

転写因子 **Maf** の多様な翻訳後修飾による
活性制御機構の解明

金井 賢一

奈良先端科学技術大学院大学

バイオサイエンス研究科 分子発生生物学講座

(高橋 淑子 教授)

平成23年1月25日提出

所属 (主指導教員)	分子発生生物学講座 (高橋 淑子)		
氏名	金井 賢一	提出	平成22年1月25日
題目	転写因子 Maf の多様な翻訳後修飾による 活性制御機構の解明		
<p>要旨</p> <p>Mafファミリー (MafA, MafB, c-Maf など) は、bZip 型の転写活性化因子群であり、水晶体 (c-Maf) やマクロファージ (MafB) などの分化制御因子として知られている。これまでに当研究グループは、MafA が哺乳類では膵島β細胞に特異的に発現しており、インスリン遺伝子の発現を Pdx1、Beta2 と協調的に活性化することを見いだした。MafA は、β細胞内でN末端領域内の5つのセリン/スレオニン残基が Glycogen Synthase Kinase 3 (GSK3)によりリン酸化され、プロテアソームを介して分解される。このリン酸化依存的な MafA の分解には、ユビキチン化を必要とせずにプロテアソームによる分解を促進する Proteasome Activator 28γ (PA28γ) タンパク質との結合を介している可能性を見いだしている。これらのリン酸化部位は MafB、c-Maf でも保存されており、Mafファミリータンパク質の量的な制御に関与するという知見が蓄積しつつある。</p> <p>Mafファミリーは、細胞分化を促す一方で、癌遺伝子産物でもある。Mafファミリーの過剰発現は、ニワトリの胚性繊維芽細胞 (CEF : chicken embryonic fibroblast) のトランスフォーメーションを誘導する。またヒトにおいては、染色体転座を伴う Maf タンパク質の過剰発現が、多発性骨髄腫などの悪性リンパ腫の原因となることも報告されている。Mafによる CEF のトランスフォーメーションには、転写活性化能が必須であり、多発性骨髄腫においては、CyclinD2などを標的として発現誘導することが報告されている。しかし、Mafが、分化誘導と発癌という相反する機能をどのように発揮できるのかは明らかではない。一方で、Mafが癌抑制遺伝子 p53 の転写を直接活性化して細胞死を誘導するという報告もある。</p> <p>MafファミリーのN末端は、GSK3によるリン酸化を受けるのみならず、酸性アミノ酸に富んでいて転写活性化領域としても機能する。これまでに、MafA の GSK3 によるリン酸化部位のアラニン置換変異体 (5A) や GSK3 阻害剤を用いた解析から、MafA と転写コアクチベータ PCAF との結合や、CEF のトランスフォーメーションにはリン酸化が必須であることが報告されている。しかしながら、5A 変異型 MafA も転写活性化能を有しており、転写活性の有無だけでトランスフォーム能を説明できないことも事実である。</p> <p>そこで本研究では、リン酸化を含めた翻訳後修飾に注目し、Mafの素機能が変換される詳細な分子機構を明らかにすることによって、発癌や細胞分化過程における Maf の制御機構を解き明かすことを目的とした。</p>			

本研究ではまず、MafA のリン酸化による機能の違いを調べる手がかりとして、リン酸化を受けない変異型 MafA (5A) と野生型 MafA を Western blot で比較解析した。その結果、5A 変異型 MafA が、リン酸化とは異なる修飾を野生型 MafA よりも効率よく受けることを見いだした。そしてこの修飾は、Maf ファミリーの転写活性化領域内に保存されたコンセンサス配列への SUMO 化であることを明らかにした。ユビキチン様タンパク質である SUMO (Small Ubiquitin-like Modifier) は、転写因子に結合すると転写活性が抑制される例が多く報告されている。そこで SUMO 化を受けない変異型 MafA (K32R) および SUMO 融合 MafA (SUMO-K32R) を作製し、レポーターアッセイおよび DF-1 細胞 (ニワトリ胚性繊維芽細胞株) のコロニー形成誘導能を検討した。その結果、SUMO 化によって MafA の転写活性化能およびトランスフォーム能が抑制されることを明らかにした。

この結果から、5A 変異型 MafA は、SUMO 化の亢進のために転写活性とトランスフォーム能が抑制されているのではないかと考え、二重変異型 MafA (K32R-5A) を作成し、その活性を調べた。K32R-5A 変異体は、5A および K32R 単独の変異体よりも予想通りに高い転写活性を示したが、5A 変異型で失われたコロニー形成能は、K32R-5A 二重変異によっては回復しなかった。したがって、5A 変異体は、転写活性化能とは非依存的にコロニー形成能を抑制すると考えられた。

そこで、それ自体でコロニー形成能を有するヒト癌細胞株である HeLa 細胞および p53 ノックアウトマウス由来胚性繊維芽細胞 (MEF p53^{-/-}) に、5A 変異型 MafA を導入したところ、コロニー形成が抑制された。また、p35 (apoptosis inhibitor) を共発現しても、5A 変異体によるコロニー形成抑制は起きた。さらに細胞増殖能と細胞周期についても検討した結果、5A 変異体により細胞増殖の抑制されていた。これらの結果から、5A 変異型 MafA は、細胞死を誘導することなく、p53 非依存的に細胞増殖の抑制を引き起こしていると考えられた。

一方で、リン酸化依存的な Maf の分解に関わるユビキチンリガーゼの探索を行い、Fbxw7 がリン酸化依存的に MafB および MafA と相互作用することを見いだした。Fbxw7 は c-Myc などの癌遺伝子産物の分解を促進する癌抑制遺伝子産物であるが、MafB もリン酸化依存的に Fbxw7 によってユビキチン化されてプロテアソームで分解され、それに伴って MafB のトランスフォーム能も抑えられることを明らかにした。さらに興味深いことに、*fbxw7* の発現を抑制した DF-1 細胞では、5A 変異型 MafA によってもコロニー形成が誘導された。逆に、野生型 MafA と Fbxw7 の共発現により、MEF p53^{-/-} のコロニー形成能の抑制がみられた。そこで MafA はリン酸化依存的に Fbxw7 の活性を負に制御しているのではないかと考え、その指標として Fbxw7 の基質である c-Myc のタンパク質量を解析したところ、リン酸化型の MafA の発現によって c-Myc タンパク質の蓄積が見られた。したがって、MafA は Fbxw7 と協調的に細胞増殖を抑制しており、MafA がリン酸化されることによって Fbxw7 に結合してその活性を抑制し、増殖抑制が解除され、トランスフォーメーションが誘導されると考えられる。

以上の結果から、Maf は転写活性のみにとどまらない機能を持ち、細胞周期を正にも負にも制御しうることを、またその活性はリン酸化などの多様な修飾によって調節されていることが明らかになった。今後は、Maf と Fbxw7 との機能的な相互作用の分子機構を解明することにより、Maf による発癌および細胞分化過程の全容が明らかになることが期待される。

< 目次 >

序論	P5
材料と方法	P12
結果	P24
考察	P39
謝辞	P48
参考文献	P49
図	P62

< 序論 >

転写因子 Maf

Mafファミリータンパク質は塩基性ロイシンジッパー (basic leucine zipper; bZip) 型の転写因子で、Large Maf サブファミリーと Small Maf サブファミリーからなる。これら Maf タンパク質はホモ2量体を形成して Maf-recognition elements (MAREs; TGCTGAC(G)TCAGCA) と名付けられたコンセンサス DNA 配列およびその類似配列に結合する(Kataoka et al., 1994b)。Small Maf サブファミリー (MafK、MafF、MafG など) はほぼ DNA 結合ドメインからなり、転写活性化ドメインを持たない。一方、Large Maf サブファミリー (以下、Maf と省略する) は N 末端側に酸性アミノ酸に富んだ転写活性化ドメインを、C 末端側に DNA 結合ドメインである bZIP ドメインを持つ転写活性化因子である。またこれらの中にはヒスチジン残基やグリシン残基がそれぞれ 8~10 個繰り返されている特徴的な配列のヒンジドメインが存在する (図 1) (Kataoka et al., 1993)。

Large Maf ファミリーとしては、哺乳類では MafA, MafB, c-Maf, Nrl が同定されており、これらの因子は組織特異的な遺伝子発現やそれらの細胞分化の制御因子として働くことが知られている (表 1)。また Maf の機能欠損や発現異常が、さまざまな発生異常や疾患を引き起こすことが報告されている (表 1)。たとえば、c-Maf は helper T-cell のサブセットである Th2 細胞で発現して、分化制御および *interleukin-4* 遺伝子の発現を活性化する (Ho et al., 1996)。さらに c-Maf は哺乳類の水晶体細胞で *crystallin* 遺伝子群を制御することが知られており (Kawauchi et al., 1999; Kim et al., 1999; Ring et al., 2000)、先天性白内障の患者で *c-maf* 遺伝子の機能欠損変異が生じていることが明らかになっている (Jamieson et al., 2002)。また Nrl は網膜で特異的に発現しており (Swaroop et al., 1992)、網膜色素変性症の家系で変異が同定されている (Bessant et al., 1999)。一方、MafB は α 細胞に発現しており、*glucagon* 遺伝子の発現を制御している (Artner et al., 2006)。また膵臓の内分泌細胞の発生過程において、発生初期の膵島 β 細胞で MafB が発現し、インスリン遺伝子の発現を活性化することが β 細胞の成熟に重要であることも報告されている (Artner et al., 2007)。さらに発生が進むと MafB の発現は消失し、MafA が特異的に発現するようになる。MafA は成体の β 細胞に特異的に発現しており、インスリン遺伝子プロモーターのグルコース応答性に関わる C1 エレメントに結合し発現を活性化する (Artner et al., 2007; Kajihara et al., 2003; Kataoka et al., 2002; Matsuoka et al., 2003; Olbrot et al.,

2002)。さらに MafA は *glucose transporter 2 (glut2)* や *granuphilin* などの β 細胞特異的に発現する遺伝子群も制御しており、 β 細胞の成熟にも必須である(Kato et al., 2006; Wang et al., 2007; Zhang et al., 2005)。そのため、これら MafA, MafB の欠損マウスは糖尿病を引き起こすことが知られている(表 1) (Artner et al., 2007; Nishimura et al., 2008; Zhang et al., 2005)。さらに近年、MafA と Ngn3 および Pdx1 の3つの転写因子を膵臓の外分泌細胞に発現させることによって、*in vivo* において成熟した β 細胞に分化転換させることができることが報告され(Zhou et al., 2008)、遺伝子治療による糖尿病治療のためのツールになることが期待されている。一方、MafA は dorsal root ganglia 内の low-threshold mechanoreceptor neuron の特定のサブタイプに発現し、その分化を制御していることが最近報告された(Bourane et al., 2009; Lecoin et al., 2010)。またニワトリでは MafA/L-Maf は *crystallin* 遺伝子の制御因子として同定され、水晶体分化を制御している(Ogino & Yasuda, 1998)。これらのことから、Maf ファミリーは多様な細胞の分化や生理的な機構を発揮するために必須な因子であることがわかる。

転写因子 Maf と発癌

転写因子 Maf ファミリーは、分化制御因子である一方で発癌タンパク質でもある(表 1)。すなわち、Maf はニワトリの筋腱膜繊維肉腫 (Musculoaponeurotic fibrosarcoma) を引き起こすレトロウイルス AS42 ウイルスから同定された癌遺伝子産物 v-Maf と相同なタンパク質群である(図 1) (Nisizawa et al., 1989)。例えば、ヒトの形質細胞の難治性の悪性腫瘍である多発性骨髄腫(multiple myeloma; MM)において、*c-maf*, *mafB*, *mafA* 遺伝子の免疫グロブリン遺伝子座 (*IgH* または *IgL*) への染色体転座による過剰発現がしばしば見られる(Chesi et al., 1998; Chng et al., 2007; Hanamura et al., 2001; Hurt et al., 2004)。また *c-maf* の過剰発現は血管免疫芽球性 T 細胞リンパ腫(angioimmunoblastic T-cell lymphoma; AITL)の 60%で見られ、実験的にも T 細胞特異的な *CD2* プロモーターで *c-maf* 遺伝子を過剰発現させたトランスジェニックマウスでは T-cell lymphoma が形成されることが明らかとなっている(Morito et al., 2006)。また実験的にニワトリの初代胚性繊維芽細胞(primary chicken embryo fibroblast; CEF)やその細胞株である DF-1 細胞に Maf タンパク質を過剰発現させることでトランスフォーメーション(形質転換)を *in vitro* 系で誘導することができる(Nishizawa et al., 2003; Pouponnot et al., 2006)。またこれらの Maf による発癌にはコード領域内の変異は必要がないことから Maf タンパク質の機能的な変化ではなく、異所的な発現や過剰発現が癌化を引き起こすと考えられる。しかしながら、正常な Maf を

発現する細胞において、この発癌活性がどのように抑制されているのかは未知な点が多い。

これまでの *in vitro* 系の形質転換能の解析により、Maf タンパク質の転写活性化能が CEF の形質転換能に必須であることが、v-Maf/c-Maf と MafA の DNA 結合ドメインの変異または転写活性化ドメインの欠損が Maf の形質転換能を失われることから明らかになっている(Kataoka et al., 1996; Pouponnot et al., 2006)。さらに MM と AITL では、悪性化の原因と考えられる Cyclin D2 や Integrin β 7、C-C chemokine receptor-1 (CCR1)、AMP-activated protein kinase (AMPK)-related protein kinase 5 (ARK5)などの遺伝子発現が、Maf タンパク質によって活性化されていることが明らかになっている(Hurt et al., 2004; Suzuki et al., 2005)。一方、CEF の形質転換を引き起こす Maf タンパク質の標的遺伝子の候補として HB-EGF などが報告されているが(Fu et al., 1999)、ほとんど明らかになっていない。その一方で、MafA の転写活性化能は c-Maf、MafB と比較して最も低い、トランスフォーメーション活性は最も高いという報告もある(Nishizawa et al., 2003)。この知見から、Maf タンパク質には転写活性化能以外にも形質転換能を発揮するための未知の機能を有している可能性があると考えられている。

以上のように Maf ファミリーはさまざまな細胞の分化の制御因子であり、かつ癌遺伝子でもあることから、Maf タンパク質の持つ多様な分子機能を明らかにすることは、再生医療や癌治療への応用のために不可欠であると考えられる。本研究では、Maf タンパク質の多様な活性の調節機構として、翻訳後修飾に注目し、解析を行った。

転写因子 Maf のリン酸化による制御

タンパク質の活性制御には翻訳後修飾が重要な役割を果たしており、リン酸化やユビキチン化、SUMO 化などの多様な化学修飾により厳密に調節されている(図 2)。これまでの知見から、Maf ファミリーは細胞内で高度にリン酸化されており、MafA では形質転換能や細胞分化の制御にリン酸化が重要な役割を果たしていることが特に良く解析されている(図 3)。例えば、MafA の Thr57 と Ser65 が MAPK の Erk や p38 によってリン酸化される(図 3a)(Benkhelifa et al., 2001; Nishizawa et al., 2003; Ochi et al., 2003; Sii-Felice et al., 2005)。また MafA の転写活性化ドメイン内の Ser65 がリン酸化された後、GSK3 によって Ser61、Thr57、Thr53、Ser49 が連続的にリン酸化されることも報告されており、これらのリン酸化にはプロテアソームによる分解やコアクチベーターである P/CAF との相互作用などの機能的な役割が報告されている(Han et al., 2007; Rocques et al., 2007)。さらにこれらのリン酸化を受けない変異の導入により、MafA の

形質転換能が失われることが報告されている(Pouponnot et al., 2006; Rocques et al., 2007)。一方で、Ser65 のリン酸化部位の変異によって、転写活性化能および形質転換能が増強するという報告もある(Nishizawa et al., 2003)。このように、これらの MafA のリン酸化の転写活性化能や形質転換能に対する重要性は見いだされているが、相反する知見もあり、MafA のリン酸化による機能の詳細な分子機構は未だ不明な点が多い。そのため、MafA による生理的な機能や発癌を理解するためには、リン酸化による分子機能の変換を知ることが重要である。

転写因子 Maf の SUMO 化修飾

本研究では Maf タンパク質が SUMO 化修飾を受けることを見いだした。SUMO (Small ubiquitin-like modifier) とは 100 アミノ酸程度のユビキチン様のタンパク質であり、酵母からヒトまで種を超えて広く保存されており、哺乳類では少なくとも 3 種類 (SUMO-1, 2, 3) 存在する。SUMO はその C 末端の数アミノ酸が切断されることによりグリシン残基が露出して成熟型になり、SUMO 活性化酵素 E1(Aos1/Uba2)、SUMO 結合酵素 E2 (Ubc9)、SUMO リガーゼ E3 (PIAS ファミリー、Pc2、RanBP2 など)によって ATP 依存的に SUMO のグリシン残基と基質タンパク質のリジン残基がイソペプチド結合する (図 2) (Johnson, 2004)。また SUMO 化反応は可逆的な反応であり、イソペプチダーゼである脱 SUMO 化酵素 (SENP ファミリーなど) によって SUMO の結合した基質タンパク質は脱 SUMO 化される(Zhang et al., 2002)。SUMO の結合は、ほとんどの場合、基質タンパク質の SUMO 化コンセンサス配列と呼ばれる Ψ KXE (Ψ : 疎水性アミノ酸、K: リジン、X: 任意のアミノ酸、E: グルタミン酸) 配列内のリジン残基に生じる(Johnson and Blobel, 1999)。

近年、多種のタンパク質が SUMO 化修飾を受けることが報告され、SUMO 化修飾の生理的意義が注目されている。SUMO 化反応はユビキチン化反応と非常に類似しているが、修飾後の機能的役割は異なり、結合する基質タンパク質によって、その細胞内局在、タンパク質間相互作用や活性の変化、安定性などのさまざまな機能変換をもたらすことが明らかになりつつある(Bachant et al., 2002; Desterro et al., 1998; Muller et al., 2004; Ross et al., 2002)。例えば、DNA グリコシダーゼの立体構造変化や、ヒストンへの修飾によるクロマチンレベルでの遺伝子発現の抑制、SIM (SUMO interacting Motif) と呼ばれる V/IXV//IV/I (V/I: バリン/イソロイシン、X: 任意のアミノ酸) 配列を持つ他のタンパク質との相

相互作用の獲得などが知られている(Girdwood et al., 2003; Hardeland et al., 2002; Song et al., 2004)。特に転写因子が基質になる場合には、SUMO 化修飾によって、その細胞内局在や安定性、DNA 結合能などが制御されること、SIM 配列を持った HDAC がリクルートされることによってクロマチン上でヒストンの脱アセチル化が誘導されることで、遺伝子発現が抑制されることなどが知られている(Gill, 2005; Tsuruzoe et al., 2006)。また、SNF ファミリーのクロマチンリモデリング因子 ARIP4 が核内受容体型の転写因子 Ad4BP/SF-1 と SUMO 化依存的に結合することで、遺伝子発現を抑制することも報告されている(Ogawa et al., 2009)。一方で、他の修飾との関連についてもいくつかの報告がある。例えば、I κ B α ではユビキチンが結合するリジン残基に SUMO が結合することでプロテアソームによる分解を阻止する(Desterro et al., 1998)。一方で SIM 配列を持ったユビキチンリガーゼが SUMO 化されたタンパク質を特異的にユビキチン化する例も知られている(Prudden et al., 2007)。しかしながら、Maf タンパク質の SUMO 化修飾による転写活性や形質転換能に対する役割は明らかになっていない。本研究では、SUMO 化による Maf タンパク質の転写活性化能および形質転換能の制御について解析を行い、SUMO 修飾による機能を明らかにした。

SCF 複合体によるユビキチンプロテアソーム系と細胞周期の制御

転写因子 Maf はリン酸化や SUMO 化修飾以外にユビキチン化を受けることが報告されている(Guo et al., 2009; Mao et al., 2007; Rocques et al., 2007; Tanahashi et al., 2010)。ユビキチン化で最も主要な機能が、ユビキチン・プロテアソーム系である。ユビキチン・プロテアソーム系とは、ユビキチン活性化酵素 (E1)、ユビキチン結合酵素 (E2)、ユビキチンリガーゼ (E3) という 3 つの酵素による一連の ATP 依存的なリレー反応を介して基質タンパク質にユビキチンが付加され、このユビキチンが目印となって 20S プロテアソームと 19S プロテアソームが会合した 26S プロテアソームによって基質タンパク質が分解されるシステムのことである(Varshavsky et al., 2005)。Maf タンパク質のユビキチン化もプロテアソームによる分解を促進していることが報告されている(Guo et al., 2009; Mao et al., 2007; Rocques et al., 2007; Tanahashi et al., 2010)。しかしながら、ユビキチン化を行う E3 (ユビキチンリガーゼ) は未だに同定されていない。本研究では、MafB の E3 として Fbxw7 α を同定した。そこで Fbxw7 α について詳しく説明する。

細胞周期の進行はサイクリン依存性キナーゼ (CDK) のリン酸化活性によっ

て制御を受けているが、その制御サブユニットであるサイクリンや阻害因子である CDK インヒビターなど、多くの調節因子群はユビキチン・プロテアソーム系によって量的な制御を受けている (図 4a) (Hershko et al., 2000; Sherr & Roberts, 1999)。細胞周期において働くユビキチンリガーゼは主に APC/C と SCF 複合体であり、両者は細胞周期において時期特異的に活性が変化する。M 期から G1 期にかけては APC/C が、G1 後期から S 期にかけては SCF 複合体がおもな活性を担っている (Deshaies et al., 1999; Harper et al., 2002; Nakayama et al., 2001)。SCF 複合体は、Skp1/Cul-1/Rbx1 と基質認識サブユニットである F-box タンパク質からなるユビキチンリガーゼである (図 4b)。Fbxw7 は F-box タンパク質のひとつである。

Fbxw7 (SEL-10、hCdc4 もしくは hAgo) は *C. elegans* における Notch ホモログである lin-12 の活性を負に制御する分子 Sel-10 として遺伝学的に同定された (Hubbard et al., 1997)。これまでに Fbxw7 は細胞周期促進因子や癌遺伝子産物として知られている Cyclin E、c-Myc、Aurora-A、Notch、c-Jun にリン酸化依存的にユビキチンを付加し、分解へと導くことが報告されている (Gupta-Rossi et al., 2001; Hubbard et al., 1997; Koepp et al., 2001; Moberg et al., 2001; Mao et al., 2004; Moberg et al., 2001; Nateri et al., 2004; Oberg et al., 2001; Strohmaier et al., 2001; Welcker et al., 2004; Wu et al., 2001; Yada et al., 2004)。これらの分解促進を担う Fbxw7 は細胞周期を負に制御する強力な因子であり、癌抑制タンパク質として機能することが考えられる。実際、Fbxw7 遺伝子は多くのヒトの癌において変異し、それによって染色体の不安定性がひきおこされることが知られている (Rajagopalan et al., 2004)。

Myc ファミリーは種々のヒトの腫瘍形成に関与し、遺伝子増幅や変異が数多く報告されている有名な癌遺伝子の 1 つである。c-Myc は Max とヘテロ 2 量体を形成して転写活性化能を発揮するが、細胞内における Max の発現量は一定であり、c-Myc-Max 複合体の転写活性化能は c-Myc の発現量に依存している。そのため、c-Myc の発現量は厳密に制御される必要があり、その破綻は癌化の原因の 1 つとなる (Grandori et al., 2000)。c-Myc はユビキチン・プロテアソーム系によって、30 分以下の半減期で非常に速やかに分解されることが知られている。c-Myc の N 末端側に存在する転写活性化領域には高度に保存された Myc ボックス 1 (MB1) と Myc ボックス 2 (MB2) が存在する。GSK-3 によって MB1 の 58 番目のスレオニン残基のリン酸化と他のキナーゼによる 62 番目のセリン残基の

リン酸化は c-Myc の安定性に重要な役割をしている。つまり、c-Myc は両者のリン酸化依存的に Fbxw7 に結合し、ユビキチン化依存的な分解を受ける(Yada et al., 2004)。これらの例のように、Fbxw7 は細胞周期の制御に重要な因子であり、c-Myc や Cyclin E といった細胞周期を S 期に進行させる因子の分解を行っている。そのため、Fbxw7 の機能欠損により、これらの因子の蓄積することで発癌の原因となりうると考えられている。

本研究では、Maf ファミリーのひとつである MafB が Fbxw7 のアイソフォームのひとつである Fbxw7 α によりユビキチン化を受け、分解が促進されることを見いだした。さらに、MafB の形質転換能と Fbxw7 α との関係および、もうひとつのメンバーである MafA との相互作用の解析により、Maf タンパク質による形質転換能の新規の機構を明らかにした。

<材料と方法>

培養細胞

NIH3T3 (マウス胎性繊維芽細胞株)

DF-1 (胚性ニワトリ繊維芽細胞株)

HeLa Tet on (ヒト子宮頸部ガン細胞株)

Floating-adaptive HeLa (F-HeLa) (ヒト子宮頸部ガン細胞株) (情報通信研究機構、小川研究員より供与)

MIN6 (マウスインシュリノーマ細胞株)

NIT-1 (マウス膵β細胞株)

βTC6 (マウスインシュリノーマ細胞株)

MEF(p53^{-/-}) (p53 ノックアウトマウスの胎児から調整された繊維芽細胞) (奈良先端大、松田助教より供与)

Bosc (ヒト胚性腎臓細胞株由来レトロウイルス・パッケージング細胞) (情報通信研究機構、小川研究員より供与)

NIT-1細胞の培養にはF12K medium (F12K) (GIBCO) を、それ以外の細胞の培養にはDulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) (Wako) を使用した。また、血清はFetal Calf Serum (FCS)を使用し、MIN6、β-TC6細胞の培養には15%の濃度で用い、それ以外の細胞の培養には10%の濃度で用いた。

細胞の継代は、細胞が 90% コンフルエントに達した時に PBS (137mM NaCl、8.1mM Na₂HPO₄、2.68mM KCl、1.47mM KH₂PO₄) で細胞を洗浄後、1×Trypsin (Wako) を用いて細胞をはがし、10~40 倍に希釈して行なった。

使用したプラスミド

pHygEF2

挿入した遺伝子を EF-1α (Elongation factor 1α) プロモーターの支配下で哺乳類細胞に発現させるプラスミドベクター。tk (チミジンキナーゼ) プロモーターより hygromycin 耐性遺伝子を発現するユニットも持つ。アンピシリン耐性。

EF-1α プロモーター上の AP-1 結合部位には変異が導入されており、AP-1

(Jun/Fos) や Maf などによる autoregulation が起こらないように改変されている (Nishizawa et al., 2003)。

pHygEF2/HA-m-mafA

pHygEF2 に HA タグを N 末端側に付加したマウス由来の *mafA* を挿入した発現プラスミド (Aramata et al., 2005)。

pHygEF2/HA-m-mafA (K32R)

pHygEF2/HA-m-mafA の *mafA* の ORF 中の 32 番目のリジン残基をアルギニン残基に変異を加えたプラスミド (Kanai et al., 2010)。

pHygEF2/HA-m-mafA (5A)

pHygEF2/HA-m-mafA の *mafA* の ORF 中の 49、53、57、61、65 番目のセリン/スレオニン残基をアラニン残基に変異を加えたプラスミド (Han et al., 2007)。

pHygEF2/HA-m-mafA (K32R-5A)

pHygEF2/HA-m-mafA の *mafA* の ORF 中の 32 番目のリジン残基をアルギニン残基に、49、53、57、61、65 番目のセリン/スレオニン残基をアラニン残基に変異を加えたプラスミド。

pHygEF2/HA-m-mafA (S342A)

pHygEF2/HA-m-mafA の *mafA* の ORF 中の 342 番目のセリン残基をアラニン残基に変異を加えたプラスミド (荒俣博士論文, 2008)。

pHygEF2/HA-m-mafA (K32R-S342A)

pHygEF2/HA-m-mafA の *mafA* の ORF 中の 32 番目のリジン残基をアルギニン残基に、342 番目のセリン残基をアラニン残基に変異を加えたプラスミド。

pHygEF2/HA-m-mafA (L23P)

pHygEF2/HA-m-mafA の *mafA* の ORF 中のロイシンジッパー構造の 2 番目と 3 番目 (L295、L302) のロイシン残基をプロリン残基に変異を加えたプラスミド。

pHygEF2/HA-m-mafA (5A-L23P)

pHygEF2/HA-m-mafA の *mafA* の ORF 中のロイシンジッパー構造の 2 番目と 3 番目 (L295、L302) のロイシン残基をプロリン残基に、49、53、57、61、65 番目のセリン/スレオニン残基をアラニン残基に変異を加えたプラスミド。

pHygEF2/HA-SUMO-m-mafA (SUMO-K32R)

pHygEF2/HA-m-mafA の *mafA* の ORF 中の 32 番目のリジン残基をアルギニン残基に変異を加え、HA タグと *mafA* の間に C 末端の Gly-Gly を欠損した *SUMO-1* の ORF を挿入したプラスミド (Kanai et al., 2010)。

pHygEF2/Gal4-DBD

酵母の転写因子 Gal4 の DNA 結合ドメインの発現プラスミド(Han et al., 2007)。

pHygEF2/HA-Gal4-m-*mafA*

Gal4 の DNA 結合ドメインの C 末端にマウス由来の *mafA* の転写活性化ドメイン (4~148) を融合させた発現プラスミド(Han et al., 2007)。

pHygEF2/HA-Gal4-m-*mafA* (K32R)

pHygEF2/HA-Gal4-m-*mafA* の *mafA* の ORF 中の 32 番目のリジン残基をアルギニン残基に変異を加えたプラスミド(Kanai et al., 2010)。

pHygEF2/HA-h-*mafB*

pHygEF2 に HA タグを N 末端に付加したヒト由来の *mafB* を挿入したプラスミド(Aramata et al., 2005)。

pHygEF2/HA-h-*mafB* (K32R)

pHygEF2/HA-h-*mafB* の、*mafB* の ORF 中の 32 番目のリジン残基をアルギニン残基に変異を加えたプラスミド(Kanai et al., 2010)。

pHygEF2/HA-h-*mafB* (5A)

pHygEF2/HA-h-*mafB* の、*mafB* の ORF 中の 54、58、62、66、70 番目のセリン/スレオニン残基をアラニン残基に変異を加えたプラスミド。

pHygEF2/FLAG-h-*mafB*

pHygEF2 に FLAG タグを N 末端に付加したヒト由来の *mafB* を挿入したプラスミド。

pHygEF2/FLAG-h-*mafB* (5A)

pHygEF2/FLAG-h-*mafB* の、*mafB* の ORF 中の 54、58、62、66、70 番目のセリン/スレオニン残基をアラニン残基に変異を加えたプラスミド。

pHygEF2/HA-h-*c-maf*

pHygEF2 に HA タグを N 末端に付加したヒト由来の *c-maf* を挿入した発現プラスミド。

pHygEF2/HA-h-*c-mafA* (K33R)

pHygEF2/HA-h-*c-maf* の、*c-maf* の ORF 中の 33 番目のリジン残基をアルギニン残基に変異を加えたプラスミド(Kanai et al., 2010)。

pHygEF2/FLAG-m-*SUMO1*

pHygEF2 に FLAG タグを N 末端に付加したマウス由来の *SUMO-1* を挿入したプラスミド(Kanai et al., 2010)。

pHygEF2/FLAG-m-*SUMO2*

pHygEF2 に FLAG タグを N 末端に付加したマウス由来の *SUMO-2* を挿入したプラスミド(Kanai et al., 2010)。

SUMO-2 の ORF (open reading frame) は、MIN6 細胞から精製した Total RNA を鋳型に、Fw primer : agaactagtagtggccgacgagaaacccaa、と Rv primer : agagcggccgcttagtagacacctccagtct を使って、PrimeScript One Step RT-PCR kit (TaKaRa) を用いて増幅した。得られた DNA 断片を Spe I と Not I で消化し、pHygEF2/FLAG-m-*fbxw7α* を Spe I -Not I 消化により *fbxw7α* の ORF 部分を除いたものに T4 DNA Ligase (TaKaRa) を用いて挿入することで作成した。

pHygEF2/FLAG-m-SUMO3

pHygEF2 に FLAG タグを N 末端に付加したマウス由来の *SUMO-3* を挿入したプラスミド(Kanai et al., 2010)。

SUMO-3 の ORF (open reading frame) は、MIN6 細胞から精製した Total RNA を鋳型に Fw primer : agaactagtagtgcggaagagaagcccaa、と Rv primer : agagcggccgctcaatagcacaggctcaggac を使って、PrimeScript One Step RT-PCR kit (TaKaRa) を用いて増幅した。得られた DNA 断片を Spe I 、Not I で消化し、pHygEF2/FLAG-m-*fbxw7α* を Spe I -Not I で *fbxw7α* の ORF 部分を除いたものに T4 DNA Ligase (TaKaRa) を用いて挿入することで作成した。

pHygEF2/FLAG-m-*fbxw7α*

pHygEF2 に FLAG タグを N 末端側に付加したマウス由来の *fbxw7α* を挿入した発現プラスミド。

pHygEF2/ m-*fbxw7α*

pHygEF2 にマウス由来の *fbxw7α* を挿入した発現プラスミド。

pHygEF2/*egfp*

pHygEF2 に *egfp* を挿入した発現プラスミド。

pEF/*c-myc*

pEF にヒト由来の *c-myc* を挿入した発現プラスミド。

pCAGGS/d-*p35*

pCAGGS に昆虫ウイルス由来の *p35* を挿入した発現プラスミド。(奈良先端大、齋藤助教より供与)

pCAGGS/*egfp*

pCAGGS にニワトリ由来の *egfp* を挿入した発現プラスミド。

pcDNA

CMV のエンハンサー／プロモーターにより挿入した遺伝子を真核生物に発現させるプラスミドベクター。SV40, pUC origin。ネオマイシン、アンピシリン耐性。

pcDNA/HA-ubiquitin

pcDNA に HA タグを N 末端に付加した *ubiquitin* を挿入した発現プラスミド(筑波大学、柳澤純博士より供与)。

pRV9

トリレトロウイルス Rous Sarcoma Virus (RSV) 由来の発現ベクター(Nishizawa et al., 2003)。導入された細胞のゲノム DNA に組み込まれて A-type のレトロウイルス粒子を産生し、感染を広げる。

pRV9/HA-m-mafA

pRV9 に HA タグを N 末端に付加したマウス由来の *mafA* を挿入した発現プラスミド。

pRV9/HA-m-mafA (K32R)

pRV9/HA-m-mafA の *mafA* の ORF 中の 32 番目のリジン残基をアルギニン残基に変異を加えたプラスミド。

pRV9/HA-m-mafA (5A)

pRV9/HA-m-mafA の *mafA* の ORF 中の 49、53、57、61、65 番目のセリン/スレオニン残基をアラニン残基に変異を加えたプラスミド。

pRV9/HA-m-mafA (K32R-5A)

pRV9/HA-m-mafA の *mafA* の ORF 中の 32 番目のリジン残基をアルギニン残基に、49、53、57、61、65 番目のセリン/スレオニン残基をアラニン残基に変異を加えたプラスミド。

pRV9 B

トリレトロウイルス Rous Sarcoma Virus (RSV) 由来の発現ベクター(Nishizawa et al., 2003)。導入された細胞のゲノム DNA に組み込まれて B-type のレトロウイルス粒子を産生し、感染を広げる。

pRV9-B/dsred

pRV9-B に蛍光タンパク質 *dsred* を挿入した発現プラスミド。

pRV9/FLAG-m-*fbxw7* α

pRV9-B に FLAG タグを N 末端側に付加したマウス由来の *fbxw7* α を挿入した発現プラスミド。

3×MARE(#7)/RBGP-*luc*

ウサギ β グロビン 遺伝子の TATA 配列の上流に、MARE#7 (TGATTACTAAGCA) を含む 32mer オリゴ DNA がタンデムに 3 つ挿入されたルシフェラーゼ発現プラスミド(Kataoka et al., 1994a)。MARE#7 配列には、Maf の結合は妨げないが、AP-1 (Jun/Fos) が結合できないように、完全なコンセンサス MARE 配列 (TGCTGACTCAGCA) に 2 塩基の置換が導入されている。

pG4x5/TATA/*luc*

酵母の転写因子 Gal4 の結合配列である UAS の配列がタンデムに 5 つ挿入されたルシフェラーゼ発現プラスミド(Han et al., 2007)。

pGL2/m-*ggn-p-luc*

マウスのグルカゴンプロモーターの領域が pGL2 (Promega) に挿入されたルシフェラーゼ発現プラスミド(Kataoka et al., 2004)。

pGL2/c- α A-*crystallin-p-luc*

ニワトリの α A クリスタリンプロモーターの-427~+79 の領域が pGL2 (Promega) に挿入されたルシフェラーゼ発現プラスミド(Kanai et al., 2010)。

pGL2/m-*IL4(-766)-p-luc*

マウスの IL4 プロモーターの-766~+63 の領域が pGL2 (Promega) に挿入されたルシフェラーゼ発現プラスミド(Kubo et al., 1997)。

pGL4/h-*ins-p-luc*

ヒトのインスリンプロモーターの+25~350 の領域が pGL4 (Promega) に挿入されたルシフェラーゼ発現プラスミド(Kataoka et al., 2002)。

pEF-*Rluc*

EF-1 α プロモーターによって *Renilla* ルシフェラーゼが誘導される発現プラス

ミド(Kataoka et al., 2001)。

pEF3 BcrGFP U6

U6 プロモーターの下流に挿入された配列が polIIIにより転写され、ヘアピン構造を作らせ、効率的に RNAi を起こさせるプラスミド。pEF3 プロモーターにより GFP 融合プラスチジン耐性遺伝子を発現する。

pEF3 BcrGFP U6/c-*fbxw7*

ニワトリの *fbxw7* 遺伝子に対する sh-RNA を発現するプラスミド。

pOZ-N

N 末端側に FLAG タグと HA タグを持ち、細胞のソーティングのための IL2 レセプターを IRES により発現するレトロウイルスベクター(Nakatani et al., 2003)。*gp* と *env* を持たない。Xho I と Not I のサイトに目的遺伝子を挿入する。(情報通信研究機構、小川研究員より供与)

pOZ-NK

pOZ-N ベクターを改変し、マルチクローニングサイトの制限酵素サイトを増やしたベクター。Mlu I および Bgl II、Cla I、Not I、Xho I が使用可能。10 μ L の gatcatccaccatggactacaaggacgacgatgacaagcagcgcgctcagatctacatcgatc (100 μ M) の配列を持ったオリゴヌクレオチドと 10 μ L の tcgagatcgatgtagatctgacgctgcttgcacgctcgtc cttgtagtccatggatggat (100 μ M) の配列を持ったオリゴヌクレオチド、10 μ L の H buffer を混ぜ合わせ、100 μ L にメスアップし、サーマルサイクラーを用いて 1 時間半かけて 99°C から徐々に 30°C まで下がる条件で反応させることで 2 本鎖を形成させる。その後、4°C にした 2 本鎖オリゴヌクレオチドを Bgl II と Xho I で消化した pOZ-N ベクターに T4 DNA Ligase (TaKaRa) を用いて挿入することで作成した。

pOZ-NK/ m-*mafA*

pOZ-NK にマウス由来の *mafA* を挿入したプラスミド。N 末端に FLAG タグと HA タグを持つ。

pHygEF2/HA-m-*mafA* および pOZ-NK を Mlu I と Not I で消化し、T4 DNA Ligase (TaKaRa) を用いて結合させることで作成した。

上記のプラスミドのうち、参考文献などの記述のないプラスミドに関しては、

片岡浩介博士（奈良先端大）より供与していただいた。

免疫沈降

12 wellプレートに HeLa 細胞または NIH3T3 細胞を播種し、24 時間培養した。1 well あたり 1.6 μ g の pHygEF2/*mafA* と 0.4 μ g の pHygEF2/*SUMO-1*、*SUMO-2*、*SUMO-3* のプラスミド DNA を 4 μ L の Lipofectamine2000 (Invitrogen) を使用してトランスフェクションを行い、さらに 24 時間培養した。1mL の 1×PBS で洗浄した後、120 μ L の氷冷した RIPA (1% NP40、1% sodium deoxy cholate、0.1% SDS、150mM NaCl、10mM Tris-HCl(pH7.5)、5% NEM、1% Protease inhibitor (Nacalai)) で細胞を溶解して 1.5mL チューブに回収し、10 秒間の超音波粉碎を行なった。この細胞破碎液を 14000rpm で 5 分遠心し、上清を回収した。この内の 30 μ L を分取し、10 μ L の 4×SDS dye (200mM Tris-HCl (pH6.8)、8% SDS、400mM DTT、0.2% BPB、40% glycerol) を加え、95°C で 5 分煮沸し、input 画分とした。残りの細胞破碎液には Anti-HA affinity Matrix (Roche) または Anti-FLAG M2-Agarose from mouse (SIGMA) を各 2 μ L 加えて、4°C で一晩ローテートした。遠心 (3000 rpm、1 分) によって抗体ビーズを沈降させ、500 μ L の RIPA で 3 回洗浄した後、2×SDS Dye (100mM Tris-HCl (pH6.8)、4% SDS、200mM DTT、0.1% BPB、20% glycerol) を 15 μ L 加えて 95°C で 5 分煮沸した。

in vivo ユビキチン化アッセイ

6 wellプレートに HeLa 細胞または DF-1 細胞を播種し、24 時間培養した。1 well あたり 2.4 μ g の pHygEF2/FLAG-*mafB* と 0.8 μ g の pHygEF2/*fbxw7* または pEF3 BcrGFP U6/*c-fbxw7*、0.6 μ g の pcDNA/HA-*ubiquitin*、0.2 μ g の pHygEF2/*egfp* のプラスミド DNA を Lipofectamine2000 (Invitrogen) を使用してトランスフェクションを行い、さらに 16 時間培養後、8 時間 15 μ M MG132 (Wako) 処理を行った。1mL の 1×PBS で洗浄した後、150 μ L の denature buffer (0.5% SDS、50mM Tris-HCl(pH8.0)、70mM β mercaptoethanol、1% Protease inhibitor (Nacalai)) で細胞を溶解して 1.5mL チューブに回収し、95°C で 10 分間処理を行った。そこに 2×RIPA (SDS なし) (2% sodium deoxy cholate、300mM NaCl、20mM Tris-HCl(pH7.5)、2% TritonX、2% Protease inhibitor (Nacalai)) を加えて、この細胞破碎液を 14000rpm で 90 分遠心し、上清を回収した。上清を Anti-FLAG M2-Agarose from mouse (SIGMA) を用いて免疫沈降を行い、Western blot により検出した。

Western blot

サンプルの調整

24well プレートに HeLa 細胞又は NIH3T3 細胞を播種し、24 時間培養した。1 well あたり 0.8 μ g の pHygEF2/*mafB*, *c-maf* と 0.2 μ g の pHygEF2/*SUMO-1*, *SUMO-2*, *SUMO-3* を、または 0.8 μ g の pHygEF2/*FLAG-pdx1*, *FLAG-pdx1-HA* のプラスミド DNA を 2 μ L の Lipofectamine2000 (Invitrogen) を使用してトランスフェクションを行い、さらに 24 時間を培養した。0.5mL の 1×PBS で洗浄した後、細胞に 4×SDS dye を 40 μ L 直接加えて溶解し、回収した。これを 95°C で 10 分煮沸することにより細胞全溶解液を得た。

SDS-PAGE

細胞全溶解液 (4 μ L) あるいは免疫沈降により回収したサンプル (IP 画分は 7 μ L, Input 画分は 5 μ L) を 10% e-PAGEL (ATTO) にアプライし、Electrophoresys buffer (0.025M Tris base, 0.192M glycine, 0.1% SDS) を用いて泳動した。(120 V, 90~120 min)

ブロッティングと抗体反応

泳動後、タンパク質を Transfer buffer (0.025M Tris base, 0.192M glycine, 10% MeOH) 中で、ゲルから PVDF 膜 (Immobilon-P, MILLIPORE) に、4°C で 150 mA, 30 min および 300 mA, 60min の 2ステップで転写を行った。転写後、2% スキムミルク (2% スキムミルク, 0.02M Tris-HCl, 0.15M NaCl, 0.03% NaN_3) でブロッキングを行い、2% スキムミルクに希釈した一次抗体で一次抗体反応を 1 時間行った。TBS-T (0.02M Tris-HCl, 0.15M NaCl, 0.5% Tween20) で 7 分間メンブレンを 3 回洗った後、TBS-T に希釈した二次抗体液にメンブレンを移し、振とうさせながら抗体反応を 30 分間行った。その後、TBS-T で 3 回、TBS (0.02M Tris-HCl, 0.15M NaCl) で 1 回洗った。

一次抗体 :

Anti-HA IgG/Rabbit (MBL) 800 倍希釈で使用。

Anti-FLAG M2 IgG/Mouse (SIGMA) 200 倍希釈で使用。

Anti-pan-Maf IgG/Rabbit (Santa Cruz Biotechnology; sc-764) 1000 倍希釈で使用。

Anti-TBP IgG/Rabbit (Santa Cruz Biotechnology; sc-273x) 1000 倍希釈で使用

Anti-EGFP IgG/Rabbit (Invitrogen) 5000 倍希釈で使用

Anti-Myc IgG/Rabbit (Santa Cruz Biotechnology; sc-7866) 1000 倍希釈で使用

二次抗体：

Anti-Rabbit IgG-HRP (Dako) 4000 倍希釈で使用。

Anti-Mouse IgG-HRP (Amersham Life Science) 4000 倍希釈で使用。

発色と検出

ECL Western Blotting Detection Reagents (GE Healthcare) で発色反応を行い、Hyperfilm ECL (GE Healthcare) または LAS-3000 mini (FUJI FILM) を用いて検出した。

ルシフェラーゼレポーターアッセイ

24 well プレートに HeLa 細胞、NIH3T3 細胞、DF-1 細胞、MEF 細胞又は In1024 細胞を播種し、24 時間培養を行った。1 well あたり 0.2 μ g のレポータープラスミド (0.1 μ g の pEF-*Rluc* と 0.1 μ g の 3 \times MARE(#7)/RBGP-*luc* 又は pGL4/h-ins-p-*luc*) と 0.8 μ g のエフェクタープラスミド DNA (0.8 μ g の pHygEF2/HA-*maf* または 0.4 μ g の pHygEF2/HA-*mafA* と 0.2 μ g の pHygEF2/FLAG-*pdx1*、0.2 μ g の pHygEF2/FLAG-*beta2*) を Lipofectamin2000 (Invitrogen) を使用してトランスフェクションを行った。24 時間後、PBS で細胞を洗浄し、Dual-Luciferase Reporter Assay System (Promega) を添付のマニュアルに従って用いて、転写活性化能を測定した。

Chicken embryonic fibroblast (CEF) の調製とトランスフェクション

CEF の調製

WL-M/O 系のニワトリの受精卵 (日本生物科学研究所) を 10 日間、37 $^{\circ}$ C の恒温槽でインキュベートした。10 日目胚を取り出し、頭部、四肢、内蔵を取り除き、1 \times PBS で洗浄した。ハサミで細かく切り刻んだ後、10mL の 5 \times Trypsin (GIBCO) を加え、室温で 10 分間攪拌しながら消化した。その後、10mL の MEM (大日本住友製薬) を加え、ステンレス・メッシュに通し、3000rpm、5 分の遠心分離によって細胞を回収し、MEM (+ 10% TPB、5% FBS) で再懸濁した。これらを 10cm シャーレ 5 枚に播種し、CEF として 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ で 2~3 日間培養した。

トランスフェクション

10cm dish に培養した CEF を 1×Trypsin ではがし、60mm シャーレに 2.2×10^6 個になる様に細胞を播種し、24 時間培養した。SuperFect Transfection Reagent (QIAGEN) 15 μ L を用いて、12.5 μ g のプラスミド DNA (pRV9/HA-m-*mafA*、pRV9/HA-m-*mafA* (K32R)、pRV9) をトランスフェクションした。その後、1 週間に一度継代を行い、全面感染させた。

タンパク質の回収

タンパク質の回収は、60mm シャーレに対して 500 μ L の RIPA buffer を加えて細胞を溶解し、10 秒間の超音波粉碎後、4×SDS dye を 1/4 量加えた。Western blot にはこのタンパク質溶液を各 10 μ L ずつ用いた。

コロニー形成アッセイ

DF-1 細胞、HeLa 細胞又は MEF (p53^{-/-}) 細胞を 24 well プレートに播いて培養。トランスフェクションを行い、12 時間後に 60 mm dish に 2×10^5 個の細胞をまき、DMEM (3% FBS, 100 μ g/mL Hygromycin B) で培養した。2~3 日毎に、培地交換をしながら 3 週間培養後、Crystal violet で染色し、撮影した。

軟寒天培養アッセイ

60mm dish に 3mL の Hard agar (DMEM、3% FBS、10% TPB、0.66% Agar Noble) を加え、室温で固めた。その上に、pRV9 で感染させた DF-1 細胞を Soft Agar (DMEM、3% FBS、10% TPB、0.33% Agar Noble) に 2×10^5 個の細胞を加え、培養した。4 日に一度、Soft agar を 500 μ L 加え、3 週間培養した。その後、200 μ L の Int Solution (SIGMA) を加え、発色したコロニーを撮影した。

FACS 解析

野生型または 5A 変異型 MafA をレトロウイルス (pRV9) で全面感染させた DF-1 細胞を 10cm dish からトリプシン消化により回収して、1'000 rpm の遠心分離後、PBS で 2 回細胞を洗い、終濃度 70%になるようにエタノールを加え、細胞を固定した。PBS で 2 回細胞を洗った後、40 μ g/mL の RNaseA を加え、室温で 30 分間、反応させた。さらに 25 μ g/mL Propidium Iodide (Nacalai tesque) を

加え、フィルターに通した後、FACScan により解析を行った（奈良先端大、竹家研究室の協力）。

レトロウイルスの調整および MafA 安定発現細胞の樹立

Bosc 細胞を 10cm dish に培養する。翌日、 $10\ \mu\text{g}$ の pOZ-NK/MafA を Lipofectamin 2000 (invitrogen) を用いて、トランスフェクションにより導入した。2 日後に上清を回収した。75mL 容フラスコに F-HeLa 細胞を 2×10^6 個の細胞を播き、そこに回収した上清を加えて、ウイルス感染をさせる。その後、175mL 容フラスコに細胞を継代し、細胞数を増やした。コンフルエントになった後、細胞を回収し、抗 IL-2 抗体を結合したマグネティックビーズを用いて、感染細胞をソーティングした。この作業を 3 回繰り返して安定発現細胞を樹立した。

MafA の複合体精製および同定

樹立した FLAG-HA-MafA 安定発現細胞をスピナーフラスコで 20L まで培養した。細胞を回収し、核抽出液を調整した後、抗 FLAG 抗体結合アガロースおよび抗 HA 抗体結合アガロースを用いて 2 回精製を行った。精製産物をグラジエントゲル(5-12.5%)により分離し、Flamingo (Bio-Rad) により染色後、質量分析機により精製されたタンパク質の同定を行った（奈良先端大、植物ユニットの協力）。

< 結果 >

1. Maf タンパク質の SUMO 化による制御

1-1 Maf タンパク質は SUMO 化修飾を受ける

これまでの複数の報告から、MafA が高度にリン酸化を受けることが明らかになっているが (図 3a)、他の翻訳後修飾を受けている可能性を検討するために MafA の翻訳後修飾を Western blot により解析することを試みた。インシュリーノーマ由来細胞株で発現している内在性の MafA は、Glycogen Synthase Kinase 3 (GSK3)により高度にリン酸化修飾を受けることから約 46 kDa のあたりに複数のバンドが検出される(Han et al., 2007; Rocques et al., 2007)。そのため、細胞をあらかじめ GSK3 の阻害剤 (SB216763) で処理することで、その移動度が早くなる (図 5a)。これらの Western blot の結果において、40~48kDa 付近の高リン酸化および低リン酸化型の MafA タンパク質のみならず、MafA 本来の分子量とはかけ離れた 60kDa 程度の分子量の位置にも特異的なシグナルが観察され、さらにこのバンドは、GSK3 によるリン酸化の阻害に伴って低分子量側へとシフトすることが観察された (図 5a)。転写因子でこのような移動度の大きな変化が見られる修飾として、ユビキチンや SUMO による修飾の例が多くあるため、MafA のアミノ酸配列を解析した。その結果、MafA の転写活性化ドメイン内に Maf ファミリー間で保存されている SUMO 化コンセンサス配列 (Ψ KXE: Ψ 疎水性アミノ酸、X 全てのアミノ酸) が存在することを見いだした (図 5b)。このことから、MafA の 32 番目のリジン残基が SUMO 化修飾を受ける可能性がある。

そこで、この修飾が SUMO によるものであるかを検証するために、インシュリーノーマ由来の NIT-1 細胞に、HA-タグを付加した MafA と FLAG タグを付加した SUMO-1 をそれぞれ発現するプラスミド (図 6a) をトランスフェクションにより強制発現させ、この細胞の抽出液を抗 HA 抗体により免疫沈降した後、抗 HA 抗体と抗 FLAG 抗体を用いて Western blot を行った。その結果、抗 HA 抗体によって、40~45kDa 付近の MafA タンパク質に加えて 60kDa 付近にもシグナルを検出した。さらに抗 FLAG 抗体によってもこれと同じ分子量の約 60kDa の位置にシグナルが検出されたことから、MafA が細胞内で SUMO 化修飾を受けることが明らかとなった (図 6b)。

さらに SUMO による MafA の修飾部位を決定するために、SUMO 化コンセンサス配列と一致する 32 番目のリジン残基や、その近傍のリジン残基 (28 番目および 33 番目) をアルギニン残基に置換した変異体 (以後 K32R 変異体などと記す) (図 6b) を作成し、同様の実験を行ったところ、K32R 変異体では SUMO 化修飾に相当するシグナルが得られなかった (図 6b)。また SUMO 化コンセンサス配列とは異なる K28R および K33R の変異では SUMO 化に対して影響は見られなかった。以上の結果から、MafA が細胞内で SUMO 化修飾されること、およびその修飾部位が 32 番目のリジン残基であることを明らかにした。

次に、SUMO には 3 つのアイソフォーム (SUMO-1, SUMO-2, SUMO-3) があり、基質タンパク質に選択性がある例があり、不明な点が多いが構造上の違いから機能が異なると考えられている。そこで MafA に結合する SUMO アイソフォームの選択性を調べるため、HA タグを付加した野生型 (WT) あるいは K32R 変異型 MafA と FLAG タグを付加した SUMO-1, SUMO-2 あるいは SUMO-3 (図 7a) を HeLa 細胞に共発現させ、抗 HA 抗体で免疫沈降後、抗 HA 抗体と抗 FLAG 抗体を用いて Western blot を行った (図 7b)。その結果、抗 HA 抗体で、野生型および K32R 変異型 MafA が検出でき、SUMO-1, SUMO-2, SUMO-3 の強制発現下では野生型 MafA で分子量 60kDa 付近に SUMO 化 MafA のシグナルが検出された。またこれらのシグナルは、抗 FLAG 抗体でも検出されたことから、確かにそれぞれ SUMO-1, SUMO-2, SUMO-3 が共有結合したものであることが確認された。以上の結果から、MafA には SUMO-1 が最も効率が良いが、SUMO-1, 2, 3 のどれもが結合することができ、どのアイソフォームも 32 番目のリジン残基に結合することが明らかとなった。

また MafA の SUMO 化されるリジン残基を含む SUMO 化コンセンサス配列は、他の Large Maf ファミリーである MafB、c-Maf にも保存されている (図 5b)。そこで MafB と c-Maf も MafA 同様に SUMO 化修飾を受けるかどうかを、HA タグ付きの KR 変異体 (図 8a) (MafB は K32R 変異体、c-Maf は K33R 変異体) と FLAG タグ付きの SUMO-1, SUMO-2, SUMO-3 と共発現させ、Western blot により検討した。その結果、MafB および c-Maf はいずれも SUMO-1 の過剰発現により SUMO 化修飾を受け、それぞれの KR 変異体では修飾を受けないことがわかった (図 8b)。SUMO-2 および SUMO-3 の共発現による MafB の SUMO 修飾は SUMO-1 よりも少なかった。これらの結果から、MafB と c-Maf もファミリー間で保存された SUMO 化コンセンサス配列が SUMO 化修飾を受けることが明らか

になった。

1-2 Maf タンパク質の SUMO 化修飾による転写活性への影響

これまでに、SUMO 化修飾を受けることが報告されている転写因子は SUMO 化により、その転写活性化能が制御される例が多く報告されている(Gill, 2005)。そこで Maf タンパク質により転写が誘導される 3×MARE (#7) / RBGP-luc (図 9a) をレポータープラスミドとして用いて、それぞれの Maf と共に HeLa 細胞にトランスフェクションにより導入し、ルシフェラーゼアッセイを行った (図 9b)。これまでの報告と同様に、野生型 Maf タンパク質 (MafA、MafB、c-Maf) は、このレポーターを活性化し、またその強さは MafB が最も高く、c-Maf、MafA の順であった。野生型 MafA はこのレポーターを数倍活性化したが、SUMO 化を受けない K32R 変異型の転写活性化能は野生型よりも顕著に高いことが明らかになった (図 9b)。また c-Maf も MafA の場合と同様に、K33R 変異型の方が高い転写活性化能を示したが、MafB は野生型と K32R 変異型の間には有意な差は見られなかった (図 9b)。

さらに NIH3T3 細胞を用いて、導入する MafA の量を変化させて、3×MARE (#7) / RBGP-luc を用いたルシフェラーゼアッセイを行った (図 10a)。その結果、野生型 MafA ではプラスミドの導入量に依存的して活性が増加し、0.2 μ g のプラスミドを導入した際にプラトーに達していた。SUMO 化に寄与しない K28R 変異型 MafA も野生型と同様の傾向を示し、このリジン残基の変異が転写活性化能には影響を与えないことが示された。一方で、K32R 変異型 MafA は 0.2 μ g 以下のプラスミドを導入した際でも野生型および K28R 変異型よりも高い活性を示し、さらに転写活性の最高値が高いことが示された (図 10a)。この結果から、K32R の変異は単なる発現量の増加ではなく、MafA タンパク質の質的な変化を引き起こすことで、高い転写活性化能を発揮させている可能性が示された。このことは、MafA タンパク質量がこれらの変異によって影響を受けていないという Western blot 解析の結果からも示されている (図 10b)。以上の結果から、SUMO 化により MafA の転写活性化能が抑制されることが明らかになった。

図 10b で示した様に、SUMO 化部位の変異は MafA タンパク質の量に影響を与えなかった。さらに SUMO 化が MafA タンパク質の安定性に対して影響を与えないことを示すために、MafA タンパク質のプロテアソーム阻害剤に対する感受性への KR 変異の影響について解析を行った。野生型および各 KR 変異型 MafA

を MIN6 細胞に発現させ、プロテアソーム阻害剤 MG132 で処理後、全タンパク質を回収して Western blot を行った (図 11b)。その結果、野生型 MafA では、これまでの報告どおり MG132 処理により MIN6 細胞内で MafA タンパク質の蓄積が見られた。一方、図 11a で示しているリン酸化部位に変異を導入した S65A 変異型 MafA は、プロテアソームにより分解されにくいことが知られており、MG132 処理の有無に関わらず MafA タンパク質の蓄積が見られた(Han et al., 2007)。一方、K32R を含む KR 変異型 MafA では MG132 処理による MafA タンパク質の蓄積が野生型と同様に見られ、また泳動度から判断するに K32R の変異による MafA のリン酸化状態の変化は見られなかった。これらの結果から、MafA の SUMO 化の阻害はリン酸化およびタンパク質の安定性には影響を与えないことが明らかになった。これらのことから、K32R の変異による MafA の転写活性化能の増加は、リン酸化や量的な変化によるものではないと考えられる。

次に MafA の SUMO 化修飾による転写抑制機構の検討を試みた。これまでに SUMO 化修飾による転写活性化能の抑制機構は、DNA 結合の阻害や、コアクチベーターやコレプレッサーなどとの相互作用の変化による例が知られている (Gill, 2005; Ogawa et al., 2009; Tsuruzoe et al., 2006)。そこで SUMO 化による MafA の転写活性化能の抑制に対する DNA 結合ドメインの必要性を調べるために、Gal4 システムを用いた解析を行った。これは酵母の転写因子 Gal4 の DNA 結合ドメイン (DBD) に、野生型または K32R 変異型 MafA の転写活性化ドメインを融合したタンパク質 (図 12a) と Gal4 の結合配列である UAS 配列を持つレポーター (図 12b) を用いたレポーターアッセイ法である(Han et al., 2007)。その結果、融合タンパク質によりレポーターの活性化が見られ、また図 9、10 の結果と同様に K32R 変異型 MafA の融合タンパク質の転写活性化能が、野生型よりも有意に高いことが明らかとなった (図 12b)。また、抗 pan-Maf 抗体による Western blot により、この Gal4-MafA 融合タンパク質と SUMO-1, SUMO-2 あるいは SUMO-3 との共発現によって、野生型でのみ SUMO 化修飾されたと考えられるシグナルが検出された (図 12c)。これらの結果から、SUMO 化による MafA の転写活性の抑制は、MafA の転写活性化ドメインだけで十分であり、DNA 結合ドメインは関与しない可能性が示唆された。

さらにこれまでに使用していたような人工的な結合配列を用いたレポーターではなく、実際に Maf ファミリーの標的であり活性化されることが知られているいくつかのプロモーターへの MafA の SUMO 化の影響の解析を行った。Maf

タンパク質の標的遺伝子のプロモーターをつないだレポーター (図 13a) と野生型または K32R 変異型 MafA を同様に NIH3T3 細胞にトランスフェクションにより共導入し、ルシフェラーゼアッセイを行った (図 13b)。インスリン遺伝子およびグルカゴン遺伝子プロモーター、 α A クリスタリン遺伝子プロモーターにおいて K32R 変異型 MafA は野生型よりも高い活性を示した。一方で、IL4 遺伝子プロモーターでは有意な差は見られなかった (図 13b)。これらの結果から、既知の多くのプロモーターで SUMO 化による MafA の転写活性の抑制は見られるが、一部のプロモーターでは影響を与えない可能性が示された。

1-3 MafA によるコロニー形成能の獲得は SUMO 化により抑制される

これまでの報告から、Maf タンパク質の過剰発現により胚性ニワトリ繊維芽細胞 (CEF) をトランスフォーム (形質転換) することが明らかになっている (Nishizawa et al., 1989)。この MafA の形質転換能に対する SUMO 化修飾による影響の解析を試みた。ニワトリの 10 日目胚から調製した CEF に、野生型あるいは K32R 変異型 MafA を発現するレトロウイルスベクター (pRV9) をトランスフェクションにより導入し、数日間にわたって培養と継代を続け全面感染させた (図 14a)。コントロールには EGFP を導入し、その蛍光で全面感染したことを判断した (Data not shown)。野生型および K32R 変異型 MafA を発現する CEF は、コントロールとして導入したベクターと比較して細長く伸長した形態を示した (図 14b)。このような細胞形態は Maf ファミリーによって形質転換した細胞に見られる特徴であり、マウス由来の MafA でも CEF の形質転換能があることが示唆された。また K32R 変異型 MafA も同様に形態変化を誘導し、K32R の変異による形態変化への影響は見られなかった。またこれらの全面感染細胞から全タンパク質を回収し、抗 HA 抗体を用いて Western blot を行った。その結果、野生型および K32R 変異型 MafA タンパク質はいずれも高リン酸化型および低リン酸化型の複数のバンドとして検出され、その発現量にはほとんど違いは見られなかった (図 14c)。これらの結果から、MafA 発現による細胞形態の変化に対しては、SUMO の影響がないことが明らかになった。

次に MafA のトランスフォーメーション能への SUMO 化の影響を解析するために、胚性ニワトリ繊維芽細胞株である DF-1 細胞にハイグロマイシン耐性遺伝子を持つベクターを用いて野生型および K32R 変異型 MafA (図 15a) をトランスフェクションにより導入し、ハイグロマイシンを含む培養液中で培養するこ

とで、低密度下でのコロニー形成能を解析した。その結果、野生型 MafA の発現により DF-1 細胞のコロニー形成が顕著に増加し、さらに K32R 変異型 MafA の発現は野生型 MafA より数、大きさ共に増大した (図 15b)。さらに 3×MARE (#7) /RBGP-luc レポーターを用いて、それぞれの MafA を DF-1 細胞にトランスフェクションにより導入し、ルシフェラーゼアッセイを行った。その結果、DF-1 細胞においても K32R 変異型 MafA は野生型 MafA よりもレポーターに対して高い活性を示した (図 15c)。これらの結果から、MafA によるコロニー形成能の獲得は、転写活性化能と同様に SUMO 化により抑制されることが明らかになった。

さらに SUMO の MafA への結合が転写活性化能および形質転換能を抑制しているかを直接的に検討するため、SUMO 融合 K32R 変異型 MafA (SUMO-K32R) (図 15a) を作成し、同様の実験を行った。その結果、SUMO-K32R 変異型 MafA はレポーターの活性をコントロールよりも抑制していた (図 15c)。さらに、SUMO-K32R 変異型 MafA ではコロニー形成の誘導能もほとんど見られなかった (図 15b)。また野生型および K32R 変異型、SUMO-K32R 変異型 MafA のタンパク質量に差はなかった (図 15d)。以上のことから、SUMO の結合が MafA の転写活性化能および形質転換能の抑制に十分であることが明らかになった。

ここまでの結果から、MafA は細胞内で転写活性化ドメイン内の 32 番目のリジン残基に SUMO 化修飾を受けること、またこの修飾により MafA の転写活性化能が積極的に抑制されることが明らかになった。この抑制は Gal4-DBD との融合タンパク質でも見られることから、MafA の DNA 結合ドメインが関与しない機構であることが示唆される。さらに MafA の過剰発現による細胞の形質転換能も SUMO 化によって抑制されることから、MafA の転写活性化能により形質転換能が発揮されることが示された (図 30)。

2. Maf タンパク質の SUMO 化とリン酸化による制御

2-1 リン酸化を受けない変異により MafA の SUMO 化が亢進する

図 11 の結果から、MafA の SUMO 化の有無はリン酸化の状態に影響を与えないことが示された。そこで逆に MafA のリン酸化による SUMO 化への影響の解析を行った。DF-1 細胞に野生型および 5A 変異型 MafA をトランスフェクションにより発現させ、回収したタンパク質を Western blot により解析した (図 16a)。

その結果、5A 変異型 MafA は野生型よりもタンパク質量の蓄積が見られた。さらに 5A 変異型 MafA は野生型に比べて、顕著に SUMO 化 MafA の割合が増加していた。そこで、さらに K32R の変異を加えた K32R-5A 変異型を作成し、Western blot を行った所、SUMO 化のバンドは見られなくなった。

次にこれらの変異による転写活性化能への影響を解析するために、3×MARE (#7)/RBGP-luc レポーターを用いて、ルシフェラーゼアッセイを行った。その結果、5A の単独の変異では野生型 MafA の活性化能と有意な差は見られなかった。しかしながら、K32R-5A 変異型 MafA では K32R 単独の変異よりもレポーターに対して高い活性を示した (図 16b)。これらの結果から、5A 変異型 MafA がタンパク質量の蓄積が生じるにも関わらず、野生型 MafA と同程度の転写活性化能を示していた理由として、非リン酸化状態の MafA は SUMO 化を受けやすく、この SUMO の付加によって、転写活性化能が積極的に抑制されているからであると考えられる。

一方で、MafA の C 末端側にある 342 番目のセリンをアラニンに置換した変異型 MafA (S342A) (荒俣博士論文, 2008) を用いて同様の解析を行った。その結果、5A の変異と同様に SUMO 化する MafA の割合がわずかに増加していた (図 15c)。しかしながら、K32R-S342A 変異型 MafA と K32R 変異型 MafA の転写活性化能の間には有意な差は見られなかった (図 15d)。

2-2 MafA による細胞のコロニー形成能の獲得にはリン酸化が必須である

これまでに MafA の S65A や 5A といったリン酸化部位の変異により、MafA の形質転換能が失われるという報告がある (Pouponnot et al., 2006; Rocques et al., 2007)。この原因として、コアクチベーター P/CAF との相互作用や転写活性化能の低下が提唱されているものの、S65A 変異型 MafA の転写活性化能および形質転換能が高いという相反する報告もあり矛盾点もある (Nishizawa et al., 2003)。また本研究においても 5A 変異型 MafA が野生型と同程度の転写活性化能を有していることが示された (図 16b)。一方で、5A 変異型 MafA では SUMO 化が亢進していることを見いだしている (図 16a)。このことから、これまでのリン酸化部位の変異によって形質転換能が失われるという報告が、SUMO 化の影響による結果ではないかと考えた。そこでこれらの変異型 MafA を用いた低密度下での DF-1 細胞のコロニー形成アッセイにより、SUMO 化とリン酸化の形質転換能に対する影響について解析を行った。その結果、野生型 MafA の発現によりコロニ

一の形成は見られたが、5A 変異型 MafA 発現細胞ではコロニー形成の誘導はほとんど見られなかった (図 17a)。また足場非依存性の獲得について検討するために、DF-1 細胞にレトロウイルスベクター (pRV9) を用いて、野生型および 5A 変異型 MafA を発現させ、軟寒天培地中で培養した。その結果、低密度培養時と同様に 5A の変異によりコロニーの形成能は見られなかった (図 17b)。しかしながら、これらの結果に反して 5A 変異型 MafA の発現により図 14b で示した様な特有の細胞形態変化は見られた (図 17c)。これらの結果から、5A の変異によって MafA はコロニー形成能を失うが、形態変化の誘導能は有していると考えられる。これらの結果から、MafA による細胞の形質転換において、コロニー形成能と形態変化は独立に獲得される形質であることが考えられる。また以前の報告にある S65A の変異により形質転換能が強くなるという報告では (Nishizawa et al., 2003)、形態変化を指標にしていたため矛盾が生じたのだと考えられる。

一方、MafA のコロニー形成能が失われることが、リン酸化部位の変異による SUMO 化の亢進の結果であるかを明らかにするために、SUMO 化部位とリン酸化部位に変異を導入した MafA (K32R-5A) を用いて、低密度下および軟寒天培地中でのコロニー形成能の解析を行った。その結果、先のデータと同様に K32R 単独の変異は野生型 MafA の発現よりも効率的にコロニーの形成を誘導した (図 15b、図 17a、図 17b)。しかしながら、K32R 単独の変異導入時よりも転写活性化能が高いにも関わらず (図 16b)、K32R-5A 変異型 MafA によるコロニー形成の誘導は見られなかった (図 17a、図 17b)。一方で、5A 単独の変異の時と同様に細胞の形態変化は見られた (図 17c)。

これらの結果から、MafA の転写活性化能は遺伝子の発現誘導を介して細胞の形態変化を引き起こすが、コロニー形成能には不十分であることが明らかになった。また MafA によるコロニー形成の誘導にはリン酸化を受けることが必須であり、これら 5 カ所のリン酸化は転写活性化能とは独立の機能を有する可能性が示された。

2-3 5A 変異型 MafA の発現は細胞周期の停止を引き起こす

5A 変異型 MafA がコロニー形成能を失う原因を解明するために、野生型および各変異型 MafA 発現細胞の増殖能を解析した。DF-1 細胞にレトロウイルスベクター (pRV9) を用いて、野生型および 5A 変異型 MafA を全面感染させ、通

常の培養条件下で培養し、1日毎に細胞数をカウントした(図 18a)。その結果、野生型 MafA の発現は低密度や軟寒天培地での増殖能を与えるものの、通常の培養条件においてはコントロールよりも細胞の増殖能の低下が見られた(図 18a、赤および青)。このことは、MafA は増殖を促進するのではなく、低密度や足場非依存的条件においての増殖能を与えていると考えられる。一方で、5A 変異型 MafA 発現細胞においては全く増殖が見られなかった(図 18a、緑)。一方で、K32R の変異は野生型および 5A 変異型 MafA に対して、共に影響を与えなかった。さらに DF-1 細胞においても、5A 変異型 MafA は転写活性化能有している(図 16b)。以上のことから、5A 変異型 MafA の発現によって積極的に細胞増殖が抑制されること、またこの増殖の抑制には MafA の転写活性化能には依存しないことが明らかになった。

次に細胞周期に対する MafA の発現の影響を検証するために、野生型および 5A 変異型 MafA 発現細胞を用いて FACS 解析を行った(図 18b)。その結果、野生型 MafA の発現によってコントロールと比べて S 期の割合の低下が見られた。さらに 5A 変異型 MafA 発現細胞では S 期および G2/M 期の細胞の割合が顕著に少なくなっており、G1 期で細胞周期の停止が引き起こされていると考えられた。

これらの結果を合わせて考えると以下のような機構が考えられる(図 30)。MafA は転写活性化能を通して、細胞形態変化やおそらく低密度や軟寒天中での増殖能を細胞に与える。しかし、その一方で、MafA の発現は転写活性化能とは異なる機能により、G1 期での停止を引き起こすと考えられる。この活性は 5A 変異型 MafA の発現により顕著に見られることから、MafA がリン酸化を受けることにより解除されると考えられる。

2-4 5A 変異型 MafA の発現はコロニーの形成を積極的に抑制する

これまでに Maf タンパク質の発現により *p53* の発現が活性化されることが報告されている(Hale et al., 2000)。そのため、5A 変異型 MafA がコロニー形成を誘導できない理由として、*p53* の発現誘導により細胞周期の停止や細胞死の誘導が生じている可能性が考えられる。そこで *p53* 遺伝子のノックアウトマウス由来の MEF 細胞を用いてコロニー形成アッセイを行った(図 19b)。その結果、*p53* 遺伝子のノックアウト MEF 細胞は、低密度培養条件下でコロニーを形成することが見いだされた。一方、野生型 MafA は、CEF や DF-1 細胞に対するのと異なり、野生型 MEF を形質転換しないことがわかっているが、*p53* 遺伝子のノック

アウト MEF 細胞のコロニー形成にも影響を与えなかった。一方で、5A 変異型 MafA の発現によるコロニーの形成の抑制はこの MEF 細胞でも見られた (図 19b)。これらの結果から、この p53 ノックアウト MEF 細胞においても 5A 変異型 MafA による細胞周期の停止が引き起こされていると考えられる。これは 5A 変異型 MafA による細胞周期の停止が p53 の活性には依存しないものであることを示している。また MafA がリン酸化を受けることがこの G1 期停止の活性を打ち消していることも示唆している。

さらに MafA の細胞周期停止を引き起こす活性への転写活性化能の必要性を調べるために、ロイシンジッパードメインに変異を加えた変異型 MafA (L23P または 5A-L23P) (図 19a) を作製し、コロニーの形成抑制能について検討した。これらは DNA 結合ドメイン内のロイシンジッパー構造内にプロリン置換を加えることで、立体構造を破壊し、DNA 結合能を失わせた変異型 MafA である。野生型およびこれらの変異型 MafA の活性を 3×MARE (#7) / RBGP-luc レポーターを用いたルシフェラーゼアッセイにより解析した結果、L23P の変異により MafA の転写活性化能は期待通りに失われていた (図 19d)。またコロニー形成アッセイの結果、転写活性化能のない 5A-L23P 変異型 MafA でも積極的なコロニー形成の抑制が見られた (図 19b)。この結果からも、MafA の発現に伴う細胞周期の停止には、転写活性化能が関係ないことが示唆された。一方、L23P 単独の変異だけでも 5A 変異型ほどではないが、形成されるコロニー数の減少が見られた (図 19b)。Western blot 解析の泳動度から判断すると、L23P 変異型 MafA も野生型と同程度にリン酸化を受けていることから (図 19c)、リン酸化依存的な細胞周期の進行には、部分的に MafA の転写活性化能も必要であると考えられる。

さらに癌細胞由来の HeLa 細胞においても MafA 発現によるコロニー形成能の抑制が生じるかを検討した。HeLa 細胞に野生型および 5A 変異型 MafA をトランスフェクションにより導入し、コロニー形成能を調べた。その結果、ベクターコントロールで HeLa 細胞は多数のコロニーを形成した (図 20)。一方、5A 変異型 MafA の発現により、野生型 MafA の発現時よりもコロニー形成の抑制が見られた (図 20)。また細胞死の誘導の可能性についても検討するために、アポトーシスの実行因子であるカスパーゼの阻害タンパク質である p35 の共発現におけるコロニー形成能についても検討を行った (Resnicoff et al., 1998)。その結果、p35 の発現によりコロニー形成の効率が增加していた (図 20)。これは p35 による細胞死の抑制による結果であると考えられる。一方で、p35 と 5A 変異型 MafA

の共発現によっても、コロニー形成の回復は見られなかった (図 20)。この結果から、MafA の発現による HeLa 細胞のコロニー形成の抑制が細胞死によるものではなく、細胞周期の積極的な停止によるものであると示された。

これらの結果から、MafA の発現により積極的な細胞周期の停止が引き起こされることが明らかになった。その結果として、コロニー形成が抑制されている。またこの細胞周期停止の活性は転写活性化能の高い K32R-5A 変異型や転写活性化能のない変異を持つ 5A-L23P 変異型においても同様にコロニー形成の抑制が見られることから、MafA の転写活性化能に依存しないと考えられる。さらに、この細胞周期停止の活性は 5A 変異型 MafA では顕著に見られるが、野生型 MafA では見られない。そのため、MafA はリン酸化を受けることで S 期への進行を可能にする新たな機能を獲得している可能性が考えられる。

3. Fbxw7 α と Maf タンパク質の相互作用とその役割

3-1 Fbxw7 α による MafB のユビキチン化および分解制御

本研究の結果から、Maf タンパク質のリン酸化が細胞周期の進行に重要であることが示された。これらのリン酸化の機能として、プロテアソームによる分解が報告されている。これまでに GSK3 の阻害や MafA の 65 番目のセリン残基、MafB の 62 番目 (MafA の 57 番目に相当) のスレオニン残基の変異により、Maf タンパク質のポリユビキチン化およびプロテアソームによる分解が起こらなくなることを報告されている (Guo et al., 2009; Mao et al., 2007; Rocques et al., 2007; Tanahashi et al., 2010)。これらの結果から、Maf ファミリー間で保存されている転写活性化ドメイン内のリン酸化が (図 3b)、ユビキチン化を受ける前提となっていると考えられる。しかしながら、Maf タンパク質のユビキチン化を行うユビキチンリガーゼ (E3) は未だ同定されていない。そこで Maf タンパク質のユビキチン化を行う E3 の同定を試みた。候補として、Maf タンパク質の分解がリン酸化に依存的であることから、リン酸化依存的にユビキチン化を促進するという報告があり、細胞周期制御に密接に関わる Skp2、 β TrCP、Fbxw 7 α に注目した。そこでこれらを Maf タンパク質と HeLa 細胞に共発現を行い、Maf タンパク質の解析を行った。その結果、Skp2、 β TrCP ではタンパク質量の変化は見られなかったが、Fbxw 7 α の共発現時に、Fbxw7 α の導入量に依存した MafB の

タンパク質量の減少が見られた (図 21a)。この Fbxw7 α によるタンパク質量の減少は c-Maf でも同様に見られたが(Data not shown)、MafA タンパク質量ではあまり影響を与えなかった。そこでまず MafB のユビキチン化について解析することにした。そこで Fbxw7 α によるポリユビキチン化の促進を HeLa 細胞を用いた *in vivo* ユビキチン化アッセイにより検討したところ、野生型 MafB のポリユビキチン化が Fbxw7 α の過剰発現により促進されることを明らかにした (図 22a)。これらの結果から、MafB は細胞内で Fbxw7 α によりユビキチン化を受け、プロテアソームによって分解されると考えられる。

次にこの MafB タンパク質のポリユビキチン化がリン酸化に依存しているかを検討した。これまでに MafB の分解に関わるリン酸化部位として MafA の GSK3 によるリン酸化部位との間で保存されている 5 カ所のセリン/スレオニン残基が報告されている (図 3b、図 23a) (Tanahashi et al., 2010)。そこでこれらのリン酸化を受けない変異を導入した 5A 変異型 MafB を作成し、同様に DF-1 細胞を用いた *in vivo* ユビキチン化アッセイを行った。その結果、DF-1 細胞内では野生型 MafB はユビキチン化を受けるが、5A 変異型 MafB ではほとんどユビキチン化が見られなかった (図 23b)。また内在性の Fbxw7 α が MafB のユビキチン化を促進しているかを検討するために *fbxw7* 遺伝子のノックダウンを行った結果、野生型 MafB のユビキチン化の減少が見られた (図 23b)。また 5A 変異型 MafB では Fbxw7 α との共導入によるタンパク質量の減少が見られなかった (図 24a)。これらの結果から、MafB はリン酸化依存的に細胞内で Fbxw7 α によりユビキチン化を受けることが、MafB タンパク質の分解促進に重要であることが明らかになった。

3-2 MafB の形質転換能は Fbxw7 の共発現により抑制される

MafB の形質転換能への Fbxw7 α の影響を解析するために、DF-1 細胞を用いて解析を行った。野生型または 5A 変異型 MafB と Fbxw7 α をトランスフェクションにより導入し、低密度培養下でのコロニー形成能を調べた。その結果、野生型 MafB でコロニーの形成の誘導が見られたが、過去の知見と一致して、MafA よりも形質転換の効率が低かった(Nishizawa et al., 2003)。また MafA の場合と同様に 5A の変異によりコロニー形成の誘導はほとんど見られなかった (図 24b、図 24c)。さらに Fbxw7 α の共発現により、5A 変異型 MafB およびコントロールでは影響は見られないが、野生型 MafB 発現時にコロニー形成を有意に抑制した

(図 24b、図 24c)。これらの結果から、Fbxw7 α は MafB の分解を促進することによって、その形質転換能を抑制していると考えられる。

3-3 MafA はリン酸化依存的に Fbxw7 α と結合する

本研究から、MafB が Fbxw7 α によりユビキチン化受け、分解が促進されることが明らかになった。しかしながら、認識に必須であると考えられるリン酸化部位の配列の相同性が高いにも関わらず、Fbxw7 α の共発現による MafA の分解の促進はほとんど見られなかった(図 21b)。そこで、この分解制御の違いが Mafファミリー間の形質転換能の違いを生むのではないかと考えた。これまでに、ヒトの神経芽細胞腫内で Fbxw7 がその基質のひとつである Aurora A と相互作用することにより、Aurora A のキナーゼ活性とは関係なく Fbxw7 の機能が抑制され、その結果、Fbxw7 の別の基質である N-Myc タンパク質が安定化されて細胞増殖が促進されるという報告がある(Otto et al., 2009)。この知見から、リン酸化を受けた Maf タンパク質、特に分解されにくい MafA が Fbxw7 と相互作用してその機能を抑制することにより、細胞増殖を促進しているのではないかと考えた(図 25b)。

この可能性を検証するために、まず免疫沈降実験により野生型または 5A 変異型 MafA と Fbxw7 α の相互作用を解析した。HA-MafA と FLAG-Fbxw7 α を HeLa 細胞に発現させ、抗 HA 抗体で免疫沈降後、Western blot により検出した。その結果、野生型 MafA では Fbxw7 α を共沈させることができたが、5A 変異型 MafA での共沈は検出できなかった(図 25a)。さらにリン酸化 MafA と Fbxw7 α との相互作用により、Fbxw7 α の活性が抑制されるかを検証するために、MafA の過剰発現系における Fbxw7 α の基質のひとつである c-Myc タンパク質量の変化の解析を試みた。野生型または 5A 変異型 MafA と c-Myc を DF-1 細胞に共発現し、細胞抽出液を Western blot により解析した。その結果、野生型 MafA を発現した際に c-Myc タンパク質が蓄積することが明らかになった(図 26a)。さらに c-Myc だけでなく Fbxw7 α の他の基質である CyclinE についても野生型 MafA の過剰発現により、タンパク質の蓄積が生じることを見いだしており、この蓄積が野生型 MafA による Fbxw7 α の機能阻害の結果であることがすでに示されている(植田修士論文, 2010)。また野生型 MafB の過剰発現においても c-Myc タンパク質の蓄積が見られることから(Data not shown)、この Fbxw7 α の機能を阻害する機能は Maf タンパク質の間で共通の機能である可能性が考えられる。

これらの結果から、MafA がリン酸化依存的に Fbxw7 α と相互作用することで Fbxw7 α の活性を阻害し、Fbxw7 α の基質の蓄積を介して細胞周期の進行を促進している可能性が示唆された (図 25b)。

3-4 Fbxw7 の機能阻害は 5A 変異型 MafA でもコロニー形成を誘導する

MafA のリン酸化によるコロニー形成能の獲得の分子機構が Fbxw7 α の活性阻害によるものであるかを検討するために、野生型または 5A 変異型 MafA と *fbxw7* 遺伝子のノックダウンベクターをトランスフェクションにより DF-1 細胞に発現させ、低密度培養下でのコロニー形成能を調べた (図 26b)。その結果、以前と同様に 5A 変異型 MafA ではコロニーの形成がほとんど見られなかった。しかし、*fbxw7* 遺伝子のノックダウンによる機能阻害によって、5A 変異型 MafA 発現時にもコロニー形成能の野生型と同レベルへの回復が見られた (図 26b)。コントロールでも *fbxw7* 遺伝子のノックダウンによりコロニー形成の促進が多少見られるが、これは Fbxw7 が癌抑制因子として知られていることから、Fbxw7 の機能阻害により細胞増殖の亢進が起こったためと考えられる。

さらに MafA 発現細胞において Fbxw7 α の活性の阻害がコロニー形成能に必須であることを調べるために、すでにコロニー形成能を有する MEF^{p53^{-/-}}細胞に野生型または 5A 変異型 MafA と Fbxw7 α の共発現を行い、コロニー形成能の解析を行った。その結果、野生型 MafA においても Fbxw7 α との共発現により、5A 変異型 MafA と同様にコロニーの形成が抑制された (図 27)。一方、5A 変異型 MafA では Fbxw7 α の有無に関わらずコロニーの形成が抑制された (図 27)。この結果は、過剰発現した MafA が形質転換能を発揮する際に、内在性の Fbxw7 α との相互作用を介して機能を阻害することが、細胞周期を進行させ、コロニー形成能を獲得させることに必須であることを示している。

これらの結果を総括すると、以下のことが明らかになった。MafA タンパク質の発現は細胞増殖に対して抑制的である。そのため、MafA が形質転換能を発揮するためには、リン酸化依存的な相互作用を介した Fbxw7 α の活性抑制が必須であると考えられる。Fbxw7 α を過剰発現した場合には野生型 MafA によっても p53 ノックアウト MEF 細胞のコロニー形成が抑制されたのは、Fbxw7 α の機能を阻害しきれないためと考えられる。さらに MafB でも DF-1 細胞のコロニー形成能を Fbxw7 α の共発現により抑えられたが、この原因として MafB が分解されるこ

とだけでなく、MafA と同様に Fbxw7 α の活性を抑えきれなかった可能性も考えられる。これらをふまえて考えると、本研究で見いだした MafA の G1 期停止の活性と Fbxw7 α の阻害による細胞周期の進行は Maf ファミリーに保存された機能であり、Fbxw7 α による分解のされやすさが形質転換能の強さに違いを与えているのかもしれない。

4. MafA の機能複合体の同定

これまでの結果から、Fbxw7 α が MafA とリン酸化依存的に相互作用することが MafA の持つ形質転換能に必須であると考えられる。しかしながら、MafA の転写活性化能がなければ、形質転換は引き起こされない。また Fbxw7 α 以外の他のタンパク質との相互作用も MafA が形質転換能を発揮する際に関与している可能性も否定できない。一方で、5A 変異型 MafA の発現による細胞周期の停止の分子機構も明らかになっておらず、図 18 の結果から考えるに転写活性化能とは関係のない機能であると考えられる。これらの分子機構を明らかにするために、細胞内で MafA と安定に結合する機能的な複合体の精製を試みた。その結果、図 28 に示す様に複数の特異的なシグナルの検出に成功した。また植物ユニットの協力によりこれらのバンドを質量分析により同定した結果、FACT の複合体および DNA-PKc と Ku の複合体などであることが明らかになった。これらの因子が、実際に MafA の機能とどう関与するかについては、現在解析中である。

< 考察 >

MafA の SUMO 化による転写活性および形質転換能の抑制

本研究の結果から、Mafファミリーである MafA、MafB、c-Maf が細胞内で転写活性化ドメインの保存されたリジン残基に SUMO 化修飾を受けることが明らかになった (図 6b、図 8b)。また近年、Maf タンパク質が SUMO 化修飾を受けることも相次いで報告されている (Leavenworth et al., 2009; Lin et al., 2010; Roger et al., 2010; Shao & Cobb, 2009; Tillmanns et al., 2007)。MafA は SUMO の 3 種類のアイソフォームの全てが結合可能 (図 7b) であることを示したが、SUMO-2 と SUMO-3 はその一次構造がほぼ完全に一致しているので、機能に違いはないと考えられている。一方で、SUMO-1 と SUMO-2, 3 のアミノ酸配列が 50% ほどしか相同性がないことから、SUMO のアイソフォームの違いによって、修飾による生理機能の違いがある可能性があると考えられる。

一方、本研究では SUMO 化されない変異体を用いることによって、SUMO 化修飾により MafA の転写活性化能が抑制されることを明らかにした (図 9、図 10)。また DF-1 細胞を用いた低密度下または軟寒天培地中でのコロニー形成を指標として形質転換能を解析した結果、K32R 変異型 MafA は野生型 MafA よりも強い形質転換能を有していた (図 15b、図 17a、図 17b)。これは転写活性化能の増加と一致している。またこの結果は、Maf タンパク質の形質転換能に転写活性化因子としての機能が必須であるという過去の知見と一致している (Kataoka et al., 1996; Pouponnot et al., 2006)。

また Maf ファミリーの SUMO 化修飾による転写活性への影響は、c-Maf に関しても MafA 同様に K33R 変異型 c-Maf は野生型と比べて転写活性化能が高いことが明らかとなった (図 9b)。しかし、MafB に関しては 32 番目のリジン残基の変異による転写活性化能への影響は見られなかった。MafB は少なくとも *in vitro* の SUMO 化系では MafA、c-Maf には保存されていない 287 番目のリジン残基も SUMO 化されることが示されており、この両リジン残基に変化を導入することで高い転写活性を示すことが報告されている (Tillmanns et al., 2007)。このことから、本研究の結果では K32R だけの変異では SUMO 化を受けた MafB は全く見られなくなるが、MafB の転写活性への影響は見られなかった可能性が考えられる。

Maf タンパク質の SUMO 化による転写調節機構

本研究から、MafA の転写活性化ドメインと Gal4 融合タンパク質でも SUMO 化の影響を受けることから DNA の結合能の変化などとは無関係に、転写活性化能の変化だけで MafA の SUMO 化による転写活性化能の抑制機構を説明できると考えられる。しかしながら、図 5a の様に細胞内で Maf タンパク質が SUMO 化される割合は、全 Maf タンパク質に比べて極めて少なく、転写活性化能の抑制機構は不明な点が多い。このような傾向は、他の SUMO 化修飾を受ける転写因子でもみられており、その説明としていくつかの説が提唱されている。

この制御機構の有力な可能性として、SUMO 化修飾による他のタンパク質との相互作用能の変換が考えられる。例えば、SUMO 化修飾を受けた Elk-1 には HDAC1 が相互作用することで選択的に DNA 上へリクルートされ、Elk-1 の結合部位周辺を特異的にヒストンの脱アセチル化を誘導することで効率的な転写抑制を行っている(Gill, 2005)。Maf ファミリーに関してもこのように、HDAC の様なクロマチンレベルで転写を抑制するようなレプレッサーと SUMO 化依存的に相互作用が可能になり、その機能により効率的に転写の抑制を行っているのではないかと考えられる。我々はそのような候補として、MafA が ARIP4 と結合することを見いだしている(Data not shown)。ARIP4 は SNF ファミリーのクロマチンリモデリングファクターであり、転写因子 Ad4BP/SF-1 の SUMO 化特異的に結合することが報告されている(Ogawa et al., 2009)。

2 つ目は SUMO 化修飾を受けることで別の修飾が印として残され、この印によって転写活性が抑制される可能性である。これまでに MafA の C 末端側の Ser342 が Dyrk1A によってリン酸化され、この修飾によってインスリン遺伝子プロモーターの強制的な転写活性化が抑制される事が示唆されている(荒俣博士論文, 2008)。また前述の ARIP4 は Dyrk1A と複合体を形成していることも知られており、ARIP4/Dyrk1A 複合体が Maf タンパク質の SUMO 化による機能を担っている可能性が考えられる。この Ser342 のリン酸化が SUMO 化されたことの痕跡となって MafA の転写活性を抑制している可能性がある。S342A 変異型 MafA ではこの一連の流れが遂行できなくなるため、SUMO 化の割合が増加している様に見えるのかもしれない(図 16c)。

SUMO 化修飾依存的な MafA の修飾

図 7b 下図で示した 抗 FLAG 抗体を用いた Western blot の結果で、60 kDa の

SUMO 化 MafA よりもさらに高分子量の約 80 kDa のシグナルも検出された。この修飾は SUMO の強制発現時に野生型 MafA でのみ見られることから、MafA は 32 番目のリジン残基の SUMO 化依存的にさらなる修飾を受けている可能性が示された。その候補として、Lys32 にポリ SUMO 化がおきている可能性（ポリ SUMO 化）と、Lys32 の SUMO 化依存的にさらに別のリジン残基に SUMO が結合している可能性（マルチ SUMO 化）が考えられる。

ポリ SUMO 化については、これまでに SUMO-2/3 はユビキチン化同様にポリ化する可能性が示されている(Tatham et al., 2001)。しかしながら、SUMO-1 はポリ化しないと考えられており、SUMO-1 の強制発現時にもこの修飾が検出されることからポリ SUMO 化の可能性は低いと考えられる。

一方のマルチ SUMO 化については、MafB がファミリー間で保存された 32 番目だけでなく 287 番目のリジン残基も SUMO 化修飾を受けることがすでに報告されている(Tillmanns et al., 2007)。しかしながら、MafA にはこのリジン残基は保存されていない。また今回の結果から、修飾されたバンドの数から考えて、さらなる修飾は複数であると考えられる。

一方で、この実験系ではプロテアソーム阻害剤の MG132 処理を行っているため、SUMO 化ではなくユビキチン化が生じている可能性も考えられる。MafA がユビキチン化されるという報告があることから(Guo et al., 2009; Rocques et al., 2007)、32 番目のリジン残基に結合するのではないかと考えられる。しかしながら、K32R の変異が MafA タンパク質の安定性に寄与しないこと (図 11b)、またそれだけではこの修飾を検出するための SUMO の強制発現の必要性が説明できないことから、SUMO 化依存的に基質へのユビキチン化を行うユビキチンリガーの可能性を考えた。SUMO 化を認識して基質をユビキチン化する E3 として STU_BL (SUMO-Targeted Ubiquitin Ligase) ファミリーが知られており(Prudden et al., 2007)、MafA のユビキチン化を制御している可能性が考えられる。またこの修飾がユビキチン化であったとしても、ユビキチン・プロテアソーム系とは異なる機能を担っている可能性も考えられる。

MafA の SUMO 化と協調的な転写活性化制御

本研究から Maf タンパク質の標的遺伝子のプロモーターの多くに対して K32R 変異型 MafA は野生型よりも高い活性化能を発揮した。しかしながら、K32R の変異による転写活性化能の増強が、少なくとも MafA 単独での導入では

見られない IL-4 遺伝子の様なプロモーターの存在が明らかになった (図 13b)。しかしながら、これらのプロモーターは図 13a に示す様に複数の転写活性化因子により制御されていることが明らかになっている。例えば、インスリン遺伝子のプロモーターは MafA、Pdx1、Beta2 が結合し協調的に働くことで相乗的な転写活性化が生じる(Aramata et al., 2005)。このような協調的な転写活性化の例は他にも多く存在し、Maf ファミリーが関わる例だけでも IL-4 遺伝子 (c-Maf と NF-AT) や 2 型コラーゲン遺伝子 (c-Maf と Sox9)、グルカゴン遺伝子 (MafB と Pax6) などが知られている (図 13a) (Gauthier et al., 2007; Huang et al., 2002; Li et al., 1999)。しかしながら、これらの組織特異的な遺伝子は Maf タンパク質が発現していても、他の組織では発現していない。このように生体内での適切な遺伝子の発現制御を可能にしているのが、協調的な転写制御であると考えられる。

これまでの研究から、ステロイドホルモンレセプターを含む複数の転写因子の転写活性化ドメインや DNA 結合ドメイン以外に、他の転写因子と協調的に働くために必要な領域として、Synergy control motif と名付けられた配列が見いだされている (図 29) (Iniguez-Lluhi and Pearce, 2000)。この配列に変異を導入することにより転写活性化能が上昇することから、この領域に相互作用する Synergy control factor (SCF) と呼ばれる仮想的な因子が存在し、積極的に転写活性を抑制しているのではないかと考えられてきた。さらに Synergy control motif の中に SUMO 化コンセンサス配列が含まれていることも報告され(Subramanian et al., 2003)、この協調的な転写活性化を引き起こす機構の例として、SUMO 化修飾の関与が考えられている。そのため、Maf タンパク質の SUMO 化による活性の抑制が不適切な遺伝子の発現を抑え、協調的に働く因子がある際にのみ、適切な遺伝子の発現が可能になると考えられる。

この可能性を支持するデータとして、ニワトリ胚の頭部外胚葉に MafA 強制発現させ内在性の δ -crystallin 遺伝子の発現を異所的に誘導させることのできる実験系を用いた解析結果がある(Ogino and Yasuda, 1998)。この系では、野生型 MafA の導入された細胞では一部の細胞でしか誘導されないが、K32R 変異型では DNA の導入されたほぼ全ての細胞で δ -crystallin 遺伝子の異所的な誘導が見られた (Kanai et al, 2010)。この水晶体特異的な δ -crystallin 遺伝子の発現は MafA と Sox2 が協調的に働くことで強く誘導されることが明らかになっており (Shimada et al., 2003)、MafA 単独の導入では協調的に働く Sox2 の発現が限られた領域にしかな

いことから、野生型 MafA の単独の導入だけでは δ -crystallin 遺伝子を広範囲の細胞で誘導するためには不十分であると考えられる。一方、K32R 変異型 MafA では SUMO による抑制が行われないうために、異所的な発現を高確率で起こせるのではないかと考えられる。もしこれらの仮説が正しければ、複数の転写因子が協調的に働くプロモーターによって制御されている遺伝子の発現は転写因子の SUMO 化によって制御されている可能性がある。そのため SUMO 化による転写抑制の欠如は、生体内で異所的な遺伝子の発現を誘発し、結果として細胞分化の異常や発癌などを引き起こすのではないかと考えられる。

MafA のリン酸化とその生物学的活性

本研究でも示された様に、MafA のリン酸化はその活性の調節に重要である。例えば、ニワトリの S65A 変異型 MafA が MARE レポーターの活性化と CEF の形質転換能が野生型よりも高いことを報告されている(Nishizawa et al., 2003)。その一方で、65 番目のセリン残基のリン酸化やリン酸化に続く GSK3 によるリン酸化が MafA の転写活性および CEF の形質転換能必須であるという報告もある(Pouponnot et al., 2006; Rocques et al., 2007)。その他にも、MafA のリン酸化が生物学的活性に与える影響について、一致しない報告がある。例えば、S65A 変異型 MafA は野生型よりも神経網膜細胞 (NR) 特異的な QR1 遺伝子プロモーターの活性化、NR 内での内在性 QR1 とクリスタリン遺伝子の発現および NR のレンズ様細胞への分化転換活性が低いと報告されている(Benkhelifa et al., 2001)。それに対して、水晶体細胞内での α A クリスタリン遺伝子の発現や NR での δ クリスタリン遺伝子の発現誘導など S65A 変異型 MafA が野生型よりも活性を増加させる例もある(Ochi et al., 2003)。

MafA のリン酸化に関して、複数の研究者間で一致している機能のひとつにプロテアソームによる分解がある。MafA のセリン 65 番目が未同定のリン酸化酵素によりリン酸化を受けた後、GSK3 により 4 カ所 (Ser61、Thr57、Thr53、Ser49) がリン酸化され、プロテアソームにより分解されることが報告されている。またこれらの GSK3 によるリン酸化は MafB および c-Maf にも同様に生じ、プロテアソームにより分解されることを明らかにされている(Rocques et al., 2007)。

MafA のリン酸化と SUMO 化の関係

本研究から、SUMO 化を受けない変異型 MafA (K32R) がリン酸化状態やタ

ンパク質の安定性に影響を与えないにも関わらず、野生型 MafA よりも高い転写活性を持つことを示した。また他のグループも SUMO 化により MafA の転写活性が抑制されることを報告している(Shao & Cobb, 2009)。一方で、5A 変異型 MafA はプロテアソームによる分解を受けないことで、タンパク質の量が増加する(Han et al., 2007; Rocques et al., 2007)。しかしながら、5A の変異は MafA の MARE を含むレポーターに対する活性化に有意な影響を与えなかった(図 16b)。この理由として、おそらく 5A 変異型 MafA は野生型 MafA と比べて SUMO 化の割合が増加しているからだと考えられる(図 16a)。この考えを支持するように、SUMO 化、リン酸化を共に受けない変異型 MafA (K32R-5A) は、K32R 単独の変異型 MafA よりも高い活性を示した(図 16b)。それゆえ MafA のリン酸化は本質的な転写活性化能には関与せず、MafA タンパク質の安定性制御と SUMO 化による間接的な転写活性の制御を行っており、結果的に転写活性が低くなっていたと考えられる。この点を考慮すると、MafA のリン酸化部位の変異による影響が報告によって一致しない点が、本研究で示された様に MafA がリン酸化により複数の活性が制御されており、SUMO 化や転写活性化能に依存しない活性(図 31b) (G1 期停止や Fbxw7 の阻害) などによる影響を考慮に入れていなかったためではないかと考えられる。

MafA の発現による細胞周期の停止について

本研究から、5A および K32R-5A 変異型 MafA が細胞の形態変化を引き起こす能力を有するにも関わらず、コロニー形成能を失っていることを見いだした(図 17a、図 17b)。さらに MafB においても 5A の変異によってコロニー形成能は失われていた(図 24b、図 24c)。またこれまでに MafA が Maf ファミリーの中で、転写活性化能が最も弱いにも関わらず、最も強い形質転換能を有することから、MafA が転写活性化能とは異なる別の機能を持つことが予想されていた(Nishizawa et al., 2003)。これらのことから、Maf タンパク質のリン酸化は転写活性化能とは別の機能を Maf タンパク質に与え、この機能が細胞を増殖させるのに必須であるのではないかと考えられる。本研究から、MafA の発現により細胞の増殖能の低下が見られ(図 18a)、さらに 5A 変異型 MafA が発現することにより、顕著に G1 期で細胞周期が停止することを見いだした(図 18b)。生理的には Maf タンパク質がほとんどの細胞で分化制御因子として働くことを考えると、その機能として G0 期に細胞周期を停止させる活性を持つことは考えやすい。実

際に MafA がニワトリの水晶体の分化誘導時に Cdk インヒビターである p27kip1 の発現を誘導して、細胞周期を停止することが報告されている(Reza et al., 2007)。しかしながら、DNA 結合能を失った L23P 変異型 MafA を用いた図 19b の結果から、この細胞周期の停止が、MafA の転写活性化能には依存しない可能性が示された。そのため、この細胞周期停止の機能として、他のタンパク質との複合体を形成することにより発揮されるものである可能性が考えられる。図 28 に示した様に、本研究では細胞内で MafA の作る複合体の精製を行い、DNA-PKc などの機能的な複合体の精製に成功している。しかしながら、実際にこれらの因子との相互作用が MafA の機能にどのように関わっているかは今後、解析を進める必要がある。

Fbxw7 による MafB のポリユビキチン化と分解

これまでに MafB がリン酸化依存的にポリユビキチン化を受け、プロテアソームにより分解されることが報告されていたが、ユビキチン化を誘導する E3 は同定されていなかった。本研究では、MafB が SCF 複合体の基質認識サブユニットのひとつである Fbxw7 α を MafB と細胞に共発現させることで、MafB タンパク質の量を減少させることを明らかにした(図 21a、図 24a)。またこの MafB タンパク質の Fbxw7 α による減少が、MafB の転写活性化ドメイン内のリン酸化依存的なユビキチン化によるものであることも明らかにした(図 22a、図 23b)。さらに MafB の形質転換能が Fbxw7 α との共発現により抑制されることも明らかにした(図 24b、図 24c)。これらの結果は、Fbxw7 α による MafB タンパク質の分解を介して、MafB の形質転換能を抑制していることを示している。また c-Maf においても Fbxw7 α との共発現により分解が促進することから、Fbxw7 α の基質となって分解され、形質転換能が抑制されることが期待される。

リン酸化 MafA による Fbxw7 α の活性制御と細胞周期への影響

本研究から、5A 変異型 MafA の発現により G1 期で細胞周期が停止することが明らかになった(図 18b)。野生型 MafA も細胞周期を抑制する傾向があり、そのためコロニー形成能を発揮するためには、S 期の進行を促進しなければならない。本研究から、Fbxw7 α の共発現による MafA タンパク質の分解はほとんど見られなかったが、MafA のリン酸化依存的な Fbxw7 α との相互作用があることが明らかになった(図 21a、図 25a)。図 4 に示す様に、S 期の進行に関わる c-Myc

などのタンパク質は Fbxw7 α により分解されることが知られており、リン酸化 MafA の過剰発現時により、Fbxw7 α の活性が阻害されたことで c-Myc タンパク質の蓄積が見られたと考えられる (図 26a)。またロックダウンによる Fbxw7 の機能阻害によって、5A 変異型 MafA のコロニー形成能が野生型 MafA と同レベルまで回復した (図 26b)。これらの結果から、MafA の発現により引き起こされる細胞周期の停止は、リン酸化 MafA が Fbxw7 α との相互作用を介した Fbxw7 α の活性を抑制により c-Myc などの基質タンパク質の蓄積を促し、結果として形質転換を引き起こすのではないかと考えられる (図 31b)。

本研究のまとめ

本研究では、リン酸化および SUMO 化を受けない変異型 MafA を用いることで、MafA の発現が細胞周期の停止を引き起こすことを見だし、リン酸化を受けることで転写活性化能とは非依存的に増殖停止を解除することを見いだした (図 30)。それゆえ、MafA は細胞の形質転換を引き起こす転写活性化能およびリン酸化依存的な新規機能の異なる 2 つの機能を有していると考えられる。前者は細胞の形態変化の誘導に寄与し (図 17c)、後者は細胞周期を進行させるために寄与している (図 18b)。さらに MafA のリン酸化が SUMO 化を阻害して、MafA の転写活性化能を増加させている可能性も示した (図 16a、図 16b)。これらの結果はリン酸化が MafA タンパク質の安定性だけでなく、本研究で見いだされた MafA の発現による細胞周期の進行にも重要であることを示している。

MafA は β 細胞特異的な遺伝子の活性化因子であり、 β 細胞の成熟と機能に重要な因子で、 β 細胞の再生を促進するツールとしても使われる (Zhou et al., 2008)。しかしながら、糖尿病の遺伝子治療のために MafA を使用する際に、腫瘍形成のリスクを考慮しなければならない。もし 5A 変異型 MafA が β 細胞の再生能を有するのであれば、細胞周期の積極的な停止および SUMO 化による不必要な遺伝子の発現の抑制を伴うため、遺伝子治療において腫瘍形成のリスクを排除した有効な糖尿病治療のツールになるかもしれない。

また多発性骨髄腫の細胞株で発現する MafB、c-Maf も GSK3 によってリン酸化を受けている (Rocques et al., 2007)。それゆえ、本研究より見いだされたリン酸化の阻害による細胞増殖の抑制が、これらの癌細胞においても発揮されるかを検討する必要がある。もしそうであれば、GSK3 もしくは未同定のプライミングキナーゼの阻害剤が Maf タンパク質の過剰発現を伴う多発性骨髄腫や免疫芽球

性 T 細胞性リンパ腫などの腫瘍の治療に有効かもしれない。

最後に、本研究では MafA が単なる転写活性化因子ではなく、複数の翻訳後修飾（リン酸化や SUMO 化）の制御下にある多様な機能を有している因子であることを明らかにした。これらの修飾と Maf タンパク質の生理機能との関連が多く報告されていることから、本研究による分子的な解明から見いだされた Maf タンパク質の機能が細胞分化、細胞障害、悪性の形質転換などに関与すると期待される。そのため、これらの修飾機構の制御解明を行うことが、遺伝子治療や癌治療において重要になると考えられる。

< 謝辞 >

本研究を行なうに当たって多くの方々のご指導、ご尽力がありました。特に高橋淑子教授および直接指導にあたってくださった片岡浩介准教授に心より感謝と敬意の意を表します。この研究室で過ごした5年間は非常に刺激的で、自分の能力を向上することができたと確信しています。高橋淑子教授には、いつも良く目をかけていただき、物事の考え方から発生生物学の面白さなど多くのことをご指導してくださったこと大変感謝します。また片岡浩介准教授には、いつも丁寧な指導をしていただき、研究手法や考え方だけでなく、文章の書き方、プレゼンテーションなど多くのことを学ばせていただき、今後の研究人生において書かすことのできない能力を身につけることができました。斎藤大介助教、田所竜介助教には、公私共にいつも相談にのっていただき、プラスミドの提供や実験手法の指導していただきました。また発生ゲノミクス荻野肇准教授、越智陽城助教には、Maf 研究の先輩としての助言だけでなく、海外へ視野を向けることの大切さと、一步を踏み出す一押しをしてくださいました。また秘書の酒井洋子さん、堀内由美さんをはじめ、励ましあい、お互いを高めあった全ての研究室のメンバーに感謝します。

さらに共同研究を行った情報通信研究機構・大阪大学の小川英知博士にはツールの提供から生化学的な実験手法を指導していただきました。筑波大学の柳澤純教授にはプラスミドを提供していただきました。また本学の細胞増殖学講座の佐藤みずほさんにはFACS 解析を、植物ユニットの倉田理恵さん、深尾陽一郎准教授には質量分析の際にお世話になりました。また動物遺伝子機能学講座の松田永照助教には細胞を提供していただきました。

またそれだけではなく、学会等で出会った富山大学の熊芳明教授、理化学研究所の倉永英里奈チームリーダー、神戸大学の井垣達吏准教授をはじめとする多くの方々には、名前を全てあげきれませんが、助言、助力与えていただき、すばらしい研究生活をおくれたことを本当に感謝します。

最後にこの5年間支えてくれた家族を含めた全ての方々に、そしてこれからも支え合っていく全ての人に感謝いたします。

< 参考文献 >

Aramata, S., Han, S. I., Yasuda, K., and Kataoka, K. (2005). Synergistic activation of the insulin gene promoter by the beta-cell enriched transcription factors MafA, Beta2, and Pdx1. *Biochim Biophys Acta* 1730, 41-46.

Artner, I., Bianchi, B., Raum, J. C., Guo, M., Kaneko, T., Cordes, S., Sieweke, M., and Stein, R. (2007). MafB is required for islet beta cell maturation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 3853-3858.

Artner, I., Le Lay, J., Hang, Y., Elghazi, L., Schisler, JC, Henderson, E, Sosa-Pineda, B, Stein, R. MafB: an activator of the glucagon gene expressed in developing islet alpha- and beta-cells. *Diabetes* 2006;55(2):297-304.

Bachant, J., Alcasabas, A., Blat, Y., Kleckner, N., and Elledge, S. J. (2002). The SUMO-1 isopeptidase Smt4 is linked to centromeric cohesion through SUMO-1 modification of DNA topoisomerase II. *Mol Cell* 9, 1169-1182.

Benkhalifa, S, Provot, S, Nabais, E, Eychène, A, Calothy, G, Felder-Schmittbuhl, MP. Phosphorylation of MafA is essential for its transcriptional and biological properties. *Mol Cell Biol* 2001;21(14):4441-52.

Bessant, DA, Payne, AM, Mitton, KP, Wang, QL, Swain, PK, Plant, C, Bird, AC, Zack, DJ, Swaroop, A, Bhattacharya, SS. A mutation in NRL is associated with autosomal dominant retinitis pigmentosa. *Nat Genet* 1999;21(4):355-6.

Bourane, S, Garces, A, Venteo, S, Pattyn, A, Hubert, T, Fichard, A, Puech, S, Boukhaddaoui, H, Baudet, C, Takahashi, S, Valmier, J, Carroll, P. Low-threshold mechanoreceptor subtypes selectively express MafA and are specified by Ret signaling. *Neuron* 2009;64(6):857-70.

Chesi, M., Bergsagel, P. L., Shonukan, O. O., Martelli, M. L., Brents, L. A., Chen, T., Schrock, E., Ried, T., and Kuehl, W. M. (1998). Frequent dysregulation of the c-maf proto-oncogene at 16q23 by translocation to an Ig locus in multiple myeloma. *Blood* 91, 4457-4463.

Chng, WJ, Glebov, O, Bergsagel, PL, Kuehl, WM. Genetic events in the pathogenesis of multiple myeloma. *Best Pract Res Clin Haematol* 2007;20(4):571-96.

Deshaies, RJ. SCF and Cullin/Ring H2-based ubiquitin ligases. *Annu Rev Cell Dev Biol* 1999;15(0):435-67.

Desterro, J. M., Rodriguez, M. S., and Hay, R. T. (1998). SUMO-1 modification of I κ B inhibits NF- κ B activation. *Mol Cell* 2, 233-239.

Fu, S, Bottoli, I, Goller, M, Vogt, PK. Heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor, a v-Jun target gene, induces oncogenic transformation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999;96(10):5716-21.

Gauthier, B. R., Gosmain, Y., Mamin, A., and Philippe, J. (2007). The beta-cell specific transcription factor Nkx6.1 inhibits glucagon gene transcription by interfering with Pax6. *Biochem J* 403, 593-601.

Gill, G. (2005). Something about SUMO inhibits transcription. *Curr Opin Genet Dev* 15, 536-541.

Girdwood, D., Bumpass, D., Vaughan, O. A., Thain, A., Anderson, L. A., Snowden, A. W., Garcia-Wilson, E., Perkins, N. D., and Hay, R. T. (2003). P300 transcriptional repression is mediated by SUMO modification. *Mol Cell* 11, 1043-1054.

Grandori, C, Cowley, SM, James, LP, Eisenman, RN. The Myc/Max/Mad network and the transcriptional control of cell behavior. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2000;16(0):653-99.

Guo, S, Burnette, R, Zhao, L, Vanderford, NL, Poitout, V, Hagman, DK, Henderson, E, Ozcan, S, Wadzinski, BE, Stein, R. The stability and transactivation potential of the mammalian MafA transcription factor are regulated by serine 65 phosphorylation. *J Biol Chem* 2009;284(2):759-65.

Gupta-Rossi, N, Le Bail, O, Gonen, H, Brou, C, Logeat, F, Six, E, Ciechanover, A, Israël, A. Functional interaction between SEL-10, an F-box protein, and the nuclear form of activated Notch1 receptor. *J Biol Chem* 2001;276(37):34371-8.

Hale, TK, Myers, C, Maitra, R, Kolzau, T, Nishizawa, M, Braithwaite, AW. Maf transcriptionally activates the mouse p53 promoter and causes a p53-dependent cell death. *J Biol Chem* 2000;275(24):17991-9.

Han, S. I., Aramata, S., Yasuda, K., and Kataoka, K. (2007). MafA stability in pancreatic beta cells is regulated by glucose and is dependent on its constitutive phosphorylation at multiple sites by glycogen synthase kinase 3. *Mol Cell Biol* 27, 6593-6605.

Hanamura I, Iida S, Akano Y, Hayami Y, Kato M, Miura K, Harada S, Banno S, Wakita A, Kiyoi H, Naoe T, Shimizu S, Sonta SI, Nitta M, Taniwaki M, Ueda R. (2001). Ectopic expression of MAFB gene in human myeloma cells carrying (14;20)(q32;q11) chromosomal translocations. *Jpn J Cancer Res.* 92:638-644

Hardeland, U., Steinacher, R., Jiricny, J., and Schar, P. (2002). Modification of the human thymine-DNA glycosylase by ubiquitin-like proteins facilitates enzymatic turnover. *Embo J* 21, 1456-1464.

Harper, JW, Burton, JL, Solomon, MJ. The anaphase-promoting complex: it's not just for mitosis any more. *Genes Dev* 2002;16(17):2179-206.

Hershko, A, Ciechanover, A, Varshavsky, A. Basic Medical Research Award. The ubiquitin system. *Nat Med* 2000;6(10):1073-81.

Ho, IC, Hodge, MR, Rooney, JW, Glimcher, LH. The proto-oncogene c-maf is responsible for tissue-specific expression of interleukin-4. *Cell* 1996;85(7):973-83.

Huang, W., Lu, N., Eberspaecher, H., and De Crombrughe, B. (2002). A new long form of c-Maf cooperates with Sox9 to activate the type II collagen gene. *J Biol Chem* 277, 50668-50675.

Hubbard, EJ, Wu, G, Kitajewski, J, Greenwald, I. sel-10, a negative regulator of lin-12 activity in *Caenorhabditis elegans*, encodes a member of the CDC4 family of proteins. *Genes Dev* 1997;11(23):3182-93.

Hurt, E. M., Wiestner, A., Rosenwald, A., Shaffer, A. L., Campo, E., Grogan, T., Bergsagel, P. L., Kuehl, W. M., and Staudt, L. M. (2004). Overexpression of c-maf is a frequent oncogenic event in multiple myeloma that promotes proliferation and pathological interactions with bone marrow stroma. *Cancer Cell* 5, 191-199.

Iniguez-Lluhi, J. A., and Pearce, D. (2000). A common motif within the negative regulatory regions of multiple factors inhibits their transcriptional synergy. *Mol Cell Biol* 20, 6040-6050.

Jamieson, RV, Perveen, R, Kerr, B, Carette, M, Yardley, J, Heon, E, Wirth, MG, van Heyningen, V, Donnai, D, Munier, F, Black, GC. Domain disruption and mutation of the bZIP transcription factor, MAF, associated with cataract, ocular anterior segment dysgenesis and coloboma. *Hum Mol Genet* 2002;11(1):33-42.

Johnson, E. S. (2004). Protein modification by SUMO. *Annu Rev Biochem* 73, 355-382.

Johnson, E. S., and Blobel, G. (1999). Cell cycle-regulated attachment of the ubiquitin-related protein SUMO to the yeast septins. *J Cell Biol* 147, 981-994.

Kajihara, M, Sone, H, Amemiya, M, Katoh, Y, Isogai, M, Shimano, H, Yamada, N, Takahashi, S. Mouse MafA, homologue of zebrafish somite Maf 1, contributes to the specific transcriptional activity through the insulin promoter. *Biochem Biophys Res Commun* 2003;312(3):831-42.

Kanai, K, Reza, HM, Kamitani, A, Hamazaki, Y, Han, SI, Yasuda, K, Kataoka, K. SUMOylation negatively regulates transcriptional and oncogenic activities of MafA. *Genes Cells* 2010;15(9):971-82.

Kataoka, K., Fujiwara, K. T., Noda, M., and Nishizawa, M. (1994a). MafB, a new Maf family transcription activator that can associate with Maf and Fos but not with Jun. *Mol Cell Biol* 14, 7581-7591.

Kataoka, K., Han, S. I., Shioda, S., Hirai, M., Nishizawa, M., and Handa, H. (2002). MafA is a glucose-regulated and pancreatic beta-cell-specific transcriptional activator for the insulin gene. *J Biol Chem* 277, 49903-49910.

Kataoka, K., Nishizawa, M., and Kawai, S. (1993). Structure-function analysis of the maf oncogene product, a member of the b-Zip protein family. *J Virol* 67, 2133-2141.

Kataoka, K., Noda, M., and Nishizawa, M. (1994b). Maf nuclear oncoprotein recognizes sequences related to an AP-1 site and forms heterodimers with both Fos and Jun. *Mol Cell Biol* 14, 700-712.

Kataoka, K., Noda, M., and Nishizawa, M. (1996). Transactivation activity of Maf nuclear oncoprotein is modulated by Jun, Fos and small Maf proteins. *Oncogene* 12, 53-62.

Kataoka, K., Yoshitomo-Nakagawa, K., Shioda, S., and Nishizawa, M. (2001). A set of Hox proteins interact with the Maf oncoprotein to inhibit its DNA binding, transactivation, and transforming activities. *J Biol Chem* 276, 819-826.

Kato, T, Shimano, H, Yamamoto, T, Yokoo, T, Endo, Y, Ishikawa, M, Matsuzaka, T, Nakagawa, Y, Kumadaki, S, Yahagi, N, Takahashi, A, Sone, H, Suzuki, H, Toyoshima, H, Hasty, AH, Takahashi, S, Gomi, H, Izumi, T, Yamada, N. Granuphilin is activated by SREBP-1c and involved in impaired insulin secretion in diabetic mice. *Cell Metab* 2006;4(2):143-54.

Kawauchi, S., Takahashi, S., Nakajima, O., Ogino, H., Morita, M., Nishizawa, M., Yasuda, K., and Yamamoto, M. (1999). Regulation of lens fiber cell differentiation by transcription factor c-Maf. *J Biol Chem* 274, 19254-19260.

Kim, JI, Li, T, Ho, IC, Grusby, MJ, Glimcher, LH. Requirement for the c-Maf transcription factor in crystallin gene regulation and lens development. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999;96(7):3781-5.

Koepp, DM, Schaefer, LK, Ye, X, Keyomarsi, K, Chu, C, Harper, JW, Elledge, SJ. Phosphorylation-dependent ubiquitination of cyclin E by the SCFFbw7 ubiquitin ligase. *Science* 2001;294(5540):173-7.

Leavenworth, JW, Ma, X, Mo, YY, Pauza, ME. SUMO conjugation contributes to immune deviation in nonobese diabetic mice by suppressing c-Maf transactivation of IL-4. *J Immunol* 2009;183(2):1110-9.

Lecoin, L, Rocques, N, El-Yakoubi, W, Ben Achour, S, Larcher, M, Pouponnot, C, Eychène, A. MafA transcription factor identifies the early ret-expressing sensory neurons. *Dev Neurobiol* 2010;70(7):485-97.

Li, B., Tournier, C., Davis, R. J., and Flavell, R. A. (1999). Regulation of IL-4 expression by the transcription factor JunB during T helper cell differentiation. *Embo J* 18, 420-432.

Lin, BS, Tsai, PY, Hsieh, WY, Tsao, HW, Liu, MW, Grenningloh, R, Wang, LF, Ho, IC, Miaw, SC. SUMOylation attenuates c-Maf-dependent IL-4 expression. *Eur J Immunol* 2010;40(4):1174-84.

Mao, JH, Perez-Losada, J, Wu, D, Delrosario, R, Tsunematsu, R, Nakayama, KI, Brown, K, Bryson, S, Balmain, A. Fbxw7/Cdc4 is a p53-dependent, haploinsufficient tumour suppressor gene. *Nature* 2004;432(7018):775-9.

Mao, X, Stewart, AK, Hurren, R, Datti, A, Zhu, X, Zhu, Y, Shi, C, Lee, K, Tiedemann, R, Eberhard, Y, Trudel, S, Liang, S, Corey, SJ, Gillis, LC, Barber, DL, Wrana, JL, Ezzat, S, Schimmer, AD. A chemical biology screen identifies glucocorticoids that regulate c-maf expression by increasing its proteasomal degradation through up-regulation of ubiquitin. *Blood* 2007;110(12):4047-54.

Matsuoka, TA, Zhao, L, Artner, I, Jarrett, HW, Friedman, D, Means, A, Stein, R. Members of the large Maf transcription family regulate insulin gene transcription in islet beta cells. *Mol Cell Biol* 2003;23(17):6049-62.

Moberg, KH, Bell, DW, Wahrer, DC, Haber, DA, Hariharan, IK. Archipelago regulates Cyclin E levels in *Drosophila* and is mutated in human cancer cell lines. *Nature* 2001;413(6853):311-6.

Morito, N, Yoh, K, Fujioka, Y, Nakano, T, Shimohata, H, Hashimoto, Y, Yamada, A, Maeda, A, Matsuno, F, Hata, H, Suzuki, A, Imagawa, S, Mitsuya, H, Esumi, H, Koyama, A, Yamamoto, M, Mori, N, Takahashi, S. Overexpression of c-Maf contributes to T-cell lymphoma in both mice and human. *Cancer Res* 2006;66(2):812-9.

Muller, S., Ledl, A., and Schmidt, D. (2004). SUMO: a regulator of gene expression and genome integrity. *Oncogene* 23, 1998-2008.

Nakayama, KI, Hatakeyama, S, Nakayama, K. Regulation of the cell cycle at the G1-S transition by proteolysis of cyclin E and p27Kip1. *Biochem Biophys Res Commun* 2001;282(4):853-60.

Nateri, AS, Riera-Sans, L, Da Costa, C, Behrens, A. The ubiquitin ligase SCFFbw7 antagonizes apoptotic JNK signaling. *Science* 2004;303(5662):1374-8.

Nishimura, W, Rowan, S, Salameh, T, Maas, RL, Bonner-Weir, S, Sell, SM, Sharma, A. Preferential reduction of beta cells derived from Pax6-MafB pathway in MafB deficient mice. *Dev Biol* 2008;314(2):443-56.

Nishizawa, M, Kataoka, K, Vogt, PK. MafA has strong cell transforming ability but is a weak transactivator. *Oncogene* 2003;22(39):7882-90.

Nishizawa, M., Kataoka, K., Goto, N., Fujiwara, K. T., and Kawai, S. (1989). v-maf, a viral oncogene that encodes a "leucine zipper" motif. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86, 7711-7715.

Oberg, C, Li, J, Pauley, A, Wolf, E, Gurney, M, Lendahl, U. The Notch intracellular domain is ubiquitinated and negatively regulated by the mammalian Sel-10 homolog. *J Biol Chem* 2001;276(38):35847-53.

Ochi, H, Ogino, H, Kageyama, Y, Yasuda, K. The stability of the lens-specific Maf protein is regulated by fibroblast growth factor (FGF)/ERK signaling in lens fiber differentiation. *J Biol Chem* 2003;278(1):537-44.

Ogawa, H, Komatsu, T, Hiraoka, Y, Morohashi, K. Transcriptional Suppression by Transient Recruitment of ARIP4 to Sumoylated nuclear receptor Ad4BP/SF-1. *Mol Biol Cell* 2009;20(19):4235-45.

Ogino, H., and Yasuda, K. (1998). Induction of lens differentiation by activation of a bZIP transcription factor, L-Maf. *Science* 280, 115-118.

Olbrot, M, Rud, J, Moss, LG, Sharma, A. Identification of beta-cell-specific insulin gene transcription factor RIPE3b1 as mammalian MafA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002;99(10):6737-42.

Otto, T, Horn, S, Brockmann, M, Eilers, U, Schüttrumpf, L, Popov, N, Kenney, AM, Schulte, JH, Beijersbergen, R, Christiansen, H, Berwanger, B, Eilers, M. Stabilization of N-Myc is a critical function of Aurora A in human neuroblastoma. *Cancer Cell* 2009;15(1):67-78.

Pouponnot, C, Sii-Felice, K, Hmitou, I, Rocques, N, Lecoin, L, Druillenec, S, Felder-Schmittbuhl, MP, Eychène, A. Cell context reveals a dual role for Maf in oncogenesis. *Oncogene* 2006;25(9):1299-310.

Prudden, J., Pebernard, S., Raffa, G., Slavin, D. A., Perry, J. J., Tainer, J. A., McGowan, C. H., and Boddy, M. N. (2007). SUMO-targeted ubiquitin ligases in genome stability. *Embo J* 26, 4089-4101.

Rajagopalan, H, Jallepalli, PV, Rago, C, Velculescu, VE, Kinzler, KW, Vogelstein, B, Lengauer, C. Inactivation of hCDC4 can cause chromosomal instability. *Nature* 2004;428(6978):77-81.

Resnicoff, M, Valentinis, B, Herbert, D, Abraham, D, Friesen, PD, Alnemri, ES, Baserga, R. The baculovirus anti-apoptotic p35 protein promotes transformation of mouse embryo fibroblasts. *J Biol Chem* 1998;273(17):10376-80.

Reza, HM, Nishi, H, Kataoka, K, Takahashi, Y, Yasuda, K. L-Maf regulates p27kip1 expression during chick lens fiber differentiation. *Differentiation* 2007;75(8):737-44.

Ring, BZ, Cordes, SP, Overbeek, PA, Barsh, GS. Regulation of mouse lens fiber cell

development and differentiation by the Maf gene. *Development* 2000;127(2):307-17.

Rocques, N, Abou Zeid, N, Sii-Felice, K, Lecoin, L, Felder-Schmittbuhl, MP, Eychène, A, Pouponnot, C. GSK-3-mediated phosphorylation enhances Maf-transforming activity. *Mol Cell* 2007;28(4):584-97.

Roger, JE, Nellissery, J, Kim, DS, Swaroop, A. Sumoylation of bZIP transcription factor NRL modulates target gene expression during photoreceptor differentiation. *J Biol Chem* 2010;285(33):25637-44.

Ross, S., Best, J. L., Zon, L. I., and Gill, G. (2002). SUMO-1 modification represses Sp3 transcriptional activation and modulates its subnuclear localization. *Mol Cell* 10, 831-842.

Shao, C, Cobb, MH. Sumoylation regulates the transcriptional activity of MafA in pancreatic beta cells. *J Biol Chem* 2009;284(5):3117-24.

Sherr, CJ, Roberts, JM. CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression. *Genes Dev* 1999;13(12):1501-12.

Shimada, N., Aya-Murata, T., Reza, H. M., and Yasuda, K. (2003). Cooperative action between L-Maf and Sox2 on delta-crystallin gene expression during chick lens development. *Mech Dev* 120, 455-465.

Sii-Felice, K, Pouponnot, C, Gillet, S, Lecoin, L, Girault, JA, Eychène, A, Felder-Schmittbuhl, MP. MafA transcription factor is phosphorylated by p38 MAP kinase. *FEBS Lett* 2005;579(17):3547-54.

Song, J., Durrin, L. K., Wilkinson, T. A., Krontiris, T. G., and Chen, Y. (2004).

Identification of a SUMO-binding motif that recognizes SUMO-modified proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 14373-14378.

Strohmaier, H, Spruck, CH, Kaiser, P, Won, KA, Sangfelt, O, Reed, SI. Human F-box protein hCdc4 targets cyclin E for proteolysis and is mutated in a breast cancer cell line. *Nature* 2001;413(6853):316-22.

Subramanian, L., Benson, M. D., and Iniguez-Lluhi, J. A. (2003). A synergy control motif within the attenuator domain of CCAAT/enhancer-binding protein alpha inhibits transcriptional synergy through its PIASy-enhanced modification by SUMO-1 or SUMO-3. *J Biol Chem* 278, 9134-9141.

Suzuki, A, Iida, S, Kato-Uranishi, M, Tajima, E, Zhan, F, Hanamura, I, Huang, Y, Ogura, T, Takahashi, S, Ueda, R, Barlogie, B, Shaughnessy, Esumi, H. ARK5 is transcriptionally regulated by the Large-MAF family and mediates IGF-1-induced cell invasion in multiple myeloma: ARK5 as a new molecular determinant of malignant multiple myeloma. *Oncogene* 2005;24(46):6936-44.

Swaroop, A, Xu, JZ, Pawar, H, Jackson, A, Skolnick, C, Agarwal, N. A conserved retina-specific gene encodes a basic motif/leucine zipper domain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992;89(1):266-70.

Tanahashi, H, Kito, K, Ito, T, Yoshioka, K. MafB protein stability is regulated by the JNK and ubiquitin-proteasome pathways. *Arch Biochem Biophys* 2010;494(1):94-100.

Tatham, M. H., Jaffray, E., Vaughan, O. A., Desterro, J. M., Botting, C. H., Naismith, J. H., and Hay, R. T. (2001). Polymeric chains of SUMO-2 and SUMO-3 are conjugated to protein substrates by SAE1/SAE2 and Ubc9. *J Biol Chem* 276, 35368-35374.

Tillmanns, S., Otto, C., Jaffray, E., Du Roure, C., Bakri, Y., Vanhille, L., Sarrazin, S., Hay, R. T., and Sieweke, M. H. (2007). SUMO modification regulates MafB-driven macrophage differentiation by enabling Myb-dependent transcriptional repression. *Mol Cell Biol* 27, 5554-5564.

Tsuruzoe, S., Ishihara, K., Uchimura, Y., Watanabe, S., Sekita, Y., Aoto, T., Saitoh, H., Yuasa, Y., Niwa, H., Kawasuji, M., *et al.* (2006). Inhibition of DNA binding of Sox2 by the SUMO conjugation. *Biochem Biophys Res Commun* 351, 920-926.

Varshavsky, A. Regulated protein degradation. *Trends Biochem Sci* 2005;30(6):283-6.

Wang, H, Brun, T, Kataoka, K, Sharma, AJ, Wollheim, CB. MAFA controls genes implicated in insulin biosynthesis and secretion. *Diabetologia* 2007;50(2):348-58.

Welcker, M, Orian, A, Jin, J, Grim, JE, Grim, JA, Harper, JW, Eisenman, RN, Clurman, BE. The Fbw7 tumor suppressor regulates glycogen synthase kinase 3 phosphorylation-dependent c-Myc protein degradation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004;101(24):9085-90.

Wu, G, Lyapina, S, Das, I, Li, J, Gurney, M, Pauley, A, Chui, I, Deshaies, RJ, Kitajewski, J. SEL-10 is an inhibitor of notch signaling that targets notch for ubiquitin-mediated protein degradation. *Mol Cell Biol* 2001;21(21):7403-15.

Yada, M, Hatakeyama, S, Kamura, T, Nishiyama, M, Tsunematsu, R, Imaki, H, Ishida, N, Okumura, F, Nakayama, K, Nakayama, KI. Phosphorylation-dependent degradation of c-Myc is mediated by the F-box protein Fbw7. *EMBO J* 2004;23(10):2116-25.

Zhang, C, Moriguchi, T, Kajihara, M, Esaki, R, Harada, A, Shimohata, H, Oishi, H, Hamada, M, Morito, N, Hasegawa, K, Kudo, T, Engel, JD, Yamamoto, M, Takahashi, S. MafA is a key regulator of glucose-stimulated insulin secretion. *Mol Cell Biol* 2005;25(12):4969-76.

Zhang, H., Saitoh, H., and Matunis, M. J. (2002). Enzymes of the SUMO modification pathway localize to filaments of the nuclear pore complex. *Mol Cell Biol* 22, 6498-6508.

Zhou, Q, Brown, J, Kanarek, A, Rajagopal, J, Melton, DA. In vivo reprogramming of adult pancreatic exocrine cells to beta-cells. *Nature* 2008;455(7213):627-32.

荒俣晋作 (2008)

赜島b細胞特異的な転写因子MafAのリン酸化機構とインスリンプロモーター活性化機構の解明

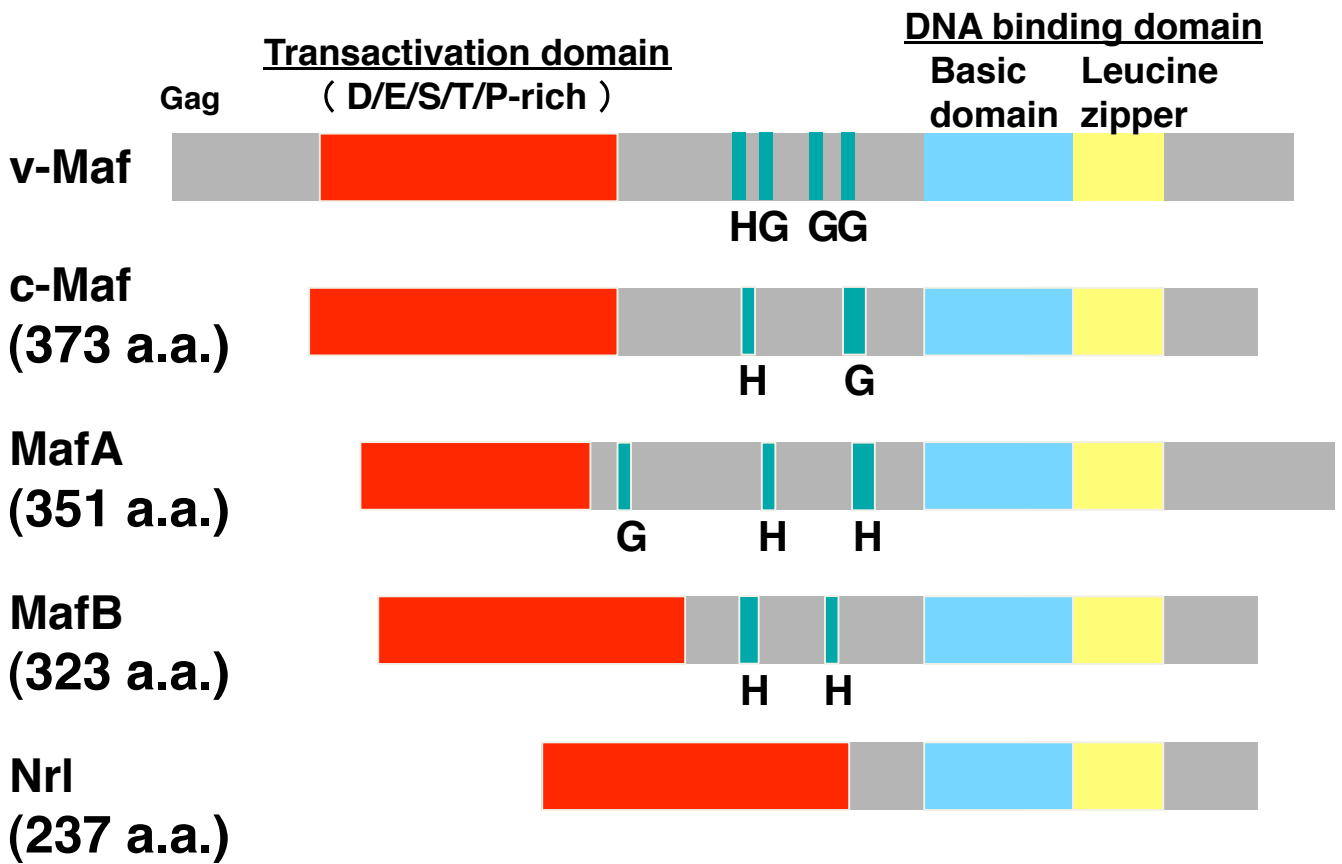
博士論文、奈良先端科学技術大学院大学

植田沙央里 (2010)

癌遺伝子産物MafAによる新規発癌メカニズムの解明

修士論文、奈良先端科学技術大学院大学

< 図 >



G : Glycine repeats
H : Histidine repeats

図1 Large Mafファミリータンパク質の模式図

ヒトのLarge Mafサブファミリーの構造の模式図およびそのアミノ酸数を示した。N末端に転写活性化ドメインであるアスパラギン酸、グルタミン酸、セリン、スレオニン、プロリン残基に富んだ領域、C末端にDNA結合ドメインである塩基性領域及びロイシンジッパー構造を持つ。これらのドメインの間にはグリシン (G) とヒスチジン (H) の連続したヒンジ領域を持つ。Gagはv-Mafと融合したレトロウイルス由来の配列である。

・生理機能および関連する疾患

	組織・細胞	標的遺伝子	ノックアウトマウス表現型、疾患
c-Maf	ヘルパーT(Th2)細胞	インターロイキン4	インターロイキン4の発現低下
	水晶体	クリスタリン(α A、 γ F)	水晶体形成不全、白内障(ヒト)
	軟骨細胞	コラーゲン2a1	軟骨内骨形成不全
MafB	菱脳節 r5/6	hoxa-3、hoxb-3	脳節 r5/6欠損(kreisler変異マウス)
	呼吸中枢		中枢性無呼吸
	腎臓糸球体上皮細胞	nephrin?、podocin?	糸球体の濾過装置形成不全
	マクロファージ	F4/80、 β -アクチン?	
	膵島 α 細胞	グルカゴン	
MafA	膵島 β 細胞	インスリン、pdx1	インスリン分泌低下・糖尿病
Nrl	光受容細胞	ロドプシン	網膜色素変性症(ヒト)

・癌

v-Maf	AS42 レトロウイルス	HB-EGFなど	筋腱膜繊維肉腫 (トリレトロウイルス感染)
c-Maf	形質細胞	サイクリンD2 インテグリン β 7など	血管免疫芽球性T細胞リンパ腫(AITL)
MafB			多発性骨髄腫(MM)
MafA			(ヒト・染色体転座)

表1 Mafの生理機能と疾患との関連、発現組織・細胞、および標的遺伝子

Mafファミリーが発現している組織・細胞と、その細胞における標的遺伝子を示し、関連する疾患やノックアウトマウスの表現型との関連を示す。標的遺伝子のうち、直接の関連が確定的でないものは“?”印を付した。

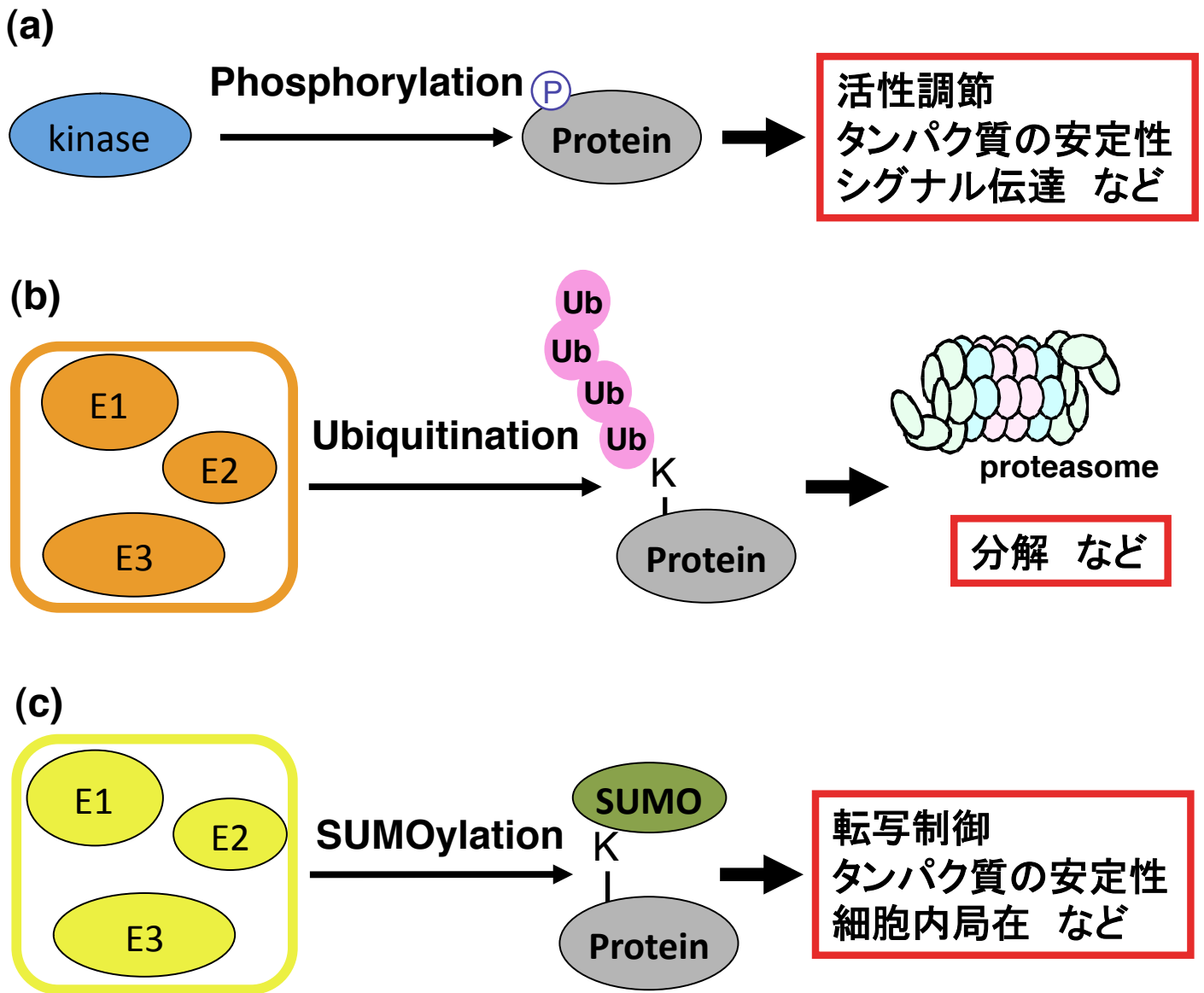


図2 タンパク質の翻訳後修飾機構とその役割

(a)多くのタンパク質は翻訳後にさまざまな化学的な修飾が加えられ、活性や安定性などが調節されている。リン酸化はMAPキナーゼなどのシグナル伝達や立体構造変化を伴った活性制御などを制御しており、多種のリン酸化酵素によって標的タンパク質に修飾される。

(b)ユビキチン化による選択的なタンパク質の分解機構。ユビキチンは約100アミノ酸残基のペプチドであり、3種の酵素群（E1、E2、E3）により活性化され、ユビキチンのC末端のグリシン残基とE3に認識された標的タンパク質のリジン残基がイソペプチド結合により修飾される。ユビキチン化には、モノユビキチン化と修飾されたユビキチンにさらにユビキチンが修飾されるポリユビキチン化があり、タンパク質の細胞内局在などのさまざまな機能を制御していることが明らかになってきている。特に良く知られている機能は、ポリユビキチン化を受けたタンパク質が26Sプロテアソームに認識されて速やかに分解されるユビキチン・プロテアソーム系である。(c)SUMOはユビキチン様のタンパク質であり、3種のユビキチン様酵素群によって基質タンパク質のリジン残基へと修飾される。転写因子では転写活性やタンパク質の安定性、細胞内局在などに影響を与えることが知られている。

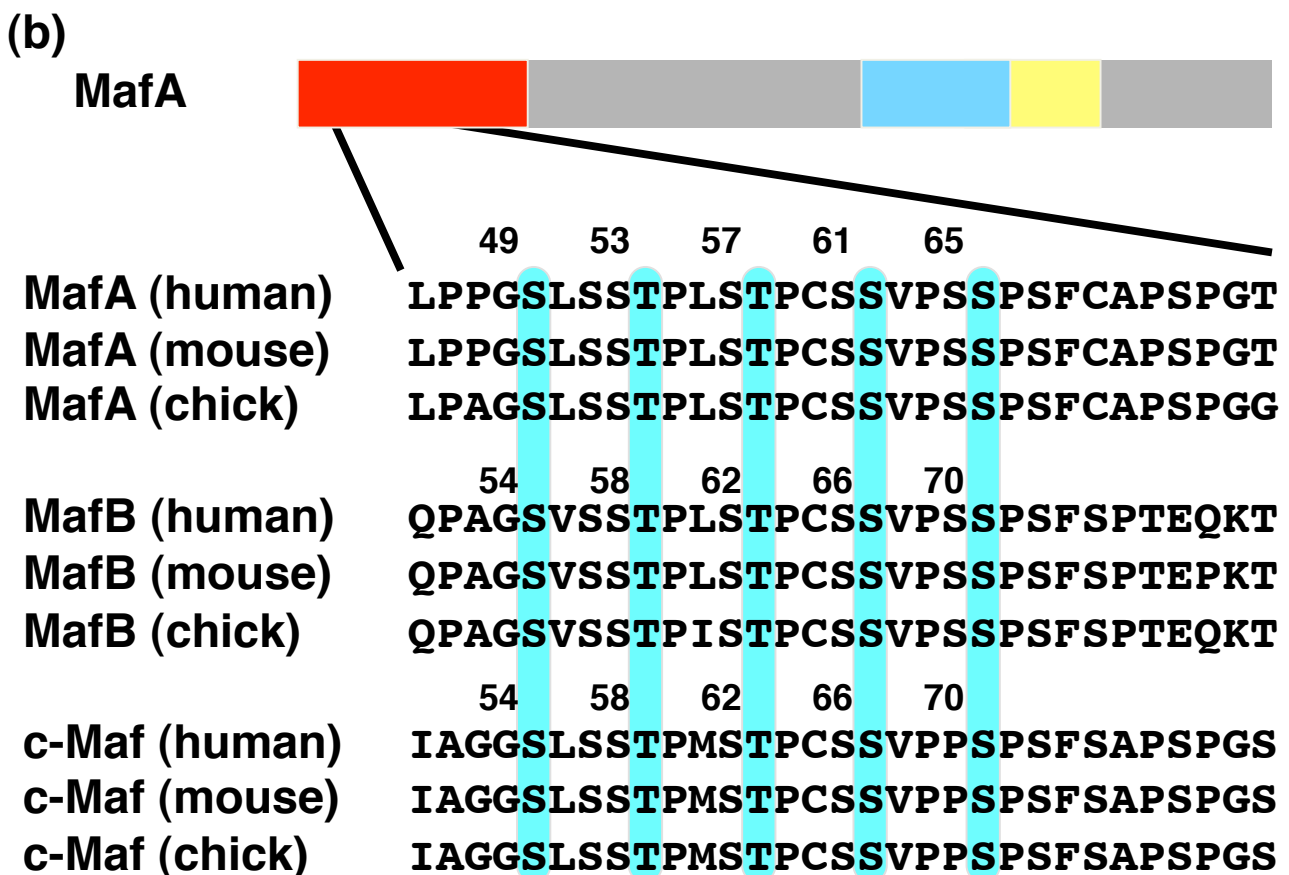
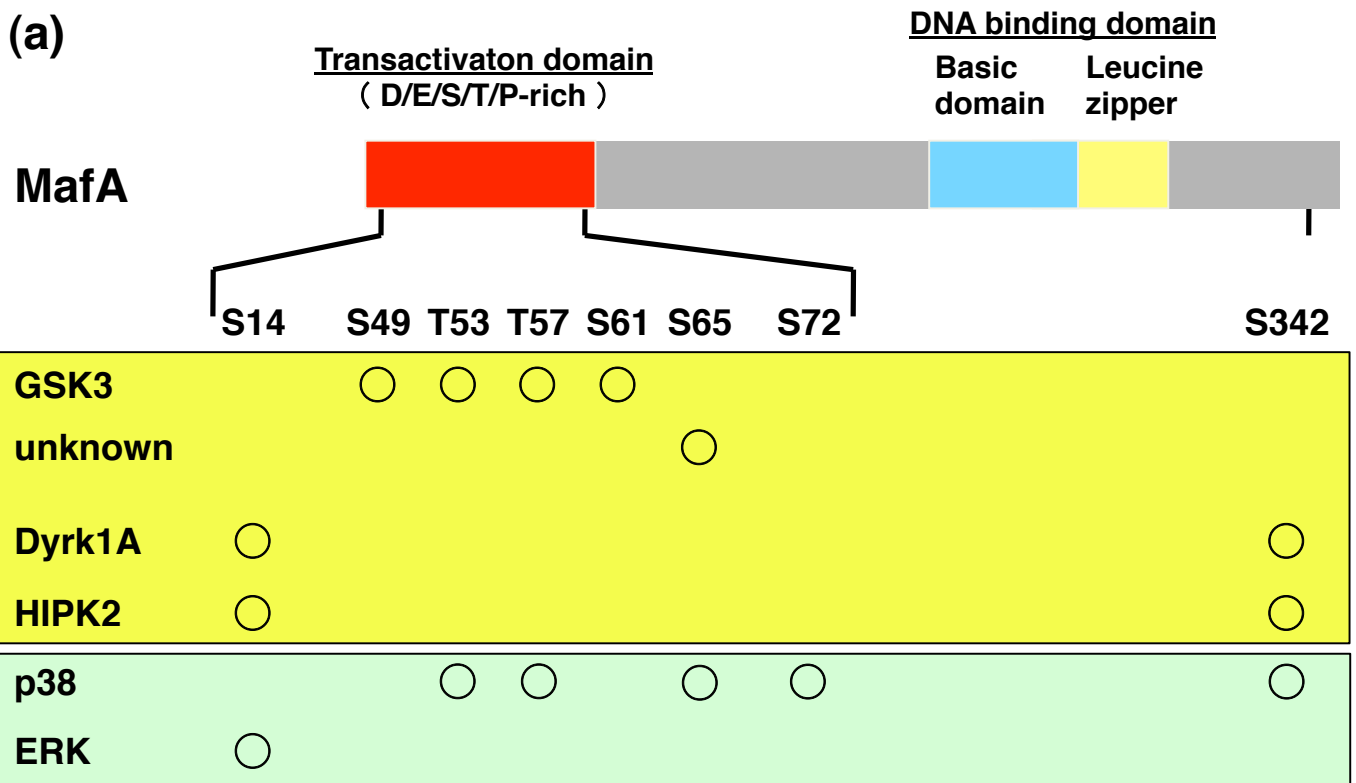


図3 MafAタンパク質のリン酸化部位とその酵素

(a) 転写因子MafAは細胞内で高度にリン酸化されることが多数報告されている。上図はそのリン酸化部位およびそれを修飾する酵素について記載している。黄色は哺乳類で報告されているもので、緑は鳥類での報告である。(b) Mafファミリーで保存されているリン酸化部位をヒト、マウス、ニワトリを比較した。囲いはリン酸化部位を、数字はそのヒトでのN末端からの位置を示している。これらのリン酸化部位が種を超えて保存されていることがわかる。

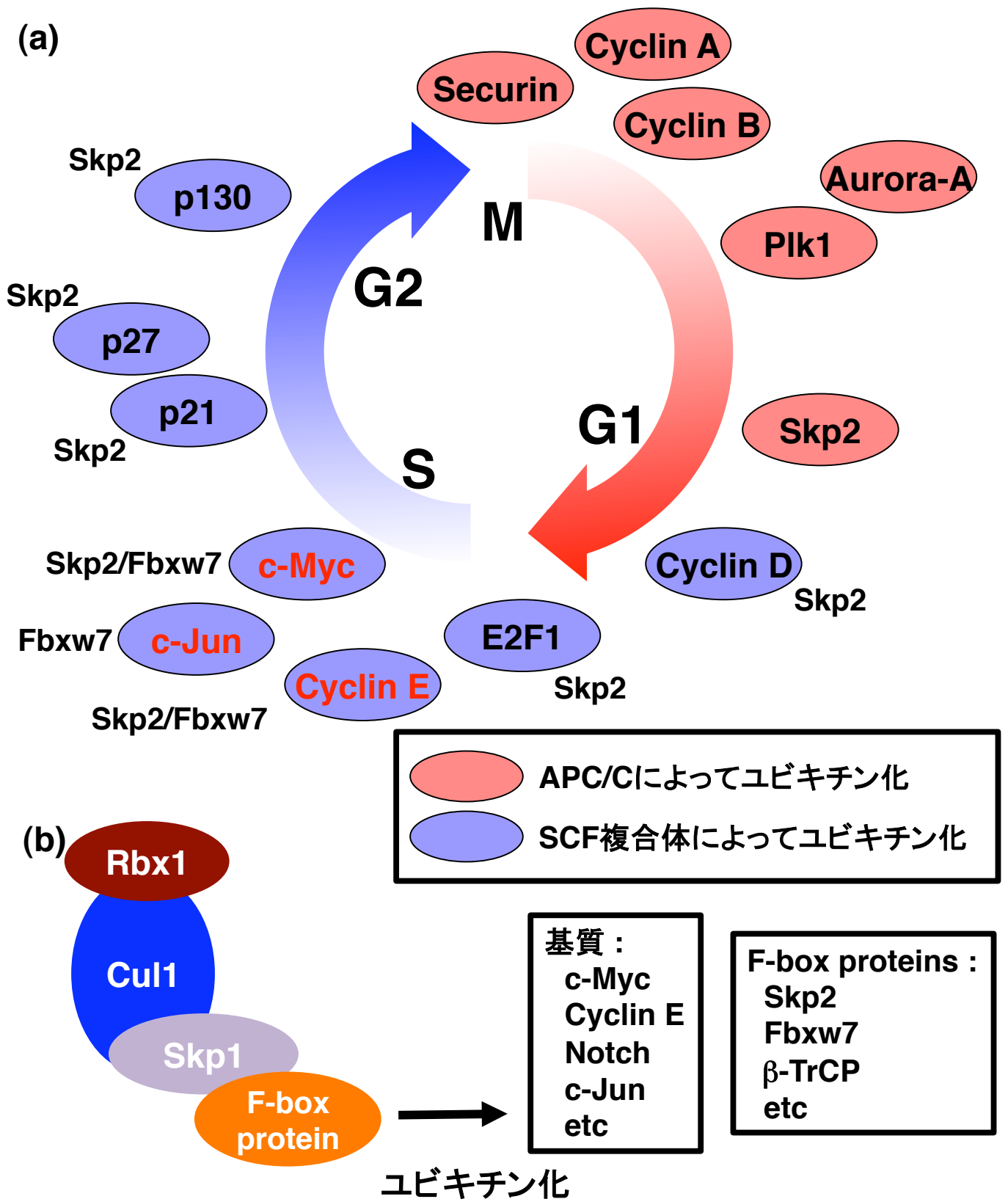
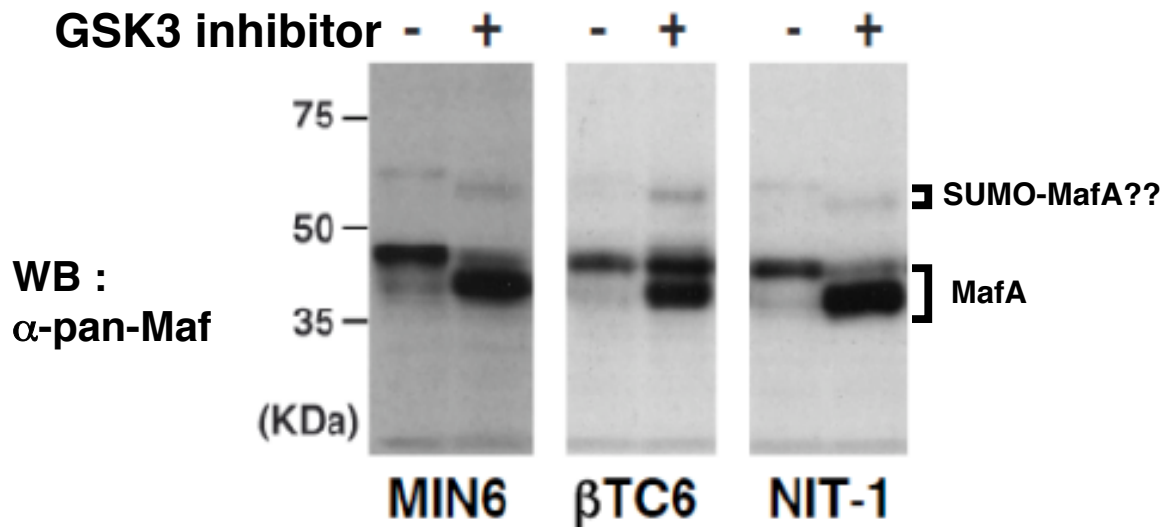


図4 ユビキチン・プロテアソーム系による細胞周期の制御

(a) 細胞周期は分裂期であるM期とDNA合成期であるS期、そしてその間のG1期とG2期から成る。この周期形成や制御には多くのタンパク質が関わっているが、そのほとんどはAPC/CまたはSCF複合体型ユビキチンリガーゼによって発現量が調節されている。赤色で示した丸はAPC/Cでユビキチン化される因子、青色で示したものはSCF複合体でユビキチン化される因子である。付記してあるのは認識サブユニットであり、認識サブユニットがFbxw7のものは赤字で示した。また記載した位置は分解される時期を示している。(b) SCF複合体の模式図。基質認識サブユニットであるF-boxタンパク質が変わることで、多数の基質を認識することができる。横には代表的な基質と認識サブユニットであるF-boxタンパク質を示した。

(a)



(b)

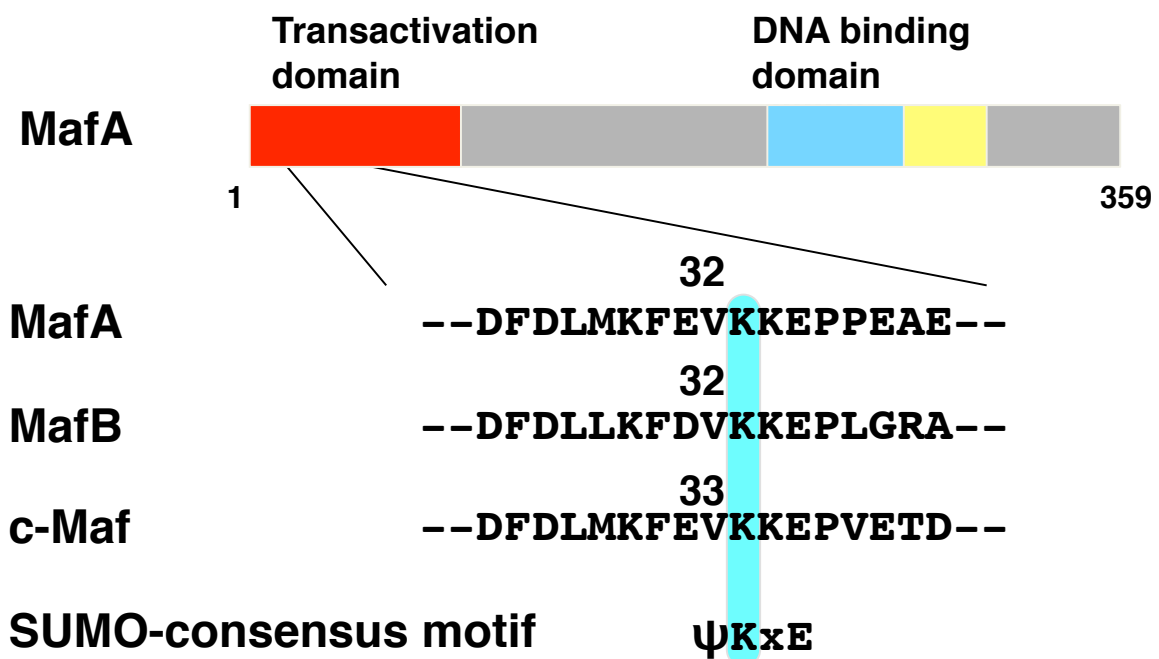


図5 MafAはSUMO化修飾を受ける可能性がある

(a) インシュリノーマ由来の細胞株に発現する内在性のMafAを抗pan-Maf抗体によって、Western blotにより検出した。あらかじめGSK3の阻害剤SB216763で細胞を処理することで移動度 (40~48kDa) が大きく変化した。この変化に伴って移動度の変化するバンドが、高分子量 (約60kDa) の位置にも見られた。(b) Mafファミリーの転写活性化ドメインに保存されているSUMO化コンセンサス配列を示した。

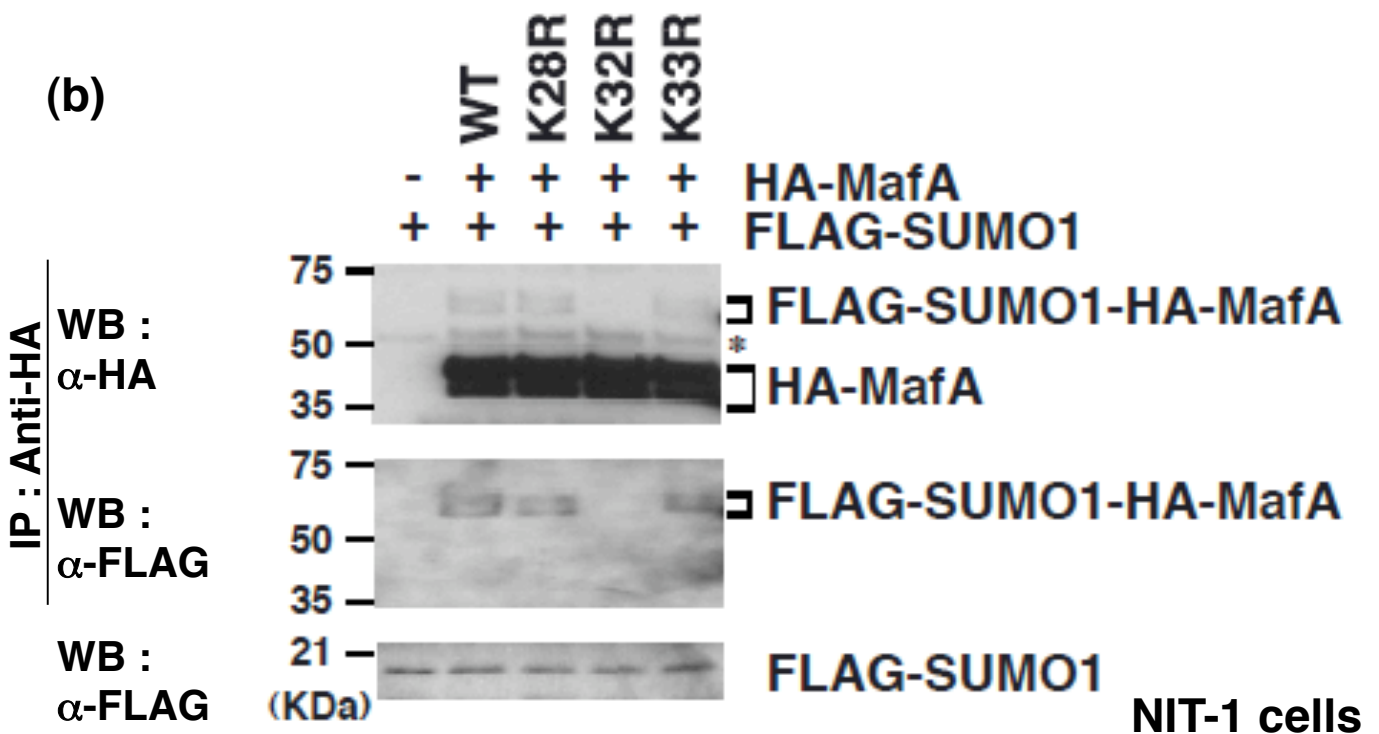
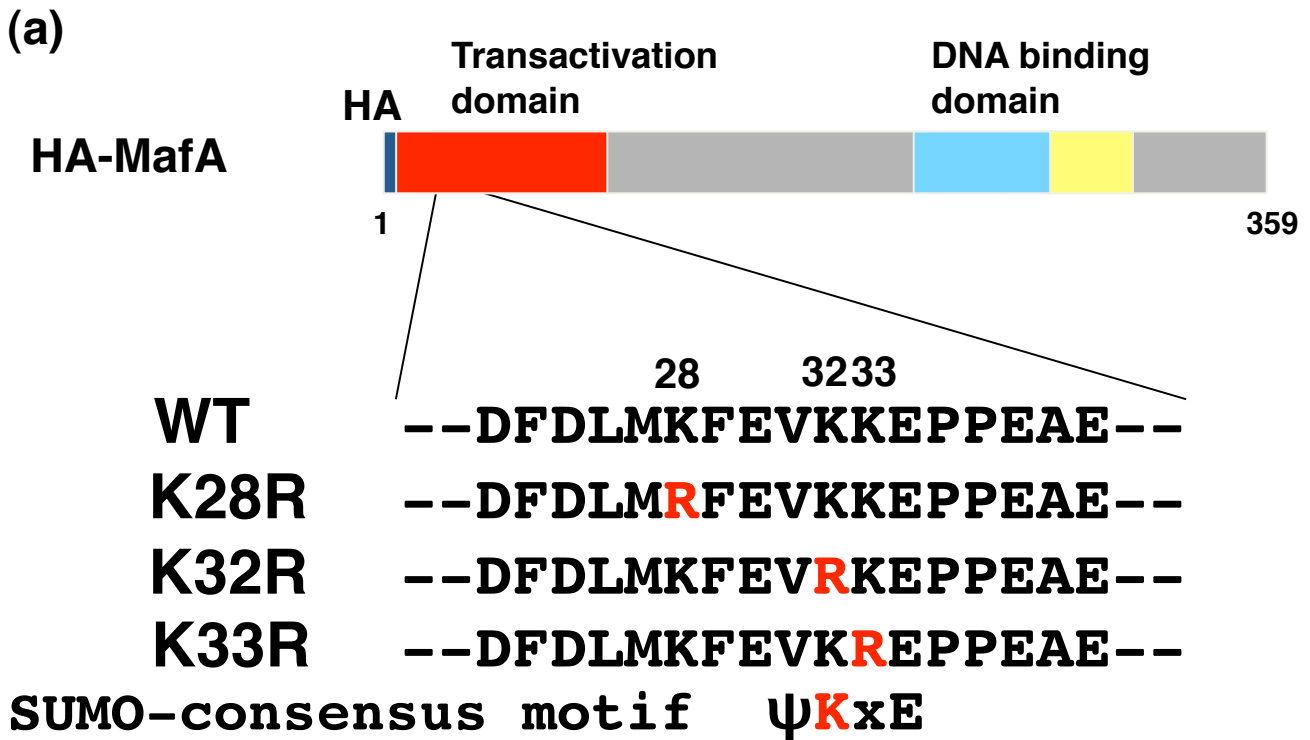
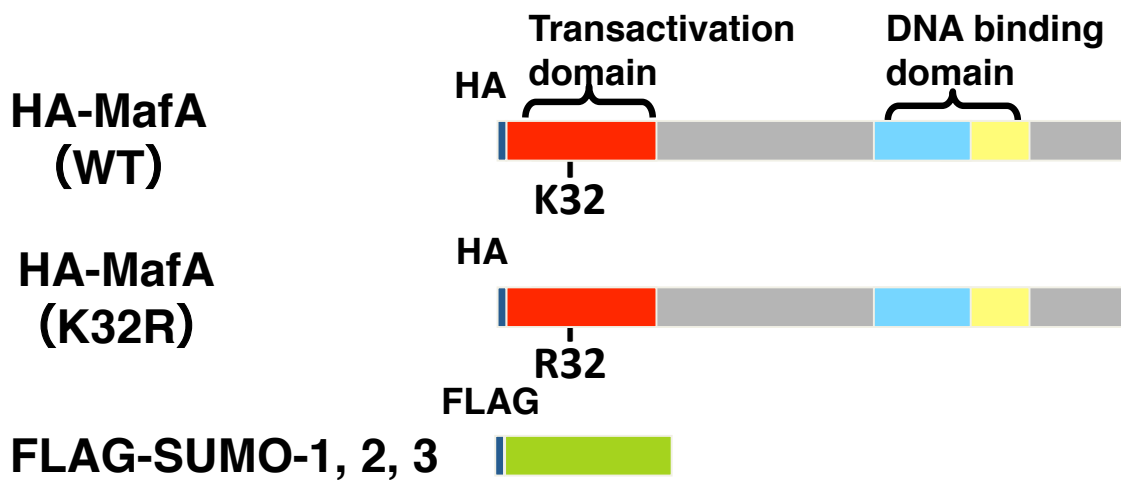


図6 MafAのSUMO化コンセンサス内の32番目のリジン残基がSUMO化修飾を受ける

(a) MafAの構造の模式図と使用している変異型MafAの変異部位を示した。(b) インシュリノーマ由来のNIT-1細胞に各HA-MafAとFLAG-SUMO1の発現プラスミドをトランスフェクションにより導入し、それらの細胞の抽出液を抗HA抗体で免疫沈降後、抗HA抗体（上）と抗FLAG抗体（下）でWestern blotを行った。抗HA抗体を用いたWestern blotで、図5aの修飾と思われるバンドが野生型MafA（WT）で検出された。また、このバンドは抗FLAG抗体でも検出できた。これらのことから、MafAが β 細胞内でSUMO化修飾を受けることが明らかとなった。さらに、KR変異体を用いて、SUMOの修飾部位の決定を行った。その結果、28番目、33番目のリジン残基の変異はSUMO化に影響を及ぼさなかったが、転写活性化ドメイン内の32番目のリジン残基の変異によりSUMO化が見られなくなった。これらの結果から、MafAの32番目のリジン残基がSUMO化されることが明らかになった。*は非特異的なシグナルである。

(a)



(b)

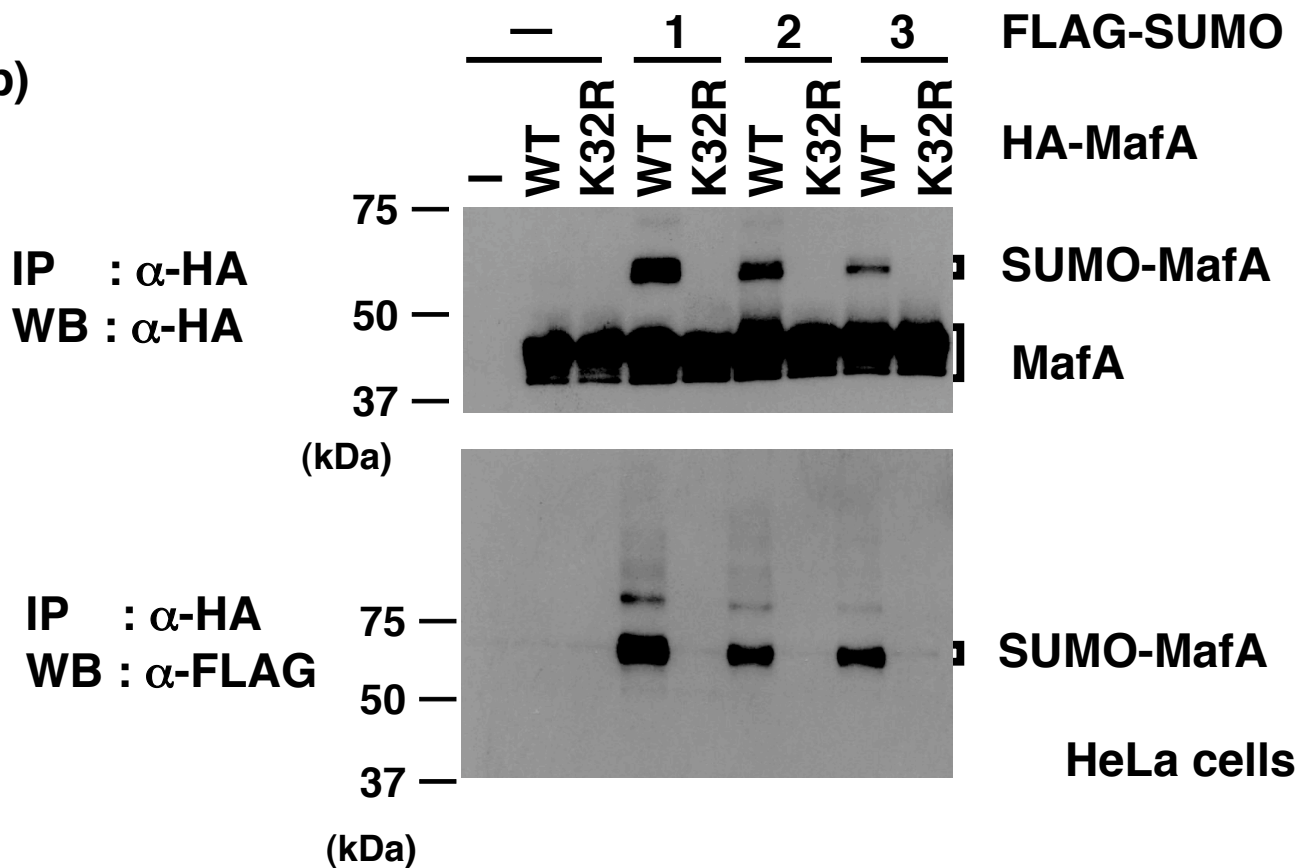
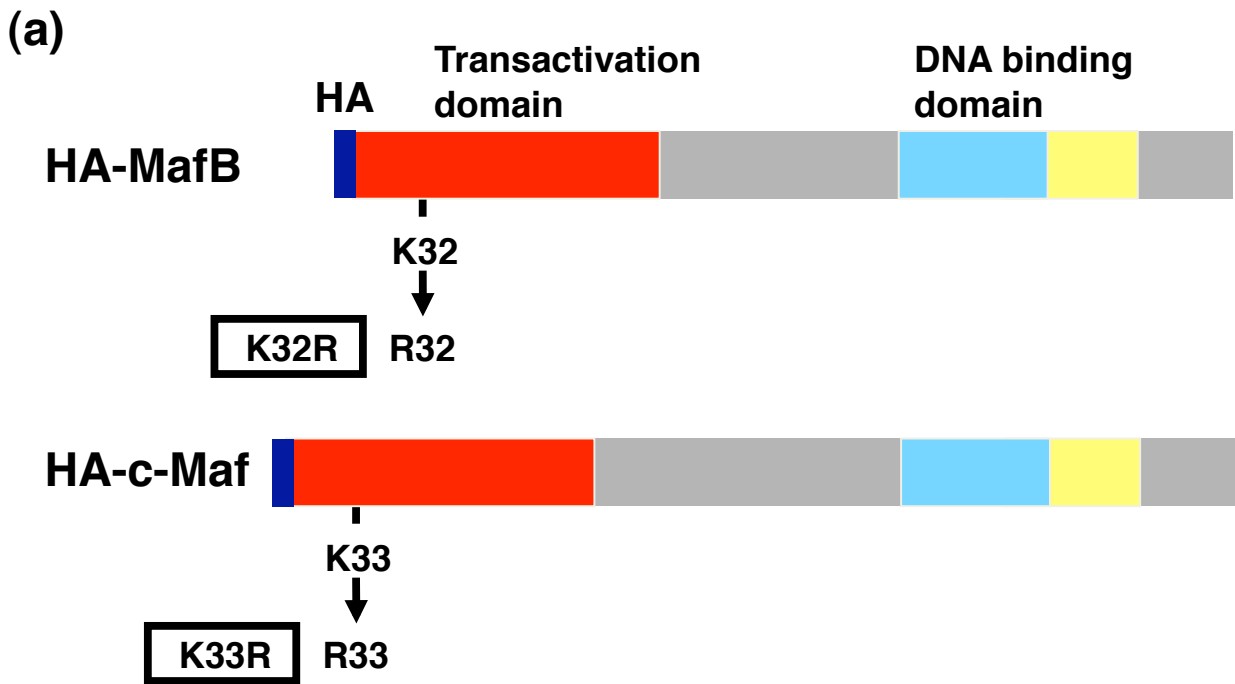


図7 MafAにはSUMOのアイソフォームの3種とも結合可能である

(a) 野生型およびK32R変異型HA-MafAとFLAG-SUMOの模式図。(b) 野生型又はK32R変異型HA-MafAをFLAG-SUMO-1, 2, 3とトランスフェクションによってHeLa細胞に共発現させ、抗HA抗体で免疫沈降後、抗HA抗体（上）と抗FLAG抗体（下）でWestern blotを行った。その結果、抗HA抗体で野生型とK32R変異型MafAが検出された。またSUMO化MafAのシグナルは、SUMOの共発現時にのみ、野生型MafAだけで検出できた。さらに、このシグナルは抗FLAG抗体により、共発現するFLAG-SUMOのアイソフォームに関係なく検出された。これらのことから、MafAの32番目のリジン残基にはSUMO-1, 2, 3のどれでも結合可能であることが明らかとなった。



(b)

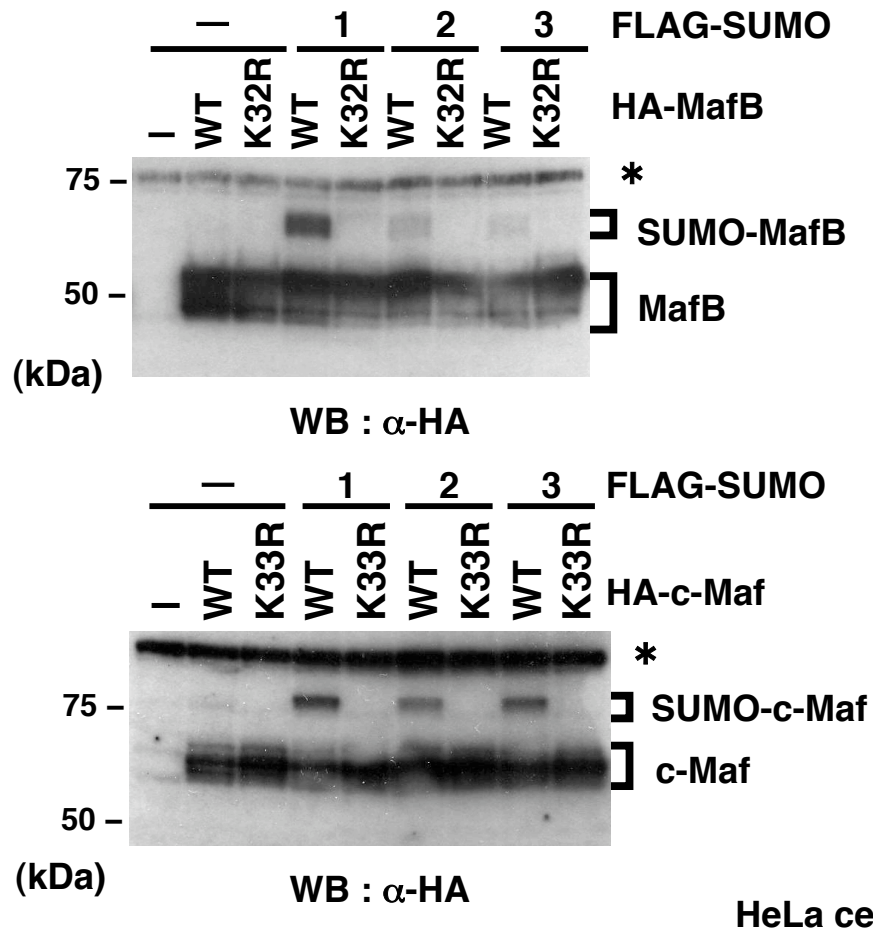


図8 MafBおよびc-Mafも保温されたリジン残基にSUMOが修飾される

(a) HA-MafBおよびc-Mafの構造と変異を導入したSUMO化部位を示した模式図。(b) 野生型またはKR変異型HA-MafBとHA-c-Mafと各FLAG-SUMOをHeLa細胞に共発現し、その総タンパク質を抗HA抗体を用いたWestern blotにより検出した結果。MafB、c-Mafのいずれも、野生型でのみSUMO化したシグナルが検出された。*印は非特異的なシグナルである。

(a)

3xMARE/TATA-luc



(b)

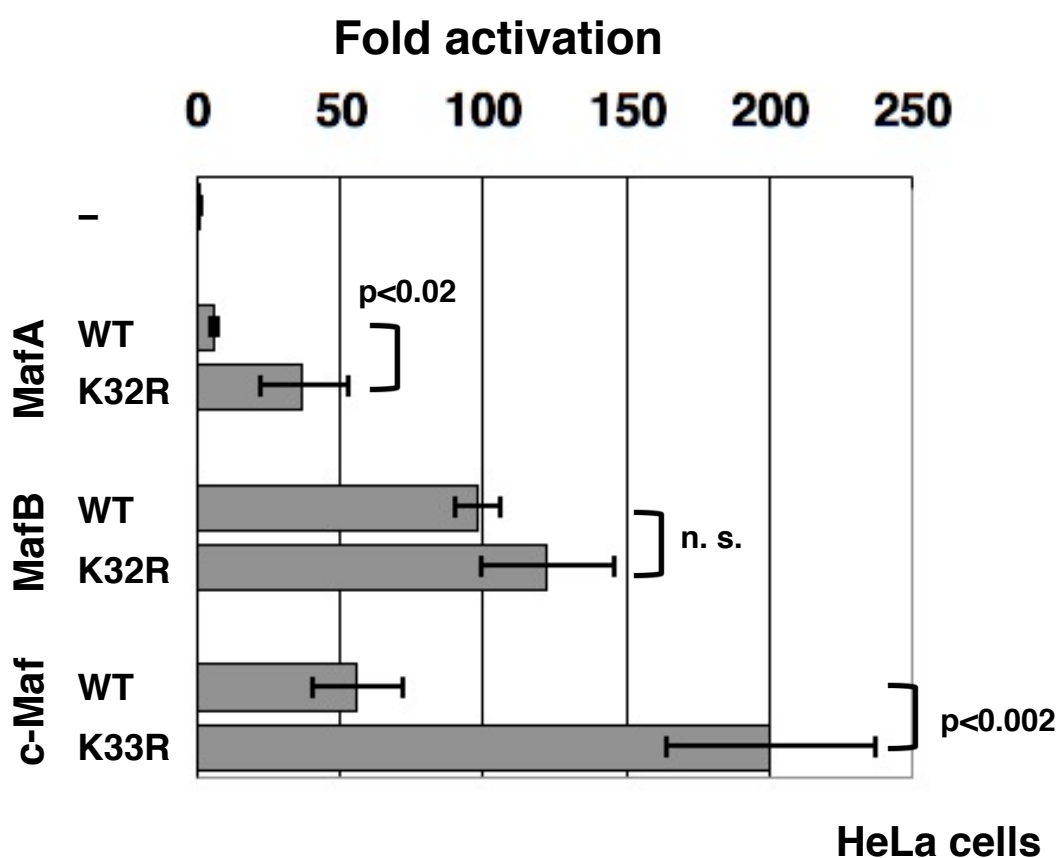
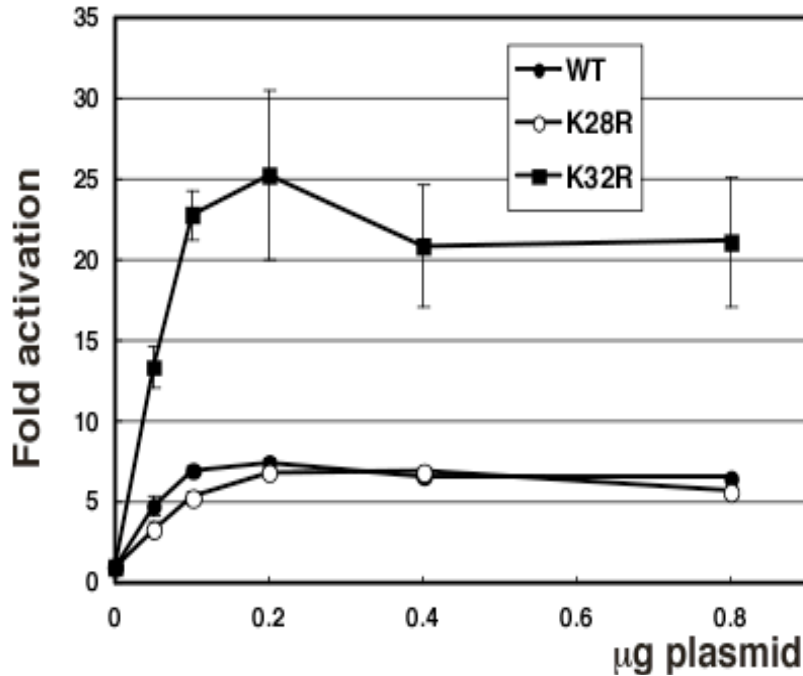
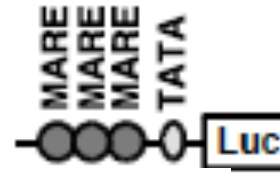


図9 SUMO化修飾によるMafタンパク質の転写活性化能への影響

(a) 3×MARE (#7)/RBGP-lucの模式図。MARE (Maf-recognition element) は、Mafファミリーが結合する配列 (TGCTTACTAAGCA) である。このレポータープラスミドにMafが結合することによってルシフェラーゼの発現が誘導される。(b) 3×MARE (#7)/RBGP-lucのレポータープラスミドを用いてルシフェラーゼアッセイを行った結果。野生型ではMafAの転写活性化が最も低く、MafBが最も高い活性を示した。また、MafAとc-MafのSUMO化部位の変異 (KR変異体) により、野生型と比べて高い転写活性化能を示した。しかしながら、MafBでは野生型とK32R変異型の間には有意な差は見られなかった。

(a)

3xMARE/TATA-luc



(b)

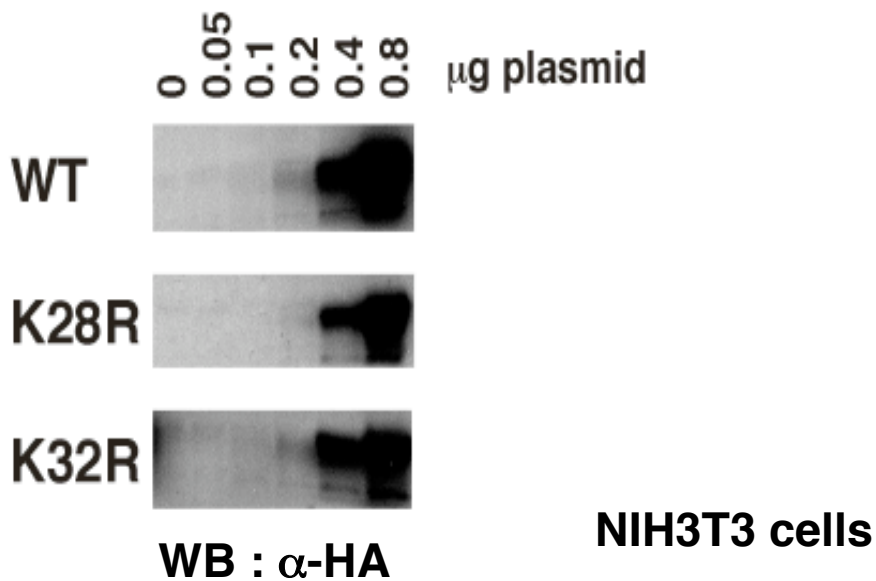
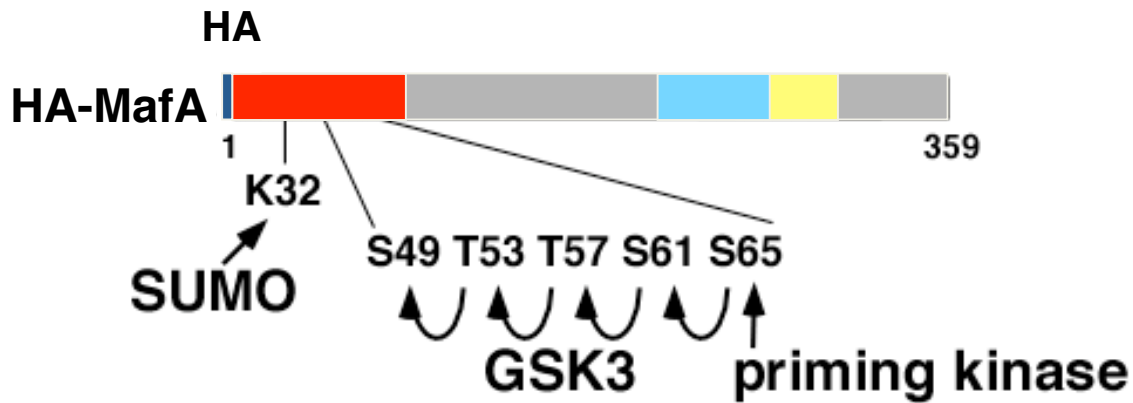


図10 K32R変異型MafAはタンパク質量とは関係なく、高い転写活性化能を有する

(a) 3×MARE (#7) / RBGP-luc レポーターを用いて、ルシフェラーゼアッセイを行った結果。K32R変異型は野生型HA-MafAと比べて、顕著に高い転写活性化能を持つことが明らかとなった。(b) 回収した細胞抽出液を抗HA抗体を用いて、Western blotにより解析した結果。プラスミドの導入量の増加に伴い、MafAタンパク質量の増加が見られるが、KRの変異による違いは見られなかった。

(a)



(b)

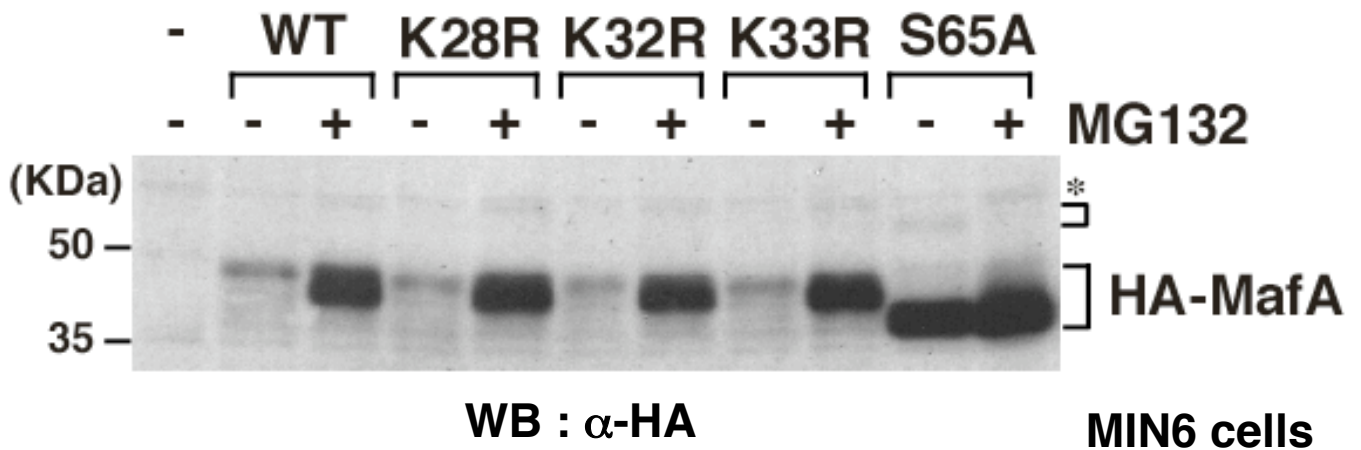
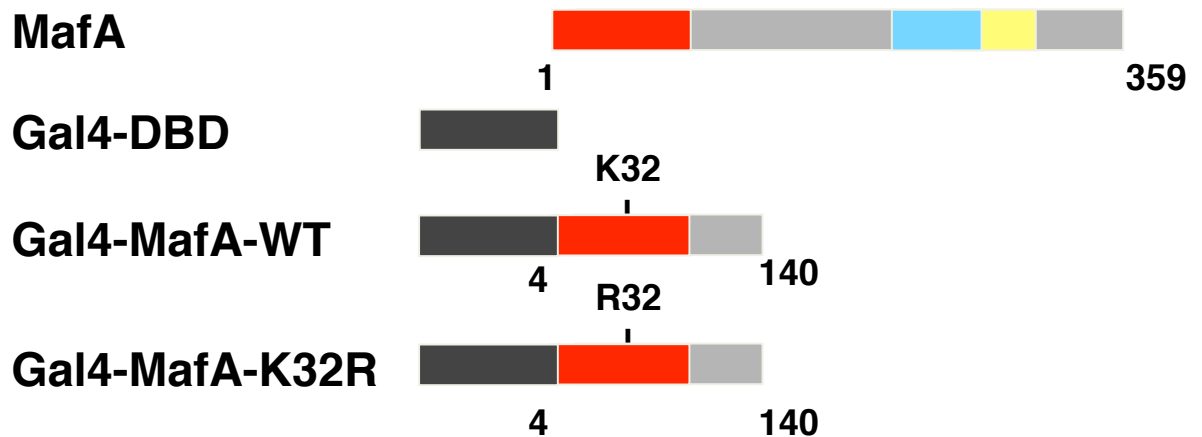


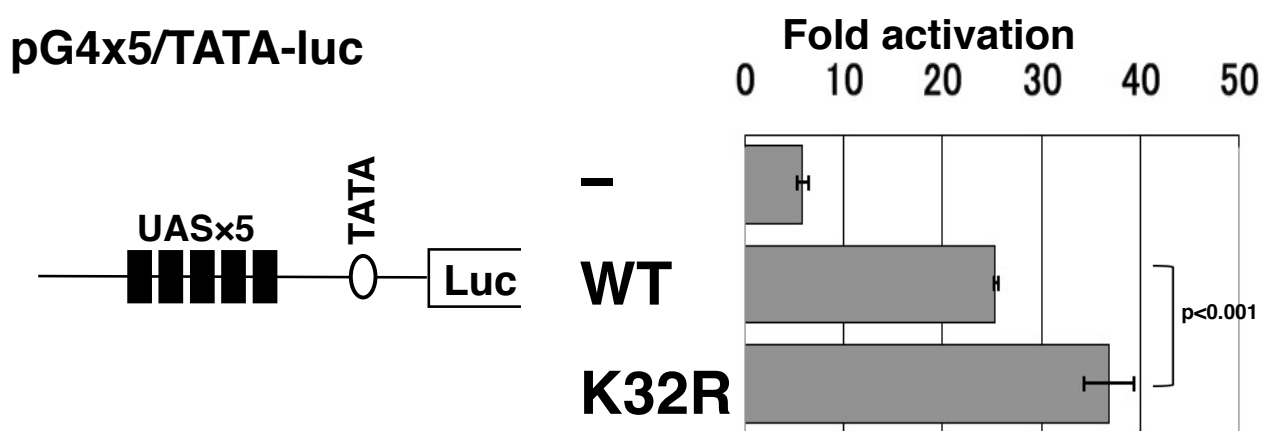
図11 K32Rの変異はMafAのMG132に対する感受性に影響を与えない

(a) MafAの構造とSUMO化およびリン酸化部位の模式図。(b) Min6細胞に野生型および変異型HA-MafA (K28RまたはK32R、K33R、S65A) をトランスフェクションにより発現させ、プロテアソーム阻害剤MG132 (5 μ M) を8時間処理した後にタンパク質を回収して、細胞抽出液を抗HA抗体を用いて、Western blotにより解析した結果。MG132への感受性および泳動度は野生型およびK32R変異型MafAの間に差は見られなかった。*は非特異的なシグナルである。

(a)



(b)



(c)

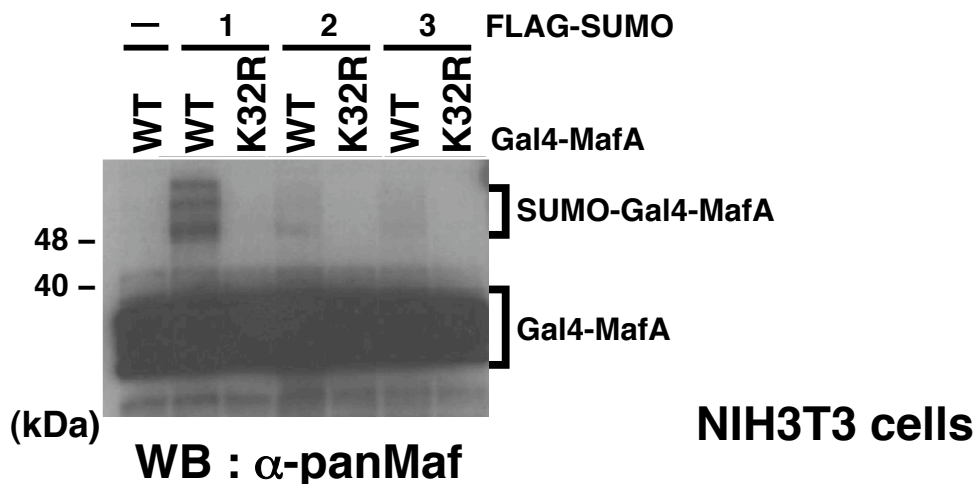
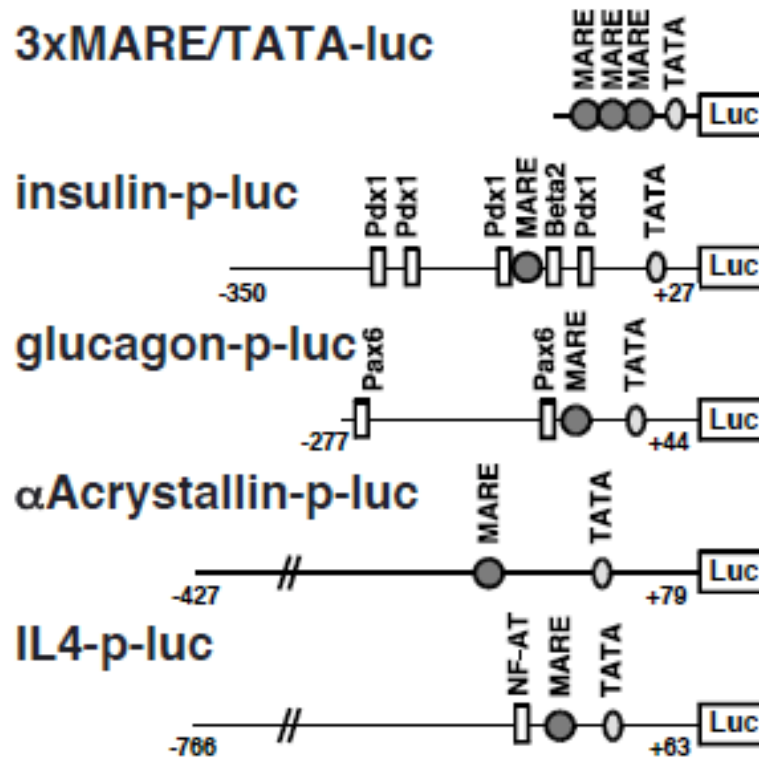


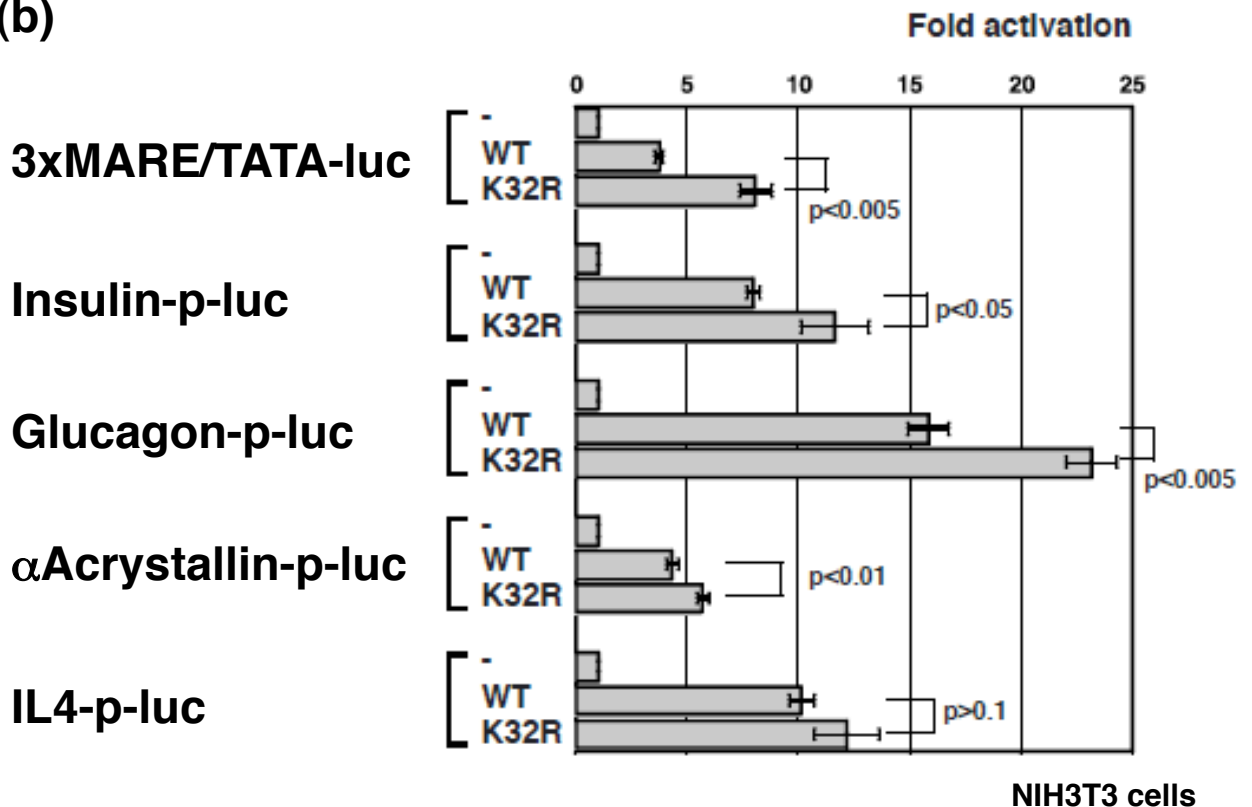
図12 MafAの転写活性化ドメインとGal4のDNA結合ドメインとの融合タンパク質においてもK32Rの変異により転写活性化能が高くなる

(a) MafAおよびMafAのN末端をGal4のDNA結合ドメイン (Gal4-DBD) を融合したタンパク質 (Gal4-MafA) の模式図。(b) pG4x5/TATA-lucレポーターを用いて、ルシフェラーゼアッセイを行った結果。融合タンパク質においても、K32Rの変異により野生型MafAと比べて顕著に高い転写活性を示すことが明らかになった。(c) 野生型およびK32R変異型Gal4-MafAと3種類のSUMOそれぞれとをNIH3T3細胞に共発現させ、その細胞抽出液を抗panMaf抗体を用いて、Western blotにより解析した結果。野生型のみがSUMO化修飾を受けている。

(a)



(b)



NIH3T3 cells

図13 MafAのK32R変異による転写活性化能への影響はプロモーターにより異なる

(a) 使用したMafの標的遺伝子のプロモーターの模式図。MAREはMafの結合部位を表し、他は協調的に働く転写因子の結合領域を示している。(b) Mafが標的とする遺伝子のプロモーターを挿入したレポータープラスミド(a)と野生型およびK32R変異型HA-MafAをNIH3T3細胞にトランスフェクションにより共導入し、24時間後に細胞を回収して、ルシフェラーゼの活性を測定した。K32R変異型HA-MafAはインスリン、グルカゴンおよびクリスタリン遺伝子のプロモーターに対して野生型よりも高い活性を示したが、IL4遺伝子のプロモーターではK32Rの変異による影響は見られなかった。

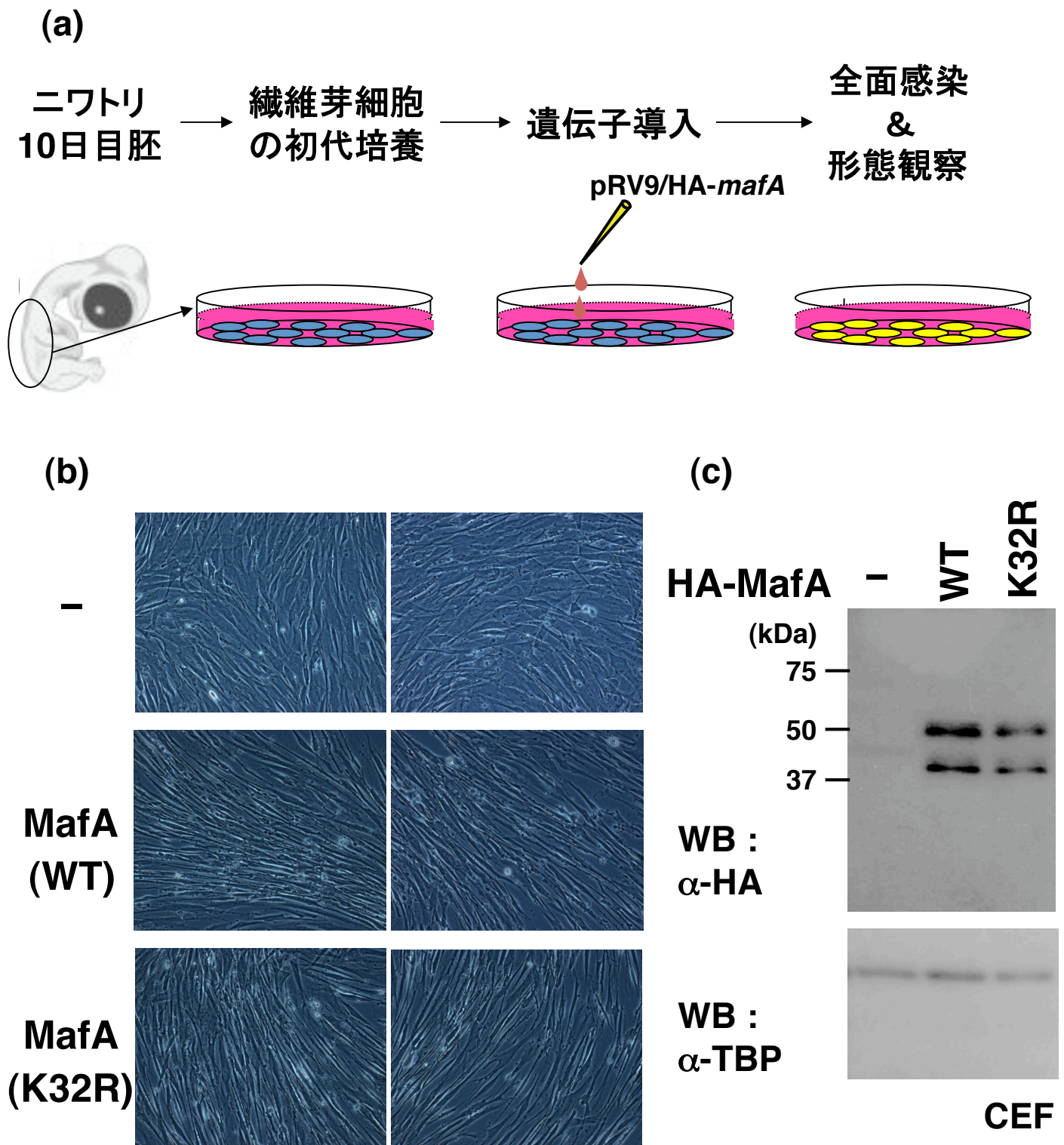


図14 CEFの形質転換による細胞の形態変化

(a) Chicken Embryonic Fibroblast (CEF) の初代培養およびレトロウイルスベクターによる HA-MafA の全面感染の模式図。ニワトリの10日目胚から初代培養した繊維芽細胞に、野生型またはK32R変異型HA-MafAを挿入したレトロウイルスベクターpRV9をトランスフェクションにより導入した。数日間後には、ほぼ全面感染に至り、CEFの形質転換が引き起こされる。(b) 野生型またはK32R変異型HA-MafAの全面感染により形質転換したCEFの明視野顕微鏡写真。WT、K32R変異体ともに細長く伸長した形態の変化が見られた。(c) これらの全面感染細胞の細胞抽出液を抗HA抗体を用いて、Western blotにより解析した結果。野生型と比較してK32Rの変異によるMafAのタンパク質量およびリン酸化状態への影響は見られなかった。TBP (TATA binding protein) はローディングコントロールである。

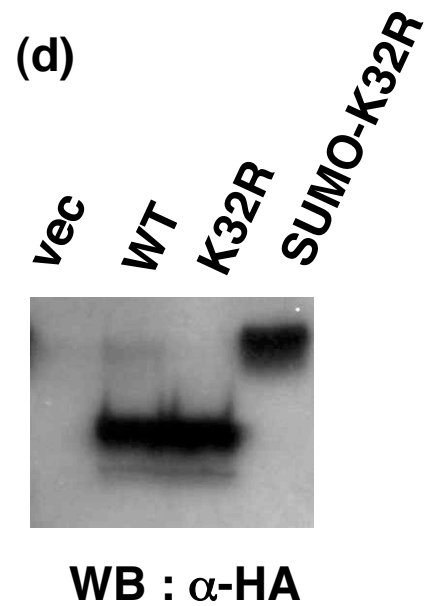
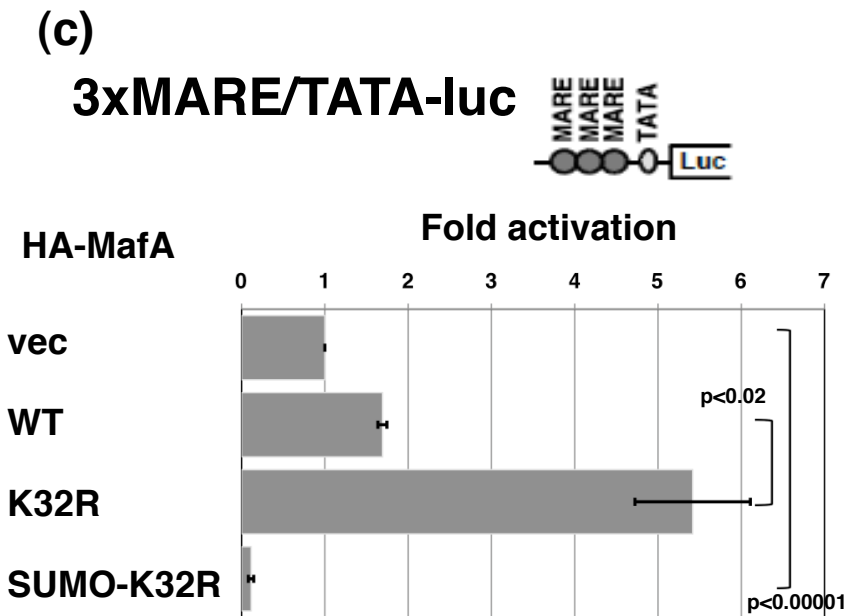
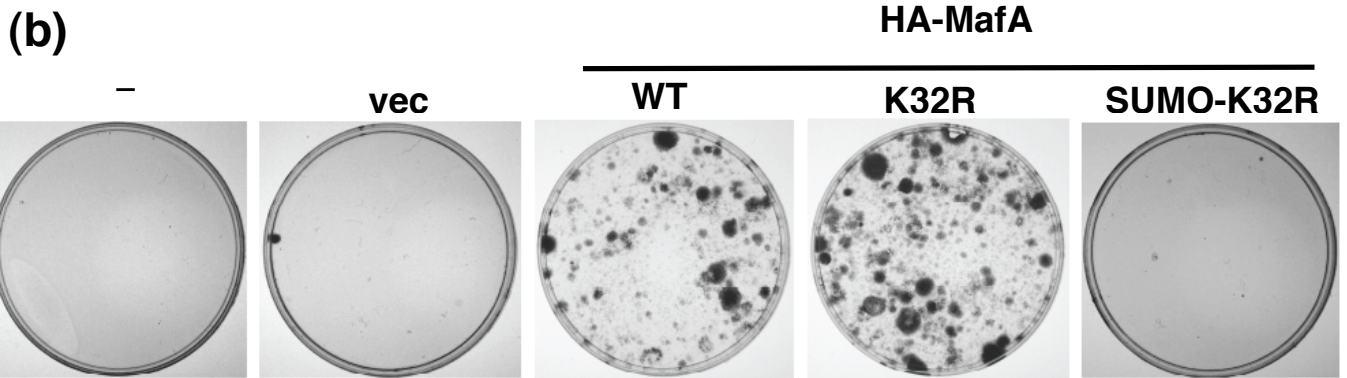
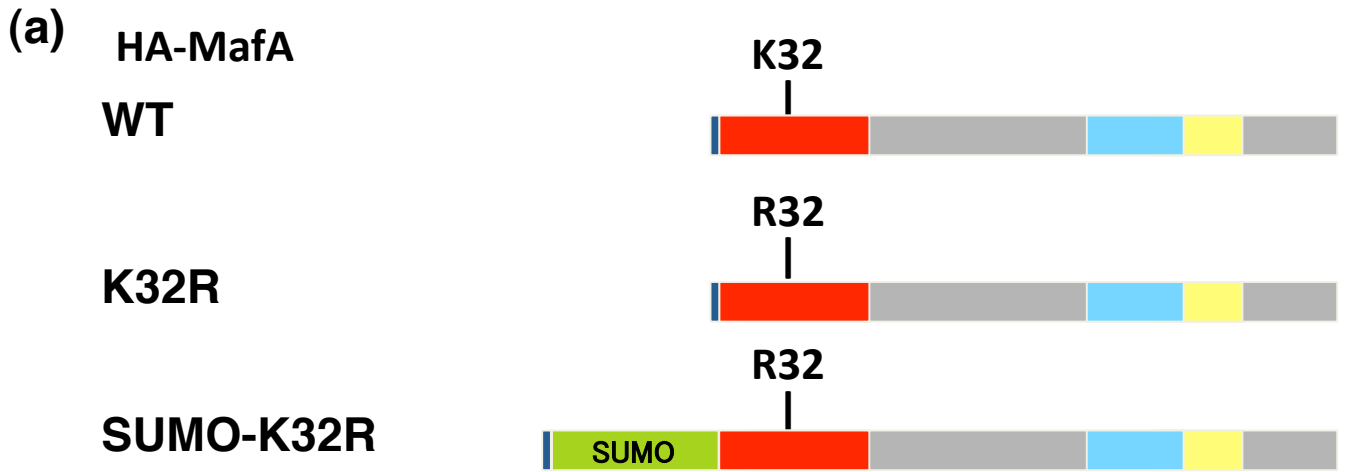


図15 SUMO化によってMafAの転写活性および形質転換能は抑制される

(a) 野生型および変異型MafAの模式図。(b) DF-1細胞に各HA-MafAを組み込んだハイグロマイシン耐性遺伝子を持った発現ベクターをトランスフェクションにより導入し、ハイグロマイシンを含む培養液中で3週間培養した。その後、クリスタルバイオレットでコロニーを染色し、形成されたコロニーを観察した。(c) 3xMAREレポーターと各HA-MafAをトランスフェクションにより共導入し、ルシフェラーゼの活性を測定した。HA-SUMO融合MafAは積極的な転写抑制を示した。(d) ルシフェラーゼアッセイのサンプルを抗HA抗体を用いて、Western blotにより解析した結果。これらのMafAタンパク質量に顕著な違いは見られなかった。

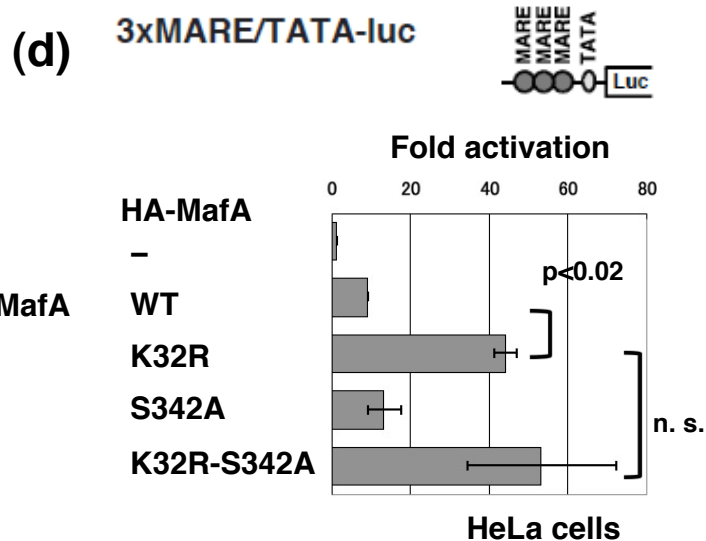
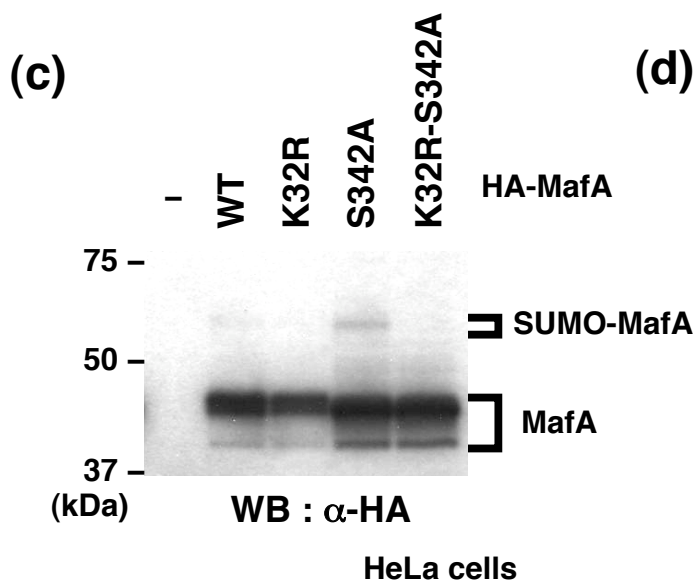
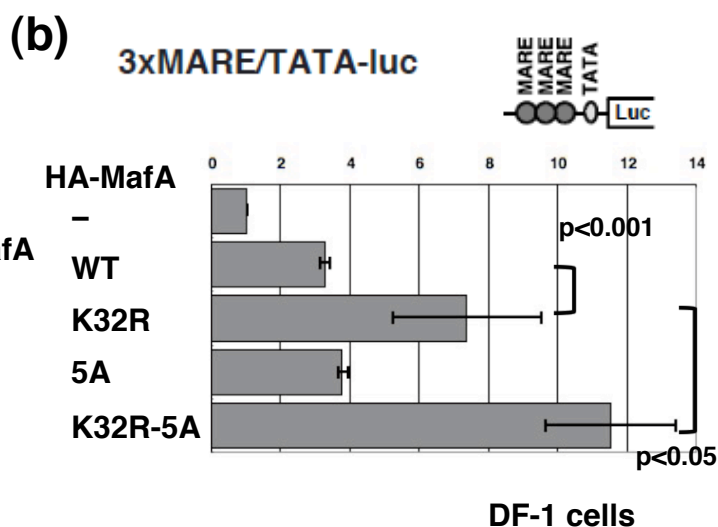
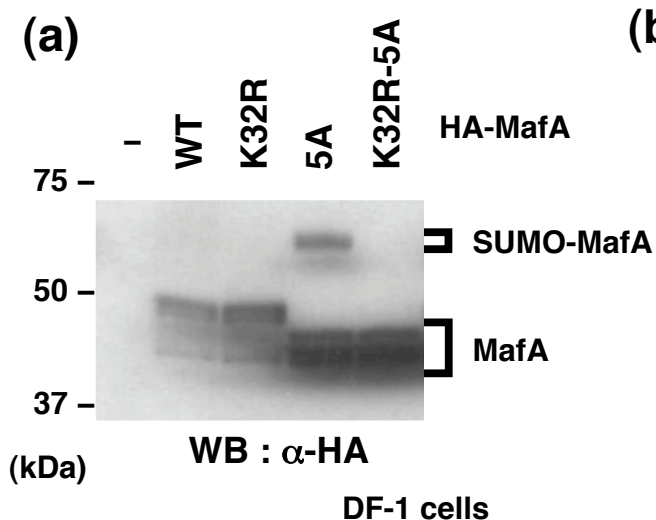
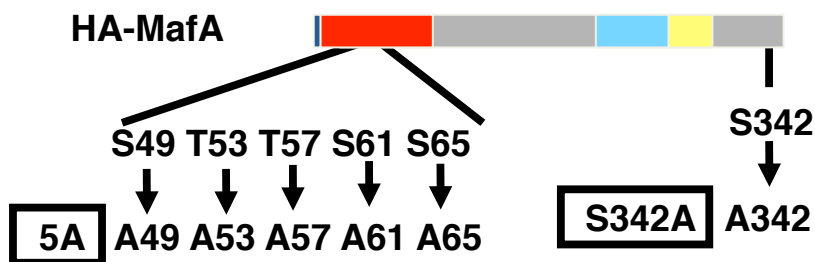


図16 リン酸化部位の変異はMafAのSUMO化を亢進させる

(a, b) 野生型および変異型HA-MafAをトランスフェクションによりDF-1細胞に導入し、24時間後にタンパク質を回収、Western blot (a)およびルシフェラーゼの活性(b)を解析した。5Aの変異により、SUMO化MafAの割合が増加していた。またK32R-5Aの変異により、K32R単独の変異よりも高い転写活性を示した。(c, d) 野生型および変異型HA-MafAをトランスフェクションにより、HeLa細胞に導入し、24時間後にタンパク質を回収、Western blot (c)およびルシフェラーゼの活性(d)を解析した。S342Aの変異により、SUMO化MafAの割合が増加していた。しかしながら、K32R-S342Aの変異による転写活性化能への影響はK32R単独の変異型MafAと比べても見られなかった。

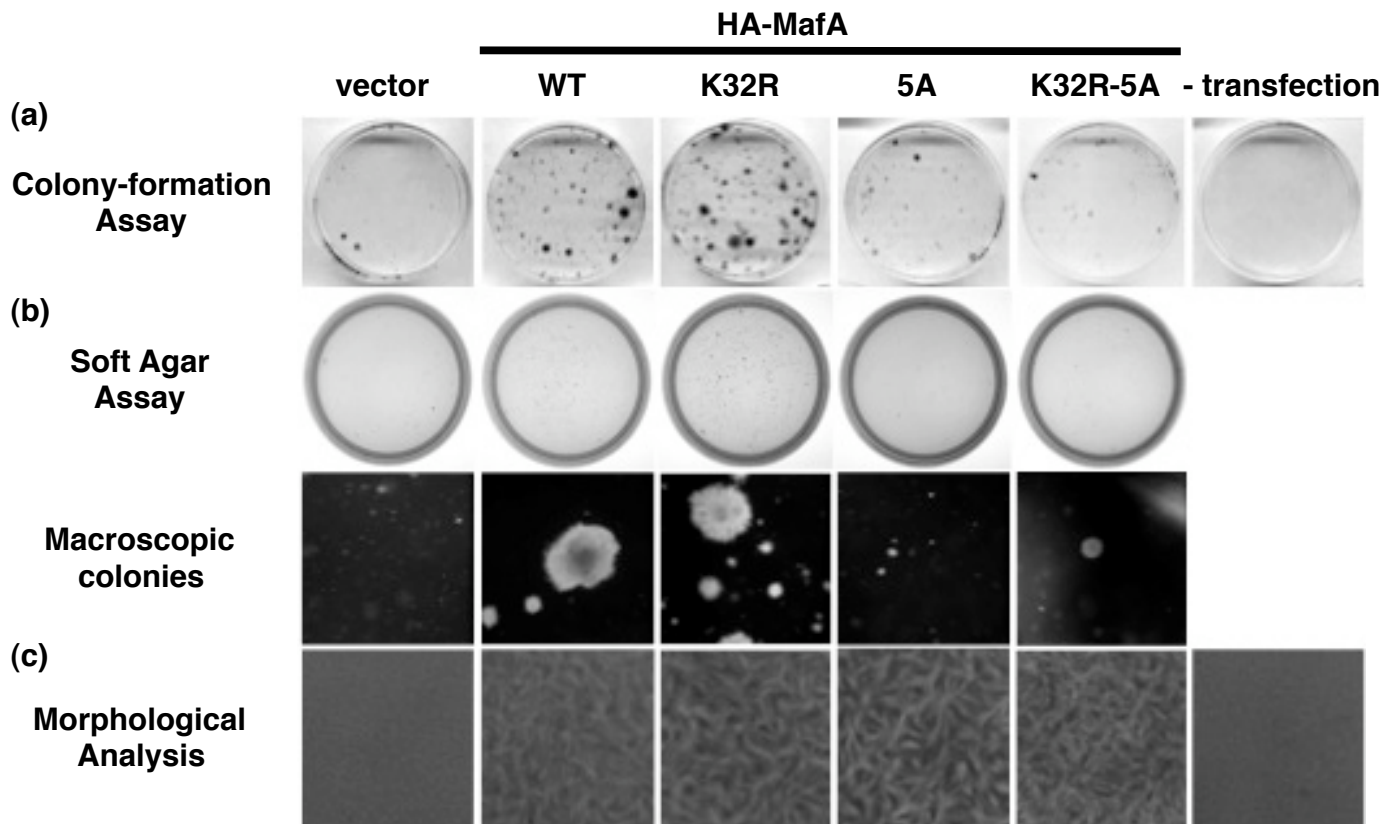
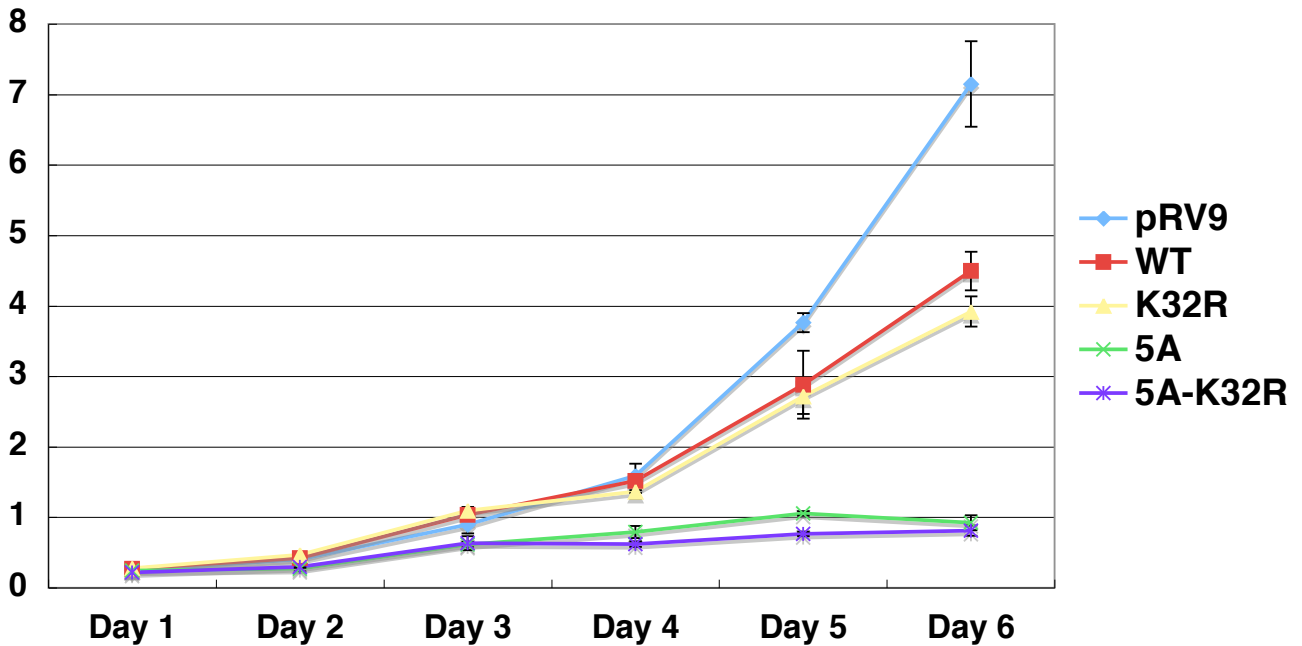


図17 5Aの変異により細胞形態の変化は見られるが、コロニーの形成能が失われる

(a) 野生型または変異型HA-MafA (K32R, 5A, K32R-5A) をpHygEF2ベクターを用いてDF-1細胞にトランスフェクションにより導入し、ハイグロマイシンを含む培養液で培養し、形成したコロニーを観察した。5Aの変異によりコロニー形成が見られなくなった。(b) 野生型または変異型HA-MafA (K32R, 5A, K32R-5A) をpRV9ベクターにより全面感染させたDF-1細胞を、軟寒天培地中で培養し、コロニー形成能を解析した。上図はプレート全体を示し、下図は拡大図を示している。5Aの変異によりコロニー形成が見られなくなった。(c) 野生型または変異型HA-MafA (K32R, 5A, K32R-5A) を全面感染させたDF-1細胞の形態を観察した結果。野生型、変異型に関係なくMafによる形態変化の誘導が見られた。

(a)

$\times 10^6$ cells



(b)

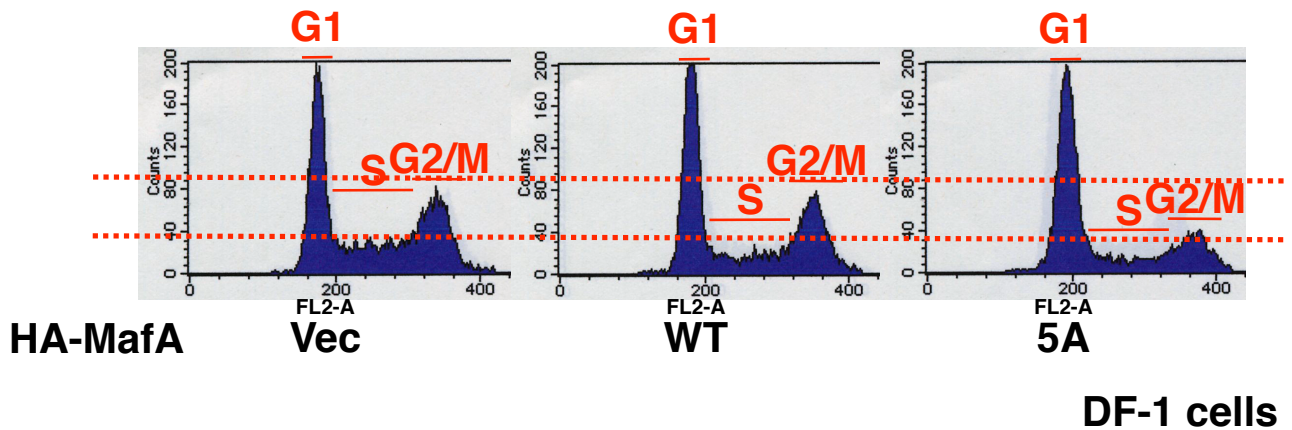
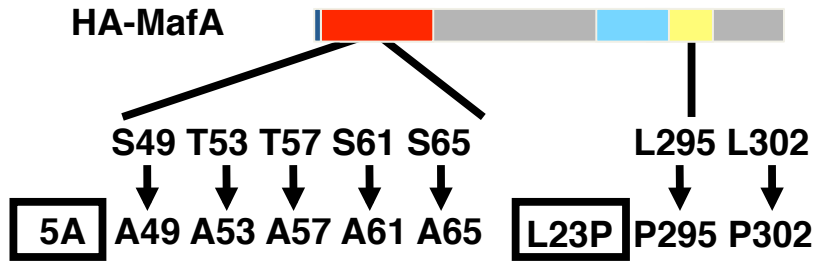


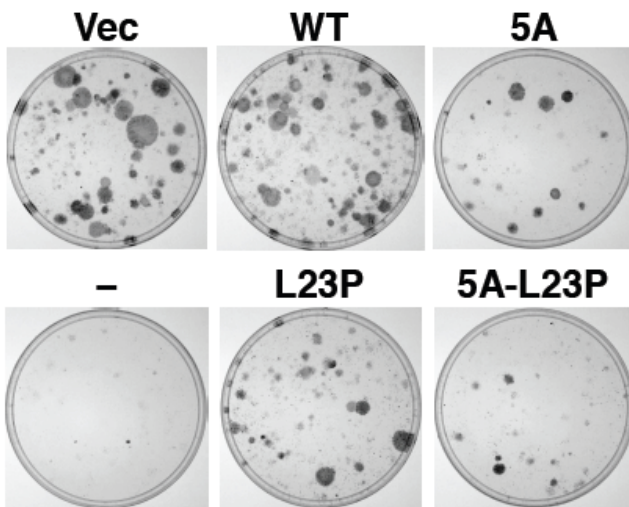
図18 5A変異型MafAは積極的に細胞増殖を抑制する

(a) DF-1細胞に野生型または変異型HA-MafA (K32R, 5A, K32R-5A) をレトロウイルスベクター (pRV9) を用いて全面感染させ、通常の条件で培養し、24時間毎に細胞数をカウントした。統計は独立した2回の実験により行った。5A変異型MafAの発現は転写活性とは非依存的に細胞増殖の抑制を行っていた。(b) 野生型または5A変異型HA-MafAを全面感染させたDF-1細胞を回収し、PIで染色後、FACSにより細胞周期の解析を行った。5A変異型MafAの発現によりS期およびG2/M期の細胞の割合が顕著に低下していた。

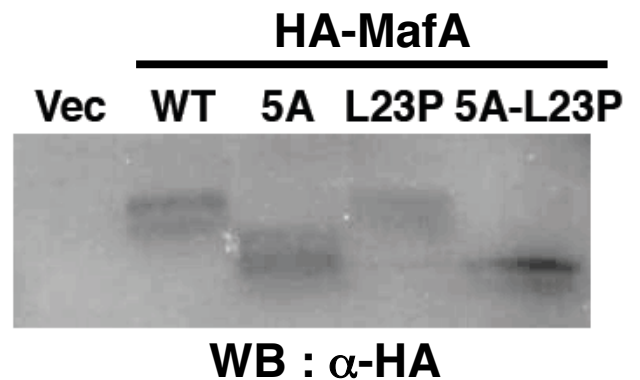
(a)



(b)



(c)



(d)

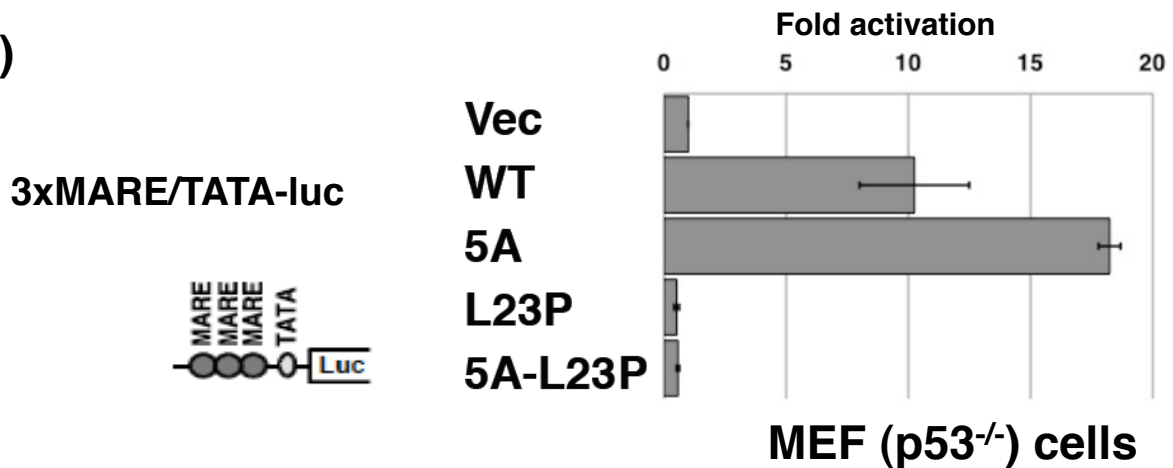


図19 5A変異型MafAによるコロニー形成能の抑制は転写活性化能およびp53とは関係ない
(a) 実験に使用した変異型MafAの変異部位の模式図。(b) MEF $p53^{-/-}$ 細胞に野生型または変異型HA-MafA (L23P, 5A, 5A-L23P) をトランスフェクションにより導入し、ハイグロマイシンを含む培養液中で培養後、コロニー形成を見た。各変異により野生型よりもコロニー形成の抑制が見られた。(c, d) 野生型または変異型HA-MafA (L23P, 5A, 5A-L23P) をトランスフェクションによりMEF $p53^{-/-}$ 細胞へと導入し、細胞抽出液をWestern blot (c)およびルシフェラーゼの活性を測定した(d)。泳動度から判断すると、L23P変異型MafAもリン酸化を受けていると考えられる。またL23Pの変異により、転写活性化能は失われた。

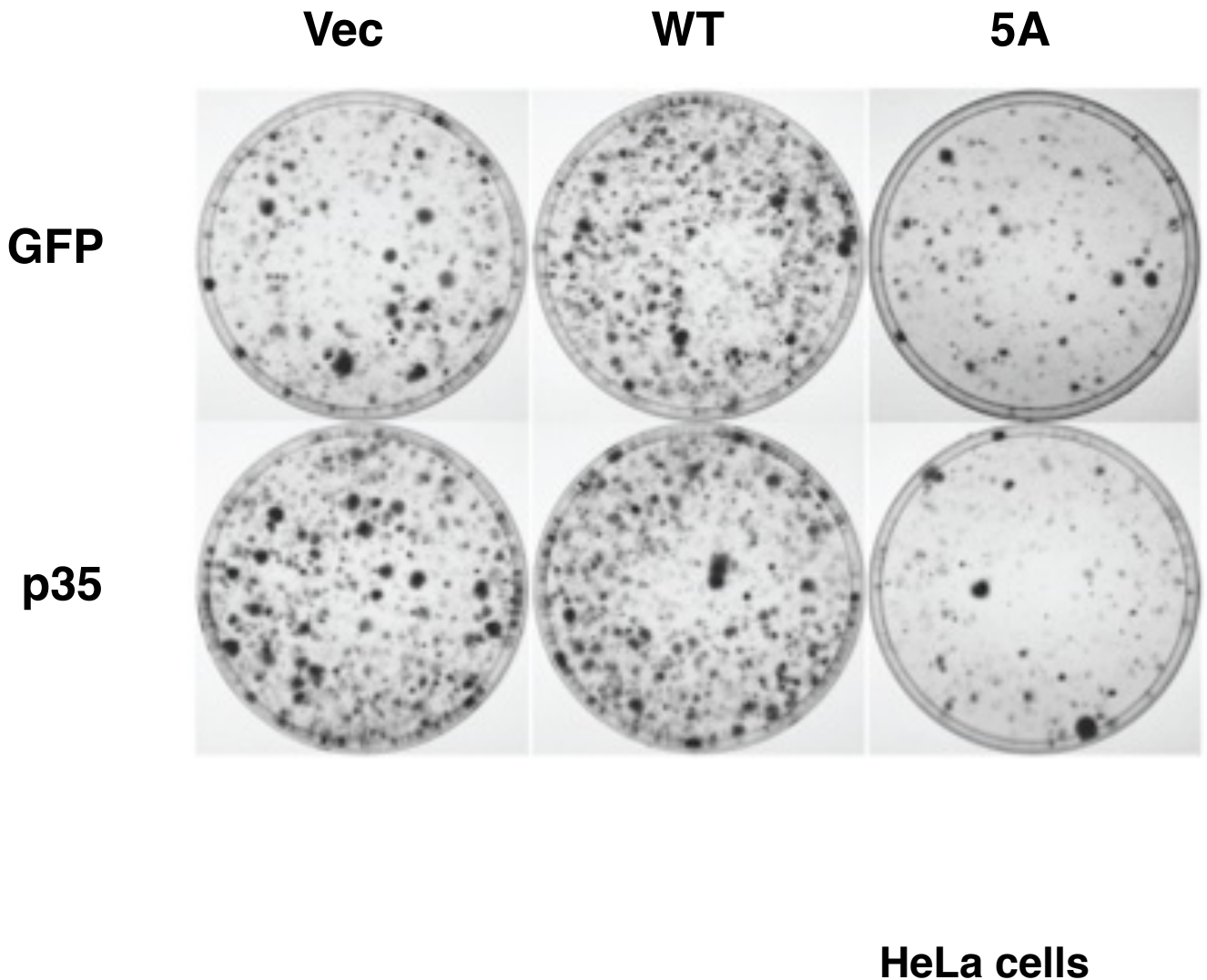


図20 5A変異型MafAの発現は細胞死とは関係なくHeLa細胞のコロニー形成を抑制する

HeLa細胞に野生型または5A変異型HA-MafAとp35 (apoptosis inhibitor)をトランスフェクションにより共導入し、ハイグロマイシンを含む培養液中で培養後、形成されたコロニーを解析した。その結果、5A変異型MafAの発現により、野生型MafAよりもコロニー形成の抑制が見られた。また、このコロニー形成の抑制はp35の共発現時にも見られた。

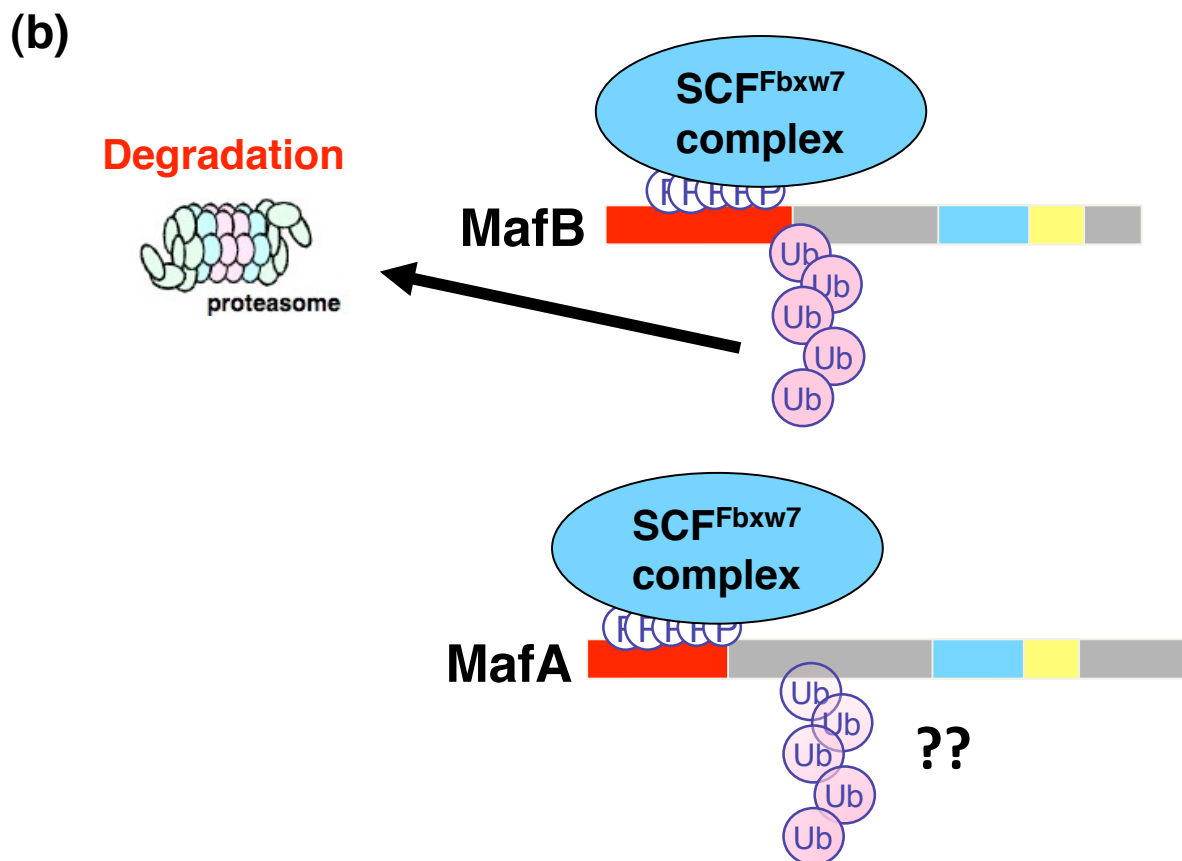
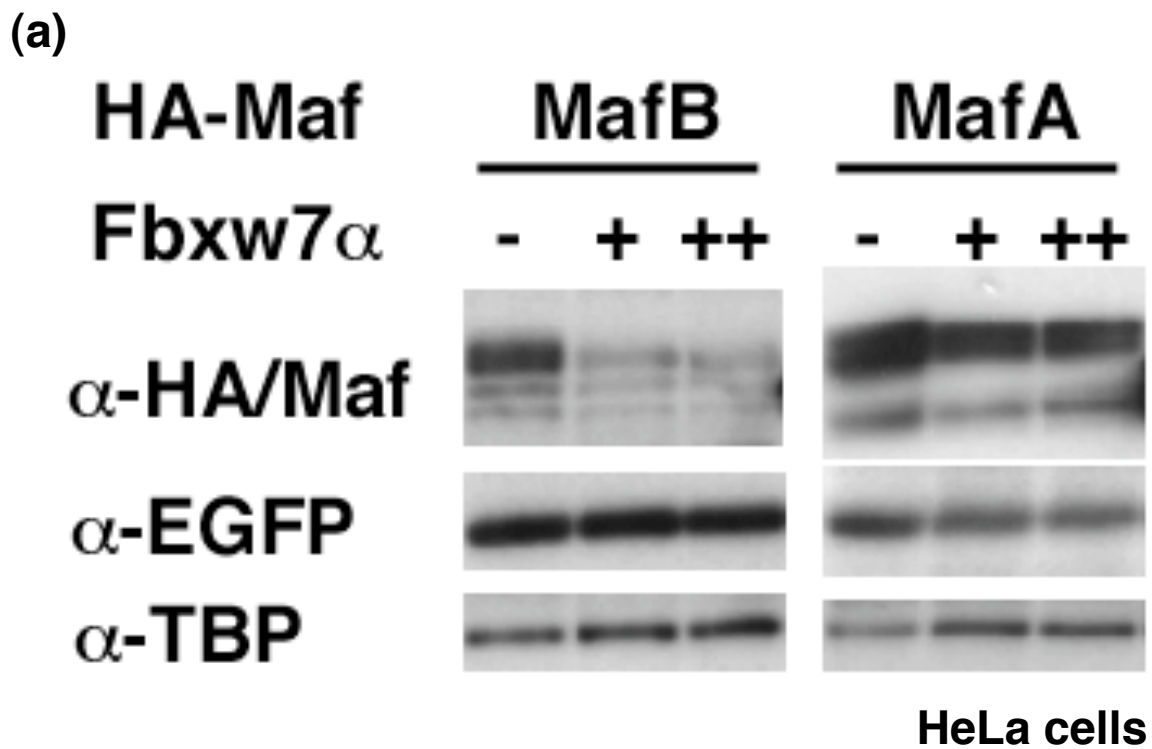


図21 Fbxw7との共発現はMafBタンパク質の量を減少させる

(a) HeLa細胞にHA-MafBまたはHA-MafAとFbxw7 α を共発現させ、細胞抽出液をWestern blotによりタンパク質量を解析した結果。Fbxw7 α の共発現によりMafBのタンパク質量は減少したが、MafAはあまり変化が見られなかった。(b) Fbxw7 α によるMafタンパク質の制御機構の概念図。Fbxw7 α は基質のリン酸化を認識することが知られている。MafBはFbxw7 α によりユビキチン化を受け、分解が促進するが、MafAは分解の促進がほとんど見られない。

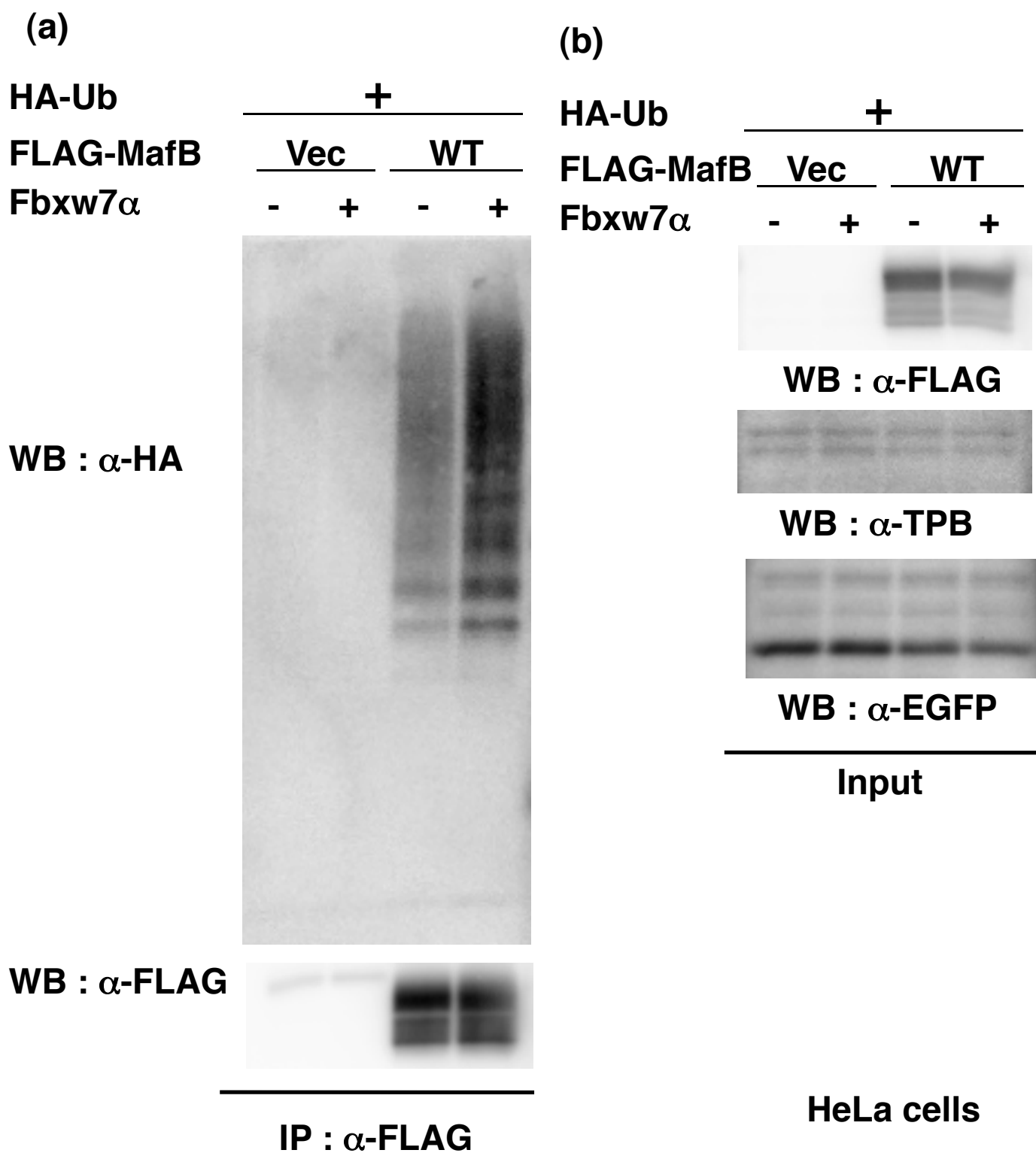


図22 Fbxw7 α はMafBのユビキチン化は促進する

(a、b) HeLa細胞にHA-UbiquitinおよびFLAG-MafB、Fbxw7 α を共導入し、8時間のMG132処理後、回収した細胞抽出液を抗FLAG抗体により免疫沈降を行い、その後Western blotにより解析を行った。その結果、Fbxw7 α の共導入により(a)免疫沈降を行ったサンプル。(b) inputのサンプル。

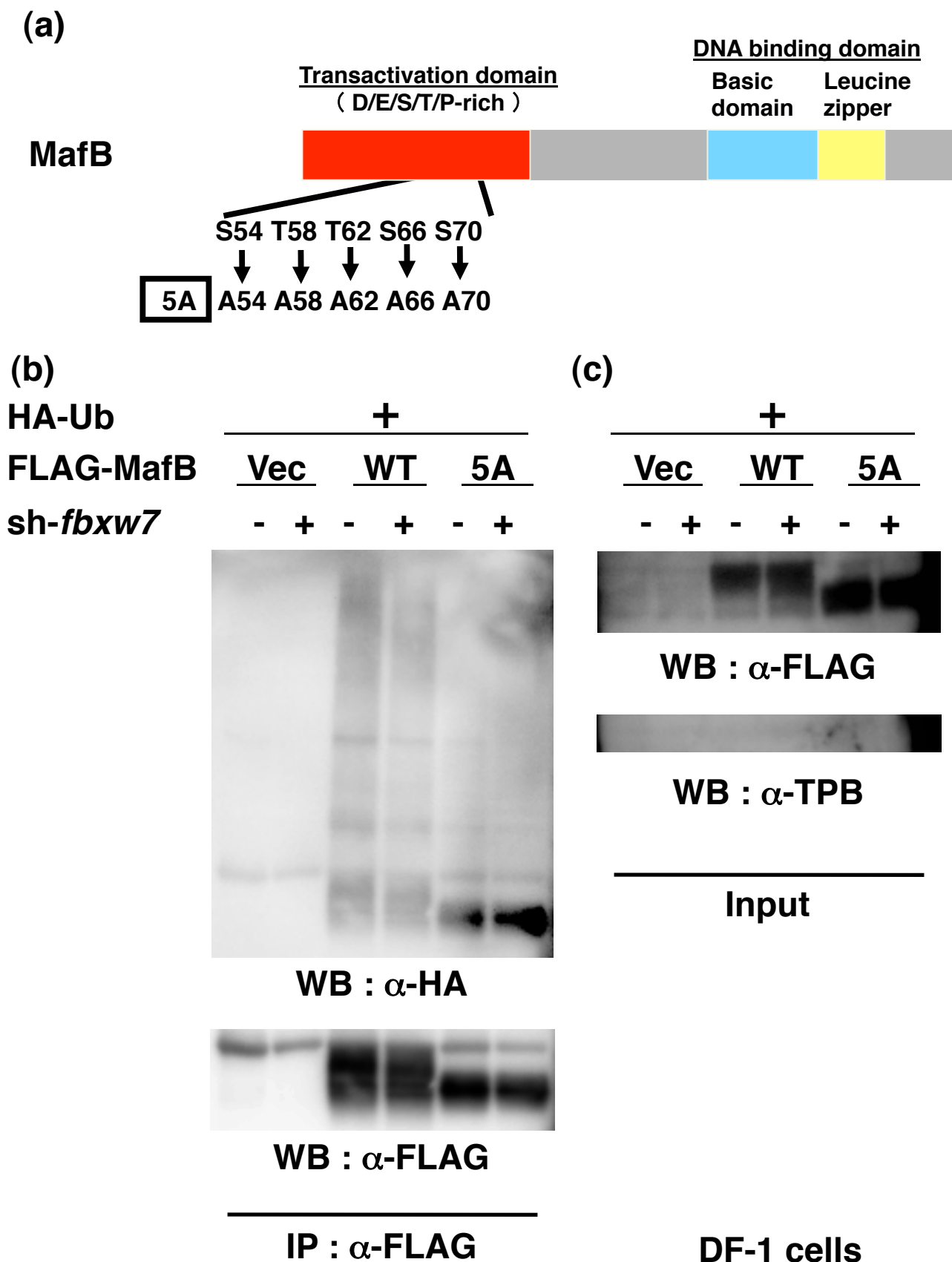


図23 *fbxw7*遺伝子のノックダウンによりMafBのユビキチン化は低下する

(a) MafBの構造と変異部位を示した模式図。(b) 野生型および5A変異型FLAG-MafBとHA-ubiquitin (HA-Ub)、sh-*fbxw7*をDF-1細胞にトランスフェクションにより共導入し、8時間MG132処理をした。トランスフェクションを行ってから24時間後に細胞を回収して、細部抽出液を抗FLAG抗体により免疫沈降後、Western blotによりMafBのユビキチン化およびタンパク質量を解析した。*fbxw7*遺伝子のノックダウンによりMafBのユビキチン化は低下していた。(c) inputのWestern blot解析の結果。

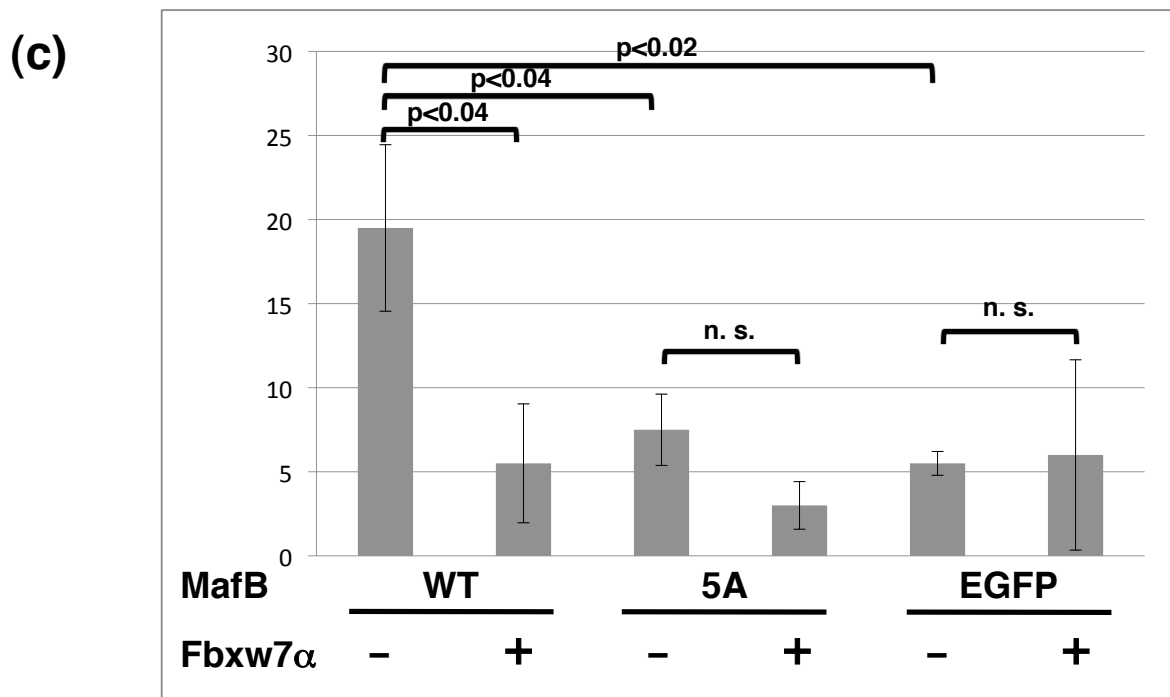
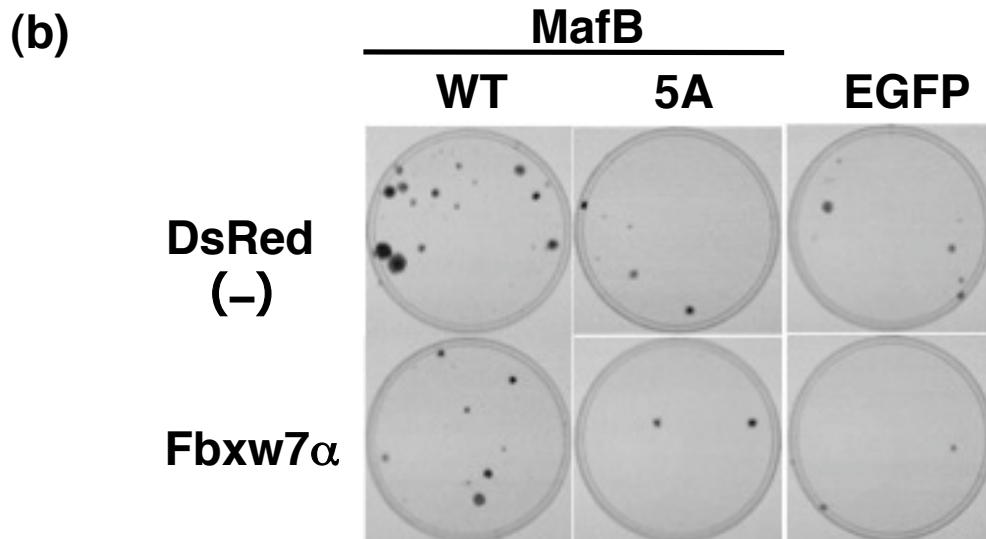
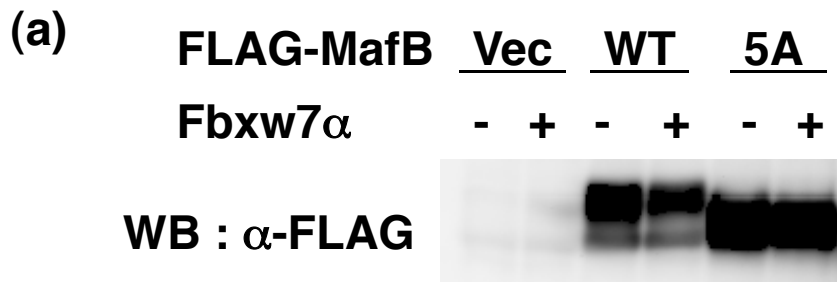


図24 MafBはFbxw7 α との共導入によりトランスフォーメーション活性が抑えられる

(a) 野生型および5A変異型FLAG-MafBとFbxw7 α をDF-1細胞にトランスフェクションにより共導入し、24時間後に細胞を回収して、Western blotによりMafBのタンパク質を解析した。Fbxw7 α の共導入による5Aの変異によりMafBタンパク質の減少は見られなくなった。

(b) DF-1細胞にトランスフェクションにより野生型および5A変異型MafAを組み込んだハイグロマイシン耐性遺伝子を持った発現ベクターを導入し、ハイグロマイシンを含む培養液中で3週間培養後、コロニーをクリスタルバイオレットで染色した。

(c) コロニー数をカウントし、グラフ化した結果。Fbxw7 α の共導入によりMafBの形質転換能が抑制された。統計解析は独立した2回の解析に基づいたt検定を行った。

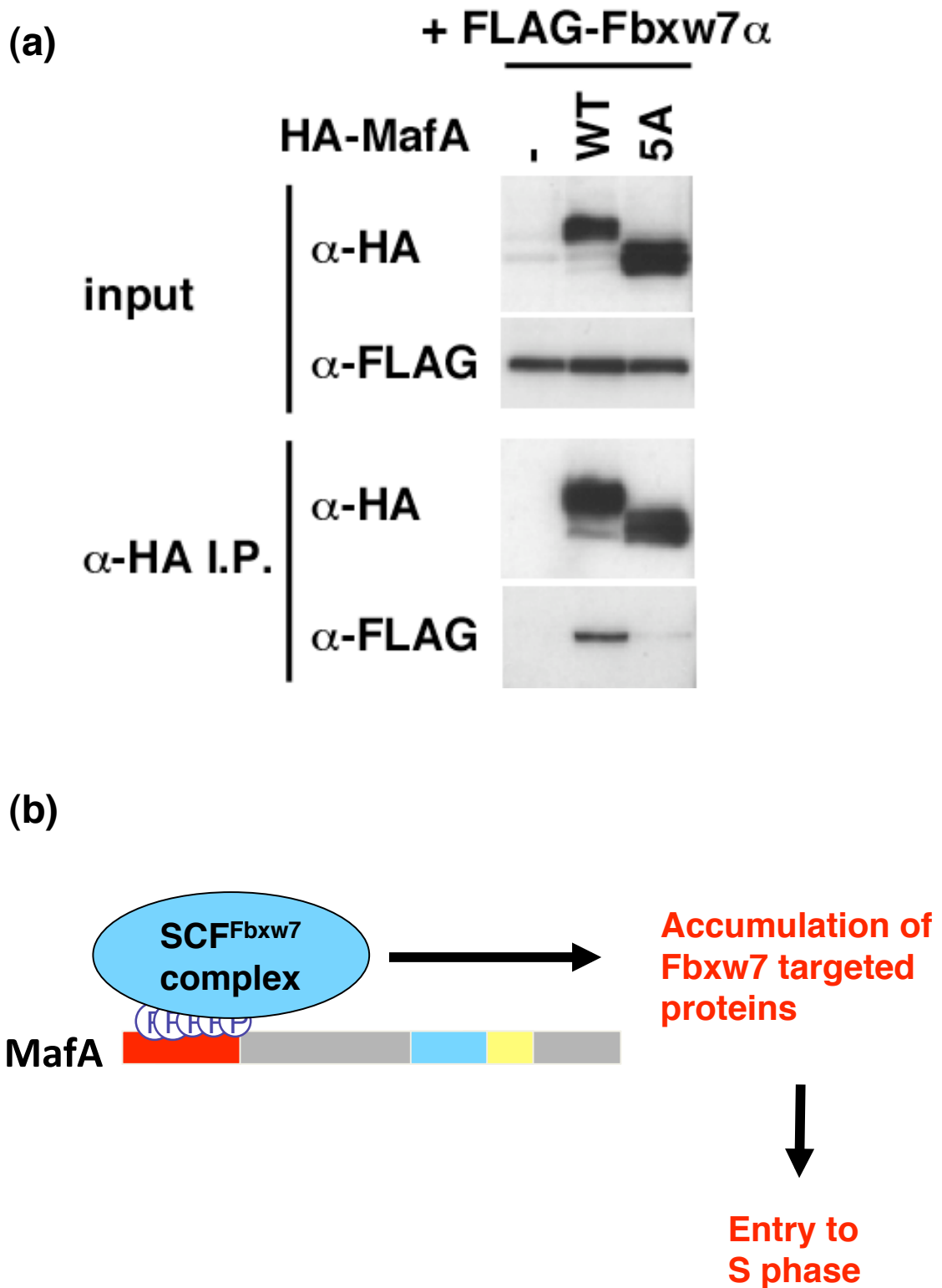


図25 Fbxw7 α はリン酸化MafAと特異的に結合する

(a) HeLa細胞に野生型または5A変異型HA-MafAとFLAG-Fbxw7 α を共発現させ、抗HA抗体を用いて免疫沈降後、Western blotにより解析した結果。野生型MafAはFbxw7 α と相互作用するが、5Aの変異により相互作用が見られなくなった。(b) MafAによるFbxw7の活性調節機構のモデル図。

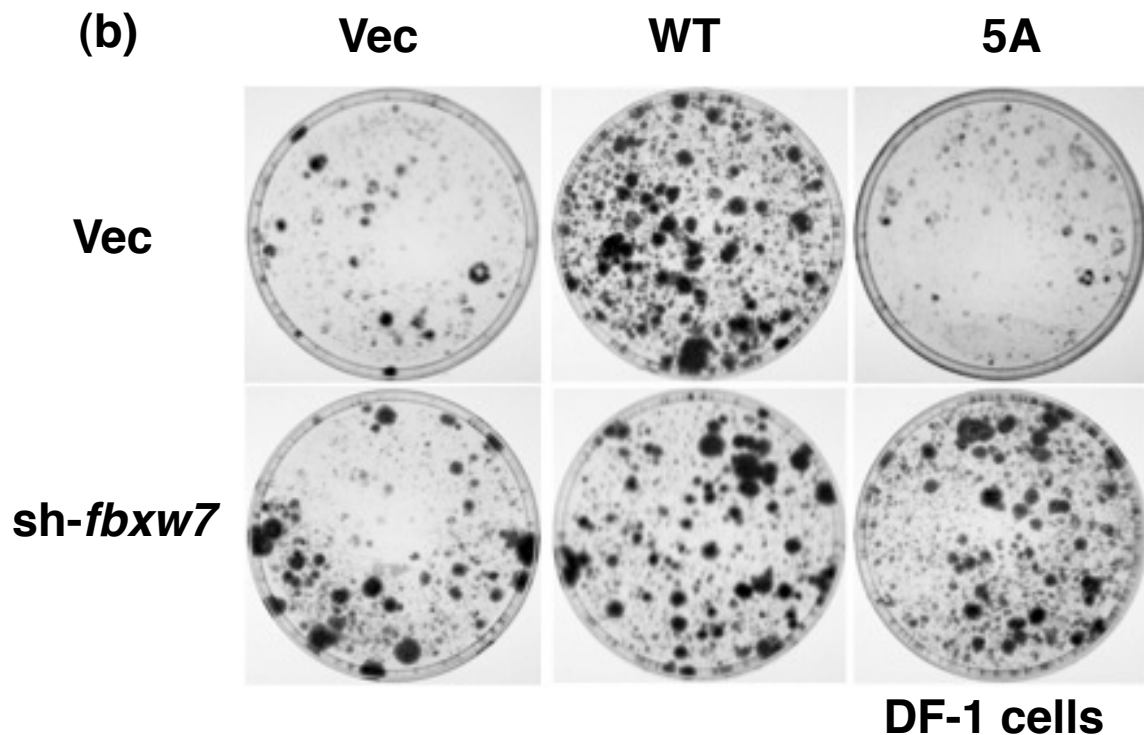
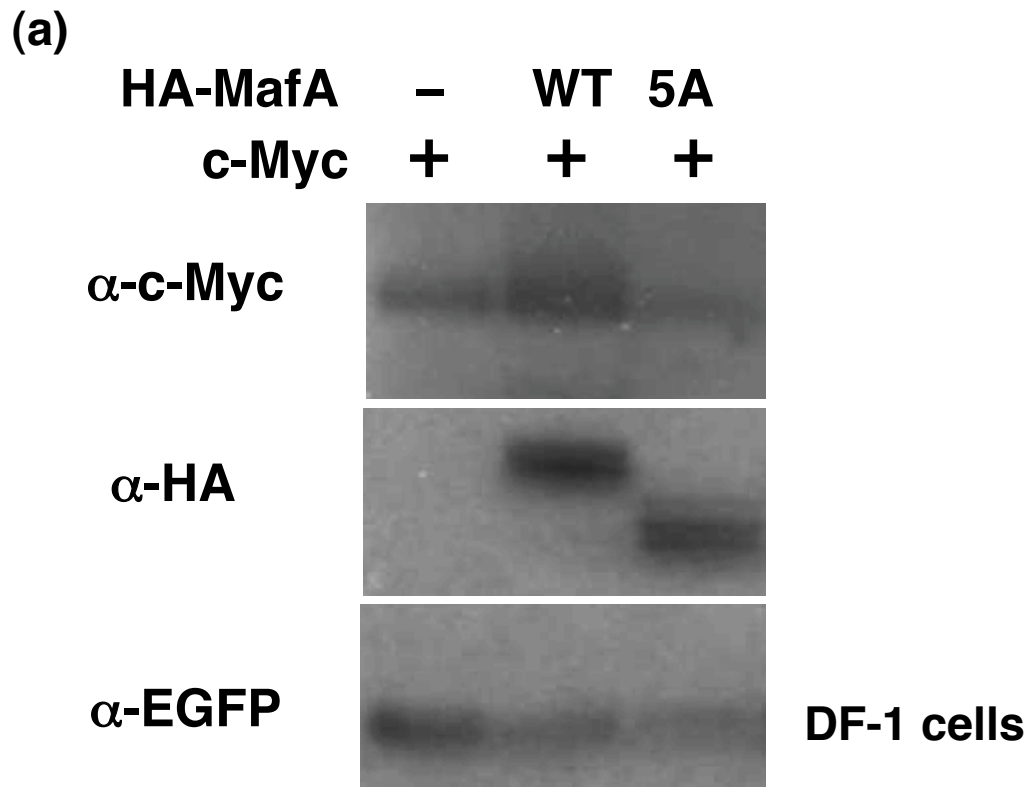


図26 *fbxw7*のノックダウンにより5A変異型MafA発現細胞でもコロニー形成が可能になる
 (a) DF-1細胞に野生型または5A変異型HA-MafAとc-Mycを共発現させ、抗c-Myc抗体および抗HA抗体、抗EGFP抗体（トランスフェクションコントロール）を用いて、Western blotにより解析した。野生型MafAの発現時にのみc-Mycタンパク質の増加が見られた。(b) DF-1細胞にトランスフェクションにより野生型または5A変異型HA-MafAを組み込んだハイグロマイシン耐性遺伝子を持った発現ベクターおよびsh-*fbxw7*を導入し、ハイグロマイシンを含む培養液で培養後、コロニーをクリスタルバイオレットで染色した。*fbxw7*遺伝子の機能阻害により5A変異型MafA発現細胞でもコロニーの形成が見られた。

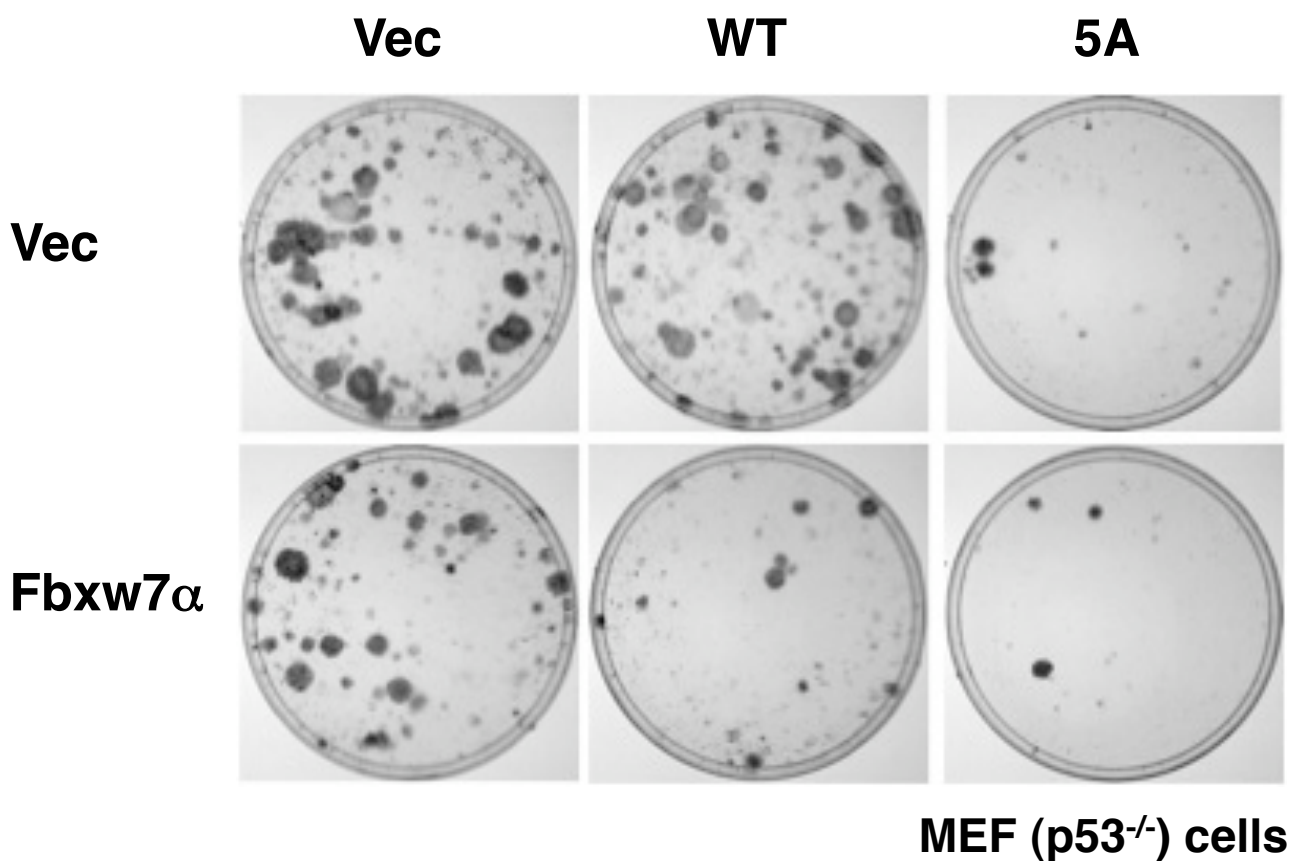


図27 Fbxw7 α の共導入により野生型MafAでもコロニー形成の抑制が生じる

MEF_{p53^{-/-}}細胞に野生型または5A変異型HA-MafAおよびFbxw7 α をトランスフェクションにより共導入した後、ハイグロマイシンを含む培養液で培養後、コロニーをクリスタルバイオレットで染色した。その結果、Fbxw7 α の単独の発現によるコロニー形成能への影響は見られなかった。一方で、5A変異型MafAと同様に、野生型MafAでもFbxw7 α を共発現することでコロニーの形成の抑制が見られた。

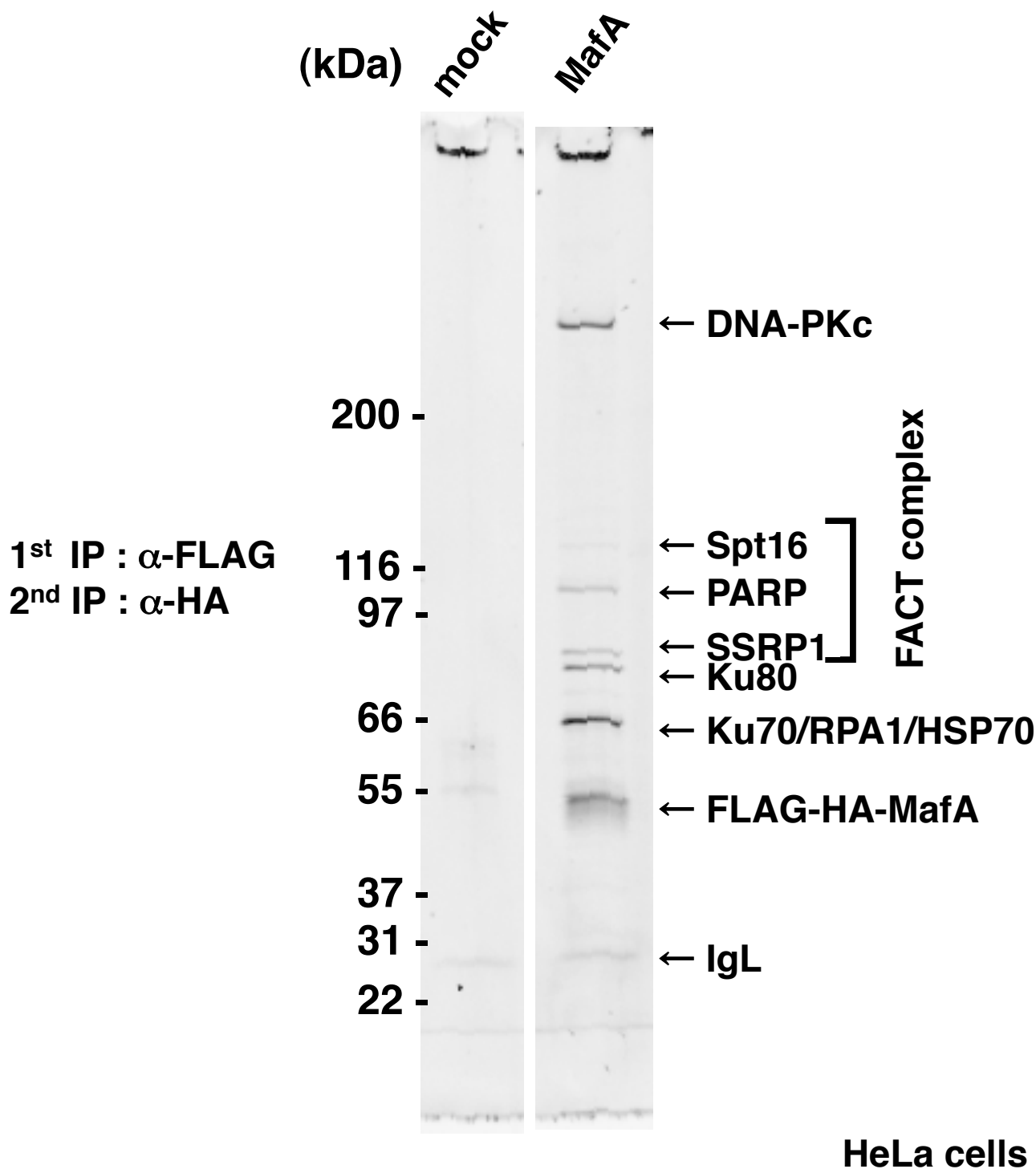


図28 MafAの複合体精製

Floating-adaptive HeLa細胞にレトロウイルスベクター (pOZ) でFLAG-HA-MafAを発現させた後、IRESにより発現するIL-2の細胞外ドメインを認識する抗体を結合したマグネティックビーズを用いて、3度ソーティングを行った。その後、樹立した細胞をスピナーフラスコ内で10Lになるまで培養した。その後、回収した細胞の核内抽出液を調整し、抗FLAG抗体および抗HA抗体を用いて2回精製を行った後、SDS-PAGEにより分離したゲルを蛍光染色した。その後、質量分析機により、タンパク質の同定を行った。

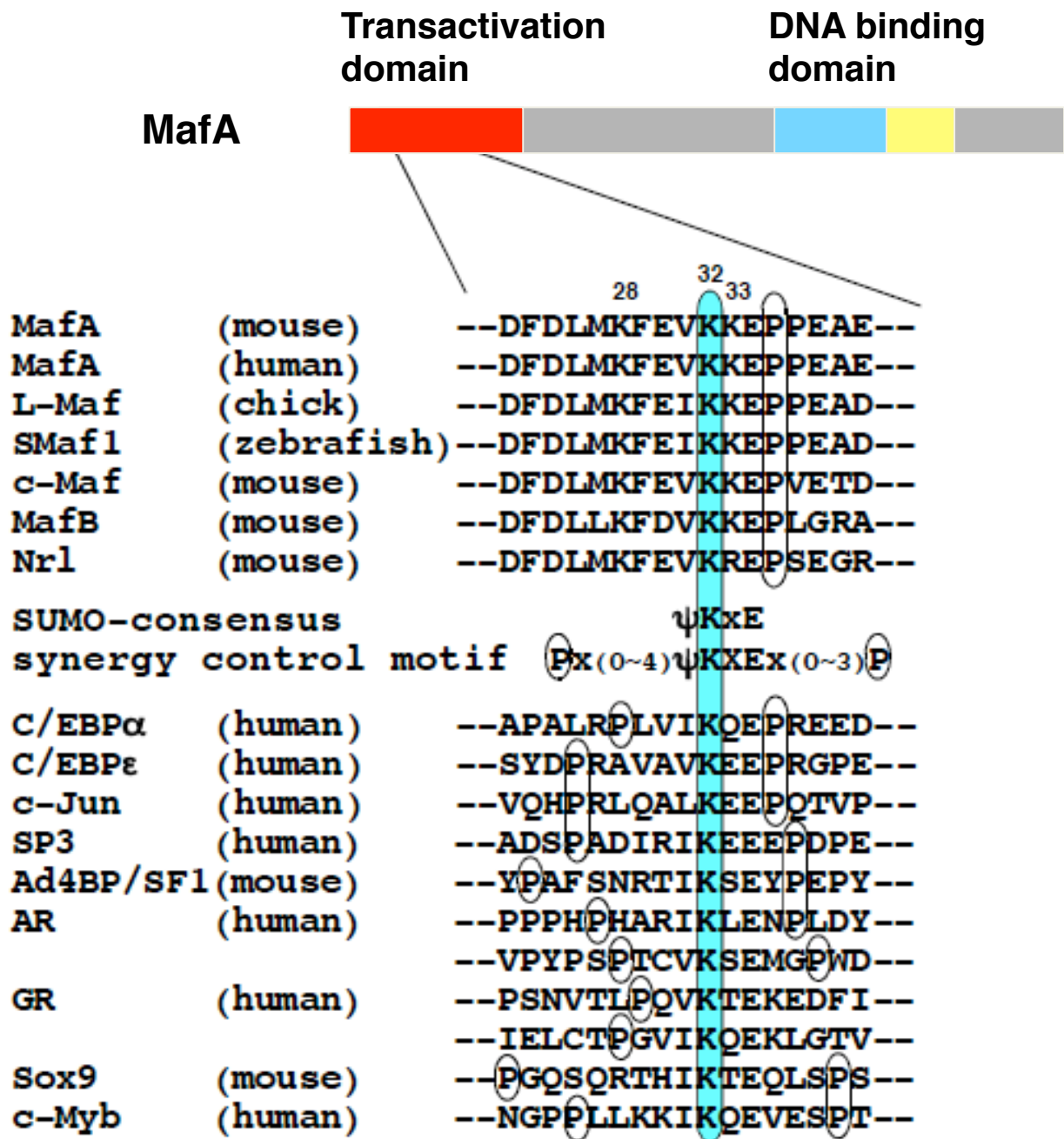


図29 MafAはSUMO化修飾を受ける可能性がある

Mafファミリーの転写活性化ドメインに保存されているSUMO化コンセンサス配列を示した。また、既に知られている転写因子のSynergy control motifと比較した。SUMO化コンセンサス配列はSynergy control motifと部分的に一致している。MafファミリーのSUMOコンセンサス配列のC末端側にはプロリンが存在しており、Synergy control motifとも部分的に類似している。

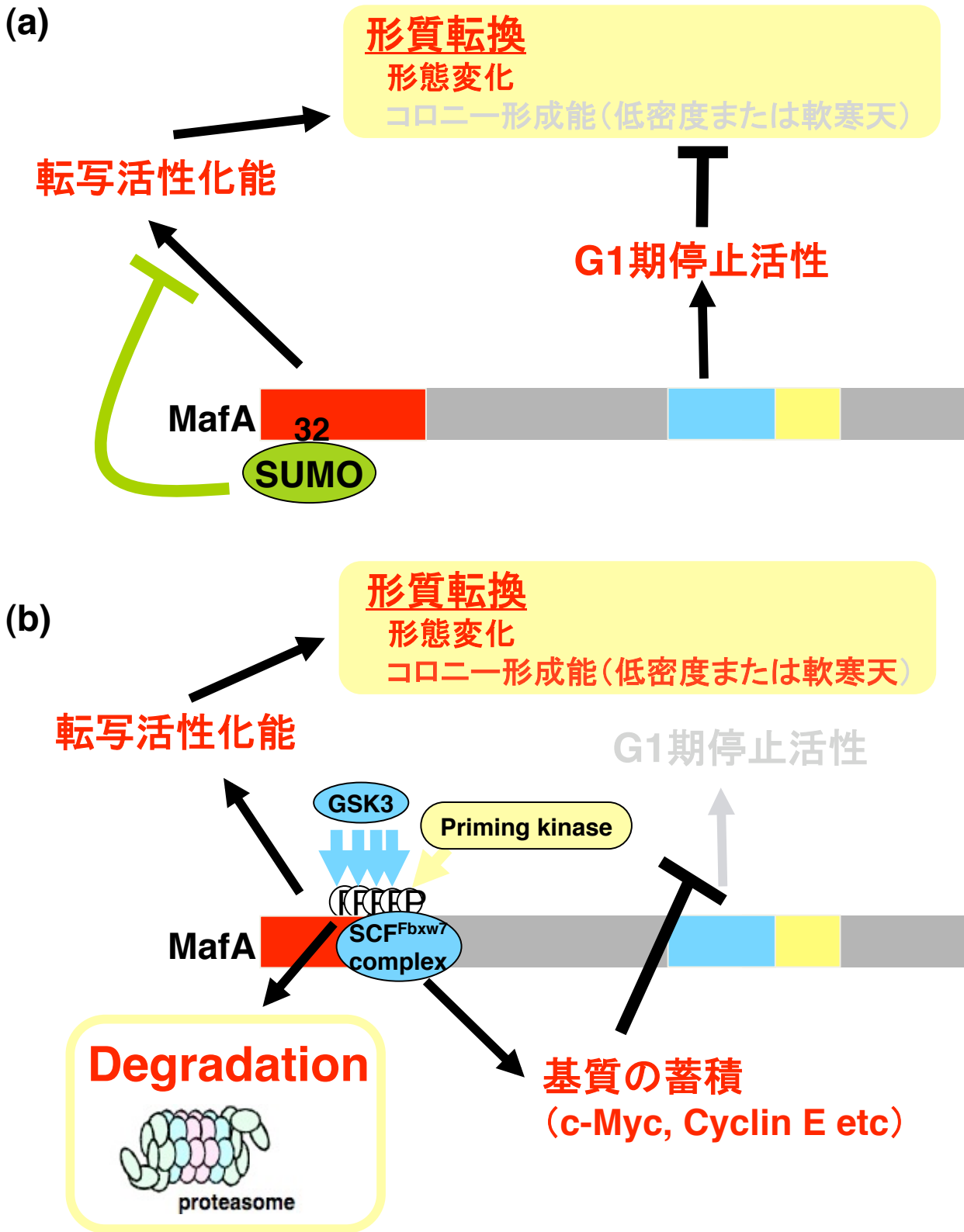


図30 MafAの形質転換の分子機構モデル

(a) MafAは転写活性化能により、組織特異的な遺伝子の発現を行い細胞分化を誘導する。一方で、発現異常による発癌を引き起こす。しかしながら、本研究では図に示す様にMafAがG1期で細胞周期を停止させる活性を持つこと見だし、細胞増殖が抑制されていることを明らかにした。さらに、非リン酸化状態ではSUMO化による転写活性化能の抑制も起こっている。(b) MafAのリン酸化はさまざまな機能を与える。そのひとつにプロテアソームによる分解がある。さらに本研究から、MafAはリン酸化依存的なFbxw7 α との相互作用を介して、Fbxw7 α の機能阻害を起こす。その結果、基質であるc-Mycなどの蓄積が生じ、これらの機能により細胞周期が進行すると考えられる。このMafAの異なる2つの機能が発癌を引き起こす分子機構となっていると考えられる。