

氏 名 相 田 紀 子

学位（専攻分野） 博士(理学)

学 位 記 番 号 総研大甲第432号

学位授与の日付 平成11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 ショウジョウバエ超らせん化因子はパフに局在し、遺伝子発現に
関与する

論 文 審 査 委 員 主 査 教 授 廣海 健
教 授 佐々木 裕之
教 授 石濱 明
助 教 授 林 茂生
教 授 菊池 韶彦（名古屋大学）

ころ1000℃以下の冷却期の温度しか得られなかったが、最高到達温度（～1100℃）での圧力条件を見積もると0.8～1.1 GPaというリーセルラルセン山と同様かあるいはやや高圧条件となった。このことは、ナピア岩体の高変成地域で少なくとも40km離れた2地域で、その変成条件が中～下部地殻の深度で1100℃を越えていたことを示している。

ナピア岩体の超高温変成作用の時期として提案されている28-29億年前（Harley and Black, 1997）と25億年前（Grew and Manton, 1979; De Paolo *et al.*, 1982）という2つの年代の是非を検討するために、電子線マイクロプローブを用いて超高温変成岩中のモナザイトとジルコンの結晶中に含まれるU, Th, Pbの定量分析をおこない、それらの元素の量比に基づく年代測定（CHIME法：Suzuki *et al.*, 1991; Yokoyama and Saito, 1996）をおこなった。その結果、全11試料から得られた有効年代値のほぼ全てが24～25億年前あるいはそれより若い年代を示し、3粒子（5分析点）からのみ27～29億年前という年代値が得られた。また、25億年前の年代値を示すモナザイトとジルコン粒子のいくつかは超高温変成作用の指標鉱物である大隅石中に包有されている。以上の結果から、28-29億年にも何らかの熱イベントが認められるものの、超高温変成作用の時期として25億年前説を支持する。

これまでに提案されているナピア岩体の超高温変成作用の熱源・テクトニックプロセスを有限微分法による深さ-温度分布の熱モデル計算（Peacock, 1989）を用いて検証したところ、以下のような結果が得られた。（1）大陸衝突に伴う地殻の厚化とそれとともに加熱（Ellis, 1987; Harley, 1989, 1991）だけでは1100℃まで加熱するのは困難。（2）高温マグマ（例えばアノーソサイト）の地殻中部への貫入（Sheraton *et al.*, 1980; Grew, 1980; Hensen and Motoyoshi, 1992）の場合は、1500℃に達するような高温のマグマが必要であり、その場合でも1100℃に達する領域はマグマの近傍に限られる。（3）リソスフェア下部の熱境界層の剥ぎ取りによるマントルアセノスフェアからの加熱（Harley, 1998）の場合、1100℃まで達することは十分に可能である。上記の結果に加えて、石英長石質の岩石が固体のまま超高温変成条件に達するためには、それに先立つ脱水作用・無水化のプロセスが必要である。

以上の考察に基づいてナピア岩体の形成発達過程をまとめると、まず石英長石質の岩石の脱水作用がおきた後、マントルアセノスフェアを熱源とする超高温変成作用が約25億年前におこり、中～下部地殻（0.6～1.1 GPa）が1100℃以上の高温条件に加熱されたと解釈される。

(1413)に結合した。HDEFを欠いた欠失変異体SCF (SCF-PKA Δ HDEF)で、同様にFar western すると、殆ど結合が見られなかった。この結果から、SCFとTopoisomeraseIIの相互作用には、TopoisomeraseIIのATPaseドメインの後半からDNA結合ドメインの前半に至るヒンジ領域があれば十分と結論した。

SCFが相互作用するTopoisomeraseIIのヒンジ領域をショウジョウバエ個体で強制発現させて内在性のSCFをトラップするために、GAL4-UASシステムでドライブされるヒンジ領域のトランスジェニックフライを作製した。発現させるヒンジ領域のC末端或はN末端側のいずれかには、FLAGTMタグと核移行シグナルを付けた。Actin5Cプロモータ下GAL4を発現するyw; Act5C17b/TM6Bの他、多数のGAL4発現システムのショウジョウバエと各々掛け合わせたが、次世代の個体には著しい形態変化は見られなかった。

最後に、C-46 (I)/yw; Df (3L)Ar 14-8/Act5C17bの個体を得て、熱ショックを37°C 1時間与え、hsp70 mRNAの発現量の変化をNorthern Blotによって観察した。コントロールyw; (3L)Ar 14-8/Act5C17bと比較して、約10%の発現量の低下が見られた。ヒンジ領域を強制発現させたラインで、SCFとFLAG付きTopoisomeraseIIヒンジ領域の相互作用が確認され、さらにhsp70 mRNAの発現量の低下が見られたことから、SCFがhsp70 mRNAの発現に関与することが示唆された。

論文の審査結果の要旨

転写や複製などDNAを基質とする反応の多くには、DNAの超らせん構造の変化が伴っている。真核生物Topoisomerase IIは、それ自身では、超らせんを弛緩する活性しか持たぬため、負の超らせん生成に関わる因子の存在が予想されていた。これまでに広瀬研において、カイコ絹糸腺から分離された負の超らせん生成活性はTopoisomerase IIとSCF (Super Coiling Factor) の複合体によるものであることが示されており、ショウジョウバエからもカイコscf遺伝子のホモログがクローニングされていた。相田さんはショウジョウバエscf遺伝子の解析を通してSCFの生体内における役割を研究した。

これまでに得られていたショウジョウバエscf cDNA がコードする蛋白質は、シグナルペプチドとER retention signal を持つことが予測されるため、生体内でSCF活性を持つ蛋白質ではない、と解釈されていた。相田さんは、5' RACE 法により、scf 遺伝子にはER 内在性蛋白質をコードするエクソンの中に、第2の転写開始点がある可能性を示した。Northern、Western blotting の解析と合わせると、ショウジョウバエscf 遺伝子は2つのmRNA を造り、1.8kb mRNA はER 内在性の機能未知の45kD蛋白質をコードし、1.6kb mRNA は30kD 核蛋白質をコードすると考えられた。細胞内局在が異なる2種の蛋白質が、プロモーターの選択的利用により作られる例は少なく、相田さんの発見は分子生物学的・細胞生物学的に高い意義がある。

次に、抗SCF抗体を用い、唾腺染色体状でのSCF蛋白質の分布を解析した。Topoisomerase IIは染色体上に一様に存在していたのに対し、抗SCF免疫反応物は特定のバンドに局在していた。この結果は、SCFがTopoisomerase IIの機能の一部のみを担っているという考えと合致していた。エクダイソン処理や熱ショック処理の条件下では、抗SCF免疫反応は転写が活性化されている染色体パフにのみ認められた。このような抗SCF免疫反応物の局在パターンは、SCFが転写やそれに伴う染色体・DNAの構造変化に何らかの役割を果たしていることを示唆している。

続いて、相田さんは遺伝学的手法を用い、SCFの生体内での機能を解析した。既存の突然変異やトランスポゾン挿入系統の中にはscf遺伝子の変異を見いだせなかったため、ドミナントネガティブ法によるSCF機能欠損系統を作成した。まず、抗体阻害法及びFar Western法により、Topoisomerase II分子内のSCF結合部位を決定した。この領域(hinge領域と呼ぶ)をショウジョウバエ生体内で発現誘導することができるベクターを作成し、GALA/UAS法により強制発現を行った。正常型個体では30kD SCFはすべてTopoisomerase IIに結合した形で存在しているのに対し、細胞質アクチン遺伝子のプロモーターを用いてhinge領域の強制発現を行った場合に

は、Topoisomerase IIに結合した核内30kD SCF はほとんど存在しなかった。このことは、強制発現したhinge 領域によってSCF のtitration が効率よく行われたことを示している。しかし、このような個体は致死とはならず、発生・パターン形成などに対する影響も観察されなかった。SCF titration の遺伝子発現に対する影響を調べるため、熱ショックに際して発現するhsp70 mRNA 量をNorthern Blot により定量した。その結果、hinge 領域を発現する系統では、熱ショック後に存在するhsp70 mRNA 量がコントロールに比べて約10%減少していることがわかった。これは、SCFをTopoisomerase II から引き離しても、生体内遺伝子発現はおおむね正常に起こることを示す重要な結果である。

相田さんは、分子生物学、細胞生物学、生化学、遺伝学など様々な手法を組み合わせ、SCFの生体内での役割を解析した。これまで、遺伝子発現にはTopoisomerase II/SCF 複合体によってつくられる負の超らせんが重要であろうと想像されていた。相田さんの実験結果の一部は予想に反するものであったが、それ故に高い価値を持っている。今後、彼女のデータを元に、SCFの機能とDNAの負の超らせん生成におけるTopoisomerase II の役割について、さらに検討が加えられるだろう。

以上の理由で相田紀子さんの論文は博士号授与の要件を満たすと審査員全員一致で判断した。