

Title	cDNA Cloning and Expression of Rat Homeobox Gene, Hex and Functional Characterization of the Protein
Author(s)	田中, 高志
Citation	大阪大学, 1999, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/41632">https://hdl.handle.net/11094/41632</a>
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">〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉</a> 大阪大学の博士論文について <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">〈/a〉</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	たなか 高 志
博士の専攻分野の名称	博 士 (医 学)
学位記番号	第 1 4 4 4 5 号
学位授与年月日	平成11年3月25日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 医学系研究科生理系専攻
学位論文名	cDNA Cloning and Expression of Rat Homeobox Gene, Hex and Functional Characterization of the Protein. (ラットホメオボックス遺伝子 <i>Hex</i> の cDNA クローニングと発現, および <i>Hex</i> タンパク質の機能解析)
論文審査委員	(主査) 教授 谷口 直之  (副査) 教授 高井 義美 教授 中村 敏一

### 論 文 内 容 の 要 旨

#### 【目的】

ピルビン酸キナーゼL遺伝子の転写調節領域L-IIIに依存して転写を促進する核タンパク質を同定するために yeast one-hybrid system を用いたスクリーニングを行った。その結果、ホメオボックスの一つである Hex (Haematopoietically expressed homeobox) の cDNA クローンが単離された。Hex は271残基のアミノ酸より構成されており、ホメオドメインとそのN末端側にプロリンリッチな領域を持っている。Hex は多能性造血前駆細胞において分化とともにその発現は低下すること、また、肝臓、脾臓および肺などで発現していることが報告されているが、その役割は明らかでない。また、Hex がどのように転写調節に関与するのかわからないままである。そこで、本研究では肝臓における Hex の役割を知る手がかりを得るために種々の条件下（高炭水化物食、再生肝）の肝臓、15日および20日目胎児の肝臓、肝癌細胞株（HepG 2, MH1C1, dRLh-84）での Hex 遺伝子の発現およびマウス胚性癌細胞株である F9 細胞を分化誘導したときの Hex 遺伝子の発現を調べた。さらに Hex がどのように転写を制御するのかを解析し、その機能領域や、DNA 結合ドメインの同定を行った。

#### 【方法ならびに成績】

L-III領域に結合する核タンパク質の cDNA クローンを単離するために5コピーのL-III領域のオリゴヌクレオチドを pRS315HIS に挿入したプラスミド (pHISL-III) をレポーターとして yeast one-hybrid system でラット肝 cDNA ライブラリーのスクリーニングを行った。その結果、2個の独立したクローン y9-10と y9-18が得られた。これらのクローンのインサートを Sal I / Not I で切断し、得られた cDNA 断片を pSPORT 1 の Sal I / Not I 部位にサブクローニングして p9-10と p9-18を得た。これらの DNA 配列を決定したところ、3' non-coding region の長さに違いがあるもののどちらも同じ配列を有しており、271残基のアミノ酸をコードしていた。ホモロジー検索の結果、翻訳配列はヒト、マウス、ニワトリで報告されている Hex と極めて類似しておりラット Hex であると考えられた。しかし、electrophoretic mobility shift assay やレポータージーンアッセイにより Hex は L-III に結合する転写因子ではないことが判明した。

種々の条件下における肝臓での Hex 遺伝子の発現を調べるために total RNA を採取し、Hex cDNA の Sac II / EcoR I 断片 (700bp) をプローブとして Northern blot analysis を行った。絶食時および絶食後高炭水化物食を6

時間, 16時間与えたラットの肝臓での Hex mRNA は 2 kb と 1.4 kb の二本のバンドとして検出され, その量は 6 時間の摂食後に絶食時の約 1.7 倍とわずかな増加が見られた。再生肝においては, 70% の肝臓を切除した後, 8 時間後, 1, 2, 4 日後に total RNA を採取し, Hex mRNA を測定した。その結果, Hex mRNA は 8 時間目から 4 日目の再生肝にかけて 1.6 倍とわずかに増加した。肝細胞および分化度の異なる肝癌細胞株 (MH<sub>1</sub>C<sub>1</sub>, HepG 2, dRLh-84) における Hex mRNA 量を検討したところ肝細胞において最も高く, 次いで分化型肝癌細胞である MH<sub>1</sub>C<sub>1</sub>, HepG 2 の順であり, 未分化型の dRLh-84 では Hex 遺伝子の発現は認められなかった。また, 発生段階の Hex 遺伝子の発現を調べたところ, 15 日目および 20 日目のラット胎児肝において Hex mRNA は検出されたが, その量は成体の肝臓に比べると低かった。細胞の分化における Hex mRNA の変動を調べるために, 肝細胞の分化の一つのモデルとしてマウス胚性癌細胞の F 9 細胞を浮遊培養し, レチノイン酸 ( $7.5 \times 10^{-8}$  M) 処理により内臓内胚葉へと分化誘導し, 1, 2, 4, 6 日目に total RNA を採取した。Hex mRNA は未処理の F 9 細胞においてもわずかに検出され, その量はレチノイン酸処理後徐々に増加し 4 および 6 日目において最大となった。また, 分化指標として用いた  $\alpha$ -fetoprotein mRNA は分化誘導後 4 日目に検出され, 6 日目にさらに増加した。このように, 肝細胞の分化度と Hex の発現レベルに相関が見られた。

Hex の転写調節機能を調べるためにほぼ全長の Hex cDNA (6-271) を GAL 4 DNA binding domain (GAL 4 DBD) との融合タンパク質として発現するように構築したプラスミド pSG-Hex (6-271) と 5 コピーの GAL 4 binding site を挿入したレポータープラスミド 5 x GAL 4 GL 3-control を HepG 2 細胞にコトランスフェクトし, 48 時間培養後細胞を回収し, ルシフェラーゼ活性を測定した。pSG-Hex (6-271) は濃度依存的にルシフェラーゼ活性を低下させ, 最大約 80% の活性を抑制した。このことから Hex は転写を抑制する転写因子であることが示唆された。さらに, Hex の転写抑制ドメインを同定するために様々な N 末端, C 末端の deletion mutant を PCR 法にて作成し, pSG424 に挿入し, レポータープラスミドと HepG 2 細胞にコトランスフェクトした後, ルシフェラーゼ活性を測定した。その結果, Hex 転写抑制ドメインはホメオドメインより N 末端側のアミノ酸残基 45-136 の領域に存在することが明らかとなった。

さらに Hex の DNA 結合ドメインを同定するためにホメオドメイン以降の領域, ホメオドメインのみ, およびホメオドメインを含まない C 末端領域を GST との融合タンパク質として発現するように構築したプラスミド pGST-Hex (130-271), -Hex (134-199), -Hex (206-271) をそれぞれ大腸菌に導入した。発現させた融合タンパク質はグルタチオンセファロース 4 B カラムにて精製し, electrophoretic mobility shift assay に用いた。コンペティションアッセイには 500 倍量のラベルしていないオリゴを反応液中に添加した。スーパーシフトアッセイには抗 GST 抗体を添加し, 予め氷温下で 30 分間反応させた。その結果, Hex のバンドは Hex (137-271) および Hex (200-271) でのみ検出され, これらのバンドはコンペティターで消失し, 抗 GST 抗体でスーパーシフトした。これらの結果から, Hex のホメオドメインが DNA 結合ドメインとして機能することがわかった。

#### 【総括】

本研究においてクローニングしたラット Hex は 15 日目胚の肝臓や, 分化型肝癌細胞で発現がみられたが, 未分化型肝癌細胞では認められなかった。また, 分化誘導した時の F 9 細胞では  $\alpha$ -fetoprotein に先行して発現量の増加が見られた。これらのことは Hex が肝細胞などの分化あるいは分化の維持に関与する可能性を示唆する。また, Hex が転写を抑制する転写因子であり, その転写抑制ドメインがアミノ酸残基 45-136 の領域に存在すること, また, Hex の DNA 結合ドメインがホメオドメインにあることを明らかにした。

#### 論文審査の結果の要旨

ホメオボックスタンパク質の Hex (Haematopoietically expressed homeobox) は 271 残基のアミノ酸で構成されており, ホメオドメインとその N 末端側のプロリンリッチな領域および C 末端側の三つの領域で構成されている。Hex cDNA はこれまでにヒト, マウスおよびニワトリで単離されており, 多能性造血前駆細胞, 肝臓, 肺, 脾臓な

どでその発現が確認されている。なかでも肝臓においては非常に高い発現を示すことが報告されている。しかしながら、Hex の機能およびその標的となる遺伝子はまだ明らかにされてはいない。本研究はラットの Hex cDNA をクローニングし、肝臓や種々の肝癌細胞での Hex 遺伝子の発現、および Hex タンパク質の機能を解析したものである。Hex mRNA 量は高炭水化物食や再生肝ではわずかな変化しか示さなかったが、肝細胞の分化状態に応じて著明な変動を示した。すなわち、Hex 遺伝子の発現は肝細胞において最も高く、ついで分化型の肝癌細胞でもその発現は検出されたが、未分化型の肝癌細胞では検出されなかった。ラットの発生段階では15日目胎児の肝臓でも発現していた。また、内臓内胚葉へと分化誘導した F 9 細胞では Hex mRNA 量の増加は分化指標である  $\alpha$ -fetoprotein に先行して検出された。これらの結果は Hex が肝細胞の分化あるいは分化の維持に関与する可能性があることを示唆するものである。また、GAL 4 DNA 結合ドメインと Hex の融合タンパク質を発現するプラスミドと GAL 4 結合部位を含むレポータープラスミドを HepG 2 細胞にコトランスフェクションを行ったところ、Hex が転写を抑制する転写因子であり、その転写抑制ドメインがアミノ酸残基45-136のプロリンリッチな領域に存在することが明らかになった。さらに、Hex の DNA 結合ドメインがホメオドメインにあることを示した。

本研究において Hex が肝細胞の分化あるいは分化の維持に関与する可能性を示唆するとともに Hex が転写抑制因子であること、およびその転写抑制ドメインと DNA 結合ドメインを明らかにしたことは、今後の肝臓の分化に関する研究に貢献するものであり、学位の授与に値すると考えられる。