

# 生化学部門

## Department of Biochemistry

当部門では教授の定年退官（平成元年3月）を勘案し、昭和62年度、63年度には大学院生を受け入れなかった。前報以降の人事移動は以下の通りである。

助手	藤吉利信	昭和62年 6月	鹿児島大学医学部配置換
	古市正人	同 8月	生化学部門助手に就任 現在に至る。
	高橋慶吉	昭和63年 4月	国立精神神経研究所室長 に配置換
	荒木和男	同 4月	生化学部門助手に就任
		同 10月	国立養殖研究所に配置換

昭和59年度入学の大学院生市吉裕二、上野孝毅、野替一郎は昭和63年度3月課程修了し、学位取得、市吉は母教室（二外科）に戻り、上野はNCIに留学、野替はWashington大学に留学中である。昭和60年度入学の後藤公宣および昭和61年度入学の松口徹也は平成元年3月課程を修了し、学位取得後、それぞれの母教室（三内科および一内科）に戻る。現在はそのほかに池尻公二（昭和60年度入学）、藤也寸志、中島秀彰、中牟田誠、高楓（以上昭和61年度入学）の4人の大学院生が在学中であるが、何れも単位は取得し、それぞれ欧文誌に投稿した。既に半数は受理されている。従ってほとんどの大学院生は教授退官後の平成元年4月以降学位審査を申請するはこびになっている。

当部門の主要研究テーマは発癌機構の解析である。細胞の癌化に伴っておこる遺伝子発現の異常の解析から、逆行性に癌化の本質にせまろうというのが基本戦略である。この様な観点からここ数年来癌組織で発現が強く誘導され、正常組織には殆ど発現の見られない遺伝子の分離、同定を行ってきた。その結果、分離されたクローンのうち約半数が反復配列由来のクローンからなり、残りが単一遺伝子からなることが我々の研究から明かとなった。更に前者は内在性レトロウイルスがその実体であることを明らかにすることができた。そこで昭和62年度、63年度はこの問題の更なる解析と、同定された遺伝子クローンのうち特にr I GF II 遺伝子に焦点を絞って研究を進めた。又新たに、同じく癌で発現が誘導される遺伝子としてrL - ALP 遺伝子を取りあげその構造解析を行なった。一方、正常肝で豊富に発現し肝癌で発現が強く抑制される遺伝子クローンのうち、 $\alpha 2u$ グロブリン遺伝子とラットカタラーゼ遺伝子を取りあげその構造解析を行なった。

### A. 癌で特異的に発現の高い反復配列由来のクローンの解析

ラット内在性レトロウイルスの分離と同定

RALは癌で豊富に発現している配列として見出されたもののうち、中頻度反復配列に属するもので、

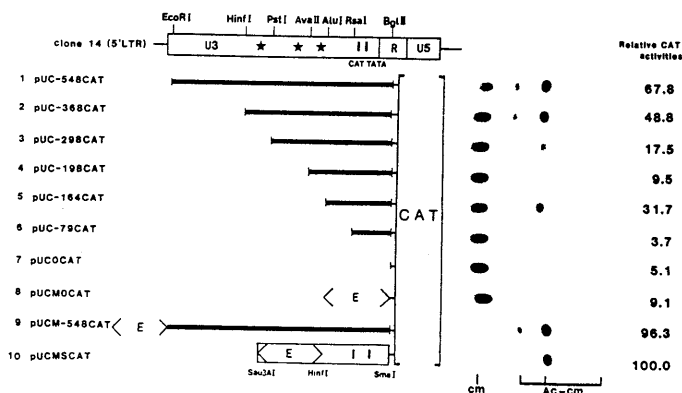
これまでに知られていない配列を含むレトロウイルスLTR様構造を持っていた (年報 vol. 2)。解析したクローンのRALには solitary type だけでなく、3' 側にレトロウイルス構造と同様 primer binding site 及び gag, pol に相同な領域を持つものが存在したので、RALは本来内在性ウイルスに由来するものと考えられた。

そこで、本構造の全容を解明すべく少なくとも2個のRALをもつクローンを多数分離しその内最長のユニット構造を持つクローンを1つ選びその全塩基配列を決定したところ、約7300bpよりなるレトロウイルス様の構造あることを確認した。しかし、gag, pol, およびenvに対して部分的相同性はあるものの、長いorfは存在せず、欠損株であると考えられた(1)。しかしある系の腹水肝癌上清中には逆転写酵素活性を持つ粒子化した画分が存在しこれより抽出したRNAサンプルはRALと強い相同性を示すことから多数のゲノムの内のいくつかのpol及びenvは活性型である可能性が高い (山本他論文準備中)。他のクローンの部分的な塩基配列解析の結果、gag - pol - envのウイルス構造体領域はほぼ同一なのにLTR部分に著しい変化が存在することも見いだした (高橋他論文準備中)。これらはこのクラスの内在性レトロウイルスの成立ちを考える上で手がかりを与えるものと考えられ興味深い。次にこの遺伝子群の癌特異的転写のメカニズムを探るため機能的解析を試みた。図1は、RALの種々のU3フラグメントについてCAT遺伝子と連結して行ったCATアッセイの結果を示している。これによりRALはポジティブコントロールpMSVCAT (Moloney MuSVのエンハンサー、プロモーターをCATに連結したもの) 100に対して、約80という十分につよいプロモーター活性を有していることがわかった。また、EcoRI - PstI間に正に作用するcisエレメントが、Ava II - Alu Iの間には弱いながらも働くcisエレメントが存在することが示唆された。

これらが癌特異的発現に関与するのか更にトランス因子などは今後調べなければならない。

いくつかの内在性ウイルスの活性化には、脱メチル化が関与していることが示唆されている。RALについても、癌細胞においては正常細胞に比し強い脱メチル化特に5'LTR領域に脱メチル化が起こっている(1)、メチル化・脱メチル化の関与も考慮しなければならないだろう。

fig.1 Transient expression of CAT gene in AH60c cells



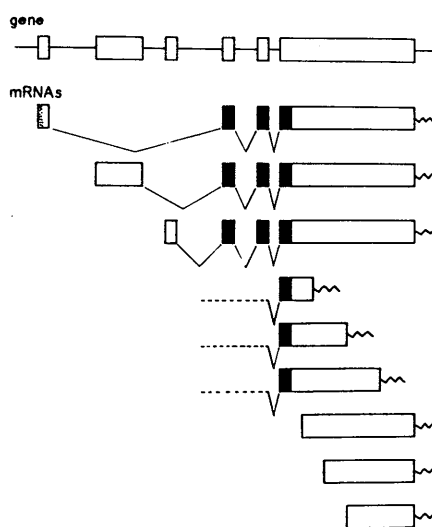
## B. 癌で発現の高い単一遺伝子の分離、同定

### 1. ラットインスリン様増殖因子 (rIGFII) 遺伝子の構造と発癌

癌で転写の高まっている mRNA の内 pAH64 と名付けた cDNA クロームは塩基配列決定の結果、報告にあるヒト IGF II に相同性が見られ r IGF II 遺伝子由来であることが想像された。プライマー伸長法により cDNA の全長鎖に近い産物を分離分析したところ 5' 末端部が一定の部位を境として 3 種類の全く異なる配列につながるということが明かとなった。E1, E2 及び E3 と名付けたこれらは異なる 3 つの転写開始部位に由来すると考え確認のためゲノム遺伝子を分離しこの地図上にそれぞれをマップし、S1 ヌクレアーゼ及びプライマー伸長法で 5' 末端を決定し全く独立した転写単位であること、更にその上流領域の構造よりこれらが独自のプロモータを有する択一的に利用されるリーダーエキソンである可能性を示した。ただ残念なことに論文準備中に r IGF II に 2 つのリーダーエキソン (我々の E2 及び E3 に当たる) の存在が他の 2 つのグループにより見出され同時に発表されたため、我々は E1 の存在についてのみ報告を行なうことになってしまった(2)。この様に 3 つのリーダーエキソンを有する単一遺伝子は当時非常に珍しく当然発現パターンの解析が次なる課題となった。pAH64 は単離された時点から癌胎児性発現を示すことを明かにしていたし、又癌胎児性蛋白質の多くに共通する性質として成体の脳にも発現が見られる事から、先ず胎児、新生児各組織及び脳に於ける 3 つのリーダーエキソンの利用をそれぞれ特異的プロンプを用いて測定した。興味深いことにこれらは E3 > E2 > E1 の順にどの正常組織に於いても発現パターンはほぼ一定しており、これら 3 つのプロモーターは正常組織内ではかなり厳密に調和して制御されていることが想像された。これら 3 つのプロモーターはそれぞれかなり異なる構造をもっていることから、この調和的制御には単純な塩基配列の 1 次構造でなくより高次のレベルによる制御機構の存在が推測される(3)。ところがこの協調的制御は癌になると非常に異なるパターンを示した。即ちある系では正常パターンを保持しているものの他の系では E1 活性が高かったり、又別の系では E2 が強調され E1, E3 が非常に押えられていた。更に 3 つとも全く発現しないという系迄存在しており、これから癌になると正常細胞に見られた協調的制御は失われ、むしろ独立した制御を受けていると考えられた。この様に r IGF II の 3 つのリーダーエキソンのプロモーターは協調的にも独立的にも制御され得ることが示された(3)。現在まで同一もしくは類似の蛋白質を生産するのに 2 つ以上のプロモーターを有する遺伝子がいくつか知られているが、これらのプロモーターはほとんどそのいずれかがその蛋白質を必要とする組織に特異的にもしくは発生時期に特異的に発動され、r IGF II の様に同時に一定の比率をもって発現されるという例は見られない。無駄に思われるこの発現パターンの多様性の意味もしくは意義については現在のところ全く不明である。r IGF II は正常成体組織では脳神経系を除いて殆ど発現が見られないのに確立された多くの癌の系列では発現されている。近年オンコジンの多くが増殖因子のシグナル伝達系路上の産物と考えられるようになり、実際増殖因子そのものもオンコジンたり得ることが sis その他で明らかになっている。我々は r IGF II の肝癌発生における関与を調べるため肝特異的発癌化合物 3' MeDAB をラットに投与し経時的に肝を摘出、r IGF II の発現を上記 3 つのリーダーエキソン特異的プロンプを用いてそれぞれ定量的に測定した。投与開始約 6 週間で

はごく小さな過形成結節が点在するのみであり、アルブミン合成等は殆ど影響を受けていないのにr I GF IIの合成は少量ながら出現し始めていた。この発現は投与期間の長さと共に漸増し9週では3つのプロモーター共再活性化していることが明らかであった(4)。又20週を越えるあたりから肝癌が生じてくるが、例外無く非常に高いr I GF IIの転写が見られた。しかしながら発現パターンはE1が強いもの、E2が強いもの、E3が強いもの、又いくつかのコンビネーションといくつかの型があり、癌塊のクローナルな増殖を示唆した。この様にr I GF IIと肝癌発生とは強い相関が有るように見えたが、確立された肝癌系のなかには全くr I GF II発現の無いものも存在し、一旦癌が成立してしまっただ後はもはやr I GF IIはその状態の維持には必ずしも必須でないと考えられる。r I GF IIはラット肝発癌に於けるオンコジンの役割を持っているのかも知れない(4)。我々はr I GF II mRNAの構造を5'末端迄完全に明らかにした。5'端は上記のごとく非常に特殊なアレンジメントを有していたが3'端も更に複雑な構成を示した。即ち3'端を含むエクソンE6は単一の3kb以上にわたる巨大なものであった。r I GF II転写の特徴として産物が長さの多様性を持つことが挙げられるがこれは主としてE6内で主要な3'末端より上流でポリA付加がおこなわれることによるということを示す様々な部位特異的プローブを用いたノーザンブロット及びS1ヌクレアーゼ反応により明らかにした(5)。r I GF II mRNAは3'非翻訳部が約3kbにも及ぶ構造を持つが、この非翻訳部が単にmRNAのサイズ多様性を生じさせるためののみ存在するとは考えられない。実際このエクソンをいくつかに分割しそれぞれプローブとしてノーザンブロットを行なうと3'末端に近い部分を用いた時に全体のノーザンパターンが大きく変化し、新たに1.8kbのバンドが生じることが分かった。これは上流のイントロンを含むいかなる部位に由来するプローブや3'側のr I GF II外部を用いても検出されないことから、E6の3'側のみを含むRNA種であることが考えられた。プライマー伸長法及びS1ヌクレアーゼ反応によりこのRNA種の5'末端は確かにE6の内部に存在することが明らかにされ、更にこの上流域の塩基配列が真核細胞プロモーターのいくつかの特徴を備えていることから、このRNA種はE6内に局限する独立した転写単位に由来すると考えられた(6)。このRNAは主要なr I GF II mRNAと同一鎖より転写されr I GF IIが発現される組織では多かれ少なかれ検出できることから、r I GF II転写もしくは作用の制御に関わるのではないかと想像している。このRNA種はr I GF IIペプチドは全くコードできず又自身のコード能も非常に短いことが配列から明らかであった(6)。同時期に非常に似た遺伝子配列を有するヒトI GF IIの最終エクソンからも同様の1.8kbRNA種が産生されることが他のグループにより明らかにされこのRNA

fig.2 Complex transcription units of rIGFII

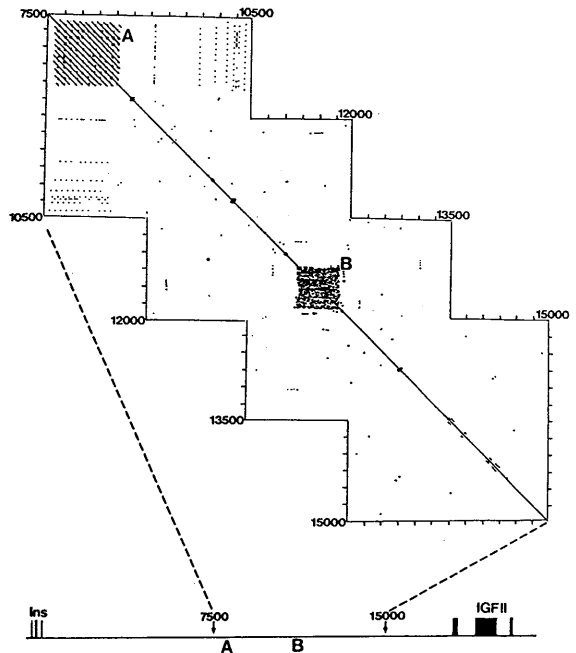


種存在の必然性が示唆された。図2に我々が明らかにしたr I GF II転写の多様性をシェーマ的に示す。

さてr I GF IIはH - ras, Insulin 遺伝子の下流に隣りあって存在し、Insulinとは全体的構築、ペプチド及び生物活性の類似により遺伝子複製によって生じたと考えられている。我々はこの名残りを遺伝子配列上に見出すため及びr I GF II 遺伝子全体の構造及びその特徴を明らかにするため、Insulinを含むr I GF II全領域36kbの塩基配列を決定することにした(7)。これら2つの遺伝子はわずか数十kbをへだてて存在しており、遺伝子間配列が完全に明らかにされた例は殆どなく、今迄ともすれば無視されてきたこの領域の機能を探る上からも大切なことだと考えられた。Insulinとr I GF II 遺伝子の塩基配列上の類似性は殆ど存在せずペプチド上にわずかに残っているのみであった。

従ってこれらの複製は太古に起こったことは明らかである。遺伝子間にはAluやID等の既知の反復配列の他に予想外のタンデムに連なった色々なサイズの反復配列が存在していた。例えば24bユニットが3回反復したもの、60bユニットの2回反復、12~15bユニットの43回反復、更に、約100bのユニットが12回反復したもの等々である。これらはその反復性の故、例えば約500bpの領域に27個もの制限酵素AatI siteが生じることにもなる。遺伝子は長い期間のうちに主として点突然変異を蓄積しながら進化していくと考えられているようだがr I GF II領域の解析で明らかになった様に部分的な色々なユニットサイズの多重化によりずっとダイナミックに動いているように見える

fig.3 Harr plot of Ins/rIGFII gene region



(7)。図3にInsulin - r I GF II 遺伝子間領域の一部のハープロットを示す。部分的重複が明らかである。更に全遺伝子領域をカバーすることができたので、これらの部分を用いて種間における相同性の保存についてサザンハイブリ及びデータバンクに登録してある主としてヒトのIGFII領域との比較を行った。マウスにおいては用いた全てのラット遺伝子領域でクリアなバンドが得られ、これら2者に於けるIGFII領域の相同性の高さを示した。ところがウサギではIGFペプチドをコードする領域以外では殆どハイブリせず同じげっ歯でありながらかなりの変化を受けていることが考えられた。一方ヒトではペプチド部以外にも2、3の箇所では相同性のある場所が存在しウサギにおける結果と比較し意外であった。このヒトとの相同性のある部分は興味深いことにヒトでのみ転写されることが証明されているエクソン部分であった。この内ヒトエクソン2に相当する配列はラットでも80%以上の相同性を持ち良

く保存されていたが、エクソン3相当部は上述の43回反復により中央部が破壊されていた。又これら2個のエクソンのリーダーエクソンに当たるエクソン1配列はラットには全く存在せずこのエクソン1-エクソン2-エクソン3という転写系がラットでは作動し得ないことは明らかであった(7)。一方ラットにおいて我々がその存在、構造及び転写特異性を明らかにしたエクソンE1(2)は発表以来約1.5年になるが、他研究室からの確認報告は私信、論文両面から未だなされていない。我々はE1に特異的なプローブを用いてヒト、マウスに相同配列を確認しゲノム遺伝子をクローンし塩基配列を決定し比較した。ヒトではあまり相同性が高く又ノーザンでもこの転写産物を確認していないので実際ヒトでこの転写系が活性なのかどうかは不明である(池尻他論文準備中)。又マウスでは95%以上の相同性がありノーザンにおいても明確なバンドを生じるため、ラット同様この転写系が活発に働いていることは明らかであった(池尻他投稿準備中)。

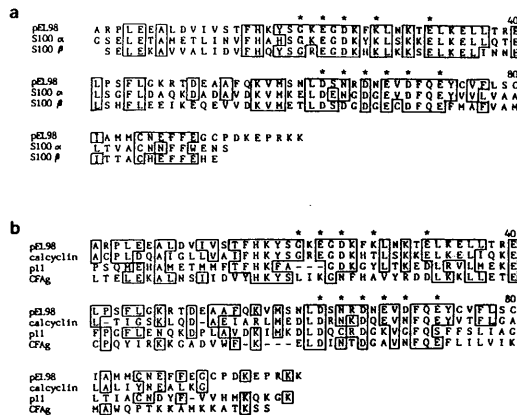
r I GF IIの研究はこの様に構造解析を中心としてなされれば全面的に明かとなったが、ペプチド自身はいくつかのヒト癌に高く表現されていることが示されており今後発癌に於ける意義等機能的側面を調べたい。

## II. 細胞の不死性獲得に関連した遺伝子発現：S-100類似蛋白質遺伝子の解析

細胞癌化における最初期段階には、不死性獲得という基本ステップが存在すると考えられる。このステップについての知見は、癌化の機構を解明する上で大きな手掛かりを与えるものと期待される。

この観点からマウス線維芽細胞とその不死性を獲得したBalb/c3T3培養細胞との比較において後者に量的増加のあるmRNAの存在を期待しBalb/c3T3由来のcDNAライブラリーを分別的ハイブリによりスクリーニングしたところ4個のcDNAが単離できた。これらのうち、クローンpEL98の塩基配列を決定し、解析した結果、コードされる遺伝子産物がカルシウム結合タンパク質S-100に類似することを見出した。図4はそのタンパク質とS-100およびS-100関連タンパク質とのホモロジーを見たものである。EF-hand構造を持つ2個のカルシウム結合部位(\*はカルシウム結合に関与す

fig.4 Amino acid sequence comparisons



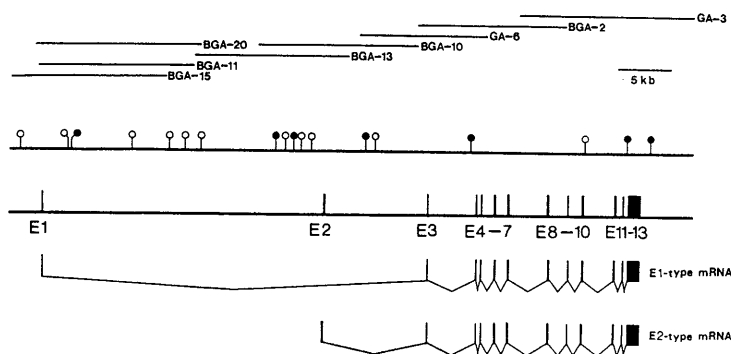
るアミノ酸を示す) および近傍に高いホモロジーが見られる(8)。

さらに、このcDNAを、SP6プロモータを利用して人工的に転写させて調製したRNA、およびハイブリセレクト法により調製した細胞RNAとをin vitroで翻訳させたところ、いずれのRNAを用いた場合にも、等電点5.4、分子量12,000のタンパク質が検出され、塩基配列から予想される産物とほぼ一致することが明らかになった(9)。現在は、HeLa細胞に相同配列の発現が認められたので、このcDNAの解析と、マウスゲノム遺伝子の解析を行っている。細胞の分化、増殖に関連してS-100様タンパク質をコードする遺伝子の発現が見出されており、本遺伝子も細胞の分化・増殖更には癌化に深く関わっているものと考えられて興味深い。今後遺伝子導入による、初代培養細胞の不死化やトランスジェニックマウスの作製等の問題に取り組むことができるものと期待される。

### III. ラット肝型アルカリフォスファターゼ (rL-ALP) 遺伝子

ALPはある種の癌で高く発現され臨床的にマーカーとして用いられている。しかるにその蛋白質は多形性が非常に高く、近年迄その遺伝子はコピー数すら定かでなかった。最近いくつかのグループによりcDNAが分離され蛋白質構造が明らかになるにつれ、いくつかの独立した遺伝子の存在が確定した。福岡大生化学池原グループは以前よりrL-ALPに関する研究を行ってきたが、最近cDNAの分離に成功した。我々は共同研究として更なる解析、ゲノム遺伝子の構造決定等を行ない興味ある知見を得た。cDNAライブラリーから新たに約50個の全長鎖に近いクローンを分離し制限酵素地図を作製したところ、部分的に不一致のあることを見出した。これらは主としてクローンの両側に存在し中央部分は完全に同一であるように見えた。これらの塩基配列を決定したところ5'末に近い領域が、上述rIGFIIで見られたような2種類の異なる配列に分類されることが明らかとなった。これら2つをそれぞれE1及びE2と名付けそれぞれの部分のみを含むプローブを作製し得られた50個のcDNAクローンとの分別的ハイブリを行なったところ、一方のプローブと反応するものは他方とはせず完全に二者択一的であった。出現頻度は約3対1であり又ノーザンにおいてもほぼ同じ長さの場所に同様の量比でバンドを生じたことから、これらはやはり独立したリーダーエクソンをなすものと考えた(10)。ポリA付

fig.5 Gene and mRNA structures of the rat liver ALP



加部は少なくとも2か所あることも明かとなった。このような複雑な構造はそれ迄のいかなる ALP 遺伝子にも報告されておらず、これら2つのリーダーエクソンの制御機構にも興味があるためゲノム遺伝子の構造解析を行なうことにした。cDNAをプローブとして約20個のゲノムクローンを得たが、これらはラットゲノムの約70kb領域をカバーするものであった。塩基配列決定の決果、rL-ALPは13個のエクソンよりなることがわかった。特徴的なことは2つのエクソンE1、E2がALPペプチドをコードする領域よりはるかに離れて存在したことでE1-E3間は約36kb、E2-E3間でも約10kbのイントロンをはさむことになる。E1、E2がリーダーエクソン、即ち独立した転写開始部位を持つことを示すため、5'最末端をS1ヌクレアーゼ反応、プライマー伸長法で決定し、更にこの領域を含む断片をCAT遺伝子上流に組み込みプロモーター活性を確認した(11)。これらの解析によりrL-ALPは全長約55kbにわたる2個のリーダーエクソンを有する単一遺伝子であると結論した。図5に明らかになったrL-ALP遺伝子とmRNA生成パターンをシェーマ的に示す。又他のいかなるALP遺伝子にも複数のリーダーエクソンの存在は報告されていないため我々はヒトとマウスにE2のアナログをさがすことにした。マウスではゲノム上に非常に相同性の高い領域が存在し同様のリーダーエクソンが存在することは疑いない。(藤他投稿準備中)。一方ヒトではサザンにおいてもゲノムライブラリーのスクリーニングにおいてもE2アナログは見出せず、もし存在したとしてもかなり変化した塩基配列を有することが想像された。実際ヒト肝ALPの解析を行なっているグループよりの私信で、cDNAの5'端にE1型と全く異なる配列が低頻度ながら存在することに以前より気付いていたことが知らされ、ヒトとラットの肝型ALP遺伝子の全体的構築の類似性に更なる支持を与えた。

## C. 癌で発現が抑制される遺伝子

### 1. $\alpha$ 2uグロブリン遺伝子ファミリー

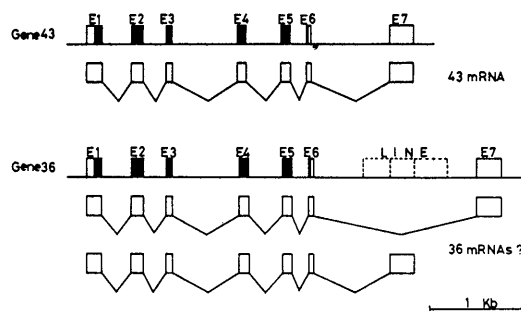
細胞癌化により発現が抑制される遺伝子がある。これらも癌における遺伝子発現の特異性を明らかにするに際し重要な知見を提供すると考えられる。幸運に恵まれれば癌抑制遺伝子に遭遇する可能性もあるだろう。このような考え方の下に我々は正常肝と肝癌による分別的スクリーニングを行ない正常肝に特異的ないくつかのcDNAクローンを得た。その内の1つのクローンは解析の決果、 $\alpha$ 2uグロブリンであることが判明した。これ自身の機能は不明であるがいくつかのグループにより既に多くの遺伝子レベル、蛋白質レベルの研究がなされている。即ち遺伝子は約25個の非常の類似したファミリーより成り蛋白質は主として成体雄ラットの肝で複雑なホルモン制御下にいくつかのファミリーメンバーより合成されるが、他のメンバーのいくつかは唾液腺等でホルモンに無関係に転写を受けるとされている。我々は肝で転写活性のあるメンバーの数を推測するためcDNAクローンの塩基配列を決定した。前もって作成した制限酵素地図によると少なくとも4種類が存在するかに見えた。これらのアラインメントをとってみると塩基配列としては2種類存在することが分かった。ただしそれぞれの配列群に第6イントロンの5'末端由来の25bを余分に持つものとそうでないものが存在していた。これらは第6イントロンのスプライス供与部の択一的選択によって生じたことは明かで、しかも2種類の遺伝子に同様



な現象が見出されたことは機能的必然性を考えさせる。short型とlong型の比は約30:1で圧倒的にshort型が多いがこれはlong型mRNAの不安定性によるものではないことが $\alpha$ 2uグロブリン合成の出現時においても、又エストロゲン投与による消失時においてもその比に差が無いこと等により示された(12)。次に肝型遺伝子を約50個程分離し数個について全構造を明らかにした。これらのうちクローン43と36は5'非転写部に至る迄お互い90%以上の相同性を有し、プロモーター部もほぼ同一、グルココルチコイド反応性要素(GRE)も報告にあるコンセンサス配列とほぼ同一、又所々に点突然変異は存在するもののペプチドをコードする部分は完全に同一の長さを示し双方とも活性遺伝子としての資格を充分備えているように見えた。ただクローン36のイントロンには約900bの無関係の配列が挿入されておりその両端は16bの完全な直接反復により囲まれていた。このことはこの配列が動く遺伝子であることを示唆し、実際、塩基配列よりLINE1であることが明かとなった。このLINE1は3'末端約150bが3回繰り返すという奇妙な構造を持っておりその生成過程に興味を持たれた。全体が直接反復で囲まれているのでこの3回反復が $\alpha$ 2uグロブリン遺伝子に挿入される以前に起こったことは明らかである。

更にこのLINE1の中にはスプライス受容部と完全に一致する配列を中央部に有しその下流に多数のポリA付加部位を持つためこの部分をスプライスにより受け入れてしまう可能性がある様に見えた(13、図6)。もし実際の様なキメラ分子が生じるなら遺伝子進化における動く遺伝子の機能に対する

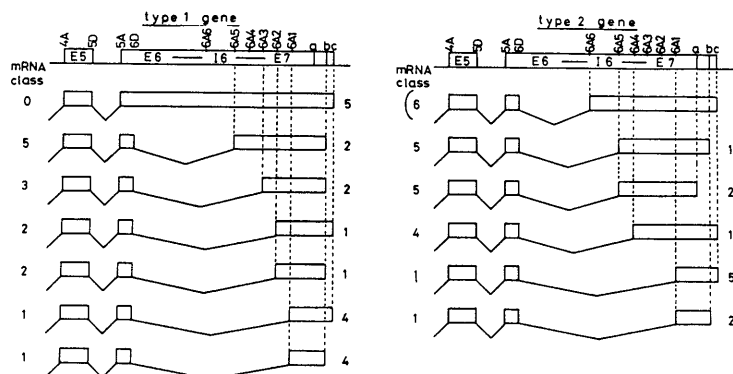
fig.6 Possible transcription/splicing patterns in the liver



1つの大きな示唆を得ることになる。

$\alpha$ 2uグロブリン遺伝子ファミリーのあるメンバーは前述の如く唾液腺その他の排泄臓器においてホルモン非依存性に合成される。異なる転写制御を受ける相同遺伝子の構造的特徴を明らかにするため唾液腺型遺伝子も調べることにした。先ず唾液腺のcDNAライブラリーを作製し肝型cDNAを用いてスクリーニングを行なった。約50個のクローンを分離しその内30個の全長鎖に近いクローンの全塩基配列を決定した。これらの配列は大きく2つのtypeに分類されたが驚いたことにそれぞれのtype内で非常に多様な長さの違いが存在した。即ち第6エキソン-第6イントロン-第7エキソン部における少なくとも6か所のスプライス受容部である。更に約5分の1のクローンは第6イントロンを全てcDNA内に含んでおりそのためこの産物は異常に長くなっていた。この産物が実際安定なRNAとして臓器に存在していることは第6イントロン特異的プローブを用いたノーザンプロットで2kbのバンドのみ、又

fig.7 Transcription/splicing in salivary glands



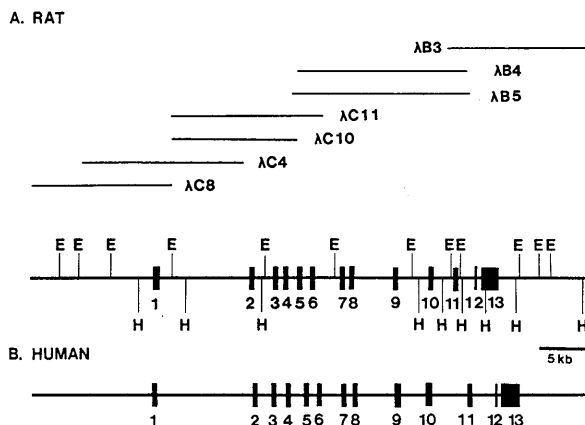
この部を持たないcDNAプローブを用いた反応で1.2kbと2kbの2つのバンドを生じることより明らかであった(14)。図7にcDNA解析によって得た結果をスキーム的にまとめて示すがこれ程多様なスプライス受容部が1つのイントロン内に存在し1つの臓器で頻度の差はあれ同時に利用されているという例は我々の知る限り現在まで報告を見ない。唾液腺型ゲノム遺伝子は肝と唾液腺のcDNAを比較し最も違いの大きい部位を見つけそれぞれ27merの合成ヌクレオチドを合成し唾液腺特異的のプローブに反応するもの6個を得た。肝型遺伝子と唾液腺型の比は約5対1であった。これ等のうち2個の塩基配列を完全に、他を部分的に決定した。クローンGF4はプロモーター、エキソン、イントロン等の構造は肝型のそれに非常に類似し活性型遺伝子としての特徴を備えていた。一方クローンA2u42は第2イントロンの5'端のGがTに変異しておりスプライス供与部としてのコンセンサスをなしていなかった。このため直ぐ下流に枠内ノンセンスコドンが生じペプチドが停止するという構造を形成していた。又この遺伝子は5'上流も約100bあたりより上流は通常の $\alpha$ 2uグロブリン遺伝子に見られる構造と全く関係のない構造が存在し遺伝子の再配列が行なわれたことを疑わせた。これらよりこの遺伝子は唾液腺型の偽遺伝子であると考えている(15)。クローンGF4上流には肝型遺伝子に見られるGREと非常に良く似た構造が存在しているがGRE活性に必須とされる部位のhexamer反復が点突然変異により破壊されていた。又クローンA2u42ではGREは遺伝子再配列により完全に失われていた。これらは唾液腺型遺伝子のホルモン非反応性に説明を与えるものであり構成的合成能獲得のためのメカニズムも突然変異と再配列の少なくとも2つの方法があることを示す(15)。現在何故のスプライス多様性かについて機能面からのアプローチを試みるべく思索をめぐらしている。この遺伝子に見られる多様性がスプライス供与部選択(12)、受容部選択(14)、LINE1挿入(13)と全て第6イントロン部に集中し観察される理由も興味深い。

## II. ラットカタラーゼ遺伝子

カタラーゼも担癌状態で著しく産生量が低下する。今春限りで当生化学部門を定年により退官する遠藤が30年以上も前に研究生生活に入った時に中原和郎の指揮下に鋭意遂行中のテーマでもあった。現在に至るもこの低下のメカニズムは解明されていない。近年信州大学生化学橋本グループにより

cDNAが分離されたので我々は共同研究としてゲノム遺伝子の構造解析を行なうことにした。cDNAをプローブとしてゲノムライブラリーをスクリーニングし約50kbの領域をカバーする16個のクローンを得た。エキソン部分をすべて解析し遺伝子全構造を明らかにした。全長は約33kbでありヒトカタラーゼ遺伝子と良く似た構成を持っていた(16, 図8)。5'末端は例によってS1ヌクレアーゼ反応とプライマー伸長法により決定した。転写開始部位は少なくとも8か所存在している様に見えた。この上流域の配列にはTATA様構造が見られずこのため転写開始点に厳密さが失くなるのかもしれない。同様のプロモーター構造は他のいくつかのリソゾーム酵素遺伝子にも見られ特徴の1つと考えられる。この複数の転写開始点が独立に制御されているか、または一括して制御されているかを調べるため担癌状態でカタラーゼの低下している状態との比較を行なったところ全ての開始点からの転写が同一比率で低下していることが分かり一括して制御されていることが考えられた。又この実験は担癌時におけるカタラーゼの低下は転写の低下によるということも示した。現在正常、担癌及び癌細胞からの抽出成分を用いて転写制御機構を明らかにすべく実験を行ないつつある。

fig.8 Genomic organizations of catalase genes



## 業績目録

### 原著論文

1. Nakamuta M., Furuichi M., Suzuki N., Takahashi K., Endo H., and Yamamoto M., : 1989  
Isolation and characterization of a new family of a rat endogenous retroviral proviruses. *Virus genes*, in press.
2. Ueno T., Takahashi K., Matsuguchi T., Endo H., and Yamamoto M., : 1987  
A new leader exon identified in the rat insulin-like growth factor II gene. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 148, 344 - 349

3. Ueno T., Takahashi K., Matsuguchi T., Endo H., and Yamamoto M., :1988  
Transcriptional deviation of the rat insulin – like growth factor II gene initiated at three alternative leader – exons between neonatal tissues and ascites hepatomas. *Biochim.Biophys. Acta* 950, 411 – 419
4. Ueno T., Takahashi K., Matsuguchi T., Ikejiri K., Endo H., and Yamamoto M., :1988  
Reactivation of rat insulin – like growth factor II gene during hepatocarcinogenesis. *Carcinogenesis* 9, 1779 – 1783
5. Ueno T., Takahashi K., Matsuguchi T., Ikejiri K., Endo H., and Yamamoto M., :1989  
Multiple polyadenylation sites in a large 3' – most exon of the rat insulin – like growth factor II gene. *Biochim. Biophys. Acta*, in press.
6. Matsuguchi T., Takahashi K., Ueno T., Endo H., and Yamamoto M. :1989  
A novel transcription unit within the exon sequence of the rat insulin – like growth factor II gene. *Biochem. Internat.* 18, 71 – 79
7. Ikejiri K., Ueno T., Matsuguchi T., Takahashi K., Endo H. and Yamamoto M. :1988  
Structural analysis of the entire insulin – like growth factor II gene region of the rat and interspecific comparisons. *J. Mol. Evol.*, submitted
8. Goto K., Endo H. and T. :1988  
Cloning of the sequences expressed abundantly in established cell lines: Identification of a cDNA clone highly homologous to S – 100, a calcium binding protein. *J. Biochem.* 103, 48 – 53
9. Goto K. and Endo H. :1989  
In vitro translation of a calcium binding protein mRNA preferentially expressed in immortalized cell lines. *Biochem. Internat.*, in press.
10. Toh Y., Yamamoto M., Endo H., Fujita A., Misumi Y. and Ikehara Y. :1989  
Sequence divergence of 5'extremities in rat liver alkaline phosphatase mRNAs. *J. Biochem.* 105, 61 – 65
11. Toh Y., Yamamoto M., Endo H., Misumi Y., and Ikehara Y., :1989 Isolation and characterization of a rat liver alkaline phosphatase gene : A single gene with two promoters. *J. Eur. Biochem.*, in press.
12. Ichiyoshi Y., Endo H. and Yamamoto M. :1987  
Length polymorphism in the 3'noncoding region of rat hepatic  $\alpha 2u$  – globulin mRNAs. *Biochim. Biophys. Acta* 910, 43 – 51
13. Yamamoto M., Gao F., Furuichi M., Ichiyoshi Y. and Endo H. :1989  
Line 1 sequence interrupts a rat  $\alpha 2u$  globulin gene. *Biochim. Biophys. Acta*, in press.

14. Gao F., Ichiyoshi Y., Endo H. and Yamamoto M. : 1989  
Complete structures of a rat salivary type  $\alpha 2u$  globulin gene and its pseudogene. DNA, submitted.
15. Gao F., Endo H. and Yamamoto M. : 1989  
Length heterogeneity in rat salivary gland  $\alpha 2u$  globulin mRNA : multiple splice – acceptors and polyadenylation sites. Nucleic Acids Res. 17, 4629 – 4636
16. Nakashima H., Yamamoto M., Goto K., Osumi T., Hashimoto T. and Endo H. : 1989  
Isolation and characterization of the rat catalase gene. Gene, in press.

## 学会報告

1. 市吉裕二、山本三毅夫、遠藤英也 : 1987  
ラット肝  $\alpha 2u$  グロブリン mRNA 生成における alternative splicing メカニズムの関与 (第10回日本分子生物学会年会)
2. 高橋慶吉、山本三毅夫、遠藤英也 : 1987  
癌細胞で発現がみられるラット内在性レトロウイルスの構造解析 (第10回日本分子生物学会年会)
3. 中牟田誠、古市正人、高橋慶吉、山本三毅夫、遠藤英也 : 1988  
ラット内在性レトロウイルスの同定と癌における選択的発現 (第47回日本癌学会総会)
4. 池尻公二、上野孝毅、松口徹也、高橋慶吉、山本三毅夫、遠藤英也 : 1988  
癌におけるラットインスリン様増殖因子の発現特異性について (第47回日本癌学会総会)
5. 藤也寸志、山本三毅夫、遠藤英也、三角佳生、池原征夫 : 1988  
ラット肝アルカリフォスファターゼにおける転写の多様性 (第61回日本生化学会大会)
6. 池尻公二、山本三毅夫、上野孝毅、松口徹也、高橋慶吉、遠藤英也 : 1988  
ラットインスリン様増殖因子 II 遺伝子全領域の解析 (第11回日本分子生物学会年会)
7. 高楓、山本三毅夫、市吉裕二、遠藤英也 : 1988  
ラット唾液腺型  $\alpha 2u$  グロブリン遺伝子の単離・解析 (第11回日本分子生物学会年会)
8. 中島秀彰、後藤公宣、山本三毅夫、遠藤英也、古田秀一、橋本隆 : 1988  
ラット肝カタラーゼ遺伝子の単離と構造 (第11回日本分子生物学会年会)
9. 山本三毅夫、高楓、古市正人、市吉裕二、遠藤英也 : 1988  
ラット肝型  $\alpha 2u$  グロブリン遺伝子の反復配列 LINE1 による中断 (第11回日本分子生物学会年会)
10. 松口徹也、高橋慶吉、上野孝毅、遠藤英也、山本三毅夫 : 1988  
ラットインスリン様増殖因子 II のエクソン配列内に存在する独立転写単位の解析 (第11回日本分子生物学会大会)