

審査の結果の要旨

氏名 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細胞へ分化誘導される。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* 遺伝子の高発現が細胞分化の誘導に直接寄与していると想定されている。所属研究室では、*c-jun* 遺伝子の 5'-上流域に RA や E1A による細胞分化に伴って活性化される配列 DRE (differentiation response element) とそこに結合する 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ことを報告している。また、RA による *c-jun* 遺伝子のトランス活性化、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、更に DRF 複合体中に、未知のコンポーネントを同定している。本論文では、RA による *c-jun* 遺伝子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ことを報告している。

まず、本論文では、ATF-2 結合蛋白質を用いた Yeast-two hybrid screen により、JDP2 (Jun dimerization protein 2) を ATF-2 の新たな結合蛋白質として同定し、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)を有することを明らかにした。次に、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、各々異なるレベルではあるものの、JDP2 はほとんどのマウスの組織で発現し、また発生と共に、その発現量が徐々に増加していくことも明らかにした。更に、蛋白質間相互作用に関する *in vivo* と *in vitro* の実験で、JDP2 と ATF-2 がそれぞれの b-Zip ドメインを介して結合することを確認し、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。

次に、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を加えている。DRE をプローブとしたゲルシフト解析の結果では、抗 JDP2 抗体添加により、特異抗体-DNA-蛋白質複合体のスーパーシフトが観察されることによって、DRF 複合体中には JDP2 分子が含まれることを示し、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を確認している。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を示し、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* 遺伝子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ことを示している。一方、JDP2 の抑制作用は、ヒストン脱アセチル化酵素 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 活性を有することから、JDP2 の抑制機構は HDAC 依存的であることを推定し、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を観察している。また、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を明らかにした。更に、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が低アセチル化状態から高アセチル化状態へ変化することも示した。

以上、本論文は、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、更に JDP2 が特異的に HDAC3 複合体を *c-jun* 遺伝子の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らかにした。また、F9 細胞の未分化状態では、JDP2 により、*c-jun* 遺伝子のプロモーター上に脱アセチル化酵素である HDAC3 がリクルートされ、その結果として、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を示した。更に、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が低アセチル化状態から高アセチル化状態へと動的変化することにより、*c-jun* 遺伝子からの転写開始反応と活性化を通して、F9 細胞の分化誘導が ON になるモデルが推定できると考えられる。

これらの成果は、分化、癌化における遺伝子発現制御機構の一端を明らかにする意欲的なものであり、生物学の基本的な仕組みを基にした医薬品化学にも貢献すると考えられる。したがって、本論文は博士（薬学）の学位に値するものと判定した。