

2005 年
甲番号 告白

1993年度 学位申請論文

δ-クリスタリンエンハンサーの
制御因子 δEF1 の
構造と胚発生期における発現

名古屋大学大学院理学研究科分子生物学専攻

舟橋 淳一

①

学位申請論文（主論文）

δークリスティンエンハンサーの
制御因子 δ E F 1 の
構造と胚発生期における発現

名古屋大学大学院理学研究科分子生物学専攻
舟橋 淳一

要旨

組織特異的な遺伝子発現の調節機構の解析から、種々の遺伝子の発現調節のカスケードを通じて起こるであろう胚発生の全体像に迫ることを目標にして、 δ -クリスタリン遺伝子の水晶体特異的な発現の調節機構を解析してきた。

δ -クリスタリン遺伝子の水晶体特異的な発現は、この遺伝子の第3イントロンにある約1 kb のエンハンサーによって制御されている。その水晶体特異的な活性は、その中の約 120 bp のエンハンサーコアによってほぼ規定される。コアの中で活性に必要不可欠な塩基配列が TTGCTCACCT であることを同定した。おそらくこの配列に結合する核内因子が水晶体に存在し、それがこのエンハンサーの水晶体特異的な活性の制御の鍵を握っているはずである。

水晶体や他の組織にはこの配列に特異的に結合する因子 δ EF1 が存在することが明らかになったので、 δ EF1 の cDNA をサウスウェスタン法でクローニングするした。スクリーニングの結果得られたクローニングの内のひとつ JF12 は、DNA 結合特異性、抗原性に関して δ EF1 と等しく、ORF には DNA 結合モチーフである Zn フィンガー (Cys₂₋₁₁is₂ 型) が連続して 3 つコードされていたことから、 δ EF1 の DNA 結合ドメインをクローニングできたと結論した。

JF12 を元に δ EF1 の全長をコードする cDNA を得て、その塩基配列からアミノ酸配列を予想した。その結果、 δ EF1 は C 末端よりの 3 個だけでなく、N 末端よりも 4 個の Zn フィンガーが、さらにその間にホメオドメインがあるという複数の DNA 結合モチーフを持つ物であることが判った。またこれら以外にも転写活性化に関わると予想

される領域も存在した。一方 δ EF1 が転写活性に及ぼす影響を評価するため、コード領域全体を強制発現ベクターに組み込み、 δ -クリスタリンエンハンサーのコア領域を持つレポーター遺伝子と共に、水晶体細胞の初代培養にコトランスフェクションした。その結果 δ EF1 はコアに対してリプレッサーとして働く事が明らかとなった。

δ EF1 は発生過程の胚の多くの組織に存在することから、水晶体の分化のみならず他の組織の発生にも働いている可能性があると考え、これを検討するため δ EF1 の発現の組織分布をニワトリの発生段階を追って詳しく調べることにした。その結果次の事が明かとなった。

(1) δ EF1 の発現はまず脊索で始まり、その後神経管や体節、腎節等の中胚葉由来の組織でみられる。(2) 分化が進むと、筋節での発現が特に強まる。(3) 中胚葉以外の発現は神経系と水晶体でのみ強く、その他の外胚葉や内胚葉ではごく弱い。これらより δ EF1 は水晶体はもちろん、それ以外にも特に中胚葉を中心とした組織の分化に深く関わっていると思われる。

さて、そもそも δ EF1 は、 δ -クリスタリンエンハンサーの水晶体特異的な活性に必要不可欠な領域であるエンハンサーコアに結合する因子としてクローニングした遺伝子であったが、リプレッサーとしての活性を示したり、発現様式は水晶体特異的ではなく、むしろ普遍的であった。この結果は一見矛盾を含んでいるように見える。最も単純な説明は、 δ EF1 は水晶体以外の組織では δ -クリスタリンの発現を抑え、水晶体ではクリスタリン以外の遺伝子 (δ EF1 の結合配列を持つ) の発現を抑さえているというものである。しかし、その発現パターンのダイナミックな変化や構造上の特徴を考えると、 δ EF1 が細胞の分化に何らかの積極的な役割をはたしているのではと期待させら

れる。また、 δ EF1 と構造の上で相同意が無いショウジョウバエの *zfh-1* は、*snail* と *twist* の制御下にあることが知られており、その初期胚における発現パターンは中胚葉に特異的である。このアナロジーからニワトリなどの脊椎動物でも同様なカスケードが存在し、 δ EF1 はその中に位置づけることができのかも知れない。

要旨	S 1
目次	1
序論	5
本論	
1. δ - クリスタリンエンハンサーの水晶体特異性を司る領域 の解 析	
● 序	7
● 材料と実験方法	8
・ エンハンサーの断片化	
・ BN 突然変異体の合成	
・ トランスフェクション	
・ CAT アッセイ	
● 結果と議論	9
・ 水晶体特異的なエンハンサー活性は BN 断片の 3' 側にある	
・ エンハンサー活性に必要不可欠な配列	
＊ 図	

2. δ EF1 の cDNA のサウスウェスタン法によるクローニング	
● 序	1 2
● 材料と実験方法	1 3
・ cDNA ライブライマーの作製	
・ λ gt11 発現型ライブライマーのスクリーニング	
・ 塩基配列の決定	
● 結果と議論	1 4

* 図、表

3. δ EF1 の cDNA クローニングの過程で分離した他のクローンの
解 析

● 序	-----	1 6
● 材料と実験方法	-----	1 6
・ 塩基配列の解析とホモロジー検索		
・ DNA 結合能の解析		
● 結果と議論	-----	1 7
・ JF9 と JF10 は HMG ボックスを持つ		
・ DNA 結合能とエンハンサー活性		

* 図

4. JF12 のコードするタンパク質に対する抗体は δ EF1 を特異的に
認識する

● 序	-----	1 9
● 材料と実験方法	-----	1 9
・ JF12 融合タンパク質の発現と精製		
・ 抗体の產生とアフィニティーカロマトグラフィ ーによる精製		
・ 抗体のタイマーの測定		
・ ゲルシフト		
● 結果と議論	-----	2 1

* 図

5. δ EF1 の全長をコードする cDNA のクローニング

●序	2 3
●材料と実験方法	2 3
・ハイブリダイゼーション	
・cDNA ライブラーの作製	
・cDNA ライブラーのスクリーニング	
●結果と議論	2 4
・ δ EF1 の主な mRNA は 5.5 kb の長さを持つ	
・全コード領域を含むクローンの単離	
・水晶体以外の組織の δ EF1	

* 図

6. δ EF1 はホメオドメインと Zn フィンガーをもつ

●序	2 7
●材料と実験方法	2 7
●結果と議論	2 7
・ δ EF1 タンパク質の構造	
・ δ EF1 と相同意の高い遺伝子がショウジョウバエなどにある	

* 図

7. δ EF1 はリプレッサーとして働く

●序	3 0
●材料と実験方法	3 0
●結果と議論	3 1

* 図

8. 胚発生過程における δ EF1 の発現

● 序 ----- 3 3

● 材料と実験方法 ----- 3 3

● 結果と議論 ----- 3 5

* 図、表

総合議論 ----- 3 8

- δ EF1 産物の構造とその DNA 結合能
- 水晶体における δ EF1 の働き
- 中胚葉における δ EF1 のダイナミックな発現の変化
- δ EF1 は転写抑制にしか働きかないのだろうか？
- 転写制御因子としての δ EF1 が発生過程で果たす役割

参考文献 ----- 4 5

謝辞 ----- 5 0

序論

「発生という現象は、正しい遺伝が正しい場所で正しい時期に発現する事により押し進められている」。ほんの数年前にこう言い切る事は少なからず勇氣のいる事であった。しかし今日では逆にこの仮説に反論する事の方が勇気を要するほどになった。

実際ショウジョウバエや線虫だけでなく高等脊椎動物においても数多くの実験が、ある遺伝子を破壊したりその発現を乱した場合に正常な発生が起こらなくなる事を示し、その遺伝子は正常な発生のために必要であると結論づけている。だがこれがそのまま最初にあげた仮説の証明にはならない。この仮説を証明し発生現象の全体像を明らかにしていくためには、より多くの遺伝子について同じような実験を行うだけでなく、個々の遺伝子についてその時期特異的および組織特異的な発現調節機構を解析する事が必要である。

水晶体という組織は、外胚葉が眼胞の誘導を受けてプラコードを形成し、それが陥入してできる組織である。また胚発生の過程で例外的に早い時期に分化の最終段階を迎える組織でもある。ほぼその水晶体だけで発現するニワトリの $\delta 1$ -クリスタリン遺伝子は、水晶体の発生過程において水晶体を特徴づける遺伝子としてはもっとも早く発現される。したがってこの遺伝子の発現の制御機構を解析する事で、どの様な機構で水晶体が外胚葉から出来上がってくるのかという問題もさることながら、種々の遺伝子の発現調節のカスケードを通じて起こるであろう胚発生の全体像にも迫れると私は考えた。

ニワトリの $\delta 1$ -クリスタリン遺伝子は 8kb の長さで 17 のエクソンから構成されている。私の所属する研究グループでは、この遺

伝子を水晶体特異的に発現させる制御領域を解析してきた。そして水晶体特異性はその第3イントロンに存在するエンハンサーによって主に制御されている事を明らかにしてきた (Hayashi et al., 1987; Goto et al., 1990)。

第3イントロンのエンハンサーは約1 kb の長さがある。これをいくつかの領域に切り分けてそれぞれの活性を検討していくと、このエンハンサーは複数の制御領域によって構成されている事が明かとなった (Goto et al., 1990)。それぞれの領域は単独ではエンハンサー活性を示さないが、同じもの同士あるいは異なるものとの組み合わせにより初めてエンハンサー活性を示す。これらの構成要素のそれぞれを同じもの同士幾つも連結してエンハンサー活性をしらべていくと、特に厳密に水晶体特異性を示す約 120 bp の領域が特定できた。これを我々はエンハンサーコアと名付けた。

エンハンサーは、そこに DNA 結合能を持つ転写調節因子が結合して、さらにその因子が転写開始複合体に直接あるいは間接的に働きかける事で機能すると考えられている。したがって水晶体特異性に関わるような転写調節因子が上に述べた約 120 bp のコア領域のどこかに結合するはずである。

私は、そのような因子を見つけてそこから水晶体特異的な遺伝子の発現調節機構のカスケードを辿っていくべく、まず約 120 bp のコア領域のどこが水晶体特異的なエンハンサー活性に必要不可欠なのかを明らかにしようと考えた。またさらにその場所に結合するタンパク質因子のクローニングを行う計画を立てた。そのような因子は水晶体特異的な転写調節に関わる因子である事が期待されるからである。

●序

δ-クリスタリンエンハンサーはδ-クリスタリン遺伝子の第3イントロンに存在し、その長さは約1kbである。このエンハンサーの水晶体特異的な活性は、その中にある約120 bpのBN断片（エンハンサーコア）によってほぼ規定される。私はこの断片の中で水晶体特異的なエンハンサー活性に必要不可欠な領域を特定しようと考えた。序論で述べたようにそのような領域は、水晶体特異的な転写制御に関わる因子が結合する場所であるはずだからである。

約120 bpのBN断片の中でエンハンサー活性に不可欠な領域を特定するために最初に行った解析は、それまでのエンハンサーの解析で使われてきた方法に沿ったものである。即ち解析すべき領域をいくつかに断片化し、それを同じもの同士複数連結し（以下これを「多量体化する」と表現する）それらの水晶体特異的なエンハンサー活性を調べるというものである。ただこの方法には限界がある。あまり領域を狭めてしまうと多量体化してもエンハンサー活性が測定できないほど低下してしまう恐れがある。そこである程度まで領域を狭める事が出来たら、その後の解析はその領域の塩基配列に突然変異を導入し、その結果生ずる活性の変化を見る事で、活性に必要不可欠な領域の塩基配列を特定する事にした。

エンハンサー活性の測定にはCATアッセイを用いた。このためにチミジンキナーゼのプロモーターモーターとCAT（クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ）遺伝子の下流に、活性を測定しようとするエシハシサーの断片を挿入したプラスミドptkCATを

構築する。これをニワトリ胚から調製した水晶体細胞などの初代培養に導入して、発現された CAT の酵素活性をもとにエンハンサー活性を評価する。

● 材料および実験方法

・ エンハンサーの断片化

約 120 bp の BN 断片を *HinfI* サイトで 2 分割し 70 bp の BH 断片と 55 bp の HN 断片とした。また *HinfI* サイトをまたぐような 59 bp の塩基配列を持つ断片 (DELC02) を合成した。これらのそれを同じ向きに 8 個つないで 8 量体として, ptkCAT の *BamHI* サイトに挿入した。

・ HN 突然変異体の合成

変異体は, HN 断片を 5 ~ 10 bp の 8 つのブロックに分けて、それぞれのブロックの中の塩基を全て置換するような塩基配列とした。さらに多量体を作るため 5' と 3' にそれぞれ *BglII* と *BamHI* のリンカーの塩基配列を付け足した 61 bp のオリゴヌクレオチドを作成した。これらをライゲーションして同じ向きに 8 個つなぎ, ptkCAT の *BamHI* サイトに挿入した。

・ トランスフェクション

15 日目ニワトリ胚より水晶体上皮と皮下の繊維芽細胞、肺、肝臓、脳を取り初代培養を作った。細胞の密度はそれぞれ直径 3.5 cm の培養皿あたり 2.0×10^5 あるいは 1.0×10^5 とした。培養開始後 48 時間目にリン酸カルシウム法によってトランスフェクション

を行った。用いた DNA の量は直径 3.5 cm の培養皿あたり 1 μ g である。トランスフェクション後 4 時間目に培地を交換し、さらに 20 時間培養した。

• CAT アッセイ

トランスフェクションした細胞をかき取って集め 250 μ l の 25 mM Tris (pH 7.8) に懸濁した後、凍結・融解を 3 回繰り返す。これを 60 °C で 5 分間加熱後遠心し上清を抽出液とする。この抽出液 20 μ l を 0.2 μ Ci の 14 C 標識クロラムフェニコール, 0.8 mM アセチル CoA, 200 mM Tris-Cl (pH 7.8) を含む合計 100 μ l の反応液中で 37 °C, 2 時間反応させた。反応後の溶液を酢酸エチルで抽出し、有機相を蒸発乾固後ふたたび酢酸エチルに溶かし、薄層クロマトグラフィーを行った。結果はオートラジオグラムか放射線量の測定により評価した。

● 結果と議論

• 水晶体特異的なエンハンサー活性は BN 断片の 3' 側にある
エンハンサーコア (BN 断片) の 5' 側 70 bp (BH 断片) と 3' 側 50 bp (HN 断片)、その境目の 59 bp (DELC02) (図 1 - 1 A) それぞれを 8 量体として ptkCAT に挿入しそれぞれのエンハンサー活性を調べた (図 1 - 1 B)。BH 断片と DELC02 は水晶体細胞ではエンハンサー活性を示さなかった。これに対して HN 断片は水晶体細胞においてエンハンサーがない場合に比べて 21 ± 4 倍 (11 回の実験の平均値) の活性を示したが、他の細胞ではエンハンサー活性を示さなかった。これらの結果は HN 断片の中にこのエンハンサー

の水晶体特異的な活性に必要不可欠な領域が含まれている事を示している。そこで次にこの HN 断片の塩基配列に塩基置換を導入した合成 DNA を作り、それらのエンハンサー活性を調べる事で、活性に不可欠な領域を特定しようと考えた。

・ エンハンサー活性に必要不可欠な配列

HN 断片を 5 bp から 10 bp の 8 つのブロックに分けて、それぞれのブロックの中の塩基置換を行った配列を持つ DNA を合成した。ブロックの分け方は特に 3' 側を細かくする事にした。それは DELCO2 は HN 断片の 5' 寄りの塩基配列を持っているのにも関わらずエンハンサー活性を示さなかったためである。塩基置換はプリンをピリミジンに、また A-T ペアを G-C に替えるというトランスページョンとした。ただしこれらの塩基置換により既知の転写制御因子の結合配列を生ずる場合は、この規則からはずれた配列とした。以下これらの塩基置換を導入した HN 断片を HN 変異体 (HN3~HN10) と呼ぶ事にする。また塩基置換を行っていない元の配列を持つものは HNW とよぶ (図 1-2 A)。これらそれを 8 量体としてエンハンサー活性を測定した。

CAT アッセイの結果の一例を図 1-2 B に示す。また水晶体細胞で行った数回の実験結果をまとめたのが図 1-2 C である。活性を調べる断片は CAT 遺伝子に対してそれぞれ順向きと逆向きに挿入したが、全ての変異体について双方に活性の差は見られなかった。

さて、水晶体細胞では HN10 以外の全ての HN 変異体でエンハンサー活性の低下が観察された。中でも HN5 と HN6 ではエンハンサー活性がほぼ完全に失われた。一方繊維芽細胞では CAT の発現はエ

ンハンサーやその変異体の有無に関わらず変化しなかった。唯一の例外は HN4 であるが、これは何らかの未知の活性化因子の結合配列が塩基置換の導入によって出来てしまったためであろう。この繊維芽細胞での結果は HN5 と HN6 のエンハンサー活性の喪失は、一般的な転写の阻害によるものではなく、水晶体特異的なエンハンサー活性を塩基置換により失ったためであることを裏付けている。したがってこの 10 bp の配列 TTGCTCACCT/AACGAGTGGA が、水晶体特異的な活性の制御に関わる因子が結合する領域の最有力候補である。

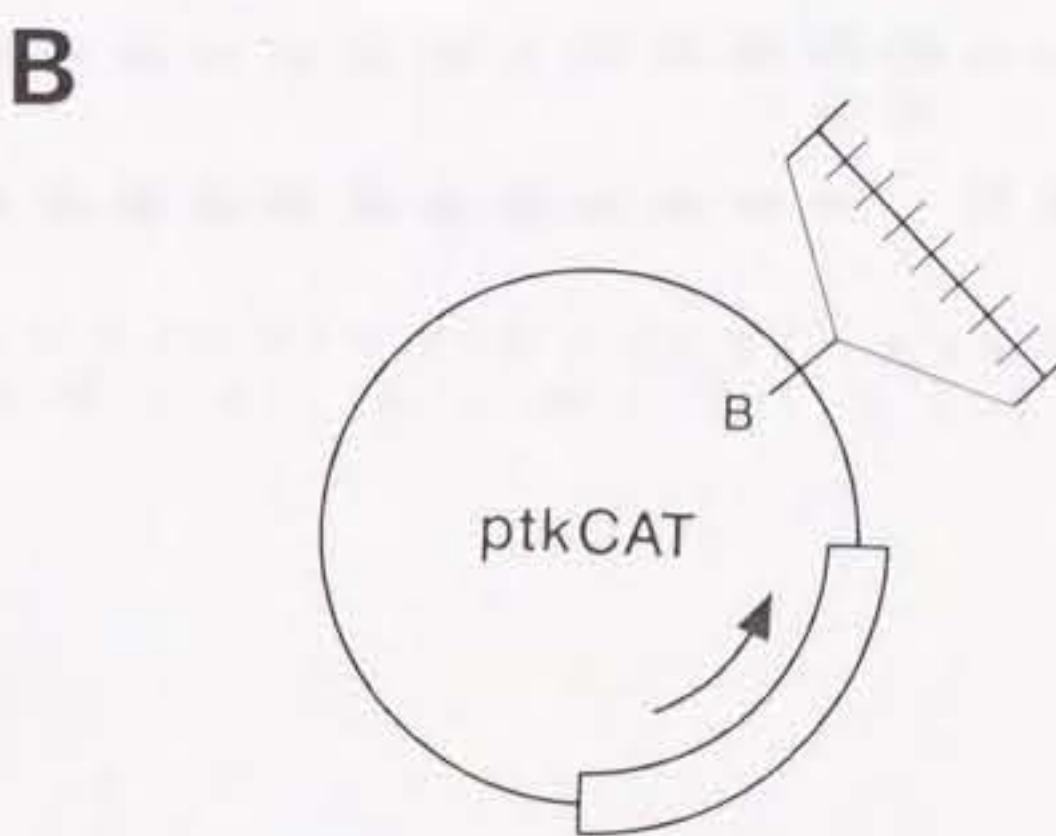
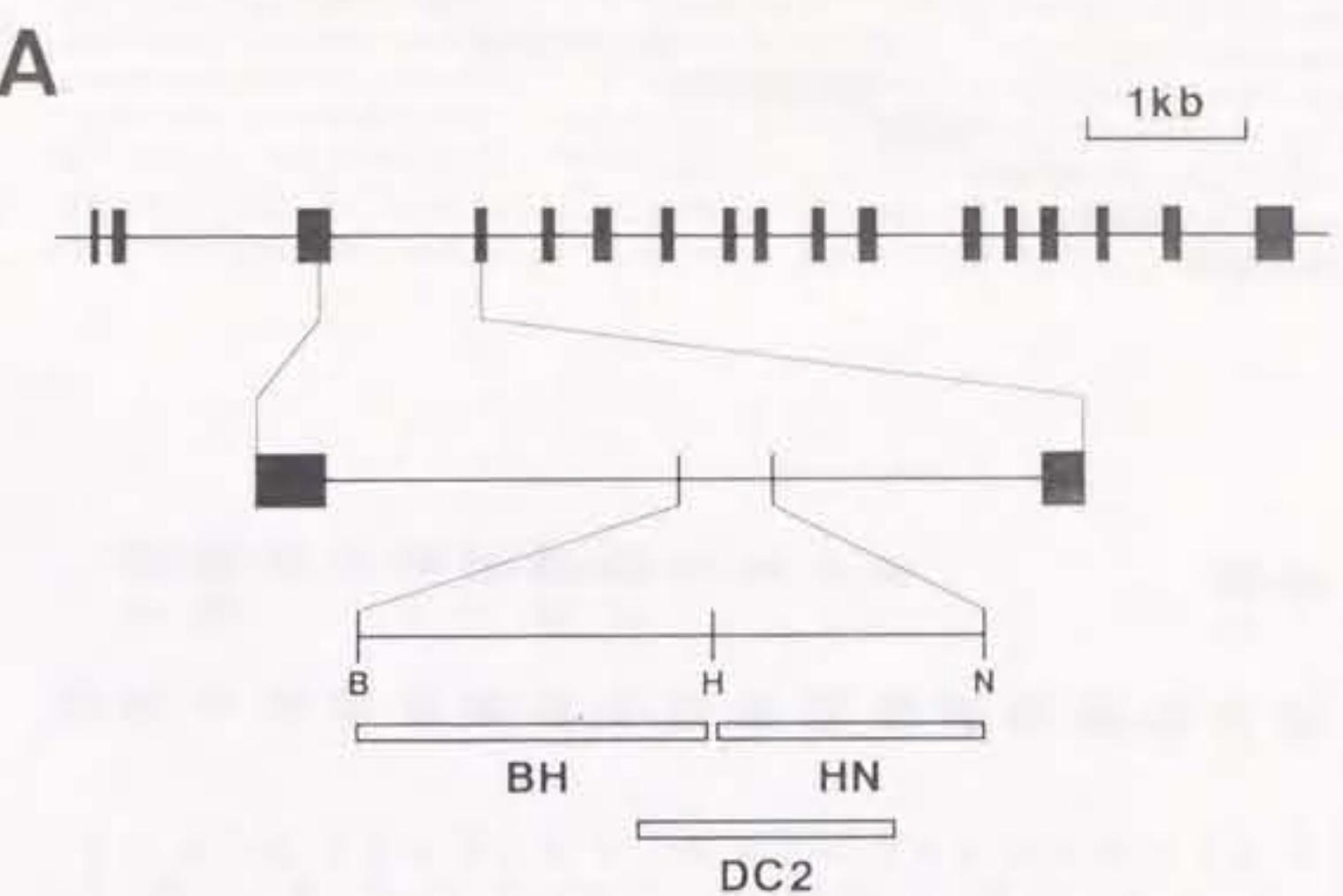


図 1 - 1.

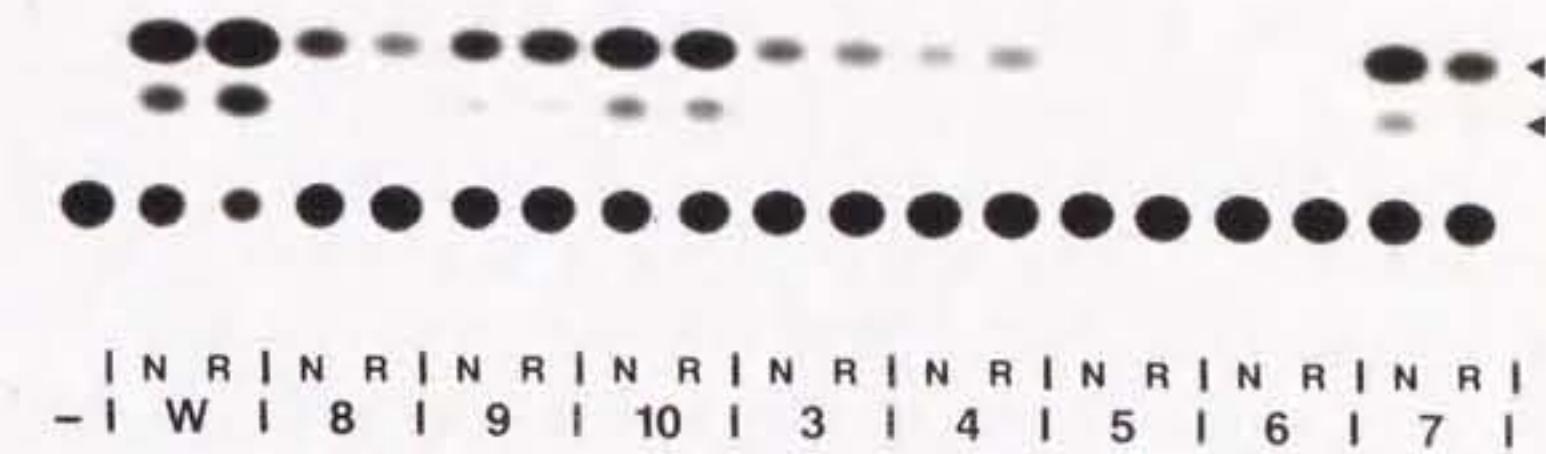
A. $\delta 1$ -クリスタリンエンハンサーとエンハンサー α およびその断片。 $\delta 1$ -クリスタリン遺伝子の構造の模式図を転写方向について左から右へ描いた。エクソンは黒塗りの四角で、非翻訳領域およびイントロンは直線で記した。第3イントロンがこの遺伝子のエンハンサーで、BからNがコア、BH、HN、DC2はその断片である。制限酵素による切断部位を、B, BamHI; H, HindIII; N, NcoIでそれぞれ表した。

B. プラスミド ptkCAT の構造。エンハンサー活性を測ろうとする断片は BamHI サイトに挿入した。白抜きの四角は tkCAT の転写単位を示し、その内側の矢印はその転写方向である。

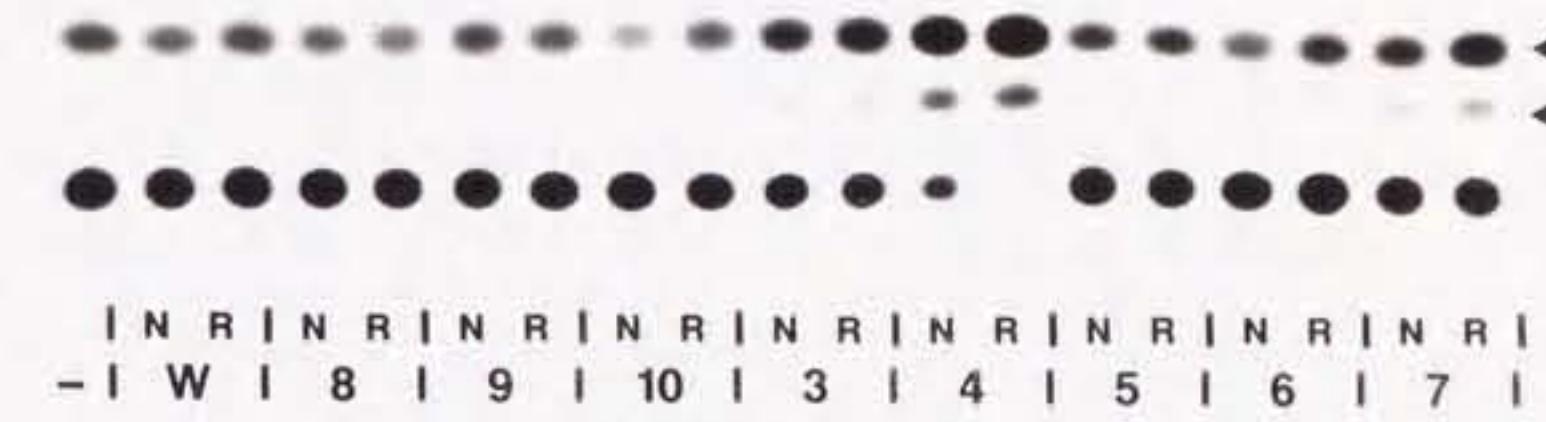
A

HNW	gatctAGTCAGCCACTAAGCACTTTCTGAAATATTCAATTGTTGTTGCTCACCTACCATggatc
HN8	gatct CATACTTA ACTAAGCACTTTCTGAAATATTCAATTGTTGTTGCTCACCTACCATggatc
HN9	gatctAGTCAGCC CAGCTTAA ACTTTCTGAAATATTCAATTGTTGTTGCTCACCTACCATggatc
HN10	gatctAGTCAGCCACTAAGC TCTGAACATCAAATATTCAATTGTTGTTGCTCACCTACCATggatc
HN3	gatctAGTCAGCCACTAAGCACTTTCTG CCCACCGACGTGTTGTTGGTCACCTACCATggatc
HN4	gatctAGTCAGCCACTAAGCACTTTCTGAAATATTCA GCGGATTGCTCACCTACCATggatc
HN5	gatctAGTCAGCCACTAAGCACTTTCTGAAATATTCA GCGGATTGCTCACCTACCATggatc
HN6	gatctAGTCAGCCACTAAGCACTTTCTGAAATATTCA GCGGATTGCTCACCTACCATggatc
HN7	gatctAGTCAGCCACTAAGCACTTTCTGAAATATTCA GCGGATTGCTCACCTACCATggatc

B a



b



C

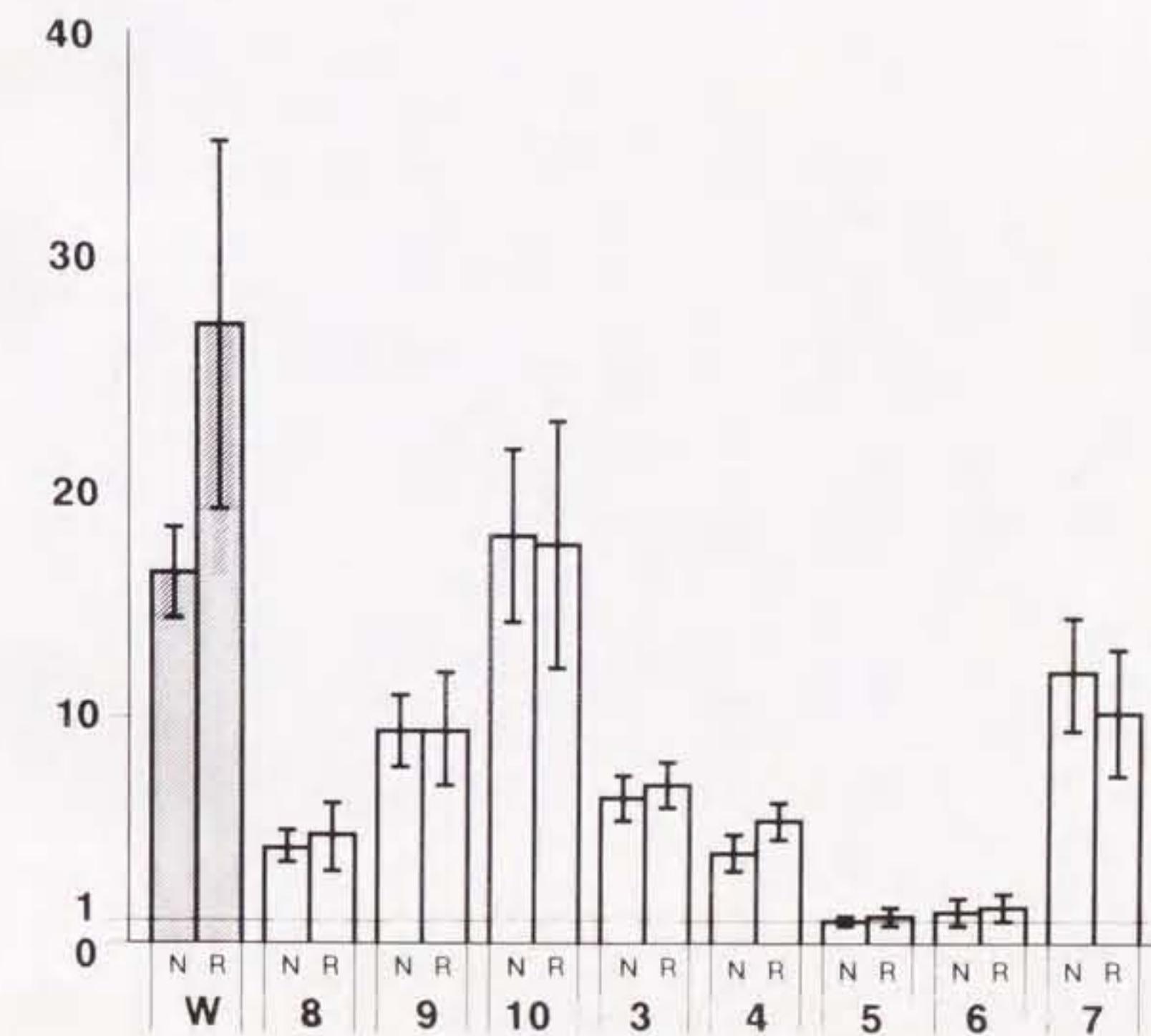


図 1 - 2. HN 断片とその突然変異体の塩基配列とそれらのエンハンサー活性。（前頁）

A. HN 断片の元の配列が HNW で、その塩基置換による突然変異体が HN4 から HN10 である。塩基配列はセンス鎖のみを示し、塩基置換された配列は四角で囲って示した。またこれらを多量体化するためにつけ加えたリンカーの配列は小文字で示した。

B. 水晶体（a）および繊維芽細胞（b）における HN 変異体の 8 量体のエンハンサー活性を CAT アッセイにより調べた結果の一例を示した。アセチル化されたクロラムフェニコールのスポットを矢尻で示した。クロマトグラムのしたに示した（-）は挿入断片がない場合で、（W）は HNW、8 から右はそれぞれ HN 変異体を挿入したものである。N と R のレーンはそれぞれの断片を CAT の転写方向に対して順向きあるいは逆向きに挿入したことを見出す。HN5 と HN6 の CAT 活性はエンハンサーがない場合に等しいことに注目されたい。

C. 水晶体での HN 変異体の効果をエンハンサーがない場合を 1 として CAT 活性が何倍になったかを示した。それぞれのヒストグラムは 6 回から 11 回の実験の結果の平均値を示しており、標準誤差を縦棒で示した。N と R は（B）と同様に 8 量体の向きを示す。

●序

第1章に述べた研究によって、 δ -クリスタリン遺伝子の水晶体特異的なエンハンサーの活性には、エンハンサーコアの中の配列 TTGCTCACCT が必要不可欠である事が明かとなった。おそらくこの配列に結合する因子が水晶体の核内に存在し、それがこのエンハンサーの水晶体特異的な活性の制御の鍵を握っているはずである。そのような制御機構の詳細を明らかにするために最も直接的な方法は、それらの因子をクローニングする事である。幸い我々のグループの研究によって、実際にこの領域に結合する因子 δ EF1 が水晶体細胞や他の多くの組織にも存在する事が明かとなった (J. Funahashi et al., 1991)。そこで私はこの δ EF1 の cDNA をクローニングする事にした。

クローニングにはサウスウェスタン法を用いた (Vinson et al., 1988)。また cDNA は、 δ -クリスタリンの発現が極大となる時期より 1 日前の 14 日目ニワトリ胚より調製した poly(A)⁺ RNA からオリゴ dT あるいはランダムオリゴマーをプライマーとして合成し、 λ gt11 発現ベクターに挿入してライプラリーとした。したがって挿入された cDNA は N 末端側に β ガラクトシダーゼ持つ融合タンパク質として発現される。プローブは末端ラベルした hn 断片の 8 量体を用いた。hn 断片は前章で述べたように 55 bp の長さを持ち、 δ EF1 の結合配列をその 3' 側に含む。またこの断片は多量体化すると強い水晶体特異的なエンハンサー活性を示すものである (J. Funahashi et al., 1991)。またサードスクリーニングの段階で hn

の変異体をプローブにしてそれぞれのクローンの DNA 結合特異性を調べた。

ところで、スクリーニングをはじめた時点では δ EFL と HN 断片との結合に最適な条件がはっきりしていなかった。そこでそれまでに報告されていたサウスウェスタン法の成功例を参考にして、もっとも一般的と思われる条件を用いることにし、その後少しづつ改良を加えていった（表 2-1）。

● 材料および実験方法

・ cDNA ライブライリーの作製

13 日目ニワトリ胚水晶体より poly(A)⁺ RNA を調製し、cDNA 合成キット（invitrogen）を使用しランダムプライム法により cDNA を合成した。これを λ gt11 の EcoRI サイトに EcoRI-NotI リンカー（invitrogen）または EcoRI-BamHI-NotI リンカー（宝酒造）を用いて挿入し、Stratagen 社のパッケージングエクストラクトを使用しパッケージングを行った。得られた cDNA ライブライリーの平均インサート長は 300~2000 bp に及んでいた。

・ λ gt11 発現型ライブライリーのスクリーニング

水晶体より調製したランダムプライムライブライリーを主に Vinson et al. (1988) の方法に基づいてスクリーニングした。

2.0 \times 10⁵ 個のファージをホストバクテリア Y1090 に感染させ、9 \times 13 cm の寒天培地上に蒔き 42 °C で 3.5 時間保温した。次に 10 mM の IPTG を染み込ませた後風乾したナイロン膜 (Nytran from Schleicher & Schuell) をかぶせ、37 °C で一晩保温した。その後ナ

イロン膜をはがし風乾し、結合緩衝液 (10 mM HEPES, 50 mM NaCl, 1 mM Na₂HPO₄, 0.1 mM ZnSO₄, 1 mM DTT, 5 % glycerol) 中で塩酸グアニジンによる変性・脱変性の操作を行った。最後に膜を 5 % のスキムミルク (Difco) を含む結合緩衝液でブロッキングし、0.25 % のスキムミルクを含む結合緩衝液で洗った。

上記のナイロン膜 2 枚づつをプラスチックバッグに入れ、末端ラベルした HNW の 8 量体のプローブ (3×10^6 cpm/ml; 23 ng/ml) と 0.3 μ g の poly(dA-dT), 0.25 % のスキムミルクを含む結合緩衝液を加え、室温で 2 時間保温した。これらのナイロン膜を 20 枚当たり 500 ml の結合緩衝液で 5 分間 3 回洗った後、オートラジオグラフィーを行った。

・ 塩基配列の決定

シーケンシングは ³²P と Sequenace を用いてジデオキシ法で行った。

● 結果と議論

スクリーニングの初期において 3 種のクローンが得られた。しかし HN 断片の変異体をプローブにしてこれらの DNA 結合特異性を調べると δ EF1 のそれとは異なる物であることがわかった。この時は非特異的な DNA 結合のコンペティターとして poly(dIdC) を用いていたが、ちょうどその頃に δ EF1 の HN 断片への結合にはコンペティターとして poly(dAdT) を用いると有効であることが明かとなつたため、これを用いることにした。またこの結合に亜鉛イオンが必要な可能性もあると考えこれも加えることにした（表 2-1）。

これらの改良を加えながら最終的に 4×10^6 個のプレートをスクリーニングして合計 5 個の陽性のクローンが得られた。その中のひとつに δ EF1 の結合部位（ブロック 5 と 6、図 2-1A）に特異的に結合するクローン JF12 があった（図 2-1B）。このクローンをこのあと詳しく解析することにした。なお残りの 4 つのクローンについては次の章で述べる。

クローン JF12 の cDNA挿入断片の長さは 826 bp で、その全長にわたってオープンリーディングフレーム（ORF）をとることが出来た。この ORF から予想されるアミノ酸配列には DNA 結合モチーフである Zn フィンガー（Cys₂-His₂ 型）が連続して 3 つ存在していた。おそらくこれらが β ガラクトシダーゼ : JF12 融合タンパク質の DNA 結合能を担っているのであろう。

表2-1 サウスウェスタンスクリーニングの条件

DNA 結合 タンパク質	認識部位	緩衝液	フィルター	非特異的 コンペティター	変性/脱変性 の有無
H2TF1 NF-κB	MHC クラスI 遺伝子 κ鎖 遺伝子 SV40 エンハンサー	10 mM Tris (pH 7.5) 50 mM NaCl 1 mM DTT 1 mM EDTA	ニトロセルロース	poly-(dIdC)	なし
oct2	免疫 クロマチン・ プロモーター にある オクタマー 配列	同上	同上	変性した ウシ胸腺 の DNA	なし
κ E2結合 タンパク質	免疫クロ マチン κ 鎖 エンハンサーに ある κ E2 領域	同上	同上	同上 5 μg/ml	なし
IRF-1	IFNβ 遺伝子の 調節領域	10 mM HEPES (pH 7.5) その他は上と同じ	ナイロン	サケ精子 DNA 350 μg/ml	なし
C/EBP	ウィルスの エンハンサー	25 mM HEPES (pH 7.9) 25 mM NaCl 5 mM MgCl2 0.5 mM DTT	ニトロセルロース	なし	あり
JF9/JF10		10 mM HEPES (pH 7.8) 50 mM NaCl 1 mM DTT 1 mM Na2HP04	ナイロン	poly-(dIdC) 10 μg/ml	あり
JF11		上に加えて 0.1 mM ZnSO4	同上	poly-(dAdT) 0.35 μg/ml	あり
JF13		同上	同上	変性した ウシ胸腺 の DNA 5 μg/ml	あり
JF12 (δ EF1)		同上	同上	poly-(dAdT) 0.3 μg/ml	あり

A

HN	8	9	10	3	4	5	6	7	
	AGTCAGCC	ACTAAGC	ACTTTTCTG	AAATATTCA	TGTTG	TTGCT	CACCT	ACCAT	G

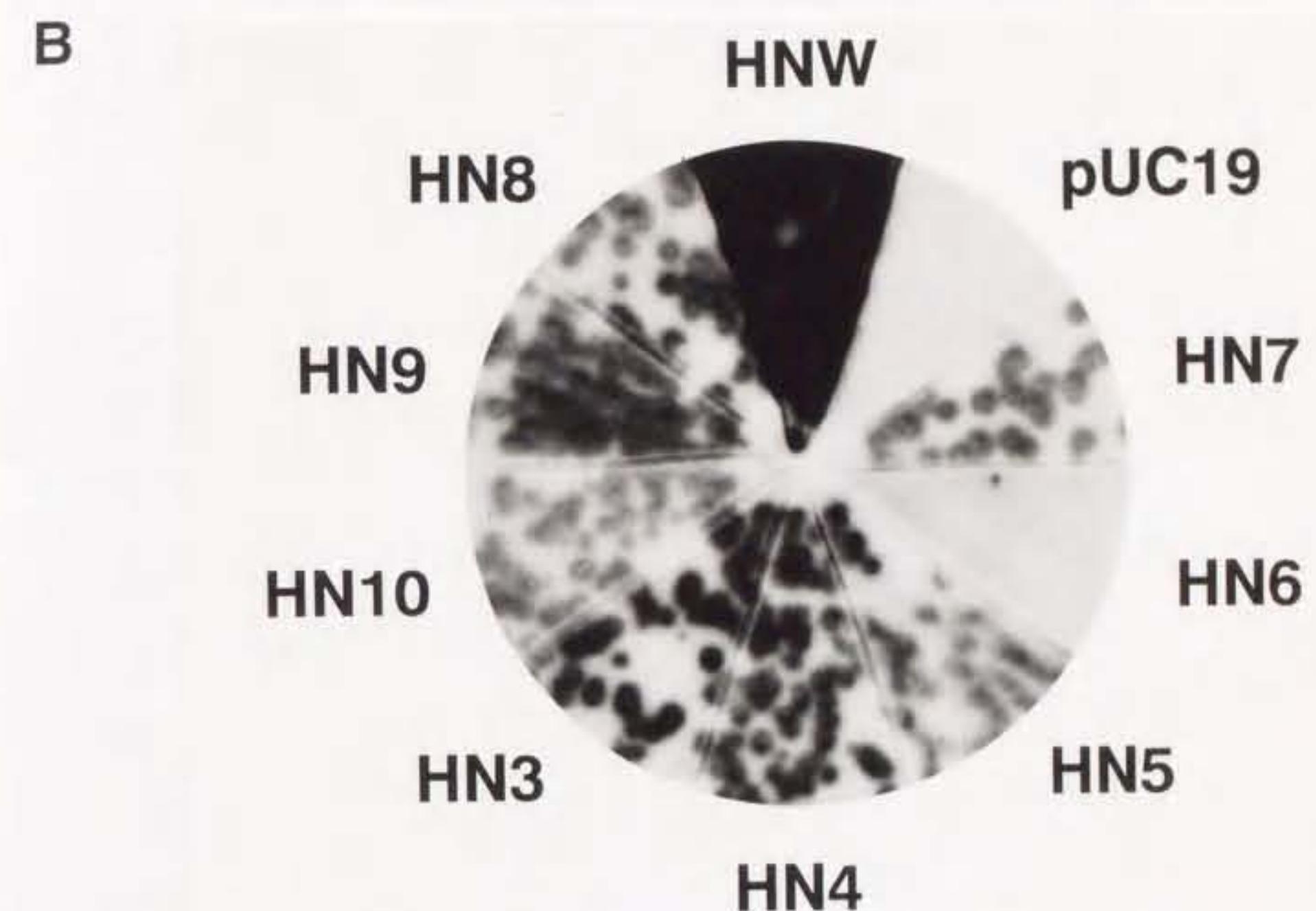


図2-1. サウスウェスタン法により得られたクローン JF12
 A. プローブとして用いたHN断片の塩基配列。サードスクリーニングでは四角で囲ったブロックそれぞれに塩基置換を導入した配列（第1章参照）を持つオリゴヌクレオチドをプローブとした。配列の上の数字はそれらのブロックの番号である。
 B. クローン JF12 のサードスクリーニングの結果。HN断片の塩基配列を持つ HNW、あるいはその変異体である HN3 から HN10 までをプローブとして、ニトロセルロースフィルター上の融合タンパク質と結合させたもののオートラジオグラム。pUC19 はネガティブコントロールである。

3. δ EF1 の cDNA クローニングの過程で分離した他のクローンの解析

●序

δ EF1 の cDNA クローニングの過程で、目的とするクローン以外に 4 つのクローンが得られ、それぞれ JF9, JF10, JF11, JF13 と名付けた。これらのクローンは、おそらく HN 断片のある塩基配列に特異的に結合するのでクローニング出来たのであろう。それならば HN 断片に結合する事によって δ -クリスタリンエンハンサーに何らかの働きをしている可能性がある。そこでこれらの塩基配列を決定し DNA 結合モチーフを持つかどうか調べると共に、それぞれの DNA 結合能についても調べる事にした。

●材料と実験方法

・塩基配列の解析とホモロジー検索

塩基配列およびアミノ酸配列の解析とホモロジー検索は DNASIS (宝酒造) あるいは日本 DNA データバンク (DDBJ) のデータについては FASTA および TFASTA を用いて行った。

・DNA 結合能の解析

寒天培地上に一面にうえたホストの大腸菌に JF9 から JF13 までのファージクローンのライセートを爪楊枝で数カ所づつ感染させて 42°C で 3.5 時間保温した。その後 10 mM の IPTG を染み込ませた後風乾したナイロン膜をかぶせ、37 °C で一晩保温した。ナイロン膜をはがし風乾し、スクリーニングの時と同様に変性脱変性を行った

後、 ^{32}P で標識した HNW あるいは HN 変異体をプローブとして結合反応を行い、洗浄後オートラジオグラムをとった。

● 結果と議論

・ JF9 と JF10 は HMG ボックスを持つ

塩基配列を決定し、DNA データベースを検索した結果、JF9 と JF10 は HMG ボックス (Jantzen et al., 1990) をもっている事が明かとなった。また JF9 はその塩基配列の相同意性の高さからニワトリの HMG1 であると結論づけた (図 3-1)。ところで JF9 の DNA 結合能は JF10 のそれに比べて非常に弱いものであった。おそらく JF9 (即ち HMG1) は JF10 と同様に HMG ボックスを持っているために、弱くはあるが HN 断片に結合できるのであろう。その他の 2 つ、JF11 と JF13 には既知の DNA 結合モチーフは見いだせなかった。なおこれらの cDNA の塩基配列は DDBJ/GenBank/EMBL のデータベースに D14313 ~ D14318 の番号で登録されている。

・ DNA 結合能とエンハンサー活性

これらの 4 つのクローンは HN 断片の中の 10 と 3 のブロックに特異的に結合した (図 3-2)。

ここで第 1 章に記した研究を振り返ってみる。ブロック 3 と 4 に塩基置換を導入した場合には HN 断片の水晶体特異的なエンハンサー活性は野生型の 3 分の 1 から 4 分の 1 に低下したので、この領域に結合する因子の存在が予想できる。一方ブロック 1 0 ではエンハンサー活性はほとんど変化しなかった。したがってこの結果からはブロック 10 と 3 にまたがって結合し活性を制御するような因子が

存在するとは考えにくい。むしろこの領域は非常に AT リッチな塩基配列となっているために、そのような部分に結合する性質を持ったタンパク質の cDNA がクローニングされてきたと考える方が自然かも知れない。

JF9 (HMG1) MAKGDPKKPKGKMSAYAFFVQTCREEHKK-NPEPVNFAEFSKKCERWKTMSKEAKF
 Pig HMG1 MGKGDPPKRGMSSYAFFVQTCREEHKKHPDASVNFEFSKKCERWKTMSAKEKGKF
 Rat HMG1 MGKGDPPKRGMSSYAFFVQTCREEHKKHPDASVNFEFSKKCERWKTMSAKEKGKF
 Hum HMG1 MGKGDPPKRGMSSYAFFVQTCREEHKKHPDASVNFEFSKKCERWKTMSAKEKGKF
 Bov HMG1 MGKGDPPKRGMSSYAFFVQTCREEHKKHPDASVNFEFSKKCERWKTMSAKEKGKF
 *

JF9 (HMG1) DEMAKADKVRYDREMKDYGPAKGK---DPNAPKRPPSGFFLFCSEFRPKIKSTNPGI
 Pig HMG1 EDMAKADKARYEREMKTYIPPKGETKKFKDPNAPKRPPSAFFLFCSEYRPKIKGEHPGL
 Rat HMG1 EDMAKADKARYEREMKTYIPPK-ETKKFKDPNAP-RASSAFLFCSEYRPKIKGEHPGL
 Hum HMG1 EDMAKADKARYEREMKTYIPPKGETKKFKDPNAPKRPPSAFFLFCSEYRPKIKGEHPGL
 Bov HMG1 EDMAKADKARYEREMKTYIPPKGETKKFKDPNAPKRPPSAFFLFCSEYRPKIKGEHPGL
 *

JF9 (HMG1) SIGDVAKKLGEMNNLSDGEKQPYNNKAALKKEKYEKDVADYKSKGKFDGAKGAATKAAR
 Pig HMG1 SIGDVAKKLGEMNNNTAADDKHPYEKKAALKKEKYEKDIAAYRAKGKPDAAKKGVVKAEK
 Rat HMG1 SIGDVAKKLGEMNNNTAADDKQPYEKKAALKKEKYEKDIAAYRAKGKPDAAKKGVVKAEK
 Hum HMG1 SIGDVAKKLGEMNNNTAADDKQPYEKKAALKKEKYEKDIAAYRAKGKPDAAKKGVVKAEK
 Bov HMG1 SIGDVAKKLGEMNNNTAADDKQPYEKKAALKKEKYEKDIAAYRAKGKPDAAKKGVVKAEK
 *

JF9 (HMG1) KK-----VEEEDEEEDEEEDEDDDE
 Pig HMG1 SKKKKEEEEDDEEDEEEDEEEDEEEDEDDDE
 Rat HMG1 SKKKKEEEEDDEEDEEEDEEEDEEEDEDDDE
 Hum HMG1 SKKKKEEEEDDEEDEEEDEEEDEEEDEDDDE
 Bov HMG1 SKKKKEEEEDDEEDEEEDEEEDEEEDEDDDE
 *

図 3-1. クローン JF9 の塩基配列から予想したアミノ酸配列と種々の動物の HMG1 のアミノ酸配列との比較。一致するアミノ酸の下に * 印をつけた。Pig, ブタ; Rat, ラット; Hum, ヒト; Bov, ウシの HMG1.

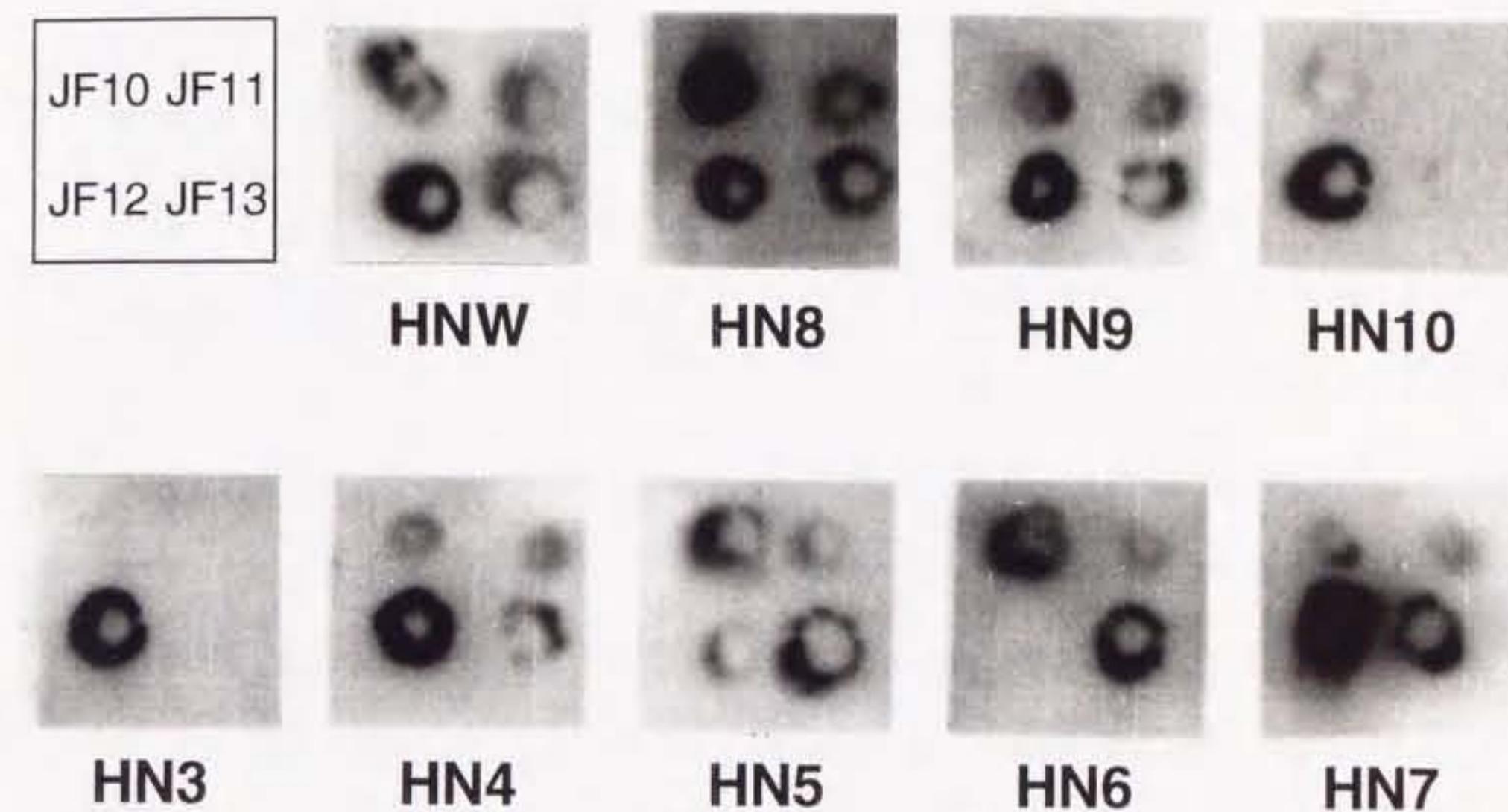


図3-2. クローン J F 1 0 から J F 1 3 の DNA 結合能の解析。
 寒天培地上にうえたホストの大腸菌に J F 1 0 から J F 1 3 までのファージクローンをスポット状に感染させ、 IPTG で融合タンパク質の合成を誘導し、 できたタンパク質をナイロンフィルターに移しとった。 ^{32}P で標識した H N W あるいは H N 変異体をプローブとして結合反応を行い、 オートラジオグラムをとった。 J F 1 0 と J F 1 1, J F 1 3 の融合タンパク質は H N 断片のブロック 1 0 と 3 を塩基置換すると H N 1 0 と H N 3) 結合出来なくなるので、 これらの領域に結合すると考えられる。

4. JF12 のコードするタンパク質に対する抗体は δ EF1 を特異的に認識する

●序

JF12 が確かに δ EF1 の DNA 結合ドメインをコードしているのかを確かめ、さらにその機能の解析や発現パターンを調べるために、JF12 のコードするタンパク質に対する抗体を作製した。抗原には β ガラクトシダーゼとの融合タンパク質ではなく、cDNA 断片をプラスミドベクターにサブクローニングして GST (グルタチオン S トランスフェラーゼ) との融合タンパク質を作るようとした。これにはグルタチオンとの親和性を利用して精製が簡単に出来る利点がある。また抗体の精製には MBP (マルトース結合タンパク質) と JF12 の融合タンパク質をカップリングさせたカラムを用いて GST に対する抗体を除き、タイマーの高い抗体を得られるようにした。

●材料と実験方法

・ JF12 融合タンパク質の発現と精製

JF12 の cDNA の挿入断片を λ gt11 より切り出して pGEX-3X(NotI) または pMAL-c2 (New England Biolabs) に挿入して、GST または MBP との融合タンパク質を大腸菌に発現させた。GST との融合タンパク質の場合は cDNA 断片を NotI サイトで切り出して、pGEX-3X(NotI) の NotI サイトに挿入した。このベクターは GST と JF12 のコード領域のフレームが合うように pGEX-3X (Smith and Johnson, 1988) の SmaI サイトに NotI リンカー (New England Biolabs) を挿入したものである。MBP との融合タンパク質の場合は

cDNA 断片は EcoRI サイトで切り出して pMAL-c2 の EcoRI サイトに挿入した。これらのプラスミドを用いて大腸菌をトランスフォームして融合タンパク質を作らせ、これを Smith and Johnson. (1988) の方法あるいは製品に付属の説明書に従ってアフィニティー精製した。大まかに見積もって 1 l の大腸菌の培養から 1 mg の GST の融合タンパク質あるいは 2 mg の MBP 融合タンパク質が得られた。GST 融合タンパク質についてはさらに FPLC で Mono Q カラム (Pharmacia) を用いて精製した。

・抗体の產生とアフィニティークロマトグラフィーによる精製
抗 GST:JF12 抗体を得るために Mono Q カラムを用いて精製した GST:JF12 融合タンパク質を Freund's アジュバントを用いて約 2 ヶ月齢（体重 1.5 kg）日本白色種のウサギの皮下に注射した。3 ~ 5 回の二次免疫注射を行ったのち採血し、常法により抗血清を得た。この血清を MBP:JF12 融合タンパク質をカップリングした CNBr-activated Sepharose 4B (Pharmacia) のカラムにのせた。溶出は 10 mM グリシン (pH 2.5) と 100 mM トリエチルアミン (pH 11.5) で行い、それぞれの溶出画分を合わせたのち PBS に対して透析した。

・抗体のタイマーの測定
7 × 9 cm のニトロセルロースフィルターを, 30 μg/ml の MBP:JF12 を含む PBS の入ったプラスチックバックにいれ、室温で 2 時間保温した。次にこの filter を 3 % の BSA を含む PBS で 3 時間室温でブロッキングした。これを PBS で洗ったのち、

screener-blotted で、希釈した抗体と反応させた。抗体の希釈には 3 % の BSA を含む PBS を用いた。反応は室温で 1 時間行った。反応後 PBS で洗い、1/250 希釈した protein A, HRP conjugated (Amersham) と室温で 1 時間半反応させた。その後 PBS で洗浄し、aminoethylcarbazol で検出した。なお抗体の希釈率は 5 倍、25 倍、125 倍、625 倍、3125 倍、15625 倍とした。

・ゲルシフト

水晶体や脳の核抽出液は 15 日目ニワトリ胚より Dignam et al. 1983 の方法で調製した。プローブは DC5 の単量体を BamHI/BglII 末端を $\alpha^{32}\text{P}$ -dATP 存在下でフィルインして作った。0.5 ng (0.01 pM) のプローブと共に 10 ng の融合タンパク質あるいは 10 μg の核抽出液を 1 μg の poly(dAdT), 100 mM KC1, 1 mM ジチオトレイトル、10 mM HEPES (pH 7.9), 15% グリセロール、2 mM MgCl₂ 共存下、10 μl の反応液中で室温で 30 分保温した。特異的コンペティターとして未標識の HN 変異体を加える場合は 10 ng を予め加えた。抗血清を加える場合は、予め 1 μl を加え室温で 10 分間保温したのちプローブを加えた。タンパク質と DNA の複合体を 0.5 mM EDTA を含む 22 mM Tris ホウ酸バッファー中で 6% のポリアクリルアミドゲルで電気泳動し、乾燥後オートラジオグラムをとった。

●結果と議論

JF12 のコードするタンパク質に対する抗体を作るために用いた抗原は、GST:JF12 融合タンパク質を大腸菌に合成させ、これをグルタチオン-sepharose により精製したものである。この融合タンパク

質は δ EF1 と同じ DNA 結合特異性を示すことが、ゲルシフト法によって確かめられた（図 4 - 2 B）。また、この DNA 結合能は亜鉛イオンの存在に依存し、EDTA を加えることで阻害された。このことは Zn フィンガーが DNA 結合ドメインとして働いていることを強く示唆する。

精製した GST:JF12 融合タンパク質をウサギに免疫して抗血清を得た。さらにこれを MBP:JF12 融合タンパク質をカップリングさせたカラムで精製した（図 4 - 1 A）。得られた抗体の GST:JF12 融合タンパク質に対する反応性を調べた結果を図 4 - 1 B に示す。この条件下では抗体を 3125 倍まで希釈しても抗原を検出できた。

得られた抗体が δ EF1 と DNA との結合に及ぼす影響を、ゲルシフト法によって調べた。図 4 - 2 C に示すように、抗 GST:JF12 抗体はプローブの DC5 (HN 断片の 3' 側の塩基配列を持つ δ EF1 の結合領域を含む) と GST:JF12 との複合体形成を阻害するだけでなく、 δ EF1 との複合体の形成も阻害した。また一部の抗体は DC5 との結合を阻害せずに、より泳動度の遅い複合体を形成し、スーパーシフトしたバンドとして観察された。

以上のようにクローン JF12 は、DNA 結合能に関して δ EF1 と同じ特異性を持ち、かつ同じ抗原性を示すことから、私はこのクローンのもつ cDNA 配列が δ EF1 の DNA 結合ドメインを含む領域をコードしているものと結論づけた。

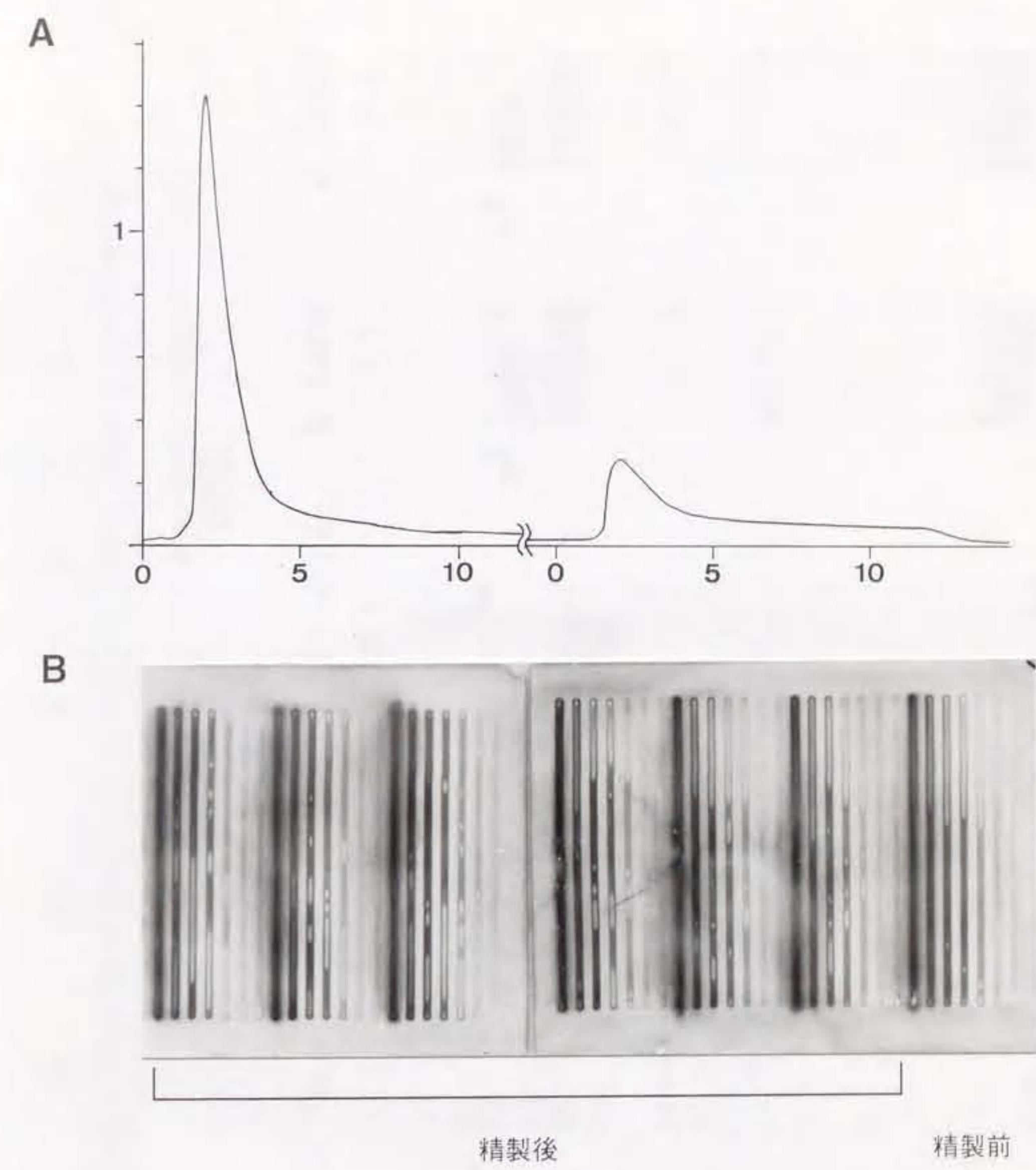


図4-1. 抗JF12抗体のアフィニティクロマトグラフィーによる精製と抗体価の測定.

A. 抗JF12抗血清をMBP:JF12をカップリングさせたCNBr-activated Sepharose 4Bカラムで精製した際のクロマトグラムの一例。10 mM グリシンで溶出後 10 mM Tris-Cl(pH 8.8)でカラムを平衡化し、続いて 100 mM トリエチルアミンで溶出した。縦軸は光学密度を示し、横軸は容量(ml)を示す。

B. 数回に分けて精製した抗体それぞれについて5倍づつ希釀していき、MBP:JF12融合タンパク質に対する反応性をみた。抗体の希釀率はそれぞれ左から5倍、25倍、125倍、625倍、3125倍、15625倍である。



図 4-2. δ EF1 と GST:JF12 融合タンパク質のゲルシフトと抗 JF12 抗体の効果. (前頁)

A. HN 断片とそのプロック. それぞれのプロックの配列を塩基置換したものが HN 変異体である(第1章参照). DC5 は HN 断片の 3' 半分の塩基配列を持つもので、これをゲルシフトのプローブとした.

B. HN 断片の変異体をコンペティターとして用いた場合の DC5 のゲルシフトに及ぼす影響. アフィニティー精製した GST:JF12 (a) あるいは水晶体の核抽出液 (b) の結果を示した. - は特異的なコンペティターを加えなかった場合で、3 から 7 は HN 断片のそれぞれのプロックに塩基置換を導入したコンペティターを加えた場合である. 矢尻は GST:JF12 (a) あるいは δ EF1 (b) とプローブの複合体を示す. GST:JF12, δ EF1 ともにプロック 5 を塩基置換するとプローブとの結合は弱まり、プロック 6 を置換すると完全に結合できなくなったことに注目されたい.

C. GST:JF12 融合タンパク質に対する抗体がプローブと DNA 結合因子との複合体形成に及ぼす効果. (a) GST:JF12 (1 レーンあたり 100 ng), (b) 水晶体の核抽出液 (1 レーンあたり 100 μ g), (c) 脳の核抽出液 (1 レーンあたり 5 μ g). - は抗血清無し. P は免疫前の血清. I は融合タンパク質に対する抗血清を加えたことを示す. 矢尻は融合タンパク質や δ EF1 との複合体を示し、* はスーパーシフトした複合体を示す.

●序

JF12 が δ EF1 の DNA 結合領域をコードしていることが明かとなつたので、次に全長をコードするクローンを単離する事にした。これによって δ EF1 の全アミノ酸配列が予想でき、全構造が明らかになる上、トランスフェクションなどを用いた機能の解析も可能となる。まず mRNA の長さを知るためにノザンハイブリダイゼーションを行い、続いて JF12 をプローブとして cDNA ライブラリーをスクリーニングした。

●材料と実験方法

・ノザンハイブリダイゼーション

13 日目のニワトリ胚の種々の組織から poly(A)⁺ RNA を調製した。電気泳動やニトロセルロースフィルターへの転写、ハイブリダイゼーションは一般的な方法を用いた (Sambrook, et al., 1989)。プローブはプラスミドから適当な制限酵素サイトで切りだした cDNA 断片を $\alpha^{32}P$ -dCTP を用いて標識して熱変性して使用した。検出にはオートラジオグラフィーあるいは BAS2000 (Fuji film) を用いた。

・cDNA ライブラリーの作製

13 日目ニワトリ胚水晶体より poly(A)⁺ RNA を調製し、cDNA 合成キット (Amersham) を使用しランダムプライマーあるいはオリゴ dT プライマーを用いて cDNA を合成した。一方脳の poly(A)⁺ RNA よりオリゴ dT プライマーを用いて cDNA を合成した。これら

を λ gt11 あるいは λ gt10 の EcoRI サイトに EcoRI-BamHI-NotI リンカーア (宝酒造) を用いて挿入し, Stratagen 社のパッケージングエクストラクトを使用しパッケージングを行った。得られた cDNA ライブラリーのインサート長は 300~2000 bp に及んでいた。

・ cDNA ライブラリーのスクリーニング

スクリーニングはハイブリダイゼーションにより一般的な方法で行った (Sambrook, et al., 1989)。プローブは cDNA 断片を $\alpha^{32}\text{P}$ -dCTP を用いて標識して熱変性して使用した。

・ COS7 細胞のトランスフェクションとウェスタンブロッティング

δ EF1 のコード領域全長を発現ベクター pCDM8 (Seed, 1987) に組み込んだ。これをリン酸カルシウム法で COS7 細胞にトランスフェクションし、48 時間後に細胞を集めて核抽出液を調製した。核抽出液 1 容に対して 1/50 容の抗血清を加え、室温で 1.5 時間保温後、proteinA-sepharose (Pharmacia) を 50 μl 加え 4 °C で一晩保温した。これを遠心し、沈澱に SDS-PAGE サンプルバッファーを加え、電気泳動しニトロセルロースフィルターに転写した。プロッキングは 5% のスキムミルクを使用し、1 次抗体は 50 倍希釈とした。抗原抗体複合体の検出には HRP conjugated ProteinA (Amersham) と ECL system (Amersham) を用いた。

● 結果と議論

・ δ EF1 の主な mRNA は 5.5 kb の長さを持つ

まず δ EF1 の mRNA の長さを知るために、13 日目のニワトリ胚の

種々の組織から調製したポリA⁺ RNAを利用してノザンハイブリダイゼーションを行った。図5-Iに示すように主なる mRNA 分子種である 5.5 kb のものは調べた全ての組織から検出された。このことは、すでに明かとなっていた δ EF1 の DNA 結合活性が普遍的に存在するということと一致している。なおこの分子種以外に水晶体以外の組織からは 4 kb のものも検出された。

・全コード領域を含むのクローンの単離

つぎに JF12 を元に、隣接する領域をコードする cDNA クローンを λ gt10 と λ gt11 のライブラリーより次々と分離していった(図 5-2 A (b))。これらのクローンから再構成した cDNA の長さはポリA配列をのぞいて 5271 bp あり、ノザンハイブリダイゼーションで検出された 5.5 kb の mRNA と一致する。最も長いオープンリーディングフレームは 3342 bp (図 5-2 A) で、124 kDa のタンパク質をコードする。ところが、抗 JF12 抗体(即ち抗 δ EF1)を用いて水晶体と脳の核抽出物のウェスタンプロットを行うと、170 kDa のバンドが検出され、明らかに cDNA のコードできる大きさを越えている。しかし、クローン RS12-118 と RS12-119 から再構成した cDNA を発現ベクター pCDM8 (Seed, 1987) に組み込んで COS7 細胞にトランسفェクションすると、この cDNA から 170 kDa のタンパク質が合成された(図 5-3, レーン 1)。したがって δ EF1 コード領域の全長を持つ cDNA をクローニング出来たと考えた。なお、この塩基配列は DDBJ/GenBank/EMBL のデータベースに D14313 という番号で登録されている。

・水晶体以外の組織の δ EF1

再構成した cDNA の塩基配列には、5' 端に 11 ベースの非翻訳領域があり、コード領域のあとには 1918 ベースの非翻訳領域が存在した。3' 側の非翻訳領域を調べると ORF の直後にポリ A 付加サイトとなり得る塩基配列が見つかった。このもう一つのポリ A 付加サイトが、水晶体以外の組織で見られた 4 kb の mRNA を作っているの可能性がある。それはノザンハイブリダイゼーションで、もっとも 5' 寄りの cDNA をプローブとすると両方の分子種を検出できるが（図 5 - 1 B），最初のポリ A サイトより下流のプローブでは 5.5 kb のものしか検出できないからである（図 5 - 1 C）。

また 13 日目ニワトリ胚脳のオリゴ dT をプライマーとして作った cDNA ライブラリーをクローン RS12-113 と RS12-1 の 5' 側半分（コード領域の N 端と C 端に相当）（図 5 - 2 A (b)）をプローブとしてスクリーニングすると、単離したクローンの大部分が開始コードンの Met 付近から始まり終止コドンから約 160 ベース下流で終結するものであった（図 5 - 2 A (c)）。この事は水晶体でも脳でも共通の転写開始部位から mRNA が転写され、また脳ではもう一つのポリ A 付加シグナルがしばしば使われていることを示している。なお翻訳領域の塩基配列を水晶体と脳とで比較したが、数カ所でアミノ酸の置換を伴わない塩基置換があつただけであった。この塩基の違いは、使用したニワトリが純系ではないために遺伝子の多型性が現れているためと思われる。以上より水晶体と脳の間で δ EF1 のアミノ酸配列には差がなく、おそらく他の組織でも同様であろうと私は結論づけた。

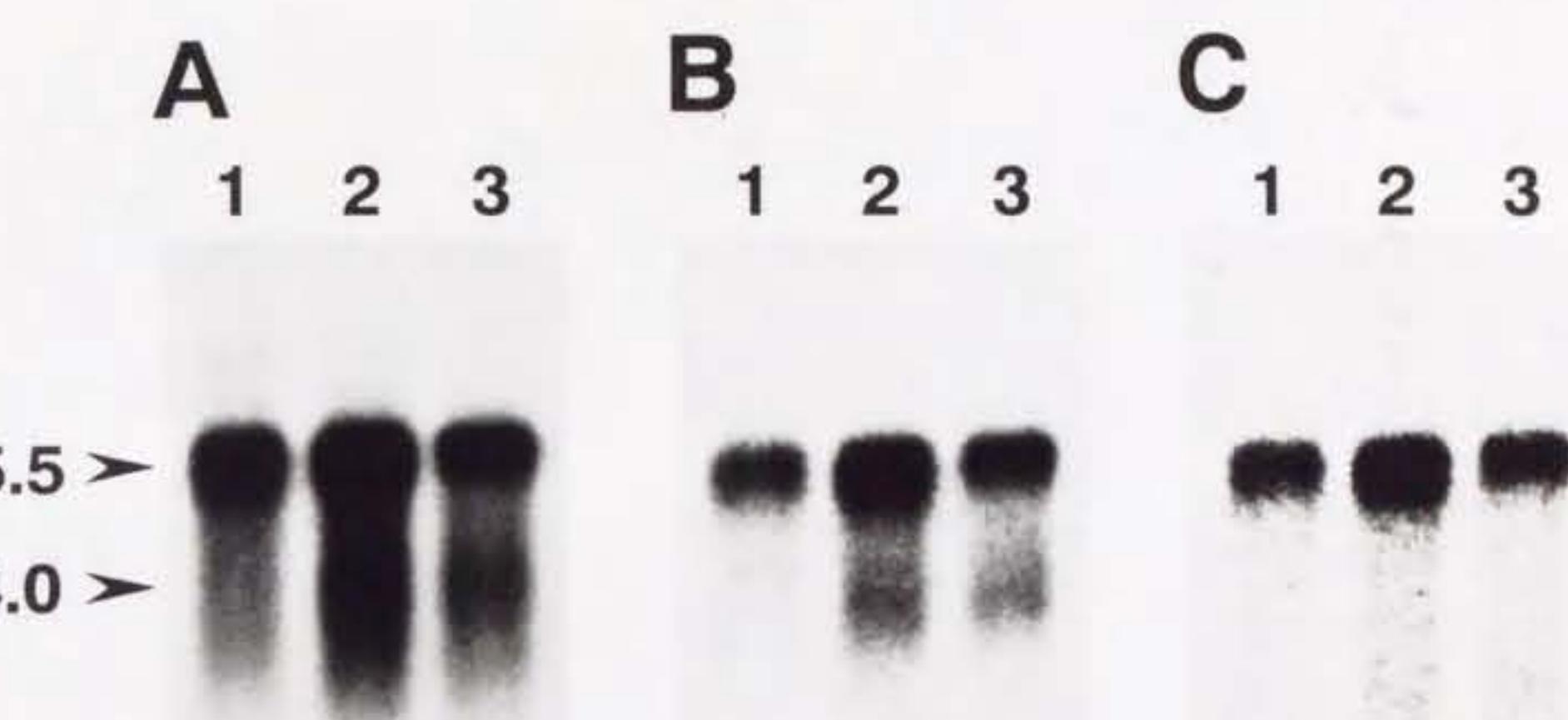


図 5-1. δ EF1 mRNA のノザンハイブリダイゼーション.

13 日目ニワトリ胚の水晶体 (1), 脳 (2), 心臓 (3) の poly(A)⁺ RNA を
1.2 μ g づつ電気泳動, 転写して, それぞれ JF12 (A), RS12-113 (コード領域
の 5' 側に相当) (B), RS12-32 の 3' 側半分 (非コード領域に相当) (C)
をプローブとしてハイブリダイゼーションを行った.

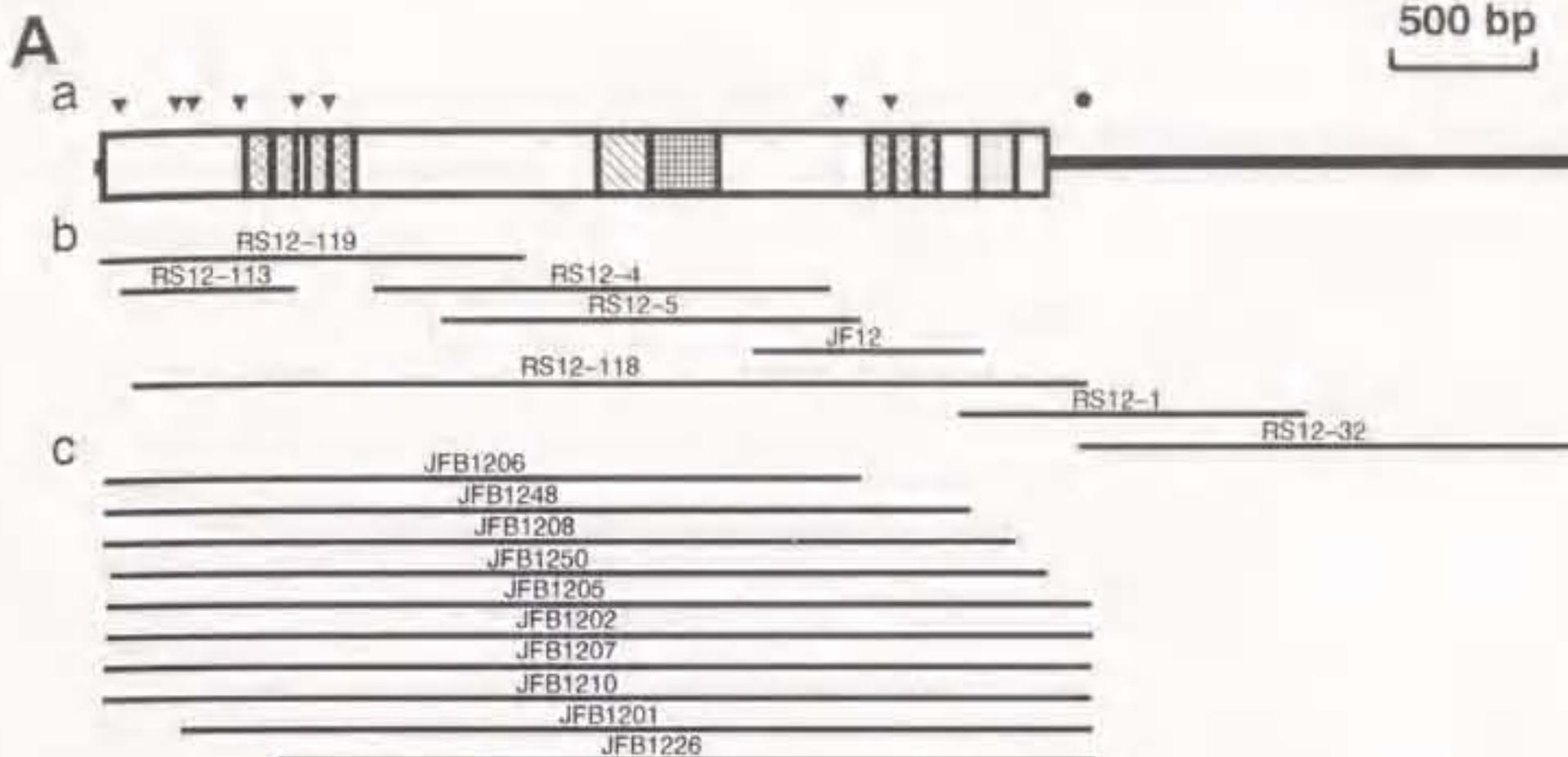


Fig.3図 5 - 2. δ EF1 の cDNA クローン. (前頁)

A. cDNA の構造の模式図と個々の cDNA クローン. (a) 再構成した δ EF1 の cDNA の全長とそのコード領域. コード領域は長方形で示した. また特徴的なドメインはそれぞれ, Zn フィンガーを (▨) で, ホメオドメインを (▨▨) で, プロリンに富んだドメインを (▨▨▨) で, 酸性ドメインを (▨▨▨▨) で示した. 構型はゲノム配列にあるイントロンの場所を示し, 点は polyA が付加され得る箇所を示す. (b) 水晶体のライプラリーより得られた重なり合う cDNA クローン. RS12-32 と RS12-118, RS12-119 はオリゴ dT プライムライプラリーから得られたクローンで, その他はランダムプライムライプラリーからのものである. (c) 脳のオリゴ dT ライプラリーから RS12-1 (5' 半分) と RS12-113 をプローブにして得られた cDNA クローン.

B. ヌクレオチド配列とそこから予想されるアミノ酸配列. ヌクレオチド配列は RS12-119 と RS12-118, RS12-32 より得た. 図ではゲノム配列と完全に一致するものを最後のヌクレオチド (5271 番目) としたが, クローン RS12-32 にはこの後に polyA が存在する. polyA シグナルとなり得る配列は四角で囲い, アミノ酸配列の中では, Zn フィンガーを下線で示し番号をふって, 目印のシステインとヒスチジンを網掛けで示した. またホメオドメインは破線の下線で示し, 糖鎖の付加し得るアミノ酸残基を丸で囲い, リン酸化され得る残基は四角で囲って示し, 終止コドンはアスタリスクで示した.

1 2 3 4 5

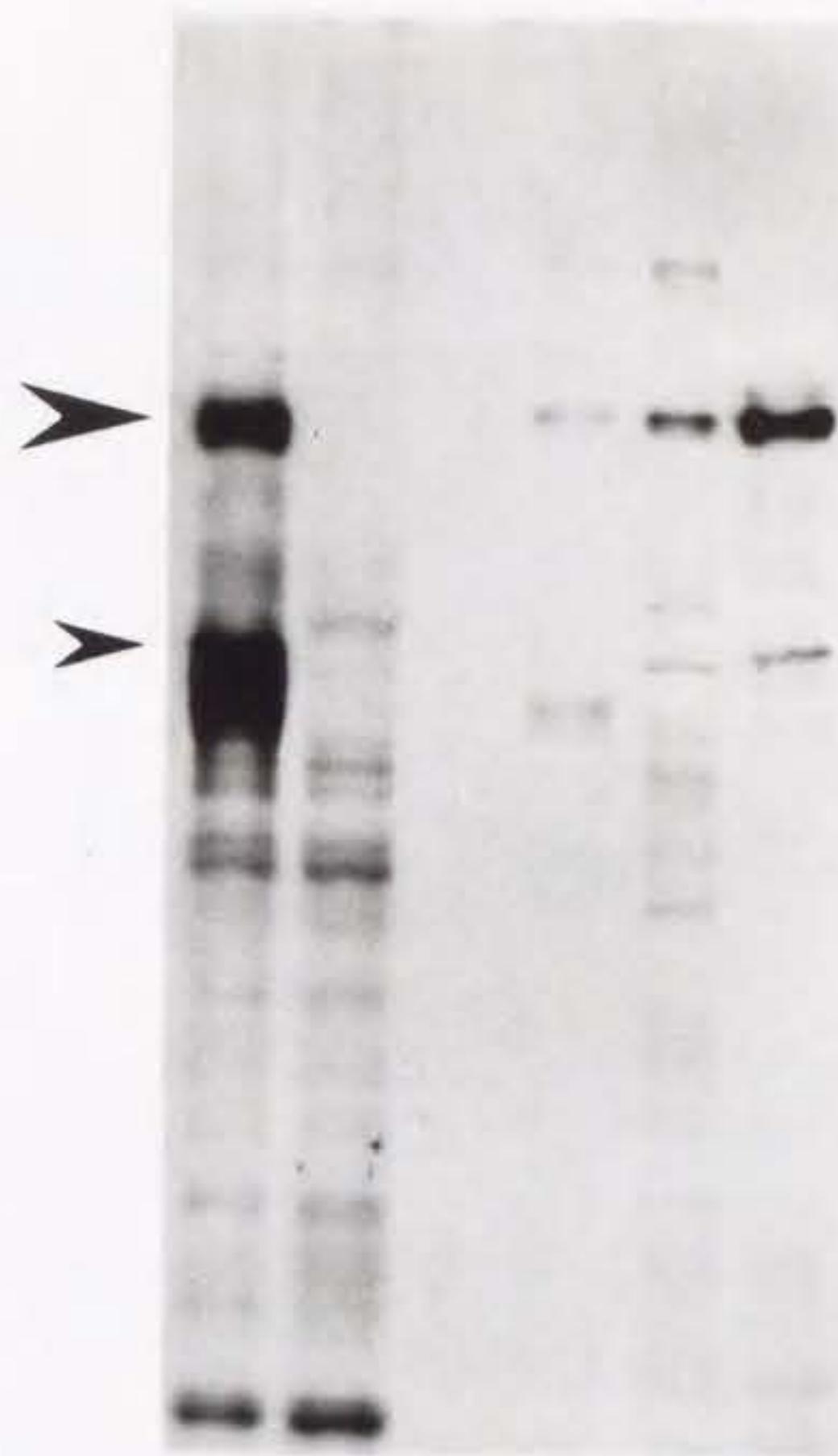


図5-3. δ EF1 の cDNA を発現させた COS7 細胞と、ニワトリ胚の組織の核抽出液のウェスタンブロッティング。

レーン1, δ EF1 の cDNA (RS12-119 と RS12-118 を繋いだもの) を挿入した pCDM8 ベクター (Seed, 1987) をトランスフェクションした COS7 細胞の核抽出液 (6 μ g)。

レーン2, トランスフェクションしていない COS7 細胞 (6 μ g)。

レーン3, 13日目ニワトリ胚水晶体の核抽出液 (6.5 μ g)。

レーン4, 13日目ニワトリ胚脳の核抽出液 (5 μ g)。

レーン5, 5倍量の同じ脳の抽出液を免疫沈降させたもので、矢尻で示したバンドだけが濃縮されることから、これらが本来の抗原であることが判る。

大きい矢尻で示したバンドが δ EF1 で、その分子量は 170 kDa に相当する。下の小さい矢尻で示したバンド (120 kDa) はトランスフェクションした COS7 細胞と脳の核抽出液で検出されるが、これらは調製中に δ EF1 が加水分解して生じたものである。何故なら数種類のプロテアーゼの阻害剤を加えた抽出溶液を使用するとこのバンドが薄くなるからである。

6. δ EF1 はホメオドメインと Zn フィンガーをもつ

●序

δ EF1 の全長の cDNA の塩基配列とそこから予想されるアミノ酸配列から、この遺伝子の機能に関して何らかの情報が得られることを期待してホモロジー検索などを行った。

●材料と実験方法

塩基配列およびアミノ酸配列の解析とホモロジー検索は DNASIS (宝酒造)，あるいは日本 DNA データバンク (DDBJ) のデータについては FASTA および TFASTA を用いて行った。

●結果と考察

・ δ EF1 タンパク質の構造

cDNA の塩基配列から予想される δ EF1 のアミノ酸配列には、DNA 結合タンパク質としての興味深い特徴があった (図 5-2B)。まず JF12 で見いだされた C 末端よりの 3 つの Zn フィンガー (C-フィンガー) の他に N 末端よりも Cys₂-His₂ 型の 4 つの Zn フィンガー (N-フィンガー) が存在していた。ただこの N-フィンガーの中の 4 つ目のフィンガー (フィンガー 4) は他とは違ってヒスチジンがシスチンに置き変わっていたが、その他の特徴 (フェニルアラニンの位置、酸性アミノ酸がいくつかヒスチジンのそばにある事、フィンガーに典型的なアミノ酸残基の間隔) から見て Cys₂-His₂ 型の Zn フィンガーと言える。

さらにより興味深い事に、二つの Zn フィンガークラスターの間

にはホメオドメインが存在していた。このホメオドメインのアミノ酸配列は、らせん構造をとると考えられている部位で目印となるアミノ酸残基がよく保存されており、それらは POU のホメオドメイン（なかでも I-POU (Treacy et al., 1992) と Brn-3 (He et al., 1989)）と似ていた（図 6-1）。また一般的にはホメオドメインには N 端よりに酸性アミノ酸がたまって存在するのに対して、 δ EF1 のホメオドメインにはそれらが存在しないという点も興味深い。

以上その他、このアミノ配列の中程にはプロリンに富んだ領域があり（図 5-2 A），また C-フィンガーの C 端側にはグルタミン酸に富んだ酸性領域がある（図 5-2 A, B）。これらは転写活性化因子一般に存在するものである (Mitchell and Tijan, 1989; Seipel et al., 1992)。この他リン酸化を受ける可能性のある部位が数カ所と、糖鎖の付加を受け得る箇所が相当数ある（図 5-2 B）。この中でも特に C-フィンガーの最も N 末端寄りに、チロシンキナーゼによりリン酸化を受け得るチロシン残基が存在する事は、 δ EF1 の機能の調節を考える上で興味深い。

• δ EF1 と相同性の高い遺伝子がショウジョウバエなどにもある
ここ数年内に、複数の Zn フィンガードメインの間にホメオドメインが存在するというようなタンパク質がいくつか報告された。
それはショウジョウバエの ZFH タンパク質 (ZFH-1 と ZFH-2) (Fortini et al., 1991; Lai et al., 1991) およびラットの α -fetoprotein エンハンサー結合タンパク質 ATBF1 (Morinaga et al., 1991) である。興味深い事に δ EF1 と ZFH-1 は単に DNA 結合ドメ

インの並び方が似ている（図 6-2 A）だけでなく、DNA 結合ドメインのアミノ酸配列まで似ていた（図 6-2 B）。特に δ EF1 のフィンガー 3 と 4 は ZFH-1 のフィンガー 4 と 5 と、δ EF1 のフィンガー 5 から 7 までは ZFH-1 のフィンガー 7 から 9 までと非常に高い相同意を示した。さらに δ EF1 のフィンガー 3 と 4（N-フィンガー）は、自身のフィンガー 6 と 7（C-フィンガー）と相同意がある（図 6-2 B）。一方 DNA 結合ドメイン以外の領域では δ EF1 と ZFH-1 の間に特筆すべき相同意は見られなかった。

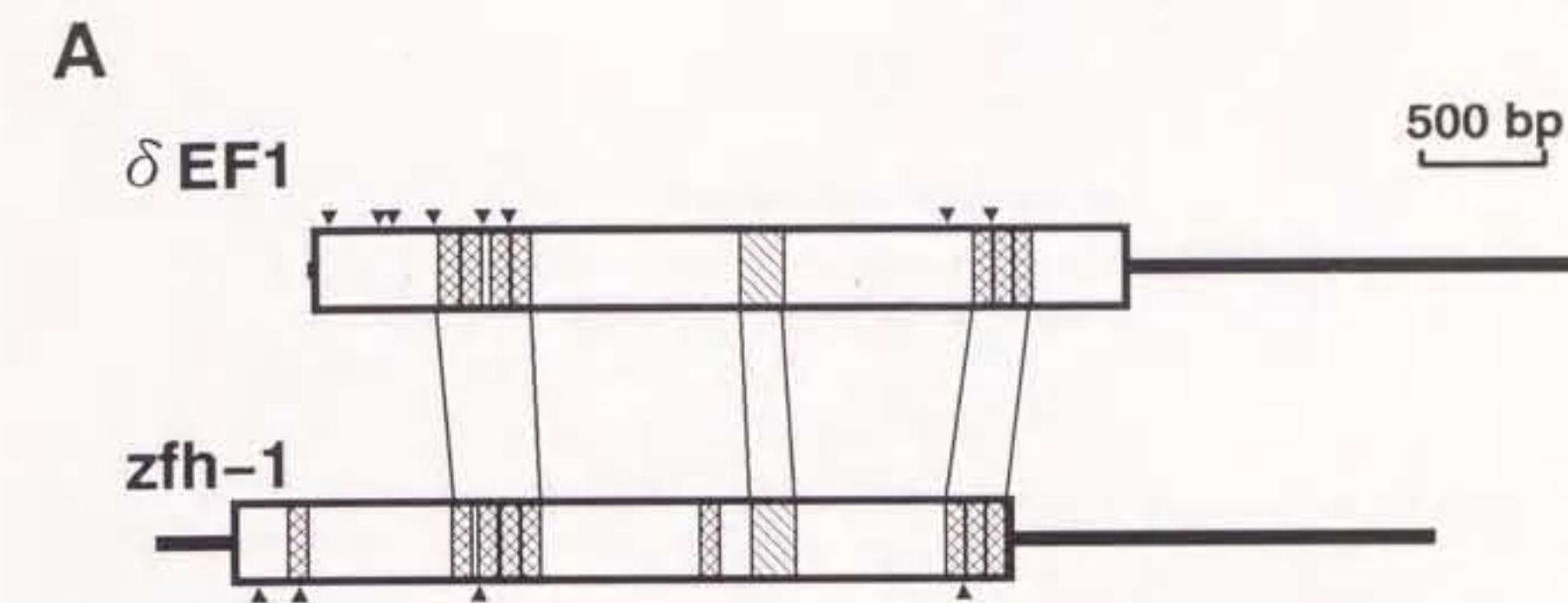
ところで DNA データベースを検索した結果、δ EF1 の C 端側半分はヒトの N11-2-a (Williams et al., 1991) と塩基配列もアミノ酸配列も非常に高い相同意を示す事がわかった。N11-2-a は IL2 のプロモーターの -100 から -105 の領域に結合するタンパク質をコードする cDNA としてクローニングされたもので、その結合領域は δ-クリスタリンエンハンサーの HN 断片中のブロック 6 とほぼ一致する。δ EF1 と N11-2-a のアミノ酸配列を並べて比較してみると、後者は δ EF1 の配列の C 端側約 2/3 に位置し、80% 以上のアミノ酸残基が一致していた（図 6-3）。さらに相同意の高い部分は N11-2-a の配列上の最初のメチオニン残基より上流にまでおよんでいた。ちなみにこの残基は δ EF1 ではバリンである。これらのことから N11-2-a をコードする cDNA は、第 2 の δ EF1 というよりはヒトの δ EF1 そのものの cDNA の一部分であると考えるべきであろう。実際これを支持するデータを我々のグループでは持っている。それは、ニワトリとマウスの δ EF1 遺伝子を比較してみると、δ EF1 は種間で非常によく保存されていると云うものである。これはヒトとの間でも同様であると予想される。

δ EF1 ENNLSPGQPPLKNLSSLKAYYALNAQPSAEELSKIADSVNLP LDVVKWFEKMQAGQISVQSSGPS
I-POU PAGEKKRTSIAAPEKRSLEAYFAVQPRPSGEKIAIAEKLDLKKNVVRVWFCNQRQKQKRIVSSVTP

δ EF1 ENNLSPGQPPLKNLSSLKAYYALNAQPSAEELSKIADSVNLP LDVVKWFEKMQAGQISVQSSGPS
Brn-3 GEKKRKRTSIAAPEKRSLEAYFAVQPRPSSEKIAIAEKLDLKKNVVRVWFCN

図 6 - 1. δ EF1 と POU ファミリーのホメオドメインのアミノ酸配列の比較。

I-POU (Treacy et al., 1992) と Brn-3 (He et al., 1989) のホメオドメインを δ EF1 のそれと並べて比較した。同じアミノ酸残基は (:) で示し、似た性質を持つものは (.) で示した。



三

N-terminal Zn finger domain

```

DEF1      G-TPDAFSQLLTCPYCDRGYKRFTSLKEHIKYR----HEKNEDNFSCSLCSYTFAYRTQLDRHMTSHKSGR
          : :....: .: : . . . . :.: . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . .
zfh-1     GSTTGDLSGAYPCMCTASFASREQLEQHEQLHSPCGPAAVSNVSQTCRICHKAFAVYRLQRHMHIS-----*
          *   *           *   *           *   *           *   *
DQRHVTQSSGNRKFCKTECGKAFKYKHHLKEHLRIHSGEKPYECPNCKRFSHGGSYSSHISSSKKCIGLMPV
          . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . .
-----DESALLRKFKCKECDKAFKFKHHLKEHVRIHSGEKPYECPNCKRFSHGGSFSSHMTSKKCISMGLK

```

Homeo domain

6EF1 NNLSPGQPPLKNLLSLLKAYYALNAQPSAEELSKIADSVNLP LDVVKKWF EKM QAGQI SVQ
..... . . . : .
zfh-1 RKVRVRTAINEEEOOOOLKOHYSLNARPSRDEF R MIAARLLOLDPRVVQVWFQNNRSRERKMC

C-terminal Zn finger domain

δEF1 YACDLCDKIFQKSSSLRHKYEHTGKRPHHECGICKKAFKHKKHLIEHMRLHSGEKPYQCDKGKRFSHSGSYSQHMHRYSYCKREAE
 :.:
zfh-1 YVCDQCDKAFAKQSSLARHKYEHSQQRPYQCIECPKAFKHKKHLTEHKRLHSGEKPFQCSKCLKRFSHSGSYSQHMHRYSYCKPYRE

C

δEF1 Zn Finger

Fig.5

6-1

図 6-2. δ EF1 とショウジョウバエの ZFH-1 の Zn フィンガード
メインとホメオドメインの比較. (前頁)

A. Zn フィンガードメイン (▨) とホメオドメイン (▨) の位置を
cDNA の構造の模式図の上に示した. 長方形の部分がコード領域で
ある.

B. DNA 結合ドメインのアミノ酸配列の比較. 亜鉛イオンのキレー
トに関わるアミノ酸残基であるシステインとヒスチジンの下に *
印をつけて示した. 同じアミノ酸残基は (:) で示し, 似た性質を
持つものは (.) で示した.

C. δ EF1 の N-フィンガーの 3-4 と C フィンガーの 6-7 のアミ
ノ酸配列の比較

Ch. δ EFI Hu.NiI2a	MADGPRCKRR KQANPQRNNV TNYNNVIEAN SDSDEDKLH IVEEESITDA ADGDASVPE DLPTDHTVLP ENSEREGSTN SCWDEGKET KEILGPEAQ
Ch. δ EFI Hu.NiI2a	DEVGCTVKED ECDSAENEQ NHDPNVEEFL OQEDTAVIYP EAPEEDQROG TPEASSODEN GTPDAFSQL TCPYCDRGYK RFTSLKEHJK YRHEKNEDNF
Ch. δ EFI Hu.NiI2a	SCSLCSYTFAYRTOLDRHMT SHKSGRDQRH VTQSSGNFKF KCTECGKAFK YKHHHLKEHLR IHSGEKPYEC PNCKKRFSSH GSYSSHISSK KCIGLMPVKG
Ch. δ EFI Hu.NiI2a	RARSGLKTSO CSSPSLSASP GSPARPOIRO KIEINKPLQE LPVNQIKTEP VDYEFPKIVV ASGINCSTPL ASGINCSTPL ONGVFSGGSP ONGVFTGGGP LOATSPOGV LOATSPOGM VGAVVLPPTVG VGAVVLPPTVG*
Ch. δ EFI Hu.NiI2a	LYSPISINLS DIONVNLKVAV DGNVIRVLE DGNVIRVLE QETISNASIO QAGHSLSIA SLPLYDDGT TKIIINSYLE QPSOLQVPO TKIIINSYLE OPSQLQVPO NLKKEHSVPT NLKKENPVAT
Ch. δ EFI Hu.NiI2a	NSCKNEKLPE DLTVKSEKDK NFEGETNDST CLLCDDCPGD LNALOELKHY ETKNPPQLPO SSGTEAEKPS SPAPSETGEN NLSPGQPLK NLSPSOPPLK NLSSLKAYY NLSSLKAYY
Ch. δ EFI Hu.NiI2a	ALNAQPSAEE LSKIADSVNL PLDVVKWFE KMQAGCI SVQ SSGPSSPEQV KISSPTDND QAATTNESEP QMSNTNNSONP QHSTVNQSP SKMTNSPVLF VGSTTNGSRS
Ch. δ EFI Hu.NiI2a	STPSPSPNL SSSRNSOYGT YTAEGI/DEEP OMEPLDLSP KOHGELLERS TITSVYONSY YSVOEPLNL SCVTDSEPVV
Ch. δ EFI Hu.NiI2a	NIAIPTVTAQ LPTIVAIADO NSVPCLRALA ANKOTILIPQ VAYTYSTTVS PAVQETPKO TQANGSODER QDTSSGEVSN VEDQNSDST PPKKKMKTE PPKKKMKTE
Ch. δ EFI Hu.NiI2a	NGMYACDLCD KIFQKSSLL RHKYEHGTGKR PHECGICKA FKHKHHHLIEH MRLHSGEKPY OCDKCGKRF HSGSYSOHNM
Ch. δ EFI Hu.NiI2a	VGOEVLSSEH AGARASPSQI DSDERESLTR EEEEDSEKEE EEEEDSEKEE QDVEEEEEE LQEEKECEKP QGDEEEEEE EG----- EG----- EGNKNDVYN HRYSYCKREA EERDSTEQEE
Ch. δ EFI Hu.NiI2a	RASNAEPEVI OSNG-CVSEE GESSECVSEE KTNEA SOASSLGQKV

図 6-3. δ EF1 とヒトの Ni1-2-a とのアミノ酸配列の比較. (前
頁)

DNA 結合ドメインと考えられる Zn フィンガーのクラスターとホメオボックスを四角で囲い、 δ EF1 と Ni1-2-a の間で同じアミノ酸残基を網をかけて示した。Ni1-2-a の最初のメチオニン残基の下には * 印をつけた。

●序

δ EF1 の cDNA の塩基配列から予想したアミノ酸配列の解析から、 δ EF1 は転写調節因子としての興味深い特徴を幾つか持っていることがわかった。しかし実際には δ EF1 がどの様な活性を持っているのかは実験的に調べる必要がある。そこで私は次のような実験を行った。即ち δ EF1 を強制発現ベクターに組み込み（これをエフェクターと呼ぶ）、これを HN 断片の 8 量体にルシフェラーゼ遺伝子をつなぎレポーターとコトランスフェクションするというものである（図 7-1 A）。ルシフェラーゼ遺伝子は δ -クリスタリン遺伝子のプロモーターで制御されるようになっているが、このプロモーターには組織特異性はない（Hayashi et al., 1987; Kamachi and Kondoh, 印刷中）。このプロモーターの上流に発現を活性化するよう野生型の塩基配列を持った 8 量体の HN エンハンサー (HNW) を配置した。HNW は第 1 章で述べたように強い水晶体特異性のあるエンハンサー活性を示す。これに対して、活性化の度合いを見るための対照として、HN6 の 8 量体を用いた。HN6 はエンハンサー活性と δ EF1 の結合能を完全に失った変異体である（図 7-1 B）。

●材料と実験方法

・レポーターおよびエフェクタープラスマドの構築

レポーター遺伝子としてルシフェラーゼを使うため、p δ 51LucII (Kamachi and Kondoh, 印刷中) の持つ δ -クリスタリン遺伝子の

プロモーターの上流に HNW あるいは HN6 の 8 量体を挿入した。一方エフェクターは pCDM8 由来のベクター pCMVX に δ EF1 の全コード領域を挿入したものである (pCMVX-δ EF1, Kamachi and Kondoh, 印刷中)。

・トランスフェクション

15 日目ニワトリ胚より水晶体上皮と皮下の纖維芽細胞を取り初代培養を作った。細胞の密度はそれぞれ直径 3.5 cm の培養皿あたり 2.0×10^5 とした。培養開始後 24 時間目にリン酸カルシウム法によってトランスフェクションを行った。用いた DNA の量は直径 3.5 cm の培養皿あたり 1 μg である。トランスフェクション後 4 時間に培地を交換し、さらに 18 時間培養した後に集めた。

・ルシフェラーゼアッセイ

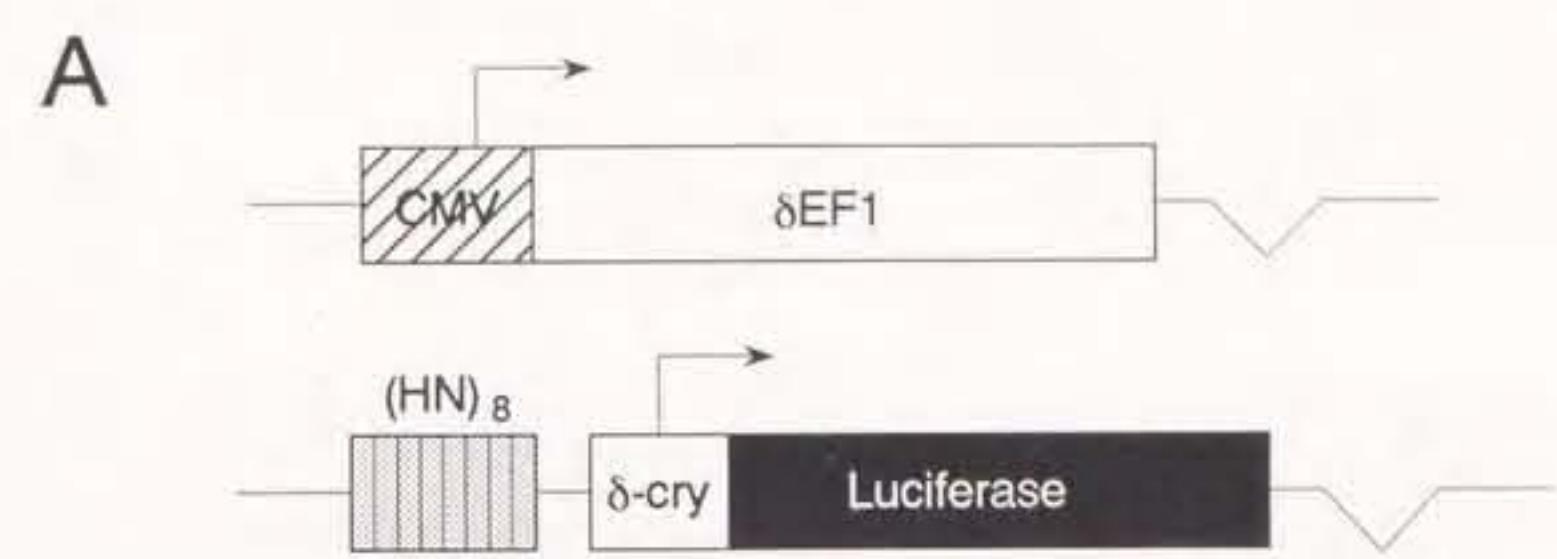
トランスフェクションした細胞を PBS 3 回で洗ってから、 $300 \mu\text{l}$ の抽出緩衝液 (0.1 M リン酸カルシウム [pH 7.8], 1% Nonidet P-40, 1 mM dithiothreitol) により抽出した。この 5~50 μl を $350 \mu\text{l}$ の測定用緩衝液 (25 mM glycylglycine [pH 7.8], 2 mM ATP, 15 mM MgSO₄, 1 mM dithiothreitol) に加えた。 $30 \mu\text{l}$ の 1 mM ルシフェリンを加えることで反応を開始させ、発光を 2~22 秒間ルミノメータ (Wallac 社製, 1251 型) で抽出液で測定した。

● 結果と議論

水晶体細胞ヘレポーターとエフェクター (即ち δ EF1) をコトランスフェクションした。外部から加えた δ EF1 の発現がない場合、8

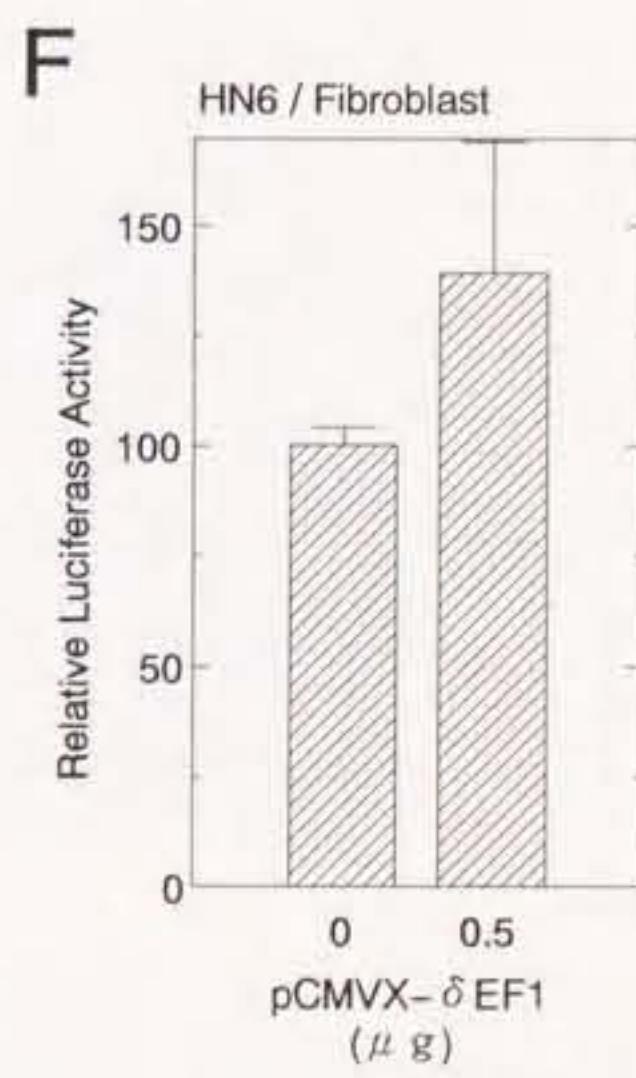
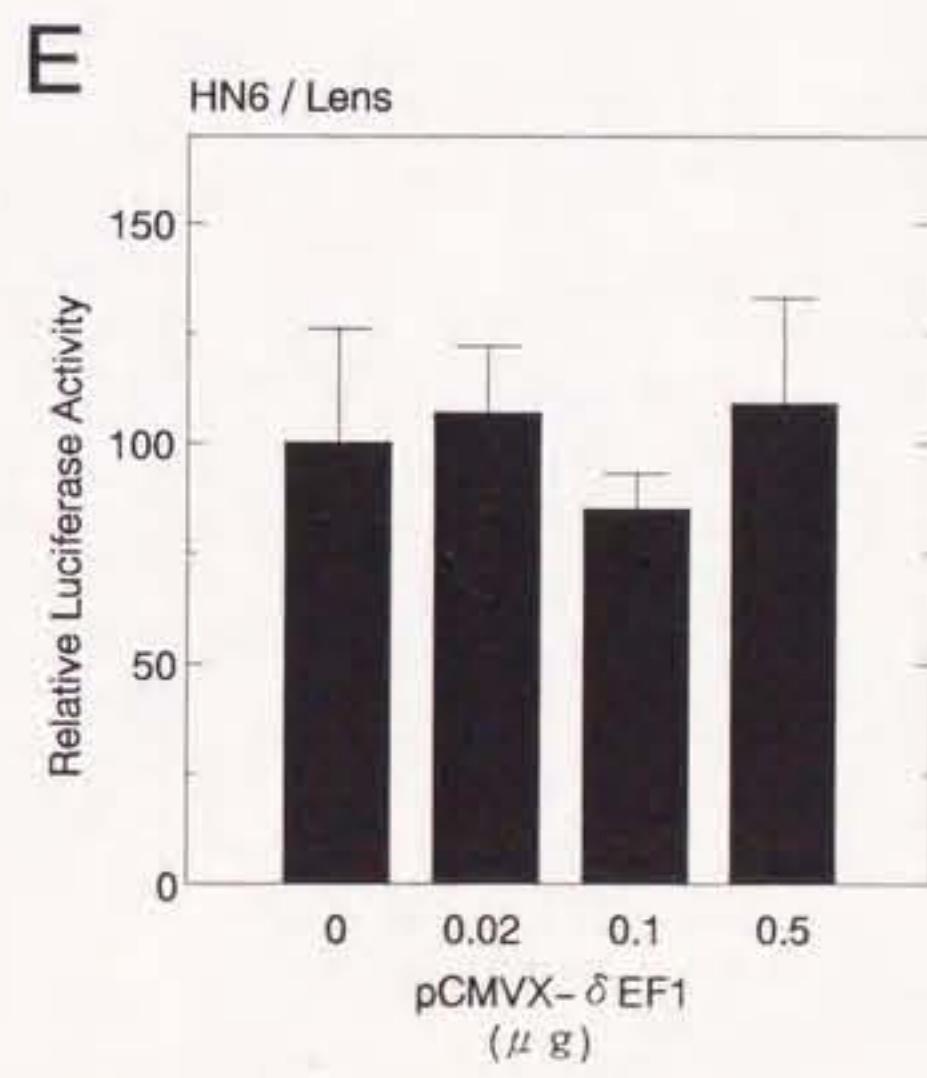
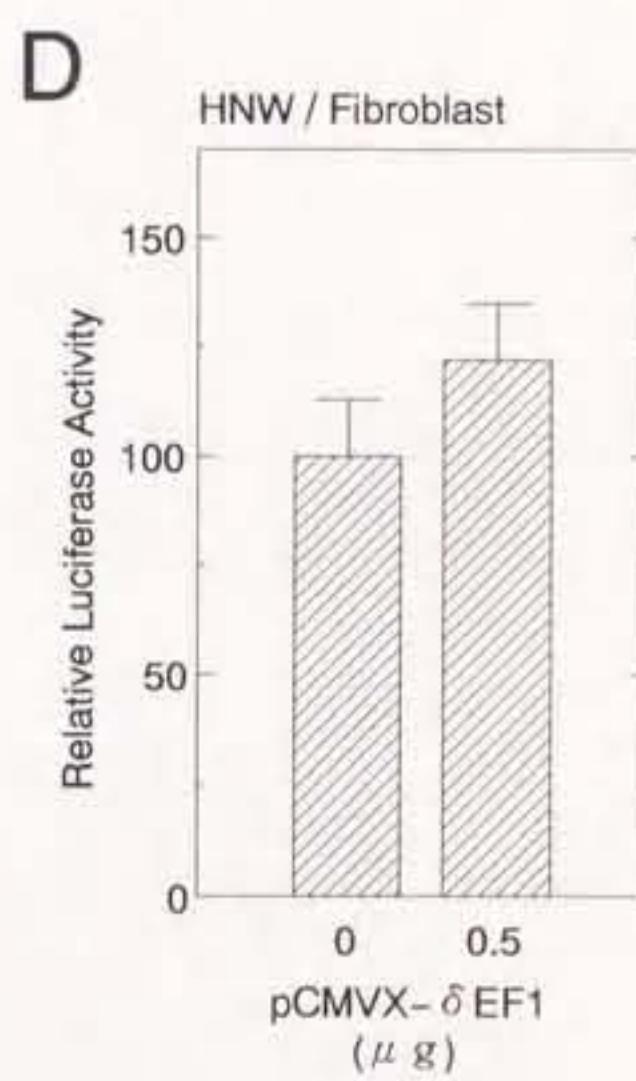
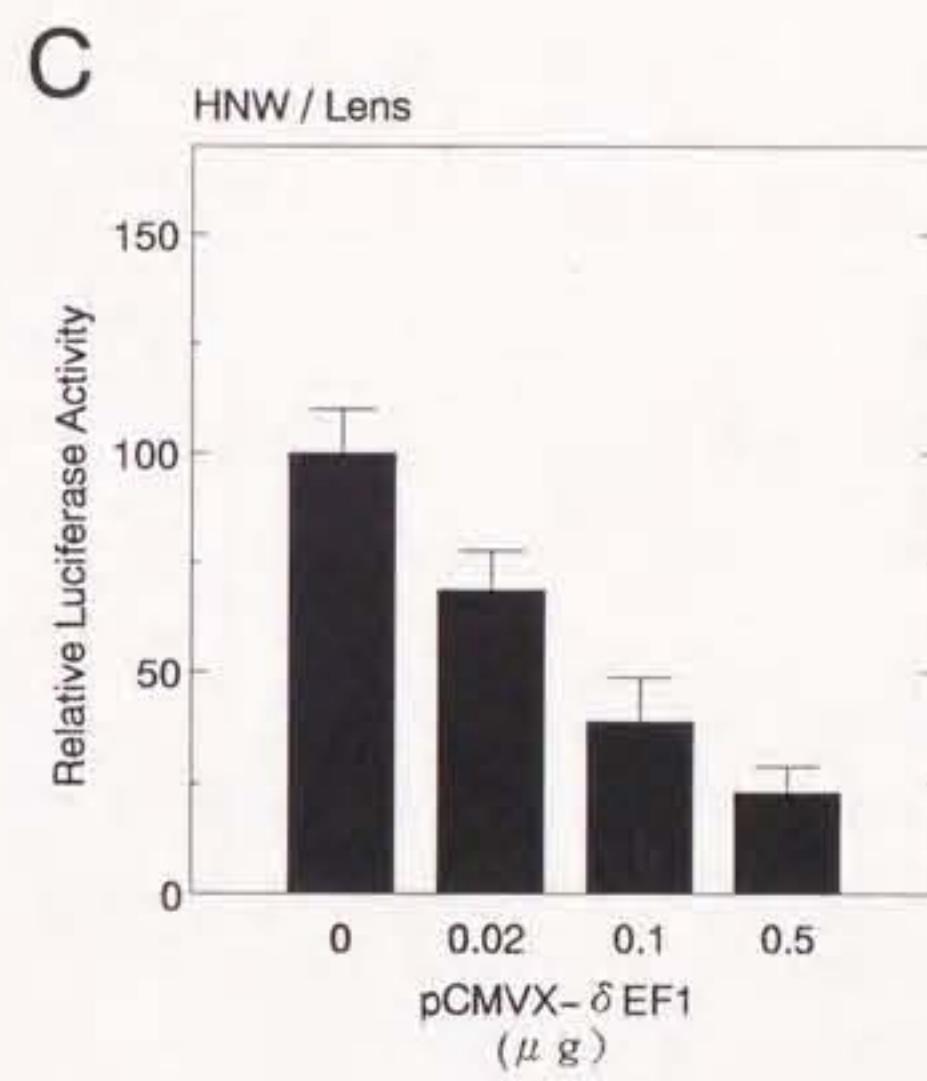
量体の HNW は HN6 と比べて 13 倍の活性化を見せたが、コトランスフェクションする δ EF1 の量を増やしていくと、HN 断片のエンハンサー活性は次第に低下していった（図 7-1 C）。加えたエフェクター（δ EF1 の強制発現ベクター）とレポーターのルシフェラーゼ遺伝子とのモル比がほぼ 1 対 1 のとき、エンハンサー活性の低下は約 5 分の 1 であった。これに対して δ EF1 が結合できない変異体である HN6 をもつルシフェラーゼ遺伝子は外から加えた δ EF1 に影響を受けなかった（図 7-1 E）。またコトランスフェクションした δ EF1 発現ベクターの効果は水晶体だけで観察され、繊維芽細胞などでは見られなかった（図 7-1 D, F）。これらの結果から δ EF1 は HN 断片に結合する事によってエンハンサー活性を抑制するように働く事がわかった。

そもそもエンハンサーに結合する因子としてクローニングした δ EF1 が転写抑制因子としての活性を持っていたということは一見矛盾する結果のように見える。この点に関しては δ EF1 の胚発生過程における発現パターンと合わせて総合議論の章で議論する。



B

HNW gatctAGTCAGCCACTAAGCACTTTCTGAAATATTCAATTGTTGCTCACCTACCATggatc
HN 6 gatctAGTCAGCCACTAAGCACTTTCTGAAATATTCAATTGTTGGTACAAGACCATggatc



8. 胚発生過程における δ EF1 の発現

●序

これまでの研究によって δ EF1 は発生過程の胚で多くの組織で発現される転写調節因子であり、水晶体の初代培養においては δ-クリスタリンエンハンサーに結合して転写を抑制する効果を持つということがわかった。このような性質を持つ因子が水晶体の分化だけでなく胚発生全体においてどの様な役割をはたしているのかは興味深い問題である。そこでこの間に対しでて答えるための手がかりを得るため、δ EF1 に対する抗体を用いて胚発生過程におけるその発現パターンを調べることにした。

まずははじめに色々なステージのニワトリ胚から核抽出液を調製しウェスタンブロッティングにより大まかな発現パターンを見た。次に免疫組織化学によってより詳細な発現パターンを観察した。

●材料と実験方法

・核抽出液の調製

種々のステージからとった組織を剃刀で細かく刻んで 7 ml の buffer A (10 mM HEPES (pH 7.9), 1.5 mM MgCl₂, 10 mM KCl, 0.5 mM DTT, 0.5 mM PMSF) に懸濁した。これを Dounce 型のホモゲナイザーでホモゲナイズした後、15 ml の遠心管で 2000 rpm, 4 °C で 5 分間遠心して上清を除いた。これを再び buffer A に懸濁して核の数を算定した後、核の数として 5×10^6 ずつになるよう分注して、1.5 ml の遠心管で 5,000 rpm, 4 °C で 5 分間遠心して上清を除いた後 -80 °C で保存した。これを使用直前に融解し 10 μl の

SDS sample buffer に懸濁し, 100 °C で 5 分間煮沸したものを核抽出液とした。

・ウェスタンブロッティング

電気泳動, ナイロンフィルターへの転写, 抗体との反応は一般的な方法を用いた。ナイロンフィルターは Nytran (Schleicher & Schuell) を用いた。プロッキングは 5% のスキムミルクを使用し, 1 次抗体は 1/250 希釈とした。抗原抗体複合体の検出には HRP conjugated ProteinA (Amersham) と ECL system (Amersham) を用いた。

・免疫組織化学

Hamburger and Hamilton (1951) に従ってステージを決定したニワトリ胚を 3.5% パラフォルムアルデヒドを含む HEPES 緩衝液 (HBS) 中で 4 °C で 2~5 時間固定し, 洗浄し, ショ糖を含む HBS に 4 °C で浸しショ糖の濃度を 10%, 15%, 25%, と順次あげていった。これを OCT コンパウンド (Miles Scientific) に抱埋しドライアイスで凍結した。凍結切片はクリオスタット (Bright) を使用して 4 μm の厚さとし, ゼラチンコートしたスライドグラスに移し, 風乾した。これを室温で 1/100 希釈の精製した抗 δ EFL 抗体, 1/1000 希釈の anti-rabbit Ig, biotinylated (Amersham), 1/1000 希釈の streptoavidine, fluorescein-conjugated (Amersham) または streptoavidine-biotinylated peroxidase complex (Amersham) の順で反応させた。このあと fluorescein の場合は 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の DAPI (4',6'-diamidino-2-phenylindole

dihydrochlofide) で二重染色し, peroxidase の場合は DAB (diaminobenzidine) で発色させた。これらの反応は全て 0.1% Tween-20 と 10% スキムミルクを含むトリス平衡類溶液 (TBS) 中で行い、またそれぞれの反応の間には TBS による洗浄を行った。最後にこれらの切片を PermaFluoro (日本ターナー) あるいはグリセリンゼリー (10% ゼラチン水溶液とグリセリンを 5 対 4 の割合で混合) で封入して顕微鏡で観察し、写真を撮影した。

● 結果と議論

アフィニティーコロマトグラフィーによって精製した抗 δ EF1 抗体を用いて、 δ EF1 の組織分布をニワトリ胚の色々なステージについて検討した。まずウェスタンプロッティングを行った結果、 δ EF1 は孵卵開始後 2 日目にすでに発現されていることが明かとなった (図 8-1)。そこで特に初期胚に的を絞って免疫組織化学によってより細かい解析を行った。

その結果をまとめたのが表 8-1 である。大まかにみて δ EF1 の発現は 10 体節のステージ頃 (ステージ 10 (Hamburger and Hamilton, 1951), 1.5 日) から始まって 20 体節 (ステージ 13+, 約 2 日) を過ぎる辺りから急激に強まるといえる。

ステージ 8 は吻側でちょうど 3 胚葉が出来上がる時期であるが、まだ δ EF1 の発現は検出できない (図 8-2A と B)。発生が進んでステージ 10 になると、 δ EF1 の発現が中胚葉で観察されはじめる。それはまず脊索で始まり、その後体節から腎節、側板へと続いている (図 8-2C から F)。また外胚葉由来の神経管でも発現が見られるようになる。これらの組織での δ EF1 の発現の特徴は、ひとつ

の組織の中の全ての核で同じような強さで発現するのでなく、強い発現を見せる核とそうでないものとが混在しているという点にある。またその分布は特に体軸に沿うような勾配は示さない。さらに発生が進むと δ EF1 を発現する核の割合は組織内でほぼ 100% となる。

ステージ 18 になると体節は真皮節や筋節、硬節に分化していくが、 δ EF1 の発現は特に筋節で強まり、この時期の胚ではもっとも発現が目立つ箇所となる（図 8-3 A と B）。この同じ切片上で見える神経管での発現は、体節と比べると弱い事がわかる。遊走をはじめた神経冠細胞は δ EF1 を発現していないが（図 8-3 A、矢尻）、神経節（図 8-3 A）や内臓弓の間充織（図 8-3 C）に定着すると再び発現をはじめる。一方中腎では、凝集している間充織や形成中の中腎細管は強い δ EF1 の発現を示すが、ヴォルフ管やそこにつながる細管は発現していない（図 8-3 C と D）。この様に δ EF1 の発現パターンが組織形成に伴ってダイナミックに変化することから、 δ EF1 がこれらの組織形成に何らかの重要な役割をはたしている可能性がある。

ところで水晶体での発現はどうであろうか。外胚葉からレンズプロコードが形成され続いて陷入をはじめる頃（2.5 日）には、 δ -クリスタリンの発現ははっきりと確認されるが、 δ EF1 は検出できなかった。 δ EF1 の発現がかろうじて確認できるようになるのは水晶体胞が形成される頃であった（図 8-4 A と B）。このことは δ EF1 は δ -クリスタリンの発現の開始にはおそらく必要でない事を示している。しかしながら、水晶体の発生が進んで水晶体纖維が出来る時期になると、 δ EF1 の発現は水晶体の全ての細胞の核で検出されるようになる。より水晶体の発生が進んで例えば 8 日目のステージ

33になると、 δ EF1の発現は上皮細胞よりも繊維細胞の方で強くなる（図8-4EとF）。つまり δ -クリスタリン遺伝子を大量の発現している細胞の核で δ EF1がより多く発現している事になる。

ところで、第7章で述べた研究によれば δ EF1は δ -クリスタリンエンハンサーにたいして転写抑制因子としての活性を持つ。それでは水晶体で δ -クリスタリンの発現が増大するときに δ EF1の発現量も高いという事実をどう説明づければよいのだろうか。ヒントは成熟しつつある水晶体ではクリスタリンの合成量はもちろん非常に高まっているが、逆にクリスタリン以外のタンパク質の合成は呼応するように低下しているという点にある。おそらく δ EF1はクリスタリン以外のタンパク質のうちで δ EF1の結合部位を持つ遺伝子（既知の幾つか遺伝子の制御領域の中に δ EF1の結合する配列が存在する）の発現を押さえよう働いているのではなかろうか。この点について、総合議論の章で再び詳しく論ずる。

さて一般に外胚葉のプラコードからできる組織では δ EF1が発現するかといえば、答は否である。即ちその発現は水晶体だけに限られていて、例えば耳胞や鼻孔の上皮では δ EF1は発現していないままであった（図8-5）。これ以外のほとんどの外胚葉由来の組織での δ EF1の発現は無いか非常に低い。また内胚葉由来の組織でも同様であった。

図 7-1. コトランスフェクションした δ EF1 発現ベクターによる
HN 断片を持つルシフェラーゼ遺伝子の発現の抑制。（前頁）

A. サイトメガロウィルスのプロモーターで制御される δ EF1 の発
現ベクター（上）と、8 量体化した HN 断片を上流に持つ δ - ク
リスタリン遺伝子の最小限のプロモーターで制御されるルシフェ
ラーゼをコードするレポーター遺伝子（下）の構造の模式図。

B. 野生型の HN 断片の単量体 (HNW) と変異体の HN6 の塩基配列。
リンクバーの配列は小文字で示し、塩基置換された配列に網をかけ
て示した。

C から F. δ EF1 発現ベクターの量を増やしていく時のルシフェ
ラーゼの活性を、δ EF1 を加えないときの活性を 100% として表
した。外来の DNA による転写因子の希釈の効果を最小限にするた
めに、加える発現ベクターのコピー数と DNA の総量 ($1 \mu g$) は、
挿入断片無しの pCMVX ベクターと pUC プラスミドを加えること
で一定に保った。(C) 水晶体での HNW (野生型の HN 断片)。
(D) 繊維芽細胞での HNW. (E) 水晶体での HNW. (F) 繊維芽
細胞での HN6. δ EF1 を加えない時のルシフェラーゼの比活性は、
HN 断片を持たないルシフェラーゼ遺伝子のそれに対して C から F
までそれぞれ 31 倍、0.5 倍、2.4 倍、1.6 倍であった。

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12

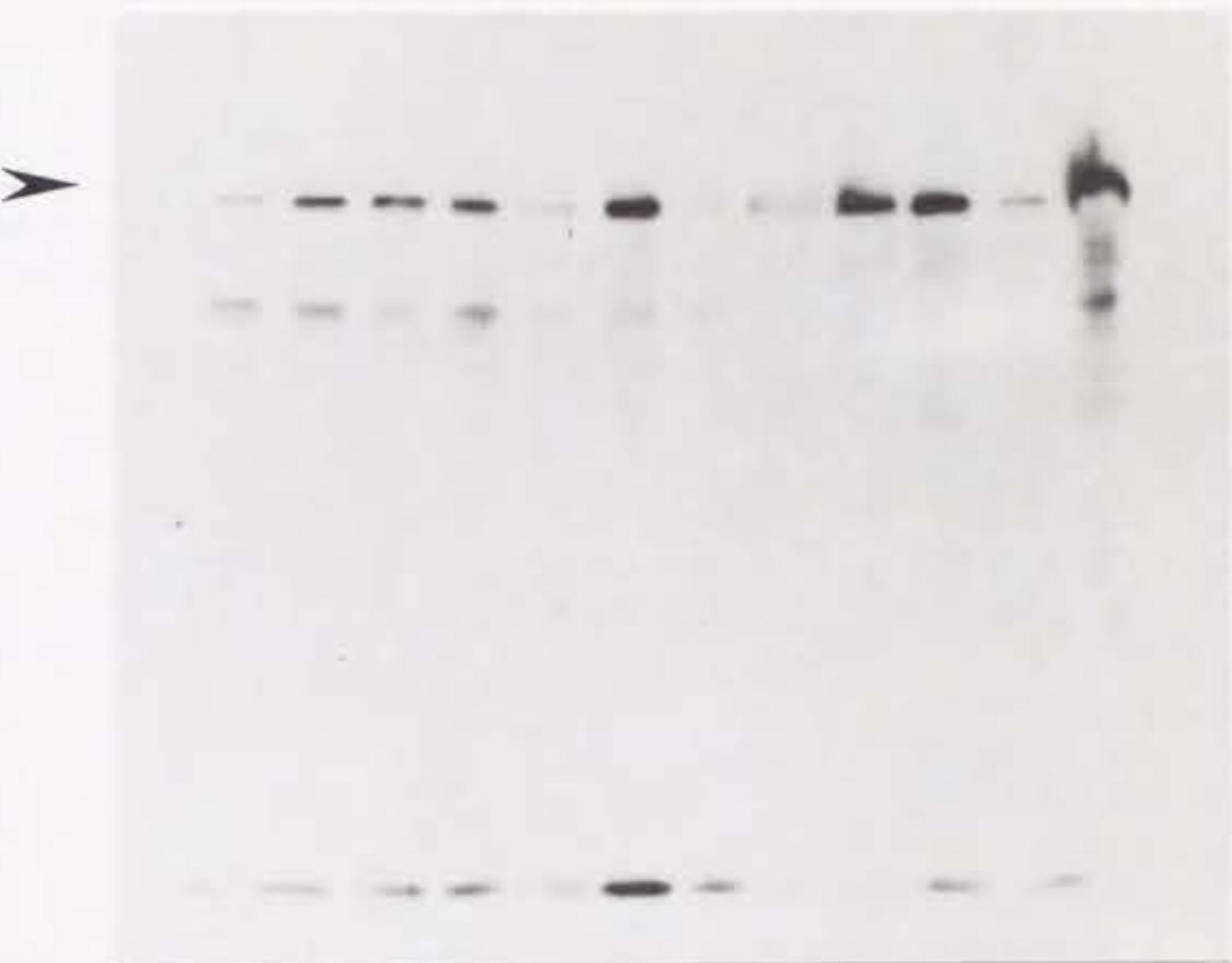


図8-1. 種々の発生段階にある胚組織の抗 δ EF1抗体によるウェスタンブロッティング.

各レーンとも 5×10^6 個の核の抽出液を泳動した分離ゲルのアクリルアミドの濃度は 7.5% である.

レーン 1, 2 日胚；レーン 2, 2.5 日胚；レーン 3, 3.5 日胚の頭部；レーン 4, 3.5 日胚の胴体；レーン 5, 9 日胚の水晶体；レーン 6, 9 日胚の脳；レーン 7, 9 日胚の肺；レーン 8, 9 日胚の心臓；レーン 9, 14 日胚の水晶体；レーン 10, 14 日胚の脳；レーン 11, 14 日胚の肺；レーン 12, 14 日胚の心臓.

矢尻で示したバンドが δ EF1 でその下の薄いバンドは加水分解物である.

Table 8-1 Summary of immunohistological analysis of δ EF1 expression at various developmental stages

Stage Number of somites	8 4	8+ 5	10 10	10+ 11	11- 12	11 13	12- 15	12+ 17	13- 18	13+ 20	14 22	18 30-36
Ectoderm												
Neural tube	-	-	-	-	-	-	-	+	+	++*	++	++
Retina	/	/	/	/	/	/	/	/	+	++*	++	++
Lens	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	-	+
Rathke's pouch	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	-	-
Otic vesicle	/	/	/	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Neural crest derivatives												
Cephalic mesenchyme	/	/	-	+	+	+	++	++	++	++	++	++
Mesenchyme of visceral arches	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	+	+
Mesoderm												
Notochord	-	-	+	+	+	+	++	++	++	+++	+++	+++
Somites	-	-	-	-	-	-	+	+	+	dm+++	d ++	++
										sc ++	m +++	++++
										sc ++	sc ++	+++
Lateral plate	-	-	-	-	-	-	-	-	+	++*	++*	++*
Nephrotome	/	/	-	-	-	-	-	-	+	++*	++*	++*
										W +	-	-
Heart	/	/	+	+	+	+	++	++	+++	+++	+++	+++
Endoderm												
Pharynx/Digestive tract	/	/	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Amnion	/	+	++	++	++	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++

The stage of development was determined according to Hamburger and Hamilton (1951).

/, the tissue has not developed yet; -, no significant expression; + to ++++, weak to very strong expression.

*, scattered or non-homogeneous distribution of the δ EF1-expressing cells.

dm, dermamyotome; sc, sclerotome; d, dermatome; m, myotome; W, Wolffian duct.

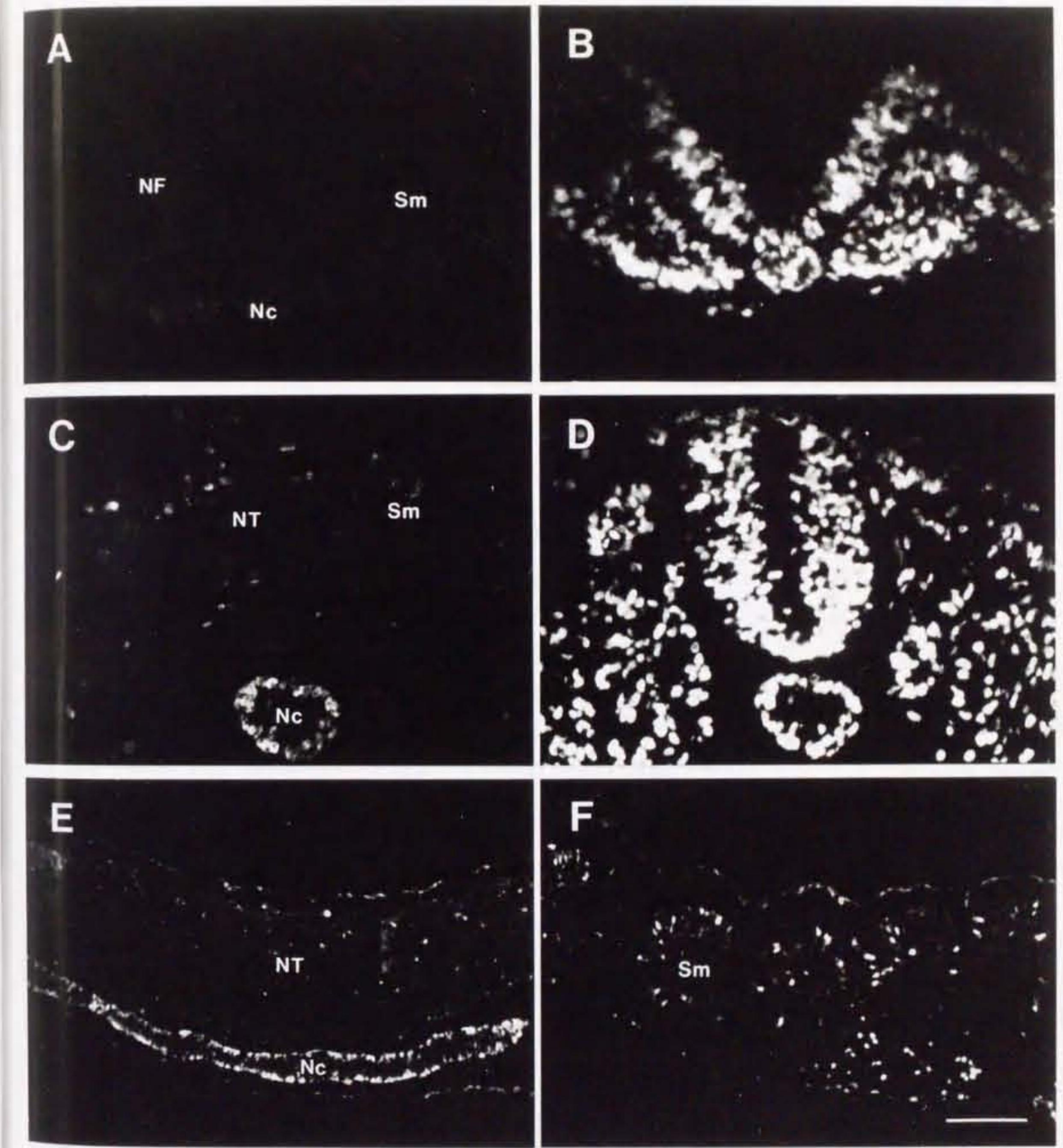


図 8-2. 原腸陥入後の体幹部の抗 δ EF1 抗体による免疫組織化学。
(前頁)

A と B. ステージ 8 の吻側から 3 つ目の体節 (Sm) を横切る横断切片。(A) は抗 δ EF1 抗体を FITC で染色したもので、(B) は DAPI で染色したものである。NF, 神経管；Nc, 脊索。

C と D. ステージ 14 の横断切片を抗 δ EF1 抗体 (C) または DAPI (D) で染めた。NT, 神経管；Sm, 体節；Nc, 脊索。脊索では全ての核が δ EF1 陽性であるが、神経管と体節の核は陽性のものとどうでないものが混在していることに注目されたい。

E と F. ステージ 14 の胚の脊索を通る正中断面 (E) とそのやや外よりの体節を通る断面 (F)。右が吻側である。脊索での δ EF1 の発現は吻側から尾側まで一様に強く (E)。体節ではほとんど δ EF1 陽性の核は外側の上皮層にある (F)。写真の中の横棒は A から D では $50 \mu\text{m}$ で、E と F では $100 \mu\text{m}$ に相当する。

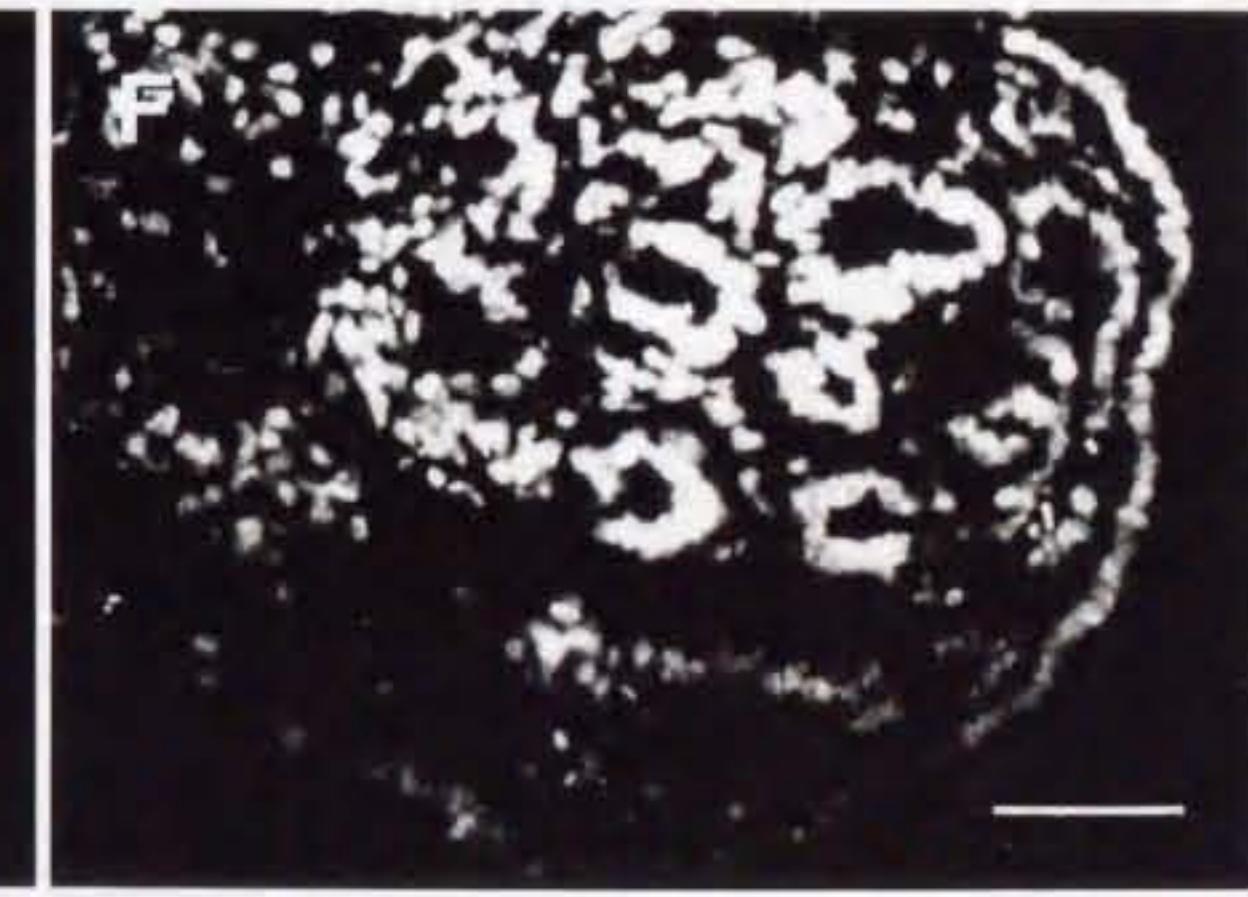
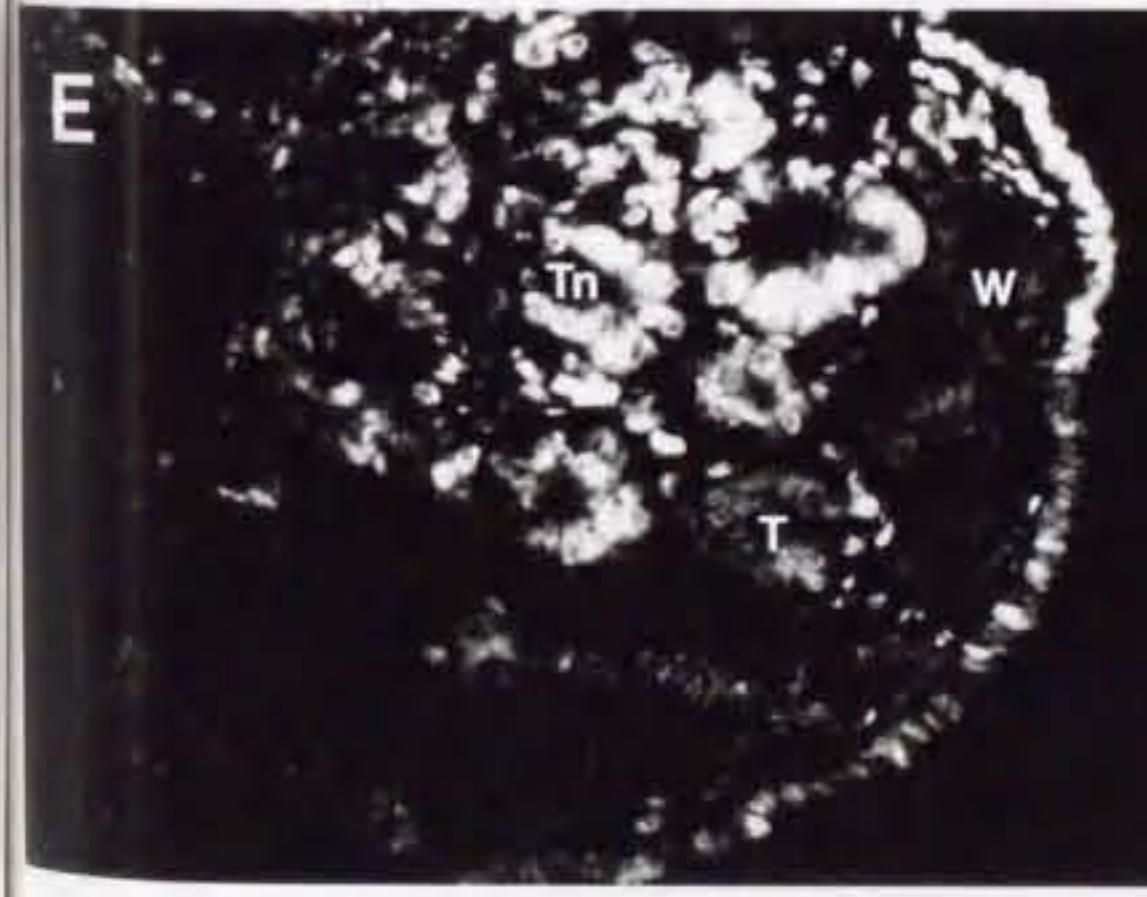
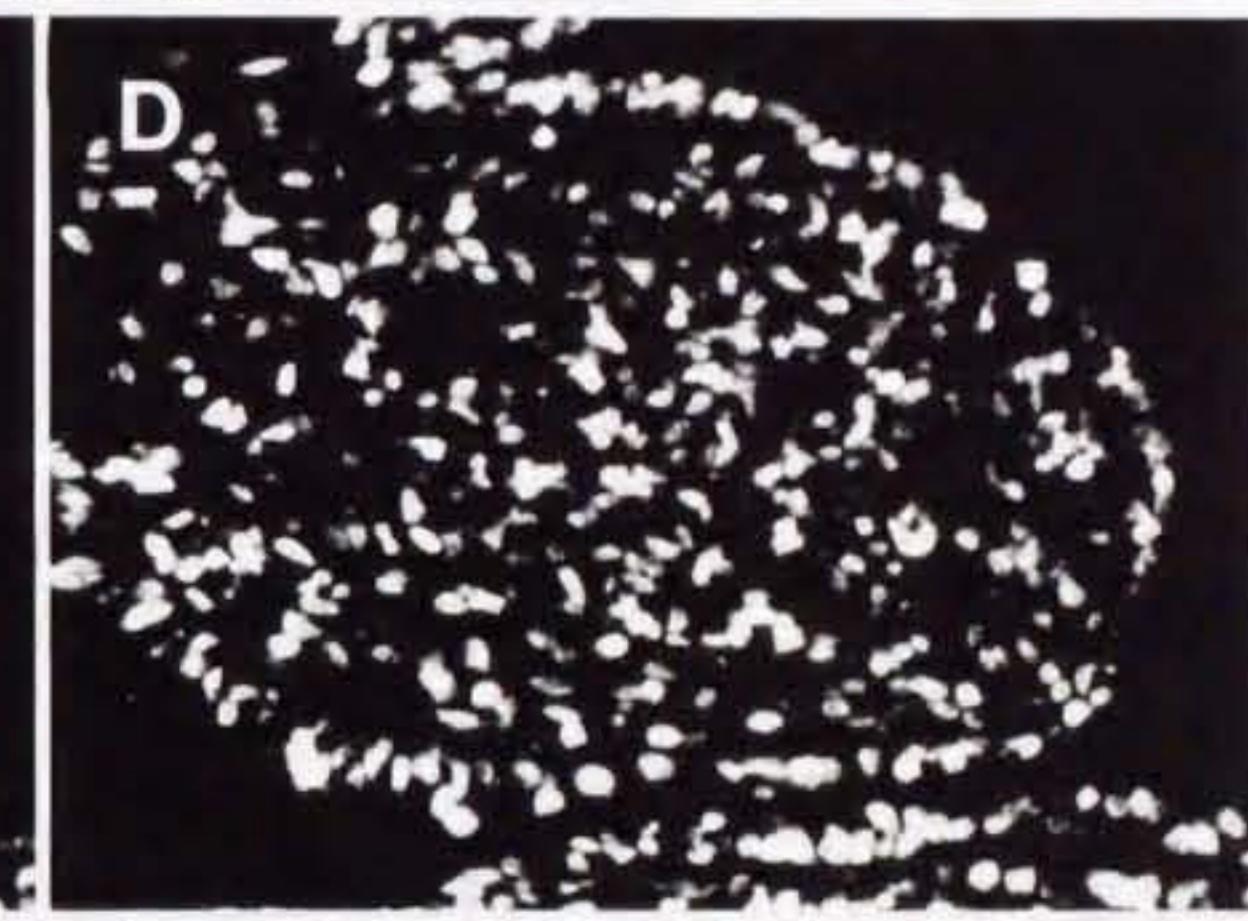
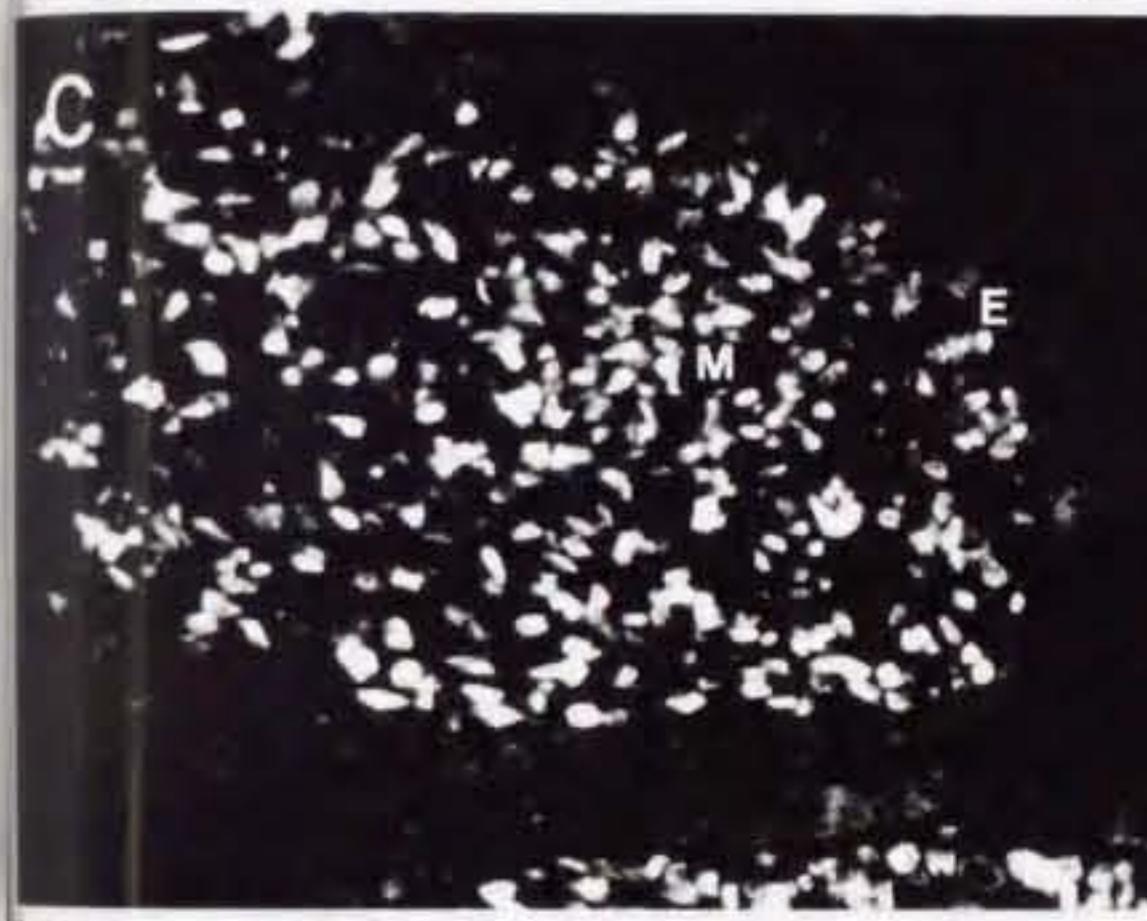
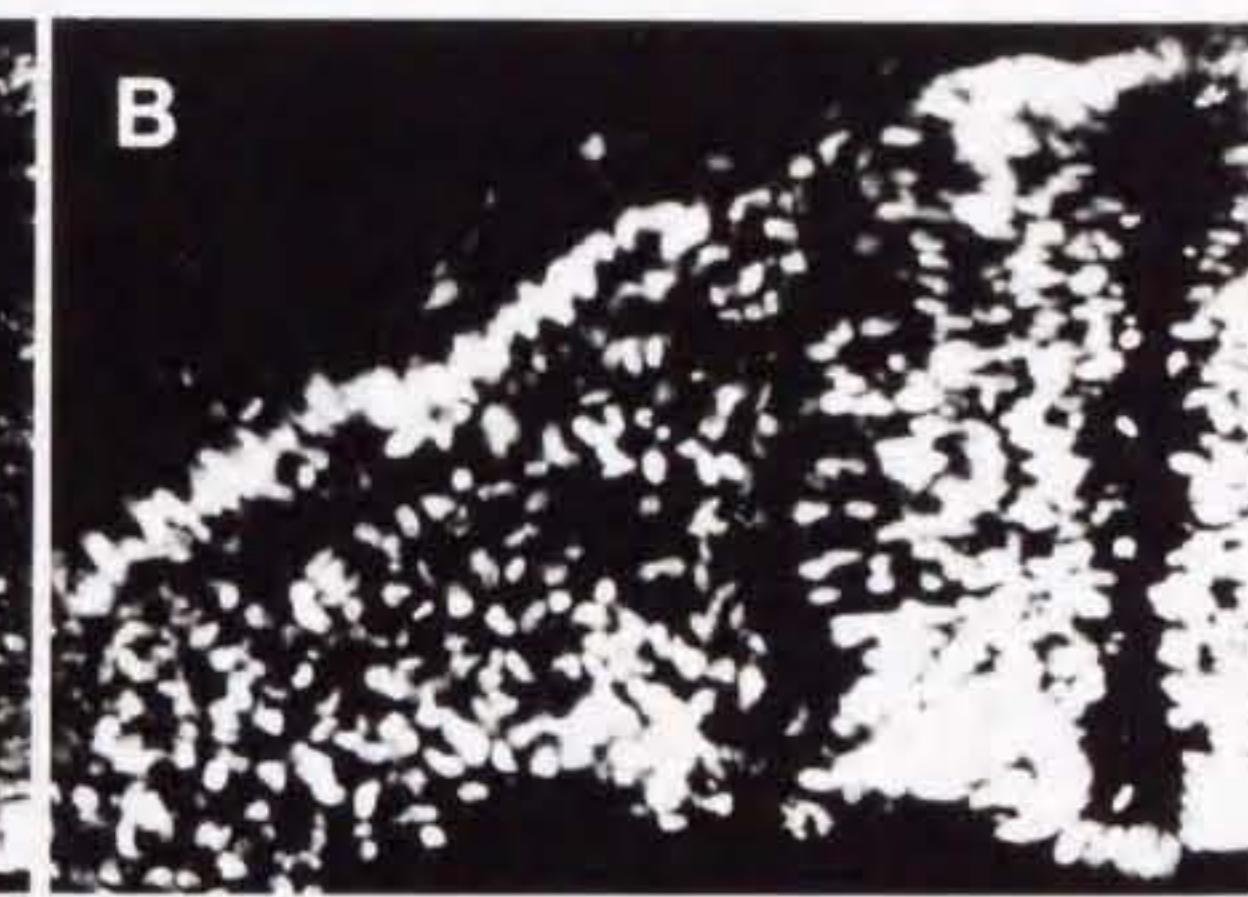
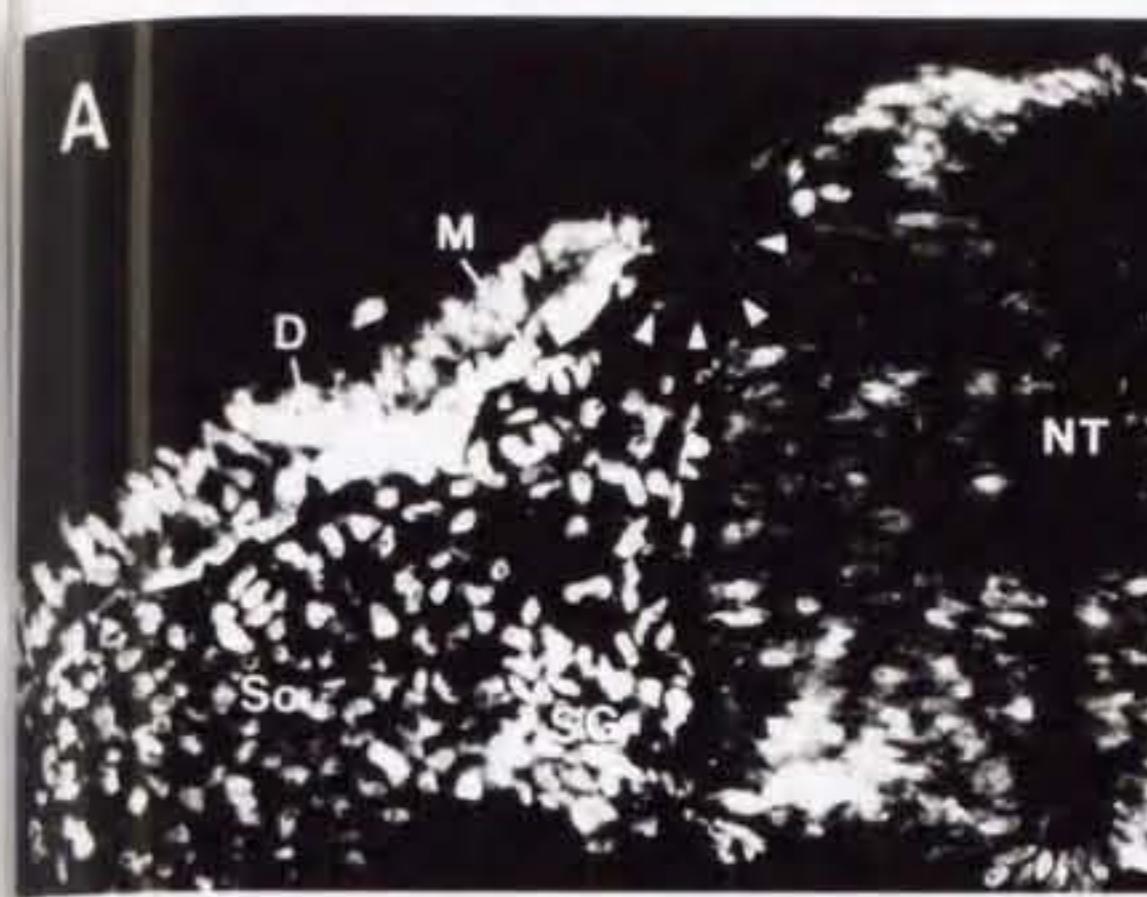


図 8-3, 中胚葉と神経冠細胞由來の組織における δ EF1 の発現.

(前頁)

A と B, ステージ 18 の胚の横断切片を抗 δ EF1 抗体 (A) または DAPI (B) で染めたものの一部分, D, 真皮節; M, 筋節; NT, 神経管; Sc, 硬節; SG, 将来の脊髄神経節. 移動を始めた神経冠細胞の塊を矢尻で示した.

C と D, ステージ 18 の胚の内臓弓を横切る横断切片を抗 δ EF1 抗体 (C) または DAPI (D) で染めたもの. E, 内胚葉と外胚葉からなる上皮; M, 間充織 - ほとんどが神経冠細胞由來.

E と F, ステージ 23 の胚の中腎を抗 δ EF1 抗体 (E) または DAPI (F) で染めたもの. 形成中の中腎細管 (Tn) での δ EF1 の発現は高いが, この時期のヴォルフ管 (W) での発現はほとんどなく, ここにつながる管の発現も非常に低いことに注目されたい. 横棒は 50 μ m を示す.

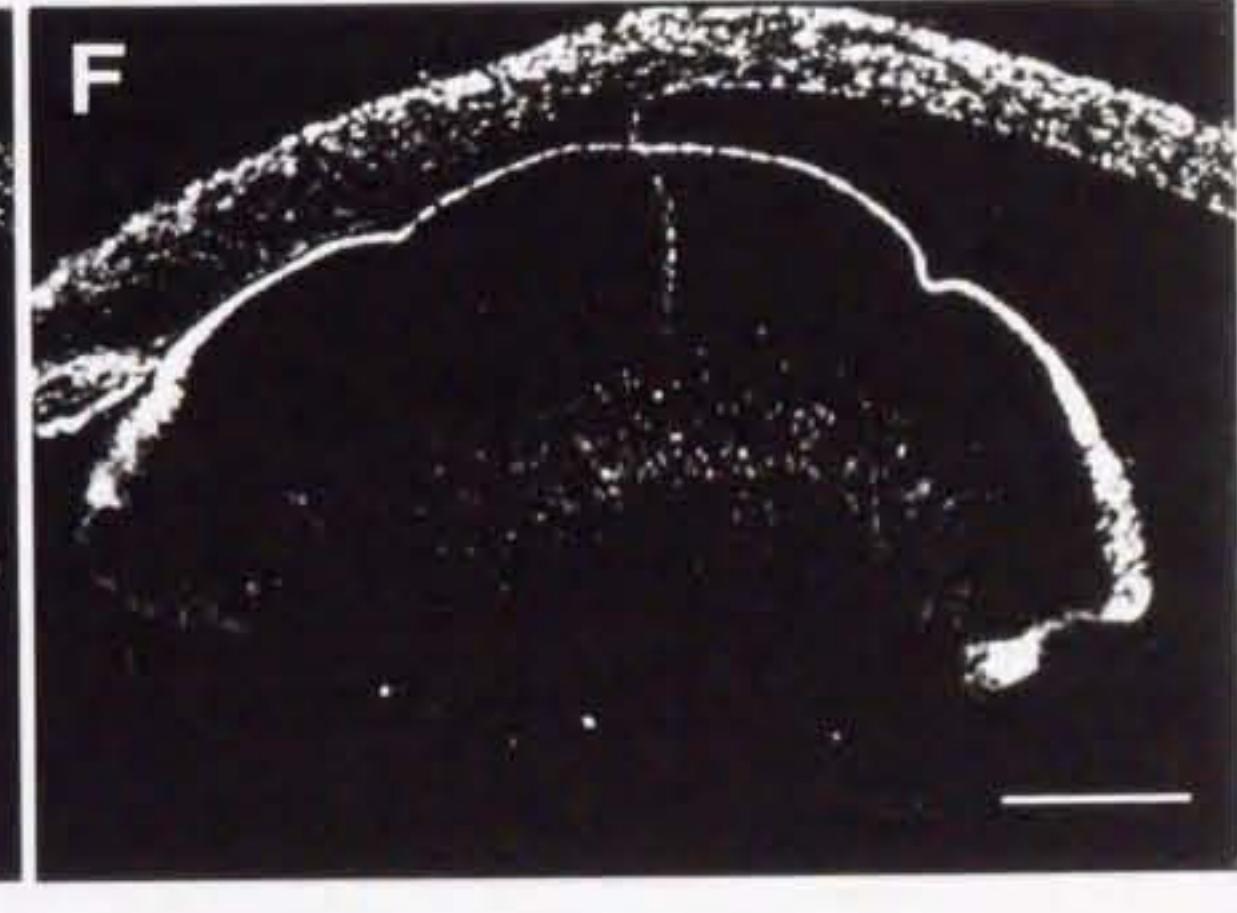
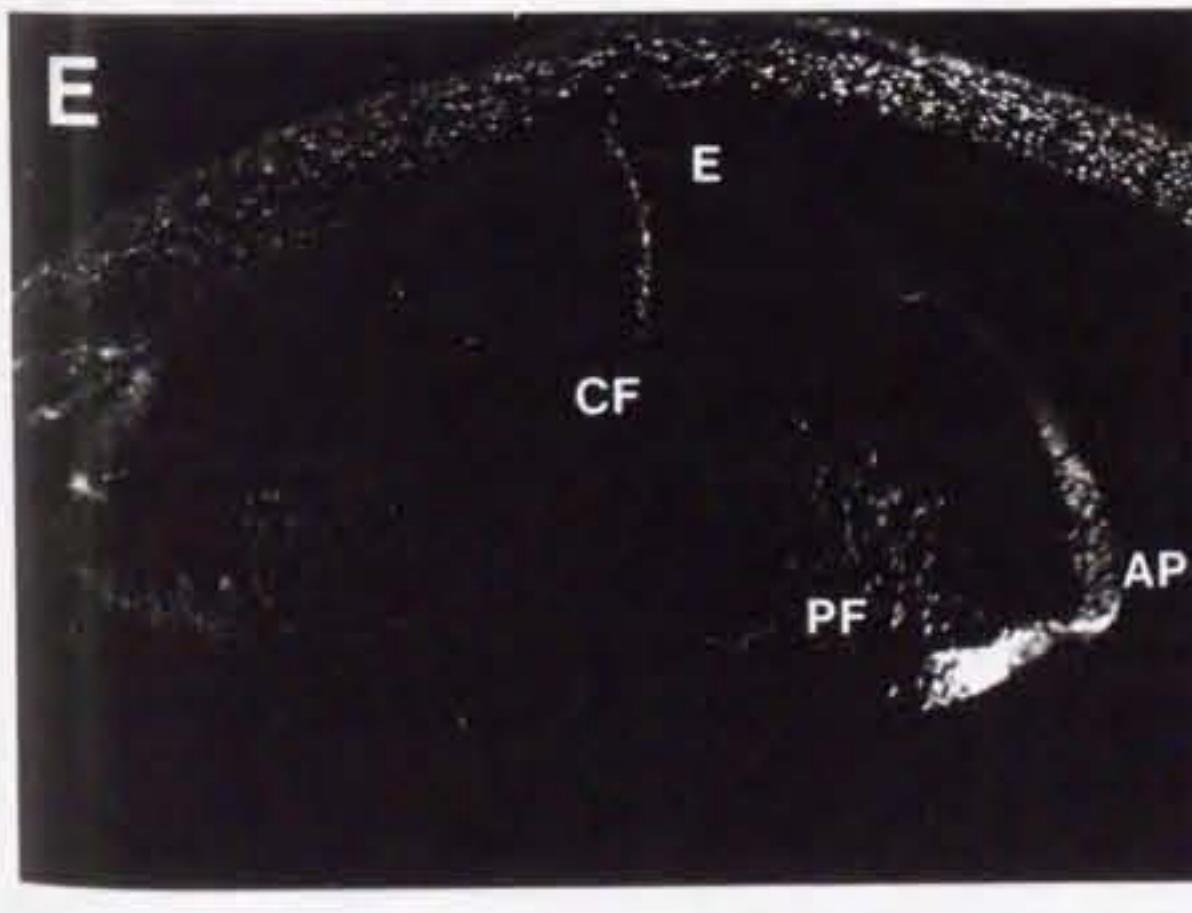
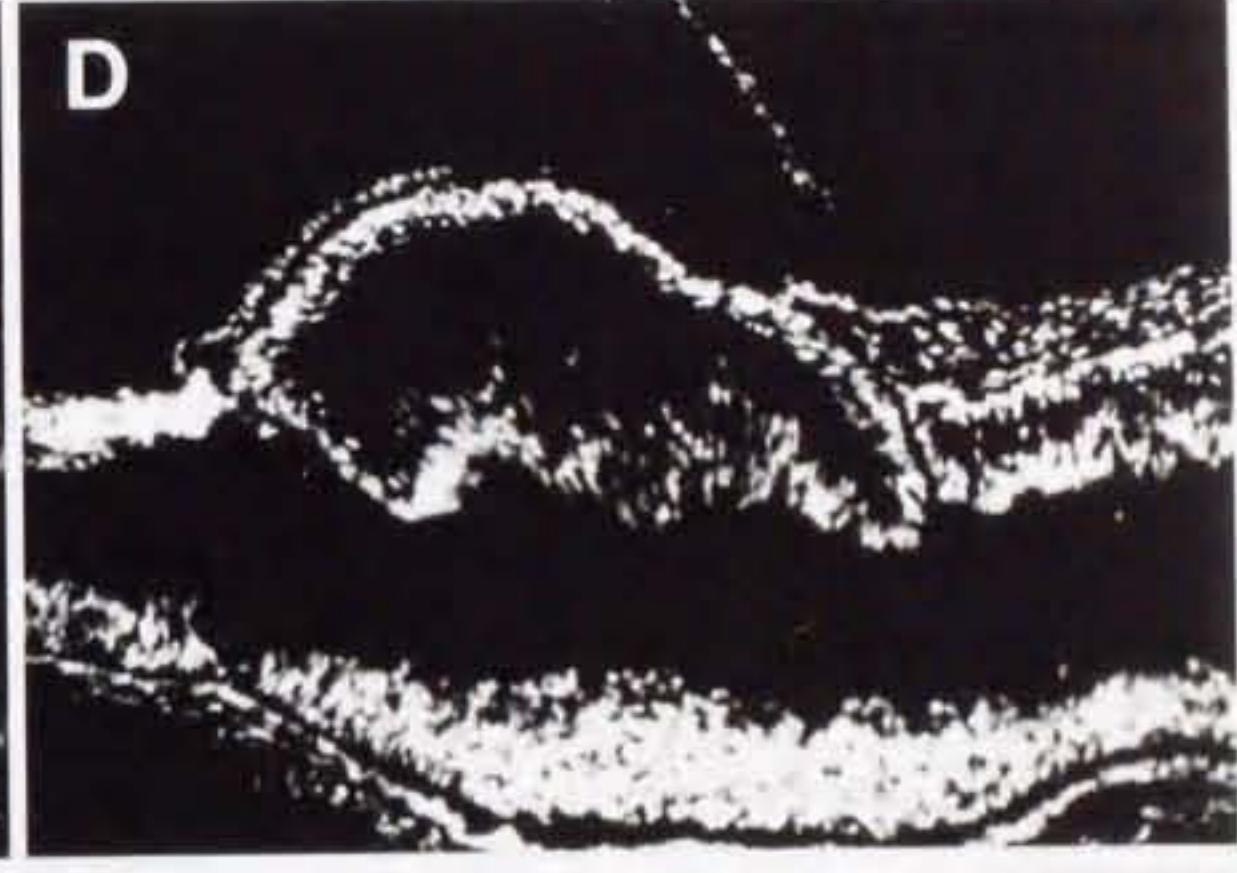
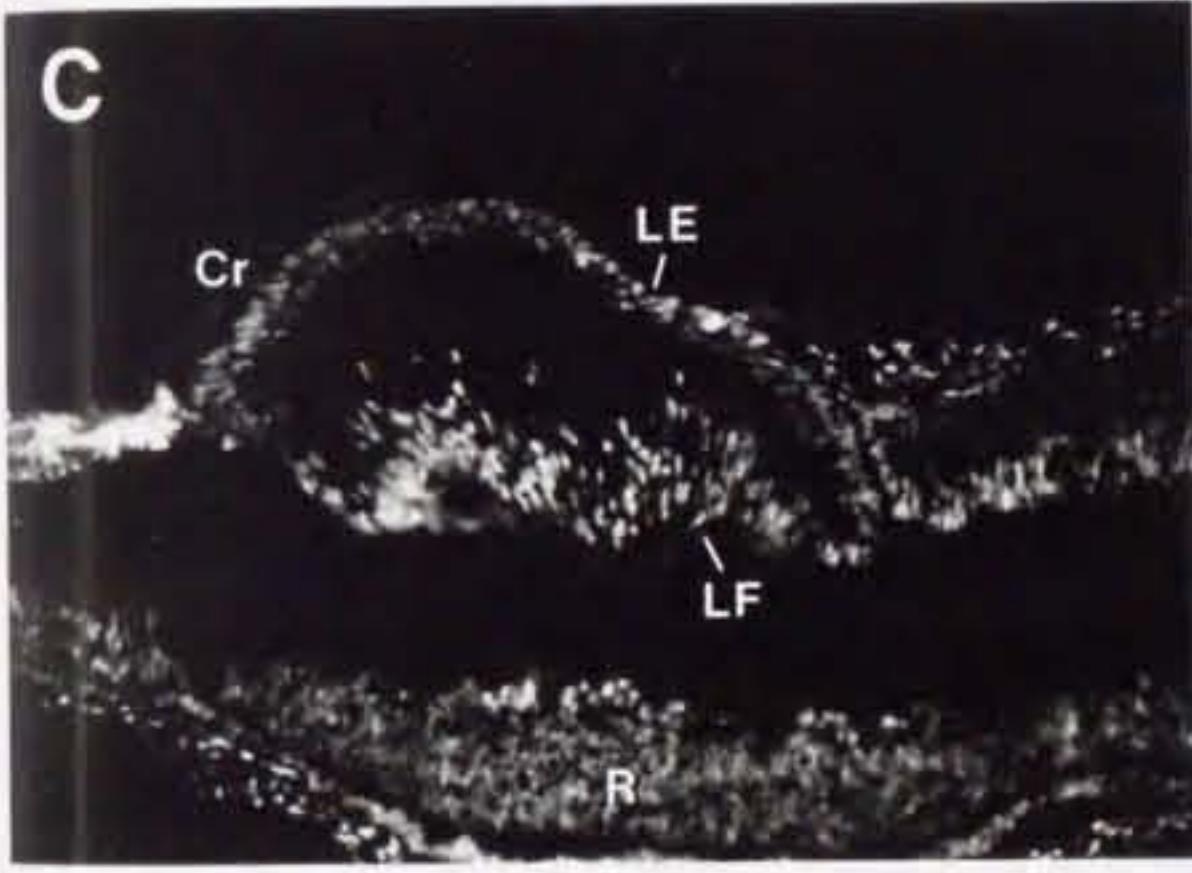
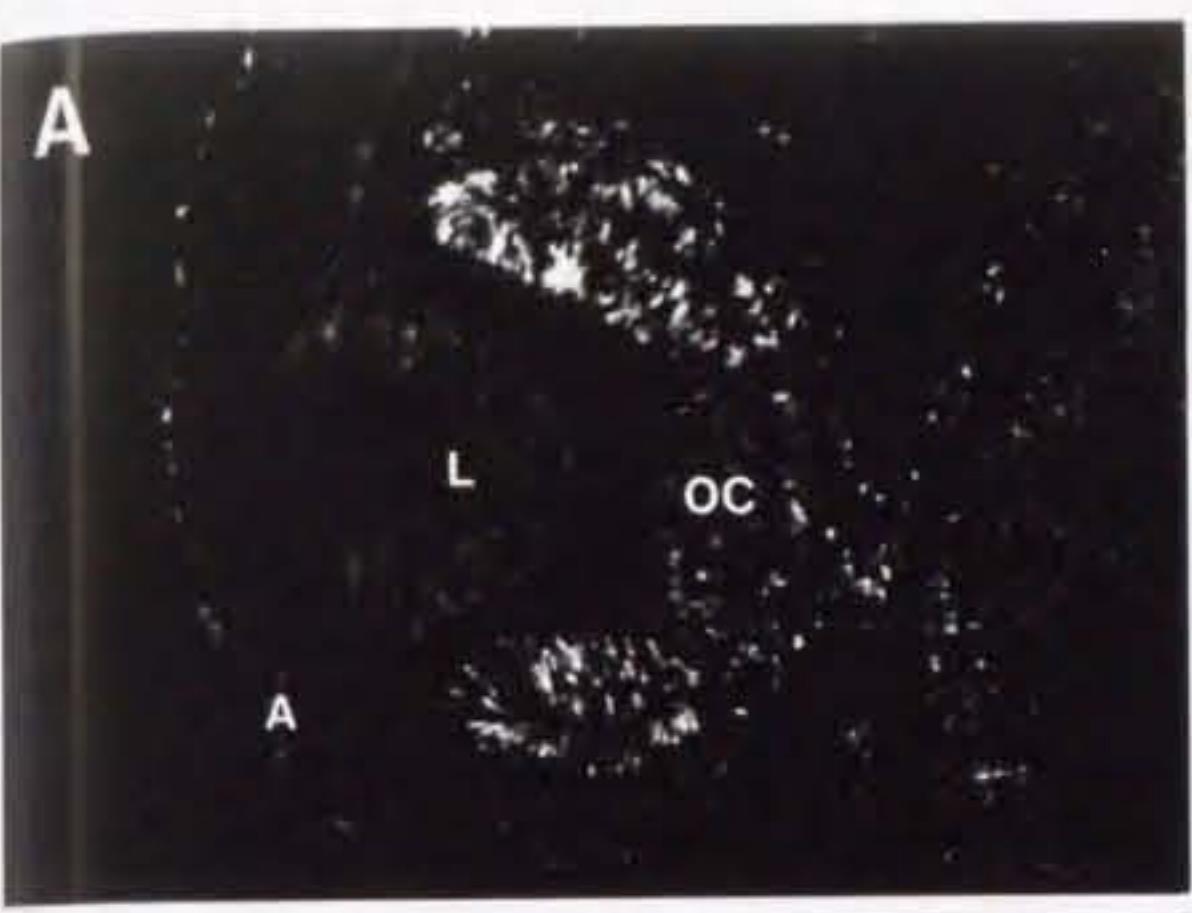


図 8-4. 発生過程における水晶体における δ EF1 の発現. (前頁)

A と C, E は抗 δ EF1 抗体で染めたもので, B と D, F は DAPI で染めたものである.

A と B, 水晶体胞が形成される頃のステージ 18 の胚. A, 羊膜; L, 水晶体胞; OC, 眼盃. 水晶体胞とまだそこにつながっている外胚葉での δ EF1 の発現は, 眼盃に比べると非常に低いことに注目されたい.

C と D, ステージ 23 の水晶体. 水晶体繊維が伸長し始めている. 外側の水晶体上皮も内側の水晶体繊維も強い δ EF1 の発現があるが, 外胚葉の発現は非常に弱いままである.

E と F, ステージ 33 (8日胚) の水晶体. δ EF1 の発現は周縁部 (AP) と周辺の繊維 (PF) では強いが, 上皮層 (E) や中央部の繊維 (CF) ではほとんど検出できない. 横棒は A から D では 100 μ m, E と F では 200 μ m を表す.

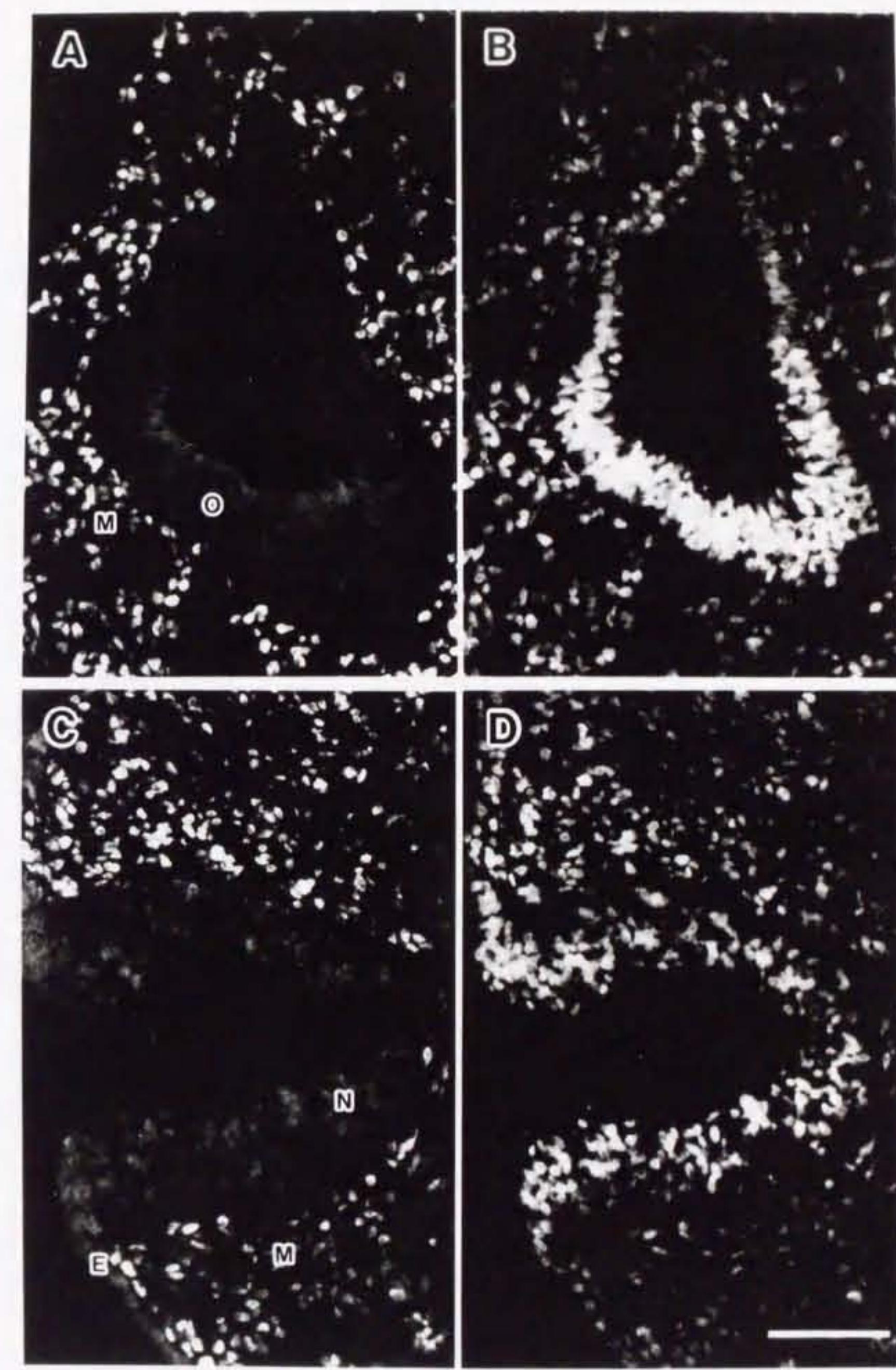


図 8-5. 水晶体以外の上皮由来の組織の抗 δ EF1 抗体による免疫組織化学。
 AとCは抗 δ EF1 抗体で染めたもので、BとDは DAPI で染めたものである。
 AとB、ステージ 23 の耳胞。O、外胚葉由来の耳胞；M、間充織。
 CとD、ステージ 23 の鼻孔。N、鼻孔；E、外胚葉；M、間充織。横
 棒は 50 μm を示す。

● δ EFL 産物の構造とその DNA 結合能

δ EFL タンパク質は DNA 結合タンパク質として非常に興味深い構造を持っていた。即ち DNA ドメインとなり得る 2 つの Zn フィンガードメインだけでなくその間にホメオドメインまで持っているという点である。この様な構造をとるタンパク質としてショウジョウバエの 2 つの zfh 遺伝子産物 (Fortini et al., 1991; Lai et al., 1991) とラットの α -fetoprotein エンハンサー結合タンパク質 (Morinaga et al., 1991) がある。特に δ EFL はその DNA 結合ドメインの配置とドメイン内のアミノ酸配列が zfh-1 と驚くほど似ていた。このことはこれら二つのタンパク質の持つような構造が DNA 結合タンパク質に一般的に存在することを示唆する。

それではこの様な複数の DNA 結合ドメインは一体どのようにしてゲノム上の DNA の塩基配列と相互作用するのであろうか。これは δ EFL についてのみならず複数の DNA 結合ドメインを持ったタンパク質全般にとって重要な問題である。

δ EFL の C 末端側のフィンガー (C-フィンガー) のみを持つ JF12 は、エンハンサーコアの一部である DC5 断片をプローブにして DNA 結合能を調べると、 δ EFL 全体と同じ結合特異性を示す。これは C-フィンガーだけでこのエンハンサーコアの領域に結合できることである。ところで PRDII-BF1 という DNA 結合タンパク質も 2 つの Zn フィンガードメインを持っていて、それぞれは N 末端と C 末端に離れて位置し、どちらも同じ DNA 結合特異性を示す (Fan and Maniatis, 1990)。第 6 章の図 6-2 C で示したように、

δ EF1 の N - フィンガーのフィンガー 3-4 は C - フィンガーの 6-7 とアミノ酸配列の相同意が高いため、したがって N - フィンガーの結合する配列が C - フィンガーの結合部位と相同であるかもしれない。

一方ひとつの転写因子の持つ複数の Zn フィンガーの組み合わせをデリーションや組換えによって変更すると、DNA 結合特異性が変化するという例も知られている (Keller and Maniatis, 1992)。このことから類推すれば、 δ EF1 はいくつかの異なる DNA 結合特異性を場合によって使い分けているの可能性もある。

また δ EF1 の持つホメオドメインは塩基配列に特異的な結合能を示すか否かははっきりしないが、ZFH-1 のホメオドメインはそのような活性を示す (Fortini et al., 1991)。ホメオドメインの働きについては別の可能性も考えられる。POU-ホメオドメインに見られるように (Treacy et al., 1992)、 δ EF1 のホメオドメインは他のタンパク質と 2 量体を形成するように働くことも有り得る。それは第 6 章の図 6-1 に示したように δ EF1 のホメオドメインは I-POU のホメオドメインと相同意があるからである。

● 水晶体における δ EF1 の働き

δ EF1 の水晶体における発現が δ -クリスタリンの発現よりも遅れて始まり、しかも δ -クリスタリンの合成が増大するのに呼応するように発現が高まるのは何故かという点について考えてみる。

δ EF1 の強制発現ベクターを HN エンハンサーを持ったレポーター遺伝子と共にコトランスフェクションすると、 δ EF1 はこの δ -クリスタリンエンハンサーにたいして抑制因子として働く。その後、私たちのグループで HN 断片により細かい変異を導入して解析した

結果、HN 断片には δ EF1 結合部位に別の活性化因子の結合部位が重なるように存在していて、そのため水晶体細胞では δ EF1 と活性化因子が競合していることが判った (Kamachi and Kondoh, 印刷中)。おそらく発生過程にある水晶体では活性化因子の力が勝っていて、 δ EF1 の抑制効果が打ち消されているのであろう。これに対して、水晶体以外の多くの組織では活性化因子が働くかず、 δ EF1 が α -クリスタリンの発現を抑制することでこの遺伝子の発現の水晶体特異性をより厳密なものとしているのであろう。事実、何種類もの初代培養や株細胞について調べてみたが、常に HN 断片に δ EF1 が結合するとレポーター遺伝子の発現は抑制された (Kamachi and Kondoh, 印刷中)。

さてここでもう一度はじめの間について考えてみる。成熟しつつある水晶体ではクリスタリンの合成量はもちろん非常に高まっているが、逆にクリスタリン以外のタンパク質の合成は呼応するよう降低している。おそらくクリスタリン以外のいくつかの遺伝子は δ EF1 の結合部位を持っていても、水晶体にある強い活性化因子の結合部位は持たないために、 δ EF1 はそれらの遺伝子の発現を抑制するように働くのであろう。

● 中胚葉における δ EF1 のダイナミックな発現の変化

発生過程の胚の中で δ EF1 の発現が最も目立つ場所は中胚葉である。 δ EF1 は原腸陥入が終了して器官形成が始まるや否や発現します。またほとんどの中胚葉由来の組織で δ EF1 の発現はみられ、脊索から始まり、続いて体節や腎節、側板で発現が見られるようになる。ステージ 12 から 14 の頃 δ EF1 は全ての脊索の核で高い発現を示

すが、ちょうどその頃は脊索が神経管に対して背腹軸の誘導を行っている時期として知られている (Yamada et al., 1991)。体節での δ EF1 の発現はまずその外側の上皮部分で始まり中心部はまだ発現していない。発生が進んで体節から 3 つの組織すなわち真皮節、筋節、硬節が分化すると、筋節における発現が最も高くなる。筋節では、管状の構造がまさに出来つつあるときに δ EF1 の発現が最も顕著となる。この様な δ EF1 の発現のダイナミックな変動は、 δ EF1 がこれらの組織形成に何らかの重要な役割をはたしていると思われる。

タンパク質のアミノ酸配列の相似から δ EF1 がショウジョウバエの zfh 遺伝子ファミリーに属するらしいと上で述べたが、発現パターンの上からも δ EF1 と zfh-1 は非常に近い関係にある。zfh-1 遺伝子の産物は初期胚の中胚葉で発現され、発生が進んでからも幾つもの中胚葉由来の組織で発現され続ける。また中枢神経系でも発現されていて、その形成に重要な働きをしていると考えられている (Lai et al., 1991)。この点からみても δ EF1 は zfh 遺伝子ファミリーの一員であると言えよう。

● δ EF1 は転写抑制にしか働かないのだろうか？

さて、この様な興味深い δ EF1 の発現パターンを見ると、 δ EF1 が単に水晶体以外の組織では δ -クリスタリンの発現を抑さえ、水晶体ではクリスタリン以外の遺伝子の発現を抑さえているという以上に、細胞の分化に何らかの積極的な役割をはたしているのではと期待せられる。

δ EF1 のアミノ酸配列の中程にはプロリンに富んだ領域が、また

C末端にはグルタミン酸に富んだ領域があるが、この様な領域は多くの転写活性化因子の活性化領域に見いだされる (Mitchell and Tijan, 1989; Seipel et al., 1992; およびこれらの内の参考文献)。また幾つかのクリスタリン以外の遺伝子の細胞種特異的に働くエンハンサーの中に、 δ EF1 の結合部位が見つかっている。 δ EF1 が、活性化と抑制の 2 つの機能を持つ可能性と、ひとつのタンパク質の中に異なった DNA 結合ドメインを複数持つということを考えると、このタンパク質因子は細胞種や制御する相手の遺伝子によって様々にその作用機構を変えて働くのかも知れない。

● 転写制御因子としての δ EF1 が発生過程で果たす役割

δ EF1 は、 δ -クリスタリンエンハンサーの水晶体特異的な活性に必要不可欠な領域である IIIN 断片に結合する因子としてクローニングした遺伝子であったが、少なくともコトランスフェクションの実験では、このエンハンサーコアに対して抑制的な効果を及ぼす。また δ EF1 の発現様式は水晶体特異的ではなく、むしろ普遍的な様式を示した。この結果は一見矛盾を含んでいるように見えるが、実は逆に組織特異的な遺伝子の発現の制御機構の全体像を考える上で、非常に示唆に富むものであると云える。

それぞれの組織特異的な発現をする遺伝子について、一つひとつ制御因子（転写活性化因子）が対応していると云う仮定は単純ではあるが、結果として無限個の制御因子を必要とするモデルを要求する。しかし個々の細胞の持つ遺伝子の数に限りがある以上このモデルは成り立たない。従って論理的に受け入れることの出来るモデルは次のようなものとなるであろう。

発生学においては、一つの胚葉のある領域がある組織へと分化するよう方向付けられる、すなわち「決定」なる現象が起こるとされている。この際にいわゆる master gene なるものが活性化を受けると考える。この遺伝子の働きによって、例えば水晶体であればこれを形作るのに必要な遺伝子群が次々とカスケードのように発現されていって、ついにはひとつの組織が形成されると云うわけである。この過程の内にはいわゆるフィードバック制御もあるはずで、そのような制御には活性化因子はもちろん必要であるが抑制因子も同様に重要な役割を担っていると想像できる。またカスケードを構成する個々の遺伝子は必ずしもそのカスケードの中だけで機能しているとは限らず、時間的あるいは空間的に異なる組織形成に関わるカスケードであれば、そのメンバーが別のカスケードにおいては異なる役割をはたしていたとしても問題は生じないはずである。

この様なカスケードの存在が実験的にかなり明らかになっているのはショウジョウバエである。その点からみても δ EFL と ZFH-1 の構造と発現パターンの類似は興味深い。

ショウジョウバエの zfh-1 の中胚葉における発現は snail と twist 遺伝子の活性に依存している (Lai et al., 1991)。これら 2 つの遺伝子のマウスの相同遺伝子はすでにクローニングされており、それぞれ Sna (Smith et al., 1992) と M-twist (Wolf et al., 1991) と名付けられ、マウス胚における発現パターンが報告されている。どちらの遺伝子の発現も中胚葉由来の組織と神経冠細胞由来の間充織に広く分布している。マウスのデータがそのままニワトリにも当てはまるとすれば、snail と twist のニワトリの相同遺伝は δ EFL より早く発現されていることになる。これらからショウジ

ヨウバエと同様の中胚葉形成に関わる遺伝子制御のカスケードが、ニワトリやマウスのような脊椎動物にも存在することは容易に想像できる。

今後の課題は、カスケードの上流に向かってはこの転写調節因子 δ -EF1 自体の発現が胚発生過程において時間的・空間的にどのように制御されるのかと云うことになる。また δ -EF1 の機能を水晶体の分化という分脈の中だけでは語れなくなつたため、下流に向かっても δ -EF1 はどのようにして色々な細胞種に対してその効果を及ぼすのかを検討することが必要となつた。すでにニワトリとマウスの δ -EF1 の遺伝子が私たちのグループの手の中にある。したがつて上にあげたどちらの課題についても、ジーンターゲッティングやトランスジェニック動物作製の技術を用いて解析することが可能である。

そもそも私は細胞の分化の遺伝子による制御を、分化のほぼ終端に位置する δ -クリスタリンからカスケードを遡って行けば master gene まで到達できるという期待のもとにこの研究を始めた。いまようやくその道のりの第一段階を登ったところであるが、今後この方向で研究が進み、いつかの日か「外胚葉を水晶体にする遺伝子」が同定されるとともに、これらの成果が胚発生の全体像の解明に役立つことを期待する。

参考文献

- Bairoch, A. (1992). PROSITE: a dictionary of sites and patterns in proteins. *Nucl. Acids Res.* 20, 2013-2018.
- Chen, C. and Okayama, H. (1987). High efficiency transformation of mammalian cells by plasmid DNA. *Mol. Cell. Biol.* 7, 2745-2752.
- deWet, J.R., Wood, K.V., Deluca, M., Helinski, D.R. and Subramani, S. (1987). Firefly luciferase gene: structure and expression in mammalian cells. *Mol. Cell. Biol.* 7, 725-737.
- Fan, C.-M. and Maniatis, T. (1990). A DNA-binding protein containing two widely separated zinc finger motifs that recognize the same DNA sequence. *Genes Dev.* 4, 29-42.
- Fortini, M.E., Lai, Z. and Rubin, G.M. (1991). The *Drosophila* zfh-1 and zfh-2 genes encode novel proteins containing both zinc-finger and homeodomain motifs. *Mech. Dev.* 34, 113-122.
- Funahashi, J., Kamachi, Y., Goto, K. and Kondoh, H. (1991). Identification of nuclear factor δ EF1 and its binding site essential for lens-specific activity of the δ 1-crystallin enhancer. *Nucl. Acids Res.* 19, 3543-3547.
- Goto, K., Okada, T.S. and Kondoh, H. (1990). Functional cooperation of lens-specific and nonspecific elements in the δ 1-crystallin enhancer. *Mol. Cell. Biol.* 10, 958-964.
- Grainger, R.M. (1992). Embryonic lens induction shedding

- light on vertebrate tissue determination. *Trends Genet.* 8, 349-355.
- Hamburger, V. and Hamilton, H.L. (1951). A series of normal stages in the development of the chick embryo. *J. Morphol.* 88, 49-92.
- Hayashi, S., Goto, K., Okada, T.S. and Kondoh, H. (1987). Lens-specific enhancer in the third intron regulates expression of the chicken δ 1-crystallin gene. *Genes Dev.* 1, 818-828.
- He, X., Treacy, M.N., Simmons, D.M., Ingraham, H.A., Swanson, L.W. and Rosenfeld, M.G. (1989). Expression of a large family of POU-domain regulatory genes in mammalian brain development. *Nature* 340, 35-42.
- Jantzen, H.-M., Admon, A., Bell, S.P. and Tijan, R. (1990). Nucleolar transcription factor hUBF contains a DNA-binding motif with homology to HMG proteins. *Nature* 344, 830-836.
- Kamachi, Y. and Kondoh, H. (1993). Overlapping positive and negative regulatory elements determine lens-specific activity of the δ 1-crystallin enhancer. *Mol. Cell. Biol.*, in press.
- Kato, K., Kanamori, A. and Kondoh, H. (1990). Rapid and transient decrease of N-myc expression in retinoic acid-induced differentiation of OTF9 teratocarcinoma stem cells. *Mol. Cell. Biol.* 10, 486-491.
- Keller, A.D. and Maniatis, T. (1992). Only two of the five

zinc fingers of the eukaryotic transcriptional repressor PRDI-BF1 are required for sequence-specific DNA binding.

Mol. Cell. Biol. 12, 1940-1949.

Lai, Z., Fortini, M.E. and Rubin, G.M. (1991). The embryonic expression patterns of zfh-1 and zfh-2, two *Drosophila* genes encoding novel zinc-finger homeodomain proteins.

Mech. Dev. 34, 123-134.

Mitchell, P.J. and Tjian, R. (1989). Transcriptional regulation in mammalian cells by sequence-specific DNA binding proteins. Science 245, 371-378.

Morinaga, T., Yasuda, H., Hashimoto, T., Higashio, K. and Tamaoki, T. (1991). A human α -fetoprotein enhancer-binding protein, ATBF1, contains four homeoproteins and seventeen zinc fingers. Mol. Cell. Biol. 11, 6041-6049.

Sambrook, J., Fritsch, E. F., and Maniatis, T. (1989) Molecular cloning, a laboratory manual, 2nd ed., Cold spring harbor laboratory press.

Seed, B. (1987). An LFA-3 cDNA encodes a phospholipid-linked membrane protein homologous to its receptor CD2. Nature 329, 840-842.

Seipel, K., Georgiev, O. and Schaffner, W. (1992). Different activation domains stimulate transcription from remote ('enhancer') and proximal ('promoter') positions. EMBO J. 11, 4961-4968.

- Singh, H., LeBowitz, J.H., Baldwin, Jr. A.S. and Sharp, P.A. (1988). Molecular cloning of an enhancer binding protein, isolation by screening of an expression library with a recognition site DNA. *Cell* 52, 415-423.
- Smith, D.B. and Johnson, K.S. (1988). Single-step purification of polypeptides expressed in Escherichia coli as fusions with glutathione S-transferase. *Gene* 67, 31-40.
- Smith, D.E., del Amo, F.F. and Gridley, T. (1992). Isolation of Sna, a mouse gene homologous to the *Drosophila* genes snail and escargot: its expression pattern suggests multiple roles during postimplantation development. *Development* 116, 1033-1039.
- Treacy, M.N., Neilson, L.I., Turner, E.E., He, X. and Rosenfeld, M.G. (1992). Twin of I-POU: a two amino acid difference in the I-POU homeodomain distinguishes an activator from an inhibitor of transcription. *Cell* 68, 491-505.
- Vinson, C.R., LaMarco, K.L., Johnson, P.F., Landschulz, W.H. and McKnight, S.L. (1988). In situ detection of sequence-specific DNA binding activity specified by a recombinant bacteriophage. *Genes Dev.* 2, 801-806.
- Williams, T.M., Moolten, D., Burlein, J., Romano, J., Bhaerman, R., Godillot, A., Mellon, M., Rauscher, F.J. and Kant, J.A. (1991). Identification of a zinc finger

protein that inhibits IL-2 gene expression. *Science* 254,
1791-1794.

Wolf, C., Thisse, C., Stoezel, C., Thisse, B., Gerlinger, P.
and Perrin-Schmitt, F. (1991). The M-twist gene of Mus is
expressed in subsets of mesodermal cells and is closely
related to the Xenopus X-twii and the Drosophila twist
genes. *Dev. Biol.* 143, 363-373.

Yamada, T., Placzek, M., Tanaka, H., Dodd, J. and Jessel,
T.M. (1991). Control of cell pattern in the developing
nervous system: polarizing activity of the floor plate
and the notochord. *Cell* 64, 635-647.

謝 辞

この研究を進めるに当たり、近藤寿人先生にはたいへんお世話になりました。特に目的とするクローンが取れるまでの間1年以上、ときには励まし、ときには適切なアドバイスを下さりながら辛抱強く待って下さいました。この励ましがなければおそらく途中で挫折してしまっていたことでしょう。また、直接の議論だけでなく多くの機会から、科学者のあるべき姿というものを学んだような気がします。

高橋直樹先生、岡本光正先生、東雄二郎先生との議論も、この研究を深めるのに大いに役立ちました。また、共に関連するテーマを研究した後藤弘爾氏、蒲池雄介氏、関戸良平氏、村井かすみ氏の協力がなければ、とてもこれだけの時間にここまで成果は上がらなかっただと思います。さらに研究室の皆さんとの議論も重要な糧となりました。

皆さんに深く感謝いたします。

