

氏 名 中 山 貴 博

学位（専攻分野） 博士(理学)

学 位 記 番 号 総研大甲第602号

学位授与の日付 平成14年3月22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 ショウジョウバエGAGA 因子-p93-p130 複合体の
構造・機能解析

論文審査委員	主 査 教授	荒木 弘之
	教授	佐々木 裕之
	教授	林 茂生
	教授	廣海 健
	教授	古関 明彦 (千葉大学)

論文内容の要旨

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* のハイボモルフである *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。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。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。

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 を加えると、GAGA 因子依存的に転写が活性化される。そして、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。しかし、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、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ている。さらに、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ている。しかし、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。

そこで本研究では、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°C、30 分間) を施したポリテン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 (*p93/+* または *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, 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というエピジェネティックな働きが明らかとなった。

論文審査結果の要旨

本論文は、ショウジョウバエ GAGA 因子と複合体を形成し、クロマチンのリモデリングを促進する p93, p130 について解析を行ったものである。

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、大腸菌で発現させたそれぞれのタンパク質を精製し、GST プルダウンアッセイを行った。その結果、GAGA 因子と p130 の結合は検出できなかったが、p93 とは直接結合することが明らかになった。そして、GAGA 因子の zinc finger からそのすぐ C 末端側に至る領域で p93 と結合することが分かった。一方 p93 は、GAGA 因子とは N 末から 296 番目のアミノ酸残基から 623 番目のアミノ酸残基までの領域で、p130 とは 405 番目から 623 番目のアミノ酸残基までの領域で、結合した。さらに p130 は、579 番目から 1037 番目のアミノ酸残基の領域で p93 に結合することが分かった。

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 つのタンパク質の分布を、ポリテックロモゾーム上での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。さらに、3 齢幼虫に熱ショック処理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。

GAGA 因子をコードする *Trithorax-like*(*Trl*) 遺伝子の変異である *Trl^{13C}* 変異では、*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。そこで、GAGA 因子、p93、p130 複合体の生体内での役割を調べるために、PEV の解析を行った。その結果、*Trl^{13C}* 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 が増強されていることが観察された。さらに、*Trl^{13C}* と *p130* の二重欠損変異体 (*Trl^{13C}, $\Delta p130/+$*) では、*Trl^{13C}/+* より PEV が増強されていることが観察された。

これらの解析により、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というエピジェネティックな働きをしていると結論している。

本論文は、クロマチン構造を介した転写の制御への研究に新たな知見を加えたもので、学位授与の要件を十分満たすものと判断できる。