

学位論文題名

Cloning and Characterization of Promoter
of the Mouse *mafB* Gene(マウス *mafB* 遺伝子のクローニングおよびプロモーターの機能解析)

学位論文内容の要旨

I. 背景と目的

*maf*はニワトリ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*遺伝子は、転写因子に共通するモチーフの一つである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) を持つ転写因子をコードする。すでにニワトリや哺乳動物から6種類の細胞性関連遺伝子が報告され、ファミリーを形成している。それら遺伝子がそれぞれ発生や分化の特異的段階で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考えられている。発生や分化などの制御機構の理解のためには転写因子による細胞特異的な遺伝子発現の調節機構の解明が必要と考えられる。

先に我々は、ラットから *maf-1* cDNA (Rat *maf-B*) をクローンした。本研究では、*mafB*遺伝子の発現が発生や組織分化の過程でどの様に制御されているかを解明するため、マウス *mafB*遺伝子のクローニングおよびプロモーターの機能解析を行い、新たな知見を得た。

II. 材料及び方法

1) *mafB*遺伝子のクローニング: ラット *maf-1* cDNAをプローブとして129SVマウス遺伝子ライブラリーからマウス *mafB*遺伝子クローンを単離した。

2) DNA塩基配列の決定: クローニングされた遺伝子、PCR産物をプラスミドベクターにサブクローニングし、ジデオキシ法により蛍光自動DNAシーケンサーを用いて塩基配列を決定した。

3) RNase Protection Assay: マウス *mafB*遺伝子の転写開始点付近を含むDNA断片をプラスミドベクターに組み込み、T7RNAポリメラーゼによりリボプローブを作成した。これと肝臓細胞全RNAをハイブリッド形成させた後、RNase A処理を行った。保護された断片を変性ポリアクリルアミドゲル電気泳動で解析した。

4) Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR): ランダムオリゴヌクレオチドプライマーを用い、筋肉細胞の全RNAからcDNAを合成した。これを鋳型としてラット *myoD*の特異的なプライマーを用い、PCRを行った。

5) マウス *mafB* 5'側欠失変異体の作成: マウス *mafB*の転写開始点から上流領域約6500bp断片と、この領域の種々の長さの欠失変異断片を調製し、ルシフェラーゼレポーター遺伝子 (pGVB₂) にサブクローニングしてレポータープラスミドを構築した。

6) 動物培養細胞を用いた転写促進活性の解析: 種々のレポータープラスミド、転写

因子 (MafB, MyoD) の発現プラスミド、及び内部標準のための大腸菌 β -ガラクトシダーゼ発現プラスミドをHuH-7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測定して、転写活性を調べた。

III. 結果

1) マウス *mafB* 遺伝子のクローニング及び塩基配列の決定:

得られたマウス *mafB* 遺伝子クローンの5' 上流、3' 下流及びコーディング領域の塩基配列を決定した。報告されたマウス *mafB* cDNAと比較すると、cDNAに相当する領域はまったく一致していた。このことから少なくとも5' 非翻訳配列、及びコーディング領域にはイントロンが存在しないことが分かった。5' 側上流領域にTATA-box様の配列 (5'-GATAAAA-3')、逆向きCCAAT-box、二つのGC-box、二つのMaf認識配列 (MARE: Maf recognition element) と一つのE-boxを含む10bpの回文配列が存在している。塩基配列を決定した650bpの3' 非翻訳領域には、polyA signal様配列 (5'-ATTTAA-3') が存在している。

2) RNase protection assay による *mafB* 遺伝子の転写開始点の同定

マウス肝臓由来のRNAを用いたRNase protection assayの結果、約134bp断片がRNaseより保護された。その部位と対応する配列 (5'-ACAGCT-3') はATGコドンから上流389bpに存在している。(5'-ACAGCT-3')の5'末端の"A"が*mafB*遺伝子の転写開始点であると考えられる。

3) *mafB* 遺伝子のプロモーターの解析

5' 上流領域を持つレポーター プラスミドを動物培養細胞に導入して転写活性を調べた結果、601bp 上流領域を持つプラスミドが最も高い活性を持っていた。-229から-61までの断片を欠失させると、95%活性が減少することから、転写開始点上流229bpの断片が*mafB*遺伝子の基本的な転写に必要であると考えられた。-91から-61までの断片を欠失させると、86%の活性が減少することから、この領域に存在するCCAAT-boxが*mafB*遺伝子の基本的な転写に必要であると証明された。-229から-91までの断片を欠失させると、約1/3に活性が減少することから、欠失領域に含まれる二つのGC-box、E-boxあるいはMARE配列がエンハンサーとして機能していて、*mafB*遺伝子の転写活性を促進することが示唆された。

4) MyoD及びMafBによる*mafB*遺伝子の転写促進

MyoD発現プラスミドと種々のレポーター プラスミドとのco-transfectionを行い、MyoDが二つのE-boxと結合して*mafB*遺伝子のプロモーター活性を促進することが解った。さらに、MafB発現ベクターとのco-transfectionによって、*mafB*遺伝子のMARE配列を持つレポーター プラスミドが特異的に転写促進されることから、*mafB*遺伝子がそれ自身の産物によって転写促進されるautoregulation機構が働いていることが明らかとなった。

IV. 考察

1) マウス*mafB*遺伝子はイントロンが存在しないことが明らかになったが、トリ*mafB*遺伝子やラット及びマウス*maf-2(c-maf)*遺伝子もイントロンを持たないことが解っている。

2) RNase protection assayにより、*mafB*遺伝子の転写開始点を決定した。他のいくつかの真核生物の遺伝子にも-GATAAAAのTATA-box様配列が転写開始点から上流領域20bp~30bpに存在していることが報告されているが、これらは一般に弱いプロモータ活性を持つ。弱いTATA boxの上流に存在する、CCAAT-box、GC-box及びE-boxとMAREを含んだ回文配列が*mafB*遺伝子の転写促進及び発現調節に、重要な役割を果たしていると思われる。これはEBウイルス遺伝子のMinLプロモーターにおいてTFIIDと鋳型の結合を安定させるために、上流領域の調節因子が必要であるとの報告と一致する。

3) *mafB*遺伝子はMyoDにより転写が促進されることを見い出した。MyoDは組織特異

的な転写因子として筋肉の分化過程にマスター遺伝子の役割を果たしている。トリの筋肉では*mafB* mRNAの発現量が低いが、これはトリ *mafB* プロモーターにE-boxが存在しないことによると思われる。ラットでは *mafB/maf-1*が筋肉で高く発現している。

*mafB*遺伝子がMafBによって転写促進されるautoregulation機構が働いていることが明らかとなった。核内癌遺伝子*mafB*発現におけるautoregulationは細胞の増殖、発癌などの機構に関与することが考えられる。

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 田 中 一 馬

学 位 論 文 題 名

Cloning and Characterization of Promoter of the Mouse *mafB* Gene

(マウス *mafB* 遺伝子のクローニングおよびプロモーターの機能解析)

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事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。既に申請者がラット肝臓 cDNA ライブラリーからラット *mafB* をクローンした。*mafB* 遺伝子が極めて限られた組織で特異的に発現している事から、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、それによる細胞特異的な遺伝子発現の調節機構の解明が重要と考えられる。

申請者は、本研究において、*mafB* 遺伝子の発現が発生や組織分化の過程でどの様に制御されているかを解明するため、マウス *mafB* 遺伝子のクローニングおよびプロモーターの機能解析を行い、新たな知見を得た。ラット *mafB* cDNA をプローブとして用いて、マウス *mafB* 遺伝子クローンを単離した。既にクローンされている cDNA と比較すると、この遺伝子にはイントロンが存在しない事が判明した。RNase Protection Assay により、マウス *mafB* 遺伝子の転写開始点が翻訳開始コドンの上流 389 bp に存在している事を明らかにした。また、その近傍の上流に TATA-box 様配列、CCAAT-box が存在した。転写制御領域に存在する GC-box、MARE (*maf* recognition element)、E - box が Luciferase Assay により、*mafB* 遺伝子の発現に重要と思われた。さらに、E - box が機能しているかどうかを確かめるために、MyoD 発現プラスミドと種々の *mafB* のレポータープラスミドとの co - transfection を行った。

MyoD が二つの E - box を介し *mafB* 遺伝子のプロモーター活性を促進する事を明らかにした。MyoD は組織特異的な転写因子として筋肉の分化過程にマスター遺伝子の役割を果たしている。この結果 *mafB* 遺伝子が MyoD の発現により、筋肉の発生、分化に関与している可能性を示唆した。*mafB* 遺伝子転写制御領域に存在する MARE 配列が機能しているかどうかを確かめるために、*mafB* 発現ベクターとの co-transfection によって、*mafB* 遺伝子の

MARE 配列を持つレポータープラスミドが特異的に転写促進され、この領域を欠失したプラスミドは *mafB* によって活性化されないことから、*mafB* 遺伝子がそれ自身の産物によって、転写促進される autoregulation 機構が働いていることを明らかにした。

核内癌遺伝子 *mafB* 発現における autoregulation が細胞の増殖、発癌などの機構に関与する事を示唆していると解釈した。

これらの結果は、発生、分化、発癌などにおいて、Maf が関係する転写制御機構の解明に有用と思われる。

審査に当たって、副査石橋教授より RNase Protection Assay 法の結果、Northern blotting を行ったかどうか、*mafB* が認識する DNA 配列、*mafB* 遺伝子に近いプロモーター領域に転写を抑制する DNA 認識配列について、質問があった。さらに、副査田中教授よりマウス *mafB* 遺伝子の遠い上流領域に転写を抑制する DNA 認識配列、*mafB* 以外に autoregulation 機構が働いている遺伝子について質問があった。また、主査西教授より *mafB* 蛋白質の標的遺伝子を同定し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。