

氏名(本籍)	あら たに さと こ 荒谷 聡子 (愛知県)
学位の種類	博士(農学)
学位記番号	博甲第3263号
学位授与年月日	平成15年5月31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	Dual Roles of RNA Helicase A in CREB-Dependent Transcription (CREB 依存性転写における RNA ヘリケース A の複合的役割)

主査	筑波大学教授	農学博士	馬場 忠
副査	筑波大学教授	農学博士	小林 達彦
副査	筑波大学教授	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

真核生物の転写においてコアクチベーター CBP は様々な転写因子と結合し転写統合装置として機能し、細胞の増殖や分化、アポトーシスになど多くの生命現象に関与していることが示されている。CBP による転写活性化には CBP 自身の HAT 活性に加えて、RHA を介した Pol II との複合体形成が必要である。RHA は ATPase/DNA-RNA ヘリケースファミリーに属する因子で、ショウジョウバエで X 染色体における遺伝子量補正に関わることが報告されている MLE のホモログである。また RHA は holo-Pol II 複合体に含まれ、CBP に Pol II をリクルートし、CREB の転写を ATPase/Helicase 活性依存的に活性化することが知られている。

本論文では、RHA の転写活性化最小ドメインの同定および同領域を介した転写活性化機構の解明を目的として研究を行っている。まず、Transactivation assay を用いて転写活性化最小領域を 331-380 の 50 アミノ酸に決定し Minimal Transactivation Domain (MTAD) とした。同領域は Pol II 複合体と結合し、CREB 依存的な転写にも重要であった。MTAD のアミノ酸配列はホモログ間でよく保存されているが、他の転写調節因子の転写活性化ドメインとの相同性は低く新規の転写活性化ドメインである可能性が示唆された。そこで転写活性化に必要な残基を調べるため、同領域内のホモログ間で保存されているアミノ酸をアラニンに置換し転写活性化能への影響を検討した。その結果、トリプトファン残基が転写活性化および Pol II 複合体との結合に重要であることが明らかになった。さらにトリプトワンの側鎖の転写活性化への影響を検討するために、トリプトファンを別の芳香族アミノ酸(フェニルアラニン)、疎水性アミノ酸(ロイシン)に置換した変異体を作製した。フェニルアラニンに置換した変異体のみ wild type と同等の転写活性化能および Pol II 結合能を有し、このことから MTAD のトリプトファン残基の芳香族側鎖が重要であることが明らかになった。

RHA は CREB 依存的な転写を ATPase/helicase 活性依存的に活性化し、ATP 結合能が低下した変異体では転写活性化能の低下が見られる。トリプトワンのアラニンへの置換が ATPase/helicase 活性に影響している可能性が考えられた。そこで、同変異体の ATP 依存的活性を測定したところ野生型と同等の活性

をもっていることが明らかになった。さらに、Pol II 結合および ATP 結合に必要なアミノ酸の両方をアラニンに置換した変異体を用いてレポーターアッセイを行った。その結果両方の機能に対する変異体はそれぞれの変異体より転写活性化能の低下がみられた。このことから RHA は Pol II リクルートと ATP 依存的なメカニズムという 2 つの転写活性化機構をもち、それぞれが独立に機能しうることが示された。

審 査 の 結 果 の 要 旨

この学位論文では、RHA による転写活性化機構の解析を行っている。その結果、転写活性化最小領域を同定し、同領域の作用機構および ATP 依存的な転写活性化メカニズムとの関係について明らかにしている。

RHA はコアクチベーター CBP に Pol II 複合体をリクルートし ATP 依存的な活性を用いて cAMP の転写を活性化することが示されていた。本研究によって、転写活性化ドメインが 50 アミノ酸に同定され、ヘリケースドメインとは独立に機能しうることが示された。また転写活性化ドメインはアミノ酸配列からいくつかのグループに分けられている。同定された転写活性化ドメインは 1 次構造上どのグループにも当てはまらず新規モチーフの可能性を示唆している。このことは同領域の解析は RHA のみでなく真核生物の転写活性化機構の解明につながると期待される。

転写活性化ドメインを同定し転写活性化に必要なアミノ酸残基の詳細な解析は評価できるが、同ドメインの構造レベルでの解析・結合する因子の同定また ATP 依存的活性の作用機序など明らかにされておらず、これらは今後に残された課題である。しかし、研究自体は非常に注意深く行われており、じゅうぶんな信頼性を有していると判断でき、当該研究分野の発展にじゅうぶんな貢献をしたと判断できる。

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。