

[課程-2]

審査の結果の要旨

氏名 松山玲子

本研究は、核内オーファン受容体であるエストロゲン関連受容体 α (ERR α) の転写活性化制御機構の解明および生体内機能の解析を行うために、生化学的手法を用いて ERR α の新規転写共役因子の精製・同定を試みたものであり、下記の結果を得ている。

1. ERR α を恒常的に発現する細胞株 (Stable cell line) を HeLa 細胞にて樹立した。この細胞株を大量培養し、核抽出液を取得したのち、抗体カラムを用いて精製し、得られた相互作用因子を質量分析計にて同定した。その結果、Double PHD finger protein 2 (DPF2) を始めとして、多数の機能未知因子が取得され、ERR α には多数の相互作用因子が存在することが示唆された。
2. 筋芽細胞株 C2C12 細胞を用いたレポーターアッセイを行い、DPF2 が転写共役抑制因子 (コリプレッサー) の活性を有すること、DPF2 が ERR α に対して転写共役抑制因子として働くことが示された。さらに DPF2 は、アンドロゲン受容体 (AR) に対しては転写共役抑制因子であった一方、エストロゲン受容体 α (ER α) に対しては転写共役因子活性を示さなかった。したがって、DPF2 は核内受容体選択的に機能する転写共役抑制因子であることが示された。
3. DPF2 は C 末端に二つの PHD フィンガー領域を有するタンパク質である。この PHD フィンガー領域によるヒストン修飾の認識能をヒストンプルダウン法にて検討したところ、DPF2 のダブル PHD フィンガー領域がヒストンのアセチル化修飾およびトリメチル化修飾を認識し結合することが示された。PHD フィンガー領域は従来、ヒストンのメチル化修飾を認識する領域として報告されているが、DPF2 の PHD フィンガー領域がヒストンのアセチル化修飾を認識し結合できる点で、新たな発見であった。
4. DPF2 はヒストン脱アセチル化酵素 (HDAC1) と相互作用することが、C2C12 細胞を用いた免疫沈降法により示された。さらに、GAL4 応答配列レポーターの恒常発現細胞を用いたレポーターアッセイにより、GAL4-DPF2 の転写共役抑制活性は、ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤により解除されることが判明した。したがって、DPF2 はヒストン脱アセチル化酵素との相互作用により、ERR α に対して転写共役抑制活性を発揮することが示された。
5. DPF2 は、BAF クロマチンリモデリング因子複合体のコアサブユニットである BAF155, BAF170, BAF250 と相互作用することが、C2C12 細胞を用いた免疫沈降法により示さ

れた。したがって、DPF2 がクロマチンリモデリング因子複合体を構成していることが示唆された。

6. C2C12細胞を用いたクロマチン免疫沈降法により、ERR α の標的遺伝子である GLUT4, PDK4, STK11 のプロモーターの ERR α 結合配列近傍において、DPF2 がリクルートされることが示された。また、DPF2 を RNAi によりノックダウンすると、これらの標的遺伝子プロモーターの ERR α 結合配列近傍のヒストンアセチル化修飾が増強された。したがって、DPF2 はこれらのプロモーターにおいて、ヒストンアセチル化修飾を制御していることが示唆された。
7. C2C12細胞において、DPF2 を RNAi によりノックダウンし、ERR α 標的遺伝子 mRNA の発現変動をリアルタイム PCR 法にて検討した。その結果、GLUT4, PDK4, STK11 の mRNA はいずれも発現が上昇した。さらに、DPF2 と ERR α の両者をノックダウンした C2C12細胞を用いたリアルタイム PCR 法では、これらの遺伝子 mRNA の発現変動が観察されなかった。したがって、これらの代謝関連遺伝子において、DPF2 は ERR α を介して発現を抑制していることが示された。

以上、本研究では ERR α の相互作用因子の生化学的な精製により、新規転写共役抑制因子 DPF2 を取得した。DPF2 が転写共役因子活性を有すること、核内受容体に対して転写共役因子として働くことを初めて明らかにした。さらに DPF2 の PHD フィンガー領域がヒストンのアセチル化修飾を認識し結合すること初めて見出した。本研究は、不明な点の多い核内オーファン受容体の転写活性化調節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。