

学 位 論 文 題 名

Jun and Fos related gene products bind to and modulate the GPE I,
a strong enhancer element of the rat glutathione transferase P gene.

(Jun/Fos関連遺伝子産物はラットグルタチオントランスフェラーゼ遺伝子の強力な
エンハンサー-GPE I 配列に結合しその転写調節活性を変化させる。)

学位論文内容の要旨

緒

言

ラットグルタチオントランスフェラーゼ P (GST-P: glutathione transferase, EC 2.5.1.18) 遺伝子は肝化学発癌の初期から特異的に発現される腫瘍マーカーであり、この遺伝子発現の機構を解明することは肝化学発癌過程の遺伝子発現変化を知る一助となる。GST-P遺伝子はその5'-上流に位置する強力なエンハンサー (GPE I 配列) により発現が調節されることが知られているが、このGPE I 配列はphorbol 12-O-tetradecanoate 13-acetate (TPA) 応答配列 (TPA responsive element: TRE) 様配列が逆向きに2個並んだ構造で、TRE配列に結合する転写因子AP-1の関与が示唆される。AP-1はJun/Fosファミリーに属する構造が類似した複数のタンパク質の二量体でTPAの核内シグナル伝達を担う因子として同定された。Jun/Fosファミリーは3個のjun遺伝子: c-jun, junB, junDおよび5個のfos遺伝子: c-fos, fosB, Δ fosB, fra1, fra2からなる。c-Jun/c-Fos二量体がGPE I 配列に結合し転写調節を行う可能性はすでに示されていたが、この二量体を持たないマウス未分化F 9細胞においてもGPE I 配列が高い活性を示すことから、この高活性はc-Jun/c-Fos二量体では説明されず、他の転写因子の関与が示唆される。そこで我々は、Jun/Fos関連遺伝子産物のGPE I 配列に対する結合親和性と転写調節能を検討した。

材 料 と 方 法

(1) Jun/Fos関連遺伝子産物の合成とゲルシフトアッセイ

c-jun cDNAはラット肝cDNAライブラリーよりクローンした。fosB, Δ fosB, fra1, fra2のcDNAはラット線維芽細胞株3Y1のRNAから逆転写後polymerase chain reactionで増幅した。junB, junDのcDNAはD. Nathans博士から、c-fos cDNAはN. Nomura博士からそれぞれ供与を受けた。各cDNAをpBluescriptII (Stratagene, CA, USA) に挿入し、T3あるいはT7 RNA合成酵素を用いて試験管内でcap類似体存在下に転写反応を行いRNAを合成し、これらのRNAからウサギ網状赤血球ライセート(Promega, WI, USA) を用いて各遺伝子産物を合成した。下記のオリゴヌクレオチドをKlenow酵素を用いて [α - 32 P]-dCTPで標識し、遺伝子産物とともに2 μ gのポリ(dI-dC)・ポリ(dI-dC) 存在下で37℃で30分間結合反応を行った。反応物は4%ポリアクリルアミドゲル内で電気泳動した。

TRE: 5'-GATCCATGAGTCAGACAGGATC-3'

GPE I: 5'-GATCCGTAAGTCAGTCACATGATTTCAGCAACGGATC-3'

(2) jun/fos関連遺伝子の導入とクロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ

(Chloramphenicol acetyltransferase: CAT) アッセイ

β -actin promoter (c-jun), RSV-LTR (junB, junD), SR α promoter (c-fos, fosB, Δ fosB, fra1, fra2) をそれぞれプロモーターとして持つjun/fos関連遺伝子の発現プラスミドを作製し、これを2 μ gとTRE配列あるいはGPE I配列の下流にCAT遺伝子を持つレポーター遺伝子2 μ gをリン酸カルシウム共枕法にて未分化マウスF9細胞に導入した。CAT活性を導入48時間後に測定し、デンストメーター(Molecular Dynamics, CA, USA)にて相対的CAT活性を評価した。

結

果

(1) Jun/Fos関連遺伝子産物のGPE I配列に対する結合親和性

標識したTRE配列およびGPE I配列をプローブとして用いたゲルシフトアッセイの結果、Jun/Fos関連遺伝子産物の様々な組合せからなる二量体はすべて特異的にGPE I配列に結合することが示された。GPE I配列に対する結合はc-Jun/FosBおよびc-Jun/ Δ FosBの組合せが同程度で他の組合せより強かった。GPE I配列への結合は、いずれの組合せの場合もTRE配列に対してより低かった。さらにこのことは、大量未標識TRE配列あるいはGPE I配列オリゴヌクレオチドを用いた競合的結合阻害実験によって確認された。

(2) Jun/Fos関連遺伝子導入のGPE I配列に対する転写調節

Jun/Fos関連遺伝子産物のGPE I配列に対する転写調節能を検討するために、未分化F9細胞においてTRE配列あるいはGPE I配列を持つレポーター遺伝子を用いたCATアッセイを行った。c-junあるいはjunDをc-fosとの組合せで導入した場合、GPE I配列を介した転写が増加した。fosBあるいは Δ fosBは、単独あるいはc-junとの組合せで導入した場合、GPE I配列の活性を部分抑制した。一方TRE配列に対してfosB、 Δ fosBともにc-junによる転写活性増強を抑制したが Δ fosBの方がfosBよりもその効果は大であった。

考

察

(1) Jun/Fos関連遺伝子産物のGPE I配列に対する結合親和性に関して

Jun/Fos関連遺伝子産物は二量体の組合せによりTRE配列に対して異なる結合親和性を持つことが報告されていたが、GPE I配列に対しての体系的報告はこれまでなかった。c-Jun/FosBおよびc-Jun/ Δ FosBの組合せがGPE I配列に対する高親和性を示したが、Jun/Fos二量体のTRE配列に対する解離定数がnMオーダーであるのに対し、この二量体形成の解離定数がmMオーダーであるとの報告を考えると、この実験でみられたJun/Fos関連遺伝子産物のTRE配列あるいはGPE I配列に対する様々な二量体の結合親和性の違いを規定しているのは、二量体としてのDNA結合能よりむしろ二量体形成の段階の方かも知れない。またこれら二量体のGPE I配列に対する結合親和性はTRE配列に対するより低いことを示したが、これはGPE I配列のTRE様配列が完全なTRE配列ではないためと思われた。

(2) Jun/Fos関連遺伝子産物のGPE I配列に対する転写調節に関して

線維芽細胞ではTRE配列を介した転写をFosBは活性化し、一方 Δ FosBは抑制することが報告されているが、我々の用いた系ではTRE配列に対してはFosBと Δ FosBの効果の差がみられたが、GPE I配列に対しては認められなかった。GPE I配列結合能に関してc-junとの組合せでFosBと Δ FosBの間で差はみられなかったので、Jun/Fos関連遺伝子産物の間のGPE I配列を介した転写調節能の違いより、むしろJun/Fos関連遺伝子産物以外のGPE I配列結合因子の関与を考慮すべきであろう。肝化学発癌過程においてGPE I配列の高活性の責任因子は同定されていないが、これを発見することがGST-P遺伝子の転写活性化の機構を明かにするうえで重要であることは言うまでもない。しかしGPE I配列に対して高親和性を持つc-Jun/FosBあるいはc-Jun/ Δ FosBの二量体がこの因子のGPE I配列への結合を抑制する、または、FosBあるいは Δ FosBがこの因子と結合して、GPE I配列を介したこの因子の転写活性化を抑制する可能性は否定できない。

- (1) Jun/Fos関連遺伝子産物の二量体はすべて特異的にGPE I 配列に結合するがその親和性はTRE配列に対してより低かった。GPE I 配列に対する結合親和性はc-Jun/FosBおよびc-Jun/ Δ FosBの組合せが同程度で他の組合せより高かった。
- (2)未分化F 9細胞においてfosBあるいは Δ fosBの導入は、単独あるいはc-jun導入との組合せでGPE I 配列を介した転写活性を部分抑制した。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 石 橋 輝 雄

副 査 教 授 犬 山 征 夫

副 査 教 授 西 信 三

学 位 論 文 題 名

Jun and Fos related gene products bind to and modulate the GPE I,
a strong enhancer element of the rat glutathione transferase P gene.

(Jun/Fos関連遺伝子産物はラットグルタチオントランスフェラーゼ遺伝子の強力な
エンハンサーGPE I 配列に結合しその転写調節活性を変化させる。)

ラット胎盤型グルタチオントランスフェラーゼ (GST-P) 遺伝子は肝化学発癌の初期から特異的に発現され、その5'-上流に位置する強力なエンハンサー (GPE I 配列) により発現調節されることが知られている。GPE I 配列は12-O-tetradecanoyl-phorbol 13-acetate (TPA) 応答配列 (TRE) 様配列が逆向きに2個並んだ構造で、TRE 配列に結合する転写因子AP-1の関与が示唆される。AP-1はJun/Fosファミリーに属する構造が類似した複数のタンパク質の二量体でTPAの核内シグナル伝達を担う因子であり、このファミリーは c-jun, junB, junDのjun遺伝子と c-fos, fosB, Δ fosB, fra1, fra2のfos遺伝子からなる。c-Jun/c-Fos二量体がGPE I 配列に結合し転写調節を行う可能性はすでに示されていたが、この二量体を持たないマウス未分化F 9細胞においてもGPE I 配列が高い活性を示すことから、この高活性はc-Jun/c-Fos二量体では説明されず、他の転写因子の関与が示唆されるため、Jun/Fos関連遺伝子産物のGPE I 配列に対する結合親和性と転写調節能を検討した。

合成Jun/Fos 関連遺伝子産物とTRE 配列およびGPE I 配列を用いたゲルシフトアッセイの結果から、これら遺伝子産物の二量体はすべて特異的にGPE I 配列に結合するがその親和性はTRE 配列に対してより低く、GPE I 配列に対する結合親和性はc-Jun/FosBおよびc-Jun/ Δ FosBの組合せが同程度で他の組合せより高いことが示された。次にGPE I 配列の下流にクロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ遺伝子を持つレポーター遺伝子を用いて未分化F 9細胞におけるGPE I 配列を介した転写調節に対するjun/fos 関連遺伝子導入の効果を検討したところ、fosBあるいは Δ fosBの導入が、単独あるいはc-jun導入との組合せでGPE I 配列を介した転写を部分抑制したことから、Jun/Fos関連遺伝子産物がGPE I 配列を介してGST-Pの発現調節を行うことが示

唆された。また、肝化学発癌過程におけるGPE I 配列の高活性の責任因子はJun/Fos 関連遺伝子産物であるという可能性は少なく、この因子を明らかにすることが今後重要であるとの考察を加えた。

口頭発表に当たり、副査の犬山教授より 1) ヒトホモログの発現調節について、2) 腫瘍マーカーとしてのラットGST-P発現に関する最近の研究について、3) GPE I 配列の高活性の責任因子の同定について、質問がなされた。申請者は1) ヒトホモログであるGST- π の発現調節領域にGPE I 配列が存在するという報告はなく、ヒトにおいてはGST- π は腫瘍マーカーとは考えられていないこと、2) 埼玉医科大学衛生化学教室の村松教授らのグループが、GST-Pの発現調節領域の下流にCAT遺伝子をもつコンストラクトを組み込んだトランスジェニックラットを作製し、*in vivo*においても実際にGST-Pが肝化学発癌の腫瘍マーカーであり、この発現にGPE I 配列が必要であったことを証明したこと、3) 未発表の実験結果としてHeLa細胞の核抽出液内でGPE I 配列に特異的に結合する因子の部分精製を試みたこと、を回答した。ついで副査の西教授より 1) 試験管内でのタンパク合成、遺伝子導入の際の発現レベルの検討について、2) 肝化学発癌過程におけるAP-1の発現様式とTRE 配列を持った遺伝子とGST-P遺伝子の発現差異について、質問がなされた。申請者は1) すべての関連遺伝子産物の*in vitro* transcription/translation実験に同じシステムを用いているためGPE I 配列に対する結合親和性の違いはタンパク合成量の違いによるものとは考えにくいこと、fos関連遺伝子の導入に同じプロモーターを用いて異なる効果を認めたことから発現レベルの違いでは実験結果の説明が難しいこと、2) 肝化学発癌過程におけるAP-1の発現は高くなり、コラゲナーゼ等のTRE 配列を持つ遺伝子の発現も増加すると考えられるが、その発現パターンの特異性ではGST-P遺伝子の発現ほど特異的ではないこと、を回答した。最後に主査の石橋教授より 1) GPE I 活性のfosB, Δ fosBによる抑制と腫瘍マーカーとしてのGST-P発現の関係について、2) 結合能の違うタンパクを遺伝子導入実験で用いる場合の問題点について、質問がなされた。申請者は1) fosB, Δ fosBは肝化学発癌過程におけるGST-P発現の主因子ではなく未知なる責任因子の同定が必要であること、2) 結合能の強弱もそれぞれのJun/Fos関連遺伝子産物の性質のひとつであると考えられること、を回答した。

審査員一同は、本研究がJun/Fos関連遺伝子産物のGPE I 配列に対する結合親和性と転写調節能を検討した体系的報告であり独創性を有していることを高く評価し、また申請者が研究者として誠実かつ熱心であり、大学院課程における研鑽や単位取得なども併せ、博士（医学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。