

氏名(本籍)	ほし の ひて と 星 野 英 人 (愛 知 県)		
学位の種類	博 士 (医 学)		
学位記番号	博 甲 第 2392 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		
審査研究科	医学研究科		
学位論文題目	転写因子 Bach ファミリーの機能に関する研究		
主査	筑波大学教授	獣医学博士	八 神 健 一
副査	筑波大学教授	医学博士	林 英 生
副査	筑波大学客員教授 (理化学研究所)	理学博士	石 井 俊 輔
副査	筑波大学助教授	理学博士	石 井 哲 郎
副査	筑波大学講師	医学博士	小 島 寛

論 文 の 内 容 の 要 旨

(目的)

転写因子 Bach ファミリーは Bach1 と Bach2 から構成され、ともに bZip ドメインの他に特徴的な BTB ドメインを有する。生理的機能は不明であるが、培養細胞で過剰発現させた Bach2 は主に細胞質に局在する。また、マウス Bach2 の発現は、胎仔期の脳と成獣の B リンパ細胞で認められる。一方、成獣の脳では Bach2 の発現は認められず、Bach2 は胎仔期の脳において重要な機能を担うと考えられている。一方、Bach1 は造血組織をはじめ多くの組織で発現が認められる。

そこで、本研究では、Bach2 に関しては細胞内局在制御機構の解析および胎仔期での発現部位の解析を通して、また Bach1 については遺伝子破壊のアプローチにより、各因子の生理的機能を解明することを目的とした。

(対象と方法)

1) Bach2 の細胞内局在制御機構の解析および神経細胞における発現解析

Bach2 の細胞内局在を制御する領域を特定するため、Bach ファミリー間での保存領域を検索した。C 末端の保存領域に関して、欠失変異体あるいはアミノ酸置換変異体を作成し、細胞内局在に及ぼす影響を検討した。また、野生型 Bach2 を発現させた培養細胞を様々な薬剤で処理することにより、Bach2 の細胞内分布に影響する上位のシグナル伝達系の解明を試みた。また、マウス胎仔の脳神経組織から RNA およびタンパク質を抽出し、RT-PCR / サザンブロット解析とイムノブロット解析により bach2 遺伝子の発現を調べた。また胎仔期での Bach2 の発現部位を特定するために、アフィニティー精製した抗 Bach2 抗体を用いて、マウス 12.5 日胚に対する免疫組織染色を行った。

2) bach1 遺伝子破壊マウスの作成と解析

常法に従いマウス bach1 遺伝子破壊マウスを作成し、このマウスの血液細胞等の異常の有無を検討した。

(結果)

1) Bach2が細胞質に局在するためにはBach1との間で保存されるC末端領域が必須であるので、既知のモチーフと全く相同性がないこの領域をCLS (cytoplasmic localization signal) と名付けた。薬剤による野生型 Bach2の細胞内局在の変化を検討した結果、酸化ストレス誘導剤であるジエチルマレイン酸と核外輸送の担体であるCrm 1 (chromosomal region maintenance 1) 特異的阻害剤であるレプトマイシン Bにより効率的に核局在が誘導された。CLSは典型的な核外輸送シグナル (NES) とは全く異なる配列であり、アミノ酸置換変異体の解析から疎水性アミノ酸残基だけでなく、親水性アミノ酸残基も含めたCLS配列そのものが核外排出機構に重要であることが示唆された。

また、マウス胎仔の脳神経組織において、mRNA及びタンパク質のレベルでbach2遺伝子の発現が認められた。

また、免疫組織染色によりマウス胎仔におけるBach2の発現は脳神経組織とレンズに特異的であり、ともに最終分化過程にある細胞で顕著であった。さらに、試験管内の系で観察された細胞質から核への細胞内局在の変化が、生体内でも起こることが示唆された。

2) bach1ノックアウトマウスにおいて、ゲノムDNAおよびタンパク質レベルでのbach1遺伝子の欠失を確認した。bach1ノックアウトマウスは正常に出生、生育し、これまでのところ血球細胞などに明確な異常は現れていない。

(考察)

1) 転写抑制化因子であるBach2は試験管内の酸化ストレス誘導系ではNrf2、胎仔期の脳やレンズでは大Maf因子という転写活性化因子と競合してMAREを介した転写を制御すると考えられる。恐らく生体内では活性酸素種が媒介するシグナル伝達系が存在し、その下流でCLSを介してBach2の核-細胞質間の分布が制御されると推測される。このようなMAREを介した負の制御ループの生理的意義も含め、Bach2の生理機能の解明については、今後bach2遺伝子破壊マウスの解析などのアプローチが必要になる。

2) bach1遺伝子の発現組織は、他のCNCファミリー因子の発現組織と重複するため、それら因子によりbach1遺伝子欠損による影響が補償された可能性がある。MAREとその結合因子が酸化ストレス応答に重要であることが相次いで報告されているが、Bach1もCLSを有することから酸化ストレス応答機構に関与する可能性がある。これらを踏まえて、今後、p45やNrf2などのダブルノックアウトマウスの作成が必要になると考えられた。

審 査 の 結 果 の 要 旨

遺伝子の発現を調節する転写因子は、発生・分化、増殖などに伴う細胞あるいは時期特異的な転写調節を制御し、様々な生命現象や疾患と深い関わりを持つ。本研究は、転写因子Bachファミリーを構成するBach1とBach2の生理的機能を解明することを目的とし、Bach2がマウス胎仔の神経細胞やレンズ細胞で発現すること、Bach2はCrm 1依存性の核外排出機構により制御され、酸化ストレスによりこれが阻害されることを明らかにし、Bach2がこれらの組織において、酸化ストレスに応答して種々の遺伝子発現を調節する可能性を示した。本研究は、脳神経系の発生段階での細胞分化や酸化ストレス応答時におけるBach1およびBach2の生理的機能の一部を明らかにした優れた研究であり、今後、Bachファミリーを中心とした転写制御ネットワークの全体像の解明が期待される。よって、著者は博士(医学)の学位を受けるに十分な資格を有するものと認める。