

[別紙2]

審査の結果の要旨

氏名 宮本 索

本研究は血管のリモデリングにおいて重要な役割を演じていると考えられる転写因子 (Krüppel-like zinc finger transcription factor 5, KLF5) の転写調節機構を明らかにするため、KLF5 に対する相互作用因子を単離し、その制御メカニズムの解析を試みたものであり、下記の結果を得ている。

1. KLF5 の DNA 結合領域に結合する相互作用因子を血管平滑筋培養細胞の核抽出液から単離し、急性白血病に関連する SET であると同定した。精製した SET と KLF5 が *in vitro* で直接結合することが確認され、また、免疫沈降法により細胞内でも結合していることが確認された。
2. SET の KLF5 に対する制御機構を解析するために KLF5 が調節する胎児型ミオシン重鎖遺伝子 (SMemb) のプロモーター領域をプローブとしてゲルシフトアッセイを行ったところ、SET は KLF5 のプロモーターへの結合を阻害した。また、SMemb 及び PDGF-A 鎖をレポーターとして用いたレポーターアッセイにより KLF5 によるこれら遺伝子の発現亢進を SET が抑制した。さらに、KLF5 の細胞増殖亢進作用を SET が抑制した。これらのことから、SET は KLF5 の DNA への結合を阻害し、KLF5 の作用を抑制する因子であることが示された。
3. 細胞増殖刺激により血管平滑筋培養細胞内で KLF5 は誘導がかかり、同時に SET の発現は抑制がかかった。同時に KLF5 が調節する下流遺伝子である PDGF-A 鎖の発現亢進が認められた。このことから細胞増殖刺激により SET の発現量が減少し、KLF5 の抑制を解除してい

る可能性があると考えられた。また、バルーン障害血管内膜肥厚モデルにおいて肥厚した新生内膜で KLF5 と SET の発現がみられ、個体レベルでも SET と KLF5 との間に相互作用がありうることが示された。

4. アセチル化酵素 p300 によるヒストンアセチル化を SET が抑制するとの報告があることから、KLF5 がアセチル化されるか細胞レベルで^[3H]acetate を用いて検討した結果、KLF5 は細胞内でアセチル化されることが確認された。また、精製した KLF5 の全長、KLF5 の DNA 結合領域のタンパク質ならびに DNA 結合領域を除いた領域のタンパク質を用いたところ p300 は KLF5 の DNA 結合領域をアセチル化した。さらに、p300 抗体を用いて細胞を免疫沈降したところ、免疫沈降物中に KLF5 があることが確認され、p300 と KLF5 が結合しうることが示された。p300 の KLF5 の転写活性化に及ぼす影響を解析するためにレポーターアッセイをおこなったところ、p300 は KLF5 の転写活性化を促進し、この効果は p300 のアセチル化領域欠損変異体では減弱することから、p300 の KLF5 に対する促進作用の一部は KLF5 のアセチル化に起因していることが示された。

5. 最後に p300 によるアセチル化を SET が抑制するか検討した。精製した KLF5 の DNA 結合領域が *in vitro* で p300 によりアセチル化させる条件下で SET を添加すると KLF5 DNA 結合領域のアセチル化が抑制された。この抑制には p300 の添加前に SET を添加することが必要であることから、SET は KLF5 を脱アセチル化するのではなく、KLF5 のアセチル化部位を覆い隠すことによりアセチル化を抑制することが示された。

以上、本論文は KLF5 に対する相互作用因子の単離・解析から、KLF5 に対して促進的に働く p300 及び抑制的に働く SET の存在ならびに相互作用を明らかにした。本研究は KLF5 の転写調節機構に新たな作用様式を提唱するものであり、将来的には血管病の予防につながると考えられ、学位の授与に値するものと考えられる。