

学位論文題名

c-MYC 結合タンパク質 AMY-1の機能解析

学位論文内容の要旨

c-myc 遺伝子は、トリレトロウィルス MC29 のもつ発癌遺伝子 v-myc に対応する細胞遺伝子として同定された。その遺伝子産物である c-Myc は、多くの癌細胞で発現が亢進しているというだけでなく、正常細胞においても、増殖、分化、アポトーシスなどに様々なかたちで関与しており、細胞の運命を司る重要な因子であることが示唆されている。このような c-Myc の多機能性は、Max をはじめとした、他のタンパク質との複合体生成によって説明されており、現在までにいくつかの c-Myc 結合タンパク質が報告されている。

当研究室では c-Myc のさらなる機能解析を目的として、yeast two-hybrid system を用いたスクリーニングにより、c-Myc と結合するタンパク質として AMY-1 (Associate of c-Myc) をクローニングした。その後の研究により AMY-1 は c-Myc の E-box を介した転写を増強することを明らかにしている。しかし、AMY-1 の細胞内における機能については未だ不明な点が多く存在する。

そこで本研究では、AMY-1 の転写調節機構の解析、AMY-1 結合タンパク質の単離と機能解析、AMY-1 の赤血球分化に対する影響の検討、そして AMY-1 欠損マウスの作成を試みた。

AMY-1 は血球系の細胞において高発現している。c-MYC は血球分化を負に制御しているため、AMY-1 も血球分化に何らかの影響があるのではないかと考えられた。そこで造血肝細胞から AMY-1 の強制発現株を樹立し、赤血球分化に対する影響を検討した。その結果、c-MYC とは反対に AMY-1 は赤血球分化を促進することが明らかになった。

また AMY-1 は先に述べたように c-MYC の発現量によって、その細胞内での局在を変え、c-MYC の機能を増強していると考えているが、細胞周期のなかで S 期の占める割合はわずかである。そこで S 期以外で細胞質に存在する AMY-1 にも別の機能があるのではないかと考え、Yeast two-hybrid 法を用いて AMY-1 と結合するタンパク質を探索した。その結果、S-AKAP84/149, AKAP95 をはじめとした AKAP ファミリーが多数得られた。AKAP (A Kinase Anchor Protein) は、シグナル伝達において重要なキナーゼである PKA と結合し、リン酸化の「足場」として重要な役割を担っている。AKAP ファミリーが AMY-1 結合タンパク質として多数得られたことより、AMY-1 が PKA によるリン酸化のシグナル伝達系に関与している可能性が考えられた。AMY-1 は精巢特異的に発現が認められ、AMY-1 トランスジェニックマウスはオスに不妊の傾向が見られており、AMY-1 の精子形成過程での関与を考えている。得られた AKAP のうち S-AKAP84 は精巢特異的に発現していることが報告さ

れており、AMY-1 と発現パターンが類似していた。そこで S-AKAP84 と AMY-1 の相互作用について解析を進めた。yeast 内、*in vitro* プルダウンアッセイ、*in vivo* 免疫沈降法において AMY-1 と S-AKAP84 の結合を確認した。さらに S-AKAP84 は精子ネックのミトコンドリアに局在することが報告されていたため、AMY-1 もそこに局在するのではないかと考え、蛍光抗体を用いた細胞、組織染色を行った。その結果 AMY-1 と S-AKAP84 は共に精子ネックに局在することが明らかになった。

精子ネックミトコンドリアは精子の運動に重要であると考えられており、運動には PKA からのシグナルが不可欠であると考えられている。そこで、AMY-1 が PKA に与える影響を AMY-1 の強制発現系を用いて検討した。細胞に AMY-1 を強制発現させ、PKA の活性を測定したところ、活性は約 30% 低下し、S-AKAP84 と PKA の結合性も大幅に低下したため、AMY-1 が PKA を競合的に阻害していることが明らかになった。AMY-1 トランスジェニックマウスに不妊傾向がみられたのは、AMY-1 の過剰発現によって PKA からのシグナル伝達に異常が起きたためと考えている。

このように AMY-1 は細胞、細胞周期、組織特異的に非常に興味深い機能をもったタンパク質であることを明らかにした。そこで AMY-1 の細胞、組織特異的な発現がどのように制御されているのかに興味をもち、AMY-1 遺伝子の転写調節機構について解析した。マウスの脾臓のライブラリーよりマウス AMY-1 遺伝子を単離し、転写開始点をプライマーエクステンション法により決定した。次にプロモータ領域の各種欠失変異体を作製し、下流にルシフェラーゼ遺伝子を連結し、転写活性を測定した。その結果、マウス AMY-1 遺伝子は Sp1 によって基本転写がなされていて、血球系の細胞などではさらに GATA1 転写因子がコアクチベーターとして働いていることが明らかになった。GATA1 は精巣でも働いていることが報告されているため、精巣や血球系細胞で AMY-1 が高発現しているのは Sp1 と GATA1 が協調して転写を活性化しているためと考えられた。

このように AMY-1 は赤血球分化促進、精子の運動性への関与が明らかになっており、生体内において非常に重要なタンパク質であると考えられた。しかし、これらは *in vitro* や細胞内レベルでの結果から生体内の AMY-1 の機能を推測しているに過ぎない。ジーンターゲット法は胚性肝細胞を用い、遺伝的手法を利用して、マウス生体内で遺伝子機能を直接解析することが出来る方法として有効である。そこで最後に AMY-1 の生体内での機能を探るためジーンターゲット法による AMY-1 ノックアウトマウスの作製を試みた。まず、転写調節機構解析の時に得たマウス AMY-1 遺伝子の全塩基配列を決定した。その結果、マウス AMY-1 遺伝子は 15 kb にわたっており、5 つのエキソンから構成されていることが明らかになった。次に開始コドンを含む第一エキソンを Neo 耐性遺伝子に置き換えたターゲットベクターを作製し、ES 細胞に導入し Neo 耐性クローンを単離した。得られたクローンのうち、AMY-1 遺伝子の位置で正しく相同組換えを起こしているクローンをサザンブロッティングにより解析し、ターゲットアレルをもった ES 細胞を単離した。交配 3 日後のメスより受精卵を取り出し、マイクロマニピレーターを用いて、先に樹立した ES 細胞を 8~16 細胞期にある受精卵に導入し、キメラマウス 5 匹を単離した。キメラマウスに成長遅延や、行動の異常などは観察されていない。次にこれら得られたヘテロマウス同士

を交配することにより，AMY-1 遺伝子のホモ欠損マウスの作製を試みた．現在までに得られたマウスについて先と同様にサザンブロッティングによりチェックを行ったが，ホモ欠損マウスは得られていない．原因としてホモ欠損マウスの胎生致死などの要因が考えられるが，想像の域を出ておらず，今後詳細な解析が必要であると考えている．

学位論文審査の要旨

主 査	教 授	有 賀 寛 芳
副 査	教 授	松 田 正
副 査	助教授	平 敬 宏
副 査	助教授	高 橋 和 彦

学 位 論 文 題 名

c-MYC 結合タンパク質 AMY-1の機能解析

発癌遺伝子産物 c-Myc は、多くの癌細胞で発現が亢進しているというだけでなく、正常細胞においても、増殖、分化、アポトーシスなどに様々なかたちで関与しており、細胞の運命を司る重要な因子であることが示唆されている。当研究室では c-Myc の機能解析を目的として、yeast two-hybrid system を用いたスクリーニングにより、c-Myc と結合するタンパク質として AMY-1 (Associate of c-Myc) をクローニングした。その後の研究により AMY-1 は c-Myc の E-box を介した転写を増強することを明らかにしている。しかし、AMY-1 の細胞内における機能については未だ不明な点が多く存在する。

そこで本研究では、AMY-1 の転写調節機構の解析、AMY-1 結合タンパク質の単離と機能解析、AMY-1 の赤血球分化に対する影響の検討、そして AMY-1 欠損マウスの作成を試みた。

AMY-1 は血球系の細胞において高発現している。c-MYC は血球分化を負に制御しているため、AMY-1 も血球分化に何らかの影響があるのではないかと考えられた。そこで造血肝細胞から AMY-1 の強制発現株を樹立し、赤血球分化に対する影響を検討した。その結果、c-MYC とは反対に AMY-1 は赤血球分化を促進することが明らかになった。

また AMY-1 は先に述べたように c-MYC の発現量によって、その細胞内での局在を変え、c-MYC の機能を増強していると考えているが、細胞周期のなかで S 期の占める割合はわずかである。そこで S 期以外で細胞質に存在する AMY-1 にも別の機能があるのではないかと考え、Yeast two-hybrid 法を用いて AMY-1 と結合するタンパク質を探索した。その結果、

S-AKAP84/149, AKAP95 をはじめとした AKAP ファミリーが多数得られた。AKAP (A Kinase Anchor Protein) は、シグナル伝達において重要なキナーゼである PKA と結合し、リン酸化の「足場」として重要な役割を担っている。AKAP ファミリーが AMY-1 結合タンパク質として多数得られたことより、AMY-1 が PKA によるリン酸化のシグナル伝達系に関与している可能性が考えられた。AMY-1 は精巢特異的に発現が認められ、AMY-1 トランスジェニックマウスはオスに不妊の傾向が見られており、AMY-1 の精子形成過程での関与を考えている。得られた AKAP のうち S-AKAP84 は精巢特異的に発現していることが報告されており、AMY-1 と発現パターンが類似していた。そこで S-AKAP84 と AMY-1 の相互作用について解析を進めた。yeast 内、*in vitro* プルダウンアッセイ、*in vivo* 免疫沈降法において AMY-1 と S-AKAP84 の結合を確

認した。さらに S-AKAP84 は精子ネックのミトコンドリアに局在することが報告されていたため、AMY-1 もそこに局在するのではないかと考え、蛍光抗体を用いた細胞、組織染色を行った。その結果 AMY-1 と S-AKAP84 は共に精子ネックに局在することが明らかになった。

精子ネックミトコンドリアは精子の運動に重要であると考えられており、運動には PKA からのシグナルが不可欠であると考えられている。そこで、AMY-1 が PKA に与える影響を AMY-1 の強制発現系を用いて検討した。細胞に AMY-1 を強制発現させ、PKA の活性を測定したところ、活性は約 30% 低下し、S-AKAP84 と PKA の結合性も大幅に低下したため、AMY-1 が PKA を競合的に阻害していることが明らかになった。AMY-1 トランスジェニックマウスに不妊傾向がみられたのは、AMY-1 の過剰発現によって PKA からのシグナル伝達に異常が起きたためと考えている。

このように AMY-1 は細胞、細胞周期、組織特異的に非常に興味深い機能をもったタンパク質であることを明らかにした。そこで AMY-1 の細胞、組織特異的な発現がどのように制御されているのかに興味をもち、AMY-1 遺伝子の転写調節機構について解析した。マウスの脾臓のライブラリーよりマウス AMY-1 遺伝子を単離し、転写開始点をプライマーエクステンション法により決定した。次にプロモータ領域の各種欠失変異体を作製し、下流にルシフェラーゼ遺伝子を連結し、転写活性を測定した。その結果、マウス AMY-1 遺伝子は Sp1 によって基本転写がなされていて、血球系の細胞などではさらに GATA1 転写因子がコアクチベーターとして働いていることが明らかになった。GATA1 は精巣でも働いていることが報告されているため、精巣や血球系細胞で AMY-1 が高発現しているのは Sp1 と GATA1 が協調して転写を活性化しているためと考えられた。

このように AMY-1 は赤血球分化促進、精子の運動性への関与が明らかになっており、生体内において非常に重要なタンパク質であると考えられた。しかし、これらは *in vitro* や細胞内レベルでの結果から生体内の AMY-1 の機能を推測しているに過ぎない。ジーンターゲティング法は胚性肝細胞を用い、遺伝的手法を利用して、マウス生体内で遺伝子機能を直接解析することが出来る方法として有効である。そこで最後に AMY-1 の生体内での機能を探るためジーンターゲティングによる AMY-1 ノックアウトマウスの作製を試みた。まず、転写調節機構解析の時に得たマウス AMY-1 遺伝子の全塩基配列を決定した。その結果、マウス AMY-1 遺伝子は 15 kb にわたっており、5 つのエキソンから構成されていることが明らかになった。次に開始コドンを含む第一エキソンを Neo 耐性遺伝子に置き換えたターゲティングベクターを作製し、ES 細胞に導入し Neo 耐性クローンを単離した。得られたクローンのうち、AMY-1 遺伝子の位置で正しく相同組換えを起こしているクローンをサザンブロッティングにより解析し、ターゲティングアレルをもった ES 細胞を単離した。交配 3 日後のメスより受精卵を取り出し、マイクロマニピレーターを用いて、先に樹立した ES 細胞を 8~16 細胞期にある受精卵に導入し、キメラマウス 5 匹を単離した。キメラマウスに成長遅延や、行動の異常などは観察されていない。次にこれら得られたヘテロマウス同士を交配することにより、AMY-1 遺伝子のホモ欠損マウスの作製を試みた。現在までに得られたマウスについて先と同様にサザンブロッティングによりチェックを行ったが、ホモ欠損マウスは得られていない。原因としてホモ欠損マウスの胎生致死などの要因が考えられるが、想像の域を出ておらず、今後詳細な解析が必要であると考えている。

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