

氏名	たに ぐち まこと 谷 口 真
学位の種類	博士 (生命科学)
学位記番号	甲第50号
学位授与年月日	平成18年 3月10日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
学位論文題目	CCAAT/enhancer binding protein- β (C/EBP- β), a pivotal regulator of the TATA-less promoter in the rat catalase gene (C/EBP- β はラットカタラーゼ遺伝子 TATA-less プロモーターの重要な制御因子である)
学位論文審査委員	(主査) 林 慎 一 (副査) 箸 本 英 吉 佐 藤 健 三

学位論文の内容の要旨

カタラーゼは過酸化水素を水と酸素に分解する抗酸化酵素であり、肝臓や腎臓で高い酵素活性を示しているが、肝癌や肝障害において転写レベルで低下することが知られている。しかし、ラットカタラーゼ遺伝子のプロモーターには TATA box が存在せず、複数の転写開始点を持つが、その転写のメカニズムは解っていない。これまでのプロモーター解析から、翻訳開始点から上流-126 bp~-26 bp が転写に必要な最小領域であり、この領域に結合する蛋白質複合体が存在することが報告された。本研究ではプロモーター内の-126 bp~-26 bp 領域に結合する因子の結合配列を決定しその因子を同定した。

方 法

カタラーゼ遺伝子プロモーター上流-187 bp~-26 bp 領域を細分化した DNA 断片の転写制御に関しては、これらの DNA 断片を CAT レポーター・プラスミドに繋ぎ、ヒト肝癌細胞株 HepG2 に導入し転写活性を測定した。ラット肝臓から核蛋白を抽出し、プロモーター領域 DNA 断片と核蛋白との結合活性をゲルシフトアッセイ(EMSA)により解析した。また、プロモーター領域の合成オリゴマーによる競合阻害実験、抗体を用いたスーパーシフト解析を行った。ヒト子宮頸癌細胞株 HeLa に発現ベクターを導入し、その結合活性を EMSA で、転写活性をレポーター(CAT)アッセイにより解析した。また、ラット高分化型肝癌細胞株 Reuber を用いてクロマチン免疫沈降(ChIP)解析を行った。さらに、詳細な複合体形成を調べるためにプロテアーゼ・クリッピング解析を行った。

結 果

カタラーゼ遺伝子プロモーターでの CAT アッセイにより転写活性を解析したところ、-126 bp ~ -26 bp 領域で強い転写活性を示し、-72 bp ~ -26 bp (領域 I) でも転写活性があることを示した。また、-46 bp ~ -31 bp に存在する C/EBP- β 結合配列に突然変異を入れることで、その転写活性がほとんど抑えられた。ラット肝臓から調製した核蛋白を用いて EMSA を行ったところ、C/EBP- β 配列を含む領域 I に複数の蛋白複合体が結合しており、この複合体は C/EBP- β の特徴である熱耐性を有しており、C/EBP- β 抗体を用いたスーパーシフト解析により結合が阻害されたことから、複数の複合体が C/EBP- β を中心としたものであることが確認された。また、C/EBP- β を導入した HeLa の核蛋白で EMSA を行ったところ、ラット肝核蛋白と同様の結合パターンを再構成し、C/EBP- β 導入 HeLa におけるカタラーゼプロモーターでの CAT アッセイでは転写活性も見られた。さらに、Reuber での C/EBP- β 抗体を用いた ChIP 解析により、内在のカタラーゼプロモーターにも C/EBP- β が結合していることが示された。

領域 I と C/EBP- β 結合配列のみでの EMSA を行ったところ、領域 I では複数の複合体を形成したが、C/EBP- β 配列では拡散的な単一の大きな複合体を示した。この領域を用いたプロテアーゼ・クリッピング解析では、全ての領域で、結合複合体が一箇所の小さい複合体に集約された。さらに、単一の大きな複合体が見られた C/EBP- β 相同結合配列を領域 I 内の C/EBP- β 配列と置き換え EMSA を行うと、再び複数の複合体を形成した。

考 察

ラットカタラーゼ遺伝子プロモーターは TATA-box 及びイニシエーター配列の両方を欠いており、複数の転写開始点を有する。本研究では、複数の転写開始点より下流の -46 bp ~ -31 bp 領域に存在する C/EBP- β 結合配列に、C/EBP- β を中心とした複数の複合体で結合し転写を活性化させることが観察された。さらに、Reuber での ChIP 解析から、内在プロモーターへの C/EBP- β 結合が見られた。以上の結果は、C/EBP- β がカタラーゼ TATA-less プロモーターに結合し、中心的に転写を制御していることを示唆している。

領域 I では複数の複合体を形成し、C/EBP- β 結合配列のみでは拡散的な単一複合体を形成するが、結合配列は同一であり、プロモーターの長さによりその複合体形成の違いを生み出していることを示した。C/EBP- β はロイシンジッパーを有した肝特異的転写因子で、自身または他のロイシンジッパーを持つ因子とホモ及びヘテロ二量体で DNA に結合する。以上から、C/EBP- β はカタラーゼ遺伝子プロモーター上で多彩な複合体形成を行うことで、複数の転写開始点を生み出す可能性が示唆された。

結 論

プロモーター領域 -46 bp ~ -31 bp に存在する C/EBP- β 結合配列に結合する C/EBP- β が、カタラーゼ遺伝子プロモーターからの転写に重要であることが示唆された。

審査結果の要旨

本研究は、肝臓で発現が高いラットカタラーゼ遺伝子の TATA-less プロモーターにおける転写制御機構について、特異的転写因子レベルから検討したものである。その結果、プロモーターからの転写には C/EBP- β 結合配列が重要であり、C/EBP- β が複数の複合体形成を行い、この配列に結合することで、転写を活性化することが判明した。本論文の内容はカタラーゼ遺伝子 TATA-less プロモーターからの転写に関わる因子とその制御領域を明らかにしたものであり、転写制御の研究分野において明らかに学術水準を高めたものと認める。