



Identification of Regulatory Elements of Human $\alpha 6$ Integrin Subunit Gene

西田, 康太郎

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

1998-03-31

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲1823

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1001823>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



氏名・(本籍)	にし だ こうたろう 西 田 康太郎	(島根県)
博士の専攻分野の名称	博士(医学)	
学位記番号	博い第1170号	
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当	
学位授与の日付	平成10年3月31日	
学位論文題目	Identification of Regulatory Elements of Human $\alpha 6$ Integrin Subunit Gene (インテグリン $\alpha 6$ サブユニット遺伝子の発現調節領域の同定)	
審査委員	主査 教授 前 田 盛 教授 守 殿 貞 夫 教授 水 野 耕 作	

論文内容の要旨

【目 的】

インテグリンは種々の α 、 β のサブユニットからなる膜蛋白質で、細胞外マトリックスに対する受容体である。この中でもインテグリン $\alpha 6$ サブユニットは、 $\beta 1$ 及び $\beta 4$ サブユニットとヘテロ二量体を形成し、基底膜の主要な構成成分の一つであるラミニンに対する受容体として作用する。インテグリン $\alpha 6$ サブユニットの発現は、悪性腫瘍における基底膜を介する浸潤・転移への深い関与が示唆されている。今回私どもは、インテグリン $\alpha 6$ サブユニットの遺伝子発現を調節する機構を解明する目的で、プロモーター領域をクローニングし、その解析を行った。

【方 法】

インテグリン $\alpha 6$ 遺伝子のExon 1領域にPrimerを設定し、175bpのPCR産物を得た。これをプローブとしてヒト genomic DNA libraryよりインテグリン $\alpha 6$ 遺伝子の5'上流領域を含む、約15kbのDNAフラグメントをクローニングした。Exon 1より上流約4.0kbをサブクローニングし、塩基配列を決定した。転写開始部位は、インテグリン $\alpha 6$ サブユニットを発現しているヒト線維肉腫細胞株HT-1080より抽出したpoly(A)+RNAを用い、プライマー伸長法により決定した。クローニングしたインテグリン $\alpha 6$ 遺伝子5'上流領域の転写活性は、ルシフェレースレポーター遺伝子を用いたルシフェレースアッセイで検討した。即ち、ベクターpGL3に $\alpha 6$ 遺伝子5'上流1.8kbを組み込み種々の転写調節領域欠損組み換え株を作成し、線維肉腫細胞株HT-1080と乳癌細胞株MCF7に遺伝子導入し、ルシフェレース活性を計測した。さらに $\alpha 6$ 遺伝子発現に対する性ホルモンの短期的影響を調べる目的で、プロゲステロン及び17 β エストラジオール添加時のルシフェレース発現活性の変化を測定した。

【結 果】

プライマー伸長法の結果、主要転写開始部位は翻訳開始部位の上流208bpに位置し、これを+1と

した。インテグリン $\alpha 6$ 遺伝子 5' 上流領域には T A T A box や G C box はなく、T A T A 様配列が転写開始部位より 23bp 上流に認められた。転写開始部位より 100bp 以内に、C R E B (−32) と 2 ヶ所の S P 1 配列を認めた。170~220 bp 上流には他の S p 1 や N F - κ B 等のコンセンサス配列を認めた。さらに組織特異的転写因子が上流 1160 bp 以内に偏在していた。−360 に A p 1, −56 と −417 に 2 つの A P -2, −345 に c -myc のコンセンサス配列を認めた。潜在的グルコルチコイド／プロゲステロン受容体配列 (G R E / P R E) が A p 1 及び c -myc 配列の下流に存在していた。種々の転写調節領域欠損組み換え株を導入した培養細胞のルシフェレース発現活性は、A p 1 及び c -myc 欠損株で約 1 / 3 に低下し、さらに G R E / P R E も欠損した株では活性が著明に低下した。全長株が導入された細胞群においては、プロゲステロンの短時間投与により、ルシフェレース発現活性が 5.7 倍まで増加し、G R E / P R E 欠損株ではこの効果は観察されなかった。

【考 察】

転移は、基底膜を通過し、間質への浸潤、血管内侵入、運搬、定着といった複雑な過程を経て成立する。そのなかでも、マトロプロテイナーゼ (M M P s) のような基質破壊酵素の放出を伴う腫瘍細胞とラミニンの相互作用は、腫瘍が基底膜を浸潤する際の重要な過程と考えられている。これらの相互作用は、腫瘍細胞表面に発現しているラミニンレセプターを介するため、ラミニンレセプター発現のメカニズムを理解することは、複雑な転移機構を解明するために不可欠である。

$\alpha 6$ 遺伝子 5' 上流領域の D N A 解析の結果、転写開始部位より上流 150bp 以内に、T A T A 様配列と S P 1 や N F - κ B 等のコンセンサス配列を認め、レポーター遺伝子分析の結果から、この領域が基本プロモーターとして機能することが確認できた。

さらに転写開始部位より 360bp 上流に A p 1 及び c -myc がみられ、これらと G R E / P R E がインテグリン $\alpha 6$ サブユニット遺伝子における陽性調節エレメントを形成していた。プロモーター領域に存在したパリンδροーム様配列は、2 つのレセプター結合部位を含み、それらは 3 つのヌクレオチドによって 2 分され、典型的な G R E / P R E を形成していた。G R E / P R E 欠損株ではプロゲステロン処理に反応せず、G R E / P R E を有する株では反応がみられたことから、このパリンδροーム様配列 A G A A C A G G C T G C T C A がプロゲステロンの機能的レスポンスエレメントと考えられた。

【結 語】

ヒトインテグリン $\alpha 6$ 遺伝子プロモーター領域をクローニングし、レポーター遺伝子分析により、遺伝子発現を調節する機構の解析を行った。本研究は、プロゲステロンがラミニンレセプターの発現を増加させることにより、腫瘍細胞の基底膜浸潤を促進する可能性についての分子モデルを示したものである。

論 文 審 査 の 結 果 の 要 旨

細胞と細胞外マトリックスとの相関は種々の生物学的ステップの中で重要で、インテグリンはその機構の中で重要な役割を果たしている。インテグリンは種々の α , β のサブユニットからなる膜蛋白質で、細胞外マトリックスに対する受容体である。この中でもインテグリン $\alpha 6$ サブユニットは、 $\beta 1$ 及び $\beta 4$ サブユニットとヘテロ二量体を形成し、基底膜の主要な構成成分の一つであるラミニンに

対する受容体として作用し、悪性腫瘍における基底膜を介する浸潤・転移への深い関与が示唆されている。本研究者は、インテグリン $\alpha 6$ サブユニットへの遺伝子発現を調節する機構を解明する目的で、プロモーター領域をクローニングし、その解析を行った。

【方 法】

インテグリン $\alpha 6$ 遺伝子のExon 1領域にPrimerを設定し、175bpのPCR産物を得た。これをプローブとしてヒトgenomic DNA libraryよりインテグリン $\alpha 6$ 遺伝子の5'上流領域を含む、約15kbのDNAフラグメントをクローニングした。Exon 1より上流約4.0kbをサブクローニングし、塩基配列を決定した。転写開始部位は、インテグリン $\alpha 6$ サブユニットを発現しているヒト線維肉腫細胞株HT-1080より抽出したpoly(A)+RNAを用い、プライマー伸長法により決定した。クローニングしたインテグリン $\alpha 6$ 遺伝子5'上流領域の転写活性は、ルシフェレースアッセイを行った。さらに $\alpha 6$ 遺伝子発現に対する性ホルモンの短期的影響を調べる目的で、プロゲステロン及び17 β エストラジオール添加時のルシフェレース発現活性の変化を測定した。

【結 果】

主要転写開始部位は翻訳開始部位の上流208bpに位置した。インテグリン $\alpha 6$ 遺伝子5'上流領域にはTATA boxやGC boxはなく、TATA様配列が転写開始部位より23bp上流に認められた。転写開始部位より100bp以内に、CREB(-32)と2ヶ所のSp1配列を認めた。170~220bp上流には他のSp1やNF- κ B等のコンセンサス配列を認めた。さらに組織特異的転写因子が上流1160bp以内に偏在していた。-360にAp1、-56と-417に2つのAp-2、-345にc-mycのコンセンサス配列を認めた。潜在的グルココルチコイド／プロゲステロン受容体配列(GRE/PRE)がAp1及びc-myc配列の下流に存在していた。種々の転写調節領域欠損組み換え株を導入した培養細胞のルシフェレース発現活性は、Ap1及びc-myc欠損株で約1/3に低下し、さらにGRE/PREも欠損した株では活性が著明に低下した。全長株が導入された細胞群においては、プロゲステロンの短時間投与により、ルシフェレース発現活性が5.7倍まで増加し、GRE/PRE欠損株ではこの効果は観察されなかった。

【考 察】

$\alpha 6$ 遺伝子5'上流領域のDNA解析の結果、転写開始部位より上流150bp以内に、TATA様配列とSp1やNF- κ B等のコンセンサス配列を認め、レポーター遺伝子分析の結果から、この領域が基本プロモーターとして機能することが確認できた。さらに転写開始部位より360bp上流にAp1及びc-mycがみられ、これらとGRE/PREがインテグリン $\alpha 6$ サブユニット遺伝子における陽性調節エレメントを形成していた。プロモーター領域に存在したパ lindローム様配列は、2つのレセプター結合部位を含み、それらは3つのヌクレオチドによって2分され、典型的なGRE/PREを形成していた。GRE/PRE欠損株ではプロゲステロン処理に反応せず、GRE/PREを有する株では反応がみられたことから、このパ lindローム様配列AGAACAGGCTGCTCAがプロゲステロンの機能的レスポンスエレメントと考えられた。

本研究は、ヒトインテグリン $\alpha 6$ 遺伝子プロモーター領域についてレポーター遺伝子分析により、遺伝子発現を調節する機構の解析を研究したものであるが、従来ほとんど行われなかった遺伝子発現の調節について重要な知見を得たものとして価値ある集積であると認める。よって、本研究者は、博士(医学)の学位を得る資格があると認める。