

マウス顎下腺におけるマルチホルモン
調節系の分子生物学的解析

富山医科薬科大学大学院
薬学研究科
医療薬科学専攻
病態生化学部門

黒澤 信幸

①

マウス顎下腺におけるマルチホルモン 調節系の分子生物学的解析

富山医科薬科大学和漢薬研究所
病態生化学部門

黒澤 信幸

[序]

マウス顎下腺は男性ホルモンや甲状腺ホルモンなどの標的臓器として知られている。この組織には、表皮成長因子(EGF)や神経成長因子(NGF)などの他に、カリクレインファミリーに属するプロテアーゼが高濃度に存在している。マウス顎下腺に存在するこれら生理活性に関与する蛋白質は、男性ホルモンや甲状腺ホルモンなどの変化に鋭敏に反応するため、マルチホルモン調節作用を解析するための恰好の実験材料として注目されてきた。特に顎下腺に存在する一連のプロテアーゼは組織特異的でしかもその測定法が容易であることから、ホルモン作用を解析するための指標酵素として用いられてきた。また顎下腺から単離された数種類のプロテアーゼは、EGFやNGFなどの成長因子に結合する性質を持つことから、顎下腺に存在するプロテアーゼの機能として生理活性因子調節作用が示唆されてきた。単離されたプロテアーゼのアミノ酸配列をもとに、現在までに24種類ものカリクレイン様遺伝子がクローニングされ、遺伝子レベルからの機能解析も行なわれるようになった。近年分子生物学の著しい進歩により、多くのステロイドホルモン受容体遺伝子がクローニングされ、その結果ホルモン-受容体-遺伝子活性化に至る機構が次第に解明されるようになった。顎下腺に存在するEGF、NGF及びプロテアーゼは、組織特異的で、しかも複数のホルモンによる調節を受けることから、これら蛋白質をコードする遺伝子のホルモンによる転写活性化機構の解析を行うことは、組織特異的マルチホルモン調節機構解明のため重要である。本研究ではマウス顎下腺に多種多量に存在するプロテアーゼに特に注目し、顎下腺プロテアーゼのホルモン投与による影響を蛋白質レベル及び遺伝子レベルで解析した。

第I章に、ホルモン作用を有する薬物の簡便なスクリーニング法として、唾液プロテアーゼ活性測定法を、第II章に顎下腺プロテアーゼの諸性質を明らかとするために行ったプロテアーゼ活性の基質特異性に基づく分類を、第III章にEGF、NGF及びプロテアーゼ遺伝子発現の解析を行った結果を記す。

目次

第I章 男性ホルモンの指標酵素として有用なマウス唾液プロテアーゼ

緒論	1
材料と方法	
1. 材料	2
2. マウス唾液採取法	2
3. マウス唾液プロテアーゼ活性測定法	2
4. 電気泳動用試料	
(1) 唾液プロテアーゼ試料	3
(2) 顎下腺試料	3
5. 電気泳動法	
(1) 等電点電気泳動法	3
(2) 垂直式微量電気泳動法	4
(3) 二次元電気泳動法	4
6. プロテアーゼ活性検出法	4
実験結果	5
考察	7
参考文献	11

第II章 マウス顎下腺プロテアーゼの基質特異性に基づく分類

緒論	13
材料と方法	
1. 顎下腺試料調製法	14
2. 電気泳動法	
(1) 等電点電気泳動法	14
(2) 垂直式微量電気泳動法	14
(3) 二次元電気泳動法	15
3. プロテアーゼ活性測定法	
(1) p-ニトロアニリン誘導体を基質としたプロテアーゼ活性検出法	15
(2) 高分子基質を用いたプロテアーゼ活性検出法	16
実験結果	16
考察	19
参考文献	24

第III章 マウス顎下腺における遺伝子発現

緒論	26
材料と方法	
1. 材料	27
2. マウス組織からのRNA抽出法	27
3. ポリメラーゼチェーンリアクション法	
(1) 一本鎖cDNA合成法	28
(2) PCR	28
(3) プライマー合成	28
(4) PCR反応条件	29
5. ポリアクリルアミドゲル電気泳動	30
6. 制限酵素によるPCRサンプルの解析	30
7. PCRサンプルのベクターへのサブクローニング	30
8. ノーザンブロットハイブリダイゼーション	31
結果	32
考察	37
参考文献	42
結論	45
謝辞	46

第 I 章

男性ホルモン作用の指標酵素として有用なマウス唾液プロテアーゼ

〔緒論〕

マウス顎下腺は男性ホルモンや甲状腺ホルモンなどのマルチホルモン調節系をうける臓器として知られている(1,2)。この臓器の雄雌間には形態的にも生化学的にも著しい性差が認められる。即ち形態的には雄マウス顎下腺ではGCT (granular convoluted tubules)が発達しており、これが顎下腺の50%をしめる。また生化学的に性差の認められるEGFやNGFなどの成長因子やプロテアーゼは、いずれもこのGCT細胞分泌顆粒中に存在することが組織学的に確認されており、これら生理活性に関与する因子のいずれもが唾液中に分泌されていることが報告されている(3,4,5,6,7,8,9)。GCT細胞の分化増殖には、男性ホルモンや甲状腺ホルモンなど2つ以上のホルモンが関与している。すなわち胎児期から出生後しばらくはGCT細胞は顎下腺に確認されないが、甲状腺ホルモンが血中に分泌され始めるとGCT細胞の分化増殖が顎下腺において観察されるようになる。雄マウスにおいては、第二次性成長に伴い精巣から男性ホルモンが分泌され、顎下腺GCT細胞の増殖が再び活発になる。これに伴いこの細胞で生合成される蛋白質であるEGF、NGF及びプロテアーゼの顎下腺での濃度が著しく上昇する。顎下腺の持つ性差の理由やEGF、NGF及びプロテアーゼなどが他の組織に比べ高濃度に含有されている理由はいまだ明らかではないが、この臓器は以上の理由からホルモン作用を研究するうえで非常に興味を持たれている。特に顎下腺に存在するプロテアーゼはホルモン投与によりその酵素活性が大きく変動することや、組織特異的でしかも多量に存在し、その定量法が簡単である点などを考慮するとホルモン作用を有する薬物のスクリーニングを行うための指標酵素として最適であると考えられた。我々は顎下腺プロテアーゼを指標酵素として、

ホルモン作用を有する薬物のスクリーニングを行い、八味地黄丸の構成生薬である地黄、附子が男性ホルモン様作用を有することを明らかとしてきた(10.11.12)。顎下腺GCT細胞に存在するプロテアーゼは α -アドレナリン刺激によって唾液中に分泌されるため、この唾液を採取しプロテアーゼ活性を測定することが可能である。そこで我々は、顎下腺プロテアーゼ活性に影響を及ぼす薬物を簡便にスクリーニングするため、従来行なわれてきた顎下腺プロテアーゼ活性を測定するといった方法にかわり、マウス唾液中に分泌されるプロテアーゼ活性を測定する方法を考案した。

[材料と方法]

1. 材料

マウスはC3H系の7から18週齢、ddY系の8週齢を三協ラボサービスより購入した。フェニレフリン、イソプロテレノール、ピロカルピン及び電気泳動用試薬は、和光純薬より購入した。その他プロテアーゼ活性測定用基質はシグマ社より、テストステロンプロピオネートは帝国臓器製薬より購入した。

2. マウス唾液採取法

フェニレフリン $10\mu\text{g}/30\text{g}$ body weightを尾静脈注射し、1から3分後に口腔内に分泌される唾液を、 $1\times 5\text{mm}$ の大きさのセルロースアセテート膜に吸収させることにより採取した。

3. マウス唾液プロテアーゼ活性測定法

プロテアーゼ活性測定法はAiping, H.らの方法を応用した(12)。唾液を吸収させたセルロースアセテート膜細片を、膜に付着した蛋白質を溶出させるため 1.2ml のイオン交換水に浸し1時間氷上に放置した。この溶出液より適量を採取しイオン交換水を加え全量を 0.25ml とした。 37°C 、10分間のプレインキュベーション後、リン酸緩衝液に溶解した 10mM N- α -benzoyl-DL-arginine-p-nitroanilide 基質溶液 0.5ml をこれに

加え37℃にて1時間インキュベーションし酵素反応を行わせた。20%過塩素酸水溶液0.25mlを加え酵素反応を停止させた。0.2%亜硝酸ナトリウム溶液1mlを加え氷上で10分間放置し酵素反応の結果生じたp-ニトロアニリンをジアゾ化した。過剰な亜硝酸ナトリウムを分解させるために、0.5%スルファミン酸アンモニウム溶液1mlを加え攪はんし室温にて5分間放置した。0.05%ナフチルエチレンジアミン溶液2mlを加えることによりジアゾカップリング反応を行わせ、得られた紫紅色の吸光度を546nmにて測定した。マウス顎下腺プロテアーゼ活性測定法は唾液プロテアーゼ活性測定法に順じておこなった。すなわちマウスから顎下腺をすばやく摘出し、イオン交換水を10%w/vとなるように加えポッター型ガラスホモジナイザーで摩砕し、10000xg、4℃にて30分間遠心した。得られた上澄を組織抽出液として酵素活性測定に用いた。唾液、顎下腺試料の蛋白質定量法は、Lowry法に従って行った(13)。

4. 電気泳動用試料

(1) 唾液プロテアーゼ試料

マウス尾静脈へのフェニレフリン10 μ g/30g body weight投与後1から3分後に分泌される唾液を、セルロースアセテート膜細片に吸収させることにより採取した。これをイオン交換水10 μ lに浸し1時間氷上に放置することでセルロースアセテート膜細片に付着した蛋白質を溶出させ、この溶出液を電気泳動用試料として用いた。

(2) 顎下腺試料

マウスから顎下腺を摘出し10%w/vとなるようにイオン交換水を加えポッター型ガラスホモジナイザーにて摩砕、10000xg、4℃で30分間遠心し得られた上澄を組織抽出液とし、これを電気泳動用試料として用いた。

5. 電気泳動法

(1) 等電点電気泳動法

等電点電気泳動用ゲルとして、60x80x1mm、pHレンジ3.5~9.5のポリアクリルアミ

ドゲル薄層を作成した。陽極液として20mM H_3PO_4 水溶液を、陰極液として40mM NaOH水溶液を用いた。4°C、400V定電圧で1.5時間のプレラン後試料を添加し400V定電圧にて5時間泳動を行った。

(2)垂直式微量電気泳動法

荻田らにより考案されたポリアクリルアミドゲルを支持体とする垂直式微量電気泳動法に従って行った(18)。分離用ゲル緩衝液として188mM トリス塩酸緩衝液(pH8.3)、濃縮用ゲル緩衝液として30mM トリス塩酸緩衝液(pH6.8)を用いた。分離用ゲル濃度は8%、濃縮用ゲル濃度は4%とした。ゲル幅1cmあたり1mAの電流が流れるように調整し、定電流4°Cにて2時間泳動を行った。

(3)二次元電気泳動法

二次元電気泳動法は柴田らの方法に従って行った(19)。等電点電気泳動法により一次元目の泳動分離を行った。泳動終了後、泳動分離された蛋白成分の存在するゲル薄層部分を泳動方向に沿って5mm幅で切り出した。二次元目の泳動は垂直式微量電気泳動法に従って行なった。すなわち、8%ポリアクリルアミド分離用ゲル薄層及び試料孔のない4%ポリアクリルアミド濃縮用ゲルを作成した。切り出した一次元目のゲル薄層を濃縮用ゲル上にのせ、30.25mM トリス塩酸緩衝液(pH6.8)に溶解した1%シーブラークアガロース溶液で二次元目のゲルに固定し2時間泳動を行った。

6. プロテアーゼ活性検出法

(1)p-ニトロアニリン誘導体を基質としたプロテアーゼ活性検出法

p-ニトロアニリン誘導体のN- α -benzoyl-DL-arginine-p-nitroanilide(BAPNA)10mgを0.5mlのジメチルスルフォキシドに溶解し、50mMリン酸緩衝液(pH7.6)2mlを加えたものを基質溶液として用いた。基質溶液に数分間浸透させたセルロースアセテート膜を電気泳動終了後のゲル薄層に密着させセルロースアセテート膜上に基質の分解物であるp-ニトロアニリンの黄色のスポットが検出されるまで、37°Cで酵素反応を行な

わせた。セルロースアセテート膜をゲル薄層からはがし、5%過塩素酸水溶液10mlに浸した後0.2%亜硝酸ナトリウム水溶液10mlを加え氷上で3分間放置した。過剰の亜硝酸ナトリウムを分解するために0.5%スルファミン酸アンモニウム水溶液10mlを加え室温で1分間振とうの後、0.05%N-1-ナフチルエチレンジアミン溶液20mlを加えジアゾカップリング反応を行わせることにより酵素活性を赤紫色の泳動帯として検出した。

[結果]

マウス顎下腺プロテアーゼは、顎下腺のGCT細胞分泌顆粒中に存在し唾液中に分泌されることが知られている(9)。この分泌顆粒中のプロテアーゼがどのような刺激により唾液中に分泌されるかを検討するため、交感、副交感神経作動薬をマウスに投与し、分泌されるプロテアーゼ活性を、ポリアクリルアミドゲル電気泳動法を用いて解析した。基質にプロタミン及びN- α -benzoyl-DL-arginine-p-nitroanilide(BAPNA)を用いたところ、 β -アドレナリン作動薬のイソプロテレノール、副交感神経作動薬のピロカルピン刺激では、最も易動度の速いプロテアーゼ活性が検出されたのみであったが、 α -アドレナリン作動薬であるフェニレフリン投与により多量のプロテアーゼが唾液中に分泌されることが明らかとなった[Fig.1A]。この唾液プロテアーゼ活性のサイモグラムは顎下腺プロテアーゼ活性のサイモグラムと非常に類似していたため、唾液プロテアーゼは顎下腺由来であることが示唆された。唾液プロテアーゼが顎下腺由来であることを確認するため、これらプロテアーゼのポリアクリルアミドゲル二次元電気泳動法的解析を行った。その結果顎下腺で検出されたプロテアーゼ活性の総てが唾液中に検出されることが明らかとなった[Fig.1B]。耳下腺、舌下腺ではプロテアーゼ活性は検出されなかった。また唾液特異的なプロテアーゼ活性も検出されたが、これは唾液線以外の他の臓器由来であるか、もしくは顎下腺プロテアーゼの自己分解により生じたものと考えられた。

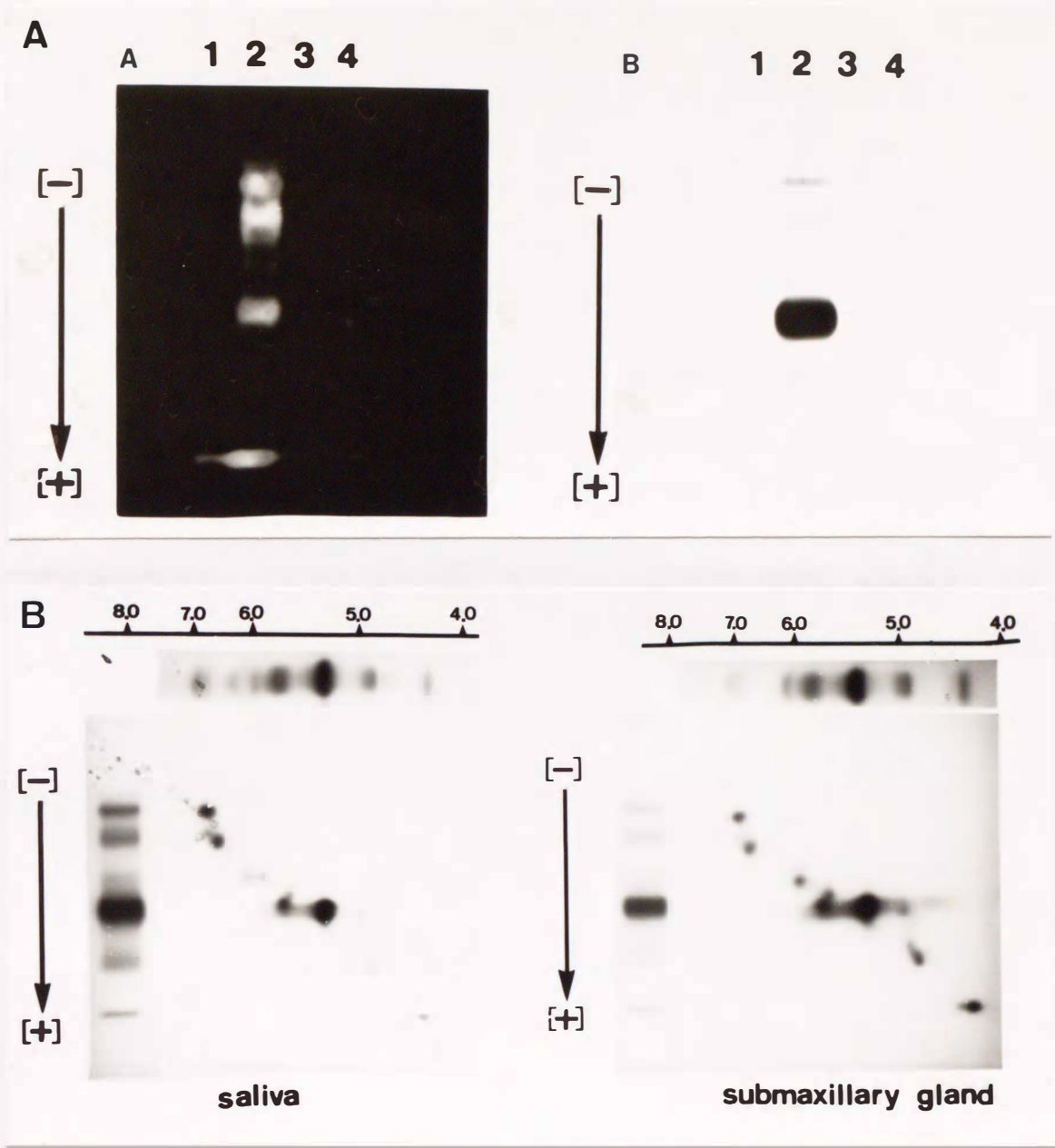


Fig. 1 Polyacrylamide gel electrophoretic analysis of saliva proteases.

A: Sympathometric agents and a parasympathometric agent were injected into the caudal veins of male mice (strain, C3H, 7 weeks old). After one minute of the injection, secreted saliva was absorbed by small pieces of cellulose acetate membrane. Each of 40 μ g protein was applied. protamin(A) or BAPNA(B) was used as a substrate. Lane 1: mouse injected with saline. Lane 2: mouse injected with 10 μ g of phenylephrine hydrochloride. Lane 3: mouse injected with 10 μ g pilocarpine hydrochloride. Lane 4: mouse injected with isoproterenol hydrochloride.

B: Ten micrograms of phenylephrine hydrochloride were injected into the caudal vein of male mouse (C3H, 7 weeks old). After one minute of the injection, secreted saliva was absorbed by the cellulose acetate membrane. Immediately, the submaxillary gland was excised from the mouse and the tissue extract was used as electrophoretic sample. Each of 40 μ g protein was applied. BAPNA was used as a substrate.

フェニレフリン刺激により分泌される唾液の量は非常に微量なため、これを定量的に採取することは困難である。そこで唾液を何等かの支持体に吸収させる方法を用いた。支持体としての強度、唾液の保持量、蛋白質吸着の有無を考慮した結果、セルロースアセテート膜が最適であることが明らかとなった。そこでセルロースアセテート膜を用いたマウス唾液採集法の精度を確認するため、セルロースアセテート膜細片(10×5mm)をモデルとし、セルロースアセテート膜の顎下腺組織抽出液吸収量とプロテアーゼ活性との関係を調べた。セルロースアセテート膜に1から5μlの10%顎下腺組織抽出液を浸透させた後、1.2mlのイオン交換水中にて1時間放置し膜に付着した蛋白質を溶出させた。それぞれの溶出液のプロテアーゼ比活性を測定した結果をTable 1に示した。この結果セルロースアセテート膜細片に吸収された組織抽出液の量にかかわらず一定の比活性値が得られ、この測定値は顎下腺組織抽出液のプロテアーゼ比活性とほぼ類似した値であった。この測定法の信頼性を確認するためintraassay及びinterassayを行った[Table 2]。フェニレフリン刺激によりマウス口腔内に分泌された

Table 1. The activity-volume relation using small piece of cellulose acetate membrane (10×5mm) was used as absorbent of submaxillary gland extract.

Sample	Volume (μl)	Mean (unit/mg protein)	SD	CV (%)
1	1	264	65	25
2	2	280	26	9
3	3	233	14	6
4	5	281	29	10
5	—	266	—	—

Statistics were calculated for each of five samples from the result of 6 pairs of tubes in a single assay. Samples 1-4 were specific activity of male submaxillary gland trypsin-like protease using small pieces of cellulose acetate membrane as absorbent of the tissue extract. Sample 5 was specific activity of male submaxillary gland trypsin-like protease obtained by large scale assay.

Table 2. The reliability of the spectrophotometric assay using small pieces of cellulose acetate membrane (5×1 mm) as absorbent of saliva.

A) Intraassay: Statistics were calculated for each of four samples from the result of five pairs of tubes in a single assay.

Sample	Mean (unit/mg protein)	SD	CV (%)
1	1236	80	7
2	1200	108	9
3	164	92	56
4	120	60	50

B) Interassay: Statistics were calculated for each of four samples from the results of pairs of tubes in eight different assays.

Sample	Mean (unit/mg protein)	SD	CV (%)
1	1108	136	12
2	1292	172	13
3	67	20	30
4	86	22	25

Samples 1 and 2 were male, samples 3 and 4 were female

唾液をセルロースアセテート膜細片(1x5mm)5枚を用いて採取し、それぞれのプロテアーゼ活性を測定することにより各セルロースアセテート膜ごとの測定値のばらつきを計算した。その結果雄マウスでは標準偏差が測定平均値の約8%、雌マウスでは50%であった(intraassay)。また1週間ごとのフェニレフリン投与により得られた唾液のプロテアーゼ活性を測定し、各週毎の測定値のばらつきを計算したところ、雄では標準偏差が測定平均値の約13%、雌では28%であった。唾液プロテアーゼを指標酵素として利用するためには、顎下腺に含有されるプロテアーゼ比活性値を唾液プロテアーゼ比活性値が反映していなければならない。そこでマウス顎下腺及び唾液プロテアーゼ比活性値の相関性を検討した〔Fig.2〕。雄マウス54匹、去勢1週間後の雄マウス6匹、去勢2週間後の雄マウス8匹、去勢3週間後の雄マウス5匹、計73匹の唾液プロテアーゼ比活性をX軸に、顎下腺プロテアーゼ比活性をY軸にとると両者の相関関係は $Y=0.256X+2.2$ $r=0.8268$ $P<0.001$ となった。また雄マウスのみでも $Y=0.175X+83.7$ $r=0.5564$ $P<0.001$ と、高い相関係数が得られた。よって唾液プロテアーゼ活性値が、マウス顎下腺のプロテアーゼ活性値を反映していることが明らかとなった。

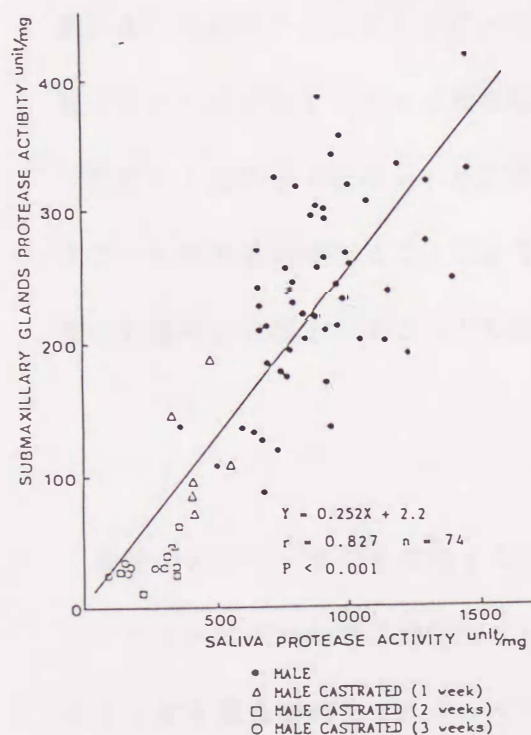


Fig. 2 Correlation between salivary protease activity and submaxillary gland protease activity.

Ten micrograms of phenylephrine were injected into caudal vein of mice. One minute after the injection, secreted saliva was absorbed by 4 pieces of cellulose acetate membrane (5x1mm) and the salivary protease activity was assayed. The next day, the submaxillary gland was removed from the mouse and the submaxillary gland protease activity was assayed.

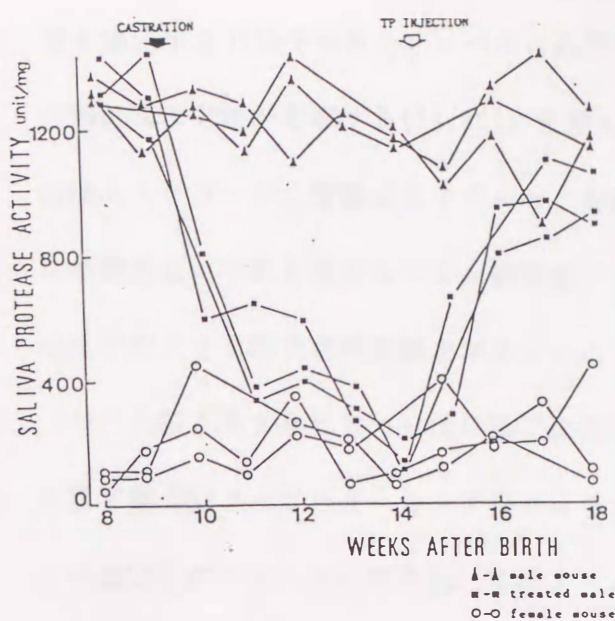


Fig. 3 Time-course observation of the salivary protease activity. 8 weeks old male and female mice were given weekly injections of phenylephrine hydrochloride (10 μ g/30g body weight), and the salivary protease activity was assayed. Mice were castrated at age of 10 weeks old. Testosterone (0.6mg/30g body weight, 3 times injection /week) was injected into the 14 weeks old mice castrated after 4 weeks.

マウス唾液を指標酵素としてマウスの男性ホルモンに対する影響を経時的に測定した〔Fig. 3〕。8週齢から1週間ごとに18週齢に至るまで、各週毎にマウス唾液を採取しプロテアーゼ活性を測定した。雄マウスではその活性は1000から1400 unit/mg protein付近の値を示し、去勢によりその活性は1週間で雄のレベルの約50%程度に減少、去勢4週間後でその活性は雌の活性と同程度にまで減少するなど、顎下腺において観察されたプロテアーゼ活性と類似した変動を示した。去勢後4週間目の雄マウスへのテストステロン投与により、その活性は2週間で雄の50%のレベルにまで回復し4週間目で雄のレベルの70%程度まで上昇した。このようにマウス唾液プロテアーゼ活性を測定することにより、ホルモン投与による顎下腺プロテアーゼ活性の変化を経時的に測定することが可能となった。

〔考察〕

薬物のホルモン作用を検定する方法は多数報告されている。1959年BersonとYalowによりインスリンの微量測定法として開発されたラジオイムノアッセイ法は、感度もよくしかも直接目的とするホルモンのレベルを測定することが可能であるため現在最

も広く用いられている方法である。他の簡便な方法として、ホルモンの標的臓器の重量を測定する方法やホルモンレベルに応答を示すような酵素を指標として用いるなどの間接的な方法が存在する(14,15)。性差を示す蛋白質は顎下腺プロテアーゼ以外に、血漿エステラーゼ、腎臓エステラーゼ、肝臓P450の数種類などが知られている。これらの酵素はいずれも男性ホルモン依存性であるが、これらの酵素は顎下腺プロテアーゼほどに大きな酵素活性変動を示さないことが報告されている(16)。

マウス顎下腺プロテアーゼはGCT細胞において生合成されている。1982年雄マウス顎下腺cDNAライブラリーからグラニューラカリクレインファミリーに属するプロテアーゼ遺伝子がクローニングされ、そのアミノ酸配列の一次構造が明らかとなった(17)。その結果顎下腺プロテアーゼはシグナルペプチドシーケンスを有する分泌型プロテアーゼであり、このためGCT細胞の分泌顆粒へと移行することが明らかとなった。この細胞の分泌顆粒は α -アドレナリン刺激により細胞外へ脱顆粒される(8)。このためGCT細胞で生合成されたプロテアーゼやEGF、NGFが α -アドレナリン刺激により唾液中に検出されるのである。分泌されたこれら蛋白質の唾液中での生理的役割は現在不明である。唾液中へ分泌されたプロテアーゼ活性を測定する方法を用いて薬物のスクリーニングを行う場合、フェニレフリンの連続投与による影響が問題となる。イソプロテレノール連続投与によるマウス顎下腺肥大の報告例はあるが(9)、フェニレフリン連続投与によるマウス顎下腺への影響の報告は今のところ知られていない。また我々が行ったフェニレフリン1週間おき11回の連続投与実験においても、マウス顎下腺のアミラーゼ、エステラーゼ、プロテアーゼ及びLDHアイソザイムの変化は認められなかった。本法は実験動物であるマウスを殺すことなくマウス顎下腺に影響を及ぼす薬物のスクリーニングを行うことができる。このためホルモン作用を有すると考えられる薬物の簡便なスクリーニングや、薬物に対し応答性を示すようなマウスの選択育成などに利用することが可能である。

[参考文献]

1. Aloe, L. and Levi-montalcini, R., Comparative studies on testosterone and L-thyroxine effects on the synthesis of nerve growth factor in mouse submaxillary gland. *Cell. Res.* 1980, 125, 15-32.
2. Wilson, C.W. Myhre, M.J. Reynolds, R.C. and Wilson, J.D., Regulation of mouse submaxillary gland renin by thyroxine. *Endocrinology* 1982, 110, 982-989.
3. Takuma, T. and Kumegawa, M., Regulation of esteroprotease synthesis by 5α -dihydrotestosterone and triiodothyronine in mouse submaxillary gland. *J. Biochem.* 1981, 90, 1371-1375.
4. Bhoola, K.D. Dorey, G. Jones, C.W., The influence of androgen on enzymes and cellular structure of the mouse submaxillary gland. *J. Physiol.* 1973, 235(2), 503-522.
5. Hosoi, K. Kida, T. and Uehara, T., Induction of various androgen-dependent esteroproteases by tri-iodo-L-thyronine in the mouse submandibular glands of female mice and mice with TFM. *J. Biochem.* 1981, 89, 1793-1798.
6. Takuma, T. and Kumegawa, M., Basic isozymes of chymotrypsin-like esteroprotease from mouse submandibular gland. *Biochem. Biophys. Acta.* 1979, 546, 335-341.
7. Angeletti, R.A. Angeletti, P.U. and Calissano, P., Testosterone induction of estero-proteolytic activity in the mouse submaxillary gland. *Biochem. Biophys. Acta.* 1967, 139, 372-381.
8. Murphy, R.A. and Watson, A.Y., The mouse submandibular gland. *J. Histochem. Cytochem.* 1980, 28, 890-902.
9. Barka, T., Biologically active polypeptides in submandibular gland. *J. Histochem. Cytochem.* 1980, 28, 836-859.
10. Taie, H. and Z. Ogita, A significant effect of Hatimi-zio-gan on arginine aminopeptidase in mouse submaxillary gland. *和漢薬学会誌* 1985, 2, 411-417.
11. Taie, H. and Z. Ogita, Responsiveness of submaxillary gland arginine aminopeptidase to Aconiti Tuber exert. *和漢薬学会誌* 1986, 3, 177-183.
12. Aiping Hung and Z. Ogita, Androgen-dependent effect of Rehmanniae Radix on trypsin-like protease of the mouse submaxillary gland. *和漢薬学会誌* 1988, 5, 191-199.
13. Lowry, O.H., Roserbrough, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.J., Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 1951, 193, 265-275.

14. Nakayama, K. Masuoka, M. Masaki, T. and Shimamoto, K., Anti androgen TSAA-291. *Acta. Endocrinol.* 1979, 92(sup229), 2-23.
15. Nakayama, R. Masuoka, M. Hiraga, K. and Miki, T., Anti androgen TSAA-291. *Acta. Endocrinol.* 1979, 92(sup229), 100-107.
16. Aiping Hung and Z. Ogita, Sexual difference in enzyme activities in the mouse. *Physico-Chem. Biol.* 1989, 33, 47-53.
17. Richards, R. I. et. al. *J. Biol. Chem.*, 1982, 257, 2758-2769.
18. Z. Ogita., and Markert, C. L. A miniaturized system for electrophoresis on polyacrylamide gels.
19. Masaharu, I. and Z. Ogita., Electrophoretic analysis of pancreatic proteases and zymogen-activating factors in the mouse.

第II章

マウス顎下腺プロテアーゼの基質特異性に基づく分類

(緒論)

マウス顎下腺にはEGF、NGFなどの成長因子や、塩基性アミノ酸に対し特異性を示すプロテアーゼが多種多量に存在することが知られている。これらプロテアーゼのうち現在までに、EGF-binding protein、 α -、 γ -NGFなどの成長因子に結合した形で顎下腺に存在する酵素が分離精製されその性質が明らかにされてきた(1.2)。しかし多くのプロテアーゼについての基質特異性をはじめとする諸性質は明らかとされていなものが多い。顎下腺プロテアーゼはアルギニンのアミドやエステル合成基質に対して特異性を有することから、これらプロテアーゼはアルギニンエステロプロテアーゼ、トリプシン様プロテアーゼなどと呼ばれてきた(1.3.4.5.6.7)。1983年から1987年にかけて顎下腺プロテアーゼの遺伝子が次々とクローニングされた(8.9.10.11.12)。その結果これらプロテアーゼのアミノ酸配列は既に他の動物においてクローニングされていたカリクレインと高い相同性を有することが明らかとされ、よって顎下腺において発現している一連のプロテアーゼは以後グラニューラカリクレインファミリーと呼ばれるようになった。

マウス顎下腺において検出されるプロテアーゼ活性の多様性は、それぞれが独立した遺伝子によってコードされた蛋白質であるのか、それとも幾つかの遺伝子にコードされた蛋白質がポストトランスクリプションナルモディフィケーションを受けることにより多様性を獲得したのか興味を持たれた。これらグラニューラカリクレインファミリーの総合的な解析を行うには、電気泳動法は簡便で優れた手段である。そこで我々は、ポリアクリルアミドゲル二次元電気泳動法とセルロースアセテート膜を基質保持体とする基質特異的プロテアーゼ活性検出法を組み合わせることで、顎下腺プロテアーゼ

の基質特異性を決定した。この方法は、基質を浸透させたセルロースアセテート膜を電気泳動終了後のゲル薄層の表面に密着させることにより、ポリアクリルアミドゲル電気泳動法で泳動分離された酵素分子をセルロースアセテート膜上に活性泳動帯として移し取る方法である(13)。また異なった基質を含ませたセルロースアセテート膜をゲルの表と裏の両面に密着させることにより、一枚のゲルから2枚以上のザイモグラムが得られ、これらのザイモグラムを比較することでどちらか一方もしくは両方の基質に対して特異性を持つ活性泳動帯の識別が容易にできるなど、基質特異性の決定に有効な方法である。我々はこの方法を用いることで、顎下腺に存在するプロテアーゼの個々の基質特異性を始めとする生化学的性質を明らかにした(14)。

[材料と方法]

1. 顎下腺試料調製法

C3H系7週齢のマウス顎下腺をすばやく摘出し10%w/vとなるようにイオン交換水を加えポッター型ホモジナイザーを用いて摩砕した。10000xg、4℃、30分の遠心により得られた上澄を電気泳動用試料として用いた。

2. 電気泳動法

(1) 等電点電気泳動法

等電点電気泳動用ゲルとして、60x80x1mm、pHレンジ3.5~9.5のポリアクリルアミドゲル薄層を作成した。陽極液として20mM H_3PO_4 水溶液を、陰極液として40mM NaOH水溶液を用いた。4℃、400V定電圧で1.5時間のプレラン後試料を添加し400V定電圧にて5時間泳動を行った。

(2) 垂直式微量電気泳動法

荻田らにより考案されたポリアクリルアミドゲルを支持体とする垂直式微量電気泳

動法に従って行った(15)。分離用ゲル緩衝液として188mMトリス塩酸緩衝液(pH8.3)、濃縮用ゲル緩衝液として30mMトリス塩酸緩衝液(pH6.8)を用いた。分離用ゲル濃度は8%、濃縮用ゲル濃度は4%とした。ゲル幅1cmあたり1mAの電流が流れるように調整し、定電流4℃にて2時間泳動を行った。

(3)二次元電気泳動法

二次元電気泳動法は柴田らの方法に従って行った(16)。等電点電気泳動法により一次元目の泳動分離を行った。泳動終了後、泳動分離された蛋白成分の存在するゲル薄層部分を泳動方向に沿って5mm幅で切り出した。二次元目の泳動は垂直式微量電気泳動法に従って行なった。すなわち、8%ポリアクリルアミド分離用ゲル薄層及び試料孔のない4%ポリアクリルアミド濃縮用ゲルを作成した。切り出した一次元目のゲル薄層を濃縮用ゲル上へのせ、30.25mMトリス塩酸緩衝液(pH6.8)に溶解した1%シーブラークアガロース溶液で二次元目のゲルに固定し2時間泳動を行った。

3. プロテアーゼ活性検出法

(1)p-ニトロアニリン誘導体を基質としたプロテアーゼ活性検出法

p-ニトロアニリン誘導体のN- α -benzoyl-DL-arginine-p-nitroanilide(BAPNA)10mgを0.5mlのジメチルスルフォキシドに溶解し、50mMリン酸緩衝液(pH7.6)2mlを加えたものを基質溶液として用いた。基質溶液に数分間浸透させたセルロースアセテート膜を電気泳動終了後のゲル薄層に密着させセルロースアセテート膜上に基質の分解物であるp-ニトロアニリンの黄色のスポットが検出されるまで、37℃で酵素反応を行なわせた。セルロースアセテート膜をゲル薄層からはがし、5%過塩素酸水溶液10mlに浸した後0.2%亜硝酸ナトリウム水溶液10mlを加え氷上で3分間放置する。過剰の亜硝酸ナトリウムを分解するために0.5%スルファミン酸アンモニウム水溶液10mlを加え室温で1分間振とうの後、0.05%N-1-ナフチルエチレンジアミン溶液20mlを加えジアゾカップリング反応を行わせることにより酵素活性を赤紫色の泳動帯として検出した。

(2) 高分子基質を用いたプロテアーゼ活性検出法

磯部らの非特異的プロテアーゼ活性検出法に従って行った(17)。基質溶液として1%ポリアミノ酸もしくは1%プロタミン溶液を用いた。酵素反応はセルロースアセテート膜に基質溶液を浸透させた後これをゲル薄層に密着させ、30から60分間湿式箱中で37℃で保温した。染色はセルロースアセテート膜をゲル薄層からはがし、これを0.1% Coomassie Brilliant Blue R、40%メタノール、12.5%トリクロロ酢酸よりなる蛋白染色溶液に20分浸透させた。10%酢酸溶液による脱色によりプロテアーゼ活性は青の背景に白くぬけた泳動帯として検出された。

3) エステロプロテアーゼ活性検出法

Nustad, K.らのエステロプロテアーゼ活性比色定量法を応用した(18)。10mM benzoyl-arginine-ethylester、100unit/mlのアルコールデヒドロゲナーゼ、10mM NADを含む154mMピロリン酸-154mMセミカルバジド-40mMグリシン緩衝溶液(pH8.7)を基質溶液とした。基質溶液を浸透させたセルロースアセテート膜を電気泳動終了後のゲル薄層に密着させ、37℃にて数分間保温させた。プロテアーゼの酵素反応の結果、基質が分解して生じたエタノールをアルコールデヒドロゲナーゼの基質とし、生じたNADHの蛍光を紫外線ランプで検出、直ちに写真に取り記録した。

4. 基質特異性決定法

用いた基質に対する特異性の有無は、ポリアクリルアミドゲルを基質と4時間反応させた際、酵素活性が検出されなかった場合を基質特異性が認められないと判断した。

【結果】

顎下腺プロテアーゼのおおよその基質特異性を調べるため、種々の基質に対する特異性を一次元のポリアクリルアミドゲル電気泳動法により解析した[Table1]。この結果顎下腺プロテアーゼは塩基性アミノ酸の合成基質であるBAPNA、BAEEやアルギニン、

Table 1 Synthetic substrates used to examine substrate specificities of proteases in mouse submaxillary gland.

Hydrolyzed substrates		Not hydrolyzed substrates
BAPNA	++	L-histidine- <i>p</i> -naphthylamide
BAEE	+++	L-leucyl- <i>p</i> -naphthylamide
BLPNA	+	L-alanine- <i>p</i> -nitroanilide
Poly-L-arginine	+++	Poly-L-histidine
Protamine	+++	SAPNA
Histone	++	
Casein	(+)	
L-lysine- <i>p</i> -nitroanilide	(+)	
APAEE	+++	

+++ strong, ++ medium, + weak, (+) bands hardly visible.

Abbreviations: APAEE, acetyl-phenylalanyl-arginine-ethylester; BLPNA, N-benzoyl-DL-lysine-*p*-nitroanilide; SAPNA, succinyl-L-alanyl-L-alanyl-L-alanine-*p*-nitroanilide

リジンに富むヒストンやプロタミンをよく分解することが明らかとなった。顎下腺に多種類存在するプロテアーゼの各々の基質特異性を決定するため、二次元電気泳動法及びセルロースアセテート膜を基質保持体とするプロテアーゼ活性検出法を用いた解析を行った。ポリアルギニンを基質として用いたところ、雄ではpI 4 ~ 8 の領域に21種類のプロテアーゼ活性が検出された[Fig. 1A]。これらのプロテアーゼ活性はいずれも、BAEEなどのアルギニンのエチルエステル基質やアルギニンに富んだ蛋白質であるプロタミンやヒストンをよく分解した。しかし非特異的プロテアーゼの基質であるカゼインは、ほとんど分解されなかった。BAPNAを基質として用いるとFig. 1Aで検出されたプロテアーゼ活性のうちの1 ~ 11が検出された[Fig. 1B]。ポリリジンを基質として用いたところ 1 ~ 6及び12, 13のプロテアーゼ活性が検出された[Fig. 1C]。雌マウスプロテアーゼ活性は雄マウスに比べ低くプロテアーゼ1以外の活性はほとんど検出されなかった[Fig. 1D]。よってプロテアーゼ1は唯一男性ホルモン非依存性のプロテアーゼであることが明らかとなった。雄マウス去勢によりプロテアーゼ活性のザイモグラムは雌のザイモグラムに類似するようになり、去勢雄マウスへのテストステロン投与によりすべてのプロテアーゼ活性が雄型になった。以上の結果よりマウス

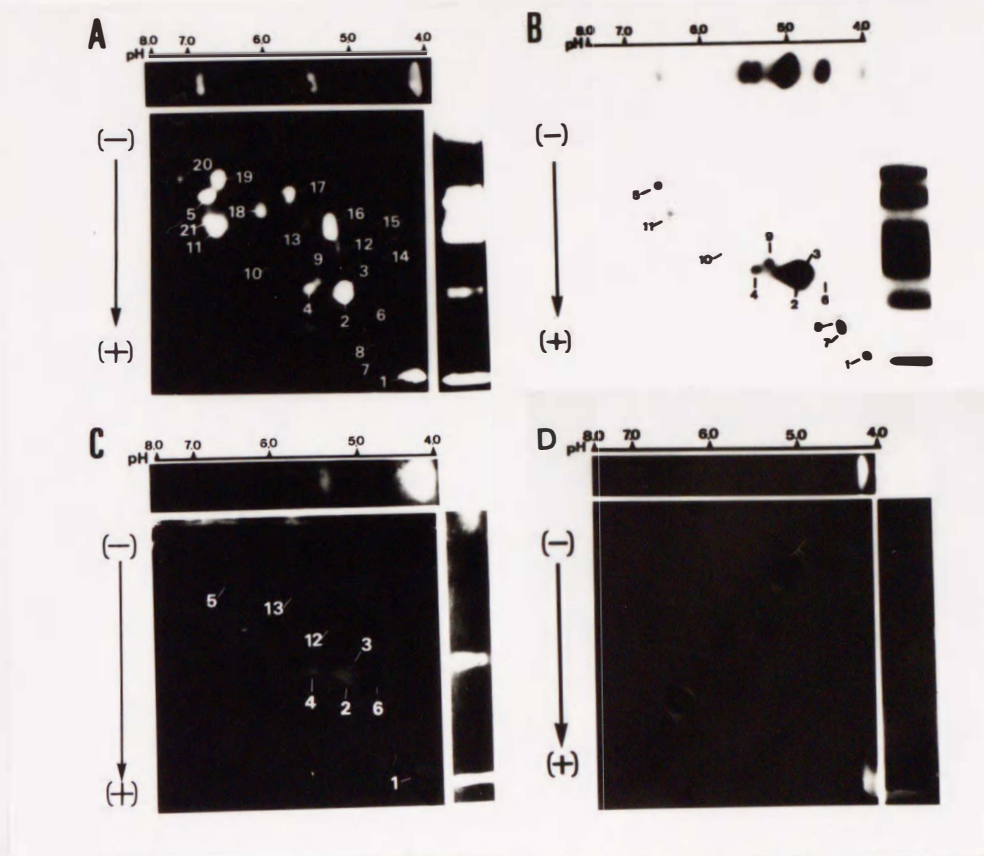


Fig. 1 Two-dimensional polyacrylamide gel electrophoretic patterns of protease activity in mouse submaxillary gland.

Submaxillary gland extract (3 μ l) of C3H/He mice was applied on two-dimensional polyacrylamide gel. Substrates used were A; poly-L-arginine, B; BAPNA, C; poly-L-lysine, and D; poly-L-arginine. A, B, and C were zymograms of male mouse protease activity, D was female mouse protease activity.

顎下腺プロテアーゼは基質特異性により4つのタイプに分類された[Fig. 2]。即ちポリアルギニン、ポリリジン、BAPNAを分解するTYPE-1。ポリアルギニン、BAPNAを分解するTYPE-2。ポリアルギニン、ポリリジンを分解するTYPE-3。ポリアルギニンのみを分解するTYPE-4である。

これらプロテアーゼのさらに詳しい解析を行うために、種々の阻害剤に対する影響を解析した[Fig. 3]。1%牛豚臓トリプシンインヒビターを含む1%プロタミンを基質溶液として浸透させたセルロースアセテート膜を、二次元電気泳動後のポリアクリルアミドゲル薄層に密着させプロテアーゼ活性を検出したところ、Fig. 1 Aで検出されたプロテアーゼ活性のうち1~4、6、8~10、12~15のプロテアーゼ活性が阻害

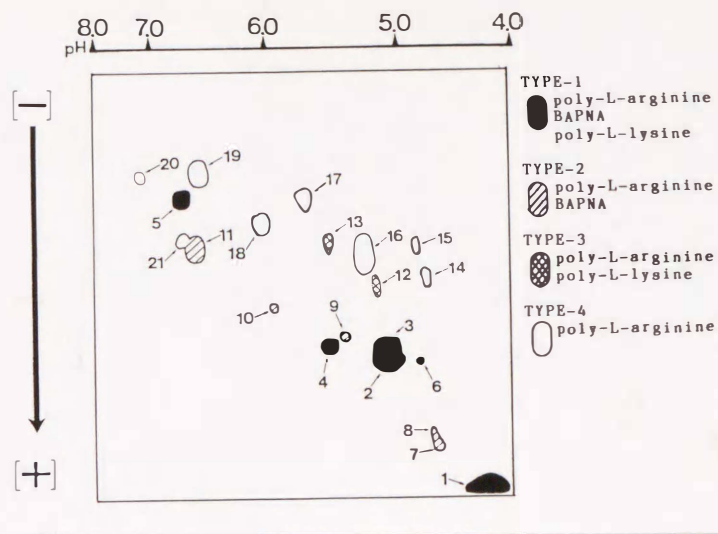


Fig. 2 Classification of proteases in mouse submaxillary gland by their substrate specificities.

Twenty-one proteolytically active enzymes shown in Fig. 1, were classified into four types by their substrate specificities. TYPE-1 proteases exhibited hydrolyzing activity with poly-L-arginine, BAPNA and poly-L-lysine; TYPE-2 with poly-L-arginine and BAPNA; TYPE-3 with poly-L-arginine and poly-L-lysine; and TYPE-4 with poly-L-arginine as substrate.

された[Fig. 3B]。また50mMの二価の亜鉛イオンを含むトリス塩酸緩衝液(pH7.6)に15分間浸したポリアクリルアミドゲル薄層に、1%プロタミン基質溶液を浸透させたセルロースアセテート膜を密着させプロテアーゼ活性を検出したところ、Fig. 1 Aで検出された21種類のプロテアーゼ活性すべてが強力に阻害された[Fig. 3 C]。これら亜鉛イオンにより阻害されたプロテアーゼ活性はEDTA処理によりその活性が回復した。ダイズトリプシンインヒビター、フェニルメチルスルフォニルフルオライド、N-トシル-L-リジン-クロロメチルケトンなどのプロテアーゼ阻害剤は、これら21種類のプロテアーゼ活性をまったく阻害しなかった。

[考察]

マウス顎下腺プロテアーゼ活性の測定には、アルギニンのエステルもしくはアミド合成基質類などを用いた比色定量法が行なわれてきた(1-7)。これらの基質は発色反応の最終反応生成物が水溶性であるためザイモグラム法の基質として用いられるこ

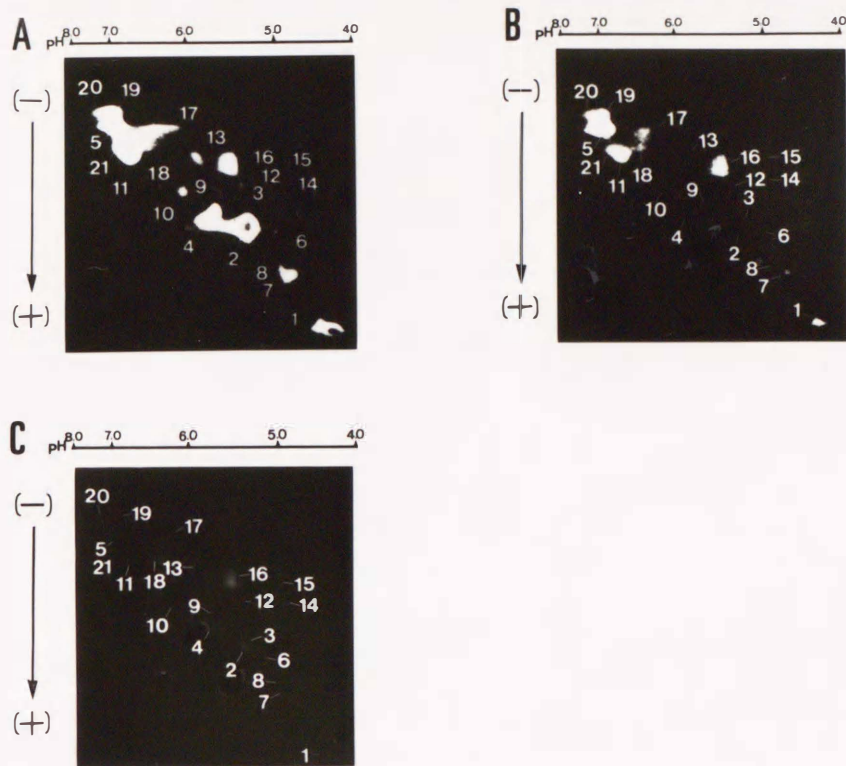


Fig. 3 Inhibition of mouse submaxillary gland protease activity with various agents.

A: Control. Twenty-one separate forms of protease activity were detected using protamine as substrate. B: Inhibition with BPTI. Cellulose acetate membrane was immersed in 1% of protamine solution containing 1% of BPTI. The cellulose acetate membrane was placed on the surface of two-dimensional polyacrylamide gel layer. C: Inhibition by zinc ion. After two-dimensional electrophoresis, the gel layer was immersed in 50mM zinc sulfate solution for 15 minutes. Substrate was protamine.

とが少なかった。ザイモグラム法の基質としては反応生成物が不溶性である基質、例えば benzoyl-arginine-naphtylamide や N-acetyl-L-methionine-naphtylester などが用いられてきた(19)。このため比色定量法によって得られた結果とザイモグラム法によって得られた結果とを直接比較することが困難であった。我々が開発したセルロースアセテート膜を基質保持体とする酵素活性検出法は、反応生成物が水溶性となる基質を使用する場合でも鮮明なザイモグラムを得ることが可能である。よってアルギニンのエチルエステル合成基質や p-ニトロアニリド合成基質を用いた比色定量法による結果と、これら基質を用いて得られたザイモグラム法による結果とを直接比較することが可能である。

Table 2 Characterization of proteases
in mouse submaxillary gland

Type	ESTP No.	Substrate specificities				Inhibition	
		Poly-L-arginine	BAPNA	Poly-L-lysine	BPTI	Zn ²⁺	Androgen- dependence
1	1	+++	+++	+++	+	+++	-
	2	+++	+++	+++	+++	+++	+
	3	+++	+++	+++	+++	+++	+
	4	++	++	++	+++	+++	+
	5	+++	++	+	-	+++	+
	6	+	+	+	+	+++	+
2	7	+	++	-	-	+++	+
	8	+	++	-	+++	+++	+
	9	++	++	-	++	+++	+
	10	+	+	-	+++	+++	+
	11	+++	++	-	-	+++	+
3	12	+	-	+	+	+++	+
	13	+	-	+	++	+++	+
4	14	+	-	-	+	+++	+
	15	+	-	-	+	+++	+
	16	+++	-	-	-	++	+
	17	+++	-	-	-	+++	+
	18	+++	-	-	-	+++	+
	19	+++	-	-	-	+++	+
	20	++	-	-	-	+++	+
	21	+++	-	-	-	+++	+

マウス顎下腺プロテアーゼは基質特異性により4つのタイプに分類され、これらのタイプは更に阻害剤に対する影響と男性ホルモン依存性によりいくつかのグループに分類された(Table 2)。TYPE-1に分類されるプロテアーゼはテストステロン依存性と阻害剤に対する影響により3つのグループに分けられた。即ちプロテアーゼ1はテストステロン非依存性である。プロテアーゼ2、3、4、6は牛豚膵トリプシンインヒビター感受性であり、プロテアーゼ5は非感受性である。TYPE-2に分類されるプロテアーゼのうち、プロテアーゼ8~10は牛豚膵トリプシンインヒビターに対して感受性であり、プロテアーゼ7、11は非感受性である。TYPE-3に分類されるプロテアーゼはすべて牛豚膵トリプシンインヒビターに対して感受性である。TYPE-4に分類されるプロテアーゼのうちプロテアーゼ14、15は牛豚膵トリプシンインヒビター感受性であった。

Richardsらによってクローニングされたグラニューラカリクレイン遺伝子群のうち現在10種類の遺伝子の発現が顎下腺において確認されており、このうちの6種類のグラ

	22	91	134	140	163	182	220
mGK-1 (unidentified)	K	DYS	S	FQY	H	DTCK	SWGYNPC
mGK-3 (γ -NGF)	T	YDY	S	FQF	H	DTCK	SWGHTPC
mGK-4 (α -NGF)	N	DDY	S	FKY	H	YTCE	SWGPEPC
mGK-6 (renal kallikrein)	T	DDY	S	YEY	H	DTCA	SWGPRPC
mGK-9 (EGF-BP Type-C)	N	YDY	S	FQN	H	DTCK	SYGFTPC
mGK-13 (EGF-BP Type-B)	Y	ADF	S	WQK	-	DTCK	SYGPVPC
mGK-22 (EGF-BP Type A)	D	ADL	S	WQN	H	DTCK	SWGSTPC
PNF-1 (Unidentified)	K	ADF	S	WQK	H	DTCA	STGPIPC
mGK-5 (Unidentified)	F	DDY	S				
mGK-16 (γ -renin)	K	ADF	S	WQK	H		

Fig. 4 Comparison of glandular kallikrein amino acid sequences of substrate-binding pocket. The asterisked residues are crucial to the formation of a serine protease catalytic site^(?). The aspartic acid residue (182) confers on a serine protease the ability to cleave at lysine or arginine basic residues^(?). Numbers refer to the position relative to the N-terminal isoleucine of mature protein encoded by mGK-1. Residues which are identical between at least six out of eight are boxed.

ニューラカリクレイン遺伝子mGK-22,16,9,3,4,15がそれぞれ、EGF-BPタイプA,B,C、 α -及び γ -NGF、 γ -レニンなどの蛋白質としてその機能が明らかにされている(1,2,9,10,11,12,22.)。現在までに報告されているこれら顎下腺プロテアーゼの電気泳動の易動度及び基質特異性の情報をもとに、二次元電気泳動法及び基質特異のプロテアーゼ活性検出法によって分類されたプロテアーゼ活性の帰属を行ったところ、プロテアーゼ1は男性ホルモン非依存性でありタイプ1に属する基質特異性を有することからHosoi, K.らによって単離されたプロテアーゼFであろうと推測された(21)。タイプ1に分類されるプロテアーゼ2,3,4,6はmGK-22,13,9によりコードされるEGF-BPタイプA,B,CもしくはmGK-5にコードされる γ -レニンであろうと推測された(1,2,22)。タイプ2に分類されるプロテアーゼ7,9及び11はmGK-3によってコードされる γ -NGFがポストトランスクリプショナルモディフィケーションにより3つのプロテアーゼ活性として検出されたものと推測された(1)。

遺伝子のクローニングにより明らかとなったマウスグラニューラカリクレインファミリーのアミノ酸配列の相同性は平均75%と、非常に高度に保存されているプロテアーゼである(10,11)。このようにアミノ酸配列が高度に保存されながら基質特異性

及び阻害剤に対する感受性が異なるのは、これらグラニューラカリクレインの基質結合領域のアミノ酸配列の差異によるものと推測された。そこでグラニューラカリクレインの基質結合領域と考えられるアミノ酸配列の比較を行った[Fig.4]。その結果セリンプロテアーゼに特異的に保存されているアミノ酸(91-アスパラギン酸、182-アスパラギン酸、220-セリン)の前後のアミノ酸配列に相同性の低下が認められた。よってこの領域のアミノ酸配列の差異が、マウス顎下腺プロテアーゼの合成基質に対する特異性の決定に深く関与しているものと測された。

亜鉛イオンによるプロテアーゼ活性の阻害作用[Fig. 3 C]は γ -NGFで報告されている(23)。顎下腺ではNGFは亜鉛イオンを介してグラニューラカリクレインである α -, γ -NGFと結合しており、この状態ではこれらグラニューラカリクレインのプロテアーゼ活性が阻害されている。このようなマウス顎下腺に存在するプロテアーゼは、 α -, γ -NGFやEGF-BPのように成長因子に結合するだけでなく、ホルモン投与や去勢によりEGFやNGFなどの成長因子とともに顎下腺における量が変動することが報告されている。グラニューラカリクレインの示すこれらの性質は、これらプロテアーゼがそれぞれ特異的な生理活性因子を基質とすることで生理活性因子の調節を行っているものと推測された。今後これらグラニューラカリクレインcDNAの培養細胞での発現実験を行うことで、いまだ機能の明らかとされていないグラニューラカリクレイン遺伝子の蛋白質としての性質を明らかにすることが可能であろう。

[参考文献]

1. Server, A.C. and Shooter, E.M. Comparison of the arginine esteroproteases associated with the nerve and epidermal growth factors. *J. Biol. Chem.* 1979, 251, 165-173.
2. Taylor, J.M., Mitchell, W.M. and Cohen, S. Characterization of the binding protein for epidermal growth factor. *J. Biol. Chem.* 1974, 249, 2188-2194.
3. Takuma, T. and Kumegawa, M., Regulation of esteroprotease synthesis by 5α -dihydrotestosterone and triiodothyronine in mouse submaxillary gland. *J. Biochem.* 1981, 90, 1371-1375.
4. Bhoola, K.D., Dorey, G., Jones, C.W., The influence of androgen on enzymes and cellular structure of the mouse submaxillary gland. *J. Physiol.* 1973, 235(2), 503-522.
5. Hosoi, K., Kida, T. and Uehara, T., Induction of various androgen-dependent esteroproteases by tri-iodo-L-thyronine in the mouse submandibular glands of female mice and mice with TFM. *J. Biochem.* 1981, 89, 1793-1798.
6. Takuma, T. and Kumegawa, M., Basic isozymes of chymotrypsin-like esteroprotease from mouse submandibular gland. *Biochem. Biophys. Acta.* 1979, 546, 335-341.
7. Angeletti, R.A., Angeletti, P.U. and Calissano, P., Testosterone induction of estero-proteolytic activity in the mouse submaxillary gland. *Biochem. Biophys. Acta.* 1967, 139, 372-381.
8. Mason, A.J., Evans, B.A., Cox, D.R., Shine, J. and Richards, R.I., Structure of mouse kallikrein gene family suggests a role in specific processing of biologically active peptides. *Nature* 1983, 303, 300-307.
9. Evans, B.A. and Richards, R.I., Genes for the α and γ subunits of mouse nerve growth factor are contiguous. *EMBO Journal* 1985, 4, 133-138.
10. Drinkwater, C.C., Evans, B.A. and Richards, R.I., Mouse glanular kallikrein genes identification and characterization of the genes encoding the epidermal growth factor binding protein. *Biochemistry.* 1987, 26, 6750-6756.
11. van Leeuwen, B.H., Evans, B.A., Tregear, G.W. and Richards, R.I. Mouse glanular kallikrein genes. *J. Biol. Chem.* 1986, 261, 5529-5535.
12. Evans, B.A., Drinkwater, C.C. and Richards, R.I. Mouse glanular kallikrein genes. *J. Biol. Chem.* 1987, 262, 8027-8034.
13. Nobuyuki, K. and Z. Ogita., Method for the detection of substrate specific

- protease activity by using cellulose acetate membrane as a absorbant of substrate. 1988.32.49-54.
14. Nobuyuki, K. and Z. Ogita., Classification of mouse submaxillary gland estero-
proteases by their substrate specificities. *Electrophoresis* 1989.10.194-198.
 15. Z. Ogita. and Markert, C.L. A miniaturized system for electrophoresis on
polyacrylamide gels. 1979.99.233-241.
 16. Futoshi, S. and Z. Ogita., Epigenetic modification of murine Cu,Zn-superoxide
dismutase. *Electrophoresis* 1986.7.426-428.
 17. Masaharu, I. and Z. Ogita., Electrophoretic analysis of proteases and zymogen-
activating factors in the mouse. *J. Experi. Zool.* 1984.230.347-354.
 18. Nustad, K. The relationship between kidney and urinary kininogenase.
Br. J. Pharmac. 1970.39.73-86.
 19. Arnold, W.H., Orstavik, T.B. and Holch, M., A methoxy-2-naphthylamide substrate
for the histochemical localization of esteroproteases in the submandibular
gland of the rat. *Histochemical Journal.* 1983.15.139-146.
 20. Otto, J. and von Deimling, O., Classification of multipul forms of
submandibular gland esteroproteases of the mouse.
Comp. Biochem. Physiol. 1980.65B.615-622.
 21. Hosoi, K., Tanaka, I. and Ueha, T., A new esteroproteinase (proteinase F) from
the submandibular gland of female mice. *Biochem. Biophys. Acta.* 1983.163-170.
 22. Poe, M. et. al. Purification and properties of renine and γ -renin from mouse
submaxillary gland. *J. Biol. Chem.* 1983.258.2209-2216.
 23. Pattison S.E. and Dunn, M.F. On the relationship of zinc ion to the structure
and function of the 7S nerve growth factor protein.
Biochemistry 1983.14.2733-2739

第III章

マウス顎下腺における遺伝子発現の解析

〔緒論〕

1985年グルココルチコイドレセプターのcDNAがクローニングされて以来、多くのステロイドホルモンレセプター遺伝子がクローニングされ、そのアミノ酸一次構造が明らかとなった(1)。これに伴いホルモンによる遺伝子発現機構の解明が分子レベルで行なわれるようになり、とくにホルモンによって誘導のかかる標的遺伝子のプロモーター領域とステロイドホルモンレセプターとの関連が注目されるようになった(2, 3)。この結果標的遺伝子のプロモーター領域に、ステロイドホルモンレセプターが直接結合する特異的な塩基配列であるホルモンレスポンスエレメント(HRE)が同定された(4, 5, 6, 7, 8)。またHREがプロモーター領域に存在してもそのホルモンレセプターが発現する細胞や組織が異なると、ホルモンによる発現誘導が起こらない遺伝子や、逆にHREがプロモーター領域に存在しなくてもホルモンにより遺伝子発現が誘導される例などが報告されるようになった。これらの事実からホルモンによる遺伝子発現にはHREの他に組織特異的な因子が関与している可能性が示唆されるようになった(9, 10)。また単一の遺伝子発現に複数のホルモンの働きが関与している、遺伝子発現のマルチホルモン調節系の例も近年報告されるようになった(11)。

マウス顎下腺ではEGF、NGF及びグラニューラカリクレインがGCT細胞で生合成されており、これら遺伝子の発現には少なくとも男性ホルモンや甲状腺ホルモンなど2種類以上のホルモンの働きが関与していることが報告されている(12, 13)。1984年から1987年にかけてグラニューラカリクレインゲノム遺伝子が310kbpにおよぶクロモソームウォーキングにより次々とクローニングされ、その結果偽遺伝子を含む24種類の遺伝子が染色体7番上に連座していることが明らかとなった(14)。このうち14種類が

構造遺伝子であり、現在10種類の遺伝子の発現がマウス顎下腺で確認されている(15)。興味深いことにこれらグラニューラカリクレイン遺伝子にはエクソン領域のみならずプロモーター領域も高度に保存されていながら、ホルモンにより異なる発現誘導を示す遺伝子が存在するなど、プロモーター領域の解析に好都合である(16)。またグラニューラカリクレイン同様、雄マウス顎下腺GCT細胞において多量に発現しているEGF及びNGF遺伝子もクローニングされ、それぞれがマウス染色体3番上の異なる位置にマップされた(12,13)。このように染色体上の全く独立した位置に存在する複数の遺伝子が、おそらく1種類の細胞で多量に発現しており、尚且つ複数のホルモンによりその発現が調節されることから、これら遺伝子発現の解析を行うことは組織特異的なホルモン作用を解析するうえで重要であると考えられた。我々は、マウス顎下腺において発現しているこれら遺伝子の解析を行った結果、組織特異的転写調節因子がホルモンによる遺伝子発現を調節していることを明らかとした。

〔材料と方法〕

1. 材料

DNA合成試薬は、バイオサーチ社より購入した。セシウムクロライド、ニックトランスレーション用試薬、制限酵素、リバーストランスクリプターゼはBRL社より購入した。T4DNAリガーゼはファルマシア社より購入した。グアニジウムイソチオシアネートはフルカ社より購入した。Taqポリメラーゼはプロメガ社より購入した。HB101コンピテント細胞はフナコシより購入した。dCTP (α - 32 P)はNEN社より購入した。その他電気泳動用試薬は和光より購入した。プラスミド分離用にはベックマン卓上超遠心機を用いた。

2. マウス組織からのRNA抽出法

マウス組織からのRNA抽出法はセシウムクロライド-グアニジウム法にもとずいて

行った。すなわちマウスより抽出した組織を0.83%メルカプトエタノール-4Mグアニジウムイソチオシアネート溶液(pH6.0)中でテフロン-ガラスホモジナイザーにて破碎し組織細胞蛋白質を変性溶解させた。この溶液を5.7Mセシウムクロライド溶液(pH6.0)に重層し、日立超遠心機スィングロータRPS-40Tにて32krpm、12時間遠心分離を行なうことで遠心チューブの底にRNAを沈澱させた。沈澱したRNAをDEPC処理滅菌水にて溶解し、フェノールクロロホルム抽出にて除蛋白を行い、エタノール沈澱にて再びRNAを沈澱させ、これにDEPC処理滅菌水を加えRNA最終濃度を5 μ g/ μ lに調整した。

3. ポリメラーゼチェーンリアクション法

1) 一本鎖cDNA(RT-sample)合成法

一本鎖cDNA(RT-sample)はMoloney murine leukemia virusリバーstransクリプターゼ(M-MLV-RV)により合成した。5xM-MLV-RVバッファー(250mM Tris-HCl pH8.3, 375mM KCl, 50mM di-thiothreitol, 15mM MgCl₂)2 μ l、oligo-dT(0.2 μ g/ μ l)0.5 μ l、dNTP(0.5mM each dATP, dTTP, dGTP, dCTP)2 μ l、RNAを1 μ g、50UのM-MLV-RVを加え全量を滅菌水にて50 μ lに調整し、37 $^{\circ}$ Cにて60分反応を行わせ一本鎖cDNAを合成させた。

2) PCR

PCR法はKoss, R. D.らの方法にもとずいて行った(17)。即ち10xTaq-DNA-polymeraseバッファー(100mM Tris-HCl, pH8.3, 15mM MgCl₂, 500mM KCl, 0.01% gelatin)5 μ lに、10mM MgCl₂を5 μ l、dNTP(1.25mM each dATP dTTP dGTP dCTP)を8 μ l、滅菌水28 μ l、1UのTaq-DNA-polymeraseを0.5 μ l、プライマー(50pM each)を2 μ l、以上の溶液に一本鎖cDNAを1 μ l加えPCR反応を行った。

3) プライマー合成

プライマーの合成はバイオサーチ社DNA合成装置モデル8750にて β -アミグイド法により合成した。合成したプライマーの精製は、アプライドバイオシステム社のオリゴDNA精製カラムを用いた。合成したプライマーを以下に示す。 β -アクチンプライマー。

5'-ATCGTGGGCCGCCCTAGGCA-3', 5'-TGGCCTTAGGGTTCAGAGGGG-3', mGK-4プライマー。
5'-CCTGGATCCTGTCACCAGTGGTTCCTGATCCTG-3', 5'-GTGAAGCTTAGGGGTTTTTGGCCATAGTGTCT
TT, mGK-22プライマー。5'-CTGAGCTCCTGGACACCTGTTACCACCATGAGGTTCTGCTG-3', 5'-
GTGAGCTCAGGGGTTTTTGGCCATAGTGTCTTTTA-3', mGK-6プライマー。5'-CTGAATGAGCACACC
CCACAA-3', 5'-TTGGTTACACGGCCCATAG-3', カリクレインプライマー。5'-GACCTGATGC
TGCTGCTCGGCCTC-3', 5'-ACCATCACAGATCAGTGGCCT-3', EGFプライマー。5'-AATAGTTATC
CAGGATGCCCATCCTCA-3', 5'-ACGCAGCTCCCACCATCGTAGGTCTCG-3', NGFプライマー。5'-T
CATCCACCCACCCAGTCTTC-3', 5'-TCAGCCTCTTCTGTAGCCTT-3'。

4) PCR反応条件

mGK-4、mGK-6及びmGK-22 mRNAの増幅。熱変性94°C1.5分、アニーリング64°C2分、酵
素反応72°C2分、以上のサイクルを顎下腺RTサンプルにおいて25回、他の臓器において
は40回増幅を行った。カリクレイン、EGF、NGF mRNAの増幅は、熱変性94°C1.5分、アニ
ーリング60°C2分、酵素反応72°C2分、以上のサイクルを顎下腺RTサンプルにおいては
25回、他の臓器においては40回増幅を行った。

5. ポリアクリルアミドゲル電気泳動

PCRサンプル(5 µl)に2 µlの5xサンプルロードバッファー(0.05% bromphenol blue,
0.05% Xylene cyanol FF, 30mM EDTA, 2% SDS, 30% sucrose)を加え電気泳動によ
りサイズフラクショネーションを行なった。泳動条件は1 mmの厚さのnondenaturing
6%ポリアクリルアミドゲル、0.5xTAEバッファー(0.045mM Tris-HCl, 0.045mM boric
acid, 1mM EDTA)にて10V/cm でおこなった。サイズマーカーには1KラダーDNAを用い
た。

6. 制限酵素によるPCRサンプルの解析

mGK-3、mGK-4、mGK-6及びmGK-22のPCRサンプルを制限酵素により切断し、切断され
たDNAの大きさを電気泳動法により確認した。mGK-3 PCRサンプル(804bp)5 µlに10xの

制限酵素バッファー(10mM Tris-HCl pH8.3, 10mM MgCl₂, 50mM NaCl)を1μl、5UのEcoRI及び滅菌精製水4μlを加え37℃にて60分酵素反応を行った。mGK-22PCRサンプル(804bp)5μlに10xの制限酵素バッファーを1μl、5UのHindIII及び滅菌精製水4μlを加え37℃にて60分酵素反応を行った。mGK-4及びmGK-6PCRサンプル(414bp)はSstIにより切断した。

7. PCRサンプルのベクターへのサブクローニング

mGK-4及びmGK-22PCRサンプル即ちα-NGF及びEGF-BPタイプAをコードするcDNAのベクターへのサブクローニングは以下の方法で行った。それぞれのPCRサンプルをバイオラッド Prep-A-geneを用いて精製し、これを各遺伝子のプライマー内に合成した制限酵素サイト(mGK-4 BamHI HindIII、mGK-22 SstI)にて切断し、これを再びPrep-A-geneにて精製、このうちの0.1μgをpBS SK(-)の0.4μg(BamHI-HindIII及びSstI切断)とライゲーションさせた。ライゲーション反応条件を以下に示す。0.1μgインサートDNA、0.4μgプラスミドDNA、10xライゲーションバッファー(0.5M Tris-HCl pH7.4, 0.1M MgCl₂, 0.1M dithiothreitol, 10mM spermidine, 10mM ATP)10μl、10U T4DNAリガーゼ、以上の溶液に滅菌精製水を加え全量を0.1mlに調整し、4℃にて12時間保温した。ライゲーション反応後エタノール沈澱によりDNAを沈澱させこれを滅菌精製水10μlに溶解した。ライゲーション反応後3μlのDNA溶液を熱ショック法(42℃、2分)にて大腸菌株HB101にトランスフォームさせた。アンピシリン選択培地上(50μg/ml)で増殖した大腸菌コロニーをプラスミッドミニプレップ法により解析し目的とする組み替え体を選択した。大腸菌からのプラスミドDNAの調整法はアルカリSDS法に従って行った。即ちLB10もしくはTB培地100ml中で12時間増殖させ大腸菌を3000rpmの遠心により沈澱させた。大腸菌ペレットに滅菌精製水4mlを加えけん濁し、これに0.5N水酸化ナトリウム-1%SDS溶液12mlを加え5分間放置し大腸菌を溶解させた。これに5M酢酸カリウム溶液(pH5.4)8mlを加え大腸菌ゲノムDNA及び蛋白質

を塩析させた。3000rpm遠心の後上澄を回収し、これに0.6倍量のイソプロピルアルコールを加え0℃15分間放置し、3000rpmの遠心によりプラスミドDNAを沈殿させた。プラスミドDNAの精製法はセシウムクロライド-エチジウムブロマイド密度勾配遠心法にしたがって行った。即ちエチジウムブロマイド(8mg/ml)-セシウムクロライド溶液(1.55g/ml, $n = 1.3860$)にDNAを溶解させ、ベックマン卓上超遠心機TL-100にてアングルローターTLA1002を用い100000rpmの遠心によりDNAを分離精製した。

8. ノーザンブロットハイブリダイゼーション法

各組織から抽出したRNA10 μ gに、RNAサンプルロードバッファー(0.75ml formamide, 0.15ml 10xMOPS, 0.24ml formaldehyde, 0.1ml glycerol, 0.1ml DEPC-H₂O, 0.08ml 10% bromophenol blue)15 μ lを加え65℃にて15分加温し、これに1 μ lのEtBr(1.0mg/ml)を加えたものを1%アガロースゲルにチャージした。ゲル組成は、1%アガロース, 1xMOPS, 1.85% formaldehydeである。電気泳動は1xMOPSを泳動バッファーとし、30V定電圧にて8時間行った。RNAのナイロン膜へのプロットティングは以下の方法で行った。電気泳動後のアガロースゲルを10xSSC(1.5M塩化ナトリウム, 0.15Mクエン酸ナトリウム)にて60分平衡化した後10xSSCにてナイロン膜へキャピラリープロットした。プロット後、RNAを0.05N水酸化ナトリウム処理によりナイロン膜へ結合させた。DNAプローブの調整はニックトランスレーション法により行った。ハイブリダイゼーションは以下の条件で行った。ハイブリダイゼーション溶液として、50xデンハート溶液(フェイコール1g, ポリビニルピロリドン1g, 牛血清アルブミン1g/100ml) 2ml, 20xSSC 4ml, 1%鮭精子DNA 0.1ml, 滅菌精製水 3ml, 5x10⁷cpm/0.1 μ g DNAプローブを作成し、これにナイロン膜を浸透させ37℃にて12時間ハイブリダイゼーションを行った。ナイロン膜の洗浄は2xSSC-0.1%SDS溶液中で65℃にて行った。リハイブリダイゼーションはナイロン膜を94℃の0.1%SDS溶液にて洗浄後行った。

〔結果〕

雄マウス顎下腺には雌に比べ多量のEGF、NGF及びグラニューラカリクレインファミリーが存在することが知られている(13)。顎下腺以外の臓器においても、これら遺伝子の発現量に性差が存在するかPCR法を用いて検討した[Fig. 1]。グラニューラカリクレインファミリーのうち α -NGFをコードする遺伝子mGK-4(18)、及びEGF-BPタイプAをコードする遺伝子mGK-22(19)の発現量を解析した。その結果これら遺伝子は顎下腺において特異的に発現しており、特に雄においてその発現量の多いことが明らかとなった。カリクレインファミリー間で保存されている領域のプライマーを用いてPCRを行なった結果、腎臓、膵臓においてもなんらかのカリクレイン遺伝子が発現していることが明らかとなった。しかし腎臓、膵臓でのカリクレイン遺伝子発現量に性差は確認されな

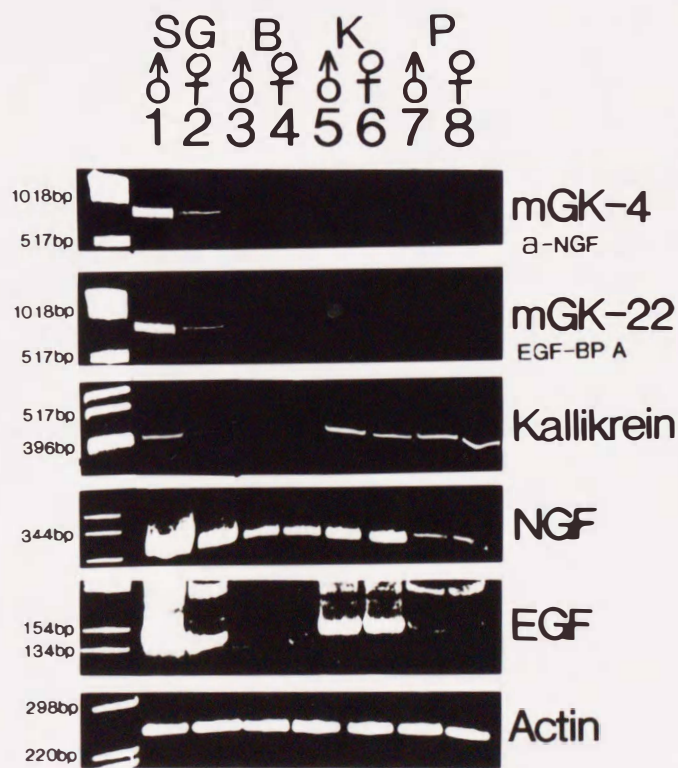


Fig. 1 Detection of EGF, NGF and kallikrein mRNA by RT-PCR. PCR was carried out for 25 cycles (in submaxillary gland RT-samples) or 40 cycles (in brain, kidney, pancreas RT-samples) with an annealing temperature of 64°C (mGK-4 and mGK-22) or 60°C (EGF, NGF and kallikrein). Detection of actin mRNA by RT-PCR was carried out for 30 cycles with an annealing temperature of 60°C. Lane 1; Male submaxillary gland. Lane 2; Female submaxillary gland. Lane 3; Male brain. Lane 4; Female brain. Lane 5; Male kidney. Lane 6; Female kidney. Lane 7; Male pancreas. Lane 8; Female pancreas.

かった。EGF及びNGF遺伝子の発現について検討したところ、これら遺伝子は顎下腺において多量に発現しており、この発現にも性差が観察された。これら遺伝子は顎下腺以外に脳、腎臓、膵臓においてもその発現が観察されたが、その発現量に性差は観察されなかった。以上の結果からマウス顎下腺において特異的にこれら遺伝子の発現に性差が認められることが明らかとなった。雄マウスの各臓器におけるグラニューラカリクレインmRNA量をノーザンブロットハイブリダイゼーション法により解析した[Fig. 2]。その結果雄マウス顎下腺、腎臓、膵臓において遺伝子の発現が認められ、特に顎下腺でのmRNA量は腎臓、膵臓のmRNA量の100倍以上であることが明らかとなった。マウス顎下腺に存在するEGF、NGF及びグラニューラカリクレインはテストステロンや甲状腺ホルモンに依存していることが知られている。そこでテストステロン及び甲状腺ホルモン投与による顎下腺EGF、NGF及びグラニューラカリクレイン遺伝子発現の変化を解析した[Fig. 3]。雄マウス去勢によりこれら遺伝子の発現は急激に低下し、特にEGFやNGFは去勢6日後で雌マウスの発現量にまで低下した。グラニューラカリクレインmRNA量の減少はEGFやNGFに比較すると遅く、去勢8日後で雌のmRNA



Fig. 2 Tissue distribution of glandular kallikrein gene mRNA. Total RNA (10 μ g) was applied to each lane and hybridized with radiolabeled cDNA probe encoding EGF-BP type A (mGK-22).

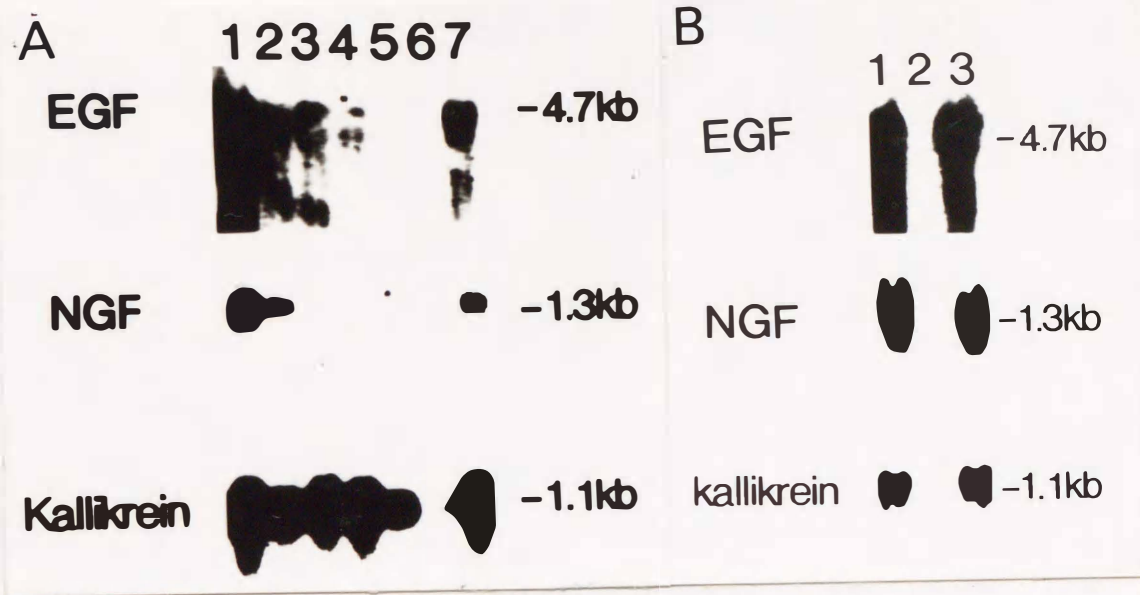
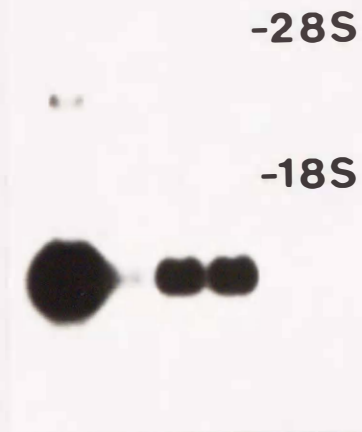


Fig. 3 The effects of hormones on mouse submaxillary gland gene expression. A; Northern blot analysis of EGF, NGF and kallikrein mRNA in mouse submaxillary gland at different times following castration or testosterone administration. Aliquots, containing 10 μ g of total RNA were electrophoresed in formaldehyde-containing agarose gels and blotted onto nylon membrane. Lane 1; Male mouse. Lane 2; Male mouse castrated after 2 days. Lane 3; Male castrated after 4 days. Lane 4; Male castrated after 6 days. Lane 5; Male castrated after 8 days. Lane 6; female. Lane 7; Female after administration of testosterone propionate (200 μ g/BW. 4days). B; Northern blot analysis of EGF, NGF and kallikrein mRNA in mouse submaxillary gland after administration of T3. Lane 1; Male. Lane 2; Female. Lane 3; Female after administration of T3 (100 μ g/BW. 4days). The blots were hybridized sequentially with radiolabeled cDNA probes encoding EGF, NGF or EGF-BP (mGK-22).

量の3倍程度に低下した。これはEGF及びNGFのmRNAがグラニューラカリクレイン mRNAに比べその大きさが4.5kb及び1.5kbと長く、また3'の非翻訳領域が比較的A Uリッチであることから、mRNAの細胞内での寿命が短くなるためであろうと推測された。雌マウスへのテストステロン投与(200 μ g 4日間腹腔内)により顎下腺EGF、NGF及びグラニューラカリクレイン遺伝子の発現は急激に上昇し、ホルモン投与4日目で雄マウスのmRNA量にまで上昇した[Fig. 3 A lane 6,7]。又甲状腺ホルモン投与(トリヨードサイロキシシン100 μ g 4日間腹腔内)により雌マウスEGF、NGF及びグラニューラカリクレイン遺伝子発現はいずれも上昇し、投与4日目で雄マウスの発現量にまで上昇した[Fig. 3 B]。

1 2 3 4

Fig.4 The effect of retinol on mouse submaxillary gland glandular kallikrein gene expression. The blot are hybridized with radiolabeled cDNA probe encoding EGF-BP type A(mGK-22). Lane 1: Male mouse. Lane 2: Female mouse. Lane 3: Female mouse after administration of retinol (5000U/B.W. 4days). Lane 4: Female mouse after administration of retinol (5000U/B.W. 6days).



マウス唾液プロテアーゼを指標酵素として様々な薬物をスクリーニングしたところ(22)ビタミンAがプロテアーゼ活性を上昇させる傾向のあることが明らかとなった。そこでビタミンA投与によるマウス顎下腺でのグラニューラカリクレイン遺伝子発現の変化をノーザンブロットハイブリダイゼーション法により解析した[Fig. 4]。その結果、雌マウスへのビタミンA投与(5000U腹腔内)によりグラニューラカリクレインmRNA量はコントロールである雌マウスの3倍に上昇した。

マウス顎下腺では現在、10種類のグラニューラカリクレインファミリー遺伝子(mGK-1,3,4,5,6,9,13,16,22,PNF-1)の発現が確認されている。この10種類のグラニューラカリクレインファミリー遺伝子の中で、現在のところ唯一その発現量に性差が確認されていない遺伝子としてmGK-6が報告されている。そこでmGK-6のホルモン依存性及び組織特異的発現についてPCR法を用いて解析した[Fig.5]。mGK-6遺伝子に特異的なプライマーを用いPCRを行うことにより、mGK-6及びmGK-3mRNAが特異的に増幅される。増幅されたmGK-6及びmGK-3のPCRサンプルはその大きさが同一(414bp)である。これを区別



Fig. 5 A The sequence of PCR primers. Primers are identical to bases 316-356 and to complementary bases 708-728 of mGk-6 cDNA. mGK-6 and mGK-3 mRNA are specifically amplified by RT-PCR. Treatment with SstI, mGK-6 PCR product is digested into two fragments of expected size 192bp and 222bp.

B Detection of mGK-6 mRNA in submaxillary gland by RT-PCR. PCR was carried out for 30 cycles with an annealing temperature of 62°C. After PCR amplification, 5 μ l of PCR-sample was completely digested with SstI and applied to each lane. Lane 1: Male mouse. Lane 2; Female mouse. Lane 3; Female mouse after administration of T3 (100 μ g/B.W. 4days).

C Tissue distribution of mGK-6 mRNA. PCR was carried out for 40 cycles with an annealing temperature of 62°C. Lane 1: Intestine PCR product. Lane 2; SstI fragments of intestine PCR product. Lane 3; Kidney PCR product. Lane 4; SstI fragments of Kidney PCR product. Lane 5; Pancreas PCR product. Lane 6; SstI fragments of pancreas PCR product. Lane 9; Stomach PCR product. Lane 8: SstI fragments of stomach PCR product. Lane 7: Blank.

するため制限酵素SstIでPCRサンプルを切断すると、mGK-6はプライマーの内側にSstIサイトが存在するため222bpと192bpの2つのバンドが検出される。これに対しmGK-3はSstIサイトが存在しないため414bpのバンドが検出される[Fig. 5 A]。 mGK-3は雄雌のマウス顎下腺で発現量に性差が確認され、また雌マウスへの甲状腺ホルモン投与により遺伝子発現に誘導のかかることが確認された。これに対しmGK-6はその発現量に性差が存在せず、また雌マウスへの甲状腺ホルモン投与によっても遺伝子発現に誘

導がかからないことが明らかとなった[Fig. 5 B]。顎下腺以外の臓器でも発現量に性差のないグラニューラカリクレイン遺伝子が存在していることから[Fig. 1]、これらの組織で発現しているグラニューラカリクレインが α GK-6である可能性が示唆された。そこで α GK-6の組織特異的発現について解析した[Fig. 5 C]。その結果 α GK-6は顎下腺以外に、腎臓、膵臓、胃、腸において発現していることが明らかとなった。以上の結果から α GK-6は、男性ホルモン及び甲状腺ホルモン非依存性で、しかも組織特異的発現が失われているグラニューラカリクレインであることが明らかとなった。

〔考察〕

マウス顎下腺では男性ホルモンや甲状腺ホルモン投与によりEGF、NGF及びグラニューラカリクレイン遺伝子に発現誘導がかかることが明らかになった[Fig. 3]。これら複数の遺伝子のホルモンによる発現調節機構には現在2つの機構を考えることができる。すなわちホルモンレセプターが個々の標的遺伝子のHREに独立に作用する機構、もしくは複数の標的遺伝子の発現に共通に作用する転写調節因子を介した機構である。マウス顎下腺におけるEGF、NGF及びグラニューラカリクレイン遺伝子の転写は男性ホルモンや甲状腺ホルモン依存性であることから、これら遺伝子のプロモーター領域にアンドロジェンレスポンスエレメント(ARE)や甲状腺ホルモンレスポンスエレメント(TRE)の存在を予測することができる。そこでグラニューラカリクレイン遺伝子群のプロモーター領域を約-600bp解析した[Fig. 6]。その結果TREであるGGTCA*TGACC(TRE-PAR)、もしくはミオシンヘヴィーチェーン遺伝子やグロースホルモン遺伝子のプロモーター領域に同定されたTREであるTRE-MHCやTRE-GHに共通した塩基配列GCNNN*TGACCが存在するか検討した(7)。その結果グラニューラカリクレイン遺伝子のプロモーター領域にTREのハーフパルンドロームに相当する塩基配

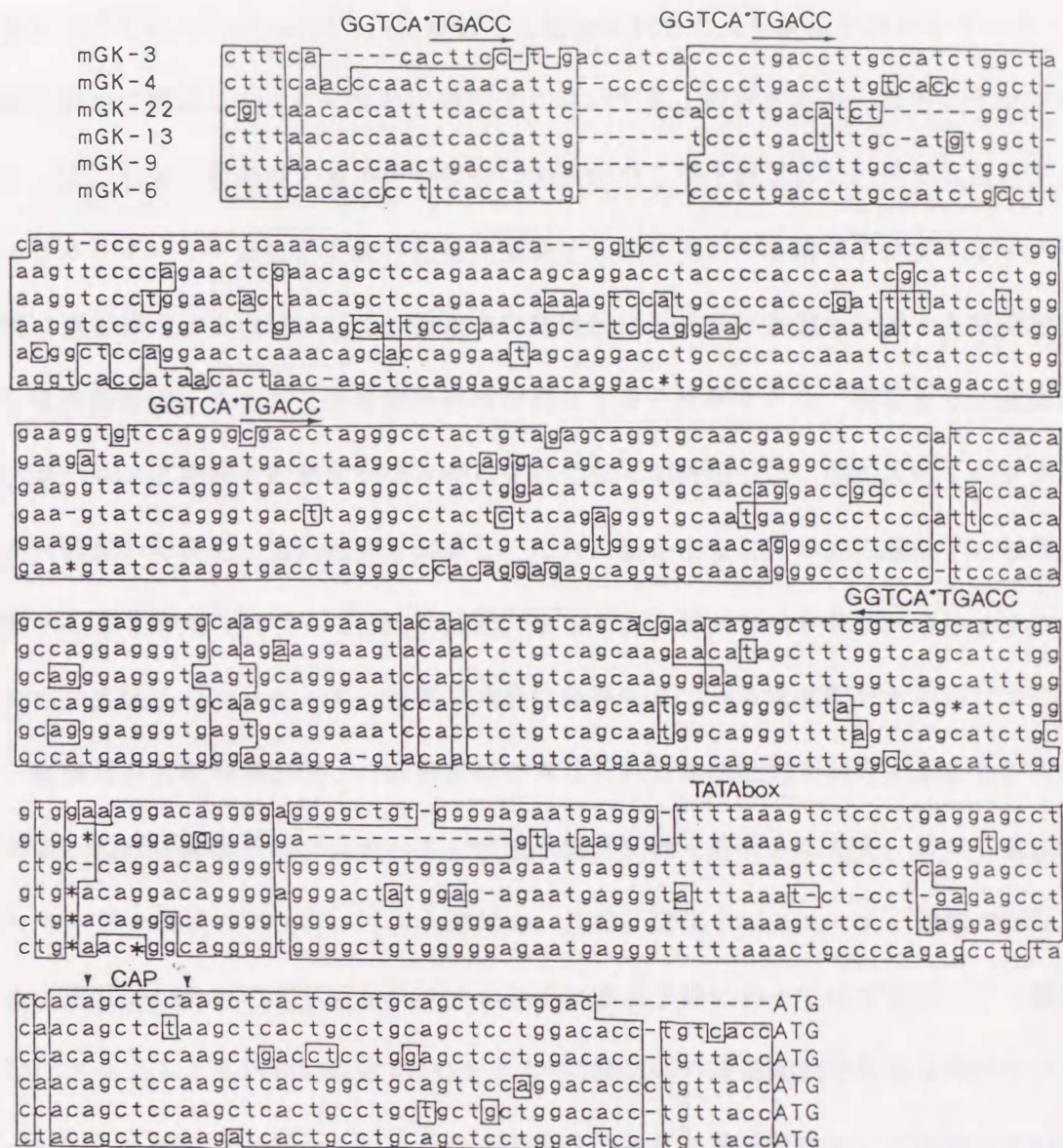


Fig. 6 Comparison of 5' flanking sequence of mouse glandular kallikrein genes. Nucleotide sequences which are identical between at least four out of the six sequences are boxed. Thyroid hormone response element is shown above the sequences.

列を4箇所みいだすことができた。がこれらはいずれも現在知られているTREに相当しなかった。EGF遺伝子プロモーター領域(23)について約1000bp解析を行ったところ、ハーフパリンδροームに相当する部位が2箇所(-948, -1213)存在したがこれらもTREに相当する塩基配列ではなかった。NGF遺伝子のプロモーター領域(マウス顎下腺での転写開始地点から-416bp)について同様な解析を行ったが明らかなTREをみいだすことはできなかった(24)。AREは現在明確にされていないがその候補

であるGREのGGTACAnnnTGTCTに類似した塩基配列をこれら遺伝子のプロモーター領域において解析したが、いずれの遺伝子においてもその存在をみいだすことができなかった。以上の結果からホルモン投与によるマウス顎下腺EGF、NGF及びグラニューラカリクレイン遺伝子の転写活性化機構は、ホルモンが各遺伝子のプロモーター領域に直接作用するのではなく、複数の標的遺伝子の発現に共通に作用する組織特異的な転写調節因子を介した発現調節機構が存在すると推測された。現在までに遺伝子がクローニングされその性質が明らかにされた転写調節因子は、標的遺伝子のプロモーター領域の特異的な塩基配列を認識し、これに結合することで標的遺伝子の転写を調節することが知られている(10,25,26)。よってEGF、NGF及びグラニューラカリクレイン遺伝子のプロモーター領域に共通に保存されている塩基配列をみいだすことで、組織特異的転写調節因子の結合部位と考えられる塩基配列を同定することが可能である。これら遺伝子のプロモーター領域の塩基配列を解析した結果、EGF遺伝子プロモーター領域のTATAボックス上流20bp、NGF遺伝子プロモーター領域のTATAボックス上流32bp、そしてグラニューラカリクレイン遺伝子群においてはプロモーター領域のTATAボックス上流約33bp付近に、いずれもAGGAnAGGGの塩基配列からなるモチーフをみいだすことができた[Fig. 7]。このモチーフはマウス顎下腺において発現しているが、ホルモン依存性を示さないアミラーゼ遺伝子のプロモーター領域には存在しなかった(27)。mGK-6の染色体上の位置は、mGK-3,4,5と連座しており(16)、尚且つこの遺伝子のプロモーター領域の塩基配列は他のホルモン誘導を受けるグラニューラカリクレイン遺伝子群のプロモーター領域と90%以上の相同性を有している[Fig. 6]。このように他のグラニューラカリクレイン遺伝子と非常に類似したプロモーター領域を有していながら、mGK-6はグラニューラカリクレイン遺伝子群のうち唯一ホルモン誘導及び組織特異的発現の失われた遺伝子である[Fig. 5]。そこでmGK-6遺伝子プロモーター領域の組織特異的転写調節因子結合部位と考えられたAGGAnAGGGの塩基配列からなるモチーフ

```

EGF      -aaAGGAgaAGGGatt-//-TATATA-//-aAGGA*TCCTa--//-ATG
NGF      -cctGGAggAGGGGct-//--TTAAA-// (CAGGaagCCIG) -//-ATG
mGK-1    -AGGAAGGAGGGGct-//-TTTAAA-//-cAGGg*gCCIC--//-ATG
mGK-3    -acAGGAc-AGGGGag-//-TTTAAA-//-TGAGGtc*CCICA--//-ATG
mGK-4    -aaAGGAc-AGGGGag-//-TTTAAA-//-tGAGGag*CCIC--//-ATG
mGK-9    -acAGGgc-AGGGGTG-//-TTTAAA-//-ttAGGag*CCIC--//-ATG
mGK-13   -acAGGAc-AGGGGag-//-TTTAAA-//-TGAGag*CCICA--//-ATG
mGK-22   -ccAGGAc-AGGGGtg-//-TTTAAA-//-aGGAGC*CTCCa--//-ATG
mGK-6    -acAGGgc-AGGGGtg-//-TTTAAA-//-cAGAG*CTCTa--//-ATG

```

—AGGA—AGGG—

Fig. 7 5' flanking sequence consensus between EGF, NGF and glandular kallikrein genes. Boxed areas represent nucleotide sequences which are identical in EGF, NGF and glandular kallikrein genes.

の解析を行ったところ、mGK-6においてはAcGgnACGGと、ピリミジンプリン及びプリン-プリンとの2塩基置換が認められた。このために組織特異的転写調節因子がこのモチーフに結合できず、よってmGK-6はホルモン誘導や組織特異的発現が失われたものと推測された。

以上の結果から推測される、マウス顎下腺におけるマルチホルモン調節機構は、顎下腺において組織特異的に発現する転写調節因子遺伝子のプロモーター領域にAREやTREからなるマルチホルモン調節領域が存在すると考えられる。ホルモンによりこの遺伝子発現が誘導され翻訳された転写調節因子が、他の複数の遺伝子のプロモーター領域に結合することで遺伝子の転写を同時に調節するのであろう。また我々はビタミンAがマウス顎下腺グラニューラカリクレイン遺伝子の転写を上昇させることを明らかにした[Fig. 4]。1987年、ビタミンAの活性体であるレチノイン酸レセプターのcDNAがクローニングされ、レチノイン酸レセプターはDNA結合ドメインを持つステロイドホルモンレセプターファミリーであることが明らかとなった(28)。またレチノイン酸レスポンスエレメント(RRE)が同定され、その結果RREはTREと非常に類似していることも明らかとなった。最近マルチホルモン調節機構の一端として、レチノイン酸レセプターが甲状腺ホルモンレセプターとともに共通のHREを認識するという報告もなされるようになった(29)。よって我々が検出したビタミンAによる遺伝子発現の活性化は、恐らく転写調節因子遺伝子プロモーター領域のTREを解して

行なわれているものと推測された。

遺伝子が、ホルモンなどの刺激により特定の組織や細胞で発現するメカニズムの解明は重要な課題となっている。現在組織特異的転写にかかわる因子の検出、単離が多くの研究室で試みられ分子レベルでの問題解決へと向かっているが、カイコ絹糸腺抽出液中でのフィブロネクチン遺伝子やラット肝抽出液中でのアルブミン遺伝子など、まだ限られた例でしか成功していない(30,31)。マウス顎下腺におけるEGF、NGF遺伝子及びグラニューラカリクレイン遺伝子群の組織特異的転写調節因子を介した転写調節機構の解明は、今後これらの問題を解決するための重要な手掛かりとなるであろう。今後レポーター遺伝子のプロモーター領域に顎下腺特異的転写調節因子結合部位と考えられる塩基配列を挿入させたキメラ遺伝子をマウス受精卵に移入することで得られるトランスジェニックマウスを用いた実験を行うことで、組織特異的転写調節因子結合領域を細詳に同定し、この領域をDNAプローブとしたサウスウエスタンブロッティング法により転写調節因子遺伝子のクローニングを行うことが可能となるであろう。

[参考文献]

1. Hullenberg, S.M., Weinberger, C., Ong, E.S., Cerelli, G., Oro, A., Levo, R., Thompson, E.B., Rosenfeld, M.G., and Evans, R.M. Primary structure and expression of a functional human glucocorticoid receptor cDNA. *Nature* 1985, 318, 635-641.
2. Hullenberg, S.M., Giguere, V., Segui, P., and Evans, R.M. Colocalization of DNA binding and transcriptional activation functions in human glucocorticoid receptor cDNA. *Cell* 1987, 49, 39-46.
3. Hullenberg, S.M., and Evans, R.M. Multiple and cooperative trans-activation domains of the human glucocorticoid receptor. *Cell* 1988, 55, 899-906.
4. Chalepakis, G., Arnemann, J., Brullar, H.J., Gross, B., and Beato, M. Differential gene activation by glucocorticoid and progestin through the hormone regulatory element of mouse mammary tumor virus. *Cell* 1988, 53, 371-382.
5. Chalepakis, G., Postoma, J.P.M., and Beato, M. A model for hormone receptor binding to the mouse mammary tumor virus regulatory element based on hydroxyl radical DNA footprinting. *Nucl. Acids Res.* 1988, 16, 10237-10247.
6. Chandler, V.L., Maler, B.L., and Yamamoto, K.R. DNA sequences bound specifically by glucocorticoid receptor in vitro render a heterologous promoter hormone responsive in vitro. *Cell* 1983, 33, 489-499.
7. Glass, C.K., Franco, R., Weinberger, C., Albert, V., Evans, R.M., and Rosenfeld, M.G., A c-erb-A binding site in the rat growth hormone gene mediate transactivation by thyroid hormone. *Nature* 1987, 329, 738-741.
8. Klein-Hitpass, L., Schorpp, M., Wagner, U., and Ryffel, G.U., An estrogen responsive element derived from 5' flanking region of the *Xenopus vitellogenin A2* gene functions in transfected human cells. *Cell* 1986, 46, 1053-1061.
9. Tola, L., Gaub, M., Mader, S., Dierich, A., Bellard, M., and Chanbon, P., Cell-specificity of GGTCA half palindromic estrogen-responsive element in the chicken ovalbumin gene promoter. *EMBO J.* 1988, 7, 3771-3778.
10. Holly, A., et al. A tissue-specific transcription factor containing a homeodomain specifies a pituitary phenotype. *Cell* 1988, 55, 519-529.
11. 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* 1988, 336, 262-265.
12. Murphy, R.A. and Watson, A.Y., The mouse submandibular gland. *J. Histochem. Cytochem.* 1980, 28, 890-902.

13. Barka, T., Biologically active polypeptides in submandibular gland. *J. Histochem. Cytochem.* 1980. 28. 836-859.
14. Mason, A. J., Evans, B. A., Cox, D. R., Shine, J. and Richards, R. I., Structure of mouse kallikrein gene family suggests a role in specific processing of biologically active peptides. *Nature* 1983. 303. 300-307.
15. van Leeuwen, B. H., Evans, B. A., Tregear, G. W. and Richards, R. I. Mouse glanular kallikrein genes. *J. Biol. chem.* 1986. 261. 5529-5535.
16. Evans, B. A., Drinkwater, C. C. and Richards, R. I. Mouse glanular kallikrein genes. *J. Biol. chem.* 1987. 262. 8027-8034.
17. Koss, R. D., and Seidel, R. H., Detection of acidic fibroblast growth factor mRNA in the rat ovary using reverse transcription-polymerase chain reaction amplification. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1989. 30. 82-88.
18. Evans, B. A. and Richards, R. I., Genes for the α and γ subunits of mouse nerve growth factor are contiguous. *EMBO Journal* 1985. 4. 133-138.
19. Drinkwater, C. C., Evans, B. A. and Richards, R. I., Mouse glanular kallikrein genes identification and characterization of the genes encoding the epidermal growth factor binding protein. *Biochemistry.* 1987. 26. 6750-6756.
20. Scott, J., Selby, M., Urdea, M., Quiroga, M., Bell, G. I., and Rutter, W. J., Isolation and characterization of a cDNA encoding nerve growth factor. *Nature* 1983. 302. 538-540.
21. Scott, J., Urdea, M., Quiroga, M., Sanchez-Pescador, R., Fong, N., Selby, M., and Bell, G. I., Structure of mouse submaxillary messenger RNA encoding epidermal growth factor and seven related proteins. *Science* 1983. 221. 236-240.
22. Nobuyuki, K., and Z. Ogita., Saliva proteases, useful marker enzyme for androgen. *Physico-Chem. Biol.* 1989. 33. 55-60.
23. Pascall, J. C., Structural analysis of 5' flanking region of the mouse epidermal growth factor gene. *J. Mol. Endocrinol.* 1988. 1. 5-11.
24. Selby, J. M., Edwards, R., Sharp, F., and Rutter, W., Mouse nerve growth factor gene: structure and expression. *Mol. Cell. Biol.* 1987. 7. 3057-3064.
25. C. G., Currie, R. A., and Roeder, R. G., A human lymphoid-specific transcription factor that activates immunoglobulin genes is a homeobox protein. *Nature* 1988. 336. 551-557.
26. Schuermann, M., et al. The leucine repeat motif in Fos protein mediates complex formation with Jun/AP-1 and is required for transformation. *Cell* 1989. 56. 507-516.

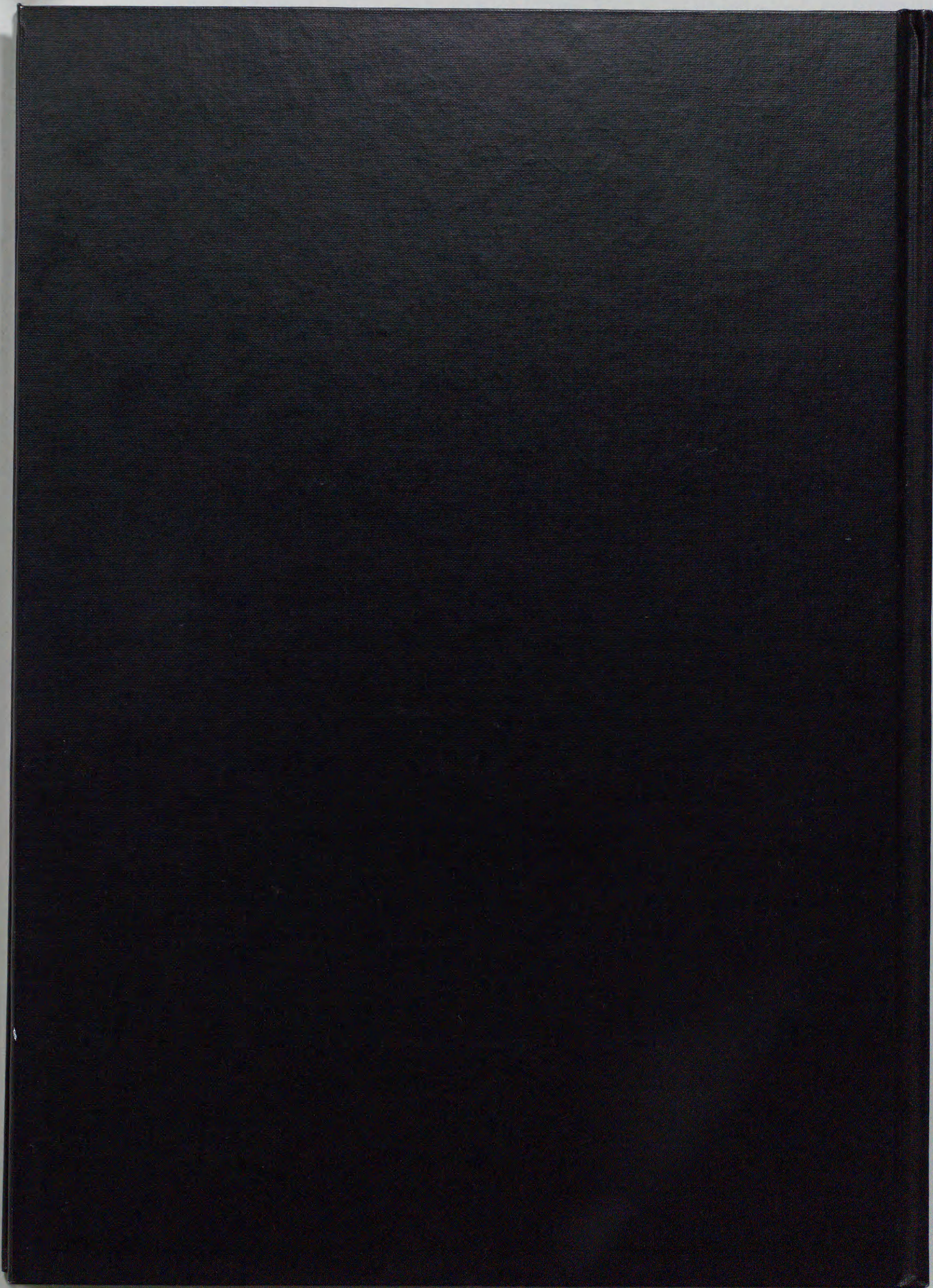
27. Hagenbuechle, O., Schibler, U., Petrucco, S., van Tuyle, G.C., and Wellauer, P.K.,
Expression of mouse Amy-2- α alpha-amylase genes is regulated by strong
pancreas-specific promoters. *J. Mol. Biol.* 1985, 185, 285-293.
28. Petkovich, M., Brand, A., Krust, A., and Chambon, P., A human retinoic acid
receptor which belongs to the family of nuclear receptors.
Nature 1987, 330, 444-450.
29. 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* 1988, 336, 262-265.
30. Gorsky, K., Carneiro, M., and Schibler, U., Tissue-specific in vitro
transcription from mouse Albumin promoter. *Cell* 1986, 47, 767-776.
31. Tsuda, M., and Suzuki, Y., Faithful transcription initiation of fibroin gene
in homologous cell-free system far upstream. *Cell* 1981, 27, 175-182.

結論

1. ホルモン作用を有する薬物の簡便なスクリーニング法としてマウス唾液プロテアーゼ活性法を考案した。
2. マルチホルモン調節を受けるマウス顎下腺グラニューラカリクレインファミリーのプロテアーゼ活性を、基質特異性、ホルモン依存性、及び阻害剤に対する感受性に基づき分類した結果、これらプロテアーゼは機能上少なくとも8種類のグループに分類された。
3. グラニューラカリクレイン、表皮成長因子(EGF)、神経成長因子(NGF)のマウス顎下腺における遺伝子発現を解析したところ、これら遺伝子は異なるホルモンにより非常に類似した転写調節を受けることが明らかとなった。その結果、組織特異的転写調節因子がこれら遺伝子のマルチホルモン調節に関与している可能性が示唆された。

謝 辞

本研究を遂行するにあたり、終始丁寧な御指導を賜りました荻田善一教授、ならびに助言、援助をいただきました病態生化学部門の皆様に深く感謝いたします。



inches 1 2 3 4 5 6 7 8
cm 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19

Kodak Color Control Patches

© Kodak, 2007 TM: Kodak



Kodak Gray Scale



© Kodak, 2007 TM: Kodak

A 1 2 3 4 5 6 **M** 8 9 10 11 12 13 14 15 **B** 17 18 19

