

氏名・（本籍）	やすもと けんいち 安 元 研 一
学位の種類	博 士（理 学）
学位記番号	理博第1318号
学位授与年月日	平成5年3月25日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
研究科専攻	東北大学大学院理学研究科 （博士課程）化学第二専攻
学位論文題目	シトクロム P450（CYP1 A1）遺伝子の転写制御に働く配列 BTE とその結合因子の解析
論文審査委員	（主査） 教 授 藤 井 義 明      教 授 小 倉 協 三 教 授 篠 野 昌 弘 助 教 授 十 川 和 博

## 論 文 目 次

序 論

第1章 BTE 配列の分析

第2章 BTE 結合因子 BTEB と Sp 1 の DNA 結合活性の比較

第3章 大腸菌で発現した BTEB の精製と転写活性の解析

第4章 非翻訳領域の二次構造が翻訳の効率に及ぼす影響

# 論文内容要旨

## 序論

シトクロム P450 は一原子酸素添加反応を触媒するヘム酵素であり、外来薬物の代謝反応や、ステロイドホルモンやプロスタグランジンなどの生合成に関与しており、それぞれの反応に特異的なシトクロム P450 がそれぞれの目的に応じた適切な制御を受けて組織特異的あるいは時期特異的に発現している。従ってそれぞれの P450 がその機能に応じてどのように発現が制御されているのか、また異なる P450 でその制御がどのように異なっているのかなど興味深い点がある。

本研究の対象である CYP1A1 はラット肝臓で薬物代謝に働くシトクロム P450 として見いだされたもので、肝臓や肺、腎臓など様々な組織で発現している。この CYP1A1 は 3-メチルコロンスレン (3-MC) などの芳香族炭化水素で発現量が数十倍に誘導され、その 3-MC やベンツピレンなどを反応基質としてそれらの化合物を酸化する。さらにいくつかの薬物はこの CYP1A1 による酸化によって発癌性を獲得するので人工化合物による化学発癌に関与していることから注目されている。

この CYP1A1 遺伝子の発現調節は転写の段階で制御されており、遺伝子の転写制御に必要な 2 種類の DNA エlement Xenobiotic Responsive Element (XRE) と Basic Transcription Element (BTE) が見いだされている。XRE は薬物による誘導に関与している制御配列であり、BTE は構成的発現に関与していると思われる制御配列で、転写に必要な Element である TATA-box の 5' 上流近傍に存在している。これらの配列とそこに結合して転写を制御する因子についてさらに詳しく解析する事が本研究の目的である。

## 第 1 章 BTE 配列の解析

この CYP1A1 遺伝子の転写制御に働く DNA 配列とそこに結合する因子について解析する為に *in vitro* 転写活性測定反応系を構築した。内在性の CYP1A1 遺伝子を発現しており、薬物による誘導能を保持しているヒト子宮頸癌由来の HeLa 細胞の核抽出液を用いて CYP1A1 遺伝子の上流 -6.3kb までを含むプラスミド pMC6.3k を鋳型 DNA として用いて転写活性測定反応を行なった結果、正しい転写開始点からの転写産物が確認でき、また転写反応に 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  の低濃度のアマニチンを加えると転写産物が消失することからこの転写が RNA ポリメラーゼ II によるものであることが確かめられた。この実験系を用いて CYP1A1 遺伝子の転写開始点上流 -6.3kb から順に欠失していった鋳型 DNA を用いて転写活性測定反応を行なった結果、上流 -6.3kb から -53b まで削っても 3-MC による処理の有無に関わらず転写産物の生成レベルはほとんど変化しなかった。この結果から、薬物によって誘導的に働く配列である XRE の効果が *in vitro* 転写活性測定反応では再現できていない事が判明した。一方 -53b から -44b まで削った場合転写活性はほとんど完全に消失することから、構成的に働く転写制御配列 BTE の存在が確かめられたことになる。しかも細胞を用いた実験では BTE の効果は極く弱く検出限界に近いので、この系を

用いることによって BTE について培養細胞を用いる場合よりも詳しい解析が行なえることがわかり、以後 BTE の解析を目的として実験を行なった。

この BTE の配列中に 2 塩基ずつ変異を入れたオリゴヌクレオチドを 8 種類作成し、DNA 結合活性や転写活性に変異が及ぼす影響を見ることによって塩基配列中の活性に必要な部分を求めた。その結果 AGGCGT という配列がタンパク質因子が、DNA に結合するために必要なコア配列であること、転写活性に働く因子が作用するために必要な配列であること、そして転写活性に必要な領域と DNA 結合に必要な領域とが一致することから、この配列に直接転写因子が結合することが転写活性に必要なことが判明した。

## 第 2 章 BTE 結合因子 BTEB と Sp 1 の DNA 結合活性の比較

この BTE 配列に結合する因子がラット肝臓 cDNA ライブラリーから BTE をプローブとしてスクリーニングされ、ヒトの転写因子 Sp 1 のラット相同タンパク質と、未知のタンパク質で、BTE に結合するというで Basic Transcription Element Binding protein (BTEB) と名付けられたタンパク質の 2 種類のクローンが単離された。BTEB は DNA 結合に働く zinc finger 部分のアミノ酸配列が Sp 1 と約 72% の類似性を持っているもののその他の部分では全く類似性が認められず、しかも既知の転写活性化ドメインと類似性のある領域が見いだせなかった。一方現在立体構造解析によって DNA 配列を認識して塩基特異性を決定するために重要であることが報告されている位置のアミノ酸が BTEB と Sp 1 の zinc finger 部分では一致していることから、この両者に DNA に対する結合親和性は同等であるかあるいは非常に近いと推測された。このことを確かめるために大腸菌で発現させた後抽出して精製した BTEB と Sp 1 を用いてゲルシフトを行ない塩基配列による結合親和性に差が存在するのかどうかを調べたところ、この両者の DNA 結合に関する配列特異性や結合親和性には全く差がないという結論が得られた。

## 第 3 章 大腸菌で発現した BTEB の精製と転写活性の解析

この BTEB は mRNA レベルでは調べた全ての組織や培養細胞で発現しており普遍的な転写因子であると考えられた。しかしながら BTEB に対する抗体を用いた実験ではタンパク質としての存在が確認できなかったため組織あるいは培養細胞からの BTEB の精製を断念し大腸菌で BTEB を大量発現させて精製した後に DNA 結合活性や *in vitro* 転写活性測定反応に用いた。

大腸菌 BL21 (DE 3) においてヒスチジンクラスターの下流に BTEB を結合させた融合タンパク質を T7 プロモーターで発現させると、大部分が不溶性の沈殿 (封入体) となる。これを遠心処理で集めた後 8 M 尿素で可溶化し、ニッケルアフィニティーカラムにかけるとヒスチジンクラスターがニッケルイオンに特異的にキレート結合するため、カラムを洗浄した後溶液の pH を下げることによってヒスチジンクラスターを伴った BTEB が溶出した。次にこのサンプルを SDS 変性ゲルにかけ目的の分子量のバンドをとりアセトン沈殿で濃縮した後緩衝液に溶解する事により非変性状態に戻した。SDS 変性ゲルで泳動した後に銀染色によってタンパク質を検出

して確認したところ最終的に精製された BTEB は純度がほぼ99%以上にまで精製されていた。

この BTEB を用いてゲルシフトを行なった結果、BTEB の DNA 結合活性が精製の操作の後に回復しているということが確認された。

この BTEB が転写に及ぼす影響を *in vitro* 転写活性測定反応系を用いて調べた。そのために HeLa 細胞から転写因子 Sp 1 の転写活性を除くため小麦胚芽アグルチニンカラムを用いて Sp 1 を含む糖タンパク質画分 (Sp 1 画分) を核抽出液から除いた。その結果小麦胚芽アグルチニンカラムの素通り画分のみでは転写は起こらないがそこに Sp 1 画分を加えると転写活性が回復した。その反応系に大腸菌から精製した BTEB を加えると Sp 1 画分によって活性化された転写が抑制された。また素通り画分に BTEB を加えた場合でも転写の活性化は起こらなかった。従って BTEB は GCbox に結合することによって同じエレメントに結合する Sp 1 の転写活性化作用を抑制するのではないかと考えられた。しかしながら、この実験に用いた BTEB は大腸菌で発現させたものなので、真核細胞で発現させた場合とリン酸化や糖鎖による修飾という点で異なっている可能性があること、変性状態から非変性状態に戻す段階でもとのコンフォメーションに戻らなかったという可能性があることなど幾つかの留意点があり、さらに検討する必要がある。

#### 第 4 章 非翻訳領域の二次構造が翻訳の効率に及ぼす影響

BTEB は mRNA レベルでは発現しているもののタンパク質レベルでの発現が検出できないという結果が得られていたが、BTEB の 5' 非翻訳領域が約500b という長い領域にわたっており、しかも非常に GC 塩基に富んでおり二次構造を取って安定化しやすいため、翻訳が阻害され、転写が行なわれているにも関わらずタンパク質レベルでの発現量が低くなっている原因ではないかと考えられた。

そこで T7 プロモーターによって BTEB の mRNA を作成し、網状赤血球抽出液を用いて *in vitro* で翻訳させ生成したタンパク質を SDS ゲル電気泳動にかけたオートラジオグラフで見ることによって翻訳の効率を調べた。

5' 上流方向から順に非翻訳領域を削っていった mRNA を *in vitro* で転写させて作製し翻訳反応を行なうと、-176b まで削っても翻訳産物の生成レベルはあまり変化しないが-65b まで削ると生成レベルの急激な上昇が認められた。さらにこの翻訳の効率が急激に変化した-176b から-65b の間を細かく欠失させて翻訳レベルの変化が起こる領域を調べた。その結果-138b から-107の間で翻訳物生成レベルの急激な変化が見られた。この31b 間でこのような変化が起こる原因を考察するためこの BTEB mRNA がとりうる二次構造を T7 RNA ポリメラーゼによって転写させるためのベクター配列と 5' 非翻訳領域、それと翻訳開始の AUG コドンから下流95b までを含む配列を用いて RNA 二次構造推定プログラムを用いて推定した。その結果約-80b から+50b までの配列ではほぼ共通の構造を取るがその部分より 5' 上流部分の配列の違いによってできる二次構造が異なりその部分での安定化エネルギーの差が翻訳の効率に影響を与えているのではないかと考えられた。

現在 mRNA からタンパク質が翻訳される段階における効率を決定する段階が幾つか存在しており、その一つが翻訳開始の AUG の 5' 側に形成される RNA の二次構造であると考えられており、この BTEB のような非翻訳領域が二次構造を取って翻訳を阻害していると考えられる場合、タンパク質として発現する為は何らかの機構によってこの二次構造が解消されるか、あるいはリボソーム複合体がこの二次構造を突破する機構が必要であると考えられる。

## 論文審査の結果の要旨

本論文はシトクロム P-450c (CYP1A1) 遺伝子の転写調節に働く DNA 配列とそこに作用するタンパク質因子の解析を目的に、HeLa 細胞核抽出液を用いて、タンパク質因子依存的に転写活性が発現する *in vitro* 転写系を構築した。この転写系を用いて BTE 配列が転写活性に必要であることを確認した。さらに、この BTE 配列に導入して実験を行なった結果、AGGCGT の 6 塩基に変異を導入した場合に結合活性と転写活性の消失が起こっており、この配列が転写活性に重要であることを明かした。そして BTE 配列に直接制御因子が結合することが転写活性化に必要であると結論した。また BTE 配列に結合する因子を明らかにするためにラット肝臓 cDNA ライブラリーからクローニングされた 2 種類の BTE 配列結合因子 BTEB と Sp 1 の cDNA を用いて大腸菌で発現させると、両タンパク質とも BTE 配列に対して特異的に結合することが確かめられた。その発現した 2 種類のタンパク質、BTEB と Sp 1 の DNA 結合特異性は BTE を含む様々な GC-box 配列に対して同等であり、アミノ酸配列から予測された結果と一致することがわかった。

大腸菌 BL21 を用いて大量発現させニッケルアフィニティーカラムを用いて精製した組み替え BTEB は、DNA 結合活性を持っていたが転写活性化作用を示さないことがわかった。Sp 1 は転写活性化作用を示すが、BTEB を共存させると、BTEB は Sp 1 の転写活性化作用を拮抗的に抑制することが明らかとなった。

また、BTEB の mRNA は種々の組織で高い発現が見られるが、免疫学的に検討するとタンパク質としての存在量が低いことから翻訳段階で発現が抑制されていると推定された。*in vitro* 翻訳系を用いて mRNA の翻訳効率を検討したところ、全長の mRNA の翻訳効率は非常に低いことが観察された。この mRNA の非翻訳領域の長さを変えて翻訳の効率に対する影響を調べた結果、翻訳開始コドンから 5' 上流 -138b まで削っても翻訳効率はほとんど変化しなかったが、-107b まで削ると翻訳効率の著しい上昇が認められ、5' 上流の構造が翻訳に阻害的に働いていることが明らかとなった。RNA 二次構造推定プログラムを用いて検討した結果、5' 上流領域で形成されるヘアピン構造が翻訳効率に影響を及ぼしていることが推定された。従って BTEB mRNA がタンパク質として発現する為には何らかの機構によってこの二次構造の形成による翻訳段階での抑制作用を解除する因子の存在が示唆された。以上の結論は本人が自立して研究活動を行なうに必要な高度の研究能力と学識を有することを示している。よって安元研一提出の論文は博士(理学)の学位論文として合格と認める。