

【別紙 2】

審査の結果の要旨

氏名 高野（宗政） 歆子

本研究は血管病態形成における転写調節反応の解明を目的として、実施された。本研究は、平滑筋脱分化を介して血管リモデリング・動脈硬化・血管新生に寄与する KLF5 とその相互作用因子の機能解析を通じ、これらの因子による転写調節機構を解明しようと試みたものであり、下記の結果を得ている。

1. HeLa S3 核抽出液と KLF5 の DNA 結合ドメインを用いたタンパク質カラムにより、SDS-PAGE 上での移動度が 32kDa であるタンパク質を分離し、p32 とした。質量分析の結果、p32 は ANP32B であることが明らかになった。このように、ANP32B が KLF5 相互作用因子として取得された。
2. レコンビナントタンパク質を用いた *In vitro* での相互作用検討の結果、ANP32B が KLF5 の DNA 結合ドメインに直接相互作用することが明らかになった。
3. レコンビナントタンパク質と KLF5 の結合モチーフを含むオリゴ DNA を用いた *In vitro* での EMSA アッセイの結果、KLF5 と ANP32B の相互作用は、KLF5 の DNA 結合を阻害することが明らかになった。
4. KLF5 の下流遺伝子である細胞増殖関連因子 PDGF-A chain のプロモーターを含むレポーターを用い、KLF5 による転写活性化に対する ANP32B の効果を調べた。その結果、KLF5 の転写活性化を ANP32B が抑制することが明らかになった。
5. ANP32B はグルタミン酸・アスパラギン酸という酸性アミノ酸に富むこと、ANP32B が属する ANP32 ファミリーは核内因子であることから、ANP32B は塩基性アミノ酸に富むヒストンに直接相互作用することが示唆された。ヒストンは、コアヒストン（DNA と共にヌクレオソームを形成）と、リンカーヒストン（ヌクレオソームに結合し、ヌクレオソーム間相互作用を安定化する）に分類される。レコンビナントタンパク質を用いた *In vitro* での相互作用検討の結果、ANP32B はコアヒストンに直接相互作用することが明らかになった。更に、ANP32B はリンカーヒストンよりもコアヒストンに嗜好性を示すことが明らかになった。
6. ANP32B とヒストンの相互作用から、ANP32B がヌクレオソーム形成に寄与するヒストンシャペロンであることが示唆された。レコンビナントタンパク質を用いた *In vitro* でのヒストンシャペロン活性検討の結果、ANP32B はヌクレオソーム形成活性を有するヒストンシャペロンであることが明らかになった。
7. 内在性の ANP32B の機能を検討するため、HeLa 細胞に siANP32B を導入し、

ANP32B の機能欠損を検討した。その結果、ANP32B と PDGF-A chain のノックダウンが mRNA レベルで確認された。このことから、内在性の ANP32B が PDGF-A chain の転写を抑制していることが示された。

8. 細胞内での ANP32B による KLF5 の制御を明らかにするため、HeLa 細胞に siANP32B を導入し、PDGF-A chain プロモーターへ KLF5 の結合に対する効果を検討した。その結果、ANP32B ノックダウンにより PDGF-A chain プロモーターへ KLF5 の結合が促進された。このことから、ANP32B が PDGF-A chain プロモーターへ KLF5 の結合を抑制していることが示された。

9. 細胞内での ANP32B によるクロマチン構造の制御を明らかにするため、HeLa 細胞に siANP32B を導入した結果、PDGF-A chain プロモーター領域に特異的に (1) ヒストン H4, H2B の減少、(2) アセチル化ヒストン H3, H4 の増加を観察した。このことから、ANP32B は PDGF-A chain プロモーター上でのヒストン量増加、ヒストンアセチル化阻害に寄与することが明らかになった。

10. ANP32B の局在を調べたところ、PDGF-A 遺伝子プロモーターへの結合が見られたものの、PDGF-A chain 5'側、3'側には結合が観察されなかった。このことから、ANP32B は PDGF-A chain プロモーターに局在することが明らかになった。このことから、ANP32B ノックダウンによる PDGF-A chain プロモーター上での全ヒストン量・アセチル化ヒストン量の変動が ANP32B によることが確認された。

11. ANP32B の局在に対する KLF5 の効果を検討するため、siKLF5 を HeLa 細胞に導入した。その結果、ANP32B の PDGF-A chain プロモーターへの結合が減少したものの、5'および 3'への ANP32B の結合レベルには影響がなかった。このことから、KLF5 は PDGF-A chain プロモーターへの ANP32B のリクルートに必要であることが明らかになった。

12. ANP32B のリクルートがヒストン量変動に寄与するかを確認するため、siKLF5 を HeLa 細胞に導入した。その結果、PDGF-A chain プロモーター上でのヒストン量が減少し、5'および 3'でのヒストン量には影響がなかった。このことから、KLF5 による ANP32B のリクルートがヒストン量変動に寄与することが明らかになった。

13. KLF5 のリプレッサーであり、かつ共にヒストンシャペロンである TAF-I と ANP32B による転写調節を明らかにするため、siANP32B, siTAF-I を HeLa に導入した結果、(1) PDGF-A chain 発現の増加、(2) KLF5 の PDGF-A chain 遺伝子プロモーターへの結合が見られた。このことから ANP32B と TAF-I は共に PDGF-A chain 遺伝子の抑制を行うことが明らかになった。

14. 転写調節における ANP32B と TAF-I の関係性を明らかにするため、両者が PDGF-A chain プロモーターに同時に結合しているかを調べた。その結果、ANP32B と TAF-I は PDGF-A chain プロモーターに共局在することが明らかになった。更に、ANP32B のノックダウンにより TAF-I の PDGF-A chain プロモーターへの結合が減少し、TAF-I の

ノックダウンにより ANP32B の PDGF-A chain プロモーターへの結合が減少することが確認された。このことから、ANP32B と TAF-I は協調的に PDGF-A chain 遺伝子の抑制を行うことが明らかになった。

15. ANP32B と TAF-I の機能的な差を明らかにするため、両者のヒストン・KLF5 DNA 結合ドメインの zinc finger への結合の差について調べた。その結果、両者とも全てのヒストンサブユニットに結合を示すものの、両者が共存する条件ではヒストンサブユニットへの嗜好性に差が見られた。一方、KLF5 DNA 結合ドメインへの結合には、差が見られなかった。

16. ANP32B と TAF-I の立体構造を調査した結果、ANP32B は平行ベータシートを基本構造とする一両体であるが、TAF-I は逆平行ベータシートを含む2または4両体であることがわかった。このことから、KLF5 は全く異なる立体構造をとるヒストンシャペロンと相互作用し、これら相互作用因子により自身の下流遺伝子の転写を制御されることが明らかになった。

以上、本論文は、転写因子 KLF5 とその相互作用因子として取得された ANP32B の解析を行うことにより、(1) ANP32B が新規ヒストンシャペロンであること、(2) KLF5 は ANP32B との相互作用により、DNA 結合活性を抑制されること、(3) KLF5 は ANP32B のリクルートにより KLF5 下流遺伝子プロモーターのヒストン量を増大させること、(4) ANP32B は TAF-I と協調的に KLF5 下流遺伝子の転写を抑制することを明らかにした。転写調節反応では(2)の報告はあるが、(3)(4)のケースは今回が初めてであった。このように、本研究は新しい転写調節機構の解明につながった。病態制御におけるクロマチン構造変換の意義、転写抑制におけるクロマチン転写調節機構は、今までほとんど未知であったが、本研究はこれら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。