

氏 名（本籍）	ふじ 藤	はら 原	とおる 亨
学位の種類	博 士（医 学）		
学位記番号	医 博 第 2 2 8 1 号		
学位授与年月日	平 成 1 8 年 3 月 2 4 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	ヘム欠損赤芽球にて発現低下を認める赤血球特異的遺伝子の同定		

（主 査）

論文審査委員	教授 佐々木	毅	教授 柴 原 茂 樹
	教授 帯 刀 益 夫		

# 論文内容要旨

## 目 的

赤血球造血に関わる分化制御機構の詳細は未だ明らかとされていない。本研究においてはヘムがこの制御機構の中心を担っていると考え、ヘム制御下にある赤血球特異的遺伝子群の同定を試みた。

## 方 法

cDNA アレイにおいて対象となった 8737 の遺伝子から、野生型赤芽球においてヘム欠損赤芽球に比べ 3 倍以上の強い発現を示す遺伝子を抽出し、この中から、赤血球造血においてこれまで未知の 40 遺伝子を解析対象とした。この 40 遺伝子のうち、1) 定量 PCR 法にてマウスの骨髄細胞において赤芽球系列特異的に発現を示すもの、2) Northern blot 法及び定量 PCR 法により造血組織に強い発現を示すもの、3) 細胞内ヘムにより発現誘導されるもの、以上の全ての条件を満たす遺伝子を最終的な候補遺伝子とした。

## 結 果

40 遺伝子のうち、11 遺伝子が赤血球系列特異性を示し、この中の 4 遺伝子が造血組織に強い発現を示し、かつ細胞内ヘム量に発現誘導されたため、最終的な候補遺伝子とした。4 遺伝子は、既に報告のある UCP 2 (uncoupling protein 2), NuSAP (nucleolar spindle associated protein), CNBP (cellular nucleic acid binding protein) と、未知の 1 遺伝子であった。未知の遺伝子は、110 アミノ酸からなる GNAT (GCN 5-related N-acetyltransferase) superfamily protein で、in vitro acetyltransferase assay の結果より、新規のヒストンアセチルトランスフェラーゼであることが明らかとなり、HE-AT1 (Heme-regulated Erythroid-specific Acetyl Transferase 1) と名づけた。転写抑制因子 Bach 1 はヘムによりその機能が制御されていることが知られているが、Bach 1 ノックアウトマウスを用いてこれら 4 遺伝子の発現量を検討したところ、CNBP は Bach 1 欠損赤芽球にて野生型赤芽球に比べ有意に発現が高く ( $P < 0.05$ )、同因子を介し発現が制御されている可能性が示唆された。

次に、これら 4 遺伝子のうち、特に造血組織のみに発現が認められた NuSAP 遺伝子について、赤血球造血における機能を検討した。NuSAP 遺伝子をマウス赤白血病細胞株 (MEL) に一過性に強制発現させ細胞周期を検討した結果、対照と比べ G 2/M 期の割合が著明に増加し、同遺伝子は赤芽球系前駆細胞の増殖促進に関与する可能性が示唆された。さらに本遺伝子のヘムを介した発現制御機構を明らかにするため、MEL 細胞を用いてプロモーター解析を行った結果、

-30/-34における CCAAT がプロモーター活性において重要であり，NF-Y が同領域を介して本遺伝子の発現を調節している可能性が示唆された。

## 結 語

以上の結果より，ヘムは赤血球造血において多岐にわたる遺伝子群の発現を制御しており，今回同定された候補遺伝子の解析が赤芽球分化制御機構の解明に寄与すると考えられた。

## 審査結果の要旨

赤血球は他の血液細胞と同様に造血幹細胞を起源とし、BFU-E, CFU-Eといった前駆細胞を経た後、成熟赤血球へと分化する。前赤芽球の段階から成熟赤血球に至る時間はおよそ3日間とされており、この極めて短い時間に細胞毒性の強い大量の鉄を取り込み、ヘモグロビンへと有効利用し、さらに核や細胞内小器官などを排除した細胞へと特化するために、これらに関わる遺伝子群の緻密でかつ協調的な発現制御が赤芽球内で行われていると考えられるが、その詳細は明らかとなっていない。赤血球分化のゴールは酸素運搬に特化したヘモグロビン含有細胞であるため、赤血球の最終形質はヘモグロビン合成に同調して発現するはずである。そこで、本研究では、ヘムそのものが赤血球分化において特異的遺伝子の発現を統御している分子であるとの仮説のもとに、野生型赤芽球およびヘム欠損赤芽球の遺伝子発現プロファイルを比較し、ヘム制御下にある赤血球関連遺伝子群の同定を試みた。方法としてマウス ES 細胞の *in vitro* 分化系を用い、野生型赤芽球およびヘム欠損赤芽球を作製し、その発現プロファイルを比較し一次スクリーニングを行った後に、*in vivo* のマウス血液細胞、組織を用い新たな赤血球特異的な4遺伝子を同定した。この4遺伝子は細胞内ヘム量に相関した発現を示したことから、ヘム制御下にある遺伝子であることも示唆された。具体的にこれら4遺伝子は、レドックス制御に関わる UCP2、新規の微小管結合蛋白質で細胞周期の制御に関わる NuSAP、DNA 結合蛋白質である CNBP、新規のヒストンアセチルトランスフェラーゼ HE-AT1であることが明らかとなった。このうち特に骨髄に限り発現が認められる Nusap 遺伝子については、赤血球造血が刺激された瀉血マウス赤芽球でコントロールに比べ高い発現が認められ、さらに赤白血病細胞株への強制発現で G2/M 期の細胞集団を増加させるなど、実際に赤血球増殖に機能している実験結果も示された。これらの結果は、ヘムが赤血球造血において幅広く遺伝子発現を制御している可能性を示しており、本研究は赤血球分化の新しい制御機構を提示するものとして学位論文に値するものとする。