



Title	肝化学発ガン過程におけるヒストンアセチル化酵素 MOZの機能解析
Author(s)	大田, 久美子
Citation	大阪大学, 2005, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/45666
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、 https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed 大阪大学の博士論文について

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

氏名	大田久美子
博士の専攻分野の名称	博士(薬学)
学位記番号	第19430号
学位授与年月日	平成17年3月25日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 薬学研究科生命情報環境科学専攻
学位論文名	肝化学発ガン過程におけるヒストンアセチル化酵素 MOZ の機能解析
論文審査委員	(主査) 教授 西原 力 (副査) 教授 前田 正知 教授 田中 慶一 教授 土井 健史

論文内容の要旨

真核生物の核内DNAは、ヒストンタンパク質に巻き付いたヌクレオソームを基本単位として、クロマチンを形成している。これまでに、クロマチン内ヒストンのアセチル化やリン酸化などの修飾反応がクロマチン構造を変化させ、転写反応を制御していると考えられている。クロマチンの局所的な構造変化に関する因子として、ヒストンアセチル化酵素(histone acetyltransferase、HAT)がある。近年、転写共役因子がHAT活性を併せ持つことから、HAT活性はおもに転写活性化に寄与すると考えられている。

多くのガンでHATの遺伝子異常がみつかっており、HATによるクロマチン制御の破綻がガン化の引き金になると考えられている。また、ガン関連因子のc-JunやP53の発現や機能にHATが関与することが報告されている。

本研究では、肝ガンにおけるHATの機能について明らかにすることを目的とし、ラット肝化学発ガンのモデル系としてSolt-Farbor法を用いて、発ガン過程におけるHATの発現変化を解析した。これまでにHATとしては乳類で同定されている8種類について、肝ガン誘導による発現変化をウェスタンプロット法により解析した。その結果、腫瘍に対して抑制的に働くことが知られているP300およびCBPの発現が減少するのに対し、MYSTファミリーに属するHATであるMonocytic leukemia zinc finger protein(MOZ)の発現が増加していた。調べた中で唯一MOZの発現が発ガン誘導に伴って増加したことから、MOZに着目して肝特異的機能への関与について解析した。

MOZは白血病患者で高頻度に染色体転座を起こしており、MOZの機能異常が白血病の原因になると考えられている。肝ガンラットでもMOZの染色体転座を起こしているかについて調べた。MOZのN末端領域、MYST領域およびC末端領域の異なる位置を抗原として認識する特異的抗体を用いて、ウェスタンプロット解析を行った。肝ガンラットにおいて、MOZを認識する全ての抗体で約230kDaの同位置にバンドが検出された。MOZの融合転座の標的因子として知られるTIF2およびSRC-1の発現は、サイズおよび量ともに肝ガン誘導による変化はみられなかった。また、MOZの特異的プライマーを用いてRT-PCRおよびDNAシーケンス解析を行ったが、正常および発ガンラットのどちらにもMOZの染色体転座は検出されなかった。このことより、肝前ガン病変においてMOZの染色体転座は起こしておらず、野生型MOZの発現が増加することが示唆された。さらに、発ガンラットの核抽出液を用い、MOZ複合体の分子量をカラム分画により推定した。その結果、発ガンラットMOZ複合体は約2MDaの巨大なタンパク質複合体を形成していた。

MOZの機能を解析するために、ラット肝臓RNAよりRT-PCR法を用いてラットMOZ cDNAをクローニングした。ラットMOZは1998アミノ酸からなり、アミノ酸配列はヒトMOZと全体で89%一致していた。特に、ヒトMOZ

で転写調節に機能すると考えられている histone H1 and H5 like motif、PHD zinc finger motif および Methionine rich region、HAT 活性に必須の MYST 領域はラット MOZ でも高度に保存されていた。また、ラット MOZ もヒストン H3 および H4 のアセチル化活性を示し、肝細胞の増殖分化に関与する b-ZIP 型転写因子 (c-Jun、C/EBP α および C/EBP β) と相互作用することを GST pull-down 法により明らかにした。このことから、ラット MOZ も HAT 活性を有する転写因子として生体内で機能することが示唆された。

MOZ の肝ガン特異的機能を解析するために、肝腫瘍マーカー Glutathione S-transferase P (GST-P) 遺伝子発現制御機構に対する MOZ の関与について解析した。GST-P は薬物代謝酵素の 1 つであり、ラット肝化学発ガン過程で顕著に発現が上昇する。この変化は肝特異的であり、また正常肝では全く発現しないことから、発ガン過程を解析するための最も良い指標の 1 つとして考えられている。これまでの GST-P 転写制御領域の解析から、発現を正に制御するエンハンサー (GST-P enhancer element, GPE) と負に制御するサイレンサーの存在が報告されている。ラット肝ガン由来 H4IIE 細胞を用いて、GST-P プロモーター活性に対する MOZ の影響についてレポータージーンアッセイにより評価した。GST-P 遺伝子 5'-上流発現制御領域について、エンハンサーやサイレンサーなどの機能領域を欠失させてルシフェラーゼ遺伝子上流に組み込み、MOZ の作用領域を同定した。その結果、MOZ は GPE 領域に対して正に作用することを明らかにした。GPE 領域は GPE1 と GPE2 の 2 つに分けられ、Nrf2 と MafK がヘテロダイマーを形成して GPE1 に結合する転写活性化因子として同定されている。MOZ の GPE 領域に対する作用機構を明らかにすることを目的として、MOZ と GPE 結合因子 MafK との相互作用について、免疫沈降法により解析した。ヒト子宮頸ガン由来 HeLa 細胞を用いて調べた結果、MOZ と MafK は細胞内で相互作用することを明らかにした。さらに無細胞系として GST pull-down 法を用いて解析した結果、MOZ と MafK は直接的に結合した。このことから、MOZ の GPE 領域への作用は MafK を介すると考えられた。MafK は単独では転写活性化能を持たないが、転写活性化因子 Nrf2 が DNA に結合するための必須因子として知られている。Nrf2/MafK ヘテロダイマーを介した GST-P 転写調節に対する MOZ の影響について、マウス胚性ガン由来 F9 細胞を用いてレポータージーンアッセイを行った。GPE1 と GST-P プロモーター領域 (-50 から +56 bp) をルシフェラーゼ遺伝子上流に組み込んだレポータープラスミドとともに Nrf2 および MOZ をエフェクターとして F9 細胞に発現させ、ルシフェラーゼ活性を測定した。その結果、ルシフェラーゼ活性は Nrf2 単独では活性化がみられない条件下において、Nrf2 と MOZ の共発現により相乗的に上昇することに明らかにした。さらに、内在性 GST-P に対する MOZ の作用について、ウェスタンプロット法により解析した。ラット肝ガン由来 H4IIE 細胞における内在性 GST-P の発現は、MOZ の発現プラスミド量依存的に増加することを明らかにした。

これらの結果から、肝化学発ガン過程において MOZ は Nrf2/MafK に対してコアクチベーター (DNA 結合型転写調節因子と基本転写因子群との間を仲介し転写活性化を導く因子) として機能し、GST-P 遺伝子の発現制御に関与することが示唆された。MOZ は GST-P の転写調節において重要な因子の 1 つと考えられる。

本研究において、肝ガン進行に伴い HAT の発現が変動し、発現増加した MOZ がガン関連因子の発現や機能に関与することを示した。今回得られた知見は、肝発ガン過程の分子機構の解明に有用であると考えられる。

論文審査の結果の要旨

大田君は、化学発ガンへの HAT (ヒストンアセチル化酵素) の関与について明らかにする目的で、肝化学発ガン過程における各種 HAT の発現変動について検討した。先ず化学発ガンの進行に伴って腫瘍マーカーとして知られている GST-P が大きく発現誘導されるが、HAT の P300 や CBP は発現が低下するのに対し、MOZ (Monocyclic leukemia zinc finger protein) は上昇することをはじめて見出した。そして、MOZ は肝ガン細胞では融合転座をせずに、複合体を形成して機能していることを示した。さらに、MOZ は Nrf2/MafK ヘテロダイマーと結合し、コアクチベーターとして GST-P 遺伝子のエンハンサー領域に作用し、GPE1 を介して GST-P の転写調節にかかわることを明らかにした。すなわち、MOZ などの HAT の発現異常がガン関連因子の発現調節に関与することを示した。

以上の成果は、発ガン過程の分子機構の解明に寄与するものであり、学術的に高く評価され、博士 (薬学) 学位論文として充分価値あるものと認められる。