慶應義塾大学学術情報リポジトリ
Keio Associated Repository of Academic resouces

Title	Functional conservation of platelet glycoprotein V promoter between mouse and human megakaryocytes.
Sub Title	マウスおよびヒト巨核球で機能保存された血小板膜糖蛋白V(GPV) プロモーター領域の解析
Author	佐藤, 範英
Publisher	慶應医学会
Publication year	2003
Jtitle	慶應医学 (Journal of the Keio Medical Society). Vol.80, No.1 (2003. 3) ,p.3-
JaLC DOI	
Abstract	
Notes	号外
Genre	Journal Article
URL	https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=AN00069296-20030303-0003

慶應義塾大学学術情報リポジトリ(KOARA)に掲載されているコンテンツの著作権は、それぞれの著作者、学会または出版社/発行者に帰属し、その権利は著作権法によって保護されています。引用にあたっては、著作権法を遵守してご利用ください。

The copyrights of content available on the KeiO Associated Repository of Academic resources (KOARA) belong to the respective authors, academic societies, or publishers/issuers, and these rights are protected by the Japanese Copyright Act. When quoting the content, please follow the Japanese copyright act.

Functional conservation of platelet glycoprotein V promoter between mouse and human megakaryocytes.

（マウスおよびヒト巨核球で機能保存された血小板膜糖蛋白V（GPV）プロモーター領域の解析）

佐藤　範英

内容の要旨

巨核球、血小板の分化機構を理解するため、血小板・巨核球系に特異的に発現する血小板特異膜糖蛋白の発現機構の解析が行われているが、巨核球の成熟過程における一連の遺伝子群の発現制御機構の研究には、巨核球成熟に伴って発現が上昇する分子を対象として解析を行うのが適していると考えられる。

血小板特異膜糖蛋白であるGPVは巨核球のより成熟した段階になって発現してくることが明らかとされ、その発現調節機構の解析は巨核球特異的、分化段階依存性の蛋白発現の制御機構の研究に適している。本研究では、マウスGPV遺伝子の5'非翻訳領域を含んだ遺伝子配列を用いて、そのプロモーター活性に関する解析を行った。方法として、マウスGPVの-481/+22 5'側遺伝子断片の正常マウス骨髄細胞と種々のヒト細胞株におけるプロモーター活性をルシフェラーゼおよびgreen fluorescence protein（GFP）の２つのレポータージーンアッセイ系を用いて測定した。

TPO添加マウス骨髄細胞培養系においてGFPをレポーターとして、GPV5'遺伝子断片のプロモーター活性を解析したところ、GFP発現は、巨核球のみに認められた。ヒト巨核球細胞株Damiを用いた解析においても高度のGFP発現が認められ、遺伝子断片が巨核球において十分なプロモーター活性を有することが明らかとなった。次に、デュアルルシフェラーゼアッセイを用いて解析を行ったところ、全長-481/+22 5'遺伝子断片は、ヒトおよびマウス巨核球細胞株において、種々のプロモーター活性を示したが、非巨核球系細胞株においてはプロモーター活性を示さず、プロモーター活性は巨核球系細胞に特異的であることが示唆された。また、十分なプロモーター活性は、明らかなGPVmRNAの発現を認める細胞株にのみ認められ、各細胞株における血小板特異抗原の細胞表面への発現パターンと、GPVプロモーター活性との間に一定の相関が認められたことから、解析に用いたGPV5'遺伝子断片は、分化段階依存性の発現調節に十分な機能を有していることが示唆された。

GPV5'遺伝子断片のdeletion mutantおよびpoint mutationを用いた解析では、血小板特異的遺伝子に普遍的に認められるcis-acting motifである-75と-46に位置するGATAとEts motifがプロモーター活性に必須であることが示唆された。

以上の解析の結果、GPVプロモーターは血小板特異的遺伝子の普遍的な特徴を有し、巨核球特異的かつ分化段階依存性のGPV遺伝子発現調節機構は、ヒトとマウスの間で高度に保存されていることが明らかとなった。細胞株あるいは骨髄細胞培養系を用いたGPV遺伝子転写調節機構の解析は巨核球の成熟過程の解明に有用な情報をもたらすことが期待される。

論文審査の要旨

巨核球系細胞は、核多倍体化、血小板形成といった特異な分化様式を示し、その分化には非常に特異なメカニズムが働いていると考えられているが、その詳細を明らかになっておらず、その分化機構の詳細を明らかにすべく、血小板特異膜糖蛋白の発現機構の解析が行われている。本研究では、マウス遺伝子を用いて巨核球分化後期の分子マーカーである血小板特異膜糖蛋白GPVのプロモーター解析を行い、巨核球特異的かつ分化段階依存性のGPV遺伝子の発現調節機構が種の違いを越えて高度に保存されていることを示した。また、その転写活性には、GATAおよびEts認識配列が重要であることを示し、巨核球特異的な転写調節機構の一端を明らかにした。

審査ではまず、GPV遺伝子の上流および下流にわたる広範囲な遺伝子領域に関しては検討がなされておらず、一部の領域のみに的を絞った限定的な解析結果であるとの指摘とともに、各細胞株において、EMSAの系を用いた転写因子モチーフの解析や、PMAを使用したプロモーター活性の解析等を行うことによって転写調節機構について、さらなる知見が得られる可能性があるとの指摘がなされた。ヒトGPVとマウスGPVのプロモーター解析結果の違いについて質問がなされ、解析した範囲については、概ね同様であるとの回答がなされた。これに対し、両者の解析結果は、保存された転写因子モチーフの重要性が示された点で共通しているが、幾つかの相違点も認められ、それらの相違が生体内において、より明確な差として現れる可能性もあり、その評価は慎重に行うべきとの指摘がなされた。また、今回の解析結果が、どの程度生体における発現機構を反映すると予測しているかとの質問がなされ、実際の遺伝子発現機構は、ゲノムの高次構造のレベルから調節がなされており、今回の解析結果がそのまま生体内に反映される保証はないが、それに対して結論を出す一つの手段としてtransgenic mouseの系が考えられていると回答された。今後の方向性についての質問がなされ、今回の解析結果から重要性が示された、GATAやEts familyの転写因子と相互作用を示す転写因子を対象として解析を行って行きたいとの回答がなされた。

以上のように、本研究はさらに検討されるべき課題は残しているが、巨核球特異的な転写調節の一端を明らかにし、それが種の違いを越えて保存されている可能性を示したことから、造血研究の立場から非常に有意義で価値ある研究であると評価された。

論文審査担当者　主査　内科学　池田　康夫
先端医科学　河上　裕　　病理学　岡田　保典
微生物学　小安　重夫　分子生物学　清水　信義

学力確認担当者：
審査委員長：河上　裕

試問日：平成14年９月18日