

氏名	平田普三
学位(専攻分野)	博士(理学)
学位記番号	理博第2232号
学位授与の日付	平成12年3月23日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
研究科・専攻	理学研究科生物科学専攻
学位論文題目	コラーゲン特異的分子シャペロン HSP 47 の cell type 特異的発現は2つの cis-element によって規定されている

論文調査委員 (主査) 教授 永田和宏 教授 米原 伸 教授 井口八郎

### 論文内容の要旨

コラーゲンに結合能をもつ熱ショックタンパク質 HSP 47 は、小胞体内でプロコラーゲンの修飾や三本鎖形成などに関与し、コラーゲンの生合成に必須の分子シャペロンとして報告されている。HSP 47 はコラーゲンを産生する組織、細胞では発現するが、コラーゲンを産生しない組織、細胞では発現が認められない。申請者はマウス及びヒトの培養細胞、またトランスジェニックマウスを用いて、hsp 47 遺伝子の発現制御領域を解析し、HSP 47 の cell type 特異的発現機構の分子レベルでの解明を目指した。その結果、hsp 47 遺伝子の上流プロモーター領域と下流イントロン領域にコラーゲンを産生する組織、細胞での発現という HSP 47 の発現の cell type 特異性に関わるシスのエレメントが存在することを発見した。本論文でその解析結果を報告している。

HSP 47 は熱ショックタンパク質であり、熱ストレス時には発現が転写レベルで一過的に増大するが、非ストレス条件下ではコラーゲンと共発現することが知られている。熱ショックによる発現誘導は十分に解析されているが、非ストレス条件下での cell type 特異的発現の機構は全く不明であった。申請者はこれに関与する DNA、タンパクを明らかにする目的で hsp 47 遺伝子のプロモーター解析を試みた。マウスのゲノムライブラリーをスクリーニングし、hsp 47 のプロモーター領域 5.5 kb をクローニングした。レポーターとしてルシフェラーゼ遺伝子を用いて、さまざまな領域の転写活性をコラーゲンを産生する細胞 (BALB/c 3 T 3 細胞, MC 3 T 3 -E 1 細胞, HeLa 細胞, HOS 細胞), コラーゲンを産生しない細胞 (F 9 細胞, 293 細胞, Jurkat 細胞) で調べ、コラーゲンを産生する細胞における HSP 47 の発現にはプロモーター領域 280 bp と下流イントロンが必要であることを *in vitro* で明らかにした。lacZ 遺伝子を発現するトランスジェニックマウスを X-gal 染色で解析することにより、コラーゲンを産生する組織での HSP 47 の発現はこの 2 つの領域により十分に規定されることを *in vivo* で確認した。

申請者はさらに必須のエレメントを狭め、上流プロモーター領域 280 bp の中では転写開始点から上流-210 bp の位置にある Sp1 タンパク結合部位が重要で、ここには Sp3 タンパクと未知のタンパクが結合することを証明した。また、下流イントロン領域の中では第 I イントロン中の 500 bp の領域が重要で、ここにはコラーゲンを産生する細胞の抽出液だけでタンパク質の結合がみられることを示した。このことからイントロン中の 500 bp の領域が HSP 47 の発現の cell type 特異性を規定していることが示唆された。近年、コラーゲンの組織特異的発現に関わるシスのエレメントも解析されてきているが、コラーゲンの場合にもプロモーター領域とイントロンの領域に必須のシスのエレメントが存在することが報告されている。本研究により分子シャペロンである HSP 47 とその基質であるコラーゲンとともにプロモーターとイントロンという類似した機構で cell type 特異的発現が規定されることが明らかとなった。

### 論文審査の結果の要旨

コラーゲン特異的分子シャペロン HSP 47 はコラーゲンを産生する組織・細胞では発現がみられるが、コラーゲンを産生

しない組織・細胞では発現が認められない。申請者はマウスとヒトの培養細胞を用いた *in vitro* の解析、またトランスジェニックマウスを用いた *in vivo* の解析を行い、コラーゲンを発現する組織・細胞における HSP 47 の発現の機構を明らかにした。

HSP 47 の発現は転写レベルで調節されていることが報告されているので、プロモーター解析により非ストレス条件下での発現を調べるために *hsp 47* ゲノムをクローニングした。トランスフェクション及びルシフェラーゼアッセイの解析によりコラーゲンを産生する細胞における HSP 47 の発現には上流プロモーター 280 bp と下流イントロン領域がシスのエレメントとして必要であることを明らかにした。これらの領域でコラーゲンを産生する組織での HSP 47 の発現が十分に規定されることを証明した。上流プロモーター 280 bp で必須のエレメントが転写開始点から -210 bp の位置にある Sp 1 結合部位であることを明らかにし、ここに Sp 3 タンパクと未知のタンパクが結合することを示した。Sp 1 結合部位に結合するタンパクとしては Sp 1 ファミリーの Sp 1 タンパク、Sp 2 タンパク、Sp 3 タンパク、Sp 4 タンパクが知られているが、申請者が結合を確認した未知のタンパクはこのどれでもなく、Sp 1 ファミリーに属する新しいタンパクであることが予想される。下流のイントロン領域での必須のエレメントは第 I イントロン中の 500 bp 領域であることを明らかにし、コラーゲンを産生する細胞ではこの 500 bp の DNA に何らかのタンパクが結合するが、一方でコラーゲンを産生しない細胞ではタンパクの結合が認められないことを示した。このことはコラーゲンを産生する組織・細胞では HSP 47 が発現し、コラーゲンを産生しない組織・細胞では HSP 47 の発現は認められないという HSP 47 が cell type 特異的発現を示すことと合致する。

コラーゲンの発現制御においてもイントロン領域が重要な役割を果たすことは知られており、特に II 型コラーゲンや XI 型コラーゲンではイントロン領域が軟骨組織特異的発現を規定することが示されている。本研究は分子シャペロンとその基質で同じ機構により cell type 特異性が規定されることを示した初めての報告である。

以上、申請論文は HSP 47 の cell type 特異的発現を規定するエレメントを同定し、関与するタンパクの存在を明らかにした。本研究によって得られた知見はコラーゲンの発現の理解や制御、そして肝硬変などの組織の線維化の理解や治療に大きく寄与するものであると考えられる。よって本論文は理学博士の学位論文として価値あるものと認める。

なお、主論文及び参考論文に報告されている研究業績を中心として、これに関連した研究分野について試問した結果、合格と認めた。