

学位論文題名

Regulatory Mechanisms and Functions of Ascidian NF- κ B/Rel Family Proteins

（ホヤ NF- κ B/Rel ファミリーの調節機構と機能に関する研究）

学位論文内容の要旨

1. はじめに

NF- κ B /Rel ファミリーに属する遺伝子は、当初、免疫グロブリン κ 軽鎖遺伝子のエンハンサー領域に結合する転写因子として同定され、現在までに多数の同属遺伝子が単離されている。これら転写因子の N 末端に約 300 アミノ酸残基の相同性領域が存在し、Rel Homology Domain (RHD)と呼ばれている。RHD は、DNA との結合や、制御因子である I κ B との相互作用、二量体の形成に重要な役割をはたしている。

NF- κ Bの活性化機構はファミリー間で高度に保存されている。既知の NF- κ B 分子種は全て核局在化シグナル (NLS) を有しているが、I κ B と結合することで NLS が隠され細胞質に局在する。サイトカイン等の刺激により I κ B はリン酸化され、直ちに 26S プロテアソームにより分解される。その結果、NLS が露出し、NF- κ B は核内へ移行して 標的遺伝子の転写を促す。さらに、ファミリータンパク質のリン酸化等を紹介する調節機構等も明らかにされている。

当研究室の嶋田によって、原索動物マボヤ (*Halocynthia roretzi*) から NF- κ B /Rel ファミリーに属する 2 つの cDNA クローン (As-rel1 と As-rel2) が単離された。As-rel1 は、RHD と NLS を有し、典型的な NF- κ B /Rel ファミリーに属するが、As-rel2 は、As-rel1 と完全に同一な RHD を有するが、C 末端側の配列を欠失しており、NLS を持たないユニークな構造をしている。これまでの研究から、As-rel1 が初期発生過程の脊索形成に関与することが示唆されている。しかし、As-rel1 と As-rel2 の相互作用の機構や脊索形成における役割に関していまだ不明な点が多く残されている。

本研究では、発生における NF- κ B /Rel ファミリーの役割を解明するために、マボヤの As-rel1 と As-rel2 との相互作用の機構、I κ B による調節機構、さらに、ホヤ発生過程における NF- κ B/Rel ファミリーの機能を解析し、新知見を得た。

2. マボヤ NF- κ B/Rel ファミリー As-rel1 と As-rel2 の調節機構の解析

As-rel1 と As-rel2 の RHD は mRNA 上で同一であることから、両者が alternative splicing により生成すると考えられる。そこで、マボヤのゲノム配列を解析し、As-rel1 と As-rel2 が splice variant であると結論した。

次に、培養細胞にそれぞれ単独あるいは両者を過剰発現して免疫沈降実験を行い、As-rel1 がホモダイマーを、As-rel1 と As-rel2 がヘテロダイマーを形成することを明らかにした。また、細胞内局在性を解析した結果、As-rel1 単独では核に、As-rel2 単独では細胞質に局在し、両者を共発現させると、As-rel1 と As-rel2 が共に核に存在することが明らかになった。次に、転写活性化能について解析した。As-rel1 の場合は、濃度依存的な転写活性化が観察されたが、As-rel2 の場合には、転写活性化が観察されなかった。一方、両者を共発現した場合、As-rel1 の転写活性化が As-rel2 によって抑制された。このことは、As-rel2 が As-rel1

の転写活性に対して抑制作用を有することを示している。

次に、NF- κ B/Rel ファミリーの制御因子である I κ B について解析を行った。最近構築されたカタユレイボヤ (*Ciona intestinalis*) EST データベースを検索し、I κ B ホモログ (Ci-I κ B) が検出されたので、その塩基配列を決定した。Ci-I κ B を用いて、As-rel1 と As-rel2 との相互作用を解析した。過剰発現後の免疫沈降実験から、Ci-I κ B が As-rel1 および As-rel2 のそれぞれと複合体を形成することが明らかになった。細胞内局在性を解析した結果、3 者を共発現させた場合には、As-rel1 は核に、As-rel2 は細胞質に存在することが明らかになった。これは、As-rel2 が Ci-I κ B を細胞質でトラップすることによって、As-rel1 が核内に移行できたためと考えられる。転写活性化能の解析でも、Ci-I κ B による As-rel1 の転写活性化能の阻害が As-rel2 により回復することが明らかになった。以上の結果から、As-rel1 の核内移行および転写活性化能が splice-variant である As-rel2 により調節されるという新しい機構を提案した。

3. 発生過程におけるカタユレイボヤ NF- κ B/Rel ファミリーの機能解析

ホヤは系統進化的に脊索動物と無脊椎動物の中間に位置し、その幼生体は脊索を有する。ごく最近、カタユレイボヤの全ゲノムが解析され、そのデータベースにおいて、マボヤと同様に NF- κ B/Rel ファミリー (Ci-rel1 と Ci-rel2) が存在し、それらも alternative splicing により生成することが明らかにされた。また、カタユレイボヤでは、遺伝子導入が容易であること、上記のように制御因子 Ci-I κ B が存在することなどの利点を考慮して、カタユレイボヤを用いて、発生過程における NF- κ B/Rel ファミリーの機能について解析した。

初めに、カタユレイボヤの各発生ステージにおける Ci-rel1、Ci-rel2 および Ci-I κ B 遺伝子の発現を *in situ* ハイブリダイゼーション法により解析した。次に、Ci-I κ B に対するモルフォリノオリゴヌクレオチド (M-oligo-Ci-I κ B) をホヤ胚に注入し、Ci-I κ B をノックダウンした時の発生に対する影響を解析した。その結果、M-oligo-Ci-I κ B を注入した胚では、正常な尾芽胚で起こる脊索細胞の挿入に異常が起きていることが明らかになった。即ち、Ci-I κ B をノックダウンさせたことにより、Ci-rel1 が過剰に働き、脊索形成に異常が起きたと考えられる。また、Ci-Bra (*Ciona Brachyury*: 脊索特異的に発現する遺伝子) のプロモーターの下流に GFP と各遺伝子を連結させた発現プラスミドをホヤ胚に導入し、各 GFP 融合タンパク質の胚での発現を解析した。その結果、GFP-Ci-rel1 が神経胚期に特異的に核内に移行することが明らかになった。GFP-Ci-rel1 発現胚では初期尾芽胚期において Ci-I κ B の発現が誘導されることも明らかになった。この後者の結果と、ゲノム上で Ci-I κ B の上流に Ci-rel 結合配列が存在することから、初期尾芽胚期において Ci-rel1 の活性化がおきていると考えられる。以上の結果から、Ci-rel が尾芽胚期において脊索細胞の挿入を調節していると考えられる。

4. まとめ

- (1) NF- κ B/Rel ファミリーに属するマボヤ As-rel1 の核内局在性と転写活性化能が splice variant である As-rel2 によって調節されているという新しい機構を提案した。
- (2) NF- κ B/Rel ファミリーに属するカタユレイボヤ Ci-rel が初期発生過程において脊索細胞の挿入に関与していることを明らかにした。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 横 沢 英 良
副 査 教 授 鈴 木 利 治
副 査 助 教 授 松 岡 一 郎
副 査 助 教 授 川 原 裕 之

学 位 論 文 題 名

Regulatory Mechanisms and Functions of Ascidian NF- κ B/Rel Family Proteins

(ホヤ NF- κ B/Rel ファミリーの調節機構と機能に関する研究)

NF- κ B/Rel ファミリーは、N末端に約300アミノ酸残基からなる相同性領域(RHD)を有する転写因子で、免疫や発生などの制御に関与しており、その活性化機構はファミリー間で高度に保存されている。系統発生的に脊椎動物と無脊椎動物の中間に位置している原索動物ホヤは、進化的に最も初期に脊椎を獲得した動物であることから、脊椎動物の発生を単純化したモデル動物と考えられおり、マボヤでは、NF- κ B/Rel ファミリーが初期発生過程の脊索形成に関与することが示唆されている。

本論文提出者は、マボヤ NF- κ B/Rel ファミリータンパク質である As-rel1 と As-rel2 の相互作用の機構、I κ B による調節機構、さらに、ホヤ発生過程における NF- κ B/Rel ファミリーの機能に関する一連の研究を展開し、以下の成果をおさめた。

(1) マボヤの As-rel1 は典型的な NF- κ B/Rel ファミリーに属し、一方、As-rel2 は、As-rel1 と完全に同一な RHD を有するが、C 末端側の配列を欠失したユニークな構造をしている。そこで、マボヤのゲノム配列を解析し、As-rel1 と As-rel2 が alternative splice variant であることを明らかにした。次に、両者の相互作用、細胞内局在性および転写活性化機構を解析し、As-rel1 と As-rel2 がヘテロダイマーを形成すること、単独では、As-rel1 は核に、As-rel2 は細胞質に局在し、両者が共存すると、共に核に局在すること、As-rel1 の転写活性化が As-rel2 によって抑制されることを明らかにした。

(2) NF- κ B/Rel ファミリーの制御因子である I κ B について、カタユウレイボヤの I κ B ホモログ (Ci-I κ B) の塩基配列を決定し、それを用いて、As-rel1 と As-rel2 との相互作用、および、As-rel1 と As-rel2 の細胞内局在性や転写活性化に対する影響

を解析した。そして、Ci-I κ B が As-rel1 および As-rel2 のそれぞれと複合体を形成すること、3 者が共存すると、As-rel1 は核に、As-rel2 は細胞質に存在すること、Ci-I κ B による As-rel1 の転写活性化の阻害が As-rel2 により回復することを明らかにし、As-rel1 の核内移行および転写活性化が splice variant である As-rel2 により調節されるという新しい調節機構を提案した。

(3) 全ゲノム解析がなされているカタユレイボヤを用いて、in situ ハイブリダイゼーション法により、各発生ステージにおける NF- κ B/Rel ファミリー (Ci-rel1 と Ci-rel2) と Ci-I κ B の遺伝子発現を明らかにした。さらに、Ci-I κ B に対するモルフォリノオリゴヌクレオチド (M-oligo-Ci-I κ B) をホヤ胚に注入して、Ci-I κ B をノックダウンした時の発生に対する影響を解析し、M-oligo-Ci-I κ B を注入した胚では、正常な尾芽胚で起こる脊索細胞の挿入に異常が起きていることを明らかにした。Ci-I κ B をノックダウンさせると、Ci-rel1 が過剰に働き、脊索形成に異常が生じると考えられる。また、Ci-Bra (脊索特異的に発現する遺伝子) のプロモーターの下流に GFP と各遺伝子を連結させた発現プラスミドをホヤ胚に導入し、各 GFP 融合タンパク質の胚での発現を解析し、GFP-Ci-rel1 が神経胚期に特異的に核内に移行すること、GFP-Ci-rel1 発現胚では、初期尾芽胚期において、Ci-I κ B の発現が誘導されること、ゲノム上で Ci-I κ B の上流に Ci-rel 結合配列が存在することを明らかにした。以上の結果をもとに、Ci-rel が尾芽胚期で脊索細胞の挿入に関与していると提案した。

以上の新知見およびそれらを得るために用いた新研究方法は、ホヤ NF- κ B/Rel ファミリーの調節機構やホヤ発生における機能の理解にとどまらず、広く他の生物における NF- κ B/Rel ファミリーの調節機構や機能を理解する上で重要な寄与をなすものである。

審査委員一同このことを高く評価し、本論文提出者が博士 (薬学) の称号を受けるにふさわしいものと一致して判断した。