

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	https://hdl.handle.net/11094/39831
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。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

Osaka University

氏名	中 江 一 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 PEA 3 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、PEA 3 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、HepG 2 poly (A)⁺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PEA 3 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ERM cDNA 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、PEA 3 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シフェラーゼレポーター遺伝子と共に一過性にNIH 3T3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NIH 3T3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

REB)を用いた場合は抑制されなかった。以上のことより、ERMによるEBS-CREエンハンサーの活性化には、CRE-BP1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CRE結合蛋白がERMと協調作用を示しうるのか、種々のCRE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ERMと協調的に作用することが判明した。

ERMのDNA結合活性をc-Junが増強するかどうか、それぞれのリコンビナント蛋白を用い、EBS-CRE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CRE結合蛋白が、ERM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に、GAL4 DNA結合ドメインとERMの融合蛋白発現ベクターを作製、種々のCRE結合蛋白と共にNIH3T3細胞に導入して解析した。その結果、c-Junのみが、GAL4-ERMの転写活性化能を約30倍増強させることが判明した。ERM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。GAL4 DNA結合ドメインとERMの種々の欠変異体との融合蛋白発現ベクターを構築し、ERMのどの領域がc-Junによる転写能増強に必須であるのか検討した。その結果、c-Junによる活性化にはERM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GAL4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、ERMのアミノ酸166-326は転写抑制領域と考えられた。またGSTとERM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³⁵S-c-Jun蛋白との会合を検討した結果、ERM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の間には、直接的な会合は認めなかった。

【総括】

ETSドメイン特異的プライマーを用いたRT-PCRにより、ETS転写因子ERMを単離した。ERMはPEA3サブファミリー(PEA3, 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。

ERM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、ERMのアミノ酸166-326を含むN末が重要であることが明らかになった。また、ERM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ERMの転写活性化能の増強は、ERM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。

ERM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ERMのN末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ERMの転写活性化能の増強は、ERM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、EBSとCRE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、ERM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に転座や欠変を認める腫瘍に、ERM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、DNA複製など、種々の重要な役割を担うETS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、ETSドメイン特異的プライマーを用いたRT-PCR法により、ETS転写因子・ERMを単離し、その発現様式、染色体座を明らかにすると共に、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ものである。

ノザンプロットを用いて、ERM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。FISH法により、ERM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、ERM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、ERM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、ER

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。