



Title	ERM, a PEA3 Subfamily of Ets Transcription Factors, Can Cooperate with c-Jun.
Author(s)	中江, 一人
Citation	大阪大学, 1996, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/39831">https://hdl.handle.net/11094/39831</a>
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、<a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">大阪大学の博士論文について</a>をご参照ください。

*The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA*

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

氏名	なかえかずと人
博士の専攻分野の名称	博士(医学)
学位記番号	第12421号
学位授与年月日	平成8年3月25日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 医学研究科外科系専攻
学位論文名	ERM, a PEA3 Subfamily of Ets Transcription Factors, Can Co-operate with c-Jun. (c-Junと協調的に転写を活性化するETS転写因子ERM)
論文審査委員	(主査) 教授 田野 保雄  (副査) 教授 辻本 賀英 教授 平野 俊夫

## 論文内容の要旨

## 【目的】

ETS転写因子ファミリーは、ETSドメインと言われる特異な構造を介して、GGA(A/T)コアモチーフを認識する転写因子群であり、他のDNA結合蛋白や補助活性化因子との相互作用、協調作用によって、それぞれのETS転写因子に独特な転写活性を発揮することが知られている。また、ETS結合部位は、多くのウイルス遺伝子や、細胞遺伝子のプロモーター、エンハンサーに存在し、細胞内シグナル伝達路の標的としても重要である。そこで、我々は、ETSドメイン特異的プライマーを用いたRT-PCR法により、PEA3と相同性の高いEts cDNA(ERM)を単離し、ERMと他の蛋白分子との相互作用、活性化機構について検討を加えた。

## 【方法ならびに成績】

ETSドメイン内で特に保存された領域に対して特異的プライマーを作成し、HepG2 poly(A)<sup>+</sup>mRNAを用いてRT-PCRを行ない、Ets cDNA部分ライブラリーを作製した。その中よりPEA3類似クローン(ERM)のcDNA断片を単離し、それをプローブとして用いて、ヒトλgt11cDNAライブラリーよりERMcDNA全長を得た。ERMは、C末にETSドメイン(アミノ酸364-448)、N末に酸性領域を持つ510アミノ酸からなるETS転写因子であり、PEA3サブファミリーのマウスER81と特に高い相同性が認められた。MAPキナーゼの基質となる部位を3ヶ所に認め、アミノ酸146-195からなるプロリンに富む部位は、ERMに特異的であった。

ERMは、胎児期細胞株を含めて、広範な組織、細胞系に発現していることをノザンプロットを用いて明らかにした。さらに、ERMの染色体座をFISH法を用いて検討した結果、3q27に位置することが判明した。

ERM発現ベクターを、種々のエンハンサーを含むルシフェラーゼレポーター遺伝子と共に一過性にNIH3T3細胞に形質導入し、ERMの転写活性を検討した。レポーター遺伝子の発現は、ERMの発現により、ETS結合配列(EBS)単独では4倍であったのに対し、EBSとAP1配列からなるエンハンサー(EBS-AP1)では6倍、EBSとCRE配列からなるエンハンサー(EBS-CRE)では27倍に増加した。このことから、ERMがAP1あるいはCRE結合蛋白と協調して転写を活性化する可能性を考え、ERMと協調するCRE結合蛋白の同定を試みた。まず種々のCRE結合蛋白のドミナントネガティブとして機能する発現ベクターをERMと共にNIH3T3細胞に導入して解析した。ERMによる3XEBS-CREレポーター遺伝子の活性化は、2種類のCRE-BP1のドミナントネガティブとして機能するCRE-BP1変異体を導入した場合に抑制され、CREBドミナントネガティブ(KC

R E B) を用いた場合は抑制されなかった。以上のことより、E R MによるE B S - C R E エンハンサーの活性化には、C R E - BP 1あるいはそれとヘテロダイマーを形成しうる蛋白の関与が示唆された。そこで、どのC R E 結合蛋白がE R Mと協調作用を示しうるのか、種々のC R E 結合蛋白発現ベクターを用いて検討したところ、c - Jun のみがE R Mと協調的に作用することが判明した。

E R MのD N A 結合活性をc - Jun が増強するのかどうか、それぞれのリコンビナント蛋白を用い、E B S - C R E 配列をプローブとしたゲルシフトアッセイを行い検討したが、明らかな結合能の増強及び複合体形成は認めなかった。次に、c - Jun を含む種々のC R E 結合蛋白が、E R Mの転写活性化能にどのような効果を持つか検討するため、GAL 4 D N A 結合ドメインとE R Mの融合蛋白発現ベクターを作製、種々のC R E 結合蛋白と共にNIH 3 T 3 細胞に導入して解析した。その結果、c - Jun のみが、GAL 4 - E R Mの転写活性化能を約30倍増強させることができた。E R Mと相同性の高いER81の転写活性は、c - Jun により活性化されなかった。GAL 4 D N A 結合ドメインとE R Mの種々の欠失変異体との融合蛋白発現ベクターを構築し、E R Mのどの領域がc - Jun による転写能増強に必須であるか検討した。その結果、c - Jun による活性化にはE R Mのアミノ酸1 - 165, 166 - 326の両方の領域が必須であることが判明した。チミジンキナーゼプロモーターを挿入したGAL 4 結合配列を含むレポーター遺伝子を用いて検討した結果、E R Mのアミノ酸166 - 326は転写抑制領域と考えられた。またG S TとE R Mの種々の変異体との融合蛋白を作成し、ウサギ網状赤血球ライセートを用いて合成した<sup>35</sup>S - c - Jun 蛋白との会合を検討した結果、E R Mのc - Jun による転写活性化の増強に必要な領域（アミノ酸1 - 326）とc - Junとの間には、直接的な会合は認めなかった。

#### 【総括】

E T S ドメイン特異的プライマーを用いたR T - P C Rにより、E T S 転写因子E R Mを単離した。E R MはPEA 3 サブファミリー（PEA 3, ER81）と高い相同性が認められ、胎児期細胞株を含む広範な組織、細胞系に発現していた。

E R Mはc - Junと共に転写を協調的に活性化すること、c - Junによる転写活性化能の増強には、E R Mのアミノ酸166 - 326を含むN末端が重要であることが明らかになった。また、E R Mと高い相同性を持つER81に対しては、c - Junは転写を活性化しないことから、c - JunによるE R Mの転写活性化能の増強は、E R Mに特異的なプロリンに富むアミノ酸146 - 195の領域が重要な役割を果たしていると思われた。

E R Mのアミノ酸166 - 326は転写抑制領域と考えられること、c - JunとE R MのN末端との間には直接的な会合は認められないことなどから、c - JunによるE R Mの転写活性化能の増強は、E R Mの転写抑制領域が持つ転写抑制効果を、c - Junが阻害することによるものであると考えた。

*JunB, Rb, CD8 α、TCR α* 遺伝子等、E B SとC R E 配列からなるエンハンサー、プロモーターを持つ遺伝子に対して、E R Mとc - Junが協調的に転写を制御している可能性が示唆された。

染色体座3q27に転座や欠失を認める腫瘍に、E R Mの発現、活性化の異常が関わっている可能性が考えられた。

#### 論文審査の結果の要旨

遺伝子発現調節、シグナル伝達、細胞増殖、D N A複製など、種々の重要な役割を担うE T S 転写因子ファミリーについて、それぞれの特徴、分子間相互作用を明らかにすることは、細胞内シグナル伝達研究にとって不可欠である。

本研究は、E T S ドメイン特異的プライマーを用いたR T - P C R法により、E T S 転写因子・E R Mを単離し、その発現様式、染色体座を明らかにすると共に、E R Mと他の蛋白分子との相互作用、活性化機構について検討を加えたものである。

ノザンプロットを用いて、E R Mは、広範な組織、細胞系に発現していることを明らかにした。F I S H法により、E R Mの染色体座（3q27）を決定した。

ルシフェラーゼアッセイ等を用いて、E R Mの転写活性が、c - Junにより特異的に活性化されることを示し、さらに、E R Mの転写抑制領域（アミノ酸166 - 326）が持つ転写抑制効果を、c - Junが間接的に阻害する結果、E R

Mの転写活性が増強すると言う転写活性化機構を明らかにした。

ERMの発現様式、染色体座、転写活性化機構を明らかにした本研究は、転写因子として多彩な生理作用を持つETSファミリーを理解、研究していく上で重要な足掛かりとなるものである。c-Junにより転写活性が活性化されるETS転写因子は、本論文のERMが最初であり、その転写制御機構を明らかにした成果は高く評価され、学位論文として十分値するものと認められる。