



Title	ヒト β -アクチン遺伝子プロモーターに於ける発現制御領域の構造と機能
Author(s)	杉山, 弘高
Citation	大阪大学, 1988, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/36033
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed 大阪大学の博士論文について https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed をご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

【7】

氏名・(本籍)	すぎ 杉	やま 山	ひろ 弘	たか 高
学位の種類	医	学	博	士
学位記番号	第	8084	号	
学位授与の日付	昭和63年3月25日			
学位授与の要件	医学研究科生理系専攻 学位規則第5条第1項該当			
学位論文題目	ヒト β -アクチン遺伝子プロモーターに於ける発現制御領域の 構造と機能			
論文審査委員	(主査) 教授	角永 武夫		
	(副査) 教授	松原 謙一	教授	中田 篤男

論文内容の要旨

〔目的〕

アクチンは真核細胞に広範かつ多量に存在する細胞骨格系タンパク質としてよく知られ、細胞運動のみならず細胞分化や細胞増殖に於ける役割も注目されている。ヒト β -アクチンは癌遺伝子であるc-fos及びc-mycとならんで細胞周期のG0期にかけて、血清や増殖因子、腫瘍プロモーター、12-*o*-tetradecanoyl phorbol-13-acetate (TPA) 刺激によって最も早期に誘導をうける遺伝子である。また、近年形質転換したヒト繊維芽細胞中に変異 β -アクチンが発見されたことや、白血病細胞HL60中に変異 γ -アクチンが見つかったことから、その機能と発現機構は注目を集めるところとなった。今回、単離したヒト β -アクチン遺伝子の発現制御領域を決定する目的で以下の実験を行った。

〔方法ならびに成績〕

単離したヒト β -アクチン遺伝子のプロモーター領域4.3kbを制限酵素及びDNA修飾酵素を用いて切断し、chloramphenicol acetyl transpherase (CAT) geneに連結することにより、3'側及び5'側からの各種欠失組換え体を作製した。できた欠失組換え体をマウスNIH3T3細胞に磷酸カルシウム法を用いて移入し、48時間後に得られた細胞抽出液中のCAT酵素活性を測定することによりヒト β -アクチン遺伝子プロモーター内の発現制御領域を決定した。5'側非翻訳領域4.3kb断片の上流3.2kbを欠失したプロモーター活性は0.8倍に低下したが、この1.2kb断片はSV40プロモーターより2倍高いプロモーター活性を示した。更に詳細な欠失組換え体を作製しCAT assayを行った結果、この1.2kb断片内に二つのプロモーターの存在が確認された。また、これらの二つのプロモーターの間には転写に抑制的に作用する領域の存在が示唆された。上流に存在するプロモーター (classical promoter, at-239

to at 83) は、TATA-及びCCAAT-boxからなり、CCAAT-box上流-239から-179には転写活性促進に関与している領域が確認され、ポリオーマウイルスのエンハンサー領域内に見られる共通の配列CTCTCCCTCCTCCTが見いだされたがエンハンサー活性は認められなかった。第一イントロン内に存在するプロモーター (second promoter, at 305 to at 935) は、Z-form DNA, CCGCCC及びGGGCGGからなり、SV40ウイルスのエンハンサーに類似した配列TATGGTAAATが存在していた。S1 nuclease mapping法を用いて、それぞれのプロモーターからの転写産物の転写開始点を決定した。classical promoterの転写産物はTATA-boxの下流24bpの所より始まり、second promoterの転写産物は第一転写開始点の下流891bpの位置から転写され、その上流16bpにはGC-box様配列が見いだされた。これらの二つのプロモーターには、ヒトのc-fos遺伝子に存在し血清誘導に関与する領域 (SRE) に類似した塩基配列 (CArG-box) が存在した。また、second promoter内のCArG-boxを含む、種を越えて保存された領域は転写活性にTPA依存性を示すことが示唆され、ヒトメタロチオネイン11A遺伝子のTPA依存領域に類似した塩基配列が見いだされた。しかしながら上流のclassical promoterはsecond promoterと同じCArG-boxを持つにも関わらずエンハンサー活性はなく、プロモーター活性のTPA依存性も認められなかった。更に、これら二つのプロモーターの相対活性を比較したところ、second promoterの活性を1とするとclassical promoterが4であったが、双方が連結した1.2kb断片では36であった。

[総括]

ヒトβ-アクチン遺伝子はヒトc-myc遺伝子等と同様にclassical promoter以外に第一イントロン内に機能的に非常に重要なsecond promoterを持つことが示唆された。これらの二つのプロモーターは13bpにわたって同一の塩基配列からなるSRE様GC-boxをもつがエンハンサー活性はsecond promoterに存在するのみであった。このことから、近年単離されている転写制御因子 (SRF, R.Treisman; c-fos enhancer-binding factor, R.Prywes) のDNA親和性はin vitroにおいてGAR-box (10bp) の塩基配列に依存するとされているが、in vivoにおいてはGAR-boxの塩基配列が同じでもそれが遺伝子上に占める位置または周辺の遺伝子構造にも依存することが予想される。しかしながら、S1 mappingによって得られた主要な転写開始点は上流のclassical promoter内に存在した。また、CAT assayの結果からもこれらの二つのプロモーターには相乗作用のあることが示唆された。即ち、エンハンサー活性に関与する転写制御因子はsecond promoterに結合するが、その作用はむしろ上流のTATA-boxをもつclassical promoterに有利であると考えられた。このことは主要な転写因子であるRNA polymerase IIがGC-boxよりもTATA-boxにより高い親和性を示すとしたTjian等の報告にも裏打ちされる。以上ヒトβ-アクチン遺伝子の発現には第一イントロンが重要な役割を担っていることが示唆された。

論文の審査結果の要旨

本研究はヒト β -アクチン遺伝子を用いて、遺伝子発現のメカニズムを解析したものである。従来 β -アクチンは増殖因子や腫瘍プロモーターにより発現誘導をうけることや、haploid当り一遺伝子ながら多量に発現していることが報告されていたが、遺伝子上の解析は行われていなかった。本研究はヒト β -アクチン遺伝子のプロモーター領域を決定し、その遺伝子がSV40プロモーターより高いプロモーター活性を持つこと、第一イントロン内にエンハンサーを持つこと、増殖因子のシグナルをこのエンハンサーで受け取ることを解明した。更に本研究は生理活性物質の多量生産法に従来のウイルスプロモーターにかわってヒト β -アクチン遺伝子プロモーターを用い、より効率よく生理活性物質を得る上での細胞工学的基礎を築いた。よって、医学博士の学位論文にあたいするものであると認める。