

氏 名 阿 川 泰 夫

学位（専攻分野） 博士(理学)

学 位 記 番 号 総研大甲第678号

学位授与の日付 平成15年3月24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FTZ-F1遺伝子の発現制御因子p170の解析

論 文 審 査 委 員 主 査 教授 荒木 弘之  
教授 上田 龍  
教授 廣海 健  
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

昆虫の脱皮、変態はステロイドホルモンであるエクジステロイドによって制御されている。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(20-HE)が主要なホルモンとして作用し、種々のエクジステロイド応答性遺伝子の発現を調節することで脱皮・変態をコントロールする。Ashburner モデルによれば、20-HE が結合したエクジソンレセプターは、その標的遺伝子である初期遺伝子を活性化し、初期遺伝子産物は、その標的である後期遺伝子を活性化する一方で、初期遺伝子自身の抑制を行う。これらエクジステロイドに応答した遺伝子活性化の流れの中で、 $\beta$ FTZ-F1 遺伝子は、初期遺伝子、後期遺伝子よりもさらに遅れて発現する mid-prepupal gene に分類され、この遺伝子産物である $\beta$ FTZ-F1 は、核内レセプタースーパーファミリーに属する転写因子である。 $\beta$ FTZ-F1 は、脱皮の直前や変態期の特定の時期に存在するエクジステロイドパルス直後に誘導されることが知られる唯一の転写因子であり、この時期特異的な $\beta$ FTZ-F1 の発現がショウジョウバエの脱皮・変態において必須であることが示されている。これまでに、 $\beta$ FTZ-F1 転写調節領域に作用する因子 Factor I-4 の存在が予想され、この仮想因子の結合部位である site I-4 が同定されている。また、Factor I-4 活性は、高エクジステロイド時に、 $\beta$ FTZ-F1 の発現に先行して検出されるが、 $\beta$ FTZ-F1 発現時には検出されなくなる。一方、種々の $\beta$ FTZ-F1 転写調節領域と *LacZ* 遺伝子を融合したトランスジェニックフライによるレポーターアッセイの結果、site I-4 は低エクジステロイド時における $\beta$ FTZ-F1 遺伝子の高いレベルの発現に必要な cis-element であることが明らかとなっている。これらのことから、Factor I-4 は、 $\beta$ FTZ-F1 転写開始前に、 $\beta$ FTZ-F1 転写調節領域である site I-4 に結合して何らかの作用を行い、 $\beta$ FTZ-F1 の高いレベルの発現を可能とさせるという、現在までに知られていない機能を有する因子であることが予想された。そこで、Factor I-4 がどのような分子であり、またどのような分子機構によって $\beta$ FTZ-F1 の転写活性化を可能とするのかを明らかにすることを目的とし、本研究において Factor I-4 の同定と特徴付けを行った。

Factor I-4 の分子実体を知る目的で、site I-4 DNA 結合活性を指標に精製を行なった。まず、より効率的に Factor I-4 を得るために、ショウジョウバエ胚由来核抽出液(Nuclear Extract : NE)の調製法を検討した。その結果、非イオン性の界面活性剤を緩衝液に加えることにより、site I-4 DNA 結合活性の高い NE を得ることが出来た。次に、種々の変異あるいは部分欠失した site I-4 領域の DNA 断片を用いたゲルシフトコンペティションアッセイを行い、Factor I-4 が相互作用する DNA 塩基配列が site I-4 内の GAAA を含む 6 塩基の 3 回タンデムリピートであること、また、site I-4 領域の中で Factor I-4 と強固に相互作用するに十分な 25 bp の領域を明らかにした。そして、site I-4 DNA(25 bp)をタンデムに結合したものを Factor I-4 精製のためのアフィニティーリガンドとして用いた。アフィニティー精製に用いる site I-4 DNA の担体には、樹脂への非特異的なタンパク質の結合が少なく、DNA を高密度で固定化出来る Latex 樹脂を選び、site I-4 DNA 固定化樹脂を作成した。胚由来 NE には、多くの核酸結合性因子、プロテアーゼ、ヌクレアーゼ等の存在が予測されたことから、アフィニティー精製を行う前に、S Sepharose を用いて NE を粗分画した後、site I-4 DNA 固定化 Latex 樹脂を用いてアフィニティー

分画した。得られた溶出画分を変異型 site I-4 DNA 固定化樹脂を用いて非特異的な DNA 結合因子を除き、再び site I-4 DNA 固定化樹脂を用いて 2 回目のアフィニティー分画を行い、最終画分とした。精製過程の全画分を、ゲルシフトアッセイ法により Factor I-4 活性を測定するとともに、銀染色法でタンパク質を染色し、活性とタンパク質の染色の強度に相関の見られた分子量約 170 k のバンドを特定し、p170 と命名した。そして、この p170 の質量分析を行い、得られた結果をデータベースサーチしたところ、p170 は、ヒストンテイルへのメチルトランスフェラーゼ活性を持つことで知られている SET domain と、DNA 結合ドメインとして知られている zinc finger domain を持つ因子であることが判明した。

大腸菌で発現させた p170 zinc finger リコンビナントタンパク質を用いてゲルシフトコンペティションアッセイを行ったところ、NE に含まれる Factor I-4 活性と同様の塩基配列特異的結合活性を示したことから、p170 が Factor I-4 である事が強く示唆された。また、粗核抽出液と結合 DNA 断片を用いたサウスウェスタンブロットティング法及び、粗精製標品と結合 DNA による UV クロスリンクングアッセイにおいて、170 k 付近にバンドが確認されたことから、p170 が Factor I-4 であることがさらに支持された。次に、p170 の発現時期を知る目的で、三齢後期から前蛹期のステージングした全 RNA を調製し、ノーザンブロットティングを行った。その結果、調べたステージ全てに渡って検出される 2 本のバンドと、高エクジステロイド時に対応した 2 本の時期特異的に検出されるバンドが観察された。高エクジステロイド時に検出されるバンドが、ゲルシフトアッセイによって Factor I-4 活性が検出される時期に観察されることも、p170 が Factor I-4 であることを支持している。また、p170 mRNA がエクジステロイド濃度の上昇に対応して発現していることから、この遺伝子は新規の初期遺伝子に属する可能性が示唆された。さらに、RNAi 法により p170 の発現量を低下する事ができるトランスジェニック・フライシステムを作成したところ、複数の独立の系統が *FTZ-F1* 変異と同様の表現型を示したことから、p170 が  $\beta$ *FTZ-F1* 遺伝子を正に調節していることが示唆された。

以上の結果より、p170 は、高エクジステロイド時に zinc finger domain を介して site I-4 に塩基配列特異的に結合し、SET domain によって site I-4 近傍のヌクレオソームヒストンに転写活性化のためのメチル化を行っていることが考えられる。一般に、ヒストンのメチル化は安定とされており、p170 によって  $\beta$ *FTZ-F1* 遺伝子領域のヒストンがメチル化されると、エクジステロイド濃度の低下により Factor I-4 活性が消失した後もそのメチル化が維持され、 $\beta$ *FTZ-F1* 遺伝子の高レベルでの発現を可能とするというモデルが考えられる。ただし、p170 がメチル化を行う証拠は得られておらず、Factor I-4 が他の転写活性化因子をリクルートし、リクルート後は活性化因子と共に安定にプロモーター上に安定に存在し続けるか、あるいは、プロモーター上より解離するものの活性化因子がプロモーター上に残されるため、見かけ上 Factor I-4 活性消失後に転写活性化が生じるというモデルも考えうる。

## 論文の審査結果の要旨

昆虫の脱皮・変態はステロイドホルモンであるエクジステロイドによって制御されている。キイロショウジョウバエの  $\beta FTZ-F1$  遺伝子は、脱皮・変態期直前のエクジステロイドのパルス直後に時期特異的に誘導され、この時期特異的発現が脱皮・変態に必須である。 $\beta FTZ-F1$  遺伝子上流には高エクジステロイド時に結合する仮想因子 Factor I-4 の結合配列 site I-4 が存在する。一方、site I-4 は、低エクジステロイド時の  $\beta FTZ-F1$  遺伝子の高発現に必要なシスエレメントでもある。この site I-4 と Factor I-4 による  $\beta FTZ-F1$  遺伝子の発現調節機構を知る目的で、阿川君は Factor I-4 の同定と特徴付けを行った。

阿川君はまず Factor I-4 精製のため、核抽出液の調製法に改良を加えるとともに、ゲルシフトアッセイにより site I-4 の Factor I-4 との結合領域が GAAA を含む 6 塩基の 3 回タンデム配列 (site I-4A) であることを明らかにした。次に、S Sepharose により核抽出液を粗分画した後、ラテックスビーズに site I-4A DNA を結合した樹脂によりアフィニティー精製を行った。そして、ゲルシフトアッセイでの Factor I-4 結合活性とアフィニティー樹脂から溶出されてくるタンパク質のパターンから、推定分子量 170 k のタンパク質 (p170) を Factor I-4 の候補として、質量分析 (peptide mass finger-printing) を行った。その結果、p170 は Set ドメインと zinc finger を持つマウス Blimp-1 (B lymphocyte-induced maturation protein-1) のショウジョウバエホモログであることが分かった。そこで、P170 の Zinc finger ドメインを大腸菌で発現・精製した後、DNA 結合能を調べたところ、site I-4 DNA に特異的に結合した。一方、核抽出液と site I-4 DNA を用いたサウスウエスタンブロットティング法により 170 kDa の位置に結合活性が認められ、粗精製 Factor I-4 と site I-4 DNA による UV クロスリンクでは 190~200 kDa の位置にシグナルが観察された。さらに、Factor I-4 結合活性の検出できる時期に、特異的に観察される p170 転写産物が存在する。これらのことから阿川君は、Factor I-4 の結合活性が p170 によるものであると結論している。

阿川君はさらに、RNAi 法を用いて p170 の発現を抑えると、変態の過程に異常が生じることを示した。これは、 $FTZ-F1$  遺伝子の発現異常から説明できる現象であり、p170 がこの遺伝子の発現制御に関与していることを示唆している。最後に、 $FTZ-F1$  遺伝子の発現が Factor I-4 結合活性が検出できない時期に観察されることを説明するため、1) p170 の  $FTZ-F1$  遺伝子上流への結合が基本転写因子や他の転写活性化因子をリクルートし、Factor I-4 が解離後にこれら因子が活性化される、2) p170 が Set ドメインを持つことから、Factor I-4 がヒストンをメチル化することにより転写調節領域に印付けをし、これを指標に基本転写因子や他の転写活性化因子が Factor I-4 解離後に結合する、という 2 つのモデルを提案している。

本研究は、転写因子による発生過程の制御の一端を明らかにするものであり、今後の関連研究への貢献も大きく、本論文が学位授与の要件を十分満たすものと審査員一同判断した。