

癌遺伝子産物v-MafとAP-1(Jun/Fos)の相互作用

片岡 浩 介

①

学位論文

癌遺伝子産物v-MafとAP-1(Jun/Fos)の相互作用

平成6年3月博士(理学)申請

東京大学大学院理学系研究科 生物化学専攻

片岡 浩介

①

学位論文

癌遺伝子産物v-MafとAP-1(Jun/Fos)の相互作用

平成6年3月博士(理学)申請

東京大学大学院理学系研究科 生物化学専攻

片岡 浩介

<目次>

序	---1
材料と方法	---7
1) <i>in vitro</i> 転写および翻訳	---7
1-1) <i>in vitro</i> 転写および翻訳	---7
1-2) プラスミドの構築	---7
1-2-1) <i>v-maf</i> とその変異遺伝子	---7
1-2-2) <i>maf</i> 関連遺伝子とそれらの変異遺伝子	--12
1-2-2-1) <i>mafB</i> とその変異遺伝子	--12
1-2-2-2) <i>mafK</i> とその変異遺伝子	--13
1-2-2-3) <i>mafF</i> とその変異遺伝子	--15
1-2-2-4) <i>mafG</i> とその変異遺伝子	--16
1-2-3) <i>jun</i> および <i>fos</i> とそれらの変異遺伝子	--18
2) 融合タンパク質の産生と精製	--19
3) 結合DNA配列の決定	--20
4) アミロース・レジンによる共沈実験	--21
5) ゲルシフト・アッセイ法	--21
6) トランスフェクションとルシフェラーゼ・アッセイ	--21
結果	--22
1) <i>v-Maf</i> および <i>v-Jun</i> の結合するDNA配列の決定	--22
2) <i>v-Maf</i> およびAP-1(<i>Jun/Fos</i>)の認識するDNA配列の特異性	--30
3) <i>v-Maf</i> のDNA結合領域の同定	--34
4) <i>v-Maf</i> と <i>Jun</i> または <i>Fos</i> との会合	--40
5) <i>v-Maf</i> と <i>Jun</i> または <i>Fos</i> とのヘテロ2量体の形成	--42
6) ヘテロ2量体形成による結合DNA配列の特異性の変化	--44
7) <i>v-Maf</i> の転写活性化能	--46
8) <i>v-Maf</i> と <i>Jun</i> または <i>Fos</i> との転写調節における相互作用	--49

9) <i>maf</i> 関連遺伝子産物のDNA結合能とその特異性	--51
10) <i>maf</i> 関連遺伝子産物間のホモ/ヘテロ2量体形成能	--64
11) <i>maf</i> 関連遺伝子産物とJunまたはFosとのヘテロ2量体形成能	--70
12) Mafによって転写調節を受ける候補遺伝子の検索	--74
考察	--76
1) v-MafとAP-1の相互作用	--76
2) v-Mafの機能領域	--80
3) <i>maf</i> 関連遺伝子産物の機能	--84
4) Mafの標的遺伝子の検索	--87
5) まとめ	--89
参考文献	--91
謝辞	-108

<序>

癌は早期発見に努めるならばもはや決して恐ろしいものではなくなったと言われるようになって久しいが、死に至る病の主たるものとしてわれわれの誰もが無縁でいることのできないこともまた事実である。癌は様々な内的（遺伝的）および外的（環境的）要因によって引き起こされるが、つまるところ、染色体DNAの変化すなわち癌遺伝子の活性化と癌抑制遺伝子の不活性化によって、細胞が正常な増殖の制御から逸脱してしまった状態であるにとらえることができよう。したがって、癌遺伝子および癌抑制遺伝子を単離しその機能を知ることは、癌の予防・治療を考える上でもたいへん重要であるが、また同時に、正常な細胞の増殖や、個体の発生・分化など、生物学的に興味深い問題に対する理解を深めてくれる結果ともなってきた。

現在までに優に100を超える数の癌遺伝子が単離されており、その数はなお増えつつある。ヒトおよび実験動物における未知の癌遺伝子を検出し単離する方法の主なものは次の5つであろう。すなわち、1)ある種の腫瘍で共通して見られる染色体異常（増幅、染色体転座など）を解析する方法、2)腫瘍材料から得られたゲノムDNAまたはcDNAを正常細胞にトランスフェクションする方法、3)急性型造腫瘍性レトロウイルスに取り込まれた癌遺伝子を解析する方法、4)慢性型造腫瘍性レトロウイルスが共通して組み込まれる染色体部位を解析する方法、5)既知の癌遺伝子と相同性のある遺伝子を検索する方法である。これらのいずれの方法によっても数々の重要な遺伝子が発見・単離されてきたし、されつつある。本論文で扱う *maf1* は、実験材料としてニワトリの腫瘍を用いて、上記のうちの最も古典的とも言える3番の方法で比較的最近単離された癌遺伝子である。

ラウス肉腫ウイルス(Rous sarcoma virus : RSV)と *src* 癌遺伝子の発見 (115) 以来、数多くの癌遺伝子がこの方法によって見いだされており、ごく最近にも *ryk* (50)、*qin* (62) といった新たな癌遺伝子が発見されている。この方法で見つかる癌遺伝子が必ずしもヒトの癌に関与しているとは限らないし、大変な労力とウイルス学・分子生物学の知識・技術を必要とする方法であるにも関わらずいまだにその魅力を失っていないのにはそれなりの理由があると思われる。

その1つ目として、特にニワトリを材料として用いた場合に顕著であるが、癌遺伝子の検出法としてたいへん鋭敏であることがあげられよう。増殖因子、その受容

体、非受容体型チロシンキナーゼ、セリン・スレオニンキナーゼ、GTP結合タンパク質、転写制御因子など多くの範疇に属する癌遺伝子が単離されてきたことはそれを裏付けている。最近では、avian sarcoma virus 17 (ASV17)の持つ*v-jun*の由来する細胞側遺伝子*c-jun*の産物が、発癌プロモーターであるphorbol 12-*O*-tetradecanoate-13-acetate (TPA)によって活性化される転写制御因子AP-1の成分のひとつであることが判明したし (11)、reticuloendotheliosis virus-T (REV-T)の持つ*v-re*癌遺伝子の由来する*c-rel*の産物がリンパ球の情報伝達において主要な役割を担う転写因子NF- κ Bと構造・機能上深く関連のあることが分かり (33, 54)、いずれの分野においても分子レベルでの理解が急速に進展したことは記憶に新しい。また、CT-10ウイルスの持つ癌遺伝子*v-crk*は上に挙げた範疇のいずれにも属さない癌遺伝子であるが、この遺伝子の発見はチロシンキナーゼとイノシトールリン脂質による細胞内情報伝達を理解する上でのひとつの突破口を開くことになった (71)。ここにあげた*jun*, *rel*, *crk*遺伝子はいずれもレトロウイルスに取り込まれて構造変化を受けたことによってそのトランスフォーム活性が増強ないし賦与されており、しかもトランスフォームさせることのできる細胞が限られている。このような遺伝子はレトロウイルスを用いた系でなければ癌遺伝子として発見され得なかったかも知れない。

もうひとつの利点は、ひとつの癌遺伝子に対して協調的に働く第2の遺伝子の検出が可能なことである。例えば、*v-erbB*遺伝子を持つavian erythroblastosis virus-H (AEV-H)に比べて、さらに*v-erbA*遺伝子も合わせ持つavian erythroblastosis virus-ES4 (AEV-ES4)、また、*v-myb*遺伝子を持つavian myeloblastosis virus (AMV)に比べて、さらに*v-ets*遺伝子も合わせ持つE26ウイルスは、*in vivo*での造腫瘍性がより強く、感染細胞の分化程度がより未熟であることが知られている。これらの例においては、第2の遺伝子産物が感染細胞の分化を抑制することによって第1の遺伝子産物の効果を高めていると理解されている (31, 73)。*v-erbA*, *v-ets*は、単独ではトランスフォーム活性がないかあるいは非常に弱く、癌遺伝子の範疇に含まれるかどうかは議論のあるところであるが、*c-erbA*産物はステロイドホルモン受容体ファミリーに属する甲状腺ホルモン受容体 (105, 125)、*c-ets*産物は様々な増殖関連遺伝子やウイルスのエンハンサーに結合する転写制御因子 (36) であって、いずれも細胞の分化・増殖にとって重要な機能を担っていると考えられている。これらもまた、レトロウイルスを用いた系でなければ発見され得なかったかもしれない。

さて、先に述べたように、本研究で取り上げた*v-maf*は、ニワトリの脚の関節に

生じた腫瘍（筋腱膜繊維肉腫：*masculoaponeurotic fibrosarcoma*）から、河井らによって発見・単離されたレトロウイルスAS42のゲノム中に見いだされた癌遺伝子である（53, 89）。図1に示すように、AS42ゲノム中には、*v-maf*遺伝子はウイルスの*gag*遺伝子と融合した形で取り込まれているが、これまでに、ニワトリ胚繊維芽細胞（chicken embryo fibroblast：CEF）をトランスフォームする活性には*gag*部分には必要がないこと、また、*gag*との組み換え部位にあるメチオニンを指定するコドンATGは*c-maf*遺伝子における開始コドンに相当し、かつ*v-Maf*タンパク質と*c-Maf*タンパク質との間には1アミノ酸の変異しもなく、*c-maf*遺伝子にも*v-maf*と同程度のトランスフォーム活性があることをあきらかにしてきた（51）。

*v-Maf*はそのC末端にいわゆるb-Zip構造を持つ。b-Zip構造は、ヘリックス・ターン・ヘリックス（116）、ジंक・フィンガー（9）、ヘリックス・ループ・ヘリックス（80）などと同様にDNA結合タンパク質に共通に見られる構造の1つであり、DNAに直接接触して認識する塩基性アミノ酸に富む領域（basic）と、コイルド・コイル構造により2量体形成を担う、7アミノ酸ごとに4個から6個のロイシン残基があらわれる両親媒性の α -ヘリックス構造（leucine zipper）から成っている（60, 122）。従って、*v-Maf*はそれ自体とホモ2量体あるいは他のb-Zipタンパク質とヘテロ2量体を形成し、特定のDNA配列を認識して結合する転写制御因子であろうと予想された。これまでに、*v-Maf*は細胞内で主に核に局在することを特異抗体を用いた間接蛍光抗体法によって示し、また、ロイシンジッパー構造を介してホモ2量体を形成することをあきらかにしてきた（51）。さらに、*in vitro*で作製した変異遺伝子を用いた解析から、*v-Maf*のトランスフォーム活性にはb-Zip構造を含むC末端側約3分の1に相当する約100アミノ酸にわたる領域が不可欠であること、そしてこの領域に加えてN末端側約3分の2の、酸性アミノ酸に富む領域または、ヒステジン残基およびグリシン残基の連続したクラスター構造を含む領域のいずれかがさらに必要であることをあきらかにした（51）。これらの実験結果は、*v-Maf*が転写制御因子であること、そしてこの機能がトランスフォーム活性と密接に関連していることを示唆しており、このことを分子レベルで証明するためには*v-Maf*が認識して結合するDNA配列を同定することが必須の課題であると考えられた。

*v-Maf*のアミノ酸配列をb-Zip構造を持つ他のタンパク質のそれと比較したところ、DNA結合領域と思われるbasic領域についてJunやcyclic-AMP response element binding protein（CREB）と20から30%程度の相同性が見られた（89）。細胞癌遺伝子産物*c-Jun*

は先にも触れたが、SV40の初期プロモーターからの転写を促進するエンハンサー結合活性として同定されてきた転写因子AP-1 (61) の成分のひとつである (11)。現在、AP-1はc-Junおよびc-Fosとそれぞれの関連遺伝子産物からなる複合体であると考えられている (95, 96)。v-junはニワトリの肉腫ウイルスASV17 (69) のゲノム中に、またv-fosはマウスの骨肉腫ウイルスFBJ-MuSV (120), FBR-MuSV (121) のゲノム中にそれぞれ見いだされた癌遺伝子であり、それぞれに対応する細胞内癌遺伝子c-jun、c-fosの他に、関連遺伝子としてjunB, junDおよびfosB, fra-1, fra-2の存在が知られている (15, 41, 70, 87, 99, 100, 127)。これらの産物のいずれもがb-Zip構造を持つが、jun関連遺伝子産物はそれらの間での2量体およびfos関連遺伝子産物とのヘテロ2量体を形成するのに対し、fos関連遺伝子産物はそれらの間での2量体を形成しない。また、jun関連遺伝子産物はfos関連遺伝子産物とヘテロ2量体を形成することでDNAに対してより強い親和性を獲得する (1, 2, 39, 56, 83, 106, 113, 総説として18, 123)。これらのタンパク質はTPA-responsive element (TRE : T_GACTCA)と呼ばれるDNA配列に結合することが知られていたが、これに1塩基の挿入を持つcyclic-AMP responsive element (CRE : T_GACGTC)にも結合することが分かってきた (103)。これらのDNA配列はそれぞれ、発癌プロモーターであるTPA、細胞内情報伝達物質であるcyclic-AMPによる転写の活性化に必要なcis-elementとして同定されてきたものである (4, 77)。CREに結合するタンパク質としては最初にCREB (34, 42) が単離されたのを皮切りに、多くのやはりb-Zip構造をコードする遺伝子群が単離され、CREB/ATFファミリーを形成していることがあきらかになった (16, 25, 29, 38, 68, 91, 126)。さらに、jun関連遺伝子産物、fos関連遺伝子産物がCREB/ATFファミリーのいくつかとヘテロ2量体を形成することがあきらかにされ、両者の間にクロストークのあることも分かってきた (8, 37, 44, 48, 66)。

さて、以上のような知見に基づいて、v-Mafが既知のTREないしCRE配列を持つDNA断片に結合するかどうかをゲルシフト法で調べたが、結果は否定的であった (52)。そこで本研究においてはまず、ランダムな配列を持つオリゴヌクレオチドからv-Mafが特異的に結合するDNA配列を選択することを試みた。これによって得られた結合コンセンサス配列は13ないし14塩基からなる回文構造を有しており、その中央にTREないしCREを含んでいたが、v-MafのDNA結合の特異性はJunないしJun/Fosのそれとはあきらかに異なっていた。また、v-MafはJunおよびFosとヘテロ2量体を形成し、それによって新たなDNA認識の特異性を獲得することをあきらか

にした。このことは、タンパク質-タンパク質の相互作用と、DNA-タンパク質の相互作用の双方によって標的遺伝子の転写量が微妙に調節されている可能性を示すものである。さらに、得られた結合DNA配列を介してv-Mafが転写活性化因子として機能すること、また、転写調節のレベルにおいてもMafがJun, Fosと機能的に相互作用することもあきらかにした。

v-mafには、対応する細胞側遺伝子c-mafの他に関連遺伝子として現在までにmafB, mafK, mafF, mafGがニワトリのゲノムDNAおよびcDNAライブラリーから得られており (28, 90)、また、網膜で特異的に発現されている遺伝子としてヒトcDNAライブラリーからNRLが単離されている (118)。関連遺伝子産物の機能の探索が生命現象の理解に重要な知見を与えてきたという先例にならって、これらのうち、mafB, mafK, mafF, mafGの機能についても調べた。これらの産物のDNA結合の特異性はv-Mafのそれと極めて似ていたが、それぞれのヘテロ2量体形成やJunおよびFosとのヘテロ2量体の形成の特異性は必ずしも同じではないことが判明した。このことは、Mafとその関連遺伝子産物がAP-1タンパク質と協働ないし拮抗して複雑かつ精妙な機能を発揮する可能性を示唆するものであり、本稿ではこれらの一群のタンパク質が細胞の増殖と分化の制御に果たす役割についても論じる。

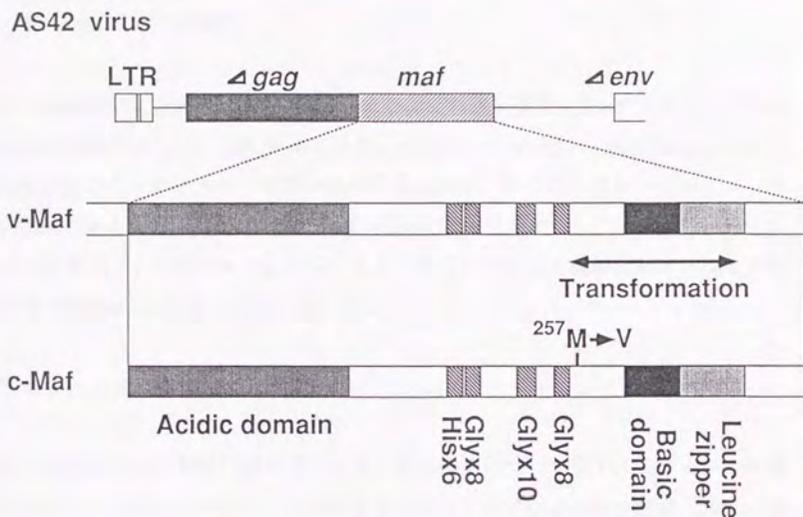


図1: AS42ウイルスのゲノムおよびv-Maf, c-Mafの構造

AS42ウイルスのゲノム中には *gag* 遺伝子と *env* 遺伝子の間に宿主細胞由来の配列が取り込まれており、MafはGagとの融合タンパク質として発現される。v-MafはN末端から順に、酸性アミノ酸に富む領域、ヒスチジン残基およびグリシン残基の連続するクラスターを持ち、C末端側にb-Zip構造 (basic regionとleucine zipper)を持つ。

*gag-maf*の組み換え部位のATGコドンは*c-maf*における開始メチオニンを指定するコドンに相当する。v-Mafとc-Mafとの間で異なるアミノ酸 (²⁵⁷Met→Val)を示す。また、v-Mafのトランスフォーム活性に最低限必要な領域を矢印で示す。

<材料と方法>

1) *in vitro*転写および翻訳

1-1) *in vitro*転写および翻訳

*in vitro*転写は、以下に述べる遺伝子または変異遺伝子をpGEMプラスミドに挿入したものを鋳型として、T7RNAポリメラーゼを用いたキット (MEGAscript kit : Ambion社)によって行った。鋳型DNAの直鎖化には、特に断りのないものについてはpGEMプラスミドのポリリンカー部位のEcoRI部位を用いた。

*in vitro*翻訳は、上記の*in vitro*転写によって得られたRNAを鋳型として、コムギ胚抽出液 (Promega社)を用いておこなった。

1-2) プラスミドの構築

*in vitro*転写および翻訳に用いたプラスミドの構築について以下に述べる。点変異は、特に断りのないものについてはいずれも原則としてKunkelらの方法 (59) に従って導入したが、*maf*関連遺伝子群はいずれもGC含量が高く相補鎖の合成が困難であったので、T4 gene32タンパク質 (single strand DNA binding protein)を加えて合成反応を行った。塩基置換に用いたオリゴヌクレオチドの配列をそれぞれの構築法と合わせて示し、置換される塩基を下線で示す。また、塩基置換によって制限酵素部位が導入されたり消失したりする場合にはその情報も合わせて示すが、最終的にはどの変異遺伝子も塩基配列を確認して使用した。

1-2-1) *v-maf*とその変異遺伝子

*v-maf*とその変異遺伝子の塩基およびアミノ酸の番号は、*gag*遺伝子と*v-maf*遺伝子の組み換え位置から数えたものであり (89)、*c-maf*の開始ATGコドンおよびメチオニン残基からの番号と一致する。

pGEM/Pt

v-*maf*の⁵³NcoI-¹¹²³Bsu36I断片の5'側に、Rous sarcoma virusのsrc遺伝子の開始ATGコドン直前の非翻訳領域のBalI-NcoI断片34bp (17)を結合し、その両端を平滑化したのちにMluIリンカー(GACGCGTC)を付加した。これをpGEMベクターのマルチクローニング部位のHincII-SmaI部位にMluIリンカーを付加したもの(pGEM/MluI)に挿入したプラスミドである。その構築の概要を図2に示す。v-*maf*の¹⁹MetのNcoI部位(CCATGG)が開始コドンを与え、gag配列と5'末端の54bpを欠失するが、開始コドン周辺の配列が翻訳開始のコンセンサス配列(57)によく一致したv-*maf*遺伝子となっている。本研究では、この遺伝子Ptを野生型v-*maf*遺伝子と呼んで使用した。その産物PtはN末端の18アミノ酸を欠失しているが、レトロウイルスベクターを用いてCEFに導入するとAS42と変わらないトランスフォーム活性を持つことが確認されている(51)。本研究で用いた欠失および置換変異遺伝子はすべてpGEM/Ptを原型として作製されたものである。これらの作製法の詳細は文献51, 52に述べられているが、本研究において新たに作製されたものについては、以下に述べる。欠失変異遺伝子にコードされるタンパク質の構造を表1および図7に示す。またアミノ酸置換変異遺伝子産物の構造は図9に示す。

ND5.5

pGEM/Ptの⁵³NcoI-⁷⁵⁶BstEII断片を次のオリゴヌクレオチドと置換した。置換によってMunI認識部位が導入されるので構築の成否を容易に確認できるが、最終的には塩基配列を確認して使用した。

NcoI	+MunI	BstEII
5' CATGGGATCTCTCAGATGAACAATTG 3'		
3' CCTAAGAGTCTACTTGTTAACCAGTG 5'		
Met GlyPheSerAspGluGlnLeuVal		

ND5.8

ND5.5と同様の⁵³NcoI-⁷⁵⁶BstEII断片を次のオリゴヌクレオチドと置換した。MunI認識部位の導入によって構築の成否が容易に確認されるが、最終的には塩基配列を確認して使用した。

NcoI +MunI BstEII

5' CATGGGCGAACAATTG 3'

3' CCGCTTGTTAACCAGTG 5'

Met GlyGluGlnLeuVal



Amino Acid Composition of Maf Deletion Mutants

mutant	amino acids present	total amino acids
PT	¹⁹ M to ³⁶⁹ M	351
ND1	<u>MG</u> ¹¹⁴ V to ³⁶⁹ M	258
ND2	<u>MG</u> ¹³⁹ A to ³⁶⁹ M	233
ND3	<u>MG</u> ¹⁵⁴ A to ³⁶⁹ M	218
ND4	<u>MG</u> ²⁰³ P to ³⁶⁹ M	169
ND5	<u>M</u> ²⁴⁰ G to ³⁶⁹ M	131
ND5.5	<u>MG</u> ²⁴⁷ F to ³⁶⁹ M	125
ND5.8	<u>MG</u> ²⁵⁰ E to ³⁶⁹ M	122
ND6	<u>M</u> ²⁵³ V to ³⁶⁹ M	118
CD1	¹⁹ M to ³⁴⁷ S	329
CD2	¹⁹ M to ³³³ <u>KSS</u>	317
CD3	¹⁹ M to ³²⁰ <u>LAS</u>	305
CD4	¹⁹ M to ²⁵⁴ T	236
ND5CD2	<u>M</u> ²⁴⁰ G to ³³³ <u>KSS</u>	97
VD1	¹⁹ M to ¹⁸⁸ G and ²²² G to ³⁶⁹ M	318
VD3	¹⁹ M to ¹⁸⁸ G and ²²¹ G to ³⁶⁹ M	319
VD7	¹⁹ M to ¹⁸⁸ G and ²³⁹ G to ³⁶⁹ M	301
MD23	¹⁹ M to ¹⁷¹ A and ²⁰² P to ³⁶⁹ M	321
MD23.5	¹⁹ M to ¹⁷¹ <u>AVT</u> and ²⁴¹ L to ³⁶⁹ M	284
MD24	¹⁹ M to ¹⁷¹ A and ²⁵³ V to ³⁶⁹ M	270
MD45	¹⁹ M to ²⁵¹ Q and ²⁶⁴ L to ³⁶⁹ M	339
MD56	¹⁹ M to ²⁶³ Q and ³⁰⁹ L to ³⁶⁹ M	306
MD15	¹⁹ M to ¹³⁷ Q and ²⁶⁴ L to ³⁶⁹ M	225
MD16	¹⁹ M to ¹³⁷ Q and ³⁰⁹ L to ³⁶⁹ M	180
MD46	¹⁹ M to ²⁵¹ Q and ³⁰⁹ L to ³⁶⁹ M	294
c-Maf	¹ M to ³⁶⁹ M	369

表1: *v-maf*の欠失変異遺伝子産物の構造

それぞれの欠失遺伝子産物に含まれるアミノ酸残基（1文字の略号）とその合計を示す。アミノ酸残基の番号は、*gag*遺伝子と*v-maf*遺伝子の組み換え位置にコードされるメチオニン残基を1とした。PTは本研究で野生型*v-Maf*として用いた、N末端18アミノ酸を欠く産物である。構築の際に導入されたリンカーや制限酵素部位に由来するアミノ酸は下線で示した。

1-2-2) *maf*関連遺伝子とそれらの変異遺伝子

mafB, *mafK*, *mafF*, *mafG*とその変異遺伝子の塩基およびアミノ酸の番号は、それぞれの開始ATGコドンおよびメチオニン残基から数えたものである (28, 90)。ここに述べる遺伝子にコードされるタンパク質の構造の模式図はそれぞれ図20, 21, 22, 23に示す。

1-2-2-1) *mafB*とその変異遺伝子

mafB

*mafB*遺伝子の⁵³NcoI-¹⁰⁰¹MseI断片の5'側に、Rous sarcoma virusの*src*遺伝子の開始ATGコドン直前の非翻訳領域のBall-NcoI断片34bpを結合し、その両端を平滑化したのちにBssHIIリンカー(CGCGCGCG)を付加してpGEM/MluIベクターに挿入したプラスミドpGEM/*mafB*を原型として用いた。pGEM/*mafB*の構築の概要を図2に示す。ここにコードされるMafBはN末端18アミノ酸を欠失しており、v-MafにおけるPtに相当する。

mafBL2PL4P

ロイシンジッパー構造のロイシン残基の繰り返し(Leu-Leu-Leu-Leu-Tyr-Leu)のうち、2番目と4番目のロイシン残基をそれぞれプロリン残基に置換する変異(²⁶¹Leu→Pro、²⁷⁵Leu→Pro)であり、v-MafにおけるL2PL4P (図9参照)に相当する。用いたオリゴヌクレオチドは以下の通りである。

5' CCTGCTGAATGGGCTGGGTC 3' :²⁶¹Leu

+NaeI

5' CTCTGGCCGGCCGGGTCACTTCG 3' :²⁷⁵Leu

mafBR22E

ロイシンジッパー構造の最初のロイシン残基から遡って22番目のアルギニン残基をグルタミン酸残基に置換する変異(²³²Arg→Glu)であり、v-MafにおけるR22E (図9参照)に相当する。次のオリゴヌクレオチドを用いて塩基置換を導入した。

5' CTTCAAGGTCTCCTCTCTGC 3'

mafBK19E

ロイシンジッパー構造の最初のロイシン残基から遡って19番目のリジン残基をグルタミン酸残基に置換する変異(²³⁵Lys→Glu)であり、v-MafにおけるK19E (図9参照)に相当する。次のオリゴヌクレオチドを用いて塩基置換を導入した。

5' CCCCTGTTCTCCAAGGTCCCTCC 3'

$\Delta mafB$

pGEM/*mafB*の³⁷⁹StuI部位にNcoIリンカー(5' CAGCCATGGCTG 3')を付加してNcoIで消化後、⁵³NcoI部位とライゲーションした。リンカー由来のMet-Alaと¹²⁸Ala以降の合計186アミノ酸をコードし、N末端127アミノ酸を欠失する。

$\Delta mafBL2PL4P$

$\Delta mafB$ と*mafBL2PL4P*とのキメラ遺伝子であり、N末端127アミノ酸を欠失しL2PL4Pのアミノ酸置換を持つ産物をコードする。

$\chi mafB$

v-*maf*の欠失変異遺伝子のひとつMD24 (表1および図7参照)の⁵³NcoI-⁷⁵⁶BstEII断片を、 $\Delta mafB$ の⁵³NcoI部位と末端平滑化ののちにライゲーションした。v-Mafの¹⁹Met-¹⁷¹Alaと制限酵素部位由来のVal-Thr-Met-AlaのうしろにMafBの¹²⁸Ala以降のつなごうた、v-MafのN末端半分とMafBのC末端半分からなるキメラタンパク質をコードする。

$\chi mafBL2PL4P$

$\chi mafB$ と*mafBL2PL4P*とのキメラ遺伝子であり、v-MafのN末端半分とMafBL2PL4PのC末端半分からなるキメラタンパク質をコードする。

1-2-2) *mafK*とその変異遺伝子

mafK

まず、*mafK*cDNAクローンの開始ATGコドン周辺の配列をKunkel法によって

BspHI部位(T↓CATGA)に変換した遺伝子(*mafK-BspHI*)を作製した (28)。この塩基置換はアミノ酸置換は伴わない。そして、*mafK*のコード領域をすべて含む⁻²BspHI-⁵²⁵EcoT22I断片の5'側に、Rous sarcoma virusの*src*遺伝子の開始ATGコドン直前の非翻訳領域のBamI-NcoI断片34bpを結合し、その両端を平滑化したのちにMluIリンカーを付加して、pGEM/MluIベクターに挿入したpGEM/*mafK*を原型として用いた。pGEM/*mafK*の構築の概要を図2示す。

mafKL2PM4P

ロイシンジッパー構造のロイシン残基の繰り返し(Leu-Leu-Leu-Met-Leu-Leu)のうち、2番目のロイシン残基と4番目のメチオニン残基をそれぞれプロリン残基に置換する変異(⁸⁶Leu→Pro, ¹⁰⁰Met→Pro)であり、v-MafにおけるL2PL4Pに相当する。以下のオリゴヌクレオチドAを用いてKunkel法で⁸⁶Leuを置換したのち、オリゴヌクレオチドB,Cを²⁷⁸BamI-³¹³BsaHI断片と入れ換えて¹⁰⁰Metを置換した。

-PstI

A: 5' CCTCTTGCTGCGGCTCAACCCGCTGCCTC 3'

+XhoI

B: 5' CCAGAGAAAACTCGAGCCCGAAGCTAGAGCTGGA 3'

C: 3' GGTCTCTTTTGAGCTCGGGCTTCGATCTCGAC 5'

mafKR22E

⁵⁷Arg→Gluの置換で、v-MafのR22Eに相当する。次のオリゴヌクレオチドを用いて塩基置換を導入した。

5' CTTCAGCGTCTCCCTCCTCTGCTTC 3'

mafKK19E

⁶⁰Lys→Gluの置換で、v-MafのK19Eに相当する。次のオリゴヌクレオチドを用いて塩基置換を導入した。

+XhoI

5' TAGCCCCGGTTCTCGAGCGTGCGCCTCC 3'

mafK Δ, mafK Δ L2PM4P

それぞれpGEM/mafK, pGEM/mafKL2PM4Pを³⁶⁹EcoO109Iで直鎖化したものを鋳型とすることでその産物を得た。¹²⁴Gly以降を欠く産物が期待される。

χ mafK

v-mafの欠失変異遺伝子のひとつMD24の⁵³NcoI-⁷⁵⁶BstEII断片を、mafK-BspHIの⁻²BspHI部位と、末端平滑化のちにライゲーションした。v-MafのN末端およそ半分の¹⁹Met-¹⁷¹Alaと制限酵素部位由来のVal-ThrのうしろにMafKの全長が繋がったキメラタンパク質をコードする。

χ mafKL2PM4P

χ mafKとmafKL2PM4Pとのキメラ遺伝子であり、v-MafのN末端およそ半分のうしろにMafKL2PM4Pの全長が繋がったキメラタンパク質をコードする。

1-2-2-3) mafFとその変異遺伝子

mafF

mafFの全コード領域を含む-2NcoI-452NaeI断片の5'側に、Rous sarcoma virusのsrc遺伝子の開始ATGコドン直前の非翻訳領域のBamI-NcoI断片34bpを結合し、その両端を平滑化したのちにMluIリンカーを付加して、pGEM/MluIベクターに挿入したpGEM/mafFを原型として用いた(28)。pGEM/mafFの構築の概要を図2に示す。

mafFL2PM4P

⁸⁶Leu→Pro, ¹⁰⁰Met→Proの置換であり、v-MafのL2PL4Pに相当する。次のオリゴヌクレオチドを用いて塩基置換を導入した。

5' CCCATTCCGGCTCCATCTTC 3'

-BstXI

5' CCAGGCGCGGGGCAGCGTTC 3'

mafFR22E

⁵⁷Arg→Gluの置換であり、v-MafのR22Eに相当する。次のオリゴヌクレオチドを用いて塩基置換を導入した。

5' GGTTCCTTCAGCGTCTCTCGTCCGCTGCTTC 3'

mafFK19E

⁶⁰Lys→Gluの置換であり、v-MafのK19Eに相当する。次のオリゴヌクレオチドを用いて塩基置換を導入した。

+XhoI

5' CCCCGGTTCTCGAGCGTCCGTC 3'

*mafF*Δ, *mafF*Δ L2PM4P

それぞれpGEM/*mafF*, pGEM/*mafFL2PM4P*を³³⁹Ssc8387Iで直鎖化したものを鋳型とすることでその産物を得た。¹¹⁵Gln以降を欠く産物が期待される。

χ *mafF*

v-*maf*の欠失変異遺伝子のひとつMD24の⁵³NcoI-⁷⁵⁶BstEII断片を、*mafF*の⁻²NcoI部位と、末端平滑化ののちにライゲーションした。v-MafのN末端のおよそ半分の¹⁹Met-¹⁷¹Alaと制限酵素部位由来のVal-Thrのうしろに、MafFの全長が繋がったキメラタンパク質をコードする。

χ *mafFL2PM4P*

χ *mafF*と *mafFL2PM4P*とのキメラ遺伝子であり、v-MafのN末端のおよそ半分のうしろにMafFL2PM4Pの繋がったキメラタンパク質をコードする。

1-2-2-4) *mafG*とその変異遺伝子

mafG

まず、*mafG*cDNAクローンの²⁶StuI部位から5'側に合成オリゴヌクレオチドを付加することにより開始ATGコドン周辺にBspHI部位を導入した遺伝子(*mafG*-*BspHI*)を作製した。この塩基置換はアミノ酸置換を伴わない。そして、*mafG*のコード領域をすべて含む⁻²BspHI-⁶⁶⁶EcoT22I断片の3'側に、Rous sarcoma virusの*src*遺伝子の開始ATGコドン直前の非翻訳領域のBstEII-NcoI断片34bpを結合し、その両端を平滑化したのちにMluIリンカーを付加して、pGEM/MluIベクターに挿入した

pGEM/*mafG*を原型として用いた。pGEM/*mafG*の構築の概要を図2に示す。

mafGL2PM4P

⁸⁶Leu→Pro, ¹⁰⁰Met→Proの置換であり、v-MafのL2PL4Pに相当する。次のオリゴヌクレオチドを用いて塩基置換を導入した。

-PstI

5' CCTCCTGCTGGGGCTCTGCC TTCTGC 3'

5' TTCCATTTTCGGGCTGGCGT TCTCAG 3'

mafGR22E

⁵⁷Arg→Gluの置換であり、v-MafのR22Eに相当する。次のオリゴヌクレオチドを用いて塩基置換を導入した。

5' TTC TTCAGCGTCTCCGACGCTGCTTCAG 3'

mafGK19E

⁶⁰Lys→Gluの置換であり、v-MafのK19Eに相当する。次のオリゴヌクレオチドを用いて塩基置換を導入した。

+XhoI

5' GCCTCGGT TCTCGAGCGTGCGCCGACG 3'

*mafG*Δ, *mafG*Δ L2PM4P

それぞれpGEM/*mafG*, pGEM/*mafGL2PM4P*を³⁵³BstXIで直鎖化したものを鋳型とすることでその産物を得た。¹²¹Val以降を欠く産物が期待される。

χ *mafG*

v-*maf*の欠失変異遺伝子のひとつMD24の⁵³NcoI-⁷⁵⁶BstEII断片を、*mafG*-BspHIの²BspHI-⁶⁶⁶EcoT221断片と末端平滑化ののちにライゲーションした。v-MafのN末端のおよそ半分の¹⁹Met-¹⁷¹Alaと制限酵素部位由来のVal-Thrのうしろに、MafGの全長がつながったキメラタンパク質をコードする。

χ mafGL2PM4P

χ mafG と mafGL2PM4P とのキメラ遺伝子であり、v-Maf の N 末端のおよそ半分のうしろに MafGL2PM4P のつながつたキメラタンパク質をコードする。

1-2-3) jun および fos とそれらの変異遺伝子

v-jun

ASV17 ウイルス (69) の、gag を除くすべての v-jun の配列を含む SacII-EcoRI 断片 (約 1kb) を、末端平滑化ののちに MluI リンカーを付加して pGEM/MluI ベクターに挿入した。構築の概要は図2に示す。

v-junL3P

ロイシンジッパー構造のロイシン残基の繰り返し (Leu-Leu-Leu-Leu-Leu) のうち、3 番目のロイシン残基をプロリン残基に置換するような変異を次のオリゴヌクレオチドを用いて導入した。

+NaeI

5' CCGTGGATGCCGGCTCTGAGTTCTGGG 3'

v-fos

用いる遺伝子の由来する種を統一するために、ニワトリ由来の fos を持つ NK24 ウイルス (88) の、gag および 5' 側の配列を除いた ²¹⁵NotI-¹⁰⁰⁰ApaI 断片と、Rous sarcoma virus の src 遺伝子の開始 ATG コドン直前の非翻訳領域の BalI-NcoI 断片 34bp を末端平滑化によって結合し、その両端に MluI リンカーを付加して、pGEM/MluI ベクターに挿入した。この構築の概要を図2に示す。このプラスミドには v-Fos の C 末端 251 アミノ酸がコードされるが (ニワトリ c-Fos とのあいだに違いはない (27)) ラット c-Fos においては、これに相当する領域で Jun との 2 量体形成、DNA 結合、転写活性化の能力が充分にあることが分かっている (1)。

v-fosL3P

ロイシンジッパー構造のロイシン残基の繰り返し (Leu-Leu-Leu-Leu-Leu) のう

ち、3番目のロイシン残基をプロリン残基に置換するような変異 ($^{133}\text{Leu}\rightarrow\text{Pro}$)を、次のオリゴヌクレオチドを用いて導入した。

+Bsu36I

5' CTATCTCCGCCTGAGGAGCGGACTTCTCCTCC 3'

2) 融合タンパク質の産生と精製

認識DNA配列の決定やゲルシフト・アッセイ法などに用いるために、各種の遺伝子産物をマルトース結合タンパク質 (maltose binding protein : MBP)との融合タンパク質として大腸菌で発現させた。この目的にはpMAL-cベクター (New England Biolabs 社)を用いて以下のような構築を行った。

MBP-Maf

v-*maf*の $^{720}\text{HaeIII}$ - $^{1123}\text{Bsu36I}$ 断片を末端平滑化したのち、それぞれの端にEcoRIリンカー、XbaIリンカーを付加して、pMAL-cのEcoRI-XbaI部位に挿入した。v-Mafの ^{241}Leu 以下129アミノ酸がMBPとの融合タンパク質として発現される。

MBP-Jun

ASV17ウイルス (69) のNaeI-EcoRI断片を末端平滑化してpMAL-cのStuI部位に挿入した。v-JunのC末端166アミノ酸がMBPとの融合タンパク質として発現される。

MBP-Fos

NK24ウイルス (88) の $^{89}\text{AlwNI}$ - $^{567}\text{StuI}$ 断片を末端平滑化し、pMAL-cのStuI部位に挿入した。v-Fosの ^{30}Trp - ^{189}Ala がMBPとの融合タンパク質として翻訳され、v-*fos*インサート直後のベクター内の終止コドンで終了する。

以上のプラスミドを持つ大腸菌を培養して、対数増殖期 ($\text{OD}_{600}=0.4$) に isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside (IPTG) を添加して融合タンパク質の産生を誘導し、2時間後に集菌した。融合タンパク質はNew England Biolabs社の勧めるところにほぼ従ってアミロース・レジン・カラムを用いて精製した。すなわち、集めた大腸菌を緩衝液L (10mM sodium phosphate (pH7.0), 30mM NaCl, 0.25% Tween20, 10mM 2-

mercaptoethanol, 10mM EDTA, 10mM EGTA) に懸濁し、lys ozyme を添加して溶菌し、超音波破碎した。これにNaClを最終濃度1Mになるように加え、遠心して上清を取り、アミロース・レジン・カラムにかけた。0.25%Tween20, 500mM NaClを含む緩衝液A (10mM sodium phosphate (pH7.2), 1mM sodium azide, 10mM 2-mercaptoethanol, 1mM EGTA) および、500mM NaClを含む緩衝液Aでよく洗って大腸菌由来のタンパク質を除き、1mM NaClを含む緩衝液Aで洗って融合タンパク質に吸着する大腸菌由来のDNAを除いた。次に緩衝液B (20mM HEPES-KOH (pH7.9), 1mM EDTA, 20mM KCl, 10mM 2-mercaptoethanol, 4mM MgCl₂) に置換した。実験によってはレジンを吸着したままで用いたが、ゲルシフト・アッセイには10mM maltoseを含む緩衝液Bでカラムより溶出して使用した。

3) 結合DNA配列の決定

v-Mafおよびv-Junの結合DNA配列の決定には次のオリゴヌクレオチドを用いた。

HindIII

XbaI

5' TAGGCATGTAAGCTTCTCTGGG- (N) ×20-GGGCACGTCTAGAACCTTCAAT 3'

Nはランダムな配列を表す。また、このオリゴヌクレオチドをPCR法で増幅するのに次のプライマーを用いた。

A: 5' TAGGCATGTAAGCTTCTCTGGG 3'

B: 5' ATTGAAGGTTCTAGACGTGCCC 3'

まず、ランダムな配列を持つオリゴヌクレオチドをプライマーBとアニールさせ、Klenow fragmentを作用させて2重鎖にし、T4ポリヌクレオチドキナーゼで末端を³²P標識した。これを、MBP-MafまたはMBP-Junを吸着し、緩衝液Bで平衡化したアミロース・レジン・カラムに加えた。非特異的に吸着したDNAを緩衝液Bでよく洗い流したのちに、1M NaClを含む緩衝液Bで溶出する画分を回収した。これをPCR法で増幅して再び末端を³²Pで標識し、溶出したMBP-MafまたはMBP-Junと混合してゲルシフトを行った。特異的にタンパク質と複合体を形成したバンドが検出されたのでこれをゲルから切り出して回収した。PCR法とゲルシフト法を用いた精製をさらに2回繰り返す、最終的に回収されたオリゴヌクレオチドをHindIIIとXbaIで消

化してpUCベクターにクローン化し、その塩基配列を解析した。

4) アミロース・レジンによる共沈実験

およそ200ngのMBP融合タンパク質を吸着したアミロース・レジン20 μ lをTNN緩衝液(10mM Tris-HCl (pH7.5), 150mM NaCl, 1% Nonidet P-40) 800 μ lに懸濁し、これに³⁵Sメチオニン存在下で*in vitro*翻訳反応を行ったコムギ胚抽出液3 μ lを加えた。これを4°Cで一晩混合したのち、遠心してレジンを回収し、TNN緩衝液800 μ lで3度洗って、吸着したタンパク質をSDS-PAGEで解析した。

5) ゲルシフト・アッセイ法

およそ50ngのMBP融合タンパク質または*in vitro*翻訳反応を行ったコムギ胚抽出液4 μ lを、DNA結合溶液(最終濃度20mM HEPES-KOH (pH7.9), 1mM EDTA, 20mM KCl, 5mM dithiothreitol, 4mM MgCl₂, 4% glycerol, 400 μ g/ml poly(dI-dC)(dI-dC), 100 μ g/ml bovine serum albumin)に全液量10 μ lとなるように加えた。これに末端を³²Pで標識したオリゴヌクレオチド250ngを加えて25°Cで20分間結合させたのち、1xTBE (89mM Tris-borate, 2mM EDTA (pH8.3)) 緩衝液中で4%のポリアクリルアミド・ゲルを用いて解析した。用いたオリゴヌクレオチド・プローブの塩基配列は表2に示す。

6) トランスフェクションとルシフェラーゼ・アッセイ

レポータープラスミドの構築にはptk-luc(東京大学医科学研究所・細胞生物研究部、藤沢順一博士供与)を使用した。これは、pGL-Basicプラスミド(Promega社)のBglII部位にpBL-CAT2プラスミド(5)のBamHI-BglIII断片が挿入されたもので、単純ヘルペスウイルス(HSV)のチミジンキナーゼ(tk)のプロモーター(124)から転写が開始されてルシフェラーゼ遺伝子が発現されるプラスミドである。ゲルシフト・アッセイに用いたオリゴヌクレオチドを直列にライゲーションしたものをXhoIで部分消化して、3個つながったものをゲルから回収し、ptk-lucのXhoI部位に挿入することによって3x#7/tk-lucなどのレポータープラスミドを作製した。

発現プラスミドの構築にはpEF-BOS (大阪バイオサイエンス研究所、長田重一博士供与 (76)) を使用した。これはpolypeptide chain elongation factor 1 α (EF-1 α)のプロモーターから任意の遺伝子を発現させることのできるプラスミドである。このプロモーターは活性がたいへん強く、Mafの認識配列を持たない。ただし、SV40の複製起点を持ちその中にAP-1結合部位が含まれるので、これを含むHindIII断片を除去した。さらに、stufferを含むXbaI断片を除いてBssHIIリンカーを付加することによりpEF/BssHIIを作製した。このBssHII部位に、in vitro転写・翻訳に用いたpGEMプラスミドからMluIないしBssHII消化により各遺伝子を取り出して挿入することで、おのおの発現プラスミド (pEF/v-*maf*など) を作製した。これらのプラスミドの模式図を図14に示す。

NIH3T3細胞は10%のfetal calf serumを含むD-MEMで培養した。1.6 $\times 10^6$ 個の細胞を60mmのシャーレに蒔き、24時間後にリン酸カルシウム法でプラスミドDNAをトランスフェクトした。トランスフェクションに用いたプラスミドDNAはイオン交換カラムを用いたQiagen plasmid kit (Qiagen社)で精製した。また、リン酸カルシウムとDNAとの共沈澱はmammalian transfection kit (STRATAGENE社)を用いて作製し、60mmシャーレ1枚あたりレポータープラスミド1 μ g、発現プラスミド6 μ g、 β -gal発現プラスミド (pEF/ β -gal) 0.5 μ gの合計7.5 μ gのプラスミドを添加した。その12時間後に培地を除き、phosphate buffered saline (PBS) 2mlで培養皿を2度洗って沈澱を除去し、新たに培地を加えて培養を続けた。その24時間後に培地を除き、PBSでシャーレをよく洗って、luciferase assay system (Promega社)に従って細胞粗抽出液を調製した。この抽出液をルシフェラーゼの基質であるluciferinとATPを含む試薬と混合し、発生する蛍光をルミノメーターで測定した。

<結果>

1) v-Mafおよびv-Junの結合するDNA配列の決定

v-*maf*遺伝子産物の結合するDNA配列を決定するにあたり、充分量のMafタンパク質が必要であったが、その全長を大腸菌内で発現させる試みは、おそらくその産物が大腸菌の生育にとって有害であるためと考えられるが、成功しなかった(51)。そこで、v-Mafのb-Zip領域を含むC末端のおよそ120アミノ酸をマルトース結合タンパク質(maltose binding protein: MBP)との融合タンパク質として発現させることにした(図3)。この領域は、欠失および点変異を導入した機能解析の結果から同定された、トランスフォーメーションに最低限必要な領域を含んでいること(51)、また、関連遺伝子産物間で最もよく保存されている領域を含んでいることから、DNA結合にとって必要な領域も含んでいるものと想像された。この融合タンパク質(MBP-Maf)はアミロース・レジン・カラムを用いて容易に精製できる。まず、MBP-Mafを結合したレジン・カラムに20塩基のランダムな配列を含むオリゴヌクレオチドを加え、低塩濃度の緩衝液でよく洗ったのち、高塩濃度の緩衝液で溶出する画分を回収した。これを、ランダムな配列の両側のプライマー結合部位を利用したpolymerase chain reaction (PCR)での増幅と、MBP-Mafタンパク質によるゲルシフト法を繰り返すことによって、MBP-Mafに特異的に結合するオリゴヌクレオチドを濃縮した。この精製過程を3度繰り返した後に得られたオリゴヌクレオチドをプラスミド・ベクターにクローン化し、そのうち45クローンについてそれらの塩基配列を決定した。図4にその結果を示す。

これらのクローンのほとんどは13塩基の回文構造からなる配列TGCTGACTCAGCAに近い配列を含んでおり、また残りの4クローンはその中心に1塩基の挿入を持つ14塩基からなる配列TGCTGACGTCAGCAに近い配列を含んでいたことから、この2種類の配列がMafタンパク質の結合するコンセンサス配列であると考えられた。また、得られたクローンのいずれもこれらのコンセンサス配列に完全には一致せず、1から5塩基のミスマッチを持っていたことから、Mafタンパク質は他のb-Zipタンパク質の認識配列よりも比較的長い配列に比較的厳密でなく結合するのではないかと考えられた。さらに驚いたことに、これら2種類の配列はそれぞれその中央部分にTRE (TGACTCA)とCRE (TGACGTCA)を含んでいた。

そこで、TREおよびCREのいずれにも結合することの知られているb-Zipタンパク質であるJunの結合する配列との異同をあきらかにすることをこころみた。v-Junのb-Zip領域をMBPとの融合タンパク質として大腸菌内で大量に発現させて精製し(図3)、同様の方法で特異的に結合するオリゴヌクレオチドを選択して31クローンについてそれらの塩基配列を解析した。その結果を図5に示す。ほとんどのクローンはいわゆるCREを、残りの3クローンはTREを含んでおり、JunはTREよりもCREをより好んで結合することが示唆された。また、さらにその外側にもう1塩基ずつのコンセンサスをとることができた(ATGACGTCAT, ATGACTCAT)が、中央の8ないし7塩基が得られたすべてのクローンで完全に保存されていることを考え合わせると、JunはMafに比べてより短い配列をより厳密に認識するのではないかと考えられた。以下、v-Mafの認識する13塩基からなるコンセンサス配列(TGCTGACTCAGCA)をTREを含むことからTRE型MARE(Maf recognition element)、14塩基からなるコンセンサス配列(TGCTGACGTCAGCA)をCREを含むことからCRE型MAREと呼ぶことにする。

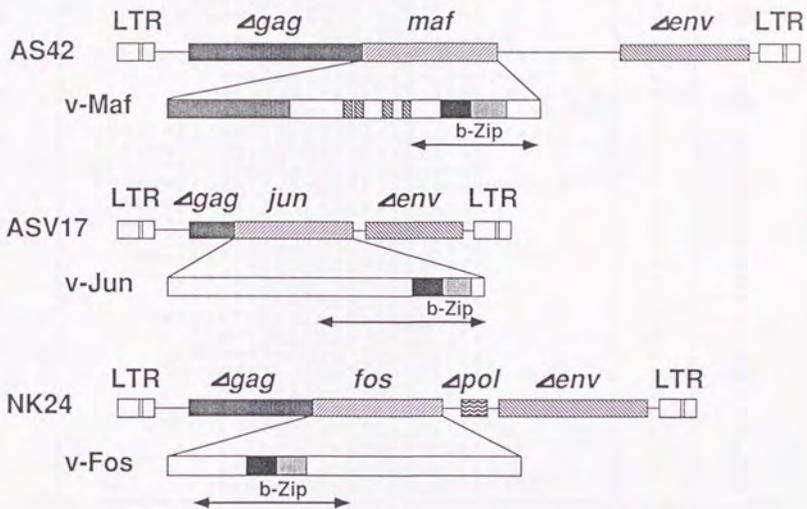


図3: b-Zip構造を持つレトロウイルス癌遺伝子産物の構造

v-Maf, v-Jun, v-Fosの構造と、それらの由来するウイルスのゲノム構造を模式的に示す (69, 88, 89)。MBPとの融合タンパク質として大腸菌で発現させたb-Zip構造を含む部分を矢印で示した。v-Mafのドメイン構造の詳細は図1参照。

LTR: long terminal repeat

(A)		mismatches from cons.	orientation
clone			
M38	ACCCCGTAAAAAATGCTGAc ccag agagc t t	3	A
M109	TATACTCATAAAAA TGCTGAc ccag agag	3	A
M41	TCATAAAAA CGATGACTCAG ccag	3	A
M121	TTCATAAATTCGCTGACTCAT ccag	3	A
M108	TGGGCACGTGCTGACTCAGT ccca	2	A
M130	ATAAAAA TGCTGACTATG Acca	4	A
M20	TACCTTATGCTGACGTGCG Accc	3	A
M22	GAAGAAA CGCTTACACTGCA ccc	4	A
M7	AATAAA TGCTAGCTAAGCA ccc	3	A
M36	CCATTGTGATGACTCAGTAT cc	2	A
M114,120	AAATAATGCCA ACTCAGCTT cc	3	A
M106	GGTTATGTATACTCAGCAAT c	3	A
M122	CATGAAGCTGACTATGCAT Tc	3	A
M110	ACGAAGAAGACTCAGCATT C	3	A
M32	cAATGCTGACAATACAAA CG	4	A
M39	ccCTGCTGACTCGGCACCACT T	1	A
M45	cccTGCTGACGCAGATAGACAAA	3	A
M23	acg t g c c c A T T C A G C A T T A T G A G A T G A C	3	A
M31	acg t g c c c A C T C A G C A A C A C A T C C A C T T	2	A
M47	AAACTATAAAACCGATGACT g g g c a c g t c t a g a	4	B
M107	TAAGGGTTATGATGATGACT g g g c a c g t	3	B
M112	CACGTTGTGGCATGCTGACA g g g c a c g t	3	B
M119	TTAATCCACGAATGCTGATT g g g c a c g t	3	B
M2	TAAGCGAAATATGCTGGCG g g g c a c g t	4	B
M1,25	ACCTAATAATCGCTGACGCA g g g c a c	4	B
M6	CAGTGAATCTGCTGACTAAG g g g c a c	3	B
M19	TGGCGATTATGCTGACGCA g g g c a c	3	B
M34	TGCAATTC TGCTTACACAGC g g g c	3	B
M28	TTTTATGCTGACTCAGCG g g g	1	B
M117	AAAAATCTGATGACCGTGCA g g g	4	B
M37	TTACTTGCTGACGCTGCTCT g	3	B
M4	CGGGAAGCTGATTACAGCAC A g	2	B
M26	TAACTGCTGATCTGTCAAAT	5	B
M132	TAGTAGCTGACTGTGCCAGAT	3	B
M5	TTGTGCTGACTAAGGGCCTAG	3	B
M123	gTACGGCTGATTCAGCATCATT	2	B
M131	ggTAAATGACTCAGCACAAATTT	3	B
M3	ggAGTCTGACATTGCATTTTTG	5	B
M27	gggTAAATGACTAAGCATAATTCA	3	B
Consensus	TGCTGACTCAGCA		

		mismatches from cons.	orientation
clone			
M33	TGAAAATATGCTGACGCTAT c c c a g	4	A
M29	ccATCCATATGTCAGCAATTTT	4	A
M124	ccGTGCTTACATCAGCAATATA	2	A
M21	g t g c c c t T A G C T C A G C A T T A A C C C G T	5	A
Consensus	TGCTGACGTCAGCA		

(B)

A	17	12	19	5	2	9	2	1	37	-	5	8	23	1	4	24	7	12	12
C	3	7	7	6	-	29	2	2	-	34	5	21	1	-	29	5	18	11	10
G	8	8	6	1	36	-	-	33	2	-	6	7	7	36	4	7	6	9	9
T	11	12	7	27	1	1	35	3	-	5	23	3	8	2	2	3	8	6	8
Consensus	T G C T G A C T C A G C A																		

図4: v-Mafの認識DNA配列の決定: 次ページ参照。

図4: v-Mafの認識DNA配列の決定

(A): v-Mafに特異的に結合したオリゴヌクレオチドの塩基配列

用いたオリゴヌクレオチドのランダムな部分に由来する配列を大文字で、PCRに用いたプライマー結合部分に由来する配列の一部を小文字で示した。解析したクローンのうちの4クローンがCRE型MAREを、残りの41クローンがTRE型MAREを含んでいた。また、クローンM114とM120、M1とM25の配列は一致しており、同一のオリゴヌクレオチドがPCRで増幅されたものに由来すると考えられた。コンセンサス配列に一致する塩基を下線で示し、またコンセンサス配列からのミスマッチの数と、オリゴヌクレオチドの方向を右側に示した。

(B): ヌクレオチドの出現頻度

得られたオリゴヌクレオチドのうちTRE型MAREを持つものについて、それぞれの塩基の出現する数をまとめた。コンセンサス配列の同定の根拠となる塩基の出現頻度を太字で示した。

(A)

clone		mismatches from cons.	orientation
J75	CAGGCNNNGTGA <u>TGACGTC</u> A cccagagaagc t t	1	A
J11	AGTTCCGCCAAT <u>TGACGTC</u> ATccc	0	A
J57	CTGTGGAGTGGT <u>TGACGTC</u> ACccc	2	A
J56	ATATCCACTAAT <u>TGACGTC</u> ATccc	0	A
J60	AGGGGGCACGGT <u>TGACGTC</u> ATccc	1	A
J73,79	GCGGCAAGGAT <u>TGACGTC</u> ATccc	0	A
J56	AACTCAGCTAT <u>TGACGTC</u> ATccc	0	A
J61	TTGTGGCCGAT <u>TGACGTC</u> ATccc	0	A
J65	TCACACACGAT <u>TGACGTC</u> ATccc	0	A
J12	TACCTCGAT <u>TGACGTC</u> ATTA	0	A
J51	ACGTGGGAT <u>TGACGTC</u> ATGCT	0	A
J71	ACTCAGTAT <u>TGACGTC</u> ATTCT	0	A
J16,64	GCAGCGGT <u>TGACGTC</u> ATTTT	1	A
J66,74	AAGTAGAT <u>TGACGTC</u> ATTGAT	0	A
J69	AACTAAT <u>TGACGTC</u> ATTTTA	0	A
J49	GATCAGT <u>TGACGTC</u> ATGTGC	1	A
J59	CAATAAT <u>TGACGTC</u> AGAAAAC	1	A
J10	TTTGAT <u>TGACGTC</u> ATGCACAG	0	A
J52	GATGAT <u>TGACGTC</u> ATGTTAA	0	A
J70	ATCGAT <u>TGACGTC</u> ATGGCCC	0	A
J76	CCGAT <u>TGACGTC</u> ATAGCACCT	0	A
J62,63	cTAAT <u>TGACGTC</u> ATCTTCGGAT	0	A
J80	cAGAT <u>TGACGTC</u> ATCCTACCTT	0	A
J78	t c t a g a c g t g c c c t A T G A C G T C A T A A T A C A G T A	0	A
Consensus	A T G A C G T C A T		

clone		mismatches from cons.	orientation
J14	A T C A C C G T A T G A C T C A T C C G	0	A
J77	A A G G T C T G A C T C A C A C T G T G	2	A
J72	g g T A T G A C T C A T C A C C T G T G A A	0	B
Consensus	A T G A C T C A T		

(B)

A	6	2	6	20	-	-	24	-	-	-	24	-	5	3	5	
C	8	11	-	-	-	-	24	-	-	24	-	2	8	13	10	
G	5	3	15	4	-	24	-	-	-	-	-	1	4	4	-	
T	5	8	3	-	24	-	-	-	-	24	-	-	21	7	4	9
Consensus	A	T	G	A	C	G	T	C	A	T						

図5: v-Junの認識DNA配列の決定 : 次ページ参照。

図5: v-Junの認識DNA配列の決定

(A): v-Junに特異的に結合したオリゴヌクレオチドの塩基配列

用いたオリゴヌクレオチドのランダムな部分に由来する配列を大文字で、共通部分に由来する配列の一部を小文字で示した。解析した31クローンのうち、28クローンがCREを、残りの3クローンがTREを含んでいた。また、クローンJ73とJ79、J16とJ64、J66とJ74、J62とJ63の配列は同一であった。コンセンサス配列に一致する塩基に下線を引き、一致しない塩基の数とオリゴヌクレオチドの方向を右側に示した。

(B): ヌクレオチドの出現頻度

CRE型のコンセンサス配列を持つものについてそれぞれの塩基の出現頻度をまとめた。

2) v-MafおよびAP-1(Jun/Fos)の認識するDNA配列の特異性

以上の結果から、MafおよびJunは互いに似てはいるが異なるDNA配列を認識するものと考えられたので、表2に示すような配列を持つオリゴヌクレオチドを各種合成して、それぞれに対する結合の強度を検定することにした。オリゴヌクレオチド1および2はそれぞれTRE型MARE, CRE型MAREを含んでいる。そして以下のオリゴヌクレオチドは、これらのコンセンサス配列に対して1から6塩基のミスマッチを持っており、奇数番はTRE型、偶数番はCRE型である。また、3から24番は対称的に、25から32番は非対称的にミスマッチを持つ。

これらのオリゴヌクレオチドをプローブとして、大腸菌内で発現させたMBP融合MafおよびJunタンパク質に対する結合をゲルシフト法で調べた。また、転写活性化因子AP-1をJunとともに形成するFosのb-Zip領域もMBP融合タンパク質として発現させて精製し(図3)、MBP-Junの共存下で同様の検定を行った。結果を図6に示す。

予想されたように、MafおよびJunの結合するDNA配列はあきらかに異なるけれども一部分重複していることが分かった。たとえば、11、12番のオリゴヌクレオチドはMaf, Junのいずれにもよく結合したが、3、4番はMafに、23、24番はJunにそれぞれ特異的に結合した。また、Mafは1、2番に最も強く結合し、これらが結合のコンセンサス配列であることが確認されるが、TRE型、CRE型のいずれにもほぼ同程度の親和性で結合した。ランダムな配列のプールにはCRE型の方がTRE型に比べて4分の1の頻度でしか存在しないため、図4においてCRE型MAREが得られた頻度がTRE型MAREに比べて少なかったのであろうと思われる。そして、3から16番のプローブに対する結合が示すように、1から2塩基程度のミスマッチはMafの結合に対して少ししか影響を与えず、Mafがより長い配列をより厳密でなく認識するという予想を裏付ける結果であった。しかし、5、6番への結合は相対的に弱いことから、MafによるDNA認識におけるそれぞれの塩基の重要性が異なることもまたあきらかである。一方Junはコンセンサス配列を持つ11、12番および21、22番に最も強く結合したが、同じコンセンサス配列を含む19、20番への結合は相対的に弱いことから、これらの9ないし10塩基対からなるコンセンサス配列よりもさらに外側の塩基がJunのDNA認識に影響を与えている可能性がある。また、JunはあきらかにTRE型よりも、CRE型の配列に強く結合する。そして、中心のいわゆるTRE、CRE配列内の塩

基置換はその結合を大きく阻害することから、Junはより短い配列をより厳密に認識するという予想もまた裏付けられた。Jun/Fosのヘテロ2量体はJunの結合するいずれのオリゴヌクレオチドに対してもより強く結合した。結合の特異性についてはJun/FosとJun単独との間に違いは見いだせなかった。

	Mismatches from		Binding for		
	MAREs	Jun-cons.	Maf	Jun	Fos/Jun
#1 : TGCTGACTCAGCA	0	2	+++	+	++
#2 : TGCTGACTCAGCA	0	2	+++	++	+++
#3 : TGCTGATTCAGCA	1	3	+++	-	-
#4 : TGCTGATTCAGCA	2	4	+++	-	-
#5 : TGCTGGCCAGCA	2	4	++	-	-
#6 : TGCTGGCCAGCA	2	4	++	-	-
#7 : TGCTTACTAAGCA	2	4	++	-	-
#8 : TGCTTACTAAGCA	2	4	+++	-	-
#9 : TGCCGACTCGCA	2	4	++	-	-
#10 : TGCCGACTCGCA	2	4	++	-	-
#11 : TGATGACTCATCA	2	0	+++	+++	+++
#12 : TGATGACTCATCA	2	0	+++	+++	++++
#13 : TACTGACTCAGTA	2	2	++	-	+
#14 : TACTGACTCAGTA	2	2	++	+	++
#15 : GGCTGACTCAGCC	2	2	++	-	+
#16 : GGCTGACTCAGCC	2	2	++	+	+++
#17 : TGAGGACTTCCTCA	4	2	-	-	-
#18 : TGAGGACTTCCTCA	4	2	-	-	-
#19 : TAATGACTCATTA	4	0	+	+	+
#20 : TAATGACTCATTA	4	0	+	++	++++
#21 : GGATGACTCATCC	4	0	+	++	+++
#22 : GGATGACTCATCC	4	0	+	+++	++++
#23 : CAATGACTCATTC	6	0	-	+	+
#24 : CAATGACTCATTC	6	0	-	++	+++
#25 : TGCTGACTCATCA	1	1	+++	++	++
#26 : TGCTGACTCATCA	1	1	+++	++	++++
#27 : TGCCGACTCATCC	3	2	++	-	-
#28 : TGCCGACTCATCC	3	2	+	-	+
#29 : TGCCGACTCATTC	4	2	++	-	-
#30 : TGCCGACTCATTC	4	2	+	-	-
#31 : TGCCGGCTCATTC	5	3	-	-	-
#32 : TGCCGGCTCATTC	5	3	-	-	-

表2: ゲルシフト・アッセイに使用したオリゴヌクレオチドの配列

本研究でゲルシフト・アッセイに用いたオリゴヌクレオチドの+鎖の中央の塩基配列のみを示した。オリゴヌクレオチド1の全配列は次の通りである。

5' TCGAGCTCGGAATTGCTGACTCAGCA TTACTC 3'

3' TCGAGCCTTAACGACTGAGTTCGT AATGAGAGC 5'

MAREと一致する塩基を下線で示し、また、MafおよびJunの結合のコンセンサス配列に対して異なる塩基の数も示した。それぞれのオリゴヌクレオチド・プローブのMaf, Jun, Jun/Fosに対する結合の強さは図6の結果をイメージ・アナライザーで定量した。Mafについては2番のプローブに対するMafの結合の強さを100%とし、JunおよびJun/Fosについては12番のプローブに対するJunの結合の強さを100%としてその相対値を示した。

++++: >100%, +++: 50-100%, ++: 20-50%, +: 5-20%, -: <5%

3) v-MafのDNA結合領域の同定

すでに以前に、v-MafのCEFに対するトランスフォーメーション活性およびホモ2量体形成能に必要な領域の同定を、種々の欠失およびアミノ酸置換を導入した変異v-maf遺伝子を用いて同定しているが(51)、DNA結合活性に必要な領域をも同定することは、v-Mafの機能を理解する上で重要であると考え、各変異体を*in vitro*で合成しTRE型MAREに対する結合能をゲルシフト法で検定した。各変異遺伝子産物の構造を図7, 9に、その結果を図8, 10に示す。

N末端の欠失については、ND1, ND2, ND3, ND4, ND5, ND5.5, ND5.8はDNAに結合したが、ND5.8よりもさらに3アミノ酸を欠いたND6はもはやDNA結合能を失っていた(図8(B): レーン3-9)。C末端の欠失については、CD1およびロイシンジッパー構造の最後のロイシン残基以降を欠くがホモ2量体を形成できるCD2はDNAに結合したが、3つのロイシン残基の繰り返ししか持たず2量体を形成できないCD3はDNAに結合できなかった(レーン11-14)。また、ロイシンジッパー構造の2番目と4番目の2つのロイシン残基をプロリン残基に置換したL2PL4PはDNAに結合しなかった(レーン23)。また、maf関連遺伝子産物間のみならずロイシンジッパー構造を持つ遺伝子産物間でもよく保存されている塩基性アミノ酸3残基を酸性アミノ酸に置換したKRR·EEE、5アミノ酸を欠失したMD26·22もDNAに結合できなかった(レーン24, 25)。以上の結果から、2量体形成に必要なロイシンジッパー構造に加えて、それ以前の塩基性アミノ酸に富む領域を含む49アミノ酸残基がDNA結合にとって最低限必要であることが分かった。ここに述べた以外の欠失変異体のDNA結合能もこの結論に矛盾しなかった(レーン15-22)。

ここで同定したDNA結合領域内のアミノ酸置換のDNA結合能に対する影響も同様に調べた(図9, 図10)。TRE型MAREに対する結合能は、R22Eでは失われていたが他のものでは変わらなかった(図10(B))。これらの変異遺伝子のうち、Q5Hは野生型よりもトランスフォーム活性が増強されていることので分かった人工変異体であるが、残りはいずれもホモ2量体を形成するがトランスフォーム能を失っていることが分かっている(51)。この結果は、これらの変異遺伝子産物がトランスフォーム能を失っているのはDNA結合能が失われているためであろうという予想に反していた。そこで、TRE型MARE以外のDNA配列に対する結合能を調べることにし、2塩基のミスマッチを持つ7番、9番、11番をプローブとしてゲルシフトを行った(図

10 (C), (D), (E))。R22E, K19Eはこれらのいずれにも結合せず、A14D, A14V, R10Dも9番、11番に対しては結合が大幅に減少していた。しかしA14D, A14Vの7番に対する結合は野生型に比べてむしろ増強されていた。また、Q5Hはいずれのプロープに対しても野生型とほぼ同等の結合能を示した。これらの変異遺伝子産物を用いた結果は、少なくともこの領域内のアミノ酸置換がDNA結合に影響を及ぼすことを示していた。DNA結合能とトランスフォーム活性との関係についてはのちに考察する。

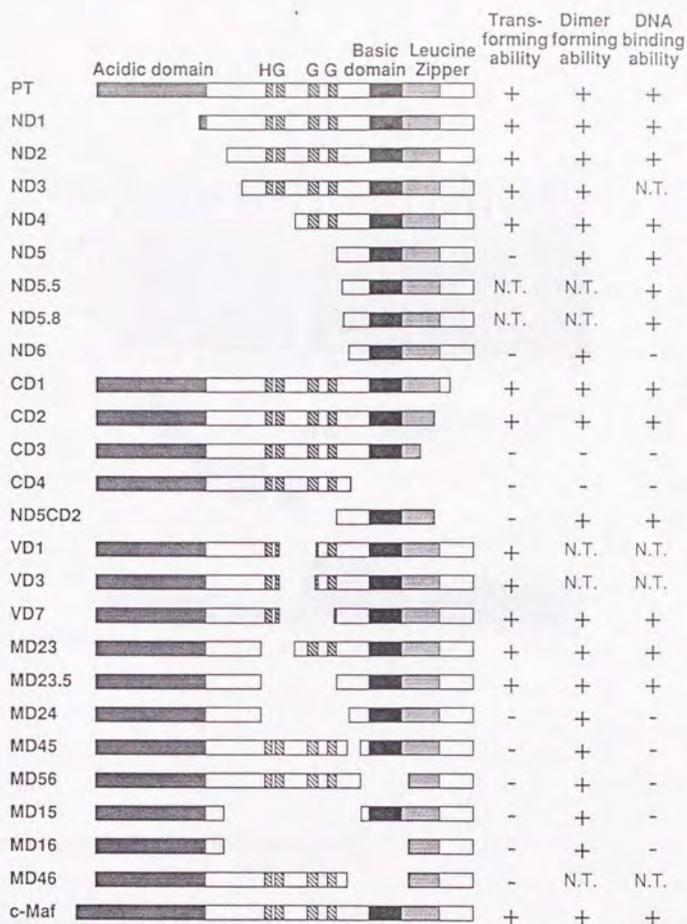


図7: *v-maf*の欠失変異遺伝子産物の構造

*v-maf*の欠失変異遺伝子産物の構造を模式的に示し、図8で検定したTRE型MAREに対するそれぞれの結合能を示した。PTは本研究で野生型*v-Maf*として使用しているほぼ全長の*v-maf*産物である。それぞれの変異遺伝子を持つ組み換えレトロウイルスをCEFに感染させたときの軟寒天培地中でのコロニー形成能と、それぞれの産物を*in vitro*で翻訳しグルタルアルデヒドで架橋することによって検定したホモ2量体形成能も合わせて示した(51)。

N.T.: 未検定

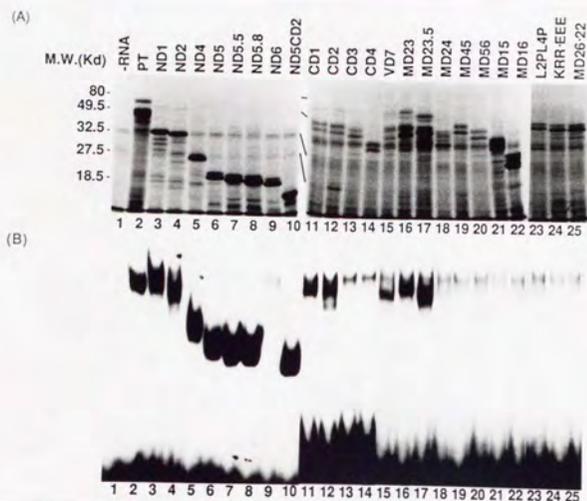


図8: *v-maf*の欠失変異遺伝子産物のDNA結合能

(A): *in vitro*で合成した欠失遺伝子産物

それぞれの変異遺伝子産物をコムギ胚抽出液を用いて³⁵Sメチオニン存在下で合成し、その4 μ lをSDS-PAGEで解析した。左側に分子量マーカーの位置を示す。

(B): 欠失変異遺伝子産物のDNA結合能

コムギ胚抽出液を用いて合成したそれぞれのタンパク質のTRE型MARE (表2 : オリゴヌクレオチド1) に対する結合能をゲルシフト法で検定した。それぞれの産物の構造は図7 (一部は図9) に示す。

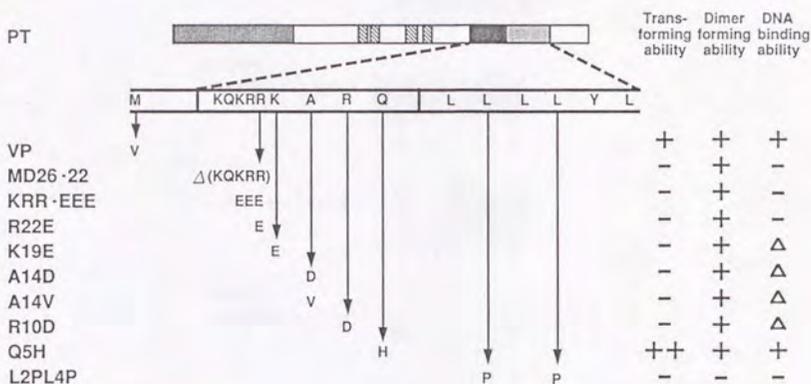


図9: v-mafのアミノ酸置換変異遺伝子産物の構造

v-mafのアミノ酸置換変異遺伝子産物の構造を模式的に示し、図10（一部は図8）で検定したTRE型MAREに対するそれぞれの結合能を示した。△は、TRE型MARE以外のプロープに対する結合能がPTに比べて低下していることが観察されたことを示す。PTは本研究で野生型v-Mafとして使用しているほぼ全長のv-maf産物である。またMD26-22は5アミノ酸の欠失を持つ。それぞれの変異遺伝子を持つ組み換えレトロウイルスをCEFに感染させたときの軟寒天培地中でのコロニー形成能と、それぞれの産物を *in vitro* で翻訳しグルタルアルデヒドで架橋することによって検定したホモ2量体形成能も合わせて示した (51)。Q5Hはコロニー形成能が野生型に比べて約20倍増強されていることが分かっている変異体である (51)。

N.T.: 未検定

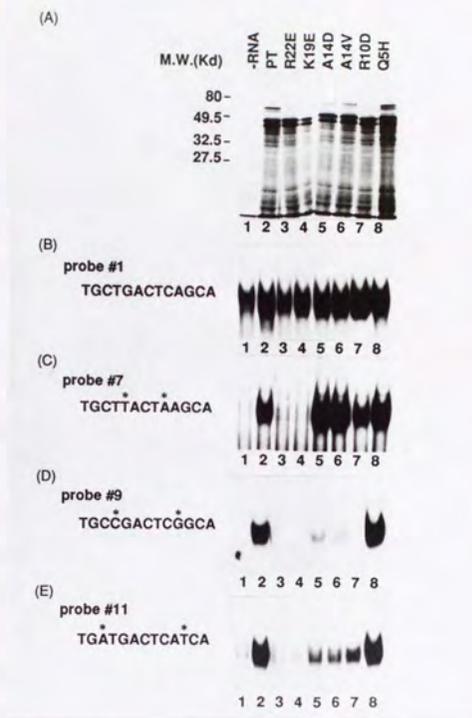


図10: v-mafのアミノ酸置換変異遺伝子産物のDNA結合能

(A): *in vitro*で合成したアミノ酸置換変異遺伝子産物

それぞれの変異遺伝子産物をコムギ胚抽出液を用いて³⁵Sメチオニン存在下で合成し、その4 μ lをSDS-PAGEで解析した。左側に分子量マーカーの位置を示す。

(B), (C), (D), (E): アミノ酸置換変異遺伝子産物のDNA結合能

コムギ胚抽出液を用いて合成したそれぞれのタンパク質のDNA結合能をゲルシフト法で検定した。それぞれの産物の構造は図9に示す。プローブとして用いたオリゴヌクレオチド(表2参照)の番号とその配列の一部をそれぞれのパネルの左側に示し、TRE型MAREと異なる塩基に*印を付けた。

4) v-MafとJunまたはFosとの会合

v-Mafはそのロイシンジッパー構造を介してホモ2量体を形成することが分かっており、AS42ウイルスまたはv-maf遺伝子を発現する組み換えウイルスの感染したCEFの細胞抽出液を免疫沈降した実験ではv-maf遺伝子産物と会合しているタンパク質は検出されないことから、少なくともトランスフォームしたCEFにおいてはv-Mafはホモ2量体として機能していると推測されていた (51, 53)。しかし、v-Mafの認識するDNA配列がJun/JunあるいはJun/Fosの結合DNA配列と相同性を有することがあきらかになったので、v-MafがJunあるいはFosとヘテロ2量体を形成する可能性があると考え、確かめることにした (図11)。

v-Maf, v-Jun, v-Fosおよびそれらのロイシンジッパー構造に変異を導入したもの (L2PL4P, v-JunL3P, v-FosL3P)を³⁵Sメチオニン存在下で*in vitro*で合成した (レーン1-6)。これをMBP-Maf, MBP-Jun, MBP-Fosを吸着したアミロース・レジンとよく混合したのちに界面活性剤を含む緩衝液でよく洗い、結合したタンパク質をSDS-PAGEで解析した。

JunおよびJunL3Pはアミロース・レジンに少量吸着したが (レーン9,10)、Maf, Jun, Fosともにそのロイシンジッパー構造に依存してMBP-Maf (レーン13-18), MBP-Jun (レーン19-24) に結合した。またよく知られているように、Fosタンパク質は自分自身とは会合しなかった (レーン25-30)。すなわち、Maf/Maf, Maf/Jun, Maf/Fos, Jun/Jun, Jun/Fosのロイシンジッパー構造依存的な会合が検出された。

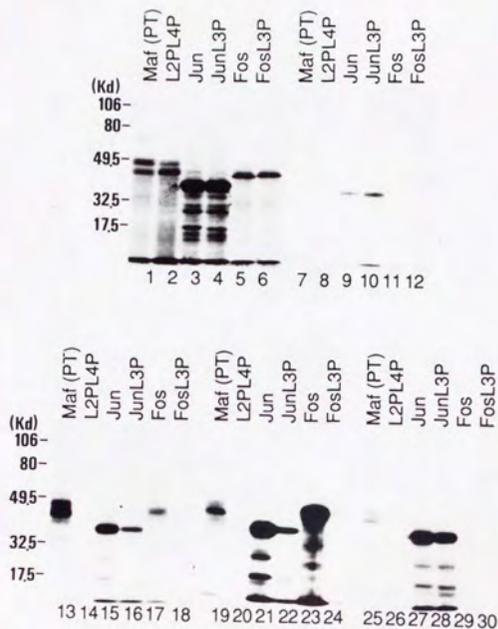


図11: v-MafとJun, Fosとの複合体形成

それぞれのレーンの上を示したタンパク質をコムギ胚抽出液を用いて³⁵Sメチオンin存在下で合成し、SDS-PAGEで解析した(レーン1-6)。またこれらの産物を、タンパク質を吸着していないアミロース・レジンは(レーン7-12)、MBP-Maf(レーン13-18)、MBP-Jun(レーン19-24)、MBP-Fos(レーン25-30)をそれぞれ吸着したアミロース・レジンを混合し、結合したタンパク質をSDS-PAGEで解析した。分子量マーカーの位置を左側に示す。

5) v-MafとJunまたはFosとのヘテロ2量体の形成

次に、これらの複合体が2量体であるか、そしてDNAに結合するかどうかをゲルシフト法で調べた。はじめに、それぞれのMBP融合タンパク質を混合した後にMafおよびJunのいずれにもよく結合するプローブ11に対する結合能を検出することを試みたが、図6に示すMBP-JunとMBP-Fosの場合のように、MafとJun、MafとFosは各種の条件下で容易にヘテロ複合体を作らなかった。大腸菌で発現させたJunタンパク質が、2量体どうしの間で容易に交換されないことが報告されており(113)、これに相当する現象であろうと考えられた。

そこで、Maf, Jun, Fosタンパク質を*in vitro*で同時に翻訳したものをプローブ11と混合してゲルシフトを行うことにした。図12に示すように、ほぼ全長(PT)およびN末端を欠いた(ND5)Mafタンパク質の共存下では、それぞれの中間の移動度を示すタンパク質-DNA複合体が新たに検出された(レーン4)。これはMafタンパク質がホモ2量体を形成してDNAに結合することを示している。これと同様に、MafとJunの共存下ではそれぞれのホモ2量体に相当するバンドに加えてMaf/Junヘテロ2量体に相当するバンドが検出された(レーン11)。また、Fosは単独ではDNA結合能を持たないが、Mafとの共存下でMaf/Fosヘテロ2量体に相当する位置にDNAとの複合体が検出された(レーン17)。さらに、これらすべてのタンパク質-DNA複合体はそのいずれかのタンパク質のロイシンジッパー構造に変異が導入されていると検出されなかった(レーン5, 6, 12, 13, 18, 19)。以上の結果は、MafがJunおよびFosとそれぞれのロイシンジッパー構造を介して効率よくヘテロ2量体を形成しDNAに結合することを示している。

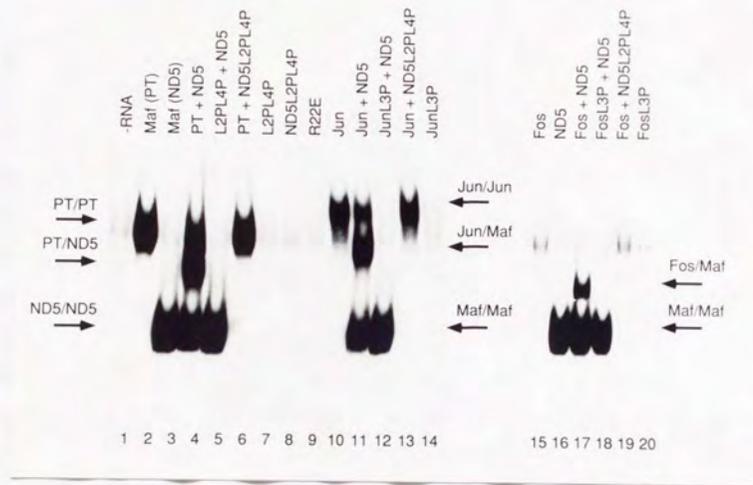


図12: v-MafとJun, Fosとのヘテロ2量体形成

それぞれのレーンの上にしたタンパク質を *in vitro* で合成し、11番のオリゴヌクレオチド (表2参照) をプローブにしてゲルシフト・アッセイを行った。PT, ND5, L2PL4P, R22Eの構造は図7、図9に示す。ND5L2PL4PはND5とL2PL4Pとのキメラタンパク質である。JunL3P, FosL3PはそれぞれJun, Fosのロイシンジッパー構造にアミノ酸置換を導入した変異タンパク質である。それぞれの2量体とDNAの複合体に対応するバンドを矢印で示した。

6) ヘテロ2量体形成による結合DNA配列の特異性の変化

X線結晶解析や変異DNAなどを用いた解析から、b-Zip構造を持つタンパク質の2量体はそれぞれのポリペプチド鎖が回文構造状のDNA配列の半分ずつを認識していることが分かっている (21, 82, 98)。MafとJunというそれぞれ異なるDNA結合特異性を持つタンパク質どうしがヘテロ2量体を形成することがあきらかとなったので、Maf/Junのヘテロ2量体がいずれのホモ2量体とも異なるDNA結合特異性を持つのではないかと推測し、以下の実験を行った。一定量のmaf (ND5) mRNAに対し、様々な量のjun mRNAを加えて*in vitro*で翻訳し、各種のオリゴヌクレオチドをプローブとしてゲルシフトを行った (図13)。

Maf, Junの双方のホモ2量体によく結合するプローブ11を用いると、Junが増加するに従ってJunホモ2量体とMaf/Junヘテロ2量体が増加し、Mafホモ2量体が減少して行くことが観察された (レーン1-5)。このような状況下では、Mafによく結合しJunには結合しないプローブ7へのMafの結合がJunの増加によって阻害されて減少した (レーン6-9)。また、Junによく結合しMafには結合しないプローブ23へのJunの結合はJunがMafに対して量的に多くなければ検出できなかった (レーン10-13)。一方、非対称的な配列を持つプローブ29への結合はMaf/Junヘテロ2量体の増加に従って増強された (レーン14-17)。このプローブ29はMafおよびJunの結合コンセンサス配列に対してそれぞれ4および2塩基のミスマッチを持つが、予想されるMaf/Junヘテロ2量体の非対称的な結合コンセンサスTGCTGACTCATからは1塩基のミスマッチであるため、Maf/Junヘテロ2量体に特に強く結合するものと考えられる。

以上の結果は2つの事実を示している。すなわち、1) Maf/Junヘテロ2量体のDNA結合の特異性はMafおよびJunそれぞれのホモ2量体の特異性とはあきらかに異なる。2) MafおよびJunは標的となるDNA配列によって互いに協調的あるいは阻害的に働く。

同様の実験をMafとFosについて行っても同様の結果が得られた。また、Maf/Fosヘテロ2量体のDNA結合特異性とMaf/Junのそれとのあいだには違いは見いだせなかった。

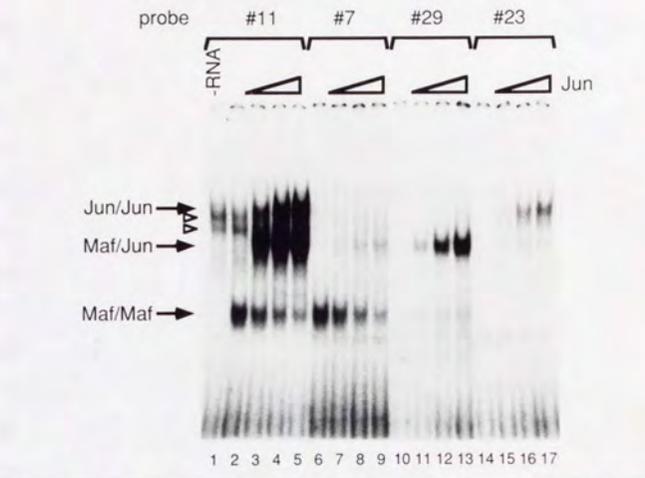


図13: ヘテロ2量体形成によるMafおよびJunのDNA結合特異性の変化

一定量のMaf(ND5)をコードするmRNAに対して、2倍量(レーン2, 6, 10, 13)、4倍量(レーン3, 7, 11, 15)、8倍量(レーン4, 8, 12, 16)、16倍量(5, 9, 13, 17)のJunをコードするmRNAを加えて*in vitro*翻訳反応を行い、それぞれのレーンの上
に示したオリゴヌクレオチド(配列は表2参照)をプローブとしてゲルシフト・アッセイを行った。それぞれの2量体とDNAの複合体に対応するバンドを矢印で示し、またプローブ11に結合するコムギ胚抽出液中のタンパク質に由来するバンドを三角印で示した。

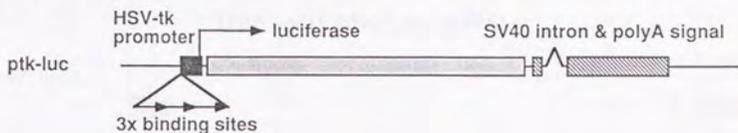
7) v-Mafの転写活性化能

v-Mafが塩基配列特異的なDNA結合タンパク質であることがあきらかになったので、次に、転写活性化能があるかどうかを一過性発現によるルシフェラーゼ・アッセイで調べることにした。polypeptide chain elongation factor-1 α (EF-1 α)プロモーターによる発現プラスミド (76) と、Herpes simplex virus-1 (HSV-1)のチミジンキナーゼ (thymidine kinase: tk) プロモーター (124) によるレポータープラスミドを用い、NIH3T3細胞を受容細胞として同時にトランスフェクトしてルシフェラーゼ活性を測定した。アッセイ系の概要を図14に、結果を図15に示す。

Mafの結合しない17番のオリゴヌクレオチドが3個タンデムに挿入された3x#17/tk-lucでは、v-Mafによってルシフェラーゼ活性がほとんど変化しなかったが (レーン1, 2)、Mafの結合する7番のオリゴヌクレオチドが3個タンデムに挿入された3x#7/tk-lucでは、v-Mafの発現によって約6倍の活性の上昇が見られた (レーン3, 4)。この活性化はホモ2量体は形成するがDNAに結合できない変異遺伝子R22Eの産物の発現によっては観察されなかった (レーン5)。v-MafおよびR22E産物が細胞内で発現されて核に局在することはv-Mafに対する特異抗体 (51) を用いた間接蛍光抗体法により確認した。以上のことは、DNA結合に依存してv-Mafが転写を活性化する能力を持つことを示している。7番のオリゴヌクレオチドの配列はJunの結合のコンセンサス配列と4塩基の違いがあること、また、TRE型であることから、Jun, Fos, ATF/CREBなどのMaf以外の内在性の転写因子の影響を受けにくいであろうと推測されたので、これをMafの結合配列として用いた。

Luciferase Assay System

* Reporter Plasmid



* Effector Plasmid

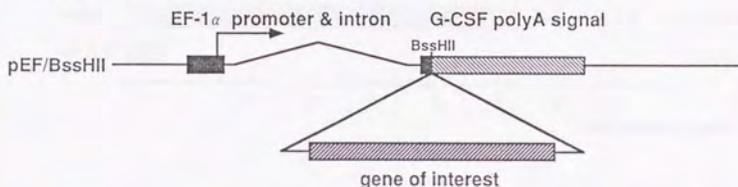


図14: ルシフェラーゼ・アッセイに用いたレポータープラスミドと発現プラスミドの構造

レポータープラスミド (ptk-luc)と発現プラスミド (pEF/BssHII)の基本構造と、その転写、スプライシングおよびポリA付加の様式の概略を図示する。本研究では ptk-lucの tk (チミジンキナーゼ) プロモーターの上流に7番または17番のオリゴヌクレオチドを3個直列につないだものを挿入した3x#7/tk-lucおよび3x#17/tk-lucを使用した。また、pGEMプラスミドに挿入された各々の遺伝子を MluIないし BssHIIで切り出して、pEF/BssHIIの BssHII部位に挿入したものを発現プラスミドとして使用した。

Transactivation by v-Maf

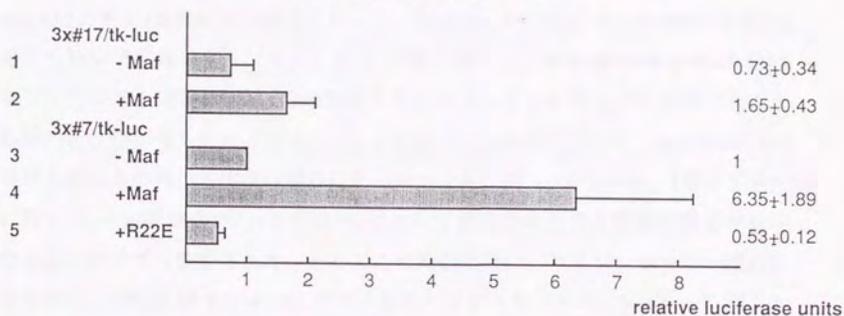


図15: v-Mafによる転写活性化

レポータープラスミド (レーン1, 2: 3x#17/tk/luc, レーン3, 4, 5: 3x#7/tk-luc) を1 μ g、発現プラスミド (レーン1, 3: pEF/BssHII, レーン2, 4: pEF/v-maf, レーン5: pEF/R22E) を6 μ g、pEF/ β -galを0.5 μ gの合計7.5 μ gを60mmシャーレに蒔いたNIH3T3細胞にトランスフェクトしてルシフェラーゼ活性を測定した。異なるロットのプラスミドDNAを用いて最低2回以上行った結果の平均値を取り、レーン3の値を1とした相対値と、標準誤差を示す。

8) v-MafとJunまたはFosとの転写調節における相互作用

さて、v-MafとJunおよびFosがヘテロ2量体を形成して異なるDNA認識特異性を獲得することにより、DNA配列によってはその配列への結合に関して互いに協調的または阻害的に働くことをすでに示した。v-Mafが転写活性化因子として機能することがあきらかになったので、転写の調節に関してもMafとJunまたはFosが互いに影響を及ぼし得るかどうかを検討することにした。

Maf/Mafのホモ2量体のみ結合しJun/Jun, Jun/Fos, Maf/Jun, Maf/Fosのいずれの2量体にも結合できないオリゴヌクレオチド7番を挿入した3x#7/tk-lucをv-Mafを発現するプラスミドと同時にNIH3T3細胞にトランスフェクトするとすでに示したように転写の活性化が見られた(図16: レーン1, 2)。これにさらに、JunまたはFosを発現させるとその活性化が抑制された(レーン3, 4)。すなわち、7番のプロープに対するv-Mafの結合がJunまたはFosによって阻害されたのと同様の現象が転写活性化能においても観察された。そしてこの抑制効果は、ロイシンジッパー構造に変異を導入したJunL3PまたはFosL3Pでは見られなかった(レーン5, 6)。このことは、この抑制効果が1) Maf/Jun, Maf/Fosのヘテロ2量体形成に依存していること、2) JunまたはFosの過剰発現によって基本転写因子が奪い取られてしまういわゆるスクウェルチング効果によるのではないことを示している。

また、MafとJunまたはFosの抑制的な相互作用だけでなく協調的な相互作用をも検出することを試みたが、調べた限りの細胞株において、Maf/Jun, Maf/Fosに特異的に結合するようなDNA配列に依存した内在性の転写活性が高いためこれまでのところ成功していない。しかしながら、ここで得られた結果から、DNA結合に関してあきらかにしたようなMafとJunまたはFosの相互作用が転写調節のレベルで実際に起こっていることが十分に示唆される。

Repression of v-Maf Transactivation by AP-1

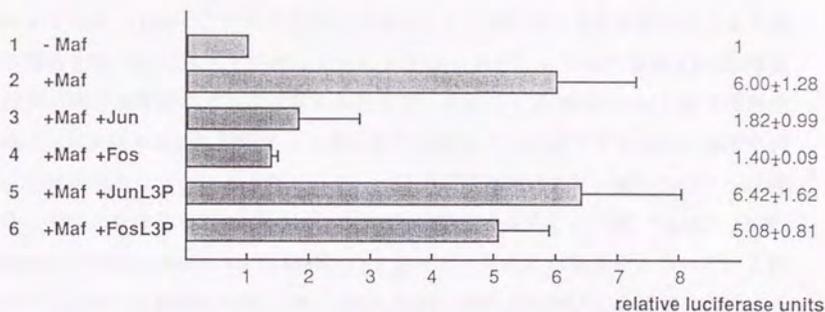


図16: Jun, Fosによるv-Mafの転写活性化の阻害

レポータープラスミド (3x#7/tk-luc)を $1\mu\text{g}$ とpEF/ β -galを $0.5\mu\text{g}$ に加えて、レーン1では発現プラスミドとしてpEF/BsSIIIを $6\mu\text{g}$ の合計 $7.5\mu\text{g}$ を、60mmシャーレに蒔いたNIH3T3細胞にトランスフェクトしてルシフェラーゼ活性を測定した。また、レーン2から6では発現プラスミドとしてpEF/v-mafを $1\mu\text{g}$ と、さらにpEF/BsSIII(レーン2)、pEF/v-jun(レーン3)、pEF/v-fos(レーン4)、pEF/v-junL3P(レーン5)、pEF/v-fosL3P(レーン6)をそれぞれ $5\mu\text{g}$ 加えた合計 $7.5\mu\text{g}$ をトランスフェクトした。異なるロットのプラスミドDNAを用いて最低2回以上行った結果の平均値を取り、レーン1の値を1とした相対値と、標準誤差を示す。

9) maf関連遺伝子産物のDNA結合能とその特異性

これまでに、*v-maf*と相同性のある遺伝子として、西澤および藤原によって*mafB*, *mafK*, *mafF*, *mafG*の4種がCEFのcDNAおよびゲノムライブラリーより単離されている(28, 90)。また、網膜に特異的に発現している遺伝子としてヒトcDNAライブラリーからSwaroopらによって単離された*NRL*遺伝子が*v-maf*と相同性を有することが分かっている(118)。これらの遺伝子産物のアミノ酸配列の比較を図17に、また産物の構造を模式的に示して比較したものを図18に示す。いずれの産物もb-Zip構造を持ち、転写制御因子であると考えられるが、なかでもMafBはv-Mafと最も相同性が高く、N末端から順に酸性アミノ酸に富む領域とアミノ酸のクラスター構造を持ち、全体の構造も互によく似ている。*NRL*遺伝子産物はアミノ酸クラスターを持たないものの全体にわたってv-Maf, MafBと相同性を有する。一方、MafK, MafF, MafGはいずれもv-MafのN末端側3分の2をそっくり欠失した構造をしている。これらどうしは互いに相同性が高いが、v-Maf, MafB, *NRL*とはDNA結合領域に相当する領域においてのみ相同性が高く、ロイシンジッパー部分の相同性はあまり高くない。

これらの関連遺伝子産物がDNAに結合するかどうか、また結合するとすればその特異性はどうかを調べるために、MafB, MafK, MafF, MafGタンパク質をMBPとの融合タンパク質として大腸菌内で発現させて精製し、表2に挙げた各種のオリゴヌクレオチドをプローブとしてゲルシフトアッセイを行った。図19に示すように、いずれのタンパク質も単独でDNA結合能を示した。また、その結合の強弱のパターンはいずれもv-Mafのそれと同じであり、v-MafのDNA認識の特異性と同一か少なくともきわめてよく似ていると判断された。

また、DNA結合能がb-Zip構造に依存するかどうかを調べるため、v-MafにおけるR22E, K19E, L2PL4Pに対応するアミノ酸置換を導入して*in vitro*で翻訳し、TRE型MAREをプローブとしてゲルシフトを行うことにした。作製した変異遺伝子にコードされるタンパク質の構造の模式図を図20から図23の(A)に示す。のちに各種のヘテロ2量体形成を検討するために作製した欠失変異遺伝子および、v-MafのN末端側半分とのキメラ遺伝子の産物の構造も同時に示す。

それぞれの関連遺伝子産物を用いた実験結果を図20から図23の(B), (C)に示す。MafB, MafK, MafFに関してはいずれもDNAとの複合体を検出できたが(図20, 21, 22, 各(C): レーン2)、MafGは*in vitro*翻訳系での産物がおそらく不溶化してしまう

ためにDNAとの複合体を明瞭なバンドとして検出できなかった(図23 (C): レーン2)。しかし、ロイシンジッパー構造よりもC末端側を欠失させたり (MafG Δ)、v-MafのN末端を融合させることにより (γ MafG)、そのDNA結合能を確認することができた(図23 (C): レーン6, 10)。いずれの関連遺伝子産物についても、R22EまたはL2PL4P (MafK, MafF, MafGではL2PM4P)のアミノ酸置換によってDNA結合活性が失われた(図20, 21, 22 (C): レーン3, 4, 5, 7, 9, 図23 (C): レーン7, 8, 9, 11)。このことは、これらの関連遺伝子産物のDNA結合能がやはりv-Mafにおけるのと同様にb-Zip構造に依存していることを示している。一方、K19Eのアミノ酸置換による影響は各遺伝子産物間で違いが見られた。すなわち、TRE型MAREに対する結合は、v-MafではK19E変異によってほとんど影響を受けなかったのに対し、MafK, MafGではかなり阻害される結果となっており(図21 (C): レーン5, 図23 (C): レーン9)、MafB, MafFでは完全に阻害されていた(図20, 22 (C): レーン5)。これらの結果は、図19に示したようなMBP融合タンパク質を用いた検定では検出できなかったDNA結合特異性の違いが各関連遺伝子間に存在する可能性を示している。

v-Maf	MA	SE	LA	MS	QS	DL	PT	SPL	AME	YV	ND	FD	LM	KF	EV	KE	VE	IT	DR	IS	QC	GR	LL	(49)		
MafB	MA	GE	LS	I	GA	EL	PT	SPL	AME	YV	ND	FD	LM	KF	EV	KE	EL	GR	DR	SG	GR	CT	RL	(49)		
NRL	MA	---	---	---	---	LP	SP	PL	AME	YV	ND	FD	LM	KF	EV	KE	RE	SE	---	---	---	---	---	(31)		
v-Maf	I	AG	GS	LS	ST	M	ST	PC	SS	V	P	S	P	S	A	D	SP	G	S	Q	T	D	OK	THL	(98)	
MafB	Q	P	A	G	S	V	S	T	P	I	S	T	P	C	S	S	V	P	S	S	P	S	F	S	---	(92)
NRL	---	P	---	---	---	G	S	T	H	V	S	S	V	P	S	---	---	---	---	---	---	---	---	---	(79)	
v-Maf	Q	D	I	N	P	E	A	L	C	F	S	P	E	D	A	V	E	A	L	I	N	S	S	H	L	(147)
MafB	Q	D	I	N	P	E	A	L	C	L	T	P	E	D	A	V	E	A	L	I	N	S	S	H	O	(125)
NRL	Q	D	I	N	P	E	A	L	C	L	S	P	E	A	V	E	A	L	I	N	S	S	H	O	V	(124)
v-Maf	A	E	E	M	G	S	A	A	V	V	S	A	V	I	A	A	A	A	A	A	G	G	A	P	H	(199)
MafB	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	(156)	
NRL	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	(156)	
v-Maf	P	S	A	P	P	S	S	A	G	S	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	(247)	
MafB	S	C	H	P	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	(199)	
MafK	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	(24)	
MafF	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	(24)	
MafG	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	(24)	
NRL	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	(132)	
v-Maf	S	D	E	L	V	T	M	S	V	R	E	L	N	R	L	R	Q	V	S	K	E	E	V	I	R	(297)
MafB	S	D	E	L	V	S	M	S	V	R	E	L	N	R	L	R	Q	V	T	K	E	E	V	I	R	(249)
MafK	S	D	E	L	V	S	M	S	V	R	E	L	N	R	L	R	Q	V	T	K	E	E	V	I	R	(74)
MafF	S	D	E	L	V	T	M	S	V	R	E	L	N	H	L	R	Q	L	S	K	E	E	V	A	R	(74)
MafG	T	D	E	L	V	T	M	S	V	R	E	L	N	H	L	R	Q	L	S	K	E	E	T	I	L	(74)
NRL	S	D	E	L	V	T	M	S	V	R	E	L	N	R	L	R	Q	V	G	R	E	A	L	R	L	(182)
v-Maf	O	R	H	V	L	S	E	R	N	Q	L	L	O	O	V	E	L	K	O	E	I	S	H	L	V	(347)
MafB	O	R	H	V	L	S	E	R	N	Q	L	L	O	O	V	E	L	K	O	E	I	S	H	L	V	(299)
MafK	O	K	E	E	L	R	O	T	V	E	L	O	O	V	E	L	K	O	E	I	S	M	K	L	E	(124)
MafF	O	K	E	E	L	R	O	T	V	E	L	O	O	V	E	L	K	O	E	I	S	M	K	L	E	(124)
MafG	O	K	E	E	L	R	O	T	V	E	L	O	O	V	E	L	K	O	E	I	S	M	K	L	E	(124)
NRL	O	R	L	E	A	E	R	A	R	L	A	A	L	L	A	L	A	L	A	L	A	V	A	L	A	(124)
v-Maf	S	S	D	N	F	S	S	P	E	F	F	M	Y	P	R	S	S	T	T	D	M	---	---	---	(369)	
MafB	T	S	D	N	F	S	S	P	E	F	F	M	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	(311)	
MafK	P	I	T	P	T	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	(156)	
MafF	G	P	-	P	A	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	(149)	
MafG	P	V	T	P	V	R	G	L	T	S	S	M	G	P	L	V	P	G	K	V	A	T	S	V	I	(161)
NRL	S	H	L	F	L	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	(237)	

図17: maf関連遺伝子産物のアミノ酸配列の比較

それぞれのmaf関連遺伝子の塩基配列から予想されるアミノ酸配列をお互いに比較した。v-Mafと一致するアミノ酸を枠で囲い、またロイシンジッパー構造のロイシン残基の繰り返しを網掛けして示す。塩基配列のデータは、v-maf (89)、mafKおよびmafF (28)、mafBおよびmafG (90)、NRL (118)によった。

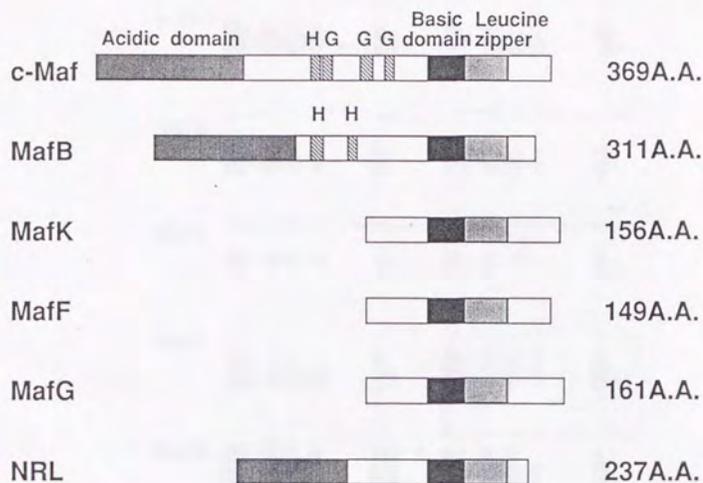


図18: *maf*関連遺伝子産物の構造の比較

それぞれの*maf*関連遺伝子産物の構造を模式的に示して相互に比較した。酸性アミノ酸に富む領域、b-Zip構造 (basic region と leucine zipper) を強調し、またヒスチジン残基、グリシン残基のクラスター構造をそれぞれH,Gで示す。それぞれの産物を構成するアミノ酸残基数の合計も示した。

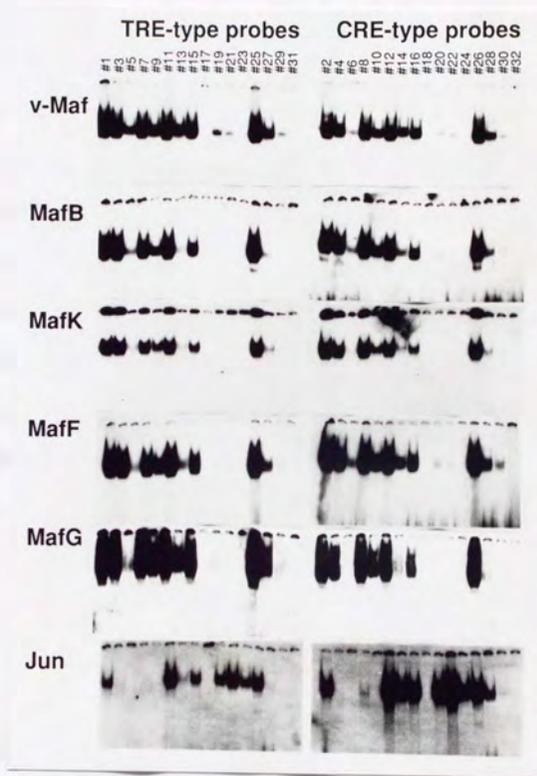


図19: *maf*関連遺伝子産物のDNA結合の特異性

大腸菌で発現させて精製したそれぞれの融合タンパク質について、表2に示した各種のオリゴヌクレオチドをプローブとしてゲルシフト・アッセイを行った。

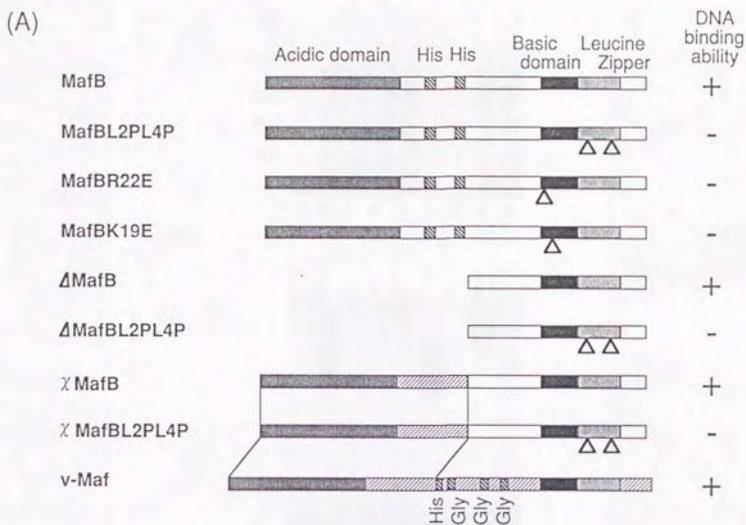


図20: MafB のDNA結合能

(A): 変異 $mafB$ 遺伝子産物の構造

本研究で用いた変異 $mafB$ 遺伝子産物の構造を模式的に示した。三角印はアミノ酸置換の導入された部位を示す。これらの産物のTRE型MAREに対する結合能を測定した(C)の結果をまとめて右に示した。

(B)



(C)



(B): *in vitro*で合成した変異*mafB*遺伝子産物

それぞれの変異遺伝子産物をコムギ胚抽出液を用いて³⁵Sメチオニン存在下で合成し、その4 μ lをSDS-PAGEで解析した。左側に分子量マーカの位置を示す。

(C): 変異*mafB*変異遺伝子産物のDNA結合能

コムギ胚抽出液を用いて合成したそれぞれのタンパク質のTRE型MARE (表2 : オリゴヌクレオチド1) に対する結合能をゲルシフト法で検定した。

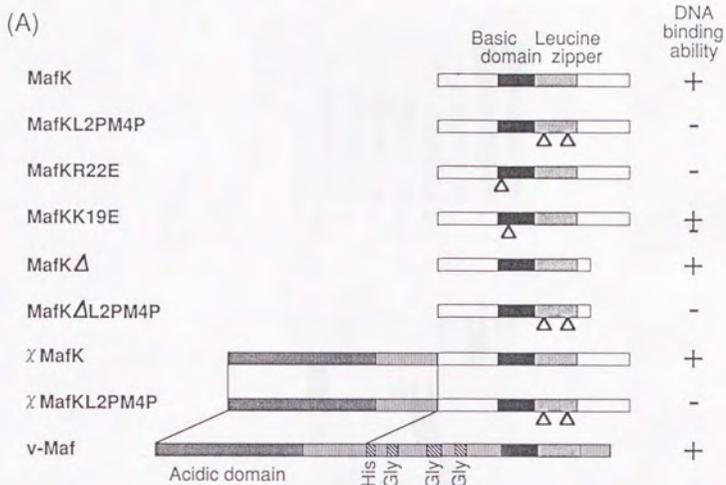
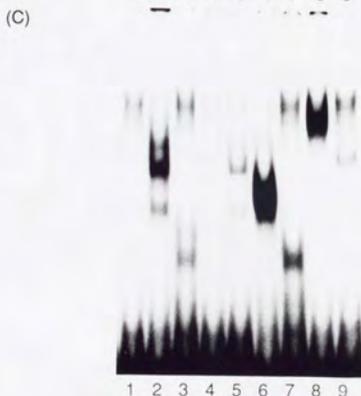
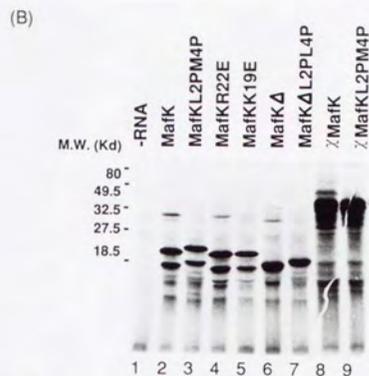


図21: MafK のDNA結合能

(A): 変異mafK遺伝子産物の構造

本研究で用いた変異mafK遺伝子産物の構造を模式的に示した。三角印はアミノ酸置換の導入された部位を示す。これらの産物のTRE型MAREに対する結合能を測定した(C)の結果をまとめて右に示した。



(B): *in vitro*で合成した変異*mafK*遺伝子産物

それぞれの変異遺伝子産物をコムギ胚抽出液を用いて³⁵Sメチオニン存在下で合成し、その4 μ lをSDS-PAGEで解析した。左側に分子量マーカーの位置を示す。

(C): 変異*mafK*変異遺伝子産物のDNA結合能

コムギ胚抽出液を用いて合成したそれぞれのタンパク質のTRE型MARE (表2 : オリゴヌクレオチド1) に対する結合能をゲルシフト法で検定した。

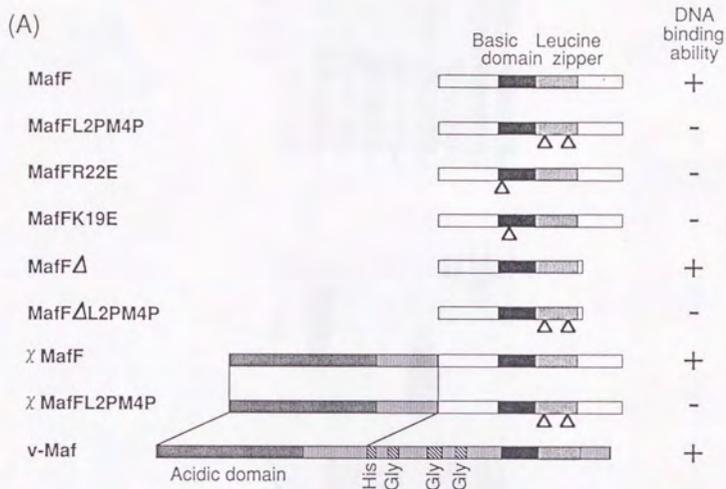
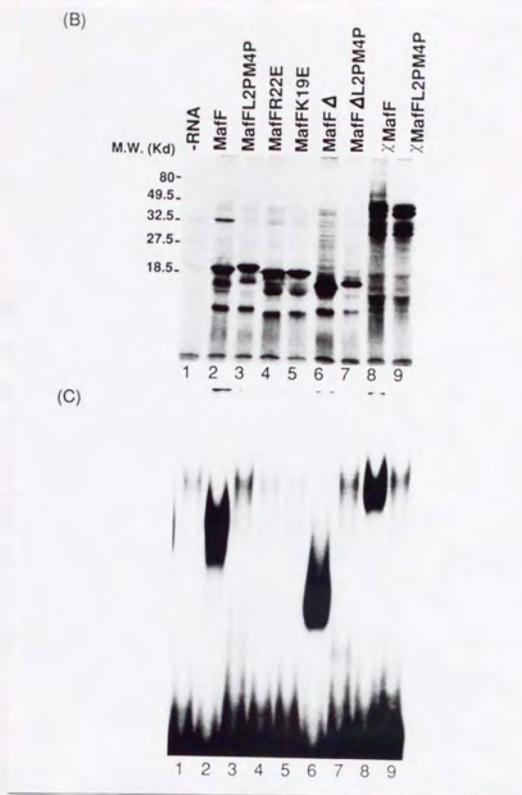


図22: MafF のDNA結合能

(A): 変異 $mafF$ 遺伝子産物の構造

本研究で用いた変異 $mafF$ 遺伝子産物の構造を模式的に示した。三角印はアミノ酸置換の導入された部位を示す。これらの産物のTRE型MAREに対する結合能を決定した(C)の結果をまとめて右に示した。



(B): *in vitro*で合成した変異*mafF*遺伝子産物

それぞれの変異遺伝子産物をコムギ胚抽出液を用いて³⁵Sメチオニン存在下で合成し、その4 μ lをSDS-PAGEで解析した。左側に分子量マーカーの位置を示す。

(C): 変異*mafF*変異遺伝子産物のDNA結合能

コムギ胚抽出液を用いて合成したそれぞれのタンパク質のTRE型MARE (表2 : オリゴヌクレオチド1) に対する結合能をゲルシフト法で検定した。

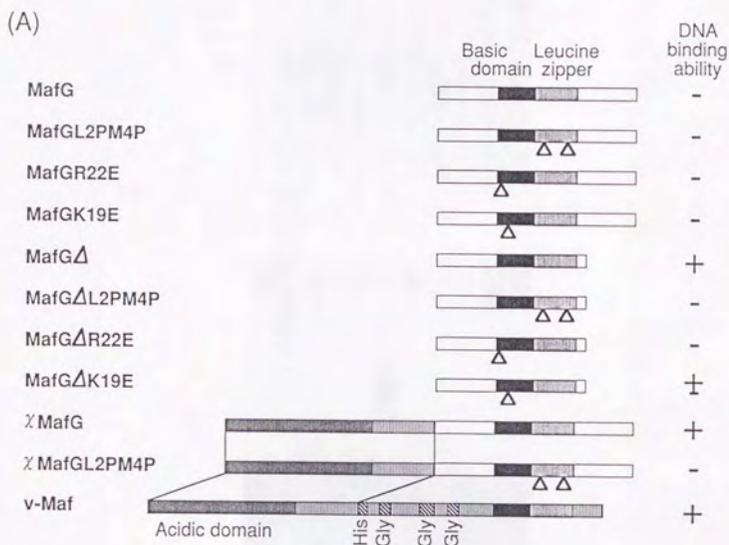
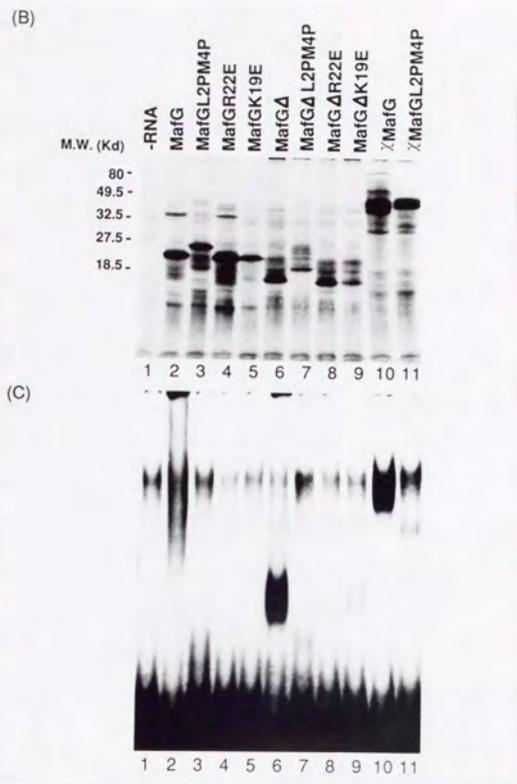


図23: MafG のDNA結合能

(A): 変異mafG遺伝子産物の構造

本研究で用いた変異mafG遺伝子産物の構造を模式的に示した。三角印はアミノ酸置換の導入された部位を示す。これらの産物のTRE型MAREに対する結合能を測定した(C)の結果をまとめて右に示した。



(B): *in vitro*で合成した変異*mafG*遺伝子産物

それぞれの変異遺伝子産物をコムギ胚抽出液を用いて³⁵Sメチオニン存在下で合成し、その4 μ lをSDS-PAGEで解析した。左側に分子量マーカーの位置を示す。

(C): 変異*mafG*変異遺伝子産物のDNA結合力

コムギ胚抽出液を用いて合成したそれぞれのタンパク質のTRE型MARE (表2 : オリゴヌクレオチド1) に対する結合力をゲルシフト法で検定した。MafGはおそらくDNA結合の反応溶液中で不溶化するために、DNAとの複合体を明瞭なバンドとして検出できなかった (レーン2)。

10) maf関連遺伝子産物間のホモ/ヘテロ2量体形成能

次に、各遺伝子産物がホモ2量体としてDNAに結合しているかどうかをあきらかにすることを試みた。すなわち、分子量の異なる2種のタンパク質を同時に *in vitro* で翻訳してゲルシフトアッセイを行った。結果を図24、図25に示す。MafB, MafK, MafF, MafGともに、それぞれ分子量の異なる産物を同時に翻訳してゲルシフトを行った場合に、それぞれとDNAの複合体の中間の移動度を示すバンドが新たに検出され(図24, 25: レーン4)、いずれもホモ2量体でDNAに結合することが確認された。またこれらの中間的な移動度を示すバンドは、いずれかの産物のロイシンジッパー構造にアミノ酸置換が導入されている場合には検出されず(レーン5, 6)、2量体形成はロイシンジッパー構造に依存することが確認された。

そこで次に、各関連遺伝子産物間でヘテロ2量体が形成されるかどうかを同様の検定法で調べた。まずv-MafまたはMafBとのヘテロ2量体形成の有無について調べたところ、v-MafとMafBとを同時に翻訳したときにのみヘテロ2量体に由来するバンドが検出され(図26 (A): レーン10, 11, (B): レーン11, 12)、v-MafまたはMafBと、MafK, MafF, MafGとの間のヘテロ2量体は検出されなかった((A): レーン7, 8, 9, (B): レーン8, 9, 10)。これらのタンパク質はいずれもホモ2量体でTRE型MAREによく結合するので、ヘテロ2量体が形成されていながらDNAとの複合体を形成しないとは考えにくく、このアッセイでヘテロ2量体に由来するバンドを検出できなければ2量体を形成しないと結論した。v-MafとMafBのヘテロ2量体形成がそれぞれのロイシンジッパー構造に依存することは、ヘテロ2量体に由来するバンドがいずれかのロイシンジッパー構造にアミノ酸置換が導入されていると検出されなかったことから確認された(図27)。一方、MafK, MafF, MafGの間ではヘテロ2量体が形成されること(図28: 各パネル、レーン4)、ヘテロ2量体形成がロイシンジッパー構造に依存すること(レーン5, 6)が、同様の検定法により確認された。



図24: MafBのホモ2量体形成

コムギ胚抽出液を用いてそれぞれのレーンの上に表示する産物を *in vitro* で合成し、TRE型MAREを含むオリゴヌクレオチド1 (表2) をプローブとしてゲルシフトを行った。それぞれの産物とDNAとの複合体に由来するバンドを矢印で示した。それぞれの産物の構造は図20(A)参照。

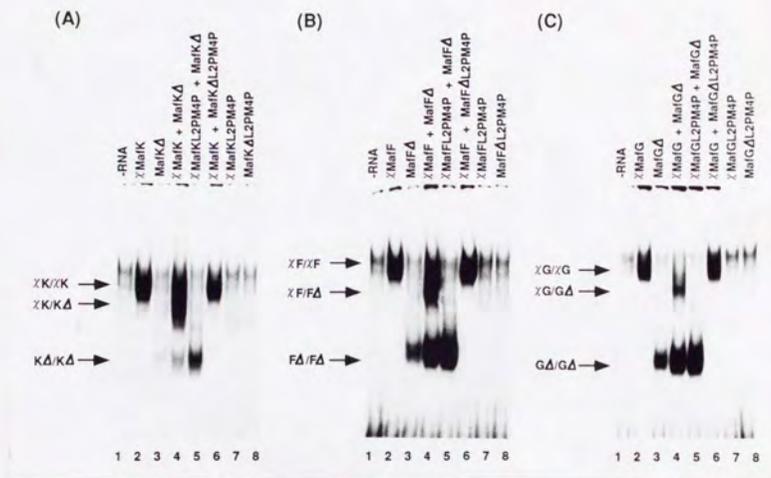


図25: MafK, MafF, MafGのホモ2量体形成

- (A): MafKのホモ2量体形成
- (B): MafFのホモ2量体形成
- (C): MafGのホモ2量体形成

コムギ胚抽出液を用いてそれぞれのレーンの上を示す産物を *in vitro* で合成し、TRE型MAREを含むオリゴヌクレオチド1 (表2) をプローブとしてゲルシフトを行った。それぞれの産物とDNAとの複合体に由来するバンドを矢印で示した。それぞれの産物の構造は、MafK: 図21(A), MafF: 図22(A), MafG: 図23(A)にそれぞれ示す。

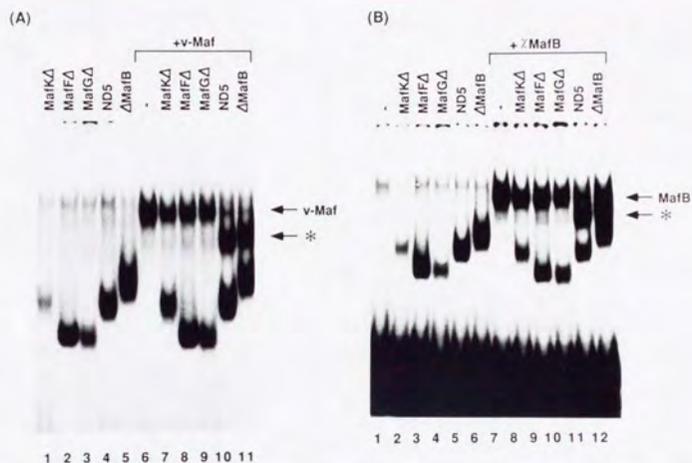


図26: v-Maf, MafBと各maf関連遺伝子産物とのヘテロ2量体形成能

(A): v-Mafと各maf関連遺伝子産物とのヘテロ2量体形成能

(B): MafBと各maf関連遺伝子産物とのヘテロ2量体形成能

コムギ胚抽出液を用いてそれぞれのレーンの上を示す産物を *in vitro* で合成し、TRE型MAREを含むオリゴヌクレオチド1 (表2) をプローブとしてゲルシフトを行った。v-Mafのホモ2量体由来するバンド(A)およびMafBのホモ2量体由来するバンド(B)を矢印で示す。また2種類の関連遺伝子産物を同時に合成してゲルシフトを行った時に新たに検出されるバンドを*印で示す。

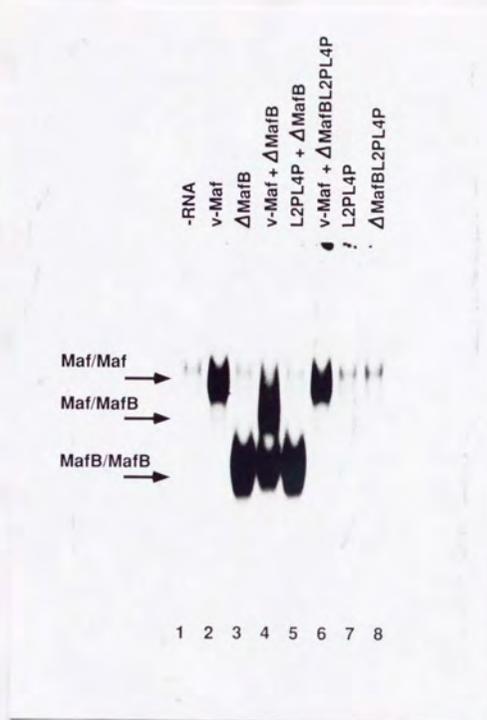


図27: v-MafとMafBのヘテロ2量体形成

コムギ胚抽出液を用いてそれぞれのレーンの上を示す産物を *in vitro* で合成し、TRE型MAREを含むオリゴヌクレオチド1 (表2) をプローブとしてゲルシフトを行った。それぞれの産物とDNAとの複合体に由来するバンドを矢印で示した。

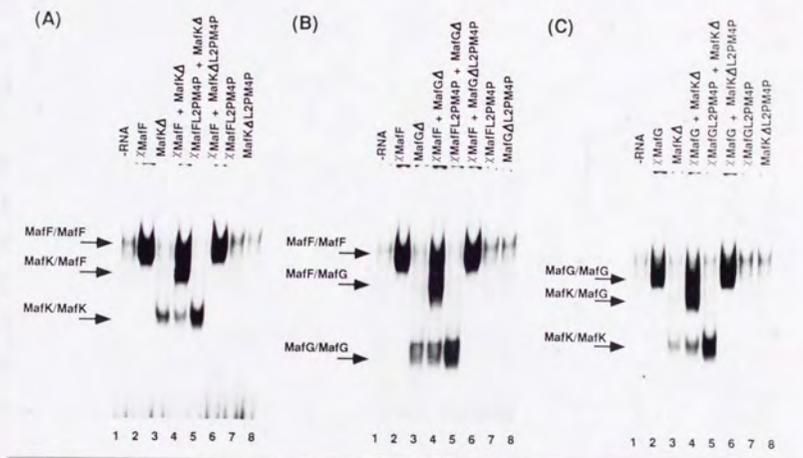


図28: MafK, MafF, MafGの間のヘテロ2量体形成

(A): MafKとMafFのヘテロ2量体形成

(B): MafFとMafGのヘテロ2量体形成

(C): MafGとMafKのヘテロ2量体形成

コムギ胚抽出液を用いてそれぞれのレーンの上を示す産物を *in vitro* で合成し、TRE型MAREを含むオリゴヌクレオチド1 (表2) をプローブとしてゲルシフトを行った。それぞれの産物とDNAとの複合体に由来するバンドを矢印で示した。

11) *maf*関連遺伝子産物とJunまたはFosとのヘテロ2量体形成能

さらに、*maf*関連遺伝子産物とJunまたはFosとのヘテロ2量体が形成されるかどうかを同様の方法で検定した。ここでは、v-MafとJun、Fosとの間のヘテロ2量体形成の検出に用いたのと同じ11番のオリゴヌクレオチドをプローブとした。図29に示すようにv-MafのみがJunと効率よくヘテロ2量体を形成し、他の関連遺伝子産物とJunとの間の2量体由来するバンドは検出できなかった(レーン7-11)。MafBとv-Mafとはロイシンジッパー部分に関してもアミノ酸配列の相同性が高く、また互いにヘテロ2量体を形成するにも関わらず、Junとのヘテロ2量体形成能において違いが見られたことは意外であった。一方、Fosとのヘテロ2量体は関連遺伝子産物のいずれとの間にも形成されることが分かった(レーン13-17)。さらに、これらの2量体形成がそれぞれのロイシンジッパー構造に依存することも同様の検定法によって確かめた。すなわち、それぞれの*maf*関連遺伝子産物とFosを同時に合成してゲルシフトを行った時にのみ検出されるヘテロ2量体由来するバンド(図31, 32: 各レーン4)は、どちらかのロイシンジッパー構造にアミノ酸置換が導入されている場合には検出されなかった(各レーン5, 6)

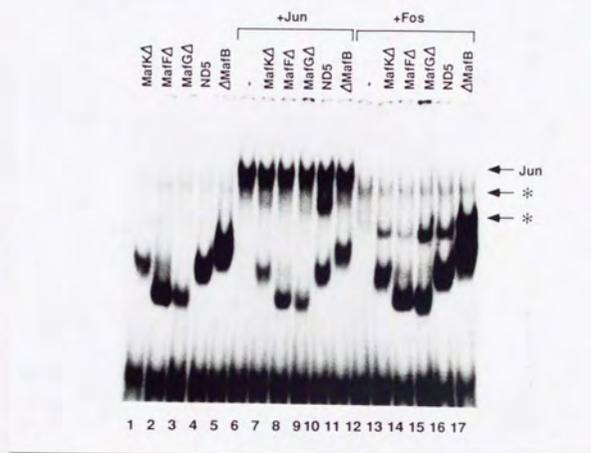


図29: *maf*関連遺伝子産物とJunまたはFosとのヘテロ2量体形成能

コムギ胚抽出液を用いてそれぞれのレーンの上を示す産物を *in vitro* で合成し、オリゴヌクレオチド11 (表2) をプローブとしてゲルシフトを行った。Junのホモ2量体由来するバンドを矢印で示した。また、JunまたはFosを同時に合成した時のみ出現するバンドを*印で示した。

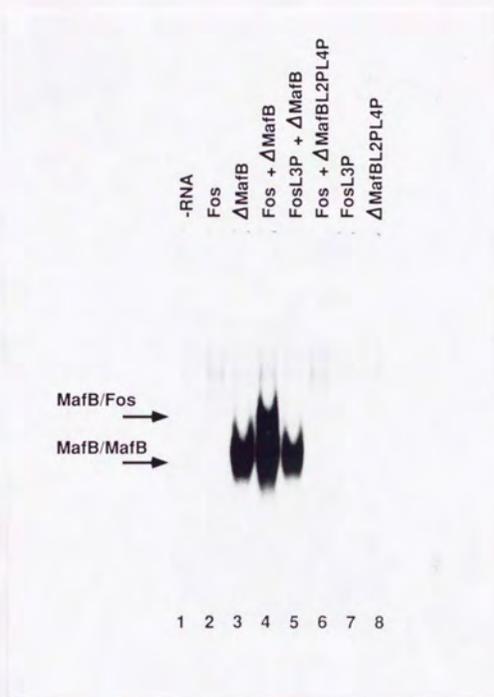


図30: MafBとFosとのヘテロ2量体形成

コムギ胚抽出液を用いてそれぞれのレーンの上を示す産物を *in vitro* で合成し、オリゴヌクレオチド11 (表2) をプローブとしてゲルシフトを行った。それぞれの産物とDNAとの複合体に由来するバンドを矢印で示した。

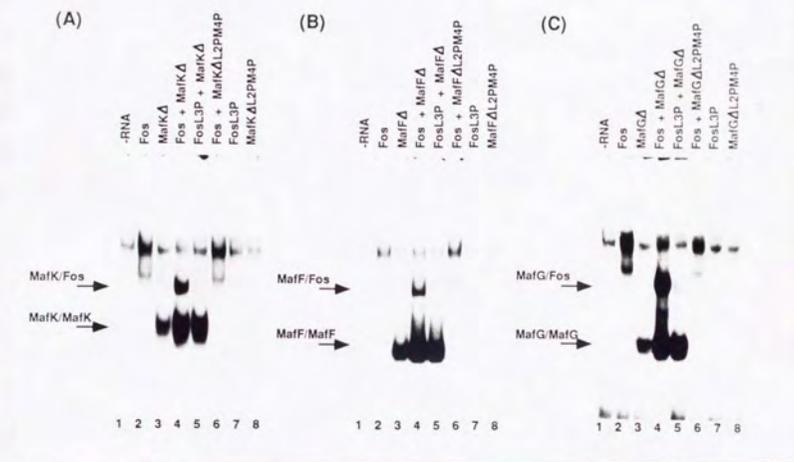


図31: MafK, MafF, MafGとFosとのヘテロ2量体形成

(A): MafKとFosとのヘテロ2量体形成

(B): MafFとFosとのヘテロ2量体形成

(C): MafGとFosとのヘテロ2量体形成

コムギ胚抽出液を用いてそれぞれのレーンの上を示す産物を *in vitro* で合成し、オリゴヌクレオチド11 (表2) をプローブとしてゲルシフトを行った。それぞれの産物とDNAとの複合体に由来するバンドを矢印で示した。

12) Mafによって転写調節を受ける候補遺伝子の検索

Mafの認識するDNA配列は比較的長い為、Mafによって転写の調節を受ける遺伝子の候補をDNAデータベースの中から検索することが可能ではないかと考えてこれを試みた。脊椎動物およびウイルスのDNAデータベースをTRE型およびCRE型MAREに対して3塩基までのミスマッチを許して検索したところ20000以上の配列が得られたが、これらの中から、ゲノムDNAの転写調節領域に相当すると思われる位置に存在するもので、なおかつ、進化的に保存されているもの、関連遺伝子間で保存されているもの、または、転写調節に関与していることのアきらかにされている位置に存在するものを選び出して表3に示した。それぞれの候補遺伝子におけるMafの関与の可能性についてはのちに考察を加える。

[TRE-type MARE]

	sequence	reference
Hepatitis B virus X gene enhancer ¶	1988 GGTTGCCTCAGCA	(30)
Feline leukemia virus LTR ¶	179 AGCTGAAACAGCA	(19)
Mouse mammary tumor virus LTR ¶	790 TGTTGACTCAGGA	(79)
Rous sarcoma virus LTR ¶	9017 CGATGAGTTAGCA	(108)
Human 92kDa type IV collagenase 5' ¶	-82 CCCTGAGTCAGCA	(45)
Human opsin 5' §	134 TGCTGATTCAGCC	(84)
Mouse γ 2-crystallin 5' §¶	-47 TGCCAAACACAGCA	(64)
Rat glutathione S-transferase-Pi 5' §¶	-64 TGTTGACTCAGCA	(58)
Mouse glutathione S-transferase Ya 5' ¶	-731 TGGTGACAAAGCA	(26)
Human NAD(P)H:quinone oxidoreductase 5'	-464 AGTTGACTCAGCA	(49)
Mouse β -globin enhancer §†¶	-9774 TGCTGAGTCATGC	(78)
	-9764 TGCTGAGTCATGC	
	-167 CAGTGACTCAGCA	(74)
Human porphobilinogen deaminase ¶	-251 TGGCGAGTCAGCC	(6)
Hamster histone H3.2 5' §¶	-1003 GGCTGAGGCAGCA	(72)
Human pim-1 5' §	-1336 TTCAGAGACAGCA	(67)
Human <i>c-erbB</i> upstream enhancer ¶	130 TGCTGAGCCTGCA	(67)
Human <i>c-erbB</i> downstream enhancer ¶	137 TGCAGCCTCAGCC	(7)
Human insulin 5' §	-283 TGCTGAGTCACTA	(97)
Human IL-6 5' §	-293 TCCTGACTCTGCA	(10)
Human p53 5' §	-21 TGCTGAGCCAGTG	(46)
Human plasminogen 5' †	-219 CACTGACTTAGCA	(40)
Human cathepsin G 5' †	-94 TGCGGACTCAGCG	(24)
Human metallothionein-IG 5' †		

[CRE-type MARE]

Human corticotropin-releasing factor precursor 5' §	-1215 CGTTGACGTCACCA	(112)
---	-------------------------	-------

表3: Mafの標的遺伝子の候補

Mafによって認識される可能性のある配列の位置を示す番号は、それぞれを引用した文献の中で使用されているものである。MAREと一致する塩基には下線を引いた。

¶: 転写制御に関わっていることが知られている領域に存在するもの

§: 生物種を超えて保存されているもの

†: 関連遺伝子の間で保存されているもの

<考察>

1) v-MafとAP-1の相互作用

本研究においては、癌遺伝子産物v-Mafの機能を分子レベルで解明する目的でその認識するDNA配列を決定したが、得られた結合コンセンサス配列はTREないしCREと相同性を有していた。そこで、TRE、CREに結合することの知られているv-Junの結合DNA配列をあらためて決定することにより、v-MafのDNA認識の特異性と、v-JunまたはJun/Fosのそれとがはっきり異なるけれども一部重複することを明らかにした。以前に、v-Mafが既知のTRE、CREを含むDNA断片に結合しないことをゲルシフト法で確認しており(52)、この観察がv-Mafの認識DNA配列の決定へと研究を進める結果になったわけであるが、このときに用いたプローブはラットのap2遺伝子のTRE(95)と、ヒトのソマトスタチン遺伝子のCRE(77)であり、それぞれTRE型MARE、CRE型MAREと比較して5および4塩基の違いがあり、v-Mafによる結合が見られなかったことの原因はいまやあきらかである。また、一般にJunおよびJun/FosはCREよりもTREに対してより強い親和性を持つと考えられているが(83)、これは中央の7ないし8塩基対の外側の配列には注目せずに親和性の大小を検討しているために生じた結果であろうと思われる。本研究ではこれと逆に、JunおよびJun/FosがTREよりもCREに対してより強い親和性を持つという結果を得たが、これは、外側の配列にも注目して結合の強弱を比較したRyseckらの観察(103)と一致するものである。いずれにせよ、このようにそれぞれのタンパク質の結合配列の特異性を明らかにしたことは、ある遺伝子の転写制御のシス配列に対してこれらのタンパク質が結合するかどうかを予測するうえで有用である。

また、v-MafがJunおよびFosとロイシンジッパー構造を介してヘテロ2量体を形成すること、2量体形成により新たな結合DNA配列の特異性を獲得することを明らかにした。図32に示すように、Maf、Jun、Fosの3種類のタンパク質によってDNA認識の特異性の異なる5種の2量体が形成されるわけである。Maf/JunおよびMaf/Fosヘテロ2量体は、結晶構造解析を含めたb-Zipタンパク質のDNA結合モデル(21, 82, 98)から予想されたように、それぞれの認識するDNA配列の半分ずつからなる非対称的なDNA配列(図33)により強く結合することも示した。さらに、ヘテロ2量体の形成によってあるDNA配列に対する結合が増強されたり抑制されたりすることを

あきらかにした。すなわち、片方のホモ2量体のみよく結合できるようなDNA配列に対してはもう片方のタンパク質の増加によってその結合が阻害され、専らヘテロ2量体によって認識されるようなDNA配列に対しては両者が協調的に結合した。これまで調べた限り、培養細胞における*c-maf*のmRNAの発現は増殖刺激で変化しない(89)。一方、*junD*を例外として(41, 99) AP-1関連遺伝子の発現は増殖刺激により一過的にすばやく誘導されることが知られている(15, 35, 58, 87, 100, 101, 102)。これらの知見は、Mafの生理的役割を考える上で興味深い。つまり、Mafにより転写を促進される遺伝子の発現がAP-1タンパク質の増加によって抑制される可能性のあることが容易に想像されるし、また、Mafの発現が高い細胞においてはAP-1の転写活性化能がMafにより協調的あるいは抑制的に調節される可能性も考えられる。

実際に、*v-Maf*がその結合DNA配列に依存した転写活性化能を有することをあきらかにし、その上で、MafとJunおよびFosとの間に転写制御のレベルでの相互作用があることを示した。すなわち、*v-Maf*によってのみ活性化されるDNA配列を介した転写がJunないしFosを加えることで阻害された。これは上に述べたMafとAP-1の機能的相互作用の一部分を裏付ける結果であって、タンパク質-タンパク質の相互作用と、タンパク質-DNAの相互作用の双方によってある遺伝子の転写量が精妙に調節されている可能性を示すものである。

本研究では、*v-Maf*とJunおよびFosの相互作用に注目してきたが、TREないしCREに結合する他のタンパク質との相互作用についても今後あきらかにして行かなければならない。既にJunやFosがATF/CREB関連遺伝子産物のあるものとヘテロ2量体を形成することがあきらかにされており(8, 37, 44, 48, 66)、*v-Maf*がこれらの他のb-Zipタンパク質とヘテロ2量体を形成するかどうかは興味深い問題である。また、ヘテロ2量体を形成しなくても少なくともDNA結合に関して互いに拮抗する可能性があるので、今後あきらかにして行かねばならない課題である。

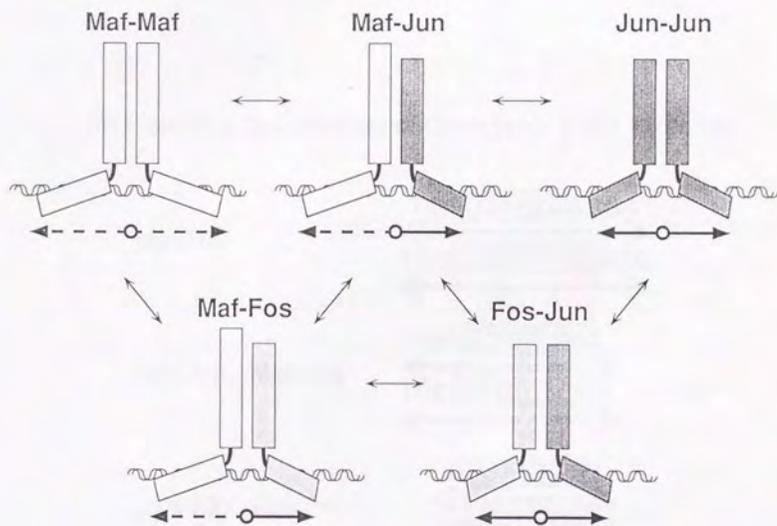


図32: Maf, Jun, Fos からなる2量体とDNAとの相互作用

Maf, Jun, Fosによって構成される2量体と、それらの結合するDNA配列を模式的に示した。Mafは点線の矢印で示した比較的長いDNA配列を、Jun, Fosは実線の矢印で示した比較的短いDNA配列を最もよく認識する。Maf/Jun, Maf/Fosの2量体はそれぞれ半分ずつから成る非対称的なDNA配列に最も強く結合する。Jun, Fosが増殖刺激で増加するとこれらの2量体の比率が変化し、それぞれのDNA配列を介した転写に正または負の影響を及ぼす。

DNA-binding Specificities of Oncogenic b-Zip Proteins

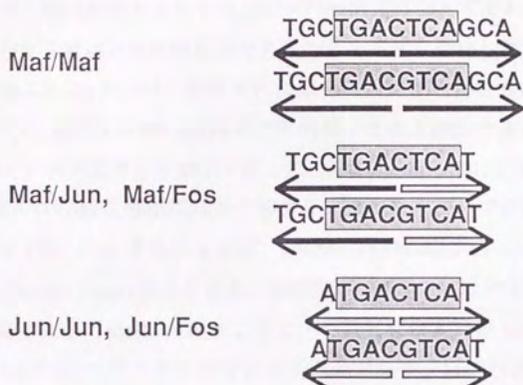


図33: Maf, Jun, Fos からなる2量体のDNA認識の特異性

図32に示したそれぞれの2量体の最もよく認識するDNA配列をそれぞれ矢印とともに示した。また中心のTRE, CRE配列を網掛けした。

2) v-Mafの機能領域

これまでに、欠失あるいはアミノ酸置換を導入した変異遺伝子を用いた解析により、v-Mafのトランスフォーム活性にはC末端のおよそ100アミノ酸が少なくとも必要であることを明らかにしてきた。この領域にはb-Zip構造が含まれており、ホモ2量体形成能はトランスフォーム活性にとって必須であることも分かっていた(51)。本研究ではさらにDNA結合に必要な領域の同定を行った。b-Zip構造を持つ他のタンパク質における(20, 32, 85, 94, 119)のと同じように、2量体形成能はDNA結合の前提条件であった。そして、図34に詳しく示すように、欠失変異遺伝子産物を用いた解析により、DNA結合にはロイシンジッパー構造に加えてそれよりN末端側の49アミノ酸にわたる領域が最低限必須であることを明らかにした。同定されたDNA結合領域は他のb-Zipタンパク質のそれに比べると比較的長いものであった。このことは、v-Mafの認識するDNA配列が比較的長いことと対応するようと思われる。酵母のb-Zipタンパク質でありTREと同じ7塩基対からなるDNA配列に結合するGCN4タンパク質のDNA結合領域はおよそ30アミノ酸であり、その立体構造も明らかにされている(21, 43)。それによれば、DNA結合領域は1本の α -ヘリックス構造をとってDNAのmajor grooveに入り込み、認識配列の半分のおよそ4塩基対を認識するとされている。しかしMafにおけるように13ないし14塩基対からなる配列を認識するためには1本の α -ヘリックスだけでは不十分であり、MafはGCN4とは異なった様式でDNAに結合していると考えられる。

いずれにしても、欠失変異遺伝子産物においては、そのDNA結合能はトランスフォーム活性にとって必須であるという相関関係が認められた。ところが、アミノ酸置換を導入した変異遺伝子産物については、TRE型MAREをプローブとして用いた場合、この相関関係は必ずしも成り立たなかった。すなわち、野生型と同程度のDNA結合活性を持っているにも関わらずトランスフォーム能を持たない例が存在した(K19E, A14D, A14V, R10D)。しかしこれらの変異産物もMAREに塩基置換のあるDNAに対してはその結合能が野生型に比べて低下していることが分かった。v-Mafは他のb-Zipタンパク質と比べてより長いDNA配列に対してより厳密ではなく結合するという知見からすれば、この結果はけして驚くべきことではないように思われる。すなわち、1ないし2塩基の置換が野生型v-Mafによる結合にほとんど影響を与えないように、v-Mafの側のアミノ酸置換もDNA結合領域全体の構造に影響を与

えない限りにおいては、MAREに対する結合には影響を与えないのであろうと推測される。よって、欠失変異遺伝子産物の解析から得られた結論に従ってトランスフォーム活性とDNA結合能の間に相関関係があるとするならば、v-Mafによるトランスフォーメーションにおいては、これらの置換変異遺伝子産物が結合することのできるようなDNA配列を介した転写制御は必ずしも重要ではなく、むしろ野生型は結合できるが変異産物は結合できないようなDNA配列を介した転写制御が重要であると考えることができる。

どのようなDNA配列を介した転写制御がトランスフォーメーションにとって重要かという問題は、Maf, Jun, Fosのいずれもがレトロウイルスから見いだされた癌遺伝子であり、しかもそれぞれによって引き起こされる腫瘍の種類が異なること(23, 53, 69, 88)を考え合わせると興味深い。言い換えれば、図32に示した5種類の2量体のうちのどれがトランスフォーメーションにおいて重要な働きをしているのかという問題である。このことは例えば、1)MafとJunがそれぞれ異なるDNA配列を介してトランスフォーメーションを引き起こすのか、それとも、2)トランスフォーメーションを引き起こす共通した標的遺伝子が存在するのかといった問題を含んでいる。Junのロイシンジッパー構造をGCN4のそれと置き換えてホモ2量体しか形成しえなくしたキメラ遺伝子もトランスフォーム活性を持つという報告があるが、1), 2)のいずれが正しいかを判断する根拠とはならない(12, 93)。しかしながら、MafとGCN4のキメラ遺伝子がトランスフォーム活性を持つかどうかを調べることや、MafとJun, MafとFosがトランスフォーメーションにおいて協調的に働くかどうかを調べることは、真に重要な標的遺伝子がなんであるかを検索をするうえでの手がかりを与えるであろう。

こうした標的遺伝子を検索する上で、MafのDNA結合領域のアミノ酸置換変異遺伝子産物は有効な道具になり得ると考えられる。すなわち、トランスフォーム活性と結合可能なDNA配列との間の相関関係から、より重要なDNA配列を予測することができよう。7番のオリゴヌクレオチドに対するA14D, A14Vの結合が野生型に比べて増強していることから、さらに一歩進んで、これらのアミノ酸置換によりDNA結合の特異性が変化していると考えることが可能である。実際、他のb-Zipタンパク質でそのような現象が観察されている(55, 117)。そうした観点からすれば、特にQ5Hはそのトランスフォーム活性が野生型よりも増強されておりそのDNA結合の特異性には興味を持たれたが、残念ながら今までのところ野生型のDNA結合特

異性と異なる点は見いだされていない。

また、v-Mafによるトランスフォーメーションの機構をさらに詳しく理解するためには、転写活性化能との間の相関関係をあきらかにして行く必要がある。欠失変異遺伝子産物ND5CD2はトランスフォーメーションに不可欠な領域のみから成っておりトランスフォーム能がないことが分かっているが(51)、DNA結合能があり核内に局在するにも関わらず転写活性化能を欠いていることがあきらかとなりつつある。また、トランスフォーメーションにはこの領域に加えてv-MafのN末端側約3分の2の、酸性アミノ酸に富む領域または、ヒスチジン残基およびグリシン残基のクラスター構造のいずれかがさらに必要であるが(51)、これらの領域が転写活性化能を担っていることがあきらかになりつつある。

DNA Binding Ability of Mutant Maf Proteins

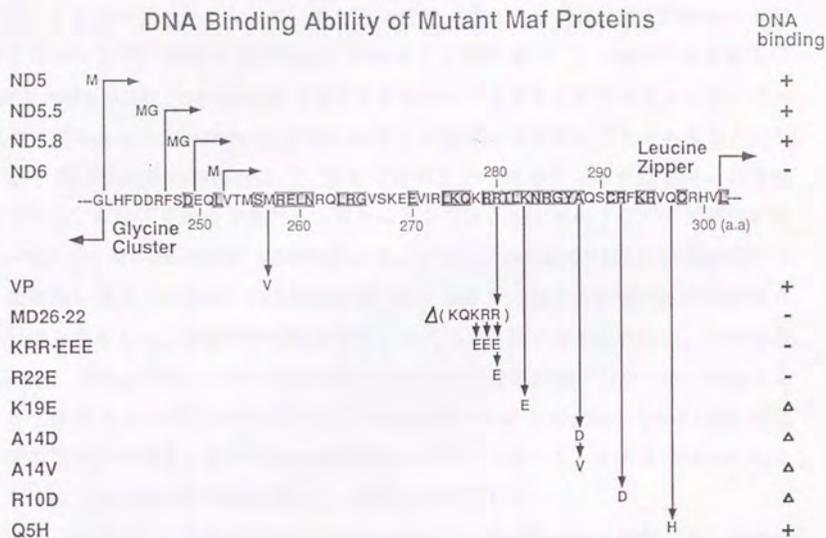


図34: v-MafのDNA結合領域の解析

v-Mafの3つ目のグリシン残基のクラスター構造とロイシンジッパー構造の間のアミノ酸配列を示し、各関連遺伝子間で保存されているアミノ酸残基を網掛けした。図7, 9に示したv-Mafの変異遺伝子産物のうちのいくつかについて、欠失変異遺伝子産物の構造を上、アミノ酸置換変異産物の構造を下に示した。また、それぞれのTRE型MAREに対する結合能を示した。△は、TRE型MARE以外のDNAに対する結合能の低下が観察されたことを示す。

3) *maf*関連遺伝子産物の機能

構造上互いによく似た遺伝子産物が似たような機能を持つことや、全く逆の機能を持つことがあきらかとなって、それらの産物の果たす役割に対する理解がより深まるといった例は枚挙に暇がない。そのような例に倣って、*v-maf*の関連遺伝子 *mafB*, *mafK*, *mafF*, *mafG*の産物の性質をあきらかにすることを試みた。まず、これらがいずれもホモ2量体でb-Zip構造に依存してDNAに結合することをあきらかにした。そのDNA結合の特異性は、大腸菌で発現させた融合タンパク質を用いて各種のプロープに対する結合を検討した限りにおいては、いずれのタンパク質についても*v-Maf*との間に違いを見いだせなかった。しかし、*v-Maf*のK19Eに相当するアミノ酸置換を導入した場合にTRE型MAREに対する結合に与える影響の度合いが違うことから考えると、認識の特異性は必ずしも同じではないかも知れない。この問題は*v-Maf*, *v-Jun*で行ったのと同じ方法でそれぞれの認識配列をあらためて決定することで解決されよう。いずれにせよ、*v-Maf*においてあきらかにしたDNA結合領域が関連遺伝子産物間で互いに高い相同性を有することからも、これらが互いに極めてよく似たDNA結合特異性を持つことが強く示唆される。

また、関連遺伝子産物どうしまたは*Jun*, *Fos*との2量体形成能も検討した。その結果を図35にまとめる。アミノ酸レベルでの相同性や全体の構造上の特徴、エクソン-イントロン構造から、*mafK*, *mafF*, *mafG*は*maf*遺伝子ファミリー内でサブファミリーを形成していると考えられたが(28, 90)、実際これらの2量体形成能には違いは認められなかった。すなわち、サブファミリーどうしの2量体は形成するが、*v-Maf*, *MafB*とは形成しない。また、*Jun*と2量体を形成せず、*Fos*とは形成する。一方、*MafB*はそのロイシンジッパー構造が*v-Maf*のそれと相同性が高いことから*v-Maf*と同じ2量体形成能を持つと想像された。確かに*MafB*は*v-Maf*とは2量体を形成し、*MafK*サブファミリーとは形成しなかった。しかし意外なことに*Fos*との2量体は形成したが*Jun*とは2量体を形成できなかった。

この点は*MafB*の機能を考える上でたいへん興味深い。先に述べたように*Maf*は*Jun*および*Fos*と機能的に相互作用して転写の調節を行っているが、*MafB*は*Jun*と直接に相互作用しない点で*Maf*とは異なる。*MafB*には*v-Maf*と同じように結合DNA配列に依存した転写活性化能を現在あきらかにしており、この2量体形成能の違いは*MafB*の生理的機能にとって重要であるかも知れない。例えば、*c-Maf*の発現が高く

MafBの発現が少ない細胞とその逆の細胞とでは、静止期の転写制御様式は同じでも、増殖刺激を受けてAP-1タンパク質の発現が誘導された時の細胞の応答が異なることが予想される。*maf*関連遺伝子の発現は組織特異的である(28, 52, 90, 118)ので、このような機能の分担が実際に存在することは容易に想像され、今後あきらかにしてゆかねばならない興味深い問題のひとつである。

また、MafK, MafF, MafGはその構造上から、転写活性化能を欠くと想像されるが、そうであるとすれば、これらはc-MafおよびMafBに対してDNA上で互いに拮抗する転写抑制因子であると考えることができる。さらに、これらがFosとヘテロ2量体を形成した場合に転写活性化因子として機能するのかなど、これからあきらかにしてゆかねばならない問題は多い。加えて、これらMaf関連遺伝子産物群と、AP-1以外のCREB/ATF関連遺伝子産物群などの他のb-Zipタンパク質との2量体形成やDNA上での相互作用もあきらかにせねばならない課題である。

Dimer Forming Specificities of Maf Family Proteins

	v-Maf	MafB	MafK	MafF	MafG	Jun	Fos
v-Maf	○	○	×	×	×	○	○
MafB		○	×	×	×	×	○
MafK			○	○	○	×	○
MafF				○	○	×	○
MafG					○	×	○
Jun						○	○
Fos							×

図35: *maf*関連遺伝子産物の2量体形成の特異性

v-Maf, MafB, MafK, MafF, MafG, Jun, Fos の間の2量体形成能をまとめて示した。

4) Mafの標的遺伝子の検索

本研究であきらかにしたMafの認識DNA配列をもとに、Mafおよびその関連遺伝子産物によって転写制御を受ける可能性のある遺伝子をデータベースから検索した。実際にMafによって制御されているかどうかは今後調べてゆかねばならないが、その可能性について論じる。

得られた候補遺伝子のうち、あるものはAP-1によっても制御を受ける可能性がある。例えば、92-kDa IV型コラーゲナーゼのプロモーターに見いだされるTREとして同定されている配列(45, 107)にはAP-1だけでなくMafも結合可能なようである。

細胞の増殖と関連のある遺伝子としては、細胞癌遺伝子である*pim-1* (72, 109), *c-erbB* (67) の転写制御領域に結合配列が見いだされた。また、インシュリン遺伝子のcap部位のすぐ上流(7)や、インターロイキン6(97), p53遺伝子(10)のプロモーターに種を通じて保存されているMaf結合配列が見いだされた。また、ヒストンH3.2遺伝子の細胞周期依存的なエンハンサー配列に結合する因子のDNA結合の特異性は、Mafのそれとよく似ている(81, 110)。

*maf*とその関連遺伝子の発現は先にも述べたように組織特異的であり、特に*NRL*遺伝子は網膜に特異的に発現している遺伝子として単離されたことから、オプシン(84)や γ -2-クリスタリン遺伝子(64, 65)はその標的遺伝子である可能性が高い。また、B型肝炎ウイルスX遺伝子の肝特異的エンハンサーの中にもMaf結合配列が見出された(22, 30, 111)。

組織特異的発現という点で特筆すべきなのは、赤芽球系細胞特異的に発現の見られる遺伝子、例えば、 α -および β -グロビン遺伝子やヘム合成系の遺伝子の転写制御領域に共通してMaf結合配列が見いだされたことである。これらの配列には赤芽球系細胞に特異的な転写活性化因子NF-E2が結合することが知られていた(14, 74, 75, 78)。最近、この因子は45キロダルトンと18キロダルトンのタンパク質から成り、そのp45サブユニットはb-Zip構造を持つことがあきらかにされた(3, 86)。その後、東北大学・山本らとの共同研究により、MafK, MafF, MafGのいずれかあるいはすべてがNF-E2のp18サブユニットであることがあきらかになってきている(47)。すなわち、NF-E2結合配列(TGCTGACTCAT)はその半分がMAREに完全に一致するが、MafK, MafF, MafGがp45とヘテロ2量体を形成してこの配列により強く結合し、転写を活性化することがわかった。このことは、Mafの認識DNA配列の決定とその関

連遺伝子の機能解析から演繹して生理的に重要な分化因子の同定に到達し得たと言う点で大きな意義があると考えられる。NF-E2結合部位にはAP-1も結合可能であること、赤芽球系細胞の分化がTPAで阻害されることが知られているが⁽¹¹⁴⁾、MafKサブファミリーがFosとヘテロ2量体を形成することと考え合わせて、分化の阻害の分子機構を解明することは今後の重要な課題のひとつである。

NF-E2のp45サブユニットは赤芽球系細胞に主に発現しているが⁽³⁾、*mafK*、*mafF*、*mafG*の発現は赤芽球系細胞に限られていない^(28, 90)。その点からみて、肝臓に特異的な解毒作用に関与する一連の遺伝子の制御領域に共通してMafの結合配列が見いだされたことは注目に値する^(26, 49, 58)。これらはxenobioticsによるこれらの遺伝子の誘導に必要な配列であり^(26, 63, 104)、NF-E2結合配列と極めてよく似ている。従って、NF-E2に相当するような肝臓に特異的なサブユニットが存在し、これとMafK、MafF、MafGのいずれかあるいはすべてとヘテロ2量体を形成してこれらの配列に結合するのではないかと想像することができる。ごく最近、NF-E2のp45サブユニットに相同性のある遺伝子*Nrf1*がクローニングされ⁽¹³⁾、この遺伝子がファミリーを形成していることが示唆されつつあり、肝臓特異的に発現しているメンバーの存在する可能性が充分考えられる。NF-E2のp45サブユニットとその関連遺伝子産物と、MafK、MafF、MafGとのヘテロ2量体が各種の細胞の分化因子であると考えられることは、Maf、Jun、Fosによるトランスフォーメーションの機構を解明するうえで興味深い視点を与えてくれる。すなわち、Maf、Jun、Fosがこれらの分化因子とその認識DNA配列への結合に関して互いに拮抗しあうことで細胞の癌化を引き起こす可能性が考えられる。特にFosはMafK、MafF、MafGとヘテロ2量体を形成することでp45サブユニット様タンパク質と拮抗し得る。v-Mafが筋肉の腫瘍を誘発する機構を考える上で、先に述べた*Nrf1*は特に骨格筋での発現が高い⁽¹³⁾ことから興味深い。ここに述べたような機構が実際に有り得ることかどうか調べるために、既知の因子との相互作用をあきらかにしてゆくこととあわせて、未知の因子の同定なども進めて行く必要があるだろう。

5) まとめ

これまでに、外界からの刺激に対する細胞の増殖や分化といった様々な応答を転写のレベルで司る重要なシス・エレメントとしてTRE, CREというDNA配列が同定されてきた(4, 77)。また、それらに結合するトランス因子として、癌遺伝子産物であるJun, Fosを含むAP-1(15, 41, 70, 87, 99, 100, 127)やCREB/ATFファミリー(16, 25, 29, 34, 38, 42, 68, 91, 126)に属する数多くのタンパク質が同定され、これらの間で互いにクロストークのあることもあきらかにされてきた(8, 37, 44, 48, 66)。本研究においては、これまでに考えられていたTRE, CREの概念からはあきらかに異なるMAREというシス・エレメントが存在すること、しかも、TRE, CREとMAREとは判然と分けられるものではなく一部分重複するものであることをあきらかにした。さらに、これらのDNA配列に結合する因子であるJun, FosとMafの間でタンパク質どうしの相互作用が存在することもあきらかにした。これらのことは、今まで考えられていたシスおよびトランスの因子にMAREとMafを加えた新しい全体像を呈示するものであり、この全体像の中でそれぞれの因子の役割を考えてゆかなくてはならないことを示すものである。v-mafはニワトリのRNA腫瘍ウイルスの癌遺伝子として発見されたわけであるが、これまでのところそのトランスフォーム活性はCEFに対してしか検出されておらず、この遺伝子はニワトリのレトロウイルスを用いた系でなければ癌遺伝子として発見され得なかったかもしれない。そしてそのような遺伝子産物が、やはり癌遺伝子産物であるJunやFosを含めた大きなネットワークの一部分を形成することを示して、これらの産物のトランスフォーメーションにおける、あるいは生理的役割における機能に関してあらたな視点を与えたことは、この系の有用性をあらためて印象付けるものとなるであろうと信ずる。

また、本研究ではMaf関連遺伝子産物の機能についても検討を加えたが、ここで得られた知見に基づいて、Maf関連遺伝子産物のいくつかが赤芽球系細胞の分化に重要な役割を果たす転写制御因子NF-E2のサブユニットであることがあきらかになった。このことは、癌遺伝子の関連遺伝子産物が生理的に重要な機能を持つ因子であることがあきらかになった例として意義深いことである。

v-mafの発見以来5年が経とうとしているが、ここに至ってようやくその機能と医学・生物学における位置付けがあきらかになりつつある。これから解明しなければならない問題は山積しているが、Mafとその関連遺伝子産物の機能の解明が医学・

生物学においてあらたな一分野を開拓するであろうことを信じるものである。

なお、本研究の内容の一部は以下に公表した。

Maf nuclear oncoprotein recognizes sequences related to an AP-1 site and forms heterodimers with both Fos and Jun. Kohsuke Kataoka, Makoto Noda, and Makoto Nishizawa. 1994. *Molecular and Cellular Biology*, 14: 700-712.

< 参考文献 >

1. Abate, C., D. Luk, and T. Curran. 1991. Transcriptional regulation by Fos and Jun in vitro: Interaction among multiple activator and regulatory domains. *Mol. Cell. Biol.* 11: 3624-3632.
2. Abate, C., D. Luk, R. Gentz, F. J. Rauscher III, and T. Curran. 1990. Expression and purification of the leucine zipper and DNA-binding domains of Fos and Jun: Both Fos and Jun contact DNA directly. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87: 1032-1036.
3. Andrews, N. C., H. Erdjument-Bromage, M. B. Davidson, P. Tempst, and S. H. Orkin. 1993. Erythroid transcription factor NF-E2 is a haemopoietic-specific basic-leucine zipper protein. *Nature* 362: 722-728.
4. Angel, P., M. Imagawa, R. Chiu, B. Stein, R. J. Imbra, H. J. Rahmsdorf, C. Jonat, P. Herrlich, and M. Karin. 1987. Phorbol ester-inducible genes contain a common *cis* element recognized by a TPA-modulated *trans*-acting factor. *Cell* 49: 729-739.
5. Angel, P., I. Baumann, B. Stein, H. Delius, H. J. Rahmsdorf, and P. Herrlich. 1987. 12-*O*-tetradecanoyl-phorbol-13-acetate induction of the human collagenase gene is mediated by an inducible enhancer element located in the 5'-flanking region. *Mol. Cell. Biol.* 7: 2256-2266.
6. Artishevsky, A., S. Wooden, A. Sharma, E. Resendez, and A. S. Lee. 1987. Cell-cycle regulatory sequences in a hamster histone promoter and their interaction with cellular factors. *Nature* 328: 823-827.
7. Bell, G. I., R. L. Pictet, W. J. Rutter, B. Cordell, E. Tischer, and H. M. Goodman. 1980. Sequence of the human insulin gene. *Nature* 284: 26-32.

8. Benbrook, D. M., and N. C. Jones. 1990. Heterodimer formation between CREB and JUN proteins. *Oncogene* 5: 295-302.
9. Berg, J. M. 1986. Potential metal-binding domains in nucleic acid binding proteins. *Science* 232: 485-487.
10. Bienz-Tadmor, B., R. Zakut-Houri, S. Libresco, D. Givol, and M. Oren. 1985. The 5' region of the p53 gene: evolutionary conservation and evidence for a negative regulatory element. *EMBO J.* 4: 3209-3213.
11. Bohmann, D., T. J. Bos, A. Admon, T. Nishimura, P. K. Vogt, and R. Tjian. 1987. Human proto-oncogene *c-jun* encodes a DNA binding protein with structural and functional properties of transcription factor AP-1. *Science* 238: 1386-1392.
12. Castellazzi, M., L. Loiseau, F. Piu, and A. Sergeant. 1993. Chimeric c-Jun containing an heterologous homodimerization domain transforms primary chick embryo fibroblasts. *Oncogene* 8: 1149-1160.
13. Chan, J. Y., X. -L. Han, and Y. W. Kan. 1993. Cloning of Nrf1, an NF-E2-related transcription factor, by genetic selection in yeast. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 90: 11371-11375.
14. Chretien, S., A. Dubart, D. Beaupain, N. Raich, B. Grandchamp, J. Rosa, M. Goossens, and P.-H. Romeo. 1988. Alternative transcription and splicing of the human porphobilinogen deaminase gene result either in tissue-specific or in housekeeping expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85: 6-10.
15. Cohen, D. R., and T. Curran. 1988. *fra-1*: a serum-inducible, cellular immediate-early gene that encodes a Fos-related antigen. *Mol. Cell. Biol.* 8: 2063-

16. Cowell, I. G., A. Skinner, and H. C. Hurst. 1992. Transcriptional repression by a novel member of the bZip family of transcription factors. *Mol. Cell Biol.* 12: 3070-3077.
17. Czernilofsky, A. P., A. D. Levinson, H. E. Varmus, J. M. Bishop, E. Tischer, and H. Goodman. 1983. Corrections to the nucleotide sequence of the *src* gene of Rous sarcoma virus. *Nature* 301: 736-738.
18. Distel, R. J., and B. M. Spiegelman. 1990. Protooncogene *c-fos* as a transcription factor. *Advances in Cancer Research* 55: 37-55
19. Donahue, P. R., E. A. Hoover, G. A. Beltz, N. Riedel, V. M. Hirsch, J. Overbaugh, and J. I. Mullins. 1988. Strong sequence conservation among horizontally transmissible, minimally pathogenic feline leukemia viruses. *J. Virol.* 62: 722-731.
20. Dwarki, D. J., M. Montminy, and I. M. Verma. 1990. Both the basic region and the 'leucine zipper' domain of the cyclic AMP response element binding (CREB) protein are essential for transcriptional activation. *EMBO J.* 9: 225-232.
21. Ellenberger, T.E., C. J. Brandl, K. Struhl, and S. C. Harrison. 1992. The GCN4 basic region leucine zipper binds DNA as a dimer of uninterrupted α helices: crystal structure of the protein-DNA complex. *Cell* 71: 1223-1237.
22. Faktor, O., S. Budlovsky, R. Ben-Levy, and Y. Shaul. 1990. A single element within the hepatitis B virus enhancer binds multiple proteins and responds to multiple stimuli. *J. Virol.* 64: 1861-1863.
23. Finkel, M. P., B. O. Biskis, and P. B. Jinkins. 1966. Virus induction of

osteosarcomas in mice. *Science* 151: 698-701.

24. Foster, R., N. Jahroudi, U. Varshney, and L. Gedamu. 1988. Structure and expression of the human metallothionein-IG gene. *J. Biol. Chem.* 263: 11528-11535.
25. Foulkes, N. S., E. Borrelli, and P. Sassone-Corsi. 1991. CREM gene: use of alternative DNA-binding domains generates multiple antagonists of cAMP-induced transcription. *Cell* 64: 739-749.
26. Friling, R. S., S. Bergelson, and V. Daniel. 1992. Two adjacent AP-1-like binding sites form the electrophile-responsive element of the murine glutathione S-transferase Ya subunit gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 668-672.
27. Fujiwara, K. T., K. Ashida, H. Nishina, H. Iba, N. Miyajima, M. Nishizawa, and S. Kawai. 1987. The chicken *c-fos* gene: cloning and nucleotide sequence analysis. *J. Virol.* 61: 4012-4018.
28. Fujiwara, K. T., K. Kataoka, and M. Nishizawa. 1993. Two new members of the *maf* oncogene family, *mafK* and *mafF*, encode nuclear b-Zip proteins lacking putative trans-activator domain. *Oncogene* 8: 2371-2380.
29. Gaire, M., B. Chatton, and C. Keding. 1990. Isolation and characterization of two novel, closely related ATF cDNA clones from HeLa cells. *Nucleic Acids Res.* 18: 3467-3473.
30. Galibert, F., E. Mandart, F. Fitoussi, P. Tiollais, and P. Charnay. 1979. Nucleotide sequence of hepatitis B virus genome (subtype ayw) cloned in *E. coli*. *Nature* 281: 646-650.
31. Gandrillon, O., P. Jurdic, M. Benchaibi, J. H. Xiao, J. Ghysdael,

- and J. Samarut. 1987. Expression of the *v-erbA* oncogene in chicken embryo fibroblasts stimulates their proliferation in vitro and enhances tumor growth in vivo. *Cell* 49: 687-697.
32. Gentz, R., F. J. Rauscher III, C. Abate, and T. Curran. 1989. Parallel association of Fos and Jun leucine zippers juxtaposes DNA binding domains. *Science* 243: 1695-1699.
 33. Ghosh, S., A. N. Gifford, L. R. Riviere, P. Tempst, G. P. Nolan, and D. Baltimore. 1990. Cloning of the p50 DNA binding subunit of NF- κ B: homology to *rel* and *dorsal*. *Cell* 62: 1019-1029.
 34. Gonzalez, G. A., K. K. Yamamoto, W. H. Fischer, D. Karr, P. Menzel, W. Biggs III, W. W. Vale, and M. R. Montminy. 1989. A cluster of phosphorylation sites on the cyclic AMP-regulated nuclear factor CREB predicted by its sequence. *Nature* 337: 749-752.
 35. Greenberg, M. E., and E. Ziff. 1984. Stimulation of 3T3 cells induces transcription of the *c-fos* proto-oncogene. *Nature* 311: 433-438.
 36. Gunther, C. V., J. A. Nye, R. S. Bryner, and B. J. Graves. 1990. Sequence-specific DNA binding of the proto-oncogene *ets-1* defines a transcriptional activator sequence within the long terminal repeat of the Molony murine sarcoma virus. *Genes Dev.* 4: 667-679.
 37. Hai T., and T. Curran. 1991. Cross-family dimerization of transcriptional factors Fos/Jun and ATF/CREB alters DNA binding specificity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 88: 3720-3724.
 38. Hai, T., F. Liu, W. J. Coukos, and M. R. Green. 1989. Transcription factor ATF cDNA clones: an extensive family of leucine zipper proteins able to

selectively form DNA-binding heterodimers. *Genes Dev.* 3: 2083-2090.

39. Halazonetis, T. D., K. Georgopoulos, M. E. Greenberg, and P. Leder. 1988. c-Jun dimerizes with itself and with c-Fos, forming complexes of different DNA binding affinities. *Cell* 55: 917-924.
40. Heusel, J. W., R. D. Hanson, G. A. Silverman, and T. J. Ley. 1991. Structure and expression of a cluster of human hematopoietic serine protease genes found on chromosome 14q11.2. *J. Biol. Chem.* 266: 6152-6158.
41. Hirai, S.-I., R.-P. Ryseck, F. Mechta, R. Bravo, and M. Yaniv. 1989. Characterization of *junD*: a new member of the *jun* proto-oncogene family. *EMBO J.* 8: 1433-1439.
42. Hoeffler, J. P., T. E. Meyer, Y. Yun, J. L. Jameson, and J. F. Habener. 1988. Cyclic AMP-responsive DNA-binding protein: structure based on a cloned placental cDNA. *Science* 242: 1430-1433.
43. Hope, I. A., and K. Struhl. 1986. Functional dissection of a eukaryotic transcriptional activator protein, GCN4 of yeast. *Cell* 46: 885-894.
44. Hsu, J.-C., T. Laz, K. L. Mohn, and R. Taub. 1991. Identification of LRF-1, a leucine-zipper protein that is rapidly and highly induced in regenerating liver. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88: 3511-3515.
45. Huhtala, P., A. Tuuttila, L. T. Chow, J. Lohi, J. Keski-Oja, and K. Tryggvason. 1991. Complete structure of the human gene for 92-kDa type IV collagenase. *J. Biol. Chem.* 266: 16485-16490.
46. Ichinose, A. 1992. Multiple members of the plasminogen-apolipoprotein(a) gene family associated with thrombosis. *Biochemistry* 31: 3113-3118.

47. Igarashi, K., K. Kataoka, M. Nishizawa, K. Itoh, N. Hayashi, and M. Yamamoto. 1994. Regulation of transcription by dimerization of erythroid factor NF-E2 p45 with small Maf proteins. *Nature* 367: 568-572.
48. Ivashkiv, L. B., H.-C. Liou, C. J. Kara, W. W. Lamph, I. M. Verma, L. H. Glimcher. 1990. mXBP/CRE-BP2 and c-Jun form a complex which binds to the cyclic AMP, but not to the 12-*O*-tetradecanoylphorbol-13-acetate, response element. *Mol. Cell. Biol.* 10: 1609-1621.
49. Jaiswal, A. K. 1991. Human NAD(P)H:quinone oxidoreductase (NQO1) gene structure and induction by dioxine. *Biochemistry.* 30: 10647-10653.
50. Jia, R., B. J. Mayer, T. Hanafusa, and H. Hanafusa. 1992. A novel oncogene, *v-ryk*, encoding a truncated receptor tyrosine kinase is transduced into the RPL30 virus without loss of viral sequence. *J. Virol.* 66: 5975-5987.
51. Kataoka, K., M. Nishizawa, and S. Kawai. 1993. Structure-function analysis of the *maf* oncogene product, a member of the b-Zip protein family. *J. Virol.* 67: 2133-2141.
52. Kataoka, K. 1991. 修士論文. *v-maf* 癌遺伝子産物の構造と機能の解析.
53. Kawai, S., N. Goto, K. Kataoka, T. Saegusa, H. Shinno-Kohno, and M. Nishizawa. 1992. Isolation of the avian transforming retrovirus, AS42, carrying the *v-maf* oncogene and initial characterization of its gene product. *Virology* 188: 778-784.
54. Kieran, M., V. Blank, F. Logeat, J. Vandekerckhove, F. Lottspeich, O. L. Bail, M. B. Urban, P. Kourilsky, P. A. Baeuerle, and A. Israel. 1990. The DNA binding subunit of NF- κ B is identical to factor KBF1 and

homologous to the *rel* oncogene product. *Cell* 62: 1007-1018.

55. Kim, J., D. Tzamarias, T. Ellenberger, S. C. Harrison, and K. Struhl. 1993. Adaptability at the protein-DNA interface is an important aspect of sequence recognition by bZip proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 90: 4513-4517.
56. Kouzarides, T., and E. Ziff. 1988. The role of the leucine zipper in the fos-jun interaction. *Nature* 336: 646-651.
57. Kozak, M. 1986. Point mutations define a sequence flanking the AUG initiator codon that modulates translation by eukaryotic ribosomes. *Cell* 44: 283-292.
58. Kruijer, W., J. A. Cooper, T. Hunter, and I. M. Verma. 1984. Platelet-derived growth factor induces rapid but transient expression of the *c-fos* gene and protein. *Nature* 312: 711-716.
59. Kunkel, T. A., J. D. Roberts, and R. A. Zakour. 1987. Rapid and efficient site-specific mutagenesis without phenotypic selection. *Methods Enzymol.* 154: 367-382.
60. Landschulz, W. H., P. F. Johnson, and S. L. McKnight. 1988. The leucine zipper: a hypothetical structure common to a new class of DNA binding proteins. *Science* 240: 1759-1764.
61. Lee, W., P. Mitchell, and R. Tjian. 1987. Purified transcription factor AP-1 interacts with TPA-inducible enhancer elements. *Cell* 49: 741-752.
62. Li, J., and P. K. Vogt. 1993. The retroviral oncogene *qin* belongs to the transcription factor family that includes the homeotic gene fork head. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 90: 4490-4494.

63. Li, Y., and A. K. Jaiswal. 1992. Regulation of human NAD(P)H: quinone oxidoreductase gene. *J. Biol. Chem.* 267: 15097-10104.
64. Lok, S., M. L. Breitman, A. B. Chepelinsky, J. Piatigorsky, R. J. M. Gold, and L. C. Tsui. 1985. Lens-specific promoter activity of a mouse γ -crystallin gene. *Mol. Cell. Biol.* 5: 2221-2230.
65. Lok, S., Stevens, W., Breitman, M. L., and Tsui, L.-C. 1989. Multiple regulatory elements of the murine γ 2-crystallin promoter. *Nucleic Acids Res.* 17: 3563-3582.
66. Macgregor, P. F., C. Abate, and T. Curran. 1990. Direct cloning of leucine zipper proteins: Jun binds cooperatively to the CRE with CRE-BP1. *Oncogene* 5: 451-458.
67. Maekawa, T., F. Imamoto, G. T. Merlino, I. Pastan, and S. Ishii. 1989. Cooperative function of two separate enhancers of the human epidermal growth factor receptor proto-oncogene. *J. Biol. Chem.* 264: 5488-5494.
68. Maekawa, T., H. Sakura, C. Kanei-Ishii, T. Sudo, T. Yoshimura, J. Fujisawa, M. Yoshida, and S. Ishii. 1989. Leucine zipper structure of the protein CRE-BP1 binding to the cyclic AMP response element in brain. *EMBO J.* 8: 2023-2028.
69. Maki, Y., T. J. Bos, C. Davis, M. Starbuck, and P. K. Vogt. 1987. Avian sarcoma virus 17 carries the *jun* oncogene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84: 2848-2852.
70. Matsui, M., M. Tokuhara, Y. Konuma, N. Nomura, and R. Ishizaki. 1990. Isolation of human *fos*-related genes and their expression during monocyte-

macrophage differentiation. *Oncogene* 5: 249-255.

71. Mayer, B. J., M. Hamaguchi, and H. Hanafusa. 1988. A novel oncogene with structural similarity to phospholipase C. *Nature* 332: 272-275.
72. Meeker, T. C., J. Loeb, M. Ayres, and W. Sellers. 1990. The human *pim-1* gene is selectively transcribed in different hemato-lymphoid cell lines in spite of a G+C-rich housekeeping promoter. *Mol. Cell. Biol.* 10: 1680-1688.
73. Metz, T., and T. Graf. 1991. *v-myb* and *v-ets* transform chicken erythroid cells and cooperate both in *trans* and in *cis* to induce distinct differentiation phenotypes. *Genes Dev.* 5: 369-380.
74. Mignotte, V., J. F. Eleouet, N. Raich, and P.-H. Romeo. 1989. Cis- and trans-acting elements involved in the regulation of the erythroid promoter of the human porphobilinogen deaminase gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86: 6548-6552.
75. Mignotte, V., L. Wall, E. deBoer, F. Grosveld, and P.-H. Romeo. 1989. Two tissue-specific factors bind the erythroid promoter of the human porphobilinogen deaminase gene. *Nucleic Acids Res.* 17: 37-54.
76. Mizushima, S., and S. Nagata. 1990. pEF-BOS, a powerful mammalian expression vector. *Nucleic Acids Res.* 18: 5322.
77. Montminy, M. R., K. A. Sevarino, J. A. Wagner, G. Mandel, and R. H. Goodman. 1986. Identification of a cyclic-AMP-responsive element within the rat somatostatin gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 83: 6682-6686.
78. Moon, A. M., and T. J. Ley. 1990. Conservation of the primary structure, organization, and function of the human and mouse β -globin locus-activating

regions. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87: 7693-7697.

79. Moore, R., M. Dixon, R. Smith, G. Peters, and C. Dickson. 1987. Complete nucleotide sequence of a milk-transmitted mouse mammary tumor virus: two frameshift suppression events are required for translation of *gag* and *pol*. J. Virol. 61: 480-490.
80. Murre, C., P. S. McCaw, and D. Baltimore. 1989. A new DNA binding and dimerization motif in immunoglobulin enhancer binding, *daughterless*, *MyoD*, and *myc* proteins. Cell 56: 777-783.
81. Naeve, G. S., A. Sharma, and A. S. Lee. 1992. Identification of a 10-base pair protein binding site in the promoter of the hamster *H3.2* gene required for the S phase dependent increase in transcription and its interaction with a Jun-like nuclear factor. Cell Growth Differ. 3: 919-928.
82. Nakabeppu, Y., and D. Nathans. 1989. The basic region of Fos mediates specific DNA binding. EMBO J. 8: 3833-3841.
83. Nakabeppu, Y., K. Ryder, and D. Nathans. 1988. DNA binding activities of three murine Jun proteins: stimulation by Fos. Cell 55: 907-915.
84. Nathans, J., and D. S. Hogness. 1984. Isolation and nucleotide sequence of the gene encoding human rhodopsin. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81: 4851-4855.
85. Neuberg, M., M. Schuermann, J. B. Hunter, and R. Muller. 1989. Two functionally different regions in Fos are required for the sequence-specific DNA interaction of the Fos/Jun protein complex. Nature 338: 589-590
86. Ney, P. A., N. C. Andrews, S. M. Jane, B. Safer, M. E. Purucker, S. Weremowick, C. C. Morton, S. C. Goff, S. H. Orkin, and A. W.

- Nienhuis. 1993. Purification of the human NF-E2 complex: cDNA cloning of the hematopoietic cell-specific subunit and evidence for an associated partner. *Mol. Cell. Biol.* 13: 5604-5612.
87. Nishina, H., H. Sato, T. Suzuki, M. Sato, and H. Iba. 1990. Isolation and characterization of *fra-2*, an additional member of the *fos* gene family. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87: 3691-3623.
88. Nishizawa, M., N. Goto, and S. Kawai, S. 1987. An avian transforming retrovirus isolated from a nephroblastoma that carries the *fos* gene as the oncogene. *J. Virol.* 61: 3733-3740.
89. Nishizawa, M., K. Kataoka, N. Goto, K. T. Fujiwara, and S. Kawai. 1989. *v-maf*, a viral oncogene that encodes a "leucine zipper" motif. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86: 7711-7715.
90. Nishizawa, M. unpublished data.
91. Nomura, N., Y.-L. Zu, T. Maekawa, S. Tabata, T. Akiyama, and S. Ishii. 1993. Isolation and characterization of a novel member of the gene family encoding the cAMP response element-binding protein CRE-BP1. *J. Biol. Chem.* 268: 4259-4266.
92. Okuda, A., M. Sakai, and M. Muramatsu. 1987. The structure of the rat glutathione S-transferase gene and related pseudogene. *J. Biol. Chem.* 262: 3858-3863.
93. Oliviero, S., G. S. Robinson, K. Struhl, and B. M. Spiegelman. 1992. Yeast GCN4 as a probe for oncogenesis by AP-1 transcription factors: transcriptional activation through AP-1 sites is not sufficient for cellular transformation. *Genes Dev.* 6: 1799-1809.

94. Ransone, L. J., J. Visvader, P. Sassone-Corsi, and I. M. Verma. 1989. Fos-Jun interaction: mutational analysis of the leucine zipper domain of both proteins. *Genes Dev.* 3: 770-781.
95. Rauscher III, F. J., L. C. Sambucetti, T. Curran, R. J. Distel, and B. M. Spiegelman. 1988. Common DNA binding site for Fos protein complexes and transcription factor AP-1. *Cell* 52: 471-180.
96. Rauscher III, F. J., D. R. Cohen, T. Curran, T. J. Bos, P. K. Vogt, D. Bohmann, R. Tjian, and B. R. Franza Jr. 1988. Fos-associated protein p39 is the product of the *jun* proto-oncogene. *Science* 240: 1010-1016.
97. Ray, A., S. B. Tatter, L. T. May, and P. B. Sehgal. 1988. Activation of the human " β 2-interferon/hepatocyte-stimulating factor/interleukin 6" promoter by cytokines, viruses, and second messenger agonist. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85: 6701-6705.
98. Risse, G., K. Jooss, M. Neuberg, H.-J. Brüller, and R. Müller. 1989. Asymmetrical recognition of the palindromic AP1 binding site (TRE) by Fos protein complexes. *EMBO J.* 8: 3825-3832.
99. Ryder, K., A. Lanahan, E. Perez-Albuerno, and D. Nathans. 1989. *Jun-D*: A third member of the *Jun* gene family. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86: 1500-1503.
100. Ryder, K., L. F. Lau, and D. Nathans. 1988. A gene activated by growth factors is related to the oncogene *v-jun*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85: 1487-1491.
101. Ryder, K., and D. Nathans. 1989. Induction of protooncogene *c-jun* by serum

growth factors. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 85: 8464-8467.

102. Ryseck, R. -P., S. I. Hirai, M. Yaniv, and R. Bravo. 1988. Transcriptional activation of *c-jun* during G0/G1 transition in mouse fibroblasts. Nature 334: 535-537.
103. Ryseck, R.-P., and R. Bravo. 1991. c-Jun, JunB, and JunD, differ in their binding affinities to AP-1 and CRE consensus sequences: effect of Fos proteins. Oncogene 6: 533-542.
104. Sakai, M., A. Okuda, and M. Muramatsu. 1988. Multiple regulatory elements and phorbol 12-*O*-tetradecanoate 13-acetate responsiveness of the rat placental glutathione transferase gene. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 9456-9460.
105. Sap, J., A. Munoz, K. Damm, Y. Goldberg, J. Ghysdael, A. Leutz, H. Beug, and B. Vennstrom. 1986. The *c-erbA* protein is a high-affinity receptor for thyroid hormone. Nature 324: 635-640.
106. Sassone-Corsi, P., L. J. Ransone, W. W. Lamph, and I. M. Verma. 1988. Direct interaction between fos and jun nuclear oncoproteins: role of the 'leucine zipper' domain. Nature 336: 692-695.
107. Sato, H., and M. Seiki. 1993. Regulatory mechanism of 92 kDa type IV collagenase gene expression which is associated with invasiveness of tumor cells. Oncogene 8: 395-405.
108. Schwartz, D. E. , R. Tizard, and W. Gilbert. 1983. Nucleotide sequence of Rous sarcoma virus. Cell 32: 853-869.
109. Selten, G., H. T. Cuypers, W. Boelens, E. Robanus-Maandag, J. Verbeek, J. Domen, C. van Beveren, and A. Berns. 1986. The primary

structure of the putative oncogene *pim-1* shows extensive homology with protein kinases. *Cell* 46: 603-611.

110. Sharma, A., T. J. Bos, A. Pekkala-Flagan, P. K. Vogt, and A. S. Lee. 1989. Interaction of cellular factors related to the Jun oncoprotein with the promoter of a replication-dependent hamster histone H3.2 gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86: 491-495.
111. Shaul, Y., and R. Ben-Levy. 1987. Multiple nuclear proteins in liver cells are bound to hepatitis B virus enhancer element and its upstream sequences. *EMBO J.* 6: 1913-1920.
112. Shibahara, S., Y. Morimoto, Y. Furutani, M. Notake, H. Takahashi, S. Shimizu, S. Horikawa, and S. Numa. 1983. Isolation and sequence analysis of the human corticotropin releasing factor precursor gene. *EMBO J.* 2: 775-779.
113. Smeal, T., P. Angel, J. Meek, and M. Karin. 1989. Different requirements for formation of Jun:Jun and Jun:Fos complexes. *Genes Dev.* 3: 2091-2100.
114. Solomon, W. B., C. -H. Lin, J. Palma, X. Y. Gao, and S. Wu. 1993. Suppression of a cellular differentiation program by phorbol esters coincides with inhibition of binding of a cell-specific transcription factor (NF-E2) to an enhancer element required for expression of an erythroid-specific gene. *J. Biol. Chem.* 268: 5089-5096.
115. Stehelin, D., R. V. Guntaka, H. E. Varmus, and J. M. Bishop. 1976. Purification of DNA complementary to nucleotide sequence required for neoplastic transformation of fibroblasts by avian sarcoma viruses. *J. Mol. Biol.* 101: 349-365.
116. Steitz, T. A., D. H. Ohlendorf, D. B. McKay, W. F. Anderson, and

- B. W. Matthews. 1982. Structural similarity in the DNA-binding domains of catabolite gene activator and *cro* repressor proteins. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 79: 3097-3110.
117. Suckow, M., B. v. Wilcken-Bergmann, and B. Müller-Hill. 1993. Identification of three residues in the basic regions of the bZIP proteins GCN4, C/EBP and TAF-1 that are involved in specific DNA binding. EMBO J. 12: 1193-1200.
118. Swaroop, A., J. Xu, H. Pawar, A. Jackson, C. Scolnick, and N. Agarwal. 1992. A conserved retina-specific gene encodes a basic motif/leucine zipper protein. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 266-270.
119. Turner, R., and R. Tjian. 1989. Leucine repeats and an adjacent DNA binding domain mediate the formation of functional cFos-cJun heterodimers. Science 243: 1689-1694.
120. Van Beveren, C., F. v. Straaten, T. Curran, R. Muller, and I. M. Verma. 1983. Analysis of FBJ-MuSV provirus and *c-fos*(mouse) gene reveals that viral and cellular *fos* gene products have different carboxy termini. Cell 32: 1241-1255.
121. Van Beveren, C., S. Enami, T. Curran, and I. M. Verma. 1984. FBR murine osteosarcoma virus. II. nucleotide sequence of the provirus reveals that the genome contains sequences from two cellular genes. Virology 135: 229-243.
122. Vinson, C. R., P. B. Sigler, and S. L. McKnight. 1989. Scissors-grip model for DNA recognition by a family of Leucine zipper proteins. Science 246: 911-916.
123. Vogt, P. K., and T. J. Bos. 1990. jun: Oncogene and transcription factor.

Advance in Cancer Research 55: 1-35.

124. Wagner, M. J., J. A. Sharp, and W. C. Summers. 1981. Nucleotide sequence of the thymidine kinase gene of herpes simplex virus type 1. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 78: 1441-1445.
125. Weinberger, C., C. C. Thompson, E. S. Ong, R. Lebo, D. J. Gruol, and R. M. Evans. 1986. The *c-erbA* gene encodes a thyroid hormone receptor. Nature 324: 641-646.
126. Yoshimura, T., J. Fujisawa, and M. Yoshida. 1990. Multiple cDNA clones encoding nuclear proteins that bind to the *tax*-dependent enhancer of HTLV-1: all contain a leucine zipper structure and basic amino acid domain. EMBO J. 9: 2537-2542.
127. Zerial, M., L. Toschi, R.-P. Ryseck, M. Schuermann, R. Müller, and R. Bravo. 1989. The product of a novel growth factor activated gene, *fos B*, interacts with JUN proteins enhancing their DNA binding activity. EMBO J. 8: 805-813.

<謝辞>

本研究は、もとより多くの方々の理解と御力添えがあっはじめて為し得たものでありますが、この場であらためて以下の方々に感謝の意を表します。

レポータープラスミド ptk-luc を東京大学医科学研究所の藤沢順一博士に、発現プラスミド pEF-BOS を大阪バイオサイエンス研究所の長田重一博士に、*v-jun* のクローンを Peter K. Vogt 博士に供与して頂きました。また、藤沢博士と、理化学研究所の石井俊輔博士、前川利男博士には、転写制御因子研究の方法論について貴重な助言を頂きました。あらためて感謝致します。また、プラスミド DNA の構築および塩基配列の解析を手伝ってくれた高橋郁子さん、培養細胞系をサポートしてくれた松崎朋子さん、そして日々の研究において刺激を与え続け、討論して下さった増井徹博士、Sharad Kumar 博士をはじめ癌研究会癌研究所ウイルス腫瘍部の皆様に感謝致します。

また、本研究において常に助言と激励を下された西澤誠博士にあらためて感謝の意を表します。そして、*mafK*、*mafF* の構造と機能の解析をされた藤原康策さんをはじめ *maf* と苦楽を共にした方々への感謝の念を新たにします。

また、研究の場を与えて下さり御指導下さった癌研究会癌研究所ウイルス腫瘍部部長の野田亮博士に感謝致します。

本研究の発端となった AS42 ウイルスは、練達なウイルス学者であられた故河井貞明先生の多大なる御努力によって発見されたものであります。その業績にあらためて畏敬の念を強くするとともに、研究に対する姿勢を身を持って御教え下さったことを感謝するものであります。心より御冥福をお祈り申し上げます。

卒論製本
ヤマザキ
☎ (03) 3958-1681



Kodak Color Control Patches

Blue Cyan Green Yellow Red Magenta White 3/Color Black

Kodak Gray Scale

A 1 2 3 4 5 6 M 8 9 10 11 12 13 14 15 B 17 18 19



© Kodak, 2007 TM Kodak