

[別紙 2]

審査の結果の要旨

氏名 今村 潤

本研究は、近年、胃癌の癌抑制遺伝子として報告された転写因子 Runx3 の分子機構を解明するために、複合体型タグによる affinity purification の手法と質量分析計を用いて RUNX3 の新規結合蛋白の同定を行い、その機能解析を行ったものである。下記の結果を得ている。

1. RUNX3 の新規結合蛋白を同定するために、複合体型タグを融合した蛋白発現プラスミド MTF-RUNX3 を作製し、HEK293T 細胞にトランスフェクションした。この細胞抽出液を 2 段階精製し、結合分子の affinity purify を行い質量分析計でシーケンスした。この結果、新規の宿主側の結合因子として、DNA 修復蛋白である Ku70 および Ku80 を同定した。
2. 免疫沈降を行い、RUNX3 と Ku70 および Ku80 が細胞内で複合体を形成していることを示した。また、ウサギ網状赤血球 lysate で MTF-RUNX3 を *in vitro* translation し、大腸菌で精製した His 融合 Ku70 および Ku80 を用いて pull down アッセイを行い、RUNX3 が Ku70 と直接結合しており、Ku80 とは直接は結合しないことを示した。
3. RUNX3 の Ku70 との結合部位を明らかにするために、RUNX3 の欠失変異体の発現プラスミドを作製し、これを用いて *in vitro*での pull down アッセイを行ったところ、RUNX3 の転写活性化ドメイン全長を保持する欠失変異体のみが Ku70 と結合する結果となり、同部が RUNX3 と Ku70 の結合部位と推定された。
4. RUNX3 と Ku70 の細胞内での局在を調べるために、免疫蛍光染色を行った。pcDNA3/Flag-RUNX3 および hKu70-EGFP を COS7 細胞にトランスフェクションし、共焦点顕微鏡で観察したところ、RUNX3 および Ku70 はいずれも核内の核小体を除いた部位に共局在した。
5. HEK293T 細胞に pcDNA3/Flag-RUNX3 をトランスフェクションすると、p21 が誘導された。MKN45 細胞の Ku70 をノックダウンし、p21 レポーターと pcDNA3/Flag-RUNX3 をトランスフェクションしたところ、Ku70 をノックダウンすることにより p21 レポーターのルシフェラーゼ活性が有意に低下することを明らかにした。

6. HEK293T細胞にpcDNA3/Flag-RUNX3をトランスフェクションしフローサイトメトリーにより細胞周期を解析した。Runx3をトランスフェクションすることにより、G2/M期のピークは低下し、RUNX3によりG1期における細胞周期の停止が起こることを明らかにした。

以上、本論文は癌抑制遺伝子 Runx3 に結合する分子として Ku70 を同定し機能解析した初めての報告である。本研究からは、Ku70 による RUNX3 の転写活性化能の調節が p21 を介して細胞周期をコントロールしている可能性が示唆され、癌化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。

尚、審査会時点から、論文の内容について以下の点が改訂された。

1. フローサイトメトリーによる解析を追加した。
2. 統計上の表記および方法を適切なものに改めた。
3. 全体の文章構成を見直し、不適切な表現を改めた。
4. 目的および考察を適切なものに改めた。