

## 新規 FKHR サブファミリーの同定

宗片 圭祐 (筑波大学 生物学類 4年) 指導教官: 坂本 和一 (筑波大学 生物科学系)

## 【導入・目的】

FKHR (forkhead in rhabdomyosarcoma) は、アポトーシスの誘導に関与するフォークヘッド型転写因子の一つで、横紋筋肉腫 (rhabdomyosarcoma) において多くの変異が認められることからガンの抑制に関わると考えられている。FKHR は、インシュリンシグナル伝達経路の下流において活性化され、PI3K を経てプロテインキナーゼの Akt によりリン酸化されることで機能が抑制される。これまでの研究により FKHR はアポトーシス誘導因子である Bim や FasL、細胞周期の停止に関与する P27<sup>Kip1</sup> などの転写促進を行うことが知られている。これまでに FKHR には特異的なフォークヘッドドメインを持つ FKHR、FKHRL1、AFX の 3 種類のサブファミリーが同定されている。一方、本研究室では、ゲノム解析により FKHR 特異的なフォークヘッドドメインに類似した領域を持つ新規 FKHR 遺伝子の存在を明らかにしている。そこで本研究では、新規 FKHR ファミリーの cDNA を単離し、生理機能と作用の分子メカニズムを明らかにすることを目的とした。

## 【方法】

新規 FKHR 遺伝子のフォークヘッドドメイン領域に特異的な primer (S2) を作成し、ヒト精巢の cDNA library を鋳型にし、3' RACE 法により C 末端 cDNA クローンの単離を試みた。また、新規 FKHR 遺伝子の 3' 非翻訳

領域に特異的な primer (A3) を作成し、S2 primer と A3 primer とを用いてヒト精巢 cDNA library を鋳型にして PCR を行った。得られた DNA 断片を PUC19 の *Hinc*・サイトに組み込んでサブクローニングを行い、それぞれの cDNA の塩基配列の決定を行った。さらに、フォークヘッドドメインに特異的な cDNA 断片 (300b) と新規 FKHR に特異的な C 末端領域を含む cDNA 断片 (2kb) を Bca best 法を用いて [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P] dCTP で標識し、コロニーハイブリダイゼーションを行った。

## 【結果・考察】

上記の実験の結果、3' RACE 法により 400b の cDNA 断片が得られ、また PCR 法により C 末端領域を含む 2kb の cDNA 断片が得られた。これらの cDNA の塩基配列を調べたところ、3' RACE 法により得られた cDNA 断片にはイントロンがなく、C 末端領域を含む cDNA 断片には一つのイントロンが確認できた。また、どちらの cDNA もフォークヘッドドメインを後半から欠いており、新規遺伝子には 2 種類またはそれ以上の isoform が存在することが予想された。現在、得られた probe を用いてヒト精巢 cDNA library のコロニーハイブリダイゼーションを行っているところである。今後、全長 cDNA クローンが得られ次第、アポトーシス誘導作用、細胞内局在、Bim、FasL、P27 など標的遺伝子への転写レベルでの作用を調べる予定である。