

理化学研究所 主任研究員

石井 俊輔

「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

基本構想

CBP などのコアクティベーターや N-CoR などのコリプレッサーの仲介因子はプロモーター上流のエンハンサー・サイレンサーに結合する転写制御因子とコアプロモーターに結合する TBP などの基本転写因子との間のブリッジ役の分子として同定された。仲介因子はヒストンをアセチル化する酵素 (HAT: histone acetyltransferase) や逆にアセチル基を除く酵素 (HDAC: histone deacetylase) と複合体を形成することから、ヒストンのアセチル化を介してクロマチン構造を変化させ、遺伝子発現を制御する。このように、仲介因子の研究は従来ブラックボックスであったクロマチン構造を介した遺伝子発現制御の研究に新たな分野を開きつつある。本研究では生体防御系における仲介因子の役割の解明を目指して、Myb などの造血・免疫系において重要な役割を果たす転写因子の仲介因子について種々の角度から解析した。

実施・研究成果

1) Ski/Sno はコリプレッサーであり、がん抑制因子としても機能する

ski 遺伝子は 20 年以上前に発がん遺伝子として見い出され、その機能は長らく不明であった。私達は *ski* 遺伝子産物 (Ski) およびその関連因子として同定した Sno が HDAC と複合体を形成し、コリプレッサーとして機能することを初めて明らかにした。さらに、Ski/Sno は 2 つのがん抑制因子 Mad と Rb の活性に必須であることから、Ski/Sno はある状況下では細胞増殖を負に制御し、がん抑制因子としても機能することを示した。私達のこの研究が端緒となり、TGF- β シグナル伝達経路で作用する転写因子 Smad の活性が Ski/Sno によって負に制御されるという、一連の研究成果が他の研究グループによって報告された。

2) Ski/Sno による他の転写因子の制御

Ski/Sno が関与する遺伝子発現ネットワークを明らかにするため、Ski/Sno と結合する転写因子を解析した。脳腫瘍の発症や形態形成に関与する転写因子 GLI3 にも Ski/Sno と CBP が結合して、活性を制御することが示された。さらに、Ski/Sno がメチル化 DNA に結合するリプレッサー MeCP2 にも結合し、メチル化 DNA を介した転写抑制に必須であり、ゲノムインプリンティングなどにも関与することを見出した。

3) コリプレッサーと核内構造体—白血病発症メカニズム

Ski と結合する因子をスクリーニングする過程で、PML が Ski に結合することを見出した。PML はレチノイン酸受容体 RAR α との融合遺伝子 PML-RAR α が急性白血病 APL を引き起こすことから見い出され、核内の Nuclear Body と呼ばれる点状構造に局在している。一連の解析から PML はコリプレッサー複合体に結合して、転写抑制 machinery を Nuclear Body に局在させ、この領域に特定遺伝子がリクルートされることによって、転写が抑制されることが示唆された。さらに、PML-RAR α がいびつな形でコリプレッサー複合体に結合すると、Nuclear Body への局在が乱れ、がん抑制因子 Mad や Rb 活性の低下が起

こり、白血病の発症に至ることが示された。このように、コリプレッサーと核内構造体との相互作用を解析することによって、白血病発症の分子メカニズムを明らかにすると共に、「仲介因子を介した核内構造体による転写制御」という遺伝子発現制御の興味深い点を明らかにすることができた。

4) Myb 活性の仲介因子による制御

myb がん遺伝子産物 (Myb) は AACNG 配列に結合し、転写を制御することによって、造血系細胞の増殖・分化を制御している。Myb は C/EBP β などの転写因子と協調的に一群の標的遺伝子の転写を誘導する。私達は Myb-C/EBP β -DNA 複合体の構造を決定し、これらの転写因子が DNA ループを形成させることを明らかにした (横浜市立大学・緒方教授のグループとの共同研究)。そして、Myb にはコアクティベーター CBP と Ski などのコリプレッサーが競合的に結合すること、Myb はコアクティベーターと結合すると転写を活性化し、コリプレッサーと結合すると転写を抑制することを明らかにした。このように仲介因子の研究によって、転写活性化因子と抑制因子の区別がなくなりつつある。さらに *c-myb* 遺伝子の C 端側欠失による **Oncogenic activation** が、コリプレッサーの結合部位の欠失によることが明らかにされた。これは仲介因子の解析によって初めて明らかになった「プロトオンコジーンの活性化メカニズム」である。一方、私達は Myb 活性の制御に関連する新規の仲介因子を遺伝学的にスクリーニングする系をショウジョウバエを用いて作製した。そしてこの系を用いて Myb と CBP との両方に結合してコアクティベーターとして機能する新規の RNA ヘリカーゼ (Rham) を同定した。

5) Ski に結合する Ikaros 様因子 Schnurri-T 細胞分化の制御

私達がかつとも NF- κ B サイトに結合する転写因子として同定し、HIV-EP と名付けた因子は、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セット持つ。この構造は T 細胞特異的な遺伝子の発現をヘテロクロマチン依存性の転写抑制によって制御する Ikaros に類似している。HIV-EP ファミリーは 1、2、3 の3つのメンバーからなっているが、ショウジョウバエの核内因子 Schnurri (Shn) と高いホモロジーを有することから、現在では Shn-1, 2, 3 と呼ばれている。私達は Shn が Ski に結合することを見い出しており、Shn はプロモーター上の2つの部位に結合して、転写制御領域の高次構造を変え、転写抑制の足場を形成するのではないかと推定している。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・解析した結果、SP-T 細胞が顕著に減少しており、Positive selection に異常が認められた。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ことが分かっているが、動物細胞での Shn の作用メカニズムは不明な点が多い。このように私達の研究により、T 細胞の分化に関与する新たな因子が同定された。

6) 乳癌抑制因子 Brca1 と転写因子 ATF-2-乳癌発症メカニズム

転写因子 ATF-2 は私達が初めて同定した転写因子であり、JNK/p38 などのストレス応答性キナーゼによって活性化されることが知られている。ATF-2 変異マウスを作製・解析し

た結果、ホモ変異マウスはヒト胎便吸引症候群様の症状を呈し、生後すぐに呼吸不全で致死となること、ヘテロ変異マウスは長期飼育すると高頻度に乳癌を発症することが明らかとなった。一連の解析の結果、ATF-2 は乳癌抑制因子として同定され転写仲介因子として機能する *Brcal* と複合体を形成し、一群の標的遺伝子の転写を誘導することが示された。従って、ATF-2 は *Brcal* と同様に、ある種の乳癌の抑制因子と考えられる。

以上のように、Ski/Sno を中心とした仲介因子の研究により、発がんや T 細胞分化に関連する興味ある分子メカニズムが明らかになった。

本研究では転写仲介因子の研究を種々の方法によって統合的に進めることを意図した。そのため、「分子生物学グループ」「マウスグループ」「ショウジョウバエグループ」「構造解析グループ」の4つの研究グループによって研究を推進したが、これらの研究グループは Ski/Sno, Myb, Shn, ATF-2 などの共通の転写因子について研究を進めた。分子生物学グループはこれらの転写因子に結合する因子の同定などの生化学的な解析や培養細胞を用いた転写因子の機能解析などを主として行った。マウスグループはこれらの転写因子の変異マウスを作製し、解析し、その生理機能を探ると共に、疾患との関連を解析した。そして、ショウジョウバエグループはこれらの転写因子と遺伝学的に相互作用する新たな因子を遺伝学的にスクリーニングし、解析した。また、構造解析グループは Myb を含む複合体の構造決定を主として行った。このように、これらの研究グループは用いる解析手法は異なるが、研究の対象や目的を共有しており、互いに密接な議論を行いながら、研究を推進した。

2. 研究構想

CBP などのコアアクティベーターや N-CoR などのコリプレッサーの仲介因子はプロモーター上流のエンハンサー・サイレンサーに結合する転写制御因子とコアプロモーターに結合する TBP などの基本転写因子との間のブリッジ役の分子として同定された (図1)。仲介因子はヒストンをアセチル化する酵素 (HAT: histone acetyltransferase) や逆にアセチル基を除く酵素 (HDAC: histone deacetylase) と複合体を形成することから、ヒストンのアセチル化を介してクロマチン構造を変化させ、遺伝子発現を制御する。このように、仲介因子の研究は従来ブラックボックスであったクロマチン構造を介した遺伝子発現制御の研究に新たな分野を開きつつある。本研究では生体防御系における仲介因子の役割の解明を目指して、Myb などの造血・免疫系において重要な役割を果たす転写因子の仲介因子について種々の角度から解析した。特に本研究の初年度に *ski/sno* 遺伝子産物 (Ski/Sno) がコリプレッサーとして機能することを明らかにすることができ、Ski/Sno が研究の大きな柱となった。そして、Ski などのコリプレッサーと Myb などの転写因子との相互作用に関する研究が進んだ。

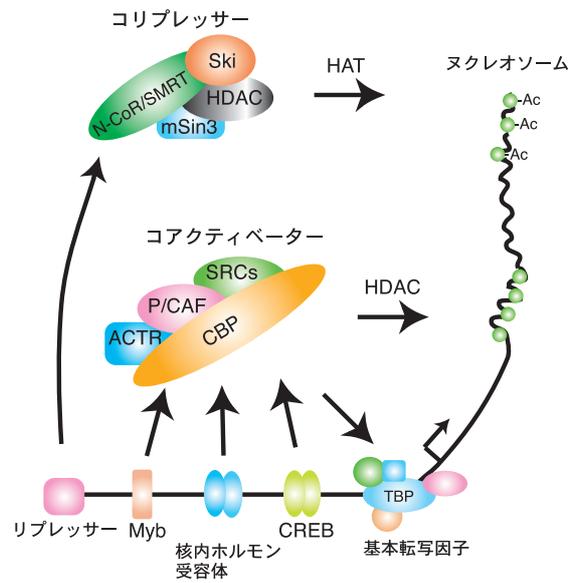
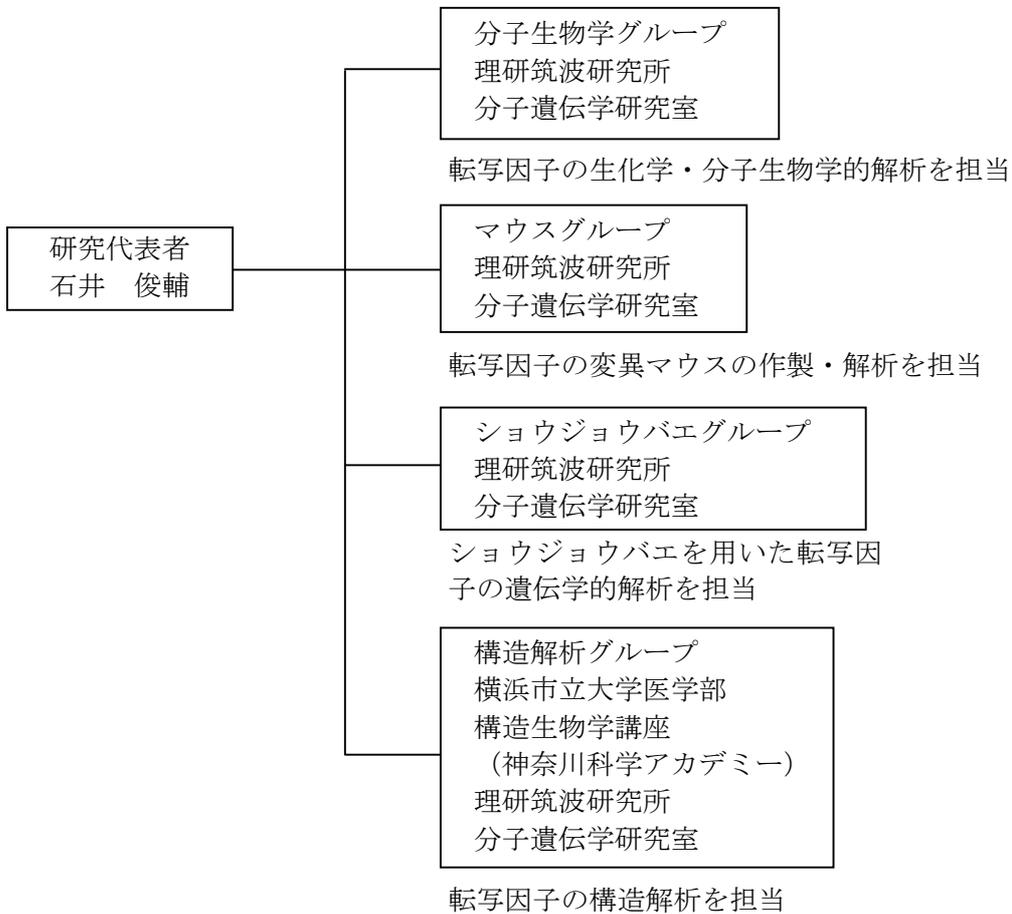


図 1. 転写制御における仲介因子の役割

3. 研究実施体制

(1) 体制



4. 研究期間中の主な活動

(1) ワークショップ・シンポジウム等

なし

5. 主な研究成果

(1) 論文発表 (海外 26 件、国内 0 件)

1. 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. (1998). 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.
2. Sano, Y., Tokitou, F., Dai, P., Maekawa, T., Yamamoto, T. & Ishii, S. (1998). CBP alleviates the intramolecular inhibition of ATF-2 function. *J. Biol. Chem.* 273, 29098-29105.
3. 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.
4. Tokitou, F., Nomura, T., Khan, M. M., Kaul, S. C., Wadhwa, R., Yasukawa, T., Kohno, I. & Ishii, S. (1999). Viral-Ski inhibits retinoblastoma protein (Rb)-mediated transcriptional repression in a dominant negative fashion. *J. Biol. Chem.* 274, 4485-4488.
5. Dai, P., Akimaru, H., Tanaka, Y., Maekawa, T., Nakafuku, M. & Ishii, S. (1999). Sonic hedgehog-induced activation of the *Gli1* promoter is mediated by GLI3. *J. Biol. Chem.* 274, 8143-8152.
6. Sano, Y., Harada, J., Tashiro, S., Gotoh-Mandeville, R., Maekawa, T. & Ishii, S. (1999). ATF-2 is a common nuclear target of Smad and TAK1 pathways in TGF- β signaling. *J. Biol. Chem.* 274, 8949-8957.
7. Maekawa, T., Bernier, F., Sato, M., Nomura, S., Singh, M., Inoue, Y., Tokunaga, T., Imai, H., Yokoyama, M., Reimold, A., Glimcher, L. H. & Ishii, S. (1999). Mouse ATF-2 null mutants display features of severe type of meconium aspiration syndrome. *J. Biol. Chem.* 274, 17813-17819.
8. Tanaka, Y., Patestos, N. P., Maekawa, T. & Ishii, S. (1999). *B-myb* is required for inner cell mass formation at an early stage of development. *J. Biol. Chem.* 274, 28067-28070.
9. Nagadoi, A., Nakazawa, K., Uda, H., Okuno, K., Maekawa, T., Ishii, S. & Nishimura, Y. (1999). The 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.
10. Morii, H., Uedaira, H., Ogata, K., Ishii, S. & Sarai, A. (1999). Shape and energetics of a cavity in c-Myb probed by natural and non-natural amino-acid mutations. *J. Mol. Biol.* 292, 909-920.
11. 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.
12. Takahashi, T., Suwabe, N., Dai, P., Yamamoto, M., Ishii, S. & Nakano, T. (2000). Inhibitory interaction of c-Myb and GATA-1 via transcriptional co-activator CBP. *Oncogene* 19, 134-140.
13. 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, 15578-15585.
14. 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.
 15. Tahirov, T. H., Inoue, T., Sasaki, M., Kimura, K., Morii, H., Fujikawa, A., Shiina, M., Sato, K., Kumasaka, T., Yamamoto, M., Ishii, S. & Ogata, K. (2001). Structural analyses of DNA recognition by the AML1/Runx-1 Runt domain and its allosteric control by CBF β . *Cell* 104, 755-767.
 16. 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.
 17. Takagi, T., Jun Harada, J. & Ishii, S. (2001). Murine Schnurri-2 is required for positive selection of thymocytes. *Nature Immunol.* 2, 1048-1053.
 18. Sano, Y. & Ishii, S. (2001). Increased affinity of c-Myb for CREB-binding Protein (CBP) after CBP-induced acetylation. *J. Biol. Chem.* 276, 3674-3682.
 19. Kokura, K., Kaul, S. C., Wadhwa, R., Nomura, T., Khan, M. M., Shinagawa, T., Yasukawa, T., Colmenares, C., & Ishii, S. (2001). The Ski family is required for MeCP2-mediated transcriptional repression. *J. Biol. Chem.* 276, 34115-34121.
 20. 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.
 21. 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.
 22. 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.
 23. 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.
 24. 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.
 25. 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.
 26. Dai, P., Shinagawa, T., Nomura, T., Harada, J., Kaul, S.C., Wadhwa, R., Akimaru, H., Sasaki, H., Colmenares, C. & Ishii, S. (2002). Ski is involved in transcriptional regulation by the repressor and full-length forms of Gli3. *Genes & Dev.* 16, 2843-2848.

(2) 特許出願（国内 1 件、海外 1 件）

1. 発明名称：sno 遺伝子欠損ヘテロ及びホモ変異マウス

発明者：石井俊輔

出願番号：特願平 11-064372

出願日：平成 11 年 3 月 11 日

国際出願番号：PCT/JP99/06541

国際出願日：平成 11 年 11 月 24 日

予定指定国：米国、カナダ、オーストラリア

(3) 新聞報道等

なし

(4) その他特記事項

なし