

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	

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

Osaka University

氏名	た 田 辺 敦 弘
博士の専攻分野の名称	博 士 (薬 学)
学位記番号	第 1 6 1 4 9 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、GPS 2 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 GPS 2 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 GPS 2 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 GPS 2 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 GPS 2 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、BTEB 2、CPBP、EZF、LKLF、Sp 4、TIEG 1、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 RP 4-75IH13 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 C₂H₂ 型の亜鉛フィンガーモチーフを有していた。特に BTEB 2、CPBP、EZF、LKLF、Sp 4、TIEG 1 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 RP 4-75IH13 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 GTF 3 A 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、ノザンプ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。