

氏 名	谷 口 善 仁
学位(専攻分野)	博 士 (医 学)
学位記番号	医 博 第 2035 号
学位授与の日付	平 成 10 年 5 月 25 日
学位授与の要件	学 位 規 則 第 4 条 第 1 項 該 当
研究科・専攻	医 学 研 究 科 分 子 医 学 系 専 攻
学位論文題目	LIM protein KyoT2 negatively regulates transcription by association with the RBP-J DNA-binding protein.

(LIM蛋白質KyoT2はDNA結合蛋白質RBP-Jと結合することにより転写を負に制御する。)

(主査)

論文調査委員 教授 伊藤嘉明 教授 野田 亮 教授 本庶 佑

論 文 内 容 の 要 旨

転写活性化因子であるNotch蛋白質の細胞内領域(活性型Notch)やEpstein-Barrvirus nuclear alltigen 2 (EBNA 2)は、それ自身ではDNAに結合できず、DNA結合因子RBP-Jを介して特異的なプロモーター配列に結合して転写を活性化することが知られている。また、RBP-J自身は転写抑制能を有し、RBP-Jに結合する転写抑制因子の存在が想定されている。このようなRBP-Jを介した転写メカニズムの詳細を明らかにするために、酵母を用いたtwo-hybrid法によりRBP-J結合因子の単離を試みた。その結果、Notchを含むいくつかの遺伝子断片が単離されたが、その内の1つは蛋白質間相互作用に関与するモチーフとして知られているLIMドメインを持つ遺伝子、KyoTであった。KyoTには、少なくとも2つの転写産物が存在し、それぞれ4つ及び2つのLIMドメインを持つ蛋白質をコードしていた(KyoT 1, KyoT 2)。これら2つの転写産物は、エクソンの1つが選択的スプライシングにより除去されるために後続のエクソンで異なる読み枠が使われ、KyoT 1では第3、第4LIMドメインに、KyoT 2ではRBP-J結合領域に翻訳されることがゲノムの解析より示唆された。

酵母を用いたtwo-hybrid法、及び、glutathione-S-transferase (GST) 融合蛋白質を用いた結合実験において、KyoT 2はRBP-Jと強固に結合することが示された。それに比して、C末端のRBP-J結合領域を欠くKyoT 1は、RBP-Jとごく微弱な結合しか示さなかった。RBP-Jは普遍的に発現しているが、ノーザンブロット法により、KyoTも様々な組織で発現していることが示された。特に肺や骨格筋で強い発現が認められた。どの組織においてもKyoT 1の方が多く発現していた。未分化胚細胞F9に発現させると、KyoT 1は細胞質に、KyoT 2は核に存在し、KyoT 2は細胞の核内でRBP-Jと結合していることが示唆された。KyoT 2とRBP-JをCOS 7細胞に発現させ免疫沈降を行うとお互いに共沈することから、これら2つの蛋白質は細胞内でも会合していることが示された。またelectrophoresis mobility shift assayより、KyoT 2はDNAに結合したRBP-Jに結合するとともに、RBP-JをDNAから解離させる作用があることが明らかとなった。

NotchやEBNA 2には保存されたトリプトファンとプロリンが存在し、RBP-Jとの結合に必須であるが、KyoT 2のRBP-J結合部位にもこれらのアミノ酸は保存されていた。また、種々のRBP-J変異体とKyoT 2との結合実験より、KyoT 2はNotchやEBNA 2と同様にRBP-J蛋白質の中央部分に結合することが示された。GST融合蛋白質を用いた免疫沈降実験では、KyoT 2, Notch, EBNA 2はRBP-Jへの結合をお互いに競合することが示された。これらのことより、この3つの蛋白質は非常に似た様式でRBP-Jに結合することが示唆された。また、KyoT 1, KyoT 2自身は転写活性を持たないが、KyoT 2は活性型NotchやEBNA 2による転写活性を用量依存的に抑制した。以上のことから、現在までRBP-Jを介した転写を負に抑制するものとしてショウジョウバエのHairlessが知られていたが、KyoT 2は哺乳細胞で働きうる、Hairlessとは異なる新しい転写調節因子と考えられた。

論文審査の結果の要旨

転写因子RBP-Jに結合する因子を明らかにするために、酵母を用いたtwo-hybrid法を試み、LIMドメインを持つ遺伝子、KyoTを単離した。KyoTには、選択的スプライシングにより少なくとも2つの転写産物、KyoT1、KyoT2が存在し、それぞれ4つ及び2つのLIMドメインを持つ蛋白質をコードしていた。

酵母を用いたtwo-hybrid法、in vitroでの結合実験、及び、免疫沈降において、KyoT2はRBP-Jと強固に結合したが、C末端のRBP-J結合部位を欠くKyoT1は、RBP-Jとごく微弱な結合しか示さなかった。ゲルシフト法では、KyoT2はRBP-JをDNAから解離させた。KyoTは肺や骨格筋を始めとする様々な組織で、KyoT1優位の発現を示した。F9細胞に発現させると、KyoT1は細胞質に、KyoT2は核に存在した。

KyoT2、及び、転写活性化因子であるNotchやEBNA2はRBP-J蛋白質の中央部分に結合し、RBP-Jへの結合をお互いに競合阻害した。さらにKyoT2はこれら転写活性化因子による転写活性を用量依存的に抑制した。以上のことから、KyoT2はRBP-Jを介した転写を負に抑制し得る転写調節因子と考えられた。

以上の研究はRBP-Jを介した転写機構の解明に貢献し、医学の発展に寄与するところが多い。

従って本論文は博士（医学）の学位論文として価値あるものと認める。

なお、本学位授与申請者は、平成10年3月19日実施の論文内容とそれ関連した試問を受け、合格と認められたものである。