

Title	転写因子Nuclear Factor 1の遺伝子構造および機能解析
Author(s)	徐, 明旭
Citation	大阪大学, 1997, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/40531
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	徐 明 旭
博士の専攻分野の名称	博 士 (薬 学)
学位記番号	第 1 3 4 0 6 号
学位授与年月日	平成 9 年 9 月 30 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 Nuclear Factor 1 の遺伝子構造および機能解析
論文審査委員	(主査) 教授 西原 力 (副査) 教授 前田 正知 教授 山元 弘 教授 溝口 正

論 文 内 容 の 要 旨

ラット肝化学発癌過程において発現が増加する胎盤型グルタチオントランスフェラーゼは正常肝臓においては発現が抑えられている。これまでに当研究室において、この遺伝子の発現制御領域を解析した結果、発現を負に制御するサイレンサーを同定し、そこに作用する転写因子として Nuclear Factor 1 (NF1) を精製してきた。NF1 はアデノウイルス DNA の複製と様々な遺伝子の転写調節の両方に働く因子として知られている。複数の生物から単離された NF1 cDNA の解析により、NF1 はファミリーを形成しており、少なくとも 4 種類の遺伝子 (NF1-A, NF1-B, NF1-C, NF1-X) に分かれていると考えられている。現在まで、ニワトリやヒトなど様々な生物から NF1 cDNA が単離されているが、哺乳類において、4 種類すべての NF1 cDNA が単離されている生物種はない。また、ニワトリにおいてのみすべての NF1 cDNA が単離されているが、遺伝子構造および機能に関する解析は行われていない。そこで、本研究において、ラット NF1 ファミリー cDNA の単離および NF1-A 遺伝子の単離と構造解析を行い、NF1-A の機能解析についても検討した。

NF1 の転写制御機能解析の第一段階としてラット NF1 cDNA の単離を行った。すでにラット NF1-A cDNA については当研究室において単離されているため、まだ単離されていないラット NF1-B, NF1-C, NF1-X cDNA をラット肝臓 cDNA ライブラリーより単離した。塩基配列を決定した結果、NF1-B については複数のスプライシングアイソフォームが存在することが明らかとなった。NF1-C, NF1-X については、それぞれ一種類のみが単離された。他の種属にスプライシングアイソフォームが存在することより、ラット NF1-C, NF1-X においても他のアイソフォームが存在すると予想される。塩基配列およびアミノ酸配列の比較により、ラット NF1 ファミリー間において、N 末端側の配列は高く保存されており、C 末端側の配列はファミリー間で異なることが明らかとなった。C 末端側の塩基配列およびアミノ酸配列の違いが NF1 の機能の違いにつながる可能性が考えられる。ラットの NF1-A, NF1-B, NF1-C, NF1-X それぞれがマウス、ヒト、ハムスターの NF1 と非常に高い相同性を示した。このことから、種属間において、NF1 ファミリーのそれぞれの機能の違いはほとんどないと推定される。

NF1 はそれぞれの遺伝子から選択的スプライシングによりアイソフォームが生じると考えられている。ラット

NF1-A については当研究室において4種類のアリソフォームを単離している。しかし、NF1 ファミリーのゲノム遺伝子については、ブタ NF1-C 遺伝子のみが単離されているがプロモーター領域は同定されていない。そこで、ラット NF1-A 遺伝子の単離を行った。ラット肝臓ゲノムライブラリー約300万個のクローンから NF1-A 遺伝子の5' 上流領域および open reading frame を含むクローンを得た。NF1-A cDNA との比較により、NF1-A 遺伝子は11個のエキソンよりなることを示した。また、ラット NF1-A アイソフォームである NF1-A2, NF1-A3, NF1-A4 はそれぞれエキソン3, エキソン3-6, エキソン10が欠失していることが明らかとなった。また、この遺伝子は70 kb 以上であることが明らかとなった。決定した塩基配列より、NF1-A 遺伝子のエキソン-イントロンのスプライシングサイトのすべてが GT/AG ルールに従っていることが明らかとなった。また、エキソン-イントロン周辺配列も報告されている境界領域周辺配列のコンセンサス配列と類似していた。また、5'-RACE 法により転写開始点を決定した。しかし、5' 側の長さが異なる複数のフラグメントが5'-RACE 法により回収されたことから、NF1-A 遺伝子には複数の転写開始点が存在すると考えられた。転写開始点より上流領域の塩基配列を調べたところ、典型的な TATA 配列は存在せず、Sp1 や AP2 のコンセンサス配列が多く存在し、上流約500bp領域の GC 含量が80%を越えるなどの転写開始点が複数存在する遺伝子に特徴的な配列が多く存在した。

NF1 ファミリーの機能について、NF1-C, NF1-X は遺伝子の発現を正に制御する因子として同定され、C 末端領域に転写活性化ドメインが存在することが報告されている。NF1-B は HMG-CoA reductase 遺伝子のプロモーターに作用する因子として報告されているが、その詳細は明らかにされていない。NF1-A はいくつかの遺伝子のサイレンサーに作用する因子として同定されているが、転写抑制領域の存在は全く報告されていない。そこで、NF1-A の C 末端領域と GAL4 の DNA 結合ドメインとの融合クンパク質を発現するプラスミドを用いたトランスフェクション法により、NF1 による負の制御機構について検討した。その結果、NF1-A の C 末端領域は様々なプロモーターに対して転写抑制効果を示した。NF1-A の転写抑制領域の同定を行ったところ、318-427番目のアミノ酸領域が repression domain であることが明らかとなった。また、この領域の上流209-315番目のアミノ酸領域が存在することにより、最大抑制作用を示したことから、実際の NF1-A は209-427番目のアミノ酸領域を介して転写抑制作用を示すと考えられた。これらの領域はセリン、プロリンまたはセリン、グリシンを多く含む特徴的なアミノ酸組成であった。

本研究において、ラット NF1 ファミリーの cDNA を単離し、ラット NF1 ファミリー間およびラットと他の生物種間のアミノ酸配列の相同性を明らかにした。また、NF1-A 遺伝子を単離することにより、スプライシングアイソフォームとエキソンの対応を明らかにした。また、NF1-A の C 末端領域の解析により、repression domain の同定した。今後 NF1-A の repression domain が作用する因子を明らかにすることにより、NF1-A の転写抑制機構がより詳細に解明されると考えられる。また、NF1-A 遺伝子の詳細なプロモーター解析によりこの遺伝子自体の発現調節機構も明らかにされるものと期待される。

論文審査の結果の要旨

肝化学発癌のマーカー酵素である Glutathione-S-transferase は正常な肝細胞では発現が抑制されている。その発現抑制機構として転写抑制因子が明らかにされているが、そのひとつである Nuclear Factor 1 (NF1) について、徐君は遺伝子構造解析と機能解析を行った。まずラット肝臓から NF1-B, C, X の cDNA を単離することに成功し、これら相互および NF1-A との間、NF1-B 各アイソフォーム間や他動物のそれらとの相同性等を明らかにした。NF1-A 遺伝子を単離し、11個の Exon からなる70 kb の遺伝子であることを明らかにするとともに、転写開始点も解析した。さらに NF1-A の C 末端領域の Repression domain を決定し、特徴的なアミノ酸配列をもつことも示した。

これらの成果は、化学発癌機構の解明に関する重要な知見であり、学術的に高く評価され、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。