

[別紙 2]

審査の結果の要旨

氏名 武藤真祐

本研究は動脈硬化形成過程において重要な役割を演じていると考えられる特異的 DNA 結合型転写因子である KLF5 (Krüppel-like factor 5) の化学修飾による転写制御の解析を試みたものであり、下記の結果を得ている。

1. 転写コアクチベーターとして機能し、細胞周期、分化、アポトーシスなどにおいて重要な役割を演じているヒストンアセチル化酵素である p300 が KLF5 の DNA 結合ドメインをアセチル化し、KLF5 と結合することを初めて見出した。他のヒストンアセチル化酵素である GCN5 や Tip60 では KLF5 はアセチル化されず酵素特異性がある。
2. KLF5 の DNA 結合ドメインを構成する 3 つの zinc finger 毎の合成ペプチドを基質として filter binding HAT assay を行い、アセチル化される zinc finger を決定した。
3. アセチル化した合成ペプチドをエンドペプチダーゼである Lys-C で切断し、断片を TOF-MS spectrometry で質量を測定することによりアセチル化されるリジン残基を同定した。
4. そのリジン残基のみがアセチル化されることを KLF5 全長及び一部と、mutant(K→R) をタグ付蛋白として精製し、アセチル化アッセイを用いて示した。
5. 上で得た知見と過去の論文で報告されたデータを基に Sp/KLF ファミリー因子の N 端にある zinc finger において、アセチルされるリジン残基のルールを提唱した。
6. そのルールを検証するために Sp1 の DNA 結合ドメインにおいても 3 つの zinc

finger 毎の合成ペプチドを基質として、アセチル化される zinc finger を決定した。さらに、TOF-MS spectrometry でアセチル化されるリジン残基を同定し、私が提唱したルールが正しいことを示した。

7. KLF5 が血管の狭窄病変の開始と進行において重要な役割を演じている増殖因子 Platelet-derived growth factor (PDGF)-A のプロモーター活性を用量依存的に上げることを reporter gene assay で示し、さらに p300 の共発現が相乗的にこの転写活性を上昇することを示した。アセチル化ドメインを欠損させた p300 ではこの相乗的効果は見られなかった。

以上、本論文は KLF5 が p300 によりアセチル化されることを示しそのアセチル化リジン残基を同定した。さらに KLF5 はアセチル化を介して PDGF-A の転写活性を制御することを明らかにした。また、非ヒストン蛋白におけるアセチル化リジン残基のルール化を提唱することができた。本研究は、これまで未知に等しかった動脈硬化とアセチル化の関係を転写因子のアセチル化という観点から明らかにし、また非ヒストンのアセチル化のルールを提唱した初めての研究であり、学位の授与に値するものと考えられる。