



Title	Identification of Novel Pancreas-specific Regulatory Sequences in the Promoter Region of Human Pancreatic Secretory Trypsin Inhibitor Gene
Author(s)	安田, 卓司
Citation	大阪大学, 1999, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/43059
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、 https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed 大阪大学の博士論文について 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	安 田 卓 司
博士の専攻分野の名称	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	第 1 4 8 4 1 号
学 位 授 与 年 月 日	平 成 11 年 5 月 28 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	Identification of novel pancreas-specific regulatory sequences in the promoter region of human pancreatic secretory trypsin inhibitor gene (ヒト膵分泌性トリプシン・インヒビター遺伝子の膵特異的発現を制御するプロモーター領域上の DNA 配列の同定)
論 文 審 査 委 員	(主査) 教 授 門 田 守 人 (副査) 教 授 田 中 亀 代 次 教 授 平 野 俊 夫

論 文 内 容 の 要 旨

【目的】

多細胞生物の多くの遺伝子の発現は転写レベルで制御されている。膵特異的発現を示すアミラーゼ等は遺伝子の上流 5' 側にある特定の共通配列を膵特異的転写因子“PTF1”が認識、結合することでその発現が制御されている。ヒト膵分泌性トリプシン・インヒビター (PSTI) も膵管内に分泌され、トリプシンと結合してその活性化を阻害し膵臓を自己消化の危険から守る蛋白質で、同様の制御機構の存在が推測される。そこで、この PSTI の発現調節機構を解明すべく、以下実験を行った。

【方法並びに成績】

全長 27 kb のヒト PSTI 遺伝子を導入したトランスジェニックマウスを作製し、各種臓器より RNA を抽出、Northern Blot 法にてその転写レベルを検討した。転写調節領域の推定は、CAT assay 法を用いた。また、核蛋白の結合領域の同定には、rat 膵癌細胞株：AR42j 及び rat 線維芽細胞株：XC から抽出した核蛋白を用い、DNase 1 footprinting を行った。更に、結合領域の二本鎖 DNA を合成し Gel mobility shift assay (GMSA) を行い、core DNA 配列の同定、既知の膵特異的転写因子である PTF1 の関与の有無を検討した。

- 1) Northern Blot 法により、PSTI 遺伝子の 5' 側が -1.0 kb しかないトランスジェニックマウスにおいてもヒト PSTI RNA は膵特異的に転写されていた。つまり、PSTI は転写レベルでその発現が調節され、その制御領域は 5' 側 -1.0 kb 以内にあると推測された。
- 2) 上流 -1.0 kb より 5' 側が順次欠失した PSTI 遺伝子を持つ CAT plasmid を用い、AR42j に transfection し CAT assay を行った。その結果、-159/-141 に活性化領域、-134/-115 に不活化領域、-115/-98 に活性化領域そして -98/-77 に基本転写領域の各 5' 端が存在すると推測された。
- 3) DNase 1 footprinting assay により転写因子である核蛋白の結合領域を検討した。AR42j の核蛋白では、Region I (I_A : -161/-136、I_B : -131/-116)、Region II (II_A : -103/-95、II_B : -94/-74)、Region III (-65/-44) への結合が示されたが、CAT assay の結果に矛盾しなかった。XC の核蛋白とでは Region IV (-154/-137) の

みであった。Region III は PSTI の転写開始点が -60 bp であることより promoter 領域と推察された。

- 4) Region I and/or II の欠失の有無による CAT assay の結果、Region II のみでも約半分の転写活性を示したが、Region I のみではほぼ消失した。Region II は PSTI 遺伝子における膵特異的発現の調節領域、Region I はその増幅領域であると考えられた。
- 5) Region IV の機能を解明すべく、3) と同様の実験を XC 細胞株で行った。XC では PSTI の転写活性は認めないが、-141 bp 以降の 5' 側の欠失で Region IV が欠落されると、AR42j の basal activity と同程度の転写活性が得られた。これより、Region IV は PSTI 非発現細胞における負の制御領域と推測された。
- 6) 膵特異的転写因子“PTF1”の認識配列を cold probe として GMSA を行った。各 Region-核蛋白複合体形成において全く競合は示さなかった。
- 7) Region I、II、IV について 10 bp 毎の substitution mutant を cold probe とした GMSA にて核蛋白の認識する core 配列を検討した。Region II は -93/-74 であったが、Region I 及び IV はいずれも -148/-139 で、“CAAT-CAATAAC” という配列を共有していた。

【総括】

ヒト PSTI 遺伝子は、上流 5' 側の増幅領域 (-161/-136)、抑制領域 (-131/-116)、膵特異的転写活性化領域 (-103/-95)、基本転写領域 (-94/-74) と promoter 領域 (-65/-42) の相互作用により、その転写が膵特異的に調節されていた。この調節に“PTF1”の関与はなく、他の膵酵素とは全く異なる制御機構を持つと考えられた。増幅領域の“CAATCAATAAC”という特徴的な core 配列は、同時に PSTI 非発現細胞における転写抑制領域 (-154/-137) の core 配列でもあり、PSTI 発現膵細胞においては活性化領域として、PSTI 非発現非膵細胞においては不活化領域として機能していると思われた。

論文審査の結果の要旨

膵分泌性トリプシン・インヒビター (PSTI) は、膵管内での膵液の活性化を抑え、膵臓の自己消化を防ぐという極めて重要な役割を担う蛋白質である。本研究は、PSTI の膵臓特異的発現について検討を加え、その転写制御機構を解明したものである。ヒト PSTI 遺伝子を組み込んだトランスジェニック・マウスの実験、CAT assay を用いた 5' 側領域の転写活性の実験、及び DNaseI footprinting assay や Gel shift assay による核蛋白-DNA の結合実験等を駆使し、膵臓における PSTI の転写制御が上流 5' 側にある増幅、抑制、膵特異的転写調節、基本転写、promoter の五つの領域の相互作用によることを明らかにした。また、この領域には既知の膵特異的転写因子 (PTF1) の関与はなく、全く新しい制御機構であることを証明した。更に、膵臓以外の非発現細胞における抑制領域の存在をも明らかにし、その core sequence “CAATCAATAAC” は膵臓における増幅領域の core sequence と同一で、細胞によって正にも負にも働く極めて unique な配列であることを証明した。以上の結果はすべてこれまでに報告のない全く新しいもので、本研究は学位の授与に値するものと考えられる。