



Title	転写因子C/EBP δ 遺伝子の発現調節機構に関する研究
Author(s)	山田, 朋子
Citation	大阪大学, 1997, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/40137
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">https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed >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	山 田 朋 子
博士の専攻分野の名称	博 士 (薬 学)
学 位 記 番 号	第 13091 号
学 位 授 与 年 月 日	平成 9 年 3 月 25 日
学 位 授 与 の 要 件	学位規則第 4 条第 1 項該当 薬学研究科環境生物薬学専攻
学 位 論 文 名	転写因子 C/EBP δ 遺伝子の発現調節機構に関する研究
論 文 審 査 委 員	(主査) 教 授 西 原 力 (副査) 教 授 前 田 正 知 教 授 溝 口 正 教 授 田 中 慶 一

論 文 内 容 の 要 旨

高等生物には 5 万から 10 万種類の遺伝子が存在しており、これらが巧妙に発現制御を受けることにより生体の機能を維持している。なかでも転写は、遺伝子発現の最初のステップであることから最も重要な位置を占めていると考えられている。種々の遺伝子の発現を調節する転写因子の解析が多く行われているが、それらの転写因子自身の発現制御が明らかになっている因子はそれほど多くなく、その機構を解析することは発現調節の主たるものを解明する手掛かりになると考えられる。

炎症や感染によっておこる初期の生体防御作用のひとつである急性期反応において、肝臓では急性期タンパク質と呼ばれる血清タンパク質が誘導される。これら急性期タンパク質の発現制御を行う転写因子として知られているものの中に、CCAAT/enhancer binding proteinファミリーである C/EBP β や C/EBP δ がある。いずれの因子も急性期反応時に発現が上昇することが知られている。C/EBP β については発現制御の解析が行われており、プロモーター領域に存在する C/EBP 結合配列に β 自身が作用することにより行われていることが明らかになっている。一方、C/EBP δ は急性期反応時において、C/EBP β より早期に急激な発現上昇が観察されており、C/EBP β と異なる活性化経路を経て調節されていると推察されているものの、その発現経路や活性化の機構については全く明らかになっていない。また、制御領域の単離も行われていない。そこでラットの C/EBP δ 遺伝子を単離し、プロモーター解析を行うことにより、急性期反応時における C/EBP δ の発現調節機構の解明を目的として以下の検討を行った。

まずはじめに、ラット肝臓由来の genomic library から、マウス C/EBP δ 遺伝子の open reading frame を含む約 1 kb を用いてスクリーニングを行った。約 60 万個から 2 個のポジティブクローンを単離し、遺伝子構造を解析した。その結果、ラット C/EBP δ 遺伝子はイントロンを含まない遺伝子であることが明らかとなった。プライマー伸長法により決定した転写開始点は翻訳開始コドンより上流 40 bp のチミン塩基であり、その 30 bp 上流付近に TATA box 様配列が存在した。

C/EBP δ 遺伝子のプロモーター活性を、ラット線維芽細胞株 3 Y 1 を用いたトランスフェクション法により解析した結果、-175 bp から -79 bp までの領域が重要であることが明らかとなった。この領域には 3 カ所のタンパク質結合領域 (5' 側から δ I, δ II, δ III とする) が存在した。 δ I および δ II には既知の転写因子結合配列が存在しないことから、未知の因子が結合すると考えられた。また、 δ III には典型的な GC box が存在したため Sp 1 が結合すると予想された。これらのことから、定常状態 (basal level) における C/EBP δ 遺伝子の発現には、これら 3 つ

の因子が重要であると考えられた。

次に、急性期反応時の C/EBP δ の発現調節機構について調べた。lipopolysaccharide (LPS) によって誘導されてくる interleukin-1 や interleukin-6 (IL-6), tumor necrosis factor 等の炎症性サイトカインによっても C/EBP δ 遺伝子の発現が誘導されることが知られている。この中で最もシグナル伝達経路が解析されている IL-6 を用いて、ヒト肝癌細胞株 HepG2 における C/EBP δ 遺伝子の発現誘導を調べた。その結果、IL-6 処理30分後から発現誘導が観察され、4 時間後には約 4 倍に発現が上昇した。そこで HepG2 細胞を用いたトランスフェクション法により、C/EBP δ 遺伝子の IL-6 応答領域を解析した。その結果、-175 bp から -79 bp までの領域が IL-6 に応答する領域であることが明らかとなった。次に、ラット肝臓から調製した核抽出液を用いてフットプリント法により、急性期反応時における -175 bp から -79 bp までの領域に作用する因子について解析を行った。その結果、前述の δ I, δ II, δ III に加え、さらに LPS 処理において -112 bp から -98 bp の領域 (以後 δ IV とする) に新たなタンパク質結合領域が観察された。この領域の塩基配列は、急性期反応時にリン酸化により DNA 結合活性が上昇する転写因子 acute phase response factor/signal transducers and activators of transcription 3 (APRF/STAT3) の結合配列と非常に相同性が高かった。HepG2 の細胞の核抽出液においても、IL-6 刺激によって δ IV に特異的に結合する因子の存在をゲルシフト法により確認した。また、その因子が APRF/STAT3 であることを、抗 APRF/STAT3 抗体を用いたスーパーシフトアッセイを行い明らかにした。さらに、 δ IV を欠失したコンストラクトを作成し、トランスフェクション法を行った結果、 δ IV の欠失により IL-6 による応答が消失した。したがって、 δ IV が C/EBP δ 遺伝子の急性期反応応答に重要であることが明らかとなった。

急性期反応時における APRF/STAT3 の活性化は刺激後 1 時間で消失することが知られている。しかしながら、C/EBP δ 遺伝子の発現は C/EBP ファミリーの他の因子に比べて持続していることから、持続的に発現を上昇させる他の因子の関与が考えられる。そこで次に、いくつかの転写因子や C/EBP α や β において報告されている、自己制御による発現調節の可能性について検討した。C/EBP δ 自身によって活性化される領域は C/EBP δ 遺伝子の上流 -9500 bp までには存在しなかったが、下流の +3350 bp から +3700 bp までの領域に存在した。この領域には C/EBP 結合配列と相同性のある領域が 2 カ所存在した。この 2 カ所にはいずれも特異的に C/EBP δ が結合可能であり、双方を欠失させると C/EBP δ に応答しなくなることから、この領域が C/EBP δ 遺伝子の自己制御に関与することが明らかとなった。C/EBP 結合配列には C/EBP δ 以外に C/EBP ファミリーの他の因子も結合可能である。従って、急性期反応時に C/EBP δ より遅れて発現誘導されてくる C/EBP β も C/EBP δ 遺伝子の発現の持続に関与すると考えられる。また、さらに遅れて発現誘導されてくる転写不活性化因子の C/EBP-homologous protein-10 や liver inhibitory factor などにより発現が抑制されると考えられる。

以上のことから、C/EBP δ 遺伝子の発現調節機構は次のように考えられた。basal level の発現は上流領域の δ I, δ II, δ III に作用する Sp1 を含む転写因子により制御されている。一方、急性期反応時にはプロモーター領域に存在する δ IV に作用する APRF/STAT3 が C/EBP δ 遺伝子の急速な発現上昇に関与する。そして、発現した C/EBP δ は、下流領域に存在する C/EBP 結合配列に作用し、自身の活性維持に関与する。また、この自己制御領域は、C/EBP ファミリーの他の抑制因子の作用により、basal level に戻す役割を担っていると推察された。

論文審査の結果の要旨

C/EBP δ は炎症などに対する生体防御反応である急性期反応時に出現する転写因子のひとつである。山田君は、C/EBP δ 遺伝子を単離し、その遺伝子構造を解析した。さらに発現調節に関係する領域を同定するとともに、そこにサイトカイン刺激によって誘導される APRF や C/EBP δ 自身が結合し、C/EBP δ 遺伝子の発現が制御されていることを明らかにし、急性期反応時の C/EBP δ の挙動に自己制御機構を含めた機構が関与していることを示した。

これらの成果は、生体防御機構について重要な知見を与えるものであり、学術的に高く評価でき、博士(薬学)学位論文として充分価値あるものと認められる。