



Involvement of CCAAT/enhancer binding protein  
in the regulation of the rat serine :  
pyruvate/alanine : glyoxylate aminotransferase  
gene expression

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 浜松医科大学 公開日: 2014-10-30 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 杉山, 壮 メールアドレス: 所属:
URL	<a href="http://hdl.handle.net/10271/1194">http://hdl.handle.net/10271/1194</a>

学位論文の内容の要旨及び論文審査の結果の要旨

学位記番号	医博第 341号	学位授与年月日	平成13年 3月27日
氏名	杉山 壮		
論文題目	Involvement of CCAAT/enhancer binding protein in the regulation of the rat serine:pyruvate/alanine: glyoxylate aminotransferase gene expression (ラットセリン：ピルビン酸/アラニン：グリオキシル酸トランスアミナーゼ遺伝子の発現制御への CCAAT/enhancer binding protein の関与)		

博士(医学) 杉山 壮

論文題目

Involvement of CCAAT/enhancer binding protein in the regulation of the rat serine: pyruvate/alanine: glyoxylate aminotransferase gene expression

(ラットセリン：ピルビン酸/アラニン：グリオキシル酸トランスアミナーゼ遺伝子の発現制御への CCAAT/enhancer binding proteinの関与)

論文の内容の要旨

〔はじめに〕

セリン：ピルビン酸/アラニン：グリオキシル酸アミノ転移酵素(SPT/AGT)は、ラット肝臓ではミトコンドリアとペルオキシソーム両オルガネラに存在する。SPT/AGT遺伝子は単一遺伝子であるが、第一エキソン上の2箇所の転写開始部位よりサイズの異なる2種のmRNAが合成される。上流側開始部位からの転写は定常状態ではほとんど行われていないが、グルカゴン投与によって著しい活性化を受け、それによりミトコンドリアに局在するSPT/AGTをコードするmRNAが合成される。一方、下流からの転写によってペルオキシソームに局在するSPT/AGTをコードするmRNAが合成される。今回我々は、SPT/AGT遺伝子の下流側転写開始を支配するプロモーター領域の解析とそれに関与する転写因子について検討した。

〔材料ならびに方法〕

(1) chloramphenicol acetyltransferase (CAT) assay: 種々のSPT/AGT遺伝子断片あるいは点変異を加えたSPT/AGT遺伝子を持つレポーター遺伝子組み換え体を肝癌細胞(HepG2 cell)に導入し、発現活性を調べた。(2) ゲルシフト法: 種々のSPT/AGT遺伝子断片を<sup>32</sup>Pで標識し、HepG2 cellより抽出した核蛋白と反応させ、プロモーター領域に結合する転写因子を検索した。

〔結果〕

レポーター遺伝子解析により、SPT/AGT遺伝子の+21~+90(+1:上流側、+66:下流側転写開始部位)が発現活性に必要な最小領域であることを確認した。+21から+36の5'側の欠失で転写活性は約1/5へ低下し、+30~+45の領域に含まれるinverted repeat配列(CCCAGAGCTAGCTGGG)への点変異の導入によっても転写活性は約1/5へ低下した。このinverted repeat配列の転写への関与が示唆され、ゲルシフト法によりこの領域に結合する因子を検出したが、残念ながら同定には至らなかった。下流転写開始部位を含む領域(+50~+76)に複数のCCAAT/enhancer binding protein (C/EBP) 結合のコンセンサス類似配列があり、ゲルシフト法からC/EBP $\alpha$ とC/EBP $\beta$ が結合することが確かめられた。C/EBP $\alpha$ またはC/EBP $\beta$ の過剰発現を行うとプロモーター活性の上昇が観察され、これはdominant-negative変異体の発現さらに結合部位への点変異の導入により抑制された。またC/EBP結合領域に一部重複して結合する別の因子の存在を認めた。転写開始部位直後への点変異の導入によりこの因子の結合は阻害されたが、プロモーター活性は約2倍に増加したことから、これはリプレッサーであることが示唆された。

〔考察〕

SPT/AGTは蔞酸の直接の前駆体であるグリオキシル酸をグリシンへ代謝する酵素であり、この酵素の

欠損により蓚酸の過剰生成をきたす。グリオキシル酸は草食動物では主としてペルオキシソームでグリコール酸(光呼吸の中間体、植物に多い)の酸化により、肉食動物ではミトコンドリアにおけるヒドロキシプロリン(コラーゲンの構成アミノ酸)の代謝により生じることを示唆する実験結果が得られている。SPT/AGTをこれらグリオキシル酸の主たる生産の場に配置してこれを効率よくグリシンに代謝することで蓚酸生成の削減に成功した動物種が生き延びてきたと推測される。草食動物ではミトコンドリア標的シグナルの翻訳上に関わる上流側ATGコドンの変異という手段を用いて、分子内ペルオキシソーム標的シグナルによるSPT/AGTの選択的なペルオキシソームへの移行を可能にしている。そして、SPT/AGTをミトコンドリアとペルオキシソームの両方に必要とするラットやマーモセットは上流側転写開始部位に加えて下流側転写開始部位を設置したと推測される。このSPT/AGT遺伝子の下流側転写開始を支配するプロモーター領域には、TATA boxやinitiator elementを認めない。この研究から+30~+45領域のinverted repeat配列に結合する転写因子、下流側転写開始部位直後の領域に結合する転写抑制因子に加えて、C/EBP  $\alpha$  とC/EBP  $\beta$  がSPT/AGT遺伝子の下流側転写開始部位を含む領域に結合し、下流からの転写活性に寄与することが示された。従来、C/EBPはenhancerとして位置付けられているが、C/EBP自身がinitiator因子としても機能する可能性が示唆され、今後の検討が必要である。

#### [結論]

本研究によりC/EBPはSPT/AGT遺伝子の下流側転写開始部位を含む領域に結合し、下流からの転写活性に寄与していることが判明した。さらに下流側転写開始部位を含む領域に結合し転写を抑制する因子の存在が示唆された。

### 論文審査の結果の要旨

本研究は、ラットセリン：ピルビン酸/アラニン：グリオキシル酸アミノ転移酵素(SPT/AGT)遺伝子の2つの転写開始部位のうちの下流にある構成的発現を示す転写制御領域のシスエレメントとそれに相互作用をする転写因子について明らかにした研究である。

SPT/AGTはラット肝臓ではミトコンドリアとペルオキシソームの両方に存在する。SPT/AGT遺伝子は単一遺伝子であるが、第一エキソン上の2箇所の転写開始部位よりサイズの異なる2種のmRNAが合成される。上流側開始部位からの転写は定常状態ではほとんど行われておらずグルカゴン投与によって著しい活性化を受け、それによりミトコンドリア局在シグナルを余分に含んだSPT/AGTをコードするmRNAが合成される。一方、下流からの転写によってペルオキシソームに局在するSPT/AGTをコードするmRNAが合成される。2箇所の転写開始部位の使い分けの違いにより、ミトコンドリア局在化シグナルを持つ前駆体酵素ができるか、最初からペルオキシソーム局在シグナルをもつ成熟体酵素ができるかがその分子メカニズムである。

杉山氏はまずラットSPT/AGT遺伝子の5'調節領域およびその欠失変異体をCATレポーター遺伝子に連結したコンストラクトをヒト肝癌由来細胞HepG2に遺伝子導入して、5'調節領域の転写活性を測定したところ、+21~+90がプロモーター活性に必要な最小領域であることを確認した。また、+21から+36まで欠失を進めると転写活性が約1/5に低下することを見だし、そこに含まれるinverted repeat配列の重要性をその変異体を作製して、ゲルシフト法および細胞内での転写活性を測定することで明らかにした。次に、下流側転写開始部位(+66)の少し上流部位にあるC/EBP結合様配列に注目し、この配列を含むDNA

