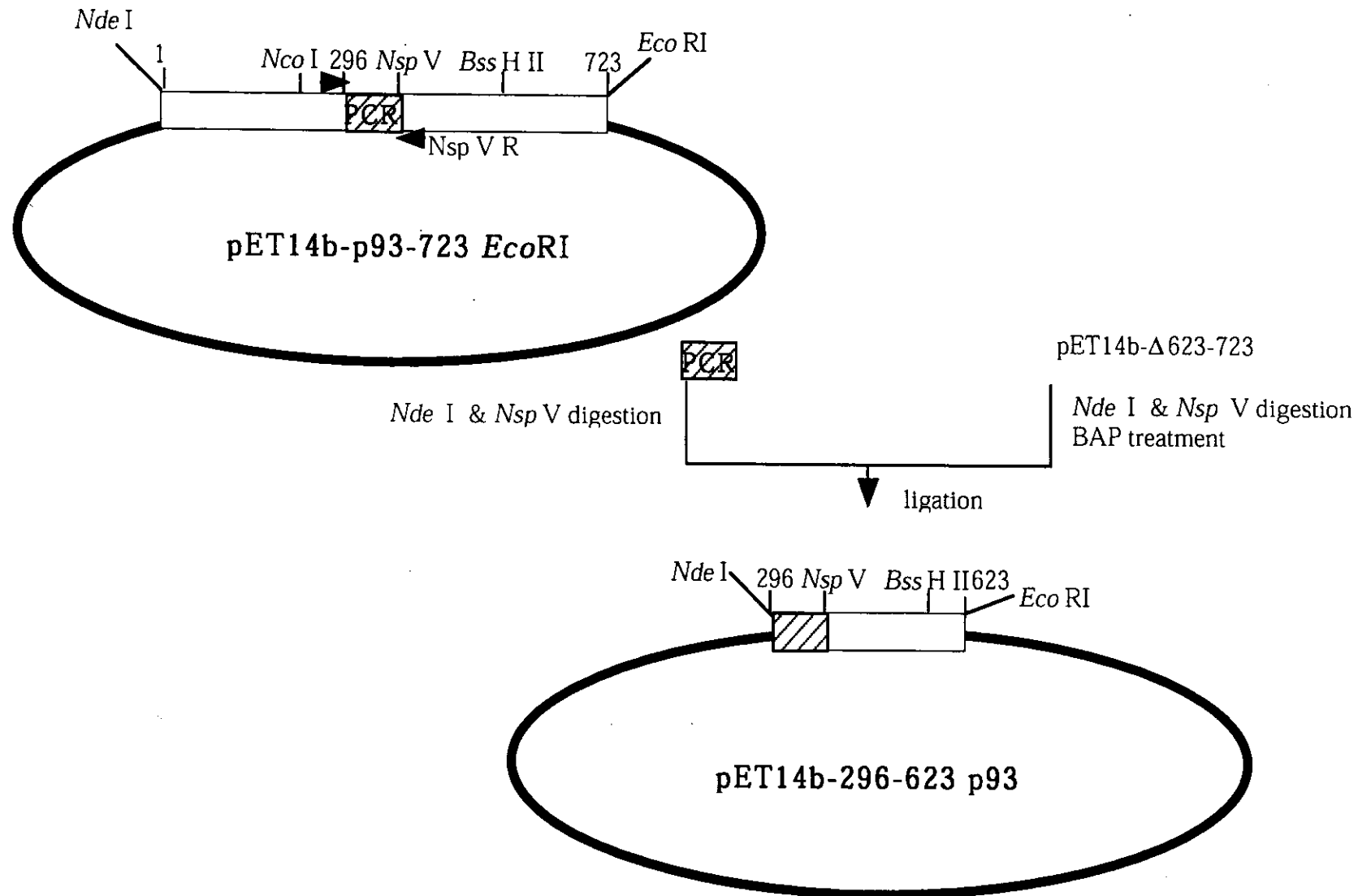
Construction of pET14b-127-623 p93 and pGEX4T-3 *Nde* I-127-623 p93



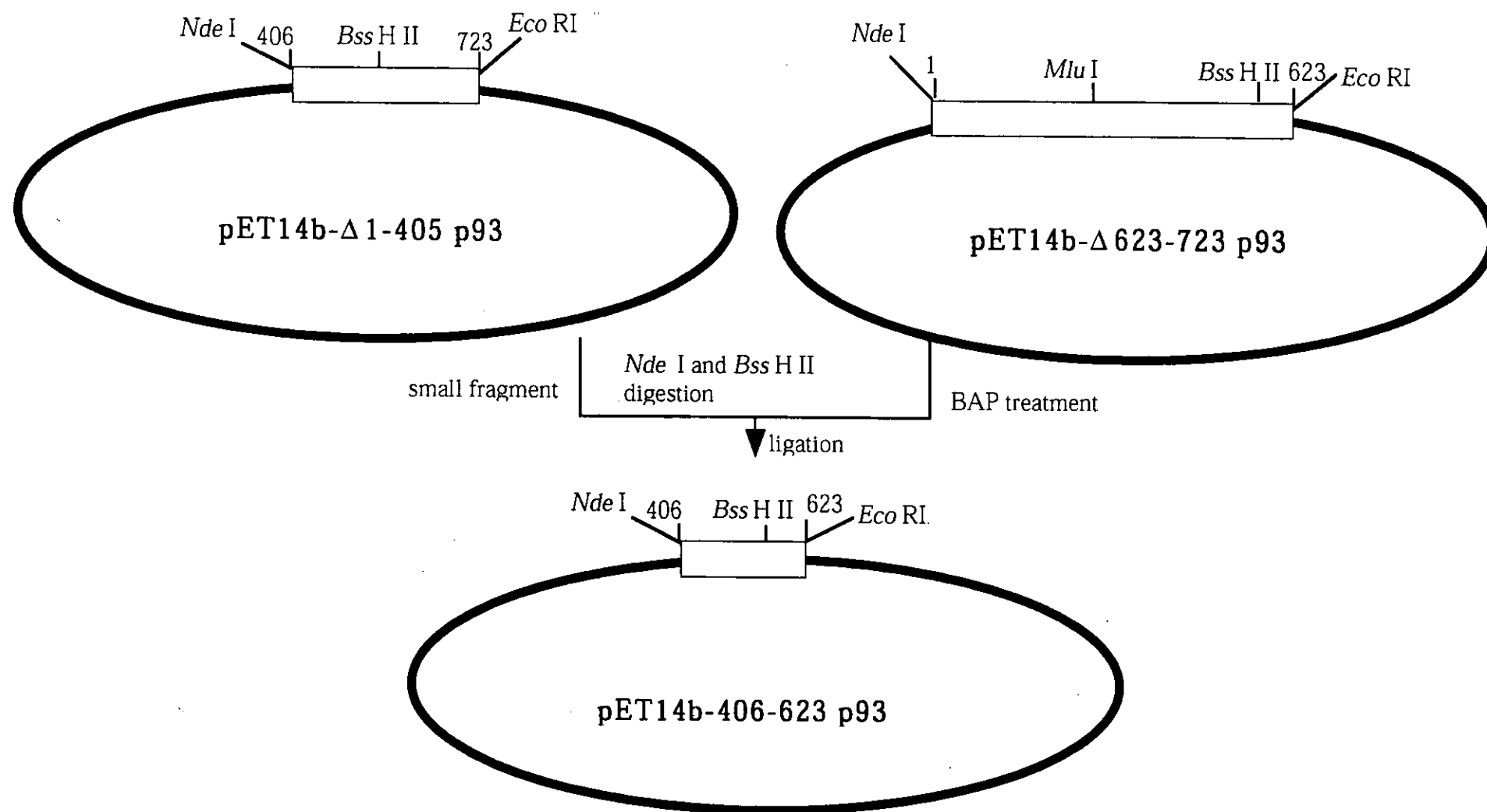
Construction of pET14b-175-623 p93 and pGEX4T-3 *Nde* I-175-623 p93



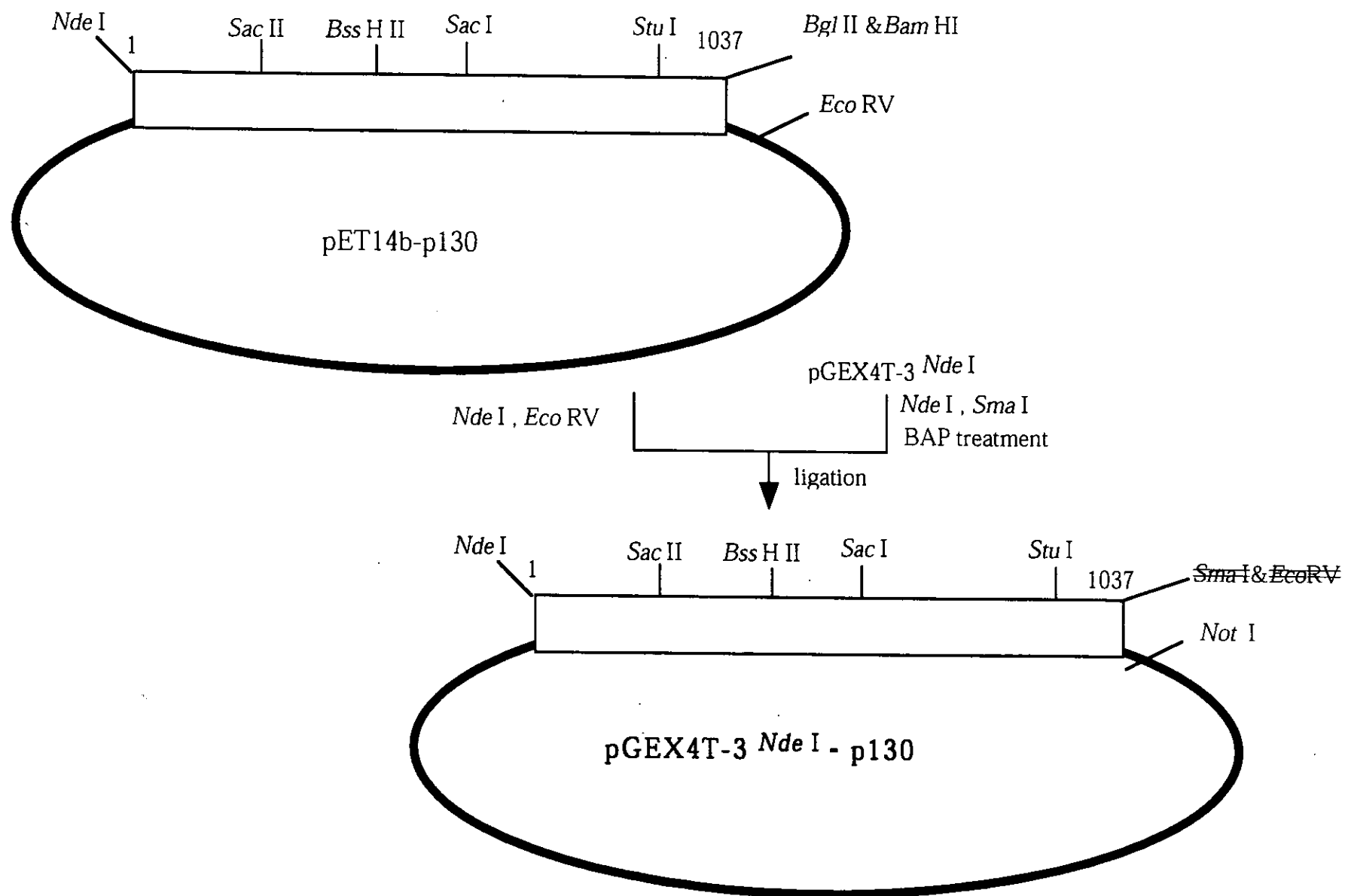
Construction of pET14b-296-623 p93 and pGEX4T-3 *Nde* I-296-623 p93



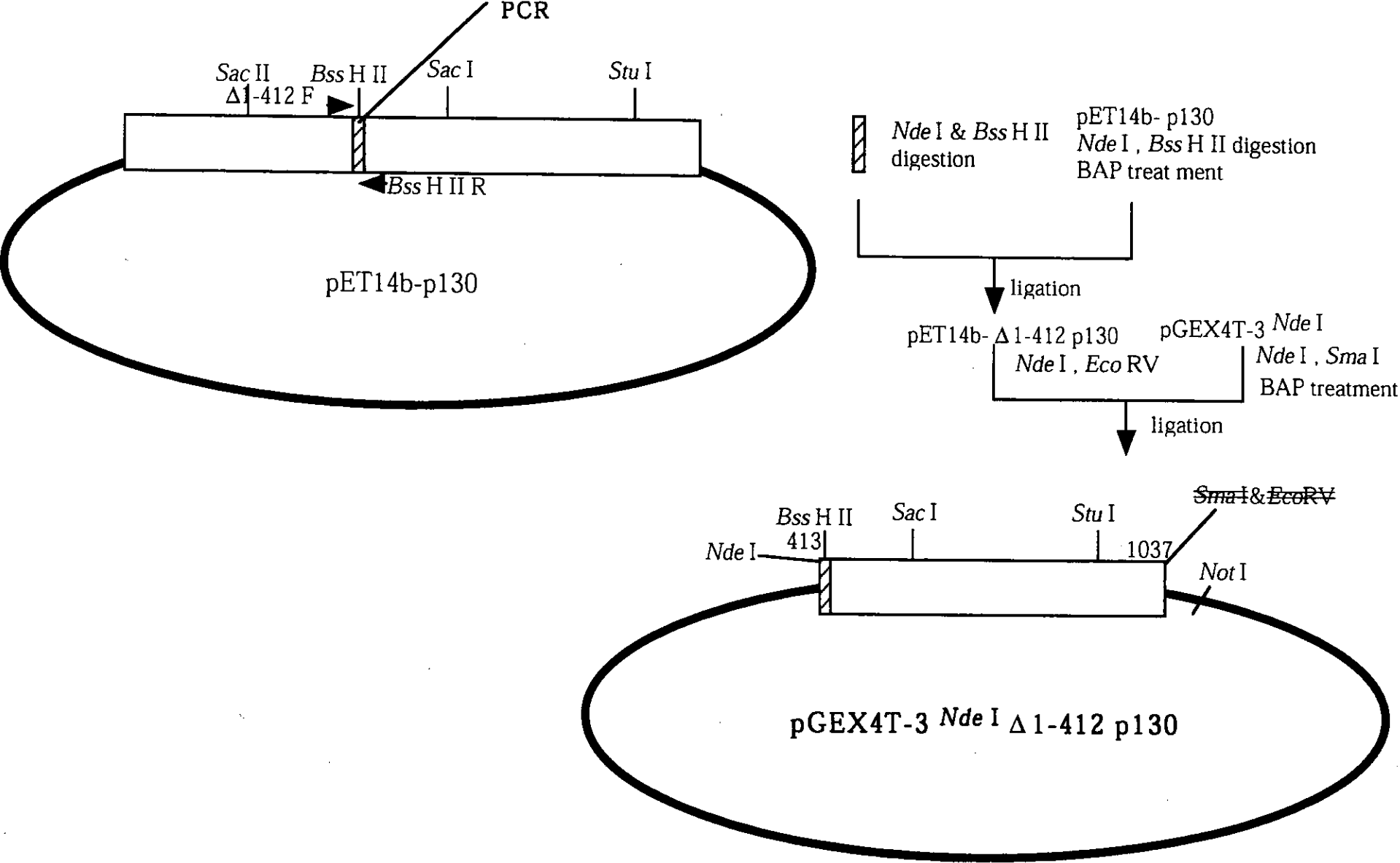
Construction of pET14b-406-623 p93 and pGEX4T-3 *Nde* I-406-623 p93



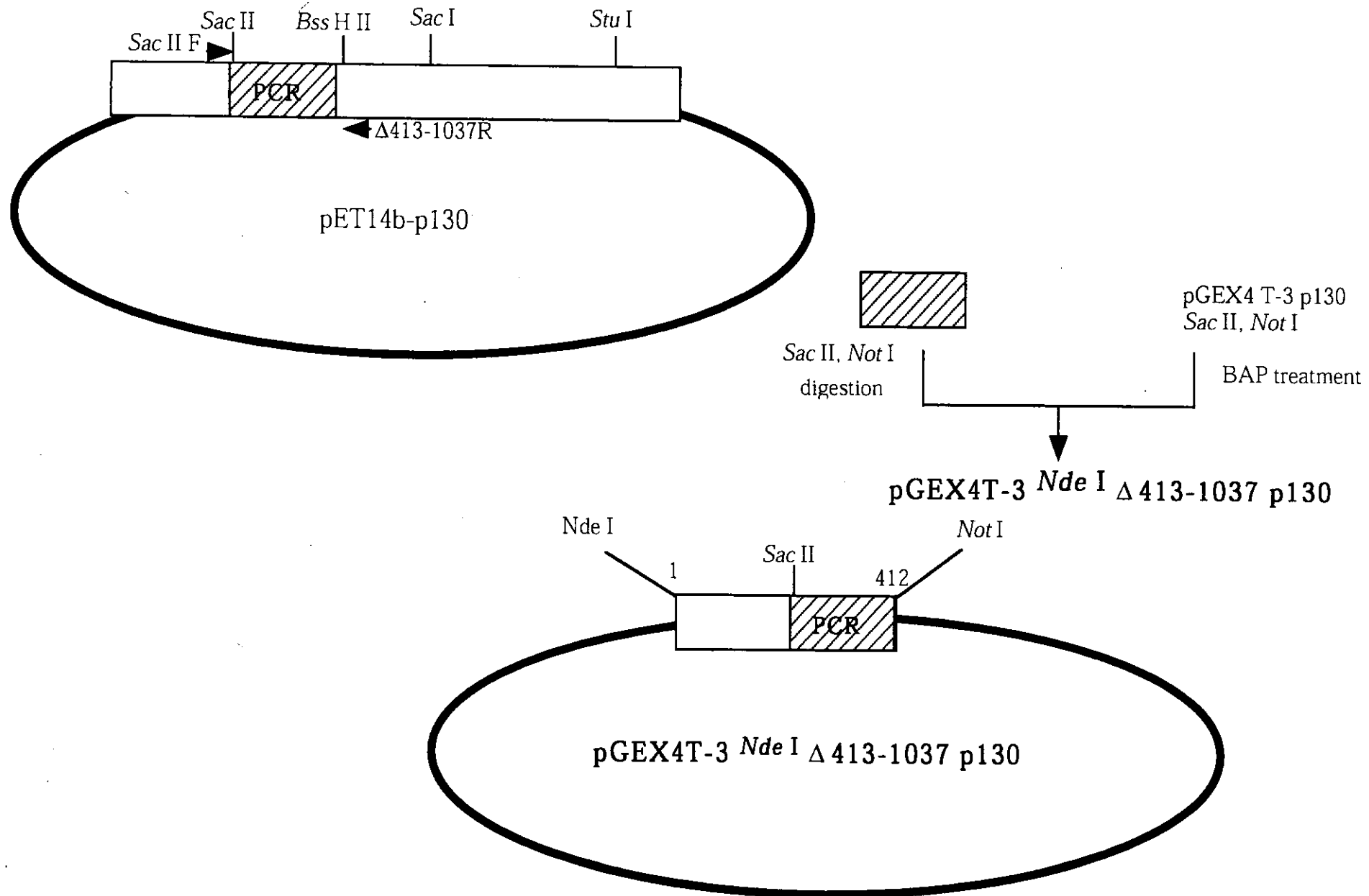
Construction of pGEX4T-3 *Nde* I - p130



Costruction of pGEX4T-3^{NdeI}Δ1-412 p130



Construction of pGEX4T-3 *Nde* I Δ 413-1037 p130



Construction of pGEX4T-3 *Nde* I - Δ 922-1037p130

Stu I-Not I F ; CCTACAATCCCACCGACGCCGAATCGGATATGGC

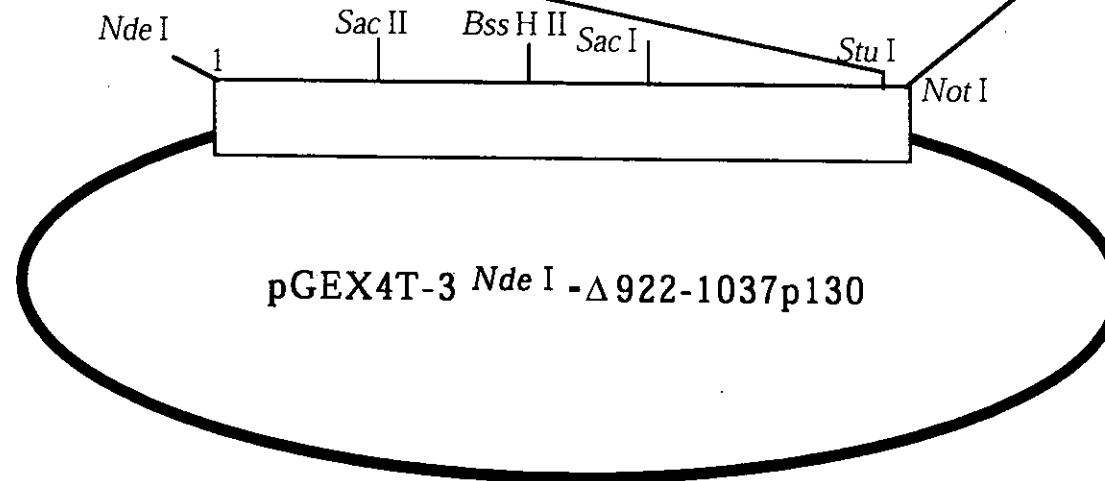
Stu I-Not I R; GGCCGCCATATCCGATTCGGCGTCGGTGGGATTGTAGG

pGEX4T-3 *Nde* I p130

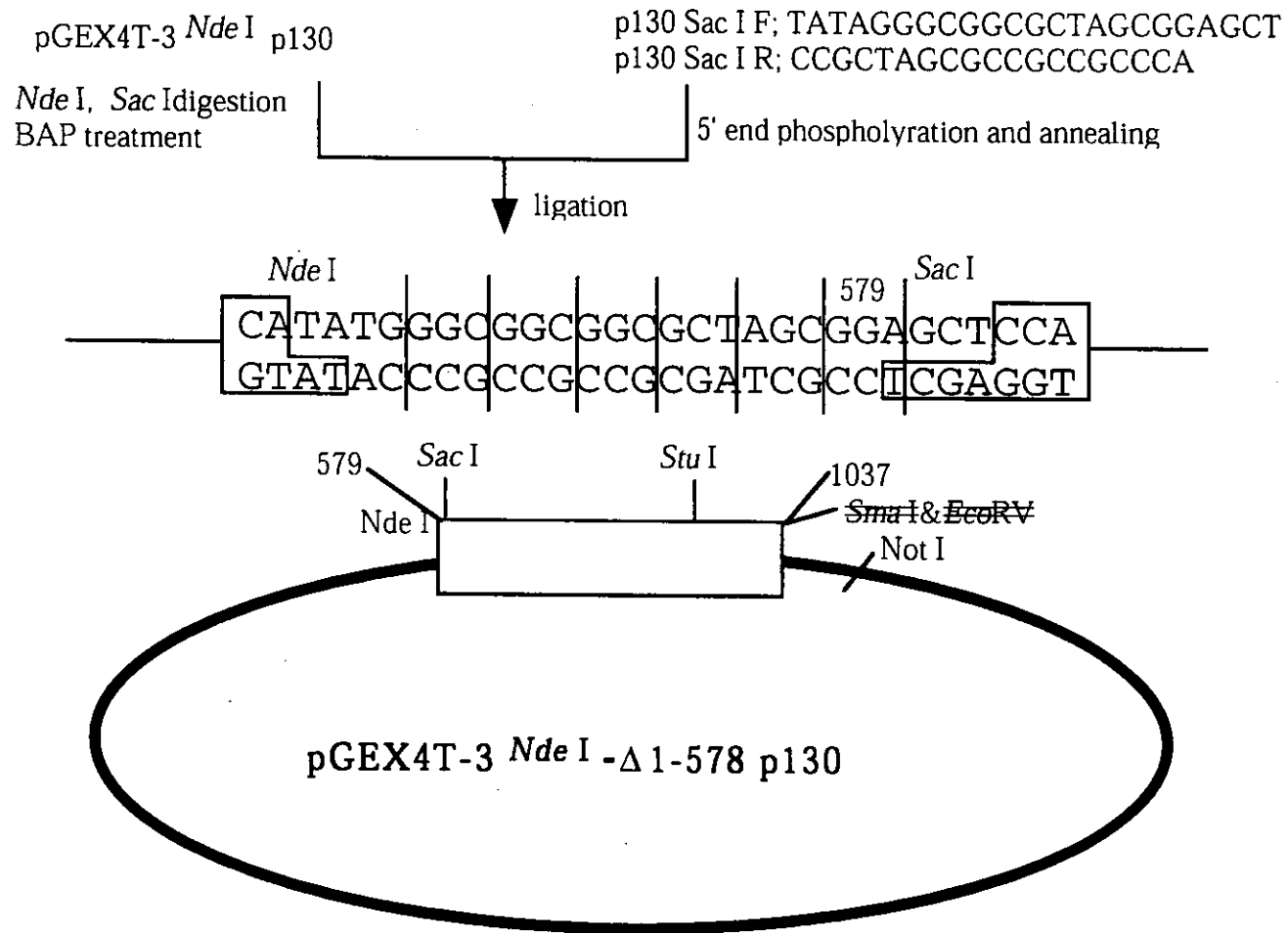
5' end phosphorylation and annealing

Stu I, *Not* I digestion
BAP treatment

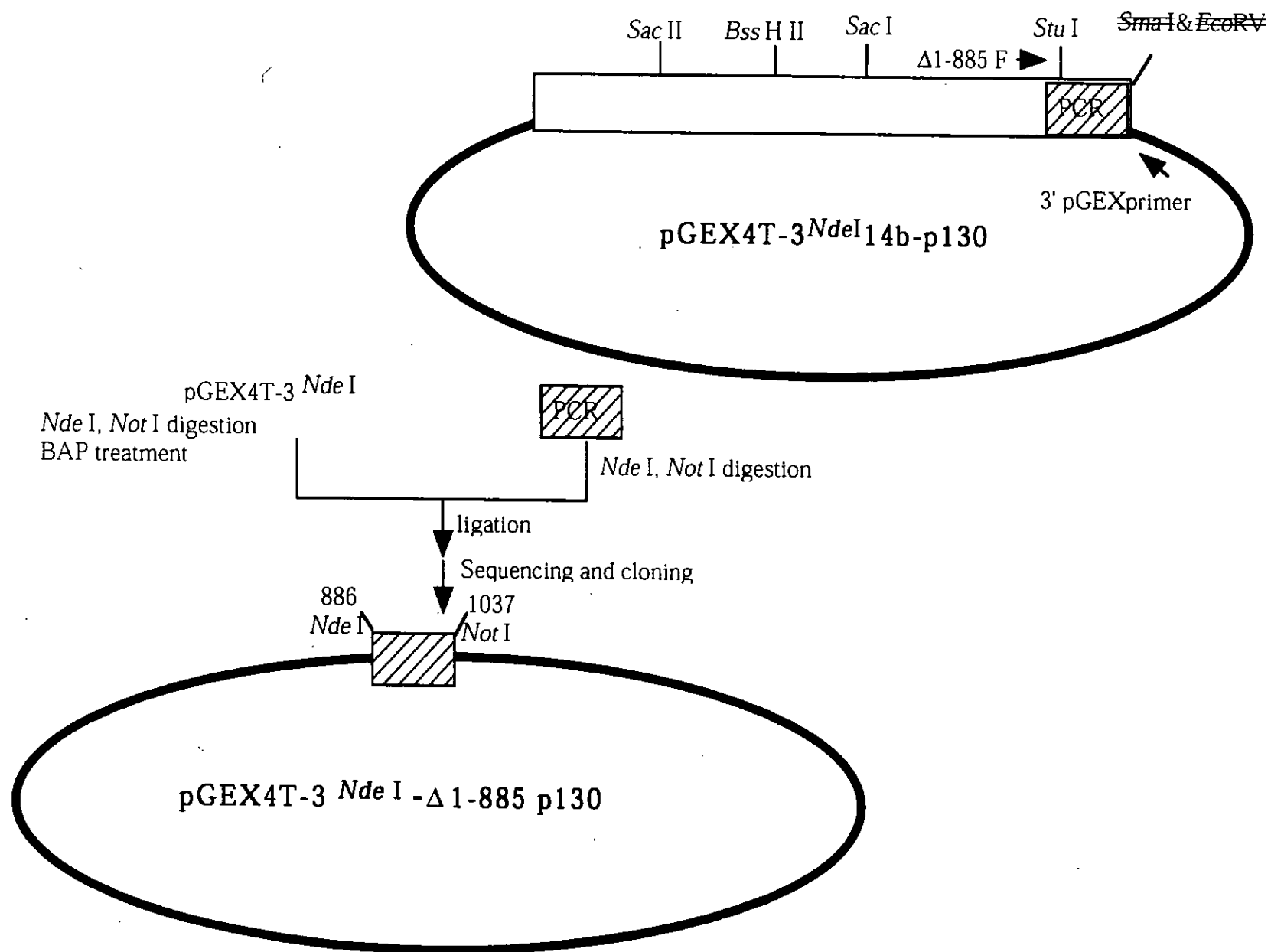
Stu I 913 914 915 916 917 918 919 920 921 *Not* I
 AGGCCTACAATCCCACCGACGCCGAATCGGATATGGCGGCCGC
 TCCGGATGTTAGGGTGGCTGCGGCTTAGCCTATACCGCCGGCG



Construction of pGEX4T-3 *Nde*I -Δ1-578 p130



Construction of pGEX4T-3 *Nde* I - Δ 1-885 p130



Construction of pCasper HS83-Flag p93

