Kobe University Repository : Kernel

PDF issue: 2025-12-05

Bcl6-dependent transcriptional repression by bazf

竹長，真紀

(Degree)
博士（医学）
(Date of Degree)
2003-03-31
(Resource Type)
doctoral thesis
(Report Number)
甲2854
(URL)
https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1002854

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。

【１２８】

氏　名　・(本　籍)　　竹長　真紀　　（　山口県　）

博士の専攻分野の名称　博士（医学）

学　位　記　番　号　　博い第1523号

学位授与の　要　件　　学位規則第４条第１項該当

学位授与の　日　付　　平成１５年３月３１日

【 学位論文題目 】

Bcl6-dependent transcriptional repression by BAZF
(BAZFの転写抑制作用はBcl6が規制している)

審　査　委　員

主　査　　教　授　黒田　嘉和
　　教　授　南　　康博
　　教　授　千原　和夫

Bcl6 は non-Hodgkin lymphoma のクロモゾームの breakpoint（3q27）より分離された、プロトオンコジーンの一つであり、germinal center の形成に関与している。N 端に BTB／POZ タイプのドメインを持ち、C 端には、Kruppel-type の zinc finger を持っている。

BTB/POZ ドメインは蛋白－蛋白との結合に重要な働きをしており、zinc finger は DNA との結合に重要な働きをしている。また、Bcl6 は核内に存在する核内蛋白であり、転写抑制作用を持つ。転写抑制作用は BTB／POZ ドメインだけでなく、BTB/POZ ドメインと zinc finger との間の中央の領域だけでも活性を持つ。転写抑制のメカニズムの一つてして、コリプレッサーである SMRT と mSin3 と結合し、HDAC1 を recruit する事によりヒストンの脱アセチル化により抑制作用を示す。

一方、BAZF は Bcl6 のホモログとしてクローニングされた新しい遺伝子である。BAZF と Bcl6 の一番の違いは組織での expression pattern である。Bcl6 がユビキタスに存在するの対し、マウスにおいては BAZF は肺や脾臓において、expression が強くみられる。しかしながら、Bcl6 と同様に BTB／POZ タイプのドメインを N 端に持ち、C 端には Kruppel-type の zinc finger を持つ。アミノ酸レベルでは、zinc finger は 94%、BTB／POZ ドメインは 65%の相同性を持つ。また中央には全く同じ配列である 17 のアミノ酸が Bcl6 では 370aa から 386aa に、BAZF では 188aa から 204aa に存在する。BAZF も Bcl6 と同様に核内蛋白として存在し転写抑制作用を示す事が知られているが、そのメカニズムはまだ解明されていない。

そこで、我々は yeast-two-hybridscreening の手法を用いて、BAZF と結合する蛋白を同定し、転写抑制作用について明らかにしようと試みた。

Yeast-two-hybrid screening では、コリプレッサーである SMRT, mSin3, HDAC1 等の蛋白は分離されず、BAZF 自身、それらの complex を recruit 出来ない可能性が示唆された。

そのため、転写抑制作用を示すには Bcl6 等の他の molecular の必要性があると考えられた。そこでルシフェラーゼリポーターアッセイの系を用い、BAZF、Bcl6 それぞれの fusion protein(Gal4-fusion-BAZF/Gal4-fusion-Bcl6)を作り、Bcl6 を欠いたマウスの embryonal fibroblast（MEF）にトランスフェクションし、転写抑制作用について検討を行なった。Wild type の MEF では BAZF, Bcl6 ともに転写抑制作用を示したが、Bcl6-deficient の MEF では、BAZF のみ転写抑制作用を示さなかった。そこで、Bcl6-deficient の cell line である K562 cells、WIL2-NS cells を用いて、同様の実験を行なった。BAZF は同じく転写抑制作用を示さなかった。

次に、Bcl6 と同様に BTB/POZ ドメインを含む領域（1-128aa）と中央の部位(148-319aa)に分け、それぞれ Gal4 との fusion protein を作り、検討を行なった。NIH3T3 cells(Bcl6+)においては、どちらの領域も転写抑制作用を示したが、K562 cells(Bcl6-)の場合はどちらの領域も転写抑制作用を示さなかった。そこで BAZF にたいする Bcl6 の必要性について検討するために、さまざまな量の Bcl6 の expresion vector（pcDNA3-Bcl6）を Gal4-fusion-BAZF とともにトランスフェクションを行なった。K562cells においては Gal4-fusion- BAZF は Bcl6 の濃度依存性に転写抑制作用を示した。これらの結果から BAZF は BTB／POZ ドメインだけでなく中央の領域も転写抑制作用を示すには、Bcl6 が必要であると示唆された。

次に in vitro での BAZF と Bcl6 の結合の有無について、mammlian-two-hybrid の system を用いて検討した。Bcl6 の BTB／POZ ドメイン（1-117aa）は BAZF の BTB／POZ ドメイン（1 —128aa）とのみ結合し、BAZF の中央の領域は Bcl6 の中央の領域のみと結合した。中央には全く同じ配列である 17aa が存在しこの部位を含む 27aa(Bcl6: 370-386aa, BAZF: 188-204aa)の領域だけでも転写抑制作用を示す事から、この部位だけでも結合する可能性が示唆されたため、GST-BAZF-27aa と Bcl6（1-520aa）との結合の有無を pull-down にて行なった。結果が示すように、この部位だけでも結合した。以上の結果から BAZF は Bcl6 と BTB／POZ ドメインだけでなく中央の部位でも結合し特に、共通の配列である 17aa が binding site として重要であることが証明された。

次に BAZF の転写抑制作用に HDAC が関与しているかを検討するために、HDAC の阻害剤である TSA を用いた。K562cells に Gal4-fusion-BAZF とともに Bcl6 の expression vector(pcDNA3-Bcl6)をトランスフェクションして転写抑制をおこし、TSA の濃度を変えて培養した。TSA 濃度依存性に転写抑制作用が認められなくなった。これらの結果から、BAZF の転写抑制機構に HDAC が関与していると思われた。次に in vitro において BAZF が HDAC や mSin3 と直接結合するか、mammlian-two-hybrid system を用いて検討を行なった。Gal4-bd-BAZF と Ga14-ad-mSin 3 ,HDAC1 の fusion protein をそれぞれ作り、NIH3T3cells(Bcl6+)と K562 cells（Bcl6-）において検討した。NIH3T3cells においては結合が認められたが

k562cells においては結合が認められなかった。以上の結果より、BAZF は indirectly に mSin3 と HDAC1 と結合することが示唆された。
最後に、BAZF の full-length と Bcl6／BAZF の binding-DNA-sequence との fusion protein を作り、さまざまな量の Bcl6 の expression vector(pcDNA3-Bcl6)とともに k562cells にトランスフェクションを行なった。BAZF は Bcl6 の量依存性に転写抑制作用を示した。同様の結果が WIL2-NS(Bcl6-null)cells においても認められた。
以上の結果より BAZF は physiologically に Bcl6 と作用し、また転写抑制作用を示すために、Bcl6 が必要であることが証明された。
今回の実験において、以下の新たなメカニズムが証明された。
Bcl6 のホモログである BAZF はそれ自身では転写抑制作用を示さず、転写抑制因子として活性を示すには、Bcl6 が必要である。また転写抑制の機構には、TSA による阻害剤を用いた実験や mammlian-two-hybrid の実験により、間接的ではあるが mSin3 や HDAC とのコンプレックスを形成している。
また、GST-pull-down 等の実験により、BAZF は Bcl6 と BTB/POZ domain だけでなく中央の領域に存在する全く同じ配列である 17aa の部位の二ケ所にて結合するため、両方の部位において転写抑制作用を持っている事が証明された。

論文審査の結果の要旨			
受付番号	甲第　1525 号	氏　名	竹長　真紀
論文題目	Bcl6-dependent Transcriptional Repression by BAZF BAZF の転写抑制作用は Bcl6 が規制している		
審査委員	主　査　黒田嘉和 副　査　南　康博 副　査　千原和夫		
審査終了日	平成　15 年　3 月　7　日		

（要旨は１，０００字～２，０００字程度）

BAZF（Bcl6 asoociated with zinc finger motif）はBcl6のホモログとしてクローニングされた新しい遺伝子の一つである。Bcl6はプロトオンコジーンの一つであり、ノックアウトマウスの解析からgerminal centerの形成に関与している。一方BAZFの働きに関しては、ほとんど分かっていないが、Bcl6との相同性は非常に高く、N端にはBTB/POZタイプのドメインを持ち、C端にはzinc fingerを持つ。また中央には全く同じ配列を持った、１７アミノ酸の領域がある。どちらも核内プロテインであり転写抑制作用を持つ。今回、我々はyesat-two-hybridの手法を用いて、結合するプロテインを同定しBAZFの転写抑制機構を明らかにしようと試みた。

転写抑制機構のメカニズムとしてはコリプレッサーである、SMRT、やmSin3と直接結合することによりHDACをリクルートし、ヒストンの脱アセチル化により作用を示す事が知られている。Bcl6やPLZF、HIC-2など上記のメカニズムにより転写抑制作用を持つ。

しかしながら、BAZFの場合は、yeast-two-hybridやmanmalian-two-hybridによる、解析結果が示すように直接、コリプレッサーと結合する事ができない。転写抑制作用の重要な役割を示しているのが中央の１７アミノ酸であり、GST-pull-downの結果が示しているように、Bcl6と直接結合する。

また、Bcl6を含まない、Bcl6 knock-out mouseのembryonal fibroblastやK562を用いてのルシフェラーゼアッセイの結果より、転写抑制作用を示すにはBcl6が必要であり、BAZFの転写抑制作用はBcl6が規制しており、その系にはヒストンのアセチル化が関与している事が明らかになった。

本研究は、BAZFという新しい遺伝子について、その転写抑制機構のメカニズムを研究したものであるが、従来の機構とは全く違うメカニズムが存在することについて重要な知見を得たものとして価値ある集積であると認める。よって、本研究者は、博士（医学）の学位を得る資格があると認める。