The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	血小板第４因子遺伝子の発現を制御する転写因子群に関する研究
Author(s)	岡田, 欣晃
Citation	大阪大学, 2003, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/44135
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、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

氏　　名　岡　田　欣　晃（おかだ よしあき）

博士の専攻分野の名称　博　士（薬　学）

学 位 記 番 号　第　17780　号

学位授与年月日　平成15年3月25日

学位授与の要件　学位規則第4条第1項該当

薬学研究科生命情報環境科学専攻

学 位 論 文 名　**血小板第4因子遺伝子の発現を制御する転写因子群に関する研究**

論 文 審 査 委 員　（主査）

教　授　土井　健史

（副査）

教　授　前田　正知　　教　授　山元　　弘　　教　授　真弓　忠範

論 文 内 容 の 要 旨

血小板は、止血という重要な役割を担っている。血小板減少症は、生体内の血小板数が減少する疾患であり、現在までに薬剤による副作用やHIVウイルス感染、遺伝的要因などが原因で発症することが知られている。生体における血小板数の減少は止血効果の低下をもたらし、全身への出血傾向を引き起こす。頭部での出血など重篤な場合には命にも関わる疾患となる。1994年にそのcDNAがクローニングされたトロンボポエチン（TPO）は、血小板産生を強く促進する造血因子であり、血小板減少症治療薬としての応用が期待された。しかし、臨床試験に用いられたTPO分子には抗原性があったため、生体内への投与ではその機能が十分に発揮されず、医薬品への応用が難しいことが明らかとなってきつつある。そのため、TPOにかわる分子をターゲットとした血小板減少症治療薬の開発は急務である。しかし、現状では血小板系列の分化・成熟機構について不明な点が多いため、まずその全容を明らかにすることが医薬品開発研究を行う上での重要な課題の一つであると考えられる。

著者らは一つのアプローチとして、血小板系列にのみ発現が認められる血小板第4因子（PF4）遺伝子に着目し、その発現制御領域及び、そこに結合し発現を制御する転写因子について解析を進めてきた。現在までに、転写因子GATA-1、ETS-1がラットPF4遺伝子のプロモーターを活性化することを明らかにしてきたが、これらの因子のみでPF4遺伝子をはじめとする血小板系列に必須の遺伝子群が、血小板系列にのみ特異的に発現する機構については説明することはできず、他の転写因子の関与が考えられた。そこで、それらの因子の同定を目的とし、ラットPF4遺伝子のプロモーター領域のより詳細な解析を行った。

まず、PF4遺伝子のプロモーターにおける新規転写調節領域を同定するために、PF4遺伝子のプロモーター領域1.1 kbを部分断片にわけ、ルシフェラーゼ遺伝子の上流に組み込んだレポータープラスミドを作成した。このプラスミドを、非造血系細胞株である、HepG2、HeLa細胞、比較的未分化な造血系細胞であるK562細胞、巨核球形質を持つHEL細胞の4つの細胞株に導入し、その活性を評価することにより、新規転写調節領域TME（tandem repeat of MEIS1 binding element）を同定することができた。このTMEをプローブとしてゲルシフトアッセイを行ったところ、巨核球形質を持つHEL細胞において結合タンパク質が多く存在することが明らかとなった。次にこのTME結合タンパク質を同定するために、TMEを用いたDNAアフィニティーカラムによりTME結合タンパク質の精製を行い、HPLCに直接質量分析装置を連結させたLC-MSのシステムを用いて解析を行った。このMS/MS解析から得られたクロマトグラムを、プログラムSEQUESTを用いてデータベースサーチを行った結果、さまざまな核酸結合タ

ンパク質が同定され、そのなかにいくつかの転写因子も含まれていた。これらの中から、TME 中に結合モチーフが含まれ、直接の結合が予想された USF2、造血系への関与が示唆されている PBX（PBX1B と PBX2）と AML1 の 3 つの転写因子をピックアップし、以後の解析を行った。まず、質量分析装置による同定が確実であるかどうかを確かめるために、DNA アフィニティーカラム精製により得られたフラクションを用いてウエスタンブロッティングを行った。なお、これらの転写因子にはいくつかの相互作用因子が報告されていたため、それらの関連因子についても併せて実験を行った。その結果、PBX ファミリーのうち、PBX1B と PBX2 が検出され、その相互作用因子である MEIS1、PREP1 も検出された。また、USF-2 と同じファミリーに属する USF-1、さらに AML1 との相互作用が報告されている ETS-1 の存在も確認され、PBX、USF-2、AML1 とその関連因子が TME に結合していることが強く示唆された。そこで、ピックアップした 3 因子と、その相互作用因子の TME への結合と、転写活性化能について、それぞれゲルシフトアッセイとレポータージーンアッセイを行って検討した。その結果、MEIS1、PREP1 が PBX と複合体を形成し TME に結合し PF4 遺伝子のプロモーターを 1.5～3 倍に活性化することを明らかにした。また、MEIS/PBX、PREP1/PBX 複合体が既知の転写因子 GATA-1、ETS-1 と協調的に PF4 遺伝子のプロモーターを 15～20 倍に強く活性化することを明らかにした。次に、USF-1、2 が TME に結合し、PF4 遺伝子のプロモーターを約 15 倍まで強く活性化することを明らかにした。さらに、AML1 が ETS-1、CBF β と協調的に PF4 遺伝子のプロモーターを約 25 倍に強く活性化することを明らかにした。さらに、ヒト臍帯血由来の巨核球を用いて行った RT-PCR の実験において、今回機能を解析した全ての転写因子が発現していることを明らかにし、TME 上で形成される転写因子の予想結合モデル図を構築することができた。

以上の結果から、今回同定した転写因子群が、PF4 遺伝子の発現を調節していることが明らかとなった。さらに、今回同定した転写因子のほとんどは、これまでに血小板系列への関与が示されていなかったものであるため、今後の血小板系列の分化・成熟過程の研究において、非常に有用な知見となると考えられる。

論文審査の結果の要旨

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、これに関与する転写因子がいくつか明らかにされてきたが、巨核球特異的遺伝子発現機構等に関しては、依然不明な点が多い。

岡田君は、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、種々のアプローチを用いて試みた。その結果、今まで言われていたシスエレメントの他に、巨核球特異的発現に関係する DNA 配列を見い出し、さらにそこに結合するタンパク質群の同定に、アフィニティカラムクロマト及び質量分析装置（LC/MS/MS）を用いることにより成功した。この中から USF2、PBX（PBX1B、PBX2）、AML1 についてさらに詳しく調べた結果、USF1 は USF2 と、PBX は MEIS1 と、AML1 は CBF β、ETS-1 と共にプロモーター活性を上昇させることを明らかにした。特に、MEIS1/PBX 複合体は、今まで巨核球特異的発現への関与が知られている GATA-1、ETS-1 と協調的に働き、その活性を倍増させることを見い出した。このようにホメオドメインタンパク質が、巨核球特異的遺伝子発現に大きく関与していることを、この研究で初めて明らかにすることができた。

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。