

審査の結果の要旨

氏名 吉田（橋立） 智美

本研究は、白血球走化因子であるロイコトリエン B₄ (LTB₄) の第一受容体 (BLT1) の白血球における発現調節機構を明らかにするため、ヒト骨髄性白血病細胞株 HL-60 をレチノイン酸にて分化誘導する系を用いて、プロモーターに作用する転写因子の探索とエンハンサー領域の特定を試みたものであり、下記の結果を得ている。

1. Electrophoretic mobility shift assay の結果より、HL-60 細胞において BLT1 のプロモーター領域内の Sp1 結合サイト（転写活性に必要）への Sp1 以外の転写因子の結合を見出した。またウエスタンブロット解析の結果より、HL-60 細胞では Sp1 が検出出来なかった。
2. Reporter gene assay、Electrophoretic mobility shift assay の結果から、この転写因子が Sp1 と同様に Sp1 結合サイトを認識する KLF ファミリーのメンバーである可能性を示唆した。
3. レチノイン酸刺激した HL-60 細胞における BLT1 の mRNA 増加は、レチノイン酸が BLT1 のプロモーターへ直接作用するためではない事を reporter gene assay や chromatin immunoprecipitation (ChIP) assay より示した。さらに DNase I-hypersensitivity assay の結果から、レチノイン酸反応エレメント (AE-BLex) が BLT1 のイントロン 1 とエクソン 2 の間に存在する事を明らかにした。
4. AE-BLex はエンハンサー活性を持つ事、さらにこの活性には血球の分化・成熟に寄与する転写因子である AML1 の結合サイトが重要であることを reporter gene assay の結果より明らかにした。siRNA を用いた AML1 ノックダウン実験では AML1 の発現低下とともに BLT1 の mRNA 量の減少も観察した。また ChIP assay では、レチノイン酸刺激により AE-BLex 付近のヒストンのアセチル化が上昇し、AML1 の結合が増加する事も示唆した。

5. 血球系細胞株において、BLT1 が発現している細胞では AE-BLex への AML1 の結合が見られたのに対し、未発現の細胞では AE-BLex 付近のヒストンのアセチル化および AML1 の結合が検出出来なかった。またヒト末梢血由来の白血球においても、AE-BLex 付近において AML1 が結合している事を明らかにした。

以上、本論文は、ヒト骨髄性白血病細胞株 HL-60 において、KLF ファミリーが BLT1 のプロモーターに作用しうる可能性と、AML1 がエンハンサーを介して BLT1 の発現に寄与している事を明らかにした。本研究はこれまで未知に等しかった、白血球における BLT1 の発現調節の解明に重要な貢献をなすと考えられ、学位の授与に値するものと考えられる。