

[ 別紙 2 ]

## 論文審査の結果の要旨

申請者氏名 朝妻 知子

ビタミン D は広範な組織を標的として多様な生理作用を発揮する脂溶性低分子化合物である。ビタミン D の生理作用の多くは、核内受容体スーパーファミリーに属する転写因子、ビタミン D 受容体(VDR)による転写制御により発揮される。これまで VDR の構成する複合体については、核内受容体間で共通の転写共役因子複合体群が知られており、各転写共役因子群の機能により、ヒストン修飾やクロマチン構造調節と RNA ポリメラーゼのリクルートを行い、VDR は転写活性化能を発揮する。

一方でビタミン D の生理作用については、刺激後数分から一時間単位で発揮される急速な反応や、標的組織・遺伝子特異的に異なる応答時間が見られることから、未知の分子機構があると考えられてきた。VDR ノックアウトマウスの解析から、このような急速な反応の一部は VDR を介することが明らかとなっていた。そこで本研究では、VDR の新たな分子機能を明らかにするために、VDR が自己ユビキチン化活性を有することに着目した。この活性を指標に、VDR の新規相互作用因子を生化学的に同定することで、VDR の新たな分子機能解明を試みている。

第一章の序論に引き続き、第二章では、VDR の新規相互作用因子として同定した BEND3 の機能解析を行った。BEND3 は機能未知タンパク質であるが、核内において多く発現しており、VDR とリガンド非依存的に相互作用した。また、BEND3 過剰発現によるレポーターアッセイや、BEND3 ノックダウン時のビタミン D 標的遺伝子に対するリアルタイム PCR により、BEND3 が VDR の転写活性化能を促進する転写共役因子であることを見出した。

第三章では、新たな VDR 相互作用因子の同定を試み、VDR の N 末領域を用いた複合体精製を行った。この結果、ヒストン H2A 脱ユビキチン化酵素である MYSM1 を同定した。MYSM1 についてもレポーターアッセイ・リアルタイム PCR 法を用いた検討を行い、MYSM1 が VDR の転写活性化能を促進することを見出した。

MYSM1 が H2A 脱ユビキチン化酵素であることからまず、ビタミン D 標的遺伝子上流における VDR 結合領域について、ユビキチン化 H2A 量をクロマチン免疫沈降法(ChIP)により検討した。この結果、ビタミン D 添加による転写活性化に伴い、この領域のユビキチン化 H2A 量が減少することを見出した。そこで、同領域について、MYSM1 ノックダウン時のユビキチン化 H2A 量について検討した。この結果、MYSM1 のノックダウンにより、ユビキチン化 H2A の減少が抑制された。このことから、MYSM1 が VDR 結合領域の H2A 脱ユビキチン化により、VDR の転写活性化能を促進することが明らかとなった。

第四章では、VDR の新規活性である、ユビキチン化活性に着目した研究を行った。VDR のユビキチン化活性について、その基質は不明であったため、この活性にビタミン D 依存性を見出すことが出来ていなかった。本研究では、ユビキチン化反応がユビキチン自身を基質とするユビキチン付加反応であることに着目し、ポリユビキチン鎖伸長活性を検出した。この結果、VDR 免疫沈降産物及びリコンビナントタンパク質について、ビタミン D 依存的な活性を検出した。そこで、第三章にて同定した因子である MYSM1 が VDR のユビキチン化基質となる可能性を検討した。この結果、*in vitro* ユビキチン化アッセイにおいて MYSM1 がビタミン D 依存的にポリユビキチン化されることを見出した。

VDR の有するユビキチン化活性の活性中心を明らかにするため、VDR のユビキチン化サイトの同定を試みた。この結果、VDR の DNA 結合ドメイン内に含まれるシステインが同定された。同定されたシステインをセリンに置換した点変異体を用い、再度 MYSM1 に対するユビキチン付加活性を検討した。この結果、VDR の 44 番システインをセリンに置換した際に、MYSM1 に対するポリユビキチン化のバンドが検出されなかった。この結果より、このシステインが VDR のユビキチン化活性中心であることが示唆された。

更に、MYSM1 のユビキチン化サイトの同定を試み、MYSM1 の脱ユビキチン化活性ドメイン近傍のリジン及びクロマチン結合ドメイン内のリジンを同定した。

本論文では、VDR の新規活性である自己ユビキチン化活性を指標に複合体精製を行い、BEND3、MYSM1 の 2 つの転写共役因子を同定した。MYSM1 は VDR 標的遺伝子上流 H2A を脱ユビキチン化した。また、ポリユビキチン鎖の検出により VDR がビタミン D 依存的にポリユビキチン鎖伸長活性を有することを見出した。更に、今回同定した MYSM1 が *in vitro* において VDR のユビキチン化基質であることが示唆された。

以上、本研究はユビキチン修飾系に着目することで、ビタミン D 応答の分子機構の一端を明らかにした。よって、審査委員一同は本論文が博士(農学)の学位論文として価値のあるものと認めた。