

氏 名 (本籍)	おき 沖	なが 永	しょう 壯	じ 治
学位の種類	博 士 (医 学)			
学位記番号	医 博 第 1 1 1 5 号			
学位授与年月日	平 成 4 年 3 月 27 日			
学位授与の条件	学位規則第4条第1項該当			
研究科専攻	東北大学大学院医学研究科 (博士課程)内科学系専攻			
学位論文題目	Identification of A Nuclear Protein Constitutively Recognizes Heat Shock Element : Its Binding Properties and Possible Function Modulating Heat Shock Induction of Heme Oxygenase Gene (熱ショックによるヘムオキシゲナーゼ遺伝子の発現調節機構に関する研究)			
	(主 査)			
論文審査委員	教授	佐々木 英 忠	教授	岡 本 宏
	教授	林 典 夫		

## 論文内容要旨

ヘムオキシゲナーゼ (HO) は、ヘムを酸化的に分解する律速酵素であるが、ラットでは分子量約32,000の熱ショック蛋白質 (HSP) としても知られている。即ちラットにおいては、HOはその基質であるヘムにより誘導をうけるばかりでなく、熱ショック、重金属、酸化剤などのさまざまなストレスによっても誘導され、そのいずれもが転写レベルで制御されている。本研究では、このうちの熱ショックによるラット HO の転写誘導に焦点をあて、その制御機構の一端を解明し、さらにその過程において未知の転写因子を同定することに成功した。

1962年、Ritossa のショウジョバエにおける熱ショック応答の発見に端を発した HSP の転写誘導に関する研究は、以来真核細胞の遺伝子発現の格好のモデルとして注目され、現在に至るまで多くの成果が蓄積されてきた。その誘導機構は、酵母から高等動物に至るまで広く保存されている。即ち、HSP 遺伝子の5' 上流領域に存在する HSE (Heat Shock Element) という共通の塩基配列に、熱ショックにより活性化された核内の HSF (Heat Shock Factor) が結合することにより HSP の転写が著しく促進される。我々はラット HO 遺伝子5' 上流領域の構造を解析することにより、そこに2つの HSE (HSE 1, HSE 2) をみだし、ゲルシフト法及びフットプリント法により、両 HSE ともラットグリオーマ細胞核抽出液中の活性化 HSF により認識されることを明らかにした。さらに HSE 2 のみは構成的結合活性をもつ未知の核内因子により認識され、これを我々は CHBF (Constitutive HSE-binding Factor) と命名した。CHBF は起源の異なるマウスやヒトの培養細胞の核抽出液中にも認められ、種特異性や組織特異性のない遍在性の蛋白質であることがわかった。UV クロスリンク法により、ラット CHBF の分子量は約110,000と推定された。さらにラット HO 遺伝子の5' 上流領域をプロモーターとした融合遺伝子をマウスの細胞に導入し、熱ショック (42°C, 3時間) による一過性の発現誘導を観察した。HSE 2 のみを持つプロモーターでは、熱ショックによるレポーター遺伝子の RNA の増加は認められなかったが、HSE 1 のみの場合では約3倍の増加が生じた。HSE 1 と HSE 2 の両者が存在すると、レポーター遺伝子の転写は著しく増加し、熱ショックにより約19倍の RNA の蓄積が観察された。以上の結果をまとめると、HSE 2 は、それ自身のみでは転写誘導能を持たないが、HSE 1 を介する熱ショック誘導をエンハンスし、その作用には HSE 2 のみを認識する CHBF が関与することが示唆された。

HSE に構成的に結合する活性は、ヒトの HeLa 細胞中に、ヒト HSP70 遺伝子の HSE に結合する因子として既に報告されていたが、その因子と CHBF をゲルシフト法によって比較したところ、結合の様式と移動度が異なり、両者は別個のものであることが判明した。

HSE 1 と HSE 2 とでは、トランスの因子によって認識される様式が互いに異なるという事実は極めて興味深い。HSE は従来 5'-CNNGAANNTTCNNG-3' という 14 塩基から成るコンセンサス配列を指したが、現在では 5'-NGAAN-3' という 5 塩基単位が逆向きに数回反復配列したものと、より広い概念で捉えられるようになった。HSE 1 と HSE 2 の構造をみると、HSE 2 は改変された HSE コンセンサスに合致するが、古典的な HSE コンセンサスには合わない。一方 HSE 1 は、どちらの HSE コンセンサスにも合致する。改変された HSE については、そのシスエレメントとしての機能がまだ十分に検討されていない現在、古典的 HSE に比して多機能を有する可能性があり、HSE 2 はそれを示唆するものと考えられる。

近年 HSF のクローニングが相次ぎ、真核細胞における熱ショック誘導のメカニズムが次第に明らかになってきた。特にヒトとマウスではそれぞれ 2 種類の HSF がクローニングされ、HSF は単一の蛋白質ではなく、ひとつの遺伝子ファミリーを形成していることが判明した。さらに 2 種類のマウス HSF (mHSF 1, mHSF 2) のうち、mHSF 1 は熱ショックによって初めて HSE への結合能を持つようになるが、mHSF 2 は構成的な結合能を有した。熱ショック誘導とは、生体が様々なストレスにさらされた際の適応手段であり、それらに対処するために複雑な誘導機構を持つことは当然と考えられ、mHSF 2 の発見はその多用性を説明する一例と考えられている。未だ mHSF 2 の機能は不明であるが、同じく HSE に構成的に結合する CHBF が、その機能と共に同定されたことは意義深いと思われる。ここで mHSF 2 と CHBF の相同性が問題となるが、今後の重要な検討課題と考えている。

## 審査結果の要旨

ヘムオキシゲナーゼ (HO) は、ヘムを酸化的に分解する律速酵素であるが、ラットでは P32 熱ショック蛋白質 (HSP) としても知られている。即ち HO は基質であるヘムにより誘導を受けるばかりでなく、熱ショック、重金属、酸化剤などの様々なストレスによっても誘導され、いずれもが転写レベルで制御されている。著者はラット HO 遺伝子 5 上流領域の構造を解析することにより、そこに 2 つの HSE (heat shock element : HSE1, HSE2) をみだし、ゲルシフト法及びフットプリント法により、両 HSE とともにラットグリオーマ細胞核抽出液中の活性化 HSF により認識されることを明らかにした。さらに HSE2 のみは構成的結合活性をもつ未知の核内因子により認識され、これを CHBF (constitutive HSE-binding factor) と命名した。CHBF は組織の異なるマウスやヒトの培養細胞の核抽出液中にも認められ、種特異性や組織特異性のない偏在性の蛋白質であることがわかった。UV クロスリンク法により、ラット CHBF の分子量は約 110,000 と推定された。さらにラット HO 遺伝子の 5 上流領域をプロモーターとした融合遺伝子をマウスの細胞に導入し、熱ショック (42°C, 3 時間) による一過性の発現誘導を観察した。HSE2 のみを持つプロモーターでは、熱ショックによるレポーター遺伝子の RNA の増加は認められなかったが、HSE1 のみの場合では約 3 倍の増加が生じた。HSE1 と HSE2 の両者が存在すると、レポーター遺伝子の転写は著しく増加し、熱ショックにより約 19 倍の RNA の蓄積が観察された。以上の結果をまとめると、HSE2 は、それ自身のみでは転写誘導能を持たないが、HSE1 を介する熱ショック誘導をエンハンスし、その作用には HSE2 のみを認識する CHBF が関与することが示唆された。

HSE1 と HSE2 とでは、トランスの因子によって認識される様式が互いに異なるという事実は極めて興味深い。HSE は従来 5-CNNGAANN TTCNNG-3 という 14 塩基から成るコンセンサス配列を指したが、現在では 5-NGAAN-3 という 5 塩基単位が逆向きに数回反復配列したものと、より広い概念で捉えられるようになった。HSE1 と HSE2 の構造をみると、HSE2 は改変された HSE コンセンサスに合致するが、古典的な HSE コンセンサスには合わない。一方 HSE1 は、どちらの HSE コンセンサスにも合致する。改変された HSE については、そのシスエレメントとしての機能がまだ十分に検討されていない現在、古典的 HSE に比して多機能を有する可能性があり、HSE2 はそれを示唆するものと考えられる。本論文では、熱ショック誘導に関して、シス (HSE2) 及びトランス (CHBF) にはたらく新しい転写様式を発見した点が高く評価でき、学位論文に値すると判断される。