

論文の内容の要旨

論文題目：ヒトポリペプチド鎖伸長因子 1A-1 遺伝子 5' terminal oligopyrimidine tract の転写における役割

氏 名 二 瓶 秋 子

ヒトポリペプチド鎖伸長因子 1A-1 (eEF1A-1) 遺伝子は、5' terminal oligopyrimidine tract (5' TOP) 遺伝子ファミリーの一員で、転写活性の高いハウスキーピング遺伝子である。5' TOP とは、転写が C 残基から始まり、次いでピリミジン残基が約 13 個連続する構造と定義され、両生類やほ乳類において細胞周期依存的に翻訳を制御するシスエレメントとして知られている。5' TOP を含むヒト eEF1A-1 遺伝子プロモーターの活性は大変高いため、真核細胞で外来遺伝子を発現させる際のプロモーターとして利用されているが、5' TOP の転写制御における役割については、未だに不明である。

ヒトゲノムプロジェクトの一環として、オリゴキャップ法で作製された完全長 cDNA ライブラリより多数の cDNA の 5' 端配列を解読していく過程で、eEF1A-1 cDNA の 5' 端配列が独特な特徴を有していることが判明した。この遺伝子の 5' TOP にはゲノム上では T が 5 個連続しているが、この連続数が 5 個ではない全長 cDNA が多数得られたのである。また、この T の数の差は、他の方法で作成した cDNA ライブラリより得られた eEF1A-1 cDNA の 5' 端配列からも同様に確認された。しかしながらこの現象がいつどのような過程で起きるかは未解明であった。

以上を背景に本研究では、ヒト eEF1A-1 遺伝子 5' TOP の転写における役割の解析を目的とした。第 1 章では、eEF1A-1 cDNA の 5' TOP に並ぶ T の数にばらつきがみられたことに注目して解析し、その原因が *in vitro* のアーティファクトによるものではなく、*in vivo* で、転写中あるいは転写後に起きた現象であることを明らかにした。さらに第 2 章では、5' TOP が eEF1A-1 遺伝子の転写活性に与える影響を CAT アッセイと *in vitro* 転写系を用いて解析し、5' TOP が転写のイニシエーター様エレメントとして機能していることを示した。

第 1 章 ヒト eEF1A-1 cDNA の 5' TOP 領域中の T の数の違いに関する解析

本章では、ヒト eEF1A-1 cDNA の 5' TOP でみられた T の数のばらつきについて詳しく調べるため、オリゴキャップ法で作製した完全長 cDNA ライブラリから得られたヒト eEF1A-1 cDNA 125 クローンの 5' 端配列およびその中の無作為な 19 クローンにつき全長配列を決定し、T の数に差がみられたクローンの割合と、全体で起こった変異の割合を比較検討した。5' TOP の T の数がゲノム上での数 (5 個) ではないクローンは、125 クローン中 40 クローン (32%) 存在していた。また、全長 1744 塩基の配列を決定した 19 クローン全体中で、5' TOP を除いた +7 より下流に生じていた点変異は SNP を除き 25 個であり、ライブラリ作製時の PCR により生じたと考えられる点変異の確率は、1321 塩基に 1 塩基と 5' TOP に比べ低いものであった。

オリゴキャップ法では、mRNA の 5' 端をオリゴヌクレオチドに置換する過程で、アルカリフォスファターゼ、タバコアシッドピロフォスファターゼ、RNA リガーゼの 3 種の酵素反応をおこなうが、これらの酵素には塩基数を増減させる活性はなく、ライブラリ作製過程でこの T の数を変え得るのは逆転写酵素 (RT) のみである。しかし、RT 処理はオリゴキャップ後におこなわれるので、この段階で 5' TOP は既に mRNA の 5' 端ではなく内在しているかたちになる。eEF1A-1 cDNA には、5' TOP 以外に 9 ヶ所、5 個以上 T または A が連続する部分が内在している。19 クローン中でこの 9 ヶ所には、1 塩基置換が 2 個、1 塩基欠失および 1 塩基挿入が各 1 個の合計 4 個の変異のみ見られたので、その変異の確率は $4/171$ である。これを 5' TOP で起きていた確率 $40/125$ と二項検定すると、両者の変異率の差の有意確率は、 $p=1.1 \times 10^{-10}$ となり、その差は明らかであった。以上より 5' TOP で生じた T の数の差は、ライブラリ作製過程でのアーティファクトによるものではなく、*in vivo* で起きている現象であることが示された。

さらに、5' TOP に生じた T の数の増減が、ゲノム上に T の数の異なる遺伝子コピーが複数存在するためにみられた現象である可能性も考えられるが、これについても緑色蛍光タンパク質 (GFP) トランスジェニックマウスを用いて検討をおこなった。このマウスは、1 個の eEF1A-1 遺伝子由来のプロモーターによって GFP を発現するため、GFP 遺伝子の転写は eEF1A-1 遺

伝子の配列から開始される。このマウスの胎児よりオリゴキャップ法で完全長 cDNA ライブラリを作製し、ここから 25 個の GFP cDNA クローンを単離して、それらの 5' 端配列を決定した。その結果、25 クローン中 7 クローン (28%) で、T の数に増減がみられ、5' TOP で生じた T の数のばらつきは、ゲノムレベルではなく、転写中あるいは転写後に起こったものであることが確認された。

大腸菌の RNA ポリメラーゼは、転写開始点近くの T の連続部分で少し滑り、転写産物の T の数に差が見られることが知られており、この現象はスリッページと呼ばれている。eEF1A-1 遺伝子 5' TOP の T の連続部分でもスリッページが起きると仮定すると、RNA ポリメラーゼ II が次々とやってきてスリッページを起こしつつ転写を開始するので、転写活性は大変高く、5' TOP の T の数に多少のばらつきがある mRNA が生じる可能性が考えられる。

第 2 章 ヒト eEF1A-1 遺伝子コアプロモーター領域の解析

5' TOP が翻訳を制御するシスエレメントであることは、既に様々な研究によって明らかにされてきた。本章では翻訳ではなく転写に着目し、まずヒト eEF1A-1 プロモーターの活性を CAT アッセイにより確認した上で、プロモーターの -204 から +24 部分を有するクロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ (CAT) 発現ベクター pEF204 Δ -CAT を基として、転写開始点周辺、特に 5' TOP に集中していくつかの変異を導入し、その変異が転写活性に及ぼす影響を CAT アッセイと *in vitro* 転写系により解析した。

はじめに、5' TOP に 5 個連続する T を 1 塩基ずつ欠失した変異体を作製し、これらの変異が転写活性に及ぼす影響を調べた。その結果、eEF1A-1 遺伝子が高い転写活性を有するためには、5' TOP に少なくとも 3 個 T が連続している必要があることが示された。この結果は、eEF1A-1 遺伝子の 5' TOP が転写のイニシエーター様エレメントとして機能していることを示唆するものであった。イニシエーターのコンセンサス配列は “Py Py A₊₁ N T/A Py Py” とされており、この配列を認識して結合し機能するタンパク質がいくつか知られている。eEF1A-1 の 5' TOP は、イニシエーターコンセンサス配列と類似しているが、最も重要といわれる A₊₁ が異なっており、また eEF1A-1 プロモーターの 5' TOP を含むイニシエーター様エレメントは、既知の転写因子結合配列とホモロジーがないため、5' TOP は典型的なイニシエーターとは異なるタイプであると考えられる。

さらに、TATA box のみの欠失変異体、転写開始点直前 8 塩基の欠失変異体、5' 端の C 残基を G に置換した変異体も作製し、それらの変異の影響を調べたところ、いずれも転写活性は野生型に比べ、大きく減少した。これらの結果より、eEF1A-1 プロモーターが高い活性を保つためには 5' TOP に T が 3 個以上連続していることに加え、TATA box、転写開始点の直前配列、+1 の C 残基も必要不可欠であることが示された。全ての実験において、CAT アッセイと *in*

vitro 転写系による解析の結果に矛盾はなかった。

T の連続する 5' TOP 部分は、GC 含有量の多い配列に比べ、比較的 2 重鎖が解離しやすい状態にあると考えられる。転写開始部位で 2 重鎖が解離しやすい状態にあれば、開始複合体から伸長複合体への移行が早いと考えることができ、このことが eEF1A-1 プロモーターの高い活性に寄与している可能性が示唆される。またスリッページ仮説の下では、T の連続数を減らした変異体は RNA ポリメラーゼ II によるスリッページを伴った効率良い転写開始が妨げられ、プロモーター活性が低下した可能性が示唆される。今後さらなる解析を進め、5' TOP のイニシエーター様エレメントとしての作用機構を解明することが課題である。