

京都大学	博士 (生命科学)	氏名	柿崎 文彦
論文題目	Caudal-related homeobox (CDX) の新規標的遺伝子 <i>solute carrier family 5, member 8 (SLC5A8)</i> の同定		
(論文内容の要旨)			
<p><i>CDX1</i> と <i>CDX2</i> は <i>caudal-related homeobox</i> 遺伝子ファミリーのメンバーであり、ホメオドメイン転写因子をコードしている。<i>CDX1</i> と <i>CDX2</i> は腸上皮細胞の増殖・分化を制御することが示唆されている一方で、ヒト大腸癌でその発現が抑制されていることや、大腸癌細胞株にそれらを強制発現させると細胞増殖が抑制されることなどから、大腸癌の癌抑制タンパクの候補として報告されている。この <i>CDX1</i> と <i>CDX2</i> の新規標的遺伝子を同定するため、クロマチン免疫沈降 (ChIP) スクリーニングを行った結果、Na⁺共役型トランスポーターをコードする <i>solute carrier family 5, member 8 (SLC5A8)</i> 遺伝子のプロモーター領域の DNA 断片が単離された。<i>SLC5A8</i> はプロピオン酸、酢酸、酪酸などを含む短鎖脂肪酸や、乳酸、ピルビン酸、ニコチン酸のようなモノカルボン酸を取り込むことが分かっている。また、<i>SLC5A8</i> は癌抑制作用を持つヒストン脱アセチル化酵素阻害物質 (HDACi) の酪酸等を基質としていることに加えて、大腸癌においてその発現が抑制されていることから、癌抑制タンパクの候補とされている。この <i>SLC5A8</i> のプロモーターに <i>CDX1</i> と <i>CDX2</i> が結合することを ChIP-PCR で確認し、ルシフェラーゼレポーター遺伝子アッセイを用いて <i>CDX1</i> と <i>CDX2</i> がこの領域内に存在する <i>CDX</i> 結合配列を介して <i>SLC5A8</i> プロモーターを活性化することを見出した。更に、<i>CDX1</i> や <i>CDX2</i> を強制発現させた大腸癌細胞株では内在性 <i>SLC5A8</i> の発現が誘導され、逆に <i>CDX1</i> と <i>CDX2</i> をノックダウンするとその発現が減少することから、<i>SLC5A8</i> が <i>CDX1</i> と <i>CDX2</i> の直接の標的遺伝子であることが示された。一方、免疫組織化学による解析では、<i>Cdx1</i> と <i>Cdx2</i> を発現しているマウス大腸上皮細胞の頂端膜に <i>Slc5a8</i> の局在が見られ、qRT-PCR やウェスタンブロット法による解析では <i>Cdx1</i>^{-/-}マウスや <i>Cdx2</i>^{+/-}マウスの大腸における <i>Slc5a8</i> の発現が野生型マウスのそれと比較して減少していることが分かった。また、家族性大腸腺腫症モデルマウスである <i>Apc</i> 変異マウスの大腸腫瘍で、<i>Cdx1</i> と <i>Cdx2</i> の発現減少に伴った <i>Slc5a8</i> の発現低下が観察された。これらの結果から、<i>CDX1</i> と <i>CDX2</i> が直接的に <i>SLC5A8</i> の発現を制御することが明らかとなり、<i>SLC5A8</i> が <i>CDX1</i> と <i>CDX2</i> の癌抑制タンパクとしての作用を担っている可能性が示唆された。</p>			

(論文審査の結果の要旨)

申請者は、ヒト大腸癌の癌抑制遺伝子の候補として報告されている CDX1 と CDX2 の新規標的遺伝子の同定を目的として研究を行った。このためにまず、CDX1 と CDX2 の抗体による網羅的クロマチン免疫沈降 (ChIP) スクリーニングを行い、Na⁺共役型トランスポーターをコードする *solute carrier family 5, member 8 (SLC5A8)* 遺伝子を同定した。SLC5A8 はプロピオン酸、酢酸、酪酸などを含む短鎖脂肪酸や、乳酸、ピルビン酸、ニコチン酸のようなモノカルボン酸を取り込むことが分かっている。また、SLC5A8 は癌抑制作用を持つヒストン脱アセチル化酵素阻害物質 (HDACi) の酪酸等を基質としていることに加えて、大腸癌においてその発現が抑制されていることから、癌抑制タンパクの候補とされている。この *SLC5A8* のプロモーターに CDX1 と CDX2 が直接結合することを ChIP-PCR で確認し、ルシフェラーゼレポーター遺伝子アッセイを用いて CDX1 と CDX2 がこの領域内に存在する CDX 結合配列を介して *SLC5A8* プロモーターを活性化することを見出した。更に、CDX1 や CDX2 を強制発現させた大腸癌細胞株では内在性 SLC5A8 の発現が誘導され、逆に CDX1 と CDX2 をノックダウンするとその発現が減少することから、*SLC5A8* が CDX1 と CDX2 の直接の標的遺伝子であることが示された。一方、免疫組織化学による解析では、Cdx1 と Cdx2 を発現しているマウス大腸上皮細胞の頂端膜に Slc5a8 の局在が見られ、qRT-PCR やウエスタンブロット法による解析では *Cdx1*^{-/-}マウスや *Cdx2*^{-/-}マウスの大腸における Slc5a8 の発現が野生型マウスのそれと比較して減少していた。更に、大腸腫瘍形成と CDX1 と CDX2 による SLC5A8 の発現制御との関係を調べるため、腸管腫瘍形成モデルマウスである *Apc* 変異マウスの大腸腫瘍を解析した結果、Cdx1 と Cdx2 の発現減少に伴った Slc5a8 の発現低下が観察された。

以上の研究により、CDX1 と CDX2 が直接的に SLC5A8 の発現を制御することが明らかとなり、SLC5A8 が CDX1 と CDX2 の癌抑制タンパクとしての作用を担っている可能性が示唆された。これは癌抑制遺伝子の候補でもある *SLC5A8* が CDX1 と CDX2 の直接の標的遺伝子であることを示した初めての報告であり重要な知見である。従って、本論文は博士 (生命科学) の学位論文として価値あるものと認めた。

なお、本学位授与申請者は、平成 22 年 2 月 12 日実施の論文内容とそれに関連した口頭試問を受け、合格と認められたものである。

論文内容の要旨及び審査の結果の要旨は、本学学術情報リポジトリに掲載し、公表とする。特許申請、雑誌掲載等の関係により、学位授与後即日公表することに支障がある場合は、以下に公表可能とする日付を記入すること。

要旨公開可能日： 年 月 日