京都工芸繊維大学

氏　　名	ぬえん　　とうらん　とうえ NGUYEN TRONG TUE
学位(専攻分野)	博　士（学術）
学位記番号	博甲第　５９０　号
学位授与の日付	平成 23 年 3 月 25 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当
研究科・専攻	工芸科学研究科　生命物質科学専攻
学位論文題目	Identification of transcriptional regulation factors and their roles on *Drosophila p53* gene expression （ショウジョウバエ *p53* 遺伝子発現を調節する転写因子の同定とそれらの役割の解明）
審査委員	(主査)教授　山口政光 教授　竹谷　茂 教授　伊藤雅信 准教授　亀井加恵子

論文内容の要旨

申請論文は「序論」、第１章「ショウジョウバエ *p53* 遺伝子の転写制御における DREF の役割」、第２章「NF-Y はショウジョウバエ *p53* 遺伝子を転写制御する」から構成されている。

序論では、本論文の背景と目的が述べられている。がん抑制遺伝子産物である p53 は、ゲノムの守護神として重要な働きを担っている。p53 の機能については多くの研究が蓄積されているが、その転写調節機構についてはまだ良くわかっていない。そこで申請者はショウジョウバエをモデル生物として用いて *p53* 遺伝子の転写を制御する因子の同定とそれらの機能解析を行うことを目的とした。

第１章では、ショウジョウバエ *p53* 遺伝子の転写制御における転写因子 DREF の役割について述べている。DNA 複製関連エレメント（DRE）／DRE 結合因子（DREF）による転写調節システムはショウジョウバエの細胞増殖のマスター制御システムのひとつとして知られている。DREF は DRE 配列を持つショウジョウバエ *p53* 遺伝子のプロモーター領域に結合することを、抗 DREF 抗体を用いたクロマチン免疫沈降法により証明した。また p53 遺伝子突然変異系統を交配させることにより、p53 遺伝子量を半減させると DREF 過剰発現系統が示す複眼形態異常（rough eye 表現型）を抑圧することを見出した。さらに二本鎖 RNA を導入することにより、DREF をノックダウンしたショウジョウバエ培養細胞では p53 mRNA レベルが低下すること、またルシフェラーゼレポーター遺伝子を用いて測定した p53 プロモーター活性も低下すること、そしてこの低下が p53 プロモーターに存在する DRE 配列に変異を導入するとほぼ完全に見られなくなることを明らかにした。また申請者は DRE が p53 プロモーター活性に必要である事は、p53 プロモーターと lacZ 融合遺伝子を導入した遺伝子導入ショウジョウバエを用いた個体レベルでの解析でも確認した。

第２章では、*p53* 遺伝子を制御するもう一つの転写因子 NF-Y について述べられている。申請者は p53 プロモーター上には転写因子 NF-Y の結合コンセンサス配列（CAAT ボックス）が４つ存在することを見出した。NF-Y は NF-YA, NF-YB, NF-YC の三つのサブユニットからなる三量体として機能し、哺乳動物培養細胞を用いたこれまでの研究から主に細胞周期制御に関わる遺伝子を制御することが知られている。申請者はショウジョウバエ NF-YA（dNF-YA）に特異的な抗体を用いた

クロマチン免疫沈降法により、dNF-YA が CAAT ボックスを含むショウジョウバエ *p53* 遺伝子のプロモーター領域に結合することを明らかにした。さらに dNF-YA ノックダウン系統が示す thorax disclosed 表現型を p53 突然変異が増強することを見出した。さらに二本鎖 RNA を導入することにより、dNF-YA をノックダウンしたショウジョウバエ培養細胞（S2 細胞）では p53 mRNA レベルが低下すること、またルシフェラーゼレポーター遺伝子を用いて測定した p53 プロモーター活性も低下すること、そしてこの低下が p53 プロモーターに存在する CAAT ボックスに変異を導入するとほぼ完全に見られなくなることも明らかにした。また CAAT ボックスが p53 プロモーター活性に必要である事は、p53 プロモーターと EGFP 融合遺伝子を導入した遺伝子導入ショウジョウバエを用いた個体レベルでの解析でも確認した。

以上の結果から、ショウジョウバエ p53 遺伝子の発現には転写因子 DREF と dNF-Y の両方が必須であると申請者は結論している。転写因子 DREF は細胞増殖のマスター制御因子として知られるが、複雑な複製や増殖の過程でゲノムを無傷に保つために DREF は p53 遺伝子発現も同時に誘導するのかも知れない。一方 NF-Y は JNK 経路の誘導にも関わり、JNK 経路を誘導するとともに p53 遺伝子の発現も誘導し、細胞をアポトーシスに向かわせるのかも知れないと申請者は考察している。

論文審査の結果の要旨

がん抑制遺伝子産物である p53 は、ゲノムの守護神として重要な働きを担っていることが知られているが、その転写調節機構についてはまだ良くわかっていない。一方 DNA 複製関連エレメント（DRE）／DRE 結合因子（DREF）による転写調節システムはショウジョウバエの細胞増殖のマスター制御システムのひとつとして知られている。申請者は DREF が DRE 配列を持つショウジョウバエ *p53* 遺伝子のプロモーター領域に結合することを、抗 DREF 抗体を用いたクロマチン免疫沈降法により証明した。また *p53* 遺伝子突然変異系統を交配させることにより、*p53* 遺伝子量を半減させると DREF 過剰発現系統が示す複眼形態異常（rough eye 表現型）を抑圧することを見出した。さらに二本鎖 RNA を導入することにより、DREF をノックダウンしたショウジョウバエ培養細胞では p53 mRNA レベルが低下すること、またルシフェラーゼレポーター遺伝子を用いて測定した p53 プロモーター活性も低下すること、そしてこの低下が p53 プロモーターに存在する DRE 配列に変異を導入するとほぼ完全に見られなくなることを明らかにした。また申請者は DRE が p53 プロモーター活性に必要であることを、p53 プロモーターと *lacZ* 融合遺伝子を導入した遺伝子導入ショウジョウバエを用いた個体レベルでの解析でも確認した。

一方申請者は p53 プロモーター上には転写因子 NF-Y の結合コンセンサス配列（CAAT ボックス）が４つ存在することを見出した。NF-Y は NF-YA, NF-YB, NF-YC の三つのサブユニットからなる三量体として機能し、哺乳動物培養細胞を用いたこれまでの研究から主に細胞周期制御に関わる遺伝子を制御することが知られている。そこで申請者はショウジョウバエ NF-YA（dNF-YA）に特異的な抗体を用いたクロマチン免疫沈降法により、dNF-YA が CAAT ボックスを含むショウジョウバエ p53 遺伝子のプロモーター領域に結合することを明らかにした。さらに dNF-YA ノックダウン系統が示す thorax disclosed 表現型を p53 突然変異が増強することを見出した。さらに二本鎖 RNA を導入することにより、dNF-YA をノックダウンしたショウジョウバエ培養細胞（S2 細胞）では p53 mRNA レベルが低下すること、またルシフェラーゼレポーター遺伝子を用いて測定した p53 プ

ロモーター活性も低下すること、そしてこの低下が p53 プロモーターに存在する CAAT ボックスに変異を導入するとほぼ完全に見られなくなることを明らかにした。さらに申請者は CAAT ボックスが p53 プロモーター活性に必要である事を、p53 プロモーターと *EGFP* 融合遺伝子を導入した遺伝子導入ショウジョウバエを用いた個体レベルでの解析でも確認した。

以上の結果から、ショウジョウバエ p53 遺伝子の発現には転写因子 DREF と dNF-Y の両方が必須であることが結論できる。これらの研究は、DRE/DREF 制御システムや転写因子 NF-Y の理解をさらに深めるものであり、その学問的意義は高く評価できる。また p53 が関与するがん抑制の仕組みやその異常によるがん化の仕組みを理解する上でも重要な基盤を与える。学位論文は英文で丁寧に作成されており、論旨も明解であった。本論文の内容は、査読制のある国際的学会誌にすでに発表済みあるいは印刷中である下記の２編の論文を基礎としている。

1) Tue, N. T., Thao, D. T. P. and Yamaguchi, M.: Role of DREF in transcriptional regulation of the *Drosophila p53* gene. Oncogene 29, 2060-2069, 2010.
2) Tue, N. T., Yoshioka, Y. and Yamaguchi, M.: NF-Y transcriptionally regulates the *Drosophila p53* gene. Gene, 2011, in press (PMID: 21044877).