OUKA
Osaka University Knowledge Archive

Title	Rat Pyruvate Kinase M Gene : Its complete structure and characterization of the 5' flanking region
Author(s)	竹中, 優
Citation	大阪大学, 1991, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.11501/2964382
rights	© the American Society for Biochemistry and Molecular Biology
Note	

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

Osaka University

【11】

氏名・(本籍)	竹中(たけなか) 優(まさる)
学位の種類	医学博士
学位記番号	第9662号
学位授与の日付	平成3年3月26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	Rat Pyruvate Kinase M Gene : Its complete structure and characterization of the 5′ flanking region **(ラットピルビン酸キナーゼM遺伝子：その全構造と5′上流域の解析)**
論文審査委員	(主査) 教授 田中 武彦 (副査) 教授 吉川 寛 教授 鎌田 武信

論文内容の要旨

(目　的)

ピルビン酸キナーゼ（RK）は，解糖系の律速酵素の1つであり4種のアイソザイム（L，R，M_1，M_2）が知られている。これら4種のアイソザイムは，それぞれ組織特異的に発現している。胎生期では未分化型PKであるM_2型は，すべての組織に存在しているが，分化に従い肝臓ではL型が，赤血球ではR型が，又，筋肉，脳ではM_1型が主になる。また，癌化するとM_2型が増加することが知られている。これら，PK遺伝子の組織特異的な，また分化に伴った発現制御機構を解明することを目的として，本研究では，M_1・M_2型PKをコードしているPKM遺伝子の構造及びプロモーター領域を解析した。

(方法および結果)

ラット肝DNAより作られた遺伝子ライブラリーをM_2型PK cDNAをプローブとしてスクリーニングし，λMPK37，λMPK34のクローンを得，解析したが5′上流域及び5′ノンコーディング配列は見いだせなかった。そこで，ラット肝DNAをHindⅢで切断した後cDNAの5′端およびλMPK34の5′端をプローブとしてサザンブロットを行なったところ，11.3kbにバンドを認めたため，HindⅢで切断したラット肝DNAの9から14kbのフラグメントを回収し，EcoRIリンカーを用いてEMBL4ファージに組み込み，遺伝子ライブラリィーを作成した。このライブラリィーを前述の2種類のプローブを用いてスクリーニングし，λMPK5を得た。λMPK5 DNAをEcoRIで切断すると4つのフラグメントが生じ，サザンブロットの結果，3.8kbのフラグメントに第1エクソンが存在することが確認されたため，M13ファージにサブクローンを行った後，ダイデオキシ法によりDNA配列を決定した。これにより，ラットPKM遺伝子は，12のエクソンと11のイントロンを持ち全長約20kbであることが明

らかになった。その5′上流域は，“ＴＡＴＡ”および“ＣＡＡＴ”配列を欠きＧＣ含量が高くＧＣボックスを複数持っていた。次に，転写開始点を決定するためにラットの筋肉よりえられたM_1型ＰＫｍＲＮＡを含むＲＮＡと，ＡＨ－130肝癌細胞から得られた，M_2型ＰＫｍＲＮＡを含むＲＮＡを用いて，Ｓ１マッピングを行った。この結果６ケ所の転写開始点が同定され，しかも，M_1型及びM_2型ＰＫｍＲＮＡで同じであった。さらに5′上流域がプロモーター活性を持つことを確かめるために，ＣＡＴアッセイをおこなった。ＰＫＭ遺伝子の転写開始点上流約2.2kb，1.8kb及び0.5kbのフラグメントをＣＡＴ遺伝子の上流に組み込み，これらのプラスミドＤＮＡを，Ｌ型ＲＫを発現しているラット成熟肝細胞及びM_2型ＰＫを発現しているｄＲＬｈ－84肝癌細胞にエレクトロポレーション法により導入し，48時間後にＣＡＴ活性を測定した。その結果，成熟肝細胞では，すべてのフラグメントがプロモーター活性を示さなかったがｄＲＬｈ－84細胞では，逆にすべてのフラグメントがプロモーター活性を示した。これは，転写開始点上流約500bp がプロモーターとして機能し得ることを示し，又，組織特異的な転写に関わるシス作用因子を含む可能性を示す。さらに，ラットＤＮＡライブラリィーをスクリーニング中，イントロンを欠くM_2型ＰＫｍＲＮＡに似たクローンを見いだしＤＮＡ配列を決定した。その5′上流約1.5kbをＣＡＴ遺伝子の上流に組み込みｄＲＬｈ－84細胞及び成熟肝細胞に，エレクトロポレーション法により導入しＣＡＴ活性を調べたが，プロモーター活性は，見いだせなかった。Ｓ１マッピングでもこの遺伝子が転写されているとすれば見られるはずのフラグメントがなかったことから，この遺伝子はpseudogeneと考えられた。胎生15，19，21日目の筋肉と脳でM_1・M_2型ＰＫ特異的エクソンをプローブとしノーザンブロットを行った。胎生初期では，M_2型ＰＫが主であるがその発現量は，M_1型ＰＫが増えるに従い減少し，酵素レベルでの所見と一致した。

（総　括）

ＰＫＭ遺伝子の，すべてのエクソンの配列を決定した。ＰＫＭ遺伝子は，12のエクソンと11のイントロンを持ち全長約20kbで，M_1及びM_2に特異的なエクソンは，それぞれ第９，第10エクソンに存在している。ＰＫＭ遺伝子の5′上流域はいわゆるハウスキーピング遺伝子の特徴を持っいる。つまり，ＴＡＴＡボックス，ＣＡＡＴボックスは存在せず，ＧＣボックスを複数もつ。また，ＧＣ含量が高い。Ｓ１マッピングよりM_1及びM_2型ｍＲＮＡは，複数の同じ転写開始点を持つことが明らかとなった。ＣＡＴアッセイにより，転写開始点上流約500bpのフラグメントが組織特異的なプロモーター活性を持つことが示唆された。また，イントロンが存在しない遺伝子を見いだし，ＤＮＡ配列を決定したところM_2型ＰＫと99％の相同性を認めたが，pseudogeneであることを確認した。胎生期の脳・筋肉で分化に伴ってM_2型ＰＫが減少するに従いM_1型ＰＫが増加することがｍＲＮＡレベルで確認された。

論文審査の結果の要旨

本研究は，ピルビン酸キナーゼM遺伝子（ＰＫＭ遺伝子）の全構造を解明し，そのプロモーター領域を解析したものである。その結果，M_1，M_2両タイプのｍＲＮＡは，同じ転写開始点を持つことが明か

となり，同一の転写産物が組織特異的なスプライシングを受けて両タイプのｍＲＮＡが作られることが確認された。又，ＰＫＭ遺伝子のプロモーター領域は，ハウスキーピング遺伝子の特徴を持つことがわかり，転写開始点上流約500bp 以内に，組織特異的なプロモーター活性が存在する可能性を認めている。これらの結果は，ＰＫＭ遺伝子の組織特異的な発現及び，細胞の癌化の際のM_2 型の増加の機構を解明する端緒となり，ひいては，高等動物の細胞の分化や癌化の機構の解明あるいは，組織特異的な遺伝子発現の制御機構の解明に役立つと考えられ，学位に値するものと認める。