

論文の内容の要旨

論文題目 腫瘍壊死因子 (TNF α) による血管内皮細胞の
transcriptome 解析と新規 TNF α 誘導遺伝子の同定

氏名 村上 猛

近年、高齢化の進む社会において、心血管系疾患の予防、治療方法の確立が急がれている。本研究では血管病変の形成に重要と考えられる血管内皮細胞について、炎症反応のメディエーターである腫瘍壊死因子 (TNF α)刺激による遺伝子発現変動の解析を行った。

これまで、血管内皮細胞に対する TNF α 刺激による個々の遺伝子発現変動について調べた研究が数多くなされている。しかし、TNF α の生理活性を知るためには TNF α 刺激によって発現が変動する遺伝子を包括的にかつ網羅的に同時解析を行うことが必要になると考えられ、これを行う方法の一つとして DNA マイクロアレイ解析がある。DNA マイクロアレイ解析は数千から数万の遺伝子に対するプローブがジーンチップと呼ばれるチップ上に貼り付けてあり、細胞より抽出した mRNA を標識し、その後ジーンチップ上のプローブとハイブリダイゼーションさせ、結合した mRNA 量を測定することによって、多数の遺伝子の発現解析を同時に行うことが出来る技術である。そこで、本研究の第 1 章では TNF α 刺激後の血管内皮細胞の遺伝子発現変動を DNA マイクロアレイ解析によって調べた。

また、DNA マイクロアレイ解析では、新規遺伝子の DNA 断片(EST)の発現変動も調べることが出来ることから、本研究の第 2 章では TNF α によって発現が誘導される新規遺伝子を探し出し、その遺伝子についてコードされているタンパク質の構造予測を行った。実験では血管内皮細胞としてヒトさい帯静脈内皮細胞(HUVEC)を用いた。

第1章 DNAマイクロアレイによるTNF α 刺激後のHUVECの遺伝子発現解析を2回行った。2回の実験において、発現誘導倍率が大きい遺伝子上位20個を比較したところ、2回とも上位20位以内になっていた遺伝子はICAM-1, TRAF-1, fractalkine, IL8, E-selectin, lymphotoxin β , VCAM-1, junB, B94, RING4, MDNCF, MGSA, Gro- β , p50 NF κ Bの14個であった。一方、発現抑制倍率の大きい遺伝子上位17個を比較したところ、2回とも上位17位以内になっていた遺伝子は connexin 37, LYL-1 protein, apolipoprotein A1 regulatory protein, Id1の4個であった。このことから、DNAマイクロアレイ解析においては発現誘導される遺伝子については再現性が良いが、発現抑制される遺伝子については再現性を得るのが難しいと考えられた。

TNF α 刺激したHUVECで変動した遺伝子の機能的分類としては、単球との接着に関わる分子(ICAM-1, E-selectin, VCAM-1)、サイトカイン(fractalkine, IL8, lymphotoxin β , MDNCF, MGSA, Gro- β)、シグナル伝達に関わる分子、転写因子(TRAF-1, junB, B94, RING4, p50 NF κ B)の遺伝子発現が誘導されており、血管内皮細胞間の接着に関わる分子(connexin 37)の遺伝子が抑制されていた。

次にHUVECと単球、マクロファージ、胎児脳、正常肝細胞、肝癌、胃癌、神経芽細胞腫、副腎、HepG2(肝細胞の細胞株)の9臓器、細胞と比較し、HUVECに多い遺伝子を検索したところ、細胞接着分子(ICAM-a2, VE-cadherin, connexin37)、細胞外基質関連分子(extracellular protein S1-5, type I interstitial collagenase, collagen type VIII α 1, collagen type V α 2)、血液凝固関連因子(protein C receptor, von Willebrand factor, TNF inducible TSG-14)、シグナル伝達分子、転写因子(endothelin-1, DRAL, Tie-1, GTP binding protein Ral, LYL-1 protein)、となっていた。TNF α 刺激後のDNAマイクロアレイ解析の結果から、これらHUVEC特異的遺伝子ではTNF α 刺激によって発現が変動する遺伝子は少ないことが判った。

以前に炎症状態のHUVECの遺伝子発現を包括的かつ網羅的に同時解析した実験が報告されている。これはマクロファージを培養した培地によってHUVECに炎症を引き起こし、その時の遺伝子発現解析をserial analysis of gene expression(SAGE)で行ったデータである。次にこのデータとDNAマイクロアレイ解析の結果の比較を行った。その結果、SAGEとDNAマイクロアレイ解析で、同様に発現誘導が見られた遺伝子はIL8, MCP-1, VCAM-1, PAI-1, Gro- α , E-selectin, Gro- β , であった。SAGEとDNAマイクロアレイ解析で遺伝子発現変動が一致しない遺伝子も見られたが、これはSAGEのデータがマクロファージから放出された様々なサイトカインで刺激されたHUVECの遺伝子発現解析であるのに対して、DNAマイクロアレイ解析のデータではTNF α のみで刺激したHUVECの遺伝子発現解析であるという差であると考えられた。

TNF α 刺激後のHUVECの遺伝子発現をDNAマイクロアレイによって解析した結果、HUVECではTNF α 刺激によって、単球との相互作用が促進されると同時に血管内皮細胞間の接着が抑制され、単球が血管内皮細胞下に潜り込みやすくなっていると考えられた。

第2章 DNAマイクロアレイ解析のデータから TNF α 刺激によって発現が誘導される新規遺伝子を検索した。その結果、発現誘導倍率が上位 17 位以内のものは、ai573096, t95064, ai220942, aa771995, ai361426, ai473781, aa609601, aa584292, aa151265, aa761595, aa887772, n98428, ai422142, ai589557, aa813851, aa632166, h27628 (GenBank accession No.) であった。

これらの中で、h27628 はノーザンハイブリダイゼーションによっても発現誘導が確認でき、かつ発現量の多い遺伝子であったので、全長 DNA 配列を決め、コードされているタンパク質について構造を予測することにした。未同定の 3'端側の配列はゲノムシステムズより分与を受けたクローン内の DNA 配列を読むことにより同定し、未同定の 5'端側の配列は 5' Rapid Amplification of cDNA Ends(5'RACE)を使うことにより同定した。その結果、全長 1318bp の DNA 配列を決めることが出来た。この DNA 配列からアミノ酸数 343 個のタンパク質がコードされていることが予測された。

このタンパク質について GenBank CDS translations, PDB, SwissProt, PIR, PRF の 5 つのデータベース内に登録されているタンパク質とのホモロジー検索を行ったところ、シヨウジョウバエの CG2716 gene product が見出された。ホモロジーのある領域は h27628 の N 端より 154 番目のロイシンから 307 番目のバリンと CG2716 gene product の N 端より 7 番目のイソロイシンから 160 番目のバリンまでの間であり、57%のホモロジーがあることが判った。

次に h27628 について Chou-Fasman 法、Garnier-Robson 法によって 2 次構造予測を、Kyte-Doolittle 法によって疎水性領域予測を行った。しかし、明確な膜貫通部位(アミノ酸数 23 個の疎水性の高い α ヘリックス部位)を見つけることは出来なかったことから、SOSUI プログラムを用いた膜貫通領域予測を行った。この結果、5 箇所膜貫通領域があることが予測され、このタンパク質が膜タンパク質である可能性が考えられた。

次に h27628 発現の臓器分布を調べた。その結果、心臓、筋肉、小腸、唾液腺、胎児の肝臓、膵臓に多く発現している遺伝子であると考えられた。

TNF α 刺激によって発現が誘導される新規遺伝子 h27628 について、ホモロジー検索、2 次構造予測、疎水性領域予測、膜貫通領域予測、臓器分布の解析を行った結果、h27628 は心臓などに多く発現している最大で 5 回膜を貫通する膜タンパク質であり、また CG2716 gene product とファミリーを形成しているタンパク質であると考えられた。