

学位論文題名

マウス SULT2B1b 遺伝子プロモーター領域の解析

学位論文内容の要旨

基質の官能基にスルホン基 (sulfonate group : SO_3^-) を転移する反応は硫酸化 (sulfonation) と呼ばれているが、これは生体内における共有結合性修飾をもたらす普遍的な反応の一つである。この修飾を受けることによって基質には他の分子が付加されその生化学的性質が変化する。この反応を触媒する酵素は硫酸基転移酵素 (sulfotransferase) と呼ばれている。硫酸基転移酵素は細胞質型硫酸基転移酵素 (SULT) と膜結合型硫酸基転移酵素の 2 つに大別され、SULT はホルモンや神経伝達物質、胆汁酸といった比較的分子量の小さな生体内物質や薬物などを基質としている。SULT の生理作用としては、ステロイドホルモン、甲状腺ホルモン、カテコールアミン類などのホルモンを硫酸化することによりその活性を調節していることが挙げられる。また硫酸化は薬物や非生体物質の代表的な解毒・代謝反応である硫酸抱合反応としても知られているが、その機序として硫酸抱合反応によって基質の受容体への結合力が減弱して生化学的活性が低下することや、スルホン基が負に荷電していることから基質の極性が変化し、疎水性物質から親水性物質へと特性が変わることで輸送、代謝がされ易くなることが知られている。

SULT は触媒する基質によって分類される遺伝子ファミリーを構成しているが、SULT2B1b はコレステロールを筆頭に DHEA、pregnenolone を基質とする酵素である。SULT2B1b の発現には組織特異性が認められるが、特に皮膚においては SULT2B1b が多く発現しており、角化細胞内のコレステロールとそのスルホン基付加体である硫酸コレステロールの量的バランスを規定している主要な因子として注目されている。硫酸コレステロールには細胞膜機能の調節や protein kinase C 等の酵素活性の制御など様々な生理作用が報告されているが、皮膚においては分化マーカーである involucrin や transglutaminase I を介して角化細胞の分化を誘導していると想定されている。硫酸コレステロールの生化学的な作用機序については不明な点が多いが、SULT2B1b 遺伝子の転写制御機構を解析することはその解明に繋がるという意味も持っており極めて意義深いと思われる。

プロモーター領域の解析を行うにあたって最初に転写開始点の同定を行った。マウス角化細胞由来細胞株 PAM212 から総 RNA を抽出し、RLM-RACE 法によって得られた cDNA を塩基配列決定して検討した結果、異なる 12 箇所転写開始点の存在を確認した。このうち最上流の転写開始点を +1 と定義した。RLM-RACE 法にて同定した転写開始点を確認するために、最上流の転写開始点の上流と下流に特異的センスプライマーを設定し、第 2 エクソン内に設定したアンチセンスプライマーとの間で RT-PCR を行った。+1 より下流のセンスプライマーでのみバンドを認めたことから RLM-RACE 法にて決定した +1 が最上流の転写開始点であると判断した。転写開始点近傍の塩基配列を検索した結果、マウス SULT2B1b 遺伝子のプロモーターは TATA ボックスや CAAT ボックスを認めない TATA-less プロモーターであることを明らかにした。同部位の塩基配列をラットおよびヒトと比較したところ、マウス (翻訳開始コドンから 201bp 上流まで) とラット (同 203bp 上流まで) では 98% と極めて相対性が高く、ヒト (同 247bp 上流まで) でも 67% と比較的よく保存されていることが判明した。

次にプロモーター領域を含む 5' 側上流ゲノム DNA 断片を単離し、これをライゲーションしたレポーターコンストラクトを用いて欠失実験を行った。最上流転写開始点+1 から -1117bp の位置にセンスプライマーを設定し、+55bp の位置に設定したアンチセンスプライマーとの間で PCR を行い 5' 側上流ゲノム DNA 断片を単離した。これをルシフェラーゼ発現ベクターである pGL3 basic vector にライゲーションし pGL3 -1117/+55 を作製した。このコンストラクトを鋳型として特異的プライマーを用いて 5' 側より順に欠失させた DNA 断片を PCR 法にて単離した後、同様に pGL3 basic vector にライゲーションし各レポーターコンストラクトを作製した。各レポーターコンストラクトを PAM212 細胞に遺伝子導入して転写活性を比較検討したところ、-66/-46 の 21bp を欠失させると活性が最も顕著に低下した。この 21bp 中の転写因子結合配列を検索したところ、-65/-59bp に Sp/KLF ファミリー結合配列が、-51/-57bp に AP-2 結合配列が含まれていることが判った。さらに-39/-34bp と-13/-4bp に位置する Sp/KLF ファミリー結合配列にも転写を正に制御している可能性が示唆された。これらの配列に変異導入したレポーターコンストラクトを作製して変異導入実験を行ったところ、-65/-59bp と-13/-4bp に位置する Sp/KLF ファミリー結合配列が転写を正に制御していると予想された。

Sp/KLF ファミリーが発現していない細胞株としてショウジョウバエ胚由来細胞株 SL2 細胞を選択し、転写因子発現ベクターを用いて転写因子 Sp1 および Sp3 を発現させた。同時に pGL3 -66/+55 とこの配列中に含まれる-65/-59bp および-13/-4bp の Sp/KLF ファミリー結合配列に変異導入したレポーターコンストラクトを遺伝子導入して転写活性がどのように変化するかを比較検討した。これらの実験の結果から Sp1 は-65/-59bp および-13/-4bp の Sp/KLF ファミリー結合配列を介してアクチベーターとして機能すること、これらの配列に結合した Sp1 は互いに協調して機能することを確認した。また、Sp1 と Sp3 を同時に発現させた場合、Sp3 が Sp1 に対するリプレッサーとして機能している可能性が示唆された。

本研究ではマウス SULT2B1b のプロモーター領域を解析し、Sp/KLF ファミリーによる転写制御機構への関与を明らかにしたが、今後更に解析を進めることによって硫酸コレステロールの生化学的な作用機序の解明がより深まることが期待出来ると考えた。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 小 池 隆 夫

副 査 教 授 島 山 鎮 次

副 査 教 授 吉 岡 充 弘

学 位 論 文 題 名

マウス SULT2B1b 遺伝子プロモーター領域の解析

基質の官能基にスルホン基を転移する反応は sulfonation と呼ばれているが、これは生体内において共有結合性修飾をもたらす普遍的な反応の一つである。この修飾を受けることによって基質の生化学的な性質が変化する。この反応を触媒する酵素は sulfotransferase と呼ばれており、その中で細胞質に存在する酵素は特に SULT と略して呼ばれる。SULT は触媒する基質によって分類されるファミリーを構成しており、SULT2B1b はコレステロールを筆頭に DHEA、pregnenolone を基質とする酵素である。SULT2B1b の発現には組織特異性が認められるが特に皮膚で多く発現しており、ケラチノサイト内のコレステロールとそのスルホン基付加体である硫酸コレステロールの量的バランスを規定している主要な因子として注目されている。

マウス SULT2B1b 遺伝子のプロモーター領域の解析を行うにあたって、最初に RLM-RACE 法による転写開始点の同定を行った。その結果、この遺伝子には異なる 12 箇所の転写開始点が存在していることが分かり、このうち最上流の転写開始点を+1 と定義した。さらに RT-PCR 法にて+1 が最上流の転写開始点であることを確認した。転写開始点近傍の塩基配列を検索した結果、マウス SULT2B1b 遺伝子のプロモーターは TATA ボックスや CAAT ボックスを認めない TATA-less プロモーターであることを明らかにした。次にプロモーター領域を含む 5' 側上流ゲノム DNA 断片(-1117~+55bp)を単離し、レポーターアッセイを用いた欠失実験、続いて変異導入実験を行った。この結果、-65/-59bp と-13/-4bp に位置する Sp/KLF ファミリー結合配列が正の転写制御に関与していることを確認した。この結果を基に Sp/KLF ファミリーが発現していない細胞株に転写因子 Sp1 および Sp3 を発現させ、同時に-66/+55bp、およびこの中の-65/-59bp、-13/-4bp の配列に変異導入したレポーターコンストラクトを遺伝子導入するレポーターアッセイを行った。この実験の結果から Sp1 は-65/-59bp と-13/-4bp の Sp/KLF ファミリー結合配列を介してアクチベーターとして作用すること、これらの配列に結合した Sp1 は互いに協調して作用することを確認した。また、Sp1 と Sp3 を同時に発現させた場合、Sp3 が Sp1 に対するリプレッサーとして作用するのではないかと予想した。

副査の島山鎮次教授からは、①スルホン化は他の修飾をもたらす反応と比較して生体内での重要度はどのように考えられているのか②転写開始点の決定に RLM-RACE 法を用いているがその妥当性はどう評価しているのか③SULT の組織特異的な発現を誘導する機序で知られていることは無いのかについて質問があった。これに対して申請者は①SULT2B1 が基質とするステロイドホルモンではスルホン化はその活性調節において中心的な役割を果たしている②RLM-RACE 法で得られた cDNA はシークエンスで特に問題を認めず、メジャーとなる転写開始点も同定できたので信用できる結果であると判断した③今回の実験結果を含めて、SULT の組織特異的な発現を誘導する機序を解明した報告は無いと回答した。副査の吉岡充弘教授からは、①Sp1 はホモ複合体を構成して協調的に作用しているとしていたが、その作用機序はどうなって

いるのか②SULT2B1b 遺伝子が Sp1 と Sp3 の量的バランスによって転写制御されるのであれば、さらに上位に Sp1 や Sp3 遺伝子の制御を行っている機構があると考えて良いのかについて質問があった。これに対して申請者は① Sp1 は TF II D の構成蛋白の一つ TAF II 130 を介して機能すること、Cofactor required for Sp1 transcriptional activation (CRSP)と呼ばれるコファクターを介して機能することが言われているが詳細は解明されていない②文献的にも Sp1 と Sp3 の上位にそれぞれの転写調節機構が存在しているとされていると回答した。主査の小池隆夫教授からは、①SULT2B1b 以外の SULT は同じような転写調節機構を持っているのか②今後、代謝、内分泌分野に応用していくためにどのような方向を考えているのかについて質問があった。これに対して申請者は①他の SULT についてのプロモーター解析は報告が少ないが、検索した範囲ではそれぞれ構造が異なるようであり、それぞれの遺伝子が異なる転写制御機構を備えていると予想している②我々はこれまでにウサギ SULT2B1b が動脈内皮細胞に発現していることを報告しているが、SULT2B1b は抗動脈硬化ホルモンとされている DHEA も基質としており、動脈硬化巣における SULT2B1b の発現を調べることによって DHEA の作用を解明することにつながるのではないかと考えていると回答した。

この論文は、コレステロール等の sulfonation に深く関係している SULT2B1b に関して、マウス SULT2B1b 遺伝子のプロモーター領域の解析を初めて行い、転写因子 Sp1 および Sp3 による転写制御機構を明らかにした点が高く評価され、今後更に解析を進めることによって硫酸コレステロールの生化学的な作用機序の解明がより深まることが期待出来るとされた。

審査員一同は、これらの成果を高く評価し、大学院課程における研鑽や取得単位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。