

学 位 論 文 題 名

Regulation of gene expression
by forkhead transcription factor FKHR

（フォークヘッド転写因子 FKHR による遺伝子発現制御の調節）

学位論文内容の要旨

【背景と目的】フォークヘッド転写因子 FKHR は染色体転座による横紋筋肉腫の原因因子 PAX3/FKHR の融合遺伝子としてはじめて報告され、また線虫におけるホモログ Daf-16 の遺伝的解析を契機に研究が進んできた。現在までに、生体におけるさまざまな組織において重要な遺伝子の発現制御に関与すること、また分子機能調節メカニズムについても成長因子による制御が明らかにされてきたが、いまだ不明な点も数多く残されている。そこで、いまだ明らかではない骨組織、骨芽細胞における FKHR の発現、制御遺伝子の探索、さらに核内における FKHR の分子機能調節メカニズム解明を目指し、本研究を進めることにした。

【材料と方法】

細胞培養：本研究に用いた細胞株 MC3T3-E1 は 10%FBS 含有 α MEM また UMR106、293T、HepG2 および SaOS2 細胞においては 10%FBS 含有 DMEM にて培養した。

RT-PCR：total RNA を抽出したのち逆転写反応、PCR をおこなった。

immunoblotting アッセイ：目的タンパク質サンプルを SDS-PAGE したのち PVDF 膜に転写し、特異的抗体を用いて検出した。

免疫沈降法：細胞溶解液を特異的抗体、プロテイン G セファロースを用いて 4℃にて反応させたのち、immunoblotting アッセイにより目的タンパクを検出した。

プラスミド：FKHR 発現プラスミドは RT-PCR によりクローニングした FKHR cDNA を pcDNA3-FLAG ベクターに挿入して作製し、またリン酸化部位変異体 FKHR (FKHR3A)、各種アセチル化部位変異体は PCR を用いて作製した。ALP promoter レポータープラスミドは ALP promoter 領域を pGL3 ベクターのルシフェラーゼ上流に組み込み、各種 deletion レポータープラスミドは制限酵素により切断し作製した。PKB/Akt1 プラ

スミド、CBP プラスミドおよび各種レポータープラスミドは筑波大学深水昭吉教授との共同研究により使わせていただいた。

レポーターアッセイ：UMR106 細胞に対してはレポータープラスミドおよび各種発現プラスミドをリポフェクション法により導入し、ルシフェラーゼ活性を測定し解析した。また HepG2 細胞にはリン酸カルシウム法を用いてプラスミドを導入した。

ゲルシフトアッセイ：精製 GST 融合 FKHR タンパクを RI ラベルした 2 本鎖 DNA とインキュベーションしたのちアクリルアミドゲルにて泳動し、オートラジオグラフィにより検出した。

In vitro binding アッセイ：GST 融合タンパクと細胞溶解液を 4℃にて反応させたのち、immunoblotting アッセイにより目的タンパクを検出した。

IP-HAT アッセイ：基質タンパク、免疫沈降により調製した CBP タンパクと RI ラベルしたアセチル補酵素 A をインキュベーションしたのち SDS-PAGE し、オートラジオグラフィにより検出した。

【結果】骨芽細胞における FKHR の発現については、RT-PCR による結果から MC3T3-E1、UMR106 および SaOS2 細胞において FKHR mRNA が発現していることが示された。さらに抗 FKHR 抗体を用いた immunoblotting アッセイによってタンパク質レベルでの FKHR の発現を確認することができた。我々は、ALP 遺伝子上 promoter 領域に FKHR により調節されうる可能性のある DNA 配列を見出し、この領域を FRE-LR1 および-LR2 と名付けた。次に、ALP promoter レポータープラスミドと FKHR 発現プラスミドを UMR106 細胞に導入し FKHR による効果を解析したところ、導入した FKHR 発現プラスミド量に依存して ALP 遺伝子の転写活性は亢進した。さらに FKHR を抑制する PKB/Akt1 により ALP 遺伝子の転写活性は抑制され、PKB/Akt1 により抑制されない変異体 FKHR3A では転写活性に影響を受けないことを確認した。そして、ALP promoter deletion レポータープラスミドと FKHR 発現プラスミドを用いたレポーターアッセイから ALP 遺伝子上 promoter 領域の FRE-LR1 は FKHR に応答するが、-LR2 は応答しないことが示された。この結果を踏まえ、FKHR- FRE-LR1、2 結合親和性についてゲルシフトアッセイをおこなったところ、FRE-LR1 と FKHR は結合するが、FRE-LR2 は結合しないことが明らかとなった。

核内における FKHR の分子機能調節メカニズムの解析において、転写共役因子 CBP と FKHR の相互作用が免疫沈降法により示された。さらに、相互作用には CBP の CH1 領

域と FKHR の C 末端領域が重要であること、CBP の有するヒストンアセチルトランスフェラーゼ活性 (HAT 活性) により、FKHR の DNA 結合ドメイン (フォークヘッドドメイン) がアセチル化されることが明らかとなった。アセチル化修飾は FKHR の DNA および CBP との結合親和性を低下させること、その結果として、転写活性化能に対し抑制的に作用することが示された。さらに CBP の各種機能欠損変異体を用いたレポーターアッセイにより、CBP と FKHR の相互作用は転写活性亢進に作用するが、一方では CBP の HAT 活性による FKHR のアセチル化が転写活性に対し抑制的に作用するという両方向への作用が明らかにされた。

【考察】本研究から転写因子 FKHR が骨芽細胞において発現していることがはじめて明らかにできた。マウス、ラット、ヒトの 3 種の骨芽細胞株について発現が確認されたことから、骨芽細胞においても FKHR は重要な遺伝子の発現制御に関わっているのではないかと考えられ、骨芽細胞特異的遺伝子との関連を検討することになった。その結果 FKHR が骨芽細胞分化マーカーである ALP 遺伝子 promoter 領域に存在する FKHR 応答配列 FRE-LR1 を介してその発現を活性化させることが明らかとなり、骨組織においても FKHR が遺伝子発現に関与することが示された。また骨芽細胞は増殖の停止と骨芽細胞特異的遺伝子の発現により分化を促進させることが知られているが、FKHR は細胞周期関連遺伝子の発現も制御することから、骨芽細胞特異的遺伝子と細胞周期関連遺伝子の両方を調節することにより総合的に骨芽細胞分化に関与している可能性がある。FKHR と CBP の相互作用に関する解析により、FKHR が CBP によりアセチル化修飾され機能的変化を受けることが新たに明らかにされた。さらに FKHR によるターゲット遺伝子発現において FKHR-CBP 相互作用により転写が開始されるが、その後の CBP の HAT 活性によるアセチル化によって抑制的にはたらくという 'hit and away model' という新規制御機構により調節されている可能性が示された。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 鈴 木 邦 明

副 査 教 授 田 村 正 人

副 査 教 授 柴 田 健一郎

学 位 論 文 題 名

Regulation of gene expression by forkhead transcription factor FKHR

(フォークヘッド転写因子 FKHR による遺伝子発現制御の調節)

審査は、全審査委員出席のもと行い、まず学位申請者に対して提出論文の内容の説明を求めた。学位申請者からは以下の内容の論述がなされた。

フォークヘッド転写因子 FKHR は種々組織において重要な遺伝子の発現制御に関与しているが、骨組織に関しては報告がない。そこで骨芽細胞における FKHR

の発現をまず確認し、ついで硬組織石灰化に重要な役割を果たすと考えられているアルカリ性ホスファターゼ (ALP) の転写に対する作用を調べ、さらにより一般的に FKHR の機能調節機構について解析を行い以下のような結果を得た。

まずマウス、ラット、ヒト由来の3種の骨芽細胞株において FKHR の mRNA およびタンパク質の発現を確認した。ALP 遺伝子の promoter 領域の解析を行ったところ FKHR により調節されうる可能性のある塩基配列を2箇所見出したので、この領域をそれぞれ FRE-LR1 および-LR2 と名付けた。ALP promoter レポータープラスミドと FKHR 発現プラスミドを UMR106 細胞に導入し FKHR による効果を解析したところ、導入した FKHR 発現プラスミド量に依存して ALP 遺伝子の転写活性は亢進した。また、リン酸化により FKHR の転写活性を抑制する PKB/Akt1 を共発現させると ALP 遺伝子の転写活性は抑制されたが、PKB/Akt1 によりリン酸化されない FKHR 変異体に PKB/Akt1 を共発現させても抑制はみられなかった。また ALP promoter 領域の deletion レポータープラスミドと FKHR 発現プラスミドを用いたレポーターアッセイにより、ALP 遺伝子 promoter 領域の FRE-LR1 は FKHR に応答するが、-LR2 は応答しないことを示した。ゲルシフトアッセイをおこなったところ、FRE-LR1 と FKHR は結合するが、FRE-LR2 は結合しないことが明らかとなった。本研究は転写因子 FKHR が骨芽細胞において発現していることを示し

た最初の報告であり、ALP 遺伝子 promoter 領域に存在する FKHR 応答配列 FRE-LR1 を介してその転写活性を調節していることを示した。FKHR は細胞周期関連遺伝子の発現も制御することから、骨芽細胞の増殖の停止と骨芽細胞特異的遺伝子の発現による分化の過程の調節にも関与している可能性がある。

次に FKHR の機能調節機構の解析を行った。まず免疫沈降法によって転写共役因子 CBP と FKHR の相互作用を示し、その作用には CBP の CH1 領域と FKHR の C 末端領域が重要であること、および CBP の有するヒストンアセチルトランスフェラーゼ活性 (HAT 活性) により、FKHR の DNA 結合ドメイン (フォークヘッドドメイン) がアセチル化されることを明らかにした。また、アセチル化修飾は FKHR の DNA および CBP との結合親和性を低下させ、その結果として、転写活性化能に対し抑制的に作用することを示した。CBP の各種アセチル化部位変異体を用いたレポーターアッセイにより、CBP と FKHR の相互作用は転写活性を亢進するが、その後に起こる CBP の HAT 活性による FKHR のアセチル化は転写活性を抑制することを明らかにした。これらの結果を、hit and away model という新しい制御機構モデルで説明した。

以上の論述に引き続き、各審査委員より提出論文の内容ならびにそれに関連のある学術について口頭により質疑および試問が行われた。主な試問内容としては、FKHR 機能と成長因子シグナル、PKB によるリン酸化と活性化、核と細胞質の局在、ALP の転写活性化、14-3-3 タンパク質との結合などの関連、FKHR ファミリーの局在と機能およびコンセンサス配列、FKHR が LR1 にのみ結合する理由、提出した hit and away モデルの機構、ゲルシフトアッセイの詳細、CBP によるアセチル化と転写活性抑制の機構および他の転写因子との関連、更には、ALP の骨形成およびその他の組織における機能、ALP の遺伝子について、FKHR のノックアウトマウスについてなどがあり広範囲にわたった。いずれの質問に対しても学位申請者から適切かつ明快な回答が得られた。また、今後の研究の方向性と将来の展望などについても明確な方針が示された。

本論文の内容は非常に高いレベルにあり、今後のこの分野の研究の発展に大きく寄与するものと考えられた。加えて、試問の結果より学位申請者は専攻分野の専門領域のみならず関連分野についても十分な学識を有していることが認められた。従って、学位申請者は、博士(歯学)の学位を授与されるのにふさわしいと認められた。