

論文の内容の要旨

応用生命工学専攻

平成12年度博士課程 入学

氏 名 竹 澤 慎一郎

指導教官名 加 藤 茂 明

論文題目 核内レセプター新規転写共役因子に関する機能解析

第一章 序論

1-1 はじめに

視細胞特異的核内レセプター(Photoreceptor Nuclear Receptor; PNR)は網膜視細胞層にのみ特異的に発現する核内レセプターである。マウスにおいてPNRは胚発生のE18前後に網膜視細胞層の細胞核がある領域(Outer Nuclear Layer; ONL)に発現が見い出され、成体に至るまで発現している。本遺伝子の不活性化はヒトではEnhanced S-Cone Syndrome(ESCS)として視覚障害が生じ、マウスにおいても同様に変異が知られている。より詳細な解析から、視細胞発生の段階でPNRは神経網膜前駆細胞(Retinal Progenitor Cells; RPCs)の増殖を負に制御しており、かつ特定細胞(青色錐体細胞)の分化抑制機能を示された。さらに成体においては視細胞の正常な機能維持に必要であることから、PNRは視細胞の発生・分化・恒常性の維持にとって必須の視細胞制御因子であると考えられる。

核内レセプター群は、脂溶性低分子やステロイドホルモンをリガンドとしたリガンド依存的転写制御因子である。一方PNRを始めとして、リガンドを持たない核内オーファンレセプター群の中には構成的な転写抑制能により標的遺伝子の発現を制御するレセプターが知られている。このような構成的転写抑制型核内レセプターは、NCoRやSMRTといったコリプレッサーがそのCoRNR motifを介して直接核内レセプターに結合することで転写抑制される。この転写抑制は、NCoR/SMRTが会合するヒストン脱アセチル化酵素HDACの活性に

より発揮される。即ち NCoR/SMRT は細胞内の生理条件により Sin3A、HDAC1/2、HDAC3、TBL1 などの構成因子群が様々な組み合わせにより複合体を形成する。

1-2 本研究の目的

このように PNR の視細胞増殖制御能も標的遺伝子の転写抑制を介して発揮されていると考えられるが、PNR の標的遺伝子群は未知であり、更に転写抑制機構も不明であった。一方 NCoR もしくは SMRT による PNR の制御も推定はできるものの、NCoR/SMRT 欠損マウスや培養細胞の解析において視細胞の増殖・分化やそれらの機能必須性は観察されなかった。そのため、視細胞においては PNR の転写制御能を担う未知コリプレッサーの存在が予想された。そこで、PNR の転写抑制能を担うコリプレッサーを探索する目的で Yeast two-hybrid screening を行い、新規コリプレッサーの同定に成功した。更にその複合体を精製により同定し、機能について解析した。

第二章 新規転写共役因子 Dev-CoR の同定

2-1 Dev-CoR の同定・構造・発現

Yeast two-hybrid screening の結果、新規の PNR 相互作用因子を単離した。この因子は 1194 アミノ酸から構成され、C 末端側にファミリー間で保存された Devh-box motif を持つことから、Dev-CoR と名付けた。Dev-CoR の N 末端側には CoRNR motif が存在した。実際、Dev-CoR の PNR に対する結合も、この CoRNR motif が必要であった。Dev-CoR の発現は、RT-PCR 法により様々な組織に見い出されたが、網膜組織における発現では、in-situ RT-PCR 法により、ONL に特異的であった。また、胚発生における眼球での Dev-CoR の発現は E12 から成体にかけて発現していることが明らかとなった。これは PNR の発現部位、時期と一致しており、Dev-CoR の発現は PNR と空間的、時間的に共存することが示唆された。

2-2 Dev-CoR の転写抑制制御能

PNR に対する Dev-CoR のコリプレッサーとしての機能を、Dev-CoR 自身の転写制御能についてレポーターアッセイにより調べた。その結果、Dev-CoR は PNR の転写を協調的に抑制しており、一方 CoRNR motif 欠失変異体は PNR の転写抑制に影響しないことから、CoRNR motif を介して転写抑制能を発揮していることが示された。また、Dev-CoR の N 末端側に強い転写抑制能があり、核抽出液からこの領域にリクルートされる因子群を免疫沈降し、HDAC アッセイをしたところ、HDAC 活性が見い出された。以上より、Dev-CoR は PNR のコリプレッサーであり、HDAC を含んだ複合体を形成することが示唆された。

第三章 Dev-CoR 複合体の同定

PNR の Dev-CoR 複合体機能の解明を目的に、Dev-CoR 高発現 293F 細胞株を樹立し、その核抽出液から Dev-CoR を含む複合体を精製した。グリセロール密度勾配遠心法により分画したところ、約 1MDa の巨大複合体の存在が見い出され、この複合体には Dev-CoR を含め 15 種のタンパク質から構成されていた。MALDI-TOF-MS もしくはウェスタンブロッティングにより同定したところ、新規コリプレッサー複合体であることが明らかとなった。この複合体は、HDAC1/2 や HDAC3、NCoR/SMRT、Sin3A、RbAp46/48、TBL3 といった核内レセプターに関連した既知コリプレッサーに加え、p107 や RBBP2、RAP140、ING1、CDK9、Myb-binding protein1A といった細胞周期関連因子ならびに約 200KDa の未同定タンパク質を含む新規複合体であることが判明した。

第四章 Dev-CoR の細胞増殖制御の解析

PNR のコリプレッサーである Dev-CoR の複合体中に細胞周期関連因子である p107 などを同定し、PNR が RPCs の増殖抑制を誘導することから、Dev-CoR 複合体は PNR の転写制御を介した細胞増殖抑制制御能を担うことが予想された。そこで、Dev-CoR 自体の生理学的機能を解明するために、以下の実験を行った。まず、colony formation assay により Dev-CoR の細胞増殖能につき検討したところ、細胞増殖を抑制する因子であることが示唆された。次に FACS 解析から、Dev-CoR 高発現細胞は G0/G1 期に停止している細胞の率が高まることが示唆された。M 期同調培養後の G1/S 移行期のマーカーである CyclinE の発現も Dev-CoR 高発現細胞で遅延することが明らかとなった。また、Dev-CoR タンパク質の発現自体も G1 前期にピークがあり、G1 前期の増殖制御因子であることが強く示された。これらの結果から、PNR の転写制御を介した RPCs の増殖抑制の制御においても、Rb/p107/HDAC 及び Myb 関連因子を含んだ Dev-CoR 複合体が寄与していることが示唆された。

第五章 総合討論

本研究では、PNR の転写抑制機構を解明することを目的にコリプレッサーを探索し、新規コリプレッサー Dev-CoR を同定、単離した。更に Dev-CoR 複合体の精製により、Dev-CoR 複合体には HDAC や SMRT といった既知コリプレッサー群に加え、細胞周期制御因子群を含む抑制複合体であることを明らかにした。また、実際 G1 期の制御に Dev-CoR が関連していること示した。そこで、本項では PNR が担う視細胞増殖制御能における、Dev-CoR 複合体及びその構成因子群による制御機構に関し議論する。

5-1 Dev-CoR 複合体による Rb/p107 経路の制御

Dev-CoR 複合体の構成因子であることが明らかとなった p107 は、Rb ファミリータンパク質の一つである。Rb/p107 は G1 前期に転写因子 E2F に結合し、HDAC 複合体を形成して標的遺伝子である関連因子の転写を抑制することが知られている。実際 Rb ヘテロ p107 ホモ欠損マウスでは網膜に損傷の顕在化が観察されており、RPCs の増殖抑制の消失によると考えられる。また、E2F1 の網膜におけるトランスジェニックマウスも RPCs の過剰増殖が観察されている。これらマウスの表現型はすべて PNR 欠損マウスの神経網膜における RPCs の過剰増殖による表現型と酷似していた。これらの事実は PNR と Rb/p107 が遺伝的相互作用があることを意味しており、本研究第 3 章において Dev-CoR コリプレッサー複合体中に p107 および Rb 関連因子である RBBP2、RAP140 が存在することを支持するものである。ゆえに PNR は RPCs の増殖制御において、Dev-CoR 複合体を介し、E2F と協調して G1/S 期関連標的遺伝子の転写を抑制制御することが考えられた。

5-2 Dev-CoR 複合体による Myb 経路の制御

本研究第 3 章において Dev-CoR 複合体構成因子として見いだした NCoR/SMRT、CDK9、Myb-binding protein1A は転写因子 Myb のコリプレッサーとして機能することが知られている。Myb は原癌遺伝子であり、未分化細胞で高発現するが分化の進行に伴い活性が消失することが知られている。発生期の神経網膜においても Myb は発現することから、RPCs の増殖に関連すると考えられる。ゆえに PNR は RPCs の増殖制御において、Dev-CoR 複合体を介して E2F 同様に Myb に対しても協調して標的遺伝子の転写を抑制制御することが示唆された。

5-3 総括と今後の展望

以上のように、Dev-CoR は G1 期制御因子群と複合体を形成することに加え、本研究第 4 章より、Dev-CoR が G1 前期にのみタンパク質として存在することが示唆された。ゆえに、Dev-CoR は G1 前期特異的な PNR のコリプレッサーであると考えられる。核内レセプターの細胞周期依存性転写共役因子は、Dev-CoR が初めての例である。また、PNR と Dev-CoR 複合体が制御する標的遺伝子は、前記のように E2F や Myb によっても制御されており、かつ視細胞増殖制御に関連すると示唆される。ゆえに候補因子として CyclinD1、CyclinT1、E2F1 などが挙げられ、今後これらのプロモーター解析によりその発現制御が明らかになると期待される。一方 PNR の視細胞増殖制御における Dev-CoR の必須性は、Dev-CoR の遺伝子欠損マウスの作成及び解析により将来明らかになると考えられる。このように、PNR は RPCs が増殖能を失う時期に発現し、その際 Dev-CoR 複合体を介して RPCs を G1 期に停止させ分化を促すモデルが想定され、神経網膜発生の分子制御機構の一端を本研究は示唆している。