

氏名(本籍)	にしむらしげこ 西村 滋子(東京都)
学位の種類	博士(医学)
学位記番号	博甲第2418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	GATA-1 遺伝子の転写制御機構の解析
主査	筑波大学教授 博士(医学) 榎 正 幸
副査	筑波大学教授 医学博士 山 田 信 博
副査	筑波大学教授 医学博士 赤 座 英 之
副査	筑波大学助教授 医学博士 石 井 哲 郎

論文の内容の要旨

(目的)

GATA-1は、血球系で特異的に発現する転写因子であり、その発現制御機構の解明は、造血発生機構を解明する上で重要である。本研究ではGATA-1 遺伝子の転写制御領域と制御因子を明らかにすることを試みた。

(対象と方法)

マウスGATA-1 遺伝子を対象とし、遺伝子制御領域の同定には、トランスジェニックマウス、培養細胞への一過性遺伝子導入実験を、制御因子の同定には、ゲルシフトアッセイ、ノックアウトマウスとトランスジェニックマウスを用いた。

(結果)

GATA-1 遺伝子の発現に重要な領域として、G1HE (UE) 領域、double GATA 領域、CACCC 領域、イントロン領域の4領域を同定し、G1HEについて最も詳細に解析を行った。

血球特異的エクソン上流3.9kbpから2.6kbpの領域(G1HE)は、GATA-1が胚型及び成体型赤血球、巨核球で発現するために必須な領域である。この領域は、培養細胞への一過性遺伝子導入実験では古典的エンハンサーの定義を満たすが、トランスジェニックマウスを用いた解析では、プロモーターに対する向きやプロモーターの種類を変えると転写活性を失うことが判明した。G1HEの中心配列(149bp)は、GAT配列、GATA配列、2つのE-box配列を含み、GATA配列のみがGATA-1 遺伝子の転写活性化に必須であった。このGATA配列には血球系GATA因子全てが結合したが、GATA配列に結合する高分子量複合体には、E-box結合因子の一つであるE2Aは含まれなかった。別のE-box結合因子SCLは、その欠損マウスを用いた解析から、GATA-1 遺伝子の発現(開始)に必要なでないことが明らかとなった。G1HEの中央配列は、赤血球系でのGATA-1 遺伝子の発現に十分だが、巨核球での発現には不十分であり、巨核球での発現にはさらに長い領域(235bp)を必要とした。

また、第2転写制御領域であるdouble GATA配列も転写活性に寄与する重要な領域であること、CACCC領域がGATA-1の血球特異的発現に関与する領域であること、イントロン領域が成体型赤血球造血に必要な領域であることが明らかとなった。

(考察と結語)

G1HEはマウス個体の解析で、非常に強力な血球系のエンハンサーであることが示された。培養細胞とトランスジェニックマウスでの転写活性化能の相違は、2つの実験系に於けるトランスジーン存在状態の相違による可能性があり、トランスジェニックマウス解析の方が、一過性遺伝子導入実験より生理的な環境での転写制御機構を反映していると考えられる。今後、様々な解析法により新たな転写活性化機構が解明されると、エンハンサーの定義も変わっていくものと考えられる。

GATA/E-boxの配列には、GATA-1, SCL, E2Aが、Lmo2とLbd1によりまとめられた転写因子複合体が結合し、血球系細胞で重要な役割を果たしていることが提唱されている。しかし、G1HEのGATA配列に結合する高分子量複合体はE2Aを含んでおらず、文献的に示されたものと構成分子が異なることが考えられた。このG1HEのGATA配列、double GATA配列などを介して、GATA-1または他のGATA因子が転写制御のネットワークを形成し、GATA-1遺伝子の赤血球特異的発現の分子的基盤となっていると考えられる。

G1HEの中心配列は赤血球系の発現には十分であるが、巨核球での発現にはさらに長い領域を必要とした。従って、G1HEに複数の制御領域(GATA配列及び巨核球系エンハンサー)が含まれると考えられる。GATA-1の組織特異性に関与する領域として、G1HE, CACCC領域、イントロン領域が同定されたが、これらは各組織で分化段階に応じて利用され、複雑な転写制御が行われていると考えられ、生体内での複雑な転写制御機構の解明には、更なる解析が必要である。

この研究により、GATA-1遺伝子の発現に重要な4つの転写制御領域と、そこに関与する制御因子のいくつかを明らかにすることができた。その結果GATA-1の発現と同じ時期、組織で遺伝子発現を誘導できる短いベクターを作成することが可能となり、今後の造血系の研究や、ひいては臨床応用にも役立つことが期待される。

審査の結果の要旨

GATA-1は血球系で特異的に発現している転写因子であり、造血に必要な事が知られている。本研究は、GATA-1遺伝子の転写制御領域と制御因子について研究したものである。手法として、培養細胞への一過性遺伝子導入、ゲルシフトアッセイ等の *in vitro* の実験系のみならず、トランスジェニックマウスやノックアウトマウスを用いた個体レベルでの研究に踏み込んでいる。特にGATA-1遺伝子の転写制御領域をトランスジェニックマウスを用いて丹念に調べている点が大きく評価できる。

実験の結果、GATA-1遺伝子の発現に重要な4つの領域を同定し、特にG1HE領域について詳しい解析を行った。G1HE領域の中心配列(149bp)は、GAT配列、GATA配列、2つのE-box配列を含み、GATA-1遺伝子の赤血球での発現にはGATA配列のみで十分であったが、巨核球での発現には更に広い領域が必要であった。G1HE領域のGATA配列には、全ての血球系GATA因子群が結合したが、結合複合体にはE-box結合因子E2Aは含まれなかった。また、別のE-box結合因子SCLは、GATA-1遺伝子の発現に必要なでないことが明らかにされた。更に、G1HE領域は、培養細胞を用いた一過性遺伝子導入実験では、古典的エンハンサーの定義を満たすが、トランスジェニックマウスを用いた解析では、プロモーターに対する向きやプロモーターの種類を変えると転写促進活性を失う等の新知見も得られた。

本研究は、個体レベルにおけるGATA-1遺伝子の発現調節に関して多くの点を明らかにしたものと高く評価できる。今後は、GATA-1遺伝子発現調節ネットワークの解析や臨床的な応用へ進む事が期待される。

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。