

報告番号

※ 甲 第 1695 号

主論文の要旨

題名 *In vivo*におけるカイロフィブロイン遺伝子の
基本的なプロモーターの同定と解析

氏名 徳 永 克 男

主論文の要旨

報告番号

※甲第

号

氏名

徳永克男

カイコ絹糸腺は、高等動物の分化した細胞内での特異的遺伝子発現を研究する上で、きわめてすぐれた実験系を提供している。主要な絹糸タンパク質であるフィブロインは後部絹糸腺で合成され、中部絹糸腺ではまったく合成されない。一方、もう一つの絹糸タンパク質セリシンは、中部絹糸腺で合成され、後部絹糸腺ではまったく合成されない。この特異的遺伝子発現機構を探るために、現在までに、クローン化されたフィブロイン遺伝子とセリシン遺伝子を使用して、*in vitro* 転写系による転写機構の解析が進められてきた。とりわけ、フィブロイン遺伝子については早くに遺伝子の単離と構造解析が行われ、転写機構の解析が進められてきた。すなわち、人工的に作製された欠失遺伝子と単一塩基置換遺伝子を用いた解析によって、*in vitro* でのフィブロイン遺伝子の転写プロモーターが、-29から+6（+1は転写開始点相当）という領域に存在すること、さらに、単一塩基置換遺伝子による解析は、-30から-27に見出されるTATA配列と、-20周辺の各塩基が重要な働きをしている事を明らかにしている。

しかしながら、これらの *in vitro* 転写系による転写プロモーターの解析にはいくつかの限界が存在すると言わざるを得ない。一つには、これら転写系を支える無細胞抽出液が含む転写因子の数と種類である。これらの無細胞抽出液の調製過程で失活したファクターや、抽出できなかったファクターが存在する可能性は充分にある。核膜やクロマチンに強く結合しているようなタンパク質はそのような可能性を持つファクターの一つである。さらにまた、高等動物の細胞では、核内のDNAはヌクレオゾームを基本単位としたクロマチン構造に組み込まれている。このような細胞内状況下で、遺伝子の転写開始にどのような領域が要求されるのかを明らかにし、その *in vivo* の特性を解析することは、とりわけ、高等動物細胞の遺伝子発現機構の研究にとって

重要な課題である。

本研究では、クローン化されたフィブロイン遺伝子を培養下の細胞内へ人為的に導入し、生細胞内でのフィブロイン遺伝子の転写開始機構を解析した。培養細胞として、サル腎臓由来のCOS細胞を使用した。この細胞は、SV40ウィルスのT抗原タンパク質を産生しており、人為的に細胞内へ導入されたSV40DNA複製開始点を持つプラスミドを核内で複製させる。この系を利用し、フィブロイン遺伝子をSV40DNA複製開始点と接続したプラスミドを作製し、これをリン酸カルシウムの微細な沈澱と共にCOS細胞に導入し、*in vivo*におけるフィブロイン遺伝子の転写開始機構を解析した。フィブロイン遺伝子を導入されたCOS細胞から48時間後にRNAを抽出し、転写産物を逆転写酵素によるプライマー伸長法と、S1ヌクレアーゼマッピング法との二つの方法によって解析した。いずれの解析によっても、フィブロイン遺伝子を導入したCOS細胞のRNA中に、カイコ絹糸腺細胞のフィブロインmRNAとまったく同一の部位より転写開始されたフィブロイン遺伝子の転写産物が検出された。すなわち、COS細胞という異種の細胞内にもかかわらず、フィブロイン遺伝子が細胞内で正確に転写開始される事が確認された。さらに、このフィブロイン遺伝子の転写産物は正常にポリA鎖の付加を受けており、このことから、フィブロイン遺伝子のポリA鎖付加シグナルも正しく認識されていることが判明した。

次に、この生細胞転写系を使用してフィブロイン遺伝子の *in vivo* における正確な転写開始に責任のあるDNA配列の同定を試みた。フィブロイン遺伝子の5'上流に人為的な欠損をほどこした一連の人工的欠失遺伝子を作製し、それらのCOS細胞内での転写活性を検討した(図1)。転写開始点上流 -860 から-19にかけての五種類の欠失遺伝子(5' Δ -860, -115, -73, -44, -19)をテストした。S1ヌクレアーゼ法による解析は、これらの遺伝子が、5' Δ -19以外は、すべて同等の転写活性を持つことを示した。一方、5' Δ -19では正確な転写開始シグナルが消失していた。このことは、フィブロイン遺伝子の5'側-44から-19の間に生細胞内での転写に重要

なシグナルが含まれていることを示した。さらに、 Δ [-58~-20] という人工的中間置換遺伝子をテストした。この置換遺伝子は、5' 上限を-860 まで含むが、-58 から-20までの限定された小区間をリンカー由来の人工的配列で置換してある。この置換遺伝子は転写活性をまったく持たなかった。これらの結果は、フィブロイン遺伝子の生細胞内での基本的転写活性が、-44以内のきわめて短いDNA配列によって受け持たれている事と、なかでも-44から-19の間に含まれる配列がとりわけ重要な役割を果している事を示している。

さらに、この-44以内のDNA配列の性格をより詳細に検討するために、-44以内の三つの部分に対する群置換遺伝子 (sbA, sbB, sbC) を作製し、また、-30から+1 にわたる領域に於いて単一置換遺伝子を作製し、それらをCOS細胞に導入した (図2)。フィブロイン遺伝子のCOS細胞内での転写活性は、TATA配列を含む-27から-36にかけての群置換 (sbA) によって強く阻害された。さらに、-30, -29, -28に対する単一塩基置換が、転写活性を大きく低下させる事が判明した。これらは、TATA配列がフィブロイン遺伝子の生細胞内での正確な転写開始に重要な役割を持つ事を明確に示している。また、転写開始点を内含する群置換 (sbB) によっても、フィブロイン遺伝子の転写活性が強く阻害される事が判明した。-10, -7, -4, +1 の各塩基に対する単一の置換も同じく転写活性を低下させた。これらの結果は、TATA配列に加えて転写開始点周辺の塩基配列が、フィブロイン遺伝子の生細胞内での転写開始に重要な機能を持っている事を明確に示している。

一方、*in vitro* 転写系に於いて阻害効果が観察される-20周辺の塩基置換については、COS細胞内ではほとんど転写活性に対する阻害効果を見る事ができなかった。この違いは、両転写系に於ける鋳型DNAの構造上の差異に起因していると思われる。*In vitro* 転写系では、フィブロイン遺伝子は裸の直鎖状DNAであるが、COS細胞内では、ヒストンと結合したミニクロマチン構造をとっているからである。これまでに報告されている真核生物遺伝子の *in vivo* における転写プロモーター

の解析結果のほとんどは、TATA配列より上流のなんらかの配列が生細胞内での転写開始に要求される事を示している。しかしながら、本研究によって、これらの報告とは対照的に、-44以内というきわめて短いDNA配列によっても生細胞内での正確な転写開始が可能である事が明らかになると同時に、生細胞内での転写活性を担うフィブロイン遺伝子のプロモーターが、TATA配列と転写開始点周辺配列という二つのパートから構成されている事が明確に示された。

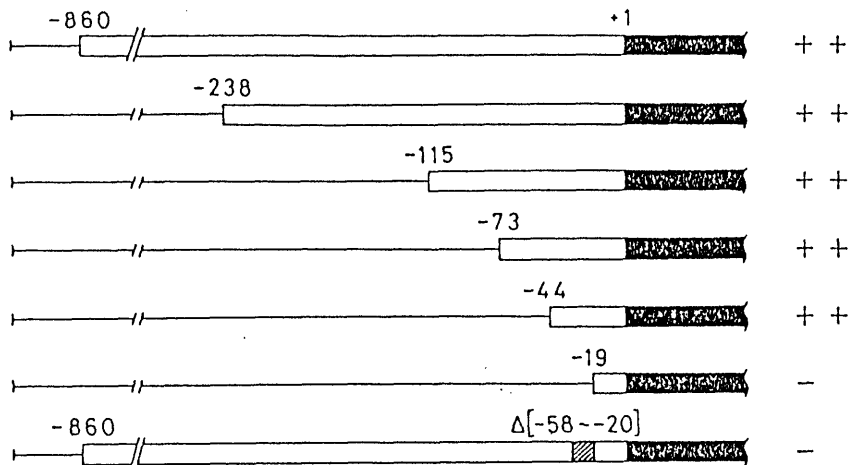


図1. 5'欠失フィブロン遺伝子のCOS細胞内での転写活性。
 黒い部分は転写領域、白い部分は5'非転写領域、斜線部はリンカーDNA、直線はベクターDNAをそれぞれ示す。COS細胞内でのフィブロン遺伝子の正確な転写活性は、5'側上流配列を、-860 から-44まで短くしても変化しないが、-19まで短くした場合には失われてしまう。また、上限を-860 まで保持していても、-58から-20までの小区間だけをリンカーDNAで置換すると転写活性が失われる。

Template	-50	-40	-30	-20	-10	+1	+10	+20	+30	+40	Activity
WILD	CAAAACTCGAAAATTTTCAGTATAAAAAGGTTCAACTTTTTCAAATCAGCATCAGTTCGGTTCCTCAAGTTCAGAGTCAAACTT										1.0
sbA	-----CGGATCCGTGG-----										0.2
sbB	-----CGG-ATC-CAAG-TTGG-----										0.1
sbC	-----CGGG-T-CGGGTG-----										1.2
-30	-----C-----										0.8
-29	-----G-----										0.4
-28	-----C-----										0.5
-20	-----C-----										1.2
-18	-----T-----										1.1
-17	-----G-----										1.0
-10	-----C-----										0.6
-7	-----G-----										0.7
-4	-----T-----										0.3
+1	-----G-----										0.7

図2. 置換変異遺伝子の構造と転写活性。
 各置換変異遺伝子について野生型塩基配列と異なる塩基のみを示してある。破線部の塩基は野生型と同一。野生型遺伝子の転写活性を 1.0とした場合の各遺伝子の相対的転写活性をβ-グロビン遺伝子との比を規準にして算出した。