

論文内容の要旨

論文題目

新規 Armadillo 結合蛋白質 Sunspot による細胞周期制御遺伝子の転写の制御

氏名 西田 歩

序

ショウジョウバエのセグメントポラリティ遺伝子 *armadillo (arm)* はヒトの癌遺伝子 β -catenin のホモログとして知られている。Arm 蛋白質は細胞内において細胞膜から核内まで幅広く局在し、細胞接着因子 E-カドヘリンの裏打ち蛋白質、Wingless (Wg) シグナルの伝達、Wg シグナル伝達経路の下流での転写の制御などの多くの機能を有している。Arm の多くの機能は、Arm 蛋白質と結合する因子の多様性に起因すると考えられる。Arm 蛋白質は N 末端領域、アルマジロリピート領域、C 末端領域から構成され、特に中央に位置するアルマジロリピート領域には E-カドヘリン、APC、Axin、TCF、Legless など、多数の蛋白質が結合する。本研究では、Arm 蛋白質に結合する新規の蛋白質の存在を想定し、検索を行った結果、新規 Armadillo 結合蛋白質 Sunspot を見出し、その機能を解析した。

新規 Armadillo 結合蛋白質 Sunspot の同定

Arm のアルマジロリピートを bait として、ショウジョウバエ embryo cDNA ライブラリーより Yeast two-hybrid 法を用いて新たな遺伝子の検索を行ったところ、新規の遺伝子 sunspot を見出した。Sunspot 蛋白質は 368 アミノ酸をコードしていた。Sunspot のアミノ酸配列よりドメイン検索を行ったところ N 末端側には BED finger モチーフが存在することが判明した。BED finger モチーフはショウジョウバエの DREF、Beaf-32 などの蛋白

質に存在し、Zn finger を形成して DNA に結合すると考えられる。次に Sunspot 蛋白質のどの領域が Arm との結合に重要な領域かを検討するために、Sunspot 蛋白質の断片と Arm 蛋白質とで pull down アッセイを行った。その結果、Sunspot の 235 アミノ酸から 307 アミノ酸を含む領域が Arm 蛋白質との結合に重要であることが明らかになった。

Sunspot 蛋白質の細胞内局在

Sunspot 蛋白質の細胞内局在を調べるために蛍光蛋白質 GFP (Green-Fluorescent-Protein) を付加した GFP-Sunspot を作成し、ショウジョウバエ成虫原基において発現させ、その細胞内局在を観察した。その結果、GFP-Sunspot は核内に局在し、凝集体を形成していることが明らかになった。次に Sunspot のアルマジロと結合する領域 (AB 領域: Armadillo Binding region) を含まない GFP-Sunspot Δ C を作成しその細胞内局在を観察すると GFP-Sunspot Δ C は核内に存在するが GFP-Sunspot で観察されたような凝集体を形成しないことが明らかになった。

Arm 蛋白質との結合能を有し、核内に存在する蛋白質として TCF が知られているが、細胞膜結合型 Arm と TCF 蛋白質を共発現させると核内に局在する TCF 蛋白質は細胞膜に移行することが報告されている。Sunspot 蛋白質についても同様の現象が観察されるかどうか検討したところ、細胞膜結合型 Arm と共発現させることにより Sunspot は細胞膜に移行することが観察された。また、細胞膜結合型 Arm と Sunspot のアルマジロと結合する領域を含まない GFP-Sunspot Δ C を共発現させると、核内に存在している GFP-Sunspot Δ C の局在は変化しなかった。これらの観察結果を総合すると、Sunspot は *in vitro* だけでなく *in vivo* においても Sunspot の AB 領域を通して Arm と相互作用していると考えられる。また、GFP-Sunspot で観察された核内凝集体の形成には Sunspot の AB 領域を含む部位が重要であると考えられる。

sunspot 変異体の表現型

sunspot 遺伝子の生体内での役割を明らかにするために sunspot 遺伝子欠損動物の作成を試みた。作製には P 因子の再転位と不正確な切り出しを利用した。その結果、sunspot 遺伝子内部におよそ 600bp の欠失を持つ sunspot⁵⁹⁸ を作出することができた。sunspot⁵⁹⁸ は Sunspot 蛋白質の開始コドンを含む領域を欠失しているため正常な Sunspot 蛋白質を発現することができない。このことから sunspot⁵⁹⁸ は機能完全欠失変異体であると考えられた。sunspot 変異体は 3 令幼虫から蛹に変態できず、成虫原基が正常アリの成虫原基と比較して著しく小型であった。さらに sunspot 変異体には受精後およそ 6 日後から、多くの個体で体内に 'melanotic-pseudotumor' の形成が認められた。Gal4/UAS 系を用いて GFP-Sunspot を sunspot⁵⁹⁸ にユビキタスに発現させるとこれらの表現型は回復したが、GFP-Sunspot Δ C をユビキタスに発現させてもこれらの表現型は回復しなかった。以上の結果より、sunspot 遺伝子はショウジョウバエの成虫原基の発達に必須の遺伝子で、AB 領域がその機能に重要であると考えられる。

Sunspot は細胞周期制御遺伝子の転写を制御する

Arm 蛋白質のアルマジロリピートに結合する蛋白質の多くは Wg シグナル伝達経路を制御することが知られている。Sunspot 蛋白質も Arm 蛋白質と結合することから、Wg シグナル伝達経路を制御する可能性が考えられる。この可能性を検討するために、成虫原基上に sunspot 変異細胞を誘導し、その細胞において Wg 標的遺伝子の発現が変化するかどうかを観察した。しかし、sunspot 変異細胞において Wg 標的遺伝子の発現の変化は観察されず、sunspot 遺伝子は Wg シグナル伝達経路に必須な遺伝子ではないことが考えられた。

Sunspot 蛋白質の N 末端側には BED finger モチーフが存在する。BED finger モチーフはショウジョウバエの DREF、Beaf-32 などの蛋白質に存在し、このうち DREF は E2F-1 や PCNA などの細胞周期制御遺伝子の転写を制御していることが知られている。そこで、Sunspot が細胞周期制御遺伝子の転写を制御する可能性があると考え、成虫原基上に sunspot 変異細胞を誘導し、E2F-1 や PCNA の発現が変化するかどうかを検討した。その結果、sunspot 変異細胞において E2F-1 や PCNA の発現が低下することが明らかになった。また、Gal4/UAS 系を用いて成虫原基上で sunspot を強制発現させ E2F-1 や PCNA の発現が変化するかどうか検討したところ、sunspot が強制発現された領域で E2F-1 や PCNA の発現が上昇することが明らかになった。以上の結果より、sunspot は成虫原基上において E2F-1 や PCNA などの細胞周期制御遺伝子の転写を正に制御する機能を有することが明らかになった。

結論

我々は Arm 蛋白質と結合する新規蛋白質 Sunspot を見出し、ショウジョウバエの成虫原基の発達に必要な遺伝子で、E2F-1 や PCNA などの細胞周期制御遺伝子の転写を正に制御する機能を持つことを明らかにした。Arm 蛋白質は Wingless シグナル伝達経路以外にも Sunspot を介した細胞周期制御遺伝子の転写調節に関与していると考えられる。