

Title	グルタチオントランスフェラーゼP遺伝子のサイレンサーに作用する転写因子に関する研究
Author(s)	長田, 茂宏
Citation	大阪大学, 1997, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/40488
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	おさ だ しげ ひろ 長 田 茂 宏
博士の専攻分野の名称	博 士 (薬 学)
学 位 記 番 号	第 1 2 7 7 7 号
学 位 授 与 年 月 日	平 成 9 年 1 月 16 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	グルタチオントランスフェラーゼP 遺伝子のサイレンサーに作用する転写因子に関する研究
論 文 審 査 委 員	(主査) 教 授 西 原 力 (副査) 教 授 真 弓 忠 範 教 授 前 田 正 知 教 授 花 岡 文 雄

論 文 内 容 の 要 旨

ラット肝化学発癌過程で生じる過形成結節や肝細胞癌において、胎盤型グルタチオントランスフェラーゼ(GST-P)の発現が顕著に増大する。この現象は肝臓特異的であり、また、正常肝ではこの遺伝子は全く発現していないことから、GST-Pは優れた腫瘍マーカーのひとつとされている。腫瘍マーカー遺伝子の癌化における活性化機構の解明は分子生物学的な面から精力的になされている。GST-P遺伝子においても発現制御領域の解析により、遺伝子発現を正に制御するエンハンサーと負に制御するサイレンサーの存在が明らかにされている。一方、正常状態における腫瘍マーカー遺伝子の発現抑制機構に関する報告は少ない。正常肝においてGST-Pの発現が完全に抑えられていることはエンハンサーに作用する因子のみでは説明できない。そこで、発現を負に制御するサイレンサーが注目された。このサイレンサーには複数のシスエレメントが存在し、少なくとも3種類の転写因子(Silencer Factor-A, -B, -C: SF-A, -B, -C)が結合した。シスエレメント欠損実験や*in vivo*競合実験により、これらのシスエレメントに結合する因子が協調して最大の抑制効果が現れること、また、SF-Aはこれらの領域の中でGST-P silencer 4 (GPS4)に最も強く結合するだけでなく、サイレンサー中の複数の部位に結合することが明らかにされている。そして、GST-P silencer 1 (GPS1)に結合する因子SF-BのcDNAはサウスウエスタン法により単離され、その塩基配列は転写因子C/EBP β と一致することも明らかにされた。そこで、サイレンサーに作用する転写因子に関する検討を行うことにより、正常肝におけるGST-P遺伝子の不活性化機構をより詳細に明らかにすることを試みた。

GPS1に結合するC/EBP β はC/EBPファミリーのひとつである。C/EBPファミリータンパク質は発現部位や時期が異なることから機能の違いが予想されている。負のエレメントに結合する因子としてC/EBP β を単離したにもかかわらず、C/EBP β は誘導型の活性化因子としての報告が多い。そこで、C/EBPファミリーの機能の違いを認識配列から検討した。最近、ランダムな配列を含むオリゴヌクレオチドから、転写因子が結合するオリゴヌクレオチドを回収することにより、転写因子の認識配列のコンセンサスが求められている。そこで、この方法を用いることにより、C/EBPファミリーの認識配列を同定した。その結果、C/EBP α 、C/EBP β 、C/EBP δ の結合コンセンサス配列は類似しており、5'-ATTGC-3'をハーフサイトとするパリンドローム様の配列であることが示された。また、C/EBPファミ

リーの結合性の傾向も類似しており、C/EBP 結合配列の機能にかかわらず、コンセンサス配列に近いほど高い結合性を示すことが明らかとなった。

C/EBP ファミリータンパク質の認識配列は似ていることから、GPS1 には C/EBP β 以外の他のメンバーも作用し、サイレンサーは制御されていると予想される。C/EBP ファミリーの中で、C/EBP α 、C/EBP β 、C/EBP δ は発生、細胞の分化の過程において発現量が変化することが報告されている。そこで、肝化学発癌過程における C/EBP ファミリーの発現量の変化に注目し、GPS1 に結合する因子の変化と C/EBP ファミリーの GPS1 に対する作用を検討した。その結果、正常肝に豊富に存在する C/EBP α は癌化に伴い減少するが、C/EBP β の発現量に変化がないことが明らかとなった。また、トランスフェクション実験により、C/EBP α は C/EBP β による活性化を阻害する因子として働くことが示された。サイレンサー活性は、GPS1 に結合する C/EBP β に対する C/EBP α の割合が重要な要因のひとつであり、肝化学発癌過程においてこの割合が減少することにより、サイレンサー活性が下がり、GST-P 遺伝子の活性化につながると予想された。

前述のように、このサイレンサーが最大の抑制活性を示すためには SF-A、SF-B、SF-C の相互作用が重要であると考えられている。なかでも SF-A はサイレンサーの複数のシスエレメントの中で最も強く GPS4 に結合するだけでなく、サイレンサーの複数の部位に結合するので、SF-A の解析はサイレンサーの機構を考えるにあたり非常に重要である。そこで、ラット肝臓核抽出液より SF-A を精製し、cDNA クローニングを行い、SF-A の機能を解析した。精製の結果、SF-A は NF1 ファミリータンパク質であることが明らかとなった。さらに、単離した NFI-A cDNA を用いたトランスフェクション実験により、NFI-A の C 末端領域は転写不活性化領域として機能することが示された。

GST-P 遺伝子のサイレンサーに作用する 3 種類の転写因子のうち、SF-A は NF1 ファミリー、SF-B は C/EBP ファミリーであることが明らかとなった。そして、それぞれのファミリーのうちで正常肝に豊富に存在する NFI-A は直接発現を抑える抑制因子として、C/EBP α は C/EBP β による活性化を阻害する抑制因子としてサイレンサーに働くことにより、正常肝における GST-P 遺伝子の発現抑制に関与していると考えられた。肝化学発癌発生過程での GST-P の発現率がほとんど 100% であることは肝細胞を腫瘍化する原動力となる遺伝子と GST-P 遺伝子が何らかの共通な機構で制御されている可能性を示唆する。これらの遺伝子が位置的には連鎖していないが、何かある制御因子を共有している可能性が、トラスジェニックラットを用いた実験により示されている。癌化機構は非常に複雑であるが、腫瘍マーカー遺伝子の正常状態における抑制機構を明らかにした本研究は、癌化機構を分子生物学的に理解するために役立つと考えられる。

論文審査の結果の要旨

ラット肝臓のグルタチオントランスフェラーゼ P (GST-P) 遺伝子は化学発癌過程において顕著に発現するが、正常肝では発現していない。そこで、正常肝臓での発現抑制機構について、長田茂宏君は GST-P 遺伝子のサイレンサーに作用する 3 種類の転写因子 (SF-A、SF-B、SF-C) に着目して検討した。まず SF-A を精製し、NF-I ファミリーの、SF-B は C/EBP ファミリーのタンパク質であり、これらの因子の認識配列や結合性、転写調節作用の類似性や相違点を明らかにした。そして、それぞれのファミリーのうちで正常肝に豊富に存在する NF-IA と発癌により減少する C/EBP α が転写抑制因子としてサイレンサーに作用することにより、正常肝臓の発現抑制に関与することを示した。

これらの研究は化学発癌機構について重要な知見を示したものであり、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。