

氏 名	むら たく や 村 田 卓 也
学位(専攻分野)	博 士 (理 学)
学位記番号	理 博 第 2002 号
学位授与の日付	平 成 10 年 9 月 24 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	理 学 研 究 科 生 物 科 学 専 攻
学位論文題目	ニワトリ α A-クリスタリン遺伝子の転写調節機構の研究
	(主査)
論文調査委員	教 授 竹 市 雅 俊 教 授 梅 園 和 彦 教 授 西 田 栄 介

論 文 内 容 の 要 旨

ニワトリ α A-クリスタリン遺伝子の水晶体特異的な発現はプロモーター上の2つのエンハンサー α CE1及び α CE2によって調節されている。本研究では、 α CE1に結合する因子の単離と機能解析を通じて、ニワトリ α A-クリスタリン遺伝子の転写調節機構の解明をめざした。 α CE1結合因子 α CEF1には、2種類のサブユニットをそれぞれ特異的に認識するモノクローナル抗体が作成されており、そのうちの一方を認識する抗体をもちいてcDNAクローンが得られていた。そこで、このcDNAクローン101がサブユニットをコードしているかどうか検討するところから研究を開始し、以下のことを明らかにした。1) cDNAクローン101は、ニワトリCP2 (cCP2) タンパク質をコードする。2) cCP2タンパク質は、単独でも α CE1に塩基配列特異的に結合し、 α CEF1と同一の塩基配列特異性を示す。3) 新たに作成したcCP2抗体は、 α CEF1を認識することから、cCP2は α CEF1のサブユニットをコードする。4) cCP2タンパク質は4量体を形成する。5) α CE1を介して転写を活性化する。

続いて、残りのサブユニットのクローニングを試み、ニワトリNF2d9 (cNF2d9) にコードされていることを明らかにした。cNF2d9はcCP2と高い相同性を有し、DNA結合、転写活性化などの機能が相同であることが分かった。また、cCP2とcNF2d9は、いずれもニワトリ胚全体で発現していることが明らかとなった。cCP2/cNF2d9で構成される α CEF1が普遍的な因子であるため、 α CEF1自身が α CE1の水晶体特異的なエンハンサー活性を規定する因子とは考えにくい。そこで、これまで明らかにしてきたcCP2/cNF2d9タンパク質およびその相同因子の機能解析の結果を利用し、 α CE1の水晶体特異的なエンハンサー活性を生じさせるメカニズムの解析を続けた。その結果、 α CEF1のDNA結合がエンハンサー活性にとって必須であるが、十分ではなく、 α CE1の水晶体特異性を規定するのは α CEF1結合配列 (CP2コンセンサス) の3'側に位置するLSE (Lehs-specific element) と名付けた6bpの領域であることがわかった。すなわち、 α CE1とは、CP2コンセンサスとLSEという性質の異なる2つの制御配列のモジュール構造をとっていることを明らかにした。LSEに結合する因子は、 α CE1の水晶体特異性を規定する可能性が高いため、LSE結合因子の同定を試みた。いくつかの因子を検討したなかでは、転写因子ATF4が最も有力な候補であることがわかった。

論 文 審 査 の 結 果 の 要 旨

水晶体は、組織分化のモデルシステムとして長い研究の歴史を持っている。水晶体分化のメカニズムを知るための方法論として、分化に伴って発現するクリスタリン遺伝子の発現制御機構について、ニワトリ初代培養細胞をもちいた解析が盛んにおこなわれてきた。この系は、水晶体分化のメカニズムの解析と同時に、水晶体特異的な転写調節機構の研究においても、すぐれた実験系を与えるものである。

申請者は、ニワトリ α A-クリスタリン遺伝子に着目し、その転写制御領域 α CE1を介した転写活性化のメカニズムの詳細

細な解析を、 α CE1 結合因子 α CEF1 に注目して行なった。申請者は、まず、 α CEF1 の構成タンパク質がニワトリ CP2 (cCP2), ニワトリ NF2d9 (cNF2d9) であることを明らかにした。次に、cCP2 タンパク質を用いた解析により、1) cCP2 タンパク質が、 α CE1 のエンハンサー活性に重要な塩基配列に特異的に結合する。2) その結合特異性が α CEF1 と一致している。3) α CE1 を介して転写を活性化する。4) α CE1 のエンハンサー活性にとって必須である。5) 4量体を形成する。といった点を明らかにした。cCP2 と cNF2d9 は構造的に類似したタンパク質であり、このような点に関しては、cNF2d9 においても、同様の実験結果を得ている。

次に、 α CEF1 の結合配列である CP2 コンセンサス配列は、 α CE1 にとって重要な塩基配列であり、 α CEF1 の構成タンパク質 cCP2 はエンハンサー活性にとって必須であることを明らかにしている。しかし、 α CEF1 は胚全体に分布する普遍的な核内因子であり、 α CE1 のエンハンサー活性とエンハンサー活性に必須な α CEF1 の発現パターンとの間には相関がない。この矛盾を埋め合わせる形で、 α CEF1 結合配列 (CP2 コンセンサス) の 3' 側に、エンハンサーの水晶体特異性を規定する LSE (Lens-specific element) が位置することを明らかにすることに成功した。LSE は、 α CE1 エンハンサーの水晶体特異性を規定する配列であり、 α CE1 は、CP2 コンセンサスと LSE が組み合わされた形で機能することが分かった。また、LSE に結合する転写因子の候補の中では、ATF-4 が最もふさわしいことを明らかにした。

以上、申請論文は、新規の転写因子 cCP2 と cNF2d9 複合体である α CEF1 の機能解析を行ない、この転写因子複合体が、水晶体特異的な転写調節において、決定的に重要な役割を担っていることを示したものである。また、申請者は、 α CEF1 による水晶体特異的な転写には、転写因子 ATF-4 との協調的な転写の活性化が必要である可能性を示唆しており、今後、 α CEF1 と ATF-4 による水晶体特異的な転写調節機構の解析を通して、水晶体分化の制御機構の研究に新たな道を開くものと期待される。本研究は、普遍的な転写因子による組織特異的な転写調節機構の理解に大きく寄与しており、今後の発展の方向性を示したものとみなされる。

よって、本論文は博士 (理学) の学位論文として価値あるものと認められる。なお、主論文に報告されている研究業績を中心とし、これに関連した研究分野について試問した結果、合格と認めた。