

論文内容の要旨

論文題目 エクジソン誘導性核内受容体遺伝子群のエクジソン

応答性の解析

氏名

白井 博之

【序論】

現在、地球上には 80 万種を超える昆虫が存在し、最も多様性に富んだ生物群と考えられている。昆虫繁栄の理由の一つには、脱皮と変態というシステムを環境に応じて上手く利用したことが挙げられる。脱皮と変態はステロイドホルモンの一種であるエクジソンによって進行する。エクジソンの刺激は多数の遺伝子の発現を誘導するが、この誘導は全て同じタイミングで起こるわけではない。エクジソンによって直接速やかに誘導される少数の転写因子（初期遺伝子）や、その転写因子によって誘導される多数の遺伝子（後期遺伝子）がある。つまり、各組織でエクジソンによって引き起こされる遺伝子群の極めて順序だった階層的な発現（エクジソン誘導経路）が脱皮や変態という現象を引き起こしている。

昆虫において機能的なエクジソンは 20-hydroxyecdysone (20E)であり、核内受容体遺伝子の一つエクジソン受容体(ecdysone receptor, EcR)によって受容される(図 1 A)。核内受容体とは、DNA 結合ドメインとリガンド結合ドメインを持つ転写因子の総称である。EcR はリガンドのエクジソンを受容する唯一の分子であり、他の核内受容体 USP とヘテロダイマーを形成して機能的な転写因子となる。この複合体 (20E-EcR/USP) は、遺伝子の promoter 領域などにある cis-element に結合し、その遺伝子の転写を制御すると考えられる。脱皮期や変態期には、前胸腺からエクジソンが分泌され体内の濃度が上昇し、それに伴って階層的な遺伝子発現が起こる。低濃度のエクジソンによって速やかに少数のクラス I 初期遺伝子、少し遅れて少数のクラス II 初期遺伝子が誘導される。前者に属する EcR はわずか数 ng/mL のエクジソンで誘導される一方、E75 などのクラス II 遺伝子の誘導にはその 10 倍程度のエクジソンが必要とされる(図 1 B)。これらに遅れて、HR3 などの少数の初期-後期遺伝子の誘導には数 ug/mL 以上の高濃度エクジソンと初期遺伝子産物が必要とされる(図 1 B)。このような転写因子群の階層的な発現が最終的に多数の後期遺伝子群を誘導するが、初期、初期-後期遺伝子群がエクジソンによって転写が誘導される機構はほとんどわかっていない。

本研究では、培養細胞やゲノム情報の利用できるカイコ *Bombyx mori* を用いて、上述した異なる 3つのクラスに属するエクジソン誘導性転写因子 BmEcR, BmE75, BHR3 に着目し、解析を行った。いずれも昆虫全般で高度に保存された、核内受容体に属する転写因子である。これまでにい

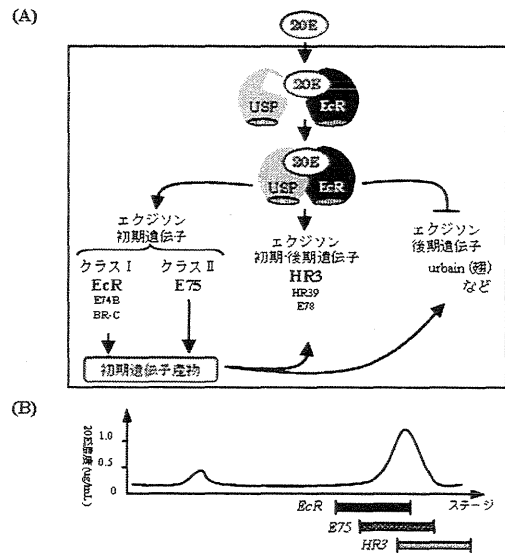


図1. エクジソン応答遺伝子の階層性の概念図

くつかの構造タンパク質遺伝子で EcR/USP の結合する *cis*-element としてエクジソン応答配列 (Ecdysone Response Element, EcRE) が報告されたが、それらの構造の保存性は低く、またエクジソン誘導経路への関与も明瞭には示されていないものが多い。一方、エクジソン誘導経路の転写因子群に関しては、エクジソン応答が明瞭に示された応答配列は全く知られていない。そこで、これら3つの核内受容体のエクジソン誘導性を制御する *cis*-element を同定し、それらの比較から個々の誘導パターンに違いを生じさせる原因や階層性の機構を探ろうと考えた。

【結果】

1. カイコ培養細胞のエクジソン応答性の違いと遺伝子発現の網羅的解析

カイコの組織由来培養細胞ではエクジソンに対する応答性や内在的な遺伝子発現の変動はほとんど調べられていない。そこで BmN (卵巣由来)、ao1 (卵巣由来)、aff3 (脂肪体由来) の各細胞の 20E に対する応答を調べた。その結果、ao1 細胞、aff3 細胞では、細胞の一部が凝集する反応が見られたが、BmN 細胞では外見上明瞭な細胞応答は観察されなかった(図 2 A)。

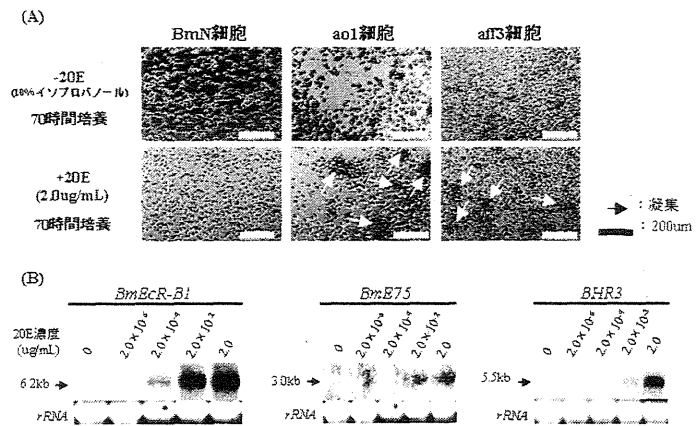


図2. 3種類の培養細胞のエクジソン応答性と核内受容体遺伝子の20Eによる発現パターンの変化

次に、*BmEcR-B1*、*BmE75*、*BHR3* のエクジソンに対する mRNA 発現パターンの変化を NorthernBlot で調べた。その結果、ao1 細胞では、*BmEcR-B1* は 20E 濃度が 2.0×10^{-4} ug/mL で誘導が見られたのに対し、*BmE75* は 20E 濃度 2.0×10^{-2} ug/mL 以上の濃度でしか誘導が確認できなかった(図 2 B)。一方、*BHR3* は 2ug/mL 以上の高濃度で非常に強く誘導された(図 2 B)。この3つの遺伝子の濃度依存性傾向は他の細胞でも同様であり、発生段階などで示されていたエクジソン応答性と3つの遺伝子のクラス分けがこれらの細胞でも適用できることが確認された。またカイコ microarray を用いて BmN、aff3 細胞間の遺伝子の発現の変動を網羅的な解析、比較を行った。

2-(1) クラス I 初期遺伝子 *BmEcR* の転写制御に関わる *cis*-element の同定

(a) *BmEcR* isoform の転写開始点近傍で基本転写活性を担う *cis*-element

BmEcR では、選択的転写により N 末端側のアミノ酸配列が異なる 2 種類の isoform (A, B1) が生じる。各 EcR isoform は組織分化や細胞応答に密接に関連し機能的に分化しているが、その promoter 領域はほとんど調べられていない。2つの isoform の第1エクソンはゲノム上では少なくとも 150kb 以上離れている(図 3 A)。そこで、まず第1エクソン周辺をゲノムからクローニングして転写開始点を決定した。興味深いことに、*BmEcR* の2つの isoform はいずれも TATA box のない TATA-less 遺伝子であることがわかった。転写開始点付近の配列は特異的な転写制御に関わるとの報告もあり、各 isoform の転写開始点近傍の基本転写に必要な *cis*-element を解析した。その結果、A isoform では Inr (initiator) および転写開始点下流側+28 位に存在する DPE (downstream promoter element) が必須であるのに対し(図 3 B)、B1 isoform では DPE とは全く異なる *cis*-element が機能していることが明らかとなった(図 3 C)。このような EcR isoform 転写開始点近傍の構造の差異が示されたのは初めてである。

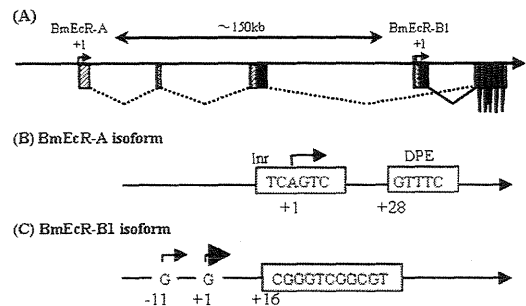


図3. *BmEcR*-A、-B1 isoform の転写開始点周辺の違い

転写開始点付近の配列は特異的な転写制御に関わるとの報告もあり、各 isoform の転写開始点近傍の基本転写に必要な *cis*-element を解析した。その結果、A isoform では Inr (initiator) および転写開始点下流側+28 位に存在する DPE (downstream promoter element) が必須であるのに対し(図 3 B)、B1 isoform では DPE とは全く異なる *cis*-element が機能していることが明らかとなった(図 3 C)。このような EcR isoform 転写開始点近傍の構造の差異が示されたのは初めてである。

(b) *BmEcR-B1* のエクジソン応答配列 (*BmEcRB1*-EcRE) の同定

BmEcR isoform の promoter 領域からエクジソン応答配列を同定するべく、カイコのゲノム情報を基に、*BmEcR*-A は転写開始点上流 3.9kb から下流 309bp (*pBmEcR-A*_-3932/+309)、*BmEcR*-B1 は

上流 3.7kb から下流 248bp (pBmEcR-B1_-3652/+248) をゲノムから単離した。aff3 細胞を用いた Dual-Luciferase reporter assay の結果、pBmEcR-B1_-3652/+248 は 20E を添加して 12 時間後から転写活性が誘導され、その誘導は 20E 濃度 2.0×10^{-2} ug/mL でも検出された(図 4 A)。これに対して pBmEcR-A_-3932/+309 は、エクジソンを添加しても転写活性に変化は見られなかった。次にエクジソン応答性の見られた pBmEcR-B1_-3652/+248 に対し、複数の

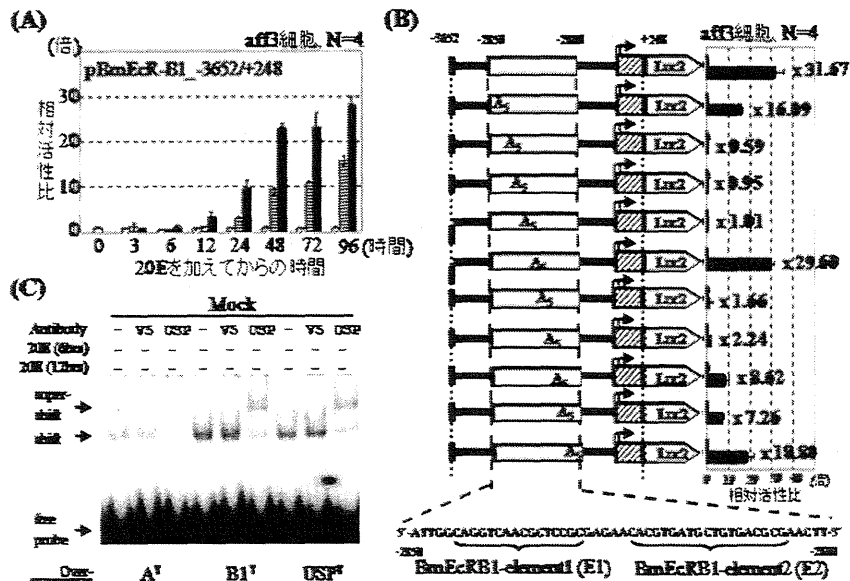


図4. pBmEcR-B1_-3652/+248のエクジソン応答配列の解析 (A) pBmEcR-B1_-3652/+248のエクジソン応答性。グラフのバーは \square : 2.0×10^{-2} ug/mL, \square : 2.0×10^{-4} ug/mL, \blacksquare : 2.0 ug/mLの20Eを加えた場合、 \square : 10%インプロパノールを添加した場合の相対活性比を示す。相対活性比とは10%インプロパノールの活性を1とした時、20Eを加えた後何倍になったのかを示す。

(B) pBmEcR-B1_-3652/+248の-2850~-2800に対し、5'-AAAAA-3'(A₅)のmutationを加えた解析。BmEcRB1-element1(E1), BmEcRB1-element2(E2)の配列を示す。(C) 抗体を用いたEMSA解析。MockはpIZTV5-Hisの空ベクターをlipofectionしたことを示す。A¹, B¹, USP¹は各ORFにV5タグをついたものをoverexpressionさせたことを示す。

deletion コンストラクトを順次作成していき、最終的に-2850~-2800 位の 50bp にエクジソン応答配列が存在することが明らかになった。この領域を 5bp ずつ 5'-AAAAA-3'(A₅)に置換して絞り込んだ(A₅ mutation)ところ、-2845~-2830 までの領域 (BmEcRB1-element1, 以下 E1)、及び-2825~-2805 までの領域 (BmEcRB1-element2, 以下 E2) がエクジソン応答性に関与していた(図 4 B)。更に 2bp ずつの mutation で解析した結果、BmEcR-B1 isoform のエクジソン応答性には 2つの領域が必須であることが示された。このような構造をもったエクジソン応答配列はこれまでに報告がない。E1、E2 と EcR/USP との相互作用を解析するため、aff3 細胞抽出物を用いて EMSA(electrophoretic mobility shift assay)を行った。その結果、E1 のプローブに対しては明瞭なバンドが観察され、このバンドは 20E 処理した抽出物では増強されること、また USP 抗体でスーパーシフトすることがわかった(図 4 C 上段)。更に、BmEcR-A, -B1, BmUSP に V5 タグを付けたキメラタンパクをそれぞれ過剰発現させた aff3 細胞抽出物を用いると、同様なバンドが観察され、抗 V5 抗体によってスーパーシフトした(図 4 C 下段)。この結果は、E1 に EcR/USP ヘテロダイマーが結合していることを強く示唆する。一方、E2 プローブでは、明瞭なバンドが観察されるが、20E では増強されないこと、EcR/USP の結合が見られないことが示された。この結果は、E2 には定常的に発現する細胞内因子が結合する可能性を示唆する。

2-(2) クラス II 初期遺伝子 BmE75-A のエクジソン応答配列 (BmE75A-EcRE) の同定

BmE75 には N 末配列の異なる A~D の 4 種類の isoform が存在するが、カイコゲノム情報を基に A isoform の転写上流約 5kb (pBmE75-A_-5023/+85) をクローニングし、解析を行った。この領域全体は低濃度のエクジソンに対する明瞭な応答性を示

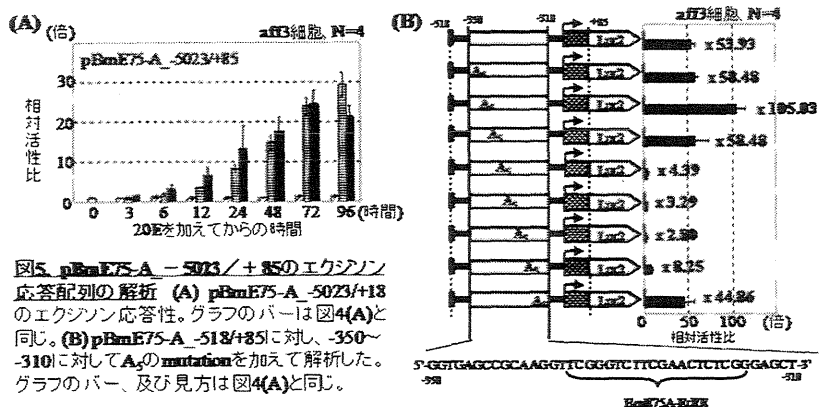


図5. pBmE75-A_-5023/+85のエクジソン応答配列の解析 (A) pBmE75-A_-5023/+85のエクジソン応答性。グラフのバーは図4(A)と同じ。(B) pBmE75-A_-518/+85に対し、-350~-310に対してA₅のmutationを加えて解析した。グラフのバー、及び見方は図4(A)と同じ。

したので(図 5 A)、複数の deletion 及び A₅ mutation から、最終的に-335~-315 の 20bp の配列 (BmE75A-EcRE)がエクジソンにตอบสนองし転写を活性化することが明らかになった(図 5 B)。更に EMSA から、この領域に EcR/USP のヘテロダイマーが結合することが明らかとなった。

2-(3) 初期-後期遺伝子 BHR3 のエクジソン応答配列 (BHR3B-EcRE) の同定

BHR3 には N 末配列の異なる A と B の 2 種類の isoform が存在するが、カイコゲノム情報を基に B isoform の転写上流約 2.9kb (pBHR3-B_-2891/+18) をクローニングし、解析を行った。このコンストラクトは、20E が高濃度の 2.0ug/mL の場合、転写活性が数百倍以上に上昇したが、低濃度の 2.0×10⁻²ug/mL の場合にはほとんど応答性を示さず、初期-後期遺伝子のエクジソン応答性を維持していた(図 6 A)。この pBHR3B_-2891/+18 に対し、deletion コンストラクトを順次作成して解析したところ、エクジソン応答配列は-445~-405 の 40bp に絞り込まれた(図 6 B)。EMSA から、この領域の 18bp の配列(BHR3B-EcRE)が EcE/USP ヘテロダイマーと強く結合することが明らかとなった。

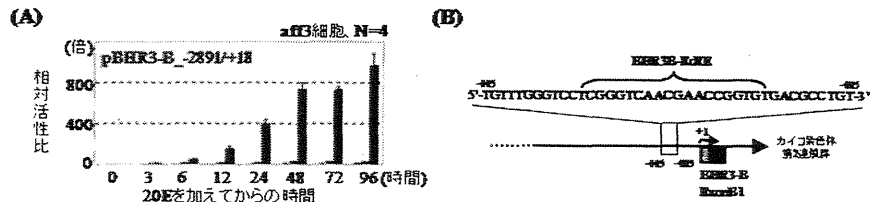


図6. pBHR3B_-2891/+18のエクジソン応答配列の解析 (A) pBHR3B_-2891/+18のエクジソン応答性。グラフのバーは図4(A)と同じ。(B) pBHR3B_-485/+18に対し、-485~-285に20bpずつ欠損を加えて絞り込み、-445~-405を欠損するとエクジソン応答性が消失した。絞り込まれたBHR3B-EcREの配列を示す。

【考察と結論】

本研究により、クラス I 初期遺伝子 BmEcR-B1、クラス II 初期遺伝子 BmE75-A、初期-後期遺伝子 BHR3-B の EcRE を同定することに成功した。初期遺伝子、初期-後期遺伝子の各クラスで EcRE を明瞭に示したのは今回が初めてである。

BmEcRB1-EcRE は、EcR/USP 複合体が認識・結合する E1 と、隣接した E2 から構成されていた。EcR/USP が結合しない E2 の配列の一部には bHLH (basic helix loop helix) の認識する CACGTG 配列が

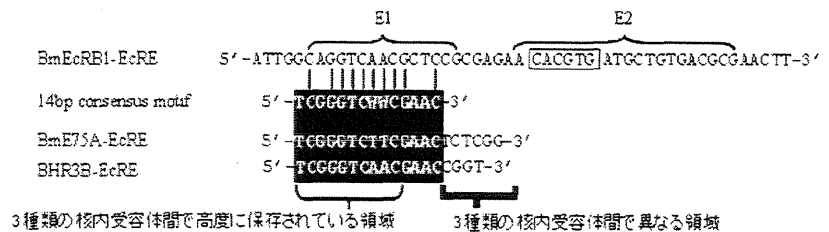


図7. 同定されたEcREに見られるconsensus配列 W = A or T □: bHLHの認識配列

含まれており、bHLH 型の転写因子がある程度定常的に結合している可能性が考えられる。一方、BmE75A-EcRE は 20bp からなる単純な EcR/USP 結合配列であり、両者のエクジソン応答性にはこのような EcRE の構造上の差が反映されているのかもしれない。高濃度の 20E で誘導される初期-後期遺伝子 BHR3B-EcRE は、BmE75 と同様に 18bp からなる単純な EcR/USP 結合配列だった。従来から、HR3 の転写は当初初期遺伝子によって抑制され、高濃度のエクジソンで誘導されると報告されている。BHR3 の EcRE が機能するにはこのような抑制から開放される必要があるのだろう。興味深いことに、3 つの遺伝子の EcR/USP 結合配列では 5' 末端側 14bp (5'-TCGGGTCWCGAAC-3') は完全に保存されていることが明らかとなった(図 7)。これに対し 3' 末端側は各クラスで違いが見られ、EcR/USP への結合に差をもたらしている可能性が考えられた。今後、EcR/USP の結合強度を比較することにより、エクジソン誘導性経路の階層性がより明確になると考えられる。

【発表論文】

- 1) Shirai H, Kamimura M and Fujiwara H. (2007). Characterization of core promoter elements for ecdysone receptor isoforms of the silkworm, *Bombyx mori*. *Insect Mol Biol.* 16(2):253-64.
- 2) Shirai H, Imanishi S, Kamimura M, Kojima T and Fujiwara H. Identification and characterization of ecdysone response elements conserved among edysone inducible nuclear receptor genes, BmEcR, BmE75 and BHR3. *Manuscript in preparation*