

氏 名	まつ だ えい しょう 松 田 永 照
学位(専攻分野)	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	医 博 第 2362 号
学位授与の日付	平 成 13 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	医 学 研 究 科 分 子 医 学 専 攻
学位論文題目	Targeting of Krüppel-associated Box-containing Zinc-finger Proteins to Centromeric Heterochromatin: Implication for the Gene Silencing Mechanisms (KRAB を持つ Zn フィンガー蛋白のセントロメアヘテロクロマチンへの局在: 遺伝子発現抑制機構への示唆)
論文調査委員	(主 査) 教 授 武 田 俊 一 教 授 野 田 亮 教 授 清 水 章

論 文 内 容 の 要 旨

数百のメンバーからなるの Krüppel タイプ Zn フィンガー (Krüppel-ZF) 因子のおよそ 3 分の 1 のメンバーが有する、高度に保存されている KRAB ドメインが転写抑制活性を有することが明らかになってきた。KRAB ドメインは KAP-1 (KRAB Associated Protein-1) を介して転写抑制機能を持つと報告されている。しかし、それらの転写抑制のメカニズムは未解明である。

Krüppel タイプ Zn フィンガーによく保存された特徴的のアミノ酸に対応するプライマを用いた RT-PCR 法により KRAZ1 と KRAZ2 が単離され、これらが KRAB ドメインを持つことが判明した。さらに、(1)KRAZ1 および 2 が DNA への結合かつ KRAB に依存して転写を抑制すること、(2)KRAZ1 および 2 の KRAB に KAP-1 が結合すること、(3)KAP-1 自身に転写抑制活性があり、KBAZ1 および 2 による転写抑制が KAP-1 の過剰発現によって増強されること、(4) mammalian two-hybrid assay を用いて、KAP-1 が KRAZ1 および 2 と細胞内で実際に結合し、corepressor として機能すること、などが明らかにされた。

KRAZ1 および 2 による転写抑制には、KAP-1 および直接転写抑制に関与するといわれている HP1 (heterochromatin protein-1) との細胞内での局在の一致が必要なのではないかと考え、KRAZ1 および 2、ならびに KAP-1 の細胞内局在と転写抑制の相関について検討した。Tag を付加した全長の KRAZ1 および 2 などを、transfection により NIH3T3 細胞で発現させ、Tag に対する単クローン性抗体などを用いて二重免疫蛍光染色したのち、共焦点レーザー顕微鏡を用いて観察した。その結果、(1)全長の KRAZ1 および 2 は核内移行シグナルを持ち、核内では特徴的な dot 様構造を形成すること、(2)その dot の分布は核内において centromeric heterochromatin に局在する KAP-1 と HP1 α のそれと一致すること、(3)KRAZ1 の centromeric heterochromatin への局在は KRAB に依存し、転写抑制と相関すること、(4)KAP-1 の centromeric heterochromatin への局在には HP1 結合ドメインと oligomerization ドメイン (RBCC) が必要であり、転写抑制と相関すること、(5)mammalian two-hybrid assay により検討すると、KRAZ1・KAP-1 複合体の centromeric heterochromatin への局在は転写抑制能とダイナミックに相関すること、(6)KRAZ1 および KAP-1 の centromeric heterochromatin への局在およびこれらの蛋白質による転写の抑制は histone deacetylase の阻害剤 (TSA) で解除されること、などが明かとなった。

以上の結果より、KRAZ と結合した制御対象遺伝子領域が、KRAZ と KAP-1 および HP1 との相互作用を介して核内において転写の不活性化場である centromeric heterochromatin に運ばれることが、KRAZ・KAP-1 複合体による転写抑制メカニズムのひとつであり、この機構は histone の脱アセチル化に依存してと考えらる。

論文審査の結果の要旨

Krüppel 型 Zn フィンガー蛋白のおよそ3分の1のメンバーに、高度に保存されている KRAB ドメインは転写抑制活性を有するが、その転写抑制メカニズムはまだ十分に解明されていない。この論文では申請者らが単離した KRAB-ZF 因子である KRAZ の転写抑制メカニズムを明らかにする目的で、転写抑制活性と細胞内局在との相関を検討した。レポーターアッセイと共焦点レーザー顕微鏡を用いた免疫蛍光染色法によって解析した結果、KRAZ は KAP-1 をという co-repressor を介して centromeric heterochromatin に局在し、この局在能力と転写抑制活性が相関することを見出した。また、KAP-1 の centromeric heterochromatin への局在には KRAZ との結合ドメインと HP1 結合ドメインが必要であることを明らかにした。さらに、mammalian two-hybrid assay を用いて、KRAZ-1 による転写抑制が、対象遺伝子領域の転写抑制性核内コンパートメントへの移動による可能性を見出し、転写抑制性構造の維持にヒストン脱アセチル化酵素が必須であることを証明した。これらは、転写抑制機構を考える上で非常に重要な知見であり、分子生物学の発展に寄与するところが多い。従って、本論文は博士（医学）の学位論文として価値あるものと認める。

なお、本学位授与申請者は、平成13年2月14日実施の論文内容とそれに関連した試問を受け、合格と認められたものである。