

氏 名 (本籍) なが い ま ゆ み
永 井 真 由 美

学 位 の 種 類 博 士 (医 学)

学 位 記 番 号 医 第 3011 号

学 位 授 与 年 月 日 平 成 9 年 9 月 10 日

学 位 授 与 の 条 件 学 位 規 則 第 4 条 第 2 項 該 当

最 終 学 歴 昭 和 61 年 3 月 20 日
弘前大学医学部医学科卒業

学 位 論 文 題 目 ラットハーダー腺におけるヘム合成系酵素の発現
調節機序に関する研究

(主 査)

論 文 審 査 委 員 教 授 飯 沼 一 宇 教 授 柴 原 茂 樹

教 授 岡 本 宏

論文内容要旨

【目 的】

ヘム蛋白は生命現象の維持にとって大変重要な役割を果たしている。その構成成分であるヘムは全ての組織で合成されているが、ヘモグロビン産生のために大量のヘム合成を必要とする赤血球系とその他の組織とでは、ヘム合成調節の機構が異なっている。このようなヘム合成の調節機序を理解することは生命現象そのものを理解し、さらにはその異常によってひきおこされるポルフィリン症を始めとする病態を解明する上で大変重要である。本研究では、ヘム合成系の間産物であるポルフィリンの大量蓄積が認められるハーダー腺に注目し、その特徴的なヘム合成調節機序について、赤血球型、非特異型のヘム合成調節機構と比較しつつ検討を行った。

【研究結果および考察】

1) 最初に、ハーダー腺で高発現している δ -アミノレブリン酸シンターゼ (ALAS) が非特異型 (ALAS-N)、赤血球型 (ALAS-E) のいずれであるのかをRNAプロット法、in situハイブリダイゼーション法および免疫プロット法により検討したところ、ALAS-Nの発現のみが認められた。さらに、 δ -アミノレブリン酸デヒドラターゼ (ALAD) についても非特異型のmRNAのみ存在が認められ、ハーダー腺では赤血球型の酵素発現調節はなされていないものと結論された。一方、ALAS-N mRNAは肝臓と比較して15倍以上と大変高く発現していたが、肝臓と異なり、アリルイソプロピルアセトアミドによる発現誘導は認められなかった。2) 次に、ALAS以外のヘム合成系酵素についてRNAプロット法で発現の様子を調べたところ、ハーダー腺でのALAD、ポルフォピリノーゲンデアミナーゼ、ウロポルフィリノーゲンデカルボキシラーゼおよびコプロポルフィリノーゲンオキシダーゼのmRNA発現量は、いずれも肝臓と比較し5倍から20倍高いことが明らかとなった。しかし、ヘム合成系の最終反応を触媒するフェロケラターゼ (FeC) については肝臓に比べ非常に低い発現量しか認められなかった。3) ピリジンヘモクローム測定法によりマイクロソーム画分のヘム濃度を測定したところ、肝臓では1 nmol/mg proteinであったのに対し、ハーダー腺では著しく低く、検出感度以下であった。またハーダー腺のプロトポルフィリンIX濃度は、肝臓と比較し1000倍以上と大変高かった。ハーダー腺におけるこれらの結果は、ヘム合成系各酵素は全体的に高い発現を示すが、FeCの発現のみは例外的に低いという特徴的な発現調節がその一因であると理解される。4) ハーダー腺におけるヘム濃度の低下に対するヘム分解系の関与について検討するため、ヘムオキシゲナーゼ-1 (HO-1) の発現について調べた。その結果、HO-1 mRNAの発現は肝臓より10倍以上高いことが明らかと

なった。HO-1は基質であるヘムにより強く発現が誘導されることが知られているが、ハーダー腺ではヘム濃度が極めて低いことから、他の原因によりHO-1発現量の増加が起こっているものと思われる。この結果としてヘムの分解が促進され、さらにハーダー腺におけるヘムの欠乏を増強しているものと推察された。5) 既知の非特異型ヘム合成調節では、律速酵素であるALAS-Nは最終産物であるヘムによりその発現が抑制される。もし、ハーダー腺においても同様の調節が働き得るものとするれば、ALAS-Nの高度な発現はヘム欠乏による脱抑制の結果であると理解される。そこで、ハーダー腺の器官培養を行い、ヘミン添加のALAS-N発現への影響について検討した。その結果、ヘミン添加によりHO-1 mRNAの発現は著しく誘導されたが、ALAS-N mRNAの発現は全く影響を受けなかった。この結果は、ハーダー腺ではヘムによるALAS-N遺伝子への抑制的な発現調節が、HO-1の発現誘導がみられる条件下でも存在していない可能性を示している。従って、ハーダー腺におけるALAS-Nの高度な発現は、ヘム欠乏による脱抑制の結果ではないものと示唆された。

以上の結果より、ハーダー腺におけるヘム合成系には、従来知られている非特異型や赤血球型のいずれとも異なる、全く新しい調節機序の存在が示唆された。この調節機序では、調べた範囲ではFeCを除く全てのヘム合成系酵素の高度な発現という特徴をもつことから、これらの酵素遺伝子の発現を共通に強く誘導し得るような転写調節機構の存在についても検討する必要がある。

審査結果の要旨

ヘム合成系酵素の異常により、種々のポルフィリン症が引き起こされる。ハーダー腺は多くの陸棲脊椎動物の眼窩内に存在する腺組織であり、通常げっ歯類では際立った発達を示している。またハーダー腺では高濃度のプロトポルフィリンが蓄積し、高い δ -アミノレブリン酸シンターゼ (ALAS) 活性を示すことが知られている。ハーダー腺はヘム合成調節機構に重要な役割を有している器官と考えられる。そこでハーダー腺におけるヘム合成系諸酵素および分解酵素であるヘムオキシゲナーゼ (HO-1) の発現について検討した。

この結果、ハーダー腺では非特異型 δ -アミノレブリン酸シンターゼ (ALAS-N) mRNA の発現が増加していたが、赤血球 δ -アミノレブリン酸シンターゼ (ALAS-E) mRNA の発現は認められなかった。 δ -アミノレブリン酸デヒドロターゼ、ポルフォビリノーゲンデアミナーゼ、ウロポルフィリノーゲンデカルボキシラーゼおよびコプロポルフィリノーゲンオキシダーゼの mRNA についても ALAS と同様、肝に比べて発現量の増加が認められたが、フェロケラターゼ (FeC) mRNA の発現は例外的に非常に減少していた。肝で高度の ALAS-N の誘導を生ずる 2-allyl-2-isopropylacetamide 投与により、ハーダー腺では ALAS-N の誘導は認められなかった。またヘム代謝系の律速酵素である HO-1 mRNA の発現量は肝と比較して著明に増加していた。ハーダー腺中には大量のプロトポルフィリンの蓄積がみられたが、その一方でヘム量は極めて少なく、検出することができなかった。この事実は以上観察されたヘム合成系および分解系酵素の発現の様子とよく一致しており、これら酵素遺伝子の特徴的活性化の結果によるものと考えられた。さらにハーダー腺の器官培養法を用いて ALAS-N および HO-1 に対するヘミン添加の影響を調べたところ、HO-1 の mRNA の発現がヘミンにより肝と同様著明に誘導されたのに対し、肝でみられるようなヘミンによる ALAS-N mRNA の発現抑制は観察されなかった。これらの結果から、ハーダー腺におけるヘム合成系は、非特異型 (肝型) および赤血球型として知られている機構とは全く異っており、ALAS-N mRNA の発現はヘムにより誘導も抑制もされず、また FeC を除くほとんど全ての酵素の mRNA の発現が恒常的に増加しているような新しい機構による発現調節を受けている可能性が考えられた。

このようにハーダー腺において全く新しいヘム合成調節機構を見出した優れた研究であり、医学博士の学位に値すると考える。