



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	肝癌細胞におけるラットプロテインホスファターゼ1 α 型(PP1 α)の遺伝子発現に関する研究
Author(s)	野本, 憲
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(理学)
Dissertation Number	甲第3995号
Issue Date	1997-03-25
DOI	https://doi.org/10.11501/3122153
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/51402
Type	doctoral thesis
File Information	000000307344.pdf



学位論文

肝癌細胞におけるラットプロテインホスファターゼ

1 α 型 (PP1 α) 遺伝子発現に関する研究

北海道大学大学院理学研究科博士課程化学専攻

免疫科学研究所 生化学部門

野本 憲

①

学位論文

肝癌細胞におけるラットプロテインホスファターゼ

1 α 型 (PP1 α) 遺伝子発現に関する研究

北海道大学大学院理学研究科博士課程化学専攻

免疫科学研究所 生化学部門

野本 憲

学位論文

肝癌細胞におけるラットプロテインホスファターゼ

1 α 型 (PP1 α) 遺伝子発現に関する研究

北海道大学大学院理学研究科博士課程化学専攻

免疫科学研究所 生化学部門

野本 憲

1895-1896

1895-1896

1895-1896

1895-1896

1895-1896

1895-1896

1895-1896

1895-1896

1895-1896

1895-1896

1895-1896

1895-1896

1895-1896

1895-1896

1895-1896

1895-1896

1895-1896

1895-1896

目次

略語	5
要旨	6
序論	8
各章に共通する一般的操作	
DNAのフェノール・クロロホルム抽出およびエタノール沈殿による	
核酸の精製、濃縮	15
DNA フラグメントのアガロースゲルからの回収	15
トランスフォーメーションに用いるコンピテント大腸菌の調製	16
大腸菌の培養およびプラスミドの調製	
(1) ミニプレパレーション	17
(2) ラージスケールプレパレーション	17
第一章 肝癌細胞におけるPP1 α mRNAの安定性の検討	
第一節 序論	19
第二節 材料および方法	
(1) 材料	20
(2) 細胞培養	20
(3) Actinomycin D の添加および RNA 調製	21
(4) Northern blotting による解析	22
第三節 結果	23
第四節 考察	23

第五節	この章のまとめ	24
第二章 ラットPP1 α 遺伝子5' -上流域のクローニング		
第一節	序論	26
第二節	材料および方法	
(1)	材料	27
(2)	ライブラリースクリーニング	27
(3)	塩基配列解析のための プラスミドベクターへのサブクローニング	30
(4)	シーケンシング	32
第三節	結果	35
第四節	考察	37
第五節	この章のまとめ	39
第三章 PP1 α 遺伝子プロモーターの機能領域の同定		
第一節	序論	43
第二節	材料および方法	
(1)	材料	45
(2-1)	プライマー伸長法	
(2-1-1)	mRNA 調製	45
(2-1-2)	プライマーの放射標識	47
(2-1-3)	サイズマーカーに用いるためのシーケンシング	47
(2-1-4)	プライマー伸長法	47
(2-1-5)	電気泳動による解析	48
(2-2)	ルシフェラーゼをレポーターとした、PP1 α 5' -上流域遺伝子の	

転写活性に影響を及ぼす領域の同定	48
(2-2-1) 細胞培養	49
(2-2-2) 種々のPP1 α 5' -上流域遺伝子断片を組み込んだ、 ルシフェラーゼレポータープラスミドの構築	50
(2-2-3) トランスフェクション、 およびトランスフェクションした細胞の培養	53
(2-2-4) トランスフェクションした細胞からの細胞抽出液の調製	55
(2-2-5) β -ガラクトシダーゼアッセイ	55
(2-2-6) ルシフェラーゼアッセイ	56
(2-2-7) データハンドリング	57
第三節 結果	58
第四節 考察	60
第五節 この章のまとめ	62

第四章 PP1 α 遺伝子プロモーターの機能領域に結合する因子の検討

第一節 序論	68
第二節 材料および方法	
(1) 材料	69
(2-1) ゲルシフトアッセイ	70
(2-1-1) 核抽出液の調製	70
(2-1-2) プローブの調製	72
(2-1-3) ゲルシフトアッセイ	74
(2-2) UVクロスリンク	75
(2-2-1) SDS-ポリアクリルアミドゲルの作製	76
(2-2-2) プローブの作製	76
(2-2-3) UVクロスリンク	77

(2-3)	DNase I フットプリント	78
(2-3-1)	核抽出液の調製	78
(2-3-2)	プローブの調製	79
(2-3-3)	マクサム・ギルバート法による G+A マーカーの調製	79
(2-3-4)	ポリアクリルアミドゲルの作製	80
(2-3-5)	DNase I 滴定	80
(2-3-6)	フットプリント反応、および電気泳動による分画	81
第三節	結果	83
第四節	考察	86
第五節	この章のまとめ	87
総括と展望		95
謝辞		98
参考文献		99

略語

AcOH	:	Acetic acid
bp	:	base pair
BPB	:	bromophenolblue
BSA	:	bovine serum albmin
cpm	:	count per minute
CS	:	calf serum
DMEM	:	Dulbecco' s modified Eagle medium
DTT	:	dithiothreitol
EDTA	:	ethylenediaminetetraacetic acid
EGTA	:	ethyleneglycol- <i>O,O'</i> -bis (2-aminoethyl) - <i>N,N,N',N'</i> -tetraacetic acid
EtBr	:	ethidium bromide
fbs	:	fetal bovine serum
HEPES	:	2-[4- (2-hydroxyethyl) -1-piperazinyl]ethanesulfonic acid
2-ME	:	2-mercaptoethanol
NaOAc	:	sodium acetate
NH ₄ OAc	:	ammonium acetate
NP40	:	Nonidet P40
SDS	:	sodium dodecylsulfate
TEMED	:	<i>N,N,N',N'</i> -Tetramethylethylenediamine
Tris	:	tris (hydroxymethyl) aminomethane

要旨

AH13 を含む種々の移植性腹水肝癌細胞株で一様に観察された PP1 α mRNA の発現亢進とその癌性変異との関連を明らかにすべく、ラット PP1 α 遺伝子の転写調節機構の解析を試みた。

1. PP1 α mRNA の高発現は、その安定性の上昇によるものではなく、転写速度の上昇によることが明らかになった。

2. ラットゲノムライブラリーより PP1 α 遺伝子 5' -上流域をクローニングした。

3. プロモーター領域付近の塩基配列を、翻訳開始点から上流約 1.8 kbp、下流約 0.4 kbp を決定した。翻訳開始点上流約 300 bp は、非常に高い GC 含量の配列を有し、TATA box、CAAT box は存在しなかった。また、第一エクソンは 18 アミノ酸残基をコードする領域が含まれていた。

4. 複数の転写開始点が、高 GC 領域内に存在した。

5. NIH3T3 マウス線維芽細胞株および正常肝細胞では、高 GC 領域のみが PP1 α の転写に影響を及ぼしていた。これに対し移植性腹水肝癌細胞株 AH13 では、高 GC 領域のみならず、-0.5 ~ -0.8 kbp の領域が転写活性化にかかわっていることが明らかとなった。

6. ゲルシフトアッセイでは、高 GC 領域に対して、正常肝細胞に比べ、検討した 5 種の移植性腹水肝癌細胞株のいずれも Sp1 の結合量が増加していた。また、AH13 において転写活性化に関与していた -0.5 ~ -0.8 kbp の約 0.3 kbp の領域のうち、-742 ~ -862 のフラグメントに対し、正常肝細胞核抽出液ではシフトバンドは

見られなかったが、AH13 核抽出液では、強いシフトバンドが見られた。このシフトバンドは AH7974F 核抽出液でも観察されたが、AH109A、AH225A の核抽出液では非常に弱く、AH130 核抽出液ではまったく見られなかった。

7. -742 ~ -862 のフラグメントに対して AH13 核抽出液で検出されたシフトバンドは、39、35、21 kDa の少なくとも、3つの因子を結合することによるものであることが明らかとなった。

以上の結果より、種々の移植性腹水肝癌細胞株において PP1 α mRNA 発現上昇するメカニズムは、検討したすべての細胞において Sp1 結合量が増加すること、およびこれに加えて AH13、AH7974F では、正常状態では発現、または DNA 結合活性が抑制されている何らかの因子が活性化していることの両機構によるものであることが明らかとなった。

序論

肝臓は、生体における物質代謝の中樞臓器であり、糖、蛋白、脂質などの代謝や、解毒、薬物代謝、胆汁の分泌等で重要な機能を果たしている。また近年、飲酒、喫煙、食物や周囲の環境から摂取される人工的な化学物質などにより、生活が豊かになる反面、肝疾患も増加の方向にある。肝癌もそのような疾患の一つであり、ウイルスなどにより引き起こされる肝炎等はその主な原因の一つであるが、食物や環境中に存在する微量の化学物質も、見逃せない原因の一つとして考えられる。

癌は、様々な因子による影響で遺伝子に変異を受け、修復不能となった部分の遺伝子から、そこに本来コードされていた蛋白質とは機能や活性の変異した分子が生じ、その蓄積で細胞内の機能に変調をきたし、その自律的な増殖と転移により、ついに宿主は死に至るものである。遺伝子に変異をきたす因子として、紫外線、放射線、ウイルス、化学物質などがある。遺伝子の変異には、いくつかのタイプが存在する。たとえば、塩基をアルキル基で修飾し、DNA複製時に水素結合でつながるもう一方の鎖の塩基が正常な水素結合を形成できなくなることにより他のものと置き換わってしまう結果、アミノ酸が置換してしまうもの、塩基対間にインターカレートしてフレームシフトを起こし、その部位以降のアミノ酸を変化させるもの、ラジカルを発生しDNA鎖の切断や塩基の修飾などの変異が生じるものなどがある。

遺伝子変異により、正常機能が変化しそれにより癌化するような蛋白をコードする遺伝子を、癌（原）遺伝子、または癌抑制遺伝子という。前者は正常状態より活性が亢進することによって癌化の原因となる遺伝子、後者は正常状態では癌化を抑える活性を保っているが、その活性が失われることにより癌化する。いずれも塩基の置換、転移、転座、欠失等による蛋白の機能変異、もしくはプロモーターの活性化又は不活性化などの原因による発現量の変化により引き起こされる。

癌遺伝子、癌抑制遺伝子として知られるものの多くは、増殖因子受容体、GTP結合蛋白、細胞質型チロシンキナーゼ、転写因子など、主に細胞増殖とそのシグナル

伝達に關与する機能蛋白をコードする。これらの蛋白は、正常状態においては適切に発現または活性が調節されている。その主な調節機構が蛋白の可逆的リン酸化である。律速酵素の多くは可逆的リン酸化により調節を受ける。このリン酸化、脱リン酸化を担うのが、プロテインキナーゼおよびプロテインホスファターゼである。リン酸化されるアミノ酸残基は、セリン、スレオニン、チロシンなどであるが、癌遺伝子産物の多くは増殖因子のレセプターまたは細胞質型として存在するチロシンキナーゼである。しかし、*Raf*、*Mos* のようにいくつかのセリン、スレオニンキナーゼも癌遺伝子産物として報告されている。また、発癌プロモーターである TPA (12-O-tetradecanoyl phorbol-13-acetate) は、PKC (Protein kinase C: Ca²⁺ 依存性プロテインキナーゼ) の活性化因子であり、PKC 自体は癌遺伝子ではないものの、セリン、スレオニンリン酸化と癌化、悪性変異との関連も重要であると考えられる。よってその逆反応であるセリン、スレオニンリン酸を脱リン酸するプロテインホスファターゼもその関与が注目される。実際、多くの転写因子は可逆的リン酸化によって転写活性化能を調節される。例えば CREB (cAMP responsive element binding protein) は PKA (cAMP 依存性プロテインキナーゼ) によってリン酸化され、転写活性可能を上昇させるが、その脱リン酸化反応は PP1 により行われることが報告されている [1]。また、癌抑制遺伝子の一つである RB

(retinoblastoma susceptibility gene) は 2-ハイブリッドクローニングによって PP1 が RB と作用していることが明らかとなり [2]、細胞周期の進行の抑制において PP1 の脱リン酸活性の重要性が示唆された。また、RB をリン酸化する cdc2 キナーゼは、デュアルホスファターゼ (スレオニン・チロシンリン酸を脱リン酸する活性を有する) cdc 25 [3, 4] によって脱リン酸化されることが知られている。同様に、癌抑制遺伝子として知られる p53 に結合する p53BP2 が PP1 を阻害することが明らかになっている [5]。以前にも、分裂酵母の低温感受性変異株の原因遺伝子 *dis2*、*sds21* が PP1 と高いホモロジーを有することが明らかとなっており、これら両方の破壊株は生育不能である [6-8] ことから、PP1 活性が細胞分裂に必須であることが示唆されている。このように、癌化および癌における重要な形質である細胞増殖に PP1 が深くかかわっていることを示す事実が多く明らかにされている。

ここで本研究の対象となったプロテインホスファターゼ1 α 型アイソフォームを含む、PP1についてのこれまでの知見を以下に述べる。

セリン、スレオニンプロテインホスファターゼは、表-1に示すように、Cohenらによって1983年に分類されたPP1、PP2A、PP2B、PP2Cの4タイプが存在するが[9]、徐々に他の分子も発見されつつある。酵素学的手法を用いていた、以前のプロテインホスファターゼ研究は、その基質調製の困難さからキナーゼ研究に比べ遅れていた。しかし、クロイソ海綿から精製されたオカダ酸が、PP1およびPP2Aを阻害する[10, 11]ことが明らかになってから近年その解析が進みつつあり、さらに分子生物学的手法を用いて多くの新しい分子種やアイソフォーム、サブユニットなどがクローニングされ、その機能について徐々に明らかにされつつある。セリンスレオニンプロテインホスファターゼの一分子種であるPP1については、インヒビター1[12]、2[13]、NIPP-1[14]、Gサブユニット[15-18]、Mサブユニット[19-21]などの制御サブユニットが見いだされ、局在性も調べられてはいるが(図-1)、そのほかに、海馬でのシナプス長期抑制に関与していることや[22]、植物ではストレスによって発現する[23]など動物細胞では見られていない現象も観察され、その機能、基質特異性は非常に広く、 α 、 γ -1、 γ -2、 δ の4活性サブユニットについては、その役割、局在についていまだはっきりとした知見が得られていない[24, 25]。わずかに精巣のみでPP1 γ -2が特異的に発現しているなどの報告[26]があるに過ぎない。菊池らは移植性腹水肝癌細胞株AH13において、その細胞内への高グリコーゲン蓄積からプロテインホスファターゼに注目し、精製した酵素の性質などからそれがCohenらによりウサギからクローニングされていたPP1によるものであることを明らかにし[27-29]、次いでcDNAクローニングによりPP1 α ラットホモログの塩基配列を決定した[30]。また同じ時期に、佐々木らにより、酵母由来の*dis2m1*および*dis2m2*をプローブとして、ラットにおけるPP1の4アイソフォームであるPP1 α 、PP1 γ -1、PP1 γ -2、PP1 δ のcDNAがクローニングされた[26]。当研究室の北村らは、正常肝細胞に比較し、AH13 mRNAが数倍から十数倍高発現されていることを見だし[30]、さらに他の移植性腹水肝癌細胞株においても、PP1の他のアイソフォームや、PP2A、PP2Cなどはあまり変化が見られなかったのに対し、

PP1 α mRNA のみ一様に高発現が見られた [31, 32]。また、その酵素蛋白量についても同様に PP1 α の特異的上昇が見られ、全アイソフォームの和ではあるが PP1 活性も著しく上昇していた [33, 34]。正常肝においても、部分肝切除後の再生肝では mRNA の一過性の発現上昇 [35]、細胞周期を同調したマウス線維芽細胞株 NIH3T3 においても mRNA の周期的変化が見られた [36]。また、Solt-Farber の肝化学発癌過程においても、mRNA 発現上昇が認められた [37]。

以上のような事実より、PP1 α 高発現と、癌形質もしくは細胞増殖との関連に注目し、その mRNA 発現機構を明らかにすることが有意義であると考えられた。また、ジェノミックサザンブロットにより、肝癌細胞において PP1 α 遺伝子増幅はおこっていないことが明らかとなっており（北村、未発表）、mRNA 転写速度が亢進していることが予想された。すでに他のセリン、スレオニンプロテインホスファターゼ分子種である PP2A、PP2B A α について、そのプロモーター領域がクローニングされ、解析がなされている [38-40]。PP2A 遺伝子においては、TATA box、CAAT box のない、高 GC 領域を持つハウスキーピング遺伝子様のプロモーターを有している。PP1 は、PP2A とはアミノ酸レベルで約 43 % の相同性を有し、かつウイルス、細菌から動物まですべてに存在し（表-2）、広い細胞内局在や幅広い基質の特異性などの両者の類似性を考慮すると、PP1 遺伝子も PP2A のそれと類似のプロモーターを持つことが予想される。ハウスキーピング遺伝子とは、その細胞にとって生存するのに必須な蛋白をコードする遺伝子を言い、一般には、これらの遺伝子の発現は一定のレベルに維持されており、そのためノーザンブロットイングのコントロールとして用いられることが多い。したがって、そのようなプロモーターを持つと予想される PP1 α 遺伝子が、mRNA 発現を大きく変化させることは非常に興味深いことであると考えられ、PP1 α 遺伝子のプロモーター領域の解析を始めた。

	Regulatory molecule	IC ₅₀ of Okadaic acid
PP1	Inhibitor - 1 Inhibitor - 2 G subunit M subunit NIPP- 1 DARPP- 32	20 nM
PP2A	A and B subunit	0.2 nM
PP2B	B subunit Ca ²⁺ /Calmodulin	5 μM
PP2C	Mg ²⁺	no inhibition

表-1 セリン/スレオニンホスファターゼの性質

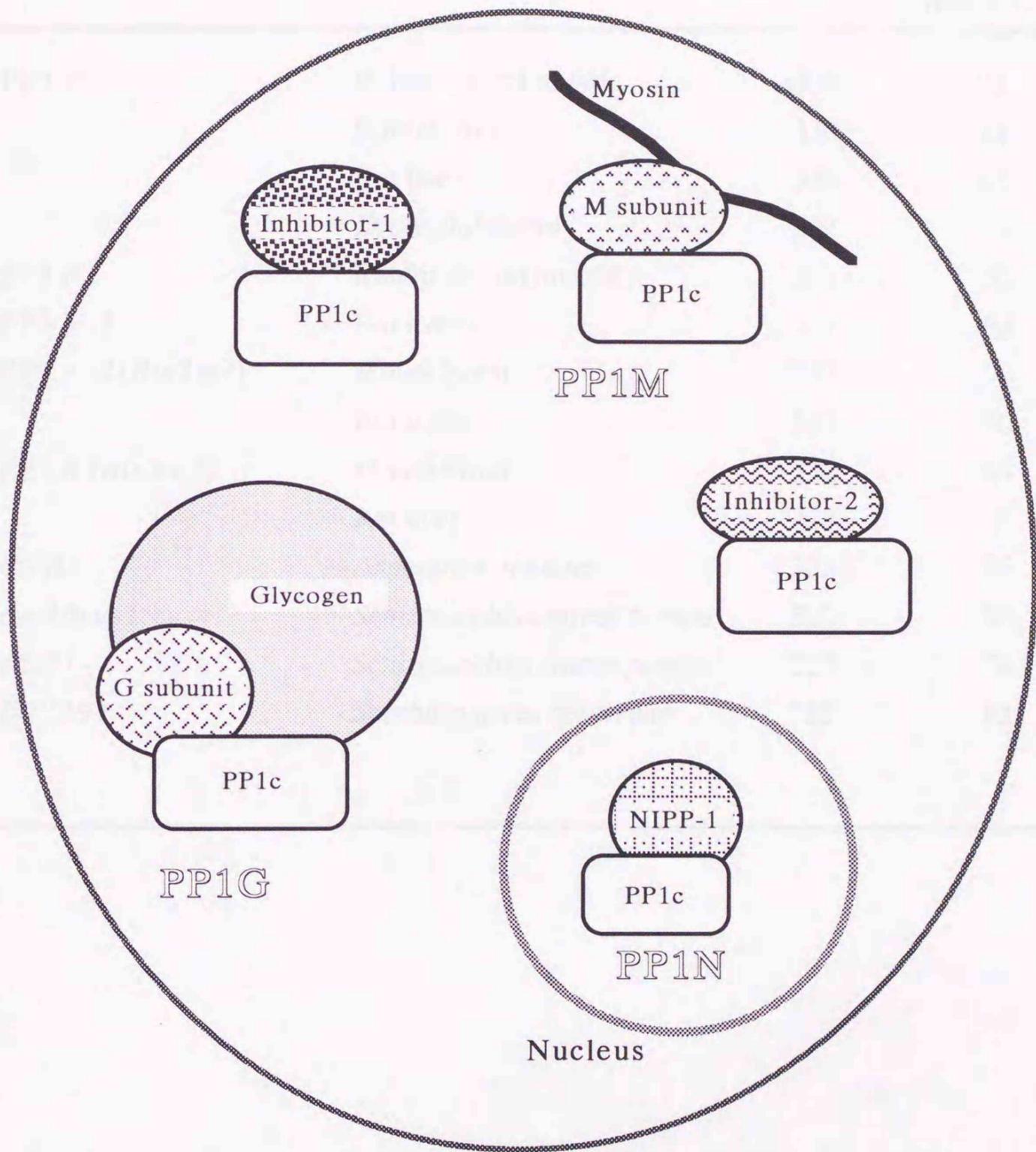


図 - 1 PP1 ホロ酵素の細胞内分布

Name	Source	Number of amino acids	Percentage of identity (rabbit PP1 α =100)
PP1 α	Rabbit skeltal muscle	330	100
	Rabbit liver	330	100
	Rat liver	330	100
	<i>Drosophila</i> head	302	99
PP1 β	Rabbit skeltal muscle	311	95
PP1 γ -1	Rat liver	323	93
PP1 γ -2(<i>dis2m1</i>)	Mouse brain	337	90
	Rat testis	337	90
PP1 δ (<i>dis2m2</i>)	Mouse brain	327	89
	Rat liver	327	89
<i>bimG</i>	<i>Aspergillus nidulans</i>	323	86
<i>dis2/bws1</i>	<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	327	82
<i>sds21</i>	<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	322	74
<i>DIS2S1</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	312	83

表-2 PP1 のホモログ (文献 [25] を改変)

各章に共通する一般的操作

DNA のフェノール・クロロホルム抽出およびエタノール沈殿による 核酸の精製、濃縮

酵素反応後、反応溶液と等量の PCI (buffered phenol : chloroform : isoamylalcohol=25 : 24 : 1) を反応溶液に加え、激しく攪拌した。室温で、15,000 rpm、10 分遠心して上層を新しい遠心チューブに移した。この時、上層の 7~8 割を目安に、中間にある変性した蛋白を可能な限り取らないようにした。チューブに等量以上のエーテルを加え、激しく攪拌した後、軽く遠心し二相を分離させ、上層を捨てた。しばらくふたを開けて、残ったエーテルを揮発させた後、溶液の 1/10 容の 3 M NaOAc および 2.5 倍量の冷エタノール (もしくは 1/2 容の 7.5 M NH₄OAc および 2.5~3 倍量の冷エタノール) を加えて攪拌し、-20 °C で 20 分 ~ 1 時間保存し、15,000 rpm、20 分遠心して DNA を沈殿させ、液を捨て、70 % 冷エタノールでペレットを洗浄した。ペレットを乾燥後、適量の TE (10 mM Tris-Cl (pH 8.0)、1 mM EDTA (pH 8.0)) に溶かし、その一部を TE で希釈し、紫外吸光光度計で 280 nm の吸光度を測定して、TE 中の DNA の濃度を求めた。

DNA フラグメントのアガロースゲルからの回収

いくつかの方法で回収を行ったが、QIAEX II (Bio 101, CA) を使用したものは、キットの付属のプロトコールに従った。ここでは、あまり一般的には行われな
いが、非常に迅速かつ簡便な方法で、特にオリゴヌクレオチドなど短めの DNA 断
片を回収するのに特に有効な方法を示した。

アガロースゲルで電気泳動し、分離した DNA フラグメントは、UV トランスイ
ルミネーター上で写真撮影の後、目的のバンドをメス刃でできるだけ小さく切り出
し、細かく刻み、底に 20 G などの注射針で穴を開けた 1.5 ml マイクロチューブに
入れた。次にそのチューブをもう一つの 1.5 ml マイクロチューブに重ねてパラフィ

ホルムで固定した。遠心機に入れて 10,000 rpm 程度で一分程度回転させ、上に載せたマイクロチューブの穴からゲルが細かく砕かれながら落ちるようにした。上のチューブを外し、ゲルの体積の 1/10 ~ 1/2 程度の TE と、それらを合わせた体積と等量の buffered phenol を加えて良く攪拌し、ふたを閉めて液体窒素に浸し、瞬間的に凍結させた。その後、室温で 15,000 rpm、10 分遠心し上部の水層を 7~8 割程度回収し新しいマイクロチューブに移した。以降の操作は先に述べた「DNA のフェノール・クロロホルム抽出およびエタノール沈殿による核酸の精製、濃縮」と同じである。

トランスフォーメーションに用いるコンピート大腸菌の調製

Hanahan の方法 [41, 42] を改変して用い、作製した。

菌体のストックを白金耳を使用して寒天培地上に広げ、一晚放置しコロニーを生成させた。寒天培地上に生成したコロニーの一つを滅菌した爪楊枝で突き、100 ml の SOB 培地 (500 ml 当たりの組成: 20 g Triptone、5 g Yeast extract、0.3 g NaCl、0.1 g KCl、10 mM MgCl₂、10 mM MgSO₄) 中にいれ、18 °C で 600 nm の吸光度が 0.4 になるまでおよそ 2 日培養した。600 nm の吸光度が 0.4 になったら、氷上で 10 分間冷却し、遠心チューブに移した後、4 °C で 3,000 rpm、10 分間遠心し、菌体を沈殿させた。培養液を捨てた後、40 ml の 4 °C に冷却した TB (10 mM PIPES-K (pH 6.7)、15 mM CaCl₂、250 mM KCl、55 mM MnCl₂) を加えて菌体を懸濁し、10 分間氷上で放置した。4 °C で 3,000 rpm、10 分間遠心し、菌体を沈殿させた後、再度 10 ml の TB に懸濁し、0.7 ml の dimethylsulfoxide を加え、さらに 10 分間氷上におき、100 又は 200 µl を 1.5 ml のマイクロチューブに分注し、液体窒素で瞬間的に凍結させた後、使用時まで -80 °C で保存した。

大腸菌の培養およびプラスミドの調製

(1) ミニプレパレーション

コンピテント大腸菌をトランスフォームし、寒天培地上に生成したコロニーからのプラスミド調製は、アルカリ溶菌法 [43, 44] を改変して用い、以下のようにして行った。プラスミドにコードされる蛋白により不活化される抗生物質を添加した培地 2~5 ml を 15 ml のチューブにいれ、生成したコロニーを一つ突き、チューブ中に投入して 37°C で 6 時間から一晩培養した。十分大腸菌が増殖し、懸濁したその溶液を 1.5 ml チューブに入れ、15,000 rpm で 30 秒ほど遠心して大腸菌を沈殿させ、上清を捨てた。ペレットを 4°C に冷却した 100 μ l の GTE solution (50 mM glucose、25 mM Tris-Cl (pH 8.0)、10 mM EDTA、25 mg/ml lysozyme) を加えて懸濁し、氷上で 10 分静置した。さらに 200 μ l の NaOH/SDS solution (0.2 % NaOH、1 % SDS、使用時に調製) を加えて攪拌し、穏やかに攪拌し同様に氷上で 10 分静置した。次に、150 μ l の 3 M KOAc (pH 5.5) を加えて同じく穏やかに攪拌し同様に氷上で 10 分静置した。その後、4°C、15,000 rpm で 5 分間遠心し、上清を新しいマイクロチューブに移した。等量の PCI を加えて激しく攪拌し、室温で 15,000 rpm で 5 分間遠心し、上清を新しいマイクロチューブに移した。その上層を新しいマイクロチューブに移して 1 ml の冷エタノールを加え、しばらく -20°C で冷却して沈殿を形成させ、4°C、15,000 rpm で 10 分間遠心し、上清を捨て、70 % 冷エタノールでペレットを洗浄、乾燥後、10 μ g/ml の濃度で RNaseA を加えた TE でペレットを溶かし、プラスミド溶液とした。

大腸菌の培養およびプラスミドの調製

(2) ラージスケールプレパレーション

ミニプレパレーションで目的のプラスミドを持つことを確認した大腸菌から、大

量調製用に改変したアルカリ溶菌法 [43, 44] を使用してプラスミドを回収した。100 ml ないし 500 ml の抗生物質を含む培養液で目的のプラスミドを持つ大腸菌を、37 °C で一晩振盪培養した。培養液を遠心チューブに移して、4 °C、5,000 rpm、10 分遠心し、上清を捨てた。ミニプレパレーションと同様に、順に 10 ml の GTE solution、20 ml の NaOH/SDS solution、15 ml の 3 M KOAc (pH 5.5) で処理し、4 °C、10,000 rpm、10 分遠心して上清を 50 ml の遠心チューブに移し、等量の冷イソプロパノールを加えて攪拌し、4 °C、10,000 rpm、10 分遠心して核酸を沈殿させた。上清を捨て、ペレットを 10 ml の TE に溶かし、5 M LiCl を加えて氷上で 30 分静置し、4 °C、10,000 rpm、10 分遠心して RNA を沈殿させた。上清を新しい 50 ml チューブに移し、等量の冷イソプロパノールを加えて攪拌し、4 °C、10,000 rpm、10 分遠心し、上清を捨ててペレットを乾燥させ、4 ml の TE に溶かし、4.4 g の CsCl、100 μ l の EtBr (10 mg/ml) を加えて良く溶かし、5.1 ml Quick-Seal

Poliallomer tube (Beckman, CA) に封入し、Optima TLX 型卓上超遠心機

(Beckman, CA) で、TLA-100.4 ローターを使用し 20 °C、100,000 rpm、8 時間遠心した [45]。遠心後、真ん中あたりに見える太い赤色のバンドを 18 G の注射針を付けた 2.5 ml シリンジで抜き取り、15 ml 遠心チューブに移した。そこに水で飽和した 1 ml の 1-ブタノールを加えて激しく攪拌し、30 秒ほど遠心して二相を分離させた。EtBr が抽出され赤く染まった上層を捨て、この操作を下の層の赤さが無くなるまで繰り返し、無色になったと判断した時点で後一回行なった。残った CsCl を含むプラスミド溶液を透析チューブ (Dialysis membrane, Size 8、和光純薬、大阪) に入れて封をし、低温室内で 1 l の TE に対して 30 分透析し、外液を交換してさらに 30 分透析し、再び外液を交換してさらに一晩透析した。

必要に応じて二回超遠心をかける場合は、一回目の超遠心から回収したバンドを新しい超遠心チューブに移し、100 % CsCl 溶液 (100 g の CsCl を TE で溶かし 100 ml に合わせたもの) で遠心チューブを満たして再度遠心した。

第一章 腹水肝癌細胞におけるPP1 α mRNAの安定性の検討

第一節 序論

我々の研究室では、腹水肝癌細胞におけるPP1 α mRNA高発現を見だし、報告してきた [30, 32]。その原因として、1) プロモーターの活性化による転写速度の上昇、および 2) ゲノムの変異又は細胞内環境の変化によるPP1 α mRNAの安定化の二つが考えられる。本章においては、腹水肝癌細胞での、このPP1 α mRNA高発現がこれらのいずれによるものかを明らかにするため、肝癌細胞でのPP1 α mRNAの分解速度を、初代培養肝細胞のそれと比較した。

第二節 材料および方法

(1) 材料

移植性腹水肝癌細胞株 AH13 は、東北大学加齢医学研究所癌細胞保存施設より供与された。Donryu ラットは日本エスエルシー（静岡）より購入した。TRIzol Reagent は、Life Technologies（MD）より購入した。Megaprime DNA labelling kit は、Amersham（England）より購入した。各種制限酵素、修飾酵素は、宝酒造（京都）、東洋紡績（大阪）、New England Biolabs（England）より購入した。 $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{dCTP}$ は Du Pont（MA）より購入した。本文中に示した以外の一般試薬は、和光純薬工業株式会社（大阪）、ナカライテスク株式会社（京都）、Sigma（MO）から購入した。

(2) 細胞培養

凍結保存細胞は、37℃のウォーターバス中で速やかに解凍後、15 ml falcon 2059 tube（Beckton Dickinson、NJ）に移し、10 ml の10% 仔牛胎児血清（Equatech-Bio、TX）添加 Dulbecco 改変 Eagle 培地（以下10% fbs/DMEMとする）（極東製薬工業（株）、東京）を加え、800 rpm、4℃で5分遠心し、細胞を洗浄した。洗浄は2回行い、その後、同培地1 ml に懸濁し、19 G の静脈留置針（ベニユーラ S、（株）トップ、東京）を付けた5 ml シリンジ（テルモ（株）、東京）を用いて Donryu ラット（3週齢、クリーン動物、オス）（日本エスエルシー（株）、静岡）の下腹部腹腔内に注入した。約1週間後、癌細胞の増殖により膨満した腹腔内より、5 ml シリンジを付けた19 G の留置針を用い腹水を採取した。腹腔内に残った細胞はPBS（-）を適量注入し、採取した。約5 ml の細胞を含む腹腔液は50 ml のfalcon 2070 tube に入れ、800 rpm、4℃で5分遠心し、上清を捨てた後、30 ml のATC solution（0.82% NH_4Cl 、20 mM Tris-Cl（pH 7.4））に懸濁し、10分間氷上に静置し、赤血球を破壊した後、800 rpm、4℃で5分遠心し上清を捨てた。細胞

は冷 PBS で 2 回洗浄後、10 % fbs/DMEM に適当な濃度で懸濁し、37 °C、5 % CO₂ 下で培養した。数度の継代の後、AH13 のみとなったところで実験に使用した。

初代培養肝細胞は、以下の方法により、当研究室の今井が分離したものを用いた。Wistar ラット (約 200 g、SPF、オス) (日本エスエルシー (株)、静岡) より コラゲナーゼ灌流法を用いて分離した肝細胞を Percoll により精製し、肝実質細胞のみとして用いた。分離した肝細胞は L-15 培地 (極東製薬工業 (株) 東京) に懸濁後 Vitrogen 100 (Celtrix、CA) で一晩コーティングし、PBS (-) で洗浄した シャーレ (IWAKI 1020-100、岩城硝子、千葉) に 6×10^6 細胞ずつプレATING し、37 °C、大気中 (ビニール袋による密閉下、CO₂ インキュベータ中に置いた) で 2 時間培養し、シャーレに付着させた。

(3) Actinomycin D の添加および RNA 調製

AH13 には、以下のようにして Actinomycin D 処理し、AGPC 法 [46] にて全 RNA を抽出、回収した。10 ml の 10 % fbs/DMEM 中に、 1×10^6 細胞ずつシャーレ (ニプロシャーレ 90 x 15 mm、(株)ニプロ) にプレATING し、Actinomycin D (和光純薬 (株)、大阪) を終濃度 5 μ g/ml となるよう加え、0、1、3、6、12、24 時間後に 15 ml falcon 2095 tube に細胞を含んだ培養液を移し、800 rpm、5 分、4 °C で遠心し細胞を回収し、500 μ l の TRIzol (Life Technologies、MD) で細胞を溶解、1.5 ml マイクロチューブに移した後、100 μ l のクロロホルムを加え、激しく攪拌の後、16,000 rpm、4 °C、10 分の遠心後、上清を回収、新しいマイクロチューブに移し、2.5 倍量の冷エタノールを加え、-20 °C で 30 分放置後、16,000 rpm、4 °C、10 分遠心し、上清を捨て、75 % エタノールでペレットを洗浄、乾燥の後、抽出された全 RNA のペレットを適量の DEPC-H₂O で溶解した。

肝実質細胞では以下のように Actinomycin D 処理し、全 RNA を抽出、回収した。シャーレにプレATING した 2 時間後、10 % fbs/DMEM に培地を交換し、

同時に終濃度 5 $\mu\text{g/ml}$ となるよう Actinomycin D を加え、AH13 と同様に 37 °C、5 % CO_2 下で 0、1、3、6、12、24 時間培養し、各時間後、培養液を捨てた後、シャーレに 500 μl の TRIzol (Life technologies、MD) を加え、細胞を溶解、AH13 と同様にし、全 RNA を抽出した。

(4) Northern blotting による解析

回収した全 RNA 各 20 μg を用いノーザンブロッティングを行った。ホルムアルデヒド/1 % アガロースゲルで電気泳動し分画した後、ニトロセルロース膜 (BA85、0.45 μm 、Schleicher & Schuell、Germany) に一晩キャピラリーブロットした。ニトロセルロース膜は、80 °C、2 時間減圧下でベーキングしたのち、プレハイブリダイゼーション液 (50 % ホルムアミド、5 x SSPE (0.9 M NaCl、50 mM NaH_2PO_4 、0.5 mM EDTA、pH 7.4) , 5 x Denhardt' s solutin (0.1 % Ficoll 400、0.1 % polyvinylpyrrolidone、0.1 % gelatin) 、100 $\mu\text{g/ml}$ Salmon sperm DNA) 中で 42 °C で終夜インキュベートした。翌日、Megaprime DNA labelling kit (Amersham、England) および 1.85 Mbq の [α - ^{32}P]dCTP (Du Pont、MA) でラベルした PP1 α cDNA をプローブとして加えたハイブリダイゼーション液 (プレハイブリダイゼーション液+20 % 硫酸デキストラン、0.1 % SDS) に交換し、一晩ハイブリダイズさせた。ニトロセルロース膜は、5 x SSPE で洗浄し、乾燥後、ラップフィルムにくるみ、BAS III S イメージングプレート (IP) (BAS 1000用) に感光後、IP を BAS 1000 Mac (富士写真フィルム (株)、東京) で読みとり、各バンド強度を数値化した。次に、コントロール実験として、PP1 α プローブをプローブ除去液 (5 mM Tris-Cl (pH 8.0) 、3 mM EDTA、0.1 x Denhardt' s soltion) 中 80 °C で洗浄後、同様にプレハイブリダイゼーションを行い、グリセロアルデヒド三リン酸デヒドロゲナーゼ (GAPDH) cDNA を同様にラベルし、ハイブリダイゼーションを行い、バンドの強度を解析、数値化し、PP1 α の値を GAPDH の値で割って補正し、

グラフにプロットした。

第三節 結果

図に示すように、肝細胞に比べ、AH13 のグラフの傾きの方が右下がりであり、AH13 中での PP1 α の mRNA の減少速度の方が速いことが明らかとなった。

第四節 考察

mRNA の真の減少速度を測定するなら、一定量ずつの細胞から全 RNA を調製し、その全ての量中で比較すべきである。しかしながら完全に全ての RNA を回収するのは技術的に不可能であり、今回は、回収された RNA から一定量を取ることによって、つまり全 RNA 中ほとんどの割合を占めるリボゾーム RNA の減少速度を基準に PP1 α mRNA の減少速度を比較した。つまり PP1 α の mRNA に変異がなければ、環境中での rRNA の減少の変化と同様の変化を示すであろう、という予測のもとに行った。PP1 α cDNA (= mRNA) 中には、一般に知られる mRNA を不安定化させる配列は見られなかった。よって、ある mRNA をターゲットにして分解する RNase の活性化が見られたとしてもその影響はあまり受けないであろうと考えられた。実際、同様の実験を行ったという報告がある [47]。もちろん、注目する mRNA の通常の減少速度が rRNA のものよりおそいのなら、一見増加しているように見えるのは当然である。

肝細胞に比し癌細胞での mRNA 量が増加している原因が、転写活性化によるものでなく、安定性が高まった結果であるなら、グラフの傾きは肝細胞のほうが下がっているはずである。しかしながら、図に示すようにむしろ癌細胞のほうが右下がりである。この結果は、肝癌細胞株 AH13 での mRNA 量の増加は、安定性の向上でなく、転写速度の上昇によることが、間接的ながら示された。よって、以下の章に述べたような、PP1 α のプロモーター領域の解析は有意義であると考えられ、

実験を行った。

第五節 この章のまとめ

移植性腹水肝癌細胞株 AH13 と初代培養肝細胞において PP1 α mRNA の安定性を検討したところ、AH13 での現象速度の方が速く、AH13 における PP1 α mRNA の高発現は転写速度の亢進によることが示唆された。



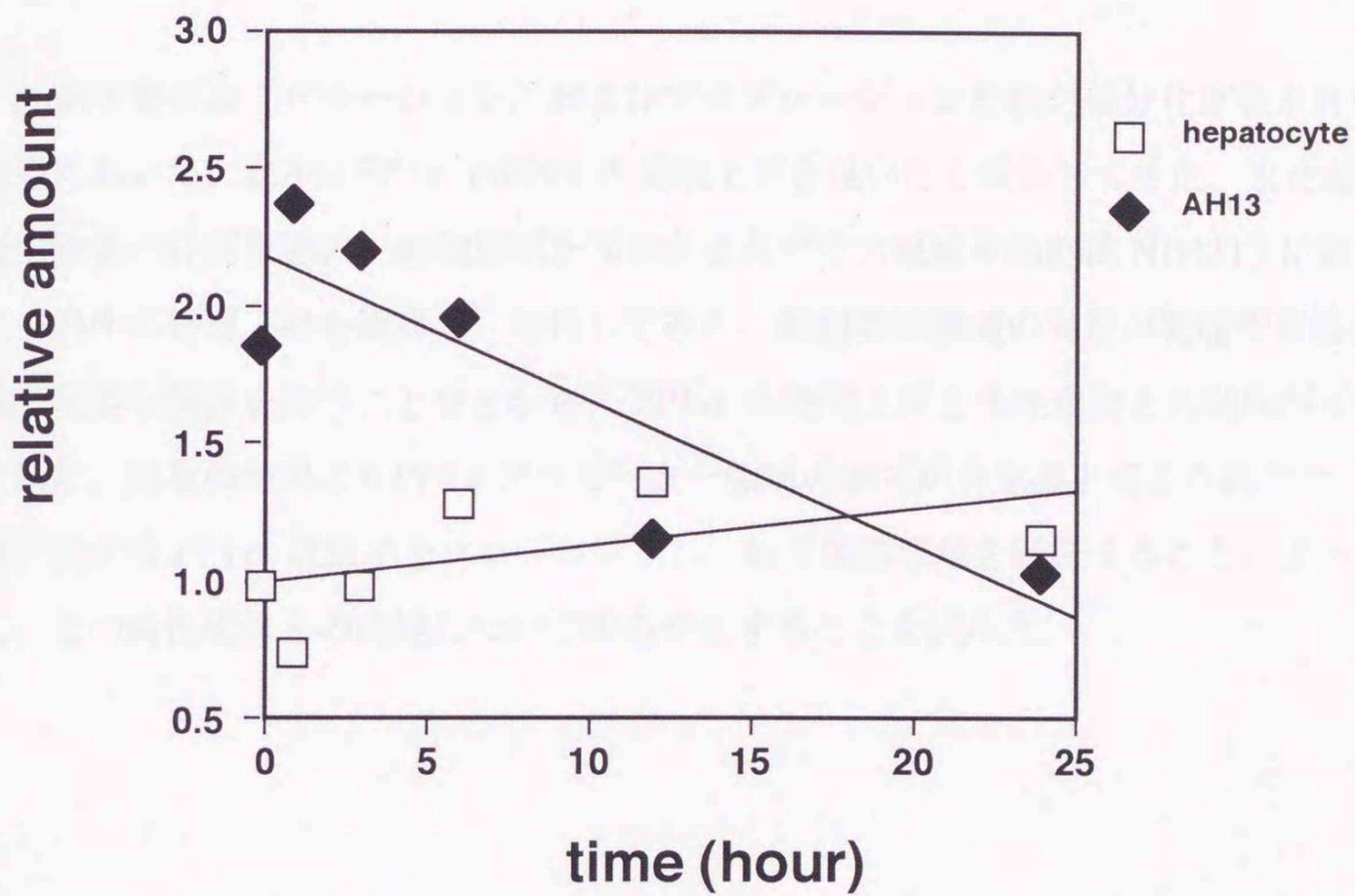


図-2 mRNAの安定性の比較

肝細胞、AH13は、終濃度5 $\mu\text{g/ml}$ になるよう Actinomycin Dを添加して、各時間培養後 mRNAを抽出し、その20 μg を使用してノーザンブロッティングを行った。

第二章 ラット PP1 α 遺伝子 5' -上流域のクローニング

第一節 序論

肝化学発癌のプロモーション、およびプログレッションを経た低分化型腹水肝癌細胞において、我々はPP1 α mRNA の発現上昇を見だし報告してきた。また部分肝切除後の肝再生過程、細胞周期を同調させたマウス線維芽細胞株 NIH3T3 において一過性の発現上昇を観察し、報告してきた。細胞増殖機構の異常が発癌や癌性変異と重要な関係を持つことなどから、PP1 α の発現上昇と悪性変異との関係が示唆された。前章の結果よりPP1 α プロモーター領域の解析が有意義と考えられたため、我々はPP1 α 遺伝子をクローニングし、転写調節領域を解析することによって、その癌性変異との関連について明らかにすることを試みた。

第二節 材料および方法

(1) 材料

ラットジェノミックライブラリー (Sprague Dawley rat testis genomic library) は、Stratagene (CA) より購入した。Megaprime DNA labelling kit は、Amersham (England) より購入した。BcaBEST Dideoxy Sequencing Kit は、宝酒造 (滋賀) より購入した。各種制限酵素、修飾酵素は、宝酒造 (京都)、東洋紡績 (大阪)、New England Biolabs (England) より購入した。 $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{dCTP}$ は Du Pont (MA) より、 $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ は Amersham (England) より購入した。本文中に示した以外の一般試薬は、和光純薬工業株式会社 (大阪)、ナカライテスク株式会社 (京都)、Sigma (MO) から購入した。

合成オリゴヌクレオチドは、北海道大学免疫科学研究所細菌感染部門技官、山口桂氏に合成を依頼した。

(2) ライブラリースクリーニング

ライブラリースクリーニングは、Benton らの方法 [48] に従って行った。ライブラリーは、Sprague Dawley rat testis genomic library (Stratagene, CA) を使用した。まず 1 次スクリーニングを行う前にファージ溶液原液のプラーク形成能 (pfu) を求めた。ファージは 0.2 % マルトースおよび 10 mM MgSO_4 を含む LB 培地で増殖させた大腸菌株 SRB (P2) に感染させ、NZYM-寒天培地上にプラークを形成させた。ファージ溶液は適宜 SM で希釈後、falcon 2059 tube 中で、それぞれ 0.2 % マルトースおよび 10 mM MgSO_4 を含む LB 培地で増殖させた大腸菌株 SRB(P2) 溶液 200 ml に加え、15 分、37 °C で感染させた。0.2 % マルトースを加えた Top Agarose (NZYM-0.7 % agarose) は電子レンジで加熱して溶解し、48 °C のウォーターバス中で保温しておき、10 cm シャーレに作製した Bottom Agar (NZYM-1.5 % agar) は 37 °C で温めておいた。感染後、2 ml の Top Agarose を

tube に加え、泡立てないように攪拌し、温めておいた Bottom Agar の入ったシャーレに流し込み、すばやくひろげて固めた。Top Agarose が固化したら、シャーレは 37°C で一晩放置し、ファージプラークを形成させた。希釈したファージそれぞれから形成したプラーク数を数え、ファージ溶液原液のプラーク形成能 (pfu) を求めた。

次に 1 次スクリーニングを行った。以上より求めた pfu から、約 100,000 個のプラーク形成能のある SM に、希釈したファージ溶液を 1 枚のシャーレにまき、計 30 枚、 3×10^6 プラークよりスクリーニングを開始した。同様に、falcon 2059 tube 中で、それぞれ 0.2% マルトースおよび 10 mM $MgSO_4$ を含む LB 培地で増殖させた大腸菌株 SRB (P2) 溶液 600 μ l に 100,000 pfu のファージを感染させ、感染後、5 ml の Top Agarose を加えて混ぜ、150 mm シャーレに作製した Bottom Agar に広げ、同様にプラークを形成させた。形成したプラークに円形ニトロセルロース膜 (BA85、132mm、0.45 μ m、Schleicher&Schuell、Germany) をのせ、ファージを吸着させた。それぞれのニトロセルロース膜を区別するため、各ニトロセルロース膜にはシャーレと同じ番号を打っておき、また、X線フィルムとプラークの位置を合わせるために、各ニトロセルロース膜をプラークの形成した Top Agarose の上から、27 G の注射針を付けた 1 ml シリンジに滅菌したインクをいれたもので、非対称となるよう 3 箇所突き刺し、印を付けた。それぞれのシャーレから 2 枚の、ファージを吸着させたニトロセルロース膜を作製した。1 枚目は 1 分、2 枚目は 5 分間 Top Agarose の上にのせ、吸着させた。Top Agarose から外したニトロセルロース膜は、吸着面を上にし、3MM 濾紙 (Whatmann, England) 上で乾燥させた。乾燥したニトロセルロース膜は、(1) 0.5 M NaOH/1.5 M NaCl, (2) 0.75 M Tris-Cl (pH 7.4) /1.5 M NaCl, (3) 2 x SSPE の溶液に、それぞれ 2 分、5 分、5 分ずつ浸した後、同じように、吸着面を上にし、3MM 濾紙上で乾燥させた。乾燥後、ニトロセルロース膜は上下を 3MM 濾紙ではさみ、減圧下、80°C で 2 時間、ベーキングした。ベーキング後、42°C に温めたプレウォッシュ液 (50 mM Tris-Cl (pH 7.4) , 1 M NaCl, 1.25 mM EDTA, 0.1% SDS) で 1 時間洗浄し、2 x SSPE です

すいだ。(円形ニトロセルロース膜の枚数 + 2) x 1.5 ml のプレハイブリダイゼーション液(「第一章第二節(4) Northern blotting による解析」を参照)を加えたシャーレにニトロセルロース膜を、気泡が残らないように浸し、パラフィルムでシールした後 42 °C で一晩インキュベートした。翌日、ニトロセルロース膜を各セットに分け、ラベルしたプローブを各々加えたプレハイブリダイゼーション液に同様に浸して、42 °C で一晩ハイブリダイズした。プローブにはラット PP1 α cDNA [30] の全長、およびその 5' -末端より SmaI 制限酵素部位までの約 200 bp を使用した。プローブはメガプライム DNA ラベリングキット (Amersham, England) および [α -³²P]dCTP (Du Pont, MA) によりラベルし、使用した。それぞれ約 50 ng の DNA と 1850 kBq の [α -³²P]dCTP を使用し、キットのプロトコールに従い 10 分間、37 °C で反応させ、等量の PCI (Buffered Phenol : Chloroform : Isoamylalcohol = 25:24:1) を加え、激しく攪拌の後に室温で 10 分間、15,000 rpm で遠心分離し、上層を新しいマイクロチューブに移し、キットに付属の carrier DNA を 10 μ l、1/10 容の 3 M NaOAc (pH 5.2)、2.5 倍量の冷エタノールを加え、-20 °C で 20 分放置後、4 °C、10 分間、15,000 rpm で遠心分離し、溶液を捨て、ペレットを 100 μ l の TE に溶解し、3 分間ボイルし、氷冷して使用した。

翌日、ノーザンブロットイング(「第一章第二節(4) Northern blotting による解析」を参照)と同様に洗浄し、乾燥後、ラップフィルムにくるみ、-80 °C 下、カセット内で X 線フィルム (XRP-5, Eastman Kodak, NY.) に一晩感光させた。それぞれのプローブで得られたシグナルが一致するもののみを選び、現像した X 線フィルムとプラークを形成したシャーレを、インクのマークを目印に重ね合わせ、シグナルが存在した箇所を大きめにえぐり取って回収し(滅菌した 1 ml ピペットチップの反対側を使用した)、1.5 ml マイクロチューブに入れ、1 ml の SM と一滴のクロロホルムを加え、4 °C で一晩放置しファージを溶出させた。このファージが溶出した溶液を SM で適当に希釈し同様に SRB (P2) に感染させ、100 mm シャーレでプラークを形成させた。この結果より、適当な希釈を選び、回収に用いたチップの面積の Top Agarose に含まれるファージの個数を、最初に一枚のシャーレにまいた

ファージの面積当たりの個数から計算し必要量を、再び同様にプレーティングして2次スクリーニングを行った。2次スクリーニングは、回収したシグナルにつきそれぞれ行なった。同様に3次スクリーニングまで行い、ファージをクローニングした。

得られたクローンは、cDNA 5'-末端の32 mer アンチセンスオリゴヌクレオチド (5'-GGCCCTCTCCTGCCTCCCGCCCTCTTGCAGCC-3') 約50 pmol を1,850 mBq の [γ - 32 P]ATP および T4 polynucleotidekinase でエンドラベルしたものを同様にプラークを形成させたシャーレから作製したニトロセルロース膜にハイブリダイズさせ、少なくともこのクローンに5'-末端が含まれることを確認した。

(3) 塩基配列解析のためのプラスミドベクターへのサブクローニング

ライブラリースクリーニングで得られたファージは、大量培養後、DNA を回収し、各種制限酵素で切断の後、サザンブロット [49] を行い、目的のフラグメントを回収し、プラスミドベクターに組み込みサブクローニングした。まず、クローニングしたファージは以下のようにして大量培養し、DNA を抽出した。まず、クローニングしたファージは同様の方法で150 mm シャーレ上にプラークを形成させ、そのうえに5 ml の SM、100 μ l のクロロホルムを加え、パラフィルムでシールし、4°C でゆっくり一晩振とうして溶出させ、回収した。

次に、液体培地を用いて大量培養した。falcon 2070 tube 中0.2% マルトースを添加した25 ml の LB 培地で大腸菌株 SRB (P2) を培養、適宜サンプリングし、可視吸光度計で $ABS_{600}=0.6$ になるまで、増殖させた。その大腸菌液にシャーレから回収したファージの含まれた SM を加え、一晩37°C で増殖させた。次にその溶液を0.2% マルトースを添加した1 l の LB 培地中に加え、さらに一晩増殖させた。翌日、透明になった培養液に、10 ml のクロロホルムを加え、10分、37°C で振とうしながらインキュベートし、その後1時間室温で放置した。そこに各1 mg の DNaseI および RNaseA (Boeringer Mannheim, IN) を加え10分から30分室温で放置した。次に、終濃度1 M となるよう結晶 NaCl を加え(約60 g) 溶かし、1時

間氷上で放置し、その後 100 g の Polyethyleneglycol 6000 (和光純薬、大阪) を加えて溶かし、250 ml 遠心チューブに分注し、氷上で 3 時間放置した。これを 4 °C、5000 rpm、20 分遠心し、上清を捨て、ペレットを 5 ml の SM に溶かした。この溶液を 50 ml の遠心チューブに移し、等量のクロロホルムを加え、激しく攪拌し、4 °C、5000 rpm、20 分遠心し最上層のみ回収した。この溶液を SW40Ti 用ウルトラクラーチューブ中に作製した CsCl 密度勾配溶液 (下層: $\rho = 1.70$ 、中間層: $\rho = 1.50$ 、上層: $\rho = 1.30$ 、それぞれ CsCl を SM に溶解させて作製) に静かにのせ、4 °C、100,000 x g、2 時間遠心した。ファージは上層と中間層の間に青白いバンドとしてみられ、これをそのうえの液を捨ててから約 0.5 ml 回収し、透析チューブ (Dialysis membrane, Size 8、和光純薬、大阪) に入れて封をし、TM (10 mM Tris-Cl (pH 7.5、10 mM MgSO₄) に対して 4 °C で 3 時間以上透析した。このファージ液を TE で 1 ml に合わせ、10 μ l の 10 % SDS、100 μ l の 5 M NaCl、1 ml の Buffered Phenol を加え、4 °C で 30 分間ゆっくり攪拌した。その後、4 °C、15,000 rpm、10 分間遠心し、上層を回収、新しいマイクロチューブに移し、等量のクロロホルムを加え、攪拌、同様に遠心し上層を回収、透析チューブに入れ、TE に対して 4 °C で一晩透析した。翌日、チューブから回収した液をファージ DNA 溶液とし、以下の実験に用いた。

得られたファージ DNA は、6 塩基認識の各種制限酵素 (*Bam*HI、*Bgl*II、*Eco*RI、*Hind*III、*Pst*I) で切断し、1.5 % アガロース/TBE (0.09 M Tris、0.09 M Boric acid、0.02 M EDTA) ゲルで電気泳動し、分画後、サザンブロッティングを行った (結果示さず)。泳動後のゲルは 0.2 M NaOH/0.6 M NaCl 溶液に 30 分振とうしながら浸して DNA 鎖を解離させた後、0.75 M Tris-Cl/1.5 M NaCl (pH 7.5) 溶液に 30 分振とうしながら浸して中和し、ノーザンブロッティング (「第一章第二節 (4) Northern blotting による解析」を参照) と同様の方法でニトロセルロース膜上にキャピラリーブロッティングし、以下ノーザンブロッティングと同様の方法で (プローブハイブリダイゼーション時のみハイブリダイゼーション液ではなくプレハイブリダイゼーション液を使用)、プローブにラット PP1 α cDNA の全長、および 5' 末端より *Sma*I 制限酵素部位までの約 200 bp、5' -末端 32 mer アンチセン

スオリゴヌクレオチドを使用しハイブリダイズするバンドを検出した。その結果、*Hind*III で切断した約 8 kbp のフラグメントに cDNA 全長、cDNA 5' -末端より *Sma*I 制限酵素部位まで、5' -末端 32 mer アンチセンスオリゴヌクレオチドの各プローブがハイブリダイズしたため、そのフラグメントを回収した。ファージ DNA を再び *Hind*III で切断、0.7% アガロース/TBE ゲルで電気泳動により分離し、UV トランスイルミネーターでバンドを確認後、目的のバンドのすぐ + 極側に切れ目をいれ、DE-81 paper を挿入、再び短時間の電気泳動で DE-81 にフラグメントを吸着させ、回収した DE-81 を滅菌蒸留水で洗浄後、0.6 ml のマイクロチューブ中にいれ、TE/50 mM NaCl で洗浄後、TE/1 M NaCl を加え、37 °C で 3~4 時間溶出させ、溶液を回収し、新しい溶液に代え、これを 3 回繰り返して DNA フラグメントを溶液中に回収した。回収した溶液はフェノール/クロロホルム抽出、エタノール沈殿の後、TE に溶かし吸光光度計で濃度を測定したのち使用した。回収したフラグメントは pBluescript KS-、pBluescriptII SK+ (Stratagene, CA) の両プラスミドを *Hind*III で切断したものに、フラグメント : プラスミド = 3 : 1 (モル比) で混合、T4 DNA ligase で 16 °C で一晩ライゲーションした。このライゲーション産物で大腸菌株 DH5 α をトランスフォームし、プラスミドを大量に合成させた。このプラスミドから *Hind*III フラグメントを回収し、更に種々の制限酵素で切断、サザンブロットィングを繰り返し大まかな制限酵素地図を作製し、8 kbp のフラグメントの、どのあたりに cDNA 5' -末端が存在するかを調べた。また、それぞれのフラグメントを pBluescript KS-、pBluescriptII SK+ に組み込んで増やし、シーケンシングに用いた。

(4) シーケンシング

*Hind*III 8 kbp フラグメントの 3' 末端から約 2.2 kbp 上流の *Eco*RI 制限酵素部位までの塩基配列は、BcaBEST Dideoxy Sequencing Kit (宝酒造、滋賀) および 185 kBq の [α -³²P]dCTP (Du Pont, MA) を使用し、ジデオキシ法 [50] にて決定した。40 cm x 20 cm のシーケンス用ゲル板の耳付きの方の内側に自動車のフロントガラス

撥水剤である Super rain X (Unelco, USA) を塗布し、洗浄、乾燥した。反応の前日に、0.4 mm のスぺーサーをはさんで組み立て、40 ml の6%アクリルアミド/8 M 尿素/0.5% TBE (45 mM Tris, 45 mM Boric acid, 1 mM EDTA) ゲル溶液を調製、15 分の脱気後、300 μ l の5% 過硫酸アンモニウム溶液を加え、氷水中でしばらく冷却した後、30 μ l の TEMED (*N,N,N',N'*-Tetramethylethylenediamine) を加え、すばやく、気泡が残らないように流し込み、コームのまっすぐな方を差し込み、一晚放置して固化させた。

シーケンシング反応 (伸長反応) はキットのプロトコールに従い以下のようにして行った。フラグメントをクローニングした約 1~2 nmol のプラスミド溶液をマイクロチューブに取り、4 μ l の 1 N NaOH、2 μ l の 2 mM EDTA を加え、滅菌蒸留水で 20 μ l に合わせ、37 $^{\circ}$ C で 5 分インキュベートした後、2 μ l の 3 M NaOAc (pH 5.2)、50 μ l の冷エタノールを加え、-20 $^{\circ}$ C でしばらく放置した後、4 $^{\circ}$ C、16,000 rpm、10 分遠心し、溶液を捨て、10 μ l の滅菌蒸留水に溶かしたのち、2 本の 0.6 ml マイクロチューブにそれぞれ 5 μ l ずつ分注し、それぞれ 1.5 μ l の 10 x buffer、0.5 pmol のシーケンシングプライマーを加え、滅菌蒸留水で 13.5 μ l に合わせ、185 kBq の [α - 32 P]dCTP (0.5 ml)、酵素溶液 1 μ l を加え、さきに 2 μ l ずつキットに付属の dddATP、dddCTP、dddGTP、dddTTP をそれぞれ分注しておいた 4 本の 0.6 ml マイクロチューブに、3.5 μ l ずつ分注し 65 $^{\circ}$ C で 3 分間反応させた後、キットに付属の chase mix をそれぞれ 1 μ l 加え、さらに 65 $^{\circ}$ C で 3 分反応させ、3 μ l の Stop solution (キットに付属) を加え、反応を停止させた。

前日に作製したアクリルアミドゲルは脱気した 0.5 x TBE buffer を満たした泳動層に取り付け、サンプルを泳動する 30 分前に 55 W でプレランさせて温めておいた。サンプルは、3 分間沸騰水上で加熱した後氷冷し、尿素を除いてコームの菌の

付いた側を差し込んだゲル上端に3 ml アプライし45 Wで泳動した。約1時間半後、キシレンシアノール（水色の色素）がゲル下端から抜けたところで、残りのサンプルの4 ml をアプライして再び45 Wで泳動し、キシレンシアノールがゲル下端まで来たところで泳動を停止した。耳のついたゲル板の方を上にし、ゲル板をはがし、一回り大きくカットした3MM濾紙の平滑面をゲルに張り付け、丁寧にはがし、ラップフィルムでゲル側のみくるみ、その下にさらに一回り大きくカットした3MM濾紙を敷き、ゲルドライヤーで80 °C、1時間半吸引乾燥した。乾燥したゲルはカセットにX線フィルム（XRP-5, Eastman Kodak, NY）と共にいれ、-80 °Cで一晩感光させ、翌日現像し、塩基配列を読みとった。解析はGenetyx Mac ver. 7.3（ソフトウェア開発株式会社、東京）を使用した。

第三節 結果

ライブラリースクリーニングは3次まで行い、1クローンを得た。スクリーニングのプロブはPP1 α cDNA 全長と *Sma*I で切断した5' -末端側のフラグメントを使用した。これは、cDNA 全長をプロブとして用いることでプロブの比活性が高められ、強いシグナルが得られるであろうことと、5' -末端に限定したプロブを用いることで、同領域を含むクローンを選択的に得られることを目的とし、予想通りのクローンを得た。クローニングしたファージ DNA を各種制限酵素で切断し、サザンブロッティングを行った結果、*Hind*III で切断した約 8 kbp のフラグメントに PP1 α cDNA の 5' -末端が含まれることが確認されたため、プラスミドにサブクローニングし、以後、それを使用し解析を行った (図 - 3)。得られた *Hind*III 8 kbp フラグメントは、*Bgl*II、*Eco*RI、*Pst*I、*Sma*I の各制限酵素で切断の後、サザンブロッティングを行い、*Sma*I で切断した PP1 α cDNA の 5' -末端側のフラグメントをプロブとして用いた。その結果、*Pst*I で切断した約 0.5 kbp のフラグメントにハイブリダイズし、PP1 α cDNA 5' -末端は、*Hind*III フラグメントの 3' -末端から約 500 bp 以内に存在することが示唆され、*Hind*III フラグメント中に PP1 α 遺伝子の 5' -上流転写調節領域が含まれる可能性が非常に高く、このフラグメントを用いて解析することは有意義であると考えられた。同様に、*Hind*III フラグメントを *Eco*RI で切断して得られた *Eco*RI-*Hind*III 約 2.2 kbp のフラグメントをシーケンシングした (図 - 4)。当初、DNA polymerase に klenow fragment や Sequenase を使用したキットを用いてシーケンシングを開始したが、高 GC 領域の存在のため強いポージング (伸長反応の停止) が起こりうまく行かなかったので、好熱菌由来の DNA polymerase を採用し、反応温度を 65 °C に設定してあるシーケンシングキットである BcaBEST Dideoxy Sequencing Kit (宝酒造、滋賀) を使用したところ、良好な結果を得た。PP1 α cDNA 中には *Hind*III site は存在しないので、*Hind*III 8 kbp フラグメントの 3' -末端はイントロン内であることは予測されていたが、塩基配列を解析した結果は、3' -末端の *Hind*III site から約 270 bp のイントロンが存在し、その上流に開始メチオニンから 18 アミノ酸をコードする領域を含むエクソン

が存在した。3' -末端の *Hind*III site から下流の DNA 断片はクローニングしていないので、第一イントロンの長さや、その他のエクソン、イントロンなどの情報は得られていない。第一エクソン-イントロン接合部は、一般的な接合部のイントロンの 5' -末端側に特徴的な配列である “GT” が見られた。翻訳開始点から約 300 bp は GC が非常に高い割合で含まれ、TATA box や CAAT box は存在しなかった。また、Inr [51] 様の配列も見られず、ハウスキーピング遺伝子様のプロモーター配列であった。

この様なハウスキーピング遺伝子の発現に主に関与する転写因子として Sp1 が知られているが、本遺伝子の翻訳開始点から上流約 300 bp に存在する高 GC 領域には、Sp1 結合可能な配列として一般的に知られる “GGGCGG” もしくは “CCGCCC” が 9 箇所見られた。しかしながらその配列を中心とした周囲の配列も結合に関与するようであり、9 箇所のうちどこに結合するかは推定できなかった。

第四章 考察

真核細胞における、蛋白質をコードする遺伝子の mRNA の転写は、RNA polymerase II によって行われるが、その転写開始機構は、図 X のように 3 種に大別される。以前に 5' -上流域について報告されているセリン/スレオニンプロテインホスファターゼの一分子である PP2A の場合も本遺伝子と同様に TATA box や CAAT box は存在せず、ハウスキーピング遺伝子様であると筆者らは述べている [38]。ハウスキーピング遺伝子とは、生体機能を維持する上で必須な蛋白質をコードする遺伝子のこと、とされており、常に一定レベルの発現を保っていると考えられる。PP1 は、 γ -1 アイソフォームを除き、各臓器、細胞で広く発現しており、また細胞内分布も広く、活性サブユニットの基質特異性も低いため、細胞内での様々な脱リン酸化反応に関与していることが予想されている。よって、PP1 もこの様なハウスキーピング遺伝子の一つであろうことは予想される。実際、PP1 α 遺伝子の 5' -上流域は、ハウスキーピング遺伝子のプロモーターの特徴を備えていた。よってその塩基配列の特徴から PP1 α の転写は、図 5 に示すような mRNA 転写開始機構の、C でのように、Sp1 のプロモーター部位への結合をきっかけとして行われるものと考えられる。

PP2A の場合、cAMP responsive element (CRE) が存在しており、PP2A 遺伝子のプロモーター領域をつないだ CAT (Chloramphenicol Acetyltransferase) ベクターを NIH3T3 細胞に導入し、アデニル酸シクラーゼの活性化剤である forskolin で処理することにより細胞内の cAMP 濃度を上昇させてやると CAT の転写が活性化することが報告されている [38]。また、calcineurin A α (PP2B A α) プロモーターには脳に発現する遺伝子に特異的な配列が存在することが報告されている [40]。しかしながら本酵素では、そのような特徴的な配列は見られなかった。

現在では TFD (Transcription Factor Database) により、塩基配列から作用する転写因子を検索することは可能である。しかし、得られた情報は、あくまで配列と転写因子の結合の可能性を示したに過ぎず、細胞内ではゲノム DNA はヌクレオソームに巻き付いた形で存在し、転写に必要なときのみほどこかれ、転写因子が結合

し得るし、また、因子自体が発現しているか、また存在していても活性化し結合可能な状態にあるかは現段階では知り得ず、今後の課題として残されている。

第五節 この章のまとめ

1. ラットゲノムライブラリーから PP1 α 遺伝子の 5' -上流域をクローニングした。
2. 翻訳開始点から上流約 1.8 kbp、下流約 0.4 kbp の計約 2.2 kbp をシーケンシングした。その結果、翻訳開始点上流約 300 bp は高 GC 配列を有した。TATA box、CAAT box は存在せず、ハウスキーピング遺伝子に特徴的なプロモーターの配列を有していた。この様な遺伝子のプロモーターに作用することが知られる転写因子 Sp1 に対する結合配列が、翻訳開始点より上流に 9 箇所、第 1 イントロンの一部に 2 箇所存在した。第一エクソンは、18 アミノ酸をコードしていた。

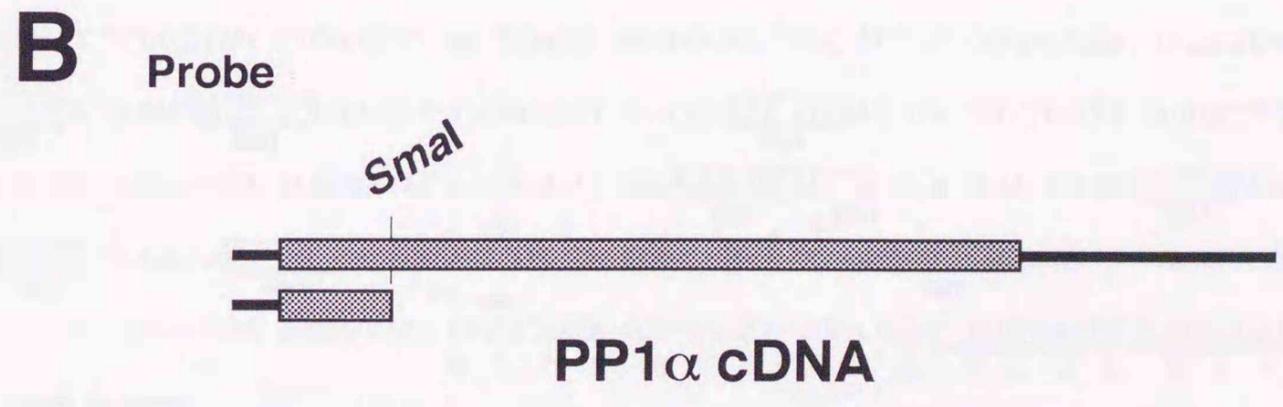
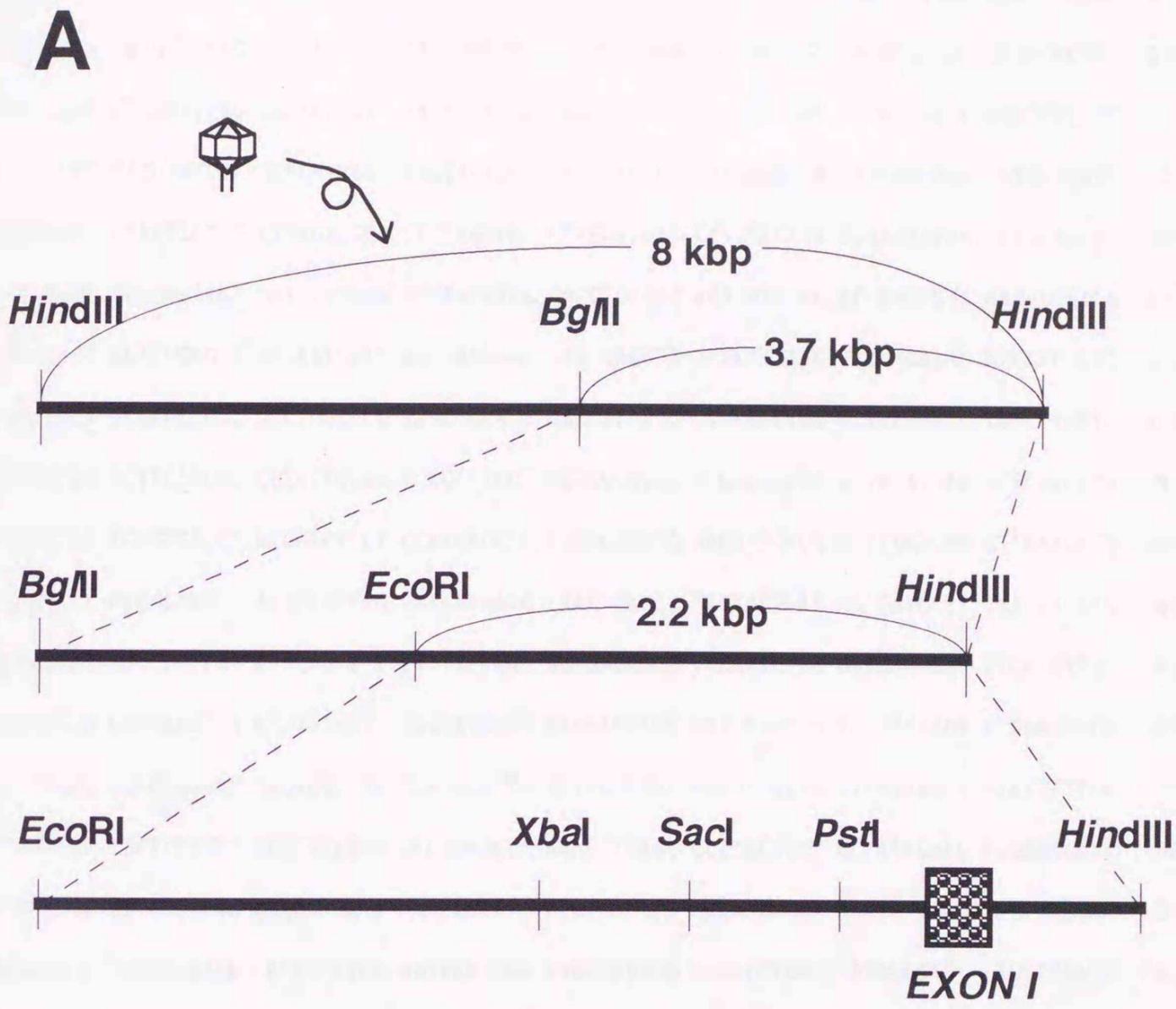


図-3 フェージ DNA からの PP1 α 遺伝子5'-上流域のクローニングの手順
 A: クローニングしたフェージ DNA から *Hind*III で切断した約 8 kbp のフラグメントを得た。そのフラグメントを *Bgl*III で切断した下流の約 3.7 kbp のフラグメントを以降に述べるルシフェラーゼアッセイで使用した。さらにそのフラグメントを *Eco*RI で切断した下流の 2.2 kbp の塩基配列を決定した。第一エクソンを box で示した。B: クローニングに使用したプローブ。PP1 α cDNA の全長および *Sma*I で切断した上流約 200 bp を使用した。

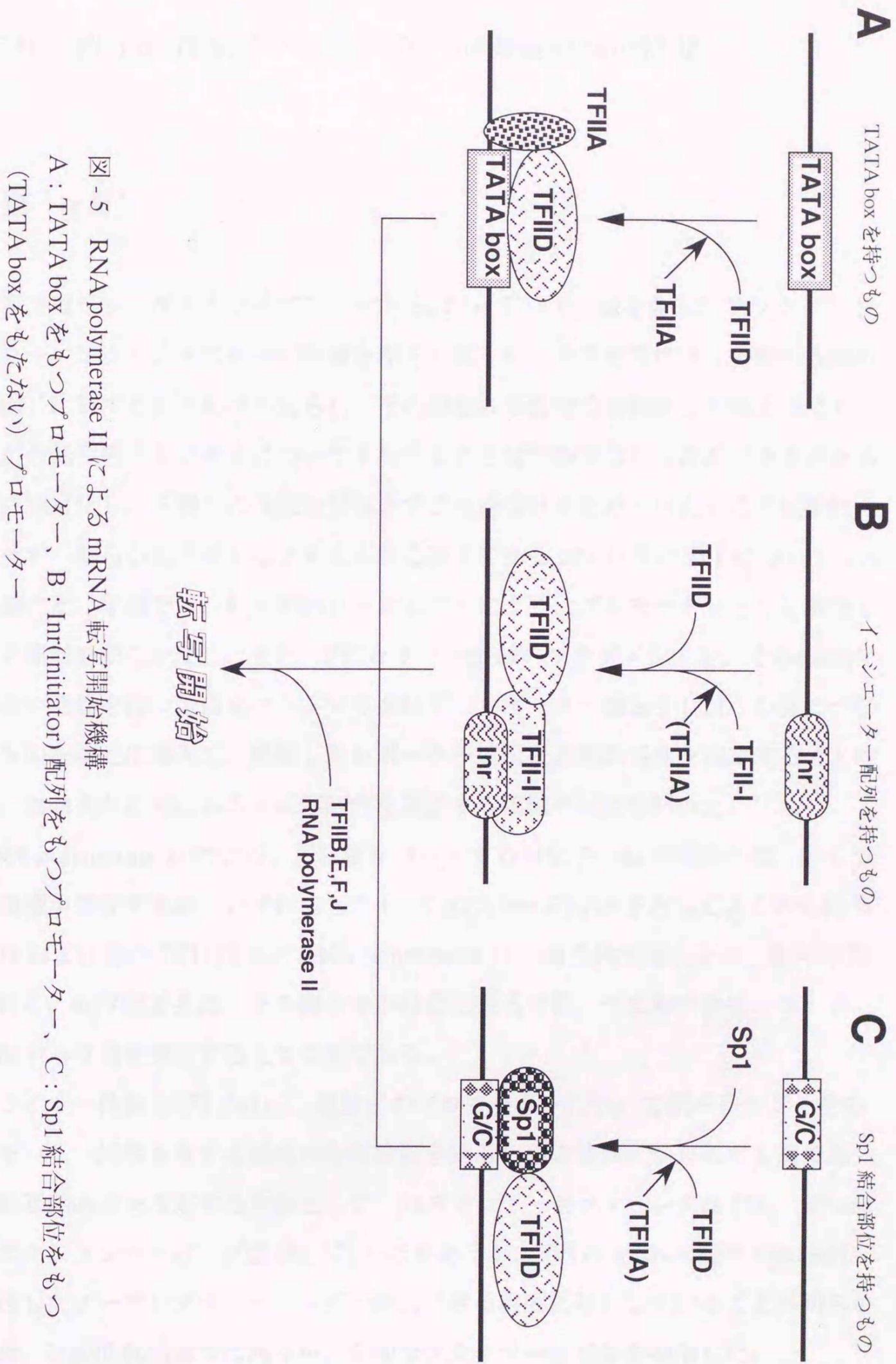


図-5 RNA polymerase II による mRNA 転写開始機構

A : TATA box をもつプロモーター、B : Inr(initiator) 配列をもつプロモーター、C : Sp1 結合部位をもつ (TATA box をもたない) プロモーター

第三章 PP1 α 遺伝子プロモーターの機能領域の同定

第一節 序論

前章ではラットゲノムライブラリーからPP1 α 5' -上流域を含んだフラグメントをクローニングし、その配列の特徴を明らかにした。その配列には、各種の既知の転写因子に対する結合配列が見られ、その細胞の形質や培養状態との関連によりいくつかの転写因子との作用について予想することは可能ではあったが、思考がある方向に固定化し、予想外の現象を見落とすことを避けるため、あえてその結果には注目せず、明らかに作用すると考えられる因子である Sp1 以外の因子についての言及を避けた。本章では、転写開始点を知ることにより、プロモーターとして機能している領域を明らかにし、また、PP1 α 5' -上流域のフラグメントを、その細胞内にはない活性を持つ蛋白をコードする遺伝子（レポーター遺伝子 [52]）の前につないだものを細胞に導入し、発現したレポーター遺伝子産物の活性を測定することにより、おおまかにではあるが転写活性を調節する領域の同定を試みた。

RNA polymerase II による、蛋白質をコードする遺伝子の転写開始には、いくつかの機構が存在するが、いずれにしても、TATA box 結合因子としてよく知られる TFIID および他の TFII 因子と RNA polymerase II の複合体生成により、転写が開始される。転写開始点は、その複合体が結合し得る位置、つまりプロモーターとして機能する位置を推定する上で重要である。

プライマー伸長法 [53, 54] は、遺伝子のプロモーターについて調べる上で、そのプロモーター活性を有する部位の存在位置を知るための簡便且つ有効な方法である。転写開始点を決定する方法として、S1ヌクレアーゼマッピング法 [55]、RNase プロテクションマッピング法 [56, 57] などがあるが、PP1 α mRNA 量が total RNA を使用したノーザンブロットィングで検出できる程度に存在していることが明らかでないため、比較的感度ではあるが、簡便なプライマー伸長法を採用した。

また、転写因子の多くは、単独では転写開始をおこさないが、転写開始に直接関

与する領域以外で DNA に結合し、その因子が転写開始複合体と作用することで転写活性を変化させることが知られている。レポーターを用いた実験では結合したフラグメントの違いで生じた転写活性の変化を捉えることにより、転写因子と作用する領域を特定、又は限定しうる。また、その差が生じた領域の有無を各細胞間で比較することにより、それぞれの細胞がおかれている状態でのその領域に対する転写因子の作用の差を推測することができる。

本章では、本遺伝子プロモーターの機能を有する領域を限定すること、および癌細胞でのそれを正常細胞と比較し、癌細胞での転写の亢進の原因をとなる領域を同定すべくレポーター遺伝子を用いた実験を行った。レポーターには、近年良く用いられているホタルルシフェラーゼ [58] を使用した。

第二節 材料および方法

(1) 材料

pRSVLacZ は、免疫科学研究所細菌感染部門助手、幸田敏明先生より供与された。

Superscript II Reverse Transcriptase、LipofectAMINE Reagent、Opti-MEM I Reduced-Serum Medium は、Life Technologies (MD) より購入した。Exo/Mung Deletion Kit は Stratagene (CA) から、Kilo-Sequence 用 Deletion Kit は宝酒造 (京都) から購入した。BcaBEST Dideoxy Sequencing Kit は、宝酒造 (滋賀) より購入した。ルシフェラーゼベクター pGV-B2 およびピッカジーン発光キットは、東洋インキ製造 (東京) より購入した。XhoI および HindIII リンカーは、宝酒造 (京都) より購入した。各種制限酵素、修飾酵素は、宝酒造 (京都)、東洋紡績 (大阪)、New England Biolabs (England) より購入した。 $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{dCTP}$ は Du Pont (MA) より、 $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ は Amersham (England) より購入した。Wister rat (8 週齢、オス、SPF) は、日本エスエルシー (静岡) より購入した。本文中に示した以外の一般試薬は、和光純薬工業株式会社 (大阪)、ナカライテスク (京都)、Sigma (MO) から購入した。

(2-1) プライマー伸長法

(2-1-1) mRNA 調製

全 RNA は、ラット肝より AGPC 法 [46] により調製した。断頭屠殺し、十分脱血させた Donryu ラット肝臓は、使用時まで $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ で保存した。使用時に、 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ に保存しておいた肝臓を冷蔵庫より取り出し、すばやく木槌でたたいて粉碎し、約 1 g を秤りとり、10 ml の solution D (5.5 M GTC (Guanidin isothiocyanate)、25 mM NaOAc、0.5 % sodium lauryl sarcosinate) をあらかじめ入れて氷中で冷却して

おいた 20 ml ポッター型ホモジェナイザーにいれて、ピストンをモータードライブに固定し、15 回のストロークで懸濁した。溶液は 2 本の falcon 2059 tube に 5 ml ずつ分注し、1 ml の 3 M NaOAc (pH 4.8)、5 ml の水飽和フェノール、2 ml のクロロホルムを加え、攪拌し氷上で 15 分放置した。その後、4 °C、4,000 rpm、15 分遠心し、最上層を回収、新しいチューブに移し、等量の冷イソプロパノールを加え 4 °C、4,000 rpm、15 分遠心した。溶液を捨て、ペレットを 75 % 冷エタノールで洗浄し、適量の DEPC 処理した滅菌蒸留水に溶かし全 RNA 溶液とした。同溶液は、紫外吸光光度計で濃度を測定した。使用時まで -20 °C で保存した。

得られた全 RNA は oligo p(dT) カラムにて精製し poly (A)⁺ RNA 画分を得た。約 5 mg の全 RNA は 65 °C にインキュベートし、同時にインキュベートしておいた 2x binding buffer を等量加え、ゆっくり室温に戻した。約 1 ml の oligo p(dT) cellulose (Amersham, England) を充填したカラムは、0.1 N NaOH で活性化した後、DEPC 処理した滅菌蒸留水で洗浄し、排出される液の pH が 8 以下になったところで 10 ml の binding buffer を通して平衡化させた。室温に戻った RNA-binding buffer をカラムに流し、流出した溶液を回収して再び流すことを 4 回繰り返す、poly (A)⁺ RNA をカラムに吸着させた。その後、10 ml の binding buffer、10 ml の washing buffer を通して非 poly (A)⁺ RNA を洗浄し、65 °C にインキュベートした 0.5 ml の elution buffer を流した後、回収用の tube をカラム下に置き、さらに 65 °C にインキュベートした 3.5 ml の elution buffer を流して poly (A)⁺ RNA を溶出させ回収した。回収した溶液からエタノール沈殿によって poly (A)⁺ RNA を得た。1/10 容の 3 M NaOAc (pH 4.8) および 2.5 容の -20 °C に冷却したエタノールを加え、-20 °C で数時間放置、4 °C、4,000 rpm、10 分の遠心によって RNA を沈殿させ、ペレットを -20 °C に冷却した 75 % エタノールで洗浄し、適量の DEPC 処理した滅菌蒸留水で溶かして poly (A)⁺ RNA 溶液とした。同溶液は、紫外吸光光度計により濃度を測定した。使用時まで -20 °C で保存した。

(2-1-2) プライマーの放射標識

翻訳開始点より 21 番の塩基から、26 mer のアンチセンスオリゴヌクレオチド (5' -CTTCCAGCAGGCCCGATGATGGAA-3') を合成し、その 5' -末端を [γ - 32 P]ATP および T4 polynucleotidekinase でエンドラベル (「第二章第二節 (2) ライブラリースクリーニング」を参照) したものをプライマーとした。

(2-1-3) サイズマーカーに用いるためのシーケンシング

ゲノムライブラリーからプラスミドベクターにクローニングした約 8 kbp の *Hind*III フラグメントの、3' 末端から約 1.6 kbp 上流の *kpn*I 制限酵素部位までを、pBluescript KS- のマルチクローニングサイト内の *Hind*III および *kpn*I 制限酵素部位に組み込んだ pBKH- を、プライマー伸長法に用いた 26 mer のオリゴヌクレオチドをプライマーとして使用し、ジデオキシ法 [50] にて作製した。手順は、「第二章第二節 (4) シーケンシング」の方法に従って行った。

(2-1-4) プライマー伸長法

プライマー伸長法の反応は、Bina らの方法 [53] を改変して用いた。1.5 ml のマイクロチューブを用い、5 mg の poly (A)⁺ RNA および 50,000 cpm のラベルしたプローブを、20 μ l のハイブリダイゼーション液 (1x TE, 0.25 M KCl) 中で、65 °C で 1 時間インキュベートした後、室温で 1.5 時間、アニールさせた。その後、80 μ l の 4/5 RT buffer (31.25 mM KCl, 5 mM MgCl₂, 60 mM Tris-Cl (pH 8.3))、2.5 mM dATP、2.5 mM dCTP、2.5 mM dGTP、2.5 mM TTP、200 U (1 μ l) の SuperscriptII reversetranscriptase (Life technologies, MD) および 1 U の RNasin (Promega, WI) を加え、45 °C で 1 時間インキュベートした。反応後、等量の PCI (Buffered Phenol : Chloroform : Isoamylalcohol = 25 : 24 : 1) を加え、攪拌し

た後、室温で 15,000 rpm で 10 分間遠心し、上層を新しい 1.5 ml マイクロチューブに移し、10 μ l の 3 M NaOAc (pH 5.2)、250 μ l の冷エタノールを加え、-20 $^{\circ}$ C で 1 時間放置後、4 $^{\circ}$ C、15,000 rpm、15 分遠心して沈殿後させ、風乾したペレットを 10 μ l の Loading dye (50 % Formamide, 10 mM EDTA, 0.025% Bromophenol Blue, 0.025% Xylene Cyanol FF) に溶かしてサンプルとした。

(2-1-5) 電気泳動による解析

先述のように作製したサンプルは、同時に、50,000 cpm のプライマーと 1 mg yeast tRNA とで同様に反応させたものをネガティブコントロールとしたもの、プライマーのみのも、また伸長産物の長さを決定するため、おなじく先に述べたように、同じプライマーをもちいて、クローニングしたゲノム DNA をシーケンシングしたものを作製し、共に、30 分間 55 W でプレランし、温めておいた 7% Urea-Acrylamide gel (40 x 20 cm) にアプライし、45 W で約 2 時間泳動させ、Xylene Cyanol FF がゲル下端から約 5 cm に到達したところで止めた。耳のついたゲル板をはがし、ゲルより一回り大きく切った 3MM 濾紙 (Whatmann, England) の平滑面をゲルに張り付け、丁寧にはがしてゲル面のみラップフィルムでくるみ、ゲル面を上にし、下にさらに一回り大きく切った 3MM 濾紙を敷いて、80 $^{\circ}$ C に加熱したゲルドライヤーで約 1 時間半吸引乾燥させた。乾燥したゲルは、X 線フィルム (Eastman Kodak XAR-5, NY.) と共にカセットに入れ、-80 $^{\circ}$ C で 2 日間感光させ、現像した。

(2-2) ルシフェラーゼをレポーターとした、PP1 α 5' -上流域遺伝子の転写活性に影響を及ぼす領域の特定

プロモーターフラグメントの転写活性の測定のためにレポーター遺伝子を用いた実験 [52] は広く行われており、今回用いたルシフェラーゼ [59-62] の他にも以前か

ら良く使用されている CAT (Chloramphenicol Acetyltransferase) [63]、今回も使用した β -ガラクトシダーゼ、最近使われた GFP (Green Fluorescent Protein) [64]、などが用いられている。本実験では高感度で簡単に測定が可能なルシフェラーゼをレポーターとして使用した。また、各サンプル間でのトランスフェクション効率の差を補正するため、RSV (Rous Sarcoma Virus) プロモーターを β -ガラクトシダーゼにつないだプラスミドを一定量同時にトランスフェクションし、その活性を測定した。

(2-2-1) 細胞培養

本実験には、(1) マウス線維芽細胞株 NIH3T3、(2) ラット初代培養肝細胞、(3) 移植性腹水肝癌細胞株 AH13 を使用した。

(1) NIH3T3 細胞は、以下のように培養した。10% DMSO を含む 10% CS (Calf Serum) /DMEM 中で凍結保存された細胞の入ったチューブを 37°C のウォーターバス中で速やかに解凍後、15 ml falcon 2059 tube (Beckton Dickinson, NJ) に移し、4°C に冷却した PBS (-) 約 10 ml を加え、4°C、1,200 rpm、5 分遠心し、上清を捨てることを 2 回繰り返して洗浄し、組織培養用シャーレ (IWAKI 3020-100、岩城硝子、千葉) に 10 ml の 10% CS/DMEM 中で $1\sim 2 \times 10^5$ cells/100 mm dish の細胞密度でプレーティングし、5% CO₂、37°C の CO₂ インキュベーター内で培養した。シャーレの底面積の約 70~80% が細胞で占められた時点で、培養液を捨て、適量の PBS (-) をシャーレに静かに加えて細胞を洗浄し、液を捨て、2 ml の 0.05% Trypsin-0.53 mM (0.2%) EDTA 溶液を加えて CO₂ インキュベーター内で約 5 分温めて細胞を剥離した。剥離した細胞は適量の PBS (-) をシャーレに加えて falcon 2059 tube に入れ、4°C、1,200 rpm、5 分遠心し、上清を捨て、適量の培地に懸濁後、細胞数を数え、再び 100 mm 径の組織培養用シャーレに 10 ml の 10% CS/DMEM 中で $1\sim 2 \times 10^5$ cells/100 mm dish の細胞密度でプレーティングすることを繰り返して継代培養した。細胞の形質転換を防ぐため、初めに大量の細胞の冷凍ストックを作製しておき、実験ごとに融解してプレーティングしたも

のを使用した。細胞の冷凍ストックは以下のように作製した。上記と同様に細胞を剥離し、細胞数を数えてから洗浄し遠心によってペレットにした。ペレットにした細胞は10%のDMSOを添加し、4°Cに冷却した10%CS/DMEMに少なくとも 2×10^6 cells/mlとなるよう懸濁し、falcon 2047 tube（又は同等品）に細胞の懸濁した溶液を入れ10分間氷上で放置した後、発泡スチロールの箱に入れ、-80°Cのフリーザーに入れ徐々に温度を下げるようにして凍結させた。凍結した細胞は液体窒素中に保存した。

(2) ラット初代培養肝細胞 (3) 移植性腹水肝癌細胞株 AH13 については、「第一章第二節 (2) 細胞培養」に記述した。

(2-2-2) 種々の PP1 α 5' -上流域遺伝子断片を組み込んだルシフェラーゼレポータープラスミドの構築

レポーター遺伝子にはルシフェラーゼを用いた。ベクターは pGV-B2（東洋インキ製造、東京）を使用した。各種の PP1 α 5' -上流域フラグメントを組み込んだレポータープラスミド（図-7）は以下のように構築し、DH5 α 大腸菌株に導入し大量に合成させた後、Alkali lysis /二回の CsCl 密度勾配中で精製し、TE に対して透析後、使用した。

ルシフェラーゼベクターに組み込んだフラグメントは、第二章で、シーケンシングのために PP1 α 遺伝子の 5' 上流域を pBluescript プラスミドに組み込んだものを利用して作製した。まず、pLuc3.7、pLuc1.8、pLuc0.8、pLuc0.5、pLuc(-198) の 5 種を作製した。それぞれ第二章でクローニングしたファージ DNA から、プラスミドベクターにサブクローニングした *Hind*III 8 kbp フラグメントの 3' -末端から上流に最初に現れる *Bgl*II、*Eco*RI、*Xba*I、*Sac*I、*Pst*I の各制限酵素部位の 5' -末端に *Xho*I リンカー（宝酒造、滋賀）、翻訳開始点上流 37 base に存在する *Apa*I 制限酵素部位の 3' -末端に *Hind*III リンカー（宝酒造、滋賀）を付け、ルシフェラーゼベクターのマルチクローニングサイト内の両制限酵素部位に組み込んだ。なお、*Eco*RI-*Xba*I 間に *Apa*I 制限酵素部位が存在したため、*Bgl*II、*Eco*RI site-*Xba*I site

の両フラグメントの5'-末端に *Xho*I リンカーを付けたもの、および *Xba*I site-*Apa*I site のフラグメントの3'-末端に *Hind*III リンカーを付けたものをそれぞれ作製し、後から結合して作製した。

pLuc3.7は次のように作製した。まず、*Xho*I リンカーを付けた *Bgl*II site-*Xba*I site のフラグメントを作製した。ファージからサブクローニングした *Hind*III 8 kbp フラグメントを組み込んだプラスミド pBH8+ は、*Bam*HI、*Bgl*II の両制限酵素で切断、電気泳動にて分画し、*Bgl*II-*Hind*III/pBluescript II SK+ の約 8 kbp のフラグメントを回収、T4 DNA polymerase により末端を平滑化し、*Xho*I リンカーをライゲーションしたもので、DH5 α をトランスフォームし、プレート上に生成したコロニー数個をミニカルチャーし、そこから得られた DNA から *Xho*I、*Xba*I で切断し、約 2.7 kbp のフラグメントが生成するものを選び、その約 2.7 kbp のフラグメントを回収した。次に、*Hind*III 8 kbp の3'-末端から上流に最初に現れる *Xba*I 制限酵素部位から翻訳開始点上流 37 base に存在する *Apa*I 制限酵素部位までの約 0.8 kbp を同様に pBluescript II SK+ の両制限酵素部位に組み込んだプラスミド pBXA+ を用いて、*Xba*I site-*Apa*I site のフラグメントの3'-末端に *Hind*III リンカーを付けたプラスミド pBXA(*Hind*III)+ を作製した。pBXA+ は、*Apa*I で切断した後同様に T4 DNA polymerase により末端を平滑化し、*Hind*III リンカーをライゲーションしたもので DH5 α をトランスフォームし、プレート上に生成したコロニー数個をミニカルチャーし、そこから得られたプラスミドを *Xba*I、*Hind*III で切断し、約 0.8 kbp のフラグメントが生成するものを選び、そのフラグメントを回収した。最後に、先に回収した *Xho*I リンカーを付けた *Bgl*II site-*Xba*I site のフラグメントと *Xba*I site-*Apa*I site のフラグメントの3'-末端に *Hind*III リンカーを付けたものを、ルシフェラーゼプラスミド pGV-B2 をマルチクローニングサイト内の *Xho*I、*Hind*III 両制限酵素部位で切断したものにライゲーションした。

pLuc1.8 も同様の方法で作成した。*Eco*RI site-*Hind*III site のフラグメントを組み込んだ pBluescript II SK+ を *Eco*RI で切断、T4 DNA polymerase で末端を平滑化し、*Xho*I リンカーをライゲーションしたもので DH5 α を形質転換し、生成したコロニー数個をミニカルチャーし、そこから得られた DNA を *Xho*I、*Xba*I で切断

し、約 1 kbp のフラグメントが生成するものを選び、そのフラグメントを回収した。先に述べたように作製した、*Xba*I site-*Apa*I site のフラグメントの 3' -末端に *Hind*III リンカーを付けたものと同様にルシフェラーゼプラスミド pGV-B2 に組み込んだ。

pLuc0.8、pLuc0.5、pLuc (-198) は、先に述べた、pBXA+ の *Apa*I site に *Hind*III リンカーを組み込んで作製したプラスミド pBXA(*Hind*III)+ から作製した。それぞれ、pBXA(*Hind*III)+ を、*Xba*I、*Sac*I、*Pst*I で切断、T4 DNA polymerase で末端を平滑化し、*Xho*I リンカーをライゲーションした。生成したプラスミドで同様に DH5 α を形質転換して、生成したコロニー数個をミニカルチャーし、そこから得られたプラスミドを *Xho*I および *Hind*III で切断し、それぞれ約 0.8 k、0.5 k、0.2 k のフラグメントが切り出されたものを選んだ。

また、pLuc (-198) (*Pst*I 制限酵素部位)、pLuc (-157)、pLuc (-124)、pLuc (-112)、および pLuc (-68) は、Henikoff [65] および Yanisch-Perron らの方法 [66] に従い、pLucPA を Exo/Mung Deletion Kit (Stratagene, CA) および、Kilo-Sequence 用 Deletion Kit (宝酒造, 京都) を使用し、挿入した *Pst*I-*Apa*I フラグメントを短くし、調製した。pLuc (-198) は、*Xho*I、*Kpn*I の両制限酵素で切断、5' -および 3' -突出末端を形成させた後、DNA フラグメント 1 pmol あたり 20 U の Exonuclease III を加え、23 °C で反応させ、導入したフラグメントを削っていった。反応溶液中から、20 又は 30 秒毎に 1/10 容ずつサンプリングし、氷冷した Mung Bean nuclease buffer 中に加えて反応を停止させ、すべてを移し終えた後、65 °C で 15 分加熱して Exonuclease III を熱変性させて失活させ、冷却後、Mung Bean nuclease 50 U を加え、37 °C、30 分インキュベートし、DNA の 1 本鎖の部分分解した。反応後、PCI 抽出、エタノール沈殿によって DNA フラグメントを回収し、DNA のペレットを 50 ml の Klenow buffer に溶解し、2 U の Klenow fragment を加えて 37 °C で 15 分間インキュベートし、末端を完全に平滑化した。その溶液の 5 ml を使用し、T4 DNA ligase でプラスミドを再度環化した。この溶液を、PCI 抽出、エタノール沈殿によって DNA フラグメントを回収し、*Xho*I で切断した後に、この溶液を用いて DH5 α を形質転換して ampicillin を添加した LB

plate 上に広げてコロニーを形成させ、数百個のコロニーからプラスミドを回収し、制限酵素による切断および電気泳動で、削った後に残ったフラグメントの長さを求めた。フラグメントの5'-末端は、シーケンシングにより確認した。

また、pLuc1.8 ($\Delta 198$)、pLuc0.8 ($\Delta 198$)、pLuc0.5 ($\Delta 198$) は、それぞれ pLuc1.8、pLuc0.8、pLuc0.5 を、*Pst*I、*Hind*III で切断し、T4 DNA polymerase で末端を平滑化した後に、T4 DNA ligase でライゲーションして作製した。

(2-2-3) トランスフェクション、およびトランスフェクションした細胞の培養

NIH3T3 にはリン酸カルシウム法 [67] を用いた。60 mm の組織培養用シャーレ (IWAKI 3010-060、岩城硝子、千葉) にトランスフェクション時に 2×10^5 cells/dish となるように、前日に計算して 3 ml の 10% CS/DMEM 中にプレーティングした。倍加時間はほぼ 20 時間であったため、 t 時間後にトランスフェクションする細胞数 n は、次の式により求めた。 $2 \times 10^5 = n \cdot 2^{t/20}$ よって $n = 2 \times 10^5 \times 1/2^{t/20}$ 。トランスフェクション 1 時間前に培地を交換し、さらにトランスフェクションの 30 分前に以下の溶液を混合できるように調製し、混合した。2 μ g の各ルシフェラーゼプラスミドと、0.3 μ g の pRSVLacZ [68]、5 μ g のサケ精子 DNA を 1.5 ml マイクロチューブ中で混合し、17 μ l の 2.5 M CaCl_2 を加え、滅菌蒸留水で 170 μ l に合わせたものを用意し、2 ml マイクロチューブ中に用意した 170 μ l の 2x HBS (pH 7.15、50 mM HEPES、280 mM NaCl、1.5 mM Na_2HPO_4) 中に攪拌しながら一滴ずつゆっくり加え、室温で 30 分放置し、沈殿を形成させた。混合から 30 分後、形成した沈殿溶液を、シャーレ中に培養液を攪拌しながら一滴ずつ加えた。37°C、5% CO_2 下で 24 時間培養した。

初代培養肝細胞には LipofectAMINE (Life technologies, MD) を使用し、リポフェクション法 [69] にて導入した。トランスフェクション前日、3.5 cm 径のシャー

レ (IWAKI 1000-035、岩城硝子、千葉) に、1 ml の Vitrogen 100 を加え、一晩放置しコーティングし、使用直前に適量の PBS (-) で洗浄した。コラゲナーゼ灌流法により分離された肝細胞は、L-15 培地に懸濁し、シャーレに 1×10^6 cells 加え、L-15 培地で 2 ml に合わせた。すぐにシャーレを軽く振とうし、細胞が底面に均一に広がるようにし、3 枚のシャーレを 1 枚の 10 cm 径のシャーレ中にいれ、そのシャーレをポリエチレンの袋に入れて密封し、 37°C のインキュベーターの中で 2 時間付着させた。その 1.5 時間後に以下の溶液を混合できるよう用意し、混合した。1.5 μg の各ルシフェラーゼプラスミドと 0.5 μg の pRSVLacZ を混合して TE で 20 μl に合わせた後、80 μl の Opti-MEM I Reduced-Serum Medium (Life technologies, MD) (以下 Opti-MEM と略した) を加えた溶液を、90 μl の Opti-MEM に 10 μl の LipofectAMINE reagent (Life technologies, MD) を加えた溶液を入れたマイクロチューブに少しずつ加え、30 分放置して DNA-プラスミド複合体を形成させた。30 分後、L-15 培地中で細胞を付着させたシャーレの培地を除き、0.8 ml の Opti-MEM を加えておいたところに、複合体を形成させた溶液 0.2 ml をゆっくり加えて全体に行き渡らせた。 CO_2 インキュベーター内で 1 時間放置した後、1 ml の 10 % fbs/DMEM を加え、24 時間培養した。24 時間後に培地を 2 ml の 10 % fbs/DMEM に交換、さらに 24 時間後に培地交換し、72 時間培養した。

AH13 にはエレクトロポレーション (電気穿孔法) [70] により導入した。増殖状態にある AH13 は、50 ml の falcon 2070 tube に入れ、800 rpm、5 分遠心し細胞を集めた。適量の PBS (-) で懸濁した後再度遠心する操作を二度繰り返して細胞を洗浄した。洗浄された細胞は、 1×10^7 cells/ml になるように PBS (-) で希釈し、1.5 ml マイクロチューブに入れて 3,000 rpm、1 分遠心して上清を除いた後、40 μg の各ルシフェラーゼプラスミド、2 μg の pRSVLacZ、300 μg のサケ精子 DNA を混合し、PBS (-) で 500 μl に合わせた溶液で懸濁し、電極間が 4 mm のエレクトロポレーション用キュベットに移し、10 分間室温で放置した。エレクトロポレーション

は Gene pulser (Bio-Rad, CA) を使用し、360 V、960 mF の条件で行った。パルスをかける直前に、キュベットを軽く振とうして沈んだ細胞を均一に懸濁させた。パルス後、室温で15分静置し、10 cm 径のシャーレに10 ml の10 % fbs/DMEM を満たした中に戻した。37 °C、5 % CO₂ 下で24時間培養した。

(2-2-4) トランスフェクションした細胞からの細胞抽出液の調製

付着細胞である NIH3T3 および 初代培養肝細胞からは、以下のように細胞抽出液を回収した。培養液を除いたシャーレに適量の PBS (-) を加えて細胞をすすぎ、捨てることを二回繰り返して細胞を洗浄し、十分 PBS (-) をのぞいてから室温にしたピッカジーン培養細胞溶解剤 PGC-51 (東洋インキ製造、東京) (25 mM Tris-phosphate (pH 7.8)、2 mM DTT、2 mM 1,2-diaminocyclohexane-*N,N,N',N'*-tetraacetic acid、10 % glycerol、1 % Triton X-100) を NIH3T3 には 500 μl、初代培養肝細胞には 250 μl 加えて15分放置、ボルテックスミキサーで振動して細胞をはがし、マイクロチューブに移し軽く遠心して固形物を沈殿させ、上清を新しいマイクロチューブに移して使用時まで -80 °C で保存した。

浮遊細胞である AH13 からは以下のようにして回収した。細胞を含む培養液を15 ml の falcon 2059 tube に移し、3,000 rpm、1分遠心し培養液を除いた。細胞は、適量の PBS (-) で懸濁して再び遠心することを二回繰り返して、細胞を洗浄した。最後に1 ml の PBS (-) に懸濁してマイクロチューブに移し、3,000 rpm、1分遠心した後上清を完全に除いた。500 μl の室温にしたピッカジーン培養細胞溶解剤 PGC-51 を加えて懸濁し、室温に15分放置、軽く遠心して固形物を沈殿させ、上清を新しいマイクロチューブに移して使用時まで -80 °C で保存した。

(2-2-5) β-ガラクトシダーゼアッセイ

回収した細胞抽出液のβ-ガラクトシダーゼ活性は以下のようにして測定した。回

収した細胞抽出液は、Z-buffer (0.1 M Na-phosphate buffer (pH 7.5)、10 mM KCl、1 mM MgSO₄、50 mM 2-ME) で10倍、100倍に希釈したものそれぞれ180 μ lに、30 μ lの15 mM CPRG (chlorophenolred- β -D-galactopyranoside、Boehringer Mannheim、Germany) を加えて1時間、37°Cでインキュベートした。反応は150 μ lの1 M Na₂CO₃を加えて停止させ、可視吸光光度計で574 nmの吸光度を測定した。結果をグラフにプロットし、直線の傾きをそのサンプルの β -ガラクトシダーゼ活性とした。

(2-2-6) ルシフェラーゼアッセイ

回収した細胞抽出液のルシフェラーゼ活性は以下のようにして測定した。1 mg/mlの濃度でBSA (fraction V、Sigma、MO) を添加したルシフェラーゼ培養細胞溶解剤で、回収した細胞抽出液を、1/4、1/16、1/64、1/256のように4倍ずつ希釈したものを調製した。基質溶液 (ピッカジーン発光キット、東洋インキ製造、東京)、希釈した細胞抽出液は、30分以上室温に平衡化させてから使用した。

ルシフェラーゼの発光は、液体シンチレーションカウンター (beckman LS-6500) を使用して測定した [60]。核種を“Wide”で、30秒、1回のプログラムを作製し、ラックをチャンバー内にセットしておき、プログラム No. のカードを付けておいた。ガラス製の液体シンチレーションカウンター用バイアルのふたを開けておき、0.5 ml マイクロチューブ中で100 μ lの基質溶液と10 μ lの希釈した細胞抽出液をすばやく混ぜてふたをし、バイアルに入れてふたを閉め、ラックにセットして測定を開始した。混合から測定開始までの時間は毎回一定になるようにした。プリントアウトされたデータの化学発光の割合がほぼ100%であることを確認し (数百cpmからほぼ100%になる)、低ければ再度測定し直した。基質のみのものをバックグラウンドとして測定した。

(2-2-7) データハンドリング

ルシフェラーゼ活性は以下のようにして算出した。得られた各サンプルの cpm 値から基質のみの値をバックグラウンドとして引いた後に平方根を取り、横軸に細胞抽出液の希釈率、縦軸に計算した値をとり、直線を引いてその傾きをそのサンプルのルシフェラーゼ活性とした。ルシフェラーゼ活性は室温等に影響されるため、全てのベクターを一度に、同時にトランスフェクションし、測定も同時に行った。得られたルシフェラーゼ活性を、そのサンプルの β -ガラクトシダーゼ活性の値で割り、1シリーズの値の最大値ですべてのサンプルルシフェラーゼ活性値を割った値を補正後のルシフェラーゼ活性とした。各トランスフェクションは少なくとも3回行い、グラフ化した。

第三節 結果

まず、プライマー伸長法での結果について述べる。図-6に示すように、強弱ある複数の転写開始点の存在が明らかとなった。主なものを図-4中に矢印で示したが、いずれも高GC領域内に存在した。しかしながら、その位置関係からプロモーターとして重要な Sp1 結合部位は、特定するには至らなかった。

次に、ルシフェラーゼアッセイの結果について述べる。NIH3T3 マウス線維芽細胞株に導入した結果は(図-8)、高GC領域を上流から少しずつ短くして行くに従い、ルシフェラーゼ活性、すなわちプロモーター活性もそれとともに減少していき、北村らの報告[30]での PP1 α cDNA 5' -末端の塩基より下流、つまり PP1 α mRNA の 5' -側の非翻訳領域内にある -68 から -37 までのフラグメントをルシフェラーゼプラスミドに組み込んだ pLuc (-68) を導入した細胞中のルシフェラーゼ活性は、コントロールとして pGV-B2 を細胞に導入した結果とほとんど同じく、ほぼ転写活性は認められなかった。また、pLuc (-112) と pLuc (-124) を NIH3T3 に導入した細胞でのルシフェラーゼ活性を比較してみると、12 base 短くするだけでかなり活性が低下することより、その 12 base に含まれる Sp1 結合部位は、複数ある Sp1 結合部位の中でも、Sp1 が結合し転写活性に影響を及ぼしている可能性は非常に高いといえるであろう。さらに、-198 より上流 3.7 kbp まで伸ばしたフラグメントは、NIH3T3 細胞中では転写活性に全く影響していないことが明らかとなった。また、その高GC領域の大部分を除いたフラグメントをルシフェラーゼベクターに組み込んだプラスミド pLuc1.8 (Δ 198)、pLuc0.8 (Δ 198)、pLuc0.5 (Δ 198) を導入した細胞のルシフェラーゼ活性は、ほとんど活性が失われたことから、同細胞中では、高GC領域のみで転写活性が調節されていることが示唆された。

初代培養肝細胞に導入した結果(図-9)は NIH3T3 細胞の結果と非常に良く似ており、高GC領域を短くしていくことにより、それにもない転写活性は減少していったが、それより上流域は転写活性には影響を与えなかった。

一方、移植性腹水肝癌細胞株 AH13 に導入した結果 (図 - 10) は、高 GC 領域を短くすることによりルシフェラーゼ活性が減少してゆく点、pLuc (-198) と pLuc (0.5) を導入した細胞での活性がほぼ同じ点は、NIH3T3 や初代培養肝細胞の結果と同様であったが、pLuc (0.8) を導入した細胞での活性は、pLuc (0.5) を導入した細胞での活性から大幅に上昇していた。

第四節 考察

プライマー伸長法で転写開始点を決定する前に、予備実験として、Hela 細胞の核抽出液を用い、*in vitro* 転写を行いその転写産物を電気泳動で分離し、おおよその転写開始点の見当を付けたが（分子量の指標となる DNA マーカーと転写産物である RNA の移動度が数パーセント程度異なるため、転写開始点の塩基を決定することはできなかつたので、その結果はここには示さないが）、いずれも高 GC 領域内に存在し、この高 GC 領域がプロモーターとして機能していることが明らかとなった。

蛋白質をコードする遺伝子は、RNA polymerase II により転写されるが、その転写開始機構は、第二章で示した図 -5 のような 3 種類に分類される。いずれも最終的に、TFIID 複合体を形成したものが転写開始点上流に付き、そこに RNA polymerase II が付くことにより転写が開始される。この一般に TATA box と呼ばれるモチーフが存在する場合（図 -5、A）は、TBP（TATA-binding protein、TFIID τ とも呼ばれる）が、その配列に結合して TFIID の他の各サブユニットが複合体を形成し、TFII 因子群および RNAPolymerase II が結合して、ほぼその 25~30 base 下流から転写が開始する。本遺伝子のような、TATA box が存在しないものは直接 TBP がプロモーターに結合せず、まず Sp1 が DNA に結合し、架橋する 110 kDa の分子を介して TBP が付き、TFIID 転写開始複合体が形成し、RNA polymerase II が付くことにより転写が開始される [71]。よってその転写開始点は Sp1 結合部位より 35~40 base 以上下流で、40 base 下流であるという報告があるが [72]、明らかではない。今回の結果も、転写開始点からは転写開始に重要と考えられる Sp1 結合部位は同定できなかつた。これを明らかにするためには点突然変異などの手法を用いる必要があると考えられる。

NIH3T3 での PP1 α プロモーター活性の測定で -198 base までを削ったフラグメントをルシフェラーゼベクターに組み込んだものを導入した結果、わずかではあるが、ある程度のルシフェラーゼ活性が残存するのは、約 300 bp 存在する高 GC 領域のうち、下流側の約 200 bp しか除いておらず、残ったおよそ 100 bp 中に Sp1 結合

部位が3箇所残っているため、その Sp1 結合部位が転写開始に働いた結果であると考えられた。この現象からも、PP1 α 遺伝子の転写に高 GC 領域が不可欠であろうことが示された。

初代培養肝細胞と移植性腹水肝癌細胞 AH13 に、それぞれ種々の PP1 α 5' -上流域のフラグメントを組み込んだルシフェラーゼベクターを導入してその転写活性を比較した実験では、-0.8 kb から -0.5 kb の領域の有無で明らかに AH13 で転写活性化がみられたが、AH13 では PP1 α をコードする遺伝子の増幅がおこっていないこと（北村、未発表）に照らし合わせると、この領域での転写活性化が AH13 での PP1 α mRNA 高発現の原因となっていることは間違いではないであろう。この結果は、正常肝細胞では発現していないかもしくは DNA 結合活性を抑制されている何らかの転写因子が、AH13 では発現又は活性化され、この -0.5 から -0.8 kb までの領域に作用して転写活性を亢進させていることが示唆された。ただ、AH13 で、PP1 α 遺伝子に遺伝子増幅のような変異はなくとも、点突然変異や短いフラグメントの挿入、転座などがおこっている結果、正常肝細胞でも発現し転写活性化能の高い因子が作用することによって、さらに転写活性化している可能性は否定できない。これは AH13 での PP1 α 遺伝子の解析を行い明らかにしなければならない問題である。

第五節 この章のまとめ

1. 転写開始点は高 GC 領域内に複数存在していた
2. マウス線維芽細胞株 NIH3T3、正常肝細胞では PP1 α の転写は高 GC 領域のみで支配されていると考えられるが、移植性腹水肝癌細胞株 AH13 では先の二つの細胞では発現していない因子が -0.5 ~ -0.8 kb の領域に結合し、PP1 α mRNA の転写を活性化させていることが予想された。

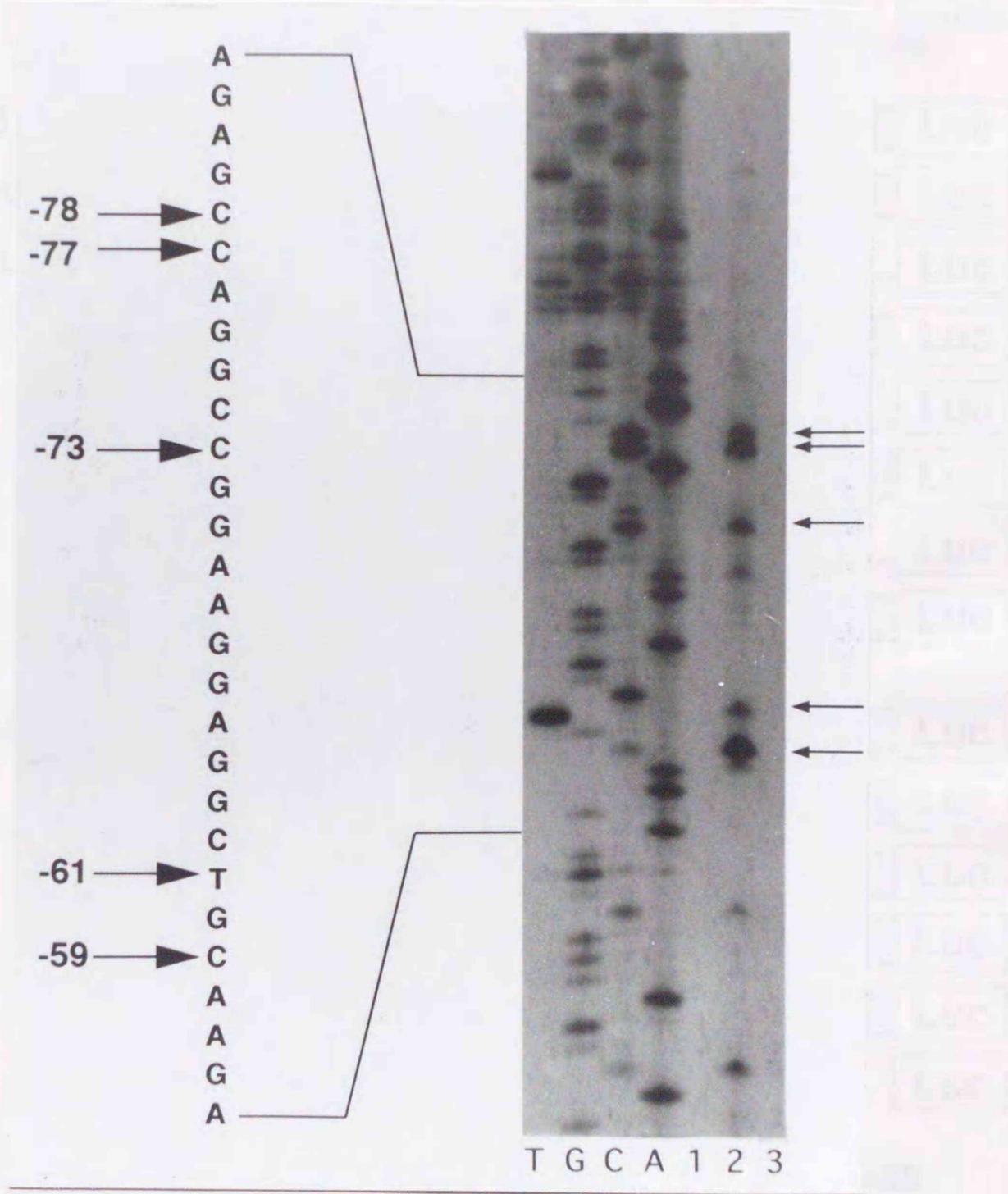


図-6 プライマー伸長法による転写開始点の同定
 主な5つの転写開始点を矢印で示した。プライマーは5'-末端を[γ - 32 P]ATP
 および T4 polynucleotide kinase で標識して使用した。A、プライマー伸長法に
 よって生成したフラグメントを8M 尿素/ポリアクリルアミドゲルによって分離
 した。レーンT-A: ゲノムを同じプライマーで sequencing したもの。レーン
 1: プライマーのみ。レーン2: 5 μ g poly(A)⁺ RNA と 50,000 cpm のプローブ
 で反応させたもの。レーン3: 1 μ g の酵母 RNA と 50,000 cpm のプローブで
 反応させたもの。

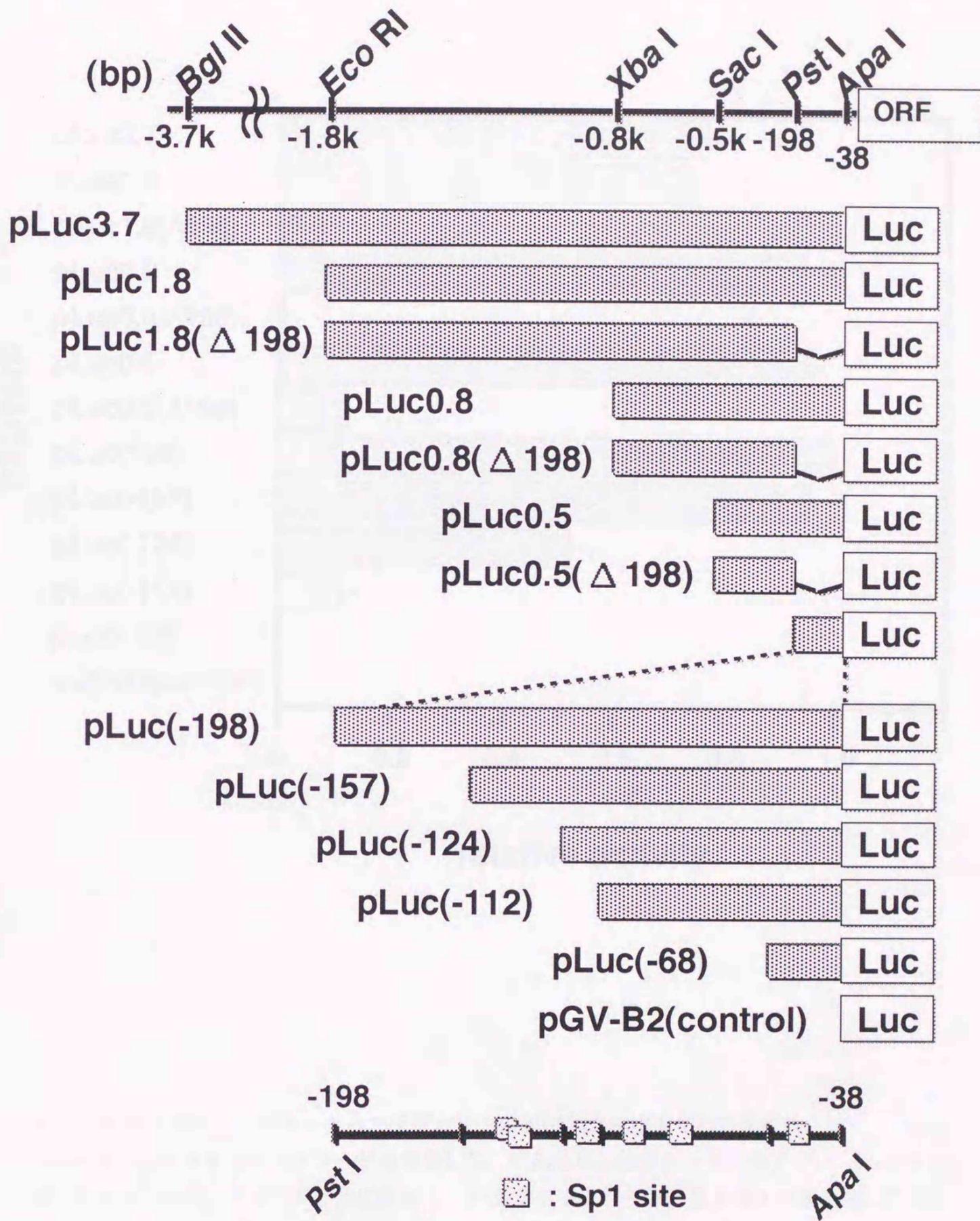


図-7 ルシフェラーゼアッセイに使用した PP1 α 遺伝子 5'-上流域フラグメント
pLuc(-198) より短いものは拡大して示した。

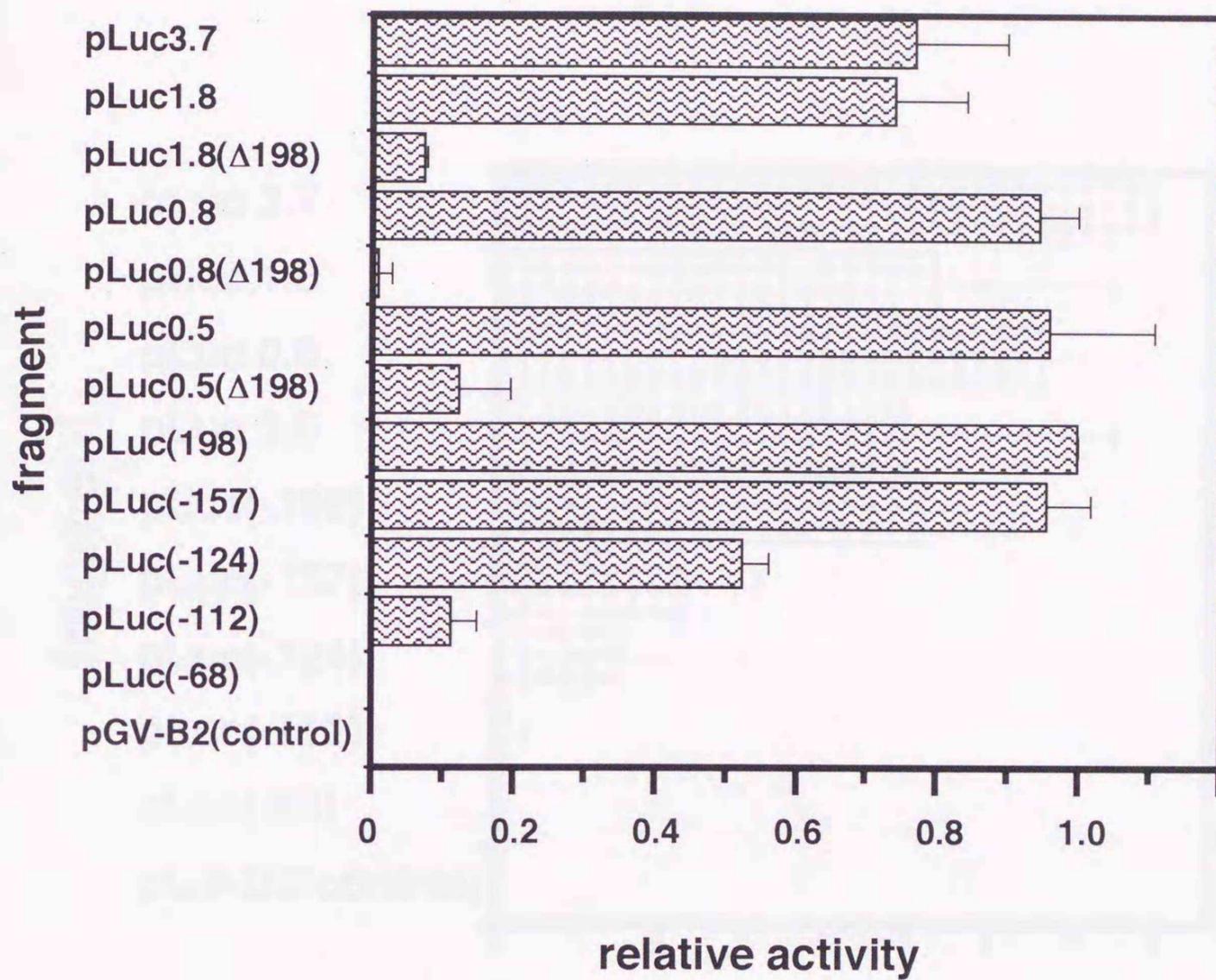


図-8 各種のPP1 α プロモーターフラグメントの NIH3T3 細胞中での転写活性
 レポーターはホタルルシフェラーゼを使用した。導入はリン酸カルシウム法で行い、pRSVLacZ
 をルシフェラーゼプラスミドと共に導入し、 β -ガラクトシダーゼ活性で導入効率を補正した。

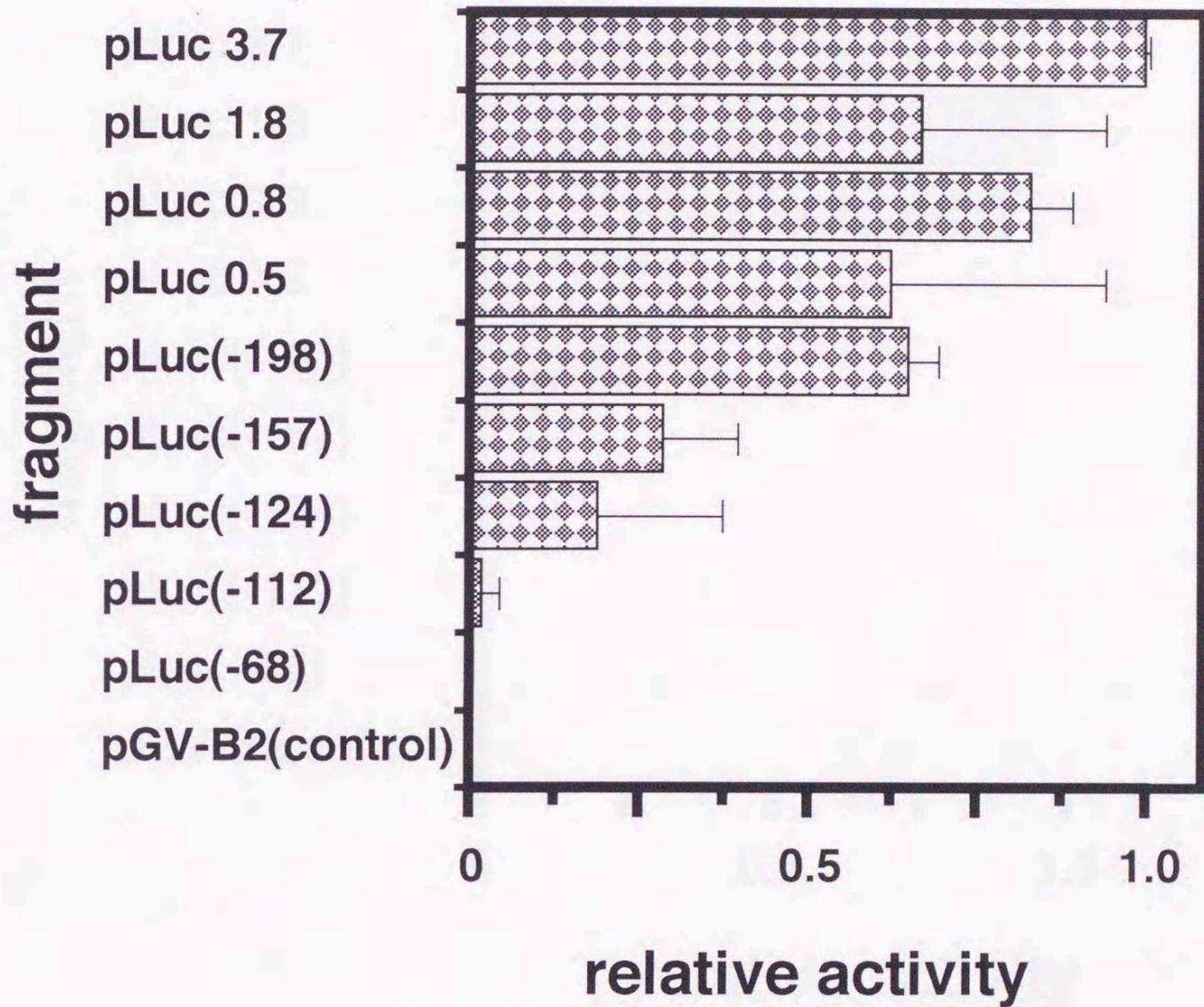


図-9 各種のPP1 α 遺伝子の5' -上流域フラグメントの初代培養肝細胞中での転写活性。導入はLipofectAMINEを用い、リポフェクション法で行った。

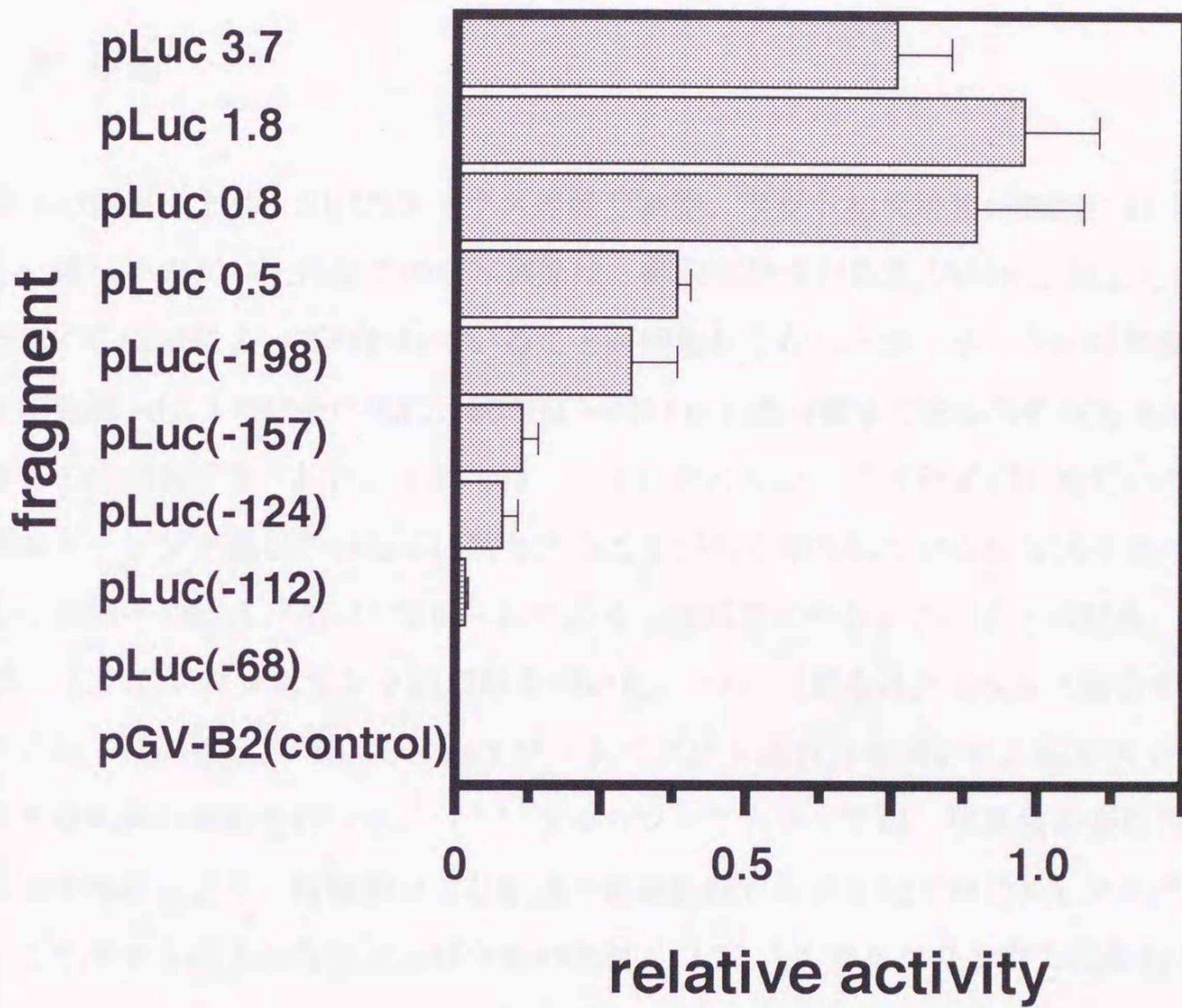


図-10 各種のPP1 α 遺伝子の5' -上流域フラグメントのAH13細胞中での転写活性。導入は、エレクトロポレーションで行った。

第四章 PP1 α 遺伝子プロモーターの機能領域に結合する

因子の検討

第一節 序論

前章の結果により、NIH3T3 マウス線維芽細胞、ラット初代培養肝細胞における PP1 α 遺伝子の 5' -上流域での転写調節は、翻訳開始点から約 300 bp 上流まで存在する高 GC 領域によって行われていることが明らかとなったが、ラット移植性腹水肝癌細胞株 AH13 ではその他に、約 800 ~400 bp 上流の領域に転写活性化を及ぼす因子との作用が示唆された。本章では、(1) ゲルシフトアッセイ [73] を用いた、ハウスキーピング遺伝子の転写に関与することが良く知られている転写因子 Sp1 の高 GC 領域への結合、AH13 で見られたより上流域での何らかの因子との結合、および、(2) UV クロスリンク法 [74] を用いた、(1) で見られた DNA に結合する因子の分子量の推定、(3) DNase I フットプリント法 [75] を用いた、転写因子と結合する配列の検索を行った。(1) ゲルシフトアッセイでは、移動度の変化したバンドの解析により、肝細胞および数種の移植性腹水肝癌細胞での DNA フラグメントに作用する因子の有無又は結合量の差異、(2) UV クロスリンクでは結合する因子のおおよその分子量の推定、およびそのペプチド構成が単一か複数であるかを推定することができ、(3) DNase I フットプリント法では転写因子と結合する塩基配列が得られることから、既知の転写因子の結合配列との比較による、因子の推定、もしくは未知の因子の結合を推測することが可能である。

第二節 材料および方法

(1) 材料

PCR のプライマーとして、以下のものを使用した。合成は北海道システムサイエンスに依頼した。S1-862: (5' -CTGATCCTCCTGTGTCTA-3')、S2-762: (5' -TAATACCTTTCCCCCCTTT-3')、S3-678: (5' -CAAGCATTCTACAAAGGACT-3')、S4-570: (5' -CATTGCTTCGAGTTCAGT-3')、AS1-759: (5' -GAAAAGGGGGGAAAGGTA-3')、AS2-679: (5' -CCTTTGTAGAATGCTTGG-3')、AS3-570: (5' -TACTGAACTCGAAGCAATG-3')、AS4-504: (5' -AGCTCCAAACCTCCAGA-3')。また、Sp1 結合部位を持つ二本鎖のオリゴヌクレオチドは同様にセンス鎖、アンチセンス鎖を合成し、混合してアニールさせて使用した。以下にその配列を示した。Sp1-sense: (5' -AGTTCGATCGGGGCGGGGCGAGAGC-3')、Sp1-antisense: (5' -GCTCTCGCCCCGCCCCGATCGAACT-3')。抗 Sp1 抗体は、Santa Cruz Biotechnology (CA) より購入した。Hela 細胞核抽出液は、Trevigen (MD) より購入した。Transcription Factor SP1, Human は和光純薬工業より購入した。

3' -end labelling kit は、Amersham (England) より購入した。 $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{dCTP}$ は Du Pont (MA) より、 $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{ddATP}$ および $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ は、Amersham (England) より購入した。Wister rat (8 週齢、オス、SPF) は、日本エスエルシー (静岡) より購入した。各種制限酵素、修飾酵素は、宝酒造 (京都)、東洋紡績 (大阪)、Life Technologies (MD)、New England Biolabs (England) より購入した。本文中に示した以外の一般試薬は、和光純薬工業株式会社 (大阪)、ナカライテスク (京都)、Sigma (MO) から購入した。

(2-1) ゲルシフトアッセイ

本章の序論でも述べたように、前章に示したルシフェラーゼアッセイの結果から、いずれの細胞においても PP1 α 遺伝子 5' -上流域の高 GC 領域が転写活性に影響を与えること、また移植性腹水肝癌細胞株 AH13 では、NIH3T3 マウス線維芽細胞、ラット初代培養肝細胞では見られなかった、転写活性化領域の存在が示唆された。本実験ではそれらの領域と実際に転写因子が結合するか、またその量の各細胞での差異を検討した。またルシフェラーゼアッセイによって転写因子の結合領域を約 300 base 上流までの高 GC 領域と、-0.5 k~-0.8 k の二つの領域にある程度限定したが、本実験によりより狭い領域に限定した。

(2-1-1) 核抽出液の調製

核抽出液は、Schreiber らの方法 [76] を改変して用い、得た。

初代培養肝細胞核抽出液は、当研究室の今井により Wister rat の肝臓から、コラゲナーゼ灌流法で調製した肝細胞から以下のようにして調製した。細胞調製（コラゲナーゼ灌流）を行う前日、10 mm 径シャーレに、2 ml の Vitrogen 100 を入れ、一晚放置することによりコーティングした。翌日シャーレは 2 ml PBS (-) にて洗浄後、使用した。Wister rat (8 週齢、オス、SPF) (日本エスエルシー、静岡) の肝臓から、コラゲナーゼ灌流法を用いて分離された肝実質細胞を、コーティングしたシャーレに $2 \times 10^6/10$ ml L-15/シャーレとなるようにプレーティングし、ビニール袋に入れ外気と同様の酸素・二酸化炭素分圧を維持しながらインキュベーター中で 37°C で 2 時間培養し、細胞をシャーレに定着させた。2 時間後、ビニール袋を開封し、シャーレ中の L-15 培養液を捨て、10 % fbs/DMEM 培養液 10 ml を加え、24 時間培養した。その後、培養液を捨て、冷 PBS (-) で細胞の付着したシャーレを 2 回洗浄後、4°C に冷却した 5 ml の NP40 lysis buffer (10 mM Tris-Cl (pH 7.4)、10 mM NaCl、3 mM MgCl₂、0.5 % NP40) を加え、セルスクレーパーでシャーレから細胞をはがし 15 ml tube に移して氷上で 15 分放置した。4°C、3,000 rpm、10 分

の遠心により核を沈殿させ、上清を捨てた後に適量の NP40 lysis buffer を加えて核を懸濁し、マイクロチューブに移して再度遠心して上清を捨て、核を洗浄した。ペレットになった核は、少なくとも核ペレット体積の 10 倍量の、4 °C に冷却した核抽出液バッファ（20 mM HEPES-Na (pH 7.9)、0.4 M NaCl、1 mM EDTA、1 mM EGTA、1 mM DTT、1 mM PMSF、(DTT および PMSF は使用直前に添加した)）で懸濁し、30 分間低温室中で (4 °C) ゆっくりチューブを揺り動かした。30 分後、4 °C、16,000 rpm、5 分遠心し、上清を新しいマイクロチューブに移し、固形物を持ち込んだようなら再度遠心して上清を新しいマイクロチューブに移し、それを 20 μ l もしくは 100 μ l ずつ分注して -80 °C に保存した。その一部を取り蛋白濃度を測定した。蛋白濃度は Lowry らの方法 [77] を改変して作製された試薬である Bio-Rad DC protein assay kit (Bio-Rad, CA) を使用し、以下のようにして測定した。得られた核抽出液 2 μ l を、18 μ l の H₂O に加えて 10 倍希釈したサンプル溶液を作製した。検量線をとるため、0、0.1、0.25、0.5、0.75、1.0 mg/ml の BSA 濃度となるよう各 20 μ l の溶液を作製し、BSA 溶液、サンプル溶液共に 100 μ l の reagent A を加え、続いて 800 μ l の reagent B を加え、攪拌した後、15 分間室温で放置した。その後、溶液の 750 nm の吸光度を可視吸光度計で測定し、各濃度の BSA の値からグラフを作製し、グラフよりサンプルの蛋白濃度を求め、10 倍して核抽出液の蛋白濃度とした。

浮遊細胞である移植性腹水肝癌細胞株からは、以下のようにして核抽出液を調製した。十分増殖状態にある細胞を含む培養液を、50 ml の falcon 2070 tube に移し、4 °C、3,000 rpm、1 分遠心し培養液と細胞を分離した。培養液を捨て、適量の PBS (-) で細胞を懸濁した後、再度遠心することを 2 回繰り返し細胞を洗浄した。洗浄用の PBS (-) を十分除いた後に、4 °C に冷却した 5 ml の NP40 lysis buffer で細胞を懸濁した後、15 分間氷上に置いた。遠心して上清を捨て、再び同量の NP40 lysis buffer でペレットを懸濁して遠心し、核を洗浄した。以下の操作は先に述べた肝細胞からの抽出法と同じである。

(2-1-2) プローブの調製

ゲルシフトアッセイに用いたプローブは (1) 制限酵素による切断、(2) PCR、の2通りの方法で作成し、(3) TdT (Terminal deoxynucleotidyltransferase) により [α - 32 P]ddATP を使用してフラグメントの3'-末端をエンドラベルして使用した。

(1) 制限酵素による切断

-0.8 kbp までの領域を制限酵素処理と回収を繰り返して5つのフラグメントを作製した。まず、約 300 μ g の pBKH- (第二章で得た約 8 kbp の *Hind*III フラグメントの3'-末端から約 1.7 kbp 上流に存在する *Kpn*I site までを pBliescript II SK+ の両制限酵素部位に組み込んだもの) を、まず *Apa*I、次いで *Xba*I で切断し、0.8% アガロースゲルで電気泳動し、0.8 kbp のフラグメントを回収した。得られた *Xba*I-*Apa*I フラグメントは、*Afa*I、*Nae*I で同時に切断し、2% アガロースゲルで電気泳動し、約 0.5 kbp の *Xba*I-*Afa*I フラグメント、約 0.2 kbp の *Afa*I-*Nae*I フラグメント、約 0.1 kbp の *Nae*I-*Apa*I フラグメントを得た。さらに、回収した *Xba*I-*Afa*I フラグメントは、*Sac*I で切断、2.5% アガロースゲルで電気泳動し、約 350 bp の *Xba*I-*Sac*I フラグメント、約 150 bp の *Sac*I-*Afa*I フラグメントを得た。さらに、回収した *Xba*I-*Sac*I フラグメントは、*Eco*T14I で切断、2.5% アガロースゲルで電気泳動し、約 250 bp の *Xba*I-*Eco*T14I フラグメント、約 100 bp の *Eco*T14I-*Sac*I フラグメントを得た。

(2) PCR を使用した DNA フラグメントの合成

-862~-488 までの領域は、-862~-742、-762~-662、-678~-552、-570~-488 の4つのフラグメントを PCR で作製した。それぞれ、S1-862/AS1-759、S2-762/AS2-

679、S3-678/AS3-570、S4-570/AS4-504 のプライマーの組み合わせで、0.2 ml の PCR tube に、プライマー各 100 pmol、各 2 μ l ずつの 25 mM dATP、dCTP、dGTP、TTP、10 μ l の 25 mM MgCl₂、10 μ l の 10 x buffer、微量の *EcoRI-HindIII* フラグメント（塩基配列を決定したもの）、2.5 U の AmpliTaq GOLD（Perkin-Elmer、CT）を加え、滅菌蒸留水で 100 μ l に合わせた後、95 °C で 9 分加熱した後に、94 °C で 30 秒、60 °C で 30 秒を 1 サイクルとして 45 サイクルの反応を行った。

(3) プローブのラベリング

全てのプローブは、3' -末端に一つだけ [α -³²P]ddATP を導入し、エンドラベルした。ラベリングには、3' -endlabelling kit（Amersham、England）を使用した。プローブにする DNA フラグメント約 1 pmol、つまり末端は 2 pmol 存在するので、キットのプロトコールに従い [α -³²P]ddATP（Amersham PB10233、England）はその 5 倍、つまり 10 pmol 使用した。 [α -³²P]ddATP は、10 mCi/ml、3,000 Ci/mmol であるから、1 μ l あたり約 3.33 pmol である、よって 10 pmol は 3 μ l である。したがって [α -³²P]ddATP はプローブ DNA 1 pmol あたり 3 μ l 使用した。 [α -³²P]ddATP の使用量もしくはプローブ DNA 溶液の使用量に応じてキットのプロトコールに示された反応体積を調整した。反応は、37 °C で 2 時間行った。反応後、同体積の PCI を加えて激しく攪拌し、TdT を失活させた。室温で 10 分間、15,000 rpm 遠心して上層を新しいマイクロチューブに移し、過剰量のエーテルを加えて激しく攪拌し、再び遠心して上層を捨て、1/2 容の 7.5 M NH₄OAc、3 倍量の冷エタノールを加え、-20 °C で 1 時間放置し、4 °C で 15,000 rpm、20 分間遠心し、液を捨て、ペレットを 70 % 冷エタノールで洗浄し、取り込まれなかった放射活性のあるヌクレオチドを可能な限り除いた。ドラフト内でペレットをしばらく乾

燥させ、100 μ l の TE に溶解させ、-20 $^{\circ}$ C で使用時まで保存した。使用時にその一部をマイクロチューブに取り、液体シンチレーションカウンターでチェレンコフ光を測定し、適宜 TE で希釈し、使用した。

(4) Sp1 結合配列に競争阻害させるオリゴヌクレオチドの作製

Sp1 結合配列に競争させる二本鎖のオリゴヌクレオチドは、合成したセンス鎖、アンチセンス鎖それぞれのオリゴヌクレオチドをサーマルサイクラーを用いて加熱後、徐々に冷却してアニールさせ、使用した。合成したセンス鎖、アンチセンス鎖それぞれのオリゴヌクレオチドは、0.2 ml の PCR 用チューブに 10 nmol ずつ加え、100 μ l の溶液 (20 mM Tris-Cl (pH 7.5)、10 mM MgCl₂、50 mM NaCl) 中で、85 $^{\circ}$ C、5 分加熱し、85 $^{\circ}$ C から 42 $^{\circ}$ C まで 99 分かけて一定の速度で冷却させ、1.5 ml のマイクロチューブに移して TE 900 μ l を加えて、終濃度 1 pmol/ml に合わせ、使用時まで -20 $^{\circ}$ C で保存した。

(2-1-3) ゲルシフトアッセイ

予備実験の結果に基づき、以下に示した実験条件下で行った。

電気泳動を行う前日もしくは少なくとも 6 時間前にポリアクリルアミドゲルを製作した。13.5 cm x 13.5 cm x 1 mm のスラブゲル板の耳付きの方の内側は、Super rain X 処理し、組み立てておいた。25 ml の 1/2 TBE-4.5 % アクリルアミド

(acrylamide : *N,N'*-methylenebisacrylamide = 29 : 1) 溶液を十分脱気し、300 μ l の 10 % 過硫酸アンモニウム溶液を加えて氷水上でしばらく冷却し、20 μ l の TEMED を加えてすばやくゲル板内に流し込み、1 cm 幅のコームを差し込み固化させた。ゲルは、使用時まで水でしめらせたペーパータオルとともにシールバッグに入れ、4 $^{\circ}$ C で保存し、乾燥を防いだ。

液、0.3~1 μg の poly (dI-dC) · poly (dI-dC) (Amersham, England) を、24 μl の結合バッファ (12.5 mM HEPES-K (pH 7.5)、1.5625 mM MgCl_2 、0.05 % NP40、5 μM ZnCl_2 、50 mM KCl) 中で混合、25 $^\circ\text{C}$ で1時間インキュベートし、1 μl の0.1 % BPB を加えてウェルにアプライし、10 mA の定電流で泳動した。、サンプルをアプライする30分前に、1/2 TBE バッファを入れた泳動層にゲルをセットし、5 mA でプレランさせておいた。約2時間~2時間20分泳動し、BPB がゲル下端から約1 cm のところで停止した。耳のついたゲル板をはがし、一回り大きく切った3MM 濾紙の平滑面をゲルに張り付け、ガラス板からはがし、ゲル面をラップフィルムで覆い、下にさらに一回り大きく切った3MM 濾紙を敷き、80 $^\circ\text{C}$ で1時間吸引乾燥した。乾燥したゲルは、12時間 BAS III S イメージングプレート (IP) に感光させた後、IP を BAS1000 Mac で読みとり、解析した。

(2-2) UV クロスリンク

ゲルシフトアッセイで見られたバンドシフトは、非変性ポリアクリルアミドゲル上での分離であり、フラグメントに結合する因子の有無以外の情報は得られない。結合する因子の既知、未知に関わらず、その分子量は非常に重要な情報であり、おおよそのそれを推定するために本実験を行った。原理は、先に述べたゲルシフトアッセイのように、DNA フラグメントと各抽出液を混合、インキュベーションして結合させる点は同じであるが、放射活性を持つプローブを作製する際、エンドラベルではなく、 $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{dCTP}$ を使用して全体をラベルしたものを使用し、結合反応後、UV を照射して結合した蛋白とフラグメントを結合部位で架橋させ、その後プローブの非結合部分を DNaseI で分解し、SDS-PAGE で分画して放射活性のあるバンド、すなわち DNA プローブと結合した蛋白の分子量を推定するものである。

(2-2-1) SDS-ポリアクリルアミドゲルの作製

アクリルアミドゲルは、使用する前日に作製した。13.5 cm x 13.5 cm x 1 mm のスラブゲル板の耳付きの方の内側は、Super Rain X 処理し、ゲルからはがしやすくした。ゲル板を組み立て、20 ml の10 % セパレーションゲル (10 % acrylamide (acrylamide : N,N' -methylenebisacrylamide = 30 : 0.8) 、0.375 M Tris-Cl (pH 8.8) 、0.1 % SDS、0.05 % ammoniumpersulfate) および 6 ml の4 % スタッキングゲル (4 % acrylamide (acrylamide : N,N' -methylenebisacrylamide = 30 : 0.8) 、0.125 M Tris-Cl (pH 6.8) 、0.1 % SDS、0.05 % ammoniumpersulfate) を調製し、充分脱気した。まず、セパレーションゲル溶液に 10 μ l の TEMED を加えてすばやくゲル板の約 7 割程度まで流し込み、ゲル板を立ててゲルの上に蒸留水を丁寧に重層した。しばらく放置し、ゲルと水との界面がはっきりしたら、水を捨て、少量の4 % スタッキングゲル溶液ですすいだ後、スタッキングゲル溶液に 10 μ l の TEMED を加えて固まったセパレーションゲルの上に流し込み、すばやく幅 1 cm のコームを差し込んで固化させた。固化したゲルは、水でしめらせたペーパータオルとともにシールバッグに入れ、4 $^{\circ}$ C で翌日まで保管した。

(2-2-2) プローブの作製

プローブは、以下のようにして作製した。0.2 ml PCR 用マイクロチューブに各 50 pmol のセンス・アンチセンス両プライマー、8 ml の 4dNTP mix (25 mM dATP、2.5 mM dCTP、25 mM dGTP、25 mM dTTP) 、5 μ l (1.85 MBq) の [α - 32 P]dCTP (3000 Ci/mmol、10 mCi/ml) 、5 μ l の 10 x buffer、5 μ l の 25 mM MgCl₂、適量の cold template (先に、*Eco*RI-*Hind*III フラグメント (「第二章第二節 (2-2-2) 」参照) を鋳型にして、本条件中の 4dNTP mix 中の dCTP 濃度を 2.5 mM \rightarrow 25 mM にし、[α - 32 P]dCTP を除き、PCR を行い得られたもの) 、2.5 U

AmpliTaq GOLD (Perkin-Elmer, CT) を加え、水で 50 ml に合わせた後、95 °C で 9 分間加熱の後、94 °C で 30 秒、65 °C で 30 秒を 1 サイクルとして、45 サイクルの反応を行った。反応物は等量の PCI で抽出した後、1.5 ml のマイクロチューブに移して等量のエーテルで抽出、1/2 容の 7.5 M NH₄OAc および 3 容の冷エタノールを加え、-20 °C に 30 分放置し、4 °C、15,000 rpm、20 分遠心し DNA を沈殿させた。沈殿は、70 % 冷エタノールでリンスし、可能な限り取り込まれなかったヌクレオチドを除いた。沈殿は、100 μl の TE に溶解し、一部を取り、その放射活性を測定した。使用時までプローブは -20 °C にて凍結させておいた。

(2-2-3) UV クロスリンク

UV クロスリンクの反応は、以下のようにして行った。0.5 ml のマイクロチューブ中で、500,000 cpm のプローブ、蛋白量で 30 mg 相当の核抽出液、10 μg の poly (dI-dC) ・ poly (dI-dC) は、24 μl の、終濃度 12.5 mM HEPES-K (pH 7.5) 、1.5625 mM MgCl₂、10 % NP40、5 mM ZnCl₂、50 mM KCl を含むバッファー中で、25 °C、30 分インキュベートした。30 分後ふたを開け、ふたのかわりにラップフィルムをかぶせてパラフィルムで止め、マイクロチューブ立てに垂直に立てて、下図のように UV トランスイルミネーターをセットし、304 nm の UV を 30 分照射した。30 分後、10 mM MgCl₂/5 mM CaCl₂ で 0.2 mg/ml に希釈した DNaseI を 5 μl 加え、37 °C で 1 時間インキュベートした。1 時間後、7.5 μl の SDS-PAGE sample buffer (0.313 M Tris-Cl (pH 6.8) 、10 % SDS、0.01 % BPB) 、2 ml の 2-ME を加え、3 分間沸騰水上で変性させ、室温に戻るまで放置した。スラブゲル用泳動層に SDS-PAGE 用 running buffer (25 mM Tris、200 mM glycine、0.1 % SDS) を満たしてゲル板をセットし、prestained marker (New England Biolabs, England) 、室温に冷却したサンプルをアプライし、20 mA の定電流で BPB がゲル下端から流れ出る直前まで (約 4.5 時間) 泳動した。泳動停止後、耳のついたゲル板をはが

し、スタッキングゲルを除いて、ゲルより大きめに切った3MM濾紙の平滑面を張り付け、丁寧にはがし、ゲル面をラップフィルムでおおい、下に3MM濾紙を敷いた80°Cのゲルドライヤーで1時間吸引乾燥した。乾燥したゲルは12時間BAS III Sイメージングプレート (IP) に感光させた後、IPをBAS1000 Macで読みとり、ゲル上の分子量マーカーより泳動距離と分子量の関係を計算し、バンドの位置からそのおよその分子量を算出した。

(2-3) DNase I フットプリント

ゲルシフトアッセイでは、DNAフラグメントの因子との結合領域をある程度限定することは可能である。またそのフラグメントを少しずつ短縮し、移動させていくことで、結合領域は特定可能ではあるが、あまりに多くの労力と費用がかかる。DNaseI フットプリント法ではそれを一度に決定する方法である。原理は、片側だけに末端標識したDNAフラグメントにゲルシフトと同様に因子を結合させ、その状態で弱く（およそ1フラグメントにつき1箇所切れるような条件で）DNaseIを作用させると、転写因子と結合している部分のDNAフラグメントは、その立体障害によりDNaseIから保護され切断されないが、結合していない部分は、切断される。よって、同時にDNAフラグメントだけをDNaseIで切断したものを同時に電気泳動すると、転写因子が結合し、DNaseIで切断されなかった部分のラダーが出ず、いわゆる転写因子の「足跡」が見える。本実験はその条件設定が難しく、用いたDNAフラグメントのほぼ全てに転写因子が結合していないと、「足跡」の出るべき箇所で結合していないフラグメントが切断され、その「足跡」が消されてしまうこととなる。本実験でも、その条件設定は困難をきわめた。

(2-3-1) 核抽出液の調製

核抽出液の調製は、ゲルシフトアッセイ（「本章第二節 (2-1-1)」参照）と同様の方法で核細胞から抽出した。

(2-3-2) プローブの調製

ゲルシフトアッセイと異なり、プローブはDNAフラグメントの片側のみを末端標識したものをを用いるため、実際にプローブとして使用するDNAフラグメントよりも長いものを用意し、ラベル後、制限酵素により切断し、電気泳動により目的のフラグメントのみを回収し、使用した。

-332 ~ -37 (AfaI ~ ApaI) のプローブは、以下のようにして調製した。制限酵素で切断してラベルしたフラグメントを回収するとき、その二本のフラグメントのサイズが電気泳動したゲル上で十分分離し、選択的に回収できるように、約0.8 kbpの XbaI-ApaI フラグメントを選択した。まず -0.8 kb に存在する XbaI site から -37 base に存在する ApaI site までの約0.8 kbp のフラグメントを、pBXA+

(pBluescript II SK+ の XbaI site および ApaI site に、上記の約0.8 kbp のフラグメントを組み込んだもの) プラスミドを XbaI および ApaI で切断し、電気泳動により分離した後、目的の約0.8 kbp のフラグメントを回収した。このフラグメントを、ゲルシフトアッセイのプローブの調製の項 (本章第二節 (2-1-2) (3) プローブのラベリング) で述べたように、フラグメントの両3' -末端を [α -³²P]ddATP および TdT でラベルした。ラベルしたフラグメントは、AfaI で切断し、スラブゲル中に作製したアガロースゲルにアプライして電気泳動し、約300 bp のフラグメントを回収した。

(2-3-3) マクサム・ギルバート法 [78, 79] による G+A マーカーの調製

フットプリントされた位置を同定するための G+A マーカーは、SureTrack Footprinting Kit (Pharmacia Biotech, NJ) を使用して作製した。

約150,000 cpm のプローブ、1 μ g の Calf thymus DNA を混ぜ合わせて滅菌蒸留水で20 μ l に合わせ、1 μ l の4% formic acid を加えて37°C で25分間インキュベートした。その後、氷上で冷却し、135 μ l の滅菌蒸留水、15 μ l の10 M piperidine を加

えて 90 °C で 30 分間加熱した。氷上にて冷却し、1 ml の 1-butanol を加えて激しく攪拌し、2 分間、15,000 rpm 遠心して上清を捨てた。ペレットを、150 μ l の 1 % SDS に溶かし、1 ml の 1-butanol を加えて激しく攪拌し、2 分間、15,000 rpm 遠心して上清を捨てた。0.5 ml の 1-butanol を加えてペレットを洗浄した後、乾燥させ、チューブごと液体シンチレーションカウンターでチェレンコフ光を測定し、約 10,000 cpm/ml となるように 50 % ホルムアミドを含む色素溶液に溶かして、使用时、約 10,000 cpm 分を取り、3 分間沸騰水上で加熱した後氷冷し、30 分間プレランしたゲルにアプライした。泳動は 45 W の定電力で行った。キシレンシアノールの水色の帯が、下から 1/4 位のところまで泳動された時点で止め、シーケンシングと同様にガラス板を外し、3MM 濾紙を張り付けてゲルをガラス板からはがし、ラップフィルムで覆って 80 °C で吸引乾燥した後、BAS 用 IP に 12 時間感光させ、BAS 1000 Mac で読みとった。

(2-3-4) ポリアクリルアミドゲルの作製

短めのフラグメントについて解析するため、ゲル濃度は 7 % で作製した。製法は、シーケンシングの項（「第二章第二節（4）」参照）で述べた方法に従った。

(2-3-5) DNase I 滴定

ラベルしたフラグメントを DNaseI 処理する際に、完全に切断してしまつてはフットプリントが見えなくなるので、わずかに切断される適当な DNaseI 量を滴定して求めた。

まず、500 μ l の以下の溶液（10 サンプル分、100,000 cpm のプローブ、6 μ g poly (dI-dC) \cdot poly (dI-dC)、100 μ g BSA、1 mM CaCl₂、12.5 mM HEPES-K (pH 7.5)、2 mM MgCl₂、10 % NP40、5 μ M ZnCl₂、50 mM KCl) を作製し、50 μ l ずつ 9

本のマイクロチューブに加えて室温においた。次に、4本の希釈した DNaseI 溶液を作製した。まず、10 mM CaCl₂/5 mM MgCl₂ 溶液で希釈した、3 U/ml の DNaseI 溶液を作製し、8 μl ずつの10 mM CaCl₂/5 mM MgCl₂ 溶液を加えておいた3本のマイクロチューブに、順次1 μl ずつ移していき、順に1/9 ずつ希釈された DNaseI 溶液4本 (No.1~4) を作製した。DNaseI stop solution (192 mM NaOAc, 32 mM EDTA, 0.14 % SDS, 64 μg/ml yeast RNA) を、37 °C でインキュベートしておいた。先に9本のチューブに分注しておいた溶液に希釈した DNaseI 溶液を、No.1 から順に3 ml、1 ml、No.2 から3 ml、1 ml..... というように8本目まで加え、1分後にインキュベートしておいた DNaseI stop solution を140 μl 加えて反応を停止させた。200 μl の PCI を加えて攪拌、室温で15,000 rpm、10分遠心し、上層を取り、新しいマイクロチューブに移した。そのチューブに400 μl の冷エタノールを加え、-20 °C で30分放置した。4 °C で15,000 rpm、15分遠心し、上清を捨てペレットを乾燥し、3 μl の50 %ホルムアミド入り色素溶液にとかし、3分間沸騰水上で加熱した後氷冷し、30分間プレランしたゲルにアプライした。泳動は、45 W の定電力で行った。キシレンシアノールの水色の帯が、下から1/4位のところまで泳動された時点で止め、シーケンシングと同様にガラス板を外し、3MM 濾紙を張り付けてゲルをガラス板からはがし、ラップフィルムで覆って80 °C で吸引乾燥した後、BAS 用 IP に12時間感光させ、BAS 1000 Mac で読みとった。

(2-3-6) フットプリント反応、および電気泳動による分画

上で述べた DNase I 滴定で、プローブが DNaseI によって切断されることにより生じたラダーが、低分子のものから高分子のものまで均一の放射活性になるような、適当な DNaseI 濃度を選択した。

反応は、上に述べた DNaseI 滴定とほぼ同じ方法で行った。サンプルの数 +1 本の 1.5 ml のマイクロチューブ中に 50 μ l の以下の溶液 (10,000 cpm のプローブ、1 μ g の poly (dI-dC) \cdot poly (dI-dC) 、1 mM CaCl₂、12.5 mM HEPES-K (pH 7.5) 、2 mM MgCl₂、10 % NP40、5 μ M ZnCl₂、50 mM KCl、20 μ g 蛋白量の核抽出液 (1 本のみ、コントロールとして核抽出液のかわりに 10 μ g BSA を使用) を作製した。作製した溶液に、DNaseI 滴定で決定した量の DNaseI を加えて室温で 1 分間反応させ、同様に 37 $^{\circ}$ C でインキュベートした DNaseI stop solution を 140 μ l 加えて反応を停止させた。200 μ l の PCI を加えて攪拌、室温で 15,000 rpm、10 分遠心し、上層を取り、新しいマイクロチューブに移した。そのチューブに 400 μ l の冷エタノールを加え、-20 $^{\circ}$ C で 30 分放置した。4 $^{\circ}$ C で 15,000 rpm、15 分遠心し、上清を捨てペレットを乾燥し、3 ml の 50 % ホルムアミド入り色素溶液にとかし、3 分間沸騰水上で加熱した後氷冷し、30 分間プレランしたゲルにアプライした。泳動は、45 W の定電力で行った。キシレンシアノールの水色の帯が、下から 1/4 位のところまで泳動された時点で止め、シーケンシングと同様にガラス板を外し、3MM 濾紙を張り付けてゲルをガラス板からはがし、ラップフィルムで覆って 80 $^{\circ}$ C で吸引乾燥した後、BAS 用 IP に 12 時間感光させ、BAS 1000 Mac で読みとった。

第三節 結果

(1) ゲルシフトアッセイでは、主に、ルシフェラーゼアッセイで見いだされた -0.8 kb ~ -0.5 kb までの領域に、果たして何らかの因子が作用しているのか、という点および、高 GC 領域において結合の予想される Sp1 の DNA 結合活性がどの程度であるのか、という点を明らかにするとともに、この後に述べる実験の DNaseI フットプリント法で用いる、DNA フラグメントと因子との最適な結合条件を見いだす、という点について検討した。

まず、最適な実験条件を検討した。「材料および方法」に記した条件は、Pascal らの報告に記載された条件をもとに、各種塩濃度、核抽出液量、poly (dI-dC) · poly (dI-dC) 量、各種添加物の量、反応温度と時間、電気泳動時のアクリルアミドゲルの組成、濃度、泳動バッファー、バッファー温度、電流量などを変化させて、特異的に結合したシフトバンドがはっきりし、非特異的に結合したバンドができるだけ弱くなるようなものを選んだ。

まず、高 GC 領域である *NaeI*-*ApaI* フラグメント (-133 ~ -37) では、AH13 の核抽出液に対して図 -11 のような複数のシフトバンドを認めた。800 倍量 (モル比、結合数比では 200 倍) の Sp1 結合配列を持つ未標識のオリゴヌクレオチドとの競争阻害実験で、全てのバンドが消失したことから、これらはすべて、Sp1 結合配列に作用する因子によって生じたものであることが明らかである。また、抗 Sp1 抗体をさらに作用させると、上部の二本のバンドが消失し、さらに上方にバンドが見られるいわゆるスーパーシフトバンドが確認された。よってこのバンドは Sp1 がこのフラグメントに結合して生じたものであることが確認された。また、さらに確認のために、精製された Sp1 標品とこのフラグメントとのインキュベーションを行い、泳動したところ、図のように二本のバンドが見られ、先に得られた結果と一致した。このフラグメントを使用し、肝細胞の核抽出液と、AH13、AH130、AH7974F、AH109A、AH225A の種々の移植性腹水肝癌細胞株の核抽出液との比較を試みた (図 -12)。肝細胞に比較し、移植性腹水肝癌細胞株での Sp1 の結合量が明らかに増加していた。-32 ~ -846 までの領域を 5 つのフラグメントに分け、先に

検討した -32 ~ -133 のフラグメントより上流の4つのフラグメントについて、肝細胞および AH13 の核抽出液との結合作用を検討したところ、図 -13 のように、-134 ~ -332 のフラグメントに対しては -32 ~ -133 のフラグメントと同様のシフトバンドを示した。これは、3つの Sp1 結合配列が存在するためであろうと考えられた。その上流の3つのフラグメントについては、AH13 の核抽出液で -591 ~ -846 のフラグメントに対してスミアとなり、はっきりしたバンドは見られなかったが、何らかの因子との作用を予想させた。この領域は、前章のルシフェラーゼアッセイの結果から AH13 で何らかの活性化を受ける領域の一部であり、フラグメントを短くすることにより、よりはっきりした結果が観察されるであろうことを予想し、一応 -488 ~ -862 の領域について4つのフラグメントに分けるようにプライマーをデザインし、PCR でそれぞれ約 100 bp のフラグメントを作製し、これらに対しての肝細胞および AH13 の核抽出液との結合作用を検討した (図 -14) 。図のように、AH13 の核抽出液においてもっとも上流の -742 ~ -862 のフラグメントに対してのみ二本のシフトバンドが見られた。よってルシフェラーゼアッセイで見いだされた -0.5 ~ -0.8 kb の領域での転写活性化は、このバンドシフトを起こさせた因子によるものであることが示唆された。また、同様にこの -742 ~ -862 のフラグメントについて肝細胞の核抽出液と、AH13、AH130、AH7974F、AH109A、AH225A の種々の移植性腹水肝癌細胞株の核抽出液とを比較した結果、先に AH13 で確認されたシフトバンドと同様のバンドが AH7974F でもはっきり観察されたが、AH109A、AH225A では非常に弱く、また AH130 では全く確認されなかった (図 -15) 。

(2) UV クロスリンク法によって、先にゲルシフトアッセイで見られた -742 ~ -862 のフラグメントに結合する因子の分子量を推定することを試みた。わずか 120 bp あまりの領域に、39 kDa、35 kDa、21 kDa の転写因子としては比較的低分子の蛋白が結合していた (図 -16) 。この結果は、SS 結合の還元条件下でのものであるが、非還元条件下でも同様の結果が得られた。

(3) DNaseI フットプリントでは、先に述べたような実験で DNA フラグメントに結合することが明らかとなった因子が、どの配列を認識するのかを検討した。結

合反応は、ゲルシフトアッセイにより、全てのプローブに対して結合し、未結合のプローブが残らない条件を検討して行った。高GC領域のプローブに対する反応では、プローブのかなりの領域が高いGC含量で、Sp1結合部位も9箇所存在したためか、きれいなフットプリントの像は得られなかったが、図-17のようにSp1結合部位を含む領域がバンドが薄くなった図が得られた。

第四節 考察

以上の結果、移植性腹水肝癌細胞では、あらかじめそのプロモーターの配列から予測された、転写因子 Sp1 の結合が確認され、その結合量も正常肝細胞に比較して増加していたことが明らかとなった。分化に関与するのではないかとされる Sp1 は、最近の報告で、肝細胞においては、低分化段階では低リン酸化状態であり、その状態では DNA に対する親和性は高いが、最終分化段階ではリン酸化され、DNA 結合能が低下又は喪失しているらしい [80]。また、Acetyl-CoA carboxylase 遺伝子は、肝細胞でグルコースによって発現が亢進するが、その原因となるのは PP1 が Sp1 を脱リン酸化することによるらしい [81]。この様な現象より、癌化、つまり低分化段階では Sp1 の低リン酸化状態が PP1 α 転写を活性化し、それに伴い上昇した PP1 活性が Sp1 を脱リン酸化状態に維持するのではないかとの仮説が立てられる。AH13、AH7974F で発現し、PP1 α 遺伝子に作用しているような、正常肝細胞では発現していない因子の作用のみられない AH130 でも PP1 α の転写が亢進している理由もうなずける。しかし、他の領域で転写活性化因子が働いている可能性は否定できない。

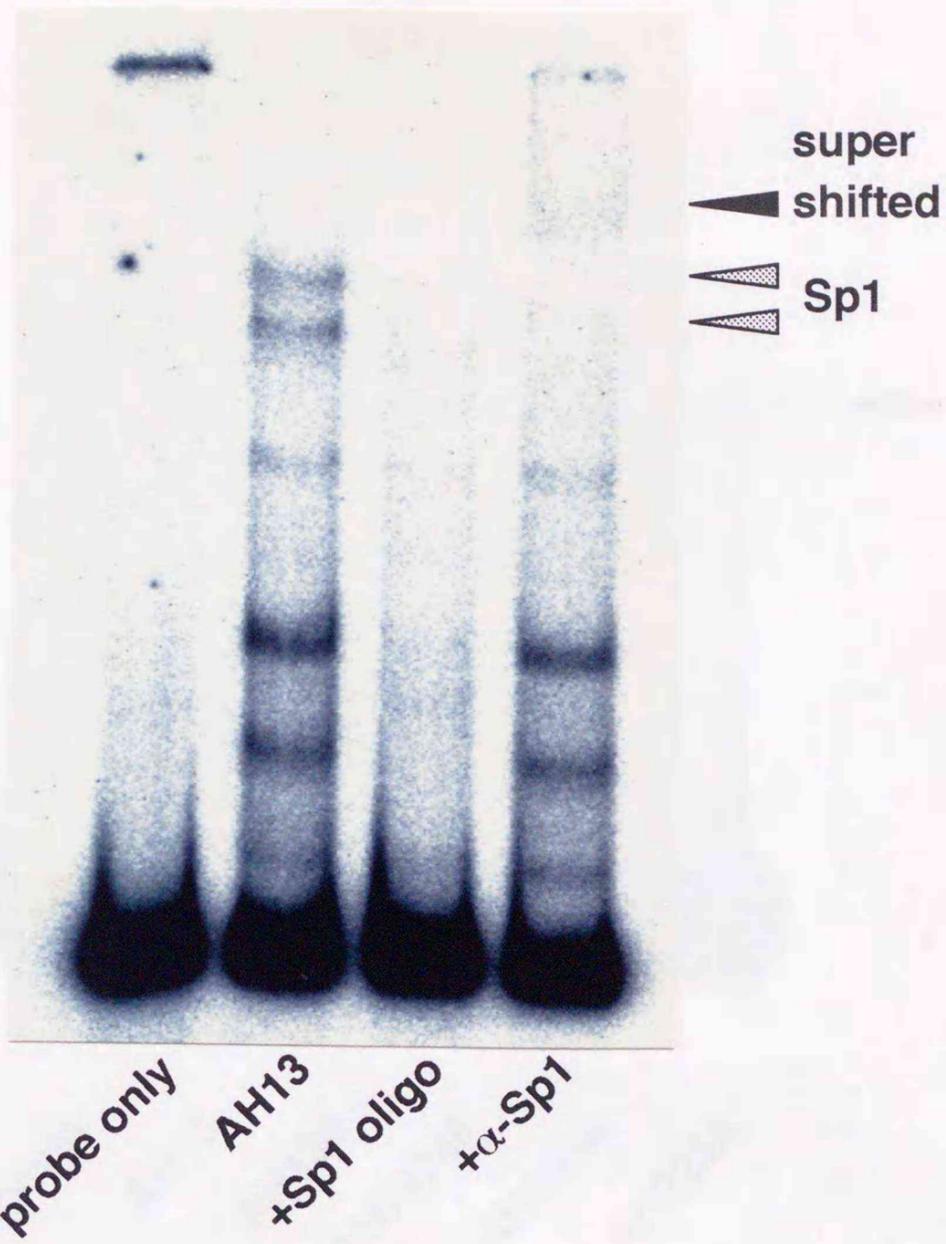
また、-742 ~ -862 のフラグメントに対しては少なくとも AH13 および AH7974F の二つの細胞株においては何らかの3つの因子が強く結合し、AH109A、AH225A では非常に弱い作用を示し、AH130 では全く作用が見られなかった、正常肝細胞では発現又は DNA 結合活性の抑制された因子は、その細胞の性格を比較してみると興味ある点が見えてきた。強い作用が見られる AH13 および AH7974F は、完全に自由細胞のみであるが、弱い作用を示す AH109A、AH225A は小さな島を形成し、全く作用が見られない AH130 はかなり大きな島を形成する。この事から、先の因子は細胞接着もしくは細胞間のシグナル伝達に関与して発現が誘導されているのではないかとの見方もできる。これはもう少し多くの細胞種で一般化すべき問題である。また、これらの因子の構造、機能、発現様式や制御については早急に明らかにすべき問題であり、それによりはじめて PP1 α mRNA 発現と癌性変異との関連について考察し得るであろう。

第五節 この章のまとめ

1. 高GC領域に、Sp1が結合すること、また、種々の移植性腹水肝癌細胞株で肝細胞に比しその結合量の増加が観察された。また、AH13細胞において前章のルシフェラーゼアッセイで観察された転写活性化領域 -0.5 ~ -0.8 kには、その -742 ~ -862 の領域に何らかの因子が結合していることが明らかとなった。さらに、同様の結果がAH7974Fでも観察された。しかしながら、AH109A、AH225Aではその結合によるシフトバンドは非常に弱く、またAH130においては全く観察されなかった。

2. ゲルシフトアッセイで観察された、AH13核抽出液における -742 ~ -862 のフラグメントに対するシフトバンドは、39、35、21 kDaの蛋白が結合することによって明らかとなった。

A



B

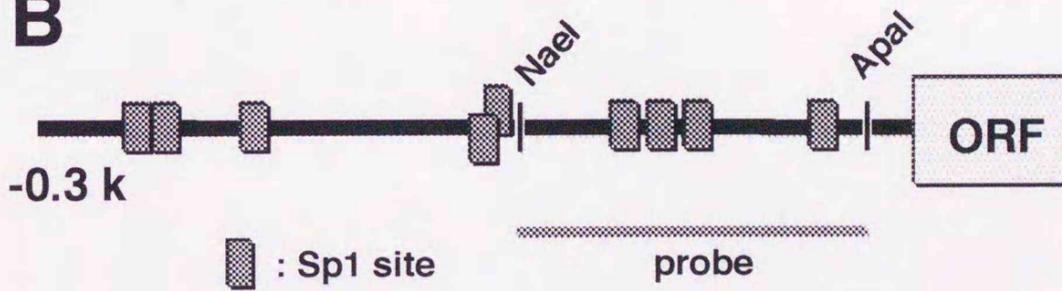


図 - 11 PP1 α 遺伝子 5'-上流高 GC 領域における転写因子 Sp1 との作用

A : AH13 核抽出液は *NaeI* ~ *ApaI* のフラグメントに結合して複数のシフトバンドを形成させた。Sp1 結合部位を有する二本鎖オリゴヌクレオチドとの競争阻害実験でシフトバンドはすべて消失した。また抗 Sp1 抗体の添加により上部二本のシフトバンドが消失し、かわりにさらに高分子側にスーパーシフトバンドが見られた。

B : 使用したプローブ

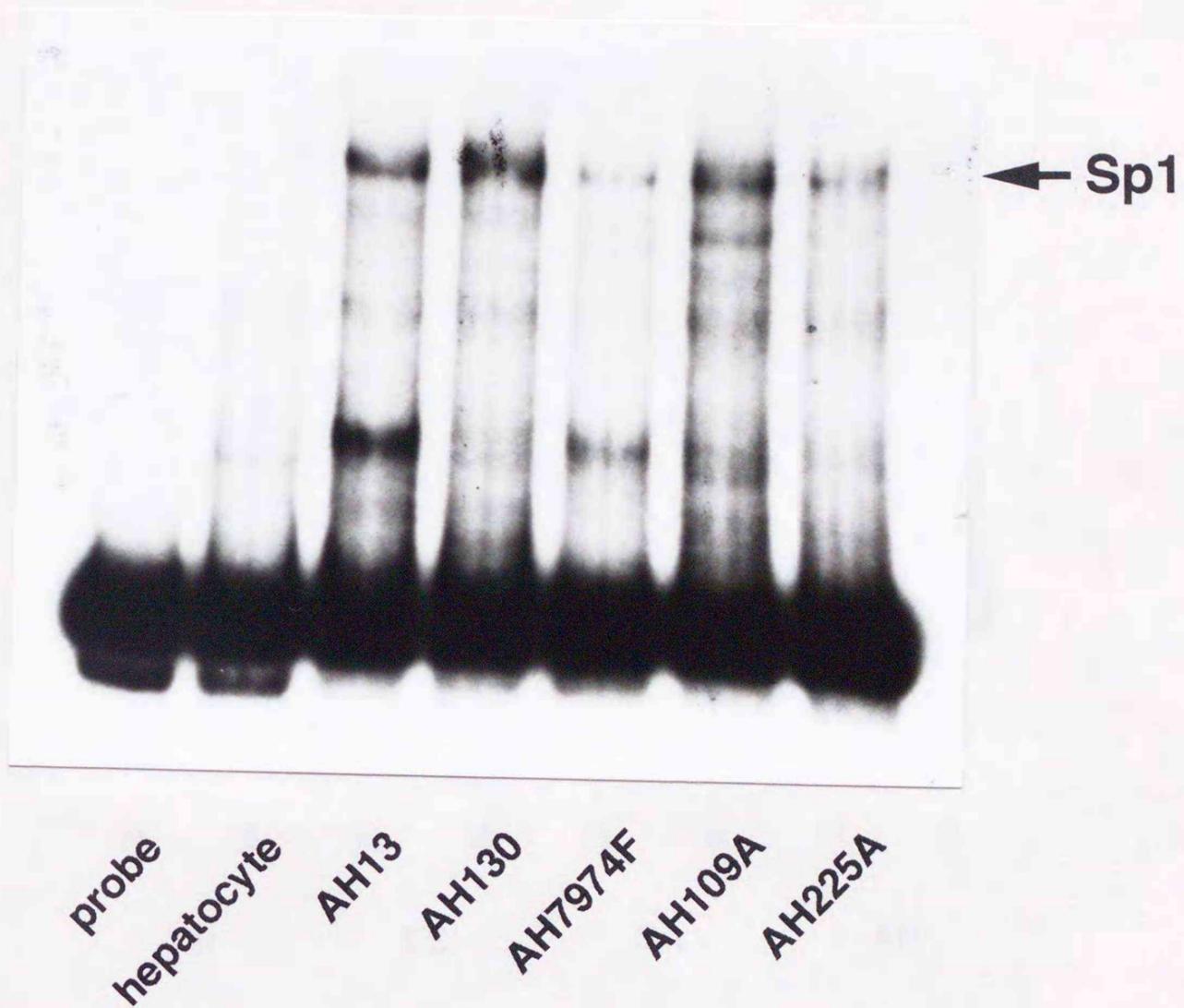
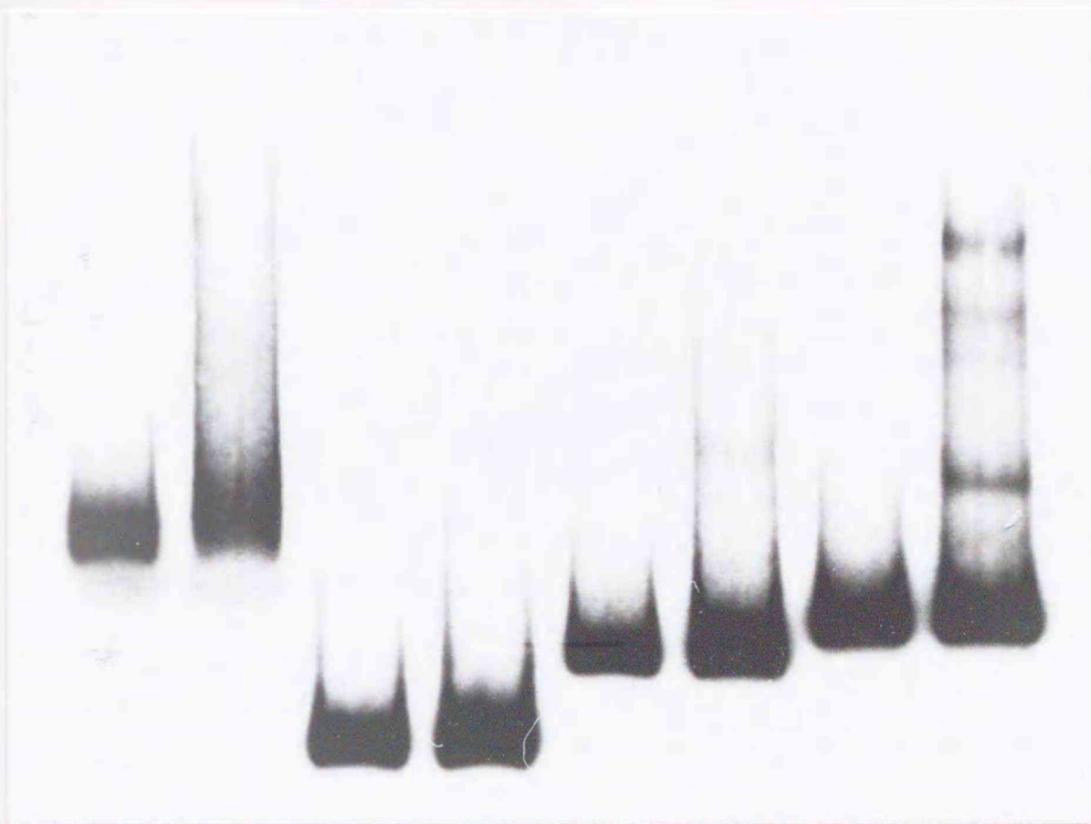


図 - 12 高 GC 領域に対する肝細胞および腹水肝癌細胞の核抽出液での
 ゲルシフトアッセイ
 10,000 cpm のフラグメント、1 μ g タンパク量の核抽出液を使用した。



H A H A H A H A
 XE ES SA AN

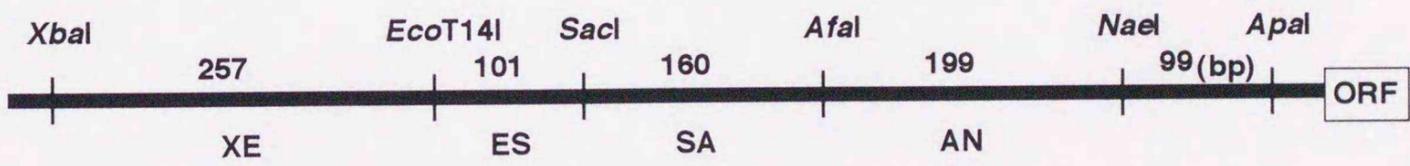


図-13 -0.8k ~ -0.13kまでのフラグメントに対する肝細胞および AH13 核抽出液でのゲルシフトアッセイ
 H : 肝細胞、A : AH13

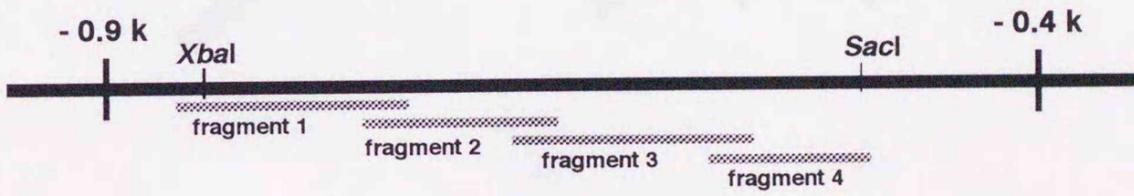
A**B**

図 - 14 XbaI~SacI の約 0.3 kb のフラグメントを 4 分割した、それぞれのフラグメントでのゲルシフトアッセイ
 A、ゲルシフトアッセイの図。H：肝細胞、A：AH13。B、使用したフラグメントの位置。



図 - 15 -862/-742 のフラグメントに対する、肝細胞および各種腹水肝癌細胞核抽出液でのゲルシフトアッセイ



図-16 UVクロスリンクによる、-862~-742のフラグメントに結合する因子の分子量の推定

[α -³²P]dCTPを取り込ませたフラグメントとAH13核抽出液をゲルシフト法の条件でインキュベートし、305 nmの紫外線を照射して架橋させた後、DNaseIで結合していない部位のフラグメントを分解、SDS-PAGEで分画して分子量を推定した。

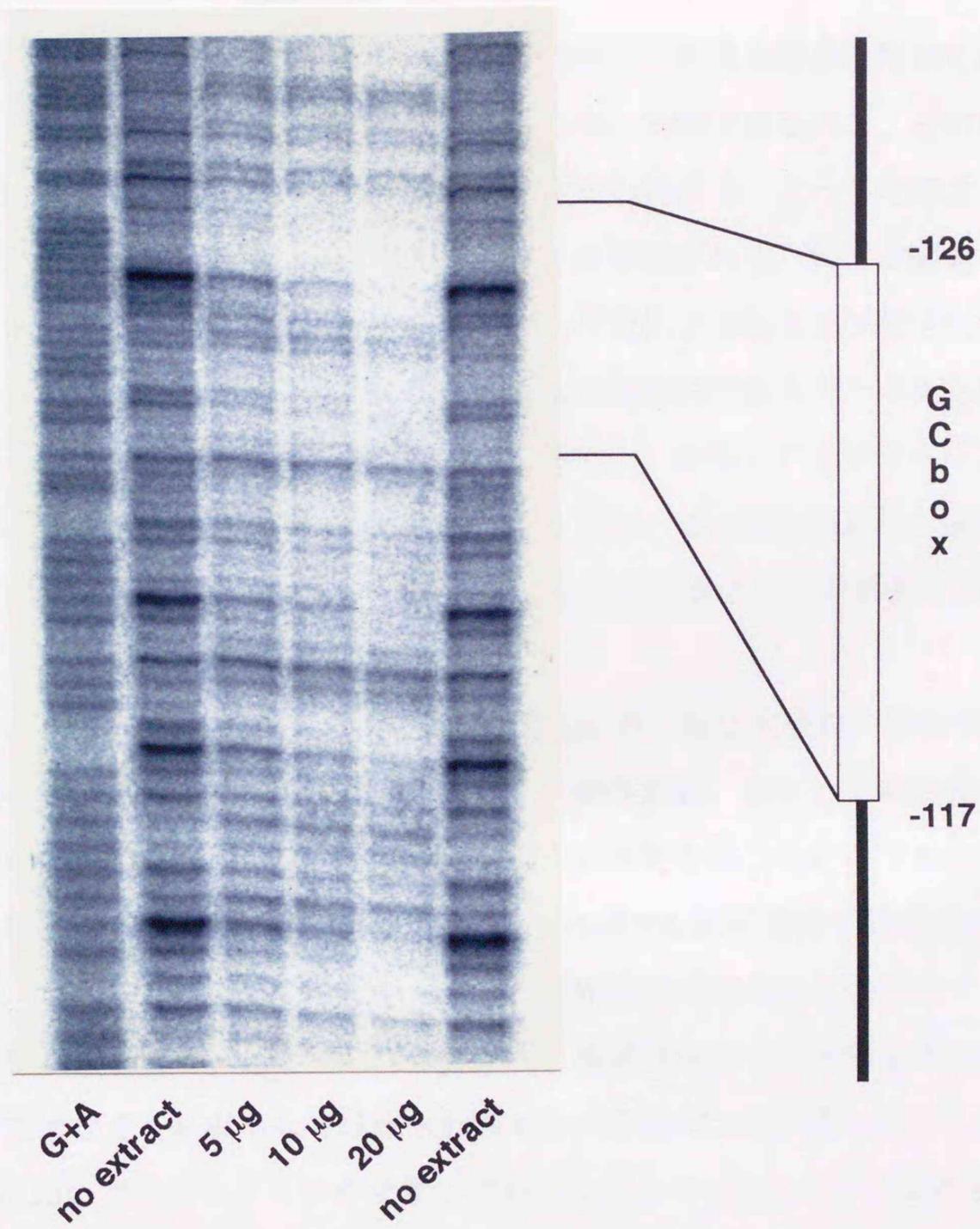


図 - 17 高 GC 領域に対する肝細胞核抽出液でのフットプリント

総括と展望

正常な細胞が遺伝子変異を起こし、その結果生じた異常な酵素活性のために癌化は起こる。癌は、別名を悪性新生物と言われるが、生物である以上、その異常に亢進又は失活した酵素活性のもとでその機能を維持し続ける。よってそのような酵素活性の変異が癌形質の維持に必須であろうことは推測される。特に本酵素のようなシグナル伝達系に関与し、又、ハウスキーピング遺伝子であると予想され、また細胞各所での働きが推測されるものの異常は細胞に致命的であろうと考えられる。しかしながら種々の移植性腹水肝癌細胞では、PP1、しかも一アイソフォームであるPP1 α のみが異常に高発現し、その酵素活性も高い。この様な高脱リン酸環境下で細胞が維持されるのは、少なくともPP1 α の基質となる分子に対するリン酸化環境もかなり亢進していると思われる。

いずれにせよ、移植性腹水肝癌細胞でのPP1 α の様な高発現が序論で述べたような、現在までに観察されたような現象より、癌性変異、またはその代表的な性質の細胞増殖に関与するであろうという考えから本研究をはじめたのであるが、その結果は、種々の移植性腹水肝癌細胞でのPP1 α mRNA 転写活性化機構は一様ではなかった。最近の報告では、骨肉腫などの他の癌細胞ではPP1 α ではなくPP1 γ -1の発現上昇が見られているものもあり[82-86]、癌細胞すべてでPP1 α が高発現しているわけではなく、肝癌もしくは腹水肝癌のみの現象であるかもしれない。

AH13において、ジェノミックサザンブロットによりPP1 α のゲノム付近は正常細胞と変化はないであろうという結果（北村、未発表）であったが、点突然変異の可能性は残っているし、また他の移植性腹水肝癌細胞のゲノムについての情報はないので、あくまでこの結果はPP1 α 遺伝子には全く変異がないことを前提としたものである。しかしながら、AH13においても染色体の構成や構造は正常肝細胞のものとはかなり異なっているし（Saadat、未発表）先の前提は、かなりあいまいなものであることは確かである。ただ、間違いなく言えることは、少なくともAH13、AH7974Fという二つの異なった細胞株では、正常肝細胞では発現していないかもしくはDNA結合活性を抑制されている何らかの転写因子が、これらの細胞内では発

現又は活性化されていることであり、それらは正常細胞の PP1 α 遺伝子に対しては結合作用を示すことである。そして、少なくとも5種の異なった性質を持つ移植性腹水肝癌細胞株において、PP1 α を含むハウスキーピング遺伝子の転写に必須な転写因子である Sp1 の DNA 結合性が上昇していることである。ここで Sp1 について簡単に述べておくと、Sp1 は Specificity protein 1 の略で、その名が示すように、細胞の粗抽出液を各種のクロマトグラフィーによる分画を重ねることにより精製された、最初の DNA 結合性転写因子の一つで、SV40 (Simian virus 40) の初期遺伝子のプロモーターの転写活性に必要な分画として、1983 年に Dynan らによって、Hela 細胞の粗抽出液から同定されており [87]、cDNA クローニングされた [88, 89]。また Sp1 は多くの転写因子と同様、糖鎖を付加した約 95 ~ 105 kDa の単一ポリペプチドであることが確認されている [90]。Sp1 はほとんど全ての細胞、組織で発現しているが、その mRNA 量は少なくとも 100 倍の差が見られる [91]。転写因子に特異的なドメインのうちの一つである Zn フィンガーと呼ばれる、亜鉛イオンにシステイン残基二つとヒスチジン残基二つが配位するモチーフが、3箇所 C 末側に存在する。二カ所ずつのセリンおよびグルタミンに富む領域が存在するが、その機能は明らかではない。また、四量体を形成し、それを単位とした多量体を形成する [92]。

このような性質を持つ Sp1 は、ハウスキーピング遺伝子のみならず、数多くの遺伝子の転写に関与していることが知られている。第四章では、細胞の低分化状態での Sp1 の低リン酸化レベルによる PP1 α 発現の活性化と、それによる PP1 活性上昇による Sp1 の低リン酸化レベルの維持が考えられることを記した。もちろん Sp1 の活性化による転写の亢進は間違いないであろうが、Sp1 により制御されている多くの遺伝子が、すべて PP1 α と同様に転写活性化されているなら PP1 α の転写活性化も観察されなかったであろうことを考えると、Sp1 の影響はそれほどのもではなく、やはり AH13 や AH7974F で見られたような因子によって転写活性化されている比重の方が大きいと考えた方が妥当であろう。よって、AH13 や AH7974F で見られたような因子の影響がない又は少ないと考えられる AH130、AH109A、AH225A などは、他の、例えばその細胞内での PP1 α 遺伝子の変異や、他の転写活

性化因子の存在の可能性が有力であろう。また、PP1 α と同じように各種臓器、細胞に広く分布しているPP1 γ 、 δ などの他のアイソフォームも、同様なハウスキーピング遺伝子のプロモーターを有すると考えられるが、それらの転写もPP1 α にもなって上昇しないことはそれでは説明できない。

実験を始める前に立てた仮説として、高グルコース蓄積という現象から、インシュリン又はグルコースによって転写が活性化する機構が存在し、それが癌化した細胞では常にそのシグナルが活性化した状態で転写を亢進させる遺伝子が高発現しており、PP1 α もそのような遺伝子の一つで転写調節領域にインシュリン活性化配列が存在しているであろう、というモデルを考えた。しかし、今回の結果からはインシュリンで活性化するような配列は見られず、卓上の空論であった。mRNA高発現の結果、増加したPP1 α の蛋白およびPP1活性は核内に存在することは今まで明らかとなっているが、そのターゲットになっている分子の同定が待たれるところであり、それによってPP1 α 移植性腹水肝癌細胞で発現上昇する意義が僅かでも明らかとなるであろう。この点は、プロテインホスファターゼ研究の最大の難関となって進展を阻んでいるが、なにか新しい方法論の開発が必要であろう。

また、本研究で明らかとなった、正常肝細胞ではPP1 α 遺伝子に作用しないが、AH13では結合する転写因子は、一体どの様なものなのか、また癌性変異によってのみ働くのか、もしくは正常状態でも何らかの作用をしているのか、その因子の発現は何により制御されているのかなど興味は広まるばかりではあるが、残念ながらここまでしか明らかにできなかった。今回見いだされた因子の解析はかなり困難が伴うと予想されるが、ぜひその機能を解析し、PP1 α と肝癌との関連を明らかにされることを強く願う。

謝辞

本研究の遂行において終始御懇篤な御指導と御鞭撻を賜りました北海道大学免疫科学研究所生化学部門 菊池九二三教授に感謝申し上げます。

本論文に関し、御校閲を賜り、また、本研究所在籍中御指導を賜りました北海道大学免疫科学研究所化学部門 東市郎教授、本論文を御校閲賜り、また理学部生物化学講座に在籍させて戴き、御指導賜りました北海道大学大学院理学研究科化学専攻 谷口和弥教授に謹んで感謝申し上げます。

本研究の実施にあたり、御指導下さいました北海道大学免疫科学研究所生化学部門 水野佑亮助教授に厚く御礼申し上げます。

本研究において、御指導並びに pRSVlacZ を供与戴きました北海道大学免疫科学研究所細菌感染部門 幸田敏明博士に厚く御礼申し上げます。

本研究の遂行において御協力いただきました北海道大学免疫科学研究所生化学部門 松澤秀一博士、吉田栄子氏、柿木康孝博士、モスタファ サアダト博士、朱 棠博士、中村恒史博士、松田明生博士、片桐千華氏、滝澤典夫氏、南部徹氏、川村猛氏、北村隆也氏、漆原範子氏、小松正和氏、斎藤隆明氏、横山明彦氏、石田麻恵氏、田沼延公氏、本間玲子氏に感謝いたします。本研究の遂行において初代培養肝細胞を調製いただいた今井陽子氏に感謝いたします。また、本研究を開始するきっかけを戴くとともに御指導戴いた北村一樹博士に感謝いたします。

最後に、本研究の大半において共同研究者として御尽力戴きました柴田直子氏に心より感謝いたします。

参考文献

1. Alberts, A. S., Montminy, M., Shenolikar, S. and Feramisco, J. R. Expression of a peptide inhibitor of protein phosphatase 1 increases phosphorylation and activity of CREB in NIH 3T3 fibroblasts (1994) *Mol. Cell Biol.* 14, 4398-407
2. Durfee, T., Becherer, K., Chen, P. L., Yeh, S. H., Yang, Y., Kilburn, A. E., Lee, W. H. and Elledge, S. J. The retinoblastoma protein associates with the protein phosphatase type 1 catalytic subunit (1993) *Genes Dev.* 7, 555-69
3. Kumagai, A. and Dunphy, W. G. Regulation of the cdc25 protein during the cell cycle in *Xenopus* extracts (1992) *Cell* 70, 139-51
4. Izumi, T., Walker, D. H. and Maller, J. L. Periodic changes in phosphorylation of the *Xenopus* cdc25 phosphatase regulate its activity (1992) *Mol. Biol. Cell* 3, 927-39
5. Helps, N. R., Barker, H. M., Elledge, S. J. and Cohen, P. T. Protein phosphatase 1 interacts with p53BP2, a protein which binds to the tumour suppressor p53 (1995) *FEBS Lett.* 377, 295-300
6. Ohkura, H., Kinoshita, N., Miyatani, S., Toda, T. and Yanagida, M. The fission yeast *dis2+* gene required for chromosome disjoining encodes one of two putative type 1 protein phosphatases (1989) *Cell* 57, 997-1007
7. Kinoshita, N., Ohkura, H. and Yanagida, M. Distinct, essential roles of type 1 and 2A protein phosphatases in the control of the fission yeast cell division

cycle (1990) *Cell* 63, 405-15

8. Ohkura, H. and Yanagida, M. S. pombe gene *sds22+* essential for a midmitotic transition encodes a leucine-rich repeat protein that positively modulates protein phosphatase-1 (1991) *Cell* 64, 149-57
9. Ingebritsen, T. S. and Cohen, P. The protein phosphatases involved in cellular regulation. 1. Classification and substrate specificities (1983) *Eur. J. Biochem.* 132, 255-61
10. Takai, A., Bialojan, C., Troschka, M. and Ruegg, J. C. Smooth muscle myosin phosphatase inhibition and force enhancement by black sponge toxin (1987) *FEBS Lett.* 217, 81-4
11. Bialojan, C. and Takai, A. Inhibitory effect of a marine-sponge toxin, okadaic acid, on protein phosphatases. Specificity and kinetics (1988) *Biochem. J.* 256, 283-90
12. Brandt, H., Lee, E. Y. and Killilea, S. D. A protein inhibitor of rabbit liver phosphorylase phosphatase (1975) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 63, 950-6
13. Huang, F. L. and Glinsmann, W. H. Separation and characterization of two phosphorylase phosphatase inhibitors from rabbit skeletal muscle (1976) *Eur. J. Biochem.* 70, 419-26
14. Beullens, M., Van, E. A., Bollen, M. and Stalmans, W. Inactivation of nuclear inhibitory polypeptides of protein phosphatase-1 (NIPP-1) by protein kinase A (1993) *J. Biol. Chem.* 268, 13172-7

15. Schelling, D., Leader, D. P., Zammit, V. A. and Cohen, P. Distinct type-1 protein phosphatases are associated with hepatic glycogen and microsomes (1988) *Biochim. Biophys. Acta* 972, 221-31
16. Tang, P. M., Bondor, J. A., Swiderek, K. M. and DePaoli, R. A. Molecular cloning and expression of the regulatory (RG1) subunit of the glycogen-associated protein phosphatase (1991) *J. Biol. Chem.* 266, 15782-9
17. Chen, Y. H., Hansen, L., Chen, M. X., Bjorbaek, C., Vestergaard, H., Hansen, T., Cohen, P. T. and Pedersen, O. Sequence of the human glycogen-associated regulatory subunit of type 1 protein phosphatase and analysis of its coding region and mRNA level in muscle from patients with NIDDM (1994) *Diabetes* 43, 1234-41
18. Chisholm, A. A. and Cohen, P. The myosin-bound form of protein phosphatase 1 (PP-1M) is the enzyme that dephosphorylates native myosin in skeletal and cardiac muscles (1988) *Biochim. Biophys. Acta* 971, 163-9
19. Chisholm, A. A. and Cohen, P. Identification of a third form of protein phosphatase 1 in rabbit skeletal muscle that is associated with myosin (1988) *Biochim. Biophys. Acta* 968, 392-400
20. Alessi, D., MacDougall, L. K., Sola, M. M., Ikebe, M. and Cohen, P. The control of protein phosphatase-1 by targetting subunits. The major myosin phosphatase in avian smooth muscle is a novel form of protein phosphatase-1 (1992) *Eur. J. Biochem.* 210, 1023-35

21. Okubo, S., Erdodi, F., Ito, M., Ichikawa, K., Konishi, T., Nakano, T., Kawamura, T., Brawtigan, D. L. and Hartshorne, D. J. Characterization of a myosin-bound phosphatase from smooth muscle (1993) *Adv. Prot. Phosphatases* 7, 295-314
22. Mulkey, R. M., Endo, S., Shenolikar, S. and Malenka, R. C. Involvement of a calcineurin/inhibitor-1 phosphatase cascade in hippocampal long-term depression (1994) *Nature* 369, 486-8
23. Zimmerlin, A., Jupe, S. C. and Bolwell, G. P. Molecular cloning of the cDNA encoding a stress-inducible protein phosphatase 1 (PP1) catalytic subunit from French bean (*Phaseolus vulgaris* L.) (1995) *Plant Mol. Biol.* 28, 363-8
24. Cohen, P. The structure and regulation of protein phosphatases (1989) *Annu. Rev. Biochem.* 453-508
25. Bollen, M. and Stalmans, W. The structure, role, and regulation of type 1 protein phosphatases. [Review] (1992) *Critical Reviews in Biochem. Mol. Biol.* 27, 227-81
26. Sasaki, K., Shima, H., Kitagawa, Y., Irino, S., Sugimura, T. and Nagao, M. Identification of members of the protein phosphatase 1 gene family in the rat and enhanced expression of protein phosphatase 1 alpha gene in rat hepatocellular carcinomas [published erratum appears in *Jpn J Cancer Res* 1991 Jul;82(7):873] (1990) *Jpn. J. Cancer Res.* 81, 1272-80
27. Hiraga, A., Kikuchi, K., Tamura, S. and Tsuiki, S. Purification and characterization of Mg²⁺-dependent glycogen synthase

- phosphatase (phosphoprotein phosphatase IA) from rat liver (1981) *Eur. J. Biochem.* 119, 503-10
28. Kikuchi, K., Shineha, R., Hiraga, A., Tamura, S., Kikuchi, H. and Tsuiki, S. Cytosolic protein phosphatases of rat ascites hepatoma AH-13 as compared with those of rat liver: isolation and characterization of a novel protein phosphatase (1984) *Gann* 75, 388-94
29. Shineha, R., Kikuchi, K., Tamura, S., Hiraga, A., Suzuki, Y. and Tsuiki, S. Particulate-associated protein phosphatases of rat hepatomas as compared with the enzymes of rat liver (1990) *Jpn. J. Cancer Res.* 81, 161-8
30. Kitamura, K., Mizuno, Y., Sasaki, A., Yasui, A., Tsuiki, S. and Kikuchi, K. Molecular cloning and sequence analysis of cDNA for the catalytic subunit 1 alpha of rat kidney type 1 protein phosphatase, and detection of the gene expression at high levels in hepatoma cells and regenerating livers as compared to rat livers (1991) *J Biochem (Tokyo)* 109, 307-10
31. Kitamura, K., Mizuno, Y., Hatayama, I., Sato, K. and Kikuchi, K. Selective high expression of protein phosphatase PP1a mRNA in rat poorly differentiated ascites hepatomas (1993) *Int. J. Oncol.* 2, 237-240
32. Saadat, M., Kitamura, K., Mizuno, Y., Saeki, H., Kudo, T. and Kikuchi, K. Gene expression of protein phosphatases in rat ascites hepatoma cell lines (1994) *Cancer Detect. Prev.* 18, 115-122
33. Takizawa, N., Mizuno, Y., Ito, Y. and Kikuchi, K. Tissue distribution of isoforms of type-1 protein phosphatase PP1 in mouse tissues and its diabetic

alterations (1994) *J. Biochem.* 116, 411-5

34. Saadat, M., Mizuno, Y., Takizawa, N., Kakinoki, Y. and Rikuchi, R. Neoplastic alterations in subcellular distribution of type 1 alpha protein phosphatase in rat ascites hepatoma cells (1995) *Cancer Lett.* 94, 165-70
35. Kakinoki, Y., Kitamura, K., Matsuzawa, S.-i., Mizuno, Y., Miyazaki, T. and Kikuchi, K. Gene expressions and activities of protein phosphatases PP1 and PP2A in rat liver regeneration after partial hepatectomy (1992) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 185, 291-297
36. Nakamura, K., Koda, T., Kakinuma, M., Matsuzawa, S., Kitamura, K., Mizuno, Y. and Kikuchi, K. Cell cycle dependent gene expressions and activities of protein phosphatases PP1 and PP2A in mouse NIH3T3 fibroblasts (1992) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 187, 507-14
37. Kitamura, K., Mizuno, Y., Hatayama, I., Sato, K., Tamura, S., Nagao, M., Tsuiki, S. and Kikuchi, K. mRNA levels of catalytic subunits of protein phosphatases 1, 2A, and 2C in hepatocarcinogenesis (1992) *Jpn. J. Cancer Res.* 83, 66-71
38. Kitagawa, Y., Shima, H., Sasaki, K. and Nagao, M. Identification of the promoter region of the rat protein phosphatase 2A alpha gene (1991) *Biochim. Biophys. Acta* 1089, 339-44
39. Alberts, A. S., Deng, T., Lin, A., Meinkoth, J. L., Schonthal, A., Mumby, M. C., Karin, M. and Feramisco, J. R. Protein phosphatase 2A potentiates activity of promoters containing AP-1-binding elements (1993) *Mol. Cell. Biol.* 13, 2104-12

40. Chang, C. D., Takeda, T., Mukai, H., Shuntoh, H., Kuno, T. and Tanaka, C. Molecular cloning and characterization of the promoter region of the calcineurin A alpha gene [published erratum appears in *Biochem J* 1993 May 1; 291(Pt 3):951] (1992) *Biochem. J.* , 801-5
41. Hanahan, D. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids (1983) *J. Mol. Biol.* 166, 557-80
42. Hanahan, D., Jessee, J. and Bloom, F. R. Plasmid transformation of *Escherichia coli* and other bacteria. [Review] (1991) *Method Enzymol.* 204, 63-113
43. Birnboim, H. C. and Doly, J. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA (1979) *Nucleic Acids Research* 7, 1513-23
44. Birnboim, H. C. A rapid alkaline extraction method for the isolation of plasmid DNA (1983) *Methods in Enzymology* 100, 243-55
45. Radloff, R., Bauer, W. and Vinograd, J. A dye-buoyant-density method for the detection and isolation of closed circular duplex DNA: the closed circular DNA in HeLa cells (1967) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 57, 1514-21
46. Chomczynski, P. and Sacchi, N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction (1987) *Anal. Biochem.* 162, 156-9
47. Tay, A., Maxwell, P., Li, Z. G., Goldberg, H. and Skorecki, K. Cytosolic

- phospholipase A2 gene expression in rat mesangial cells is regulated post-transcriptionally (1994) *Biochem. J.* , 417-22
48. Benton, W. D. and Davis, R. W. Screening lambda^{gt} recombinant clones by hybridization to single plaques in situ (1977) *Science* 196, 180-2
49. Southern, E. M. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis (1975) *J. Mol. Biol.* 98, 503-17
50. Sanger, F., Nicklen, S. and Coulson, A. R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors (1977) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 74, 5463-7
51. Weis, L. and Reinberg, D. Transcription by RNA polymerase II: initiator-directed formation of transcription-competent complexes. [Review] (1992) *Faseb J.* 6, 3300-9
52. Alam, J. and Cook, J. L. Reporter genes: application to the study of mammalian gene transcription. [Review] (1990) *Anal. Biochem.* 188, 245-54
53. Bina, S. M., Thoren, M., Salzman, N. and Thomson, J. A. Rapid sequence determination of late simian virus 40 16S mRNA leader by using inhibitors of reverse transcriptase (1979) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 76, 731-5
54. McKnight, S. L. and Kingsbury, R. Transcriptional control signals of a eukaryotic protein-coding gene (1982) *Science* 217, 316-24
55. Berk, A. J. and Sharp, P. A. Sizing and mapping of early adenovirus mRNAs by gel electrophoresis of S1 endonuclease-digested hybrids (1977) *Cell* 12, 721-32

56. Krieg, P. A. and Melton, D. A. In vitro RNA synthesis with SP6 RNA polymerase (1987) *Method Enzymol.* 155, 397-415
57. Melton, D. A., Krieg, P. A., Rebagliati, M. R., Maniatis, T., Zinn, K. and Green, M. R. Efficient in vitro synthesis of biologically active RNA and RNA hybridization probes from plasmids containing a bacteriophage SP6 promoter (1984) *Nuc. Acid Res.* 12, 7035-56
58. Deluca, M. Firefly luciferase. [Review] (1976) *Adv. Enzymol. Related Areas of Mol. Biol.* 44, 37-68
59. de, W. J., Wood, K. V., DeLuca, M., Helinski, D. R. and Subramani, S. Firefly luciferase gene: structure and expression in mammalian cells (1987) *Mol. Cell. Biol.* 7, 725-37
60. Nguyen, V. T., Morange, M. and Bensaude, O. Firefly luciferase luminescence assays using scintillation counters for quantitation in transfected mammalian cells (1988) *Anal. Biochem.* 171, 404-8
61. Williams, T. M., Burlein, J. E., Ogden, S., Kricka, L. J. and Kant, J. A. Advantages of firefly luciferase as a reporter gene: application to the interleukin-2 gene promoter (1989) *Anal. Biochem.* 176, 28-32
62. Badia, E., Duchesne, M. J., Pons, M. and Nicolas, J. C. Membrane targeting of firefly luciferase: a new bioluminescent reporter gene (1994) *Anal. Biochem.* 217, 333-5

63. Gorman, C. M., Moffat, L. F. and Howard, B. H. Recombinant genomes which express chloramphenicol acetyltransferase in mammalian cells (1982) *Mol. Cell. Biol.* 2, 1044-51
64. Prasher, D. C., Eckenrode, V. K., Ward, W. W., Prendergast, F. G. and Cormier, M. J. Primary structure of the *Aequorea victoria* green-fluorescent protein (1992) *Gene* 111, 229-33
65. Henikoff, S. Unidirectional digestion with exonuclease III creates targeted breakpoints for DNA sequencing (1984) *Gene* 28, 351-9
66. Yanisch, P. C., Vieira, J. and Messing, J. Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors (1985) *Gene* 33, 103-19
67. Wigler, M., Silverstein, S., Lee, L. S., Pellicer, A., Cheng, Y. c. and Axel, R. Transfer of purified herpes virus thymidine kinase gene to cultured mouse cells (1977) *Cell* 11, 223-32
68. Koda, T., Hasan, S., Sasaki, A., Arimura, Y. and Kakinuma, M. Regulatory sequences required for hst-1 expression in embryonal carcinoma cells (1994) *FEBS Lett.* 342, 71-5
69. Felgner, P. L., Gadek, T. R., Holm, M., Roman, R., Chan, H. W., Wenz, M., Northrop, J. P., Ringold, G. M. and Danielsen, M. Lipofection: a highly efficient, lipid-mediated DNA-transfection procedure (1987) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 84, 7413-7

70. Neumann, E., Schaefer, R. M., Wang, Y. and Hofschneider, P. H. Gene transfer into mouse lyoma cells by electroporation in high electric fields (1982) *EMBO J.* 1, 841-5
71. Pugh, B. F. and Tjian, R. Mechanism of transcriptional activation by Sp1: evidence for coactivators (1990) *Cell* 61, 1187-97
72. Donahue, J. P., Sugg, N. and Hawiger, J. The integrin alpha v gene: identification and characterization of the promoter region (1994) *Biochim. Biophys. Acta* 1219, 228-32
73. Garner, M. M. and Revzin, A. A gel electrophoresis method for quantifying the binding of proteins to specific DNA regions: application to components of the Escherichia coli lactose operon regulatory system (1981) *Nuc. Acid. Res.* 9, 3047-60
74. Chodosh, L. A., Carthew, R. W. and Sharp, P. A. A single polypeptide possesses the binding and transcription activities of the adenovirus major late transcription factor (1986) *Mol. Cell. Biol.* 6, 4723-33
75. Galas, D. J. and Schmitz, A. DNase footprinting: a simple method for the detection of protein-DNA binding specificity (1978) *Nuc. Acid. Res.* 5, 3157-70
76. Schreiber, E., Matthias, P., Muller, M. M. and Schaffner, W. Rapid detection of octamer binding proteins with 'mini-extracts', prepared from a small number of cells (1989) *Nuc. Acid. Res.* 17,
77. Lowry, O. H., Rosenbrough, N. J., Farr, A. L. and Randall, R. J. Protein

measurement with the folin phenol reagent (1951) *J. Biol. Chem.* 193, 265-275

78. Maxam, A. M. and Gilbert, W. A new method for sequencing DNA (1977)

Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 74, 560-4

79. Maxam, A. M. and Gilbert, W. Sequencing end-labeled DNA with base-specific chemical cleavages (1980) *Methods Enzymol.* 65, 499-560

80. Leggett, R. W., Armstrong, S. A., Barry, D. and Mueller, C. R. Sp1 is phosphorylated and its DNA binding activity down-regulated upon terminal differentiation of the liver (1995) *J. Biol. Chem.* 270, 25879-84

81. Daniel, S., Zhang, S., DePaoli, R. A. and Kim, K. H. Dephosphorylation of Sp1 by protein phosphatase 1 is involved in the glucose-mediated activation of the acetyl-CoA carboxylase gene (1996) *J. Biol. Chem.* 271, 14692-7

82. Sogawa, K., Yamada, T., Funamoto, Y., Kohno, K., Nishikawa, H., Kishida, F., Hamazaki, F., Yamashita, N. and Matsumoto, K. Selective increase in expression of isoform PP1 gamma 1 of type-1 protein phosphatase in chondrosarcoma cells (1994) *Res. Commun. Mol. Pathol. Pharm.* 86, 375-8

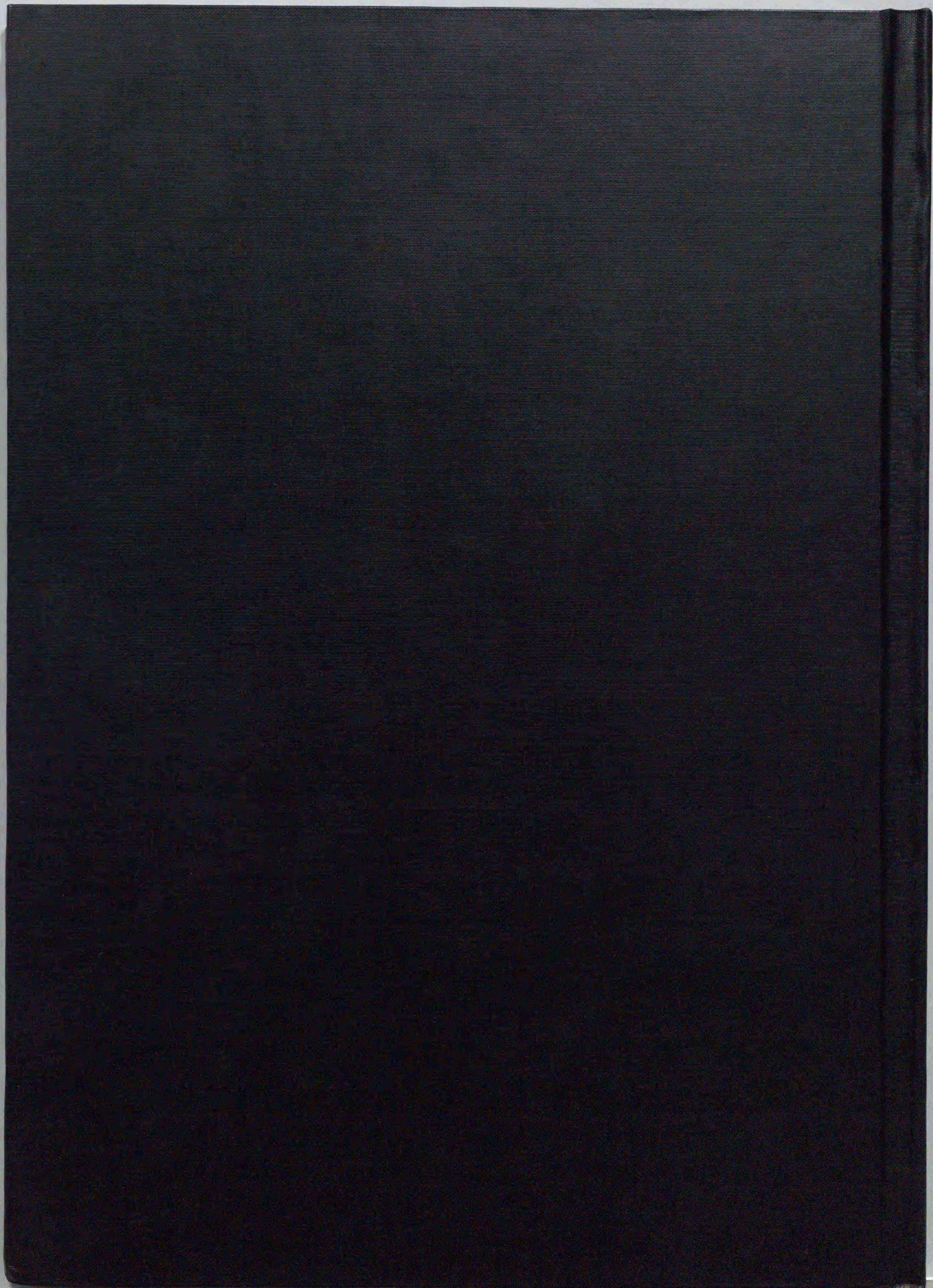
83. Sogawa, K., Yamada, T., Masaki, T., Nishikawa, H., Cai, Y., Oka, S., Norimatsu, H. and Matsumoto, K. Enhanced expression of catalytic subunits of protein phosphatase type 1 and high S-phase fraction in liposarcoma (1994) *Res. Commun. Mol. Pathol. Pharm.* 85, 359-62

84. Yamada, T., Sogawa, K., Masaki, T., Funamoto, Y., Kohno, K., Oka, S., Norimatsu, H. and Matsumoto, K. Enhanced expression of catalytic subunit

- isoform PP1 gamma 1 of protein phosphatase type 1 in malignant fibrous histiocytoma (1994) *Res. Commun. Mol. Pathol. Pharm.* 86, 125-8
85. Sogawa, K., Yamada, T., Oka, S., Kawasaki, K., Mori, S., Tanaka, H., Norimatsu, H., Cai, Y., Kuwabara, H., Shima, H. and et, a. l. Enhanced expression of catalytic subunit isoform PP1 gamma 1 of protein phosphatase type 1 associated with malignancy of osteogenic tumor (1995) *Cancer Lett.* 89, 1-6
86. Sogawa, K., Yamada, T., Sugita, A., Kito, K., Tachibana, M., Nezu, K. and Ueda, N. Role of protein phosphatase in malignant osteogenic and soft tissue tumors (1996) *Res. Commun. Mol. Pathol. Pharm.* 93, 33-42
87. Dynan, W. S. and Tjian, R. Isolation of transcription factors that discriminate between different promoters recognized by RNA polymerase II (1983) *Cell* 32, 669-80
88. Kadonaga, J. T., Carner, K. R., Masiarz, F. R. and Tjian, R. Isolation of cDNA encoding transcription factor Sp1 and functional analysis of the DNA binding domain (1987) *Cell* 51, 1079-90
89. Kadonaga, J. T., Courey, A. J., Ladika, J. and Tjian, R. Distinct regions of Sp1 modulate DNA binding and transcriptional activation (1988) *Science* 242, 1566-70
90. Jackson, S. P. and Tjian, R. O-glycosylation of eukaryotic transcription factors: implications for mechanisms of transcriptional regulation (1988) *Cell* 55, 125-33

91. Saffer, J. D., Jackson, S. P. and Annarella, M. B. Developmental expression of Sp1 in the mouse (1991) *Mol. Cell Biol.* 11, 2189-99

92. Mastrangelo, I. A., Courey, A. J., Wall, J. S., Jackson, S. P. and Hough, P. V. DNA looping and Sp1 multimer links: a mechanism for transcriptional synergism and enhancement (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 88, 5670-4

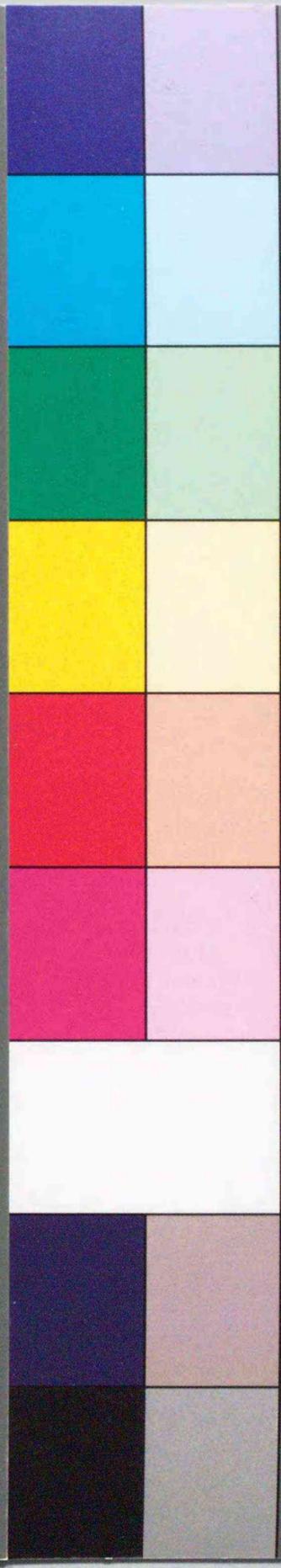


inches 1 2 3 4 5 6 7 8
cm 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19

Kodak Color Control Patches

© Kodak, 2007 TM: Kodak

Blue Cyan Green Yellow Red Magenta White 3/Color Black



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

