Osaka University Knowledge Archive

Title	Identification and characterization of hepatocyte-specific regulatory regions of the rat pyruvate kinase L gene : the synergistic effects of multiple elements.
Author(s)	山田, 一哉
Citation	大阪大学, 1993, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.11501/3065796
rights	© the American Society for Biochemistry and Molecular Biology
Note	

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

Osaka University

【17】

氏　　名	山　田　一　哉（やま　だ　かず　や）
博士の専攻分野の名称	博　士（医　学）
学　位　記　番　号	第　10625　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 医学研究科生理系専攻
学　位　論　文　名	Identification and characterization of hepatocyte-specific regulatory regions of the rat pyruvate kinase L gene: the synergistic effects of multiple elements. **（ラットピルビン酸キナーゼL遺伝子の肝細胞特異的発現調節領域の同定と特性：複数の因子の相乗効果について）**
論　文　審　査　委　員	（主査） 教　授　田中　武彦 （副査） 教　授　吉川　　寛　　教　授　平野　俊夫

論　文　内　容　の　要　旨

（目　　的）

ラットピルビン酸キナーゼ（PK）L遺伝子は，R型およびL型の2つのPKアイソザイムをコードしている。本遺伝子は，12個のエクソンから構成されており，第1エクソンはR型に，第2エクソンはL型に特異的エクソンであり，他は両者に共通のエクソンである。従って，PKL遺伝子は，組織特異的なプロモーターの使用により，赤血球ではR型，肝臓ではL型PKアイソザイムmRNAを転写すると考えられる。本研究では，このうち肝特異的遺伝子発現に必須のシスエレメントの同定とそれに結合する因子についての検討を行った。

（方法ならびに成績）

(1) L型PKの転写開始点上流－3200bpから欠失させたDNA断片を大腸菌のクロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ（CAT）遺伝子の上流に組み込んだプラスミドを初代培養肝細胞やHeLa細胞，K562細胞にトランスフェクションし，CAT活性を測定した。

初代培養肝細胞にエレクトロポレーション法でトランスフェクションしたところ，L遺伝子の上流－3200から－279bpまでをのぞいたプラスミドではCATの発現にほとんど差は認められなかったが，－185bp までデリーションを行なったプラスミドではCATの発現はわずかに増大が認められた。さらに，－152，－94bpまでデリーションを行なったプラスミドでは，暫時CATの活性低下がみられ，－62bpではCAT活性はみられなかった。一方，これらのすべてのプラスミドは，HeLa細胞やK562細胞ではCAT活性はみられなかった。

さらに，－94から－62bpまでの領域を詳細に調べるために－74bpまでデリーションしたプラスミドをトランスフェクションしたところCAT活性はみられなかった。そこで，－94から－76bpに相当する合成ヌクレオチドを－62bpの上流に挿入したところCAT活性がみられた。この領域をL－Ⅰとなずけた。次に，－185から－95bpの領域を詳細に調べるために，3’端を－95bpに固定し，5’端を－185，－170，－155bpまでデリーションした断片を－94bpから下流を含むプラスミドに挿入した場合，－170bpまでは同程度の活性であったが，－155bpでは活性が低下した。また，5’端を－170bp に固定し，3’端を－95，－126，－139bpまでデリーションした断片を挿入した場合，－126bp までは同程度の活性であったが，－139bpでは活性が低下した。従って，－170 から－126bpまでの領域が活性をもつことが明らかになった。この領域には，LF-A1とMLTFの結合配列がみられたため，－126から－149bpをL－Ⅱ，－150から－170bpをL－Ⅲとなずけ，各々の合成ヌクレオチドを合成した。

これらの3つの合成ヌクレオチドを単独で，あるいは様々な組み合わせで，方向も変えて－62bpより下流を含むプラスミドに挿入して肝細胞にトランスフェクションした。その結果，L－Ⅰは単独で方向に無関係に活性をもった。L－ⅡはL－Ⅰに，L－ⅢはL－Ⅱに依存して互いに相乗的に作用した。これらの3つのエレメントはこの順序で，おなじ向きに存在するときに最大活性を示した。また，これら3つの領域を含むDNA断片をSV40のプロモーターの上流や下流に逆向きに挿入したプラスミドを肝細胞にトランスフェクションしたところ，それぞれCAT活性を上昇させた。また，肝細胞では発現しないPKM遺伝子の上流に逆向きに挿入した場合でもCATの発現がみられた。

(2) これらの3つのエレメントに結合する因子を同定することを試みた。L－ⅠにはLF－B1，L－ⅡにはLF－A1，L－ⅢにはMLTFの結合コンセンサス配列がみられたので，それぞれについてゲルシフト法を用いて検討した。L－Ⅰは，LF－B1を大腸菌に発現させた抽出物との間で結合がみられた。また，その結合力は，アルブミンのLF－B1結合配列よりも弱かった。L－Ⅱは，肝核抽出物中に結合因子がみられたが，それはLF－A1とは異なっていた。L－Ⅲも同様に，肝核抽出物中に結合因子がみられたが，それはMLTFとは異なっていた。

（総　括）

(1) ラットPKL遺伝子の肝細胞特異的遺伝子には，L型PKの転写開始点上流－76から－94bp（L－Ⅰ），－126から－149bp（L－Ⅱ）および－150から－170bp（L－Ⅲ）の3つのシスエレメントが必要であった。L－Ⅰは単独でエンハンサー様活性を示したが，L－ⅡやL－Ⅲは単独では不活性であった。L－ⅡはL－Ⅰに，L－ⅢはL－Ⅱに依存して互いに相乗的に作用した。これらの3つのエレメントはこの順序で，おなじ向きに存在するときに最大活性を示したことから，1つのユニットを構成していると考えられた。このユニットは，ヘテロなプロモーターとも，位置や方向に関係なく作用することから，組織特異的エンハンサーであることが明らかになった。

(2) L－ⅠにはLF－B1が結合し，他の2つには未知の転写因子が結合することが示された。

論文審査の結果の要旨

本研究は，ピルビン酸キナーゼL遺伝子の肝細胞特異的な遺伝子発現制御領域を解析し，それらに結合するタンパク質について検討したものである。その結果，L遺伝子の転写開始点上流－189bp内のL－Ⅰ，L－Ⅱ，L－Ⅲという3つの制御領域が，1つのエンハンサーユニットとして肝細胞特異的遺伝子発現に寄与していることを示している。また，L－Ⅰには転写因子のLF－B1が，L－ⅡやL－Ⅲには未知のタンパク質が作用することも明らかにしている。

これらの結果は，肝細胞の分化機構，L遺伝子の細胞特異的遺伝子発現にかかわる転写因子間の相互作用機構，ならびにホルモンや高炭水化物食による転写促進機構の解明に役立つと考えられ，学位に価するものと認める。