

「生体防御のメカニズム」
平成9年度採択研究者代表者

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

SkiなどのコリプレッサーがPMLに結合することを見だし、PMLががん制御因子として機能するメカニズム及びPMLとレンチノイン酸受容体RAR α との融合蛋白質PML-RAR α が急性前骨髄性白血病を引き起こすメカニズムの一端を明らかにした。さらに発がん遺伝子産物Mybとがん制御因子P53が拮抗してシャペロンの発現を制御することを見出した。また、代表的なコアクティベーター CBPの変異マウスを解析し、CBPが血管形成、神経管の閉塞、そして造血に重要な役割を果たすことを明らかにした。そして白血病の原因遺伝子産物であるAML(CBF α とCBF β の2つのサブユニットから成る)とDNAの複合体の結晶構造を決定し、抗癌剤作製のための重要な基礎を作った。

2. 研究実施内容

(1) コリプレッサーの機能にはがん制御因子PMLが必要である

もともとがん遺伝子として見い出されたSki遺伝子産物(Ski)がコリプレッサーとして機能することを私達はこれまでに明らかにした。さらにリプレッサーとして機能するがん抑制因子MadやRbによる転写抑制にSkiは必須であり、このためある種の細胞では、Skiはがん抑制因子としても機能する。Skiを介した転写抑制メカニズムをさらに明らかにするため、Skiに結合する因子を酵母Two-hybridスクリーニングによって探索し、PMLを同定した。PMLは核内で20 - 30個の点状に存在し、細胞増殖抑制機能を有することが報告されている。また染色体転座によって形成されるレンチノイン酸受容体RAR α との融合蛋白質PML-RAR α は急性前骨髄白血病(APL)を引き起こすことで有名である。しかしながら、なぜPMLが細胞増殖を抑制し、またPML-RAR α がどのようなメカニズムでAPLを引き起こすのかは明らかにされていなかった。私達は一連の解析を行い、PMLがSki, N-CoR, mSin3Aなどのコリプレッサー及びヒストンデアセチラーゼ(HDAC)と直接結合し、さらにこれらのコリプレッサーを介した転写抑制に重要な役割を果たすことを見出した。従ってPML欠損細胞では、がん抑制因子Madによる転写抑制が低下し、その結果細胞増殖が促進される。一方、私達はPML-RAR α がコリブ

レッサーを介した転写抑制を解除し、PML-RAR α 存在下ではMadによる転写抑制が起きないことを見出した。これはPML-RAR α がPML部分とRAR α 部分の2つのサイトを介してコリプレッサー - NCoRに結合するため、コリプレッサーの構造が変化してしまうためと考えられる。このように、PMLとコリプレッサーとの結合を見出したことによって、今まで不明であったPML-RAR α によるAPL発症のメカニズムの一端が明らかにされた。

(2) Mybと p53との拮抗的相互作用

発がん遺伝子産物MybはAACNG配列に直接結合して転写を活性化すると共に、転写因子HSF3 (heat shock factor3) に結合して、HSF3を活性化してシャペロン遺伝子の転写を誘導する。MybによるHSF3活性化の分子メカニズムを探る過程で、私達はがん抑制因子p53がMybと競争的にHSF3に結合して、MybによるHSF3の活性化を阻害することを見出した。さらに、p53はMybの分解を促進することが分かった。これはp53によって誘導されるSiah-1がMybに直接結合して、E3 ligaseとして機能し、Mybの分解を促進するためである。Mybは細胞周期のG1/S移行期に上昇し、HSF3を活性化することによってシャペロン遺伝子の発現を誘導する。種々のシャペロンは細胞周期をスムーズに進行させるために重要な役割を果たすことが知られている。一方、細胞が γ 線などのDNAダメージストレスを受けると、p53が誘導され、p53はCdk inhibitorなどを誘導することによって、G1/S移行を阻害すると考えられている。私達の結果は、p53がMybによるHSF3の活性化を阻害し、シャペロン遺伝子の発現を阻害することが、p53による細胞周期停止に寄与していることを示唆している。

(3) コアクティベーター CBPの整生理機能

CBPは多くの転写因子の共通のコアクティベーターとして機能していて、MybやATF-2などの通常の転写因子に比べ細胞内での存在量が多い。従って、その存在量が半減した*Cbp*ヘテロ変異マウスでは、GL13などによる転写活性化などが低下し、その結果骨形成異常が観察されることを私達はすでに報告した。本年度はCBPの生理機能を理解するために、*Cbp*ホモ変異マウスを詳細に解析した。*Cbp*ホモ変異マウスはE10.5-E12.5で致死であった。*Cbp*ホモ変異マウス胎仔では頭部に出血が見られ、これが致死の主原因と推定された。さらにこの出血は頭部での血管形成の不全によることが分かった。また、*Cbp*ホモ変異マウスでは神経管の閉塞不全が観察された。さらに*Cbp*ホモ変異マウスではprimitive及びdefinitiveな造血能力が部分的に低下していた。以上の結果から、CBPは血管形成、神経管の閉塞、そして造血に重要な役割を果たすことが示された。

(4) 造血系細胞の増殖・分化を制御する転写因の構造解析

転写因子Mby, C/EBP β , AML, GATAなどは骨髄細胞などの造血系細胞特異的

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、これらの転写因子の複合体の構造解明を目指して、一連の解析を行った。その結果、白血病の原因遺伝子産物であるAML (CBF α とCBF β の2つのサブユニットから成る)とC/EBP β , DNAの複合体の結晶を作製し、その構造決定に成功した。この構造から、DNAに直接結合しないCBF β サブユニットがどのようなメカニズムでCBF α サブユニットのDNAへの結合を強めるが原子レベルで理解できるようになり、抗癌剤作製のための重要な基礎が作られた。

3 . 主な研究成果の発表 (論文発表)

Tanikawa, J., Ichikawa-Iwata, E., Kanei-Ishii, C., Nakai, A., Matsuzawa, S., Reed, J. C. & Ishii, S(2000) p53 suppresses the c-Myb-induced activation of heat shock transcription factor 3. *J. Biol. Chem.* 275, 1578-15585.

Shinagawa, T., Dong, H.-D., Xu, M., Maekawa, T. & Ishii, S(2000) The *sno* gene, which encodes a component of the histone deacetylase complex, acts as a tumor suppressor in mice. *EMBO J.* 19, 2280-2291.

Tanaka, Y., Naruse, I., Hongo, T., Xu, M., Nakahata, T., Maekawa, T. & Ishii, S(2000) Extensive brain hemorrhage and embryonic lethality in a mouse null mutant of CREB-binding protein. *Mech. Dev.* 95, 133-145.

Tahirov, T. H., Inoue, T., Sasaki, M., Kimura, K., Morii, Fujikawa, A., Shiina, M., Sato, K., Kumasaka, T., Yamamoto, M., Ishii, S(2000) & Ogata, K(2000) Structural analyses of DNA recognition by the AML 1 /Runx- 1 Runt domain and its allosteric control by C/EBP β . *Cell* 104, 775-767.

Sano, Y. & Ishii, S(2000). Increased affinity of c-Myb for CREB-binding protein (CBP) after CBP-induced acetylation. *J. Biol. Chem.* 276, 3674-3682.

Khan, M. M., Nomura, T., Kim, H., Kaul, S. C., Wadhwa, R., Shinagawa, T., Ichikawa-Iwata, E., Zhong, S., Pandolfi, P. P. & Ishii, S(2001) Role of PML and PML-RAR α in Mad-mediated transcriptional repression. *Molecular Cell* 7, 1233-1243.