

ヒト *Jy* 遺伝子プロモーター領域の解析

指導教官名 山本 雅 教授

平成元年4月

東京大学大学院理学系研究科

第三種博士課程 (医学)

第三基礎医学専攻 入学

内 海 文 彰

①

ヒト *lyn* 遺伝子プロモーター領域の解析

指導教官名 山本 雅教授
平成元年 4 月
東京大学大学院医学系研究科
第三種博士課程 (医学)
第三基礎医学専攻 入学

内海 文彰

目次

	ページ
はじめに	1
第1章 ヒト <i>lyn</i> 遺伝子プロモーター領域の解析及びヒト成人白血病ウイルス (HTLV-I) にコードされる p40 ^{src} によるそのトランス活性化	
1-1. 序	2
1-2. 材料と方法	4
1-3. 結果	9
1-4. 考察	26
第2章 ヒト <i>lyn</i> 遺伝子プロモーターの抑制配列及び塩基配列特異的結合因子の同定	
2-1. 序	30
2-2. 材料と方法	32
2-3. 結果	36
2-4. 考察	49
参考文献	54
謝辞	66

はじめに

現在までに *src* 遺伝子群に属する遺伝子は *src* 以外に *blk*, *fgr*, *fyn*, *hck*, *lck*, *lyn*, 及び *yes* が知られている。これらの遺伝子にコードされる蛋白質はいずれも膜結合非受容体型のチロシンキナーゼである。これら *Src* ファミリー蛋白質は、互いに極めて類似しているが、N 末端側にはそれぞれ全く異なった一次構造 (ユニーク領域) を持っている。このユニーク領域が、それぞれの蛋白質の機能の特異性を決めていると考えられている。また EGF 受容体等のレセプター型チロシンキナーゼから類推して、*Src* ファミリー蛋白質は、何らかの膜表面分子と複合体を形成し、機能するのではないかと予想されていた。事実、*Lck* 蛋白質が T 細胞上で CD4, CD8 分子と物理的に結合していることを始めとして、T 細胞抗原受容体と *Fyn* 蛋白質、B 細胞受容体と *Blk*, *Fyn* 蛋白質、及び *Lyn* 蛋白質、そして IL-2 受容体 β 鎖 (IL-2R β) と *Lck* 蛋白質などの会合で示されるように、*Src* ファミリー蛋白質と他の受容体との相互作用が相次いで明らかにされている。さらに、このような相互作用は、免疫系に於ける情報伝達機構において *Src* ファミリー蛋白質が重要な役割を果たしていることを示している。

src 遺伝子群は血球系に於ける発現様式がそれぞれ異なっている。例えば *lck*, *fyn* 遺伝子などは T 細胞で高い発現が見いだされ、*blk*, *lyn* 遺伝子は B 細胞で発現が高く、T 細胞では殆ど見いだされない。更に、*c-fgr* 遺伝子は単球/マクロファージ、顆粒球で高い発現の見られることなどが知られている。このような発現様式の違いを解明するために、それぞれのプロモーター領域についての研究がなされてきており、既に *hck*, *c-yes*, *c-fgr*, 及び *lck* 遺伝子などはプロモーター領域が同定されている。

本研究に於ては、まだ解析の進んでいないヒト *lyn* 遺伝子プロモーター領域の同定を試みている。そして、更に研究を進展させ、ヒト成人白血病ウイルス (HTLV-I) のコードする p40^{ex} によりトランス活性化される領域の存在すること (第 1 章)、及び *lyn* 遺伝子プロモーター中に存在する抑制的配列の存在と塩基配列特異的結合因子 (第 2 章) について明らかにした。

第1章 ヒト *lyn* 遺伝子プロモーター領域の解析及びヒト成人白血病

ウイルス (HTLV-I) にコードされる $p40^{src}$ によるそのトランス活性化

1-1. 序

lyn 遺伝子は *src* 遺伝子群に属し、チロシンキナーゼ Lyn 蛋白質、即ち $p56^{lyn}$ 及び $p53^{src}$ をコードする (72, 90, 92)。これら *src* 遺伝子群のコードする Src ファミリー蛋白質は非受容体型の膜結合蛋白質である。そのため、これらは細胞内ドメインを持たない細胞表面受容体と会合して細胞内情報伝達に関わっている分子であると考えられてきた (25, 59, 80)。Lyn 蛋白質は B 細胞で膜結合型 IgM, IgD と会合していることが既に報告されている (89, 91)。B 細胞抗原受容体を架橋し、刺激することにより Lyn 蛋白質のキナーゼ活性が上昇することから Lyn 蛋白質はこれら受容体型免疫グロブリンを介した情報伝達に於いて重要な働きをしていることが示唆されている (91)。

ヒト *lyn* 遺伝子は最初トリ肉腫ウイルス Y73 のオンコジーンである *v-yes* 遺伝子、及び *lck* 遺伝子と相同性の高いものとして単離された (87)。*lck* 遺伝子は T 細胞リンフォーマ LSTRA 細胞でレトロウイルスの遺伝子挿入によって過剰発現が示されていたものである (44)。興味深いことに、互いにホモロジーのある *lyn* 遺伝子と *lck* 遺伝子の血球系に於ける発現様式は対照的である。*lck* 遺伝子は T 細胞で高く発現されている (33, 79) のに対し、*lyn* 遺伝子は B 細胞、単球 / マクロファージ、血小板で発現が見い出され、T 細胞では殆ど見い出されない (88)。ところが、ヒト成人白血病ウイルス (HTLV-I) に感染し、ウイルスを産生する T 細胞株では *lyn* 遺伝子の発現が見い出される (88)。*lck* 遺伝子はインターロイキン-2 (IL-2)・非依存的 HTLV-I 感染 T 細胞では発現が抑制されることも考え、*lyn* と *lck* 遺伝子の転写は共に HTLV-I に感染した T 細胞中に存在する何らかの因子によって制御されていることが示唆される。

HTLV-I は成人 T 細胞白血病 (ATL) の病原ウイルスである (26, 86, 93)。このヒトレトロウイルス遺伝子は Gag, Pol, 及び Env などのウイルスを構成する蛋白質をコードしているが、他の多くの急性形質転換レトロウイルスが持つオンコジーンをコードしていない。その代わり、HTLV-I ゲノム上には、分子量 40,000 の蛋白質 ($p40^{src}$) がコードされている。この $p40^{src}$ はウイルスゲノム中のロングターミナルリピート (LTR) 中のプロモ

ーターをトランス活性化することが知られている(5, 13, 17, 18, 63, 71)。更に、p40^{lax} は細胞側のある種の遺伝子、例えば IL-2 (49, 68), IL-2 受容体 α 鎖 (IL-2R α) (10, 27, 57), c-fos (16, 50), 及び顆粒球-巨核球コロニー刺激因子 (GM-CSF) (47) 等の遺伝子プロモーターをトランス活性化することも示されている。ATL 発症の初期段階では、IL-2 依存的に T 細胞が増殖していることが知られており、IL-2 や IL-2R α の遺伝子発現が p40^{lax} によって誘導されることは、この ATL 発症の初期段階にとって重要であると考えられている (69, 76, 94)。

そこで、本章ではヒト *lyn* 遺伝子プロモーター領域を同定すると共に、*lyn* 遺伝子が p40^{lax} によりトランス活性化されることについて明らかにした。また、p40^{lax} によりトランス活性化される *lyn* プロモーター中の領域についても検討を加えた。

1-2 材料と方法

1. 細胞及び細胞培養

Raji はヒトバークットリンパ腫細胞株である。Jurkat はヒト急性リンパ腫 T 細胞株である(88)。J24 細胞は Jurkat を親株とし、p40^{fas} 遺伝子をメタロチオネインプロモーター下流にもつプラスミドを導入したクローン細胞である(27a)。J24 細胞に於ける p40^{fas} 遺伝子の発現は、培養液中に最終濃度 1.25 μ M となるように硫酸カドミウム (CdSO₄) を加えることにより誘導される。HBC21.7.31 (以下 HBC) はマウスヘルパー T 細胞ハイブリドーマであり、B10 マウス (I-A^b) の免疫 T 細胞と AKR 由来胸腺細胞腫 BW5147 を融合させることによって作製された(鈴木元より供与された)ものである。これらの細胞を 10% ウシ胎児血清、2 mL-グルタミン、及び抗生物質を含む RPMI-1640 培地にて培養した。また、サル腎細胞株 CV-1、及びヒト扁平上皮癌細胞株 A431 を 10% ウシ胎児血清 (FCS)、2 mL-グルタミン、及び抗生物質を含むダルベッコ変法イーグル (DME) 培地にて培養した。

2. DNA クローニング及びスクリーニング

ヒト胎盤から λ gt10 ベクターを用いてゲノムライブラリーを作製し、ヒト *lyn* cDNA の 5' 末端を含む pLY2.2 (87) の *Hind*III 断片 0.9-kbp を ³²P-標識したプローブによりスクリーニングを行った。ポジティブクローンより 0.77-kbp の *Eco*RI - *Sac*I 断片を pUC119 プラスミドに組み込んで作製したプラスミドを pLYN-EcoSac と命名した。この 0.77-kbp 断片の塩基配列は dGTP の代わりにデオキシ-7-デアザグアノシン 3 リン酸を用いたジデオキシ法 (48) により決定された。

3. S1 スクレアーゼマッピング法

塩基番号 -173 から +116 (図 1) までの一本鎖 DNA を S1 マッピングプローブとした。これは以下の様に作製した。まず、+100 から +116 までのアンチセンス配列に対応する 17-mer 塩基 プライマー (5'-TTGCCGCGGGCTGGAGG-3'; 図 1) を T4 DNA キナーゼにより ³²P で末端を標識した後、0.77-kbp の *Eco*RI-*Sac*I 断片を含む鋳型の一本鎖プラスミド DNA にアニールした。更に、このアニールしたプライマーを Klenow 酵素にて伸長する反応を行ない、次に *Sma*I にて切断した。生成したプローブは 7M 尿素-6% ポリアクリルアミドゲルにて電気泳動した後、ゲルから切り出して精製した。

S1 スクレアーゼマッピングは文献 (42) に記載されている方法に準じて行なわれた。簡略にその方法を以下に示す。上記のプロープ DNA を 20 μ l の S1 ハイブリダイゼーション溶液 [80 % フォルムアミド, 50 mM ピペラジン-N,N'-ビス(2-エタンスルホン酸) (PIPES; pH 6.4), 1 mM EDTA, 及び 0.4 M NaCl] にて Raji 細胞由来の poly(A)⁺ RNA 20 μ g と 85 °C で 5 分、引き続き 60 °C で 3 時間アニールの反応を行なった。アニールした DNA-RNA ハイブリッドは S1 スクレアーゼ (200 及び 400 U) と共に 200 μ l の S1 溶液 [290 mM NaCl, 4.5 mM ZnCl₂, 及び 30 mM 酢酸ナトリウム (pH 4.5)] 中で 37 °C で 30 分反応させた。反応は 2.5 倍量の氷冷したエタノールを加えることによって終結させ、このエタノール沈殿物を 7 M 尿素-6 % アクリルアミドシークエンスゲルにて分析した。

4. クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ (CAT) 発現プラスミドの作製

まず、pLYN-EcoSac を制限酵素処理することによって 0.77-kbp の *lyn* プロモーター領域を含む DNA 断片を得た。この断片の末端を T4 DNA ポリメラーゼによって平滑化し、pSV0CAT (pSV2CAT から SV40 プロモーターを除いたプラスミド [22]) の *Hind*III 部位へ CAT 遺伝子に対して正方向に組み込んだ。この作製されたプラスミドは pLNCAT03 と命名した。また、末端を平滑化した 0.77-kbp の *Eco*RI-*Sac*I 断片を pUC00CAT ベクターの *Sph*I 部位に CAT 遺伝子に対し正及び逆方向に接続し、それぞれ pLNCAT11 及び pLNCAT12 と命名した。pLNCAT11 に挿入された DNA は 5' 末端より欠削し、デレーションプラスミドを作製した。さらに、pLNCAT11 より作製したデレーションプラスミドのうちのひとつ (pLNCATIV) を *Eco*RI と *Hind*III で切断した。この 0.33-kbp の *Eco*RI-*Hind*III 断片を T4 DNA ポリメラーゼにて末端を平滑化し、pUC00CAT の *Sma*I 部位に挿入した。作製されたプラスミドを *lyn* プロモーターの 3' 側より欠削したデレーションプラスミド作製に用いた。これら *lyn* プロモーター領域の 5' 末端、あるいは 3' 末端からの欠削はキロシークエンスキット (Takara Corp.) を用いて行った。

5. 点突然変異の導入

オクタマー配列 (OTF) に変異を導入したオリゴヌクレオチドプライマー (28-mer) を DNA 合成機 (Applied Biosystems model 381 A) により合成した。この変異を導入したプラスミドはクンケルの報告した点突然変異導入法 (36) を改変した方法に基づき作製された。変異を導入した後、上記の方法 2. により DNA 塩基配列を確認した。

6. 培養細胞への遺伝子導入法

プラスミド DNA を CV-1 及び A431 細胞にはリポフェクチン (Bethesda Research Laboratories) を用いたリポフェクション法 (14) により導入した。簡略に記すと、次のようである。あらかじめ、導入する CAT 発現プラスミドを再留水で希釈し、濃度を $10 \mu\text{g}/50 \mu\text{l}$ としたものと、リポフェクチン ($30 \mu\text{g}/50 \mu\text{l}$) を混合し、室温で 15 分間放置しておいた。また、細胞 ($2 \times 10^6/10 \text{ cm dish}$) には FCS を含まない DME 培地 (5 ml) を加えておいた。ここで、先に記した DNA-リポフェクチン混合物を加え、 37°C で 6 時間培養した後、10% FCS を含む DME 4.5 ml, 及び FCS 0.5 ml を加え、 37°C で 48 時間培養した。

Raji, Jurkat, 及び J24 細胞に対しては、DEAE-デキストラン法 (21) により DNA を導入した。細胞 (2×10^6) を 0.4 ml の TBS (25 mM Tris [pH 7.4], 137 mM NaCl, 5 mM KCl, 0.6 mM Na_2HPO_4 , 0.7 mM CaCl_2 , 0.5 mM MgCl_2) に懸濁し、2.5 μg のレポータープラスミドと 0.3 μg の p40^{bx} 発現ベクターあるいはベクタープラスミド、0.5 μg の p β act- β gal プラスミド (β -ガラクトシダーゼ遺伝子上流に β -アクチンプロモーターを挿入したプラスミド), 及び 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の DEAE-デキストランを加え、30 分間室温にて放置した。次に、細胞を TBS にて洗浄し、細胞に非吸着の DNA を除いた後、RPMI 培地にて 48 時間培養した。CAT アッセイ及び薄層クロマトグラフィーの方法は文献 (46) の記載に従った。その方法を以下簡略に記す。総蛋白量 100 μg 分の細胞抽出液を [^{14}C] クロラムフェニコール及びアセチルコエンザイム A を加え、3 時間から 12 時間 37°C にて反応させた。CAT 活性は反応生成物を薄層クロマトグラフィーにて展開し、Fuji BAS 2000 イメージアナライザーシステム (Fuji Film) を用いて定量分析した。図 4. 及び表 1. に示した CAT 活性は β -ガラクトシダーゼ活性により補正した値である。

7. ゲル移動度シフト分析

DNA と蛋白質の結合反応と電気泳動による移動度シフト分析は文献 (81) に記載されている方法を改変して行った。簡略に記すと次のようである。まず、下に示したオリゴヌクレオチドを DNA 合成機により合成し、Klenow 酵素を用いて [α - ^{32}P] dATP にて標識した。約 0.1 ng の ^{32}P -標識したオリゴヌクレオチド ($1 \times 10^4 \text{ cpm}$) を総蛋白量 2 μg の Raji 及び Jurkat 細胞抽出液と 2 μg のポリ-(dI-dC) (Pharmacia) と共に 20 μl の結合緩衝液

(25 mM N-2-ヒドロキシエチルピペラジン-N'-エタンスルホン酸 (HEPES)-KOH (pH 7.9), 50 mM KCl, 1 mM ジチオスレイトール, 1 mM フェニルメチルスルフォニルフルオリド (PMSF), 1 mM EDTA, 及び 10 % (vol / vol) グリセロール) 中、30 分間室温で反応させた。競合反応の際、過剰量 (0.8 から 100 倍量) の非標識オリゴヌクレオチドを結合反応に加えた。DNA-蛋白質複合体は 4 % ポリアクリルアミドゲルにて分析した。泳動緩衝液は 6.7 mM Tris-HCl (pH 7.5), 3.3 mM 酢酸ナトリウム, 及び 1 mM EDTA とした。

用いたオリゴヌクレオチドは以下の通りである。

プローブ T (*lyn* プロモーターの -54 から -6 までを含むオリゴヌクレオチド)

5'-AATTCGCGCTCCGGGCTCAATATGCAAATCCGAGCACCAGGAAGTAGCTGGG-3'
3'-GGCGGGAGGCCCGAGTTATACGTTTAGGCTCGTGGTCCTTCATCGACCCTTAA-5'

プローブ O (マウス T1 V_K プロモーター中のオクタマー配列部分 [7, 61] を含むオリゴヌクレオチド)

5'-AATTCTTCCCAATGATTGTCATGCTCTCAG-3'
3'-GAAGGGTTACTAAACGTACGAGAGTCTTAA-5'

プローブ OM1 (プローブ O に表 1 に示した 5M1 に導入したものと同一変異を導入した)

5'-AATTCTTCCCAATGATCCGCATGCTCTCAG-3'
3'-GAAGGGTTACTAGGCGTACGAGAGTCTTAA-5'

プローブ MT (プローブ T に表 1 に示した 5M2 に導入したものと同一変異を導入した)

5'-AATTCGCGCTCCGGGCTCAATATTTAAATCCGAGCACCAGGAAGTAGCTGGG-3'
3'-GGCGGGAGGCCCGAGTTATAAATTTAGGCTCGTGGTCCTTCATCGACCCTTAA-5'

プローブ κB (NFκB - 結合配列 [6] を持つオリゴヌクレオチド)

5'-AATTCAGAGGGGACTTTCAGAGG-3'
3'-GTCTCCCTGAAAGGGTCTCCTTAA-5'

8. *lyn* 転写産物の PCR 法を用いた定量

ゲアニジンイソチオシアネート-セシウムクロライド超遠心法により、培養細胞から全 RNA を抽出した。poly (A)⁺ RNA はオリゴ (dT) - ラテックス (Nippon Roche Inc.) を用いて精製した。次に、相補的 DNA (cDNA) は Raji, Jurkat, 及び J24 細胞由来の poly (A)⁺ RNA (2.5 µg) を 200 unit のマウス白血球ウイルス逆転写酵素 (Bethesda Research Laboratories) 処理することによって作成された。次にこの cDNA の 1/10 量をポリメラーゼチェーンリアクション (PCR) 法により増幅した。この条件等は文献 (90) と同一である。即ち、合成した 28-mer の pr85 (5'-AAGAAAGGAGAGAAGATGAAAGTCCTGG-3') 及び αpr204 (5'-GATACAGGGAAAAGTGATTCGTGGAGAG-3') をそれぞれセンス及びアンチセンスプライマーとした。これらを用いることにより、Lyn 蛋白質の SH3/SH2 領域に対応する部分の DNA が増幅される。PCR の条件は次の通りである。変性を 94 °C にて 1 分間、アニールを 37 °C にて 2 分間、次いで伸長を 72 °C にて 3 分間、これらを 30 回繰り返した。PCR 産物は 4 % アガロースゲル (FMC Bioproducts Corp.) にて泳動し、このゲルをサザンブロッティングに用いた。Raji mRNA より生成された PCR 産物をニックトランスレーションキット (Amersham Inc.) を用いて [α -³²P] dCTP により標識し、サザンプローブとした。プレハイブリダイゼーション、ハイブリダイゼーション、及びニトロセルロース膜の洗浄は文献 (87) の記載に従った。その膜は -70 °C にて Kodak X-Omat フィルムに増感紙を用いて露光した。また、定量の際には Fuji BAS 2000 イメージアナライザーシステムによりシグナル強度を測定した。

9. ノーザンブロッティング

poly (A)⁺ RNA (2.5 µg) をフォルムアミドを含む 1.0 % のアガロースゲル (Nippon Gene Corp.) にて分離し、ニトロセルロース膜に転写した。p40^{cat} コード領域を含む 1,074-bp の DNA 断片を ³²P 標識したものをプローブとしてハイブリダイゼーションを行なった。条件等は文献 (87) と同じである。

1-3 結果

1. ヒト *lyn* 遺伝子 5' 上流域の同定

lyn cDNA (87) の 5' 末端部とのハイブリダイゼーションによるスクリーニングを行うことによって、ヒトゲノムライブラリーから 0.75-kbp の *Eco*RI-*Sac*I 断片を含むクローンが得られた。この *Eco*RI-*Sac*I 断片の塩基配列を決定したところ、cDNA の 5' 末端部の配列を持つエクソンの存在が明らかとなった。この cDNA として得られている末端部を塩基番号 +1 と表した (図 1A)。この領域には TATA 或いは CCAAT ボックスと類似した配列は見い出されなかったが、4 つの GC ボックス類似の配列 (コンセンサス塩基配列の 10-bp と 1 塩基のミスマッチを許した場合) が塩基番号 -485, -331, -165 及び +223 の位置に認められた。コンピューターを用いた塩基配列のホモロジー検索により、この 768-bp の *lyn* 遺伝子の 5' 上流域に幾つの特徴的な配列の存在することが明かとなった。それらは、サイクリック AMP (cAMP) - 反応性配列 (-492), リンフォカイン遺伝子プロモーター類似配列 -2 (-338), オクタマー配列 (-36), 及び 2 つの PEA-3 類似配列 (-19 と +23) である。更に、c-Myb 結合の可能性のある配列の中心塩基配列 (AAC 及び GTT; -461, -412, -359, -67, +24, +175) が見い出された。これらのうち、-67 と +24 番の位置を含む DNA 塩基配列には、バクテリアに発現させた c-Myb 蛋白質が実際に結合することもフットプリント分析によって示されている (仙波未発表データ)。

lyn mRNA の転写開始点を決定するために、-172 番から +116 番に対応する一本鎖 DNA プローブを用いて S1 マッピング分析を行った (図 1B)。用いたプローブは非コード鎖の 5' 末端を 32 P により標識したものである (材料と方法 3. 参照)。このプローブと Raji 細胞より得られた poly (A)⁺ RNA とのハイブリダイゼーションを行った。図 1B に示される通り、S1 - スクレアーゼによる分解を受けなかった複数の断片が検出された。量的に多かった断片は 107 から 103 及び 98 から 90 塩基長であり、これは転写開始点が +10 から +14 までのクラスター、及び +19 から +27 までのクラスターが主要なものであることを示している。*lyn* cDNA はこの主要な転写開始点より上流にあることになるが、S1 - スクレアーゼ耐性断片は -16 番と -11 番からの開始点も示唆しており、恐らくこの量的には少ない転写産物から cDNA が合成されたものと考えられる。以上の実験は、Raji 細胞由来 poly (A)⁺ RNA の代わりに等量の大腸菌 tRNA を用いた場合、パン

ドが検出されない条件で行われた。

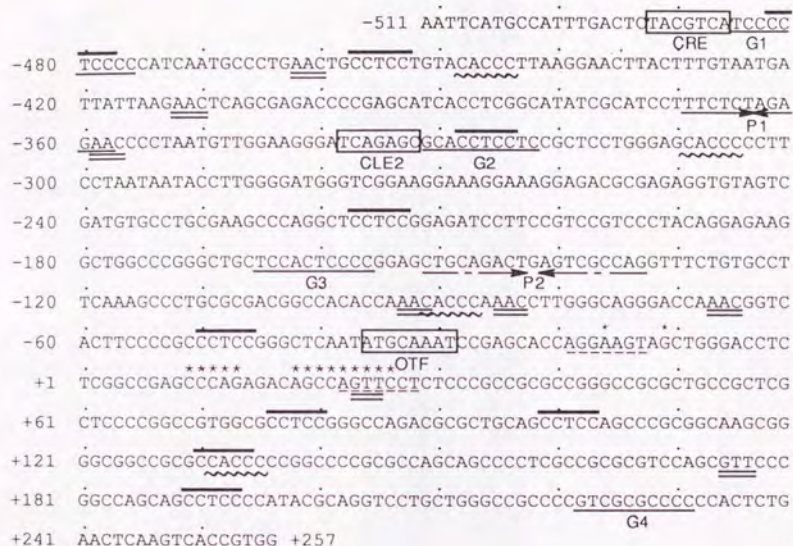


図 1. (A) ヒト *lyn* 遺伝子 5' 上流域の塩基配列。クローニングされた 768 塩基対の DNA 断片の塩基配列を示す。cDNA として得られている最も上流を塩基番号 +1 として示してある。S1 スクレアゼ分析 (図 1B 参照) により決定された転写開始点を星印 (*) で示した。各々の星印の大きさは Raji 細胞での転写産物の開始点の相対的頻度を表わす。二重下線を施した AAC 及び GTT は、c-Myb 蛋白質の認識配列、5'-(C/Pu)(Py/A)PyAACPyPu-3' (52) に 2 塩基以内のミスマッチを許した場合の中心配列である。4 つの GC ボックス類似配列 (G1 から G4 まで) には下線を施した。これらの GC ボックス類似配列は Sp1 認識配列 (3)、5'-(G/T)(G/A)GG(C/A)G(G/T)(G/A)(G/A)(C/T)-3' のコンセンサス配列と 1 塩基以内のミスマッチの配列である。塩基配列の上部に太線を施したものは HTLV-I の LTR 中にある p40^{int} 反応性配列 (43)、5'-CC(AT)CC-3' である。点線は PEA-3 類似配列 (83) を示す。CACCC ボックス配列 (67) は波線で示してある。

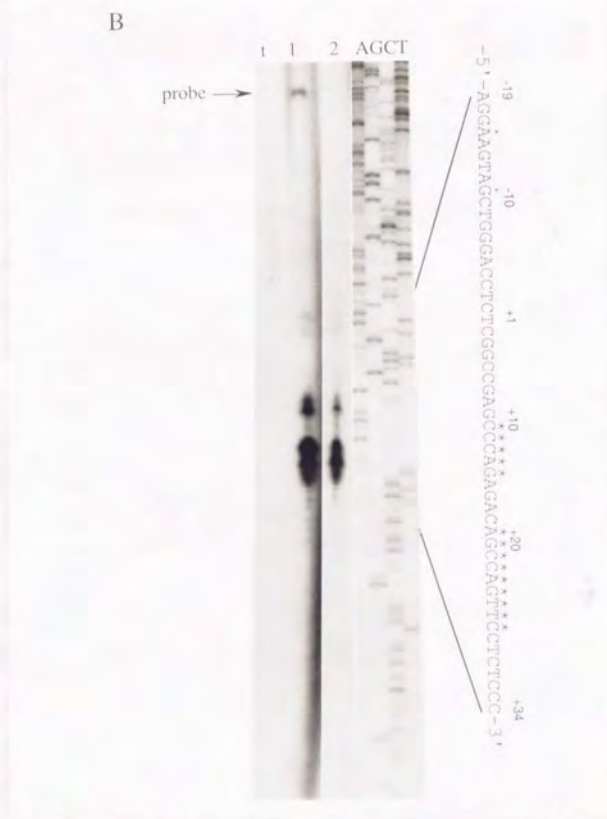


図 1. (B) Raji 細胞内の *lyn* 転写産物による S1 スクレアーゼ分析. Raji 細胞由来の poly(A)⁺ RNA (20 µg) (レーン 1 と 2)、及び 20 µg の大腸菌 tRNA (レーン t) それぞれを 288 塩基長 (-172 番から +116 番までに相当) の一本鎖 DNA プローブと 60 °C で 3 時間ハイブリダイズさせた (レーン t, 1, 及び 2)。反応液は S1 スクレアーゼ (レーン 1 では 200 U; レーン t 及び 2 では 400 U) で 37 °C、30 分間処理した。S1 スクレアーゼ分解を受けなかったものを 7M 尿素 - 6% ポリアクリルアミドゲルで分析した。検出されたバンドは S1 分析用のプローブを製した際、使用したプライマーと同じものを用いて同時にシーケンス反応を行い、長さを決定した。レーン t, 1, 及び 2 は 7 日間、レーン A, G, C, 及び T は 3 時間、X 線フィルムに露光した。図の右側には、対応する塩基配列を示してあり、* 印は転写開始点と考えられる塩基を表す。

2. *lyn* 遺伝子プロモーター活性の同定

lyn 遺伝子 5' 上流域 768-bp の配列によるプロモーター活性を調べるために、この 768-bp の領域を pUC00CAT ベクターのバクテリア由来の CAT 遺伝子上流に、正逆両方向に挿入した。CAT 遺伝子に対して同方向に挿入されたものを pLNCAT11、逆方向に挿入されたものを pLNCAT12 と命名した。これらを CV-1, A431, Raji, Jurkat 及び HBC 細胞にトランジェントに導入し、CAT アッセイを行った。この実験では、pLNCAT11 を導入した場合、HBC 細胞以外の全ての細胞に於いて CAT 活性が認められた（図 2, レーン 2, 7, 12, 17, 及び 22）。pLNCAT11 を導入した細胞の CAT 活性は pSV2CAT による場合の約 5 % から 30 % であった。一方、pLNCAT12 を導入した場合は CV-1 細胞を除いて、殆ど CAT 活性は検出されなかった（レーン 8, 13, 18, 及び 23）。CV-1 細胞に於ける pLNCAT12 による CAT 活性（レーン 3）は、この細胞特異的に *lyn* 遺伝子に対して逆方向に転写される遺伝子の存在を示唆する。しかしながら、pLNCAT12 を用いて CV-1 細胞で比較的高い CAT 活性が得られたのは、CAT 遺伝子に対して反対方向であっても偶然 CV-1 細胞で活性が検出されてしまう偽のプロモーターとして働いたためであることも考えられる。ノーザンプロット分析では、Jurkat 細胞も含めて T 細胞株に於いては全く *lyn* 遺伝子の発現は認められない (88)。しかし、Jurkat 細胞では pLNCAT11 による CAT の発現が検出された（レーン 17）。この実験結果から、*lyn* 遺伝子転写を抑制する因子の量が Jurkat 細胞で充分ではなく、外来のプロモーター活性を抑制することができなかったこと、あるいはここで分析した 768-bp 領域の上流にも T 細胞で転写を抑制する配列の存在することなどが示唆された。HBC（マウス T 細胞ハイブリドーマ）や Molt4（ヒト T 細胞株）細胞等では pLNCAT11 を導入しても CAT 活性は検出されなかったため（レーン 22 と内海ら未発表データ）、pLNCAT11 による CAT 活性が見られた Jurkat 細胞は T 細胞のうちでも、特殊なものであったと考えられる。以上の結果は *EcoRI-SacI* 断片 768-bp 中に *lyn* 遺伝子の機能的なプロモーターが存在することを強く示唆する。

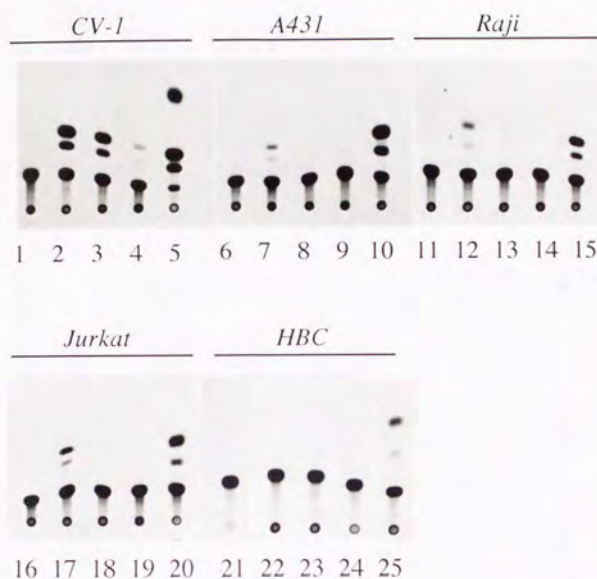


図 2. ヒト *lyn* 遺伝子 5' 上流域支配による CAT 遺伝子のトランジェントな発現. CV-1, A431, Raji, Jurkat, 及び HBC 細胞にそれぞれの CAT 発現プラスミド (2.5 μ g) を導入した。48 時間後に各々の細胞を集め、CAT アッセイを行った (材料と方法参照)。ここで用いたレポータープラスミドは以下の通りである: pLNCAT11 (レーン 2, 7, 12, 17, 及び 22), pLNCAT12 (レーン 3, 8, 13, 18, 及び 23), pSV00CAT (レーン 4, 9, 14, 19, 及び 24), そして pSV2CAT (レーン 5, 10, 15, 20, 及び 25)。レーン 1, 6, 11, 16, 及び 21 はレポータープラスミド DNA を導入しなかった場合を示す。

3. ヒト *lyn* 遺伝子プロモーター領域の欠失実験

プロモーター活性に必要とされる DNA 塩基配列を知るために pLNCAT11 の *lyn* プロモーター部分を 5' 上流から欠失させたレポータープラスミドを作製し、種々の細胞に導入した。図 3 にはこれらの欠失プラスミドを CV-1, Raji, 及び Jurkat 細胞に導入した場合の CAT 活性を示してある。全ての細胞に於いて、-56 番までの 5' 上流配列を持つ CAT 発現プラスミドによる CAT 活性が検出された。

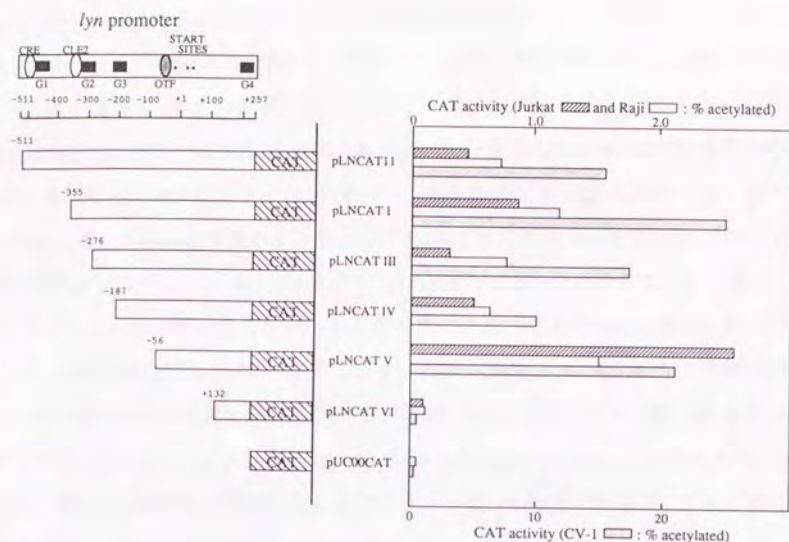


図3. ヒト *lyn* プロモーターの欠失分析. pLNCAT のヒト *lyn* プロモーター領域の 5' 上流より欠失したレポーター CAT プラスミドの構造を左に示す. ヒト *lyn* 遺伝子プロモーターの 5' 上流領域の模式図を幾つかのエLEMENT も含めて上に示してある. CRE は cAMP 反応性配列, CLE2 はリンフォカイン遺伝子プロモーター類似配列である. これらのレポータープラスミドを CV-1, Raji, 及び Jurkat 細胞に導入し、細胞抽出物 (CV-1 の場合は 50 μ g; Raji, 及び Jurkat の場合には 100 μ g) を CAT アッセイに用いた. 棒グラフは CAT 活性 (% アセチル化) を示す.

-187 番から -57 番の領域を除くことにより全ての細胞でプロモーター活性が上昇したため、この領域は負の働きのある塩基配列を含んでいると思われる。この効果は特に Jurkat 細胞で顕著であった。より細かく欠失したプラスミドを作製し、同様の実験を行うと、-110 番から -79 番の 30-bp の間に抑制的な配列のあることが示された (第 2 章参照)。また、Jurkat 細胞に 5' 上流より +132 番まで欠失した pLNCATVI を導入した場合の CAT 活性は、pLNCATV を導入した場合の活性と比較すると約 2 % であった。-4 番まで欠失すると pLNCATVI と同程度の活性を示すことから (図 8B と図 9)、-56 番から -4 番までのオクタマー配列 (OTF) を含む領域が *lyn* プロモーター活性にとって重要であると考えられる。

4. オクタマー配列の *lyn* プロモーター活性に及ぼす効果

lyn プロモーター領域の -36 番から -29 番にオクタマー配列が存在する。*lyn* プロモーターに於けるオクタマー配列の *lyn* プロモーター中での役割を調べるために、pLNCATV のオクタマー配列に点突然変異 (表 1) を導入した。pLNCATV を用いた理由は、それが *lyn* プロモーターの -56 番より +257 番までの塩基配列を持っており、CV-1, Raji, そして Jurkat 細胞などに導入して CAT アッセイを行った場合にプロモーター塩基配列欠失プラスミドの中で最も高い CAT 活性が認められたからである (図 3)。表 1 に示したのは、その変異レポータープラスミドを Raji 及び Jurkat 細胞に導入したときの CAT 活性である。5M1 の変異により、もとの pLNCATV に比較して両細胞株で得られる CAT 活性が激減した。また、この変異により、オクタマー配列結合蛋白質 OTF-1 及び 2 は DNA に対する結合が妨げられる (図 4C から 4D)。このことから、*lyn* 遺伝子の転写は両細胞株で発現していてオクタマー配列に作用する因子によって正に制御されている、という結論が得られた。更に、5M2 の変異により、*lyn* プロモーター活性が Jurkat 細胞の場合減少し、Raji では影響がなかったことから、オクタマー配列に作用する何らかの特異的制御因子が T 細胞中に存在することも示唆された。

表 1. pLNCATV のオクタマー配列への変異導入による影響

細胞に導入した DNA	-36 番から -29 番までの塩基配列	導入した細胞株	
		Jurkat	Raji
pLNCATV (WT)	ATGCAAAT	100*	100*
5M1	ATGCGGAT	2.3	13.9
5M2	ATTTAAAT	64.1	120.6
pUC00CAT		2.1	8.8

細胞抽出物 (蛋白量 100 μ g) と [14 C] クロラムフェニコールとを 37 $^{\circ}$ C で 10 時間反応させて CAT アッセイを行った。ここで示した CAT 活性は、細胞に共に導入した p β act- β gal プラスミドによる β -ガラクトシダーゼ活性に対する補正值である。

* 相対 CAT 活性は、pLNCATV を導入した細胞に於けるトランスアセチレーション百分率として表した。pLNCATV を導入した細胞に於ける実際のトランスアセチレーション百分率は、Jurkat 細胞では 1.7 %、Raji 細胞では 0.9 % であった。

5. *lyn* プロモーター中のオクタマー配列への核内因子の結合

オクタマー配列を含む -56 番から -4 番までの領域に、核内に存在する因子が結合するか否かについて検討した。Jurkat 及び Raji 細胞より調製した核抽出物と末端を³²P- 標識した 57-bp の二本鎖合成オリゴヌクレオチドプローブ（プローブ T; *lyn* プロモーターの -54 番から -6 番までの配列を含む）を反応させた。この結合反応後、非変性ポリアクリルアミドゲル電気泳動すると、まず移動度のシフトしたバンド I が検出された。これは Jurkat, Raji 両細胞株の核内蛋白質がプローブ T に結合したことを示している（図 4A, レーン 1 と 5）。この DNA-蛋白質複合体を表すバンド I は 100 倍量の非標識プローブ T を加えることによって消失した（図 4A, レーン 2 と 6）。マウス κ 軽鎖プロモーター中のオクタマー配列 (7, 61) を含むプローブ O でもこの複合体形成は阻害された（図 4A, レーン 3 と 7）。即ち、57-bp の DNA プローブ T が OTF-1 と作用することが示された。もう一つの移動度のシフトしたバンド（バンド II）は Raji 細胞由来の核抽出液でのみ形成された（図 4A, レーン 1）。このバンド II として認められた DNA と蛋白質の複合体の形成は過剰量のプローブ T あるいはプローブ O 存在下で阻害された。バンド II に当たるものはその他の非 B 細胞株の核抽出液を用いた場合、検出されなかったため、これは DNA プローブ T と B 細胞特異的に発現している OTF-2 (61, 73) の結合を示していると考えられる。また、³²P- 標識した DNA プローブ O と Raji 細胞核抽出液で反応を行うと、2 つの移動度のシフトしたバンド（バンド I' 及び II'）が検出され（図 4B, レーン 1）、Jurkat 核抽出液ではバンド I' のみが検出された（レーン 6）。

オクタマー配列に変異を導入した 5M1 のレポータープラスミドを導入した Jurkat 細胞では、もとの pLNCATV による CAT 活性よりも減少した活性が得られたため、この変異導入によって OTF-1 と *lyn* プロモーターの間で相互作用の減少したことが予想された。そこで、この可能性を確かめるために、³²P- 標識した DNA プローブ O を用いてゲルシフト競合実験を行った（図 4C, D, 及び E）。Raji 細胞（図 4C 及び D）、或いは Jurkat 細胞（図 4E）からの核抽出液を用いたとき、5M1 と同じ変異を導入した非標識プローブ OMI では標識プローブ O による DNA-蛋白質複合体であるバンド I' 及び II' の形成が阻害されなかったが、非標識 DNA プローブ O, T, 及び MT（材料と方法参照）では阻

害された。これらの結果より、オクタマー配列結合蛋白質と *lyn* プロモーターの相互作用が *lyn* 遺伝子転写に重要な役割を果たしていると結論された。

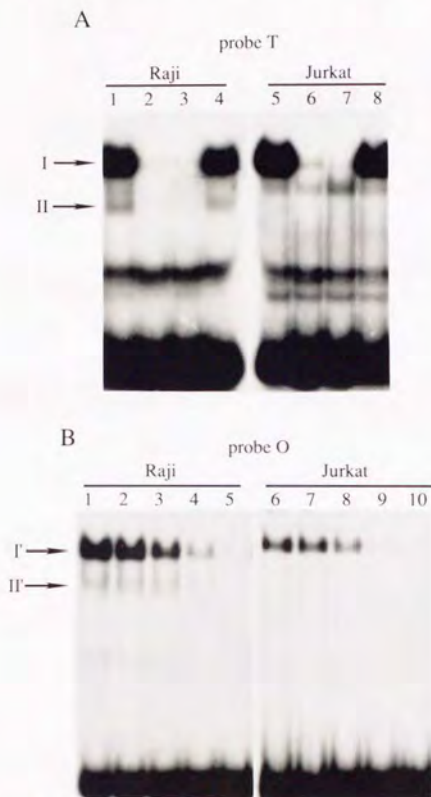


図 4. オクタマー配列を含むプローブに対する核内因子の結合。(A)オリゴヌクレオチドプローブ T (材料と方法を参照)を Klenow 酵素を用いて $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]$ dATP にて標識し、このプローブを結合緩衝液中で $2\mu\text{g}$ のポリ-(dI-dC) 及び $2\mu\text{g}$ の Raji (レーン 1 から 4)、または Jurkat (レーン 5 から 8) 細胞核抽出物と室温で 30 分間インキュベートした。この反応物を 4% ポリアクリルアミド非変性ゲルにて電気泳動した。結合反応に加えた非標識コンペティタープローブは以下の通り: 10 ng のプローブ T (レーン 2 と 6), 10 ng のプローブ O (レーン 3 と 7), 及び 10 ng のプローブ κB (レーン 4 と 8) である。レーン 1 と 5 はコンペティター非存在下で反応を行った場合である。(B)ゲル移動度シフト分析を ^{32}P -標識プローブ O を用いて行った。核抽出物は Raji (レーン 1 から 5), 及び Jurkat (レーン 6 から 10) 細胞より調製した。非標識のプローブ O を競合阻害実験に用いた。コンペティターの DNA 量は以下の通り: 0.08 ng (レーン 2 と 7), 0.4 ng (レーン 3 と 8), 2 ng (レーン 4 と 9), 10 ng (レーン 5 と 10) である。レーン 1 及び 6 は、コンペティター非存在下に於ける反応の結果を示す。

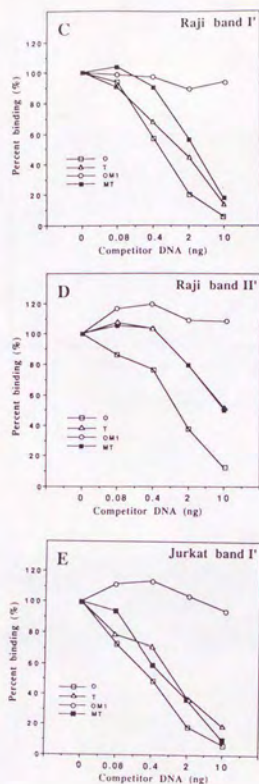
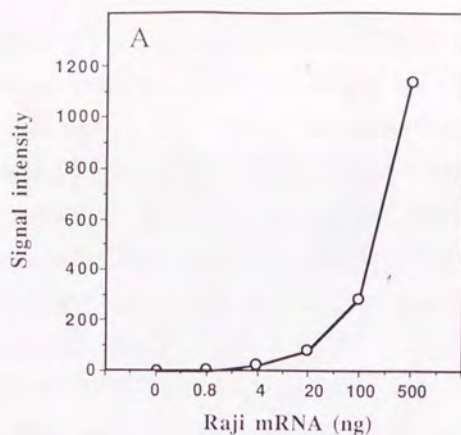


図 4. (C から E) 変異を導入したオクタマー配列に対する核内因子の結合. ^{32}P -標識プローブ O を用いてゲルシフト分析し、コンペティターとしてプローブ O, OM1, T, あるいは MT を用いた。Raji 細胞核抽出物によるバンド I' (C) とバンド II' (D) を定量した。パネル E では Jurkat 細胞核抽出物によるバンド I' の定量分析結果である。バンド I', 及び II' はパネル (B) に示してある位置にある。

6. $p40^{\text{HTLV}}$ は *lyn* 遺伝子転写をトランス活性化する

lyn 遺伝子が T 細胞では殆ど発現されず、HTLV-I ウイルスを産生する T 細胞株で発現されることは、既に報告されている (88)。この発見から、*lyn* 遺伝子プロモーターが HTLV-I にコードされる $p40^{\text{HTLV}}$ によりトランス活性化されるのではないかと考えられた。



B



図 5. *lyn* 遺伝子転写産物の PCR を用いた定量分析. (A) まず、Raji 細胞より poly (A)⁺ RNA を調製した。逆転写酵素により cDNA を合成する前に、poly (A)⁺ RNA を含む溶液 (2.5 μ g / 20 μ l) を大腸菌 tRNA 溶液 (2.5 μ g / 20 μ l) で希釈した。それぞれの試料より合成された PCR 産物を 4 % 低融点アガロースゲルにて電気泳動後、サザンブロット分析を行い、360-bp のシグナル強度を材料と方法に記載通りに定量した。(B) p40^{BCL-2} 発現ベクターを導入した Jurkat 細胞に於ける *lyn* 転写産物の PCR 法による増幅。ベクターのみを導入した Jurkat 細胞 (レーン 2), 及び p40^{BCL-2} 発現ベクター (0.375, 0.75, 1.5, 及び 6 μ g / 10⁷ 細胞 [レーン 3, 4, 5, 及び 6]) を導入した Jurkat 細胞の mRNA より cDNA を合成し、PCR を適用した。上記と同様に 360-bp の PCR 産物を検出した。レーン 1 は鋳型 DNA なしで PCR 反応を行った場合を示す。また、PCR 産物の量的なマーカーとなるように、Raji mRNA より合成した cDNA、50 ng (レーン 11), 5 ng (レーン 10), 0.5 ng (レーン 9), 0.05 ng (レーン 8), 及び 0.005 ng (レーン 7) による PCR 産物も同時に流した。

そこで、この可能性を確かめるために、検出感度の非常に高い方法、即ち *lyn* 遺伝子転写産物を PCR 法を用いて増幅し、次にサザンブロットによる検出を行うことを試みた。PCR 法を行うに当たって、用いたプライマーは *Lyn* 蛋白質の SH3/SH2 領域に対応する 360-bp の DNA 断片が増幅されるように計画されたものである (90)。PCR の条件を決定するための実験結果は、図 5A に示した。360-bp の PCR 産物量の増加が、Raji 細胞由来の poly (A)⁺ RNA 量に相関していることが明らかである。

Jurkat 細胞に p40^{max} 発現プラスミド pRSV55IV (19) の量を変えて導入し、24 時間後に細胞から全 RNA を抽出した。Fuji イメージアナライザーシステムを用いて測定すると、p40^{max} 発現ベクターを導入しなかった場合の Jurkat 細胞の mRNA より合成された 360-bp の PCR 産物は Raji 細胞の mRNA から合成された場合の約 1/1,000 であった (図 5B; レーン 2 と 8)。pRSV55IV を導入した Jurkat 細胞の mRNA による PCR 産物量 (レーン 3 から 6) は等量の Raji mRNA による PCR 産物量の約 1/100 であった。DNA の導入効率が 10⁻¹ から 10⁻² であったと考えると、pSV55IV を導入した細胞の *lyn* mRNA のレベルは 10² 倍以上になるはずである。以上より、細胞内での *lyn* 遺伝子転写は p40^{max} によりトランス活性化されると結論された。また、同様に pRSV55IV の Jurkat 細胞への導入後の時間を変えて *lyn* 遺伝子転写産物量を定量したところ、36 時間後から 48 時間後も 24 時間後と同じレベルであった (内海ら未発表データ)。

このようにトランジェントに p40^{max} 発現ベクターを導入して得られた結果を更に確かめるために、CdSO₄ 刺激により p40^{max} 遺伝子の発現を誘導することが可能な J24 細胞を用いて実験を行った。J24 細胞は Jurkat を親株とし、メタロチオネインプロモーター支配により p40^{max} を発現する形質転換細胞である。*lyn* 遺伝子転写産物量は p40^{max} 発現誘導レベルに応じて 15 倍から 30 倍に増大した (図 6A, レーン 7 から 11 及び図 6B, レーン 2 から 4)。一方、親株である Jurkat 細胞に CdSO₄ 処理をしても *lyn* 遺伝子転写産物量には全く変化が見られなかった (図 6A, レーン 2 から 6)。CdSO₄ 処理されない場合の J24 細胞由来の mRNA から得られた PCR 産物量は、Jurkat 細胞由来の mRNA から得られた PCR 産物量の約 10 倍であったが、これは、CdSO₄ 処理しなくても既に若干 J24 細胞で p40^{max} が発現されているためと考えられる (図 6B, レーン 2)。以上より、内在性の *lyn* 遺伝子の転写が p40^{max} によりトランス活性化されるという結論が得られた。

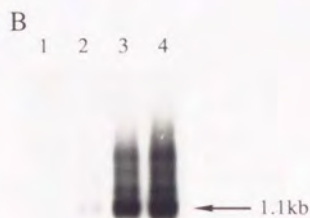
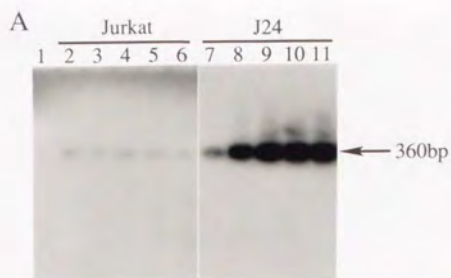


図 6. CdSO_4 刺激による J24 細胞内 *lyn* 遺伝子転写産物の PCR 法を用いた定量. (A) poly (A)⁺ RNA を Jurkat (レーン 2 から 6), 及び J24 (レーン 7 から 11) 細胞から調製した. 加えた CdSO_4 の培地中の最終濃度は 0 μM (レーン 2 と 7), 1.25 μM (レーン 3 と 8), 2.5 μM (レーン 4 と 9), 5 μM (レーン 5 と 10), 7.5 μM (レーン 6 と 11) である. これらの mRNA から合成された cDNA を PCR 法により増幅し、次にサザンブロット分析を行った (図 5, あるいは材料と方法参照). レーン 1 は、鋳型 DNA のない場合の PCR 産物を表す. フィルターを X 線フィルムに 72 時間 (レーン 1 から 6), 及び 12 時間 (レーン 7 から 11) 露光した. (B) CdSO_4 最終濃度 0 μM (レーン 2), 1.25 μM (レーン 3), 5 μM (レーン 4) で 24 時間処理した J24 細胞、または 5 μM (レーン 1) より poly (A)⁺ RNA を調製し、p40^{ras} をコードする DNA プローブを用いたノーザンブロット法により p40^{ras} 転写産物を検出した.

7. *lyn* プロモーター内の $p40^{ox}$ 反応性領域について

768-bp の *lyn* プロモーター領域中に $p40^{ox}$ 反応性配列があるか否かについて検討するために、pLNCAT11 レポータープラスミドを $p40^{ox}$ 発現ベクター (pRSV55IV) またはコントロールベクター (pRSV55TK) と共に Jurkat 或いは Raji 細胞に導入した (図 7A)。

IL-2 プロモーターを持つ pIL2CAT や SV40 プロモーターを持つ pSV2CAT を pRSV55IV と共に Jurkat 細胞に導入すると、それら CAT 発現プラスミドによる CAT 活性が増大するのと同様に、*lyn* プロモーターを持つ pLNCAT11 の CAT 活性は、pRSV55IV と共に Jurkat 細胞に導入した場合に増大した。これらの CAT 発現プラスミドによる CAT 活性は Raji 細胞に於いては $p40^{ox}$ によって大きく変化しなかった。また、Jurkat 細胞では、c-yes プロモーターを持つ pYSCAT レポータープラスミドの CAT 活性は $p40^{ox}$ によって増大しないため (図 7B)、 $p40^{ox}$ による pLNCAT11 の CAT 活性増大はこの *lyn* プロモーター特異的であることが示唆される。このように、*lyn* プロモーターからの転写は IL-2 プロモーター或いは SV40 プロモーターと同様に、 $p40^{ox}$ によって制御されうると考えられる。

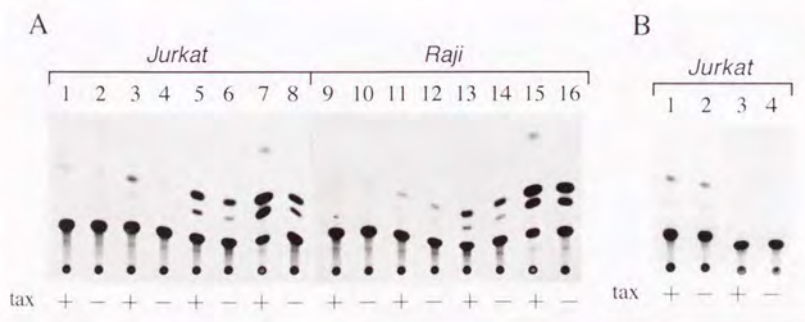
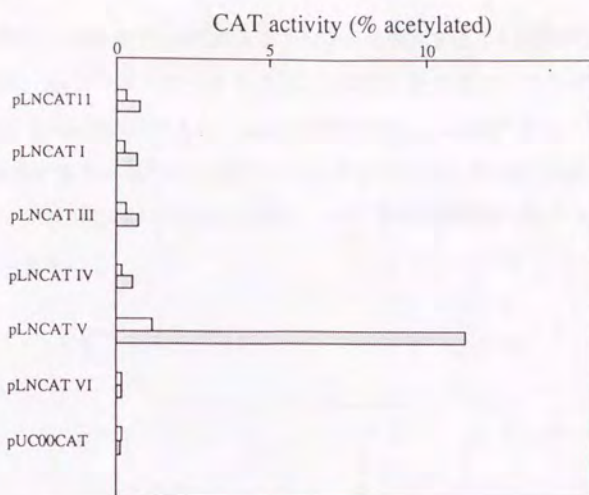


図 7. *lyn* プロモーター CAT プラスミドの CAT 活性に対する $p40^{ox}$ の影響。(A) Jurkat (レーン 1 から 8), 及び Raji (レーン 9 から 16) 細胞に、それぞれ 2.5 μ g の pSV00CAT (レーン 1, 2, 9, 及び 10), pIL2CAT (レーン 3, 4, 11, 及び 12), pLNCAT03 (レーン 5, 6, 13, 及び 14), あるいは pSV2CAT (レーン 7, 8, 15, 及び 16) を $p40^{ox}$ 発現ベクターと共に (+), あるいは、コントロールベクターと共に (-) 導入し、CAT アッセイを行った。(B) 同様の実験を Jurkat 細胞に対し、pYSCAT (レーン 1 と 2), pUC00CAT (レーン 3 と 4) を $p40^{ox}$ 発現ベクターと共に (+), あるいは、コントロールベクターと共に (-) 導入し、CAT アッセイを行った。

A



B

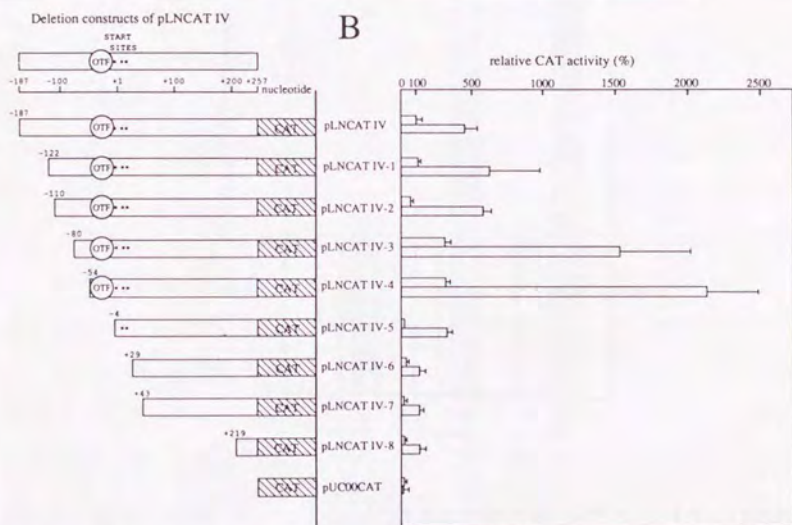


図 8. *lyn* プロモーター内の $p40^{BM}$ 反応性配列の存在. (A と B) ヒト *lyn* 遺伝子プロモーターの 5' 上流より欠失したレポータープラスミド (各 2.5 μ g) を Jurkat 細胞に $p40^{BM}$ 発現プラスミド (0.3 μ g) と共に (dotted bar), あるいは、コントロールベクターと共に (open bar) 導入した。CAT アッセイを行い、その活性を定量した (材料と方法参照)。結果は 2 回の独立の実験による [14 C] クロラムフェニコールのパーセントアセチル化の平均値 (A), 及び $p40^{BM}$ 発現ベクターなしで pLNCATIV を導入した Jurkat 細胞に於ける CAT 活性に対する相対値 (relative CAT activity) (B) で示した。(B) では、各々のカラムについて、最低 3 回の独立の実験を行い、結果はその平均値を S. D. 値と共に示した。

次に、*lyn* プロモーター中で $p40^{lac}$ によるトランス活性化を受ける配列がどの部分かを決定するために、*lyn* プロモーターの 5' 上流より欠失した CAT プラスミドを $p40^{lac}$ 発現ベクターと共に Jurkat 細胞に導入し、CAT 活性を測定した。 $p40^{lac}$ によって pLNCATV による CAT 活性が最も増大した。更に、+131 番まで欠失した pLNCATVI では、その活性化の度合いが減少した (図 8A)。即ち、 $p40^{lac}$ 反応性配列は -56 と +131 の間にあるということになる。

C

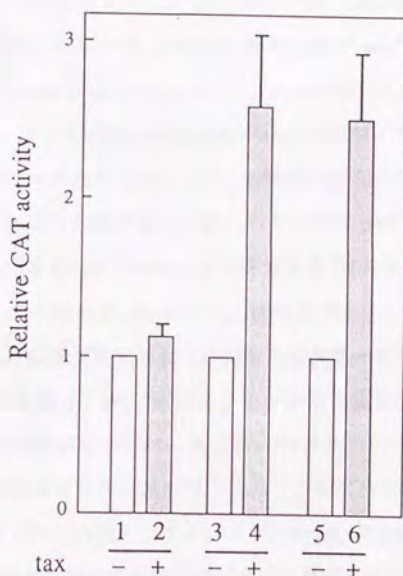


図 8. (C) *lyn*-yes プロモーターハイブリッド CAT 発現プラスミドの $p40^{lac}$ によるトランス活性化。pLNCATV-5 のプロモーター部分 (塩基番号 -4 番から +257 番) を pYSCAT の *c*-yes プロモーター上流に同方向に接続した pLYCAT-5 (カラム 3 と 4) を作製した。pLYCAT-5R (カラム 5 と 6) では、*lyn* プロモーター部が *c*-yes プロモーターの方向に対して逆向きになっている。これら、及びもとの pYSCAT (カラム 1 と 2) を Jurkat 細胞に、 $p40^{lac}$ 発現ベクターと共に (カラム 1, 3, 及び 5) あるいは、コントロールベクターと共に (カラム 2, 4, 及び 6) 導入した。CAT アッセイを行い、それぞれのプラスミドについて、コントロールベクターと共に導入した場合に対する相対値として示した。結果は 4 回の独立の実験による平均値と S. D. 値で表した。アセチル化の実際の値は、カラム 1, 3, 及び 5 でそれぞれ 0.85, 0.35, 及び 0.33 % であった。

更に、 $p40^{lac}$ 反応性配列を調べるために、pLNCATIV のプロモーター部分を 5' 上流より欠失させたプラスミドを $p40^{lac}$ 発現ベクターと共に Jurkat 細胞に導入した。塩基番号 -54 番まで欠失させた pLNCATIV-4 の場合、明らかに $p40^{lac}$ によるトランス活性化を受けることが示された (図 8B)。この CAT 発現プラスミドから、オクタマー配列を除き、-4 番まで欠失した pLNCATIV-5 による CAT 活性は pLNCATIV-4 によるものに比較すると激減してはいたが、 $p40^{lac}$ によって活性化を受けることが明らかである。更に、5M1 プラスミド (表 1) の CAT 発現は、 $p40^{lac}$ により活性化された (内海ら未発表データ) ので、オクタマー配列自体は $p40^{lac}$ による活性化に関係しないと考えられる。また、-4 番よりも 3' 側まで欠失したプラスミドでも、まだ $p40^{lac}$ に対し弱いながらも反応していることが示されている。即ち、-4 番から +257 番の間の領域が $p40^{lac}$ による活性化を受けることが示唆された。この領域が $p40^{lac}$ によりトランス活性化されることを示すために、pYSCAT の c-yes プロモーター上流に pLNCATIV-5 の *lyn* プロモーター領域を正、及び逆方向に挿入した。図 8C に示されているように、活性化の度合いは若干減少したが、-4 番から +257 番の領域が正逆両方向どちらに組み込まれても $p40^{lac}$ により反応することが示された。他に pLNCATIV の *lyn* プロモーター部分を 3' 側から欠失して $p40^{lac}$ 反応性領域を検討してみたが、その場合は -56 番と +12 番の間の領域が $p40^{lac}$ によるトランス活性化に必要であるという結果が得られた (内海ら未発表データ)。以上の結果を併せて、-4 番から +12 番の塩基配列が $p40^{lac}$ によるトランス活性化にとって重要であることが示唆されたが、この可能性については、例えばこの -4 番から +12 番の塩基配列を、 $p40^{lac}$ に反応しない CAT 発現プラスミドに組み込んで、 $p40^{lac}$ に対する反応性が獲得されるか否かを検討するなど更に実験を要する。また、768-bp の *lyn* プロモーター領域以外にも、その上流に他の $p40^{lac}$ 反応性配列の存在する可能性も否定はできない。

1-4 考察

本研究では、まずヒト胎盤ゲノムライブラリーより *lyn* 遺伝子プロモーターを含むクローンの得られたことが始まりとなっている。この 768-bp の *EcoRI*-*SacI* 断片には、HBC や Molt4 細胞などの T 細胞株以外でプロモーター活性が検出された。更にまた、HTLV-I ゲノム中にコードされる p40^{src} が T 細胞株 Jurkat で *lyn* 遺伝子の転写を 768-bp のプロモーター中にある配列に作用して、トランス活性化しうることが示された。

lyn プロモーター領域の塩基配列の構造は、報告されている他の *src* 遺伝子群のプロモーター、例えば *hck* (41), *c-src* (46), *c-fgr* (53), 或いは *lck* 遺伝子 (75) などのプロモーターと類似している。これらのプロモーターには典型的な TATA ボックスや CCAAT ボックスなどが見い出されない。転写開始点が複数存在するのは TATA 配列を欠失しているためであろうと思われる。これらの遺伝子のうち、*c-src* 遺伝子は細胞種によらず普遍的に発現されており、プロモーター領域中には、GC ボックス以外に典型的なエンハンサー配列が認められない (46)。それに対し、*c-fgr* や *lck* 遺伝子などの発現はむしろ細胞種特異的である。*c-fgr* 遺伝子は単球/マクロファージ系の細胞にて発現される (40)。*c-fgr* のプロモーター領域には 5 つの AP-2 結合部位があるが、これは *c-fgr* 遺伝子の細胞特異的な発現に寄与していると考えられている (53)。*lck* 遺伝子は血球系では T 細胞特異的に発現される (33)。*lck* プロモーター領域 (I 型及び II 型) には GC ボックスや TATA ボックスなどの、よく知られているシスに作用する配列のコンセンサス配列は含まれていない。しかし *lck* プロモーターの I 型には、免疫グロブリンエンハンサーのコンセンサス配列と同じ CCAGGTGG の配列があり、この配列が T 細胞特異的な *lck* 遺伝子発現の原因となっていると思われる (75)。*lck* プロモーターとは対照的に、*lyn* プロモーターの 768-bp 内には、良く研究されている DNA 塩基配列、即ち cAMP 反応性配列、リンフォカイン遺伝子プロモーター類似配列 -2、PEA-3 類似配列、及びオクタマー配列などが含まれている。更に、c-Myb 蛋白質の結合する可能性のある領域や、2 つのパリンドローム構造を持つ塩基配列などが見い出された。これらの配列の *lyn* 遺伝子発現に対する生物学的意義はまだ解かっていないが、*lyn* プロモーター領域の欠失及び変異分析により、オクタマー配列とその下流にある複数の転写開始点を含む領域が *lyn*

のプロモーター活性に基本的に重要であるということが示唆された。

B細胞核抽出液中の OTF-1 及び OTF-2 という 2つのエンハンサー蛋白質が、免疫グロブリン遺伝子のプロモーターに存在するオクタマー配列に結合し、この遺伝子の細胞特異的な発現を制御していることは知られている (73, 85)。B細胞核抽出液中の OTF-1 及び OTF-2 は、*lyn* プロモーター中のオクタマー配列に結合するので (図 4A と 4B)、B細胞特異的な *lyn* 遺伝子の発現というのはこれらの因子により制御されているかも知れない。予想通り T細胞核抽出液を用いた実験によると、種々の遺伝子発現にとって重要であると考えられている OTF-1 (15, 49, 74) が *lyn* プロモーター中のオクタマー配列に作用することが明らかとなった。OTF-1 が *lyn* プロモーターに結合することは、*lyn* 遺伝子の発現にとって基本的に重要であるに違いない。この考えは、OTF-1 の結合を減少させる (図 4C, D, 及び E) 点突然変異をオクタマー配列に導入すると、*lyn* プロモーター活性が T細胞株 Jurkat に於いても激減したことからも支持することができる。更に、本研究では *lyn* プロモーターの -110 番から -79 番の間、及び +75 番と +126 番の間の領域が T細胞株 Jurkat に於いてプロモーター活性を負に調節することも示唆された。この負の調節に関係した配列についての検討は、第 2 章に記すことにする。

正常の T細胞株では *lyn* 遺伝子は殆ど発現されないが、HTLV-I を産生する T細胞株では容易に *lyn* mRNA 及び *Lyn* 蛋白質が検出される (88)。この事実から、*lyn* 遺伝子の転写が HTLV-I にコードされる蛋白質によって活性化されることが示唆されていた。本研究に於いては、p40^{src} によって *lyn* プロモーターの活性が正に制御されることが明確に示された (図 7 及び 8)。HTLV-I の LTR 中に存在する 21-bp の配列が p40^{src} によるトランス活性化に必要とされることは知られている (18, 66)。しかし、*lyn* プロモーター中にはこの配列と類似した配列は見い出されない。ともあれ、21-bp 配列による遺伝子発現のトランス活性化の度合いは *lyn* のトランス活性化で見られるものよりはるかに強大である (18)。そのため *lyn* プロモーターに於ける p40^{src} によるトランス活性化の機構は複雑なものであると予想される。IL-2R α (1, 6, 38) や GM-CSF 遺伝子 (47, 62) プロモーター領域に存在する NF- κ B 結合配列もまた、p40^{src} によるトランス活性化に関係している。*lyn* プロモーター中の -8 番から +2 番までの 5'-GGGACCTCTC-3' という配列は、マウス κ 軽鎖エンハンサーの NF- κ B 結合配列 5'-GGGACTTTCC-3' (6) と核内因子との

結合を競合阻害しなかった（内海ら未発表データ）。そのため、NF- κ B が、この -8 番に位置する 10 塩基に作用した結果 p40^{mt} による *lyn* 遺伝子転写のトランス活性化が起こるとは考えにくい。また、CC(A/T)CC 配列は、HTLV-I の LTR 中に見い出されるものであり、p40^{mt} 反応性配列として働くことが最近示された (2, 43)。この 6 塩基配列は *lyn* プロモーター中に 9 個も見い出される。+29 番から +257 番までの領域が p40^{mt} に弱いながらも反応し、また 4 つの CC(A/T)CC 配列を含んでいることは注目すべきである。

最近、DNA 腫瘍ウイルスにコードされたトランスに働く因子が転写装置を構成する因子に直接作用することを示唆する結果が報告された (20, 37)。恐らく p40^{mt} は転写開始因子のような基本的に転写反応に必要とされる因子に直接、或いは間接に作用することにより *lyn* 遺伝子発現を活性化するのであろう。

p40^{mt} によって、幾つかの細胞側の遺伝子、例えば IL-2, IL-2R α , c-Fos, 及び GM-CSF などをコードする遺伝子のトランス活性化されることが報告されている。T 細胞が増殖する際、IL-2 が IL-2R 複合体に作用することが、最も重要であることと考えられている (24, 70)。p40^{mt} によって誘導された IL-2 や IL-2R などの発現は ATL 発症の初期段階に於いて HTLV-I に感染した T 細胞をポリクローナルな増殖へと導くであろう。しかしながら、これらの効果だけでは ATL に於ける T 細胞の形質転換、及び悪性化には充分ではない。なぜならば ATL 発症の後期に於いては、T 細胞は増殖因子非依存的にモノクローナルな増殖をしているからである。*lyn* 遺伝子産物である Lyn 蛋白質は、HTLV-I に誘起された白血病に於いてひとつの原因となるかも知れない。最近の研究では、Lyn 蛋白質が B 細胞に於いて膜結合型免疫グロブリン M と物理的、及び機能的に会合していることが明かにされている (89-91)。この事実は、Lyn 蛋白質が B 細胞内での抗原受容体を介した情報伝達に重要な役割を果たしていることを示唆する。しかしながら、正常 T 細胞では、Lyn 蛋白質の発現がほとんど検出されない (88) ため、正常 T 細胞中での Lyn 蛋白質の機能は今まで研究がなされていない。本研究では *lyn* 遺伝子の発現が、p40^{mt} により誘導されることが示された。一方、*src* 遺伝子ファミリーに属する *lck* 遺伝子は、IL-2 非依存性の HTLV-I 感染 T 細胞株では発現されない (34)。*lck* 遺伝子産物である Lck 蛋白質は T 細胞で CD4 及び CD8 表面分子と物理的に会合しており、これら分子を抗体でクロスリンクすることにより活性化される (58, 80)。更に、Lck 蛋白質は IL-2R β

と相互作用していることが発見され (25)、IL-2 に刺激された T 細胞ではそれが活性化されると思われる。また、Lck 蛋白質のキナーゼ領域のアミノ酸配列は IL-2R β との会合に必要である。Lyn と Lck 蛋白質のキナーゼ領域の一次構造は類似したものであるため、IL-2R β は Lyn 蛋白質とも HTLV-I 感染 T 細胞で機能的に相互作用していることが考えられる。また、最近このことを支持する報告もなされている (77)。Lyn 蛋白質の HTLV-I 産生 T 細胞に於ける役割を明確にするためには、さらに実験が必要とされる。

この章に記した研究は、内海が、

Uchiumi, F., K. Semba, Y. Yamanashi, J. Fujisawa, M. Yoshida, K. Inoue, K. Toyoshima, and T. Yamamoto. 1992. Characterization of the promoter region of the *src* family gene *lyn* and its *trans* activation by human T-cell leukemia virus type I-encoded p40^{tax}. *Mol. Cell. Biol.* 12:3784-3795.

に発表した。

第2章 ヒト *lyn* 遺伝子プロモーターの抑制配列及び塩基配列特異的結合因子の同定

2-1 序

第1章序文にも記したが、*lyn* 遺伝子は *src* 遺伝子群に属しており、そのコードするチロシンキナーゼ Lyn 蛋白質は、特に B 細胞での情報伝達に深く関わっているものであることが最近示され、注目されている (89-91)。Lyn 蛋白質も含めて、Src ファミリー蛋白質の血球系に於ける機能解析が進められており、それと共にこれらの分子の発現がどのような制御を受けているのかを検討する必要性が生じてきた。例えば、*lck*, *fyn* 遺伝子は T 細胞で高い発現が見いだされ (31, 33, 79)、*blk*, *lyn* 遺伝子は B 細胞で高く発現され (12, 88)、T 細胞ではその発現がほとんど見いだされない。また、*c-fgr* 及び *hck* 遺伝子は単球/マクロファージなどで高い発現が見られ (40, 54)、*c-yes* 遺伝子は B 細胞では発現が低いものの、他の血球細胞では普遍的に発現されている (64)。このように、血球系の正常細胞に於ける発現様式は各々の遺伝子によって異なっている。最近になって、*src* 遺伝子群の幾つかのものについてプロモーター領域が同定された。1-4 に記したように、*lck* プロモーター内には免疫グロブリン遺伝子上流に見られるコンセンサス配列が存在し、これが T 細胞特異的な発現に関与している可能性が指摘されている (75)、*c-fgr* 及び *hck* プロモーター内には AP-2 結合部位が見いだされ (41, 53)、これもまた細胞特異的な発現に影響している可能性がある。更に、*c-yes* プロモーター中には5つの GC ボックスが存在し、そのため *c-yes* 遺伝子は比較的細胞種によらない普遍的な発現様式をとるのではないかと考えられている (46)。*lyn* プロモーター (第1章)、及び *fyn* プロモーター (仙波ら未発表) の配列も併せて、これらに共通する点は、典型的な TATA ボックスあるいは CCAAT ボックスが見いだされないことと、複数の転写開始点の存在することである。Src ファミリー蛋白質は構造的に類似しているが、それぞれの細胞内での役割が微妙に異なっている。同様に、その転写を司るプロモーター領域も構造的に類似しているが、それぞれの発現様式は微妙に異なっている。このように、Src ファミリー蛋白質のプロモーター領域も「似て非なる」ものであることは興味深い。

さて、第1章では *lyn* プロモーター領域の同定についての研究を記してあり、主としてプロモーターからの転写を正に制御する因子について検討してある。5' 上流より *lyn*

プロモーター領域を欠失する実験や、点突然変異を導入する実験により、オクタマー配列がプロモーター活性にとって基本的に重要であることが示された。オクタマー配列は、転写因子 OTF-2 が結合することによって免疫グロブリン遺伝子の転写を正に制御していることが知られている配列である (73, 85)。また、オクタマー配列に結合することが知られているもう一つの因子 OTF-1 は、ヒトのヒストン H2b 遺伝子の転写を正に制御することが報告されている (15)。ところで、第 1 章には、*lyn* プロモーターの 5' 上流から欠失した CAT 発現プラスミドの一つである pLNCATV を T 細胞株 Jurkat に導入すると、検出される CAT 活性が pLNCAT11 による CAT 活性より高いこと (図 3)、あるいは、pLNCATV のオクタマー配列に OTF-1 の結合しない変異を導入した場合、Jurkat 細胞でプロモーター活性の激減すること (表 1) が記されている。そのため、T 細胞で *lyn* 遺伝子の発現が殆ど見られないのは、OTF-1 による正の制御を打ち消し、プロモーター活性をバックグラウンドレベルまで抑制する機構があるためではないかと予想された。

現在までは、真核細胞に於ける正の転写制御因子についての研究が主流になっていた。しかしながら最近では、より正確に転写のメカニズムについて解明するために、負の転写制御機構についての研究も増加しており (39, 60)、生物学的に意義のある分子も同定されてきつつある。例えば、ヒト α -フェトプロテイン (51)、*c-fos* (55)、*c-mos* (96)、IL-2 α (84)、 β -インターフェロン (32)、あるいはマウス *c-myc* (30) などのプロモーター領域には負の調節配列のあることが報告されている。また、レチノブラストーマ (Rb) 遺伝子産物 (55)、ウィルムス腫瘍抑制因子 (WT1) (11) などの転写抑制効果も同定されており、負に転写を調節する因子は俄かに脚光をあびるようになった。

本章においては、*lyn* プロモーター領域を 1 章で行なったものより更に詳細に欠失、あるいは変異分析することによって、30-bp の配列 (以下 NRL とした) の抑制的な効果が見出されたことを記した。また、その配列に塩基配列特異的に結合する因子についても検討を加えた。

2-2 材料と方法

1. 細胞及び細胞培養

Raji と Dauji はヒトバーキットリンパ腫細胞株である。Jurkat と Molt4 はヒト急性リンパ腫 T 細胞株である (88)。Hut-102 及び MT-2 は HTLV-I 産生 T 細胞株である (88)。J24 は第 1 章の材料と方法の項に記した細胞である。以上の細胞を 10 % ウシ胎児血清、2 mM L- グルタミン、及び抗生物質を含む RPMI-1640 培地にて培養した。また、サル腎細胞株 CV-1 及びヒト上皮癌細胞株 HeLa を 10 % FCS、2 mM L- グルタミン、及び抗生物質を含む DME 培地にて培養した。

2. CAT 発現プラスミドの作製

lyn プロモーター と CAT 遺伝子を接続した pLNCATIV 及びその欠失プラスミド pLNCATIV-1 から pLNCATIV-8 などの作製法は、第 1 章の材料と方法の項 4. に記した。pLNCATIVA, IVB, IVC, 及び IVD は図 10. に示した点突然変異を pLNCATIV に導入したものである。*lyn* プロモーター配列の部分欠失プラスミド pLNCATIVA Δ 1, Δ 2, Δ 3, 及び Δ 5 は pLNCATIVA, IVB, IVC, 及び IVD を *Nde*I, *Xba*I にて分解した DNA 断片を再構成することにより作製された。もう一つの部分欠失プラスミド pLNCATIVA Δ は pLNCATIV の NRL 配列に *Xho*I 切断部位を導入した 2 つの別々のプラスミドを制限酵素分解して得られた DNA 断片を再構成することによって得られた。

ヘテロのプロモーターよりなる CAT 発現プラスミドを作製するに当たっては、まず DNA 合製機を用いて *lyn* プロモーターの NRL を含む配列 (塩基番号 -112 番から -75 番まで) の両鎖を合成し、アニールした。この DNA 断片は両端がそれぞれ *Bam*HI 及び *Bgl*II となるようにしてあり、DNA リガーゼにより接続した後、T4 ポリメラーゼ処理して末端を平滑化した。更にこのタンデムに接続された DNA 断片に *Sal*I リンカーを接続した。塩基配列を確かめた後、この接続された DNA 断片 (同方向に 4 単位含む) を pdN55 (エンハンサーのない HTLV-I プロモーターの下流に CAT 遺伝子を含むレポータープラスミド [19])、あるいは WTCAT (pdN55 のプロモーター上流に HTLV-I の 21-bp のエンハンサーを 5 個含む CAT プラスミド) の *Sal*I 部位に挿入した。

3. 点突然変異の導入

第 1 章、材料と方法 5 を参照。

4. DNA の培養細胞への導入

Jurkat, Molt4, Raji, 及び Dauji 細胞にはプラスミド DNA を DEAE デキストラン法にて導入し、これは、第 1 章材料と方法 6 に示した通り

である。CV-1, 及び HeLa 細胞には、リン酸カルシウム法 (46) により導入した。簡略に記すと次のようである。細胞 (2×10^6) に $10 \mu\text{g}$ の CAT 発現プラスミドと $0.5 \mu\text{g}$ の p βgal - βact プラスミドを含む Hebs - NaHPO_4 溶液に、塩化カルシウム溶液を加え、生成したカルシウム-DNA の沈殿を細胞に散布後、4 時間で沈殿を除き、15 % グリセロールで 3 分間処理した。グリセロールを FCS を含まない DME 培地にて洗浄し、10 % FCS を含む DME 培地で 37°C で 48 時間培養した。CAT アッセイの方法は、第 1 章、材料と方法 6. に示した通りである。CAT 比活性は共に導入した p βact - βgal による β -ガラクトシダーゼ活性により補正した CAT 活性の値である。

5. ゲル移動度シフト分析 (ゲルシフトアッセイ) DNA と蛋白質の結合反応と移動度シフト分析は第 1 章の材料と方法 7 の項とほぼ同じだが、若干の変更を加えた。まず、結合緩衝液の KCl 濃度は 250 mM とした (他の組成は同じ)。そして、泳動緩衝液は 50 mM Tris-HCl ($\text{pH } 7.5$), 380 mM グリシン, 及び 2 mM EDTA とし、移動度シフト分析は 4 % ポリアクリルアミド - 2.5 % グリセロール非変性ゲルにて行った。

用いたオリゴヌクレオチドは以下の通りである。

プローブ N (*lyn* プロモーターの -112 番から -79 番までを含むオリゴヌクレオチド)

5'-AATTCTGCGCGACGGCCACACCAAACACCCAAACCTTG-3'
3'-GACGCGCTGCCGGTGTGGTTGTGGGTTTGGAACTTAA-5'

プローブ MN1 (プローブ N に変異を導入したオリゴヌクレオチド)

5'-AATTCTGCGCGACGGCCACACCAAAGCGGGCCACCTTG-3'
3'-GACGCGCTGCCGGTGTGGTTTCGCCCCGGTGGAACTTAA-5'

プローブ MN2 (プローブ N に変異を導入したオリゴヌクレオチド)

5'-AATTCTGCGCGACGGAGCGGGCAAACACCCAAACCTTG-3'
3'-GACGCGCTGCCTCGCCCGTTTGTGGGTTTGGAACTTAA-5'

プローブ $\Delta 3$ (*lyn* プロモーターの -98 番から -64 番までを含むオリゴヌクレオチド)

5'-AATTACCAAACACCCAAACCTTGGGCAGGGACCAAACG-3'
3'-GTGGTTTGTGGGTTTGAACCCGTCCCTGGTTTGCTTAA-5'

プローブ R (*lyn* プロモーターの -82 番から -52 番までを含むオリゴヌクレオチド)

5'-AATTCTTGGGCAGGGACCAACGGTCACTTCCCCG-3'

3'-GAACCCGTCCCTGGTTTGCCAGTGAAGGGGCTTAA-5'

プローブ RD (プローブ R に変異を導入したオリゴヌクレオチド: 変異は図 10 の pLNCATIVD に導入したものと同じ)

5'-AATTCTTGGGCAGGGTCTAGACGGTCACTTCCCCG-3'

3'-GAACCCGTCCAGATCTGCCAGTGAAGGGGCTTAA-5'

プローブ N15 (プローブ N に変異を導入したオリゴヌクレオチド: 変異は図 10 の pLNCATIVA に導入したものと同じ)

5'-AATTCTGCGCGACGGCTCGAGAACCTTG-3'

3'-GACGCGCTGCCGAGCTCTTGGAACCTTAA-5'

6. UV クロスリンク分析 *lyn* プロモーター領域の -110 番から -61 番に相当する二本鎖 DNA プローブを作製した。まず、次の 2 つのオリゴヌクレオチド、5'-GCGCGACGGCCACACCAACACCCAAACCTTGGGCAGGGACCAACGGTC-5' 及び 5'-GACCGTTTGGTCCCT-3' をアニールし、それぞれを鋳型とプライマーとした。次に、 $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]$ dGTP、及び 5'-ブロモデオキシウリジン (Brd-U)、dATP、dCTP 存在化で Klenow 酵素により 37°C で 20 分、プライマーを伸長させた。更に、このラベルされた二本鎖 DNA (プローブ U) をセファデックス G-50 カラムによるゲル濾過処理し、プローブに取り込まれなかった $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]$ dGTP と分離した。結合反応はこの Brd-U を取り込んだプローブ U と Jurkat 細胞核抽出物、或いは部分精製した蛋白質分画 (次の項に記す) とを混合し、室温で 30 分インキュベートすることによって行われた。次に、この反応物を 4 % - アクリルアミド - 2.5 % (v/v) グリセロール非変性ゲルによる電気泳動を行った後、UV (264 nm) を 15 分間照射した。DNA - 蛋白質複合体は、シフトしたバンドを透析膜に移して電気泳動にて溶出し、回収された。次に、このサンプルに 2 倍量の冷アセトンを加えて蛋白質を沈殿させた後、SDS-PAGE 分析を行った。幾つかの実験に於いては、結合反応後、ゲルシフト電気泳動を行わずに反応物を 1.5 ml ポリエチレンチューブに入れ

たまま UV 光を照射し、ただちに SDS-PAGE 分析した。

7. 蛋白質の精製 Jurkat 細胞核抽出物中に存在する蛋白質を部分精製することによって、検出されたプローブ N との DNA-蛋白質複合体を形成する分画が、分離可能か否かを検討した。Jurkat 細胞よりゲルシフト分析に於いて複合体 N1 を構成する蛋白質を精製した方法は以下の通りである。まず、Jurkat 細胞より Dignum らの方法 (9) で核抽出液を調製し、これを、そのまま緩衝液 C [20 mM Hepes-KOH (pH 7.9) / 0.5 mM EDTA / 50 mM KCl / 10 % (v/v) グリセロール / 0.5 mM DTT / 0.5 mM PMSF] にて平衡化しておいた Bio Rex-70 カラムに通した。樹脂に吸着しなかった蛋白質の分画を、緩衝液 X [20 mM Hepes-KOH (pH 7.9) / 0.2 mM EDTA / 50 mM KCl / 20 % (v/v) グリセロール / 0.5 mM DTT / 0.5 mM PMSF] で平衡化した DE-52 カラムにかけ、吸着した蛋白質分画を 200 mM KCl の緩衝液 X で溶出、回収した。この蛋白質分画を 10 から 60 % の硫化アンモニウムで沈殿させ、緩衝液 Z [20 mM Hepes-KOH (pH 7.9) / 0.2 mM EDTA / 50 mM KCl / 25 % (v/v) グリセロール / 0.5 mM DTT / 0.5 mM PMSF] に溶解し、Sephadex G-200 カラムによるゲル濾過を行った。プローブ N と複合体 N1 を形成する活性のある蛋白質分画を集め、*lyn* プロモーターの NRL 配列 (30-bp) を固相化した Sepharose 4B カラムに通した。結合した蛋白質分画は 1 M から 2 M の KCl 濃度の緩衝液 Z によって溶出された。活性のある分画は緩衝液 Z にて透析し、これを -70°C にて保存した。

2-3. 結果

1. lyn 遺伝子プロモーター領域には抑制的な配列が存在する 第1章では、*lyn* プロモーター領域 768-bp を CAT 遺伝子上流に接続した CAT 発現ベクターを作製し、その領域のプロモーターとしての機能を解析した。また、プロモーターの塩基配列を欠失する実験によって、塩基番号 -187 番と -54 番の間に抑制的な働きのあることが示唆された。この抑制的な働きのある配列を決定するために、pLNCATIV の *lyn* プロモーター領域を 5' 上流から欠失させたレポータープラスミドを CV-1, Raji, 及び Jurkat 細胞に導入し、CAT アッセイを行なった (図 9)。

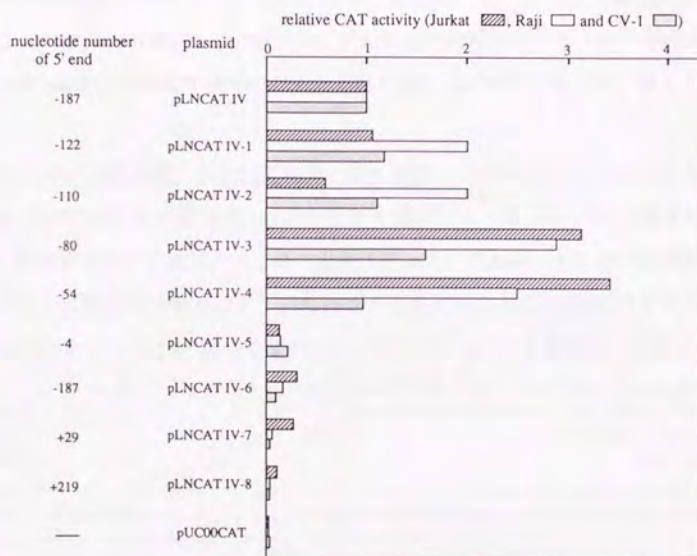


図 9. *lyn* プロモーター領域の欠失分析. pLNCATIV (第1章参照) のヒト *lyn* プロモーター領域の 5' 上流より塩基配列を欠失させたレポーター CAT 発現プラスミドを Jurkat, Raji, 及び CV-1 細胞に導入し、CAT アッセイを行った。それぞれのプラスミドに於ける *lyn* プロモーターの最も上流部分の塩基番号をそれぞれのプラスミドの名称の左側に記した。ヒストグラムは pLNCATIV を導入した細胞による CAT 活性に対する、同じ細胞株の相対 CAT 活性を示す。独立の実験を最低 2 回行い、その平均値を示してある。

pLNCATIV-1 及び IV-2 を導入した細胞から得られる CAT 活性は、Raji 細胞以外ではほとんど同レベルであった。しかしながら、pLNCATIV-2 から *lyn* プロモーターの -110 番から -80 番までを欠失した pLNCATIV-3 プラスミドを導入した細胞では pLNCATIV-2 による CAT 活性よりも高い CAT 活性が検出された。また、この -110 番から -80 番の塩基配列を除くことによる CAT 活性の上昇は Jurkat 細胞で最も顕著であった。即ち、この *lyn* プロモーター中の -110 番から -80 番までの配列は T 細胞中で最も良くプロモーター活性をシスに抑制する働きのあることが示唆された。以下、この 30-bp 配列を NRL (negative regulatory sequence of the *lyn* promoter) と記すことにした。更に、T 細胞株 Molt4 を用いて同様の実験を行なったが、*lyn* プロモーターを含むレポーター CAT プラスミドによる CAT 活性はバックグラウンドレベルであった。そのため、T 細胞においては NRL による抑制効果以外にも *lyn* プロモーター自体が転写反応の進みにくい構造をしていることが *lyn* 遺伝子の転写産物のほとんど検出されない原因となっているとも考えられる。

2. NRL への点突然変異、部分欠失変異の導入実験 pLNCATIV の *lyn* プロモーター中の NRL 及びその付近に変異或いは部分欠失を導入して (図 10)、どの塩基配列が負の制御に関係するのかを確認するための実験を行った。これは、もし負の制御配列が変異導入によって働かなくなれば、これらのプラスミドによる CAT 活性はもとのプラスミド pLNCATIV による CAT 活性に比較して増大するであろうと期待した実験である。

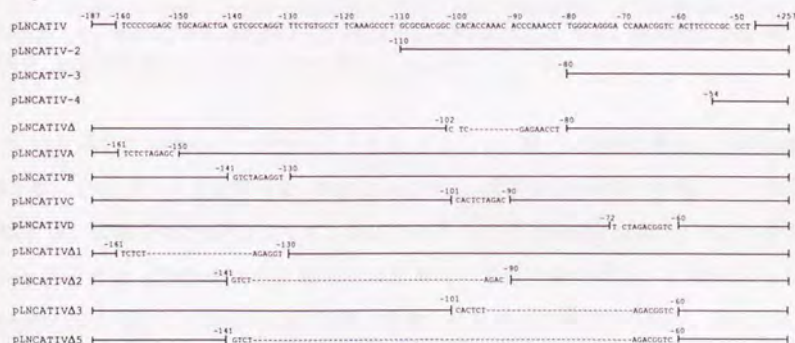


図 10. pLNCATIV プラスミドの *lyn* プロモーター部分に導入した変異. もとの pLNCATIV の -160 番から -48 番までの塩基配列を一番上に記してある。直線、及び点線は、それぞれもとの *lyn* プロモーターと同一の塩基配列、及び部分欠失した塩基配列を表す。

表 2. pLNCATIV プラスミドの *lyn* プロモーター領域に対する点、及び部分欠失変異導入の影響

細胞に導入した DNA	細胞株				
	Raji	Dauji	Jurkat	HeLa	CV-1
pLNCATIV	100	100	100	100	100
pLNCATIVAΔ	N.D.	104	214	58	95
pLNCATIVA	65	101	169	66	100
pLNCATIVB	126	97	146	102	105
pLNCATIVC	87	75	116	86	118
pLNCATIVD	97	131	302	59	106
pLNCATIVAΔ1	86	112	165	82	133
pLNCATIVAΔ2	82	127	245	129	184
pLNCATIVAΔ3	57	97	278	125	92
pLNCATIVAΔ5	91	108	372	129	108
pUC00CAT	27	14	1	7	0

細胞抽出物 (蛋白量 100 μg) と [¹⁴C] クロラムフェニコールとを 37 °C にて 15 時間 (Raji, Dauji, 及び Jurkat 細胞抽出物の場合), または 3 時間 (HeLa, 及び CV-1 細胞抽出物の場合) インキュベートして CAT アッセイを行った。それぞれの CAT 活性は、共に細胞に導入した pβact-βgal プラスミドによる β-ガラクトシダーゼ活性により補正した。同一の細胞種において、pLNCATIV を導入した場合得られた CAT 活性を 100 として、それに対する相対 CAT 活性を示した。それぞれの値は、最低 2 回の独立の実験の平均値である。N.D. は実験を行っていないものである。

図 10 に示したレポータープラスミドを表 2 に示した種々の細胞に導入して細胞抽出液を得、CAT アッセイを行った。Raji, Dauji, HeLa, 及び CV-1 細胞では導入した点突然変異、或いは部分欠失変異によって、検出される CAT 活性は増大しなかった。しかし、Jurkat 細胞では pLNCATIV の変異プラスミドのうち幾つかを導入した場合、もとの pLNCATIV を導入した場合の CAT 活性に比較して高い活性が認められた。図 9 に示した通り、pLNCATIV-3 を導入した Jurkat 細胞では pLNCATIV-2 を導入した場合の約 5 倍の CAT 活性が認められた。部分欠失変異導入プラスミドの pLNCATIVA, Δ2, Δ3, 及び

$\Delta 5$ を Jurkat 細胞に導入した場合、pLNCATIV による CAT 活性の 2 倍から 3 倍の活性が得られた。これらの CAT レポータープラスミドは *lyn* プロモーター中の配列の -100 番から -91 番までを欠失しており、それに対して、pLNCATIV $\Delta 1$ のように -156 番から -137 番を欠失した場合には Jurkat 細胞に於いて影響は比較的少なかった。以上の結果は -100 番から -91 番までの 10-bp の塩基配列 (5'-CACACCAAAC-3') が *lyn* 遺伝子発現の負の制御に関係することを示唆する。更に、図 10 に示されている通りの点突然変異を pLNCATIV に導入したレポータープラスミド pLNCATIVA, IVB, IVC, 及び IVD を Jurkat 細胞に導入した。pLNCATIVA 及び IVB を導入した場合、検出された CAT 活性は pLNCATIV による場合に対して約 1.5 倍に、pLNCATIVD を導入した場合には約 3 倍にプロモーター活性の上昇する結果が得られた (表 2) ので、*lyn* プロモーターの -110 番から -91 番だけでなく -71 番から -67 番を含む配列もまた (T 細胞特異的に) *lyn* 遺伝子発現を負に調節することが示唆された。また、pLNCATIVC に導入した変異は -100 番から -91 番の間にあるが、CAT 活性に変化を及ぼさなかった。これは、多分この変異導入では抑制因子が NRL 配列に結合することを妨げられなかったと思われる。

3. *lyn* プロモーターの NRL に塩基配列特異的に結合する因子の解析 pLNCATIV-3 は pLNCATIV-2 から *lyn* プロモーターの -110 番から -80 番まで (NRL) を欠失しており、このため約 5 倍に CAT 活性の上昇することが認められたので、この領域には何らかの (抑制) 因子が結合するのではないかと予想された。そこで、細胞核内因子がこの配列に結合することを示すために、更に、結合する因子が細胞種特異的か否かを検討するために、NRL を含むプローブ N (材料と方法参照) を ^{32}P -標識し、種々の細胞の核抽出液を用いてゲルシフト分析した。Jurkat, Hut-102, MT-2, Raji, 及び CdSO_4 処理した J24 細胞核抽出液と ^{32}P -標識プローブ N とを結合反応させると、DNA-蛋白質複合体を表すバンド N1 と N2 が検出された (図 11)。バンド N1, 及び N2 よりも移動度の早いバンド (レーン 9) は、検出される再現性に乏しく、非常に不安定な蛋白質によるものと考えられる。興味深いことに、MT-2 細胞核抽出液の場合には、複合体 N1 の量が他の細胞 (レーン 1, 3, 5, 及び 9) の場合に比較して非常に少なかった (レーン 7)。更に、先の実験に用いた pLNCATIV-2 と pLNCATIV-3 を MT-2 細胞に導入してみたが、得られた CAT 活性はほぼ同じレベルであった (内海ら未発表データ)。これらのことから、

MT-2 細胞においては複合体 N1 を形成する因子が減少しているため *lyn* 遺伝子を発現していると考えられることも可能である。ところが、Hut-102 細胞核抽出物を用いた場合には、複合体 N1 が検出された (レーン 5) ので、NRL 配列に結合する因子の欠如だけが *lyn* 遺伝子の発現を正に制御しているとはただちに結論することはできない。このように、複合体 N1 及び N2 は MT-2 以外の用いた全ての細胞 (ここでは示さなかったが Molt4, HeLa 細胞の場合も含めて) 核抽出物を反応に用いた場合、形成することが認められたため、NRL と作用する因子は細胞種によらず普遍的に存在するものと考えられた。

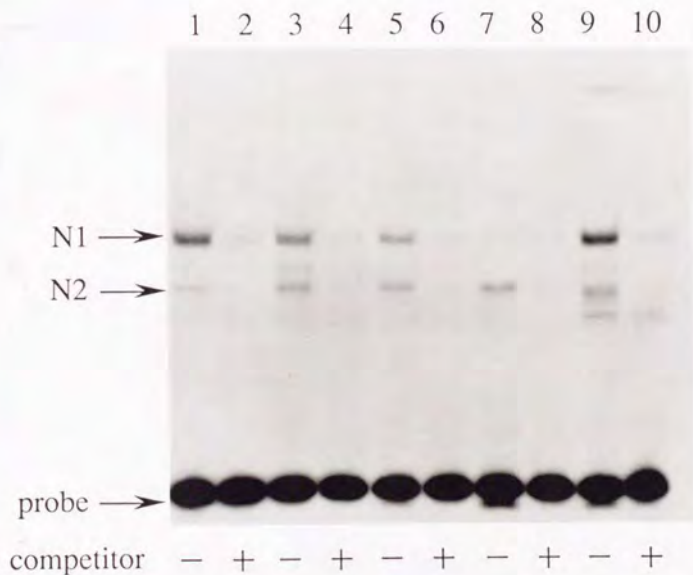


図 11. *lyn* プロモーター中の抑制制御配列 (NRL) と細胞核内因子の結合。結合反応はプローブ N (*lyn* プロモーターの -112 番から -79 番までを含む) を放射標識プローブとして用い、Jurkat (レーン 1 と 2), CdSO₄ 処理した J24 (レーン 3 と 4), Hut-102 (レーン 5 と 6), MT-2 (レーン 7 と 8), 及び Raji (レーン 9 と 10) 細胞核抽出物と反応させた。また、放射標識プローブに対して約 100 倍量の非標識プローブ N を結合反応液に加えた (レーン 2, 4, 6, 8, 及び 10)。核内蛋白質と結合にあずからなかった標識プローブとシフトしたバンド N1 及び N2 の位置を左に記した。

4. NRL に作用する因子は塩基配列特異的に結合して複合体 N1 及び N2 を形成する

複合体 N1 と N2 が検出されるのは、塩基配列特異的に蛋白質が DNA に結合した結果であることを示すために、Jurkat 細胞核抽出液と ^{32}P - 標識したプローブ N を用いて結合反応を行う際、様々な非標識 2 本鎖 DNA プローブを加えて競合実験を行った (図 12A)。複合体 N1 及び N2 は非標識プローブ N を反応液中加入することにより消失した (レーン 2, 3, 及び 4)。プローブ R (*Iyn* プロモーターの -82 番から -52 番を含む; レーン 8, 9, 及び 10) やプローブ RD (変異を導入したプローブ R; レーン 14, 15, 及び 16) をコンペティターとして用いた場合には全く競合阻害が見られなかった。プローブ MN1, MN2 (プローブ N に変異を導入した DNA プローブ; それぞれレーン 11 及び 12) やプローブ N15 (プローブ N に pLNCATIVΔ と同じ欠失変異を導入した DNA プローブ; レーン 17 及び 18) をコンペティターとして用いた場合には、若干複合体 N1 及び N2 形成の競合阻害が見られたが、それはプローブ N による阻害効果よりも弱いことが明らかであった。更に複合体 N1 及び N2 形成は非標識プローブ Δ3 (*Iyn* プロモーターの -98 番から -64 番までを含むまでを含む; レーン 5, 6, 及び 7) をコンペティターとして用いた場合、ほとんど競合阻害が見られなかったので、プローブ N の 5' 側約 10 塩基もまた複合体形成に関与していることが考えられる。更に、 ^{32}P - 標識したプローブ MN1 や MN2 と Jurkat 細胞核抽出物との結合反応を行った場合、複合体 N1 と N2 はほとんど検出されなかったため、-101 番と -85 番の間の配列が複合体形成に関与すると思われる。

次に、プローブ N, MN1, 及び MN2 を用いて、それぞれの Jurkat 細胞核内因子との結合親和性を検討するために、それぞれの非標識プローブの濃度を変えて、 ^{32}P - 標識したプローブ N との競合阻害実験を行った (図 12B)。2 ng のプローブ N を結合反応に加えると、複合体 N1 の形成は約 35 % にまで減少したが、それに対して、プローブ MN1 や MN2 では 150 ng 加えてもそのレベルまで減少しなかった。これと同様の結果が、Molt4 や Raji 細胞核抽出物を用いた実験からも得られている (内海ら未発表データ)。以上の結果より、複合体 N1 の形成は核内因子のプローブ N に対する塩基配列特異的結合によるものであることが示された。複合体 N2 の形成もまた、塩基配列特異的ではあるが、競合阻害のされ方は N1 のそれとは全く異なっている (図 12C)。例えば、複合体 N2 形成を競合阻害する際、N1 と同じだけレベルを減少させるためには約 4 倍量の

非標識プローブ N が必要である。以上のことから、DNA と蛋白質の相互作用は複合体 N1 と N2 を形成する場合で全く異なっていると思われる。更に、変異プローブ MN1, MN2 をコンペティターとして用いた場合には、複合体 N2 の形成に対する競合阻害効果が全く見られなかった。Jurkat 細胞核抽出物をイオン交換クロマトグラフィーに通すと、複合体 N1 と N2 を形成する因子の分画が分離されるので（内海ら未発表データ）、それぞれの因子は全く異なったものであると考えられる。以上の結果から、複合体 N1 及び N2 の形成はプローブ N に対する塩基配列特異的な蛋白質の結合によるものであること、そして複合体 N1 と N2 に含まれる核内蛋白質はそれぞれ異なったものであることが示唆された。

A

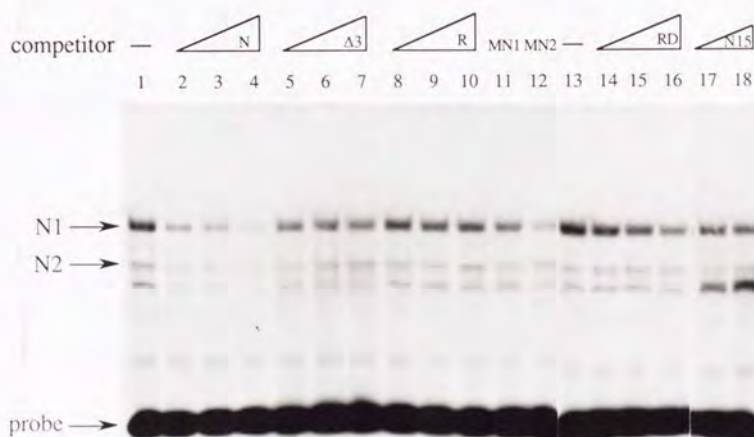


図 12. 複合体 N1 と N2 のゲルシフト競合阻害実験。(A) 各結合反応は、 ^{32}P -標識したプローブ N と Jurkat 細胞核抽出物 (蛋白量 $2\mu\text{g}$) により行った。複合体形成競合阻害に用いたコンペティターは、プローブ N (レーン 2, 3, 及び 4), プローブ $\Delta 3$ (レーン 5, 6, 及び 7), プローブ R (レーン 8, 9, 及び 10), プローブ MN1 (レーン 11), プローブ MN2 (レーン 12), プローブ RD (レーン 14 と 15), そしてプローブ N15 (レーン 17 と 18) である。結合反応に加えたコンペティター DNA の量は、 0.4 ng (レーン 2, 5, 8, 14, 及び 17), 2 ng (レーン 3, 6, 9, 15, 及び 18), 10 ng (レーン 4, 7, 10, 11, 12, 及び 16) である。レーン 1 と 13 は結合反応中にコンペティター DNA 断片を加えなかった場合のシフトしたバンド N1 及び N2 を表す。シフトしたバンド N1 と N2, そして ^{32}P -プローブ N の位置を左に記した。

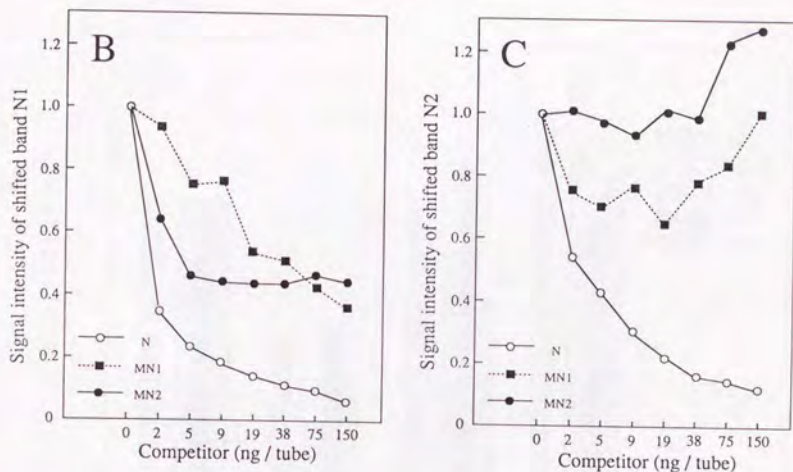


図 12. (B と C) (A) と同様の実験を行い、Fuji イメージアナライザーシステムにより定量した。ここでは、複合体形成競合阻害を見るために、プローブ N、あるいは変異プローブ MN1 及び MN2 をコンペティター DNA 断片として用いた。コンペティターを加えない場合のバンド N1 (B) 及びバンド N2 (C) のシグナル強度に対する相対シグナル強度を示してある。この実験ではコンペティターを加えなかった場合のバンド N1 のシグナル強度は、バンド N2 のそれに対して約 2 倍であった。

5. NRL を含む 38-bp の配列は *lyn* 以外のプロモーターに対しても抑制的である

lyn プロモータ中で抑制効果を持つ NRL が、他のプロモーターに対してどのような影響を及ぼすかを調べるために、NRL を含む 38-bp の配列、或いはそれに変異を導入した配列をそれぞれ同方向に 4 個結合し、他の CAT 発現ベクターのプロモーター上流に挿入して CAT アッセイを行った。遺伝子を導入した細胞は Jurkat, Molt4, Dauji, CV-1, 及び HeLa 細胞である。HTLV-I のプロモーター (21-bp のエンハンサーは除かれている) に対しての効果を図 13A に示した。全ての細胞に於いて NRL を 4 個挿入した pdNN4 による CAT 活性はもとの pdN55 (19) によるものよりも減少していた (カラム e から i)。

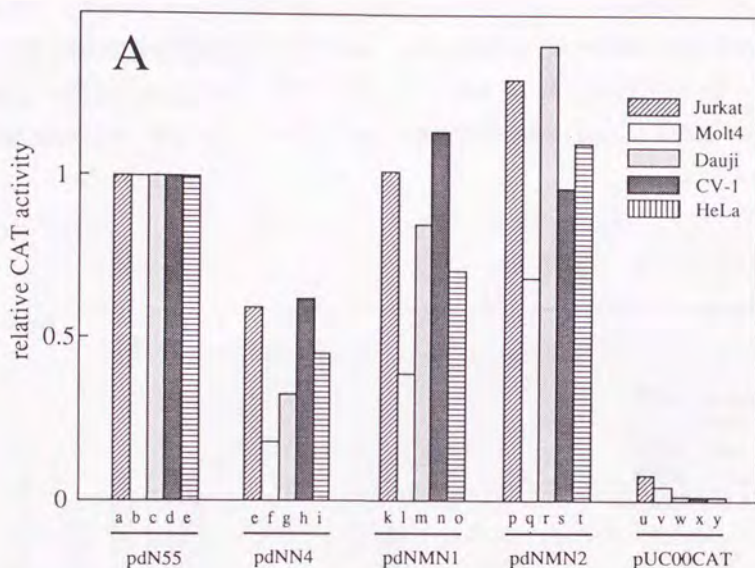


図 13. NRL 配列の他のプロモーターに及ぼす影響. (A) *lyn* プロモーター中の -112 番と -75 番の間の配列を 4 個同方向に接続した (DNA 断片 N4) を pdN55 (a, b, c, d, 及び e) の HTLV-I プロモーター上に挿入し、これを pdNN4 (f, g, h, i, 及び j) とした。ゲルシフト分析で用いた競合プローブ MN1, MN2 と同じ変異を導入されたものをそれぞれ pdNMN1 (k, l, m, n, 及び o), pdNMN2 (p, q, r, s, 及び t) とした。これらのレポータープラスミド及び pUC00CAT (u, v, w, x, 及び y) を Jurkat (a, e, h, p, 及び u), Molt4 (b, f, l, q, 及び v), Dauji (c, g, m, r, 及び w), CV-1 (d, h, n, s, 及び x), 及び HeLa (e, i, o, t, 及び y) 細胞に導入し CAT アッセイを行った。結果は、同じ細胞株で pdN55 による CAT 活性に対する相対 CAT 活性で表した。ヒストグラムは最低 2 回の独立の実験の平均値を表す (独立の実験数は Jurkat 及び Molt4 で 5 回, CV-1 で 4 回, Dauji 及び HeLa で 2 回である。)。

NRL に先のゲルシフト分析で複合体形成が弱まる変異を導入した pdNMN1 及び pdNMN2 による CAT 活性は、Jurkat, Dauji, CV-1 及び HeLa 細胞で、挿入のない pdN55 によるものとはほぼ同じレベルの活性であった。このことは NRL に対し複合体 N1 及び

N2 を形成することがプロモーターの抑制に関係することを示唆する。Molt4 細胞では、pdNMN1 及び pdNMN2 による CAT 活性レベルは pdN55 による活性に達しなかったが (図 13A, カラム l と q)、これは NRL を含む 38-bp の配列中に、Molt4 細胞において抑制的に働く配列の存在することを示唆する。しかしながら、Molt4 細胞を用いた実験では NRL を HTLV-I プロモーター上流に挿入したことにより、ほとんどプロモーター活性が抑制されており (図 13A, カラム f)、NRL が抑制的な効果を持つことは間違いない。

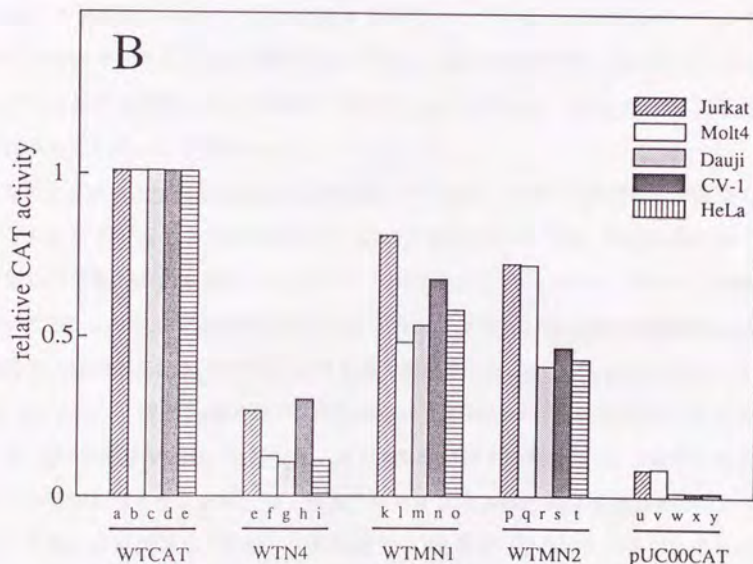


図 13. (B) 変異のない DNA 断片 N4, 変異 DNA 断片 MN1 及び MN2 を WTCAT (pdN55 の HTLV-I プロモーター上流に 5 個の 21-bp 配列が挿入されているレポータープラスミド) に挿入し、作製されたプラスミドをそれぞれ WTN4, WTMN1, 及び WTMN2 とした。(A) と同様の実験及び分析を行い、結果を同じ細胞株に WTCAT を導入したときの CAT 活性に対する相対 CAT 活性で表した。独立の実験の回数は、Molt4 で 5 回、Jurkat で 4 回、CV-1 で 3 回、Dauji と HeLa では 2 回である。

NRLを含む38-bpを挿入するプラスミドをWTCAT (HTLV-Iの21-bpエンハンサー5個の繰り返しをpdN55に挿入したレポータープラスミド)とした場合についての結果を図13Bに示した。NRL配列を含む38-bpを4個挿入したプラスミド(WTN4)の場合、どの細胞に導入した場合も、もとのWTCATによるCAT活性の10%から20%程度までCAT活性の減少することが認められた(図13B, カラムeからi)。また、MN1及びMN2の変異を導入することによってその抑制効果は弱まった。以上の実験結果より、NRLを含む38-bp配列には、細胞種によらずHTLV-Iプロモーターに対する抑制効果のあること、そして複合体N1及びN2の形成がその抑制効果に関係することが示された。更に、pdN55或いはWTCATのどちらの系に於いても同様の結果が得られたことは、NRLの抑制効果はその下流の他のエンハンサーの存在や転写開始点からの距離によらないものであることを示唆する。ただし、以上の実験では、NRLのHTLV-Iプロモーターに対する影響について検討しており、*lyn*プロモーター中でのNRLの機能を正確に反映しているわけではない。

6. UVクロスリンク法によるNRL結合因子の同定 NRLに核内因子が結合した結果、ゲルシフト分析で2つの複合体N1とN2が検出されたので、実際の因子がどのような蛋白質であるのかを検討した。まず、 ^{32}P -標識したプローブU(材料と方法参照)を用いてUVクロスリンク分析を行った。ゲルシフト分析ではJurkat細胞核抽出液を用いた場合、複合体N1のほうがN2よりも多く検出されること(図11, レーン1, 及び図12A, レーン1)、更に、複合体N1の形成のほうが競合プローブNに対し感受性の高いこと(図12B及び12C)などから、以下の実験では主に複合体N1を形成する因子についての解析を行った。まず、 ^{32}P -標識プローブUとJurkat細胞核抽出物を用いて結合反応した後、ゲル内でUV照射してから複合体N1及びN2のバンドを切り出した。次に、これらのバンドから蛋白質を溶出し、アセトンにて沈殿した後、SDS-PAGE分析した。複合体N1中でラベルされた主要蛋白質は、110kDa, 100kDa, 及び85kDaの3つであった(図14A, レーン1)。複合体N2からは複数のより分子量の小さな蛋白質(50から60kDa)が検出され、非標識プローブNによる競合阻害効果は弱かった(図14B, レーン1と2)。複合体N1を形成する活性を指標に核蛋白質分画を、Bio Rex-70, DE-52, 及びSephadex G-200カラムにより部分精製し、最も高い活性を示した分画にはJurkat細

胞核抽出物と同じく3つの蛋白質が検出された(図 14A, レーン 2)。これらのバンドは、結合反応の際プローブ N を加えることによって消失した(図 14A, レーン 3)。更に、Sephadex G-200 による部分精製分画を、NRL 配列を含む 2 本鎖 DNA の固相化されたオリゴヌクレオチドカラムにて精製した。この分画を用いた場合もやはり同様に3つの蛋白質が検出された(図 14A, レーン 4)。以上の結果より、複合体 N1 を形成する主要蛋白質は分子量約 110kDa, 100kDa, 及び 85kDa であること、及びそれらは N2 を形成する蛋白質とは異なるものであることが示された。

次に、これらの蛋白質が検出されたのは、プローブ U に対する塩基配列特異的な結合をした結果であることを示すために、結合反応、及び UV 照射後ただちに SDS-PAGE 分析した(図 14C)。この場合も同様に3つの蛋白質が Sephadex G-200 による部分精製分画とプローブ U の結合反応により検出された(図 14C, レーン 1)。また、これらのバンドは結合反応の際、非標識プローブ N を加えることによって消失した(図 14C, レーン 2)が、同量の非標識プローブ MN1 や MN2 を加えても消失しなかった(図 14C, レーン 3 と 4)。プローブ U に MN1, MN2 と同じ変異を導入したプローブ UM1, 及び UM2 を ^{32}P - 標識して UV クロスリンク法を適用した場合、3つの蛋白質はほとんど検出されなかった(図 14C, レーン 5, 及び 6)。以上の結果により、分子量 110kDa, 100kDa, 及び 85kDa の蛋白質の NRL に対する塩基配列特異的な結合が示された。

NRL に結合する因子について更に分析するためには、それらを精製或いはその遺伝子をクローニングする必要があると考えられ、その場合には、以上の実験によって得られた結合因子の分子量や結合状態についての情報が役に立つはずである。

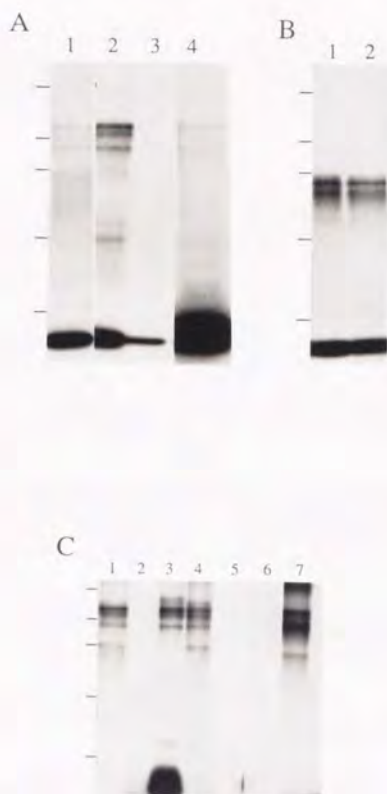


図 14. NRL 配列に結合する核内因子の UV クロスリンク法による同定. (A) Brd-U 及び $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]$ dGTP を取り込んだ NRL 配列を含むプロンプ U と、Jurkat 細胞核抽出液 (レーン 1), 或いはセファデクス G-200 カラムの分画 (レーン 2 と 3) で結合反応を行い、非変性ポリアクリルアミドゲルで電気泳動を行った。レーン 3 では、コンペティタープロンプ N を 67 ng 結合反応時に加えたものである。UV 光を照射した後、複合体 N1 をゲルから切り出し、回収された蛋白質を SDS-PAGE 分析した。レーン 4 は NRL オリゴヌクレオチドカラムに結合した蛋白質分画をプロンプ U と結合反応後、UV 照射し、SDS-PAGE 分析したものである。左に示したのは、分子量マーカーの位置である (上から 200, 97.4, 69, 46, 及び 30 kDa)。 (B) 同様の実験を、放射標識プロンプ U と Jurkat 細胞核抽出液による複合体 N2 中の UV クロスリンクラベルされた蛋白質を示す。レーン 2 はコンペティタープロンプ N 67 ng を結合反応時に加えた場合、レーン 1 は加えなかった場合である。 (C) UV クロスリンク競合阻害分析。 ^{32}P -標識プロンプ U (レーン 1 から 4 及び 7), ^{32}P -標識プロンプ UM1 (レーン 5), あるいは ^{32}P -標識プロンプ UM2 (レーン 6) と複合体 N1 形成活性のあるセファデクス G-200 カラムの分画で結合反応を行った。80 ng の非標識コンペティタープロンプ N (レーン 2), プロンプ MN1 (レーン 3), 及びプロンプ MN2 (レーン 4) を結合反応に加えた。レーン 1, 5, 及び 6 は、非標識コンペティタープロンプ を含まない場合の結果である。また、レーン 7 は Jurkat 細胞の核抽出物を用いた反応を表す。(A) で用いたものと同じ分子量マーカーの位置を左側に示した。

2-4 考察

本研究では、*lyn* プロモーター領域の負の調節配列の解析と、この配列 (NRL) に塩基配列特異的に結合する因子の同定についてを記した。第1章では、主に *lyn* プロモーター領域中の正の制御配列についての検討が記されている。正の制御の働きを持つ配列は、転写開始点のクラスターより約 50 塩基上流に存在するオクタマー配列であった。転写制御因子 OTF-2 はオクタマー配列に塩基配列特異的に結合し、転写活性を正に制御する蛋白質であり、血球系の B 細胞特異的に発現される (61, 73)。それ故、*lyn* 遺伝子は免疫グロブリン遺伝子と同様に、この OTF-2 による制御を受けて B 細胞で発現されているのかも知れない。第1章では、*lyn* 遺伝子プロモーターを含む CAT レポータープラスミドのオクタマー配列に変異を導入し、これを Jurkat 細胞に導入して CAT アッセイした。この実験では、プロモーター活性がバックグラウンドレベルにまで減少した。この導入された変異によって Jurkat 細胞核内の OTF-1 の結合が妨げられるので、OTF-1 もまた T 細胞内で *lyn* 遺伝子の発現を正に制御していると考えられた。転写制御因子 OTF-1 は普遍的に発現され (74)、ヒトのヒストン H2b 遺伝子の転写を促進することなどが知られている (15)。T 細胞内で *lyn* のプロモーターが、OTF-1 により正の制御を受けても発現されないならば、*lyn* プロモーター中に T 細胞で発現を抑制する配列が存在するであろうと予想されたのである。

lyn プロモーター領域の欠失、或いは点突然変異導入実験から、約 30-bp の負の調節配列の存在が示唆された。幾つかの異なった変異を導入したとき、Jurkat 細胞では CAT 活性が増大するが、他の細胞株では増大しない場合があった。例えば、pLNCATIV-3 を導入した Jurkat 細胞に於ける CAT 活性は pLNCATIV-2 を導入した場合に得られる CAT 活性の約 3.5 倍、そして部分欠失変異を導入した pLNCATIV Δ 2, Δ 3, 及び Δ 5 による CAT 活性は、もとの pLNCATIV によるものの約 2.5 倍から 3.5 倍であった (表 2)。これらの変異による CAT 活性の増大は、実験した他の細胞株においては認められなかった。これらのことより、*lyn* プロモーター中の -110 番と -81 番の間の配列が T 細胞特異的にプロモーター活性を抑制するのではないかと考えられた。pLNCATIVC に導入した変異の位置は -110 番と -80 番の間にあり、この変異の導入では Jurkat 細胞や他の細胞株で得

られる CAT 活性が pLNCATIV によるものとほとんど同じレベルであった (表 2)。プローブ N にこの pLNCATIVC と同じ変異を導入したプローブを作製し (プローブ CN)、これが、³²P- 標識プローブ N と Jurkat 細胞核抽出物による複合体 N1 及び N2 の形成を阻害するか否かをゲルシフト競合実験で検討したところ、プローブ N とプローブ CN による阻害効果はほとんど同じであった (内海ら未発表データ)。すなわち pLNCATIVC に導入した変異は抑制因子の結合を妨げる変異ではないことが示唆された。

興味深いことに、pLNCATIVD に導入した変異は Jurkat 細胞だけでプロモーターの活性を増大させた (表 2)。この結果は *lyn* プロモーターの -72 番から -66 番までを含む配列もまたプロモーター活性の抑制に関わることを示唆する。NRL を含む配列を他のプロモーター上流に接続すると細胞種によらず抑制する効果が認められたので、*lyn* プロモーター中には NRL の抑制効果に T 細胞特異性を与える配列の存在する可能性がある。ラットのプロラクチン遺伝子プロモーターに存在する負の調節領域 (FPII) の場合、付近に存在する配列によってその効果が左右されると報告されている (28)。また、最近ラットのエポキシヒドラーゼ遺伝子の調節領域の抑制制御は、2 つの別の配列から成り立っていることも報告されている (35)。*lyn* プロモーターの -70 番付近の配列が負の調節に対し T 細胞特異性を与えているのかも知れない。しかし、このことを証明するためには、-70 番付近の塩基配列を NRL の下流に組み込んだ場合、実際に T 細胞のみでプロモーター活性を減少させることを示す実験をすることが必要である。

lyn プロモーター領域を含むプラスミド pLNCATIV や V を Molt4 や HBC 細胞に導入した場合、CAT 活性はほとんど検出されなかった (内海ら未発表データ)。そのため、*lyn* プロモーターの構造自体が、T 細胞で転写の起こりにくい構造であることも考えられる。

最近、プロモーターの負の調節領域についての研究報告が増えつつある (60)。本研究で行ったゲルシフト競合分析の結果からは、5'-CCACACCAAACACCCAAACCT-3' という配列 (この配列はコンペティタープローブ N15 の失っている配列であり、プローブ MN1 及び MN2 の変異を導入した箇所も含んでいる) が複合体形成に必要な配列であると考えられた。また、5'-CTGCGCGACGGCCA-3' の配列もまた核内因子の結合にとって必要であると考えられる。なぜなら、プローブ Δ3 はこの配列を失っており、競合阻

害実験の際、複合体 N1 及び N2 の形成を競合阻害しなかったからである。もちろん、ここで用いたプローブ N の塩基配列よりも強く複合体を形成する塩基配列のある可能性を否定することはできない。

NRL 配列中の A 及び C の塩基に富んだ配列によるプロモーター抑制効果というのは報告されておらず、それゆえ、本研究中の UV クロスリンク法によって検出された蛋白質は、未知のものである可能性がある。NRL 中には CACCC の配列がある。この配列は、 β -グロブリン遺伝子の転写に必要とされ、またラットのトリプトファンオキシゲナーゼプロモーターのグルココルチコイド受容体結合配列と共にプロモーター活性に影響することが知られている (67)。また、興味深いことに、最近、HNF-5 結合配列が報告されており (23)、それは 5'-T(G/A)TTTG(C/T)-3' であるという。この配列に 1 塩基のミスマッチを許すと、NRL 配列中に逆向きになって存在する。しかし、 ^{32}P -標識したプローブ N と Jurkat 細胞核抽出物を用いてゲルシフト競合分析した場合、HNF-5 結合配列を含む非標識プローブをコンペティターとして用いたときは非標識プローブ N を用いたときに比較して複合体 N1 及び N2 形成阻害効果が非常に弱かった (内海ら未発表データ)。即ち、複合体 N1 及び N2 の形成は HNF-5 結合因子の関与しないものであることが示唆された。HNF-5 結合因子はチロシニアミノ転移酵素遺伝子の肝細胞特異的な転写にとって必要な転写因子として報告されている。*lyn* 遺伝子が胎児肝で発現しており、成人肝では発現レベルが減少することも併せて考えると面白い。甲状腺ホルモン受容体反応性配列 (TRE) というのは、正及び負の両調節をすると報告されているし (8)、*neu* 遺伝子のプロモーターのエンハンサー配列は *neu* の発現による抑制に関係すること (95)、更に免疫グロブリン遺伝子のエンハンサー配列も正、負の両調節を行うこと (92) などが知られている。また、表 2 に示されている通り、NRL 内に変異を導入した CAT プラスミドを HeLa 細胞に導入した際、検出された CAT 活性の減少した結果からも HeLa 細胞内で NRL が正の制御をしている可能性が示唆される。それゆえ、NRL 配列が正と負の調節をしたとしても不思議ではない。しかしながら、この可能性を検討するためには、胎児肝に於ける *lyn* 遺伝子転写の機構を明らかにする実験などが必要とされる。

lyn プロモーターの解析を行うことによって *lyn* プロモーターの構造 (図 15) 及びその生物学的な意義が明らかとなりつつある。*lyn* 遺伝子は B 細胞、単球/マクロファーク

ジ、及び血小板等で発現されるが、T細胞においてその発現レベルの非常に低いこと(88)は、*lyn* プロモーター中に存在する負の調節配列の制御による可能性がある。また、HTLV-Iに感染し、ウイルスを産生するT細胞株では、*lyn* 遺伝子が発現されているが、これはHTLV-Iのコードするp40^{int}によるトランス活性化を受ける配列が*lyn* プロモーター中に存在することで説明された(第1章参照)。ゲルシフト分析では、プローブNとMT-2細胞株抽出物とを反応しても、複合体N1の形成がほとんど認められなかった(図3)。もしかするとp40^{int}の*lyn* プロモーターに対するトランス活性化の他にも、*lyn* プロモーター活性を抑制する因子の欠如することによって*lyn* 遺伝子の発現が増強される可能性もあるかもしれない。しかしながら、MT-2細胞と同様に*lyn* 遺伝子の発現されているHut-102細胞の核抽出物中には複合体N1及びN2を形成する因子が存在するので、NRL配列に対する蛋白質の結合だけがHTLV-I産生T細胞に於ける*lyn* 遺伝子発現の原因となっているわけではないと思われる。いずれにせよ、本研究で解析された*lyn* 遺伝子5'上流域768-bpよりも、更に上流の領域に正常T細胞での転写を強く抑制する配列やHTLV-Iウイルス産生T細胞株で転写を正に制御する配列の存在する可能性はある。

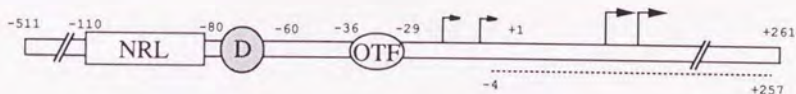


図 15. *lyn* 遺伝子プロモーター領域の構造。抑制制御配列として機能するエレメントをNRLと表してある。pLNCATIVDの変異導入部分を円で囲った。p40^{int}反応性領域には破線を施してある。この図では、cDNAとして得られている最も上流を+1としてあり、S1マッピング分析により決定された転写開始点の位置を矢印で表してある。

現在まで、転写抑制制御因子をコードする遺伝子が幾つか報告されている (11, 29, 56, 84)。レチノблаストーマ (Rb) 遺伝子は癌抑制遺伝子として知られているが、この遺伝子産物は細胞核内に局在し、DNA 結合能がある。最近、Rb 遺伝子産物はヒト *c-fos* プロモーター活性を抑えることが報告された (55)。癌関連遺伝子、あるいは増殖因子の負の制御というのは生物学的に重要である。本研究では、110kDa, 100kDa, 及び 85kDa の蛋白質が *lyn* プロモーターの NRL 配列に結合することが示された。真核細胞に於けるプロモーター抑制のメカニズムについての研究は始まっている (39) が、まだ完全には解明されていない。本研究で得られた結果は、*lyn* プロモーター中で、正の制御配列の上流に複数の蛋白質が塩基配列特異的に結合することが、負の制御効果を生ずるというモデルを提唱するだろう。更に、*lyn* プロモーターの抑制についてのメカニズムを追及するために NRL に結合する因子の遺伝子をクローニングすることが必要である。そして、もし *lyn* 遺伝子産物が、実際に成人 T 細胞白血病 (ATL) の悪性化に関係することが証明されたならば、その抑制因子のクローニングをすることによって ATL の治療に貢献することが期待される。

参考文献

1. Ballard, D. W., E. Bohnlein, J. W. Lowenthal, Y. Wano, B. R. Franza, and W. C. Greene. 1988. HTLV-I Tax induces cellular proteins that activate the κ B element in the IL-2 receptor α gene. *Science* **241**:1652-1655.
2. Brady, J., K.-T. Jeang, J. Duvall, and G. Khoury. 1987. Identification of p40_x-responsive regulatory sequences within the human T-cell leukemia virus type I long terminal repeat. *J. Virol.* **61**:2175-2181.
3. Briggs, M. R., J. T. Kadonaga, S. P. Bell, and R. Tjian. 1986. Purification and biochemical characterization of the promoter specific transcription factor, Sp1. *Science* **234**:47-52.
4. Campbell, M.-A., and B. M. Sefton. 1992. Association between B-lymphocyte membrane immunoglobulin and multiple members of the *src* family of protein tyrosine kinases. *Mol. Cell. Biol.* **12**:2315-2321.
5. Chen, I. S. Y., D. J. Slamon, J. D. Rosenblatt, N. P. Shan, S. G. Quan, and W. Wachsman. 1985. The *x* gene is essential for HTLV replication. *Science* **229**:54-58.
6. Cross, S. L., N. F. Halden, M. J. Lenardo, and W. J. Leonard. 1989. Functionally distinct NF- κ B binding sites in the immunoglobulin κ and IL-2 receptor α chain genes. *Science* **244**:466-469.
7. Currie, R. A., and R. G. Roeder. 1989. Identification of an octamer-binding site in the mouse kappa light-chain immunoglobulin enhancer. *Mol. Cell. Biol.* **9**:4239-4247.
8. Damm, K., C. C. Thompson, and R. M. Evans. 1989. Protein encoded by a *v-erbA* functions as a thyroid-hormone receptor antagonist. *Nature* **339**:593-597.

9. Dignum, J., R. M. Lebovitz, and R. G. Roeder. 1983. Accurate transcription initiation by RNA polymerase II in a soluble extract from isolated mammalian nuclei. *Nucleic Acids Res.* **11**:1475-1489.
10. Doi, T., M. Hatakeyama, S. Itoh, and T. Taniguchi. 1989. Transient induction of IL-2 receptor in cultured T cell lines by HTLV-I LTR-linked *tax-1* gene. *EMBO J.* **8**:1953-1958.
11. Drummond, I. A., S. L. Madden, P. Rohwer-Nutter, G. I. Bell, V. P. Sukhatome, and F. J. Rauscher III. 1992. Repression of the insulin-like growth factor II gene by the wilms tumor suppressor WT1. *Science* **257**:674-678.
12. Dymecki, S. M., J. E. Niederhuber, and S. V. Desiderio. 1989. Specific expression of a tyrosine kinase gene, *blk* in B lymphoid cells. *Science* **247**:332-336.
13. Felber, B. K., H. Paskalis, C. Kleinman-Ewing, F. Wong-Staal, and G. N. Pavlakis. 1985. The pX protein of HTLV-I is a transcriptional activator of its long terminal repeats. *Science* **229**:675-679.
14. Felgner, P. L., T. R. Gadek, M. Holm, R. Roman, H. W. Chan, M. Wenz, J. P. Northrop, G. M. Ringold, and M. Danielsen. 1987. Lipofection: a highly efficient, lipid-mediated DNA-transfection procedure. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **84**:7413-7417.
15. Fletcher, C., N. Heintz, and R. G. Roeder. 1987. Purification and characterization of OTF-1, a transcription factor regulating cell cycle expression of a human histone H2b gene. *Cell* **51**:773-781.
16. Fujii, M., P. Sassone-Corsi, and I. M. Verma. 1988. *c-fos* promoter trans-activation by the *tax*₁ protein of human T-cell leukemia virus type I. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**:8526-8530.

17. **Fujisawa, J., M. Seiki, T. Kiyokawa, and M. Yoshida.** 1985. Functional activation of the long terminal repeat of human T-cell leukemia virus type I by a *trans*-acting factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **82**:2277-2281.
18. **Fujisawa, J., M. Seiki, M. Sato, and M. Yoshida.** 1986. A transcriptional enhancer sequence of HTLV-I is responsible for trans-activation mediated by p40^x of HTLV-I. *EMBO J.* **5**:713-718.
19. **Fujisawa, J., M. Toita, and M. Yoshida.** 1989. A unique enhancer element for the trans activator (p40^{px}) of human T-cell leukemia virus type I that is distinct from cyclic AMP- and 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate-responsive elements. *J. Virol.* **63**: 3234-3239.
20. **Fujisawa, J., M. Toita, T. Yoshimura, and M. Yoshida.** 1991. The indirect association of human T-cell leukemia virus *tax* protein with DNA results in transcriptional activation. *J. Virol.* **65**:4525-4528.
21. **Fujita, T., H. Shibuya, T. Ohashi, K. Yamanishi, and T. Taniguchi.** 1986. Regulation of human interleukin-2 gene: functional DNA sequences in the 5' flanking region for the gene expression in activated T lymphocytes. *Cell* **46**:401-407.
22. **Gorman, C.** 1985. High Efficiency Gene Transfer into Mammalian Cells: DNA Cloning, vol. 2, Glover, D. M. (ed.). IRL Press: Oxford. pp. 143-165.
23. **Grange, T., J. Roux, G. Rigaud, and R. Pictet.** 1990. Cell specific activity of two glucocorticoid responsive units of rat tyrosine aminotransferase gene is associated with multiple binding sites for C/EBP and a novel liver-specific nuclear factor. *Nucleic Acids Res.* **19**:131-139.
24. **Greene, W. C., and W. J. Leonard.** 1986. The human interleukin-2 receptor. *Ann. Rev. Immunol.* **4**:69-95.

25. Hatakeyama, M., T. Kono, N. Kobayashi, A. Kawahara, S. D. Levin, R. M. Perlmutter, and T. Taniguchi. 1991. Interaction of the IL-2 receptor with the *src*-family kinase p56^{lck}: identification of novel intermolecular association. *Science* **252**:1523-1528.
26. Hinuma, Y., K. Nagata, M. Hanaoka, M. Nakai, T. Matsumoto, K. Kinoshita, S. Shirakawa, and I. Miyoshi. 1981. Adult T-cell leukemia: antigen in an ATL cell line and detection of antibodies to the antigen in human sera. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **78**:6476-6480.
27. Inoue, J., M. Seiki, T. Taniguchi, S. Tsuru, and M. Yoshida. 1986. Induction of interleukin 2 receptor gene expression by p40^r encoded by human T-cell leukemia virus type 1. *EMBO J.* **5**:2883-2888.
- 27a. Inoue, J., and M. Yoshida. Unpublished data.
28. Jackson, S. M., C. A. Keech, D. J. Williamson, and A. Gutierrez-Hartmann. Interaction of basal positive and negative transcription elements controls repression of the proximal rat prolactin promoter in nonpituitary cells. 1992. *Mol. Cell. Biol.* **12**:2708-2719.
29. Kageyama, R., and I. Pastan. 1989. Molecular cloning and characterization of A human DNA binding factor that repress transcription. *Cell* **59**:815-825.
30. Kakkis, E., K. J. Riggs, W. Gillespie, and K. Calame. 1989. A transcriptional repressor of *c-myc*. *Nature* **339**:718-721.
31. Katagiri, T., K. Urakawa, Y. Yamanashi, K. Semba, T. Takahashi, K. Totoshima, T. Yamamoto, and K. Kano. 1989. Over expression of *src* family gene for tyrosine-kinase p59^{lck} in CD4⁺CD8⁺ T cells of mice with a lymphoproliferative disorder. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**:10064-10068.

32. Keller, A. D., and T. Maniatis. 1991. Identification and characterization of a novel repressor of β -interferon gene expression. *Genes. and Dev.* 5:868-879.
33. Koga, Y., N. Kimura, J. Minowada, and T. W. Mak. 1988. Expression of the human T-cell-specific tyrosine kinase YT16 (*lck*) message in leukemic T-cell lines. *Cancer Res.* 48:856-859.
34. Koga, Y., N. Oh-hori, H. Sato, N. Yamamoto, G. Kimura, and K. Nomoto. 1989. Absence of transcription of *lck* (lymphocyte specific protein tyrosine kinase) message in IL-2-independent, HTLV-I-transformed T cell lines. *J. Immunol.* 142:4493-4499.
35. Kondo, S., Y. Chou, P. N. Gertson, K. Yokoyama, and K. Itakura. 1992. A bipartite suppressor: conjunction of two distinct factor-binding sites is essential for down-regulation in rat epoxide hydrolase gene expression. *Mol. Cell. Biol.* 12:4496-4502.
36. Kunkel, T. A. 1985. Rapid and efficient site-specific mutagenesis without phenotypic selection. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82:488-492.
37. Lee, W. S., C. C. Kao, G. O. Bryant, X. Liu, and A. J. Berk. 1991. Adenovirus E1A activation domain binds the basic repeat in the TATA box transcription factor. *Cell* 67:365-376.
38. Leung, K., and G. J. Nabel. 1988. HTLV-1 transactivator induces interleukin-2 receptor expression through an NF- κ B-like factor. *Nature (London)* 333:776-778.
39. Levine, M., and J. L. Manley. 1989. Transcriptional repression of eukaryotic promoters. *Cell* 59:405-408.
40. Ley, T. J., N. L. Connolly, S. Katamine, M. S. C. Cheah, R. M. Senior, and K. C. Robbins. 1989. Tissue-specific expression and developmental regulation of the human *fgr* proto-oncogene. *Mol. Cell. Biol.* 9:92-99.

41. **Lichtenberg, U., N. Quintrell, and J. M. Bishop.** 1992. Human protein-tyrosine kinase gene HCK: expression and structural analysis of the promoter region. *Oncogene* 7:849-858.
42. **Maniatis, T., E. F. Fritsch, and J. Sambrook.** 1982. *Nuclease S1 Mapping of RNA : Molecular Cloning.* Cold Spring Harbor Laboratory Press : Cold Spring Harbor, New York. pp. 207-209.
43. **Marriott, S. J., I. Boros, J. F. Duvall, and J. N. Brady.** 1989. Indirect binding of human T-cell leukemia virus type I tax₁ to a responsive element in the viral long terminal repeat. *Mol. Cell. Biol.* 9:4152-4160.
44. **Marth, J. D., R. Peet, E. G. Krebs, and R. M. Perlmutter.** 1985. A lymphocyte-specific protein-tyrosine kinase gene is rearranged and overexpressed in the murine T cell lymphoma LSTRA. *Cell* 43:393-404.
45. **Maruyama, M., H. Shibuya, H. Harada, M. Hatakeyama, M. Seiki, T. Fujita, J. Inoue, M. Yoshida, and T. Taniguchi.** 1987. Evidence for aberrant activation of the interleukin-2 autocrine loop by HTLV-1-encoded p40^x and T3/Ti complex triggering. *Cell* 48:343-350.
46. **Matsuzawa, Y., K. Semba, J. Kawamura-Tsuzuku, T. Sudo, S. Ishii, K. Toyoshima, and T. Yamamoto.** 1991. Characterization of the promoter region of the *c-src* proto-oncogene: the importance of the GC boxes on its promoter activity. *Oncogene* 6:1561-1567.
47. **Miyatake, S., M. Seiki, M. Yoshida, and K. Arai.** 1988. T-Cell activation signals and human T-cell leukemia virus type I- encoded p40^x protein activate the mouse granulocyte-macrophage colony-stimulating factor gene through a common DNA element. *Mol. Cell. Biol.* 8:5581-5587.
48. **Mizusawa, S., S. Nishimura, and F. Seela.** 1986. Improvement of the dideoxy chain termination method of DNA sequencing by use of deoxy-7-deazaguanosine triphosphate in place of dGTP. *Nucleic Acids Res.* 14:1319-1324.

49. **Murphy, S., A. Pierani, C. Scheidereit, M. Melli, and R. G. Roeder.** 1989. Purified octamer binding transcription factors stimulate RNA polymerase III-mediated transcription of the 7SK RNA gene. *Cell* **59**:1071-1080.
50. **Nagata, K., K. Ohtani, M. Nakamura, and K. Sugimura.** 1989. Activation of endogenous *c-fos* proto-oncogene expression by human T-cell leukemia virus type I-encoded p40^{xx} protein in the human T-cell line, Jurkat. *J. Virol.* **63**:3220-3226.
51. **Nakabayashi, H., T. Hashimoto, Y. Miyao, K.-K. Tjong, J. Chan, and T. Tamaoki.** 1991. A position-dependent silencer plays a major role in repressing α -fetoprotein expression in human hepatoma. *Mol. Cell. Biol.* **11**:5885-5893.
52. **Nakagoshi, H., T. Nagase, C. Kanei-Ishi, Y. Ueno, and S. Ishii.** 1990. Binding of the *c-myc* proto-oncogene product to the simian virus 40 enhancer stimulates transcription. *J. Biol. Chem.* **265**:3479-3483.
53. **Patel, M., S. J. Leever, and P. M. Brickell.** 1990. Structure of the complete human *c-fgr* proto-oncogene and identification of multiple transcriptional start sites. *Oncogene* **5**:201-206.
54. **Quintrell, N., R. Lebo, H. Varmus, J. M. Bishop, M. J. Pettanati, M. M. Le Beau, M. O. Biaz, and J. D. Rowley.** 1987. Identification of a human gene (HCK) that encodes a protein-tyrosine kinase and is expressed in hemopoietic cells. *Mol. Cell. Biol.* **7**:2267-2275.
55. **Robbins, P. D., J. M. Horowitz, and C. Mulligan.** 1990. Negative regulation of human *c-fos* expression by the retinoblastoma gene product. *Nature* **346**:668-671.
56. **Ron, D., and J. F. Habener.** 1992. CHOP, a novel developmentally regulated nuclear protein that dimerizes with transcription factors C/EBP and LAP and functions as a dominant-negative inhibitor of the gene transcription. *Genes. and Dev.* **6**:439-453.

57. Ruben, S., H. Poteat, T. Tan, K. Kawakami, R. Roeder, W. Haseltine, and C. A. Rosen. 1988. Cellular transcription factors and regulation of IL-2 receptor gene expression by HTLV-I *tax* gene product. *Science* **241**:89-92.
58. Rudd, C. E., J. M. Trevillyan, J. D. Dasgupta, L. L. Wong, and S. F. Schlossman. 1988. The CD4 receptor is complexed in detergent lysates to a protein-tyrosine kinase (pp58) from human T lymphocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**:5190-5194.
59. Samelson, L. E., A. F. Phillips, E. T. Luong, and R. D. Klausner. 1990. Association of the fyn protein-tyrosine kinase with the T-cell antigen receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**:4358-4362.
60. Sato, K., K. Ito, H. Kohara, Y. Yamaguchi, K. Adachi, and H. Endo. 1992. Negative regulation of catalase gene expression in hepatoma cells. *Mol. Cell. Biol.* **12**:2525-2533.
61. Scheidereit, C., A. Heguy, and R. G. Roeder. 1987. Identification and purification of a human lymphoid-specific octamer-binding protein (OTF-2) that activates transcription of an immunoglobulin promoter in vitro. *Cell* **51**:783-793.
62. Schreck, R., and P. A. Baeuerle. 1990. NF- κ B as inducible transcriptional activator of the granulocyte-macrophage colony-stimulating factor gene. *Mol. Cell. Biol.* **10**:1281-1286.
63. Seiki, M., J. Inoue, T. Takeda, and M. Yoshida. 1986. Direct evidence that p40^x of human T-cell leukemia virus type I is a *trans*-acting transcriptional activator. *EMBO J.* **5**:561-565.
64. Semba, K., Y. Yamanashi, M. Nishizawa, J. Sukegawa, M. Yoshida, M. Sasaki, T. Yamamoto, and K. Toyoshima. 1985. Location of the *c-yes* gene on the human chromosome and its expression in various tissues. *Science* **227**:1038-1040.

65. 仙波 憲太郎. 1992. *src* ファミリーチロシンキナーゼの構造と機能. Medical Immunology. 24:99-107.
66. Shimotohno, K., M. Takano, T. Teruuchi, and M. Miwa. 1986. Requirement of multiple copies of a 21-nucleotide sequence in the U3 regions of human T-cell leukemia virus type I and type II long terminal repeats for trans-acting activation of transcription. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83:8112-8116.
67. Shule, R., M. Muller, H. O. Murakami, and R. Reukawitz. 1988. Cooperativity of the glucocorticoid receptor and the CACCC-box binding factor. Nature (London) 332:87-90.
68. Siekevitz, M., M. B. Feinberg, N. Holbrook, F. Wong-Staal, and W. C. Greene. 1987. Activation of interleukin 2 and interleukin 2 receptor (Tac) promoter expression by the trans-activator (tat) gene product of human T-cell leukemia virus, type I. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84:5389-5393.
69. Smith, K. A. 1980. T-Cell growth factor. Immunol. Rev. 51:337-357.
70. Smith, K. A. 1984. Interleukin 2. Ann. Rev. Immunol. 2:319-333.
71. Sodroski, J., C. Rosen, W. C. Goh, and W. Haseltine. 1985. A transcriptional activator protein encoded by the *x-lor* region of the human T-cell leukemia virus. Science 228:1430-1434.
72. Stanley, E., S. Ralph, S. McEwen, I. Boulet, D. A. Holtzman, P. Lock, and A. R. Dunn. 1991. Alternatively spliced murine *lyn* mRNAs encode distinct proteins. Mol. Cell. Biol. 11:3399-3406.
73. Staudt, L. M., H. Singh, R. Sen, T. Wirth, P. A. Sharp, and D. Baltimore. 1986. A lymphoid-specific protein binding to the octamer motif of immunoglobulin genes. Nature (London) 323:640-643.

74. Sturm, R. A., G. Das, and W. Herr. 1988. The ubiquitous octamer-binding protein Oct-1 contains a POU domain with a homeo box subdomain. *Genes Dev.* 2:1582-1599.
75. Takedera, T., S. Leung, A. Gernone, Y. Koga, Y. Takihara, N. G. Miyamoto, and T. W. Mak. 1989. Structure of the two promoters of the human *lck* gene: Differential accumulation of two classes of *lck* transcripts in T cells. *Mol. Cell. Biol.* 9:2173-2180.
76. Taniguchi, T., H. Matsui, T. Fujita, M. Hatakeyama, N. Kashima, A. Fuse, J. Hamuro, C. Nishi-Takaoka, and G. Yamada. 1986. Molecular analysis of the interleukin-2 system. *Immunol. Rev.* 92:121-133.
77. Torigoe, T., H. U. Saragovi, and J. C. Reed. 1992. Interleukin 2 regulates the activity of the lyn protein-tyrosine kinase in a B-cell line. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:2674-2678.
78. Wang, J., M. Oketani, and T. Watanabe. 1991. Positive and negative regulation of immunoglobulin gene expression by a novel B-cell-specific enhancer element. *Mol. Cell. Biol.* 11:75-83.
79. Trevillyan, J. M., C. Canna, D. Maley, T. J. Linna, and C. A. Phillips. 1986. Identification of the human T-lymphocyte protein-tyrosine kinase by peptide-specific antibodies. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 140:392-398.
80. Veillette, A., M. A. Bookman, E. M. Horak, and J. B. Bolen. 1988. The CD4 and CD8 cell surface antigens are associated with the internal membrane tyrosine-protein kinase p56^{lck}. *Cell* 55:301-308.
81. Wang, J., K. Nishiyama, K. Araki, D. Kitamura, and T. Watanabe. 1987. Purification of an octamer sequence (ATGCAAAT)-binding protein from human B cells. *Nucleic Acids Res.* 15:10105-10116.

82. Wang, J., M. Oketani, and T. Watanabe. 1991. Positive and negative regulation of immunoglobulin gene expression by a novel B-cell-specific enhancer element. *Mol. Cell. Biol.* **11**:75-83.
83. Wasylyk, C., P. Flores, A. Gutman, and B. Wasylyk. 1989. PEA3 is a nuclear target for transcription activation by non-nuclear oncogenes. *EMBO J.* **8**:3371-3378.
84. Williams, T. M., D. Moolten, J. Romano, R. Bhaerman, A. Godillot, M. Mellon, F. J. Rauscher III, and J. A. Kant. 1991. Identification of a zinc finger protein that inhibits Il-2 gene expression. *Science* **254**:1791-1794.
85. Wirth, T., L. Staudt, and D. Baltimore. 1987. An octamer oligonucleotide upstream of a TATA motif is sufficient for lymphoid-specific promoter activity. *Nature (London)* **329**:174-178.
86. Wong-staal, F., and R. C. Gallo. 1985. Human T-lymphotropic retroviruses. *Nature (London)* **317**:395-403.
87. Yamanashi, Y., S. Fukushige, K. Semba, J. Sukegawa, N. Miyajima, K. Matsubara, T. Yamamoto, and K. Toyoshima. 1987. The *yes*-related cellular gene *lyn* encodes a possible tyrosine kinase similar to $p56^{lck}$. *Mol. Cell. Biol.* **7**:237-243.
88. Yamanashi, Y., S. Mori, M. Yoshida, T. Kishimoto, K. Inoue, T. Yamamoto, and K. Toyoshima. 1989. Selective expression of a protein-tyrosine kinase, $p56^{lyn}$, in hematopoietic cells and association with production of human T-cell lymphotropic virus type I. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**:6538-6542.
89. Yamanashi, Y., T. Kakiuchi, J. Mizuguchi, T. Yamamoto, and K. Toyoshima. 1991. Association of B cell antigen receptor with protein tyrosine kinase Lyn. *Science* **251**:192-194.

90. Yamanashi, Y., M. Miyasaka, M. Takeuchi, D. Ilic, J. Mizuguchi, and T. Yamamoto. 1991. Differential responses of p56^{lyn} and p53^{lyn}, products of alternatively spliced lyn mRNA, on stimulation of B cell antigen receptor. *Cell Regulation* 2:979-987.
91. Yamanashi, Y., Y. Fukui, B. Wongsasant, Y. Kinoshita, Y. Ichimori, K. Toyoshima, and T. Yamamoto. 1992. Activation of Src-like protein-tyrosine kinase Lyn and its association with phosphatidylinositol-3 kinase upon B cell antigen receptor-mediated signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:1118-1122.
92. Yi, T., J. B. Bolen, and J. N. Ihle. 1991. Hematopoietic cells express two forms of lyn kinase differing by 21 amino acids in the amino terminus. *Mol. Cell. Biol.* 11:2391-2398.
93. Yoshida, M., I. Miyoshi, and Y. Hinuma. 1982. Isolation and characterization of retrovirus from cell lines of human adult T-cell leukemia and its implication in the disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79:2031-2035.
94. Yoshida, M. 1987. Expression of the HTLV-1 genome and its association with a unique T-cell malignancy. *Biochem. Biophys. Acta.* 907:145-161.
95. Zhao, X.-Y., and M. Hung. 1992. Negative autoregulation of the *neu* gene is mediated by a novel enhancer. *Mol. Cell. Biol.* 12:2739-2748.
96. Zinkel, S. S., S. K. Pal, J. Szeberenyi, and G. M. Cooper. 1992. Identification of a negative regulatory element that inhibits *c-mos* transcription in somatic cells. *Mol. Cell. Biol.* 12:2029-2036.

謝辞

本研究は、多くの方々のご指導によって完成されました。私の指導教官である山本雅教授をはじめ、阪大微生物遺伝子研究部門 豊島 久真男教授、井上 和司研究員、東大医科研細胞化学研究部 吉田 光昭教授、藤沢 順一助手、制癌研究部 仙波憲太郎助手、山梨 裕司助手、松田 覚助手、理化学研究所分子遺伝部 石井俊輔研究員、そして制癌研究部の方々全員に深く感謝の意を表します。

1992年10月30日

内海 文彰

