

論文内容の要旨

申請者氏名 笹井 信 広

哺乳動物における転写制御には、DNA メチル化やヒストン修飾、それらに伴うクロマチンの構造変換といったエピジェネティックな機構が関与しており、最近の研究からそれらに関わる多数の酵素、転写因子、コリプレッサー等が同定されている。DNA 結合型転写因子である BTB-ジンクフィンガーファミリー遺伝子群の多くはクロマチン構造変換を介する転写抑制因子として機能し、発生、分化や増殖等の生命現象で中核的な役割を担っており、ヒト疾患との関連が示唆されているものも少なくない。しかしながら、その詳細な転写抑制機構や、生体内での役割に関してはいまだ不明な点も多い。本研究は、申請者らが新規に同定した BTB-ジンクフィンガー遺伝子 HABZ/CIBZ に関して、その転写抑制機構に関する解析を行ったものである。

GAL4-DNA 結合ドメインと融合した HABZ を用いたルシフェラーゼアッセイにより、HABZ は GAL4 結合配列に繋いだいくつものプロモーターに対して転写抑制活性を示すこと、また BTB ドメインと 158-339 の領域 (Repression Domain 2, RD2) の 2 ヶ所がそれぞれ独立して転写抑制ドメインとして機能することが明らかとなった。ヒストン脱アセチル化酵素 (HDAC) の阻害剤である TSA を用いた実験により、RD2 による転写抑制には HDAC が関与することが明らかとなり、実際、免疫沈降法により HABZ と HDAC との相互作用も確認された。さらに、酵母の Two-hybrid 法により転写抑制ドメインに結合する蛋白質としてコリプレッサーである CtBP を同定し、RD2 内の PLDLR モチーフがその結合に必要であることが証明された。CtBP との結合は RD2 による転写抑制活性にも必須であることが示されたことから、HABZ は CtBP/HDAC 複合体を形成することで転写抑制因子として機能すると推測される。

次に、Myc タグを付加した HABZ の NIH3T3 細胞内での局在を調べるために免疫蛍光染色を行ったところ、HABZ は核と細胞質の両方に局在し、核内では主にセントロメア近傍の構成的ヘテロクロマチン (pericentromeric heterochromatin) への局在が見られた。一方 CtBP は細胞質および核内に diffuse に局在したが、HABZ と共発現させると CtBP が核内の pericentromeric heterochromatin へ集積されたことから、HABZ は CtBP をヘテロクロマチン領域にリクルートする機能を有することが示唆された。

HABZ のジンクフィンガーはメチル化 DNA 結合蛋白質である Kaiso と高い相同性を示している。そこで、ゲルシフト法により HABZ の DNA 結合能を検討したところ、Kaiso 同様メチル化依存的な DNA への結合が確認され、HABZ が新規のメチル化 DNA 結合蛋白質であることが示唆された。pericentromeric heterochromatin 領域では DNA の CpG 配列が高頻度にメチル化されていること、また DNA メチル化はクロマチン構造変換を介した遺伝子の転写抑制に密接に関与していることから、HABZ はメチル化 DNA 領域に CtBP/HDAC 複合体をリクルートすることで、DNA メチル化依存的に標的遺伝子の転写抑制を行うことが強く示唆された。

論文審査結果の要旨

申請者氏名 笹井信広

最近の研究から、哺乳動物における遺伝子発現は DNA メチル化やヒストン修飾、それらに伴うクロマチンの構造変換といったエピジェネティックな機構によって制御されていることが明らかとなりつつある。DNA 結合型転写因子である BTB-ジンクフィンガーファミリー遺伝子群の多くはコリプレッサーやヒストン脱アセチル化酵素 (HDAC) と相互作用することで転写抑制因子として機能し、発生、分化や増殖等を制御しており、ヒト疾患との関連が示唆されているものも少なくない。しかし、その転写抑制機構は個々の BTB-ジンクフィンガー蛋白質間では様々であり、生体内での役割に関して不明な点が多い。そこで、申請者は新規に同定した BTB-zinc finger 遺伝子 HABZ/CIBZ の転写抑制機構の解析を行った。

まず HABZ の転写調節活性を調べるために GAL4 融合蛋白質を用いたレポーターアッセイを行い、HABZ が転写抑制因子として機能し、BTB ドメインとそれに隣接した RD2 領域が転写抑制ドメインであることを明らかにした。また、RD2 による転写抑制には HDAC が関与することを示し、実際免疫沈降法により HABZ と複数の HDAC との相互作用も確認した。さらに、Yeast Two-hybrid 法により RD2 がコリプレッサー CtBP と結合することを見出し、細胞内でも HABZ が CtBP と複合体を形成することを証明し、HABZ による転写抑制には CtBP/HDAC 複合体が関与することを明らかにした。

次に、申請者は、HABZ は核内では主にセントロメア近傍の構成的ヘテロクロマチン (pericentromeric heterochromatin) に局在することを示した。一方 CtBP は細胞質および核内に diffuse に局在するが、HABZ と共発現させることで核内の pericentromeric heterochromatin へ集積することも明らかとし、CtBP の核内での局在やその活性が HABZ によって制御されていることが推測される。

また、HABZ のジンクフィンガーはメチル化 DNA 結合蛋白質である Kaiso と高い相同性を示しており、実際 HABZ が Kaiso 同様メチル化依存的に DNA に結合することをゲルシフト法により証明した。pericentromeric heterochromatin 領域は DNA の CpG 配列が高頻度にメチル化されており、また DNA メチル化は転写抑制に密接に関与していることから、HABZ はヘテロクロマチン領域内のメチル化 DNA に結合し、RD2 を介して CtBP/HDAC 複合体を形成することで DNA メチル化依存的に標的遺伝子の転写抑制を行うことが強く示唆された。

以上のように、本論文は HABZ/CIBZ が新規のジンクフィンガー型メチル化 DNA 結合蛋白質であることを示し、またその転写抑制機構として CtBP/HDAC 複合体の関与を明らかとし、学術上、応用上貢献するところが少なくない。よって審査委員一同は、本論文が博士 (バイオサイエンス) の学位論文として価値あるものと認めた。