

氏 名 岡 田 聖 裕

学位（専攻分野） 博士(理学)

学 位 記 番 号 総研大甲第273号

学位授与の日付 平成9年3月24日

学位授与の要件 生命科学研究科 遺伝学専攻

学位規則第4条第1項該当

学 位 論 文 題 目 クロマチン構造による*fushi tarazu* 遺伝子の転写制御

論文審査委員 主 査 教 授 小川 智子
教 授 桂 勲
教 授 石濱 明
教 授 堀内 賢介
助 教 授 永田 恭介（東京工業大学）

クロマチン構造による *fushi tarazu* 遺伝子の転写制御

ショウジョウバエ *fushi tarazu* 遺伝子 (*ftz*) のプロモーター領域には、クロマチンの構造変化に関わる GAGA 因子の結合部位が複数存在する。GAGA 因子およびその結合部位は、生体内における *ftz* の発現に必要であることが知られており、*ftz* の発現には GAGA 因子によって引き起こされるクロマチンの構造変化が必要であると考えられている。クロマチンの構造変化による *ftz* の転写活性化機構を明らかにするため、クロマチン構造を再構成した *ftz* テンプレートと GAGA 因子を用いて、*in vitro* 転写反応とクロマチン構造の解析を行なった。

ftz およびカイコの *fibroin* 遺伝子のプロモーター領域を持つプラスミドに salt dialysis 法でクロマチン構造を再構成し、カイコ後部絹糸腺抽出液 (psg extract) を用いた *in vitro* 転写反応の鋳型 (クロマチンテンプレート) とした。クロマチン構造を再構成することによって、両遺伝子の転写は強く抑制された。しかし、クロマチンテンプレートを psg extract 存在下で GAGA 因子と preincubation することによって、*ftz* の転写だけが活性化された。クロマチンを再構成していない (裸の) テンプレートでは、同様の実験を行なっても GAGA 因子による転写の活性化は起こらなかった。また、*ftz* プロモーター領域の GAGA 因子の認識配列に変異を導入した *ftz mutant* クロマチンテンプレートでは、GAGA 因子による転写活性化の度合いが弱まった。さらに、MNase 法によってクロマチン構造の解析を試みたが、psg extract と preincubation することによって、GAGA 因子とは無関係にクロマチン構造が変化してしまったため、GAGA 因子によるクロマチンの構造変化を見いだすことができなかった。

次に、クロマチンの構造解析を行なうために、ショウジョウバエ初期胚由来の S150 extract を用いて GAGA 因子存在下でクロマチン構造を再構成し、MNase 法を行なった。その結果、GAGA 因子を添加することによって、*ftz* プロモーター領域のクロマチン構造が破壊されることが示された。また、*ftz mutant* を用いた場合には、GAGA 因子を添加してもプロモーター領域のクロマチン構造は破壊されなかった。しかし、S150 extract は転写を強く阻害してしまうことがわかったため、この方法と転写反応を両立させることはできず、これ以上の解析を行なうことはできなかった。

転写反応とクロマチンの構造解析を両立させるために、salt dialysis 法によって再構成したクロマチンを少量の S150 extract 存在下で GAGA 因子と preincubation するという方法で、実験を行なった。*ftz* クロマチンテンプレートからの転写は、クロマチン構造を再構成することによって抑制されていたが、GAGA 因子と preincubation することによって活性化された。裸のテンプレートをを用いた場合には、GAGA 因子を添加しても転写

は活性化されなかった。また、*ftz mutant*クロマチンテンプレートからの転写も、活性化されなかった。MNase法、および制限酵素切断法で、GAGA因子を添加することによって*ftz*プロモーター領域のクロマチン構造が特異的に破壊されることを確かめた。また、*ftz mutant*のプロモーター領域のクロマチン構造は、GAGA因子を添加しても破壊されなかった。

以上の結果から、GAGA因子の作用によって*ftz*プロモーター領域のクロマチン構造が特異的に破壊されることによって、*ftz*クロマチンテンプレートからの転写が活性化されたと考えられた。

論文の審査結果の要旨

本研究は、ショウジョウバエの *fushi tarazu* 遺伝子の転写の活性化と、クロマチン構造の変化との関連を明かにすることを目的として行われた。

Fushi tarazu 遺伝子を含むプラスミドDNA上にクロマチンを再構成し、これを鋳型として、GAGA因子の添加による、転写の活性化とクロマチン構造の変化を解析できる系を確立した。

まず、HeLa細胞核から調製したコアヒストンを用いて、プラスミドDNA上にクロマチンを再構成した。これに、精製したGAGA因子の存在下と非存在下で、クロマチンのRemodelingに必要な因子を含むショウジョウバエ胚のS150抽出液を加えて前処理し、クロマチン構造に変化が起こるかを調べた。

コントロールとしては、GAGA因子結合領域に変異をもったもので、同じ実験を行った。その結果、野性型の鋳型を用いたときにのみ、GAGA因子の存在下で、ヌクレオソーム構造が壊れることが観察されたので、クロマチンDNAのGAGAG配列に、GAGA因子が結合することで、ヌクレオソーム構造に変化が起こると結論した。

次に、この同じ条件を用いて作ったヌクレオソームを鋳型として用いたときの転写について調べた。転写系として、カイコ後部絹糸腺の抽出液を用いた。その結果、再構成したクロマチンを鋳型として用いたときには、転写活性は全く検出されなかったが、この鋳型にS150抽出液と一緒にGAGA因子を加えて前処理すると転写が活性化された。この転写の活性化は、野性型の鋳型をもちいてGAGA因子を加えたときにのみ検出されたので、*ftz* 遺伝子のGAGA因子による転写の活性化は、クロマチン構造を持つ鋳型のGAGAG配列に、GAGA因子が結合することで起こると結論した。

岡田君は、これらの結果から、GAGA因子による*ftz*遺伝子の転写の活性化と、クロマチン構造の変化には、相関があることを示唆した。

本研究の成果は分子生物学的手法を駆使して、緻密な実験計画と遂行で得られたもので、この分野の先駆的な研究であると判断され、審査委員全員の一致で、理学博士の学位論文として、十分な内容を持つと結論した。

学位論文の公開発表に続き、5名の審査委員と岡田君との間で、質疑応答を行い、その議論と提出された論文をもとに、申請者の実験結果の解釈、得られた成果の意義、関連分野に関する知識と残された今後の課題についての考察に関して審査委員で審議した。

その結果、申請者の研究能力、思考能力、知識が理学博士の学位の取得にふさわしいと判断された。なお、英語学力については、学位論文の内容を投稿論文にした英文から、充分であると判断した。