

[別紙 2]

審査の結果の要旨

氏名 水 岸 貴 代 美

本研究は脊椎動物の発達、特に神経系の発達に重要な役割を演じている転写因子、Zic ファミリー遺伝子の転写制御メカニズムを明らかにするため、in vitro の系および培養細胞を用いて、Zic 蛋白質の標的 DNA 配列の解析および GLI 蛋白質との相互作用についての解析を試みたものであり、下記の結果を得ている。

1. N を 30 個含むプローブの PCR による増幅、精製、ゲルシフトアッセイ、Zic 蛋白質によりシフトしたバンドの切り出し、DNA の溶出という過程を 5 回繰り返し、選択されてきた Zic 蛋白質の標的配列は GLI 蛋白質の標的配列と同じ、TGGGTGGTC であった。さらに 1 塩基ずつ置換した変異配列を用いて解析したところ、結合に必要な最小標的配列は GGGTGGTC であった。
2. Zic 蛋白質と GLI 蛋白質には標的配列への結合親和性に差が認められたため、ゲルシフトアッセイによって定量化を行った。その結果得られた解離定数は、GLI3 8.5×10^{-9} 、Zic1 5.2×10^{-8} 、Zic2 4.8×10^{-8} 、Zic3 7.1×10^{-8} であり、Zic 蛋白質の結合親和性は GLI 蛋白質より明らかに低かった。
3. レポーターアッセイによって、Zic 蛋白質による転写制御について解析した。全長の Zic 蛋白質を培養細胞に発現させたところ、Zic 蛋白質は様々なプロモーターを活性化することができた。さらに、Zic 蛋白質は GLI の標的配列が存在しなくても TK (thymidine kinase) プロモーターを活性化することができたが、GLI の標的配列が存在すると幾分、その活性化は促進された。一方、GLI 蛋白質による転写活性化には、GLI の標的配列の存在は不可欠であり、Zic と GLI には標的配列を介した転写制御メカニズムに違いがある可能性が示唆された。
4. 培養細胞において GLI と Zic を共に発現させ、標的配列を介した GLI 蛋白質

質の転写活性化に Zic 蛋白質が影響を与えるかどうか調べた。293T 細胞においては、Zic 蛋白質は GLI 蛋白質による転写活性化を抑制し、C3H10T1/2 細胞ではその活性化をさらに促進した。この結果から GLI と Zic の間に何らかの相互作用が存在する可能性が示唆された。さらに、この相互作用に細胞特異的な補助因子の関与も示唆された。

以上、本論文は Zic ファミリー遺伝子について、標的 DNA 配列との関係、その配列を介した転写制御、GLI 蛋白質との相互作用について明らかにした。本研究はこれまで未知に等しかった、分子レベルでの Zic の転写制御メカニズムの解明に重要な貢献をなすと考えられ、学位の授与に値するものと考えられる。