

| | |
|--------------|---|
| Title | IGF-Ⅰ 遺伝子プロモーターの同定と解析 : IGF-Ⅰ 遺伝子およびcDNA構造の進化論的検討 |
| Author(s) | 梶本, 佳孝 |
| Citation | 大阪大学, 1992, 博士論文 |
| Version Type | |
| URL | https://hdl.handle.net/11094/38450 |
| 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。 |

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

Osaka University

| | |
|-------------|--|
| 氏 名 | 梶 本 佳 孝 |
| 博士の専攻分野の名称 | 博 士 (医 学) |
| 学 位 記 番 号 | 第 1 0 3 9 1 号 |
| 学位授与年月日 | 平成 4 年 9 月 17 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 | IGF-I 遺伝子プロモーターの同定と解析 -IGF-I 遺伝子および cDNA 構造の進化論的検討- |
| 論 文 審 査 委 員 | (主査) 教 授 鎌 田 武 信 (副査) 教 授 吉 川 寛 教 授 萩 原 俊 男 |

論 文 内 容 の 要 旨

【目 的】

Insulin-like growth factor I (IGF-I) は, growth hormone の mediator として, 或は, 組織, 時間特異的に発現する autocrine, paracrine effector として, 複雑な発現制御を受けるが, その詳細は明らかでない。IGF-I 蛋白および遺伝子は哺乳類各“種”の間でモザイク状に保存されており, 発現制御に重要な部位を類推する手掛かりとして興味深い。そこで, IGF-I の進化を遡り, ニワトリ (*Gallus domesticus*, chicken) の IGF-I 遺伝子並びに cDNA, アフリカツメガエル (*Xenopus laevis*) の IGF-I cDNA を単離, 解析し, IGF-I の発現調節メカニズムの解明を試みた。

【方法ならびに成績】

I. chicken IGF-I 遺伝子の解析

- ① human IGF-I 或いは各 exon 特異的 probe を用いて chicken genomic library の screening 及びそれに続く chromosomal walking を行い, chicken IGF-I 遺伝子を単離した。chicken IGF-I 遺伝子は, 約 50kb に広がる 4 つの exon より成り, 各々が, human の exon 1, 2, 3 および 5 に対応した。
- ② RNase protection assay 法および 5' 或は 3' RACE 法を用いて, 初めて, IGF-I 遺伝子の 5' 端及び 3' 端の同定に成功した。chicken IGF-I 遺伝子は, 70bp の狭い範囲に, 少なくとも 4ヶ所の transcription initiation site (TIS) を持つが, いわゆる “house keeping gene” の特徴は他に一切認めなかった。
- ③ promoter 活性の存在を, IGF-I を産生する human neuroblastoma の cell line (SK-N-MC) を用い, luciferase を reporter とする gene transfer study を行うことにより証明した。即ち, PCR 法により合成された約 600bp の 5' - flanking sequence で既に有意な promoter 活性が, また, 約 2100bp の DNA 断片では back ground の約 9 倍の活性が認められた。
- ④ 最も 5' 側に位置する TIS は, “initiator” 類似 sequence の中にあり, 約 20bp 上流に “TATA” box 様の sequence の存在も認めた。さらに, -600bp までの promoter 領域には, *Drosophila* の homeo-box 遺伝子の時間および空間特異的発現に重要とされる “GAGA” sequence, AP-1 binding site, 及び heat-shock element 等に類似

した構造を認めた。

- ⑤ 転写開始部位周辺の sequence は human 或は rat でも極めてよく保存されており、哺乳類においても、同部位に promoter が存在する可能性が強く示唆された。

II Xenopus および chicken IGF-I cDNA の解析

- ① Xenopus では、進化上保存されている B domain および A domain の各々の部位に合致する mixed primer を用意し、また、chicken では、先の遺伝子解析により得た塩基配列を基に primer を用意し、各々、RT-PCR 法により単離した。
- ② 単離された両 species の cDNA は、哺乳類の IGF-1A type cDNA に類似した。
- ③ Xenopus と human, rat, 或は chicken において、核酸配列を比較した結果、5' UTR が 90-92% の最も高い相同性を呈し、且つ、同部位に、14 アミノ酸を code する open reading frame (ORF) を共通して認めた。このことから、IGF-I に特徴的な何らかの post-transcriptional な発現調節機構が、同部位を舞台として存在する可能性が示唆された。
- ④ アミノ酸配列を前述の 4 種で比較したところ、mature IGF-I では 70 アミノ酸のうち 57 アミノ酸の保存を認めた。また、COOH-terminal extension peptide (C-terminus) でも 35 アミノ酸のうち 25 アミノ酸が保存されていたことから、C-terminus が何らかの生理的役割を有する可能性が示唆された。
- ⑤ 一方、NH₂-terminal signal peptide は 50% のアミノ酸が 4 種で共通であるに過ぎなかったが、この signal peptide の機能上の保存の有無を検索するため、in vitro で translation および protein processing を行った。即ち、run-off transcription で合成した Xenopus 並びに human IGF-I mRNA に CAP 構造を付け、wheat germ の cell-free translation 系で蛋白に翻訳させた結果、Xenopus においても human と全く同様に、17.5KD の IGF-I primary translation product が、犬の肝 microsomal 膜の存在下で等長の蛋白に開裂することを認め、翻訳開始部位および signal peptide の機能の保存が示された。

【総括】

- ① chicken IGF-I 遺伝子、および、Xenopus 並びに chicken IGF-I cDNA を単離、解析し、同時に、IGF-I 遺伝子 promoter の同定に初めて成功した。
- ② chicken IGF-I 遺伝子は、狭い範囲に広がる複数の TIS を有し、“TATA” box 様構造、“initiator” sequence の他に、“GAGA” sequence, AP-1 binding site など IGF-I 遺伝子の発現調節メカニズムを解く鍵となり得る興味深い構造を認めた。また、promoter が同定されたことで、小人症の発症原因とも関連して興味深い、growth hormone 応答領域の検索が可能となった。
- ③ promoter 周辺の構造は進化上よく保存されており、哺乳類でも、同部位に promoter が存在する可能性が高いと考えられた。
- ④ IGF-I 遺伝子及び cDNA に広範に認められた進化上の保存は、IGF-I が、脊椎動物の進化を通じて普遍的に重要な成長因子であり続けたことを示唆した。同時に、中でも特に高い保存が認められた 5' UTR や C-terminus が、IGF-I 作用発現の制御に重要な何らかの役割を有する可能性を示唆した。

論文審査の結果の要旨

インスリン様成長因子 I (IGF-I) の発現調節は、その鍵となる遺伝子 promoter がその位置すら同定されておらず、そのメカニズムの詳細は不明であった。

本研究は、鶏およびアフリカツメガエルにおける進化論的検討により、遺伝子調節領域を含む IGF-I 遺伝子の全構造を初めて明らかとし、同時に、IGF-I mRNA の 5' 非翻訳領域、並びに、pre-proIGF-I の C 末端ペプチドに進化上高

度の保存を見だし、同部位を舞台とした IGF-I の発現制御機構の存在の可能性を示した。
従って論文としての意義は高いと考える。