



## 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として、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-hybrid screening 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 expression 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、mammalian-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、mammalian-two-hybrid system を用いて検討を行なった。Gal4-bd-BAZF と Gal4-ad-mSin3, 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の部位の二ヶ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。

神戸大学大学院医学系研究科(博士課程)

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 伊藤 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 yeast-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 mammalian-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。