

学位論文題名

ヒト錐体トランスデュースイン α サブユニット遺伝子の
細胞特異的転写機構の解析

学位論文内容の要旨

（目 的）

錐体細胞のトランスデュースイン α サブユニット（Tc α ）は β 、 γ サブユニットとともに三量体GTP結合タンパク質（Gタンパク）を構成し、色覚を含んだ昼間視の刺激伝達に関与する。

一方、Tc α 遺伝子に関してはヒトおよびマウスのcDNAの構造と予測されるタンパク質の構造が報告されているが、ゲノム構造等は明らかにされていない。私はヒトTc α のcDNAとゲノム遺伝子の構造とを検索して、他のGタンパクの α サブユニット同様に8つのエクソンから構成されていることを明らかにした。しかし、プロモーター構造をはじめ転写調節機構は不明である。なぜ、Tc α が網膜細胞で発現し、他の細胞では発現しないのかという疑問に答えるためにはTc α の転写調節機構の解明が必要と考えられる。従って、ヒトTc α ゲノム遺伝子についてプライマー伸長法を行って転写開始点を同定するとともに、Tc α を発現している網膜芽細胞腫株Y79と発現していないHeLaとについてクロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ（CAT）アッセイ、デオキシリボヌクレアーゼI（DNase I）高感受性テストおよびゲノムシーケンス法を行って本遺伝子の発現調節機構を解析した。

（試料と方法）

- 1) 5'領域の塩基配列の決定：既報のHTC-34.4ファージより、Tc α の第1エクソンを含む5'領域をpUC18プラスミドにサブクローニングし-551のSac I切断部位から下流の配列をSanger法で決定した。
- 2) プライマー伸長法：5'領域の相補オリゴマーを5'標識し、Calzoneらの方法に準じた。
- 3) DNase I高感受性テスト：Tc α ゲノム中の3カ所をプローブにして、Wuらの方法を用いた。
- 4) トランスフェクション：Tc α のプロモーター領域を含む4つのCATコンストラクトを構

築し、Y79、HeLaともにGrahamとvan der Erbらのリン酸カルシウム法で行った。用いたCATコンストラクトS、H、LおよびPCR-CATはオクタマー配列および2つのGGGGCC配列の転写促進活性を判定しうるように構築され、最長-552まで含んでいた。各15 μ gのレポーターと標準化のためのpRSV-LacZ 5 μ gをコトランスフェクトした。

5) CATアッセイ: Gormanらの方法に準じ薄層クロマトグラフィーを行い、AMBISにより定量化した。なお、標準化のための β ガラクトシダーゼ活性の測定はEdlundらの方法によった。

6) ゲノムシーケンス法: Churchらの方法に従いゲノムDNAをPst Iで切断後、化学切断し、Tc α の翻訳領域内のアンチセンスオリゴマーを3つ作成し、MuellerとWoldらのligation mediated PCRを行い変性ポリアクリルマイドゲル泳動で解析した。

(結 果)

1) Tc α の5'領域の解析: プライマー伸長法により連続した2つの転写開始点T、Cを認めTを+1とした。Tの上流36塩基(-36)にTATAAA、-63にATTGG、-217にATGCAAAT、-452、+187の2カ所にGGGGCC配列を認めた。

2) CATアッセイ: Y79、HeLaのほとんどすべてのコンストラクトに活性が認められ、両細胞株間に活性の差は認められなかった。

3) DNase I高感受性テスト: Y79では第1エクソンの近辺、第4イントロンおよび第8エクソンの下流に合計4カ所のDNase I高感受性部位が認められたが、HeLaではその活性部位は認められなかった。

4) ゲノムシーケンシング: 翻訳開始点より8bp上流のCはHeLaではメチル化されていたが、Y79ではメチル化されていなかった。

(考 察)

5'領域のシーケンシングより見出されたATTGG配列(CCAATの相補配列)、TATAAA配列は、プライマー伸長法で決められた転写開始点の上流にあり、それらの位置関係はPennotiやBucherのRNAポリメラーゼIIのプロモーターの統計解析に矛盾せず、典型的なRNAポリメラーゼIIのプロモーター構造をとるものと考えられた。

さらに、5'領域には上記配列に加えオクタマー配列が1つ、GGGGCC配列が2つ認められた。GGGGCC配列は視覚伝達に關与するラットロドプシンの転写エレメントと推定されて

いる GGCCCC 配列の相補配列で、既報の錐体、杵体トランスデュースンの 5' 非翻訳領域等にも認められるために注目される知見と考えられた。

これらの配列を含め 5' 領域の細胞特異的転写エレメントを検索する目的で Tc α を発現する Y79 と発現しない HeLa とに対して CAT アッセイを行った。その結果、CAT コンストラクト間には両細胞株で同様の活性の変化が認められ、しかもほぼすべてのコンストラクトに活性が認められたため、検索範囲内では特異的転写調節の部位は無いものと判断された。

そこで Y79 と HeLa の活性クロマチン構造の差異を調べる目的に DNase I 高感受性テストを行った。その結果、Y79 では 5' 領域近傍を含めた計 4 カ所に高感受性部位を認めたが、HeLa では認められなかった。

DNase I 高感受性（活性クロマチン構造）と脱メチレーションとの間には密接な関連が認められることが知られている。CAT アッセイで用いたコンストラクトは CpG メチレーションを受けていないため、特定の遺伝子の細胞特異的発現が CpG メチレーションにより制御されている場合は CAT アッセイでは細胞間の発現の差を明らかにできないと考えられた。そこで、ゲノムシーケンス法により 5' 領域の CpG メチレーションの有無を検索した。その結果、HeLa のみがメチレーションを受け、Y79 は受けていないことが判明し、メチレーションによる差異が転写調節に寄与していると考えられた。

（結 語）

1. ヒト Tc α 遺伝子のプロモーター構造をシーケンシングおよびプライマー伸長法を用いて明らかにした。
2. CAT アッセイ、DNase I 高感受性テストおよびゲノムシーケンス法を用いてヒト Tc α 遺伝子の細胞特異的転写機構を解析した。その結果、メチレーションによる差異が転写調節に寄与していることが示唆された。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 宮 崎 保
副 査 教 授 石 橋 輝 雄
副 査 教 授 柿 沼 光 明

1 研究目的

錐体細胞のトランスデュースイン α サブユニット ($Tc\alpha$) は β , γ サブユニットとともに三量体 GTP 結合タンパク質 (Gタンパク) を構成し, 色覚を含んだ昼間視の刺激伝達に関与する。

著者はヒト $Tc\alpha$ の cDNA とゲノム遺伝子の構造を検索して, 他の Gタンパクの α サブユニット同様に 8つのエクソンから構成されていることを明らかにしたが, 研究を進め, プロモーター構造をはじめ転写調節機構を解析した。すなわち, ヒト $Tc\alpha$ ゲノム遺伝子の 5' 領域のシーケンシングおよびプライマー伸長法によりプロモーター構造を明らかにし, $Tc\alpha$ を発現している網膜芽細胞腫株 Y79 とその発現をしていない HeLa とについてクロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ (CAT) アッセイ, デオキシリボヌクレアーゼ I (DNase I) 高感受性テストおよびゲノムシーケンス法を行って本遺伝子の発現調節機構を解析した。

2 試料と方法

- 1) 5' 領域の塩基配列の決定: 既報の HTC-34.4ファージより, $Tc\alpha$ の第 1 エクソンを含む 5' 領域を pUC18プラスミドにサブクローニングし-551の Sac I 切断部位から下流の配列を Sanger 法で決定した。
- 2) プライマー伸長法: 5' 領域の相補オリゴマーを 5' 標識し, Calzone らの方法に準じた。
- 3) DNase I 高感受性テスト: $Tc\alpha$ ゲノム中の 3カ所をプローブにして, Wu らの方法を用いた。
- 4) トランスフェクション: $Tc\alpha$ のプロモーター領域を含む 4つの CAT コンストラクトを構築し, Y79, HeLa とともに Graham と van der Erb らのリン酸カルシウム法で行った。用いた CAT コンストラクト S, H, L および PCR-CAT はオクタマー配列および 2つの GGGGC C 配列の転写促進活性を判定しうるように構築され, 最長-552まで含んでいた。各 $15\mu g$ のレポーターと標準化のための pRSV-LacZ $5\mu g$ をコトランスフェクトした。
- 5) CAT アッセイ: Gorman らの方法に準じ薄層クロマトグラフィーを行い, AMBIS により

定量化した。なお、標準化のための β ガラクトシダーゼ活性の測定は Edlund らの方法によった。

6) ゲノムシーケンス法: Church らの方法に従いゲノム DNA を Pst I で切断後、化学切断し、Tc α の翻訳領域内のアンチセンスオリゴマーを3つ作成し、Mueller と Wold らの ligation mediated PCR を行い変性ポリアクリルマドゲル泳動で解析した。

3 結 果

1) Tc α の5'領域の解析: プライマー伸長法により連続した2つの転写開始点T、Cを認めTを+1とした。Tの上流36塩基(-36)にTATAAA (TATA 配列), -63にATTGG (CCAAT 配列の相補配列), -217にATGCAAAT (オクタマー配列), -452, +187の2カ所にGGGGCC (視覚伝達に關与するラットロドプシンの転写エレメントと推定されているGGCCCC 配列の相補配列)を認めた。

2) CAT アッセイ: Y79, HeLa のほとんどすべてのコンストラクトに活性が認められ、両細胞株間に活性の差は認められなかった。

3) DNase I 高感受性テスト: Y79では第1エクソンの近辺、第4イントロンおよび第8エクソンの下流に合計4カ所のDNase I 高感受性部位が認められたが、HeLa ではその活性部位は認められなかった。

4) ゲノムシーケンシング: 翻訳開始点より8bp上流のCはHeLaではメチル化されていたが、Y79ではメチル化されていなかった。

4 考察および結語

1) 5'領域のシーケンシングより見出されたATTGG配列(CCAATの相補配列)、およびTATAAA配列は、プライマー伸長法で決められた転写開始点の上流にあり、典型的なRNAポリメラーゼIIのプロモーター構造をとった。

2) 検索した5'領域には細胞特異的エレメントは無かったが、DNase I 高感受性テストを行った結果、同領域は特異的に活性クロマチン構造をとることが判明した。DNase I 高感受性(活性クロマチン構造)と脱メチレーションとの間には密接な関連が報告されている。一方、CATコンストラクトでメチレーション状態が反映されていなかったためゲノムシーケンス法により5'領域のCpGメチレーションの有無を検索した。その結果、HeLaのみがメチレーションを受け、Y79は受けていないことが判明し、メチレーションによる差異が転写調節に寄与している

と考えられた。

以上、ヒトトランスデューシン α サブユニットのプロモーター構造および細胞特異的転写調節を解析した本研究は博士（医学）の学位論文として妥当なものと判断される。