

# 論文内容の要旨

申請者氏名 及川 優

BTB-zinc finger 因子 CIBZ (CtBP-interacting BTB zinc finger protein) は転写を抑制することや、転写コリプレッサータンパク質である CtBP と相互作用することがこれまでに報告されている。また、ZENON (rat の CIBZ 相同タンパク質) が Tyrosine hydroxylase プロモーターを活性化することや、ZBTB38 (human CIBZ) がメチル化された CpG 配列に結合することも報告されており、CIBZ は生体内で重要な機能を担っていることが示唆されている。一方で、実際の生理機能はこれまで明らかになっていない。CtBP は数多くの転写因子との結合が確認されており、最近では CtBP 欠損マウス胚性線維芽細胞を用いた研究より、p53 非依存的なアポトーシスを抑制していることが明らかにされた。CIBZ は CtBP と結合する転写因子であることから、申請者は CtBP と協調してアポトーシスに関与する可能性に着目し、CIBZ の発現が高いことが既に確認されており *in vitro* におけるアポトーシス誘導の系が確立されているマウス筋芽細胞 C2C12 を用いて、CIBZ の機能解析を行った。まず、申請者は、C2C12 細胞を低血清で培養してアポトーシス誘導すると CIBZ の発現がタンパク質レベルでのみ減少することを確認した。次に、C2C12 細胞で CIBZ をノックダウンするとアポトーシスが誘導されることも明らかにした。この際、p53 の活性化が認められないこと及び、p53 欠損マウス胚性線維芽細胞で CIBZ をノックダウンしてもアポトーシスが誘導されたことから、CIBZ の抑制によって誘導されたアポトーシスは、CtBP 同様 p53 に依存しない経路が活性化されたことによるものであることが明らかになった。

C2C12 細胞は低血清で培養すると、アポトーシスが誘導される細胞と、融合して多核細胞を形成し筋管細胞へと分化する細胞に分かれる。C2C12 細胞で CIBZ をノックダウンすると筋分化に重要な転写因子である *myogenin* の発現上昇が確認された。*myogenin* のプロモーター領域は分化誘導の前後でメチル化状態が変化することが報告されており、CIBZ はメチル化 CpG に結合することから *myogenin* の転写を直接制御している可能性が考えられた。実際に申請者は *myogenin* プロモーター配列を組み込んだ pGL3 basic ベクターを用いたレポーターアッセイの結果より、CIBZ はプロモーター配列のメチル化依存的に *myogenin* プロモーターを制御することを明らかにした。さらに、このプロモーター領域に CIBZ が結合することをクロマチン免疫沈降法で確認した。

これらのことから、CIBZ の機能としてアポトーシスの抑制と筋分化の制御に関わっていることが明らかにされた。

# 論文審査結果の要旨

申請者氏名 及川 優

CIBZ タンパク質は、メチル化 DNA に結合する転写抑制因子として機能していることが示唆されている。これまでに知られているメチル化 DNA 結合タンパク質は、発生・分化段階における転写制御や DNA メチル化の維持など重要な機能が報告されている。このことから CIBZ の生体内における機能解析が注目されている。本研究では、CIBZ の機能として以下の新しい知見を得ている。

癌化した細胞の多くは p53 に変異が生じることで、p53 に依存したアポトーシスを誘導することができなくなっている。つまり、p53 非依存的なアポトーシス経路のメカニズム解明が、癌治療に大きく貢献できる可能性があり現在注目されている。CtBP コリプレッサーは、p53 非依存的アポトーシスの抑制因子のひとつとして報告されている。本論文において、申請者は CIBZ もまた p53 に非依存的なアポトーシスを抑制している可能性を新たに示した。CIBZ と CtBP それぞれによるアポトーシス抑制メカニズムは大部分が異なっていると考えられたことから、CIBZ によるアポトーシス制御機構を明らかにすることで、p53 非依存的なアポトーシスのメカニズムの理解につながることを期待される。また、メチル化 DNA 結合タンパク質がカスパーゼの活性を制御していることを示されたのは CIBZ が初めてである。

さらに、申請者は CIBZ が myogenin のプロモーターをメチル化依存的に直接制御することを示し、筋分化の制御を行っている可能性を報告した。CIBZ は各組織でユビキタスに発現しており、Tyrosine hydroxylase プロモーターを制御していることも報告されていることから、筋細胞のみならずその他の細胞分化も制御している可能性が考えられる。これらの結果は、DNA メチル化及び、メチル化 DNA 結合タンパク質が分化制御へ果たす役割を解明するうえで重要な知見を与えるものである。

以上のように、本論文は、BTB-zinc finger タンパク質 CIBZ がアポトーシスを抑制すること及び、DNA のメチル化依存的に筋分化を制御している可能性を初めて明らかにしたものであり、学術上、応用上貢献するところが少なくない。よって審査委員一同は、本論文が博士（バイオサイエンス）の学位論文として価値あるものと認めた。