トピックス

ショウジョウバエ FACT は GAGA 因子と相互作用して *Hox* 遺伝子の発現制御に関与する

国立遺伝学研究所個体遺伝研究系形質遺伝研究部門

霜島 司, 広瀬 進

1. クロマチン構造

クロマチン構造は、生物の設計図であるゲノム DNA を細胞内の限られた領域に押し込んだ構造状態であり、その構造自体が遺伝子の発現に影響を及ぼしている。クロマチンはコアヒストンタンパク質 H2A, H2B の 2 量体 2 つと H3, H4 の 4 量体 1 つから構成される 8 量体のまわりに、146 塩基対の DNA が左に約 2 回巻きついて構成される単位、ヌクレオソームが連なった構造である。このクロマチン構造は遺伝子からタンパク質というセントラルドグマの流れにおいて、特に RNA 合成段階である転写に抑制的である。これまで数多く研究されてきた裸の DNA を鋳型とする転写因子群だけでは、クロマチンを鋳型とする場合、転写はほとんど起こらない。しかし、細胞内ではクロマチン構造をとったゲノム DNA を鋳型として、RNA ポリメラーゼが必要な遺伝子のみから転写を行い、RNA 合成に続いてタンパク質が産生されている。この事実を考えると、ここには抑制的状态を克服する何らかの機構が存在しているはずである。実際、クロマチン構造をとったゲノム中には、転写が起きている活性な領域と転写は起こらず不活性で凝縮状態の領域があり、それぞれユークロマチン、ヘテロクロマチンとよばれている (Fig.1)。

DNA の塩基配列の変化を伴わずに獲得形質が細胞分裂を経て娘細胞に伝わる現象はエピジェネティクスとよばれている。エピジェネティックな遺伝においてもクロマチン構造が重要な働きをすることが知られている。細胞分裂時に母細胞から娘細胞へとクロマチン

Fig.1 Chromatin structure. Chromatin is consisted of nucleosome arrays. The structure can change from highly condensed state to loosely condensed one reversibly. Moreover, transcription efficiency from chromatin template varies depends on the states.

の変化がそのまま受け継がれることにより、分化した細胞の記憶がクロマチン上に記録される。それにより分化した体細胞ならではの組織特異的なタンパク質の発現、形質の発現が起こる。ショウジョウバエでは *Antennapedia* や *Ultrabithorax* (*Ubx*) などのホメオティック遺伝子の発現パターンにより、各体節の独自性が決定される。ホメオティック遺伝子はその発現の開始にかかわった転写制御因子が消失した後も、細胞内のクロマチン上にその発現状態が記憶され受け継がれていく。ホメオティック遺伝子のエピジェネティックな発現は、抑制の維持に關与するポリコムグループと、活性化の維持に關与するトライソラックスグループの2つの遺伝子群により制御されている。

今回はトライソラックスグループタンパク質に属する GAGA 因子を中心として、それと相互作用する因子の単離からエピジェネティックな機能解析にいたる話を述べたい。

2. GAGA 因子¹⁾

GAGA 因子は、塩基配列 GAGAG を認識する分子量

***Drosophila* FACT is Involved in the Regulation of *Hox* Gene Expression through Physical and Functional Interaction with GAGA Factor**

Tsukasa SHIMOJIMA and Susumu HIROSE

Department of Developmental Genetics, National Institute of Genetics

67 kのDNA結合性タンパク質である。DNA結合部位のZnフィンガードメインとタンパク質間相互作用(自己集合など)にかかわるN末端のBTB/POZドメインをもち、転写活性化ドメインは有していない。これまでの研究から、GAGA因子により制御されている遺伝子*hsp26*のプロモーター上のGAGA因子結合配列を欠失させるとクロマチン構造が変化することや²⁾、ショウジョウバエの胚抽出液から、ATPとGAGA因子依存的に*hsp70*遺伝子プロモーター上のクロマチン構造が破壊されることを指標として、ATP依存的に構造変換(リモデリング)を行う因子NURF(nucleosome remodeling factor)が精製されている³⁾。またGAGA因子はトライソックスグループの遺伝子産物の1つであることから、エピジェネティックな発現制御にも関与している。

3. GAGA因子と相互作用する因子の単離

ショウジョウバエ*fushitarazu*(*ftz*)遺伝子の転写制御領域にはGAGA因子の結合配列が複数存在し、この因子により*ftz*遺伝子の発現が制御されている。クロマチン構造をとった*ftz*プロモーターからの転写には

Fig.2 Isolation of the proteins associated with GAGA factor. Nuclear extracts were prepared from embryo of transgenic fly line expressing FLAG-GAGA factor. Proteins interacting with FLAG-GAGA factor were purified using anti-FLAG beads. Nuclear extract was mixed with anti-FLAG beads. The beads were washed extensively with high salt buffer, and bound proteins were eluted with FLAG peptides. The eluate contained equimolar amounts of FLAG-GAGA factor, dSSRP1 and dSPT16.

GAGA因子、ショウジョウバエ初期胚抽出液、ATPが必要であり、このときGAGA因子結合部位近傍でのみクロマチンリモデリングが起こる。これはATP依存的クロマチンリモデリング因子共通のサブユニットであるImitationswitch (ISWI)に対する抗体の添加により阻害された⁴⁾。これらのことから、ショウジョウバエ初期胚抽出液中にはGAGA因子とISWIを含むクロマチンリモデリング因子の間を結びつける因子が存在することが強く示唆された。

この因子を単離するため、FLAGタグ付きGAGA因子を発現するトランスジェニックショウジョウバエを作製し、その初期胚核抽出液からFLAG抗体固定化ビーズを用いてFLAG-GAGA因子と相互作用する因子を単離した(Fig.2)。得られた2つのタンパク質p93(*Drosophila* structure specific recognition protein 1; dSSRP1)とp130(*Drosophila* suppressor of Ty element 16; dSPT16)は既知のもので、ヘテロダイマーを形成しており、酵母、アフリカツメガエル、ヒトなどでホモログが報告されていた。ヒトにおいてはFACT(facilitates chromatin transcription)とよばれ、クロマチン鑄型からの転写伸長因子として知られており⁵⁾、酵母では転写と複製の制御に関与していることが知られていた。ショウジョウバエではFLAG-GAGA因子と*Drosophila*(d)FACTは1:1の割合で複合体を形成していた⁶⁾。

4. 生化学的解析

単離したdFACTがどのようにGAGA因子と結合しているかを明らかにするため、GST-dSSRP1とGST-dSPT16の融合タンパク質を用いて、GAGA因子との結合実験を行った。その結果、GAGA因子はGST-dSSRP1のみと結合し、GST-dSPT16とは結合が観察されなかったことから、GAGA因子はdSSRP1を介してdFACTと結合していることが明らかとなった。裸のDNAとモノヌクレオソームを用いてdFACTのそれぞれへの親和性を調べたところ、dFACTは裸のDNAよりモノヌクレオソームに対して高い親和性を示した。*ftz*遺伝子のプロモーター領域を含むプラスミドDNA上にショウジョウバエ胚抽出液も用いてクロマチン構造を再構成し、DNA分解酵素micrococcal nuclease(MNase:この酵素処理によりヌクレオソーム間のDNAが分解されて1つ1つのヌクレオソームが得られる)を使って、クロマチンリモデリングの効率を調べた。以前に我々は、GAGA因子を大量に加えると、*ftz*プロモーター上のGAGA因子結合配列近傍のみでクロマチンリモデリングが起こることを明らかにしている⁴⁾。この系にdFACTを加えると、GAGA因子単独添加のときの1/10

Fig.3 MNase assay. (A) Chromatin was partially digested with MNase (B) Digested DNA was purified, electrophoresed on an agarose gel, and then transferred to a membrane. (C) Using indicated probes, southern hybridization was carried out. In the region where chromatin structure was maintained, 180 bp DNA ladder should be observed. In the region where chromatin structure was destroyed, a smear band should be observed. (D) GAGA factor binding sites in the promoter of *ftz* gene and the position of probes were indicated. (E) Chromatin was reconstituted on a DNA mixture consisting of 1/10 volume of plasmid DNA carrying *ftz* promoter region and 9/10 volume of carrier plasmid DNA in S150 extract and then treated with indicated amounts of GAGA and/or dFACT. After incubation, chromatin was subjected to MNase assay. Purified DNA was electrophoresed on an agarose gel, and stained with SYBR Green I dye. (F) The DNA was then transferred to a membrane, and analyzed by southern hybridization with (D) probe. It turned out that dFACT enhanced the GAGA factor-dependent chromatin remodeling.

量のGAGA因子添加でクロマチンリモデリングが観察され (Fig.3), dFACTはGAGA因子依存的クロマチンリモデリングを促進することが示された⁶⁾. dFACTはヌクレオソームのコアヒストンタンパク質の中のH2A/2Bと結合することから、ヒストンH2A/2BとDNAの相互作用を弱め、その結果クロマチンのリモデリング活性を促進するものと考えられる。またGAGA因子依存的にクロマチンリモデリングを誘起することは、クロマチン構造をとるDNAに対して単独では結合できない転写関連因子の結合を容易にすると考えられる。

5. 遺伝学的解析

無脊椎動物から哺乳動物まで、体の形づくりはおもに *Hox* 遺伝子群の発現パターンにより制御されている。GAGA因子はトライソラックス群タンパク質の中の

Trithorax-like (Trl) 遺伝子によりコードされており、*Hox* 遺伝子群の中の *Ubx* や *Abdominal-B (Abd-B)* 遺伝子などの発現制御に関与している。GAGA因子がdFACTと直接結合し機能すると考えると、FACTは単なる転写伸長促進因子としてではなく、エピジェネティックな形態形成に関与する因子としての機能も有していることが予想された。そこでGAGA因子の変異体とdFACTのサブユニットdSPT16の遺伝子を欠失したショウジョウバエを用いて、*Hox* 遺伝子群が関与する体節形成に与える影響を調べた。

これまでの遺伝学的解析からGAGA因子をコードしている *Trl* 遺伝子の変異体の八工は、胸部第3体節 (T3) が第2体節 (T2) に、腹部第6体節 (A6) が第5体節 (A5) に変わるホメオティック変換を起こすことが知られている⁷⁾。胸部第3体節から第2体節への変換の特徴として、

Fig.4 Genetic interaction. Expression of *Hox* genes and its maintenance on specific regions govern the body plans of multicellular organisms. GAGA-dFACT complex exists not only in the transcribable region but also in the regulatory region. Defects in the GAGA-dFACT complex compromise the maintenance of expression of *Hox* genes such as *Ubx* and *Abd-B*, and results in homeotic transformations from the thoracic segment T3 to T2 (haltere to wing) and the abdominal segment A6 to A5.

Ubx 遺伝子の発現低下による抑制解除のため平均棍 haltere がwing 状に巨大化する。腹部第6体節から第5体節への変換の特徴としては、第6体節上に第5体節の特徴である剛毛が観察される。dFACTのサブユニットdSPT16の欠損とGAGA因子の変異をもつ二重変異体では、上記のホメオティック変換の程度と発生率の昇が観察された。逆にこの二重変異体にdSPT16をトランスジーンとして導入しタンパク質を発現させるレスキュー実験では、ホメオティック変換の程度と発生率が低下することも観察されたことから、GAGA因子とdSPT16との間に遺伝学的相互作用が見いだされた⁶⁾。さらに、クロマチン免疫沈降法でクロマチン上でのGAGA因子、dSSRP1、dSPT16タンパク質の存在を調べたところ、*Hox*遺伝子の発現制御領域である*Ubx*遺伝子の*bxd*領域、*Abd-B*遺伝子の*iab-6*エレメントなどにGAGA、dFACTが存在することが明らかとなった⁶⁾。よって、dFACTはRNA Pol IIの転写伸長促進因子として転写領域に存在する⁸⁾だけでなく、GAGA因子とともに転写制御領域にも存在し、GAGA因子を介した転写制御にも関与していることが示された (Fig.4)。

6. 今後の展開

我々はFLAG-GAGA因子と相互作用するタンパク質としてdFACTを精製したが、当初予想されたISWIやほかのトライソックス群遺伝子産物は含まれていなかった。その原因として、FLAG-GAGA因子を抗FLAG抗体固定化ビーズでトラップした後、高塩濃度のバッ

ファーで洗浄したので、FLAG-GAGA因子と強く結合しているタンパク質しか残らなかったと考えられる。そこで、より生理的な精製条件を選ぶことにより、dFACTのほかにはISWI、ヒストン修飾酵素やほかのトライソックス遺伝子群産物を含むより大きな複合体が精製されることが考えられる。

近年、遺伝子発現の研究は裸のDNAを用いた研究から、クロマチン構造のDNAへと変化してきた。そのみならず、ヒストンへの修飾が遺伝子の発現に影響を与えることがわかり、さまざまなヒストン修飾酵素が単離され機能も明らかとなってきている。今後はヒストン修飾まで考えた研究が必須となるであろう。

文 献

- 1) Lehmann, M. (2004) *TRENDS in Genetics* **20**, 15-22.
- 2) Lu, Q., Wallrath, L. L., Granok, H. and Elgin, S. C. R. (1992) *J. Mol. Biol.* **225**, 985-998.
- 3) Tsukiyama, T. and Wu, C. (1995) *Cell* **83**, 1011-1020.
- 4) Okada, M. and Hirose, S. (1998) *Mol. Cell. Biol.* **18**, 2455-2461.
- 5) Orphanides, G., LeRoy, G., Chang, C. H., Luse, D. S. and Reinberg, D. (2003) *Cell* **92**, 105-116.
- 6) Shimojima, T., Okada, M., Nakayama, T., Ueda, H., Okawa, K., Iwamatsu, A., Handa, H. and Hirose, S. (2003) *Genes Dev.* **17**, 1605-1616.
- 7) Farkas, G., Gausz, J., Galloni, M., Reuter, G., Gyurkovics, H. and Karch, F. (1994) *Nature* **371**, 806-808.
- 8) Saunders, A., Werner, J., Andrusis, E. D., Nakayama, T., Hirose, S., Reinberg, D. and Lis, J. T. (2003) *Science* **301**, 1094-1096.

霜島 司(しもじま つかさ)

国立遺伝学研究所個体遺伝研究系形質遺伝研究部門 学術振興会特別研究員

連絡先: 〒411-8540 静岡県三島市谷田1111

E-mail: tshimoji@lab.nig.ac.jp

広瀬 進(ひろせ すずむ)

国立遺伝学研究所個体遺伝研究系形質遺伝研究部門 教授

連絡先: 〒411-8540 静岡県三島市谷田1111

E-mail: shirose@lab.nig.ac.jp