

[課程一2]

審査結果の要旨

氏名 丹藤 利夫

本研究は真核生物の多様な遺伝子制御において重要な役割を果たしているクロマチン構造変換因子 SWI/SNF 複合体の未知の転写制御機構を明らかにすることを目的として解析を行なった。SWI/SNF 複合体サブユニットに対するタンパク質相互作用を指標として新たな結合タンパク質を探索し、未知の転写制御機構を解明することを試みたものであり、下記の結果を得ている。

1. SWI/SNF 複合体の触媒サブユニットである Brm および BRG1 の N 端に FLAG タグを付けた発現ベクターを HEK-293T (ヒト胎児腎臓細胞株)にそれぞれトランスフェクションし、それぞれの核抽出液に対して抗 FLAG 抗体により免疫沈降を行なった。各免疫沈降標品をトリプシン消化したのち LC/MS 解析にかけたところ、SWI/SNF 複合体との結合がこれまでに知られていないタンパク質としてヒト REQUIEM (hREQ)を同定した。
2. NFκB レポーターを安定発現する HEK-293FT 細胞を作製して Brm, BRG1 および hREQ の外来性の発現による転写活性への影響を検証した。その結果、RelB および p52 発現ベクターの導入による NFκB レポーターの転写活性が hREQ、Brm の発現により活性化された。また、HEK-293FT に外来性の RelB および p52 発現ベクターを導入し、同時に加えた Brm および hREQ を標的とする short hairpin (sh) RNA によるノックダウンによって RelB および p52 に応答する遺伝子の転写活性にどのような影響を与えるかを調べた。その結果、RelB/p52 による *ELC* および *BLC* 遺伝子の転写活性化において Brm および hREQ ノックダウンによる活性化の減少が見られた。よって、レポーター遺伝子と内在性遺伝子で Brm および hREQ は RelB/p52 による転写活性化を制御していることが示唆された。
3. Lymphotoxin Receptor を高発現しているヒト大腸癌細胞株 (HT-29)を用いて、Lymphotoxin により内在性の RelB/p52 を活性化させた。Lymphotoxin 刺激による *BLC* 遺伝子の誘導は Brm および hREQ に対する shRNA を導入した細胞でほぼ完全に消失した。よって、細胞内における内在性の RelB/p52 活性化においても Brm および hREQ に依存して起きることが示唆された。
4. HT-29 細胞における hREQ の Brm, BRG1, RelB および p52 とのタンパク質相互作用の有無とそれらの Lymphotoxin 刺激の影響を免疫沈降法により検証した。抗 Brm 抗体および抗 BRG1 抗体による免疫沈降標品において

hREQ の共沈が認められたが、Lymphotoxin 刺激による変化は見られなかった。抗 Brm 抗体による免疫沈降標品において RelB および p52 の共沈が Lymphotoxin 刺激時にのみ認められた。また、抗 hREQ 血清による免疫沈降標品において Brm の共沈が認められ、さらに Lymphotoxin 刺激時にのみ RelB の共沈が見られた。よって、hREQ は Brm/BRG1 と Lymphotoxin 非依存的に結合しており、Lymphotoxin 刺激時に RelB および p52 と結合することが示唆された。

5. HT-29 細胞に Lymphotoxin による刺激を加え、内在性の Brm, BRG1 および hREQ が内在性の *BLC* 遺伝子の発現誘導時に *BLC* 遺伝子プロモーター上に動員されるかどうかをクロマチン免疫沈降実験により検証した。その結果、抗 Brm 抗体、抗 hREQ 血清、抗 RelB 抗体および抗 p52 抗体による免疫沈降標品において Lymphotoxin 刺激に依存した *BLC* 遺伝子プロモーターとの結合能の上昇がみられた。よって、Lymphotoxin 刺激により、Brm、hREQ、RelB および p52 が *BLC* 遺伝子プロモーターに動員され、転写活性化を行なうことが示唆された。

以上のことから、Brm および BRG1 の結合タンパク質として同定された hREQ は RelB/p52 の転写活性化に Brm と共に機能することを明らかにした。これまでに SWI/SNF 複合体と NF κ B の関係はほとんど何も明らかにされておらず、本研究を通して hREQ の存在により SWI/SNF 複合体と NF κ B の転写活性化の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。