

生化学部門

Department of Biochemistry

1989年1月から1990年3月までの人事異動は以下の通りであった。

教授 遠藤英也 1989年3月 定年により退官。4月より鳥取大学医学部附属ステロイド
医学研究施設生化学教授に就任した。

教授 関口睦夫 1990年1月 九州大学医学部生化学第一教授が当部門教授に就任した。
(医学部と併任)

助教授 山本三毅夫 1989年9月 辞職。10月より防衛医科大学校医学部生化学第二教授に就
任した。

昭和60年入学の池尻公二は3月で単位取得のうえ退学し、母教室の二外科に戻った。昭和61年
入学の大学院生藤也寸志は1989年6月に学位を取得し7月より九州大学医学部ウイルス学教室の
助手として採用された。同じく昭和61年入学の中島秀彰、中牟田誠、高楓の3人はいずれも既に
単位を取得し、学位予備審査も終了、1990年3月には学位取得の見込みであり、高楓の帰国を除
きいずれも母教室へ戻る予定である。

研究活動としては、発癌機構の解明を最終的な目標にして細胞癌化に伴って発現に変化の起る
配列として同定された遺伝子の解析を本年度も引き続き推進した。すなわち、ラットインスリン
様増殖因子II (rIGF II) 遺伝子、 $\alpha 2u$ グロブリン遺伝子、S100様蛋白質をコードする配列に
ついてである。

なお関口教授就任に伴い、1990年2月からはアルキル化剤で化学修飾をうけたDNAの修復機
構の遺伝子発現調節解明を通じて、発癌のメカニズムを探ることとなった。

A. ラットインスリン様増殖因子II (rIGF II) 遺伝子の構造と発現調節

rIGF II 遺伝子は癌で転写の高まっている配列として同定されたものの1つで、6つのエキソ
ンからなり、遺伝子領域内には4つのプロモーター (P1、P2、P3及びP6) が存在してい
る。このうち、P1及びP6については我々が初めて見いだしたものであった。P1、P2およ
びP3は3者択一的なプロモーターで第4エキソンに連結される。またP6は第6エキソン内の
独立したプロモーターとして発見されたものである (原著論文7)。癌化した細胞ではこれまで
調べた限りそのプロモーターのいずれもが程度の差はあれ活性のあることが明らかとなった。

これらのプロモーターの活性を定量的に調べ、さらにその発現調節のメカニズムを知る目的で、
各プロモーター領域をクロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ (CAT) 遺伝子に接
続し、癌化した細胞に導入して一時的な発現をさせてCAT活性を測定し、最も活性の高まった
P2について更に結合性の因子を検索した。

すなわち、まず各4つのプロモーター領域と思われる部位を含む配列を用いてそれぞれCAT構造体を作成し、rIGF II 遺伝子の発現しているA H 60 C細胞にトランスフェクションし、CATアッセイを行った。その結果、P 2、P 3のプロモーター活性はかなり高い事が示されたが、P 1、P 6のそれはほとんど検出されない程度のものであった。さらにP 2、P 3について上流より一連の欠損変異を導入して同様の実験を行った所、いずれのプロモーター領域にも発現にネガティブに働く cis の配列が存在することが示唆された。このことは胎児性発現や癌化した細胞で発現し正常細胞で発現が見られないというON-OFF以外に、微妙な調節系が存在していることを示していると考えられる。

さらにP 2領域について、この最大活性を示す原因に関与する因子の情報を得るために、HeLa細胞の核抽出液を用いてゲルシフトアッセイとDNaseI フットプリンティングを行った。その結果、P 2領域のXhoI-AluI断片にHeLa細胞核分画中の因子と結合してbandシフトさせる配列が存在することが分かった。その配列を塩基レベルで確認するために同様に核分画と処理したものにDNaseIを作用させて分析したところ、結合領域の配列はS V 40などで同定されているSp 1結合配列と一致するGGGCGGであることが判明した(Fig. 1)。このプロモーター領域にはTATAbox様の構造は存在するもののCATbox様の構造は認められない。従って、このGCbox様の構造が本遺伝子の発現に大きな役割を担っていることが推察された。

B. ラットα2uグロブリン遺伝子の構造と組織特異的発現

α2uグロブリンは肝臓、涙腺、唾液腺、性器付属腺などで生成分泌される蛋白質で、肝臓のそれは血中に分泌された後尿中に排泄される。この蛋白質の機能についてはまだ分かっていないが、本遺伝子は癌化に伴って発現の減少する配列として同定されたものである。本遺伝子は multi-gene family を構成しており、約25個の独立した遺伝子があるものと推定されている。肝型の遺伝子のみが強いホルモン制御を受けており、組織特異的発現が興味の対象となっている。これまで肝臓、唾液腺で発現している配列についてその幾つかの遺伝子と cDNA の構造解析を行ってきた。そ



Fig. 1 P 2領域のDNaseI フットプリンティング。レーン1; (-) HeLa細胞の核抽出液。レーン2; (+) HeLa細胞の核抽出液。配列を記入した部分の上側2つのバンドが、結合因子のために切断されにくくなって薄くなっている。

の結果これらの臓器において発現されている遺伝子は極く少数(多分双方合わせても5種類程度)であることが明らかとなった。

約25種類の非常に類似した遺伝子のうち残りの20種は不活性遺伝子または偽遺伝子ということだろうか。この疑問に答えるため、今年度は性器付属腺における発現を調べた。常法通り cDNA ライブラリーを作成しランダムに約20クローンを単離しその全塩基配列を決定した。予期せぬことにこれらの配列は非常に多様で10種以上の遺伝子より由来することが判明した。更にこの臓器においては先に肝及び唾液腺で示された第2エクソン内に存在する各臓器に特異的な部分が双方とも発現されており実際1つの cDNA クローンは唾液腺由来のクローンと完全に一致した。性器付属腺における肝型、唾液腺型に特異的な部分を示す27mer のオリゴヌクレオチドを用いたノーザンアッセイにおいても両方のプローブと反応を示すことにより両型の発現は確認された。この臓器における多数の遺伝子発現が確認できたことで肝、唾液腺を合わせ約15種が活性遺伝子であることが示されたわけで、また数個の遺伝子は内部の突然変異等より不活性遺伝子であることが分かっているので、 $\alpha 2\mu$ グロブリン全ファミリーの遺伝子の大部分のメンバーについてゲノムもしくは cDNA の綿から明らかにし得たと考えている。今後性器付属腺に於けるこの予想外の結果を考慮の上、他の $\alpha 2\mu$ グロブリン発現臓器に於ける遺伝子の種類を明らかにし、いかなる制御機構、各臓器における遺伝子メンバースイッチの必要性等についての解析を進める必要があると考えている。

C. S100様蛋白質をコードする配列

細胞の不死性獲得は、細胞癌化の初期段階にある基本ステップとも考えられており、本過程に関する知見は癌化の機構解明に重要な情報を与えるものと期待される。マウス繊維芽細胞 (MEF) の cDNA ライブラリーとその不死化したと考えられる Balb/c3T3 培養細胞の cDNA ライブラリーとの分別的ハイブリダイゼーションによって分離された pEL98 cDNA クローンはこの観点から得られたもので、S100様カルシウム結合蛋白質をコードし得ることを既に明らかにした。本配列と相同な配列が HeLa 細胞でも発現していることが認められていたので、cDNA としてクローニングし、その配列を決定し、マウスの配列との比較を行った。

その結果、翻訳領域ではわずかに5つのアミノ酸置換を与える25個の塩基置換が観察されたのみで非

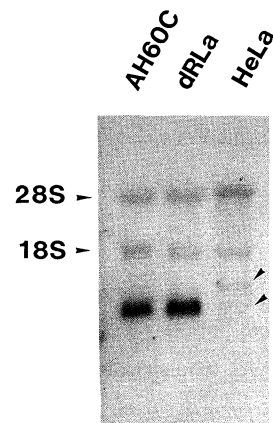


Fig. 2 mRNA のノーザンブロッティングによる分析。左よりラット AH60C 腹水肝癌、ラット dRLa 肝癌および HeLa 細胞の各 mRNA。

常にホモロジーの高いことが分かった。しかしながら、HeLa 細胞の cDNA には N 端側の E F-hand の部位に相当する配列より 5' 側に独自の不明な配列が存在することが見いだされた。このことは相同配列を有する mRNA をノーザンブロットィングで調べた場合のデータで約 500 塩基サイズの大きいバンドが検出されるのと同様のものであるのかも知れない (Fig. 2)。この由来不明の配列はゲノムの構造を調べることで確認可能であろう。本遺伝子の産物の機能についてはまだ不明であるが、この配列はその後、細胞がいったん増殖を停止し、再度増殖を再開する際に、また細胞が形を変えたり、神経突起状の構造を形成したりするときなどに発現が見られることが報告され、細胞不死化というより、細胞の増殖 (細胞周期) により直接的に関係しているのではないかとの考え方が妥当となりつつある。

原著論文

1. Nakamuta M., M. Furuichi, K. Takahashi, N. Suzuki, H. Endo and M. Yamamoto : 1989
Isolation and characterization of a family of rat endogenous retroviral sequences. *Virus Genes* **3** : 1, 69-83
2. Nakashima H., M. Yamamoto, K. Goto, T. Osumi, T. Hashimoto and H. Endo : 1989
Isolation and characterization of the rat catalase-encoding gene. *Gene*, **79**, 279-288
3. Gao F., H. Endo and M. Yamamoto : 1989
Length heterogeneity in rat salivary gland α 2u globulin mRNA : multiple splice-acceptors and polyadenylation sites. *Nucleic Acids Res.* **17**, 4629-4636
4. Yamamoto M., F. Gao, M. Furuichi, Y. Ichiyoshi and H. Endo : 1989
A LINE 1 sequence interrupts the rat α 2u globulin gene. *Biochim. Biophys. Acta* **1008**, 322-328
5. Toh Y., M. Yamamoto, H. Endo, Y. Misumi and Y. Ikehara : 1989
Isolation and characterization of a rat liver alkaline phosphatase gene : A single gene with two promoters. *Eur. J. Biochem.* **182**, 231-237
6. Toh Y., M. Yamamoto, H. Endo, A. Fujita, Y. Misumi and Y. Ikehara : 1989
Sequence divergence of 5' extremities in rat liver alkaline phosphatase mRNAs. *J. Biochem.* **105**, 61-65
7. Matsuguchi T., K. Takahashi, T. Ueno, H. Endo and M. Yamamoto : 1989
A novel transcription unit within the exon sequence of the rat insulin-like growth factor II gene. *Biochem. Internat.* **18**, 71-79
8. Matsuguchi T., K. Takahashi, K. Ikejiri, T. Ueno, H. Endo and M. Yamamoto : 1990
Functional analysis of multiple promoters of the rat insulin-like growth factor II gene. *Biochim. Biophys. Acta.* in press

著 書

1. Goto K., M. Furuichi, T. Fujiyoshi, H. Nawata, M. Yamamoto and H. Endo : 1990
S100 related proteins, in "Stimulus-Response Coupling : The Role of Intracellular Calcium"
J. R. Dedman and V. L. Smith ed., Telford Press, New York, in press.