

氏名(本籍)	おおしまもとひこ 大島基彦(愛知県)		
学位の種類	博士(医学)		
学位記番号	博甲第4776号		
学位授与年月日	平成20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	人間総合科学研究科		
学位論文題目	<b>Molecular mechanism of transcriptional repression of AhR repressor involving ANKRA2, HDAC4 and HDAC5</b> (AhR repressor による ANKRA2, HDAC4, HDAC5 を介した転写抑制の分子機構)		
主査	筑波大学教授	理学博士	岡村直道
副査	筑波大学准教授	博士(獣医学)	杉山文博
副査	筑波大学准教授	博士(医学)	濱田洋実
副査	筑波大学講師	博士(医学)	角大悟

### 論文の内容の要旨

目的: AhR hydrocarbon receptor (AhR) は、様々な外来異物をリガンドとして結合すると核に移行し、Arnt と二量体を形成して xenobiotic responsive elements (XRE) に結合する事で薬物代謝酵素群などの転写を誘導する。また、外来異物の解毒代謝の他に、ダイオキシン類による毒性発現や、血管形成、免疫や生殖などの生理的な機能を仲介する事が知られている。一方、AhR repressor (AhRR) は、AhR のN末端側と高い相同性を持つ因子で、AhR により転写誘導され、AhR による転写活性化を阻害する。その阻害機構として、Arnt との二量体形成、及び XRE への結合を AhR と競合することが考えられているが、詳細については分かっていない。本研究は AhRR による転写抑制機構の解明を目的として行なわれた。

対象と方法: Cytotrap yeast two-hybrid assay により AhRR の転写共役抑制因子を同定し、培養細胞を用いた系により、AhRR による転写抑制における共役抑制因子の役割について解析を行った。

結果と考察: AhRR の転写抑制領域を同定するため、Hepa 1 細胞を用い、GAL4 DNA 結合領域に AhRR 断片をつないだものをエフェクター、GAL4 応答配列及び TK プロモーターを上流に持つルシフェラーゼ遺伝子をレポーターとして用いたレポーター解析を行った。その結果、AhRR のC末端側 555-701 アミノ酸の領域に転写抑制領域が含まれる事が示された。

次に、histone deacetylase (HDAC) 阻害剤である TSA を用いて同様にレポーター解析を行ったところ、AhRR のC末端側半分 (342-701 アミノ酸) による転写抑制活性が、TSA により量依存的に減弱する事が示された。この結果から、AhRR のC末端側における転写抑制活性は HDAC 活性によるものである事が示唆された。そこで、AhRR の転写共役抑制因子を同定するため、AhRR のC末端側半分 (342-701 アミノ酸) を bait として用いた Cytotrap yeast two-hybrid assay を行った。その結果、DhX8, EB1, EB3, p21, Prostaglandin E receptor, EGF-containing fibrin-like extracellular matrix protein1, ANKRA2 が得られた。このうち ANKRA2 は、HDAC4 及び HDAC5 と結合する事が報告されていることから ANKRA2 と AhRR との関わりについてさらに解析を行った。

COS-7 細胞において HA タグのついた AhRR (HA-AhRR) と FLAG タグのついた ANKRA2 (FLAG-ANKRA2)

を発現させ、FLAG 抗体により免疫沈降を行ったところ、AhRR が共免疫沈降する事が示された。同様に、HA-AhRR、FLAG-ANKRA2、FLAG-HDAC4 或いは HDAC5 を発現させ、HA 抗体により免疫沈降を行った。その結果、HDAC4 は ANKRA2 が発現している時においてのみ、共免疫沈降する事が示された。一方で、HDAC5 は ANKRA2 が発現していない時でも共免疫沈降する事が示されたことから、HDAC5 は AhRR と直接、或いは ANKRA2 を介して結合している事が示唆された。

AhRR の転写抑制能における ANKRA2 の役割を解析するため、ANKRA2 siRNA を Hepa 1 細胞へ一過性に導入し、AhRR の転写抑制活性に対する影響を調べたところ、AhRR の転写抑制活性の著しい減弱が見られた。次に、内在性の AhRR/Arnt ヘテロ二量体が ANKRA2 を介して、XRE 配列によって転写誘導される内在性の標的遺伝子の発現を抑制するかどうかを調べるため、Mouse embryonic fibroblast (MEF) 細胞に ANKRA2 siRNA を導入し、mRNA の発現を約 3 割まで減少させた。AhR のリガンドである 3MC 非存在下においては AhR の標的遺伝子である CYP1A1 の mRNA の増加が見られたが、3MC 存在下で転写誘導された CYP1A1 mRNA には変化が見られなかった。定常状態での CYP1A1 の転写は、ANKRA2 を介した AhRR/Arnt ヘテロ二量体により抑制されていると言える。一方、AhRR siRNA の一過性の導入によっては、3MC 非存在下、及び存在下共に、CYP1A1 mRNA の発現の増加が見られたことから、ANKRA2 非依存的な AhRR の転写抑制活性の存在が示唆された。

これらの結果は、AhRR による 2 段階の抑制機構により説明する事が出来る。即ち、Arnt との二量体形成、及び XRE への結合を AhR と競合する事による抑制と XRE に結合した AhRR が ANKRA2、HDAC4、HDAC5 と結合する事によるさらなる抑制である。また、リガンド非存在下において、AhRR siRNA を加えたときの CYP1A1 の増加が ANKRA2 siRNA によるものより大きい事に関しては、ANKRA2 非依存的な HDAC5 の相互作用の影響が考えられた。

## 審 査 の 結 果 の 要 旨

本研究により、AhRR がその C 末端側に ANKRA2、HDAC4、HDAC5 をリクルートする事によって定常状態での CYP1A1 の転写を抑制することが示された。また、これまで機能の分かっていた ANKRA2 が、転写共役抑制因子としての役割を持つ事が新たに示された。これらの成果は、AhRR の新たな転写抑制機構を見出したものであり、非常に高く評価できる。

よって、著者は博士（医学）の学位を受けるに十分な資格を有するものと認める。