

Title	δEF1による転写抑制機構を担うコリプレッサー CtBP1、CtBP2の同定と解析
Author(s)	古澤, 貴志
Citation	大阪大学, 2001, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/42488
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、〈a href="https://www.library.osaka- u.ac.jp/thesis/#closed">大阪大学の博士論文について

## Osaka University Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

Osaka University

氏 名 古 澤 貴 志

博士の専攻分野の名称 博士(理学)

学位記番号 第 15989 号

学位授与年月日 平成13年3月23日

学 位 授 与 の 要 件 学位規則第4条第1項該当

理学研究科生物科学専攻

学 位 論 文 名 δEF 1 による転写抑制機構を担うコリプレッサー CtBP 1、CtBP 2 の

同定と解析

論 文 審 査 委 員 (主査)

教 授 近藤 寿人

(副査)

教 授 二井 將光 教 授 田嶋 正二

## 論文内容の要旨

 $\delta$  EF1 はN末端側とC末端側に Zn フィンガーモチーフ、その中央にホメオドメインを持つ転写制御因子である。  $\delta$  EF1 は Zn フィンガーを介して E2-box(CACCTG;MyoD などの bHLH タンパク質が結合)と重複した塩基配列(CACCT)に結合し、転写抑制因子として機能することが知られている。また、 $\delta$  EF1 のマウス胚発生過程における発現は特に中胚葉由来の組織でみられ、ノックアウトマウスの表現型から $\delta$  EF1 は四肢や椎骨等の骨格形成や T細胞分化に関与することが明らかとなっている。

δEF1 による転写制御機構の解明を目的とし、酵母 two-hybrid system を用いてδEF1 と相互作用する因子の探索を行った。δEF1 のホメオドメインを含む短い領域(MS 領域)を用いてスクリーニングを行った結果、陽性クローンとしてマウス CtBP1 と CtBP2 の cDNA を単離した。CtBP (C-terminal Binding Protein) は最初にヒトアデノウイルス E1A タンパク質の C末端に結合する因子として単離された。CtBP が結合することによって E1A タンパク質のN末端側領域の持つ転写活性化能が阻害されることや E1A タンパク質の腫瘍形成能が抑制されることが示されている。MS 領域を用いて得られた陽性クローンが全て CtBP1 および CtBP2 (CtBP1/2) であったことから、δEF1 と CtBP1/2 の相互作用について解析を進めた。δEF1 の全長が CtBP1/2 と結合することを酵母 two-hybrid やGST 融合タンパク質を用いた免疫沈降によって明らかにした。またこの結合には、δEF1 と E1A タンパク質の間で保存されている、PLDLSL の 6 アミノ酸からなる配列が必須であることも明らかにした。

E1A タンパク質における機能的類推から、CtBP1/2 が  $\delta$  EF1 に結合してコリプレッサーとして働くことが考えられた。この点について、 1) CtBP1/2 に DNA 結合ドメインを融合させた時に転写抑制能を持つこと、 2) CtBP1/2 が MS 領域に結合する事で転写を抑制すること、 3)  $\delta$  EF1 による転写抑制が CtBP1/2 の結合によってさらに増強されることを10T1/2 細胞を用いたトランスフェクションアッセイによって示した。

CtBP1/2のノザンブロットにより、CtBP1 はマウス胚及びマウス成体の各組織で強く発現されているのに対して、CtBP2 の発現はマウス胚特異的であることがわかった。マウス胚の whole mount in situ ハイブリダイゼーション の結果から、CtBP1、CtBP2 ともに  $\delta$  EF1 と同じ部位で発現されていたことから、実際に生体内においても CtBP1/2 は  $\delta$  EF1 のコリプレッサーとして機能している事が考えられた。

以上のように、 $\delta$  EF1 と相互作用する因子として単離した CtBP1 及び CtBP2 は、 $\delta$  EF1 が関与する転写抑制においてコリプレッサーとして機能する事を明らかにした。

## 論文審査の結果の要旨

転写制御因子 $\delta$  EF1 に関しては、転写に対して抑制的に働くこと、また複数の機能的ドメインの存在することが、 in vitro やノックアウトマウス等の解析から示唆されていた。古沢貴志君は、そのようなドメイン構造の一部は他の 因子との相互作用のために存在しその相互作用により  $\delta$  EF1 の転写抑制活性の一部が賦与されるのではないかと考え、まず酵母 two-hybrid system を用いてそのような因子を探索した。その結果、実際にこれまでアデノウイルス E1A の結合タンパク質として見出されていた CtBP タンパクが  $\delta$  EF1 と強く相互作用し得る因子であることを示し、 CtBP がコレプレッサーとして作用することを示唆した。

さらに $\delta$  EF1 と CtBP の相互作用が実際に生体内において機能し、 $\delta$  EF1 の転写抑制活性の一部がその CtBP によって担われていることを、マウス胚での両者の発現領域の解析や、培養細胞を用いたトランスフェクションの実験系を駆使して直接的に証明した。これはコレプレッサー CtBP が標的転写因子に作用し抑制活性を賦与し得ることを示した最初の報告となった。本研究は博士(理学)の学位論文として十分価値あるものと認める。