OUKA
Osaka University Knowledge Archive

| | |
|---|---|
| Title | ラットグルタチオントランスフェラーゼP遺伝子のサイレンサー領域に作用する転写因子に関する研究 |
| Author(s) | 田辺, 敦弘 |
| Citation | 大阪大学, 2001, 博士論文 |
| Version Type | VoR |
| URL | https://doi.org/10.11501/3184236 |
| rights | |
| Note | |

*Osaka University Knowledge Archive : OUKA*

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

Osaka University

# ラットグルタチオントランスフェラーゼP遺伝子のサイレンサー領域に作用する転写因子に関する研究

田辺敦弘

# ラットグルタチオントランスフェラーゼP遺伝子のサイレンサー領域に作用する転写因子に関する研究

田辺敦弘

# 目　次


緒論 1

本論 3

第1章　酵母one-hybrid systemを用いたGPS2作用因子のクローニング 3

第1節　cDNAライブラリーの選択 3
第2節　ライブラリーの大量調製 5
第3節　レポーターホストの作成 7
第4節　YM4271/GPS2のレポーター遺伝子のバックグラウンド発現のチェック 10
第5節　一次スクリーニング 11
第6節　二次スクリーニング 12
第7節　三次スクリーニング 13
第8節　四次スクリーニング 15
第9節　考察及び小括 18

第2章　サイレンサーGPS2に作用する因子の機能解析 20

第1節　ゲルシフト法によるGPS2に作用する因子の結合性の解析 20
第2節　ゲルシフト法による解離定数の算定 24
第3節　GPS2に対するKrüppel型GPS2結合因子の転写調節作用の検討 26
第4節　GPS2に対するTFIIIAの転写調節作用の検討 29
第5節　考察および小括 31

総括 34

結論 37

謝辞 38

引用文献 39

## Abbreviations

| | | |
|---|---|---|
| 3-AT | : | 3-amino1,2,4-triazol |
| AAF | : | 2-acetylaminofluorene |
| BSA | : | bovine serum albumin |
| BTEB2 | : | basic transcription element binding protein 2 |
| C/EBP | : | CCAAT/enhancer binding protein |
| CIAA | : | chloroform isoamyl alcohol |
| CPBP | : | core promoter-binding protein |
| DMSO | : | dimethyl sulfoxide |
| DTT | : | dithiothreitol |
| EZF | : | epithelial zinc finger |
| FBS | : | fetal bovine serum |
| GPS | : | GST-P silencer |
| GST-P | : | gultathione transferase P |
| IPTG | : | isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside |
| LB | : | Luria-Bertani's broth |
| LKLF | : | lung Krüppel-like factor |
| MEM | : | Minimum Essential Medium |
| MZFP | : | multiple zinc finger protein |
| NF1 | : | nuclear factor 1 |
| NP-40 | : | nonidet P-40 |
| ORF | : | open reading frame |
| PAGE | : | polyacrylamide gel electrophoresis |
| PBS | : | phosphate-buffered saline |
| PCR | : | polymerase chain reaction |
| SD | : | synthesis dropout |
| SDS | : | sodium dodecyl sulfate |
| SF-A | : | silencer factor-A |
| SF-B | : | silencer factor-B |
| SF-C | : | silencer factor-C |
| Sp4 | : | specific protein 4 |
| TFIIIA | : | transcription factor IIIA |
| TIEG1 | : | TGFβ-inducible early transcription factor gene 1 |

# 緒　論

アセチルアミノフルオレン (AAF) などの化学発癌物質によって誘発される、ラット肝癌の発生過程における特異的な遺伝子発現の変化を二次元電気泳動により検索すると、正常肝臓では発現の見られない胎盤型グルタチオントランスフェラーゼ (GST-P) がほとんど100 %の頻度で発現する。そのため、GST-Pは優れた腫瘍マーカーの１つと考えられている[1-4]。腫瘍マーカー遺伝子GST-Pの発現調節機構を解明することが、発癌機構の解明の手がかりになると考え、当研究室ではGST-P遺伝子の転写レベルでの発現調節機構について検討してきた。

転写制御機構の解明のためのアプローチの方法として、正に制御する機構の解明と、負に制御する機構の解明が考えられる。GST-P遺伝子の5'側上流-2.5 kb付近および-396から-140 bp には、それぞれ転写を正に制御するエンハンサー領域と、負に制御するサイレンサー領域があることが、様々な欠失変異体を用いた実験によって明らかにされている [5-7]。ラット正常肝臓ではGST-Pの発現がほぼ完全に抑えられていることから、当研究室ではエンハンサーを介した転写活性化機構と共に、サイレンサー領域による遺伝子発現の抑制機構が重要であると考え、サイレンサー領域に結合するタンパク質に関する研究を行っている。サイレンサー領域は、フットプリントアッセイによりGST-P Silencer (GPS) -0A, 0B, 1, 2, 3, 4, 5, TRE, GC box 及び site7 のタンパク質結合部位があることが明らかにされている。そのうちGPS1には、SF (silencer factor) -B: C/EBP (CCAAT/enhancer binding protein) ファミリーが結合し [8]、GPS-0A, 0B, 3, 4, 5, site 7 には、SF-A: NF1 (nuclear factor 1)ファミリーが結合することが明らかにされている (Fig. 1) [9, 10]。

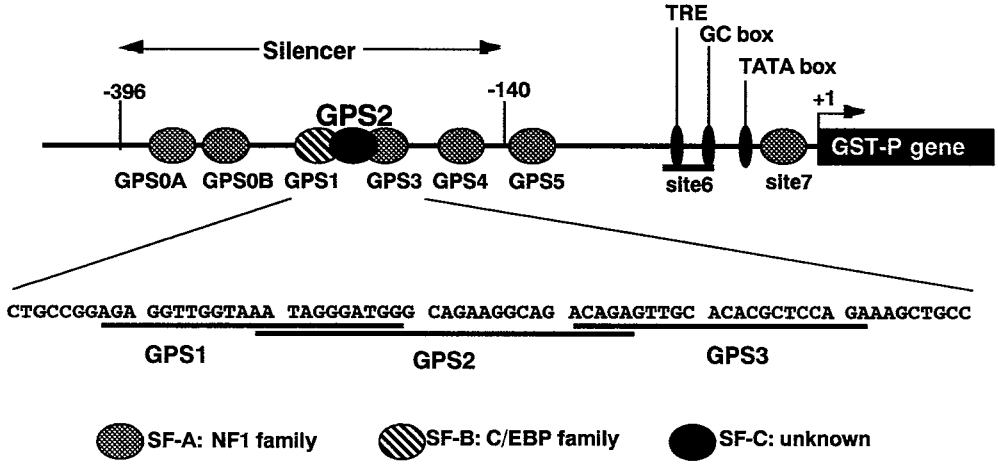



**Fig. 1. Schematic Diagram of the Promoter and Silencer Regions in the Rat GST-P Gene.** SF-C binding site as well as SF-A and SF-B are shown. SF-C binding site GPS2 partially overlaps with GPS1 and GPS3, which are bound by the C/EBP family and the NF1 family, respectively.

一方、GPS2に結合する、SF-Cと名付けている因子はクローニングされていないが、GPS2の欠失変異体を用いたトランスフェクション実験ではレポーター活性が上がり転写抑制能を失っている [9]。この結果は、SF-CがGST-P遺伝子の発現抑制に関与していることを示唆している。そこで筆者は、GPS2結合因子SF-Cの単離及び解析を行うことにした。

これまでにSF-Aはアフィニティーカラムを用いた方法でクローニングされ[9]、SF-Bは、サウスウエスタン法でクローニングされた[8]。SF-Cも上記の二つの方法でクローニングが試みられたが成功しなかった。そこで筆者は、酵母one-hybrid systemを用いることにした。酵母one-hybrid systemは、ターゲットシスエレメントにエフェクタープラスミドから転写、翻訳されたタンパク質が結合したとき、レポーター遺伝子である*his3*や*lacZ*の発現を検出することにより、特異的なDNA結合タンパク質をクローニングする方法である (Fig. 2)。本論文では、本法を用いてSF-Cのクローニングを試み、さらに得られた因子について、GPS2を介した転写調節等の機能解析を行ったので以下に報告する。

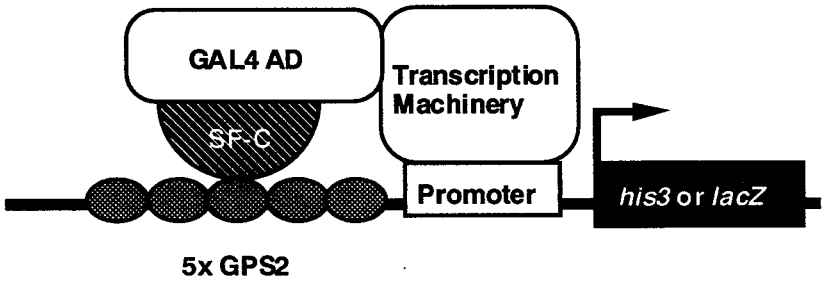



**Fig. 2. Detection of DNA-binding Proteins Using Yeast One-Hybrid System.** The principal of yeast one-hybrid system is shown. If expressed protein fused with GAL4 activation domain binds to GPS2, GAL4 activation domain activates promorter activity. Thereafter, *his3* gene or *lacZ* gene expression is detected.

# 本　論

## 第1章　酵母one-hybrid systemを用いたGPS2作用因子のクローニング

ラットGST-P遺伝子のサイレンサー領域に存在する、タンパク質結合サイトの一つのGPS2が転写抑制に関わっていることから、GPS2に結合するSF-Cのクローニングが必要であると考えた。これまでにアフィニティーカラムを用いた方法や、サウスウエスタン法では、SF-Cのクローニングができなかったことから、酵母one-hybrid systemを用いることにした。

### 第1節　cDNAライブラリーの選択

SF-Cは、ラットの正常肝臓で発現してGPS2に結合することにより、GST-P遺伝子の転写抑制に関わっていると考えられる。そのため、rat liverからGPS2に結合するタンパク質をスクリーニングをするのが適当と考えられる。しかし、他のcDNAライブラリーでもGPS2に結合するタンパク質が発現している可能性もある。そこでまず、スクリーニングに用いるライブラリーの選択をするために、いくつかのcell lineの核抽出物にGPS2結合タンパク質が存在するか否かを調べた。

(1) 実験方法

○核抽出液の調製

HeLa cell, Jurkat cell, WI-38 cellをphosphate-buffered saline (PBS)で3回洗浄した後核抽出液の調製を行った。15,000 x g, 10 sec, 4 °Cで遠心したのち、回収した細胞の8倍量のlysis bufferに細胞を懸濁した。懸濁液に、全体の1/300量の10 % NP-40 (final 0.3 %)を加え、氷上で5分間放置した。15,000 x g, 10 sec, 4 °Cで遠心した後の沈殿に、全体量と同じ量の2 M KClを加え (final 1M)、氷上で30分間放置した。その後、350,000 x g, 30 min, 4°C の遠心分離を行い、得られた上清を実験に用いた。

lysis buffer:　20 mM HEPES (pH7.9), 0.1 mM EDTA, 0.5 mM spermidine, 10 % glycerol, 1 μM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF), 1 μg/ml leupeptin, 1 μg/ml pepstatin A, 0.3 μg/ml antipain

○合成オリゴヌクレオチド

以下の合成オリゴヌクレオチドを90 °C で2分間放置した後、徐々に室温まで放冷することによってアニーリングして用いた。

```
GPS2 site:5'-ctagAATAGGGATGGGCAGAAGGCAG-3'
              3'-TTATCCCTACCCGTCTTCCGTCgatc-5'

GC box:   5'-agctTCCGTTGGGGCGGGGCTTCACG-3'
              3'-AGGCAACCCCGCCCCGAAGTGCtcga-5'

GT box:   5'-agctTCCGTTGGGGTGTGGCTTCACG-3'
              3'-AGGCAACCCCACACCGAAGTGCtcga-5'
```

○合成オリゴヌクレオチドの放射ラベル

アニーリングした合成オリゴヌクレオチド40 ng に10xKlenow buffer 2 μl, 1 mM dATP 1 μl, 1 mM dTTP 1 μl, 1 mM dGTP 1 μl, 3.33 pmol/μl [α-$^{32}$P]dCTP 3 μlを加えSTEで19 μl にしたのち、Klenow enzyme (Toyobo) 1 μl を加え30 °Cで30分反応させた。0.5 M EDTA 2 μl, 5M $NH_4OAc$ 17 μl, 5 mg/ml yeast RNA 3 μlを加え、105 μl のエタノールを加え、1,5000 x g, 10 min, 4 °Cで遠心後、沈殿を100 μl の70 % エタノールで洗浄し、50 μl のSTEに溶解した。

10xKlenow buffer : 66 mM Tris (pH7.5), 0.5 M NaCl, 66 mM $MgCl_2$, 10 mM DTT
STE: 10 mM Tris (pH7.5), 1 mM EDTA, 100 mM NaCl

○ゲルシフト法

タンパク質0.25 μg をreaction bufferと室温で30分間反応させた。反応後BPB-glycerol 1.5 μl を加え、6 % ポリアクリルアミドゲルで10 V/cm の条件下、1xTAE bufferを循環させながら電気泳動を行った。泳動後、10 % メタノール-10 % 酢酸で固定し、ゲルを乾燥させた後、オートラジオグラフィーを行った。

reaction buffer: 20 mM Tris (pH7.5), 10 % glycerol, 2 mM DTT, 10 mM EDTA, 0.5 μg poly (dI-dC), 12.5 μg bovine serum albumin (BSA), 0.2 ng of labeled probe
BPB-glycerol : 80 % glycerol, 0.6 % Bromophenol Blue (BPB)
1xTAE: 80 mM Tris (pH7.5), 40 mM NaOAc, 4 mM EDTA

(2) 実験結果

ヒト子宮頚癌細胞株HeLa cell、ヒト肺細胞株WI-38 cell 、ヒト白血病細胞株Jurkat

cellの核抽出液を用いて、GPS2をプローブとしたゲルシフトアッセイを行ったところ、各々にGPS2と非特異的なコンペティターGC boxで阻害されるバンドに加え、GPS2に特異的に阻害されるバンドが観察された (Fig. 3)。そこでrat liverに加え、HeLa cell, Jurkat cell, WI-38 cell cDNA library (CLONTECH)をスクリーニングに用いることとした。

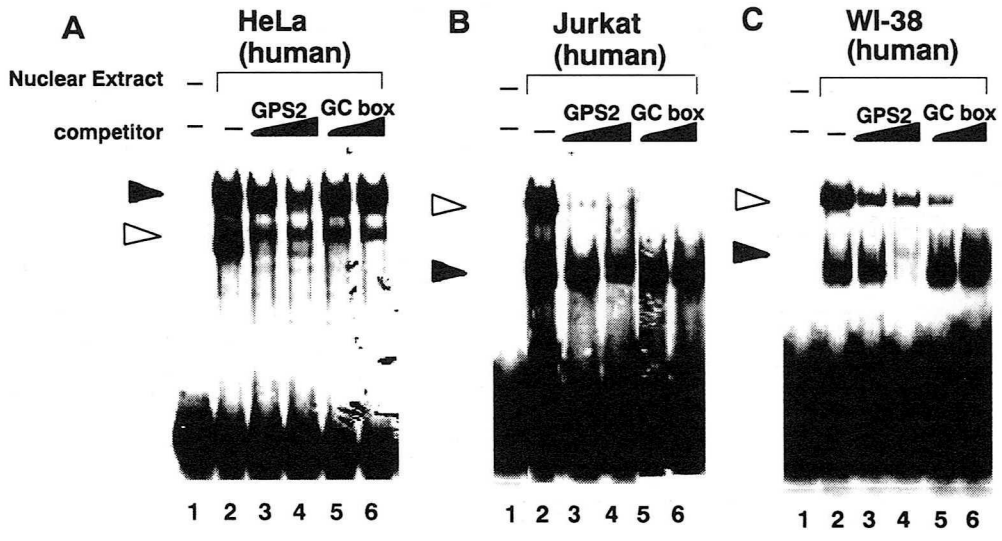



**Fig. 3. Gel-Mobility Shift Analyses Using Nuclear Extract from Several Cells.** The Gel-mobility shift analyses were performed using nuclear extract from (A) HeLa cell, (B) Jurkat cell, and (C) WI-38 cell, and the radiolabeled GPS2. Ten μg of nuclear extract from the cells indicated above each panels was added (lanes 2-6 in each panel). Lane 1 in each panel was a control with bovine serum albumin added. Either 50- or 200-fold molar excess of non-labeled GPS2 and the GC box was used for the competition analysis (lanes 3-6). The protein-bound band competed with both GPS2 and GC box and with only GPS2 are indicated by open arrowheads and closed arrowheads, respectively.

## 第2節　ライブラリーの大量調製

前節の結果より、SF-Cのスクリーニングには、rat liver, HeLa cell, WI-38 cell, Jurkat cell cDNA library を使用することとした。ライブラリーはCLONTECH社のMATCHMAKER cDNA libraryを使用することにした。one-hybrid systemを用いたスクリーニングでは、酵母にcDNAを組み込んだプラスミドを導入する。MATCHMAKER cDNA libraryは、大腸菌にライブラリープラスミドが導入された状態で市販されているため、大腸菌を増殖させてライブラリープラスミドを大量調製した。

(1) 実験方法

ライブラリープラスミドを含む大腸菌 (MATCHMAKER cDNA library; CLONTECH) を、5.0x$10^4$ cfu/15 cm plate となるようにアンピシリン (final 50μg/ml)を含むLBプレート (以下LB/Amp)5枚 に塗り広げた。37 °Cでプレートを一晩培養した後、プレート上で生育している大腸菌のコロニーをかきとり、液体LB/Amp培地200 ml に懸濁した。これらを 37 °C で3時間振とう培養した後、3,500 x g, 10 min, 4 °Cで遠心し、集菌した。菌を3 mlの solution 1 に懸濁し、1 ml のlysozyme solutionを加えて室温で5分間放置した。そこに、10 ml のsolution 2を加えて緩やかに撹拌し、10分間氷上で放置した。さらに、氷冷した solution 3を7.5 ml 加えて撹拌し、15分間氷上で放置した。4,500 x g, 20 min, 4 °C で遠心した上清に、12 ml のイソプロパノールを加えて撹拌し、室温で15分間放置した。その後、4,500 x g, 10 min, 20 °Cで遠心して得られた沈澱を、70 %エタノールで洗浄した。沈殿を乾燥させた後、1.2 ml のTEに溶かした。5 mg/ml のRNaseA 8 μl を加えて50 °C で30分間反応した。1.4 g のCsClおよび100 μl の2 mg/mlエチジウムブロマイドを加え、350,000 x g, 4 h, 20 °C で超遠心した後、プラスミドのバンドを回収した。この作業をもう一度繰り返し、水飽和イソアミルアルコールでエチジウムブロマイドを抽出した。プラスミド溶液を、5 mM のNaClを含む1,000 ml の TEで4時間室温で透析した後、新しい5 mM のNaClを含むTEで一晩4 °C で透析した。得られたDNAの濃度および純度は、吸光光度計によって260 nm と280 nm の波長を調べること及びアガロースゲル電気泳動により求めた。

| | |
|---|---|
| solution 1: | 50mM glucose, 25mM Tris-HCl (pH8.0), 10mM EDTA, 10 mg/ml lysozyme |
| lysozyme solution: | 20mg / ml in solution 1 |
| solution 2: | 0.2 N NaOH, 1% SDS |
| solution 3: | 3M/5M KOAc |
| TE: | 10 mM Tris (pH7.5), 1 mM EDTA |

(2) 実験結果

各ライブラリーが持つ、インデペンデントなクローン数の2-3倍のコロニーからプラスミドDNAを回収した (Table 1)。

Table 1. Yield of Library Plasmids for Yeast One-Hybrid System

| | independent clones ($x10^6$) | amplified clones ($x10^6$) | yield (mg) |
|---|---|---|---|
| rat liver | 3.0 | 6.0 | 4.5 |
| HeLa | 6.0 | 14 | 3.2 |
| WI-38 | 2.5 | 6.4 | 6.5 |
| Jurkat | 3.0 | 8.0 | 4.2 |

## 第3節　レポーターホストの作成

スクリーニングで用いるレポーターホストを作成するため、GPS2が5回繰り返した配列をレポータープラスミドに挿入し、それらのプラスミドを酵母のゲノムに組み込んだ。

(1) 実験方法

○レポーターコンストラクトの作成

GPS2の5回繰り返し配列を挿入したpUC18から、制限酵素 *Eco*RI および *Sal*I または制限酵素*Eco*RI および *Xba*I により切断したGPS2の5回繰り返し配列を含むDNA断片を、それぞれ pLacZi および pHISi (CLONTECH) にサブクローニングした（以下5xGPS2-pLacZiおよび5xGPS2-pHISi) (Fig. 4)。

5xGPS2-pLacZi および5xGPS2-pHISiのプラスミドを調製し、$^{32}$Pを用いたジデオキシ法 [11]に従ったSequenase Version 2.0 DNA Sequencing Kit (USB) を用いて配列の確認を行った。

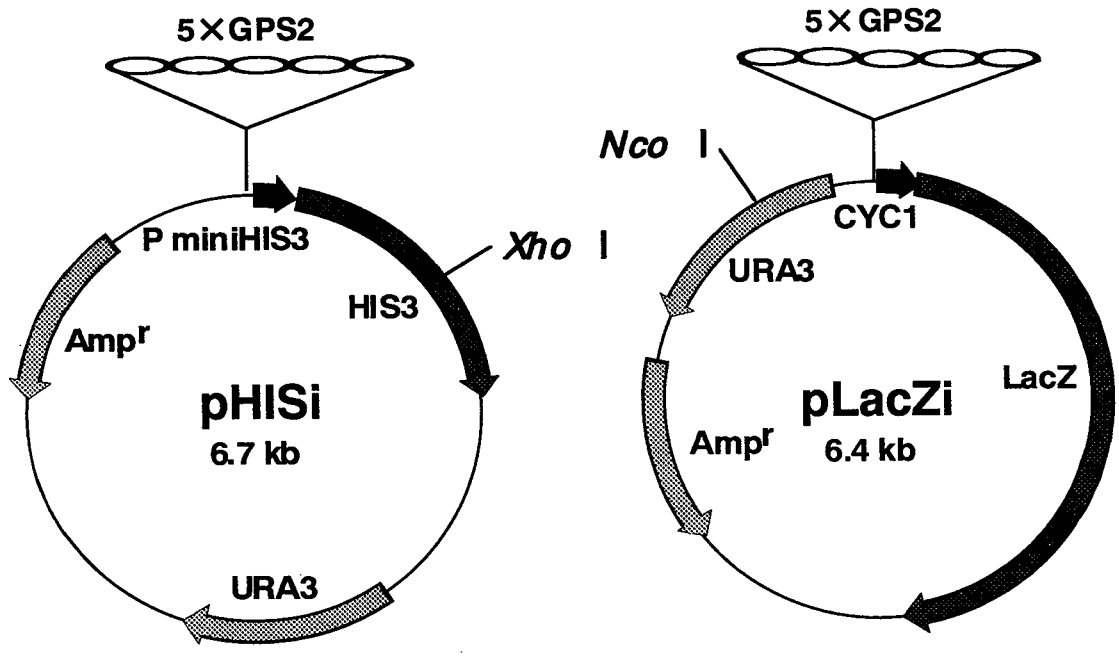



**Fig. 4. Construct of 5xGPS2-pHISi and 5xGPS2-pLacZi.** The reporter plasmids of 5xGPS2-pHISi and 5xGPS2-pLacZi are shown. As reporter genes, pHISi and pLacZi have *his3* gene and *lacZ* gene, respectively. Five times GPS2 was subcloned into the multi-cloning site upstream of these reporter genes.

○プラスミドの調製

5xGPS2-pLacZi および5xGPS2-pHISiを大腸菌 DH5α に導入した。得られた形質転換株を液体LB/Amp培地3 ml に植菌し、37 °C で一晩振とう培養した。4,000 x g, 10 min, 4 °Cで集菌後、沈殿を100 μl のsolution 1に懸濁させ、5分間室温で放置した。その後、200 μl の solution 2を加えて穏やかに混ぜ、氷上で5分間放置した。さらに、150 μl のsolution 3を加えて混合し氷上で10分間放置した。15,000 x g, 10 min, 4 °Cで遠心した上清に、フェノールを等量加え5分間穏やかに混和し、15,000 x g, 10 min, 20 °Cで遠心した。水相を回収し、等量のCIAAを加え3分間穏やかに混和し、15,000 x g, 10 min, 20 °C で遠心した。回収した水相に2.5等量の エタノール及び1/10等量の3M NaOAc (pH5.2) を加え、10分間室温で放置した。15,000 x g, 10 min, 4 °Cで遠心した後、沈澱を70 %エタノールで洗浄し、50 μl のTEに溶解した。1 μl の 0.5 mg/ml RNaseA を加え、37 °Cで30分間反応させた。30 μl の20 % PEG6000 + 2.5 M NaCl を加え、氷上で1時間放置した後15,000 x g, 10 min, 4 °Cで遠心した。沈殿を70 % エタノールで洗浄し、50 μl のTEに溶解した。

LB: 10 g/l NaCl, 10 g/l Bacto-trypton, 5 g/l Bacto-yeast extract
solution 1: 50 mM glucose, 10 mM EDTA, 25 mM Tris (pH7.5), 10 mg/ml lysozyme
solution 2: 0.2N NaOH, 0.1% SDS
solution 3: 3M /5M KOAc
CIAA: chloroform: isoamyl alcohol=24:1
TE: 10 mM Tris (pH7.5), 1 mM EDTA

○DNA シークエンス

Sequenase Version 2.0 DNA Sequencing Kit (USB) を用いて、$^{32}$Pを用いたジデオキシ法 [11]に従った。

○レポーターコンストラクトのゲノムへのインテグレーション

YPDプレート上の *S. cerevisiae* YM4271 (MATa, *ura3-52, his3-200, ade2-101, lys2-891, leu2-3, 112, trp1-903, tyr1-501*)のシングルコロニーを25 mlのYPDに懸濁した。これを30 °Cで一晩振とう培養しOD600=1.5以上にした。この菌をOD600=0.2となるように300 mlのYPDに植菌し、30 °C で4時間振とう培養した。3,000 x g, 5 min, 20 °C で集菌した後、250 mlの滅菌水で洗浄した。この菌を1 mlのLiSORBに懸濁しコンピテントセルとした。

10分間煮沸した10 mg/ml salmon sperm DNA 20 μl とLiSORB 80 μl を混合し、制限酵素*Nco*Iで切断して直鎖状とした5xGPS2-pLacZi 1 μg を加えて十分にボルテックスにより撹拌したところにコンピテントセルを100 μl加えた。ボルテックスにより撹拌した後、 300 μl 40 % PEG/LiAc/TE を加え、水浴上30 °C で30分間放置した。35 μl のDMSOを加えて緩やかに混合し、 42 °Cで15分間ヒートショックを与え、氷上で2分間放置した後 、菌液150 μl をプレート上に塗り広げた。5日後、SD/-Ura プレート上に現われたクローンを、5xGPS2-pLacZiがYM4271のゲノムにインテグレートされた株と判断した (以下5xGPS2-pLacZi /YM4271)。

次に5xGPS2-pLacZi /YM4271のコンピテントセルを作成し、制限酵素*Xho*Iにより切断し直鎖状とした5xGPS2-pHISiを導入した。5日後、SD/-Ura/-Hisプレート上に現われたクローンを、5xGPS2-pHISiが5xGPS2-pLacZi /YM4271のゲノムにインテグレーションされた株と判断した (以下YM4271i /GPS2)。

またポジティブコントロールおよびネガティブコントロールとして用いるホストの作成を行った。ポジティブコントロールとして用いるホストの作成は、プラスミドp53BLUEおよびp53HIS (CLONTECH)をそれぞれ制限酵素*Nco*I, *Xho*Iで切断し、順にYM4271へ導入しゲノムへインテグレーションした (以下YM4271/p53)。ネガティブコントロールとして用いるホストの作成は、GST-P遺伝子のエンハンサー領域に含まれるERTの4回繰り返し配列をpLacZiおよびpHISi-1 (CLONTECH) に組み込んだものを導入したホストを用いた (以下YM4271/ERT)。

YPD: 10 g/l Bacto-yeast extract, 20 g/l Bacto-peptone, 20 g/l glucose
LiSORB: 100 mM LiAc, 10 mM Tris (pH8.0), 1 mM EDTA, 1M Sorbitol
40 % PEG/LiAc/TE: 40 g Polyethyleneglycol 3350/100 mM LiAc/TE
LiAc/TE: 100 mM LiAc, 10 mM Tris (pH8.0), 1 mM EDTA

(2) 実験結果

ゲノム中にGPS2が5回繰り返した配列を持つレポーターをインテグレーションしたホスト、YM4271/GPS2、およびポジティブコントロールとしてYM4271/p53 、ネガティブコントロールとしてYM4271/ERTを作成した。

## 第4節　YM4271/GPS2のレポーター遺伝子のバックグラウンド発現のチェック

*his3, lacZ*が非特異的に発現し、スクリーニング時に影響を及ぼすことを考慮して、どの程度の非特異的な発現があらわれるかを検討し、スクリーニング時の条件を決定した。

(1) 実験方法

○pGAD424のYM4271/GPS2へのトランスフォーメーション
pGAD424のトランスフォーメーションは本章第3節レポーターホストの作成の20倍のスケールで行った。

○3-amino1, 2, 4-triazol (3-AT)を含むSD/-Leu/-His プレート上での生育
3-ATをそれぞれ終濃度 0, 5, 10, 15, 30, 45 mM 含むSD/-Leu/-His プレートにトランスフォーマントを100 μlずつプレーティングした。これらを1週間 30 °Cで培養しプレート上に現われるコロニー数を調べた。

○β-ガラクトシダーゼフィルターアッセイ
トランスフォーマントをを生育させたSD/-Leuプレートの表面に滅菌したフィルター(Whatman #5)をのせ、コロニーをフィルターに付着させた。そのフィルターを液体窒素に10秒間浸した。フィルターを室温に戻した後、コロニーのある側を上にして Z buffer/X-gal solution に浸していたフィルター(Whatman #5)に乗せた。これを30 °Cで培養しフィルター上のコロニーの色が青変するかどうかを観察した。

Z buffer: 16.1 g/l $Na_2HPO{\cdot}H_2O$, 5.5 g/l $NaH_2PO_4{\cdot}H_2O$, 0.75 g/l KCl, 0.246 g/l $MgSO_4{\cdot}7H_2O$ (pH7.0)

X-gal stock solution: 20mg/ml 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactopyranoside /N,N-dimethylformamide (DMF)

Z buffer/X-gal solution:100ml Z buffer, 0.27ml β-mercaptoethanol, 1.67ml X-gal stock solution

(2) 実験結果

○3-ATを含むSD/-Leu/-Hisプレート上での生育

3-ATがヒスチジンの生合成を抑制する[12]ことから、cDNAのインサートを持たないプラスミドpGAD424を導入したYM4271/GPS2の生育を、濃度の異なる3-ATを含むSD/-Leu/-Hisプレート上で観察することにより、スクリーニング時に用いる3-ATの至適濃度を調べた。その結果、3-ATの終濃度0 mM, 5 mMのプレートにコロニーが現われた。10 mM以上の3-ATを含むSD/-Leu/-Hisプレート上では酵母は生育しなかった。以上の結果より、スクリーニングで用いるプレートの3-ATの終濃度は、バックグラウンドの発現を抑え得る最も低い濃度の10 mMが適当であると判断した。

○β-ガラクトシダーゼフィルターアッセイ

酵母をZ buffer/X-gal solutionと反応させて、30 °Cで8時間培養したがコロニーは青変しなかった。β-ガラクトシダーゼフィルターアッセイ時の培養時間は、8時間以内であればバックグラウンドの発現はなくポジティブクローンの判別ができると判断した。

## 第5節 一次スクリーニング

前節までで作成したホストYM4271/GPS2にrat liver, HeLa cell, WI-38 cell, Jurkat cell cDNA libraryのプラスミドを導入した。

一次スクリーニングでは、*his3*遺伝子の発現を利用したスクリーニングを行った。

(1) 実験方法

○cDNAライブラリーのYM4271/GPS2へのトランスフォーメーション

本章第4節pGAD424のYM4271/GPS2へのトランスフォーメーションの項に示した方法で、rat liver, HeLa cell, WI-38 cell, Jurkat cellの各ライブラリープラスミドをホストYM4271/GPS2のコンピテントセルに導入した。10 mM 3-ATを含むSD/-Leu/-Hisプレー

ト上で30 °Cで1週間培養した後、生育したコロニーをポジティブクローンと判断した。

(2) 実験結果

各々のライブラリーが、インデペンデントなクローンを2.5-6.0x10$^6$個含むことから、その2-3倍に相当するトランスフォーマント(rat liver, 1.2x10$^7$ clones; HeLa cell, 6.9x10$^6$ clones; WI-38 cell , 1.0x10 $^7$clones; Jurkat cell, 1.0x10$^7$ clones)を、SD/-Leu/-His/10 mM 3-ATプレートに塗り広げたところ、計631個のコロニー (rat liver, 57 colonies; HeLa cell, 160 colonies; WI-38 cell , 81 colonies; Jurkat cell, 333 colonies) が生育した。これらをポジティブクローンとした (Table 2)。

**Table 2. Screening of GPS2 Interacting Proteins from Several Libraries Using Yeast One-Hybrid System**

| | Source of library | | | | total |
|---|---|---|---|---|---|
| | liver (rat) | HeLa (human) | WI-38 (human) | Jurkat (human) | |
| number of screened clones | 1.2x10$^7$ | 6.9x10$^6$ | 1.0x10$^7$ | 1.0x10$^7$ | 3.9x10$^7$ |
| 1st screening (HIS$^+$) | 57 | 160 | 81 | 333 | 631 |
| 2nd screening (LacZ$^+$) | 33 | 101 | 37 | 131 | 302 |
| 3rd screening (HIS$^+$, LacZ$^+$) | 1 | 54 | 6 | 21 | 82 |
| 4th screening (HIS$^+$, LacZ$^+$) | 1 | 33 | 6 | 9 | 49 |
| identified clones | Sp4 (1) | BTEB2 (6)<br>EZF (24)<br>Sp4 (1)<br>TFIIIA (1)<br>TIEG1 (1) | TIEG1(6) | CPBP (2)<br>LKLF (2)<br>MZFP (2)<br>TFIIIA (2)<br>TIEG1 (1) | 8 species |

The numbers of positive clones at each step are shown. The numbers in parentheses in the identified clones are the number of clones isolated.

## 第6節　二次スクリーニング

一次スクリーニングにおいてポジティブであったクローンについて、*lacZ*遺伝子の発現を利用した二次スクリーニングを行った。

(1) 実験方法

○β-ガラクトシダーゼフィルターアッセイ

一次スクリーニングにおいてポジティブであった631個のクローンを、滅菌したフィルター(Whatman #5)を乗せたSD/-Leu /-His/10 mM 3-AT プレートの表面に塗り、30 °Cで3日間培養した。トランスフォーマントが生育しているフィルターを液体窒素に10秒間浸すことにより酵母を破砕した。フィルターを室温に戻した後、コロニーのある側を上にしてZ buffer/ X-gal solution に浸していたフィルターに乗せた。これを30 °Cで3時間培養し、青変したクローンをポジティブクローンとした。

(2) 実験結果

一次スクリーニングにおいてポジティブであった631個のクローンのうち、計302個のクローン(rat liver, 33 clones; HeLa cell, 101 clones; WI-38 cell , 37 clones; Jurkat cell, 131 clones)がポジティブであった (Table 2)。

## 第7節　三次スクリーニング

二次スクリーニングにおいてポジティブであったクローンからプラスミドを回収し、YM4271/GPS2に導入した。これらに対して*his3*と*lacZ*遺伝子の発現を利用した三次スクリーニングを行った。

(1) 実験方法

○酵母からのプラスミドの回収

二次スクリーニングにおいてポジティブであった302個のクローンそれぞれのシングルコロニーを1.5 ml のSD/-His/10 mM 3-AT液体培地に植菌し、30 °Cで二日間培養した。15,000 x g 10 min, 4 °Cで遠心して上清を取り除いた後、菌を200 µl のBreaking bufferに懸濁した。200 µl のグラスビーズ (MS機器 0.5 mm) 及び200 µl のPhOH-$CHCl_3$を加えて2分間ボルテックスにより撹拌した。15,000 x g 10 min, 4 °Cで遠心した後、水相を回収し、フェノール処理及びCIAA処理を行った。500 µl のエタノールを加えて撹拌し-85 °Cで5分間放置した。15,000 x g 10 min, 4 °C で遠心した後、沈殿を70 % エタノールで洗浄し、50 µl のTEに溶解した。

Breaking buffer: 2 % TritonX-100, 1 % SDS, 10 mM NaCl, 10 mM Tris (pH 8.0), 10 mM EDTA

PhOH-$CHCl_3$: phenol:chloroform=1:1

○酵母コンピテントセルの調製

本章第4節pGAD424のYM4271/GPS2へのトランスフォーメーションの項と同様の方法でコンピテントセルを調製した。

○ホストへのトランスフォーメーション

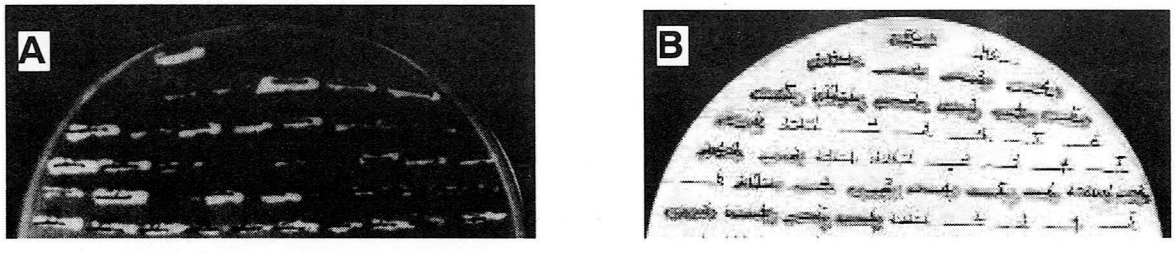
本章第4節pGAD424のYM4271/GPS2へのトランスフォーメーションの項と同様の方法で遺伝子導入を行った。

○β-ガラクトシダーゼフィルターアッセイ

トランスフォーメーション後SD/-Leuプレート上で生育してきたコロニーを、1サンプルにつき数個、SD/-Leu/-His/10 mM 3-ATプレート上のフィルターにストリークした。ここで生育したものについて、本章第6節β-ガラクトシダーゼフィルターアッセイの項に示した方法で、β-ガラクトシダーゼフィルターアッセイを行った。

(2) 実験結果

YM4271/GPS2のコンピテントセルに遺伝子導入した302個のクローンを、SD/-Leuプレート上に塗り広げた。プレート上で生育したコロニーをSD/-Leu/-His/10 mM 3-ATプレート上にストリークしなおし、β-ガラクトシダーゼフィルターアッセイを行った。その結果、計82個のクローン (rat liver, 1 clone; HeLa cell, 54 clones; WI-38 cell , 6 clones; Jurkat cell, 21 clones)がポジティブであった (Fig. 5, Table 2 )。




**Growth on Histidine (-) Plate** **β-Galactosidase Assay**

**Fig. 5. Growth on Histidine (-) Plate and β-Galactosidase Assay for 3rd Screening.** (A) The growth on histidine (-) plate of the clones from Jurkat cDNA library is shown. (B) The data of β-galactosidase assay of the clones from Jurkat cDNA library are shown.

## 第8節　四次スクリーニング

三次スクリーニングでポジティブであったクローンから回収したプラスミドを、大腸菌に導入して単一化した。これらをもう一度YM4271/GPS2に導入するのと同時に、ERTをシスエレメントに持つYM4271/ERTをネガティブコントロールとして用いて、活性がGPS2特異的か否かを検討した。GPS2特異的にポジティブであったクローンのシークエンスを行った。

(1) 実験方法

○酵母からのプラスミドの回収

本章第7節酵母からのプラスミドの回収の項に示した方法で酵母からのプラスミドの回収を行った。

○大腸菌コンピテントセルの作成

大腸菌DH5αをLBプレートに画線培養し、37 °Cで一晩培養した。シングルコロニーをかきとり、5ml LB液体培地中37 °Cで一晩振とう培養した。このうち2 ml ずつを200 ml LB液体培地で、OD600=0.5-0.8になるまで37 °Cで振とう培養した。3,000 x g, 10 min, 4 °C で集菌したのち滅菌水30 ml で菌を2回洗浄した。10 % グリセロール15 ml で洗浄し、3,000 x g, 5 min, 4 °C で集菌した。10 %グリセロール8 ml に懸濁し210 µl ずつに分注した。これらを液体窒素により凍結した後、-85 °C で保存した。

○大腸菌DH5αへのプラスミドのエレクトロポレーション

*E.coli* Pulser (BIO RAD)を用いた。キュベットはGene Pulser/*E.coli* Pulser Cuvette 0.2 cm (BIO RAD) を用いた。上記のコンピテントセル40 µl とプラスミド溶液1 µl をキュベットにアプライした後、12.5 kV/cmの電圧を印加した。印加後すぐに1.5 ml SOCを加え、14 ml 培養チューブに移し37 °C で1時間振とう培養した。その後、15,000 x g, 10 sec, 4 °Cで遠心して集菌した。100 µl のTEに懸濁しLB/Ampプレートに塗り広げた。

SOC: 2 % Bacto-tryptone, 0.5 % Bacto-yeast extract, 10 mM NaCl, 2.5 mM KCl, 10 mM $MgCl_2$, 10 mM $MgSO_4$, 20 mM glucose

○プラスミドの調製

本章第3項のプラスミドの調製の方法に従った。

○YM4271/GPS2およびYM4271/ERTへのトランスフォーメーション

回収したプラスミドを、ホストYM4271/GPS2およびネガティブコントロールとしてERTの4回繰り返し配列をターゲットシスエレメントとしたホスト (YM4271/ERT) へ、

本章第4節pGAD424のYM4271/GPS2へのトランスフォーメーションの項に示した方法でトランスフォーメーションした。

○β-ガラクトシダーゼフィルターアッセイ

本章第6節β-ガラクトシダーゼフィルターアッセイの項に示した方法で、β-ガラクトシダーゼフィルターアッセイを行った。

○DNAシークエンス

DNAシークエンスは、DNA Sequencing Kit (Applied Biosystem)を用いたDye terminater法 (ABI310 sequencer)で行った。

(2) 実験結果

三次スクリーニングでポジティブであったクローン計82個から回収したプラスミドを、大腸菌DH5αに導入し、単一化したプラスミドを回収した。回収したプラスミドをYM4271/GPS2およびYM4271/ERTに導入し、それぞれを2種類のプレート、SD/-Leuプレートおよび SD/-Leu/-His/10 mM 3-ATにストリークした。その結果SD/-Leuプレート上では全て生育したが、SD/-Leu/-His/10 mM 3-ATプレート上ではYM4271/ERTのトランスフォーマントは全て生育せず、YM4271/GPS2のトランスフォーマントの一部も生育しなかった。

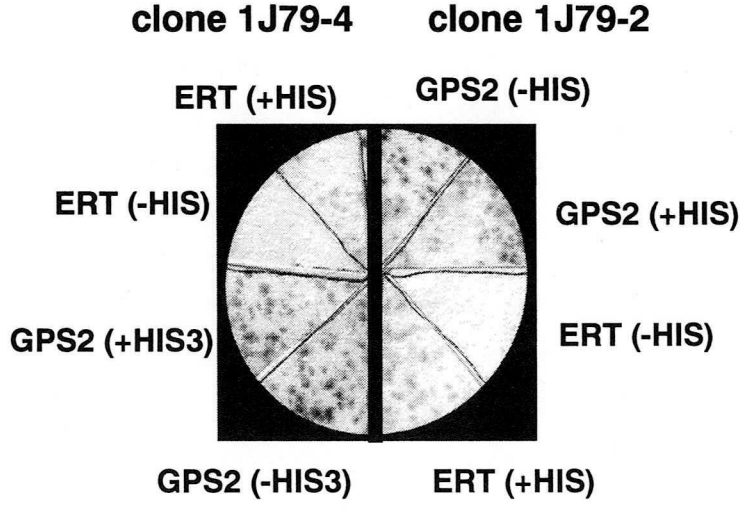



**Fig. 6. β-Galactosidase Assays for 4th Screening.** β-Galactosidase assays of two clones from Jurkat cell cDNA library (1J79-2,1J79-4) are shown. GPS2, transformant of YM4271/GPS2; ERT, transformant of YM4271/ERT; +HIS, transformant plated on SD/-Leu plate; -HIS, transformant plated on SD/-Leu/-His/10 mM 3-AT plate.

各プレート上で生育したクローンについてβ-ガラクトシダーゼフィルターアッセイを行ったところ、計51クローン (rat liver, 1 clone; HeLa cell, 33 clones; WI-38 cell , 6 clones; Jurkat cell, 9 clones) がGPS2特異的にSD/Leuプレート, SD/-Leu/-His/10 mM 3-ATプレートで青くなった (Fig. 6, Table 2)。

これらのポジティブクローンのDNA配列を決定し、データベースにより検索した。その結果、BTEB2 (basic transcription element binding protein 2), CPBP (core promoter-binding protein), EZF (epithelial zinc finger), LKLF (lung Krüppel-like factor), Sp4 (specific protein 4), TIEG1 (TGFβ-inducible early transcription factor gene 1), TFIIIA (transcription factor IIIA), および配列は登録されているものの、発現や機能についての報告の無い遺伝子 (PAC clone RP4-75IH13 ヒト染色体7q35 全長128361 bpの内 20009-21523 bp, GenBank AC004877) と一致した (Fig. 7)。今回得たPAC clone RP4-75IH13 の20009-21523 bp部分の予想されるアミノ酸配列には、亜鉛フィンガーモチーフが12個含まれることからMZFP (multiple zinc finger protein) と名付けた。

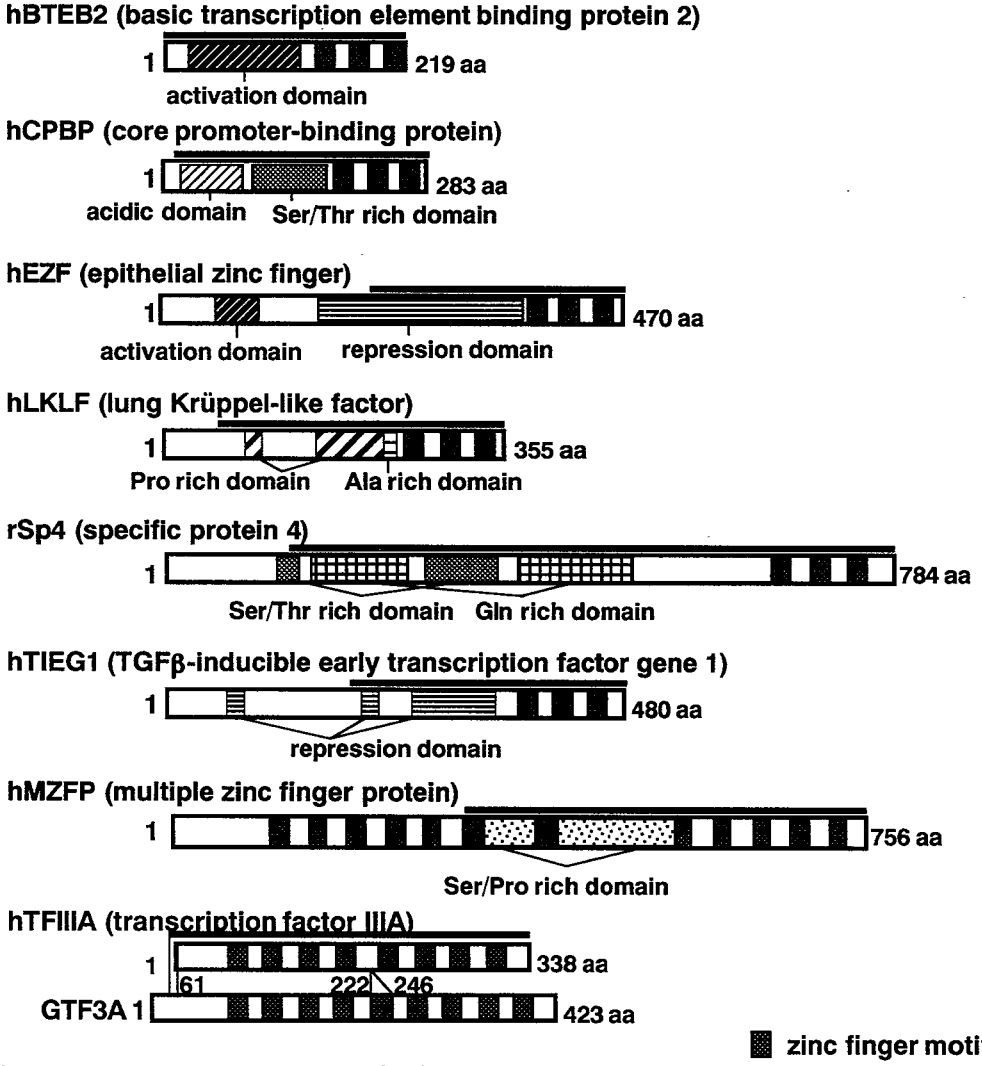



**Fig. 7. Schematic Illustration of GPS2 Interacting Factors in the Yeast One-Hybrid Screening.** The factors cloned by the yeast one-hybrid screening are shown. The black bars above each factor indicate the region obtained by the screening.

図中の黒い実線は今回のスクリーニングで得たポジティブクローンのうち最も長い領域を含むものを示している。Open Reading Flame (ORF) 全長を含むクローンが存在したのはBTEB2のみであった。しかし、全てのクローンにおいて$C_2H_2$タイプの亜鉛フィンガーモチーフを含んでいた。またTFIIIAの今回得た領域はhuman TFIIIA として報告されている配列全てを含み、5'側18bpはGTF3Aに一致していた (Fig. 7)[13, 14]。

## 第9節　考察及び小括

(1) 考察

スクリーニングを始めた当初は、二次スクリーニングの後、酵母から回収したプラスミドを大腸菌に導入していた。大腸菌から回収したプラスミドについて制限酵素によるインサート部分の切り出しを行ったところ、1つの酵母から回収したプラスミドの中に数種類の長さのバンドが観察された。そのためポジティブなエフェクタープラスミドをこの時点で特定するのは難しいと考え、三次スクリーニングを行った。

この操作で、一つの酵母に導入されるプラスミドの種類が減ると考えた。また、プラスミドの回収をするために、酵母をSD/-His/10 mM 3-AT 液体培地中で2日間培養している。この間にポジティブエフェクタープラスミド以外の、酵母の生育に必要でないプラスミドを排除できる可能性も期待できた。

今回酵母one-hybrid system を用いて、BTEB2, CPBP, EZF, LKLF, Sp4, TIEG1, TFIIIA の遺伝子をクローニングした。 さらに、MZFPと名付けた因子を得た (Fig. 7)。

これらは、全てDNA結合領域として知られている$C_2H_2$型の亜鉛フィンガーモチーフを有していた。特にBTEB2, CPBP, EZF, LKLF, Sp4, TIEG1 は$C_2H_2$型の亜鉛フィンガーモチーフを3回繰り返してもつ、Krüppel型と呼ばれる因子であった。一方、TFIIIA, MZFPはそれぞれ亜鉛フィンガーモチーフを8個および12個有する因子であった。

今回のスクリーニングでは、異なる領域をコードしている同じ遺伝子が複数得られた場合や、異なるライブラリーから得られた場合があった (Table 2)。そしてそれら異なるクローン全てが亜鉛フィンガーモチーフを含んでいた。このことは、今回得た因子が偽陽性でないことを支持する材料の一つとなると思われた。しかし酵母one-hybrid systemはDNAとタンパク質の直接的な結合を証明する方法ではないので、筆者は次章でゲルシフト法を用いて、これらの因子とGPS2の直接的な結合についての検討を行った。さらにトランスフェクション法などにより、個々の因子の解析を行った。

(2) 小括

1. 酵母one-hybrid systemを用いてGPS2に作用する8種類の因子 をクローニングした。

2. 8種類の因子は、Krüppel型のBTEB2, CPBP, EZF, LKLF, Sp4, TIEG1、および亜鉛フィンガーモチーフを多数もつTFIIIAと配列は登録されているものの発現や機能についての報告の無い遺伝子であった。

3. 今回得た発現や機能についての報告のない遺伝子をMZFPと名付けた。

# 第2章 サイレンサーGPS2に作用する因子の機能解析

前章で酵母one-hybrid法によりGPS2に作用することが明らかとなった、8種類の亜鉛フィンガータンパク質が、GPS2に対してどのように作用しているかを検討するため、1. ゲルシフト法によるGPS2との結合性、2. トランスフェクション法による転写調節活性、について検討を行った。

## 第1節 ゲルシフト法によるGPS2に作用する因子の結合性の解析

まず酵母one-hybrid法により得た8種類の因子 (BTEB2, CPBP, EZF, LKLF, Sp4, TIEG1, MZFP, TFIIIA) が実際にGPS2に結合するか否かをゲルシフト法によって検討した。

### (1) 実験方法

○発現プラスミドの作成

BTEB2については、5'側のプライマーに*Bam*HIサイトを、3'側のプライマーに*Eco*RIサイトを付加した合成オリゴヌクレオチド (Fig. 8 A)を用いてAmpli Taq Gold (Applied Biosystems)を用いたPCR法により、ラットBTEB2のORFの全長を増幅した。Sp4, TFIIIAについては、BTEB2と同様に合成オリゴヌクレオチド (Fig.8 B, C)を用いて、Sp4は亜鉛フィンガー領域を含む504 a.a.-784 a.a.に相当する部位を、TFIIIAは5'側の3つの亜鉛フィンガー領域に相当するDNA断片 (94 a.a.-197 a.a.)を増幅した。PCRは、96 °C 15分を1回、96 °C 1分、54 °C 2分、74 °C 2分のサイクルを2回、96 °C 1分、64 °C 2分、74 °C 3分を30回、74 °C 10分を1回行った。

**A** 5'-ataGGATCCATGCCCAGTTCTACAAATC- 3'
5'-ataGAATTCTCAGTTCTGGTGCCTCTT- 3'

**B** 5'-atagGGATCCTTGCTCAGATTGCTC -3'
5'-atagGAATTCTTCCATGTTTGTTGA -3'

**C** 5'-ataGGATCCCGCTTCCCAGGAGGTTCA-3'
5'-ataGAATTCCAGTCTTCAAAACTGCATAT-3'

**Fig. 8. Primers for PCR to amplify BTEB2, Sp4, and TFIIIA.** Primers for PCR to amplify BTEB2 (A), Sp4 (B), and TFIIIA (C) are shown. The restriction enzyme sites are underlined. *Bam*HI site was connected to 5'-side primer (upper) and *Eco*RI site was connected to 3'-side primer (lower).

PCR産物を制限酵素*Bam*HI, *Eco*RIで消化した後、発現ベクターpGEX-3X (Amersham Pharmacia Biotech)の*Bam*HI, *Eco*RI サイトにサブクローニングした。サブクローニングしたプラスミドを大腸菌JM109に導入した。

他の因子CPBP, EZF, LKLF, TIEG1, MZEPは、ライブラリーのベクターを制限酵素*Eco*RI, *Xho*Iで処理した後、DNA断片を回収し、その両端をKlenow処理することによって平滑末端化した。このDNA断片を、発現ベクターpGEX-2T (Amersham Pharmacia Biotech)の*Sma*Iサイトにサブクローニングし、大腸菌JM109に導入した。

○GST融合タンパク質の発現

発現ベクターを導入した大腸菌JM109をLB/Ampプレート上で一晩37 °Cで培養したのち、コロニーをかきとり3 ml のLB/Amp液体培地で一晩37 °Cで培養し、プラスミドを回収した。得られたプラスミドを大腸菌BL21に導入し、LB/Ampプレート上で一晩37 °Cで培養した。生育したコロニーをかきとり、アンピシリン (final 100 μg/ml )を含む5 ml の液体LB培地で一晩30 °Cで前培養した。これをアンピシリン(final 100 μg/ml )を含む100 ml の液体LB培地に植え継ぎOD600=0.6になるまで30 °Cで振とう培養した。IPTGを終濃度0.4 mM となるように加え、さらに30 °Cで4時間振とう培養した。4,500 x g, 10 min, 4 °Cで集菌し、沈殿をprotease inhibitorを含む1 ml の0.1M HM bufferに懸濁した。超音波破砕により菌体を破砕した後350,000 x g, 30 min, 4 °Cで遠心した。SDS-PAGEにより上清を泳動したとき、予想される大きさの位置に、GST融合タンパク質のバンドが存在することを確認した。

0.1 M HM buffer: 25 mM HEPES (pH7.8), 1 mM DTT, 12.5 mM $MgCl_2$, 20 % glycerol, 0.1 M KCl

protease inhibitor: 4 μM PMSF, 1 ng/ml leupeptin, 1 ng/ml pepstatin A, 0.1 ng/ml antipain

○タンパク質の精製

500 μl の0.1M HM bufferで3回洗浄した40 μl Gultathione Sepharose 4B (Amersham Pharmacia Biotech)を、タンパク質の溶液400 μlと氷上で30分間反応させた。1,000 x g, 10 min, 4 °Cで遠心し、沈殿を500 μl の0.1M HN bufferで3回洗浄した。上清を取り除き、40 μl の20 mM glutathione (γ-Glu-Cys-Gly; GSH) reduced form (Sigma)を加え氷上で10分間反応した後、1,000 x g, 1 min, 4 °Cで遠心し、上清を回収した。これを3回繰り返し、全量120 μlとした。精製後のタンパク質についてSDS-PAGEを行い目的のタンパク質が誘導、精製されていることを確認した。

0.1 M HM buffer: 25 mM HEPES (pH7.8), 1 mM DTT, 12.5 mM $MgCl_2$, 20 % glycerol, 0.1 M KCl

○合成オリゴヌクレオチド

第1章第1節合成オリゴヌクレオチドの項に従った。

○合成オリゴヌクレオチドの放射ラベル

第1章第1節合成オリゴヌクレオチドの放射ラベルの項に従った。

○ゲルシフト法

第1章第1節ゲルシフト法の項に従った。

(2) 実験結果

GPS2をプローブとしてKrüppel型の6種類因子についてゲルシフト法を行った結果、BTEB2, EZF, LKLF, TIEG1において移動度の遅いバンドが検出された (Fig. 9 A-D, lane 2)。また放射ラベルされていないGPS2をコンペティターとして加えたとき、Krüppel型タンパク質の認識配列とされているGC boxまたはGT boxと同様に競合された (Fig. 9 A-D, lanes 3-6 and data not shown)。一方、CPBPとSp4はGC boxまたはGT boxをプローブとして用いると結合がみられたが、GPS2をプローブとしたときの結合は非常に弱かった (Fig. 9 E, F, lanes 2-3 and data not shown)。

亜鉛フィンガーモチーフを多数持つ因子のうち、MZFPはBTEB2, EZF, LKLF, TIEG1と同様に、GPS2をプローブとしたときに移動度の遅いバンドが現われ、このバンドは放射ラベルしていないGPS2, GC boxで競合された (Fig. 9 G, lanes 2-6)。BTEB2, EZF, LKLF, TIEG1, MZFPは、GPS2, GC boxで同等もしくはGC boxで強く競合され、またプローブとしてGPS2, GC boxを用いたときにもGPS2, GC boxで同等もしくはGC boxに強く結合した (Fig. 9 and data not shown)。今回酵母one-hybrid法で得た8種類の因子の中で、TFIIIAは唯一他の因子と比較して、GC boxよりもGPS2をプローブとしたときの方が強固な結合が見られた (Fig. 9 H, lanes 2 and 4)。今回の実験結果から、BTEB2, EZF, LKLF, TIEG1, MZFP, TFIIIAがGPS2に直接結合することが明らかとなった。

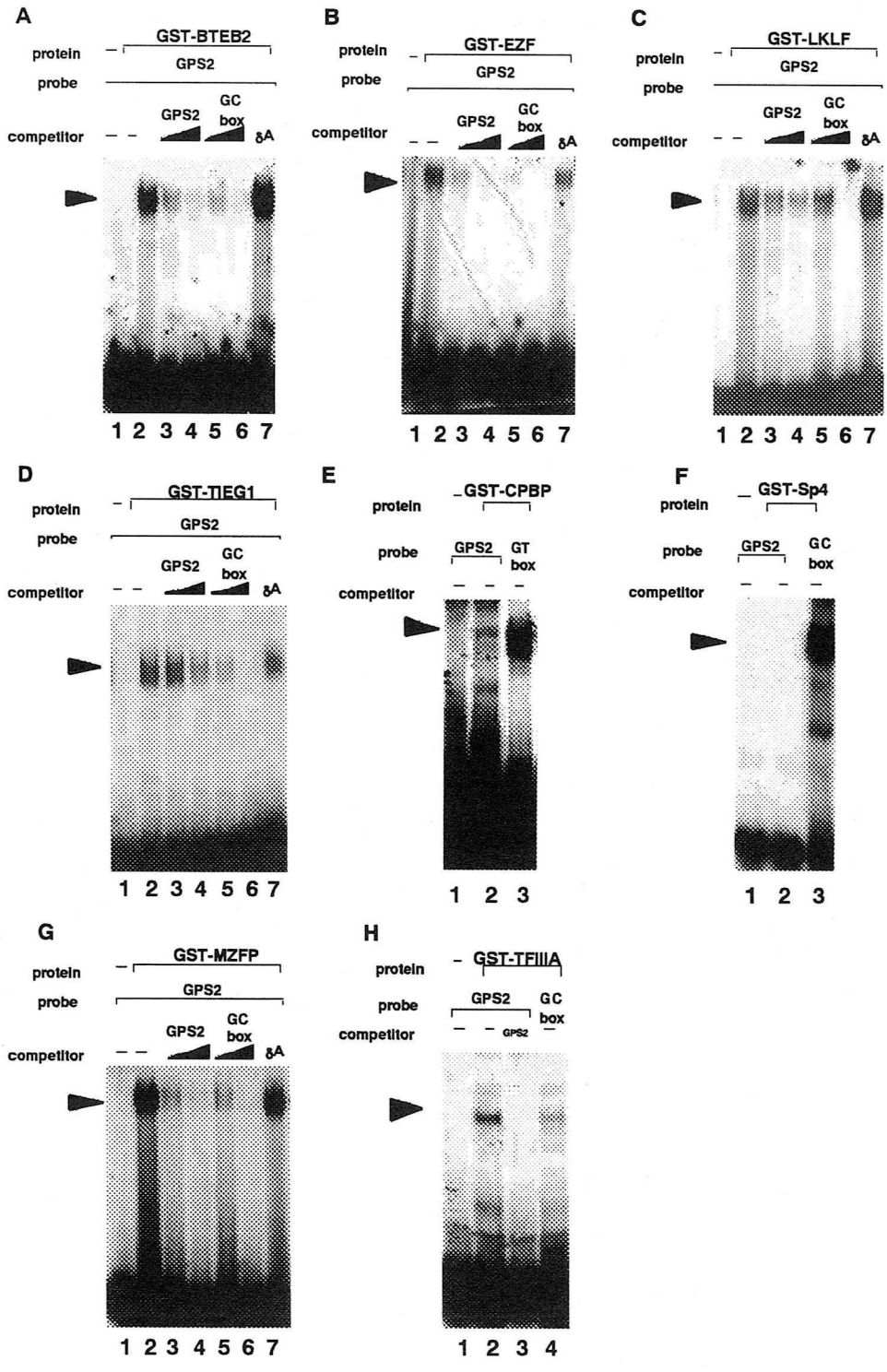



**Fig. 9. Gel-Mobility Shift Analyses for GPS2 Interacting Proteins.** The gel-mobility shift analyses were performed using bacterially expressed GST-fusion proteins and the radiolabeled GPS2 or GT box or GC box as indicated in each panel. The radiolabeled probes were incubated with GST-BTEB2 (A, lanes 2-7), GST-EZF (B, lanes 2-7), GST-LKLF (C, lanes 2-7), GST-TIEG1 (D, lanes 2-7), GST-CPBP (E, lanes 2-3), GST-Sp4 (F, lanes 2-3), GST-MZFP (G, lanes 2-7), GST-TFIIIA (H, lanes 2-4), and bovine serum albumin as a control (lane 1 in all panels). The protein-bound band are indicated by arrowheads. Either 50- or 200-fold molar excess of non-labeled GPS2 or GC box was used for the competition analyses. δA was used as a non-specific competitor.

## 第2節　ゲルシフト法による解離定数の算定

前節でGPS2に結合することを明らかとした、BTEB2, EZF, LKLF, TIEG1, MZFP, TFIIIAについて、GPS2に対する結合性の違いを調べた。

(1) 実験方法

○GST融合タンパク質の発現
本章第1節GST融合タンパク質の発現の項に従った。

○タンパク質の精製
本章第1節タンパク質の精製の項に従った。

○合成オリゴヌクレオチド
第1章第1節合成オリゴヌクレオチドの項に従った。

○合成オリゴヌクレオチドの放射ラベル
第1章第1節合成オリゴヌクレオチドの放射ラベルの項に従った。

○ゲルシフト法
第1章第1節ゲルシフト法の項に従った。

○Saturation curveおよびScatchard plot
ゲルシフトにおいてゲルを乾燥させた後、結合したプローブとフリーのプローブの放射活性を、バイオイメージングアナライザーBAS1800（富士フィルム）を用いて測定した。Saturation curveは、横軸に加えたプローブ量を、縦軸に結合したプローブ量をプロットした。Scatchard plotは、横軸に結合したプローブ量を、縦軸に結合したプローブとフリーのプローブの量の比をプロットし、その直線の傾きから解離定数 ($K_D$)を求めた。[$K_D$=-1/傾き (nM)]

(2)実験結果

GPS2に結合すると判明した因子のうち、どれがSF-Cであるかを決定する材料の一つとして、GPS2に対するBTEB2, EZF, LKLF, TIEG1, MZFP, TFIIIAの結合性について解析した。GPS2に対するBTEB2, LKLFの解離定数を求めたときの結果を示した (Fig. 10)。一定量のタンパク質に対して、プローブの量を0.123 nMから6.16 nMへ段階的に変化させてゲルシフトアッセイを行った (Fig. 10, left panels)。そして放射活性を測定すること

により、Saturation curveおよびScatchard plotを作成した。その結果、解離定数はBTEB2が1.8x10$^{-9}$ M、LKLFは6.8x10$^{-10}$ Mと算出された (Fig. 10, right panels)。同様にEZF, TIEG1, MZFP, TFIIIAについてゲルシフトアッセイを行ったところ、これら6種類のタンパク質のGPS2に対する解離定数は全て10$^{-9}$-10$^{-10}$ M 程度であった (Table 3 )。

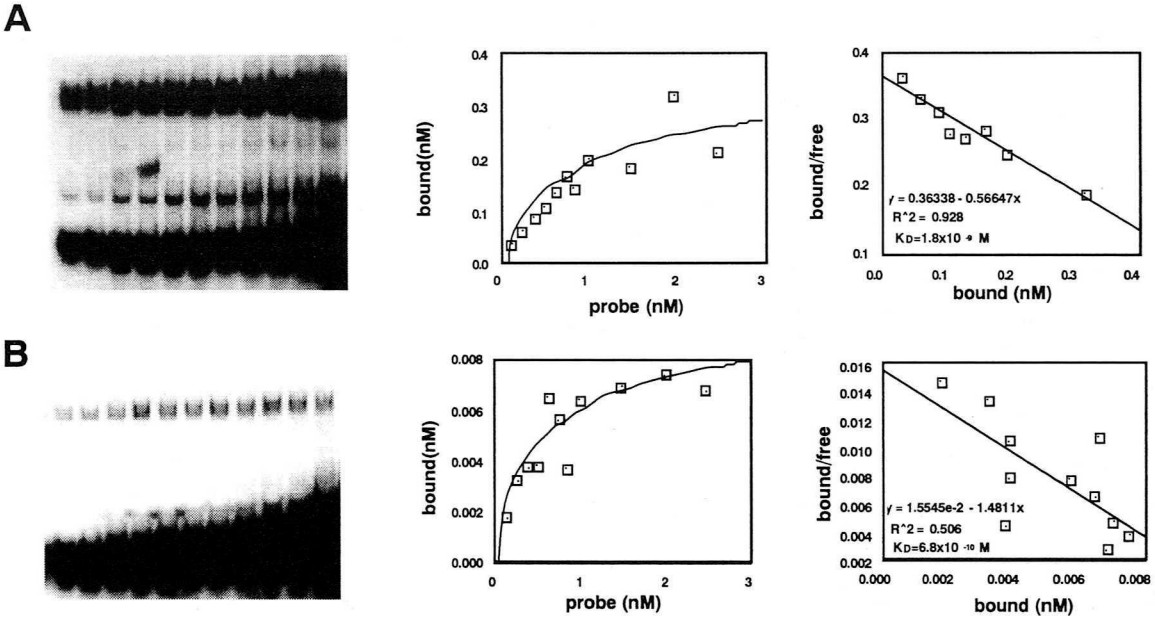



**Fig.10. Determination of Dissociation Constants of GPS2 Binding Proteins.** The left panels show the results of the gel-mobility shift analyses of BTEB2 (A) and LKLF (B) with increasing amounts of GPS2. The amount of bound probe was plotted against the total input (middle panel). Scatchard analysis was performed by plotting the ratio of bound to free probe against bound probe (right panel).

**Table 3. Dissociation Constants of GPS2 Binding Proteins**

| protein | KD (M) |
|---|---|
| BTEB2 | 1.8x10$^{-9}$ |
| EZF | 6.6x10$^{-10}$ |
| LKLF | 6.8x10$^{-10}$ |
| TIEG1 | 3.3x10$^{-9}$ |
| MZFP | 9.9x10$^{-10}$ |
| TFIIIA | 1.3x10$^{-9}$ |

## 第3節　GPS2に対するKrüppel型GPS2結合因子の転写調節作用の検討

SF-Cはラット正常肝臓で転写抑制因子として機能していると考えられる。そこで前節までにGPS2に結合することを明らかにした因子群が、実際にGPS2を介してGST-P遺伝子の発現調節に関わっているか否かを、培養細胞を用いたトランスフェクションアッセイにより検討した。まずKrüppel型の因子について検討した。

### (1) 実験方法

○細胞培養

ヒト肝癌細胞株HepG2をトランスフェクションアッセイに用いた。37 °C, 5 % $CO_2$存在下、10 % fetal bovine serum (FBS; ICN Biochemical Japan Co.Ltd.) 含有Minimum Essential Medium (MEM; Nissui)を用いて培養した。

○プラスミド構築

-395GST-luciferase は、GST-P遺伝子のサイレンサーとプロモーターを含む-395から+59の領域をPGV-B (東洋インキ製造) の *Hin*dIII 部位に挿入した。-395(ΔGPS2)GST-luciferaseは、PCR法により-395GST-luciferase からGPS2の部分を欠失させて作成した。-395GST-luciferaseの-395から-92領域を欠損させることにより、-91GST-luciferaseを作成した。GPS2オリゴヌクレオチド (第1章第1節)の5回繰り返し配列を挿入したpUC18から、制限酵素*Sma*IおよびHincIIにより切断したDNA断片を、-91GST-luciferseの*Sma*I siteに挿入することにより5xGPS2/-91GST-luciferaseを作成した。

BTEB2については、5'側のプライマーに*Bam*HIサイトを、3'側のプライマーに*Xba*Iサイトを付加した合成オリゴヌクレオチド (Fig. 11)を用いてAmpli Taq Gold (Applied Biosystems)を用いたPCR法によりヒトBTEB2のORFの全長を増幅した。増幅したDNA断片を*Bam*HI, *Xba*Iで消化した後、pcDNA3HisA (Invitrogen) の*Bam*HI, *Xba*Iサイトに挿入した。ヒトEZF、マウスLKLF、ヒトTIEG1の発現プラスミドはそれぞれハーバード大学M.-E. Lee博士、シンシナティ大学J. B. Lingrel博士、聖マリー病院R. Urrutia博士に御供与頂いた。

```
5'-ataGGATCCCATGCCCAGTTCTACAAAT- 3'
5'-ataTCTAGATCAGTTCTGGTGCCTCTTC- 3'
```

**Fig.11. Primers for PCR to Amplify BTEB2.** Primers for PCR to amplify BTEB2 are shown. The restriction enzyme sites are underlined. *Bam*HI site was connected to 5'-side primer (upper) and *Xba*I site was connected to 3'- side primer (lower).

○トランスフェクションおよびルシフェラーゼ活性測定法

培養細胞への遺伝子の導入は、ChenとOkayamaのリン酸カルシウム法[15]に従って行った。トランスフェクション24時間前に細胞 (5X10$^5$ cells/6cm dish) をまき、1時間前に培地を交換した。レポータープラスミドを1.5 μg 使用し、さらに各エフェクタープラスミドとpBluescript (Stratagene) を加えて合計4.5 μg にしたものを、リン酸カルシウムとの共沈殿物にして培地に加えた。その後、3 % $CO_2$存在下37 °Cで約16時間培養し、PBS (-)で洗浄後、新しい培地を加え、さらに5 % $CO_2$存在下37 °Cで24時間培養した。ルシフェラーゼアッセイは、ピッカージーン発光キット（東洋インキ製造）を用いて行った。トランスフェクションの効率を補正するための内部コントロールとして、各種のプローモーター (SV-40, CMV, RSV) をもつプラスミドを使用することを試みたが、エフェクタープラスミドを加えることによってその転写活性が変化した。そこでルシフェラーゼ活性はタンパク質量あたりのRelative Light Units (RLU) に換算した。タンパク定量はbovine serum albumin (BSA) を標準タンパク質とし、Bradford法 [16]に準じたProtein Assey Kit (BIO-RAD) を用いて行った。なおpRSVGALを別にトランスフェクトしてβ-ガラクトシダーゼアッセイを行うことにより、トランスフェクションの効率のばらつきが20 %以内であることを確認した。

(2) 実験結果

本章第1節でGPS2に結合することが判明した因子のうちKrüppel型の因子について、TIEG1は転写抑制因子としての報告がある [17]。一方これまでLKLFおよびBTEB2は転写活性化因子として報告されており [18-20]、EZFは転写活性化ドメインと転写抑制ドメインの両方をもつことが報告されている [21, 22]。レポータープラスミドとしてGST-P遺伝子のサイレンサーとプロモーターを含む-395GST-luciferaseまたはGPS2を欠いた -395(ΔGPS2)GST-luciferaseを用いて (Fig. 12 A)、Krüppel型GPS2結合因子 (BTEB2, EZF, LKLF, TIEG1) をコトランスフェクションした。レポータープラスミド中の未知の部位に対してエフェクタープラスミドが非特異的に作用する影響を除くため、エフェクタープラスミド存在時の活性を非存在時の活性で除して相対活性を求め、次に-395GST-luciferaseを用いた時の相対活性を -395(ΔGPS2)GST-luciferaseを用いた時の相対活性で割った。その結果Fig. 12 Bに示したように、BTEB2, EZF, TIEG1はGPS2を介した転写抑制活性を示したが、LKLFは転写を活性化した。

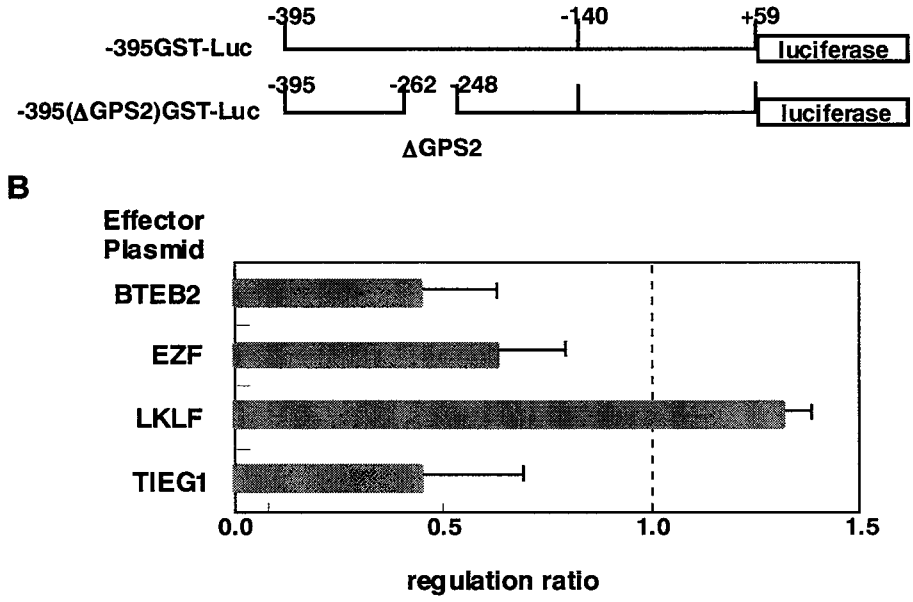



**Fig.12. Regulation of GST-P Gene Expression by Krüppel-like Proteins through GPS2 site in Silencer Region.** (A) Schematic representation of the reporter plasmids. -395GST-luciferase contains the fragment, -395 to +59 in the promoter and silencer region of GST-P gene. -395(ΔGPS2)GST-luciferase lacks the GPS2 site from the silencer region. (B) Regulation of GST-P gene expression by Krüppel-like proteins. All transfection assays were repeated at least three times by using two or three different preparations of DNA, and the regulation ratio was calculated from the mean values. The error bars indicate standard deviations.

BTEB2はこれまで転写活性化因子として報告されている[18, 19]。しかしBTEB2が、GST-P遺伝子サイレンサー全長を含むレポーターを用いたトランスフェクションアッセイで、GPS2を介した転写抑制活性を示したので、複数つないだGPS2に対する各因子の影響を検討した。また同時に、他の因子についても検討した。

GST-P遺伝子プロモーターを含むレポータープラスミドとして-91GST-luciferaseを、複数つないだGPS2を持つレポータープラスミドとして5xGPS2/-91-GST-luciferaseを使用した (Fig. 13 A)。レポータープラスミド中の未知の部位に対してエフェクタープラスミドが非特異的に作用する影響を除くため、エフェクタープラスミド存在時の活性を非存在時の活性で除して相対活性を求め、次に5xGPS2/-91-GST-luciferaseを用いた時の相対活性を -91GST-luciferaseを用いた時の相対活性で割った。

その結果、EZFはGST-P遺伝子サイレンサーの全長を含むレポーター (-395GST-luciferase) を用いたときには、GPS2を介して転写抑制活性を示したにもかかわらず、複数つないだGPS2をもつレポーター (5xGPS2/-91-GST-luciferase) を用いたときには、逆にGPS2を介した転写活性化能を示した (Fig.13 B)。またBTEB2, TIEG1は、複数つないだGPS2をもつレポーター (5xGPS2/-91-GST-luciferase) を用いたときも転写抑制活性を示したが、GST-P遺伝子サイレンサーの全長を含むレポーター (-395GST-luciferase) を用いたときのGPS2を介した転写抑制より、抑制活性は小さかった (Fig.12 B, 13 B)。

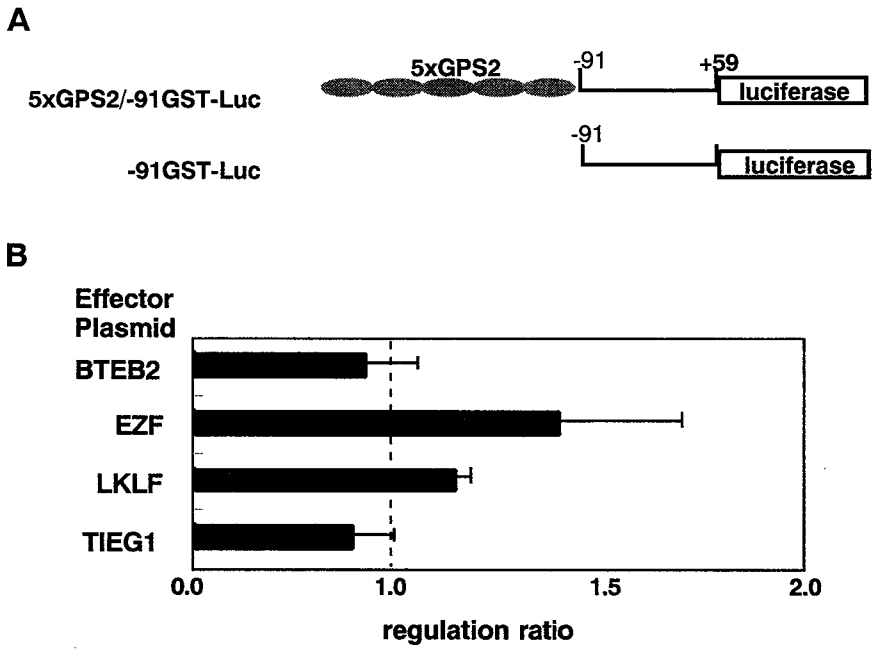



**Fig. 13. Regulation of GST-P Gene Expression by Krüppel-like Proteins through Multimerized GPS2 site.** (A) Schematic representation of the reporter plasmids. -91GST-luciferase contains the fragment, -91 to +59 in the promorter region of GST-P gene. 5xGPS2/-91-GST-luciferase contains 5 times GPS2 sites in the upstream of -91GST-luciferase. (B) Regulation of GST-P gene expressionby Krüppel-like proteins through multimerized GPS2. All transfection assays were repeated at least three times by using two or three different preparations of DNA, and the regulation ratio was calculated from the mean values. The error bars indicate standard deviation.

## 第4節　GPS2に対するTFIIIAの転写調節作用の検討

前節までの結果より、Krüppel型のGPS2結合因子のうちBTEB2, EZF, TIEG1が、サイレンサーの全長を含むレポーターを用いたときに、GPS2を介して転写を抑制していることが明らかとなった。一方、TFIIIAはこれまでclass 3の転写に関わっていると報告されている [22-24]。しかし、TFIIIAがGPS2に結合することが明らかになっているので、GPS2を介した転写調節をclass 2の遺伝子において行っているか否かの検討を行った。

(1) 実験方法

○細胞培養

本章第3節細胞培養 の項に従った。

○プラスミド構築

5'側のプライマーに*Eco*RIサイトを、3'側のプライマーに*Xba*Iサイトを付加した合成

オリゴヌクレオチド (Fig. 14)を用いて、Ampli Taq Gold (Applied Biosystem)を用いたPCR法により、ヒトTFIIIA [13]として登録されているORFの全長および、5'側に18bp GTF3A [14]の配列を含む領域を増幅した。増幅したDNA断片を制限酵素*Eco*RI, *Xba*Iで消化した後、pcDNA3HisAの*Eco*RI, *Xba*Iサイトに挿入した。

5'-ataGAATTCTGGATCCGCCGGCCGT- 3'
5'-ataTCTAGATTAGCCAAGGGTCCGTACT- 3'

**Fig.14. Primers for PCR to Amplify TFIIIA.** Primers for PCR to amplify TFIIIA are shown. The restriction enzyme sites are underlined. *Eco*RI site was connected to 5'-side primer (upper) and *Xba*I site was connected to 3'-side primer (lower).

(2)実験結果

Fig. 15 Aの実線で示した領域を発現するプラスミドを構築してトランスフェクションアッセイを行った。

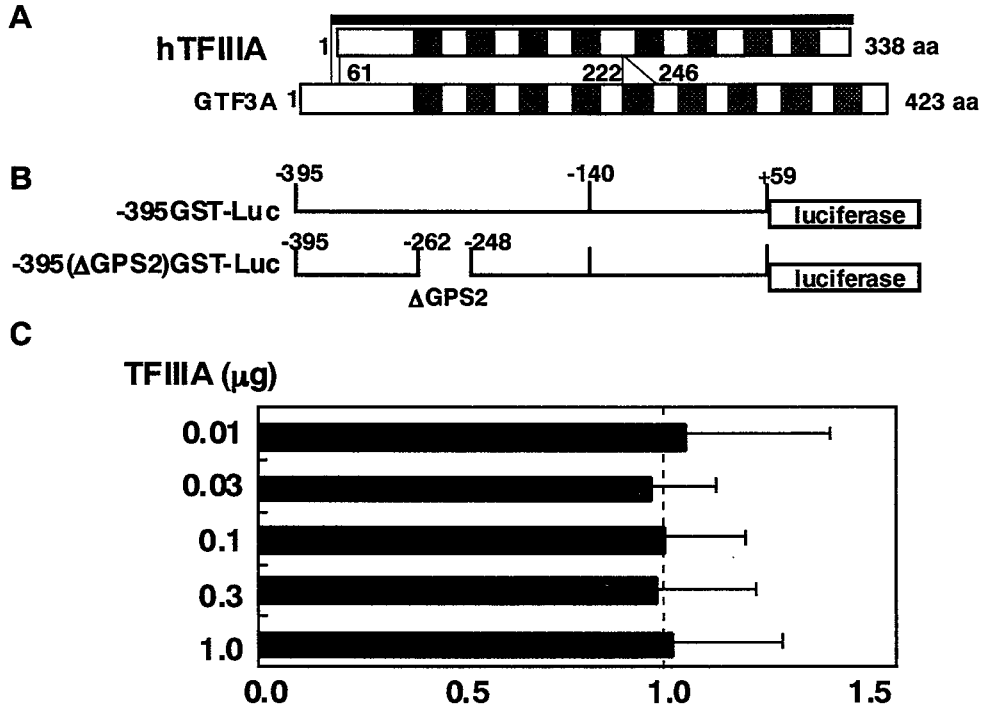



**Fig. 15. Regulation of GST-P Gene Expression by TFIIIA through GPS2 site in Silencer Region.** (A) Schematic representation of the TFIIIA. The black bar shows expressed region. (B) Schematic representation of the reporter plasmids. -395GST-luciferase contains the fragment, -395 to +59 in the promorter and silencer region of GST-P gene. -395(ΔGPS2)GST-luciferase lacks the GPS2 site from the silencer region. (C) Regulation of GST-P gene expression by TFIIIA. All transfection assays were repeated at least three times by using two or three different preparations of DNA, and the regulation ratio was calculated from the mean values. The error bars indicate standard deviation.

Fig. 15 Bに示したレポータープラスミド-395GST-luciferaseおよび-395(ΔGPS2)GST-luciferaseを用い、エフェクタープラスミドを0.01 μgから1.0 μgまで、量を変化させて加えた時のルシフェラーゼアッセイ活性を本章第3節と同様の方法で求めた。その結果、TFIIIAの量に関わらず転写調節活性は見られなかった (Fig. 15 C)。

## 第5節　考察および小括

### (1) 考察

本章では、前章において酵母one-hybrid systemによりGPS2 に作用することが明かとなった8種類の遺伝子が、どのようにしてGPS2に作用しているかを調べることにより、SF-Cの決定を試みた。

まず、これらの因子が実際にGPS2に結合しているかどうかを明らかにするために、ゲルシフト法を用いた検討を行った。その結果、BTEB2, EZF, LKLF, TIEG1, MZFP, TFIIIAはGPS2に結合したが、CPBP, Sp4のGPS2に対する結合力は非常に弱かった。この時点でCPBP, Sp4をSF-Cの候補因子から除いた。

残りの6因子について、結合性の差からSF-Cの決定を行う事を考え、解離定数を求めた。その結果、全ての因子において、$10^{-9}$-$10^{-10}$ M オーダーの解離定数が測定された。他の因子とは異なり、唯一GC boxやGT boxよりもGPS2に強く結合したTFIIIAも、他の因子と同程度の解離定数を示した。このことから、結合性の面からSF-Cの決定を行うことは出来なかったが、全ての因子が十分なアフィニティーをもってGPS2に結合することが分かった。ここで示された解離定数の値は、GPS2と隣接して存在するGPS3をはじめ、サイレンサーの中のいくつかのサイトに結合するNF1ファミリーの解離定数とも似ていた [10]。

SF-Cは、転写抑制因子として働いているため、次に、GPS2に結合することを明らかにした因子が実際に転写を抑制するか否かを、トランスフェクションアッセイにより検討した。その結果、BTEB2, EZF, TIEG1がGPS2を介して転写を抑制することが明らかとなった。

BTEB2は、これまで転写を活性化する因子として報告されている [18, 19]。しかし本研究では、GST-P遺伝子のサイレンサーの全長を含むレポーターおよびプロモーター領域にGPS2の繰り返し配列をつないだレポーターともに、トランスフェクションアッセイで転写抑制能を示した。本実験で用いているHepG2細胞では、細胞内在性の未知の転写活性化因子が、トランスフェクションしたレポータープラスミドのGPS2に結合して、もともとの転写活性をあげている可能性がある。ここにBTEB2を加えることにより、内在性の因子と置き換わり、相対的な転写活性が低下した可能性もある。しかし、複数つないだGPS2をもつレポーター (5xGPS2/-91-GST-luciferase)を用いた場合よりも、

GST-P遺伝子サイレンサーの全長を含むレポーター (-395GST-luciferase) を用いたときの方が、GPS2を介した転写抑制の割合が大きかったことから、GPS2の周辺に存在するGPS1やGPS3をはじめとするタンパク質結合サイトに結合する因子による調節を受けて転写を抑制していることが考えられた。

ヒトEZFの全長を用いたトランスフェクションアッセイでは、tk-promoterの活性を低下させるという報告がある。しかし、酵母GAL4との融合タンパク質を用いたトランスフェクションアッセイにおいて、転写活性化ドメインと転写抑制ドメインが存在していることが明らかにされている (Fig. 7)。EZFが、転写活性化ドメインと転写抑制ドメインをもちながら、tk-promoterでは転写抑制能を示したということについて、全長のEZFでは転写活性化領域が隠されるコンフォメーションとなっているという説明がなされている [21]。一方、マウスEZFは酵母GAL4との融合タンパク質を用いたトランスフェクションアッセイにおいて転写を活性化するという報告がある [22]。

今回のトランスフェクションアッセイにおいて、EZFはGST-P遺伝子のサイレンサーの全長を含むレポーター (-395GST-luciferase) においてGPS2を介して転写を抑制する一方、GPS2の繰り返し配列をGST-P遺伝子のプロモーターにつないだレポーター (5xGPS2/-91GST-luciferase) を活性化した。このようにEZFが異なるレポーターを用いることにより、反対の活性を示した事は興味深い。この原因として、GPS2の周囲の配列が影響しているものと考えられる。GPS2は一部GPS1および3と重なっている [9] (Fig. 1)。このGPS1, 2, 3のそれぞれを欠失させたレポーターコンストラクトを用いた実験などにより、これらのサイトは協調的に転写を抑制しているものと考えられている [9]。EZFが転写抑制と活性化の両方の結果を示した事も、GPS1, 3にそれぞれ結合する細胞内因性のC/EBPファミリーやNF1ファミリーにより、EZFのコンフォメーションに変化が起こるなどの影響を及ぼされているものと推察された。

TIEG1は、これまで転写抑制因子として報告されている [17]。本実験でもGPS2を介して転写を抑制した。TIEG1もまた、BTEB2と同様、複数つないだGPS2をもつレポーター (5xGPS2/-91-GST-luciferase)を用いた場合よりも、GST-P遺伝子サイレンサーの全長を含むレポーター (-395GST-luciferase) を用いたときの方が、GPS2を介した転写抑制の割合が大きかった。

LKLFは転写活性化因子として報告されている [20]。そして、本実験で用いた4種類のKrüppel型の因子の中でも唯一、2種類のレポーター共にGPS2を介して、転写活性化因子として機能した。SF-Cは転写抑制因子であると考えているので、以上の結果より、LKLFをSF-Cの候補から除外した。

TFIIIAはこれまでclass 3遺伝子の基本転写因子として知られており [23-25]、class 2遺伝子の転写に関わっているという報告はない。しかし、今回ゲルシフトアッセイにおいてGPS2に結合することが判明した。そこでGPS2を介した転写調節に関わっているか否かを、トランスフェクションアッセイにより検討した。その結果、GPS2を介した転写抑制はみられなかった。しかし、-395GST-luciferase および -395(ΔGPS2)GST-luciferaseのどちらのレポータープラスミドを用いた時にも、TFIIIAを加えることによって絶対活性は低下した (data not shown)。この結果は、TFIIIAがレ

ポータープラスミドの未知の部分に結合することにより転写を抑制することを示唆しており、class 2遺伝子の転写調節においてTFIIIAが関わっている可能性も考えられた。また、ゲルシフトアッセイではTFIIIAはGPS2に結合したが、トランスフェクションアッセイではGPS2に対して影響を示さなかった。これは、上でも述べたようにレポータープラスミドの他の部分により強く結合している可能性や、細胞中では内因性の因子に結合してしまい、GPS2には結合できない状態になっていることも考えられた。

以上の結果より、SF-Cであることの必要条件を満たす因子として、BTEB2, EZF, TIEG1がこの時点では可能性が高いと考えられた。一方LKLF, TFIIIAは、GPS2を介した転写抑制能を示さなかったことから、SF-Cである可能性は低いと考えられた。

(2) 小括

1. ゲルシフトアッセイの結果、BTEB2, EZF, LKLF, TIEG1, MZFP, TFIIIAがGPS2に結合した。その中でTFIIIAはGC boxに対してよりもGPS2に強く結合した。

2. GPS2に結合する因子の解離定数は全て$10^{-9}$-$10^{-10}$ M 程度であった。

3. トランスフェクションアッセイの結果、BTEB2, EZF, TIEG1はサイレンサー全長の中のGPS2を介する転写抑制能を示した。一方LKLFは転写を抑制しなかった。

4. トランスフェクションアッセイの結果、TFIIIAにはGPS2を介する転写抑制作用はみられなかった。

# 総　括

腫瘍マーカー遺伝子GST-Pは、ラット正常肝臓での発現が見られないにもかかわらず、化学物質により肝癌を誘発させる過程において顕著に発現が増大する[1-4]。GST-Pが正常肝臓で発現が全くみられないことは、発現を正に制御する要因が無いだけではなく、負に制御する要因があるためと考えられた。そこで転写レベルにおけるGST-P遺伝子の発現抑制についての検討を行った。

GST-P遺伝子の上流に存在するサイレンサーには3種類のタンパク質SF-A, B, Cが結合し、これまでにSF-AがNF1ファミリー、SF-BがC/EBPファミリーであることが明らかにされている[8, 9]。筆者は、まだクローニングされていないSF-Cのクローニングを試みた。これまでに当研究室では、SF-A, B同様にSF-Cも、アフィニティーカラムを用いた方法やサウスウエスタン法で、ラット肝臓からのクローニングを試みたが失敗に終わっている。そこで筆者は酵母one-hybrid systemを用いてクローニングを試みた。

酵母one-hybrid systemは、より*in vivo*に近い状態でスクリーニングを行うことができ、さらに多くのクローンをスクリーニングができる点が、アフィニティーカラムを用いた方法やサウスウエスタン法よりも優れていると考えられている。

SF-Cは、ラットの正常肝臓で発現していると考えられるため、rat liverからGPS2に結合するタンパク質のスクリーニングを行うのが妥当であると考えられた。しかし、他の臓器でもGPS2に結合するタンパク質が発現している可能性もあるので、いくつかのcell lineの核抽出物にGPS2結合タンパク質が存在するか否かを調べた。その結果、ヒト子宮頚癌細胞株HeLa cell、ヒト肺細胞株WI-38 cell 、ヒト白血病細胞Jurkat cellにGPS2結合タンパク質が存在することが明らかとなった。そこでrat liverに加え上記の細胞のcDNAライブラリーからのスクリーニングを行った。その結果8種類の亜鉛フィンガータンパク質をクローニングできた。

得られた因子が、SF-Cであることを結論付ける条件として、次の3点が挙げられる。1. GPS2に十分なアフィニティーで直接結合すること。2. GPS2を介して転写を抑制すること。3. ラット正常肝臓で発現していること。

酵母one-hybrid systemでは、GPS2へのなんらかの作用はあることは検出できるが、直接的な結合やアフィニティーについては明らかにできない。そこで、ゲルシフトアッセイにより直接的な結合の検討と解離定数の算定を試みたところ、BTEB2, EZF, LKLF, TIEG1, MZFP, TFIIIAが、GPS2に十分なアフィニティーで結合し得ることが明らかとなった。

次に、これらの因子が実際にGPS2を介した転写抑制因子として機能しうるか否かの検討をおこなった。まず、これまでに発現や転写調節などの機能に関する報告の無いMZFP、およびclass 3遺伝子の転写に関与しているという報告のあるTFIIIA [23-25]以外

の、Krüppel型に分類される4種類の因子についてのトランスフェクションアッセイを行った。その結果、サイレンサーの全長を含むレポータープラスミドを用いたときに、BTEB2, EZF, TIEG1が、GPS2を介して転写を抑制することが明らかとなった。一方、GST-P遺伝子のプロモーターにつないだGPS2の繰り返し配列を介した転写活性を調べた実験では、EZFは転写活性化因子として働いた。EZFは転写活性化ドメインと転写抑制ドメインの両方を持つことが報告されており [21]、今回のトランスフェクションアッセイでもこの両方の機能が現われたものと思われる。

GPS2はGPS1および3と一部重なって存在しており (Fig. 1) [9]、その部位に結合するC/EBPファミリーやNF1ファミリーと相互作用することにより、サイレンサー全長が存在するときには、GPS2を介しての転写抑制因子として働いたものと考えられた。今後EZFを含め、今回転写抑制活性を示した3種類の因子とC/EBPファミリー、NF1ファミリーとの相互作用などの検討を行う必要がある。

今回ラット正常肝臓での発現についての検討は示さなかったが、BTEB2, EZF, TIEG1について既に報告がある。BTEB2, EZFはラットの各臓器での発現をノザンブロット解析により調べると発現がきわめて低いことが報告されている [18, 22]。一方、TIEG1はmRNAレベルで他の臓器と比較して十分に発現している [17]。このことは、TIEG1がラット正常肝臓でGPS2に結合して、GST-P遺伝子の発現を抑制し得ることを示唆している。MZFPに関しては、ノザンブロット解析を行った結果、ラット肝臓、腎臓、心臓、肺臓、すい臓、小腸で発現が認められた (data not shown)。転写調節に関する検討によりSF-Cとなり得るか否かが明かになるが。現時点では不明である。

以上GPS2への結合性、転写抑制能、肝臓での発現の面から考慮して、現時点ではTIEG1がSF-Cの候補として最も有力であると考えられた。

SF-Aとして同定されたNF1は、NF1-A, -B, -C, -Xの4種類の遺伝子からなるファミリーを形成している [27-29]。そのなかで、NF1-Aがサイレンサー領域に結合していることを当研究室で明らかにしている [9, 10]。NF1-Aは4種類のスプライシングアイソフォーム (NF1-A1-4)を持ち、その全てが転写抑制能を持っていることも明らかにしている[25, 30]。このことより、ラット正常肝臓では、NF1-Aがサイレンサー領域に結合して、GST-Pの転写を抑制していると考えられている。

また、SF-Bとして同定されたC/EBPは、C/EBPα, β, γ, δ, ε, およびC/EBP homologous protein 10 (CHOP10) の6種類の遺伝子からなるファミリーを形成している [31-41]。当研究室では、これまでにラット正常肝臓と肝癌誘発時における、C/EBPファミリー構成因子の発現の増減をゲルシフト法により調べている。その結果、正常肝臓ではC/EBPα, βの両方が存在しているが、癌化の過程においてC/EBPαの発現が減少し、C/EBPβの発現量は変わらないことが明らかとされている [42]。またGST-Pサイレンサー中のGPS1を介して、C/EBPαはそれ自身は転写抑制活性を示すだけではなく、

C/EBPβによるGPS1を介した転写活性化をも阻害することも報告されている [42]。これらのことから、C/EBPαが正常肝臓でGPS1に結合するGST-P遺伝子の主要な転写抑制因子と考えられている。

本研究では、SF-Cのクローニングを試み、ゲルシフトアッセイ、トランスフェクションアッセイ、そしてラット肝臓での発現状況から考えて、転写因子TIEG1がSF-Cとして機能し得ることを明らかとした。

GST-P遺伝子のサイレンサーに結合する因子、SF-A, B, Cが今回の一連の実験で全てそろったことになる。これら3種類の因子は、GPS1, 2, 3に結合する。そしてGPS1 および3 はGPS2と一部重なって存在し (Fig. 1)、欠失変異体を用いたトランスフェクションにより、これらのサイトに結合する因子群により協調的に転写を抑制すると考えられている [9]。今後SF-A, B, Cの相互的な作用を含め、癌化の過程における発現量の変化、コファクターとの相互作用など、全体的な視野における検討が期待される。

# 結　論

1. 酵母one-hybrid systemを用いて、GPS2に作用する8種類の亜鉛フィンガータンパク質 (BTEB2, CPBP, EZF, LKLF, Sp4, TIEG1, TFIIIA, MZFP)をクローニングした。

2. そのうちBTEB2, EZF, LKLF, TIEG1, TFIIIA, MZFPがGPS2に十分なアフィニティーを持って結合することが明らかとなった

3. BTEB2, EZF, TIEG1が、サイレンサー中のGPS2を介してGST-P遺伝子の発現を抑制することを明らかとした。

4. これまでのラット肝臓における発現状況の報告から、SF-Cの候補としてTIEG1が最も有力であると考えられた。

# 謝　辞

本研究を遂行するにあたり終始暖かいご指導を賜わりました、大阪大学大学院薬学研究科教授、恩師 西原 力 先生に深く感謝いたします。

本研究を遂行するにあたり熱心なご指導ご鞭撻を賜わりました、名古屋市立大学薬学部教授、今川 正良 先生に深く感謝いたします。

研究途上有益なご助言をいただきました、大阪大学大学院薬学研究科助教授、西川 淳一 先生、大阪大学大学院薬学研究科助手、長田 茂宏 先生に深く感謝いたします。

実験にご協力くださいました、大阪大学大学院薬学研究科、熊原 知泉 修士、大島 和美 学士、栗田 光将 氏をはじめ微生物動態学分野のみなさまに感謝いたします。

細胞核抽出液を用いたゲルシフトアッセイを行うに当たり、Jurkat cellを御供与下さいました、本研究科タンパク情報解析学分野教授、土井 健史 先生、WI-38 cellを御供与下さいました、本研究科細胞生理学分野助手、辻川 和丈 先生に深く感謝いたします。

最後に、常日頃からご支援いただきました両親に心から感謝いたします。

# 引用文献


1. Suguoka, Y., Fujii-Kuriyama, Y., Kitagawa, Y. & Muramatsu, M. *Cancer Res.* **45,** 365-378 (1985).
2. Satoh, K., Kitahara, A., Soma, Y., Inaba, Y., Hatayama, I. & Sato, K. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **82,** 3964-3968 (1985).
3. Sugioka, Y., Kano, T., Okuda, A., Sakai, M., KItagawa, T. & Muramatsu, M. *Nucl. Acids Res.* **13,** 6049-6057 (1985).
4. Sato, K. *Adv. Can. Res.* **52,** 205-225 (1989).
5. Sakai, M., Okuda, A. & Muramatsu, M. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85,** 9456-9460 (1988).
6. Okuda, A., Imagawa, M., Maeda, Y., Sakai, M. & Muramatsu, M. *J. Biol. Chem.* **264,** 16919-16926 (1989).
7. Okuda, A., Imagawa, M., Sakai, M. & Muramatsu, M. *EMBO J.* **9,** 1131-1135 (1990).
8. Imagawa, M., Osada, S., Koyama,Y., Suzuki, T., Hirom, P. C., Diccianni, M. B., Morimura, S. & Muramatsu, M. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **179**, 293-300 (1991).
9. Imagawa, M., Osada, S., Okuda A. & Muramatsu, M. *Nucl. Acids Res.* **19**, 5-10 (1991).
10. Osada, S., Daimon, S., Ikeda, T., Nishihara, T., Yano, K., Yamasaki, M. & Imagawa, M. *J. Biochem.* **121,** 355-363 (1997).
11. Hattori, M., Hidaka, S. & Sakaki, Y. *Nucl. Acids Res.* **13**, 7813-7827 (1995).
12. Kishore, G. M. & Shah, D. M. *Annu. Rev. Biochem.* **57**, 627-663 (1988).
13. Drew, P. D., Nagle, J. W., Canning, R. D., Ozato, K., Biddison, W. E. & Becker, K. G. *Gene* **159,** 215-218 (1995).
14. Arakawa, H., Nagase, H., Hayashi, N., Ogawa, M., Nagata, M., Fujiwara, I., Takahashi, E., Shin, S. & Nakamura, Y. *Cytogenet. Cell Genet.* **70,** 235-238 (1995).
15. Chen, C. & Okayama, H. *Mol. Cell. Biol.* **7,** 2745-2752 (1987).
16. Bradford, M. M. *Anal. Biochem.* **72,** 248-254 (1976).
17. Cook, T., Gebelein, B., Belal, M., Mesa, K. & Urrutia, R. *J. Biol. Chem.* **274**, 29500-29504 (1999).
18. Sogawa, K., Imataka, H., Yamasaki, Y., Kusume, H., Abe, H. & Fujii-Kuriyama, Y. *Nucl. Acid Res.* **21,** 1527-1532 (1993).
19. Kojima, S., Kobayashi, A., Gotoh, O., Ohkuma, Y., Fujii-Kuriyama, Y. & Sogawa, K. *J. Biochem.* **121,** 389-396 (1997).
20. Anderson, K. P., Kern, C. B., Crable, S. C. & Lingrel, J. B. *Mol. Cell. Biol.* **15**,

5957-5965 (1995).
21. Yet ,S.-F., McA'Nulty, M. M., Folta, S. C., Yen, H.-W., Yoshizumi, M., Heish C.-M., Layne, M. D., Shin, M. T. Wamg, H., Perrella, M. A., Jain, M. K. & Lee, M.-E. *J. Biol. Chem.* **273,** 1026-1031 (1996).
22. Garrett-Sinha, L. A., Eberspaechaer, H., Seldin, M. F. & Crombrugghe, B. *J. Biol. Chem.* **271,** 31364-31390 (1996).
23. Hanas, J. S., Gaskins, C. J., Smith, J. F. & Ogilvie, M. K. *Prog Nucl. Acid Res. Mol. Biol.* **43,** 205-329 (1992).
24. Geiduschek, E. P. & Tocchini-Valentin, G. P. *Annu. Rev. Biochem.* **57,** 873-914 (1980).
25. Shastry, B. S. *Experientia* **49,** 831-835 (1993).
26. Osada, S., Matsubara, T., Daimon, S., Terazu, Y., Xu, M., Nishihara, T. & Imagawa, M. *Biochem. J.* **342,** 189-198 (1999).
27. Rupp, R. A. W., Kruse, U., Multhaup, G., Göbel, U., Beyreuther, K. & Sippel, A. E. *Nucl. Acid Res.* **18,** 2607-2616 (1990).
28. Kruse, U., Qian, F. & Sippel, A. E. *Nucl. Acid Res.* **19,** 6641 (1991).
29. Qian, F., Kruse, U., Lichter, P. & Sippel, A. E. *Genomics* **28,** 66-73 (1995).
30. Osada, S., Ikeda, T., Xu, M., Nishihara, T. & Imagawa, M. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **238,** 744-747 (1997).
31. Cao, Z., Umek, R. M. & McKnight, S. L. *Genes Dev.* **5,** 1538-1552 (1991).
32. Descombes, P., Chojkier, M., Lichtsteiner, S., Falvey, E. & Schibler, U. *Genes Dev.* **4,** 1541-1551 (1990).
33. Poli, V., Mancini, F. P. & Cortese, R. *Cell* **63,** 643-653 (1990).
34. Williams, S. C., Cantwell, C. A. & Johnson, P. F. *Genes Dev.* **5,** 1553-1567 (1991).
35. Chang, C. J., Chen, T. T., Lei, H. Y., Chen, D. S. & Lee, S. C. *Mol. Cell. Biol.* **10,** 6642-6653 (1990).
36. Roman, C., Platero, J. S., Shuman, J. & Calame, K. *Genes Dev.* **4,** 1404-1415 (1990).
37. Nishizawa, M., Wakabayashi-Ito, N. & Nagata, S. *FEBS Lett.* **282,** 95-97 (1991).
38. Kinoshita, S., Akira, S. & Kishimoto, T. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89,** 1473-1476 (1992).
39. Kageyama, R., Sasai, Y. & Nakanishi, S. *J. Biol. Chem.* **266,** 15525-15531 (1991).
40. Ron, D. & Habener, J. F. *Genes Dev.* **6,** 439-453 (1992).
41. Fornace, A. J. Jr, Nebert, D. W., Hollander, M. C., Luethy, J. D., Papathanasiou, M., Fargnoli, J. & Holbrook, N. J. *Mol. Cell. Biol.* **9,** 4196-4203 (1989).
42. Osada, S., Takano, K., Nishihara, T., Suzuki ,T., Muramatsu, M. & Imagawa, M. *J. Biol. Chem.* **270,** 31288-31293 (1995).