

ショウジョウバエ超らせん化因子はホメオティック遺伝子

Abd-B の発現を正に制御する

小笠原 洋平

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

2006年度

(平成18年度)

1. 要旨.....	3
2. 序論.....	5
3. 材料及び方法	8
4. 結果.....	16
5. 考察.....	23
6. 謝辞.....	28
7. 引用文献	29

1. 要旨

DNA 超らせん化因子 SCF (Supercoiling factor) はトポイソメラーゼ II と協同して DNA 鎖に負の超らせんを導入する生化学的活性を持つタンパク質である (Ohta and Hirose, 1990, Ohta *et al.*, 1995)。ショウジョウバエ生体内において SCF は唾腺染色体のインターバンドやパフ上に観察されること (Kobayashi *et al.*, 1998)、また X 染色体の遺伝子量補正機構に必要な因子であることなどが判っている (Furuhashi *et al.*, 2006)。SCF が生体内において果たす役割を調べるため SCF の変異体を観察した。SCF の機能を RNAi により低下させるとオスが特異的に死ぬが生き残ったオスの表現型を調べたところ腹部体節の前方化が観察された。次に SCF と腹部体節の形成を支配するホメオティック遺伝子 *Abd-B* との遺伝学的相関を調べるため SCF の RNAi と *Abd-B* の二重変異体を観察したところオスだけでなくメスにおいても致死であることが観察された。次に SCF 遺伝子上にナンセンス変異の導入された系統 *scf¹* を観察したところホモ接合体は性別によらず 3 齢幼虫で致死であることが観察された。次に *Abd-B* のトランス制御因子と *scf* の遺伝学的相互作用を解析した。*scf¹* のヘテロ接合体は単独で前方化を起こさないものの *Pc* 変異による後方化を抑圧し、また *scf¹* のヘテロ接合体は *trx* 群変異体の前方化を促進することが観察された。以上のような表現型を持つことから *scf* は一般的な *trx* 群遺伝子に分類されることが分かった (Kennison, 1995)。これらを踏まえより詳細な解析を進めた。*scf¹* のホモ接合体において胚発生期の *Abd-B* (*Abd-B*-RB) の転写産物量を測定したところ野生株に比べて約 30% 低下していた。次に array-based comparative genomic hybridization (array-CGH) 法により *Abd-B* 遺伝子周辺における SCF の局在性

を調べたところ SCF は *Abd-B* プロモーター上流に局在することが分かった。そこでこのプロモーターについてリポーターアッセイを行ったところ *scf*¹ のホモ接合体はリポーターの発現量が約 50% 低下していた。以上の実験により SCF は *Abd-B* 遺伝子の転写発現を活性化し正常な体節形成に必要なことが分かった。またその活性は *Abd-B* のプロモーターにおいて発揮されることが示唆された。また唾腺染色体の観察において SCF は伸長途上の RNA ポリメラーゼ II と共局在することが分かった。以上の結果を統合的に考えた場合 SCF の生体内における機能は基礎的な転写反応の活性化に関与するものであると示唆される。

2. 序論

SCF (Suprcoiling factor : 超らせん化因子) は真核生物のトポイソメラーゼ II と協同して DNA 鎖に負の超らせんを導入する生化学的活性を持つタンパク質である。その活性は初め広瀬らによってカイコ後部絹糸腺から同定され

(Hirose and Suzuki, 1988)、その後太田らによって精製された (Ohta and Hirose, 1990)。また *scf* 遺伝子はカイコ (Ohta *et al.*, 1995) 及びショウジョウバエ (Kobayashi *et al.*, 1998) にてクローニングされた。細胞生物学的観察により SCF は唾腺染色体上のパフに局在し転写活性と関連することが示唆されている。SCF は構造上の特徴として数個の Ca^{2+} 結合性の EF-hand ドメインを有しており、SCF ペプチド鎖中の広い領域がこの配列に占められている。またトポイソメラーゼ II との相互作用は C 末端の HDEF 残基を通して行われる。これらの構造はともに SCF の DNA 超らせん化活性に必須であることが小林らによって調べられている (Kobayashi and Hirose, 1999)。その後の研究により *scf* の RNAi 変異体はオス特異的致死であり、SCF はオス X 染色体上の遺伝子の転写を約 2 倍活性化する量的補正機構に必要な因子であることが分かった

(Furuhashi *et al.*, 2006)。

体軸に沿ったショウジョウバエの体節形成はホメオティック遺伝子の発現により決定されている (Lewis, 1978)。各々のホメオティック遺伝子群の発現は体節特異的であり、これら遺伝子の発現する体節は発生過程を通じて厳密に保持される (Akam, 1987)。多くの場合ホメオティック遺伝子産物はそれだけで細胞の発生運命を決定するのに十分であり、ゆえにホメオティック遺伝子の発現制御は正常な発生に重要な役割を果たす (Schneuwly *et al.*, 1987; Gibson

and Gehring, 1988, Gonzalez-Reyes et al et al., 1990)。

ショウジョウバエ腹部の後方の運命決定を支配するホメオティック遺伝子 *Abd-B* の転写発現制御の分子メカニズムは複雑である。*Abd-B* の下流にはエンハンサー領域が4ヶ所、またこれらのエンハンサーに対応する境界領域及び抑制領域が複数存在し、gap 遺伝子や pair rule 遺伝子などの制御下にある

(Casares and Sanchez-Herrero, 1995; Mihalý et al., 1998)。分子生物学的な解析によりコード領域については3'末端側のエキソンを共有しプロモーターが異なる転写産物は5つあり、ホメオドメインの位置するC末端を共有する翻訳産物は2種生じることが分かっている (Celniker et al., 1989; Zavortink and Sakonju et al., 1989; FlyBase Genome Annotators, 2004)。一方、遺伝学的解析からは *Abd-B* 遺伝子は機能的に2つのサブタイプに分類されることが既に知られていた (Casanova et al., 1986)。*Abd-B m* は成虫の腹部体節の発生運命決定に関与するサブタイプである。*Abd-B m* は *iab5*、*iab6*、*iab7*、*iab8* の4つエンハンサーにより転写発現の促進を受け、これら4つのエンハンサーは各々A5、A6、A7、A8体節の特徴の形成に関与する (Karch et al., 1985)。もう一方の *Abd-B r* はA9体節に発現し生殖器官形成に関与するサブタイプである。*Abd-B m* は *Abd-B* 遺伝子領域の最も下流のプロモーター (*Abd-B-RB* プロモーター) から発現し、その翻訳産物はその他のプロモーターから発現された異性体 *Abd-B r* の翻訳産物に比べ約220アミノ酸長く、またお互いの変異は相補的であり機能的に区別される (DeLorenzi and Bienz, 1990; Celniker et al., 1990)。特に断りのない場合、本論文では *Abd-B* と表記したときに *Abd-B-RB* 転写産物を発現する *Abd-B m* を指すものとする (図4)。

Abd-B 及びその他のホメオティック遺伝子の発現量を左右するトランス因子として *trithorax(trx)* 遺伝子群 (*trxG*) 及び *Polycomb(Pc)* 遺伝子群 (*PcG*) が知られている (Kennison, 1995)。 *trxG* は *Abd-B* の発現を活性化しその変異体は腹部において形態の前方体節化をもたらし、 *PcG* は抑制的に作用しその変異体は形態の後方体節化をもたらし。 *trx* は PS(parasegment)10-12 において *Abd-B* の発現を正に制御する、そのため *trx* 変異体は幼虫の後方体節 A5-A7 は前方化を起こす (Breen and Harte, 1993)。 *Mcp* は *Abd-B* 活性化領域 *iab5* と *iab4* を区分する領域であり、 *Mcp* の欠失により A4 体節において本来発現しない *Abd-B* が発現する。 *Abd-B* は *yellow* を活性化するので背側体表に A5、A6 体節と同様の色素沈着を生じさせる。 (Karch et al., 1994; Kopp et al., 2000; Jeong et al., 2006)。 *Pc* は *Mcp* のサイレンサーエレメント機能に必要とされ (Busturia et al., 1997)、また *Pc* の変異体も同様に A4 体節の色素沈着をもたらし (Duncun, 1982)。 *trx* 及び RNA polymerase II の 140kDa サブユニット遺伝子 (*RpII140*) 変異体はいずれもホメオティック遺伝子 *Ubx* の発現低下によるホメオティック変異を起こす (Mortin et al., 1992)。

3. 材料及び方法

キイロシヨウジヨウバエの系統

Hirose lab. stock *Df(1)w67c23, y¹*

Df(1)w67c23, y¹; e Pr Dr/TM6B, Tb¹

Df(1)w67c23, y¹; P{Gscf}

Df(1)w67c23, y¹; Sp/CyO; e Pr Dr/TM3, Sb¹ Ser¹

Df(1)w67c23, y¹; P[UAS-IRscf]²⁻¹

Df(1)w67c23, y¹; AyGal4/TM6B, Tb¹

P{hsFLP}1, y¹ w¹¹¹⁸; Dr^{Mio}/TM3, ry Sb¹

w; P{ovo^{D1-18}}3L, P{FRT(w^{hs})}2A/st¹ βTub85D^D ss¹ e^s/TM3,

Sb¹

w; P{FRT(w^{hs})}2A

Gift from Ng *et al.* *Df(1)w67c23, y¹; Df(3)Rac1/TM6B, Tb¹*

Df(1)w67c23, y¹; Rac2^Δ J(2.4)/TM6B, Tb¹

Gift from Bender *Abd-B^{HCJ199}(ry⁻)/MKRS*

Gift from Mortin *RpII140^{z43} red e/TM3, Sb¹ Ser¹*

trx^{B11}/TM3β

from Bloomington stock center

In(3R)P(Pc³), Pc³/TM1

w¹¹¹⁸; Dr^{Mio}/TM3, P{GAL4-twi.G}2.3, P{UAS-2xEGFP}AH2.3, Sb¹ Ser¹

ショウジョウバエの交配

Df(1)w67c23, y¹; Rac2^Δ J(2.4)/TM6B は Ng らより提供を受けた。*J2.4* は Ng らが *Rac2* 遺伝子に相補的な *Rac1* 遺伝子の変異体を作るため *Rac2^Δ* 変異体に対して EMS による変異導入を行った際に得られた系統である。*Df(3)Rac1* は *Rac1*、*scf*、*Rab5* の 3 つの遺伝子を欠失した変異体である。*Df(3)Rac1* と *Rac2^Δ* の二重ホモ変異体は致死である (Ng et al., 2002)。*J2.4* は *Rac2^Δ* ホモ、*Df(3)Rac1* ヘテロのバックグラウンドにおいて致死でありながら *Rac1* 上の変異が見られなかった。そこで当研究室において譲り受け配列解析を行ったところ *scf* 遺伝子 (DCB45; Kobayashi et al., 1998) ORF の 271 番目のトリプトファンコドンが終止コドンに変異していることがわかっていた。この *J2.4* 系統から *scf* 遺伝子変異のみを相同染色体組み換えを利用して分離するため以下の実験を行った。

Df(1)w67c23, y¹; Rac2^Δ J(2.4)/TM6B のオスを *Df(1)w67c23, y¹* のメスと交配し *Df(1)w67c23, y¹; Rac2^Δ J(2.4)/+* のメスを得た。*Df(1)w67c23, y¹; Df(3)Rac1/TM6B, Tb¹* のオスと交配し TM6B でバランスされた 500 匹のオスを得た。このオスを一匹ずつ *Df(1)w67c23, y¹; Df(3)Rac1/TM6B, Tb¹* のメスと交配し *Antp⁺* で致死となる約 100 個の系統を *Df(1)w67c23, y¹; e Pr Dr/TM6B, Tb¹* と交配し再度 TM6B でバランスした。この 100 系統を生んだオスをホモジナイズし *Rac2* 周辺配列を (5'-GCAAGGTCAAGTAAAGAGACTC-3') 及び (5'-GGTTCAAAGTTCTTAGAGCAG-3') のプライマーで PCR 増幅した。*Rac2* 周辺の欠失が回復し *Rac2⁺* となったことを示す約 1.1kb 長い PCR 産物の増幅された系統を 10 個得てこの *scf* 変異体を *scf¹* とした。得られた *Df(1)w67c23, y¹; scf¹/TM6B, Tb¹* 系統のメスを *Df(1)w67c23, y¹; Sp/CyO; e Pr Dr/TM3, Sb¹ Ser¹*

のオスと交配し *Df(1)w67c23, y¹; +/CyO; scf¹/e Pr Dr* のオスを得た。*scf* 遺伝子周辺領域 2.7kb からなる *Gscf* 配列によってレスキューするためこのオスを *Df(1)w67c23, y¹; P{Gscf}; Rac2^Δ J(2.4)/TM6B, Tb¹* と交配し *Df(1)w67c23, y¹; P{Gscf}/CyO; scf¹/TM6B, Tb¹* を得た。このオスとメスを交配し *scf¹* ホモで最も生存性の高い系統を選んでその後の実験に利用した。*scf* の RNAi 変異体を得るかけ合わせは Furuhashi らの論文に従った (Furuhashi et al., 2006)。

RpII140²⁴³ 及び *trx^{B11}* のオスと *scf¹* のメスを交配した。また *scf¹* のオスと *Pc³* のメスを交配した (Mortin et al., 1992; Duncan, 1982)。

転写産物量の測定

scf をカバーしかつ *scf¹* ホモの胚を効率的に見分けられる適当なマーカーを持つバランサーがないので dominant female-sterile (DFS) による germ-line chimera を利用し産まれた胚のメス由来染色体の allele が常に *scf¹* となるようにした (Chou et al., 1993)。まず 3 番染色体上での *scf¹* との組み換えによって *w; P{FRT(*w^{hs}*)}2A* より *Df(1)w67c23, y¹; scf¹, P{FRT(*w^{hs}*)}2A/TM6B, Tb¹* を作成した。*P{hsFLP}1, y¹ w¹¹¹⁸; Dr^{Mio}/TM3, ry Sb¹* のメスに *w; P{ovo^{D1-18}}3L, P{FRT(*w^{hs}*)}2A/TM3, Sb¹* のオスを交配し *P{hsFLP}1, y¹ w¹¹¹⁸; P{ovo^{D1-18}}3L, P{FRT(*w^{hs}*)}2A/TM3, ry Sb¹* のオスを得て、*Df(1)w67c23, y¹; scf¹, P{FRT(*w^{hs}*)}2A/TM6B, Tb¹* のメスと交配し、*P{hsFLP}1, y¹ w¹¹¹⁸/Df(1)w67c23, y¹; P{ovo^{D1-18}}3L, P{FRT(*w^{hs}*)}2A/scf¹, P{FRT(*w^{hs}*)}2A* のメスを得て、あらかじめ別に交配して得られた *Df(1)w67c23, y¹; scf¹/TM3, P{GAL4-*twi.G*}2.3, P{UAS-2xEGFP}AH2.3, Sb¹ Ser¹* のオスと交配し蛍光を発しない (*scf¹* ホモ)

胚を産卵後 5-16 時間で回収した (Halfon et al., 2002)。同様にして後述するレポーターを持つハエも回収した。

ショウジョウバエの胚 100~200 個程度よりセパゾール RNA I Super (ナカライテスク)を使用して RNA を抽出した。抽出した核酸全量を 15 U の DNase I (タカラバイオ)で処理しエタノール沈殿にて回収した。first cDNA strand 合成は ExScript RT reagent Kit (タカラバイオ)により行った。約 1 μ g の total RNA と random primer を 65°C で 15 分インキュベート後氷冷し、25°C で 10 分インキュベートした後 42°C で 1 時間逆転写反応し、99°C で 5 分インキュベートして酵素を失活させた。合成された cDNA 中からの定量は SYBR Premix Ex Taq (Perfect Real Time) (タカラバイオ) を反応試薬とし、ライトサイクラー (ロシュ) を用いてリアルタイム PCR により行った。各測定の内標準として *Actin5C* 遺伝子産物を利用した。

トランスジェニックショウジョウバエの作成

Busturia より提供を受けた Abd-Bppwhite ベクター ($P[AbdBpp-lacZ]$ ベクター) (Busturia and Bienz, 1993; Estrada et al., 2002) を $Df(1)w67c23, y^1$ を宿主として顕微注入し形質転換体を得た。ベクターが 2 番染色体に挿入された 2 系統を scf^1 及び前述の EGFP バランサーのバックグラウンドにそれぞれ導入し、交配から $Df(1)w67c23, y^1; P[AbdBpp-lacZ]; scf^1/TM3, P\{GAL4-twi.G\}2.3, P\{UAS-2xEGFP\}AH2.3, Sb^1 Ser^1$ のオスを得た。 scf^1 germ line chimera のメスとの交配は前述の通り行った。

使用した合成 DNA

real-time PCR には下記の合成 DNA をプライマーとして使用した。

<i>lac-Z</i>	lacZ_2281F	5'-CGCCAGTCAGGCTTTCTTTCAC-3'
	lacZ_2407R	5'-CAATGCGGGTCGCTTCACTTAC-3'
<i>Act5C</i>	Act5C.F	5'-CCCTCGTTCTTGGGAATGG-3'
	Act5C.R	5'-CGGTGTTGGCATAACAGATCCT-3'
<i>β1-tubulin</i>	β 1tubulin-F	5'-AGTTCACCGCTATGTTCA-3'
	β 1tubulin-R	5'-CGCAAAACATTGATCGAG-3'
<i>Rp49</i>	rp49-F	5'-CCACCAGTCGGATCGATATG-3'
	rp49-R	5'-CACGTTGTGCACCAGGAACT-3'
<i>Abd-B</i>	RB_827F	5'-ATCAAAAACAAACGCCAACC-3'
	RB_937R	5'-TCAGTTTTTCATTCCGGTCAATCC-3'
ChIP	RB_up3489F	5'-GGCTGGTTCTTCTTGCTGTTTC -3'
	RB_up3385R	5'-CAAAGAAGAGCGAGCGAGATGG-3'
	RB_up1792F	5'-CTTCATCCTGCGTCCTATTACC-3'
	RB_up1695R	5'-CGTCTTGTTTGCATTTGACACC-3'
	RB_up1367F	5'-CAGTTCCCATCCCACAGGTAAG-3'
	RB_up1235R	5'-GGATAAACTCTCTGCACAATAGCA-3'
	RB_6015F	5'-TTGTCGTATAATGTTTCGTC-3'
	RB_6173R	5'-TTGAATATCTCTGCGTGT-3'

クロマチン免疫沈降

クロマチン免疫沈降は Schwartz らの方法を応用して行った (Schwartz et al., 2003)。AEL(after egg laying)5-16 時間で回収した約 0.75~1 g の胚を Buffer A (0.3 M sucrose, 2 mM MgOAc, 3 mM CaCl₂, 10 mM Hepes-HCl [pH 8], 0.3% Triton X-100)にて氷上でホモジナイズし、2枚重ねられたナイロンメッシュ (日本理化学器械 25-XX) にて濾過した。あらかじめ 40 °C に加温しておいた Crosslinking buffer (0.1 M NaCl, 1 mM EDTA, 0.5 mM EGTA, 50 mM Hepes-HCl [pH 8])をホモジェネートと等量混合し 20 °C にしたところでホルマリン液(37%)を加えて最終濃度 0.37 %とした。緩やかに混合しつつ 1 分間固定し、2.5 mM のグリシンを加えて最終濃度 125 mM とし反応を停止した。2,110 G で 3 分遠心した後、核を含むペレットを胚 1g あたり 6 ml の割合で Sonication buffer (10mM Tris-Hcl, 1mM EDTA, 0.5 mM EGTA)にて溶解し 1/100 量の protease inhibitor cocktail (SIGMA P8340)を加えた。固定された核は Branson 社の Sonifier 250D とマイクロチップの組み合わせで 90 秒を 1 サイクルとし 33%の DUTY とレベル 7 の強さで 5 回超音波破碎した。溶液を 1.5 ml のサンプリングチューブに分注し RIPA (140 mM NaCl, 10 mM Tris-Cl [pH 8.0], 1 mM EDTA, 0.5 mM EGTA, 1% Triton, 0.3% SDS, 0.1% sodium deoxycholate)として調整し直した。10 分間緩やかに混合した後、10,000 g にて 10 分間遠心した。得られたクロマチン溶液約 330 µl(胚 50 mg 相当)を 50 µl の protein A agarose (Upstate technology)で 4 °C、30 分 pre-clear した後 spin down によりアガロースビーズをを沈降し上清を新しいチューブに移した。670 µl の RIPA、50 µl の Salmon Sperm DNA/ Protein A Agarose (Upstate technology)、100µl の

anti-SCF serum (alpha-CT: Kobayashi et al., 1998)をそれぞれ加えて4 °Cで一晩ローテーションした。コントロールとして 100 μ l の pre-immune serum を使った。spin down により agarose と抗体とクロマチンの複合体を沈降し、上清を捨てて RIPA で 4 回 rinse した。RIPA で 4 °C、5 分間 wash しもう一度繰り返した。NaCl 濃度を 500 mM に変更した RIPA で 1 回 rinse し 4 °C、5 分間 wash した。同様に LiCl buffer (250 mM LiCl, 10 mM Tris-HCl[pH8.0], 1 mM EDTA, 0.5 % Sodium deoxycholate, 0.5 % IGEPAL CA-630)にて rinse と wash をした。TE で 2 回 rinse した後 4 °C、5 分間で 2 回 wash した。上清を可能な限り取り除き 200 μ l の Reverse crosslink buffer (10 mM Tris-HCl[pH8.0], 1mM EDTA, 300 mM NaCl, 0.5 % SDS)を加え 65 °C で一晩反応させた。

DNA 精製のステップは Agilent 社の実験デザインに則って行った。上清を新しいチューブに移し 200 μ l の TE で extract back したあと最終濃度 0.1 mg/ml の RNase A で 37 °C、2 時間反応させさらに最終濃度 0.1 mg/ml の Proteinase K で 55 °C、30 分反応させた。2 度の phenol/chloroform extraction を経た後、16 μ l の 5 M NaCl、1.5 μ l の 20 μ g/ μ l Glycogen と 880 μ l のエタノールを加えて-80 °C、30 分間冷やした後、4 °C、20,000 g にて 30 分間遠心した。rinse し 10 分間 dry した後 70 μ l の 10 mM Tris-HCl[pH8.0]にて溶解した。

array-CGH による結合プロファイルの解析

以降の array-CGH 実験は全て Agilent 社のデザインに準拠して行った。精製クロマチンからのラベル化プローブ合成およびハイブリダイズは Agilent 社の Mammalian ChIP on chip protocol に準拠した。ショウジョウバエ胚を試料と

するにあたって若干の改変を加えた。コントロールとして ChIP の input DNA を使用した。ショウジョウバエ胚にして 35 mg 相当からの 70 μ l の DNA を平滑末端化しリンカーライゲーションした。ライゲーション以降のステップは既定のプロトコールに従った。調製されたプローブは各 0.5 μ l のみハイブリダイゼーション溶液と混合し human Cot-1 DNA は用いなかった。ハイブリダイゼーションは 18 時間で行った。アレイは Whitehead Institute designed Drosophila 44K array set: AMADID 13844 (G4480A#002) (Agilent) の MIT デザインカスタムアレイを使用した。アレイの登録番号は US45102894_251384410006 である。Feature Extraction protocol は CGH_44k_1005_NoDetrend を使用した。Grid template の登録番号は 013844_D_20060726 である。アレイスキャナにより出力された画像データは Feature Extraction により数値化し、ChIP Analytics により統合データとして出力した。統合データは Excel によってシグナルの有意なデータのみ ($P[Xbar] < 0.001$) 抽出され Gbrowse (Flybase) によって annotation 情報と統合し図を出力した。リアルタイム PCR の反応は cDNA の定量実験と同様に行った。

ショウジョウバエ多糸染色体の免疫染色法

ショウジョウバエ多糸染色体の免疫染色は Furuhashi の方法 (Furuhashi et al., 2006) に従い、抗 SCF 抗体(1:25)、H14 抗体(anti-Ser5P; 1:100, Covance)、anti-rabbit Alexa488 (1:500, Molecular Probes)、anti-mouse IgM Cy3 (1:500, Jackson Immuno Reserch)で行った。

4. 結果

1. *scf* の RNAi ノックダウンは腹部体節の前方化を促す

生体内において転写制御に関わる *scf* の機能を探るため古橋の実験により得られた *scf* の RNAi 系統 (Furuhashi *et al.*, 2006) の表現型の観察をおこなったところ、成虫の腹部体節の形成に異常のあることが明らかとなった。*scf* の RNAi 変異体ではオスが特異的に死ぬがわずかに生き残ったオスの表現型を観察したところ腹部第 6 体節 (A6) の腹側 (sternite) に本来生えてこない剛毛 (bristle) が形成される (図 1 A, B, C)。このような形成異常は *Abd-B* 遺伝子の機能欠損により起こる体節前方化変異であることが知られており (Celniker *et al.*, 1990)、プロモーター領域に P 因子挿入変異を持つ *Abd-B^{H₁CJ199}(ry-)* のヘテロ変異体においても前方化が観察されている (図 1 D; Bender and Hudson, 2000)。

Abd-B と *scf* の遺伝学的な相互作用を調べるため *scf* の RNAi 変異と *Abd-B^{H₁CJ199}(ry-)* との二重変異体を観察した。*scf* の RNAi 変異体においてメスは致死ではない。*Abd-B^{H₁CJ199}(ry-)* ヘテロ接合の条件下で *scf* の RNAi を誘導するような交配をしたところ RNAi を誘導しない場合に比べメスの発生率が 10 % まで減少する (表 1)。この実験により *Abd-B* 機能欠損による致死性が *scf* の変異によって促進されることが示唆された。また、*Abd-B* と *scf* の遺伝学的相互作用はメスにおいて観察されたことから、*scf* のホメオティックな変異表現型はオス特異的な遺伝子量補正機構には依存していないことが示唆された。

2. SCF 遺伝子変異体の単離

scf の RNAi ノックダウンによる解析では、特異的に致死となってしまう成虫オスの詳細な解析や RNAi の作用が弱い胚発生期における解析が困難なので新たに *scf* 遺伝子の変異体を得ることとした。Ng らより提供を受けた EMS 点変異系統より *scf* 遺伝子変異体の単離を行った。*scf* 近傍にある *Rac1* は同一染色体上の *Rac2* と相同性を持つ相補遺伝子であり Ng らは P 因子挿入系統 M207 及び rk519 より P 因子を imprecise excision により除去し *Rac* 遺伝子欠損変異体 *Df(3)Rac1* 及び *Rac2^Δ* をそれぞれ得た (図 2 A; Ng *et al.*, 2002; Furuhashi *et al.*, 2006)。しかし、*Rac1* 欠損変異体は挿入 P 因子と *Rac1* 遺伝子の間の領域 (*scf* 遺伝子を含む) も欠いていたので彼らは *Rac1* 単独変異体を得るため EMS 化学修飾による点変異導入系統の作成を行った。*Rac2^Δ* 変異体に EMS 変異を導入したあと *Df(3)Rac1*, *Rac2^Δ* 二重変異体と交差し致死となる系統をいくつか得た。この系統の中には *Rac1* に変異を持たないもの (*J2.4* 系統) があったのでこれを譲り受けて配列を解析したところ *scf* の ORF の 271 番目のアミノ酸であるトリプトファンをコードするコドンが終止コドンに変化していることが分かった。そこでこの遺伝子変異を *scf¹* と命名し染色体組換えによって *J2.4* 系統から *scf¹* 変異を分離し遺伝的背景を整えるため野生型と交配した。この交配により得られた *Rac2^Δ*, *J2.4/+* のメスを *Df(1)w67c23, y¹; Df(3)Rac1/TM6B, Tb¹* のオスと交配しメンデル法則上 3 分の 2 の頻度で現れる *TM6B, Tb¹* の染色体を持つオスを得た。このオスのうち *Df(3)Rac1* のメスとの交配で致死となる *scf* 変異 (*J2.4*) を保持する系統に対し PCR でスクリーニングして *Rac2^Δ* 変異が野生型に置き換わった系統 *scf¹* を得て *TM6B* バランサーとのヘテロ接合体として保持

した。*scf*¹の構造を(図2B)に示す。*scf*¹のホモ接合体は三齢幼虫で致死であった。また*scf*¹遺伝子領域及び近接領域を含む2.7kbの配列(図2A)をP因子により導入した変異体*P[Gscf]*との交配により*scf*¹のホモ接合体の致死性が回復し不稔性も見られなかった。また*scf*¹はホメオティックな表現型において劣性変異でありヘテロ接合体は尾部体節の前方化を示さないことが分かった。ゆえに*scf*¹ヘテロ接合体においてはRNAiノックダウンほど*scf*の機能が低下していないことが分かった。以上の実験により得られた*scf*¹変異系統をその後の*scf*遺伝子の機能解析に利用した。

3. *Abd-B*のトランス制御因子と*scf*の遺伝学的相互作用

*scf*変異が後腹部の前方化を促すならば*PcG*の変異表現型を抑圧すると考え交配実験により検証した。*Pc*グループ変異体ではオスのA4体節の背側体表(tergite)にA5、A6体節の特徴である色素沈着(pigmentation)が現れ後方化の表現型を呈する(図1E, F; Duncan, 1982)。このような表現型は*Mcp*エレメントの機能低下によってA5体節までに制限されていた*Abd-B*遺伝子の発現がA4体節で起こったものと考えられている(Karch et al., 1994; Kopp et al., 2000; Jeong et al., 2006)。そこで*Pc*³と*scf*¹の交配により得られた二重ヘテロ接合体のオスを観察し、*Pc*³単独変異体の表現型と比較した。その結果、A4体節の色素沈着は*scf*変異により抑制されることが分かった(表2A)。またその表現型は*P[Gscf]*の導入により*Pc*³単独変異体と同じ変異頻度に回復した。

*scf*¹のヘテロ接合体は尾部体節の前方化を示さないのに対し*trx*グループ変異体の*trx*^{B11}及び*RpII140*²⁴³(Milne et al., 1999; Mortin et al., 1992)の

ヘテロ接合体では低頻度であるが前方化を示す。そこで *scf*¹ を交配し二重ヘテロ接合体のオスを観察したところ、*trx*、*RpIII140* 両変異体の前方化の頻度が上昇した (表 2 B, C)。またこの表現型は野生型 *scf* 遺伝子領域の配列 *P[Gscf]* を第二染色体に 1 コピー導入することで回復した。以上の結果は *scf* 変異が腹部体節の前方化を促すことを示す。以上の結果は SCF が *trxG* 遺伝子としてホメオティック遺伝子 *Abd-B* の発現を促進し体節特異的な腹部の表現型決定に関わることを示唆する。

4. SCF は *Abd-B* 遺伝子の転写産物発現を正に制御する

次に *scf* 変異体における *Abd-B* の発現を測定した。*scf*¹ ホモ接合体の胚において *Abd-B* の転写産物量を RT-PCR により測定したところ約 30 % の減少が見られた (図 3)。転写産物量の測定には *Abd-B m* に特異的なプライマーを使用した。対照として測定した *β1-tubulin* 及び *Rp49* の各遺伝子は *scf*¹ と野生株で有意な差が見られなかった。以上の結果より *scf* は *Abd-B* 遺伝子の転写産物発現を正に制御することが分かった。

5. SCF は *Abd-B* プロモーター領域に局在する

SCF は多糸染色体上に特異的なパターンをもって局在しており (Kobayashi et al., 1998; Furuhashi et al., 2006)、SCF による転写制御が染色体上で行われることを示唆する。そこで SCF が *Abd-B* の制御領域に存在するか調べるため、array-CGH により *Abd-B* 遺伝子を含む 1.1Mb の領域上の SCF の局在を調べた。使用したアレイは 250base 平均でタイリングされている MIT Whitehead

Institute デザインアレイを使用した。固定した産卵後 5-16 時間の yw 胚を用い SCF 抗体により免疫沈降し精製したクロマチン DNA を Agilent array-CGH により解析した。Agilent 社のソフトウェアによって数値化処理した結果、SCF の有意なシグナルは Abd-B-RB 転写開始点の上流 1.7kb 付近を中心とした領域に集中することが分かった (図 4)。Abd-B 遺伝子のその他の領域では統計的に有意な ($P[\text{Xbar}] < 0.001$ で判別) シグナルを得られなかった。定量 PCR により免疫沈降産物 DNA の量を直接測定したところ、array-CGH で SCF の集中が見られた領域は周辺の領域に比べシグナルが高かった (図 5)。よって array-CGH の結果は信頼できることが分かった。以上の結果は SCF が Abd-B プロモーターと相互作用していることを示唆する。また、実験に使用したアレイは 3R 染色体の約 10Mb の領域を含んでいるのでこれらの領域について SCF 局在のシグナルを大まかに解析し、なんらかの特徴が見いだされるかどうか調べた。有意なシグナルの 2 個連続する領域 65 個について近傍遺伝子との位置関係を調べたところ約 80% のシグナルが遺伝子内もしくは転写開始点上流 3kb までのプロモーター領域に見いだされた。

6. SCF は Abd-B プロモーターの活性を正に制御する

SCF が Abd-B プロモーター領域で果たす役割を調べるため、scf 機能欠損変異が Abd-B プロモーターの活性に与える影響を調べた。Abd-Bpp は Abd-B-RB の上流 4.1 kb、下流 1.2 kb からなる Abd-B-RB の基礎プロモーター領域を lacZ に連結したコンストラクトである (Busturia and Bienz, 1993; Estrada *et al.*, 2002)。Abd-Bpp から発現されるレポーター遺伝子は Abd-B に特異的なパター

ンを示さずショウジョウバエの胚全体で弱く発現するため、この配列が基礎的なプロモーター領域であり、下流に存在する *iab5*~*iab8* エンハンサーにより空間特異的発現が制御されると考えられている。SCF の高局在する部位は転写開始点上流 4.1 kb の領域に含まれており *scf* 変異が Abd-Bpp の転写活性に及ぼす影響を調べることにした。*scf*¹ ホモ接合体で *Abd-Bpp-lacZ* を有する胚の *lacZ* 転写産物量を *scf* 野生型のホモ接合体と比較したところ 2 つの独立した遺伝子導入系統で 50% 近く低下していた (図 6)。よって SCF は *Abd-B* プロモーターを活性化していることが分かった。

7. SCF は伸長途上型 RNA ポリメラーゼ II と局在をともにする

RNA ポリメラーゼ II 最大サブユニット (RpII215) は C 末端反復配列がリン酸化されることで活性化する (Phatnani and Greenleaf, 2006)。この C 末端反復配列中の Ser5 は *Cdk7* によりリン酸化され (Ser5P form) (Zhou M et al., 2000)、H14 抗体により特異的に検出される (Komarnitsky et al., 2000)。C 末端反復配列のリン酸化された RNA ポリメラーゼ II は転写活性の高い領域への局在が唾腺多糸染色体上に観察され (Weeks et al., 1993)、また H14 抗体により検出される Ser5P は *Cdk7* と共局在する (Schwartz et al., 2003)。現在の知見を総合すると Ser5 のリン酸化は RNA polIII プロモーターからの脱出状態 (initiated form) に関与し、転写伸長中もリン酸化状態を保ち RNA ポリメラーゼ II の活性を促進していると考えられている (Phatnani and Greenleaf, 2006)。

染色体上の全般的な遺伝子発現と SCF の機能との関連を調べるために Ser5 リン酸化型 RNA ポリメラーゼ II と SCF の局在を比較した。SCF 抗体と Ser5P

抗体(H14)により唾腺多糸染色体を抗体染色し蛍光観察した(図7)。重ね合わせた画像からは early ecdysone puff を始めとして多くの位置での共局在が観察された。この結果は SCF が染色体上の種々の遺伝子座で転写反応の活性化に参与することを示唆する。

5. 考察

本研究により SCF は *Abd-B* の転写発現を正に制御することで、腹部体節の正常な発生を促すことが分かった。過去の研究により、SCF は唾腺多糸染色体常のパフに局在し遺伝子発現に関与することが知られていた。また、SCF はオスの X 染色体における遺伝子量補正に関与することが知られていた。さらに本研究により SCF は生体内においてプロモーターを活性化する機能を持つことが示唆された。

SCF と *trxG*、*PcG* の遺伝学的相互作用

遺伝学的交配実験の結果は SCF が表現型として *trxG* に分類されることを示す。*trxG* はホメオティック遺伝子の機能を正に制御するものである。*PcG* は遺伝子の転写を抑制するものである (Kennison, 1995)。定義に則れば RNA ポリメラーゼ II やあるいはホメオティックタンパクのコファクターも *trxG* に分類され得る。ゆえに *trxG* に分類されるだけでは必ずしも特別なこととは言えない。近年の研究において *trxG* 及び *PcG* はエピジェネティックな機構により転写の活性化状態を維持することが分かってきており、そのような活性を持つことが特別に *trxG* として分類される条件となる (Ringdöse and Paro, 2004)。今後、*scf* の機能を解析していく上でエピジェネティックな制御との関連を調べることは非常に重要である。*scf* の過剰発現は X 染色体を decondense することが知られており (Furuhashi et al., 2006)、*Abd-B* においても何らかのエピジェネティックな機構に繋がる染色体構造変換を行っていることが考えられる。

SCF が *Abd-B* の発現に与える影響

trxG 変異体における *Abd-B* の発現レベルを生体試料から定量する実験は一般的に難しい。一つの理由として *Abd-B* やその他のホメオティック遺伝子の発現する組織が限定されており組織全体での発現量の測定は誤差を生じやすく不向きであることが挙げられる。ゆえに定性的な計測にとどまっているのが現状であり、発現量の差が顕著でない例は見過ごされている可能性も高い。しかし、今回の研究からリアルタイム PCR による測定系を用いればたとえ組織特異的な遺伝子の発現であっても約 30% 程度の変化ならば検出できることが分かった。また、*Abd-B* ヘテロ接合体などに比べ必ずしも顕著とは言えない発現量の低下であってもホメオティックな変異を引き起こすのに十分であることが明らかにされた。

array-CGH 実験における SCF の結合プロフィール

array-CGH の実験により SCF は *Abd-B* プロモーター領域に集中することが分かった。array-CGH 実験より示されたシグナルがあったとしても、その結合が絶対値としてどれほど強いかが判断することはできない。よって実験の結果からは SCF が *Abd-B* 遺伝子領域内においてプロモーター以外の場所に結合しているかどうかを判定できない (Shirahige, 2006)。また、今回使用した Agilent アレイのプローブは 60mer の長さを持ち、平均 250bp 間隔でタイリングされており 500bp 以内 (プローブ 1~2 個分) の集中的な局在などは優位なシグナルとして検出できていない可能性がある (Bulyk, 2006)。また、試料が *Abd-B* を発現

する均質な細胞集団ではなくあくまで胚という混合細胞集団である以上、詳細な解析には限界がある。以上のような難点を抱えながらも今回ショウジョウバエ胚における ChIP-on-chip からホメオティック遺伝子 *Abd-B* の発現制御解析にとって非常に重要なデータが得られた。今後より精度の高い局在プロファイルの測定を行うことで今回明らかにされたショウジョウバエ生体組織における SCF の機能のさらなる解明が進むであろう。培養細胞系は観察対象としてそのような目的に適する。しかしながら *Abd-B* を発現し、また安定して成育するような培養細胞はこれまで報告されておらず実験が限られていた (Breiling et al., 2001, 2004)。最近になって *Abd-B* 遺伝子を高発現する S2 細胞の派生株 (Sg4) が発見された (Schwartz et al., 2006)。この細胞中では *Abd-B* 遺伝子領域が *Pc* や K27 メチル化 H3 による転写不活性化状態から脱しており *trxG* による脱抑制状態の形成やプロモーター領域における転写因子群のプロファイルの観察に適していると考えられる。

SCF による *Abd-B* プロモーターの活性化

定量的実験により *scf* 変異による内在的な *Abd-B* の発現低下率 (約 30%) よりも、*Abd-B* プロモーターから発現されるリポーター遺伝子の発現低下率 (約 50%) の方が顕著であった。この結果は SCF がプロモーター領域に集中しているという array-CGH 実験から得られた結論と整合性がある。本研究により得られたデータを統合的に考えるとプロモーターの活性が SCF に依存し、また *Abd-B* の発現にプロモーターと SCF の相互作用が必要であると示唆された。また、実験に使用したアレイは 3R 染色体の約 10Mb の領域を含んでいるのでこれ

らの領域について SCF 局在のシグナルを概観し特徴が見いだされるか調べた。有意なシグナルの 2 個連続する領域 65 個について近傍遺伝子との位置関係を調べたところ約 80%のシグナルが遺伝子内もしくは転写開始点上流 3kb までのプロモーター領域に見いだされた。転写開始点付近とプロモーター内に含まれるシグナルは約 30%であった。これらの事実は SCF と活性型 RNA ポリメラーゼが染色体上で共局在する事実と符合し、また *Abd-B* プロモーターの活性化が SCF の機能としては一般的な例であることを示唆する。今後は生体内における SCF の機能についてより深く解明するため、プロモーター上の配列やクロマチン構造などに依存して SCF の結合による遺伝子の活性化が起こるのかどうかについて検証が必要である。あるいは転写の活性化のみに限らず転写産物の安定性や転写後調節に寄与するといった可能性についても検証が必要である。

プロモーターの活性化と超らせん

SCF が遺伝子発現制御に関わるメカニズムと SCF の生化学的活性である超らせん化との関連は不明である。しかしながら細胞内において DNA 超らせん状態の変化がプロモーターの活性に影響を及ぼすことは明らかにされつつある。

SCF は免疫沈降実験からトポイソメラーゼ II と相互作用していることが示唆されている (Kobayashi *et al.*, 1998)。トポイソメラーゼ I 及び II は培養細胞内において種々の遺伝子のプロモーター活性を左右することが知られている

(Collins, 2001)。また同じく培養細胞内において核内レセプターより発現誘導されるプロモーターにトポイソメラーゼ II の切断活性が必要とされる例が示されている (Ju *et al.*, 2006)。研究が真核生物に先行している原核生物において

は DNA 超らせん化によるプロモーター活性の調整機構の全容が解明されつつある (Travers and Muskheishvili, 2005)。これらの事実と本研究の成果から、真核細胞生体内において SCF とトポイソメラーゼ II の複合体による DNA トポロジーの局所的变化が転写因子の DNA 結合や活性に影響を及ぼし、各遺伝子プロモーターの調節を担っているという可能性が提起される。

生体内においてリモデリング活性を持つ SWI/SNF 関連タンパク質 ISWI、Snf2、Mi-2 は *in vitro* において DNA を負に超らせん化する活性を持つことが知られている (Havas et al., 2000)。ただし、この活性は SCF の超らせん化と異なりトポイメラーゼによる共有結合の切断を伴わない。Iswi の変異は X 染色体の脱凝縮する表現型を持つが、*scf* の過剰発現変異でも同様の表現型が観察される (Furuhashi et al., 2006)。また *in vitro* において *ftz* プロモーターの活性を正に制御する (Okada and Hirose., 1998)。また ISWI と NURF 複合体を形成する *nurf* は *hsp70* プロモーターのクロマチン構造を脱凝縮し、ショウジョウバエ生体内において *hsp70* 遺伝子の誘導発現を促進している (Tsukiyama et al., 1995; Badenhorst et al., 2002)。Snf2 のホモログである *brahma* は *trxG* 遺伝子である *osa* とともに *Antennapedia* P2 プロモーターを正に制御する (Vazquez et al., 1999)。Mi-2 はショウジョウバエ生体内において DREF の活性を阻害し PCNA プロモーターを負に制御する (Hirose et al., 2002)。SCF とこれらリモデリング因子のプロモーターにおける機能の関係を調べることで、超らせん化活性による転写制御機構の総合的な解明が期待される。

6. 謝辞

本研究を進めるあたりの多大なご指導を頂きました広瀬進教授に心より感謝いたします。プログレス委員としてご指導頂いた上田龍教授、荒木弘之教授、角谷徹仁教授、佐々木裕之教授、光澤浩教授、小方康至博士に感謝いたします。多くのアドバイスを頂いた上田均教授、西岡憲一助手、布施直之助手、山田正明博士に感謝いたします。数多くのサポートを頂いた形質遺伝研究部門のみなさま、遺伝学研究所のみなさまに感謝いたします。

本研究に使用した *J2.4* 及び *Df(3)Rac1* を提供していただいた Ng 博士、*Abd-B^{HCH199}* を提供していただいた Bender 博士、*RpII140^{z43}* 及び *trx^{B11}* を提供していただいた Tamkun 博士、*Abd-Bpp* ベクターを提供していただいた Busturia 博士並びに *Pc³* 及び EGFP バランサーを提供していただいた Bloomington stock center のみなさまに感謝いたします。

7. 参考文献

- Akam, M. The molecular basis for metameric pattern in the *Drosophila* embryo. *Development* 1987;101(1):1-22.
- Badenhorst, P, Voas, M, Rebay, I, Wu, C. Biological functions of the ISWI chromatin remodeling complex NURF. *Genes Dev* 2002;16(24):3186-98.
- Breen, TR, Harte, PJ. Trithorax regulates multiple homeotic genes in the bithorax and Antennapedia complexes and exerts different tissue-specific, parasegment-specific and promoter-specific effects on each. *Development* 1993;117(1):119-34.
- Breiling, A, O'Neill, LP, D'Eliseo, D, Turner, BM, Orlando, V. Epigenome changes in active and inactive polycomb-group-controlled regions. *EMBO Rep* 2004;5(10):976-82.
- Breiling, A, Turner, BM, Bianchi, ME, Orlando, V. General transcription factors bind promoters repressed by Polycomb group proteins. *Nature* 2001;412(6847):651-5.
- Bulyk, ML. DNA microarray technologies for measuring protein-DNA interactions. *Curr Opin Biotechnol* 2006;17(4):422-30.
- Busturia, A, Bienz, M. Silencers in abdominal-B, a homeotic *Drosophila* gene. *EMBO J* 1993;12(4):1415-25.

Busturia, A, Wightman, CD, Sakonju, S. A silencer is required for maintenance of transcriptional repression throughout *Drosophila* development. *Development* 1997;124(21):4343-50.

Casanova, J, Sanchez-Herrero, E, Morata, G. Identification and characterization of a parasegment specific regulatory element of the abdominal-B gene of *Drosophila*. *Cell* 1986;47(4):627-36.

Casares, F, Sanchez-Herrero, E. Regulation of the infraabdominal regions of the bithorax complex of *Drosophila* by gap genes. *Development* 1995;121(6):1855-66.

Celniker, SE, Keelan, DJ, Lewis, EB. The molecular genetics of the bithorax complex of *Drosophila*: characterization of the products of the Abdominal-B domain. *Genes Dev* 1989;3(9):1424-36.

Celniker, SE, Sharma, S, Keelan, DJ, Lewis, EB. The molecular genetics of the bithorax complex of *Drosophila*: cis-regulation in the Abdominal-B domain. *EMBO J* 1990;9(13):4277-86.

Chou, TB, Noll, E, Perrimon, N. Autosomal P[ovoD1] dominant female-sterile insertions in *Drosophila* and their use in generating germ-line chimeras. *Development* 1993;119(4):1359-69.

Collins, I, Weber, A, Levens, D. Transcriptional consequences of topoisomerase inhibition. *Mol Cell Biol* 2001;21(24):8437-51.

Delorenzi, M, Bienz, M. Expression of Abdominal-B homeoproteins in *Drosophila* embryos. *Development* 1990;108(2):323-9.

Duncan, IM. Polycomblike: a gene that appears to be required for the normal expression of the bithorax and antennapedia gene complexes of *Drosophila melanogaster*. *Genetics* 1982;102(1):49-70.

Estrada, B, Casares, F, Busturia, A, Sanchez-Herrero, E. Genetic and molecular characterization of a novel iab-8 regulatory domain in the Abdominal-B gene of *Drosophila melanogaster*. *Development* 2002;129(22):5195-204.

FlyBase Genome Annotators. FlyBase analysis Release 3.2 of the annotated *Drosophila melanogaster* genome. 2004

Furuhashi, H, Nakajima, M, Hirose, S. DNA supercoiling factor contributes to dosage compensation in *Drosophila*. *Development* 2006;133(22):4475-83.

Gibson, G and Gehring, WJ. Head and thoracic transformations caused by ectopic expression of Antennapedia during *Drosophila* development. *Development* 1988;102(4):657-675.

Gonzalez-Reyes, A, Urquia, N, Gehring, WJ, Struhl, G, Morata, G. Are cross-regulatory interactions between homoeotic genes functionally significant? *Nature* 1990;344(6261):78-80.

Halfon, MS, Gisselbrecht, S, Lu, J, Estrada, B, Keshishian, H, Michelson, AM. New fluorescent protein reporters for use with the *Drosophila* Gal4 expression system and for vital detection of balancer chromosomes. *Genesis* 2002;34(1-2):135-8.

Havas, K, Flaus, A, Phelan, M, Kingston, R, Wade, PA, Lilley, DM, Owen-Hughes, T. Generation of superhelical torsion by ATP-dependent chromatin remodeling activities. *Cell* 2000;103(7):1133-42.

Hirose, F, Ohshima, N, Kwon, EJ, Yoshida, H, Yamaguchi, M. *Drosophila* Mi-2 negatively regulates dDREF by inhibiting its DNA-binding activity. *Mol Cell Biol* 2002;22(14):5182-93.

Hirose, S, Suzuki, Y. In vitro transcription of eukaryotic genes is affected differently by the degree of DNA supercoiling. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1988;85(3):718-22.

Jeong, S, Rokas, A, Carroll, SB. Regulation of body pigmentation by the Abdominal-B Hox protein and its gain and loss in *Drosophila* evolution. *Cell* 2006;125(7):1387-99.

Ju, BG, Lunyak, VV, Perissi, V, Garcia-Bassets, I, Rose, DW, Glass, CK, Rosenfeld, MG. A topoisomerase II β -mediated dsDNA break required for regulated transcription. *Science* 2006;312(5781):1798-802.

Karch, F, Galloni, M, Sipos, L, Gausz, J, Gyurkovics, H, Schedl, P. Mcp and

Fab-7: molecular analysis of putative boundaries of cis-regulatory domains in the bithorax complex of *Drosophila melanogaster*. *Nucleic Acids Res* 1994;22(15):3138-46.

Karch, F, Weiffenbach, B, Peifer, M, Bender, W, Duncan, I, Celniker, S, Crosby, M, Lewis, EB. The abdominal region of the bithorax complex. *Cell* 1985;43(1):81-96.

Kennison, JA. The Polycomb and trithorax group proteins of *Drosophila*: trans-regulators of homeotic gene function. *Annu Rev Genet* 1995;29:289-303.

Kobayashi, M, Aita, N, Hayashi, S, Okada, K, Ohta, T, Hirose, S. DNA supercoiling factor localizes to puffs on polytene chromosomes in *Drosophila melanogaster*. *Mol Cell Biol* 1998;18(11):6737-44.

Kobayashi, M, Hirose, S. Functional dissection of DNA supercoiling factor: EF-hand domains and C-terminal HDEF motif are essential for its activity. *Genes Cells* 1999;4(1):33-40.

Komarnitsky, P, Cho, EJ, Buratowski, S. Different phosphorylated forms of RNA polymerase II and associated mRNA processing factors during transcription. *Genes Dev* 2000;14(19):2452-60.

Kopp, A, Duncan, I. Anteroposterior patterning in adult abdominal segments of *Drosophila*. *Dev Biol* 2002;242(1):15-30.

Lewis, EB. A gene complex controlling segmentation in *Drosophila*. *Nature* 1978;276(5688):565-70.

Mihaly, J, Hogga, I, Barges, S, Galloni, M, Mishra, RK, Hagstrom, K, Muller, M, Schedl, P, Sipos, L, Gausz, J, Gyurkovics, H, Karch, F. Chromatin domain boundaries in the Bithorax complex. *Cell Mol Life Sci* 1998;54(1):60-70.

Mortin, MA, Zuerner, R, Berger, S, Hamilton, BJ. Mutations in the second-largest subunit of *Drosophila* RNA polymerase II interact with Ubx. *Genetics* 1992;131(4):895-903.

Ng, J, Nardine, T, Harms, M, Tzu, J, Goldstein, A, Sun, Y, Dietzl, G, Dickson, BJ, Luo, L. Rac GTPases control axon growth, guidance and branching. *Nature* 2002;416(6879):442-7.

Ohta, T, Hirose, S. Purification of a DNA supercoiling factor from the posterior silk gland of *Bombyx mori*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1990;87(14):5307-11.

Ohta, T, Kobayashi, M, Hirose, S. Cloning of a cDNA for DNA supercoiling factor reveals a distinctive Ca(2+)-binding protein. *J Biol Chem* 1995;270(26):15571-5.

Okada, M, Hirose, S. Chromatin remodeling mediated by *Drosophila* GAGA factor and ISWI activates fushi tarazu gene transcription in vitro. *Mol Cell Biol* 1998;18(5):2455-61.

Phatnani, HP, Greenleaf, AL. Phosphorylation and functions of the RNA polymerase II CTD. *Genes Dev* 2006;20(21):2922-36.

Ringrose, L, Paro, R. Epigenetic regulation of cellular memory by the Polycomb and Trithorax group proteins. *Annu Rev Genet* 2004;38:413-43.

Schneuwly, S, Klemen, R, Gehring, WJ. Redesigning the body plan of *Drosophila* by ectopic expression of the homoeotic gene *Antennapedia*. *Nature* 1987;325(6107):816-8.

Schwartz, BE, Larochelle, S, Suter, B, Lis, JT. Cdk7 is required for full activation of *Drosophila* heat shock genes and RNA polymerase II phosphorylation in vivo. *Mol Cell Biol* 2003;23(19):6876-86.

Schwartz, YB, Kahn, TG, Nix, DA, Li, XY, Bourgon, R, Biggin, M, Pirrotta, V. Genome-wide analysis of Polycomb targets in *Drosophila melanogaster*. *Nat Genet* 2006;38(6):700-5.

白髭克彦. タイリングアレイによる真核生物ゲノムの構造解析. *細胞工学* 2006;25(10):1161-1167.

Travers, A, Muskhelishvili, G. DNA supercoiling - a global transcriptional regulator for enterobacterial growth? *Nat Rev Microbiol* 2005;3(2):157-69.

Tsukiyama, T, Wu, C. Purification and properties of an ATP-dependent nucleosome remodeling factor. *Cell* 1995;83(6):1011-20.

Vazquez, M, Moore, L, Kennison, JA. The trithorax group gene *osa* encodes an ARID-domain protein that genetically interacts with the *brahma* chromatin-remodeling factor to regulate transcription. *Development* 1999;126(4):733-42.

Weeks, JR, Hardin, SE, Shen, J, Lee, JM, Greenleaf, AL. Locus-specific variation in phosphorylation state of RNA polymerase II in vivo: correlations with gene activity and transcript processing. *Genes Dev* 1993;7(12A):2329-44.

Zavortink, M, Sakonju, S. The morphogenetic and regulatory functions of the *Drosophila* Abdominal-B gene are encoded in overlapping RNAs transcribed from separate promoters. *Genes Dev* 1989;3(12A):1969-81.

Zhou, M, Halanski, MA, Radonovich, MF, Kashanchi, F, Peng, J, Price, DH, Brady, JN. Tat modifies the activity of CDK9 to phosphorylate serine 5 of the RNA polymerase II carboxyl-terminal domain during human immunodeficiency virus type 1 transcription. *Mol Cell Biol* 2000;20(14):5077-86.

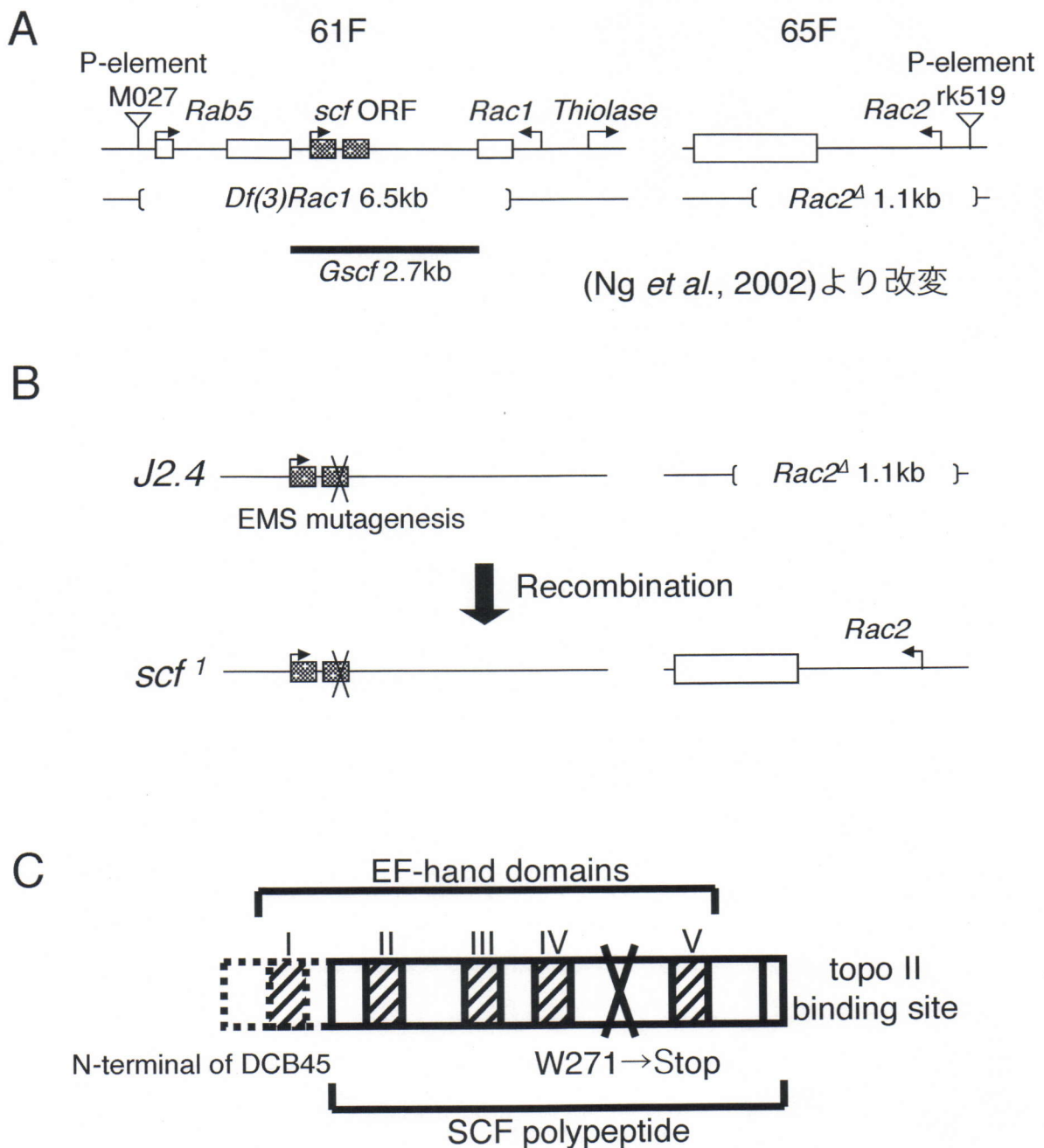


図1. *scf*¹の作成

A. *scf*及び*Rac1*、*Rac2*周辺領域の構造。*Df(3)Rac1*および*Rac2*^Δの欠失領域をカッコで示す。太線はとなり合う遺伝子のORFの間に挟まれたSCF遺伝子領域(*Gscf*)を示す。B. 染色体組換えによる*Rac2*^Δ、*J2.4*からの*scf*¹変異の分離。C. *scf*¹変異部位及びSCFポリペプチドの構造。斜線部は5つのEFハンドドメイン(核内SCFの推定される構造においては4つ)を示す。N末端の四角はトポイソメラーゼII結合部位を示す。×印はSCFのORF(DCB45)の271番トリプトファンが終止コドンに変化したことを示す。

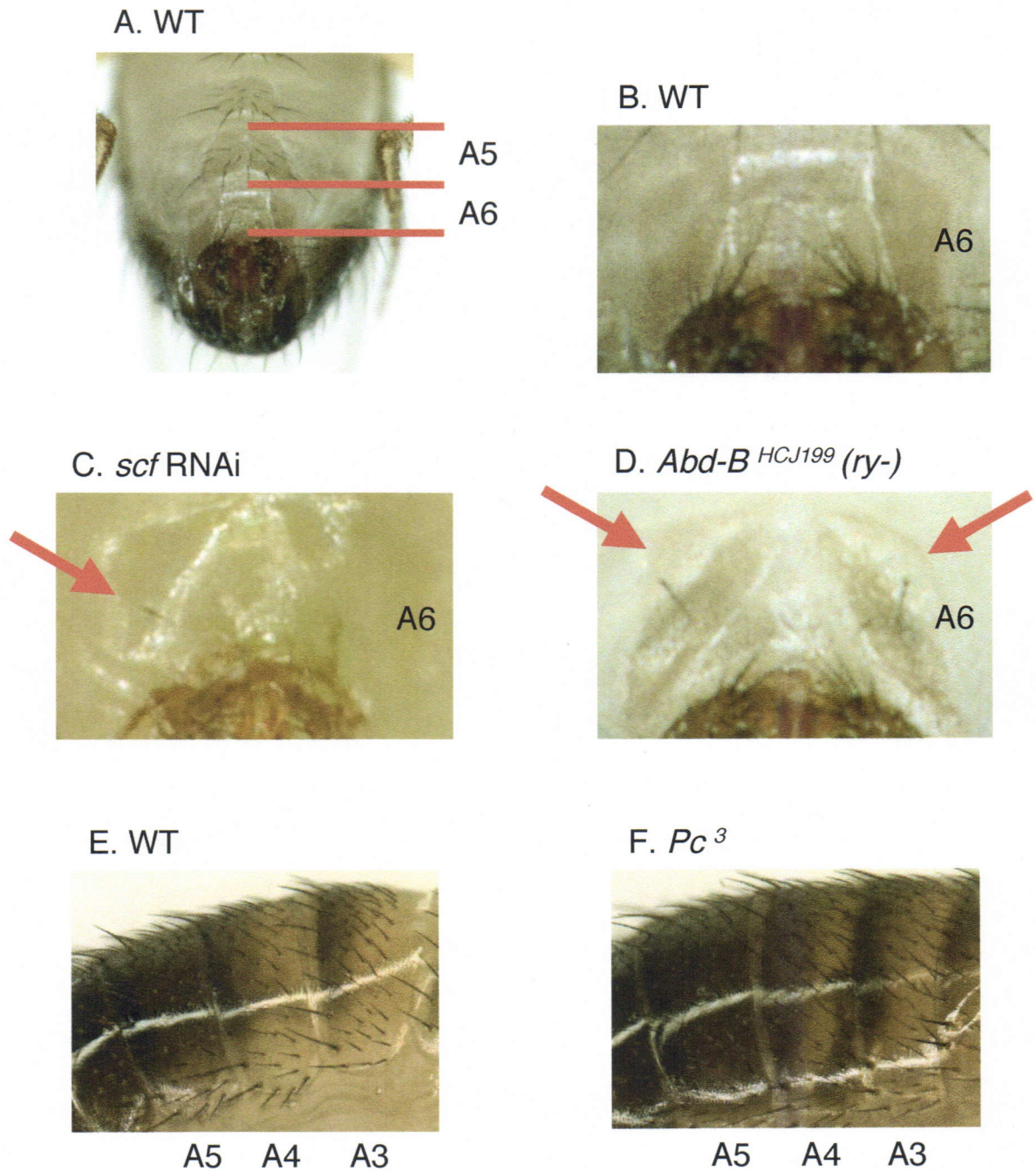


図2. *scf*及び*Abd-B*、*Pc*によって引き起こされるホメオティック変異
 A. 及びB. ショウジョウバエ野生型のオス（腹部）A5体節には剛毛があるがA6には無い。C. *scf*のRNAi変異によってA5体節の特徴である剛毛（赤い矢印）がA6体節に形成される。D. 同様の表現型は*Abd-B*の変異体*Abd-B*^{HCJ199} (*ry*-)でも観察される。E. 及びF. 野生型のA4体節の体表の前側は色素が沈着しないが、*Pc*³変異体ではA4体節の体表にA5体節と似た色素沈着が観察される。

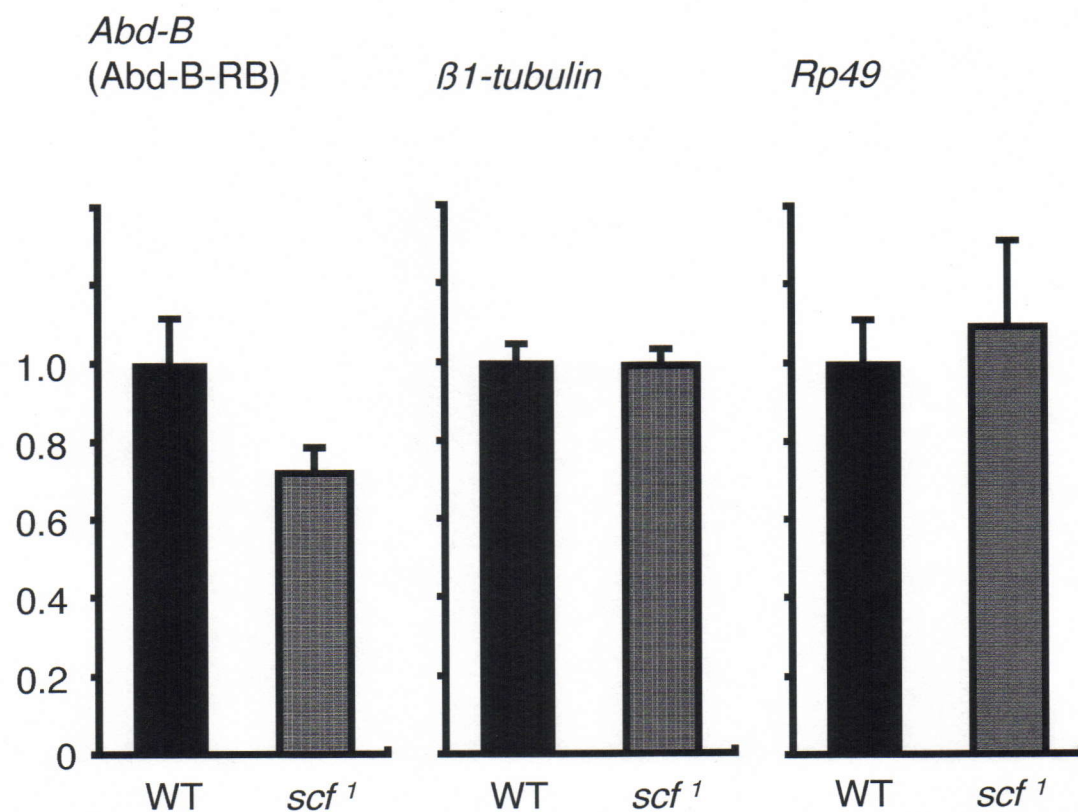


図3. *scf*変異体における*Abd-B*転写産物量
*scf*¹ ホモ接合体では野生型接合体に比べて*Abd-B*の転写産物量の比較。
 野生型を1として比を表す。対照実験として測定した*β1-tubulin*及び*Rp49*
 を右に示す。エラーバーは標準誤差を表す (n=5)。

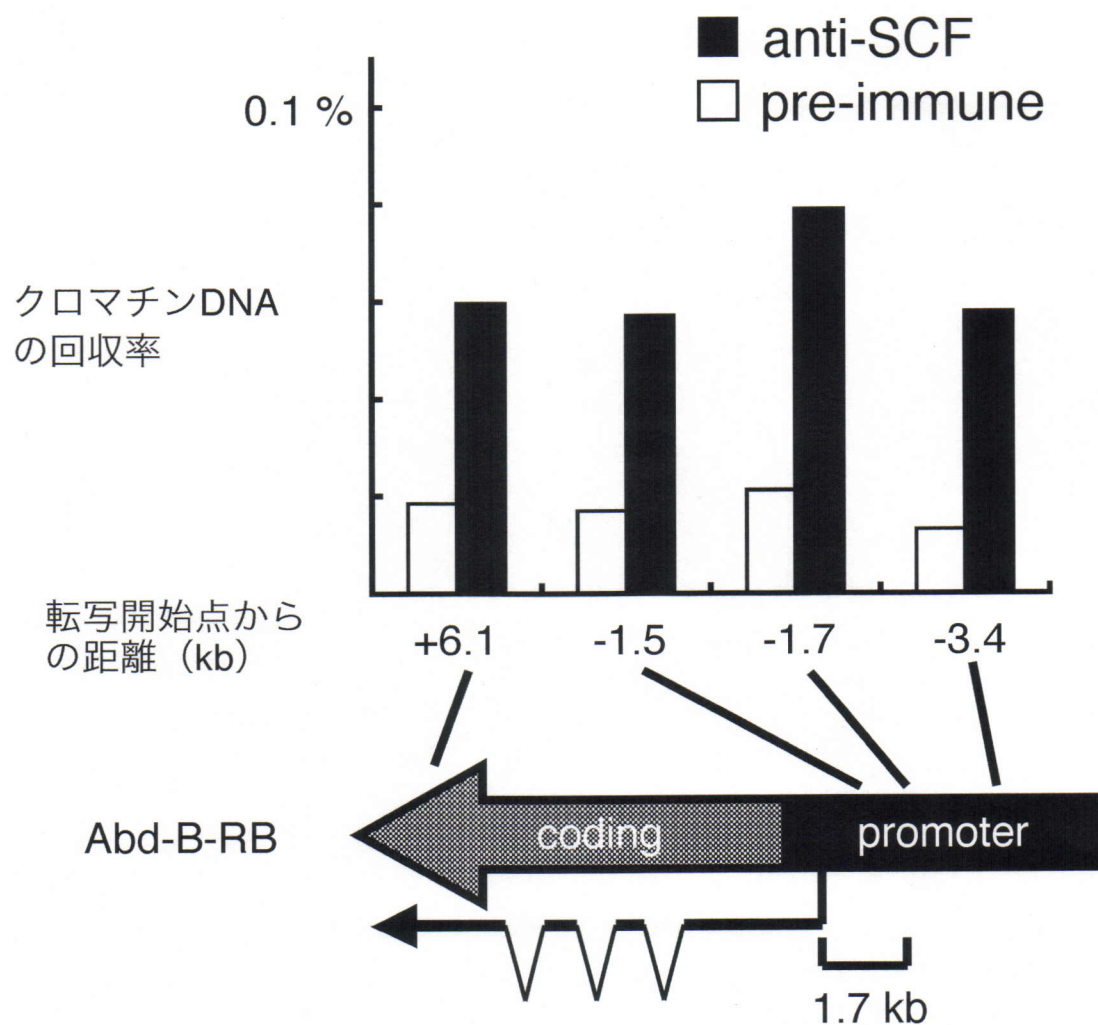
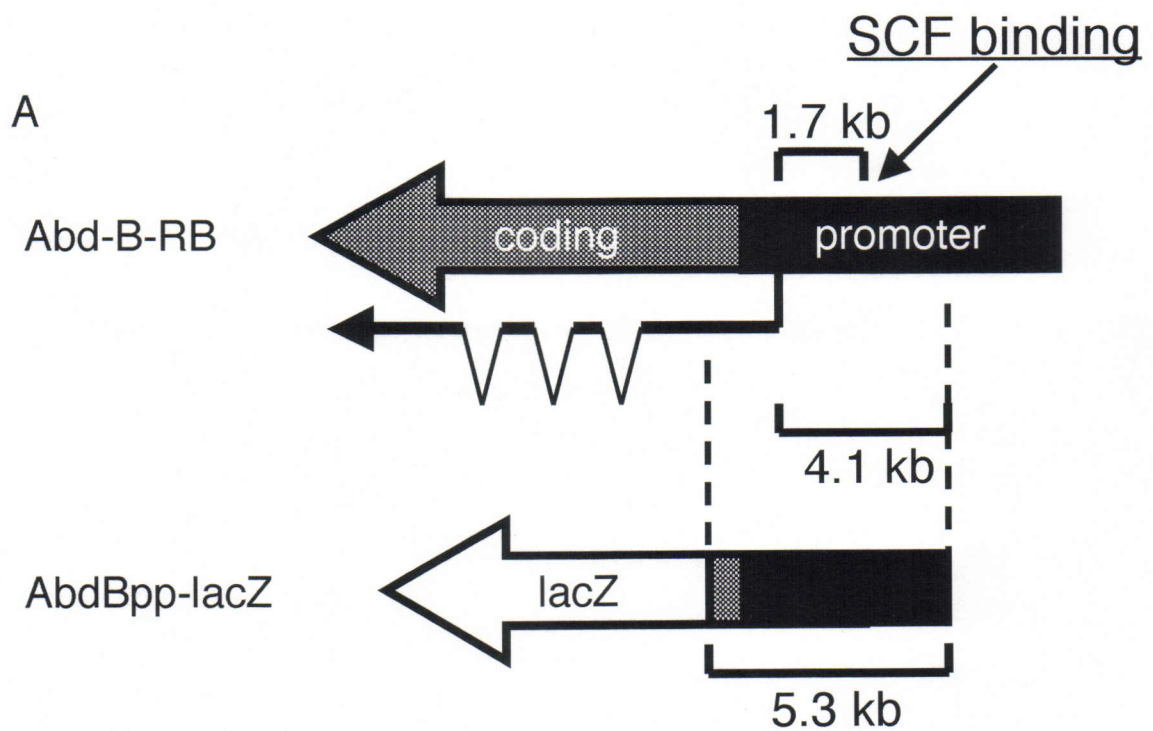


図5. 定量PCRによる*Abd-B*遺伝子領域のシグナル検出
*Abd-B-RB*プロモーター周辺でSCFの局在シグナルを測定した。縦軸はクロマチンInputに対する免疫沈降産物の回収率を表す。



(Busturia et al., 1993; Estrada et al., 2002)

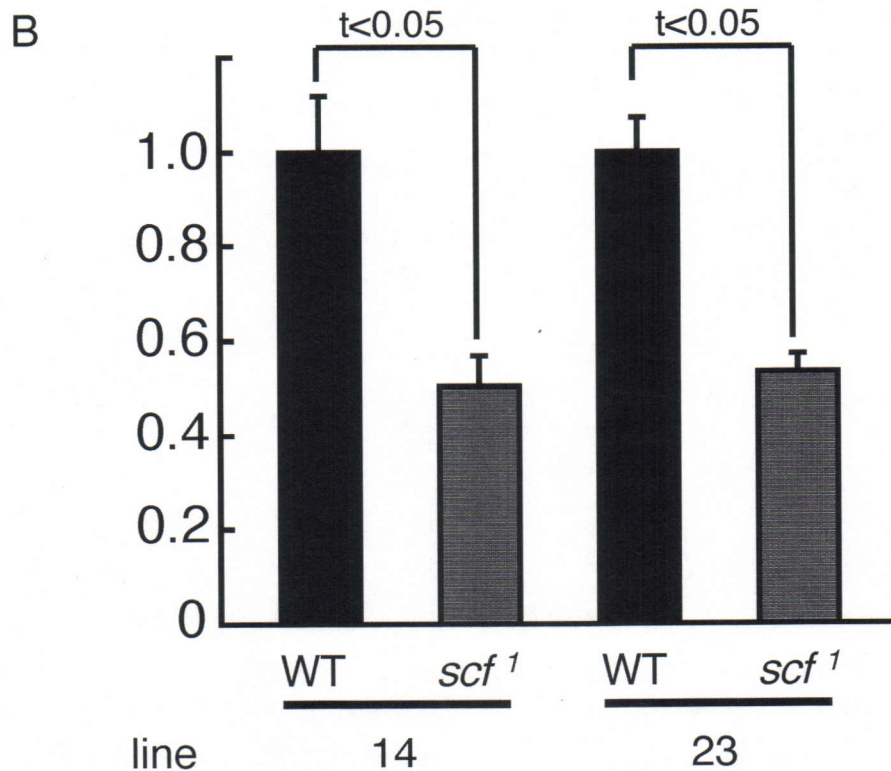


図6. AbdBpp-lacZレポーター遺伝子の転写発現量

A. Abd-Bppリポーターの構造を表す。斜めの矢印はChIP-on-chip実験で得られたSCFの高局在部位を示す。B. *scf*¹ホモ接合体における*lacZ*の転写産物量を野生型ホモ接合体と比較。Abd-Bppの導入された2系統を選んで測定した。スチューデントのt検定の結果を示す。

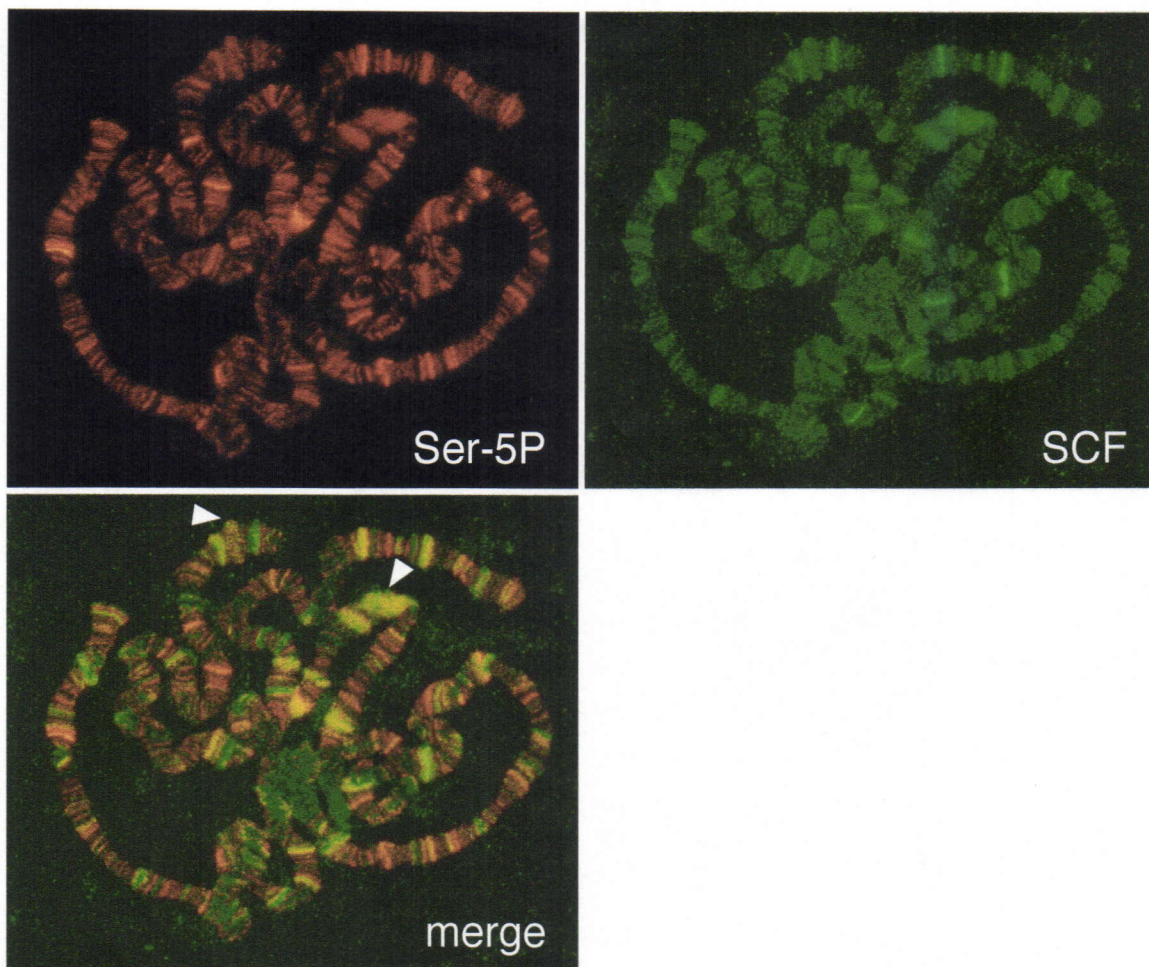


図7. 唾腺多糸染色体におけるSCFとPCTDの局在
唾腺染色体をSer5P抗体及びSCF抗体で染色した。矢頭は主要なearly ecdysone puffを表す。画像合成によってシグナルが黄色くなったところはSCFとPCTDの染色体上の共局在を表す。

表1

scf と *Abd-B* の遺伝学的相関

	Control	<i>scf</i> RNAi	<i>scf</i> RNAi/ Control ratio
WT	99	97	0.98
<i>AbdB</i> ^{HCJ199} (<i>ry-</i>)/ +	257	28	0.11

表2

A. *RpII140* と *scf* の遺伝学的相関

	Total	A6>A5 transition	not transition	penetrance	P value
<i>RpII140</i> ^{z43} / +	254	64	190	0.252	NA
<i>RpII140</i> ^{z43} / <i>scf</i> ¹	252	104	148	0.413	P<0.001
[<i>Gscf</i>]/ +; <i>RpII140</i> ^{z43} / <i>scf</i> ¹	419	150	269	0.358	P<0.001

B. *trx* と *scf* の遺伝学的相関

	Total	A6>A5 transition	not transition	penetrance	P value
<i>trx</i> ^{B11} / +	323	90	233	0.279	NA
<i>trx</i> ^{B11} / <i>scf</i> ¹	337	112	225	0.332	P>0.01
[<i>Gscf</i>]/ +; <i>trx</i> ^{B11} / <i>scf</i> ¹	534	114	420	0.213	P<0.001

C. *Pc* と *scf* の遺伝学的相関

	Total	A4>A5 transition	not transition	penetrance	P value
<i>Pc</i> ³ / +	120	71	49	0.592	NA
<i>Pc</i> ³ / <i>scf</i> ¹	78	30	48	0.385	P<0.001
[<i>Gscf</i>]/ +; <i>Pc</i> ³ / <i>scf</i> ¹	181	102	79	0.564	P<0.001

P value はカイ二乗検定によって算出した