

「生体防御のメカニズム」
平成9年度採択研究代表者

石井 俊輔

(理化学研究所 主任研究員)

「仲介因子を介した遺伝子発現制御の解明」

1. 研究実施の概要

私達は昨年度、発がん遺伝子として同定されていたski及びその関連遺伝子 sno の産物がコリプレッサーとして機能することを明らかにした。今年度は変異マウスを作製・解析した結果、ヘテロ変異マウスではがんが発症しやすいことが示され、ski/sno 遺伝子はがん抑制遺伝子としても機能することを明らかにした。また、ストレス応答キナーゼの代表的な標的である転写因子 ATF-2 (CRE-BP1) は私達が初めて cDNAクローニングによって同定したものであるが、ATF-2 の null 変異マウスを作製・解析し、ATF-2 変異マウスが胎便吸引症候群のモデルマウスとなることを示した。そしてmyb がん遺伝子ファミリーのメンバーの一つである B-myb 遺伝子の生理機能を明らかにするため、変異マウスの作製・解析を行った結果、B-myb は発生初期段階に必須であることが示された。

2. 研究実施内容

(1) ski/sno 遺伝子はがん抑制遺伝子としても機能する

ski 遺伝子は20年以上も前にかん遺伝子として同定されたもので、最初に見い出されたSloan-Kettering Institute の名にちなんで、ski と名付けられた。また、ski 関連遺伝子として sno (ski-related novel gene) が同定されている。私達は昨年度 ski/sno 遺伝子産物 (Ski/Sno) がヒストンデアセチラーゼ (HDAC) 複合体に含まれるコリプレッサーであることを明らかにした。Ski/Snoの生理機能を明らかにするため、sno 欠損変異マウスを作製・解析した。ホモ変異マウスは blastocysto が形成できず、発生の初期段階で致死であった。ヘテロ変異マウスは一見正常であるが、長期に飼育すると低頻度ながらリンパ腫を発症した。そこで、化学発がん剤 DMBA の投与実験を行ってみると、野生型マウスでは、がんが発症しない条件下で、ほとんどのヘテロ変異マウスには、Tリンパ腫、Bリンパ腫などのがんが発症した。同様の結果は ski 変異ヘテロマウスでも観察された。sno ヘテロ変異マウスの T 細胞、線維芽細胞では細胞周期のG1/S移行の停止機構に異常が見られたのに対し、sno ヘテロ変異マウスの B 細胞はアポトーシスに抵抗性であった。このように、sno 遺伝子の変異は細胞によって異なることが示された。以上の結果は、

ある種の細胞においてはSki/Snoががん抑制因子として機能することを示している。最近、いくつかのグループによって、Ski/Snoは TGF- β シグナル伝達経路上で機能する Smadに結合し、HDAC複合体をSmadにリクルートし、Smadによる転写活性化及び TGF- β シグナル伝達経路を阻害することが示された。従って、TGF- β に感受性の細胞においてはSki/Snoは発がん遺伝子として機能すると推定される。このように、Ski/Snoの細胞増殖における役割は細胞によって異なる。

(2) B-myb 遺伝子の生理機能

myb 遺伝子は造血系細胞をがん化する発がん遺伝子であるが、その関連遺伝子としてA-mybとB-myb 遺伝子が同定されている。この3つのメンバーのうちB-mybは最も発現の細胞特異性が広く、ほとんどの細胞で発現している。B-myb の生理機能を明らかにするため、変異マウスを作製し、解析した。ホモ変異マウスはICM (inner cell mass) が形成できず、発生の初期段階で致死となることが示された。myb 遺伝子ファミリーの3つのメンバーの中で、B-myb のみが発生の初期段階から発現し、多くの細胞の細胞周期調節に関与していると考えられる。

(3) 転写因子ATF-2 (CRE-BP1) の生理機能

ATF-2 (CRE-BP1) はB-ZIP 構造のDNA 結合ドメインと、メタルフィンガー構造の転写活性化ドメインを有する転写因子である。ATF-2はJNKやp38などのストレス応答キナーゼ (SAPK: stress-activated kinase) によって直接リン酸化され、活性化される。私達はATF-2の生理機能を明らかにするため変異マウスを作製・解析した。B-ZIP 構造をコードするエキソンをneoによって置換することによって、null 変異体を作製した。数年前にGlimcherらによって報告されていたATF-2変異マウスと私達の変異マウスとを比較・解析した結果、Glimcherらのマウスでは機能的に必須でないエキソンを neo で置換したため、このエキソンを欠くATF-2蛋白質が残っていることが証明された。私達の作製した null 変異マウスはすべて出生直後に呼吸不全のため死亡した。肺には胎便がつまっており、このマウスはヒトの胎便吸引症候群 (MAS: Meconium Aspiration Syndrome) のマウスモデルとなることが示された。メカニズムを解析した結果、胎盤のTrophoblast 細胞層の発達が未熟なためガス交換が不十分となり、胎児が低酸素状態になり、早期に呼吸を開始してしまうことが示された。実際に、ATF-2 null の胎仔では低酸素で誘導されるいくつかの遺伝子の発現が上昇していた。さらにATF-2 null 変異マウスにおいて発現が低下している遺伝子をスクリーニングした結果、PDGF受容体遺伝子の発現が低下していた。そしてPDGF受容体遺伝子のプロモーター領域にはATF-2が直接結合し、転写を活性化することが示された。以上の結果より、変異マウスではATF-2の標的遺伝子であるPDGF受容体の発現が低下するため、PDGFによって増殖が維持されるTrophoblast 細胞の増殖が阻害されることも明らかにされた。こ

のようにATF-2変異マウスの解析により、胎便吸引症候群のメカニズムの一端が明らかにされた。

(4) Myb と C/EBP 複合体の結晶作製及び構造解析

転写因子Myb と C/EBP は骨髄細胞特異的な遺伝子のプロモーターに結合し、協調して転写を活性化することが知られているが、そのメカニズムは分かっていない。この協調的作用のメカニズムを明らかにするため、両者の複合体の構造解明を目指して、Myb-DNA とC/EBP -DNA の複合体の結晶を作製し、その構造決定に成功した。この構造はプロモーター上に離れて結合する転写因子がどのように相互作用し、転写を協調的に活性化するかを理解するための重要な情報を与える。

3 . 主な研究成果の発表 (論文発表)

Maekawa, T., Bernier, F., Sato, M., Nomura, S., Singh, M., Inoue, Y., Tokunaga, T., Imai, H., Yokoyama, M., Reimold, A., Glimcher, L. H. & Ishii, S. (1999). Mouse ATF-2 null mutants display features of severe type of meconium aspiration syndrome. *J. Biol. Chem.* 274, 17813-17819.

Tanaka, Y., Patestos, N. P., Maekawa, T. & Ishii, S. (1999). B-myb is required for inner cell mass formation at an early stage of development. *J. Biol. Chem.* 274, 28067-28070.

Morii, H., Uedaira, H., Ogata, K., Ishii, S. & Sarai, A. (1999). Shape and energetics of a cavity in c-Myb probed by natural and non-natural amino-acid mutations. *J. Mol. Biol.* 292, 909-920.

Kittaka, A., Kuze, T., Amano, M., Tanaka, H., Miyasaka, T., Hirose, K., Yoshida, T., Sarai, A., Yasukawa, T. & Ishii, S. (1999). Introduction of 6-formylcytidine into a Myb binding sequence. *Nucleosides Nucleotides* 18, 2769-2783.

Takahashi, T., Suwabe, N., Dai, P., Yamamoto, M., Ishii, S. & Nakano, T. (2000). Inhibitory interaction of c-Myb and GATA-1 via transcriptional co-activator CBP. *Oncogene* 19, 134-140.