

「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

コリプレッサー Ski と結合する転写因子 Shn-2 の変異マウスを作製・解析し、Shn-2 が T 細胞の分化、特に Positive selection に必須であることを明らかにした。そして、Ski/Sno はメチル化 CpG に結合するリプレッサー MeCP2 と直接結合し、メチル化 CpG 依存的な転写抑制に必須であることを明らかにした。さらに、Ski に結合する PML 様の因子 RFP が核外移行シグナルを持ち、その細胞内局在は特異シグナルにより制御されることを示した。一方、造血系細胞の増殖・分化を制御する転写因子 Myb と C/EBP β がプロモーター上の離れた部位に結合し、直接相互作用することを結晶構造を決定することにより、明らかにした。さらに、Myb の制御因子を同定するための遺伝学的スクリーニング系を、ショウジョウバエ myb を用いて作製し、Myb 制御因子のスクリーニングを開始した。

2. 研究実施内容

(1) 転写因子 Shn-2 は T 細胞の分化に必須である

転写因子 Scnrri (Shn) は私達が最初に cDNA クローニングを行い同定したもので、約 270 kD の大きな蛋白質で、2つのメタルフィンガー構造を含むドメインを2セット持っている。Shn 遺伝子ファミリーは動物細胞では少なくとも3つのメンバーを含む。ショウジョウバエ Shn は TGF- β /BMP/activine のホモログ dpp のシグナル伝達経路の下流で機能する。動物細胞における TGF- β /BMP/activine シグナル経路の解明は最近大きく進展し、転写因子 Smad が重要な役割を果たすことが分かってきた。最近 Shn は Smad と直接結合することが示されると共に、私達は Shn にコリプレッサー Ski が結合することを見い出している。私達は Shn の生理機能を明らかにするため、Shn-2 の変異マウスを作製し、解析した。Shn-2 変異マウスでは SP T 細胞が顕著に減少しており、DP から SP 細胞への分化段階に異常があった。この段階では、自己の MHC に拘束された T 細胞受容体を発現する T 細胞のみが成熟するいわゆる Positive selection と共に、自己を攻撃する可能性のある T 細胞を除去する Negative selection が起きる。一連の解析から、Shn-2 変異マウスでは Positive selection が異常であることが分かった。この結果は、T 細胞の分化に TGF- β /BMP/activine シグナルが関与することを示唆しているが、メカニズムの解明のためには、更に詳細な解析が必要である。

(2) コリプレッサーSki はメチル化 CpG 依存的な転写抑制に必須である

私達はすでにコリプレッサーSki が他のコリプレッサーN-CoR や mSin3 と共に、Mad、Rb やステロイドホルモン受容体による転写抑制に関与することを報告している。本年度は Ski がさらに多様な転写抑制に関与するかどうかを解析した。その結果、Ski はメチル化 CpG に結合する因子 MeCP2 にも直接結合し、MeCP2 による転写抑制に必須であることが示された。従って、Ski/Sno はメチル化 CpG 依存的な転写抑制に必須であることが明らかにされた。いくつかのがん抑制因子の発現が DNA のメチル化によって抑制されていることが分かっているので、Ski/Sno は特異的ながん抑制因子の発現を抑制することによって、発がん遺伝子として機能する可能性が示唆される。

(3) Ski 結合因子 RFP の細胞内局在は特異シグナルにより制御される

昨年度私達は一群のコリプレッサーが PML と結合することを明らかにした。今年度は PML と類似の構造を持つ RFP もコリプレッサーに結合することを見い出した。RFP はもともと Ret 受容体との融合蛋白質 RFP-Ret が NIH3T3 細胞をがん化することから同定された。しかし、コリプレッサーを介した転写抑制における RFP の役割は不明である。興味深いことに、RFP は HepG2 細胞などでは核内の点状構造(一部は PML 構造体)に局在するが、NIH3T3 細胞などでは細胞質に局在する。RFP の一連の欠失変異体を用いて、このメカニズムを解析した結果、RFP は coiled-coil 領域に典型的な核外移行配列(Nuclear Export Sequence: NES)を持つことが分かった。NIH3T3 細胞などではこの NES が機能しているが、HepG2 細胞などではこの NES の機能がマスクされている。さらに、Ras や PKCa などを経した特異的なシグナル伝達系によってこの NES の機能が活性化されることが明らかになった。

(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 Myb, 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、Myb と C/EBP β の DNA 結合ドメインと標的遺伝子のプロモーターDNA を含む複合体の結晶を作製し、その立体構造を決定した。その結果、プロモーター上の離れた部位に結合する2つの転写因子が直接相互作用することが見い出された。さらに原子間力顕微鏡を用いた解析により、これらの転写因子の間の DNA はループを形成することが示された。これらの解析結果は、プロモーター上の離れた部位に結合する2つの転写因子の直接的な相互作用を原子レベルで明らかにした初めての例として、Cell 誌の表紙に掲載された。

(5) Myb の制御因子を遺伝学的にスクリーニングする系の作製

Myb は動物細胞においては造血系の発生・分化に重要な役割を果たしている。私達は Myb の制御因子を同定するための遺伝学的スクリーニング系の作製を試みた。ショウジョウバエ myb (dmyb) は眼の成虫原基において、morphogenetic furrow (MF) の前後に stripe 状に発現する。dMyb の C 末端が欠けた活性化型 dMyb Δ C を成虫原基後部領域で発現させると、眼の形態が異常となる rough eye phenotype が観察された。一連の解析によって、これは Cyclin B の発現が上昇するためであることを明らかにした。現在、rough eye phenotype が変化する種々の変異体をス

クリーニングすることによって、Myb 制御因子の同定・解析を行いつつある。

3. 研究実施体制

氏名	所属	役職	担当研究項目
(1) 分子生物学グループ			
石井俊輔	理研	主任研究員	全体の統括
(2) マウスグループ			
前川利男	理研	先任研究員	ATF-2 変異マウスの解析
(3) ショウジョウバエグループ			
秋丸裕司	理研	先任研究員	Polycomb 複合体の機能解析
(4) 構造解析グループ			
緒方一博	KAST	グループヘッド	Myb を含む複合体の構造解析

4. 主な研究成果の発表

(1) 論文発表

- 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. *Mol. Cell* 7, 1233-1243.
- Takagi, T., Jun Harada, J. & Ishii, S. (2001). Murine Schnurri-2 is required for positive selection of thymocytes. *Nature Immunol.* 2, 1048-1053.
- Kokura, K., Kaul, S. C., Wadhwa, R., Nomura, T., Khan, M. M., Shinagawa, T., Yasukawa, T., Colmenares, C., and Ishii, S. (2001). The Ski family is required for MeCP2-mediated transcriptional repression. *J. Biol. Chem.* 276, 34115-34121.
- Khan, M. M., Nomura, T., Kim, H., Kaul, C. S., Wadhwa, R., Zhong, S., Pandolfi, P. P. & Ishii, S. (2001). PML-RAR α alleviates the transcriptional repression mediated by tumor suppressor Rb. *J. Biol. Chem.* 276, 43491-43494.
- Harbers, M., Nomura, T., Ohno, S. & Ishii, S. (2001). Intracellular localization of the ret finger protein depends on a functional nuclear export signal and protein kinase C activation. *J. Biol. Chem.* 276, 48596-48607.
- Monzen, K., Hiroi, Y., Kudoh, S., Akazawa, H., Oka, T., Takimoto, E., Hayashi, D., Hosoda, T., Kawabata, M., Miyazono, K., Ishii, S., Yazaki, Y., Nagai, R. & Komuro, I. (2001). Smads, TAK1, and their common target ATF-2 play a critical role in cardiomyocyte differentiation. *J. Cell Biol.* 153, 687-698.
- Shinagawa, T., Nomura, T., Colmenares, C., Ohira, M., Nakagawara, A. & Ishii, S. (2001). Increased susceptibility to tumorigenesis of ski-deficient heterozygous mice. *Oncogene* 20, 8100-8108.
- Tahirov, T. H., Sato, K., Ichikawa-Iwata, E., Sasaki, M., Inoue-Bungo, T., Shiina, M.,

Kimura, K., Takata, S., Fujikawa, A., Morii, H., Kumasaka, T., Yamamoto, M., Ishii, S. & Ogata, K. (2002). Mechanism of c-Myb-C/EBP β cooperation from separated sites on a promoter. *Cell* 108, 57-70.

○ Okada, M., Akimaru, H., Hou, D.-X., Takahashi, T. & Ishii, S. (2002). Myb controls G2/M progression by inducing cyclin B expression in the Drosophila eye imaginal disc. *EMBO J.* 21, 675-684.

(2) 特許出願

なし