

学位論文題名

C/EBP α によるヒト α -フェトプロテイン遺伝子の発現制御

学位論文内容の要旨

胎児期の主要な血清蛋白質である α -フェトプロテイン (AFP) は、主に胎児肝、ヨークサックで産生され、出生と共に急速に減少し成体ではごく微量が検出されるのみである。しかし、AFP は肝障害に伴い一過性に発現が見られ、また肝細胞癌などの発生に伴い高レベルに発現することから信頼性の高い腫瘍マーカーとして知られている。AFP 遺伝子の組織特異的な発現は肝に豊富な転写因子群 HNF (Hepatocyte Nuclear Factor) -1、HNF-3、HNF-4 などによって制御されている。マウス、ラットにおいて AFP 遺伝子の転写制御領域に C/EBP (CCAAT/enhancer binding protein) の結合配列が存在することが報告されているが、C/EBP がヒト AFP 遺伝子の発現制御にどのように関与しているかはまだ分かっていない。ここでは、リコンビナント C/EBP α を用いてゲルシフトアッセイおよび DNase I フットプリンティング法を行い、AFP 遺伝子の制御領域に存在する C/EBP α の結合配列を同定した。これら結合配列が AFP 産生性肝癌細胞株において機能していることをレポーターアッセイにより確認し、更に C/EBP α が培養細胞内で実際にこれらの領域に結合していることをクロマチン免疫沈降法により示した。

まず、ヒト AFP 遺伝子の転写制御領域の確認を行った。長さの異なる 5' 領域をルシフェラーゼ (Luc) 遺伝子の upstream に組み込み、AFP 産生性ヒト肝癌細胞株 HuH-7 に遺伝子導入した。その結果、-178 bp 内に AFP 遺伝子の基本的なプロモーター領域と -5.0 ~ -3.7 kb および -3.7 ~ -2.9 kb にそれぞれ強いエンハンサー部位の存在が示された。エンハンサー部位の DNA 断片を GST-P プロモーターの upstream に組み込み更に詳しく調べた結果、AFP エンハンサー活性は -4120 ~ -3756 bp (ドメイン A) と -3492 ~ -3300 bp (ドメイン B) の 2ヶ所に局在することが示された。

次に、ゲルシフトアッセイおよび DNase I フットプリンティング法によりヒト AFP 遺伝子の転写制御領域に存在する C/EBP α の結合配列を同定した。データベース検索によりヒト AFP プロモーター部位に C/EBP α 結合配列の存在が示唆された。マルトース結合蛋白質に C/EBP α の DNA 結合ドメインを組み込み融合蛋白質として発現、精製した蛋白質を用いてゲルシフトアッセイおよび DNase I フットプリンティングを行った。この結果、プロモーター領域では -16 ~ -3 bp (site 1) と -126 ~ -111 bp (site 2) の 2ヶ所に C/EBP α の結合部位が同定された。同じ様にエンハンサー領域の C/EBP α 結合配列の同定を行ったところ、ドメイン B 領域では -3322 ~ -3304 bp (site 3)、-3449 ~ -3433 bp (site 4) および -3485 ~ -3473 bp (site 5) の 3ヶ所に、ドメイン A 領域では -3788 ~ -3771 bp (site 6) と -3918 ~ -3900 bp (site 7) の 2ヶ所に C/EBP α の結合が示された。これらの配列と融合蛋白質との結合能には大きな差が認められ、特に site 3、site 6 および site 7 で強く結合した。

これら C/EBP α の結合配列 (site 1 ~ site 7) の転写活性をレポーターアッセイにより調べた。site 1 ~ site 7 のそれぞれを合成し、Luc 遺伝子に GST-P プロモーターを繋いだ pGL3-GSTP の upstream に挿入、これらのプラスミドを AFP 高産生性 HuH-7 細胞に遺伝子導入して Luc

活性を調べた。site 3, site 6 および site 7 で強い活性が認められ、また他の site を挿入したプラスミドでもコントロールベクターより強い活性が認められた。またコピー数の増加 (3 コピー) により Luc 活性も増強された。これらレポータープラスミドを C/EBP α の発現ベクターと共に AFP 非産生性 COS-7 細胞にコトランスフェクトした。その結果、site 3, site 6 および site 7 は C/EBP α の過剰発現により 6 ~ 8 倍ほど活性が増強された。他の部位も 2 ~ 5 倍ほど活性が上昇し、これらの部位の転写活性が C/EBP α の過剰発現によって増強されることが確認された。

これらの C/EBP α の結合配列が AFP 産生細胞で実際に C/EBP α と結合していることを調べるため、クロマチン免疫沈降法による解析を行った。まず AFP 産生性のヒト肝癌細胞株 HuH-7 と胃癌細胞株 Takigawa の AFP と C/EBP α の mRNA の発現を RT-PCR により調べた。どちらの細胞株でも AFP、C/EBP α 共に強い PCR 産物のバンドが認められた。一方 AFP 非産生性の肝癌細胞株 HLEc-1 では、同じ条件の RT-PCR により AFP および C/EBP α のバンドは検出されず、mRNA の発現は無いか非常に少ないものと思われた。これら細胞をホルムアルデヒドで固定し、超音波処理により DNA の断片化を行い、C/EBP α に対する抗体で免疫沈降を行った。この抗原抗体複合体をテンプレートに用い、AFP 遺伝子のプロモーター領域 (-244 ~ -1 bp) およびエンハンサー領域 (ドメイン A、-4046 ~ -3756 bp およびドメイン B、-3608 ~ -3300 bp) に対応するプライマーを用いて PCR を行い、これらの遺伝子領域が抗体により沈降しているかどうかを調べた。HuH-7 および Takigawa の両細胞で、抗 C/EBP α 抗体がプロモーター領域、エンハンサードメイン A および B で、PCR によりそれぞれの領域に対応する 3 つのバンドが観察された。またこれら細胞株では特にドメイン A が他よりも効率よく増幅されていた。一方、HLEc-1 ではどの領域も有意なバンドは認められなかった。

これらの塩基配列を C/EBP α の consensus 結合配列 (5' -NNATTRCNAANNN-3') と比較したところ、強い結合性および転写活性が認められた site 3, site 6 および site 7 は consensus 配列に対し 83.0 ~ 93.8% と高いホモロジーを示した。site 2 はマウス、ラットのプロモーター部位に報告された C/EBP の結合配列に 100% 相同であった。ヒト AFP の制御領域にはマウス、ラットで報告された C/EBP 結合部位よりも多くの存在が示された。

以上の結果から、C/EBP α がヒト AFP 遺伝子のプロモーターに 2 ヶ所、エンハンサードメイン A に 2 ヶ所、ドメイン B に 3 ヶ所結合し、転写活性を増強することを明らかにした。また AFP を産生する細胞内では C/EBP α がこれらの領域に結合していることを示した。このように制御領域に C/EBP α の結合部位が多数存在することから、C/EBP α がヒト AFP 遺伝子の発現に極めて重要な役割を持つことが示唆された。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 西 信 三
副 査 教 授 田 中 一 馬
副 査 教 授 石 橋 輝 雄
副 査 助 教 授 酒 井 正 春

学 位 論 文 題 名

C/EBP α による

ヒト α -フェトプロテイン遺伝子の発現制御

α -フェトプロテイン (AFP) は主に胎児肝とヨークサックで産生される胎児期の主要な血清蛋白質であるが、出生と共に急速に減少し、成体ではごく微量しか検出されない。しかし、肝細胞癌の発生に伴い高レベルに産生されることから AFP の測定は信頼性の高い腫瘍マーカーとして利用されている。

本研究は肝特異的転写因子の一つである C/EBP α (CCAAT/enhancer binding protein α) のヒト AFP 遺伝子発現への関与を解析した。リコンビナント C/EBP α を用いてゲルシフトアッセイおよび DNase I フットプリンティングを行い、AFP 遺伝子転写制御領域に存在する C/EBP α の結合配列を同定した。これら C/EBP α 結合部位の転写活性化能をレポーターアッセイにより AFP 産生性肝癌細胞株を用いて解析した。また、細胞内の内在性 C/EBP α との結合をクロマチン免疫沈降法により解析した。その結果、C/EBP α はヒト AFP 遺伝子のプロモーターに 2ヶ所、エンハンサードメイン A に 2ヶ所、ドメイン B に 3ヶ所の 7カ所に結合し、転写活性を増強した。また AFP 産生細胞においては、内在性 C/EBP α がこれらの領域に結合した。以上の結果は C/EBP α がヒト AFP 遺伝子の発現に重要な役割を持つことを示唆した。

公開発表では副査田中教授からの C/EBP α のプロモーター領域における結合とエンハンサー領域のそれでは AFP 発現に対する重要性は異なるかという質問には、申請者はプロモーター領域での結合および転写活性は弱く、エンハンサー領域での結合および転写活性は強かったと回答した。また、C/EBP α consensus 配列に似た塩基配列ならばどこにでも C/EBP α は結合して転写活性を増強するかという質問には、ドメイン A とドメイン B の間には C/EBP α consensus 配列に約 80%ホモロジーを持つ配列が存在するが、レポーターアッセイでは、転写活性の上昇がなかったと回答した。さらに、C/EBP α を強制発現させた AFP 非産生細胞において C/EBP α の結

合するのかとの質問には未実験であるかったと回答した。

副査石橋教授からはマウス、ラットと異なりヒト AFP 遺伝子上流には C/EBP α 結合部位が7ヶ所も存在する理由とその意義について質問があった。申請者は AFP 遺伝子上流の塩基配列はヒトとマウス、ラットでは大きく異なることおよびエンハンサー領域はヒトでは転写開始点から約4 kb 上流に集中して存在するがマウス、ラットでは3ヶ所に大きく分かれて存在するなど両者は類似性が低いという事実を回答した。また、C/EBP α の発現と癌化の関連性についての質問には AFP 遺伝子の発現している肝癌細胞の多くは、C/EBP α も高レベルに発現しているが、AFP の発現していない肝癌細胞では、C/EBP α の発現が低レベルであることから、肝癌では C/EBP α の発現と AFP 発現に相関が認められるが、しかし、AFP 遺伝子を発現していない正常肝細胞でも C/EBP α は発現していると回答した。

副査酒井助教授からは C/EBP α 欠損マウスでの AFP の発現変化を含む性状の変化について質問があったが、申請者は文献的には C/EBP α 欠損マウスでは低血糖、高アンモニア血症、肝臓での脂質・グリコーゲン蓄積の低下、脂肪組織での脂質蓄積の低下などが原因で生後数時間後に死亡するが、AFP の発現変化は報告されていないと回答した。

審査員一同は、これらの研究成果を高く評価し、大学院課程における研鑽や単位取得状況なども併せ申請者が博士（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。