

氏 名	たはら つよし <b>田 原 強</b>
学位(専攻分野)	博 士 ( 学 術 )
学 位 記 番 号	博 甲 第 3 6 7 号
学位授与の日付	平成 17 年 3 月 25 日
学位授与の要件	学位規程第 3 条第 3 項該当
研 究 科 ・ 専 攻	工芸科学研究科 機能科学専攻
学 位 論 文 題 目	<b>赤血球分化時におけるグロビン遺伝子群の発現調節機構の解明</b> (主査)
審 査 委 員	教授 竹谷 茂 教授 伊倉宏司 教授 山口政光

## 論文内容の要旨

本論文は、ヘムが補欠分子族としての機能だけでなく、種々の細胞において、種々の mRNA 量やタンパク質量を調節すること、もしくは赤血球系前駆細胞において赤血球分化を誘導することを明らかにしたものである。

第一に、細胞内のヘム含量を変動させるために、赤血球前駆細胞である K562 および MEL 細胞あるいは ジメチルスルフォキシド によって分化誘導させた MEL 細胞は、ヘム合成系特異的阻害剤であるサクシニルアセトン (SA) とヘミン処理を行って、 $\alpha$ -および  $\beta$ -グロビン mRNA 発現量の変動を RNA ブロット解析によって調べた。いずれの細胞においても $\alpha$ -および $\beta$ -グロビン mRNA 量は、SA 処理によって減少が認められ、ヘミン添加で回復した。続いてこれらの細胞内ヘム含量に依存した  $\alpha$ -および  $\beta$ -グロビン mRNA 量の変動が、転写レベルで調節されているのか否か検討するために、 $\alpha$ -および  $\beta$ -グロビンの遺伝子発現において重要な役割を果たしている転写調節領域を用いて、レポーター解析を行った。 $\alpha$ -グロビン遺伝子群においては DNase I 高感受性領域 (HS)-40、 $\beta$ -グロビン遺伝子群では HS2 を用いた。レポーター解析の結果、HS-40 および HS2 のエンハンサー活性は、細胞内ヘム含量に依存して増減が見られた。すなわち、SA 処理を行った細胞において両エンハンサーの活性は減少が観察され、ヘミンを添加してヘム含量を回復させると活性も回復した。このヘム応答性の配列を特定するために、HS2 の MARE および HS-40 の NF-E2/AP-1 (NA) 部位に変異を作製してレポーター解析を行ったところ、HS2 および HS40 の変異型エンハンサーのレポーター活性は、活性自体が著しく低下し、ヘミン添加による活性の変動が見られなかった。すなわちヘムに応答したエンハンサー活性は、MARE および N A 部位に起因していることが示された。

第二に、ゲルシフト解析法によってヘム応答配列に結合する転写因子の同定を行った結果、まず分化させた MEL 細胞においては、 $\beta$ -グロビンの MARE 配列に 2 種類の転写因子が結合することが示された。抗体を用いたスーパーシフトによって一つは転写抑制因子 Bach1、もう一方は赤血球特異的な転写活性化因子 p45 NF-E2 であることが分かった。SA およびヘミン処理を行った K562 および MEL 細胞の核抽出物を用いて行ったところ、Bach 1 の結合量は、SA 処理を行うと増加が観察され、赤血球分化とともにもしくはヘミン処理によって減少した。一方 NF-E2 は、Bach1 とは逆に、ヘミン処理および赤血球分化に従って結合量の増加が認められた。また  $\alpha$ -グロ

ピンの NA 部位においても MARE 配列と同様な結果が得られた。

ゲルシフト解析でヘム応答配列に結合することが示された転写因子がエンハンサー活性に影響するのか否か調べるために、野生型 Bach1 および変異型 Bach1 の発現プラスミドをレポータープラスミッドとコトランスフェクションして、レポーター活性を測定した。Bach1 はヘムと結合すると DNA 結合能を喪失する特徴を持つ転写因子である。レポーター活性は、Bach1 によって顕著に抑制され、ヘミン添加によって活性の回復が観察された。一方ヘム結合モチーフに変異を持つ変異型 Bach1 を発現させた場合は、活性抑制は認められたが、ヘミンによる活性の回復は見られなかった。

さらに、*in vivo* においてもヘムに依存して結合量に変動するのか検討するために、SA およびヘミン処理をした K562 細胞を用いて、クロマチン免疫沈降法を行った。MARE および NA 部位への Bach1 の結合量は、SA 処理を行った細胞において明らかな増加が認められた。ヘミン添加した細胞においては、Bach1 結合量の減少が見られた。p45 NF-E2 の MARE および NA 部位への結合量は、Bach1 とは逆であり、ヘミン処理を行った細胞において増加した。これらはヘムが、MARE および NA 部位への Bach1 と p45 NF-E2 の結合量を調節していることを示し、また Bach1 の核外移行もヘムによって調節されていることが、細胞を核とその他の分画に分けて行ったウエスタンブロット解析の結果から明らかにした。

以上の述べてきたように、ヘムが、赤血球分化誘導時における $\alpha$ -および $\beta$ -グロビン遺伝子の発現において重要な役割を果たしており、それらの正の発現調節機構は、ヘムが転写抑制因子 Bach1 と MARE および NA 部位の相互作用を阻むことによってもたらされることが分かった。すなわち本論文において申請者は、赤血球分化時のヘムによるグロビン遺伝子発現調節機構という新しい調節機構を見いだしている。

## 論文審査の結果の要旨

ヘムは hemoglobin をはじめとする種々のヘム蛋白質の補欠分子族として、酸素利用や薬物代謝などに働いていることが知られている。一方、赤血球の分化に伴って hemoglobin をはじめとする種々の蛋白質が誘導される場合に、ヘムによる遺伝子の転写ならびに蛋白質への翻訳の促進についても多くの研究がなされてきた。しかしながら、特に、ヘムの転写レベルでの積極的な役割の機構については全く不明であった。本研究では、まず、globin を始めとする数種類の蛋白質の mRNA レベルでのヘムによる調節機構について検討がなされた。赤血球分化のモデルとして用いられているマウス赤白血球細胞の $\alpha$ -、 $\beta$ -globin, cytochrome c および 5-aminolevulinic acid synthase mRNA がヘム合成の特異的阻害剤 succinyl acetone 処理によって低下して hemin 添加で回復することを見い出した。これらの変動が遺伝子発現の転写レベルで起っているか否かを調べるために $\beta$ -globin 遺伝子のエンハンサー領域である $\mu$ LCRを組み込んだ Promoter assay や転写因子と核酸配列の相互作用を調べる Gel shift assay や CHIPassay を行って、ヘムによる活性化は エンハンサー内の DNase-hypersensitive site 2 の MARE site であることを初めて見い出した。そこで、MARE site に結合する転写抑制因子として Bach1 や転写活性化因子の NF-E2 を取り上げて、これらに因子の相互作用を調べたところ、両因子による抑制と活性化の切り替えがヘムによって起っていることを発見した。すなわち、Bach1 はヘムレベルが低下すると MARE site への結合を強めて遺伝子発現を抑制し、ヘムの増加に伴って Bach1 にヘムが結合して MARE site からの解離して、空になった MARE site

に NF-E2 が結合して $\beta$ -globin 遺伝子の発現を活性化するユニークなモデルを提案した。これは、ヒト $\alpha$ -globin 遺伝子のエンハンサー領域でも $\beta$ -globin と同様に Bach1 と NF-E2 の相互作用によって調節されることで確認された。これらの発見はヘムが種々の遺伝子発現に調節因子を介して積極的な役割を果たしている新しい機能をつきとめた画期的な発見であり、生命の基本的な機能制御への新たな発展に繋がると考えられる。

これらの研究の成果は、下記の High Rank の国際生命科学雑誌 2 編に公表されている。

「公表論文」

- (1) T. Tahara, J. Sun, K. Nakanishi, M. Yamamoto, H. Mori, H. Fujita, K. Igarashi, and S. Taketani, Heme Positively Regulates the Expression of  $\beta$ -Globin at the Locus Control Region via the Transcriptional Factor Bach1 in Erythroid Cells . *J. Biol. Chem.* **279**, 5480-5487 (2004)
- (2) T. Tahara, J. Sun, K. Igarashi and S. Taketani, Heme-dependent Upregulation of the alpha-Globin Gene Expression by Transcriptional Repressor Bach1 in Erythroid Cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **324**, 77-85 (2004).

参考論文

Y. Yasui , S. Muranaka, T. Tahara, R. Shimizu, S. Watanabe, Y. Horie, E. Nanba, H. Uezato, A. Takamiyagi , S. Taketani, and R. Akagi, A new ferrochelatase mutation combined with low expression alleles in a Japanese patient with erythropoietic Protoporphyrrias. *Clin Sci (Lond)*. **102**, 501-506 (2002).