

Title	胃酸分泌酵素遺伝子の上流を認識する新しいDNA結合蛋白質
Author(s)	田村, 茂彦
Citation	大阪大学, 1993, 博士論文
Version Type	VoR
URL	<a href="https://doi.org/10.11501/3072882">https://doi.org/10.11501/3072882</a>
rights	
Note	

*Osaka University Knowledge Archive : OUKA*

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

胃酸分泌酵素遺伝子の上流を認識する  
新しいDNA結合蛋白質

大阪大学 産業科学研究所  
生合成化学工業部門

田村 茂彦

平成5年 学位論文

## 目次

発表論文 .....	5
略号 .....	6
第一章 序論 .....	7
第1節 胃酸分泌を担うH <sup>+</sup> /K <sup>+</sup> -ATPase .....	7
第2節 胃酸分泌の調節機構 .....	10
第3節 H <sup>+</sup> /K <sup>+</sup> -ATPaseの $\alpha$ および $\beta$ サブユニットの構造と機能 .....	13
(i) $\alpha$ サブユニットの構造と機能 .....	13
(ii) H <sup>+</sup> /K <sup>+</sup> -ATPase $\beta$ サブユニットの構造と機能 .....	17
第4節 H <sup>+</sup> /K <sup>+</sup> -ATPase遺伝子の発現調節 .....	18
第5節 遺伝子の転写とその調節に関わる因子 .....	21
第6節 本研究の目的 .....	23
第2章 ヒトH <sup>+</sup> /K <sup>+</sup> -ATPase $\alpha$ サブユニット遺伝子のプロモーター領域の構造 .....	24
第1節 緒言 .....	24
第2節 材料および方法 .....	25
1. ヒト胃粘膜および肝臓から染色体DNAの調製 .....	25
2. PCR(polymerase chain reaction)法による遺伝子の増幅 .....	25
3. その他の方法と試薬 .....	26
第3節 結果 .....	27
1. ヒト $\alpha$ サブユニット遺伝子プロモーター領域のPCR法による単離 ...	27
2. $\alpha$ サブユニット遺伝子のプロモーター領域の塩基配列 .....	28
第4節 考察 .....	30
第3章 $\alpha$ および $\beta$ サブユニット遺伝子上流配列を特異的に 認識するDNA結合蛋白質 .....	31
第1節 緒言 .....	31

第2節	材料および方法	32
1.	核抽出液の調製	33
2.	ジェルシフト法によるDNA結合蛋白質の検出	34
3.	試薬およびその他の方法	34
第3節	結果	35
1.	ラットおよびヒト $\alpha$ サブユニット遺伝子のプロモーター領域に特異的に結合する蛋白質	35
2.	$\alpha$ サブユニット遺伝子のプロモーター領域に結合するDNA結合蛋白質の組織分布	37
3.	胃に特異的に存在するDNA結合蛋白質が認識する $\alpha$ サブユニット遺伝子の塩基配列	39
4.	ラット $\beta$ サブユニット遺伝子のプロモーター領域に特異的に結合する蛋白質	42
5.	$\alpha$ および $\beta$ サブユニット遺伝子のプロモーター領域に両方に結合する胃に特異的なDNA結合蛋白質	44
第4節	考察	48
第4章	胃に存在するDNA結合蛋白質 (GATA-GT1、GATA-GT2) の同定	50
第1節	緒言	50
第2節	材料および方法	51
1.	ラット胃の総RNAおよびPoly(A) <sup>+</sup> RNAの調製	51
2.	cDNAの合成	52
3.	ラット胃のcDNAライブラリーの作成	53
4.	コロニーハイブリダイゼーション法によるcDNAライブラリーのスクリーニング	53
5.	DNA塩基配列の決定	54
第3節	結果	55
1.	胃に見い出された新しいタイプのDNA結合蛋白質	55
2.	GATA-GT1、GATA-GT2に対応するラットcDNAの単離と推定アミノ酸配列	58
3.	GATA結合蛋白質の一次構造の比較	62
4.	GATA結合蛋白質の推定リン酸化部位	63

第4節 考察 .....	67
第5章 GATA-GT1およびGATA-GT2のH <sup>+</sup> /K <sup>+</sup> -ATPase遺伝子プロモーター領域への結合 .....	69
第1節 緒言 .....	69
第2節 材料および方法 .....	70
1. 発現ベクターと菌株 .....	70
2. GATA-GT1およびGATA-GT2蛋白質の誘導産生 .....	70
3. 大腸菌の粗抽出液の調製 .....	
4. DNA結合活性の検出 .....	71
第3節 結果 .....	72
1. ラットGATA-GT1およびGATA-GT2蛋白質の大腸菌における誘導産生 .....	72
2. GATA-GT1およびGATA-GT2蛋白質のH <sup>+</sup> /K <sup>+</sup> -ATPase βサブユニット遺伝子のプロモーター領域への結合 .....	73
第4節 考察 .....	76
第6章 GATA-GT1およびGATA-GT2遺伝子の転写の臓器特異性 .....	78
第1節 緒言 .....	78
第2節 材料および方法 .....	79
1. ラットとブタの各臓器からの総RNAの調製 .....	79
2. Northern Hybridization .....	79
(I) RNAの変性 .....	79
(II) アガロースゲル電気泳動 .....	80
(III) RNAのプロッティングおよびフィルターの前処理 .....	80
(IV) ハイブリダイゼーションおよびフィルターの洗浄 .....	81
第3節 結果 .....	81
1. GATA-GT1およびGATA-GT2遺伝子の転写の臓器特異性 .....	81
第4節 考察 .....	84
第7章 総括および展望 .....	85
1. 本研究で得られた成果 .....	85
2. 今後の研究の展望 .....	89

引用文献 ..... 91

謝辞 ..... 106

[発表論文]

- 1 . Tamura, S., Wang, X-H., Maeda, M. and Futai, M.  
Novel gastric DNA binding proteins recognize upstream sequence motifs of parietal cell-specific genes                    submitted
- 2 . Tamura, S., Oshiman, K., Nishi, T., Mori, M., Maeda, M. and Futai, M. (1992)  
Sequence motif in control regions of the  $H^+/K^+$ -ATPase  $\alpha$  and  $\beta$  subunit genes recognized by gastric specific nuclear protein(s)            *FEBS. Lett.*, 298, 137-141
- 3 . Maeda, M., Oshiman, K., Tamura, S., Kaya, S., Mahmood, S., Reuben, M., Lasater, L., Sachs, G. and Futai, M. (1991)  
The rat  $H^+/K^+$ -ATPase  $\beta$  subunit gene and recognition of its control region by gastric DNA binding protein.            *J. Biol. Chem.*, 266, 21584-21588
- 4 . Oshiman, K., Motojima, K., Mahmood, S., Shimada, A., Tamura, S., Maeda, M. and Futai, M. (1991)  
Control region and gastric specific transcription of the rat  $H^+/K^+$ -ATPase  $\alpha$  subunit gene.            *FEBS. Lett.*, 281, 250-254
- 5 . Maeda, M., Oshiman, K-I., Tamura, S., Futai, M. (1990)  
Human Gastric ( $H^+ + K^+$ )-ATPase Gene : Similarity to ( $Na^+ + K^+$ )-ATPase Genes in Exon/Intron organization but difference in control region  
*J. Biol. Chem.*, 265, 9027-9032
- 6 . Tamura, S., Tagaya, M., Maeda, M., Futai, M. (1989)  
Pig Gastric ( $H^+ + K^+$ )-ATPase : Lys-497 conserved in cation transporting ATPases is modified with Pyridoxal 5'-Phosphate            *J. Biol. Chem.*, 264, 8580-8584
- 7 . Tokunaga, F., Nagasawa, K., Tamura, S., Miyata, T., Iwanaga, S., Kisiel, W. (1988)  
The factor V-activating Enzyme (RVV-V) from Russel's Viper Venom : Identification of isoproteins RVV-V  $\alpha$  , RVV-V  $\beta$  , RVV-V  $\gamma$  and their complete amino acid sequences  
*J. Biol. Chem.*, 263, 17471-17481

8. Maeda, M., Tamura, S., Futai, M. (1990)

Structure and chemical modification of pig gastric (H<sup>+</sup>+K<sup>+</sup>)-ATPase

BIOENERGETICS : Molecular Biology, Biochemistry and Pathology

(Ed. Chong H. Kim), Plenum Press 217-225

略号

ATP	adenosine5'-triphosphate
ATPase	adenosine triphosphatase
bp	base pairs
BPB	bromophenol blue
BSA	bovine serum albumin
DTT	dithiothreitol
EDTA	ethylenediaminetetraacetic acid
HEPES	N-2-hydroxyethylpiperazine-N'-2-ethanesulfonic acid
kb	kilo bases
OD	optical density
PCR	polymerase chain reaction
PMSF	phenylmethanesulfonyl fluoride
poly(A) <sup>+</sup> mRNA	poly(A)-tailed messenger RNA
SDS	sodium dodecyl sulfate
SSC	standard saline citrate
Tris	N,N'-tris(hydroxymethyl)aminomethane

アミノ酸残基は1文字あるいは3文字で以下のように表記した

glycine	G	Gly	glutamine	Q	Gln
alanine	A	Ala	lysine	K	Lys
valine	V	Val	arginine	R	Arg
leucine	L	Leu	cysteine	C	Cys
isoleucine	I	Ile	methioine	M	Met
serine	S	Ser	phenylalanine	F	Phe
threonine	T	Thr	tyrosine	Y	Tyr
aspartic acid	D	Asp	tryptophan	W	Trp
asparagine	N	Asn	histidine	H	His
glutamic acid	E	Glu	proline	P	Pro



## 第一章 序論

### 第1節 胃酸分泌を担う $H^+/K^+$ -ATPase

哺乳動物における消化管のうち、胃は内腔のpHが強酸性となっている。これは胃底腺から分泌される塩酸のためである。胃酸分泌は摂食中枢をはじめホルモン、ヒスタミン等による調節を受けており、それら制御の分子機構は興味深い研究対象である。胃壁は3層の筋層(tunica muscularis)に包まれ内側に粘膜層(tunica mucosa)がある。粘膜層は、さらに表層上皮、胃底腺、幽門腺に分けられる。胃底腺には4種類の細胞、すなわち壁細胞(parietal cell)、主細胞(chief cell)、頸部粘液細胞(mucous neck cell)および銀によってよく染色される細胞(argentaaffin cell)を認めることができる。塩酸を分泌をしているのは、壁細胞である。この細胞は胃底腺の中央部分に多く、底部では主細胞の間に散在している。壁細胞の断面はほぼ三角形に近く、底辺は胃底腺の基底膜に接し、頂点にあたる部分は胃内腔側に面している。細胞内に深く切れ込んだ間隙が分泌細管(secretory canaliculi)と呼ばれている(図1-1)。ここから酸が分泌され、胃内腔の $H^+$ 濃度は約170 mMに達する。壁細胞の細胞質は中性であることから、細胞内外の $H^+$ の濃度差は $10^6$ 倍以上となる(1)。

壁細胞から $H^+$ が分泌される機構、すなわち $H^+$ ポンプの実体に関する研究は1973年に遡ることができる。GanserとForteはカエル胃粘膜のミクロソーム分画に、 $Mg^{2+}$ に依存し $K^+$ により活性が促進されるATPaseを発見した(2)。この酵素は壁細胞の分泌細管に存在し(3)、ATPの加水分解に共役して $H^+$ を細胞外に排出し、 $K^+$ を取り込む非起電性(non-electrogenic)のイオン輸送ATPaseであり、 $H^+/K^+$ -ATPaseと名づけられている(4)。 $H^+/K^+$ -ATPaseはブタ(5)、ウサギ(6)、イヌ(7)、ヒト(8)においても胃粘膜に存在することが確認された。

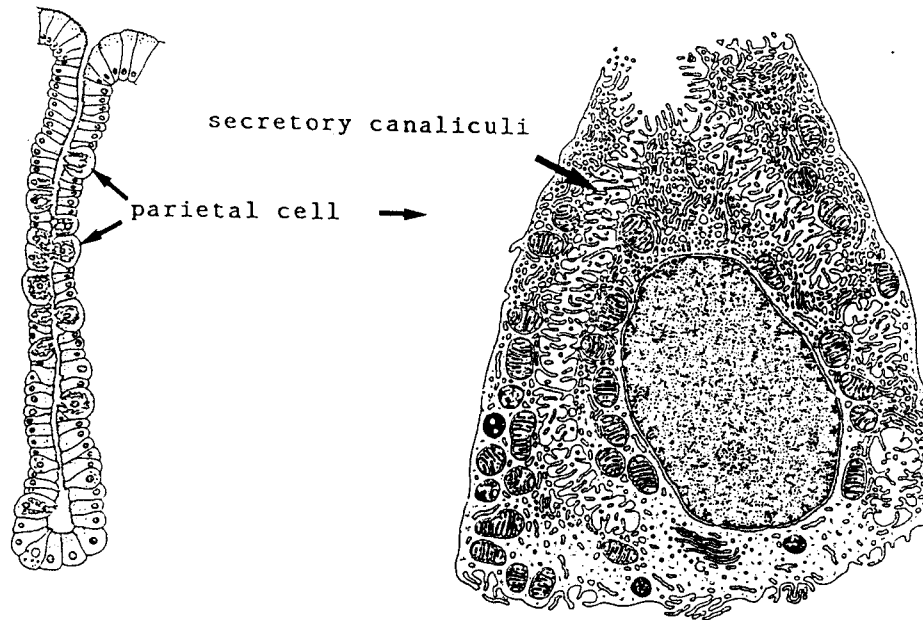


図 1-1 胃底腺に存在し胃酸分泌を担っている壁細胞

胃底腺に存在する壁細胞(parietal cell)を模式的に表わした(左側の図)。壁細胞は三角形に近い断面を持つ細胞で細胞膜が深く切れ込んだ間隙を見ることができ、これが分泌細管(secretory canaliculi)である(右側の図)。

益田龍彦 H2受容体と壁細胞の超微形態「胃酸分泌と壁細胞受容体拮抗剤」大江慶治編(1986)より引用した。

イオン輸送ATPaseは、P型、V型、F型の3種類に分けることができる(9)。  
H<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPaseはNa<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase、Ca<sup>2+</sup>-ATPase、H<sup>+</sup>-ATPase (*Saccharomyces cerevisiae*,  
*Neurospora crassa*)、K<sup>+</sup>-ATPase (*E.coli*) 等とともにP型ATPaseに分類される。P型ATPase  
は反応過程でリン酸化中間体を形成することが大きな特徴であり、他のATPaseとは区別  
される。活性中心を持つサブユニットはいずれも分子量70,000~100,000の蛋白質で、リ  
ン酸化されるのはAsp残基であることが示されている。H<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPaseは、Ca<sup>2+</sup>-ATPase、  
H<sup>+</sup>-ATPase、K<sup>+</sup>-ATPaseと同様に一つのサブユニットから構成されていると考えられてい  
た。しかし、最近Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPaseと同じように活性中心を持つαサブユニットと、分子量  
約60,000~80,000の糖蛋白質 (βサブユニット) からなることが明らかにされた(11)。

## 第2節 胃酸分泌の調節機構

胃壁細胞はガストリン、アセチルコリン、ヒスタミンなどに対して独立した受容体を持っており(114)、それぞれの刺激により酸分泌が促進される(図1-2)。アセチルコリンは迷走神経の神経伝達物質として、ガストリンは食物が胃に摂取された際に幽門部より分泌され両者はイノシトールリン脂質代謝回転に続く細胞内 $\text{Ca}^{2+}$ の上昇とCキナーゼの活性化をもたらすことが知られている(49)。一方、ヒスタミンは胃体部粘膜より分泌され、adenylate cyclase-cAMP系を介してcAMP依存性のAキナーゼを活性化することにより胃酸分泌を促進する(19)。すなわち、壁細胞は酸分泌刺激に対して $\text{Ca}^{2+}$ あるいはcAMPといった細胞内のセカンドメッセンジャーを増加させ、その結果として $\text{H}^+/\text{K}^+$ -ATPaseを細胞内膜系から胃内腔側の膜へ配向させる。休止時には壁細胞の分泌細管の表面は単純であり、細胞質には $\text{H}^+/\text{K}^+$ -ATPaseを含む細胞内膜系の小胞が多数存在している。酸分泌刺激によって小胞が分泌細管と融合し、大量の胃酸を分泌することができるようになる(50)。

酸分泌刺激時によって活性化されるキナーゼが実際にどのように上の過程に関与しているか明らかになっていない。また、上に述べた経路で活性化したAキナーゼが、 $\text{H}^+/\text{K}^+$ -ATPase遺伝子の転写調節に関与している因子をリン酸化することによってmRNAの転写活性を上昇させている可能性が考えられる。すなわち、酸分泌の活性化機構の理解のためには、壁細胞内の分泌細管の構造変化だけでなく、 $\text{H}^+/\text{K}^+$ -ATPaseを含めた酸分泌に関与している蛋白質の遺伝子の転写調節をも考慮せねばならないと考える。このような視点からの研究はこれまで行われていない。ヒスタミン、カルバコール、ガストリンの刺激に応答して、イヌの単離壁細胞において $\text{H}^+/\text{K}^+$ -ATPase $\alpha$ サブユニット、 $\beta$ アクチン等のmRNAの転写量が増加するという報告がある(52)。しかしこの結果が $\text{H}^+/\text{K}^+$ -ATPase遺伝子の特異的転写調節を反映しているものかどうか疑問がある。

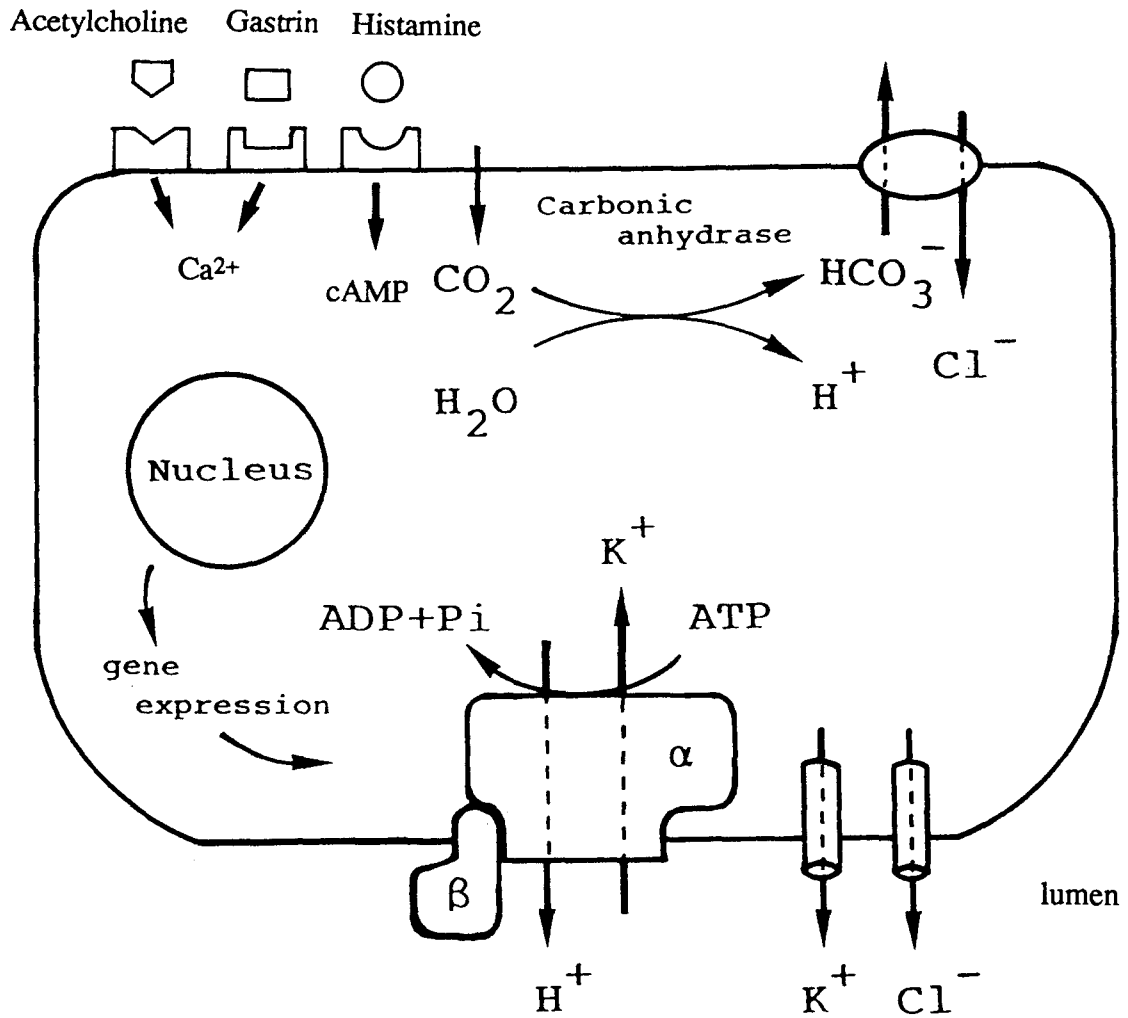


図 1-2 壁細胞における情報伝達とイオンの輸送図

壁細胞から胃酸として分泌される $\text{H}^+$ および $\text{Cl}^-$ イオンの動きを示した。また細胞膜上の受容体を介した刺激に対する応答を模式的に示した。 $\alpha$ 、 $\beta$ サブユニットからなる $\text{H}^+/\text{K}^+$ -ATPase、 $\text{HCO}_3^-/\text{Cl}^-$ 交換輸送体、 $\text{Cl}^-$ チャンネル、および $\text{K}^+$ チャンネルを模式的に示した。

### 第3節 $H^+/K^+$ -ATPaseの $\alpha$ および $\beta$ サブユニットの構造と機能

#### (i) $\alpha$ サブユニットの構造と機能

$H^+/K^+$ -ATPaseの $\alpha$ サブユニットのcDNAは、ラット(12)および、ブタ(13)のライブラリーから分離され塩基配列が決定されている。遺伝子はヒト(53)ラット(48)から分離され塩基配列が決められている。本酵素の研究が主にブタの胃粘膜を用いて行われてきたことを考えるとブタの酵素の一次構造は特に重要と考えられる。ブタの $\alpha$ サブユニットは1034アミノ酸残基からなり、分子量は114,285である。このサブユニットでは、アミノ末端15残基の配列(14)、リン酸化されるAsp残基周辺の4残基(15)、修飾試薬であるFITC (fluorescein isothiocyanate) の結合部位周辺の15残基(16)、および著者らが決定したPLP (ピリドキサル5'リン酸) の結合するLys残基の周辺6残基(17) (第2節(ii)参照) が蛋白化学的に明らかにされていた。これらのアミノ酸配列はcDNAから得られた配列と一致し、Asp-386残基 (リン酸化部位)、Lys-518残基 (FITC結合部位)、Lys-497残基 (PLP結合部位)の位置が一次構造上に同定された。また $\alpha$ サブユニットには、cAMP依存性プロテインキナーゼによってリン酸化される部位の共通配列(KRXXS and RRXS)(18)が2箇所存在する [K-R-L-A-S(359~363残基)およびR-R-L-S(950~953残基)]。これはリン酸化によって $H^+/K^+$ -ATPaseの活性が調節される可能性を示唆している(20) (図1-3A)。ラットとブタの $\alpha$ サブユニットを比較すると塩基配列は60%が、アミノ酸配列では98%が一致していた。すなわち2つの生物で、1,034残基中わずか24残基しか置換していない、保存性の高い蛋白質であった(13)。ブタ $H^+/K^+$ -ATPaseの $\alpha$ サブユニットと $Na^+/K^+$ -ATPaseの $\alpha_1$ サブユニットの配列(21)を比較すると、63%のアミノ酸残基が一致していた。ブタ $H^+/K^+$ -

ATPaseの $\alpha$ サブユニットの一次構造について疎水性残基の分布(hydrophathy profile)を調べると、少なくとも7箇所の膜貫通領域が推定できる(図1-3A)。アミノ末端側に膜貫通領域が4箇所あり、ひきつづき細胞質側を向いた約440残基におよぶ親水性領域が存在する。カルボキシル末端側の膜貫通領域については確定していないが、3箇所以上存在するものと推定している。

現在までに一次構造の決められたP型ATPaseの触媒サブユニットを比較すると10箇所のよく保存された領域が認められる(23)。それらはブタ $H^+/K^+$ -ATPaseでは a, Gln161-Arg184; b, Ile191-Ile216; c, Val224-Arg238; d, Phe255-Arg280; e, Met332-Thr352; f, Leu362-Asn395; g, Phe492-Cys529; h, Phe596-Ile643; i, Phe671-Met745; j, Ala748-Ile779 に相当する(図1-3Aのa~j) これらの領域は、P型ATPaseにおいて共通の機能を担う領域と推定できる。領域fにはリン酸化部位(Asp-386)、領域gにはPLP結合部位(Lys-497)、領域gにはFITC結合部位(Lys-518)がある。さらにLys-736は $Na^+/K^+$ -ATPaseの5-(p-fluorosulfonyl)benzoyl adenosine(FSBA)が結合するLys残基(24)、Asp-723およびAsp-731は $Na^+/K^+$ -ATPaseで $\gamma$ -4-(N-2-chlorethyl-N-methylamino) benzoylamide ATP(CIR-ATP)が結合するAsp残基(25)、またLys-788は筋小胞体 $Ca^{2+}$ -ATPaseでadenosine triphosphopyridoxal ( $AP_3PL$ )が結合するLys残基(26)にそれぞれ対応する、これらの残基はいずれも領域hおよびiに存在する。cのこれらの残基を含む領域を細胞質側におくことができるのは、試薬の近づき易さから考えて妥当であろう(図1-3A)。

上に述べたPLPの結合部位は著者の決定したものである。この修飾によって $H^+/K^+$ -ATPaseはリン酸化中間体を形成できなくなる。PLPによる酵素の修飾はFITCの場合と同様にATPが存在すると起こらない。さらにFITCによって酵素を前処理するとPLPによる修飾を受けなくなった。したがってリン酸化部位Asp-386、PLP結合部位Lys-497、FITC結合部位Lys-518は互いに近接して触媒部位の一部を形成していると結論した。これらの結果に基づき著者らは触媒部位のモデルを提出した(図1-3B)。

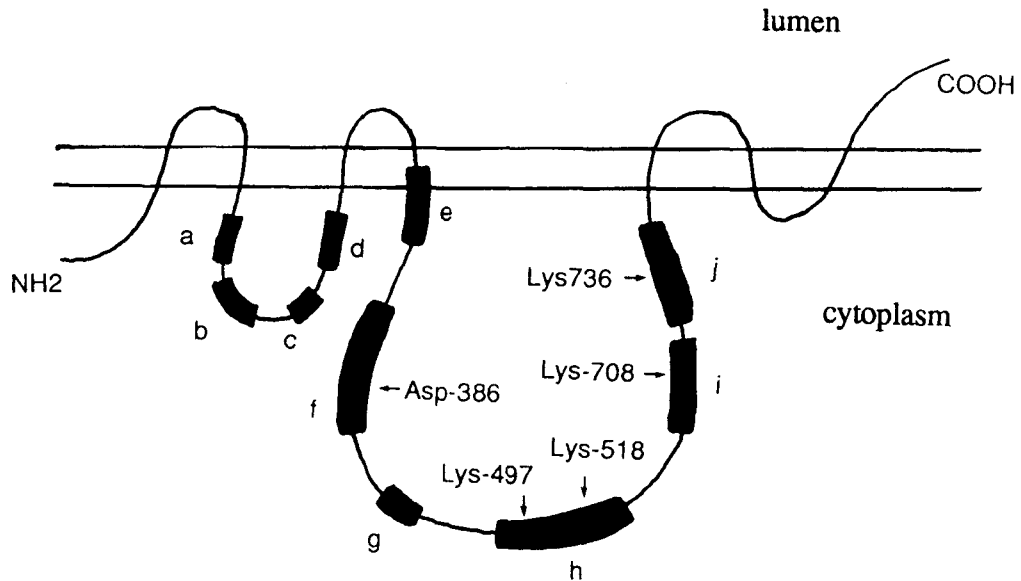


図 1-3 A  $H^+/K^+$ -ATPaseの $\alpha$ サブユニットの膜貫通モデルと機能残基

$H^+/K^+$ -ATPaseの $\alpha$ サブユニットは7回膜を貫通し、図で下側に対応する細胞質側で活性中心を形成していると考えられる。P型ATPaseにおいてよく保存された10ヶ所の領域 a~j を太く塗った線で表した。領域 f の Asp-386 は反応中間体におけるリン酸化部位 (15)、領域 g には PLP 結合部位 (Lys-497) (17)、FITC 結合部位 Lys-518 (16)、領域 i には  $AP_3$ -PL 結合部位と考えられる Lys-708 (26)、領域 j には FSBA 結合部位と考えられる Lys-736 (24) がそれぞれ存在している。



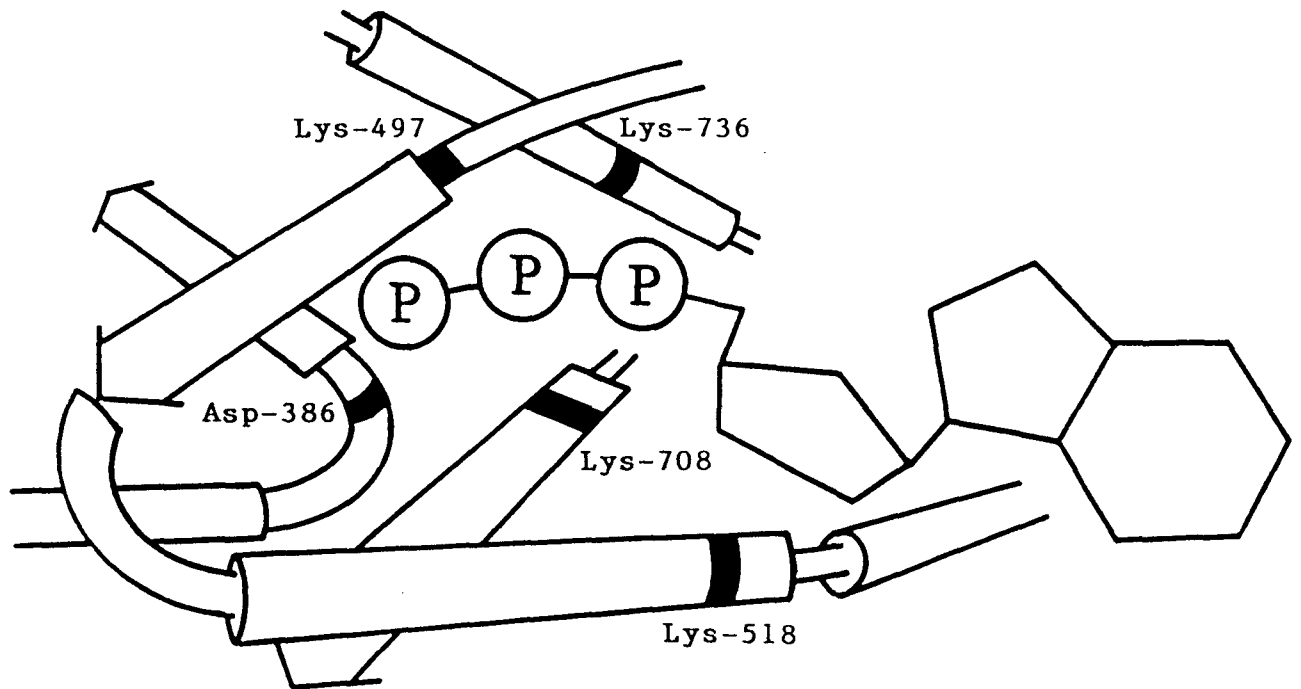


図 1-3 B  $H^+/K^+$ -ATPaseの $\alpha$ サブユニットの触媒部位

$H^+/K^+$ -ATPaseの触媒部位のモデルを示した。円筒は $\alpha$ ヘリックス、矢印は $\beta$ シートを表わしている。反応中間体におけるリン酸化部位Asp-386(15)、PLP結合部位Lys-497(17)、FITC結合部位Lys-518(16)、FSBA結合部位に対応するLys残基(24)をそれぞれ示している。2次構造はChou-Fasmanの方法(117)によって推定した。なお、PLP結合部位は後に示された $Ca^{2+}$ -ATPaseの $AP_3$ -PL結合部位である。

$H^+/K^+$ -ATPaseの膜貫通領域はイオン輸送路を形成しているはずであるが、 $H^+$ や $K^+$ の輸送に必須の残基はまだ同定されていない。膜貫通領域に存在するAsp-304、Asp-879の酸性残基をイオン輸送に関与する残基の候補に挙げることができる。アミノ末端より4番目の膜貫通領域の一次構造はP型ATPaseにおいて保存性が高く、ATP水解とイオン輸送の共役に重要な役割を果たしている可能性がある。

### (ii) $H^+/K^+$ -ATPase $\beta$ サブユニットの構造と機能

$H^+/K^+$ -ATPase  $\beta$ サブユニットの一次構造は ラット(37)、マウス(38)、ブタ(39)およびウサギ(40)のcDNAから決定されており、いずれも290-294アミノ酸からなっている。一次構造から得られる分子量(約34,000)は、糖鎖をグリコペプチダーゼFで除去した蛋白質のものとはほぼ一致している(11)。上の4種の $\beta$ サブユニットの一次構造には81~85%の相同性があるが、これは $\alpha$ サブユニットに比べてやや低い。アミノ末端側に膜を貫通する領域が存在し、カルボキシル末端を含め $\beta$ サブユニットの大部分は胃の内腔側に位置していると推定される。 $Na^+/K^+$ -ATPaseの $\beta$ サブユニットと一次構造を比較すると、約30~40%のアミノ酸残基が一致している(21, 41-43)。 $H^+/K^+$ -ATPaseの $\beta$ サブユニットに6~7個の糖鎖を結合し得るAsp残基がカルボキシル末端側に存在することは、上に述べたグリコシダーゼ処理の知見とも一致している。またCys残基が9残基あり、このうち6残基は $Na^+/K^+$ -ATPase  $\beta$ サブユニットで3対のジスルフィド結合しているものに相当している。

$Na^+/K^+$ -ATPase  $\beta$ サブユニットは $\alpha$ サブユニットと複合体を形成し、触媒サブユニットが膜に安定に分子集合するために必要であることが示されている(44)。また $\alpha$ と

$\beta$ の両サブユニットが存在しないとATPase活性もイオン輸送活性も示さず、さらに $\beta$ サブユニットのジスルフィド結合を還元すると酵素は失活する(45)。 $H^+/K^+$ -ATPaseおよび $Na^+/K^+$ -ATPaseのサブユニットの一次構造が似ていることから、 $H^+/K^+$ -ATPaseの $\beta$ サブユニットも $Na^+/K^+$ -ATPaseのものと同様の役割を持っていると考えられる。実際に、 $H^+/K^+$ -ATPaseの $\beta$ サブユニットは、 $Na^+/K^+$ -ATPaseの $\alpha$ サブユニットとキメラ複合体を形成して膜に分子集合することが示された(46)。一方、 $Na^+/K^+$ -ATPaseは壁細胞膜の血管側に、 $H^+/K^+$ -ATPaseは内腔側に局在していることから、二つの酵素の局在化を支配する異なる機構の存在することが推定される。

#### 第4節 $H^+/K^+$ -ATPase遺伝子の発現調節

$H^+/K^+$ -ATPaseが胃粘膜の壁細胞において特異的に発現していることは、免疫学的手法によって明らかにされている(3)。さらにcDNAを用いて検討すると、 $H^+/K^+$ -ATPaseの $\alpha$ および $\beta$ サブユニットのmRNAは胃においてのみ検出できる(37, 48)。したがって、 $H^+/K^+$ -ATPaseの特異的な発現は、転写レベルで制御されていると考えることができる。遺伝子の転写調節機構を理解するために、当研究室ではまずヒトとラットの $\alpha$ サブユニット遺伝子クローンを相次いで単離し、それらの構造の決定を行った(48, 53)。ヒトの $\alpha$ サブユニット遺伝子の全長は約15kbpであり、3105bpからなるコード領域は22個のエクソンに分断されていた。アミノ酸残基のレベルで約60%の相同性のある $Na^+/K^+$ -ATPaseの $\alpha 1$ (54),  $\alpha 2$ (55),  $\alpha 3$ サブユニット(56)と遺伝子構造を比較したところ、 $H^+/K^+$ -ATPaseの $\alpha$ サブユニット遺伝子におけるイントロンの挿入位置は、 $Na^+/K^+$ -ATPaseの

$\alpha 1$ 、 $\alpha 2$ とは2箇所を除いて完全に一致していた。 $\alpha 3$ とは3箇所を除いてすべて一致していた(図1-4)。一次構造と遺伝子構造の相同性から、 $H^+/K^+$ -ATPaseと $Na^+/K^+$ -ATPaseの触媒サブユニットは共通の祖先遺伝子から進化してきたことは明らかである。

$H^+/K^+$ -ATPaseは $\alpha$ 、 $\beta$ 各サブユニットが一分子ずつから形成されており、両サブユニットの遺伝子の転写は共通の機構によって制御されていると考えてよいだろう。胃壁細胞に特異的な転写調節機構を解明するうえで、 $\alpha$ だけでなく $\beta$ サブユニットの遺伝子構造を明らかにすることが重要である。当研究室では、既にラットの $\beta$ サブユニットの遺伝子を単離し塩基配列を決定した(57)。882bpからなるコード領域は、7個のエクソンに分断されていた。イントロンの挿入位置は $Na^+/K^+$ -ATPaseの $\beta 2$ サブユニット遺伝子(58-60)のものと完全に一致していた。このような結果は、 $\alpha$ サブユニットばかりでなく2つのATPaseの $\beta$ サブユニットも共通の祖先遺伝子から進化してきたことを示唆している。 $Na^+/K^+$ -ATPaseと共通の遺伝子から進化した $H^+/K^+$ -ATPaseが胃壁細胞に特異的に発現しているのは5'上流域の塩基配列とそこに結合する転写調節因子の働きによると考えることができる。

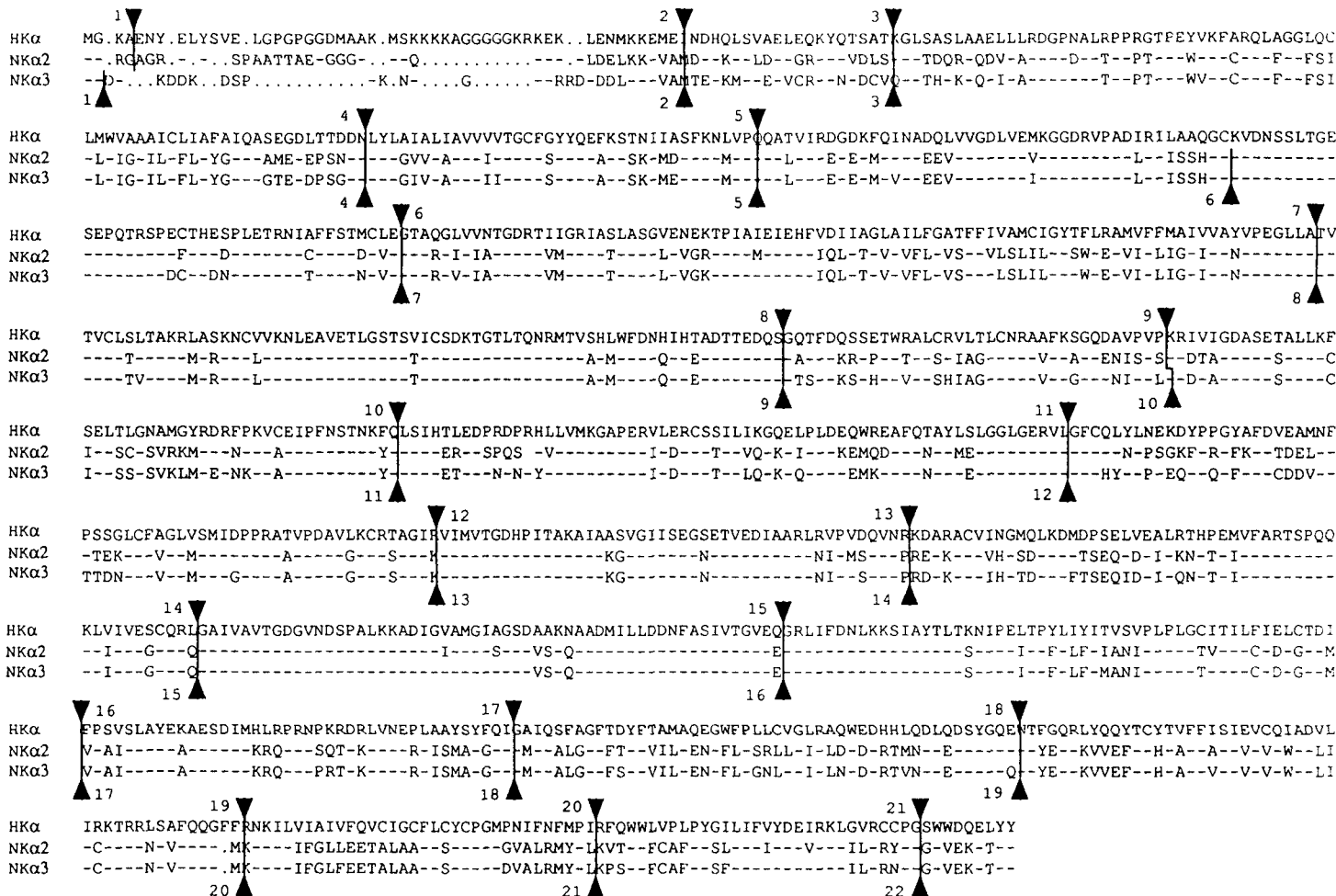


図 1-4 H<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPaseのαサブユニットの遺伝子構造

ヒトH<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPaseのαサブユニット (HKα) (53)とヒトNa<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPaseのα2サブユニット (NKα2) (55)およびヒトα3サブユニット (NKα3) (56)の遺伝子構造を比較しイントロンの挿入位置 (黒く塗った三角) を示した。挿入されたイントロンの番号を同時に示している。ヒトH<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPaseのαサブユニットのアミノ酸残基と一致しているNa<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPaseのα2およびα3サブユニットの残基は-で表わした。

## 第5節 遺伝子の転写とその調節に関わる因子

$H^+/K^+$ -ATPase遺伝子の転写調節を考える上で、現在までに知られている、遺伝子転写調節に関与する因子について考察する。遺伝子の転写開始に必要なDNAエレメント（塩基配列）は、プロモーターおよびエンハンサーあるいはサイレンサーとして同定されている。プロモーターとは、転写開始点付近およびその上流数100塩基対以内の転写開始に必要な特異的塩基配列である(61)。エンハンサーあるいはサイレンサーとは、数1000塩基上流もしくは下流にあるプロモーター活性を上昇あるいは減少させることのできる塩基配列である(61)。プロモーターは、RNAポリメラーゼIIが転写を開始するのに必要な塩基配列と、RNAポリメラーゼII活性を調節する塩基配列より構成されている。最も一般的な転写のための開始塩基配列はTATAボックスであり、高等真核生物では転写開始点より約25塩基对上流に存在する。RNAポリメラーゼ活性を調節する配列には、塩基配列に特異的な転写調節因子の結合することが知られている(62)。

これまでに同定された転写調節因子は、DNA結合ドメインや転写活性化ドメインの構造から大きく分類することができる。亜鉛フィンガー蛋白質は、システインとヒスチジンもしくはシステインとシステインのおのおの2残基がひとつの亜鉛イオンを結合する構造をとり、DNAに結合することができる(63)。この構造を持つDNA結合蛋白質には、Sp1(64)、TFIIIA(65)、ステロイドホルモン受容体(66)、GATA結合蛋白質(67)などがある。これに対して、ヘリックス-ターン-ヘリックスを持つDNA結合蛋白質およびホメオドメインを持つDNA結合蛋白質には複数の $\alpha$ ヘリックス構造間にターンが存在し、ターン構造によってDNAに結合している(68)。高度に保存された60残基からなるホメオドメインを持つホメオ蛋白質は、形態形成に重要な役割を果たすと考えられている(69)。POUドメインはPit1、Oct-1、-2、unc-86において見いだされ、DNA結合の親和性と塩基配列特異性に関与する特異的な構造と、低い親和性のDNA結合に関与するドメインからなってい

る(70, 71)。ロイシンジッパーは $\alpha$ ヘリックスの同一方向にロイシン残基が並び、この部分を介してダイマーを形成している(72)。この構造をもつDNA結合蛋白質にはJun/AP1(73)、CREB(26)などが含まれる。これらの蛋白質では、ヘテロまたはホモダイマーを形成することによってDNAへの結合活性が高くなる。ヘリックス-ループ-ヘリックス構造もダイマーの形成に関与しており、これを持つDNA結合蛋白質としてMyoDファミリー、Mycファミリーが知られている。また塩基性残基領域、酸性残基領域、グルタミンに富む領域はRNAポリメラーゼIIの活性化に関与するドメインとして知られており、それぞれGAL4、Sp1、CTFがこの構造を持っている(74)。

転写を調節する因子の機能を理解するためには、その標的となる転写基本因子の構造および役割を常に意識しておかなければならない。転写開始反応には鋳型であるDNA開始配列、RNAポリメラーゼII、正確な転写開始に必要な複数の基本因子が関与している。これらの蛋白質が遺伝子の5'上流域に結合して転写開始複合体を形成し、転写が開始される(62)。転写基本因子はHeLa細胞において詳細に調べられており、TFIIA、B、D、E、Fの他、G、H、II-Iなどが知られている。TFIIAは、TFIIDのTATAボックスへの結合活性を促進させると考えられている。TFIIBは分子量33000の蛋白質であり、ヒト(75)およびショウジョウバエ(76)のcDNAが単離されている。この因子はTFIID-DNA複合体に作用し、開始位置の決定にかかわるとされている(77)。TFIIDは分子量37000であり、TATAボックスに結合してここに他の基本因子あるいは調節因子が分子集合する。現在までにcDNAが単離された酵母(78-81)、ヒト(82)およびショウジョウバエ(83-84)の一次構造を比較すると、80%以上の相同性があった(85)。またクローン化されたTFIIDだけでは転写調節因子による転写の活性化が起きないので、他の因子がさらに必要であると考えられている。TFIIEは、57k(86)と34k(87)サブユニットが2個ずつ集合した分子量180,000の蛋白質

(82)であり、最近ヒトcDNAが単離されている(88)。TFIIIFは74kと30kサブユニットが2個ずつ分子集合した分子量190,000の蛋白質である。部分精製したTFIIIFは、RNAポリメラーゼIIのほかにTFIIBやTFIIEとも複合体を形成することが報告されている(89)。

転写の活性化の過程において、転写調節因子が特異的な塩基配列に結合しTFIIDのTATAボックスへの結合が促進され、安定な転写開始複合体が形成されると理解されている。H<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPaseのαおよびβサブユニット遺伝子のプロモーター領域においても、調節因子が特異的な塩基配列を認識し、安定な転写開始複合体が形成することによって転写が開始されていると考えることができる。転写調節機構に参与する特異的な塩基配列を明らかにし、転写調節因子を同定することは、H<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPaseの発現制御機構を解明するうえで重要な手がかりとなる。



## 第6節 本研究の目的

胃粘膜の壁細胞は上に述べたように、胃酸 (HCl) を分泌している。H<sup>+</sup>の分泌を担っているのは、壁細胞に特異的に存在しているH<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPaseである。この酵素の2つのサブユニットのmRNAは胃粘膜においてのみ検出され、厳密な調節機構によって発現が制御されている。しかしながら胃における転写調節機構の分子生物学的な研究は全くなされておらず、転写を調節している因子にどのようなものがあるのかも不明であった。本研究では、H<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPaseのサブユニット $\alpha$ および $\beta$ の遺伝子が壁細胞に特異的に転写されている機構を明らかにすることを究極の目的とした。研究の焦点を、H<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPaseの遺伝子の転写調節に関与する新しいDNA結合蛋白質が実際に存在しているかどうかに絞った。このような蛋白質の存在を確認し、蛋白質が認識する配列を明らかにし、精製すること、さらにはcDNAを同定する方向で研究を進めた。このような新しい蛋白質による調節機構が、どのような普遍性を持っているかをあわせて考察した。

## 第2章 ヒトH<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase $\alpha$ サブユニット遺伝子のプロモーター領域の構造

### 第1節 緒言

H<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPaseの $\alpha$ および $\beta$ サブユニット遺伝子の転写調節機構を明らかにするためには、それら遺伝子上流域の塩基配列を決定する必要がある。当研究室において、既に $\alpha$ サブユニットの遺伝子がヒトおよびラットの肝臓ライブラリーから単離され、その塩基配列が明らかにされている(53)。H<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPaseが胃粘膜に特異的に発現していることから、プロモーター領域を含む5'上流域の塩基配列に着目することは当然である。 $\alpha$ サブユニット遺伝子のプロモーター領域には、AP1、AP2、AP4、Sp1、NF-Yなど種々の転写調節因子の結合し得る塩基配列(53)が存在していた。これら既知の配列が胃粘膜に特異的な転写に本当に関与しているのか、それともこれまでに知られていない配列が関与しているかは興味深い問題である。

一般的には、遺伝子の構造は胃と他の組織たとえば肝臓では全く同じと考えられる。しかし、転写レベルでの特異的な調節のために、プロモーター領域の塩基配列が胃と肝臓で異なっており、胃に特異的な転写調節配列が存在する可能性も完全には否定できない。そこで改めてPCR法を用いて、ヒトH<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPaseの $\alpha$ サブユニット遺伝子の5'上流域をヒトの肝臓と胃粘膜の染色体DNAから増幅して塩基配列を比較し、胃特異的な塩基配列が存在するか、どうかを検討した。なお個体差を考慮し、同じヒトから剖検標品として胃粘膜と肝臓を得、染色体DNAを調製し、PCRを行なった。

## 第2節 材料および方法

### 1. ヒト胃粘膜および肝臓から染色体DNAの調製

ヒト胃粘膜および肝臓の剖検標品は、岡山大学医学部病理学教室の森 将晏博士より分与していただいた。組織片約2gを細かく切り刻み液体窒素中で凍結させ、テフロンの棒で粉末状にした。液体窒素を気化させた後、この粉末に10倍量（1g組織片に対して10ml）の緩衝液A [100  $\mu$ g/ml proteinase K, 0.5% Sarkosyl, 0.5M EDTA] を加えた。振とうしながら50°Cで2時間保温した後、フェノール処理を3回行った。水層を回収し、緩衝液B [10mM EDTA, 10mM NaCl, 50mM Tris-HCl(pH8.0)] に対して4°Cにて15時間透析し混在するフェノールを除いた。RNaseを最終濃度100  $\mu$ g/mlになるように加え、振とうしながら37°Cで、3時間保温した後、フェノール処理を2回行ってRNaseを除いた。水層を回収し、緩衝液C [10mM Tris-HCl (pH8.0), 10mM EDTA] に対して4°Cにて15時間透析を行った。透析後260nmの吸収を測定し、DNA量を定量した。この方法で、4gの組織から約3mgの染色体DNAを得ることができた。なお、260nmの吸収の値が20となるDNA濃度を1mg/mlとした。

### 2. PCR(polymerase chain reaction)法による遺伝子の増幅

ヒト胃および肝臓の染色体DNAを鋳型とし、一回目のPCR反応(90)でH<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase $\alpha$ サブユニット遺伝子の5'上流域、-1247から+175の領域(53)を増幅させた。プライマーはアンチセンス鎖に対応するprimer 1 [AGTCTAGAGCTGGATATGTGAGTCC(5'→3')]、センス側に対応するprimer 2 [TCGAGCTCATCTTGGCAGCCATGTC(5'→3')] をそれぞれ0.5  $\mu$ M、鋳型DNAは0.5  $\mu$ gを用い、これに1 unitのTaq Polymerase、と4種の

dNTP(deoxyribonucleotide triphosphate)を加え総容量50 $\mu$ lとした緩衝液 [10mM Tris-HCl(pH 8.3), 50mM KCl, 1.5mM MgCl<sub>2</sub>, 0.01% ゼラチン] で反応を行った。条件は「94 $^{\circ}$ C, 1分」→「55 $^{\circ}$ C, 2分」→「72 $^{\circ}$ C, 3分」を1サイクルとし、25サイクル行った。反応終了後、溶液を500倍希釈し総容量50 $\mu$ lとして2回目のPCRを行い、-1149~+136の領域を増幅させた。2回目のPCRでは、

primer 3:CGTAAAGCTTACACGTGCAGAGCCTGGCAT(5'→3')、

primer 4: GACCCAGCTCCACCGAGTAGAGCTCATAG(5'→3')を用いた。primer 3にはHin d ]制限酵素部位を、下線のように塩基置換をおこなって導入した。primer 4にはSac I 制限酵素部位が既に存在している。反応は1回目のPCRと同様に25サイクル行った。72 $^{\circ}$ C, 2分処理した後、重層してあったミネラルオイルを除き、等量のフェノール/クロロフォルム(1:1)を加えてよく攪拌し、水層を抽出した。これを5%ポリアクリルアミドゲル中で電気泳動を行い、得られた1285bpのDNA断片に対応するバンドを電気泳動により抽出し、Hin dIIIおよびSac Iで消化した。このDNA断片をpUC18プラスミドにクローニングし、DNA塩基配列を文献(91, 92)に従い決定した。

### 3. その他の方法と試薬

プライマーとして用いたオリゴヌクレオチドはDNA合成装置(Applied Biosystems, Model 381A)によって合成した。プラスミドは、Alkaline lysis法により調製した(93)。制限酵素はNippon gene社より、Ligation kit およびTaq polymeraseはTakara Shuzo社より、Sequenase kit はToyobo社より、[ $\alpha^{32}$ P] -dCTP (>3,000 Ci/mmol)は Amersham 社より購入した。PCR反応はATTO社製、Zymareactor Model AB 1800を用いた。その他の試薬は和光純薬社より購入した特級試薬を用いた。

### 第3節 結果

#### 1. ヒト $\alpha$ サブユニット遺伝子プロモーター領域のPCR法による単離

$H^+/K^+$ -ATPase $\alpha$ サブユニット遺伝子の5'上流領域が胃粘膜と他の組織で同じであることを確認するために、同じヒトの胃粘膜と肝臓より対応するDNAを調製した。 $\alpha$ サブユニット遺伝子の5'上流域をクローニングするために、primer 1とprimer 2を使ってPCR反応を行った。反応生成物を5%アクリルアミドゲル電気泳動で分析したところ約1400bpのDNA断片が主に増幅されていた。さらに5'上流域を特異的に増幅させるために、primer 3とprimer 4を使って2回目のPCR反応を行った。既に得られているヒトの遺伝子の塩基配列から考えるとこのPCRによって1,285bpのDNAが増幅されるはずである。実際にPCR反応液を電気泳動すると、1,285bpのDNA断片に対応すると考えられるDNAが単一バンドとして増幅された。このDNAを回収し、制限酵素*Hind*III、*Sac*Iで消化した後、ベクターpUC18にクローニングした。PCR反応中に塩基置換が起きることを考慮して、複数のクローンの塩基配列を決定した。

## 2. $\alpha$ サブユニット遺伝子のプロモーター領域の塩基配列

胃粘膜および肝臓から単離した $\alpha$ サブユニット遺伝子のプロモーター領域

(-1149~+136)の塩基配列を決定したところ、両者の塩基配列は完全に一致した。この結果は、 $H^+/K^+$ -ATPase $\alpha$ サブユニットの発現している胃粘膜と発現していない肝臓において、 $\alpha$ サブユニット遺伝子のプロモーター領域の塩基配列は同じであることを示している。さらに既に報告した、ヒト肝臓の遺伝子ライブラリーより単離された $\alpha$ サブユニット遺伝子の対応する領域と比較したところ、Alu配列中の-601の位置の1塩基CがTに置換していた。この置換は異なる個体からDNAを採取したため、すなわち個体差によるものと考えられる。

-1432 CCAGCCCCTCGCTGCTGCTGCCCATGGAGGTCCCTACCTGAGGGATGAGGAGGGAGTCCCAGGCCTCCT  
 -1362 GGCATCTGTCACCCAACACCAAGATCAAGCCAAGACCCTTGGACACATCCTTTCCCCATGTTGCACCTTG  
 -1292 GTTTCCCCATCTAGGGTAGGGACGGGGAATGGTTGAGAGCTGTAAAGTCTGTAGCTGGATATGTGAGTCC  
 -1222 CTGTGAGCCTCAGTTTCCCCCTCTGCACAACAGGAATGATAGTTCTGCCTGCACAGGGTTTTTTTGCAAAG  
 -1152 ACCCGTGAGGTCACACGTGCAGAGCCTGGCATGTGTGTGGTGCTGCTGCAGTGAAGTTTGGGTTTTTCCA  
 -1082 TTGGTGGTGCCATAGAAGAGCTAGGCTCTGGGGTCAAGCCCTGGGGTCAAGCCCGGGCTGGAACCCTGTC  
 -1012 CCTAATTCTTAGACGTTGAAATCTTCTGCAAAGTCCCTGATGGGGGCTAAGAAGAGAATATTGCTTTACA  
 -942 GGGCTGCTGTTAGATGCTAAGGAAACCATTTGAGTGACACACAGAGCACACCCAGCCCATAGTGAATAGT  
 -872 CAGAGTTCAGTAAACATTCAGCCACCATAGAGAGTGTGTAAGCATGGCAGGGCATGGTGGCTCACGCCT  
 -802 GTAATCCCAGCACTTTGGGAGGCCAAGGCGGGTGGATCACCTGAGGTCAGGAGTTCGAGACCAGCCTGGC  
 -732 CAACCTGGTGAAACCCCGTCTCTACTAAAAGTACAAAAATTAGCTGGGTGTGGTGGCATGTGCCTGTAGT Alu  
 -662 CCCAGCTACTCAAGAGGCTGAGGCAGGAGAATCACTTGAACCCGGGAGGCGGAGGTTGCAGT<sup>1</sup>GAGCTGAG  
 -592 ATTGCACCACTGCCTCCAACCTGGGTGTCAGAGTGACACTCCATCTCAAAAAAAAAAAGAAAAAAAAA  
 -522 AGAGTGTGGGAGCACCCCTCCTCTTCCAGTTGATCAGGCACGTGCTATTTAGACTGAAAGAGGACACTCTG  
 -452 CAGCCAGCTGATCTGGTTCTCACTCCATTATGTCTTAGCCTGTGATGGAGCCATAGGAGAATGACTCAAC  
 -382 CCCTCCATGCCTCAGTTTCCCCATCTGTAAAGGGTCTTGTCCCCTCAAAGGGTTATTGGAAGGTTAAATA  
 -312 AGTTAGCACATGGAAGCCGTCAGCACAAATGCCAGCGCATAATGAGCACCTTATGTTTGCTCTTCTTGTT  
 -242 GCTGCAGCGGTTCCAGGGGCTCCCTGATCTCAGGGCAGGTTGACATGGGGGATCTGGGCAGGGGAGGG  
 -172 GGGGGCCAGCCCAGGAGGGAATGCCTGAGGTGCCAGGCCTAGAGGTCACCCCAAGGAGCCTGTAATCAG  
 -102 CTGTGGTGGGCGGTTCTGCTCCACCCCACCGCCCTCCCTGGGTATATCAGGACTGGTCCGGGCCAGGC  
 -32 TCTGTTGGGTGGGAGCACAGGCACCGGGCACCATGGGGAAGGCCGTGAGTGGGGCCAGGGGTCCGGGGT  
 M G K A → intron  
 +40 GCAGTGGGGACAGGGGTTGCAGTGAATCTGAGTTCTCCCTCCCTCCATCCTGTCCATTTCCAGGAGAAC<sup>4</sup>  
 +110 TATGAGCTCTACTCGGTGGAGCTGGGTCCTGGCCCTGGCGGGGACATGGCTGCCAAGATGAGCAAGA  
 2

図2 ヒトH<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPaseのαサブユニット遺伝子の5'上流配列

ヒト胃の染色体DNAからprimer 1, 2, 3, 4 (矢印つきの下線で示した) を用い、PCR 法で単離した5'上流配列を示した。プロモーターと考えられる配列は四角で囲んだ。Alu配列には下線を引いた。既にMaeda et al (53)によって肝臓の遺伝子ライブラリーから得られたαサブユニットの遺伝子の塩基配列と比較すると、-601のCがTに置換しており(<sup>1</sup>)、これは個人差によるものとする。

#### 第4節 考察

ヒト胃粘膜から調製した、染色体DNAの $H^+/K^+$ -ATPase $\alpha$ サブユニット遺伝子のプロモーター領域の塩基配列（1285bp）を決定したところ、既に当研究室においてヒト肝臓ライブラリーから単離したものと-601番のTがCに置換している以外は完全に一致していた。さらに個体差による塩基置換の可能性を考慮し、胃粘膜を調製した同じヒトの肝臓から染色体DNAを調製し、 $\alpha$ サブユニット遺伝子のプロモーター領域の塩基配列を決定した。その結果、両者の塩基配列は完全に一致していた。-601のTからCへの置換はAlu配列中であり、個体差による塩基置換だと結論した。したがって胃においてのみ発現している $H^+/K^+$ -ATPaseの $\alpha$ サブユニット遺伝子は、プロモーター領域に特別な塩基配列が挿入されたり欠失することによって発現調節されているのではないことが明らかとなった。 $\alpha$ サブユニット遺伝子のプロモーター領域には、種々の転写調節因子（AP1, AP2, AP4, Sp1, NF-Y等）の認識配列が存在していた(53)。しかしながら、これらの因子が組織特異的な転写調節因子であるという報告はこれまでのところなされていない。したがって胃粘膜において未知の転写調節因子が結合する認識配列が存在し、この因子と配列が転写を制御している可能性がある。そこで、次の段階としてプロモーター領域のどのような塩基配列が認識配列になっているかを同定することが重要である。



### 第3章 $\alpha$ および $\beta$ サブユニット遺伝子上流配列を特異的に

#### 認識するDNA結合蛋白質

##### 第1節 緒言

$H^+/K^+$ -ATPaseの2つのサブユニットのmRNAは胃においてのみ検出され、転写レベルで制御されていることが示唆されている(37, 48)。本論文の第2章で、この厳密な発現調節には胃粘膜に特異的に存在する転写調節因子が関与している可能性を示唆した。このような転写調節因子、すなわち胃に特異的に存在するDNA結合蛋白質を同定することは、 $H^+/K^+$ -ATPase遺伝子の転写調節機構を解明する上で重要な手がかりを与える。現在までに、胃における遺伝子発現調節に関与している因子の研究は全くなされていない。胃にはどのようなDNA結合蛋白質が存在しているのかさえも知られていない。そこで $\alpha$ および $\beta$ サブユニット遺伝子の転写調節にかかわるプロモーター領域の特定の塩基配列と、これに特異的に結合するDNA結合蛋白質を同定する方向で研究を進めた。また、同じ転写調節因子が両サブユニット遺伝子に共通に存在する特定の配列に結合し、転写を調節しているのかも興味深い。実際、以下に述べるように胃の核抽出液に存在する蛋白質が、2つのサブユニット遺伝子で保存された塩基配列に結合することを明らかにした。このようなDNA結合蛋白質はラットの胃、ブタの胃粘膜の核抽出液に存在し、 $\alpha$ および $\beta$ サブユニット遺伝子のプロモーター領域にあり、種を越えて保存されている塩基配列に結合した。

## 第2節 材料および方法

### 1. 核抽出液の調製

核抽出液はSchiblerらの方法(94)を改良し、ラットの各組織（胃、肝臓、脳、肺、腎臓、脾臓）およびブタの胃粘膜、肝臓から調製した。ブタ胃粘膜(20 g)、ブタ肝(15 g)、ラットの胃(25 g)、肝臓(17 g)、腎(19 g)、脳(4 g)、脾臓(10 g)、あるいは肺(17 g)をはさみで細断した後に30 mlのショ糖溶液 I (HEPES-KOH pH 7.6, 15 mM KCl, 0.15 mM spermine, 0.5 mM spermidine, 1 mM EDTA, 2.2 M sucrose, 5 % glycerol, 0.5 mM dithiothreitol, 0.5 mM phenylmethane-sulfonyl fluoride, 1mg/ml pepstatin)に浸した。クリアランスが1.2 mmのテフロンホモジェナイザーを用いて均一に懸濁した。これを一重のガーゼで通過させ、未破碎の組織を除いた。ろ液(50 ml)を10 mlのショ糖溶液 II (HEPES-KOH pH 7.6, 15 mM KCl, 0.15 mM spermine, 0.5 mM spermidine, 1 mM EDTA, 2 M sucrose, 10 % glycerol, 0.5 mM dithiothreitol, 0.5 mM phenylmethanesulfonyl fluoride, 1 mg/ml pepstatin)の上に重層し、SW28 ローター(Hitachi)を用い130,000×gにて1時間、遠心した。遠心管の底に沈澱した核を5 mlの緩衝液 (10 mM HEPES-KOH pH 7.6, 100 mM KCl, 0.1 mM EDTA, 10 % glycerol, 3 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM dithiothreitol, 0.1 mM phenylmethanesulfonyl fluoride, 1 mg/ml pepstatin)にて洗浄した後、60 mlの同じ緩衝液に懸濁した。懸濁液の260 nmの吸収が0.5となるように希釈した後、核内蛋白質を抽出するために、3 M KCl を加えKCl濃度が最終的に0.55 Mとなるようにした。よく攪拌した後、氷上に30分間放置し、100,000×gで1時間の遠心を行った。上清を注意深く回収し、上清1mlあたり0.3gの固形硫酸アンモニウムをゆっくり加えた。1時間氷上に放置した後、100,000×gで1時間の遠心により沈澱を回収した。沈澱を1 mlの透析液 (25 mM HEPES-KOH pH 7.6, 0.1 mM EDTA, 40 mM KCl, 10 % glycerol, 1 mM dithiothreitol)に懸濁した後、500 mlの透析液に4時間透析した。透析後、生じた白い沈澱を100,000×gで5分間の遠心により除き、上清を回収した。得られた核内蛋白質分画を少量

ずつ分注した後、 $-70^{\circ}\text{C}$ にて保存した。以上の方法によりブタ胃粘膜から $100\mu\text{g}$ 、肝臓から $500\mu\text{g}$ 、そしてラット胃からは $50\mu\text{g}$ 、肝臓 $500\mu\text{g}$ 、脳 $30\mu\text{g}$ 、腎 $250\mu\text{g}$ 、肺 $50\mu\text{g}$ 、脾臓 $500\mu\text{g}$ の蛋白質を含む核抽出液を得た。

## 2. ジェルシフト法によるDNA結合蛋白質の検出

ラット $\text{H}^+/\text{K}^+$ -ATPaseの $\alpha$ サブユニット遺伝子のプロモーター領域(48)を制限酵素によって5つの領域 (RA1, RA2, RA3, RA4, RA5)に分断し、プローブとした。RA1は翻訳開始メチオニンから計算して+3から-124までの領域、RA2は-121から-248まで、RA3は-245から-358まで、RA4は-355から-528まで、RA5は-525から-700までを含んでいる。それぞれのDNA断片は粘着末端であり  $[\alpha^{32}\text{P}]$ -dCTP存在下でKlenow酵素処理(93)することによって放射線標識した。Klenow酵素処理は10 mM Tris-HCl (pH7.6)の緩衝液中で0.5 mM dATP, dTTP, dGTPおよび $5\mu\text{Ci}$ の  $[\alpha^{32}\text{P}]$ -dCTPを含む条件で行った。ヒト $\alpha$ サブユニット遺伝子(53)のプロモーター領域も同様に5つの領域 [HA-I(+3~-240), HA-II(-201~-445), HA-III(-446~-619), HA-IV(-620~-953), HA-V(-954~-1137)] に分け、プローブとした。

プローブDNAと蛋白質の結合反応は、25 mM HEPES-NaOH pH 7.6, 34 mM KCl, 50 mM  $\text{MgCl}_2$ の緩衝液中で行った(94)。DNAプローブ約0.2 pmol,  $2\mu\text{g}$ のpoly dI-dCと $3\mu\text{g}$ の蛋白質を加え $20\mu\text{l}$ とし、 $4^{\circ}\text{C}$ で20分間の結合反応を行った。蛋白質がプローブDNAに結合すると移動度が遅れ、シフトしたバンドを検出することができる。競合実験を行う際にはプローブDNAに対してモル比で50倍の非標識DNA断片を加えた。8%アクリルアミドゲル ( $\times 0.25$  TBE 泳動緩衝液を用いた) を電圧200Vで1時間電気泳動した後、プローブと蛋白質の反応液を上層し、4時間にわたって電気泳動した。電気泳動は冷室内 ( $4^{\circ}\text{C}$ ) で、

陽極と陰極側の緩衝液を循環させながら行った。泳動後、ゲルを10% 酢酸を含む50% メタノールで室温、30分間、固定し乾燥させ、オートラジオグラフィーを行った。

### 3. 試薬およびその他の方法

ブタ胃および肝臓は、大阪南港ミートセンターより屠殺直後のものを購入した。ラットの各組織は、ウイスター系の5週令の雄から摘出したものを使用した。競合実験に用いたオリゴヌクレオチドは、Applied Biosystem社のDNA合成装置（モデル381A）によって合成した。DNA濃度の定量後、2本鎖DNAとした。2本鎖DNAを形成させるために、一本鎖DNA 500 pmolずつを合わせ、緩衝液 [10 mM Tris-HCl (pH8.0), 10 mM NaCl] 中で90℃に熱変性し、2時間以上かけて室温にまでゆっくりと冷却した。蛋白定量はBSAを標準とし、Bio Rad 蛋白定量キットを用いた。

### 第3節 結果

#### 1. ラットおよびヒト $\alpha$ サブユニット遺伝子のプロモーター領域に

##### 特異的に結合する蛋白質

ラット $\alpha$ サブユニット遺伝子のTATAボックスを含むプロモーター領域を5つのDNA断片、RA(+3~-124)、RB(-121~-248)、RC(-245~-358)、RD(-355~-528)、RE(-525~-700)に分けた(図3-1)。これらのDNA断片をプローブとし、ラット胃および肝臓の核抽出液を用いてジェルシフト法によって、蛋白質が結合するかどうか検討した。その結果、胃の核抽出液に領域RAと結合するDNA結合蛋白質を検出することができた(図3-2)。このDNA結合蛋白質は、肝臓から調製した核抽出液に存在しなかった。また他の領域(RB, RC, RD, RE)をプローブとしても、胃および肝臓の核抽出液中にDNA結合蛋白質を検出することはできなかった。以上の結果は、胃の核抽出液中に領域RA内の塩基配列を認識して結合するDNA結合蛋白質が存在することを示している。

$\alpha$ サブユニット遺伝子の発現は、哺乳類において共通の転写調節因子によって調節されていると予想できる。そこで、ヒト $\alpha$ サブユニット遺伝子の上流域I(+3~-240), II(-201~-445), III(-446~-619), IV(-620~-953), V(-954~-1137)をジェルシフト法のプローブとし(図3-1)、ブタの胃粘膜および肝臓から核抽出液を調製して、同様に解析した。その結果、ブタ胃粘膜の核抽出液中に、領域Iに結合するDNA結合蛋白質を検出することができた。しかし領域II, III, IV, Vに結合する蛋白質は検出することはできなかった。また肝臓から調製した核抽出液には、領域Iに結合する蛋白質は存在しなかった。

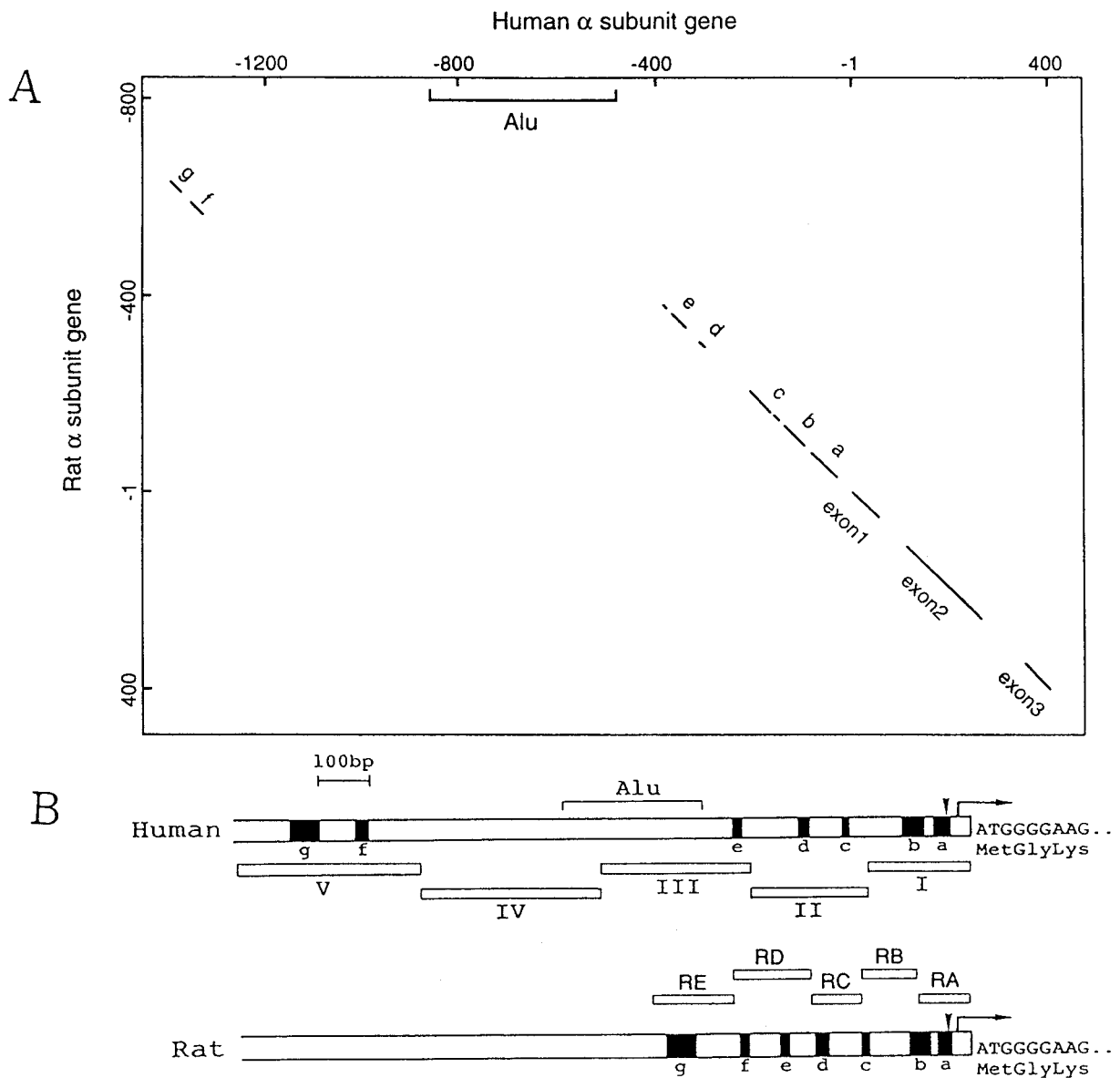


図3-1 ラットおよびヒトH<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPaseのαサブユニット遺伝子上流領域の比較

- A. ラットのH<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPaseのαサブユニット遺伝子の5'上流領域とヒトH<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPaseのαサブユニット遺伝子上流領域のHarr-plot(116)を示した。相同性のある7つの領域をa(-49から-112), b(-115から-149), c(-178から-249), d(-300から-322), e(-328から-422), f(-551から-599), g(-601から-666)とした。塩基番号はラットのαサブユニット遺伝子の翻訳開始点を+1とした。
- B. ラットのH<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPaseのαサブユニット遺伝子の5'上流領域を5つの領域RA(+3から-124), RB(-106から-320), RC(-245から-358), RD(-356から-528), RE(-525から-700)に分け、それぞれをジェルシフト法のプローブとし核抽出液中のDNA結合蛋白質との結合を解析した。同様にヒトのH<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPaseのαサブユニット遺伝子上流領域も5つの領域I(+3から-240), II(-237から-454), III(-451から-733), IV(-734から-1137), V(-1138から-1411)に分けてジェルシフト法のプローブとした。ラットとヒトで相同性のある7つの領域を黒く塗った四角で示してある。

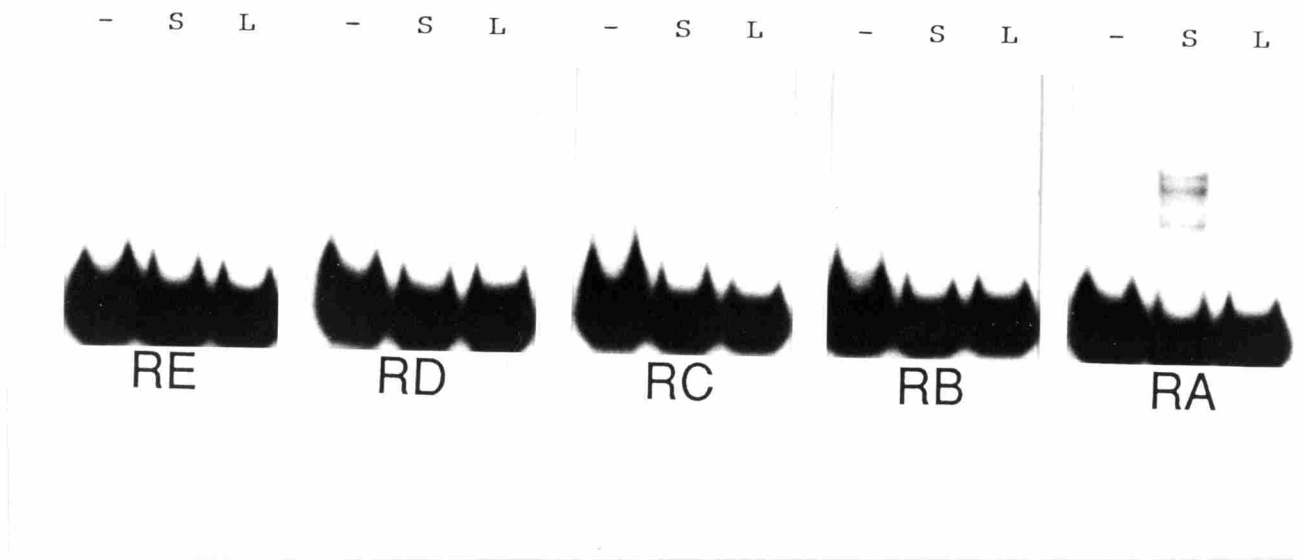


図3-2 ラットH<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPaseのαサブユニット遺伝子のプロモーター領域に結合するDNA結合蛋白質の検出

ラットのαサブユニット遺伝子のプロモーター領域を5つに分け (RA, RB, RC, RD, RE) (図3-1参照)、それぞれ放射標識した後、ジェルシフト法のプローブとし核抽出液中のDNA結合蛋白質との結合を解析した (レーン-; プローブのみで電気泳動)。ラットの胃 (レーンS) および肝臓 (レーンL) から核抽出液を調製し0.16μgずつ加え、ジェルシフト法を行うことにより蛋白質とDNAの複合体をシフトしたバンドとして検出した。

$\alpha$ サブユニット遺伝子のプロモーター領域をラットとヒトで比較すると、7箇所  
所で相同性のある領域（a～g）を見つけることができる（図3-1）。DNA結合蛋白質  
の結合配列はラットとヒトで保存されている可能性がある。実際に上で同定した配列、す  
なわちラットのRAとヒトのH-Iは相同性のある領域 a を含んでいる。したがってラット胃  
とブタ胃粘膜の核抽出液に存在するDNA結合蛋白質は保存された領域 a に含まれる配列  
を認識し、結合していると予想できる。

## 2. $\alpha$ サブユニット遺伝子のプロモーター領域に結合するDNA結合

### 蛋白質の組織分布

$\alpha$ サブユニットのプロモーター領域すなわちラットのRAとヒトのH-Iに結合す  
るDNA結合蛋白質は、胃の核抽出液には存在するが、肝臓の核抽出液では検出されな  
かった。この蛋白質が $\alpha$ サブユニット遺伝子の転写を特異的に促進すると考えると、胃に  
のみ存在していると予想できる。そこでラットの各臓器（胃、肝臓、脳、腎臓、脾臓、  
肺）から核抽出液を調製し、ラットのRA-1に結合する蛋白質が存在するかどうかを検討  
した（図3-3A）。その結果、DNA結合蛋白質は胃以外の臓器では検出できなかった。  
すなわち、このDNA結合蛋白質は胃にのみ存在し、 $\alpha$ サブユニット遺伝子の転写を調節す  
る因子の候補となり得ることが示唆された。



### 3. 胃に特異的に存在するDNA結合蛋白質が認識する $\alpha$ サブユニット遺伝子の

#### 塩基配列

続いて胃に存在するDNA結合蛋白質が認識する配列を明らかにするために、ラットのRA-1とヒトのHA-Iに結合する蛋白質の結合部位を明らかにする実験を行った。ラットのRA-1領域をR $\alpha$ 1(-120~-91)、R $\alpha$ 2(-97~-62)、R $\alpha$ 3(-69~-81)、R $\alpha$ 4(-38~-1)の4箇所に分け、それぞれのオリゴヌクレオチドを合成し、RA領域と核蛋白質の結合を阻害するかどうか検討した。ラット胃の核抽出液を用いたところ、図3-2と同様にシフトしたバンドを検出することができた。この反応液中に標識していないDNA断片R $\alpha$ 1, R $\alpha$ 2, R $\alpha$ 3, R $\alpha$ 4を個別に加えたところ、R $\alpha$ 4, R $\alpha$ 3, R $\alpha$ 2を加えてもプローブDNAと胃特異的DNA結合蛋白質との結合に影響はなかった。しかし、R $\alpha$ 1を加えるとシフトしたバンドを検出できなくなった(図3-3B)。したがって胃に特異的なDNA結合蛋白質の結合部位はDNA断片R $\alpha$ 4、R $\alpha$ 3、R $\alpha$ 2には存在せずに、R $\alpha$ 1に存在していると考えられる。

R $\alpha$ 1の塩基配列をヒトのHA-I領域と比較したところ、TAATCAGCTG配列が両者で対応する位置に保存され、特にラットでは2回繰り返していた。そこで、ヒトのHA-Iでもこの配列が胃特異的DNA結合蛋白質の結合部位であることを調べるために、TAATCAGCTG配列を含むオリゴヌクレオチドH $\alpha$ 1とそのすぐ下流のH $\alpha$ 2を2本鎖オリゴヌクレオチドとして合成し、competitorとして用いた(図3-4)。ラット胃の核抽出液とヒトH-I

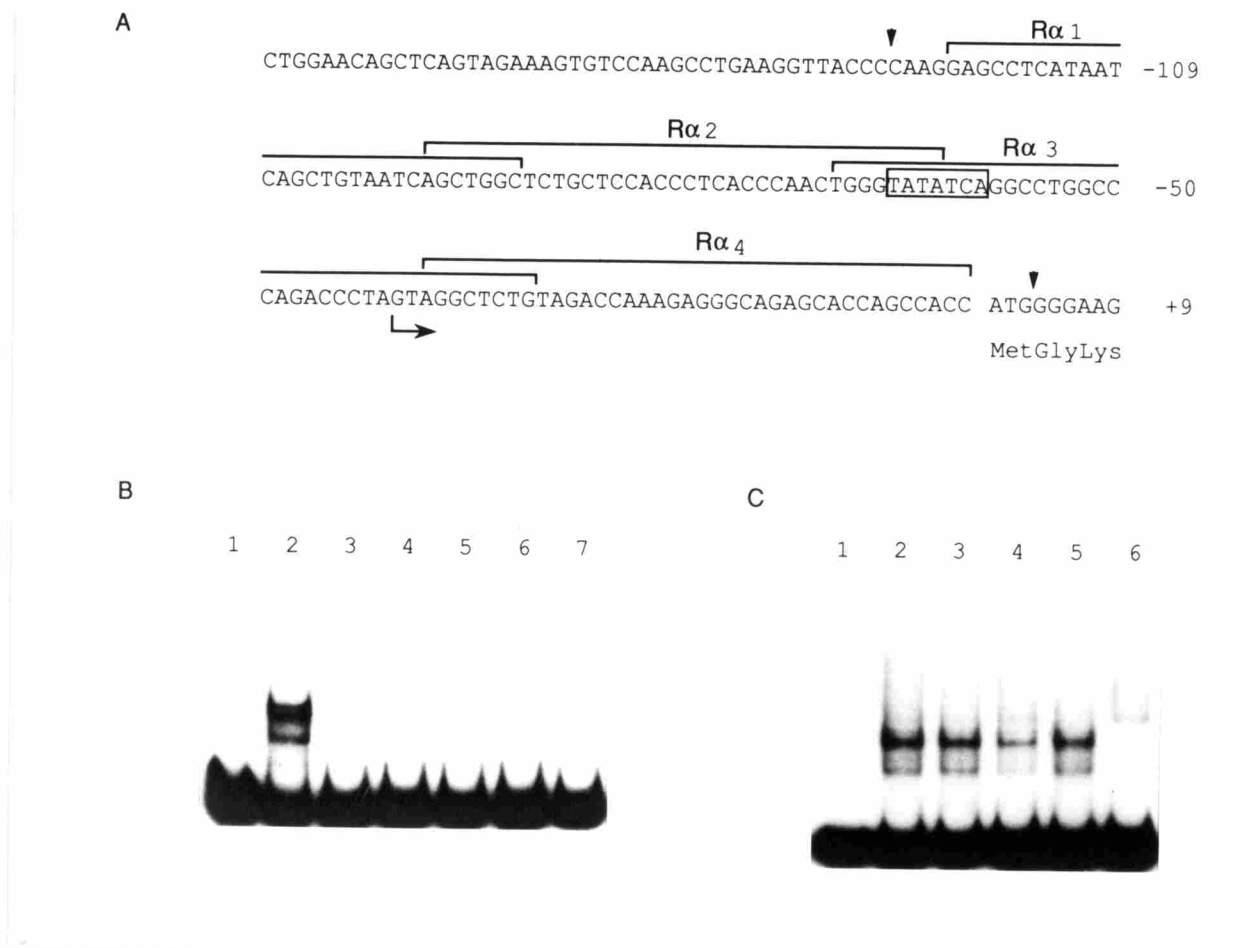


図3-3 胃に特異的なDNA結合蛋白質とその結合配列

- A. ラットH<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPaseのαサブユニット遺伝子上流で矢じり▼で示した間のRA領域(+3から-124)を4つの領域 [Rα1(-91から-120), Rα2(-62から-97), Rα3(-81から-69), Rα4(-1から-38)]に分け、competitorとした。推定プロモーター配列を四角で、転写開始点を矢印で示した。
- B. ラットの組織から調製した核抽出液(0.16 μg)と放射標識した0.1 p molのDNA断片(RA)とでジェルシフト法を行った [レーン1 (プローブのみのコントロール) レーン2~7 (核抽出液を加えたもの)]。胃(レーン2), 肝臓(レーン3), 腎臓(レーン4), ひ臓(レーン5), 脳(レーン6), 肺(レーン7)から調製した核抽出液を用いた。
- C. ラットの胃から調製した核抽出液(0.16 μg)のDNA結合蛋白質と放射標識した0.1 pmolのDNA断片(RA)の結合をcompetitor存在下にジェルシフト法によって解析した。 [レーン1 (プローブのみのコントロール), レーン2~6 (核抽出液を加えたもの)]。 competitorとしてはRα4(レーン3), Rα3(レーン4), Rα2(レーン5), Rα1(レーン6)をプローブに対してモル比で50倍量加えた。

**A**

Rat  $\alpha$  R $\alpha$ 1

cccccaaggagcctca TAATCAGCTGTAATCAGCTG gctctgctccaccctcacccaa

accccaaggagcctg TAATCAGCTG tggtcgggcggttctgctccacccccaccgccc

Human  $\alpha$  H $\alpha$ 1 H $\alpha$ 2

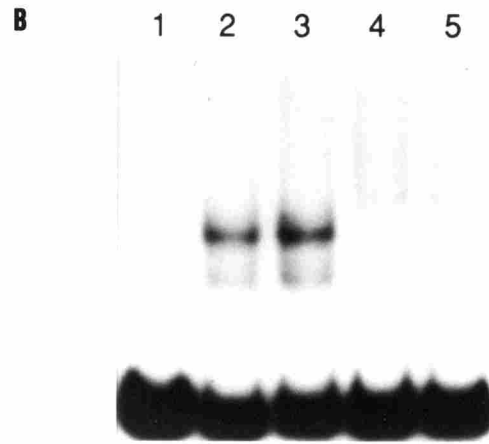


図3-4 胃に特異的なDNA結合蛋白質のラットおよびヒト $\alpha$ サブユニット遺伝子のプロモーター領域への結合

- A. ラットおよびヒトの $\alpha$ サブユニット遺伝子のプロモーター領域の塩基配列を示した。competitorとして用いたDNA断片R $\alpha$ 1(-91~-120), H $\alpha$ 1(-94~-116), H $\alpha$ 2(-70~-92)に対応する塩基配列を示した。ラットで2箇所、ヒトで1箇所存在するTAATCAGCTG配列は大文字で示してある。
- B. ラット胃から調製した核抽出液(0.28  $\mu$ g)中のDNA結合蛋白質と放射標識したヒト $\alpha$ サブユニット遺伝子のプロモーター領域のDNA断片 (I) (図3-1参照)の結合をcompetitiveの存在下にジェルシフト法によって解析した [レーン1 (プローブのみのコントロール), レーン2~5 (核抽出液を加えたもの)]。 competitorとしてH $\alpha$ 2(レーン3), H $\alpha$ 1(レーン4), R $\alpha$ 1(レーン5)を加えた。レーン1、2は competitorを加えていない。

でジェルシフト法を行ったところ、標識していないH $\alpha$ 2を加えてもシフトしたバンドは消えないが、H $\alpha$ 1やR $\alpha$ 1を加えるとバンドは検出できなくなった。したがって、胃に特異的なDNA結合蛋白質はH $\alpha$ 2ではなくH $\alpha$ 1に特異的に結合し、その結合配列はラットとヒトで保存されている

TAATCAGCTG  
ATTAGTCGAC

であることを示唆している。

#### 4. ラット $\beta$ サブユニット遺伝子のプロモーター領域に特異的に結合する蛋白質

次に、ラット  $\beta$ サブユニット遺伝子(57)のTATAボックスを含むプロモーター領域に、核蛋白質が結合するかどうか検討した。ラット  $\beta$ サブユニット遺伝子のプロモーター領域 (+10~-185) をプローブとし、ラット胃の核抽出液を用いてジェルシフト法によって検討した結果、 $\alpha$ サブユニット遺伝子をプローブとした場合と同様にプローブと核蛋白質の結合したバンドを検出することができた (図 3-5)。このDNA結合蛋白質の認識する塩基配列を調べるために、プロモーター領域を6つに分け、それぞれ2本鎖合成オリゴヌクレオチド、R $\beta$ 1(-181~-153)、R $\beta$ 2(-159~-120)、R $\beta$ 3(-129~-95)、R $\beta$ 4(-100~-61)、R $\beta$ 5(-69~-34)、R $\beta$ 6(-38~-1)を調製した (図 3-5)。プローブと同時にこのヌクレオチドを加えたところ、R $\beta$ 4、R $\beta$ 3、R $\beta$ 2を加えた場合にプローブと核蛋白質の結合したバンドが検出できなくなった。しかし、R $\beta$ 6、R $\beta$ 5、R $\beta$ 1を加えてもプローブと核蛋白質の結合したバンドの量、位置ともに影響されなかった (図 3-5)。この結果から、ラット  $\beta$ サブユニット遺伝子のプロモーター領域に結合する蛋白質は、DNA断片R $\beta$ 4、R $\beta$ 3、R $\beta$ 2に共通の塩基配列を特異的に認識していることが示唆された。そこでR $\beta$ 4、R $\beta$ 3、R $\beta$ 2の塩基配列を比較したところ、

GATAGC  
CTATCG

という配列が共通に認められ、この配列が結合配列であると予想できた (図 3-5 (I))。

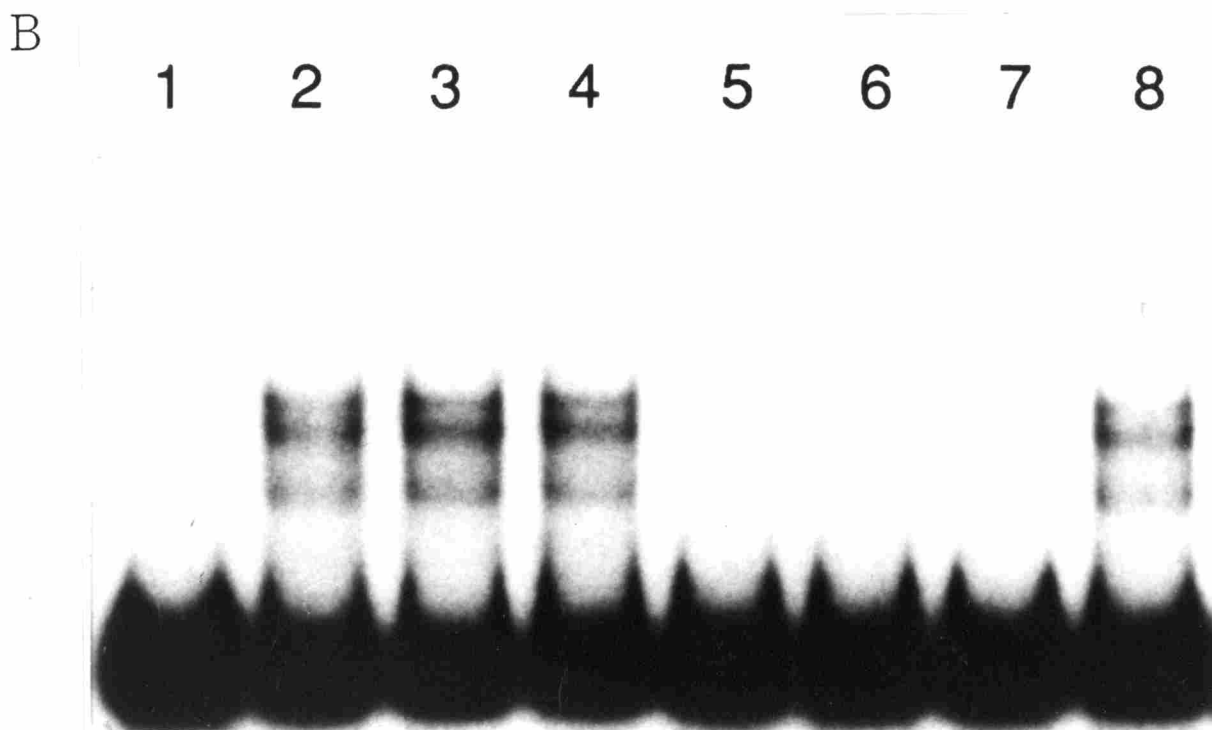
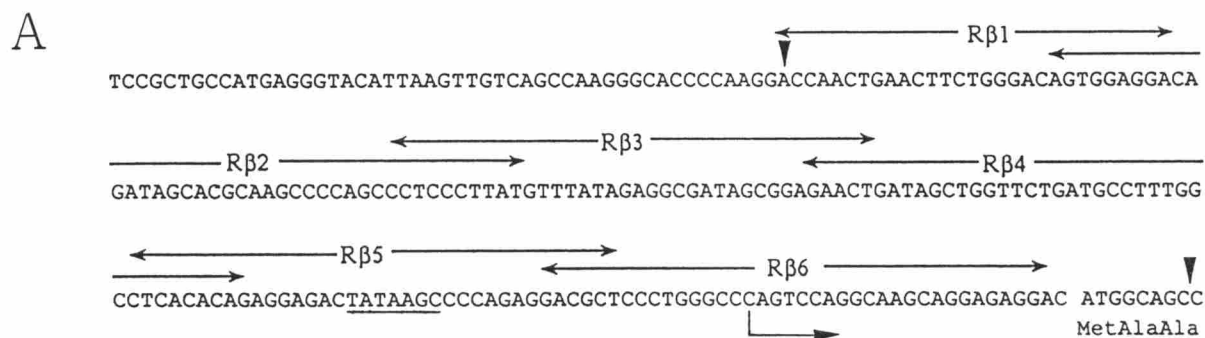


図3-5 ラットH<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPaseのβサブユニット遺伝子のプロモーター領域に結合するDNA結合蛋白質

ラットH<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPaseのβサブユニット遺伝子上流で矢じりの▼で示した間の領域を6つの領域 [Rβ1(-181~-153), Rβ2(-159~-120), Rβ3(-129~-95), Rβ4(-100~-61), Rβ5(-69~-34), Rβ6(-38~-1)] に分け、competitorとして用いた。矢じりの間の領域 [StyI(-180)~PstI(+8)] のDNA断片(0.1 p mol)を放射標識し、ラット胃から調製した核抽出液(0.16 μg)中に含まれるDNA結合蛋白質との結合をcompetitor存在下にジェルシフト法によって解析した [レーン1 (プローブのみのコントロール), レーン2~8 (核抽出液を加えたもの)]。competitorとしてRβ6(レーン3), Rβ5(レーン4), Rβ4(レーン5), Rβ3(レーン6), Rβ2(レーン7), Rβ1(レーン8)を加えた。レーン1、2にはcompetitorは加えていない。

また、実際に $R\beta 4$ ,  $R\beta 3$ ,  $R\beta 2$ に蛋白質が結合することを調べるために、これらのDNA断片を放射標識しラット胃の核抽出液を用いてジェルシフト法を行った。すると、いずれをプローブとした場合も、プロモーター領域(+10~-185)をプローブとしたときと同様に核蛋白質と結合したシフトしたバンドを検出できた(図3-5(II))。このDNA結合蛋白質は、ラットの胃にのみ存在し他の臓器では検出できないことを確認した。

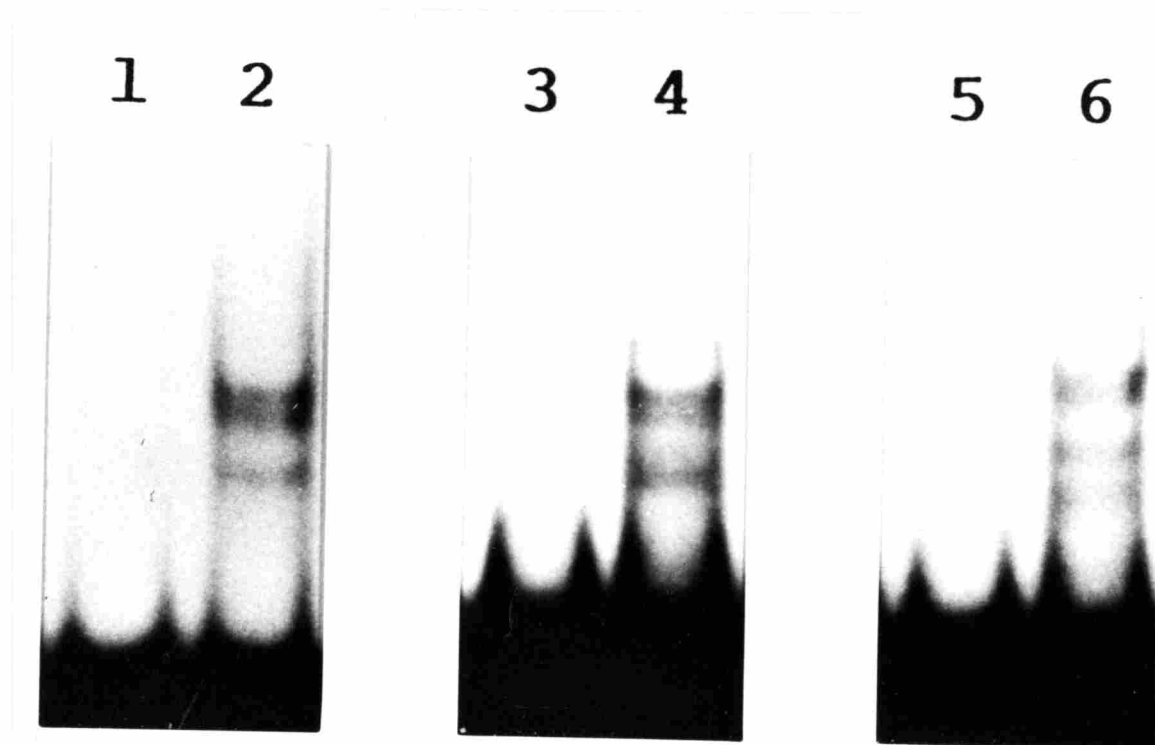


図3-5(II) オリゴヌクレオチド $R\beta 2$ 、 $R\beta 3$ 、 $R\beta 4$ に結合するDNA結合蛋白質

図3-5(I)でcompetitorとして用いたオリゴヌクレオチド $R\beta 2$ 、 $R\beta 3$ 、 $R\beta 4$ (図3-5(I)を参照)を放射標識し、ラット胃から調製した核抽出液( $0.16\mu\text{g}$ )中に含まれるDNA結合蛋白質との結合をジェルシフト法によって解析した[レーン1, 3, 5(DNA断片のみのコントロール)、レーン2, 4, 6(核抽出液を加えたもの)]。 $R\beta 2$ (レーン1、2),  $R\beta 3$ (レーン3、4),  $R\beta 4$ (レーン5、6)

## 5. $\alpha$ および $\beta$ サブユニット遺伝子のプロモーター領域に両方に結合する胃に特異的なDNA結合蛋白質

$H^+/K^+$ -ATPaseの2つのサブユニット遺伝子の特異的な転写が共通の調節機構に支配されているのかどうか問題となる。そこで、 $\alpha$ および $\beta$ サブユニット遺伝子上流域に結合した胃に特異的なDNA結合蛋白質が、共通の塩基配列を認識しているのかどうかを検討した。ラット $\alpha$ サブユニット遺伝子のプロモーター領域RAをプローブとし、ラット胃の核抽出液中の蛋白質との結合をジェルシフト法によって検討した。これに $\beta$ サブユニット遺伝子のGATAGC配列を持ったR $\beta$ 4, R $\beta$ 3, R $\beta$ 2と $\alpha$ サブユニット遺伝子のTAATCAGCTG配列を持ったR $\alpha$ 1を加えたところ、RA-1と核蛋白質の結合は検出できなくなった(図3-6)。しかし、いずれの配列も持っていないR $\beta$ 5を加えても結合に影響はなかった。さらに、 $\beta$ サブユニット遺伝子のプロモーター領域(-185~+10)をプローブとして同様に解析を行った。このプローブと核蛋白質の結合は、 $\beta$ サブユニット遺伝子のGATAGC配列を持ったR $\beta$ 2、 $\alpha$ サブユニット遺伝子のTAATCAGCTG配列を持ったH $\alpha$ 1、そしてTAATCAGCTG配列を2回繰り返して持ったR $\alpha$ 1によって阻害された(図3-6)。しかし、いずれの配列も持っていないR $\beta$ 1を加えても結合に影響は与えなかった。このことは、 $\alpha$ サブユニット遺伝子のプロモーター領域に結合するDNA結合蛋白質が、 $\beta$ サブユニット遺伝子のプロモーター領域にも結合できることを示している。すなわち、両サブユニット遺伝子の転写は共通のDNA結合蛋白質によって調節されている可能性を示唆するものである。

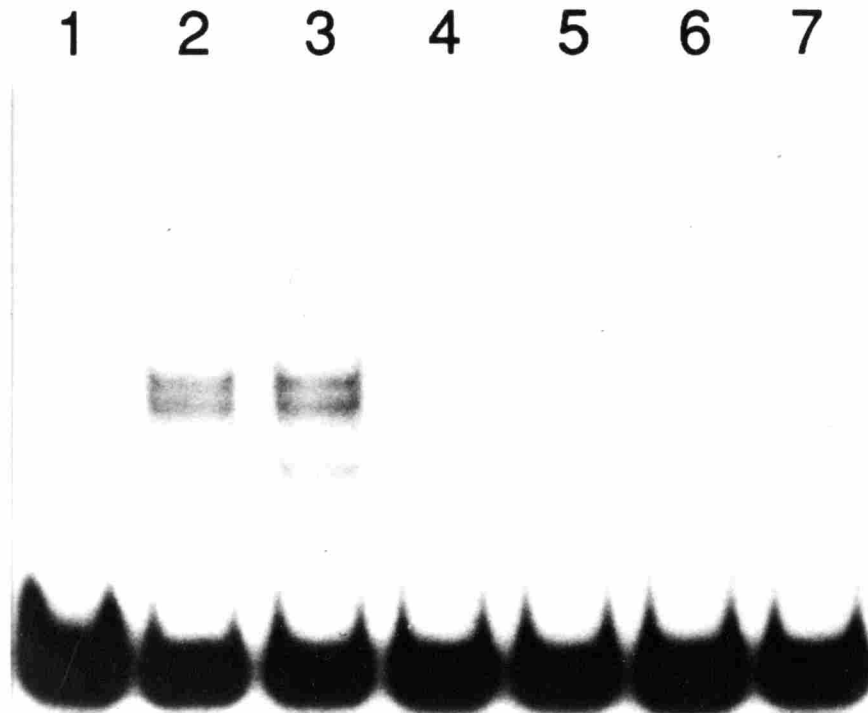


図3-6  $\alpha$ および $\beta$ サブユニット遺伝子のプロモーター領域に共通に結合する胃に特異的なDNA結合蛋白質

ラットの胃から調製した核抽出液( $0.16\mu\text{g}$ )中に含まれるDNA結合蛋白質とラット $\alpha$ サブユニット遺伝子上流のDNA断片であるRAを $0.1\text{p mol}$ との結合はジェルシフト法によって解析した [レーン1 (プローブのみのコントロール), レーン2~7 (核抽出液を加えたもの)]。competitorとしてR $\beta$ 5(レーン3), R $\beta$ 4(レーン4), R $\beta$ 3(レーン5), R $\beta$ 2(レーン6), R $\alpha$ 1(レーン5) (図3-3および3-5参照)を加えた。レーン2にはcompetitorは加えていない。



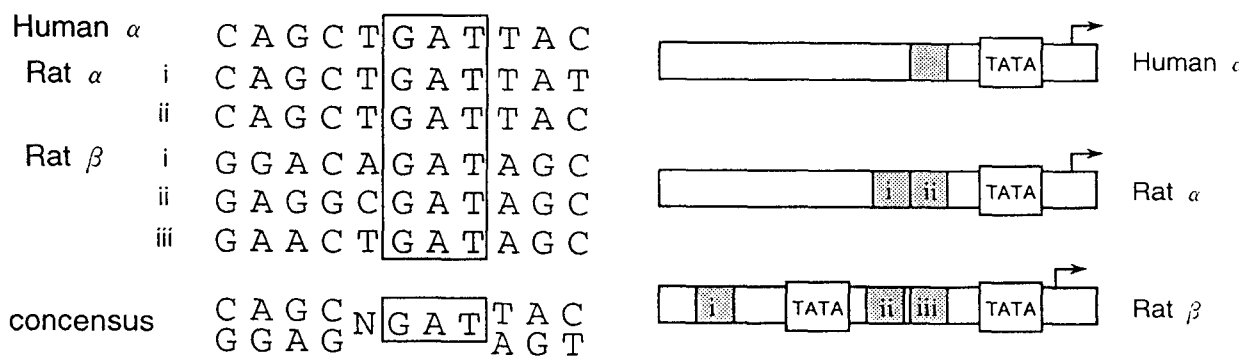


図3-7 胃に特異的なDNA結合蛋白質の $\alpha$ および $\beta$ サブユニット遺伝子上流における結合配列

胃に特異的なDNA結合蛋白質の結合するDNA断片の塩基配列を比較し、お互いに保存されている塩基配列を示した。ヒト $\alpha$ サブユニット遺伝子上の塩基配列H $\alpha$ 1とラット $\alpha$ サブユニット遺伝子上で2回繰り返して存在している配列R $\alpha$ 1'とR $\alpha$ ''はそれぞれsense-strand側を示した。ラット $\beta$ サブユニット遺伝子上の塩基配列R $\beta$ 2, R $\beta$ 3, R $\beta$ 4はantisense-strand側を示している。すべてにおいて保存されているGAT配列は四角で囲んだ。右側にヒトおよびラットの $\alpha$ サブユニット遺伝子、そしてラット $\beta$ サブユニット遺伝子上での結合配列（四角で囲み網がけしてある部分）の位置を模式的に示した。TATAはプロモーター配列、そして矢印は転写開始点の位置を示している。

		binding (%)
H $\alpha$ 1	CAGCTGATTAC	100
No.1	CAGGTGATTAC	100
2	CATGTGATTAC	49
3	CAGCACATTAC	1
4	CAGCTGATTTC	7
5	CAGCTGATTAG	107
consensus	CAGC <u>NGAT</u> TAC GGAG <u>AGT</u>	
GATA B.P.	$\begin{matrix} A & & A \\ & GATA & \\ T & & G \end{matrix}$	

図3-8 胃に特異的なDNA結合蛋白質の結合に対する塩基配列の特異性

図3-7で推測した、胃に特異的なDNA結合蛋白質の結合配列に変異を導入し、結合に重要な役割を果たしている配列を明らかにした。H $\alpha$ 1（図3-4参照）を放射標識し、ラット胃の核蛋白質を用いて形成された複合体をクロマトスキャナーで定量し、このときの値を100とした。下線を引いた塩基に変異を導入し（No.1~5）、複合体の形成量を相対値で表わした。胃に特異的なDNA結合蛋白質の結合配列の下に、GATA結合蛋白質の結合配列を示した。

#### 第4節 考察

ラットの胃とブタの胃粘膜の核抽出液に存在し、胃に特異的なDNA結合蛋白質が $H^+/K^+$ -ATPaseの $\alpha$ および $\beta$ サブユニット遺伝子のプロモーター領域に特異的に結合することを明らかにした。2つの遺伝子には共通のDNA結合蛋白質が結合することを競合実験から示した。したがって、競合実験に用いたDNA断片の中で胃に特異的なDNA結合蛋白質の結合できる、 $R\beta 4$ 、 $R\beta 3$ 、 $R\beta 2$ と $R\alpha 1$ 、 $H\alpha 1$ で保存された塩基配列が結合部位であると考えた。これらの配列を比較したところ、 $(G/C)PuPu(G/C)NGAT(A/T)PuPy$ という保存された配列を見つけることができた(図3-7)。したがってDNA結合蛋白質はこの配列を特異的に認識し、結合していると結論した。さらに、この配列に変異を導入することによってDNAと蛋白質の複合体の形成量がどのように変化するか検討した(図3-8)。すると結合配列の中でGATとその近傍が、特に重要であることを明らかにした。このGAT配列近傍は、赤芽球に特異的な転写調節因子として見いだされたGATA結合蛋白質の結合配列 $(A/T)GATA(A/G)$ (67)を含んでいる。この結果は、胃に特異的なDNA結合蛋白質のDNA結合ドメインの構造が、GATA結合蛋白質のものと高い相同性をもつことを示唆している。胃のDNA結合蛋白質の結合配列は、ラットの $\alpha$ サブユニット遺伝子ではTATAボックス配列(-59~-65)の28bpから48bp上流に2回繰り返して存在し、ヒトの $\alpha$ サブユニット遺伝子ではTATAボックス配列(-53~-59)の41bpから51bp上流に存在していた。ラット $\beta$ サブユニット遺伝子ではTATAボックス配列は2箇所あるが、上流側のTATAボックス配列より26bpから36bp上流に $(G/C)PuPu(G/C)NGAT(A/T)PuPy$ で表わされる配列が1箇所、そして下流側のTATAボックス配列より36bpから60bp上流に2箇所存在していた(図3-7)。DNA結合蛋白質がこれらの配列に結合し、第一章で述べたような安定な転写開始複合体の形成に関与している可能

性が考えられる。なお、mRNAの合成開始点は両サブユニット遺伝子のTATAボックス配列（ラットでは2箇所のうち下流のもの）の下流にあることは確認されている（図3-7）（95,96）。ラット $\beta$ サブユニット遺伝子の転写においてDNA結合蛋白質が複数の箇所に結合かどうか不明であるが、 $\alpha$ サブユニット遺伝子の場合を考えあわせると1箇所に結合すると考えてよいのではないだろうか。

$\beta$ サブユニット遺伝子はラットだけでなくマウスからも単離され、塩基配列が決定されている(38)。両者のプロモーター領域の塩基配列には、高い相同性がある。マウスにおいてもTATAボックスはラットと同様に2箇所あり、DNA結合蛋白質の結合配列も対応する位置に3箇所保存されていた。したがって、マウス $\beta$ サブユニット遺伝子においても3箇所存在する結合配列のいずれかに胃に特異的なDNA結合蛋白質が結合し、転写を調節していると考えられる。

胃に見出されたDNA結合蛋白質はラットの胃の核抽出液にのみ存在し、肝臓、脳、腎臓、脾臓、肺では検出できなかった。したがって、この蛋白質は転写の促進に関与していることが示唆される。本研究で得られたDNA結合蛋白質およびその結合配列は、1種類だけであった。 $H^+/K^+$ -ATPase遺伝子の胃における厳密な発現調節がこのDNA結合蛋白質によってのみなされている可能性と、他に活性化もしくは不活性化している因子が存在する可能性がある。本章では、 $\alpha$ および $\beta$ サブユニット遺伝子のプロモーター領域に結合したDNA-蛋白質複合体は、複数検出できた。これらのDNA-蛋白質複合体は、(G/C)PuPu(G/C)NGAT(A/T)PuPy配列を持ったDNA断片を加えることによってすべて検出できなくなった。すなわち共通の結合配列を持つDNA結合蛋白質が複数存在するか、もしくはDNA結合蛋白質に結合する因子が複数存在することを示唆している。いずれにしても、構造を明らかにすることがDNA結合蛋白質の機能を考える上でも重要である。

## 第4章 胃に存在するDNA結合蛋白質（GATA-GT1、GATA-GT2）の同定

### 第1節 緒言

胃に特異的に存在するDNA結合蛋白質の結合配列(G/C)PuPu(G/C)NGAT(A/T)PuPyは、赤芽球に特異的な転写調節因子として見いだされたGATA結合蛋白質の結合配列(A/T)GATA(A/G)を含んでいる(67)（胃の配列の下線参照）。したがって本研究で得られた胃の結合蛋白質のDNA結合ドメインの構造は、GATA結合蛋白質のものと高い相同性があると推定できる。GATA結合蛋白質には、GATA-1、GATA-2、GATA-3の3種類がこれまでに報告され、いずれも高い相同性のあるDNA結合ドメイン（119アミノ酸）を持っている(99)。GATA-1の一次構造は、ニワトリ(97)、マウス(67)、ヒト(98)、アフリカツメガエル(99)で決定されている。GATA-2はニワトリ(97)、ヒト(100)、アフリカツメガエル(99)で、GATA-3はニワトリ(97)、マウス(101)、ヒト(102-103)、アフリカツメガエル(99)でそれぞれ決定されている。これらのGATA結合蛋白質のうち異なる種類の因子の間では、DNA結合ドメインが高い相同性を持っており、同じ種類の因子の間では種を越えて全一次構造がよく保存されている(99)。GATA結合蛋白質のDNA結合ドメインにはC4タイプの亜鉛フィンガー構造(CXXC-X<sub>17</sub>-CXXC)が2個連なっているが、これは同様のC4タイプの亜鉛フィンガーをもつステロイドホルモン受容体(CXXC-X<sub>13</sub>-CXXC)と比べると明らかに異なっている(66)。これまでに報告されているマウス、ヒトおよびニワトリのGATA-1、GATA-2、GATA-3のcDNAの塩基配列(99)を比較すると、亜鉛フィンガードメインの一次構造は種を越えて79~98%という高い相同性がある。そこでこのドメインに対応するPCRプライマーを作成し、胃粘膜のcDNAを用いてPCRを行うと、胃に特異的なDNA結合蛋白質の一部を増幅できると考えた。

本章では、ラットおよびマウスの胃、およびブタ胃粘膜のcDNAから増幅した、亜鉛フィンガー部分のDNA断片の塩基配列を決定した。その結果これまでに知られていない、新しいDNA結合蛋白質の存在を示唆することができた。さらに亜鉛フィンガー部分のDNA断片を用いて、ラット胃のcDNAライブラリーから新しいDNA結合蛋白質の全長をコードしているクローンを単離し、塩基配列を決定した。

## 第2節 材料および方法

### 1. ラット胃の総RNAおよびPoly(A)<sup>+</sup>RNAの調製

ラット胃(2 g)を液体窒素で充たしたステンレス缶に入れ、粉末状にした。液体窒素が蒸発した後、20 mlのグアニジンイソチオシアネート溶液 (50 % Guanidin isothiocyanate, 100 mM 酢酸ナトリウム pH 5.0, 5 mM EDTA) を加えテフロンホモジェナイザーを用いて均一な溶液とした。これを遠心管(RP20)に移し、8,000×g で20分間遠心した。上清を2mlのセシウムクロライド溶液 (83 % CsCl, 100 mM 酢酸ナトリウム pH 5.0, 5 mM EDTA) 上に重層し、35,000×g で12~15時間にわたって遠心した(Hitachi, SW55)。グアニジンイソチオシアネート溶液層を除いた後、遠心管を底から2 cmのところまで切断し、完全に上清を取り除いた。80 %エタノールで3回洗った後、ETS溶液 (10 mM Tris-HCl, 10 mM EDTA, 0.5 % SDS) を150 μl 加えRNAの沈澱を懸濁した。この操作を3回繰り返して、得られたRNA溶液を3回フェノール抽出した。2倍量の冷エタノールを加え-20℃に30分間放置した後、15,000×g で10分間遠心した。得られた沈澱を70 %エタノールで洗浄し、乾燥させた。50 μlのTE緩衝液に懸濁し、260 nmと280 nmの吸収を測定し、その比から総RNA

の純度を検定し定量を行った。40  $\mu$ gRNA/mlのRNAが260 nmの吸収1.0を与えると仮定すると、ラット胃2 gより5 mgのラット胃総RNAを得られた。

mRNAはOligotex-dT30（日本合成ゴム）を用い、総RNAから調製した。1 mgのラット胃の総RNA溶液に緩衝液 [10 mM Tris-Cl pH7.5, 1 mM EDTA-2Na, 0.1 % SDS] を加えて全量で0.5 mlとした。0.5 mlのOligotex-dT30を加え、65°Cで5分間熱変性し、氷上で3分間急冷した。5 M NaClを0.1 ml加え、37°Cで10分間保温した。15,000 $\times$ gで10分間遠心し上清を除き、沈澱を1 mlの洗浄緩衝液（10 mM Tris-HCl pH 7.5, 1 mM EDTA, 0.1 % SDS, 100 mM NaCl）に懸濁した。37°Cで10分間保温後、15,000 $\times$ gで10分間遠心し上清を除いた。沈澱をTE緩衝液0.5 mlに懸濁し65°Cで5分間加熱しmRNAをOligotex-dT30から溶出した。次は15,000 $\times$ gで10分間遠心し、上清を回収した。100  $\mu$ lの3M酢酸ナトリウム（pH5.6）と1mlの冷エタノールを加え、-80°Cに30分間放置した。これを15,000 $\times$ gで10分間遠心し、上清を除いた。沈澱を70%エタノールで洗浄し、再び15,000 $\times$ gで10分間遠心分離し上清を除いた。得られたmRNAの沈澱を50  $\mu$ lのTE緩衝液に溶解し、溶液の260nmの吸収を測定し定量した。このようにして、1 mgのRNAからPoly(A)<sup>+</sup>RNAを15  $\mu$ g得た。

## 2. cDNAの合成

Pharmacia社製の cDNA Synthesis Kit を用いて、cDNAを合成した。このKitは、Gubler and Hoffman の方法(104)にもとづいている。方法の概略を以下に示す。5  $\mu$ gの poly(A)<sup>+</sup>RNAを鋳型として用い、Oligo(dT)をプライマーとしてReverse Transcriptase により first strand cDNA を合成した。*E.coli* DNA Polymerase I および RNaseHを用い、second strand cDNA を合成した。得られたcDNAは、Klenow Fragment で処理して平滑末端とし、*Eco* RI

adaptorを連結させ、ゲルろ過によってcDNAを精製した。合成の際に取り込ませた [ $\alpha^{32}$  P] -dCTPから求めたcDNA量は0.5  $\mu$ gであった。PCRの反応条件は第2章で述べた方法に従った。

### 3. ラット胃のcDNAライブラリーの作成

cDNA 10ngを10~40ngのプラスミドpUC18 (*Eco*RIで切断し脱リン酸化したもの)に組み入れた。組み換えプラスミド調製の反応液の全量は500  $\mu$ lとし、Takara Shuzo社製リガーゼを用いて16°Cで12時間反応を行った。ライブラリー作成の受容菌には*E.coli* JM83株を用い、Bio Rad社製Gene Pulserでエレクトロポレーションによって形質転換した(105, 106)。エレクトロポレーションは受容菌20  $\mu$ lに反応液4  $\mu$ lを加え10分間氷冷した後、2.5Vで行った。これに1mlのL-brothを加え、37°C30分間放置した後、菌液120  $\mu$ lを50  $\mu$ g/mlのアンピシリンを含むL-broth寒天培地に塗抹し、37°Cで12時間培養した。このようにしてcDNAを挿入した組み換えプラスミドを持つ、約 $4 \times 10^5$ 個のコロニーを得た。

### 4. コロニーハイブリダイゼーション法によるcDNAライブラリーのスクリーニング

cDNAライブラリーのスクリーニングは、コロニーハイブリダイゼーション法により行った(93)。寒天培地上のコロニーをニトロセルロースフィルターに転写後、10% SDSを含ませたる紙 (Whatman 3MM) 上で3分間処理し、次に0.5 M NaOH, 1.5 M NaCl を含ませたる紙上で5分間処理した。その後1.5 M NaCl, 0.5 M Tris-HCl pH 8.0 を含ませたる

紙上で5分間、さらに×2 SSC (1×SSC= 150 mM NaCl, 15 mM citrate-Na pH 7.0) を含ませたる紙上で5分間の中和処理を行った。フィルターを室温で乾燥させた後、吸引オーブン中で80℃ 1時間のベーキングを行いDNAをフィルター上に固定した。

ハイブリダイゼーション溶液 (×5 Denhardt's<sup>※</sup>, ×1 SSC, 1% SDS, 0.1mg/ml 変性サケ精子DNA) 中で42℃ 4時間プレハイブリダイゼーションを行った。ベーリンガーマンハイム社製 Random priming DNA labeling Kit を用いて [ $\alpha^{32}$ P] -dCTPで標識したプローブを $3 \times 10^5$  cpm/ml となるように加え、55℃で12~15時間ハイブリダイゼーションを行った。フィルターは室温で6×SSC, 0.1% SDSによる15分間の洗浄後、55℃で3×SSC, 0.1% SDSおよび1×SSC, 0.1% SDSによる洗浄を行った。フィルターを乾燥した後オートラジオグラフィーを行い、フィルター上でプローブが強くハイブリダイズした位置に対応するコロニーを寒天培地上からかきとった。これを寒天培地に塗抹して増殖させた後、同様の方法で2次、3次スクリーニングを行って単一コロニーを得た。

<sup>※</sup>1×Denhardt's: 0.02% Ficoll, 0.02% polyvinylpyrrolidone, 0.02% BSA

## 5. DNA塩基配列の決定

第2章に示した方法によりプラスミドを調製し、制限酵素によってcDNAを適当な断片とした。これをポリアクリルアミドゲル電気泳動により分離し、回収した後、pUC 18ベクターに組み込んでサブクローンとした。塩基配列の決定は、二本鎖ともにTOYOBO社製Sequenase Version2.0 DNA Sequencing Kitを用い、ジデオキシ法により行った(91, 92)。遺伝子解析プログラム GENETYX (SDC社製) を用い、塩基配列を解析した。



### 第3節 結果

#### 1. 胃に見い出された新しいタイプのDNA結合蛋白質

胃に特異的に存在するDNA結合蛋白質が $H^+/K^+$ -ATPase $\alpha$ および $\beta$ サブユニット遺伝子のプロモーター領域に特異的に結合し、このDNA結合蛋白質は塩基配列(G/C)PuPu(G/C)NGAT(A/T)PuPyを認識することを前章で明らかにした。同定した認識配列は、GATA結合蛋白質の結合配列(67)を含んでいた。そこでGATA結合蛋白質の保存性の高い亜鉛フィンガードメイン(99)に着目して、胃に特異的なDNA結合蛋白質に対するcDNAを検索した。まずGATA結合蛋白質の亜鉛フィンガーを、PCR法に従って胃から調製したcDNAより増幅できるように、プライマーを考察した。マウス、ヒトおよびニワトリのGATA-1、2、3で亜鉛フィンガーをコードしている塩基配列を比較し(図4-1)、縮重プライマーを以下のように決定した。

```
primer F (forward)      5'  CGTCGACTACCTATGCAACGCCTGCGG 3'
                               T G T T T
primer R (reverse)      5'  CGTCGACACAGGCGTTGTTGCAAACGGG 3'
                               G A A A T A
                               C C
                               G
```

ブタ胃粘膜のcDNA (1 ng) を用いてprimer Fとprimer R存在下にPCR反応を行ったところ、194bpのDNA断片を増幅することができた。この断片を回収後、平滑末端化し、pUC18 (*Hinc* IIによって切断されている) にクローニングした。得られた15個のクローンの塩基配列を決定したところ、GATA-2(97, 99, 100)、GATA-3(97, 99, 101-103)の他に3種類のこれまでに報告されていない亜鉛フィンガードメインの部分配列を明らかにす

primer F		
mouse	GATA-1	<u>GGTCACTACCTGTGCAATGCCTGTGGCTTGTATCACAAGATGAATGGTCAG</u>
human	GATA-1	<u>GGCCACTACCTATGCAACGCCTGCGGCCTCTATCACAAGATGAATGGGCAG</u>
chicken	GATA-1	<u>GGGCATTACCTGTGCAACGCCTGCGGGCTCTACCACCGCCTCAACGGCCAG</u>
human	GATA-2	<u>GGCCACTACCTGTGCAATGCCTGTGGCTCTACCACAAGATGAATGGGCAG</u>
chicken	GATA-2	<u>GGGCATTACCTGTGTAACGCCTGCGGGCTCTACCACAAAATGAACGGTCAA</u>
mouse	GATA-3	<u>GGGCACCTACCTTTGCAATGCGTGCGGACTCTACCATAAAAATGAATGGGCAG</u>
human	GATA-3	<u>GGACACTACCTGTGCAACGCCTGCGGGCTCTATCACAAAATGAACGGACAG</u>
chicken	GATA-3	<u>GGGCACCTACTGTGTAACGCCTGTGGACTCTATCACAAAATGAATGGGCAG</u>
mouse	GATA-1	AACCGGCCTCTCATCCGGCCCAAGAAGCGAATGATTTGTCAGCAAACGGGCA
human	GATA-1	AACAGGCCCCCTCATCCGGCCCAAGAAGCGCCTTGATTTGTCAGTAAACGAGCA
chicken	GATA-1	AACCGCCCCGCTCATCCGGCCCAAAAAGCGCCTGCTGGTGAGTAAGCGCGCA
human	GATA-2	AACCGACCACTCATCAAGCCCAAGCGAAGACTGTCGGCCGCCAGAAGAGCC
chicken	GATA-2	AACCGACCTCTCATTAACCCAAAACGAAGGCTGTCAGCGCCAGGAGAGCA
mouse	GATA-3	AACCGGCCCCCTTATCAAGCCCAAGCGAAGGCTGTCGGCAGCAAGGAGAGCA
human	GATA-3	AACCGGCCCCCTCATTAAGCCCAAGCGAAGGCTGTCTGCAGCCAGGAGAGCA
chicken	GATA-3	AACCGACCCCTGATTAACCCAAAGAGAAGGCTGTCTGCAGCCAGGAGGGCG
mouse	GATA-1	GGCACCCAATGCACTAACTGTCAAACGACCACTACAACACTCTGGCGGAGG
human	GATA-1	GGTCCTCAGTGCACCAACTGCCAGACGACCACCACGACTGTGGCGGAGA
chicken	GATA-1	GGCACAGTGTGCAGCAACTGCCAGACATCCACCACCACTCTGTGGCGTCCG
human	GATA-2	GGCACCTGTTGTGCAAAATGTTCAGACGACAACCACCACCTTATGGCGCCGA
chicken	GATA-2	GGGACGTGTTGTGCCAACTGTTCAGACAACCACCACGACCTTATGGCGACGC
mouse	GATA-3	GGGACATCCTGC CGCAACTGTTCAGACCACCACGACCACCTCTGGAGGAGG
human	GATA-3	GGGACGTCCGTGCGCAACTGTTCAGACCACCACAACCACACTGTGGAGGAGG
chicken	GATA-3	GGCACGTCCGTGTGCTAACTGTTCAGACCACCACCACCACCTGTGGAGGAGA
primer R		
mouse	GATA-1	AATGCCAGCGGAGATCCGGTATGCAATGCCTGC
human	GATA-1	AATGCCAGTGGGGATCCCGTGTGCAATGCCTGC
chicken	GATA-1	AGCCCCATGGGGACCCCGTCTGCAACGCCTGC
human	GATA-2	AACGCCAACGGGGACCCCTGTCTGCAACGCCTGC
chicken	GATA-2	AACGCCAACGGGGACCCGGTTTGTAAATGCCTGC
mouse	GATA-3	AACGCTAATGGGGACCCGGTCTGCAATGCCTGT
human	GATA-3	AATGCCAATGGGGACCCCTGTCTGCAATGCCTGT
chicken	GATA-3	AATGCCAACGGCGATCCCTGTCTGTAATGCCTGT

図4-1 亜鉛フィンガーを増幅するためのPCRプライマー

GATA-1 [マウス(67), ヒト(98), ニワトリ(97)] GATA-2 [ヒト(100), ニワトリ(97)]  
 GATA-3 [マウス(101), ヒト(102), ニワトリ(97)] の亜鉛フィンガードメインをコードする塩基配列を示した。亜鉛フィンガーを形成するCys残基に対応するコドン以太字で表わした。primer F, primer Rに対応する部分を下線で示した。

GATA-2	LYHKMNGQNRPLIKPKRRLSAARRAGTCCANCQTTTTTLWRRNANGD
GATA-3	-----S-----
GATA-GT1	--S----LS-----QK-VPSS--L-LS----H-----E-E
GATA-GT2	-----I-----Q----S--V-LS-----E-E
GATA-GT3	--S---RLS-----Q-----S--V-LS-A----T-----E-E

図 4-2 ブタ胃から得られた新しい亜鉛フィンガードメインのアミノ酸配列

PCR法に従いprimer Fとprimer Rを用いて、ブタの胃のcDNAライブラリから亜鉛フィンガードメインをコードしているDNA断片を単離し、推定アミノ酸配列を示した。ブタのGATA-2に対応するアミノ酸配列と同じ残基は-で表わした。

ることができた（図4-2）。この新しいタイプのDNA結合ドメインを持つ蛋白質をGATA-GT1、GATA-GT2およびGATA-GT3と名付けた（図4-2）。GTはgastrointestinal tractから命名した。塩基配列を決定した15個のクローンのうち、1個がGATA-2(97, 99, 100)を、5個がGATA-3(97, 99, 101-103)を、7個がGATA-GT1を、1個がGATA-GT2を、そして1個がGATA-GT3をコードしていた。ラットおよびマウス胃のcDNAについても、同様に解析した。ラット胃から得られたクローン12個のうち、1個はGATA-GT1をそして残りの11個はGATA-GT2をコードしていた。マウス胃から得られた6個のクローンのうち、1個はGATA-GT1を、4個はGATA-GT2を、さらに1個がGATA-3をコードしていた。ラットおよびマウスの胃ではGATA-GT2が最も多く、そしてGATA-GT1、GATA-GT3、GATA-3の順で存在していた。以上の結果は、これまでに知られていない3種類の新しいDNA結合蛋白質（GATA-GT1、GATA-GT2、GATA-GT3）が胃に存在する可能性を示している。

## 2. GATA-GT1、GATA-GT2に対応するラットcDNAの単離と推定アミノ酸配列

次にラット、マウスの胃、ブタの胃粘膜で種を超えて存在しているGATA-GT1、GATA-GT2およびブタの胃粘膜に見い出されたGATA-GT3に注目し、これらの全長をコードしているcDNAクローンを得るためにラット胃cDNAライブラリーをスクリーニングした。プローブとして、ブタGATA-GT1、GATA-GT2、GATA-GT3の亜鉛フィンガードメインの部分配列をコードするDNA断片（図4-2）を用いた。その結果、約 $4 \times 10^5$ 個のコロニーから、9個の陽性クローン（クローンNo.1~9）を得ることができた。塩基配列を決定したところ、クローンNo.7がGATA-GT1の全長を、クローンNo.4がGATA-GT2の全長をコードしていた。クローンNo.1は亜鉛フィンガー部分は持っていなかったが、74番目のアミノ酸残基からカルボキシル末端まで167残基はGATA-GT2と完全に一致していた。

DNA結合ドメインとして重要な機能を持つ亜鉛フィンガーを欠失していることから、クローンNo.1はcDNAを合成した際に人工的にできたものである可能性が高い。他のクローンはいずれもGATA-GT1のアミノ末端側を欠いたクローンであった。

ラットGATA-GT1の全長をコードしている塩基配列とアミノ酸配列を図4-3Aに示した。GATA-GT1は391個のアミノ酸からなり、DNA結合に参与し得る2つの亜鉛フィンガー(CXXC-X<sub>17</sub>-CXXC)を持っていた。さらに特徴的な構造として亜鉛フィンガードメインよりアミノ末端側で7個のHis残基からなるクラスターを、カルボキシル末端側で22個のSer残基を持った領域(Cys-302残基からAla-391残基の間)を見つけることができる。GATA-GT1の2つの亜鉛フィンガーの間に、プロテインキナーゼAによってリン酸化され得るSer残基、(KRXXSもしくはRRXS文献18参照) KRVPS (230~234)が存在していた。このSer-234残基は、プロテインキナーゼCによってもリン酸化され得る残基(RXXSXR)(18)である(RVPSSR, 231~236)。このような特徴的な構造が、GATA-GT1の機能に対してどのような役割を持っているか興味深い。ラットGATA-GT2の、全長をコードしている塩基配列とアミノ酸配列を図4-3Bに示した。GATA-GT2は、440のアミノ酸残基からなる。特徴的な構造として亜鉛フィンガードメインよりアミノ末端側で9個(Ala-118~Ala-126)および6個(Ala-174~Ala-179)のAla残基から成るクラスターを、カルボキシル末端側でGATA-GT1と同様にSer残基に富んだ領域(Cys-302残基からAla-391残基の間に22残基のSer残基がある)を見つけることができた。またGATA-GT2でも2つの亜鉛フィンガーの間でプロテインキナーゼAによってリン酸化され得るSer残基(18) RRLS (258~261)が存在した。

```

-268  CGACTTGGGAGGACCTGTGCTCTTCACTGACCTCGATCAGGCCGGACCCGACGCAAGCTGCTGTGGTCCAGCCGGGGCCCAAGGT
-180  GAGTCCCTTCGCGGCCGAGCAGCCGAGGAAATGTACCAGACGCTCGCCGCTCTGTCCAGCCAGGGGCCCGCCGCTTACGACGGGGCTT
-90   CGGCGGCTTCGTACTCCTCCGAGCTGCGCGCCGGGGGGGGCCGCGGACCCAGCTCTCCGGTCTACGTGCCACCACACGCGTGGGGTCC
1     ATGCTGCCCGGCTGCCTTACCTGCAGGGGGCGGGCAGCGGGCCAGCAATCACCGGGCGGCGGGGGCCACCCGGGCTGGCCCGAG
   M L P G L P Y L Q G A G S G P S N H A G G A G A H P G W P Q 30
91   GCCTCCGGCCAGACAGCCCCCGTATGGCGGGGGTGGTGCAGCGGGCGGGCGGGCCGACCCGGAGGTGCGGGATCAGCCACAGCCCA
   A S A D S P P Y G G G G A A G G G A A G P G G A G S A T A H 60
181  GCCTCTGCACGCTTCCCCTACTCGCCAGCCCGCCATGGCCAACGGCGCGCGGGACCCCGGGGGCTACGTGGCTGCGGGCGGCGG
   A S A R F P Y S P S P P M A N G A A R D P G G Y V A A G G A 90
271  GCGCGGGTAGCGTGAAGTGGCGGTGGCGGAGCTGGCGCCATGGTGGCGGGAGCACCAGTACAGCTCGCTGTCCGACCCAGGCCG
   G A G S V S G G G G S L A A M G G R E H Q Y S S L S A A R P 120
361  CTGAACGGGACGTACCACCACCACCATCACACCACCCGACCTACTCGCCCTACATGGGCGCTCCTCTGACTCCCGCCTGGCCAGCGGGA
   L N G T Y H H H H H H H P T Y S P Y M G A P L T P A W P A G 150
451  CCCTTCGAAACGCCGGTGTCCACAGTTTACAGAGCCGCGGGGAGCTCCACTCCCGGTGCCACGAGGCCCGCAGCAGACCTGTGGAG
   P F E T P V L H S L Q S R A G A P L P V P R G P S A D L L E 180
541  GACCTGTGCGAGAGCCGCGAGTGGTGAAGTGGTCCATCCAGACGCCACTGTGGAGACGAGATGGCACCGGTTCATACCTGTGCAAC
   D L S E S R E C V N C G S I O T P L W R R D G T Q H Y L C K 210
631  GCATGCGGCTCTACAGTAAGATGAACGGCCCTCAGCAGGCCCTCATCAAGCCACAGAAGCGCGTGCCTTCATCAGCAGCGGCTTGGACTG
   A C G L Y S K M N G L S R P L I K P O K R V P S S R R L G L 240
721  TCCTGTGCAACTGTACACCACAACCACTACCTTATGGCGTAGAAACGCTGAGGGTGAGCCCGTGTGCAATGCTTGGCGGGCTTTATATG
   S C A N C H T T T T T L W R R N A E G E P V C N A C G L Y M 270
911  AAATCCATGGGGTGCCTCGACCACCTGCTATGAAAAAGAAGGAATTCAAACCAGGAAACGAAAACCTAAAAATATAAATAAGTCGAAA
   K L H G V P R P L A M K K E G I O T R K R K P K N I N K S K 300
901  GCTTGTCCGGTAACAGCTCTGTTCCTATGACTCCAACCTCCTCCTCTAATTCAGATGACTGCACCAAAAATACTTCTCCTCCCACA
   A C S G N S S V P M T P T S S S S N S D D C T K N T S P P T 330
991  CAGTCGACTGCCTCAGGGTGGGTGCATCAGTGATGTCTGCGAGTGGGAGAAAGTCCCAACCCAGAAACAGTCACTCAAGTATTCAGGT
   Q S T A S G V G A S V M S A V G E S A N P E N S D L K Y S G 360
1081 CAAGATGGCCTTACATAGGTGTCAGTTTGTCTCCCTGCCGAAGTTACATCCTCGGTGCGACAGGATTCCTGGTGTGCTCTGGCCCTG
   Q D G L Y I G V S L S S P A E V T S S V R Q D S W C A L A L 390
1171 GCCTGAGCTGGTGTGCCAAGGGCTCTGAAGGCCTCATACCACCTTGTGCTGATTTTGTCCAGCAGTCCAGATGGCGGCAAAAAATGCAG
   A * 391
1261 ACATAACATTCCTTCGATGCGTGATTTCTGTGCCTTTGTTTGAAGAGATATATTTCCCAAGAAGCTTATGAAGTAAGAAGATGGG
1351 TCTTTGTAGGAAGGGGCGAGCAGCTGGGCGTGTGGCCTATTCCTGTGACGCTGGGTCTGCTTCCAGCCAGCTTGCCTCTGGCTCTGCTCC
1441 ACACCAGTGGGAGAACTGTGACAATGACTGGGGCCTTGCTGCTAAGGAAGATTGAGAGATTAATAAAAAAATAGTTTGTGATTTGCTC
1531 CAAATCATGTGCTTCTTGTGATCAACCTTGGTTATCCAGAATTC

```

図4-3A ラットGATA-GT1の一次構造

ラットGATA-GT1のcDNAの塩基配列と推定アミノ酸配列を示した。塩基配列の番  
 左側に、翻訳開始コドン(ATG)の最初の塩基を+1として表わした。右側に翻訳開始Met  
 からのアミノ酸番号を示した。プロテインキナーゼAによりリン酸化され得る配列  
 [RRXSまたはKRXXS] (18)をAと下線で示した。プロテインキナーゼCによりリン酸化  
 されうる配列 [RXXSXR] (18)をCと下線で、カルモデュリン依存性キナーゼによりリン  
 酸化されうる配列 [RXX(S/T)] (18)を波線で示した。PCRのprimerに相当する塩基配列を  
 矢印下線で示した。

CCCAGGCTCCGCTGTGCTG

-562  
-541 CAGCTCCGCGGACTCACGGAGATCGCCGGCTCTCTGGGAACTGGAGCTGGCCAGGACTGTCGCTTCAAGGGAACGGCCCTCTTCG  
-451 TCCTTCGCTGGAGCCGCACTGGAGCCACCAAAATCGCCCTGGGTGTGAGCAGGAGCAAGCAAGGACTAGGACCTCTAGCCCTGGGGT  
-361 ATCCGAAGGCTCGCGAGGTTGTCGAGACCAGTCTTACTGAGTTCCTGGGCATCTCCAGCCTCTGGGCCCTGGAGTAGAGTCAGCCCTC  
-271 CTGCAGTTTCGGAGCAACCACAAATCCAATTTGGGATTTTGTCTTCTTGGAGCAAAACAGAGCCTAAAGATTGTGTGCTCTGATGCT  
-181 GGATTTAATTCGTATATATTTTGAGCGAGTTGGGCCCTGCTCCTATTGTTTGTGATCTCCGTTTTCGCGACAGTCTGCACACCTGTATT  
-91 CCAATTCCTTGGCTTGTGCTGCGCGCCCGTGGCTCCTTGGACTTGCAATAAAGGGGAGCACCCGAAGCTCAGAGCTTGGGGCG  
1 ATGTACCAAAAGCCTGGCTATGGCCGCCAACCCAGGGCCCCCGGGGGCCCTACGAAGCGGTGGACCTGGCGCCTTCATGCACAGTGG  
M Y Q S L H G P P P G A Y E A G G P G A F M H S A M A A N A  
91 GCGCGCGCTCTCGCCGCTCTACGTGCCCACTCCGGGGTGGCCGTCTCTGTGCTGGGCCCTGCTCTACCTGCAGGGCGGAGGCACTGG  
G A A S S P V Y V P T P R V P S S V L G L S Y L Q G G G S G  
181 GCTGCTTTCGGAGCCACCTCGGGTGGCAGCTCCGGGGCGGCCCTGGGTGCTGGGCCCTGGGACCCAGCAGGGTAGCCCGGGCTGGAGC  
A A S G A T S G G S S G A G P S G A G P G T Q Q G S P G W S  
271 CAGGCTGGAGCTGAGGGAGCCGCTTACACCCACCGCCTGTGTCCCGCGCTTCTCCTTCCCGGGGACTACTGGGTCCCTGGCGGGCGCC  
Q A G A E G A A Y T P P P V S P R F S F P G T T G S L A A A  
361 GCGCCGCTGCGCAGCCCGGGGAAGCTGCAGCCTACAGCAGTAGCGGGCGGGCAGCCGGCGCTGGCCCTGGCCGGAGAGCAGTACGGG  
A A A A A A R E A A A Y S S S G G A A G A G L A G R E Q Y G  
451 CGTCCGGCTTCGAGGCTCTACTCCAGCCCTACCCAGCCTACATGCGCCGATGTGGCGCATCTGGCGCCAGCCGCTGCCCGCTCC  
R P G F A G S Y S S P Y P A Y M A D V G A S W A A A A A S  
541 GCGCCGCTTTCGACAGCCAGTCCGTCACAGCCTACCTGGCCGGGCAACCCCTGCAGACACCCCAATCTCGATATGTTGTGACTTC  
A G P F D S P V L H S L P G R A N P A R H P N L D M F D D F  
631 TCAGAAGGCAGAGATGTGTCAACTGCGGGCCATGTCCACCCCACTCTGGAGGCGAGATGGGACAGGACACTACCTATGCAACGCTGT  
S E G R E C V N C G A M S T P L W R R D G T G H Y L C N A C  
721 GGCCTTACCACAAGATGAATGGTATCAACCGCCCTCATCAAGCCTCAGCGCCGGCTGTCTGCCTCCCGGGTAGGCCCTCTCTGT  
G L Y H K M N G I N R P L I K P O R R L S A S R R V G L S C  
811 GCCAACTGCCAGACTACCACCACACTGTGGCGCGTAAAGCTGAGGGCGAGCTGTTTGGCAATGCCTGGCCCTCTACATGAAGCTC  
A N C O T T T T L W R R N A E G E P V C N A C G L Y M K L  
901 CATGGGTTCCAGGCTCTTGAATGCGGAAGGAGGGATTCAAACAGAAAACGGAGCCCAAGAATCTGAATAAATCTAAGACACCA  
H G V P R P L A M R K E G I O T R K R K P K N L N K S K T P  
991 GCAGTCTCTCGCGAGAGCCCTCCCTCCCTCCAGTGGTGCCTCCAGCAACTCCAGCAACGCCACCAGCAGCAGCAGCAGCAGTGAAGAG  
A G P P G E S L P P S S G A S S N S S N A T S S S S S S E E  
1081 ATGCGCCCATCAAGACAGAGCCCGGGCTGTCTACTATGGGACAGCAGCTCCATGTCCAGACACTCAGTACTGTGTCCGGCAT  
M R P I K T E P G L S H Y G H S S M S Q T F S T V S G H  
1171 GGGTCTCCATCCATCCAGTGTGTGGCTCTGAGCTCTCCCAAGGCTATCCATCTCTGTCTCAGACTCAGACCTCAGAGCCAGCTCC  
G S S I H P V L S A L K L S P Q G Y P S P V T Q T S Q A S S  
1261 AAGCAGGACTCTTGAACAGCCTGGTCTGGCTGACAGTATGGGACATAATCACCGCTAATCAGCACCCCTTCCCTCTCAAATTC  
K Q D S W N S L V L A D S H G D I I T A \*  
1351 CTGCTCGGACTTGGGACCTGGGGCCAGCAAAGTAAAGGCTGGGGCACCTGGCCAGCCCTCTGTGTGGAACTCCTGAAGAACA  
1441 CTGGTAGAATTTGAAGTTGTTGACAATCACTTAGGGATAAGGGTGTGGGTTTCTTCAAATACCTTTCCAGGTGGAGCACTGGAAGAAGC  
1531 CTGCATTCACAGAAAAGCCACCTTGGCTGCAAGCACAGCAGTGGGCTTTCAGTGGAGGAGACTTCTTCCCTCTCTTACC  
1621 TGCTGTCCAGGACAGACATAATCTTACCCAGCTCCCAACCCAGTGGCTGTGGTGTGGTGTGGTGTGGTGTGGTGTGGTGTGGTGTGGT  
1711 TGTAGGGACCGAGGCTTCAAGACACTGTCTACAGCCGGCGAGGGTGTCTACTTGGGACTAGACATAGCAGCCCTGGCCCTGTCCCAACA  
1801 CTCCCTTGGAGCATGGAACATCTCATGTGTCCCATACCTGATCTGACTCCTAAAGCGCTGGGTGCAGTGCAGATGTTACTGAGTGTCTCC  
1891 TGGGGGTTTAGGTGAGGAGAAGGCACATCACCCATCACAGATCGCAGCCGCTCAGAGGTGCCTTCCCTTCCCTCCAGGAACAGCA  
1981 ACCCCCTTGTCTCCAGCCTGAACATCTCTACCCCTGTAAAACCTAGAGCCAGTGTACAGCAGGCTAATACCCTAGGTGCTGTCC  
2071 CAGATCCATTTCCACCTCTTACACACAGGGGTTCCAAGGAGAACAAAACCTGCTACTAAAGCAGGGTTGGTGTGCTGTGCTATCTGC  
2161 ACCTTGGGACCCCTCGAGGTTGTGTCTACAGCACAACTCTGCCCCAGGACTCCAGCTTACTGCTCTGAGCCTGCAAGCCAGCTCT  
2251 CTCAAGTCAGACAGTAACTGGCTCTGGGACTTTCAGCACAGATCCTTTGTCTAGAAAATACGGACTGTTTGAACAAAATTCAGA  
2341 GCAGAAACAACAAAGGAAATTTTGAAGGACAAGGGTGTGGATGGAAGAAGATGCCCCAGGCCATGGGACAGCCATGCTTGCAG  
2431 TTGTGCTAGAACTGGCAACCCCTCTCCCTTCCATTAAGTGGGCTCCCAAGATTTCTTCTTGTCTTATCACCACAGAGCTGTAGCC  
2521 AACTGTGGCATTACCTTGTTTTGGCCCAAATTTCCAGCCCGCCCTAAACCTTACTGGCCGTAGCAGAGAATAGCTTTGAACCAAGATT  
2611 CTGTGTAATCATTTACGCTGTTTCTCCCTCAAGGCGCCTTCTATGCTCCCCCTCTCCACAACCCGTTAACATTTGCTTAAAGTGA  
2701 AATGGCTGAAAATCAGTATTTAACTAATAATTTATCTGTATTACTCTTAA

図4-3B ラットGATA-GT2の一次構造

ラットGATA-GT2のcDNAの塩基配列と推定アミノ酸配列を示した。polyA付加シグナルに2重下線をひいた。その他の記号は図4-3Aと同じものを用いた。

### 3. GATA結合蛋白質の一次構造の比較

本研究で得られたGATA-GT1、GATA-GT2とこれまでに知られているGATA結合蛋白質GATA-1(67, 97-98)、GATA-2(97, 99, 100)、GATA-3(97, 99, 101-103)のアミノ酸配列を図4-5に示した。亜鉛フィンガーが2箇所存在しDNA結合ドメインとされている118アミノ酸残基の領域を、四角で囲んだ(図4-5, A)。この領域が、GATA結合蛋白質およびGATA-GT1、GATA-GT2の間でよく保存されていることがわかる。おそらくGATA-GT1やGATA-GT2においても、DNA結合ドメインとなっていることが推定できる。このドメインはGATA-1, GATA-2, GATA-3の間で79から96%の相同性がある。一方DNA結合ドメインのアミノ末端側とカルボキシル末端側を比較するとGATA-2、GATA-3の間ではそれぞれ46%と56%、GATA-1とGATA-2の間で9%と4%、GATA-1とGATA-3の間で9%と4%の相同性しか見られなかった(図4-5, B)。GATA-GT1およびGATA-GT2の亜鉛フィンガー部分をGATA-1、GATA-2、GATA-3のものと比較したところ、それぞれ70~73%、75~81%の相同性があった(図4-5, B)。他の領域でGATA-GT1と3種のGATA結合蛋白質で同様の比較を行うと、アミノ末端側では6~10%、カルボキシル末端側では3~10%の相同性しかなかった。同様にGATA-GT2と3種のGATA結合蛋白質との比較ではアミノ末端側で5~10%、カルボキシル末端側で11~16%の相同性しかなかった。以上の比較から(図4-5, B)、GATA-GT1およびGATA-GT2はGATA-1、GATA-2、GATA-3のDNA結合ドメインと高い相同性をもっており、GATA結合蛋白質のファミリーに分類しうること、しかしこれまでに知られているGATA-1(67, 97-98)、GATA-2(97, 99, 100)、GATA-3(97, 99, 101-103)とは違った新しいDNA結合蛋白質であることが示唆される。



#### 4. GATA結合蛋白質の推定リン酸化部位

本研究において新しく見いだされたGATA-GT1とGATA-GT2に、各種のプロテインキナーゼによってリン酸化され得る残基が存在することを既に指摘した。しかしリン酸化によってGATA-1, -2, -3が調節されている可能性は、現在までに指摘されていない。そこで既知の3種のGATA結合蛋白質と新しい蛋白質の間で保存されている領域で、プロテインキナーゼA、プロテインキナーゼC、およびカルモデュリン依存性キナーゼによりリン酸化され得る残基に注目した。リン酸化され得る残基の位置を、図4-4のI~IVに示した。Iの領域では、GATA-2およびGATA-3にのみカルモデュリン依存性キナーゼによってリン酸化され得るSer残基もしくはThr残基 (RXXS/T) (18)が存在する。IIの領域では、すべてのGATA結合蛋白質にカルモデュリン依存性キナーゼによってリン酸化され得るSerまたはThr残基(18)が存在する。IIIの領域は2つの亜鉛フィンガーの間のはさまれた領域で、プロテインキナーゼAによってリン酸化されうるSer残基(18)がアミノ末端側に、カルモデュリン依存性キナーゼによってリン酸化され得るThr残基(18)がカルボキシル末端側に存在する。プロテインキナーゼAによるリン酸化部位(18)は、GATA-GT1、GATA-GT2だけでなくGATA-2およびGATA-3においても保存されていたが、GATA-1にはなかった。GATA-GT1のみプロテインキナーゼCによってもリン酸化され得るSer残基(18)が、この部位に重なって存在していた。したがって、GATA-GT1とGATA-GT2が異なるリン酸化機構によって調節されている可能性がある。カルボキシル末端側のカルモデュリン依存性キナーゼによってリン酸化され得る部位は、GATA-GT1、GATA-GT2には保存されていなかった。同様にIVの領域でも2箇所あるカルモデュリン依存性キナーゼによってリン酸化され得るThr残基およびSer残基(18)は、GATA-1、GATA-2、GATA-3でのみ保存されていた。このような比較からGATA-GT1とGATA-GT2は、これまでに知られているGATA-1、GATA-2、GATA-3は異なったリン酸化によって制御されている可能性を考えてよいだろう。

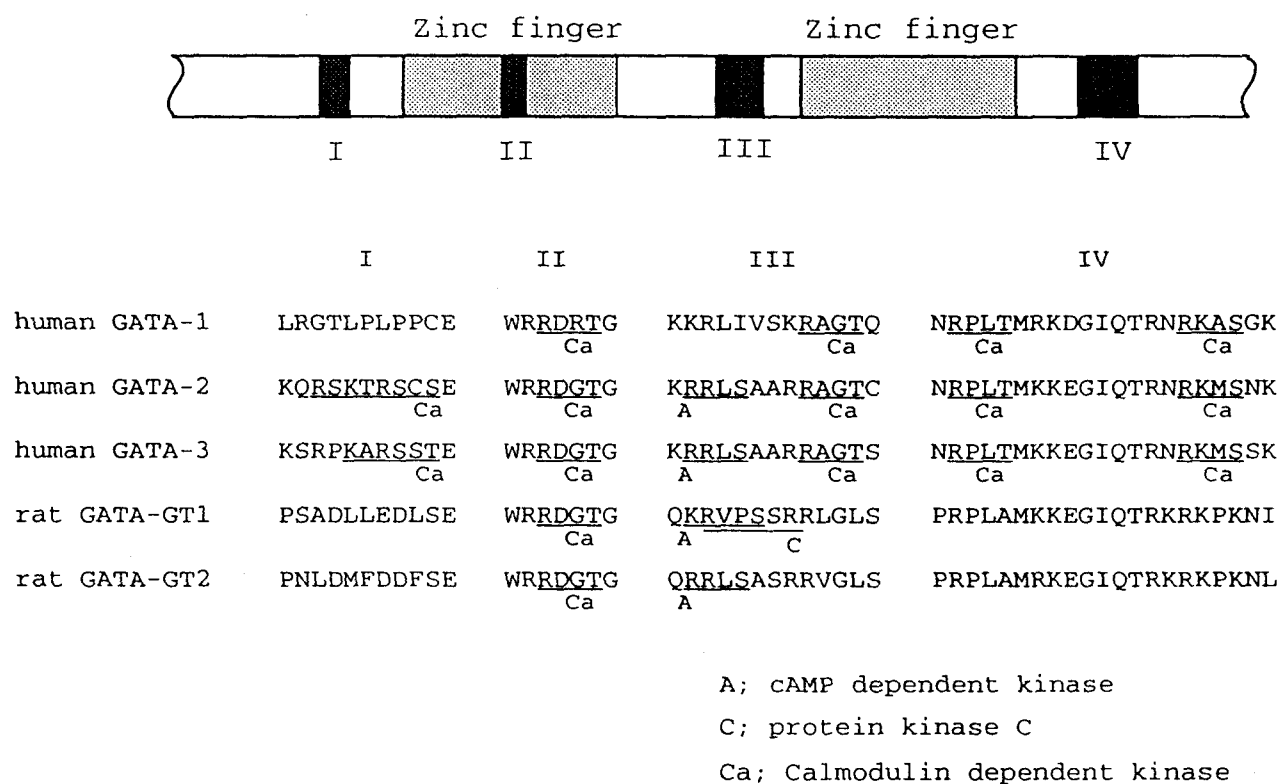


図 4-4 GATA-GT1、GATA-GT2、GATA-1、GATA-2、GATA-3蛋白質の推定リン酸化部位

ヒトのGATA-1(98)、GATA-2(100)、GATA-3(102)とラットのGATA-GT1、GATA-GT2の亜鉛フィンガードメイン近傍を模式的に表わした。プロテインキナーゼによってリン酸化され得る残基を含む領域をI, II, III, IVとしてそれぞれアミノ酸配列を比較した。プロテインキナーゼAによりリン酸化され得る配列 [RRXSまたはKRXXS] (18)をAと下線で示した。プロテインキナーゼC [RXXSXR] (18)およびカルモデュリン依存性キナーゼ [RXX(S/T)] (18)でリン酸化され得る配列をそれぞれCと下線、Caと下線で示した。

図4-5 GATA-GT1、GATA-GT2およびヒトGATA結合蛋白質の一次構造の比較

- A. ラットのGATA-GT1、GATA-GT2およびヒトのGATA-1(98)、GATA-2(100)、GATA-3(102)のアミノ酸配列を比較し、亜鉛フィンガードメインを四角で囲んで示した。
- B. 上のGATA結合蛋白質についてアミノ酸配列の相同性を示した。Zは亜鉛フィンガードメイン、Nはそれよりもアミノ末端側、Cはカルボキシル末端側の相同性を比較している。

A.

human	GATA-2	1	:	MEVAPEQPGWMAHPAVLNAQHPDSSHHPGLAHNYMEPAHVLPDDEVDFFN
human	GATA-3	1	:	MEVTADQPRWVSH-HHPAVLNGQHPDTH
human	GATA-1	1	:	MEFPGLGSLGTSEPL
human	GATA-2	51	:	HLDSQGNPYANPAQRGVSYS PAHARLTGGQMCRPHLLHSPGLPWLDGGK
human	GATA-3	28	:	HPGLSHSYMDAAQYPLPEEVDVLFNIDGQGNHVPPYGNVSRATVQRYPP
rat	GATA-GT2	1	:	MYQSLAMAANHGPPPGAYEAGGPGAFM
human	GATA-1	16	:	PQFVDPALVSSTPESGVFFPSGPEGLDAAAASSTAPSTATAAAAAALAYYRD
human	GATA-2	101	:	AALSAAHKKTWTVSPFSKTPHPSAAGGPGGHSLSCTQGLGVGGSSGSSV
human	GATA-3	78	:	THHSQVCRPPLLHGSLPWLDGGKALGSHHTASPNLSPFSKTSIHHGSP
rat	GATA-GT1	1	:	MLPGLPYLQAGSGSPSNHAGGAGAHPGWPQASAPSPPYGGGAAGGGAAG
rat	GATA-GT2	28	:	HSAGAASSPVYVPTPRVPSSVLGLSYLQGGGGAASGATSGGSSGAGPSG
human	GATA-1	66	:	AEAYRHSPVFQVYPLLNCMEGIPGGSPYAGWAYGKTGLYPASTVCPTRD
human	GATA-2	151	:	ASLTPTAAHSGSHLFGFPPRHPKELSPDPSTTGAASPASSSAGGSSARGE
human	GATA-3	128	:	GPLSVYPPASSSSLSGGHASPHLFTFPPTPPKDVSPDPSLSTPGSAGSAR
rat	GATA-GT1	51	:	PGGAGSATAHASARFPYSPSPMANGAARDPGGYVAAGGAGAGSVSGGGG
rat	GATA-GT2	78	:	AGPGTQQGSPGWSQAGAEGAAYTPPPVSPALLLPGDYWVPRAAAAAAR
human	GATA-1	116	:	SPPQAVEDLDGKGSTSFLETLKTERLSPDLLTLGPALPSSLPVPNSAYGG
human	GATA-2	201	:	DKDGVKYQASLTESMKMESGRPLRPGLATMGTQPATHHPIPTYPSYVPAA
human	GATA-3	178	:	QDEKECL--KYQVPLPDSMKLESSHSRGSMTALGGASSSTHHPIITTYPPY
rat	GATA-GT1	101	:	GSLAAMGGREHQYSSLSAARPLNGTYHHHHHHHPTYSPLYMGAPLTPAWPA
rat	GATA-GT2	128	:	EAAAYSSSGGAAGLAGREQYGRRASAGSYSSPYPAYMADVGASWAAAA
human	GATA-1	166	:	PDFSSTFFSPTGSPLNSAAYSSPKLRGTLPLPPEARECVNCGATATPLW
human	GATA-2	251	:	AHDYSSGLFHPGSFLLGGPASSFTPKQRSKTRSCSEGRECVNCGATATPLW
human	GATA-3	226	:	VPEYSSGLFPPSSLLGGSPGFGCKSRPKARSSTEGRECVNCGATSTPLW
rat	GATA-GT1	151	:	GPFETPVLHSLQSRAGAPLPVPRGSPADLLEDLSEGRECVNCGSIQTPLW
rat	GATA-GT2	178	:	AASAGPFDSVPLHSLPGRANPARHPNLDMFDDFSEGRECVNCGAMSTPLW

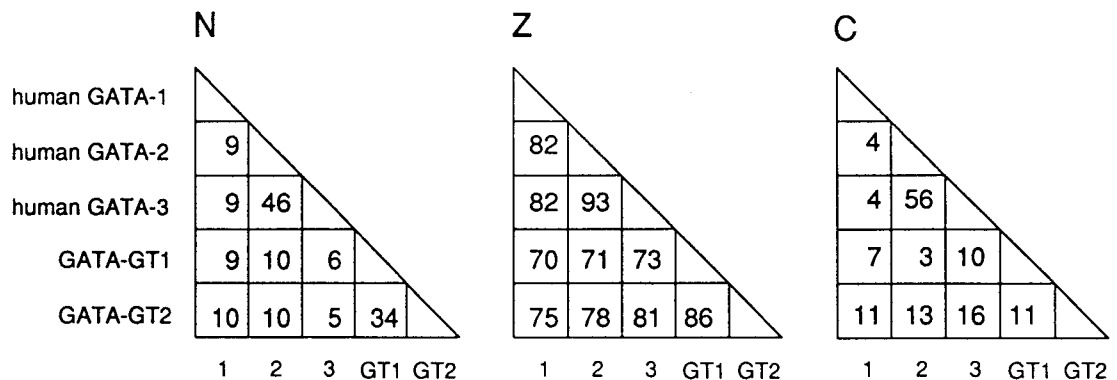
human GATA-1 216 : RRDRTGHYLCNACGLYHKMNGQNRPLIRPKRRLIVSKRAGTQCTNCQTTT  
human GATA-2 301 : RRDGTGHYLCNACGFYHKMKGQNRPLIKPKRRLSAARRAGTCCANCQTTT  
human GATA-3 276 : RRDGTGHYLCNACGLYHKMNGQNRPLIKPKRRLSAARRAGTSCANCQTTT  
rat GATA-GT1 201 : RRDGTGHYLCNACGLYSKMNGLSRPLIKPQKRVPSSRRLGLSCANCHTTT  
rat GATA-GT2 228 : RRDGTGHYLCNACGLYHKMNGINRPLIKPQRRLSASRRVGLSCANCQTTT

human GATA-1 266 : TTLWRRNASGDPVCNACGLYYKLHQVNRPLTMRKDGIQTRNRKASGKGKK  
human GATA-2 351 : TTLWRRNANGDPVCNACGLYYKLHNVNRPLTMKKEGIQTRNRKMSNKS  
human GATA-3 326 : TTLWRRNANGDPVCNACGLYYKLHNINRPLTMKKEGIQTRNRKMSNKS  
rat GATA-GT1 251 : TTLWRRNAEGEPVCNACGLYMKLHGVPRLAMKKEGIQTRKRKPKNINKS  
rat GATA-GT2 278 : TTLWRRNAEGEPVCNACGLYMKLHGVPRLAMRKEGIQTRKRKPKNLNKS

human GATA-1 316 : KRGS SLGGTGA AEGPAGGF MVVAGGSGS GNCGEVASGLTLGPPGTAHLYQ  
human GATA-2 401 : SKKGAECFEELSKCMQEKSSPFSAAALAGHMAPMGHLPPFSHSGHILPTP  
human GATA-3 376 : CKKVHDSLEDFPKNSSFNPAALSRHMSSLSHISPFSSHMLTTPTPMHP  
rat GATA-GT1 301 : KACSGNSSVPMPTPTSSSSNSDDCTKNTPPTQSTASGVGASVMSAVGESA  
rat GATA-GT2 328 : KIPAGPPGESLPPSSGASSNSSNATSSSSSSEEMRPIKTEPGLSSHYGHS

human GATA-1 366 : GLGPVVLSPVSHLMPFPGPLLSPTGSFPTGMPPTTSTTVVAPLSS  
human GATA-2 451 : TPIHPSSSLSFGHPPSSMVTAMG  
human GATA-3 426 : PSSLSFGPHHPSSMVTAMG  
rat GATA-GT1 351 : NPENSCLKYSGQDGLYIGVSLSSPAEVTSSVRQDSWCALALA  
rat GATA-GT2 378 : SSMSQTFSTVSGHGSSIHVLSALKLSPQGYPSVPTQTSQASSKQDSWNS  
rat GATA-GT2 428 : LVLADSHGDIYTA

B.



#### 第4節 考察

$H^+/K^+$ -ATPaseの $\alpha$ および $\beta$ サブユニット遺伝子のプロモーター領域に特異的に結合する、胃に特異的なDNA結合蛋白質の結合配列は(G/C)PuPu(G/C)NGAT(A/T)PuPyであることを第3章で明らかにした。本章ではこの結合配列を認識でき、これまでに知られていない新しい蛋白質が、ブタ、ラット、およびマウスに存在することを示した。これらをGATA-GT1、GATA-GT2、GATA-GT3と名付け、ラットの胃からGATA-GT1、GATA-GT2の全長をコードするcDNAを単離し、それらの一次構造を決定した。両者の2つの亜鉛フィンガードメインは、ヒトとマウスのGATA-1、-2、-3と比べ75~81%という高い相同性があった。しかし、それよりもアミノ末端側およびカルボキシル末端側では、GATA-1、GATA-2、GATA-3とは相同性はなかった。したがって、GATA-GT1とGATA-GT2はGATA結合蛋白質ファミリーに属する蛋白質と考えてよいが、これまでに知られていない転写調節を行っている蛋白質であると結論した。

ヒスタミンはH<sub>2</sub>受容体を介してアデニル酸シクラーゼを活性化し、細胞内cAMP量を上昇させる。これにともないプロテインキナーゼAが活性化され胃酸分泌が促進されることができ(52)。GATA-GT1およびGATA-GT2のいずれにも、プロテインキナーゼAによってリン酸化され得るSer残基(18) (それぞれSer-234とSer-261)が存在していた。これらのSer残基は2個の亜鉛フィンガーの間に存在しており、この残基がリン酸化されることによって2個の亜鉛フィンガードメインの立体構造が変化し、DNA結合活性が調節されている可能性がある。したがってGATA-GT1あるいはGATA-GT2がプロ

テインキナーゼAによってリン酸化され、転写を活性化し、 $H^+/K^+$ -ATPase $\alpha$ サブユニットのmRNAの転写量が増加すると考えることができる。

実際に、ヒスタミンをイヌより単離した壁細胞に作用させると、 $H^+/K^+$ -ATPaseのmRNAがほぼ2倍に増加するという報告がある(52)。しかし $\beta$ アクチン等他のmRNAも同時に増加しており、この結果が壁細胞における特異的な転写制御を反映しているかは疑問がある。DNA結合に関与している亜鉛フィンガードメインのリン酸化は、むしろDNAの負電荷と反発し結合には不適と考えることができる。したがってこの領域のリン酸化がGATA-GT1蛋白質の不活化に関与し、脱リン酸化がヒスタミンで促進されてもよいだろう。

胃酸分泌は、ガストリンやアセチルコリンによっても促進される。ガストリンやアセチルコリンは細胞内 $Ca^{2+}$ 濃度の上昇を引き起こす。したがって胃酸分泌の調節にはカルモデュリン依存性キナーゼの関与も考えられる。GATA-GT1およびGATA-GT2がリン酸化によって調節されているかどうかは今後詳しく検討していかなければならない。

## 第5章 GATA-GT1およびGATA-GT2のH<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase遺伝子プロモーター 領域への結合

### 第1節 緒言

亜鉛フィンガー構造を持つ転写調節因子にはGATA結合蛋白質(67)、Sp1 (64)、TFIIIA (65)、グルココルチコイド受容体 (66) 等があり、この構造がDNAへの結合に関与していることが知られている。GATA結合蛋白質には亜鉛フィンガー(CXXC-X<sub>17</sub>-CXXC)が2箇所存在しており、それぞれのDNA結合領域としての機能が調べられている(108)。カルボキシル末端側の亜鉛フィンガーは、マウスGATA-1因子のGATA配列への結合に必須である(108)。これに対して、アミノ末端側の亜鉛フィンガーはDNAへの結合の特異性や安定性に関与してはいるが、これのみではGATA配列への結合能はないことが報告されている(108)。またSp1やTFIIIAでは亜鉛フィンガーは3箇所存在するが、DNAへの結合には3箇所とも必須であり、さらに亜鉛フィンガーのループ構造の部分がDNAへの結合の特異性を決定していることが明らかにされている(109)。このようにGATA1、Sp1、TFIIIAにおいて亜鉛フィンガー構造はDNA結合ドメインとして機能していることが示されている。

本研究で単離したcDNAのコードする2つの蛋白質GATA-GT1、GATA-GT2はヒトGATA-1(98)とそれぞれ70%と75%の相同性のある亜鉛フィンガードメインを持っている。これら単離した蛋白質が、H<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPaseのαやβサブユニット遺伝子(48, 53, 57)のプロモーター領域にある、胃の核蛋白質の結合配列 [(G/C)PuPu(G/C)NGAT(A/T)PuPy] に結合するかどうかを検討する必要がある。そこでGATA-GT1およびGATA-GT2の、DNA結合ドメインと考えられる亜鉛フィンガードメインと周辺の配列をコードするDNA断片をプラスミドに組み入れ大腸菌に発現させ、得られた蛋白質のDNA結合活性を検討した。そ

の結果、GATA-GT2は確かに(G/C)PuPu(G/C)NGAT(A/T)PuPy配列を認識した。この事実は、少なくともGATA-GT2が*in vivo*でGATA-1、GATA-2、GATA-3と同様にDNA結合蛋白質として機能していることを示唆している。

## 第2節 材料および方法

### 1. 発現ベクターと菌株

本章で発現ベクターとして用いたpT7-7は、T7プロモーターの支配下にSD配列および翻訳開始メチオニンがあり、その下流に*NdeI* 部位から*Clal* 部位まで66bpのクローニング部位(multi-cloning site)を持っている。同時にプラスミド保持菌を選択するための、アンピシリン耐性遺伝子が存在している(110)。クローニング部位の下流にGATA-GT1、あるいはGATA-GT2を導入し、これを宿主として大腸菌BL21株 (F'-*ompT rBmB*) に発現させた。BL21株はクロラムフェニコール耐性株であり、さらにLonプロテアーゼおよびOmpTプロテアーゼを欠損している。この株にIPTG (isopropyl-1-thio- $\beta$ -D(-)-galactopyranoside) を加えるとT7RNAポリメラーゼが誘導され、T7プロモーター支配下の遺伝子を選択的に転写させることができる(111)。

### 2. GATA-GT1およびGATA-GT2蛋白質の誘導産生

L broth (10 g/l ポリペプトン、5 g/l 酵母エキス、5 g/l NaCl) に、100  $\mu$ g/mlアンピシリンおよび25  $\mu$ g/mlクロラムフェニコールを加え。GATA-GT1もしくはGATA-GT2を持つ組み換えプラスミドを導入したBL21株を、650 nmの濁度が0.8になるまで37°Cで培養



した後、最終濃度が0.4 mMとなるようにIPTGを加え37℃で2時間培養しGATA-GT1もしくはGATA-GT2を誘導した(111)。

### 3. 大腸菌の粗抽出液の調製(112)

GATA-GT1あるいはGATA-GT2をcDNAから転写させた後、1.2mlの培養液をとり8,000×gで2分間遠心した。回収した大腸菌を100 $\mu$ lの緩衝液A [50 mM Tris (pH7.5), 1 mM EDTA, 1 mM DTT, 1 mM PMSF (phenylmethanesulfonyl flouride) ] に懸濁した。液体窒素を用いて凍結融解を素速く3回繰り返す、リゾチームを0.5 mg/mlとなるように加え、4℃にて15分保温した。これに塩化ナトリウムを1 Mとなるように加え、4℃にて15分保温した。15,000×gで30分間遠心後、上清を回収し、緩衝液Aに対して1時間透析した。透析後15,000×gで10分間遠心し、上清を20 $\mu$ lずつに分注し、液体窒素を用いて急速に凍結させ、-70℃にて保存した。

### 4. DNA結合活性の検出

ジェルシフト法(94)によるDNAとの結合反応および電気泳動は、第4章に述べた方法に従った。プローブはラットH<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase  $\beta$ サブユニットのプロモーター領域の*StyI-PstI*断片 (195bp) を用いた (図3-6)。

### 第3節 結果

#### 1. ラットGATA-GT1およびGATA-GT2蛋白質の大腸菌における誘導産生

ラットGATA-GT1の亜鉛フィンガードメインを含む領域（Ala31～Ala391）をコードするcDNA（*Stu* I-92～*Stu* I-1202）を、発現ベクターpT7-7の*Eco*RI部位に挿入しpT7-7GT1を作成した。同様に、GATA-GT2のAla126～Gly369をコードするcDNA（*Sma* I 380～*Sma* I 1104）をpT7-7の*Sma* I 部位に挿入し、pT7-7GT2を作成した。各組換えプラスミドの制限酵素地図を作成するとともに塩基配列を決定し、GATA-GT1およびGATA-GT2の亜鉛フィンガードメインが、翻訳される向きに挿入されていることを確認した。各組換えプラスミドおよびベクターpT7-7を大腸菌BL21株に導入し、得られた形質転換株(BL21/pT7-7GT1, BL21/pT7-7GT2, BL21/pT7-7)を以下の実験に用いた。

BL21/pT7-7GT1, BL21/pT7-7GT2, BL21/pT7-7を37℃で650nmの濁度が0.6～0.8になるまで培養し、IPTGを添加しT7ポリメラーゼを誘導した。37℃でさらに2時間培養し、T7プロモーター支配下の挿入配列を転写させた。pT7-7GT1は、GATA-GT1の配列（Ser32～Ala391）の両端にそれぞれ5残基と7残基のpT7-7ベクター由来のアミノ酸を持った融合タンパク質をコードしている。同様にpT7-7GT2は、GATA-GT2の配列（Glu368～Pro368）の両端に5残基と18残基のアミノ酸残基を持つ融合タンパク質をコードしている。ベクターであるpT7-7はT7プロモーターの下流にGATA-GT1、GATA-GT2とは無関係の32残基のアミノ酸残基をコードしている。それぞれの大腸菌の粗抽出液を調製し、組み換えプラスミドのコードする蛋白質がDNAに結合するかどうかをジェルシフト法によって検出した。

## 2. GATA-GT 1 およびGATA-GT2蛋白質のH<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase βサブユニット遺伝子のプロモーター領域への結合

組み換えプラスミドpT7-7GT1およびpT7-7GT2にコードされているラット

GATA-GT 1 およびGATA-GT2蛋白質がH<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPaseのβサブユニット遺伝子上流領域に結合するかどうかを解析した。プローブとして、ラットのβサブユニット遺伝子のプロモーター領域のStyI-PstI断片(195bp)を用いた(図3-5、レーン1)。BL21/pT7-7GT1, BL21/pT7-7GT2, BL21/pT7-7株から細胞抽出液を調製した。BL21/pT7-7GT2の抽出液にはプローブと結合する蛋白質が検出できた(図5-1、レーン5, 6, 7)。このDNA-蛋白質複合体は、ラット胃の核抽出液で認めたものとほぼ同じ移動度を示す3本のバンドとして検出できた。対照としたBL21/pT7-7(ベクター)の抽出液には、プローブに結合する蛋白質は存在しなかった(図5-1;レーン2, 3, 4)。したがってプラスミドpT7-7GT2からGATA-GT2のDNA結合ドメインが転写され、さらに大腸菌細胞内で翻訳されプローブDNAと複合体を形成したことを示している。一方、BL21/pT7-7GT1の抽出液には、プローブと結合する蛋白質を検出することができなかった。これはおそらく発現した蛋白質が不安定であるためか、大腸菌体成分によって結合が阻害されたためと考えている。

第3章でラットの胃の核より調製した核蛋白質の中に、H<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPaseのαおよびβサブユニット遺伝子のプロモーター領域上の(G/C)PuPu(G/C)NGAT(A/T)PuPy配列に結合するDNA結合蛋白質を見出した。大腸菌体内で合成されたGATA-GT2が、どのようなDNA塩基配列を認識しているのか、その特異性を調べるために合成オリゴヌクレオチドをcompetitorとしてジェルシフト法の反応液中加入した。上と同様の実験(図5-2;レーン1, 2, 3)の後に、(G/C)PuPu(G/C)NGAT(A/T)PuPy配列を持ったラットαおよびβサブユ

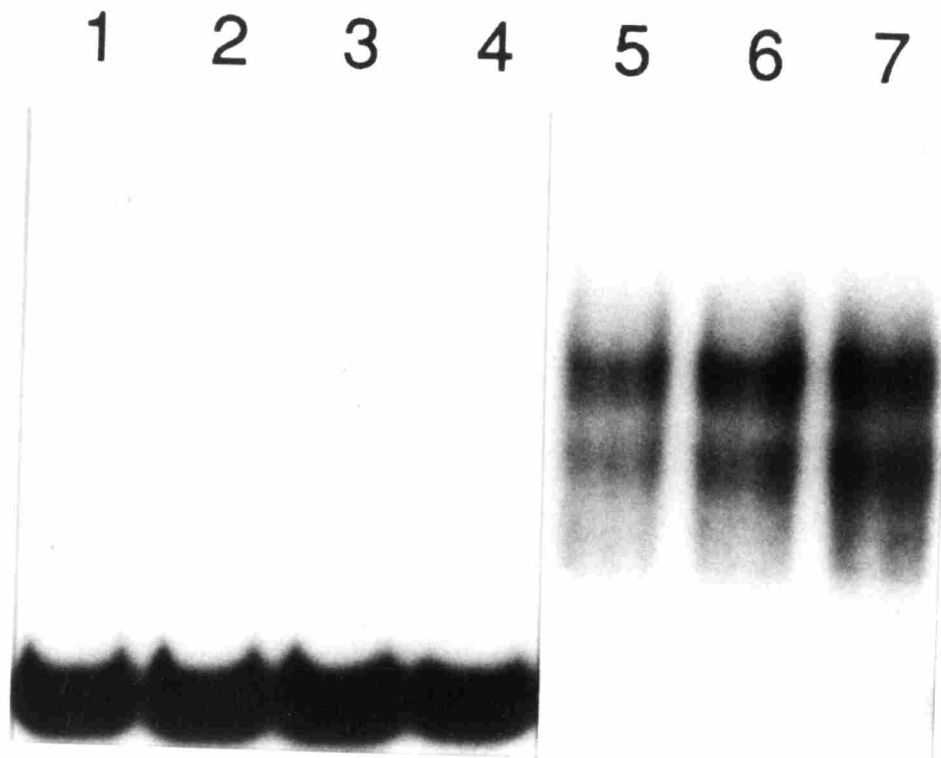


図5-1 GATA-GT2蛋白質のDNAへの結合

ラットH<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPaseのβサブユニット遺伝子上流 [*StyI*(-180)から*PstI*(+8), 図3-5参照] のDNA断片(0.1 p mol)を放射標識し、プローブとした。これに、BL21/pT7-7の抽出液 [0 μg, 1.2 μg, 2.4 μg, 4.8 μg (それぞれレーン1, 2, 3, 4に対応)]、あるいはBL21/pT7-7GT2の抽出液 [1.2 μg, 2.4 μg, 4.8 μg蛋白質 (それぞれレーン5, 6, 7に対応)] を加えた。BL21/pT7-7GT2の抽出液に含まれるGATA-GT2とプローブが結合し、シフトしたバンドが、5、6、7で検出できた。なお、ここで用いたGATA-GT2は、Ala126-Gly369の部分ペプチドである。

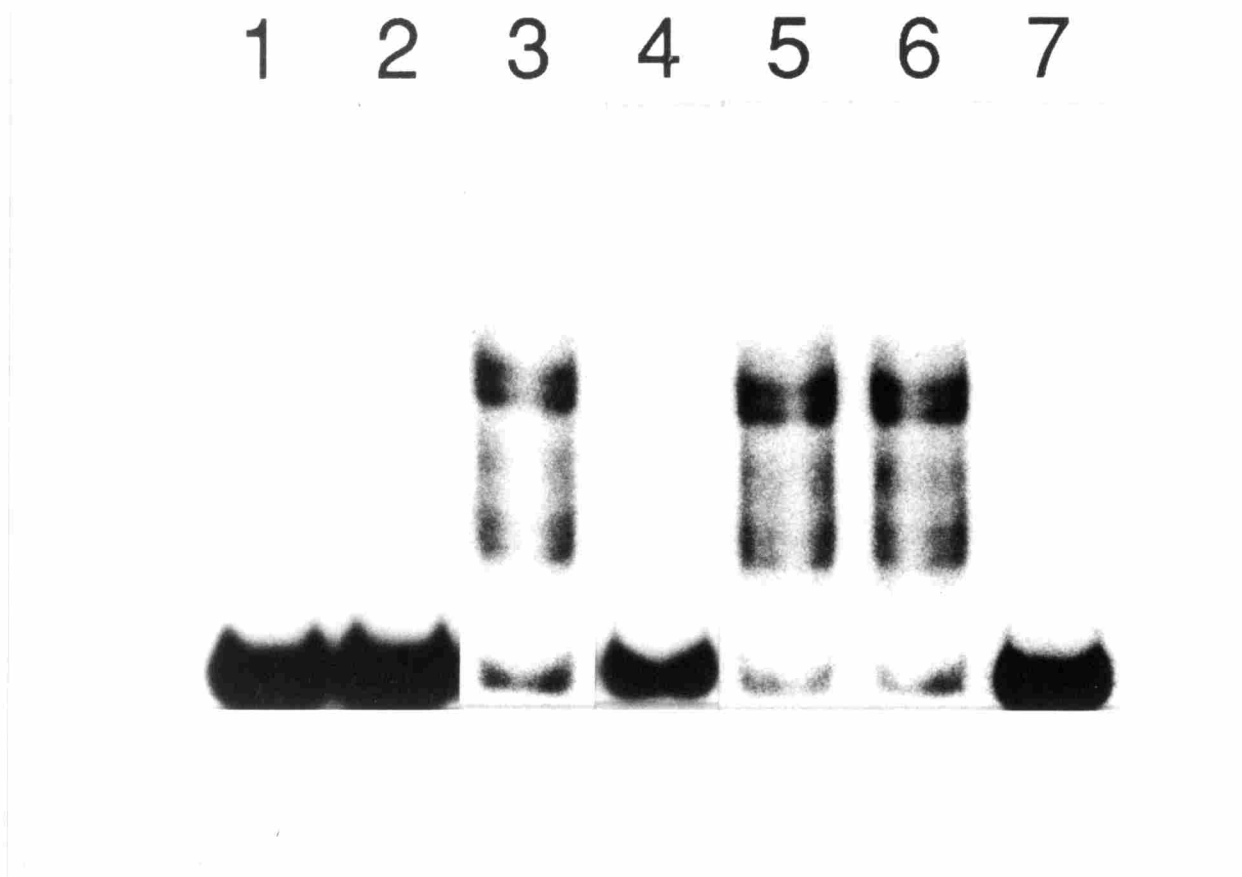


図5-2 GATA-GT2蛋白質の $H^+/K^+$ -ATPaseの $\alpha$ および $\beta$ サブユニット遺伝子のプロモーター領域への結合

ラット $H^+/K^+$ -ATPaseの $\beta$ サブユニット遺伝子上流 [StyI(-180)からPstI(+8), 図3-5参照] のDNA断片(0.1 pmol)を放射標識し、GATA-GT2を含むBL21/pT7-7GT2の抽出液(1.2  $\mu$ g)に加えた。GATA-GT2とDNA断片の結合によってシフトしたバンドが、レーン3、5および6に見られる。レーン1はプローブのみのコントロールを示す。レーン2はGATA-GT2を含まないBL21/pT7-7の抽出液(1.2  $\mu$ g)を用いた。competitorとしてR $\alpha$ 1(レーン4), R $\alpha$ 2(レーン5), R $\beta$ 1(レーン6), R $\beta$ 2(レーン7) (図3-3および3-5参照)を加えた。なお、ここで用いたGATA-GT2はAla126-Gly369残基の部分ペプチドである。

ニット遺伝子の配列 ( $R\alpha 1$ ,  $R\beta 2$ ) を competitor として加えると、BL21/pT7-7GT2の抽出液に存在するDNA結合蛋白質とプローブの結合は検出できなくなった(図5-2、レーン4, 7)。結合配列を持たないDNA ( $R\alpha 2$ ,  $R\beta 1$ ) を加えても結合阻害は認められなかった(図5-2、レーン5, 6)。すなわち $R\alpha 1$ と $R\beta 2$ はプローブと競合し、DNA結合蛋白質とプローブの結合は見られなくなった。したがって、BL21/pT7-7GT2の抽出液に存在するGATA-GT2 DNA結合蛋白質は、(G/C)PuPu(G/C)NGAT(A/T)PuPy配列を認識して特異的に結合すると結論した。興味深いことに $\alpha$ グロビンのGATA結合配列 $G\alpha 2(113)$ も competitor となった。この配列はCGGGCAACTGATAAGGATTCCであり(G/C)PuPu(G/C)NGAT(A/T)PuPyと非常に似ている。これはGATA-GT2がGATA結合モチーフ(A/T)GATA(A/G)を認識しているためであると考えられる。

#### 第4節 考察

GATA結合蛋白質では、2つの亜鉛フィンガーが、DNA結合ドメインとして機能していることが報告されている(108)。同様にGATA-GT1およびGATA-GT2においても亜鉛フィンガーがDNA結合ドメインとして機能していると推定できる。実際、GATA-GT2の亜鉛フィンガードメインを含む領域Ala126~Gly369を大腸菌において発現させ、DNA結合の特異性について検討し、GATA-GT2はラット $\beta$ サブユニットのプロモーター領域に特異的に結合できたと結論した。その結合部位は、ラットおよびブタから調製した胃に特異的なDNA結合蛋白質の結合配列(G/C)PuPu(G/C)NGAT(A/T)PuPyと同じであった。したがってGATA-GT2は、第3章で述べた胃に特異的なDNA結合蛋白質の一つであると結論できた。

本章で大腸菌において発現させた蛋白質は、GATA-GT1およびGATA-GT2の全長ではなく亜鉛フィンガードメインおよびその両側の一部を含んだ部分である。上に述べたようにGATA-GT2ペプチドはDNAに結合することができた。これは亜鉛フィンガーだけでDNAに結合できることを示している。同様な結果がGATA-1において得られている(108)。第4章で考察したように、GATA-GT1およびGATA-GT2の亜鉛フィンガードメインよりアミノ末端側では、ヒスチジン残基やアラニン残基のクラスター、カルボキシル末端側ではセリン残基に富んだ領域が存在している。これらの構造がDNAへの結合に重要な役割を果たしている可能性があり、2つのDNA結合蛋白質の全長を発現できる系を構築する必要がある。特にGATA-GT1の部分ペプチドはDNA結合活性を示さなかったが、全長を発現させて検討することが必要である。

## 第6章 GATA-GT1およびGATA-GT2遺伝子の転写の臓器特異性

### 第1節 緒言

本研究で一次構造を明らかにしたGATA-GT1、GATA-GT2蛋白質は亜鉛フィンガードメインを持つ新しいDNA結合蛋白質である。cDNAを大腸菌に転写翻訳させて得られたGATA-GT2ペプチドは、胃に特異的なDNA結合蛋白質の結合配列(G/C)PuPu(G/C)NGAT(A/T)PuPyに結合した。3章で述べた胃の核抽出液

に存在するDNA結合蛋白質は胃にのみ存在し、肝臓、脳、腎臓、肺、脾臓の核抽出液には検出できなかった。したがって、GATA-GT1とGATA-GT2が、胃の核抽出液に存在する蛋白質に対応し得るものかどうかをmRNAレベルで各臓器における局在性を検討した。

本章では、ラットの各組織（胃、肝臓、脳、腎臓、精巣、肺、脾臓、腸、心臓）とブタ胃の粘膜層および筋肉層から総RNAを調製し、GATA-GT1およびGATA-GT2に対応するmRNAが転写されているかどうか検討した。



## 第2節 材料および方法

### 1. ラットとブタの各臓器からの総RNAの調製

ラットの胃 1.7 g、脳 1.3 g、腎臓 1.1 g、精巣 1.4 g、肺 1.1 g、肝臓 1.8 g、腸 1.8 g、脾臓 0.7 g、心臓 0.7 g およびブタの胃の粘膜部分 1.4 g、筋肉部分 1.3 g から総RNAを第5章の第2節に示した方法で調製した。得られた総RNAは以下のようなものである。ラット胃, 2.4 mg; 脳, 1.1 mg; 腎臓, 2.0 mg; 精巣, 2.1 mg; 肺, 0.4 mg; 肝臓, 5.0 mg; 腸, 3.2 mg; 脾臓, 0.4 mg; 心臓, 0.4 mg; ブタの胃の粘膜部分, 1.0 mg; 筋肉部分, 0.4 mg.

### 2. Northern Hybridization

#### (I) RNAの変性

各臓器から調製した総RNAを、ホルムアルデヒドとホルムアミドを用いて変性させた。20  $\mu$ gの総RNAを6  $\mu$ lの変性用緩衝液 [20 mM MOPS-NaOH pH7.0、5mM 酢酸ナトリウム、1 mM EDTA、50 %ホルムアミド、17%ホルムアルデヒド] に溶かし、60°Cで7分間放置した。熱処理後直ちに氷上で冷却し、4  $\mu$ lの緩衝液 [0.1% BPB、80 %グリセロール] を加えた。

## (II) アガロースゲル電気泳動

泳動用緩衝液×10 [0.2 M MOPS-NaOH pH7.0、50 mM 酢酸ナトリウム、10 mM EDTA-3Na] を調製し、10倍希釈した後用いた。1.2%アガロースゲルの作製は以下のようにして行った。タイプII電気泳動用アガロース(SIGMA)を1.2g、泳動用緩衝液×10を10ml、これに純水を72ml加え、120℃、2気圧 5分間 処理しアガロースを溶解した後、約60℃になるまで冷却し17.9 mlのホルムアルデヒドを加えた。電気泳動装置に流し込み、アガロースを固めた。

変性させたRNAをゲルに上層し電圧は50Vをかけ、サンプルがゲルに入ってから100Vにて約1時間泳動した。泳動後、サイズマーカー用のレーンを切りとって1 $\mu$ g/ml エチジウムブロマイドによって染色した。

## (III) RNAのプロッティングおよびフィルターの前処理

ゲルを20×SSCに室温で30分間浸した後、ニトロセルロースフィルター上へ12～15時間プロッティングした。風乾させた後ペーパーフィルターの間にはさみ、2枚のガラス板にはさんで吸引オーブン中で80℃で4時間処理した。Hybridization用の溶液 [50%ホルムアミド、5×SSC、0.1%SDS、1×Denhard't、50mM Na-Phosphate pH6.5、200 $\mu$ g ssDNA/ $\mu$ l] 中で42℃、4時間のprehybridizationを行った。

#### (IV) ハイブリダイゼーションおよびフィルターの洗浄

GATA-GT1蛋白質のプロープは*Pst* I(1,032)-*Pst* I(1,575) (図4-3A)断片を、GATA-GT2のプロープは*Pst* I(163)-*Pst* I(390) (図4-3B)断片を、Boehringer Mannheim社製 Random Priming Labeling Kitを用いて [ $\alpha^{32}$ P] -dCTPを取り込ませることによって標識した。95°Cで5分間熱変性し、氷上で急冷したプロープを1mlのhybridization用溶液に加え ( $2.5 \times 10^6$  cpm/ml) あらかじめ42°Cにて保温した。これにフィルターをいれ、42°Cで12時間放置した。

次にフィルターを、2×SSC, 0.1% SDS溶液にて室温で15分洗浄した。放射活性を測定しながら洗浄を行い、フィルターの放射活性が約500cpm以下になるまで、0.1×SSC, 0.1% SDS溶液にて室温15分、もしくは0.1×SSC, 0.1% SDS溶液にて42°Cで15分間洗浄した。フィルターを風乾した後、オートラジオグラフィーを行った。

### 第3節 結果

#### 1. GATA-GT1およびGATA-GT2遺伝子の転写の臓器特異性

GATA-GT1とGATA-GT2の一次構造を比較すると亜鉛フィンガードメインにおいてアミノ酸残基で86%、ヌクレオチドで70%の相同性がある。しかしながらこの領域以外では、2つの蛋白質の一次構造の相同性は低い(図4-5)。そこでNorthern Hybridizationのプロープとして、2つの蛋白質で相同性の最も低い領域を用いた。GATA-GT1のAla-344からAla-391および3'非コード領域に対応する544bpのDNA断片

(1,032~1,575bp) (図4-3A) をGATA-GT1に対する特異的なプローブとした。  
GATA-GT2はGln-55からAla-130の部分をコードする、228bpのDNA断片 (163~390bp)  
(図4-3B) をプローブとした。

ラットの各臓器から総RNAを調製し、ホルムアルデヒドによって処理した後  
1.2%アガロースにて電気泳動を行った。ニトロセルロースフィルターに転写した後、2つ  
の特異的なプローブでhybridizationを行った。その結果、GATA-GT1およびGATA-GT2の特  
異的なプローブと強くhybridizeするバンドを、胃で検出できた (図6: A, レーン1; B,  
レーン1)。これらのバンドは28Sおよび18SリボゾームRNAと比較して、GATA-GT1で  
約3,300ヌクレオチド、GATA-GT2では約3,600ヌクレオチドの長さに対応していた。  
GATA-GT2の場合には、短い転写産物 (1500ヌクレオチド) が認められる。また胃に比べ  
て少量ではあるが、腸でもバンドを検出できた (図6-1: A, レーン7; B, レーン7)。し  
かしその他の臓器 (脳、腎臓、肝臓、肺、脾臓、心臓) では検出できなかった (図6:  
A, レーン2~6, 8, 9; B, レーン2, 3, 5, 6, 8, 9)。このことは、GATA-GT1および  
GATA-GT2のmRNAが主として胃で、また弱いながらも腸で発現していることを示してい  
る。精巣では、腸よりも弱いGATA-GT2のシグナルが認められた (図6: B, レーン4)。

胃は、壁細胞の存在する粘膜層とその外側の筋肉層からなっている。ラットの  
胃は、この2つの層を分けて調製するのは困難である。したがって上に述べたラットの胃  
の総RNAは、2つの層に由来するものが含まれている。そこで粘膜部分と筋肉部分の分  
離を容易にできるブタの胃を用いて、2つの層から総RNAを調製し、Northern  
Hybridizationを行った。その結果、GATA-GT1およびGATA-GT2のプローブとhybridizeする  
RNAは、胃の粘膜部分に存在していた (図6: A, レーン10; B, レーン10)。このRNA  
は、GATA-GT1で3,300ヌクレオチド、GATA-GT2で約4,600ヌクレオチドと2,100ヌクレオ  
チドの長さであった。筋肉層では検出できなかったことから、GATA-GT1および  
GATA-GT2の遺伝子は胃酸分泌酵素の存在する粘膜部分でのみ転写されていると結論し  
た。

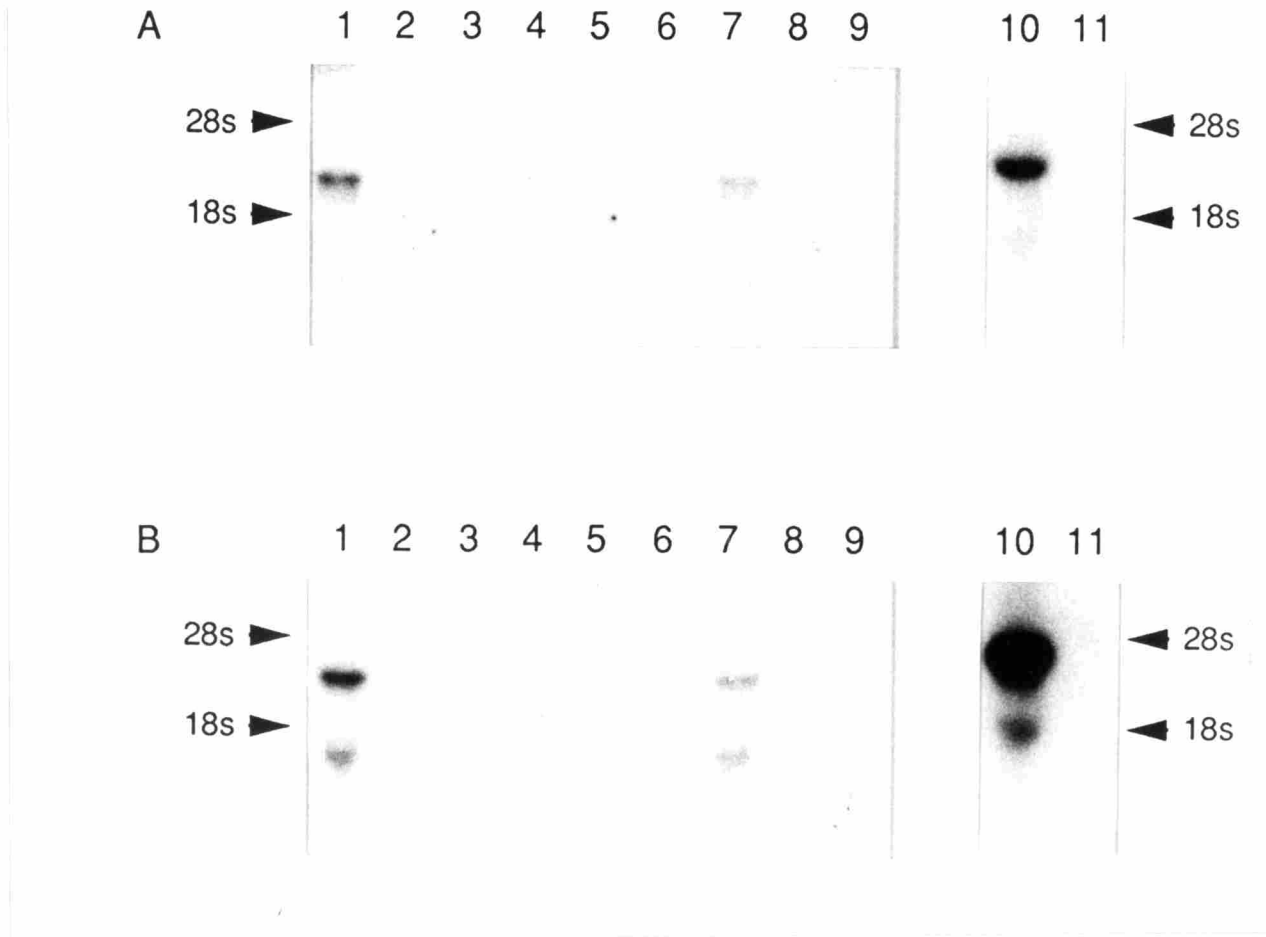


図6 GATA-GT1およびGATA-GT2遺伝子の転写の臓器特異性

ラットの胃、脳、腎臓、精巣、肺、肝臓、腸、ひ臓、心臓（それぞれレーン1～9に対応）、およびブタ胃の粘膜層（レーン10）、筋肉層（レーン11）から総RNAを調製しNorthern blot hybridizationを行った。A. GATA-GT1に特異的な領域（1,032～1,575 bp, Ala344-Ala391に対応）（図4-3）をプローブとした。B. GATA-GT2に特異的な領域（163～390bp, Leu54-Ala130に対応）（図4-3）をプローブとした。マーカーとしてリボゾームRNA（28Sと18S）の泳動位置を示した。転写産物はラット胃（レーン1）およびラット腸（レーン7）に見られる。ブタの胃では粘膜層（レーン10）に転写産物が見られる。

#### 第4節 考察

本章でNorthern Hybridizationを行った結果、GATA-GT1およびGATA-GT2の mRNAは胃（粘膜）で強く、そして非常に弱いながらも腸で発現されていることを明らかにした。GATA-GT2は精巣にも検出できた。これまでに胃を含め消化管に存在するDNA結合蛋白質に関する報告は、なされていなかった。GATA-GT1およびGATA-GT2は、消化管特異的に存在する転写調節因子と考えられるDNA結合蛋白質である。GATA-GT1およびGATA-GT2は、GATA結合蛋白質GATA-1、GATA-2、GATA-3と比較して、亜鉛フィンガードメインで66から81%という高い相同性を持っていた。GATA-1蛋白質は赤芽球において見いだされ、造血系細胞の分化の制御に関与している転写調節因子である。GATA-1はその後、肥満細胞や巨核細胞でも発現している(107)。GATA-2は血管内皮細胞(100)、GATA-3はTリンパ球で発現しているが、他の臓器においても報告されている(101)。既に4章で示したようにGATA-2、GATA-3は胃粘膜において転写されており、両者が実際にどのような遺伝子の転写を調節しているか興味深い。GATA-GT1、GATA-GT2、GATA-2、GATA-3が胃粘膜において実際に転写を調節している機構を明らかにしなければならないと考える。

既に3章で述べたように $H^+/K^+$ -ATPase遺伝子のプロモーター領域に結合するDNA結合蛋白質は胃にのみ存在し、肝臓、脳、腎臓、肺、脾臓の核抽出液では検出できなかった。したがって主として胃粘膜に発現しているGATA-GT1とGATA-GT2は、胃粘膜の核抽出液に特異的に存在し、3章で検出したDNA結合蛋白質に対応し得ると結論した。また腸でGATA-GT1とGATA-GT2が、精巣でGATA-GT2が検出できたのは、おそらくこれらの組織で胃粘膜と同様な遺伝子が転写されているためではないかと考える。本研究の延長としてさらに*in situ*のhybridizationを行いGATA-GT1とGATA-GT2がどのような細胞で転写されているか、明らかにするべく研究を進めている。

## 第7章 総括および展望

### 1. 本研究で得られた成果

胃粘膜に局在する壁細胞は、胃酸（HCl）を分泌している。このうち $H^+$ は $K^+$ との交換輸送によって、 $H^+/K^+$ -ATPaseが細胞外に分泌している。この酵素によって細胞内外の $H^+$ 濃度差は100万倍にまでなり胃内腔は強酸性となる。このような機能から容易に予想できるが、 $H^+/K^+$ -ATPaseは胃において特異的かつ厳密な調節機構によって転写/翻訳されている。したがって $H^+/K^+$ -ATPaseは組織特異的な遺伝子の発現調節機構を解明するうえでよいモデルであると考ええる。

本研究では、 $H^+/K^+$ -ATPaseの2つのサブユニット $\alpha$ および $\beta$ の遺伝子の、壁細胞における特異的な転写調節機構を明らかにすることを最終目的として研究を進めた。焦点を転写調節に関与していると考えられるDNAの上流配列とDNA結合蛋白質に絞って研究を進めた。その結果、以下のような成果を得た。

(A) 第2章に示したように、ヒト $H^+/K^+$ -ATPaseの $\alpha$ サブユニット遺伝子の5'上流域を、胃と肝臓の染色体DNAからそれぞれ単離し、塩基配列を決定した。2つのプロモーター領域の塩基配列は、Alu配列の挿入位置も含め完全に一致した。この結果は、胃において $\alpha$ サブユニット遺伝子が特異的に転写されているのは、胃の染色体DNAの塩基配列が他の組織と異なっているために調節様式が違っているのではなく、胃に特異的に存在する転写調節因子が関与していることを示している。ヒトの $\alpha$ サブユニット遺伝子の5'上流域には、種々の転写調節因子の結合し得る配列が存在している。これらの配列が重要な働きをしているのか、それともいまだ知られていない配列とそこに結合する新しい転写調節因子が存在するのかが問題となった。

(B) 著者が研究を始めた時点で、また現在でも、著者らの研究以外は胃に存在し転写を特異的に調節している蛋白質についての報告はされていない。著者は第3章で示したように、ラット $\alpha$ サブユニット遺伝子のプロモーター領域を用い、ラットの胃の核抽出液にのみ存在して、この遺伝子上流領域に特異的に結合する蛋白質を検出することができた。この蛋白質は、ヒトの遺伝子のプロモーター領域にも結合した。ヒトで1箇所、ラットで2箇所繰り返して保存されているTAATCAGCTG、または逆ストランド側でCAGCTGATTAという配列に結合すると推定した。このDNA結合蛋白質は、ブタの胃粘膜の核抽出液に存在することも確認した。

(C)  $H^+/K^+$ -ATPaseの2つのサブユニット $\alpha$ および $\beta$ の遺伝子は、ともに胃特異的に転写されることを当研究室で明らかにしている(48, 57)。したがって、両サブユニット遺伝子は共通の機構によって発現調節を受けていると考えることができる。そこで $\alpha$ サブユニット遺伝子上流に特異的に結合する蛋白質が、 $\beta$ サブユニット遺伝子のプロモーター領域にも結合し得るかどうかを検討した。その結果、第3章で示したように、この胃に特異的なDNA結合蛋白質は、ラット $\beta$ サブユニット遺伝子のプロモーター領域の3箇所に結合することを明らかにした。この3箇所の塩基配列を比較したところ、GATAGCまたは逆ストランド側でGCTATC配列が保存されていた。この配列が $\beta$ サブユニット遺伝子における結合配列と推定した。 $\alpha$ サブユニット遺伝子のTAATCAGCTGまたは逆ストランド側でCAGCTGATTA配列に結合するものと、 $\beta$ サブユニット遺伝子のGATAGCまたは逆ストランド側でGCTATC配列に結合するものは、同一のDNA結合蛋白質であることを競合実験から示した。すなわち、胃に特異的なDNA結合蛋白質の結合配列は、 $\alpha$ および $\beta$ サブユニット遺伝子で決定した配列の比較から、(G/C)PuPu(G/C)NGAT(A/T)PuPyであることが示唆された。この配列の逆ストランド側



の配列にも結合することができる。このDNA結合蛋白質が胃にのみ存在することから、

(A) の結論ともあわせ、胃における特異的な転写調節を行っている可能性を指摘した。

(D) 胃に特異的に見いだされた蛋白質が結合する推定配列は、主として血液系の細胞で調べられているGATA結合蛋白質 (GATA-1、GATA-2、GATA-3) (99)のものによく似ていた。このことから、胃に特異的な蛋白質のDNA結合ドメインは、GATA-1のものによく似ているものと推測した。そこで第4章で示したように、GATA結合蛋白質のDNA結合ドメインすなわち亜鉛フィンガードメインの部分配列を、ラットおよびマウスの胃、ブタ胃粘膜のcDNAを鋳型として増幅した。この結果、新しい配列を3種類

(GATA-GT1、GATA-GT2とGATA-GT3) 単離することができた。すなわちラットとマウスの胃からGATA-GT1とGATA-GT2、ブタ胃粘膜からGATA-GT1、GATA-GT2、GATA-GT3の3種類を同定することができた。この新しい蛋白質GATA-GT1、GATA-GT2、GATA-GT3が $\alpha$ および $\beta$ サブユニット遺伝子の5'上流域に結合し、転写を調節している可能性を考察した。

(E) 次にラット胃のcDNAライブラリーから、ラットGATA-GT1およびGATA-GT2の全長をコードしているcDNAクローンを単離し、決定した塩基配列から一次構造を推定した。GATA-GT1は391アミノ酸残基、GATA-GT2は440アミノ酸残基からなり、両者の亜鉛フィンガードメインはアミノ酸残基のレベルで86%の相同性を持っていた。他の領域では低い相同性 (34%以下) しかなかった。GATA-GT1およびGATA-GT2はGATA結合蛋白質と亜鉛フィンガードメイン以外では相同性はほとんどなく (18%以下)、全く新しい蛋白質であることが明らかとなった。GATA-GT1およびGATA-GT2の二つの亜鉛フィンガーの間に、cAMP依存性プロテインキナーゼによりリン酸化され得る配列(18)が存在していた。また、プロテインキナーゼCやカルモデュリン依存性キナーゼのリン酸部位(18)についても比較し、これらの蛋白質がリン酸化および脱リン酸化を介して調節を受けている可能性を考察した。

(F) GATA-GT1およびGATA-GT2の転写翻訳の組織特異性を調べるために、ラットの胃、肝臓、脳、腎臓、精巣、腸、肺、心臓、脾臓の総RNAを調製した。第5章で示したように、GATA-GT1およびGATA-GT2のmRNAは胃とわずかではあるが腸で検出することができた。GATA-GT2は精巣にも検出した。またブタの胃を粘膜と筋肉に分けて同様に解析したところ、粘膜側においてのみGATA-GT1およびGATA-GT2のmRNAを検出できた。このことは、GATA-GT1およびGATA-GT2が胃において $\alpha$ および $\beta$ サブユニット遺伝子の転写調節に関与し得ることを示している。GATA-GT1およびGATA-GT2蛋白質、は腸においても弱くではあるが発現していた。2つの蛋白質が、腸のどの部分においてどのような遺伝子の発現を調節しているか興味深い。

(G) GATA-GT1およびGATA-GT2蛋白質はその一次構造から、 $\alpha$ および $\beta$ サブユニット遺伝子のプロモーター領域に存在する(G/C)PuPu(G/C)NGAT(A/T)PuPy配列に結合すると推測できた。第6章で示したように、GATA-GT1およびGATA-GT2の亜鉛フィンガードメインを含む配列を大腸菌において発現させた。その結果GATA-GT2は $\alpha$ および $\beta$ サブユニット遺伝子のプロモーター領域の(G/C)PuPu(G/C)NGAT(A/T)PuPy配列に特異的に結合した。ラット胃の核抽出液を用いた結果と比較して、GATA-GT2は第3章で検出した胃特異的DNA結合蛋白質そのものである可能性が高いと推定した。

## 2. 今後の研究の展望

本研究において同定したGATA-GT1およびGATA-GT2は、亜鉛フィンガーを持つ新しいDNA結合蛋白質である。さらに胃から単離された、最初のDNA結合蛋白質である。これら2種の蛋白質はこれまで未知の領域であった胃、そして消化管における転写調節の研究に大きな手がかりを与えるものである。少なくともGATA-GT2が、 $H^+/K^+$ -ATPaseの2つのサブユニット $\alpha$ および $\beta$ の遺伝子上流に特異的に結合することから、胃での転写調節に関与し得ることを指摘した。さらに $H^+/K^+$ -ATPaseの $\alpha$ および $\beta$ サブユニット遺伝子の転写活性とGATA-GT2による転写調節を解析するためには、 $\alpha$ 、 $\beta$ サブユニットの遺伝子を転写することのできる細胞が必要である。現在 $\alpha$ および $\beta$ サブユニット遺伝子の転写活性を調べる実験は、適当な細胞が存在しないことから不可能であった。実際に胃癌患者より得られた壁細胞と形態学的に類似した細胞が知られている(115)。この細胞には $H^+/K^+$ -ATPase活性も $\alpha$ サブユニットの遺伝子も存在しないことが報告されている。この細胞にGATA-GT1、GATA-GT2が転写されているかどうかは不明であり興味深い。この細胞の検討とともに $H^+/K^+$ -ATPase遺伝子を発現している壁細胞を株化する実験を系統的に行うべきであると考え。そのような細胞で転写調節因子と考えられるGATA-GT1およびGATA-GT2の役割を明らかにし、 $\alpha$ および $\beta$ サブユニット遺伝子の転写機構、壁細胞に特異的に発現している他の遺伝子の転写調節機構を解明する方向で今後の研究を進めるべきであろう。さらにGATA-GT1およびGATA-GT2を本来発現していない他の細胞で発現させる研究も実り深いと考える。

GATA-GT1およびGATA-GT2による転写調節活性がcAMP依存性プロテインキナーゼ等のリン酸化によって制御されていると推定したが、これらの推定リン酸化部位が

実際にリン酸化され $H^+/K^+$ -ATPase遺伝子の転写をどのように制御し、さらに胃酸分泌をどのように調節しているかも興味深い問題である。胃酸の分泌や胃での組織特異的な発現には、解明すべき未知の因子や調節機構が多く存在すると思われる。本研究で同定したGATA-GT1およびGATA-GT2がこのような調節機構の中でどのような意味を持つか、度のような因子と相互作用するのか等、明らかにする疑問が多くある。分化した細胞のモデルとして壁細胞を研究することによって普遍的な転写調節機構に対しても新しい展開が可能ではないかと考える。

## 引用文献

1. Wolosin, J.M. (1985)  
Ion transport studies with  $H^+/K^+$ -ATPase rich vesicles implications for HCl secretion and parietal cell physiology  
*Am. J. Physiol.* G 595 - G 607
2. Ganser, A.L. and Forte, J.G. (1973)  
 $K^+$  stimulated ATPase in purified microsomes of bullhog oxyntic cells  
*Biochim. Biophys. Acta.* 307, 169 - 180
3. Saccomani, G., Helander, H.F., Crago, S., Chang, H.H., Dailey, D.W. and Sachs, G. (1979)  
Characterization of gastric mucosal membranes. X. Immunological studies of gastric  $H^+/K^+$ -ATPase.  
*J. Cell. Biol* 83, 271 - 283
4. Sachs, G., Chang, H.H., Rabon, E., Schackman, R., Lewin, M. and Saccomani, G. (1976)  
A nonelectrogenic  $H^+$  pump in plasma membrane of hog stomach  
*J. Biol. Chem.* 251, 7690 - 7698
5. Saccomani, G., Stewart, H.B., Shaw, D., Lewin, M. and Sachs, G. (1970)  
Characterization of gastric mucosal membranes  
*Biochim. Biophys. Acta.* 465, 311 - 330
6. Ray, T.K. and Forte, J.G. (1976)  
Studies on the phosphorylated intermediates of a  $K^+$  stimulated ATPase from rabbit gastric mucosa  
*Biochim. Biophys. Acta.* 443, 451 - 467
7. Saccomani, G., Shah, G., Spenney, J.G. and Sachs, G. (1975)  
Characterization of gastric mucosal membranes  
*J. Biol. Chem.* 250, 4802 - 4809
8. Saccomani, G., Chang, H.H., Mihas, A.A., Crago, S. and Sachs, G. (1979)  
*J. Clin. Invest.* 64, 627-635
9. Pedersen, P.L. and Carafori, E. (1987)  
Ion motive ATPase: I. Ubiquity, properties and significance to cell function  
*TIBS* 12, 146 - 150

10. Rudnik, G. (1986)  
ATP-driven H<sup>+</sup> pumping into intracellular organelles  
*Annu. Rev. Physiol.* 48, 403 - 413
11. Hall, K., Perez, G., Anderson, D., Gutierrez, C., Munson, K., Hersey, S.J., Kaplan, J.H. and Sachs, G. (1990) Location of the carbohydrates present in the H<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase vesicles isolated from hog gastric mucosa  
*Biochemistry* 29, 701-706
12. Shull, G.E. and Lingrel, J.B. (1986)  
Molecular cloning of the rat stomach H<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase  
*J. Biol. Chem.* 261, 16788 - 16791
13. Maeda, M., Ishizaki, J. and Futai, M. (1988)  
cDNA cloning and sequence determination of pig gastric H<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase  
*Biochem. Biophys. Res. Commun.* 157, 203 - 209
14. Lane, L.K., Kirley, T.L. and Ball, W.J.J. (1986)  
Structural studies on H<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase: Determination of the NH<sub>2</sub>-terminal amino acid sequence and immunological cross-reactivity with Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase  
*Biochem. Biophys. Res. Commun.* 138, 185 - 192
15. Walderhaug, M.O., Post, R.L., Saccomani, G., Leonard, R.T. and Briskin, D.P. (1985)  
Structural relatedness of three ion-transport adenosine triphosphatases around their active site of phosphorylation  
*J. Biol. Chem.* 260, 3852 - 3859
16. Farley, R.A. and Faller, L.D. (1985)  
The amino acid sequence of an active site peptide from the H<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase of gastric mucosa  
*J. Biol. Chem.* 260, 3899 - 3901
17. Tamura, S., Tagaya, M., Maeda, M. and Futai, M. (1989)  
Pig Gastric H<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase: Lys-497 conserved in cation transporting ATPases is modified with pyridoxal 5'-phosphate  
*J. Biol. Chem.* 264, 8580-8584
18. Kemp, B.E., and R.B., P. (1990)  
Protein kinase recognition sequence motifs  
*TIBS* 15, 342-346

19. Chew, C.S. (1985)  
Parietal cell protein kinases  
*J. Biol. Chem.* 260, 7540 - 7550
20. Tai, M.M., Im, W.B., Davis, J.P., Blakeman, D.P., Zurcher-Neely, H.A. and Heinrikson, R.L. (1989)  
Evidence for the presence of a carbohydrate moiety in fluorescein isothiocyanate labeled fragments of rat gastric  $H^+ /K^+$ -ATPase  
*Biochemistry* 28, 3183-3187
21. Ovchinnikov, Y.A., Modyanov, N.N., Broude, N.E., Petrukhin, K.E., Grishin, A.V., Arzamava, N.M., Aldanova, N.A., Monastyrskaya, G. and Sverdlov, E.D. (1986)  
Pig kidney  $Na^+ /K^+$ -ATPase: primary structure and spatial organization  
*FEBS* 201, 237 - 245
22. Ovchinnikov, Y.A., Luneva, N.M., Arystarkhova, E.A., Gevandyan, N.M., Arzamava, N.M., Kozhich, A.T., Nesmeyanov, V.A. and Modyanov, N.N. (1988)  
Topology of  $Na^+ /K^+$ -ATPase: Identification of the extra- and intracellular hydrophilic loops of the catalytic subunit by specific antibodies  
*FEBS* 227, 230-234
23. Serrano, R. (1988)  
Structure and function of proton translocating ATPase in plasma membranes of plants and fungi  
*Biochim. Biophys. Acta.* 947, 1 - 28
24. Ohta, T., Nagano, K. and Yoshida, M. (1986)  
The active site structure of  $Na^+ /K^+$ -transporting ATPase: Location of the 5'-(p-fluorosulfonyl)benzoyladenine binding site and soluble peptides released by trypsin  
*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83, 2071 - 2075
25. Ovchinnikov, Y.A., Dzhandzugazyan, K.N., Lutsenko, S.V. and Mustayev, A.A. (1987)  
Affinity modification of E1-form of  $Na^+ /K^+$ -ATPase revealed Asp-710 in the catalytic site  
*FEBS* 217, 111-116
26. Yamamoto, K.K., Gonzalez, G.A., Biggs III, W.H. and Montminy, M.R. (1988)  
Phosphorylation-induced binding and transcriptional efficacy of nuclear factor CREB  
*Nature* 334, 494-498

27. Maeda, M., Tagaya, M. and Futai, M. (1988)  
Modification of gastric  $H^+ / K^+$ -ATPase with pyridoxal 5'-phosphate  
*J. Biol. Chem.* 263, 3652 - 3656
28. MacLennan, D.H., Brandl, C.J., Korczak, B. and Green, N.M. (1985)  
Amino acid sequence of a  $Ca^{2+} / Mg^{2+}$ -dependent ATPase from rabbit muscle sarcoplasmic reticulum, deduced from its complementary DNA sequence  
*Nature* 316, 696 - 700
29. Brandl, C.J., Green, N.M., Korczak, B. and MacLennan, D.H. (1986)  
Two  $Ca^{2+}$ -ATPase genes; Homologies and mechanistic implications of deduced amino acid sequence  
*Cell* 44, 597 - 607
30. Shull, G.E. and Greeb, J. (1988)  
Molecular cloning of two isoforms of the plasma membrane  $Ca^{2+}$ -transporting ATPase from rat brain  
*J. Biol. Chem.* 263, 8646 - 8657
31. Kawakami, K., Noguchi, S., Noda, M., Takahashi, H., Ohta, T., Kawamura, M., Nojima, H., Nagano, K., Hirose, T., Inayama, S., Hayashida, H., Miyata, T. and Numa, S. (1985)  
Primary structure of the  $\alpha$  subunit of *Torpedo californica*  $Na^+ / K^+$ -ATPase deduced from cDNA sequence  
*Nature* 316, 733 - 736
32. Shull, G.E., Schwarz, A. and Lingrel, J.B. (1985)  
Amino acid sequence of the catalytic subunit of the  $Na^+ / K^+$ -ATPase deduced from a complementary DNA  
*Nature* 316, 691 - 695
33. Shull, G.E., Greeb, J. and Lingrel, J.B. (1986)  
Molecular cloning of three distinct forms of the  $Na^+ / K^+$ -ATPase  $\alpha$ -subunit from rat brain  
*Biochemistry* 25, 8125 - 8132



34. Kawakami, K., Ohta, T., Nojima, H. and Nagano, K. (1986)  
Primary structure of the  $\alpha$  subunit of human  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase deduced from cDNA sequence  
*J. Biochem.* 100, 389 - 397
35. Takeyasu, K., Tamkun, M.M., Renaud, K.J. and Fambrough, D.M. (1988)  
Oubain-sensitive  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase activity expressed in mouse L cells by transfection with  
DNA encoding the  $\alpha$  subunit of an Avian sodium pump  
*J. Biol. Chem.* 263, 4347 - 4354
36. Kirley, T.L. (1989)  
Determination of three disulfide bounds and one free sulfhydryl in the  $\alpha$  subunit of  
(Na,K)-ATPase.  
*J. Biol. Chem.* 264, 7185-7192
37. Shull, G.E. (1990)  
cDNA cloning of the  $\alpha$ -subunit of the rat gastric  $\text{H}^+/\text{K}^+$ -ATPase.  
*J. Biol. Chem.* 265, 12123-12126
38. Morley, G.P., Callaghan, J.M., Rose, J.B., Toh, B.H., Gleeson, P.A.  
and Van Driel, I.R. (1992)  
The mouse gastric  $\text{H}^+/\text{K}^+$ -ATPase  $\alpha$  subunit gene structure and co-ordination with the  $\alpha$   
subunit during ontogeny  
*J. Biol. Chem.* 267, 1165-1174
39. Toh, B.-H., Gleeson, P.A., Simpson, R.J., Moritz, R.L., Callaghan, J.M., Goldkorn, I.,  
Jones, C.M., Martinelli, T.M., Mu, F.-T., Humphris, D.C., Pettitt, J.M., Mori, Y.,  
Masuda, T., Sobieszczuk, P., Weinstock, J., Mantamadiotis, T. and Baldwin, G.S. (1990)  
The 60- to 90-kDa parietal cell autoantigen associated with autoimmune gastritis is a  $\alpha$  subunit  
of the gastric  $\text{H}^+/\text{K}^+$ -ATPase (proton pump)  
*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87, 6418-6422
40. Reuben, M.A., Lasater, L.S. and Sachs, G. (1990)  
Characterization of a  $\alpha$  subunit of the gastric  $\text{H}^+/\text{K}^+$ -transporting ATPase.  
*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87, 6767-6771

41. Good, P.J., Richter, K. and Dawid, I.B. (1990)  
A nervous system-specific isotype of the  $\alpha$  subunit of  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase expressed during early development of *Xenopus laevis*  
*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87, 9088-9092
42. Shull, G.E., Lane, L.K. and Lingrel, J.B. (1986)  
Amino acid sequence of the  $\beta$ -subunit of the  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase deduced from a cDNA  
*Nature* 321, 429-431
43. Takeyasu, K., Tamkun, M.M., Siegel, N.R. and Fambrough, D.M. (1987)  
Expression of hybrid  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase molecules after transfection of mouse Ltk- cells with DNA encoding the  $\alpha$  subunit of an Avian brain sodium pump  
*J. Biol. Chem* 262, 10733-10740
44. Noguchi, S., Higashi, K. and Kawamura, M. (1990)  
A possible role of the  $\alpha$ -subunit of  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase in facilitating correct assembly of the  $\alpha$ -subunit into the membrane  
*J. Biol. Chem.* 265, 15991-15995
45. Kawamura, M., Ohta, T. and Nagano, K. (1990)  
Effect of reducing agents on the solubilization of renal sodium and potassium dependent ATPase with detergent  
*J. Biochem.* 87, 1327-1333
46. Horisberger, J.D., Jaunin, P., Chow, D.C., Forte, J.G., Sachs, J., Rossier, B. and Geering, K. (1991)  
The  $\text{H}^+/\text{K}^+$ -ATPase  $\alpha$ -subunit can act as a surrogate for the  $\alpha$ -subunit of  $\text{Na}^+,\text{K}^+$ -pumps  
*J. Biol. Chem.* 266, 19131-19134
47. Canfield, V.A., Okamoto, C.T., Chow, D., Dorfman, J., Gros, P., Forte, J.G. and Levenson, R. (1990)  
Cloning of the  $\text{H},\text{K}$ -ATPase  $\alpha$  subunit: tissue-specific expression, chromosomal assignment, and relationship to  $\text{Na},\text{K}$ -ATPase  $\alpha$  subunits.  
*J. Biol. Chem.* 265, 19878-19884

48. Oshiman, K., Motojima, K., Mahmood, S., Shimada, A., Tamura, S., Maeda, M. and Futai, M. (1991)  
Control region and gastric specific transcription of the rat H<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase  $\alpha$  subunit gene  
*FEBS* 281, 250-254
49. Park, J., Chiba, T. and Yamada, T. (1987)  
Mechanisms for direct inhibition of canine gastric parietal cells by somatostatin  
*J. Biol. Chem.* 262, 14190-14196
50. Wolosin, J.M., and Forte, J.G. (1981)  
Changes in the membrane environment of the H<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase following stimulation of the gastric oxyntic cell  
*J. Biol. Chem.* 256, 3149-3152
51. Hanzel, D.K., Urushidani, T., Usinger, W.R., Smolka, A. and Forte, J.G. (1989)  
Immunological localization of an 80-kDa phosphoprotein to the apical membrane of gastric parietal cells  
*Am. J. Physiol.* 256, G1082-G1089
52. Campbell, V.W. and Yamada, T. (1989)  
Acid secretagogue-induced stimulation of parietal cell gene expression  
*J. Biol. Chem.* 264, 11381-11386
53. Maeda, M., Oshiman, K., Tamura, S. and Futai, M. (1990)  
Human gastric H<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase gene: Similarity to Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase genes in exon/intron organization but difference in control region  
*J. Biol. Chem.* 265, 9027-9032
54. Kano, I., Nagai, F., Satoh, K., Ushiyama, K., Nakao, T. and Kano, K. (1989)  
Structure of the  $\alpha$ 1 subunit of horse Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase gene  
*FEBS* 250, 91-98
55. Shull, M.M., Pugh, D.G. and Lingrel, J.B. (1989)  
Characterization of the human Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase  $\alpha$ 2 gene and identification of intragenic restriction fragment length polymorphisms  
*J. Biol. Chem.* 264, 17532-17543

56. Ovchinnikov, Y.A., Monastyrskaya, G.S., Broude, N.E., Ushkaryov, Y.A., Melkov, A.M., Smirnov, Y.V., Malyshev, I.V., Allikmets, R.L., Kostina, M.B., Dulubova, I.E., Kiyatkin, N.I., Grishin, A.V., Modyanov, N.N. and Sverdlov, E.D. (1988)  
Family of human Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase genes: Structure of the gene for the catalytic subunit (αIII-form) and its relationship with structural features of the protein  
*FEBS* 233, 87-94
57. Maeda, M., Oshiman, K., Tamura, S., Kaya, S., Mahmood, S., Reuben, M.A., Lasater, L.S., Sachs, J. and Futai, M. (1991)  
The rat H<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase β subunit gene and recognition of its control region by gastric DNA binding protein  
*J. Biol. Chem.* 266, 21584-21588
58. Lane, L.K., Shull, M.M., Whitmer, K.R. and Lingrel, J.B. (1989)  
Characterization of two genes for the human Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase α subunit.  
*Genomics* 5, 445-453
59. Magyar, J.P. and Schachner, M. (1990)  
Genomic structure of the adhesion molecule on glia  
*Nucleic Acids Res.* 18, 6695-6696
60. Orłowski, J. and Lingrel, J.B. (1988)  
Tissue-specific and developmental regulation of rat Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase catalytic α isoform and α subunit mRNAs  
*J. Biol. Chem.* 263, 10436-10442
61. Kustu, S., North, A.K. and Weiss, D.S. (1991)  
Prokaryotic transcriptional enhancers and enhancer-binding proteins  
*TIBS* 16, 397-402
62. Roeder, R.G. (1991)  
The complexities of eukaryotic transcription initiation: regulation of preinitiation complex assembly  
*TIBS* 16, 402-408
63. Lee, M.S., Gippert, G.P., Soman, K.V., Case, D.A. and Wright, P.E. (1989)  
Three-dimensional solution structure of a single zinc finger DNA-binding domain  
*Science* 245, 635-637

64. Kadonaga, J.T., Carner, K.R., Masiarz, F.R. and Tjian, R. (1987)  
Isolation of cDNA encoding transcription factor SP1 and functional analysis of the DNA binding domain  
*Cell* 51, 1079-1090
65. Berg, J.M. (1988)  
Proposed structure for the zinc-binding domains from transcription factor IIIA and related proteins  
*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85, 99-102
66. Hard, T., Kellenbach, E., Boelens, R., Maler, B.A., Dahlman, K., Freedman, L.P., Carlsted-Duke, J., Yamamoto, K.R., Gustafsson, J.A. and Kaptein, R. (1990)  
Solutin structure of the glucocorticoid receptor DNA-binding domain  
*Science* 249, 157-159
67. Tsai, S.-F., Martin, D.I.K., Zon, L.I., D'Andrea, A.D., Wong, G.G. and Orkin, S.H. (1989)  
Cloning of cDNA for the major DNA-binding protein of the erythroid lineage through expression in mammalian cell.  
*Nature* 339, 446-451
68. Kissinger, C.R., Liu, B., Martin-Blanco, E., Kornberg, T.B. and Pabo, C.O. (1990)  
Crystal structure of an engrailed homeodomain-DNA complex at 2.8 Å resolution: A framework for understanding homeodomain-DNA interactions  
*Cell* 63, 579-590
69. Hayashi, S. and Scott, M.P. (1990)  
What determines the specificity of action of *Drosophila* homeodomain proteins  
*Cell* 63, 883-894
70. Sturm, R.A. and Herr, W. (1988)  
The POU domain is a bipartite DNA-binding structure  
*Nature* 366, 601-604
71. Ingraham, H.A., Flynn, S.E., Voss, J.W., Albert, V.R., Kapiloff, M.S., Wilson, L. and Rosenfeld, M.G. (1990)  
The POU-specific domain of Pit-1 is essential for sequence-specific, high affinity DNA binding and DNA-dependent Pit-1 - Pit-1 interactions  
*Cell* 61, 1021-1033

72. Landschulz, W.H. and Johnson, P.F. (1988)  
The leucine zipper: A hypothetical structure common to a new class of DNA binding proteins  
*Science* 240, 1759-1764
73. Kouzarides, T. and Ziff, E. (1988)  
The role of the leucine zipper in the *fos-jun* interaction  
*Nature* 336, 646-651
74. Mitchell, P.J. and Tjian, R. (1989)  
Transcriptional regulation in mammalian cells by sequence-specific DNA binding proteins.  
*Science* 245, 371-378
75. Ha, I., Lane, W.S. and Reinberg, D. (1991)  
Cloning of a human gene encoding the general transcription initiation factor IIB.  
*Nature* 352, 689-695
76. Yanashita, S., Wada, K., Horikoshi, M., Gong, D.-W., Kubo, T., Hisatake, K., Yokotani, N., Malik, S., Roeder, R.G. and Nakatani, Y. (1992)  
*Proc. Natl. Acad. sci. USA* 89, 2839-2843
77. Malik, S., Hisatake, K., Sumitomo, H., Horikoshi, M. and Roeder, R.G. (1991)  
Sequence of general transcription factor TFIIB and relationships to other initiation factors.  
*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88, 9553-9557
78. Hoffmann, A., Horikoshi, M., Wang, C.K., Schroeder, S., Weil, P.A. and Roeder, R.G. (1990)  
Cloning of the *Schizosaccharomyces pombe* TFIID gene reveals a strong conservation of functional domains present in *Saccharomyces cerevisiae* TFIID.  
*Genes Dev.* 4, 1141-1148
79. Horikoshi, M., Wang, C.K., Fujii, H., Cromlish, J.A., Weil, P.A. and Roeder, R.G. (1989)  
Cloning and structure of a yeast gene encoding a general transcription initiation factor TFIID that binds to the TATA box.  
*Nature* 341, 299-303
80. Hahn, S., Buratowski, S., Sharp, P.A. and Guarente, L. (1989)  
Isolation of the gene encoding the yeast TATA binding protein TFIID: a gene identical to the SPT15 suppressor of Ty element insertions.  
*Cell* 58, 1173-1181

81. Cavallini, B., Faus, I., Matthes, H., Chipoulet, J.M., Winsor, B., Ebly, J.-M. and Chambon, P. (1989)  
Cloning of the gene encoding the yeast protein BTF1Y which can substitute for the human TATA box-binding factor.  
*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86, 9803-9807
82. Peterson, M.G., Tanese, N., Pugh, B.F. and Tjian, R. (1990)  
Functional domains and upstream activation properties of cloned human TATA binding proteins.  
*Science* 248, 1625-1630
83. Hoey, T., Dynlacht, B.D., Peterson, M.G., Pugh, B.F. and Tjian, R. (1990)  
Isolation and characterization of the *Drosophila* gene encoding the TATA box binding protein, TFIID.  
*Cell* 61, 1179-1186
84. Muhich, M.L., Lida, C.T., Horikoshi, M., Roeder, R.G. and Parker, C.S. (1990)  
cDNA clone encoding *Drosophila* transcription factor TFIID.  
*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87, 9148-9152
85. Hoffmann, A., Sinn, E., Yamamoto, T., Wang, J., Roy, A., Horikoshi, M. and Roeder, R.G. (1990)  
Highly conserved core domain and unique N terminus with presumptive regulatory motifs in a human TATA factor (TFIID).  
*Nature* 346, 387-390
86. Ohkuma, Y., Sumimoto, H., Hoffmann, A., Shimasaki, S., Horikoshi, M. and Roeder, R.G. (1991)  
Structural motifs and potential  $\delta$  homologies in the large subunit of human general transcription factor TFIIE.  
*Nature* 354, 398-401
87. Sumimoto, H., Ohkuma, Y., Sinn, E., Kato, H., Shimasaki, S., Horikoshi, M. and Roeder, R. (1991)  
Conserved sequence motifs in the small subunit of human general transcription factor TFIIE.  
*Nature* 354, 401-404

88. Peterson, M.G., Inostroza, J., Maxon, M.E., Flores, O., Admon, A., Reinberg, D. and Tjian, R. (1991)  
Structure and functional properties of human transcription factor IIE.  
*Nature* 354, 369-373
89. Aso, T., Vasavada, H.A., Kawaguchi, T., Germino, F., J., Ganguly, S., Kitajima, S., Weissman, S.M. and Yasukochi, Y. (1992)  
Characterization of cDNA for the Large subunit of the transcription factor TFIIF.  
*Nature* 355, 461-464
90. Innis, M.A., Gelfand, D.H., Sninsky, J.J. and White, T.J. (1990)  
PCR protocols. A guide to methods and applications.  
*Academic press, Inc.*
91. Sanger, F., Coulson, A.R., Barell, B.G., Smith, A.J.H. and Roe, B.A. (1980)  
Cloning in single-strand bacteriophage as an aid to rapid DNA sequencing  
*J. Mol. Biol.* 143, 161-178
92. Mizusawa, S., Nishimura, S. and Seel, F. (1986)  
Improvement of the dideoxy chain termination method of DNA sequencing by use of deoxy-7-deazaguanosine triphosphate in place of dGTP  
*Nucleic Acids Res.* 14, 1319-1324
93. Sambrook, J., Fritsch, E.F. and Maniatis, T. (1989)  
Molecular Cloning. A Laboratory Manual. 2nd Ed.  
*Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.*
94. Gorski, K., Carneiro, M., and Schibler, U. (1986)  
Tissue-specific in vitro transcription from the mouse albumin promoter  
*Cell* 47, 767-776
95. Newman, P.R., Greeb, J., Keeton, T.P., Reyes, A.A., and Shull, G.E. (1990)  
Structure of the human gastric H,K-ATPase gene and comparison of the 5'-flanking sequences of the human and rat genes  
*DNA and Cell Biol.* 9, 749-762
96. Newman, P.R., and Shull, G.E. (1991)  
Rat gastric H,K-ATPase subunit gene: Intron/Exon organization, identification of multiple transcription initiation sites, and analysis of the 5'-flanking region  
*Genomics* 11, 252-262



97. Yamamoto, M., Ko, L.J., Leonard, M.W., Beug, H., Orkin, S.H. and Engel, J.D. (1990)  
Activity and tissue-specific expression of the transcription factor NF-E1 multigene family  
*Genes and Development* 4, 1650-1662
98. Zon, L.I., Tsai, S.-F., Burgess, S., Matsdaira, P., Bruns, G.A.P. and Orkin, S.H. (1990)  
The major human erythroid DNA-binding protein (GF-1): primary sequence and localization of  
the gene to the X chromosome.  
*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87, 668-672
99. Zon, L.I., Mather, C., Burgess, S., Bolce, M.E., Harland, R.M. and Orkin, S.H. (1991)  
Expression of GATA-binding proteins during embryonic development in *Xenopus laevis*.  
*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88, 10642-10646
100. Dorfman, D.M., Wilson, D.B., Bruns, G.A.P. and Orkin, S.H. (1992)  
Human transcription factor GATA-2: Evidence for regulation of preendothelin-1 gene  
expression in endothelial cells  
*J. Biol. Chem.* 267, 1279-1285
101. Ko, L.J., Yamamoto, M., Leonard, M.W., George, K.M., Ting, P. and Engel, J.D. (1991)  
Murine and human T-lymphocyte GATA-3 factors mediate transcription through a *cis*-regulatory  
element within the human T-cell receptor  $\delta$  gene enhancer.  
*Mol. Cell. Biol.* 11, 2778-2784
102. Ho, I.-C., Vorhees, P., Marin, N., Oakley, B.K., Tsai, S.-F., Orkin, S.H.  
and Leiden, J.M. (1991)  
Human GATA-3: a lineage-restricted transcription factor that regulates the expression of the  
T cell receptor  $\alpha$  gene.  
*EMBO J.* 10, 1187-1192
103. Joulin, V., Bories, D., Eleouet, J.-F., Labastie, M.-C., Chretien, S., Mattei, M.-G. and  
Romeo, P.-H. (1991)  
A T-cell specific TCR  $\delta$  DNA binding protein is a member of the human GATA family.  
*EMBO J.* 10, 1809-1816
104. Gubler, U. and Hoffman, B.J. (1983)  
A simple and very efficient method for generating cDNA libraries  
*Gene* 25, 263-269

105. Dower, W.J., Miller, J.F. and Ragsdale, C.W. (1988)  
High efficiency transformation of *E. coli* by high voltage electroporation  
*Nucleic Acids Res.* 16, 6127-6145
106. Taketo, A. (1988)  
DNA transfection of *Escherichia coli* by electroporation  
*Biochim. Biophys. Acta.* 949, 318-324
107. Martin, D.I.K., Zon, L.I., Mutter, G. and Orkin, S.H. (1990)  
Expression of an erythroid transcription factor in megakaryocytic and mast cell lineages  
*Nature* 344, 444-447
108. Yang, H.Y. and Evans, T. (1992)  
Distinct roles for the two cGATA-1 finger domains  
*Mol. Cell. Biol.* 12, 4562-4570
109. Nardelli, J., Gibson, T.J., Vesque, C. and Charnay, P. (1991)  
Base sequence discrimination by zinc-finger DNA-binding domains  
*Nature* 349, 175-178
110. Tabor, S. and Richardson, C.C. (1985)  
A bacteriophage T7 RNA polymerase/ promoter system for controlled exclusive expression of specific genes  
*Proc. Natl. Acad. Sci.* 82, 1074-1078
111. Studier, F.W., Rosenberg, A.H., Dunn, J.J. and Dubendorff, J.W. (1990)  
T7 expression system: Use of T7 RNA polymerase to direct expression of cloned genes  
*Methods in Enzymology* 185, 60-89
112. Singh, H., Lebowitz, J.H., Baldwin, A.S. and Sharp, P.A. (1988)  
Molecular cloning of an enhancer binding protein: isolation by screening of an expression library with a recognition site DNA  
*Cell* 52, 415-423
113. Brady, H.J.M., Sowden, J.C., Edwards, M., Lowe, N., and Butterworth, P.H.W. (1989)  
Multiple GF-1 binding sites flank the erythroid specific transcription unit of the human carbonic anhydrase I gene  
*FEBS Lett.* 257, 451-456
114. Chiba, T., Fisher, S.K., (1989)  
*Am. J. Physiol.* 256 G356-363

115. Arima, N., Yamashita, Y., Nakata, H., Nakamura, A., Kinoshita, Y. and Chiba, T. (1991)  
Presence of histamine H<sub>2</sub>-receptors on human gastric carcinoma cell line MKN-45 and their  
increase by retinoic acid treatment  
*Biochim. Biophys. Acta.* 176, 1027-1032
116. Dayhoff, M. (1978) Atlas of protein sequence and structure  
(National Biomedical Research Foundation, Silver Spring, Md.) Vol. 5, Supplement 3
117. Chou, P.Y. and Fasman, G.D. (1978)  
Empirical predictions of protein conformation *Annu. Rev. Biochem.* 47, 251-276

## 謝辞

本研究は、大阪大学産業科学研究所、二井研究室において行ったものであります。本稿を終えるにあたり、6年間にわたり直接の御指導ならびにご教示を賜りました二井将光教授に深く感謝いたします。実験の御指導そして多くの貴重な御助言をいただきました前田正知 助教授に心から感謝いたします。本研究に終始ご指導、ご協力をしていただきました森山芳則 助手、ロバート中本 博士、岩本昌子 博士、表弘志 博士、そして大志万浩一 氏、王 曉輝 氏、西 毅 氏をはじめ二井研究室の皆様は厚く感謝いたします。最後に温かな御支援、御激励をしていただいた方々に心より感謝いたします。