

## 論文の内容の要旨

応用生命工学専攻  
平成 15 年度博士課程 入学  
氏名 伊藤 紗弥  
指導教員名 加藤 茂明

論文題目 遺伝学的アプローチによる核内レセプター新規転写共役因子の機能解析

### 第一章 序論

高等真核生物において高度に保存された遺伝情報の発現は、主として遺伝子発現の転写レベルで調節されている。転写は無数の制御因子により連続的かつ不可逆的に調節され、染色体構造調節・修飾を伴う。転写を制御する因子群は、標的遺伝子プロモーターに直接結合するDNA結合性転写因子群、基本転写因子群、及びこれらを仲介する転写共役因子群が知られている。近年、これら転写共役因子群の機能の一つは標的遺伝子周辺の染色体構造を認識結合し、ヒストンを修飾することであると明らかにされつつある。これらアセチル化、リン酸化、メチル化等のヒストン化学修飾はヒストンテールの特定のアミノ酸残基に入ることによって染色体機能状態を規定・維持することが知られている。ユークロマチン領域では、ヒストンリジン残基のアセチル化による転写の活性化を示す構造を形成するが、一方、ヒストンリジン残基のメチル化は転写不活性化状態であるヘテロクロマチン構造を形成することが知られている。更にこれらユークロマチンとヘテロクロマチン間の状態変換には、SWI/SNF複合体等のクロマチンリモデリング複合体群、ヒストン置換・輸送を担うヒストンシャペロン、ヘテロクロマチン化誘導因子HP1(Heterochromatin protein 1)等の因子群が必須であることが知られている。従って、染色体構造変換を伴う転写開始段階は転写共役因子群と染色体構造変換制御因子群各々が独立した複合体として協調的に機能すると考えられていた。しかしながら、これら転写共役因子群や染色体構造変換制御因子群の同定は、各々相互作用を指標とした探索やこれらの活性を指標とする複合体精製による生化学的手法が主流であったことから、両者を繋ぐ因子や機能的相互作用の分子基盤の大部分は依然として不明である。

そこで本研究では既知因子複合体群を仲介する新しいクラスの転写共役因子の取得を目指し、分子遺伝学的なアプローチを用いた。これまでショウジョウバエを用いた分子遺伝学的アプローチにより、ヒト核内ステロイドレセプターの機能的転写制御系の構築に成功してきた<sup>1)</sup>。核内レセプターはリガンド依存的に転写活性を発揮するため転写誘導の同調が整えられ、かつリガンド依存的に相互作用する転写共役因子群の同定・機能解析に有用である。更にショウジョウバエ既知転写共役因子はヒトホモログ同様、核内レセプターを転写共役することから、八エでのヒト核

内レセプター転写制御解析系は哺乳動物の生体内機能を反映することを示唆してきた<sup>2)</sup>。本研究は、特に染色体構造変換機構に連続した転写共役因子による新たな転写制御能の解明を目的とし、ヒト核内レセプターの転写活性を指標とした新規転写共役因子の探索・同定を試みた。

## 第二章 ショウジョウバエを用いた核内レセプター新規転写共役因子の遺伝学的探索

個眼特異的に発現するヒトアンドロゲンレセプター(AR)の転写活性をGFP蛍光で観察可能なトランスジェニック系統を用い、ARの転写活性を指標とした新規転写共役因子の遺伝学的スクリーニングを行った。約 1200 系統の遺伝子過剰発現及び機能欠損系統(GS lines)とAR転写制御系統を交配した次世代 3 齢幼虫の個眼原基のGFP蛍光強度を観察し、AR転写活性制御を判断した。その結果、約 10 の遺伝子変異系統で著しくARの転写活性強度が変動し、変異の生じた遺伝子から発現する因子がAR転写共役因子として機能することが示唆された。さらに、これら同定したAR転写共役候補因子のうちヒトホモログが機能未知である 4 つの因子に関してヒト培養細胞におけるレポーターアッセイを行い、ARに対するヒトホモログの転写制御能を検討した。その結果、1 つの因子では転写活性の変動が見られなかったものの、2 つの因子で転写促進、1 つの因子で転写抑制が確認された。そこで核内レセプターの転写活性を強力に抑制する転写共役因子であるCG32529 について以下詳細な解析を行うこととした。CG32529 のヒトホモログは機能未知因子BAHD1(Bromo adjacent homology domain containing 1)であり、C末端にBAH(Bromo adjacent homology)ドメインが保存されている。BAHドメインの分子機能は明らかにされていないが、クロマチンリモデリング活性をもつSWI/SNF複合体の構成因子であるBAF180 やヒストンテールの特異的なリジン残基をメチル化するTrithorax複合体を構成するASH1 もこのドメインを有することから、BAHD1 が染色体構造変換を担う因子であることが推測された。そこで、ショウジョウバエでPEV(Position Effect Variegation)を用いた解析を行い、BAHD1 のショウジョウバエホモログCG32529 の染色体構造変換能を検討した。PEVとは、赤眼を呈する *White* 遺伝子がクロマチン構造のゆらいだユークロマチンとヘテロクロマチンの境界領域に導入されると、細胞ごとに遺伝子発現強度に差異が生じて赤と白の斑眼を呈する現象を指す。PEVにおいて赤眼を呈する遺伝子変異系統では、*White* 遺伝子の発現が亢進しており境界領域の染色体構造がユークロマチン化していると判断できる。一方、白眼を呈する遺伝子変異系統は境界領域の染色体構造がヘテロクロマチン化していると判断することができる。CG32529 遺伝子機能欠損変異系統は赤眼を呈したことから、CG32529 はヘテロクロマチン化能を有することが見出された。以上の結果より、BAHD1 が転写制御及び染色体構造変換制御を担う負の調節因子であることが推測された。

## 第三章 新規転写共役因子BAHD1 の生理学的機能の解析

Northern blottingにより、ヒトBAHD1 mRNAは副腎でのみ顕著に発現することを見出した。副腎の発生・分化は生殖腺と共通の原基から始まり、転写因子を中心とした各種因子群により段階的に制御されている。代表的な転写因子としてWT-1(Wilms' tumor 1)、Ad4BP/SF-1(Ad4

binding protein/steroidogenic factor 1)、DAX-1(Dosage-sensitive sex reversal-adrenal hypoplasia congenita critical region on the X chromosome, gene 1)等が知られている。成熟した副腎組織は皮質、髄質からなる 2 層構造をとっており、外側の皮質では多種のステロイド合成酵素を介してグルココルチコイドやミネラルコルチコイド、副腎アンドロゲン等のステロイド合成を行うことが知られている。BAHD1 が副腎における発生・分化さらにステロイド合成系に及ぼす影響を検討するため、マウス副腎皮質由来 Y1 細胞を用いた RT-PCR 法により BAHD1 依存的に発現量の変動する因子を探索した。その結果、核内レセプター SF-1 及び SF-1 により発現誘導される核内レセプター DAX-1 が BAHD1 存在下で発現抑制された。さらに、球状帯・束状帯・網状帯の 3 帯から成る副腎皮質の中でマウス BAHD1 の発現は球状帯に局限しており、SF-1、DAX-1 の発現部位と一部重複が見られたことから BAHD1 と SF-1、DAX-1 との機能的相互作用の可能性が強く示唆された。一方、ヒト BAHD1 は細胞増殖を促進することが明らかとなり、SF-1、DAX-1 が制御を担う分化に対し抑制的に作用する可能性が示された。以上の結果より、BAHD1 は SF-1、DAX-1 の発現抑制を介した発生・分化制御の一端を担うことが推測された。

#### 第四章 BAHD1 の性状解析

次に、BAHD1 の転写抑制能を詳細に解析した。ヒト培養細胞を用いたレポーターアッセイにより、AR を始めとする各種核内レセプター及び転写因子 VP16 に対し BAHD1 はいずれも転写共役抑制因子として機能することが確認された。さらに、免疫染色法と免疫沈降法によりヒト培養細胞内で BAHD1 は常に核内に存在し、AR、エストロゲンレセプター $\alpha$  (ER $\alpha$ )と相互作用することが明らかとなった。また、BAHD1 は N 末端領域及び BAH ドメインに隣接した N 末側領域の 2 箇所を介して AR、SF-1、ER $\alpha$  と直接結合することが GST pull-down 法により判明した。

近年、転写抑制状態のクロマチン構造の指標となるヒストンテールの修飾としては、主にヒストン H3-K9 のメチル化、H3-K27 のメチル化、H4-K20 のメチル化が観察されている。そこで、BAHD1 による転写抑制の場でこれらヒストン修飾が生じているか否かを検討した。免疫染色を行った結果、H3-K9 のジメチル化部位と BAHD1 の局在が一致していた。H3-K9 はメチル化酵素 Suv39h によりジ・トリメチル化され、ヘテロクロマチン化誘導因子 HP1 を誘導することでヘテロクロマチンを形成することが知られている。そこで、BAHD1 の転写抑制能が Suv39h 及び HP1 との相互作用を介したクロマチン構造変換を伴い発揮される可能性を検討した。ヒト培養細胞から抽出したクロマチン画分を用いた免疫沈降法より、BAHD1 は Suv39h1 及び HP1  $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$  との相互作用に加え、SWI/SNF 型クロマチンリモデリング複合体構成因子である ATPase 活性酵素 Brg1 とも会合することが判明した。さらに、BAH ドメインを欠失した BAHD1 変異体はこれら因子と相互作用しなかったことから、BAHD1 を介したクロマチン構造変換において BAH ドメインが必須であることが示唆された。さらに、*in vitro* クロマチン再構築系を用いて実際に BAHD1 を含む複合体がクロマチン構造変換を担うか否かを確認したところ、ATP 依存的にヌクレオソーム配列を変動させることが示された。以上の結果より、核内レセプターを含む

一部の転写因子の転写活性を抑制する BAHD1 が、BAH ドメインを介して染色体構造変換因子群を誘導するアンカー因子である可能性が推察された。

## 第五章 総合討論

### 新規転写共役因子BAHD1の同定と機能解析

本研究では、ショウジョウバエ分子遺伝学を用いた核内レセプター転写共役因子の探索により、転写抑制を担う機能未知因子 BAHD1 を見出した。一方、BAHD1 は Suv39h1、HP1、Brg1 と BAH ドメインを介して結合しヘテロクロマチン化を誘導することが示された。以上の結果から、BAHD1 が染色体構造変換制御と連動して標的遺伝子の転写抑制制御を担う機能を有することが推測された。すなわち、BAHD1 は転写共役因子群と染色体構造変換制御因子群を仲介するアンカー因子である可能性が考えられた。このように従来の生化学的手法では、同定困難であったアンカー因子を、本研究で用いた分子遺伝学的手法により初めて同定することに成功した。さらに本研究では、機能が不明であった BAH ドメインが Suv39h1、HP1、Brg1 の結合誘導に必須なドメインであること、さらにヘテロクロマチン化誘導因子 HP1 とクロマチンリモデリング酵素 Brg1 が協調的に作用し染色体構造変換を担う可能性を示すことができた。一方、BAHD1 はマウス副腎での発現部位が限局しており、発生・分化段階の転写制御の時期・組織特異性を規定する因子である可能性が推測された。

### 今後の展望

今後、BAHD1 による転写抑制と HP1、Brg1 による染色体構造変換が同時に進行することを同一染色体上で証明することは必須であると考えられる。そのため BAHD1 の直接的な標的遺伝子の同定、標的遺伝子上での転写因子依存的な染色体構造変換制御を解析する予定である。これらの成果は、副腎分化における時期・部位特異的な遺伝子発現制御の理解に繋がるものと期待される。さらに BAHD1 ノックアウトマウスを作出することにより、副腎及び生殖腺における BAHD1 の分化制御を始めとした生体内高次機能を明確にする予定である。

以上、本研究では転写活性を指標とした遺伝学的アプローチを用いることで、染色体構造変換を伴う新しいクラスの核内レセプター転写共役因子の同定に成功した。本研究は、染色体構造変換因子群による核内レセプター転写制御機構への関与を解明した新たな試みであり、生体内での時期・組織特異的な転写制御における染色体構造変換機構の理解に繋がるものであると期待される。

- 1) Takeyama, K. *et al.* Androgen-dependent neurodegeneration by polyglutamine-expanded human androgen receptor in *Drosophila*, *Neuron*, 35, 855-864 (2002)
- 2) Ito, S. *et al.* In vivo potentiation of human oestrogen receptor alpha by Cdk7-mediated phosphorylation, *Genes Cells*, 9, 983-992 (2004)