

氏 名（本籍）	ね 根 もと 本 やす 靖 ひさ 久
学 位 の 種 類	博 士 （ 医 学 ）
学 位 記 番 号	医 博 第 1 1 3 9 号
学 位 授 与 年 月 日	平 成 5 年 3 月 25 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 ） 病 理 学 系 専 攻
学 位 論 文 題 目	マウスグリコホリン遺伝子の赤血球分化特異的な 発現制御機構の解析

（ 主 査 ）

論 文 審 査 委 員	教 授 帶 刀 益 夫 教 授 林 典 夫
	教 授 柴 原 茂 樹

論文内容要旨

ひとつの未分化な細胞が分化するには様々な遺伝子産物が階層性をもって動員され、最終的には分化形質をコードする遺伝子のスイッチが入力される。本研究では、赤血球分化特異的に発現する遺伝子の発現制御機構を明らかにし、それにかかわる新たな核内因子を探索する目的で、赤血球分化特異的に発現する末端分化マーカーである膜蛋白マウスグリコホリン遺伝子の発現制御領域について、人為的に分化誘導可能な赤芽球系培養細胞マウス赤白血病細胞 (MEL 細胞) をもちいて検討した。まず、分化特異的にグリコホリン遺伝子の転写を活性化するエレメントを検索する目的で、グリコホリン遺伝子転写開始点を含む 5' 上流域の欠失変異遺伝子を CAT 遺伝子につなぎ MEL 細胞に導入後、分化誘導剤添加および無添加培地にて 4 日間培養後の細胞抽出液で CAT アッセイを行なった。その結果、5' 上流 0.9 キロから 1.14 キロまでの領域を含むと転写が活性化し、さらに分化誘導によって CAT 活性が 4 倍増大することが判明し、この領域をマウスグリコホリン遺伝子転写制御領域 (MGRE) と称することにした。MGRE の塩基配列には、グリコホリン遺伝子と同様赤血球分化マーカーであるグロビン遺伝子の転写制御領域である LCR においても認められる、近接して存在する赤血球特異的転写因子 GATA-1 および NF-E2 の認識配列と、幾つかの既知の転写因子の認識配列が存在する。そこで分化誘導前後の MEL 細胞核抽出液をもちいて、MGRE をプローブにして DNase I フットプリント法を行い核内因子の結合部位の同定ならびにその結合の程度を明らかにし、そして明らかになった各結合部位をプローブにしてゲルシフトアッセイを行い核内因子の結合特異性および結合活性を明らかにすることを試みた。その結果以下の点が明らかになった。まず、赤血球特異的転写因子 GATA-1 や NF-E2 の認識配列に因子の結合が認められたが、その結合活性は、MEL 細胞の分化誘導前後では変化しなかった。さらにこれまでに知られていない 2 箇所の部位でも分化誘導前後いずれにおいても核内因子が結合することが判明した。ところで、分化誘導前後で因子の結合に変化の見られる配列も明らかになった。ひとつは癌遺伝子 Ets ファミリーに属する PU.1 (Spi-1) 遺伝子産物の認識配列である。Spi-1 はフレンドウィルス感染により癌化した赤芽球細胞で強く発現している癌遺伝子であり、PU.1 遺伝子産物と同一であることが知られていることから転写因子として癌化に関するものと予想されている。DNase I フットプリント法の結果から分化誘導にともなってこの認識配列での因子の結合が消失し、PU.1 認識配列をプローブにもちいたゲルシフトアッセイからも因子の結合活性が 1/5 に減少することが判明した。ノザン解析によるとこの結合活性の減少は分化誘導にともなう PU.1 遺伝子産物の量的減少であることが示された。一方、さらに興味深いことに MyoD や E 蛋白さらには Myc に代表されるヘリックス・ループ・ヘリックス DNA

結合ドメインをもつ転写因子が認識しうる CACGTG 配列 (E-box) を中心とした領域に核内因子が結合し、分化誘導にともなってその結合が変化し、結合の度合いが2倍増すことも、DNase I フットプリントの結果から明らかになった。そこでこの結合領域をプローブにして種々のコンペティターを添加するゲルシフトアッセイを行なったところ、E-box を認識する因子とそれ以外の未知の配列を認識する因子の2種類の因子が結合することが示された。そして E-box 認識因子は分化誘導前後で結合に変化は見られないものの、もう一方の因子はグリコホリン遺伝子の発現が開始上昇する分化誘導2日目でも最も結合活性が増大することが判明した。この因子が MGRE の活性に寄与するものと考え GRBF と称することにし、その認識配列を明らかにするためにまずゲルシフトアッセイコンペティタースキニングを行い E-box の 3' 側 15bp にまで絞り込み、さらにこの配列の変異オリゴヌクレオチド断片によるゲルシフトアッセイを行なって検討したところ、CCATTT 配列を認識することが明らかになった。この配列を認識配列とする既知の転写因子はなく、GRBF がこれまでに知られていない新たな核内因子であることが明らかとなった。以上の結果に基づいて MGRE における転写活性化機構のモデルを考えた。まず分化誘導前後いずれにおいても結合する赤血球特異的転写因子 GATA-1 および NF-E2 がグロビン遺伝子の LCR ならびに他の赤血球特異的遺伝子の転写制御領域の場合と同様に、赤血球特異的発現を規定しているものとする。そして、分化誘導前では過剰発現している PU.1 (Spi-1) が結合し負の転写因子として作用しているが、分化誘導にともなってその発現量が減少して結合が消失し転写の抑制が解除されるとともに、本研究で新たに存在が明らかになった核内因子 GRBF が結合し転写のスイッチがオンになるという転写制御モデルである。

審査結果の要旨

未分化な細胞が分化するには様々な遺伝子産物が階層性をもって動員され、最終的には分化形質をコードする特異的遺伝子のスイッチが入力される。本研究では、赤血球分化で特異的に発現する遺伝子の制御機構を明らかにする目的で、赤血球膜特異的蛋白グリコホリン遺伝子の発現制御領域の解析と、これに関与する核内因子を、人為的に分化誘導可能な赤白血病 (MEL) 細胞を用いて同定した。まず、グリコホリン遺伝子の分化特異的発現を制御するエレメントを検索する目的で、この遺伝子の転写開始点を含む 5' 上流域とその欠失変異遺伝子を CAT 遺伝子につなぎ、MEL 細胞に導入しトランジェントアッセイを行なった。その結果、5' 上流 0.9 キロから 1.14 キロの領域を含むと転写が活性化することが分かり、これをこの遺伝子の転写制御領域 (MGRE) と同定した。MGRE の塩基配列には、赤血球で多量に発現するグロビン遺伝子の制御領域である LCR に認められる赤血球特異的転写因子 GATA-1、及び NF-E2 の認識配列が近接して認められ、また幾つかの既知の転写因子の認識配列が認められた。そこで、この領域に結合する核内因子の挙動を、MEL 細胞の分化誘導前後でゲルシフトアッセイと DNaseI フットプリント法により解析した。まず、GATA-1、NF-E2 はともに分化誘導前から結合し、変化が無いことが分った。一方、分化誘導に依存して変化する因子があることが分った。ひとつは癌遺伝子 Ets ファミリーのひとつ PU.1 (Spi-1) 遺伝子産物で、分化誘導とともにその結合活性が減少する。この減少は、結合量、すなわち蛋白量の減少であることがいくつかの実験から判明した。さらに興味深いことに、MyoD や Myc に代表されるヘリックスルーパーヘリックス DNA 結合ドメインをもつ転写因子が認識しうる CACGTG 配列 (E-box) を中心とした領域に核内因子が結合し、その結合強度が変化することである。詳しい解析の結果、この結合の変化は、E-box に結合する因子ではなく、他の因子によることが分った。この因子は CCATTT 配列を認識して結合する因子で、全く新しい因子であり、分化誘導に伴なって増大することが分った。この結果をもとに、この新しい結合因子の遺伝子クローニングを行ない、この候補となる遺伝子のクローニングに成功した。

以上のごとく、根本靖久は、赤血球分化における特異的遺伝子発現に関与する複数の核内因子の実体を明らかにし、一つの遺伝子がこれら複数の因子の協調的な結合の変化によって転写制御をうける機構を明らかにした。

これらの研究成果は細胞生物学、分子生物学研究に大きく貢献するものであり、医学博士の学位に値するものと判断する。