

論文の内容の要旨

論文題目

Identification of SWI/SNF complex subunit BAF60a as a major determinant of transactivation potential of Fos/Jun dimers

(SWI/SNF 複合体の構成成分、BAF60a は、Fos/Jun ダイマーによる転写活性化能を決定する因子である)

氏名 伊藤 太二

ある細胞がこれまでの発生過程を記憶していて、その細胞に特異的な遺伝子発現様式を維持したり、各刺激に対して特異的な応答をする、といった特異性の形成、確立、維持の分子機構はほとんど未知であり、現代生物学の一つの課題になっている。これらの特異性を担う因子は標的遺伝子のクロマチンの状態を認識し、維持する活性を持つものであると考えられる。実際、このような epigenetical な制御を受ける遺伝子の発現はヒストンのアセチル化・脱アセチル化、DNA のメチル化といったクロマチンの修飾に関わる因子群やクロマチン構造変換因子群等によって制御されることが示唆されている。

AP-1 は細胞の増殖・分化・癌化等に対して重要な役割を担っている転写制御因子である。AP-1 は、Fos ファミリータンパク質 (c-Fos, Fra-1, Fra-2, FosB) と Jun ファミリータンパク質 (c-Jun, JunB, JunD) から構成されている。Jun ファミリータンパク質はいずれも、Fos ファミリーのどの構成タンパク質とも安定なダイマーを形成するが、Jun ファミリータンパク質相互の間でも不安定なダイマーを形成しうる。ダイマーは両ファミリータンパク質が持つロイシンジッパー構造を介して形成され、いずれのダイマーも TGA(C/G)TCA という AP-1 結合配列に結合する。我々の研究室では、内在性 AP-1 活性が低い mouse embryonic carcinoma F9 細胞株を用いて、各 Fos, Jun 発現ベクターと、human collagenase 遺伝子のプロモーター領域にある典型的 AP-1 配列を一つ持つレポーター CAT プラスミド(1×col.TRECAT)とを同時に導入して解析してきた。その結果、c-Jun ホモダイマーに対し c-Fos の添加は転写の活性化を促すが、Fra-1, Fra-2 は抑制的に働くこと等を示している (1)。このことは、各ダイマーがそれぞれ独特の転写制御活性を有していて、2 つのファミリータンパク質間で形成されるダイマーの種類によって、AP-1 結合配列を介する発現に極めて広い多様性が生み出されることを示している。しかしながら、このような多様な転写制御活性を担う機構やそれに関わる分子は未知である。

本研究では、Jun ファミリータンパク質の中で c-Jun による転写の活性化の分子機構の解明を目指し、酵母 two-hybrid スクリーニングにより c-Jun の転写活性化能を担うとされる N 端領域 (a.a.25-187) を bait として mouse brain cDNA ライブラリーの中で相互作用する因子をスクリーニングした。5×10⁵ クローンをスクリーニングし、23 個のヒスチジン非要求性、β-galactosidase 陽性のクローンを得た。うち 1 クローンが mouse SWI/SNF 複合体の構成成分、BAF60a の C 端をコードしていた。

SWI/SNF 遺伝子群は最初、酵母の接合型変換に関与する HO endonuclease 遺伝子の転写制御因子群 (SWI; switching)、および sucrose 代謝に関与する SUC2 invertase 遺伝子の転写制御因子群 (SNF; sucrose nonfermenting) として同定された。その後 SWI2 は SNF2 と同一のタンパク質をコードし、DNA-dependent ATPase 活性を持つことが示されている。最近、mammalian の SWI/SNF 複合体がクローニングされ、それは 11 個のサブユニットから成り、BRG1 または Brm のいずれか一方のみを必ず含む 2 MDa の複合体であることが示された (2)。これら BRG1 および Brm は SWI2/SNF2 の mammalian ホモログであり、DNA-dependent ATPase 活性を持ち、SWI/SNF の持つクロマチンリモデリング活性を担うコアサブユニットである。

c-Jun の N 端領域と SWI/SNF 構成成分 BAF60a との結合が示されたことで、AP-1 による転写活性化の分子機構をクロマチンリモデリングの視点で解明できる可能性が高いと考えられた。そこでまずスクリーニングで得られたクローンを元に全長の BAF60a をコードする cDNA を得た。次に、BAF60a と c-Jun の結合が *in vitro* でも見られるか調べた。BAF60a を GST に融合させたもの、c-Jun の N 端 (a.a.1-225) にヒスチジンタグをつけたものとともに *E.coli* で発現、精製して結合実験を行ったところ、BAF60a と c-Jun の N 端は直接的に結合することが示された。ここで AP-1 構成成分間で BAF60a に対する結合性に差があるのかを *in vitro* で調べたところ、BAF60a は他の Jun family として JunB と (c-Jun に比べて) 弱く結合し、JunD との結合は検出できなかった。また BAF60a は Fos ファミリーの中では Jun ファミリーとは一次構造の大きく違う c-Fos とも結合した。さらに、c-Fos の deletion mutant を作製して BAF60a との結合を調べたところ、c-Fos では、bZip を含まない C 端領域 (a.a.237-380) で結合に十分であった。

in vivo では AP-1 は主に Fos ファミリーと Jun ファミリーとの間で安定なヘテロダイマーを形成して機能すると考えられるので、予め Fos ファミリーと Jun ファミリーの間でダイマーを形成させた後、BAF60a との結合を調べた。結果、図 1 に示すように、BAF60a は c-Fos/c-Jun ヘテロダイマーを高い選択性で結合すること (図 1 A)、c-Fos または c-Jun を含むヘテロダイマーとは弱い親和性を持つこと (図 1 B、C)、Fra-2/JunD ダイマーとの結合は検出されないこと (図 1 D) が示された。次に Fos ファミリー、Jun ファミリータンパク質間で形成される様々な組み合わせのヘテロダイマーの転写活性化能を比較検討した。F9 細胞株に対して AP-1 構成成分の発現プラスミド及び 1×col.TRECAT プラスミドを一過的に導入して CAT assay を行ったところ、表 1 に示すように、c-Fos/c-Jun ダイマーがもっとも強い転写の活性化を示し、Fra-2/JunD ダイマーはほとんど活性化は示さなかった。これらのことから、Fos/Jun ダイマーの転写活性化能は BAF60a との結合能によって主に決定されていることが強く示唆された。

次に c-Fos あるいは c-Jun は *in vivo* で SWI/SNF 複合体と結合しているかを確認する実験を行った。血清飢餓状態にさらして、G₀ 期に同調した細胞に対して血清刺激を行うと一過的

に c-Fos、c-Jun の著しい発現が起こる (3)。その状態における NIH3T3 の細胞抽出液を用いた免疫沈降法を行ったところ、c-Fos、c-Jun が SWI/SNF 複合体構成成分 Brm 及び INI1 を含む複合体と *in vivo* で結合していることが示された。

最後に、c-Fos/c-Jun ダイマーによる転写の活性化は SWI/SNF によるクロマチンリモデリングを介しているのか、またその際にも BAF60a によって c-Fos/c-Jun ダイマーが選択される分子機構が働くのかを調べた。SWI/SNF の DNA-dependent ATPase 活性を担う Brm や BRG1 を発現していない副腎皮質由来の adenocarcinoma SW13 細胞株での CAT assay で、c-Fos/c-Jun ダイマーは Brm の共導入に依存して collagenase 上流域由来の AP-1 結合配列を介した著しい転写の活性化を示したが、この活性化は BAF60a への結合が検出されなかった Fra-2/JunD ダイマーではみられなかった。ここで、同じ系を用いて AP-1 結合配列を上流に持つ collagenase 及び c-met の内在の発現を調べたところ、図 2 に示すように c-Fos/c-Jun ダイマーは collagenase では BRG1 及び Brm の、また c-met においては BRG1 の共導入に依存して著しい転写の活性化を示したが、これらの活性化は Fra-2/JunD ダイマーではみられなかった。

以上より、AP-1 成分中の特定のダイマーは BAF60a を介して SWI/SNF 複合体を染色体上に動員させて、転写開始を誘導することが示された。特に c-Fos が PDGF、interferon、血清、TPA 等の刺激に応答して一過的に発現する超初期遺伝子であることを考えると、AP-1 結合配列を持っているが通常は不活性な状態にある標的遺伝子のクロマチン構造は、それらの多様な刺激に応答して c-Fos を含むダイマーにより動員された SWI/SNF 複合体により活性型のクロマチンへと構造変換を受けるものと考えられる。BAF60a については SWI/SNF 複合体に対する結合活性を持たない Fos/Jun ヘテロダイマー (例えば Fra-2/JunD ダイマー) は c-Fos を含むダイマーにより一旦 open な状態になった AP-1 結合配列に結合して、転写を ON の状態に保持するといった機能を持つと考えられる。今後は Fos/Jun ダイマーの制御下において組織特異性の維持、発生・分化の誘導、また組織特異性の破綻から生じると考えられる腫瘍形成等といった過程に直接に関わる標的遺伝子の検索を行い、それらの過程における Fos/Jun による転写制御に SWI/SNF 複合体の動員がどのように関わるかを追求したい。

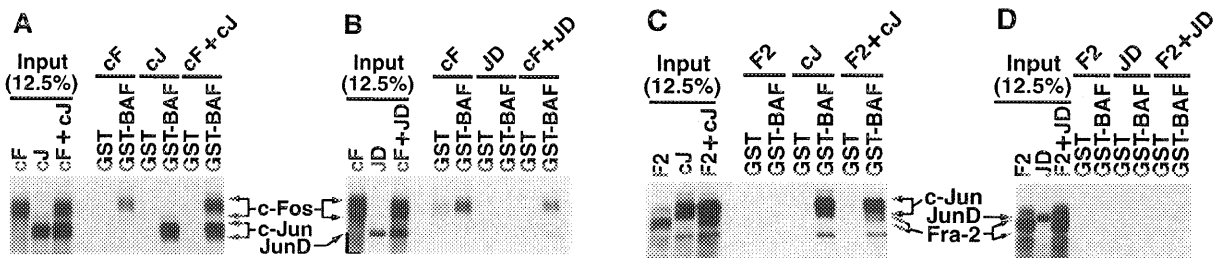


図 1. 各 Fos/Jun ダイマーの BAF60a への結合性

³⁵S メチオニン及びウサギ網状赤血球抽出液を用いて作製した c-Fos (Fra-2)及び c-Jun (JunD) を混合して 37°C で 30 分間保温することにより、ヘテロダイマーを形成させた。この後、GST 融合 BAF60a と混合して、GST pull down assay を行った。

Jun	c-Jun	JunB	JunD
Fos			
c-Fos	9.7	7.0	3.6
Fra-1	2.0	1.1	1.2
Fra-2	2.7	1.1	1.4

表1. F9細胞株における各Fos/Junダイマーの転写活性化能

F9細胞株にFos及びJunファミリータンパク質発現プラスミドと1Xcol.TRECATを一過的に共導入し、CAT活性を測定した。空のプラスミドをタンパク質発現プラスミドの代わりに用いた場合のCAT活性を1として相対的に表した。

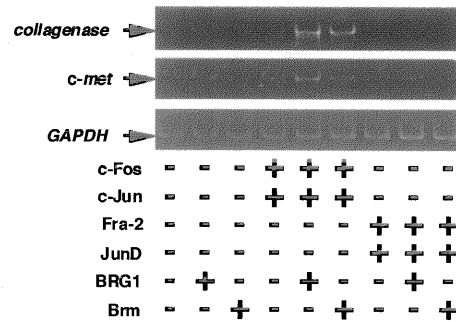


図2. BRG1及びBrmの共導入のAP-1の転写活性化能への効果

SW13細胞株に発現プラスミドを一過的に導入し、各トランスフェクタントから全RNAを抽出後、各内在遺伝子に対するプライマーを用いてRT-PCRを行った。GAPDHは内部標準遺伝子として用いた。

参考文献

- (1) Suzuki, T., Okuno, H., Yoshida, T., Endo, T., Nishina, H., and Iba, H. (1991). *Nucleic Acids Res.* 19, 5537-5542.
- (2) Wang, W., Xue, Y., Zhou, S., Kuo, A., Cairns, B.R., and Crabtree, G.R. (1996). *Genes Dev.* 10, 2117-2130.
- (3) Murakami, M., Ui, M., and Iba, H. (1999). *Cell Growth Differ.* 10, 333-342.