

ヒトチミヅル酸合成酵素遺伝子の
発現調節機構の研究

堀江 信之

ヒトチミジル酸合成酵素遺伝子の
発現調節機構の研究

堀江 信之

目 次

序論	1
第1章 ヒトチミジル酸合成酵素遺伝子のプロモーター領域の同定と発現調節に関する因子の解析	4
1-1 プロモーター領域の同定と微細構造の解析	5
材料と方法	5
結果	9
1-2 主要転写開始点下流領域の遺伝子発現に対する機能の解析	11
材料と方法	12
結果	14
1-3 プロモーター領域に結合する核内因子の検索	15
材料と方法	16
結果	17
1-4 考察	19
hTS 遺伝子プロモーターに対する転写開始点上流域の機能配列と発現制御	19
hTS 遺伝子のプロモーター領域に結合するトランス因子と発現制御	21
シス因子としての繰り返し配列と翻訳開始コドン	24
同定されたプロモーター領域と他の調節領域との関連性	26

第2章 細胞分化に依存したヒトチミジル酸合成酵素遺伝子の発現制御因子の解析	46
2-1 HL-60 の細胞分化過程で変化を示す hTS 遺伝子結合性核内因子の同定	47
材料と方法	47
結果	48
2-2 核内因子、NF-TS2 および NF-TS3 の結合位置の決定	50
材料と方法	51
結果	52
2-4 主要転写開始点の下流領域のプロモーター配列および細胞の種類に対する依存性	54
材料と方法	55
結果	55
2-5 考察	56
NF-TS2 および NF-TS3 と hTS 遺伝子の発現制御	56
hTS 遺伝子主要転写開始点下流領域 (<i>Bss</i> HII- <i>Bgl</i> I) の遺伝子発現に及ぼす影響と NF-TS3 の機能	57
転写開始点下流領域の調節配列と NF-TS2 との関連性および今後の展望	58
総括	72
謝辞	78
参考文献	79

図 版 目 次

図 1-1	ヒトとマウスのチミジル酸合成酵素遺伝子 5'-上流域の比較	27
図 1-2	pIGCAT の構造	28
図 1-3	CAT アッセイに用いた hTS 遺伝子の 5'-上流域の欠失変異体の構造	29
図 1-4	CAT アッセイの定量性の検討	30
図 1-5	hTS 遺伝子のプロモーター領域の決定	31
図 1-6	hTS 遺伝子 5'-上流域の欠失変異体による CAT アッセイ	32
図 1-7	hTS 遺伝子 5'-上流域のカセット変異体の構造	33
図 1-8	hTS 遺伝子 5'-上流域のカセット変異体による CAT アッセイ	34
図 1-9	hTS 遺伝子プロモーター領域をプローブとしたゲルシフトアッセイ	35
図 1-10	hTS 遺伝子プロモーター領域に結合する核内因子の解析	36
図 1-11	hTS 遺伝子の CACCC ボックス近傍に結合する核内因子の解析	37
図 1-12	hTS 遺伝子の Sp1 認識配列近傍に結合する核内因子の解析	38
図 1-13	hTS 遺伝子の発現抑制配列に結合する核内因子の検索	39
図 1-14	hTS 遺伝子の転写開始点下流域の欠失変異体による CAT アッセイ	40
図 1-15	hTS 遺伝子のくり返し構造の数が遺伝子発現に及ぼす影響	41
図 1-16	翻訳開始コドンの点変異の遺伝子発現に対する影響	42
図 1-17	hTS 遺伝子の抑制配列	43
図 2-1	NF-TS1、NF-TS2 および NF-TS3 の検出と結合反応の特異性の検討	60
図 2-2	HL-60 細胞の分化に伴う DNA 結合因子の変化	61
図 2-3	色々な分化誘導剤で処理した場合の NF-TS2 および NF-TS3 の変化	62
図 2-4	NF-TS2 および NF-TS3 の細胞周期依存性の解析	63

図 2-5	ゲルシフトアッセイの競合実験に用いた DNA 断片の構造.....	64
図 2-6	NF-TS1 の結合位置の決定.....	65
図 2-7	NF-TS2 および NF-TS3 の結合位置の決定 (1) : Methylation Interference による解析.....	66
図 2-8	NF-TS2 および NF-TS3 の結合位置の決定 (2) : 競合 DNA を 用いた解析.....	67
図 2-9	NF-TS2 および NF-TS3 の DNA への結合における ATG 配列の 関与.....	68
図 2-10	CAT アッセイに用いた hTS 遺伝子断片の構造.....	69
図 2-11	hTS 遺伝子 5'-上流域の <i>Bss</i> HII- <i>Bgl</i> II 断片の遺伝子発現に及ぼす 影響.....	70
図 3-1	hTS 遺伝子 5'-上流域の発現調節にかかわる因子.....	77

表 目 次

表 1-1	カセット変異体の作製に用いた PCR 用プライマーの配列.....	44
表 1-2	ゲルシフトアッセイの競合実験に用いた DNA 結合因子の認 識配列を含む DNA 断片の構造.....	44
表 1-3	オリゴヌクレオチドプライマー (点変異導入用) の配列.....	45
表 2-1	オリゴヌクレオチドプライマー (競合実験用) の配列.....	71

略語一覽

CAT	Chloramphenicol acetyltransferase
DHFR	Dihydrofolate reductase
DMSO	Dimethylsulfoxide
hTS	Human thymidylate synthase
PMA	Phorbol myristate acetate
RA	Retinoic acid
TK	Thymidine kinase
TS	Thymidylate synthase
VD3	1, 25-dihydroxyvitamin D ₃

序論

チミジル酸合成酵素 (TS, EC 2.1.1.45) は DNA 合成の前駆体であるチミジル酸を *de novo* に合成する唯一の酵素であり、また、チミジン 5'-三リン酸 (dTTP) によるフィードバックコントロールによって、細胞内の 4 種の DNA 合成前駆体の供給バランスを調節している鍵酵素である。この酵素の阻害剤である 5-フルオロ-2'-デオキシウリジンを培養細胞に加えて、TS を阻害し、dTTP を不足させると、DNA 複製に依存した DNA 二重鎖切断¹⁾、染色体の切断や組み換えを伴う染色体異常²⁾が顕著に誘発される。また、この処理により、脆弱 X 症候群の患者に見られる、遺伝性の染色体脆弱部位での染色体異常の発現が誘発される³⁾ことなどから、この酵素の発現は細胞の DNA 複製に依存した厳密な調節を受けていると考えられる。実際、TS は細胞周期に依存した調節を受けている代表的なハウスキープینگ遺伝子の 1 つであり、TS 活性および mRNA レベルは S 期で急激に上昇することが知られている^{4,5)}。また、この酵素の活性は非増殖性の細胞では非常に低いが、癌細胞などの増殖性の高い細胞では比較的高い。そのため癌細胞を同定するためのマーカー酵素としても最近注目を集めている。また、TS は 5-フルオロウラシル等の癌化学療法剤の標的酵素として古くから知られており⁶⁾、その発現調節機構を探ることは癌の治療という観点からも興味深い。以上のように、ヒト TS 遺伝子の発現調節機構を解明することは基礎科学的な意味からも、また、癌の治療という実用的な観点からも重要と考えられる⁷⁾。

遺伝子の発現調節機構を探る上で、遺伝子の構造的な知見が不可欠である。ヒト TS 遺伝子は竹石等により、クローニングが完了しており、その全一次構造が決定されている⁸⁾。他の生物種としては大腸菌⁹⁾、酵母¹⁰⁾、マウス¹¹⁾等の遺伝子構造が明らかにされているが、その中で、ヒトの遺伝子と最も高い相同性を持つのはマウスの TS 遺伝子である。

マウスとヒトの TS を比較するとアミノ酸レベルで 90%の相同性があり遺伝子上の ORF 部分の遺伝子でも 85%のホモロジーを示す。また、イントロンエクソンの境界も完全に一致しており、ヒトにおいて例外的に長い LI 配列を含む第 3 イン트로

ンを除くと、イントロンの相対的な長さにも類似が見られる¹²⁾。

マウスとヒトの TS 遺伝子は機能的にも非常に類似性が高いと考えられる。実際、ヒトの TS 遺伝子はマウス由来の TS 欠損細胞株を相補する遺伝子としてクローニングされた。また、マウス細胞に導入されたヒトの遺伝子もマウスの TS やヒト細胞におけるヒトの TS と同じ様に細胞周期に依存した調節を受けることが示されている¹³⁾。

しかし、発現調節において重要と考えられる 5'-上流域についてみると、ヒトの転写開始点から、翻訳開始コドンまでの領域での相同性は 63% (但し、後から述べる繰り返し配列部分は除く) であるが、その上流の 100bp では 36% でほとんど有意なホモロジーを示さない。(図 1-1) このことは、発現調節のうち、転写調節を支配していると思われるプロモーター領域の配列が異なることを示唆しており興味深い。さらにヒトの TS 遺伝子に特徴的なこととしては転写開始点の下流に特徴的な 3 回の繰り返し配列とそれに相補的な配列が存在することが上げられる¹⁴⁾。以上のようにマウスとヒトの TS 遺伝子は機能的に類似した調節を受けているにもかかわらず、5'-上流域は構造的に異なることが明らかとなっており、その発現調節機構を探ることは興味深い問題であると考えられる。

しかしながら、ヒト TS 遺伝子 (以下 hTS 遺伝子) の発現に関するプロモーターの構造やその発現制御に関する領域についてはほとんど解明されていなかった。特に、この遺伝子の発現制御において最も重要と考えられる細胞の増殖性に関連した制御についても、5'-上流域約 4kb の領域と第 1 イントロンの両方にその活性があるという予備的な解析¹³⁾の他は、ほとんど研究が行われていない。一方、TS と同じく DNA 合成前駆体の供給にかかわり、細胞周期に依存した調節を受けているチミジンキナーゼ (TK) やジヒドロ葉酸還元酵素 (DHFR) の遺伝子についてはプロモーターの構造をはじめ、プロモーター領域中の細胞増殖に関連した調節を司る DNA 結合因子の部分的な同定が行われている。しかしながら、DHFR 遺伝子については転写因子の 1 つである E2F が G₁-S 期でのこの遺伝子の転写活性化に関与している¹⁵⁾のに対し、TK では E2F の関与も指摘されているものの、最も詳しい解析では Pardee らが Yi と呼んでいる E2F とは異なる CDK2 を含む因子が関与するとされており¹⁶⁾、両

遺伝子は同じ S 期に発現するにもかかわらず、必ずしも共通のメカニズムで説明できないのが現状である。そこで著者は、hTS 遺伝子の発現制御のメカニズムを探ることによって細胞増殖に関連した発現調節に関する新たな知見が得られると考え、hTS 遺伝子の発現制御機構の解明を目指して以下の研究を行った。

第 1 章ではヒトチミジル酸合成酵素遺伝子のプロモーター領域の解析を中心に、機能配列の同定とその領域に結合する核内因子の解析を行った。まず、CAT アッセイを用いて、これまでに明らかにされていなかったヒト TS 遺伝子のプロモーター領域を確定し、詳細な解析を行うことによって、プロモーター近傍の正および負の調節配列を同定した。また、ヒト TS 遺伝子に特徴的なくり返し配列と遺伝子上の翻訳開始コドンを含む領域が実際に遺伝子の発現活性に関与していることを明らかにした。また、同定したプロモーター領域に結合する核内因子について解析を行い、マウスの TS 遺伝子と共通してみられる Sp1 結合部位への Sp1 と考えられる因子が hTS 遺伝子のプロモーター活性に重要であることを示すとともに、hTS 独自の調節配列およびそこに結合する因子の存在を明らかにした。

第 2 章ではこれらの知見をもとに、TS の発現が変化する系を用いてその調節にかかわる発現制御因子の検索および解析を行った。まず、TS の発現が変化する系を用いて、TS 遺伝子の 5'-上流域に結合する核内因子のうち、変化を示す因子を検索した。その結果、NF-TS2 および NF-TS3 と名付けた因子が、ヒト前骨髄球性白血病患者由来の細胞株である HL-60 細胞が試験管内で分化し増殖を停止する過程で、TS 遺伝子の発現抑制と相関して変化することを見出した。また、NF-TS2 および NF-TS3 の機能を明らかにするため、これらの TS 遺伝子上の結合位置を決定し、その領域を欠失させた場合の遺伝子の発現について CAT アッセイを用いて検討をおこなった結果、同定した因子のうち、NF-TS3 は hTS 遺伝子のプロモーターに依存した遺伝子の発現抑制に関与していることが示唆された。

第1章 ヒトチミジル酸合成酵素遺伝子のプロモーター領域の同定と発現調節に関する因子の解析^{17,18)}

hTS 遺伝子の細胞増殖に依存した発現制御機構を解析するために、この章ではその基礎となるプロモーター領域の解析とその周辺領域の遺伝子発現に及ぼす影響を、導入 DNA の一過的発現系を用いて解析した。hTS 遺伝子の細胞増殖に依存した調節については従来から転写レベルより転写後での調節が大きいとされている⁵⁾が、hTS 遺伝子の全構造が明らかになっているにもかかわらず、遺伝子発現の基本となるプロモーター領域については、通常の真核生物のプロモーターに見られる TATA Box や典型的な GC Box が存在しないため、その機能配列の同定もなされていなかった。遺伝子の配列上で相同性の高い、マウスの TS 遺伝子に関しては、機能配列と合わせていくつかのプロモーター活性に重要な DNA 結合因子が同定されている¹⁹⁾が、マウスとヒトに共通してみられる Sp1 の結合部位を除くと、マウスの遺伝子で同定された機能配列とヒトの TS 遺伝子の間に共通の DNA 配列は見出せなかった。また、hTS 遺伝子の発現制御に転写過程での調節がどの程度関与しているかという問題についても、転写にかかわるシスおよびトランスに働く因子が確定されていない状況ではその関与を完全に否定できないとおもわれる。例えば、TK 遺伝子についても当初転写段階での細胞増殖に依存した制御は少ないと考えられていたが、その後、G₀ 期には厳密な転写の停止が起こること²⁰⁾が報告され、また、TK 遺伝子のプロモーター上に G₁-S 期に特異的な結合因子の結合¹⁶⁾が報告されるなど、転写段階でも重要な調節が行われることが明らかとなっている。また、TS 遺伝子についてもミニジーンを用いた解析では、遺伝子の 5'-上流域約 4kb と第1イントロンが G₁-S 期の調節に重要で、この両方の領域が相乗的に機能していることが報告されている¹³⁾。この内、5'-上流域の関与については、cDNA クローンを SV40 のプロモーターにつないだ場合と、hTS 本来のプロモーターにつないだ場合とで比較をしており、転写産物そのものの構造に、大きな違いはないものと考えられることから、どうしても hTS 遺伝子の転写開始点周辺あるいはその上流部分のプロモーター領域の G₁-S 期の調節への関与を考えざるを得ない。さらに、近年 DHFR をはじめとする遺伝子の G₁-S

期での転写制御を担う因子として注目されている E2F の認識配列が TK や hTS に存在することが指摘され、これらの機能も含め、hTS 遺伝子のプロモーター領域の詳細な解析がこの遺伝子の制御機構を探る上で重要であると考えた。また、hTS 遺伝子では転写後の遺伝子の発現にいたるまでの過程も発現調節に重要であるとの観点から、転写開始点から、翻訳開始コドンまでの領域についても CAT アッセイを用いて解析を行うことにした。この領域にはヒトの TS 遺伝子に特徴的な 3 回のくり返し構造とそれに相補的な配列が存在し、この領域の機能についても興味をもたれると考えたからである。

1-1 プロモーター領域の同定と微細構造の解析

hTS 遺伝子のプロモーターは遺伝子導入を用いた実験から 5'-上流域の Scal 部位より下流に存在することが示されていたが、CAT アッセイを用いた解析では、非常に弱いプロモーター活性しか得られていなかった⁸⁾。また、著者等は第 1 イントロン内に hTS 遺伝子プロモーター特異的に働くエンハンサー様の活性があることを明らかにした²¹⁾が、この第 1 イントロンを組み込んだ場合にもプロモーター活性は非常に弱く、詳細な解析は困難であった。ここでは hTS 遺伝子のプロモーター領域を更に詳しく解析するため、非常に弱い CAT 活性を定量的に解析する手法を確立し、hTS 遺伝子のプロモーター領域の欠失変異体を作製して、CAT アッセイを行った。その結果、hTS 遺伝子の 5'-上流域には強力な発現抑制部位が存在し、この部分を欠失させると有意なプロモーター活性が得られることがわかった。さらに機能部位を同定するため、詳細な欠失変異体を作製し、解析を行ったところ、hTS 遺伝子のプロモーター活性に必要な領域として、CACCC ボックスと Sp1 の認識配列を同定した。また、これらに挟まれた領域にはプロモーター活性を抑制する機能を持つ領域が存在していた。

材料と方法

試薬および酵素

[α - 32 P]dCTP(3,000 Ci/mmol)と D-threo-[1,2- 14 C]chloramphenicol(40-60 mCi/mmol)は ICN Biomedicals Inc.より購入した。DNA 制限酵素と DNA 修飾酵素は Bethesda Research Laboratories(Gaithersburg MD, USA)、宝酒造、および東洋紡績(株)より購入した。*Thermus aquaticus* の DNA polymerase (AmpliTaq; Perkin-Elmer Cetus)は宝酒造より購入した。細胞培養に用いた ES 培地²³⁾と F12 培地は日本水薬(株) および Hazelton Biologics Inc. (Lenexa, KS, USA)よりそれぞれ購入した。牛胎児血清は Bocknec Laboratories Inc. (Canada)より、DMSO は和光純薬(株)よりそれぞれ購入した。

CAT プラスミドおよび hTS 遺伝子 5'-上流域の欠失変異体の作製

欠失変異体を効率良く作製するために、ポリリンカーを含む CAT ベクターを作製した。まず pSV2CAT²²⁾の *Bam*HI 部位をリンカーを用いて *Bgl*II 部位と置き換えた。ついで *Acl*I および *Hind*III で消化して、SV40 由来のプロモーターおよびエンハンサー領域を取り除き、残りの部分と pUC119 のポリリンカーと M13 の intergenic region を含む断片 (T4 DNA polymerase により平滑化した *Apa*LI 部位から *Hind*III 部位までの領域) を結合した。構築したプラスミドのポリリンカー領域にある ATG 配列を取り除くために、このプラスミドを *Sph*I で切断した後、平滑化して再結合した。このプラスミドを以後 pIGCAT¹⁷⁾と名付けた。(構造を図 1-2に示す。)対照実験のためのプラスミドとして、pSV2CAT 中の SV40 のプロモーター/エンハンサー領域 (*Acl*I から *Hind*III までの DNA 断片)を pIGCAT のポリリンカー部位にある *Sal*I から *Hind*III の間に挿入したプラスミドを作製し、pIGSVCAT と名付けた。

hTS 遺伝子の cap site と翻訳開始コドンを含む 1091bp の *Bgl*II-*Bgl*II 断片を、hTS 遺伝子のサブクローンである pHRR68³⁹⁾より調製し、平滑化した後、pIGCAT 中の CAT 遺伝子とフレームがあうように 10mer の *Hind*III リンカーを用いて CAT 遺伝子の上流に挿入した。生じたプラスミドのうち、CAT 遺伝子と同じ方向に hTS 遺伝子断片が挿入されたものを選択した。このプラスミドを pIGBgBgCAT と呼ぶ。ついで、このプラスミドを *Bam*HI と *Kpn*I で切断し、exonuclease III を用いて hTS 遺伝子の上流側から DNA を分解し、mung bean nuclease で処理した後、平滑化し、再結合した。

得られた欠失変異体について DNA Sequencer(Model 373A, Applied Biosystems)を用いて配列を決定し、その中から、*ScaI* 部位の下流領域に欠失を含むもの4種類を選び出した。これらのプラスミドはそれぞれ、主要なキャップ部位を+1として、-487 (F1)、-409 (F2)、-242 (F3) および-147 (F4) より下流の配列を含んでいた*。これらの構造図 1-3をに示す。また、*ScaI* 部位の下流の領域について詳しく解析するために、hTS 遺伝子 5'-上流域の *ScaI*-*Bgl*II 断片を pIGCAT の平滑化した *Sall* 部位と *Hind*III の間に挿入した。但し hTS 遺伝子と pIGCAT 上の CAT 遺伝子のフレームを合わせるために、*Bgl*II 部位に 10mer の *Hind*III リンカーを介してベクター上の *Hind*III 部位と結合した。このプラスミドを元に、同様の方法を用いて欠失変異体を作製した。得られた変異体の構造を図 1-6の左側に示す。

hTS 遺伝子 5'-上流域のカセット変異体の作成

hTS 遺伝子のプロモーター領域に存在する CACCC ボックスと Sp1 の認識配列のプロモーター活性への寄与について検討をするために、この部分を中心に、hTS 遺伝子の配列を *Bgl*II の認識配列と置き換えた DNA 断片を作製した。変異の導入は PCR を用いて行った。図 1-7に示した5種の変異を含む DNA 断片(LS2 から LS6)を作成するために、10種の DNA プライマー(表 1-1の LS2a から LS6b)を DNA 合成機(model 381A; Applied Biosystems)により合成した。図 1-7に示した Primer1 および Primer2 は表 1-1に示したものを用いた。これらのプライマーを用い、pIGBgBgCAT を鋳型として PCR を行い、それぞれの変異体 DNA 断片の 5'-側および 3'-側に相当する DNA 断片を合成して、T4 DNA polymerase により平滑化した後に、pUC19 の *Sma*I 部位にクローニングした。PCR には通常の条件を用い²⁴⁾、アニーリング温度は 55°C で行った。ついで、それぞれの断片の方向を配列解析で確認した後、5'-側を含むプラスミドを *Bgl*II と *Hind*III で消化し、そこに、対応する *Bgl*II と *Hind*III で切り出し

*ヒト TS 遺伝子の主要な転写開始点 (図 1-1に示したヒト TS 遺伝子の上流側から 2つめの転写開始点) を+1としたときはそれぞれ、-310 (F1)、-232 (F2)、-65 (F3)、+31 (F4)より下流の配列を含んでいた。

た3'-側の断片を挿入した。このようにして得られたプラスミド上の変異を含む hTS 遺伝子断片を *PvuII* および *HindIII* で切り出した後、5%のポリアクリルアミドゲル電気泳動で精製した。次いで、pIGCAT のポリリンカー部位にある *Sall* 部位と *HindIII* 部位の間に、ベクター側の *Sall* 部位を T4 DNA polymerase により平滑化して挿入した。得られたプラスミドは hTS 遺伝子 5'-上流域の *PvuII* 部位（遺伝子上の翻訳開始コドンの A を +1 として +253）から、+22 までを含み、それぞれ図 1-7 に示した変異を含んでいた。（LS2 から LS6）また、コントロールのプラスミドとして図 1-7 の Primer1 と Primer2 を用いて変異を含まない hTS 断片を PCR により合成し、pIGCAT の同じ位置に挿入した。（LS1）また、ヒト TS 遺伝子の多型性を解析する過程で、PCR を用いて hTS 遺伝子の上流域を増幅させた際に、上記の *Spl* 結合部位に点変異の導入された DNA 断片が得られた¹⁸⁾のでその断片を挿入した CAT プラスミドを作成し（phTS146A）、CAT アッセイを行った。

培養細胞および培養条件

HeLaS3 (SC) は Japanese Cancer Research Resources Bank（東京）より入手し、10%の牛胎児血清を含む ES 培地²³⁾で培養した。

DNA の細胞への導入および CAT アッセイ

細胞への DNA の導入にはリン酸カルシウム法²⁴⁾を用いた。60-mm または 100-mm 径のシャーレに 1.0×10^5 の HeLa 細胞（60-mm 径のシャーレでは 0.5×10^5 ）をまいた後、24 時間後の細胞に対し、DNA の導入を行った。DNA の導入効率を補正するために、pSV- β -galactosidase plasmid (Promega, Madison, WI, USA) を同時に導入した。それぞれのシャーレに対し、10 μ g の CAT プラスミドと 20 μ g の pSV- β -galactosidase プラスミドを導入した。60-mm 径のシャーレに対しては、それぞれ、半分の量の DNA を用いた。DNA 導入の 48 時間後に細胞を回収して細胞抽出液を調製した。CAT アッセイに際しては、発現されてくる β -galactosidase の活性を測定して、0.1 milli unit* の活性あたりの CAT 活性を測定した²⁴⁾。定量的な CAT アッセイを行うために、得られ

*37°C で 1 分間に 1 μ mol の ONPG (*o*-Nitrophenyl β -D-galactopyranoside) を分解する酵素活性を 1 unit とした²⁴⁾。

た TLC 上の未反応およびアセチル化されたクロラムフェニコールのスポットを BAS2000 Bioimaging Analyzer (富士フィルム) で測定し、クロラムフェニコールの全水酸基に対するアセチル化された水酸基の割合を計算し、CAT の活性とした。

結果

定量的な CAT アッセイの検討

定量的な CAT アッセイを行うために、CAT アッセイでの定量性の検討を行った。pIGSVCAT を導入した HeLa 細胞の抽出液を一定量含む試料について、0.4 mM の Acetyl-CoA および 0.1 μ Ci の 14 C-クロラムフェニコールを加え、37°C で 60 分間反応させた後、酢酸エチルで抽出し、TLC で展開した。それぞれのスポットを Bioimaging Analyzer BAS2000 で定量した後、以下の式の値を計算した。

$$\text{Acetylation(\%)} = \frac{(1\text{-acetyl CM}) + (3\text{-acetyl CM}) + 2 \times (1,3\text{-diacetyl CM})}{(1\text{-acetyl CM}) + (3\text{-acetyl CM}) + 2 \times (1,3\text{-diacetyl CM}) + 2 \times (\text{nonacetylated CM})} \times 100$$

ただし CM はクロラムフェニコールを示し、() は括弧内の成分のスポットの BAS2000 Bioimaging Analyzer による定量値とする。

反応液に含まれる細胞抽出液の量と上記により計算した Acetylation(%) の値をグラフにして図 1-4 に示す。一般に、通常の CAT アッセイの場合には使用した反応系でのクロラムフェニコールのアセチル化率が 20-30% を越えると定量性に乏しいとされているが²⁵⁾、グラフに示したように、0-90% の範囲で、反応液中の CAT の量と得られた Acetylation(%) の値に良い相関関係が見られることがわかった。

hTS 遺伝子のプロモーター領域の決定

hTS 遺伝子の 5'-上流域には他の真核生物由来のプロモーターに見られるような TATA ボックスや GC ボックスなどの配列は存在しない。これまでの解析ではマウスの TS 欠損細胞株に対する DNA 導入の結果から、hTS 遺伝子のプロモーターが 5'-上流域の *Scal* 部位の下流に存在することが示唆されていたが⁸⁾、hTS 遺伝子の主要

な転写開始部位から3.1kb上流の *DraI* 部位より下流の領域をふくむいくつかの制限酵素断片を用いて CAT アッセイを行ったところいずれの場合にも有意なプロモーター活性は検出されなかった²⁶⁾。一方、著者等は hTS 遺伝子の第1イントロン中にプロモーター特異的なエンハンサー様活性を見出し、この第1イントロン由来の断片と hTS 遺伝子 5'-上流域の断片の両方を同時に CAT ベクターに組み込むとプロモーター活性が検出されることを見出した²¹⁾。これは、hTS 遺伝子のプロモーター活性が非常に弱いか、あるいは、何等かのサイレンサー様の活性をもつ領域をその近傍に伴っているからと考えられる。そこで、hTS 遺伝子 5'-上流域の *Scal* 部位より下流の領域に対し、欠失変異体を作製して、これらの断片を用いて CAT アッセイを行った。結果を図 1-5 および図 1-6 に示す。まず、欠失変異体を作成する際に、直接 *Scal* 部位より欠失を加えると、短い欠失を含む断片が得られなくなる可能性があることから、*Scal* より約 0.6kb 上流の *BglI* 部位より欠失を加えた集団の中から、約 100bp ほどの欠失を持つ4つのクローンを選び、実験を行った。その結果を図 1-5 に示す。この結果から、hTS 遺伝子の主要な転写開始点から数えて、-309bp から-66bp の範囲の DNA 断片を含む断片ではプロモーター活性が検出されないのに対し、-65bp から+30bp の領域を含む DNA 断片では有意なプロモーター活性が得られることがわかった。この結果は hTS 遺伝子のプロモーター活性に必要な領域がこの転写開始部位より-65bp から+30bp にあることを示し、また、その上流にあたる-66bp から-309 の範囲にはこのプロモーター活性を抑制する配列が存在していることを示していると考えられる。これらの機能的に重要な領域について、更に詳細な検討を行った結果を図 1-6 に示す。この結果から、翻訳開始点の A の塩基を+1 として、-229 から-223 の領域と-187 から-147 の領域は、その欠失によって、CAT の発現が大きく減少しており、CAT 遺伝子の発現に対して正の寄与をしていることがわかる。(図 1-6 の phTSd229 と phTSd223 および phTSd187 と phTSd147 を参照) この2つの領域のうち、上流側の領域は前に述べた CACCC ボックスを含む領域であり、下流側には-150 から-142 の部分に *Sp1* の認識配列²⁷⁾ (KRGCGKRY) が存在している。(hTS 遺伝子の配列は GAGGCGGAG) 一方、-342 から-269 の領域および-212 から-201 の領域はともにその領域の欠失によって CAT の活性が上昇していることから、遺伝子の

発現に対して抑制的に働いていることが示唆された。

hTS 遺伝子 5'-上流域のカセット変異体による解析

次に欠失変異体の解析によって hTS 遺伝子プロモーターの活性への寄与が示唆された CACCC ボックスと Sp1 の認識配列についてさらに検討を行うために、これらの領域を含む配列を BglII の認識配列で置き換えた変異体を作製し、CAT アッセイを行った。また、Sp1 結合部位に点変異を導入した DNA 断片についても CAT アッセイを行った。用いた DNA 断片の構造を図 1-7に、結果を図 1-8に示す。まず、hTS 遺伝子の 5'-上流域にある Sp1 結合部位に変異を導入した DNA 断片の CAT アッセイについて見てみると、カセット変異を導入した場合も、点変異を導入した場合も CAT の活性が大幅に減少し、hTS 遺伝子の 5'-上流域のプロモーター活性に重要であることが示唆された。(図 1-8の pLS1CAT に対する pLS6CAT および phTS146A)また、CACCC ボックスについてもカセット変異を導入すると部分的ではあるが CAT 遺伝子の発現が減少し(図 1-8の pLS2CAT)、この領域がプロモーター活性に対し、正の寄与をしていることが示唆された。一方、遺伝子の発現に対し、抑制的に働くことが示唆された-212から-201の領域に変異を導入すると予想通り CAT の発現は増大し(図 1-8の pLS3CAT)、この領域が遺伝子の発現に対し抑制的に働いていることが確認された。

1-2 主要転写開始点下流領域の遺伝子発現に対する機能の解析

これまでの欠失変異体を用いた CAT アッセイでは全て hTS 遺伝子の翻訳開始コードンの A を +1 としたときに +28 までを含む DNA 断片を用い TS の 5'-領域と CAT 遺伝子の融合蛋白質として発現が起こるようにレポーター遺伝子を設計していた。これは予備的な解析から、hTS 遺伝子の ATG より 5'-上流側の BssHII 部位あるいは XbaI 部位より下流を含まない断片では、CAT アッセイで測定した場合に、有意なプロモーター活性が得られなかったことによる。この結果は hTS 遺伝子の遺伝子発現には転写開始点の周囲だけではなく、転写開始点の下流領域も重要な寄与をしていることを示唆している。この領域はヒトおよびサル TS 遺伝子³⁶⁾に特徴的な 3 回の繰り返しの配列を含む構造と、翻訳開始コドンを含んでいる。この領域の機能配列について

更に検討するために、この領域の欠失変異体を作製し、前項と同じように CAT アッセイを用いて遺伝子発現に対する機能を解析した。その結果、3 回の繰り返し配列を含む領域は遺伝子発現を促進する効果があり、特に、一組の繰り返し配列とそれに相補的な配列を欠失させてしまうと HeLa 細胞での hTS 遺伝子プロモーター領域の活性が検出できなくなることがわかった。また、遺伝子発現に影響を及ぼす領域として遺伝子上の翻訳開始コドンを含む領域が同定された。

材料と方法

細胞培養および CAT アッセイ

CAT アッセイに用いる細胞として HeLa 細胞を用いた。培養条件および CAT アッセイについては“1-1 プロモーター領域の同定と微細構造の解析”と同じ方法で行った。

hTS 遺伝子転写開始点下流領域の欠失変異体を含む CAT プラスミドの作製

hTS 遺伝子の転写開始点下流領域の欠失変異体を作成するために、“1-1 プロモーター領域の同定と微細構造の解析”で作製したプラスミド、F3 を用いた。(プラスミド F3 は hTS 遺伝子の 5'-上流域のうち、翻訳開始コドンの A を+1 として-242 より下流の領域を含むので、以下このプラスミドを phTSd242 と呼ぶ。) このプラスミドを *Hind*III で消化し、直線化した後、0.8%のアガロースゲル電気泳動で精製した。その DNA 断片を exonuclease III で時間を変えて消化し、(0.5-10min)さらに、mung bean nuclease と Klenow fragment で処理した後、*Bgl*II で切断した。このようにして得られた DNA 断片の中から、hTS 遺伝子の 5'-上流域を含む断片を 0.8%のアガロースゲル電気泳動で分取し、別に用意した、pIGCAT の CAT 遺伝子を含む、平滑化した *Hind*III から *Bgl*II までの領域の DNA 断片と結合した。得られたプラスミドは hTS 遺伝子の翻訳開始点の A の塩基を+1 として、-242 から+28 までの領域を CAT 遺伝子の上流部分にもち、hTS 遺伝子上の *Bgl*II 部位 (+28) から上流方向へ、色々な長さの欠失を含んでいた。それぞれの欠失した領域は DNA Sequencer (model 373A, Applied Biosystems)で cycle sequence 法により決定した。得られたプラスミドに含まれる、hTS 遺伝子の 5'-上流域の構造を図 1-14の左に示す。

また、hTS 遺伝子の繰り返し構造中に存在する E2F の結合配列²⁸⁾(TTTTCCCG₃-121 から-128 の領域)を欠失させるために、プラスミド F3(phTSd242)を *Bss*HII および *Eco*52I で消化した後、平滑化し、再結合して、-133 から-119 の領域を欠失させたプラスミド、F3ΔEB を作製した。

2回のくり返し配列を持つ hTS 遺伝子断片の調製と CAT プラスミドへの組み込み

プラスミド F3(phTSd242)上の TS 遺伝子断片の *Xba*I から、*Hind*III の領域を、ヒト TS 遺伝子のポリモルフィズムの解析過程で得られた3回および2回のくり返し配列を持つ hTS 遺伝子の相当する領域で置換したプラスミドを作製し¹⁸⁾、CAT アッセイを行った。

翻訳開始コドンに点突然変異を含む hTS 遺伝子 5'-上流域の DNA 断片を持った CAT プラスミドの作成

hTS 遺伝子の 5'-上流域の翻訳開始コドン領域に点突然変異を導入した DNA 断片を含む CAT プラスミドを用いて、CAT アッセイを行うために、まず、翻訳開始コドン部分に点変異を導入した DNA 断片を PCR 反応を用いて合成した。hTS 遺伝子の 5'-上流域を合成するためのプライマーとして、表 1-3に示した sense 鎖および、anti-sense 鎖のプライマーを用いた。プライマーは DNA 合成機 (model 381A; Applied Biosystems)を用いて合成した。合成したプライマーは Oligonucleotide Purification Cartridge (Applied Biosystems)を用いて精製し PCR に用いた。PCR は以下の組成の反応液中で行った。

10mM Tris-HCl (pH8.3、25°C)

50mM KCl

1.5 mM MgCl₂

100μg/ml gelatin

0.2 mM dNTP

1μM each primer

10 % DMSO

total 50 μl/reaction

さらに鋳型として1反応当り、1ng の *ScaI*-*BglI* 断片および 2.5unit の *Thermus aquaticus* 由来の DNA 合成酵素 (AmpliTaq; Perkin Elmer Cetus, Norwalk, CT, USA) を加えた。反応液にミネラルオイルを重層した後に、Zymoreactor(model AB-1800; アトー (株)) に移し、以下の条件で PCR を行った。

反応条件

94°C	1 min	} 30 cycle
60°C	1 min	
72°C	2 min	
72°C	5 min	

得られた断片は *XbaI* および *HindIII* で消化した後、F3(phTSd242)の *XbaI* と *HindIII* 部位の間にクローニングした。それぞれの配列を dideoxy 法により決定し、翻訳開始コドンに点突然変異を含むクローンを選択した。

結果

hTS 遺伝子の3回の繰り返し配列とその近傍の遺伝子発現に及ぼす影響

図 1-14に得られた hTS 遺伝子の欠失変異体の構造と、CAT アッセイの結果を示す。転写開始点下流の領域について、翻訳開始点の下流から欠失を加えていくと、翻訳開始コドンを欠失させたところで、CAT の発現が約4倍に上昇した。(phTSd242+15 と phTSd242-3) さらに、上流に向かって欠失を加えていくと、-3 から -120 までを欠失させたところで、有意な CAT の発現がなくなることが示された。この結果から、この領域が遺伝子の発現に対し、促進的に働いていることが示唆された。特に、3回の繰り返し配列の内1つを残している、phTSd242-61 では phTSd242 と同程度の CAT の発現があるのに対し、最後の繰り返し配列とそれに相補的な配列を欠失させると有意な CAT の発現がなくなることから、hTS 遺伝子の 5'-上流域による遺伝子の発現には転写開始点下流領域の繰り返し配列を含む構造のうち、1対の繰り返し配列とそれに相補的な配列が必要であると考えられる。

この3回の繰り返し配列を含む構造中には、転写因子のひとつである E2F の結合し得る配列が -121 から -128 の領域に見られる。(TTTTCCCG²⁸)に相補的な配列) そ

ここで、この部分の遺伝子発現に対する影響を調べるために、この部分を欠失させた変異体を作製し、CAT アッセイを行った。結果を見ると、この領域を欠失させたプラスミド phTSd242ΔEB は phTSd242 に比べ、CAT の活性はむしろ上昇する傾向にあり、この配列は遺伝子発現に対して、促進的には働いていないと考えられる。

hTS 遺伝子の3回のくり返し配列を含む構造のくり返しの数と遺伝子発現の関係を調べるためには、くり返しの数が異なるクローンを作成する必要がある。著者等は hTS 遺伝子の多型性を解析する過程で正常なヒトの間に、3回のくり返し構造に加え、2回のくり返し構造を持つ hTS 遺伝子が存在することを見出した¹⁸⁾。そこで、hTS 遺伝子より PCR により得られた2回のくり返し構造を持つ hTS 遺伝子断片を用いて、くり返し数の遺伝子発現に及ぼす影響について検討した。その結果を図 1-15 に示す。結果を見るとクローン化された hTS 遺伝子と同じ構造を持つ Raji 細胞から増幅された DNA 断片と、3回のくり返し構造を持つ S3-1 で示した DNA 断片はほぼ同じ CAT の発現が見られるのに対し、2回のくり返し構造しか持たない S3-2 で示した DNA 断片では、CAT の発現が約 1/2 に低下していた。この結果は、くり返し数が多いほうが遺伝子発現が増強されることを示唆している。

hTS 遺伝子の翻訳開始コドンを含む領域の遺伝子発現に対する影響

欠失変異体を用いた解析から、hTS 遺伝子の翻訳開始コドンを欠失させた場合に遺伝子の発現が大幅に上昇する結果を得たので、その機構を更に解析するために、翻訳開始コドンに点変異を導入した hTS 遺伝子断片を用いて、CAT アッセイを行った。その結果を図 1-16 に示す。結果を見ると、翻訳開始コドンに点変異を導入した hTS 遺伝子断片を含む CAT プラスミドでは、いずれの場合にも CAT の発現が上昇していた。

1-3 プロモーター領域に結合する核内因子の検索

1-1 節で、hTS 遺伝子プロモーター領域の機能部位について推定することができたので、これらの領域と特異的に相互作用している核内因子を検索した。

材料と方法

ゲルシフトアッセイに用いた DNA プローブ

ゲルシフトアッセイに用いる DNA プローブとしては、CACCC ボックスと Sp1 結合領域を分けて解析するために、hTS 遺伝子のプロモーター活性に必要な領域を含む、*PvuII-XbaI* および *XbaI-BssHII* の断片を用いた。(図 1-7参照) また、CAT アッセイにより、プロモーター活性が異なることが示された LS2 から LS6 の変異体からも相当する領域を切り出してプローブとして用いた。DNA 結合因子の同定は既知の結合因子の認識配列を含む DNA 断片を用いたゲルシフトアッセイの競合実験で行った。検出された結合因子の同定に用いた、AP1、AP2、AP3、Sp1、NF1/CTF、NF-kB、TFIID、GRE、CREB の認識配列を含む DNA 断片は Gel Shift Assay Kit(Stratagene, La Jolla, CA, USA) および Gel Shift Assay System(Promega, Madison, WI, USA) に付属のものを用いた。その配列を表 1-2 に示す。また、大腸菌中で遺伝子組み換えにより調製した AP2 は Promega より購入したものを用いた。また、hTS 遺伝子のプロモーター領域中の発現抑制配列に結合する因子を検索するために、5'-GATCCCCTGCGTTTCCCCCTGGATC-3'の配列を持つ二重鎖の DNA を DNA 合成機(model 381A; Applied Biosystems)により合成した。

ゲルシフトアッセイ

核抽出液は Schreiber 等²⁹⁾の方法により調製した。蛋白質濃度の測定は色素結合法³⁰⁾を用い、bovine γ -globulin を基準にして行った。核抽出液は通常 2-5 mg/ml の蛋白質を含んでいた。結合反応は 15 mM Hepes-KOH (pH 7.9)、1 mM dithiothreitol、0.2 mM MgCl₂、5% glycerol を含む溶液中に 1 反応当たり (10 μ l 中)、0.5 ng のラベルした DNA 断片、2.5 μ g の蛋白質を含む核抽出液、1.5 μ g の poly (dI-dC) (Pharmacia LKB Biotechnology AB, Uppsala, Sweden)を加え、0°C、30 分間行った。電気泳動は 4% ポリアクリルアミド (mono-: bis-acrylamide= 39:1) を用い、6.7 mM Tris-HCl (pH 7.9)、3.3 mM 酢酸ナトリウム、1 mM EDTA を含む溶液で行った。電気泳動に際しては予備泳動を 2 時間行った後、反応溶液をそのまま電気泳動にかけた。泳動の後、ゲルを乾燥させ、オートラジオグラフにより、DNA を含むバンドを検出した。

結果

実際のプロモーター活性に必要な領域をプローブとして用いることにより、図 1-9 A のレーン 2 に示したように 3 本の蛋白質の結合によると思われるバンドが検出された。それぞれのバンドの濃さを定量した結果を図 1-9 B に示す。この結果とそれぞれの変異体のプロモーター活性 (図 1-8) を比較してみると図 1-9 A で a と示したバンドの濃さと断片が示すプロモーター活性の間に相関のあることがわかる。特にプロモーター活性をほとんど示さない LS6 の変異体では a で示したバンドが約 1/3 に減少していた。(図 1-9 A のレーン 7 参照) この変異体はマウスの TS 遺伝子で Sp1 結合領域と同定された領域に相当する部分に変異を導入した変異体であり、以上のことから、a で示したバンドはヒト TS 遺伝子中の Sp1 結合領域に結合しプロモーター活性に重要な寄与をしている DNA 結合因子によるバンドであることが推測される。

次に、それぞれのバンドに対応する DNA 結合因子を同定するために、AP1、AP2、AP3、Sp1、NF1/CTF の各 DNA 結合因子の認識配列を含む DNA 断片を用いた競合実験を行った。その結果を図 1-10 に示す。図で c と示したバンドには大きな変化は見出されなかったが、a のバンドは Sp1 の結合領域を含む DNA を加えることにより特異的に消失した。(図 1-10 A レーン 8 および 9) この結果から、a で示したバンドは Sp1 の結合により生じていることが示唆された。

さらに、CAT アッセイにより同定された hTS 遺伝子プロモーターの機能配列のうち、CACCC ボックスと Sp1 の認識配列を分けて解析するため、プローブを *Xba*I 部位で切断し、同様の実験を行った。上流側にあたる *Pvu*II-*Xba*I 断片による結果を図 1-11 に示す。まず、変異を導入していないプローブでは複数のバンドが検出され (図 1-11 A、レーン 1)、カセット変異を導入したものでは、CACCC ボックスに変異を導入したプローブ (L2) でゲル上で最も泳動度の低いバンドが消失し、それよりやや下側に新たなバンドが生じた。(図 1-11 A のレーン 2 の白い矢印を付したバンド) また、各転写因子の認識配列を含む競合 DNA 断片を加えた実験では、図 1-11 B に示したように、Sp1 の認識配列を含む競合 DNA 断片を加える事により最も泳動度の

低いバンドを含む、ほとんどのバンドが消失した。さらに、Sp1 の認識配列を持つ競合断片を加えた場合に残るバンドはAP2の認識配列を持つ競合断片を加える事で特異的に消失した。以上の結果から、hTS 遺伝子 5'-上流域の CACCC ボックスには Sp1 の認識配列を認識する複数の因子が結合している事が示唆された。また、PvuII-XbaI 断片への AP2 の結合を確認するために、大腸菌で遺伝子組み換えにより調製した AP2 を用いてゲルシフトアッセイを行った結果を図 1-11 C に示す。図に示したように、AP2 を加えた場合にもシフトしたバンドが見られる事から、この領域に AP2 が結合することが確認された。コンピューターによる検索を行ったところ、翻訳開始点コドンの A を +1 としたときに、-197 から、-206 の位置に、AP2 の認識配列である、YCSCCMNSSS³¹⁾と一致した配列が存在する事がわかった。以上の結果から、hTS 遺伝子のプロモーター領域の一部である、PvuII-XbaI の領域には AP2 が結合し、その結合位置はこの領域の-197 から-206 の位置であると推定された。

一方、hTS 遺伝子のプロモーター領域の下流部分にあたる、XbaI-BssHII 断片をプローブに用いた場合の結果を図 1-12 に示す。まず、変異を含まないプローブでは図 1-12 A レーン 1 に示したように、白い矢印を付した位置に濃いバンドが現れ、カセット変異を導入したプローブを用いた結果 (図 1-12 A) では Sp1 の結合領域に変異を導入したプローブ(L6)でこの最も濃いバンドが消失し、それよりやや下側に新たなバンドが生じた。(図 1-12 A レーン 4 の白い矢印を付したバンド) また、各転写因子の認識配列を含む競合 DNA 断片を加えた実験では、図 1-12 B に示したように、Sp1 の認識配列を含む競合 DNA 断片を加える事により最も泳動度の低いバンドが消失した。以上の結果は hTS 遺伝子の 5'-上流域の Sp1 認識配列に Sp1 が実際に結合する事を強く示唆している。

また、CAT アッセイで同定された、hTS 遺伝子プロモーター領域の CACCC ボックスおよび Sp1 認識配列に挟まれた領域にある発現抑制配列に結合する核内因子を検索するために、この領域の配列を持つ合成 DNA を作成し、ゲルシフトアッセイを行った。結果を図 1-13 に示す。合成 DNA をプローブに用いたゲルシフトアッセイの結果 (図 1-13 A) から、この領域に何等かの因子が結合している事が示唆された。核蛋白質の量を増やすと、ゲル上でシフトしたバンドの上に新たなバンドが生

じている事から、この因子は蛋白濃度に応じて二量体を形成することが考えられる。また、各転写因子の認識配列を含む競合 DNA を加えた場合 (図 1-13 B) は、実際に用いたいずれの DNA 断片でもバンドは消失しなかったことから、検出された因子は Sp1 や AP2 とは異なる因子であることを示している。ただし、興味深いことに、前に述べた実験で、hTS 遺伝子のプロモーター領域に結合する事が示された Sp1 および AP2 の認識配列を持つ DNA を加えた場合に、ゲル上に生ずるバンドの上に薄いバンドが生じていた。(図 1-13 B のレーン 5,6 およびレーン 9,10) これは、この hTS 遺伝子プロモーター領域の発現抑制配列に結合する因子が、Sp1 や Ap2 そのもの、あるいはその認識配列とも相互作用をし得ることを示していると考えられる。

1-4 考察

hTS 遺伝子プロモーターに対する転写開始点上流域の機能配列と発現制御

欠失変異体を用いた hTS 遺伝子プロモーターの解析により、プロモーターの活性に必要な機能配列として、hTS 遺伝子の転写開始点上流 (翻訳開始コドンの A を+1 として-228 から-220) に存在する CACCC ボックスと、転写開始点下流域 (翻訳開始コドンの A を+1 として-150 から-142) に存在する Sp1 の認識配列が同定された。

CACCC ボックスはその共通配列として、CCACACCC の配列を持ち、SV40 のエンハンサー領域³²⁾やヒトの β -globin 遺伝子³³⁾にも存在している。この配列に結合する因子については、完全に同定されていないが、組織特異的なものと、各種細胞に普遍的に存在しているものがあると考えられている。そのうち、SV40 のエンハンサー活性に関与するトランス因子は組織特異的な結合因子であると考えられている³⁴⁾。CACCC ボックスは一般的に、エンハンサーとしても、プロモーターの上流配列としても機能し得るが、Sp1 も弱く結合することから、プロモーターそのものとしても機能し得る可能性がある。hTS 遺伝子の CACCC ボックスでは、この領域の欠失により、CAT 遺伝子の活性は約 1/3 に低下し、また、カセット変異を加えた hTS 遺伝子プロモーターの場合には、約 65%に活性が低下している。この結果から hTS 遺伝子の CACCC ボックスも遺伝子の発現に対し促進的に機能していることが示唆された。

一方、CACCC ボックスの下流に存在する Sp1 結合配列の場合は、GAGGCGGAG から GAGGAGGAG の点変異の導入により、CAT の活性が約 1/2 となり、さらにカセット変異の導入により GAGGCGGAG から ATCTCGGAG へと、コンセンサス配列中に 4 塩基の置換を導入すると、CAT の発現がほぼバックグラウンドまで低下することから、hTS 遺伝子の場合、この Sp1 結合配列が主要なプロモーター活性を担っており、CACCC ボックスはエンハンサーあるいはプロモーターの上流配列として機能していると考えられる。さらに、ゲルシフトアッセイの結果から、ヒト TS 遺伝子の Sp1 結合部位に実際に Sp1 の認識配列である GC ボックスを認識する因子が結合していることが明らかとなった。以上のことから、ヒト TS 遺伝子の場合にも CAT アッセイで検出された主要なプロモーター活性は Sp1 結合部位に結合する Sp1 によることが示唆された。

hTS 遺伝子の Sp1 結合配列は、マウスの TS 遺伝子について、L. F. Johnson 等により non-consensus な Sp1 結合配列として報告された領域¹⁹⁾と相同性の高い領域である。またこの領域は、最近クローニングされたラットの TS 遺伝子³⁵⁾や、我々が最近クローニングしたサルの TS 遺伝子³⁶⁾でも保存されていた。一方精製した Sp1 の DNA に対する結合性の検討から、Sp1 の認識配列として、KRGGCGKRRY が提唱され²⁷⁾、この配列に一致していることが明らかとなった。マウス TS 遺伝子の場合には転写開始点を決定する配列を欠いているために、この Sp1 結合領域の下流の複数の場所から転写が開始される。マウスの TS 遺伝子において転写が開始される領域はヒト TS 遺伝子との間にも有意な相同性が見られる³⁷⁾。一方、ヒト TS 遺伝子の転写開始部位はプライマー伸長法を用いた解析で、この Sp1 結合部位の上流域、翻訳開始点から-160~-180 の範囲に複数個同定されているが⁸⁾、hTS 遺伝子 5'-上流域に存在する繰り返し配列のため、Sp1 結合配列の下流に相当する-120 付近の転写開始点については S1 マッピングを用いた解析でその存在が示唆されていたものの¹⁴⁾、解析は困難であった。今回のプロモーター領域の解析結果から考えると、hTS の転写開始点もマウスと同様に、今回同定されたプロモーター活性に必要な Sp1 結合配列の下流領域に存在する可能性が高いと考えられる。

hTS 遺伝子のプロモーター活性に必要な CACCC ボックスと Sp1 結合配列の上流

域 (-269 から -342) とこれらの配列の間の領域 (-201 から -212) には、プロモーター活性に対して、抑制的に働くと考えられる領域の存在することが示された。2つの抑制的に働くと考えられる領域のうち、下流側に存在する抑制配列は、欠失変異体およびカセット変異を用いた解析から、TGC GTT TCCCC の配列を含み、そのうち、GCG TTT の配列を AGATCT で置換してしまうと機能しなくなると考えられる。一方、プロモーターの上流域に存在する抑制的に働く領域と配列を比較してみると TTCCC を基本とする相同性のある配列が両方の領域に存在していることがわかる (図 1-17)。以上の結果から、hTS 遺伝子においてはこの TTCCC を基本とする配列が遺伝子発現に対し抑制的に働く配列として機能している可能性が示唆された。hTS 遺伝子のほかにもプロモーター配列の上流に抑制的に働く領域を持つ遺伝子として、ヒトの hypoxanthine phosphoribosyltransferase³⁸⁾ やマウスの DNA polymerase β ³⁹⁾ などが知られており、マウスの DNA polymerase β の場合、この抑制的な領域の働きが、細胞の種類で異なることが知られている⁴⁰⁾。TS 遺伝子の場合、その発現が多すぎても、細胞内のスクレオチドプールのバランスが崩れて、正常な DNA 合成に障害の起こることが予想されるため、増殖に伴う発現の誘導に加え、抑制的な調節も生理的に意義が大きいと考えられる。その点で、これらの配列がどのように遺伝子発現を抑制しているかは興味深い。

hTS 遺伝子のプロモーター領域に結合するトランス因子と発現制御

CACCC ボックスおよび Sp1 の認識配列を含む *PvuII-BssHII* 断片をプローブとして用いて、hTS 遺伝子のプロモーター領域に結合する因子について検討した結果、少なくとも 3 種の DNA-蛋白質複合体が形成されることが示された。これらのなかでゲルシフトアッセイで最も濃いバンドを与えた複合体は、hTS 遺伝子上の Sp1 結合部位を *BglIII* の認識配列で置換したプローブでは形成が阻害され、さらに競合実験の結果から、Sp1 の認識配列 (GC ボックス) を認識する因子を含むことが示された (図 1-9)。

さらに、より短いプローブを用いて検討したところ、CACCC ボックスおよび Sp1 の認識配列にはともに、Sp1 が結合していることが示唆された。バンドの濃さおよび位置から判断して、*XbaI-BssHII* 断片をプローブとした場合に最も濃くあらわれ

るバンドは *PvuII-BssHII* 断片をプローブにしたときに最も濃くあらわれるバンドに相当すると思われる。(図 1-9 A レーン 2 と図 1-12 A レーン 1 を参照) 両者はともに、Sp1 の認識配列を持つ DNA 断片を加えることにより、特異的に消失することから、Sp1 の結合によるバンドであると考えられる。

一方、CACCC ボックスを含む *PvuII-XbaI* 断片をプローブに用いた場合には複数のバンドが検出されるが、そのうちの最も泳動度の低いバンドは、*XbaI-BssHII* 断片を用いた場合に最も濃くあらわれるバンドとほぼ同じ位置に生じている。(図 1-11 A レーン 2 と図 1-12 A レーン 1 を参照) さらに、このバンドを含むほとんどのバンドは Sp1 の認識配列を含む DNA 断片を加えることにより消失することから、この最も泳動度の低いバンドが、Sp1 の結合により生じており、それ以外に、Sp1 の認識配列を認識する複数の因子が CACCC ボックスに結合していると考えられる。*PvuII-BssHII* 断片をプローブとして用いた場合に検出された薄い 2 本のバンドのうち、図 1-9 で c と示したバンドは hTS 遺伝子上の CACCC ボックスを置換したプローブで約 7 割までバンドの強度が減少しており、CACCC ボックスに結合する因子との関連性が示唆されるが、バンドの位置および競合実験の結果から考えて、図 1-11 A の c を付したバンドに相当すると思われる。

一方、*PvuII-XbaI* 断片をプローブに用いたときに生ずるバンドのうち、図 1-11 A の b で示したバンドは Sp1 の認識配列を持つ DNA 断片を加えたときは変化しないが、AP2 の認識配列を持つ DNA 断片を加えることにより特異的に消失することから、AP2 の結合によるバンドであると考えられる (図 1-11 B)。また、*PvuII-XbaI* 断片に組み換え体で作成した AP2 が結合することを確認した。(図 1-11 C) この場合、シフトしたバンドが、HeLa 細胞の核抽出液を用いた場合と若干異なる位置に検出されるが、これは AP2 の修飾等の違いによると推測される。さらに、この領域の DNA の配列中に AP2 が結合しうる配列を見出すことができた。

また、CAT アッセイによる結果から、hTS 遺伝子のプロモーター領域の CACCC ボックスと Sp1 の認識配列の間に、遺伝子の発現を抑制する配列を見出したが、この部分の DNA 配列をプローブに用いることで、この領域に特異的に結合すると考えられる因子を見出した (図 1-13)。ゲルシフトアッセイによる競合実験の結果か

ら、この因子は Sp1 や AP2 とは異なる認識配列をもつ因子であるが、Sp1 や AP2 あるいはその認識配列を持つ DNA 断片と何等かの相互作用をしている可能性が示唆された。

hTS 遺伝子の発現調節との関連という観点から、図 1-8に示したプロモーター変異体による CAT の活性と、図 1-9に示した各変異体由来の *PvuI*-*Bss*III 断片をプローブとしたゲルシフトアッセイの結果を比べてみると、ゲルシフトアッセイでの各複合体によるバンドの濃さと CAT の発現にはある程度の相関が有り、特に、いずれのバンドにおいても CACCC ボックスを置換した LS2 のプローブではバンドが薄くなるが、抑制配列と考えられる領域を置換した LS3 では逆に濃くなっていることがわかる。特に図 1-9で最も泳動度の低い、a と示したバンドの濃さと CAT の発現は LS5 を除くとかなり良い相関が見られる。以上のことから、図 1-9の a で示した複合体は hTS 遺伝子の転写活性に重要な寄与をしていると考えられ、さらに、この複合体は、hTS 遺伝子プロモーター上の Sp1 認識配列への Sp1 の結合に由来する一方で、CACCC ボックスへの Sp1 の結合や、上に述べた抑制配列への核内因子の結合などによる調節を受けている、複数の蛋白質からなる複合体である可能性がある。この観点からすると、抑制配列に結合する因子が、ゲルシフトアッセイの競合実験で見られたように Sp1 あるいは Sp1 の認識配列を持つ DNA と相互作用する可能性が示されたことは興味深い。

hTS 遺伝子は細胞周期に依存して発現が調節される代表的な遺伝子の一つである。その調節には転写および転写後の調節のあることが知られており、hTS 遺伝子の 5'-上流域と第 1 イントロンがその調節にかかわることが明らかにされている¹³⁾。細胞周期に依存した調節を行う代表的な転写因子として、E2F²⁸⁾があり、hTS 遺伝子にもその認識配列が存在するが、この配列の効果を CAT アッセイを用いて検討した結果、転写の促進に機能しているという結果は得られなかった。(図 1-14) 一方、hTS 遺伝子のプロモーター活性は主として Sp1 を含む複合体の形成と関連が深いことが示された。最近、Sp1 も細胞周期に依存した調節を行うことが複数の研究者により指摘されており^{41,42)}、hTS 遺伝子の細胞周期に依存した調節も Sp1 による支配を受けている可能性が示唆された。

シス因子としての繰り返し配列と翻訳開始コドン

転写開始点下流領域の遺伝子発現に対する機能配列としては、まず、欠失変異体を用いた解析から、3回の繰り返し配列とそれに相補的な配列を含む領域が遺伝子発現に対し、促進的に働く領域として同定された。CAT アッセイの結果から、HeLa細胞中で発現させた場合には1対の繰り返し配列とそれに相補的な配列が遺伝子の発現に必要であることが示唆された。この発現に必要な領域はステムループ構造をとり得ることから、第3章の考察にも述べたように、この領域がRNAの高次構造を通じて機能している可能性が考えられる。以前に、cDNAを用いて、この領域の翻訳に対する機能が検討されたが、その結果によると、3回の繰り返し配列を欠失したほうが、翻訳効率が上がるという、今回の実験とは逆の結果が得られた⁴³⁾。ただし、この時に用いられたhTS cDNAは逆むきの配列を欠いており、遺伝子発現に対する逆むきの配列の重要性が示唆される。これは、上記のRNAのステムループ構造を含む二次構造を媒介とするモデルを支持する結果と考えられる。翻訳の制御による遺伝子の発現調節については、原核生物やイースト、ショウジョウバエ等で良く知られている。真核生物においては、サイトメガロウィルス mRNAの翻訳制御について、5'-上流側の配列が必要であることが知られている⁴⁴⁾。また、イーストについては、人工的に導入されたステムループ構造が翻訳効率を1/20まで減少させることが知られている⁴⁵⁾。さらに、RNAの高次構造による遺伝子の翻訳制御については ferritin の鉄に依存した調節系でも明らかにされている⁴⁶⁾。TS 遺伝子についても、プロモウリジンを導入して、高次構造を変化させた TS mRNA について、翻訳効率が増加することが示されている⁴⁷⁾。また、RNA上のステムループ構造はRNAの安定性を増加させることも知られている。histone の転写産物においては、3'-側に存在する配列が細胞周期に依存したRNAの安定性の維持のために必要であることが知られている⁴⁸⁾。以上のことから、hTS 遺伝子の5'-上流域に存在する3回のくり返し配列とそれに相補的な配列の遺伝子発現に対する促進効果はRNAの二次構造を介して働いている可能性が高いと考えられる。

一方、CAT アッセイにおいて、hTS 遺伝子の翻訳開始コドンを欠失させたり、コドンに点変異体を導入した場合、いずれもCAT 遺伝子の発現が増加していることか

ら、hTS 遺伝子の翻訳開始コドンは遺伝子発現に対し、抑制的に働いているようにみえる。この機構の説明としては、次の2つの可能性が考えられる。第1の可能性はこのhTS 遺伝子の翻訳開始コドンが、翻訳過程での調節を受けている可能性である。hTS 遺伝子の翻訳開始コドンに続くコード領域は、プラスミド上のCAT 遺伝子とフレームを合わせて挿入してあるので、CAT プラスミドにhTS 遺伝子の翻訳開始コドンが含まれている場合は、hTS 遺伝子の翻訳開始コドンから翻訳が始まるが、これが欠失した場合には、その下流にある、CAT 遺伝子の翻訳開始コドンから翻訳が開始されると考えられる⁴⁹⁾。そこで、hTS 遺伝子の翻訳開始コドンが、CAT 遺伝子の5'-端のATG コドンに比べ、翻訳開始の効率が低いと仮定すると、hTS 遺伝子の翻訳開始コドンに変異を導入したときに、遺伝子発現の効率が上昇することを説明することができる。第2の可能性としては、このATG を含む領域が、DNA 結合因子と相互作用して、シス因子として遺伝子発現を抑制していることが考えられる。この場合にはATG を含む領域に点変異を導入した場合、DNA 結合因子の結合に依存して、遺伝子発現に対する効果が変わってくるはずである。hTS 遺伝子の翻訳開始コドンを含む領域は、第2章で述べるように、hTS 遺伝子のATG コドンを含む領域に結合するNF-TS2 およびNF-TS3 が結合する位置であり、これらの因子のうち、CAT アッセイに用いたHeLa細胞ではNF-TS2 が主にhTS 遺伝子に結合し得ると考えられる。一方、第2章で示すように、用いた変異体のNF-TS2 への結合性を調べてみると、翻訳開始コドンをATAに変換したものについては、野生型と同じように結合しており、翻訳開始コドンの遺伝子発現に対する抑制的な効果は、DNA 結合因子であるNF-TS2 の結合とは直接の相関が見られなかった。このことから考えると、このHeLa細胞を用いてのCAT アッセイで見られた翻訳開始コドンの遺伝子発現に対する抑制的な効果は mRNA の翻訳の段階で機能している可能性が高いと考えられる。

翻訳段階の調節としては、まず、mRNA のATG 近傍の配列は蛋白質の翻訳開始効率に影響を与えることが知られている⁵⁰⁾。また、E. Chu らはTS 酵素そのものが、hTS mRNA の翻訳開始コドンを含む領域に結合して、その翻訳を制御しており⁵¹⁾、さらに、mRNA 上の結合部位の一つは翻訳開始コドンを含む領域であることを示してい

る⁵²⁾。今回、この研究で明らかになった hTS 遺伝子の翻訳開始コドンの遺伝子発現に対する抑制効果はこのモデルで説明することができる。

同定されたプロモーター領域と他の調節領域との関連性

最初にも述べたように、hTS 遺伝子のミニジーンを用いた解析では hTS 遺伝子の 5'-上流域 3.8kb の間に細胞周期に依存した調節領域があることが報告されている¹³⁾。この研究で明らかになった hTS 遺伝子プロモーター領域とその上流の抑制配列が、細胞周期に依存した調節を担うかどうかは今後検討が必要であるが、hTS 遺伝子の翻訳開始点より 4kb の範囲には合計 6 個の Alu 配列が存在しており、最も TS 遺伝子に近いものは翻訳開始点の 0.6kb 上流に存在していることから、この研究で明らかにした機能配列の中に、細胞周期に関連した調節をおこなう領域も含まれている可能性がある。前にも述べたように、Sp1 も細胞周期に依存した調節を行うことが複数の研究者により指摘されており^{53,54)}、ミニジーンを用いた解析で同定された 5'-上流域の細胞周期に依存した調節領域が、hTS 遺伝子プロモーターそのものである可能性もある。今後は同定された各領域の変異体などを用いることにより、細胞周期に依存した調節を担う領域の詳細な検討が可能になると考えられる。また、第 1 イントロンには細胞周期に依存した調節のほかに、hTS 遺伝子のプロモーターに依存したエンハンサー様活性のあることが明らかにされている²¹⁾。第 1 イントロンにはゲルシフトアッセイにより複数の核内因子の結合することが報告されており、既知の核内因子の認識配列として GC ボックスが存在する。この研究で明らかになったように、hTS 遺伝子のプロモーター活性にはプロモーター領域への Sp1 の結合が重要であった。Sp1 はプロモーター領域からかなり離れた GC ボックス結合してプロモーター領域に結合した Sp1 と相乗的に転写を活性化することが知られており⁵⁵⁾、hTS 遺伝子の場合もこのような機構が働いている可能性が考えられる。

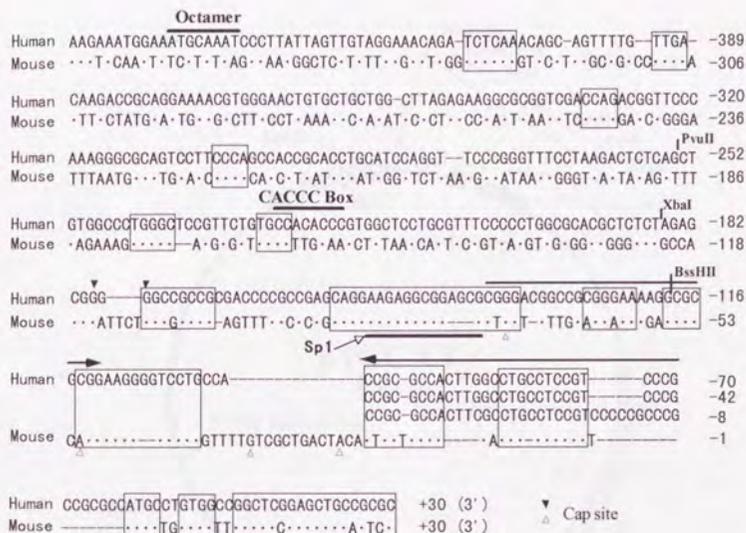


図 1-1 ヒトとマウスのチミジル酸合成酵素遺伝子 5'-上流域の比較

ヒトの遺伝子の配列¹⁴⁾を上段に、マウスのTS遺伝子の配列¹¹⁾を下段に示した。それぞれの遺伝子の三角で示した一はヒト⁸⁾(黒い三角)およびマウス¹¹⁾(白い三角)のこれまでに報告されたCapサイトを示す。・は一致する塩基を、四角で囲んだ部分は一致する領域(連続して4塩基以上)を示す。ヒトの配列のうち、3回の繰り返り配列とそれに相補的な配列を矢印で示した。また、ヒト遺伝子中のOctamer配列およびCACCCボックス(CA Box)の配列およびマウスの遺伝子のSp1結合部位¹⁹⁾を下線で示した。(Sp1結合部位およびCACCCボックスについては第1章本文参照)

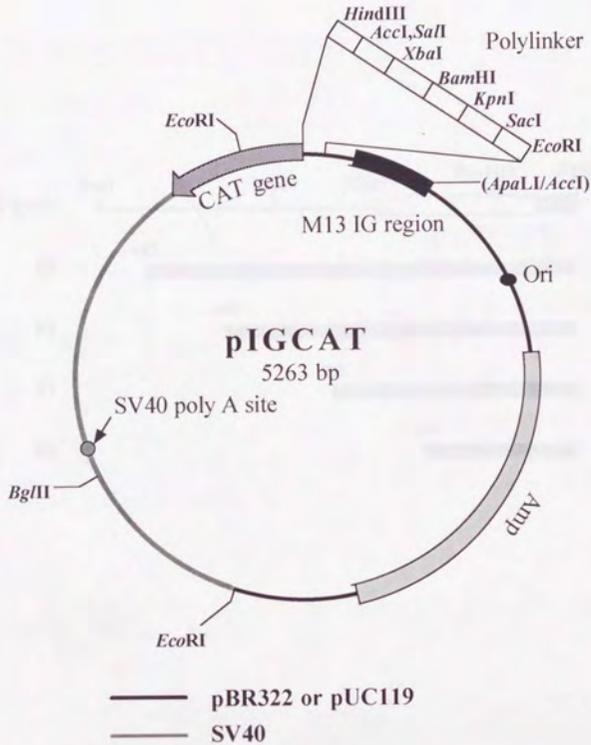


図 1-2 pIGCAT の構造

黒線は pBR322 あるいは pUC119 由来の配列を、灰色の線は SV40 DNA 由来の配列を示す。

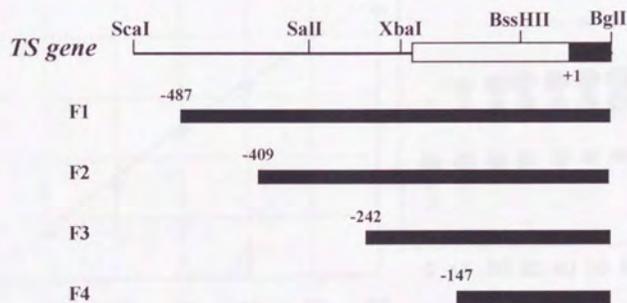


図 1-3 CAT アッセイに用いた hTS 遺伝子の 5'-上流域の欠失変異体の構造

hTS 遺伝子の構造を上部に示した。白い四角と黒い四角はそれぞれ非翻訳領域とコード領域を示す。最上部には制限酵素部位を示した。下段左にそれぞれの欠失変異体の名前を右にそれぞれの欠失変異体の構造を示す。黒い棒は hTS 遺伝子由来の領域を示す。

Determination of CAT Enzyme by CAT Assay

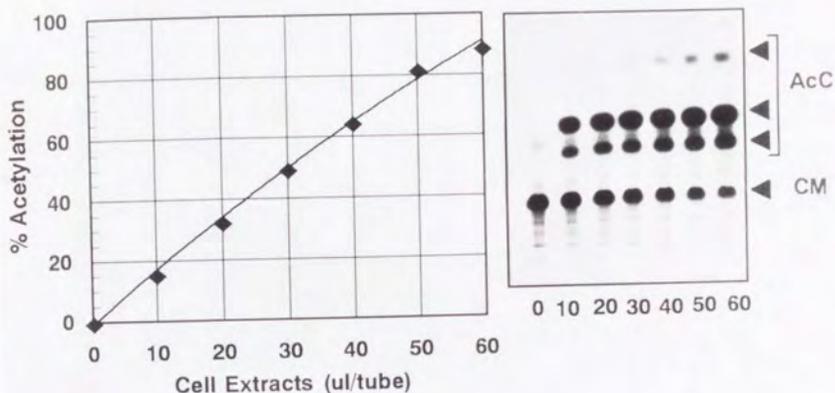


図 1-4 CAT アッセイの定量性の検討

pIGSVCAT と導入した HeLa 細胞の抽出液、0 μ l から 60 μ l を含む試料について CAT の活性を測定した。得られた TLC のオートラジオグラフを右に示す。TLC 上のクロラムフェニコール (CM) およびアセチル化されたクロラムフェニコール (AcCM) のスポットを定量した後、本文に示した方法により、Acetylation(%)の値を計算した。そのグラフを左に示す。

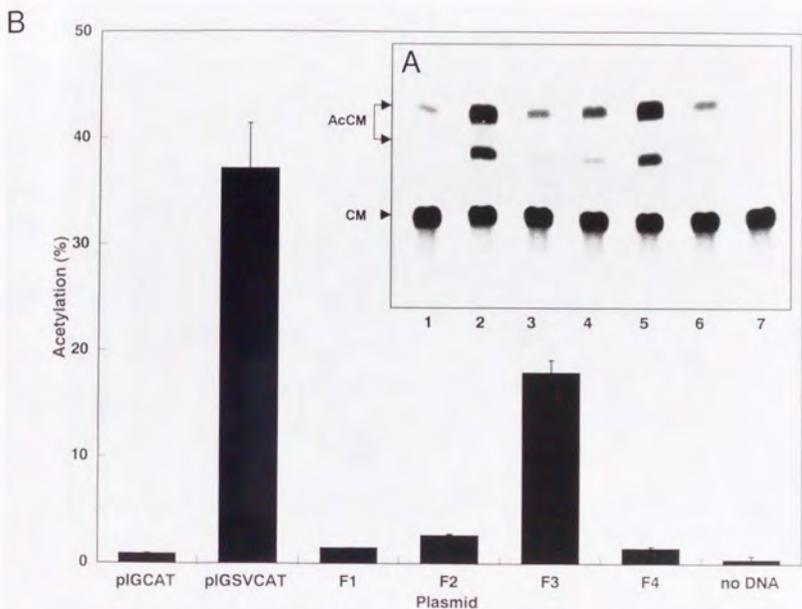


図 1-5 hTS 遺伝子のプロモーター領域の決定

A:CAT アッセイにより得られた TLC のオートラジをグラム。クロラムフェニコールおよびアセチル化されたクロラムフェニコールのスポットをそれぞれ CM および AcCM で示した。B:CAT アッセイの結果を定量化したグラフ。縦軸は本文中の計算式より求めた Acetylation(%)の値を示す。また、no DNA は pSV- β -galactosidase plasmid のみを導入した HeLa 細胞より調製した細胞抽出液による結果を示す。エラーバーは独立な 3 回の実験から計算した標準偏差を示す。

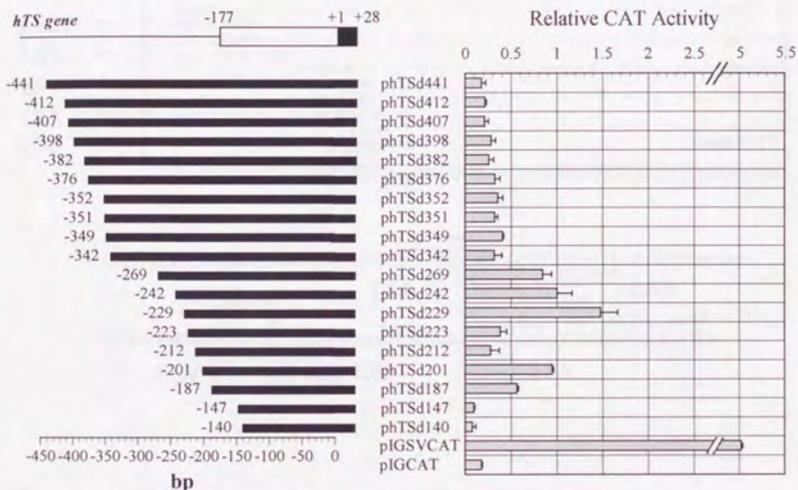


図 1-6 hTS 遺伝子 5'-上流域の欠失変異体による CAT アッセイ

左上に hTS 遺伝子の構造を示す。白い四角と黒い四角はそれぞれ非翻訳領域とコード領域を示す。番号は翻訳開始コドンの A を +1 としたときの塩基番号を示す。左の黒い棒は欠失変異体に含まれる hTS 遺伝子の領域を示す。黒い棒の右にそれぞれの変異体 DNA 断片を組み込んだ CAT プラスミドの名前を示す。右にはそれぞれのプラスミドを HeLa 細胞に導入したときに発現されてくる CAT の活性を相対値で示す。エラーバーは独立な 3 回の実験結果から計算した標準偏差を示す。

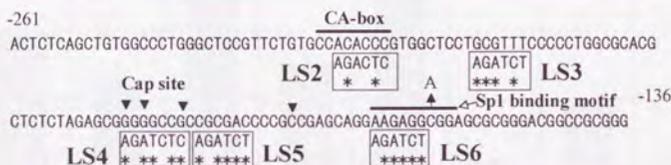
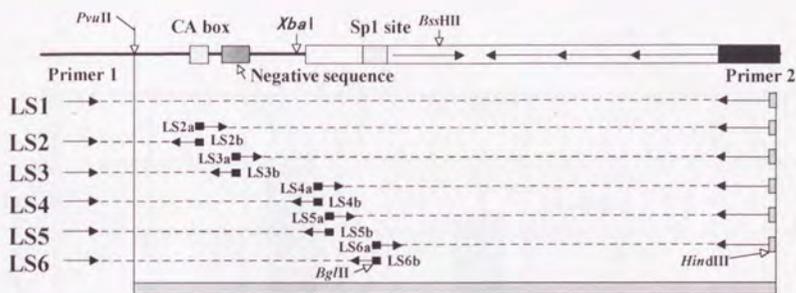


図 1-7 hTS 遺伝子 5'-上流域のカセット変異体の構造

上段に hTS 遺伝子の構造を示す。CACCC ボックス(CA Box)および Sp1 の結合部位を淡灰色の四角で、また、欠失変異体を用いた CAT アッセイの結果から同定された Negative sequence を暗灰色の四角で示す。中段に作製したカセット変異体の構造を示す。左に断片の名前を、また、5'および 3'-末端の PCR 用プライマー (Primer1 および Primer2)の位置を矢印で示す。Primer2 の右に付けた四角はプライマー中の HindIII 部位を示す。LS2 から LS6 の断片中に BgIII 部位を導入するために用いたプライマー (LS2a から LS6b、配列については表 1-1を参照)を短い矢印で示す。それぞれのプライマーの端に付けた黒い四角はプライマー中の BgIII 部位を示す。それぞれの断片は hTS 遺伝子中の PvuII 部位および Primer2 の端に付けた HindIII で切断した後 CAT プラスミドに挿入した。下段にそれぞれの変異体の変異した部分の配列を示す。配列に付した番号は遺伝子上の翻訳開始コドンの A を+1 としたときの塩基番号を示す。また、CACCC ボックス(CA Box)と Sp1 結合部位を黒線で、Cap site を黒三角で示した。四角で囲んだ部分がそれぞれの変異体で導入された BgIII 部位を示し、* を付けた塩基が実際に置換された塩基である。また、Sp1 結合部位に点変異の導入された変異体 (phTS146A) で置換された塩基を黒い矢印で示した。

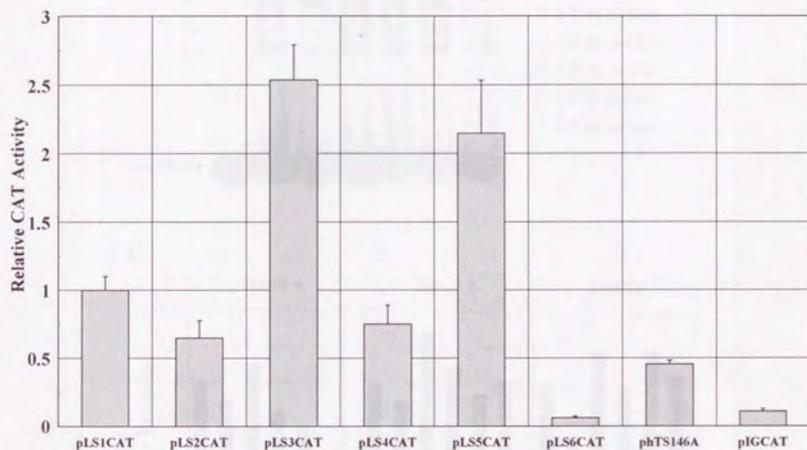


図 1-8 hTS 遺伝子 5'-上流域のカセット変異体による CAT アッセイ

それぞれの変異体 DNA を CAT プラスミドに挿入して HeLa 細胞で発現させた場合の CAT の活性を相対値で示す。エラーバーは 3 回の独立した実験結果から計算した標準偏差を示す。

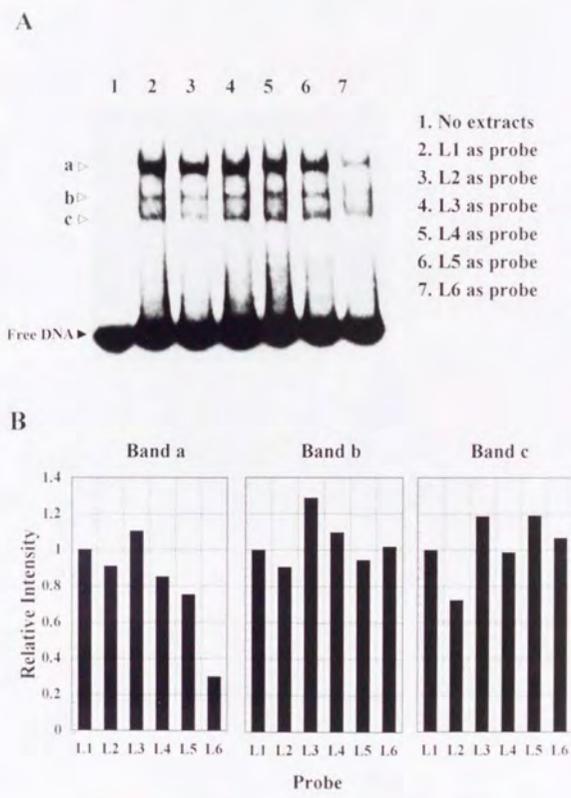


図 1-9 hTS 遺伝子プロモーター領域をプローブとしたゲルシフトアッセイ

A: hTS 遺伝子プロモーター領域あるいはそのカセット変異体より調製した *PvuII*-*Bss*III 断片をプローブとしたゲルシフトアッセイの結果を示す。核抽出液は HeLa 細胞から調製したものをを用いた。右に各レーンで用いたプローブを示す。L1~L6 はそれぞれ pLS1CAT~pLS6CAT より切り出した DNA 断片を示す。a、b、c は蛋白質の結合によるバンドを示す。B:A に示した a、b、c のバンドの放射活性を BAS2000 Bioimaging Analyzer (富士フィルム) を用いて定量した結果を相対値で示す。

Competitive Gel Mobility Shift Assay with Promoter
Region of hTS Gene

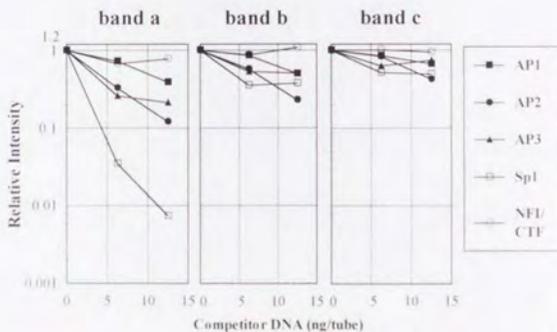


図 1-10 hTS 遺伝子プロモーター領域に結合する核内因子の解析

上段: hTS 遺伝子、5'-上流域の *PvuII-BssHIII* 断片をプローブとした競合実験の結果を示す。競合断片として、右に示した各転写因子の認識配列を持つ DNA 断片を用いた。a、b、c は蛋白質の結合によるバンドを示す。下段: a、b、c の各バンドを BAS2000 Bioimaging Analyzer (富士フイルム) を用いて定量した結果をグラフにして示す。

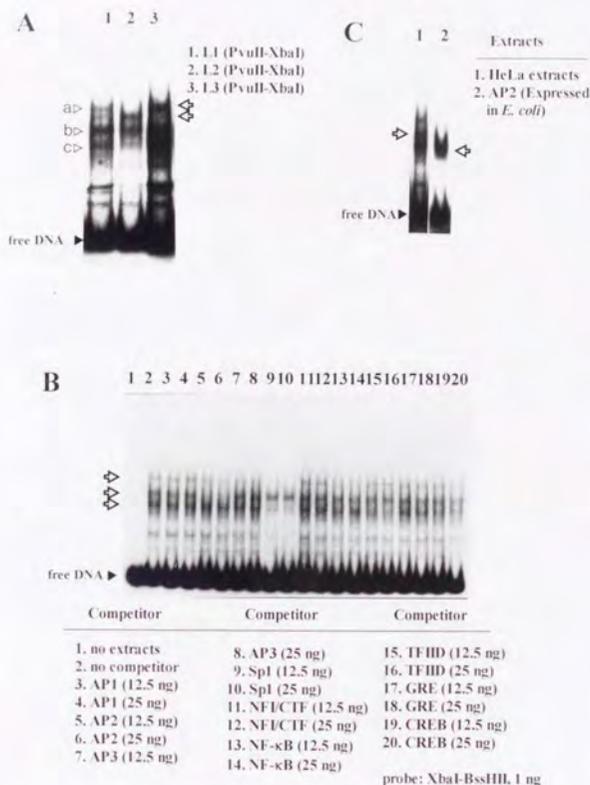


図 1-11 hTS 遺伝子の CACCC ボックス近傍に結合する核内因子の解析

A: hTS 遺伝子プロモーター領域あるいはそのカセット変異体から調製した *PvuII-XbaI* 断片をプローブとしたゲルシフトアッセイの結果を示す。核抽出液は HeLa 細胞から調製したものをを用いた。右に各レーンで用いたプローブを示す。L1~L3 はそれぞれ pLS1CAT~pLS3CAT より切り出した DNA 断片を示す。a, b, c はシフトしたバンドを、また、白抜きの矢印は変化を示すバンドを示した。B: hTS 遺伝子、5'-上流域の *PvuII-XbaI* 断片をプローブとした競合実験の結果を示す。競合断片として、右に示した DNA 断片を用いた。白抜きの矢印は変化を示すバンドを示した。C: 大腸菌で作成した AP2、あるいは HeLa の核抽出液を用いたゲルシフトアッセイの結果を示す。白抜きの矢印でシフトしたバンドを示した。プローブは *PvuII-XbaI* 断片を用い、核蛋白質としては右に示したものをを用いた。

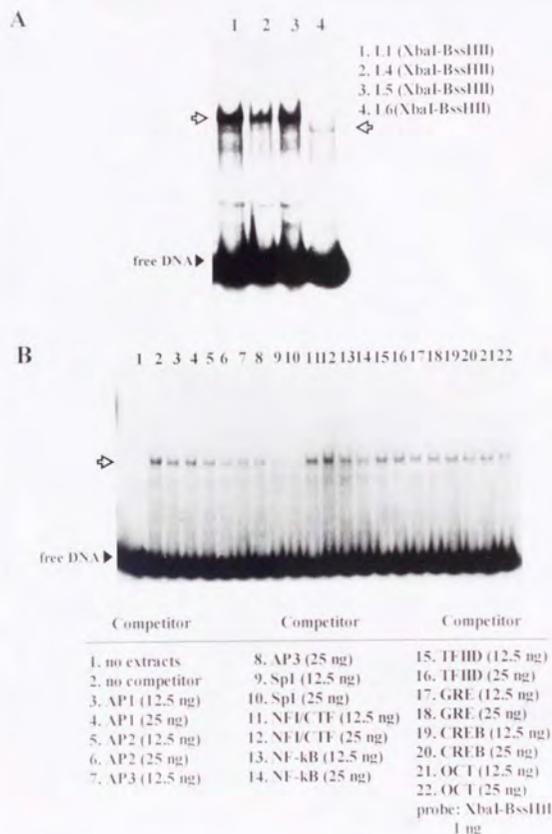


図 1-12 hTS 遺伝子の Sp1 認識配列近傍に結合する核内因子の解析

A: hTS 遺伝子プロモーター領域あるいはそのカセット変異体から調製した *XbaI-BssIII* 断片をプローブとしたゲルシフトアッセイの結果を示す。核抽出液は HeLa 細胞から調製したものをを用いた。右に各レーンで用いたプローブを示す。L1, L4~L6 はそれぞれ pLSICAT, pLS4CAT~pLS6CAT より切り出した DNA 断片を示す。白抜き矢印は変化を示すバンドを示した。B: hTS 遺伝子、5'-上流域の *XbaI-BssIII* 断片をプローブとした競合実験の結果を示す。競合断片として、右に示した DNA 断片を用いた。白抜き矢印は変化を示すバンドを示した。

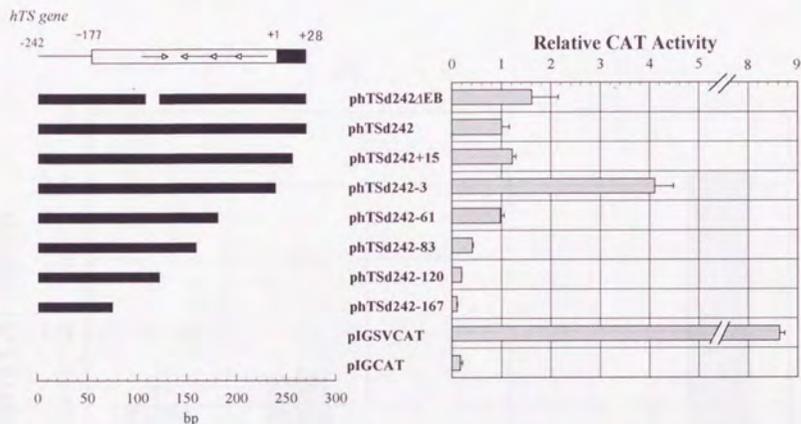


図 1-14 hTS 遺伝子の転写開始点下流域の欠失変異体による CAT アッセイ

左上に hTS 遺伝子の構造を示す。白い四角と黒い四角はそれぞれ非翻訳領域とコード領域を示す。番号は翻訳開始コドンの A を +1 としたときの塩基番号を示す。白い四角の中の矢印は 3 回の繰り返し配列とそれに相補的な配列を示す。中段左の黒い棒は欠失変異体に含まれる hTS 遺伝子の領域を示す。黒い棒の右にそれぞれの変異体 DNA 断片を組み込んだ CAT プラスミドの名前を示す。右にはそれぞれのプラスミドを HeLa 細胞に導入したときに発現される CAT の活性を相対値で示す。エラーバーは独立な 3 回の実験結果から計算した標準偏差を示す。

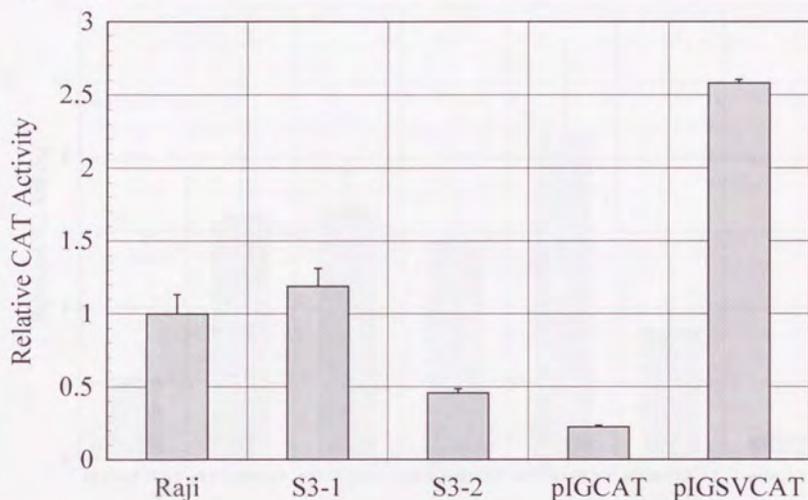


図 1-15 hTS 遺伝子のくり返し構造の数が遺伝子発現に及ぼす影響

PCR で増幅されたヒト染色体 DNA 断片を *Xba*I-*Hind*III 断片として CAT プラスミドに組み込み HeLa 細胞で一過的に発現させた時の CAT の活性を相対値で示す。エラーバーは 3 回の独立した実験結果から計算した標準偏差を示す。Raji: Raji 細胞の DNA より増幅された hTS 断片で、クローン化された hTS 遺伝子と同じ構造を持つ。S3-1: ヒトの染色体 DNA より増幅した DNA 断片で、3 回のくり返し構造を持つ。S3-2: ヒトの染色体 DNA より増幅した DNA 断片で、2 回のくり返し構造を持つ。

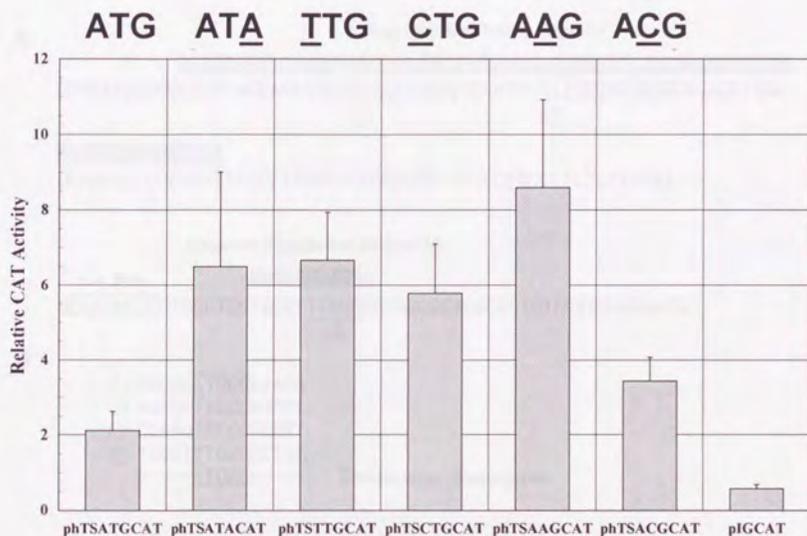


図 1-16 翻訳開始コドンの点変異の遺伝子発現に対する影響

hTS 遺伝子の翻訳開始コドンに点変異を導入した変異体の *Xba*I-*Hind*III 断片を hTS 遺伝子のプロモーター領域とともに piGCAT に組み込んで HeLa 細胞中で発現させたときの CAT の活性を相対値で示す。グラフの上には CAT プラスミドに挿入した hTS 遺伝子の翻訳開始コドン部分の配列を示し、下線で変異を導入した塩基を示す。グラフの下に用いた CAT プラスミドの名前を示す。プラスミドの名前は挿入した hTS 遺伝子の翻訳開始コドン部分の配列を xyz としたとき phTSxyzCAT として示した。エラーバーは 3 回の独立した実験結果から計算した標準偏差を示す。

Primer 1	5'-CCAGGTTCCCGGGTTT-3'
Primer 2	5'-CCAAGCTTGGCTCCGAGCCGGCCACAGGCATGGCGCGG-3'
LS2a	5'-AGATCTGGCACAGAACGGAG-3'
LS2b	5'-AGATCTGTGGCTCCTGCGTT-3'
LS3a	5'-AGATCTAGGAGCCACGGGTG-3'
LS3b	5'-AGATCTCCCGCTGGCGCACG-3'
LS4a	5'-GAGATCTCGCTCTAGAGAGC-3'
LS4b	5'-AGATCTCCCGCGACCCCGCC-3'
LS5a	5'-AGATCTGCGGCCCCCGCTCT-3'
LS5b	5'-AGATCTCCCGCGAGCAGGA-3'
LS6b	5'-AGATCTCCTGCTCGGCGGGG-3'
LS6b	5'-AGATCTCGGAGCGGGGACG-3'

表 1-1 カセット変異体の作製に用いた PCR 用プライマーの配列

AP1	5'-CTAGTGATGAGTCAGCCGGATC-3'
AP2	5'-GATCGAACTGACCGCCCGCGCCCGT-3'
AP3	5'-CTAGTGGGACTTTCCACAGATC-3'
SP1	5'-GATCGATCGGGGCGGGGCGATC-3'
NF1/CTF	5'-ATTTTGGCTTGAAGCCAATATG-3'
NF-κB	5'-ATYYGAGGGGACTTTCCAGGC-3'
TFIID	5'-GCAGAGCATATAAGGTGAGGTAGGA-3'
GRE	5'-TCGACTGTACAGGATGTTCTAG-3'
CREB	5'-AGAGATTGCCTGACGTCAGAGAGCTAG-3'

表 1-2 ゲルシフトアッセイの競合実験に用いた DNA 結合因子の認識配列を含む DNA 断片の構造

実験には表に示した配列を持つ double strand DNA を用いた。

sense 鎖用プライマー

Primer 0 5'-GTGGCTCCTGGCTTCCCCC-3'

anti-sense 鎖用プライマー

Primer 1 5'-CCAAGCTTGGCTCCGAGCCGGCCACAGGCATGGCGCGG-3'

Primer 2 5'-CCAAGCTTGGCTCCGAGCCGGCCACAGGCAVGGCGCGG-3'

Primer 3 5'-CCAAGCTTGGCTCCGAGCCGGCCACAGGCBTGGCGCGG-3'

Primer 4 5'-CCAAGCTTGGCTCCGAGCCGGCCACAGGDATGGCGCGG-3'

表 1-3 オリゴヌクレオチドプライマー（点変異導入用）の配列

ATGC 以外の記号は以下の塩基をあらわす。 V=A, G, C; B=T, G, C; D=A, T, G.

第2章 細胞分化に依存したヒトチミジル酸合成酵素遺伝子の発現制御因子の解析^{17,56)}

hTS 遺伝子の発現制御機構を研究する上で最も興味深いのは、この遺伝子の細胞の増殖性に依存した発現制御の機構である。この問題を解析するための系として、この章では細胞分化に伴う hTS 遺伝子の発現調節を取り扱う。一般的に、多細胞生物では、組織の分化に先立ち、細胞の増殖が起こる。細胞の増殖期には TS を始めとする細胞増殖に必須の遺伝子が発現するが、ある時点で組織への分化が始まると、細胞の増殖に必要な遺伝子の発現は急速に低下し、それぞれの組織に特異的な遺伝子発現の誘導が起こると考えられる。このような過程での hTS 遺伝子の発現制御の機構を解析するモデルとして、ヒト前骨髄球性白血病患者より樹立された HL-60 細胞を用いることにした。この細胞は、活性化型 vitamin D₃ 等の薬剤を加えることにより、*in vitro* でマクロファージ様の細胞等へ分化させることができ、その過程で細胞の増殖性も急速に低下することが知られている。この系の利点としては、HL-60 細胞自体非常に増殖性の高い細胞であり、その点で取り扱いが容易なことと、分化を誘導する薬剤を変えることで、単球/マクロファージ系あるいは顆粒球系の異なる型の細胞に分化させることができ、分化の方向に依存した遺伝子発現の変化と分化過程に伴う共通の変化による遺伝子発現の変化を分けて解析できることがあげられる。ここで扱っている、hTS 遺伝子の場合、ヒトの TS 遺伝子にしか存在しない DNA 配列の機能を解析する必要があるため、ヒトの細胞を用いて解析をおこなうのが最も理想的である。ヒトの細胞を用いて細胞分化を扱おうとした場合、組織そのものを扱うことが困難なため、血球系の培養細胞を用いた系が唯一利用可能であるという点も、この系を用いた理由のひとつである。この章では、まず、この系を用いて細胞増殖の停止に伴い変化を示すような、hTS 遺伝子の 5'-上流域への結合因子を検索した。その結果、NF-TS1、NF-TS2 および NF-TS3 の 3 種の因子を、変化を示す因子として同定した。これらの因子のなかで、NF-TS2 および NF-TS3 の 2 つの因子は TS 遺伝子の発現の低下と対応して大きく変化することがわかったので、この 2 つの因子に着目し、更に詳しい解析を行った。

2-1 HL-60 の細胞分化過程で変化を示す hTS 遺伝子結合性核内因子の同定

HL-60 細胞の分化過程でどのような遺伝子の発現制御が行われているかについては多くの研究がなされている⁶⁰⁾が、TS のような細胞増殖に必須の遺伝子の発現調節については、ほとんど研究がなされていない。TK 遺伝子については、予備的な解析であるが、HL-60 を TPA で分化させた場合に、転写及び転写後の調節で発現が低下することが報告されている⁵⁷⁾。また、hTS 遺伝子については活性化型 vitamin D₃ で処理した場合に mRNA 量が低下することが報告されている⁶²⁾が、その機構等については明らかにされていなかった。ここでは、第 1 章と同様に、やはり hTS 遺伝子の 5'-上流域に着目し、この領域に結合する核内因子のうち、HL-60 の分化時に変動を示す核内因子を検索することにした。そこで、まず、第 1 章で同定した核内因子の他に、hTS 遺伝子に結合する因子があるかどうかを hTS 遺伝子の 5'-上流域を用いて検索した。

材料と方法

試薬および酵素

1, -25-dihydroxyvitamin D₃ (VD₃) は Roussel Pharmaceutical (Paris, France) より、Retinoic acid (RA) および Phorbol myristate acetate (PMA) は Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA) よりそれぞれ購入した。[α -³²P]dCTP(3000Ci/mmol) は NEN Research Products(Boston, MA, USA) より購入した。

培養細胞および培養条件

HeLaS3 (SC) は Japanese Cancer Research Resources Bank (東京) より入手し、10% の牛胎児血清を含む ES 培地⁵⁸⁾ で培養した。Raji 細胞も同様に 10% の牛胎児血清を含む ES 培地で培養した。HL-60 細胞は 10% の牛胎児血清を含む F12 培地で培養した。分化の誘導は 2×10^5 /ml の細胞について、それぞれ、1.3% DMSO、 10^{-7} M VD₃、 10^{-6} M RA あるいは $10 \mu\text{g}/\text{ml}$ PMA を含む培地で一定期間培養した。それぞれの誘導剤を含む培地は 3 日ごとに交換した。ヒトの正常繊維芽細胞である TIG-1 は Japanese Cancer Research Resources Bank より入手し、10% の牛胎児血清を含む ES 培地²³⁾ で培養した。同調培養のために、血清濃度を 0.25% とした培地で 1 週間培養した後、10% の血清を含む培地と交換し、細胞分裂を開始させた。

ゲルシフトアッセイに用いた DNA プローブの調製

ゲルシフトアッセイに用いた DNA 断片は hTS 遺伝子のサブクローンである pHRR68⁵⁹⁾より調製した。pHRR68 を適当な制限酵素で切断した後、翻訳開始コドンを含む 587bp の *Scal*-*Bgl*I 断片 (図 2-1 C 参照) を 1% のアガロースゲル電気泳動を用いて精製した。そして、*Hind*III リンカーを用いて pIGCAT¹⁷⁾の平滑化した *Sal*I から、*Hind*III までの間に挿入した。そのプラスミドを適当な制限酵素で分解し、生じた断片を 4% の Nusieve GTG agarose gel (FMC BioProducts、Rockland、ME、USA)を用いた電気泳動により精製した。精製した DNA 断片は Klenow fragment を用いて [α -³²P]dCTP によりラベルした後、5% のポリアクリルアミドゲル電気泳動により精製し、ゲルシフトアッセイに用いた。精製した断片の比放射能は 20,000 から 50,000 cpm/ng であった。

ゲルシフトアッセイ

ゲルシフトアッセイは“1-1 プロモーター領域の同定と微細構造の解析”と同じ方法を用いて行った。ただし、電気泳動は 5% ポリアクリルアミド (mono- : bis-acrylamide = 39:1) を使い、6.7 mM Tris-HCl (pH 7.9)、3.3 mM 酢酸ナトリウム、1 mM EDTA を含む溶液で行った。

結果

ヒトチミジル酸合成酵素遺伝子の 5'-上流域に結合する核内因子の検出

hTS 遺伝子の 5'-上流域に結合する蛋白性の因子をゲルシフトアッセイを用いて検索した。プローブには hTS 遺伝子 5'-上流域を含む、*Scal*-*Sal*I 断片 (222bp)、*Sal*I-*Xba*I 断片 (149bp)、*Xba*I-*Bgl*I 断片 (216bp) を用いた (図 2-1C 参照)。これらの中で、図 2-1 に示したように *Scal*-*Sal*I 断片を用いた場合に 1 本 (図 2-1 A のバンド a)、および *Xba*I-*Bgl*I 断片を用いた場合に 2 本 (図 2-1 A のバンド b および c) のシフトしたバンドが見られた。これらのバンドのうち、バンド c は HeLa 細胞の核抽出液を用いた場合には非常に薄く、Raji 細胞を用いた場合には検出されなかった。また、その他のバンドについては HeLa 細胞と Raji 細胞でほとんど差がなかった。バンド b および c の特異性を確認するために、ラベルしていない *Xba*I-*Bgl*I 断片およびその上

流にある *Scal-BglI* 断片を用いた競合実験を行った。その結果を図 2-1 B に示す。図 2-1 B のレーン 3, 4 に示したように、結合反応の競合断片として hTS 遺伝子の *Scal-XbaI* 断片を加えた場合、図 2-1 A で★を付けたバンドは消失したが、バンド b については結合の阻害がかからず、特異的な結合因子に由来するものであることがわかった。また、第 1 章で検出された CACCC Box および Sp1 結合部位に結合する因子はこのアッセイでは検出されなかったが、その一部は★をつけたバンドの中に含まれている可能性が考えられる。(バンド a および c の特異性については“2-2 核内因子、NF-TS2 および NF-TS3 の結合位置の決定”を参照。) 以後、バンド a に相当する因子を NF-TS1、バンド b に相当する因子を NF-TS2、バンド c に相当する因子を NF-TS3 と呼ぶことにする。

細胞分化における核内因子の変化

hTS 遺伝子 5'-上流域に結合する核内因子として、NF-TS1、NF-TS2 および NF-TS3 の 3 つの因子が同定されたので、次にこれらの因子の HL-60 細胞の分化過程での変動について検討した。HL-60 細胞は色々な試薬で処理することにより、顆粒球あるいは単球/マクロファージ系の細胞へと試験管内で分化させることができ⁶⁰⁾、その分化に伴って、細胞の増殖性が低下することが知られている⁶¹⁾。特に VD3 を用いて単球/マクロファージ系の細胞に分化させた場合には hTS 遺伝子の発現が mRNA のレベルで減少することが知られている⁶²⁾。この VD3 を用いて、HL-60 細胞を分化させた場合の hTS 遺伝子に結合する核内因子の変化について検討を行った結果を図 2-2 に示す。HL-60 細胞はこの条件では 5-6 日で分化を完了する。まず、NF-TS1 の変化についてみると (図 2-2 A)、分化に伴い、バンドが薄くなっていることがわかる。また、NF-TS2 および NF-TS3 についてみると (図 2-2 B) 分化前のパターンは HeLa 細胞や、Raji 細胞と非常に似ているが、分化の進行に伴って、NF-TS2 は減少するのに対し、NF-TS3 は増加してくることがわかる。この変化は、hTS mRNA の変化とよく対応している⁶²⁾、これらの DNA 結合因子が、TS の発現に何等かの関与をしていると推測される。

異なる分化誘導剤で分化させた場合の、NF-TS2 および NF-TS3 の変化

HL-60 細胞は VD3 の他に、phorbol ester でも単球/マクロファージ系の細胞に、

また、DMSO や、RA で顆粒球系の細胞に分化させることができる。これらの細胞分化の過程で、上記の NF-TS2 および NF-TS3 がどのように変化するかを検討した。図 2-3 に示したように、分化誘導剤の種類、分化の方向（マクロファージ/単球系の細胞に分化するか、顆粒球系の細胞に分化するか）にかかわらず、いずれの場合にも NF-TS2 が減少し、NF-TS3 が増加していることがわかる。細胞の増殖性はいずれの場合にも低下することから、hTS 遺伝子に結合するこれら 2 つの因子は細胞分化に伴う、共通の変化、例えば、増殖性に変化に応じて、hTS 遺伝子の発現を制御している因子であることが考えられる。

NF-TS2 および NF-TS3 の細胞周期依存性

以上の様に、NF-TS2 および NF-TS3 は 1,25-hydroxyvitamin D₃ による HL-60 細胞の分化過程において、hTS 遺伝子の発現の低下に伴って大きく変化していた。同様の変化が、他の hTS 遺伝子の発現が変化する系でも起こるかどうかにについて検討するため、これらの核内因子の細胞周期依存性について解析を行った。hTS 遺伝子は細胞周期に依存した調節を受けており、TIG-1 細胞の実験では、G₀ 期ではその発現はほとんど見られないが、血清刺激後約 24 時間後に mRNA レベルが最大値となることが知られている⁵⁾。そこで、この系について NF-TS2 および NF-TS3 の変化を前と同様にゲルシフトアッセイを用いて検討した。その結果を図 2-4 に示す。なお、細胞同調をしていない細胞では結果には示さないが、図 2-4 のレーン 3 とほぼ同じパターンを示した。この結果をみると血清飢餓により G₀ 期とした TIG-1 細胞では NF-TS2 はほとんど見られず、NF-TS3 が主に存在しているのに対し、血清濃度を 10% とすると、3 時間後には NF-TS2 が見られるようになり、細胞周期を通じてほぼ同じパターンを示すことがわかる。以上のように、TIG-1 細胞では HeLa 細胞とは異なり、通常 NF-TS2 に比べ、NF-TS3 が細胞中に多く存在しており、また、細胞を血清飢餓により G₀ 期に置くと NF-TS2 が更に減少することがわかった。

2-2 核内因子、NF-TS2 および NF-TS3 の結合位置の決定

前項で、hTS 遺伝子に結合し、遺伝子の発現に関与していると思われる因子を同定することができたので、次に、メチレーションインターフェレンスおよびゲルシ

フトアッセイでの競合実験等の手法を用いて、これらの因子の DNA 上の結合位置を解析した。その結果、NF-TS1 と名付けた因子は hTS 遺伝子上流のオクタマー配列 (ATGCAAAT) に結合していた。また、他の2つ (NF-TS2 および NF-TS3) は hTS 遺伝子の翻訳開始コドンの近傍に結合していた。さらに、NF-TS2 および NF-TS3 については点変異を導入した DNA プローブを用いることによって、翻訳開始コドンと直接相互作用していることが示された。

材料と方法

試薬および酵素

Thermus aquaticus の DNA polymerase (AmpliTaq; Perkin-Elmer Cetus)は宝酒造より購入した。

ゲルシフトアッセイの競合実験に用いた DNA 断片の作製

ゲルシフトアッセイの競合実験に用いる DNA 断片は PCR を用いて合成した。hTS 遺伝子の 5'-上流域を増幅させるための sense および anti-sense 鎖のオリゴヌクレオチドプライマー (図 2-5 および表 2-1 参照) を DNA 合成機 (model 381A; Applied Biosystems)を用いて合成した。合成したオリゴヌクレオチドの配列を表 2-1に示す。合成したプライマーは Oligonucleotide Purification Cartridge (Applied Biosystems)を用いて精製し PCR に用いた。PCR は以下の組成の反応液中で行った。

10mM Tris-HCl (pH8.3、25°C)

50mM KCl

1.5 mM MgCl₂

100μg/ml gelatin

0.2 mM dNTP

1μM each primer

total 50 μl/reaction

さらに鋳型として1反応当たり、1ng の *ScaI*-*Bgl*II 断片および 2.5unit の *Thermus aquaticus* 由来の DNA 合成酵素 (AmpliTaq; Perkin-Elmer Cetus, Norwalk, CT, USA) を加えた。反応液にミネラルオイルを重層した後に、Zymoreactor(model AB-1800; ア

ト一 (株) に移し、以下の条件で PCR を行った。

反応条件

94°C	1 min	} 30 cycle
55°C	1 min	
72°C	2 min	
72°C	5 min	

ただし、図 2-5 の Primer 4 および Primer 7 をもちいた PCR では、上記の条件では DNA の増幅が見られたかったため、鋳型として 1 μ g のラジ細胞由来の DNA を用い、アニーリング温度を 65°C にして行った。合成した DNA 断片は 4% の NuSive GTG agarose gel を用いた電気泳動で精製し、実験に用いた。

Methylation interference による DNA 結合領域の解析

hTS 遺伝子 5'-上流域の 587bp の *Scal*-*Bgl*I 断片 (図 2-5 A 参照) の 5'-末端を polynucleotide kinase を用いて ³²P でラベルし、ついで *Xba*I で切断した。*Bgl*I 部位がラベルされた *Xba*I-*Bgl*I 断片を 5% のポリアクリルアミドによる電気泳動で精製し、実験に用いた。methylation interference の方法は San 等の方法⁶³⁾に従ったが、ポリアクリルアミドゲルからの抽出は 0.5 M CH₃COONH₄、0.1% SDS、1 mM EDTA、10% methanol、50 μ g/ml proteinase K を含む溶液中で、37°C、16 時間インキュベートすることにより行った。

翻訳開始コドン部分に点変異を導入したプローブの作製

翻訳開始コドン部分に点変異を導入した DNA 断片は、“1-2 主要転写開始点下流域の遺伝子発現に対する機能の解析” で作製したものをを用いた。ゲルシフトアッセイに用いるために、それぞれの断片が組み込まれたプラスミドを *Bam*HI および *Hind*III で消化し、生じた断片を 4% NuSieve GTG agarose gel を用いた電気泳動を用いて精製した。精製した DNA 断片は Klenow fragment を用いて [α -³²P]dCTP によりラベルした後、5% のポリアクリルアミドゲル電気泳動により精製し、ゲルシフトアッセイに用いた。

結果

NF-TS1 の結合位置の解析

NF-TS1 の結合する hTS 遺伝子の *Scal-SalI* 断片上には、核内因子の結合配列の候補となるオクタマー配列 (ATGCAAAT) が翻訳開始コドンの 433bp 上流に存在する (図 2-5 A を参照)。そこで、この配列と NF-TS1 の関係を調べるために、PCR を用いてこの部分を欠失させた DNA 断片を作製し (図 2-5 の P1 から P3)、ゲルシフトアッセイでの競合実験を行った。結果を図 2-6 に示す。この結果から、上記のオクタマー配列を含む断片を用いた場合のみに、DNA の結合に競合が見られ、NF-TS1 のバンドが消失していることがわかる。この結果から、NF-TS1 はオクタマー配列に結合していることが示唆された。

NF-TS2 および NF-TS3 の結合位置の決定

次に、NF-TS2 および NF-TS3 の DNA 上での結合位置を決定した。HL-60 を用いた細胞分化時の核内因子の変化の実験から、NF-TS2 または NF-TS3 を含む核抽出液を別々に調製出来ることがわかったので、NF-TS2 については分化前の HL-60 細胞より、NF-TS3 については VD3 で分化させた後の HL-60 細胞より調製した核抽出液を試料として用いた。まず、NF-TS2 および NF-TS3 の DNA との相互作用領域を解析するために、methylation interference⁶³⁾による解析を行った。核抽出液としては HeLa 細胞より調製したものおよび分化前後の HL-60 細胞より調製したものをを用いた。結果を図 2-7 に示す。この結果から、用いた核抽出液のいずれの場合も翻訳開始コドンより -4 から +11 の範囲に因子の結合による G のバンドの強度の減少が見られた。以上より、HeLa 細胞で検出された NF-TS2 および HL-60 細胞の分化前後に見られた NF-TS2 および NF-TS3 はいずれも hTS 遺伝子上の翻訳開始コドンを含む領域に結合していることが示唆された。ただし、この実験ではあまり明確な G のバンドの消失を示さなかったため、PCR を用いて予想される結合部位を欠失させた DNA 断片を作製し、ゲルシフトアッセイによる競合実験を行って結合位置を確認することにした。そのために、図 2-5 の SP4 および SP5 に示した DNA 断片を作製し、ゲルシフトアッセイの競合 DNA として用いた。その結果を図 2-8 に示す。この結果から、NF-TS2 および NF-TS3 の DNA への結合は hTS 遺伝子上の翻訳開始コドンを含む DNA 断片(+1 から +27 の領域)で競合が見られることがわかった。また、結果には示

さないが HeLa 細胞の核抽出液を用いた場合にも、HL-60 細胞の分化前の核抽出液を用いた場合と同様の結果を得た。

NF-TS2 の DNA への結合に対する翻訳開始コードンの関与

NF-TS2 および NF-TS3 の DNA 上の結合位置について、hTS 遺伝子上の翻訳開始コードンを含む領域が重要であることが明らかとなったので、この翻訳開始コードン部分に点変異を導入したプローブを作製し、HeLa 細胞および TIG-1 細胞の核抽出液を用いて NF-TS2 および NF-TS3 の結合について検討を行った。まず NF-TS2 についての結果を図 2-9A に示す。NF-TS2 によるバンドの形成は、ATG および ATA の配列を持つプローブについては変化は見られないが、翻訳開始コードンを TTG、CTG、AAG、ACG に変化させたプローブを用いた場合には、NF-TS2 のバンドと同じ位置か、やや下に薄いバンドが生じ、また、上にも新たなバンドが生じていることがわかった。これらの結果は NF-TS2 を含む複合体の形成に何等かの変化が生じたことを示しており、hTS 遺伝子の翻訳開始コードンの AT の配列が重要であることを示唆している。また、変異を導入したプローブで 2 本のバンドが観察されることから、この複合体が複数の蛋白質をその構成要素として持つことが推測される。また、NF-TS3 については図 2-9B に示した様に、翻訳開始コードン部分の配列が ATG および ATA の場合には、NF-TS2 の時と同じように結合に変化が見られないのに対し、その他の変異体については、結合が見られず、DNA への結合については、NF-TS2 と同じように、翻訳開始コードンの AT の配列が重要であることがわかった。これらのことから、NF-TS2 および NF-TS3 は hTS 遺伝子上のほぼ同じ位置に結合するのみでなく、その DNA の認識についても共通している可能性が示唆された。

2-4 主要転写開始点の下流領域のプロモーター配列および細胞の種類に対する依存性

hTS 遺伝子に細胞の増殖性に伴う TS の発現と相関して変動する因子の結合が確認されたので、これらの因子の機能を更に詳しく解析するために、この NF-TS2 および NF-TS3 の結合領域を含む hTS 遺伝子の転写開始点下流領域について、NF-TS2 および NF-TS3 の存在状態が異なる HeLa 細胞と TIG-1 細胞を用いて遺伝子発現に及

ばす効果を検討することにした。

材料と方法

CAT プラスミドの作成

転写開始点の下流領域の発現活性におよぼす影響を調べるために、前節の F3(phTSd242)のプラスミドより 148bp の *Bss*III-*Hind*III 断片を取り除いたプラスミド (F3 Δ BsBg、図 2-10参照) を作製した。

また、pIGBgCAT より hTS 遺伝子のプロモーター領域を含む 973bp の *Bam*HI-*Bss*III 断片を取り除き、その部位に pIGSVCAT のプロモーター/エンハンサーを含む *Bam*HI-*Hind*III 断片を組み込んだプラスミド pIGSVBsBgCAT を作製した。これらの構造を図 2-10に示す。

DNA の細胞への導入および CAT アッセイ

DNA の細胞への導入および CAT アッセイは“1-1 プロモーター領域の同定と微細構造の解析”と同様の方法で行った。但し、導入は 60-mm 径のシャーレにまいた細胞に対して行い、CAT プラスミド 5 μ g および pSV- β -galactosidase plasmid 5 μ g を一回の DNA 導入に用いた。

結果

転写開始点下流領域 (*Bss*III-*Bgl*I 断片) の hTS 遺伝子プロモーターに対する効果

作成したプラスミド F3 および F3 Δ BsBg を HeLa 細胞および TIG-1 細胞に導入したときの CAT の相対活性をそれぞれ図 2-11の A および B に示す。まず、HeLa 細胞に導入した場合には *Bss*III-*Bgl*I の領域を欠失することによって CAT の活性が約 1/3 程度に減少していることがわかる。一方、TIG-1 細胞に導入した場合にはこの領域を欠失することにより、CAT の活性はむしろ上昇していることがわかる。以上の様に、この領域は hTS 遺伝子のプロモーターに対し、細胞の種類によって異なる機能を示し、HeLa 細胞ではその発現を強める効果を示すのに対し、TIG-1 細胞ではむしろ抑

制する働きをしていることが示唆された。

転写開始点下流領域 (BssHII-BglI 断片) の SV40 初期遺伝子プロモーターに対する効果

次に、この *BssHII-BglI* の領域を SV40 の初期遺伝子のプロモーターの下流に結合したプラスミド (pIGSVBsBgCAT) と SV40 のプロモーターのみを CAT 遺伝子の上流に結合したプラスミド (pIGSVCAT) を HeLa 細胞および TIG-1 細胞に導入した場合の CAT の相対活性を図 2-11 の C に示す。結果からわかるように、この領域は HeLa 細胞においては、hTS 遺伝子のプロモーターへの効果と同様に、SV40 のプロモーターに対してもその発現を強める効果を持ち、この領域の欠失によって CAT の活性は約 1/5 に低下していた。いっぽう、TIG-1 細胞においては hTS 遺伝子のプロモーターの場合と異なり、この領域を欠失させても CAT の活性に有意な差は見られなかった。以上の結果から、hTS 遺伝子 5'-上流域の *BssHII-BglI* の領域は細胞の種類だけでなくその上流のプロモーターの種類にも依存して機能していると考えられる。

2-5 考察

第 1 章ではプロモーター活性を示す領域をプローブとして Sp1 等の因子の結合を見出した。この章ではまず、hTS 遺伝子 5'-上流域の更に広い範囲を用いてゲルシフトアッセイを行い、hTS 遺伝子に結合する核内因子の検索を行った。hTS 遺伝子はミニジーンを用いた解析から、図 2-1 に示した *Scal* より下流の領域で、TS(-)のマウス細胞を TS(+)へ変換すること、また、*Scal* より上流は約 3kb にわたって、Alu 配列に富む領域が見られることから、*Scal* 以下の領域に主な調節部位が存在すると考えられる。この領域をプローブとしたゲルシフトアッセイを行った結果、3 種の DNA 結合因子を見出した。そのうちの一つは上流のオクタマー配列に結合しており、残りの 2 つは hTS 遺伝子上の翻訳開始コドンの付近に結合していた。

NF-TS2 および NF-TS3 と hTS 遺伝子の発現制御

ここで見出した、NF-TS2 および NF-TS3 は hTS 遺伝子上のほぼ同じ位置に結合しており、HL-60 細胞を試験管内で分化させる系において、細胞分化に伴い、NF-TS2 が減少し、NF-TS3 が増加するという変化を示すことが明らかとなった。この変化は

分化誘導に用いる試薬や、細胞が分化する方向に依存していなかった。細胞が分化する場合の共通の変化として、増殖性の低下が上げられる。TS は細胞増殖に伴う DNA 合成に必須の因子であり、実際に、VD3 による分化の場合に、hTS 遺伝子の発現が mRNA レベルで低下することから、hTS 遺伝子に結合する NF-TS2 および NF-TS3 の変化は HL-60 細胞の分化に際し、増殖性の低下に伴う TS の発現調節に関与していることが示唆された。また、第 1 章で検出された hTS 遺伝子のプロモーター領域の Sp1 結合部位に対する Sp1 の結合については、HL-60 の VD3 による細胞分化過程では大きな変化は見られなかった（データは示していない）。

一方、TIG-1 細胞を用いて、この NF-TS2 および NF-TS3 の細胞周期依存性について検討を行ったところ、細胞周期に依存した hTS 遺伝子の発現状態と NF-TS2 および NF-TS3 の変化には対応が見られず、G₀-G₁ 期の変化に際して、NF-TS2 の増加が見られた。さらに、TIG-1 細胞の場合は、HeLa 細胞や HL-60 細胞と異なり、増殖状態でも細胞内に NF-TS3 が多く存在しており、分化後の HL-60 細胞に近いパターンを示すことがわかった。従って、この結果から、NF-TS2 および NF-TS3 は G₀-G₁ 期の変化という細胞の増殖性の変化には関連しているものの、細胞周期に依存した hTS 遺伝子の発現調節には直接関与していないことが考えられる。

hTS 遺伝子の細胞周期依存的発現にはこの遺伝子の 5'-上流域と第一イントロンが重要である事が知られている¹³⁾。ここで同定された、NF-TS2 および NF-TS3 の結合位置である hTS 遺伝子上の翻訳開始コドンは上記のように hTS 遺伝子の細胞周期依存的発現と直接関連していないものの、細胞の増殖状態と関連が見られる事から、細胞周期に依存した発現を支配する領域の一部に含まれている可能性がある。

hTS 遺伝子主要転写開始点下流領域 (BssHII-BglI) の遺伝子発現に及ぼす影響と NF-TS3 の機能

一方、hTS 遺伝子の 3 回のくり返し配列および NF-TS2、NF-TS3 の結合部位を含む転写開始点の下流領域 (BssHII-BglI の領域) の、遺伝子発現に対する効果について検討したところ、この領域はプロモーターの種類および発現させる細胞の種類により、遺伝子発現に対し、異なる機能を示すことが示唆された。この領域は、hTS 遺伝子のプロモーターの下流に存在すると、HeLa 細胞では促進的に、TIG-1 細胞で

は抑制的に遺伝子の発現を制御していた。第1章で述べたように、HeLa細胞ではhTS遺伝子に対し、NF-TS2が主に結合しているのに対し、TIG-1細胞ではNF-TS3が主に結合しており、NF-TS2は遺伝子の発現を促進するのに対し、NF-TS3は抑制していることが示唆される。しかし、一方で、TIG-1細胞で見られた抑制機能が、上流のプロモーターにより影響を受け、SV40由来のプロモーターでは働いていないと考えられることから、これら2つの因子の作用機構は異なることが推測される。

また、このBssHII-BglII断片はヒトのTS遺伝子に特有の3回の繰り返し配列とそれに相補的な配列を含んでいる。この構造は転写産物であるRNAの5'-上流域で安定な二次構造を形成することが考えられ⁵⁹⁾、転写産物やmRNAの安定化を通じて遺伝子の発現を増強する可能性が考えられ、実際に第1章で示したようにHeLa細胞中でhTS遺伝子の発現に対し促進的に働くことが示唆された。以上のことから、HeLa細胞に導入したときに見られるBssHII-BglII断片の、プロモーターの種類に依存しない発現促進効果は、くり返し配列部分の遺伝子発現にたいする効果としても説明が可能であると考えられる。

一方、TIG-1細胞中で観察された遺伝子発現への抑制的な働きは、hTS遺伝子のプロモーターに特異的であることから、転写段階の調節である可能性が高いと考えられる。現在のところ直接的な証拠は得られていないが、TIG-1細胞ではhTS遺伝子の翻訳開始コドンにNF-TS3が結合していることから考えて、このNF-TS3がhTS遺伝子のプロモーターに特異的なDNA結合因子と相互作用することによりhTS遺伝子の転写抑制に関与していることが考えられる。さらに、HL-60細胞を*in vitro*で分化させる系において、分化誘導剤の種類によらず、増殖性の低下に伴いNF-TS3の増加が見られることも、この因子とhTS遺伝子の発現抑制の関連性を示唆している。

転写開始点下流領域の調節配列とNF-TS2との関連性および今後の展望

第1章で述べた様に、転写開始点下流領域の遺伝子発現に対する調節領域として、繰り返し配列を含む領域と、翻訳開始コドンを含む二つの領域が同定され、さらにこれらの領域は、転写後の過程で機能している可能性が高いと考えられた。一方、これら二つの領域を含む、hTS遺伝子5'-上流域のBssHII-BglII断片には、プロモ-

ターの種類および細胞の種類に依存した調節配列の存在が示唆された。

一方、NF-TS2 については、TS 遺伝子の発現が高い細胞で多く見られることから、TS 遺伝子の発現に対して正の寄与をしていることが考えられるが、結合部位である翻訳開始コドンに変異を導入した DNA 断片の CAT アッセイでは、因子の結合と、CAT の発現の間に相関が見られなかった。(図 1-16 および図 2-9 参照) 第 1 章の考察で述べたように、変異を導入した hTS 遺伝子の翻訳開始コドンを含む領域は、遺伝子の翻訳制御にかかわっている可能性があり、CAT アッセイの結果にもその効果が現れていることが推測される。従って、NF-TS2 の hTS 遺伝子の転写調節に関しては更に検討が必要であると考えられる。

今後の課題としては、hTS 遺伝子の発現制御機構について、転写、RNA のプロセッシング、翻訳などの各段階における発現調節機構を明らかにするとともに、これまでの研究で同定された、プロモーター領域と遺伝子発現の調節に関与すると思われる領域と相互作用している核内因子、特に NF-TS2 および NF-TS3 などについて、クローニングおよび機能の解析を行うことが必要である。

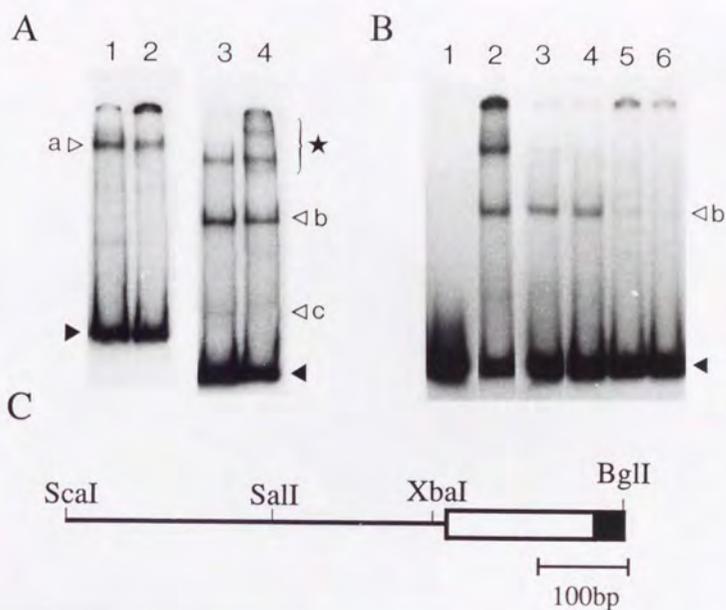


図 2-1 NF-TS1、NF-TS2 および NF-TS3 の検出と結合反応の特異性の検討

A: NF-TS1, 2 および 3 の検出。レーン 1, 3 は HeLa 細胞の核抽出液をレーン 2, 4 は Raji 細胞の核抽出液を用いた。レーン 1, 2 は hTS 遺伝子 5'-上流域の *Scal*-*SalI* 断片を、レーン 3, 4 は *XbaI*-*BglII* 断片をプローブとして用いた。a, b, c はそれぞれ、NF-TS1、NF-TS2 および NF-TS3 の結合によるバンドを、星印は非特異的な結合によるバンドを、また黒い三角は free DNA のバンドを示す。(図 1-1、B 参照) B: hTS 遺伝子の *XbaI*-*BglII* 断片に結合する因子の特異性の確認。プローブとして、3'-末端をラベルした *XbaI*-*BglII* 断片 (0.5ng) を用い、HeLa 細胞の核抽出液を用いてゲルシフトアッセイを行った。レーン 3, 4 には競合断片としてラベルしていない 25ng および 50ng の *Scal*-*XbaI* 断片を、レーン 5, 6 には 25 および 50ng の *XbaI*-*BglII* 断片を反応液に加えた。C: hTS 遺伝子の 5'-上流域の構造。制限酵素部位を上側に示した。白い四角は非翻訳領域を黒い四角はコード領域を示す。

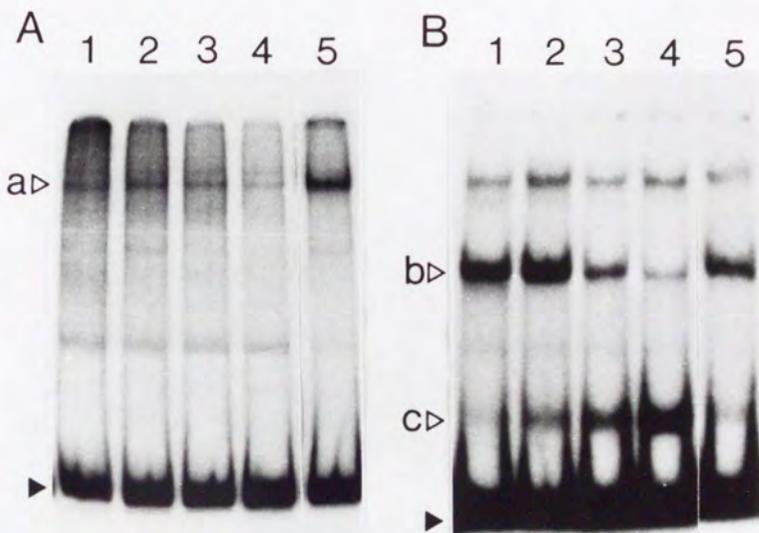


図 2-2 HL-60 細胞の分化に伴う DNA 結合因子の変化

3'-末端をラベルした hTS 遺伝子 5'-上流域の *Scal-XbaI* 断片 (A) および *XbaI-BglII* 断片 (B) を HeLa 細胞の核抽出液 (レーン 5)、あるいは未分化の HL60 細胞の核抽出液 (レーン 1)、VD3 添加 2 日後 (レーン 2)、3 日後 (レーン 3)、6 日後 (レーン 4) の細胞より調製した核抽出液と複合体を形成させた後電気泳動にかけた。a、b、c はそれぞれ NF-TS1、NF-TS2 および NF-TS3 によるバンドを、黒い三角は free DNA によるバンドを示す。

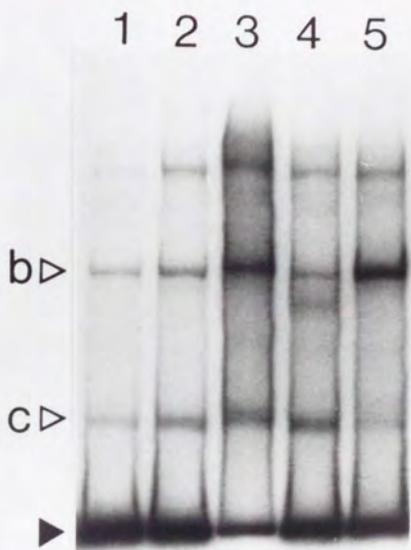


図 2-3 色々な分化誘導剤で処理した場合の NF-TS2 および NF-TS3 の変化

3'-末端をラベルした hTS 遺伝子 5'-上流域の *Xba*I-*Bgl*II 断片を未分化の HL-60 細胞 (レーン 5) あるいは DMSO (レーン 1)、VD3 (レーン 2)、RA (レーン 3)、TPA (レーン 4) で 3 日間処理した HL-60 細胞より調製した核抽出液と複合体を形成させた後、電気泳動のかけた。b、c のバンドはそれぞれ NF-TS2 および NF-TS3 によるバンドを、黒い三角は free DNA によるバンドを示す。

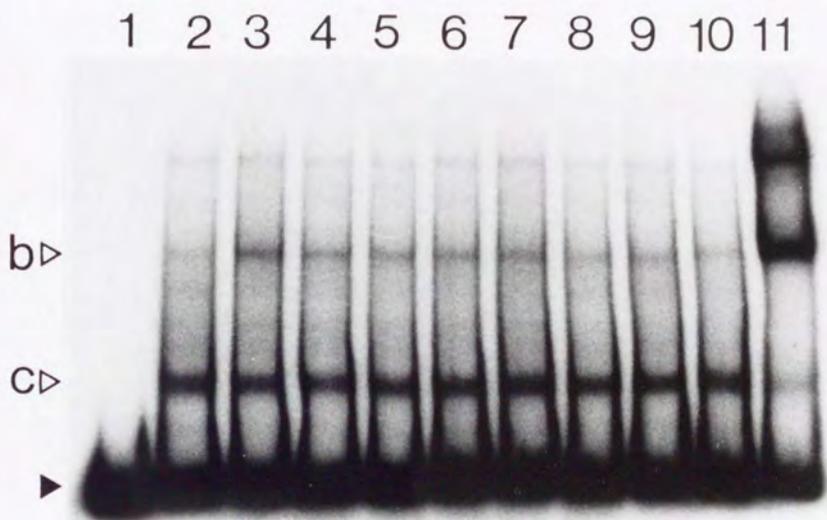


図 2-4 NF-TS2 および NF-TS3 の細胞周期依存性の解析

通常の増殖状態にある TIG-1 細胞 (レーン 1) あるいは、血清飢餓により G₀ 期にした後、血清を加え、それぞれ 0hr (レーン 2)、3hr (レーン 3)、6hr (レーン 4)、9hr (レーン 5)、10hr (レーン 6)、11hr (レーン 7)、12hr (レーン 8)、13hr (レーン 9)、14hr (レーン 10) 後の細胞から核抽出液を調製し、ゲルシフトアッセイに用いた。また、コントロールとして、HeLa 細胞 (レーン 11) の核抽出液を用いた。プローブには 3'-末端をラベルした hTS 遺伝子 5'-上流域の *Xba*I-*Bgl*II 断片 (図 2-1 C 参照) を用いた。b、c はそれぞれ NF-TS2 および NF-TS3 に相当するバンドを黒い三角は free DNA によるバンドを示す。

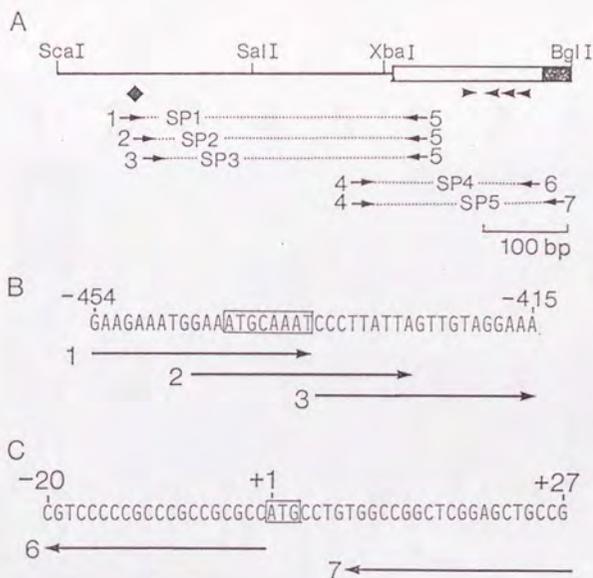


図 2-5 ゲルシフトアッセイの競合実験に用いた DNA 断片の構造

A:hTS 遺伝子の 5'-上流域の構造と競合実験に用いた DNA 断片の構造を示す。制限酵素部位を上部に示した。白い四角および黒い四角は、それぞれ非翻訳領域とコード領域を示す。◆はオクタマー配列の位置を示す。黒い三角は3回の繰り返し配列とそれに相補的な配列を示す。番号を付けた矢印は DNA 断片の合成に用いた PCR 用プライマーの位置を、点線は PCR 反応により合成される断片 (SP1~SP5) を示す。B:PCR 用プライマー1,2,3 の構造を示す。hTS 遺伝子の配列と遺伝子の翻訳開始コドンの A を+1 としたときの塩基番号を上部に示した。オクタマー配列を四角で囲んで示す。番号を付けた矢印に相当する配列を PCR 用プライマーとして用いた。C:PCR 用プライマー6 および7 の構造。B と同様に PCR 用プライマー6 および7 の構造を示した。図に示したそれぞれの DNA プライマーの配列を表 2-1に示す。

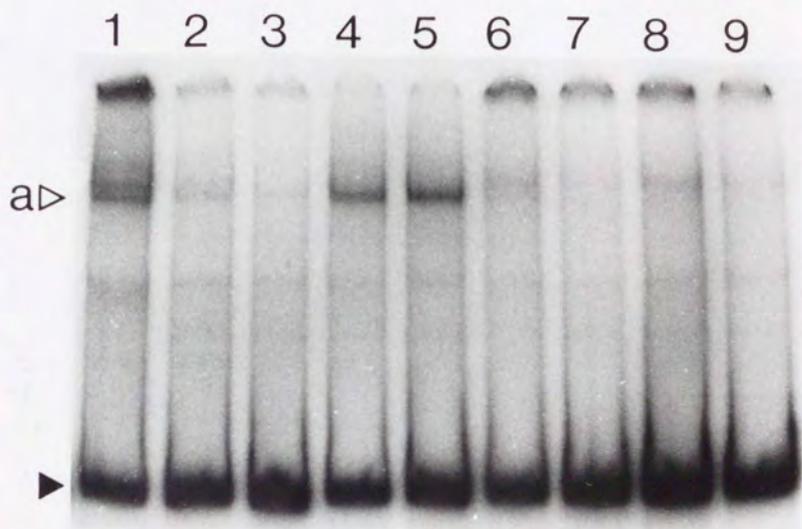


図 2-6 NF-TS1 の結合位置の決定

プローブとして、3'-末端をラベルした hTS 遺伝子 5'-上流域の *Scal-XbaI* 断片 (0.5ng) を用い、(図 2-1 C 参照) HeLa 細胞より調製した核抽出液を用いて実験を行った。競合断片として、12.5ng (レーン 2, 4, 6, 8) または 25ng (レーン 3, 5, 7, 9) の以下に示す DNA 断片を加えた。レーン 1: プローブのみ、レーン 2, 3: *Scal-XbaI* 断片、レーン 4, 5: SP3 断片 (図 2-5 参照)、レーン 6, 7: SP2 断片、レーン 8, 9: SP1 断片。白い三角は NF-TS1 によるバンドを、黒い三角は free DNA によるバンドを示す。

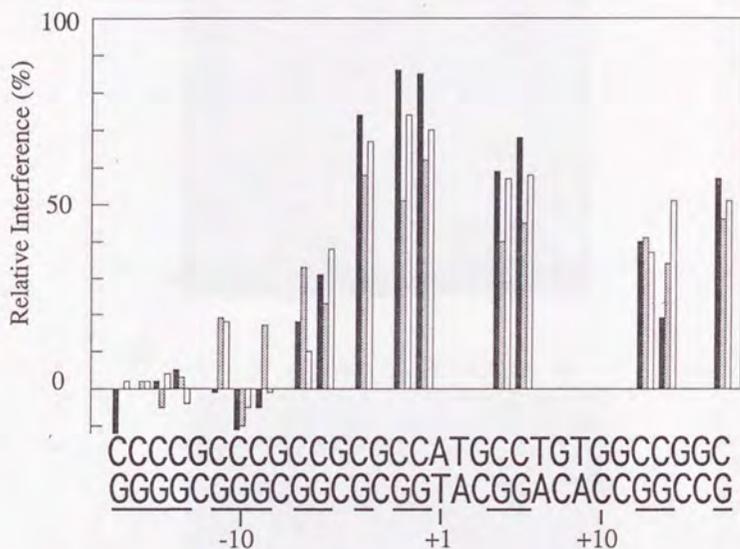


図 2-7 NF-TS2 および NF-TS3 の結合位置の決定 (1) : Methylation Interference

による解析

hTS 遺伝子 5'-上流域の *Xba*I-*Bgl*II 断片の 5'-末端をラベルした後、部分的にメチル化し、HeLa 細胞あるいは VD3 で 3 日間処理した HL-60 細胞より調製した核抽出液と複合体を形成させた。NF-TS2 あるいは NF-TS3 に相当する複合体と free DNA をそれぞれ 5%ポリアクリルアミド電気泳動で分離した後抽出し、ピペリジンで処理し、電気泳動を行った。オートラジオグラフの後、得られたラダーを UltraScan XL (Pharmacia LKB Biotechnology, Uppsala, Sweden) でスキャンした。横軸に示した各 G のバンドに対し、グラフの縦軸にはそのバンド強度の複合体の形成による減少の割合を%で示した。黒い棒と点を打った棒は、それぞれ HL-60 細胞の NF-TS2 および NF-TS3 のバンドより抽出した DNA による結果を、白い棒は HeLa 細胞の NF-TS2 のバンドより抽出した DNA による結果を示す。

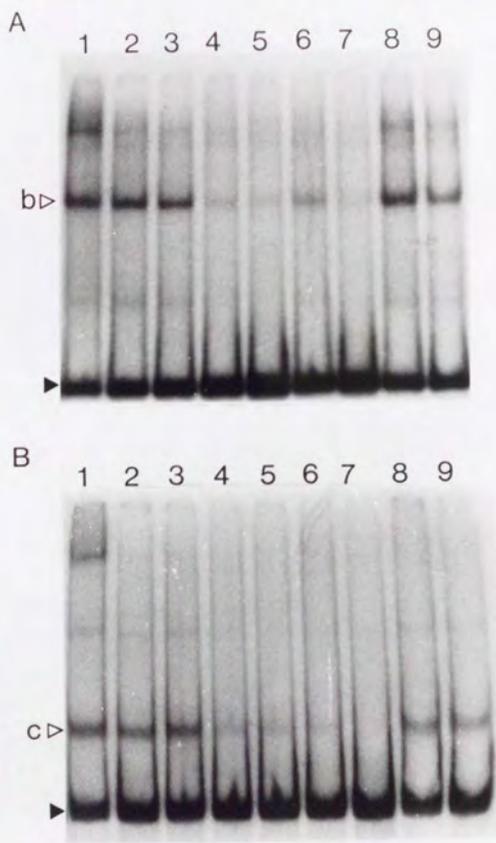


図 2-8 NF-TS2 および NF-TS3 の結合位置の決定 (2) : 競合 DNA を用いた解

析

プローブとして、3'-末端をラベルした hTS 遺伝子 5'-上流域の *Xba*I-*Bgl*II 断片 (0.5ng) を用い、(図 2-1 C 参照) 未分化の HL-60 細胞 (A) あるいは VD3 で 6 日間処理した HL-60 細胞 (B) より調製した核抽出液を用いて実験を行った。競合断片として、25ng (レーン 2, 4, 6, 8) または 50ng (レーン 3, 5, 7, 9) の以下に示す DNA 断片を加えた。レーン 1: プローブのみ、レーン 2, 3: *Scal*-*Xba*I 断片、レーン 4, 5: *Xba*I-*Bgl*II 断片、レーン 6, 7: SP5 断片 (図 2-5 C 参照)、レーン 8, 9: SP6 断片。b, c のバンドはそれぞれ NF-TS2 および NF-TS3 によるバンドを、黒い三角は free DNA によるバンドを示す。

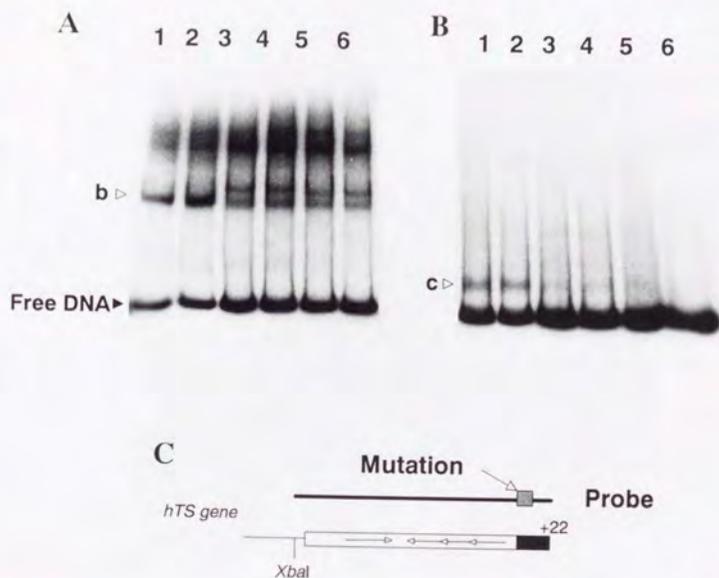


図 2-9 NF-TS2 および NF-TS3 の DNA への結合における ATG 配列の関与

A, B: ATG 配列を変化させたプローブを用いたゲルシフトアッセイ。hTS 遺伝子の翻訳開始コドンを以下に示す配列と置き換えた DNA 断片をプローブにして、HeLa 細胞 (A) あるいは TIG-1 細胞 (B) から調製した核抽出液と複合体を形成させた後電気泳動にかけた。レーン 1: ATG、レーン 2: ATA、レーン 3: TTG、レーン 4: CTG、レーン 5: AAG、レーン 6: ACG。b, c はそれぞれ NF-TS2 および NF-TS3 に相当するバンドを示す。C: ゲルシフトアッセイのプローブに用いた DNA 断片の構造。上段にプローブの構造、下段に hTS 遺伝子の構造を示した。灰色の四角は変異を導入した hTS 遺伝子上の翻訳開始コドンの位置を示す。白い四角と黒い四角はそれぞれ非翻訳領域とコード領域を示す。白い四角の中の矢印は 3 回の繰り返し配列とそれに相補的な配列の位置を示す。プローブは図に示した hTS 遺伝子の XbaI 部位から、翻訳開始点下流の +22bp までを含んでいる。

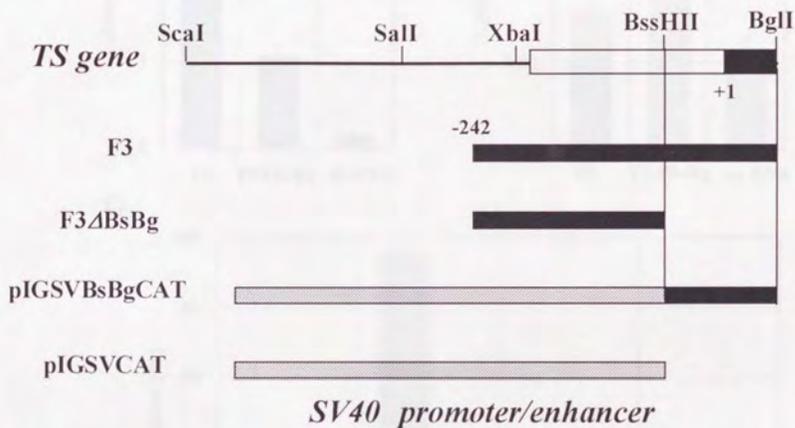


図 2-10 CAT アッセイに用いた hTS 遺伝子断片の構造

hTS 遺伝子の構造を上部に示した。白い四角と黒い四角はそれぞれ非翻訳領域とコード領域を示す。最上部には制限酵素部位を示した。下段左にそれぞれの CAT プラスミドの名前を右に CAT 遺伝子の upstream に組み込まれた断片の構造を示す。黒い棒は hTS 遺伝子由来の領域を、また、pIGSVBsBgCAT および pIGSVCAT に含まれる縞を付けた棒は、SV40 初期遺伝子由来のプロモーター/エンハンサー領域を示す。

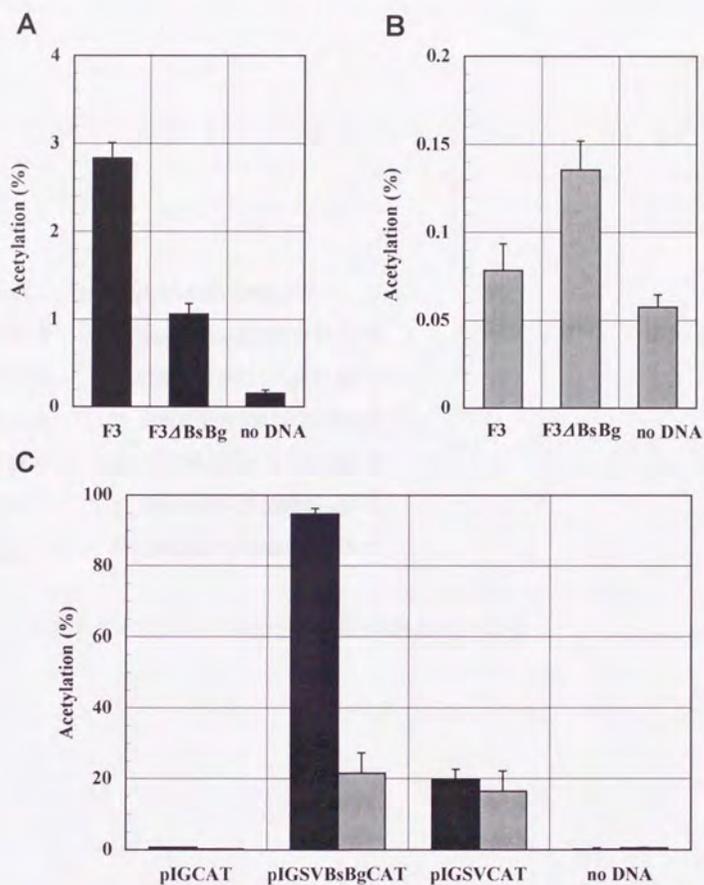


図 2-11 hTS 遺伝子 5'-上流域の *Bss*HII-*Bgl*II 断片の遺伝子発現に及ぼす影響

A, B: hTS 遺伝子のプロモーターにたいする *Bss*HII-*Bgl*II 断片の効果。HeLa 細胞 (A) および TIG-1 細胞 (B) に導入した場合の結果を示す。C: SV40 初期遺伝子のプロモーターにたいする *Bss*HII-*Bgl*II 断片の効果。黒い棒は HeLa 細胞に導入した場合、灰色の棒は TIG-1 細胞に導入した場合の結果を示す。A, B, C ともに縦軸は本文中の計算式より計算した Acetylation(%)の値を示し、エラーバーは独立な 3 回の実験から計算した標準偏差を示す。また、no DNA は pSV- β -galactosidase plasmid のみを導入した細胞より調製した細胞抽出液による結果を示す。

Site 15'-GAAGAAATGGAAATGCAAAT-3'

Site 2 5'-GAAATGCAAATCCCTTATTA-3'

Site 3 5'-CCCTTATTAGTTGTAGGAAA-3'

Site 4 5'-GTGGCTCCTGCCTTCCCCC-3'

Site 5 5'-GCTCCGCCTCTTCCTGCTCG-3'

Site 6 5'-GGCGCGCGCGGGCGGGGACG-3'

Site 7 5'-CGGCAGCTCCGAGCCGGCCA-3'

表 2-1 オリゴヌクレオチドプライマー（競合実験用）の配列

総括

ヒトチミジル酸合成酵素の発現制御機構の解明を目指して、以下の研究を行った。得られた成果の要約は以下の通りである。

第1章 ヒトチミジル酸合成酵素遺伝子のプロモーター領域の同定と発現調節に関する因子の解析

その第1段階として、未同定であった hTS 遺伝子のプロモーターの同定およびその周辺領域の詳細な解析を行った。hTS 遺伝子のプロモーター領域には真核生物由来のプロモーターによく見られる CAAT Box や TATA Box、典型的な GC Box が存在せず、その詳しい機能領域については解析がなされていなかった。マウスの TS 遺伝子ではプロモーター領域の解析がなされており、同定された転写に重要な領域のうち、Sp1 の結合領域の1つがヒトの遺伝子と高い相同性を示しているが、その他の TS 遺伝子に特徴的な調節を行っていると考えられる因子についてはその結合領域がヒトとマウスの間で保存されていない。また、上に述べた共通の Sp1 の結合領域の上流では両方の遺伝子にほとんど相同性が見られなくなることから、ヒトの TS に特異的な発現制御領域の存在が示唆された。そこで、hTS 遺伝子プロモーター領域とその調節領域を同定するために、欠失変異体を作製し、HeLa 細胞を用いた CAT アッセイによりそれらの領域を同定した。その結果、hTS 遺伝子のプロモーター活性に必要な領域として転写開始点を+1 として-65 から+30 の領域が同定された。この領域は、SV40 初期遺伝子のエンハンサー領域やヒトの b-globin 遺伝子のプロモーターに見られる CACCC Box(CCACACCC)およびマウスの TS 遺伝子の Sp1 結合部位と相同性の高い領域を含んでいた。hTS 遺伝子のプロモーター活性にかかわる DNA 上のモチーフを決定するため、さらに詳細な欠失変異体およびカセット変異体を用いた CAT アッセイを行った。その結果、hTS 遺伝子のプロモーター活性には hTS 遺伝子の 5'-上流域に存在する CACCC Box および Sp1 結合部位が重要であることが明らかとなった。また、これらの領域の近くには、遺伝子の発現を抑制すると考えられる 2 つの領域が存在し、そのなかには TTCCC という配列が共通して含まれていた。転写開始点の下流の領域についても欠失変異体を用いて解析を行った。その結

果、hTS 遺伝子の 5'-上流域を用いた CAT アッセイにおいては hTS 遺伝子の 3 回の繰り返し配列とそれに相補的な配列を含む領域が遺伝子の発現を促進する効果を持ち、有意な発現には少なくとも 1 組の逆向き反復配列が必要であることが示された。この結果はこの領域が mRNA に転写された後に高次構造を介して機能している可能性を示している。また、hTS 遺伝子の翻訳開始コドンを含む領域は、遺伝子の発現に対し抑制的に働いていることが示唆された。この ATG を含む領域は DNA の転写の段階および RNA の翻訳の段階で機能する 2 つの可能性が考えられた。

次に、同定された DNA 上の転写調節に関ると考えられる領域に対する DNA 結合因子についても検討を行った。その結果、マウスの TS 遺伝子と相同性の高い hTS 遺伝子の Sp1 結合部位には実際に Sp1 と考えられる因子が結合し、この因子の結合と CAT アッセイにおける hTS 遺伝子のプロモーター活性との間に相関関係が見られることがわかった。また、ヒトの TS 遺伝子に特異的な CACCC Box には Sp1 に関連した複数の因子が結合することを見出した。さらに、CACCC Box と Sp1 の結合領域に挟まれた、遺伝子の発現を抑制すると考えられる領域にも、核内因子が結合することを見出した。これらの因子が hTS 遺伝子の転写段階での正および負の発現制御に関与していることが考えられた。

第 2 章 細胞分化に依存したヒトチミジル酸合成酵素遺伝子の発現制御因子の解析

次に、以上の知見をもとに TS 遺伝子の発現が変化するような系を用いて、その発現制御にかかわる因子の解析を行った。その系としてまず、ヒト前骨髄球性白血病患者より樹立された HL-60 細胞を 1,25-dihydroxyvitamin D₃ によりマクロファージ様細胞に分化させた場合の変化について解析を行った。この細胞分化の誘導により hTS の mRNA レベルが低下することが知られている。ゲルシフトアッセイを用いて hTS 遺伝子に結合する核内因子の変化について調べたところ、hTS 遺伝子の転写に重要と考えられる Sp1 のプロモーター領域への結合については大きな変化は見られなかったが、新たに hTS 遺伝子断片への結合が変化を示す複数の DNA 結合因子を見出した。これらのうちの 1 つ (NF-TS1) は hTS 遺伝子 5'-上流域の Octamer 配列 (ATGCAAAT) に結合していた。一方、他の 2 つ (NF-TS2 および NF-TS3) は転写

開始点の下流である遺伝子上の翻訳開始コドン近傍に結合していた。NF-TS2 および NF-TS3 について結合部位を詳しく解析したところ、これらの因子はともに、hTS 遺伝子の翻訳開始コドンの A を+1 としたときに、-4 から+11 の塩基と相互作用しており、また複合体の形成には翻訳開始コドン中の AT の配列が重要であることがわかった。また、NF-TS2 の複合体については複数の蛋白質よりなる可能性が示唆された。これら 3 つの因子のうち、特に NF-TS2 と NF-TS3 は分化に伴い大きな変化を示し、分化前にはほとんど見られなかった NF-TS3 が細胞分化とともに増加し、一方 NF-TS2 は分化に伴い減少した。NF-TS3 が増加するという変化は HL-60 細胞を retinoic acid や DMSO で顆粒球へ分化させた場合にも観察され、分化誘導剤の種類や分化の方向によらないことが明らかとなった。HL-60 細胞の分化時における共通の変化として細胞の増殖性の低下があげられるが、以上の結果から NF-TS2 および NF-TS3 は HL-60 細胞の分化における共通の変化、たとえば細胞の増殖性の変化に伴う hTS 遺伝子の発現調節に関与していることが示唆された。

さらに、TS 遺伝子の発現が変化する系として、ヒトの正常繊維芽細胞である TIG-1 細胞を用いて細胞周期に依存した hTS 遺伝子結合性の核内因子の変動について解析を行った。その結果、血清飢餓により G₀ 期とした細胞では NF-TS2 はほとんど見られないのに対し、血清を添加すると 3 時間後には NF-TS2 が観察されるようになることがわかった。この結果は hTS 遺伝子の発現する時期とは対応していないが、NF-TS2 および NF-TS3 が細胞の増殖性と関連のあることを示唆している。また、HeLa 細胞や Raji 細胞、分化前の HL-60 細胞などの培養細胞系においては NF-TS2 が多く存在するのに対し、ヒトの正常繊維芽細胞である TIG-1 細胞では NF-TS3 が常に多く存在していた。

以上のように、hTS 遺伝子の転写開始点下流領域に細胞の増殖性に関連すると考えられる因子の結合が見られたことから、この領域の hTS 遺伝子発現に与える影響について解析をおこなった。そのために、転写開始点の下流に存在する 3 回のくり返し配列および NF-TS2 および NF-TS3 の結合部位を含む領域 (*Bss*III-*Bgl*I の領域) を、SV40 の初期遺伝子のプロモーター/エンハンサー領域の下流、あるいは hTS 遺伝子のプロモーターの下流に挿入した場合の効果について、NF-TS2 および NF-TS3

の存在状態が異なる HeLa 細胞および TIG-1 細胞を用いて検討を行った。その結果、HeLa 細胞を用いた CAT アッセイでは、ともに CAT 遺伝子の発現を促進するのに対し、TIG-1 細胞を用いた場合には SV40 のプロモーターでは *Bss*HII-*Bgl*II 断片の有無で CAT 遺伝子の発現は変化せず、hTS 遺伝子のプロモーターでは、この領域を挿入することにより、CAT 遺伝子の発現が抑制されることがわかった。

一方、前に述べた欠変異体を用いた CAT アッセイの結果から、hTS 遺伝子の 3 回のくり返し配列を含む構造は遺伝子発現を増強する働きのあることが示唆されていた。この実験で観察された、HeLa 細胞に導入したときに見られるプロモーターの種類に依存しない発現促進効果は、くり返し配列部分の RNA の高次構造を介した遺伝子発現に対する効果としても説明が可能であると考えられる。一方、TIG-1 細胞中で観察された遺伝子発現への抑制的な働きは、hTS 遺伝子のプロモーターに特異的であることから、転写段階の調節である可能性が高いと考えられる。

現在のところ直接的な証拠は得られていないが、TIG-1 細胞では hTS 遺伝子の翻訳開始コドンに NF-TS3 が結合していることから考えて、この NF-TS3 が hTS 遺伝子のプロモーターに特異的な DNA 結合因子と相互作用することにより hTS 遺伝子の転写抑制に関与していることが考えられる。

本研究で明らかにした hTS 遺伝子 5'-上流域の発現調節に関するシス及びトランスに働く因子を図 3-1 に示す。まず、hTS 遺伝子のプロモーターはマウスとヒトの TS 遺伝子で保存された Sp1 結合配列とその上流の CACCC Box からなり、このモチーフの両方に Sp1 か Sp1 に類似した因子が結合すると考えられる。この 2 つのモチーフのうち、Sp1 の結合配列は hTS 遺伝子のプロモーター活性に大きな寄与をしており、マウスとヒトのほか最近分離されたラットとサルの TS 遺伝子でも保存されていた。以上のプロモーターの構造から考えて、現在同定されているマウスの TS 遺伝子と異なる転写開始点のほかに、マウスの TS 遺伝子と共通の位置にも転写開始点が存在する可能性が示された。さらに、これらのモチーフの近傍に転写因子である AP2 が結合することも確認した。また、CACCC Box と Sp1 の結合領域に挟まれた領域と、その上流域には TTCCC の配列を共通配列として含む抑制領域が存在

しており、そこにも未知の核内因子が結合することを示唆する結果を得た。著者等は、hTS 遺伝子の第1イントロンに、hTS 遺伝子プロモーターに特異的なエンハンサー活性のあることを見出しているが、このエンハンサーも、上に述べた hTS 遺伝子のプロモーターを構成する領域と相互作用をしていると考えられる。一方、hTS 遺伝子の翻訳開始コドンを含む領域には、HL-60 細胞の分化過程で変動を示す、NF-TS2 および NF-TS3 の2つの核内因子が結合することを見出したが、このうち NF-TS3 は TIG-1 細胞を用いた解析から、hTS 遺伝子のプロモーターと相互作用して遺伝子発現を抑制する働きを持つことが示唆された。また、転写開始点の下流に存在する3回のくり返し配列とそれに相補的な配列は、現在ヒトとサルで TS 遺伝子にのみ見出されているが、おそらく mRNA の二次構造を介して、遺伝子発現を促進する効果を持つことが推測された。最後に、hTS 遺伝子の翻訳開始コドンは、HeLa 細胞中で、見掛け上遺伝子発現を抑制する効果を持つことを示したが、これは、hTS 遺伝子の翻訳段階での調節を反映していると考えられた。

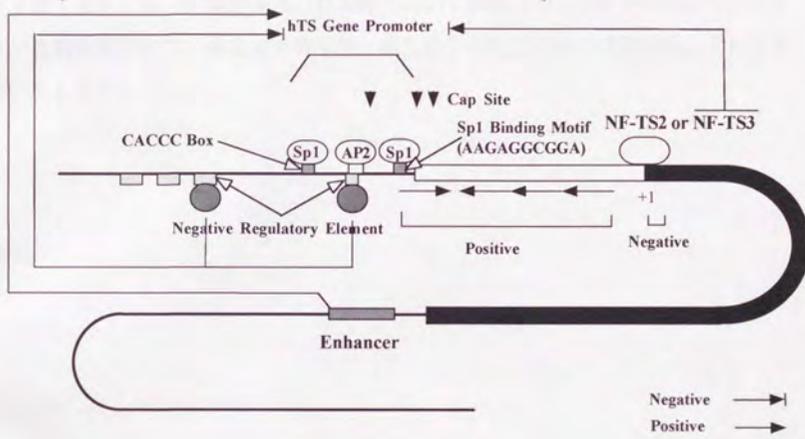


図 3-1 hTS 遺伝子 5'-上流域の発現調節にかかわる因子

hTS 遺伝子の 5'上流域に同定された発現調節にかかわる領域を示した。中央に hTS 遺伝子 5'-上流域の構造を示し、Negative Regulatory Element、CACCC ボックスおよび Sp1 Binding Element を四角で示す。また、白抜き四角および黒い四角は転写される領域のうち、非翻訳領域およびコード領域を示す。上部には現在同定されている Cap site の位置⁸⁾を示す。また、右上部には NF-TS2 および NF-TS3 の結合位置を示す。また、hTS 遺伝子の下に付けた矢印は繰り返し配列とそれに相補的な配列の位置を示す。それぞれの領域に付した機能の説明に関しては本文を参照のこと。

謝辞

本研究を行うにあたり常に暖かい御助言と御指導をいただいた静岡県立大学・食品栄養科学部・遺伝子工学研究室の竹石桂一教授に心から謝意を表します。また、適切な御助言を賜りました東京大学・理学部・生物化学科の横山茂之教授に深く謝意を表します。HL-60 細胞を用いた実験について御助言および便宜をはかっていた静岡県立大学・食品栄養科学部・微生物学研究室の野沢龍嗣教授に心から感謝いたします。

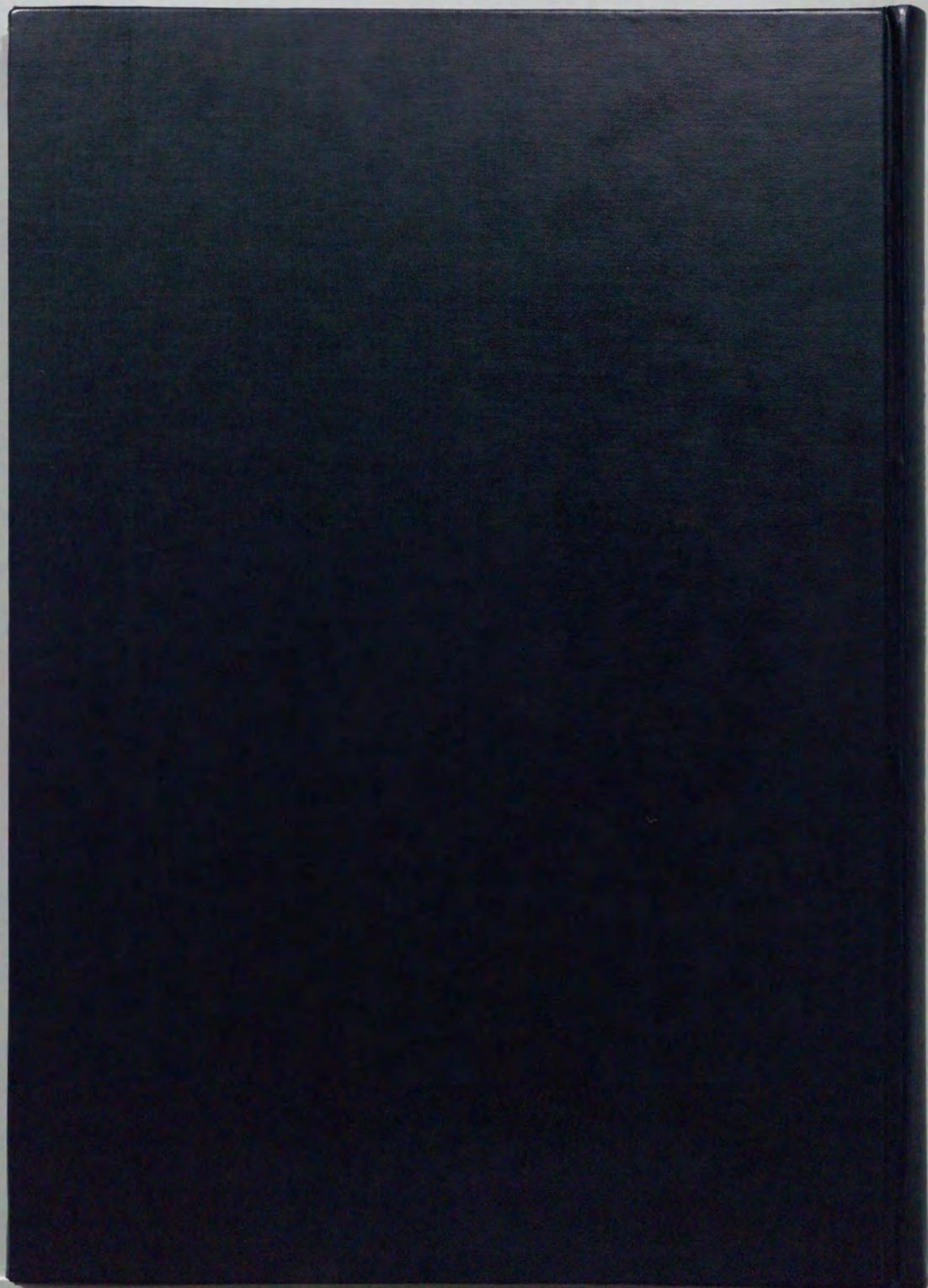
参考文献

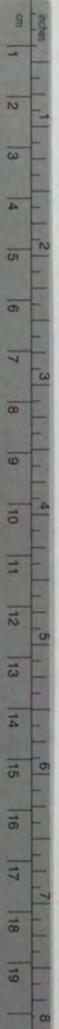
1. Ayusawa, D., Shimizu, K., Koyama, H., Takeishi, K. and Seno, T. (1983) *J. Biol. Chem.*, **258**, 12448-12454.
2. Hori, T., Ayusawa, D., Shimizu, K., Koyama, H. and Seno, T. (1984) *Cancer Res.*, **44**, 703-809
3. Hori, T., Ayusawa, D., Glover, T. W. and Seno, T. (1985) *Jpn. J. Cancer res. (Gann)*, **76**, 977-983
4. Naval Gund, L. G., Rossana, C., Muench, A. J., Johnson, L. F. (1980) *J. Biol. Chem.*, **255**, 7386-7390
5. Ayusawa, D., Shimizu, K., Koyama, H., Kaneda, S., Takeishi, K. and Seno, T. (1986) *J. Mol. Biol.*, **190**, 559-567
6. Danenberg, P. V. (1977) *Biochem. Biophys. Acta*, **473**, 73-92.
7. Takeishi, K. (1990) *YAKUGAKU ZASSHI*, **110**, 891-907.
8. Kaneda, S., Nalbantoglu, J., Takeishi, K., Shimizu, K., Gotoh, O., Seno, T., and Ayusawa, D. (1990) *J. Biol. Chem.*, **265**, 20277-20284
9. Berfort, M., Maley, G., Pedersen-Lane, J., Maley, F., (1983) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **80**, 4914-4918
10. Tayer, G. R., Lagosky, P. A., Storms, R. K., Haynes, R. H., (1987) *J. Biol. Chem.*, **262**, 5298-5307.
11. Deng, T., D. Li, C.-H. Jenh, and Johnson, L. F. (1986) *J. Biol. Chem.*, **261**:16000-16005
12. Horie N., Nalbantoglu, J., Kaneda, S., Ayusawa, D., Seno, T., and Takeishi, K. (1989) *J. Biochem. (Tokyo)*, **106**, 1-4.
13. Takayanagi, A., Kaneda, S., Ayusawa, D., and Seno, T. (1992) *Nucleic Acids Res.*, **20**, 4021-4025.
14. Takeishi, K., Kaneda, S., Ayusawa, D., Shimizu, K., Gotoh,) and Seno, T. (1989) *J. Biochem. (Tokyo)*, **106**, 575-583.
15. Slansky, J. E., Li, Y., Kaelin, W. G., and Farnham, P. J. (1993) *Mol. Cell. Biol.*, **13**, 1610-1618.

16. Dou, Q.-P., Markell, P. J., and Pardee, A. B. (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **89**, 3256-3260.
17. Horie, N., Chimoto, M., Nozawa, R., and Takeishi, K. (1993) *Biochim. Biophys. Acta*, **1216**, 409-416
18. Horie, N., Aiba, H., Oguro, K., Hojo, H., and Takeishi, K. (1995) *Cell Struct. Func.*, **20**, 191-197
19. Joliff, K., Li, Y., and Johnson, L. F. (1991) *Nucleic Acids Res.*, **19**, 2267-2274.
20. Lipson, K. E. and Baserga, R. (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **86**, 9774-9777.
21. Kaneda, S., Horie, N., Takeishi, K., Takayanagi, A., Seno, T., and Ayusawa, D. (1992) *Somatic Cell Mol. Genet.*, **18**, 409-415.
22. Gorman, C. M., Moffat, L. F., and Howard, B. H. (1982) *Mol. Cell. Biol.*, **2**, 1044-1051.
23. Koyama, H. and Kodama, H. (1982) *Cancer Res.*, **42**, 4210-4214.
24. Sambrook, J., Fritsch, E. F., and Maniatis, T. (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd Edn., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor.
25. Kingston, R. E., Harvest and assay for chloramphenicol acetyltransferase in *Current Protocols in Molecular Biology Vol. 1* (1987) edit. Ausubel, F. M., Brent, R., Kingston, R. E., Moore, D. D., Seidman, J. G., Smith, J. A., and Stuhl, K. Massachusetts General Hospital, Harvard Medical School, pp9.6.3-9.6.6.
26. Horie, N. and Takeishi, K., unpublished result.
27. Briggs, M. R., Kadonaga, J. T., Bell, S. P., and Tjian, R. (1986) *Science*, **234**, 47-52.
28. Nevins, J. R. (1992) *Science*, **258**, 424-429
29. Schreiber, D., Matthias, P., Müller, M. M. and Schaffner, W. (1989) *Nucleic Acids Res.*, **17**, 6419.
30. Bradford, M. M. (1976). *Anal. Biochem.*, **72**, 248.
31. Imagawa, M., Chiu, R. and Karin, M. (1987) *Cell*, **51**, 251-260.
32. Davidson, I., Fromental, F., Augereau, P., Wildeman, A., Zenke, M., and Chambon, P. (1986) *Nature*, **323**, 544-548.
33. Myers, R. M., Tilly, K., and Maniatis, T. (1986) *Science*, **232**, 613-618.
34. Xiao, Jia-Hao, Davidson, I., Macchi, M., Rosales, R., Vigneron, M., Staub, A., and

- Chambon, P. (1987) *Genes Dev.*, **1**, 794-807.
35. Ciesla, J., Weiner, K. X. B., Weiner, R. S., Reston, J. T., Maley, G. F., Maley, F. (1995) *Biochim. Biophys. Acta*, **1261**, 233-242.
36. 片井秀幸、若林真希、堀江信之、竹石桂一(1994)日本薬学会 114 回年会、要旨集 3、123
37. Geng, Y. and Johnson, L. F. (1993) *Mol. Cell. Biol.*, **13**:4894-4903
38. Rincon-Limas, D. E., Drueger, D. A., and Patel, P. I. (1991) *Mol. Cell. Biol.*, **11**,4157-4164.
39. Yamaguchi, M., Hayashi, Y., and Matsukage, A. (1989) *J. Biochem.(Tokyo)*, **105**, 79-83.
40. Yamaguchi, M., Hayashi, Y, Ajiro, K, and Matsukage, A., (1989) *J. Cell. Physiol.*, **141**, 431-436.
41. Chen, L. I., Nishinaka, T., Kwan, K., Kitabayashi, I., Yokoyama, K., Fu, Yu-Hsieh, F., Grünwald, S., and Chiu R., (1994) *Mol. Cell. Biol.*, **14**, 4380-4389.
42. Shao, Z. H. and Robbins, P. D. (1995) *Oncogene*, **10**, 221-228.
43. Kaneda, S., Takeishi, K., Ayusawa, D., Shimizu, K., Seno, T. and Altman, S. (1987) *Nucleic Acids Res.*, **15**, 1259-1270.
44. Geballe, A. P., Spaete, R. R., and Mocarski, E. S. (1986) *Cell*, **46**, 865-872.
45. Kozak, M. (1986) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **83**, 2850-2854.
46. Hentze, M. W., Rouault, T. A., Caughman, S. W., Dancis, A., Hartford, J. B., and Klausner, R. D. (1987) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **84**, 6730-6734.
47. Schmittegen, T. D., Danenberg, K. D., Horikoshi, T., Lenz, H. J., Danenberg, P. V. (1994) *J. Biol. Chem.*, **269**, 16269-16275.
48. Schümperli, D. (1986) *Cell*, **45**, 471-472.
49. Moldave, K. (1985) *Ann. Rev. Biochem.*, **54**, 1109-1119.
50. Kozak, M. (1983) *Microbiol. Rev.*, **47**, 1-45.
51. Chu, E., Koeller, D. M., Casey, J. L., Drake, J. C., Chabner, B. A., Elwood, P. C., Zinn, S., and Allegra, C. J. (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **88**, 8977-8982.
52. Chu, E., Voeller, D., Koeller, D. M., Drake, J. C., Takimoto, C. H., Maley, G. F., Male, F., and Allegra, C. J. (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **90**, 517-521.

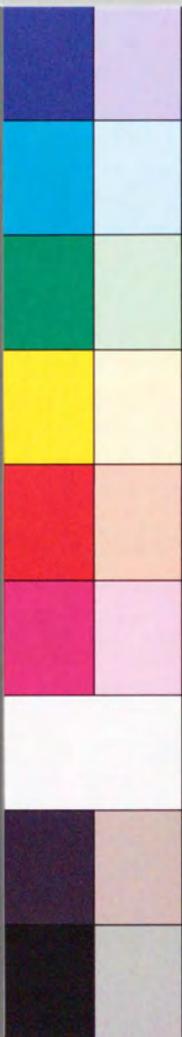
53. Chen, L. I., Nishinaka, T., Kwan, K., Kitabayashi, I., Yokoyama, K., Fu, Yu-Hsieh, F., Grünwald, S., and Chiu R., (1994) *Mol. Cell. Biol.*, **14**, 4380-4389.
54. Shao, Z. H. and Robbins, P. D. (1995) *Oncogene*, **10**, 221-228.
55. Courey, A. J., Holtzman, D. A., Jackson, S. P., and Tjian R. (1989) *Cell*, **59**, 827-836.
56. Horie, N., Nozawa, R., and Takeishi, K. (1992) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **185**, 127-133.
57. Chang, Z.-F. (1990) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **169**, 780-787.
58. Koyama, H. and Kodama, H. (1982) *Cancer Res.*, **42**, 4210-4214.
59. Takeishi, K., Ayusawa, D., Kaneda, S., Shimizu, K., and Seno, T. (1984) *J. Biochem.(Tokyo)*, **95**, 1477-1483
60. Collins, S. J. (1987) *Blood*, **70**, 1233-1244
61. Mihara, H., Abe, E., Miyaura, C., Shiina, Y. and Suda, T. (1983) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **117**, 86-92
62. Kuruto, R., Nozawa, R. Takeishi, K., Arai, K., Yokota, T. and Takasaki, Y. (1990) *J. Biochem. (Tokyo)*, **108**, 650-653
63. Sen, R. and Baltimore, D. (1986) *Cell*, **46**, 705-716.





Kodak Color Control Patches

Blue Cyan Green Yellow Red Magenta White 3/Color Black



Kodak Gray Scale

A 1 2 3 4 5 6 M 8 9 10 11 12 13 14 15 B 17 18 19



© Kodak, 2007 TM Kodak