

氏名 影山裕二

学位（専攻分野） 博士（理学）

学位記番号 総研大甲第211号

学位授与の日付 平成8年3月21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 ショウジョウバエの転写因子FTZ-F1の転写制御  
機構の解析

論文審査委員 主査 教授 石浜 明  
教授 堀内 賢介  
教授 杉山 勉  
助教授 小原 雄治  
室長 山口 政光

（愛知県がんセンター研究所）

## 論文内容の要旨

多くの昆虫において、脱皮および変態の引き金となるのは、ステロイドホルモンであるエクジステロイドの生体濃度の一過的な上昇である。キイロショウジョウバエ *Drosophila melanogaster* では、20-ヒドロキシエクジソン(20HE)が主要な脱皮ホルモンとして同定されている。また、転写の活性化の指標となる唾腺染色体上のパフの消長の観察や、パフ上に存在する遺伝子の発現パターンの解析から、20HEによる遺伝子誘導の機構について以下のようなモデルが提唱されている。すなわち、20HE-受容体複合体は、early puffs と呼ばれるパフ上の遺伝子(early genes)を活性化し、early genesの遺伝子産物はlate puffsと呼ばれる別のパフ上にある遺伝子(late genes)を活性化する。一方、mid-prepupal puffsと呼ばれるパフはこれらearly puffsおよびlate puffsより遅れて形成され、20HEの濃度が上昇した後、下降してからはじめて誘導される。したがってmid-prepupal puffs上の遺伝子(mid-prepupal genes)の制御機構についてはより複雑な制御機構の存在が予想されるが、その詳細は明らかにされていない。

FTZ-F1は、核内ホルモンレセプタースーパーファミリーの一員である。また、現在クローン化が行われている唯一のmid-prepupal geneである。FTZ-F1遺伝子の遺伝子座である75CDに形成されるパフの観察から、FTZ-F1遺伝子は20HEの生体濃度が上昇した後、下降したときにはじめて発現すると予想されていた。実際に、脱皮、変態時において、20HEのピークの直後にFTZ-F1遺伝子が発現すること、およびカイコにおけるFTZ-F1遺伝子のカウンターパートであるBmTFZ-F1遺伝子が20HEの一過的な上昇により誘導されることが示されている。

FTZ-F1遺伝子の時期特異的転写制御機構を明らかにするため、様々な長さのFTZ-F1遺伝子の5'末端領域と、レポーター遺伝子(大腸菌*lacZ*遺伝子)との融合遺伝子を導入したキイロショウジョウバエの系統を作製し、抗 $\beta$ -ガラクトシダーゼ抗体を用いたウエスタンブロット法により、融合遺伝子の発現を定量的に解析した。その結果、1.6kbのFTZ-F1遺伝子5'末端領域を含む融合遺伝子が、FTZ-F1遺伝子と同様の時期特異的発現パターンを示したことから、この1.6kbの領域がFTZ-F1遺伝子の時期特異的発現に関わると考えられた。この領域に塩基配列特異的に結合する因子を検索するため、1.6kb領域内の制限酵素断片をプローブとし、後期胚および前蛹から調製した核抽出液を用いたelectrophoresis mobility shift assay (EMSA)を行った。その結果、時期特異的に検出される18個の因子と、時期を問わず常に検出される13個の遺伝子を検出することが出来た。時期特異的に検出される因子のうち、I-4、II-4、II-7と名付けた因子は胚発生後期および前蛹期の両方の時期に検出され、FTZ-F1遺伝子の制御因子の有力な候補であると考えられた。メチル化干渉法による解析の結果、I-4は6塩基の繰返し配列に結合し、II-4およびII-7は核内ホルモンレセプターの認識配列に結合することが明かとなった。II-4およびII-7は結合部位周辺の配列が似ているだけでなく、検出パターンもよく一致しており、II-4およびII-7が同一の因子である可能性が考えられたので、この可能性を検出するため、II-4、II-7の結合部位(それぞれsite IIa, site IIc)の合成オリゴヌクレオチドを用いた競合阻害実験を行った。site-IIaをプローブに用いたEMSAにsite IIcの非標識合成オリゴヌクレオチドを加える

と、加えた量に応じてII-4の結合が阻害された。これとは逆にsite IIcをプローブに用いたEMSAにsite IIaの非標識合成オリゴヌクレオチドを加えた場合も同様の阻害が観察された。これらの結果から、II-4およびII-7は同一の因子であると考えられた。3齢幼虫後期および前蛹から経時的に調製した核抽出液を用いてEMSAを行い、I-4およびII-4/II-7の検出される時期を詳細に調べたところ、I-4は20HEの生体濃度のピークに呼応して検出されはじめ、FTZ-F1遺伝子の発現する時期には消失していた。一方、II-4/II-7もI-4とほぼ同時期に検出され始めるが、I-4とは異なりFTZ-F1遺伝子が発現している時期にも検出された。これらの結果から、I-4がFTZ-F1遺伝子の早すぎる発現を抑制し、II-4/II-7がFTZ-F1遺伝子を活性化している可能性が考えられる。

## 論文の審査結果の要旨

キイロショウジョウバエ *Drosophila melanogaster*では、20-ヒドロキシエクジソン (20HE)が主要な脱皮ホルモンとして同定されている。20HE・受容体複合体は、唾腺染色体上の early puffs 上の遺伝子(early gens)を活性化し、early genes の遺伝子産物はlate puffs 上にある遺伝子(late genes)を活性化する。これらより遅れて形成されるmid-prepupaは、20HEの濃度が下降しはじめてから誘導される。核内ホルモン受容体スーパーファミリーの一員であるFTZ-F1は、これまでにクローン化されている唯一のmid-prepupal geneである。

本研究は、FTZ-F1遺伝子の、ホルモン支配による時期特異的転写制御機構を明らかにするため、その5'末端領域の転写制御シグナルと、そこに作用する転写制御因子の実体解明を目指したものである。レポーター遺伝子(大腸菌*lacZ*遺伝子)との融合遺伝子を導入したキイロショウジョウバエの系統を作製し、融合遺伝子の発現には、1.6kbのDNA領域がFTZ-F1遺伝子の時期特異的発現に関わることが判明した。この1.6kb領域内の制限酵素断片をプローブとし、後期胚および前蛹から調製した核抽出液を用いたelectrophoresis mobility shift assay (EMSA)を行った結果、時期特異的に検出される18個の転写因子候補と、時期を問わず常に検出される13個の因子候補を検出した。胚発生後期および前蛹期の両方の時期に検出された2つの因子候補が、FTZ-F1遺伝子の時期特異的制御因子の有力な候補であると推定した。さらに、メチル化干渉法による解析によって、それらのDNA結合配列を推定した。DNA結合活性を指標に分化過程を調査した結果から、ひとつはFTZ-F1遺伝子の早すぎる発現を抑制し、他方がFTZ-F1遺伝子を活性化している可能性を示唆した。

ショウジョウバエの発生分化のprepupa形成期の遺伝子発現制御機構は、殆ど解析されていなかったが、本研究によって、この時期の遺伝子群の転写調節に関与する因子の実体解明の確実な手がかりが得られた。分子遺伝学の基礎的素養を習得し駆使した研究で、しかも学位論文に相応しい先駆的研究でもある。論文構成も確かである。よって、学位を授与するに値する論文と判定した。