

[別紙 1]

論文の内容の要旨

論文題目 低酸素ストレスに対する生体応答機構の解明に関する研究

副題 グルココルチコイドは hypoxia-inducible factor-1 α (HIF-1 α) の転写活性化能を増強させる

指導教官 森本幾夫教授

東京大学大学院医学系研究科

平成 11 年 4 月入学

医学博士課程

内科学専攻

氏名

児玉常憲

目的

生体内の酸素分圧は肺胞気、動脈血、毛細血管、そして組織の順に徐々に低下し、細胞レベルでは 10 mmHg 前後である。また組織血流は生理的あるいは血管閉塞などの病態時に変動することから、細胞は頻りに低酸素環境に暴露される。細胞には酸素分圧の低下に対する様々な適応機構が存在し、その恒常性維持を可能にしている。とくに、hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1)は転写レベルで細胞の低酸素環境に対する適応を制御するマスターレギュレーターといえる。実際、vascular endothelial growth factor (VEGF)、glucose transporter-3 (GLUT3)、adrenomedullin (ADM) 遺伝子のプロモーター上には hypoxia response element (HRE)が存在し、HIF-1 はこれらの遺伝子発現を転写レベルで正に制御する。HIF-1 は α 、 β サブユニットからなるヘテロ二量体であり、低酸素誘導性は α サブユニットが司る。近年、遺伝子変異などによる HIF-1 機能の異常と固形腫瘍との関連、虚血性疾患などの低酸素が関与する病態の形成における HIF-1 の役割も解明されつつある。一方、中枢性ストレス応答系のうち、視床下部-下垂体-副腎系は副腎皮質ホルモンであるグルココルチコイドを介して末梢組織の恒常性維持に貢献している。現在、すべてのグルココルチコイド作用は核内レセプターに属する転写因子である glucocorticoid receptor (GR)を介すると考えられている。すでに、個体が低酸素環境下におかれた場合、副腎皮質におけるグルココルチコイド合成が亢進し、その血中濃度も上昇することが知られている。また、

低酸素環境下における造血充進機構に GR が関与していることも示されている。しかし、グルココルチコイドー GR のシステムによる低酸素に対する適応応答制御機構の詳細は不明である。そこで、本研究は、HIF-1 による転写制御におけるグルココルチコイドの役割とその分子機構を明らかにすることを目的とした。

方法

細胞

HeLa 細胞および COS7 細胞は RIKEN より入手した。

RNA 抽出および RT-PCR 解析

HeLa 細胞より抽出した全 RNA を鋳型として RT-PCR を施行した。PCR 産物を 2% アガロースゲルで泳動し、エチジウムブロマイド染色した。mRNA の定量解析には NIH Image を用いた。

細胞への一過性遺伝子導入およびレポーター活性の解析

転写因子 HIF-1 または GR 応答性転写活性の解析にはそれぞれの結合配列である各々、HRE、GRE の下流にルシフェラーゼ遺伝子をもつレポーター遺伝子を使用した。培養細胞へのレポーター遺伝子と各種発現プラスミドの一過性導入は、リポフェクション法を用いて行った。遺伝子導入後、各種刺激下で培養し、全細胞抽出液を採取してルシフェラーゼ活性を測定した。

イムノプロット解析

細胞抽出液を SDS-PAGE で泳動後、PVDF 膜へ転写し、抗 HIF-1 α または抗 GR 抗体と反応後 horse radish peroxidase 標識 2 次抗体と反応させ、ECL 法によって検出した。

Green fluorescent protein (GFP) 融合タンパクの細胞内局在の解析

GR あるはミネラルコルチコイドレセプター (MR) と GFP との融合蛋白発現プラスミドを COS7 細胞に導入し、各種条件培養下で培養後、共焦点レーザー顕微鏡により観察した。

結果

低酸素分圧下における HIF-1 依存性遺伝子発現に与えるグルココルチコイドの影響

HeLa 細胞を用いて、HIF-1 標的遺伝子 VEGF、GLUT3、ADM の発現に与える低酸素分圧と dexamethasone (DEX) の影響を RT-PCR にて検討した。VEGF、GLUT3、ADM mRNA 発現は低酸素分圧下において誘導されたとともに、その誘導効果は DEX によりさらに増強された。HRE 依存性レポーター遺伝子発現実験においても、低酸素

による HIF-1 転写活性は DEX の濃度依存性に増加した。また COS7 細胞を用いた共発現実験においてかかる DEX による増加作用は GR の発現量に依存していた。ここで、低酸素分圧下における HIF-1 α タンパク量には DEX は影響を与えなかった。

GR による HIF-1 依存性転写活性増強の分子機構の検討：リガンドおよびレセプター選択性

GR アゴニスト cortivazol (CVZ)、アンタゴニスト RU38486 (RU)、および MR アゴニスト aldosterone (ALD)を用いて HIF-1 依存性転写活性増強効果のリガンド選択性を HRE 応答性レポーター遺伝子を用いた一過性遺伝子導入実験において検討した。その際、GR あるいは MR を共発現し、レセプター選択性もあわせて解析した。なお、これらのリガンド存在下における GFP-GR、GFP-MR の細胞内局在は低酸素分圧環境においても変化しなかった。GR を発現させた場合、HIF-1 転写活性化能の増強は DEX と CVZ においてのみ認められた。MR を発現させた場合にはいずれのリガンドによっても HIF-1 依存性転写活性の増強はみられなかった。

GR による HIF-1 依存性転写活性増強の分子機構の検討：GR のドメイン解析

GR は N 末端から、AF-1 転写活性化領域、DNA 結合領域、リガンド結合領域 (LBD) /AF-2 転写活性化領域などの独立した機能ドメインからなっている。各ドメイン欠失変異体と HRE-Luc を用いた一過性遺伝子導入実験において、AF-1 欠失変異体は DEX 依存性増強効果を現した。しかし、リガンドに依存せずに恒常的に転写を活性化する LBD 欠失変異体では HIF-1 転写活性を変化させなかった。また、C 末端の 12 アミノ酸除去により DEX との結合能を欠失させた変異体においても増強効果は消失していた。しかし、ホモ二量体を形成せず転写を活性化しない GR 変異体を用いてもかかる増強効果が認められたことから、LBD と SV40 large T antigen の核移行シグナルの融合タンパクもリガンド依存性に HIF-1 転写活性増強効果を現わした。すなわち LBD はリガンド結合後それ自身で HIF-1 転写活性増強効果を発現しうるということが明らかとなった。

GR による HIF-1 依存性転写活性増強の分子機構の検討：HIF-1 のドメイン解析

HIF-1 は、N 末端から、他の転写因子にも保存されている basic helix-loop-helix 領域と PAS 領域、そして HIF-1 α にユニークな転写活性化領域、などから構成されている。まず HIF-1 α と酵母転写因子 Gal4 の DNA 結合領域との融合タンパクを発現させ、Gal4 依存性遺伝子発現に与えるグルココルチコイドと GR の作用を検討した結果、

DEX は GR 依存性にレポーター遺伝子の発現を誘導した。すなわち、GR は HIF-1 α の転写活性化領域に作用している可能性がある。そこで、HIF-1 α の転写活性化領域を酵母転写因子 VP-16 の転写活性化領域と置換した融合タンパクを発現させ、GR による HRE 応答性レポーター遺伝子発現増強効果を検討した。その結果、GR は HIF-1 α -VP16 によってはレポーター遺伝子発現は影響を受けず GR は HIF-1 α の転写活性化領域に作用していることが示唆された。

考察

グルココルチコイドは視床下部—下垂体—副腎系の末梢におけるエフェクター分子であり、GR を介して末梢組織ないし細胞のストレス応答を制御するとされている。GR 遺伝子破壊マウスは致死的であることから生命維持に GR は必須といえるが、ストレス応答の分子機構は不明のままである。ここで、細胞自身もストレス応答機構を内包しており、なかでも HIF-1 は低酸素応答におけるきわめて重要な制御因子である。今回、グルココルチコイドが GR を介して HIF-1 による低酸素依存性転写活性を増強することが明らかになった。またミネラルコルチコイドあるいは MR ではかかる効果がみられないことは、細胞の低酸素ストレス応答における GR システムの特異性のみならず重要性をも示唆する。その分子機構に関し、GR の LBD が必須であり、DNA 結合や転写活性化が必ずしも必要でないことは注目に値する。すでに、GR の機能のあるものは DNA 結合に依存していないことが示されている。たとえば AP-1 や NF- κ B などの転写因子との相互作用はタンパク—タンパク相互作用などの機序が想定されている。しかし、LBD 単独でもグルココルチコイドの生理的働きが伝搬されうることを示した報告はこれがはじめてである。RU や ALD も GR の LBD と結合することが知られていることから、今回の結果は LBD のアゴニスト特異的なコンフォメーション変化が HIF-1 依存性転写活性化の増強に関与することを強く示唆する。ここで、現時点で GST プルダウンなどにおいても LBD あるいは GR と HIF の直接の相互作用は検出されておらず、他の細胞内因子の関与も想定されている。いずれにせよ、グルココルチコイドによる HIF-1 転写活性の増強に、HIF-1 の構成要素のうち HIF-1 α が重要であり、GR と HIF-1 α の相互作用は互いのきわめて特徴的な機能領域の間に生じるものであることは興味深い。今後その分子機構を明らかにすることによりグルココルチコイドによるストレス応答機構の一端が解明されるものと考えている。