

[別紙 2]

審 査 の 結 果 の 要 旨

氏名 松村 貴由

本研究は、Sp/KLF 型転写因子群の一員である Krüppel 型転写因子 KLF5 が心血管リモデリングにおいて中心的役割を果たすこと、および、その活性化にアセチル化が深く関与していることに着目し、脱アセチル化酵素 HDAC1 が KLF5 の転写活性を直接的に抑制しうるか、さらに、心血管系リモデリング抑制のための将来の薬剤開発につながりうるかについて検討したものであり、下記の結果を得ている。

1. KLF5 と HDAC1 が細胞内で相互作用することを免疫沈降法で示し、その結合が直接的であることを組み替え蛋白質による *in vitro* 結合試験で示した。更に、両蛋白質の変異体を用い、両者の結合部位は KLF5 の C 末端にある DNA 結合領域と HDAC1 の N 末端の調節領域であることを示した。
2. ゲルシフト DNA 結合試験で KLF5 と HDAC1 の結合は KLF5 の DNA 結合活性を阻害することを示した。さらに、KLF5 の下流遺伝子であり心血管リモデリングに重要である血小板由来成長因子 A 鎖(PDGF-A)遺伝子のプロモーター領域を使用したレポーターアッセイにて、HDAC1 は KLF5 依存性のプロモーター活性作用を容量依存性に抑制することを示した。
3. KLF5 は phorbol ester による活性化に続いてその下流の PDGF-A 遺伝子を活性化することが知られていたため、HDAC1 の過剰発現が phorbol ester 刺激

後の内因性 PDGF-A 遺伝子の発現上昇に及ぼす影響を調べたところ、HDAC1 は内因性 PDGF-A 遺伝子の発現上昇を抑制することが示された。

4. KLF5 の DNA 結合領域のうちどの小領域が HDAC1 に結合するかを確認したところ、KLF5 の DNA 結合領域に含まれる 3 つの Zinc-フィンガー型配列 (ZF1-3) のうち最も N 末端側の ZF1 であった。この部位は KLF5 を活性化させることが知られていたアセチル化酵素 p300 が KLF5 と結合し、かつアセチル化する部位と同一であった。
5. 組み替え蛋白質を用いた *in vitro* 競合的結合試験にて、HDAC1 と p300 は KLF5 の同一部位に結合し、前者は後者の結合を競合的に容量依存性に阻害した。さらに、その結果、レポーターアッセイにて HDAC1 の過剰発現は p300 による KLF5 転写活性化作用を完全に抑えることが示された。

以上、本論文は、心血管系転写因子 KLF5 が脱アセチル化酵素 HDAC1 により抑制され、それは DNA 結合活性、プロモーター活性化作用に対する直接的抑制効果によるだけでなく、アセチル化酵素 p300 との相互作用を阻害する効果にもよることを明らかにした。これは脱アセチル化酵素による転写制御機構に関する新たな知見である。また、KLF5 の転写活性に重要な小領域を同定し得たことにより、その部位を目標とした将来の薬剤開発のための重要な情報をえることができたと考えられる。

よって、本研究は心血管系リモデリングの機序や治療戦略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。