

氏名	せと ひろかず 瀬戸 洋一
学位(専攻分野)	博土(学術)
学位記番号	博甲第440号
学位授与の日付	平成18年9月25日
学位授与の要件	学位規則第3条第3項該当
研究科・専攻	工芸科学研究科 機能科学専攻
学位論文題目	Studies on regulatory function of <i>Drosophila</i> DNA replication-related element-binding factor(DREF) in cell proliferation and differentiation (細胞増殖と分化における転写制御因子DREFの機能についての研究) (主査)
審査委員	教授 山口政光 教授 遠藤泰久 教授 竹谷 茂

### 論文内容の要旨

申請論文は、第1章「序論」、第2章「ショウジョウバエDNA replication-related element-binding protein(DREF)をコードする遺伝子の転写制御」、第3章「ショウジョウバエPCNA遺伝子の転写制御」から構成されている。

「序論」では、本論文の背景と目的が述べられている。転写調節エレメント DRE は、ショウジョウバエ複製関連遺伝子のプロモーターに共通してみられる 8 塩基対のパリンドローム配列として見出され、そこには転写因子 DREF が特異的に結合し、プロモーター活性を正に制御する。その後 DRE/DREF 制御経路は、複製関連遺伝子のみならず幅広く増殖に関わる遺伝子群の制御に関与することが明らかにされてきている。しかしながら、DREF 遺伝子自身の転写制御機構と細胞が増殖停止し分化に向かう時に DREF の機能がどのように抑制されているかについては、良く分かっていなかった。本論文では、これらの問題点に検討を加え遺伝子発現制御機構についてのモデルを提唱している。第2章と第3章の要旨を以下に示す。

進化的に離れた *Drosophila* 属の2種、*Drosophila melanogaster* と *Drosophila virilis* の間で比較すると、DREF のアミノ酸配列は 3 つの領域で高度に保存されていた。また *DmDREF* と *DvDREF* 遺伝子の 5'上流領域にもいくつかの高度に保存された領域があることが明らかになった。それらの領域に相当するオリゴヌクレオチドを用いたゲルシフトアッセイの結果、タンパク質因子が少なくとも 3 つの領域 -554 ~ -543 (5'-TTGTTCTTGCG)、-81 ~ -70(5'-GCCCACGTGGCT) 及び +225 ~ +234(5'-GCAATCAGTG) に結合しうることを示した。ルシフェラーゼ一時的発現アッセイを行い、*DmDREF* プロモーター活性にとって、-554 ~ -543 は負の制御配列として機能し、一方、-77 ~ -70(5'-ACGTGGCT) 及び +225 ~ +236 (5'-GCAATCAGTGTT) は正の制御配列として機能することを示した。一方、*DmDREF* 遺伝子上では 5 つある DRE のうち、*DvDREF* 遺伝子においても保存されている 3 番目の DRE(+211 ~ +218) を介して正の自己転写制御していることが示された。遺伝子導入ショウジョウバエを用いた実験系でも、*in vitro* 及び培養細胞の系で得られた結果に一致する結果を得た。以上の結果は、*DmDREF* の発現はそのプロモーター上の進化的に高度に保存された領域を介して転写制御因子

による正・負の制御を受けていることを示唆するものであった。

一方、ショウジョウバエ PCNA(*dPCNA*)遺伝子はそのプロモーター領域に DRE を持ち、DREF による発現調節を受ける遺伝子のひとつであることが知られている。PCNA は DNA ポリメラーゼ / のリーディング鎖における DNA 合成反応の補助因子としてだけでなく、正常な細胞増殖の進行、修復といった細胞機能上、重要な過程に関与していることが知られており、*dPCNA* の発現調節機構の解析は、DREF やその他の転写制御因子の生物学的意義を検討する上でも興味深いものである。これまでの研究から、*dPCNA* のプロモーター領域には DRE 以外にも、upstream regulatory element (URE)、CFDD 結合サイト、E2F 結合サイトといった複数の転写制御領域があることが知られており、転写制御因子 grainy head (Grh) や Replication Factor X2 (RFX2) がそれぞれ URE や URE-DRE 間に存在する RFX2 結合領域を介して *dPCNA* の発現制御を行っていることも示唆されている。

*dPCNA* 遺伝子上の DRE を 3 回繰返し連結したものを「おとり」として酵母 one hybrid スクリーニングを行った結果、DREF 以外に Cut が DRE 結合因子として同定された。Cut はヒトの CCAAT-Displacement Protein(CDP) のショウジョウバエホモログで、ショウジョウバエでは外部神経器官、マルピーギ管など、さまざまな組織で発現しており、細胞の運命決定を行う因子の一つと考えられている。ゲルシフトアッセイの結果から、Cut は DRE 及び URE の 5'-AATCAAAC に結合することが示唆された。また、Cut と DREF の *dPCNA* 転写制御における役割を調べるために、ショウジョウバエ S2 細胞を用い RNA 干渉(RNAi)により Cut や DREF をそれぞれ特異的にノックダウンさせた後、*dPCNA* のプロモーター領域をルシフェラーゼ遺伝子上流に結合させたプラスミドをトランスフェクションし、ルシフェラーゼ発現アッセイによる評価を行った。その結果、Cut は *dPCNA* の発現を抑制的に、一方 DREF は促進的に調節していることが示唆された。また、RNA 干渉後のウェスタンブロッティング法により、内在性の *dPCNA* レベルも同様に変化することが明らかとなった。形態形成誘導ホルモン 20-ヒドロキシエクジソンは S2 細胞に対して増殖を抑制し、分化へと誘導することが知られている。*dPCNA* の発現については、ルシフェラーゼアッセイの結果から、20-ヒドロキシエクジソンは抑制的に働くことが確認された。この S2 細胞分化誘導系を用いて、クロマチン免疫沈降法 (Chromatin immunoprecipitation(ChIP)) により Cut 及び DREF の *dPCNA* プロモーター上での挙動を解析した。その結果、DREF はエクジソンの存在・非存在下のどちらでも *dPCNA* プロモーター上に局在していたが、Cut はエクジソン存在下においてのみ局在していることが示された。以上の結果から、細胞増殖条件下では DREF が *dPCNA* の発見を正に制御し、分化誘導条件下では Cut が *dPCNA* のプロモーター上にリクルートされ、負の制御を行い、細胞の増殖停止、分化誘導を行うというモデルが提唱できる。

### 論文審査の結果の要旨

DNA 複製関連遺伝子をはじめとする多くの細胞増殖関連遺伝子群の制御に、DRE/DREF 制御経路が重要な関与をすることで注目されている。本論文において申請者は、進化的に離れた *Drosophila melanogaster* と *Drosophila virilis* の間で比較すると、両遺伝子の 5' 上流領域にいくつかの高度に保存された領域があることを明らかにした。またこれらの領域に相当するオリゴヌクレオチドを用いたゲルシフトアッセイの結果、タンパク質因子が少なくとも 3 つの領域に結合し、これらの領域が正または負の制御配列として機能することを示した。一方、DmDREF 遺伝子上に 5 つあ

る DRE のうち、DvDREF 遺伝子においても保存されている 3 番目の DRE(+211 ~ +218)を介して正の自己転写制御していること見出した。

一方、ショウジョウバエ PCNA(dPCNA)遺伝子上の DRE を「おとり」として酵母 one hybrid スクリーニングを行った結果、DREF 以外に Cut が新たな DRE 結合因子として同定された。Cut はヒトの CCAAT-Displacement Protein(CDP)のショウジョウバエホモログで、ショウジョウバエでは細胞の運命決定に関わる重要な転写因子の一つと考えられている。ゲルシフトアッセイの結果から、Cut は DRE 及び URE の 5' -AATCAAAC に結合することが示唆された。また、ショウジョウバエ S2 細胞を用いた RNA 干渉(RNAi)により Cut や DREF をそれぞれ特異的にノックダウンさせた後、dPCNA プロモーター活性を測定した結果、Cut は dPCNA プロモーターを抑制的に、一方 DREF は促進的に調節していることが示唆された。また、昆虫の分化促進ホルモンである 20-ヒドロキシエクジソンで S2 細胞を処理すると dPCNA プロモーター活性が低下する現象についても解析し、次のことを明らかにした。クロマチン免疫沈降法により Cut 及び DREF の dPCNA プロモーター上での挙動を解析した結果、DREF はエクジソンの存在・非存在下のどちらでも dPCNA プロモーター上に局在していたが、Cut はエクジソン存在下においてのみ局在していることが示された。以上の結果から、細胞増殖条件下では DREF が dPCNA の発現を正に制御し、分化誘導条件下では Cut が dPCNA のプロモーター上にリクルートされて負の制御を行い、細胞の増殖停止、分化誘導を行うというモデルが提唱された。dPCNA 遺伝子発現制御において増殖関連遺伝子群の共通制御因子 DREF と細胞運命決定因子 Cut がアンタゴニスティックに働くことは新しい発見である。この発見は細胞の増殖と分化の振り分けの機構を考える上でも極めて有意義であり、高く評価できる。

学位論文は丁寧に作成されており、論旨も明解であった。本論文の内容は、申請者を筆頭著者および第 2 著者とする下記の 2 編の論文を基礎としている。なおこの他に申請者を共著者とする 2 編の関連論文が公表あるいは印刷中である。

- 1)H.Seto, Y.Hayashi, E.Kwon, O.Taguchi and M.Yamaguchi. Antagonistic regulation of the *Drosophila* PCNA gene promoter by DREF and Cut. *Genes to Cells*, 11, 499-512(2006)
  - 2)E.Kwon, H.Seto, F.Hirose, N.Ohsima, Y.Takahashi, Y.Nishida, and M.Yamaguchi. Transcription control of a gene for *Drosophila* transcription factor, DREF by DRE and cis-elements conserved between *Drosophila melanogaster* and *virilis*. *Gene*, 309, 101-116(2003)
- (参考論文)
- 1)Y.Hayashi, M.Kato, H.Seto and M.Yamaguchi. *Drosophila* Distal-less negatively regulates dDREF by inhibiting its DNA binding activity. *Biochem.Biophys.Acta.* in press
  - 2)H.Sato, M.Hatanaka, S.Kimura, M.Oshige, Y.Tsuya, Y.Mizushina, T.Sawado, N.Aoyagi, T.Matsumoto, J.Hashimoto and K.Sakaguchi Purification and characterization of a 100 kDa DNA polymerase from cauliflower inflorescence. *Biochem.J.*, 332, 557-563(1998)