OUKA
The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	Regulation of Myeloid Zinc Finger Protein 2A Transactivation Activity through Phosphorylation by Mitogen-activated Protein Kinases
Author(s)	小川, 裕規
Citation	大阪大学, 2003, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/43908
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	小川 裕規（おがわ ひろのり）
博士の専攻分野の名称	博士（医学）
学位記番号	第 17603 号
学位授与年月日	平成15年3月25日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 医学系研究科生体制御医学専攻
学位論文名	Regulation of Myeloid Zinc Finger Protein 2A Transactivation Activity through Phosphorylation by Mitogen-activated Protein Kinases （MAPキナーゼリン酸化によるMZF-2A転写活性の制御）
論文審査委員	（主査） 教授 長田 重一 （副査） 教授 金倉 譲　教授 近藤 寿人

論文内容の要旨

＜目的＞

myeloid zinc finger（MZF）遺伝子は、骨髄細胞に特異的に発現し、その増殖・分化を制御していると考えられている。近年、MZF ノックアウトマウスが作製され、これらのマウスでの骨髄細胞の分化異常、そして肝臓および脾臓での腫瘍形成が報告された。この腫瘍は増殖能の高い骨髄細胞からなることから、MZF は骨髄細胞において腫瘍/増殖抑制因子として機能していると考えられる。MZF 遺伝子からは、転写開始部位の選択により2種のポリペプチド、MZF-2A および MZF-1、が産生される。MZF-2A は特徴的なドメインとして LeR ドメイン、転写活性化ドメイン、そして13個の Zinc フィンガードメインをもつ。一方、MZF-1 は本質的に Zinc フィンガードメインのみからなり、MZF-2A と比較すると極めて弱い転写活性しかもっていない。本研究は、MZF-2A による転写活性化の分子機構を明らかにすることを目的に、MZF-2A の MAP キナーゼによるリン酸化に着目して解析を行った。

＜方法ならびに成績＞

MZF-2A の転写活性化ドメインをより詳細に解析するために、種々の欠失変異体を作成し、それらの転写活性をレポーターアッセイにより検討した。その結果、分子中央の約 50 アミノ酸からなる領域が、最小転写活性化ドメインとして機能することが分かった。この領域は、眼の発生に重要な転写因子 Pax6 の転写活性化ドメインと高い相同性を示し、MAP キナーゼによるリン酸化を受ける可能性が考えられた。そこで、大腸菌で生産した GST 融合タンパク質および精製 MAP キナーゼを用いた in vitro リン酸化アッセイにより検討したところ、MZF-2A の転写活性化ドメインは ERK1 によって強く、p38 MAP キナーゼによって弱くリン酸化されるが、JNK1 には全くリン酸化を受けないことが分かった。次に、リン酸化部位を同定するために、リン酸化候補部位をアラニンに置換した一連の点変異体を作成して、上と同様の in vitro リン酸化アッセイを行った。その結果、転写活性化ドメイン内に存在する3つのセリン残基 Ser257、Ser275、および Ser295 が、MAP キナーゼによってリン酸化されることが分かった。骨髄細胞株である LGM-1 細胞に、野生型 MZF-2A もしくは3カ所のリン酸化部位すべてをアラニンに置換した変異体（S257/275/295A）を導入し、TPA、FCS、IL-3 といった MAP キナーゼ経路活性化剤で細胞を刺激したところ、野

生型 MZF-2A は顕著にリン酸化を受けたにもかかわらず、S257/275/295A 変異体はまったくリン酸化を受けなかった。また、ERK もしくは p38 MAP キナーゼに対する特異的阻害剤は、上記刺激に伴う野生型 MZF-2A のリン酸化を阻害した。これらの結果は、in vivo においても MZF-2A は ERK および p38 MAP キナーゼによってリン酸化されることを示している。次に、このリン酸化の意義を明らかにするために、S257/275/295A 変異体の転写活性をレポーターアッセイにより検討したところ、この変異体は野生型に比べて約 6 倍高い転写活性を示し、MZF-2A の転写活性が MAP キナーゼによるリン酸化によって抑制されることが分かった。

また、MZF-2A の転写 co-factor を同定することを目的に、新規の酵母 two-hybrid 法である Ras recruitment system によるスクリーニングを行った。その結果、SWI2/SNF2 型 ATPase ドメインを有する新規タンパク質が、MZF-2A の転写活性化ドメインに結合することを見いだした。私はこの新規タンパク質を、Drosophila の Domino タンパク質と高い相同性を示すことから、mammalian Domino（mDomino）と命名した。興味深いことに、Drosophila において domino 遺伝子が欠失すると、血球細胞が全く産生されないことが知られており、進化を通じて Domino が血球の増殖・分化に関わっている可能性が考えられた。

＜総括＞

IL-3 など多くの増殖/生存促進因子が、ERK および p38 MAP キナーゼを活性化することが知られている。したがって、これらの因子は MZF-2A のリン酸化を引き起こし、その結果 MZF-2A の腫瘍/増殖抑制効果を減退させる可能性が考えられる。また、MZF-2A が mDomino と協調してどのような遺伝子の発現を調節しているのかを明らかにすることは、今後の重要な課題である。

論文審査の結果の要旨

本研究は、転写因子 MZF-2A による転写活性化の分子機構を生化学的および分子生物学的手法により解析し、MZF-2A の転写活性が MAP キナーゼによるリン酸化そして mDomino との結合という全く異なる 2 つの機構により制御されていることを明らかにした。本研究は、転写因子による転写調節機構の理解に大きく貢献するものであり、博士（医学）の学位授与に値すると考えられる。