

「生体防御のメカニズム」
平成9年度採択研究代表者

石井 俊輔

(理化学研究所 主任研究員)

「仲介因子を介した遺伝子発現制御の解明」

1. 研究実施の概要

転写抑制に関与する仲介因子コリプレッサーとヒストンデアセチラーゼとの複合体の構成因子として ski/sno 遺伝子産物を同定した。ski/sno 遺伝子はがん遺伝子として見つかったものだが、これまでその機能は不明であった。私達の結果から、ski/sno によるがん化のメカニズムが見えてきた。そして、sno の変異マウスを作製し、解析した。また、転写活性化に関与する仲介因子であるコアクティベーター CBP が発がん遺伝子産物 GLI3 に結合して Shh シグナル伝達経路において重要な役割を果たすことを明らかにした。そして、転写因子 ATF-2 (CRE-BP1) が TGF- β シグナルを伝達するのに重要であることを示すと共に、ATF-2 欠損マウスの作製・解析を行った。

2. 研究実施内容

(1) Ski はコリプレッサー・ヒストンデアセチラーゼ複合体の構成因子である

ski 遺伝子は20年以上も前のがん遺伝子として同定されたもので、最初に見い出された Sloan-Kettering Institute の名にちなんで、ski と名付けられた。また、ski 関連遺伝子として sno (ski-related novel gene) が同定されている。ski/sno 遺伝子産物 (Ski/Sno) の機能は全く不明であり、その機能解明は発がんメカニズムを理解する上で有用と考え、一連の解析を行った。私達は以前に Ski/Sno は直接 DNA に結合する活性は持たないが、未同定の因子と結合して、DNA に結合することを明らかにしていた。そこで、Ski 結合因子を同定するため、Ski を bait にした酵母 two hybrid screening を行った。その結果、コリプレッサー N-CoR が Ski 結合因子として同定された。コリプレッサー N-CoR や関連因子 SMRT は核内ホルモン受容体に結合して、リガンド非存在下での核内ホルモン受容体による転写抑制を仲介する。またこれらのコリプレッサーは転写抑制因子 Mad に結合するコリプレッサーとして同定された mSin3 (酵母の Sin3 ホモログ) やヒストンデアセチラーゼ (HDAC) と複合体を形成して機能することが示されている。そこで、Ski/Sno とコリプレッサー・HDAC 複合体の構成因子との間の結

合を解析した結果、Ski/Sno は N 端側の Cys に富む領域でコリプレッサー N-CoR/SMRT と結合し、C 端側の Coiled-Coil 領域でコリプレッサー mSin3 と結合することが示された。また免疫共沈実験により、Ski/Sno は N-CoR/SMRT, mSin3, HDAC と細胞内で複合体を形成していることが示された。さらに一連のコトランスフェクション実験・抗体注入実験・マウス ski 変異体の解析によって、Ski/Sno はリプレッサー Mad や Rb による転写抑制に必須であることが示された。また sno 欠損マウスを作製・解析した結果、sno ヘテロ欠損マウスは種々の興味ある症状を呈することが分かった。

(2) ヘッジホグ (Hh) シグナル伝達経路における CBP と GLI3 の役割

Hh シグナル伝達経路はがん化・形態形成などにおいて重要な役割を果たしている。ショウジョウバエ転写因子 Ci は Hh シグナルによって活性化され、dpp などの一群の遺伝子の転写を活性化する。私達は以前コアクティベーター CBP が Ci に結合し、Ci による転写活性化に必須であることを示した。Ci の動物細胞ホモログとしては発がん遺伝子産物 GLI (Glioblastoma) 1, 2, 3 の 3 つの転写因子が知られているが、これらの機能的差異についてはよく分かっていない。そこで、GLI1, GLI3 に注目し、CBP との結合などについて検討した。CBP は GLI3 には結合するが、GLI1 には結合しなかつた。また、GLI3 はショウジョウバエ Ci と同様に N 端側に転写抑制ドメイン及び C 端側に転写活性化ドメインを有し、プロセッシングによりリプレッサーが産生され、このプロセッシングは Shh シグナルによって阻害された。これに対し、GLI1 は転写活性化ドメインのみを有し、プロセッシングも受けなかつた。さらに、GLI3 は Gli1 遺伝子のプロモーターに結合し、Gli1 遺伝子の転写を Shh 依存的に活性化することが分かった。これらの結果から、動物細胞においては Gli 遺伝子ファミリーメンバー間で機能分担があり、GLI3 は Shh シグナルのメディエーターとして機能し、標的遺伝子 Gli1 の発現を誘導することが示された。

(3) 転写因子 ATF-2 (CRE-BP1) の生理機能

ATF-2 による転写制御メカニズムを解析し、コアクティベーター CBP が ATF-2 の B-ZIP 構造を持つ DNA 結合ドメインに結合することを見出した。ATF-2 の N 端側の転写活性化ドメインは C 端側の DNA 結合ドメインとの分子内結合によってマスクされていることが知られている。CBP が DNA 結合ドメインに結合することによって、この分子内結合が解除され、ATF-2 による転写活性化が起こると推定された。また、N 端側の転写活性化ドメインは C2H2 タイプのメタルフィンガー様の配列とストレス応答キナーゼ (SAPK: stress-activated kinase) のリン酸化部位を持つ。NMR による構造解析の結果、転写活性化ドメインは典型的なメタルフィンガー構造を有する領域と、SAPK リン酸

化部位を含む flexible な構造を持つ領域の2つのサブドメインから成ることが示された。一方、ATF-2 の B-ZIP 領域には TGF- β シグナル伝達系経路において機能する転写因子 Smad3/4 が結合することを見い出した。また、TGF- β 刺激によって、TAK1 キナーゼを介して SAPK の一種である p38 が活性化され、ATF-2 の N 端側の転写活性化ドメインがリン酸化されることが分かった。これらの2つの経路による ATF-2 の活性化メカニズムは協調的に作用して ATF-2 を活性化することが示され、ATF-2 が TGF- β シグナル伝達経路において重要な役割を果たすことが示唆された。

(4) Myb と NF-IL6 複合体の結晶作製及び構造解析

転写因子 Myb と NF-IL6 は骨髄細胞特異的な遺伝子のプロモーターに結合し、協調して転写を活性化することが知られているが、そのメカニズムは分かっていない。この協調的作用のメカニズムを明らかにするため、両者の複合体の構造解明を目指している。今年度はようやく結晶作製に成功し、構造決定に道を開くことができた。

3. 主な研究成果の発表 (論文発表)

- Tavner, F. J., Simpson, R., Tashiro, S., Favier, D., Jenkins, N. A., Gilbert, D. J., Copeland, N. G., Macmillan, E. M., Lutwyche, J., Keough, R. A., Ishii, S. & Gonda, T. J.: Molecular cloning reveals that the p160 Myb-binding protein is a novel, predominantly nucleolar protein which may play a role in transactivation by Myb. *Mol. Cell. Biol.* 18, 989-1002 (1998).
- Sano, Y., Tokitou, F., Dai, P., Maekawa, T., Yamamoto, T. & Ishii, S.: CBP alleviates the intramolecular inhibition of ATF-2 function. *J. Biol. Chem.* 273, 29098-29105 (1998).
- Tokitou, F., Nomura, T., Khan, M. M., Kaul, S. C., Wadhwa, R., Yasukawa, T., Kohno, I. & Ishii, S.: Viral-Ski inhibits retinoblastoma protein (Rb)-mediated transcriptional repression in a dominant negative fashion. *J. Biol. Chem.* 274, 4485-4488 (1999).
- Nomura, T., Khan, M. M., Kaul, S. C., Dong, H.-D., Wadhwa, R., Colmenare, C., Khono, I. & Ishii, S. (1999). Ski is a component of the histone deacetylase complex required for transcriptional repression by Mad and thyroid hormone receptor. *Genes & Dev.* 13, 412-423 (1999).
- Dai, P., Akimaru, H., Tanaka, Y., Maekawa, T., Nakafuku, M. & Ishii, S.: Sonic hedgehog-induced activation of the Gli1 promoter is mediated by GLI3. *J. Biol. Chem.* 274, 8143-8152 (1999).

- Sano, Y., Harada, J., Tashiro, S., Gotoh-Mandeville, R., Maekawa, T. & Ishii, S.: ATF-2 is a common nuclear target of Smad and TAK1 pathways in TGF- β signaling. *J. Biol. Chem.* 274, 8949-8957 (1999).
- Nagadoi, A., Nakazawa, K., Uda, H., Okuno, K., Maekawa, T., Ishii, S. & Nishimura, Y. Solution structure of the transactivation domain of ATF-2 comprising a zinc finger-like subdomain and a flexible subdomain. *J. Mol. Biol.* 287, 593-607 (1999).