The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

| | |
|---|---|
| Title | 白血病細胞の分化誘導過程で発現変動する遺伝子の解析 |
| Author(s) | 興梠, 順也 |
| Citation | 大阪大学, 2000, 博士論文 |
| Version Type | |
| URL | https://hdl.handle.net/11094/41969 |
| 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。 |

*The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA*

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

The University of Osaka

【23】

| | |
|---|---|
| 氏　　名 | 興　梠　順　也（こうろき　じゅんや） |
| 博士の専攻分野の名称 | 博　士（薬　学） |
| 学　位　記　番　号 | 第　15378　号 |
| 学位授与年月日 | 平成12年3月24日 |
| 学位授与の要件 | 学位規則第4条第1項該当<br>薬学研究科環境生物薬学専攻 |
| 学　位　論　文　名 | **白血病細胞の分化誘導過程で発現変動する遺伝子の解析** |
| 論文審査委員 | （主査）<br>教　授　田中　慶一<br>（副査）<br>教　授　那須　正夫　　教　授　土井　健史　　教　授　西原　　力 |

## 論文内容の要旨

白血病細胞は正常造血システムの破綻により、未分化な形質と自己複製能を保持し続ける。すなわち、白血病細胞は、分化に関わる機能分子が発現されず、増殖に関わる機能分子が終始発現された状態にあると捉えることができる。従って、all－*trans* retinoic acid（ATRA）によるHL－60細胞の分化現象に代表されるような白血病細胞の分化誘導過程では、これら機能分子の発現変動が引き起こされているものと予想され、その分子を同定することは分化メカニズムを解明するための一つのアプローチになるものと考えられる。LiangとPardeeによって開発されたdifferential display（DD）法は、このような特異的発現パターンを示す遺伝子群を検出するための手法であり、これまでに、癌細胞と正常細胞で発現レベルが異なる遺伝子の同定や、細胞周期、アポトーシス、発生・分化などに関与する遺伝子がDD法を用いた解析により同定されてきた。しかし、DD法は開発された当初から、再現性の低さや偽陽性の多さ、解析できる遺伝子に制限があるなど様々な問題点が指摘され、最近ではこれらの問題点を補う様々な改良法が確立されるようになった。ODD法やmolecular indexing法など、制限酵素処理したcDNAフラグメントを増幅することで網羅的解析が行える優れた方法が種々報告されるようになってきた。しかし、結局それらの改良法も、複雑な操作と多くのステップを必要とすることから、発現量の違いを忠実に解析できるとはとうてい考えられないのが実状である。このような観点から、本研究ではまず、特異的発現パターンを示す遺伝子群を、複雑な操作を必要とせず包括的に同定できる新技術の開発に取り組み、その結果、迅速かつ簡便に解析できる改良型DD法を確立した。

本方法は、比較する検体に由来するtotal RNAから混合オリゴdTプライマーを用いて2本鎖cDNAを合成し、*Sau* 3ＡＩでこのcDNAを切断したのち、全ての切断部位にアダプターオリゴヌクレオチドを連結させ、それを鋳型としてオリゴdTプライマーとアダプタープライマーでPCRを行い増幅産物のフィンガープリントを比較する。用いるプライマーはアダプター配列の3'側に任意に2塩基を付加したadapter extended primer（AEP）と、FITC標識オリゴdTプライマーの3'側に任意に2塩基付加したoligo dT extended primer（TEP）であるが、このようにプライマーに任意配列を付加させることで、その付加配列に相補的な2塩基を持つcDNA断片のみが増幅されるように制限される。従って、PCRで増幅されるcDNAの数は電気泳動により分離可能な程度に限定でき、またその組み合わせ192パターン全てについてPCRを行うことで、理論上ほぼ全てのmRNAの発現変化を解析することができる。本方法の問題点は、PCRにおけるプライミングの特異性が完全にプライマーの末端2塩基のみに依存するため、非特異的バンドが多く検出される可能性があることである。しかし、1塩基しか配列上違いがない類似のプライマー間

でも増幅産物のバンドパターンが全く異なることからプライミングの特異性は非常に高く、本法が、従来法のように異なるプライマーを使っても同じcDNAが何度も繰り返し増幅される、といった問題がない優れた技術であることが明らかとなった。

次に、本方法を用いて、ATRA処理によるHL−60細胞の顆粒球系分化誘導時に発現量が変化する遺伝子群の検索を行った。その結果、分化に伴いシグナル強度が変化するいくつかのバンドを認め、これまでに約20種の遺伝子について実際の発現挙動をノーザンブロット解析で確認した。単離したこれらの遺伝子は、ATRA処理後直ちに発現が誘導されるものや、徐々に発現が上昇するもの、一過性に上昇するもの、発現量が減少するものなど、様々な発現動態を示した。決定した塩基配列をもとにGenBank／EMBL／DDBJデータベースに登録されている遺伝子とのホモロジー検索を行ったところ、既知遺伝子との相同性が認められたものが17種、既知遺伝子との相同性がない新規遺伝子が3種であった。既知遺伝子のうち、5種はATRA処理による発現変化が既に報告されており、その他は機能未知あるいは血球分化における関与が報告されていない分子であった。

新規遺伝子のうち、バンド1132Aに相当する遺伝子は*Alu*配列の一部であることが判明したため、このcDNAフラグメントをもとに構造解析を進めた。そして、ATFファミリーに属する新規転写因子をコードする遺伝子であることを明らかにし、構造的特徴からこの遺伝子を*ATF* 9と命名した。ホモロジー検索の結果、*ATF* 9はマウスATFxと最も類似しており、bZIPドメインでは実に95%の相同性を示した。またヒトATF 4ともbZIPドメインで約55%の相同性を示し、機能上の類似性やダイマー形成の可能性などが予想された。しかし、*ATF* 9の正常組織における発現分布を調べると、ATF 4がユビキタスに発現する一方、*ATF* 9の発現には特異性があることが判明し、むしろATF 9には特異的な機能があることを予感させた。*ATF* 9の発現は分化に伴って減少するだけではなく、誘導剤で処理した直後、つまり分化のトリガーが引かれる頃にわずかながら発現上昇すること、また分化の方向性に関わらず同じ発現パターンを示すことを明らかにした。この発現パターンは白血病細胞のATRA処理に伴う増殖パターンと相関しており、ATF 9が増殖に関わる何らかの機能分子を活性化する可能性を示唆するものである。さらに、細胞増殖が盛んで造血幹細胞的特徴をもつK562細胞は、今回検討した数種の白血病細胞株のうち最もATF 9の発現が高く、このことからも細胞増殖機構におけるATF 9の関与がより強く示唆される。

近年、転写因子の活性にコアクチベーターによる制御が深く関わっていることが明らかとなりその重要性が示唆されるようになってきた。申請者はSamuelsらとの共同研究によりATF 9が新規コアクチベーターであるNRIF 3と相互作用することを見いだした。NRIF 3は核内レセプターとリガンド依存的に結合することから、ATF 9の作用機構における核内レセプターの関与が示唆され、両者の間で何らかのクロストークが行われていると推測される。今後、ATF 9、核内レセプター、NRIF 3の3者の関係がより詳細に解析されることで、分化や増殖といった生命現象の神秘を解き明かす新たな発見がなされていくものと期待される。

## 論文審査の結果の要旨

白血病細胞は、分化に関わる機能分子が発現されず、増殖に関わる機能分子が終始発現された状態にあると言える。従って白血病細胞の分化誘導過程では、これら機能分子の発現変動が引き起こされているものと予想され、その分子を同定することは分化メカニズムを解明するための一つのアプローチになるものと考えられる。

differential display (DD) 法は、このような特異的発現パターンを示す遺伝子群を検出するために用いられてきたが、本研究ではまず、従来法の欠点を克服して迅速かつ簡便に解析できる優れた改良型DD法を確立した。本法は理論上ほぼ全てのmRNAの発現変化を解析することができ、プライミングの特異性も高く優れた分析法であると評価できる。

次に、本法を用いて、retinoic acid処理によるHL−60細部の分化誘導時に発現量が変化する遺伝子群の検索を行い約20種の遺伝子の発現挙動を確認した。決定した塩基配列ホモロジー検索から、既知遺伝子との相同性が認められたものが17種、新規遺伝子が3種であった。新規遺伝子の一つは*Alu*配列を含んでおり構造解析よりATFファミリーに属する新規転写因子をコードする遺伝子であると考えられ、*ATF* 9と命名した。ホモロジー検索の結果、*ATF* 9

はマウスATFxと最も類似しておりbZIPドメインでは95%の相同性を示した。また、*ATF* 9の正常組織における発現分布には特異性があることや分化の方向性に関わらず同じ発現パターンを示すことなどを明らかにした。またこの発現パターンは白血病細胞のretinoic acid処理に伴う増殖パターンと相関しており、ATF 9が増殖に関わる何らかの機能分子を活性化する可能性を示唆している。このATF 9の機能については共同研究者が新規コアクチベーターであるNRIF 3と相互作用することを見いだしており、今後の解明が期待される新規遺伝子であると考えられる。

以上の知見は特異的発現パターンを示す遺伝子群を検出する方法論を示すとともに、白血病の発症機構解明上重要な示唆を与えるものであり博士（薬学）の学位を授与するにふさわしいと考える。