

氏名(本籍)	あさ か まさ みつ 浅 賀 正 充 (福 島 県)		
学位の種類	博 士 (医 学)		
学位記番号	博 甲 第 5119 号		
学位授与年月日	平成 21 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	Sp1 によるヒストンシャペロン TAF-I アイソフォームの転写調節機構		
主 査	筑波大学教授	医学博士	久 武 幸 司
副 査	筑波大学准教授	博士(医学)	角 大 悟
副 査	筑波大学講師	博士(理学)	小 林 麻己人
副 査	筑波大学講師	博士(理学)	三 輪 佳 宏

論 文 の 内 容 の 要 旨

(目的)

1. TAF-I の発現制御機構の解析。
2. Sp1 における転写抑制遺伝子の転写活性化機構の解析。

(対象と方法)

1. 転写開始点同定のために 5' RACE PCR 法およびプライマーエクステンションを行った。プロモーター同定のためにルシフェラーゼを含むベクターに TAF-I 上流領域をクローニングし、プロモーターの欠損変異体を作成しルシフェラーゼアッセイを行った。Sp1 のプロモーター結合をゲルシフトアッセイおよびクロマチン免疫沈降法 (ChIP) で調べた。Sp1 が細胞内 TAF-I α プロモーターの活性に影響しているか調べるために siRNA を用いたノックダウンを行った。Sp1 の転写活性化を TAF-I が抑制するかを調べるため、ルシフェラーゼアッセイによって検討した。
2. Jurkat 細胞での TAF-I α の発現を調べるために RT-PCR を行った。Jurkat 細胞での Sp1 の発現をゲルシフトアッセイで検討した。Jurkat 細胞内の TAF-I α プロモーターに Sp1 が結合しているか調べるために ChIP を行った。Sp1 のリプレッサーが Jurkat 細胞内に存在するか調べるために試験管内転写反応を行った。HeLa 細胞と Jurkat 細胞で TAF-I α プロモーターのクロマチン構造が異なるかを検討するために、in vivo フットプリントを行った。Sp1 の過剰発現で Sp1 が TAF-I α プロモーターに結合し TAF-I α が発現するかを調べるために RT-PCR および ChIP を行った。ヒストンアセチル化と TAF-I α プロモーターの活性の関係を調べるために TSA 処理細胞を用いて ChIP を行った。Sp1 の欠損変異体を作成し、RT-PCR にて Sp1 の転写活性化領域を検討した。

(結果)

1. 今回の解析の結果、TAF-I α および β はそれぞれ異なるプロモーターから転写され、また TAF-I β の翻訳開始コドン付近で翻訳調節が行われている可能性が示唆された。ヒト TAF-I α プロモーターの解析から、-132bp から -31bp の領域には 3 つの Sp1 結合領域が存在することが明らかとなった。Sp1 を過剰発現させると TAF-I α プロモーターの転写活性が上昇し、HeLa 細胞では 3 つのうち 2 つの Sp1 結合領域に変異

が導入されると活性が減少する。ChIP および siRNA から、Sp1 は細胞内のプロモーターに結合し、転写を正に制御していることが明らかとなった。一方 TAF-I β には siRNA の影響はみられず、Sp1 転写制御は TAF-I α のみで起こっていることが示された。

2. Jurkat 細胞では Sp1 が発現しているにも関わらず、TAF-I α プロモーターに結合できない。これは Jurkat 細胞内での TAF-I α プロモーターのクロマチン構造による可能性が示唆された。さらに Sp1 を Jurkat 細胞に過剰発現させると TAF-I α の発現が確認された。これは、Jurkat 細胞を TSA 処理しても TAF-I α は発現しないことから、Sp1 結合後にアセチル化が起きていることが示唆された。

(考察)

1. TAF-I β の翻訳調節および TAF-I β のアミノ酸配列の比較に基づき、TAF-I β の 2 番目のセリンが TAF-I β の活性に重要である可能性が考えられた。Sp1 発現は分化段階、組織で変動するので、TAF-I α 発現も変動することでクロマチンリモデリング活性が調節される可能性がある。
2. Sp1 がクロマチン構造をとった TAF-I α プロモーター上に結合し、クロマチンリモデリング因子を呼び込むことでクロマチン構造を変換している可能性が考えられる。

審査の結果の要旨

本研究は、TAF-I の発現制御機構の解析と Sp1 による転写活性化機構の解析の 2 点について行われている。著者は、分子生物学や生化学で用いられるアッセイ系を駆使して多方面から検討を加え、その機構の一端を明らかにしている。

TAF-I には TAF-I α と TAF-I β があるが、この二つが異なるプロモーターを用いて個別に転写制御されていることを明らかにし、また、Sp1 が TAF-I α プロモーターを活性化することを、ルシフェラーゼアッセイ、ゲルシフトアッセイ、クロマチン免疫沈降法やノックダウン法を用いて詳細に検討している。さらに、Sp1 は発現しているが TAF-I α の発現に差がある HeLa および Jurkat の細胞を用いて実験を行い、Sp1 の有無以外の要因、おそらくクロマチン修飾の差が TAF-I α の発現に関与することを明らかにしている。

以上の実験より、TAF-I α および TAF-I β はそれぞれ独立のプロモーターで制御されており、Sp1 が TAF-I α の転写を制御すること、また Sp1 はクロマチン構造によって抑制されている Jurkat 細胞内で TAF-I α の転写を活性化しうることが明らかになった。

これらの結果は TAF-I の転写制御に Sp1 が関与することを明らかにしただけでなく、さらに一歩進んで TAF-I クロマチン構造と Sp1 の関係にまで踏み込んで解析を進めており、そのメカニズムに迫っていることから、本研究は高く評価できる。

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。