

氏名(本籍)	かわ ^{さき} ひろ ^{あき} 川 崎 広 明 (茨城県)		
学位の種類	博 士 (農 学)		
学位記番号	博 甲 第 1,820 号		
学位授与年月日	平成10年3月23日		
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当		
審査研究科	農 学 研 究 科		
学位論文題目	Functional "Knock-Out" of Transcription Factors by Antisense and Catalytic Nucleic Acids (アンチセンス核酸およびリボザイムによる転写因子の機能のノックアウト)		
主査	筑波大学教授	Ph. D. (理学)	多比良 和 誠
副査	筑波大学教授	農学博士	祥 雲 弘 文
副査	筑波大学助教授	農学博士	深 水 昭 吉
副査	筑波大学教授	農学博士	田 仲 可 昌

論 文 の 内 容 の 要 旨

マウス由来のF9細胞は、EC (embryonal carcinoma) 細胞でありRA (retinoic acid) など種々の誘導剤によって分化の表現型を示すことから細胞の分化メカニズムを解明する上でよく用いられている。RAによる分化誘導の過程においては*c-jun* 遺伝子の発現の上昇が見られ、この*c-jun* 遺伝子の転写誘導が分化において重要であることが知られている。*c-jun* 遺伝子のプロモーター領域には、分化応答に必要なエレメント (DRE) が存在し、この領域には分化制御因子の複合体 (DRF) が結合する。その複合体内には、転写の仲介因子であるp300が存在する。Ad5型E1A蛋白質の細胞内標的因子の一つであるp300は、核内リン酸化蛋白質であり、またCBP (CREB binding protein) との相同性が高く転写の仲介因子として知られている。さらにp300/CBPは、CREB (cAMP response element binding protein) familyだけでなく核内レセプターやp53など多くの因子と相互作用することから、種々の異なるシグナル伝達に関与していると考えられている。本研究は、RAによる分化誘導の過程におけるp300とCBPの個々の機能解明の目的からリボザイムやアンチセンスオリゴマーを用いてp300およびCBPの機能的ノックアウトを行ったものである。

はじめに、効果の高いリボザイムを構築するために細胞内でのリボザイム効果を簡便に評価できるアッセイ系を構築し、細胞内で効果の高いリボザイムを選択することに成功した。次にp300やCBPのmRNAをターゲットとしたリボザイム発現プラスミド (p300-リボザイム, CBP-リボザイム) をそれぞれF9細胞に導入し、G418で選択したクローンの表現型を解析した。まず、p300やCBP遺伝子の発現をcompetitive RT-PCRやELISA法で解析したところmRNAレベルや蛋白質レベルでそれぞれ減少が見られた。さらにRA処理した後の表現型を解析したところp300-リボザイムを導入した細胞では分化抵抗性を示し、分化表面マーカーのSSEA-1の減少やCollagen IVの増加の抑制が認められた。一方、CBP-リボザイムを導入した細胞では分化誘導の影響は見られなかった。このことから、p300がRA誘導の分化において重要な役割を担っていると考えられる。また、p300やCBP遺伝子を標的としたアンチセンスオリゴマーを導入した細胞の解析においても、それぞれ同様の表現型を示した。さらにRAにより誘導されるアポトーシスには、それぞれのリボザイム導入細胞で影響が見られ、p300やCBPのそれぞれがアポトーシスに必要であることが示唆された。またRA誘導のG1休止に関与するcdk阻害因子であるp21^{Cip1}やp27^{Kip1}の影響を検討したところ、p300-リボザイムを導入した細胞ではp21^{Cip1}の

CBP-リボザイムを導入した細胞では p 27^{Kip1} の発現誘導に影響が見られ、それぞれの転写の仲介因子が特定の cdk 阻害因子の発現に関与していることが考えられた。よって p 300 や CBP は、RA 誘導の分化応答において各々別々の機能を有すると考えられる。

さらに、p 300 が分化に必須であることを詳細に検討するために、p 300 と ATF-2 との相互作用による *c-jun* の転写誘導の解析を行った。ATF-2 は、CREB family であり bZip を介して CRE エlement に結合する。また、*c-jun* 遺伝子のプロモーター上の DRE エlement に一部重複する jun 2-TRE には、ATF-2 が結合することが報告されている。よってはじめに、DRE プローブを用いて種々の抗体による super-shift アッセイを試みた。その結果、ATF-2 と p 300 の抗体のみ super-shift が検出された。このことから DRF 複合体には、少なくとも ATF-2 と p 300 が含まれることが明らかになった。また逐次免疫沈降法を用いた解析の結果、*in vivo* において p 300 と ATF-2 は相互作用し、ATF-2 は特に高リン酸化型 p 300 と結合することが明らかになった。さらに *c-jun* promoter CAT アッセイにより、ATF-2 と p 300 が相互作用することにより CAT 活性を上昇させることが明らかになった。よって、p 300 は ATF-2 と相互作用することにより RA 誘導の *c-jun* 遺伝子の転写誘導に関与していることが明らかとなった。*c-jun* の転写誘導は RA 誘導による分化応答に必須であるため、これらの結果はリボザイムやアンチセンスオリゴマーによって得られた結果を支持していると考えられる。

審査の結果の要旨

本研究は、転写の仲介因子である p 300 や CBP に対して、その細胞内での機能解明を主たる目的とし、リボザイムやアンチセンスオリゴマーを用いて p 300 や CBP の機能的ノックアウトを行ったものである。効果の高いリボザイムを構築するために、その細胞内でのリボザイム効果を簡便に評価できるアッセイ系を構築し、効果の高いリボザイムを選択することに成功した。それらのリボザイムを用いて p 300 や CBP の機能的ノックアウトによる解析を行った。その解析から、p 300 は RA による F9 細胞の分化誘導に必須であることを明らかにした。またアポトーシスには、p 300 と CBP の各々が必要であることも明らかにした。さらに、G1 休止に重要な役割を有する cdk 阻害因子である p 21^{Cip1} や p 27^{Kip1} 発現において、p 300 は p 21^{Cip1} の、また CBP は p 27^{Kip1} の発現誘導に深く関与することを明らかにした。この知見は、これまで同じ役割を有すると考えられていた p 300 と CBP がそれぞれ違った役割も有することを示した最初の例である。また、p 300 が ATF-2 と相互作用することにより、RA による *c-jun* の発現を制御していることを明らかにした。この結論は、リボザイムやアンチセンスオリゴマーによって得られた結論を支持するものである。

本研究は、リボザイムやアンチセンスオリゴマーを用いて、p 300 や CBP の機能的ノックアウトによる解析から p 300 や CBP の RA 誘導による分化過程において役割を明らかにしたものであり、RA 誘導による分化、アポトーシス、G1 休止と p 300/CBP の関係解明の点において極めて意義深い成果である。

よって、著者は博士（農学）の学位を受けるに十分な資格を有するものと認める。