

論文審査の結果の要旨

申請者氏名 高橋 恭子

近年、アレルギー性喘息、アトピー性皮膚炎、食物アレルギーなどのアレルギー性疾患が社会問題となっている。高親和性 IgE レセプター(FcεRI)は、IgE 抗体により媒介されるこれらのアレルギー反応において鍵を握る受容体である。この受容体がアレルゲンと IgE によって架橋されることにより細胞内へシグナルが伝達され、アレルギー反応が開始される。本論文は、FcεRI α鎖の発現制御機構に関する研究を行ったものであり、6章より構成されている。

第1章は、研究の背景についての記述である。FcεRI は肥満細胞や好塩基球などの限られた細胞表面上に発現し、α鎖、β鎖、γ鎖の3種類のサブユニットから構成されている。本論文では FcεRI に必須かつ特有のサブユニットであるα鎖に注目し、ヒト FcεRIα鎖遺伝子の転写調節領域および転写調節因子についての解析を行った。

第2章では、まず、α鎖遺伝子のプロモーター近傍の5'フランキンク領域中から転写活性化エレメントを特定し、それらのエレメントに結合する転写因子の同定を行った。α鎖遺伝子の約2.4kbの5'フランキンク領域中領域の様々な長さの遺伝子断片及び部位特異的変異を導入した遺伝子断片をルシフェラーゼをレポーターとしてコードするプラスミドへ挿入した。これらのレポータープラスミドをα鎖を発現するラット肥満細胞株 RBL-2H3 及びマウス肥満細胞株 PT-18、α鎖非発現細胞であるヒト T 細胞株 Jurkat へ導入して一過性の発現試験を行った。その結果、nt -50 及び nt -75 を中心とする領域が発現細胞特異的なα鎖プロモーターの活性化に機能することが明らかになった。これらの領域の配列を含む標識二本鎖オリゴ DNA プローブと PT-18 細胞及び RBL-2H3 細胞より調製した核タンパク質を用いたゲルシフトアッセイの結果、特定した遺伝子領域に配列特異的に結合するタンパク質がそれぞれ存在した。抗 E1f-1 抗体、抗 GATA-1 抗体を添加した場合に、核タンパク質の結合によりシフトした標識プローブのバンドがスーパーシフトあるいは消失した。さらに、*in vitro* 転写・翻訳系により調製した E1f-1 及び GATA-1 を用いて nt -50 及び nt -75 を中心とする領域に結合する因子がそれぞれ E1f-1 及び GATA-1 であることを確認した。

次に、第3章では、3'側非翻訳領域やイントロン等を含む、プロモーター近傍以外の約20kbにわたるα鎖遺伝子領域中からシスエレメントの探索を行った。この領域を7つの遺伝子断片に分割し、ルシフェラーゼを SV40 プロモーター支配下にコードするレポーター

プラスミドの SV40 プロモーター上流へ各断片を挿入した。作製したプラスミドを RBL-2H3 及び PT-18 細胞へ導入して一過性の発現試験を行った結果、第 1 イントロンを含む遺伝子断片に強いエンハンサー活性が認められた。もともと遺伝子上に存在するのと同じ位置関係において α 鎖遺伝子の第 1 イントロンが α 鎖のプロモーターを活性化することを確認した。第 1 イントロン内に存在する様々な転写因子の結合モチーフに部位特異的変異を導入してさらに詳細なマッピングを行った結果、E-box モチーフの 1 つである CAGCTG 配列がエンハンサーエレメントとして機能することが明らかとなった。ゲルシフトアッセイより、この配列に特異的に結合する核タンパク質が存在することが示された。抗 USF1 抗体、抗 USF2 抗体及び *in vitro* 転写・翻訳系により調製した USF1、USF2 を用い、結合因子が USF1、USF2 のヘテロダイマーであることを明らかにした。さらに、USF2 アンチセンス発現プラスミドを細胞に導入することにより α 鎖の発現が抑制されたことからこの転写因子が実際に転写活性化に機能することを確認した。

同定した各転写因子の発現プラスミドを作製するにあたり、未だ報告のなかったラット Elf-1 及びラット USF2 の全長 cDNA のクローニングを行い塩基配列を決定した。両者の cDNA には複数種の多型がそれぞれ存在した。これらの多型が、 α 鎖遺伝子の発現制御に関与する可能性が考えられるため、第 4 章においては Elf-1 の、第 5 章においては USF2 の各多型の DNA 結合能や転写調節能等の特性についての解析を行った。

第 6 章は、総括と今後の展望である。以上本論文はヒト高親和性 IgE レセプター α 鎖の発現制御機構を明らかにし、その発現制御を通じてアレルギー反応制御への可能性について論述したものであり、学術上、応用上貢献するところは少なくない。よって、審査委員一同は本論文が博士(農学)の学位論文として価値あるものと認めた。