

氏 名（本籍）	あら や なつみ 新 谷 奈津美（岩 手 県）		
学 位 の 種 類	博 士（学 術）		
学 位 記 番 号	博 甲 第 3739 号		
学位授与年月日	平成 17 年 3 月 25 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	生命環境科学研究科		
学 位 論 文 題 目	A Role for Ewing's Sarcoma Gene Product EWS in Transcriptional Regulation (転写制御におけるユーイング肉腫原因遺伝子産物 EWS の役割)		
主 査	筑波大学教授	農学博士	馬 場 忠
副 査	筑波大学教授	博士（薬学）	柳 澤 純
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	小 林 達 彦

論 文 の 内 容 の 要 旨

近年、遺伝子発現の第一段階である転写の活性化においては、個々の転写因子の作用だけではなく複数の転写因子が介在する分子間ネットワークの重要性が注目されている。中でも DNA に直接結合することなく転写因子と RNA polymerase II (pol II) を含む基本転写因子群とを仲介する転写コアクチベーター CREB binding protein (CBP) はその中核を担う分子である。当研究室では CBP の相互作用因子の探索および解析を行っており、yeast two hybrid 法を用いた探索の結果、新規の CBP 結合因子として EWS (Ewing's sarcoma) を見出ししていた。

EWS は染色体転座によって融合遺伝子を形成し、Ewing 肉腫・小児性神経芽腫などの悪性腫瘍を引き起こす原因遺伝子であると考えられているが、その分子機能や腫瘍発症機構は不明である。そこで、EWS と CBP との相互作用から EWS の転写への関与を予想し、(1) 転写制御における EWS の細胞生理機能の解明、および (2) EWS 機能を制御し得る新たな制御系を明らかにすることを目的とし本研究を行った。

(1) 転写制御における EWS の細胞生理機能の解明

CBP は転写開始合体の中心である非リン酸化型 pol II・pol IIa と相互作用し、転写の開始段階において転写活性に作用する。はじめに、EWS が CBP と同様に pol IIa と相互作用することを明らかにし、EWS が転写開始段階において CBP と共に転写制御に関与する可能性を示した。そこで、EWS の転写機能を解析するに当たり、EWS の転写コアクチベーターとしての機能を予測し、EWS が作用する DNA 結合性転写因子の探索を行った。その結果、CBP の標的転写因子の一つである核内受容体 Hepatocyte Nuclear Factor4 (HNF4) を候補として同定した。さらに、ヒト肝癌由来 HepG2 細胞を用いた免疫沈降実験から、細胞内で EWS/CBP/HNF4 が相互作用すること、そして、EWS は CBP と協調的に HNF4 の転写活性を増強する転写コアクチベーター活性を有することがわかった。また、CBP 結合活性を欠損した EWS は HNF4 転写系への活性化能を消失することから、EWS のコアクチベーター活性には CBP との相互作用が不可欠であることが示唆された。

以上の結果から、EWS は CBP、HNF4 と複合体を形成し、CBP と協調的に HNF4 の転写活性化能を増強

する転写コアクチベーターであることが明らかとなった。本研究において、EWSの具体的な標的遺伝子として HNF4 の制御下にある遺伝子群がその候補であること、また、それら遺伝子群の転写制御に EWS/CBP 複合体が協調的に関与するという事実が新たに判明し、今まで不明であった EWS の生理機能解明に近づいている。

(2) EWS 機能を制御し得る新たな制御系の解明

次に、EWS の転写コアクチベーター活性化能を制御し得る新たな制御機構を明らかにするために、EWS 分子内の機能ドメインに結合する新規因子の同定と解析を行った。EWS が転写コアクチベーターとして機能するためには、核への局在が重要である。そこで、EWS の機能の特徴づける機能ドメインとして、核移行領域に着目し、数種類の EWS 欠失変異体を作製し、EWS の核移行領域を決定し、その領域に結合する新規因子を Yeast Two Hybrid 法により探索した。その結果、EWS の新規結合因子としてアルギニンメチル基転移酵素・PRMT1 を同定した。EWS に対する PRMT1 の作用について詳細な解析を行った結果、PRMT1 はほ乳類細胞レベルにおいても EWS と相互作用し、EWS の転写コアクチベーター活性化能に対して抑制的に作用する因子であった。PRMT1 による EWS のメチル化活性の検討と細胞内局在変化の観察から、PRMT1 による EWS の抑制作用は、PRMT1 による EWS のメチル化活性が EWS の細胞内局在を核から細胞質へと移行させることによって起こることが示唆された。以上の結果から、PRMT1 による EWS の翻訳後修飾はその転写活性化能を制御する上で重要な役割を担っていることが示唆された。

審 査 の 結 果 の 要 旨

DNA に直接結合することなく、転写因子と RNA pol II を含む基本転写因子群とを仲介する CBP はその中核を担う分子である。新規の CBP 結合因子として見出された EWS は、Ewing 肉腫・小児性神経芽腫などの悪性腫瘍を引き起こす原因遺伝子であると考えられているが、その分子機能や腫瘍発症機構は不明である。本研究では、EWS の細胞生理機能の解析を試み、EWS が CBP とその標的転写因子の一つである HNF4 と複合体を形成し、CBP と協調的に HNF4 の転写活性化能を増強する転写コアクチベーターであることが明らかとなった。また、アルギニンメチル基転移酵素・PRMT1 が EWS の転写活性化能を制御する上で重要な役割を担っていることも明らかにした。

これらの結果は今まで不明であった EWS の生理機能に関して新しい境地を築いており、これまで明確になっていなかった EWS の細胞生理機能について、それらの機能や制御系を新たに同定した点は十分に評価できる。しかし、それらの普遍的な最終結論を得るまでには至っておらず、今後に残された課題も少なからずある。結論として、研究自体は非常に注意深く行われており、十分な信頼性を有し当該研究分野の発展に貢献したと判断できる。

よって、著者は博士（学術）の学位を受けるに十分な資格を有するものと認める。