



|                  |   |
|------------------|---|
| Title            | 分泌型生物発光レポーターを用いた成長ホルモン遺伝子転写活性の連続測定法の開発  |
| Author(s)        | 棚橋, 祐典  |
| Citation         | 北海道大学. 博士(医学) 甲第5032号   |
| Issue Date       | 2000-03-24  |
| DOI              | 10.11501/3168597  |
| Doc URL          | <a href="http://hdl.handle.net/2115/51639">http://hdl.handle.net/2115/51639</a> |
| Type             | theses (doctoral)   |
| File Information | 000000353789.pdf  |



[Instructions for use](#)

①

学 位 論 文

分泌型生物発光レポーターを用いた成長  
ホルモン遺伝子転写活性の連続測定法の  
開発

北 海 道 大 学

棚 橋 祐 典



①

学 位 論 文

分泌型生物発光レポーターを用いた成長  
ホルモン遺伝子転写活性の連続測定法の  
開発

北 海 道 大 学

棚 橋 祐 典



## Abstract

The genetic reporter system has been introduced as a tool for sensitive and convenient monitoring of gene expression. In the present study, the promoter activity of growth hormone (GH) coding gene was sequentially monitored in GH3 cells (rat pituitary adenoma cell-line) by means of bioluminescence which was evoked by a secreted reporter, *Vargula hilgendorfii* (VH) luciferase.

Three kinds of expression plasmid were constructed, which consists of a rat GH promoter fragment and the VH luciferase cDNA, and transfected to GH3 cells. The sensitivity of reporter was revealed to be extremely high from the dose-response curve of VH luciferase. Using the stable transformant, the reporter activity as well as GH were sequentially measured in plate culture. The intracellular dynamics of reporter signals was analyzed through the response to inhibitors of transcription, protein synthesis and vesicle transport, suggesting that the overall time from transcription to secretion was essentially identical for the VH luciferase and GH although the both proteins took different time course at different intracellular stages.

When the GH promoter was activated by triiodothyronine (T3), the reporter activity was increased, and well correlated with the amount of GH mRNA, which indicates a reliability of the reporter system. Furthermore, using the present reporter system, a synergistic effect of T3 and dexamethasone was suggested only on the GH transcription but also on the stability of mRNA.

It is concluded that the bioluminescence reporter system using the VH luciferase was an excellent tool for sequential monitoring of the GH transcriptional activity.

Key words: Luciferase, Bioluminescence reporter, Promoter activity, Growth hormone, Genetic engineering



## 緒言

近年、レポーターアッセイ法による目的遺伝子の転写活性の測定がさかんに行われている。レポーターアッセイ法とは、目的遺伝子のプロモーター下流にレポーター遺伝子を組み込んで、細胞に導入し、目的遺伝子の発現を同時に転写されるレポーター遺伝子の転写活性（レポーター活性）を測定することにより評価する方法である<sup>1)</sup>。なかでも、ホタルルシフェラーゼ（firefly luciferase）や Green fluorescent protein（GFP）などの生物発光を用いたレポーターはその感度のよさ、測定の簡便さから広く用いられている<sup>2)</sup>。一般にルシフェラーゼ発光では、基質ルシフェリンがルシフェラーゼ酵素により酸化される際に、一定量の光量子（フォトン）が放出される。したがって、発光量を測定することにより、ルシフェラーゼ量、すなわちレポーター活性を定量することができる<sup>3-5)</sup>。しかしながら、これまでのアッセイ法では、発光反応が細胞内で生じるため、レポーター活性を測定するには細胞を破碎しなければならず、同一細胞において経時的に測定することが困難であった。また、細胞内の発光反応を画像解析で評価することが試みられているが<sup>6-9)</sup>、その場合には大量の基質（ルシフェリン）を投与しなければならず、細胞膜の通過性やルシフェリンの細胞毒性、細胞内因子による発光反応の修飾などの問題<sup>10-12)</sup>があり、実用化に至っていない。

本研究は、レポーター蛋白が細胞外へ分泌される分泌型ルシフェラーゼ、ウミボタルルシフェラーゼ（*Vargula hilgendorffii* Luciferase）を利用し、同一細胞を用いて遺伝子発現を連続的に測定することを目的とした新しい分子生物学的方法論の確立を目指すものである。ウミボタルは海洋中の発光小動物であり、その発光反応は種特異的なルシフェリン・ルシフェラーゼ反応であることが明らかになっている<sup>13)</sup>。ウミボタルルシフェラーゼは遺伝子クローニングによってその配列にシグナルペプチド部位を持つ分泌型の蛋白であることが知られており<sup>14)</sup>、このルシフェラーゼ遺伝子が導入された細胞は細胞外にルシフェラーゼを分泌する。したがって、細胞外液中のルシフェラーゼ活性を測定することにより、合成されたルシフェラーゼ量すなわち遺伝子転写活性を評価できる<sup>15)</sup>。

本研究では、ウミボタルルシフェラーゼのレポーターをラット下垂体腫瘍株



化細胞 (GH3)<sup>16)</sup> に導入し、成長ホルモン (GH) 遺伝子発現を連続的にモニターするシステムを開発した。GH3 は GH および prolactin を分泌する cell-line であり、GH 遺伝子発現メカニズムを解明する研究に広く利用されている。生物発光レポーターシステムは、ラット GH プロモーターの下流にウミボタルルシフェラーゼ cDNA を組み込んだプラスミドを GH3 細胞に導入をして作成した。GH 遺伝子の転写活性は培養液中のレポーター活性を連続的にモニターすることによって測定した。同時に GH や GH mRNA を測定することにより、レポーター遺伝子の GH プロモーター活性と内因性 GH 遺伝子の転写活性を比較検討した。また、レポーターの細胞内動態を明らかにするために、遺伝子転写から分泌に至る過程の各段階で阻害剤を作用させ、レポーター活性の経時的変化を測定した。一方、GH の産生に促進的に影響を及ぼす因子としては甲状腺ホルモンが知られており、転写調節因子であるステロイドホルモン受容体スーパーファミリーに属する受容体と結合し、成長ホルモン遺伝子の転写活性に影響を及ぼすことが明らかになっている。さらに、甲状腺ホルモンとグルココルチコイドとの GH 産生に対する協調作用はよく知られているが、その作用機序については議論がある。本研究ではこのレポーターシステムを用いて、これらについての検討を加えた。

## 材料と方法

### 1. 細胞培養

実験には 15% ウマ血清と 2.5% 胎児ウシ血清 (penicillin 100U/ml, streptomycin 100  $\mu$ g/ml を含む) を含む Ham's F10 (GIBCO BRL) にて継代培養した GH3 細胞 (Human Science research Bank JCRB9047) を用いた。維持培養では、5%CO<sub>2</sub>、37°C の培養条件下で、3 - 4 日毎に培養液の交換をおこなった。遺伝子導入およびルシフェラーゼ活性測定実験では、無血清培養液 Opti-MEM1 (GIBCO BRL) を用いた。

### 2. 発光 (ルシフェラーゼ活性) 測定

ルシフェラーゼのレポーター活性はルシフェリン・ルシフェラーゼ反応で生



じた光量子量を測定することで定量した。測定の直前に基質ルシフェリンを 0.01M Tris-HCl バッファーにて 0.4 ng/ $\mu$ l に調製した。培養液サンプル 50  $\mu$ l を 96-well ルミノプレート(Labsystems)に移し、基質ルシフェリンを 50  $\mu$ l 添加した際の発光をルミノメーター(ATTO JNR-2000)にて測定した。添加後、20 秒間の発光量 (cps; counts/second)を連続測定し、その最大値をレポーター活性 (RLU; relative light unit)とした。

ウミボタルルシフェラーゼの標準溶液は、ウミボタルより抽出、精製したルシフェラーゼ<sup>17)</sup>を用いて調製した。

### 3. プラスミドの作製

ラット GH 5'側上流領域の配列 (Gene Bank No. X1269) を参照してプライマーを作成し、ラットゲノム DNA (Clontech) から PCR 法にて3種のプロモーター領域を増幅した (Fig. 1A)。それぞれのプロモーターの長さは GH-1 promoter が 1.8kb で GH 遺伝子の転写開始点を含む領域, GH-2 promoter が 1.6kb, GH-3 promoter が 1.4kb の DNA 領域であった。最も長い GH-1 promoter 領域には, GH 転写開始点より上流約 170bp 付近に甲状腺ホルモン応答配列(TRE)<sup>18) 19)</sup>, さらに 3'側の2カ所には Pit-1 結合部位<sup>20)</sup>が存在する。3種の増幅した DNA 領域を制限酵素 *Spe*I, *Hind*III で切断し、ウミボタルルシフェラーゼ cDNA (1.8kb) を含む pSV2-VL<sup>15)</sup> の SV40 promoter を欠失させた部位に挿入した。これらのプラスミドをそれぞれ pGH-1-VL, pGH-2-VL, pGH-3-VL と名付けた。

Fig. 1B はプラスミド pGH-1-VL の構造模式図である。プライマー GHf (AGT TAC TAG TAG GAA TGA ATT CTT) と GHr (CTT TAC CTG AAG CTT TCG CCA CT)を用いて増幅した DNA 断片(1.8kb)をウミボタルルシフェラーゼ cDNA の上流に挿入した。

### 4. GH3 細胞への遺伝子導入

#### 1) 一過性発現 (transient)

60mm plate を用い 70% confluent の状態に増殖させた GH3 細胞に pGH-1-VL, pGH-2-VL, pGH-3-VL あるいは pSV2-VL をリポフェクション法により導入した。各プラスミド 2  $\mu$ g と lipofectamine (GIBCO BRL) 10  $\mu$ l を GH3 細胞



に添加した. 対照実験として lipofectamine のみの添加を同様条件下でおこなった. プラスミド添加 48 時間後に培養液を交換し, さらに 24 時間培養した. 培養終了後, 培養液中のルシフェラーゼ活性を測定した.

## 2) 安定発現 (stable)

60 mm plate 70% confluent の GH3 細胞に pGH-1-VL 4  $\mu\text{g}$  およびネオマイシン耐性遺伝子を含む pcDNA3 (Invitrogen) 0.5  $\mu\text{g}$  (量比 8:1) を lipofectamine PLUS (GIBCO BRL) とともに添加した. プラスミド添加 48 時間後にネオマイシン (Geneticin; GIBCO BRL) 400  $\mu\text{g}/\text{ml}$  を含む培養液に交換し, 約 3 週間後にネオマイシン耐性コロニーを得た. さらに継代培養し, 60 mm plate 70% confluent で, 24 時間培養後に培養液中のルシフェラーゼ活性を測定し, ルシフェラーゼ安定発現株 (*vl*-GH3) を選択した.

## 5. プレート培養

6-well plate (poly-L-ornithine coated)を用いて, 約  $10^5$  cell/well の *vl*-GH3 細胞を 10 - 14 日間 3 ml の培養液中にて培養した.

各 well の培養液を同量の無血清培養液に交換し, その後 1 時間毎に全置換し, 8 時間まで繰り返した. 回収した培養液中のルシフェラーゼ活性および GH 量を測定した.

レポーターの細胞内動態を調べる実験では, 転写阻害剤 camptothecin (SIGMA) を dimethylsulfoxide(DMSO)にて 10mM 溶液とし, 実験日に無血清培養液にて最終濃度 20  $\mu\text{M}$  に調製した. 同様に, 蛋白合成阻害剤 cycloheximide (SIGMA) は 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , 分泌蛋白輸送阻害剤 brefeldin A (Wako)は 70%エタノールで溶解し 5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  になるように調製した. 各阻害剤を投与する 1 時間前に培養液を無血清培養液に交換し(pre-incubation), その後, 阻害剤を含む培養液で培養した. 培養液は 1 時間毎に全置換し, 8 時間まで繰り返した.

GH 転写活性を刺激する実験では, T3 (SIGMA)および dexamethasone (SIGMA)を用いた. T3 は 10  $\mu\text{M}$  保存溶液を作製し, 実験開始直前に 10 nM に調製した. 実験開始 48 時間前に 90%コンフルエントな 6-well plate 中の *vl*-GH3 細胞の培養液を無血清培養液と交換した (pre-incubation). その後, 対照群と T3 (10nM)



添加群に分け、4時間、8時間ないし24時間の培養をおこない、培養終了後、培養液を回収してルシフェラーゼ活性およびGH量を測定した。また、24時間培養後の $\nu$ -GH3細胞を剥離しRNA抽出をおこない、GH mRNAをノーザンブロット法で測定した。24時間の培養において、対照群およびT3添加群のルシフェラーゼ活性、GHmRNA量、GH量の各値についてそれぞれの相関をとった。同様に、T3とデキサメサゾン(1  $\mu$ M)を含む培養液にて、 $\nu$ -GH3細胞を24時間培養した後に培養液中のルシフェラーゼ活性およびGH量を測定した。

## 6. GH 測定

培養液中のラットGHは酵素抗体法(EIA)により測定した。使用した抗体は、National Hormone & Pituitary Program (NIDDKD)により供与された。培養液サンプル50  $\mu$ lを抗GHウサギ血清で処理した後、ペルオキシダーゼ結合GHを反応させ、基質添加後の酵素反応を吸光度測定により定量化した。この系における最小測定限界は12.5 pg/wellであり、アッセイ間、アッセイ内変動はそれぞれ4.0%および8.5%であった。

## 7. RNA 抽出およびノーザンブロット法

$\nu$ -GH3細胞のRNAをISOGEN(NipponGene)により抽出した。ノーザンブロット法はジゴキシゲニン標識によるDIG system (Roche Diagnostics)<sup>21)</sup>によりおこなった。RNA(各10  $\mu$ g)をホルマリン変性ゲルにて電気泳動し、ナイロンメンブレンフィルターにブロッティングした後、55°Cで一晩ハイブリダイゼーションをおこなった。Rat GHプローブには、pBR322-GH<sup>22)</sup>のHindIII切断フラグメント(800bp)をジゴキシゲニンで標識して用いた。Rat GH mRNAは、CSPD (TROPIX, Inc.) 化学発光によるオートラジオグラフィフィルム上のシグナル強度をデンストメトリーで定量し、18S, 28S ribosomal RNAで標準化した(Fig. 7A)。

## 8. 統計学的検定

有意差検定は、Student's *t*-testによりおこなった。培養液中ルシフェラーゼ活



性および GH の経時変化の検定は重複測定分散分析法(repeated measure ANOVA)を用いた。ルシフェラーゼ活性、GH mRNA および GH の相関においては、回帰直線を単回帰分析によって導き、相関関係の検定はピアソンの相関係数の検定を用いた。

## 結果

### 1. ルシフェラーゼ量と発光量との相関

標準ウミボタルルシフェラーゼを用いて、生物発光の容量応答曲線を得た (Fig. 2)。発光量はルシフェラーゼ量と強く相関し、ルシフェラーゼ  $5 \times 10^{-2}$  から 50 fg の範囲で直線性が得られた。

### 2. GH3 細胞へのレポーター遺伝子導入

#### 1) 一過性発現によるプロモーター活性の測定

本研究で構築したプラスミド pGH-1-VL, pGH-2-VL, pGH-3-VL および pSV2-VL を GH3 細胞へ導入し、ルシフェラーゼ活性を測定した (Fig. 3A)。すべての遺伝子導入細胞において、培養液中にルシフェラーゼ活性を認めた。しかしながら、導入したプロモーターの相違により発光量には差異が認められ、pGH-1-VL は  $7.5 \times 10^6$  counts/sec. と、他の導入細胞の 10 - 20 倍の発光量を示した。この結果より、pGH-1-VL を用いてルシフェラーゼ安定発現株を作成した。

#### 2) ルシフェラーゼ安定発現株の選択

GH3 細胞へ pGH-1-VL を導入し、ネオマイシン耐性選択スクリーニングにより、53 個のクローンを得た。これらのクローンには増殖速度に若干の差異はあったものの、形態的な変化はみられなかった。得られたクローンについて 24 時間培養液中のルシフェラーゼ活性を測定した (Fig. 3B)。この結果、発光を認めたクローンは、53 個中 43 個であった。この中で最も発光量の大きかった clone No. 2 ( $3.1 \times 10^6$  cps) をルシフェラーゼ安定発現 GH3 細胞 (vl-GH3) として以降の実験に用いた。



### 3. プレート培養におけるルシフェラーゼ活性および GH の経時的変化

同一 well から得られた 1 時間毎の培養液中ルシフェラーゼ活性および GH 量の変化を標準化し、6 well の平均値として Fig. 4 に示した。各 well のルシフェラーゼ活性は  $1 - 5 \times 10^5$  cps, GH 量は 20 - 60 ng/ml の範囲で変動した。連続 8 時間の培養において、GH 量はほぼ一定 (ANOVA; NS) であるのに対して、ルシフェラーゼ活性は培養開始後 2 時間まで増加し (ANOVA;  $p < 0.05$ )、その後はわずかに増加傾向を示した。

### 4. 各種阻害剤によるルシフェラーゼ活性および GH の経時的変化

Fig. 5 に転写阻害剤(camptothecin), 蛋白合成阻害剤(cycloheximide)および分泌蛋白輸送阻害剤(brefeldin A)による培養液中のルシフェラーゼ活性および GH 量の 1 時間毎の変化を示す。Brefeldin A は分泌蛋白のゴルジ体への輸送を阻害する薬物<sup>23)</sup>であり、ルシフェラーゼ活性および GH 量はともに投与後 2 時間までにほとんど消失した。一方、蛋白合成阻害剤<sup>24)</sup>である cycloheximide の投与では、ルシフェラーゼ活性は徐々に低下し 8 時間後には対照群の約 50%までに低下したのに対して、GH 量は 2 時間後にはほぼ完全に消失した。Camptothecin はトポイソメラーゼ I の阻害剤で、トポイソメラーゼ I と DNA 鎖の結合を修飾することにより転写を抑制する<sup>25)</sup>。Camptothecin 投与により、ルシフェラーゼ活性は投与開始 5 時間後まで、GH 量は 4 時間後まで変化しなかった。その後ルシフェラーゼ活性は対照群の 75%、GH 量は 65%まで減少した。

### 5. T3 刺激によるルシフェラーゼ活性, GH mRNA 量, GH 分泌量の反応

Fig. 6 に T3 (10nM) を投与した 4 時間, 8 時間および 24 時間後の培養液中ルシフェラーゼ活性および GH 量を示す。ルシフェラーゼ活性および GH 量とも培養時間が長くなるにつれて増加したが、ルシフェラーゼ活性は 8 時間では有意な増加はなく、24 時間で対照群に対し有意差を認めた。一方、GH 量は T3 添加 8 時間後で有意に増加し、24 時間後にはさらに増加した。対照群に対する増加率は常に GH 量がルシフェラーゼ活性よりも大きかった。

T3 投与 24 時間後の培養液中のルシフェラーゼ活性, GH 量および GH mRNA



量を Fig. 7B に示す. いずれも対照群に対し有意な増加を認めた. ルシフェラーゼ活性と GH mRNA 量の増加率はそれぞれ 1.7 倍, 1.8 倍であったのに対して, GH 量の増加率は 2.5 倍であった.

ルシフェラーゼ活性, GH mRNA および GH 量には, 有意な正の相関があった (Fig. 8). ルシフェラーゼ活性と GH 量との相関係数は 0.821 であり, ルシフェラーゼ活性と GH mRNA, GH 量と GH mRNA との相関係数はそれぞれ 0.655, 0.702 であった.

#### 6. T3 とデキサメサゾンの GH 遺伝子転写活性に対する協調作用

デキサメサゾンと T3 の併用投与はルシフェラーゼ活性および GH 量ともに T3 単独投与に比較し, 有意に増加した (Fig. 9). しかし, その増加率は GH 量では約 38%, ルシフェラーゼ活性では約 19% であった. また, デキサメサゾン単独投与ではルシフェラーゼ活性および GH 量に有意な増加を認めなかった (未発表データ).

### 考察

生物発光は鋭敏かつ簡便なレポーターとして, 遺伝子の機能解析に利用されているが, 同一細胞において経時的な変化をモニターした例は少ない. これまで分泌型ウミボタル発光系は, 蛋白分泌のリアルタイムの画像解析<sup>26)</sup> および胚細胞における遺伝子導入のマーカー<sup>27)</sup> として応用されてきた. しかしながら, 特定の目的遺伝子の遺伝子発現を連続的にモニターすることは未だ報告されていない. 本研究は生物発光の利点を生かし, 同一細胞において遺伝子転写活性の経時的なモニタリングを可能にしたはじめての研究である.

今回作成したウミボタル発光系は, その容量応答曲線 (Fig. 2) から, 極めて高感度であることが示された. 最小測定可能値はおよそ 0.05 fg であり, この感度はアルカリフォスファターゼ (AP) の 33 fg<sup>28)</sup> およびホタルルシフェラーゼの 3.1 fg<sup>2)</sup> に対しておよそ 100 - 600 倍となる. また, ウミボタルルシフェラーゼによる発光はホタルルシフェラーゼの瞬時発光<sup>2)</sup> に比較して, 持続し安定である. これらの特性はウミボタルルシフェラーゼの発光酵素としての高い代謝回転数



(1600 molecule/min)<sup>13)</sup> によるものと思われる。

GH3 細胞への遺伝子導入によるルシフェラーゼ活性の発現量は GH プロモーター領域の差に依存していた (Fig. 3A)。pGH-1-VL における発現量が他に比べて非常に大きかったことは、GH-2 promoter および GH-3 promoter 領域には含まれない GH-1 promoter 領域に転写を制御する部位が存在している可能性を示す。また、汎用プロモーター SV40 promoter を持つ pSV2-VL<sup>15)</sup> によるルシフェラーゼ活性の発現量が pGH-2-VL、pGH-3-VL による発現量とほぼ同様であったことから、pGH-1-VL における強いプロモーター活性は下垂体由来の GH3 細胞に特異的な因子によるものと考えられる。Pit-1(GHF-1)は下垂体特異的な転写因子で、GH 遺伝子の上流に結合し、転写を高める作用がある<sup>29)</sup>。GH プロモーター上の Pit-1 結合部位は転写開始点より-80bp 付近と-120bp 付近の 2 カ所である<sup>20)30)</sup> (Fig. 1A)。したがって、Pit-1 結合部位をもたない GH-3 promoter (pGH-3-VL)のプロモーター活性が低いことには Pit-1 が関連しているかもしれない。しかしながら、Pit-1 結合部位を持つ pGH-2-VL も活性が低いことから、他のプロモーター領域が転写調節にかかわっていることも否定できない。

同一細胞におけるルシフェラーゼ活性および GH 量の経時変化 (Fig. 4) をみた実験では、ルシフェラーゼ活性は徐々に増加した。この増加は頻回の培養液の交換による細胞の刺激により、ルシフェラーゼの合成、分泌が高まったためかもしれない。一方、GH 分泌量はほぼ一定であった。Lapp ら<sup>31)</sup> は、GH3 細胞の灌流系における GH 分泌量の経時変化から GH 分泌には自己分泌あるいは傍分泌のフィードバックメカニズムがあることを示唆した。本培養系においても、GH 分泌に関し、負のフィードバック制御がはたらき、1 時間で平衡状態に達した可能性がある。

ウミボタルルシフェラーゼの細胞内動態についての検討 (Fig. 5) では、ゴルジ体への分泌蛋白輸送を阻害する brefeldin A によって、2 時間以内にルシフェラーゼ活性および GH 量がほとんど消失した。これは、ルシフェラーゼおよび GH がともに共通の分泌過程を持ち、そのプロセスは比較的短時間であることを示唆する。一方、蛋白合成阻害剤である cycloheximide は、GH 量を約 2 時間で完全に阻害するのに対して、ルシフェラーゼ活性は徐々に阻害した。この反応性の違いは、ルシフェラーゼと GH との細胞内での代謝回転を反映してい



ると考えられる。この GH の比較的速い代謝回転は、分泌顆粒が非常に少なく細胞内に少量の蛋白プールしかないという GH3 細胞の特徴<sup>32) 33)</sup> に一致するものである。また、cycloheximide 投与後のルシフェラーゼ活性の減衰過程から、ウミボタルルシフェラーゼ蛋白の細胞内での半減期はおよそ 2-3 時間であると推定される。これは、ホタルルシフェラーゼの半減期<sup>34)</sup> とほぼ一致する。さらに、ルシフェラーゼ活性および GH 量ともに camptothecin の阻害作用があらわれるまでに 4-5 時間かかったが、その後の経過はほぼ同様であった。この事実とルシフェラーゼの代謝回転が GH よりも遅いことを考え合わせると、ルシフェラーゼ mRNA の半減期は GH mRNA の半減期<sup>35)</sup> よりも短いことが予想される。したがって、ウミボタルルシフェラーゼと GH とは異なる細胞内動態をもつが、転写から蛋白合成、分泌へと至る過程に要する時間はほぼ同じであると考えられる。

GH 遺伝子の転写活性を促進させる因子としてよく知られているものに甲状腺ホルモン(T3)がある。T3 は核内レセプター(TR)を介して、GH 遺伝子上流に存在する TRE に結合し GH 遺伝子の転写活性を高める<sup>36-38)</sup> とされる。GH-1 promoter 領域に TRE が存在することから予想されたように、T3 はルシフェラーゼ活性を増加させた (Fig. 6,7) 。しかし、T3 投与後の GH mRNA とルシフェラーゼ活性の増加率が対照群に対して 1.7 - 1.8 倍であったのに対し、GH 量の増加率は 2.5 倍と、T3 に対する反応性に差異がみられた。合成される蛋白の量は遺伝子の転写で生じる mRNA の量だけではなく、生じた mRNA の半減期 (安定性) によっても変化する。したがって、ルシフェラーゼ活性と GH mRNA の増加率がほぼ同じであったことから、反応性にみられた差異は遺伝子転写量の差異ではなく、生じた mRNA の半減期の差に起因していると考えられる。すなわち、GH mRNA の半減期がルシフェラーゼ mRNA の半減期よりも長いことを示していると思われる。これは阻害剤を用いた実験結果とも一致する。Fig. 8 に示すように、T3 投与前後のルシフェラーゼ活性と GH mRNA 量には有意な相関がみられた。この結果からも、ルシフェラーゼ活性が GH 遺伝子転写活性のマーカーとして有用なことが示される。

GH 遺伝子の転写および GH 合成に対する甲状腺ホルモンと糖質コルチコイド (デキサメサゾン) の協調作用はよく知られている<sup>39-41)</sup> 。しかしながら、デ



キサメサゾンの作用が転写活性の促進にあるのか、転写後の mRNA 安定化にあるのかは議論がある<sup>19)</sup>。Fig. 9 に示すように、T3 の存在下で、デキサメサゾンは GH 転写活性を反映するルシフェラーゼ活性を増強したが、そのルシフェラーゼ活性の増加率は GH 量の増加率よりも低かった。この結果から、デキサメサゾンは GH 遺伝子の転写促進だけではなく、GH mRNA の安定性にも関与していると思われる。

以上、*vl*-GH3 細胞の培養液中ルシフェラーゼ活性は GH 転写活性を反映し、しかも同一 well で繰り返し測定することが可能なことから、遺伝子転写活性の経時的解析に極めて有用であり、本研究により作成した生物発光レポーターシステムは GH 遺伝子発現の調節機能を解明する上で強力な手段になると思われる。

#### 結語

1. 分泌型ウミボタルルシフェラーゼ cDNA の上流に GH プロモーターを挿入したプラスミドを構築し、GH3 細胞に導入して安定発現株 (*vl*-GH3) を得た。
2. ウミボタルルシフェラーゼ発光系の感度は従来のレポーター系と比較し、100 - 600 倍と極めて高いことが示された。
3. *vl*-GH3 細胞の培養液中のルシフェラーゼ活性は GH 遺伝子転写活性を反映し、同一細胞での転写活性の経時変化を追うことが可能となった。
4. 各種阻害剤を用いたレポーターの細胞内動態の解析により、ウミボタルルシフェラーゼと GH は異なる細胞内動態を示すが、転写から分泌に至る過程に要する時間はほぼ等しいことが示唆された。
5. GH 遺伝子発現は T3 およびデキサメサゾンにより亢進したが、デキサメサゾンは GH 遺伝子の転写活性を促進するだけではなく、GH mRNA の安定化にも関与していることが推測された。



## 謝辞

本研究を行うにあたり、ご指導と論文のご校閲を賜りました北海道大学医学部統合生理学講座 本間研一教授ならびに直接実験のご指導をいただきました同講座 本間さと助教授、また GH 測定に関してご助言をいただきました同講座 勝野由美子助手に深謝いたします。また、生物発光について貴重なご助言を終始いただきました静岡大学教育学部 近江谷克裕助教授ならびにウミボタルルシフェリンを提供いただきました名古屋大学大学院生物農学研究科 中村英士教授に心よりお礼を申し上げます。

最後になりましたが、基礎研究の機会を与えていただきました北海道大学医学部小児科学講座 小林邦彦教授ならびに同講座 藤枝憲二講師に深く感謝いたします。



## References

1. Alam J, Cook JL (1990): Reporter genes: application to the study of mammalian gene transcription. *Anal Biochem* 188: 245-254.
2. Bronstein I, Fortin J, Stanley PE, Stewart GS, Kricka LJ (1994): Chemiluminescent and bioluminescent reporter gene assays. *Anal Biochem* 219: 169-181.
3. Brasier AR, Ron D (1992): Luciferase reporter gene assay in mammalian cells. *Methods Enzymol* 216: 386-397.
4. Pardy K (1994): Reporter enzymes for the study of promoter activity. *Mol Biotech* 2: 23-27.
5. Ford SR, Leach FR (1998): Improvements in the application of firefly luciferase assays. *Methods Mol Biol* 102: 3-20.
6. Frawley LS, Faught WJ, Nicholson J, Moomaw B (1994): Real time measurement of gene expression in living endocrine cells. *Endocrinology* 135: 468-471.
7. Castano JP, Kineman RD, Frawley LS (1996): Dynamic monitoring and quantification of gene expression in single living cells: a molecular basis for secretory cell heterogeneity. *Mol Endocrinol* 10: 599-605.
8. Villalobos C, Faught WJ, Frawley LS (1998): Dynamic changes in spontaneous intracellular free calcium oscillations and their relationship to prolactin gene expression in single, primary mammatropes. *Mol Endocrinol* 12: 87-95.



9. Takasuka N, White MR, Wood CD, Robertson WR, Davis JR.R (1998): Dynamic changes in prolactin promoter activation in individual living lactotrophic cells. *Endocrinology* 139: 1361-1361.
10. Craig FF, Simmonds AC, Watmore D, McCapra F, White MR (1991): Membrane-permeable luciferin esters for assay of firefly luciferase in live intact cells. *Biochem J* 276: 637-641.
11. Gandelman O, Allue I, Bowers K, Cobbold P (1994): Cytoplasmic factors that affect the intensity and stability of bioluminescence from firefly luciferase in living mammalian cells. *J Biolumin Chemilumin* 9: 363-371.
12. Lembert N, Idahl LA (1995): Regulatory effects of ATP and luciferin on firefly luciferase activity. *Biochem J* 305: 929-933.
13. Simomura O, Johnson FH, Masugi T (1969): Cypridina bioluminescence: Light-emitting oxyluciferin-luciferase complex. *Science* 164: 1299-1300.
14. Thompson EM, Nagata S, Tsuji FI (1989): Cloning and expression of cDNA for the luciferase from the marine ostracod *Vargula hilgendorffii*. *Proc Natl Acad Sci USA* 86: 6567-6571.
15. Thompson EM, Nagata S, Tsuji FI (1990): *Vargula hilgendorffii* luciferase: a secreted reporter enzyme for monitoring gene expression in mammalian cells. *Gene* 96: 257-262.
16. Tashjian AH J, Yasumura Y, Levine L, Sato GH, Parker ML (1968): Establishment of clonal strains of rat pituitary tumor cells that secrete growth hormone. *Endocrinology* 82: 342-352.



17. Tsuji FI, Lynch RV, Stevens CL (1974): Some properties of luciferase from the bioluminescent crustacean, *Cypridina hilgendorffii*. *Biochemistry* 13: 5204-5209.
18. Brent GA, Williams GR, Harney JW, Forman BM, Samuels HH, Moore DD, Larsen PR (1991): Effects of varying the position of thyroid hormone response elements within the rat growth hormone promoter: implications for positive and negative regulation by 3,5,3'-triiodothyronine. *Mol Endocrinol* 5: 542-548.
19. Tuggle CK, Trenkle A (1996): Control of growth hormone synthesis. *Domest. Anim Endocrinol* 13: 1-33.
20. Lira SA, Kalla KA, Glass CK, Drolet DW, Rosenfeld MG (1993): Synergistic interactions between Pit-1 and other elements are required for effective somatotroph rat growth hormone gene expression in transgenic mice. *Mol Endocrinol* 7: 694-701.
21. Lanzillo JJ (1991): Chemiluminescent nucleic acid detection with digoxigenin-labeled probes: a model system with probes for angiotensin converting enzyme which detect less than one attomole of target DNA. *Anal Biochem* 194: 45-53.
22. Martial JA, Seeburg PH, Guenzi D, Goodman HM, Baxter JD (1977): Regulation of growth hormone gene expression: synergistic effects of thyroid and glucocorticoid hormones. *Proc Natl Acad Sci USA* 74:4293-4295.
23. Orci L, Tagaya M, Amherdt M, Perrelet A, Donaldson JG, Lippincott-Schwartz J, Klausner RD, Rothman JE (1991): Brefeldin A, a drug that blocks secretion, prevents the assembly of non-clathrin-coated buds on Golgi cisternae. *Cell* 64: 1183-1195.



24. Jimenez A (1976): Inhibitors of translation. *Trends Biochem Sci* 1: 28-30.
25. Stewart AF, Schutz G (1987): Camptothecin-induced in vivo topoisomerase I cleavages in the transcriptionally active tyrosine aminotransferase gene. *Cell* 50: 1109-1117.
26. Inouye S, Ohmiya Y, Toya Y, Tsuji FI (1992): Imaging of luciferase secretion from transformed Chinese hamster ovary cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 89: 9584-9587.
27. Thompson EM, Adenot P, Tsuji FI, Renard JP (1995): Real time imaging of transcriptional activity in live mouse preimplantation embryos using a secreted luciferase. *Proc Natl Acad Sci USA* 92: 1317-1321.
28. Bronstein I, Martin CS, Fortin JJ, Olesen CE, Voyta JC (1996): Chemiluminescence: sensitive detection technology for reporter gene assays. *Clin Chem* 42: 1542-1546.
29. Suen CS, Chin WW (1993): Ligand-dependent, Pit-1/growth hormone factor-1 (GHF-1)-independent transcriptional stimulation of rat growth hormone gene expression by thyroid hormone receptors in vitro. *Mol Cell Biol* 13: 1719-1727.
30. Schaufele F, West BL, Baxter JD (1992): Synergistic activation of the rat growth hormone promoter by Pit-1 and the thyroid hormone receptor. *Mol Endocrinol* 6: 656-665.
31. Lapp CA, Tyler JM, Lee YS, Stachura ME (1989): Autocrine-paracrine inhibition of growth hormone and prolactin production by GH3 cell-conditioned medium. *In Vitro Cell Dev Biol* 25: 528-534.



32. Tashjian AH Jr (1979): Clonal strains of hormone-producing pituitary cells. *Methods Enzymol* 58: 527-535.
33. Stachura ME, Lapp CA, Tyler JM, Lee YS (1990): Medium flow rate modulates autocrine-paracrine feedback of GH and PRL release by perfused GH3 cells. *In Vitro Cell Dev Biol* 26: 482-492.
34. Thompson JF, Hayes LS, Lloyd DB (1991): Modulation of firefly luciferase stability and impact on studies of gene regulation. *Gene* 103: 171-177.
35. Yaffe BM, Samuels HH (1984): Hormonal regulation of the growth hormone gene. Relationship of the rate of transcription to the level of nuclear thyroid hormone-receptor complexes. *J Biol Chem* 259: 6284-6291.
36. Crew MD, Spindler SR (1986): Thyroid hormone regulation of the transfected rat growth hormone promoter. *J Biol Chem* 261: 5018-5022.
37. Flug F, Copp RP, Casanova J, Horowitz ZD, Janocko L, Plotnick M, Samuels HH (1987): cis-acting elements of the rat growth hormone gene which mediate basal and regulated expression by thyroid hormone. *J Biol Chem* 262: 6373-6382.
38. Brent GA, Moore DD, Larsen PR (1991): Thyroid hormone regulation of gene expression. *Annu Rev Physiol* 53: 17-35.
39. Dobner PR, Kawasaki ES, Yu LY, Bancroft FC (1981): Thyroid or glucocorticoid hormone induces pre-growth-hormone mRNA and its probable nuclear precursor in rat pituitary cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 78: 2230-2234.



40. Spindler SR, Mellon SH, Baxter JD (1982): Growth hormone gene transcription is regulated by thyroid and glucocorticoid hormones in cultured rat pituitary tumor cells. *J Biol Chem* 257: 11627-11632.
41. Nyborg JK, Nguyen AP, Spindler SR (1984): Relationship between thyroid and glucocorticoid hormone receptor occupancy, growth hormone gene transcription, and mRNA accumulation. *J Biol Chem* 259: 12377-12381.



## Figure legends

Fig.1. (A) Cloned GH promoter fragments (GH-1 – GH-3). Three fragments of rat GH 5'-flanking region were cloned by PCR amplification of rat genomic DNA. The amplified DNA fragments were digested with *SpeI* and *HindIII* and separately cloned into expression plasmids, which were named pGH-1-VL, pGH-2-VL, pGH-3-VL. pSV2-VL was used as a control plasmid, which consists of SV40 early region promoter and VH luciferase cDNA. A closed arrow represents thyroid hormone response element (TRE), which is located at -188 to -165 bp from the transcription initiation site. Open arrows represent two DNA-binding sites of Pit-1.

(B) Construct of VH luciferase reporter plasmid (pGH-1-VL).

1.8kb of GH 5'-flanking region (*SpeI-HindIII* fragment) was fused to the upstream of VH luciferase (1.8kb).

Fig.2. VH luciferase-luminescence calibration curve (log-log scale).

A dose-response curve was obtained for the purified VH luciferase ( $5 \times 10^4$  –  $5 \times 10^3$  fg).

Fig.3. (A) Transient expressions of VH luciferase. Two days after transfection, the GH3 cells on 60mm plate were replaced with 5ml of serum-free medium and incubated for 24 hours. The sample medium was collected and assayed for luminescence.



(B) Expressions of VH luciferase in stable transformants. Three-four weeks after stable transfection, isolated colonies in 60mm plate were incubated with 5 ml of serum-free medium for 24 hours. Luminescence in the medium was measured. (⊕) represents the selected colony (colony No.2) with the most intense luminescence.

Fig.4. Sequential measurements of the reporter activity (RLU) and GH secretion in vI-GH3 cells for 8 hours.

vI-GH3 cells in 6 well plates were incubated with 3 ml of serum-free medium. The incubation medium was thoroughly exchanged with fresh one every an hour. The collected medium was supplied for the determination of reporter activity and GH. The results were showed as the mean of 6 wells. Reporter activity (—●—) and GH (--O--) in each well were standardized with the maximum values as 100%. Each point represents the mean  $\pm$  SEM (n=6).

Fig.5. Effects of camptothecin (20  $\mu$ M), cycloheximide (1  $\mu$ g/ml) and brefeldin A (5  $\mu$ g/ml) on the reporter activity (A) and GH secretion (B) in plate culture.

Pre-incubation with serum-free medium was performed for 1 hour before application of inhibitor. The incubation medium was exchanged every 1 hour up to 8 hours and assayed for the reporter activity and GH. The results were standardized with the values in the pre-incubation as 100%. (—●—); camptothecin, (--O--); cycloheximide, (--▲--); brefeldin A. Each point represents the mean  $\pm$  SEM (n=6).



Fig.6. Time courses of the reporter activity (RLU) and GH secretion after T3 application in plate culture.

*v/l*-GH3 cells in 6 well plates were incubated with 3 ml of serum free medium containing T3 (10nM) for 4,8 and 24 hours. The control medium contained the same amount of vehicle. The reporter activity (—●—) and GH (--O--).

Each data is shown as the fold-induction over the mean control value, and represented by the mean  $\pm$  SEM (n=8).

\* (p<0.05), \*\* (p<0.01) vs. control (*t* test).

Fig.7. (A) Northern blot analysis for the determination of GH mRNA.

Northern blotting was carried out with 10 $\mu$ g of total RNA from *v/l*-GH3 cells incubated for 24 hr with 10nM T3. The blots were hybridized with DIG-labeled cDNA probe for GH. The lower panel shows the ribosomal RNAs (rRNA), stained with ethidium bromide.

(B) Effects of T3 on the reporter activity (VL), GH mRNA and GH secretion (GH).

*v/l*-GH3 cells in 6 well plates were incubated in the absence (open column) and presence (shaded column) of T3 (10nM) for 24 hours. Each value is expressed by the fold-induction over the mean control value (mean  $\pm$  SEM) (n=6).

\* (p<0.05), \*\* (p<0.01) vs. control (*t* test).



Fig.8. Correlations between the reporter activity, GH mRNA and GH secretion in 24 hour incubation.

*v/l*-GH3 cells in 6 well plates were incubated in the absence (n=6) and presence (n=6) of T3 (10nM) for 24 hours. The panels show correlations between the reporter activity and GH mRNA (A) (n=12), and between the reporter activity and GH secretion (B) (n=12).

Regression lines were drawn in the graphs. The correlation coefficient between the reporter activity and GH was  $r=0.821(p<0.01)$ , that between the reporter activity and GH mRNA was  $r=0.655(p<0.05)$ , and that between GH and GH mRNA was  $r=0.702(p<0.01)$ .

Fig.9. Synergistic effects of T3 (10nM) and dexamethasone (1 $\mu$ M) on the reporter activity and GH secretion in 24 hour plate culture.

*v/l*-GH3 cells in 6 well plates were incubated with dexamethasone and T3 for 24 hours. The sample medium was collected and assayed for the reporter activity and GH. Closed columns represent the reporter activity and dotted columns GH, respectively. Each value is expressed as fold-induction over the vehicle treatment (mean  $\pm$  SEM) (n=6).

\* ( $p<0.05$ ), \*\* ( $p<0.01$ ) vs. control (*t* test). \* ( $p<0.05$ ) T3 vs. T3+Dex (*t* test).



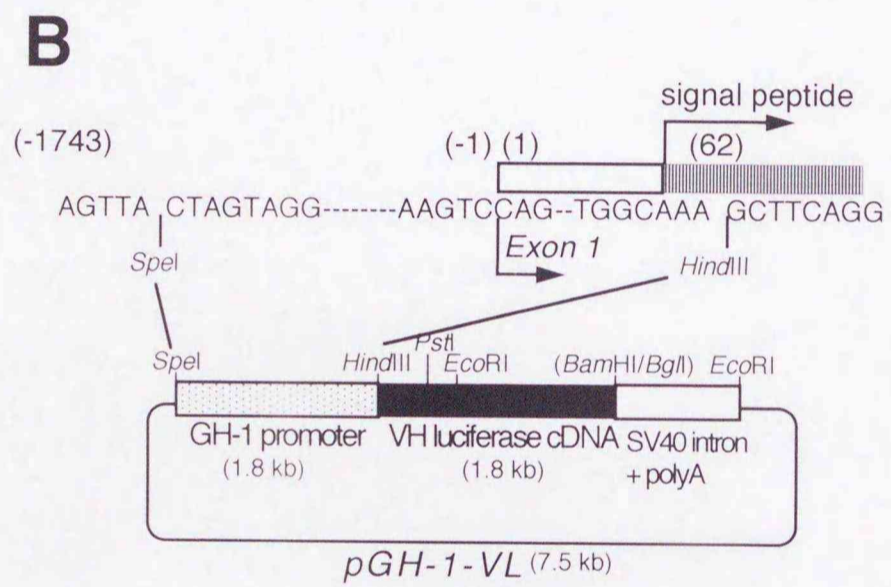
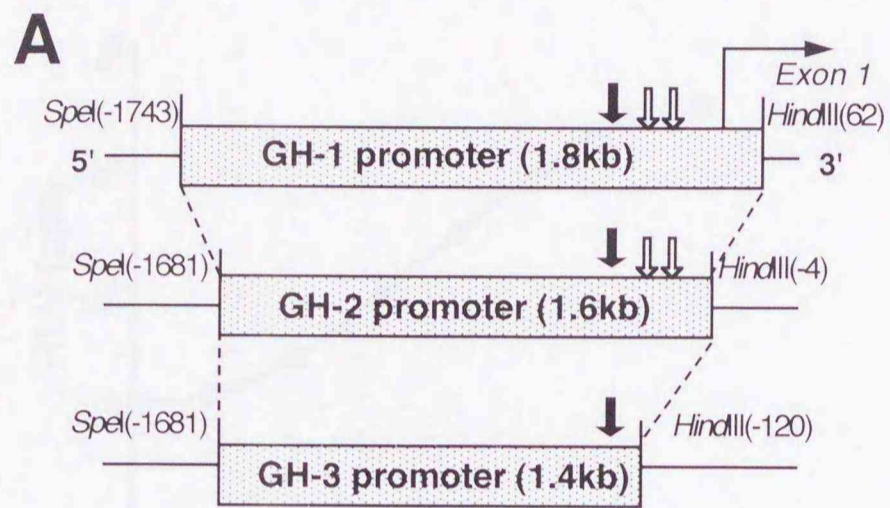


Fig.1 棚橋祐典



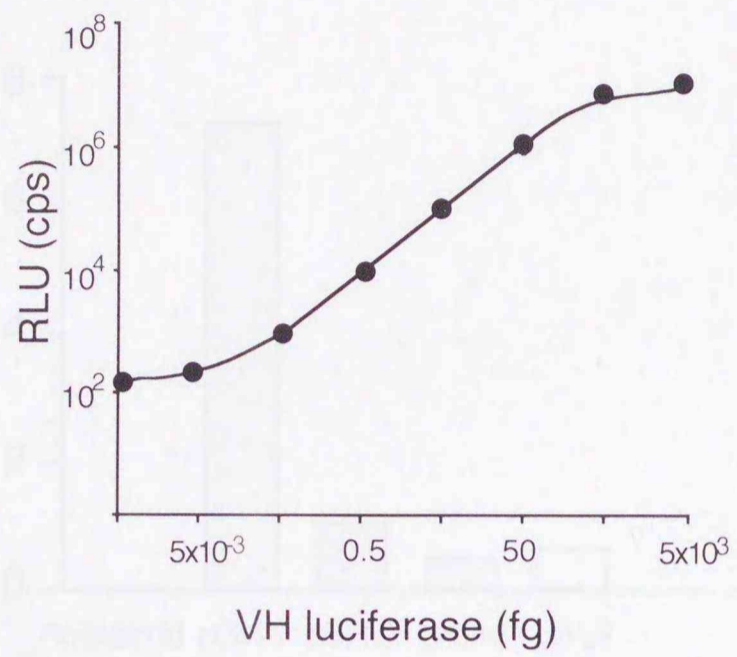
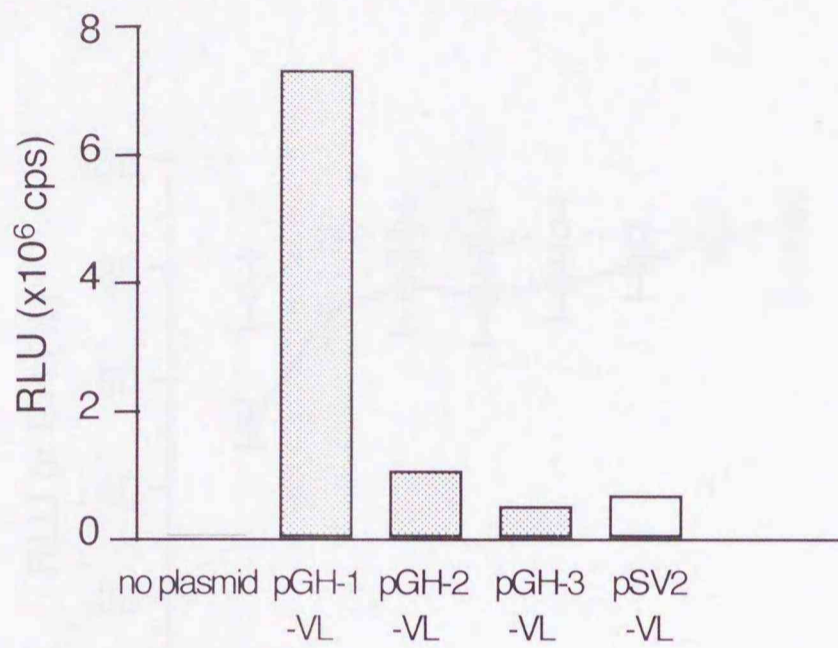


Fig.2 棚橋祐典



**A**



**B**

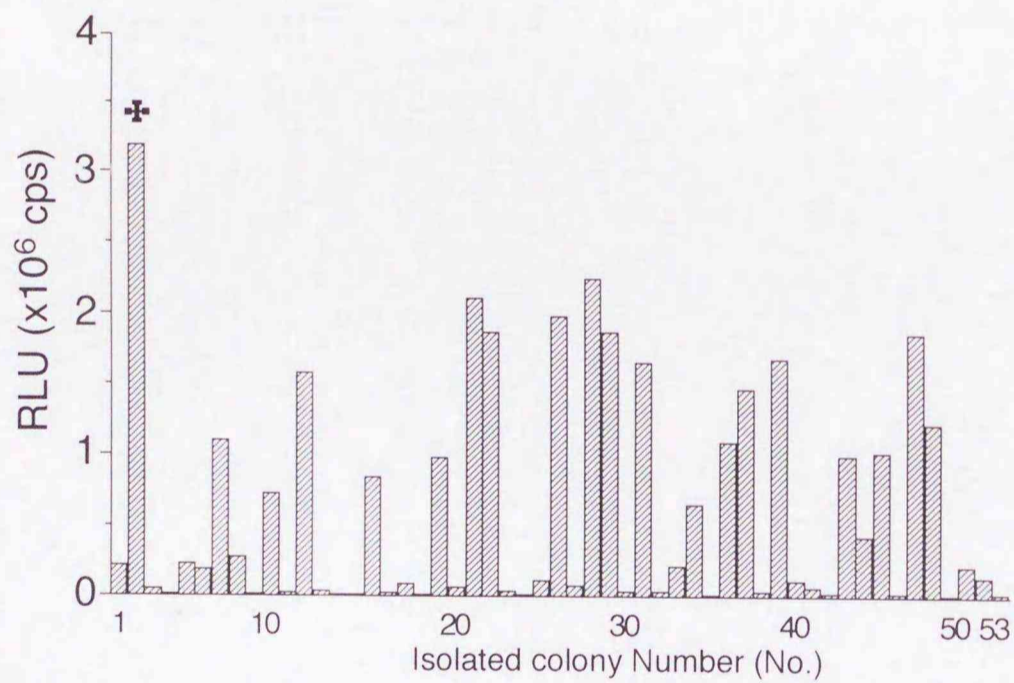


Fig.3 棚橋祐典



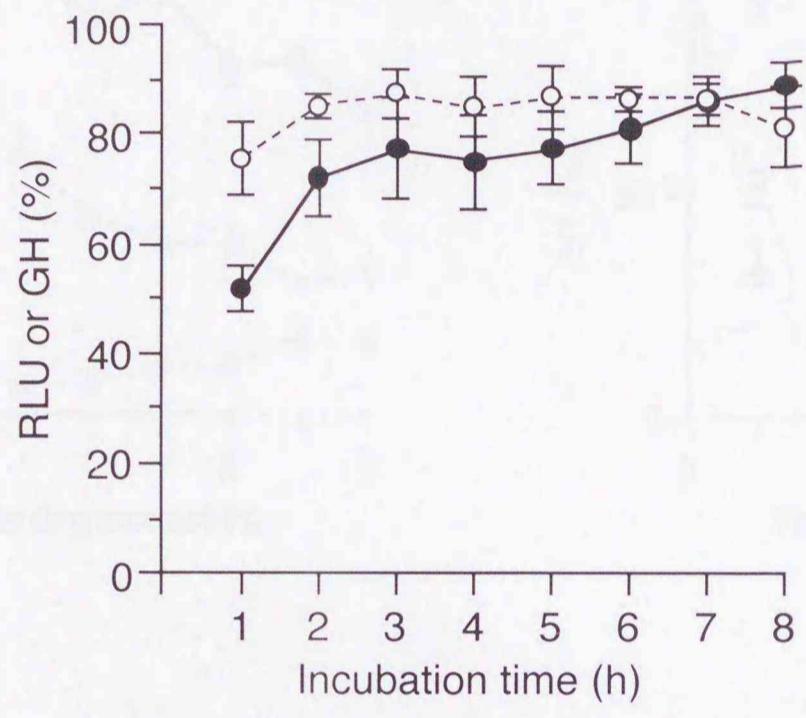


Fig.4 棚橋祐典



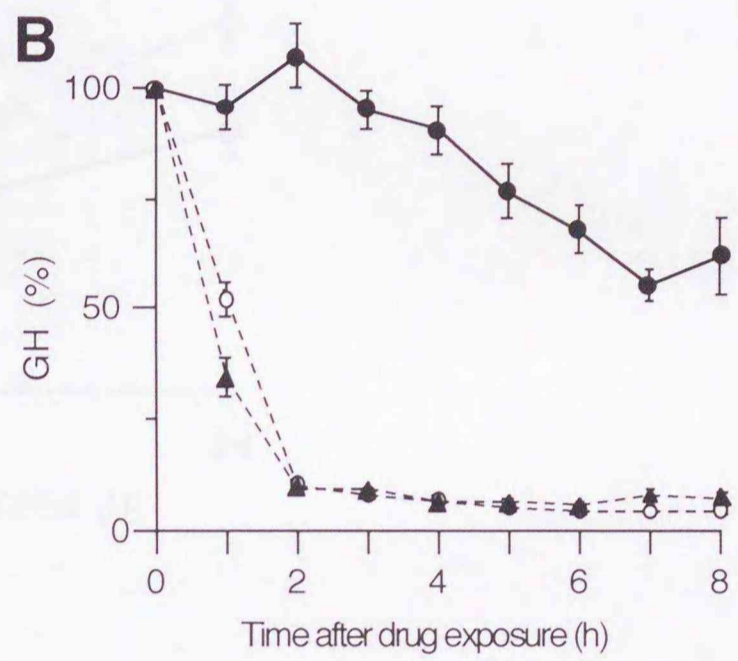
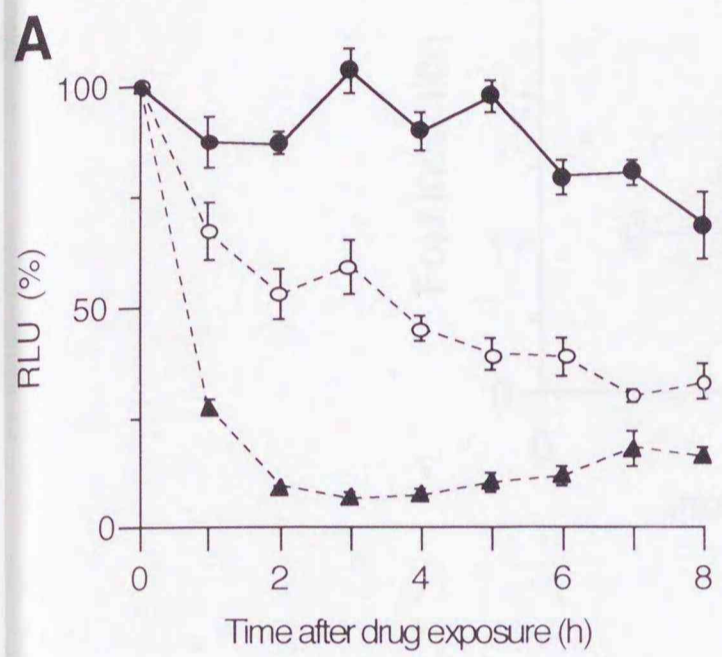


Fig.5 棚橋祐典



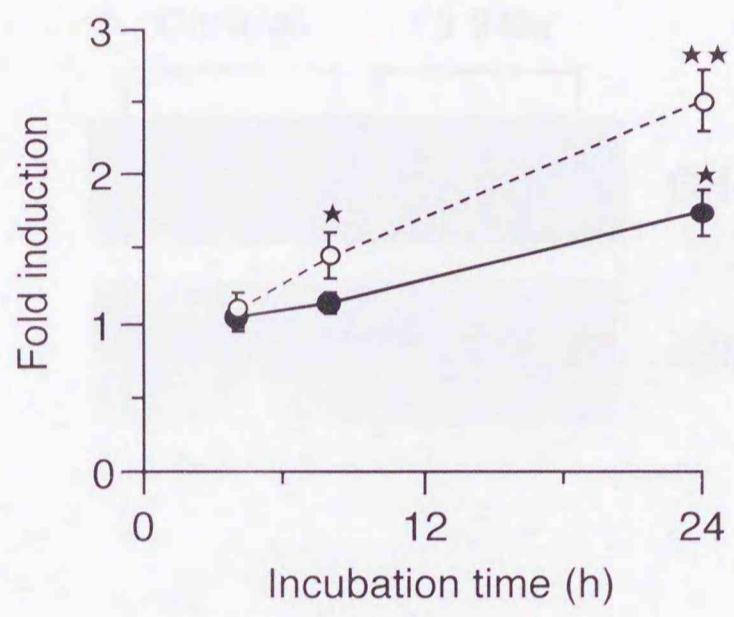


Fig.6 棚橋祐典



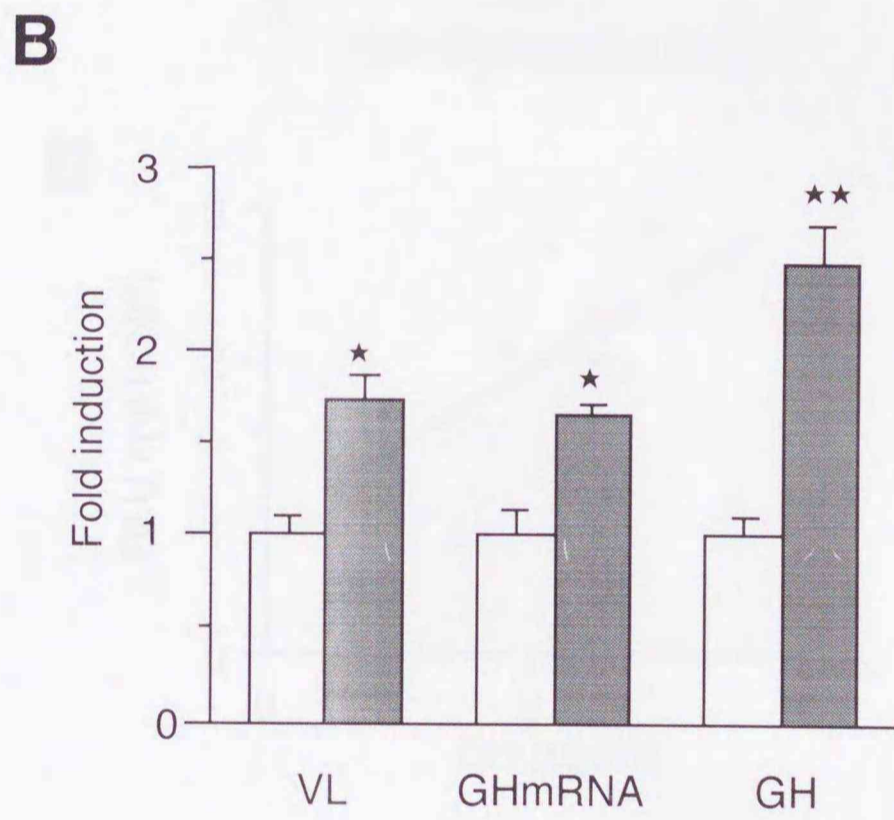
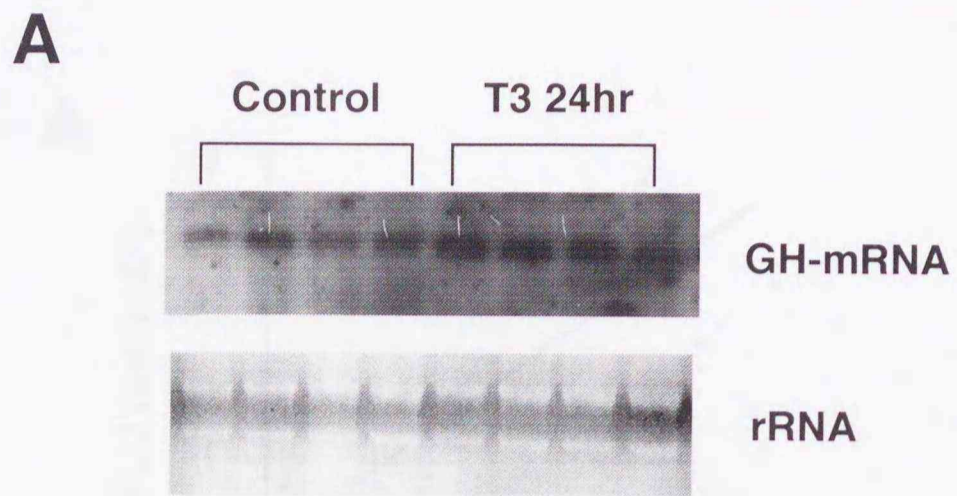


Fig.7 棚橋祐典



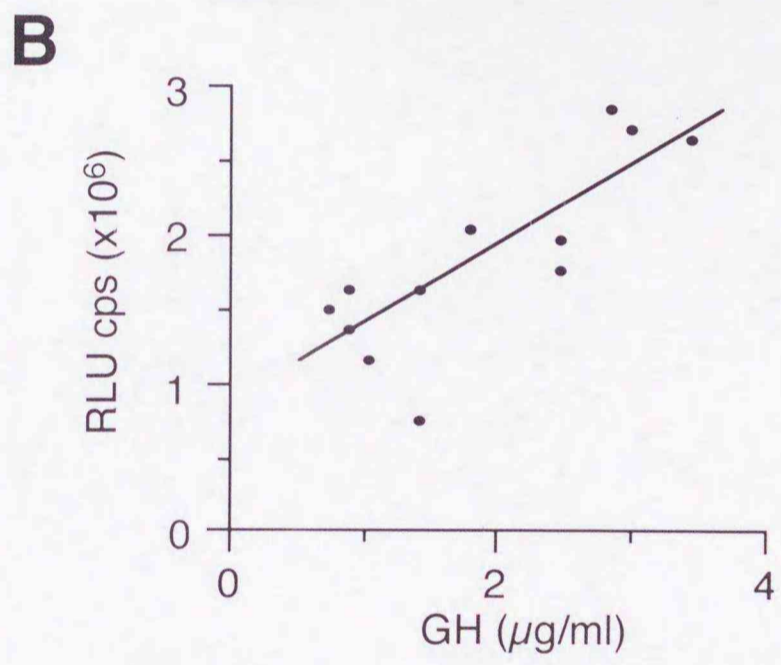
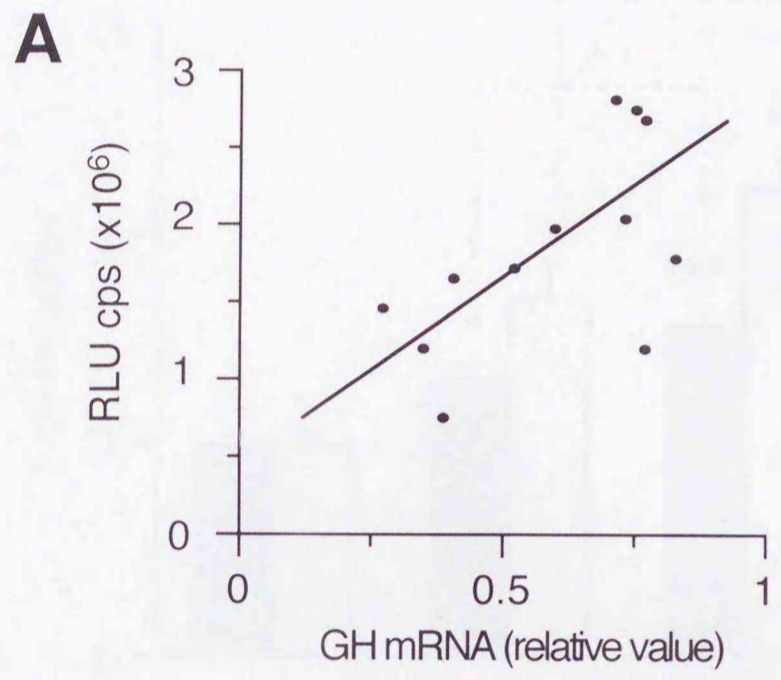


Fig.8 棚橋祐典



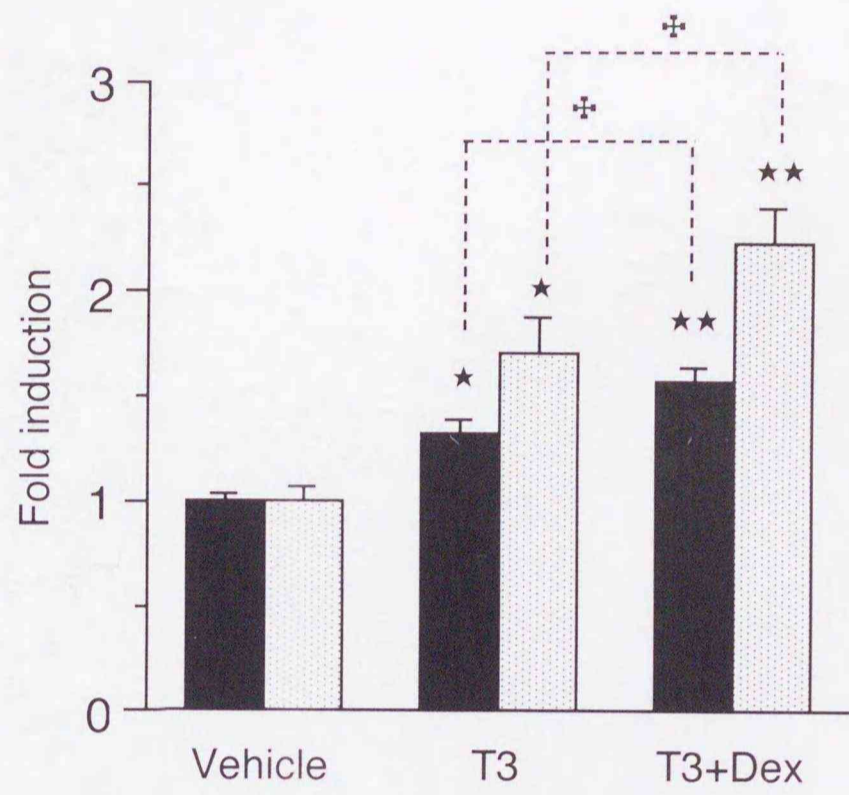
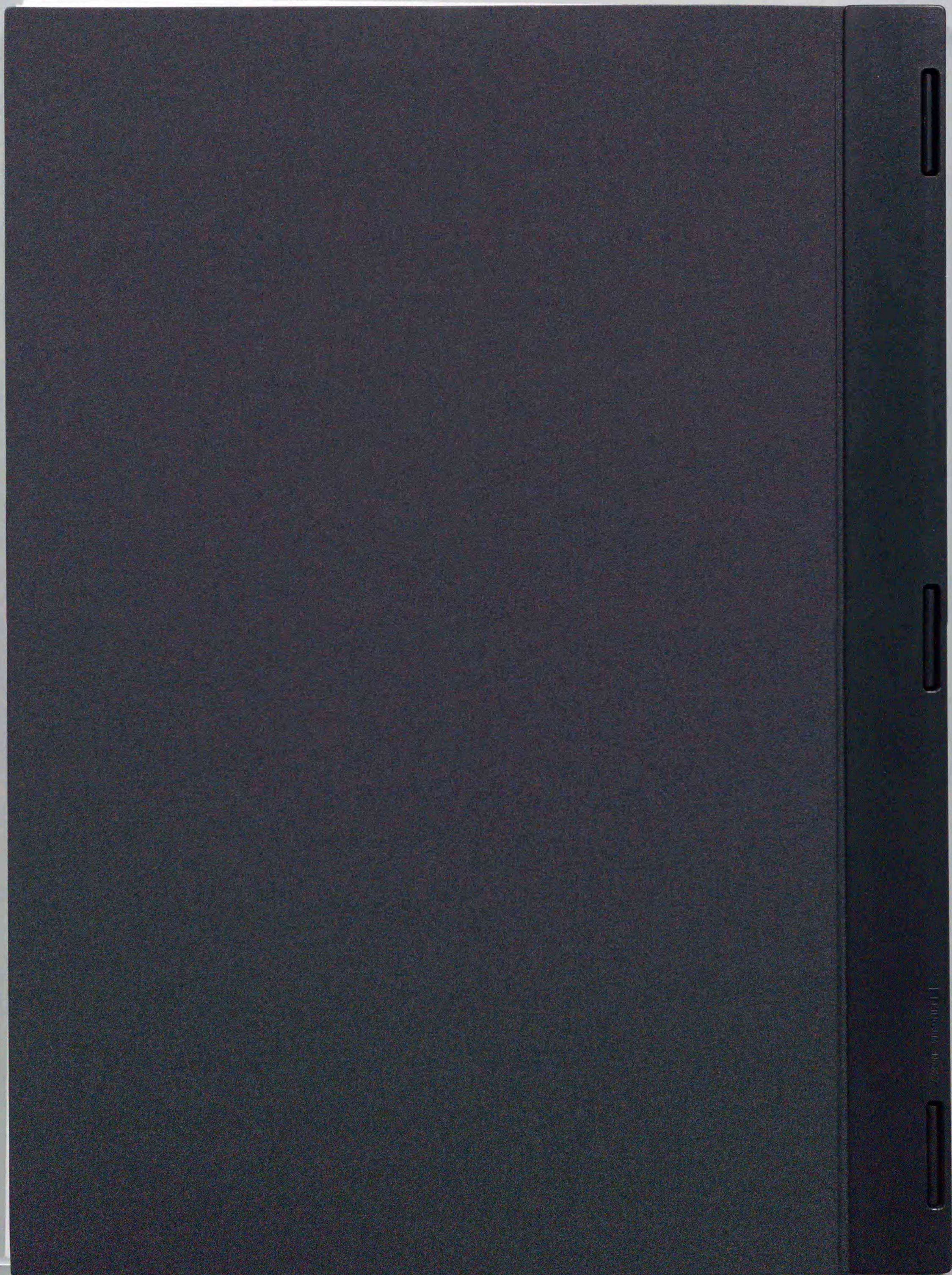


Fig.9 棚橋祐典





LEONARDO ARS



Inches 1 2 3 4 5 6 7 8  
cm 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19

# Kodak Color Control Patches

© Kodak, 2007 TM: Kodak

| Blue      | Cyan      | Green     | Yellow    | Red       | Magenta   | White     | 3/Color   | Black     |
|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| [Patch 1] | [Patch 2] | [Patch 3] | [Patch 4] | [Patch 5] | [Patch 6] | [Patch 7] | [Patch 8] | [Patch 9] |

# Kodak Gray Scale



© Kodak, 2007 TM: Kodak

A 1 2 3 4 5 6 M 8 9 10 11 12 13 14 15 B 17 18 19

