

氏名(本籍)	みやぎし まこと 宮 岸 真(栃木県)
学位の種類	博士(学術)
学位記番号	博甲第2288号
学位授与年月日	平成12年3月24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	農学研究科
学位論文題目	Transcriptional regulation of bHLH transcription factor and coactivator CBP (bHLH型転写因子とコアクティベータCBPに関する転写調節の解析)
主査	筑波大学教授 農学博士 馬場 忠
副査	筑波大学教授 工学博士 松村 正利
副査	筑波大学教授 農学博士 深水 昭吉
副査	筑波大学教授 理学博士 宗像 英輔

### 論文の内容の要旨

転写調節には、1) 特異的なDNA配列に結合する転写因子、2) タンパク質間の相互作用によりプロモーターにリクルートされるコアクティベーターおよびコリプレッサー、3) クロマチン構造の再構成に寄与するタンパク質等が関与していることが知られており、これらの因子がどのように相互作用し合い、転写を調節しているかを解き明かすことが、現在の転写研究において大きな課題となっている。本研究では、転写因子およびコアクティベーターに関する解析を行った以下の2つの事例について報告している。

#### 1) 中胚葉特異的に発現するbHLHタンパク質、POD-1/Capsulinの分子生物学的解析

細胞種特異的に発現するbHLH proteinには、筋細胞におけるMyo-D family melanocyteにおけるmicrophthalmiaなどがよく知られており、これらの転写因子は筋細胞やmelanocyteの分化調節に非常に重要な働きをしていることがさまざまな研究から明らかにされている。

本研究では新たな細胞特異的に発現するbHLH proteinを探索する事を目的として、bHLHモチーフの2nd Helixの相同性に基づいた探索を行い、新規bHLH protein (POD-1/Capsulin)を単離している。各種ヒト細胞株を用いたノーザン解析により、POD-1/Capsulinは、ヒトの培養血管平滑筋細胞に特異的に発現していることを明らかにした。また、マウスの各種組織についても同様の解析を行ったところ、心臓、肺、腎臓、睪丸、脾臓に高い発現がみられた。つぎに、POD-1/Capsulinと相互作用する因子の探索を目的として、yeast two-hybrid systemにより、ヒト腎臓cDNA libraryのスクリーニングを行った結果、classAのbHLHであるITF-2およびHEBが単離され、POD-1/CapsulinはこれらのclassAbHLHタンパク質とヘテロダイマーを形成し機能していることも示唆された。さらに、GAL4-fusion assayを行い転写活性可能を調べたところ、HT1080細胞とHeLa細胞においては転写活性化能があり、HepG2細胞では転写抑制活性があることが明らかとなり、細胞種依存的な転写活性化能を有することを見いだした。

#### 2) Lef依存的な転写調節とp53依存的なアポトシスの抑制における $\beta$ -cateninとCBPの関与

CBP/p300は様々な転写因子のコアクティベーターとして機能すると共に、細胞の分化、増殖、アポトシスなどの生理現象に重要な役割を果たしていることが明らかになっている。本論文では、CBP/p300がWnt/Wingless情報伝達経路におけるsignal transducerである $\beta$ -cateninと相互作用していることを見いだしている。HA- $\beta$ -cateninをtransfectionした293T細胞の核抽出液をHA抗体により免疫沈降したところ、CBPが共沈されることが明らかとなった。GST融合 $\beta$ -cateninを用いて、CBP内での結合部位を調べた結果、 $\beta$ -cateninはCBPのCH3領域を介して相互

作用していることも明確になった。また、CBP/p300が $\beta$ -cateninのLef依存的な転写活性化を増強することや、E1Aが部分的にその転写活性化を阻害することが判明し、 $\beta$ -cateninのLef依存的な転写活性化にCBP/p300が関与していることが示唆された。さらに、CBP/p300を介した転写因子間のクロストークの可能性を調べるために、CBPと機能的に相互作用するp53に対する $\beta$ -cateninの影響について検討したところ、 $\beta$ -cateninはp53とp300を取り合うことにより、p53に対して阻害的に作用することが示唆された。

以上の結果から、CBP/p300は $\beta$ -cateninと核内で結合し、 $\beta$ -cateninの転写活性化に関与していること、および $\beta$ -cateninがp53に対して抑制的に働く可能性が見いだされた。

## 審査の結果の要旨

本研究において、著者は転写調節に関わるふたつの事例について論じている。まず、bHLHモチーフを有する新規転写因子、POD-1/Capsulinを単離している。その発現分布を調べることによって、組織特異的、かつ細胞特異的なパターンを示していることを見だし、この転写因子が発生あるいはある種の細胞の分化過程に重要な役割を果たしている可能性を提唱している。したがって、今回の新規転写因子のクローニングは、発分化や器官形成に関する分野において、非常に重要な知見を与えたといえる。今後、ノックアウトマウス等を用いた研究による詳細な機能解析が行われることにより、その重要性がより明らかになると思われる。

また、POD-1/Capsulinの転写活性化能を調べる過程において、その転写活性化能が細胞種特異的であり、細胞種によっては転写抑制活性をもつことを明らかにしている。ひとつの転写因子が細胞種依存的に転写活性化と転写抑制化という相反する活性をもつ事例はほとんど知られておらず、今回の研究は転写因子の細胞種特異的転写調節機構という新しい理論構築をした点で非常に評価されるものである。今後、転写活性化/抑制化のスイッチング機構の解析、下流の転写因子の同定等、その生理的役割の解析を含め、更なる研究の発展が期待できる。

2番目の事例として、Wnt/Winglessのシグナルにおける細胞質から核へのトランスデューサーである $\beta$ -cateninの転写活性化で転写コアクティベーターCBPが関与していることを、生化学的な結合解析、免疫染色法を用いた細胞内局在の解析、およびレポーター遺伝子を用いた転写調節の解析により明らかにしている。また、CBPがさまざまな転写因子間でクロストークしているという事実にも着目して、 $\beta$ -cateninの場合においてもCBPを取り合うことにより癌抑制遺伝子p53のシグナルと拮抗的に阻害し合うことを示し、癌化機構においてコアクティベーターを介した抑制化という新たな概念を提唱している。

以上のように、本研究は遺伝子転写調節研究の分野において新規性かつ独創性の高い研究であると結論できる。よって、著者は博士（学術）の学位を受けるに十分な資格を有するものと認める。