

審査の結果の要旨

氏名 大森義裕

本研究は新規哺乳類 BBF2 様転写因子である CREB-H と OASIS の転写因子としての機能を明らかにするため、組織における発現解析、DNA 結合能解析、転写活性化能解析、細胞内局在解析を試みたものであり、下記の結果を得ている。

1. オリゴキャップ法により作製した 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から、新規な肝臓特異的発現を示す転写因子 CREB-H を同定した。CREB-H は basic-zipper (b-Zip) ドメインをもち、その配列がハエの Box-B Binding Factor-2 (BBF2) と高い相同性を示すことが示された。
2. CREB-H と GAL4 の DNA 結合ドメインの融合タンパクを作製し、レポーターアッセイによる CREB-H の転写活性化能を測定したところ、CREB-H は転写活性化能をもつ転写活性化因子であり、N 末端側の 149 アミノ酸に転写活性化ドメインが存在することが示された。
3. CREB-H の GST 融合タンパクを作製し、ゲルシフトアッセイにより DNA 結合能を測定した結果、CREB-H は CRE や Box-B エlement に直接結合能をもつことが示された。Box-B エlement をプロモーターに含むレポーターベクターを用いて、レポーターアッセイを行なったところ、CREB-H との共発現により、レポーター遺伝子の転写活性化がみられ、CREB-H が Box-B エlement を介して、転写活性化することが示された。
4. ホモロジー検索により、CREB-H と相同性の高い転写因子 OASIS を見出し、ヒト OASIS のクローニングを行なった。ノザンブロットィングにより、組織の発現を解析したところ、OASIS は膵臓や前立腺で高レベルに発現していることが示された。
5. OASIS と GAL4 の DNA 結合ドメインの融合タンパクを作製し、レポーターアッセイにより転写活性化能を測定したところ、OASIS は N 末の 60 アミノ酸に転写活性化ドメインを含む転写活性化因子であることが示された。また、OASIS の GST 融合タンパクを作製し、ゲルシフトアッセイを行なったところ、OASIS は CRE や Box-B エlement に結合能を持つことが示された。Box-B エlement を含むレポーターベクターを用いて、レポーターアッセイを行なったところ、OASIS は Box-B エlement を介して転写活性化することが示された。

6. CREB-H と OASIS に対して、アミノ酸配列解析を行なったところ、CREB-H と OASIS の両方に共通して b-Zip ドメインより C 末側に膜貫通ドメインを見出した。膜貫通ドメインを削除した CREB-H や OASIS を作製し、レポーターアッセイを行なったところ、膜貫通ドメインを削除した CREB-H や OASIS では、完全長の CREB-H や OASIS よりも、転写活性化能が亢進することが示された。

7. 蛍光免疫染色により、細胞内の局在を調べたところ、膜貫通ドメインを削除した CREB-H や OASIS は、主に核に局在し、完全長の CREB-H や OASIS は主に小胞体に局在することが示された。膜結合型転写因子である CREB-H や OASIS は完全長のとき膜貫通ドメインを介して小胞体膜にアンカーしており、膜貫通ドメインの N 末端側がプロテアーゼなどにより切断され転写活性化する可能性が示唆された。

以上、本論文は新規に同定した哺乳類 BBF2 様転写因子 CREB-H と OASIS の解析からこれらの転写因子が Box-B エlement を介する転写活性化因子であり、膜貫通ドメインがその転写活性化制御機構に重要な役割をもつことを明らかにした。本研究はこれまで未知に等しかった、哺乳類 BBF2 様転写因子の機能と転写活性化機構の解明に重要な貢献をなすと考えられ、学位の授与に値するものと考えられる。