

学位論文の要旨

Abstract of Thesis

研究科 School	自然科学研究科
専攻 Division	地球生命物質科学
学生番号 Student No.	51429206
氏名 Name	宮川航一

学位論文題目 Title of Thesis (学位論文題目が英語の場合は和訳を付記)

キイロショウジョウバエ変態初期におけるエクダイソン誘導性遺伝子の転写制御機構の解析

学位論文の要旨 Abstract of Thesis

生物の多くは、その発生において適切なタイミングで各ステージの発生を進める制御を行っており、そのタイミングを制御するためのタイマー機構が存在すると考えられる。完全変態昆虫でも一定の環境下で飼育した際、採餌に特化した幼虫期に一定回数の脱皮を繰り返した後に蛹に転換し、一定期間後に羽化することで生殖に特化した成虫へとその形態を移行する。そして、これら各ステージへの移行は、ステロイドホルモンの一種であるエクダイソンの体内濃度の増減によって制御されていることが明らかとなっている。完全変態昆虫であるキイロショウジョウバエでは、終齢となる3齢幼虫後期に体内エクダイソン濃度の一過的な上昇により、囲蛹殻の形成が誘導され蛹の前段階である前蛹へとなる。この上昇した体内エクダイソン濃度は、摂氏 25℃の恒温条件下で飼育したキイロショウジョウバエにおいて、囲蛹殻形成後 (after puparium formation (APF)) 2~3 時間後に減少する。その後、およそ APF10 時間で再び体内のエクダイソン濃度が上昇することで、蛹化が誘導され APF 約 11 時間で蛹化が完了する。また、前蛹期だけでなくそれ以外の胚期や幼虫期、蛹期においてもエクダイソンの濃度変化とともに形態の変化が誘導されるため、エクダイソンの濃度変化を基軸とした発生制御が行われていると考えられる。所属研究室における前蛹期間決定の分子機構に関する先行研究により、エクダイソンパルスによって前蛹への移行が誘導され、前蛹期中後期にかけて時期特異的に発現する転写因子 FTZ-F1 が蛹化のタイミングを決定することが明らかにされている。そして、この *ftz-fl* 遺伝子は前蛹中後期の適切なタイミングで発現するよう転写抑制因子の *Blimp-1* によって制御されていることが明らかとなっている。*Blimp-1* 遺伝子は、エクダイソンでその発現が誘導される遺伝子で、体内エクダイソン濃度の一過的な上昇に伴い発現した *Blimp-1* は、前蛹初期から中期にかけて *ftz-fl* 遺伝子の転写を強力に抑制するが、その安定性は低く、体内エクダイソン濃度の減少に伴う新たな *Blimp-1* の供給停止後には、プロテアソーム系による速やかな分解を受けて消失することで *ftz-fl* 遺伝子の発現開始時期を決定していることが示されている。この FTZ-F1 と *Blimp-1* による発生タイミングの決定機構は蛹期でも同様に存在することからも、キイロショウジョウバエでは *Blimp-1* タンパクの不安定性を利用して発生ステージの移行のタイミングをコントロールするタイマー機構の存在が示されている。また、FTZ-F1 が発現する前蛹中後期には、成虫原基の急速な発達や *Edg84A* 遺伝子のような蛹のクチクラタンパクをコードする遺伝子が一過的に非常に急激に発現し、短時間に行われる急激な形態の移行を迅速に完了させる。

本研究では *Blimp-1* のタンパク質のどの部分かその安定性や転写抑制能に影響を及ぼし、*Blimp-1* を発生タイミング制御のタイマー機構の根幹たらしめるのかを明らかとすると共に、その後の発生ステー

ジの速やかな移行を下支えする転写活性化機構として、所属研究室で発見されていた染色体のペアリングを利用した未知の転写の超活性化機構についてその分子機構を探った。

1. Blimp-1 のドメイン機能解析

これまで所属研究室では、Blimp-1 による発生タイミング制御機構として Blimp-1 の分解とその転写抑制能について解析が進められてきたが、Blimp-1 タンパクのどの領域が転写抑制や不安定性に影響を与えているかについては、未だ精細な解析がなされておらず、十分な知見が得られていなかった。そこで、FLAG タグを付加した Blimp-1、あるいは任意の領域を欠失させた Blimp-1 を熱ショックプロモーター下で任意のタイミングで発現させることができる transgenic 系統を用いて、発現誘導させた Blimp-1 を Western blot により継時的に検出し、分解速度を調べることで、Blimp-1 タンパク質内のどの領域が Blimp-1 の安定性に影響を与えているかを調べた。その結果、1203 a.a.から成る Blimp-1 の Proline rich な領域の255-853 a.a.の領域内の複数の領域によって分解が促進されることを明らかにすると共に、Blimp-1 の分解にマイクロペプチドの Polished rice が関与することを示した。これらのことから、Blimp-1 の分解の機構が単純ではないことを示し、発生および遺伝子発現のタイミング決定のために複雑な制御機構が存在することが推定された。次に、蛹化誘導に関与する FTZ-F1 の発現直前に各 Blimp-1 を発現させることで、FTZ-F1 の発現タイミングにどのような影響が生じるかを観察した。その結果、種間で保存された領域で Short conserved 領域と名付けた領域 ($\Delta 51-129$ a.a.) と Proline rich な領域の一部分に転写抑制能を司る領域が存在することを示す結果が得られ、多細胞動物間でよく保存された Blimp-1 の転写抑制機構についての新たな知見となった。

2. 染色体ペアリング依存的な転写超活性化 (PDSA) 機構の解析

ショウジョウバエの体細胞における相同染色体の核内トポロジーは非常にユニークで、核内で広くペアリングをしている。この相同染色体のペアリングは遺伝子の転写制御にも影響を与えており、染色体ペアリング依存的な遺伝子のサイレンシングや、アレル間で転写制御部位の異なる部位に変異が存在する時にその転写をレスキューする transvection という現象が知られている。これとは異なる染色体ペアリングが引き起こす第3の転写制御機構として染色体ペアリング依存的な転写の超活性化 (PDSA) 機構についてその分子機構の解析が所属研究室で行われてきた。先行研究では、*Edg84A-LacZ* 遺伝子が PDSA を受けることが明らかになり、さらに *Edg84A-LacZ* 遺伝子が近傍にある場合に *mini-w* 遺伝子が PDSA を受けることや、PDSA を引き起こす一部のエンハンサーが同定されると共に、PDSA が transvection やペアリング依存的なサイレンシング同様に Polycomb の存在によりサポートされることが示されているが、どのようにして PDSA が起こるのか明らかでない。そこで、本機構は変態期に急速に発現する遺伝子の重要な遺伝子発現制御機構と考え、PDSA の機構をさらに詳しく調べることにした。その結果、相同染色体のペアリングに必要な Polycomb Group 遺伝子に属する *Zeste* やインシュレーター構成因子をコードする遺伝子の変異体を用いた解析により、PDSA が transvection と類似の機構をベースとして引き起こされるという以前からの考えを補強した。また、本研究の解析途中の2016年に *5xUAS-PrP* 遺伝子が PDSA による制御を受けることが報告されたが、これと類似の遺伝子構造をもつ *3xP3-RFP* 遺伝子も PDSA の制御を受けることを発見した。これらの2つプロモーターは、Gal4 あるいは *Eyless* の転写因子結合配列をタンデムに持つエンハンサーと *hsp70* の basal promoter が融合された構造をしているが、所属研究室での先行研究では、*hsp70* の basal promoter と *Edg84A* の basal promoter を置換した際に PDSA は消失することが示されていた。これらのことから、*hsp70* basal promoter には PDSA を単体で引き起こす能力は存在しない、また、これら2つの遺伝子が PDSA を引き起こす要因は、5xUAS、3xP3 エンハンサーにあると考えられた。また、*Edg84A-LacZ* 遺伝子の転写活性化を行う FTZ-F1 の認識配列を一部改変した場合に、*Edg84A-LacZ* の PDSA は消失したが、同様に FTZ-F1 結合配列が無傷でも basal promoter が適切なものでない場合には PDSA は消失した。このことから、単一の転写因子の結合が PDSA を引き起こすのではなく、複数の転写因子が適切に結合したエンハンサーでなければ PDSA は引き起こされないと考えられた。また、これまで示してきた PDSA エンハンサーの構造の比較から、PDSA

Name	宮川 航一
------	-------

は転写因子結合配列が高密度に配置されたエンハンサー依存的に引き起こされることが示唆された。このようなエンハンサー構造が PDSA を引き起こす原理として、まず核内で自由運動を行う転写因子が超巨大分子で運動性の低い DNA のエンハンサーに結合することで転写因子のエントロピーの低下が引き起こされる。次にエントロピーが減少した転写因子が高密度に結合したエンハンサー領域とペアリングすることによって転写因子や転写共益因子等が機械的に濃縮される。これにより液-液相分離の必要条件である分子運動の低下や分子濃度の上昇が満たされることによりスーパーエンハンサー様の液滴が形成され転写効率が向上する仮説を考えた。この仮説を実証するために、まず液-液相分離の阻害剤である 1,6-hexandiol をショウジョウバエ前蛹の囲蛹殻下に投与したところ、*Edg84A-LacZ* の PDSA は完全に崩壊し、PDSA 機構では液滴が形成することが示唆された。次に、スーパーエンハンサーに集積される Brd4 や Med12 等コアクチベーターの遺伝子の変異体でも *Edg84A-LacZ* の発現は消失した。これらのことから、PDSA は DNA 配列依存的な液-液相分離誘導による転写ファクトリー形成によって転写効率を向上させている可能性が示唆された。また、一部の PDSA を起こすエンハンサーは、インシュレーター結合配列の影響を受けず、エンハンサー-プロモーター間の距離非依存的に標的遺伝子の転写を活性化させる遠位エンハンサー様の性質を持つことが明らかとなった。さらに、PDSA は性染色体常染色体であるかを問わず様々な染色体の部位で PDSA 観察され、ショウジョウバエのゲノム全体で起こりうる制御機構と考えられた。