

論文の内容の要旨

論文題目 ホメオボックス遺伝子の活性制御因子マウス *Dlxin-1* の機能

氏名 増田 芳子

骨はカルシウム調節ホルモンやサイトカインの作用により、絶えず代謝を行なっている組織である。大部分の骨表面は不活性な骨芽細胞に覆われており(静止相)、ここに骨吸収促進因子が作用すると骨芽細胞が活性化され(活性化相)、情報伝達により破骨細胞を活性化する(吸収相)。その吸収窩に骨芽細胞が骨基質を分泌して(形成相)、骨代謝の周期が終了する。

骨芽細胞は間葉系幹細胞を由来とし、I型コラーゲン(COL1)、オステオカルシン(OCN)など骨基質となるタンパク質を分泌、石灰化する。骨芽細胞の分化には骨形成タンパク質(BMP)が重要であり、BMPは細胞内シグナル伝達を介して遺伝子の発現を制御する。BMPで発現制御される転写制御因子*Cbfa1*のノックアウトマウス(KO)には石灰化骨が無いことから、*Cbfa1*が骨芽細胞分化に必須の因子と思われたが、このマウスにも骨芽細胞の初期マーカーが発現すること、*in vitro*の実験で骨芽細胞の分化マーカー上昇後に*Cbfa1*が発現したことから、*Cbfa1*より早くBMPシグナルに応答する遺伝子が骨芽細胞への分化を決定するのではないかと考えた。そこで、BMPで発現が制御され、骨に発現する遺伝子を検索したところ、*Msx*、*Dlx*などホメオボックスをもつ転写制御因子がみ

つかった。ホメオボックスとはDNA結合性転写制御因子のDNA結合領域のモチーフで、ヘリックス-ターン-ヘリックス構造を持ち、DNAに直接結合する。転写制御因子はDNA結合領域、転写活性化領域、二量体形成領域など幾つかの領域で構成され、通常、転写制御因子はDNA結合領域により遺伝子の転写活性化領域の特定な塩基配列に結合する。この他にDNA非結合性の転写共役因子があり、これは転写制御因子、基本転写因子に直接、または転写共役因子を介して結合し、転写制御を行なっている。Dlx5は骨折治癒過程や骨格形成過程に発現し、OCNプロモーターに直接結合し、COL1、OCNなど骨芽細胞に発現するタンパク質を増産させる転写活性化因子である。一方で、Dlx5はOCNプロモーターを抑制して発現量を低下、Dlx5 KOマウスの骨芽細胞でOCNの発現が増大する結果も示されている。このように、Dlx5はOCNの発現に関して二面性をもつ転写制御因子であることから、骨芽細胞の分化を解明するためにはDlx5の作用機序を解明する必要があると考えた。

そこで、本研究では、骨芽細胞の分化に関与するホメオボックスタンパク質 Dlx5 の作用機序を解明することを目的として研究を開始し、Dlx5 に結合する新規遺伝子を得たので、この遺伝子がどのような機能を持つのか解析を行なうことにした。

まず、BMP 処理を行なった骨芽細胞様細胞 MC3T3-E1 細胞で Dlx5、Msx2、Cbfa1 の発現を観察した。その結果、Msx2 は最も早く上昇後、すぐに減少し、それと相反して Dlx5 が上昇、その後 Cbfa1 が緩やかに上昇した。Dlx5 より Cbfa1 の発現時間が遅いことから、Dlx5 の下流に Cbfa1 が位置することも考えられたが、Dlx5 ノックアウトマウスでは Cbfa1 が変化しないことから、その可能性は低い。これらの遺伝子は発現時期に差があることから、BMP シグナル伝達経路において別々の発現制御を受け、異なる分子機能を有することが推測された。

次に、Dlx5 が転写活性化因子かどうかを確認するため、Dlx5 で転写活性化が報告されている COL1 プロモーター上の Dlx 応答配列を組込んだレポータープラスミド pDlxRE を作製し、P19 細胞に Dlx5 を導入した P19 Dlx5 細胞を用いて検討したところ、転写が活性化した。そこで、Dlx5 の転写活性化領域を検討した結果、ホメオボックスよりも N 末端領域に転写活性化能が存在したことから、この領域が Dlx5 の転写活性化領域であり、Dlx5 が転写活性化因子であると同定した。

そこで Dlx5 の転写活性化領域に結合して、Dlx5 の機能を制御する因子を検索する為に、yeast two hybrid 法でマウス胎児 11 日齢 cDNA のスクリーニングを行なった。そ

の結果、長さの異なる重複した塩基配列を持つクローンが確認され、これらは新規遺伝子 *Dlxin-1* をコードしていた。*Dlxin-1* は 775 アミノ酸残基で、中央部分にはトリプトファン、グルタミン、プロリンを基本骨格とするアミノ酸配列が 25 回繰返される特徴的な領域を持ち、この配列はすべてのクローンに共通なことから、*Dlx5* 結合領域 (*DlxBD*) と推測された。当初、全長で相同性のある遺伝子はなかったが、その後発表されたヒト *MAGE-D1*、ラット *NRAGE*、ラット *SNERG-1* と相同性を示したことから、これらの遺伝子のマウスホモログであると考えられた。*Dlxin-1* は胎生期から成獣期にかけて広く発現し、*BMP* で発現制御されない遺伝子であり、*Dlx5* とは発現領域が重複していた。*Dlxin-1* と *Dlx5* のタンパク質間結合を検討したところ、*Dlxin-1* は *Dlx5* と弱い結合を示し、更に *Dlx/Msx* ファミリーの *Dlx7*、*Msx2*、*Dlxin-1* 自身とも結合を示したことから、*Dlxin-1* は二量体を形成し、*DlxBD* を介して *Dlx5* と直接、間接的に結合することが示唆された。

次に *Dlxin-1* が *Dlx5* の転写に与える影響を検討するため、最も *Dlxin-1* の発現の低い HT1080 細胞を使用して実験を行なった。レポータープラスミド *pGAL4 Dlx5ΔC* と *Dlxin-1* を同時に発現させると転写が上昇した。また、*pDlxRE* と *Dlx5* だけでは転写は活性化しないが、そこに *Dlxin-1* を添加すると転写が活性化した。これらのことから、*Dlx5* がプロモーター上の *DlxRE* に結合し、*Dlx5* の N 末端領域に *Dlxin-1* が *DlxBD* を介して結合し、*Dlx5* を活性化するという構図が示された。しかし、*Dlxin-1* には転写活性化能がないことから、*Dlxin-1* が他の転写制御因子を介して *Dlx5* の転写を活性化する可能性が示唆された。それを証明するため、P19 *Dlx5* 細胞と *pDlxRE* の系に *Dlxin-1* と *DlxBD* を発現させ、転写活性の変化を検討したところ、*Dlxin-1* では変化はなかったが、*DlxBD* では転写活性が 50% 近く減少した。これは、*Dlxin-1* の N 末端領域や C 末端領域に他の基本転写因子、転写共役因子が結合して *Dlx5* を活性化していると考えられ、*Dlxin-1* がアダプタータンパク質であることが示された。

考察、及び展望

本研究では、*OCN* プロモーターの制御に関与して、骨芽細胞の分化に促進と抑制という相反した機能を示す転写制御因子 *Dlx5* の機能を解明することを目的に研究を行なった。その結果、*Dlx5* が N 末端領域に転写活性化領域をもつ転写活性化因子であることを同定した。そして、この転写活性化領域に結合する新規遺伝子 *Dlxin-1* を単離し、この因子が *Dlx5* と重複した組織に発現し、*Dlx5*、*Dlx7*、*Msx2*、*Dlxin-1* 自身と直接結

合または間接結合することを示した。これは Dlxin-1 が二量体を形成し、Dlx/Msx ファミリーに結合する因子であることを示している。転写実験の結果、Dlxin-1 は Dlx5 の転写を活性化するが、それ自身には転写活性化能が無いこと、Dlxin-1 の Dlx5 転写活性化能は Dlxin-1 の中央に位置する Dlx5 結合領域だけでは発揮されないことから、Dlxin-1 の N 末端領域もしくは C 末端領域が他の基本転写因子、転写共役因子との複合体を架橋もしくは安定化する機能を持つアダプタータンパク質であると結論した。

更に、Dlxin-1 の C 末端領域で yeast two hybrid screening 法を行なった結果、zinc finger ファミリーに属する RING-H2 モチーフを持つ Praja1 遺伝子が結合した。近年、RING finger タンパク質がユビキチン共役酵素 E2s と結合し、E3 ユビキチン化酵素として働くことが示されている。その後の解析で、Praja1 は Dlxin-1 の E3 ユビキチン化酵素であり、Dlx5 依存性の転写を抑制したことから、Praja1 は Dlx5 の転写を抑制する転写共役因子であることが示された。しかし、これは Dlx5 を活性化する転写共役因子でないため、Dlxin-1 には他の転写共役因子との結合が示唆される。

今回、Dlx5 が転写活性化因子であることを示したが、なぜ OCN プロモーターにみられるような機能の二面性が起こるのかということを検討した。一つには Dlx5 の転写制御時の発現レベルが問題であると考えられた。Dlxin-1 が濃度比例的に Dlx5 依存的転写を活性化したことから、Msx/Dlx ファミリーの比だけでなく Dlxin-1 との比が重要であると考えられた。次に、Dlx5 には、基本的な OCN プロモーターへの転写活性と、骨芽細胞分化終期における OCN の発現を促進する転写制御因子を阻害する機能があるためと考えられた。最後に、Dlx5 には幾つかのアイソフォームがあり、ホメオボックス以下を欠損する δ Dlx5 が骨芽細胞系に発現していた。この δ Dlx5 は、Dlx5 と N 末端領域が共通であることから、Dlx5 と Dlxin-1 との結合に影響を持つことが考えられた。このように幾つかの要因により、Dlx5 の転写制御機能に差が出るものと考えられた。

本研究では、これまで明確ではなかった転写制御因子 Dlx5 の転写活性化領域を決定し、その転写活性化領域に結合し、転写機能を正に制御する新規のアダプタータンパク質 Dlxin-1 を単離した。これらの結果より、骨芽細胞の分化に関与する Dlx5 の転写制御の一環を分子レベルで明らかにすることができた。