



Title	NF-Y Regulates Transcription of the Phospholamban Gene
Author(s)	矢吹, 正典
Citation	大阪大学, 1998, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/40736">https://hdl.handle.net/11094/40736</a>
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。

*The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA*

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

The University of Osaka

氏名	矢吹正典
博士の専攻分野の名称	博士(医学)
学位記番号	第13747号
学位授与年月日	平成10年3月25日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 医学研究科内科系専攻
学位論文名	NF-Y Regulates Transcription of the Phospholamban Gene (ホスホランバン遺伝子の転写調節機構:転写因子NF-Yの関与について)
論文審査委員	(主査) 教授 多田道彦
	(副査) 教授 谷口直之 教授 祖父江憲治

### 論文内容の要旨

#### 【目的】

ホスホランバン(PLN)はカルシウムポンプと共に心筋小胞体膜に存在し、蛋白質間相互作用によりカルシウムポンプの活性を調節している。非リン酸化状態のPLNはカルシウムポンプ活性の抑制因子として機能し、一方cAMP依存性またはCa<sup>2+</sup>／カルモジュリン依存性キナーゼによりリン酸化されるとその抑制効果は解除される。PLNは心臓および骨格筋の遅筋と平滑筋に組織特異的に発現がみられる。また、心臓に対する甲状腺ホルモン負荷や圧負荷によってPLNの発現量は低下し、カルシウムポンプ活性への抑制効果は減少する。このようにホスホランバン遺伝子の転写調節機構の解明は、心臓の発生分化および心機能調節を理解する上で重要である。本研究において、ホスホランバン遺伝子の転写調節部位を解析するとともに、この調節部位に結合する転写因子の同定を行った。

#### 【方法】

##### 1: ルシフェラーゼアッセイ

PLN遺伝子の転写開始部位から5'上流領域3121base pair(bp)と下流領域84bpを含むDNA断片をクローニングした。異なる末端5'領域よりなるPLN遺伝子のDNA断片を作成し、ルシフェラーゼ発現ベクターに挿入した。これらのコンストラクトを初代培養心筋細胞にリポフェクチン法を用いて導入し、48時間後これらの細胞を可溶化してそのルシフェラーゼ活性を測定した。

##### 2: ゲルシフトアッセイ

Dignamらの方法により調整した心筋細胞の核抽出物と<sup>32</sup>PでラベルしたPLN遺伝子のDNA断片を混合して電気泳動し、DNA断片と核蛋白質の結合を検討した。さらに結合する転写因子を同定するために、合成オリゴヌクレオチドおよび抗体を用いて検討した。さらにリコンビナント転写因子とDNA断片の結合実験を行った。

##### 3: NF-YA, NF-YBのセンスおよびアンチセンスcDNA発現実験

センスとアンチセンス方向にNF-YA, NF-YBのcDNAを挿入した発現ベクターをPLN-ルシフェラーゼコンストラクトと共に培養心筋細胞に導入し、その培養細胞のルシフェラーゼ活性を測定した。

## 【結果】

ルシフェラーゼ活性は、上流-3.1 kbp から-96bp まで順次欠損させたコンストラクトで高値を示したが、さらに-78bp まで欠損させると著明に減少した。従って-96bp から-78bp の領域(PRE) が PLN 遺伝子の転写活性に重要であることが示された。

ゲルシフトアッセイを行った結果、PRE を含む DNA 断片と核抽出物との結合がみられた。核酸配列の分析により、この PRE に CCAAT 配列を認めたため、CCAAT 結合因子について次に検討した。合成オリゴヌクレオチドによる競合実験において、転写因子 NF-Y および YB-1 結合配列を含むオリゴヌクレオチドが、この DNA 断片と核抽出物の結合を抑制した。NF-Y のサブユニットである NF-YA, NF-YB および YB-1 に対する抗体を用いてゲルシフトアッセイを行うと、NF-YA, NF-YB に対する抗体が DNA 断片と核抽出物の結合を阻害したが、YB-1 に対する抗体は阻害しなかった。さらに、リコンビナント NF-YA, NF-YB および YB-1 蛋白質を作成し、DNA 断片との結合を検討したところ、リコンビナント NF-YA と NF-YB が共存した場合のみ、DNA 断片との結合がみられた。以上より、NF-YA と NF-YB が二量体を形成して PRE に結合することが示された。

次に、PLN 遺伝子の転写活性における NF-Y の機能的関与を検討するため、NF-YA, NF-YB のセンスおよびアンチセンス cDNA 発現実験を行った。アンチセンス方向に NF-YA または NF-YB の cDNA を挿入した発現ベクターを導入した培養心筋細胞では、ルシフェラーゼ活性がおよそ 50% 減少した。以上より NF-YA と NF-YB は機能的にも PLN 遺伝子の転写調節に関与していることが示された。

## 【総括】

PLN 遺伝子の発現調節に CCAAT 配列を含む 5' 上流-96/-78bp の領域が重要であった。さらに、NF-YA と NF-YB はこの転写調節領域に結合し、PLN 遺伝子の転写活性を制御することが示唆された。

## 論文審査の結果の要旨

心筋小胞体の Ca 輸送調節機構は、心筋の興奮収縮連関において心筋収縮・弛緩特性の両方を規定する。ホスホランバーンは心筋型カルシウムポンプの制御因子として機能し、心機能調節の上で大変重要な因子である。ホスホランバーン遺伝子の発現には組織特異性がみられ、心筋と平滑筋、骨格筋の遅筋にのみ発現する。本研究では、ホスホランバーン遺伝子の上流領域を解析することにより、転写活性の維持に重要な領域の同定を行った。また、転写因子 NF-Y がこの領域に結合し、転写活性の調節を行うことを明らかにした。

本研究では、ホスホランバーン遺伝子の発現機構を考える上で示唆に富み、よって学位に値するものと考える。