



|              |                                                                                 |
|--------------|---------------------------------------------------------------------------------|
| Title        | 胃粘膜・壁細胞における遺伝子の特異的な転写調節機構                                                       |
| Author(s)    | 西, 毅                                                                            |
| Citation     | 大阪大学, 1996, 博士論文                                                                |
| Version Type | VoR                                                                             |
| URL          | <a href="https://doi.org/10.11501/3109896">https://doi.org/10.11501/3109896</a> |
| rights       |                                                                                 |
| Note         |                                                                                 |

*The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA*

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

The University of Osaka

# 胃粘膜・壁細胞における遺伝子の特異的な転写調節機構

大阪大学理学研究科・生物化学専攻  
大阪大学・産業科学研究所  
生体応答科学部門・生体膜分子学分野

西 毅

平成7年度学位論文

目次  
発表論文  
略号

第1章 序論

|                                                 |    |
|-------------------------------------------------|----|
| 第1節 胃底腺を構成する細胞                                  | 1  |
| 1. 壁細胞                                          |    |
| 2. 主細胞                                          |    |
| 3. クロム親和細胞 (ECL細胞: enterochromaffin-like cells) |    |
| 第2節 胃酸分泌の調節機構                                   | 2  |
| 1. 酸分泌の促進機構                                     |    |
| 2. 酸分泌の抑制機構                                     |    |
| 第3節 胃粘膜・壁細胞に発現している遺伝子群                          | 5  |
| 1. 胃酸分泌酵素 ( $H^+/K^+-ATPase$ )                  |    |
| i) $H^+/K^+-ATPase$ の構造と機能                      |    |
| ii) $H^+/K^+-ATPase$ の遺伝子構造                     |    |
| 2. ヒスタミン $H_2$ 受容体                              |    |
| 3. 内因子 (Intrinsic factor)                       |    |
| 第3節 遺伝子の組織特異的な転写調節                              | 13 |
| 第4節 本研究の目的                                      | 16 |

第2章 ラット $H^+/K^+-ATPase$   $\beta$ サブユニット遺伝子5'上流域に  
特異的に結合する蛋白質と認識配列

|                                                               |    |
|---------------------------------------------------------------|----|
| 第1節 緒言                                                        | 17 |
| 第2節 材料及び方法                                                    | 20 |
| 1. 試薬                                                         |    |
| 2. ラット胃の核蛋白質の調製                                               |    |
| 3. ラットの他の臓器からの核蛋白質の調製                                         |    |
| 4. ブタの胃粘膜からの核蛋白質の調製                                           |    |
| 5. ラット $H^+/K^+-ATPase$ $\beta$ サブユニット遺伝子の上流領域<br>を持つプラスミドの調製 |    |
| 6. ゲルシフト法に用いたプローブの調製                                          |    |
| 7. 非標識DNA断片の調製                                                |    |
| 8. ゲルシフト法によるDNA結合蛋白質の検出                                       |    |
| 9. DNase Iによるフットプリント法に用いたプローブの調製                              |    |
| 10. DNase Iによるフットプリント法                                        |    |
| 第3節 結果                                                        | 27 |
| 1. ラット $H^+/K^+-ATPase$ $\beta$ サブユニット遺伝子上流に<br>結合する蛋白質の同定    |    |

|                                                                            |    |
|----------------------------------------------------------------------------|----|
| 2. 領域 I に存在する認識配列の同定                                                       |    |
| 3. 領域 II、III および IV に結合する蛋白質の解析                                            |    |
| 4. 領域 II および IV に結合する蛋白質の結合領域の同定                                           |    |
| 第 4 節 考察                                                                   | 42 |
| 第 3 章 壁細胞に特異的に発現している転写調節因子による                                              |    |
| ラット $H^+/K^+$ -ATPase 遺伝子の転写活性化                                            |    |
| 第 1 節 緒言                                                                   | 46 |
| 第 2 節 材料及び方法                                                               | 47 |
| 1. HeLa 細胞の培養                                                              |    |
| 2. レポータージーンベクター                                                            |    |
| 3. レポータージーン・プラスミドの構築                                                       |    |
| 4. GATA 配列への部位特異的な変異導入                                                     |    |
| 5. トランスフェクションに用いる細胞の調製                                                     |    |
| 6. 細胞への発現プラスミドの導入                                                          |    |
| 7. ルシフェラーゼ活性の測定                                                            |    |
| 8. $\beta$ ガラクトシダーゼ活性の測定                                                   |    |
| 9. ラットの胃からの核蛋白質の調製およびゲルシフトアッセイ法                                            |    |
| 10. 試薬                                                                     |    |
| 第 3 節 結果                                                                   | 56 |
| 1. GATA-GT1 および GATA-GT2 による遺伝子の転写活性化                                      |    |
| 2. $H^+/K^+$ -ATPase $\alpha$ サブユニット遺伝子の GATA-GT1 および GATA-GT2 が作用する部位の同定  |    |
| 3. $H^+/K^+$ -ATPase $\beta$ サブユニット遺伝子上流において GATA-GT1, GATA-GT2 が作用する部位の同定 |    |
| 4. GATA 配列への GATA-GT1 および GATA-GT2 の結合                                     |    |
| 第 4 節 考察                                                                   | 67 |
| 第 4 章 壁細胞のモデルとしての MKN45 細胞                                                 |    |
| 第 1 節 緒言                                                                   | 68 |
| 第 2 節 材料及び方法                                                               | 69 |
| 1. 細胞の培養                                                                   |    |
| 2. 培養細胞からの全 RNA の調製                                                        |    |
| 3. RNA のホルムアミド変性ゲルアガロース電気泳動                                                |    |
| 4. RNA のブロッティングおよびフィルターの前処理                                                |    |
| 5. ハイブリダイゼーションおよびフィルターの洗浄                                                  |    |
| 6. ゲノム DNA のアガロースゲル電気泳動                                                    |    |
| 7. ニトロセルロース膜へのブロッティング<br>およびハイブリダイゼーション                                    |    |

|                                      |     |
|--------------------------------------|-----|
| 8. 試薬                                |     |
| 第3節 結果                               | 72  |
| 1. MKN45細胞において壁細胞特異的遺伝子が転写されていることの確認 |     |
| 2. MKN45細胞におけるH2受容体遺伝子の構造            |     |
| 3. MKN45細胞におけるGATA-GT1遺伝子の構造         |     |
| 第4節 考察                               | 73  |
| 第5章 ヒスタミンH2受容体遺伝子のMKN45細胞での発現調節機構の解析 |     |
| 第1節 緒言                               | 77  |
| 第2節 材料及び方法                           | 78  |
| 1. PCRによるヒスタミンH2受容体遺伝子のコード領域のクローン化   |     |
| 2. ファージの宿主菌の調製                       |     |
| 3. ファージプラークの形成                       |     |
| 4. プローブの調製                           |     |
| 5. レプリカの調製およびフィルターの前処理               |     |
| 6. ハイブリダイゼーションおよびフィルターの洗浄            |     |
| 7. ファージDNAの大量調整                      |     |
| 8. サブクロニング                           |     |
| 9. ヒスタミンH2受容体遺伝子の塩基配列の決定             |     |
| 10. Reporter gene assay              |     |
| 1) レポーター遺伝子ベクター                      |     |
| 2) 遺伝子導入用の細胞の調製                      |     |
| 3) ルシフェラーゼおよび $\beta$ ガラクトシダーゼ活性の測定  |     |
| 11. MKN45細胞の核蛋白質の調製                  |     |
| 12. ゲルシフト法に用いたプローブの調製                |     |
| 13. 核蛋白質とプローブの結合反応の拮抗に用いたDNA断片の調製    |     |
| 14. ゲルシフト法によるDNA結合蛋白質の検出             |     |
| 15. その他の方法および試薬                      |     |
| 第3節 結果                               | 86  |
| 1. ヒトのヒスタミンH2受容体遺伝子のクローニング           |     |
| 2. ヒトのヒスタミンH2受容体遺伝子5'上流領域の塩基配列の解析    |     |
| 3. ヒスタミンH2受容体遺伝子のプロモーター領域の同定         |     |
| 4. ヒスタミンH2受容体遺伝子上流に結合するMKN45細胞の核蛋白質  |     |
| 5. DNA断片R1に存在する核蛋白質の認識配列の同定          |     |
| 6. DNA断片R2に存在する核蛋白質の認識配列の同定          |     |
| 7. DNA断片R3に存在する核蛋白質の認識配列の同定          |     |
| 第4節 考察                               | 100 |

|               |     |
|---------------|-----|
| 第6章 総括及び展望    | 102 |
| 1. 本研究で得られた成果 |     |
| 2. 今後の研究への展望  |     |
| 引用文献          | 105 |
| 謝辞            |     |

本論文中に用いた略号

|        |   |                                                                      |
|--------|---|----------------------------------------------------------------------|
| ATP    | : | adenosine 5'-triphosphate                                            |
| ATPase | : | adenosine 5'-triphosphatase                                          |
| bp     | : | base pair(s)                                                         |
| BPB    | : | bromophenol blue                                                     |
| cDNA   | : | complementary DNA                                                    |
| CIP    | : | calf intestine alkaline phosphatase                                  |
| c.p.m. | : | count per minuit                                                     |
| DMEM   | : | Dulbecco's minimun essential medium                                  |
| DNA    | : | deoxyribonucleic acid                                                |
| DTT    | : | dithiothreitol                                                       |
| EDTA   | : | ethylenediaminetetraacetic acid                                      |
| FCS    | : | fetal calf serum                                                     |
| HEPES  | : | <i>N</i> -2-hydroxyethylpiperazine- <i>N</i> '-2-ethanesulfonic acid |
| mRNA   | : | messenger RNA                                                        |
| NCS    | : | newborn calf serum                                                   |
| OD     | : | optical density                                                      |
| PBS    | : | phosphate buffered saline                                            |
| PCR    | : | polymerase chain reaction                                            |
| PMSF   | : | phenylmethanesulfonyl fluoride                                       |
| SDS    | : | sodium dodecylsulfate                                                |
| TMA Cl | : | tetramethylammonium chloride                                         |
| Tris   | : | tris(hydroxymethyl)aminomethane                                      |
|        |   |                                                                      |
| A      | : | adenosine 5'-monophosphate                                           |
| C      | : | cytidine 5'-monophosphate                                            |
| G      | : | guanosine 5'-monophosphate                                           |
| T      | : | thymidine 5'-monophosphate                                           |

## 発表論文

### 本報告に関する論文

1. Shigehiko Tamura, Ko-Ichi Oshiman, Tsuyoshi Nishi, Masaharu Mori, Masatomo Maeda, and Masamitsu Futai  
Sequence motif in control regions of the  $H^+/K^+$  ATPase  $\alpha$  and  $\beta$  subunit genes recognized by gastric specific nuclear protein(s).  
*FEBS Lett.*, **296**, 137 - 141 (1992)
2. Tsuyoshi Nishi, Takashi Koike, Toshihiko Oka, Masatomo Maeda and Masamitsu Futai  
Identification of the promotor region of the human histamin  $H_2$ -receptor gene.  
*Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **210**, 616 - 623 (1995)
3. Masatomo Maeda, Ken-taro Kubo, Tsuyoshi Nishi and Masamitsu Futai (1996)  
Roles of gastric GATA DNA-binding proteins.  
*J. Exp. Biol.* in press
4. Tsuyoshi Nishi, Takashi Koike, Masahisa Hasebe, Masatomo Maeda and Masamitsu Futai  
The upstream sequence motifs essential for transcriptional activation of human histamine  $H_2$ -receptor gene.  
In preparation
5. Tsuyoshi Nishi, Ken-taro Kubo, Masatomo Maeda and Masamitsu Futai  
Activation of  $H^+/K^+$ -ATPase  $\alpha$  and  $\beta$  subunit genes by gastric specific GATA proteins.  
In preparation

### その他の論文

1. Masatomo Maeda, Seikyo Asahara, Tsuyoshi Nishi, Satoru Mushiake, Toshihiko Oka, Shoichi Shimada, Tsutomu Chiba, Masaya Tohyama, and Masamitsu Futai  
The rat intrinsic factor gene: 5'-upstream region and chief cell-specific transcription.  
*J. Biochem.*, **177**, 1305 - 1311 (1995)
2. Kazuo Kobayashi, Satoshi Komatsu, Tsuyoshi Nishi, Hisanori Hara, and Koichiro Hayashi  
ATP-dependent transport for glucuronides in canalicular plasma membrane vesicles.  
*Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **176**, 622 - 626 (1991)



## 第1章 序論

### 第1節 胃底腺を構成する細胞

脊椎動物の胃には高濃度の塩酸を含む胃酸が分泌されていることはよく知られている。この胃酸により胃の内腔は約pH 1に保たれており、酸性pHは食物の消化はもとより、細菌の進入を防ぐ意味でも重要な役割を担っている。胃は、幽門部、胃体部、噴門部に分けられ、それぞれ幽門腺、胃底腺、噴門腺という分泌腺が存在する。胃底腺には壁細胞 (parietal cells)、主細胞 (chief cells)、粘液細胞 (mucous neck cells)、クロム親和細胞 (enterochromaffin-like cells) などの高度に分化した細胞が存在している。

#### 1. 壁細胞

胃底腺の細胞の約25%を占める壁細胞は中央部に主に存在し、胃酸を分泌している。壁細胞は酸分泌に要するエネルギーを供給するため、多くのミトコンドリアをもっている。構造的な特徴として、細胞内に、滑面管状小胞 (tubulovesicles, TV) や細胞内分泌細管 (intracellular canaliculus, IC) が発達している (図1-1)。酸分泌が行われていないときには、分泌細管は小さく、小胞が細胞内全体に広く存在している。酸分泌が活発に行われているときには、小胞は分泌細管に融合し細管の細胞内面積が増大して、微絨毛 (microvilli) を形成する。この融合には、壁細胞の細胞骨格系の関与が示唆されている。

#### 2. 主細胞

主細胞は壁細胞より小型な細胞で、胃底腺の底部に多数存在する。典型的な分泌細胞様の形態を示し、小胞体やゴルジ体様構造を発達させており、多数の分泌顆粒を持っている。ペプシンの前駆体であるペプシノーゲンはこの細胞から分泌されている。

#### 3. クロム親和細胞 (ECL細胞)

ECL細胞は、胃体部に存在する主要な内分泌細胞である。細胞内に分泌小胞を持ち、アセチルコリンやガストリンの刺激でヒスタミンを分泌する。胃酸の分泌はヒスタミン刺激により活性化されることがわかっており、この細胞が酸分泌の調節機構に重要な働きをしていると考えられている。

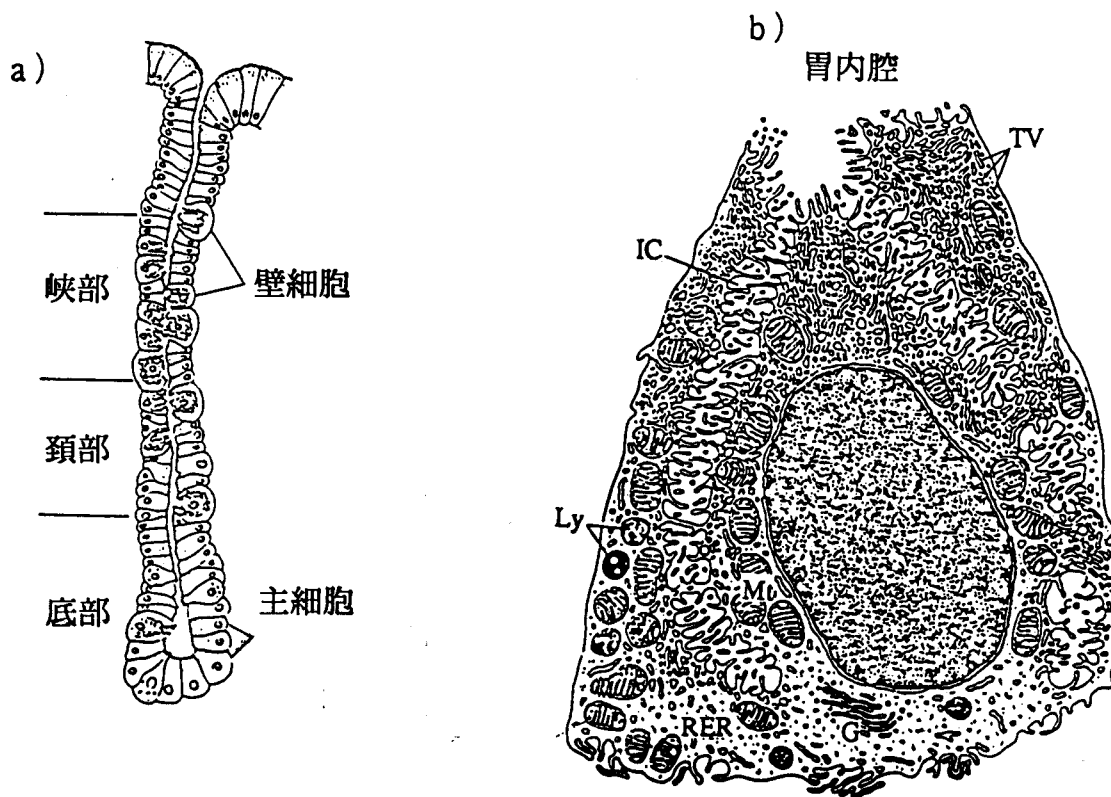


図1-1) 胃底線および壁細胞の模式図

- a) 胃体部に存在する胃底腺の模式図 b) 壁細胞の切片の電子顕微鏡像を模式的に示した。  
 胃内腔に開口して微絨毛を形成している細胞内分泌細管 (IC) と多数の管状小胞 (TV) が見られる。またそのまわりに多数のミトコンドリア (Mt) が見られる。  
 他に粗面小胞体 (RER)、ゴルジ装置 (G)、リソゾーム (Ly) などが見られる。  
 (益田龍彦 H<sub>2</sub>受容体と壁細胞の超微形態 「胃酸分泌機構と壁細胞受容体拮抗剤」  
 大江慶治、早川晃編 東洋書店、(1986) を一部改変)

## 第2節 胃酸分泌の調節機構

### 1. 酸分泌の促進機構

古くから、胃酸分泌は、3つの経路によって促進されることが知られている。1つは、アセチルコリンのような神経伝達物質によるニューロクリン系、次はガストリンのように血液中に分泌されて離れたところに作用するエンドクリン系、最後はヒスタミンのように近接した部位に作用するパラクリン系である。これらの経路による調節は独立に行われるものではなくおたがいに干渉しあっている。アセチルコリン、ガストリンはECL細胞に働きかけ、このとき分泌されるヒスタミンが、壁細胞からの酸分泌を促進することが知られている。また、アセチルコリン、ガストリンは壁細胞にも直接作用し、細胞内 $\text{Ca}^{2+}$ 濃度を上昇させる<sup>1)</sup>。一方、ヒスタミンは細胞内のcAMP濃度を上昇させる<sup>2)</sup>。これら複数の経路によって酸分泌が促進されるが、詳細は不明である。壁細胞から実際に酸を分泌している酵素、すなわち胃酸分泌酵素は、 $\text{H}^+/\text{K}^+$ -ATPaseである(図1-2)。この酵素は壁細胞に特異的に発現しており、ヒスタミン刺激によってそのmRNA量が増加することが報告されている<sup>3)</sup>。臓器(細胞)特異的な遺伝子の発現、さらに酸分泌の調節という点からも、この遺伝子の転写がどのように調節されているかは、非常に興味深い。

### 2. 酸分泌の抑制機構

壁細胞に直接作用し、胃酸分泌の抑制に働くものとして、ソマトスタチン、プロスタグランジンE<sub>2</sub>(PGE<sub>2</sub>)、EGF(epidermal cell growth factor)、TGF- $\alpha$ (transforming growth factor)などが知られている。このうち最も強力なものが、ソマトスタチンである。ソマトスタチンは胃体部に存在するD細胞から分泌され、壁細胞のソマトスタチン受容体に働いて、抑制性G蛋白質を活性化することにより、アセチルコリン、ガストリン、ヒスタミン、刺激による酸分泌を抑制する。一方、PGE<sub>2</sub>は胃粘膜の種々の細胞から産生され、ソマトスタチンとは異なり、ヒスタミンによる酸分泌のみを抑制するといわれているが、詳しい機構についてはよくわかっていない。また、EGF/TGF- $\alpha$ の働く機構についても、他のものとは異なると考えられているが、詳しいことは知られていない

胃内腔 (Lumen)

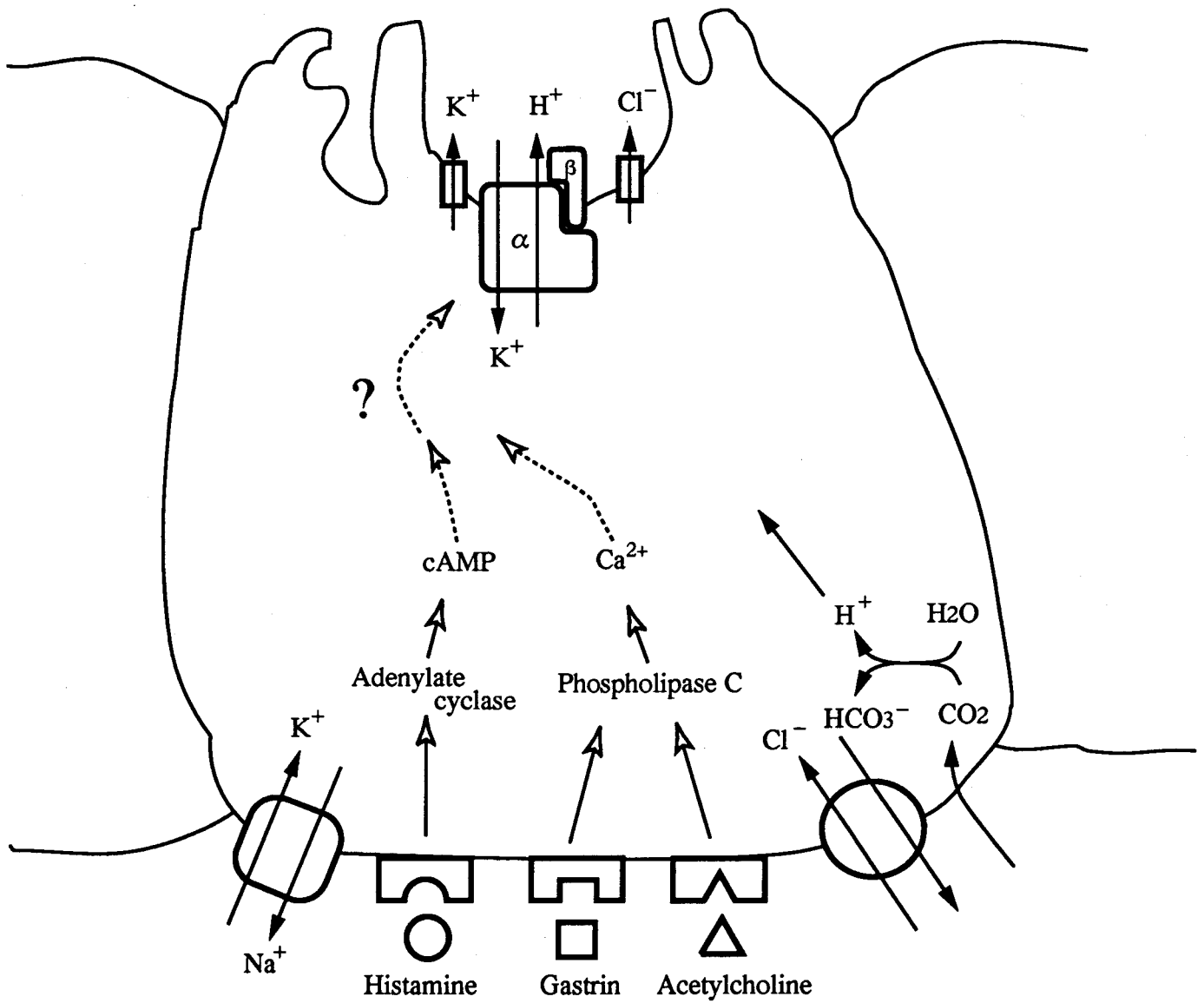


図 1-2) 胃粘膜・壁細胞におけるイオンの動きと酸分泌刺激に対する応答の模式図  
イオン輸送蛋白質、 $H^+/K^+-ATPase$ 、チャンネル等によるイオンの動きを黒矢印で、細胞膜上の受容体を介した刺激に対する応答を白矢印で示した。

### 第3節 胃粘膜・壁細胞に発現している遺伝子群

#### 1. 胃酸分泌酵素 ( $H^+/K^+$ -ATPase)

##### i) $H^+/K^+$ -ATPaseの構造と機能

$H^+/K^+$ -ATPaseは、触媒部位を形成している $\alpha$ と、 $\beta$ の2つのサブユニットから成っている。胃酸分泌の中心的な役割を担っているこの酵素についての研究は古くからなされている。1973年にGanserとForteが食用ガエル胃粘膜のミクロソーム画分に $Mg^{2+}$ の存在下に $K^+$ によって活性が促進されるウアバイン非感受性ATPaseとして見いだしたのが $H^+/K^+$ -ATPaseの最初の報告である<sup>4)</sup>。その後、この酵素がリン酸化中間体をつくること<sup>5)</sup>、ATPの加水分解に共役して、 $H^+$ を細胞外に $K^+$ を細胞内に非起電的に交換輸送していること<sup>6)</sup>が明らかになった。酵素反応中間体としてリン酸化中間体を生じるカチオン輸送性の膜蛋白質として $H^+/K^+$ -ATPase以外に $Ca^{2+}$ -ATPase、 $Na^+/K^+$ -ATPase、 $H^+$ -ATPaseなどが知られており、これらは一般に、P型ATPaseと呼ばれている<sup>7)</sup>。特に $Na^+/K^+$ -ATPaseは $Na^+$ を細胞外に、 $K^+$ を細胞内に輸送する酵素であり、 $H^+/K^+$ -ATPaseとよく似た性質を持っている。しかし、 $Na^+/K^+$ -ATPaseは $H^+/K^+$ -ATPaseとは異なり、2個の $Na^+$ と3個の $K^+$ を逆方向に起電的に輸送しており、また一般にウアバイン感受性である。

近年、 $Na^+/K^+$ -ATPase、 $H^+/K^+$ -ATPaseのcDNAおよび遺伝子が相次いで単離された。その結果、 $Na^+/K^+$ -ATPaseの $\alpha$ サブユニットは $\alpha 1$ 、 $\alpha 2$ 、 $\alpha 3$ という3種類のisoformがあり<sup>8,9)</sup>、 $\beta$ サブユニットも $\beta 1$ 、 $\beta 2$ 、 $\beta 3$ という3種のisoform<sup>10,11)</sup>が存在することが明らかになった。これらのサブタイプは、それぞれ発現する組織や量が異なっていることがノーザンブロット法により示されている<sup>12)</sup> (表1)。一方、 $H^+/K^+$ -ATPaseでは現在のところ $\alpha$ サブユニット<sup>13)</sup>、 $\beta$ サブユニット<sup>14,15)</sup>ともに1種類ずつしか見いだされていない。このATPaseの発現している場所は胃粘膜に限られており、遺伝子の転写がどのように調節されているかに興味を持たれる。

$H^+/K^+$ -ATPaseの $\alpha$ サブユニットの一次構造はブタ<sup>16)</sup>、ラット<sup>17)</sup>、ヒト<sup>18,19)</sup>およびウサギ<sup>20)</sup>で決定されている。アミノ酸配列を比較すると、相同性は98%と高い。また、 $H^+/K^+$ -ATPaseの $\alpha$ サブユニットは $Na^+/K^+$ -ATPaseの $\alpha 1$ サブユニットと63%アミノ酸配

列の一致が見られた。これは両サブユニットの構造がよく似ていることを示している。一次構造から推定すると、 $\alpha$ サブユニットは膜を8回<sup>17)</sup>もしくは7回<sup>21)</sup>横切る構造をとっていると考えられる。 $H^+/K^+-ATPase$ の $\beta$ サブユニットはマウス<sup>22)</sup>、ラット<sup>23)</sup>、ブタ<sup>24)</sup>、ウサギ<sup>25)</sup>、ヒト<sup>26)</sup>で一次構造が決定されている。これらの相同性は81から85%であり、 $\alpha$ サブユニット間での相同性(98%)より低いが有意に高い値を示している。 $H^+/K^+-ATPase$ の $\beta$ サブユニットはマウス $Na^+/K^+-ATPase\beta 1$ サブユニット、 $\beta 2$ サブユニットと、それぞれ31%と39%の相同性がある。 $\beta$ サブユニットはアミノ末端側に一ヶ所の膜貫通領域を持ちカルボキシル末端側が細胞外に向く構造をとっている。また、 $Na^+/K^+-ATPase$ において3対のS-S結合をつくるとされている6残基のCys<sup>27,28)</sup>は $H^+/K^+-ATPase$ においても保存されている。以上のことから、これら2種のATPaseの $\alpha$ 、 $\beta$ サブユニットは、ともに同じような機能を持っていると考えてよいだろう。

| Tissue   | $\alpha$ subunit                        |            |            |                                        | $\beta$ subunit                         |           |                                        |
|----------|-----------------------------------------|------------|------------|----------------------------------------|-----------------------------------------|-----------|----------------------------------------|
|          | $\text{Na}^+/\text{K}^+ \text{-ATPase}$ |            |            | $\text{H}^+/\text{K}^+ \text{-ATPase}$ | $\text{Na}^+/\text{K}^+ \text{-ATPase}$ |           | $\text{H}^+/\text{K}^+ \text{-ATPase}$ |
|          | $\alpha 1$                              | $\alpha 2$ | $\alpha 3$ | $\alpha$                               | $\beta 1$                               | $\beta 2$ | $\beta$                                |
| Kidney   |                                         |            |            |                                        |                                         |           |                                        |
| Fetal    | +++                                     | -          | -          |                                        |                                         |           |                                        |
| Neonatal | ++++                                    | -          | -          |                                        | +++                                     | +         |                                        |
| Adult    | +++++                                   | -+         | -          | -*                                     | ++++                                    | +         | -*                                     |
| Lung     |                                         |            |            |                                        |                                         |           |                                        |
| Fetal    | ++                                      | -          | -          |                                        |                                         |           |                                        |
| Neonatal | +++                                     | -          | -          |                                        | -                                       | -         |                                        |
| Adult    | ++                                      | -+         | -          | -                                      | +                                       | +         | -                                      |
| Muscle   |                                         |            |            |                                        |                                         |           |                                        |
| Fetal    | +                                       | -+         | -          |                                        |                                         |           |                                        |
| Neonatal | +                                       | ++         | +          |                                        |                                         |           |                                        |
| Adult    | +                                       | ++++       | +          | -                                      |                                         |           | -                                      |
| Brain    |                                         |            |            |                                        |                                         |           |                                        |
| Fetal    | +                                       | +          | ++         |                                        |                                         |           |                                        |
| Neonatal | ++                                      | ++         | +++        |                                        | +++                                     | ++++      |                                        |
| Adult    | +++                                     | +++        | +++        | -                                      | ++++                                    | +++++     | -                                      |
| Heart    |                                         |            |            |                                        |                                         |           |                                        |
| Fetal    | +++                                     | -          | ++         |                                        |                                         |           |                                        |
| Neonatal | +++                                     | +          | ++         |                                        | ++                                      | ++        |                                        |
| Adult    | +++                                     | ++         | -          | -                                      | ++                                      | +++       | -                                      |
| Stomach  |                                         |            |            |                                        |                                         |           |                                        |
| Adult    |                                         |            |            | +++++                                  |                                         |           | +++++                                  |

表1)  $\text{Na}^+/\text{K}^+ \text{-ATPase}$ と $\text{H}^+/\text{K}^+ \text{-ATPase}$ の $\alpha$ サブユニットおよび $\beta$ サブユニットのmRNAの組織および発生時期による発現量の比較<sup>10,12)</sup>。各サブユニットの組織における発現量を相対的に示した。発現量を+の数で示した、発現していないものは-で示した。この表より、 $\text{H}^+/\text{K}^+ \text{-ATPase}$ の一次構造および遺伝子構造が $\text{Na}^+/\text{K}^+ \text{-ATPase}$ と似ているにも関わらず、その発現している場所は異なっており、 $\text{H}^+/\text{K}^+ \text{-ATPase}$ が胃においてのみ特異的に発現していることが分かる。\*は極微量ある。

## ii) $H^+/K^+$ -ATPaseの遺伝子構造

当研究室において既にヒト $H^+/K^+$ -ATPaseの $\alpha$ サブユニット遺伝子の構造が明らかにされている<sup>18)</sup>。これによると、蛋白質をコードしている領域は22個のエクソンに分断されて存在している。この構造を $Na^+/K^+$ -ATPaseの $\alpha 2$ と $\alpha 3$ サブユニット遺伝子と比較すると、21個あるイントロンのうち19個までが全く同じ位置に挿入されていた。ヒト $Na^+/K^+$ -ATPase  $\beta 1$ サブユニット<sup>29)</sup>、マウス $\beta 2$ サブユニット<sup>30)</sup>と、ラット<sup>31,32)</sup>及びマウス<sup>22,33)</sup> $H^+/K^+$ -ATPase  $\beta$ サブユニットの間で遺伝子構造を比較した。 $H^+/K^+$ -ATPase  $\beta$ サブユニット、 $Na^+/K^+$ -ATPase  $\beta 2$ サブユニットでは6つ、 $\beta 1$ サブユニットでは5つあるイントロン挿入位置のうち、イントロン1、2、5、の挿入位置は完全に保存されていた(図1-3)。このように、アミノ酸配列の高い相同性とイントロン挿入位置が同じであることを考えると、2つのATPaseの $\alpha$ サブユニットと $\beta$ サブユニットはそれぞれ共通の祖先から進化してきたものと考えられる。

ノーザンブロットによると、 $H^+/K^+$ -ATPaseのmRNAは胃粘膜細胞に特異的に発現しており、脳、腎臓、肝臓、心臓、等には発現していない<sup>13-15)</sup>。これに対して、 $Na^+/K^+$ -ATPaseは普遍的に分布していることが知られている。しかし各isoformの間で組織分布が異なることが示されている(表1)。たとえば、 $\beta 1$ サブユニットでは腎臓、脳、心臓において<sup>34)</sup>、 $\beta 2$ サブユニットは脳<sup>35)</sup>、松果体<sup>36)</sup>、光受容細胞<sup>37)</sup>などに発現している。すなわち、よく似た構造をもち、同じ機能を示す、これらのサブユニットの遺伝子の発現は異なる調節を受けている。

遺伝子の転写調節に関与していると考えられる5'側上流域の塩基配列を $H^+/K^+$ -ATPaseと $Na^+/K^+$ -ATPaseの各サブユニット間で比較してみると、共通に保存された配列は見られない。したがって、 $H^+/K^+$ -ATPaseの胃における特異的な発現は5'上流が関与しており、そこに胃に特異的な因子の結合する調節配列が存在すると考えてよいだろう。



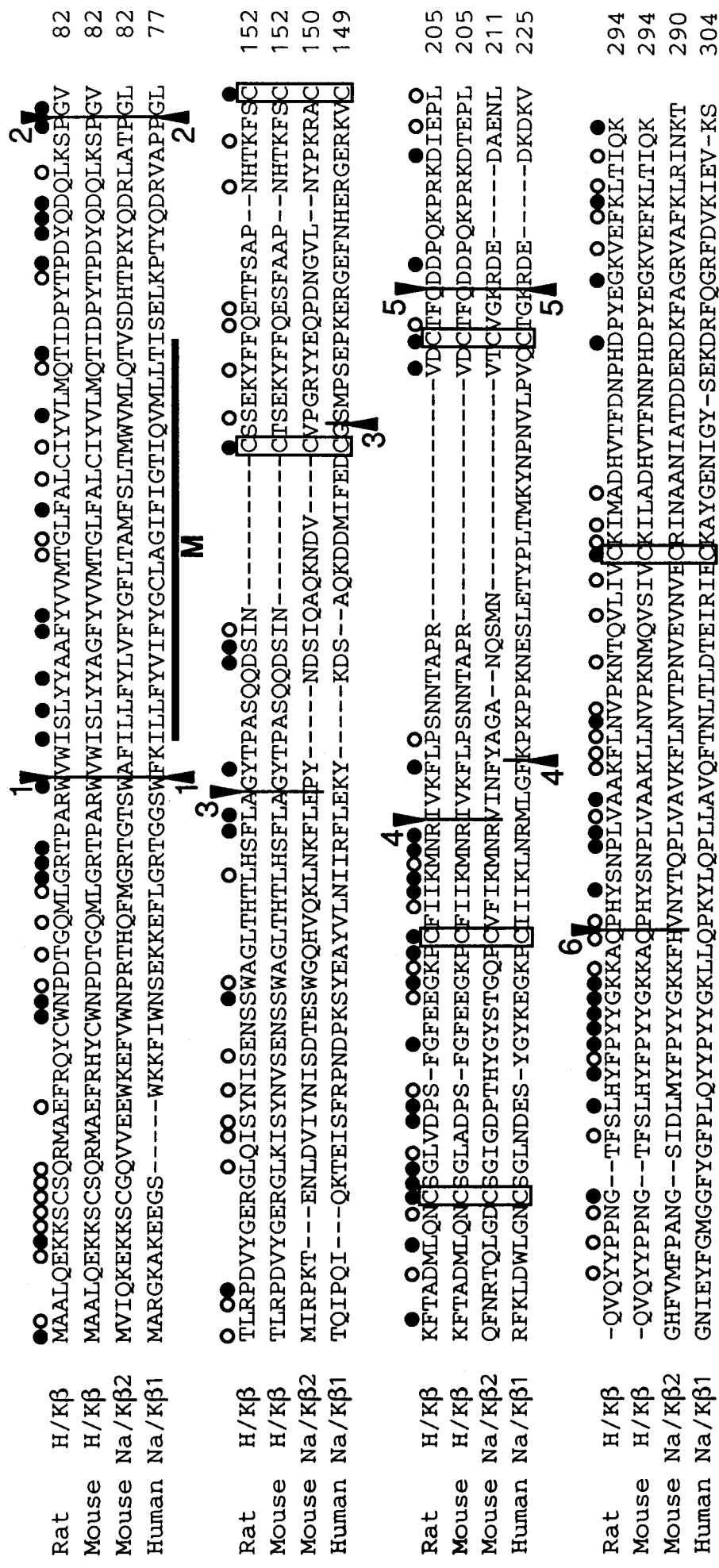


図 1-3) ラット<sup>31,32)</sup>とマウス<sup>22,33)</sup>のH<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPaseのβサブユニット (H/Kβ) とマウスのNa<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPaseのβ2サブユニット (Na/Kβ) とヒトのβ1サブユニット (Na/Kβ) <sup>29)</sup> の一次構造およびイントロン挿入位置の比較  
 S-S結合を形成しているCysは□で囲んだ。膜貫通領域と推定される部分は下線 (M) で示した。  
 イントロン挿入位置は矢印と番号で示した。4種類の間で一致した残基には●、3種類の間で一致した残基は○をつけた。

## 2. ヒスタミンH<sub>2</sub>受容体

ヒスタミン受容体はその薬理学的な性質から、3種のサブタイプH<sub>1</sub>、H<sub>2</sub>、H<sub>3</sub>に分類される。ヒスタミンによる胃酸分泌の促進は、胃壁細胞に発現している、H<sub>2</sub>受容体を介して行われる<sup>38)</sup>。他のヒスタミン受容体 (H<sub>1</sub>, H<sub>3</sub>) は、胃酸の分泌には関与しない。H<sub>1</sub>受容体は各種組織の平滑筋、副腎髄質、心臓、血管内皮細胞および脳に発現し、平滑筋収縮および毛細血管透過性促進に関与しており<sup>39)</sup>、H<sub>3</sub>受容体は主として、神経末端に存在しヒスタミン遊離を抑制すると考えられている<sup>40)</sup>。ヒスタミン刺激により、H<sub>1</sub>受容体は、Gsタンパク質を介し、ホスホリパーゼCを活性化する。ホスホリパーゼCによりIP<sub>3</sub>が増加し、これが小胞体のCa<sup>2+</sup>チャンネルに結合し、細胞質中のCa<sup>2+</sup>濃度が増加する<sup>41)</sup>。これに対して、H<sub>2</sub>受容体は、Gsタンパク質を介し、アデニル酸シクラーゼを活性化し、細胞内cAMP濃度を上昇させる<sup>2)</sup>。

イヌ<sup>42)</sup>、ラット<sup>43)</sup>、ヒト<sup>44)</sup>のヒスタミンH<sub>2</sub>受容体の遺伝子はすでに報告されている。H<sub>2</sub>受容体も他の G-タンパク質に共役した受容体と同じように、遺伝子はイントロンを持たず、その推定アミノ酸配列から膜を7回貫通した構造をしていると考えられる。また、アミノ末端から三番目の膜貫通領域には、これらの受容体の間でよく保存されている、アスパラギン酸残基が存在する。このアスパラギン酸残基はドーパミン受容体ではカテコールアミンの結合部位と考えられている<sup>45)</sup>。また、アミノ末端から五番目の膜貫通領域に存在するアスパラギン酸およびスレオニン残基はイミダゾール基の結合部位として興味をもたれている<sup>42)</sup> (図 1-4)。

ヒスタミンH<sub>2</sub>受容体は胃壁細胞とともに脳にも特異的に発現している。これより、胃にのみ特異的に発現しているH<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPaseと同じような機構によって転写が調節されているのかどうかに興味をもたれる。これまでに、H<sub>2</sub>受容体遺伝子の5'上流領域はラットとイヌでそれぞれ-522残基<sup>44)</sup>と-167残基<sup>42)</sup>までが報告されている。これらの領域には、H<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPaseと共通する部分は存在しない。さらに遺伝子上流の構造を明らかにし、H<sub>2</sub>受容体遺伝子の発現を調節している因子や塩基配列を見いだすことは、組織特異的な遺伝子の発現機構を明らかにする上で興味深い。

|       |                                                               |     |
|-------|---------------------------------------------------------------|-----|
| Human | MAPNGTASSFCLDSTACKITITTVVLAVLILITVAGNVVVCLAVGLNRRLRNLTNCFIVSL | 60  |
| Dog   | -IS---G-----PP-R--VS---T-----I-----S-----                     | 60  |
| Rat   | -E---VH-C---MAL-V--S---TT---I-----S-----S-----                | 60  |
|       | M 1                                                           |     |
| Human | AITDLLLGLLVLPFSAIYQLSCKWSFGKVFCNIYTSLDVMLCTASILNLFMISLDRYCAV  | 120 |
| Dog   | -----F-----R-----                                             | 120 |
| Rat   | -A-----FT---H-----                                            | 120 |
|       | M 2                                                           | M 3 |
| Human | MDPLRYPVLVTPVRVAISLVLIWVISITLSFLSIHLGWNSRNETSKGNHTTSKCKVQVNE  | 180 |
| Dog   | T-----I-----V-----SF---IP-----L                               | 180 |
| Rat   | T-----F-----G-RG--D-.F-----                                   | 179 |
|       | M 4                                                           |     |
| Human | ▽ VYGLVDGLVTFYLPLLIMCITYYRIFKVARQAKRINHISWKAATIREHKATVTLAAVM  | 240 |
| Dog   | -----V-----I-----H-MG-----G-----                              | 240 |
| Rat   | -----V-----I--E-----                                          | 239 |
|       | M 5                                                           |     |
| Human | GAFIICWFPYFTAFVYRGLRGDDAINEVLEAIVLWLGYANSALNPILYAALNRDFRTGYQ  | 300 |
| Dog   | -----V-----K-----AF--V-----T-----A--                          | 300 |
| Rat   | -----AV-G-----A--                                             | 299 |
|       | M 6                                                           | M 7 |
| Human | QLFCCRLANRNSHKTSLSNASQLSRTQSREPRQEEKPLKLQVWSGTEVTAPQGATDR     | 359 |
| Dog   | ---R--P-SH-AQE-----S---A-N---M-----R---                       | 359 |
| Rat   | ---H-KF-SH-----L-N-L-P-S---G-W-----LT-P--NPI-                 | 358 |

図1-4) ヒト<sup>42)</sup>、イヌ<sup>43)</sup>およびラット<sup>44)</sup>のヒスタミンH2受容体の一次構造および二次構造の比較  
ヒトのアミノ酸残基と一致する残基は“-”で示した。ドーパミン受容体においてカテコールアミンの結合部位と考えられるアスパラギン酸残基を\*で、イミダゾール基の結合部位と考えられるアスパラギン酸及びスレオニン残基を▽で示した。膜貫通領域と考えられる部分 (M1 ~ M7) を下線で示した。

### 3. 内因子 ( Intrinsic factor )

ビタミンB12 (シアノコバラミン) は補酵素として生体に必須な物質であり、欠損によりいろいろな病気が起こることが知られている。食物とともに取り込まれたビタミンB12は、まず唾液から分泌されるトランスコバラミン I と結合する。胃でトランスコバラミン I から、新たに内因子と結合し、小腸上皮細胞の受容体に結合し、エンドサイトーシスによって吸収される。これまでにラット<sup>46)</sup>、ヒトの内因子のcDNA及びヒトの遺伝子<sup>47)</sup>が単離されている。内因子は免疫学的手法により、ヒトでは壁細胞に、マウスでは主細胞にラットでは主細胞と壁細胞に発現していることが示されていた<sup>48)</sup>。我々は、壁細胞においてどの様にして特異的に転写されているのかに興味を持ち、内因子の遺伝子を単離した。単離した遺伝子の一部を用いて、*in situ* hybridization法を行ったところ、壁細胞には発現しておらず、主細胞に発現していることを明らかにした<sup>49)</sup>。

#### 第4節 遺伝子の組織特異的な転写調節

すでに述べたように、胃壁細胞において、 $H^+/K^+$ -ATPaseやヒスタミン $H_2$ 受容体の mRNAが、特異的に転写されていることが示されている。これら遺伝子の転写の調節を行っている因子やその結合配列を明らかにすることは、遺伝子の転写調節の機構の理解を深めることにつながると考える。

真核生物の遺伝子を転写しているのはRNAポリメラーゼ I, II, IIIの3種の転写酵素であり、それぞれ主に、rRNA, mRNA, 5SrRNAとtRNAの転写を行っている<sup>50-52</sup>。蛋白質をコードするmRNAの転写を行っているRNAポリメラーゼIIには 1. 正確な開始位置からの転写に必要である基本転写因子、2. ある特定の調節配列(cis-DNA element)に結合し転写量の調節を行う調節因子(transcription regulatory factor)が関与している。これらの因子のDNAとの結合、各因子の間およびRNAポリメラーゼIIとの相互作用によって転写が調節されている<sup>51,53,54</sup> (図1-5)。

基本転写因子としては、現在までにTFIIA~TFIIJおよびTFIIS (S-II)が報告されている。これらの因子についてはゲルシフト法やフットプリント法などを用いて転写開始複合体の形成過程、遺伝子との結合状態等について詳細に研究されている。また、TFIIB<sup>55-58</sup>), TFIID<sup>59-69</sup>), TFIIE<sup>70-72</sup>), TFIIF<sup>73-76</sup>), TFIIH<sup>77-81</sup>)およびTFIIS (S-II)<sup>82</sup>)のcDNAは既に単離されている。

調節因子は細胞の性質や分化を考える上で重要である。各種の調節因子による遺伝子の組織特異的な発現、特異的な発現時期に関して詳しく解析がされ、既に多くの因子が精製され、cDNAが単離されている。調節因子には、大きく分けて3つの機能ドメイン 1) DNA結合ドメイン 2) 転写活性化ドメイン 3) 転写制御ドメインが存在すると考えられる。このうちDNA結合ドメインには、特徴的な配列や構造が数多く見いだされている<sup>52</sup>)。代表的なDNA結合ドメインとして以下のものがある。1) Helix-Turn-Helix構造：初期に細菌やファージリプレッサー蛋白質から明らかにされ、ショウジョウバエのホメオボックス因子中においても、DNA結合領域として見いだされた。βターンに連結された2つのαヘリックスのうちC末端側のヘリックスがDNAの主鎖にそって塩基対を認識す

る。NMRやX線結晶解析などによって詳しく解析がされている<sup>83)</sup>。2) Zinc finger構造：はじめに、TFIIIA<sup>84)</sup>において見いだされた。4個のCys、もしくは2個のCysと2個のHisがZnをキレートすることによりフィンガーと呼ばれる構造をとる。2個のCysと2個のHisを持つものとしてはSP1が、4個のCysを持つものは、ステロイドレセプター<sup>85)</sup> (C-X2-C-X13-C-X2-C)、GATA結合蛋白質<sup>86-90)</sup> (C-X2-C-X17-C-X2-C) 等がよく知られており、NMRによりDNAとの相互作用が解析されている<sup>85,91)</sup>。このうち、GATA結合蛋白質は、血球系に細胞特異的に発現し、細胞の分化にも関与しており、細胞特異的な転写調節因子として注目されている。3) Basic Region-Leucine Zipper構造：アミノ末端側に $\alpha$ -ヘリックス構造を持つ塩基性領域(Basic Region)、続いて7アミノ酸残基ごとにLeu残基が通常5回現れるLeucine Zipper構造を持つ。実際にDNAに結合するのは塩基性領域であるが結合活性を持つにはホモもしくはヘテロ二量体の形成が必要であり、この二量体の形成にはLeucine Zipper領域が必要である<sup>92)</sup>。他にも、Basic Region-Helix-Loop-Helix構造、POUドメイン、 $\sigma$  Homology構造などを持つ因子が見られている。今後の研究によってさらに新たな構造上の特徴を持つ因子が見いだされる可能性がある。転写活性化に関与するドメインとしては、酸性領域、高グルタミン酸領域、高プロリン領域などが示唆されているが、いずれも直接的な証明はない。転写を制御するドメインは、リン酸化などの修飾、他の因子との会合、プロテアーゼによる解離などをうけ、転写調節因子を活性化したり不活性化したりしている。胃壁細胞における遺伝子の特異的な転写にどのような塩基配列や調節因子が関与しているかを同定し、その因子の構造と機能を明らかにすることは、非常に興味深いことである。

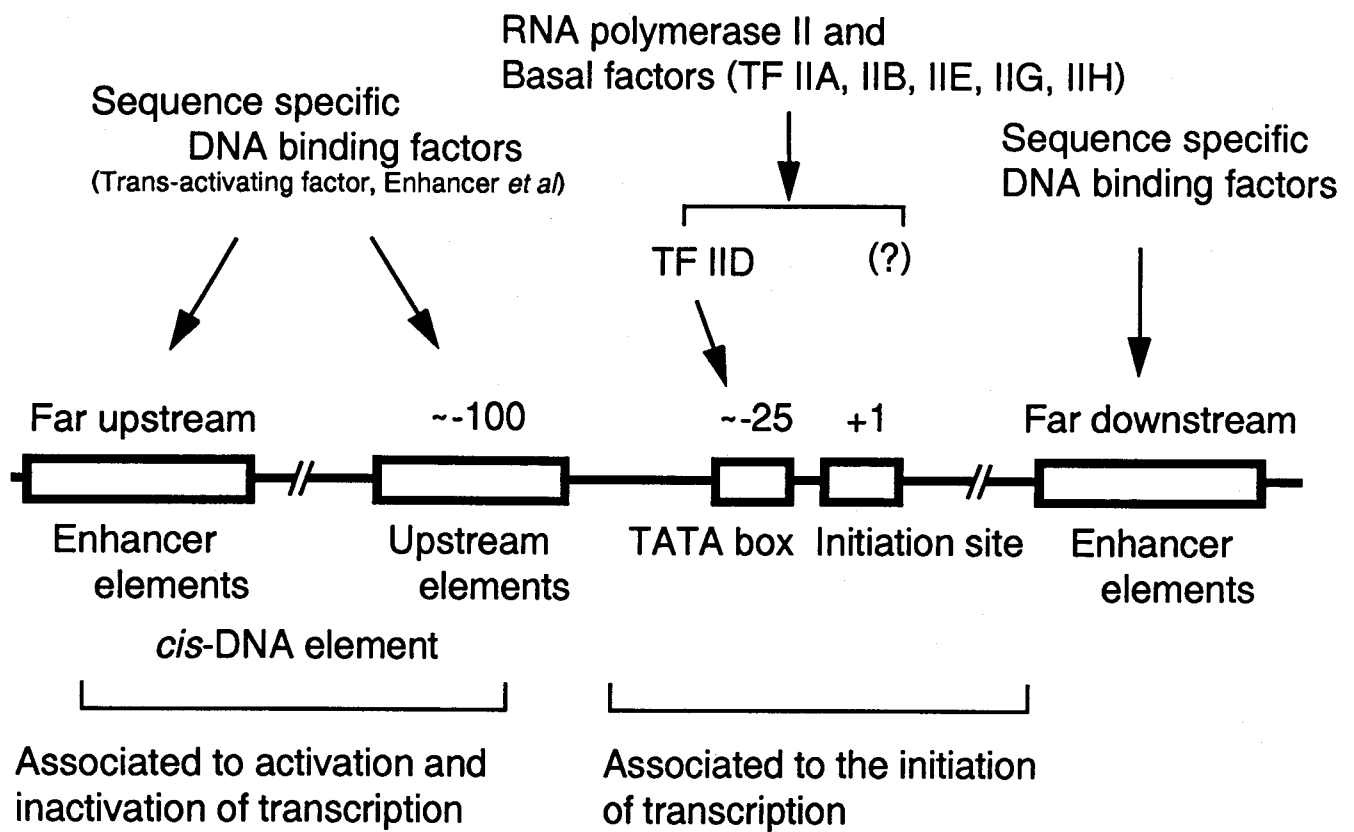


図 1-5) 遺伝子の調節配列の模式図

遺伝子上で転写に関与する因子および配列の位置を模式的に示した。

転写因子については上段に、その配列の位置については中央に、

その働きについては下段に示した。

(大熊ら、実験医学 (1992) 10 1520-1530 の図を一部改変)

## 第5節 本研究の目的

すでに述べたように胃は高度に分化した細胞よりなっている。 $H^+/K^+$ -ATPase遺伝子は胃粘膜の壁細胞においてのみ転写されている。このように特定の細胞に発現している遺伝子の転写制御機構を研究することは、細胞の特異的な機能がどのようにして決まっているかを知ることであり、究極的には、細胞分化の機構を明らかにすることにつながる。本論文では壁細胞に発現している遺伝子として、 $H^+/K^+$ -ATPase遺伝子及び、ヒスタミン $H_2$ 受容体遺伝子に着目し、これらの遺伝子の転写の調節がどのように行われているかを明らかにしようとした。すでに述べたように、胃では細胞特異的な転写調節が非常に厳密に行われているにも関わらず、これまで転写調節機構に関する分子生化学的研究は、ほとんど行われていない。本論文では、1) 遺伝子の転写に関与する5'上流域に着目し、この領域に結合し、壁細胞にのみ存在する因子、および、その因子のみが認識できる結合配列を明らかにし、その因子の細胞での機能を明らかにした。2) 壁細胞のモデルとなりうる細胞を同定し、この細胞を用いて遺伝子の転写に関与する配列および調節因子を同定した。これらの研究を通して、壁細胞における特異的な転写調節機構の解明をめざした。



## 第2章 ラットH<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase βサブユニット遺伝子の5'上流域に特異的に結合する 蛋白質と認識配列の同定

### 第1節 緒言

H<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPaseをコードするmRNAは胃粘膜の壁細胞において特異的に発現していることはノーザンブロット法および *in situ* hybridization法によって示されている。H<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPaseは壁細胞を特徴づけている酵素であり、この酵素の転写がどのような機構によって行われているかを明らかにすることは、壁細胞の分化の機構を知ることにつながる。既に当研究室においてヒト、およびラットのαサブユニット遺伝子の5'上流域に胃の核蛋白質が特異的に結合する塩基配列が存在することが明らかにされ、この配列がαサブユニット遺伝子の特異的な転写に関与している可能性が示唆されている<sup>13,18,95</sup>。また、α、βサブユニット蛋白質がマウスの発生の過程において同じ時期に壁細胞に見いだされることが、抗体を用いた実験によって明らかにされている<sup>33</sup>。したがって、2つのサブユニット遺伝子が同じ因子によって転写調節され、同時期に転写されている可能性が高い。一方、ラットとマウスのβサブユニット遺伝子上流配列を比較すると非常に相同性のある領域がラットの配列上で翻訳開始点から上流-445bpまでに存在し、その相同性は80%である（図2-1）。これに対して、-445bpよりさらに上流-709bpまでには相同性がほとんどなくなっている。また、ラットおよびマウスのβサブユニット遺伝子の転写開始点はほぼ同じ位置である（図2-2）。このことは、βサブユニット遺伝子において、ラットとマウスで同じような転写調節が行われており、胃粘膜壁細胞における特異的な転写調節に関与する配列がこの相同性の高い領域に存在している可能性を示唆している。そこで、プロモーターの配列を含む翻訳開始点(+1bp)から-445bpまでの上流領域に結合する調節因子および特異的な結合配列を明らかにするために、以下の実験を行った。

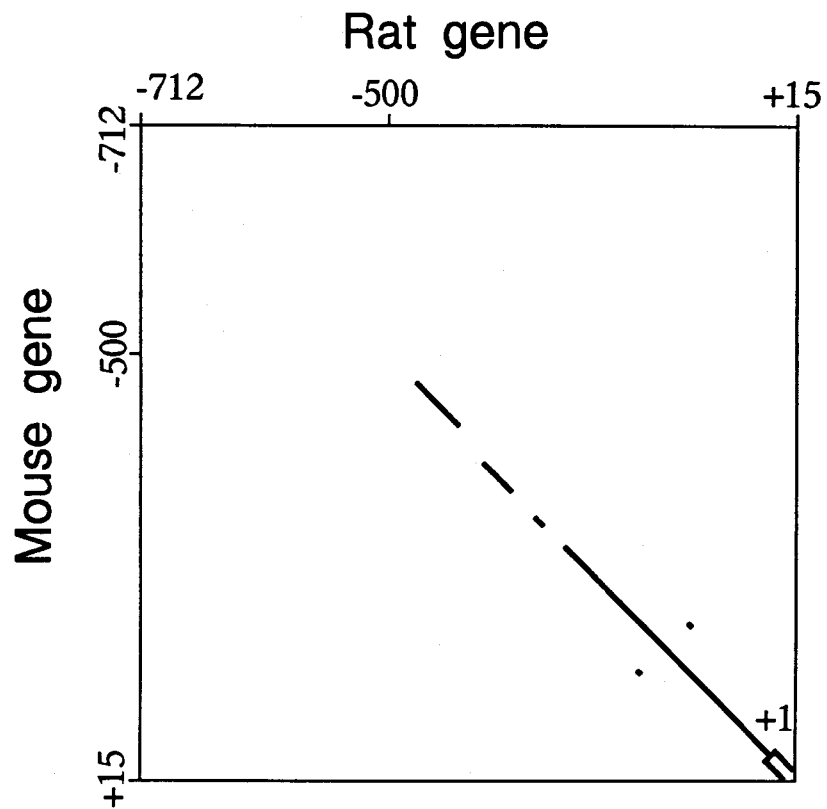


図 2-1) ラットとマウスのH<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPaseのβサブユニット遺伝子の5'上流領域  
 (+15bpから-712bp) の相同性  
 20塩基中15塩基以上が一致する場合に点を打つ条件でHarr plotを行なった。  
 実線は2つの遺伝子で相同性の高い部分を示している。  
 白抜きの四角で囲んだ部分(+1より下流)は蛋白質をコードしている領域を示している。



## 第2節 材料および実験方法

### 1. 試薬

[ $\gamma$ - $^{32}\text{P}$ ] ATP (5000Ci/mmol)、 [ $\alpha$ - $^{32}\text{P}$ ] dCTP (800Ci/mmol)はAmersham社から購入した。制限酵素はニッポンジーン社、東洋紡績（株）及び宝酒造（株）より購入した。Sequenase Ver. 2.0、Sequencing KitはUnited States Biochemical 社より購入した。ウシ小腸アルカリホスファターゼ (CIP)はBoehringer Mannheim社から購入した。Deoxyribonuclease I (DNase I)、DNA Ligation Kitは宝酒造（株）より購入した。Klenow 酵素、T4 polynucleotide kinaseはニッポンジーン社より、Tris、Ribonuclease A (RNase A)、リゾチーム、アガロース（タイプII）はSigma社より、メタノール、酢酸、尿素は半井化学薬品（株）より、EDTA・2Na、HEPES、は同仁化学（株）よりそれぞれ購入した。その他の試薬は和光純薬工業（株）より特級品を購入した。

### 2. ラット胃の核蛋白質の調製

日本生物材料センターより購入したラット [ウイスター系♂、体重150 - 200 g] から胃を摘出し、切り開いて内容物を水道水でよく洗い流した。赤みを帯びている粘膜組織の部分を切り取り、氷冷したPBS (0.13 M NaCl, 3 mM KCl, 8 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> · 12H<sub>2</sub>O, 1.5 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>)に10分間浸した。ハサミで細かく切ったのち、ショ糖溶液 I (10 mM HEPES-KOH, pH7.6, 15 mM KCl, 0.15 mM スペルミン, 0.5 mM スペルミジン, 1 mM EDTA, 2.2 M ショ糖, 5% グリセロール, 0.5 mM DTT, 0.5 mM PMSF, 0.5  $\mu\text{g/ml}$  ペプスタチン)を組織10 gに対して30 ml加えた。これをテフロンホモジナイザーを用いて900rpmで3回 (30秒/1回)ホモジナイズした。あらかじめ遠心管にショ糖溶液 II (10 mM HEPES-KOH, pH7.6, 15 mM KCl, 0.15 mM スペルミン, 0.5 mM スペルミジン, 1 mM EDTA, 2 M ショ糖, 10% グリセロール, 0.5 mM DTT, 0.5 mM PMSF, 0.5  $\mu\text{g/ml}$  ペプスタチン)を10 ml入れ、この上にホモジネートを注意深く重層した。これを日立SRP28SAローターを用いて、4℃において26,000rpm で1時間 遠心を行った。上清を捨て核溶解用緩衝

液 ( 10 mM HEPES-KOH, pH7.6, 100 mM KCl, 0.1 mM EDTA, 10% グリセリン, 3 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.5 mM DTT, 0.5 mM PMSF, 0.5 µg/ml ペプスタチン)で遠心管の内壁をよく洗い、さらにキムワイプを用いて壁に残っているショ糖溶液IIをよく除いた。沈澱を1 mlの核溶解用緩衝液に懸濁した。ここで、核懸濁液20µlに0.5% SDS 980µlを加えて核を溶解し、核中のDNAの量をOD<sub>260</sub> (260nmの吸光度) により測定し、得られた核の量を求めた。DNA量は1 µg/ml=0.02 OD<sub>260</sub>として計算した。核懸濁液のDNA量が0.5 mg/mlになるように核溶解用緩衝液で希釈した。これに氷冷した3 M KClを終濃度0.55 Mになるように加え、よく混合した後に4℃で30分間放置し、核を溶解した。この溶液を100,000 x g ( RP-50ローターで40,000rpm) で30分間、4℃で遠心した。沈澱したクロマチンが混入しないように注意して素早く上清を別の遠心管に回収した。上清1 mlに対して固形硫酸を0.3 g加え、硫酸を完全に解かした後、4℃に30分放置した。この溶液を100,000 x gで30分間、4℃で遠心し沈澱を得た。得られた沈澱は少量の透析用緩衝液 ( 25 mM HEPES-KOH, pH7.6, 0.1 mM EDTA, 40 mM KCl, 10% グリセリン, 1 mM DTT) に溶かした後、500 mlの透析用緩衝液に対して透析した。2時間後に透析外液を新しいものに交換し、計4時間にわたって透析を行った。透析終了後、卓上遠心器で15,000r.p.m 5分間、4℃の遠心を行なうことによって不溶性物質を除き上清を回収した。10 µlごとに分注し液体窒素で凍らせた後、-80℃で保存した。以下の実験にはこれを氷上で溶かした後に使用した。

### 3. ラットの他の臓器からの核蛋白質の調製

ラットから各臓器を摘出し、氷冷したPBSでよく洗った。核蛋白質は上に述べた胃の場合と同じ方法で調製した。

### 4. ブタの胃粘膜からの核蛋白質の調製

ブタの胃は粘液をよく除いた後、粘膜の部分を筋肉層より剥がし、これにショ糖溶液Iを加え、ミキサーで細かく砕いた。この液を2重に重ねたガーゼでこすことにより、

大きな未破碎の組織を除いた。以下の操作はラットの核蛋白質の調製と同様に行った。

#### 5. ラットH<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase βサブユニット遺伝子上流域をもつプラスミドの調製

ラットβサブユニット遺伝子のファージクローンから、+15bpから-709bpの領域に対応するDNA断片を*Pst* Iで切りだしBluescriptSK<sup>+</sup>の*Pst* I部位に挿入して得られたプラスミドをpHKB3とした。このpHKB3から*Sty* Iを用いて切り出した-192bpから-558bpまでのDNA断片をKlenow酵素で末端平滑化した後、pUC18の*Sma* I部位に挿入した。さらにこれから*Bam* HI, *Eco* RIの二つの酵素で切り出した断片をBluescriptSK<sup>-</sup>の*Bam* HI, *Eco* RI部位に挿入しなおして得たプラスミドをpHKB3-VIとした。pHKB3-VIから*Stu* Iを用いて切り出した-331bpから-423bpまでの断片をpUC18の*Sma* I部位に挿入したものをpHKB3-IIIとした(図2-3)。

#### 6. ゲルシフト法に用いたプローブの調製

プローブに用いたDNA断片は、ラットβサブユニット上流領域(-709bpから+15bp)を持つプラスミドpHKB3から*Pst* Iと*Sty* Iの二種の制限酵素を用いて切り出した断片を、それぞれ領域I(+15bpから-185bp), 領域VI(-193bpから-557bp), 領域V(-554bpから-709bp)とした。同様にプラスミドpHKB3-VIから*Stu* Iと*Hind* IIIで切り出したDNA断片を領域II(-193bpから-322bp), *Stu* Iと*Xba* Iで切り出した断片を領域IV(-424bpから-556bp)とした。さらにプラスミドpHKB3-IIIから*Eco* RIと*Hin* d IIIで切り出した断片を領域III(-331bpから-423bp)として用いた。それぞれのDNA断片は制限酵素により処理した後、フェノールとクロロホルムで処理し、エタノール沈澱を行なった。この断片を、[α-<sup>32</sup>P] dCTP存在下にKlenow 酵素によって5'突出末端を平滑化することにより末端標識した。標識した各DNA断片はポリアクリルアミドゲル電気泳動により分離し、ゲルより電氣的に溶出した後、エタノール沈澱によって精製した。この沈

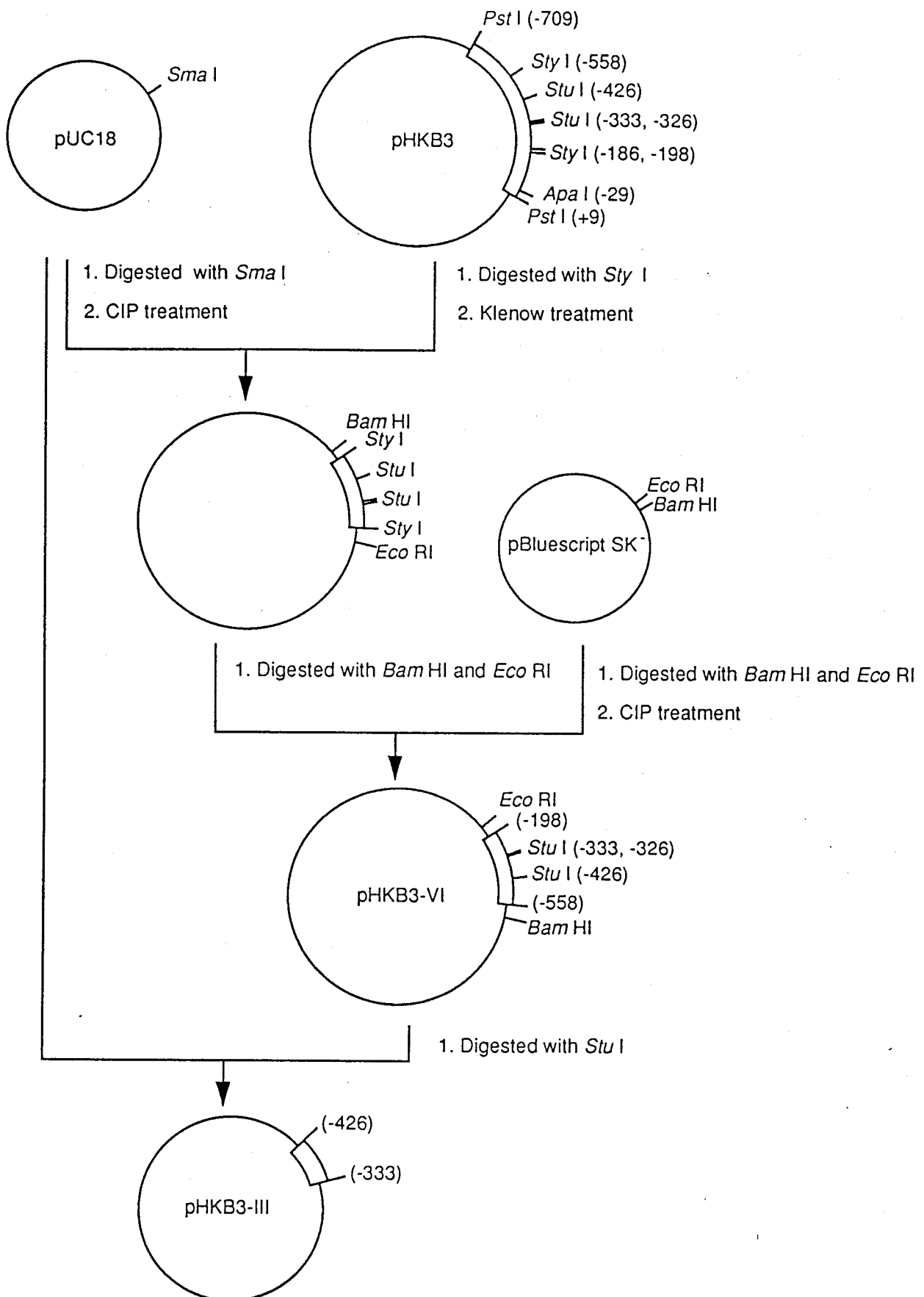


図2-3) プローブ調製用に用いたプラスミドの構造および作成方法。

ラットH<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPaseのβサブユニット遺伝子上流領域に対応するところをボックスで示した。数字は、ラットβサブユニット遺伝子上での塩基の位置を示す。  
CIPはウシ小腸アルカリフォスファターゼを示す。

澱を 2,000 cpm /  $\mu$ l になるように TE 緩衝液 (10 mM Tris-HCl, pH8.0, 1 mM EDTA) に溶かし、ゲルシフト法のプローブとして用いた。

## 7. 非標識 DNA 断片の調製

6 種の二本鎖 オリゴヌクレオチドである R $\beta$ 1 (-181bp から -153bp), R $\beta$ 2 (-159bp から -120bp), R $\beta$ 3 (-129bp から -95bp), R $\beta$ 4 (-100bp から -61bp), R $\beta$  5 (-69bp から -34bp), R $\beta$ 6 (-38bp から -1bp) は、DNA 合成機を用いて合成した相補的な 2 本の オリゴヌクレオチドより調製した。II-A (-221bp から -245bp), II-B (-239bp から -266bp), IV-A (-432bp から -456bp), IV-B (-522bp から -556bp) についても同様に相補的な 2 本の オリゴヌクレオチドをより調製した。領域 I ~ 領域 V までの断片は、上に (第 2 節 6) 示したのと同じ操作によって調製した DNA 断片を末端標識はせずに用いた。

## 8. ゲルシフト法による DNA 結合蛋白質の検出

DNA プローブと蛋白質の結合反応は全量 15  $\mu$ l 中で行った。用いた結合反応液の最終組成は 25 mM HEPES-NaOH, pH7.6, 34 mM KCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 5% グリセロール, 1  $\mu$ g poly(dI-dC), <sup>32</sup>P で末端標識したプローブ 2000-4000 c.p.m (約 0.05-0.1 pmol) となるようにした。同じ条件下で非標識 DNA 断片を加え、拮抗反応を行った。これらの反応溶液に、核蛋白質を (0.16 - 0.48  $\mu$ g) 加え、反応を開始し、氷上で 30 分間放置した。この反応液をあらかじめ予備電気泳動 (120V, 4℃ で 1 時間) をしておいた 8% ポリアクリルアミドゲルに上層した。泳動槽には 89 mM Tris-borate (pH 8.0), 2.5 mM EDTA を入れ両極の液を循環させながら 120V, 4℃ の条件で電気泳動した。ゲルは真空下 80℃ にて乾燥後、オートラジオグラフィーを行った。

## 9. DNase I による フットプリント法に用いたプローブの調製

プラスミド pHKB3 を、制限酵素 Sty I により処理し、つづいて 45℃ で 20 分間の条件で 2 回 アルカリフォスファターゼ処理し、3' 末端のリン酸基を取り除いた。次に STE 緩衝液



(10mM Tris-HCl, pH8.0, 0.1mM EDTA, 0.1M NaCl)中で68℃、15分間処理した後、フェノール／クロロホルム抽出、さらにエーテル抽出を行った。DNA断片はエタノール沈澱により回収し、 $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$  ATP存在下に、polynucleotide kinaseによる5'末端へのリン酸の付加により末端標識を行った。標識したDNA断片を制限酵素 *Apa*Iで切断し、160bpの大きさの断片 (-25bpから-185bp) を得た。DNA断片はポリアクリルアミドゲル電気泳動によって分離し、ゲルから溶出した後、10,000 cpm/ $\mu$ lになるようにTE緩衝液に溶かし、以下の実験に用いた。

#### 10. DNase Iによるフットプリント法

塩基配列のマーカを調製するために、プローブを塩基AとGで特異的に切断するMaxamとGilbertの方法によるA+G反応を行った。プローブに4%ギ酸5 $\mu$ lと蒸留水を加えて50  $\mu$ lとした後、37℃で30分間ときどき激しく混ぜながら反応させた。これに0.1 mM EDTAを含む0.3 M 酢酸ナトリウムを200  $\mu$ l加えた。更にエタノール700  $\mu$ lを加えてよく混ぜた後、-80℃に10分間放置した。卓上遠心機で15,000r.p.m, 4℃で10分間遠心した後、沈澱は70%エタノールで洗い乾燥させた。沈澱を10%(V/V)ピペリジン 50  $\mu$ lに溶かし、ときどき攪拌しながら90℃で40分間加熱した。この後、まず真空遠心乾燥機でピペリジンを除き、得られた沈澱を20  $\mu$ lの蒸留水に溶かした。再びこれを真空乾燥し沈澱を得た。この操作をさらに2回繰り返す、ピペリジンを完全に除去した。最後に得られた沈澱を色素液20  $\mu$ l(1 mM EDTA, pH8.0, 0.1%ブロモフェノールブルー, 0.1%キシレンシアノール, 96%脱イオン化ホルムアミド)に溶かし解析に用いた。

フットプリント法におけるDNAと蛋白質の結合反応はゲルシフト法と同様の反応条件で、液量は40  $\mu$ l, プローブは9で示したフットプリント法用に調製したものに変えて反応を行った。反応液は30分間氷上に放置したのち、2  $\mu$ lのDNaseI (60 units/ml)を加えて20℃、1分間反応させた。これに100  $\mu$ lの反応停止液(20 mM EDTA, 0.2% SDS, 0.3 M NaCl)を加えた。フェノール／クロロホルム処理、エタノール沈澱の後、得られた沈澱は70%エタノールで洗い、乾燥させ、色素液8  $\mu$ lに溶かした。これを90℃、3分間熱変性させた後、

4 $\mu$ lずつを12.5%尿素-8%ポリアクリルアミドゲルに上層し、1500V、2時間電気泳動した。  
ゲルは真空下で80℃にて乾燥した後、オートラジオグラフィーを行った。

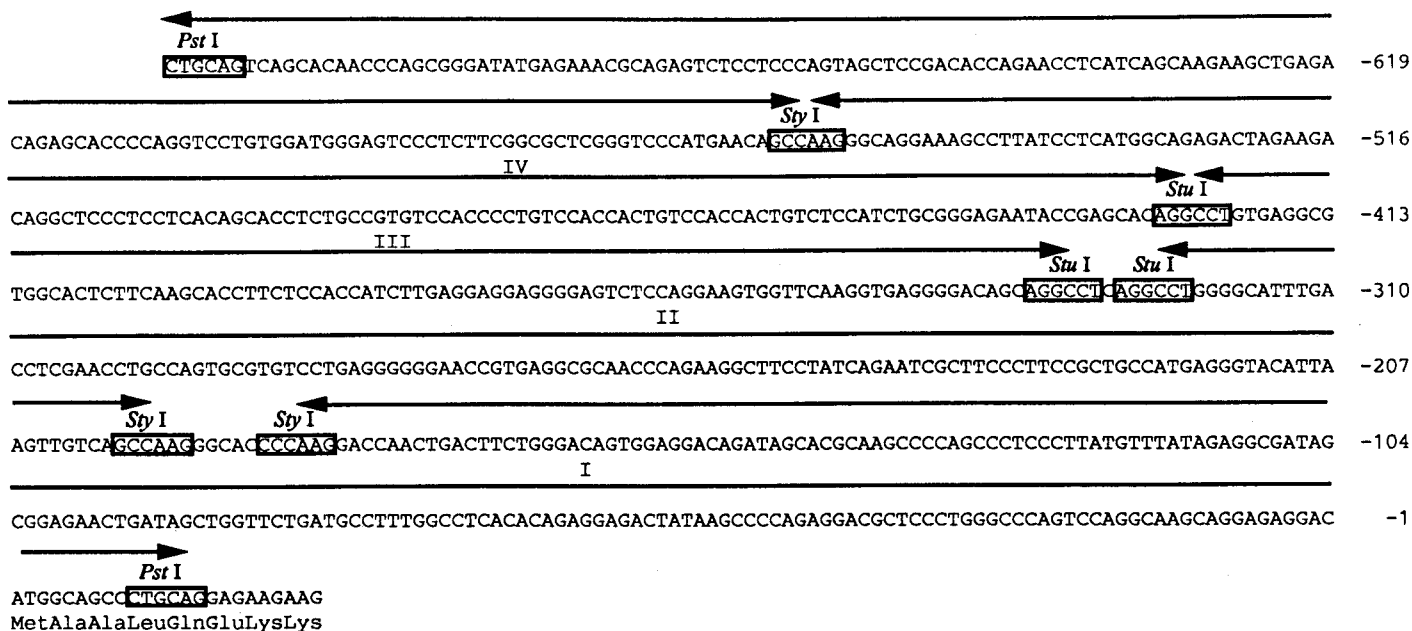
### 第3節 結果

#### 1. ラットH<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase βサブユニット遺伝子上流に結合する蛋白質の同定

これまでに、H<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase βサブユニットの遺伝子としてラット<sup>31,32)</sup>およびマウス<sup>22,33)</sup>の遺伝子が単離されており、当研究室においてはラットの遺伝子を得ている<sup>31)</sup>。一般に、転写を調節する配列は遺伝子の5'上流領域に存在し、この配列に結合する因子が転写調節に関与していると考えられている<sup>55)</sup>。ラットおよびマウスのβサブユニット遺伝子上流領域を比較すると、既に述べたように+1bpから-445bpまでの領域は相同性が高く(80%)、特に+1bpから-251bpまでの領域は保存性が高くなっている(91%)。これに対して-445bpより上流-712bpにはほとんど相同性がない。(図2-1、図2-2)。このように、異なる種の同じ遺伝子の間で高度に保存されている上流領域には、その遺伝子に特異的な転写の調節配列が含まれる可能性がある。すなわち胃においてのみ発現しているβサブユニット遺伝子に特異的な転写の調節配列が存在する可能性がある。

そこでラットβサブユニット遺伝子上流域(-709bpから+15bp)を5つのDNA断片 I (+15bpから-185bp), II (-193bpから-322bp), III (-330bpから-423bp), IV (-424bpから-556bp), V (-553bpから-709bp)に分け、それぞれのDNA断片をプローブとして、ラット胃の核から調製した蛋白質(以後、核蛋白質と略称する)およびラット肝臓の核蛋白質を用いてゲルシフト法によってDNA結合蛋白質の検出を行った。その結果、DNA断片 I, II, IIIおよびIVに胃の核蛋白質が結合することを、ポリアクリルアミドゲル電気泳動により検出した(図2-4)。この結果は、βサブユニット遺伝子上流には、胃の核蛋白質が結合する配列が存在することを示している。これに対して、肝臓の核蛋白質の結合はDNA断片 IおよびVをプローブとしたときには全く見られなかった。しかし、DNA断片 II, IIIおよびIVを用いた場合に、反応液中の肝臓の核蛋白質の量を3倍に増加させることにより蛋白質の結合によるバンドが見られるようになった。このバンドの位置は胃の核蛋白質を用いたときに見られるバンドの一部と一致していた。

a)



b)

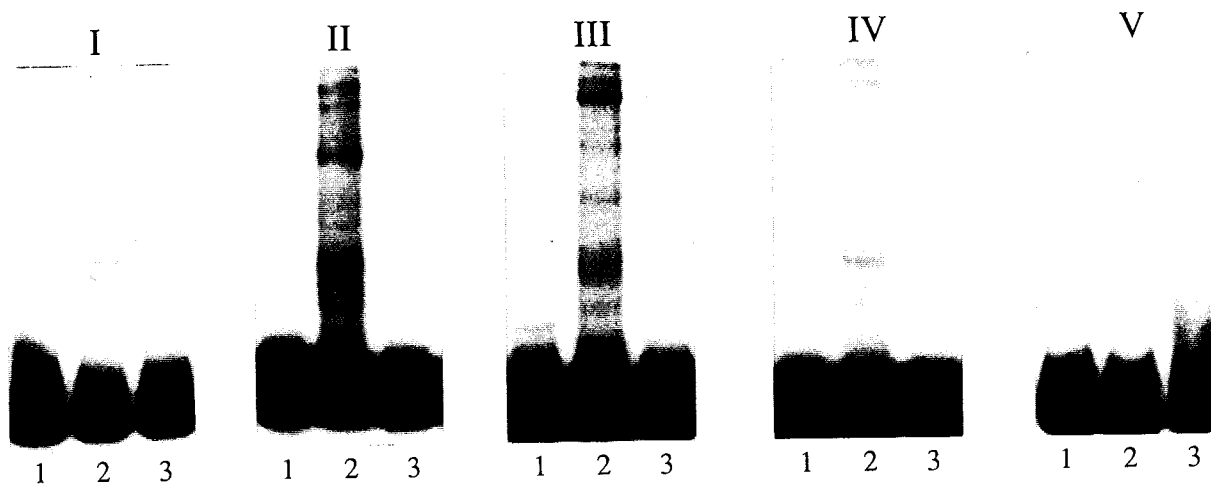


図2-4) ラットH<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPaseのβサブユニット遺伝子の5'上流への核蛋白質の結合。

a) ラットH<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPaseのβサブユニット遺伝子の5'上流の配列

領域I～領域Vまでに対応する位置を示した。また、制限酵素の切断部位も示した。

b) 領域Iから領域VまでのDNA断片をそれぞれプローブとしたときのゲルシフト法

によるDNA結合蛋白質の解析を行なった。Iは領域I、IIは領域II、IIIは領域III、IVは領域IV、Vは領域Vをそれぞれプローブにした。レーン1はプローブのみ、レーン2はプローブと胃の核蛋白質(0.16μg)、レーン3はプローブと肝臓の核蛋白質(0.24μg)を加えて反応させた。反応後、いずれも8%アクリルアミドゲル中で電気泳動を行ない、ゲルを乾燥させた後、オートラジオグラフィーを行なった結果を示した。下端に黒く見えるのはプローブである。

遺伝子の組織特異的な転写は、組織特異的に存在する調節因子の働きで調節されると考えられる。遺伝子上流には転写調節に重要な領域が存在するので（図2-2）、この領域の配列に結合する核蛋白質が、組織特異的な転写調節に重要と考えた。結合した核蛋白質の性質を明らかにするために、肝臓の核蛋白質が全く結合せず、胃の核蛋白質が結合したDNA断片Iについて詳細に検討した。まず、DNA断片Iに結合する蛋白質が胃の核においてのみ存在しているのかどうかを明らかにするために、ラットの各臓器（胃、肝臓、脾臓、脳、腎臓、肺）から核蛋白質を調製した。これら各臓器の核蛋白質のDNA断片Iへの結合をゲルシフト法により調べたところ、胃の核蛋白質のみがこの領域に結合した（図2-5）。したがって、DNA断片Iに存在する塩基配列と、これに特異的に結合する蛋白質が胃壁細胞に特異的な遺伝子の転写に重要な役割を担っている可能性が示唆された。

ヒトおよびラットの $\alpha$ サブユニット遺伝子上流領域に胃の核蛋白質のみが特異的に結合する配列が既に同定されており、この配列が $\alpha$ サブユニット遺伝子の転写に重要な役割を果たしていると考えられている。そこで、 $\beta$ サブユニット遺伝子のDNA断片Iに結合する蛋白質が、 $\alpha$ サブユニット遺伝子上流領域に存在する配列に結合する蛋白質と同じものかどうかを明らかにするために、以下の実験を行った。ヒトの $\alpha$ サブユニット遺伝子上流配列のうち、胃の核蛋白質の結合する配列を含む領域 H $\alpha$ 1(-116bpから-94bp)とその下流で核蛋白質の結合しない領域 H $\alpha$ 2(-92bpから-70bp)のDNA断片を用いて、 $\beta$ サブユニット遺伝子のDNA断片Iと胃の核蛋白質との結合が阻害されるかどうかを調べた。その結果、H $\alpha$ 1を用いたときにのみDNA断片Iへの蛋白質の結合が阻害された（図2-6）。この結果は、 $\beta$ サブユニット遺伝子のDNA断片Iと $\alpha$ サブユニット遺伝子のH $\alpha$ 1に同じ因子の認識配列が存在していることを示している。つまり、 $\alpha$ サブユニット遺伝子上流に見いだされていた胃の核蛋白質の結合配列TAATCAGCTGに結合するものと、 $\beta$ サブユニット遺伝子上流に結合する蛋白質が同じものであると考えられる。

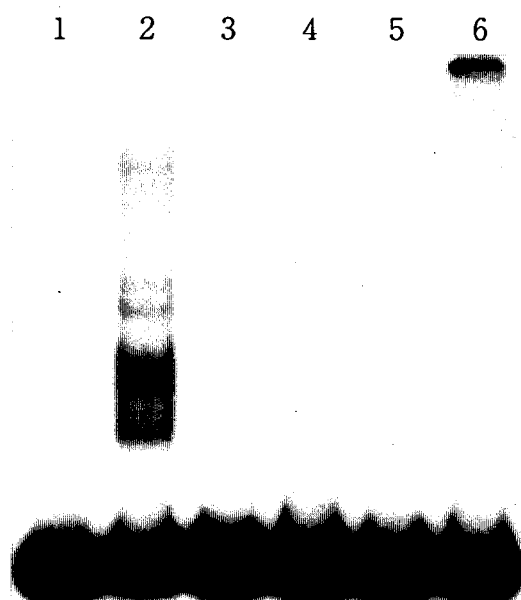


図2-5) 各種臓器から調製した核蛋白質の $H^+/K^+$ -ATPaseの $\beta$ サブユニット遺伝子上流のDNA断片Iへの結合。

レーン1はプローブのみ、レーン2～レーン6は各種臓器の核蛋白質を加えた。

レーン2は胃(0.16 $\mu$ g)、レーン3は肝臓(0.5 $\mu$ g)、レーン4は腎臓(0.46 $\mu$ g)、レーン5は脾臓(0.46 $\mu$ g)、レーン6は脳(0.46 $\mu$ g)の核蛋白質をそれぞれ用いた。図2-4で示した領域IのDNA断片をプローブとして、ゲルシフト法により解析を行なった。反応後、8%アクリルアミド中で電気泳動を行ない、乾燥後、オートラジオグラフィーを行なった結果を示した。プローブと核蛋白質の結合によるバンドは矢印で示した。

## 2. 領域 I に存在する認識配列の同定

上に述べたように、 $\beta$ サブユニット遺伝子のDNA断片 I (+15bpから-185bp) に特異的に結合する蛋白質が胃においてのみ見いだされた。この蛋白質とDNA断片 I に存在する結合配列が胃壁細胞における $\beta$ サブユニット遺伝子の特異的な発現に関与している可能性が高い。そこで、この核蛋白質の認識配列を同定することを試みた。まず結合領域を絞るために、DNA断片 I の3'側が40bpを欠失したDNA断片(DNA断片 I')をつくり、ゲルシフト法により胃の核蛋白質が結合するかどうかを調べた。DNA断片 I をプローブとして用いたときに見られる蛋白質の結合によるバンドは、非標識のDNA断片 I' を過剰に加えると拮抗反応により消失した。さらにDNA断片 I' をプローブとしてゲルシフト法を行ったところ、DNA断片 I をプローブに用いたときと同じ移動度のバンドが検出された(図 2-7)。以上の結果から、胃の核蛋白質の結合する領域はDNA断片 I' に対応する部分(-26bpから-186bp)の間にあることが明らかになった。

さらに詳しく核蛋白質の結合領域を同定するため、合成した二本鎖オリゴヌクレオチド R $\beta$ 1 (-181bpから-153bp), R $\beta$ 2 (-159bpから-120bp), R $\beta$ 3 (-129bpから-95bp), R $\beta$ 4 (-100bpから-61bp), R $\beta$  5 (-69bpから-34bp), R $\beta$ 6 (-38bpから-1bp)のいずれかが、DNA断片 I への核蛋白質の結合を阻害するかどうか実験を行った。この結果、R $\beta$ 2, R $\beta$  3, R $\beta$ 4が核蛋白質とDNA断片 I の結合を拮抗的に阻害した(図 2-8)。この結果は、R $\beta$ 2, R $\beta$  3, R $\beta$ 4の3つのDNA断片に共通に含まれる塩基配列にこの蛋白質が結合していることを示唆している。実際に、これらの断片に共通に存在する配列GATAGCとを見いだすことができた。

さらに、フットプリント法によって核蛋白質の結合している塩基配列を同定した。すなわち、 $\beta$ サブユニット遺伝子上流に上に述べたGATAGCという配列を含む-103bpから-111bpに胃の核蛋白質が結合した。さらに、蛋白量を増やしていくと、-85bpから-94bp、-137bpから-151bpの領域にも核蛋白質の結合が見られるようになり、これらの領域にもGATAGCという配列が存在した(図 2-9)。以上の結果から、胃の核蛋白質のなかに $\beta$ サブユニット遺伝子上流のDNA断片 I に結合するものがあり、

a)

```

                                     Hα1
                                     _____
-124                                accccaaggagcctgTAATCAGCT -101
                                     Hα2
      _____
-100  Gtggtcggggcggttctgctccacccccaccgcccctccctgggtatatcagg -51
      _____
-50  actggtccggggcccaggctctgttgggtgggagcacaggcaccggggcacc -1

```

b)

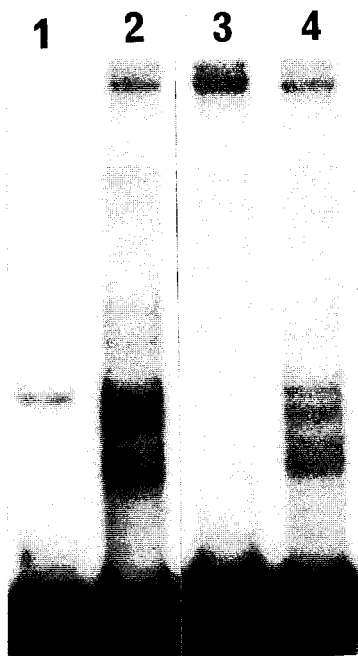


図2-6)  $H^+/K^+$ -ATPaseの $\alpha$ サブユニットと $\beta$ サブユニット遺伝子上流域に共通に結合する胃の核蛋白質が存在する。

- a)  $H^+/K^+$ -ATPaseの $\alpha$ サブユニット遺伝子上流領域で胃の核蛋白質が結合する配列。  
 $\alpha$ サブユニット遺伝子上流領域で胃の核蛋白質が結合する配列（これを大文字で示した）を含む領域をHα1（-94bp～-116bp）、結合配列を含まない領域をHα2（-70bp～-92bp）とした。
- b)  $\beta$ サブユニット上流の領域Iに対応するDNA断片と胃の核蛋白質の結合に対するHα1とHα2による拮抗阻害反応。  
 レーン1はプローブのみ、レーン2はプローブと胃の核蛋白質を加えた。  
 レーン3にはHα1、レーン4にはHα2をそれぞれプローブ胃の核蛋白質とともに加えた。  
 図8で示した領域IのDNA断片をプローブとして、ラットの胃から調製した核蛋白質を0.16 $\mu$ g用いて反応を行なった。反応後、8%ポリアクリルアミド中で電気泳動を行ない、乾燥後、オートラジオグラフィーを行なった結果を示した。拮抗反応は、Hα1とHα2をプローブの50倍加えて行なった。プローブと核蛋白質の結合によるバンドは矢印で示した。



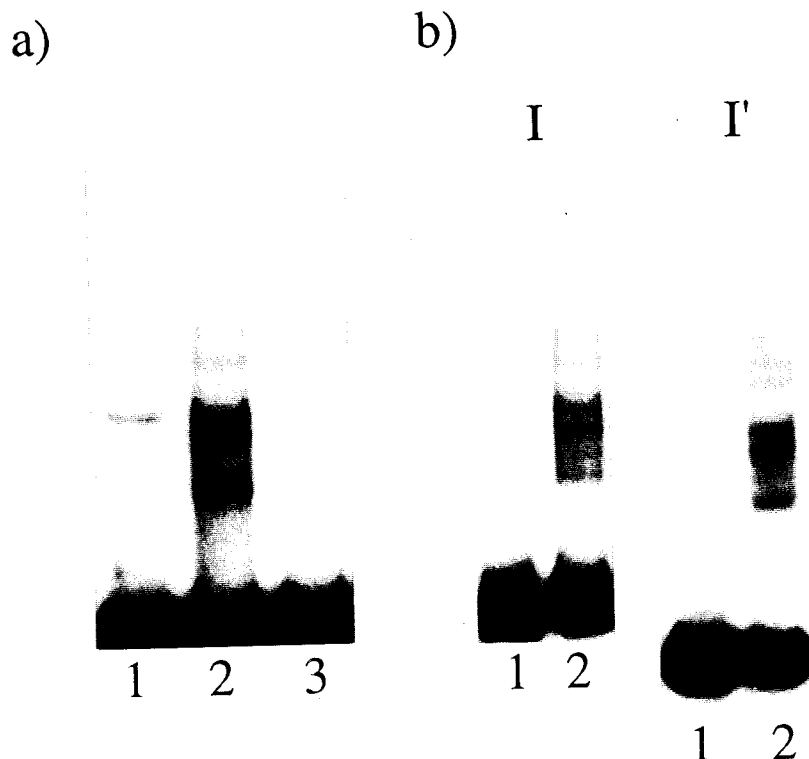
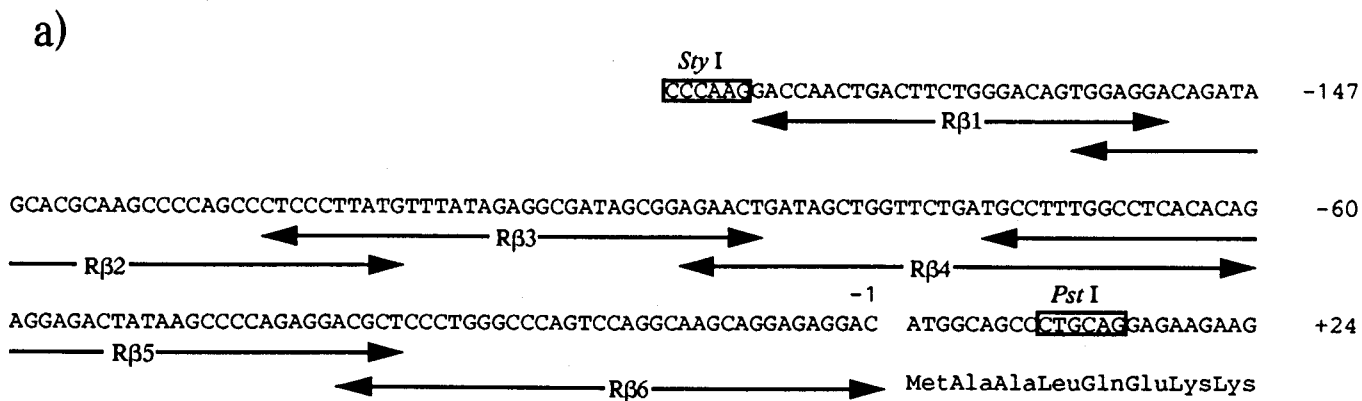


図 2-7)  $H^+/K^+$ -ATPase  $\beta$ サブユニット遺伝子上流領域 I に存在する胃の核蛋白質の結合領域の同定

- a) 領域 I に対応する DNA 断片をプローブと、胃の核蛋白質との結合が領域 I' (領域 I の C 末端側を 40bp 欠失したもの) に対応する DNA 断片により拮抗阻害されるかどうかを調べた。  
 レーン 1 はプローブのみ、レーン 2 はプローブとラットの胃の核蛋白質 (0.16 $\mu$ g) を加えたもの、レーン 3 はさらに領域 I' の DNA 断片をプローブの 50 倍量加えたもの。反応後、8% ポリアクリルアミド中で電気泳動を行ない、ゲルを乾燥後、オートラジオグラフィーを行なった結果を示した。
- b) DNA 断片 I' をプローブとして胃の核蛋白質の結合を確認した。  
 レーン 1 はプローブのみ、レーン 2 はプローブとラットの胃の核蛋白質 0.16 $\mu$ g を加えたもの。反応後、8% ポリアクリルアミド中で電気泳動を行ない、ゲルを乾燥後、オートラジオグラフィーを行なった結果を示した。



b)

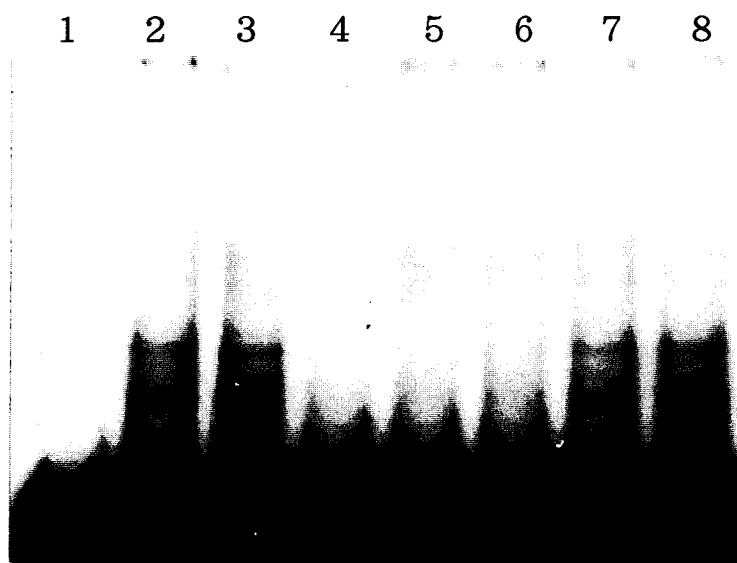


図 2-8)  $H^+/K^+$ -ATPase  $\beta$ サブユニット遺伝子上流領域 I に存在する胃の核蛋白質の結合部位の同定。

- a) 領域 I を 5 つの部分に分けた。Rβ1(-181bp から -153bp)、Rβ2(-159bp から -120bp)、Rβ3(-129bp から -95bp)、Rβ4(-100bp から -61bp)、Rβ5(-69bp から -34bp)、Rβ6(-38bp から -1bp) の位置と塩基配列を示した。
- b) 領域 I に対応する DNA 断片と、ラットの胃の核蛋白質との結合を Rβ1~Rβ6 の DNA 断片が拮抗阻害するかどうか調べた。
- レーン 1 はプローブ (領域 I に対応する DNA 断片) のみ、レーン 2 はプローブとラット胃の核蛋白質 (0.16 $\mu$ g) を加えたもの、レーン 3~8 はさらに Rβ1、Rβ2、Rβ3、Rβ4、Rβ5、Rβ6 の断片をそれぞれプローブの 50 倍加えた。反応後、8% ポリアクリルアミド中で電気泳動を行ない、ゲルを乾燥後、オートラジオグラフィーを行なった結果を示した。

この蛋白質はDNA断片 IにあるGATAGCという塩基配列を認識していることが明らかになった。

### 3. 領域 II, IIIおよびIVに結合する蛋白質の解析

領域 I以外に、胃の核蛋白質は領域 II, IIIおよびIVにも結合した(図 2-4)。そこで領域 Iに対応するDNA断片Iをプローブとしてゲルシフト法を行ない、領域 IからVの非標識のDNA断片がプローブと核蛋白質の結合を拮抗阻害するかどうか実験を行った(図 2-10)。プローブに対してそれぞれ50倍の標識していないDNA断片を加えると、領域 I, 領域 IIおよびIVのDNA断片を加えたときに領域 Iと核蛋白質との結合が拮抗的に阻害された。この結果、領域 Iに結合する蛋白質は領域 II, IVの配列も認識すると考えられた。しかし、領域 I、領域 IIおよび 領域IVのDNA断片に対し、同じ量の胃の核蛋白質を結合させたところ、領域 IIおよび 領域IVのDNA断片に対する、核蛋白質の結合によるバンドが、領域 IのDNA断片に対するものよりもかなり薄い(図 2-4)、また、領域 IのDNA断片への胃の核蛋白質の結合が、プローブとして用いたDNA断片の50倍量の非標識の領域 Iにより完全に拮抗されるのに対し、領域 IIおよび領域 IVのDNA断片を用いたときに、同じ50倍量を用いても完全には阻害されなかった(図 2-10)。この結果、領域 IIおよび領域 IVに対する胃の核蛋白質の親和性は、領域 Iに対してよりも低いことが分かった。

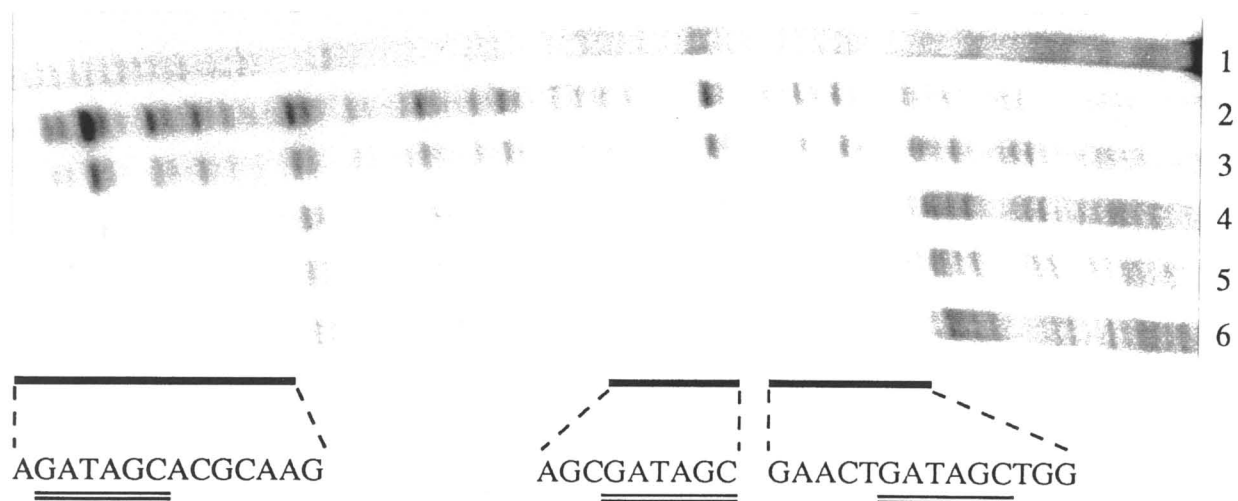


図2-9) フットプリント法によるH<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase βサブユニット遺伝子上流領域Iに存在する核蛋白質の結合配列の同定。

領域Iに対応するDNA断片と、ブタ胃粘膜から調製した核蛋白質との結合をみた。

レーン1は領域IのDNA断片を用いMaxam-GilbertのA+G反応を行ったもの、レーン2～6は領域IのDNA断片と蛋白質を加えて、DNase Iフットプリント法を行ったものを示した。レーン2はBSAを30μg、レーン3～6は胃の核蛋白質をそれぞれ、レーン3は2.2μg、レーン4は5μg、レーン5は7μg、レーン6は10μg加えてフットプリント反応を行なった。反応後、ポリアクリルアミド中で電気泳動を行ない、ゲルを乾燥後、オートラジオグラフィーを行なった結果を示した。フットプリントの見えた部分(黒太線)塩基配列を横に示した。

#### 4. 領域 II および IV に結合する核蛋白質の結合領域の同定

これまでの結果より、領域 I に結合する核蛋白質と領域 II と領域 IV に結合する核蛋白質が類似の配列を認識している可能性が示唆された。そこで、これらの異なる領域に結合する蛋白質の認識配列を明らかにする必要がある。まず、領域 II, IV に対応する DNA 断片をプローブにして、図 2-8 で示した DNA 断片 R $\beta$ 1, R $\beta$ 2, R $\beta$ 3, R $\beta$ 4, R $\beta$ 5 および R $\beta$ 6 を用いた結合拮抗実験を行った(図 2-1 1)。この結果、領域 II と領域 IV においても領域 I のときと同じように、R $\beta$  2, R $\beta$ 3, R $\beta$ 4 を用いたときにおいてのみ移動度の異なるバンドが消失した。したがって領域 II および領域 IV に結合する蛋白質も領域 I と同じく、GATAGC という配列を認識していることが明らかになった。そこで領域 II および領域 IV に GATAGC という配列が実際に存在するかを検索した。その結果、同じ配列は存在しなかったが、よく似た配列が領域 II (GATTCT, GATAGG) と 領域 IV (GATGGA, GATAAC) 共に 2 箇所ずつ存在した(図 2-1 2)。したがって、2 つの領域ともに 2 箇所ずつある配列のどちらかもしくは両方に核蛋白質が結合すると考えられる。そこでどちらの配列に結合しているかを明らかにするために、その配列を含む領域 II-A(-221bp から -245bp), II-B(-239bp から -266bp), IV-A(-432bp から -456bp), IV-B(-522bp から -556bp) に相当する二本鎖オリゴヌクレオチドを合成し、これらを用いてプローブと核蛋白質の結合を拮抗的に阻害するかを検討した(図 2-1 2)。その結果、領域 II では II-B を、領域 IV では IV-B を用いたときにそれぞれ特異的に各領域と核蛋白質との結合が阻害された。これより領域 II では -239 から -266 の領域に、領域 IV では -522 から -556 の領域に蛋白質が結合することが明らかになった。以上の結果から核蛋白質の結合配列を推定し、領域 II では GATAGG, 領域 IV では GATAAG であると結論した。さらに領域 I で決定した結合配列 GATAGC と合わせて、 $\beta$  サブユニット遺伝子上流領域に結合する蛋白質の認識配列は GATA(G/A)(G/C) であると結論した。

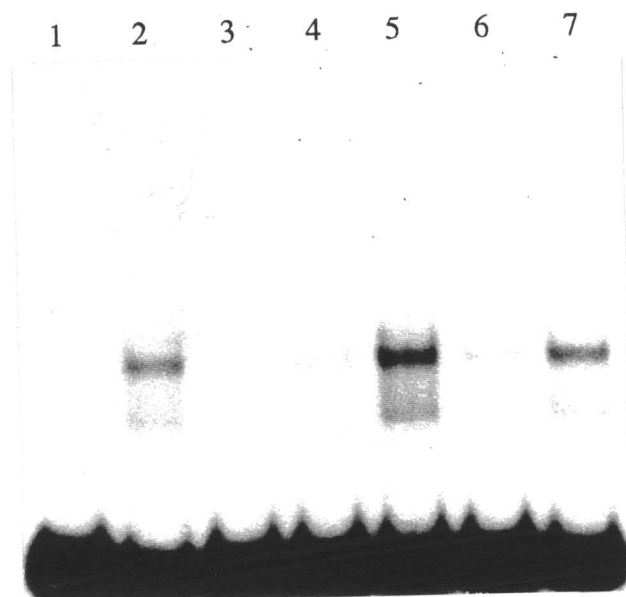


図2-10) 同じ核蛋白質がH<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase βサブユニット遺伝子上流の異なる部分に結合する。

領域ⅠのDNA断片をプローブとして、ラットの胃の核蛋白質との結合を行った。

これに領域Ⅰ～領域Ⅴに対応するDNA断片を加えることによって結合が拮抗阻害されるかを調べた。レーン1はプローブのみ、レーン2はプローブとラット胃の核蛋白質(0.16μg)を加えたもの、レーン3は領域Ⅰ(+14bpから-185bp)、レーン4は領域Ⅱ(-193bpから-322bp)、レーン5は領域Ⅲ(-330bpから-423bp)、レーン6は領域Ⅳ(-424bpから-556bp)、レーン7は領域Ⅴ(-553bpから-708bp)までの断片をそれぞれプローブの50倍量加えた。反応後、ポリアクリルアミド中で電気泳動を行ない、ゲルを乾燥後、オートラジオグラムを行なった結果を示した。

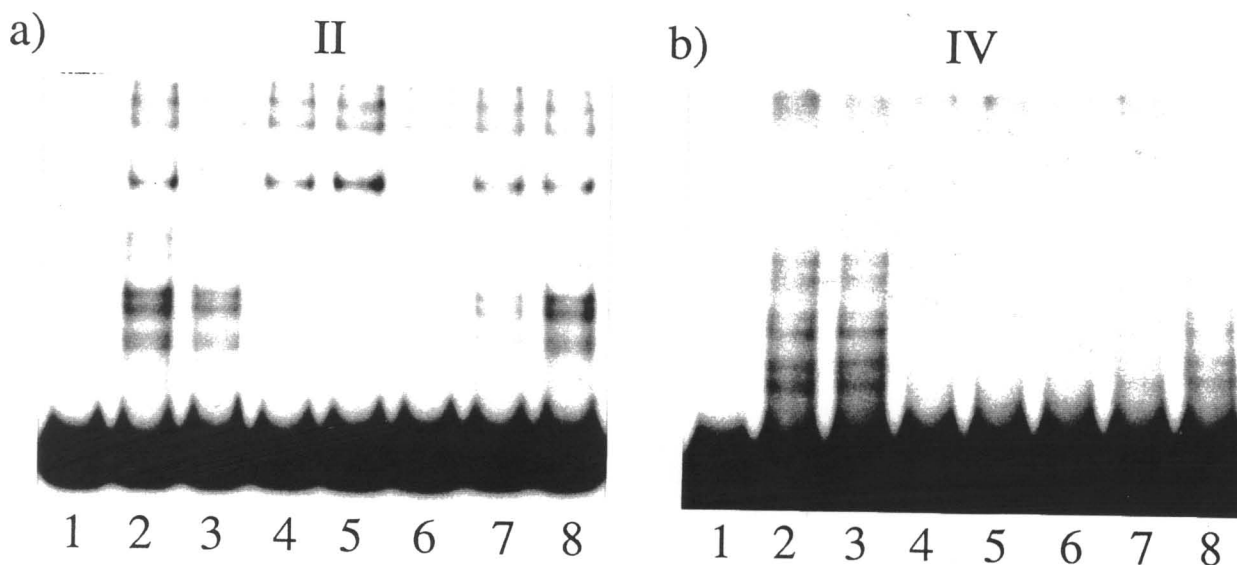
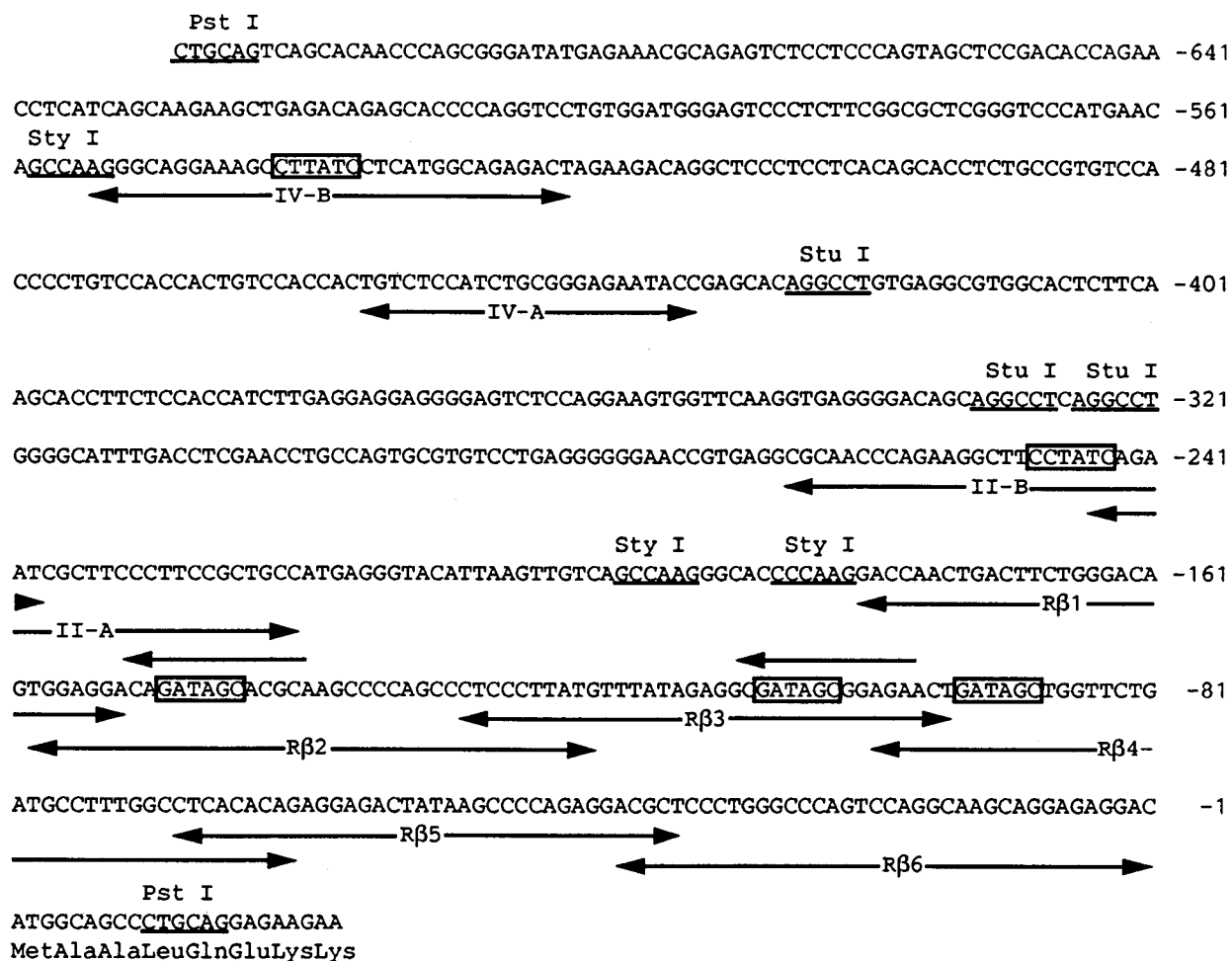


図 2-11)  $H^+/K^+$ -ATPase  $\beta$ サブユニット遺伝子上流領域 II と IV に存在する胃の核蛋白質が結合する部位の同定。

領域 II の DNA 断片および領域 IV の DNA 断片と核蛋白質の結合に対する図 2-8 で示した  $R\beta 1 \sim R\beta 6$  までの断片による拮抗阻害を調べた。

- a) は領域 II に対応する DNA 断片を 0.2 pmol b) は領域 IV に対応する DNA 断片を 0.2 pmol プローブとして用いた。レーン 1 はプローブのみ、レーン 2 はプローブとラット胃の核蛋白質 (0.4  $\mu$ g) を加えたもの、レーン 3 ~ 8 はさらに非標識のオリゴヌクレオチドをそれぞれプローブの 50 倍加えたものを示した。[レーン 3,  $R\beta 1$  (-181bp から -153bp)、レーン 4,  $R\beta 2$  (-159bp から -120bp)、レーン 5,  $R\beta 3$  (-129bp から -95bp)、レーン 6,  $R\beta 4$  (-100bp から -61bp)、レーン 7,  $R\beta 5$  (-69bp から -34bp)、レーン 8,  $R\beta 6$  (-38bp から -1bp)]。反応後、8% ポリアクリルアミド中で電気泳動を行ない、ゲルを乾燥後、オートラジオグラフィーを行なった結果を示した。
- c)  $H^+/K^+$ -ATPase  $\beta$ サブユニット遺伝子上流領域 (+15bp から -709bp) までの配列を示した。図 2-8 ですでに示した  $R\beta 1 \sim R\beta 6$ 、および II-A (-221bp から -245bp)、II-B (-239bp から -266bp)、IV-A (-432bp から -456bp)、IV-B (-522bp から -556bp) の位置を示した。また領域 I で既に見いだした GATAGC の配列、さらに、領域 II と領域 IV に 2 個ずつある類似の配列を  $\square$  で示した。DNA 断片の調製に用いた制限酵素部位を下線を引いて示した (次頁) 図 15-C)

图 2-1 1 c)





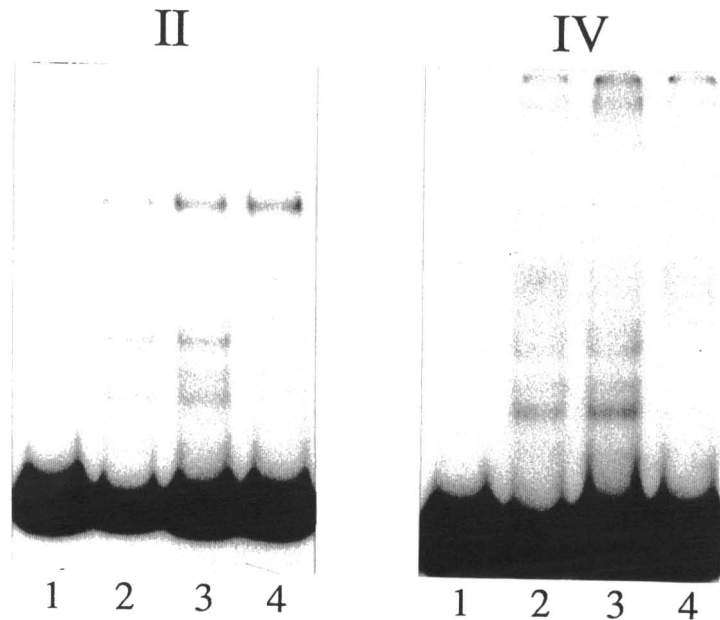


図 2-1 2)  $H^+/K^+$ -ATPase  $\beta$ サブユニット遺伝子上流領域 II および IV に対応する DNA断片の胃の核蛋白質の結合配列。

- a) は領域 II の DNA断片を、b) は領域 IV の DNA断片をプローブとして、核蛋白質との結合に対する合成オリゴヌクレオチド断片による拮抗阻害を調べた。
- a) レーン 1 はプローブのみ、レーン 2 はプローブとラット胃の核蛋白質(0.48 $\mu$ g)を加えたもの、レーン 3 とレーン 4 はさらに、II-A(-221bp から -245bp)、II-B(-239bp から -266bp) のオリゴヌクレオチドをそれぞれプローブの 50 倍加えた。
- b) レーン 1 はプローブのみ、レーン 2 はプローブとラット胃の核蛋白質(0.4 $\mu$ g)を加えたもの、レーン 3 とレーン 4 はさらに IV-A(-432bp から -456bp)、IV-B(-522bp から -556bp) のオリゴヌクレオチドをそれぞれプローブの 50 倍加えた。どちらも反応後、8% ポリアクリルアミド中で電気泳動を行ない、ゲルを乾燥後、オートラジオグラフィーを行なった結果を示した。オリゴヌクレオチド II-A、II-B、IV-A、IV-B の位置と配列は図 1 5- c) に示した。

#### 第4節 考察

既に述べたように、胃酸分泌酵素である $H^+/K^+$ -ATPaseの遺伝子は胃粘膜において特異的に発現している<sup>13-15)</sup>。本論文では遺伝子の特異的な転写に関与する因子および配列を同定することを目的として研究を進めている。結果の項で述べてきたように、 $H^+/K^+$ -ATPase  $\beta$ サブユニット遺伝子上流で領域I, 領域IIおよび領域IVに同じ胃の核蛋白質が特異的に結合する領域が存在することを明らかにした。合成オリゴヌクレオチドを用いた結合拮抗実験や、フットプリント法によってこの蛋白質の認識配列を検討した。その結果、この蛋白質はGATA(G/A)(G/C)という配列を認識していることを明らかにした。この配列はすでに明らかになっている $\alpha$ サブユニット遺伝子上流に存在する、胃の核蛋白質による認識配列CAGCTGATTAとよく似ている。実際に、この配列を含むDNA断片との拮抗実験より領域Iには $\alpha$ サブユニット遺伝子上流と同じ蛋白質が結合していることが明らかになった(図2-13)。以上の結果は、 $H^+/K^+$ -ATPaseの $\alpha$ サブユニットと $\beta$ サブユニットの遺伝子が共通の転写因子によって調節されていることを示唆しており、両サブユニットの協同的な発現を考える上で興味深い。壁細胞に特異的に発現している他の遺伝子として、ヒスタミン $H_2$ 受容体<sup>42-44)</sup>、内因子<sup>46,47)</sup>等が知られているが、これら遺伝子の5'上流域に $H^+/K^+$ -ATPaseの $\beta$ サブユニット遺伝子上流に見いだした塩基配列が存在するかを調べることは重要であると考えられる。

$H^+/K^+$ -ATPaseの2つのサブユニット遺伝子上流に見いだした核蛋白質の結合配列は中心にGATAという配列を持っている。GATAという配列を認識する核蛋白質として、GATA結合蛋白質が知られている<sup>94)</sup>。これらの蛋白質は、WGATAR (ここではWはA/T、RはA/Gを示す) という配列を認識している。この配列に結合する転写因子として、最初に発見されたのがGATA-1である。この因子のcDNAはマウス<sup>86)</sup>、ニワトリ<sup>89)</sup>、ヒト<sup>91)</sup>、アフリカツメガエルの卵<sup>92)</sup>からそれぞれ得られている。cDNAより推定される一次構造から、この因子は4個のCys残基からなる新しい形のCXXC-X<sub>17</sub>-CXXC型 (Cはシステインを、Xは他のアミノ酸を示す) のZnフィンガー

|                      |                       |               |                               |
|----------------------|-----------------------|---------------|-------------------------------|
| Rβ2 (-159bp--120bp)  | TGGAGGACAG            | <b>GATAG</b>  | CACGCAAGCCCCAGCCCTCCCTTATG    |
| Rβ3 (-129bp--95bp)   | CTCCCTTATGTTTATAGAGGC | <b>GATAG</b>  | CGGAGAACT                     |
| Rβ4 (-100bp--61bp)   | AGAACT                | <b>GATAG</b>  | CTGGTTCTGATGCCTTTGGCCTCACACAG |
| II-B (-238bp--265bp) | ATTCT                 | <b>GATAG</b>  | GAAGCCTTCTGGGTTGCG            |
| IV-B (-522bp--554bp) | AGTCTCTGCCATGAG       | <b>GATA</b>   | AAGGCTTTCCTGCCCT              |
| β consensus sequence |                       | <b>GATARS</b> |                               |
| α consensus sequence | CAGCT                 | <b>GATTA</b>  |                               |

図2-13) H<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase α、β両サブユニット遺伝子上流領域に見いだされた胃の核蛋白質が結合するβサブユニット遺伝子上流の塩基配列とその位置。  
 胃の核蛋白質はRβ2、Rβ3、Rβ4、II-B、IV-Bに結合することを示した(図2-8,12)。これらのオリゴヌクレオチドの共通に存在する配列(β consensus sequence)としてGATARSが明らかになった。この配列をαのものと比較すると、GATA(A/T)という共通配列が見いだせる。この配列に、胃の核蛋白質が結合し転写調節に関与していると考えられる。ここで、RはA/G、SはC/Gを示している。

構造を2つ並んで持つことが示されている。GATA-1は赤血球系の分化に必須であり、赤血球系に特異的な転写調節因子であると考えられていた。しかし最近になり、GATA-1が肥満細胞<sup>95)</sup>、巨核球<sup>95,96)</sup>や精巣<sup>97)</sup>においても発現し、転写調節を行っていることが報告され、GATA-1単独では赤血球系に特異的な転写調節を行えず、赤血球系に発現している他の因子との相互作用が必要であることが示された。GATA-2は、血管内皮細胞<sup>98-100)</sup>、赤芽球に加えて胎児の脳、肝臓などに発現している<sup>88)</sup>。GATA-3はT細胞および脳に特異的な遺伝子の転写に関与していると考えられている<sup>101-103)</sup>。この様にGATA因子群は同じ調節配列を認識する転写調節因子として1つのファミリーを形成しており、主に細胞の特異的な分化の決定に働いていると考えられている。

したがって、本研究で新たに見い出された $H^+/K^+$ -ATPaseの $\beta$ サブユニット遺伝子および $\alpha$ サブユニット遺伝子上流に存在するGATA様配列に結合する蛋白質がこの転写調節因子ファミリーに属している可能性が高い。この蛋白質が調節因子として、単独でもしくは他の因子と共同で、胃の壁細胞に特異的な遺伝子の発現調節に重要な役割を果たしている可能性がある。これらの蛋白質および配列が、遺伝子の転写の調節にどのように関与しているかを明らかにすることは興味深い問題である。プロモーター領域の機能を解析するためには対象とする遺伝子が恒常的に発現している培養細胞が一般に用いられている<sup>104)</sup>。しかし、 $H^+/K^+$ -ATPaseに関しては、現在このような培養細胞系は存在していない。したがって、調節蛋白質の機能を明らかにするためには1) この章で明らかにした配列に結合する、転写活性化因子を単離し、 $H^+/K^+$ -ATPase遺伝子の転写活性化への関与を調べる。2) *in vitro*で転写反応を解析する系を胃の核蛋白質を用いて構築する。3) 胃粘膜由来の癌細胞をスクリーニングすることにより、解析に用いることのできる培養細胞系を確立する。といった方法が考えられる。このうち2) で述べた *in vitro*の転写系はすでに肝臓や脳においてプロモーター活性の組織特異性を調べるのに用いられており<sup>105,106)</sup>、培養細胞系の確立よりは、容易であると考えた。そこで核蛋白質を用いて転写活性を調べられる系を構築することを試みた。しかし、胃からは十分な転写活性を持つ核蛋白質を得ることができなかった。上に述べた他の2つの方法のうち、1) につ

いては3章において、3) については5章においてそれぞれ用いて転写調節因子の機能を明らかにすべく研究を行った結果について述べる。

### 第3章 壁細胞に特異的に発現している転写調節因子による

#### ラットH<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase 遺伝子の転写活性化

##### 第1節 緒言

第2章で、 $\alpha$ と $\beta$ サブユニット遺伝子上流には、同じ核蛋白質が結合し、その共通配列は(G/C)PuPu(G/C)NGAT(A/T)PuPyであることを明らかにした。この配列は、GATA結合蛋白質の典型的な認識配列(A/T)GATA(A/G)を含んでいる<sup>94)</sup>。したがって、この配列にGATA結合蛋白質ファミリーが結合し、H<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase 遺伝子の転写活性化に関与している可能性がある。実際に、GATA結合蛋白質ファミリーにおいて保存性の高い、亜鉛フィンガー領域の配列から合成したプライマーを用い、ブタの胃のcDNAからPCR法により新しいGATA結合蛋白質をコードしていると考えられる配列が得られた<sup>107)</sup>。この配列をプローブとして、ラットの胃のcDNAライブラリーより新しいGATA結合蛋白質である、GATA-GT1, GATA-GT2が当研究室の田村らにより単離された<sup>107)</sup>。GATA-GT1とGATA-GT2のアミノ酸配列を、すでに知られていたGATA結合蛋白質と比較すると、亜鉛フィンガー領域では80%以上の相同性があったが、それ以外の領域ではほとんど類似性がなかった(図3-1)。さらに、この2つの蛋白質は壁細胞に特異的に発現していることが、*in situ* hybridization法によって明らかになった<sup>108)</sup>。以上の結果は、GATA-GT1あるいはGATA-GT2が、H<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase 遺伝子の転写活性化に関与している可能性を強く示唆している。

本章では、GATA-GT1あるいはGATA-GT2が、実際にH<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase遺伝子の転写を活性化するかどうか明らかにするべく研究を進めた。遺伝子の転写活性化機構の解析には、解析したい遺伝子の5'上流領域を、CAT (chloramphenicol acetyl transferase)、 $\beta$ -galactosidase、luciferaseなどのレポーター遺伝子につなぎ、培養細胞に導入して活性を測る方法が広く用いられている。しかし、現在までにH<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPaseが恒常的に発現しているような培養細胞はまだ樹立されていない。そこで本研究では、ラットH<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase  $\alpha$ および $\beta$ サブユニット遺伝子上流域にルシフェラーゼ遺伝子をつないだレポーター遺伝子プラスミドを構築し、これをGATA発現プラスミドと同時にHeLa細

1)

|           |                                                                                   |     |
|-----------|-----------------------------------------------------------------------------------|-----|
| hGATA-1   | -----MEFP                                                                         | 4   |
| hGATA-2   | MEVAPEQPGWMA--HPAVLNAHDPDSSHHPGLAHNYMEPAHVLPPEVDVFFNHLDSQGN---PYYANPAHARAAYS-YSF  | 74  |
| hGATA-3   | MEVTADQPRWVSHHHPAVLNGQHPDTHHPGLSHSYMDAAQYPLPEEVDVLENI-DGQGNHVPYFGNSV--RATVQRYPP   | 77  |
| hGATA-1   | GLGSLGTSEP-LPQFVD-PAL--V-SSTPE-SGVFF-PSGPEGLDA-AASSTAPSTATAAAAAALAYYRDA-EAYRHSPVF | 75  |
| hGATA-2   | AHARLTGSQMCRPHLLHSPGLPWLDGGKAALSAAAHHHNPWTVPFSKTPHPSAAGGPGGFLSVYPGAGGGSGGGSGS     | 154 |
| hGATA-3   | TH-H--GSQVCRPPLLHG-SLPWLDGGK-AL--GSHHTASPNLSPFSKTSIHH---GSP-GPLSVYPP-----AS-S     | 137 |
| rGATA-GT1 | -----MLPGLPYLQAGSGSPSNHAGGAGAHPGW-P---QA-SADSP-PY--GG--GGAAGGGAAGPGGAGSATA        | 59  |
| rGATA-GT2 | MYQSLAMAANHGPPPGAY-EAGGPGAFMHSAGAASSPVYVP-TPRVPSVLGLSYLQGGGSGAASGATSGGSSGAGPSGA   | 78  |
| cGATA-5   | MYQGLALAPNHG--QSAY--SHDSGNFLHS--SAGSPVYVP-TTRVPSVLQTLPLYLQ--SCEPHQSHL--GNP-PG-WAQ | 67  |
| hGATA-1   | QVYPLL-NCMEGIPGGSPYAGWAYGKTGLYPASTVCPTR-EDSPQAVEDLDGKGSTSF---L-ETLKTE---RLSPDLL   | 146 |
| hGATA-2   | SVASLTPTAAHSGSHLFGFPPTPPKEVSPDPSTTGAASPASSSAGGSAARGEDKDGKQVQVSLTESMKMESGSPLRPGLA  | 234 |
| hGATA-3   | S--SL--SGGHASPHLFTFPPTPPKDVSPDPS---LSTP--GSA-GS-ARQDEKECLKYQVPLPDSMKLESSHS-RGSMT  | 206 |
| rGATA-GT1 | HASARE-PYSPSPPMANGAARDPGGYVAA-GGAGAGSVSGGGGSLAAMGREHGYSSLSA-ARPLNG-TYHHHHHHHTY    | 134 |
| rGATA-GT2 | GPQTQQGSPGWSQAGAEGAAITPPPVSPRFSFPGTTGSLAAAAAAAAREAAAYSSSGGAAGAGLAGREQYGRPGFAGSY   | 158 |
| cGATA-5   | SSG--E-TTAF-N--A-GSPH-PPS-G--FSYP-HSPRAAAPRGVDGAYQGPLL--LGG-GGREQYG-NALVR-SVNGSY  | 130 |
| hGATA-1   | TL-GPALPSSLPVPN-SAY---GGPDFSSTFFSPTGSPLNSAAYS-SPKLRGTLPLPPQEAARECVNCGATATPLWRRDRT | 220 |
| hGATA-2   | TM-GTQPATHHPIPTYPSYVPAAHYSSGLFHP-GGFLGGPASSFTPKQRSK-ARSCSEGRCVNCGATATPLWRRDGT     | 311 |
| hGATA-3   | ALGGASSSTHHPIITYPYVP---EYSSGLFPP-SSLLGGSPTGFGCKSRPK-ARSTEGRCVNCGATSTPLWRRDGT      | 280 |
| rGATA-GT1 | -SPYMG---APLTPAW-----PAGPFETPVLHSLQSRAGAPLPVPRGPSADLLEDL-SESRECVNCGSIQTPLWRRDGT   | 204 |
| rGATA-GT2 | SSPYPAYM-ADVGSWAAAAAASAGPFDSPVLHSLPGR--AN-P--ARHPNLDMFDDFSEGRCVNCGAMSTPLWRRDGT    | 232 |
| cGATA-5   | SSPYPAYVTPELPPSW-----TAGHFESSVLHSLQTRQ-AALP-GRRSTFEYLEEFPGDGRECVNCGAMSTPLWRKDG    | 202 |
| hGATA-1   | GHYLCNACGLYHKMNGQNRPLIRPKRLIVSKRAGTQCTNCQTTTTTLWRRNASGDPVCNACGLYKHLQVNRPLTMRKD    | 300 |
| hGATA-2   | GHYLCNACGLYHKMNGQNRPLIKPKRRLSAARRAGTCCANCQTTTTTLWRRNANGDPVCNACGLYKHLNVNRPLTMKKE   | 391 |
| hGATA-3   | GHYLCNACGLYHKMNGQNRPLIKPKRRLSAARRAGTCCANCQTTTTTLWRRNANGDPVCNACGLYKHLNVNRPLTMKKE   | 360 |
| rGATA-GT1 | GHYLCNACGLYKMNGLSRPLIKPQKRVPSSRRLGLSCANCHTTTTTLWRRNAEGEPVCNACGLYKHLNVNRPLTMKKE    | 284 |
| rGATA-GT2 | GHYLCNACGLYHKMNGINRPLIKPQKRRLSASRRVGLSCANCQTTTTTLWRRNAEGEPVCNACGLYKHLNVNRPLTMKKE  | 312 |
| cGATA-5   | GHYLCNACGLYHKMNGINRPL-KPQKRLSSRRAGLCTTNCHTTNTTLWRRNAEGEPVCNACGLYKHLNVNRPLTMKKE    | 281 |
| hGATA-1   | GIQTRNRKASGKGGKRGSSSLGGTGAAGPAGGFVAVAGSGSGNCGEVASGLTLGPPGTAHLYQGLGPVVLSGPVSHLM    | 380 |
| hGATA-2   | GIQTRNRKMSNKSCKSK-KGAECFEELSKCMQE-KSSPFSAAALAGHMAPVGH-LPP-FSHSGHILPTPTPIHPSSSL--  | 465 |
| hGATA-3   | GIQTRNRKMSSSKSKCK-KVHDSLEDFPK-----NSS-FNPAALSRHMSLSH-ISP-FSHSSHMLTPTPMHPPSSL--    | 429 |
| rGATA-GT1 | GIQTRKRKPKNINKSKACSGNSSVPMTPTS-SSNSDDCT-KN-TS-P-PTQSTASGVGASVMSAVGESAN-PENSCLKY   | 358 |
| rGATA-GT2 | GIQTRKRKPKNLNKSCTPAGPPGESLPPSSGASSNSSNATSSSSSEEMRPIKTEPGLSSHYGHSSMSQTFSTVSGHGS    | 392 |
| cGATA-5   | SIQTRKRKPKNITKGKTSSTGSTTSATNSPSSITNSDSTVTLKSEPTT-SQYPGQ-GIVS-VSQAQSQSD--EALAGGEF  | 356 |
| hGATA-1   | PPFGPLLGSPTGSFPTGMPPTTSTTVVAPLSS                                                  | 413 |
| hGATA-2   | SF-G--HHPH-SSMVT-AMG                                                              | 480 |
| hGATA-3   | SF-G--PHHP-SSMVT-AMG                                                              | 444 |
| rGATA-GT1 | SGQDGL-YIGVS--L-SSPAEVTS--SVRQDSWCALALA                                           | 391 |
| rGATA-GT2 | SIHPVLSALKLSPQGYSPVTQTSQASSKQDSWNSLVLADSHGDIITA                                   | 440 |
| cGATA-5   | KFEP--EDYFSPSS-MAPQPGLS-VPLRQDSWCALALA                                            | 391 |

2)

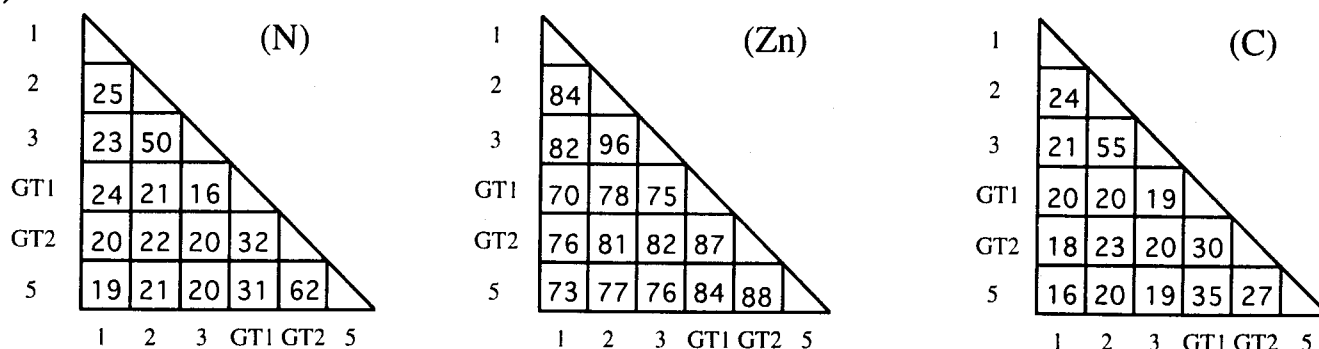


図3-1) GATA結合蛋白質の一次構造の比較

- 1) ヒトGATA-1<sup>(91)</sup>、ヒトGATA-2<sup>(98)</sup>、ヒトGATA-3<sup>(101)</sup>、ラットGATA-GT1、ラットGATA-GT2<sup>(107)</sup>、およびニワトリGATA-5<sup>(111)</sup>のアミノ酸配列を比較した。亜鉛フィンガー領域を四角で示した。
- 2) a) に示した亜鉛フィンガー領域、Zn)、そのN末端 (N)、およびC末端領域 (C) で6種のGATA蛋白質の間の相同性を比較した。亜鉛フィンガー領域以外では相同性が低いことがはっきりとわかる。

胞に導入した。すなわち、GATA-GT1あるいはGATA-GT2を一時的に発現させ、この2つの蛋白質の $H^+/K^+$ -ATPase遺伝子の転写活性化への関与について検討した。その結果、この系を用いることにより、 $H^+/K^+$ -ATPase遺伝子の転写はGATA-GT1あるいはGATA-GT2によって活性化されることが示された。

## 第2節 材料及び方法

### 1. HeLa細胞の培養

ヒト子宮頸癌由来HeLa細胞（阪大・微研 角永教授より分与）は、0.2 %  $NaHCO_3$ 、ペニシリンG（100 U/ml）、ストレプトマイシン（0.1  $\mu g/ml$ ）、ファンギゾン（2.5  $\mu g/ml$ ）、10 % NCSを含むDMEM培地を用いて、5 %  $CO_2$ 存在下で37℃で培養した。

### 2. レポータージーンベクター

ピッカジーン・ベーシックベクター, PGV-B（東洋インキ（株））は、ルシフェラーゼ遺伝子をコードするプラスミドでプロモーターを持たない（図3-2）。このルシフェラーゼ遺伝子上流に目的とする遺伝子のプロモーター領域を連結したレポータージーンプラスミドを構築し、培養細胞でルシフェラーゼ遺伝子の一過的発現をみることにより転写活性を調べた。このときの転写活性値は、SV40プロモーターとSV40エンハンサーを持つPGV-C（東洋インキ（株））（図3-2）を導入した培養細胞での活性値に対する相対値で表した。

### 3. レポータージーン・プラスミドの構築

PGV-Bの*Nhe* I-*Hin* dIII部位にラット $H^+/K^+$ -ATPaseの $\alpha$ サブユニット遺伝子上流約2.5Kbp（*Bam* HI-*Nco* I断片）を挿入したプラスミドpGVHK $\alpha$ とラット $H^+/K^+$ -ATPaseの $\beta$ サブユニット遺伝子上流約3 kbp（*Sma* I断片）を挿入したプラスミドpGVHK $\beta$ を構築した（図3-3）。さらに、ルシフェラーゼ遺伝子に連結したラット $H^+/K^+$ -ATPaseの $\alpha$ サブユニット遺伝子上流を各種制限酵素（*Afl* II、*Pst* I、*Sac* I、*Pvu* II）を用いて欠失



させたプラスミドおよび、 $\beta$ サブユニットの遺伝子上流を種々の長さ (*Sma* I - *Nde* I、*Sma* I - *Nhe* I、*Sma* I - *Nsp* V、*Sma* I - *Stu* I) で欠失させたプラスミド (図 3-4) を構築した。

#### 4. GATA配列への部位特異的な変異導入

$\alpha$ サブユニット遺伝子のTATA配列のすぐ上流に存在する2カ所のGATTをTCTTに、 $\beta$ サブユニットの上流約3 kbに存在する6つのGATA配列を各々GATAからTCTAに変異した組換えプラスミド (図 3-5) を構築した。変異DNA断片はGATA配列に変異を導入したプライマーを用い、PCR法により作成した。まず、それぞれの遺伝子上流を持つレポータージーン・プラスミドを鋳型として、変異を導入する部分に対応するセンスプライマーとその部分の外側のリバースプライマー、およびアンチセンスとフォワードプライマーでPCRを行った。その産物を分離し、鋳型DNAとして外側のフォワード及びリバースプライマーでPCRを行い、変異の導入されたDNA断片を得た。この断片をそれぞれ適切な制限酵素で切断し、レポータージーンプラスミドに再度組み込んだ (図 3-6) 。変異を導入したDNA断片はいずれも、ABI 373 自動シーケンサー (Applied Biosystems) を用いて全塩基配列を決定した。

#### 5. トランスフェクションに用いる細胞の調製

上に示した方法で培養した細胞を、細胞数が ディッシュ1枚 ( $\phi$  10 cm) あたり  $2 \sim 8 \times 10^6$  cellsになるように植え継ぎ、5 %  $\text{CO}_2$ 存在下で37 °Cで培養した。17~19時間後に培地を取り除き、細胞を10 mlのPBSで2回洗った後、0.5 mlの0.25 %トリプシンと0.5 mlのPBSを加え、5%  $\text{CO}_2$ 存在下で37 °Cで15分間トリプシン処理した。血清 (0.5 ml) を加えてトリプシンの反応を止め、ディッシュからはがした細胞を、50 mlのコーニングチューブに移し、PBSを加えて全量40 mlとなるようにした。室温で遠心 (750 rpm、5分間) し、上清を吸引して取り除いた。これにPBSを40 ml加え、ピペットによって細胞をほぐし、血球計測板を用いて細胞数を測定した。再度、室温で遠心したのち、PBSを

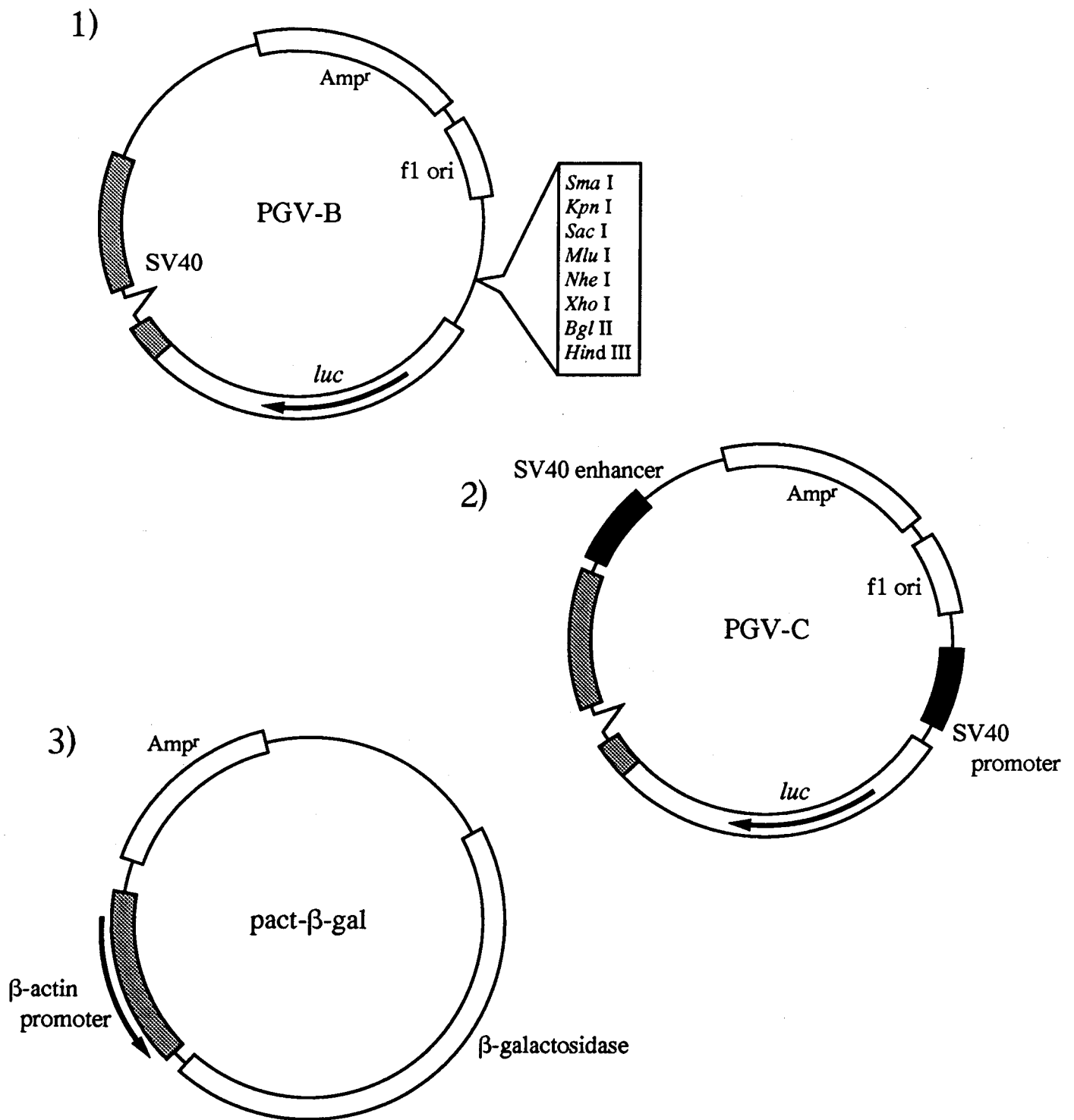


図3-2) プラスミドの構造

- 1) PGV-B ルシフェラーゼ遺伝子を持ち、そのすぐ上流に遺伝子を導入できるように各種制限酵素部位を導入したプラスミド。プロモーターおよびエンハンサーは持たない。  
*luc*はルシフェラーゼ遺伝子のコード領域、Amp<sup>r</sup>はアンピシリン耐性遺伝子、SV40はSV40の polyA付加シグナルおよびイントロンを示した。
- 2) PGV-C ルシフェラーゼ遺伝子の上流に、SV40 promoter、およびSV40 enhancerを持つ。
- 3) pact-β-Gal βアクチン・プロモーターの下流にβガラクトシダーゼ遺伝子を持つプラスミド。

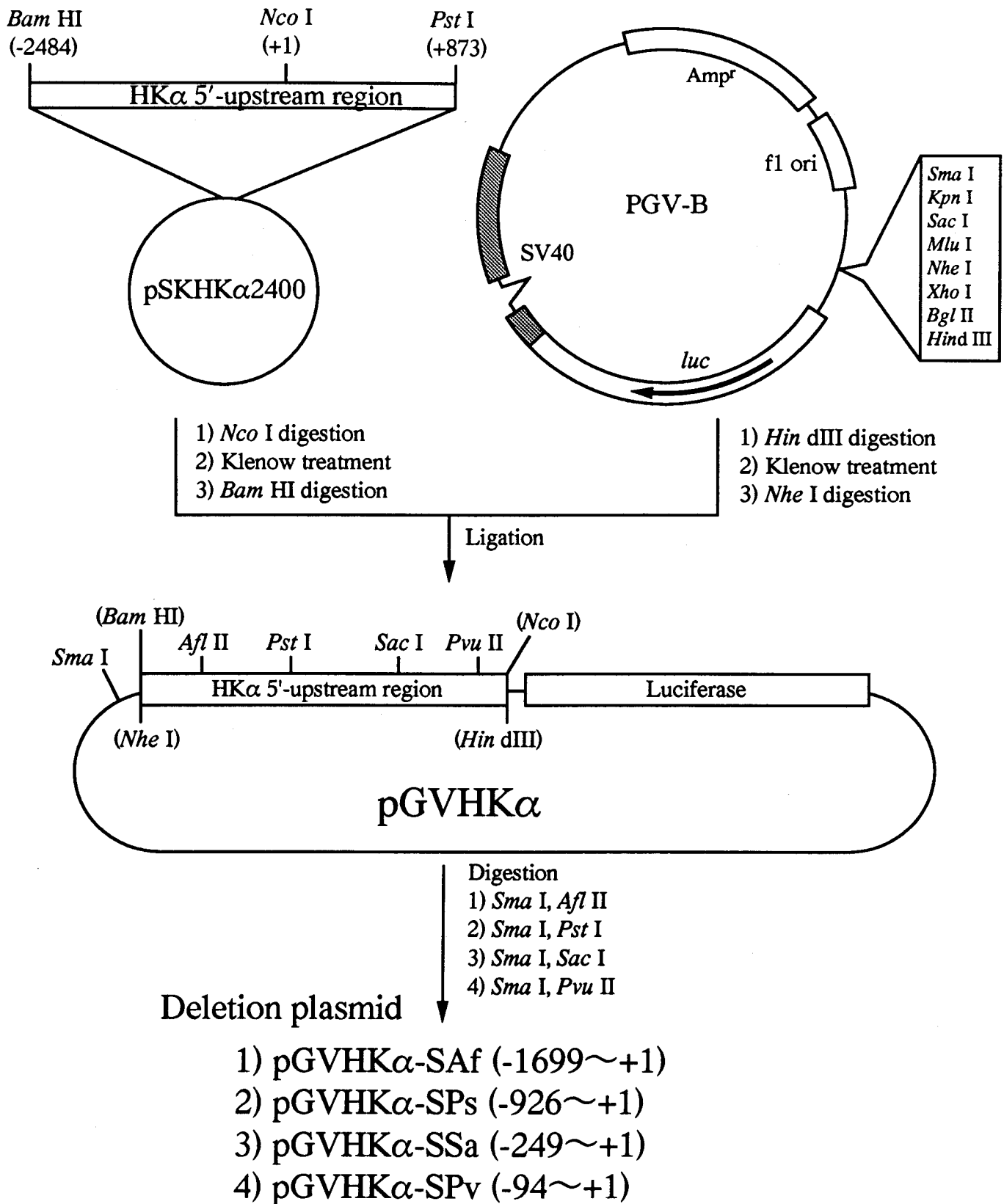


図3-3) ルシフェラーゼ遺伝子上流にラット $H^+/K^+$ -ATPase  $\alpha$ サブユニット遺伝子5'上流を結合させたレポーター遺伝子の構築

ベシクベクターPGV-Bの $Nhe$  I- $Hin$  dIII部位にラット $H^+/K^+$ -ATPase の $\alpha$ サブユニット遺伝子上流約2.5Kbp ( $Bam$  HI- $Nco$  I断片)を挿入したプラスミドpGVHKαを構築した。各種欠失変異プラスミド1) 2) 3) 4) はそれぞれ対応する制限酵素で切断し、構築した。示した数字は翻訳開始点を(+1)から上流まで、それぞれのプラスミドの持つDNA断片を示している。

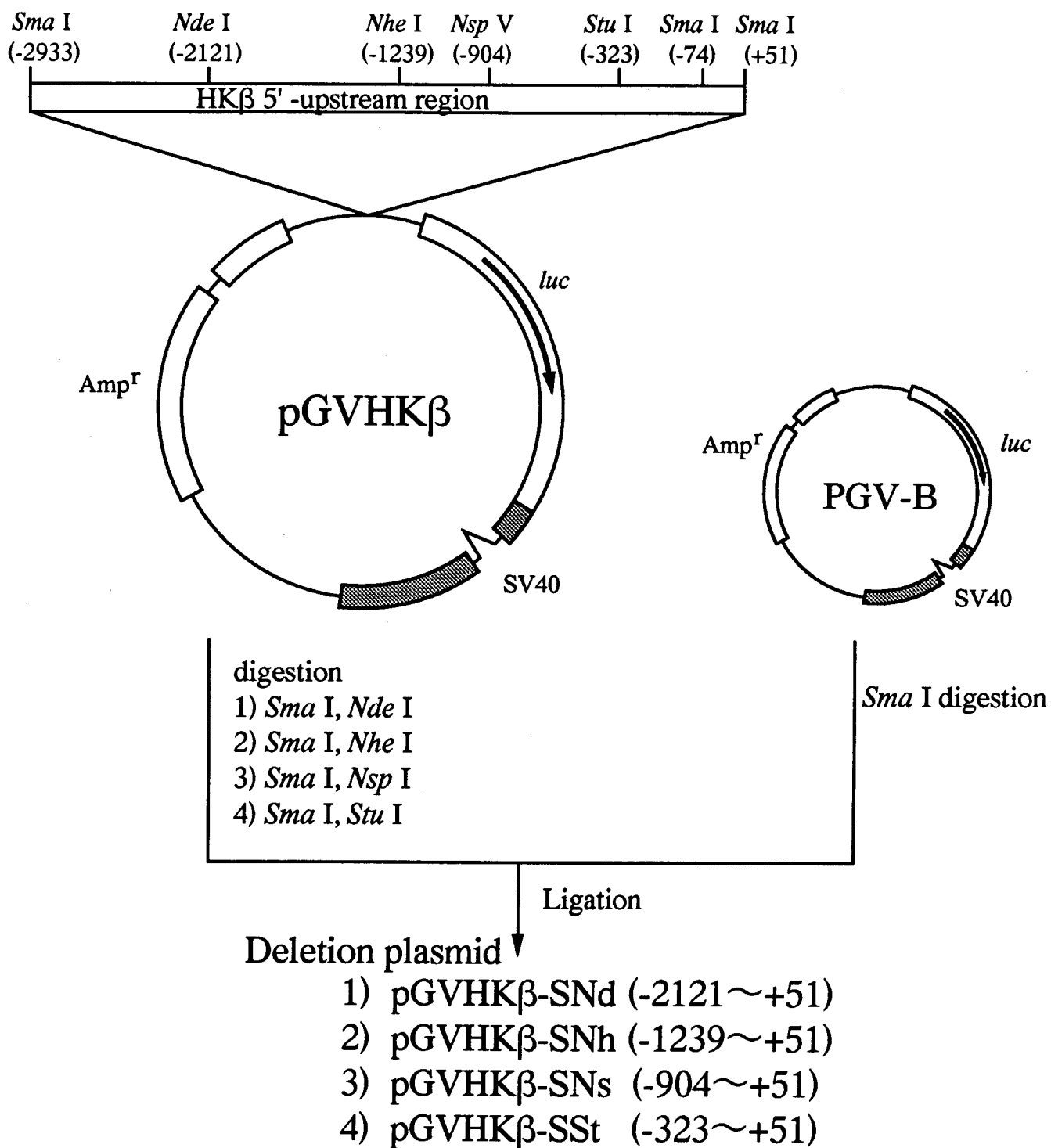


図3-4) ルシフェラーゼ遺伝子の上流にラットH<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase βサブユニット遺伝子の5'上流をつないだレポーター遺伝子の構築

ラットH<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPaseのβサブユニット遺伝子上流約3 kbp (*Sma* I断片)を挿入したpGVHKβを構築した。各種欠失変異プラスミドは、pGVHKβからそれぞれの制限酵素で切断し、PGV-Bの*Sma* I部位に導入した。

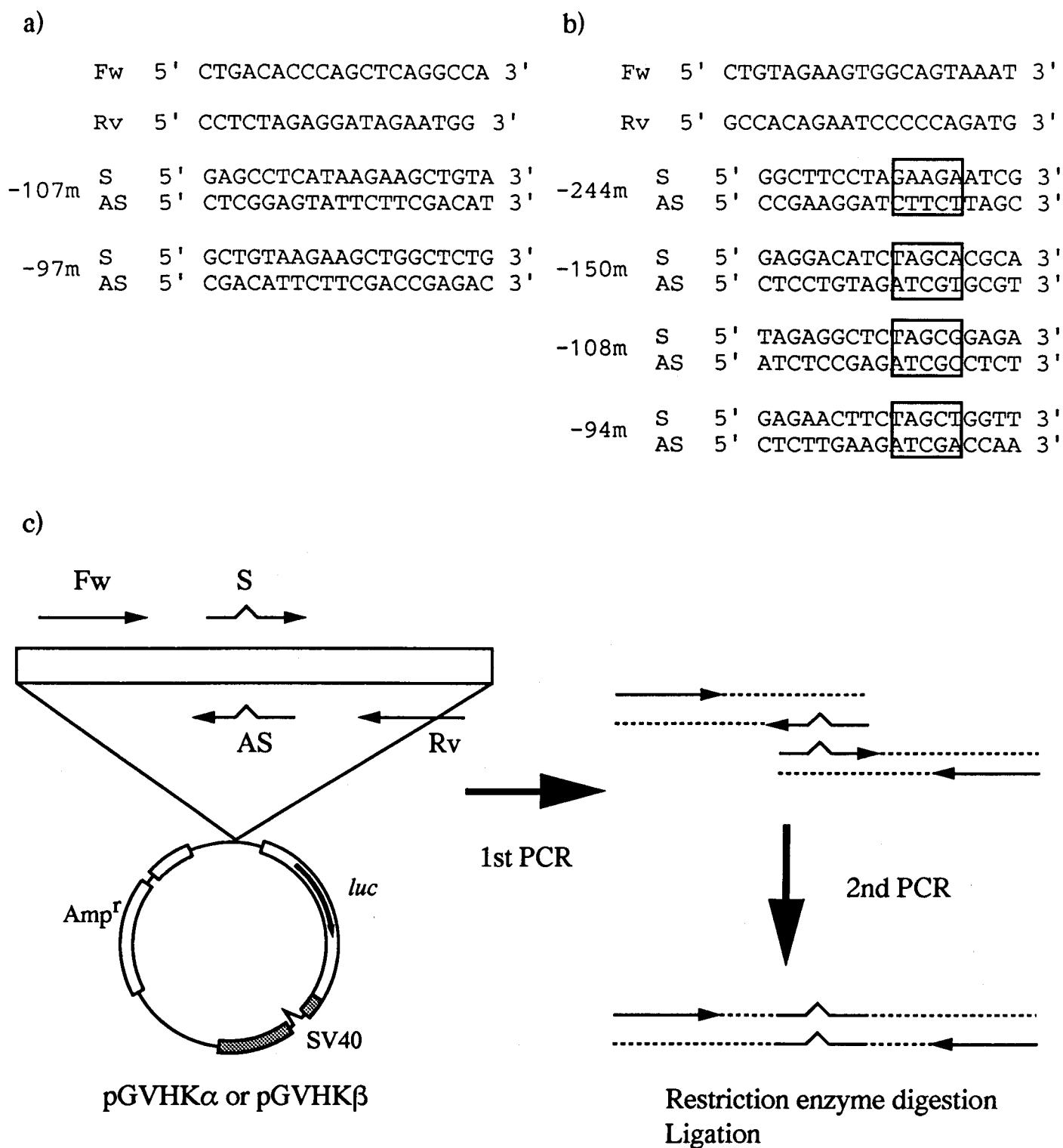


図3-5) レポーター遺伝子のGATA配列への部位特異的な変異導入

a) は $\alpha$ サブユニットの、b) は $\beta$ サブユニットのGATA配列への変異導入に用いたプライマーを示した。Fwはフォワードプライマー、Rvはリバースプライマー、Sはセンスプライマー、ASはアンチセンスプライマーを示した。c) に実際の変異導入の手順を示した。

吸引し、 $1 \times 10^7$  cells/mlになるようにPBSに細胞を懸濁し、トランスフェクション（Electroporation法による）に用いた。

#### 6. 細胞への発現プラスミドの導入

pact- $\beta$ -gal 10  $\mu$ g（図3-2）とレポータージーンプラスミド37.5  $\mu$ g、さらにGATA発現プラスミド（図3-7）またはpBluescript SKII<sup>+</sup> 20  $\mu$ gを加えた溶液30  $\mu$ lを用いた。コントロールとして、SV-40のプロモーター及びエンハンサーを持つPGV-C、および、プロモーターをもたないPGV-Bを用いた。ニワトリ $\beta$ -アクチン遺伝子のプロモーターの下流に、大腸菌の $\beta$ ガラクトシダーゼ遺伝子を融合させたプラスミドpact- $\beta$ -gal（ニッポンジーン（株））を用いてトランスフェクションの効率を補正した。また、レポータージーンを持たないコントロールとしては、pBluescript SKII<sup>+</sup> 30  $\mu$ gを用いた。ジーンパルサーの0.4 cmキューベット（Bio Rad）に上で調製した細胞を400  $\mu$ l入れ、これにプラスミド溶液を加え、ピペットによりよく混ぜ合わせた後、ジーンパルサー（Bio Rad）を用いてトランスフェクション（500  $\mu$ F, 200 V）を行った。すぐに、細胞溶液を培地5 mlに加え、6 cmディッシュに移し、5 % CO<sub>2</sub>存在下で37 °Cで48 時間培養した。

#### 7. ルシフェラーゼ活性の測定

培地を除き、細胞を5 mlのPBSで2回洗浄した、細胞溶解液（東洋インキ（株））を加え（250  $\mu$ l/dish）、15分間室温に放置し、細胞を溶かした。溶解した細胞を含む液をディッシュから1.5mlの微量遠心チューブに移し、室温で遠心（15,000 rpm、10秒間）し、その上清を測定に用いた。細胞抽出液20  $\mu$ lを25 °Cで保温した発光基質液（20 mM Tricine, 1.07 mM (MgCO<sub>3</sub>)<sub>4</sub>Mg(OH)<sub>2</sub>·5H<sub>2</sub>O, 2.67 mM MgSO<sub>4</sub>, 0.1 mM EDTA, 33.3 mM DTT, 270  $\mu$ M Coenzyme A, 470  $\mu$ M luciferin, 530  $\mu$ M ATP）（東洋インキ（株））100  $\mu$ lに素早く加えてよく混ぜた後、ルミノメーター（Berthold 型式 LB9501）で30秒間、3回ずつ発光量を測定した。

## 8. $\beta$ ガラクトシダーゼ活性の測定

1.5 mlチューブに細胞抽出液 (250  $\mu$ l / dish) を35  $\mu$ l、2 $\times$  Z buffer (0.2 M NaPi buffer (pH7.5), 20 mM KCl, 2 mM MgSO<sub>4</sub>, 100 mM 2-mercaptoethanol) 175  $\mu$ l、純水140  $\mu$ lを混ぜ合わせ、37  $^{\circ}$ Cで15分間保温した。これに $\beta$ ガラクトシダーゼの基質として、15mM CPRG (chlorophenolred- $\beta$ -D-galactopyranoside (Boehringer Mannheim) ) を70 $\mu$ l加えた、37 $^{\circ}$ Cで反応を行った後、任意の時間で、あらかじめ37.5  $\mu$ lの1 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>を入れておいた96穴平底プレートに移し、反応を止めた。 $\beta$ ガラクトシダーゼ活性は、マイクロプレートリーダー (Bio Rad) を用いて、574 nmの吸光度を測定することにより求めた。それぞれのサンプルの反応速度を求め、ルシフェラーゼ活性の値を補正した。

## 9. ラットの胃からの核蛋白質の調製およびゲルシフトアッセイ法

いずれも第2章の第2節に示した。

## 10. 試薬

DMEM培地、NCSは大日本製薬より、ファンギゾン、GIBCO BRL社より、ペニシリンG、硫酸ストレプトマイシンは明治製菓(株)より、制限酵素はニッポンジーン社、東洋紡績(株)および宝酒造(株)より購入した。トリプシン、CPRGはBoehringer Mannheim社より、発光基質液、細胞溶解剤は東洋インキ(株)より、Taq DyeDeoxy Terminator Cycle Sequencing KitはApplied Biosystems社より購入した。その他の試薬は和光純薬工業(株)および半井化学薬品(株)より購入した特級品を用いた。

### 第3節 結果

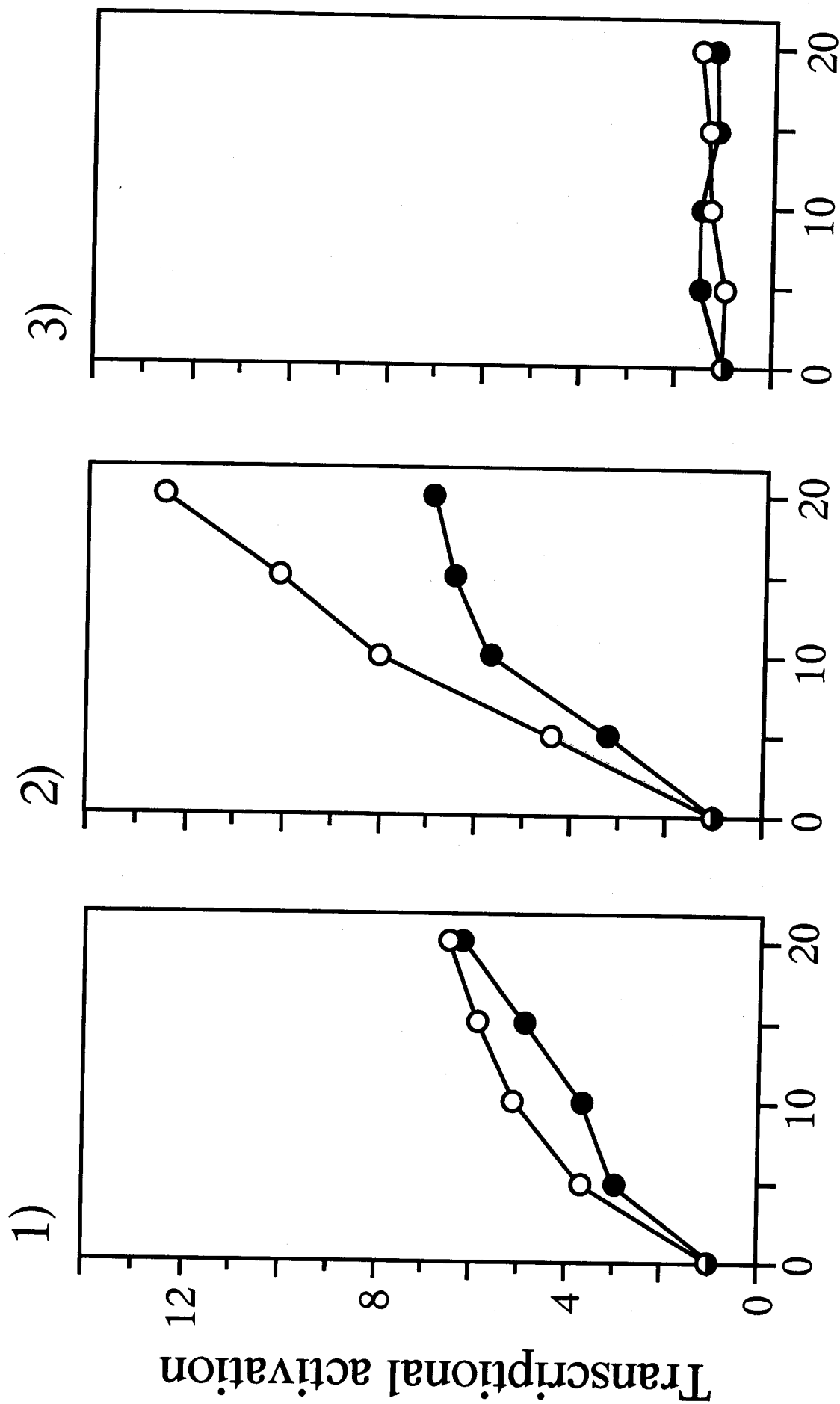
前章において、 $H^+/K^+$ -ATPase遺伝子上流に胃の核蛋白質のみが認識する配列が存在することを同定した。この配列は、GATA配列を含んでおり、壁細胞に特異的に発現しているGATA結合蛋白質であるGATA-GT1およびGATA-GT2が結合し、転写を活性化していることが示唆された<sup>107,108</sup>)。そこで、この2つのGATA結合蛋白質が $H^+/K^+$ -ATPase遺伝子の転写を活性化するかどうか培養細胞を用いて確かめるために、以下の実験を行った。

#### 1. GATA-GT1およびGATA-GT2による遺伝子の転写活性化

ラット $H^+/K^+$ -ATPaseの $\alpha$ サブユニット遺伝子上流約2.5Kbp (-2484 ~ -1) および、 $\beta$ サブユニット遺伝子上流約3 kb (-2933 ~ +51) をルシフェラーゼ遺伝子につないだプラスミドpGVHK $\alpha$ 、pGVHK $\beta$ を構築した(図3-3)。これら2つのプラスミドにおいて、 $\alpha$ あるいは $\beta$ サブユニット遺伝子上流がプロモーター活性をもつときに初めてルシフェラーゼ遺伝子は転写され、ルシフェラーゼ活性が検出されるはずである。

そこで、pGVHK $\alpha$ およびpGVHK $\beta$ をGATA発現プラスミドと同時にHeLa細胞に導入し、ルシフェラーゼ活性を測定した。プロモーターを持たない組換えプラスミドPGV-B (negative control)では、全く転写活性がみられなかった。pGVHK $\alpha$ あるいはpGVHK $\beta$ を単独で導入した場合、SV40プロモーターおよびエンハンサーを持つプラスミドPGV-C (positive control)の1~2%の活性しか持たなかった。しかし、GATA-GT1あるいはGATA-GT2の発現プラスミドを加えると、その量に依存して7から10倍転写活性が増加し、PGV-Cに対して約10%の活性であった(図3-6)。以上の結果は、GATA-GT1、あるいはGATA-GT2が $H^+/K^+$ -ATPase遺伝子の転写を活性化していることを強く示唆している。一方、 $H^+/K^+$ -ATPase遺伝子と同様に壁細胞に発現している、ヒスタミン $H_2$ 受容体(ヒト)の遺伝子上流領域Sac I - Apa I (-1773bp ~ -37bp)を持つプラスミドpGVH2SAをHeLa細胞に導入した場合には、GATA-GT1、GATA-GT2による転写の活性化は見られなかった(図3-6)。これは、ヒスタミン $H_2$ 受容体遺伝子のSac I - Apa I断片にもGATA配列





## GATA plasmid ( $\mu\text{g DNA}/10^6 \text{ cells}$ )

図 3-6) ラット  $\text{H}^+/\text{K}^+$ -ATPase  $\alpha$  サブユニット、 $\beta$  サブユニット、およびヒト・ヒスタミン  $\text{H}_2$  受容体遺伝子の GATA 蛋白質による転写活性化レポーター遺伝子として 1) pGVHK $\alpha$  (ラット  $\text{H}^+/\text{K}^+$ -ATPase  $\alpha$  サブユニット)、2) pGVHK $\beta$  (ラット  $\text{H}^+/\text{K}^+$ -ATPase  $\beta$  サブユニット)、3) pGVH2SA (ヒスタミン  $\text{H}_2$  受容体) を用い、GATA 発現プラスミドを同時に HeLa 細胞に導入したときの転写活性を示した。  
○は GATA-GT1、●は GATA-GT2 を加えたときの活性値を示した。

が存在するが、この配列を介した転写の活性化はないことを示している。実際にこの配列には核蛋白質が結合しない (data not shown)。

## 2. $H^+/K^+$ -ATPase $\alpha$ サブユニット遺伝子におけるGATA-GT1およびGATA-GT2の作用する部位の同定

GATA-GT1およびGATA-GT2の転写活性化に参与する領域を同定するため、 $\alpha$ サブユニット遺伝子上流 (2484 bp) をルシフェラーゼ遺伝子につないだプラスミド (pGVHK $\alpha$ ) の上流部分を種々の長さに欠失させたプラスミドを構築した (図3-3)。各プラスミドの転写活性を検討したところ、-250bp~-1bpまでであれば、GATA-GT1、およびGATA-GT2による転写活性化が上流-2484 bpまでを持つものと同じ程度にみられた。-2484から-1までの間には多数のGATA配列が存在し、-250bpから-1bpまでには3カ所存在する。さらに、TATA配列のすぐ上流-94bpまでを欠失させると、転写活性化は見られなくなった (図3-7)。以上の結果は、GATA-GT1およびGATA-GT2による転写活性化にはTATA配列のすぐ上流に存在する3カ所のGATA配列があれば十分であることを示している。この3カ所の配列のうち下流側の2カ所 (図中の白四角) に胃の核蛋白質が結合することを明らかにしており、この2カ所の配列が転写活性化に参与していると考えられる。

そこで、この2カ所の配列の転写活性化への関与をさらに明らかにするために、GATTがTCTTとなるように変異を導入した (図3-5)。各変異プラスミドをGATA-GT1およびGATA-GT2をコードするプラスミドとともにHeLa細胞に導入した。図3-8に示すように、2カ所のGATA配列のいずれか一方に変異を持つ遺伝子は、GATA-GT1およびGATA-GT2によって1.2倍程度転写が活性が促進されるだけであった。さらに両方に変異を導入することにより、転写活性化は完全に抑えられた。以上の結果から、GATA-GT1、GATA-GT2による $H^+/K^+$ -ATPaseの $\alpha$ サブユニット遺伝子の転写活性化には両方のGATA配列が必要であることが明らかとなった。

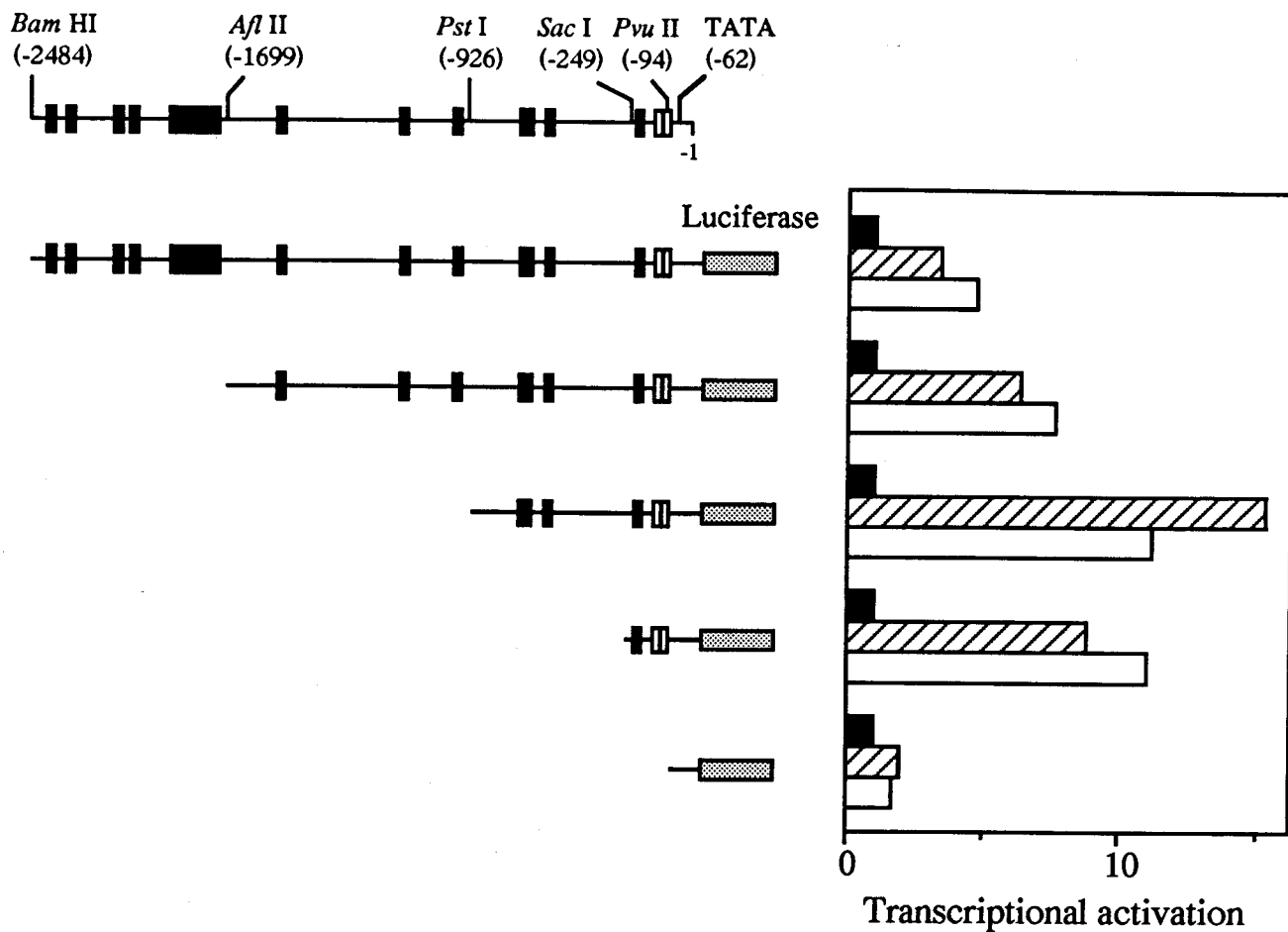


図3-7) GATA蛋白質による各種欠失変異の $H^+/K^+-ATPase$   $\alpha$ サブユニット遺伝子の転写活性化  
 左側にレポーター遺伝子 (Luciferase) につないだ $H^+/K^+-ATPase$   $\alpha$ サブユニットの5'上流領域の各種欠失変異を示した。遺伝子上流に存在するGATA配列は四角で示し、第2章で明らかにした胃の核蛋白質の結合配列を□で、それ以外のGATA配列を■で示した。右のグラフの■は発現プラスミドを導入しなかったとき、□はGATA-GT1、□はGATA-GT2発現プラスミドを (20 $\mu$ g) 導入したときの各種上流欠失体の転写活性を示した。

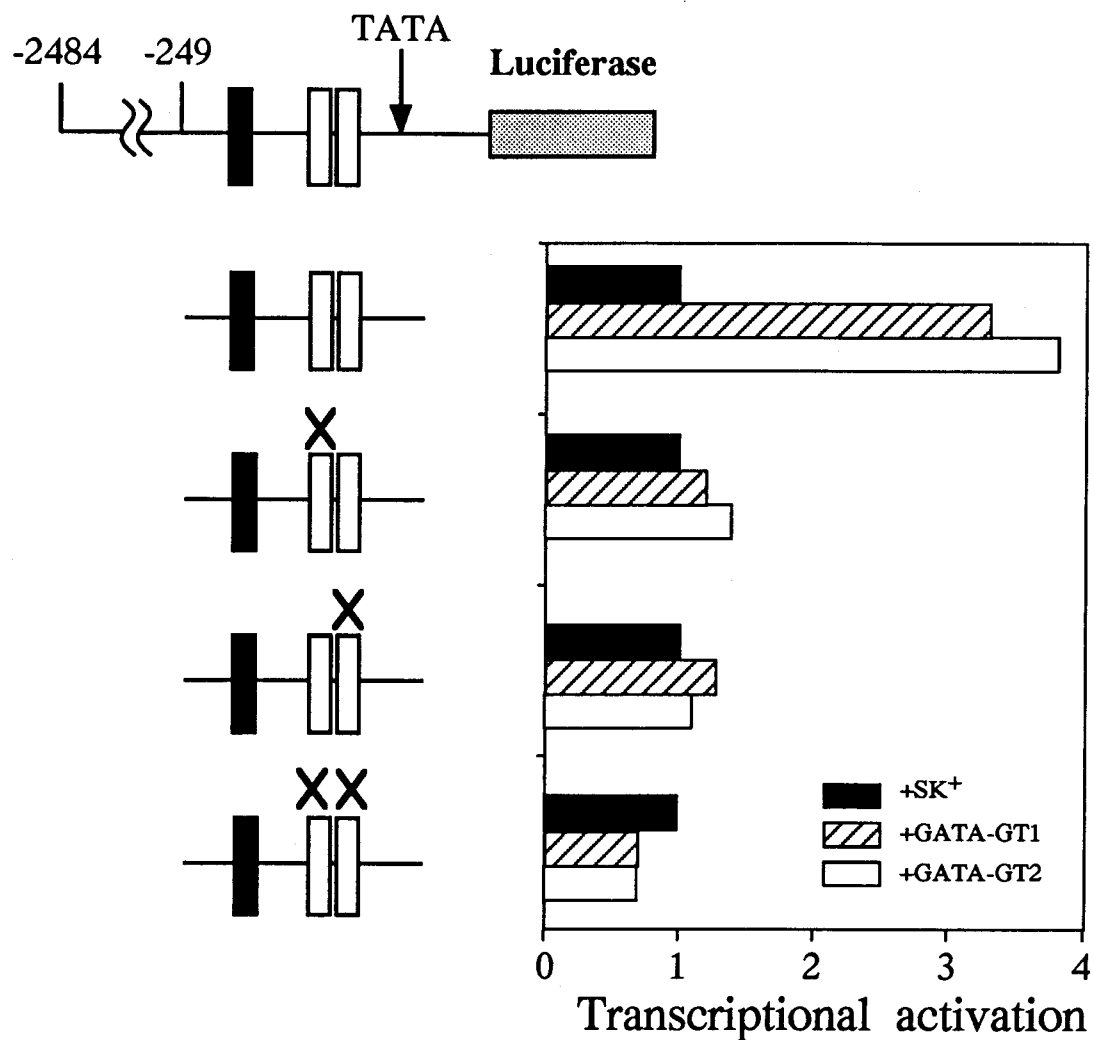


図3-8) H<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase αサブユニット遺伝子のGATA配列の変異と転写活性化

上流に存在するGATA配列への変異導入による転写活性化への影響を検討した。GATA配列は四角で示し、GATT→TCTTと変異を導入したものにXをつけて示した。右のグラフの■は発現プラスミドを導入しなかったとき、□はGATA-GT1、□はGATA-GT2発現プラスミドを（20μg）導入したときの転写活性を示した。

### 3. $H^+/K^+$ -ATPase $\beta$ サブユニット遺伝子におけるGATA-GT1およびGATA-GT2の作用する部位の同定

$\beta$ サブユニット遺伝子とルシフェラーゼをつないだプラスミド (pGVHK $\beta$ ) の上流領域 (-2933~+1bp) を種々の長さに欠失させたプラスミドを構築した (図3-4)。

GATA-GT1、GATA-GT2による転写活性化を調べたところ、上流を-2121、-1239、-904、-323 bpまでと系統的に欠失させても転写の活性化には変化がなかった。TATA配列のすぐ上流 (-75bp) まで、すなわちすべてのGATA配列を欠失させることにより、転写活性化は全く起こらなくなった (図3-9)。

以上の結果から、上流323 bpまでに存在する4カ所のGATA配列のいずれかが、GATA-GT1、またはGATA-GT2による転写活性化に重要であると結論した。そこで、この4カ所のGATA配列に、GATAがTCTAとなるように変異を導入した (図3-5)。この結果、4カ所のGATA配列のうち、上流約100 bp付近に存在する2カ所のどちらかに変異を導入したときのみ、転写活性化がみられなくなった (図3-10)。これに対して、-244bp、-150bpに存在するGATA配列に変異を導入した場合には、転写活性化には全く変化がなかった。以上の結果から、上流100 bp付近に存在する2カ所のGATA配列がいずれもGATA-GT1、GATA-GT2による転写活性化に必須であり、他のGATA配列は活性化には必要ないと結論した。これらの配列は、 $\beta$ サブユニット遺伝子に2カ所存在するうちの下流側のTATA配列のすぐ上流に存在する。したがって、GATA 結合蛋白質は下流側のTATA配列からの転写を活性化していると考えられる。実際にラットの胃において、 $\beta$ サブユニット遺伝子は主に下流側のTATA配列から転写される<sup>32)</sup>。

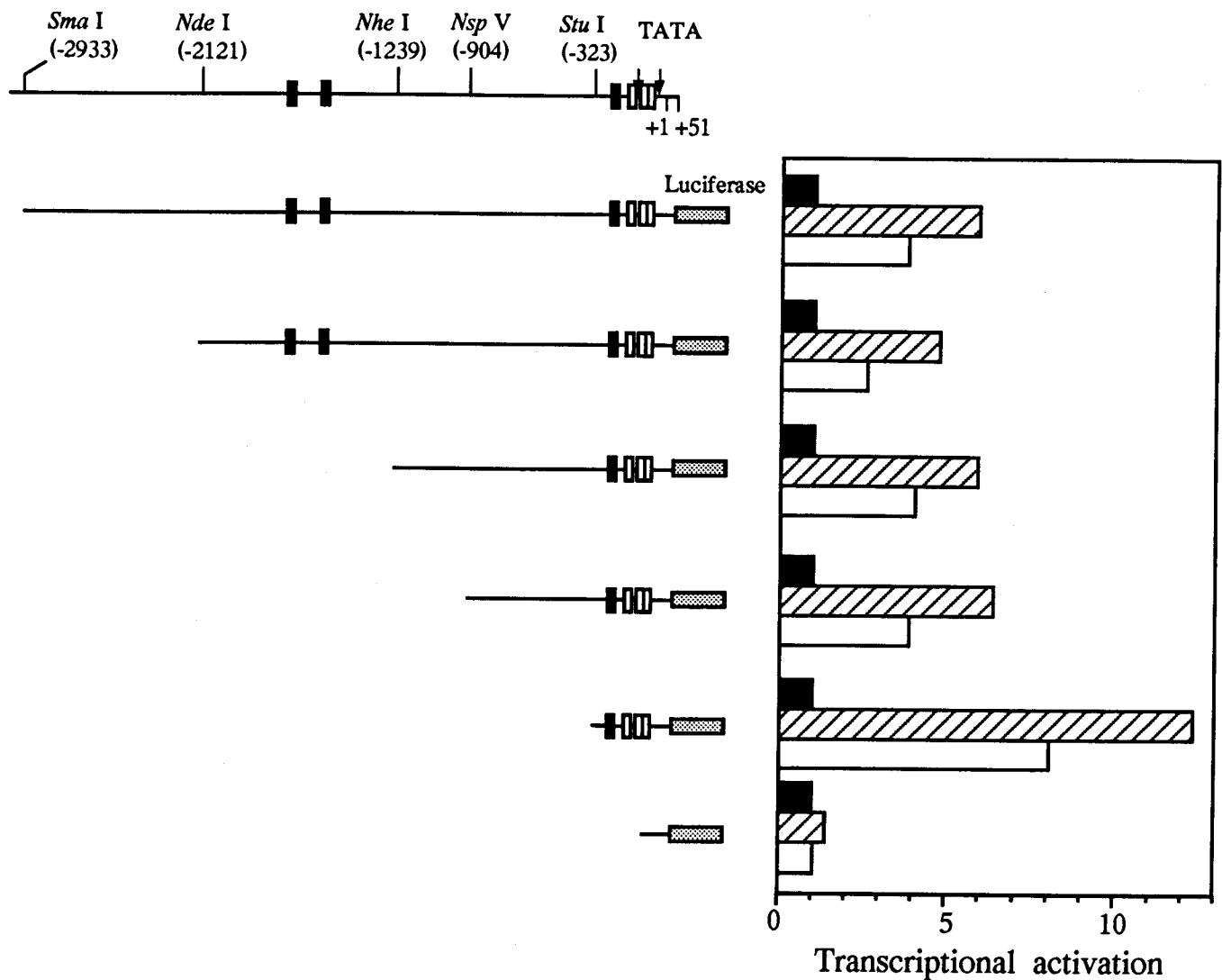


図3-9) GATA蛋白質による各種欠失変異の $H^+/K^+-ATPase$   $\beta$ サブユニット遺伝子の転写活性化

左側にレポーター遺伝子 (Luciferase) につないだ $H^+/K^+-ATPase$   $\alpha$ サブユニットの5'上流領域の各種欠失変異を示した。遺伝子上流に存在するGATA配列は四角で示し、第2章で明らかにした胃の核蛋白質の結合配列を□で、それ以外のGATA配列を■で示した。右のグラフの■は発現プラスミドを導入しなかったとき、□はGATA-GT1、□はGATA-GT2発現プラスミドを(20 $\mu$ g)導入したときの各種欠失の転写活性を示した。遺伝子上流に存在するGATA配列は四角で示し、第2章で明らかにした胃の核蛋白質の結合配列を□で、それ以外のGATA配列を■で示した。

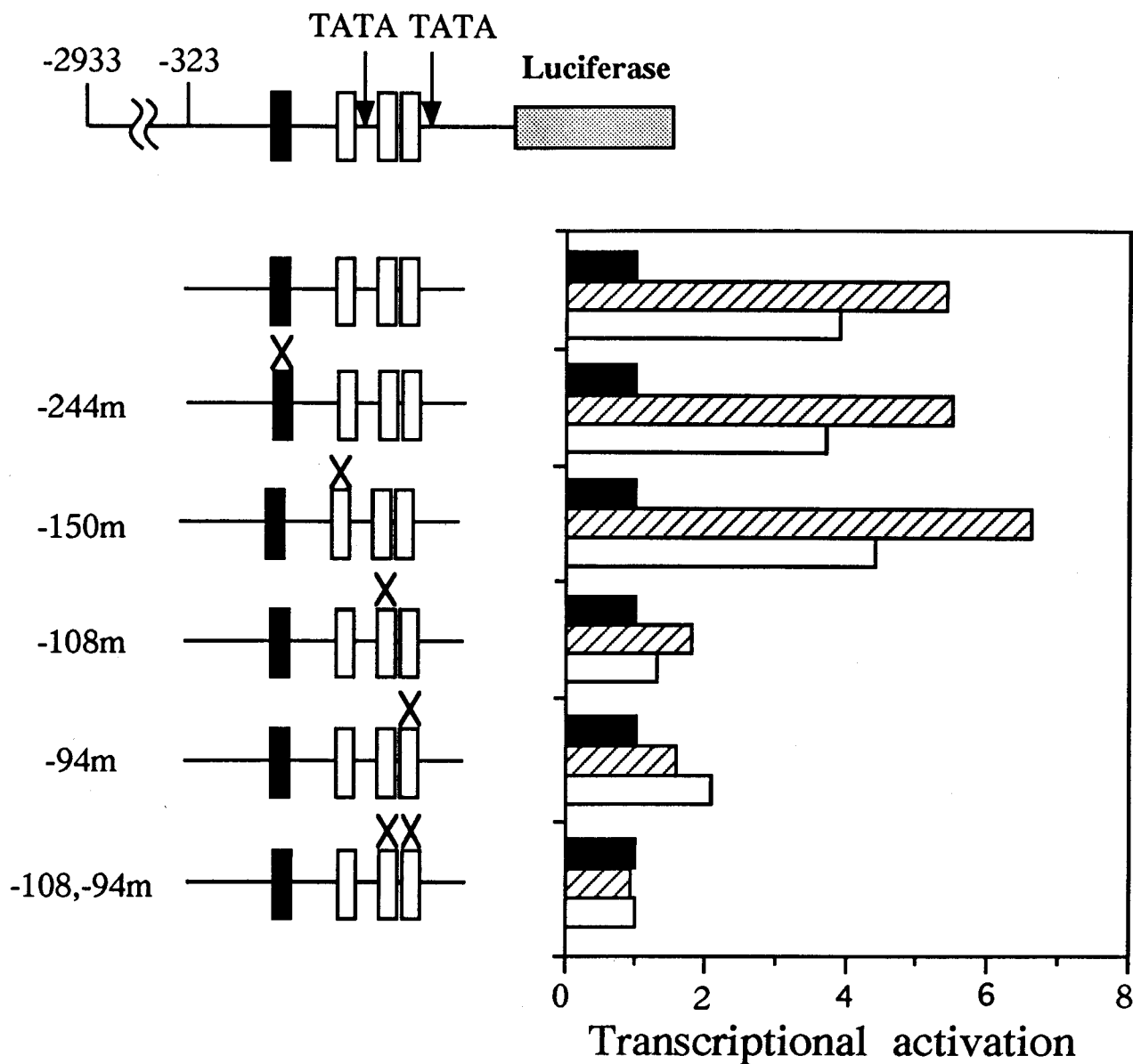


図3-10) H<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase βサブユニット遺伝子のGATA配列の変異と転写活性化

上流に存在するGATA配列への変異導入による転写活性化への影響を検討した。GATA配列は四角で示し、GATA→TCTAと変異を導入したものにXをつけて示した。右のグラフの■は発現プラスミドを導入しなかったとき、□はGATA-GT1、□はGATA-GT2発現プラスミドを(20μg)導入したときの転写活性を示した。

#### 4. GATA配列へのGATA-GT1およびGATA-GT2の結合

上に述べたように、 $\alpha$ サブユニット遺伝子、 $\beta$ サブユニット遺伝子ともに、TATA配列のすぐ上流に存在する2カ所のGATA配列が、GATA蛋白質による転写活性化に必須であることが明らかになった。 $\beta$ サブユニット遺伝子では、上流に存在するGATA配列のうち、-150bpに存在する配列に変異を導入しても、GATA結合蛋白質による転写活性化に変化はみられなかった。しかし、-108bpおよび-94bpに存在する2カ所のGATA配列にいずれかに変異を導入すると転写活性化が見られなくなった(図3-10)。

そこで、実際にGATA結合蛋白質はこれらの配列にどの様に結合しているかを検討した。GATA配列に各種の変異が入った $\beta$ サブユニット遺伝子から *Pst*I - *Sty*I断片を調製し、末端標識した。*Pst*I - *Sty*I断片は、第2章に示した領域1に相当し、GATA配列を3カ所持っている。GATA配列に1カ所ずつ、もしくは2カ所同時に変異を導入した断片を用い、ラットの胃の核蛋白質が結合するかどうかを調べた。

その結果、第2章に示したのと同様に、*Pst*I - *Sty*I断片に核蛋白質が結合し、数本のDNA-蛋白質複合体が検出できた。ところが、変異が1カ所、2カ所と入ると、核蛋白質のDNA断片への結合量が大きく変化した。変化は特にバンド1に顕著に見られた(図3-11)。これは、GATA配列への変異導入により、その配列に確かに、GATA結合蛋白質が結合できなくなっていることを示唆している。さらに、-108bpおよび-94bpのGATA配列に変異を導入することにより、野生型の断片を用いたときには見えていた移動度の小さいバンド2が消失することを明らかにした(図3-11)。このことは、バンド2は-108bpおよび-94bpへGATA結合蛋白質が結合し、この2カ所の配列に結合したものの同士が、お互いに相互作用することによって生じたものであると考えられる。これは、2カ所の配列のいずれかへの変異により、GATA結合蛋白質による転写活性化が阻害されたことと対応する(図3-10)。以上の結果、TATA配列のすぐ上流に存在する、2カ所のGATA配列に、2つのGATA結合蛋白質が結合し、お互いに相互作用することが、転写の活性化に必須であると結論した(図3-12)。



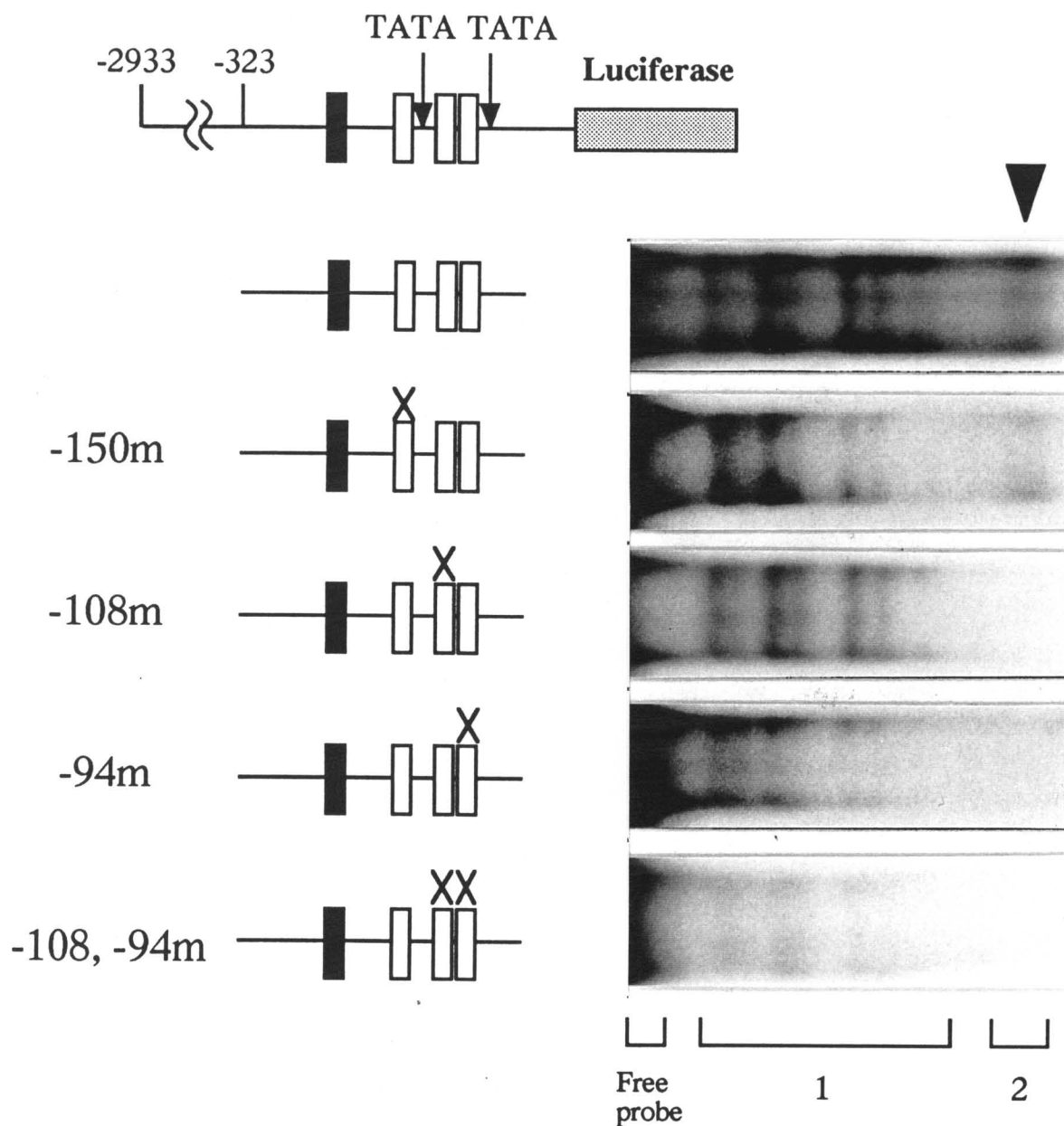


図3-1 1)  $H^+/K^+$ -ATPase  $\beta$ サブユニット遺伝子のGATA配列への変異導入と GATA蛋白質の結合  
 各種変異遺伝子の *Pst*I - *Sty*I 断片 (-185~+15bp) に対するラットの胃の核蛋白質の結合を  
 調べた。シフトしたバンドは第2章で示したように、GATA配列を持つ非標識のDNA断片  
 で拮抗的に結合が阻害される。すべてのバンドはGATA配列に依存した蛋白質の結合である。  
 GATA配列への変異により、無くなるバンドを矢印で示した。

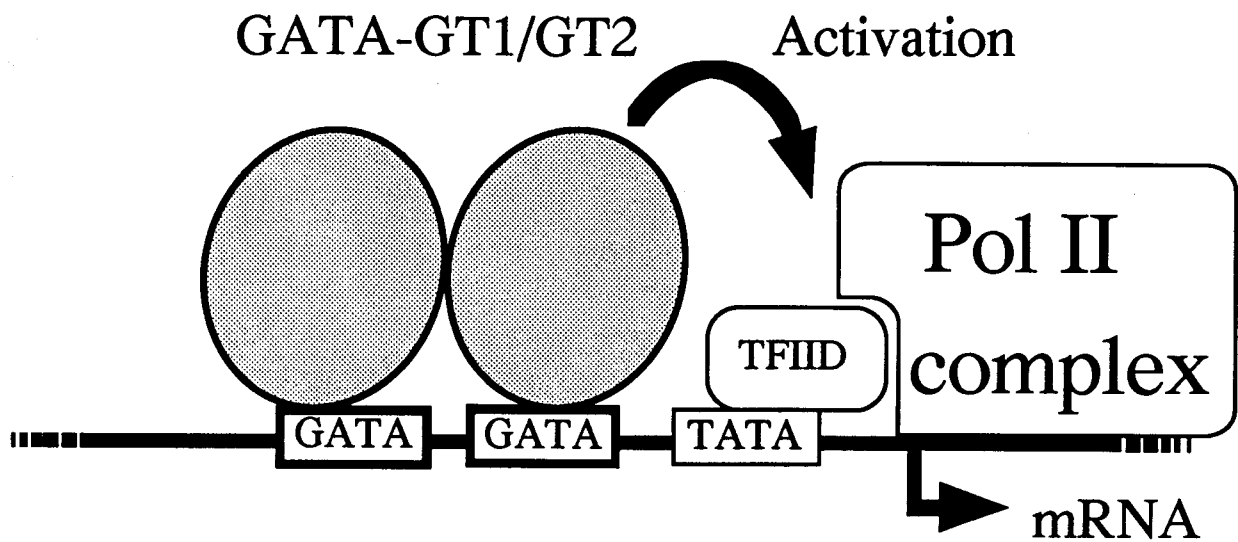


図3-1 2) GATA-GT1、GATA-GT2による $H^+/K^+-ATPase$ 遺伝子の転写活性化機構の模式図  
 GATA配列はGATA、TATA配列はTATAと示した。GATA-GT1あるいは、GATA-GT2が  
 GATA配列に結合し、 $H^+/K^+-ATPase$ 遺伝子の基本転写因子 (PolII complex) による転写を  
 活性化する。

#### 第4節 考察

H<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase 遺伝子の $\alpha$ および $\beta$ サブユニット遺伝子の5'上流領域に (G/C)PuPu(G/C)NGAT(A/T)PuPyという共通配列が存在し、この配列に胃の粘膜より単離されたGATA-GT1およびGATA-GT2が結合することを第2章で示した。本章では、GATA-GT1およびGATA-GT2の結合が、実際にH<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase 遺伝子の転写活性化に関与しているかどうかを明らかにすることを目的とした。

H<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase の $\alpha$ および $\beta$ サブユニット遺伝子の5'上流領域にルシフェラーゼ遺伝子を結合させたプラスミドpGVHK $\alpha$ 、pGVHK $\beta$ を構築し、GATA-GT1およびGATA-GT2により転写の活性化が起こるかどうか検討した。その結果、両遺伝子ともにGATA-GT1、GATA-GT2により転写が活性化され、活性化には、TATA配列のすぐ上流に存在するGATA配列が必須であることを明らかにした。これまでに、GATA-1において、その亜鉛フィンガー領域で二量体を形成しうることが示されている<sup>110)</sup>。しかし、GATA結合蛋白質が、タンデムに並んだGATA配列に結合して、二量体を形成し、転写を活性化していることは、今回初めて明らかにした。二量体を形成して転写を活性化する転写因子はロイシンジッパー構造を持つものがよく知られている<sup>92)</sup>。GATA-GT1、GATA-GT2には、ロイシンジッパー構造はもとより、お互いに相互作用すると考えられる既知の構造モチーフは存在しない。GATA-GT1、GATA-GT2の転写活性化領域およびお互いの相互作用に関係している領域を明らかにすることは興味深い。また、GATA-GT1は、2つの亜鉛フィンガーの間に、プロテインキナーゼAおよびプロテインキナーゼCによりリン酸化されうる配列を、GATA-GT2はプロテインキナーゼAによりリン酸化されうる配列を持っている。これらの配列は他のGATA結合蛋白質では存在しないことより、リン酸化により活性が調節されている可能性がある。実際これまでに、GATA-GT2はプロテインキナーゼAによるリン酸化により、DNAへの結合活性が上がるという予備的なデータを得ている。ヒスタミン刺激による細胞内cAMP濃度の上昇により、H<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPaseのmRNA量が増加することが示されており<sup>3)</sup>、GATA-GT1、GATA-GT2のリン酸化がH<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase 遺伝子の転写調節にどのように関与しているか興味深い。

## 第4章 壁細胞のモデルとしてのMKN45細胞

### 第1節 緒言

遺伝子の細胞特異的な転写調節機構を解析するためには、目的とする遺伝子を転写している培養細胞が必要である。私はこれまで述べてきたように、胃壁細胞における、 $H^+/K^+$ -ATPase遺伝子の組織特異的な転写調節機構について主に*in vitro*の系を用いて解析してきた。しかし、実際の細胞での転写がどのように行われているかを明らかにする必要がある。その1つの方法として、胃壁細胞の性質を維持した培養細胞系を利用することが考えられる。ヒトの胃の低分化腺ガン由来のMKN45細胞はヒスタミン刺激により細胞内cAMPが上昇すること、また $H_2$ ブロッカーであるシメチジンによりこの上昇が抑えられることから、 $H_2$ 受容体の発現が示唆されている<sup>110)</sup>。これは、胃壁細胞で見られるのと同じ現象であり、MKN45細胞を壁細胞のモデル細胞として用いることができる可能性を示唆している。モデル細胞を用いて転写機構の解析を行う場合、使用する細胞に目的遺伝子の発現が見られるとともに、その遺伝子構造が変化していない必要がある。そこで本章では、ノーザンおよびサザンハイブリダイゼーション法を用い、MKN45細胞において、 $H_2$ 受容体をはじめ壁細胞に特異的に発現している遺伝子が転写されているかどうか、さらに遺伝子の制限酵素地図を比較し、遺伝子構造が正常であるかどうかについて調べた。その結果、MKN45細胞が壁細胞のモデル細胞として使用できるかどうかを検討した。

## 第2節 材料と方法

### 1. 細胞の培養

ヒト胃癌細胞MKN45細胞は、3 % NaHCO<sub>3</sub>、ペニシリンG (100 U/ml)、ストレプトマイシン(0.1 µg/ml)、ファンギゾン 2.5 µg/ml、10 % FCSを含むRPMI 1640 培地中で、5 % CO<sub>2</sub> 存在下に直径10cm のプレートで 37 °Cで培養した。HeLa 細胞は 10% NCSを含むDMEM 培地を用い、他は同様の条件で培養した。

### 2. 培養細胞からの全RNAの調製

MKN45 細胞あるいはHeLa細胞（それぞれプレート8枚分）を冷PBSで2回洗った後、42mlのグアニジンイソチオシアネート 溶液 ( 50 % Guanidinisothio-cyanate, 100 mM 酢酸ナトリウム pH 5.0, 5 mM EDTA )を加え、細胞を可溶化した。この溶液をあらかじめ遠心管 ( Hitachi, 13PA ) に入れておいた、5 mlの CsCl溶液 ( 83 % CsCl, 100 mM 酢酸ナトリウム pH 5.0, 5 mM EDTA )上に7 ml ずつ重層し、33,000×g で 15 時間遠心した ( 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のところで切断し、完全に上清を取り除いた。RNA の沈澱を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)を計960 µl 加え溶かした。得られた RNA 溶液は3 回フェノール抽出し、2 倍量の冷エタノールを加え-20 °Cに30 分間放置した後、15,000×gで10 分間遠心した。沈澱を75 %エタノールで洗浄し、乾燥させ、180 µlのTE緩衝液に溶かし、260 nmと280 nm の吸収を測定し、その比からRNA の純度を検定した。

### 3. RNAのホルムアミド変性アガロースゲル電気泳動

ラットの胃粘膜、MKN45細胞およびHeLa細胞から調製した全RNA 20 µgをそれぞれ6 µlの変性用緩衝液 ( 20 mM MOPS-NaOH pH 7.0, 5 mM 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分間処理した。これを直ちに氷上で冷却し、4 µlの色素液 (0.1 % BPB、80 % グリセロール)を加えた。泳動は

×10 泳動用緩衝液 (0.2 M MOPS-NaOH pH 7.0、50 mM 酢酸ナトリウム、10 mM EDTA-3Na)を調製し、10倍希釈したもので行った。1.2% アガロースゲルの作製は以下のように行った。タイプII電気泳動用アガロース(Sigma)1.2 g、×10泳動用緩衝液10 mlを純水72 mlに加え、120 °Cで2 気圧 5 分間処理してアガロースを溶解した後、約 60 °Cになるまで冷却し17.9 mlのホルムアルデヒドを加えた。これを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、サンプルがゲルに入るまでは電圧 50 Vで、ゲルに入ってから 100 Vで4 °C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 µg/ml エチジウムブロマイドで染色した。

#### 4. 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、ハイボンド N<sup>+</sup> (Amersham)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( Whatman 3MM)の間にはさみ、2枚のガラス板にはさんで真空下 80 °Cで4時間加熱し、RNA をニトロセルロース膜に固定させた。ハイブリダイゼーション溶液( 50 %ホルムアミド、5×SSC、0.1 %SDS、1×Denhardt、50 mM Na-Phosphate pH 6.5、0.1 mg/ml 変性サケ精子 ) 中で 42 °C、15時間のprehybridizationを行った。

#### 5. ハイブリダイゼーションおよびフィルターの洗浄

ヒスタミンH<sub>2</sub>受容体のプローブとしてはコード領域を*Bst* XI (67bp~410bp) で切り出した断片を用いた。GATA-GT1は*Nco* I-*Pst* I断片 (21bp~214bp) GATA-GT2は*Pst* I断片 (160bp~386bp) を用いた。G3PDH (Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase) はPCRによって増幅した断片 (586bp~1037bp) を用いた。これらの断片にRandom Primed DNA Labeling Kit (Boehringer Mannheim) を用いて [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P] dCTPを取り込ませることによって標識した。 95 °Cで5分間の熱変性の後、氷上で急冷したプローブを1 mlのハイブリダイゼーション用溶液 (2.5×10<sup>6</sup>cpm/ml) に加えあらかじめ42 °Cにて保温した。これにフィルターを入れ、42 °Cで12時間ハイブリダイゼーション反応を行った。次にフィ

ルターを、 $2\times\text{SSC}$ , 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 500 cpm以下になるまで、 $0.1\times\text{SSC}$ , 0.1 % SDS溶液にて室温15分、もしくは $0.1\times\text{SSC}$ , 0.1 % SDS 溶液にて $42^{\circ}\text{C}$ 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。

#### 6. ゲノムDNAのアガロースゲル電気泳動

正常ヒト細胞およびMKN45細胞のゲノムDNAを各種制限酵素で処理した後、1 %アガロースゲルでTAE緩衝液 (40mM Tris-acetate, 1mM EDTA, pH 8.0) 中で電気泳動した。泳動後、1mg/mlのエチジウムブロマイドにより染色した。

#### 7. ニトロセルロース膜へのブロッティングおよびハイブリダイゼーション

ゲルをまず0.25M HClで15分間、2回処理した。蒸留水で2回洗った後、変性溶液 (0.5M NaCl, 1M NaOH) で15分間、2回、0.5M Tris-HCl、pH7.4で15分間2回処理した。最後に3M NaClで洗った後、 $2\times\text{SSC}$ に浸した。以下、ハイボンド  $\text{N}^+$  (Amersham)へのブロッティングおよびハイブリダイゼーションの操作は、上に示したRNAの時と同様に行った。

#### 8. 試薬

RPMI1640培地は大日本製薬より、アガロースはSigmaより、ハイボンド  $\text{N}^+$ はAmershamより、Random Primed DNA Labeling KitはBoehringer Mannheimより購入した。

その他の試薬は和光純薬工業 (株) および半井化学薬品 (株) より購入した特級品を用いた。

### 第3節 結果

壁細胞に特異的に発現している遺伝子の転写調節機構を解析するのに、胃癌細胞由来の培養細胞であるMKN45細胞を用いることができるかどうかを検討した。

#### 1. MKN45 細胞において壁細胞特異的遺伝子が転写されていることの確認

MKN45 細胞、およびHeLa 細胞より調製した全RNA 30 $\mu$ gに対し、壁細胞・特異的遺伝子のコード領域をプローブとし、Northern Hybridizationを行った。ヒスタミンH2受容体、GATA-GT1、およびGATA-GT2のmRNAは、MKN45細胞で発現しており、いずれの転写産物も、ヒト<sup>44)</sup>及びラット<sup>43,107)</sup>の胃粘膜で報告されているものとはほぼ同じ大きさであった。HeLa細胞ではヒスタミンH2受容体のmRNAは検出されなかったが、GATA-GT1、GATA-GT2はHeLa細胞でも発現していた。したがって、MKN45 細胞では、H2受容体のmRNAは細胞特異的に転写されていることが明らかになった。一方、当研究室の田村らによって、GATA-GT1、GATA-GT2は精巣や小腸でも弱く発現していることが示されている<sup>107)</sup>。最近、GATA-GT2 (GATA-4) が、内胚葉系の細胞に発現していることが示され、胃以外でもGATA-GT1、GATA-GT2は発現していることが示されている<sup>111)</sup>。HeLa細胞でもGATA-GT1、GATA-GT2は細胞特異的に転写されていると考えられる。なお、GATA-GT1とGATA-GT2は最近GATA-6、GATA-4とそれぞれよばれている<sup>111)</sup>が、本稿では当研究室で命名した、GATA-GT1、GATA-GT2という名称を用いる。

#### 2. MKN45 細胞におけるH2受容体遺伝子の遺伝子構造

上に述べたように、Northern Hybridizationの結果から、H2受容体の遺伝子はMKN45細胞において転写されていることが明らかになった。しかし、MKN45細胞では、染色体構造が正常細胞と比べ、大きく変化していることが報告されており<sup>112)</sup>、H2受容体の遺伝子の構造も変化している可能性がある。遺伝子の転写調節機構を研究する上で、その遺伝子構造が変異しているものを用いても、正常細胞における転写調節機構を反映しないと考えられる。そこで、正常なヒト組織（胎盤）と、MKN45細胞から調製したゲノムDNAで、制限酵素の切断地図から遺伝子構造を比較した。その結果、用いた制限酵



素により得られる断片の大きさは正常細胞と差がなく、遺伝子構造は大きく異なっていないと結論した。

### 3. MKN45 細胞におけるGATA-GT1遺伝子の構造

GATA-GT1についても、正常の細胞と、MKN45細胞で、その遺伝子構造を制限酵素の切断パターンから比較した。その結果、H<sub>2</sub>受容体遺伝子と同様に遺伝子構造は大きく異なっていないと結論した。

## 第4章 考察

以上の結果から、MKN45細胞にはヒスタミンH<sub>2</sub>受容体、GATA-GT1、およびGATA-GT2といった壁細胞に特異的に発現している遺伝子が転写されていることを明らかにした。MKN45細胞において、H<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPaseは発現していないことが、 $\alpha$ サブユニットの抗体を用いたWestern blottingにより示されている (unpublisd data)。しかし、第3章でH<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPaseの遺伝子の転写に関与していることを明らかにした、GATA-GT1、およびGATA-GT2の遺伝子は転写されていた。これは、GATA-GT1、およびGATA-GT2は転写活性化因子であるが、単独での転写活性化能は低く、一緒に働いて転写活性を増加させる未知の因子が必要である可能性が考えられる。実際に、HeLa細胞においてもGATA-GT1、およびGATA-GT2が発現していることがわかった。しかし、第3章で示したように、H<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPaseの遺伝子の転写は、GATA-GT1、およびGATA-GT2を同時に発現させないと活性化されなかった。これは2つの蛋白質の転写活性化能が弱いためと考えられる。今後、GATA-GT1、およびGATA-GT2とともに働いて転写を活性化する因子を見つける必要がある。しかし、この細胞はヒスタミンH<sub>2</sub>受容体を特異的に発現しており、ヒスタミン刺激により、細胞内cAMP濃度が上昇する。これらの事実から、MKN45細胞は部分的には壁細胞の性質を有しており、この細胞を用いて、H<sub>2</sub>受容体遺伝子の転写調節機構および壁細胞特異的な転写調節機構を調べることができると考えられる。

次章でMKN45細胞を用い、H<sub>2</sub>受容体遺伝子の転写調節機構について解析した。

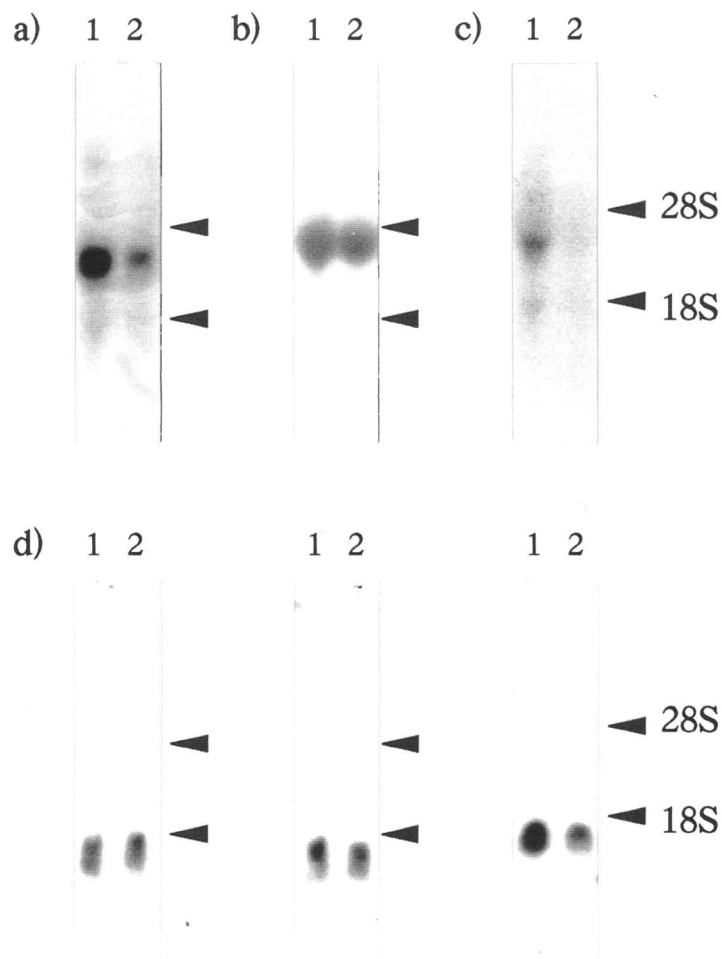


図4-1) 壁細胞に特異的な遺伝子のMKN45細胞における発現

MKN45細胞およびHeLa細胞から全RNAを調製し、Northern hybridizationを行った。

a)はGATA-GT1のNcoI-PstI断片 (21bp~214bp)、b)はGATA-GT2のPstI断片 (160bp~386bp)、c)はヒスタミンH2受容体のBst XI断片 (67bp~410bp)、d)は、a)b)c)の各フィルターからプローブをはずした後、G3PDH (Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase)のPCRによって増幅した断片 (586bp~1037bp) を用いた。番号の同じものは同じサンプルを示す。リボソームRNA (28Sと18S) の泳動位置を矢印で示した。

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10

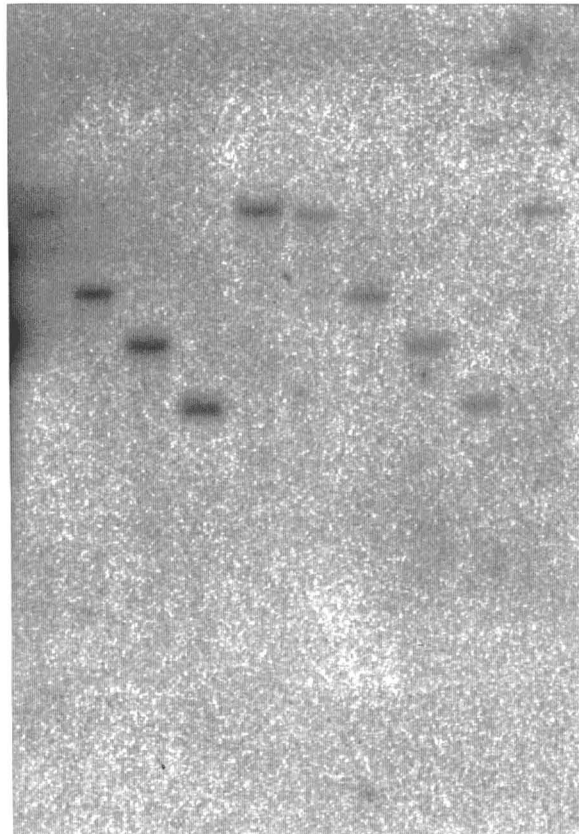


図4-2) MKN45細胞でのヒスタミンH2受容体遺伝子の構造

正常ヒト・ゲノムDNA (レーン1から5) とMKN45細胞のゲノムDNA (レーン6から10) 10 $\mu$ gをそれぞれ任意に制限酵素、*Eco*RI (レーン1と6)、*Bam*HI (レーン2と7)、*Pst*I (レーン3と8)、*Apa*I (レーン4と9)、*Nco*I (レーン5と10) で切断した。プローブにはNorthern hybridizationと同じものを用いた。

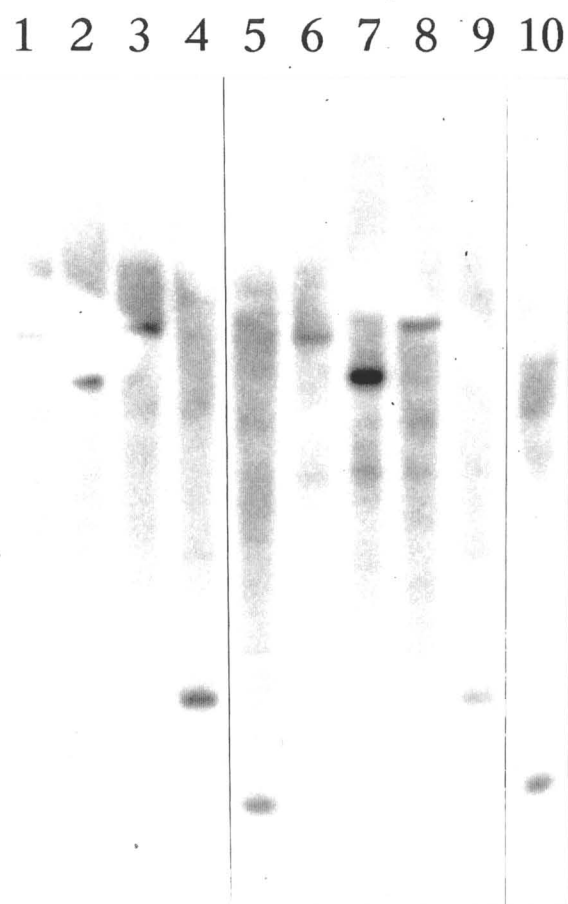


図4-3) MKN45細胞ゲノムにおけるGATA-GT1遺伝子の構造

正常ヒト・ゲノムDNA (レーン1から5) とMKN45細胞のゲノムDNA (レーン6から10)  
 10 $\mu$ gをそれぞれ任意に制限酵素、*Eco*RI (レーン1と6)、*Bam*HI (レーン2と7)、  
*Hin*dIII (レーン3と8)、*Pst*I (レーン4と9)、*Apa*I (レーン5と10) で切断した。  
 プロープにはNorthern hybridizationと同じものを用いた。

## 第5章 ヒスタミンH<sub>2</sub>受容体遺伝子のMKN45細胞における転写調節機構

### 第1節 緒言

本論文では、胃酸分泌酵素 ( $H^+/K^+-ATPase$ ) の  $\alpha$  および  $\beta$  サブユニット遺伝子の壁細胞における特異的な転写調節機構について研究を進め、第2章では、これらの遺伝子上流に存在する (G/C)PuPu(G/C)NGAT(A/T)PuPy という配列に、特異的に結合する蛋白質が、胃の粘膜の核蛋白質に存在することを示した。第3章では、胃粘膜に特異的に発現している転写調節因子である GATA-GT1 及び GATA-GT2 が  $H^+/K^+-ATPase$  の壁細胞特異的な転写に関与していることを示した。

序論で述べたように、胃壁細胞をヒスタミンで処理すると、 $H^+/K^+-ATPase$  による胃酸の分泌が促進されることが知られている。この現象は、胃壁細胞に特異的に発現しているヒスタミンH<sub>2</sub>受容体を介したものである。H<sub>2</sub>受容体 mRNA は壁細胞以外に脳でも検出されており<sup>46)</sup>、この遺伝子の転写調節機構は  $H^+/K^+-ATPase$  のものとは異なっている可能性が高い。2つの遺伝子の転写調節機構の相違を明らかにすることは、胃酸分泌の制御や細胞の分化を考える上でも重要である。そこで本研究では、H<sub>2</sub>受容体遺伝子を単離し、MKN45細胞を用いて、転写調節機構を検討した。

## 第2節 材料及び方法

### 1. PCRによるヒスタミンH<sub>2</sub>受容体遺伝子のコード領域のクローン化

ヒトのヒスタミンH<sub>2</sub>受容体遺伝子の翻訳開始点から下流 20 残基を含むオリゴヌクレオチド (5'-GAGAGACCATGGCACCCAATGGCACAGC-3') を合成し、フォワードプライマーとした。5'端に *Nco* I site を加え、さらに、オリゴヌクレオチドの安定性を高めるため GAGAGA を加えた。翻訳領域の 3' 末端 20 残基の相補鎖の 5' 端に *Nco* I site と GAGAGA を加えた配列 (5'-GAGAGACCATGGTTACCTGTCTGTGGCTCCCT-3') をリバースプライマーとした。HeLa 細胞の DNA を制限酵素 *Eco* RI, *Ban* HI, *Hinc* II で切断したものを鋳型 DNA とし、先に合成したプライマーを用いて PCR を行った。PCR には Ampli Taq Kit および DNA サーマルサイクラー PJ 2000 型 (ともに Perkin Elmer Cetus) を用いた。反応溶液は鋳型 DNA 0.5  $\mu$ g、プライマー 0.25 ~ 2.5  $\mu$ M、4種の deoxy-ribonucleotide triphosphate 0.2 mM、 $\times 10$  reaction buffer [ KCl 50 mM, Tris-HCl (pH 8.3) 10 mM, MgCl<sub>2</sub> 1.5 mM, gelatin 0.01% ], Ampli Taq 0.2 units、を混合し 全量 40  $\mu$ l で行った。反応液を 94  $^{\circ}$ C で 2 分間処理した後、94  $^{\circ}$ C 1 分、60  $^{\circ}$ C で 2 分、72  $^{\circ}$ C で 3 分という反応を 25 サイクル行い、最後に 72  $^{\circ}$ C で 5 分間処理した。反応後、30  $\mu$ l のクロロホルムを加えてよく攪拌した後、水層を抽出した。DNA をエタノール沈殿後、TE 緩衝液 [ 10mM Tris-HCl (pH 8.0), 1 mM EDTA ] に溶解した。*Nco* I で処理した後、5 % アガロースゲル電気泳動を行った。約 1000bp のヒスタミンH<sub>2</sub>受容体のコード領域に対応する DNA 断片を切り出し、電氣的に溶出した後、pUC18 の multicloning site に *Nco* I 部位を持つ pUC18Nco に導入した。

### 2. ファージの宿主菌の調製

ファージ Charon 4A の宿主菌として *E. coli* LE392 株 (F<sup>-</sup>, *hsdR*514, *supE*44, *supF*58, *lacY*1 or  $\Delta$  (*lacI*ZY)6, *galK*2, *galT*22, *metB*1) を用いた。LE392 株の単一コロニーを 0.4% (W/V) マルトースを含む 5 ml L-broth [ 1% (W/V) ポリペプトン、0.5% (W/V) Yeast extract, 0.5% (W/V) 塩化ナトリウム ] に植菌し、37  $^{\circ}$ C で一夜振とう培養した。この培養

液 1 ml をあらかじめ保温しておいた 0.4% (W/V) マルトースを含む 50 ml の L-broth に加え、37 °C で振とう培養した。

培養液の濁度 (OD<sub>650</sub>) が 0.5 ~ 0.7 ( $1.5 \sim 2.1 \times 10^9$  cells/ml) になったところで、培養液を氷上で冷やし、ローター (RP20) を用いて遠心した (3,000 rpm, 4 °C, 10 分間)。菌を 10 mM MgSO<sub>4</sub> 15ml に懸濁し、4 °C で保存した。

### 3. ファージプラークの形成

$\lambda$  agar plate [1.5% (W/V) 細菌用寒天末を含む L-broth] を 37 °C にあらかじめ保温しておいた。 $\lambda$  トップアガロース [1% (W/V) ポリペプトン、0.5% (W/V) Yeast extract、0.5% (W/V) 塩化ナトリウム、0.25% (W/V) MgSO<sub>4</sub>、0.7% (W/V) アガロース・タイプ III (Sigma)] を 5 分間 オートクレーブにかけることにより溶かし、55 °C に保温した。ファージ液を SM buffer [100 mM NaCl, 8 mM MgSO<sub>4</sub>, 50 mM Tris-HCl (pH8.0), 0.01% (W/V) ゼラチン] で希釈し、この希釈液 10 ~ 100  $\mu$ l に宿主菌液 100  $\mu$ l を加え 37 °C で 15 分放置した。これを  $\lambda$  トップアガロース 5 ml が入った小試験管に加えよく混ぜた後、 $\lambda$  agar plate へ流し込んだ。 $\lambda$  トップアガロース がある程度固まった後、37 °C で 8~10 時間培養した後、4 °C に移した。こうしてプレートあたり約  $10^4$  のプラークを形成したマスタープレートを調製した。

### 4. プローブの調製

プローブとして PCR でクローニングした H<sub>2</sub> 受容体遺伝子 (1077 bp) を用いた。すなわち、pHISH2Nco を Nco I で処理し、アクリルアミドゲル電気泳動を行い、1077 bp の H<sub>2</sub> 受容体の DNA 断片を溶出したものを Random primed DNA labeling kit (Boehringer Mannheim) によって [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P] dCTP を取り込ませ標識しプローブとした。

### 5. レプリカの調製およびフィルターの前処理

ニトロセルロースフィルター (Schleicher&Schull BA85, pore size 0.45  $\mu$  m 直径, 82

mm)は、120℃で20分間オートクレーブで滅菌したものを用いた。フィルターの縁に非対称な3点の印と番号をつけた。このフィルターをマスタープレートの寒天培地上に1枚めは3分間、2枚めは10分間接触させ、形質転換体プラークを移しとった。位置確認のため、フィルターの3点の印をプレートにも写しとった。このフィルターをプラークを移植した面を上にして、0.5 M NaOH, 1.5 M NaClを含ませた濾紙上に5分間置いてアルカリ変性した後、1.5 M NaCl, 0.5 M Tris-HCl (pH 8.0)を含ませた濾紙上で5分間、さらに2×SSC(3 M NaCl, 0.3 M 酢酸ナトリウム)を含ませた濾紙上に5分間置いて中和反応を行った。フィルターを乾燥させた後、真空中で80℃で2時間処理し、DNAをフィルターに固定した。

#### 6. ハイブリダイゼーションおよびフィルターの洗浄

フィルターはハイブリダイゼーション溶液 [3 M TMA Cl, 10 mM リン酸ナトリウム (pH 6.8), 1 mM EDTA, 0.5 % SDS, 0.1 % ドライミルク, 0.1 mg/ml 変性サケ精子DNA] 中で4℃で12～15時間 prehybridizationを行った後、熱変性したプローブ(プローブの調製の項参照)を0.5 μCi/mlとなるように加え、48℃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分間の洗浄を2回行った後、42℃で6×SSC, 0.1 % SDSおよび2×SSC, 0.1 % SDSによる洗浄を20分ずつ行った。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、陽性プラークを同定した。対応するプラークを0.5 mlのSM緩衝液中に懸濁した後、同様の方法で2次、3次スクリーニングを行い単一プラークを得た。

#### 7. ファージDNAの大量調製

プレート当たりにプラーク数が $10^5$ 程度になるようにプレートを調製した。これにSM bufferを5 mlずつ分注し、4℃で放置した。2時間おきにプレートをゆすり、ファージがSM bufferによく懸濁されるようにした。6時間以上たったところでファージ液を遠心管に移し、DNase, RNase Aをそれぞれ最終濃度が1 μg/mlになるよう加え、室温に30分間放置して宿主由来のDNA, RNAを切断した。これにNaClを最終濃度が1 Mとな



るよう溶かし、12,000 rpm で4℃ 10 分間遠心し、菌の破片を除いた。上清にポリエチレングリコール (PEG 6,000) を最終濃度 10 % (w/w) になるよう加え、室温で完全に溶解させた後、氷上に 1 時間以上放置した。10,000 rpm で4℃ 10 分間遠心し、上清を完全に取り除いた後、沈殿を 1 ml の TM 緩衝液 [50 mM Tris-HCl (pH 7.8), 10 mM MgCl<sub>2</sub>] に懸濁した。次に、5PA チューブ (Hitachi) にまず 40 % (v/v) グリセロールを含む TM 緩衝液 1.5 ml を入れ、その上層に 5 % (v/v) グリセロールを含む TM 緩衝液 2.5 ml をのせ、さらにその上層にファージ溶液 1 ml をのせた。25,000 rpm で2.5 時間、4℃ で遠心後、上清を捨て、沈殿を 500 µl の TM 緩衝液に懸濁した。DNase, RNase A をそれぞれ最終濃度が 5 µg/ml、1 µg/ml になるよう加え、37℃ で 30 分間放置した。EDTA (pH 8.0), proteinase K, と SDS をそれぞれ最終濃度が 20 mM, 66 µg/ml, 0.5% (w/v) となるように加え、65℃ で 1 時間反応させ、ファージのコートタンパク質を分解した。次に等量の phenol (TE 緩衝液により飽和させたもの)、phenol (TE 緩衝液により飽和) chloroform / isoamyl alcohol (25/24/1, V/V)、chloroform / isoamyl alcohol (24/1, V/V) で処理し、水層を TE 緩衝液 [10 mM Tris-HCl (pH 8.0), 1 mM EDTA (pH 8.0)] 400 ml に対して数時間ずつ 3 回の透析を行った。

## 8. サブクロニング

陽性クローンの *Bam* HI - *Eco* RI 4.8kbp 断片 (ヒスタミン H<sub>2</sub> 受容体のコード領域 約 1k bp、上流 約 3.5k bp 及び下流 0.3k bp を含む) を pBluescript SK(+) の *Bam* HI, *Eco* RI 部位に挿入しサブクロニングした。これを、pH2BE とした。さらに、開始メチオニン上流 -1774 から -34 bp に相当する *Sac* I - *Apa* I 断片を Klenow enzyme により平滑化し、pBluescript SK(+) の *Eco* RV 部位に挿入したものを、pH2SA とした。

## 9. ヒスタミン H<sub>2</sub> 受容体遺伝子の塩基配列の決定

塩基配列は、二本鎖ともに Sequenase Version 2.0 DNA Sequencing Kit (東洋紡) および ABI 373 自動シーケンサー (Applied Biosystems) を用い、ジデオキシ法により決定し

た(14)。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。

## 1 0. Reporter gene assay

### 1) レポーター遺伝子ベクター

先に示したプラスミドpH2SAの*Eco*RI-*Bam*HI断片をピッカジーン・ベーシックベクターPGV-B (東洋インキ (株)) の*Mlu*I部位と*Hin*dIII部位の間に挿入し、プラスミドpGVH2SAを構築した。さらに、pGVH2SAのH2受容体遺伝子のプロモーター領域を各種制限酵素を用いて系統的に欠失したプラスミドを構築し、Reporter gene assayに用いた (図5-1)。他のプラスミドは、第3章、第2節に示した。

### 2) 遺伝子導入用の細胞の調製

第4章で示した方法で培養し、第3章に示した方法でMKN45細胞を調製した。トランスフェクションする24時間前に細胞の数がプレート (直径10cm) あたり約 $5 \times 10^6$  cellsになるように植え継ぎ、5% CO<sub>2</sub>存在下に37℃で培養した。培地を取り除き細胞を10mlのPBSで2回洗った後、0.25% トリプシンを0.5mlおよびPBSを0.5ml 加え、5% CO<sub>2</sub>存在下で37℃で15分間トリプシン処理し、細胞をプレートからはがした。0.1mlのFCSを加えトリプシンの反応を止め、PBSを10ml加え、50mlのコーニングチューブに移し、PBSを加えて40 mlにした。100×gで5分間遠心し、上清を吸引し除いた。さらにPBSを40 ml加え、細胞が痛まないようにピペットによって細胞をほぐした。100×gで5分間遠心してPBSをのぞき、 $1 \times 10^7$  cells/mlになるようにPBSに細胞を懸濁してトランスフェクション (250μF、300V) を行った。これらの操作はすべて室温で行った。トランスフェクション (Electroporation法) の方法は、第3章に示した。

### 3) ルシフェラーゼおよびβガラクトシダーゼ活性の測定

第3章、第2節に示した。

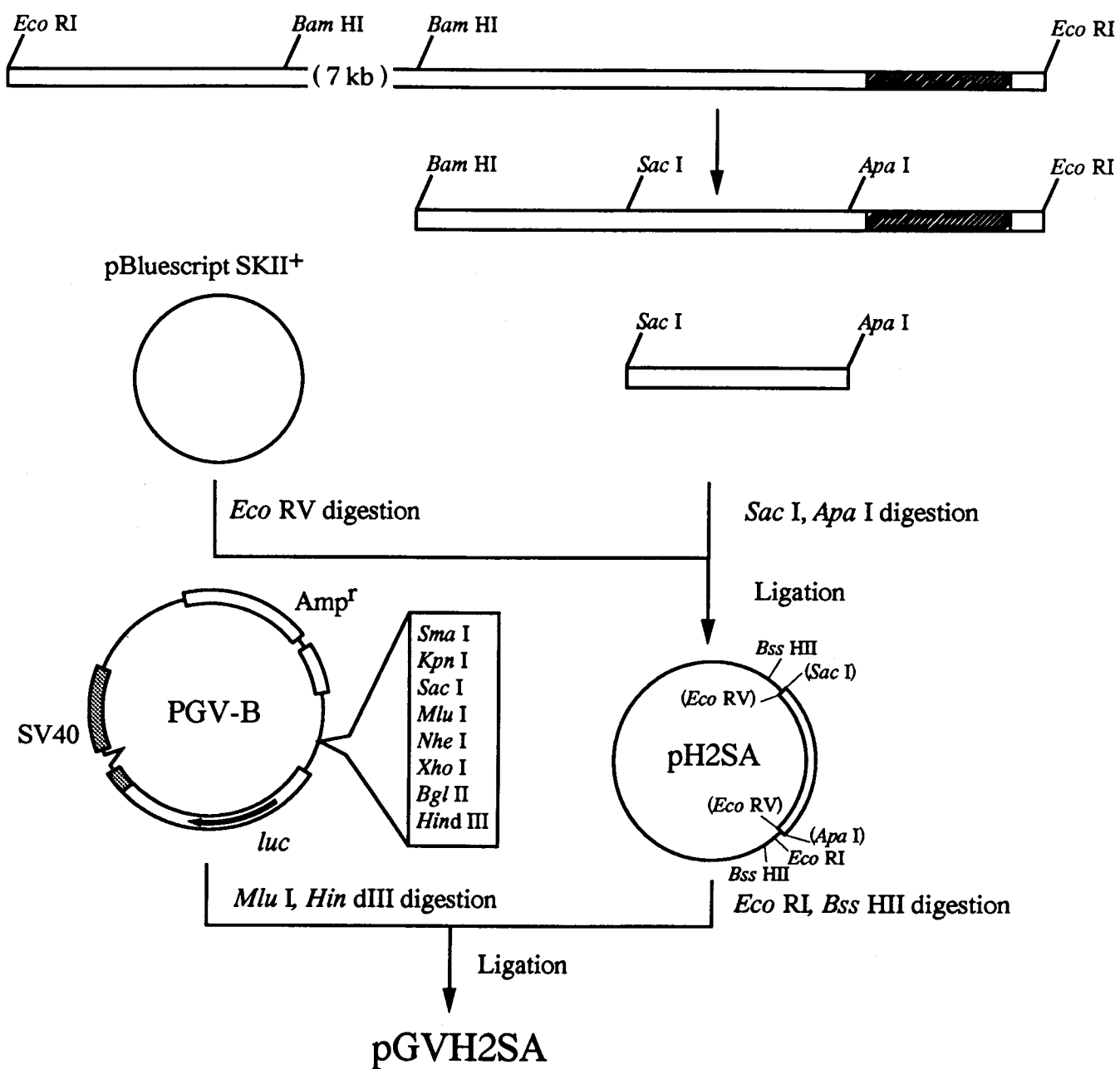


図5-1) ヒスタミンH2受容体遺伝子の5'上流領域をルシフェラーゼ遺伝子上流につないだレポーター遺伝子の構築  
 ヒスタミンH2受容体遺伝子(約15Kbp)を□で示した、コード領域を斜線で示した。  
 ルシフェラーゼ遺伝子は*luc*で示した。

### 1 1. MKN45 細胞の核蛋白質の調製

以下の操作はすべて4℃で行った。PBSで洗浄した $10^7$ 個の細胞を1mlのPBSに懸濁した後、15,000 rpm、10分間遠心して細胞を回収した。これに400  $\mu$ lの氷冷した緩衝液A (10 mM HEPES-KOH pH 7.6, 10 mM KCl, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.5 mM DTT, 0.2 mM PMSF)を加えて再び懸濁し、氷上に10分間放置後、10秒間 vortex にかけて細胞を可溶化した。この細胞液を15,000 rpmで10分間、遠心して核を沈殿させた。50  $\mu$ lの緩衝液C (20 mM HEPES-KOH pH 7.6, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 420 mM NaCl, 0.2 mM EDTA, 25 % グリセロール, 0.5 mM DTT, 0.2 mM PMSF)に核を懸濁して氷上に20分間放置して、核膜を壊し核蛋白質を抽出した。さらに15,000 rpmで2分間遠心して、不溶性画分を除いた。得られた核蛋白質は、10  $\mu$ lごとに小分けにして分注した後、液体窒素で凍らせ、-80℃で保存した。

### 1 2. ゲルシフト法に用いたプローブの調製

ヒスタミンH<sub>2</sub>受容体遺伝子上流 *Bgl* II-*Bst* XI 断片(-610bp ~ -278bp)をさらに、4つの領域 *Bgl* II-*Alw* NI, *Alw* NI-*Pvu* II, *Pvu* II-*Nhe* I, *Nhe* I-*Bst* XI に分割したものをプローブとした。それぞれのDNA断片は、[ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]dCTPの存在下にKlenow enzyme処理することによって末端標識した。標識したDNA断片はポリアクリルアミドゲル電気泳動により分離した後、ゲルより電気的に溶出しエタノールにより沈殿した。この沈殿を2,000 cpm/ $\mu$ lになるようにTE緩衝液(10 mM Tris-HCl pH 8.0, 1 mM EDTA)に溶かした。

### 1 3. 核蛋白質とプローブの結合反応の阻害に用いたDNA断片の調製

拮抗阻害用のDNA断片 C1(-614から-589bp)、C2(-605から-579bp)、C3(-591から-559bp)、C4(-571から-541bp)、C5(-545から-518bp)、C6(-520から-494bp)、C7(-493から-468bp)、C8(-477から-454bp)、C9(-467から-437bp)、C10(-431から-404bp)、C11(-423から-399bp)、C12(-412から-387bp)、C13(-383から-356bp)、およびC14(-355から-321bp)は、DNA合成機により合成した相補的な2本のオリゴヌクレオチドをアニーリングさせ調製

した。

#### 1 4. ゲルシフト法によるDNA結合蛋白質の検出

プローブ DNA と蛋白質の結合反応液の最終組成は 25 mM HEPES-NaOH pH 7.6、34 mM KCl、50 mM MgCl<sub>2</sub>、5 % グリセロール、1 µg poly(dI-dC)、<sup>32</sup>P で末端標識したプローブ (2,000 cpm) とした。拮抗阻害反応には、同じ条件下で拮抗阻害用の 非標識DNA 断片を加えた。この結合反応液に核内蛋白質を加え、氷上に30分間放置し反応させた。反応終了後、あらかじめ 120 V、4 °C で 1 時間予備電気泳動しておいた 8 % ポリアクリルアミドゲル (acrylamide:bisacrylamide 39:1)により電気泳動した。泳動槽には 89 mM Tris-Borate pH 8.0、2.5 mM EDTAを入れ、両極の液を循環させながら180 V 4 °C で泳動した。泳動後、ゲルを 10 % 酢酸を含む 50 % エタノール中で 10 分間固定し、真空下に 80 °C で乾燥して、オートラジオグラフィーを行った。

#### 1 5. その他の方法及び試薬

オリゴヌクレオチドは DNA 合成装置 (Applied Biosystems, Model 381A) を用いて合成した。制限酵素はニッポンジーン社、東洋紡績(株)および宝酒造(株)より購入した。Sequenase Ver.2.0、およびSequencing KitはUnited States Biochemical社より、Klenow 酵素、T4 polynucleotide kinaseはニッポンジーン社より、Tris、DNase I、RNase A、リゾチーム、およびアガロース(タイプII)はSigma社より購入した。[α-<sup>32</sup>P]CTP(3,000 Ci/mmol)はAmersham社より、スキムミルクは森永乳業(株)より、EDTA-2Na、HEPESは同仁化学(株)より購入した。RPMI1640、DMEMおよびFCNは大日本製薬より、ファンギゾンは、GIBCO BRL社より、ペニシリン G、および硫酸ストレプトマイシンは明治製菓(株)より購入した。ピッカジーン・ベクター、ルシフェラーゼ発光システムは東洋インキ (株) から購入した。その他の試薬は和光純薬工業 (株)および半井化学薬品(株)より購入した特級品を用いた。

### 第3節 結果

本章では、ヒスタミンH<sub>2</sub>受容体がMKN45細胞において、特異的に転写される機構を明らかにするべく研究を行った。ヒトのヒスタミンH<sub>2</sub>受容体遺伝子の転写調節に関与する5'上流領域はこれまで明らかになっていなかった。そこで、まずH<sub>2</sub>受容体遺伝子を単離し、その遺伝子を用いて転写調節の機構を解析した。

#### 1. ヒトのヒスタミンH<sub>2</sub>受容体遺伝子のクローニング

すでに報告されているヒトのヒスタミンH<sub>2</sub>受容体遺伝子のコード領域の配列<sup>44)</sup>をもとに、プライマーを作成し、HeLa細胞の染色体DNAを鋳型としてPCRを行った結果、予想される約1kbpのDNA断片が得られた。このDNAの一部の塩基配列を決定したところ、ヒトのヒスタミンH<sub>2</sub>受容体のコード領域の塩基配列と完全に一致した。そこで、このクローンをプローブとしてヒスタミンH<sub>2</sub>受容体遺伝子をクローニングした。6×10<sup>6</sup>個のプラークより、2つの陽性クローンを単離した。制限酵素地図を作成した結果、両者は同じクローン（全長約15kbp）であり、ヒスタミンH<sub>2</sub>受容体遺伝子のコード領域、5'上流約13kbp、及び3'下流245bpを含んでいた（図5-2）。

#### 2. ヒスタミンH<sub>2</sub>受容体遺伝子の5'上流領域の塩基配列の解析

得られたクローンのうち、ヒスタミンH<sub>2</sub>受容体遺伝子のプロモータ領域が含まれると考えられる5'上流1773bp、コード領域1077bpおよび3'下流領域245bpの塩基配列を決定した。ヒトとラット<sup>43)</sup>のH<sub>2</sub>受容体遺伝子を比較したところ、コード領域は85%の相同性を示すのに対して、5'上流領域は55%であった。しかし、21残基中15残基の一致で点を打つ条件でハープロットを行ったところ部分的には両者でよく保存された部分が存在した（図5-3b）。本研究で得られたヒトのヒスタミンH<sub>2</sub>受容体遺伝子のうち-604~-1773bpの領域の塩基配列は、初めて明らかになった部分であり、他の動物では得られていない。ヒトH<sub>2</sub>受容体遺伝子の5'上流領域を検索し、特徴的な配列を調べたところ、cAMP Responsive Element（CRE）の配列が5カ所存在した。

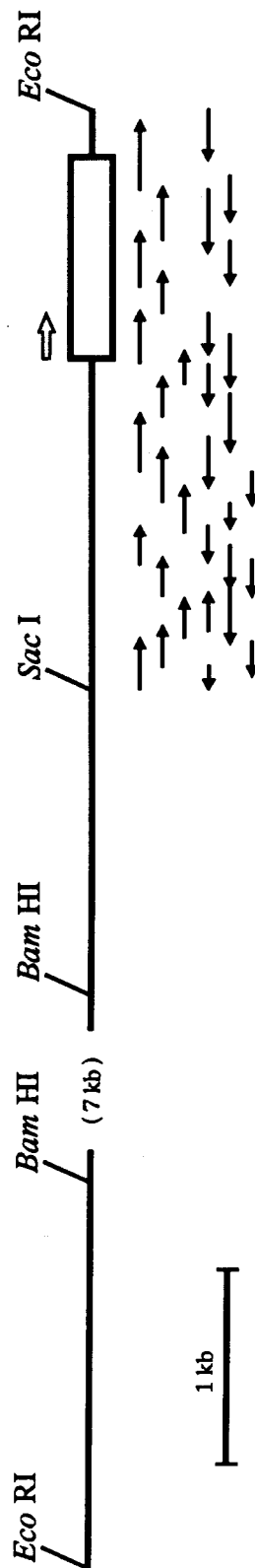
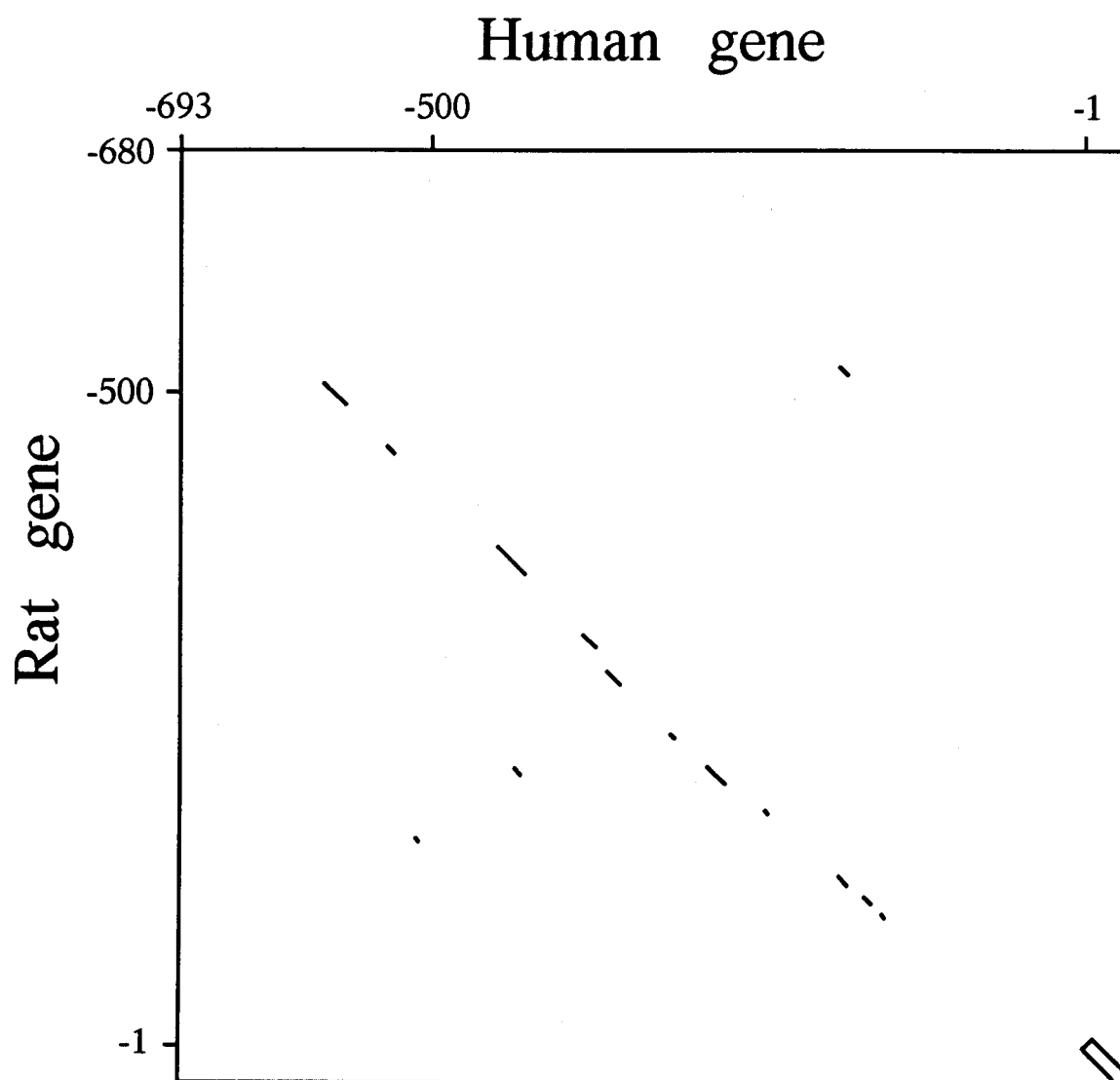


図5-2) ヒトヒスタミンH2受容体遺伝子の構造  
 単離したヒト・ヒスタミンH2受容体遺伝子の主要な制限酵素部位を示した。  
 読み枠は□で示した。転写の方向を白い矢印で示した。  
 "→"および"←"は塩基配列を決定したDNA断片を示している。





b)



また、第3章で、 $H^+/K^+$ -ATPaseの転写活性化に働くことを明らかにした、GATA 結合蛋白質の認識配列が3カ所存在した（図5-3 a, GATA）。また、Direct Repeatの配列（図5-3 a, D1とD2）が4カ所、palindromeの配列（図5-3 a, P1～P4）が2カ所存在した。しかしながら、ラットのH2受容体遺伝子では2カ所のTATA配列が存在するが（図5-3 a, TATA box）、ヒトの対応する部分の配列は異なっていた。

### 3. ヒスタミンH2受容体遺伝子のプロモーター領域の同定

すでに第4章で述べたように、MKN45細胞においてヒスタミンH2受容体遺伝子が転写されており、その遺伝子構造も、正常細胞と同じであった。したがって、単離した遺伝子を用いて、MKN45細胞における、H2受容体遺伝子の転写調節を解析できると考えた。そこで、プロモーター領域と考えられる、遺伝子の5'上流領域のSac I - Apa I (-1773bp ~ -37bp) 断片をルシフェラーゼ遺伝子上流に挿入した組み換えプラスミド pGVH2SA を構築した（図5-1）。このプラスミドをMKN45細胞に導入し、48時間後に細胞を溶解し、ルシフェラーゼの発光強度を測定することにより、転写活性を調べた。その結果、H2受容体遺伝子上流のSac I - Apa Iの領域がMKN45細胞で転写の活性化に働くことが明らかになった。そこで、Sac I - Apa I領域のどの部分にプロモーター活性があるかを詳しく調べるために、系統的に欠失させたプラスミドを構築し、MKN45細胞に導入した（図5-4）。その結果、Sac I - Apa I領域を5'側から段階的に、Pma CI (-1202bp) まで欠失すると（pGVH2L1）一旦転写活性が上昇するが、以下欠失にともなって、段々と下がっていき、Bst XI (-273bp) までを欠失すると完全に活性がなくなった。また、Bgl II - Bst XI部分 (-610bp ~ -278bp) を一部欠失すると、活性は大きく低下した。さらに、Bgl II - Bst XI領域単独でも高いプロモーター活性を示した。

以上の結果から、Bgl II - Bst XI領域がH2受容体遺伝子で最小のプロモーター領域であると結論した。

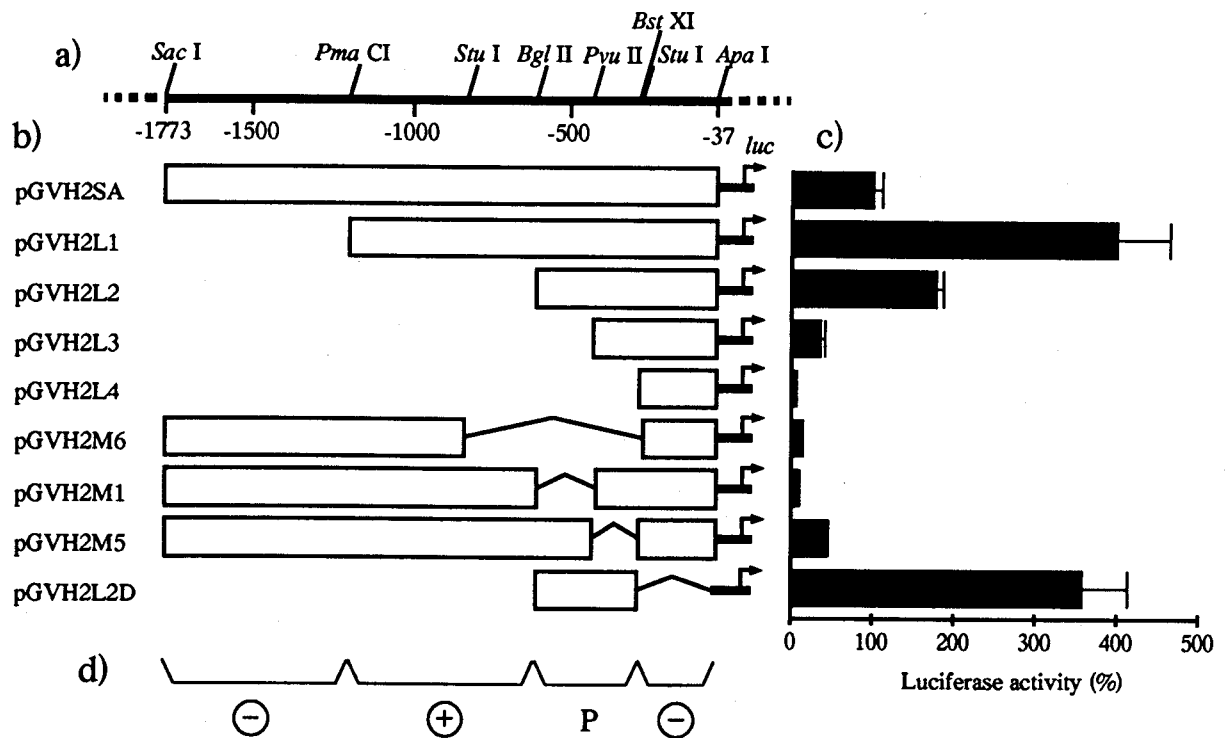


図 5-4) H2受容体遺伝子の5'上流領域の欠失と転写活性の変化

a) にH2受容体遺伝子の5'上流領域の制限酵素地図を示した。b) 各種欠失変異を持つプラスミドを示した。c) 各プラスミドをMKN45細胞に導入した時の、ルシフェラーゼ活性を示した。*luc*でルシフェラーゼ遺伝子を示した。pGVH2SAをMKN45細胞に導入したときの転写活性値を100としたときの相対活性を示した。d) 転写活性の測定の結果から5'上流領域の機能を推定した。+は転写を促進する、-は抑制する領域を、Pで最小のプロモーター領域を示した。

#### 4. ヒスタミンH<sub>2</sub>受容体遺伝子上流に結合する MKN45 細胞の核蛋白質

転写活性に必須の領域として、明らかになった*Bgl* II-*Bst* XI領域のどの配列に、どのような因子が結合することによって転写が促進されるのか興味深い。そこで、*Bgl* II-*Bst* XI領域にMKN45細胞の核蛋白質が結合する配列があるかどうか検討した。まず、*Bgl* II-*Bst* XI領域を R1 (-611から-526)、R2 (-523から-432)、R3 (-431から-317)、およびR4 (-320から-278)の4つの領域に分け、それぞれのDNA断片をプローブとし、MKN45細胞の核蛋白質の結合をゲルシフト法により調べた。その結果、プローブR1、R2、およびR3に核蛋白質が結合し、DNA-蛋白質複合体が検出された(図5-5)。しかし、R4では検出されなかった。R1、R2では1本、R3では2本のバンドがみられた。以上の結果は、確かに*Bgl* II-*Bst* XI領域に、MKN45細胞の核蛋白質が結合して転写を活性化していることを示唆している。

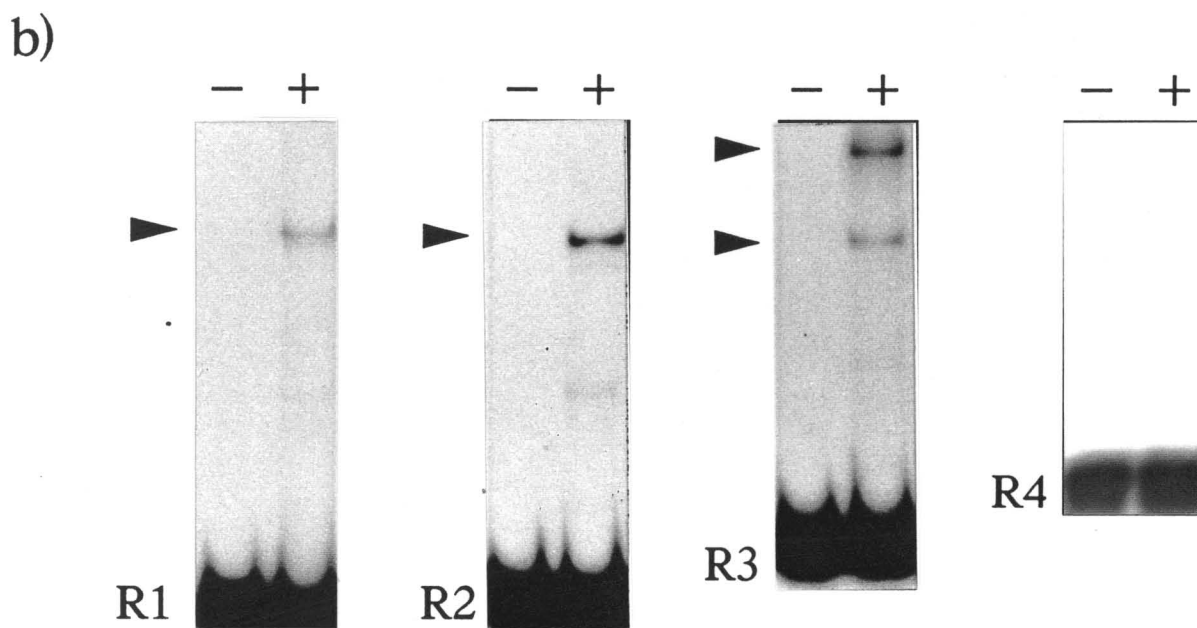


図 5-5) H2受容体遺伝子のプロモーター領域へのMKN45細胞の核蛋白質の結合

- a) H2受容体遺伝子のプロモーター領域 (-614~-271bp) をR1 (-611~-523bp) R2 (-522~-452bp) R3 (-451~-318bp) R4 (-317~-279bp) の4つの領域に分けた。
- b) R1~R4の領域に対応するDNA断片をプローブとした。レーン (-) はプローブのみ、レーン (+) はプローブとMKN45細胞の核蛋白質を反応させた。反応後、8%アクリルアミドゲル中で電気泳動を行い、ゲルを乾燥後、オートラジオグラムをとった結果を示した。下端に黒く見えるのがプローブ、プローブと核蛋白質の結合を矢印で示した。

## 5. DNA断片R1に存在する核蛋白質の認識配列の同定

DNA断片R1に存在する核蛋白質の結合配列を同定するために、DNA断片R1の部分配列に対応する二本鎖オリゴヌクレオチドC1、C2、C3、C4、およびC5を合成し、いずれがR1と核蛋白質の結合を拮抗阻害するかどうか検討した（図5-6）。その結果、C2を用いたときにのみ、核蛋白質とR1の結合が見られなくなった。またC2と一部配列の重なるC3を用いたときにも、核蛋白質の結合が減少した。この実験から、R1では、C2とC3に共通に存在する配列（おそらくTCTTGAATTG GG）に核蛋白質が結合すると結論した。

## 6. DNA断片R2に存在する核蛋白質の認識配列の同定

DNA断片R1と同様に、DNA断片R2に対しても、C5、C6、C3、C7、C8およびC9の二本鎖オリゴヌクレオチドを合成し、DNA断片R2と核蛋白質との結合を拮抗阻害するかどうかを検討した（図5-7）。その結果、C7とC9を用いたときにのみ、核蛋白質とR2の結合が見られなくなった。したがって、DNA断片R2ではC7とC9の領域に存在する配列に核蛋白質は結合しうると考えられる。また、核蛋白質とR2の結合によるシフトしたバンドは、R1領域の一部であるC2を用いたときにも消失した。これは、R1とR2に、同じ認識配列を持つ核蛋白質が結合していることを示している。

## 7. DNA断片R3に存在する核蛋白質の認識配列の同定

同様に、C10、C11、C12、C13、およびC14の二本鎖オリゴヌクレオチドを合成し、DNA断片R3と核蛋白質との結合を拮抗阻害するのかどうか検討した（図5-8）。DNA断片R3は、核蛋白質との結合により、2本のバンドが生じた。そのうちの移動度の遅いバンドは、C13を加えると完全に消失した。すなわち、このバンドは、C13にある配列への核蛋白質の結合によることを示している。移動度の速いバンドは、C10、C11、C12、およびC2によって消失した。したがって、このバンドは、C10、C11、C12の共通領域の配列への核蛋白質の結合によると考えられ、この核蛋白質はDNA断片R1、R2に結合し

たものと同じものであると結論した。そこで、C2、C7、C10、C11およびC12の配列を比較したところ、共通配列としてTCATGNATTGGGという配列を見いだした。また、C13の配列を、既知のDNA結合蛋白質の認識配列と比較したところ、TFII-Iの認識配列とよく似ていることが明らかになった（図5-9）。

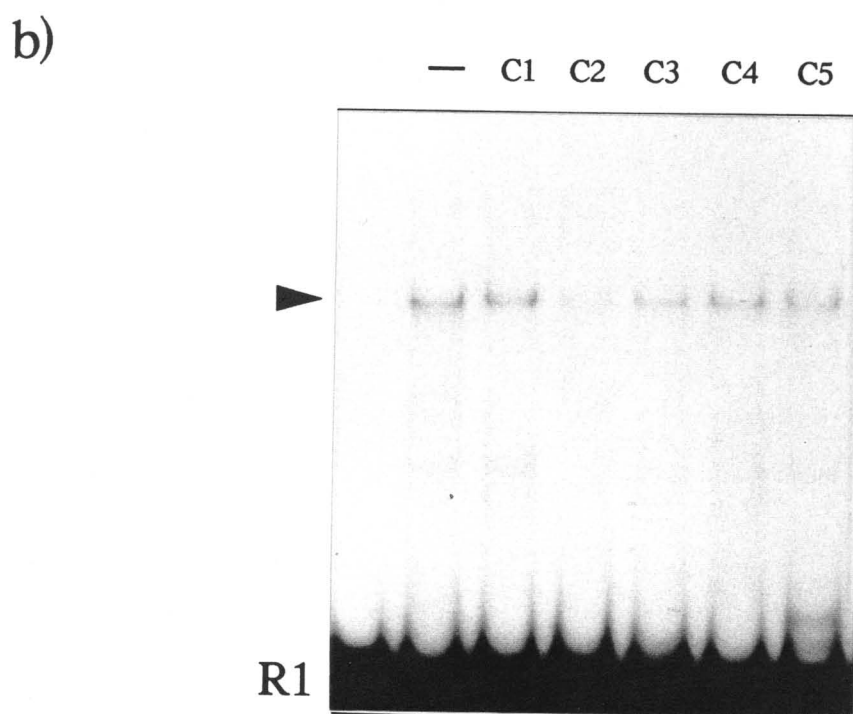
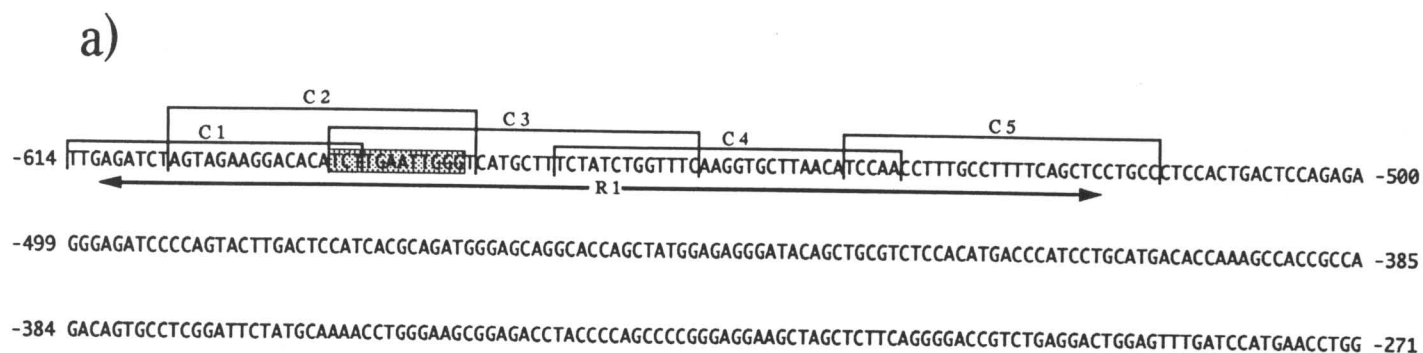


図5-6) DNA断片R1とMKN45細胞の核蛋白質の結合

- 最小のプロモーター領域の塩基配列を示した。プローブにしたDNA断片R1に対応する位置を矢印で、オリゴヌクレオチドC1、C2、C3、C4、C5に対応する位置を示した。斜線で核蛋白質の結合すると推定した配列を示した。
- 矢印で、プローブと核蛋白質の結合によるバンドを示した。R1は核蛋白質の結合していないプローブのみのバンドの位置を示した。



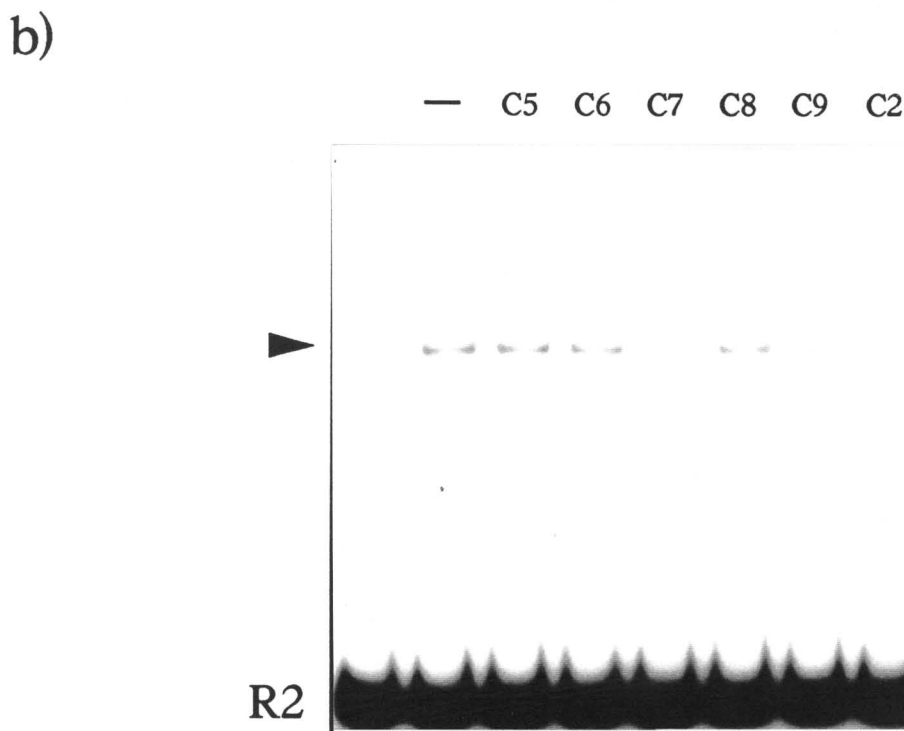
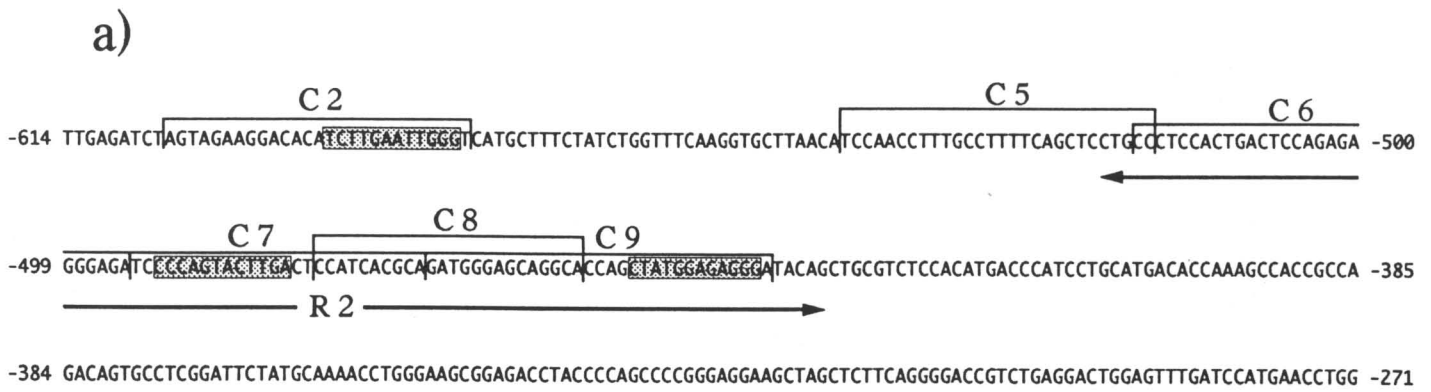


図5-7) DNA断片R2へのMKN45細胞の核蛋白質の結合

- 最小のプロモーター領域の塩基配列を示した。プローブにしたDNA断片R2に対応する位置を矢印で、オリゴヌクレオチドC2、C5、C6、C7、C8、C9の位置を囲んで示した。斜線で核蛋白質の結合すると推定した配列を示した。
- 矢印で、プローブと核蛋白質の結合によるバンドを示した。R2は核蛋白質の結合していないプローブのみのバンドの位置を示した。

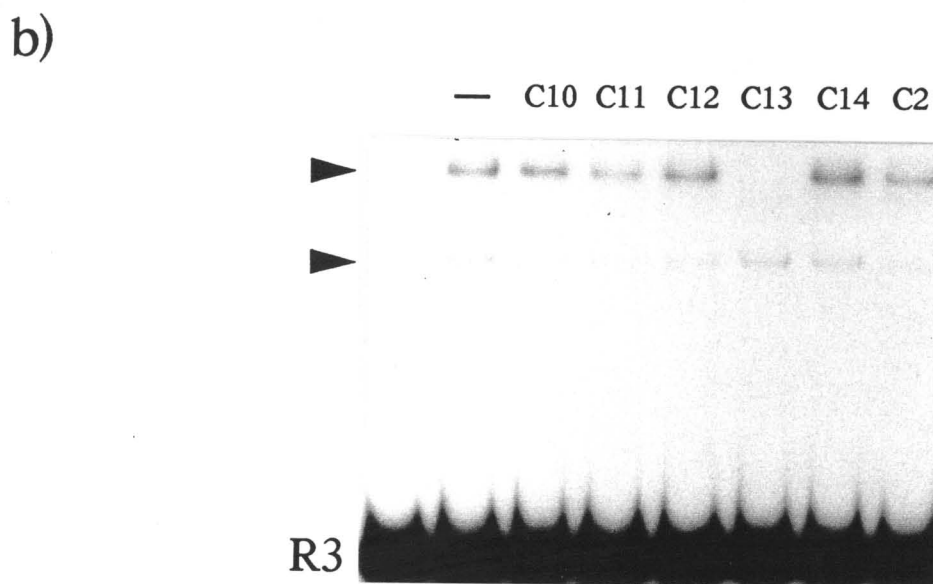
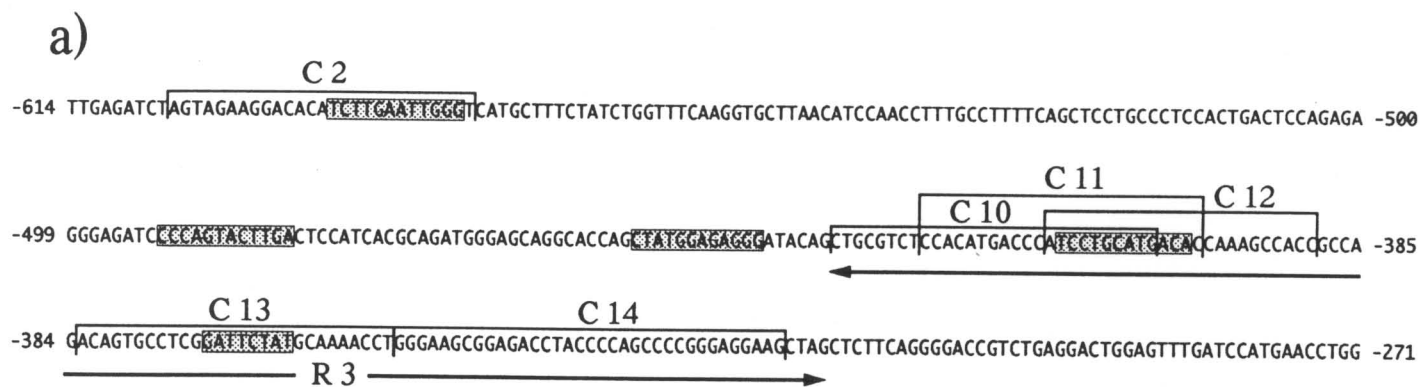


図5-8) DNA断片R3へのMKN45細胞の核蛋白質の結合

- a) 最小のプロモーター領域の塩基配列を示した。プローブにしたDNA断片R3に対応する位置を矢印で、オリゴヌクレオチドC2、C10、C11、C12、C13、C14の位置を囲んで示した。斜線で核蛋白質の結合すると推定した配列を示した。
- b) 矢印で、プローブと核蛋白質の結合によるバンドを示した。R3は核蛋白質の結合していないプローブのみのバンドの位置を示した。

|           |      |              |      |       |      |     |      |
|-----------|------|--------------|------|-------|------|-----|------|
| C2        | -591 | TC           | t    | TGA   | ATT  | GGG | -580 |
| C7        | -480 | TCA          | a    | GTAC  | T    | GGG | -491 |
| C9        | -449 | ct           | ATGG | Aga   | GGG  |     | -438 |
| C11       | -411 | TC           | c    | TGCAT | gaca |     | -400 |
| Consensus |      | TCATGNATTGGG |      |       |      |     |      |

|        |      |          |      |
|--------|------|----------|------|
| C13    | -372 | GATTCTAT | -365 |
| TFII-I |      | YAYTCYYY |      |

図5-9) MKN45細胞の核蛋白質による認識配列

最小のプロモーター領域 (*Bst* XI ~ *Bgl* II, -614~-271bp) における核蛋白質の結合配列を示した。

- a) オリゴヌクレオチドC2、C7、C9、C11の塩基配列から推定したコンセンサス配列をconsensusとして下に示した。共通配列には影をつけ、コンセンサス配列と異なる塩基配列を小文字で示した。
- b) TFII-IとC13の間で共通の配列を影をつけて示した。ここでYはA/Tを示している。

#### 第4節 考察

これまでに述べてきたように、ヒスタミンH<sub>2</sub>受容体は壁細胞に特異的に発現している<sup>111)</sup>。本論文の第4章では、H<sub>2</sub>受容体をはじめ壁細胞に特異的な遺伝子が、MKN45細胞において転写されていることを明らかにした。第5章ではMKN45細胞におけるH<sub>2</sub>受容体遺伝子の転写調節を解析した。5'上流域を系統的に欠損し、転写活性を検討したところ、*Bgl* II - *Bst* XI領域が転写に必須であることを明らかにした。この領域はヒト、ラットおよびイヌの間でよく保存されている。転写に重要と考えられる領域が、種を越えて保存されているのは当然であろう。さらに上流の*Sac* I - *Pma* CI 領域を欠失すると転写活性が増加し、さらに*Sac* I - *Bgl* II領域を欠失すると転写活性が減少した。したがって、*Sac* I - *Pma* CI 領域は転写を抑制し、*Pma* CI - *Bgl* II領域は転写を促進すると考えられる(図5-4, d)。

転写に必須であり、最小のプロモーター領域である *Bgl* II - *Bst* XI領域に、MKN45細胞の核蛋白質が結合するかどうか検討した。その結果、C2、C7、C10、C11およびC12に共通に結合するものと、C13に結合するものの、2種類の核蛋白質が存在することを明らかにした。C13に見いだした配列は、TFII-Iの認識配列とよく似ていた(図5-9)。TFII-Iは転写の開始に働くことが知られており<sup>113)</sup>、H<sub>2</sub>受容体遺伝子はTATA配列を持たないことから、この配列にTFII-Iが結合して、転写複合体を形成するものと考えられる。また、C2、C7、C10、C11およびC12の配列を比較することにより、共通配列としてTCATGNATTGGGという配列を見いだした(図5-9)。この配列は既知のDNA結合蛋白質の認識配列には存在しなかった。したがって、新しい核蛋白質とその認識配列がH<sub>2</sub>受容体の転写に重要であると考えられる。この配列に結合する因子のプロモーター活性への働きをさらに明らかにする必要がある。

また、*Bgl* IIよりも上流に、転写を促進する領域があり、そこにはCRE配列が多く存在する。ヒスタミンH<sub>2</sub>受容体は、ヒスタミン刺激により細胞内のcAMP濃度を上昇させることが明らかとなっており<sup>2)</sup>、自らの転写もcAMPによって調節している可能性がある。またすでに、H<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPaseの転写に関与していることを明らかにしたGATA結合蛋白質

の認識しうる配列が存在する。実際、壁細胞に特異的に発現する GATA-GT1、GATA-GT2のmRNAは MKN45細胞に存在していることを第4章で示した。しかし、H2受容体で見いだしたGATA配列にはMKN45細胞の核蛋白質は結合しなかった。また、第3章の図3-6に示したように、H2受容体遺伝子の転写活性はGATA-GT1、GATA-GT2により上昇しなかった。以上の結果から、 $H^+/K^+$ -ATPaseとは異なり、H2受容体遺伝子の転写にはGATA結合蛋白質は関与していないと結論した。

MKN45細胞を用いてH2受容体遺伝子あるいは他の壁細胞特異的な遺伝子の転写調節機構をさらに詳細に明らかにすることが可能になった。

## 第6章 総括および展望

### 1. 本研究で得られた成果

第1章で述べたように、胃には高度に分化した細胞が存在し、それぞれの細胞が独自の機能を担っている。そのうちでも、胃底腺に存在する壁細胞は、胃の重要な機能の1つである胃酸の分泌を行っている。壁細胞がどのようにして胃酸分泌酵素である $H^+/K^+-ATPase$ をはじめとする、特異的な蛋白質を発現しているかを明らかにする目的で本研究を開始した。

第2章では、 $H^+/K^+-ATPase$   $\beta$ サブユニット遺伝子（ラット）のプロモーター領域を用いて、ラットの胃の核蛋白質のみが特異的に結合する配列GATA(G/A)(G/C)を同定した。この配列に結合する蛋白質は、 $\alpha$ サブユニット遺伝子のプロモーター領域に結合するものと同じであり、その共通配列は、(G/C)PuPu(G/C)NGAT(A/T)PuPyであることを明らかにした。この配列はGATA結合蛋白質の認識配列(A/T)GATA(A/G)を含んでいた。この配列にGATA結合蛋白質が結合する可能性を示した。

第3章では、第2章で示した共通配列（以下GATA配列という）に、壁細胞に特異的に発現しているGATA-GT1（GATA-6）、およびGATA-GT2（GATA-4）が結合し転写を活性化していることを明らかにした。さらにこの転写の活性化にはTATA配列のすぐ上流に2カ所存在するGATA配列のみが必須であり、他の位置にあるGATA配列は転写に関係しないことを明らかにした。

第4章では、壁細胞のモデル細胞として、MKN45細胞を用いることができることを示唆した。MKN45細胞には、壁細胞に特異的に発現しているヒスタミン $H_2$ 受容体、GATA-GT1およびGATA-GT2が発現しており、それらの遺伝子構造は正常細胞と大きく変化していないことを明らかにした。以上の結果から、MKN45細胞を用いてヒスタミン $H_2$ 受容体遺伝子の転写調節機構を解析できることを示した。

第5章では、ヒスタミン $H_2$ 受容体遺伝子の転写調節機構について検討した。その結果最小のプロモーター領域としてBgl II - Bst XI (-610bp ~ -278bp)を同定した。この領域

に結合するMKN45細胞の核蛋白質の結合配列として2つの配列を同定した。1つはTFII-Iの認識配列とよく似ており、おそらく転写開始に関与するであろうと考えられる。もう1つは、TCATGNATTGGGという配列であるが、これはこれまでに知られていない認識配列であり、全く新しい核蛋白質が転写調節に関与していることを示唆した。

## 2. 今後の研究への展望

本研究において、 $H^+/K^+$ -ATPase遺伝子の2つのサブユニットの転写をGATA-GT1およびGATA-GT2が活性化し、その活性化にはTATA配列のすぐ上流に存在する2カ所のGATA配列が重要であることが明らかとなった。しかし、このGATA配列は、他のこれまで知られているGATA結合蛋白質の認識配列とほとんど同じであり、多くの遺伝子上流領域に見いだせる。最近、グロビン遺伝子等の解析から、細胞特異的な転写調節機構に、GATA結合蛋白質と他の転写調節因子との相互作用が必要であることが示されている。実際、 $H^+/K^+$ -ATPase遺伝子の転写は、赤芽球に特異的な転写調節因子として見いだされたGATA-1によっても活性化される。しかし実際には、壁細胞にはGATA-1発現していないし、GATA-1の発現しているところで、 $H^+/K^+$ -ATPase遺伝子の転写は見られない。壁細胞に特異的に発現しているGATA-GT1およびGATA-GT2により、 $H^+/K^+$ -ATPase遺伝子の転写は活性化されるが、実際の細胞では、これらが単独で壁細胞特異的な転写調節を行っているのではないことを示している。今後、GATA-GT1およびGATA-GT2と相互作用し、壁細胞における $H^+/K^+$ -ATPase遺伝子の転写を調節する因子を同定することは重要である。

また、第3章で、GATA-GT1およびGATA-GT2が、プロテインキナーゼによって調節されている可能性を示唆した。蛋白質のリン酸化によって転写活性化が調節されている例はよく知られている。 $H^+/K^+$ -ATPase遺伝子の転写がどのように調節されているか興味深い。

MKN45細胞が壁細胞のモデル細胞になる可能性を示し、ヒスタミン $H_2$ 受容体遺伝子のプロモーター領域を同定した。今後、ヒスタミン $H_2$ 受容体遺伝子の細胞特異的な転写

を調節している新しい蛋白質を同定し、その機能を解析することが重要である。

また、ヒスタミンH<sub>2</sub>受容体と同じく、MKN45細胞に発現しているGATA-GT1およびGATA-GT2の遺伝子を単離し、転写調節機構をヒスタミンH<sub>2</sub>受容体、H<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase遺伝子と比較することは、壁細胞に特異的な遺伝子の転写調節を普遍的に明らかにすることにつながると考える。

本研究で確立した培養細胞系を用いることによって、胃壁細胞に特異的な転写調節の解明の足がかりができたと考える。今後、壁細胞における特異的な発現に関与する新しい因子を同定し、その機能を明らかにし、究極的には細胞の分化の普遍的な理解につながる機構を明らかにしたいと考えている。



## 引用文献

1. Berglindh, T., G. Sachs, and N. Takeguchi (1980).  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent secretagogue stimulation in isolated rabbit gastric glands. *Am. J. Physiol.* **239**, G90-G94.
2. Thompson, W.J., L.K. Chang, and G.C. Rosenfeld (1981). Histamine regulation of adenylyl cyclase of enriched rat gastric parietal cells. *Am. J. Physiol.* **240**, G76-G84.
3. Campbell, V. W. and Yamada, T. (1989) Acid secretagogue-induced stimulation of parietal cell gene expression. *J. Biol Chem.* **264**: 11381-11386
4. Cansler, A.L. and J.G. Forte (1973).  $\text{K}^{+}$ -stimulated ATPase in purified microsomes of bullfrog oxyntic cells. *Biochim. Biophys. Acta.* **307**, 169-180.
5. Saccomani, G., G. Shah, J.G. Spenney, and G. Sachs (1975). Characterization of gastric mucosal membranes. *J. Biol. Chem.* **250**, 4802-4809.
6. Sachs, G., H.H. Chang, E. Rabon, R. Schackman, and G. Saccomani (1976). A nonelectrogenic  $\text{H}^{+}$  pump in plasma membranes of hog stomach. *J. Biol. Chem.* **251**, 7690-7698.
7. Serrano, R. (1988). Structure and function of proton translocating ATPase in plasma membranes of plants and fungi. *Biochim. Biophys. Acta.* **947**, 1-28.
8. Shull, G.E., J. Greeb, and J.B. Lingrel (1986). Molecular cloning of three distinct forms of the  $\text{Na}^{+}, \text{K}^{+}$ -ATPase  $\alpha$  subunit from rat brain. *Biochemistry* **25**, 8125-8132.
9. Herrera, V.L., J.R. Emanuel, N. Ruiz-Opazo, R. Levenson, and B. Nadal-Ginard (1987). Three differentially expressed Na,K-ATPase  $\alpha$  subunit isoforms: Structural and functional implications. *J. Cell Biol.* **105**, 1055-1065.
10. Martin-Vasallo, P., W. Dackowski, J.R. Emanuel, and R. Levenson (1989). Identification of a putative isoform of the Na, K-ATPase  $\beta$  subunit : primary structure and tissue-specific expression. *J. Biol. Chem.* **264**, 4613-4618.
11. Good, P.J., K. Richter, and I.B. Dawid (1990). A nervous system-specific isotype of the  $\beta$  subunit of  $\text{Na}^{+}, \text{K}^{+}$ -ATPase expressed during early development of *Xenopus laevis* *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**, 9088-9092.
12. Lingrel, J.B. (1992). Na,K-ATPase: Isoform structure, function, and expression. *J. Bioenerg. Biomemb.* **24**, 263-270.
13. Oshiman, K.-I., K. Motojima, S. Mahmood, A. Simada, S. Tamura, M. Maeda, and M. Futai (1991). Control region and gastric specific transcription of the rat  $\text{H}^{+}/\text{K}^{+}$ -ATPase  $\alpha$  subunit gene. *FEBS Lett.* **281**, 250-254.

14. Shull, G.E. (1990). cDNA cloning of the  $\beta$ -subunit of the rat gastric H,K-ATPase. *J. Biol. Chem.* **265**, 12123-12126.
15. Canfield, V.A., C.T. Okamoto, D. Chow, J. Dorfman, P. Gros, J.G. Forte, and R. Levenson (1990). Cloning of the H,K-ATPase  $\beta$  subunit: tissue-specific expression, chromosomal assignment, and relationship to Na,K-ATPase  $\beta$  subunits. *J. Biol. Chem.* **265**, 19878-19884.
16. Maeda, M., J. Ishizaki, and M. Futai (1988). cDNA cloning and sequence determination of pig gastric H<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **157**, 203-209.
17. Shull, G., E. and J.B. Lingrel (1986). Molecular cloning of the rat stomach (H<sup>+</sup>+K<sup>+</sup>)-ATPase. *J. Biol. Chem.* **261**, 16788-16791.
18. Maeda, M., K.-I. Oshiman, S. Tamura, and M. Futai (1990). Human gastric H<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase gene. Smilarity to Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase genes in exon/intron organization but difference in control region. *J. Biol. Chem.* **265**, 9027-9032.
19. Newman, P.R., J. Greeb, T.P. Keeton, A.A. Reyes, and G.E. Shull (1990). Structure of the human gastric H,K-ATPase gene and comparison of the 5'-flanking sequence of the human and rat genes. *DNA Cell Biol.* **10**, 749-762.
20. Bamberg, K., F. Mercier, M.A. Reuben, Y. Kobayashi, K.B. Munson, and G. Sachs (1992). cDNA cloning and membrane topology of the rabbit gastric H<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase  $\alpha$  subunit. *Biochim. Biophys. Acta* **1131**, 69-77.
21. Maeda, M. and M. Futai (1989). Structural analysis of gastric (H<sup>+</sup>+K<sup>+</sup>)-ATPase. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **574**, 204-207.
22. Canfield, V.A. and R. Levenson (1991). Structural organization and transcription of the mouse gastric H<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase  $\beta$  subunit gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**, 8247-8251.
23. Shull, G.E. (1990). cDNA cloning of the  $\beta$ -subunit of the rat gastric H,K-ATPase. *J. Biol. Chem.* **265**, 12123-12126.
24. Toh, B.-H., P.A. Gleeson, R.J. Simpson, R.L. Moritz, J.M. Callaghan, I. Goldkorn, C.M. Jones, T.M. Martinelli, F.-T. Mu, D.C. Humphris, J.M. Pettitt, Y. Mori, T. Masuda, P. Sobieszczuk, J. Weinstock, T. Mantamadiotis, and G.S. Baldwin (1990). The 60- to 90-kDa parietal cell autoantigen associated with autoimmune gastritis is a  $\beta$  subunit of the gastric H<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase (proton pump) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**, 6418-6422.

25. Reuben, M.A., L.S. Lasater, and G. Sachs (1990). Characterization of a  $\beta$  subunit of the gastric  $H^+/K^+$ -transporting ATPase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**, 6767-6771.
26. Ma, J.Y., Y.H. Song, S.E. Sjostrand, L. Rask, and S. Mardh (1991). cDNA cloning of the  $\beta$  subunit of the human gastric H,K-ATPase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **180**, 39-45.
27. Kirley, T.L. (1989). Determination of three disulfide bounds and one free sulfhydryl in the  $\beta$  subunit of (Na,K)-ATPase. *J. Biol. Chem.* **264**, 7185-7192.
28. Miller, R.P. and R.A. Farley (1990).  $\beta$  subunit of  $(Na^++K^+)$ -ATPase contains three disulfide bonds. *Biochemistry* **29**, 1524-1532.
29. Lane, L.K., M.M. Shull, K.R. Whitmer, and J.B. Lingrel (1989). Characterization of two genes for the human Na,K-ATPase  $\beta$  subunit. *Genomics* **5**, 445-453.
30. Shyjan, A.W., V.A. Canfield, and R. Levenson (1991). Evolution of the Na,K- and H,K-ATPase  $\beta$  subunit gene family: structure of the murine Na,K-ATPase  $\beta 2$  subunit gene. *Genomics* **11**, 435-442.
31. Maeda, M., K.-I. Oshiman, S. Tamura, S. Kaya, S. Mahnood, M. Reuben, G. Sachs, and M. Futai (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.
32. Newman, P.R. and G.E. Shull (1991). Rat gastric  $H^+/K^+$ -ATPase  $\beta$  subunit gene: intron/exon organization, identification of multiple transcription initiation site, and analysis of the 5'-flanking region. *Genomics* **11**, 252-262.
33. Morley, G.P., J.M. Callaghan, J.B. Rose, B.H. Toh, P.A. Gleeson, and I.R. van Driel (1992). The mouse gastric  $H^+/K^+$ -ATPase  $\beta$  subunit gene structure and co-ordination with the  $\alpha$  subunit during ontogeny. *J. Biol. Chem.* **267**, 1165-1174.
34. Shyjan, A.W. and R. Levenson (1989). Antisera specific for the  $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$ ,  $\alpha 3$ , and  $\beta$  subunits of the Na,K-ATPase: Differential expression of  $\alpha$  and  $\beta$  subunits in rat tissue membranes. *Biochemistry* **28**, 4531-4535.
35. Shyjan, A.W., C. Gottardi, and R. Levenson (1990). The Na,K-ATPase  $\beta 2$  subunit is expressed in rat brain and copurifies with Na,K-ATPase activity. *J. Biol. Chem.* **265**, 5165-5169.
36. Shyjan, A.W., V. Cena, D.C. Klein, and R. Levenson (1990). Differential expression and enzymatic properties of the  $Na^+,K^+$ -ATPase  $\alpha 3$  isoenzyme in rat pineal glands. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**, 1178-1182.

37. Schneider, B.G., A.W. Shyjan, and R. Levenson (1991). Co-localization and polarized distribution of Na,K-ATPase  $\alpha 3$  and  $\beta 2$  subunits in photoreceptor cells. *J. Histochem. Cytochem.* 39, 507-517.
38. Ganelin, C.R., and Parson, M.E. (1982) *Pharmacology of histamine receptors*, Bristol, U. K.
39. Yamashita, M., Fukui, H., Sugama, K., Horio, Y., Ito, S., Mizuguchi, H., and Wada, H (1991). Expression cloning of a cDNA encoding the bovine histamine H1 receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88, 11515-11519.
40. Fujimoto, K., Mizuguchi, H., Fukui, H., and Wada, H (1991) Presynaptic localization of histamine H3-receptor in rat brain. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 177, 907-912.
41. Berglindh, T., Sachs, G., and Takeguchi, N. (1980)  $Ca^{2+}$ -dependent secretagogue stimulation in isolated rabbit gastric glands. *Am. J. Physiol.* 239, G90-G94.
42. Gantz, I., Schäffer, M., DelVall, J., Dogsdon, C., Campbell, V., Uhler, M., and Yamada, T. (1991) Molecular cloning of a gene encoding the histamine H2 receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88, 429-433.
43. Ruat, M., Traiffort, E., Arrang, J.-M., Leurs, R., and Schwartz, J.-C. (1991) Molecular cloning and tissue expression of a rat histamine H2-receptor gene. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 179, 1470-1478
44. Gantz, I., Munzert, G., Tashiro, T., Schäffer, M., Wang, L., Del Valle, J., and Yamada, T. (1991) Molecular cloning of the humane histamine H2 receptor *Biochem. Biophys. Res. commun.* 178, 1386-1392
45. Catherine, D. S., Irving, S. S., Mari, R. C., Elaine, R. Wendy, S. H, and Richard, A. F. (1988) Conserved aspartic acid residues 79 and 113 of  $\beta$ -adrenergic receptor have different roles in receptor function. *J. Biol. Chem.* 263, 10267-10271.
46. Dieckgraefe, B. K., Seetharam, B., Banaszak, L., Leykam, J. F., and Alpers, D. H. (1988) Isolation and structural characterization of a cDNA clone encoding rat gastric intrinsic factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85, 46-50.
47. Hewitt, J.E., M.M. Gordon, R.T. Taggart, T.K. Mohandas, and D.H. Alpers (1991). Human gastric intrinsic factor: characterization of cDNA and genomic clones and localization to human chromosome 11. *Genomics* 10: 432-440.

48. Lee, E. F., Seetharam, B., Alpers, D. H., and DeSchryver-Kecsckemeti, K. (1989) Immunohistochemical survey of cobalamin-binding proteins. *Gastroenterology* **97**, 1171-1180
49. Maeda, M., Asahara, S., Nishi, T., Mushiake, S., Oka, T., Shimada, S., Chiba, T., Tohyama, M., and Futai, M. (1995) The rat intrinsic factor gene: its 5'-upstream region and chief cell-specific transcription. *J. Biochem.* **117**, 1305-1311
50. Sollner-Webb, B. and J. Tower (1986). Transcription of cloned eukaryotic ribosomal RNA genes. *Ann. Rev. Biochem.* **55**, 801-830.
51. Mitchell, P.J. and R. Tjian (1989). Transcriptional regulation in mammalian cells by sequence-specific DNA binding proteins. *Science* **245**, 371-378.
52. Gabrielsen, O.S. and A. Sentenac (1991). RNA polymerase III (C) and its transcription factors. *Trends Biochem. Sci.* **16**, 412-416.
53. Roeder, R.G. (1991). The complexities of eukaryotic transcription initiation: regulation of preinitiation complex assembly. *Trends Biochem. Sci.* **16**, 402-408.
54. Greenblatt, J. (1991). RNA polymerase-associated transcription factors. *Trends Biochem. Sci.* **16**, 408-411.
55. Ha, I., W.S. Lane, and D. Reinberg (1991). Cloning of a human gene encoding the general transcription initiation factor IIB. *Nature* **352**, 689-695.
56. Hisatake, K., S. Malik, R.G. Roeder, and M. Horikoshi (1991). Conserved structural motifs between *Xenopus* and human TFIIB. *Nucleic Acids Res.* **19**, 6639.
57. Malik, S., K. Hisatake, H. Sumitomo, M. Horikoshi, and R.G. Roeder (1991). Sequence of general transcription factor TFIIB and relationships to other initiation factors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**, 9553-9557.
58. Yamashita, S., K. Wada, M. Horikoshi, D.-W. Gong, T. Kubo, K. Hisatake, N. Yokotani, S. Malik, R.G. Roeder, and Y. Nakatani (1992). Isolation and characterization of a cDNA encoding *Drosophila* transcription factor TFIIB. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**, 2839-2843.
59. Cavallini, B., I. Faus, H. Matthes, J.M. Chipoulet, B. Winsor, J.-M. Ebly, and P. Chambon (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.
60. Gasch, A., A. Hoffmann, M. Horikoshi, R.G. Roeder, and N.-H. Chua (1990). *Arabidopsis thaliana* contains two genes for TFIID. *Nature* **346**, 390-394.

61. Hahn, S., S. Buratowski, P.A. Sharp, and L. Guarente (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.
62. Hoey, T., B.D. Dynlacht, M.G. Peterson, B.F. Pugh, and R. Tjian (1990). Isolation and characterization of the *Drosophila* gene encoding the TATA box binding protein, TFIID. *Cell* **61**, 1179-1186.
63. Hoffmann, A., M. Horikoshi, C.K. Wang, S. Schroeder, P.A. Weil, and R.G. Roeder (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.
64. Hoffmann, A., E. Sinn, T. Yamamoto, J. Wang, A. Roy, M. Horikoshi, and R.G. Roeder (1990). Highly conserved core domain and unique N terminus with presumptive regulatory motifs in a human TATA factor (TFIID). *Nature* **346**, 387-390.
65. Horikoshi, M., C.K. Wang, H. Fujii, J.A. Cromlish, P.A. Weil, and R.G. Roeder (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.
66. Kao, C.C., P.M. Lieberman, M.C. Schmidt, Q. Zhou, R. Pei, and A.J. Berk (1991). Cloning of a transcriptionally active human TATA box binding factor. *Science* **248**, 1646-1650.
67. Muhich, M.L., C.T. Lida, M. Horikoshi, R.G. Roeder, and C.S. Parker (1990). cDNA clone encoding *Drosophila* transcription factor TFIID. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**, 9148-9152.
68. Peterson, M.G., N. Tanese, B.F. Pugh, and R. Tjian (1990). Functional domains and upstream activation properties of cloned human TATA binding proteins. *Science* **248**, 1625-1630.
69. Schmidt, M.C., C.C. Kao, R. Pei, and A.J. Berk (1989). Yeast TATA -box transcription factor gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**, 7785-7789.
70. Peterson, M.G., J. Inostroza, M.E. Maxon, O. Flores, A. Admon, D. Reinberg, and R. Tjian (1991). Structure and functional properties of human transcription factor IIE. *Nature* **354**, 369-373.
71. Ohkuma, Y., H. Sumimoto, A. Hoffmann, S. Shimasaki, M. Horikoshi, and R.G. Roeder (1991). Structural motifs and potential  $\sigma$  homologies in the large subunit of human general transcription factor TFIIE. *Nature* **354**, 398-401.

72. Sumimoto, H., Y. Ohkuma, E. Sinn, H. Kato, S. Shimasaki, M. Horikoshi, and R. Roeder (1991). Conserved sequence motifs in the small subunit of human general transcription factor TFIIE. *Nature* 354, 401-404.
73. Spt, M., Z.F. Burton, and J. Greenblatt (1989). Structure and associated DNA-helicase activity of a general transcription initiation factor that binds to RNA polymerase II. *Nature* 341, 410-414.
74. Horikoshi, M., H. Fujita, J. Wang, R. Takada, and R.G. Roeder (1991). Nucleotide and amino acid sequence of RAP30. *Nucleic Acids Res.* 19, 5436.
75. Aso, T., H.A. Vasavada, T. Kawaguchi, F. Germino J., S. Ganguly, S. Kitajima, S.M. Weissman, and Y. Yasukochi (1992). Characterization of cDNA for the Large subunit of the transcription factor TFIIF. *Nature* 355, 461-464.
76. Finkelstein, A., C.F. Kostrub, J. Li, D.P. Chavez, B.Q. Wang, S.M. Fang, J. Greenblatt, and Z.F. Burton (1992). A cDNA encoding RAP74, a general initiation factor for transcription by RNA polymerase II. *Nature* 355, 464-467.
77. Drapkin, R., Reardon, J. T., Ansari, A., Huang, J.-H., Zawei, L., Ahn, K., Sancar, A., and Reinberg, D. (1994) Dual role of TFIIH in DNA excision repair and in transcription by RNA polymerase II. *Nature* 368, 769-772
78. Fischer, L., Gerad, M., Chalut, C., Lutz, Y., Humbert, S., Kanno, M., Chambon, P., and Egly, J.-M. (1992) Cloning of the 62-kilodalton component of basic transcription factor BTF2. *Science* 257, 1392-1395
79. Humbert, S., van Vuuren, H., Lutz, Y., Hoeijmakers, J. H. J., Egly, J.-M., and Moncollin, V. (1994) p44 and p34 subunits of the BTF2/TFIIH transcription factor have homologies with SSL1, a yeast protein involved in DNA repair. *EMBO J.* 13, 2393-2398
80. Schaeffer, L., Moncollin, V., Roy, R., Staub, A., Mezzina, M., Sarasin, A., Weeda, G., Hoeijmakers, J. H. J., and Egly, J.-M. (1994) The ERCC2/DNA repair protein is associated with the class II BTF2/TFIIH transcription factor. *EMBO J.* 13, 2388-2392
81. Schaeffer, L., Roy, R., Humbert, S., Moncollin, V., Vermeulen, W., Hoeijmakers, J. H. J., Chambon, P., and Egly, J.-M. (1993) DNA repair helicase: a component of BTF2(TFIIH) basic transcription factor. *Science* 260, 58-63
82. Hirashima, S., H. Hirai, Y. Nakanishi, and S. Natori (1988). Molecular cloning and characterization of cDNA for eukaryotic transcription factor S-II. *J. Biol. Chem.* 263, 3858-3863.

83. Laughon, A. (1991). DNA binding specificity of homeodomains. *Biochemistry* 30, 11357-11367.
84. Klug, A. and D. Rhodes (1987). 'Zinc fingers': a novel protein motif for nucleic acid recognition. *Trends Biochem. Sci.* 12, 464-469.
85. Schwabe, J.W. and D. Rhodes (1991). Beyond zinc finger: steroid hormone receptors have a novel structural motif for DNA recognition. *Trends Biochem. Sci.* 16, 291-296.
86. Evans, T. and G. Felsenfeld (1989). The erythroid-specific transcription factor Eryf1: a new finger protein. *Cell* 58, 877-885.
87. Tsai, S.-F., D.I.K. Martin, L.I. Zon, A.D. D'Andrea, G.G. Wong, and S.H. Orkin (1989). Cloning of cDNA for the major DNA-binding protein of the erythroid lineage through expression in mammalian cell. *Nature* 339, 446-451.
88. Yamamoto, M., L.J. Ko, M.W. Leonard, H. Beug, S.H. Orkin, and J.D. Engel (1990). Activity and tissue-specific expression of the transcription factor NF-E1 multigene family. *Genes Dev.* 4, 1650-1662.
89. Zon, L.I., S.-F. Tsai, S. Burgess, P. Matsdaira, G.A.P. Bruns, and S.H. Orkin (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.
90. Zon, L.I., C. Mather, S. Burgess, M.E. Bolce, R.M. Harland, and S.H. Orkin (1991). Expression of GATA-binding proteins during embryonic development in *Xenopus laevis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88, 10642-10646.
91. Omichinski, J. G., Clore, G. M., Schaad, O., Felsenfeld, G., Trainor, C., Appella, E., Stahl, S. J., and Gronenborn, A. M. (1993) NMR structure of a specific DNA complex of Zn-containing DNA binding domain of GATA-1. *Science* 261, 438-446
92. Lamb, P. and S.L. Mcknight (1991). Diversity and specificity in transcriptional regulation: the benefits of heterotypic dimerization. *Trends Biochem. Sci.* 16, 417-422.
93. Tamura, S., K.-I. Oshiman, T. Nishi, M. Mori, M. Maeda, and M. Futai (1992). Sequence motif in control regions of the H<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase  $\alpha$  and  $\beta$  subunit genes recognized by gastric specific nuclear protein(s). *FEBS Lett.* 298, 137-141.
94. Orkin, S.H. (1990). Globin gene regulation and switching: Ciria 1990. *Cell* 63, 665-672.



95. Martin, D.I.K., L.I. Zon, G. Mütter, and S. Orkin (1990). Expression of an erythroid transcription factor in megakaryocytic and mast cell lineages. *Nature* 344, 444-447.
96. Romeo, P.-H., M.-H. Pradini, V. Joulin, M. Mignotte, W. Prenant, G. Vainchenker, G. Marguerie, and G. Uzan (1990). Megakaryocytic and erythrocytic lineages share specific transcription factors. *Nature* 344, 447-449.
97. Ito, E., Tsutomu, T., Ishihara, H., Ohtani, H., Gu, L., Yokoyama, M., Engel, J. D., and Yamamoto, M. (1993) Erythroid transcription factor GATA-1 is abundantly transcribed in mouse testis. *Nature* 362, 466-468
98. Dorfman, D. M., Wilson, D. B., Bruns, G. A. P., and Orkin, S. H. (1992) Human transcription factor GATA-2: evidence for regulation of preproendothelin-1 gene expression in endothelial cells. *J. Biol. Chem.* 267, 1279-1285
99. Lee, M.-E., Temizer, D. H., Clifford, J. A., and Quertermous, T. (1991) Cloning of the GATA-binding protein that regulates endothelin-1 gene expression in endothelial cells. *J. Biol. Chem.* 266, 16188-16192
100. Wilson, D. B., Dorfman, D. M., and Orkin, S. H. (1990) A nonerythroid GATA-binding protein is required for function of the human preproendothelin-1 promoter in endothelial cells. *Mol. Cell. Biol.* 10, 4854-4862
101. Ho, I.-C., P. Vorhees, N. Marin, B.K. Oakley, S.-F. Tsai, S.H. Orkin, and J.M. Leiden (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.
102. Joulin, V., D. Bories, J.-F. Eléouet, M.-C. Labastie, S. Chrétien, M.-G. Mattéi, and P.-H. Roméo (1991). A T-cell specific TCR  $\delta$  DNA binding protein is a member of the human GATA family. *EMBO J.* 10, 1809-1816.
103. Ko, L.J., M. Yamamoto, M.W. Leonard, K.M. George, P. Ting, and J.D. Engel (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.
104. Alam, J., and Cook, J. L. (1990) Reporter genes: application to the study of mammalian gene transcription. *Anal. Biochem.* 188, 245-254
105. Tamura, T.-A., A. Aoyama, T. Inoue, M. Miura, H. Okano, and K. Mikoshiba (1989). Tissue-specific *in vitro* transcription from the mouse myelin basic protein promoter. *Mol. Cell. Biol.* 9, 3122-3126.

106. Gorski, K., M. Carnerio, and U. Schibler (1986). Tissue-specific *in vitro* transcription from the mouse albumin promoter. *Cell* **47**, 767-776.
107. Tamura, S., Wang, X., Maeda, M., and Futai, M. (1993) Gastric DNA binding proteins recognized upstream sequence motifs of parietal cell-specific genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**, 10876-10880.
108. Mushiake, S., Etani, Y., Shimada, S., Tohyama, M., Hasebe, M., Futai, M., and Maeda, M. (1994) Genes for members of GATA-binding protein family (GATA-GT1 and GATA-GT2) together with H<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase are specifically transcribed in gastric parietal cells. *FEBS Lett.* **340**, 1237-1245.
109. Crossley, M., Merika, M., and Orkin, S. H. (1995) Self-association of the erythroid transcription factor GATA-1 mediated by its zinc finger domains. *Mol. Cell. Biol.* **15**, 2448-2456.
110. Arima, N., Yamashita, Y., Nakata, H., Nakamura, A., Kinoshita, Y., and Chiba, T. (1991) Presence of histamine H<sub>2</sub>-receptors on humane gastric carcinoma cell line MKN-45 and their increase by retinoic acid treatment *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **176**, 1027-1032.
111. Laverriere, A. C., MacNeill, C., Mueller, C., Poelmann, R. E., Burch, J. B. E., and Evans, T. (1994) GATA-4/5/6, a subfamily of three transcription factors transcribed in developing heart and gut. *J. Biol. Chem.* **269**, 23177-23184.
112. Motoyama, T., Hojo, H., and Watanabe, H. (1986) comparison of seven cell lines derived from human gastric carcinomas. *Acta Pathol. Jpn.* **36**, 65-83.

## 謝辞

本研究は大阪大学産業科学研究所、生合成化学工業部門（現・生体膜分子学分野）において行ったものであります。本稿を終えるにあたり、5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將光教授に深く感謝いたします。本研究を行うにあたり、御指導ならびに多くのご助言を賜りました前田正知助教授（現・薬学部教授）に深く感謝します。実験のご指導、ご協力をしていただきました田村茂彦博士に深く感謝いたします。本研究を行うにあたり、有益なご助言ならびにご協力をいただきました岩本昌子博士、長谷部真久修士、小池隆司修士、久保健太郎修士、川崎晶子修士をはじめとする二井研究室のみなさまに深く感謝いたします。最後に、今まで支援していただいた両親をはじめとする家族に心より感謝いたします。