

氏名	こやなぎ みちよ 小柳 三千代
学位(専攻分野)	博士(薬学)
学位記番号	薬博第590号
学位授与の日付	平成18年3月23日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
研究科・専攻	薬学研究科生命薬科学専攻
学位論文題目	転写因子NF- κ Bの相互作用因子CPAPの機能解析

論文調査委員 (主査) 教授 下遠野邦忠 教授 伊藤信行 教授 中山和久

論文内容の要旨

転写因子NF- κ Bは免疫応答、炎症、アポトーシスなどの細胞内イベントに関わる様々な遺伝子の発現を制御していることで知られている。このNF- κ Bを介した転写の活性化機構については様々な報告があるものの、その全貌に関しては未だ明らかでない。今回、著者はNF- κ BのコンポーネントであるRelAと相互作用する因子としてCentrosomal P4.1-associated protein (CPAP)を同定した。種々の機能解析からCPAPがNF- κ Bの新規転写コアクチベータであり、NF- κ Bの転写活性化に関与することを明らかにした。CPAPは、このように細胞内で転写活性化因子として機能する一方で、中心体に存在して微小管形成に何らかの役割を果たすことが知られている。最近、このCPAPが脳の神経細胞数の減少を主症状とする劣性遺伝性小頭症の原因遺伝子の一つであると報告された。しかしながら、その発症メカニズムは未だ明らかになっていない。そこで、著者はさらにCPAPの生体における生理機能を明らかにすることを目的として、ショウジョウバエを用いて、その脳神経発生における機能解析をおこなった。

第1章 NF- κ Bの新規転写コアクチベータとして機能するCPAP

我々はNF- κ Bを介した転写活性化機構の詳細を明らかにするため、酵母ツーハイブリッド法によりNF- κ Bの1つのサブユニットであるp65 (RelA)のN末端領域と相互作用する細胞性因子のスクリーニングをおこなった。その結果、CPAPが候補物質の一つとして得られた。CPAPは中心体に存在するタンパク質Centrosomal P4.1と相互作用するタンパク質として単離されたものであるが、一方で免疫系に関与する転写因子STAT5と相互作用してSTAT5を介した転写に促進的に働くことが既に報告されている。まず、我々はRelAとCPAPとのタンパク質間の相互作用をGST pull down assayと免疫沈降法により確認した。NF- κ Bの転写活性を測定できるレポータープラスミドを用いて細胞内のNF- κ B転写活性化能を測定したところ、CPAPの強制発現によりTNF α 刺激に応じたNF- κ Bの転写活性が上昇し、また、逆に内在性のCPAPのタンパク質レベルをRNAiによって減少させることによりNF- κ Bの転写活性が減少した。このことから、CPAPはNF- κ Bによる転写活性化を促進することが示唆された。CPAPは主に細胞質に存在することが既に報告されているが、MCF-7細胞においては、TNF α 刺激により、CPAPが細胞質から核へと移行する現象が観察された。さらに、DNA/タンパク質複合体免疫沈降法により、CPAPはTNF α 刺激下でRelAと共にNF- κ B結合配列を有する転写プロモーターに存在することがわかった。また、One hybrid アッセイ法により、CPAPは転写プロモーターの近傍に存在する時に転写を活性化する潜在活性をもつことが示された。これらの結果から、CPAPはRelAと相互作用し、NF- κ Bによる転写活性化を促進するコアクチベータとして働くことが示唆された。さらにCPAPは転写コアクチベータであるCBP/p300とも相互作用することが明らかとなった。この両者はNF- κ Bによる転写活性化に相乗的に作用したことからCPAPはCBP/p300と協調的にNF- κ Bによる転写活性化に関与していることが示唆された。

第2章 CPAPのショウジョウバエホモログの機能解析

ヒトCPAPに対するショウジョウバエホモログをNCBIのHomologeneサーチシステムにより、アミノ酸配列の類似性

に着目して探索したところ、C末端側の特徴的な配列において45%の同一性を持つCG10061を見いだした。更に、この特徴的な配列はヒトからハマダラ蚊に至るホモログ間で広く保存されていることがわかった。この領域はRelAとの結合責任領域でもあり、転写の活性化にも関与することから、CPAPが機能する上で重要な領域であることが示唆された。このCG10061遺伝子をクローニングし、ショウジョウバエS2細胞で発現させ、細胞内局在を調べたところ、間期において主に細胞質に局在することがわかった。また、転移因子Pエレメントの挿入によりCG10061遺伝子が破壊されている株を観察したところ、ホモ接合体は羽化後歩いたり飛んだりすることができずに死亡することがわかった。また、高頻度で、末梢神経系の機械刺激受容器官である剛毛が過剰に形成されていた。以上の結果からCG10061が個体の生存や神経系の発生において重要な役割を果たしていることが示唆された。

以上、著者はCPAPが転写因子NF- κ Bのコアクチベータとして機能することを明らかにした。またCPAPのショウジョウバエホモログCG10061の遺伝子破壊株がCPAPの機能を個体レベルで明らかにするためのモデルとして有用である可能性を示した。

論文審査の結果の要旨

転写因子NF- κ Bは免疫応答、炎症、アポトーシスなどの細胞内イベントに関わる様々な遺伝子の発現を制御していることで知られている。このNF- κ Bを介した転写の活性化機構については様々な報告があるものの、その全貌に関しては未だ明らかでない。今回、申請者はNF- κ Bを介した転写活性化機構の詳細を明らかにするため、酵母ツーハイブリッド法によりNF- κ Bの1つのサブユニットであるp65 (RelA)のN末端領域と相互作用する細胞性因子のスクリーニングをおこなった。その結果、RelAと相互作用する因子としてCentrosomal P4.1-associated protein (CPAP)を同定した。CPAPは中心体に存在するタンパク質Centrosomal P4.1と相互作用するタンパク質として単離されたものであるが、一方で免疫系に関与する転写因子STAT5と相互作用してSTAT5を介した転写に促進的に働くことが既に報告されている。まず、申請者はRelAとCPAPとのタンパク質間の相互作用をGST pull down assayと免疫沈降法により確認した。次にNF- κ Bの転写活性を測定できるレポータープラスミドを用いて細胞内のNF- κ B転写活性化能を測定したところ、CPAPの強制発現によりTNF α 刺激に応じたNF- κ Bの転写活性が上昇し、また、逆に内在性のCPAPのタンパク質レベルをRNAiによって減少させることによりNF- κ Bの転写活性が減少した。このことから、CPAPはNF- κ Bによる転写活性化を促進することが示唆された。CPAPは主に細胞質に存在することが既に報告されているが、MCF-7細胞においては、TNF α 刺激により、CPAPが細胞質から核へと移行する現象が観察された。さらに、DNA/タンパク質複合体免疫沈降法により、CPAPはTNF α 刺激下でRelAと共にNF- κ B結合配列を有する転写プロモーターに存在することがわかった。また、One hybrid アッセイ法により、CPAPは転写プロモーターの近傍に存在する時に転写を活性化する潜在活性をもつことが示された。これらの結果から、CPAPはRelAと相互作用し、NF- κ Bによる転写活性化を促進するコアクチベーターとして働くことが示唆された。さらにCPAPは転写コアクチベータであるCBP/p300とも相互作用することが明らかとなった。この両者はNF- κ Bによる転写活性化に相乗的に作用したことからCPAPはCBP/p300と協調的にNF- κ Bによる転写活性化に関与していることが示唆された。

CPAPは、このように細胞内で転写活性化因子として機能する一方で、中心体に存在して微小管形成に何らかの役割を果たすことが知られている。また、最近このCPAPが脳の神経細胞数の減少を主症状とする劣性遺伝性小頭症の原因遺伝子の一つであると報告された。しかしながら、その発症メカニズムは未だ明らかになっていない。そこで、申請者はさらにCPAPの生体における生理機能を明らかにすることを目的として、ショウジョウバエを用いて、その脳神経発生における機能解析をおこなった。

まずヒトCPAPに対するショウジョウバエホモログをNCBIのHomologeneサーチシステムにより、アミノ酸配列の類似性に着目して探索したところ、C末端側の特徴的な配列において45%の同一性を持つCG10061を見いだした。更に、この特徴的な配列はヒトからハマダラ蚊に至るホモログ間で広く保存されていることがわかった。この領域はRelAとの結合責任領域でもあり、転写の活性化にも関与することから、CPAPが機能する上で重要な領域であることが示唆された。このCG10061遺伝子をクローニングし、ショウジョウバエS2細胞で発現させ、細胞内局在を調べたところ、間期において

主に細胞質に局在することがわかった。また、転移因子Pエレメントの挿入によりCG10061遺伝子が破壊されている株を観察したところ、ホモ接合体は羽化後歩いたり飛んだりすることができずに死亡することがわかった。また、高頻度で、末梢神経系の機械刺激受容器官である剛毛が過剰に形成されていた。最後にRNA *in situ* hybridization法によりCG10061のmRNAの胚発生期における局在を調べたところ、中期において脳での発現が観察された。以上の結果からCG10061が個体の生存に必要であり、脳・神経系の発生に関与している可能性が示唆された。

以上、申請者はCPAPが転写因子NF- κ Bのコアクチベータとして機能することを明らかにした。またCPAPのショウジョウバエホモログの候補であるCG10061の遺伝子破壊株がCPAPの機能を個体レベルで明らかにするためのモデルとして有用である可能性も示した。

以上より、本論文は博士（薬学）の論文として価値あるものと認める。

更に、平成18年2月24日論文内容とそれに関連した口頭試問を行った結果合格と認めた。