



Title	DNA bending and binding factors the human β -action promoter
Author(s)	河本, 健
Citation	大阪大学, 1989, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://hdl.handle.net/11094/37119
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

氏名・(本籍)	河 本 健
学位の種類	医学博士
学位記番号	第 8921 号
学位授与の日付	平成元年12月31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	DNA bending and binding factors of the human β -actin promoter (ヒト β -アクチン・プロモーターの折れ曲がり構造と結合因子)
論文審査委員	(主査) 教授 藤尾 啓 (副査) 教授 中田 篤男 教授 吉川 寛

論文内容の要旨

(目的)

β -アクチンは非筋肉細胞の細胞骨格を形成する主要タンパク質の一種で、細胞形態の維持や細胞運動に重要な働きをしている。 β -アクチン遺伝子の発現は多くの種類の細胞で非常に強く、血清中の増殖因子による誘導をうける。本研究では、血清刺激により誘導される β -アクチン遺伝子の発現調節機構を解明する目的で以下の実験を行い、ヒト β -アクチンのプロモーター活性に重要な二つの領域を同定し、その領域に結合因子(タンパク質)が結合すること、さらに、その一つはDNAの折れ曲がり構造の中心領域に存在することを明らかにした。

(方法ならびに成績)

【プロモーター活性】HuT-14細胞から分離したヒト β -アクチン遺伝子の-3350(転写開始点より)から+13までのDNA断片をプロモーター活性アッセイ用ベクターのcat(chloramphenicol acetyl-transferase=CAT)遺伝子の上流につないで、NIH 3T3細胞に導入し、CATアッセイを行うことによりプロモーター活性を測定した。血清刺激を行った場合のCAT活性は血清刺激を行わない場合の約10倍高い値を示した。プロモーター活性に必要な領域を決定するために、上流側から欠失DNA断片を作製して同様にプロモーター活性を調べた。上流から-245までを欠失させると活性は約60%低下し、-164または-112までの欠失ではそれと同レベルの活性を示し、-52まで欠失がすすむと活性は著しく低下した。

-111から-52までの領域にはCCAAT box様の配列と、その11塩基対下流にヒト、ラット、ニワトリの β -アクチン遺伝子間で非常によく保存されている25塩基対(以下、保存配列という)とが存在し

た。これらの領域のどちらが発現に重要であるかを調べるために、この領域の塩基配列を部分的に（8塩基対ずつ）他の塩基配列と置き換えた変異プラスミドを作製し、同様にしてプロモーター活性を測定した。その結果、CCAAT box を他の配列と置き換えた場合は、活性は1/10以下に低下したが血清刺激による誘導は認められた。一方、保存配列を他の配列と置き換えた場合はプロモーター活性はまったく認められなくなった。以上のこととは、CCAAT box と保存配列とは共に重要で、その上、共同的に働いており、血清刺激による誘導には保存配列が必須であることを示している。

【折れ曲がり構造】-224から+13までを含むDNA断片を低温（10°C）で電気泳動すると、同じ塩基対数のDNA断片よりも泳動度が低下し、高温（50°C）で電気泳動すると泳動度はほぼ同様になることを発見した。これは、このDNA断片が折れ曲がり構造をとっていることを示唆している。同様な実験を保存配列の一部を他の塩基配列と置き換えたDNA断片で行うと、低温での泳動度の低下が減少することから、保存配列が折れ曲がりに関与していると考えられる。折れ曲がりを形成する塩基配列の中心がDNA断片の中央近くに位置するほど泳動度は低下し、端にあるときは泳動度の低下は少ないという性質を利用して、保存配列が折れ曲がりの中心にあるかどうかを検討した。塩基対数を一定にして保存配列の位置を変動させたDNA断片を低温で電気泳動して、保存配列が折れ曲がりの中心に存在することを確かめた。この領域には、折れ曲がり構造をとるDNA断片が共通に持っている塩基配列と類似の配列が存在している。

【DNA結合タンパク質】プロモーター領域に結合する結合因子（タンパク質）が存在するかどうかをゲルシフト法によって調べた。各種欠失DNA断片や変異DNA断片をプローブとしてゲルシフトアッセイを行い、HeLa細胞の粗抽出液中にCCAAT box および保存配列領域と結合するタンパク質が存在することを明らかにした。このことはDNase I フットプリント法によっても確認した。

（総括）

1. ヒト β -アクチン・プロモーターは高いプロモーター活性を持っており、その活性は血清刺激によって誘導される。
2. β -アクチン遺伝子の上流の-111から+13までの領域は、血清刺激によって発現誘導されるプロモーターを含んでいる。
3. この領域にはCCAAT box および、ヒト、ラット、ニワトリの β -アクチン遺伝子間で保存されている25塩基対の保存配列が存在し、血清刺激による誘導には保存配列が必須である。
4. 保存配列を含む領域は塩基配列特異的な折れ曲がり構造をとり、折れ曲がりの中心は保存配列の中央付近であると考えられる。
5. CCAAT box 領域および保存配列領域にはそれぞれに特異的な結合因子が結合すると考えられる。
6. 以上、ヒト β -アクチン遺伝子の発現ではCCAAT box と保存配列とに特異的なタンパク質が結合して転写を促進していると考えられる。

論文の審査結果の要旨

β -アクチン遺伝子の発現は多くの種類の細胞で非常に強く、また、血清刺激による誘導を受ける。本研究では、血清刺激による誘導に必要なプロモーター領域とその構造の解明を行った。ヒト β -アクチン遺伝子の第1エクソンよりも上流の領域をプロモーター活性測定用ベクターの *cat* 遺伝子上流につなぎ、NIH 3T3細胞に導入してCAT活性を測定し、血清刺激によって発現が顕著に上昇するプロモーターが含まれていることを確認した。さまざまな変異DNA断片を作製して調べた結果、このプロモーター活性にはCCAAT box配列と、その下流に存在する一定の配列（ヒト、ラット、ニワトリの β -アクチン遺伝子間で非常によく保存されている）とが必須であること、また、保存配列領域にはDNAの折れ曲がり構造が存在することを証明した。さらにHeLa細胞にはこのCCAAT boxおよび保存配列のそれぞれに特異的に結合するタンパク質が存在することを明らかにした。以上の結果から、 β -アクチン・プロモーターは血清刺激によってCCAAT boxと折れ曲がり構造をとる保存配列とに特異的なタンパク質が結合し、それらが転写の促進因子として働くと考えられる。本論文は学位に値するものと評価できる。