

(様式4)

学位論文の内容の要旨

(錦戸 彩加) 印

(学位論文のタイトル)

SF-1 mediates expression of human KCNJ5 in the adrenal cortex:

Complete genomic organization and promoter function

(SF-1はヒト副腎皮質においてKCNJ5の発現を調節する:

KCNJ5の全遺伝子配列およびプロモーター機能)

(学位論文の要旨)

【背景】KCNJ5はG 蛋白質活性型内向き整流性カリウムチャネルの一つであり、*KCNJ5*遺伝子変異はアルドステロン産生腺腫 (APA) の原因となる。KCNJ5変異ではKチャネルのフィルター部に異常を生じ、本来のKチャネルからNaが流入し脱分極を起こす。その結果、電位依存性Caチャネルが活性化され、持続的にCaイオンが流入しアルドステロンの合成促進が起きるとされている。筆者らの研究室では本邦のAPAの約79%でKCNJ5変異を認めたことを報告しており、これは欧米と比較して極めて高率である。本研究では変異KCNJ5のAPAの腫瘍発生機構解明のため*KCNJ5*遺伝子の全構造を決定し、副腎での発現調節機構を解明することを目的とした。

【方法】1) ヒトの全身組織での*KCNJ5* mRNA発現をQ-PCRにて検討した。2) ヒト*KCNJ5*遺伝子を単離し、全遺伝子構造を決定し、転写開始点を5' RACE法、poly(A)添加部位を3' RACE法により決定した。3) ヒト*KCNJ5*遺伝子プロモーター領域の転写因子結合部位をTRANSFACなどにより予測した。4) 遺伝子プロモーター活性を、副腎を含めた各種細胞で比較検討し、各種変異体を作成し転写共役因子等との関連を検討した。5) 副腎特異的転写因子であるSteroidogenic factor 1(SF-1)に対する各種領域のElectrophoresis Mobility Shift Assay(EMSA)を行った。6) 正常副腎皮質組織を用いてKCNJ5、SF-1抗体による免疫組織染色を行った。

【結果】1) *KCNJ5* mRNA発現は副腎で極めて強い発現を認めた。2) *KCNJ5*遺伝子は全長29.8kbで、3個のエクソン、2個のイントロンにより構成される。3) 転写開始点は翻訳開始点の上流380bpの単一の開始点でこの部位を+1とした。4) Poly(A)添加部位は3' 非翻訳領域でstopコドンの4,432bp下流に存在した。5) *KCNJ5*遺伝子プロモーター活性は副腎癌細胞株H295R細胞で有意に高かった。6) 副腎特異的転写因子であるSF-1に対する結合配列が-1,789~-1,782に推定された。プロモーター領域(-2,444~+202)の各種欠損変異体や点変異体を用いた解析では、この領域を欠損または変異させると遺伝子プロモーター活性が有意に低下した。7) EMSAにてこの領域にSF-1結合が確認された。8) 免疫組織染色の結果、正常副腎においてKCNJ5は球状層に強く発現し、SF-1は副腎皮質全体に発現していることが確認された。

【考察】*KCNJ5*遺伝子の全構造を明らかとした。ノーザンブロッティングの結果、約6.9と5.2kbに2つのバンドが確認された。Poly(A)付加信号はstopコドンの4,410と2,863bp下流にあり、上記2つのバンドがこれら2つの異なるPoly(A)添加部位によるものであると示唆された。過去の文献では睥島および睥外分泌腺において約6.8、5.4、2.4の3つのバンドが報告されており、今回なぜ異なる数のバンドが観察されたのかについてはさらなる検討が必要である。また、*KCNJ5*遺伝子

プロモーター領域にSF-1結合配列が推定された。転写調節因子であるSF-1は、ヒト副腎、脾臓、卵巣および精巣で発現が確認されている。SF-1ノックアウトマウスでは副腎が低形成となり、また遺伝子変異のある患者では副腎不全を呈したとの報告があり、これらはSF-1がヒトおよびマウスにおいて副腎皮質の発達に重要であることを示唆している。さらにSF-1は副腎癌の発症への関与も示唆されている。今回の検討では、*KCNJ5*遺伝子プロモーター領域の各種欠損変異体や点変異体を用いた解析で、推定SF-1結合配列が*KCNJ5*プロモーター活性に重要であることが判明した。また*CYP11B1*、*CYP11B2*遺伝子のプロモーター領域にもSF-1結合配列が報告されており、SF-1はそれら遺伝子の副腎特異的な発現にも重要な役割を果たしていると考えられた。一方で、免疫組織染色の結果、*KCNJ5*は球状層で強い発現が認められたものの、SF-1は副腎皮質全体に発現しており、なぜ*KCNJ5*が球状層に特異的に発現しているかの詳細なメカニズムの解明にはさらなる研究が必要である。

【結語】 1) *KCNJ5*遺伝子の全構造を明らかとした。2) *KCNJ5*遺伝子は副腎で高発現が認められ、転写制御因子SF-1がプロモーター領域(-1,789~-1,782)に結合し、*KCNJ5*遺伝子発現の制御に重要な役割を果たしていることが判明した。