

論文の内容の要旨

論文の題目 : Analysis of novel mammalian BBF2
like transcription factors

新規哺乳類 BBF2 様転写因子の解析

氏名 大森義裕

生体内では、個別の臓器の特徴をつくりあげるために、それぞれの組織に特異的な遺伝子セットを発現している。これら組織特異的な発現をする遺伝子のプロモーター領域には、それぞれの組織に特有なエレメントが存在する。このエレメントに組織特異的転写因子が結合することによって、組織特異的遺伝子の発現は制御されている。私は組織特異的転写因子に興味をもち、新規な組織特異的転写因子を単離、解析することを試みた。

オリゴキャップ法により作製した完全長 cDNA ライブラリをランダムシーケンスすることにより構築されたデータベースに対し、ホモロジー検索を行い、いくつかの新規転写因子を単離した。この中から RT-PCR による解析を行い、肝臓特異的な発現をする新規転写因子 CREB-H (CREB-Hepatocyte)を見出した。CREB-H は basic-leucine zipper(b-Zip)ドメインをもつ転写因子であり、この b-Zip ドメインは CREB /ATF ファミリーの転写因子群の中でも特にハエの BBF2 に対し高いホモロジーを示した。

ハエのアルコールデヒドロゲナーゼ (ADH) は、脂肪体と呼ばれる組織に特異的に発現する酵素であり、その組織特異的発現は ADH 遺伝子のプロモーター上に存在する Box-B 配列に依存する。Box-B 配列に結合する因子として転写因子 BBF2 (Box-B binding factor2) が単離され、BBF2 がハエの脂肪体特異的な遺伝子の発現を制御することが示唆

された。

これまでにハエ **BBF2** と相同性のある哺乳類の転写因子は **OASIS**, **LZIP** が知られている。**CREB-H**、**OASIS**、**LZIP** の相同性を他の **CREB/ATF** ファミリーの転写因子と比較したところ、これら 3 つの転写因子は、**CREB/ATF** ファミリーの転写因子の中でも特に相同性が高くサブファミリー（哺乳類 **BBF2** 様転写因子ファミリー）を形成すると考えられた。

CREB ファミリーの転写因子には、転写を活性化するものと、抑制するものがある。**CREB-H** に転写活性化能があるかどうかを調べるため、**GAL4** の DNA 結合ドメインと **CREB-H** の融合タンパクを作製し、ルシフェラーゼをレポーターとして転写活性化能の測定をおこなった。その結果、**CREB-H** は N 末部分に転写活性化能をもつ転写活性化因子であることがわかった。また、**CREB-H** と **GST** の融合タンパクを作製しゲルシフトアッセイで測定した結果、**CREB-H** は、**CRE** や **Box-B** エlementに結合能をもつことがわかった。

CREB-H は、**CREB/ATF** に相同性が高いこと、また、**CRE** に結合能をもつことから、**CREB-H** は **CRE** を介した転写活性化能をもつことが予想された。そこで、**CRE** を含むルシフェラーゼ発現ベクターを用いて **CREB-H** の転写活性化能を測定した。しかし、意外なことに、ルシフェラーゼの転写活性化は見られなかった。**CREB-H** に相同性の高い **BBF2** は **Box-B** エlementを介して転写を活性化する。そこで **CREB-H** が、**Box-B** エlementを介して転写を活性化するかどうかを調べた。**Box-B** エlementを含むルシフェラーゼ発現ベクターを用い **CREB-H** の転写活性化能を測定したところ、レポーター遺伝子の著しい転写活性化が見られた。

CREB-H やハエ **BBF2** に相同性をもつ哺乳類の転写因子 **OASIS** (Old Astrocyte Specifically-Induced Substance) は、マウスのアストロサイトのグリオーシスモデルにおいて、発現が上昇する遺伝子として発見された。**OASIS** の転写因子としての機能解析はこれまでに報告がない。我々は、**CREB-H** と **OASIS** の機能を比較するため、**OASIS** の機能解析を行なった。まず、マウス **OASIS** のヒトカウンターパートの単離を行い、以後の実験に用いた。組織での発現を解析したところ、ヒト **OASIS** の発現は、組織特異性が見られ、すい臓、前立腺で特に強い発現が見られた。**GAL4** の DNA 結合ドメインと **OASIS** の融合タンパクを作製し、レポーターの発現を測定した。その結果、**OASIS** は転写活性化ドメインを N 末の 60 アミノ酸にもつ転写活性化因子であることがわかった。次に、**GST** との融合タンパクを作製し、ゲルシフトアッセイにより **OASIS** の DNA 結合能を調べた。**OASIS** は単独で **CRE** 様の配列に結合することができた。次に、**Box-B** エlementを含むルシフェラーゼ発現ベクターを用いて、**OASIS** の転写活性化能を測定した。**OASIS** は、**CREB-H** と同様に **Box-B** エlementを介してレポーター遺伝子の転写を活性化した。さらに、**Box-B** 以外の **CRE** 様配列を介しての転写活性化能を測定した。**CREB-H** と同様に、ソマトスタチン **CRE** を介しての転写活性化能は低かった。また、**ATF6** 配列を介する活性化能は **CREB-H**

よりも低いことがわかった。

CREB-H と OASIS に対するアミノ酸配列解析を行なったところ、CREB-H と OASIS の両方において、b-Zip ドメインより C 末側に膜貫通ドメインと予測される疎水性アミノ酸に富むドメインを見出した。これまでに、膜貫通ドメインを持つ転写因子は SREBP と ATF6 が知られている。これらは、膜結合型転写因子と呼ばれ、膜貫通ドメインを介して、細胞内の膜にアンカーしており、様々な刺激により、膜貫通ドメインがプロテアーゼによって切断を受け、膜から遊離し、核へ輸送され転写を調節する。この機構は Rip(Regulated Intramembrane Proteolysis)と呼ばれている。

そこで、CREB-H と OASIS に存在する疎水性ドメインの転写活性化に与える影響を調べた。まず、CREB-H の完全長型と、CREB-H の疎水性ドメインを削除した発現ベクターを、それぞれ、Box-B エlementを含むレポータープラスミドとともにトランスフェクションを行なった。その結果、疎水性ドメインを削除した CREB-H は完全長型の CREB-H に比較して、著しく活性化能の亢進が見られた。次に CREB-H に対し蛍光抗体による免疫染色を行いこれらの細胞内局在を調べた。完全長型の CREB-H は、小胞体に局在しており、疎水性ドメインを削除した CREB-H は核に局在することがわかった。

次に、OASIS の疎水性ドメインの有無による転写活性化への影響を調べた。疎水性ドメインを削除した OASIS は、完全長の OASIS に比較して Box-B 配列を介した転写活性化が約 2 倍亢進した。CREB-H と比較すると、活性化の亢進の度合いは低かった。このときの細胞内局在を調べたところ、完全長の OASIS は、細胞内で主に小胞体に局在しているのに対し、疎水性ドメインを削除した OASIS は、核に局在することがわかった。

また、ウエスタンブロッティングにより、発現産物の分子量を測定したところ、CREB-H と OASIS の両方で完全長と思われる高分子量のタンパクと、膜貫通部位を欠くと予測される低分子量のタンパクが見られた。

これらのことから、疎水性ドメインが転写活性化や細胞内局在に重要な役割を果たすことがわかった。CREB-H や OASIS の疎水性ドメインが膜貫通ドメインとして細胞内の膜構造と相互作用しており、これらの因子は小胞体膜に存在し、何らかの刺激を受け、プロテアーゼにより疎水性ドメインが切断され、核に移行し Box-B を介した転写活性化を行なうという可能性が考えられる。このように CREB-H や OASIS の転写活性化機構には Rip が関与している可能性が示唆される。哺乳類 BBF2 様転写因子は、SREBP ファミリー、ATF 6 ファミリーに次ぐ、第 3 の膜結合型転写因子ファミリーを形成していると考えられる。

以上の結果から、哺乳類 BBF 2 様転写因子、CREB-H と OASIS は、構造的に相同性があるばかりでなく、転写因子としての機能にも、いくつかの共通した特長をもつことがわかる。CREB-H と OASIS は、ともに、転写活性化因子であり、CRE 様 Element に結

合能をもつ。また、典型的な CRE であるソマトスタチン CRE を介しての活性化能は低いが、Box-B エlementを介して転写を著しく活性化する。さらに、転写活性化には、疎水性ドメインが重要な役割を果たす。これらのことから、哺乳類 BBF 2 様転写因子は、CREB/ATF ファミリーの中でも、機能的に特に近い性質をもつサブファミリーであると考えられる。

また、CREB-H と OASIS は、いくつかの異なる特徴も持つ。CREB-H は肝臓で優位に発現しており、OASIS は、すい臓と前立腺で強い発現をしているが、肝臓での発現は見られない。さらに、CREB-H と OASIS は、ともに、Box-B エlementを介して著しい転写活性化能を持つが、ATF 6 エlementに対しては、転写活性化能が異なる。Box-B 様のElementは、哺乳類の組織特異的遺伝子上流にもいくつか見出されていることから、CREB-H と OASIS は、Box-B 様のElementを介して、それぞれの発現する組織において組織特異的な遺伝子の活性化に関与している可能性が示唆された。