The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	ラット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領域に作用する転写因子に関する研究
Author(s)	田辺, 敦弘
Citation	大阪大学, 2001, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.11501/3184236
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

【2】

氏　　名	田　辺　敦　弘（たなべ　あつひろ）
博士の専攻分野の名称	博　士（薬　学）
学　位　記　番　号	第　16149　号
学位授与年月日	平成13年3月23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	**ラット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領域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　田中　慶一　　教　授　馬場　明道　　教　授　土井　健史

論　文　内　容　の　要　旨

腫瘍マーカー遺伝子GST-Pは、ラット正常肝臓での発現がほとんど観察されない。一方、化学物質により肝癌を誘発させる過程において顕著に発現が増大する。当研究室では、発癌機構の解明の手がかりの一つとして、GST-Pの発現調節機構を解明しようとしている。

GST-Pが正常肝臓で発現が全くみられないことは、発現を正に制御する要因が無いだけではなく、負に制御する要因があると考えられた。GST-P遺伝子の5′側上流－396から－140bpには、転写を負に制御するサイレンサー領域があることが明らかとなった。このサイレンサーには、3種類のタンパク質SF-A、B、Cが結合し、これまでにSF-AがNF1ファミリー、SF-BがC/EBPファミリーであることが明らかにされている。一方、GPS2に結合して転写を抑制していると考えられるSF-Cは、まだクローニングされていない。そこで酵母one-hybrid systemを用いたスクリーニングを試みた。

SF-Cは、ラットの正常肝臓で発現していると考えられるため、rat liverからGPS2に結合するタンパク質のスクリーニングを行うのが適当であると考えられた。しかし、他の臓器でもGPS2に結合するタンパク質が発現している可能性もあるので、いくつかの細胞の核抽出物にGPS2結合タンパク質が存在するか否かをゲルシフト法により調べた。その結果、HeLa細胞、WI-38細胞、Jurkat細胞にGPS2結合タンパク質が存在した。酵母one-hybrid systemを用いた4段階のスクリーニングを行い、ラット肝臓、HeLa細胞、WI-38細胞、Jurkat細胞のcDNAライブラリーから、それぞれ数百万個以上のクローンをスクリーニングした。最終的にポジティブであったクローンのDNA配列を決定し、データベースにより検索した。その結果、BTEB2、CPBP、EZF、LKLF、Sp4、TIEG1、TFIIIA、および配列は登録されているものの、発現や機能についての報告の無い遺伝子（PAC clone RP4－75IH13ヒト染色体7q35全長128361bpの内20009－21523bp、GenBank AC004877）と一致した。

これらは全て、DNA結合領域として知られているC_2H_2型の亜鉛フィンガーモチーフを有していた。特にBTEB2、CPBP、EZF、LKLF、Sp4、TIEG1は亜鉛フィンガーモチーフを3回繰り返してもつ、Krüppel型と呼ばれる因子であった。今回得たPAC clone RP4-75IH13の20009－21523bpの部分の予想されるアミノ酸配列には、亜鉛フィンガーモチーフが12個含まれることからMZFP（multiple zinc finger protein）と名付けた。またTFIIIAの今回得た領域はhuman TFIIIAとして報告されている配列全てを含み、5′側18bpはGTF3Aに一致していた。TFIIIAは、亜鉛フィンガーモチーフを8個有していた。

得られた因子が、SF-Cであることを結論付ける条件として、1．GPS 2に十分なアフィニティーで直接結合すること。2．GPS 2を介して転写を抑制すること。3．ラット正常肝臓で発現していること。の3点が挙げられる。酵母one-hybrid systemでは、GPS 2への直接的な結合やアフィニティーについては明らかにできない。そこでゲルシフトアッセイにより直接的な結合の検討と、解離定数の算定を試み、その結果、BTEB 2、EZF、LKLF、TIEG 1、MZFP、TFIIIAが、GPS 2に十分なアフィニティーで結合し、これらの因子のGPS 2に対する解離定数に大きな差が無いことを明らかとした。

次に、これらの因子が実際にGPS 2を介した転写抑制因子として機能しうるか否かの検討をおこなった。Krüppel型に分類される4種類の因子についてのトランスフェクションアッセイを行った結果、サイレンサーの全長を含むレポータープラスミドを用いたときに、BTEB 2、EZF、TIEG 1が、GPS 2を介して転写を抑制した。一方GST-P遺伝子のプロモーターにつないだGPS 2の繰り返し配列を介した転写活性を調べた実験では、EZFは転写活性化因子として働いた。GPS 2はGPS 1および3と一部重なって存在している。EZFは、GPS 1および3に結合するC/EBPファミリーやNF 1ファミリーと相互作用することにより、サイレンサー全長が存在するときには、GPS 2を介しての転写抑制因子として働いたものと考えられた。今後EZFを含め、今回転写抑制活性を示した3種類の因子とC/EBPファミリー、NF 1ファミリーとの相互作用などの検討を行う必要がある。

BTEB 2、EZFはラットの各臓器での発現は、きわめて低いことが報告されている。一方TIEG 1は、mRNAレベルで他の臓器と比較して十分に発現している。このことは、TIEG 1がラット正常肝臓でGPS 2に結合して、GST-P遺伝子の発現を抑制し得ることを示唆している。MZFPに関しては、ノザンブロット解析を行った結果、ラット肝臓、腎臓、心臓、肺臓、すい臓、小腸で発現が認められた。しかし、転写調節に関する検討は行っておらず、現時点でSF-Cとなり得るかどうかは不明である。以上GPS 2への結合性、転写抑制能、肝臓での発現の面から考慮して、現時点ではTIEG 1がSF-Cの候補として最も有力であると考えられた。

GST-P遺伝子のサイレンサーに結合する因子、SF-A、B、Cが今回の一連の実験で全てそろった。これら3種類の因子は、GPS 1、2、3に結合する。そしてGPS 1および3はGPS 2と一部重なって存在し、欠失変異体を用いたトランスフェクションにより、これらのサイトに結合する因子群により協調的に転写を抑制すると考えられている。今後SF-A、B、Cの相互的な作用を含め、癌化の過程における発現量の変化、コファクターとの相互作用など、全体的な視野における検討が期待される。

論文審査の結果の要旨

グルタチオントランスフェラーゼP（GST-P）は腫瘍マーカー酵素のひとつであり、正常細胞では発現していない。田辺君は化学発癌機構解明のひとつとしてその発現抑制に関わる転写因子SF-Cの単離と解析を行い、以下のような知見を得た。すなわち、ラット肝臓、各種ヒトがん細胞由来株から酵母One-Hybrid法により、8種類のSF-C候補遺伝子をクローニングした。これらの因子のうち、そのDNA配列、発現タンパク質のGST-P遺伝子の上流領域への結合性や転写抑制作用などの検討から、候補因子として3因子が有力であり、各種臓器での発現状況などからTIEG 1が最有力であることを示した。

以上の成果は、化学発癌機構の一端を解明したものであり、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。