

論文内容要旨

【研究目的】

これまでヘム生合成調節に対する研究は主に肝臓および赤血球を中心に行われてきており、ヘム生合成系の最初の酵素である δ -アミノレブリン酸シンターゼ (ALAS) には赤血球型および非特異型の二つのアイソザイムが存在し、ヘムによって異なる調節を受けていることなどが明らかになってきている。さらに、最近、ハーダー氏腺におけるヘム生合成においては非特異型 ALAS のヘムによる調節が肝臓と異なることが明らかにされた。

従って、今まで見過ごされてきた他の組織におけるヘム生合成調節も検討していくことが重要である。その代表例の一つである心筋や骨格筋などの筋組織ではヘム蛋白の一つであるミオグロビンが合成されることが知られているが、筋組織におけるミオグロビン合成とヘム生合成との相互調節機構はまだよく判っていない。本研究の目的は筋細胞におけるヘム生合成とその調節を検討し、肝臓および赤血球での調節との比較を明らかにすることである。

【研究方法及び結果】

1. 筋分化に伴う赤血球型 ALAS の発現について

まず、筋分化に伴う赤血球型 ALAS の発現について検討した。C2C12細胞を分化誘導すると分化誘導後2日目には筋管細胞が見られることから、分化誘導後0, 1, 2, 3, 4日目のC2C12細胞からRNAを抽出し、ノザンプロット法にて赤血球型 ALASmRNA の発現を調べた。その結果、分化誘導後0, 1, 2, 3, 4日目のC2C12細胞には赤血球型 ALAS の発現は検出できなかった。

2. 筋分化に伴うミオグロビン, 非特異型 ALAS, ヘムオキシゲナーゼ (HO)-1 の発現について

次に、非特異型 ALAS の発現とミオグロビンの発現の関係についてノザンプロット法にて検討した。ミオグロビンmRNA は分化誘導後0日および1日目はほとんどシグナルが認められないが、筋管細胞が見られ始める分化誘導後2日目より急激に増加していた。一方、非特異型 ALASmRNA は分化誘導後ミオグロビン mRNA の増加とほぼ一致して増加していた。この時期に赤血球型 ALAS の発現は認められないことから、ミオグロビン合成のためのヘムの供給は非特異型 ALAS が行っていることが示された。

また、ヘム分解系の酵素である HO-1 は分化誘導後、早期に減少を認めた。

3. 筋分化に伴う δ -アミノレブリン酸デヒドラターゼ (ALAD), ウロポルフィリノーゲンデカ

ルポキシラーゼ (UROD), コプロポルフィリノーゲンオキシダーゼ (CPO), フェロケラターゼ (FeC) の発現について

次いで, ALAS に引き続くヘム生合成系の酵素である ALAD, UROD, CPO, FeC の発現についてノザンプロット法にて検討した。すでに述べたように非特異型ALASは分化誘導後発現の増加を認めたが, ALAD, UROD, CPO, FeC のいずれも分化誘導後発現の増加は認められなかった。従って, 筋分化に伴うヘム生合成は ALAS の段階で調節されていることが示唆された。

4. 筋分化に伴う非特異型 ALAS のヘムによる調節について

非特異型 ALAS のヘムによる調節を検討するため, 分化誘導前の筋芽細胞および分化誘導 3 日目の筋管細胞をヘミンおよびヘム合成の阻害剤であるサクシニルアセトンで処理し, 24 時間後に RNA を抽出してノザンプロット法を行った。筋芽細胞でも分化してミオグロビン合成を行っている筋管細胞でもヘミン処理で非特異型 ALAS mRNA の発現が減少し, サクシニルアセトン処理で発現が増加した。従って, 筋分化においてミオグロビン合成に関与している非特異型 ALAS は肝臓での非特異型 ALAS と同様ヘムによる負のフィードバック調節を受けていることが明らかとなった。

5. 筋分化に伴う HO-1 のヘムによる調節について

次に HO-1 のヘムによる調節を検討した。筋芽細胞でも筋管細胞でもヘミン処理で HO-1 mRNA の発現が増加し, サクシニルアセトン処理で発現が減少した。HO-1 は基質であるヘムによって誘導されることが報告されており, 筋分化においても他の組織と同様なヘム分解系の調節が行われていると考えられる。

6. 筋分化に伴うミオグロビンのヘムによる調節について

さらに, ミオグロビンのヘムによる調節を検討した。筋芽細胞ではコントロール, ヘミン処理, サクシニルアセトン処理のいずれでもミオグロビン mRNA のシグナルは認められなかった。筋管細胞ではヘミン処理でミオグロビン mRNA の発現が増加したが, サクシニルアセトン処理ではほとんど変化が認められなかった。ミオグロビン蛋白はヘミン処理で増加し, サクシニルアセトン処理で減少することが報告されている。従って, ヘミン処理によるミオグロビン蛋白の増加は mRNA 段階で調節されているが, サクシニルアセトン処理によるミオグロビン蛋白の減少は転写段階以降のレベルで調節されている可能性が高い。

審査結果の要旨

ヘムはヘモグロビンを始めとしてシトクローム、カタラーゼ、ペルオキシダーゼなどのヘム蛋白として利用され、酸素輸送、電子伝達、薬物代謝などの重要な役割を担っている。ヘム生合成系の8種類の酸素のうち、最初の反応を触媒する律速酵素である δ -アミノレブリン酸シターゼ (ALAS) には異なった遺伝子にコードされた赤血球型及び非特異型の二つのアイソザイムが存在し、それぞれ異なった調節を受けている。非特異型 ALAS を介するヘム合成は主として肝臓で行われ、ヘムは主にシトクローム P-450 の補欠分子族として利用されている。肝臓での ALAS の合成は最終産物であるヘムにより抑制的に調節されている。このことは薬物代謝酵素であるシトクローム P-450 の必要に応じたヘム合成調節を行っていることを示している。一方、赤血球型 ALAS は生体内のヘム合成の4分の3を占める赤血球系において発現しており、ヘムのほとんどがヘモグロビンの補欠分子族として利用されている。赤血球型 ALAS は赤血球分化に伴い発現が増加するばかりでなく、ヘミン処理によっても発現が誘導される。このような赤血球型 ALAS の調節によって赤血球分化の短期間に合成される大量のヘモグロビンに十分な量のヘムを供給することが可能となる。最近になって、げっ歯類の眼窩内に存在するハーダー氏腺では、非特異型 ALAS が肝臓における非特異型 ALAS と異なってヘミン処理に反応しないことが示され、非特異型 ALAS には組織特異的な発現調節が存在することが明らかとなった。

従って、今まで見過ごされてきた他の組織におけるヘム生合成調節も検討していくことによって、ヘム合成機構が進化の上でどのように変化してきたのかの一端が示されると考えられる。その代表例の一つとして心筋や骨格筋などの筋組織では、ヘム蛋白の一つであるミオグロビンが合成されることが知られているが、筋組織におけるミオグロビン合成とヘム生合成との相互調節機構はまだよく判っていない。本研究では、未だ知られていない筋細胞におけるヘム生合成とその調節を検討した点に独創性がある。また、本研究は、筋分化に伴うミオグロビン合成に関与している ALAS は非特異型のアイソザイムであることを示した興味深いもので、進化の上でよりヘムの要求量が高い（短期間に大量のヘモグロビンを合成する）赤血球系の細胞が赤血球型のアイソザイムを利用するようになったのに対し、筋細胞はミオグロビン合成にヘムによって負のフィードバック調節がかかってしまう（逆に言う必要量だけ合成し、過剰には合成しない）非特異型のアイソザイムを利用していることを明らかにしたことに意義がある。また、臨床的にも心筋や骨格筋の非特異型 ALAS の発現調節の異常がミオグロビン合成の異常を伴う病態と関わっている可能性があり、病態解明に寄与する新しい知見となり得る。よって、本論文は学位論文に値すると判断される。