

癌遺伝子の機能と細胞増殖制御の研究

小田鈎一郎

東京理科大学基礎工学部

1. 目的

細胞の増殖や分化誘導の過程で一過性に発現し、これらの過程の進行を制御している遺伝子で癌および癌抑制遺伝子の標的となっている遺伝子を単離し、その機能および発現調節の機構を解析する。

2. 組織

東京理科大学基礎工学部生物工学科

教授 小田鈎一郎

助手 中田進

(共同研究者)

東京医科歯科大学歯学部

教授 土田信夫

千葉大学医学部産婦人科

助教授 関谷宗英

3. 計画及び材料と方法

[計画] (A) E1A および RB 蛋白の標的となっている細胞周期遺伝子を単離して、その機能および発現調節を解析する。

(B) ヒト胎児性癌細胞の分化誘導初期過程で発現を変化させる分化関連遺伝子を単離してその機能および発現調節を解析する。

[材料と方法] (A1) グルココルチコイド・ホルモン投与により E1A12S cDNA (transactivation のドメインを欠くが RB などの蛋白との結合域をもつ) を発現するラット 3Y1 細胞株 (g12) を用い、ホルモン投与後 G1 期進行中に一過性に発現が促進される遺伝子 (クローン 3、16 を単離) および抑制される遺伝子 (FN、クローン 56 を単離) を単離する。

(A2) 上記 g12 細胞に neo 耐性を指標として、MMTV・LTR を付加した RB 遺伝子を導入し、ホルモン投与により E1A と RB 遺伝子を異なった量比で発現する細胞株を樹立し (gn12RB1 細胞では RB>E1A、gn12RB2 細胞では E1A>RB)、上記 (A1) で単離した細胞遺伝子の cDNA をプローブとして、これらの遺伝子の G1 期での発現変化、E1A、RB による発現調節を調べる。

(A3) E1A 遺伝子により著しく発現 (転写レベル) が抑制されるフィブロネクチン (FN) の上流転写制御領域を単離する。種々欠失を与えた上流域を大腸菌 cat 遺伝子に付加して 3Y1 細胞に導入し、G0→G1 期の過程で発現が著しく抑制されるのに必要なシグナル塩基配列を同定する。また E1A、RB 遺伝子の同時導入により上記 cat 遺伝子の発現がどう変化するかを解析する。転写制御領域への蛋白の結合パターンの変化は、ゲルシフト法、DNaseI フットプリント法で解析する。

(B1) ヒト胎児性癌 (EC) 細胞、NEC14 株は 10^{-2} M HMBA 投与により種々の細胞に分化する。分化誘導前後の細胞に種々のエンハンサー・プロモーターを付加した cat 遺伝子を導入し

細胞分化に伴う種々エンハンサーの発現変化を調べる。

(B2) NEC14 細胞の分化誘導に伴う種々 c-onc 遺伝子の発現変化を mucler run on 実験により調べた。その結果 N-myc の発現が分化誘導後、一過性に減少する (1/10 以下) ことが分かったので、分化過程のどの時期にも強く発現する β -アクチン・プロモーターを付加した N-myc 遺伝子を導入しその構成的発現が細胞分化にどのような作用を及ぼすかを分化抗原の発現パターンなどを指標として解析する。またヒト N-myc 遺伝子上流域に結合する蛋白質種が分化誘導過程でどう変動するかを、ゲル・シフト法および DNase I フットプリント法で解析する。

(B3) NEC14 細胞の分化誘導初期過程で発現を著しく変化する分化関連遺伝子の cDNA を効率良く単離するために、oligo dT-Latex をプライマーとする cDNA 合成、Latex 粒子に結合した cDNA と mRNA とのハイブリッド形成、ハイブリッドを形成しなかった mRNA の cDNA 合成とその PCR による増幅を組合わせて subtracted cDNA ライブラリィを作製する。この方法を用い、先ず未分化 NEC14 細胞で発現し、分化誘導とともに発現を殆んど停止する遺伝子の cDNA を単離する。

4. 成果

- (1) アデノウイルス E1A 遺伝子の働きにより G1 期に一過性に発現が促進されるラット 3Y1 細胞遺伝子の cDNA を 2 クローン (クローン 3、16) 単離した。塩基配列を決定した結果、クローン 3 cDNA は完全長と推定された。コンピューター解析の結果両者とも未知の遺伝子であることが分かった。これら遺伝子の発現は RB 遺伝子の働きによって抑制されるので、E1A、RB 両遺伝子の標的になっていると推定される。
- (2) E1A 遺伝子の働きにより細胞周期が G0→G1 へと移行する過程で、速かに発現が抑制される遺伝子として細胞外マトリックスの構成成分であるフィブロネクチン (FN) の遺伝子の cDNA およびその上流転写制御領域を単離した。この上流域の転写調節シグナルを cat アッセイ、ゲルシフト法、DNaseI フットプリント法で解析し、G-rich 塩基配列に E1A により誘導されたリップレッサーが結合し、転写因子 SP1 の結合を阻害することが抑制の主原因であることを示した。
- (3) ヒト胎児性癌細胞 NEC14 株の分化誘導初期過程で N-myc 遺伝子の発現レベルが 1/10 以下に一過性に減少することが分かった。 β -アクチン・プロモーターを付加した N-myc 遺伝子を導入し、N-myc を構成的に発現する NEC14 細胞株を樹立し、一過性減少と分化との関連を調べた結果、N-myc 導入株では plating efficiency が 10 倍以上増大し、細胞分裂時間も数時間短くなっていること、分化誘導とともに発現する HLA、SSEA-1 の発現が約 1/2 に抑制されるなど、正常な分化誘導に N-myc の一過性減少が必要であることが分かった。
- (4) NEC14 細胞の分化誘導過程で一過性に発現を変化する遺伝子の cDNA を効率良く単離するために、新たな subtracted cDNA ライブラリィ作製法を開発した。この方法を用い未分化 NEC14 細胞で特異的に発現している遺伝子の cDNA を 10 クローン以上単離した。その殆んどは未知の遺伝子であったが、1 クローンはマウス Id 因子のヒト・ホモログ遺伝子の cDNA と推定された。Id 因子は転写制御因子 MyoD に結合してその DNA 結合 (分化関連遺伝子の転写) を阻害する。

5. 考察

- (1) E1A で活性化される G1 期遺伝子クローン 3、16 の機能は、その完全長 cDNA の細胞への再導入、アンチ・センス鎖を合成する DNA の導入により解析する。またその上流転写制御領域を単離して cat 遺伝子に付加し、E1A、および RB 遺伝子による転写調節機構を解析する。
- (2) FN 遺伝子の発現は、RB 遺伝子によってはむしろ促進される。RB 蛋白の作用に必要な上流域の特異塩基配列を cat アッセイ、ゲル・シフト法および DNaseI フットプリント法で解析する。
- (3) ヒト NEC14 細胞の分化誘導過程で見られる N-myc 遺伝子発現の一過性減少の機構（転写レベルで働いている）を(2)と同様に解析し、N-myc 発現を一過性に抑制する因子を同定する。
- (4) 開発した subtracted cDNA ライブラリ作製法を用い分化誘導の各時期に一過性に発現する遺伝子の cDNA を単離して、その機能および発現調節を解析する。ヒト Id 因子遺伝子に関してはその完全長 cDNA を単離し、 β -アクチン・プロモーターを付加して NEC14 細胞に導入し、その構成的発現が分化誘導にどのような作用を及ぼすかを解析する。

6. 発表

1. Hara, E. et al., Molecular cloning and characterization of cell cycle genes whose expression is transiently activated by the adenovirus E1A 12ScDNA. (in preparation).
2. Hara, E. et al., Molecular cloning of the cellular genes which are specifically expressed in undifferentiated human embryonal carcinoma cells by construction of a subtracted cDNA library. (in preparation).
3. Nakajima, T. et al., Negative and positive regulation of rat fibronectin gene expression by the E1A and retinoblastoma susceptibility genes. (in preparation).
4. Nakamura, T. et al., Induction of a nuclear factor by E1A which negatively regulates the expression of the rat fibronectin gene. (in preparation).
5. Takehana, K. et al., Interaction of nuclear factors to the regulatory region of the N-myc gene during differentiation of human embryonal carcinoma cells. Submitted to "Gene".
6. Hasegawa, T. et al., A transient decrease in N-myc expression and its role during differentiation of human embryonal carcinoma cells. Submitted to "Differentiation".
7. Hara, E. et al., Construction of a subtracted cDNA library using oligo(dT)-Latex. Nucl. Acids Res., Symposium Series 22: 29-30. (1990).
8. Tsutsui, K. et al., Two-step transformation of rat 3Y1 cells by the adeno-virus E1A and E1B genes. Virus Genes, 4: 239-256 (1990).
9. Sanai, Y. et al., Induction of GD₃ ganglioside by adenovirus E1A gene 13S- and 125-mRNA products in rat 3Y1 cells. J. Biochem., 107: 740-742 (1990).

10. Tsurui, H. et al., A rapid and efficient cloning method with a solid phase DNA probe: application for cloning the 5'-flanking region of the gene encoding human fibronectin. *Gene*, 88: 233-239 (1990).
11. Hasegawa, T. et al., Expression of various viral and cellular enhancer-promoters during differentiation of human embryonal carcinoma cells. *Differentiation*, 42: 191-198 (1990).
12. Sekiya, S. et al., Induction of human embryonal carcinoma cell differentiation using N,N'-hexamethylene-bis-acetamide. *Gynecol, Oncol.*, 36: 69-78 (1990).
13. Hara, E. et al., Molecular cloning and characterization of cellular genes whose expression is expressed by the adenovirus E1a gene products and growth factors in quiescent rat cells. *Gene*, 70: 97-106 (1988).
14. 上田泰次、小田鈎一郎、「遺伝子導入による初代細胞株樹立」 最新動物細胞実験マニュアル、LSI 出版、p35-43、(1990) .
15. 原 英二、小田鈎一郎、「細胞の不死化と老化」 実験医学、8: 1456-1462、(1990)
16. 小田鈎一郎、「胎児性癌細胞で働くアデノウイルス E1A 遺伝子類似転写調節機能」 実験医学 6、359-363、(1988) .
17. 小田鈎一郎、「形質導入ベクターを用いた細胞増殖制御の解析」 細胞工学、別冊 4、3-10、(1988)
18. 小田鈎一郎、「がん遺伝子による細胞遺伝子の発現調節」 がん遺伝子研究最新の進歩、中外医学社、p273-285. (1988)