



Title	The Vitamin D-responsive Element in the Human Osteocalcin Gene Association with a Nuclear Proto-Oncogene Enhancer
Author(s)	大薗, 恵一
Citation	大阪大学, 1992, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/38306">https://hdl.handle.net/11094/38306</a>
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、<a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">大阪大学の博士論文について</a>をご参照ください。

*The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA*

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

The University of Osaka

氏名	大 蘭 恵 一
博士の専攻分野の名称	博士 (医学)
学位記番号	第 1 0 3 3 6 号
学位授与年月日	平成 4 年 6 月 8 日
学位授与の要件	学位規則第4条第2項該当
学位論文名	The Vitamin D-responsive Element in the Human Osteocalcin Gene Association with a Nuclear Proto-Oncoqene Enhancer (ヒト osteocalcin 遺伝子のビタミンDレスポンスエレメント)
論文審査委員	(主査) 教授 岡田伸太郎 (副査) 教授 奥山 明彦 教授 萩原 俊男

### 論文内容の要旨

#### [目的]

ヒト osteocalcin 遺伝子のプロモーター内にビタミンDレスポンスエレメント (VDRE) が存在することが報告されたが、詳細な検討はなされていない。本論文では、VDRE の構造・機能を解析し、ステロイドホルモンレスポンスエレメント (HRE) との共通性、相違点、および他の転写因子との相互作用について検討した。

#### [方法]

- ヒト osteocalcin プロモーター (-838/+10), あるいは site directed mutagenesis により作製した種々の mutant 遺伝子を reporter gene である CAT (chloramphenicol acetyltransferase) 遺伝子につないだ後に、ラット骨肉腫由来の ROS 17/2.8 細胞あるいはサル腎線維芽細胞由来の CV-1 細胞 (後者の場合はビタミンD受容体発現ベクターの共存下) に、polybrene 法を用いて導入した。 $10^{-8}$  M 1,25 (OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> の添加2, 3日後に CAT 活性を測定し、ビタミンD誘導性を検討した。
- ビタミンD受容体 (VDR) と遺伝子との結合性を VDR 発現ベクターを導入した COS-1 細胞より得られた VDR を含む核抽出物と P<sup>32</sup>で標識した DNA 断片 (-568/-413) を incubate し、4% polyacrylamide gel に展開して検討した (Band shift assay)。
- DNA 断片の VDR 結合部位を、methylation した DNA 断片 (-568/-413) と酵母発現系より精製したビタミンD受容体を用いて band shift assay 施行後、受容体結合 band と非結合 band を polyacrylamide gel に展開して検討した (Methylation interference)。

#### [結果]

- 既に報告された VDRE 部位の塩基配列を検討した結果、他の HRE と相似した GGTGA 配列を 3 repeats と類似配列を 1つ持つこと、また、転写因子 AP-1 の共通認識配列が存在することが判明した。VDRE 部位全体の deletion mutant では、ビタミンDに対する反応性が失われた。VDRE 内部の deletion mutant を用いた実験より以下の事が明かとなった。①上流側の AP-1 共通認識配列および第1・2の GGTGA 配列の deletion では、ビタミンD非添

加時のCAT活性(basal activity)は減少するが、ビタミンDに対する反応性は保たれた。②第1・2GGTGA間における2塩基以上の挿入(AP-1共通認識配列が消失する)でも同様にbasal activityが低下したが、ビタミンDに対する反応性は保たれた。以上より、既報告のVDRE部位の上流側は、ビタミンD反応性を媒介しないが、その存在により、basal activityが上昇し、さらにビタミンD刺激下のプロモーター活性が相乗性に増加することが示された。③AP-1共通認識配列(第1・2GGTGA)と第3GGTGAの間(gap)への塩基挿入では、basal activityは軽度低下、ビタミンD反応性は保たれた。またgapの塩基CCGをAAAに変更しても反応性が保たれた。④しかし、第3GGTGAをAATGAに変異させた場合は、ビタミンD反応性が消失した。

2. 結合性の検討では、Band shift assayで、VDR・DNA結合物を同定した。このバンドは、過剰量のAP-1共通配列oligonucleotideを加えても競合されなかった。さらに、上流域(AP-1共通配列)を除いたDNAを用いた場合は受容体バンドが認められるが、下流域を除いたDNAを用いた場合は認められなかった。
3. methylation interferenceの結果、VDRは、第3GGTGAおよびさらに下流の類似配列GGGGCAに結合することが判明した。以上の結果から、ビタミンD受容体は既報告のVDREの下流域に結合し、遺伝子の発現調節を行うことが示された。

#### [総括]

ヒトosteocalcinプロモーター内のVDREを、遺伝子発現実験及び結合実験により正確に同定した。その結果、VDREは既報告VDRE下流域のGGGTGAACGGGGCAという配列からなり、HREで報告されているようなpalindromicな配列とは異なることが判明した。更にヒトのVDREは、ラットosteocalcinのVDREとも高いhomologyがあり、half-siteが2つ、同方向に連なった構造をもつと考えられた。この構造の違いは、受容体のDNA認識の違いを示唆していると考えられ、ビタミンD受容体の独自性を報告した研究として意義がある。また、VDRE直上流にAP-1の認識配列があり、VDREと機能的な相乗作用が認められることから、受容体とprotooncogene(c-jun/c-fos)の作用連関を追求する有効なモデルと考えられた。

#### 論文審査の結果の要旨

ビタミンDを含むステロイド類縁ホルモンの受容体は、標的遺伝子上にあるレスポンスエレメントを介して遺伝子発現調節を行う。グルココルチコイド・エストロゲン等のレスポンスエレメントはPalindrome構造であることが報告された。本研究は、ヒトオステオカルシン遺伝子のビタミンDレスポンスエレメント(VDRE)について、transfectionされた変異遺伝子の機能解析およびin vitroにおける結合解析を行い正確に同定した。その結果、VDREの構造はPalindromeではなく、受容体結合部位が同方向に連なること(Tandem Repeat構造)が明かとなりVDREの独自性が示された。また、プロトオンコジーンのAP-1結合部位と並存し機能的連関があることが判明し、ホルモン作用としての遺伝子発現調節機構解明において大変意義がある。

故に学位論文として価値あるものと思われる。