

## 博士審査の結果の要旨

氏名 野中 綾

$\beta$ -catenin は Wnt シグナルの亢進により核へ移行し、下流の遺伝子の転写を亢進させる。核内では、DNA と直接結合せず、TCF4 などの DNA に直接結合する転写因子と複合体を形成することで転写制御を行う。

本研究では、クロマチン免疫沈降法 (ChIP) とタイリングアレイ解析 (chip) を組み合わせた ChIP-on-chip 法により、 $\beta$ -catenin および TCF4 の結合領域の同定を試みた。特に、転写複合体を理解するために、DNA に直接結合していない  $\beta$ -catenin に対して Chip-on-chip を行うことで、そのタンパク質複合体が結合する DNA 断片の同定を行うことを目的とした。

$\beta$ -catenin は Wnt シグナルなどによって細胞膜より核へ移行し、下流遺伝子の転写を活性化する。本研究では、恒常的に  $\beta$ -catenin が核に集積している低密度培養の大腸癌細胞株 SW480 を用いて ChIP を行うことにした。

$\beta$ -catenin が核に集積している条件で、ホルムアルデヒド架橋による  $\beta$ -catenin の ChIP を行ったが、効率よく DNA を回収できなかった。この原因は  $\beta$ -catenin が DNA に直接結合していないためと考え、タンパク質間を架橋する化合物を用いて  $\beta$ -catenin と DNA に結合する分子を共有結合させ、その複合体で ChIP を行うことにした。今回検討した 5 種類の架橋剤の中では DSP (Dithiobis [succinimidylpropionate]) で架橋した後にホルムアルデヒドで固定する方法が最も効率よく目的の DNA 断片を回収させた。また細胞質や細胞膜下にも DNA と相互作用していない  $\beta$ -catenin が存在することから、全細胞分画を用いて ChIP を行うと、DNA と相互作用していない  $\beta$ -catenin も回収してしまい、ChIP 効率の低下につながる事が予想された。そこで、核分画試料を用いることで、 $\beta$ -catenin の ChIP 効率の向上を試みた。その結果、分画後に架橋を行うことにより、分画せずに ChIP をおこなった結果と比較して *CCND1* プロモーター領域が約 4 倍濃縮された。この結果は細胞内局在の変化がみられる分子に対して ChIP を行う際に、よい手法になる可能性がある。

この ChIP 試料を用いて ChIP-on-chip 解析を行った。 $\beta$ -catenin 及び TCF4 に関して一部のゲノム配列が搭載された ENCODE アレイで結合領域を同定すると、ChIP で回収された DNA 断片の中で ENCODE アレイによって決定された配列 13 箇所のうち、定量的 PCR で再現性が確認できたのが 10 領域 (77%) と、高い相関が得られた。同定された  $\beta$ -catenin あるいは TCF4 の候補 DNA 結合領域に共通の結合配列を見いだすために、TRANSFAC®を用いたコンセンサス配列の有無を調べた結果、TCF/LEF1 サイトが最も濃縮されており、本手法での ChIP-on-chip の結果が妥当であることを強く支持した。

また、転写開始点上流 7.5 kb から下流 2.5 kb の配列が搭載されたプロモーターアレイを用いた解析では、 $\beta$ -catenin の結合領域として、880 領域が同定された。これらの領域は、プロモーターアレイ全般のバックグラウンド 22% に対して、56% の TCF/LEF1 結合配列の濃縮が見られた。プロモーターアレイで検出された 7 番染色体に含まれる領域について定量的 PCR で濃縮率を求

めると、26 領域中 23 領域 (88%) で 2 倍以上の濃縮が認められた。さらに、近傍に  $\beta$ -catenin の結合領域が存在する遺伝子について、SW480 に  $\beta$ -catenin に対する siRNA を用いて発現を抑制した際の遺伝子発現解析を行った。その結果、61 遺伝子が選出され、TCF4/LEF1 のコンセンサス配列の濃縮率は 79 % (48/61) であった。 $\beta$ -catenin の ChIP-on-chip と si  $\beta$ -catenin の発現アレイを比較することによって、すでに知られている  $\beta$ -catenin の下流遺伝子 (*MYC*, *SP5*, *MSX1*) を検出することができ、さらに既報にない遺伝子 (*TNFRSF19*, *RASL11B*) も検出できた。

本研究の目的は、クロマチン免疫沈降法とマイクロアレイ解析を組み合わせ、転写複合体である  $\beta$ -catenin および TCF4 が結合する DNA 配列を同定することにあった。これまでに、DNA に直接結合しないタンパク質と DNA の相互作用を解析した例は少ない。その原因は一般的なクロマチン免疫沈降で用いられるホルムアルデヒドによる固定では、複合体を形成するタンパク質間の架橋が十分でないことが考えられる。本研究では DSP によって複合体を形成する 2 つのタンパク質を架橋した後にクロマチン免疫沈降を行うことで、安定した結果が得られることを明らかにした。本研究が提供した複合体に適したクロマチン免疫沈降の技術は、転写複合体の組み合わせの変化によって複雑になっている転写のメカニズムを明らかにする上で、重要な技術である。

このように本研究は、転写複合体の ChIP 手法の確立および、ChIP-on-chip と発現アレイを組み合わせた網羅的な手法によって、 $\beta$ -catenin が直接制御する遺伝子群の候補を明らかにした。

この内容は 1 月 30 日の口頭発表および質疑応答を行い、審査員一同は本研究が博士論文として十分独創的であると判断した。

よって本論文は博士(工学)の学位請求論文として合格と認められる。