

氏 名 萱 嶋 泰 成

学位（専攻分野） 博士(理学)

学 位 記 番 号 総研大甲第636号

学位授与の日付 平成14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 ショウジョウバエ転写制御因子 FTZ-F1 の標的遺伝子 EDG84A の  
織特異的発現を決定する機構の解析

論 文 審 査 委 員 主 査 教授 廣海 健  
教授 上田 龍  
教授 荒木 弘之  
助教授 藤原 晴彦（東京大学）  
グループ 林 茂生（理化学研究所）  
ディレク  
ター

## 論文内容の要旨

完全変態昆虫の仲間であるショウジョウバエは、3齢幼虫後期のハイ・タイターのエクダイソンによって、幼虫から前蛹を経て蛹へと形態を変化させる。この時期の実際の分子メカニズムとして、形態形成に関与する多くの転写因子が、エクジステロイドのパルスに応じて時期特異的に発現することが現在までに明らかとなっているが、これら転写因子の多くは、体全体で発現する因子であり、エクダイソンのシグナルが異なった組織の細胞で特異的な遺伝子の発現を制御するためには、これら時期特異的制御を行う因子の他に領域特異性をもたらす別の要素が関与する必要があると考えられる。

この領域特異性を生み出す仕組みがどのようにして行われているのか知る目的で、変態期に発現し、蛹のクチクラタンパクをコードしている*EDG84A*遺伝子の発現制御の仕組みに着目した。*EDG84A*遺伝子は、Murata et al. 1996によって、前蛹期にエクダイソンのパルスの直後に発現する転写制御因子FTZ-F1の標的遺伝子の一つであることが示された。これらの発現パターンは、FTZ-F1が体全体で発現するのに対して、その標的遺伝子の*EDG84A*は体の前半部分表皮だけで発現することから、FTZ-F1は、この標的遺伝子の時期特異性を決める転写制御因子であり、組織特異性を決めるには、別の因子が作用すると考えられた。この組織特異性を生み出すメカニズムを知るために、いくつかの長さの*EDG84A*の5'末端領域と、レポーター遺伝子*LacZ*をつないだ融合遺伝子をもつトランスジェニックフライを作製した。前蛹期の*LacZ*の発現パターンについて観察するトランスジェニックフライレポーターアッセイを行ったところ、組織特異的な発現に関与する領域が複数見い出され、本来の発現部位である前半部分表皮における発現活性化には、転写開始部位より上流-193bpから-103bpの領域が必要であることが示された。以上の結果から、*EDG84A*遺伝子の前半部分表皮における発現活性化をうみだすメカニズムとして、発現時期を決めるFTZ-F1と、発現場所を決める-193bpから-103bpの領域を介して作用する未知の因子による転写制御モデルが考えられた。本研究では、AESAと名付けられたこの未知の因子が何であるのかを明らかにするために、さらにトランスジェニックフライ・レポーターアッセイをおこなって、作用領域について調べた。その結果、-174bpから+50bpまでのconstructを持つトランスジェニックフライでは前半部分表皮においてレポーター遺伝子の発現がみられたが、-151bpまでのトランスジェニックフライでは見られなくなった結果から、レポーター遺伝子の前半部分表皮における発現にとって、-174bpから-151bpまでの領域が必要であることが明らかとなった。一方、レポーター遺伝子の前半部分表皮における発現には、-174bpから-146bpまでの約30bpの領域があれば十分であることが判明し、この領域をAEE

Iと名づけ、さらに解析を行った。AEE Iを欠いたconstructを持つトランスジェニックフライを作製してレポーター遺伝子の発現をみたところ、脚・翅原基の表皮においてレポーター遺伝子の発現がみられたことから、脚・翅原基の表皮におけるレポーター遺伝子の発現にとって、AEE Iとは別の作用領域があることが判明した。次に、AEE Iを欠いたconstructをもとにして、上流をdeleteさせたconstructを作製し、これらをもつトランスジェニックフライでレポーターアッセイを行った結果、AEE Iとは別の作用領域がAEE Iのすぐ上流の19bpに存在し、前半部分表皮全体の転写活性化に関する作用領域であることが明らかとなり、AEE IIと名付けた。また、AEE IIの頭部・胸部の胴体部分での作用を抑える領域が、-408bpから-194bpの間にあることが明らかとなった。AEE Iの中から前半部分表皮における発現活性化にとって重要な配列を見出す目的で、AEEを6bpずつ5つの領域に分け、それぞれに塩基置換を施したconstructを持つトランスジェニックフライを作製し、レポーターアッセイを行った結果、前半部分表皮における発現活性化に関わる領域をさらに特定するとともに、AEE IIの働きを抑える作用領域がAEE Iの中に含まれている可能性を明らかにした。以上の結果より、前半部分表皮における発現活性化に関して、脚・翅原基の表皮と頭部・胸部の胴体部分表皮では異なった仕組みによって発現が促されていることが示唆され、そのための作用領域が複数存在し、その領域を介して作用すると考えられるいくつかの因子の特徴やその局在について予想した。

これら前半部分表皮における発現活性化の作用領域AEE I及びAEE IIに、配列特異的に結合する因子が前蛹期の核抽出液中に存在することを、EMSAによって明らかにした。

AEE Iに結合して作用因子となり得る候補としてAEF-1が挙げられ、EMSA競合実験によって結合因子であるのか検討したところ、AEF-1がAEE Iに結合するという証拠は得られなかった。

AEE I 及びAEE IIに結合する因子の探索を、Yeast One-hybrid法でのスクリーニングと、DNA結合因子データベースからの検索により行った。その結果、AEE Iに結合する因子として、p53 とX-MyT1が有力な候補となった。EMSAの結果、AEE Iに結合している因子のうちで主要なタンパク質は、報告されているショウジョウバエp53認識塩基配列を認識し得る可能性があることを明らかにした。X-MyT1のショウジョウバエホモログはCG4985遺伝子産物であり、CG4985の転写産物は前蛹期のcDNAライブラリーに存在することを明らかにし、Yeast One-hybrid法によってAEE IのDNA塩基配列に結合し得ることを明らかにした。

## 論文の審査結果の要旨

昆虫の変態期には成虫の器官形成に関与する数多くの遺伝子がホルモンシグナルに従って発現する。各器官に特異的な遺伝的プログラムがいかにしてホルモンによる時間的シグナルと統合され、時空間的に制御された遺伝子発現をもたらすのかはほとんどわかっていない。ショウジョウバエにおいて、変態ホルモンであるエクダイソンに応答して標的遺伝子に時間的情報を与える転写因子は、核内リセプターFtz-F1であることが知られていた。萱嶋君はFtz-F1の標的遺伝子の一つであるEDG84Aが変態期に体の前部だけで発現することに着目し、その転写制御領域を解析することによって、変態期における遺伝子発現機構の研究を行った。

EDG84A遺伝子の転写制御領域を同定するため、そのプロモーター領域をレポーター遺伝子lacZに結合した融合遺伝子を持つトランスジェニック系統を多数作成し、前蛹期でのlacZ発現パターンを解析した。その結果、Ftz-F1結合サイトと協調して変態期の体の前部での発現に十分である30bpの領域「AEE1」を同定した。また、変態期の核抽出液にAEE1に配列特異的に結合する因子が存在することを示し、そのような因子の候補を3つ同定した。さらに、AEE1以外にも領域特異的な転写制御に関与する3ヶ所の領域を見いだし、これらの制御領域の相互作用様式に関するモデルを提出した。

萱嶋君が得た結果は、遺伝子発現の時間的情報と領域特異性との統合機構の理解に貢献する貴重な知見である。以上の理由で萱嶋泰成君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。