

論文の内容の要旨

論文題目 *Human Telomerase Reverse Transcriptase (hTERT)* 遺伝子
プロモーターに働く *trans* 因子の解析

指導教官 藤田敏郎教授

東京大学大学院医学系研究科

平成8年4月入学

医学博士課程

内科学専攻

氏名 矢後雅子

線状染色体の末端部位にはテロメアと呼ばれる構造が存在する。テロメアには単純な繰り返し配列が存在することが知られており、ヒトでは T₂AG₃ の繰り返し配列が存在している。テロメラーゼは、テロメア配列を *de novo* に合成・伸長する逆転写酵素である。現在までにテロメラーゼを構成するサブユニットとして、鋳型 RNA (TR; telomerase RNA) と触媒サブユニット (TERT; telomerase reverse transcriptase) と TEPI (telomerase – associated protein) が知られている。

ヒトテロメラーゼ活性はほとんどのヒト正常体細胞では検出されないが、多くの癌細胞で検出されるため、テロメラーゼと癌化の関係が注目されるようになった。また、テロメラーゼ活性の検出されない細胞では分裂に伴いテロメア長が短くなること、および年齢の高いヒト個体に由来するテロメア長の短い細胞ほど *in vitro* での分裂可能回数も少なかったことから、テロメア長と細胞老化の関係が注目された。

さらにヒトテロメラーゼ活性制御には、テロメラーゼ活性と *hTERT* 遺伝子発現がよく相関すること、正常線維芽細胞に *hTERT* 遺伝子を導入することによりテロメラーゼ活性が誘導できることなどから、*hTERT* 発現はこのテロメラー

ス活性の制御に重要であると考えられている。そのため、現在までに *hTERT* 遺伝子プロモーターに働く *trans* 因子の解析が、精力的に進められてきた。1999年に *c-Myc* が *hTERT* 遺伝子プロモーターを正に制御すると報告され (Wu et al., 1999)、2000年には、*Sp1* が正に制御 (Kyo et al., 2000)、*MZF* が負に制御 (Fujimoto et al., 2000)、女性ホルモン (estrogen) が *estrogen receptor* をもつ細胞でのみ正に制御している (Misti et al., 2000) と相次いで報告されている。

本研究では、正常ヒト体細胞におけるヒトテロメラーゼ活性の制御を解析することを目的として、*hTERT* 遺伝子の転写制御を解析することにした。

まずはじめに、ヒト正常体細胞を用いて *in vitro* でテロメラーゼ活性を誘導できる実験系を確立することにした。そこで、テロメラーゼ活性の非常に弱い正常ヒト末梢血の静止期リンパ球を *in vitro* で抗原刺激により活性化すると、テロメラーゼ活性が非常に強く認められるという報告 (Igarashi et al., 1996; Weng et al., 1996) に着目した。

上記の報告を再現する目的で、正常ヒト末梢血リンパ球を *phytohemagglutinin* (PHA) で刺激し、刺激前、刺激後 1 日、3 日、5 日のリンパ球を用いて細胞数とテロメラーゼ活性を測定した。その結果、上記報告と同様にリンパ球活性化に伴い急激な増殖に伴いテロメラーゼ活性の誘導が確認できた。さらに *hTERT* 遺伝子の発現がテロメラーゼ活性と相関して誘導されることを RT-PCR 法を用いてみいだした。

一方で、それまでに報告された *hTERT* 遺伝子配列を含むヒトのゲノム DNA 約 20 kb のプラスミドを用いて、shot gun 方式により転写開始点より約 1 kb 上流までをクローニングし、塩基配列を決定した。その約 1 kb の塩基配列の中には、*c-Myc*、*Sp1*、*MZF*、*GATA1*、*c-Myb* などの転写因子結合コンセンサス配列が存在することが見いだされた。

そこで、正常ヒト末梢血リンパ球活性化に伴う *hTERT* 遺伝子発現誘導に関わる *trans* 因子を調べる目的で、静止期リンパ球と活性化リンパ球の核抽出液を用いて、*hTERT* 遺伝子上流 1 kb の領域を 100~300 bp の長さにサブクローニングした断片をプローブとして EMSA をおこなった。その結果、すべての領域で複数の特異的 DNA・蛋白質複合体が検出できた。それらの結果のなかで、今までの報告にない新たな知見について下記に記す。

(1) *c-Myb* 結合コンセンサス配列が存在する上流領域 (-834~-700 bp) をプローブとした EMSA では、活性化リンパ球でのみ特異的 DNA・蛋白質複合体が認

められた。この複合体は、テロメラーゼ活性の高い活性化リンパ球で検出され、テロメラーゼ活性の低い静止期リンパ球と正常線維芽細胞では検出されなかったため、転写活性を正に制御する因子である可能性が示唆された。そこで c-Myb 結合コンセンサス配列 (-825~-803 bp) をプローブとして EMSA をおこなったが、特異的バンドは検出されなかった。この上流領域 (-834~-700 bp) には他の転写因子の結合コンセンサス配列は見いだされず、活性化リンパ球で認められた特異的 DNA・蛋白質複合体は未知の転写因子の結合によることが示唆された。

(2) プローブ (-222~+47) を用いた EMSA では、*hTERT* 遺伝子発現量の多い活性化リンパ球で非常に多くの特異的 DNA・蛋白質複合体が検出された。この上流領域はプロモーター活性に必須で特に重要とされる *cis* 配列であり (Cong et al., 1999; Takakura et al., 1999)、Sp1 結合コンセンサス配列と E box コンセンサス配列が認められた。

そこでこの領域にある Sp1 結合コンセンサス配列 (-119~-92) をプローブとして EMSA をおこなった結果、活性化リンパ球でのみ特異的 DNA・蛋白質複合体が検出された。さらに、抗 Sp1 抗体を用いてスーパーシフトアッセイをおこなったところ、活性化リンパ球でのみ、Sp1 が結合することが示された。

次に、E box コンセンサス配列をプローブ (-184~-163) として EMSA をおこない、結合する転写因子が存在するかどうかを調べた。その結果、活性化リンパ球の核抽出液では、静止期リンパ球に比較してシグナルが増強する特異的 DNA・蛋白質複合体が検出された。また、静止期リンパ球では、活性化リンパ球で認めた特異的 DNA・蛋白質複合体よりシグナルが弱く、速い泳動度を示す特異的バンドが検出された。E box に結合する転写因子には二量体を形成して結合する c-Myc・Max、USF イソ型のホモ二量体やヘテロ二量体などが知られている。そこでこれらの検出された特異的バンドに含まれる転写因子を同定するために、抗 Max 抗体、抗 USF1 抗体を用いてスーパーシフトアッセイをおこなったところ、静止期リンパ球および活性化リンパ球で認めた特異的バンドはすべて抗 USF1 抗体を用いたときにのみバンドシフトした。したがって、転写因子 USF が *hTERT* プロモーターの E box に結合することが示された。

さらに静止期リンパ球と活性化リンパ球では USF がどのような二量体を形成して E box に結合するかを調べる目的で、抗 USF1-C 末抗体、抗 USF2-C 末抗体、抗 USF2-N 末抗体を用いてスーパーシフトアッセイをおこなった。その結果、静止期リンパ球でみられた特異的 DNA・蛋白質複合体は抗 USF1-C 末抗

体、抗 USF2-C 末抗体を用いた時にのみバンドシフトし、活性化リンパ球で見られた特異的 DNA・蛋白質複合体は、抗 USF1-C 末抗体、抗 USF2-C 末抗体、抗 USF2-N 末抗体すべての場合でバンドシフトした。活性化リンパ球で認められた特異的バンドは、293 細胞に USF1 と USF2 をコトランスフェクションして得られた核抽出液を用いた特異的バンドと同じ泳動度を示した。さらに全長 USF2 の N 末欠失体でほかの USF イソ型と二量体を形成して E box に結合すると想定されている mini USF2 ($\Delta 1-198$ a.a.)を作成し、全長の USF1 とともに 293 細胞に共強制発現した核抽出液を用いて検出した特異的バンドは、静止期リンパ球で認められた特異的バンドと同じ移動度を示し、抗 USF1-C 末抗体、抗 USF2-C 末抗体を用いた時にのみバンドシフトし、抗 USF2-N 末抗体ではバンドシフトしなかった。従って、これらの *hTERT* プロモーター上の E box に静止期リンパ球では USF1・mini USF2 が結合し、活性化リンパ球では USF1・USF2 が結合することが示唆された。

次に、静止期リンパ球と活性化リンパ球の細胞粗抽出液を用いてウェスタンブロットリングをおこないその蛋白質量を比較検討した。その結果、活性化リンパ球では全長の USF1、USF2 とともに静止期リンパ球より多く認め、静止期リンパ球では mini USF2 を認めた。

次に、USF の *hTERT* 遺伝子に対する転写活性を調べることにした。USF 1、USF2 発現プラスミドを用いて、*hTERT* 遺伝子上流領域 (-222~+47 bp)に対する相対転写活性をルシフェラーゼアッセイにより測定した。その結果、USF1、USF2 はともに 293 細胞では相対転写活性を約 2 倍に、KMST6 細胞や SUSM1、WI38RA (これらはすべて *hTERT* 発現が非常に低い)では約 4~10 倍程度に上昇させた。さらに USF の N 末欠失体で、ドミナントネガティブ効果があると考えられている mini USF (mini USF: $\Delta 1-163$, mini USF2: $\Delta 1-198$)を作成した。*hTERT* の発現量が多い 293 細胞に、*hTERT* 遺伝子上流領域 (-222~+47 bp)をもつレポーターと mini USF をコトランスフェクションしたところ、相対転写活性を約半分に抑制した。これらの結果は、USF が *hTERT* 遺伝子の正に働く転写制御因子であることを強く示唆する。

以上のことから、正常ヒトリンパ球の *hTERT* 転写制御に USF が関わっていることが示唆された。