

氏名(本籍)	田中康範(大阪府)		
学位の種類	博士(理学)		
学位記番号	博甲第1,797号		
学位授与年月日	平成10年3月23日		
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当		
審査研究科	生物科学研究科		
学位論文題目	Studies on the Physiological Roles of Transcription Factor c-Myb and its Coactivator CBP <i>in vivo</i> (転写因子 c-Myb とそのコアクティベーター CBP の生理的役割に関する研究)		
主査	筑波大学教授	理学博士	平林民雄
副査	筑波大学教授	理学博士	小熊讓
副査	筑波大学教授	農学博士	田仲可昌
副査	筑波大学助教授	理学博士	沼田治

論文の内容の要旨

ニワトリに骨髄性白血病を発症させるウイルス (AMV) v-myb 遺伝子の細胞側相同遺伝子 c-myb の機能を明らかにするために行った本研究は次の3部より成り立っている。

(1) C 端側ドメインによる DNA 結合能の抑制機構の解析

v-myb 遺伝子産物 (v-Myb) 及び c-myb 遺伝子産物 (c-Myb) はともに AACNG 配列に特異的に結合し、転写を活性化する転写制御因子であり、その C 端側には負の制御ドメインを有する。しかしこの負の制御ドメイン内のロイシンジッパー以外の役割は c-Myb の DNA 結合能を解析できる系が確立されていなかったために明らかにされていなかった。本研究では、Myb の DNA 結合能を解析できる系を作製し、負の制御ドメインの役割を明らかにした。まず一連の C 端側欠変異体の発現ベクターを作製し、これらを 293T 細胞に CaPO₄ 法で導入した後、核抽出物を調整し、ゲル移動度シフト法を用いて各変異体の DNA 結合能を比較した。その結果、DNA 結合能を負に制御するドメインが c-Myb の制御ドメイン内の C 端側と N 端側にそれぞれ存在することが明らかになった。このように c-Myb の負の制御ドメインは DNA 結合能を抑制する 3 つのサブドメイン (N 端側サブドメイン、ロイシンジッパー、C 端側サブドメイン) で構成されていることが明らかになった。AMV によってコードされている v-Myb は C 端側サブドメインが欠けており、この DNA 結合能抑制サブドメインの欠失が v-Myb の癌化能獲得の 1 つの重要な原因であると思われた。

(2) c-Myb のコアクティベーター CBP の同定

CBP (CREB-binding protein) は最初 CREB (cAMP response element-binding protein) に結合するコアクティベーターとして同定された遺伝子である。この CBP が c-Myb のコアクティベーターとして機能できるかを Yeast Two Hybrid 法により解析したところ、CBP が c-Myb の転写活性化ドメインを結合すること、CBP が c-Myb のコアクティベーターとして機能していること、が明らかとなり、生体内における CBP を介した転写因子間のネットワークの重要性が示された。

(3) ジーンターゲット法による CBP の生理的役割の解析

生体内における CBP を介した c-Myb をはじめとする転写因子間のネットワークの重要性及び RTS の発症機構を明らかにする為に ES 細胞の相同組換えを用いて CBP 欠損マウスを作製した。CBP ヘテロ変異マウスでは骨格

形成において様々な異常が観察でき、CBPの量が半分に減少することで症状が発症することが示された。CBPホモ変異マウスは胎生期に致死であり、その致死時期を詳しく解析した結果、胎生10.5日目と11.5日目の間に致死となることが明らかとなった。しかし残念なことにCBPホモ変異マウスはc-Myb欠損マウスよりも早期に死亡するため生体内でのc-MybとCBPの関係を解析できなかった。しかし胎生11.5日目CBPホモ変異マウスの表現型を観察した結果、神経管の閉鎖異常と生育不全が認められた。さらにヘマトキシリン・エオシンで染色した組織切片を作製し、詳しく観察したところ、目の形成異常や心臓の発生の遅れ等が認められた。次にCBPホモ変異マウスの致死原因について検討した。現在までに報告されているノックアウトマウスの致死時期と原因を比較検討した結果、CBPホモ変異マウスの致死原因として卵黄嚢での造血異常が考えられ、事実本研究例においても卵黄嚢の血管に赤血球がほとんど存在しなかった。

審 査 の 結 果 の 要 旨

本研究ではc-MybのDNA結合能の抑制機構に関する新知見を得、c-MybのコアクティベーターとしてCBPを同定し、その生理的役割を解析するためにジーンターゲット法を用いてCBP欠損マウスを作製し解析を行った。その結果、CBPヘテロ変異マウスが、ある遺伝病様の症状を呈すること、CBPホモ変異マウスは神経管の閉鎖異常や生育不全を呈し卵黄嚢の造血異常のために致死になることなどが解明された。この研究結果は遺伝子発現の制御機構及び癌化能獲得に関して重要な成果であると評価出来る。

よって、著者は博士（理学）の学位を受けるに十分な資格を有するものと認める。