

MM-1複合体による新規 c-Myc 転写抑制経路の解明

学位論文内容の要旨

c-Mycは転写因子としてターゲット遺伝子の転写活性化と同時に抑制化を行ない、抑制化とc-Mycの細胞癌化能との相関がより強く指摘されている。これらの機能にはN末の2つのMyc boxと、C末領域が必須であり、C末に結合するMaxからのMad/mSin3/histone deacetylase (HDAC1) による抑制経路が知られているが、N末からの経路は不明であった。MM-1はc-MycのMyc box2に結合し、c-MycのE-boxを介した転写活性を抑制する1030 base, 167 aaの核に局在するタンパク質として当研究室で単離された。FISH解析により、白血病/リンパ腫で染色体異常が認められる12q12-12q13に存在することが判明し、60-90%の白血病/リンパ腫患者のMM-1では157番目のアラニンがアルギニンに変異していた。このA157R変異はMM-1による全てのc-Myc機能抑制が解除されていた。以上のことから、MM-1は新規の癌抑制遺伝子であるがその詳細な分子機構は不明である。そこで、本研究ではその機構の解明を目的とした。

MM-1の機能解析のために、酵母two-hybrid法により部分長MM-1 (83-167 aa) をLexA融合タンパク質として酵母に発現させK562 cDNAライブラリーを用い結合タンパク質を探索した。コロニーを406個拾い、内325個にβ-gal発色が認められ、back transformationしたところHis⁺ β-gal⁺が68個、内54個をシーケンスし、5クローンがTIF1β/KAP-1であった。TIF1にはα, β, γのサブタイプがあり、TIF1βは転写コリプレッサーとして知られているリン酸化タンパク質である。構造上の特徴としてはN末よりRING finger, B1 B2 box, coiled-coil (以上をRBCC領域), TSS, PHD/TTCそしてbromodomainがあり、RBCC領域でKRABドメインを有するリプレッサーと、中央部でヘテロクロマチン結合タンパク質HP1と結合することが報告されている。

MM-1とTIF1βは、pull-down法により直接結合すること、酵母two-hybrid法によりTIF1βのHP1結合領域に結合することが判明した。TIF1βはHDAC1と複合体を形成し転写抑制を行う報告があるため、免疫沈降法によりMM-1/TIF1β複合体を解析したところ、c-Mycに加えてHDAC1およびmSin3Aが含まれていた。また、強制発現したMM-1と内在性HDAC1, mSin3Aはそれぞれ細胞内で共局在していたことからMM-1/TIF1βはHDAC複合体をリクルートしていることが示唆された。次に、MM-1/TIF1βのc-Myc転写活性に与える影響を検討するために、TIF1βのN末を欠きMM-1との結合領域を有する部分長TIF1β (470-835 aa, 以下TIF1βΔN) を、一過性発現系でc-Myc/Maxの結合配列であるE-boxをレポーターとした転写系に導入したところ、部分長TIF1βΔNはdominant negative体としてMM-1によるc-Myc転写抑制を解除し逆に強い転写活性を与え、更に、MM-1/TIF1β/HDAC1複合体形成を阻止した。また、MM-1によるc-

Myc転写活性抑制能はHDAC阻害薬trichostatin A処置で解除された。次に、MM-1/TIF1 β 複合体の更なる解析を行った。活性化状態のヒストンはアセチル化されており、HDAC, histone methyltransferase, HP1の働きにより沈静化されることから、histone methyltransferaseの1種hSUV39H1がMM-1/TIF1 β 複合体に含まれているのか免疫沈降法により検討したところ、3者は複合体を形成していることが明らかとなった。以上のことから、c-MycのMM-1/TIF1 β を介する新規転写抑制経路が明らかとなった。

次に、TIF1 β Δ NはMM-1-TIF1 β 経路を遮断するdominant negative体であることから、MM-1-TIF1 β 経路が遮断された細胞を樹立し、この細胞を親株と比較検討した。細胞株の樹立方法は、MycER細胞にpEF-TIF1 β Δ N-HAとpSV₂bsrを共導入しblasticidin S選択を行いMycER-TIF1 β Δ N (Δ N-12, Δ N-14, Δ N-15)を得た。これらの細胞においてc-MycはE-box依存性の高い転写活性を示した。

MM-1は癌抑制遺伝子であることから、MM-1-TIF1 β 経路の癌抑制機能に対する影響を見るためMycER-TIF1 β Δ N (Δ N-12, 12-B, 12-Bは Δ N-12からの亜株で軟寒天中でコロニーを形成した)細胞をヌードマウスに移植したところ、腫瘍を形成した。以上のことから、MM-1-TIF1 β 経路の重要性が確認された。

MM-1-TIF1 β によって抑制されているc-Mycのターゲット遺伝子探索のために、4-OHTを処置しMycを活性化させた状態でMycERと比較してMycER-TIF1 β Δ N (Δ N-12)で発現上昇している遺伝子をDNAマイクロアレイ法で解析したところ、M-CSF-1Rをコードする*c-fms*遺伝子が候補遺伝子となり、RT-PCRサザンにより確認した。*c-fms*はE1, E2の2種プロモーターを有し、placentaや乳癌などの上皮系細胞ではE1が、血球系細胞ではE2が機能する。そこで、MycER、並びにMycER-TIF1 β Δ N細胞株において*c-fms*遺伝子プロモーター活性を検討したところ、MycERに比較しMycER-TIF1 β Δ N細胞では強いE1プロモーター活性が得られた。以上のことから、MM-1-TIF1 β によって抑制されているc-Mycのターゲット遺伝子は*c-fms*であることが明らかになった。c-MycはCSF-1Rの下流に位置しcyclin D2誘導に関与している事は報告されているが、c-Mycのターゲット遺伝子であるという報告はない。E1プロモーターは約380 baseで、E-box like配列が3ヶ所存在するため、これらの配列を除いたE1プロモーターを作製しルシフェラーゼ活性を測定したところ、3番目のE-box likeがc-Mycによる転写活性化に大きく関与していることが判明した。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 有 賀 寛 芳

副 査 教 授 横 沢 英 良

副 査 助 教 授 平 敬 宏

副 査 助 教 授 川 原 裕 之

学 位 論 文 題 名

MM-1複合体による新規 c-Myc 転写抑制経路の解明

c-Myc は転写因子としてターゲット遺伝子の転写活性化と同時に抑制化を行ない、抑制化と c-Myc の細胞癌化能との相関がより強く指摘されている。これらの機能には N 末の 2 つの Myc Box と、C 末領域が必須であり、C 末に結合する Max からの Mad/mSin3/histone deacetylase (HDAC1) による抑制経路が知られているが、N 末からの経路は不明であった。MM-1 は c-Myc の Myc Box2 に結合し、c-Myc の E-box を介した転写活性を抑制する 1030 base, 167 aa の核に局在するタンパク質として当研究室で単離された。FISH 解析により、白血病/リンパ腫で染色体異常が認められる 12q12-12q13 に存在することが判明し、60-90 % の白血病/リンパ腫患者の MM-1 では 157 番目のアラニンがアルギニンに変異していた。この A157R 変異は MM-1 による全ての c-Myc 機能抑制が解除されていた。以上のことから、MM-1 は新規の癌抑制遺伝子であるがその詳細な分子機構は不明である。そこで、本研究ではその機構の解明を目的とした。

1. MM-1 複合体による新規 c-Myc 転写抑制経路

Yeast-two-hybrid 法により MM-1 結合タンパク質として転写コリプレッサー TIF1 β を同定した。MM-1 と TIF1 β の HP1 結合領域に直接結合することを明かにした。また免疫沈降法により MM-1/TIF1 β 複合体には c-Myc に加えて HDAC1 および mSin3A が含まれていた。次に、MM-1/TIF1 β の c-Myc 転写活性能に与える影響を検討するために、TIF1 β の N 末を欠き MM-1 との結合領域を有する部分長 TIF1 β (470-835 aa, 以下 TIF1 β Δ N) を c-Myc/Max の結合配列である E-box をレポーターとした転写系に導入したところ、TIF1 β Δ N は dominant negative 体として MM-1 による c-Myc 転写抑制を解除し逆に強い転写活性を与え、MM-1/TIF1 β /HDAC1 複合体形成を阻止した。また、MM-1 による c-Myc 転写活性抑制能は HDAC 阻害薬 trichostatin A 処置で解除された。次に、MM-1/TIF1 β 複合体の更なる解析を行った。活性化状態のヒストンはアセチル化されており、HDAC, histone methyltransferase, HP1 の働きにより沈静化されることから、histone methyltransferase の 1 種 hSUV39H1 が

MM-1/TIF1b 複合体に含まれているのか免疫沈降法により検討したところ、3 者は複合体を形成していることが明らかとなった以上のことから、c-Myc の MM-1/TIF1 β を介する新規転写抑制経路が明らかとなった。

2. MM-1-TIF1b 経路のターゲット遺伝子の同定

c-Myc 発現が estrogen で on, off される Myc-ER 細胞に TIF1 β Δ N を導入し、MM-1-TIF1 β 経路が遮断された細胞 MycER-TIF1 β Δ N を樹立した。これらの細胞において c-Myc は E-box 依存性の高い転写活性を示した。更にこの細胞は軟寒天中でコロニーを形成し、ヌードマウスに移植したところ、腫瘍を形成したことより、MM-1-TIF1 β 経路の重要性が確認された。

MM-1-TIF1 β によって抑制されている c-Myc のターゲット遺伝子探索のために、Myc を活性化させた状態で MycER と比較して MycER-TIF1 β Δ N で発現上昇している遺伝子を DNA マイクロアレイ法で解析したところ、M-CSF-1R をコードする c-fms 遺伝子が候補遺伝子となり、RT-PCR サザンにより確認した。c-fms は E1, E2 の 2 種プロモーターを有し、placenta や乳癌などの上皮系細胞では E1 が、血球系細胞では E2 が機能する。そこで、MycER、並びに MycER-TIF1 β Δ N 細胞株において c-fms 遺伝子プロモーター活性を検討したところ、MycER に比較し MycER-TIF1 β Δ N 細胞では強い E1 プロモーター活性が得られた。以上のことから、MM-1-TIF1 β によって抑制されている c-Myc のターゲット遺伝子は c-fms であることが明らかになった。c-Myc は CSF-1R の下流に位置し cyclin D2 誘導に関与している事は報告されているが、c-Myc のターゲット遺伝子であるという報告はない。E1 プロモーターは約 380 base で、E-box like 配列が 3 ヶ所存在するため、これらの配列を除いた E1 プロモーターを作製しルシフェラーゼ活性を測定したところ、3 番目の E-box like が c-Myc による転写活性化に大きく関与していることが判明した。現在、この配列に c-Myc が結合しているのか、そして、MM-1 はどのように関わっているのかを検討中である。

このように、佐藤亜希子は精力的に MM-1 の機能解析を行ない、多くの成果をあげた。これらの業績は佐藤亜希子に博士（薬学）の学位授与に十分値し、推薦するものである。