



Title	Transcriptional Regulatory Regions for Expression of the Rat Pyruvate Kinase M Gene
Author(s)	王, 自元
Citation	大阪大学, 1994, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/38897
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、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

氏 名	おう じ げん 王 自 元
博士の専攻分野の名称	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	第 1 1 2 5 7 号
学 位 授 与 年 月 日	平 成 6 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	Transcriptional Regulatory Regions for Expression of the Rat Pyruvate Kinase M Gene (ラットピルビン酸キナーゼ M 遺伝子発現の転写制御領域)
論 文 審 査 委 員	(主査) 教 授 谷 口 直 之 (副査) 教 授 岡 本 光 弘 教 授 平 野 俊 夫

論 文 内 容 の 要 旨

[目的]

細胞の癌化に伴い多くの細胞機能に著しい変化がみられる。すなわち、組織を形成して機能するための分化機能の低下あるいは消失、および癌細胞の増殖に必要な細胞機能の亢進である。解糖系律速酵素であるピルビン酸キナーゼはすべての組織の細胞に存在するが、L型、R型、M₁型、M₂型の4種類のアイソザイムを有し、それぞれ組織特異的に発現している。これらのアイソザイムのうちL型とR型、M₁型とM₂型はそれぞれL遺伝子とM遺伝子に由来する。正常肝細胞ではL型のみが発現しているが、癌化するとL型が減少し、M₂型が出現してくる。その変化の程度は肝癌細胞の分化度によって異なり、未分化の肝癌細胞ではM₂型のみが存在する。本研究は、肝癌細胞におけるこのようなM遺伝子の発現がどのような機構で起こるのかを明らかにすることを目的とした。

[方法ならびに成績]

ラットピルビン酸キナーゼM遺伝子の発現調節に、クロマチン構造が影響しているかどうかを、ラット正常肝細胞と未分化型dRLh-84肝癌細胞を用いて検討した。M遺伝子上流約2.2kbから第一イントロンまでの領域にDNase I 高感受性部位があるかどうかを調べたところ、肝細胞では認められなかったが、dRLh-84細胞では転写開始点付近(HS2)と転写開始点より2.9kb下流(HS1)の2ヶ所にDNase I 高感受性部位が認められた。この結果から、正常肝細胞とdRLh-84細胞ではM遺伝子およびその付近のクロマチン構造の違いが認められ、これが両細胞でのM遺伝子の発現の相違をもたらすひとつの機構と考えられた。

つぎに、これらの高感受性部位がM遺伝子の転写活性を調節するシス領域を含むかどうかをCATアッセイにより検討した。M遺伝子の5'上流より種々の長さに削除したDNAをCAT遺伝子に連結し、正常肝細胞およびdRLh-84細胞に導入しCATアッセイをおこなった。正常肝細胞にこれらの遺伝子を導入しても転写活性は認められなかったが、dRLh-84細胞に導入した場合-286bpまで削除しても全転写活性が存在した。また、-254bpまでの削除では約30%の転写活性が認められたが、-225bpまで削除すると全ての活性が失われた。この結果から-286から-225の領域にdRLh-84細胞での発現に必要な領域が、複数存在することが示唆された。この領域にはラットとヒトで良く保存された3ヶ所のDNA配列があり、それぞれAボックス(-281から-265bp)、Bボックス(-257から-242bp)およびCボックス(-235から-216bp)としてオリゴヌクレオチドを合成し、様々に組み合わせてM遺伝子(-68bpから+46bp)に連結し、dRLh-84細胞に導入してCATアッセイを行った。A、B、C単独およびA+

Bでは活性が認められなかったが、A + CおよびB + Cでは全転写活性の約20%、A + B + Cではほぼ全活性が認められた。すなわち、A、B、C単独ではほとんど転写活性を持たないが、3つのボックスが相乗的に作用し、M遺伝子の転写を制御することが明らかになった。一方、HS1を含む領域は転写活性に影響を与えなかったため、HS1領域は転写制御領域を含まないと考えられた。

M遺伝子上流のシス領域に結合する核タンパク質を同定するために³²Pで標識した二本鎖A、B、Cをそれぞれプローブとしてゲルシフト法を行った。AとBに結合するタンパク質は正常肝細胞とdRLh-84細胞で類似しているが、Cに結合するタンパク質は両細胞で異なっていることが示唆された。また、AボックスにはCACCC配列、BボックスにはCTCFやSp1結合部位類似配列、CボックスにはAP-2やMyb結合部位類似配列が認められたが、Myb以外の配列はそれぞれA、B、Cと相互に競合しないため、これらの転写因子と異なっていることが示唆された。Myb配列はCと競合するが、大腸菌で合成したc-MybはCに結合しないため、Cボックスに結合する転写因子はMybと異なることが判明した。

[総括]

肝癌細胞でのM遺伝子の転写にはクロマチン構造の変化、およびA、B、Cの3ヶ所の転写制御領域を通じて転写活性を上昇させる転写因子が必要であることが示された。これらの制御領域は転写開始点上流281bpから216bpまでに存在し、相乗的に作用する転写ユニットとして機能した。これらの領域には未知の異なるタンパク質が結合するが、このうちのCボックスに結合するタンパク質が肝癌細胞での発現に重要と考えられた。従ってこのタンパク質を同定することは肝細胞癌化の機構に迫る手段になりうるものと考えられる。

論文審査の結果の要旨

本研究は、ラットピルビン酸キナーゼM遺伝子の肝癌細胞での発現制御機構について検討したものである。その結果、M遺伝子の転写制御領域は転写開始点より上流-279bpから-215bpまでに存在する3つの領域A、B、Cよりなる転写ユニットであり、これらは相乗的に作用して、肝癌細胞でのM遺伝子の転写の亢進に寄与することが明らかになった。また、肝癌細胞ではM遺伝子の転写にクロマチン構造のゆるみが必要であること、及びこの転写ユニットを通じて転写活性を上昇させるのに必要な肝癌細胞特異的な未知のタンパク質が存在することも明らかにしている。

これらの結果は、M遺伝子の細胞特異的な発現に関わる転写因子の同定、及びクロマチン構造の研究による肝細胞の分化及び癌化の機構の解明につながるものと考えられ、学位に価するものと認める。