学位論文題名

Transcriptional activation of the Drosophila melanogaster glucose-6-phosphate dehydrogenase gene by insertion of defective P elements.

(動く遺伝子P因子の挿入による近傍遺伝子の転写活性化機構の研究)

学位論文内容の要旨

動く遺伝子は、キイロショウジョウバエではゲノムの約10%を占め、その転移はゲノム、染色体構造の変化を引き起こすとともに、挿入部位周辺の遺伝子の発現に影響を及ぼすことが知られている。近年、我々の研究室ではキイロショウジョウバエのグルコース6リン酸脱水素酵素(G6PD)遺伝子発現の調節機構を遺伝学的に解析している過程で、恒常的に高いG6PD活性を示す三つの変異系統を得た。その後の解析により、これらの系統では、二種の内部欠失型P因子(1154bpKP、609bpコアP)が三つ(KP-コアP-KP)、あるいは四つ(KP-コアP-コアP-KP)タンデムにG6PD遺伝子上流に挿入していることが判明し、これらの内部欠失型P因子挿入がG6PD遺伝子の過剰発現の原因であると考えられた。これまでの報告では、その挿入により近傍遺伝子の過剰な発現を引き起こす動く遺伝子はすべてレトロウイルスと類似した構造を持つレトロトランスポゾンであり、そのLong terminal repeat(LTR)内のエンハンサーが近傍遺伝子の転写を促進していると考えられている。しかし、P因子はこのレトロトランスポゾンには属さず、その過剰発現を引き起こす機構はこれまで報告されたものとは異なると考えられる。本研究は、このP因子が近傍遺伝子の発現を促進する機構について*in vivo*, *in vitro*のレベルで解析を行った。

第一章では、G6PD遺伝子のクローニングについて述べた。G6PDの一部のアミノ酸配列に基づき17 baseのoligonucleotide mixturesを合成後、この17 base oligonucleotide mixturesをプローブにキイロショウジョウバエのゲノミックライブラリーの 6×10^4 ブランクをスクリーニングした。その結果、最終的に同じ13 kb EcoRIフラグメントを持つ三つのクローンを得た。そして、このクローンDNAを

プローブに用いた唾腺染色体への in situ hybridizationにより、この DNA が既に報告されている G 6 P D 遺伝子の染色体上の位置 (18E) に結合することを示した。また、このクローン DNA に特異的にハイブリダイズした mRNA の in vitro 翻訳産物が、G 6 P D 抗体と特異的に結合することも示した。以上の結果から、このクローン DNA が G 6 P D 遺伝子を含んでいることが確認された。

第二章では、三つの高 G 6 P D 活性変異系統、三つの野性型復帰系統、一つの野性型系統を用い、P 因子挿入による転写産物への影響、及び、G 6 P D 遺伝子のクロマチン構造の変化を調べた。その結果、①二種の P 因子の挿入により G 6 P D mRNA 量の上昇が起きていること、②全系統とも、G 6 P D mRNA の長さ、転写開始点の位置が同じであること、③三つの高活性変異系統とも、G 6 P D 遺伝子の転写開始点の 29bp 上流に P 因子が挿入していること、④その転写開始点と挿入部位の間に存在する GC-rich な配列は、ハウスキーピング遺伝子の発現調節に重要と考えられているコンセンサス配列と強いホモロジーを示すこと、⑤ P 因子挿入部位周辺のクロマチン構造の変化を DNase I hypersensitive (DH) sites の解析により調べた結果、P 因子挿入によって G 6 P D 遺伝子内の既存の DH sites に変化は現れないが、挿入したコア P 内に新たに二つの DH sites が見られることが明らかになった。さらに本研究とは別に、共同研究者により、野性型復帰系統ではコア P が失われるか、あるいは、コア P の一部が欠損していること、またコア P 内の 80bp DNA 断片に特異的に結合する核タンパク質が存在することが報告されている。以上の結果から、G 6 P D 遺伝子の転写開始点の 29bp 上流に挿入したコア P に結合している転写調節タンパク質が、挿入点より下流の GC-rich な配列を含む G 6 P D 遺伝子プロモーターを活性化させていると考えられた。

第三章では、先の推測を in vitro 転写系を用いて確かめた。まず [K P - コア P] DNA、及び、コア P の 80bp DNA を G 6 P D 遺伝子上流に挿入した鑄型 DNA を作成し、この両 DNA が G 6 P D 遺伝子の転写を促進するか否かを調べた。その結果、[K P - コア P] DNA は転写を促進したが、80bp DNA は殆ど促進しないこと、[K P - コア P] DNA はその挿入の向き、G 6 P D 遺伝子との距離に関わらず転写を促進することが分かった。このことから、[K P - コア P] DNA は、G 6 P D 遺伝子のエンハンサーとして機能していると結論した。さらに、80bp DNA のみでは殆ど転写の促進が見られなかったことから、[K P - コア P] DNA 内にコア P の 80bp DNA と協調し

て転写促進を行う領域が存在することが予想された。そこで、様々な領域を欠失させた[KP-コアP]DNAをG6PD遺伝子上流に挿入し、転写促進に及ぼす影響を調べた。その結果、コアPの80bp領域(region C)以外にKP内の2つの領域(regions A、B)が、転写促進に関与していることが分かった。さらに、ゲル・シフト解析により、region Cと同様にregions A、Bに結合する核タンパク質が存在することも分かった。

一方、[KP-コアP]DNAをactin 5C遺伝子上流に挿入させた場合、actin 5C遺伝子の転写の促進は起こらなかった。このことから、G6PD遺伝子のプロモーターの一部が[KP-コアP]から成るエンハンサーと相互作用していることが予想された。そこで、様々なG6PDプロモーター領域をactin 5C遺伝子上流につないだfusion DNAを作成し、[KP-コアP]エンハンサー挿入によりこのDNAの転写が促進されるか否かを調べた。その結果、転写の促進にはG6PD遺伝子転写開始点周辺の20bp DNA(region D)の存在が必要であることが分かった。この20bp DNAは、先の章で述べたGC-rich領域の一部に位置している。

以上の結果から、P因子による挿入近傍遺伝子の転写活性化機構に関して、以下のモデルを提案した。1)G6PD遺伝子上流に挿入したKP、コアP内のregions A、B、C各々に転写調節タンパク質が結合する。2)この調節タンパク質は、G6PD遺伝子プロモーター内のregion Dに結合している別の転写調節因子と相互作用する。3)この相互作用により、G6PD遺伝子内に結合したRNA polymerase IIが活性化される。本研究でG6PD遺伝子の発現調節に重要な働きをすることが明らかになったKP、コアPは、野生集団のキイロショウジョウバエのゲノムにも存在することが報告されていることから、GC-rich regionを含む遺伝子では野生集団でも転写レベルの変異が見られる可能性がある。さらに、本研究は複数の動く遺伝子の組合せが新たな転写調節配列を作り得ることを初めて示した。これまで動く遺伝子の生物学的意義に関して、単にホストに寄生するselfish DNAとする考えと、動く遺伝子を持つことにより突然変異率が上昇し、大きな環境変動のもとではホストの適応度が上昇し得るとする考えが示されている。本研究の結果は、P因子挿入により起きた変異が直接ホストの生存に有利であることを示すものではないが、しかし、動く遺伝子が遺伝子発現に及ぼす影響は従来考えられているより多様であることを示しており、単純に「動く遺伝子 = selfish DNA」と結論は出来ないことを示唆している。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 片 桐 千 明
副 査 教 授 堀 浩
副 査 助 教 授 木 村 正 人

学 位 論 文 題 名

Transcriptional activation of the Drosophila melanogaster glucose-6-phosphate dehydrogenase gene by insertion of defective P elements.

(動く遺伝子P因子の挿入による近傍遺伝子の転写活性化機構の研究)

動く遺伝子は、キイロショウジョウバエのゲノムの約10%を占め、その転移はゲノム、染色体構造の変化を引き起こすとともに、挿入部位周辺の遺伝子の発現に影響を及ぼす。近年、キイロショウジョウバエの高いグルコース6リン酸脱水素酵素(G6PD)活性を示す変異系統を分子生物学的に解析した結果、G6PD遺伝子上流に二種の内部欠失型P因子(1154bpK P、609bpコアP)の挿入がみられ、このP因子がG6PD遺伝子過剰発現を起こしているものと考えられた。これまでの報告から、レトロトランスポゾンが挿入した場合、そのLong terminal repeat内のエンハンサーが近傍遺伝子の転写を促進することが知られている。しかし、P因子はこのレトロトランスポゾンには属さず、その過剰発現を引き起こす機構はレトロトランスポゾンとは異なると考えられた。申請者は本研究の中で、このP因子が近傍遺伝子の発現を促進する機構について以下の分子生物学的解析を行った。

(1)G6PD遺伝子のクローニング: G6PDのアミノ酸配列から遺伝子塩基配列を推定し、17 baseのoligonucleotide mixturesを合成後、このDNAをプローブに用いてキイロショウジョウバエgenomic libraryからG6PD遺伝子のクローニングを行った。

(2)P因子挿入による転写産物への影響、及び、G6PD遺伝子のゲノム構造、クロマチン構造の変化の解析: 本解析から、①P因子挿入によりG6PD遺伝子の転写上昇が起きる、②G6PD mRNAの質的な変化はない、③P因子はG6PD遺伝子の転写開始点から29bp上流に挿入しており、その挿入部位と転写開始点の間には、ハウスキーピング遺伝子の発現調節に重要なGC-rich配列が見られる、④DNase I高感受性

領域(DH site)の解析によってクロマチン構造の変化を調べた結果、P因子挿入によるG6PD遺伝子内の既存のDH sitesの変化は見られないが、挿入したコアP内に新たにDH sitesが出現することが示された。さらに同時期、共同研究者により⑤コアP内に特異的に結合する核タンパク質が存在することが報告された。以上の結果から、G6PD遺伝子上流に挿入したコアPに結合する転写調節タンパク質が、GC-rich配列を含むG6PD遺伝子プロモーターを活性化させているものと推測した。

(3)(2)の推測を確認するため、*in vitro*転写解析、および、ゲル・シフト解析を行った。本解析から、⑥KP、コアP各一個を含む[KP-コアP]DNAがG6PD遺伝子のエンハンサーとして機能する、⑦コアP内の80bp領域(region C)に加え、KP内の二つの領域(regions A、B)が、転写促進に関与する、⑧region A、B、C各々に結合する核タンパク質が存在する、⑨[KP-コアP]エンハンサーによる転写の促進にはG6PD遺伝子転写開始点周辺の20bpDNA(region D)が必要であることを明らかにした。この20bpDNAは、(2)のGC-rich配列の一部に位置している。

以上の結果から、申請者はP因子による挿入近傍遺伝子の転写活性化機構に関して、以下のモデルを提案した。1)G6PD遺伝子上流に挿入したKP、コアP内のregions A、B、C各々に転写調節タンパク質が結合する。2)この調節タンパク質は、G6PD遺伝子プロモーター内のregion Dに結合している別の転写調節因子と相互作用する。3)この相互作用により、G6PDプロモーター内に結合したRNA polymerase IIが活性化される。また、KP、コアPの両因子は、野生集団のキイロショウジョウバエのゲノムにも存在することが報告されていることから、他のハウスキーピング遺伝子でも転写レベルの変異が見られる可能性が考えられた。さらに、本研究は複数の動く遺伝子の組合せが新たな転写調節配列を作り得ることを初めて示した。これまで動く遺伝子の生物学的意義に関して、単にホストに寄生するselfish DNAとする考えと、動く遺伝子を持つことにより突然変異率が上昇し、大きな環境変動のもとではホストの適応度が上昇し得るとする考えが示されてきた。本研究の結果は、P因子挿入により起きた変異が直接ホストの生存に有利であることを示すものではないが、しかし、動く遺伝子が遺伝子発現に及ぼす影響は従来考えられているより多様であることを示しており、単純に「動く遺伝子= selfish DNA」と結論は出来ないことを示唆している。

申請者に対する最終試験は、7月26日論文の口頭発表と質疑応答の形で行われ、

満足すべき結果であった。従って審査員一同は、申請者が博士（理学）の学位を受けるに十分な資質を有するものと認めた。