

哺乳類ポリコーン群が構成する核内機能ドメインの作用機序の解析

●磯野協一¹⁾ ◆古関明彦²⁾

1) 千葉大学遺伝子実験施設 2) 千葉大学大学院医学研究科

〈研究の目的と進め方〉

ポリコーン群タンパク質はホメオチック (Hox) 遺伝子座上で複合体を形成し、体軸に沿ったHox遺伝子の発現抑制に関与することが知られている。しかしながら、近年のマウスポリコーン群の研究は、Hox遺伝子への関与のみならず細胞増殖、免疫系、器官分化、X染色体不活化など様々な細胞内機能に重要な役割を果たしていることを示している。これは種々の遺伝子座がポリコーン群の標的になっていること、そして特定の核内機能ドメインに相互作用していることを示唆している。本研究期間では哺乳類ポリコーン群がどのように複合体を形成し、そしてその複合体がどのような核内機能ドメインおよび標的遺伝子座と相互作用するかを明らかにする。進め方としては、①生化学的および遺伝学的手法を駆使し、ポリコーン群複合体に相互作用するタンパク質を網羅的に探索・同定する。②ポリコーン群・GFP融合タンパク質の生細胞蛍光観察によりポリコーン群タンパク質の核内ダイナミクスを理解する。

〈研究開始時の研究計画〉

- ① 酵母two-hybridスクリーニング法により、ポリコーン群に結合するタンパク質を同定する。その中から機能的且つ構造的に興味深いものを選別する。その選別されたタンパク質の評価は、物理学的相互作用（マウスモノクローナル抗体を作製し免疫共沈殿法などを行う）および遺伝学的相互作用（その遺伝子のノックアウトマウスを作製し、表現型解析とポリコーン群変異への影響を調べる）によってなされる。
- ② 各ポリコーン群GFP融合タンパク質およびRFP融合タンパク質を培養細胞中で同時に一過性発現させて、これらの動きを蛍光顕微鏡観察する。さらにこれらの解析結果から有意な組み合わせのものについてトランスジェニックマウスを作製する。

〈研究期間の成果〉

- ① ポリコーン群Mell18, Ring1b, Edr2 (1) に結合する候補遺伝子として以下を選別した。
スプライシング必須因子 Sf3b1 (2)
リン酸化酵素遺伝子 Hipk1, Hipk2, Hipk3
全てにおいてノックアウトマウスおよびモノクローナル抗体を作製した (3, 4)。Sf3b1とポリコーン群タンパク質の物理学的相互作用を見いだした (5)。Sf3b1, Hipk1, Hipk2ノックアウトマウスはポリコーン群変異と同様の表現型（背骨の後方化異常）を示した (4)。
- ② 培養細胞におけるポリコーン群GFPおよびRFP融合タンパク質の同時過剰発現は細胞状態を悪化させることがわかった。この状態での細胞観察は意味をなさないものであった。トランスジェニックマウスを作製したとしても結果は同じになると判断した。そこで、計画を変更し、GFP遺伝子を目的ポリコーン群遺伝子座に

ノックインすることにした。これにより発現量は本来のものとなり、またホモノックイン変異体にすれば内在性分子をGFP融合分子へと完全に置き換えることができる。これにより本来のポリコーン群タンパク質の動きを知ることができる。したがって、Mell18-GFPノックインマウスの作製に着手した。

〈国内外での成果の位置づけ〉

- ① Sf3b1, Hipk1, Hipk2, Hipk3抗体について、いくつかの研究室に参与した。Hipkノックアウトマウスについては国内の独立した2研究室と共同研究を行っている。
- ② Mell18-GFPノックインマウスについて海外の1研究室と共同研究を行う予定である。

〈達成できなかったこと、予想外の困難、その理由〉

- ① 特になし。想定範囲内。
- ② 〈研究期間の成果〉に記述。

〈今後の課題〉

- ① ポリコーン群タンパク質とスプライシング因子との機能的相互作用のメカニズムを調べる。Hipk遺伝子は最近の解析により冗長性を示したので、Hipk複合変異体を作製し、ポリコーン群変異との関連を調べる。
- ② Mell18-GFPノックインホモマウスより樹立したプライマリー細胞の生細胞観察とその解析。

〈研究期間の全成果公表リスト〉

1. 202251858
Yamaki M, Isono K, Takada Y, Abe K, Akasaka T, Tanzawa H, Koseki H. The mouse Edr2 (Mph2) gene has two forms of mRNA encoding 90- and 36-kDa polypeptides. *Gene*, 288, 103-110 (2002).
2. 202251807
Isono K, Abe K, Tomaru Y, Okazaki Y, Hayashizaki Y, Koseki H. Molecular cloning, genetic mapping, and expression of the mouse Sf3b1 (SAP155) gene for U2 snRNP component of spliceosome. *Mam. Genome*, 12, 192-198 (2001).
3. 0602010753
Horie A, Isono K, Koseki H. Generation of a monoclonal antibody against the mouse Sf3b1 (SAP155) gene product for U2 snRNP component of spliceosome. *Hybrid. Hybridomics*, 22, 117-119 (2003).
4.
Isono K, Neomoto K, Li Y, Takada Y, Suzuki R, Katsuki M, Nakagawa A, Koseki H. Overlapping roles for homeodomain-interacting protein kinases Hipk1 and Hipk2 in the mediation of cell growth in response to morphogenetic and genotoxic signals. *Mol. Cell. Biol.* in

press.

5. 0601301525

Isono K, Mizutani-Koseki Y, Komori T, Schmidt-Zachmann MS, Koseki H. Mammalian polycomb-mediated repression of Hox genes requires the essential spliceosomal protein Sf3b1. *Genes Dev.*, 19, 536-541 (2005).