

論文の内容の要旨

論文題目

マウス S-II と相互作用する新規転写活性化因子 FESTA の同定と解析

氏名

佐相 薫葉子

S-II はエールリッヒ腹水癌細胞の RNA ポリメラーゼ II の転写活性を促進する因子として、精製された転写促進因子で、*in vitro* で RNA polymerase II に直接結合する。また、RNA ポリメラーゼ II を活性化し、転写中断を解除することから、主に転写の伸長段階で働く、転写伸長因子であると考えられている。

S-II の最も興味深い特徴の一つとして、すべての臓器に発現する S-II の他に、特定の臓器にだけ発現する組織特異的な S-II が存在することがあげられ、これまでに精母細胞特異的に発現する SII-T1 と、腎臓や肝臓などに特異的に発現する SII-K1 が単離されている。各 S-II は約 300 のアミノ酸からなり、大きく 3 つのドメインに分けて考えられる。

1 つ目は C 末端側の領域で、S-II サブタイプ、あるいは種を越えてもよく保存された一次配列を持つ転写促進活性に必要不可欠な領域。2 つ目は N 末端側の領域で、やはり種を越えて保存された領域が含まれる。3 つ目は、上記の二つの領域に挟まれる中間部の領域である。

これまでに N 末端側の保存領域を含む領域が、ホロ酵素と結合することが報告されている。また中間部の領域は、サブタイプ間で相同性が低い領域であることから、組織特異的な遺伝子発現の調節に働くドメインではないかと考えており、実際に、組織特異的転写因

子である Hox B9 と Hox D9 がこの領域と結合することを私は見出している。

以上の S-II の各ドメインに関する知見、および、S-II を欠損する酵母や ES 細胞が通常条件下で増殖可能であるが、特異な条件下で致死になるという知見から、生体内で S-II は特異的遺伝子の転写制御に必要とされる因子ではないかと考え、以下に報告する研究を行った。

1. S-II の相互作用因子 FESTA の単離

S-II の N 末端側領域を bait として、Yeast two-hybrid 法により、マウス腎臓 cDNA ライブラリーから相互作用因子を検索した。

β -galactosidase 活性を有するコロニーとして同定した結合陽性のコロニーから、ライブラリー由来プラスミドを抽出し、cDNA の塩基配列を解析した結果、結合陽性のクローンのうち独立な二つのクローンが機能未知の同一の新規因子をコードすることが判明した。これらを clone 1 および、clone 2 とした。Clone 1 には 177 アミノ酸、clone 2 には 156 アミノ酸をコードする ORF が含まれていた。また、これら二つの cDNA クローンは、ORF の 3' 側に翻訳終止コドンおよび poly A 付加シグナルを含んでいた。この因子を FESTA と名付けた。

FESTA の mRNA のサイズおよび発現臓器を知る目的で、clone 1 と clone 2 で共通な部分の塩基配列をプローブとして、マウスの各組織から抽出した RNA を用いて Northern Blot 解析を行った。その結果、腎臓特異的に 1Kb のサイズのバンドが検出された。また、脾臓にも 1.4Kb のサイズのバンドが検出された。このことから、腎臓および、脾臓特異的に発現するアイソフォームがあると考えている。

Clone 1 の 5' 側上流にさらに塩基配列がづく可能性を考え、RACE 法による cDNA の単離を試みたが、clone 1 よりも上流の配列は得られなかった。このことから、clone 1 は FESTA の mRNA の全長であり、読み枠最初のメチオニンから終止コドンまでの 132 アミノ酸が FESTA 蛋白の全長であると考えられた。

しかしながら、EST クローンのデータベースから検索から、clone 1,2 とは異なる 5' 側末端側配列を持つクローンが見出された。このクローンは FESTA 遺伝子を構成する 7 つの exon のうち 4 以外を全て含み、clone 1 と同じ読み枠で翻訳され、C 末端側の 131 アミノ酸配列においては clone 1 と一致するような 262 アミノ酸からなる蛋白をコードしていた。この長いクローンからの産物を FESTA-L とした。また、このような 5' 側末端側配列を持つクローンで exon 4 をもつクローンは見出されなかった。Genomic southern blot 解析から FESTA は単一遺伝子であることが判明しており、これらの異なる 5' 末端側配列を持つクローンは、それぞれ、単一遺伝子から生じたアイソフォームであり、それ

それぞれのクローンから大きさの異なる蛋白が発現されている可能性を考えている。

2. FESTA の C 末端酸性領域は S-II との結合に必要である

S-II との結合に必要な FESTA の領域を知るため、また、スクリーニングでは得られなかった FESTA-L が S-II と結合するか否かを知る目的で、N 末端側領域や C 末端酸性領域を欠損した FESTA の部分欠損変異体を作製し、GST 融合 S-II との結合の有無を GST pull-down assay により解析した。大腸菌に発現させ、精製した GST-SII 蛋白と *in vitro* 転写・翻訳により合成して放射標識した FESTA の各コンストラクトをそれぞれ試験管内で混合した。GST を結合する beads を用いて GST-S-II 蛋白とそれに結合する蛋白を沈降した。沈降物を電気泳動により分離、放射活性を検出し、各 FESTA が沈降されたか否かを解析した。その結果、FESTA-L、FESTA-S および FESTA ΔN は beads による沈降物中に検出されたが、FESTA ΔNC は検出されなかった。したがって、FESTA ΔNC が欠損する C 末端領域が結合に必要であると結論した。

3. FESTA の転写活性化能の解析

FESTA が転写因子である S-II に結合すること、さらにある種の転写活性化因子に特徴的な領域を持つことから FESTA も転写因子として機能する可能性が考えられた。そこで、転写活性化能を有するか否かを解析する目的で、FESTA と GAL4 DNA 結合ドメインの融合蛋白、および、GAL4 の結合配列を転写制御領域にもつルシフェラーゼ遺伝子をレポーター遺伝子としてレポーターアッセイを行った。GAL4 の結合配列をもつ reporter vector である pG5Luc と FESTA-GAL4 融合蛋白発現ベクターの両者を NIH3T3 細胞に導入したところ、GAL4 の DNA 結合ドメインのみを発現する mock vector を導入した場合に比べ、約 20 倍までルシフェラーゼの活性が上昇した。また、GAL4 の結合配列を除いた pLuc を reporter vector として導入した場合には、このような活性の上昇は見られなかった。以上の結果は、GAL4 への FESTA の融合依存にレポーター遺伝子の発現が上昇したことを示し、FESTA が転写活性化能を示したと考えられる。

4. FESTA の転写活性化ドメインの解析

FESTA の転写活性化能をになう領域を同定する目的で、FESTA-L、FESTA-S、FESTA ΔN および FESTA ΔNC のコンストラクトを作製し、各コンストラクトの転写活性化能を解析した。その結果、FESTA-L は mock vector に比べて約 5 倍、FESTA および FESTA ΔN では約 20 倍にまでルシフェラーゼの活性を上昇させた。FESTA ΔNC は約 5 倍上昇させた。

これらの結果は、FESTA のセリンに富む領域から C 末端にわたる領域が転写活性化ドメインであることを示している。さらに、FESTA Δ NC のように C 末端領域を欠損した場合、FESTA および FESTA Δ N に比べ転写活性化能が大きく低下した。このことから、FESTA C 末端領域は高いレベルの転写活性化に必要であると考えられる。また、FESTA-S に比べて FESTA-L の活性化能が低かった。これについて、NIH3T3 細胞において、FESTA-L に特異的な領域を介した、活性制御機構が存在するという可能性を考えている。

5. S-II 欠損 ES 細胞を用いた FESTA の転写活性化能の解析

以上の結果から、FESTA の C 末端領域が S-II との結合、および、高いレベルの転写活性化に必要であることが判明した。そこで、FESTA による高いレベルの転写活性化には、S-II との相互作用が必要であるという可能性について検証するため、S-II を欠損する細胞では正常の細胞に比べて、FESTA の転写活性化能が低下するか否かを解析した。

正常 ES 細胞および、S-II 欠損 ES 細胞に、GAL4 融合 FESTA の発現ベクターとレポーターベクターを導入し、ルシフェラーゼアッセイを行った。その結果、正常 ES 細胞と S-II 遺伝子を欠損 ES 細胞それぞれに、空ベクターのみを導入した場合のルシフェラーゼ活性を 1 として、FESTA Δ N の転写活性化能を算出した結果、S-II と相互作用する FESTA Δ N の転写活性能は野生型細胞に比べ、約 2/3 に減少した。この結果は、S-II 欠損により、FESTA の転写活性化能が低下することを示唆し、FESTA の高いレベルの転写活性化能の発現には、S-II との相互作用が必要であるという仮説を支持するものである。

本研究において私は、腎臓と脾臓において発現する新規転写活性化因子 FESTA を同定した。さらに、FESTA による転写活性化には、FESTA と S-II との相互作用が必要であることを示唆した。これらの結果は、S-II が他の転写因子の転写活性化ドメインと直接相互作用することにより、転写活性化に寄与することを示した初めての例である。