



Molecular cloning and analysis of the 5'-flanking region of the human bone morphogenetic protein-6 (BMP-6)

玉田, 博

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

2001-03-31

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲2352

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1002352>

※ 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。



【128】

氏 名・(本 籍) 玉田 博 (兵庫県)

博士の専攻分野の名称 博 士 (医 学)

学 位 記 番 号 博い第1366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13年3月31日

【学位論文題目】

**Molecular cloning and analysis of the 5-flanking region of the human
bone morphogenetic protein-6 (BMP-6)**

ヒト BMP-6 遺伝子 5 側上流領域のクローニングと解析

審 査 委 員

主査 教授 前田 盛

教授 守殿 貞夫 教授 尾原 秀史

【緒言】

1965年にUristにより脱灰骨中に骨形成因子(Bone Morphogenetic Protein; BMP)が存在する事が発見されて以来、多くの研究者によりBMPの分離同定が試みられてきた。1988年にWoseneyらがヒトBMP-2, 4, 5, 6 cDNAのクローニングに成功して以来、現在までに約15種類がBMP familyとして分離同定された。骨形成因子(BMP)はTGF- β superfamilyに属し、生体内における骨誘導、及び胎生期の諸臓器の形態形成に深く関わっていることが推定されている。また、前立腺癌をはじめとする種々の悪性細胞において、複数のBMPが発現し、骨転移を有する前立腺癌組織に高い発現を認め、造骨性骨転移等の腫瘍間質相関に関わることが推測されている。BMP-6は、正常前立腺組織に比し癌組織、とくに転移を有する前立腺癌組織に高発現しているが、著者らは、この発現調節の理解のために、BMP-6遺伝子5'側上流転写調節領域のクローニングと解析を行った。

【材料と方法】

すでに報告されているヒトBMP-6 cDNAのExon 1に対して20、22 merのプライマーを設定し、ヒト胎盤より抽出したgenomic DNAを鋳型にしてPCRを行い、プローブ(230bp)を作成した。

BMP-6 (sense): 5'-CTGGGGCGGAGGGCGCAGTG-3

BMP-6 (antisense): 5'-TGCATCTCCCGCTTCTCCTGCGTC-3

プローブを放射線同位元素でラベルした後、ヒトgenomic library (10^8 plaque) よりスクリーニングしpositive cloneを得た。このうちBMP-6遺伝子5'側上流領域(BMP-6 promoter)を含む約1.2kbのDNA fragmentをpGEM-7Z(+)にsubcloningした。次に放射性同位元素を用いたdirect sequencingにてその塩基配列をすべて決定した。

また、転写活性を測定するために、cloningしたBMP-6 promoterをpGL-3 Luc vectorに組み込み、ヒト骨肉腫の細胞株であるSaOS-2と線維肉腫であるHT1080にlipofection(TfxTM-50)を用いたtransfectionを行い、Luciferase活性を測定した。

転写活性部位に重要な部分を決定するためにenhancerであるCCAAT box, Sp 1を欠失させたpromoterを制限酵素で消化して作成し、Luciferase活性を測定した。作成したdeletion constructは、promoter全長(-1168)、CCAAT boxを欠失させたもの(-327)、Sp 1を欠失させたもの(-73)、empty vector、controlとしてSV40をpGL-3

Luc vectorに挿入しそれぞれのconstructをSaOS-2とHT1080にtransfectionし転写活性を測定した。最後に20塩基のantisense oligo-primerに放射性同位元素をラベリングし、Primer伸長法にて転写開始部位を決定した。

【結果】

BMP-6 promoterをdirect sequencingした結果、TATA boxを持たず、GC richなpromoterであった。また、骨肉腫細胞Saos-2における転写活性は、CCAAT box、Sp 1を欠失させていくと、徐々に活性が落ちていった。一方線維肉腫であるHT1080における転写活性は、deletion constructに関わらず転写活性は低いままであった。最後にPrimer伸長法にて転写開始部位は翻訳開始のATGコドンより178bp上流に存在していた。

【考察】

現在、マウスBMP-2、3b、4及びヒトBMP-5のpromotor領域が同定されている。このなかで、BMP-5のみがTATA-boxを有し、BMP-2、3b、4はGC richなpromoterである。ヒトBMP-6はアミノ酸の相同性によりBMP-5、7、8と同一のsubgroupとなっているが、転写調節領域の特徴からはBMP-2、4との相同性を持ち、SP1、GC-box、Drosophilaの体節形成に関わるtramtrack等の転写調節領域を認めた。

また、制限酵素で処理し種々のpromoterを作成しpromoter活性を測定した結果、骨肉腫の細胞株であるSaOS-2ではCCAAT box、Sp 1を欠失させばLuciferase活性が減弱し、それぞれが転写活性に重要なことが推測された。一方線維肉腫であるHT1080にlipofectionを用いたtransfectionを行い、Luciferase活性を測定した結果、promoter活性に変化なく、ある種の細胞株において特有に作用するpromoterであることが推測された。

Primer伸長法では転写開始部位を1ヶ所認め、主要部位は、ATCコドンより178bp上流に存在した。

BMP familyは各々の生理的機能、アミノ酸に相同性があり、転写調節領域の解析は、発生段階、腫瘍細胞、特に前立腺癌細胞株、及び前立腺癌組織において、すでに報告されているBMP familyの発現機序の理解に不可欠であると思われた。

論文審査の結果の要旨			
受付番号	甲第1356号	氏名	玉田 博
論文題目	Molecular cloning and analysis of the 5'-flanking region of the human bone morphogenetic protein-6 (BMP-6) ヒトBMP-6遺伝子5'側上流領域のクローニングと解析		
審査委員	主 査 前田 盛 副 査 守殿 貞夫 副 査 尾島 秀史		
審査終了日	平成 13 年 3 月 5 日		

（要旨は1,000字～2,000字程度）

1965年にUristにより脱灰骨中に骨形成因子(Bone Morphogenetic Protein; BMP) が存在する事が発見されて、1988年にWosneyらがヒトBMP-2, 4, 5, 6 cDNAのクローニングに成功し、現在までに約15種類がBMP familyとして分離同定された。BMPはTGF- β superfamilyに属し、生体内における骨誘導、及び胎生期の諸臓器の形態形成に深く関わっていることが推定されている。また、前立腺癌をはじめとする種々の癌では、複数のBMPが発現し、骨転移を有する前立腺癌組織に高い発現を認め、造骨性骨転移等の腫瘍間質相関に関わることが推測されている。BMP-6は、正常前立腺組織に比し癌組織、とくに転移を有する前立腺癌組織に高発現しているが、本研究者は、この発現調節機序の解明のために、BMP-6遺伝子5'側上流転写調節領域のクローニングと解析を行った。

【材料と方法】

すでに報告されているヒトBMP-6 cDNAのExon 1に対して20、22 merのプライマーを設定し、ヒト胎盤より抽出したgenomic DNAを鋳型にしてPCRを行い、プローブ(230bp)を作成した。

BMP-6(sense): 5'-CTGGGGCGGAGGGCGCAGTG-3

BMP-6(antisense): 5'-TGCATCTCCCGCTTCTCCTGCGTC-3

プローブを放射線同位元素でラベルした後、ヒトgenomic library (10^8 plaque) よりスクリーニングしpositive cloneを得た。このうちBMP-6遺伝子5'側上流領域(BMP-6 promoter)を含む約1.2kbのDNA fragmentをpGEM-7Z(+)にsubcloningした。次に放射性同位元素を用いたdirect sequencingにてその塩基配列をすべて決定した。

また、転写活性は、cloningしたBMP-6 promoterをpGL-3 Luc vectorに組み込み、ヒト骨肉腫の細胞株であるSaOS-2と線維肉腫であるHT1080にlipofection(TfxTM-50)を用いたtransfectionを行い、Luciferase活性を測定した。また同様に転写活性部位に重要な部分を決定するためにenhancerであるCCAAT box, Sp 1を欠失させたpromoterを制限酵素で消化して作成し、

Luciferase活性を測定した。作成したdeletion constructは、promoter全長(-1168)、CCAAT boxを欠失させたもの(-327)、Sp 1を欠失させたもの(-73)、empty vector、controlとしてSV40をpGL-3 Luc vectorに挿入しそれぞれのconstructをSaOS-2とHT1080にtransfectionし転写活性を測定した。最後に20塩基のantisense oligo-primerに放射性同位元素をラベリングし、Primer伸長法にて転写開始部位を決定した。

【結果】

BMP-6 promoterをdirect sequencingした結果、TATA boxを持たず、GC richなpromoterであった。また、骨肉腫細胞Saos-2における転写活性は、CCAAT box、Sp 1を欠失させていくと、徐々に活性が落ちていった。一方線維肉腫であるHT1080における転写活性は、deletion constructに関わらず転写活性は低いままであった。最後にPrimer伸長法にて転写開始部位は翻訳開始のATGコドンより178bp上流に存在していた。

【考察】

ヒトBMP-6はアミノ酸の相同性によりBMP-5、7、8と同一のsubgroupとなっているが、転写調節領域の特徴からはBMP-2、4との相同性を持ち、SP1、GC-box、Drosophilaの体節形成に関わるtramtrack等の転写調節領域を認めた。また、制限酵素で処理し種々のpromoterを作成しpromoter活性を測定した結果、骨肉腫の細胞株であるSaOS-2ではCCAAT box、Sp 1を欠失させばLuciferase活性が減弱し、それぞれが転写活性に重要なことが推測された。一方線維肉腫であるHT1080にlipofectionを用いたtransfectionを行い、Luciferase活性を測定した結果、promoter活性に変化なく、ある種の細胞株において特有に作用するpromoterであることが推測された。Primer伸長法では転写開始部位を1ヶ所認め、主要部位は、ATCコドンより178bp上流に存在した。

BMP familyは各々の生理的機能、アミノ酸に相同性があり、転写調節領域の解析は、発生段階、腫瘍細胞、特に前立腺癌細胞株、及び前立腺癌組織において、す

で報告されているBMP familyの発現機序の理解に不可欠であると思われた。

本研究は、骨形成因子BMP-6について、その発現機序を研究したものであるが、従来ほとんど行われなかったBMP-6遺伝子の5'側上流転写調節領域のクローニングと解析により遺伝子レベルでの発現調節機序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。