

論 文 内 容 要 旨

The Krüppel-like zinc finger transcription factor, GLI-similar 1, is regulated by hypoxia-inducible factors *via* non-canonical mechanisms.

(Krüppel 様ジンクフィンガー型転写因子である GLI-similar 1 は低酸素誘導性転写因子の非古典的機構によって制御されている)

Biochemical and Biophysical Research Communications, 441: 499-506, 2013.

主指導教員：弓削 類 教授

(医歯薬保健学研究院生体環境適応科学)

副指導教員：濱田泰伸 教授

(医歯薬保健学研究院生体機能解析制御科学)

副指導教員：片岡 健 教授

(医歯薬保健学研究院成人健康学)

Khalesi Elham

(保健学研究科保健学専攻)

【目的】

Krüppel 様ジンクフィンガー型転写因子 GLI-similar 1 (GLIS1) は, 人工多能性幹細胞 (induced Pluripotent Stem Cell: iPS 細胞) 誘導において, がん遺伝子でもある転写因子 MYC に代わり, OCT3/4 (POU5F1), SOX2, KLF4 と協調的に細胞の初期化 (幹細胞化) を強く促進するが, 腫瘍原性はないことが, ごく最近示されました。しかしながら, GLIS1 の分子機能やその制御機構はほとんど明らかになっていませんでした。そこで, 将来的な再生医学応用をめざした iPS 細胞作製法開発に向けて, *GLIS1* 制御機構, 特に iPS 細胞誘導を促進する事が示されている低酸素環境下における転写制御機構の解明を試みました。

【材料・方法】

様々な細胞株 (乳がん細胞 5 種, 肺がん細胞 1 種, 肝がん細胞 1 種) を様々な条件下 (通常酸素下 21% pO₂, 低酸素下 1% pO₂ など) にて培養後, 全 RNA や全蛋白を抽出し, real-time RT-PCR 法やウェスタンブロッティング法にて発現解析を行いました。また, MCF-7 乳がん細胞のゲノム DNA を鋳型として, 様々な長さの *GLIS1* 遺伝子 5' 上流領域を PCR 法により特異的に増幅して, pGL4.26 ルシフェラーゼレポータープラスミドにサブクローニングし, 遺伝子発現解析用のレポーター遺伝子を作製しました。作製したレポーター遺伝子と様々な転写因子 (HIF-1 α , HIF-2 α , JUN, FOS, MYC など) 発現プラスミドを遺伝子導入試薬 Trans IT-LT1 にて MCF-7 細胞に導入し, ルシフェラーゼ活性を測定する事により, プロモーター制御機構の詳細について検討しました。

【結果】

1) 様々な細胞株において *GLIS1* 遺伝子発現が観察されたが, その発現量は様々でした。2) 今回用いた細胞株の中では MCF-7 細胞において, *GLIS1* 遺伝子発現量は最も高かった。3) 低酸素環境下において培養した幾つかの細胞株では, 通常酸素下よりも *GLIS1* 遺伝子発現量が増加しました。4) *GLIS1* 遺伝子発現量は, MCF-7 細胞において, 低酸素環境下におかれた時間に依存して増加しました。5) *GLIS1* 蛋白発現量も遺伝子同様に低酸素環境下にて増加しました。6) クローン化した *GLIS1* 5' 上流領域は強い転写 (プロモーター) 活性を示し, その活性は低酸素環境下にて増加しました。7) 同プロモーター領域内では, *GLIS1* 遺伝子転写開始点近傍に低酸素応答領域が存在する事が示唆されましたが, 典型的な低酸素応答配列は認められませんでした。8) 低酸素応答性転写因子の 2 つのアイソフォームの内, HIF-2 α がより特異的に *GLIS1* プロモーター制御に関わっている事が示されました。9) データベース解析から示唆された, AP-1 ファミリーに属する転写因子 JUN や FOS が HIF-2 α と協調的に *GLIS1* プロモーターを活性化する事が示されました。

【考察】

様々な細胞株の発現解析から、iPS 細胞誘導因子として示された *GLIS1* 発現量には細胞間の差異が存在することが明らかとなりました。また、興味深い事に、iPS 細胞誘導を促進する事が示されている低酸素環境下にて、*GLIS1* 発現量が増加する事が今回初めて明らかとなり、iPS 細胞誘導の新しい機構を示す事ができました。詳細な *GLIS1* 遺伝子プロモーター解析から、低酸素環境下での発現増加は転写量の亢進によること、低酸素応答性転写因子 HIF-2 α と AP-1 ファミリーに属する転写因子群が協調的にプロモーターを活性化するという新しい機構が存在する事が明らかとなりました。本研究により、低酸素環境下で複数の転写因子が協調的制御を行い、*GLIS1* 遺伝子発現を活性化し、細胞の初期化を促進するという、iPS 細胞誘導の新しい機構が明らかとなりました。将来的な再生医療開発にむけて、より安全で、より効率的な iPS 細胞作製法開発へ、同機構の応用展開に期待がもたれました。