

様式 (二)

論文内容の要旨

応用動物科学専攻

平成 11 年度博士課程 入学

氏 名 岸川 昭太郎

指導教官 塩田 邦郎

論文題 転写因子 Sp1 および Sp3 による DNA メチル基転移酵素 Dnmt1 遺伝子の転写制御に関する研究

-緒言-

哺乳類はその発生過程において、遺伝子の発現が時間的、空間的に調節されていることが知られている。それら遺伝子発現の調節機構を理解することは生物を理解する上で重要である。遺伝子の転写は、遺伝子発現の最初の段階であることから最も重要であると考えられ、遺伝子のプロモーター領域に存在するシスエレメントとそこに作用する転写因子群によって調節されている。さらに近年、クロマチン構造中のヒストンのアセチル化、メチル化、リン酸化および DNA のメチル化などによるクロマチンリモデリングによっても発現が調節されていることが明らかとなってきている。

遺伝子発現の調節機構の一つである DNA のメチル化は DNA (シトシン-5)メチルトランスフェラーゼによって行われ、現在、酵素活性を持つものとして Dnmt1、Dnmt3a そして Dnmt3b の 3 種類が知られている。これらは、メチル化 DNA の維持を行う Dnmt1 と *de novo* メチル化を行う Dnmt3a と Dnmt3b に分類される。しかしながらこれらのメチル化酵素の発現調節機構は十分に理解されていない。そこで我々は細胞周期の S 期に転写の活性化と酵素活性の上昇が認めれ、ゲノム DNA のメチル化を維持して

様式 (二)

いると考えられている Dnmt1 遺伝子についてその転写調節機構の解明を目的として解析を行った。

-第 1 章- Dnmt1 遺伝子の転写活性化シスエレメントと転写因子の同定

これまでの報告で、Dnmt1 遺伝子は体細胞、卵母細胞、精母細胞において、それぞれ 3 種類のエクソン 1 を使い分けていることが明らかになっている。Dnmt1 遺伝子の体細胞型エクソン 1 のプロモーター領域は TATA box のないハウスキーピング遺伝子様の構造を持つことが知られているものの、その転写調節機構はほとんど明らかになっていない。我々はまず Dnmt1 遺伝子プロモーター領域のシスエレメントとそこに作用する転写因子の同定を行った。

Dnmt1 遺伝子の 5'末端上流域のレポーターアッセイによって、転写開始点を+1 とした-173~-120 bp の領域内に転写を活性化するシスエレメントが存在することが示された。このシスエレメントを含む領域をプローブとし、核タンパク質を用いたゲルシフトアッセイを行った。その結果、3 本のシフトバンドが認められ、シスエレメントに結合する転写因子の存在が認められた。続いて転写因子の詳細な結合領域を決定するため、転写因子結合領域の変異配列をコンペティターとして用いたゲルシフトアッセイで、-161~-147 bp の領域に転写因子が結合することが示された。我々はこの転写因子結合領域を GA モチーフと名づけた。さらに抗 Sp1 抗体と抗 Sp3 抗体を用いたゲルシフトアッセイでスーパーシフトが観察され、Sp1 と Sp3 がこの GA モチーフに結合することが示された。抗 Sp1 抗体と抗 Sp3 抗体を用いたクロマチン IP によって Sp1 と Sp3 が *in vivo* でも、GA モチーフに結合することを確かめた。さらに、Sp1 ファミリーを欠失した *Drosophila* SL2 細胞での Sp1 と Sp3 の発現コンストラクトを用いたレポーターアッセイによって、Sp1 と Sp3 が Dnmt1 遺伝子の転写の活性化に働いていることがわかった。

-第 2 章- 転写因子 Sp1、Sp3 とコアクチベーター p300 による Dnmt1 遺伝子の転写活性化機構

前章で Dnmt1 遺伝子の転写活性化に転写因子 Sp1 と Sp3 が関与していることを示した。この章では Dnmt1 遺伝子の転写活性化に Sp1 と Sp3 がどのように働いているのか調べた。前章で同定した GA モチーフに Sp1 と Sp3 が別々に結合しているかど

様式 (二)

うか、GST-Sp1 と Sp3 でのゲルシフトアッセイおよび抗 Sp1 抗体と抗 Sp3 抗体を用いた免疫沈降およびウエスタンブロット解析で調べた。それらの結果より、Sp1 と Sp3 は別々に GA モチーフに結合し、それらの存在比によって結合が置き換わることが示された。

近年、遺伝子の転写調節には DNA に結合する転写因子だけでなく、直接 DNA に結合しないコアクチベーターやコリプレッサーを含んだ転写複合体を形成して作用することが明らかになってきている。そこで我々は種々の転写因子群と複合体を形成して働いている p300 の Dnmt1 遺伝子の転写への関与について調べた。NIH3T3 細胞で p300 を強発現させたレポーターアッセイによって、Dnmt1 遺伝子の転写の活性化に p300 が関与しており、Sp3 と p300 の共発現によって Dnmt1 遺伝子の転写がさらに活性化されることがわかった。また、免疫沈降およびウエスタンブロット解析と GST-プルダウンアッセイの結果より、Sp3 と p300 は直接複合体を形成していることが明らかとなった。また細胞周期における各因子の量の変動をウエスタンブロット解析によって調べたところ、G1 期に Sp1、early S 期に Sp3 が多く存在し、G2/M 期には p300 が少ないことが示された。

-考察-

本研究においてゲノム DNA のメチル化を維持していると考えられている Dnmt1 遺伝子のシスエレメント(GA モチーフ)とそこに結合する転写因子 Sp1 と Sp3 を同定し、共に転写の活性化に働くことを示した。さらに Sp1 と Sp3 は GA モチーフに別々に結合し、その存在量比に依存して両因子が置き換わることを明らかとした。また、コアクチベーター p300 と Sp3 が直接結合して転写の活性化に働いていることと、Dnmt1 遺伝子の発現に関与する転写因子群の発現が細胞周期で変動することを示した。

Sp1 と Sp3 は別々に Dnmt1 遺伝子の転写の活性化に働き、転写のコアクティベーターである p300 が Sp1 ではなく Sp3 に作用することは、Dnmt1 遺伝子の転写の調節が、活性化や抑制化に働く転写因子がシスエレメントに作用する、作用しないという単純な調節ではなく、転写の活性化だけでも異なる複数の転写因子により、細かく調節されていることを示している。また、細胞周期において Dnmt1 遺伝子の発現に関与する Sp1、Sp3、p300 の発現量は変動しており、Sp1 と Sp3 存在比によって GA

様式 (二)

モチーフへの各因子の結合が変わることから、Dnmt1 遺伝子の転写は細胞周期において、G1 期では主に Sp1 によって、early S 期においては主に p300 と結合した Sp3 によって行われていることが考えられた。

細胞周期の各時期での Dnmt1 遺伝子の発現機構とその発現に関与する Sp1、Sp3、p300 を初めとした各因子の詳細な解析を進めることで、Dnmt1 遺伝子の転写の活性化だけでなくその発現機構が明らかとなると考えられる。さらに Dnmt1 遺伝子のプロモーター領域は TATA-box を持たない CG リッチな配列でハウスキーピング遺伝子のプロモーター領域の特徴を持っており、Sp1、Sp3、p300 は多くの遺伝子の発現に働いていることから、Dnmt1 の遺伝子の転写調節機構は多くの遺伝子、特にハウスキーピング遺伝子で普遍的に行われることが考えられ、遺伝子発現での調節の一つのモデルになると考えられる。