

審査の結果の要旨

氏名 白旗 里志

白旗里志は「リゾホスファチジルコリンにより誘導される転写因子 KLF2 の発現制御機構について」をテーマに、動脈硬化促進因子として知られる脂質酸化生成物のひとつであるリゾホスファチジルコリン (LysoPC) が、抗動脈硬化的作用の期待される転写因子 Krüppel like factor 2 (KLF2) の遺伝子を発現誘導することに注目し、そのメカニズムについて明らかにすることを目的として研究を行った。

KLF2 の遺伝子欠損マウス (胎生致死約 14 日) の表現型から、KLF2 は血管形成に必須であると考えられており、Endothelial Nitric Oxide Synthase (eNOS) や Thrombomodulin の発現を誘導し、接着分子である Vascular Cell Adhesion Molecule1 (VCAM1) や E-Selectin の発現を抑制することから、抗動脈硬化作用をもつ遺伝子の 1 つだと考えられている。白旗は、脂質酸化生成物に対するヒト臍帯静脈内皮細胞(HUVEC)の遺伝子発現応答に関する DNA マイクロアレイを用いた解析結果の中から、抗動脈硬化作用が期待される KLF2 が、動脈硬化促進因子として知られる LysoPC によって特異的に誘導されることを見出した。

KLF2 の遺伝子発現についてはリアルタイム PCR 法を用いて、また、KLF2 蛋白質の増加については Western blotting 法により、それぞれ、LysoPC 濃度依存性、タイムコースなど、詳細に明らかにした。

ルシフェラーゼレポーターアッセイにより、KLF2 のプロモーター領域における LysoPC 刺激応答領域の同定を行い、転写開始点の上流-177 bp から-27 bp にある 2 つの TATA 配列を含む領域に、LysoPC による KLF2 の発現誘導に重要な領域があることを見出した。

EMSA によるスーパーシフト実験を行い、KLF2 プロモーター領域において、転写因子 MADS-box transcription enhancer factor 2 (MEF2) ファミリーに属する蛋白質が KLF2 転写開始点の上流-136bp から-127bp に結合すること、また、転写因子 Cyclin D-binding myb-like protein 1 (DMP1) が上流-108bp から-97bp に結合することを示した。LysoPC による KLF2 の発現誘導にこれらの転写因子が重要であることを支持するために、KLF2 プロモーター領域にある MEF2 結合配列および DMP1 結合配列それぞれに変異を加えてルシフェラーゼレポーターアッセイを行い、LysoPC によるルシフェラーゼ活性の上昇が抑制されることを確認した。

転写因子の活性化には様々なリン酸化酵素が関与していることが知られている。白旗は種々のリン酸化酵素阻害剤を用いて、KLF2 の発現を制御するシグナル経路の探索を行った。その結果、阻害剤 Gö6976 および Gö6983 による抑制効果を比較すると、Gö6976 では LysoPC による KLF2 の発現誘導が抑制され、Gö6983 では抑制されないことを見出した。このことから、Gö6976 特異的に阻害される何らかの因子が、LysoPC による KLF2 の発現誘導に関与すること示した。最近の報告において、Protein Kinase D (PKD) および JAK

(Janus-Activated Kinase) が Gö6983 では阻害されず、Gö6976 特異的に活性が阻害されることが報告されており、白旗が提示した結果は、今後の研究の展開にとって示唆に富むものであることが評価された。

以上、白旗は本審査において、動脈硬化促進因子として知られる脂質酸化生成物 LysoPC が、抗動脈硬化的に作用することが期待される転写因子 KLF2 の遺伝子発現を誘導することを示し、KLF2 の転写活性を制御する可能性が高い転写因子の同定を行い、そして、活性化に必要なシグナル経路について示唆に富む結果を提示することができた。

よって本論文は博士（工学）の学位論文として合格と認められる。