

原 著

## ヒト顎下腺由来腺癌細胞株 (HSG) における レチノイン酸レセプターと レチノイン酸レスポンスエレメントとの結合

客本 斉子, 星野 正行, 佐藤 詔子, 太田 稔

〔受付: 1993年12月13日〕

〔受理: 1994年1月7日〕

岩手医科大学歯学部口腔生化学講座

**Abstract** : Retinoic acid (RA) regulates the growth of human salivary gland adenocarcinoma cell line (HSG), through mediation of a retinoic acid receptor (RAR) expressed in the nuclei of HSG cells. In the process of induction of biological effects of RAR, the binding of RAR to a retinoic acid response element (RARE) on the promoter of the target gene is essential.

In this study, we first examined the DNA binding properties of the *in vitro*-transcribed and -translated human RAR $\alpha$  and RXR $\alpha$ , retinoid X receptor  $\alpha$ /9-cis RAR $\alpha$ , using a gel-mobility-shift assay. Then, the DNA binding ability of the nuclear extract of HSG cells was investigated *in vitro* to examine whether RAR expressed in HSG cells has a biological function.

*In vitro*-translated RAR $\alpha$  or RXR $\alpha$  did not bind to [ $\gamma$ - $^{32}$ P]ATP-labeled  $\beta$ RARE, a naturally occurring RARE found on the 5'-promoter of RAR $\beta$ . However, RAR $\alpha$  bound to [ $^{32}$ P] $\beta$ RARE in the presence of RXR $\alpha$ , suggesting that RAR $\alpha$  requires RXR $\alpha$  as a coregulator when it binds to  $\beta$ RARE. The binding was competed by an excess amount of unlabeled  $\beta$ RARE but not by a glucocorticoid response element (GRE), indicating that the binding was specific.

On the contrary, the nuclear extract of HSG cells bound to [ $^{32}$ P] $\beta$ RARE by itself, and the binding was found to be specific in competition analysis using an excess amount of unlabeled  $\beta$ RARE and GRE. When the amount of the nuclear extract used for the binding was increased, the band was broadened, indicating the heterogeneity of the binding.

These findings suggest that the nuclear extract of HSG cells contain molecules belonging to the RXR family, and these molecules cooperate with RAR of HSG cells in the process of transactivations which induce various biological functions of RAR.

**Key words** : retinoic acid receptor / retinoic acid response element / retinoid X receptor / human salivary gland cell line

## 緒 言

近年, レチノイン酸 (retinoic acid, RA) の細胞の増殖と分化に及ぼす広範な作用<sup>1-4)</sup>が注

目されている。特に歯胚や顎など口腔領域を含めた顔面の形態形成におけるその特異的作用<sup>5)</sup>には興味を持たれ、ホメオボックス遺伝子との関連<sup>6)</sup>からも、RAによる転写調節に関する報

Binding of retinoic acid receptor of human salivary gland adenocarcinoma cell line (HSG) with retinoic acid response element.

Seiko KYAKUMOTO, Masayuki HOSHINO, Nobuko SATO and Minoru Ota

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

告は増えつつある。しかしながら、現在なお RA の作用機序に関する分子レベルでの解明には至っていない。RA はレチノイン酸レセプター (retinoic acid receptor, RAR)<sup>7-9)</sup> を介して作用する。RAR はステロイド・サイロイドレセプタースーパーファミリーに属し、核内レセプターとして多くの標的遺伝子の転写を調節するが<sup>10-14)</sup>、この転写調節に関する研究はここ数年画期的な飛躍をとげた<sup>15-17)</sup>。

これまでに、*in vitro*における RAR の転写誘導には HeLa 細胞の抽出物などの外来性の因子が必要である<sup>10, 18)</sup>ことが知られていたが、この因子の本体については不明であった。一方、1990年に Evans らのグループにより RAR と相同性を有しているがそのリガンドが異なるレチノイド X レセプター (retinoid X receptor, RXR) がクローニングされ<sup>19)</sup>、その後 all-trans RA の立体異性体である 9-cisRA が RXR に対する特異的なリガンド X であることが 1992 年に明らかになった<sup>20, 20)</sup>。そのために RXR は、現在 9-cisRAR と呼ばれている。ところが、1991 年末から 1992 年にかけて、この RXR が RAR とヘテロダイマーを形成し標的遺伝子プロモーター上にあるレチノイン酸レスポンスエレメント (retinoic acid response element, RARE) からの転写を促進させるということが、Rosenfeld ら<sup>22)</sup>、続いて Chambon ら<sup>23)</sup>、Evans ら<sup>24)</sup>のグループにより次々に報告されたことから、前述した *in vitro*における RAR の転写誘導に関与する外来性の因子が RXR であることが判明した。かくして RXR の生理作用についても徐々に解明されつつある。

一方、私共はこれまでにヒト顎下腺由来腺癌細胞株 (human salivary gland adenocarcinoma cell line, HSG) を用いてその増殖と分化について検索してきた<sup>25-28)</sup>。HSG 細胞は多くの分化誘導剤に応答し、異なったタイプの細胞へと分化誘導されるいわゆる多分化能を持った細胞<sup>29-32)</sup>で、口腔癌の分化誘導療法を確立していく際のモデル系として非常に有用な細胞である。

HSG 細胞を生理濃度 ( $10^{-7}$ – $10^{-10}$ M) の RA で処理すると細胞の増殖は濃度依存的に抑制される<sup>29)</sup>が、この作用は RAR を介するものと思われる。事実、私共は HSG 細胞核中に RAR が存在することを見だし、これまでにその性状等について報告してきた<sup>33)</sup>。

そこで本研究では、*in vitro*の転写ならびに翻訳系を用いてヒト RAR  $\alpha$  と RXR  $\alpha$  を合成し、これらレセプターと RARE との結合を「ゲル易動度シフト法」<sup>34)</sup>により調べるとともに、HSG 細胞核と RARE との結合について検討した。またこれら結合バンドを比較することにより、HSG 細胞核内における RXR ファミリーの発現について検索した。

## 材料および方法

### 1. 培養細胞

HSG 細胞は白砂ら<sup>35)</sup>により、口腔底癌の治療のため<sup>60</sup>Co 照射を受けた 50 才男性の顎下腺より樹立された株細胞である。当教室ではこの細胞を、1986 年に徳島大学歯学部第 2 口腔外科学講座の佐藤光信教授より供与されて以来継代維持している。

HSG 細胞の培養は、L-glutamine 300mg/L、Kanamycin 100 mg/L および 5% 仔ウシ血清 (Gibco BRL, U.S.A) を含む Eagle's MEM (日水製薬) を用い、37°C、5% CO<sub>2</sub> 存在下にて行った。また、5 日ごとにトリプシン-EDTA 法により継代した<sup>27)</sup>。

### 2. HSG 細胞の核抽出物の調製

100-mm ディッシュ (Nunc, Denmark) に  $2.5 \times 10^6$  cells/dish とするよう細胞を播種し培養を行った。コンフレントに達した細胞を、細胞湿重量の 5 倍容の緩衝液 [10 mM Tris-HCl (pH 7.4), 1 M hexylene glycol, 0.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM EGTA, 2 mM leupeptin, 0.01% aprotinin] 中で 25 ゲージのシリンジを用いてホモジナイズした。ホモジネートを  $1,000 \times g$  にて 10 分間遠心し、得られた沈殿物は再び同緩衝液にて洗浄し、沈渣すなわち粗核を得た。粗核は、初めに用いた細胞湿重量の 2

倍容 (200 - 300  $\mu$ l) の核抽出用緩衝液 [50 mM Tris-HCl (pH 7.4), 1.5 mM EDTA, 1 mM DTT, 10% glycerol (TEDG), 0.3 M KCl, 2 mM leupeptin, 0.01% aprotinin] 中にて0°C, 30分抽出した。抽出物を15,000  $\times$  gにて60分遠心後, 上清を集めこれをHSG核抽出物とした。得られたHSG核抽出物は, 以下に述べる“ゲル易動度シフト法”によるレスポンスエレメントとの結合解析に用いた。

### 3. *in vitro* 翻訳 RAR $\alpha$ ならびに RXR $\alpha$ の調製

ヒト RAR $\alpha$ ならびに RXR $\alpha$ の全長をコードする cDNA を pGEM-3 ならびに pBlue-script に組み込んだプラスミドベクター<sup>22,36)</sup> (カリフォルニア大サンジエゴ校, Dr. C. K. Glass より供与) を各々特異的な制限酵素で切断後, 2,000 units / mL RNasin (RNase inhibitor, Promega, U.S.A) の存在下で, NTP 混合液 (Pharmacia, Sweden) と T7 RNA ポリメラーゼ (宝酒造) を用いて *in vitro* において転写を行いそれぞれの RNA を合成した。つづいて, 各種アミノ酸の存在下でウサギ網状赤血球 (Promega, U.S.A.) の系を用いた *in vitro* における翻訳を行い, RAR $\alpha$ ならびに RXR $\alpha$  タンパクを合成した。合成したタンパクはただちに前述の HSG 核抽出物の場合と同様にレスポンスエレメントとの結合解析に用いた。

一方, *in vitro* 翻訳タンパクの分子量を解析する実験においては, methionine のかわりに [<sup>35</sup>S]methionine (39.18 TBq / mmol, ICN, U.S.A.) を含む各種アミノ酸の存在下にて翻訳を行った。得られた RAR $\alpha$ ならびに RXR $\alpha$  各々 2  $\mu$ l に等量の sodium dodecyl sulfate (SDS)-sample buffer [0.25 M Tris-HCl (pH 6.8), 4% SDS, 10% 2-mercaptoethanol, 20% glycerol] を添加し, 100°C 5分間の加熱による可溶化ならびに SDS 化後 SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) を行った。20 mA 定電流にて 1.5 時間泳動を行った後, ゲルを乾燥させフルオログラフィーによりタンパクを検出した<sup>34)</sup>。SDS-PAGE の分子量マーカーに

は以下に記載する [<sup>14</sup>C]-標識レインボーマーカー (Amersham, U.K.) を用いた。[myosin (200 K), phosphorylase b (97.5 K), BSA (69 K), ovalbumin (46 K), carbonic anhydrase (30 K), trypsin inhibitor (21.5 K), lysozyme (14.3 K)]

### 4. ゲル易動度シフト法による RARE との結合の解析

レチノイン酸レセプター  $\beta$  遺伝子 (RAR $\beta$ ) の 5' 上流プロモーターに存在する RARE, すなわち  $\beta$  RARE を含む前後 27 個のセンス (5'-aaggggatcGGGTAGGGTTCACCGAAA GTTCACTCG-3') ならびにアンチセンス (5'-aggaagatctCGACTGAACTTTCGGTGAACCCTACCC-3') オリゴヌクレオチド鎖<sup>18)</sup> を合成した。合成した両鎖 DNA は, 48% urea (BRL, U.S.A) を含む 12.5% ポリアクリルアミドゲルを用いて精製を行った。両鎖をアニール後, [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]ATP (222 TBq/mmol, NEN, U.S.A.) で末端標識し, これをプローブとして以下の結合実験に用いた。前述2および3で調製したタンパク RAR $\alpha$  (2  $\mu$ l), RXR $\alpha$  (5  $\mu$ l) ならびに HSG 核抽出物 (2-8  $\mu$ l) を, 10 mM Tris-HCl (pH 8.0), 0.1% NP-40, 6% glycerol, 1 mM DTT, 1  $\mu$ g polydeoxyinosine-polydeoxycytosine 中で 1ng の [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]ATP-標識プローブ (10<sup>5</sup> cpm) と 0°C, 30 分間インキュベートし結合させた (総容量 20  $\mu$ l)。結合後ただちに DNA-タンパク複合体 (5  $\mu$ l) を 4% ポリアクリルアミドゲルに重層し,  $\times$  0.5 TBE [ $\times$  1 TBE = 90 mM Tris-HCl (pH 8.0), 90 mM boric acid, 2 mM EDTA] 中にて, 150 V, 1.5 時間電気泳動を行った。プローブとの結合バンドを検出するために, 泳動終了後のゲルを乾燥させ, X線フィルムを重ねて -80°C にて 14 - 18 時間感光させた。なお結合の特異性は以下のごとく検討した。すなわち, [<sup>32</sup>P]-標識  $\beta$  RARE に過剰量 (50 倍 - 200 倍) の非標識  $\beta$  RARE, あるいはグルココルチコイドレスポンスエレメント (glucocorticoid response element, GRE)<sup>37)</sup> を加えた競合実験を行い, 結

合バンドの消失の有無を調べた。

### 5. イムノブロット法

前述2で調製したHSG細胞の核抽出物(5 $\mu$ l)に等量のSDS-sample bufferを添加した。100 $^{\circ}$ C 5分間加熱し可溶化ならびにSDS化後、レインボーマーカーとともにSDS-PAGEを行った。ゲルは10%アクリルアミドゲルを用い、12mA定電流下で1.5時間泳動した。泳動終了後、ゲル上のタンパクはClear Blot Membrane-p(アトー)に8Vの低電圧にて1.5時間電気泳動的に転写した。つづいて膜は5% dried milk, 0.1% Tween-20を含むTris buffered saline [20 mM Tris-HCl (pH 7.6), 137 mM NaCl] (TBS)中に4 $^{\circ}$ C一晩静置しブロッキングを行った。ブロッキング終了後、膜を0.4%ゼラチン-TBSにて200倍に希釈した抗RAR $\alpha$ ならびに抗RXR $\alpha$ 抗体と0 $^{\circ}$ C 1時間インキュベートした。2次抗体以降の一連の操作にはBlotting detection kit (Amersham, U. K.)を用い、アビジン-ビオチンアルカリフォスファターゼ法によりRAR $\alpha$ ならびにRXR $\alpha$ を検出した。

## 結 果

### 1. *in vitro* 翻訳RAR $\alpha$ ならびにRXR $\alpha$ と $\beta$ RAREとの結合

はじめに、 $^{35}$ S]methionineを用いて*in vitro*翻訳させたRAR $\alpha$ ならびにRXR $\alpha$ のSDS-PAGE解析を行い、マーカーの易動度をもとに分子量を調べた(Fig.1)。フルオログラフィー24時間により、両レセプターはほぼ同じ位置にシングルバンドとして得られた(lanes 1, 2)が、バンドの強度が強く、位置すなわち分子量の正確な判定が困難であった。そこで感光時間を6時間と短くしたところ、RAR $\alpha$ , RXR $\alpha$ ともに54キログルトン(K)にシングルバンドが得られた(lanes 3, 4)。また、RAR $\alpha$ のバンドの強度がRXR $\alpha$ のバンドに較べ著しく強いことから、RAR $\alpha$ の翻訳効率がRXR $\alpha$ の翻訳効率に較べ高いことが明らかとなった。RAR $\alpha$ ならびにRXR $\alpha$ それぞれの

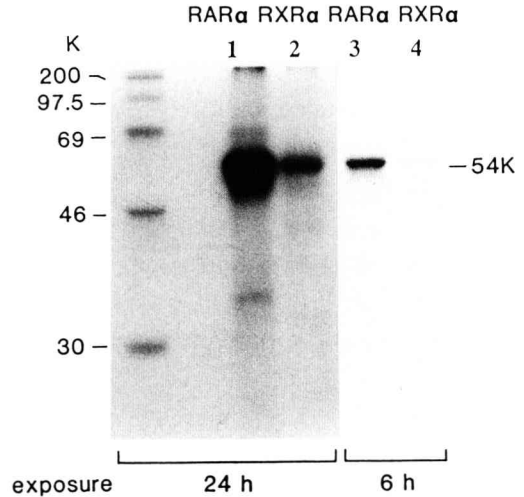


Fig. 1 SDS-PAGE analysis of *in vitro*-translated RAR $\alpha$  and RXR $\alpha$ .

A plasmid pGEM-3 containing 1.4 kb-RAR $\alpha$  cDNA or pBluescript containing 1.6 kb-RXR $\alpha$  cDNA was restricted by Sal I or Xho I, respectively. Template DNA (5 $\mu$ g) was precipitated with absolute ethanol, suspended in sterilized DEPC water, and transcribed in the presence of  $^{35}$ S]methionine using T7RNA polymerase *in vitro*. After transcription, RNA was precipitated with ethanol, suspended in sterilized DEPC water, and translated using a rabbit reticulocyte lysate translation system (Promega) as described by the supplier. An aliquot (2 $\mu$ l) of the *in vitro*-translated RAR $\alpha$  or RXR $\alpha$  was mixed with an equal volume of SDS-sample buffer and applied to SDS-PAGE gel (10%). After electrophoresis, the gel was treated with Amplify (Amersham, U. K.), and dried. Fluorography was performed at -80 $^{\circ}$ C using Fuji RX X-ray film. Exposure time was 24 or 6 h.

Marker proteins; myosin (200K), phosphorylase b (97.5K), BSA (69K), ovalbumin (46K) and carbonic anhydrase (30K) were applied on the same gel.

cDNA 配列から推定される翻訳RAR $\alpha$  (462 アミノ酸)ならびにRXR $\alpha$  (462 アミノ酸)の分子量はともに54Kであり、本実験結果はこれに一致した。従って、翻訳RAR $\alpha$ ならびにRXR $\alpha$ はいずれも無傷であることが示された。

そこで次に、これら翻訳RAR $\alpha$ ならびにRXR $\alpha$ とプローブ $\beta$ RAREとの結合について

ゲル易動度シフト解析により検討した。ゲル易動度シフト法において、プローブ DNA とタンパクが結合し DNA-タンパク複合体を形成すると、分子量は大きくなり、ゲル上での易動度はプローブのみに較べ小さくなるためバンドは上に認められる。*in vitro* 翻訳 RAR $\alpha$  ならびに RXR $\alpha$  をそれぞれ単独に、あるいは両者共存下にて放射性標識プローブ [ $^{32}$ P] $\beta$ RARE と結合後、非変性ポリアクリルアミドゲル (4%) にて電気泳動を行い、オートラジオグラフィーによりシフトした結合バンドを検出した (Fig. 2A)。RAR $\alpha$  ならびに RXR $\alpha$  の対照として用いたウサギ網状赤血球 (A, lane 2) は、プローブのみの場合 (A, lane 1) と同様に、プローブとの結合を示すシフトしたバンドは認められなかった。また、RAR $\alpha$  ならびに RXR $\alpha$  それぞれ単独では [ $^{32}$ P] $\beta$ RARE との結合は認められなかった (A, lane 3, 4)。一方、RAR $\alpha$  と RXR $\alpha$  の共存下においてシフトしたバンドが出現した (A, lane 5)。この結果、すなわち RAR $\alpha$  による  $\beta$ RARE の認識に RXR $\alpha$  の存在を必要とするという知見は、 $\beta$ RARE 上での RAR $\alpha$ -RXR $\alpha$  ヘテロダイマーの形成を示唆するものである。

つぎに、前述した RAR $\alpha$ , RXR $\alpha$  共存下で出現する [ $^{32}$ P] $\beta$ RARE との結合バンドの結合特異性を、過剰量の競合 DNA を用いて検討した (Fig. 2B)。競合 DNA には標識プローブと同じ  $\beta$ RARE, ならびに GRE を用いた。ちなみに、グルココルチコイドレセプター (GR) により特異的に認識され GRE のコンセンサス配列は AGAACA であり、RAR により特異的に認識される RARE のコンセンサス配列 AGGTCA とは異なる<sup>30)</sup>。競合実験の結果、RAR $\alpha$ , RXR $\alpha$  共存下において出現する [ $^{32}$ P]- $\beta$ RARE との結合バンド (B, lane 1) は標識プローブの 50 倍 - 200 倍過剰の非標識  $\beta$ RARE 存在下においていずれも消失した (B, lanes 2-4) が、GRE では消失しなかった (B, lanes 5-7)。この結果から、翻訳レセプターと [ $^{32}$ P] $\beta$ RARE との結合は特異的である

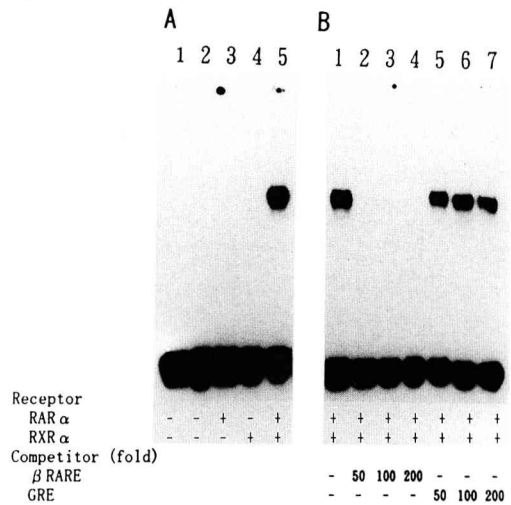


Fig. 2 Bindings of *in vitro*-translated RAR $\alpha$  and RXR $\alpha$  to [ $^{32}$ P] $\beta$ RARE.

A : Gel-mobility-shift assay was carried out using *in vitro*-translated human RAR $\alpha$  (2  $\mu$ l), RXR $\alpha$  (5  $\mu$ l) and [ $\gamma$ - $^{32}$ P]-labeled  $\beta$ RARE (1 ng). *In vitro* translation was carried out as described in the legend of Fig. 1, except for the use of unlabeled methionine instead of [ $^{35}$ S]-methionine.

B : RAR $\alpha$  and RXR $\alpha$  were incubated with [ $^{32}$ P] $\beta$ RARE in the absence or presence of an excess amount (50, 100, 200 ng) of unlabeled  $\beta$ RARE or glucocorticoid response element (GRE). RAR $\alpha$  and/or RXR $\alpha$  were incubated with [ $^{32}$ P] $\beta$ RARE (1 ng) at 0°C for 30 min in the presence of 0.1 M KCl.

The mixture was applied to 4% polyacrylamide gel and electrophoresed at 150 V for 1.5 h. The gels were dried and exposed to Fuji RX X-ray film at -80°C for 16 h. The sense and antisense strands of the  $\beta$ RARE probe consisted of sequences 5'-aaggggatccGGGTAGGGTTCACCGAAAGTTCCTCG-3' and 5'-aggaagatctCGAGTGAACCTTCGGTGAACCTTACC-3', respectively.

ことが示された。

## 2. HSG 核抽出物と $\beta$ RARE との結合

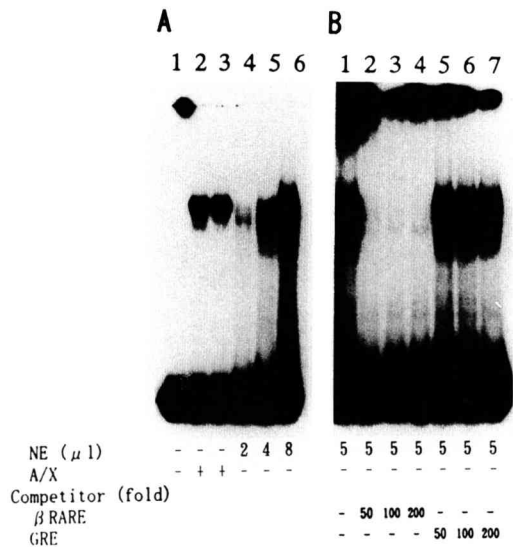
HSG 細胞で発現している RAR は、増殖抑制など生理機能発現を誘導する際の第一段階として、核内における標的遺伝子のプロモーターあるいはエンハンサー領域に存在する RARE との結合が必須である。そこではじめに、本細胞の RAR が生理活性を有するか否かを [ $^{32}$ P]-

$\beta$ RARE との結合実験により検討した。RAR 含有画分として調製した HSG の 0.3 M KCl 抽出物各 2, 4, 8  $\mu$ l を [ $^{32}$ P] $\beta$ RARE と結合後、ゲル易動度シフト解析を行った (Fig. 3A)。HSG 核抽出物は単独、すなわち外来性の因子なしで [ $^{32}$ P] $\beta$ RARE と結合した。核抽出物 2  $\mu$ l を使用した場合の結合は弱かった (A, lane 4) が、核抽出物の増量とともに結合バンドは増強された (A, lanes 5, 6)。また、対照として用いた翻訳 RAR $\cdot$ RXR の [ $^{32}$ P]- $\beta$ RARE との結合バンド (A, lanes 2, 3) と比較すると、核抽出物 2  $\mu$ l で認められるメインバンドは若干下に位置し (A, lane 4)、結合物の分子量が異なることが示唆された。核抽出物の量を増加した際に認められるバンドは、2  $\mu$ l でみられたメインバンドを中心に上下に長くなり (A, lanes 5, 6) その正確な位置の判定は困難となった。この結果は HSG 核抽出物と  $\beta$ RARE との複合体の heterogeneity を推測させるものである。

続いて、結合の特異性を調べるために過剰量の非標識 RARE ならびに GRE による競合実験を行った (Fig. 3B)。この結果、HSG 核抽出物と [ $^{32}$ P] $\beta$ RARE との結合バンド (B, lane 1) は、過剰量の  $\beta$ RARE の存在下で消失した (B, lanes 2-4) が、GRE では消失しなかった (B, lane 5-7)。従って HSG 核抽出物とプローブとの結合は特異的であることが示された。

### 3. HSG 細胞における RXR $\alpha$ 発現のイムノブロット法による検討

多くの正常細胞で RXR $\alpha$  の発現が認められている<sup>19)</sup>が、HSG 細胞における RXR $\alpha$  の発現についての検討はこれまでなされていない。そこで特異抗体を用いたイムノブロット法により HSG 細胞核内における RXR $\alpha$  の発現について検討した。核内レセプターである RXR は RAR と同様に細胞の核内に局在するが、*in vitro* では高イオン強度、たとえば 0.3-0.4 M KCl など RAR とともに核から抽出されることが明らかとなっている<sup>33)</sup>。そこで、HSG 細胞



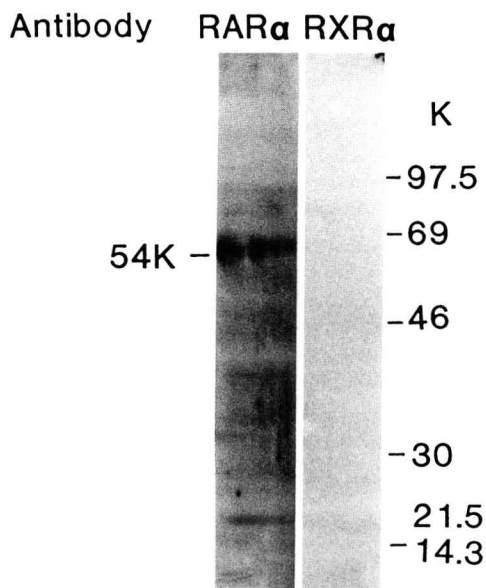
**Fig. 3** Bindings of the nuclear extract of HSG cells to [ $^{32}$ P] $\beta$ RARE.

A : Gel-mobility-shift assay was carried out using the nuclear extract of HSG cells and [ $^{32}$ P] $\beta$ RARE. The nuclei were prepared from  $10^7$  HSG cells and extracted using 200  $\mu$ l of 0.3 M KCl in TEDG buffer. Aliquots (2, 4, 8  $\mu$ l) were incubated with [ $^{32}$ P] $\beta$ RARE at 0°C for 30 min in the presence of KCl at final concentration 0.1 M. Lanes 2 and 3 show the band of RAR $\alpha$ -RXR $\alpha$  bound [ $^{32}$ P]- $\beta$ RARE for comparison with that of the nuclear extract.

B : The nuclear extract was incubated with [ $^{32}$ P] $\beta$ RARE (1 ng) in the absence or presence of an excess amount (50, 100, 200 ng) of unlabeled  $\beta$ RARE or GRE.

Details are described in the legend of Fig. 2. Exposure time was 16 h.

の 0.3 M KCl 核抽出物について SDS-PAGE を行い抗 RXR $\alpha$  抗体による検出を試みた。その結果、RXR $\alpha$  の存在を示す 54 K 付近のバンドは認められなかった (Fig. 4)。一方、RAR $\alpha$  の特異抗体を用いると、54 K 付近に RAR $\alpha$  のバンドが認められた。イムノブロットの条件を緩和させ RXR $\alpha$  の検出をさらに試みたが、RXR $\alpha$  のプロットは得られなかった (データは示さない)。



**Fig. 4** Immunoblotting analysis of the nuclear extract.

Aliquots (2.5  $\mu$ l) of the nuclear extract of HSG cells were run on the SDS-polyacrylamide gel (10%). Immunoblotting analysis was performed using the specific antibody for the C-terminal peptide (17 amino acids) of RAR $\alpha$  or the bacterially expressed DNA binding domain of RXR $\alpha$ . Detection was carried out by the avidine-biotin-alkaline phosphatase method as described in Materials and Methods. The molecular weight markers used were myosin (200K), phosphorylase b (97.5K), BSA (69K), ovalbumin (46K), carbonic anhydrase (30K), trypsin inhibitor (21.5K) and lysozyme (14.3K).

### 考 察

これまでに RAR には  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  のサブタイプが存在することが報告されている<sup>8,39-41</sup>). 私共は HSG 細胞には RAR  $\alpha$ <sup>33</sup>) ならびに  $\gamma$  (未発表) 遺伝子が発現していることを, mRNA ならびにタンパクレベルで見出した。皮膚や骨に特異的に発現される RAR  $\gamma$ <sup>40-42</sup>) と異なり, RAR  $\alpha$  は小腸, 下垂体, 海馬, 眼, 子宮, 前立腺などを含む生体内の多くの組織に発現が認められ, その作用は多岐にわたっている<sup>8,40</sup>). また, RAR  $\alpha$  は細胞の成長, 増殖, 分化といった

基本的な機能にかかわる転写制御因子とも考えられる。本研究では HSG 細胞に発現する RAR  $\alpha$  が HSG 細胞の増殖や分化をいかに制御するか, すなわち RAR  $\alpha$  による標的遺伝子の転写制御機構の解明を目的とし, HSG 細胞の RAR を含む核抽出物と  $\beta$  RARE との結合の解析を試みた。HSG 細胞の RAR と  $\beta$  RARE との結合を検索する際, 比較のために翻訳 RAR や RXR のような純化されたレセプターを用いて  $\beta$  RARE との結合を調べることは重要であり, 結合様式の違いなど多くの情報を提供する。また, RAR の RARE との結合様式に関しては, この数年 RXR とのヘテロダイマー形成の必要性が提唱されている<sup>22-24,38,43-45</sup>) が, ホモダイマーすなわち RAR 単独でも RARE に結合するとの報告もあり<sup>46</sup>) 現在でも議論が多い。そこで本実験ではまず, *in vitro* で翻訳した RAR  $\alpha$  による, 特異的レスポンスエレメントである RARE の認識を翻訳 RXR  $\alpha$  共存, 非共存下にて検索した。この結果, RAR  $\alpha$  は単独では  $\beta$  RARE を認識できず, RXR  $\alpha$  共存下でのみ  $\beta$  RARE を認識することが明らかとなった (Fig. 2A)。これは Yu らの報告<sup>22</sup>) と一致するものである。一方, HSG 核抽出物と  $\beta$  RARE との結合を調べた結果, HSG 核抽出物が単独で  $\beta$  RARE と結合することが明らかとなった (Fig. 3A)。この結果と, RAR  $\alpha$  は単独では  $\beta$  RARE を認識できないという結果 (Fig. 2A) から, HSG 核抽出物画分中に RAR の RARE との結合を増強する因子が存在することが強く示唆された。実際, HSG 核抽出物と  $\beta$  RARE との結合バンドの位置が RAR  $\cdot$  RXR と  $\beta$  RARE との結合バンドの位置とは異なる (Fig. 3A) ことにより, HSG 核抽出物中には RXR  $\alpha$  とは異なる RXR 様因子の存在が予想された。さらに, 核抽出物画分の量を増量した際に認められる結合バンドの heterogeneity (Fig. 3A) から, RAR と相互作用する RXR 様因子には数種類存在する可能性が考えられた。

RXR には RAR と同様にサブタイプが存在することが報告されている。これまでにヒトで

は RXR  $\alpha$ <sup>19)</sup>と  $\beta$ <sup>22,47)</sup>がクローニングされているが、その中でも RXR  $\alpha$ は生体内の多くの組織でその発現が認められている<sup>19)</sup>。そこで本実験では、イムノブロット法による HSG 核抽出物中の RXR  $\alpha$ の発現を検討したが、RXR  $\alpha$ は検出されなかった (Fig.4)。この結果は、HSG 細胞中に RXR  $\alpha$ が発現していないかあるいは発現レベルが非常に低いこと、また、膜にトランスファーされた RXR  $\alpha$ のエピトープが抗体と結合できないことなどを示唆するものである。今後、サザンブロットやノザンブロット法などによる DNA や mRNA レベルでの詳細な検討が必要である。また、HSG 細胞の核内に存在の予想される RXR  $\alpha$ 以外の RXR 様因子に関しては、それらがこれまでに報告されている RXR  $\beta$ や  $\gamma$ であるか、あるいは全く新しいタイプの RXR ファミリーに属する分子であるかは不明であり、これを明確にするにはクローニングが必要とされる。

現在、私共は RXR  $\alpha$ の DNA 結合領域を含む約 400 bp をはさむ上流ならびに下流プライマーを作成し、これを用いて HSG 細胞の cDNA から RXR 様分子のクローニングを試みているが、今後、顎下腺に特異的な RXR ファミリーを解明できれば、顎下腺細胞における分化誘導の詳細を RXR との関連から明らかにしていくことが可能となる。現在、乳ガンの治療において抗エストロゲン治療を行う際に、エストロゲンレセプター存在の有無が治療の有効性を予想する指標となっているが、これと同様に、臨床において、顎下腺癌患者の RXR 発現レベルを調べることは、これら癌患者への RA による分化誘導療法を有効に行う際の何らかの指標となることが期待できる。

本研究において、HSG 細胞の核内 RAR は *in vitro* において RARE と結合することから、細胞内においても生理活性を担っていることが強く示唆された。RAR の RARE との結合につづく RNA ポリメラーゼ II による転写活性誘導には、さらに TF II D などの、core promoter を構成する基本転写因子群との相互作用が必要

であり、この点に関しては、今後の検討課題と考える。

## 結 論

ヒト顎下腺由来腺癌細胞株 (HSG) の核内に発現するレチノイン酸レセプター (RAR) を含む核抽出物と [<sup>32</sup>P]-標識レチノイン酸レスポンスエレメント ( $\beta$ RARE) との結合を、*in vitro* 翻訳ヒト RAR  $\alpha$ ならびに RXR  $\alpha$ を対照として比較検討し以下の知見を得た。

1. *in vitro* 翻訳 RAR  $\alpha$ は単独では [<sup>32</sup>P]- $\beta$ RARE と結合しないが、RXR  $\alpha$ の共存下にてこれと特異的に結合することから、[<sup>32</sup>P]- $\beta$ RARE 上での RAR  $\cdot$  RXR ヘテロダイマーの形成が示唆された。
2. HSG 核抽出物は単独で [<sup>32</sup>P] $\beta$ RARE と特異的に結合した。
3. HSG 核抽出物と [<sup>32</sup>P] $\beta$ RARE との主となる結合バンドの位置は RAR  $\alpha$   $\cdot$  RXR  $\alpha$  と [<sup>32</sup>P] $\beta$ RARE との結合バンドの位置とは異なった。
4. HSG 核抽出物を増量すると結合バンドは上下に広がることから、核抽出物 - [<sup>32</sup>P]- $\beta$ RARE 複合体の heterogeneity が示唆された。

以上の結果から、HSG 細胞の RAR は標的遺伝子プロモーター上の RARE と結合し生理作用を発揮すること、また HSG 細胞の核内には数種類の RXR ファミリーが発現し、これらが共同因子として RAR の RARE との結合に関与することが示唆された。

## 謝 辞

本研究の推進に際し、御援助頂きました岩手クリニック水沢に感謝いたします。

本論文は、文部省科学研究費奨励研究 A (No. 04771461, S. K.) ならびに一般研究 B (No. 03454435, M. O.) によった。

なお本論文の要旨は第 35 回歯科基礎医学会総会 (1993 年 10 月 12 日, 長崎) において発表した。



## 参 考 文 献

- 1) Sporn, M. B. and Roberts A. B.: Interactions of retinoids and transforming growth factor- $\beta$  in regulation of cell differentiation and proliferation. *Mol. Endo.* 5 : 3-7, 1991.
- 2) Durston, A. J., Timmermans, J. P. M., Hage, W. J., Hendriks, H. F. J., de Vries, N. J., Heideveld, M. and Nieuwkoop, P. D.: Retinoic acid causes an anteroposterior transformation in the developing central nervous system. *Nature* 340 : 140-144, 1989.
- 3) Blomhoff, H. K., Smeland, E. B., Erikstein, B., Rasmussen, A. M., Skrede, B., Skjonsberg, C. and Blomhoff, R.: Vitamin A is a key regulator for cell growth, cytokine production, and differentiation in normal B cell. *J. Biol. Chem.* 267 : 23988-23992, 1992.
- 4) Lefebvre, P. P., Malgrange, B., Staecker, H., Moonen, G. and Van de Water, T. R.: Retinoic acid stimulates regeneration of mammalian auditory hair cells. *Science* 260 : 692-695, 1993.
- 5) Osumi-Yamashita, N., Noji, S., Nohno, T., Koyama, E., Doi, H., Eto, K. and Taniguchi, S.: Expression of retinoic acid receptor genes in neural crest-derived cells during mouse facial development. *FEBS Lett.* 264 : 71-74, 1990.
- 6) Tabin, C. J.: Retinoids, homeoboxes, and growth factors : Toward molecular models for limb development. *Cell* 66 : 199-217, 1991.
- 7) Petkovich, M., Brand, N. J., Krust, A. and Chambon, P.: A human retinoic acid receptor which belongs to the family of nuclear receptors. *Nature* 330 : 444-450, 1987.
- 8) Gigere, V., Ong, E. S., Segui, P. and Evans, R. M.: Identification of a receptor for the morphogen retinoic acid. *Nature* 330 : 624-629, 1987.
- 9) Vollberg, T. M., Nervi, C., George M. D., Fujimoto, W., Krust, A. and Jetten, A. M.: Retinoic acid receptors as regulators of human epidermal keratinocyte differentiation. *Mol. Endo.* 6 : 667-676, 1992 .
- 10) Umesono, K., Giguere, V., Glass, C. K., Rosenfeld, M. G. and Evans, R. M.: Retinoic acid and thyroid hormone induce gene expression through a common responsive element. *Nature* 336 : 262-264, 1988.
- 11) Hudson, L. G., Santon, J. B., Glass, C. K. and Gill, G. N.: Ligand-activated thyroid hormone and retinoic acid receptors inhibit growth factor receptor promoter expression. *Cell* 62 : 1165-1175, 1990.
- 12) Stellmach, V., Leask, A. and Fuchs, E.: Retinoid-mediated transcriptional regulation of keratin genes in human epidermal and squamous cell carcinoma cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88 : 4582-4586, 1991.
- 13) Lucas, P. C., Forman, B. M., Samuels, H. H. and Granner, D. K.: Specificity of a retinoic acid response element in the phosphoenolpyruvate carboxykinase gene promoter : consequences of both retinoic acid and thyroid hormone receptor binding. *Mol. Cell. Biol.* 11 : 5164-5170, 1991.
- 14) Richard, S. and Zingg, H. H.: Identification of a retinoic acid response element in human oxytocin promoter. *J. Biol. Chem.* 266 : 21428-21433, 1991.
- 15) Näär, A. M., Boutin, J. -M., Lipkin, S. M., Yu, V. C., Holloway, J. M., Glass, C. K. and Rosenfeld, M. G.: The orientation and spacing of core DNA-binding motifs dictate selective transcriptional responses to three nuclear receptors. *Cell* 65 : 1267-1275, 1991.
- 16) Glass, C. K., Drenzo, J., Kurokawa, R. and Han, Z.: Regulation of gene expression by retinoic acid receptors. *DNA Cell Bio.* 10 : 623-638, 1991.
- 17) Glass, C. K.: Differential recognition of target genes by nuclear receptor monomers, dimers and heterodimers. *Mol. Endo.* in press.
- 18) Glass, C. K., Devary, O. V. and Rosenfeld, M. G.: Multiple cell type-specific proteins differentially regulate target sequence recognition by the  $\alpha$  retinoic acid receptor. *Cell* 63 : 729-738, 1990.
- 19) Mangelsdorf, D. J., Ong, E. S., Dyck, J. A. and Evans, R. M.: Nuclear receptor that identifies a novel retinoic acid response pathway. *Nature* 345 : 224-229, 1990.
- 20) Levin, A. A., Sturzenbecker, L. J., Kazmer, S., Bosakowski, T., Huselton, C., Allenby, G., Speck, J., Kratzeisen, Cl., Rosenberger, M., Lovey, A. and Grippo, J. F.: 9-Cis retinoic acid stereoisomer binds and activates the nuclear receptor RXR  $\alpha$ . *Nature* 355 : 359-361, 1992.
- 21) Heyman, R. A., Mangelsdorf, D. J., Dyck, J. A., Stein, R. B., Eichele, G., Evans, R. M. and Thaller, C.: 9-Cis retinoic acid is a high affinity ligand for the retinoid X receptor. *Cell* 68 : 397-406, 1992.
- 22) Yu, V. C., Delsert, C., Andersen, B., Holloway, J. M., Devary, O. V., Näär, A. M., Kim, S. Y., Boutin, J. -M., Glass, C. K. and Rosenfeld, M. G.: RXR  $\beta$  : A coregulator that enhances binding of retinoic acid, thyroid hormone, and vitamin D receptors to their cognate response elements. *Cell* 67 : 1251-1266, 1991.
- 23) Leid, M., Kastner, P., Lyons, R., Nakshatri, H., Zacharewski, T., Chen, J. -Y., Staub, A., Saunders, M., Garnier, J. -M., Mader, S. and Chambon, P.: Purification, cloning, and RXR identity of the HeLa cell factor with which RAR or TR heter-

- odimerizes to bind target sequences efficiently. *Cell* 68 : 377- 395, 1992.
- 24) Kliewer, S. A., Umesono, K., Mangelsdorf, D. J. and Evans, R. M.: Retinoid X receptor interacts with nuclear receptors in retinoic acid, thyroid hormone and vitamin D<sub>3</sub> signalling. *Nature* 355 : 446- 449, 1992.
- 25) Kurokawa, R., Kyakumoto, S. and Ota, M.: Glucocorticoid regulates secretion of epidermal growth factor in the human salivary gland adenocarcinoma cell line. *J. Endocr.* 116 : 451- 455, 1988.
- 26) Kurokawa, R., Kyakumoto, S. and Ota, M.: Autocrine growth factor in defined serum-free medium of human salivary gland adenocarcinoma cell line HSG. *Cancer Res.* 49 : 5136- 5142, 1989.
- 27) Kyakumoto, S., Kurokawa, R., and Ota, M.: Effect of glucocorticoid on epidermal growth factor receptor in human salivary gland adenocarcinoma cell line HSG. *Biochim. Biophys. Acta* 1053 : 204- 212, 1990.
- 28) 太田稔, 客本斉子: ヒト唾液腺由来腺癌細胞の増殖とその制御 (総説) 日本唾液腺学会誌 34 : 1- 13, 1993.
- 29) Azuma, M., Kawamata, H., Kasai, Y., Nagamine, S., Yoshida, H., Yanagawa, T. and Sato, M.: Effects of retinoic acid on morphological features and biological markers of a neoplastic human salivary intercalated duct cell line in culture. *Cancer Res.* 48 : 7219- 7225, 1988.
- 30) Azuma, M., Kawamata, H., Kasai, Y., Yanagawa, T., Yoshida, H. and Sato, M.: Induction of cells with a chondrocyte-like phenotype by treatment with 1  $\alpha$ , 25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> in a human salivary acinar cell line. *Cancer Res.* 49 : 5435- 5442, 1989.
- 31) Sato, M., Yoshida, H., Kawamata, H., Yura, Y., Shirakami, N., Iga, H. and Furumoto, N.: 5- Azacytidine induction of neuron-like cells from a neoplastic human salivary intercalated duct cell line and effect of dibutyryl cyclic adenosine 3', 5'-monophosphate on proliferation and phenotype of the induced cells. *Cancer J.* 6 : 26- 36, 1993.
- 32) 星野正行: ヒト顎下腺由来腺癌細胞株の増殖と分化に及ぼすジブチリル cAMP の効果. 歯基礎誌 35 : 505- 519, 1993.
- 33) Kurokawa, R., Kyakumoto, S. and Ota, M.: Retinoic acid receptor in subclone of human salivary gland adenocarcinoma cell line HSG and effect of retinoic acid on cellular growth. *Biochim. Biophys. Acta* 1095 : 63- 74, 1991.
- 34) Yang, N., Schule, R., Mangelsdorf, D. J. and Evans, R. M.: Characterization of DNA binding and retinoic acid binding properties of retinoic acid receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88 : 3559- 3563, 1991.
- 35) Shirasuna, K., Sato, M. and Miyazaki, T.: A neoplastic epithelial duct cell line established from an irradiated human salivary gland. *Cancer* 48 : 745- 752, 1981.
- 36) Glass, C. K., Lipkin, S. M., Devary, O. V. and Rosenfeld, M. G.: Positive and negative regulation of gene transcription by a retinoic acid-thyroid hormone receptor heterodimer. *Cell* 59 : 697- 708, 1989.
- 37) Nemoto, T., Ohara-Nemoto, Y., Sato, N. and Ota, M.: Dual roles of 90-kDa heat shock protein in the function of the mineralocorticoid receptor. *J. Biochem.* 113 : 769- 775, 1993.
- 38) Kurokawa, R., Yu, V. C., Näär, A., Kyakumoto, S., Han, Z., Silverman, S., Rosenfeld, M. G. and Glass, C. K.: Differential orientations of the DNA-binding domain and carboxyterminal dimerization interface regulate binding site selection by nuclear receptor heterodimers. *Genes & Dev.* 7 : 1423- 1435, 1993.
- 39) Brand, N., Petkovich, M., Krust, A., Chambon, P., de The, H., Marchio, A., Tiollais, P. and Dejean, A.: Identification of a second human retinoic acid receptor. *Nature* 332 : 850- 853, 1988.
- 40) Krust, A., Petkovich, M., Zelent, A. and Chambon, P.: A third human retinoic acid receptor, hRAR- $\gamma$ . *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86 : 5310- 5314, 1989.
- 41) Zelent, A., Krust, A., Petkovich, M., Kastner, P. and Chambon, P.: Cloning of murine  $\alpha$  and  $\beta$  retinoic acid receptors and a novel receptor  $\gamma$  predominantly expressed in skin. *Nature* 339 : 714- 717, 1989.
- 42) Nakayama, Y., Takahashi, K., Noji, S., Muto, K. and Taniguchi, S.: Functional modes of retinoic acid in mouse osteoblastic clone MC 3 T 3 -E1, proved as a target cell for retinoic acid. *FEBS Lett.* 261 : 93- 96, 1990.
- 43) Zhang, X. -K., Hoffman, B., Tran, P. B. -V., Graupner, G. and Pfahl, M.: Retinoid X receptor is an auxiliary protein for thyroid hormone and retinoic acid receptors. *Nature* 355 : 441- 449, 1992.
- 44) Bugge, T. H., Pohl, J., Lonnoy, O. and Stunnenberg, G.: RXR $\alpha$ , a promiscuous partner of retinoic acid and thyroid hormone receptors. *EMBO. J.* 11 : 1409- 1418, 1992.
- 45) Marks, M. S., Hallenbeck, P. L., Nagata, T., Segars, J. H., Appella, E., Nikodem, V. M. and Ozato, K.: H-2 RIIBP (RXR $\beta$ ) heterodimerization provides a mechanism for combinatorial diversity in the regulation of retinoic acid and thyroid hormone responsive genes. *EMBO. J.* 11 : 1419- 1435, 1992.
- 46) Williams, G. R., Harney, J. W., Moore, D. D.,

Larsen, P. R. and Brent, G. A.: Differential capacity of wild type promoter elements for binding and trans-activation by retinoic acid and thyroid hormone receptors. *Mol. Endo.* 6 : 1527-1537, 1992.

- 47) Hamada, K., Gleason, S. L., Levi, B.-Z., Hirschfeld, S., Apella, E. and Ozato, K.: H-2 RIIBP, a member of the nuclear hormone receptor super family that binds to both the regulatory element of major histocompatibility class I genes and the estrogen response element. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86 : 8289-8293, 1989.