

ヘテロクロマチン領域内遺伝子の発現を制御する転写因子 Ouija board の活性調節メカニズム

上山 拓己 (筑波大学 生物学類) 指導教員: 丹羽 隆介 (筑波大学 生命環境系)

背景・目的

ヘテロクロマチンは高度に凝集したクロマチン構造であり、ヒトを含む真核生物の染色体中に普遍的に存在する。一般に、ヘテロクロマチン領域内に存在する遺伝子の発現は強く抑制されると考えられている[1]。しかし、ヘテロクロマチン領域内に存在する遺伝子が特異的なパターンで発現し、またそれらの遺伝子にコードされるタンパク質が生命活動に必須の機能をもつ例が多く、生物で報告されている[2,3]。このような遺伝子のひとつとして、ショウジョウバエ *Drosophila melanogaster* のゲノム中に存在する *spookier(spok)* がある。*spok* は昆虫の脱皮と変態に必須の役割を果たすステロイドホルモン、「エクジソン」の生合成を触媒する酵素をコードしている[4,5]。

所属研究室の先行研究から、*spok* の発現は Ouija board (OuiB) と Molting defective (Mld) と呼ばれる2つの転写因子によって制御されることがわかっている[6,7]。しかし、*spok* 遺伝子の発現において、これらの転写因子が物理的に凝集した状態にあるヘテロクロマチン領域にどのような作用して転写を実現させているのか、その詳細なメカニズムは不明である。

この問題を解決するために、ショウジョウバエを材料とし、OuiB と Mld の機能解析を行い、さらにこれらの転写因子に共役するタンパク質の探索を目指した。

方法

(1) 前胸腺の解剖と免疫組織化学染色法

エクジソン生合成器官である前胸腺細胞における OuiB の局在を、免疫組織化学染色法により可視化した。染色にはゲノム中に存在する *ouib* 遺伝子の C 末端側に HA タグをノックインしたシステムを用いた(熊本大学・中村輝博士より提供)。3 齢幼虫を解剖して前胸腺を取り出し、1 次抗体としてラット抗 HA 抗体 (Roche)、2 次抗体として Alexa 蛍光標識抗体 (Thermo Fisher Scientific) を用いて染色した。蛍光像は共焦点レーザー顕微鏡 LSM700(Carl Zeiss) を用いて撮影した。

(2) S2 細胞の培養

Ouib と Mld の機能解析のために、ショウジョウバエ由来の培養細胞である S2 細胞を用いた。細胞培地には Schneider's *Drosophila* Medium (Thermo Fisher Scientific) を用いて、25°C で培養した。

(3) OuiB と Mld のクローニング

S2 細胞で OuiB を発現させるために pWALIU10-moe ベクターに *ouib* 遺伝子のコーディング配列と、その N 末端側に Ty1 タグを挿入したコンストラクト(Ouib N-Ty1)を作製した。また、*mld* 遺伝子に存在するジンクフィンガーモチーフ7つすべてを欠失させ、pWALIU10-moe ベクターに挿入したコンストラクト(Mld N-HA dZnF1-7)を作製した。野生型 *mld* 遺伝子全長発現コンストラクトは所属研究室所有のものを用いた[7]。

(4) ルシフェラーゼレポーターアッセイ

ルシフェラーゼ遺伝子の上流に *spok* 遺伝子のプロモーター領域をつないだコンストラクト[6]を *ouib* および *mld* 発現コンストラクトと共に S2 細胞にトランスフェクションし、その後ルシフェラーゼの活性を Dual-Luciferase Reporter Assay System (Promega) を用いて定量した。

(5) 核分画の抽出と免疫沈降

先行研究に従い、S2 細胞由来の抽出液から核分画を抽出した[6]。抽出した核分画を用いて、免疫沈降 (IP) 法により OuiB N-Ty1 を回収できるか検証した。一次抗体にマウス抗 Ty1 タグ抗体 (Sigma)、ビーズに Dynabeads Protein G (Life Technologies) を用いた。

(6) ウェスタンブロット法

Ouib N-Ty1 はマウス抗 Ty1 タグ抗体を用いたウェスタンブロット法により検出した。サンプルには細胞抽出液、核分画、IP 産物を用いた。

結果・考察

免疫組織化学染色法の結果、OuiB は3 齢幼虫期において常に前胸腺細胞の核に局在していることがわかった。よって、OuiB の活性は細胞内局在の変化によって調節されるのではなく、何か別の共役因子によって制御されていることが予想された。

S2 細胞を用いたルシフェラーゼレポーターアッセイの結果、OuiB N-Ty1 は野生型 Mld と共に発現させた時、*spok* プロモーターからの転写活性を顕著に上昇させた。一方で、OuiB N-Ty1 とジンクフィンガーモチーフを欠失させた Mld N-HA dZnF1-7 を一緒に発現させても *spok* プロモーターは活性化しなかった。この結果は、Mld の *spok* に対する転写活性にはジンクフィンガーモチーフが重要であるということを示唆する。さらに、OuiB は N 末端側に Ty1 を付加しても *spok* に対する高い転写誘導性を保持することも合わせて示している。

ウェスタンブロット法の結果、S2 細胞で発現させた OuiB N-Ty1 を、市販の抗 Ty1 抗体と磁気ビーズを用いた IP 法によって回収可能であることが確認できた。今後、この免疫沈降物に含まれるタンパク質群を単離し、質量分析法によって解析することで OuiB の共役因子の同定へと進む予定である。

参考文献

1. Dimitri et al. *Chromosoma* **118**, 419-435(2009).
2. Altomose et al. *PLOS Comput Biol* **10**, e1003628(2014).
3. He et al. *Genome Res* **22**, 2507-2519(2012).
4. Niwa & Niwa. *Biosci Biotechnol Biochem* **78**, 1283-1292 (2014).
5. Ono et al. *Dev. Biol.* **298**, 555-570 (2006).
6. Komura-Kawa et al. *PLOS Genet* **11**(12): e1005712. (2015).
7. Uryu et al. in preparation.