

氏 名 小笠原 洋平

学位（専攻分野） 博士（理学）

学位記番号 総研大甲第 1056 号

学位授与の日付 平成 19 年 3 月 23 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 6 条第 1 項該当

学位論文題目 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

論文審査委員 主 査 教授 上田 龍  
教授 荒木 弘之  
教授 角谷 徹仁  
教授 佐々木 裕之  
主任研究員 太田 力(国立がんセンター)

## 論文内容の要旨

SCF (DNA supercoiling factor) has an activity generating unconstrained negative supercoils in the DNA strands in conjunction with eucaryotic topoisomerase II (Ohta and Hirose, 1990, Ohta et al., 1995). SCF localizes to puffs on polytene chromosomes in *Drosophila melanogaster* (Kobayashi et al., 1998). SCF is required for dosage compensation via hypertranscription of the male X chromosome (Furuhashi et al., 2006).

Homeotic (Hox) genes determine body structures along the anteroposterior axis in most animals. Expression of homeotic genes exhibits segment specific patterns that are maintained throughout development. Because the presence of homeotic gene products in cells is sufficient to determine their developmental fates, the regulation of homeotic genes plays important roles in normal development (Schneuwly et al., 1987; Gibson and Gehring, 1988, Gonzalez-Reyes et al., 1990, Maeda and Karch, 2006).

The *Abdominal-B* (*Abd-B*) is a homeotic gene categorized to bithorax complex (*BX-C*) (Lewis, 1978). *Abd-B* specifies abdominal segments A5 to A9 [parasegments (PS) 10 to 14]. *Abd-B* is classified to two subclasses *Abd-B m* and *Abd-B r*. They encode proteins that share the C-terminal amino acid sequence, including the homeodomain. The expression of *Abd-B m* products is regulated by *iab5*, *iab6*, *iab7* and *iab8* enhancer regions and these enhancers are implicated in the formation of A5, A6, A7 or A8 segments respectively. *Abd-B r* products are expressed in A9 segment and are required for genitalia development (Karch et al., 1985; Celniker et al., 1989; Zavortink and Sakonju, 1989; DeLorenzi and Bienz, 1990; Celniker et al., 1990; FlyBase Genome Annotators, 2004). In this thesis "*Abd-B*" represents the *Abd-B m* class, which is transcribed from the *Abd-B*-RB promoter.

*trithorax group* (*trxG*) and *Polycomb group* (*PcG*) genes encode trans-regulators of homeotic gene function (Kennison, 1995). Because *trx* positively regulates the *Abd-B* expression in PS (parasegment) 10-12, a *trx* mutant shows anterior transformation in A5-A7. *trx* and *RpIII40* (the second largest subunit of RNA polymerase II) mutants show homeotic transformations caused by *Ubx* defect. *Pc* is required for the function of the silencer element in *Mcp*, which limits the *Abd-B* expression in A5 and the posterior segments. Loss-of-function of *Pc* causes homeotic transformation (A4 to A5), similar to that observed in a deletion of *Mcp*.

To examine autosomal gene regulation by *scf*, I tried to observe the phenotypes of RNAi induced *scf* mutant. Though knockdown of *scf* by RNAi results in male lethality, some escaper males show a homeotic transformation of the sixth abdominal segment to more anterior identity similar to that arising from a reduced expression of *Abd-B*. I examined a genetic interaction between *scf* and *Abd-B*. Upon *scf* RNAi, heterozygotes with an *Abd-B* mutation become lethal in female. These data suggest that *scf* genetically interacts with *Abd-B*.

RNAi limits the observation of adult males because most *scf* knockdowned males die. RNAi is not suitable for examination in the early embryonic stage. So the genetical mutant is necessary for analysis in the homeotic function of *scf*. I isolated an *scf* loss-of-function mutant *scf<sup>1</sup>* from a strain *J2.4* (which is kindly provided by Dr. Ng (Ng et al., 2002)). *J2.4* includes a nonsense mutation in *scf* (*scf<sup>1</sup>*) caused by EMS and a deletion in the *Rac2* gene (*Rac2<sup>Δ</sup>*). *Df(3)Rac1* that lacks *scf*, *Rac1*,

and *Gef5* is also a gift from Dr. Ng (Ng et al., 2002; Furuhashi et al., 2006). *scf*<sup>1</sup> was recovered through recombination between *J2.4* and wild type, which was lethal over *Df(3)Rac1*, followed by PCR screening for the absence of *Rac2*<sup>Δ</sup>. *scf*<sup>1</sup> is lethal at third instar larval stage in both sexes.

Employing *scf*<sup>1</sup>, I investigate the genetic interaction between *scf* and trans-regulator of *Abd-B*. Although *scf*<sup>1</sup> heterozygotes do not exhibit obvious homeotic transformation, they suppress Pc-dependent transformation and enhance transformation caused by *trxG*. Expression of *Abd-B* exhibits 30% decrease in *scf*<sup>1</sup> compared to wildtype at the embryonic stage. These data suggest that SCF positively regulates *Abd-B* expression.

SCF displays a specific staining pattern in polytene chromosomes, which leads to a hypothesis that SCF localizes in specific chromosomal regions to control gene expression. To analyze SCF localization in the *Abd-B* gene loci, I utilized array-based comparative genomic hybridization (aCGH). Solubilized chromatin fragments were prepared from *yw* embryo, followed by immunoprecipitation with anti-SCF antibody to make hybridization probes. The probes showed fine results in hybridization. Raw data were processed in software provided by Agilent. The results show that significant SCF signals were present in the *Abd-B*-RB promoter region. The signals locate around 1.7 kb upstream region of the transcription start point. Conventional PCR assay supports the results. The array experiment suggests that SCF interacts with the *Abd-B* gene at least in the *Abd-B* promoter.

To investigate the role of SCF in the *Abd-B* promoter, I examined whether the promoter activity is influenced by the loss-of-function mutation in *scf*. *Abd-Bpp* spanning 4.1 kb of 5' flanking, 1.2 kb of mRNA leader and some coding sequence was utilized as a basal promoter of *Abd-B* in reporter assays (Busturia and Bienz, 1993; Estrada et al., 2002). Expression of the reporter *lacZ* reduced about 50 % in *scf*<sup>1</sup> homo mutant compared with wild type. This result shows that SCF positively regulates the activity of the *Abd-B* promoter.

For a transcriptional reaction the CTD (carboxyl terminal domain) of RNA polymerase II (PCTD) should be phosphorylated in an early elongation step (Phatnani and Greenleaf). To examine the correlation between SCF and gene transcription in entire chromosomes, I performed immunostaining of SCF and PCTD on polytene chromosomes. I found that SCF colocalized with PCTD in many sites including early ecdysone puffs. This result suggests that SCF is involved in transcriptional activation in various chromosomal loci.

Collectively these results show that SCF activates the expression of *Abd-B* and is required for the formation of segment-specific pattern in the abdominal segment, and suggest that SCF localizes in the *Abd-B* promoter and facilitates the promoter activity. These findings combined with the previous studies illustrate the role of DNA supercoiling in gene expression.

## 論文の審査結果の要旨

小笠原さんの博士論文は、ショウジョウバエのスーパーコイル化因子 (SCF) の生体内での機能を調べたものである。SCF は DNA トポイソメラーゼ II と協調して DNA に負の超らせんを導入するタンパク質であり、DNA の転写や複製に重要な役割を果たしていると考えられるが、その生体内でのメカニズムが完全に明らかになっているわけではない。例えば SCF は X 染色体の遺伝子量補償機構において MSL タンパク質複合体と協調して重要な役割を果たしているが、染色体上では X 染色体のみならず常染色体上にも分布している。常染色体での SCF の果たす役割はどのようなものであろうか。

SCF RNAi 変異体を詳細に観察すると、後腹部体節の“前方化”がおこっており、この部分の体節特異性を制御する *Abd-B* ホメオティック遺伝子の発現異常が示唆された。そこで SCF RNAi 変異体と *Abd-B* 変異体を用いて遺伝学的な相互作用を検定すると、両者の機能的な相互作用が明らかとなった。以降、詳細な遺伝学的解析を行うため、まず SCF 遺伝子の構造的な変異を単離することとした。EMS による致死変異を導入した染色体をスクリーンし、SCF の後半にナンセンス変異が生じているアレル (*scf [1]*) を分離することができた。ホモ接合体は両性とも致死であり、SCF は遺伝子量補償のみならず、常染色体上の遺伝子の発現にも働いている可能性が示唆された。そこで小笠原さんは *Abd-B* 遺伝子に着目して、解析を進めた。

*Abd-B* 遺伝子の発現を維持する過程では Trx グループ遺伝子群がポジティブに、Pc グループ遺伝子群がネガティブに制御している。*scf [1]* 変異を利用して、これら遺伝子群に属する *Trx*、*Pc*、*Rp1140* 遺伝子との相互作用を後腹部体節のホメオティック・トランスフォーメーション表現型で調べたところ、*scf* 遺伝子は Trx グループ遺伝子群と同様に、*Abd-B* 遺伝子をポジティブに制御している可能性が示された。そこで、*scf [1]* 変異体における *Abd-B* 遺伝子の発現量を直接測定したところ、顕著な mRNA 量の低下が観察された。胚における *Abd-B* 遺伝子の領域的な発現パターンには変化はなかった。

SCF タンパク質が *Abd-B* 遺伝子領域のどこに局在してその発現を調節しているかを調べるため、Chip-on-chip 解析を行ったところ、転写開始点上流、1.7 kb 付近に有意なシグナルを観察した。実際にこのクロマチン部分に SCF が結合することが *Abd-B* 遺伝子の転写に関わるかどうかを確かめるため、転写開始点上流 5.3 kb 断片をレポーター遺伝子につないだコンストラクトを入手し、*scf [1]* 変異体における発現量を調べたところ、50% の低下が観察された。

本研究から、SCF は *Abd-B* 遺伝子の転写開始点 1.7 kb 付近に局在し、その転写を活性化し、後腹部における体節特異的なパターン形成に必要であることが明らかとなった。SCF は特定の遺伝子の all or none 的な転写調節を担うのではなく、多くの遺伝子の転写を「促進する」機能が考えられている。しかし小笠原さんは *Abd-B* 遺伝子という明確なターゲットに絞り、その転写調節に関わる SCF の役割を明らかにした。本研究は、SCF の機能を考えていく上で今後の関連研究への貢献も大きく、本論文が学位授与の要件を十分満たすものと審査員一同判断した。