OUKA
The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	Activation of Heat Shock Transcription Factor 3 by c - Myb in the Absence of Cellurar Stress
Author(s)	谷川, 潤
Citation	大阪大学, 1999, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/41687
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、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

氏名	谷川（たにがわ）　潤（じゅん）
博士の専攻分野の名称	博士（医学）
学位記番号	第　14464　号
学位授与年月日	平成11年3月25日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 医学系研究科生理系専攻
学位論文名	Activation of Heat Shock Transcription Factor 3 by c－Myb in the Absence of Cellurar Stress （細胞性ストレス非存在下における，c－Mybによる Heat Shock Transcription Factor 3の活性化）
論文審査委員	（主査） 教授　野島　博 （副査） 教授　仲野　徹　教授　西宗　義武

論文内容の要旨

【目的】

ストレス応答において主要な役割を果たす熱ショック蛋白質は分子シャペロンとも呼ばれ，蛋白質の折り畳みや輸送に深く関与する。また，ストレスを受けていない細胞における熱ショック蛋白質の発現は細胞増殖による制御を受け，G1／S期にその発現が上昇する事が知られている。一方，原癌遺伝子産物であるc－Mybは細胞増殖制御に関与する転写因子でG1／S期にその発現が上昇し，AACNG配列に直接結合して転写を促進する事が分かっている。

以前我々は，c－Mybがhsp70遺伝子の発現をそのプロモーター上のHeat Shock Element（HSE）を介して誘導する事及び，その際にc－MybはHSEに直接結合しない事を見い出した。

本研究は，c－MybによるHSEを介した転写活性化のメカニズムをさらに解析することにより細胞増殖制御とストレス応答の関連について明らかにする事を目的とし，以下の実験を行った。

【方法ならびに成績】

Molt－4細胞の全抽出液及びHSEプローブを用いたゲルシフト法により，非ストレス条件下で見られるHSE－蛋白質複合体中にc－Mybが存在する事が分かった。

NIH3T3細胞に，HSEを含むレポータープラスミド，Heat Shock Transcription Factor（HSF）1，HSF2，HSF3及びc－Mybの発現プラスミドをトランスフェクションし，chrolamphenicol acetyltransferase assayを行った。その結果c－Mybは3種類のHSFの中で，HSF3を介してHSEからの転写促進を行う事が分かった。

Glutathione-S-transferase（GST）融合蛋白質として発現させたHSF1，HSF2及びHSF3と［^{35}S］c－Mybを用いてin vitro結合実験を行った。その結果，c－MybはHSF3とのみ結合する事が分かった。c－Myb種々のmutantを用いたin vitro結合実験から，c－MybのDNA結合ドメインがHSF3との結合に必要であった。また，c－Mybの転写抑制領域に含まれるロイシンジッパー領域も結合の安定化に寄与していた。さらにHSF3のmutantを用いたin vitro結合実験を行い，HSF3のN末端に位置するDNA結合ドメインがc－Mybとの結合に必要である事が分かった。

NIH－3T3細胞に，Ga14結合は配列を含むレポータープラスミド，Ga14－HSF融合蛋白質，c－Myb－VP16融合蛋白質又はVP16単独の発現プラスミドをトランスフェクションし，in vivo two-hybrid assayを行った。その

結果，生理的条件下でもHSF 3とｃ－Mybが特異的に結合する事が分かった。

293T細胞にHSF 3の発現プラスミドのみ又はHSF 3とｃ－Mybの発現プラスミドをトランスフェクションし，HSF 3の発現場所を共焦点レーザー顕微鏡で調べた。HSF 3単独で発現させた場合は，HSF 3は核全体に均一に分布していた。一方，HSF 3とｃ－Mybを共発現させると，HSF 3は核内の特定の領域に局在していた。

293T細胞にｃ－Myb，HSF 3単独又は両者の発現プラスミドをトランスフェクションし，その全抽出液及びHSEプローブを用いてゲルシフトアッセイを行った。その結果ｃ－MybがHSF 3のDNA結合活性を誘導する事が分かった。

【総括】

ｃ－MybとHSF 3はそのDNA結合ドメインを介して直接結合し，その結果HSF 3が活性化される事が分かった。ｃ－MybはＧ１期からＳ期にかけてその発現が上昇し，Ｇ１期からＳ期の移行に必要であると考えられている。また，Hsp70もストレスを受けていない細胞で，Ｇ１期からＳ期に発現が上昇する事が知られている。今回明らかになったｃ－MybによるHSF 3の活性化により，ストレス応答遺伝子の細胞周期に依存した発現制御が行われている事が示唆される。

論文審査の結果の要旨

本論文では，原がん遺伝子産物Mybが，ストレス応答遺伝子の転写活性化因子のひとつであるHSF 3に直接結合し，HSF 3を活性化することが初めて明らかにされている。ストレス応答遺伝子は種々の蛋白質の折れ畳みを促進する，いわゆるシャペロンと総称される制御因子をコードしており，シャペロンの発現は細胞増殖とカップルしていることが古くから知られていたが，そのメカニズムは不明であった。Mybは細胞周期がＧ１期からＳ期に移行する時に上昇することが知られている。したがって，本論文で明らかにされた，MybによるHSF 3の活性化は，細胞周期に応じたシャペロンの発現制御メカニズムの少なくとも一部を説明するものである。また，本論文では，MybとHSF 3の相互作用が詳細に解析されており，結合に関与するドメイン等についての大変精密なデーターが示されている。

さらに本論文では，代表的ながん抑制遺伝子産物であるp53がHSF 3に直接結合すること，p53とMybのHSF 3への結合は競合的であることが示され，p53がMybによるHSF 3の活性化を阻害することが，初めて明らかにされている。p53は細胞周期のＧ１期からＳ期への移行を阻害することが知られている。従って，この知見からp53がHSF 3の活性化を阻害し，シャペロンの発現上昇を抑制することが示唆された。この知見は細胞周期とシャペロンの発現が如何に関連しているかについての，大変興味ある知見である。

以上のように，本論文はシャペロンの発現が細胞周期に応じて如何に制御されているかを理解する上で，大変重要な知見を明らかにしており，博士（医学）の学位授与に値すると考えられる。