



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	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

氏名・(本籍)	たけ 竹	なか 中	まさる 優
学位の種類	医	学	博士
学位記番号	第	9 6 6 2	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, M₁, M₂) 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 M₂ 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 M₁ 型が主になる。また、癌化すると M₂ 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、M₁・M₂ 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 M₂ 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 EMBL 4 フェージに組み込み、遺伝子ライブラリーを作成した。このライブラリーを前述の 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 フェ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M₁型PKmRNAを含むRNAと、AH-130肝癌細胞から得られた、M₂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ヶ所の転写開始点が同定され、しかも、M₁型及びM₂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5'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M₂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ライブラリーをスクリーニング中、イントロンを欠くM₂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5'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M₁・M₂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、M₂型PKが主であるがその発現量は、M₁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、M₁及びM₂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ている。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M₁及びM₂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M₂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M₂型PKが減少するに従いM₁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、M₁、M₂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。