

博士論文の要旨

論文題目

「センチニクバエ由来の転写因子 SRAM (*Sarcophaga Rel/Ankyrin Molecule*)
に関する研究」

氏名

白石 博久

生物は、その個体発生や生命維持において、各段階に必要な遺伝子の選択的な利用を迫られる。この、適切な遺伝子利用のメカニズムを理解する上で、遺伝子発現制御機構の解明は不可欠といえる。

当教室ではこれまでに、昆虫センチニクバエを用いた生体防御機構の研究から、複数の抗菌物質やレクチンが、生体防御応答時や発生過程において一過的、協調的に転写レベルで発現誘導されるということを見出した。そして「生体防御」と「発生」という、個体の維持に必須でありながら異なる生命現象として捉えられてきた2つの局面において機能する二重機能性を持った因子として、その転写制御機構の解析がなされてきた。

私は修士課程において、センチニクバエレクチン（以下、レクチンと略す）遺伝子の 5' 上流転写制御領域に存在するκB 配列に特異的に結合する分子量 59kDa の因子の cDNA クローニングを行った。その結果、この蛋白がN末側に Rel homology domain (RHD)、C末側に Ankyrin repeats (ANK) と呼ばれる構造を持つ、新規な因子であったことから、SRAM (*Sarcophaga Rel/Ankyrin Molecule*) と命名した。RHD を持つ Rel family の転

写因子は、脊椎動物や昆虫において、核移行という制御によって生体防御や発生に関わる誘導性遺伝子のκB 配列を認識し転写を活性化する。その際 ANK は、Rel 因子を細胞質内で不活性化する抑制性のドメインとして機能する。しかしながら SRAM は、RHD と ANK の両構造を同一分子内に保持した形で核に常在する初めての Rel 因子であり、既知の Rel 因子とは異なる制御機構ならびに機能を有する可能性が考えられた。

本研究において私は、SRAM の分子機能を明らかにする目的で、培養細胞を用いてレクチンの発現誘導に対する SRAM の影響を解析した。更に、サブトラクション法により SRAM によって発現が制御される候補分子の同定、並びに SRAM の生体内局在の解析を行い、新規な Rel 因子としての特性を見出した。

1. 誘導性生体防御因子の発現における SRAM の機能解析

誘導性生体防御遺伝子の発現に、κB 配列及び SRAM が必須かどうかを明らかにする目的で、培養細胞を用いた Luciferase assay を行った。Reporter vector として、SRAM が結合するκB 配列を含むレクチン遺伝子プロモーターの下流に Luciferase 遺伝子を挿入した plasmid を用いた。まず、この κB 配列を有するプロモーターを持つ plasmid と、κB 配列に変異導入した plasmid をセンチニクバエ胚由来培養細胞 NIH-Sape-4 に遺伝子導入し、それぞれのプロモーター活性を調べた。その結果、変異導入によりプロモーター活性は10分の1以下に減少し、κB 配列がレクチン遺伝子の発現に必須であることが示された。更に、この細胞を SARM の dsRNA で処理する RNA 干渉法（以下、RNAi と略す）により、SRAM 蛋白の発現を10%に抑制することに成功し、この条件下で、レクチン、および、他の誘導性生体防御因子であるザルコトキシン I、II について Luciferase assay を行った。その結果、いずれの遺伝子のプロモーターについても、SRAM の RNAi 依存に顕著な活性の低下は検出されなかった。従って、この細胞に多量に発現する SRAM は、既知の生体防御遺伝子の発現に必須ではないと考えられる。SRAM の同定された経緯、並びに、

SRAM の持つ Rel 因子としての特徴を考え併せると、この結果は、当初の予想を根底から覆すものであった。

2. SRAM によって制御される候補分子の同定

しかしながら SRAM は、Rel 因子としては型破りな、ANK を保持した核内因子であることから、SRAM によって制御される遺伝子が他にあるのではないかと考え、その同定を試みた。方法は、SRAM dsRNA 無処理の NIH-Sape-4 細胞から mRNA を抽出して cDNA ライブラリーを作製し、これに対して SRAM dsRNA を 4 日間処理して SRAM の発現を抑制した同細胞より調製した cDNA ライブラリーを対照としてサブトラクション法を行い、SRAM 発現細胞に選択的に発現している遺伝子を検索した。サブトラクション・ライブラリーから無作為に抽出したクローンのうち、ドットプロット・ハイブリダイゼーション法によるスクリーニングで陽性であった 116 クローンについて更にノザンプロット解析による確認を行った結果、SRAM 発現細胞に選択的に発現している遺伝子を 6 個同定した。これらの遺伝子の内 3 個は、それぞれショウジョウバエの Ubiquitin activating enzyme、Translation Initiation Factor-2 (IF-2) 及び、importin β family の karybeta-3 gene product と高い相同性を示す ORF をコードしていた。また、1 個はマウスの NK cell tumor-recognition protein (NK-TR) と部分的に 30% の相同性を示す ORF を有していた。残る 2 個については長い ORF は見出されず、非翻訳領域である可能性が高い。また、当初ノザンプロット解析のコントロール・プローブとして用いた glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (G3PDH) 遺伝子も SRAM 発現細胞に選択的に発現している事が判明した。

以上の結果は、SRAM が、細胞の基本的機能を担うハウスキーピング遺伝子の転写制御因子として実際に機能しうる事を示唆するものといえる。これまで Rel ファミリーの転写因子は、発生や生体防御に関わる誘導性の遺伝子発現を制御する転写因子として知られて

おり、ハウスキーピング遺伝子の発現制御という視点からの報告は未だ無い。SRAM が、細胞の生理状態に応じた細胞内基本代謝の制御を担っている可能性も考えられる。

3. 生体内における SRAM の局在解析

SRAM の個体における機能を解析する目的で、センチニクバエの発生過程における発現を調べたところ、最終齢である 3 齢幼虫の後期から蛹の初期にかけて発現量が増強していた。更にこの時期における SRAM の組織別発現をイムノプロットにより解析したところ、SRAM 蛋白は多くの組織で発現するが、特に消化管で顕著に発現していることを見出した。

次に、SRAM の細胞内局在を免疫染色によって解析した。その結果、SRAM は、脂肪体を始め殆どの組織で核に局在すること、また、消化管では、核だけでなく細胞質にも存在することが明らかとなった。

これらの結果は、SRAM が生体内においても核に局在し機能していることを示しており、NIH-Sape-4 同様、核にあってハウスキーピング遺伝子群の発現制御を担っているのかもしれない。また、消化管選択的に強く発現する Rel 因子の報告はこれまでに無く、SRAM は、食餌・消化、変態期における組織崩壊・再構築など、劇的な環境変化に曝される消化管に特徴的な遺伝子の発現制御に関与している可能性が考えられる。

まとめと考察

本研究で私は、まず、センチニクバエ由来の Rel 因子 SRAM が、当初の予想に反し、誘導性生体防御遺伝子の発現の活性化に必須ではないことを、培養細胞を用いた系により示した。更にこの培養細胞において RNAi により SRAM の発現を抑制できる事を見出し、SRAM が制御する新たな候補遺伝子を同定した結果、SRAM が、ハウスキーピング遺伝子の転写制御因子として機能していることを示唆した。更に、SRAM が個体においても核に局在して機能すること、また消化管に特に強く発現する事から、個体においても SRAM が

Rel 因子として特徴的な機能を有することを示唆した。

今後、更に詳細な分子生物学的手法による解析や、個体への RNAi の応用によって、SRAM によるハウスキーピング遺伝子群の発現制御の持つ生物学的意義を明らかにしていくことが課題である。

1. Shiraishi H, Kobayashi A, Sakamoto Y, Nonaka T, Mitsui Y, Aozasa N, Kubo T, Natori S. *J Biochem.* **127**, 1127-34. (2000) Molecular Cloning and Characterization of SRAM, a Novel Insect Rel/Ankyrin-Family Protein Present in Nuclei.
2. Natori S, Shiraishi H, Hori S, Kobayashi A. *Dev. Comp. Immunol.* **23**, 317-28. (1999) The Roles of *Sarcophaga* Defense Molecules in Immunity and Metamorphosis.