

2008年度 修士論文要旨

## Zn<sup>2+</sup>によるHIF-1 $\alpha$ タンパク質発現制御機構の解明

関西学院大学大学院理工学研究科  
生命科学専攻 環境応答制御学研究室 園淵 了慈

低酸素状態は癌や心筋梗塞、脳梗塞など様々な病態に関わっている。この低酸素応答に中心的役割を果たすのはHIF-1 (hypoxia inducible factor-1) である。HIF-1 $\alpha$ は様々な翻訳後修飾により厳密に制御を受けている。当研究室の先行研究によりCo<sup>2+</sup>はHIF-1 $\alpha$ を核内移行させEPOの誘導を促進することが明らかとなっているがZn<sup>2+</sup>はHIF-1 $\alpha$ を安定化するもののEPOの誘導が起らないことが示されているが、その詳細なメカニズムは明らかにされていない。そこで本研究では Zn<sup>2+</sup> によるHIF-1 $\alpha$ 活性制御メカニズムの解明を目的とした。まず始めにZn<sup>2+</sup>ではHIF-1 $\alpha$ のタンパク質量は上昇するものの、下流因子が誘導されないことが確認できたため、続いてZn<sup>2+</sup>添加時におけるHIF-1 $\alpha$ の核内移行を検討した。免疫染色法及び核抽出法によりHIF-1 $\alpha$ の局在を検討したところHIF-1 $\alpha$ は核内に移行していることが分かった。そこで次に核内へ移行したHIF-1 $\alpha$ がHRE配列と結合しているかどうか検討するためクロマチン免疫沈降法を行った。その結果、Zn<sup>2+</sup>添加時に安定化し核内に移行したHIF-1 $\alpha$ はHREと結合していないことが解った。そこで核内でのHIF-1 $\alpha$ 転写活性化制御機構を解明するため、以下の3つの可能性を検討した。 Zn<sup>2+</sup>はPHDを阻害しFIHを阻害しないためHIF-1 $\alpha$ はFIHにより 803番目のアスパラギンに水酸化を受け、核内に移行してもCBP/p300 と結合できず活性を抑制される可能性 Zn<sup>2+</sup>が核内でのリン酸化を阻害する可能性 核内に蓄積したHIF-1 $\alpha$ にMafGをめぐるNrf2 が競合的に働いた可能性。まず1つめの可能性を検討するためFIHにより水酸化が行われる803番目のアスパラギンをアラニンに置換した変異体(以下N803A HIF)を過剰発現させた細胞を用いたRT-PCRにより検討したがN803A HIFでもEPOの誘導は見られなかった。そこで2つめの可能性を検討するためMAPKによるリン酸化部位である641、643番目のセリンをアスパラギン酸に置換した擬似リン酸化体(以下S/D HIF)を過剰発現させた細胞を用いてRT-PCRによりEPOの発現誘導を検討したところS/D HIFにおいても野生型(WT)を過剰発現させた細胞同様、Zn<sup>2+</sup>添加時のEPO誘導は見られなかった。一方新規のリン酸化が関わるか検討するためPhos-tagを用いたSDS-ポリアクリルアミド電気泳動により検討した。その結果、Zn<sup>2+</sup>を添加した際のHIF-1 $\alpha$ のバンドがシフトアップしたことから何らかのリン酸化が起こっていることが明らかとなった。そこでこのリン酸化を行うリン酸化酵素を特定するため様々なリン酸化酵素阻害剤を添加しウェスタンブロッティングを行った。しかしいずれの阻害剤を添加してもシフトアップしたバンドに変化は見られずリン酸化酵素を特定するには至らなかった。次に細胞破砕液をHIF-1 $\alpha$ 抗体で免疫沈降し、リン酸化セリン抗体及びリン酸化チロシン抗体を用いてウェスタンブロッティングを行い、リン酸化されるアミノ酸の特定を試みた。その結果、リン酸

化セリン抗体によってZn<sup>2+</sup>添加したものにバンドが検出された。

これまでZn<sup>2+</sup>の低酸素応答への影響に関して一致した見解はなくそのメカニズムは不明であったが、HIF-1αに関してこれまで知られていないリン酸化修飾がなされ、これが直接的あるいは間接的に下流因子の誘導を抑制する可能性が示唆された。このことはHIF-1αの核内での転写活性制御に新たなリン酸化が関わっていることを示唆するものである。