

氏 名（本籍）	孫 <sup>ソン</sup> 繼 <sup>ケイ</sup> 英 <sup>エイ</sup>
学位の種類	博 士（医 学）
学位記番号	医 博 第 1 8 3 2 号
学位授与年月日	平 成 1 4 年 3 月 2 5 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）医科学専攻
学位論文題目	Bach1によるheme oxygenase-1発現の制御機構 およびBach1遺伝子構造の解析

（主 査）

論文審査委員	教授 柴 原 茂 樹	教授 帯 刀 益 夫
	教授 野 田 哲 生	

## 論文内容要旨

造血系転写因子 NF-E2 p45 は、癌関連転写因子 Maf ファミリーに属する MafF, MafG 及び MafK とヘテロダイマーを形成し、Maf recognition element (MARE) に結合する。Bach 1 及び Bach 2 は p45 関連因子であり、転写抑制因子として働く。Bach 1 の特徴として、同因子はヘムを結合する CP (Cys-Pro) モチーフを有し、ヘムとの結合によりその DNA 結合が阻害されることがあげられる。このことから、Bach 1 はヘム応答性の遺伝子発現制御に関わることが予想される。本研究ではこの可能性を検討するとともに、*bach 1* 遺伝子自体の発現制御機構の解明を試みた。ヘムで誘導される代表的な遺伝子の一つが、ヘム分解の律速酵素 heme oxygenase-1 (HO-1) 遺伝子である。HO-1 の発現は、ヘム濃度上昇や、紫外線、高温、重金属など酸化ストレスの原因となる条件で誘導される。この誘導的発現を指令するエンハンサーには MARE に類似した配列が多数存在する。ゲルシフトおよびフットプリンティング法を用いて Bach 1 と *ho-1* エンハンサー領域の結合を検討したところ、少なくとも 5 カ所の MARE と結合した。この結合はヘムの添加によって著明に抑制された。また、遺伝子導入リポーターアッセイにおいて、Bach 1 は *ho-1* 遺伝子上流 15 kb を含むリポータープラスミドの発現を効率よく抑制した。この抑制は培地にヘミンを添加することにより失われた。CP モチーフに変異を有しヘムに対する結合能が低下した変異型 Bach 1 は、ゲルシフトやトランスフェクションの実験系においてヘムに対する感受性を示さず、ヘム存在下でも MARE に結合し、*ho-1* エンハンサーを抑制した。したがって、Bach 1 は *ho-1* の抑制因子であること、そしてヘム濃度の上昇に応答してこの抑制が解除されることが予想された。この可能性を個体レベルで検証するために、*bach1* ノックアウトマウスを用いて HO-1 の発現を比較した。*bach1*<sup>-/-</sup> マウスでは、様々な組織において蛋白質および RNA いずれのレベルでも HO-1 の著明な高発現が認められた。さらに、Bach 1 欠損マウス由来胸腺細胞では、*ho-1* 遺伝子座の DNase I に対する感受性が亢進しており、Bach 1 はクロマチン構造を凝集させることにより *ho-1* の発現を抑制するものと考えられた。以上の結果から、ヘムは Bach 1 に結合し、その DNA 結合活性を阻害することにより *ho-1* の発現を誘導するというモデルが考えられる。

ヘムは細胞の生存に必須の補欠分子であり、その代謝過程は厳密に制御されている。したがって、Bach 1 とヘムによる遺伝子発現の制御機構も様々な細胞系列で機能しているものと予想される。すなわち、*bach 1* 遺伝子自体の制御機構、すなわち制御機構の上位制御を理解することも極めて意義があると考えられる。そこで、マウス *bach 1* 遺伝子の構造とプロモーターの解析を試みた。*bach 1* は 5 つのエクソンと 4 つのイントロンで構成される。トランスフェクションアッ

セイから、そのプロモーターの基本活性は主に GC-box により指令されることが明らかになった。K562細胞の抽出液を用いたゲルシフト解析によりこの GC-box に対して Sp1が結合することが確認された。ヒトおよびマウスの *bach1*プロモーター領域を比較したところ、転写開始点の下流に良く保存されている MARE に類似した配列が見いだされた。この配列を欠失するリポーターは K562細胞でのプロモーター活性が増加したことから、この MARE 様配列は抑制的に作用すると考えられた。トランスフェクションアッセイにおいて Bach1はこの MARE 様配列を介して自身のプロモーターを活性化した。ゲルシフトアッセイではこの配列と Bach1との結合は検出されなかったが、K562細胞抽出液にはこの配列に特異的に結合する因子が存在した。したがって、Bach1はこの配列に結合するリプレッサーを負に制御することにより、間接的に自身のプロモーターを活性化することが示唆された。すなわち、*bach1*の発現は主に Sp1により活性化されるとともに、Bach1による間接的なポジティブフィードバックにより自身の発現が維持されるものと考えられる。このような機構により Bach1のレベルが保たれることにより、*ho-1*などの MARE 配列を持つ標的遺伝子を安定に抑制すると考えられる。

## 審査結果の要旨

Bach1はヘム結合性の転写因子であり、Maf recognition element (MARE) に結合することによって転写抑制因子として働く。Bach1のDNA結合活性はヘムの結合によって阻害されるため、Bach1はヘム応答性の遺伝子発現制御に関わることが予想された。そこで、申請者はこの可能性を個体レベルで証明するとともに、Bach1遺伝子自身の発現制御機構を明らかにした。

ヘム分解系の律速酵素である heme oxygenase-1 (HO-1) の発現は、基質であるヘム、紫外線、重金属など酸化ストレスの原因となる諸条件で誘導される。この誘導的発現に関与するエンハンサーには MARE に類似した配列が多数存在する。Bach1が ho-1 エンハンサー領域の少なくとも5カ所の MARE に結合すること、この結合はヘムの添加によって抑制されることを試験管内の結合解析により明らかにした。また、遺伝子導入実験において、Bach1は MARE を持つ ho-1 遺伝子リポータープラスミドの発現を効率よく抑制した。この抑制は培地にヘミンを添加することにより失われた。さらに、この現象を個体レベルで検証するために、Bach1ノックアウトマウスを用いて HO-1 の発現を比較した。Bach1<sup>-/-</sup> マウスでは、種々組織において HO-1 蛋白質および mRNA の高発現が認められた。Bach1欠損マウス由来胸腺細胞では、ho-1 遺伝子の DNase I に対する感受性が亢進しており、Bach1はクロマチン構造を凝集させることにより ho-1 の発現を抑制すると考えられた。したがって、Bach1は ho-1 の転写抑制因子であることが証明できた。

次いで、マウス Bach1 遺伝子プロモーターの基本活性が転写因子 Sp1 により指令されること、Bach1 遺伝子の転写開始点の下流に存在する MARE 類似配列が、Bach1 遺伝子の転写を抑制することを明らかにした。さらに、この MARE 類似配列に結合するのは Bach1 自身ではなく、未知の結合因子であることを明らかにした。一方、Bach1はこの MARE 類似配列を介して自身のプロモーターを活性化した。したがって、Bach1は MARE 類似配列に結合するリプレッサーを負に制御することにより、間接的に自身のプロモーターを活性化するという巧妙な制御機構の一端が明らかになった。

以上のように、申請者の研究は学術的に極めて重要であり、学位に値する。