

氏名(本籍)	谷本啓司(福岡県)
学位の種類	博士(農学)
学位記番号	博甲第1,200号
学位授与年月日	平成6年3月25日
学位授与の要件	学位規則第5条第1項該当
審査研究科	農学研究科
学位論文題目	Structure of the human activin β_A subunit gene and its regulation in cultured cells (ヒト・アクティビン β_A サブユニット遺伝子の構造とその調節)
主査	筑波大学教授 農学博士 村上和雄
副査	筑波大学教授 理学博士 宗像英輔
副査	筑波大学教授 農学博士 田仲可昌
副査	筑波大学助教授 農学博士 星野貴行

論文の要旨

アクティビンは、培養下垂体細胞からのFSH (follicle-stimulating hormone) の分泌を促進する物質として発見されたタンパク質であり、 β_A 鎖と β_B 鎖の組み合わせによる二量体構造を持つ。その後、 β_A 鎖のホモダイマーよりなるアクテクイビンAが、分化誘導、中胚葉誘導、神経細胞サバイバル活性なども有することが明らかとなるに及び、その活性発現のメカニズムに興味を持たれた。しかしながら、ヒトの同遺伝子についてはこれまで、発現調節機構はもとより、 β_A 鎖遺伝子の構造すら明らかにされていなかった。

そこで著者はまず、ヒト胎盤の染色体DNAライブラリーより、ラットのアクティビンcDNAをプローブとして用い、ヒト・アクティビン β_A 鎖遺伝子の単離をおこなった。制限酵素地図の作製、サザン解析、塩基配列の決定の結果、同遺伝子はハプロイドあたり1コピー存在し、約9-kbのイントロンにより分断された、2つのエクソンからなることが分かった。次に、遺伝子の発現を制御していると考えられる5'上流領域について、すでに報告されている β_B 鎖遺伝子のそれと比較した結果、 β_B 鎖遺伝子のプロモータ領域には複数のGCboxを含むGC-richな配列が存在し、さらにcAMP応答性配列(CRE, cAMP responsive element)も存在したが、 β_A 鎖遺伝子については、翻訳開始コドンより上流約1.9-kbまでの範囲にはこの様な配列は存在しなかった。このことから、 β_A 鎖と β_B 鎖遺伝子はその発現が異なるメカニズムで制御されていることが示唆された。また、 β_A 鎖遺伝子の3'側非翻訳領域には複数のポリA付加配列が見いだされ、3番目のポリA付加配列以降には、合計5つのATTTA配列(mRNA不安定化配列)が存在した。

次に、アクティビン・タンパク質を内在性に発現するヒト線維芽肉腫由来培養細胞株、HT1080を用いて、その遺伝子の発現様式の検討をおこなった。その結果、同遺伝子の発現は、TPAによるプロテイン・キナーゼCの活性化、あるいは細胞内cAMP濃度の上昇といった、細胞の機能を調節することが知られているイベントによって活性化されることが分かった。しかしながら、 β_A 鎖 mRNA が誘導されてくるまでの時間はTPAの場合には約3時間、cAMPの場合には約24時間と明らかな違いがみられ、さらに、TPAでは6.4-, 4.9-, 4.3-, 3.0-, 2.0-kbという複数のmRNA分子種が誘導されてくるのに対し、cAMPでは3.0-kbのものだけが誘導され、発現誘導のメカニズムが同一ではないことも示唆された。また、領域特異的なプローブを用いたノーザン解析の結果、 β_A 鎖 mRNA の長さの多様性はおもに、使用されるポリ A 付加配列の位置の違いにより生じることも明らかとなった。さらに、TPA処理をおこなったHT1080細胞からポリ A RNA を調製し、プライマー・エクステンションをおこなった結果、同遺伝子は複数の転写開始点から転写されることも明らかとなった。しかしながら、この場合の転写開始点の位置の違いは約70bp程度であり、これは β_A 鎖 mRNA の長さの多様性にはほとんど寄与していないと考えられた。

最後に、クローン化した β_A 鎖遺伝子の5'上流断片を用いて、転写調節領域の解析をおこなった。まず、同遺伝子の5'上流領域約4.5-kbとCAT遺伝子とを連結し、HT1080細胞に導入した。その結果、同領域に転写活性が認められ、さらにこの活性は、プロテイン・キナーゼCの核内ターゲットの一つである転写調節因子、AP-1により上昇した。このクローンについて、5'上流より欠失変異体を作製し詳細な解析をおこなった結果、転写開始点より上流約2.7-kbの位置に転写活性に必須な領域を同定できた。この領域を含むDNA断片をTKプロモーターに連結したところ、正逆方向ともに転写活性の著しい上昇がみられ、同領域中にエンハンサーが存在することが明らかとなった。

審 査 の 要 旨

近年、数多くの増殖因子やホルモンがそれぞれ単一の機能のみを持つのではなく、多様な場所や時期に、様々な活性を発現し、生体をバランスよく制御しているという考え方が一般化してきた。このような生体制御分子の活性発現メカニズムを理解する上で、遺伝子発現調節機構の解明が、受容体の解析と並んで重要視されている。この様な状況の中、多様な生理活性が報告されているアクティビンAについて、その遺伝子の構造を初めて明らかにし、培養細胞を用いて発現調節機構の解析を行ったことは非常に意味のあることと思われる。さらに、同遺伝子の発現を制御していると考えられる5'-上流領域についての解析も行い、同遺伝子が効率よく転写されるために重要な領域も明らかとなった。今後、この領域に結合するタンパク質因子を同定し、同転写調節因子のプロテイン・キナーゼCやcAMPなどの細胞内情報伝達物質による修飾を解析することにより、アクティビンの発現調節機構にとどまらず、内分泌系や細胞増殖、分化誘導といった現象をより深く理解することにつながるも期待される。

よって、著者は博士（農学）の学位を受けるに十分な資格を有するものと認める。