

[別紙 2]

論文審査の結果の要旨

申請者氏名 岸川 昭太郎

本論文は、ほ乳類ゲノムDNAの後生的修飾であるDNAメチル化を担うDnmt1の遺伝子発現調節機構を、特に二つの転写調節因子(Sp1とSp3)の関与を中心に解析したものである。二章より構成される内容を要約すれば、以下のようになる。

第1章では、まず、Dnmt1遺伝子の体細胞型エクソン1のプロモーター領域に含まれるシスエレメントと、それに作用する転写因子の探索が行われた。具体的には、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とした場合の-173から-120塩基の領域内に、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ゲルシフトアッセイ(EMSA)を行った結果、3本のシフトバンドが認められた。これは、この領域に結合する因子が確かに存在することを示す。続いて、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EMSAで、因子の結合領域がより詳細に解析され、それにより同定された-161から-147塩基の領域がGAモチーフと名付けられた。GAモチーフと既知の転写因子認識配列との相同性から、Sp1およびSp3の結合が推測され、これらに対する抗体を用いたEMSAでスーパーシフトが観察されたことから、Sp1とSp3がこのGAモチーフに結合することが証明された。さらに、抗Sp1抗体と抗Sp3抗体を用いたクロマチンIPによって、両転写因子が*in vivo*でもGAモチーフに結合することが確かめられた。これらの因子による遺伝子の転写の活性化は、Sp1ファミリーを欠失した*Drosophila* SL2細胞で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確かめられている。

第2章では、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が論じられている。GAモチーフに対するSp1とSp3の結合を、GST-Sp1とSp3を用いたEMSAと、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結果、Sp1とSp3は独立して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、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

て調べると、Dnmt1 遺伝子の転写の活性化にも p300 が関与しており、特に、それは Sp3 を介する活性化に特異的であることがわかった。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り、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。

以上の結果より、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、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が示唆される。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 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はなく、その発現機構が明らかになると期待できる。さらに Dnmt1 遺伝子のプロモーター領域は、TATA-box を持たない GC リッチな配列で、この特徴はハウスキーピング遺伝子のプロモーター領域に多く見られる。Sp1、Sp3、p300 は多くの遺伝子の発現に働いていることが知られていることから、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にも普遍的であることが考えられ、遺伝子発現調節の一つのモデルになると考えられる。

以上の発見は、細胞周期依存的遺伝子発現の制御機構を理解する上で重要な知見で、応用動物科学領域に貢献しているところが少なくない。よって、審査員一同は、本論文が博士（農学）の学位論文として価値のあるものと認めた。