

学 位 論 文 題 名

ラット *maf* 関連遺伝子産物の解析；結合
DNA 配列およびヘテロ二量体形成

学位論文内容の要旨

maf はニワトリの自然発生腫瘍から分離されたRNA腫瘍ウイルスAS42のゲノムの解析から同定された癌遺伝子である(*v-maf*)。 *maf* 遺伝子産物のアミノ酸配列中には転写因子に共通するモチーフの1つであるbasic-leucine zipper構造 (bZIP: 塩基性ドメインとそれに続くロイシンジッパー構造)が見いだされ、この遺伝子も転写因子をコードする核内癌遺伝子のグループに属することがわかった。すでに*maf* 遺伝子については、ニワトリ線維芽細胞のcDNAライブラリーから5種類の細胞性関連遺伝子がクローニングされファミリーを形成していることが知られている。それら遺伝子がそれぞれ組織特異的に発現していることから、発生や分化などに重要な役割を果たす転写因子であると推察されている。西沢らは、v-Mafを用いてMaf認識配列 (MARE: Maf recognition element) を決定し、ホモ二量体を形成した v-Maf が、-TGCTGAC(G)TCAGCA-という、認識配列としてはかなり長い2つの回文構造配列を認識することを見いだした。これらの配列の中央部の7~8塩基対はそれぞれ、転写因子AP-1 (Jun/Fos)の認識するTPA-responsive element (TRE), CREB/ATFファミリーの転写因子が認識するcAMP-responsive element (CRE) と全く同一のものである。したがって同一の塩基配列を介して転写を調節しうるMaf以外の複数の転写因子が存在し、Mafを含む複雑な転写制御のネットワークの存在が予想される。

先に我々は、ラット肝臓 cDNAライブラリーから2種類の*maf* 関連遺伝子cDNA(Rat *maf*-1, *maf*-2)をクローンし、それらの相同性からMaf-1が報告されているトリのMaf Bに、Maf-2がトリのc-Mafに相当するものと考えた。本研究では、Maf蛋白質によって転写が制御されている標的遺伝子の探索を目的として、哺乳動物由来のMaf-1およびMaf-2の結合DNA配列の決定と、bZIP構造を持つ他の転写因子とのヘテロ二量体形成能およびそれらの認識配列について検討し、新たな知見を得た。

<材料及び方法>

1) 動物培養細胞を用いた転写促進活性の測定

MAREを持つプロモーター配列をルシフェラーゼ遺伝子上流につないだレポータープラスミドを構築した。このレポータープラスミドと各々のMafの発現プラスミドをHepG2細胞(ヒト肝癌細胞株)にリン酸カルシウム法に従って導入し、48時間後に細胞抽出液中のルシフェラーゼ活性をルミノメーターで測定して、転写活性化を測定した。

2) DNA結合特異性およびヘテロ二量体形成能

*in vitro*でのDNA結合実験に用いた11種の蛋白質は、大腸菌でマルトース結合蛋白質との融合蛋白質として発現させ、アミロース・アフィニティークロマトグラフィーにより精製した。MAREおよびその関連配列をプローブとしてゲル移動度シフト法を既述の方法に従って行った。ヘテロ二量体の形成を調べる場合は、ゲルシフト上で移動度の異なる2つの蛋白質を4 M尿素中で変性させた後、尿素を除き再構成して試料とした。

3) 結合DNA配列の決定

PCR法を用いたランダムセレクション法 (SAAB : Selected and Amplified Binding Site Method) により Maf-1 および Maf-2 の結合DNA配列を決定した。さらに得られた配列の結合の強さをゲル移動度シフト法で調べた。

<結果および考察>

1) Maf-1 および Maf-2 の転写促進活性

MAREを持つレポーター遺伝子に対する Maf-1 および Maf-2 の転写促進活性を確かめた。レポーター遺伝子の転写は、v-Maf と同様に Maf-1 と Maf-2 によっても強く活性化され、転写因子として機能していることが確認された。

2) Maf-1 および Maf-2 のDNA結合特異性

v-Maf で決定された MARE およびいくつかの関連配列をプローブとしてゲル移動度シフト法を行い、Maf-1 および Maf-2 のDNA結合特異性を c-Jun または v-Maf と比較した。Maf-1 と Maf-2 は構造が似ているにもかかわらずそれぞれのDNA結合特異性は一部異なっていた。さらにアミノ酸配列から相同の転写因子と考えられた Maf-2 と c-Maf (c-Maf は v-Maf と 1 アミノ酸を除いて同一の構造を持つ) のDNA結合特異性も異なっており、トリ由来の Maf とは異なる性質が明らかとなった。

3) Maf-1 および Maf-2 の結合DNA配列

SAAB により、Maf-1 は、v-Maf で決定された MARE の回文構造の半分に相当する短い配列 -GCTGAC- および類似の配列を有する多数のDNA配列に結合することが明らかとなった。さらに選択された結合配列を持つ遺伝子に対する Maf-1 の転写活性化能を調べたところ、それらの配列は結合の強さに応じてエンハンサーとしての活性を持つことが確認された。一方、Maf-2 の結合配列は限られており、調べた中では v-Maf で決定された MARE に最も強く結合し転写を活性化することがわかった。

4) Maf-1 および Maf-2 と他の bZIP 構造を持つ転写因子とのヘテロ二量体形成およびそれらのDNA結合特異性

Maf は bZIP 構造を介してホモ二量体あるいは、いくつかの bZIP 蛋白質とヘテロ二量体を形成することが報告されている。しかし、Jun または Fos ファミリーに属するすべての転写因子とのヘテロ二量体形成能についての報告はない。そこで Maf-1 および Maf-2 と、Jun または Fos ファミリーに属するすべての転写因子とのヘテロ二量体形成能とそれらのDNA結合特異性をゲル移動度シフト法により調べた。その結果 Maf-1 および Maf-2 は Jun より Fos ファミリーに属する転写因子とヘテロ二量体を形成しやすいことがわかった。X線結晶解析の報告から二量体形成の特異性は各 leucine zipper 構造間の組み合わせによりある程度厳密に決められ、さらに各単量体は、そのホモ二量体が結合する認識配列 (回文構造) の半分の領域を維持してヘテロ二量体を形成するため、二量体の組み合わせにより多くの特異的な結合配列を生じることが明らかになっている。このようなDNA認識の多様性が、Maf-1 と Fos ファミリーとのヘテロ二量体形成において生じ、Maf-1 はその結合配列が二量体形成の相手に依存して微妙に変化した。また形成されたヘテロ二量体のDNA認識は Maf-2 に比べるとより広範囲であった。一方、Maf-2 は二量体形成もほぼ c-Fos のみに限られ、その認識も Maf-1 に比べ特異的であり、従って標的遺伝子がより限られると推察された。

現在までに Maf が二量体形成により細胞の分化や機能発現の制御をしている知見がいくつか報告されており、発生、分化、増殖、発癌などの基本的な機能の中に Maf を含む転写因子のネットワークが存在していることは明らかである。Maf の生理的機能、さらに細胞の分化や増殖において重要な役割を担う標的遺伝子とその機能を明らかにしていくことが重要であると考えられる。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 西 信 三
副 査 教 授 石 橋 輝 雄
副 査 教 授 齊 藤 政 樹

学 位 論 文 題 名

ラット *maf* 関連遺伝子産物の解析；結合 DNA 配列およびヘテロ二量体形成

maf はニワトリの自然発生腫瘍から分離されたRNA腫瘍ウイルスAS42のゲノムの解析によって同定された癌遺伝子であり転写因子をコードしている。*maf* 遺伝子産物は、basic-leucine zipper 構造 (bZIP：塩基性ドメインとそれに続くロイシンジッパー構造) を介して、他の転写因子ともヘテロ二量体を形成することで極めて広い範囲の標的遺伝子を持ち、様々な転写制御機構に関わっている可能性がある。既に申請者らがクローンしたラット *maf* 関連遺伝子 *maf-1* および *maf-2* は、それらの相同性から *Maf-1* が報告されているトリの *Maf B* に、*Maf-2* がトリの *c-Maf* に相当するものと考えられた。*Maf-1* および *Maf-2* は、それぞれきわめて限られた組織で特異的に発現していることから、発生や分化などに重要な役割を果たす転写因子であると推察され、標的遺伝子とその機能を明らかにしていくことが重要と考えられる。

申請者は、本研究において、哺乳動物由来の *Maf-1* と *Maf-2* は構造が似ているにもかかわらずそれぞれのDNA結合特異性が一部異なること、また相同の転写因子であると考えた *Maf-2* と *c-Maf* のDNA結合特異性も異なることを明らかにした。さらに、新たに *Maf-1* と *Maf-2* の標的遺伝子を探索するために、両者の結合DNA配列の決定と、bZIP構造を持つ他の転写因子とのヘテロ二量体形成能およびそれらの認識配列について検討し、新たな知見を得た。PCR法を用いたランダムセレクション法 (SAAB) により、*Maf-1* が、v-*Maf* で決定された認識配列の回文構造の半分に相当する短い配列-GCTGAC-を有する多数のDNA配列に結合することを明らかにし、従来考えられたものよりも多くの標的遺伝子に対して転写を活性化する可能性を示唆した。一方、*Maf-2* に関しては、調べた中ではv-*Maf* で決定された認識配列に最も強く結合し転写を活性化することから、結合配列が限られていると推察した。さらに *Maf-1* および *Maf-2* と、JunまたはFosファミリーに属するすべての転写因子とのヘテロ二量体形成能とそれらのDNA結合特異性をゲル移動度シフト法により調べ、*Maf-1* および *Maf-2* はJunよりFosファミリーに属する転写因子とヘテロ二量体を形成しやすいことを明らかにした。X線結晶解析の報告から二量体形成の特異性は各leucine zipper構造間の組み合わせによりある程度厳密に決められ、さらに各単量体は、そのホモ二量体が結合する認識配列 (回文構造) の半分の領域を維持してヘテロ二量体を形成するため、二量体の組み合わせにより多くの特異的な結合配列を生じることが知られている。申請者は、このようなDNA認識の多様性が、*Maf-1* とFosファミリーとのヘテロ二量体形成において生じ、*Maf-1* はその認識配列が二量体形成の相手に依存して微妙に変化し、形成されたヘテロ二量体のDNA認識

がv-MafやMaf-2に比べて広い範囲であることを明らかにした。一方、Maf-2に関しては二量体形成もほぼc-Fosのみに限られ、その認識もMaf-1に比べて特異的であり、従って標的遺伝子がより限られることを示唆した。

以上の結果は、Mafが二量体形成により細胞の分化や機能発現の制御をしているという現在までのいくつかの知見と合わせて、発生、分化、増殖、発癌などの生命現象においてMafが関連すると推察される機能の中に存在する複雑な転写制御のネットワークの解明に有用と思われる。

審査にあたっては、副査石橋教授、斉藤教授より、ゲル移動度シフト法の諸条件、ヘテロ二量体形成の具体的な判定法、特異性および定量性について質問があった。さらに副査斉藤教授より、c-MafとMaf-2の性質の違い、決定された結合DNA配列と標的遺伝子および転写制御機構との関連について質疑があった。また主査西教授より、結合配列の決定時にv-Mafで決定された認識配列はクローニングされてきたかとの質問があった。申請者は概ね妥当な回答をなした。

審査員一同は、これらの成果を高く評価し、また研究者として誠実かつ熱心であり、申請者が博士（医学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。