

論文の内容の要旨

論文題目 Transcriptional regulation of the *c-jun* gene by AP-1 repressor protein JDP2 during the differentiation of F9 cells
(AP-1 リプレッサー JDP2 による胚性腫瘍細胞 F9 の分化制御機構の解析)

氏 名 Jin Chunyuan (金春元)

マウス F9 細胞は胎児性癌由来の胚性腫瘍細胞株(EC)であり、レチノイン酸(RA)やアデノウイルス初期遺伝子 E1A によって内胚葉系列(始原、壁側、臓側内胚葉)細胞へ分化誘導することから、発生、分化の機構や発生、分化における RA の作用機序を分子レベルで解析するうえでの格好のモデル実験系として広く繁用されている。

発癌遺伝子 *c-jun* は未分化 F9 細胞ではほとんど発現していないが、RA による分化誘導と共にその発現はスーパーインダクションされる。また、*c-jun* 遺伝子の発現ベクターを F9 細胞に遺伝子導入すると RA による分化と同様な分化が誘導されることから、F9 細胞の分化過程で *c-jun* 遺伝子の高発現が直接、細胞分化の誘導に寄与していると想定されている。細胞分化に伴う *c-jun* 発現の誘導は転写レベルで調節されており、我々はその遺伝子の 5'-上流域に RA やアデノウイルス E1A による細胞分化に伴って活性化される配列 DRE (differentiation response element) を同定した。さらに、我々はこの DRE 配列に結合する DRF (differentiation regulatory factor) 複合体を同定し、しかもその複合体中には E1A 結合蛋白質 p300 と転写因子 ATF-2 (activating transcriptional factor-2) が含まれることを見出した。また、RA による *c-jun* のトランス活性化、F9

細胞の分化誘導には p300 と ATF-2 の会合と相互作用が重要であることも明らかにして来た。

しかし、p300/ATF-2 による *c-jun* 遺伝子の転写活性化の度合いが RA 処理によるものに比べると弱いこと、また、UV クロスリンキングの実験結果から、DRF 複合体中には ATF-2 と p300 以外の因子が存在する可能性が指摘された。そこで我々は DRF 複合体中未知のコンポーネントを同定し、RA による *c-jun* の転写活性化と細胞の分化誘導機構の詳細な解明を目的として以下の研究を行った。

我々は ATF-2 結合蛋白質を Yeast-two hybrid screen 法により探索し、JDP2 (Jun dimerization protein 2) を ATF-2 の新たな結合蛋白質として同定した。そして 5'-RACE (rapid amplification of cDNA ends) 法との併用によりマウス JDP2 の全長 cDNA をクローニングした。塩基配列解析から、マウス JDP2 は 1.5-kb の遺伝子転写構造を有し、163 アミノ酸に相当する 489 bp の翻訳領域 (open reading frame; ORF) が含まれ、C 末側には塩基性アミノ酸 Zipper ドメイン(b-Zip)を有することが判明した。

マウス各組織と各発生初期段階の胚から抽出した RNA を用い、JDP2 cDNA をプローブとしてノーザンブロット法で調べた結果、JDP2 はほとんどのマウスの組織で各々異なるレベルで発現し、また発生と共にその発現量が徐々に増加していく事が明らかとなった。蛋白質間相互作用の解析により、JDP2 と ATF-2 はそれぞれの b-Zip ドメインを介して結合することが *in vivo* と *in vitro* の実験で確認された。また、核酸-蛋白質間相互作用の解析 (ゲルシフト解析) により、JDP2 がホモ二量体あるいは ATF-2 とのヘテロ二量体で cAMP 応答配列 (cAMP responsive element; CRE) に結合すること、プロモーター活性の測定から JDP2 が ATF-2 によって CRE 依存的な転写を抑制することを見出した。以上の結果より JDP2 は ATF-2 の新規リプレッサーであって、Jun/Fos/ATF-2 に関わるすべての遺伝子ファミリーの転写を抑制する普遍的リプレッサーである可能性が示唆された。

ATF-2 が DRF 複合体の構成成分の一つの因子であって、*c-jun* 遺伝子の転写の活性化に必要であると言うことは、JDP2 も ATF-2 の新規リプレッサーとして *c-jun* 遺伝子の転写制御に関わる可能性が推測される。また、JDP2 が AP-1 の普遍的リプレッサーであることは、AP-1 が関与している分化を始めとした細胞の増殖、発生、癌化などすべての過程に JDP2 が関わる可能性も容易に想像される。そこで我々は RA による *c-jun* 遺伝子の転写活性化と細胞の分化誘導にお

ける JDP2 の役割について検討した。

DRE をプローブとしたゲルシフト解析の結果では、JDP2 抗体添加により DNA-蛋白質複合体のスーパーシフトが観察されたことから、DRF 複合体中には JDP2 分子が含まれることが示唆された。同じゲルシフト解析により、JDP2 が DRE に直接に結合することも確認された。また、DRE を含むプロモーターを用いた転写活性化実験では JDP2 が p300 と ATF-2 による転写活性化を抑制することから、JDP2 は DRF 複合体中の抑制的構成成分であることが示唆された。JDP2 を恒常的に強制発現させた細胞を用いた *c-jun* 遺伝子のプロモーター活性の測定実験では、JDP2 は ATF-2/p300 による *c-jun* のトランス活性化のみならず、RA による F9 細胞の分化誘導をも抑制した。以上の結果は、JDP2 が細胞分化に強く関与していることを示唆している。

一方、JDP2 の作用機構を調べるために、JDP2 と転写抑制に深く関わっていると知られているヒストン脱アセチル化酵素(HDAC)との関係を検討した。プロモーター活性測定及びヒストン脱アセチル化酵素の活性測定実験の結果より、JDP2 の抑制作用は HDAC の阻害剤である TSA (trichostatin) を添加することによって消失し、JDP2 の免疫沈降物複合体が HDAC 活性を有するから、JDP2 の抑制機構は HDAC 依存的であることが推定される。また、ゲルシフト解析、免疫沈降-ウエスタンブロット法により、JDP2 が特異的に HDAC3 と結合し、DRF 複合体中で JDP2/HDAC3 複合体を構成することが観察された。プロモーター活性測定では、JDP2 の抑制作用が HDAC3 を加えることによって更に増強されることから、JDP2 は HDAC3 依存的に抑制機能を発揮すると推測される。

F9 細胞の RA による分化誘導における JDP2 の役割を更に詳細に解析するために、我々は未分化 F9 細胞を RA で 24 時間処理し、JDP2 の DRE への結合能力、HDAC3 との会合、そして DRE を含むクロマチン上のアセチル化状態などの動的変化に関して、クロマチン免疫沈降実験等を用いて解析を行った。その結果、RA 処理によって JDP2、HDAC3 の DRE に対する結合活性と JDP2、HDAC3 間の会合能力は減少し、逆に、p300 と ATF-2 の DRE への結合能力は増加することが明かとなった。また、JDP2/HDAC3 複合体が ATF-2/p300 複合体によって DRE 上で RA 刺激依存的に置換されるに伴って、DRE を含むヒストンのアセチル化状態も脱アセチル化からアセチル化へ変化することが示唆された。

本研究においては、マウス JDP2 の全長 cDNA をクローニングし、JDP2 を ATF-2 の新規リプレッサーとして同定した。同じ b-Zip ファミリーでありながら、他

の多くの b-Zip 蛋白質ファミリーの転写能を抑制するということは大変興味深い。本研究より、JDP2 は特異的に HDAC3 複合体をプロモーター領域にリクルートすることによって、その抑制機能を発揮することを初めて明かにした。JDP2 の各組織と胚での発現研究からは、JDP2 はマウスの発生、分化そして組織、器官の正常機能と密接に関与していることが推測される。

前述のように *c-jun* 遺伝子の発現が未分化 F9 細胞でどの様に抑制されていて、RA 処理によってどの様にすみやかに活性化されるのかについては未だ明らかにされていない。本研究より一つの仮説として F9 細胞の未分化状態では脱アセチル化酵素である HDAC3 が JDP2 により *c-jun* プロモーター上にリクルートされ、この領域のヒストンが脱アセチル化状態になってクロマチンを凝縮させ、*c-jun* 遺伝子の発現が阻害される可能性が考えられる。そこに RA 刺激が加わると、JDP2/HDAC3 複合体がアセチル化酵素である p300 複合体に切り替わることで、ヒストンのアセチル化状態が脱アセチル化からアセチル化へ動的变化をする事により、*c-jun* 遺伝子の転写開始と活性化、そして F9 細胞の分化誘導が ON になると推定される。この仮説から、プロモーター上のヒストンのアセチル化状態が F9 細胞の分化決定にいかに重要であるかも示唆される。ヒストン脱アセチル化酵素の阻害剤である TSA によって F9 細胞が分化誘導されることもこの作業仮説と一致している。

本研究により、JDP2 が RA による F9 細胞の分化決定の中の鍵を握る一つの因子であること、AP-1 リプレッサーの新しい転写レベルでの遺伝子発現抑制機構が明らかになった。