

胚発生における遺伝子制御ヒエラルキーを追って —1987～1997—

鈴木 義 昭
(細胞分化部門)

当研究部門は1978年の暮にスタートし、1980年の夏には、その後の研究活動の主要な柱となる「組織由来の無細胞転写系」を成功させた(Tshda & Suzuki, 1981)。世界に先駆けること実に6年と云う快挙であった。この系に磨きがかかり、熟成した系となるのは1989年頃のことである(Suzuki et al., 1986, 1990)。中部絹糸腺抽出液中ではセリシンー1遺伝子がフィブロイン遺伝子より強く転写され、一方、後部絹糸腺抽出液中ではフィブロイン遺伝子が圧倒的に強く転写されるという、*in vitro* differential transcription が達成された(Suzuki et al., 1990)。*In vivo*での制御をかなり良く反映したこれらの無細胞抽出液中には、特異的転写に関わる転写制御因子群が含まれると予測して、すでに1987年頃より転写制御因子群の精製、cDNA クローニング、およびゲノム遺伝子クローニングを開始した。

現在までに、SGF-1 (Mach et al., 1995)、SGF-3 (Fukuta et al., 1993)、および FMBP-1 (Takiya et al., 1997) の DNA 結合を促進する因子 p28/p36 (S. Takiya et al., 未発表) の cDNAs が得られ、それぞれの全構造が明らかになっている。後述するように、SGF-2 は約12の因子から構成される巨大複合体因子で、そのうち半数については部分配列の決定によって因子の構造に推定がついてきている(K. Ohno et al., 未発表)。SGF-3 についてはゲノム遺伝子も手中にしており、そのプロモーターの解析も進んでいる(Xu et al., 1994)。その解析の一環として、SGF-3 は自身のプロモーター中の PB エLEMENT に結合して負の自動制御を行っていることを明らかにしている。

SGF-1 は、Fork head/HNF-3 β のホモログであることが明らかとなって (Mach et al., 1995)、SGF-1/Bm Fkh と呼んでいる。この因子は、セリシンー1遺伝子の SA 領域ならびにフィブロイン遺伝子の FA-FB 領域に結合して転写を促進すると推定している (Matsuno et al., 1989; Hui et al., 1990)。SGF-1/Bm Fkh は、24時間カイコ胚の前・後端部で発現が確認された後、36時間胚では primitive groove にも検出されるようになり、48時間胚で前・後腸陥入部に強い発現を示した後に、84時間胚では前・中・後腸の他に絹糸腺陥入原基に発現されてくる (Kokubo et al., 1996)。絹糸腺の発育につれ、stage 23 までには前部絹糸腺では発現が見られなくなり、中部・後部絹糸腺に発現が限局されてくる (図1A; 口絵3A参照; Kokubo et al., 1996)。絹糸遺伝子の転写制御因子としてとらえたものが、胚発生の早い時期から発現されていくつかの機能をかね備えているらしきことや、絹糸腺の発育とともに発現部域が限局されてくることなど、大変興味深い知見である。

ショウジョウバエの Fkh および Scr に関する研究から類推すると、Bm Fkh も Bm Scr の制御下にあると期待される。実際、Bm Scr は stage 19 胚の下唇節に検出され、stage 20 胚では下唇節および前胸節前半部で検出されるようになる点で、Scr の発現パターンと酷似している (Kokubo et al.,

1997)。興味深いことに、この時期の胚の絹糸腺陥入部では Bm Scr の発現が消失し、正にその部分に Bm Fkh が検出されてくる様子は、ショウジョウバエの唾腺形成の場合とは異なっている (Kokubo et al., 1997)。最近 *Bm Autp* 遺伝子の欠失変異であると同定した (Nagata et al., 1996) *Nc/Nc* 胚 (市川, 1944) では、Bm Scr の異所的発現が見られるが、これに呼応して Bm Fkh の発現を伴った絹糸腺の異所的陥入が前・中・後胸節で見られた (Kokubo et al., 1997)。

SGF-3 は、POU-specific および POU-homeo ドメインを有する因子で、当該ドメイン 170aa 残基にわたって Cfla と同じ配列を有し、SGF-3/POU-M1 と呼んでいる (Fukuta et al., 1993)。SGF-3 は、胚の前胸腺原基その他に発現が見られた後、やがて絹糸腺陥入部にも検出され始め、絹糸腺の発生につれて発現は続き、やがて前部・中部絹糸腺に限局されて後部絹糸腺では殆んど見られなくなる (図 1 B ; 口絵 3 B 参照 ; Kokubo et al., 1997b)。一方ショウジョウバエの Cfla は、唾腺で発現されるとの報告は全く無く、ここでも絹糸腺との違いが見てとれる。SGF-3 は、5 令幼虫の中部絹糸腺全体からの抽出液中には高濃度に検出された (Fukuta et al., 1993)。しかしながら、immunohistochemistry によって分布を検討した結果からは、中部絹糸腺中でも前・中部領域に強く、セリシン-1 遺伝子の発現が強く見られる後部領域での発現は弱い (図 1 B ; 口絵 3 B)。セリシン-1 遺伝子の転写に対して促進的に作用する因子として期待して来た結果にはやゝそぐわない (K. Matsunami et al.,

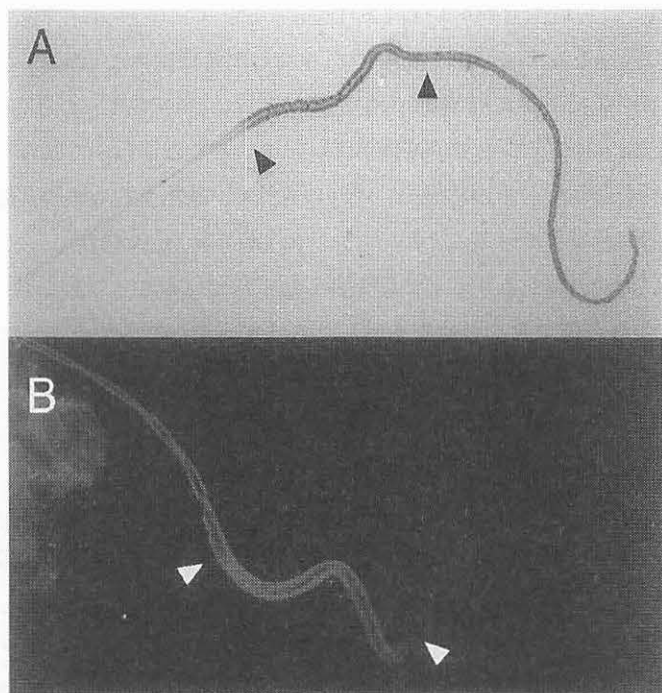


図 1 Stage 23 カイコ胚絹糸腺における SGF-1/Bm Fkh および SGF-3/POU-M1 の発現
 A. SGF-1/Bm Fkh の分布 B. SGF-3/POU-M1 の分布
 ▲, △は共に前部・中部絹糸腺境界 (左) および中部・後部絹糸腺境界 (右)

未発表)。SGF-3 は、セリシン-1 遺伝子の SC 領域に強く、SB 領域に弱く結合することが明らかになっているが (Matsuno et al., 1989, 1990; Hui et al., 1990; Fukuta et al., 1993; Xu et al., 1994), 濃度が一定値を越えると促進性から抑制性へと作用メカニズムが変化する可能性や、とらえていない未知の因子の共同作用を必要としている可能性などが想定され、最終的な解はこれからの課題である。

さて、フィブロイン遺伝子のエンハンサー I (FC, FD, FE 領域からなる) に作用する SGF-2 は、後部絹糸腺特異的転写を与えるに最重要な因子として注目してきた (Suzuki et al., 1986, 1990; Suzuki et al., 1988, 1991a, 1991b; Hui et al., 1990)。しかしながら、この SGF-2 の精製は、10 年程にわたって難航してきた。幸いなことに 1996~1997 年にかけて多年の努力が一挙にみのることとなった。FE 領域中の core element oligonucleotides の multimers (平均 15-mers) を Dyna beads に結合したものを導入することによって、精製に成功したのである (K. Ohno et al., 未発表)。精製のプロセスには、SP-Sepharose FF, Source 30Q, Dyna beads-E multimers, BioSilect 250, Mini S, Mini Q を用いた。その結果、SGF-2 は、見かけ上の分子量約 1.1MDa の巨大複合体分子であることが判明した。p36/p47B/p50B/p55, p30/p32/p33, および p45/p46/p47G/p48/p50G の 3 グループ 12 成分を含んでいる。このことは、先に SGF-2 に相当する活性が 16 万 G 3 時間の遠心で完全に沈降した (Suzuki et al., 1990) 知見とも符合する。この複雑度が従来の精製の困難さをもたらしていた元凶であると推定される。部分ペプチド配列の決定から、p36 は *Xenopus* の原口陥入部で発現されたり、細胞系譜の決定に役割を果たすことの知られている Lim homeodomain family protein であり、p47B/p50B/p55 はこれと相互作用する nuclear Lim interactors であるなど同定が進みつつある (K. Ohno et al., 未発表)。一方、SGF-2 が後部絹糸腺に特異的である点の検討については、これらの成分のうち p45, p47B, p50B, p55, p47G, p50G については抗体が得られていることから、これらを活用して中部絹糸腺抽出液について解析を行った。その結果、いずれの成分も、検出されないか、微量に検出される程度で、後部絹糸腺の特異性を裏づけることができた (K. Ohno et al., 未発表)。

基本転写因子群が巨大複合体をなすことは従来良く知られていることであるが、特異的転写制御因子が上記のような巨大複合体である可能性を示したのは本研究が初めてのことである。全成分のクローニング、recombinant proteins の調製による転写因子活性の再構築などを経て、この可能性を確定することが急務である。これら各成分因子が、発生のどの時期から、どんな濃度バランスで準備されるかを明らかにすることが次の課題であることは言うまでもない。

カイコ胚の下唇節の決定、分化を、body plan の一環としてとらえ、これに関わりのある制御遺伝子群のクローニング、構造解析、同定、発現パターンの解析を行なって、絹糸腺の発生と分化に関する興味ある知見を得てきた。一方、絹糸遺伝子の転写制御因子のいくつかを精製し、クローニングした上で制御の実体を明らかにしようとしてきた。1968 年以來の 30 年プロジェクトは、ほぼその終局 phase に入りつつあることを実感させる。現在対象としているこれら全ての制御遺伝子・転写制御因子遺伝子間の支配関係を明らかにし、最終的にネットワークの全貌を明らかにすることが今後の課題である。

本研究所に関わりのある多くの方々のご支援とはげましによって、このような研究を 18 年半にわ

たって基生研で展開することが可能となった。本研究部門で研究を共にしてきた現・旧メンバーならびに長年にわたって研究支援をしてきて下さった方々と合せて、ここに深謝の意を表したい。

List of Selected Papers (Division of Cell Differentiation)

1. Suzuki, Y., Tsuda, M., Takiya, S., Hirose, S., Suzuki, E., Kameda, M. and Ninaki, O. (1986) Tissue-specific transcription enhancement of the fibroin gene characterized by cell-free systems. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83, 9522-9526.
2. Suzuki, T. and Suzuki, Y. (1988) Interaction of composite protein complex with the fibroin enhancer sequence. *J. Biol. Chem.* 263, 5979-5986.
3. Matsuno, K., Hui, C. -c., Takiya, S., Suzuki, T., Ueno, K. and Suzuki, Y. (1989) Transcription signals and protein binding sites for sericin gene transcription *in vitro*. *J. Biol. Chem.* 264, 18707-18713.
4. Suzuki, Y., Obara, T., Takiya, S., Hui, C. -c., Matsuno, K., Suzuki, T., Suzuki, E., Ohkubo, M. and Tamura, T. (1990) Differential transcription of the fibroin and sericin-1 genes in cell-free extracts. *Develop. Growth Differ.* 32, 179-187.
5. Hui, C. -c., Matsuno, K. and Suzuki, Y. (1990) Fibroin gene promoter contains a cluster of homeodomain binding sites that interact with three silk gland factors. *J. Mol. Biol.* 213, 651-670.
6. Fukuta, M., Matsuno, K., Hui, C. -c., Nagata, T., Takiya, S., Xu, P.-X., Ueno, K., and Suzuki, Y. (1993) Molecular cloning of a POU domain containing factor involved in the regulation of *Bombyx* sericin-1 gene. *J. Biol. Chem.* 268, 19471-19475.
7. Mach, V., Takiya, S., Ohno, K., Handa, H., Imai, T., and Suzuki, Y. (1995) Silk gland factor-1 involved in the regulation of *Bombyx* sericin-1 gene contains Fork head motif. *J. Biol. Chem.* 270, 9340-9346.
8. Kokubo, H., Takiya, S., Mach, V., and Suzuki, Y. (1996) Spatial and temporal expression pattern of *Bombyx fork head/SGF-1* gene in embryogenesis. *Develop. Genes Evol.* 206, 80-85.
9. Nagata, T., Suzuki, Y., Ueno, K., Kokubo, H., Xu, X., Hui, C. -c., Hara, W., Fukuta, M. (1996) Developmental expression of the *Bombyx Antennapedia* homologue and homeotic changes in the *Nc* mutant. *Genes to Cells* 1, 555-568.
10. Kokubo, H., Ueno, K., Amanai, K. and Suzuki, Y. (1997) Involvement of the *Bombyx Scr* gene in development of the silk gland. *Develop. Biol.*, in the press.
11. Kokubo, H., Xu, P. -X., Xu, X., Matsunami, K., and Suzuki, Y. (1997b) Spatial and temporal expression of *POU-M1/SGF-3* in *Bombyx mori* embryogenesis. *Develop. Genes Evol.*, in the press.

