

生化学部門

Department of Biochemistry

当部門では、昭和61年4月より、藤也寸志、中島秀彰、中牟田誠、松口徹也、高 楓の5名が新たに院生として研究に参画した。昭和62年3月末には院生、鈴木憲明が課程を終了し、院生、志方出、鴻江俊治が単位取得の上、退学した。当部門の主要研究テーマは発癌機構の解明である。細胞の癌化に伴っておこる遺伝子発現の異常の解析から、逆行性に癌化の本質にせまろうというのが基本戦略である。この様な観点から、ここ数年来、癌組織で強く発現し、正常組織には殆ど発現の見られない遺伝子の分離、同定を行ってきたが、その結果、分離されたクローンのうち、約半数が反復配列由来のクローンからなり、残りが単一遺伝子からなることが我々の研究から明かとなった。(M.Yamamoto et al.Proc.Natl.Acad.Sci. 80,7524:1983) 昭和61年度は、前年に引き継ぎ、主としてこの両グループに属するクローンの構造及び機能について検索を進めた。

A. がんで特異的に発現の高い反復配列由来のクローンの解析

A a. 新しいファミリーに属するLTR様配列(鈴木憲明、藤吉利信、前原喜彦、高橋慶吉、山本三毅夫、遠藤英也)

ラット腹水肝癌 AH 60 C 及び、正常肝の一本鎖 cDNA をプローブとしてラットのゲノムライブラリーから、直接、目的に合致するゲノムクローンを2個(pRAL 6, pRAL 10)分離した。図1 a に pRAL 6 を4つに分け、各断片(C,D,E,F)をプローブした Northern ブロットを示す。いずれのプローブも AH 60 C RNA(Lane 2) にスメア状に強くハイブリダイズしているのに、正常 RNA (Lane 1) とはハイブリダイズしないことがわかる。また、図1 b の Dot プロットアッセイに示す様に、pRAL 6 は A H 60 C のみならず、他のラット癌にも強い発現がみられる一方、肝以外の正常組織にも発現がみられない。

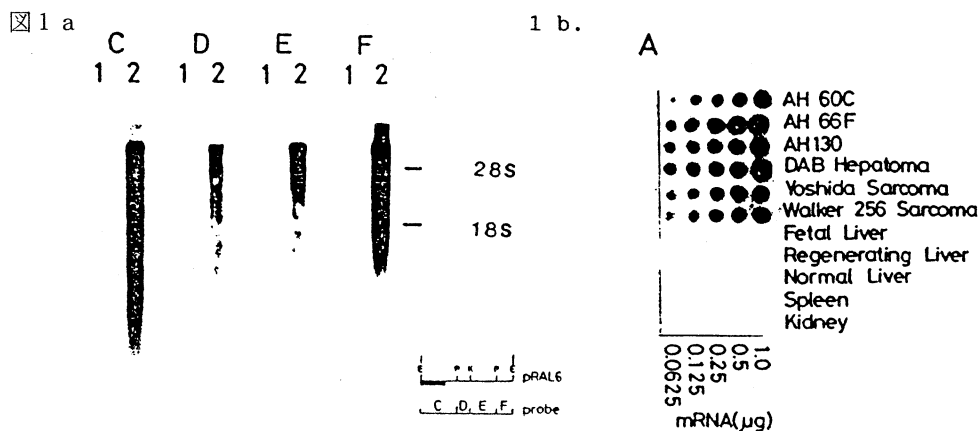


图 2 A

1320	1321	1322	1323	1324	1325	1326	1327	1328	1329	1330	1331	1332	1333	1334	1335	1336	1337	1338	1339	1340	1341	1342	1343	1344	1345	1346	1347	1348	1349	1350	1351	1352	1353	1354	1355	1356	1357	1358	1359	1360	1361	1362	1363	1364	1365	1366	1367	1368	1369	1370	1371	1372	1373	1374	1375	1376	1377	1378	1379	1380	1381	1382	1383	1384	1385	1386	1387	1388	1389	1390	1391	1392	1393	1394	1395	1396	1397	1398	1399	1400	1401	1402	1403	1404	1405	1406	1407	1408	1409	1410	1411	1412	1413	1414	1415	1416	1417	1418	1419	1420	1421	1422	1423	1424	1425	1426	1427	1428	1429	1430	1431	1432	1433	1434	1435	1436	1437	1438	1439	1440	1441	1442	1443	1444	1445	1446	1447	1448	1449	1450	1451	1452	1453	1454	1455	1456	1457	1458	1459	1460	1461	1462	1463	1464	1465	1466	1467	1468	1469	1470	1471	1472	1473	1474	1475	1476	1477	1478	1479	1480	1481	1482	1483	1484	1485	1486	1487	1488	1489	1490	1491	1492	1493	1494	1495	1496	1497	1498	1499	1500
1320	1321	1322	1323	1324	1325	1326	1327	1328	1329	1330	1331	1332	1333	1334	1335	1336	1337	1338	1339	1340	1341	1342	1343	1344	1345	1346	1347	1348	1349	1350	1351	1352	1353	1354	1355	1356	1357	1358	1359	1360	1361	1362	1363	1364	1365	1366	1367	1368	1369	1370	1371	1372	1373	1374	1375	1376	1377	1378	1379	1380	1381	1382	1383	1384	1385	1386	1387	1388	1389	1390	1391	1392	1393	1394	1395	1396	1397	1398	1399	1400	1401	1402	1403	1404	1405	1406	1407	1408	1409	1410	1411	1412	1413	1414	1415	1416	1417	1418	1419	1420	1421	1422	1423	1424	1425	1426	1427	1428	1429	1430	1431	1432	1433	1434	1435	1436	1437	1438	1439	1440	1441	1442	1443	1444	1445	1446	1447	1448	1449	1450	1451	1452	1453	1454	1455	1456	1457	1458	1459	1460	1461	1462	1463	1464	1465	1466	1467	1468	1469	1470	1471	1472	1473	1474	1475	1476	1477	1478	1479	1480	1481	1482	1483	1484	1485	1486	1487	1488	1489	1490	1491	1492	1493	1494	1495	1496	1497	1498	1499	1500

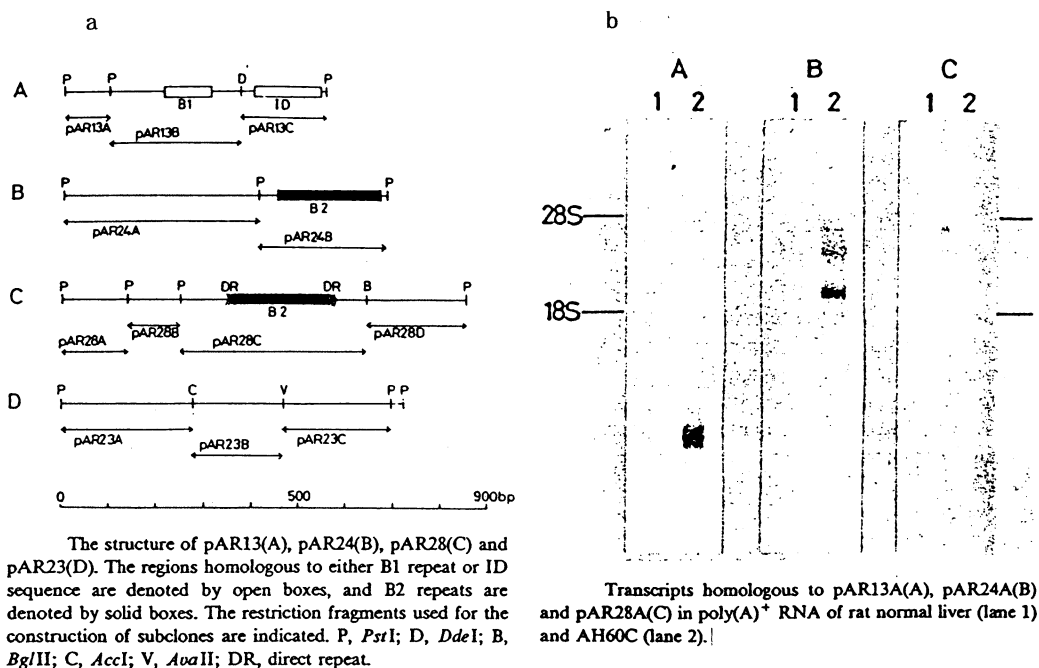
B

[illegible]

A H60Cと正常肝からの遊離核を用いた run on アッセイから R A L エLEMENT の癌特異的発現は、転写段階に於ける調節異常によることが明らかにされた。しかし、A H60C と正常肝の D N A について Southern プロットで両者のプロファイルをみると、両者殆ど同じで、少なくとも、大きな再編成や増幅の存在は認められなかった。

A b. 反復配列由来のクローンの系統的検索 (鴻江俊治、前原喜彦、遠藤英也)

図 3



ラット腹水肝癌 A H60C から作製した c D N A クローン 2500 個を A H60C のゲノムの D N A をプローブにしてスクリーニングしたところ、1.2 % にあたる 30 個が反復配列を含むことがわかった。また、そのうちの 12 個が A H60C を含んだ種々のラット癌で強く発現され、肝を含む正常組織では殆ど発現がみられなかった。この 12 個のクローンは、更に細胞質の polyA RNA とハイブリダイズするクラス I と、しないクラス II に分けられた。図 3 a の A、B はクラス I に属するクローン p A H13 と p A R 24 を、C はクラス II に属する p A R 28 のおおよかな構造を示したものであるが、クローン p A H13 には既知の反復配列、B 1 リピートや I D 配列が存在し、クローン p A R 24 と p A R 28 には、B 2 リピートが存在していた。これら反復配列の近傍の D N A 断片、p A R 13A、p A R 24A、p A R 28A、28B、28D をそれぞれプローブにして Southern プロットを行なうと、何れも 1 本のバンドを示し、単一遺伝子の存在が明らかである。興味深いのは、このうち p A R 13A、p A R 24A で図 3 b の Northern プロットプロフ

イルから明らかな様にその発現はA H60C (Lane 2) で強く、正常肝 (Lane 1) では発現がみられていない。反復配列が近傍の単一遺伝子の転写率を調節している可能性が示唆される知見として注目に価する。

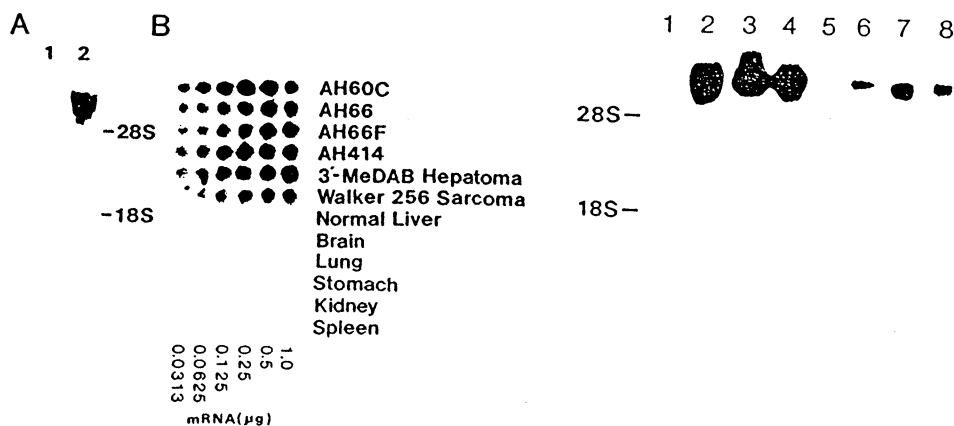
A c. 反復配列由来のクローン p A H53の解析 (山本三毅夫、高橋慶吉、遠藤英也)

p A H53は当研究部門で分離された最初の、発現がきわめて癌に特異的な、反復配列由来のクローンである。p A H53のインサートR T-1 をプローブにしてA H60Cのc D N Aライブラリーをスクリーニングして、多数の、R T-1 を含むc D N Aクローンを分離、そのうち、12種のクローンについて制限酵素地図を作製、それぞれがどのような構成ユニットから成るかを明らかにした。現在、この12種の塩基配列を決定中である。一方、R T-1 をプローブとして、ラットのゲノムライブラリーからゲノムクローンを多数分離し、その構造解析を行なっている。

B. 癌で特異的に発現の高い単一遺伝子の分離、同定

B a. c D N Aクローン p A H1005の解析 (志方出、野替一郎、池尻公二、藤吉利信、遠藤英也)

図4 a b



Northern blot analysis of various normal liver and tumor poly(A)⁺ RNAs. Poly(A)⁺ RNAs (5 µg) from mouse normal liver (lane 1), MH134 (lane 2), S180 sarcoma (lane 3), Lewis lung carcinoma (lane 4), liver tissue adjacent to human hepatoma surgically extirpated (lane 5), its hepatoma portion (lane 6), MX-1 (mammary cancer; lane 7) and MK (gastric cancer; lane 8) were Northern-blotted and hybridized with ³²P-labeled pAH1005 probe.

ラット腹水肝癌A H60Cより調製したc D N AライブラリーをスクリーニングしてA H60C

で強く発現され、正常肝には殆ど発現を見ないクローンとして、6.8 k b mRNA 由来の cDNA クローン p A H1005 を分離した (図 4 a A)。この遺伝子は、A H60C のみならず、種々のラット癌、(図 4 a B) 及びマウスの癌、更に、ヒトの癌にも発現されていたが、(図 4 b) ラット及びマウスでの正常組織、手術で摘出されたヒト肝癌周辺の肝組織にも発現されており、その特異性が種をこえて保存されていた。(図 4 b) しかしこの遺伝子の発現は、再生肝や、胎児肝にもわずかながらみられ、ラット肝の初代培養細胞に、E G F 及びインスリンを添加してもその発現が誘発されたので細胞の増殖にカップルした発現と結論された。なお、同じ動物種の肝及びヘパトーマの DNA について行なった Southern プロット解析では、両 DNA 間に、大きな増幅や再編成は見られなかった。また A H60C とラット肝の遊離核を用いた run on アッセイの実験から、この遺伝子の細胞増殖に特異的な発現は転写段階で制御されていることが明らかとなった。

B b. cDNA クローン p A H64 の解析 (上野孝毅、山本三毅夫、遠藤英也)

このクローンは、そのプラスミドをプローブとして Northern プロットを行なうと A H60C RNA に対して 4.3, 3.6, 1.8, 1.2 k b の 4 本のバンドを形成する。この mRNA の発現は、成熟ラットの肝には見られないが、脳にはみられ、更に胎児肝や新生児の、肝を含め種々の臓器にも発現していた。また、癌に於ける発現も一様ではなく同じ A H シリーズの中でもパターンは異なっていた。一方、プライマー伸長法を用いて、ほぼ全長鎖に近い cDNA が分離され、その構造解析からこのクローンはラットインスリン増殖因子 II (rIGFII) の遺伝子由来のもと同定された。ただこれら cDNA には coding 領域が共通で 5' noncoding 領域の異なるものが得られており、これらが、mRNA の多様性に対応するものと考えられ、目下、遺伝子クローンをとって解析中である。

C. 細胞の不死性獲得に関連した遺伝子発現 (後藤公宣、藤吉利信、遠藤英也)

細胞の不死性獲得は、癌化の前段階として重要なステップであり、それに伴って誘導される遺伝子発現は、癌化の分子機構の解明の手掛かりを与えるものと考えられる。この様な観点からその分離同定を試みた。まず、樹立細胞、Balb/c 3T3 から cDNA ライブラリーを調製し、Balb/c マウスの胎児線維芽細胞 (MEF) mRNA 由来の一本鎖 cDNA をプローブにして、subtraction hybridization を行ない、MEF と比較して Balb/c 3T3 により豊富に発現する cDNA クローンを分離し、その構造分析を行ったところ、得られたクローンのうち 1 つがカルシウム結合蛋白 S100 の遺伝子に近似しており、目下、その詳細を検討中である。

D. ラット肝 α 2u グロブリン mRNA 3' 非翻訳領域に見られる alternative splicing (市吉裕二、山本三毅夫、遠藤英也)

α 2u グロブリンは、雄ラットの肝臓で合成される蛋白であるがその cDNA クローンを多数

解析した結果、この蛋白の mRNA には長さの異なる2 種類のグループ (L と S) が存在することを見出した。これら cDNA の構造分析の結果、L タイプは S タイプに比較して、6 番目のエキソン-イントロン結合部に、25個の塩基が挿入されており、その部分の配列は、ゲノム DNA の第 6 イントロンの5' 側部分の配列と一致した。目下、S 1 ヌクレアーゼ解析により L タイプ S タイプの mRNA の相対量比を成熟雄ラット肝、エストロゲン投与肝について検討中である。

業 績 目 録

原稿論文

1. Suzuki N.,Fujiyoshi T.,Maehara Y.,Takahashi K.,Yamamoto M.and Endo H. : 1986
A new family of LTR-like sequences abundantly expressed in rat tumors.
Nucleic Acid Res, 14:9271-9289
2. Shikata I.,Maehara Y.,Fujiyoshi T.and Endo H. : 1987
Isolation and characterization of a conserved sequence highly expressed in tumors and growing cells.
Oncology 44:192-198
3. Kohnoe S.,Maehara Y.and Endo H.: 1987
A systematic survey of repetitive sequences abundantly expressed in rat tumors.
Biochem Biophys Acta 909:107-114

学会報告

1. Endo,H.Fujiyoshi,T.Maehara,Y.Shikata,I.Nogae,I.
A conserved sequence abundantly expressed in tumor cells.
(The 14 th International Cancer Congress Budapest, August 1986,
Symposium BII; Molecular Biology of Cancer Cell Nuclei)
2. Endo,H.
Sequences abundantly expressed in tumors and growing cells.
(US.-Japan Seminar on "Oncogenes in relation to Developmental and Transcriptional Control" Hawaii, February 1987)
3. 鈴木憲明、藤吉利信、前原喜彦、山本三毅夫、遠藤英也 : 1986
ラット癌に於ける L T R 様塩基配列の特異的発現 (第 4 5 回日本癌学会総会)
4. 上野孝毅、鴻江俊治、市吉裕二、藤吉利信、山本三毅夫、遠藤英也 : 1986
ラット腹水肝癌より単離した onco-fetal cDNA クローンの解析 (Ⅱ) (第 4 5 回日本癌学会総会)
5. 野替一郎、志方出、池尻公二、後藤公宣、藤吉利信、山本三毅夫、遠藤英也 : 1986
癌で発現量の多い cDNA クローンの解析 (第 4 5 回日本癌学会総会)