

氏 名 (本籍)	てる 照	ぬま 沼	あつし 篤
学 位 の 種 類	博 士 (医 学)		
学 位 記 番 号	医 博 第 1 2 4 7 号		
学 位 授 与 年 月 日	平 成 7 年 3 月 24 日		
学 位 授 与 の 条 件	学 位 規 則 第 4 条 第 1 項 該 当		
研 究 科 専 攻	東 北 大 学 大 学 院 医 学 系 研 究 科 (博 士 課 程) 内 科 学 系 専 攻		
学 位 論 文 題 目	<p>A novel genetic screening system for isolation of cDNA clones that trans-dominantly inhibit the DNA-binding activity of eukaryotic transcription factors : isolation and characterization of a human cDNA clone that interferes with Oct-2 protein.</p> <p>(転写調節因子の DNA 結合能をトランスドミナントに抑制する cDNA クローンを単離するための新しい遺伝学的選択システム : Oct-2 に抑制的に作用するヒト cDNA クローンを単離と解析)</p>		
論 文 審 査 委 員	<p>(主 査)</p> <p>教授 田 上 八 朗 教授 佐 竹 正 延</p> <p>教授 帯 刀 益 夫</p>		

論文内容要旨

転写調節因子の作用機構に関する解析が進み、ある転写調節因子に別のタンパクが作用して、前者の転写調節能力を修飾してしまうような、タンパク-タンパク相互作用を介した転写調節機構の存在が明らかにされてきている。私はある転写調節因子に対してドミナント・ネガティブに作用するようなタンパクをコードする遺伝子を選択するための有効な手段を得ることを目的として、真核生物の発生や分化に関わる一群の DNA 結合性転写調節因子が属する POU 転写因子ファミリーをモデルシステムに選び、POU 転写因子に対して抑制的に作用するタンパクをコードする遺伝子を大腸菌内で選択できるようなアッセイシステムを開発した。

まず、リポーター遺伝子として、オペレーター領域をオクタマー配列（POU 転写因子ファミリーのメンバー、Oct-2 や Oct-3 が認識する DNA 配列）に置き換えた *lacZ* 遺伝子を作成し、これを大腸菌の染色体上に組み込んだ。Oct-2 や Oct-3 は真核細胞内では転写活性化因子としてはたらいているが、大腸菌の転写装置とは協調的にはたらくことができない。したがって、Oct-2 や Oct-3 は大腸菌のリポーター遺伝子の転写を活性化することはできず、逆にリポーター遺伝子内のオクタマー配列に結合することでその転写の進行を阻害し、リプレッサーとして機能する。その結果、Oct-3 を発現させた試験株は、オクタマー配列依存性に *lacZ* mRNA レベルと β -ガラクトシダーゼ活性の低下を示し、寒天培地上では Lac⁻ の表現型を示した。Oct-2 を発現させた場合にも、試験株は β -ガラクトシダーゼ活性の低下と Lac⁻ の表現型を示した。つまり、このシステムでは Oct タンパクの DNA 結合能を、大腸菌試験株の表現型を通してモニターすることができる。

次に、この試験株内で Oct-2 や Oct-3 とともに、第二のイフェクター遺伝子としてヒト T リンパ球由来細胞株の cDNA ライブラリーを発現させ、Oct-2 や Oct-3 に作用してその DNA 結合能を抑制するようなタンパクをコードする cDNA クローンを、試験株の表現型を指標にして選択することを試みた。1 × 10⁵ 個のコロニーの中から再現性のある Lac⁺ のコロニーを形成させることができる cDNA クロンを選び出すことを試みたが、Oct-3 と同時に発現させて再現性のある Lac⁺ のコロニーを作らせるようなクローンは得られなかった。一方、Oct-2 と同時に発現させて Lac⁺ のコロニーを作らせる cDNA クロンは 3 つ得られた。塩基配列解析の結果、得られたクローンのうちのひとつ bCT1 は、かつて同じライブラリーから別の方法で選択した cDNA クロン hT86 の一部分であることが明らかになった。hT86 は 630 塩基の長さで、116 コドンからなるオープンリーディングフレームを含み、予測されるタンパクの一次構造上、典型的な Zn フィンガーモチーフを 1 個もっている。この hT86 は Oct-2 とともに大腸菌試験株内で発現させ

ると、Oct-2のリプレッサー活性を阻害して、 β -ガラクトシダーゼ活性を回復させ、Lac⁺の表現型をもたらす。また hT86 と Oct-2 を同時に発現させた大腸菌から回収したタンパクを用いた gel shift assay では、hT86 が Oct-2 タンパクのオクタマー配列への結合を抑制する活性を有することが示された。

真核生物の転写活性化因子を大腸菌内でリプレッサーとして作用させる実験は以前から報告されていた。しかし、そこに第二の発現ベクターを導入し、タンパク-タンパク相互作用を利用して、ドミナント・ネガティブな抑制機能を有するタンパクをコードしている遺伝子を直接選択してしまう試みはまったく新しいものである。

さらにこのアッセイシステムは、リポーター遺伝子のオクタマー配列を、任意の転写調節因子の標的 DNA 配列に置換することで、種々の転写調節因子の研究に応用できるという長所を持っている。

審査結果の要旨

本研究を行った照沼篤は転写調節因子に別のタンパクが作用して、前者の転写調節能力を修飾してしまうような、タンパク・タンパク相互作用を介した転写調節機構の存在にもとづき、ある転写調節因子に対してドミナント・ネガティブに作用するようなタンパクをコードする遺伝子を選択するための有効な手段を得る目的で実験を行った。そのため、真核生物の発生や分化に関わる一群の DNA 結合性転写調節因子が属する POU 転写因子ファミリーをモデルシステムに選んだ。まずリポーター遺伝子として、オペレーター領域をオクタマー配列に置き換えた *lacZ* 遺伝子を作成し、これを大腸菌の染色体上に組み込んだ。この系で Oct-2 や Oct-3 は真核細胞内では転写活性化因子としてはたらいっているが、大腸菌の転写装置とは協調的にはたらくことができないので、Oct-2 や Oct-3 は大腸菌内のリポーター遺伝子の転写を活性化することはできず、逆にリポーター遺伝子内のオクタマー配列に結合することでその転写の進行を阻害し、リプレッサーとして機能する。その結果、このシステムでは Oct タンパクの DNA 結合能を大腸菌試験株の表現型を通してモニターすることができることを確かめた。さらに、この試験株内で Oct-2 や Oct-3 とともに、第二のイフェクター遺伝子としてヒト T リンパ球由来細胞株の cDNA 結合能を抑制するようなタンパクをコードする cDNA クローンを、試験株の表現型を指標にして選択することを試みた。Oct-3 と同時に発現させて再現性のある Lac⁺ のコロニーを作らせるようなクロンは得られなかったが、Oct-2 と同時に発現させて Lac⁺ のコロニーを作らせる 3 つの cDNA クロンのうちのひとつ bCT 1 は、かつて同じライブラリーから別の方法で選択して cDNA クローン hT86 の一部分であることが明らかになった。この hT86 は Oct-2 とともに大腸菌試験株内で発現させると、Oct2 のリプレッサー活性を阻害して、 β -ガラクトシダーゼ活性を回復させ、Lac⁺ 表現型をもたらす。また hT86 と Oct-2 を同時に実現させた大腸菌から回収したタンパクを用いた gel shift assay では、hT86 が Oct-2 タンパクのオクタマー配列への結合を抑制する活性を有することが示された。

このような真核生物の転写活性化因子を大腸菌内でリプレッサーとして作用させる実験のうちそこに第二の発現ベクターを導入し、タンパク・タンパク相互作用を利用して、ドミナント・ネガティブな抑制機能を有するタンパクをコードしている遺伝子を直接選択する試みは新しいものである。また、このアッセイシステムは、リポーター遺伝子のオクタマー配列を、任意の転写調節因子の標的 DNA 配列に置換することで、種々の転写調節因子の研究に応用できるという長所を持つものであり学位に十分値すると思う。