

Title	Human Chorionic Gonadotropin- α Gene Is Transcriptionally Activated by Epidermal Growth Factor through cAMP Response Element in Trophoblast Cells
Author(s)	松本, 敬子
Citation	
Issue Date	
Text Version	none
URL	http://hdl.handle.net/11094/42689
DOI	
rights	

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

氏名	まつもと 敬子
博士の専攻分野の名称	博士(医学)
学位記番号	第 15636 号
学位授与年月日	平成12年6月2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	Human Chorionic Gonadotropin- α Gene Is Transcriptionally Activated by Epidermal Growth Factor through cAMP Response Element in Trophoblast Cells (絨毛細胞におけるヒト絨毛性ゴナドトロピン α 遺伝子の cAMP 応答領域を介した上皮成長因子による転写活性化の機構)
論文審査委員	(主査) 教授 村田 雄二 (副査) 教授 遠山 正彌 教授 奥山 明彦

論文内容の要旨

[目的]

上皮成長因子 (EGF) は、絨毛細胞の機能的分化を促進し、分化の指標である絨毛性ゴナドトロピン (hCG) の産生を促進することが知られている。本研究では、in vitro で分化させうるという特徴を有するラットの絨毛癌細胞由来の Rcho-1 細胞を用いて、EGF による hCG α 遺伝子活性化の機構を解析することを目的とした。

[方法ならびに成績]

hCG α プロモーターと CAT リポーターを接続した遺伝子を Rcho-1 細胞に安定導入した。得られた細胞を EGF 無添加のコントロール群と EGF 添加群に分けて培養し、それぞれ CAT アッセイを行った。なおこの Rcho-1 細胞は、10日間の培養期間を通じて、形態的及び機能的に分化した。

hCG α 遺伝子上流域-290bp を含む CAT 遺伝子を安定導入した Rcho-1 細胞に、10nM EGF を添加し2日毎に CAT 活性を測定すると、EGF 無添加群においても分化に伴う自発的な hCG α プロモーター活性の上昇が観察されたが、添加により分化に伴う hCG α プロモーターの活性化はさらに促進され、EGF を6日間作用させた時、2.7倍とその促進効果は最大となった。

hCG α 遺伝子上流290bp には、TSE (trophoblast specific element)、GATA element、CRE (cAMP response element) といった転写因子結合部位が存在する。EGF 応答領域を同定するために、種々の deletion mutants を作製し、これらを Rcho-1 細胞に安定導入してそれぞれの mutant で EGF による CAT 活性上昇がみられるか否かを検討した。CRE 2つを含む-142bp の mutant では、-290bp と同等の EGF による転写促進が認められた。一方、CRE を1つしか含まない-128bp の mutant では、EGF に対する反応性は低下傾向を示し、CRE が2つとも削除された-110bp の mutant では、EGF に対する反応性は全く認められなかった。さらに-290bp において2つの CRE に mutation を入れた CAT 遺伝子でも EGF による CAT 活性の上昇は完全に消失した。これらの結果より、hCG α 遺伝子プロモーター上の CRE が EGF 応答領域であることが明らかとなった。

次に CRE に結合する転写因子を解析するために、³²P でラベルされた CRE をプローブとしてゲルシフトアッセイを行った。EGF を作用させた Rcho-1 細胞 (EGF 群) と作用させなかったコントロール群より核蛋白を抽出し、サンプルとして用いた。コントロール群、EGF 群共に4本のバンドすなわち DNA核蛋白複合体を認めた。これらのバンドの特異性を確かめるために、cold CRE あるいは cold mutant CRE を competitor として加えたところ、コ

ントロール群、EGF 群共に cold CRE で全てのバンドは消失し、cold mutant CRE ではバンドに変化は認められなかった。ゲルシフトアッセイの結果から CRE に特異的に結合する転写因子の存在が明らかとなった。CRE に結合している転写因子をさらに解析するために、サウスウエスタンブロット及び抗 CRE binding protein (CREB) 抗体を用いたウエスタンブロットを行った結果、hCG α 遺伝子プロモーター上の CRE には CREB が結合しており、その結合蛋白量は EGF の添加により変化しないことが明らかとなった。

そこで EGF による hCG α 遺伝子活性化機構をさらに解析するために EGF による CREB のリン酸化を検討した。Rcho-1 細胞に EGF を 5 分あるいは 30 分作用させた後、核蛋白を抽出し、リン酸化 CREB を特異的に認識する抗体 pCREB 抗体を用いてウエスタンブロット解析を行った。EGF 添加前のコントロールではリン酸化 CREB は認められなかったが、EGF 添加 5 分後には、43kDa のリン酸化 CREB が検出された。さらに種々のカイネーシンヒビターで前処置後 EGF を添加すると、PKC インヒビターである H7, staurosporine, chelerythrine により EGF による CREB リン酸化は抑制された。以上より EGF は主として PKC 経路を介して CREB をリン酸化することを明らかにした。

[総括]

絨毛細胞において EGF は、hCG α プロモーター上の CRE に結合する CREB を主として PKC 経路を介してリン酸化し、hCG α 遺伝子の転写を促進することを明らかにした。

論文審査の結果の要旨

本研究は、上皮成長因子 (EGF) が絨毛細胞の機能的分化を促進し分化の指標である絨毛性ゴナドトロピン (hCG) の産生を促進するというこれまでに良く知られた現象を、遺伝子の転写レベルで解析を行ったはじめてのものである。

hCG α プロモーターにおける EGF 応答領域を同定するために、種々の deletion mutants を作成し EGF による CAT 活性の促進を調べて、EGF 応答領域は CRE (cAMP response element) であることを明らかにした。次に CRE に結合する転写因子の解析を行うために、CRE 配列をプローブとしてゲルシフトアッセイおよびサウスウエスタンブロットを、また抗 CREB 抗体を用いてウエスタンブロットを行い、CRE 配列に CREB 蛋白が結合することを明らかにした。さらに EGF により主として PKC 経路を介して CREB がリン酸化されることを明らかにし、EGF による hCG α 遺伝子の転写因子促進の機構を系統的に解明しており、本研究は学位の授与に値すると思われる。