

氏名	黒柳 裕一
(ふりがな)	(くろやなぎ ゆういち)
学位の種類	博士(医学)
学位授与番号	乙 第 号
学位審査年月日	平成31年2月6日
学位授与の要件	学位規則第4条第2項該当
学位論文題名	cAMP differentially regulates $\gamma$ -globin gene expression in erythroleukemic cells and primary erythroblasts through c-Myb expression (K562細胞株と正常赤芽球でcAMPが $\gamma$ グロビン遺伝子発現に異なる制御をするのはc-Myb遺伝子発現の有無による)
論文審査委員	(主) 教授 矢野 貴人 教授 瀧谷 公隆 教授 高井 真司

### 学位論文内容の要旨

#### 《研究目的》

ヒトの $\beta$ グロビン遺伝子座には、5つの $\beta$ 様グロビン遺伝子(5'- $\epsilon$ -G $\gamma$ -A $\gamma$ - $\delta$ - $\beta$ -3')が存在し、上流には遺伝子座制御領域(LCR)が存在する。LCRは発生段階に応じて5つの $\beta$ 様グロビン遺伝子発現を制御する。私たちは $\gamma$ グロビン遺伝子発現においてcAMPが果たす役割に注目した。その中でcAMPシグナル伝達経路を活性化すると、 $\gamma$ グロビン遺伝子発現は赤芽球系白血病細胞由来のK562細胞株では抑制されるが、成人赤芽球では逆に増強することを発見した。本研究は $\gamma$ グロビン遺伝子発現調節で、K562細胞株と成人赤芽球でcAMPシグナル伝達経路が異なる制御をする機序を明らかにすることが目的である。

## 《方法》

### グロビン遺伝子 mRNA 発現量の解析

K562 細胞株と正常赤芽球でのグロビン遺伝子の発現は、グロビン mRNA をプライマー伸長法で同定、定量した。

### マイクロアレイ解析

K562 細胞株および成人赤芽球から抽出した total RNA から cDNA を合成し、それを鋳型に試験管内転写反応を行うことによりビオチン標識した cRNA プローブを調整し、マイクロアレイ解析を行った。

### c-Myb 遺伝子 mRNA およびタンパク質発現量の解析

c-Myb 遺伝子の発現は、mRNA をノーザンブロットィング法 (NB 法) で同定、定量し、また c-Myb タンパク質の発現をウエスタンブロットィング法で同定、定量した。

### K562 細胞株での c-Myb 遺伝子の強発現

c-Myb cDNA を pcDNA3 にクローニングした c-Myb 発現ベクター (pCMV-c-Myb) を作製し、K562 細胞株に遺伝子導入した。

### c-Myb 遺伝子ノックダウン

K562 細胞株に c-Myb の siRNA を導入し、NB 法で  $\gamma$  グロビン mRNA 発現量を定量した。

### ルシフェラーゼアッセイ

LCR と  $\gamma$  グロビンプロモーター領域を含む配列を、ルシフェラーゼ遺伝子上流にクローニングしたベクター (HS2Gpro.35Luc) を作製した。本ベクターおよび c-Myb 発現ベクターを K562 細胞株に共遺伝子導入した後、ルシフェラーゼ活性をルミノメーターで定量的に測定した。

### 細胞内 cAMP 濃度の測定

正常胎児赤芽球および正常成人赤芽球で、細胞内 cAMP 濃度を酵素免疫測定法で定量した。

## 《結果》

- 1) K562 細胞株では細胞内 cAMP を上昇させると  $\gamma$  グロビン遺伝子の発現は抑制されたが、成人赤芽球では増強した。
- 2) K562 細胞株と成人赤芽球での様々な遺伝子の発現レベルをマイクロアレイ解析により比較したところ、赤血球分化の調節に関与していることが知られている c-Myb 遺伝子の発現が、K562 細胞株で成人赤芽球より 80 倍高発現していた。
- 3) K562 細胞株では c-Myb タンパク質は高発現していたが、成人赤芽球では発現していなかった。
- 4) K562 細胞株で細胞内 cAMP を上昇させると c-Myb mRNA 発現には大きな変化はなかったが、c-Myb タンパク質の発現が 6~8 倍増加した。
- 5) K562 細胞株で c-Myb 遺伝子を強制発現させると  $\gamma$  グロビン mRNA 発現が減弱した。その一方、c-Myb 遺伝子ノックダウンを行うと  $\gamma$  グロビン mRNA 発現が 4 倍以上増加した。
- 6) K562 細胞株に、一定量の HS2Gpro.35Luc ベクターと様々な量の pCMV-c-Myb ベクターを共遺伝子導入すると、pCMV-c-Myb ベクターの量依存的に  $\gamma$  グロビン遺伝子プロモーター活性が低下した。
- 7) 細胞内 cAMP 濃度は、胎児赤芽球では成人赤芽球の 7 倍以上高かった。

## 《考察および結論》

K562 細胞株では c-Myb 遺伝子が高発現しており、cAMP 濃度を上昇させると同遺伝子発現が何らかの転写後調節メカニズムによりさらに増強した。K562 細胞株で c-Myb 遺伝子を強制発現すると  $\gamma$  グロビン遺伝子発現が低下し、c-Myb 遺伝子の発現をノックダウンさせると  $\gamma$  グロビン遺伝子発現が上昇した。K562 細胞株で、c-Myb 遺伝子が  $\gamma$  グロビン遺伝子発現に対して抑制的に働く機序は、 $\gamma$  グロビン遺伝子プロモーター活性を低下させていることが原因であった。その一方で、正常成人赤芽球では c-Myb は発現しておらず、c-Myb による  $\gamma$  グロビン遺伝子発現の抑制機序が作用しないと考えられた。細胞内 cAMP 濃度の検

討から、 $\gamma$ グロビン遺伝子を高発現している胎児期は赤芽球内 cAMP 濃度が高く、同遺伝子を発現しない成人期は赤芽球内 cAMP 濃度が低かった。このことから、細胞内 cAMP 濃度が造血時期特異的に制御され、 $\gamma$ グロビン遺伝子発現が調節されていることが示唆された。

これらの結果から、K562 細胞株と正常赤芽球との間で cAMP シグナル伝達経路の活性化が $\gamma$ グロビン遺伝子発現に異なる制御をするのは、 $\gamma$ グロビン遺伝子発現に対して抑制的に働く c-Myb 遺伝子発現の有無によることが明らかになった。つまり c-Myb は赤血球系細胞において $\gamma$ グロビン遺伝子発現の調節様式を決定づけるのに重要な役割を果たしていると考えられた。

## 論文審査結果の要旨

臨床現場において、 $\beta$ -サラセミアや鎌状赤血球症などの異常 $\beta$ ヘモグロビン血症患者は、胎児型ヘモグロビン ( $\gamma$ グロビンが重要な構成要素) が発現するほど臨床症状が軽減することが知られている。そのため $\gamma$ グロビン遺伝子発現の調節機序についての研究が世界中で盛んに行われている。申請者は $\gamma$ グロビン遺伝子発現において cAMP が果たす役割について注目し研究を進め、以下の結果を得た。

- 1)  $\gamma$ グロビンを強く発現している胎児赤芽球細胞内 cAMP 濃度は成人赤芽球と比して高い。
- 2) cAMP シグナル活性を促進すると成人赤芽球は $\gamma$ グロビン遺伝子発現を増強する。
- 3) cAMP シグナル活性を抑制すると胎児赤芽球の $\gamma$ グロビン遺伝子発現が減弱する。
- 4) 赤芽球系白血病細胞由来の K562 細胞株では、cAMP シグナル伝達経路を活性化すると $\gamma$ グロビン遺伝子発現が減弱する。
- 5) K562 細胞株では、cAMP により c-Myb タンパク質の発現が誘導され、c-Myb タンパク質により $\gamma$ グロビン遺伝子の転写が抑制される。
- 6) 成人赤芽球では c-Myb タンパク質は発現していない。

本論文は、 $\gamma$ グロビン遺伝子発現調節において、K562 細胞株と正常成人赤芽球で cAMP シグナル伝達経路が異なる制御をする機序が、c-Myb 発現の有無によることを明らかにした。本論文の成果は、 $\gamma$ グロビン遺伝子発現の研究において有用な基礎的知見を提供すると考えられる。

以上により、本論文は本学学位規程第 3 条第 2 項に定めるところの博士 (医学) の学位を授与するに値するものと認める。

(主論文公表誌)

Biochemical and Biophysical Research Communications  
344(3): 1038-1047, 2006