学位論文題名

哺乳動物細胞における

tRNA^{Gln}_{UUG} 遺伝子の発現制御機構の解析

学位論文内容の要旨

哺乳動物細胞には2種類のtRNA^{Gln}、tRNA^{Gln}_{CUG}とtRNA^{Gln}_{UUG}(U*:Uの誘導体)が含まれており、後者のtRNAはUAG終止コドンを経ルタミンのコドンとして認識するサプレッサーとしての活性をもつ。両tRNA^{Gln}の構造は非常によく類似しているにもかかわらず、正常細胞におけるtRNA^{Gln}_{UUG}の含量は、tRNA^{Gln}_{CUG}の約10%にすぎない。正常細胞内においてその発現が負にコントロールされていると考えられるtRNA^{Gln}_{UUG}の発現調節機構を明らかにするため、ラット、マウス、ヒトの細胞から、対応する遺伝子を単離して塩基配列を決定し、その転写機構の解析を行った。

(1) ラットの肝臓におけるtRNA^{Gln}の発現

2つのtRNA^{Gln}の存在比は、マウスとヒトの細胞において既に分析されているが、それに加えてラットの細胞における両tRNA^{Gln}の存在比についても同様に解析を行った。ラット肝臓の粗tRNAをBD-セルロースカラムにかけ、グルタミン受容活性について調べたところ、2つの分画が得られた。これらの分画中に含まれるtRNA^{Gln}の一次構造を調べた結果、ラットにはマウスやヒトと同様、tRNA^{Gln}_{CUG}とtRNA^{Gln}_{UUG}の2種類のtRNA^{Gln}が含まれることがわかった。各分画の大きさの比較から、tRNA^{Gln}_{UUG}の含量はtRNA^{Gln}_{CUG}の約20%であることがわかり、ラット、マウス、ヒトなどの哺乳動物細胞において、tRNA^{Gln}_{UUG}の発現は低く抑えられていることが明らかになった。

(2) tRNA^{Gln}遺伝子の単離と構造解析

3種の動物細胞から、tRNA^{Gln}_{UUG}に対応する遺伝子の単離を試みた。2種のtRNA^{Gln}の塩基配列は非常によく類似しているため、tRNA^{Gln}_{UUG}のヌクレオチド3~69に相当する67merのDNAと、2つのtRNA^{Gln}間で異なるアンチコドンの一字目を中心に含み、tRNA^{Gln}_{UUG}のヌクレオチド25~45に相当する21merのDNAをプローブとして、異なる条件下で、まず初めにラットの染色体DNAライブラリーをスクリーニングした。その結果、tRNA^{Gln}_{CUG}とtRNA^{Gln}_{UUG}に対応する遺伝子、及び各tRNA^{Gln}をコードする領域中に変異のみられる遺伝子を単離することができた。次に、67merプローブや、得られたラットのtRNA^{Gln}_{UUG}遺伝子をプローブとして用いることにより、マウス、ヒトのtRNA^{Gln}_{CUG}とtRNA^{Gln}_{UUG}の遺伝子も単離した。

これらの遺伝子の構造解析を行い、tRNA^{Gln}_{CUG}遺伝子とtRNA^{Gln}_{UUG}遺伝子の塩基配列を比較した結果、両者の構造遺伝子内部に存在する転写プロモーターの配列は全く

同一であることがわかった。しかし、周辺領域の塩基配列には相同性は認められなかった。また、各々のtRNA^{Gln}遺伝子の構造を3種の動物種間で比較したところ、各tRNA遺伝子の転写領域の塩基配列は完全に保存されていることがわかった。しかし、tRNA^{Gln}_{CUG}遺伝子では構造遺伝子以外の周辺領域には特に相同性はみられなかったのに対し、tRNA^{Gln}_{UUG}遺伝子においては、5'上流域を含む周辺領域の塩基配列が動物の種を越えてよく保存されていることが明らかになった。

(3) tRNA^{Gln}_{UUG}遺伝子の5'上流域に結合するたんぱく質の存在

2種のtRNA^{Gln}の構造類似度は高く、また、染色体上における各tRNA^{Gln}遺伝子のコピー数には大差ないことがサザンブロットハイブリダイゼーションによる解析から示唆された。このことから、動物細胞内でのtRNA^{Gln}_{UUG}の低発現は、対応する遺伝子の転写活性に原因していると考えられた。tRNA^{Gln}_{UUG}遺伝子の5'上流域に転写制御シグナルが存在する可能性について検討するため、この領域を含む160bpのDNA断片をプローブとして用い、ゲル移動度シフト法を行った。その結果、ラット、マウス、ヒトの核抽出液中に、tRNA^{Gln}_{UUG}遺伝子の5'上流域を特異的に認識し、結合するたんぱく質(STGBP)が含まれることがわかった。STGBPの結合部位を詳細に検討したところ、tRNA構造遺伝子の5'末端から-67~-23bpの領域中の、特に-44bp付近に存在することが明らかになった。

(4) STGBPの性質

マウスのP388細胞から調製した核抽出液をホスホセルロース(P11)とシバクロンブルー(CB)の2種のカラムにかけ、STGBPの部分精製を行った。各溶出画分について、tRNA^{Gln}_{UUG}遺伝子の5'上流域との結合活性を指標としてSTGBPの存在を調べたところ、STGBPは、P11カラムでは0.35M KCl分画、そしてCBカラムでは1.0M KCl分画に含まれたことから、このたんぱく質はtRNA遺伝子の転写に関与している既知の転写因子とは異なるDNA結合性たんぱく質であることが明らかになった。

また、UV-クロスリンク法により、STGBPは約6万の分子量をもつことがわかった。

(5) tRNA^{Gln}_{CUG}、tRNA^{Gln}_{UUG}遺伝子の転写活性と、STGBPのtRNA^{Gln}_{UUG}遺伝子の転写に及ぼす効果

*in vivo*でのtRNA^{Gln}_{CUG}とtRNA^{Gln}_{UUG}の発現量の大きな差は、各々の遺伝子の転写活性の違いに原因することが示唆されている。そこで、*in vitro*の転写システムを用いて、2つのtRNA^{Gln}遺伝子の転写機構の解析を行った。まず初めに、ラットとマウスのtRNA^{Gln}_{CUG}遺伝子とtRNA^{Gln}_{UUG}遺伝子を鋳型とし、P388細胞の核抽出液を用いて、*in vitro*の転写実験を行った結果、tRNA^{Gln}_{CUG}遺伝子は、tRNA^{Gln}_{UUG}遺伝子の5~10倍の転写活性を示すことがわかった。そこで、次に、ラットの両遺伝子の5'上流域を相互に入れ換えたキメラ遺伝子を作製し、それらについても同様に検討したところ、5'上流域の置換によって転写活性の逆転が観察された。さらに、ラットのtRNA^{Gln}_{UUG}遺伝子の5'上流域中でSTGBPの結合領域を含む-86~-16bpを除いたものでは、転写の増加がみられた。これらの結果から、STGBP結合配列の存在は、tRNA^{Gln}_{UUG}遺伝子の転写に対して負の効果を及ぼしていることが示された。

以上の実験結果により、哺乳動物細胞におけるtRNA^{Gln}_{UUG}の低発現は、その遺伝子が、5'上流域に特異的に結合するユニークなたんぱく質因子によって、負の転写調節を受けているためであることが結論づけられた。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 大 塚 栄 子
副 査 教 授 有 賀 寛 芳
副 査 助 教 授 井 上 英 夫
副 査 助 教 授 近 藤 博 之

学 位 論 文 題 名

哺乳動物細胞における

tRNA^{Gln}_{UUG} 遺伝子の発現制御機構の解析

申請者は哺乳動物のグルタミンtRNA遺伝子の発現制御機構について研究を行って来たが、今回、以下のような結果を得た。哺乳動物細胞には2種類のグルタミンtRNAが含まれており、UUGに対応するもの(tRNA^{Gln}_{CGU})tRNAはUAG終止コドンを経グルタミンのコドンとして認識するサプレッサーとしての活性をもつ。

ラットの肝臓におけるtRNAの発現について検討した。

2つのtRNA^{Gln}の存在比は、マウスとヒトの細胞において既に分析されているが、それに加えてラットの細胞における両tRNA^{Gln}の存在比についても同様に解析を行った。ラット肝臓の粗tRNAをBD-セルロースカラムにかけ、グルタミン受容性について調べたところ、2つの分画が得られた。これらの分画中に含まれるtRNA^{Gln}の一次構造を調べた結果、ラットにはマウスやヒトと同様、tRNA^{Gln}CUGと

tRNA^{Gln}_{UUG}の2種類のtRNA^{Gln}が含まれることがわかった。各分画の大きさの比較から、tRNA^{Gln}_{UUG}の含量はtRNA^{Gln}_{CUG}の約20%であることがわかり、ラット、マウス、ヒトなどの哺乳動物細胞において、tRNA^{Gln}_{UUG}の発現はヒトなどの哺乳動物細胞において、tRNA^{Gln}_{UUG}の発現は低く抑えられていることを明らかにした。

次にグルタミンtRNA遺伝子の単離と構造解析を行った。3種の動物細胞から、tRNA^{Gln}_{UUG}に対応する遺伝子を単離し、これらの遺伝子の構造解析を行い、tRNA^{Gln}_{CUG}遺伝子とtRNA^{Gln}_{UUG}遺伝子の塩基配列を比較した結果、両者の構造遺伝子内部に存在する転写プロモーターの配列は全く同一であることがわかった。しかし、周辺領域の塩基配列には相同性は認められなかった。また、各々のtRNA^{Gln}遺伝子の構造を3種の動物種間で比較したところ、各tRNA遺伝子の転写領域の塩基配列は完全に保存されていることがわかった。しかし、tRNA^{Gln}_{CUG}遺伝子では構造遺伝子以外の周辺には特に相同性はみられなかったのに対し、tRNA^{Gln}_{UUG}遺伝子においては、5'上流域を含む周辺領域の塩基配列が動物の種を越えてよく保存されていることがわかった。

2種のtRNA^{Gln}の構造類似度は高く、また、染色体上における各tRNA^{Gln}遺伝子のコピー数には大差ないことがサザンブロットハイブリダイゼーションによる解析から示唆された。このことから、動物細胞内でのtRNA^{Gln}_{UUG}の低発現は、対応する遺伝子の転写活性に原因していると考えられたので遺伝子の5'

上流域に転写制御シグナルが存在する可能性について検討し、この領域を含む160bpのDNA断片をプローブとして用い、ゲル移動度シフト法を行った。その結果、ラット、マウス、ヒトの核抽出液中に、 $tRNA^{Gln}_{UUG}$ 遺伝子の5' 上流域を特異的に認識し、結合するたんぱく質(STGBP)が含まれることがわかった。STGBPの結合部位を詳細に検討したところ、 $tRNA$ 構造遺伝子の5' 末端から-67~-23bpの領域中の、特に-44bp付近に存在することを明らかにした。

STGBPの性質を調べたところ、このたんぱく質は $tRNA$ 遺伝子の転写に関与している既知の転写因子とは異なるDNA結合性たんぱく質であることを見いだした。

また、V-クロスリンク法により、STGBPは約6万の分子量をもつことがわかった。

次にSTGBPの転写に及ぼす効果について検討した。in vitroの転写システムを用いて、2つの $tRNA^{Gln}$ 遺伝子の転写機構の解析を行った。まず初めに、ラットとマウスの $tRNA^{Gln}_{CUG}$ 遺伝子と $tRNA^{Gln}_{UUG}$ 遺伝子を鋳型とし、P388細胞の核抽出液を用いて、in vitroの転写実験を行った結果、 $tRNA^{Gln}_{CUG}$ 遺伝子は、 $tRNA^{Gln}_{UUG}$ の5~10倍の転写活性を示すことがわかった。そこで、次に、ラットの両遺伝子の5' 上流域を相互に入れ換えたキメラ遺伝子を作製し、それらについても同様に検討したところ、5' 上流域の置換によって転写活性の逆転が観察された。以上の実験結果により、哺乳動物細胞における $tRNA^{Gln}_{UUG}$ の低発現は、その遺伝子

が、5' 上流域に特異的に結合するユニークなたんぱく質因子によって、負の転写調節を受けているためであることが結論づけられた。

以上の研究は博士（薬学）の学位を受けるに充分値するものと認めた。