

## 審査の結果の要旨

氏名 渡部 博貴

本研究では、クロマチン構造変換因子 SWI/SNF 複合体が神経選択的リプレッサーである NRSF(neuron-restrictive silencer factor)と協調して神経系特異的な遺伝子の発現を抑制する分子機構、及び SWI/SNF 複合体の機能が欠損した非小細胞肺癌(non-small cell lung carcinoma; NSCLC)におけるこれらの遺伝子発現の亢進を検討したものであり、下記の結果を得ている。

1. Western blotting 法によって、いくつかの NSCLC 細胞株での SWI/SNF 複合体の触媒サブユニット Brm と BRG1 の発現を検討したところ、高頻度でそれらの発現が失われていることを見出した。次にこれらの細胞株での神経特異的遺伝子 *synaptophysin*, *SCG10* の発現を RT-PCR 法によって解析したところ、SWI/SNF 複合体触媒サブユニットの発現とは逆相関関係になることを見出した。さらに、Brm と BRG1 の発現が正常な NSCLC 細胞株で、short hairpin (sh) RNA 発現 VSV-G シュードタイプウイルスを用いて、Brm/BRG1 あるいは Ini1 の発現を抑制した場合、これらの神経系遺伝子の発現が誘導されることが示された。
2. Brm と BRG1 の発現を欠失する NSCLC 細胞株に、Brm あるいは BRG1 を強制発現させたところ、高レベルで発現の認められた *synaptophysin* や *SCG10* の発現が有意に抑制された。一方、Brm あるいは BRG1 の代わりに各々の ATP 結合能変異体を強制発現させた場合には、このような発現抑制は認められず、SWI/SNF 複合体は ATP 依存的に神経特異的遺伝子の発現を抑制する事が示された。
3. *synaptophysin* や *SCG10* の発現抑制に関与する NRSF が SWI/SNF 複合体と結合するかどうかを検討するため、293 細胞へ Flag-tagged NRSF (F-NRSF) を強制発現させた。これらの細胞から細胞抽出液を調製後、抗 Flag 抗体で免疫沈降法を行ったところ、SWI/SNF 複合体は NRSF と相互作用していることが示された。さらに、Flag-tagged N 末側欠失 NRSF (C-NRSF) あるいは Flag-tagged C 末側欠失 NRSF (N-NRSF) でこの相互作用を検討したところ、N-NRSF でのみ SWI/SNF 複合体との結合がみられた事より、SWI/SNF 複合体の NRSF への相互作用は主に NRSF の N 末側の領域が必要であることが示された。

4. Brm と BRG1 の発現を共に欠失する NSCLC 細胞株に BRG1 を強制発現させ、クロマチン免疫沈降を行ったところ、BRG1 はヒト *synaptophysin* 遺伝子上の NRSF 結合部位に動員される事が示された。また、NRSF の corepressor である HDAC2 及び CoREST は、Brm あるいは BRG1 の強制発現に関わらず、常に NRSF 結合部位に存在していた事から、NRSF とその corepressor のゲノム上への動員に SWI/SNF 複合体は関係しない事が示唆された。さらに、Brm あるいは BRG1 を補完することによって、NRSF 結合部位付近のヒストン H4 のアセチル化レベルが有意に減少する事が示された。
5. Brm と BRG1 の発現が共に正常な NSCLC 細胞株に、HDAC 阻害剤 FK228 あるいは DNA メチル化酵素阻害剤 5-azacytidine を処理したところ、FK228 処理のサンプルでのみ *synaptophysin* や *SCG10* の発現が誘導された。さらに、Brm と BRG1 の発現を欠失する NSCLC 細胞株と両者の発現が正常な NSCLC 細胞株における *synaptophysin* 遺伝子上の CpG island のメチル化レベルを bisulfite 法で検討したところ、どちらの細胞株でも CpG のメチル化は起きていなかった事も合わせて考えると、NRSF-SWI/SNF 複合体による神経特異的遺伝子の発現抑制には主にヒストンの脱アセチル化が重要である事が示唆された。

以上、本論文は SWI/SNF 複合体の活性を失った NSCLC 細胞株では神経選択的サイレンサー NRSF の機能が破綻する事によって、正常組織において通常は発現が抑制されているいくつかの神経特異的遺伝子の発現が誘導されることを証明した。さらにこの抑制分子機構として、SWI/SNF 複合体による NRSF 結合配列近傍のヒストン H4 の脱アセチル化が関与している事を示した。これまで良く知られていた SWI/SNF 複合体による転写活性化とは全く異なる、同複合体による特異的な遺伝子群の抑制機構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。