

原 著

アンドロゲンレスポンスエレメントの新同定法の確立と マウス上皮成長因子遺伝子への適用

島崎 操一

岩手医科大学歯学部口腔生化学講座

(主任：太田 稔 教授)

(受付：1995年10月12日)

(受理：1995年11月2日)

Abstract : A novel method indentifying the androgen response element of the genes has been developed. For this purpose, the DNA-binding domain of the androgen receptor (ARDBD) was expressed as a fusion protein with glutathione S-transferase in *Escherichia coli*. Then, the fusion protein adsorbed to glutathione Sepharose was prepared and used as an affinity column to trap the DNA fragment containing a potential androgen response element. This affinity column was proved to interact specifically with the mouse mammary tumor virus DNA possessing several receptor-binding sites. With this technique was applied to the mouse epidermal growth factor gene of which expression is regulated by androgens in murine submandibular gland. Among the regions tested (about -1900~+315), a region strongly ineteracting with ARDBD was found to be located between -727 and -598. Analysis by gel shift electrophoresis supported this notion. The comparison of the nucleotide sequence of this region revealed a segment with homology to the sequences of the genes which are regulated by androgens. Therefore, it was concluded that the potential androgen response element of mouse epidermal growth factor gene is detected between -727 and -598 and that this method is efficient for indentifying the androgen response element.

Key words : epidermal growth factor gene, androgen receptor, submandibular gland, androgen response element, affinity chromatography

緒 言

上皮成長因子 (epidermal growth factor,

EGF)¹⁾ は雄マウス顎下腺より初めて精製分離された成長因子であり、細胞の分化や増殖など

Development of a novel method indentifying androgen response element and its application to mouse epidermal growth factor gene.

Soichi SHIMAZAKI

(Department of Biochemistry, School of Dentistry, Iwate Medical University, Morioka, 020 Japan)

Abbreviations : EGF, epidermal growth factor ; AR, androgen receptor ; hAR, human androgen receptor ; rAR, rat androgen receptor ; ARDBD, DNA-binding domain of AR ; ARSBD, steroid-binding domain of AR ; ARDBD/SBD, DNA- and steroid-binding domain of AR ; HRE, hormone response element ; ARE, androgen response element ; GRE, glucocorticoid response element ; TRE, thyroid response element ; MMTV, mouse mammary tumor virus ; GST, glutathione S-transferase.

に広範囲な影響を与える。例えば初期の雄性器官の分化や性成熟後の精子の生成²⁾、母乳の合成³⁾など雌雄マウスでは非常に重要な機能を担っている。EGF 受容体の cDNA クローニングの結果、癌遺伝子である *v-erbB* と細胞内ホモログであることが明らかになった⁴⁾。その後、EGF 受容体に相同性を有する癌原遺伝子の *c-erbB2* もみいだされている⁵⁾。これらのことから EGF とその受容体は細胞の増殖や分化、さらに癌化に深く関わっているものと考えられている。EGF はマウスやラットの顎下腺では主にアンドロゲン依存的にその mRNA の発現が促進されるが、腎臓ではアンドロゲンにより逆に抑制される⁶⁾。このように EGF 遺伝子の発現は組織特異的であり、かつホルモン依存的である。しかし、この EGF 遺伝子の発現調節機構はまだ解明されていない。

アンドロゲンなどのステロイドホルモンは、コレステロールから合成される脂溶性リガンドであり、核内レセプターを介して標的遺伝子に作用しその遺伝子発現を調節する。この際、核内レセプターは標的遺伝子の 5' 上流やイントロン部位に存在する特異的な配列 (hormone response element, HRE) に直接結合し、その遺伝子の転写活性を制御する⁷⁾。

アンドロゲンレセプター (AR) は核内レセプタースーパーファミリーに属し、その基本的なドメイン構造は互いに類似し、その機能から A ~ F の領域に分けられている⁸⁾。各領域には、A / B および E / F 領域に転写活性化機能、C 領域 (DNA-binding domain, DBD) に DNA 結合能、D 領域に核移行シグナル、E / F 領域 (steroid-binding domain, SBD) にステロイド結合能、ダイマー形成能などの各機能が存在する (Fig. 1)⁹⁾。DBD は 66 ~ 68 個のアミノ酸残基からなり、特に相同性が高い。この領域は塩基性アミノ酸に富み、中心部に Zn^{2+} を配位した Zn フィンガー構造を 2 個形成し、単独でも HRE に結合することができる¹⁰⁾。各レセプターは SBD を介してホモダイマーやヘテロダイマーを形成して標的遺伝子の HRE と結合する¹¹⁾。

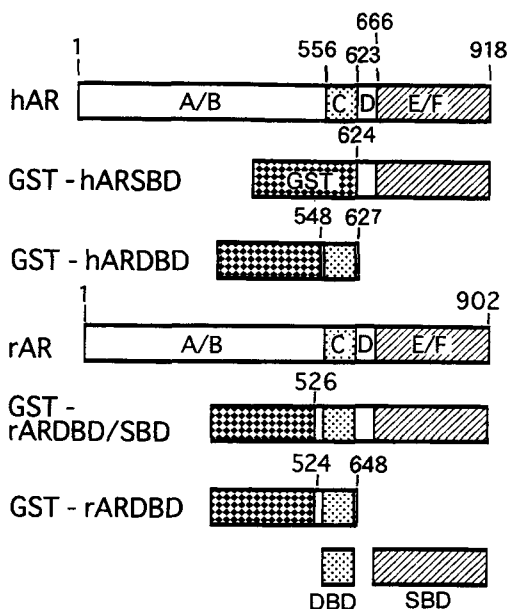


Fig. 1. Domain structures of human and rat ARs. Domain structures of human and rat ARs are schematically illustrated. A/B, C and D domains have the functions of transactivation, DNA binding and unclear translocation, respectively. E/F domain has the functions of steroid binding, transactivation and dimerization. C and E/F domains are also called DNA-binding domain (DBD) and steroid-binding domain (SBD), respectively.

本研究ではマウス顎下腺でのアンドロゲンによる EGF 遺伝子の転写調節機構を解明するために、アンドロゲンによる EGF 遺伝子の転写調節領域の検索をおこなった。はじめに ARDBD を glutathione S-transferase (GST) 融合タンパク質として大腸菌にて発現させた。この精製 GST-ARDBD を用いて、*in vitro* で ARE 配列を検出するシステムを確立した。さらにこの方法を応用して、マウス EGF 遺伝子 5' 上流の androgen response element (ARE)¹²⁾ の配列の検索を試みた。

材料および方法

1. 実験材料
 - 1) 試薬

[α - 32 P] dCTP (3000 Ci/mmol)はAmersham (Arlington Heights, IL, USA) より購入した。制限酵素と他の酵素類は, Boehringer Mannheim (Germany) とTakara (Tokyo, Japan) より購入した。pGEX ベクターと glutathione Sepharose 4 B は Pharmacia Biotech.(Uppsala, Sweden)より購入した。その他の試薬類は特級を用いた。

2) 緩衝液

以下の緩衝液を使用した。

Preparation buffer : 50 mM Tris-HCl (pH 8.0), 1 mM EDTA, 0.4 M NaCl. TE buffer : 10 mM Tris-HCl (pH 7.3), 1 mM EDTA, 10% (v/v) glycerol. 1×TBE buffer : 90 mM Tris-borate (pH 8.3), 2 mM EDTA.

2. 方法

1) AR 発現ベクターの調製

Polymerase chain reaction (PCR) によってヒト ARDBD (hARDBD) およびヒト ARSBD (hARSBD) をコードする DNA 断片を得た。hARDBD 遺伝子増幅のためのセンスプライマー (5'-GTTGGATCCATTGACTATTACT-TTC3') には制限酵素 BamHI 部位 (下線部) を, アンチセンスプライマー (5'-TCTGCAGA-ATTCGGCTCCCAGAGTCATC-3') には制限酵素 EcoRI 部位 (下線部) を導入した。hARSBD のセンスプライマー (5'-AAGCAGG-ATCCACTCTGGGAGCCCG-3') とアンチセンスプライマー (5'-AGGGGATCCAATGCTTC-ACTGGGTG-3') には BamHI 部位 (下線部) を導入した。Dr. S. Liao (シカゴ大学) より供与を受けたヒト AR (hAR) の全長をコードする cDNA クローン¹³⁾を, PCR のテンプレートとして用いた。PCR の条件は, テンプレート DNA, センスおよびアンチセンスプライマー各 200 ng, 0.2 mM dNTPs, 5 units *Taq* polymerase, 10 mM Tris-HCl, pH 8.8, 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂ を含む反応液 (100 μ l) とし, 92°C で 2 分の変性, 50°C で 2 分のアニーリング, 70°C で 2.5 分の伸長というステップを MINICycler (MJ Research) にて 25 サイクル反応を行った。

増幅 DNA は, QIAquick PCR purification kit (Qiagen) にて精製した。増幅した hARDBD 遺伝子は BamHI と EcoRI で消化した後 pGEX X-2T ベクターの BamHI/EcoRI 部位に挿入した。作成プラスミドは pGST-hARDBD と名づけた。hARSBD をコードする増幅 DNA 断片は BamHI で消化した後 pGEX-2T の BamHI 部位に挿入した。作成プラスミドは pGST-hARSBD と名づけた。また, Dr. R. Snoek (British Columbia Cancer Agency) より pGST-ラット ARDBD (pGST-rARDBD), pGST-ラット ARDBD/SBD (pGST-rARDBD/SBD) の供与を受けた¹⁴⁾。これらのプラスミドは, pGEX-3 X ベクター (Pharmacia) に rARDBD と rARDBD / SBD をコードする DNA を挿入したものである (Fig.1)。大腸菌 Y 1090 を上記のプラスミドにてトランスフォームし, それぞれのプラスミドをもつクローンを得た。

2) GST 融合 AR タンパク質の発現と抽出

pGST-hARSBD, pGST-hARDBD を保有する大腸菌 TG-1 を 50 μ g/ml のアンピシリンを含む LB 培養液 (LBamp) 300 ml で 37°C にて一晚培養した。翌日さらに isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside (最終 0.2 mM) を含む 300 ml の LBamp を加え, さらに 4~5 時間 28°C で培養して, タンパク質の発現を誘導した。この培養液を, 10000rpm で 10 分間遠心して集菌した。この菌ペレットを 20 μ g/ml leupeptin, 20 μ g/ml antipain, 20 μ g/ml soybean trypsin inhibitor, 20 μ g/ml pepstatin, 20 μ g/ml N α -tosyl-L-lysyl chloromethyl ketone を加えた preparation buffer 20 ml に懸濁した。さらに 0.5 μ g/ml の lysozyme を加え, 0°C で 30 分間インキュベートした。この溶液をソニケーションした後, 15000 rpm で 20 分間の遠心により, GST 融合 AR タンパク質を含む上清 (ライゼート) を得た。

3) GST 融合タンパク質の精製

発現した GST 融合タンパク質を, glutathione Sepharose カラムにて精製し

た¹⁵⁾。2) で調製した発現タンパク質を含むバクテリアライゼートを glutathione Sepharose カラムに添加し、ついで PBS, 0.2 M KCl を含む TE, PBS の順に洗浄し、最後に 25 mM Tris-HCl, pH 8, 10 mM glutathione, 30% glycerol で溶出した。精製したタンパク質を、sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel 電気泳動 (SDS-PAGE) で分析した。

4) マウス乳腺癌ウイルス (mouse mammary tumor virus, MMTV) プラスミドの作製

MMTV 遺伝子のうち 3 カ所にグルココルチコイドレスポンスエレメント (GRE) をもつ領域 (139 b) を PCR によって増幅した。センスプライマーには 5'-CCTTGC GGATCC CAGGGCT-3' (*Bam*HI 部位を下線で示した), アンチセンスプライマーには 5'-GATTTGGATGAATTC-CAAAAG-3' (*Eco*RI 部位を下線で示した) を用いた。テンプレートには MMTV 5031 (ガン研究振興財団より供与を受けた) を用いた。PCR にて増幅した DNA は *Bam*HI と *Eco*RI で消化し、pUC 18 の *Eco*RI/*Bam*HI 部位に挿入した。作成したプラスミドは pUCMMTV と名づけた。大腸菌 TG-1 を上記のプラスミドにてトランスフォームし、プラスミドをもつクローンを得た。

5) マウス EGF 遺伝子の 5' 上流領域の調製

マウス EGF 遺伝子の 5' 上流領域は、Dr. J. C. Pascall (AFRC 研究所) より供与を受けた clone 1, 2¹⁶⁾ を用いた。Clone 1 は、マウス EGF 遺伝子の exon 1 の一部とその 5' 上流側の *Hind*III-*Xho*I (約 -1900 ~ +309) を pUC 18 ベクターの *Hind*III/*Sal*I 部位に挿入したものであり、一方 clone 2 は Bluescript M 13 + ベクターの *Xba*I 部位にマウス EGF 遺伝子の intron 1 の一部、exon 1 とその 5' 上流側の領域、計約 11 kb を挿入したものである。大腸菌の TG-1 を clone 1, 2 にてトランスフォームしクローンを得た。

6) ARE 検索のためのマウス EGF 遺伝子 5' 上流側断片の調製

i) Clone 1 の切断

Clone 1 を制限酵素 *Hind*III, *Eco*RI, *Sph*I をもちいて消化切断した。これにより *Hind*III から *Eco*RI (約 -1900 ~ -897) までの 1 kb, *Eco*RI から *Sph*I (-896 ~ -433) までの 464 b, *Sph*I から *Xho*I (-432 ~ +315) までの 747 b, ベクターである pUC 18 の 2.69 kb に切断した。

ii) PCR 法による部分増幅

Clone 1 の *Eco*RI 部位から *Sph*I 部位 (-896 ~ -433) までの 464 b を、さらに 3 つの領域に分けて増幅したが、各領域の境界付近に ARE が存在する場合にも分断されないように、それぞれの領域の末端部が 20 b ずつ重複するよう各プライマーを設定した。-896 ~ -433 までの 464 b の領域を、-896 ~ -727 (A 領域) の 170 b, -746 ~ -579 (B 領域) の 168 b, -598 ~ -431 (C 領域) の 168 b に分け PCR 増幅した (Fig. 11)。A 領域はセンスプライマーを 5'-GAATTCCCATTGTTTCATCAA-3' (-896 ~ -877), アンチセンスプライマーを 5'-CATCTATCACATCTCAGTGA-3' (-727 ~ -746), B 領域はセンスプライマーを 5'-TCACTGAGATGTGATAGATG-3' (-746 ~ -727), アンチセンスプライマーを 5'-TAATAAAACATCACCGTGGGT-3' (-579 ~ -598), C 領域はセンスプライマーを 5'-ACCCACGGTGATGTTTTATTA-3' (-598 ~ -579), アンチセンスプライマーを 5'-CGCATGCCTGGAGCTTAATC-3' (-431 ~ -450) とした。PCR の条件は、92°C で 40 秒の変性、52°C で 40 秒のアニーリング、75°C で 40 秒の伸長というステップを 35 サイクル行った。反応液の組成は 1) の PCR と同一条件とした。

iii) EGF-A, B, C プラスミドの作製

PCR で増幅した EGF-A, B, C を 2% アガロースゲルにて電気泳動を行い、それぞれのバンドをゲルより切り出し、QIAEX DNA gel extraction kit にて精製した。各 EGF 遺伝子を、pCRII vector (Invitrogen) にライゲーションし、pCR EGF-A, B, C を得た。それぞれ

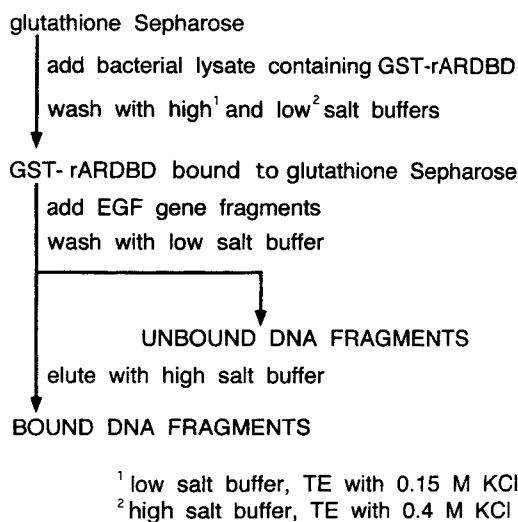


Fig. 2. Experimental procedure of ARE-selection-affinity chromatography.

のプラスミドを用いて、大腸菌株 TG-1 のコンピテント細胞を、electroporation 法によりトランスフォーメーションした。得られたクローンを LBamp にて培養し各プラスミドを精製した。これらのプラスミドを *EcoRI* を用いて、各 EGF-A, B, C と pCR II (3.9 kb) に切断した。

7) アフィニティーカラムによる AR 結合領域の検索

Glutathione Sepharose に GST-rARDBD を結合させて、ARE を含む DNA が結合するアフィニティーカラムを作製した。これに特異的結合をする EGF 遺伝子断片を検索した。その概略については、Fig. 2 に示した。通常、2) で得た GST-rARDBD を含むライゼート (500 μ l) と glutathione Sepharose (50 μ l) を使用した。GST-rARDBD と親和性の低い DNA 断片を low salt buffer にて低塩溶出画分に、結合している DNA 断片を high salt buffer にて高塩溶出画分に回収した。それぞれの画分をエタノール沈澱して脱塩と濃縮をした後、0.5 \times TBE buffer 中で 0.3 μ g/ml ethidium bromide を含む 2% agarose gel にて電気泳動し染色して分析した。

8) ゲルシフト解析

i) プローブ標識

EGF-A, B, C を PCR 法により作成する際に、基質に標識 dCTP を加えることによりプローブを標識した。PCR の条件は、20 μ M の dNTP (非標識条件の 1/10 濃度)、30 μ Ci の [α -³²P] dCTP を加え総量を 100 μ l とし、他の条件は 6) - ii) と同一とした。標識後、プローブを精製し、放射活性を測定して 10 kcpm を試料に用いた。一部の実験では、pUCMMTV を *BamH I* と *EcoRI* で消化切断し、[α -³²P] dCTP 存在下にて DNA ポリメラーゼの Klenow fragment で標識してプローブに用いた。

ii) 電気泳動

[³²P] 標識プローブと GST-rARDBD を用いて、ゲルシフト解析を行った。サンプル液 (25 μ l) の組成は、25 mM Hepes-KOH, pH 8.0, 0.5 mM EDTA, 0.15 M KCl, 0.04 mg sonicated salmon sperm DNA, 0.04 mg poly (dI-dC) \cdot poly (dI-dC), 0.04 mg bovine serum albumin, 0.04 mg milk, 7.5 μ g GST-rARDBD とした。サンプル当たり 10 kcpm の標識プローブを加えた。また一部の実験は、サンプルに競合ヌクレオチドとしてパリンδροームサイロイドレスポンスエレメント (TRE, 5'-GATCCAAGATTC-AGGTCATGACCTGAGGAGAGCCTAG-3')¹⁷⁾, ラットチロシンアミノトランスフェラーゼの GRE (5'-GGGCTGCTGTACAGGATGTTCT-AGCTACGCC-3')¹⁸⁾ を加えた。サンプル液を混合後、0 $^{\circ}$ C で 20 分間放置した。0.5 \times TBE を泳動用バッファーとし 5% アクリルアミドゲルで電気泳動した後、ゲルを乾燥させ、RX film (富士写真フィルム) にてオートラジオグラフィを行った。

結 果

1) GST 融合 AR タンパク質の発現と精製

当教室のこれまでの研究から、ステロイドレセプターを大腸菌で発現した場合、より大きな分子は発現程度が低いことが判明している¹⁹⁾。そこで本研究では AR 全長分子ではなく、その一部の機能ドメインを発現することとした。大

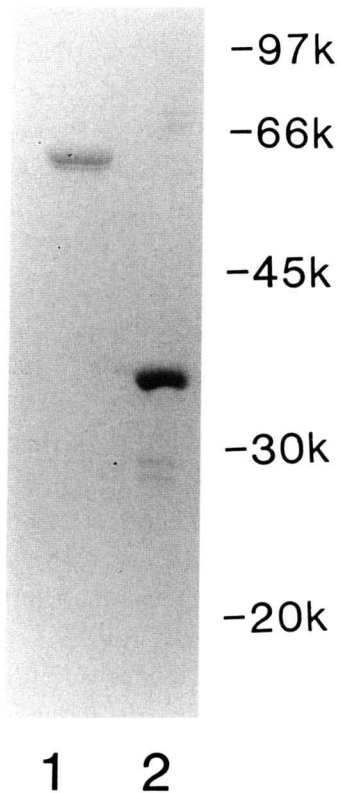


Fig.3. SDS-PAGE of the recombinant proteins. The purified proteins of *E. coli* Y1090 [pGST-hARSBD] and Y1090 [pGST-hARDBD] were analysed by SDS-PAGE. Lane 1, GST-hARSBD ; lane 2, GST-hARDBD.

腸菌で発現した GST-hARSBD は glutathione Sepharose による一段階の affinity chromatography によって純粋に精製することができた (Fig.3, lane 1)。その分子量は 60 kDa であり, hARSBD と GST の cDNA の塩基配列より予想される分子量の合計, 60.9 kDa とほぼ一致した。一方 GST-hARDBD の分子量は 35 kDa であり, 予想した分子量 36.2 kDa とほぼ一致した (lane 2)。

Y 1090 [pGST-hARSBD] のライゼート (0.1 ml) には, 合成アンドロゲンである [^3H]R 1881 10 nM とインキュベーションした場合は, 20,455 dpm の特異的結合が認められた。次に GST-hARDBD の DNA への結合活性を明らかにするために, ゲルシフト分析を行った (Fig.

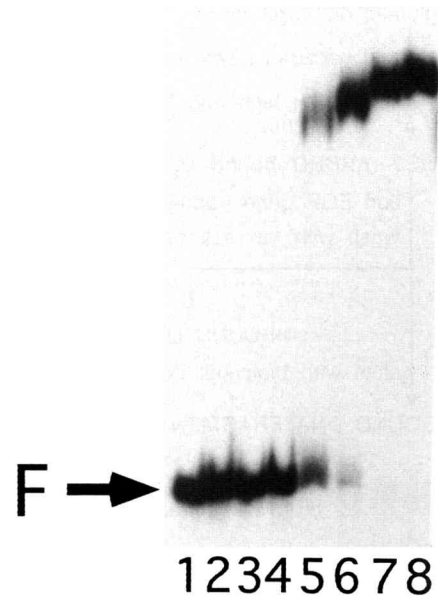


Fig.4. Gel shift assay of ^{32}P -MMTV-GST-hARDBD complexes.

GST (lanes 1-4) or GST-hARDBD (lanes 5-8) was incubated with ^{32}P -labeled MMTV and separated on a 5% polyacrylamide gel. Lanes 1 and 5, 0.5 μg ; lanes 2 and 6, 1 μg ; lanes 3 and 7, 2 μg ; lanes 4 and 8, 4 μg proteins.

4)。今回プローブとして用いた MMTV には GRE が 3 ヶ所存在するが, これらの配列は AR とも結合することが知られている^{20,21)}。GST を加えても ^{32}P -MMTV と結合してシフトするバンドは得られないが, GST-hARDBD を加えた場合には遊離のプローブのバンド以外にシフトバンドが得られた。バンドの強さとシフトする位置は, 加えた GST-hARDBD の濃度依存的であった。このことは, 加えるタンパク質の用量に依存してプローブ 1 分子に結合する GST-hARDBD の分子数が増加することを示唆している。このように発現した分子は hARSBD の場合には特異的ホルモン結合能を, また hARDBD の場合には DNA 結合能を有していた。これらの結果から本発現系により調製した AR の機能ドメインは活性を保持してお

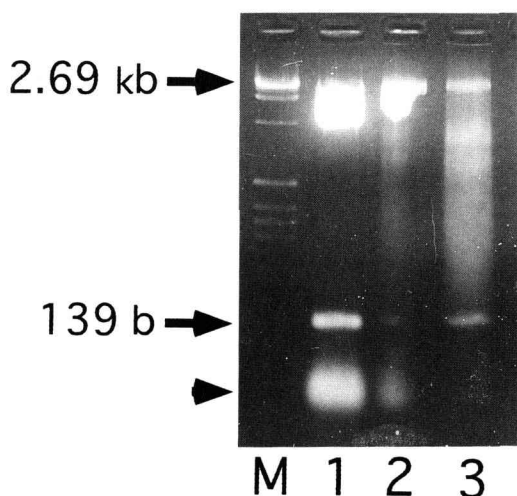


Fig. 5. Binding of MMTV fragment to GST-rARDBD affinity column. pUCMMTV was cut with *EcoRI* into 139b MMTV and 2.69kb pUC18 fragments and their bindings to GST-rARDBD were examined. An arrowhead may represent bacterial RNA. M, molecular marker (1kb ladder, Gibco-BRL): lane 1, cleaved pUCMMTV: lane 2, low salt buffer eluted: lane 3, high salt buffer eluted.

り、本研究の目的である遺伝子の転写調節領域の解析に使用しようと判断した。

同様に pGST-rARDBD (アミノ酸残基 524 ~ 648) および GST-rARDBD/SBD (アミノ酸残基 526 ~ 902) にて大腸菌 Y 1090 をトランスフォームし発現した。データには示さないが GST-rARDBD/SBD よりも、より分子量の小さい GST-hARDBD および GST-rARDBD の方がより効率よく発現した。また今回発現した GST-hARDBD と GST-rARDBD を比較した場合は、後者の方が DBD の N 末端側と C 末端側のアミノ酸配列も一部含むために DNA とのより強い結合が期待された。以上のことから、以下の DNA 結合実験には、GST-rARDBD を用いた。

2) ARDBD アフィニティーカラムによる AR 結合領域の検索

i) MMTV での検討

大腸菌内で発現した GST-rARDBD を含む

ライゼートを、glutathione Sepharose カラムに添加し結合させ、これを洗浄することにより GST-rARDBD を負荷したアフィニティーカラムを調製した。このアフィニティーカラムに遺伝子断片を添加し、選択的に結合する DNA を検索した。カラムはエッペンドルフチューブに装着したスピナカラムを使用することにより、非結合成分を迅速に洗浄を行えるようにした。はじめに GST-rARDBD が実際に特異的な配列と結合する条件を検討する目的で pUCMMTV を制限酵素で切断した試料を用いて実験を行った。その結果、非特異的な DNA である pUC 18 が 0.15 M KCl でほとんど溶出し (Fig. 5, lane 2), GRE を含む MMTV 断片は主に 0.4 M KCl で溶出された (lane 3)。MMTV よりも低分子域のバンドは主に大腸菌由来の RNA と思われるが、これも低塩溶出画分に回収された。

ii) マウス EGF 遺伝子の AR 結合領域の検索

Clone 2 を種々の制限酵素 (*EcoRI*, *HindIII*, *KpnI*, *PstI*, *SacI*, *SphI*, *XbaI*) により消化することにより、マウス EGF 遺伝子の制限酵素地図を作製した (Fig. 6)。11 kb のうちほぼ中央部分に exon 1 が、その下流には intron 1 が存在していた。これらのうち Pascall ら¹⁶⁾の決定した塩基配列は - 896 ~ + 309 のみであり、他の部分の配列は全く不明である。最初に clone 2 の 11 kb 全領域を断片化し、GST-rARDBD との結合を測定したが、得られる断片が多すぎて分析が困難であった。通常、転写調節領域は遺伝子のプロモーター近傍に存在することが多い。そこで、検索する領域を狭めて EGF 遺伝子のプロモーターを含む約 - 1900 ~ + 315 すなわち clone 1 のコードする領域を検索することにした。

あらかじめ、制限酵素 *HindIII*, *EcoRI* にて clone 1 を消化切断し、約 - 1900 ~ + 315 の領域を *HindIII* 部位から *EcoRI* 部位 (約 - 1900 ~ - 897) までの 1 kb, *EcoRI* 部位から *SphI* 部位 (- 896 ~ - 433) までの 464 b, *SphI* 部位から *XhoI* 部位 (- 432 ~ + 315) までの 747 b, それと pUC 18 の 2.69 kb に切断した。これ

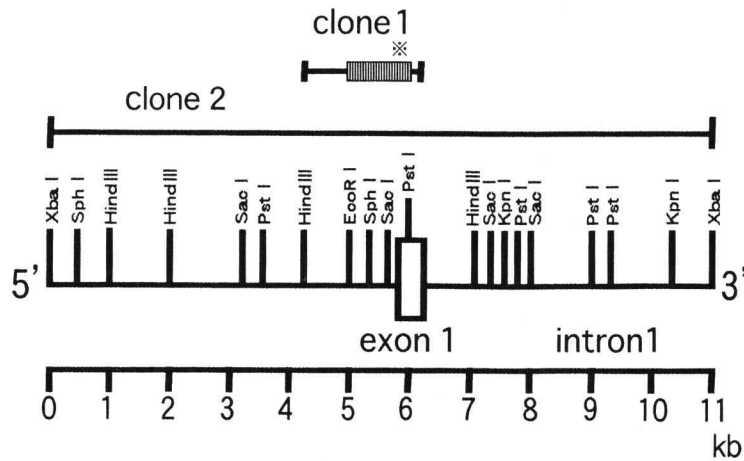


Fig. 6. Restriction map of 5'-upstream region of the mouse EGF gene encoded by clone 2. The 11 kb EGF gene encoded by clone 2 was cut with a variety of restriction enzymes. The deduced restriction map is shown. Clone 1 encodes the 2.2 kb *Hind* III-*Xho*I fragment. ※ The region sequenced is represented.

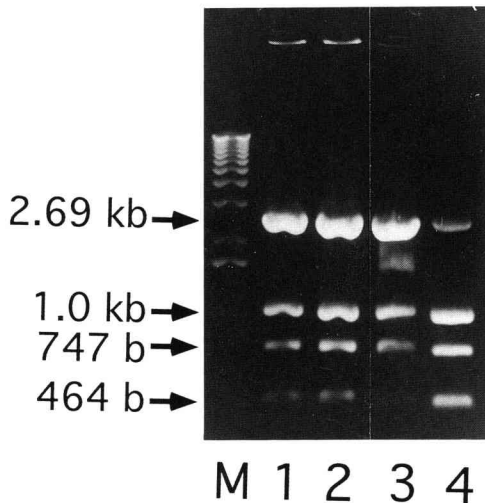


Fig. 7. Binding of EGF gene fragments to GST-rARDBD.

Clone 1 was cut with *Hind* III, *Eco*RI and *Sph*I into 463 b *Eco*RI-*Sph* I (-896~-433), 747b *Eco*RI-*Xho*I (-432~+315) and 1 kb *Hind* III-*Eco*RI (about -1900~-897) fragments and their bindings to GST-rARDBD were measured. M, 1kb ladder; lane 1, cleaved clone 1 (0.5 µg); lane 2, cleaved clone 1 (1 µg), lane 3, low salt buffer eluted; lane 4, high salt buffer eluted.

らの断片はプラスミド一分子中に、一分子ずつ存在するので、agarose gel 電気泳動した場合、エチジウムブロマイドで染色される DNA はその長さに応じて染色の程度が強くなった (Fig. 7, lanes 1, 2)。この切断断片をアフィニティークラムにて分画した結果、2.69 kb はほとんどが低塩溶出画分に回収され (lane 3)、高塩溶出画分にはほとんど認められなかった (lane 4)。一方他の 3 つの DNA 断片は、2.69 kb の断片に比べて高塩溶出画分により強いバンドが認められた (lane 4)。なかでも特に 464 b のバンドが高塩溶出画分で強く、残りの 2 つの断片の結合度には明確な差はみられなかった。

特に強い結合がみられた -896~-433 の領域 (464 b) を、5' 側から -896~-727 (A 領域) の 170 b、-746~-579 (B 領域) の 168 b、-598~-431 (C 領域) の 168 b の 3 領域に分けてさらに検索した。それぞれの DNA は pCR-A, B, C より切り出して用いたので、その際に生じる pCR II ベクター (3.9 kb) も同時に分画した。さらに、比較する対照として、A と B の二領域を含む -896~-579 (A-B 領域) の 318 b を PCR にて増幅し分画試料に加えた。その結果、pCR II ベクターはほとんど低塩溶出

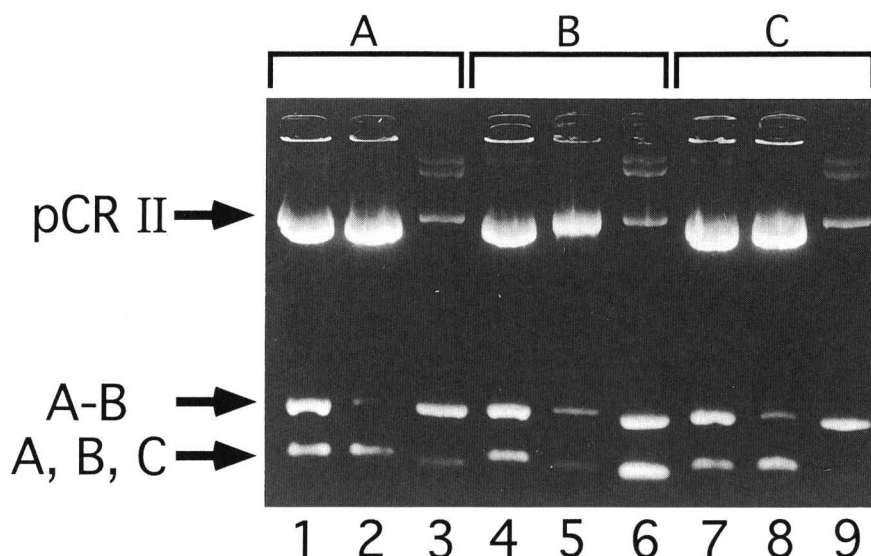


Fig. 8. Binding of EGF-A, B, and C fragments to GST-rARDBD. *EcoRI-SphI* (-896~-433) 463b region of EGF gene was divided into three regions, *i.e.*, -896~-727 (A, 170b), -746~-579 (B, 168b), -598~-431 (C, 168b). pCR EGF-A, B, and C were cut with *EcoRI* and the binding affinities to GST-rARDBD were compared to that of -896~-579 (A-B) 318b fragment amplified by PCR. Lanes 1, 4 and 7, unfractionated DNAs; lanes 2, 5 and 8, low salt buffer eluted; lanes 3, 6 and 9, high salt buffer eluted.

画分に回収された (Fig. 8, lanes 2, 5, 8)。A と A-B とを比較した場合、分画前のバンドに比べ、低塩溶出画分において A が A-B より強く、逆に高塩溶出画分では A-B が A より強かった (lanes 1-3)。また B と A-B を比較した場合、低塩溶出画分では両者とも少なく、高塩溶出画分に両者ともに強いバンドが認められた (lanes 4-6)。C については A 領域の結合と同様に、分画前に比べ低塩溶出画分において C が A-B より強く、逆に高塩溶出画分では A-B が C より強かった (lanes 7-9)。これらの結果を総合すると、GST-rARDBD と強く結合する部位は -746 ~ -579 (B 領域) に存在すると考えられた。

3) ゲルシフト解析

アフィニティーカラム実験で強い結合がみられた -896~-433 (464b) の領域について、ゲルシフト解析を用いてさらに検索した。A, B, C 領域を [³²P]dCTP で標識しプローブ³²P-EGF-A, B, C を作製した。はじめに GST-

rARDBD の量を変え³²P-EGF-B をプローブとしてゲルシフト解析をおこなった。その結果、タンパク質量が増えるに従って結合バンドの強さが増加し、それにつれてゲル先端の遊離プローブのバンドは消失した (Fig. 9)。また、タンパク質量に応じて 3 種類の結合バンドが観察された。この結果は、3ヶ所の GRE を有する³²P-MMTV をプローブとした場合のゲルシフトパターンとよく似ていることから、GST-rARDBD が³²P-EGF-B の複数の領域と結合したことが示唆された。続いて、³²P-EGF-A, C をプローブとした実験でも同様の泳動パターンが得られたが (Fig. 10a, lanes 2, 10), それらよりも³²P-EGF-B をプローブとした場合に、より強い結合がみられた (lane 6)。次にプローブ³²P-EGF-A, B, C について、競合ヌクレオチド TRE, GRE を 50ng ずつ加え実験を行った。その結果、すべて TRE 50 ng では結合が阻害されなかったが (lanes 3, 7, 11), ³²P-EGF-B のシフトバンド]を除いては、GRE 50 ng で結合が阻害

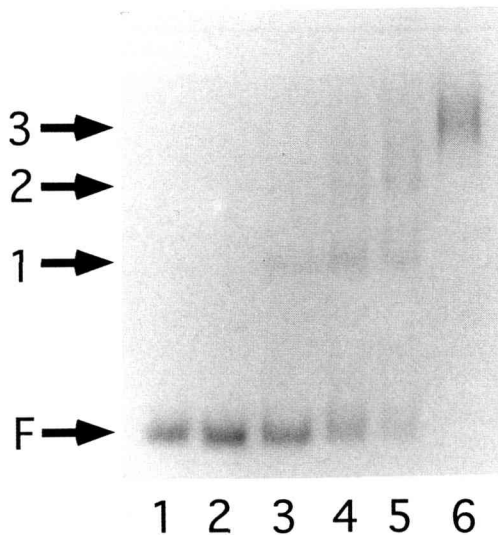


Fig. 9. Interaction of EGF-B with GST-rARDBD. 32 P-Labeled EGF-B probe (10 kcpm) was incubated with GST-rARDBD. DNA-protein complexes were separated on a 5% polyacrylamide gel in $0.5\times$ TBE buffer. Lane 1, no protein; lanes 2-6, 0.1, 0.2, 0.4, 0.6 and 0.8 μ g GST-rARDBD, respectively. Arrows 1 - 3 represent 32 P-EGF-B-GST-rARDBD complex bands. F, free probe.

されシフトバンド1~3がほとんど消失した (lanes 4, 8, 12)。しかし、 32 P-EGF-Bのシフトバンド1は、GRE 50 ngでは完全に消失しなかった (lane 8)、さらに競合ヌクレオチドの量を200 ngまであげ、ゲルシフト解析を行った (Fig. 10b)。その結果、TREの場合は200 ngでもシフトバンド1~3が完全には消失しないのに対し (lane 5)、GREでは50 ngでシフトバンド2, 3が消失し、100~200 ngですべてのシフトバンドが消失した (lanes 7, 8)。このように、rARDBDとEGF-A, B, Cとの結合はTREによっては阻害されず、GREによって特異的に阻害されたが、特にB領域において結合が阻害されにくいことから、-746~-579 (B領域)に強い結合部位が存在するという、カラムクロマトグラフィーの結果と一致した。

考 察

一般に核内レセプターの生体における発現量はきわめて微量であり、特にARの場合その量は限られている。雌ラット顎下腺細胞質では、ARの存在量は160 fmol/mg proteinであり、細胞質全タンパク質中では、わずか0.0016%にすぎない²²⁾。さらに、プロテアーゼによる分解を受けやすい²³⁾などの理由で、これまでその精製は非常に困難であった。そこで本研究ではARのcDNAより、機能ドメインをGST融合タンパク質として発現した。これにより精製過程が一段階のアフィニティークロマトグラフィーのみとなり、大量に発現、精製することを可能とした。

ステロイドレセプターのDBDを結晶解析した研究により一つのHREには二分子のDBDが結合することが知られている²⁴⁾。しかしながらDBD単独ではダイマーは形成されずモノマーとして挙動し、DNAともほとんど結合しない。しかし幸運なことに、GST融合タンパク質の形で発現した場合には、GST部分がダイマーを形成するために²⁵⁾、GST-ARDBDもダイマー構造をとりAREへ結合することができ¹⁵⁾。この意味でも今回のARDBD発現に用いたGST融合タンパク質発現系は有効であった。

本研究ではGST-rARDBDを負荷したアフィニティークラム用い、ARとの結合力を指標としてAREを見いだすという戦略をとった。この方法によって、細胞培養やトランスフェクションなどの手間のかかる手順の大部分を省き、*in vitro*でAREを見いだすのが狙いである。

今回、実験に用いたMMTVのGREには、グルココルチコイドレセプターのみならずAR、プロゲステロンレセプター、ミネラルコルチコイドレセプターの全てが結合し、その転写を促進する。このことから、これら4種類のレセプターのHREには塩基配列に差がない可能性がある²¹⁾。しかしながら、実際には生体内

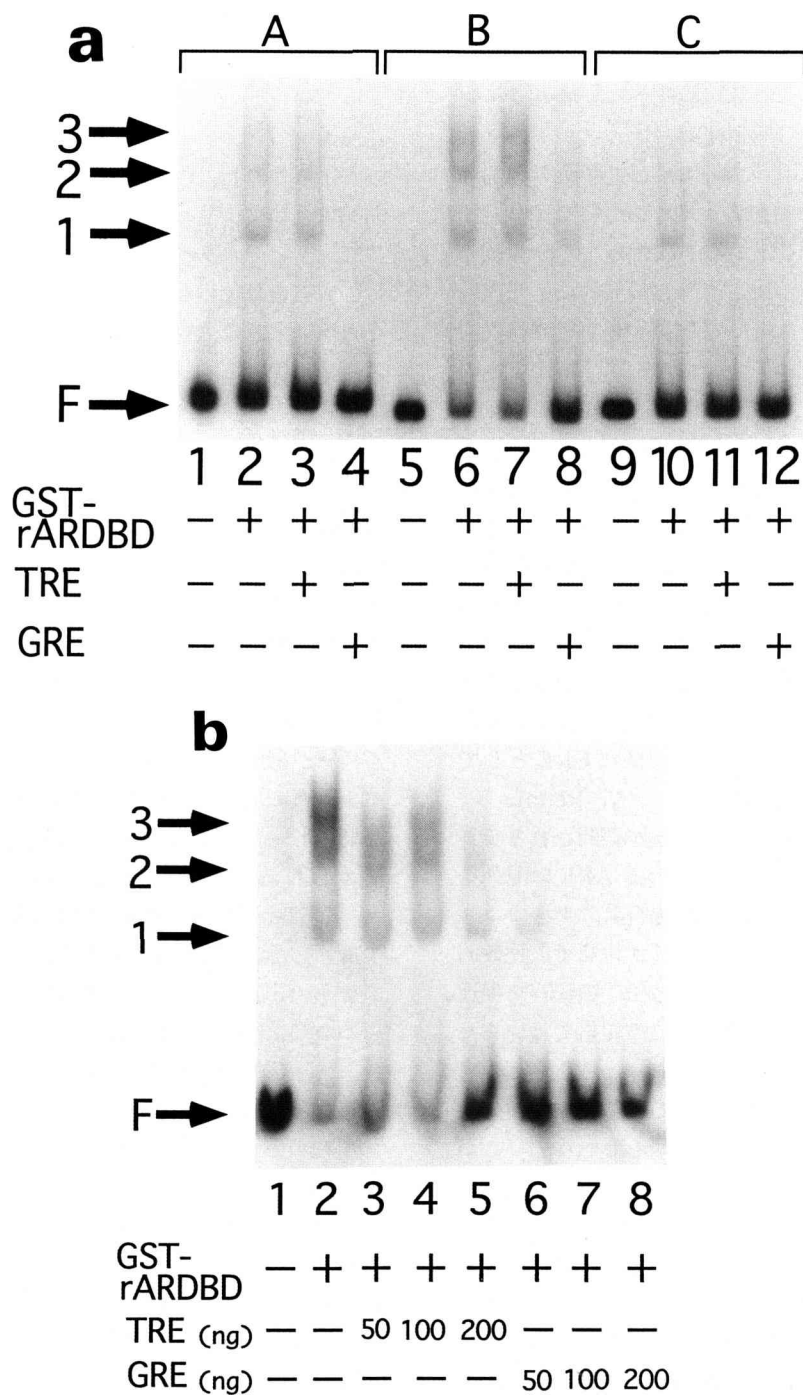


Fig. 10. Interaction of EGF-A, B, and C fragments with GST-rARDBD. (a) ³²P-Labeled EGF-A, B, or C probe (10 kcpm) was incubated with GST-rARDBD in the presence or absence of 50 ng of competitors. DNA-protein complexes (bands 1-3) were separated on a 5% polyacrylamide gel. F, free probe. (b) ³²P-Labeled EGF-B probe (10 kcpm) was incubated with GST-rARDBD and analysed as in (a). F, free probe.

ではこれら4種類のステロイドホルモンによって、明らかに異なる遺伝子の活性化がされている。そこで考えられる可能性としては、(i) 生体内の遺伝子のHRE配列にはわずかずつでも差があり、そのようなHREが1個から数個存在することによって各ホルモンの特異性が発揮される。(ii) HREには特異性がなく、それぞれのステロイドレセプターと特異的に相互作用する転写因子、あるいは制御因子が組織特異的に存在する、という2つがある。これまでのAREについての研究においては、Claessensら²⁶⁾が*in vivo*でアンドロゲンによって誘導されるC3遺伝子の第一イントロン内に存在するAREを見い出している。しかしながら、その配列の基本モチーフは“TGTTCT”で典型的なGREのそれと同一であった。また細胞発現実験により、この配列がGREやプロゲステロンレスポンスエレメントとしても機能することが示された。すなわち、このケースで同定された配列は、MMTVの場合と同様にGREとしてもAREとしても機能した。一方、Rennieら¹⁴⁾はアンドロゲン依存的に発現が調節されるラットプロバシン遺伝子内に二つのAREの配列を決定した。これらの配列の場合、グルココルチコイドはあまり遺伝子を活性化せず、比較的アンドロゲン特異的にその遺伝子の転写を促進した。このように、これまでの報告ではいまだに両方の可能性が残されており、あるいは両者のレスポンスエレメントとして機能する配列と一方に特異的配列があるのかもしれない。しかしながら、これまでのところARについてはHREとして同定された配列自体がまだ少なく、その意味でマウスEGF遺伝子のAREを決定することは非常に重要である。

マウスEGF遺伝子の5'上流をARDBDのアフィニティーカラムを用いて検索した結果、-896~-433の464bに特に強い結合がみられ、それよりやや弱いながら-432~+315までの747b、約-1900~-895までの1kbにも結合がみられた(Fig.7)。さらに-896~-433内を検索し、その中の-746~-579に強

い結合を認めた。またゲルシフト解析においても、-746~-579が他の領域に比べ強く結合するという同一の結論が得られた。以上のことから、-746~-579の領域にAREの存在が強く示唆された。さらに検索に用いたA、B、C領域は互いに少しづつオーバーラップしているため、AとB、BとCのオーバーラップ部分には強い結合部位はないと考えられる。この事実を考慮に入れると強い結合部位の存在する範囲はさらに狭められ-727~-598の130bと結論できる。

核内レセプターのHREは、例えばGREでは“AGAACAXXXXTGTTCT”のように、中心に3塩基のスペースを置いて基本モチーフ(下線部)が対称となる構造をとる。この基本モチーフに一分子のレセプター分子が、すなわち一つのHREには2分子のレセプターが結合する²⁷⁾。グルココルチコイドレセプターやARの場合、HREと結合する以前にSBDを介したダイマーが形成されている。先に述べたように、本実験系の場合も、GST-rARDBDがダイマーを形成し一つのARE様領域に結合していると考えられる。³²P-EGF-Bをプローブとした場合、GST-rARDBDの量を増やすにしたがって少なくとも3種類のバンドが検出されたので、おそらく3ヶ所のARE様構造を含んでいると思われる。ただしB領域をプローブとした場合、A、C領域より強い結合が得られたのは、AREの数の違いなのか結合親和性の差なのかは現在のところ不明である。マウスEGF遺伝子のexon1を含む5'上流領域の1.2kb(-896~+315)についての塩基配列は既に報告されており¹⁶⁾、その配列をみるかぎり上述の典型的なGREと全く同じ配列は存在しない。しかし、アンドロゲン依存的に発現する生理活性物質であるレニン²⁸⁾、カリクレイン²⁹⁾、神経成長因子遺伝子³⁰⁾と比較すると、相同性を有するいくつかの配列が存在する¹⁶⁾。本研究で特にGST-rARDBDとの強い結合がみられた-727~-598の領域中の-645~-627に相同性が高い配列が存在している(Fig.11)。今回の結

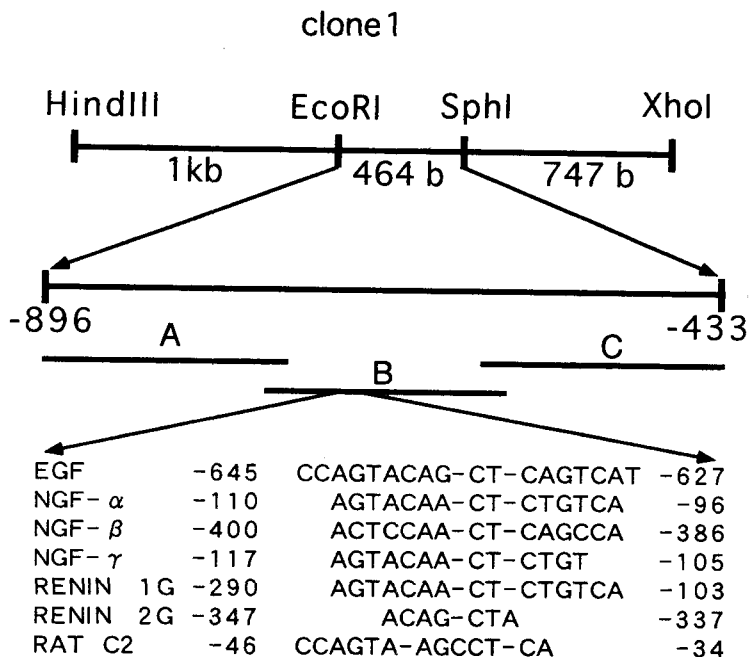


Fig.11. Comparison of the nucleotide sequence of region B with those of the genes regulated by androgens.

果を考え合わせると、この部位が ARE である可能性が高い。今後、この領域をフットプリント法やレポータージーンを用いた細胞内活性などを用いて調べ検討し、アンドロゲンによるマウス顎下腺 EGF 遺伝子の転写調節機構を解明を進めていきたい。また、今回結合がみられた領域内の -608 ~ -603 と -282 ~ -277 に、GRE の基本モチーフである "TGTTCT" 配列が存在し、他にも類似した配列がいくつか存在した。このように、今回みいだされた領域以外にも、塩基配列の面からもいくつかの結合する可能性のある部位の存在が示唆されるが、これらについてもさらに検討が必要である。

結 語

AR の機能ドメインを大腸菌発現系を用いて発現、精製した。この発現タンパク質を用いて、*in vitro* でアンドロゲン依存性発現遺伝子の ARE を同定するシステムを開発した。このシステムを用いてマウス EGF 遺伝子内の ARE

の同定を試みた。その結果、いくつかの領域が AR と親和性を示したが、特に -727 ~ -598 に AR が強く結合する部位の存在が示唆された。このことより、同領域内における ARE の存在が強く示唆されると同時に、今回開発したシステムによる ARE 検索の有効性が確かめられた。

謝 辞

稿を終えるに当たり、研究全般にわたり御指導並びに御校閲を賜った岩手医科大学歯学部口腔生化学講座太田 稔教授、並びに終始実験の御指導を賜り、かつ有益な御教示を頂いた根本孝幸講師、また御協力いただきました佐藤昭子助教授以下教室員各位、並びに口腔微生物学講座根本優子博士、歯科放射線学講座星野正行博士に感謝申し上げます。また、マウス EGF 遺伝子を含むプラスミドの clone 1,2 を御供与いただきました Dr. J. C. Pascall (AFRC 研究所)、pGST-rARDBD, rARDBD/SBD を御供

与いただきました Dr. R. Snoek (British Columbia Cancer Agency), そして hAR の cDNA を御供与いただきました Dr. S. Liao (シカゴ大学) に感謝いたします。

文 献

- 1) Gubits, R. M., Shaw, P. A., Gresik, E. W., Onetti-Muda, A., and Barka, T. : Epidermal growth factor gene expression is regulated differently in mouse kidney and submandibular gland. *Endocrinology* 119 : 1382 - 1387, 1986.
- 2) Tsutsumi, O., Kurachi, H., and Oka, T. : A possible physiological role of epidermal growth factor in male reproductive function. *Science* 233 : 975 - 977, 1986.
- 3) Okamoto, S., and Oka, T. : Evidence for physiological function of epidermal growth factor : pregestational ovariectomy of mice decreases milk production and increases offspring mortality during lactation period. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81 : 6059 - 6063, 1984.
- 4) Wells, A., and Bishop, J. M. : Genetic determinants of neoplastic transformation by the retroviral oncogene *v-erbB*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85 : 7597 - 7601, 1988.
- 5) Bajaj, M., Waterfield, M. D., Schlessinger, J., Taylor, W. R., and Blundell, T. : On the tertiary structure of the extracellular domains of the epidermal growth factor and insulin receptors. *Biochim. Biophys. Acta.* 916 : 220 - 226, 1987.
- 6) Perheentupa, J., Lakshmanan, J., and Fisher, D. A. : Urine and kidney epidermal growth factor : ontogeny and sex difference in the mouse. *Pediatr. Res.* 9 : 428 - 432, 1985.
- 7) Green, S., and Chambon, P. : Nuclear receptors enhance our understanding of transcription regulation, *Trend Genet.* 4 : 309 - 314, 1988.
- 8) Evans, R. M. : The steroid and thyroid hormone receptor superfamily. *Science* 240 : 889 - 895, 1988.
- 9) Krust, A., Green, S., Argos, P., Kumar, V., Walter, J-M. B., and Chabon, P. : The chicken oestrogen receptor sequence : homology with *v-erbA* and the human oestrogen and glucocorticoid receptors. *EMBO J.* 5 : 891 - 897, 1986.
- 10) Hard, T., Kellenbach, E., Boelens, R., Maler, B. A., Dahlman, K., Freedman, L. P., Carlstedt-Duke, J., Yamamoto, K. R., Gustafsson, J. A., and Kaptein, R. : Solution structure of the glucocorticoid receptor. *Nature* 249 : 157 - 160, 1990.
- 11) Zhang, X. K., Hoffman, B., Tran, P. B. V., Grapner, G., and Pfahl, M. : Retinoid, X. receptor is an auxiliary protein for thyroid hormone and retinoic acid receptors. *Nature* 355 : 441 - 446, 1992.
- 12) Wong, C. I., Zhou, Z. X., Sar, M., and Wilson, E. M. : Steroid requirement for androgen receptor dimerization and DNA binding. Modulation by intramolecular interactions between the NH₂-terminal and steroid-binding domains. *J. Biol. Chem.* 268 : 19004 - 19012, 1993.
- 13) Chang, C., Kokontis, J., and Liao, S. : Structural analysis of complementary DNA and amino acid sequences of human and rat androgen receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85 : 7211 - 7215, 1988.
- 14) Rennie, P. S., Bruchovsky, N., Leco, K. J., Sheppard, P. C., McQueen, S. A., Cheng, C., Snoek, R., Hamel, A., Bock, M. E., MacDonald, B. S., Nickelt, B. E., Chang, C., Liao, S., Cattini, P. A., and Matulis, R. J. : Characterization of two *cis*-acting DNA elements involved in the androgen regulation of the probasin gene. *Mol. Endocrinol.* 7 : 23 - 36, 1993.
- 15) Nemoto, T., Ohara-Nemoto, Y., Shimazaki, S., and Ota, M. : Dimerization characteristics of the DNA-and steroid-binding domains of the androgen receptor. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 50 : 225 - 233, 1994.
- 16) Pascall, J. C., and Brown, K. D. : Structural analysis of the 5'-flanking sequence of the mouse epidermal growth factor gene. *J. Mol. Endocr.* 1 : 5 - 11, 1988.
- 17) Glass, C. K., Holloway, J. M., Devary, O., and Rosenfeld, M. : The thyroid hormone receptor binds with opposite transcriptional effects to a common sequence motif in thyroid and estrogen response elements. *Cell* 54 : 313 - 323, 1988.
- 18) Strahle, U., Klock, U., and Schutz, G. : A DNA sequence of 15 base pairs is sufficient to mediate both glucocorticoid and progesterone induction of gene expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84 : 7871 - 7875, 1987.
- 19) Nemoto, T., Ohara-Nemoto, Y., and Ota, M. : Association of the 90 kDa heat shock protein does not affect the ligand-binding ability of androgen receptor. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 42 : 803 - 812, 1992.
- 20) Beato, M. : Gene regulation by steroid hormones. *Cell* 56 : 335 - 344, 1989.
- 21) Cato, A. C. B., Henderson, D., and Ponta, H. : The hormone response element of the mouse mammary tumor virus DNA mediates the progesterin and androgen induction of transcription in the proviral long terminal repeat region. *EMBO J.* 6 : 734 - 736, 1987.
- 22) 客本齊子 : マウス顎下線アンドロゲンレセプターの細胞質ならびに核画分への分布とテストステロン投与の影響. 歯基礎誌, 29 : 267 - 292, 1987.

- 23) Carlstedt-Duke, J., Gustaffson, J. A., and Wrangé, O. : Formation and characteristics of hepatic dexamethasone-receptor complexes of different molecular weight. *Biochim. Biophys. Acta* 497 : 507 - 524, 1977.
- 24) Rastinejad, F., Perlmann, T., Evans, R. M., and Sigler, P. B. : Structural determinants of unclear receptor assembly on DNA direct repeats. *Nature* 375 : 203 - 211, 1995.
- 25) Habig, W. H., Pabst, M. J., and Jakoby W. B. : Glutathione S-transferases. *J. Biol. Chem.* 249 : 7130 - 7139, 1974.
- 26) Claessens, F., Celis, L., Peeters, B., Heyns, W., Verhoeven, G., and Rombauts, W. : Functional characterization of an androgen response element in the first intron of the C3(1) gene of prostatic binding protein. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 164 : 833 - 840, 1989.
- 27) Cairns, W., Cairns, C., Pongratz, I., Poellinger, L., and Okret, S. : Assembly of a glucocorticoid receptor complex prior to DNA binding enhances its specific interaction with a glucocorticoid response element. *J. Biol. Chem.* 266 : 11221 - 11226, 1991.
- 28) McGowan, R. A., Gross, K. W., and Wilson, C. M. : Effect of androgen and thyroid hormones on renin-1 messenger ribonucleic acid levels in mouse submandibular gland. *Mol. Cell. Biol.* 56 : 271 - 276, 1988.
- 29) Ohara-Nemoto, Y., Nemoto, T., Sato, N., Kyakumoto, S., and Ota, M. : Comparison of androgen receptor in male and female rat submandibular glands. *Jpn. J. Oral Biol.* 27 : 679 - 684, 1985.
- 30) Selby, M. J., Edwards, R., Sharp, F., and Rutter, W. J. : Mouse nerve growth factor gene : Structure and expression. *Mol. Cell. Biol.* 7 : 3057 - 3064, 1987.