

平成16年度自治医科大学医学部 研究奨励賞研究成果報告

器官形成を司る Six タンパク質の標的遺伝子同定と遺伝子制御ネットワーク

人間生物学系専攻 3 年 安藤 善一

1. 背景と目的

Six ファミリー遺伝子は、ショウジョウバエの複眼形成に必須な *sine oculis* のホモログとして同定されたホメオボックス遺伝子であり、マウスおよびヒトでは *Six1* から *Six6* の 6 種類が知られている。その中で、マウス *Six1* と *Six4* は、胚発生過程における発現パターンが酷似し、また、これらの標的遺伝子である *myogenin* のプロモーターを同様に活性化する。しかしながら、これら遺伝子の欠損マウスの表現型はまったく異なる。このことは、*Six1* タンパク質および *Six4* タンパク質が生体において相異なる機能をもつことが原因であると考えられた。

本研究では、*Six1* または *Six4* タンパク質に特異的または共通の転写制御機能を明らかにするため、標的候補遺伝子のレポーターを比較し、それら標的遺伝子の発現調節メカニズムについて解析した。

2. 方法

Six1 および *Six4* タンパク質の標的候補遺伝子は、マウス後腎間葉に由来する mK4 細胞に VP16 融合 *Six1* または VP16 融合 *Six4* タンパク質を過剰発現させ、特異的に誘導される遺伝子を cDNA マイクロアレイ (Agilent 社, 20,371 遺伝子) を用いてスクリーニングした。*Six1* および *Six4* タンパク質による標的遺伝子の調節は一過性形質転換を用いて解析し、プロモーター領域における両タンパク質の結合エレメントは、ゲルシフト法を用いて解析した。

3. 結果

Six1 タンパク質特異的に誘導される遺伝子 300 個、*Six4* タンパク質特異的に誘導される遺伝子 86 個および両タンパク質共通に誘導される遺伝子 63 個を標的候補遺伝子として同定でき

た。次に同定された標的候補遺伝子の *Six1* および *Six4* タンパク質に対する反応性を、リポーター遺伝子法を用いて確認した。*Six1* タンパク質特異的な標的候補遺伝子として同定された *growth arrest specific 1* は、*Six1* および *Six4* タンパク質の量依存的に正に制御された。一方、*chloride channel 5* は、*Six1* および *Six4* タンパク質の量依存的に負に制御された。両タンパク質に共通の標的候補遺伝子として同定された *sodium-potassium-chloride co-transporter (NKCC1)* は、主として *Six1* タンパク質により量依存的に正に制御され、標的遺伝子によって *Six1* と *Six4* タンパク質による制御のされ方が異なることが明らかとなった。

これらの標的候補遺伝子のうち、*NKCC1* プロモーター領域について詳細な解析を行ったところ、転写開始点を +1 として -13/-10, +65/+74 および +89/+92 の周辺に 3ヶ所の *Six1* タンパク質特異的な結合部位が存在し、+135/+138 の周辺に両タンパク質共通の結合部位が 1ヶ所存在することが明らかとなった。置換変異を導入したリポーター遺伝子法の結果から、両タンパク質が同定されたこれらの結合部位を介して *NKCC1* プロモーターを活性化していることがわかった。

4. 考察

生体における *Six1* および *Six4* タンパク質の機能の相違は、標的遺伝子レポーターと DNA 結合特異性の一方または両方の違いによるものであると考えられた。

マウス間葉系幹細胞を用いた同種造血幹細胞移植後移植片対宿主病制御に関する研究

地域医療学系専攻 3 年 翁 家国

(背景) 骨髄由来間葉系幹細胞 (MSC) の造血支持能力と免疫抑制作用が注目されている。既