

Title	Identification and analysis of the promoter region of the type II transmembrane serine protease polyserase-1 and its transcript variants
Author(s)	端山, 昌樹
Citation	大阪大学, 2007, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/48893
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	は 端 山 昌 樹
博士の専攻分野の名称	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	第 2 1 5 6 0 号
学 位 授 与 年 月 日	平成 19 年 9 月 26 日
学 位 授 与 の 要 件	学位規則第 4 条第 1 項該当 医学系研究科臓器制御医学専攻
学 位 論 文 名	Identification and analysis of the promoter region of the type II transmembrane serine protease polyserase-1 and its transcript variants (新規 II 型膜結合型セリンプロテアーゼ、polyserase-1 とその転写バリエーションの転写因子結合領域の同定と解析)
論 文 審 査 委 員	(主査) 教 授 久 保 武 (副査) 教 授 川 瀬 一 郎 教 授 菊 谷 仁

論 文 内 容 の 要 旨

〔 目 的 〕

セリンプロテアーゼは様々な臓器や体液中に広く分布し、凝固・創傷治癒・消化・免疫応答など多様な生理的な役割を果たしている。また生理的のみならず種々の疾患にも寄与しており、例えば癌の浸潤・転移や炎症性疾患への関与が知られている。インフルエンザウイルスや SARS ウイルスなどの膜蛋白の活性化などにも関与している。これら細胞外の現象に関与する分泌型セリンプロテアーゼに加え、近年多くの膜型セリンプロテアーゼが報告されており、それらの様々な疾患への関わりが示唆されている。しかしながら、膜型セリンプロテアーゼについては、その分布および生理機能において未だ不明な点が多い。膜蛋白であるということから生理現象や病態生理に直接的に関与している可能性があると考え、我々は新たに上気道に発現する II 型の膜結合型セリンプロテアーゼのクローニングに成功し、その機能解析と転写調節領域の同定を行った。

〔 方法ならびに成績 〕

われわれは新たにクローニングした Serase-1B は 3 個のセリンプロテアーゼがタンデムに並ぶ特殊な構造を持つ蛋白 Polyserase-1 の transcript variant であった。酵素学的な解析を行ったところ、Serase-1B はトリプシンタイプのセリンプロテアーゼであった。生理的な基質を検索したところ、pro-uPA (urokinase-type plasminogen activator) の活性化酵素であることをウエスタンブロッティング法とザイモグラフィ法を用いて証明することができた。また、その活性は特異的に glycosaminoglycan やヒアルロン酸によって阻害された。

KO マウスの作製を行い、その解析をすすめるために、マウス serase-1B の転写調節について解析を行うこととした。まずマウス serase-1B の転写開始点を 5' RACE 法にて同定した。複数の転写開始点を認めたが、メチオニンの上流 272 塩基から開始しているものが最も多かった。次に転写調節領域を同定するために、メチオニンより上流約 1.8 kbps をクローニングしレポーターベクターに組み込み、serase-1B 発現細胞である CMT93 と TCMK-1 細胞を用いてレポーターアッセイを行った。その結果、転写開始点より上流のコンストラクトでは転写活性は低かったが、5'-UTR を組み込んだコンストラクトでは高い転写活性が得られた。その領域内に認められた転写因子結合領域にそれぞれ

れ変異をかけたコンストラクトを用いて同様のレポーターアッセイを行ったところ、E-Box モチーフに **mutation** を加えたものでのみ著明な転写活性の低下を認めた。さらに E-Box モチーフに確かに転写因子が結合していることを証明するため、ゲルシフトアッセイによって E-Box に転写因子が結合していることを示した。E-Box と TCMK-1、CMT93 細胞の核抽出液との結合によって認められたバンドは競合実験によって特異的な結合であることが明らかとなった。このことから 5'-UTR 内に存在する E-Box が *serase-1B* の転写に重要であることが明らかとなった。

〔 総 括 〕

- ・新たに新規Ⅱ型膜結合型セリンプロテアーゼ *Serase-1B* をクローニングした。
- ・*Serase-1B* はセリンプロテアーゼドメインをタンデムに3つ有する *polyserase-1* の transcript variant であった。
- ・*Serase-1B* は pro-uPA の活性化酵素であった。
- ・マウス *Serase-1B* は 5'-UTR 内に存在する E-Box モチーフによって転写制御されていた。

論文審査の結果の要旨

新たにⅡ型膜結合型セリンプロテアーゼ *serase-1B* をクローニングし、その転写調節について報告を行った。まずマウス *serase-1B* の転写開始点を 5' RACE 法にて同定した。複数の転写開始点を認めたが、メチオニンの上流 272 塩基から開始しているものが最も多かった。次に転写調節領域を同定するために、メチオニンより上流約 1.8 kbps をクローニングしレポーターベクターに組み込み、*serase-1B* 発現細胞である CMT93 と TCMK-1 細胞を用いてレポーターアッセイを行った。その結果、転写開始点より上流のコンストラクトでは転写活性は低かったが、5'-UTR を組み込んだコンストラクトでは高い転写活性が得られた。その領域内の E-Box モチーフに **mutation** を加えると著明な転写活性の低下を認めた。また EMSA 法によっても E-Box に転写因子が結合していることを示した。このことから 5'-UTR 内に存在する E-Box が *serase-1B* の転写に重要であることが明らかにした。以上より学位の授与に値すると考えられる。