

氏 名 刘 庆 信

学位（専攻分野） 博士(理学)

学 位 記 番 号 総研大甲第354号

学位授与の日付 平成10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 カイコ、クワコとヒマ蚕の MBF_2 に関する研究

論文審査委員 主 査 教 授 小原 雄治
教 授 廣海 健
教 授 桂 勲
助 教 授 上野 孝治
助 教 授 林 茂生

論文内容の要旨

ショウジョウバエのFTZ-F1は形態形成に関わる*fushi tarazu(ftz)*遺伝子の発現調節領域に塩基配列特異的に結合し、*ftz*遺伝子の発現をポジティブに制御する転写因子である。一方、カイコからFTZ-F1に相当する因子BmFTZ-F1もクローニングされた。in vitro 転写系を用いた解析から、BmFTZ-F1による転写活性化には、BmFTZ-F1と基本転写因子の間を仲介する2つのコアクチベーターMBF1とMBF2が必要なことが示された。MBF2とMBF1はヘテロダイマーを形成し、DNAに直接には結合しない。MBF1はMBF2、BmFTZ-F1とTATAボックス結合蛋白質TBPと相互作用し、BmFTZ-F1のDNAへの結合を安定化する。また、MBF2はTFIIAのbサブユニットと結合することによって転写を活性化する。こうして、FTZ-F1結合配列に特異的な転写活性化が起きる。MBF1は酵母からヒトまで保存されていたが、MBF2はカイコからクローニングされたcDNAの配列にもとづいて、データベースで検索しても、ホモログを見つけることはできなかった。MBF2蛋白分子中で配列が保存されている領域を鑑定するために、私はクワコとヒマ蚕のMBF2遺伝子をクローニングした。クワコとカイコのMBF2のアミノ酸のホモロジーは98%であるが、ヒマ蚕とカイコのMBF2のアミノ酸のホモロジーは50%しかない。カイコ、クワコとヒマ蚕のMBF2分子中で4つの領域が保存されていた。これら保存領域のうち2つは、MBF2とTFIIAの相互作用に必要であることが示されているMBF2の中央領域内に存在する。

MBF2の生体内での機能を明らかにする端緒として、カイコ発育におけるMBF2の発現と局在を解析した。まず、カイコの胚におけるMBF2の発現をウェスタンブロッティングにより解析したところ、MBF2は未受精卵から点青期(stage 26)にかけて存在しているが、孵化直前(stage 30)に消失した。MBF2、MBF1とBmFTZ-F1を同時に発現している胚(stage 22)を用いた抗体染色から、MBF2、MBF1とBmFTZ-F1は胚の神経細胞もしくはその近傍の細胞で発現していることが明らかとなった。

カイコの幼虫期における、ノーザンブロットハイブリダイゼーションとウェスタンブロッティング法によって、MBF2の発現を調べた。その結果、脂肪体と気管には発現していなかった。絹糸腺では、MBF2 mRNAはconstitutiveに発現しているが、MBF2蛋白質は各齢の途中から脱皮直前のD3期まで見られ、その後消失し、5齢の2日、3日にまた見られ、その後消失した。この間を抗体染色で追跡したところ、各齢途中からD2期までは細胞質に存在するが、D3期にのみ核に局在することが明らかとなった。MBF1のmRNAと蛋白質はすべての時期に発現していた。抗体組織染色から、MBF1はD3期にのみ核に局在し、D3期以外の時期に細胞質に存在した。BmFTZ-F1のmRNAと蛋白質はD3期から5齢2日まで発現していた。抗体染色によりBmFTZ-F1蛋白質は核内に存在し、MBF2、MBF1とBmFTZ-F1はD3期にのみ核に局在することが明らかとなった。さらに、免疫沈降反応によって、D3期にMBF2、MBF1とBmFTZ-F1は複合体を形成していることが示唆された。以上の結果から、MBF2は翻訳レベルでの発現制御をうけており、特定の時期に核へ移行し、MBF1とBmFTZ-F1と複合体を形成し、組織特異的および時期特異的転写制御に関わると考えられる。

論文の審査結果の要旨

真核生物の転写制御は基本転写因子と転写調節因子を通じておこなわれるが、最近、それらの間にコアクチベーターとよばれるDNA非結合因子が働く場合があることが明かにされ、コアクチベーターを介した遺伝子発現制御機構の重要性がクローズアップされている。劉慶信君はカイコの転写因子BmFTZ-F1のコアクチベーターMBF2の機能解明に向け、MBF2の発現パターンを中心とする研究をおこなった。BmFTZ-F1はショウジョウバエの形態形成に関わるftz遺伝子の発現をポジティブに制御する転写因子FTZ-F1のカイコ版である。カイコの利点を生かしたin vitro転写系を用いた解析から、BmFTZ-F1による転写活性化には、これと基本転写因子の間を仲介する2つのコアクチベーターMBF1とMBF2が必要なことが示され、これらの複合体形成のモデルが提出されてきた。

ノーザン解析の結果、胚期においてMBF2 mRNAに時期特異的な発現変動は見られなかった。ついで、MBF2タンパクに対する抗体を作成し、タンパクの発現パターンを調べた結果、MBF2は未受精卵からずっと存在し、孵化直前に消失した。幼虫期においては、絹糸腺ではmRNAの発現が見られたが、脂肪体と気管では発現が見られないという組織特異性を示した。絹糸腺でのタンパク発現を、MBF1及びBmFTZ-F1抗体も利用して経時的に詳しく調べたところ、非常に興味深いパターンが得られた。3齢から5齢幼虫にかけて、MBF1タンパクはほぼ同程度発現が見られたが、MBF2タンパクは発現が見られる時期と見られない時期があり、一方BmFTZ-F1は少しずつオーバーラップしつつMBF2とは逆転しているというものであった。

劉君はin vitro解析から導き出されたモデルを念頭に、この3つの発現が共通して見られる4齢D3期を中心に各タンパクの局在を調べた。転写因子であるBmFTZ-F1は常に核内に存在しているが、MBF1、MBF2共に通常核外（細胞質）に検出される。しかしBmFTZ-F1、MBF1、MBF2の3者の発現がみられた4齢D3期においては、MBF1、MBF2共に核に検出された。そして、4齢D3期の絹糸腺から免疫沈降実験をおこない、MBF2とMBF1、BmFTZ-F1のそれぞれが複合体を形成していることを示した。MBF2とMBF1が核には検出されない他の時期（4齢D1期）にはMBF2とMBF1が複合体を形成していることを示す免疫沈降の結果を得ている。これらのことから、4齢D3期の核内において、モデル同様の複合体が形成されている可能性を示唆した。このことの証明には押さえるべき点はまだ多々あるが、コアクチベーターが核移行というダイナミックな動きを伴って転写制御をおこなっている可能性を示唆した点で極めて興味深い発見である。両因子とも核移行シグナルは見られず、また低分子量タンパクであることから、核移行あるいは核でのretentionの機構は今後の重要な問題である。また、MBF2とBmFTZ-F1との少しずつのオーバーラップも発現微調整の点から非常に興味深い。

MBF2の機能解析のためには遺伝子操作が容易なショウジョウバエの系に持ち込む必要がある。MBF1は酵母からヒトまで保存されているが、MBF2はホモログが見つかっていない。そこで劉君は近縁のクワコとヒマ蚕のMBF2ホモログのcDNAのクローン化をおこなった。カイコMBF2とのアミノ酸配列相同性はそれぞれ98%、50%であったが、in vitroで発現させたタンパクにはカイコMBF2同様のin vitro系での転写活性化能が見られた。これらの近縁種クローンを用いて、ショウジョウバエホモログが得られることが待ち望まれる。

以上のように劉君は多数の実験を正確にこなし、コアクチベーターの働きについて興味深い発見をしたことは、この分野への寄与も大きく、学位授与の要件を満たすものと審査員一同判

断した。

公開発表では、多数の質問に誠実に答えた。ひき続き、5名の審査委員が劉慶信君と質疑応答をおこない、実験結果の解釈、博士論文及び関連分野での知識と考察力を質した。特に実験系の問題点、推論の検証法などについての理解の程度を確認し、学位にふさわしい学力を有していると判定した。英語力については、本学位論文の後半部分について国際誌に受理された論文原稿から十分な実力があると判定した。