

氏 名 竹 丸 憲 一

学位（専攻分野） 博士(理学)

学 位 記 番 号 総研大甲第296号

学位授与の日付 平成9年9月30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 Transcriptional Coactivator MBFI That Connects
a Regulatory Factor and TATA Element-Binding
Protein

論 文 審 査 委 員 主 査 教 授 石 濱 明
教 授 廣 海 健
教 授 小 川 智 子
助 教 授 林 茂 生
教 授 半 田 宏 (東京工業大学)

論文内容の要旨

ショウジョウバエやカイコなどの体節形成や変態に関わる遺伝子の転写には、核内ホルモンレセプター型特異転写因子 (FTZ-F1およびBmFTZ-F1)が関与することが知られている。これらの組織特異的転写因子は、最終的には、転写装置の活性化をするが、その機構については、最近までは全く不明であった。申請者が所属した研究室では最近、これら特異転写因子と、転写装置に直接相互作用をする基本転写因子のひとつ、プロモーター-TATA配列を認識する基本転写因子TBP (TATA element-binding protein)間の、情報交換を仲介する新たな仲介因子MBF (multiple bridging factor)が同定された。カイコMBFには、二つの成分(MBF-1とMBF-2)が会合したヘテロ二量体の存在が知られている。申請者は、MBF-1の分子の実体を解析し、その基盤の上に、FTZ-F1特異転写因子による転写昂進作用機構を解明する目的で、本研究を実施した。

研究はまず、カイコからのMBF-1のcDNAの単離に始まり、その塩基配列の解析より、MBF-1が158アミノ酸残基よりなる蛋白質であることを示唆した。cDNAを大腸菌で発現させて純化したMBF-1は、カイコMBF-2とヘテロ会合体を形成した。TBPとの相互作用は、種間で保存性が高いことから、既にクローニングされている酵母TBPを用いて調べ、両者の相互作用を観察した。蛋白分子間の直接の相互作用は、更に、ショウジョウバエの*fushi-tarazu*遺伝子特異的転写因子FTZ-F1のDNA結合領域C端との間でも実証され、仲介因子と推定された機能に矛盾しなかった。三成分との分子間相互作用活性を実証した組換え体MBF-1を、HeLa細胞核粗抽出液中での転写系に添加すると、*fushi-tarazu*遺伝子の転写を特異的に昂進し、特異転写因子と基本転写因子の仲介因子としての役割が、純化成分を用いて試験管内で実証された。

次に、特異転写因子FTZ-F1、仲介因子MBF-2、及び基本転写因子TBP三成分それぞれとの相互作用をする、MBF-1分子上での接点のマッピングを実施した。その目的のために、MBF-1の各種の欠失変異体、アミノ酸置換突然変異体を作製し、それらを精製して、試験管内の分子間相互作用測定系で調査した。その結果、MBF-1分子の中央部、アミノ酸残基35-113領域が、FTZ-F1、MBF2およびTBPの三成分いずれとの相互作用にも必要な領域であることが判明した。この狭い領域に、全ての相互作用因子が接触し、蛋白分子間のシグナル伝達をしている様相が判明した。このように申請者は、この複雑な転写制御の蛋白間ネットワークを、現在利用できる各種の分子解剖操作を駆使して解明した研究として展開し解明した。

試験管内蛋白間相互作用解析研究の成果を基盤として、申請者はさらに、MBF-1の生体内での機能解析を目指した。その目的の為に、遺伝解析が出来る出芽酵母を材料とした。まず、出芽酵母MBF-1遺伝子の破壊株を作製したところ、酵母の生育には支障なかったが、特定遺伝子、例えば*HIS3*遺伝子の転写に欠損が認められた。*HIS3*遺伝子の発現欠損は、MBF-1遺伝子を発現プラスミドとして供給することで相補され、確かにMBF-1が、この遺伝子の発現に関係していることが証明された。ところで、*HIS3*遺伝子の転写には、良く解析された特異転写因子GCN4の関与が知られている。GCN4は、FTZ-F1がMBF-1と相互作用する領域に似た配列を、そのDNA結合領域にもつ

ている。酵母MBF-1が、GCN4とTBPの仲介をしている可能性が示唆されたので、GCN4との分子間相互作用を調べた。その結果、予測通り、両者の直接接触の結果が得られ、更にGCN4のDNA結合ドメインの変異体の中に、MBF-1との相互作用欠損変異が同定された。さて一方、MBF-1のある種の変異が、TBPの多量発現で補われることが観察されたので、MBF-1とTBPとの相互作用も支持された。この結果、先に試験管内の単離蛋白間の相互作用から推定したモデルが、実際に生体内でもおきていることが、遺伝解析から実証された。

申請者は、大学院在学の短期間で、所属した研究室に伝統のあったカイコに始まって、ショウジョウバエ、出芽酵母と目的に応じて、実験材料を使い分け、*in vitro*の分子実体の研究から*in vivo*の遺伝解析までを一貫して行った。その研究戦略は見事である。拠って、本論文は、学位を授与するに相応しいと判定された。

論文の審査結果の要旨

MBF (multiple bridging factor)は、シヨウジョウバエやカイコなどの体節形成や変態に関わる遺伝子の核内ホルモンレセプター型特異転写因子 (FTZ-F1およびBmFTZ-F1)と、プロモーターTATA配列を認識する基本転写因子TBP (TATA element-binding protein)間の情報伝達を仲介する因子と推定されていた。本研究は、転写仲介因子として推定されていたカイコMBF-1蛋白のcDNAクローニングに始まり、その蛋白の量産純化し、シヨウジョウバエ特異転写因子FTZ-1及び酵母TBPとの分子間相互作用の実証し、さらにMBF-1分子上の相互作用蛋白接点の同定を行った。その上で、出芽酵母のMBF-1を対象に遺伝解析を実施し、試験管内で実証した事実を、生体内でも検証した。申請者は、大学院在学の短期間で、所属した研究室に伝統のあったカイコに始まって、シヨウジョウバエ、出芽酵母と目的に応じて、実験材料を使い分け、*in vitro*の分子実体の研究から*in vivo*の遺伝解析までを一貫して行った。その研究戦略は見事である。拠って、本論文は、学位を授与するに相応しいと判定された。

なお、学位論文審査委員会は、公聴会の直後、公聴会での講演と討論の内容、学位論文の内容などを素材とした討論形式で、申請者の学力試験を実施した。審査員の質問には的確に応答し、また自らの研究に含まれる問題点についても妥当な考察をした。また、英語能力については、論文自体が英語で記載され、また既に研究成果の一部が英文論文として国際誌に掲載されているので、それらを参考に評価し、学位授与水準の能力を備えていると判断された。