

Title	巨核球特異的に発現する血小板第4因子遺伝子の転写制御機構に関する研究
Author(s)	南, 敬
Citation	大阪大学, 1998, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/40533
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉 大阪大学の博士論文について 〈/a〉 をご参照ください。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

氏名	みなみ 南	たかし 敬
博士の専攻分野の名称	博 士 (薬 学)	
学位記番号	第 13805 号	
学位授与年月日	平成10年3月25日	
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 薬学研究科薬品化学専攻	
学位論文名	巨核球特異的に発現する血小板第4因子遺伝子の転写制御機構に関する研究	
論文審査委員	(主査) 教授 今西 武	
	(副査) 教授 前田 正知 教授 小林 祐次 教授 西原 力	

論 文 内 容 の 要 旨

造血幹細胞は、1個の細胞から赤血球、白血球、巨核球、Tリンパ球、Bリンパ球などの機能を持つ成熟血液細胞を産生する多分化能を有すると同時に、自身と同じ性質を有する娘細胞を生み出す自己複製能も合わせ持つ細胞である。そして造血幹細胞から各血液細胞への分化、成熟の過程において、多くのサイトカインが関与することが明らかとなった。中でも、近年単離されたトロンボポエチンは巨核球、血小板への分化、成熟を促すサイトカインとしてその臨床応用が待ち望まれている。

しかし、この巨核球、血小板が他の系列に比べ非常に複雑な分化形態をたどるしくみに関しては未だ分子レベルにおいて明らかにされていない。この問題を解くための1つのアプローチとしては、成熟細胞において特異的に発現している遺伝子の発現制御機構を明らかにすることが挙げられる。筆者はこの点を明らかにするため、巨核球系細胞でのみ特異的に発現している遺伝子、血小板第4因子(PF4)に着目した。このPF4の転写調節を担う転写因子を明らかにすることにより、巨核球への分化成熟機構を明らかにする手がかりが得られることが予想される。

これまでに筆者らのグループにより、ラットPF4遺伝子の同定及びそのプロモーター領域の解析が進められている。そこで筆者は、PF4遺伝子がどのようにして発現制御を受けるのかについて、PF4の発現を正に制御するプロモーター領域及び負に制御するプロモーター領域に焦点を当て詳細な解析を行った。

まず筆者は、PF4転写発現を正に制御するプロモーター領域に2つのEtsモチーフ(5'(G/C)(A/C)GGAAGT³), (-75Ets, -380Ets)並びに2つのGATAモチーフ(5'(A/T)GATA(A/G)³), (-30GATA, -130GATA)が存在する点に着目した。そして、2つのGATAモチーフとその間に位置する-75Etsモチーフに個々に欠失あるいは点変異を加えたPF4プロモーターにおいてはその活性が大きく減少すること、さらに、これら3つのモチーフのうち2つ以上を同時に変異を加えるとほとんどプロモーター活性が失われることを明らかにした。すなわち、これら各モチーフはPF4プロモーター活性に必要な不可欠であることが判明した。又Etsモチーフ及びGATAモチーフを含むDNA配列をプローブとし、巨核球系細胞(HEL細胞, MEG-01細胞)より調製した核抽出液を試料としたゲルシフト解析を行ったところ、これらのDNAプローブに特異的に結合するタンパク質因子が存在すること、かつ抗体を用いた実験を通じて、2つのEtsモチーフ及び2つのGATAモチーフには、それぞれ組織特異的な発現様式を示す転写因子Ets-1及びGATA-1が結合することを明らかにした。さらにこれらの転写因子を巨核球系細胞に過剰発現することによりPF4プロモーター活性が大きく上昇することから、これらが転写活性化因子とし

て PF4 の発現制御に関与していることが判明した。又、巨核球系細胞である HEL 細胞は DMSO を添加することにより、より成熟巨核球へと分化することがこれまでに知られているが、筆者は HEL 細胞と DMSO 分化刺激を加えた HEL 細胞より RNA を抽出し、ノーザンブロット解析を行ったところ、DMSO 処理前後で GATA-1 の発現量はほとんど変化が認められないのに対し、Ets-1 の発現量は約10倍増加し、PF4 の発現量が約20倍増加する結果が得られた。

他方、転写発現を負に制御するプロモーター領域には T クラスターが存在している。筆者はサウスウェスタン法により、本エレメントに結合するタンパク質因子の cDNA クローニングを行ったところ、RNP ドメインを有する新規なタンパク質 TCBP を同定することができた。そして、大腸菌を用いた組み替え型 TCBP を作製し、このタンパク質と T クラスターエレメントを含む DNA プローブを用いたゲルシフト解析を行ったところ、TCBP は PF4 プロモーター上の T クラスター領域及びその下流域に位置する T-rich な領域を認識して結合することが判明した。さらに HEL 細胞に TCBP を過剰発現することにより、PF4 プロモーター活性が約4割減少する結果が得られ、転写抑制因子として PF4 の発現制御に関与することが明らかとなった。又、TCBP の遺伝子配列をもとにホモロジー検索を行ったところ、TCBP はアポトーシス関連因子 nucleolysin と非常に高い相同性を有していた。そこでこれら両因子の産生機構を検討するため、ゲノムサザンブロット解析並びに YAC DNA を用いたスクリーニング実験を行ったところ、これら両因子が10番染色体上の同一遺伝子から、各々 alternative splicing により産生されることを強く示唆する結果が得られた。さらに筆者は、各細胞由来の RNA を試料とした RNase プロテクションアッセイを行ったところ、TCBP は血液細胞をはじめとするほとんど全ての細胞に普遍的に存在するが、DMSO により分化誘導を受けた HEL 細胞においては、TCBP の発現量が約半分に減少し、PF4 の発現量が大きく増加することが判明した。

以上の知見から、HEL 細胞、MEG-01細胞などの巨核球系細胞においては、組織特異的な発現様式を示す転写活性化因子 Ets-1 並びに GATA-1 が PF4 プロモーター上に結合することにより PF4 の発現が誘起され、さらに DMSO 等の分化刺激が加わった場合には、普遍的な発現様式を示す転写抑制因子である TCBP の発現量が減少し、Ets-1 の発現誘導が生じ、PF4 のさらなる転写活性化が生じるという一連の構図を明らかにすることができた。

論文審査の結果の要旨

種々の成熟血液細胞は、造血幹細胞がそれぞれの方向に分化することにより生成される。造血幹細胞から巨核球、血小板への分化の分子機構は、非常に複雑であり未だ明らかにされていない。

南君は、この分子機構を明らかにする手がかりを得るために、巨核球でのみ特異的に発現されている血小板第4因子 (PF4) 遺伝子の転写調節機構の解明を、分子生物学的手法を用いて試みた。その結果、巨核球における PF4 遺伝子の発現促進には、プロモーター領域内の Ets 結合配列、及び GATA 結合配列が重要であること、さらにこれらの配列に実際に Ets-1 及び GATA-1 が結合することを明らかにした。また、以前より発現抑制に関与することが知られていた T クラスター配列に結合する因子の cDNA のクローニングを行い、nucleolysin のアイソフォームがこれに結合し、発現を抑制していることを明らかにした。

以上の研究成果は、巨核球への分化の分子機構解明に大きく貢献することが考えられることより、博士(薬学)の学位論文として価値あるものと認める。