

Title	Characterization of the promoter region of the murine fibroblast growth factor receptor 1 gene
Author(s)	齋藤, 博
Citation	
Issue Date	
Text Version	none
URL	http://hdl.handle.net/11094/38131
DOI	
rights	
Note	

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

氏名	さいとう ひろし 齋藤 博
博士の専攻分野の名称	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	第 1 0 6 5 2 号
学 位 授 与 年 月 日	平成 5 年 3 月 25 日
学 位 授 与 の 要 件	学位規則第 4 条第 1 項該当 医学研究科内科系専攻
学 位 論 文 名	Characterization of the promoter region of the murine fibroblast growth factor receptor 1 gene (マウス繊維芽細胞増殖因子受容体-1 遺伝子プロモーターの解析)
論 文 審 査 委 員	(主査) 教 授 岸本 忠三 (副査) 教 授 谷口 直之 教 授 北村 幸彦

論 文 内 容 の 要 旨

(目 的)

Acidic 及び Basic fibroblast growth factor (FGF) は種々の細胞に対して細胞増殖作用や血管増生作用を持ち、生体内において創傷治癒や細胞分化過程等に関与する重要な因子である。そのシグナルは膜表面に存在するレセプターに結合し、レセプター自身の持つ tyrosine kinase を活性化することにより細胞内へ伝達されると考えられている。1989年に Williams らによってトリ FGF 受容体 (FGFR) がクローニングされて以来、遺伝子レベルでの FGFR の解析が行われ、murine では FGFR 1 と 2 が、human では FGFR 1 から 4 がクローニングされ、その構造が明らかとなっている。又 FGFR の発現量が細胞間に大差があること、細胞分化により発現量が著変すること、リガンド刺激により細胞特異的に発現量が変化することが知られており、受容体発現調節が重要な生物学的意義を持つと思われるが、その転写調節機構は不明である。そこで murine FGFR 1 の上流領域をクローニングし、その構造と機能を解析した。

(方法ならびに成績)

1) FGFR 1 上流領域のクローニング

マウス乳癌由来樹立細胞株である SC-3 細胞より genomic DNA を調整し、種々の制限酵素で消化、電気泳動にて分離後マウス FGFR 1 cDNA の 5' 非翻訳領域をプローブにてサザンブロット解析をおこなった。SphI 消化 DNA においてシグナルの得られた 3-5 kb の分画をゲルより精製、pUC19 ベクターへ挿入し、partial genomic library を作製した。上記のプローブにて約 30 万個のコロニーをスクリーニングし、4.8kb の上流領域をクローニングした。

2) 転写開始点ならびに塩基配列の決定

得られた断片の制限酵素地図とプローブに用いた 5' 非翻訳領域のそれと比較することにより、断片上のプローブの位置を推定した。その近傍含む 380bp 及び 210bp の断片を SC3 細胞と NIH 3 T 3 細胞より抽出した RNA とハイブリダイズさせ、S₁ nuclease mapping を行った。同時に泳動した Sequence ladder との比較により、1 塩基をはさんで相隣接する 2 つの転写開始点を同定した。

dideoxy 法にて、その上流約 900bp および下流約 700bp の塩基配列を決定した。上流領域には AP 1, AP 2, Oct 1 及び GCF のコンセンサス類似配列があり、-240 及び +50 付近に GC box が認められた。TATA box, CCAAT box はなく、house-keeping gene promoter の構造に類似していた。又、この配列をもとに primer pair を作製、

NIH 3 T 3 細胞より PCR 法にて同部位をクローニングし、塩基配列を比較したが、まったく相同であった。

3) プロモーター活性の同定

promoter を含まない pSVOOCAT ベクターへ DNA 断片を挿入し、リン酸カルシウム法にて NIH 3 T 3 細胞へトランスフェクションした。得られた cell lysate を用いて CAT assay を行い、転写開始点を含む上流領域 (-868/+104) 内にプロモーター活性を確認した。

次に、この上流領域の種々の deletion mutant-CAT fusion gene を作製し、同様の方法にて転写活性を検定した。5' 側の -868 より -107 までの欠失及び 3' 側の +104 より +26 までの欠失によっても転写活性はほとんど変化せず、これらの領域内にあるコンセンサス類似配列及び GC box は、転写調節には関与しないものと思われた。さらに欠失を加え、-106/-90 に enhancer 活性を -89/-43 に core promoter 活性を見出した。この領域には既知の転写因子に対する consensus sequence は存在しなかった。

(総括)

マウス線維芽細胞増殖因子受容体-遺伝子の上流領域をクローニング、塩基配列を決定し、転写開始点及びプロモーターを同定した。このプロモーターは 2 つの転写開始点をもつ TATA-less promoter に属し、その基本構造は神経成長因子受容体、インスリン様増殖因子 1 受容体等の promoter と類似していた。

論文審査の結果の要旨

本研究は、マウス線維芽細胞増殖因子受容体 I 遺伝子での上流領域をクローニングし、その塩基配列及び転写開始点を決定するとともに、そのプロモーターが TATA-less promoter に属し core promoter 活性をもつ領域と enhancer 活性をもつ領域とを含むことを明らかにしたものである。これらの成果は、その発現量の変化が生体内において重要な生物学的意義を持つと思われる線維芽細胞増殖因子受容体の発現調節の解明に寄与し、博士論文に値するものである。