

学 位 論 文 題 名

Molecular analysis of the thymus leukemia antigen gene promoter

（マウスの胸腺白血病抗原遺伝子のプロモーター
領域の分子生物学的解析）

学位論文内容の要旨

マウスの胸腺白血病（TL）抗原は、移植抗原であるH-2抗原や、リンパ球分化抗原であるQa抗原等のようにマウスクラスⅠ分子の一員であり、第17染色体上の主要組織適合遺伝子座に位置している。TL抗原の分子量は約45キログルトンであり、12キログルトンの β_2 -ミクログロブリンと非共有結合で結ばれている。TL抗原はH-2抗原と異なり、移植抗原としての機能はなく、H-2抗原ほど多様でもない。TL抗原の機能は現在のところ不明であるが、Tリンパ球上に発現されていることや、H-2抗原と構造上類似していることなどから、細胞間の相互作用に関与していることが予想される。

TL抗原の発現調節機構には次の3つの特徴がある。1）TL抗原はある種（C58, BALB/c等）のマウスの胸腺細胞に発現されている。2）TLハプロタイプbのマウスはTL抗原を発現しない。3）TLハプロタイプbのマウスに由来するある種の白血病細胞はTL抗原を発現する。最初の2点はいくつかの細胞分化抗原に共通した特徴であり、第3点は癌化に伴う遺伝子発現調節の異常によるものと推察されている。この異常発現の機序を解明するためには、TL抗原遺伝子の発現がT細胞の成熟過程においてどのように調節されているかを明らかにすることが必須であり、この研究の課題となっている。

T18^d遺伝子はBALB/cマウスのTL抗原をコードする遺伝子の一員であり、BALB/cマウスの胸腺細胞およびT細胞由来の白血病細胞に発現されている。TL抗原遺伝子の発現調節にはそのプロモーター領域が重要な役割を担っているとの報告に基づき、T18^d遺伝子のプロモーター領域の詳細な解析を行った。まず、T18^d遺伝子の転写開始部位をプライマー伸長法により決定した。T18^d遺伝子には複数の転写開始部位が存在し、最上流の転写開始部位は翻訳開始部位の158塩基上流に位置しており、そのグアニン残基をポジション+1とした。次に、T18^d遺伝

子のプロモーター流域（ポジション-457から+146まで）を制限酵素を用い部分的に削除し、これらの DNA 領域をクロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ（CAT）遺伝子に接続することにより作製したプラスミド DNA を TL 抗原陽性および陰性細胞に導入した。DNA の導入により形質転換された細胞の CAT 活性を測定することにより、削除された DNA 領域の T18^d 遺伝子の転写に対する影響を推定した。この方法により T18^d 遺伝子の転写調節に関わると推測される DNA 領域が数多く同定された。それらの中にはシスに転写を抑制するものと促進する機能を持つものがあった。ポジション-105と-33の間に位置する DNA 領域は TL 抗原陽性細胞と陰性細胞で異なる作用を示し、TL 抗原の表現形の決定に重要な働きをすることが示唆された。また、これらの転写調節 DNA 領域に結合する DNA 結合蛋白質がゲル移動度シフト法により同定された。3つの DNA 結合蛋白質（ファクターⅢ、Ⅳ、Ⅴ）が組織特異的転写調節 DNA 領域に特異的に結合することが明らかとなり、また、そのうちトランスに働く2つ（ファクターⅣおよびⅤ）は TL 抗原陽性細胞に特異的に発現されていることから、TL 抗原遺伝子の組織特異的転写に重要な役割を演じているものと推察された。

上記の CAT 遺伝子を用いた T18^d 遺伝子プロモーターの転写活性の測定により、2つの隣接する DNA 領域（ポジション-4から+29、および+29から+54）が T18^d 遺伝子のプロモーターを形成することが明らかとなった。そのうちポジション-4と+29間に位置する DNA 領域はインターフェロンレスポンス DNA シーケンス（IRS）を含んでおり、この DNA 領域に結合する蛋白質（ファクターⅥ）が、ゲル移動度シフト法により同定された。DNase I フットプリント法により、ファクターⅥが IRS に結合することが示された。IRS は H-2 抗原や Qa 抗原等の主要組織適合遺伝子複合体クラスⅠ遺伝子のプロモーター領域中にも保存されており、H-2 抗原遺伝子ではエンハンサーとしてインターフェロンによる H-2 抗原遺伝子の転写促進に重要な役割を果たしている。T18^d 遺伝子転写における IRS の機能を調べるため、その 5' 領域と 3' 領域の DNA 配列に人工的に変異を導入し、その転写およびファクターⅥとの結合に及ぼす影響を調べた。その結果、T18^d 遺伝子の IRS はファクターⅥとの親和性および T18^d 遺伝子のプロモーター活性に必須であることが明らかとなった。特に 3' 領域の DNA 配列が重要であることが示唆された。ゲル移動度シフト法において電気泳動時間を延長することにより、ファクターⅥが4つの構成要素より成ることが明らかとなった。そのうちのファクターⅥbは30℃で ATP あるいは dATP を加えることにより IRS から特異的に解離した。また、この反応は4℃では起こらないことから、酸素反応の関与が示唆された。このように TATA ボックスを欠く TL 抗原遺伝子では IRS がプロモーターとして重要であることが明らかとなった。H-2 抗原

遺伝子の IRS がエンハンサーとして作用するのに対し、TL 抗原遺伝子の IRS はプロモーターとして働いており、このような機能的相違は、両 IRS の塩基配列の違い、IRS の周囲の DNA 配列の違い、転写開始部位に対する IRS の相対的位置の違い等によるものと推測される。

上述の組織特異的転写調節 DNA 領域の機能の解析を *in vivo* および *in vitro* のフットプリント法により行った。まず、DNase I フットプリント法によりファクターⅢおよびⅣの結合する DNA 配列が決定された。次に、この DNA 配列が TL 抗原陽性の細胞中で実際に核内蛋白質と結合しているかどうかを調べるため、プライマー利用遺伝子増幅法を用いた *in vivo* フットプリント法を行った。その結果、この DNA 配列は TL 抗原陽性細胞でのみ蛋白質と結合していることが判明し、細胞内における TL 抗原遺伝子の組織特異的転写調節に極めて重要であることが示唆された。

TL 抗原遺伝子のプロモーター中に数多くの転写促進あるいは抑制に働く DNA 配列が近接して存在していることは、正常細胞においては TL 抗原遺伝子の総合的な転写調節が、特異的 DNA 結合蛋白質の特定部位への結合によってなされていることを暗示している。それらの DNA 結合蛋白質の合成は細胞分化の過程において調節されており、白血病細胞ではその合成に異常を来していることが予想される。

学位論文審査の要旨

主 査	教 授	小 沼	操
副 査	教 授	清 水	悠紀臣
副 査	教 授	佐 藤	文 昭
副 査	助教授	林	正 信

マウスの胸腺白血病 (TL) 抗原は、マウスクラスⅠ分子の一員であり、第17染色体上の主要組織適合遺伝子座に位置している。本抗原の機能は現在のところ不明であるが、Tリンパ球上に発現されていることや、H-2抗原と構造上類似していることなどから、細胞間の相互作用に関与していることが示唆されている。TL 抗原は BALB/c マウスの胸腺細胞に発現されているが TL ハプロタイプ b のマウスでは発現されていない。しかし TL ハプロタイプ b のマウスに由来するある種の白血病細胞では発現されている。これは癌化に伴う遺伝子発現調節の異常によるも

のと推察されている。

申請者は TL 抗原遺伝子の発現が T 細胞の成熟過程においてどのように調節されているかを検討し、本論文にまとめた。本論文は英文 80 頁からなり、参考論文 2 編を付している。

T18^d 遺伝子は BALB/c マウスの TL 抗原をコードする遺伝子の一員であり、BALB/c マウスの胸腺細胞および T 細胞由来の白血病細胞に発現されている。そこで申請者は、まず、T18^d 遺伝子のプロモーター領域の詳細な解析を行った。その結果 T18^d 遺伝子には複数の転写開始部位が存在し、最上流の転写開始部位は翻訳開始部位の 158 塩基上流に位置しており、そのグアニン残基をポジション +1 とした。T18^d 遺伝子のプロモーター領域（ポジション -457 から +146 まで）を制限酵素を用い部分的に削除し、それらの DNA 領域をクロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ（CAT）遺伝子に接続することにより作製したプラスミド DNA を TL 抗原陽性および陰性細胞に導入し、その CAT 活性を測定し、削除された DNA 領域の T18^d 遺伝子の転写に対する影響を推定した。この方法により T18^d 遺伝子の転写調節に関わると推測される DNA 領域が数多く同定され、それらの中にはシスに転写を抑制するものと促進する機能を持つものがあった。また、これらの転写調節 DNA 領域に結合する DNA 結合蛋白質がゲル移動度シフト法により同定された。3 つの DNA 結合蛋白質（ファクター III, IV, V）が組織特異的転写調節 DNA 領域に特異的に結合することが明らかとなり、また、そのうちトランスに働く 2 つ（ファクター IV および V）は TL 抗原陽性細胞に特異的に発現されていることから、TL 抗原遺伝子の組織特異的転写に重要な役割を演じているものと推察された。

次に、CAT 遺伝子を用いた T18^d 遺伝子プロモーターの転写活性の測定により、2 つの隣接する DNA 領域（ポジション -4 から +29, および +29 から +54）が T18^d 遺伝子のプロモーターを形成することが明らかにした。そのうちポジション -4 と +29 間に位置する DNA 領域はインターフェロンレスポンス DNA シーケンス（IRS）を含んでおり、この DNA 領域に結合する蛋白質（ファクター VI）が、ゲル移動度シフト法により同定された。DNase I フットプリント法により、ファクター VI が IRS に結合することが示された。T18^d 遺伝子転写における IRS の機能を調べるため、その 5' 領域と 3' 領域の DNA 配列に人工的に変異を導入し、その転写およびファクター VI との結合に及ぼす影響を調べた。その結果、T18^d 遺伝子の IRS はファクター VI との親和性および T18^d 遺伝子のプロモーター活性に必須であることが明らかとなった。特に 3' 領域の DNA 配列が重要であることが示唆された。

最後に、組織特異的転写調節 DNA 領域の機能の解析を *in vivo* および *in vitro* のフットプリント法により行った。まず、DNase I フットプリント法によりファクター III および IV の結合

する DNA 配列が決定された。次に、この DNA 配列が TL 抗原陽性の細胞中で実際に核内蛋白質と結合しているかどうかを調べるため、プライマー利用遺伝子増幅法を用いた *in vivo* フットプリント法を行った。その結果、この DNA 配列は TL 抗原陽性細胞でのみ蛋白質と結合していることが判明し、細胞内における TL 抗原遺伝子の組織特異的転写調節に極めて重要であることが示唆された。

以上の成績のように申請者は、TL 抗原遺伝子のプロモーター中に数多くの転写促進あるいは抑制に働く DNA 配列が接近して存在していることを明らかにした。この事実は、正常細胞においては TL 抗原遺伝子の総合的な転写調節が、特異的 DNA 結合蛋白質の特定部位への結合によってなされていることを暗示している。それらの DNA 結合蛋白質の合成は細胞分化の過程において調節されており、白血病細胞ではその結合に異常を来していることが予想される。この研究は、TL 抗原遺伝子の発現調節の機序に関して重要な知見を提供するものである。よって審査員一同は堀江正人氏が博士(獣医学)の学位を受けるのに十分な資格を有するものと認めた。