

氏 名（本籍）	たか 高	はし 橋	しん いち ろう 伸 一 郎
学位の種類	博 士（医 学）		
学位記番号	医 博 第 1 6 0 0 号		
学位授与年月日	平 成 1 2 年 3 月 2 3 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系研究科 （博士課程）内科学系専攻		
学位論文題目	コポロポリフィリノーゲンオキシダーゼ遺伝子に おける発現調節機構の解析		

（主 査）

論文審査委員 教授 伊 藤 貞 嘉 教授 柴 原 茂 樹

教授 岡 本 宏

論文内容要旨

研究目的

赤血球系のヘム生合成系各酵素には、赤血球分化に伴う特異的な発現調節が働いていると推察されている。しかし、全8種類の酵素のうち、3種類のみしかその組織特異的な発現調節機構は解明されていない。そこで本研究では、未だ詳細な解析が行われていないコプロポルフィリノーゲンオキシダーゼ (CPO) 遺伝子の組織特異的な発現調節機構を明らかにすることを目的とした。すなわち、赤血球系細胞、非赤血球系細胞双方を用いてプロモーター機能の比較を行うことにより、組織特異的な転写調節機構の一端を解明する。さらに、その調節機構に関与する因子を明らかにしていくことを目指した。

研究結果

CPO 遺伝子の発現調節機構を解析するため、まずマウス CPO 遺伝子全長の構造を決定した。その結果、マウス CPO 遺伝子はヒト CPO 遺伝子と類似した構造を持ち、単一のプロモーターにより制御されていることが示唆された。次に、プロモーター活性の検討を、非赤血球系の細胞として NIH3T3 (マウス線維芽) 細胞、赤血球系細胞として MEL (マウス赤白血病) 細胞を用いて解析を行った。NIH3T3 細胞においては、転写開始点より -49 から -41bp までの領域 (GGACTACAG ; CPRE [CPO promoter regulatory element]) が本遺伝子発現の正の制御領域として重要な役割を果たし、-21bpSp1 類似配列も本遺伝子発現に貢献していることが明らかになった。

一方、MEL 細胞においては、-21bpSp1 類似配列が鍵となる役割を持ち、-59bpGATA 配列及び CPRE がそれぞれ協調的に遺伝子発現を調節していることが示唆された。また、DMSO 誘導下 MEL 細胞を用いた解析より、-59bpGATA 配列が赤血球分化に最も重要であることが示された。

そこで、ゲル移動度解析法を行ったところ、上記のいずれの細胞においても CPRE における特異的な DNA 蛋白質複合体の形成が認められた。-59bpGATA 配列には、MEL 細胞において GATA-1 が結合することが示された。また、-21bpSp1 類似配列については、Sp1 以外の因子との複合体の形成が認められたが、それぞれの細胞において移動度が相違しており、互いに異なる因子が結合している可能性が示唆された。以上より、CPO 遺伝子の発現が赤血球系、非赤血球系において異なった機構で調節されていることが示された。

遺伝子データベース検索の結果、CPRE は、マウス、ヒト CPO 遺伝子のみならず、それ以外

のヘム合成系酵素遺伝子や β グロビン遺伝子などの遺伝子調節領域上に存在することが明らかになった。CPRE 結合因子を明らかにするため、まず、CPRE テトラマープローブを用いてサウスウエスタンブロット法を行った。その結果、H4IIE (ラット肝癌)、Cos7 (サル腎癌)、そして K562 (ヒト赤白血病) 細胞で約 30kDa の位置に特異的なバンドが認められた。K562 細胞を用いたゲル移動度解析法において、CPRE に対する比較的高い結合活性が認められたため、CPRE テトラマープローブと K562 細胞由来 λ gt11cDNA ライブラリーを用いてサウスウエスタンスクリーニングを行った。その結果、新規因子 KTAFF (K562 cells derived trans-activating factor) を単離した。KTAFF は全長 206 アミノ酸からなる蛋白質で、構造上の特徴として N 末端側に酸性アミノ酸領域、N 末端側から 120~170 アミノ酸の領域に核移行シグナルを含む塩基性アミノ酸領域を有することが分かった。二次構造予測より、塩基性アミノ酸領域の N 末端側はコイルドコイル構造をとる可能性が示された。また、KTAFF の発現をノザンブロット法により検討したところ、細胞株では K562 細胞及び HeLa 細胞、組織では脳で高く認められ、KTAFF は組織によって異なるが、比較的恒常的に発現している因子である可能性が考えられた。KTAFF-6 \times His 融合蛋白質と抗 His 抗体を用いたウエスタンブロット法の結果、KTAFF はサウスウエスタンブロット法で認められた CPRE 結合蛋白質と同様、約 30kDa の蛋白質であることが示された。さらに、KTAFF は、CPRE テトラマープローブを用いたゲル移動度解析法で、CPRE への特異的な結合を認め、一過性導入細胞を用いた解析から、培養細胞中で転写活性化能を持つことが示された。

研究の意義・独創的な点

本研究の成果は、新規シス-エレメント CPRE の発見やシス-エレメント間の組織特異的な共同作用の解明、ひいては CPRE への特異的な結合が認められる新規転写活性化因子の発見などである。これらは CPO 遺伝子の組織特異的発現調節機構の解明に著しく貢献するものであり、また、単一プロモーター遺伝子一般における組織特異的発現調節機構を理解する上でも意義深いと考えられる。

審査結果の要旨

ヘム合成については、赤血球系細胞と非赤血球系細胞とで著しく異なる様式の調節が行われている。赤血球系においては、細胞の赤血球への分化に伴い、ヘム合成系各酵素の発現が増加し、ヘモグロビン合成量に見合ったヘムの供給を行うようになる。この際の各酵素の発現は、MEL細胞の赤血球分化において見られるように、初発反応を触媒する赤血球型 δ アミノレプリン酸合成酵素から始まり、各段階の酵素が順次次第に増加すると考えられている。一方、非赤血球系細胞では、非特異型 δ アミノレプリン酸合成酵素（ALAS-N）を介した調節が働いており、細胞のヘム需要に対応してALAS-Nレベルが変動するが、その他のヘム合成系諸酵素の発現量に変化は認められない。このようなヘム合成系酵素における組織特異的発現調節機構は、全8種類の酵素のうち、3種類の酵素のみしか解明されていない。コプロポルフィリノーゲンオキシダーゼ（CPO）はヘム合成系の6番目の酵素であり、コプロポルフィリノーゲンⅢのピロール環AとBの各プロピオン酸基からカルボキシル基と2個の水素を奪い、ビニル基をつくる反応を触媒する。CPOの発現は赤血球分化の際に、例えばDMSO誘導下のMEL細胞においては、ヘモグロビンの合成増加に対応して著明に増加することが示されているが、赤血球以外の組織では、多量のヘムが必要な場合でも、その発現にはほとんど変化が認められない。従って、CPOの発現においても赤血球系と非赤血球系とで異なる機序で調節されていることが推察される。しかし、その組織特異的発現調節機構は依然として明らかになっていない。近年、マウス及びヒトCPOcDNAとヒトCPO遺伝子が単離された。その結果、CPOmRNAは赤血球系及び非赤血球系細胞において同一のプロモーターから翻訳されるということなどが明らかにされている。このことは単一プロモーターがCPO遺伝子の組織特異的発現を調節しているということを示しており、その調節機構の解明は非常に興味深いと考えられる。

そこで、本研究は、CPO遺伝子プロモーターの組織特異的転写調節機構を解析し、それに関与する因子を明らかにしていくことで、単一のプロモーター遺伝子における、組織特異的な発現調節機構についての理解を深めることを目指した。本研究の成果は、マウスCPO遺伝子の単離、またその制御領域における新規シス-エレメントCPREの発見やシス-エレメント間の組織特異的な共同作用の解明、ひいてはCPREへの特異的な結合が認められる新規転写活性化因子の単離、機能解析などである。これらはCPO遺伝子の組織特異的発現調節機構の解明に著しく貢献するものであり、また、単一プロモーター遺伝子一般における組織特異的発現調節機構を理解する上でも意義深いと考えられる。よって、学位に十分値するものと思われる。