

氏名	浦 聖 恵
学位（専攻分野）	博士（理学）
学 位 記 番 号	総研大甲第17号
学位授与の日付	平成4年 3月16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	Role of DNA topoisomerase II on transcription of the homeobox gene Hox-2.1 in F9 cells
論文審査委員	主 査 教 授 池 村 淑 道 教 授 瀬 野 悍 二 教 授 堀 内 嵩 助教授 小 原 雄 治 助教授 定 家 義 人

論文内容の要旨

ショウジョウバエの発生、分化に関わる遺伝子から見いだされたホメオボックスと呼ばれる領域は、その後の研究よりマウスやヒトを含む脊椎動物にも存在することが明らかになった。マウスの場合およそ35個のホメオボックス遺伝子が、100 kb以上にわたる4つのクラスター (*Hox* クラスター) を形成し、発生分化に伴い時期及び空間特異的に発現する。一つのクラスター内でホメオボックス遺伝子の発現を比較すると、いずれも同じ方向に転写され、しかも染色体上の並び順に従う発現を示す。このようなホメオボックス遺伝子の発現制御にクロマチン構造が深く関与する可能性を検証する目的で、ホメオボックス遺伝子の一つ *Hox-2.1* 遺伝子の発現制御にDNAのトポロジーを変えるトポイソメラーゼ II (トポ II) が関与するのかを調べている。

マウスのテラトカルシノーマの一種 F9 細胞を、レチノイン酸とジブチリル cAMP で処理すると3日から5日で壁側内胚葉に分化する。この分化に伴う *Hox-2.1* 遺伝子の発現を、Northern hybridization により調べたところ、未分化な F9 細胞では全く *Hox-2.1* 遺伝子の発現は見られないが、分化誘導すると4時間後には、2.1 kb の *Hox-2.1* mRNA が出現し、1日目にその蓄積はピークに達し、以後減少して5日目にはほとんど消失した。さらに、未分化 F9 細胞および4時間分化誘導した F9 細胞から核を単離して Run-on transcription 実験により進行中の転写を調べたところ、未分化 F9 細胞においても *Hox-2.1* 遺伝子は低いレベルで転写されており、分化誘導すると4時間後には転写活性が5倍上昇することが明らかになった。このことから F9 細胞の分化に伴う *Hox-2.1* 遺伝子の発現誘導は少なくとも遺伝子の転写の活性化によると結論できる。

次にこの遺伝子の転写制御にトポ II が関与しているのか調べるために、トポ II の阻害剤であるエトポシドの効果調べている。F9 細胞の分化誘導時にエトポシドを加えると、薬剤濃度を増すに従い4時間後の *Hox-2.1* mRNA の蓄積は減少し、100 μ M のエトポシドでは *Hox-2.1* 遺伝子の発現はほとんど見られない。一方、*hsp70* と β -アクトチンの mRNA 量は全く変化が見られない。同様の現象は異なるトポ II 阻害剤、mAMSA を用いても見られてい

る。エトポシドと m A M S A は構造および作用機構が大きく異なっており、両者で同じ現象が見られたことから、薬剤による *Hox-2.1* 遺伝子の発現抑制はトポ II が阻害された結果と想定される。次に *Hox-2.1* 遺伝子の発現が抑制されたのは、トポ II を阻害することにより *Hox-2.1* 遺伝子の転写が抑制されたためか、あるいは、m R N A の分解が促進されたためか、両可能性を検討するために Run-on transcription 実験及び、アクチノマイシン D を用いた実験を行っている。4 時間分化させる際に、エトポシドを加えた細胞及び加えなかった細胞から核を単離し、Run-on transcription の実験が行われた。両者を比較すると [32 P] C M P の核 R N A への取り込みに差はほとんど見られないが、*Hox-2.1* 遺伝子の転写活性はトポ II 阻害により未分化細胞の転写レベルまで抑制された。一方 *hsp70* や *c-fos*、ラミニン B 1、そして β -アクチン遺伝子の転写活性は、ほとんど影響を受けなかった。従ってトポ II 阻害による *Hox-2.1* m R N A 蓄積の減少は、少なくとも *Hox-2.1* 遺伝子の転写が抑制された結果と結論付けられている。7 時間分化誘導して *Hox-2.1* m R N A がある程度蓄積している時点でアクチノマイシン D を加え新たな m R N A の合成を阻害した場合、エトポシド添加の有無によらずそれ以降の m R N A 量の変化に差は見られない。従って一旦合成された m R N A の安定性には、トポ II を阻害することは影響しないと結論されている。

Hox-2.1 遺伝子の転写制御にトポ II が関与していることを示した後に、トポ II が作用して *Hox-2.1* 遺伝子の発現を制御している部位を D N A 上に特定するため、エトポシドを用いてトポ II による D N A 切断部位を *Hox-2.1* 遺伝子周辺に探している。エトポシドはトポ II と D N A の共有結合中間体を安定化させるため、除蛋白により生体内でトポ II が D N A 上作用していた部位を切断する。*Hox-2.1* 遺伝子を含む 2.3 k b の領域についてトポ II 切断部位を調べ、*Hox-2.1* 遺伝子の 3' 末端から 5.8 k b 下流に、ただ一ヶ所だけ切断部位を見い出している。この切断部位は、細胞の分化によらず常に存在する。この部位が *Hox-2.1* 遺伝子の発現を調節している部位であるかは、遺伝子導入などこの領域の機能解析により調べることが可能となった。

トポ II が F 9 細胞の分化に伴って *Hox-2.1* 遺伝子の転写を制御する機構として次のようなモデルを提唱している。一つは、*Hox-2.1* 遺伝子のプロモ-

ター活性が、DNAのスーパーコイルの程度による影響を強く受け、生体内で局所的にスーパーコイルの程度をトポIIが調節して遺伝子を活性化する機構である。実際、*in vitro* 転写系を用いた実験では発生分化に関わる遺伝子のプロモーターはスーパーコイル化の影響を強く受ける結果を得ており、真核生物のトポIIは、所属研究グループが精製したスーパーコイル化因子とトポIIが協調して*in vitro*でDNAに負のスーパーコイルを導入する活性を有している。もう一つの可能性は、トポIIが*Hox-2.1*遺伝子を含む不活性なクロマチンドメインを解いて活性化する機構である。遺伝学的にも生化学的にも、トポIIは細胞分裂に伴うクロマチンの高次構造変化に必要な酵素であることがすでに示されているので、遺伝子活性化に伴うクロマチンドメインの高次構造変化をトポIIが制御している可能性を提唱している。遺伝子の転写制御に果たすトポIIの役割を明かにしようとする試みは、これまでほとんど研究がなされていないクロマチンの高次構造変化による遺伝子発現制御の機構を解明する糸口になると想定される。

論文の審査結果の要旨

博士出願者の浦聖恵はマウスのホメオボックス遺伝子の発現制御にクロマチン構造が関与する可能性を考え、DNAのトポロジーを変えるトポイソメラーゼ I I の阻害剤が及ぼす H o x - 2 . 1 遺伝子発現への影響を解析している。具体的には、マウスのテラトカルシノーマ F 9 細胞をレチノイン酸とジブチル c AMP で分化誘導させることに伴いホメオボックス遺伝子 H o x - 2 . 1 遺伝子の転写が活性化する現象を見出し、この転写過程に対するトポイソメラーゼ I I 阻害剤エトポシドと m AMSA の効果を解析している。両者の阻害剤とも H o x - 2 . 1 RNA 合成へ阻害効果を与えるが、h s p 7 0、c - f o s、ベクターアクチン等の遺伝子からの転写については阻害効果は見られない。これらの結果より H o x - 2 . 1 遺伝子の発現制御にクロマチンの高次構造が関与する可能性を指摘している。これらの結果については核酸研究の国際学術誌 *Nucleic Acids Research* に発表を行っている。

上記の遺伝子発現制御の具体的機構を解明する目的でトポ I I 阻害剤存在下でのトポ I I による DNA 切断部位の検索を行い、H o x - 2 . 1 遺伝子の数 k b 下流に切断部位を見いだしている。

新しい実験系を確立するという困難さを克服しつつ、当初に立てたモデルを支持する実験結果を得ている。本人の努力と指導教官の指導の熱意を感じさせる論文である。当初に設定したモデルを超える研究への期待すら感じさせる。遺伝学専攻の博士号にふさわしい学位論文である。学位論文は明瞭で正確な英語で書かれており、博士としての十分な外国語の発表能力を備えている。