

氏名(本籍)	千 葉 智 樹 (岩手県)		
学位の種類	博 士 (医 学)		
学位記番号	博 甲 第 1,171 号		
学位授与年月日	平 成 6 年 1 月 31 日		
学位授与の要件	学位規則第 5 条第 1 項該当		
審査研究科	医 学 研 究 科		
学位論文題目	エリスロポエチン受容体を介した赤血球分化の分子機序		
主 査	筑波大学教授	薬学博士	後 藤 勝 年
副 査	筑波大学教授	医学博士	阿 部 帥
副 査	筑波大学教授	医学博士	中 内 啓 光
副 査	筑波大学教授	医学博士	浜 口 秀 夫
副 査	筑波大学助教授	理学博士	石 井 哲 郎

論 文 の 要 旨

<目的>

血液細胞は全て多能性幹細胞から派生すると考えられており、各細胞系列への分化は複雑なサイトカインネットワークによって制御されている。赤芽球の増殖分化を刺激するサイトカインはエリスロポエチン (Epo) であり、それに対するレセプター (EpoR) は赤芽球細胞 (BFUe, CFUe) の膜表面に組織特異的、分化段階特異的に発現している。赤芽球細胞は Epo の刺激によって成熟赤血球へと最終分化することから、多能性幹細胞の細胞表面に EpoR の発現する機構は、赤血球系への分化に重要であると考えられる。そこで、本研究では EpoR 遺伝子の組織特異的、分化段階特異的発現様式を明らかにし、EpoR 刺激が如何なる細胞内シグナル伝達を介して赤血球分化誘導を惹起するかを解明することを目的として以下の研究を行った。1) EpoR 遺伝子の発現制御機構を CAT アッセイ、ゲルシフトアッセイ、DNaseI フットプリンティング法を用いて解析し、2) EpoR 刺激後の細胞内シグナル伝達の一環として、細胞内蛋白のチロシンリン酸化を調べると同時に、キメラレセプターを発現させて EpoR 分子の如何なるドメインがシグナル伝達に重要な役割を果たしているかを調べ、3) それが最終的に赤血球への分化とどのように関連しているかを解析した。

<対象及び方法>

EpoR 染色体遺伝子のプロモーター領域をクロラムフェニコール・アセチル・トランスフェラーゼ (CAT) 遺伝子の upstream に挿入したレポータープラスミドを、マウス GATA-1cDNA を動物細胞発現プロモーター下流に挿入したエフェクタープラスミド存在下又は非存在下で、サル腎臓由来の COS 7 細

胞に導入して培養し、CAT アッセイに供した。GATA-1を発現している SKT 細胞と、発現していない COS 7 細胞の核の抽出液をラベルした DNA プローブとハイブリダイズさせ、アクリルアミドゲルで電気泳動 (100V, 7 時間) してゲルシフトアッセイを行った。一方、ラベルした DNA 断片と両細胞の核抽出液をインキュベートした後、DNase 1 で部分消化し、シーケンスゲルにて電気泳動 (2500V, 4 時間) した後フットプリンティング像を得た。

マウス EpoRcDNA の全長を発現ベクターの下流に挿入して発現プラスミドを作成した。キメラレセプターのプラスミドは、EpoRcDNA の細胞膜貫通領域の外側又は内側の部分を他のサイトカイン (IL-2 及び IL-3) のそれぞれと交換して作成した。これらのプラスミドを IL-3 依存性マウスプロ B リンパ球株である Ba/F 3 細胞に導入してそれぞれのレセプターを発現させ、サイトカインで刺激後、細胞内蛋白を調整した。一定量の蛋白を SDS ポリアクリルアミドゲルにて一次元又は二次元電気泳動を、更に IEF ゲルにて等電点電気泳動を行った。ニトロセルロース膜へトランスファー後、抗ホスホチロシン抗体にてウェスタンブロットを行ない、蛋白のチロシンリン酸化 (シグナル伝達) の解析を行った。

上記 Ba/F 3 細胞を Epo で刺激した時としない時の RNA をノーザンブロット解析し、 β -グロビン及び GATA-1 のそれぞれ mRNA の発現を解析した。一方、細胞内蛋白の SDS ポリアクリルアミドゲル又は酸性ウレアゲルによる電気泳動後、ウェスタンブロットを行ってヘモグロビン及び GATA-1 それぞれの蛋白の検出を行い、赤血球に特異的な形質や転写因子の発現と赤血球分化誘導との関連を調べた。

〈結果及び考察〉

1. CAT アッセイの結果、EpoRcDNA の開始コドン上流約 200bp に存在する GATA モチーフに、赤芽球特異的転写因子 GATA-1 が結合して EpoR 遺伝子の転写を活性化することが明らかとなった。この際、複数存在する GATA モチーフのうち、開始コドン上流 195~200bp に存在する GATA モチーフ一個で十分であった。ゲルシフト及びフットプリントアッセイから、この部位に赤血球に特異的な核内因子 (蛋白) が結合することが判明した。

ノーザンブロット解析から、GATA-1 mRNA は未分化の赤芽球細胞にすでに発現しており Epo の刺激による分化誘導と共にその発現が上昇することや赤血球特異性などから、この因子は GATA-1 そのものであることが示唆された。

2. Ba/F 3 細胞は IL-3 依存性に増殖し、Epo や IL-2 には応答しなかったが、それぞれのレセプターを発現させた細胞では各リガンドの刺激により増殖した。即ち、導入したレセプター刺激は細胞内にシグナルを伝達し、機能を発揮し得るものであることを物語っている。IL-3 及び Epo 刺激は共に 55, 72, 90, 160kDa の細胞内蛋白をチロシンリン酸化したのに対し、IL-2 刺激は 55, 90kDa の蛋白のみチロシンリン酸化した。興味深いことに、キメラレセプターに関する実験から、Epo に特異的なシグナル伝達は EpoR の細胞外ドメインによって決められるということである。これは、レセプターの細胞外領域と相互作用する新たな膜貫通分子を介し、特定のチロシンキナーゼがサイトカインレセプターの細胞内領域と複合体を形成することによりシグナル伝達が行われる可能性を示唆し

ている。EpoR の細胞内領域に存在する WS モチーフ及び IL-2R β と相同性の高い領域を含む91個のアミノ酸が必須であることが判明したが、それがどのようにシグナル伝達に係わるかは今後の課題である。

3. EpoR を導入した Ba/F 3 細胞は Epo 依存性に増殖し、Epo 存在下に培養すると β -グロビン mRNA のみならず、グロビン蛋白 (主として α -及び β -グロビン鎖) を発現することが明らかとなった。これらのことは、EpoR を介した Epo のシグナル伝達が Ba/F 3 細胞に赤血球特異的な形質発現を誘導することを示唆するものである。更に、Epo で刺激した Ba/F 3 細胞では、赤血球特異的転写因子 GATA-1 の mRNA 及び GATA-1 蛋白自体の発現も促進されていた。キメラレセプターを誘導した細胞に於ける解析から、これらの mRNA や蛋白の発現には、やはり EpoR の細胞外領域が Epo の作用には必須であった。

審 査 の 要 旨

本研究は、エリスロポエチン受容体 (EpoR) の刺激により、赤血球が分化する際の分子機構を探る目的で、① EpoR を有しない細胞 (COS 7 細胞など) に EpoR cDNA を導入して、受容体遺伝子の発現制御機構を調べ、② EpoR 刺激によって惹起される細胞内シグナル伝達に、受容体の如何なる領域が必須か、そして③そのシグナル伝達が細胞内でどのような遺伝子の発現と赤血球に特異的な形質を誘導して赤血球の分化につながるかを検討している。その結果、① EpoR 遺伝子の転写活性は、開始コドン上流に存在する一個の GATA モチーフに赤血球に特異的な蛋白 (おそらく GATA-1) が結合することによって促進されること、② Epo によって引き起こされる特有の細胞内シグナル伝達 (蛋白リン酸化) は、EpoR の細胞外領域によって一義的に決まること、③ EpoR を介したシグナル伝達が赤血球に特異的な β -グロビン mRNA 発現とグロビン蛋白の合成を促進し、赤血球の分化につながることを示唆された。以上のように、本研究によって赤血球分化に関する多くの知見が得られ、その一部は国際的一流誌にも掲載されるなど、高く評価されるものである。

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。