

# 分泌型生物発光レポーターを用いた 成長ホルモン遺伝子転写活性の連続測定法の開発

## 学位論文内容の要旨

近年、遺伝子転写活性を推定するのに、mRNA を直接定量するかわりに転写レポーターを用いた間接的測定が試みられている。転写活性のレポーター測定法とは、目的遺伝子のプロモーター下流にレポーター遺伝子を組み込んだプラスミドを細胞に導入し、目的遺伝子の発現を同時に転写されるレポーター遺伝子の転写活性（レポーター活性）を測定することにより評価する方法である。なかでも生物発光を用いたレポーターはその感度のよさ、測定の簡便さから広く用いられている。しかしながら、これまでの発光レポーターアッセイ法は、発光反応が細胞内で生じるため、レポーター活性を測定するには細胞を破碎しなければならず、同一細胞において経時的に測定することが困難であった。本研究では、レポーター分子が細胞外へ分泌される分泌型ルシフェラーゼ、ウミボタルルシフェラーゼ (*Vargula hilgendorfi* Luciferase) の cDNA をラット成長ホルモン(GH)プロモーターの下流に組み込んだプラスミドを作製し、ラット下垂体腫瘍株化細胞 (GH3) に導入して、GH 遺伝子発現を連続的にモニターするシステムを開発した。GH 遺伝子の転写活性は培養液中に分泌したルシフェラーゼの酵素活性を連続的にモニターすることにより測定した。ウミボタルルシフェラーゼの活性はルシフェリン・ルシフェラーゼ反応で生じた光量子量をルミノメーターにて測定することにより定量した。

GH3 細胞に遺伝子導入をおこなうため、ラット GH 5'側上流領域より3種のプロモーター領域(1.4-1.8kb)を増幅し、その下流にウミボタルルシフェラーゼ cDNA (1.8kb)を挿入したプラスミド(pGH-1-VL, pGH-2-VL, pGH-3-VL)を構築した。それぞれの一過性発現をみたところ、pGH-1-VL に最も強いルシフェラーゼ活性が測定された。そこで、pGH-1-VL を GH3 細胞へ導入し、ネオマイシン耐性選択スクリーニングにより、ルシフェラーゼ安定発現 GH3 細胞 (*v*-GH3) を作成した。標準ウミボタルルシフェラーゼを用いた容量応答曲線から、ウミボタルルシフェラーゼの感度は従来のレポーター系と比較し、100 - 600 倍と極めて高いことが示された。

*v*-GH3 における GH 遺伝子転写活性および GH 分泌量を経時的に測定するため、6-well plate を用いて、各 well の培養液を無血清培養液に交換し、1時間毎の全置換を8時間まで繰り返し、回収した培養液中のルシフェラーゼ活性および GH 量を測定した。培養液中のラット GH は酵素抗体法 (EIA)により測定した。その結果、経時測定開始後ルシフェラーゼ活性に一過性の増加がみられたが、GH 分泌量はほぼ一定であり転写活性と GH 分泌に一時的な乖離が見られた。これは GH 分泌にはたらいっていた負のフィードバック制御が解除された結果と考えられた。さらに、ウミボタルルシフェラーゼの細胞内動態を調べるために、転写阻害剤 camptothecin、蛋白合成阻害剤 cycloheximide および分泌蛋白輸送阻害剤 brefeldin A

投与後のルシフェラーゼ活性および GH 分泌の経時的変化を検討した。ゴルジ体への分泌蛋白輸送を阻害する brefeldin A 投与によって、ルシフェラーゼ活性および GH 分泌は 2 時間以内にほとんど消失した。これは、ルシフェラーゼおよび GH がともに共通の分泌過程を持ち、そのプロセスは比較的短時間であることを示唆した。一方、蛋白合成阻害剤である cycloheximide は、GH 分泌を約 2 時間で完全に停止させるのに対して、ルシフェラーゼ活性は徐々に消失した。この反応性の違いは、ルシフェラーゼと GH の細胞内での代謝回転の相違を反映していると考えられた。すなわち、GH が比較的速い代謝回転（半減期は 1 時間以内）であるのに対して、ルシフェラーゼは遅い代謝回転を持つものと思われた。さらに、ルシフェラーゼ活性および GH 分泌ともに camptothecin の阻害作用があらわれるまでに数時間かかったが、その後の経過はほぼ同様であった。この結果とルシフェラーゼの代謝回転が GH よりも遅いことを考え合わせると、ルシフェラーゼ mRNA の代謝回転は GH mRNA の代謝回転よりも速いことが予想された。したがって、ウミボタルルシフェラーゼと GH とは異なる細胞内動態をもつが、転写から蛋白合成、分泌へと至る過程に要する時間はほぼ同じであると考えられた。

次に GH 転写活性を刺激し、ルシフェラーゼ活性が GH 転写活性を正確に反映しているかを検討した。甲状腺ホルモン (T3) を培養液中に添加し、4 時間、8 時間ないし 24 時間後に培養液を回収してルシフェラーゼ活性および GH 分泌量を測定した。ルシフェラーゼ活性は T3 添加 4 時間ないし 8 時間後では有意な増加はなかったが、24 時間後に対照群に対し有意差を認めた。一方、GH 量は 4 時間後では増加しなかったが、8 時間後で有意に増加し、24 時間後にはさらに増加した。対照群に対する増加率は GH 量がルシフェラーゼ活性よりも常に大きかった。合成される蛋白の量は遺伝子の転写で生じる mRNA の量だけではなく、生じた mRNA の代謝回転によっても変化する。したがって、ルシフェラーゼ活性と GH mRNA の増加率がほぼ同じであったことから、反応性にみられた差異は遺伝子転写量の差異ではなく、生じた mRNA の代謝回転の差に起因していると考えられた。すなわち、GH mRNA の代謝回転がルシフェラーゼ mRNA の代謝回転よりも遅いことを示していると思われた。これは阻害剤を用いた実験結果とも一致した。また、24 時間培養後の  $\nu$ -GH3 細胞を剥離し RNA 抽出をおこない、GH mRNA をノーザンブロット法で測定して、ルシフェラーゼ活性、GH mRNA および GH 量の相関を検討した。その結果、これらの間にはすべて有意な正の相関が認められた。以上の結果より、培養液中のルシフェラーゼ活性は GH 遺伝子転写活性をよく反映しており、レポーターとして有用なことが示された。

糖質コルチコイドは T3 による GH 合成、分泌を促進するとされているが、その作用メカニズムは不明である。そこで、T3 とデキサメサゾンを含む培養液にて、 $\nu$ -GH3 細胞を 24 時間培養した後に培養液中のルシフェラーゼ活性および GH 分泌量を測定し、デキサメサゾンの GH 遺伝子転写活性に及ぼす効果を検討した。デキサメサゾンと T3 の併用投与はルシフェラーゼ活性および GH 量ともに T3 単独投与に比較し有意に増加させたが、その増加率は GH 量では約 38%、ルシフェラーゼ活性では約 19%であった。この結果から、デキサメサゾンは GH 遺伝子の転写促進だけではなく、GH mRNA の安定性にも関与していると思われた。

以上、 $\nu$ -GH3 細胞の培養液中ルシフェラーゼ活性は GH 転写活性を反映し、しかも同一 well で繰り返し測定することが可能なことから、遺伝子転写活性の経時的解析に極めて有用であり、本研究により作成した生物発光レポーターシステムは GH 遺伝子発現の調節機能を解明する上で強力な手段になると思われた。

# 学位論文審査の要旨

主 査 教 授 本 間 研 一  
副 査 教 授 小 林 邦 彦  
副 査 教 授 吉 岡 充 弘

学 位 論 文 題 名

## 分泌型生物発光レポーターを用いた 成長ホルモン遺伝子転写活性の連続測定法の開発

本研究では、分泌型の生物発光レポーターであるウミボタルルシフェラーゼ(*vargula hilgendorffii luciferase*)を用いて、同一細胞における遺伝子転写活性の連続測定をおこなう方法の確立を目的とした。最初に、高感度なウミボタル発光測定系を確立し、レポーター活性の簡便な測定系を作成した。次に、3種のラット成長ホルモン(GH)プロモーター領域をクローニングし、その下流にウミボタルルシフェラーゼ cDNA を持つプラスミドを構築した。これらのプラスミドを GH 産生ラット下垂体腫瘍株化細胞(GH3)に遺伝子導入をおこない、ウミボタルルシフェラーゼ安定発現株(vl-GH3)を得た。これにより、vl-GH3細胞での培養液中のルシフェラーゼ活性(レポーター活性)を測定することにより、GH 転写活性の経時的変化を連続的にモニターすることが可能となった。さらに、転写、蛋白合成、分泌の各段階を阻害する薬剤を使用し、レポーター活性の経時変化をみることにより、ウミボタルルシフェラーゼの細胞内動態についての検討をおこなった。また、甲状腺ホルモンおよびグルココルチコイドの GH 遺伝子転写活性への影響を検討し、本レポーター系の有用性を確認した。

申請者は、公開発表の前に各審査員から個別審査を受け、研究の背景や学位論文の内容についての詳細な説明をおこなった。

公開発表において、まず申請者はスライドを用いながら約20分間にわたり学位論文の内容を発表した。これに対して、副査の小林邦彦教授から、ルシフェラーゼ安定発現株を得るための遺伝子導入法について、甲状腺ホルモン、デキサメサゾン刺激時のルシフェラーゼ活性、GHの増加率の差異および培養条件下での細胞数の変化についての質問があ

った。申請者はこれらに対して、自らおこなった遺伝子導入法について説明を加え、また、研究結果から考察されたルシフェラーゼ mRNA および GHmRNA の半減期の差から、指摘された両者の増加率における差異を説明した。さらに、経時変化をモニターする時間内に vi-GH3 の細胞数の変化がみられなかったことを示した。続いて、副査の吉岡充弘教授から、ウミボタルルシフェラーゼ分泌のメカニズム、レポーター酵素の性質および in vivo の実験系への応用についての質問があった。申請者は自らの実験結果から、ルシフェラーゼ分泌も GH 分泌と同様の調節性分泌によると予想されると回答し、過去の論文を引用して、ルシフェラーゼ発光反応と酵素活性の相関についても言及した。また、ウミボタル発光系を用いた応用例として、灌流培養系システムあるいはトランスジェニック動物の手法などについても言及した。また、主査の本間研一教授から、導入したプロモーター活性の相違およびグルココルチコイドの転写調節メカニズムに関する質問があった。申請者は自らの研究結果から、遺伝子導入に用いたプラスミドのサイズおよび構造が発現量に差を認めた原因である可能性があるとして回答した。また、グルココルチコイドの応答配列が今回使用したプロモーター領域内には存在しないことを過去の論文を引用し、明解に回答した。質疑応答は約15分間であった。

本論文は、高感度な分泌型生物発光酵素による発光反応をレポーターとして用いることにより、同一細胞における経時的かつ連続的な遺伝子発現のモニターを可能とした点において高く評価され、また今後のこのレポーター系を用いた灌流培養系システムあるいはトランスジェニック動物を用いた in vivo 実験などへの応用に道を拓くすぐれた研究として期待された。審査員一同は、これらの成果を高く評価し、大学院課程における研鑽や修得単位なども考え併せ申請者が博士（医学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。