



Cloning of a protein binding to the most proximal Pit-1 binding element of Prolactin gene from human pituitary cDNA library

麓, 万里子

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

2004-01-14

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

乙2728

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D2002728>

※ 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。



【 1 6 7 】

氏 名・（本 籍） 麓 万里子 （秋田県）
博士の専攻分野の名称 博士（医学）
学 位 記 番 号 博ろ第1898号
学位授与の 要 件 学位規則第4条第2項該当
学位授与の 日 付 平成16年1月14日

【 学位論文題目 】

Cloning of a Protein Binding to the Most Proximal
Pit-1 Binding Element of Prolactin Gene from
Human Pituitary cDNA Library
(プロラクチン (PRL) 遺伝子のPit-1 結合 DNAエレメントに
結合する新規蛋白のクローニングとその機能解析)

審 査 委 員

主 査 教 授 千原 和夫
教 授 甲村 英二
教 授 岡村 均

Cloning of a Protein Binding to the Most Proximal Pit-1 Binding Element of Prolactin Gene from Human Pituitary cDNA Library

プロラクチン (PRL) 遺伝子の Pit-1 結合 DNA エlementに結合する新規蛋白のクローニングとその機能解析

緒言

Pit-1 は、POU 蛋白ファミリーの一員である転写因子で、PRL、GH、TSH β 、GHRH 受容体遺伝子、および Pit-1 遺伝子自身の Pit-1 Binding Element に結合して、それぞれの遺伝子発現を調節する。1) Pit-1 により PRL 遺伝子は活性化されること、2) cAMP により、Pit-1 による PRL 遺伝子の発現はさらに活性化されること、3) cAMP による PRL 遺伝子発現の活性化に必要な cis-Active element が Pit-1 Binding Element であること、4) A kinase によって、Pit-1 がリン酸化されることから、A kinase によってリン酸化された Pit-1 が、PRL 遺伝子を活性化するのではないかと考えられていた。しかし、A kinase によってリン酸化されるセリンとスレオニンを変異させた Pit-1 を用いて実験成績から、cAMP による PRL 遺伝子転写の活性化には、Pit-1 の存在は必須であるが、Pit-1 のリン酸化は必要ではないことが示唆された。また、酵母の転写因子 Gal4 の DNA 結合 domain に Pit-1 を結合させた fusion protein の発現ベクターを使用し、Gal4 結合 DNA 配列をもつレポーター遺伝子を活性化を検討したとき、cAMP の効果はみられなかったことから、Pit-1 存在下に起こる cAMP による PRL 遺伝子の活性化には、Pit-1 および Pit-1 結合 DNA 配列が必要であることが分かった。即ち、未知の因子が、直接 Pit-1 結合 DNA 配列に結合する可能性が示唆された。この成績をもとに、今回、

Pit-1 結合 DNA 配列に結合する新たな蛋白のクローニングを試みた。

方法と材料

クローニング

酵母の one hybrid system を用いて、ヒト下垂体ライブラリーより Pit-1 結合 DNA 配列に結合する新たな蛋白のクローニングを行なった。ヒスチジン(His)がないと増殖できない His 要求性酵母のゲノムに、His 要求性を相補する遺伝子上流に 7 個のを Pit-1 結合 DNA 配列を組み込んだ DNA をインテグレートさせた。この酵母にヒト下垂体 cDNA ライブラリーをもつプラスミドをトランスフェクトした。Pit-1 結合 DNA 配列にヒト下垂体ライブラリーに由来する核蛋白が結合して His 要求性が相補されたならば、酵母のコロニーが形成される。そのコロニーからプラスミドを回収し、その DNA 配列を決定した。

免疫組織化学

他の POU ファミリー蛋白と相同性を欠く mPOU のアミノ酸配列をヘモシアニンと結合させて、家兎に注射して抗 mPOU 抗血清を得た。ヒトプロラクチン産生下垂体腺腫と非機能性下垂体腺腫における mPOU の有無、および局在を、mPOU 抗血清を使用した免疫組織化学法(アビジン-ビオチン-ペルオキシダーゼ法)で検討した。

mPOU の DNA 結合性の検討

mPOU の Pit-1 結合 DNA 配列への結合性を、Mobility Shift Assay で調べた。PRL プロモーターの 1P、2P、3P (PRL プロモーターには 4 つの Pit-1 結合配列があり、近位より、1P、2P、3P と名づけられている) および 1P の AT rich な部位を C と G に置き換えた mutant 1P (AT mutant 1P) を ^{32}P で標識した。また、His-tagged Pit-1 および GST- mPOU を大腸菌

で産生させ、これを精製して、Mobility shift assay をおこなった。

mPOU の PRL 遺伝子活性化作用

Cos7 細胞での一過性発現系で、mPOU および Pit-1 の PRL 遺伝子発現に及ぼす効果を検討した。mPOU および Pit-1 発現ベクターとしてそれぞれ pcDNA/mPOU と pcDNA/Pit-1、ラット PRL ルシフェレースレポーター遺伝子として、0.6k PRL-Luc、7x1P-Luc(PRL ミニマルプロモーターの上流に7個の1P site を結合させたもの)、7x3P-Luc(PRL ミニマルプロモーターの上流に7個の3P site を結合させたもの)を使用した。また、CPT-cAMP (cAMP)、BayK8644 (Bay-k) を必要に応じて使用した。

結果

酵母の one hybrid system にて、ヒト下垂体ライブラリーより Pit-1 結合 DNA 配列に結合する蛋白のクローニングしたところ、Pit-1 と Oct-1 の他に、すでにヒト筋肉ライブラリーからクローニングされていた mPOU が得られた。この mPOU は、免疫組織化学法により PRL 産生下垂体腺腫の核に存在することが明らかとなった。mPOU の Pit-1 結合 DNA 配列への結合性を Mobility Shift Assay で調べたところ、mPOU は、PRL 遺伝子の1P および3P に特異的に結合した。しかし、3P に比較して、1P に対する結合のほうが明確で、1P に対して高親和性であることが示唆された。2P に対する特異的結合は確認されなかった。AT mutant 1P には、mPOU は結合しなかった。Cos7 細胞を用いた機能実験では、mPOU 単独では、用量依存的に 0.6k PRL reporter 遺伝子の発現を活性化するものの、Pit-1 に比較してその作用は弱いものであった。しかし、Pit-1 存

在下では、mPOU は用量依存的に、かつ明確に同遺伝子を活性化した。

この時、cAMP が存在すると、mPOU と Pit-1 発現ベクターによる同遺伝子の発現は、さらに増加した。同様に、mPOU は Pit-1 の存在下に 7x1Preporter 遺伝子発現を促進した。cAMP 存在下で、この活性化はさらに明確であった。しかし、細胞内カルシウムを増加させる Bay-k は Pit-1 存在下における、mPOU の 7x1P reporter 遺伝子活性化を促進しなかった。一方、7x3P reporter 遺伝子の発現は、Pit-1 で促進されるが、mPOU や cAMP では促進されなかった。

考察

mPOU は、胎児や大人の脳、大人の心臓、骨格筋、肺に発現しており、ホモログとして、ラットの Brn-5、マウスの Emb があり、いずれも主に中枢神経系に発現が認められている。しかし、mPOU の機能や標的遺伝子は、明確ではない。今回、免疫組織化学法で、mPOU がヒトのプロラクチン産生アデノーマ細胞の核に存在することが示され、PRL 遺伝子発現に関与する可能性が示唆された。そこで、mPOU の PRL 遺伝子の Pit-1 結合 DNA 配列への結合性を Mobility shift assay で調べたところ、mPOU は、用量依存的に PRL 遺伝子の1P と3P に特異的に結合するが、1P に対して3P より結合性が高いこと、2P には結合しないことが明らかとなった。AT mutant 1P には、mPOU は結合しないことから、1P の AT rich の領域が mPOU との結合に必要であると考えられた。mPOU 単独の 0.6k PRL reporter 遺伝子発現促進作用は弱いものであったが、Pit-1 および cAMP の存在下では、その効果は明瞭であり、Pit-1 と相乗的に作用する可能性、cAMP シグナルの下流に mPOU は位置する可能性

が示唆された。0.6k PRL reporter 遺伝子は4つの Pit-1 結合 DNA 配列を持つ。Mobility shift assay から、1P に強く結合することが明らかとなったため、7x1P reporter 遺伝子を使用し、同様の実験を行なったところ、Pit-1 存在下に mPOU によって同遺伝子発現は増し、cAMP によってさらに促進された。Bay-k は、細胞内カルシウムを増加させることによって PRL 遺伝子発現を促進することが知られている物質であるが、cAMP の代わりに Bay-k を加えたときには、mPOU、Pit-1 による 7x1P reporter 遺伝子発現はさらに増強されることはなかった。一方、Pit-1 は 7x3P reporter 遺伝子発現を促進したが、mPOU は Pit-1 の有無に関わらず促進しなかった。これらの結果より、mPOU と Pit-1 は 1P で相互作用し、mPOU は Pit-1、cAMP の PRL 遺伝子活性化作用を増幅する因子であることが推測された。

論文審査の結果の要旨			
受付番号	乙 第1899号	氏 名	麓 万里子
論文題目	Cloning of a Protein Binding to the Most Proximal Pit-1 Binding Element of Prolactin Gene from Human Pituitary cDNA Library プロラクチン（PRL）遺伝子の Pit-1 結合 DNA エLEMENT に 結合する新規蛋白のクローニングとその機能解析		
審査委員	主 査 千原和夫 副 査 甲村英乙 副 査 岡田均		
審査終了日	平成 15 年 12 月 10 日		

（要旨は1,000字～2,000字程度）

下垂体前葉ホルモンの下垂体前葉における合成は、細胞それぞれに特有の遺伝子発現調節系によって支配されている。ラクトロフにおけるプロラクチン(PRL)遺伝子発現調節には、POU 蛋白ファミリーに属する転写因子 Pit-1 が関与することは知られていたが、その詳細は不明のままである。一方、以前から adenylate cyclase-cAMP-A-kinase 系の活性化が PRLmRNA 量を増やし PRL 合成を高めることはよく知られていた。さらに Pit-1 による PRL 遺伝子発現亢進が cAMP によって増強されること、また、この cAMP による PRL 遺伝子発現増強を司る因子は Pit-1 結合部位に結合することから、多くの研究者は単純に adenylate cyclase-cAMP-A-kinase 系の活性化によってリン酸化された Pit-1 が PRL 遺伝子発現を促進するのであろうと推測していた。しかし置村らは、A-kinase によってリン酸化されるセリンとスレオニンを他のアミノ酸に変えた変異 Pit-1 を用いた実験成績から、cAMP による PRL 遺伝子転写促進には Pit-1 の存在は必須であるが、Pit-1 のリン酸化は必要ではないことことを明らかにした。しかし酵母の転写因子 Gal4 と Pit-1 の結合蛋白を cAMP 存在下で Gal4 結合 DNA 配列をもつレポーター遺伝子と反応させても活性化は見られなかったことより、Pit-1 存在下に起こる cAMP による PRL 遺伝子の活性化には、Pit-1 結合 DNA 配列および Pit-1 に加えて、Pit-1 結合 DNA 配列に結合する未知の因子が必要であると考えられた。そこで申請者は、酵母の one hybrid system を用いて、ヒト下垂体ライブラリーより Pit-1 結合 DNA 配列に結合する新たな蛋白のクローニングを行なった。その結果、Pit-1 と Oct-1 の他に mPOU が得られた。MPOU は、すでにヒト筋肉ライブラリーからクローニングされていた転写因子で、胎児や大人の脳、大人の心臓、骨格筋、肺への発現が報告されている他、ホモログとして、ラットの Brn-5、マウスの Emb があり、これらは主に中枢神経系に発現している。今まで下垂体に発現しているという報告はないので、特異性の高い構造を持つ mPOU フラグメントにヘモシアニンを結合させ家兎に免疫して得た抗 mPOU 抗血清を用いて、ヒトプロラクチン産生下垂体腺腫と非機能性下垂体腺腫を免疫組織化学法で調べたところ、mPOU がヒトプロラクチン産生腺種細胞の核に存在することが明らかとなっ

た。次に mPOU の Pit-1 結合 DNA 配列への結合性を Mobility Shift Assay で調べたところ、mPOU は、PRL 遺伝子プロモーターに 4 つある Pit-1 結合 DNA 配列のうち 1P および 3P に特異的に結合したが、1P に対して親和性がより高かった。さらに 1P の ATrich な部位を C と G で置換した At mutant 1P には mPOU は結合しなかった。Cos 7 細胞を用いた機能実験において、mPOU は単独で用量依存的に 0. 6k PRL レポーター遺伝子の発現を活性化するものの、Pit-1 に比べてその作用は弱かった。しかし、Pit-1 存在下で mPOU は用量依存的に、かつ明確に同遺伝子を活性化し、さらに cAMP が存在すると、その活性化はより著しくなった。これらの成績から mPOU は PRL 遺伝子プロモーターの 1P に強く結合し、cAMP のシグナルを受けて活性化され Pit-1 と相乗的に作用して PRL 遺伝子発現を促進する可能性が考えられた。1P 部位の意義をさらに明らかにするため、7x1P レポーター遺伝子を Pit-1 存在下に mPOU で刺激したところ明確に発現は増強し cAMP を加えるとより顕著になった。この効果は 7x3P レポーター遺伝子では得られず、また cAMP の代わりに Bay-K を用いた時にも見られなかった。

以上、本研究は、下垂体プロラクチン遺伝子の発現調節機構について、プロラクチン遺伝子プロモーターに結合する因子を研究したものであるが、既に知られている Pit-1 に加えて、今回特定できた mPOU がプロラクチン遺伝子プロモーターの P1 部位に結合し相乗的に PRL 遺伝子発現を促進すること、さらに mPOU が cAMP によるプロラクチン遺伝子発現増強の仲介物質であることを見出し、プロラクチン遺伝子発現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。