Osaka University Knowledge Archive

Title	Role of DNA methylation for expression of novel stem cell marker CDCP1 in hematopoietic cells
Author(s)	木村, 勇人
Citation	大阪大学, 2007, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/47410
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。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

Osaka University

【31】

氏　　名	木（き）　村（むら）　勇（はや）　人（と）
博士の専攻分野の名称	博　士（医　学）
学　位　記　番　号	第　２０９２９　号
学 位 授 与 年 月 日	平成 19 年３月 23 日
学 位 授 与 の 要 件	学位規則第４条第１項該当 医学系研究科分子病態医学専攻
学　位　論　文　名	Role of DNA methylation for expression of novel stem cell marker CDCP1 in hematopoietic cells （新規幹細胞マーカーCDCP1 の血液細胞での発現における DNA メチル化の役割）
論 文 審 査 委 員	（主査） 教　授　青笹　克之 （副査） 教　授　仲野　　徹　　教　授　川瀬　一郎

論 文 内 容 の 要 旨

【目的】

チロシンキナーゼ型レセプターである CDCP1（Cub-Domain Containing Protein 1）は、未熟な正常細胞や一部の腫瘍細胞において発現している。CDCP1 の発現における細胞特異性のメカニズムについて血液腫瘍細胞株を用いて解析した。

【方法ならびに成績】

半定量的 RT-PCR 法および定量的 Real time PCR 法にて CDCP1 の発現を血液腫瘍細胞株で検討したところ、K562（慢性骨髄性白血病の blastic crisis の細胞株）が CDCP1 陽性であるのに対し、Jurkat（T 細胞性白血病の細胞株）は CDCP1 陰性であった。以下、この２種類の血液系細胞株を用いて CDCP1 の細胞特異的発現機構の解析を行った。CDCP1 プロモーターをルシフェラーゼ遺伝子の上流に結合したレポータープラスミドを K562 に導入したところ、転写開始点より 150b～130b 上流の領域において CDCP1 の転写に対し正に働く binding motif が存在する結果が得られた。ところが、同じ領域をもつレポータープラスミドは CDCP1 陰性である Jurkat においても活性を示した。このことは、CDCP1 の転写に正に働く因子は Jurkat にも存在し、外来性に導入されたレポータープラスミドを活性化することを示唆している。レポーターアッセイの結果判明した CDCP1 遺伝子の転写に対して正に働く領域には、転写因子 zfp67 の binding motif が存在した。この motif に変異をもつレポータープラスミドではレポーター活性が得られなかったこと、si-RNA を用いて K562 における zfp67 遺伝子を knock-down したところ CDCP1 の mRNA 量が減少したことから、zfp67 がたしかに CDCP1 の発現を正に制御していることが確認された。そこで、zfp67 と CDCP1 プロモーター領域との結合を in vivo で確認するため抗 zfp67 抗体によるクロマチン免疫沈降法を施行したところ、K562 で zfp67 と CDCP1 プロモーターとの結合は確認できたが Jurkat では確認できなかった。一方、Western blot では両細胞株とも同レベルの zfp67 タンパクを認めたことより、zfp67 タンパクは Jurkat においても存在はしているものの CDCP1 プロモーターへの結合が阻害されていることが示された。プロモーター領域の DNA と転写因子との結合に関わる要因のひとつに DNA のメチル化が知られている。メチル化の程度が高度なプロモーターではクロマチンのパッキング程度が高く転写因子がアクセスできないことが知られている。そこで bisulfite sequence 法にて

CDCP1 プロモーター領域のメチル化の状態を確認したところ、K562 と比較して Jurkat におけるメチル化の頻度は高度であった。脱メチル化剤を作用させるとプロモーター領域のメチル化の頻度が低下するとともに CDCP1 の発現は増加した。この時、脱メチル化剤によってプロモーター領域のメチル化を外すと、Jurkat においても zfp67 のプロモーター領域への結合が認められた。SssI メチル化酵素を用いて CDCP プロモーター領域を in vitro でメチル化すると、K562 に導入しても非メチル化プロモーターと比較してプロモーター活性が低下した。以上の結果より、CDCP1 遺伝子のプロモーター活性にはメチル化が重要な役割を示すこと、また Jurkat においてプロモーター領域が高度にメチル化されているために zfp67 がプロモーター領域に結合できず、CDCP1 遺伝子の発現が得られなかったことがわかった。

【総括】

CDCP1 プロモーターを活性化させる zfp67 タンパクは、CDCP1 の発現が陽性である K562 と陰性である Jurkat のいずれにおいても存在している。しかし、Jurkat では CDCP1 プロモーター領域が高度にメチル化されているために zfp67 タンパクの結合が阻害され、CDCP1 の発現が認められないことがわかった。CDCP1 遺伝子の発現にはプロモーター領域のメチル化が強く関与することが示された。

論文審査の結果の要旨

幹細胞で高発現する CDCP1 は一部の腫瘍細胞においても発現しているが、その発現には細胞特異性がみられる。CDCP1 発現の細胞特異性の機構について CDCP1 陽性細胞株 K562 と陰性細胞株 Jurkat を用いて検討した。レポーターアッセイの結果、K562 では転写因子 zfp67 が CDCP1 プロモーターに結合して転写を促進することがわかった。ところが、Jurkat では zfp67 は存在するものの、CDCP1 プロモーターと zfp67 との結合を確認することはできなかった。転写因子とプロモーターの結合を制御する因子のひとつにプロモーター領域の DNA のメチル化がある。CDCP1 プロモーター領域の DNA メチル化を検討したところ、K562 ではメチル化の程度が低いのに対し、Jurkat では高頻度のメチル化がみられた。脱メチル化剤の投与で Jurkat において zfp67 の CDCP1 プロモーター領域への結合が認められ、CDCP1 が発現した。細胞種ごとに DNA メチル化の程度が異なり、それによって CDCP1 プロモーター領域への転写因子の結合が調節されることで、遺伝子発現の細胞特異性が決定されていることが示唆された。

以上の結果は、幹細胞で高発現する遺伝子の腫瘍における発現調節機構の一端を解明したもので、学位論文に値するものと認める。