

学位論文題名

胚性腫瘍細胞分化の分子機構

: 制御転写調節エレメントとその結合タンパク質

学位論文内容の要旨

生物個体の機能は、多様に機能分化した細胞群により営まれている。これらに携わる各々の細胞群がいかにして分化しその機能を獲得して役割を果たしているかは、非常に興味深い生命現象である。しかしながら、今だに未知な部分が多い。

in vitro で分化を再現できる細胞系は細胞分化の有効なモデル系である。胚性腫瘍細胞は、その様な細胞の一つであり、胚幹細胞分化の分子機構の研究に広く持ちいられている (1)。

胚幹細胞分化は複雑かつ協調的な遺伝子発現のネットワークで構成されている。実際に、ホメオボックス遺伝子群、胚性腫瘍細胞特異的転写因子 (Oct-3遺伝子 2)、*c-myc* 癌遺伝子等 (3, 4, 5, 6)の転写調節因子から細胞表面抗原等の分化マーカーに至るまで分化誘導の前後で発現の変化する遺伝子が多々報告されている。そこで、細胞分化決定機構の鍵は分化に際して遺伝子発現を制御する転写調節因子が握っているものと考えられており、細胞分化特異的転写因子の解析が精力的に行なわれている。

過去、当研究室において、胚性腫瘍細胞 F9 由来のクローンでポリオーマウイルス大型 T 抗原を発現している F9-28 細胞中にプラスミド状態で存在していた変異株 (fPyF9) より、転写調節活性を持つ DNA 配列 BOX DNA を単離した (7,8,9)。BOX DNA 結合タンパク質が胚性腫瘍細胞特異的因子である事が示唆されたので、BOX DNA 及びその因子の胚性腫瘍細胞分化への関与について本研究を行なった (10,11)。

2. BOX DNA は胚性腫瘍細胞特異的エンハンサーである。

P19、ECA2、及び F9 は細胞分化の研究に広く持ちいられるマウス胚性腫瘍細胞である。これらの細胞について BOX DNA の転写調節活性を CAT アッセイにより調べた。その結果、ここで用いた全ての胚性腫瘍細胞について、BOX DNA をプロモーター上流に接続した時のみエンハンサー活性が認められた。また、BOX DNA による転写活性の増強が胚性腫瘍細胞に特異的かどうかを知る目的で、分化したマウス繊維芽細胞である L 細胞及び Balb3T3 細胞を用いて同様の実験を行なった。その結果、これらの非胚性腫瘍細胞では、BOX DNA のエンハンサー活性はまったく認められなかった。

3. BOX DNA 結合タンパク質は胚性腫瘍細胞と非胚性腫瘍細胞で異なる。

転写調節機構は、特定の DNA 配列を認識して結合するタンパク質 (転写調節因子) とそれらと協調して働く蛋白質の相互作用等により制御されている。P19、ECA2、F9 の胚性腫瘍細胞にこのような転写調節因子、BOX DNA 特異的結合タンパク質が存在するか否かをバンドシフト法により調べた。その結果、どの胚性腫瘍細胞でも BOX DNA に特異的に結合するタンパク質複合体を示すバンドが認められた。一方、BOX DNA のエンハンサー活性が認められない L、Balb の非胚性腫瘍細胞について BOX DNA 結合タンパク質の存在を調べたところ、胚性腫瘍細胞と

は移動度の異なるバンドが認められた。これらも BOX DNA に特異的に結合した。非胚性腫瘍細胞では、BOX DNA 結合タンパク質が不活性型であるか共同因子がないなどの理由で BOX DNA がエンハンサーとして機能しないものと推測された。

4. BOX DNA のエンハンサー活性と結合タンパク質は分化に伴って減少する。

P19、ECA2、F9 の胚性腫瘍細胞を種々の方法で分化誘導し、分化誘導前後の BOX DNA の活性を比較した。その結果、いずれの細胞でも BOX DNA のエンハンサー活性は分化に伴って減少した。それに平衡した BOX DNA 結合タンパク質の減少が同様の系で認められた。以上の事から、BOX DNA 及び結合タンパク質が胚性腫瘍細胞の分化に関与する転写調節エレメント及び因子である事が示唆された。

5. BOX DNA を有する胚性腫瘍細胞由来の転写調節領域 pBOXF1 のクローニング

BOX DNA はポリオーマウイルス変異株の挿入配列として単離されたため、細胞由来であることが推測されてはいたものの、確定的ではなかった。そこで、BOX DNA の片方の鎖に相補的なオリゴヌクレオチドと制限酵素 Hind III リンカーをプライマーにした PCR 法により F9 細胞の染色体 DNA から BOX DNA を含む転写調節領域の単離を試みた。この PCR 法により 3 種類のクローン (pBOXF1, pBOXF5, pBOXF16) が得られた。更に、これらの領域内にプロモーター活性があるか否かを調べた。その結果、得られた 3 つのクローン中、pBOXF1 由来の pF1 (H) CAT のみにプロモーター活性が認められた。pBOXF1 の塩基配列を調べて見ると、BOX DNA の下流に転写因子 Sp1 の結合配列、TATA box 様配列、転写因子 Oct 配列等が存在していた。S1 マッピングにより TATA box 様配列の 180bp 下流に転写開始点の存在が明らかとなった。

6. BOX DNA を有する胚性腫瘍細胞由来の転写調節領域 BOXF1 は BOX DNA により細胞分化に応じた制御がなされている。

BOXF1 の転写活性が細胞の分化状態に応じて制御されているのか、そしてこの制御に BOX DNA が関与しているかどうかを知るために、pF1 (H) CAT の各種 deletion mutant を作製し、分化誘導前後の P19 細胞でその活性を比較した。分化誘導前の細胞では BOX DNA の欠損による BOXF1 の活性の現象が顕著に認められたが、誘導後の細胞では、殆ど認められなかった。PCR 法により BOXF1 の下流に存在する遺伝子をクローニングしたところ胚性腫瘍細胞分化に伴って発現の減少する遺伝子 (2.4 kb) が存在した。

7. 胚性腫瘍細胞からの BOX DNA 結合タンパク質の精製

BOX DNA 結合タンパク質の細胞分化への関与を分子レベルで詳細に調べるために、P19 細胞から BOX DNA 結合タンパク質の精製を行なった。9 x 10⁹個の P19 細胞から粗核抽出液を調製し、硫酸沈殿後、Heparin-Sepharose column 及び BOX DNA をリガンドにした DNA Affinity column に通し 活性画分を集め精製標品とした。得られた精製標品は分子量約 44 kDa のタンパク質であり BOX DNA に特異的に結合した。

8. バーキットリンパ腫 Raji 細胞からの BOX DNA 結合タンパク質の精製

オクタマー結合蛋白因子群や GATA 転写因子群等 (12, 13) で知られているように、細胞分化に関与する転写因子ではファミリー中の他因子が異なった細胞系で転写因子として機能・関与している事が知られている。そこで、BOX DNA にこのような活性があるか否かを血球系細胞分化について調べた。未分化な分化能のある細胞として急性前骨髄性白血病細胞 HL60、及び分化能のない細胞として急性リンパ芽球性白血病細胞 Jurkat とバーキットリンパ腫 Raji について、BOX DNA をプローブに

したバンドシフト法を行なった。その結果、これらの血球系細胞にも BOX DNA 結合タンパク質が複数存在することがわかった。

バンドシフトで認められた血球系細胞の BOX DNA 結合タンパク質が分化に関連した転写調節因子かどうかを知る目的で、Raji 細胞で BOX DNA の転写調節活性と BOX DNA 結合タンパク質の結合の特異性を調べた。その結果、分化能のない Raji 細胞では BOX DNA はエンハンサーとして働かないことが分かった。しかしながら、BOX DNA に特異的に結合するタンパク質が存在していた。そこで、P19 細胞と同様の精製法で Raji 細胞から BOX DNA 結合タンパク質を精製し、それ等を比較検討した。Raji 細胞からは、分子量約 100kDa と 60kDa のタンパク質が主に精製された。また、少量ではあるが、P19 細胞で精製されたタンパク質と同じ分子量（約 44 kDa）のタンパク質も共に精製されていた。これらの事から、BOX DNA が未分化細胞特異的エンハンサーとして血球系細胞分化にも関与している可能性が示唆された。また、Raji 細胞の結果を、上述の L 細胞や Balb3T3 細胞の結果と考え合わせると、分化能のない細胞での未分化細胞特異的エンハンサー BOX DNA 抑制機構の存在が推測された。

参考文献

- 1) Martin, G. R. (1980) *Science*. **209**, 768-776.
- 2) Okamoto, K., Okazawa, H., Okuda, A., M., Sakai, Muramatsu, M., and Hamada, H. (1990) *Cell*, **60**, 461-472.
- 3) Kihara, F., and Ariga, H. (1991) *Biochem. Biophys. Acta*. **1089**, 227-233
- 4) Taira, T., Negishi, Y., Kihara, F., Iguchi-Ariga, S.M.M., and Ariga, H. (1992) *Biocem. Biophys. Acta*. **1130**, 166-174.
- 5) Kakizaki, I., Imamura, Y., Galli, I., Kihara, F., Ariga, H., and Iguchi-Ariga, S.M.M. (1993) *Int. J. Onc.* **2**, 657-661.
- 6) Negishi, Y., Nishita, Y., Sa egusa, Y., Kakizaki, I., Galli, I., Kihara, F., Tamai, K., Miyajima, N., Iguchi-Ariga, S.M.M., and Ariga, H. (1994) *Oncogene*. in press.
- 7) Ariizumi, K., and Ariga, H. (1986) *Mol. Cell. Biol.* **6**, 3920-3927.
- 8) Ariizumi, K., and Takahashi, H., Nakamura, M., and Ariga, H. (1989) *Mol. Cell. Biol.* **9**, 4026-4031.
- 9) Arizumi, K., and Takahashi, H., Nakamura, M., and Ariga, H. (1989) *Mol. Cell. Biol.* **9**, 4032-4037.
- 10) Kihara-Negishi, F., Tsujita, R., Negishi, Y., and Ariga, H. (1993) *Mol. Cell. Biol.* **13**, 7747-7756.
- 11) Kihara-Negishi, F., Negishi, Y., Sa egusa, Y., Nishita, Y., and Ariga, H. (submitted)
- 12) Aruceli, R. J., King, A. A. J., Simon, M. C., Orkin, S. H., and Wilson, D.B. (1993) *Mol. Cell. Biol.* **13**, 2235-2256.
- 13) Ko, L. J., and Engel, J. D. (1993) *Mol. Cell. Biol.* **13**, 4011-4022.

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 有 賀 寛 芳
副 査 教 授 長 澤 滋 治
副 査 助 教 授 近 藤 博 之
副 査 助 教 授 高 橋 和 彦

学 位 論 文 題 名

胚性腫瘍細胞分化の分子機構

: 制御転写調節エレメントとその結合タンパク質

細胞は増殖、分化、死の3つの形態をとり、それぞれ遺伝子支配されている。細胞は様々な分化を繰り返し、最終的な機能分担を行っている。細胞分化の分子機構は近年様々な方法論で展開されているが、分子生物学的手法により分化を誘導あるいは維持に関わっている遺伝子群が同定されている。これらをより効率的に解析するために動物ウイルスのシステムが多用されてきた。例えばポリオーマウイルスは分化したマウス細胞を宿主とし増殖するが未分化細胞では増殖できない。未分化マウス細胞で増殖可能なウイルス変異株が1980年代初頭より単離され、得られたポリオーマウイルス変異株は一般に初期転写プロモーター内に変異を有しており、これが転写エンハンサーの発見へと続いた。これらのエンハンサー変異によりそこに結合する細胞側タンパク質因子の検索が行われ、多くのものが転写因子であり、これらが細胞分化に関与することが明かとなってきた。

当研究室においても未分化マウスF9細胞で増殖可能なポリオーマウイルスの単離を試み、F9細胞内で染色体外DNAとして自律増殖する変異株FPyf9を単離した。FPyf9はエンハンサー領域に21塩基対の外来DNAが3箇所挿入されており、これをBOXと命名した。BOX配列はポリオーマウイルスT抗原存在下では、転写と複製を抑制するサイレンサーとして機能することがその後明かにされた。従って、本学位申請者はこのBOX配列の転写調節配列としての細胞分化における機能、BOX配列に結合するタンパク質因子とそのターゲット遺伝子の同定、さらにはBOX配列結合タンパク質の精製を行い、細胞分化と転写の連動機構を詳細に検討した。

1、BOX配列の細胞分化における転写調節配列としての機能

BOX配列はポリオーマウイルスT抗原存在下では転写と複製のサイレンサーとして機能していた。そこでT抗原非存在下においてBOX配列の機能を解析するために、CAT遺伝子にヘルペスウイルスチミジンキナーゼ(tk)とBOX配列を接続したレポーター遺伝子を構築し、胚性腫瘍細胞としてマウスF9, P19, ECA2細胞、非胚性腫瘍細胞としてL, Balb3T3細胞にトランスフェクションする実験系で解析した。3種の胚性腫瘍細胞においてはBOX配列の数に依存して転写活性の増加が観察されたが、非胚性腫瘍細胞では活性の増強は見られなかった。またBOX配列に変異を導入したものでは胚性、非胚性細胞とも活性増加は現れなかった。この事実はBOX配列が胚性腫瘍細胞特異的エンハンサーとして機能することを示している。次に胚性腫瘍細胞3種をレチノイン酸、diBucAMPなどの組合せで細胞分化させ、BOX配列の転写エンハンサー活性を測定したところ、未分化時のみ活性を有していた。これらに結果はBOX配列は未分化胚性腫瘍細胞特異的エンハンサーという新しいタイプのエンハンサーであることが判明した。

2、BOX結合タンパク質の同定

一般に転写調節領域が機能する場合、その配列を認識し結合するトランスタンパク質因子が必須である。そこで、胚性、非胚性腫瘍細胞より核抽出液を作製し、BOX配列をプローブとしたバンドシフトアッセイを行った。転写活性に比例して胚性腫瘍細胞では未分化細胞で存在し、分化に伴って減少した。非胚性腫瘍細胞ではBOX結合タンパク質そのものは存在するものの、その分子種は胚性腫瘍細胞とは異なっており、BOX結合タンパク質ファミリーの存在が示唆された。これらの非胚性腫瘍細胞ではBOX配列が転写活性を示さないのは非胚性腫瘍細胞でのBOX結合タンパク質が結合しても非活性な形であることを意味しているが、この理由としてBOX結合タンパク質のリン酸化などの修飾による違い、他の会合タンパク質の存在などが考えられる。

3、BOX結合タンパク質のターゲット遺伝子の単離

BOX配列とHindIIIリンカーをプライマーとし、F9ゲノムDNAを鋳型としたPCR法によりBOX配列結合タンパク質のターゲット遺伝子、即ちBOX配列を有する遺伝子のクローニングを行った。種々の獲られたPCR断片をプラスミドにクローニング後、CAT遺伝子に連結し、塩基配列の決定と同時に転写活性を測定した。その内BOXF1と名づけたPCR断片はF9細胞で顕著な転写活性を示した。塩基配列を決定したところ、ポリオーマウイルスに位置していた場合と逆向きにBOX配列が存在し、その下流に転写調節配列オクタマー配列、SP-1、TATA boxなどが存在していた。

S1法により現実にこの遺伝子内からRNAが読まれるかを検討したところ、BOX配列下流150塩基対より転写開始されており、BOXF1がin vivoで機能している遺伝子であることが判明した。この転写プロモーターを有するBOXF1のどの領域が重要であるかを検討するために、種々の欠損変異を導入したBOXF1-CAT遺伝子を構築し転写活性を測定したところ、BOX配列が基本的に最も重要であった。またBOXF1の転写活性は未分化胚性腫瘍細胞でのみ現れ、明らかにBOX結合タンパク質のターゲット遺伝子であることが明かとなった。BOXF1は遺伝子の全長でないので、これをプローブとしてF9ゲノム及びcDNAライブラリーよりクローニングを行い、現在までポジティブクローンを得ている。獲られたcDNAは新規なものでノーザン法の結果、細胞分化に伴って発現減少する遺伝子であった。現在全構造の決定を行っている。

4、BOX結合タンパク質の精製

次にBOX結合タンパク質のcDNAクローニング、抗体生成などの目的のために胚性及び非胚性腫瘍細胞よりBOX結合タンパク質の精製を行った。ヘパリンセファロースカラムの後、BOX配列をリガンドとしたアフィニティークロマトグラフィーにより精製を行った。胚性腫瘍細胞P19からは分子量45Kダルトンのタンパク質が単離され、B細胞であるRaji細胞からは分子量110Kタンパク質と微量の45Kタンパク質が単離された。B細胞においてはBOX配列の転写エンハンサーとしての活性は検出されない。現実にこれらのタンパク質がBOX配列結合能を有することはUVクロスリンク法で確認された。これらの事実はBOX結合タンパク質のファミリーの存在を生化学的に示唆するものであり、B細胞においては、活性型45Kタンパク質が非活性型110Kタンパク質と拮抗することでBOX配列がエンハンサーとして機能しないことが考えられる。45KBOX結合タンパク質の発現が未分化細胞の維持と胚性腫瘍細胞の形質を規定していると想定される。この関係は転写因子オクタマーファミリーと類似している。オクタマーファミリーの内、OTF-1は殆ど全ての細胞に存在する転写因子であり、OTF-2はB細胞特異的エンハンサー結合タンパク質としてB細胞の形質を規定している。またOTF-3は未分化細胞のみで機能するオクタマータンパク質である。今後BOX結合タンパク質群のcDNAクローニングを行い、これらの分子種を明かにすることが重要な課題である。

以上の研究成果は細胞分化における転写因子の機能、胚性腫瘍細胞の形質発現の点で多くの新知見を与えるものである。これらの成果はすでに国際的科学雑誌に掲載され高く評価されたものであり、更にこの関連分野で公表された論文が10報近く存在する。

従って、申請者 根岸文子は博士(薬学)を授与するに充分であると判断された。