

氏名	なる 鳴 海 治
学位(専攻分野)	博士 (医学)
学位記番号	医博第2232号
学位授与の日付	平成12年3月23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	医学研究科脳統御医学系専攻
学位論文題目	OUT, a Novel Basic Helix-Loop-Helix Transcription Factor with an Id-like Inhibitory Activity (Id蛋白と同様の抑制作用を持つ新規ヘリックス・ループ・ヘリックス型転写因子OUTに関する研究)

論文調査委員 (主査) 教授 影山龍一郎 教授 鍋島陽一 教授 橋本信夫

論文内容の要旨

MyoDを始めとするベーシック-ヘリックス-ループ-ヘリックス (bHLH) 型の転写因子は種々の細胞の分化過程において重要な役割を果たしている。これらの因子は、HLH領域を介してヘテロまたはホモ二量体を形成した後、塩基性アミノ酸に富む塩基性領域を介してDNA上のE-ボックス配列 (CANNTG) に結合して下流遺伝子の転写調節を行う。E蛋白と呼ばれるclassAのbHLH型転写因子とMyoDなどの組織特異的な発現を示すclassBのbHLH型転写因子がヘテロ二量体を形成して下流遺伝子の遺伝子発現を誘導するのが一般的である。一方、bHLH型転写因子はIdと呼ばれる分化抑制因子により機能抑制を受ける。これはHLH領域を持つIdがE蛋白と二量体を形成するため、組織特異的なclassBのbHLH型転写因子がE蛋白とヘテロ二量体を形成しえなくなるためである。したがって、分化抑制因子IdがbHLH型転写因子の機能を蛋白レベルで抑制的に調節することにより、細胞の分化と機能発現が制御されているといえる。

分化抑制因子の一つであるId2の遺伝子欠損マウスにおいて妊娠に伴う乳腺の増殖と腺組織への分化に障害が認められることから、この過程に関わるbHLH型転写因子の存在が示唆されていた。このことに注目し乳腺細胞mRNAを元にdegenerate primerを用いたRT-PCRを行い、新規のbHLH型転写因子のcDNAの断片(144 bp)を同定した。これをプローブとしてマウス卵巣cDNAライブラリーから全長4.1 kbの新規遺伝子のcDNAを単離した。このcDNAにコードされる209個のアミノ酸からなる蛋白は、構造上bHLHモチーフを持つ新規bHLH型転写因子であり、中胚葉由来の臓器に特異的に発現するparaxisを始めとするbHLH型転写因子に高い相同性を示した。ノザンプロット法などによる発現解析では、マウス成体の卵巣 (Ovary)、子宮 (Uterus)、精巣 (Testis) に強い発現を認め、乳腺でも弱い発現を認めたものの、他の多くのbHLH型転写因子とは異なり胎生期の組織においては発現が認められなかった。この発現様式に基づきこの新規因子をOUTと名付けた。マウス成体子宮では、平滑筋細胞に特異的なOUTの発現を認め、妊娠に伴い増強するその発現は出産期に最も低下するという経時変化を示した。生化学的な機能解析ではHLH領域を介したE蛋白との二量体形成は共役沈降によって確認されたが、他のbHLH型転写因子とは異なり、CASTing法を用いてもOUTのDNA結合能は検出できなかった。逆にOUTは、ゲルシフトアッセイにおいて他のbHLH型転写因子のE-ボックスへの結合を阻害する活性を有していた。ルシフェラーゼアッセイにおいてもE12-MyoDヘテロ二量体によって惹起される転写活性に対して抑制効果を示した。さらにC2C12筋芽細胞を用いた分化誘導系においても同様の抑制効果を示した。OUTの欠失変異体を用いた解析によりbHLH領域からC末領域にこうした抑制活性があることが明らかになったが、転写抑制因子を介して直接転写を抑制する領域は認められなかった。

以上のことから、新規bHLH型転写因子であるOUTは、分化抑制因子Idと同様の機構により、HLH領域を介して他のbHLH蛋白と結合しDNA結合能を持たない二量体を形成することによって転写を抑制し、子宮などの生殖組織の機能発現

に関わっているものと考えられた。

論文審査の結果の要旨

basic-helix-loop-helix (bHLH) 型転写因子は様々な細胞の分化過程に関与している。妊娠マウス乳腺を元に degenerate primer 法により新規の bHLH 因子の fragment を同定し、マウス卵巣 cDNA ライブラリーより全長 cDNA を単離した。この遺伝子産物は、構造上 bHLH モチーフを持つ新規転写因子であり、中胚葉由来の組織に発現する bHLH 因子に高い類似性を示し、主にマウス成体の卵巣、子宮、精巣に発現していたが、マウス胎生期では発現が認められなかった。HLH 領域を介した E 蛋白との二量体形成は共役沈降によって示されたが、他の bHLH 因子と異なりゲルシフトアッセイにおいて E-ボックス、N-ボックスへの結合は認められず、他の bHLH 因子の DNA への結合を阻害した。同様に E12-MyoD ヘテロ二量体によって惹起される転写活性に対して抑制効果を示した。C2C12 筋芽細胞の分化に対しても同様の抑制効果を示した。これらに示された抑制機構は、転写の負の調節因子として知られる Id 蛋白の抑制機構と同様である。

以上の研究は細胞の分化と機能発現に関する研究に寄与するところが大きい。

したがって、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 12 年 2 月 21 日実施の論文内容とそれに関連した試問を受け、合格と認められたものである。