

細胞の癌化を制御する糖転移酵素遺伝子の
転写制御メカニズムに関する研究

令和3年(2021年)3月

長岡技術科学大学大学院

工学研究科

生物統合工学専攻

丹下 梨穂

目次

序章.....	1
1. 癌の制圧に向けて	1
2. 第3の生命鎖である糖鎖と癌の関係	4
3. 生命維持に欠かせない β 4-ガラクトース転移酵素	6
4. 様々なヒト疾患に関わる β 4GalT3	8
5. 未だ効果的な治療法のない神経芽腫	10
6. 様々な機能をもつ転写因子 Sp	12
7. 細胞へ情報を伝達する MAPK シグナル伝達	14
8. 細胞を用いたバイオ医薬品の探索	15
9. 本研究の目的	16
 第1章 ヒト β 4GalT3 遺伝子の転写開始点の決定	18
第1節 緒言	18
第2節 材料と方法	19
第3節 結果	24
1. ヒト癌細胞における β 4GalT3 遺伝子の発現量の解析	24
2. 転写開始点の決定	24
3. β 4GalT3 遺伝子の 5'-UTR (untranslated region) の解析	27
第4節 考察	28
 第2章 β 4GalT3 遺伝子の 5'-上流領域のプロモーター領域の解析と 結合する転写因子の特定	29
第1節 緒言	29
第2節 材料と方法	30
第3節 結果	38
1. ヒト β 4GalT3 遺伝子の 5'-上流領域の単離	38
2. β 4GalT3 遺伝子の 5'-上流領域デリションコンストラクトの作製	38
3. β 4GalT3 遺伝子のプロモーター領域の特定	38

4. β 4GalT3 遺伝子のプロモーター領域に結合しうる転写因子の検索	41
5. β 4GalT3 遺伝子のプロモーター領域への Sp1 と Sp3 の結合の解析	44
第 4 節 考察	46
 第 3 章 Sp1 及び Sp3 のβ4GalT3 遺伝子の転写活性への効果	49
第 1 節 緒言	49
第 2 節 材料と方法	50
第 3 節 結果	55
1. Sp1 及び Sp3 の遺伝子発現	55
2. Sp1 及び Sp3 の細胞内局在	55
3. Sp1 及び Sp3 遺伝子導入による β 4GalT3 転写活性の解析	57
4. 2 ヶ所の Sp1/3 結合部位への変異導入による β 4GalT3 転写活性の解析	59
第 4 節 考察	61
 第 4 章 Sp3 の翻訳後修飾がβ4GalT3 遺伝子の転写活性へ与える影響の解析	64
第 1 節 緒言	64
第 2 節 材料と方法	65
第 3 節 結果	72
1. Sp3 内のアセチル化部位への変異導入による β 4GalT3 転写活性への影響	72
2. FBS 刺激による MAPK のリン酸化と β 4GalT3 転写活性への影響	72
3. U0126 処理による MAPK のリン酸化と β 4GalT3 転写活性への影響	74
4. 内在性 Sp3 内のリン酸化 Ser 残基の解析	78
5. Sp3 内のリン酸化部位への変異導入による β 4GalT3 転写活性への影響	78
第 4 節 考察	81

第 5 章 β 4GalT3 遺伝子プロモーター領域を含むレポータープラスミドの 各種化合物に対する応答性の解析	85
第 1 節 緒言	85
第 2 節 材料と方法	87
第 3 節 結果	89
1. Mithramycin A に対するレポータープラスミドの応答性の解析	89
2. シグナル伝達経路阻害化合物に対するレポータープラスミドの応答性の解析	90
第 4 節 考察	93
総括	96
謝辞	100
公表論文	101
参考論文	101
引用文献	102

本研究で用いられている主な略語

Ala	alanine
ALK	anaplastic lymphoma kinase
AP	alkaline phosphatase
Asn	asparagine
β 4GalT	β -1, 4 Galactosyltransferase
BCA	bicinchoninic acid
BSA	bovine serum albumin
C/EBP	CCAAT/ enhancer binding protein
CADM1/TSLC1	cell adhesion molecule 1/tumor suppressor in lung cancer 1
Cer	ceramide
CER	cytoplasmic extraction reagent
ChIP	chromatin immunoprecipitation
DBD	DNA binding domain
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's medium
EGFR	epidermal growth factor receptor
ERK	extracellular signal-regulated kinase
EtBr	ethidium bromide
FAK	focal adhesion kinase
FBS	fetal bovine serum
Fuc	fucose
G3PDH	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
Gal	galactose
GalT	galactosyltransferase
GD2	disialoganglioside
Glc	glucose
GlcNAc	<i>N</i> -acetylglucosamine
GlcNAcT	<i>N</i> -acetylglucosaminyltransferase
IARC	International Agency for Research on Cancer

Ig	Immunoglobulin
INRG	International Neuroblastoma Risk Group
JNK	c-Jun N-terminal kinase
KLF	kruppel-like factor
Lys	lysine
Man	mannose
MAPK	mitogen-activated protein kinase
MYCN	myelocytomatosis neuroblastoma
NER	nuclear extraction reagent
NMR	nuclear magnetic resonance
PCR	polymerase chain reaction
PI3K	phosphatidylinositol-3 kinase
PTEN	phosphatase and tensin homolog deleted from chromosome 10
PVDF	polyvinylidene difluoride
RACE	rapid amplification of cDNA ends
Runx1	runt-related transcription factor 1
SDS	sodium dodecyl sulfate
Ser	serine
Sia	sialic acid
SOE	splicing by overlap extension
Sp	specific protein
STAT	signal transducer and activator of transcription
SUMO	small ubiquitin-related modifier
TAD	transactivation domain
Thr	threonine
TLR	toll-like receptor
UTR	untranslated region
VEGF	vascular endothelial growth factor
Xyl	xylose

序 章

1. 癌の制圧に向けて

多くの国で癌の死者数が増加したことから、国際癌研究機関 (IARC: International Agency for Research on Cancer) は発癌のメカニズム・疫学・予防などを研究する組織として、1965 年の世界保健機関総会で設立された。癌による死者が多かった先進諸国のフランス、イタリア、イギリス、ドイツ、アメリカ合衆国が IARC に参加した。その後、日本、オーストラリア、カナダ、デンマーク、オランダ等が加わった。IARC の推計によると、2020 年に癌と診断された症例は 1929 万人で、癌による死者数は 996 万人である。また、IARC は 2035 年における新たな癌罹患者数は 2400 万人、死者数は 1460 万人まで増加していくと予測している。現在、日本での死因第 1 位は癌であり、死因の 1/3 を占めている (国立がん研究センター: <http://www.ncc.go.jp/jp/index.html>)。2020 年に新しく癌と診断された人は、103 万人である。このように、人間の生活において癌はとても身近な脅威である。

私たちの体を構成する最小単位である細胞は、通常増えすぎないように適切に制御されている (1)。しかし、その制御が効かなくなり、無秩序に増え続けてできた細胞の塊が「腫瘍」である (2)。腫瘍には、良性腫瘍と悪性腫瘍があり、悪性腫瘍を癌とよぶ。良性腫瘍は、細胞が増え続けても他の臓器に移動することは無く、多くの場合、手術で取り除くことができる (2)。一方、悪性腫瘍である癌は、臓器の奥深くまで入り込み (浸潤)、血液やリンパ液を介して全身に移動でき、移動先の臓器でも増え続ける性質 (転移) をもつ (2, 3)。また、癌は他の正常細胞が摂取しようとする栄養を奪い体が衰弱する (悪液質) (2, 3)。これらの他にも、癌には 8 種の特徴があることが定義づけられており、体の免疫システムから逃れ、増殖し続ける (Fig. I) (4)。

癌の罹患について歴史的な根拠は少なく様々な議論があるが、2016 年に Odes らによって最古の癌の症例が発見された (5)。南アフリカのスワートクランズ洞窟で 160~180 万年前のヒトの足指の骨が発掘され、骨肉腫が認められた。この発見により、旧石器時代の原人から人類は癌に苦しめられてきたことが判明した。人類と癌との戦いとして学術的な知見が残されているのは 1800 年代過ぎからで、それ以降、発癌性物質の探索が進み出した。1911 年に Rous によりニワトリ肉腫無細胞濾過液中か

ら癌性物質 RSV (ラウス肉腫ウイルス) が発見された (6)。この発見を皮切りに、抗癌剤の研究が進んで行く。1950 年代から、現代も抗癌剤の主流となっているシクロフォスファミドが合成された (Fig. II)。シクロフォスファミドは、DNA の複製を阻害する作用があり (7)、元来、アメリカで毒ガスとして開発されていたナイトロジェン・マスタードの毒性を抑制し、抗癌剤として用いられるようになったという経緯がある。また、DNA を構成するチミンの合成を阻害することで DNA の複製を阻害するフルオロウラシルも同時期に開発された (Fig. II) (8)。この抗癌剤は、胃癌や大腸癌に使用されることが多く、代謝活性物質 (TdUMP) と、DNA 合成に必要なチミジル酸合成酵素と結合し、この酵素活性を阻害することでチミジル酸合成を阻害する (9)。

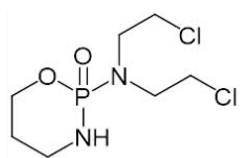
1970 年代になると、シスプラチンに代表されるプラチナ製剤や、タモキシフェン等のホルモン薬に抗癌剤としての働きがあることが発見された (Fig. II) (10–12)。この時期から、癌遺伝子 (c-Myc、epidermal growth factor receptor: EGFR、等) や癌抑制遺伝子 (p53、cell adhesion molecule 1/tumor suppressor in lung cancer 1: CADM1/TSLC1、等) が多数明らかにされるようになった (Table I) (3)。1990 年代以降は、癌細胞で DNA メチル化によるエピジェネティックな変化が発見されたことにより、EGFR や活性化癌遺伝子 (phosphatase and tensin homolog deleted from chromosome 10: PTEN) 及び血管内皮増殖因子 (vascular endothelial growth factor: VEGF) を標的とした分子標的薬が開発され、臨床的に使用されるようになった (13)。癌細胞に特異的に発現する分子や遺伝子を標的とした薬剤が分子標的薬と呼ばれるのに対し、従来の抗癌剤は細胞障害性抗癌剤と呼ばれる (13)。肺腺癌では、細胞障害性抗癌剤の平均的な奏効率がおよそ 30%であるのに対し、分子標的薬には奏効率が 60%以上のものがあり、副作用も軽いとされている (13)。また、2004 年に非喫煙者のアジア系女性の肺癌から多数の EGFR の変異が見出され、異常な EGFR には、下流の細胞シグナル伝達が活性化される部位があることが発見された (14)。この部位がリン酸化されることにより EGFR が活性化され、細胞を増殖させるシグナルが検出されたことから、リン酸化を阻害する EGFR チロシンキナーゼ阻害剤のゲフィチニブ (商品名: イレッサ) が開発された (15)。これら分子標的薬は、癌遺伝子を 100 種類以上同時に調べることのできる次世代シーケンサーの登場で、より効果的に使用できるようになった。しかし、依然として癌による死者数は減少しておらず、これまでとは異なる標的を発見し、より効果的な治療薬及び治療法を開発することが必要である。

2012 年から、転写制御の研究に着目することで癌の根治を目指す文部科学省の研究プロジェクトが発足した。癌細胞の悪性度に関わる遺伝子のプロモーター領域と、これらに作用する転写因子 (c-Myb、CCAAT/enhancer binding protein: C/EBP、runt-related transcription factor 1: Runx1、Ets1、等) をモデルとして、転写因子が形成する複合体の構造解析を中心に、X 線結晶構造解析及び核磁気共鳴 (nuclear magnetic resonance: NMR) による分子構造解析、及び細胞を用いたプロモーター活性の解析等が行われた (16–18)。この研究から、細胞の分化に関与する転写因子 Ets1 の天然変性領域 (特定の構造をもたない領域) がリン酸化されることで、自身の遺伝子発現のスイッチが切り替わるメカニズムが明らかとなった (19)。Ets1 がリン酸化を受けることにより、Ets1 と相互作用する因子と結合する立体構造が形成され、Ets1 の DNA 結合能を低下させることが、分子シミュレーションと生化学的解析により報告されている (17, 19–21)。癌の治療薬を開発するためには細胞の癌化の根本的な機構を解明する必要があり、転写制御メカニズムの解明が癌の根治療法につながる可能性を示した。

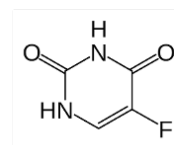


Fig. I. 癌の 8 種の特徴

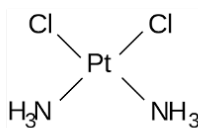
引用文献 (4) より引用した。



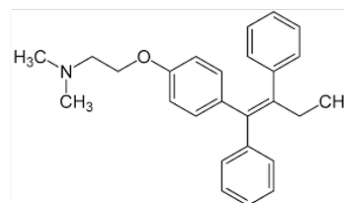
シクロフォスファミド



フルオロウラシル



シスプラチン



タモキシフェン

Fig. II. 繁用される抗癌剤の化学式

Table I. ヒトの癌に関わる主な癌遺伝子と癌抑制遺伝子

癌遺伝子 Myc群	c-myc	バーキットリンパ腫、肺がん等
	N-myc	神経芽腫
	チロシンキナーゼ群	EGFR
	c-Met	膠芽細胞腫
Ras群	K-RAS	胃癌、肺癌等
		膵癌、肺癌、卵巣癌等
癌抑制遺伝子	p53	脳腫瘍、白血病、肉腫等
	TSLC/CADM1	肺癌
	Smad4	肺癌、大腸癌等
	RB	網膜芽細胞腫

2. 第3の生命鎖である糖鎖と癌の関係

糖鎖と癌には、密接な関わりがあることが明らかになっている。癌の特徴的な性質として、細胞の増殖異常、浸潤や転移があり、これらの悪性形質に対して、細胞膜糖タンパク質に結合した糖鎖が関与することが報告されている (22, 23)。第3の生命鎖とも呼ばれている糖鎖は、細胞の表面を覆っており、タンパク質や脂質に結合し、複合糖質 (糖タンパク質及び糖脂質) を形成する (24)。糖タンパク質のなかでも、アスパラギン (Asn)-X-セリン (Ser)/スレオニン (Thr) 配列の Asn 残基の側鎖の窒素に付加

される糖鎖を N-型糖鎖と呼ぶ (25)。この糖鎖の構造は多様であり、N-アセチルグルコサミン (GlcNAc) 2 残基とマンノース (Man) 3 残基から構成されるトリマンノシルコアと呼ばれる構造に、N-アセチルグルコサミン転移酵素 (GlcNAcT) I、II、IV、及び V が働いて分岐構造が形成され、それらの非還元末端にガラクトース転移酵素 (GalT) がガラクトース (Gal) を付加する (25)。さらに、フコース転移酵素がフコース (Fuc) を、シアル酸転移酵素が Gal の先にシアル酸 (Sia) を転移することにより N-型糖鎖が形成される (Fig. III) (25)。N-型糖鎖の多様な構造は、細胞-細胞間の接着や、細胞-細胞または細胞-細胞外基質との相互作用、シグナル伝達、血中からのホルモンなどのクリアランスにおいて重要な役割を果たしている (26–29)。このような N-型糖鎖の多様な機能は、側鎖構造の GlcNAc に β 1-4 結合した Gal (Gal β 1 \rightarrow 4GlcNAc) の先に付加する様々な糖鎖抗原が担っていることが知られている (30)。また、細胞の癌化で、N-型糖鎖を合成する糖転移酵素の発現が著しく変化する (31–33)。その中でも、N-型糖鎖の分岐構造を形成する GlcNAc β 1 \rightarrow 6(GlcNAc β 1 \rightarrow 2)Man α 1 を合成する GlcNAcTV の発現が増加し、N-型糖鎖は高分岐糖鎖となる (25, 34–36)。細胞の悪性形質転換によって観察されるこのような糖鎖修飾の劇的な変化は、糖転移酵素遺伝子の発現の変化が原因であると考えられている。一方、糖脂質は動物細胞に存在するスフィンゴ糖脂質と植物細胞に存在するグリセロ糖脂質の 2 種に分類される (37)。スフィンゴ糖脂質は、スフィンゴシンと脂肪酸がアミド結合したセラミド (Cer) のアルコール基に糖が結合したものを指し、組織特異的に異なるスフィンゴ脂質糖転移酵素が働くことによってその発現パターンが決定される (38–40)。糖転移酵素をノックアウトしたマウスを用いた複数の解析から、糖脂質が発生や分化、中枢神経系の恒常性維持において重要な役割を果たしていることが報告されている (41–43)。

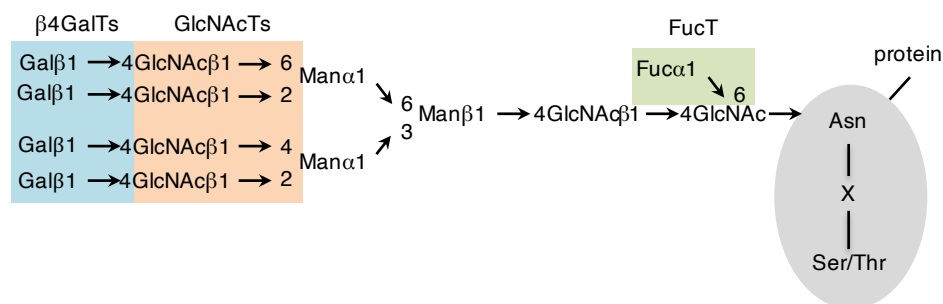


Fig. III. N-型糖鎖の生合成に関わる糖転移酵素

$\beta 4\text{GalTs}$: $\beta 4$ -ガラクトース転移酵素

GlcNAcTs : *N*-アセチルグルコサミン転移酵素

FucT : フコース転移酵素

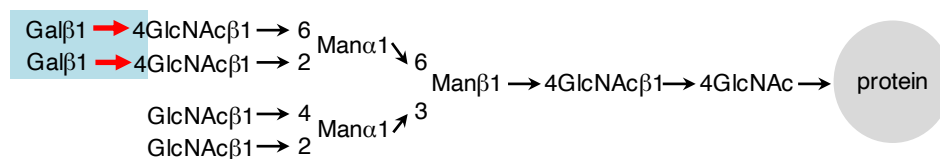
シアル酸転移酵素は、図に示した非還元末端の Gal にシアル酸を付加する。

3. 生命維持に欠かせない $\beta 4$ -ガラクトース転移酵素

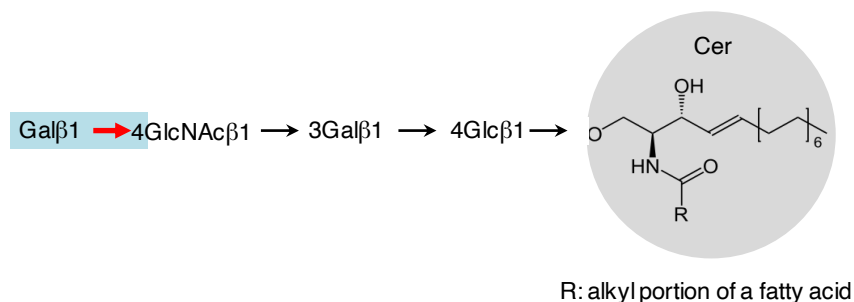
$\beta 4$ -ガラクトース転移酵素 ($\beta 4\text{GalT}$) は、Galを β -1,4結合でGlcNAc、グルコース (Glc)、及びキシロース (Xyl) に転移し、Gal $\beta 1 \rightarrow 4\text{GlcNAc/Glc/Xyl}$ 構造を合成する (44, 45)。現在、 $\beta 4\text{GalT}$ ファミリーとして7種の $\beta 4\text{GalT}$ 遺伝子が単離されており、はじめに遺伝子が単離された $\beta 4\text{GalT1}$ と相同性の高い順に番号づけされている (46–52)。それぞれ *in vitro* における基質特異性が異なることが報告されており、 $\beta 4\text{GalT1}$ と $\beta 4\text{GalT2}$ は糖タンパク質に (44, 45, 47, 53)、 $\beta 4\text{GalT3}$ と $\beta 4\text{GalT4}$ は糖脂質に (47, 48)、 $\beta 4\text{GalT5}$ と $\beta 4\text{GalT6}$ はグルコシルセラミドに (50, 54)、 $\beta 4\text{GalT7}$ はグリコサミノグリカン鎖がコアタンパク質と結合する橋渡し構造の最初の Gal を転移する (Fig. IV) (51, 52)。 $\beta 4\text{GalT1}$ ノックアウトマウスは成長遅延を示し、半数は離乳前に死に至る (55)。 $\beta 4\text{GalT2}$ ノックアウトマウスは空間学習記憶・運動学習に障害をもつ (56)。さらに、 $\beta 4\text{GalT5}$ のノックアウトマウスは胎生致死となることが判明し、 $\beta 4\text{GalT}$ は生物の機能に必須であることが示された (57)。しかし、 $\beta 4\text{GalT3}$ 及び $\beta 4\text{GalT4}$ のノックアウトマウスは作製されていないため、 $\beta 4\text{GalT3}$ と $\beta 4\text{GalT4}$ の *in vitro* での基質特異性や生体内の機能は明らかとなっていない。また、 $\beta 4\text{GalT}$ ファミリーの発現と癌の悪性度、すなわち増殖、移動、浸潤、及び転移への関与が多数報告されている。当研究室の Shirane らも $\beta 4\text{GalT}$ ファミリーと癌の関連について報告しており、NIH3T3 マウス繊維芽細胞の悪性形質転換に

伴い、 $\beta 4\text{GalT}3$ と $\beta 4\text{GalT}5$ の遺伝子発現が上昇する一方、 $\beta 4\text{GalT}2$ の遺伝子発現は低下することを見出した (58)。また、B16-F10 マウスメラノーマ細胞で $\beta 4\text{GalT}5$ 遺伝子の発現を低下させると、腫瘍形成能と転移能が顕著に抑制された (59)。同様に、B16-F10 細胞の腫瘍形成能は、 $\beta 4\text{GalT}2$ 遺伝子の発現を増加させることによって抑制された (60)。これらの知見から、糖鎖のガラクトシル化は、癌細胞の悪性形質にとって重要であることが示された。糖鎖のガラクトシル化は糖転移酵素遺伝子の発現変化に起因すると予想され、癌細胞における $\beta 4\text{GalT}1$ 、 $\beta 4\text{GalT}2$ 、 $\beta 4\text{GalT}4$ 、及び $\beta 4\text{GalT}5$ の転写制御メカニズムを解析した結果、 $\beta 4\text{GalT}1$ 、 $\beta 4\text{GalT}4$ 、及び $\beta 4\text{GalT}5$ は転写因子 Specific protein (Sp) 1 が、 $\beta 4\text{GalT}2$ は p53 が転写を制御していることが明らかとなった (61–64)。しかし、 $\beta 4\text{GalT}3$ の転写制御メカニズムは未だ明らかになっていない。

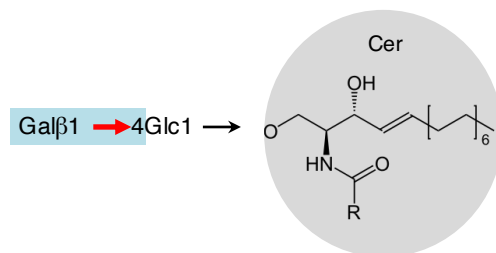
•β4GalT1, 2



•β4GalT3, 4



•β4GalT5, 6



•β4GalT7

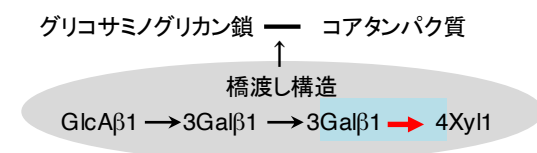


Fig. IV. β4GalTs の基質特異性

4. 様々なヒト疾患に関わるβ4GalT3

β4GalT3 遺伝子は、1997 年に Clausen らのグループによって、expressed sequence tag データベースの塩基配列情報を利用した polymerase chain reaction (PCR) により単離された (47)。β4GalT1 との相同性はアミノ酸レベルで 44%を示し、β4GalT3 遺伝子は 1 番染色体の q21-23 に存在することが報告された (47)。組換え酵素を用いた基質特異性の解析から、β4GalT3 は糖脂質のラクトトリアオシルセラミド (GlcNAcβ1→3Galβ1→4Glc-Cer) に Gal を転移することが示された (Fig. IV) (47)。その後、β4GalT3 は、in

*vitro*において複合糖質糖鎖のポリ-*N*-アセチルラクトサミン構造 ($\text{Gal}\beta 1 \rightarrow 4\text{GlcNAc}$)_n を合成できることが報告された (65, 66)。一方、アンチセンス DNA を用いた研究から、WI38 ヒト繊維芽細胞において $\beta 4\text{GalT3}$ 遺伝子の発現を低下させると、高分岐糖鎖のガラクトシル化が抑制されることが見出された (67)。さらに、Sasaki らによってヒトの心臓、脳、胎盤、肺、肝臓、筋肉、腎臓、及び脾臓で $\beta 4\text{GalT3}$ が発現しており、特に、胎児の脳、肺、肝臓、及び腎臓で高く発現していることが明らかにされた (68)。

近年、 $\beta 4\text{GalT3}$ は様々な疾患との関連が報告されている。Liao らによる、不可逆な失明の主な原因である緑内障の患者家族の遺伝子データ解析から、重症患者のみ $\beta 4\text{GalT3}$ 遺伝子に変異が起きていることが発見された (69)。また、関節リウマチにおいて免疫グロブリン (Ig) G の N-型糖鎖の低ガラクトシル化が炎症や免疫に関与することが見出され、複数の糖転移酵素の発現を解析した結果、 $\beta 4\text{GalT3}$ の発現が顕著に低下していることが判明した (70)。この2種類の疾患では、 $\beta 4\text{GalT3}$ との相関が見出されただけで疾患に至る詳細なメカニズムは不明である。他にも、複数の癌との関連が報告されており、大腸癌、膀胱癌、及び肝臓癌において $\beta 4\text{GalT3}$ の発現と癌の悪性度が負の相関を示すことが報告されている (71–73)。大腸癌組織における $\beta 4\text{GalT3}$ の高発現が細胞遊走や浸潤を抑制し、 $\beta 4\text{GalT3}$ は大腸癌患者における組織診断、進行期及び転移能と負の相関があることが示された (71)。膀胱癌では miR1247-3p という micro-RNA が $\beta 4\text{GalT3}$ の翻訳を抑制し、増殖能及び浸潤能の増加を促進することが報告された (72)。肝臓癌においても膀胱癌と同一の micro-RNA により $\beta 4\text{GalT3}$ の翻訳が抑制され、さらに、接着分子である $\beta 1$ インテグリン上の糖鎖構造を変化させて NF- κ B シグナルを活性化することで肺への転移を促進することが明らかとなった (73)。一方、これらの報告とは異なり、 $\beta 4\text{GalT3}$ の発現と悪性度が正の相関を示す例も報告されている。子宮頸癌において、 $\beta 4\text{GalT3}$ は miR-27a により上方制御され、腫瘍形成能を増大することが報告された (74)。さらに、神経芽腫において、抗体を用いて 101 人の患者の組織を染色し、患者の予後との相関を解析した結果から、 $\beta 4\text{GalT3}$ の発現が高い患者の方が、 $\beta 4\text{GalT3}$ の発現が低い患者に比べて予後が悪いことが見出された (75)。この研究では、 $\beta 4\text{GalT3}$ により合成される糖鎖についても解析しており、 β -1,4 結合したガラクトースを認識するレクチン RCA (*Ricinus communis* agglutinin)-I や、ポリ-*N*-アセチルラクトサミンを認識するレクチン LEL (*Lycopersicon esculentum* lectin) を用いたレクチンブロット解析から、神経芽腫において $\beta 4\text{GalT3}$ 遺伝子を過剰発現させ

ると、 $\beta 1$ インテグリンの糖鎖末端へのガラクトース付加とポリ-*N*-アセチルラクトサミン合成が増加した (75)。一方、siRNA (small interfering RNA) による $\beta 4\text{GalT3}$ 遺伝子の発現抑制により、それらの糖鎖構造が減少することが報告されている。また、神経芽腫における $\beta 4\text{GalT3}$ 遺伝子の過剰発現により亢進した転移や浸潤は、 $\beta 1$ インテグリンブロッキング抗体により著しく抑制された (75)。これらの知見から、神経芽腫において $\beta 4\text{GalT3}$ の発現が治療の新規標的になりうる可能性が考えられる。さらに、 $\beta 4\text{GalT3}$ 過剰発現は、 $\beta 1$ インテグリン上の *N*-アセチルラクトサミンを含む糖鎖構造を増加させ、mitogen-activated protein kinase (MAPK) を活性化させる接着斑キナーゼ (focal adhesion kinase: FAK) のリン酸化を高めた (75)。一方、これらの現象は、神経芽細胞腫の $\beta 4\text{GalT3}$ ノックダウンにより減少し、 $\beta 1$ インテグリン上のグリコシル化が減少することで $\beta 1$ インテグリンが分解へと誘導されることが示唆された (75)。以上の結果から、 $\beta 4\text{GalT3}$ 遺伝子が神経芽腫の予後不良を予測し、神経芽細胞腫において $\beta 1$ インテグリンのグリコシル化とシグナルの調節を通して、浸潤や転移の悪性形質を制御する可能性が示された。

5. 未だ効果的な治療法のない神経芽腫

神経芽腫は小児癌の一種であり、白血病や脳腫瘍に次いで患者数の多い病気で、日本では毎年約 150 から 200 人の子供に発症する (76)。1 歳以下での発症が多く、罹患者のほとんどは 5 歳以下で発見される (77)。発症部位は、副腎や背骨の両側にある交感神経節である (78)。5 歳以下の患者が多いため、具体的な不調を自ら訴えることが難しい上に、様々な部位に転移するため症状が多岐にわたり、早期発見や原因究明が遅れている。また、診断時には既に、全身に転移していることも珍しくはない。この病気の興味深い点は、生後 18 ヶ月未満の患者の神経芽腫は、自然に退行することである。新生児の神経芽腫としては、1901 年に Pepper が、生後 4 週の新生児期で発症し、その後けいれんをおこして死亡した症例を“肝臓と副腎の先天性肉腫”として最初に報告している (79)。神経芽腫に対する研究は進み、いくつかのゲノム異常が存在することが明らかとなった。代表的なものとして、癌遺伝子として知られている myelocytomatosis neuroblastoma (MYCN) の増幅 (80)、anaplastic lymphoma kinase (ALK) 変異 (81, 82)、さらには、第 1 染色体の喪失及び染色体のコピー数異常 (83) がある。

現在の日本では、診断として Table II に示した項目を評価する国際神経芽腫リスク分類 (INRG リスク分類) が用いられる。各項目の評価の組み合わせで、4 種類のグループに分類する (超低リスク、低リスク、中間リスク、及び高リスク)。それぞれのグループの中でも各項目の値によって外科的切除、化学療法、及び放射線治療等の治療法を患者個人に合わせて選択する (84)。超低リスク及び低リスクのほとんどが良好な予後を示し、長期生存は 80%以上である (85)。しかし、高リスクグループの 5 年生存期間 (再発なし) はおよそ 30%と低く、効果的な治療法がないのが現状である (85)。小児癌の発生頻度は癌全体の 1%にも満たないことから、国からの研究費が限られている。さらに、患者数が少なく臨床試験が難しいこと、患者が低年齢で錠剤やカプセルが服用できないため薬の形状に工夫が必要なことから、製薬会社も試薬の開発に積極的に取り組むことができないのが現状である。このような状況を打開するために、早期発見により神経芽腫の予後を改善することを目的として、1985 年から 2004 年にかけて生後 6 ヶ月の乳児を対象に日本全国で集団検診プログラムが実施された。しかし、高リスクの患者を診断する有用なデータを得ることはできなかった (86, 87)。高リスクに分類された患者は、外科的切除、化学療法、放射線治療、及び骨髄破壊的造血幹細胞移植による治療を行なっても予後不良であった (84)。現在、高リスクに分類される神経芽腫に対する効果的な化学療法がいくつか存在する。1 つ目は、発生中の胚及び新生児の脳でのみ発現するオーファン受容体型チロシンキナーゼの ALK 阻害剤である。染色体転座による ALK のタンパク質変異は様々なヒト悪性腫瘍で報告されている (88)。ALK の遺伝子座は、神経芽腫で高発現することが知られている MYCN と近接しており (ALK: 2p23、MYCN: 2p24)、ALK と MYCN は同時増幅する (89, 90)。さらに、ALK は N-Myc の直接的な転写標的として同定されている (89–91)。変異した ALK は、自己リン酸化によりキナーゼ活性の増加を示す (92)。活性化された ALK は RAS/MAPK 経路やホスファチジルイノシトール 3 キナーゼ (phosphatidylinositol-3 kinase: PI3K) 経路などの下流シグナル伝達経路を活性化させることによって発癌性を示し、*in vitro* 及び *in vivo* で細胞形質転換を誘導する (93)。2 つ目は、患者自身の T 細胞を回収し人工的にウイルスベクターを組み込むことで癌細胞を特異的に認識するようになるキメラ抗原受容体修飾 T 細胞 (chimeric antigen receptor-t cell: CAR-T) を用いた療法である (94)。3 つ目は、神経芽細胞腫に特異的に発現しているジシアロガングリオシド (Disialoganglioside: GD2) の抗体を用いた療法である (95)。これらの他にも

いくつかの効果的な化学療法が開発され、海外では標準的に使用されている。しかし、一部はまだ日本で承認されておらず、個人輸入して内服する患者もいる異様な状況である。近年の日本における高リスク神経芽腫の治療には、上記の化学療法に加えて、シクロフォスファミド、ニチニチソウ、及びシスプラチン等の DNA 合成阻害薬である既存の抗癌剤を使用するのが主流となっている。これらの薬剤は、正常な細胞へのダメージが多く、低年齢で発症する患者の予後への影響が懸念される。

神経芽腫患者全体の生存率は年々増加しているにもかかわらず、高リスクの神経芽腫患者は依然として予後不良である。このため、効果的な治療法が未だ発見されていない神経芽腫の治療標的及び治療薬につながる更なる研究が必要である。

Table II. INRG リスク分類に用いられる項目

1. 病期 (腫瘍の進行の程度)
2. 診断時年齢 (月齢)
3. 病理分類 (組織分類)
4. MYCN遺伝子の増幅
5. 染色体異常
6. 核DNA量 (腫瘍細胞の染色体数)

6. 様々な機能をもつ転写因子 Sp

転写因子 Sp/KLF (Kruppel-like factor) ファミリーは、C 末端のリンカー領域に等間隔に配置された3個のジンクフィンガーをもち、高度に保存されたトリプル C_2H_2 DNA 結合ドメイン (DNA binding domain: DBD) によって特徴付けられる (96)。 C_2H_2 ジンクフィンガーは、DNA 結合ドメインの1種で、亜鉛イオンと結合する2個のシステイン残基と2個のヒスチジン残基によりドメイン構造を形成する。通常、アミノ酸配列 CX(2-4)-CX(12)-HX(3-5)-H で構成される (96)。この構造は多くの転写因子にみられ、それらの配置と数に基づいて、さまざまなファミリーに細分されている。Sp 及び KLF の違いは、N 末端の近くにある保存された Sp ボックス、及びジンクフィンガーの N 末端にある Buttonhead (BTD) ボックスの存在であるが、これらの役割は不

明である (96)。しかし、ショウジョウバエと線虫における Sp においても Sp ボックスは保存されており、重要な生理学的役割を示唆している (96)。

転写因子として初めてクローニングされた Sp1 は、Dynan と Tjian によって SV40 の初期プロモーターにおける特異的結合因子として見出された (97)、TATA Box のない遺伝子のプロモーター領域やエンハンサー領域に存在する GC ボックスに結合する、およそ 100 kDa の転写因子である (98)。この Sp1 を含む Sp ファミリーは、N 末端にグルタミンに富むトランス活性化ドメイン (transactivation domain: TAD) を有する Sp1-4 と、TAD をもたない Sp5-9 の 9 種類の遺伝子から構成される転写因子ファミリーである (99)。また、前述した様に、DBD として C 末端部に高度に保存され、3 回繰り返された C₂H₂ 型のジンクフィンガー構造を有している (99)。Sp ファミリーは、9 種類の遺伝子から構成されるが、その中でも特に広範に研究されているのは、Sp1 と Sp3 である。これらの転写因子は、哺乳動物細胞において普遍的に発現している (98)。Sp1 ノックアウトマウスは胎生致死、Sp3 ノックアウトマウスは骨形成の遅れがみられ出生後に死に至ることが報告されている (100–102)。また Sp1 と Sp3 の DNA 結合部位であるジンクフィンガーは、高い相同性を有するため、GC リッチな同じ DNA 配列に同等な親和性で結合することが知られている (103, 104)。しかし、Sp1 は転写活性化因子として作用する一方、Sp3 は転写活性化因子と転写抑制因子の 2 重機能因子として作用する (105)。この Sp3 の機能的な違いは、細胞状態、遺伝子の違い、及び翻訳後修飾に起因する。また、Sp1 と Sp3 の存在比で標的遺伝子の転写制御が変化しすることが報告されている (106)。Survivin 遺伝子において、Sp3 は Sp1 と協同的に転写を活性化させるが (107)、別の遺伝子プロモーターの場合、例えば、オルニチンカルボキシラーゼ遺伝子において、Sp3 は Sp1 による活性化を競合的に阻害することで標的遺伝子の転写を負に制御している (108)。また、乳癌細胞において、TGF-β 受容体の遺伝子発現の転写制御は Sp1/Sp3 の比率が高いと転写が促進され、Sp1/Sp3 の比率が低いと転写が抑制されることが示された (109)。その比率の差異は細胞の癌化に起因し、Sp1 の発現低下と Sp3 の発現上昇の組み合わせによって TGF-β 受容体の発現を低下させ、下流のシグナルを抑制することで癌の増殖を阻止することが示唆された。

Sp1 は、長年の間、ハウスキーピング遺伝子の発現を調節する基本転写因子として考えられてきた。しかし、実際に Sp1 は、細胞増殖、生存、及び血管新生等の腫瘍形

成や転移に関与する survivin 遺伝子や、VEGF のような様々な癌関連分子の発現も制御している (107, 110)。Sp1 の発現は肺癌、グリオーマ、胃癌、乳癌や甲状腺癌では非癌部に比べて亢進することが報告されている (111–115)。一方、Sp3 は、乳癌、前立腺癌、肝癌、鼻咽頭癌、頭頸部癌、及び軟部肉腫において発現が増大することが報告されている (116–120)。他にも、人工的に悪性形質転換されたヒト繊維芽細胞を用いた実験においても Sp3 の発現が増大することが示されている (121)。そのため、癌細胞における Sp1 や Sp3 に着目することは、癌の治療標的の探索に非常に重要であると考えられる。

7. 細胞へ情報を伝達する MAPK シグナル伝達

細胞は、増殖因子や環境変化などの外部からの刺激に対して、増殖・分化・細胞死といった様々な反応を示す (122, 123)。これら外界からの刺激を細胞は内部に伝え、的確な応答を引き起こすシステムとして様々なシグナル伝達経路を有している。その中でも 1980 年代後半に発見された MAPK は、増殖因子の受容体への結合によって活性化され、核内で細胞の増殖に関与する様々な遺伝子の発現を誘導するシグナル伝達経路の主要分子として、発見以後多くの研究がなされてきた (124, 125)。MAPK 経路には、刺激により異なる 4 種類の主要な分岐経路が存在し、それに伴い数十種類の MAPK 酵素が関与することが知られている (124, 125)。分岐経路は、増殖シグナル伝達に寄与する増殖因子によって引き起こされる細胞外シグナル伝達調節キナーゼ (extracellular signal-regulated kinase; ERK) 経路、アポトーシス、増殖阻害、DNA 損傷、細胞ストレス、及び自然免疫の刺激によって活性化する c-Jun N-terminal kinase (JNK)、p38、及び ERK5 経路がある (Fig. V)。これらのそれぞれの MAPK シグナル伝達経路は、MAPKKK や MAPKK を介する 3 種類のプロテインキナーゼによる連続的な活性化が起こり、細胞の遺伝子発現や接着及び遊走を制御する (Fig. V) (126, 127)。MAPK 経路の調節不全は、アポトーシス回避能力、増殖シグナル伝達の維持、転移能、及び血管新生能を癌細胞に付与することが報告されている (126, 127)。前述した神経芽腫においても、再発した神経芽腫で、MAPK 経路が腫瘍形成に関与することを示しており、MAPK 経路に関与する遺伝子に変異が起きている (128)。これらの知見から MAPK

経路の阻害剤を開発することで、効果的な抗癌剤を作製できると考えられ多くの研究に力が注がれている。

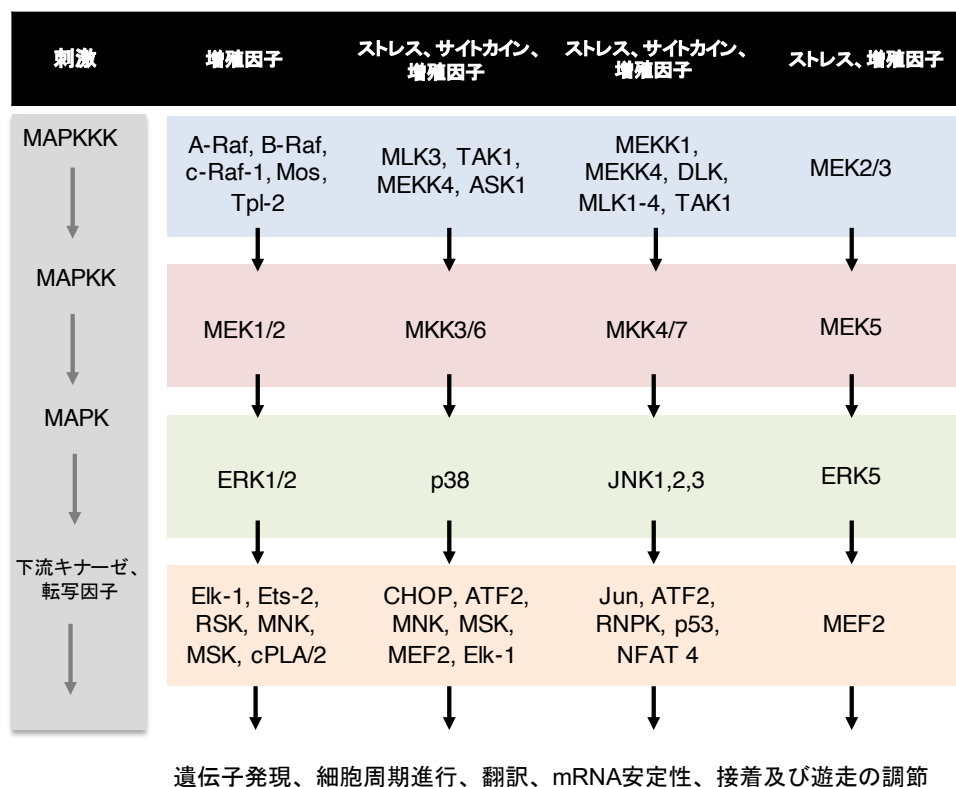


Fig. V. MAPK のシグナル伝達経路

8. 細胞を用いたバイオ医薬品の探索

創薬プロセスにおいて、より生体内に近い環境で薬の効果を解析するために、バイオアッセイが用いられている。バイオアッセイの中でも、細胞を用いて生物活性を測定する方法のことを細胞ベースアッセイと呼ぶ。細胞ベースアッセイの基本的な手法は、対象となる細胞株とバイオ医薬品を共存させ、任意の時間経過後に細胞への影響を評価することである。

細胞ベースアッセイの1種である、ルシフェラーゼ遺伝子を用いたスクリーニングシステムは簡便かつ高感度であり転写制御に着目した多くの化合物スクリーニング系で利用されている (129–134)。例えば、顔料や化粧品の製造等に使用されていた TiO_2 は、マウスを用いた解析で脳や肺で炎症を引き起こすことが示唆された (135)。炎症

検出用のセンサー細胞を開発するため、炎症シグナルを誘起する Toll 様受容体 (TLR) 4 遺伝子と炎症の主な原因で外部刺激により活性化される NF- κ B 遺伝子を導入した細胞が樹立された (130)。TiO₂ により誘発される炎症が、NF- κ B 経路の活性化を通じてセンサー細胞によって検出可能であり、安全性の評価に使用できることが示された。他にも、ルシフェラーゼ遺伝子を用いたレポータープラスミドは血管内皮増殖因子阻害薬、抗ヒト免疫不全ウイルス 1 型薬、マラリア薬及び結核菌薬のスクリーニングに利用された (131–134)。

大腸癌組織においては、 β 4GalT4 の発現増加が転移能亢進や予後不良と相関することが示された (136)。当研究室の Sugiyama は、 β 4GalT4 遺伝子の転写制御メカニズムを解析し、SW480 ヒト大腸癌細胞において Sp1 により転写が制御されていることを明らかにした (63)。この知見をもとに、当研究室の Fukushima らによって、 β 4GalT4 の転写制御に着目した大腸癌治療薬のスクリーニング法が提唱された (137)。このシステムは、 β 4GalT4 遺伝子の 5'-上流領域のプロモーター領域を組み込んだレポータープラスミドを導入したセンサー細胞を樹立し、化合物に対する応答性を解析することで大腸癌治療薬のスクリーニングが可能であることを示した (137)。また、 β 4GalT5 遺伝子の発現を減少させることで、癌細胞の悪性形質が抑制されることが報告されている (59)。したがって、 β 4GalT 遺伝子の発現の阻害剤が発見されれば、その阻害剤が癌治療に有用であることを示唆している。 β 4GalT3 の発現も、神経芽腫における悪性度の増加と相関し、 β 4GalT3 の発現を抑制すると、悪性度が低下することが明らかとなっている (75)。これらの知見から、 β 4GalT3 遺伝子の転写制御メカニズムに注目して新しいスクリーニングシステムを構築できれば、 β 4GalT3 遺伝子の発現を阻害する神経芽腫治療薬の発見に繋がる可能性がある。

9. 本研究の目的

本研究は、未だ効果的な治療法のない神経芽細胞腫に対する薬剤の探索や治療戦略への応用を目指し、 β 4GalT3 遺伝子の転写制御メカニズムを解明することを目的とした。そのために、癌細胞において、どのようなメカニズムで β 4GalT3 の転写が制御されて、発現が上昇しているのかを解明する必要がある。

本博士論文は、5章で構成されており、第1章ではヒト β 4GalT3 遺伝子の転写開始点を SH-SY5Y ヒト神経芽細胞腫において決定し、第2章では β 4GalT3 遺伝子の 5'-上流領域を単離した。さらに、単離した 5'-上流領域を用いて 2ヶ所の Sp1/3 結合部位を含むプロモーター領域を特定し、その領域に転写因子 Sp3 が結合することを明らかにした。第3章では、プロモーター領域に結合する Sp3 の β 4GalT3 遺伝子プロモーター活性への影響を解析し、Sp3 が SH-SY5Y 細胞において転写活性化因子として機能することを示した。第4章では、Sp3 の翻訳後修飾の β 4GalT3 遺伝子プロモーター活性への影響を解析し、MAPK を介した Sp3 のリン酸化が β 4GalT3 遺伝子の転写活性化に重要であることを示した。第5章では、明らかにした β 4GalT3 遺伝子の転写制御メカニズムに着目し、レポーターアッセイシステムを基盤とした神経芽腫に対する薬剤スクリーニングシステムの有用性を検討した。

第 1 章

ヒト $\beta 4\text{GalT3}$ 遺伝子の転写開始点の決定

第 1 節 緒言

生体内では、遺伝子の DNA 配列情報を鋳型に転写因子によって RNA が転写される。転写は細胞環境に応じて制御されており、転写の異常が疾患の要因あるいは悪化に関与することが明らかにされてきた。そのため、生体内でどのように遺伝子の転写制御が行われているのか、そのメカニズムを解析する研究が広範に行われている。ゲノム中のプロモーター領域に転写因子が結合することで、その遺伝子からの RNA 転写が促進または抑制させるなどの複合的な要素を経てゲノム上の転写が始まる場所“転写開始点”から転写が始まる。転写制御の研究を進めていく上で転写開始点の決定は最も基礎的な情報の 1 つである。第 1 章では、5'-Rapid Amplification of cDNA Ends (RACE) 法により、SH-SY5Y ヒト神経芽細胞腫及び A549 ヒト肺癌細胞におけるヒト $\beta 4\text{GalT3}$ 遺伝子の転写開始点の解析を行った。

第 2 節 材料と方法

・ 基本的な遺伝子操作

本研究で用いた遺伝子工学的手法は、Mainiatis らが著した Molecular cloning: A Laboratory Manual 2nd Ed. (Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 1989) 及び Ausubel らが著した Short Protocols in Molecular Biology. 3rd Ed. (John Wiley & Sons, Inc. New York, 1997) にしたがって行った。

・ 細胞培養

SH-SY5Y ヒト神経芽細胞腫 (東京都老人総合研究所 脳機能改善研究グループの阿相皓晃先生から供与) は、10% fetal bovine serum (FBS) (Biowest)、25 mM グルコース (Nacalai tesque)、及び 50 µg/ml カナマイシン (Nacalai tesque) を含む Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM)/Ham's F-12 (富士フィルム和光純薬株式会社) 培地を用いて、37°C、5% CO₂ 存在下で培養した。A549 ヒト肺癌細胞 (東北大学細胞供給センター)、SW480 ヒト大腸癌細胞 (東北大学細胞供給センター)、及び MKN1 ヒト胃癌細胞 (ヒューマンサイエンス振興財団) は、10% FBS、0.5% penicillin (10000 units/ml)-streptomycin (10000 µg/ml) (富士フィルム和光純薬株式会社) を含む DMEM 培地を用いて、37°C、5% CO₂ 存在下で培養した。

・ 定量的 RT-PCR による遺伝子の発現量の解析

定量的 RT-PCR によって SH-SY5Y 細胞、A549 細胞、MKN1 細胞、及び SW480 細胞における β4GalT3 遺伝子の発現量の解析を行った (59, 63)。

(1) total RNA の調製

Sepasol RNA I Super G (Nacalai Tesque Inc.) の実験操作手順書に従い、4 種類の細胞ペレットから total RNA を抽出した。この試料の 260 nm と 280 nm の吸光度を測定して、total RNA の定量と純度検定を行った。

(2) 逆転写反応

PrimeScript RT reagent Kit (Perfect Real Time) (Takara Bio) の実験操作手順書に従い、得られた total RNA を用いて逆転写反応を行った。Kit 付属の PrimeScript® RT Enzyme

Mix I により逆転写を行い、cDNA を得た。逆転写で得た cDNA を鋳型とし、リアルタイム用 PCR プライマー: β 4GalT3 遺伝子; HA080072-F (Takara Bio) 及び HA080072-R (Takara Bio)、glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (G3PDH) 遺伝子; HA067812-F (Takara Bio) 及び HA067812-R (Takara Bio) を用いて定量的 RT-PCR を行った。それぞれのプライマーの塩基配列は、Table 1-1 に示した。G3PDH 遺伝子は、内部標準として用いた。蛍光強度の増幅曲線から、遺伝子毎に、2nd Derivative Maximum 法によって Ct 値を算出した。標的遺伝子の Ct 値から内部標準遺伝子の Ct 値を減じた値 ($\Delta\Delta Ct$) を求め、下式を用いて内部標準遺伝子に対する標的遺伝子の相対発現量 (E_{relative}) を求めた。

$$E_{\text{relative}} = 2^{-\Delta\Delta Ct}$$

Table 1-1. 定量的 RT-PCR に用いたプライマー

名前	塩基配列 (5'-3')
HA080072-F	CTATAAGATGGTGAAGCACCGAGGA
HA080072-R	TCTCGAGCCAGCAACTGGTATG
HA067812-R	GCACCGTCAAGGCTGAGAAC
HA067812-R	TGGTGAAGACGCCAGTGGA

・統計処理

統計学的解析は、GraphPad Prism version 5.01 (GraphPad Software Inc. San Diego, CA) を用いて行った。2 群間の有意差検定は、Students *t*-test により行い、3 群間以上の有意差検定は、Tukey's multiple comparison test により行った。定量的 RT-PCR において、1 回の測定で 3 ウェル測定した。データは平均値を示し、エラーバーは標準偏差を示す。本研究の実験は、3 回の実験の平均値を示す。

・5'-RACE 法による転写開始点の決定

SH-SY5Y 細胞と A549 細胞における β 4GalT3 遺伝子の転写開始点を決定するために、GeneRacer Core Kit (Invitrogen) を用いた 5'-RACE 法により 1st strand cDNA の合成を行った (63, 64, 138, 139)。

(1) RNA の精製

RNeasy Mini Kit (QIAGEN) の実験操作手順書に従い、細胞ペレットから total RNA を回収した。φ100 mm dish に、細胞が集密期になるまで培養した。その後、PBS で 2 回洗浄し、セルスクレーパーを用いて細胞を回収した。これに kit 付属の RLT Buffer 350 μl を加え、試料と等量の 70%エタノールを加えて混和した。この試料を kit 付属の RNeasy スピンカラムにアプライし、4℃で 10,000 rpm、15 秒間遠心した。上清に kit 付属の RPE Buffer 500 μl を重層し、4℃で 10,000 rpm、2 分間遠心した後、再び 4℃で 14,000 rpm、1 分間遠心した。RNeasy スピンカラムに diethylpyrocarbonate 処理水 30 μl を重層し、4℃で 10,000 rpm、1 分間遠心することで RNA を溶出した。得られた RNA 溶液の 260 nm と 280 nm の吸光度を吸光度計 PharmaSpec UV-1700 (島津製作所) を用いて測定し、RNA の定量と純度検定を行った。

(2) RNA の脱リン酸化

回収した total RNA 中の non-mRNA 及び truncated RNA を kit 付属の calf intestinal phosphatase 1 μl を用いて 50℃で 1 時間反応させることで、脱リン酸化を行った。その後、フェノール・クロロホルム沈殿とエタノール沈殿を行った。

(3) mRNA の 5'-キャップ構造の除去

得られた脱リン酸化 RNA 濃縮液に kit 付属 の tobacco acid pyrophosphatase 1 μl を加え、37℃で 1 時間反応させることで、mRNA の 5'-キャップ構造を除去した。その後、フェノール/クロロホルム沈殿とエタノール沈殿を行った。

(4) RNA オリゴ構造の付加

mRNA の 5'-キャップ構造を除去した溶液に kit 付属 の GeneRacer RNA Oligo を加え、65℃で 5 分間反応し、氷上で 90 秒間静置した。その後、T4 RNA ligase 1 μl を加え 37℃、1 時間反応させ、フェノール/クロロホルム沈殿とエタノール沈殿を行った。

(5) 逆転写反応

RNA オリゴ構造の付加処理した溶液 10 μ l に、kit 付属の dNTP Mix 1 μ l を加え、65°C で 5 分間反応した後、氷上で 3 分間静置した。その後、kit 付属の dithiothreitol 1 μ l と kit 付属の SuperScript III Reverse Transcriptase 1 μ l を加え 25°C で 5 分間反応した。次に、50°C で 1 時間、70°C で 15 分間反応した後、氷上で 2 分間静置した。その後、RNase H 1 μ l を混和し、37°C で 20 分間反応させ、1st strand cDNA を得た。

(6) PCR による DNA 断片の増幅

得られた 1st strand cDNA を鋳型として、 β 4GalT3 遺伝子特異的なアンチセンスプライマー TS25-20 (Table 1-2) と、kit 付属の GeneRacer 5'-primer を用い、DNA ポリメラーゼとして Ex Taq (Takara Bio) を加えて 1st PCR を行った。反応は、[(98°C, 10 sec; 65°C, 30 sec; 72°C, 2 min) \times 25 cycles] で行った。

2nd PCR は、1st PCR で得られた産物 (1st PCR products) を鋳型として、 β 4GalT3 遺伝子特異的なアンチセンスプライマー TS25-19 (Table 1-2) と、kit 付属の GeneRacer 5'-Nested primer を用いて行った。DNA ポリメラーゼとして Ex Taq (Takara Bio) を用い、反応は [(98°C, 10 sec; 65°C, 30 sec; 72°C, 2 min) \times 15 cycles] で行った。

1st PCR と 2nd PCR で得られた産物は、アガロースゲル電気泳動とエチジウムブロマイド (EtBr) 染色によって増幅産物を検出した。2nd PCR で得られた産物から検出された約 350 bp の DNA 断片の塩基配列は、pGEM-T Easy Vector (Promega) を用いた TA クローニング、形質転換、及びアルカリ-sodium dodecyl sulfate (SDS) 法によりプラスミド DNA を調製し、塩基配列を解析した。塩基配列の解析は、ユーロフィンジェノミクス株式会社 (Tokyo) に依頼した。

Table 1-2. 5'-RACE で使用したプライマーの配列

位置は、 β 4GalT3 遺伝子の翻訳開始コドンのアデニンを+1 として表記した。

名前	塩基配列 (5'-3')	位置
TS25-19	ATGACAGCCAGCTGGGAGCCCACAA	1,466 to 1,490
TS25-20	ACTGTAGACATCACGAGGGTGAGAA	1,566 to 1,590

第 3 節 結果

1. ヒト癌細胞における $\beta 4\text{GalT3}$ 遺伝子の発現量の解析

定量的 RT-PCR により、4 種類の癌細胞株における $\beta 4\text{GalT3}$ 遺伝子の発現レベルを解析した。SH-SY5Y 細胞における $\beta 4\text{GalT3}$ 遺伝子の発現レベルは、A549 細胞、MKN1 細胞、及び SW480 細胞よりも、それぞれ 7.7 倍、3.9 倍、及び 5.8 倍高かった (Fig. 1-1)。解析した細胞株の中で $\beta 4\text{GalT3}$ 遺伝子の発現レベルが最も低い A549 細胞を、SH-SY5Y 細胞の比較対照として以降の研究を行った。

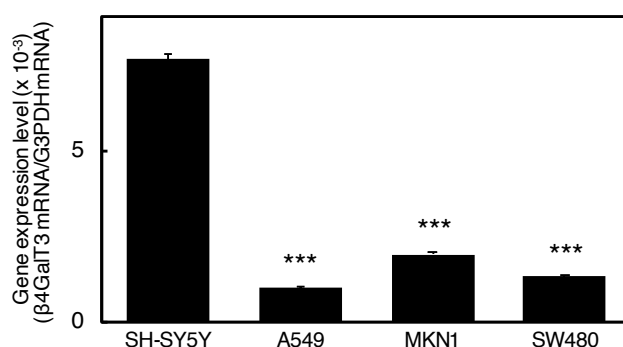


Fig. 1-1. 各種癌細胞における $\beta 4\text{GalT3}$ 遺伝子の発現量の解析

SH-SY5Y 細胞、A549 細胞、MKN1 細胞、及び SW480 細胞の totalRNA を用いて、定量的 RT-PCR を行った。遺伝子発現量は、 $\Delta\Delta\text{Ct}$ 法により、内部標準としたそれぞれのサンプルの G3PDH 遺伝子の発現量で補正した。全ての実験の値は、3 回の実験の平均値を示す。エラーバーは、標準偏差を示す。*** $p < 0.001$ vs. SH-SY5Y 細胞。

2. 転写開始点の決定

SH-SY5Y 細胞と A549 細胞における $\beta 4\text{GalT3}$ 遺伝子の転写開始点を決定するために、5'-RACE 法により、完全長 cDNA を得た。次に、kit 付属のプライマーと $\beta 4\text{GalT3}$ 遺伝子の塩基配列に特異的なプライマー TS25-19 及び TS25-20 を用いて 2 回の PCR を行い (Table 1-2) (Fig. 1-2A)、得られた DNA 断片の塩基配列を解析した。Fig. 1-2B は、各 PCR 産物をアガロースゲルにアプライし、電気泳動を行った後、EtBr を用いて染色し、UV 照射することによって可視化した写真である。両細胞において、2nd PCR で特異的な DNA 断片を 350 bp 付近に検出した (Fig. 1-2B)。本博士論文では、主要な

バンド (350 bp) の解析を行った。2nd PCR 産物はゲルから切り出して DNA を回収し、pGEM-T Easy Vector に組込んで塩基配列を解析した。その結果、SH-SY5Y 細胞と A549 細胞の両細胞において、転写開始点は翻訳開始コドンから 5'-上流 234 bp に位置した (Fig. 1-2C)。これらの結果から、両細胞で β 4GalT3 遺伝子の転写開始点は同じ位置であることが判明した。本博士論文では、以降の β 4GalT3 遺伝子の 5'-上流領域の塩基配列は転写開始点を+1 として表記した。

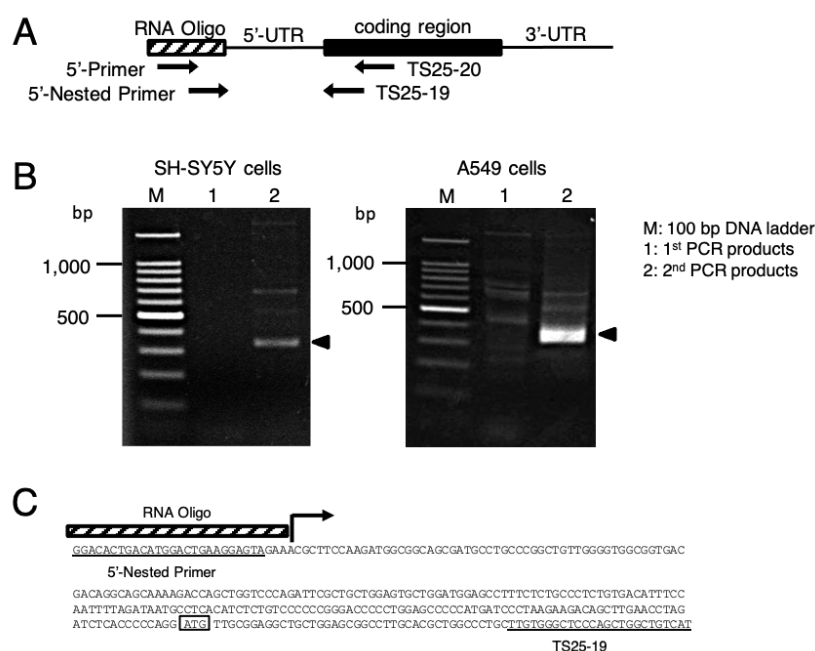


Fig. 1-2. β 4GalT3 遺伝子の転写開始点の決定

A: 5'-RACE-PCR で使用したプライマーの模式図

UTR は非翻訳領域を示す。

B: アガロースゲル中の 5'-RACE-PCR 産物を EtBr により染色した結果

ゲル上部に示したレーン 1 は、5'-primer と TS25-20 を用いた 1st PCR の結果である。また、レーン 2 は、5'-Nested Primer と TS25-19 を用いた 2nd PCR の結果である。◀は、特異的に増幅された DNA 断片を示す。

C: 5'-RACE-PCR 産物の塩基配列の解析結果

2nd PCR 産物から回収した DNA 断片の塩基配列を示す。下線部の配列は、2nd PCR に用いた 5'-Nested primer と TS25-19 を示す。上部に斜線のある配列は、 β 4GalT3 の cDNA に結合した GENE Racer RNA Oligo を示す。四角で囲った ATG は、翻訳開始コドンを示す。矢印は、転写開始点を示す。

3. β 4GalT3 遺伝子の 5'-UTR (untranslated region) の解析

解析した mRNA の塩基配列と、データベースに登録のあるゲノム DNA (Accession number: AL590714) の配列を比較することで、増幅された β 4GalT3 DNA 断片は選択的スプライシングを受けていることを見出した (Fig. 1-3)。したがって、転写開始点は翻訳開始コドンから 5'-上流 1440 bp に位置すると考えられる。全てのイントロンの塩基配列は、GT で始まり AG で終わる GT-AG ルールが適用されており (140)、 β 4GalT3 遺伝子の 5'-UTR は、3 個のエキソンと 2 個のイントロンから構成されることが判明した。また、両細胞から得られた β 4GalT3 DNA 断片の塩基配列が同一であったことから、SH-SY5Y 細胞及び A549 細胞において同様のスプライシングが行われていることが示唆された。

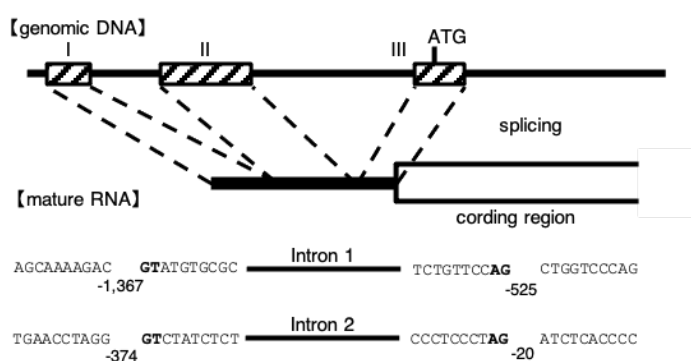


Fig. 1-3. β 4GalT3 遺伝子の 5'-上流領域のゲノム構成の模式図

5'-RACE 法により得られた、成熟 mRNA の塩基配列を示す。下付き文字で示した数字は、翻訳開始コドンのアデニンを+1 とした位置を示す。黒斜線の box は、エキソンを示す。

第 4 節 考察

$\beta 4\text{GalT3}$ 遺伝子について、ヒト正常組織における発現分布はすでに報告されており、特に、胎児の脳、肺、肝臓、及び腎臓で高く発現していることが示された (68)。4 種類の癌細胞を用いて、 $\beta 4\text{GalT3}$ 遺伝子の発現量を解析した。その結果、 $\beta 4\text{GalT3}$ 遺伝子は、SH-SY5Y 細胞で最も高い発現量を示した (Fig. 1-1)。一方で、SW480 細胞における $\beta 4\text{GalT3}$ 遺伝子の発現量は低く、SH-SY5Y 細胞の 17%であった (Fig. 1-1)。 $\beta 4\text{GalT3}$ 遺伝子は、大腸癌組織で発現が減少することが報告されているため (71)、4 種類の癌細胞の中では、比較的発現量が低かったと考えられる。

5'-RACE 法で決定したヒト $\beta 4\text{GalT3}$ 遺伝子の主要な転写開始点は、SH-SY5Y 細胞と A549 細胞で同一であった。その他の転写制御が明らかとなっているヒト $\beta 4\text{GalT1}$ 、 $\beta 4\text{GalT2}$ 、 $\beta 4\text{GalT4}$ 、及び $\beta 4\text{GalT5}$ 遺伝子の転写開始点は、 $\beta 4\text{GalT4}$ 以外は 1 ヶ所に収束する (61, 62, 64)。当研究室の Sugiyama は、 $\beta 4\text{GalT4}$ 遺伝子の複数の転写開始点を SH-SY5Y 細胞及び A549 細胞で同定し、それらのいくつかは異なる位置にあることを示した (63)。また、ヒト $\beta 4\text{GalT4}$ 遺伝子では癌細胞種によって複数のスプライシングバリエントを生成することが見出されている (63)。多重配列比較を用いた系統発生分析によって、 $\beta 4\text{GalT3}$ はアミノ酸レベルで他の $\beta 4\text{GalT}$ ファミリーメンバーよりも $\beta 4\text{GalT4}$ と高い類似性を共有することが示されている (141)。しかし、系統樹の近縁種であっても、 $\beta 4\text{GalT3}$ と $\beta 4\text{GalT4}$ では用いられている転写開始点やスプライシングバリエントの数が異なると考えられる。

一般に、5'-UTR は組織特異的な発現と遺伝子の翻訳効率の調節に関与している (142)。多くの遺伝子が複数のスプライシングバリエントを発現し、これらの領域の不適切な発現が発癌に寄与することが示唆されている。ヒト $\alpha 1,2$ -フコース転移酵素、 $\alpha 1,3$ -フコース転移酵素 4、 $\alpha 2,6$ -シアル酸転移酵素 I、及び $\alpha 2,3$ -シアル酸転移酵素 IV の遺伝子発現パターンは、5'-UTR におけるエキソンのさまざまな組み合わせが組織特異的なグリコシル化パターンと関連している (143–146)。また、 $\alpha 1,2$ -フコース転移酵素の転写開始点は癌細胞種によって異なっている (143)。一方、 $\beta 4\text{GalT}$ ファミリーは、本研究で報告する $\beta 4\text{GalT3}$ のみ複数の細胞を用いての転写制御が解析されており、後述するが、 $\beta 4\text{GalT3}$ は、細胞種によって転写を制御する転写因子が異なっている。転写開始点やスプライシングバリエントが 1 種類の場合、細胞種による転写制御の違いは、転写因子の違い等に起因する可能性が考えられる。

第 2 章

β 4GalT3 遺伝子の 5'-上流領域のプロモーター領域の解析と 結合する転写因子の特定

第 1 節 緒言

1986 年に β 4GalT1 遺伝子が単離され、その後、 β 4GalT1 との相同性の高い順に β 4GalT2、 β 4GalT3、 β 4GalT4、 β 4GalT5、 β 4GalT6、及び β 4GalT7 がファミリーとして発見された。そのうち転写制御の解析が行われているのは、ヒト β 4GalT1、 β 4GalT2、 β 4GalT4、及び β 4GalT5 である (61–64)。しかし、 β 4GalT3 遺伝子の 5'-上流領域の単離は行われておらず、転写制御メカニズムは未だ明らかになっていない。第 2 章では、第 1 章で決定した β 4GalT3 遺伝子の転写開始点から 5'-上流領域約 2.3 kb を単離した。単離した 5'-上流領域をルシフェラーゼ遺伝子上流に組込んだ各種デリーションコンストラクトを用いて、 β 4GalT3 遺伝子のプロモーター領域の解析を行った。特定したプロモーター領域の配列を TFBIND プログラムにより解析し、結合しうる転写因子の検索を行った。その結果をもとに、クロマチン免疫沈降法によりプロモーター領域に結合する転写因子を特定した。

第2節 材料と方法

・ヒトβ4GalT3 遺伝子の 5'-上流領域の単離とレポータープラスミドの構築

設計したプライマーは全て、DNA データベースに登録のあるヒト β4GalT3 遺伝子を含むゲノム DNA (Accession number: AL590714) の塩基配列に基づいて設計し、作製した。また、これらのプライマーの配列は、Table 2-1 に示した。5'-上流領域 -2190/-595 を増幅する 5'末端に KpnI 部位を付加したプライマー TS28-38 と、TS28-41 を設計した。また、-645/+89 を増幅する TS24-5 と 3'末端に HindIII 部位を付加した TS27-35 を設計した。次に、ヒト血球細胞由来ゲノム DNA (Clontech) を鋳型に用いて PCR を行った。得られた PCR 産物を塩基配列解析のため pGEM-T Easy vector に組込み、pGEM(-2190/-595) と pGEM(-645/+89) を得た。この2種類のプラスミドを、それぞれ KpnI と HpaI、HpaI と HindIII で消化し、β4GalT3 遺伝子の 5'-上流領域 -2190/+89 を pGL3 Basic Vector (Promega) に組込み、レポータープラスミド pGL(-2190/+89) を得た (Fig. 2-1)。pGL3-Basic vector はホタル由来ルシフェラーゼ遺伝子を含んでおり、ルシフェラーゼ活性を測定することでプロモーター活性を解析した。

Table 2-1. β4GalT3 遺伝子 5'-上流領域の単離とプラスミドの作製に用いたプライマー
塩基配列の下線部は、括弧内に示した制限酵素認識部位を示す。

名前	塩基配列 (5'-3')	位置
TS24-5	ACAATATGCTAGGCGGTAGTGTTC	-645/-621
TS27-35	CCA <u>AAGCTTT</u> TCCCAGCGCACATACCTGGTC (HindIII)	+69/+89
TS28-38	GGG <u>GTA</u> CCCTAAGGTAGGTGGATCATGAGG (KpnI)	-2,190/-2,169
TS28-41	ATTGAAGGTGGAGGGAAAGACAGCGTCTTC	-542/-513

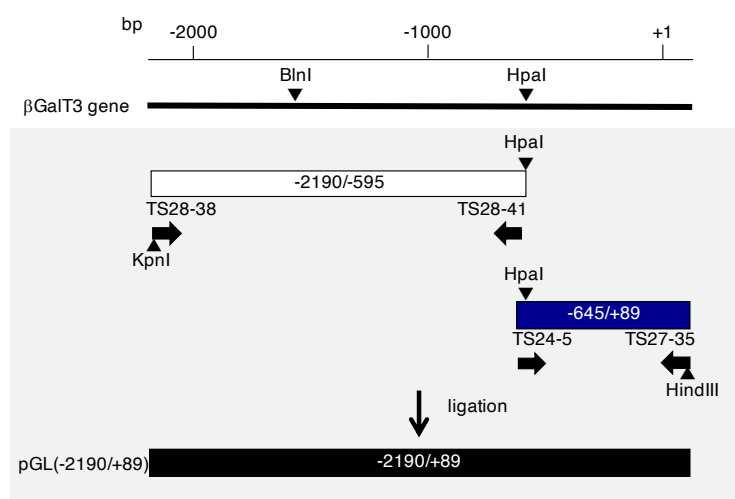


Fig. 2-1. $\beta 4\text{GalT3}$ 遺伝子の 5'-上流領域の単離方法の概略

ヒト血球細胞由来ゲノム DNA を鋳型に PCR を行い、 $\beta 4\text{GalT3}$ 遺伝子の 5'-上流領域 (-2190/-595) と (-645/+89) を増幅し、それぞれ、pGEM-Teasy Vector に組込んだ。次に、これらのベクターを、制限酵素で消化して組換え、レポータープラスミド pGL(-2190/+89) を得た。図中の▼は、制限酵素認識部位を示す。矢印は、使用したプライマーを示す。

・ $\beta 4\text{GalT3}$ 遺伝子の 5'-上流領域デリーションコンストラクトの作製

上記の《 $\beta 4\text{GalT3}$ 遺伝子の 5'-上流領域の単離とレポータープラスミドの構築》で得られた pGL(-2190/+89) を、5'末端側に付加した KpnI と BlnI (-1568/-1563) で消化することで、pGL(-1567/+89) を得た (Fig. 2-2)。同様に、pGL(-2190/+89) を、5'末端側に付加した KpnI と PmaCI (-1148/-1143) で消化することで、pGL(-1145/+89) を得た (Fig. 2-2)。また、上記の《 $\beta 4\text{GalT3}$ 遺伝子の 5'-上流領域の単離とレポータープラスミドの構築》の経過で得られた pGEM(-645/+89) を、マルチクローニングサイト中の制限酵素と HpaI (-598/-593) で消化することで、pGL(-595/+89) を得た (Fig. 2-2)。さらに、5'-上流領域 -140/+89、-30/+89、及び -5/+89 を増幅するプライマー TS27-34、TS29-5、TS29-6、TS29-9 を設計し、それぞれのプライマーの 5'末端に KpnI 部位を、3'末端に HindIII 部位を付加した (Table 2-2) (Fig. 2-3)。上記の $\beta 4\text{GalT3}$ 遺伝子の 5'-上流領域の単離で得られた pGL(-2190/+89) を鋳型に用いて、PCR を行った。得られた PCR 産物を KpnI と HindIII で消化し、pGL3 Basic Vector に組込み、pGL(-140/+89)、pGL(-69/+89)、pGL(-30/+89)、及び pGL(-5/+89) を得た (Fig. 2-3)。

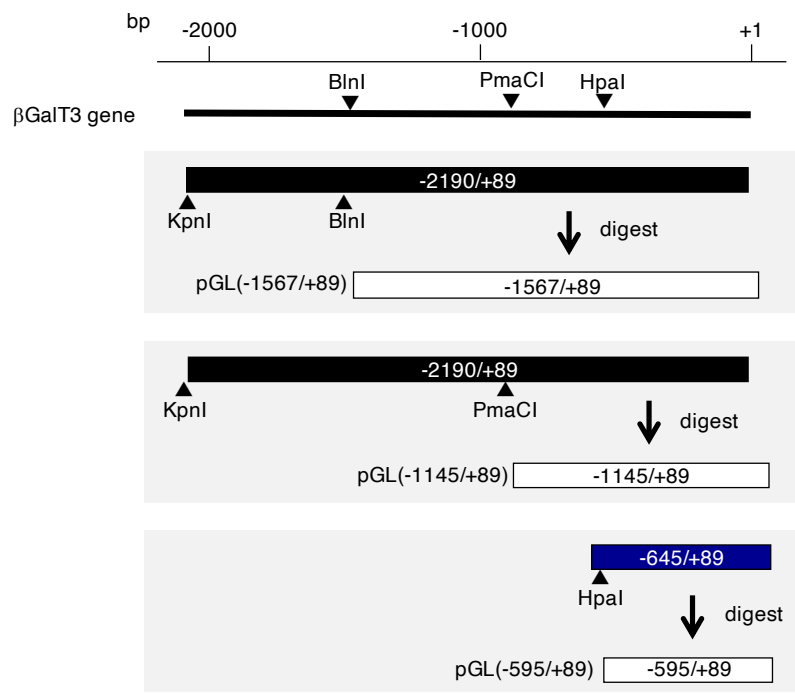


Fig. 2-2. β GalT3 遺伝子の 5'-上流領域デリーションコンストラクト作製の概略 (1)

作製した pGL(-2190/+89) を、図中に表記した制限酵素で消化し、pGL(-1567/+89) 及び pGL(-1145/+89) を得た。さらに、〈Fig. 2-1. β GalT3 遺伝子の 5'-上流領域の単離方法の概略〉で示した DNA 断片 (-645/+89) を、HpaI とマルチクローニングサイト中の制限酵素 HindIII で消化して組換え、pGL(-595/+89) を得た。図中の▼は、制限酵素認識部位を示す。

Table 2-2. β GalT3 遺伝子 5'-上流領域デリーションコンストラクト作製に用いたプライマー塩基配列の下線部は、括弧内に示した制限酵素認識部位を示す。

名前	塩基配列 (5'-3')	位置
TS27-34	GG <u>GGTACCCG</u> TTCCAGGTGGGCAGGCTCAG (KpnI)	-140/-120
TS29-5	GGGGT <u>ACCC</u> TAGTCAGCCCGGTGGCTCC (KpnI)	-69/-48
TS29-6	GGGGT <u>ACCC</u> ATGACGCGAGACCCGCCCCC (KpnI)	-30/-8
TS29-9	GGGGT <u>ACCG</u> CGCCCGCTTCCAAGATGGCGG (KpnI)	-5/+7

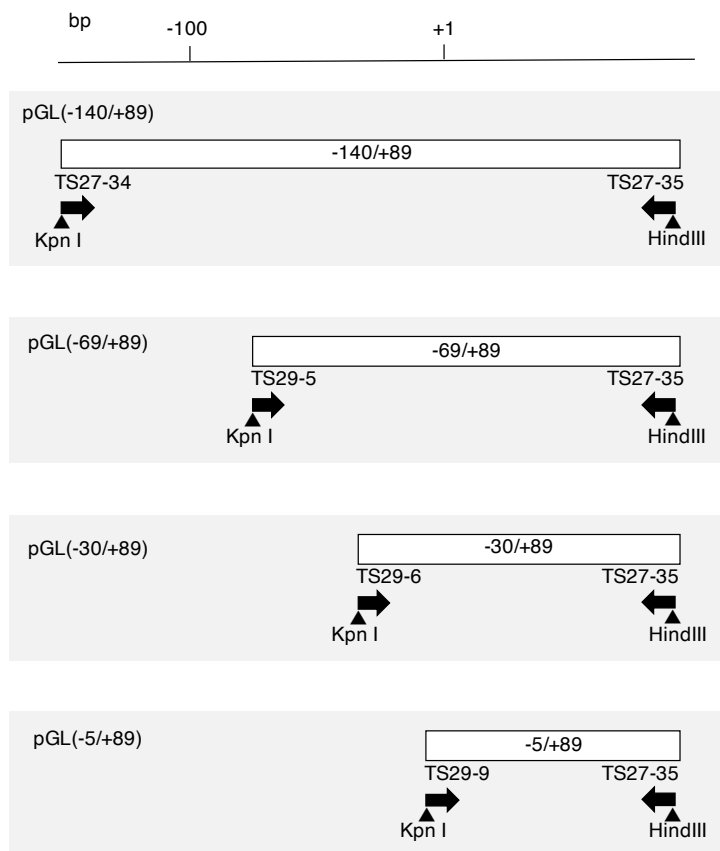


Fig. 2-3. $\beta 4\text{GalT3}$ 遺伝子の 5'-上流領域デリーションコンストラクト作製の概略 (2)

作製したレポータープラスミド pGL(-2190/+89) を鋳型に、図中に表記したプライマーを用いて PCR を行い、pGL3-Basic Vector に組込んで各レポータープラスミドを得た。図中の ▼ は、制限酵素認識部位を示す。矢印は、使用したプライマーを示す。

・ $\beta 4\text{GalT3}$ 遺伝子のプロモーター領域の解析

第 2 章で得られた 8 種のレポータープラスミド pGL(-2190/+89)、pGL(-1567/+89)、pGL(-1145/+89)、pGL(-595/+89) pGL(-140/+89)、pGL(-69/+89)、pGL(-30/+89)、及び pGL(-5/+89) を用いて、後述する《細胞への形質導入用プラスミド DNA の調製》、《培養細胞への遺伝子導入》、及び《ルシフェラーゼアッセイ》にしたがって、プロモーター活性を解析した。

・細胞への形質導入用プラスミド DNA の調製

QIAGEN® Plasmid Midi Kit (QIAGEN) の実験操作手順書に従い、培養細胞への遺伝子導入用のプラスミド DNA を調製した。得られたプラスミド DNA 溶液の 260 nm と 280 nm の吸光度を吸光光度計 PharmaSpec UV-1700 (島津製作所) により測定し、プラスミド DNA の定量と純度検定を行った。

・培養細胞への遺伝子導入

トランスフェクション試薬 X-tremeGENE HP DNA Transfection Reagent (Roche) の実験操作手順書に従い、各細胞にそれぞれのプラスミド DNA を導入した。φ35 mm dish に 1×10^5 個の細胞を播種し、37°C、5% CO₂ 条件下で 24 時間培養した。培養後、トランスフェクションの直前に培地交換を行い、トランスフェクション用細胞を得た。1.5 ml エッペンドルフチューブに DMEM 97 μl 及び X-tremeGENE HP DNA Transfection Reagent 3 μl を加えて、ピペッティングにより混和し、室温で 5 分間静置した。次に、あらかじめ新しい 1.5 ml エッペンドルフチューブにプラスミド DNA 溶液 1 μg 及び ウミシイタケ由来ルシフェラーゼレポータープラスミド pRL-TK 0.1 μg が入った試料に、DMEM と X-tremeGENE HP DNA Transfection Reagent の混合溶液を滴下によって移し、室温で 20 分間静置した。この試料をピペッティングにより混和した後、全量をトランスフェクション用細胞に添加し、φ35 mm dish を振盪することで溶液を均一化した。

・ルシフェラーゼアッセイ

Dual-Luciferase Reporter Assay System (Promega) の実験操作手順書に従い、レポータープラスミドを導入した細胞のルシフェラーゼ活性を測定した (63, 64, 147)。はじめに、氷上でトランスフェクション後 48 時間培養した細胞を含む dish から培養液を除き、氷冷した PBS で細胞を 2 回洗浄した。この dish に kit 付属の 1×PLB (細胞溶解液) を加えて細胞を剥離し、液体窒素に浸して凍結させ、37°C の恒温槽に静置して融解させた。この凍結融解を計 2 回行い、細胞懸濁液を得た。細胞懸濁液を、kit 付属の LARII 50 μl を入れたルミノメーターチューブに加え、Luminescence PSN AB-2200 (アトー株式会社) を用いて、試料中のホタル由来ルシフェラーゼ活性を測定した。なお、得られたホタル由来ルシフェラーゼ活性は、遺伝子導入効率の補正のためにウミ

シイタケ由来ルシフェラーゼ活性及びBCA (Bicinchoninic acid) (Thermo Fisher Scientific, Inc.) 法により求めた各試料に含まれるタンパク質量で補正した。

・クロマチン免疫沈降法 (chromatin immunoprecipitation assay: ChIP assay)

ChIP assay は、Chromatin Immunoprecipitation Assay Kit (Upstate) の実験操作手順書に従い、SH-SY5Y 細胞と A549 細胞における β 4GalT3 遺伝子のプロモーター領域に結合する転写因子を解析した (147)。

(1) DNA-タンパク質の架橋

両細胞 1×10^6 cells を ϕ 10 cm dish に播種し、24 時間培養後、1%ホルムアルデヒド (富士フィルム和光純薬株式会社) を含む培地に交換し、37°C、10 分間静置することで細胞内の DNA-タンパク質結合を固定した。

(2) 細胞溶解とクロマチン断片化

固定化した細胞を回収し、kit 付属の SDS lysis buffer (1% SDS, 10 mM EDTA、及びタンパク質分解酵素阻害剤を含む 50 mM Tris-HCl 溶液 (pH 8.1)) 200 μ l にタンパク質-DNA 複合体を溶解し、氷上で 10 分間静置した。溶解液を Model UCD-200 ultrasonic generator (東湘電気) を用いて 4°C で超音波破碎 (200 W で 30 秒間、4 回) した後に、4°C で 13,000 rpm、10 分間遠心して上清を回収し、タンパク質-DNA 溶解液を得た。この溶解液の容量を、kit 付属の ChIP dilution buffer (0.01% SDS、1% Triton X-100、2 mM EDTA、167 mM NaCl、及びタンパク質分解酵素阻害剤を含む 16.7 mM Tris-HCl 溶液 (pH 8.1)) で 10 倍に希釈した。

(3) 免疫沈降法

希釈溶液 1 ml に対し、抗 Sp1 抗体 (Santa Cruz Biotechnology Inc.) もしくは抗 Sp3 抗体 (Santa Cruz Biotechnology Inc.) を 2.5 μ g 相当を加えて 4°C、18 時間反応させた。ネガティブコントロールとして、ウサギ IgG (Santa Cruz Biotechnology Inc.) を使用した。

(4) 溶出、脱架橋及び DNA 精製

反応溶液に kit 付属の protein A-agarose/salmon sperm DNA (50% slurry) 30 μ l を加え、4°C で 1 時間反応させ、抗体-タンパク質-DNA 複合体溶液を得た。この溶液を、4°C で 1,000 rpm、1 時間遠心した後に、上清を除去した。次に、Table 2-3 に示す kit 付属の low salt wash buffer、high salt wash buffer、LiCl wash buffer、及び TE buffer 500 μ l をそれぞれ記載した順番に (1 液ずつ) 加えて 5 分間洗浄し、遠心、上清を除去する作業を繰り返し行った。最後の洗浄液 TE buffer を用いた洗浄のみ 2 回行った。洗浄した試料に溶出液 (1% SDS を含む 0.1 M NaHCO₃ 溶液) 125 μ l を加え、室温で 15 分間反応した後、遠心して上清中にタンパク質-DNA-複合体を回収した。この操作を回収液がおよそ 500 μ l になるまで繰り返した後、5 M NaCl 10 μ l を加え 65°C で 12 時間反応させた。反応溶液中のタンパク質を、proteinase K を加えて 45°C で 1 時間静置することで消化した。DNA はフェノール/クロロホルム抽出と、キャリアとしてグリコーゲンを用いたエタノール沈殿によって精製した。

(5) PCR によるプロモーター領域の増幅

精製した DNA を鋳型に、2 ヶ所の Sp1/3 結合部位を含む β 4GalT3 遺伝子のプロモーター領域を増幅するように設計したプライマー TS26-9 及び TS26-10 を用いて、PCR を行った。設計したプライマーの配列は、Table 2-4 に示した。DNA ポリメラーゼとして KOD plus (TOYOBO) を用いて PCR を行い、得られた PCR 産物は、アガロースゲル電気泳動と EtBr 染色により増幅産物を検出した。

Table 2-3. 洗浄液の組成

溶液名	組成
low salt wash buffer	0.1% SDS, 1% Triton X-100, 2 mM EDTA, 及び 150 mM NaCl を含む 20 mM Tris- HCl 溶液 (pH 8.0)
high salt wash buffer	0.1% SDS, 1% Triton X-100, 2 mM EDTA, 及び 500 mM NaCl を含む 20 mM Tris- HCl 溶液 (pH 8.0)
LiCl wash buffer	0.25 M LiCl, 1% Igepal CA-630, 1% sodium deoxycholate, 及び 1 mM EDTA を含む 10 mM Tris- HCl 溶液 (pH 8.1)
TE buffer	1 mM EDTA を含む 10 mM Tris-HCl 溶液 (pH 8.0)

Table 2-4. ChIP に用いたプライマー

名前	塩基配列 (5'-3')	位置
TS26-9	TCGCCTACAACGCGTTCCAG	-152 to -133
TS26-10	CGCATTTCCCAGCGCACATAC	74 to 93

第 3 節 結果

1. ヒトβ4GalT3 遺伝子の 5'-上流領域の単離

β4GalT3 遺伝子の 5'-上流領域約 2.3 kb を単離するために、設計したプライマーの TS28-38 と TS28-41、TS24-5 と TS27-35 を用いて PCR により -2190/-595 と -645/+89 を増幅し、pGEM-T Easy vector に組込んだ。プライマーの塩基配列は、Table 2-1 に示した。単離した DNA 断片の塩基配列解析を行い、DNA データベースに登録のある β4GalT3 遺伝子の 5'-上流領域 (Accession number: AL590714) と同一であることを確認した。両 DNA 断片を pGL3-Basic vector 中のルシフェラーゼ遺伝子上流に組み込み、レポータープラスミド pGL(-2190/+89) を作製した (転写開始点を+1 とした位置) (Fig. 2-1)。

2. β4GalT3 遺伝子の 5'-上流領域デリーションコンストラクトの作製

β4GalT3 遺伝子の 5'-上流領域 -2190/+89 の配列において制限酵素認識部位を検索した結果、BlnI 部位が-1568/-1563 に、PmaCI 部位が-1148/-1143 に、HpaI 部位が-598/-593 に存在した (Fig. 2-2)。これらの部位とベクターのマルチクローニングサイトを利用して 5'-上流領域のデリーションコンストラクトを作製し pGL(-1567/+89)、pGL(-1145/+89)、及び pGL(-595/+89) とした (Fig. 2-2)。さらに、設計したプライマーの TS28-38 と TS27-35、TS29-5 と TS27-35、TS29-6 と TS27-35、TS29-9 と TS27-35 を用いて PCR により -140/+89 と -69/+89、-30/+89、及び -5/+89 を増幅した (Fig. 2-3)。次に、それぞれの DNA 断片は KpnI と HindIII を用いて消化し、pGL3-Basic vector に組み込み、デリーションコンストラクト pGL(-140/+89)、pGL(-69/+89)、pGL(-30/+89)、及び pGL(-5/+89) を作製した (Fig. 2-3)。

3. β4GalT3 遺伝子のプロモーター領域の特定

第 2 章で得られた 7 種のレポータープラスミドコンストラクト pGL(-2190/+89)、pGL(-1567/+89)、pGL(-1145/+89)、pGL(-595/+89)、pGL(-140/+89)、pGL(-69/+89)、及び pGL(-5/+89) を用いて (Fig. 2-4A)、ルシフェラーゼアッセイによりプロモーター活性を測定した。SH-SY5Y 細胞と A549 細胞の両細胞において、pGL(-69/+89) は比較的高いプロモーター活性を示したが、5'-上流領域 -2190 と -6 の間の領域を欠損した pGL(-5/+89) ではプロモーター活性が著しく低下した (Fig. 2-4B)。したがって、5'-上流領域 -69 と -6 の間の領域が、β4GalT3 遺伝子のプロモーター領域であると考えた。

これらの結果は、SH-SY5Y 細胞及び A549 細胞における β 4GalT3 遺伝子の転写に同じプロモーター領域が利用されることを示す。また、pGL(-2190/+89) のプロモーター活性を 100%とした場合、SH-SY5Y 細胞における pGL(-595/+89) 、pGL(-140/+89)、及び pGL(-69/+89) のプロモーター活性は、それぞれ 187%、119%、199%を示し (Fig. 2-4B, SH-SY5Y cells)、A549 細胞における活性はそれぞれ 76%、108%、72%を示した (Fig. 2-4B, A549 cells)。これらの結果から、 β 4GalT3 遺伝子の 5'-上流領域 -595 から -141 及び -140 と -70 の間の領域には、細胞種によって異なる転写調節因子が関与する可能性が示唆された。

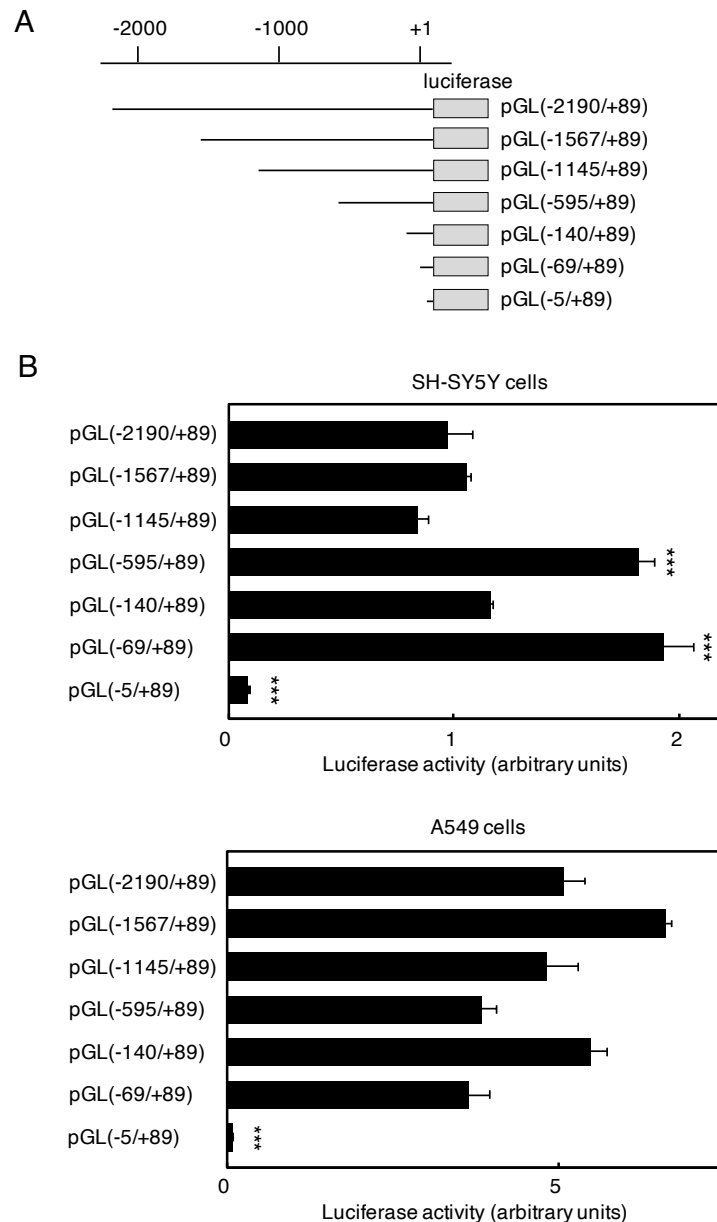


Fig. 2-4. β 4GalT3 遺伝子のプロモーター領域の解析

A: β 4GalT3 遺伝子の 5'-上流領域のデリーションコンストラクトの模式図

+1 は、転写開始点を示す。

B: 各デリーションコンストラクトのプロモーター活性

SH-SY5Y 細胞と A549 細胞を 24 時間培養した後、各種デリーションコンストラクトを導入した。その後、48 時間培養し、ルシフェラーゼアッセイによりプロモーター活性を測定した。ルシフェラーゼ活性は、それぞれのサンプルのタンパク質量及びウミシイタケ由来ルシフェラーゼ活性による遺伝子導入率で補正した。全ての実験の値は、3 回の実験の平均値を示す。エラーバーは、標準偏差を示す。*** $p < 0.001$ vs. pGL(-2190/+89)。

4. β 4GalT3 遺伝子のプロモーター領域に結合しうる転写因子の検索

β 4GalT3 遺伝子の 5'-上流領域 -69 と -6 の間のプロモーター領域を TFBIND プログラム (148) で検索したところ、 β 4GalT3 遺伝子の 5'-上流領域 -39/-30 と -19/-10 に類似性スコアの高い 2 ヶ所の Sp1/3 結合部位が存在し (Fig. 2-5A)、それぞれのスコア値は、0.97 と 1.00 であった (Fig. 2-5B)。2 ヶ所の Sp1/3 結合部位の塩基配列は、Table 2-5 に示した。Sp1/3 結合部位の機能を解析するために、上流の Sp1/3 結合部位 (-39/-30) を欠損したレポーターコンストラクト pGL(-30/+89) を新たに作製した (Fig. 2-6A)。作製した pGL(-30/+89) を導入した場合のプロモーター活性は、2 ヶ所の Sp1/3 結合部位を含む pGL(-60/+89) と比較して有意に減少した (Fig. 2-6B)。pGL(-69/+89) のプロモーター活性を 100% とした場合、SH-SY5Y 細胞における pGL(-30/+89) 及び pGL(-5/+89) のプロモーター活性は、それぞれ 59% と 5% まで減少し (Fig. 2-6B, SH-SY5Y)、A549 細胞におけるプロモーター活性は、それぞれ 71% と 3% まで減少した (Fig. 2-6B, A549)。これらの結果は、両方の Sp1/3 結合部位が β 4GalT3 遺伝子のプロモーター活性に重要な役割を果たしていることを示しており、Sp1 か Sp3 のどちらか、もしくは Sp1 と Sp3 の両方は、SH-SY5Y 細胞及び A549 細胞における β 4GalT3 遺伝子の転写に関与することが示唆された。

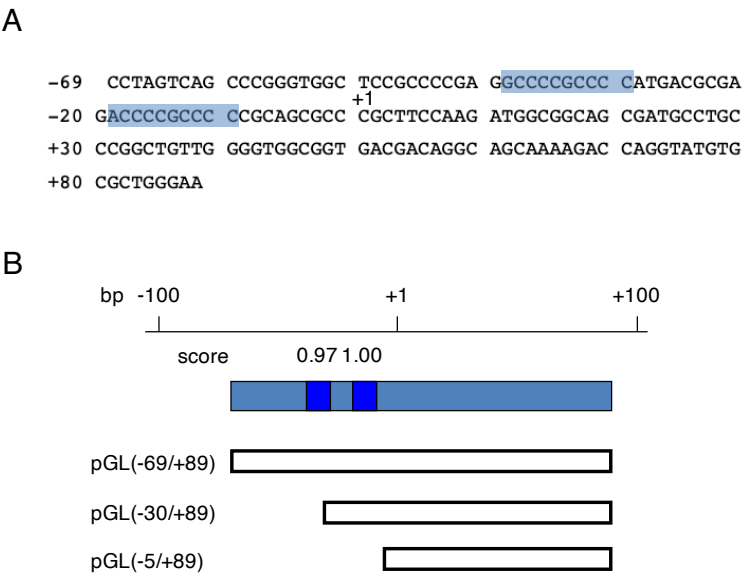


Fig. 2-5. $\beta 4\text{GalT3}$ 遺伝子の 5'-上流領域に存在する Sp1/3 結合部位

A: $\beta 4\text{GalT3}$ 遺伝子の 5'-上流領域の塩基配列と Sp1 結合部位の位置

+1 は、転写開始点を示す。青い box は、Sp1/3 結合部位を示す。塩基配列は、データベースに登録した Accession number: AB828104 を引用した (Tange, R. and Sato, T., 19-JUN-2013)。

B: $\beta 4\text{GalT3}$ 遺伝子の 5'-上流領域中の Sp1/3 結合部位の位置とスコア値

2 ヶ所の Sp1 結合部位 (-39/-30、-19/-10) の予測は、TFBIND によって解析した。青い box は、Sp1/3 結合部位を示す。

Table 2-5. $\beta 4\text{GalT3}$ 遺伝子のプロモーター領域に含まれる Sp1/3 結合部位の配列と位置

Sp1/3 結合部位の予測は、TFBIND プログラムによって解析した。コンセンサス配列中の R は A か G、W は A か T のどちらでも当てはまりうることを表している。位置は、転写開始点を +1 とした位置を示す。

コンセンサス配列	$\beta 4\text{GalT3}$ 遺伝子配列	位置	スコア値
GRGGCRGGGW	GGCCCGCCCC	-39/-30	0.97
	ACCCCGCCCC	-19/-10	1.00

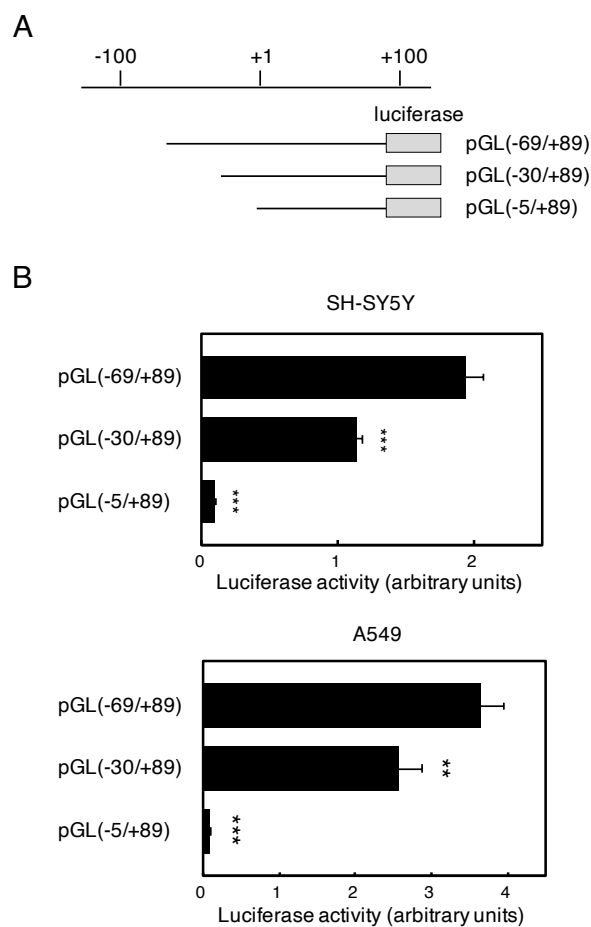


Fig. 2-6. β 4GalT3 遺伝子のプロモーター領域の解析

A: β 4GalT3 遺伝子の 5'-上流領域のデリーションコンストラクトの模式図

+1 は、転写開始点を示す。

B: 各デリーションコンストラクトのプロモーター活性

SH-SY5Y 細胞と A549 細胞を 24 時間培養した後、各種デリーションコンストラクトを導入した。その後、48 時間培養し、ルシフェラーゼアッセイによりプロモーター活性を測定した。ルシフェラーゼ活性は、それぞれのサンプルのタンパク質量及びウミシイタケ由来ルシフェラーゼ活性による遺伝子導入率で補正した。全ての実験の値は、3 回の実験の平均値を示す。エラーバーは、標準偏差を示す。*** $p < 0.001$ 、** $p < 0.01$ vs. pGL(-69/+89)。

5. β 4GalT3 遺伝子のプロモーター領域への Sp1 と Sp3 の結合の解析

β 4GalT3 遺伝子のプロモーター領域に結合する転写因子を特定するために、クロマチン免疫沈降法による解析を行った。予測された2ヶ所の Sp1/3 結合部位を含む β 4GalT3 遺伝子のプロモーター領域 (245 bp) を増幅するプライマーTS26-9 と TS26-10 を設計し、免疫沈降したクロマチンから調製したDNAを鋳型にしてPCRを行った (Table 2-4, Fig. 2-7A)。その結果、抗 Sp3 抗体を用いて SH-SY5Y 細胞からクロマチン免疫沈降で得た DNA を鋳型にした場合に、PCR によってプロモーター領域が特異的に増幅されたバンドが 245 bp に検出された (Fig. 2-7B)。しかし、抗 Sp1 抗体及び対照としてウサギ IgG を用いたクロマチン免疫沈降で得た DNA を鋳型にした場合には、バンドは検出されなかった (Fig. 2-7B)。一方、抗 Sp1 抗体を用いて A549 細胞からクロマチン免疫沈降で得た DNA を鋳型にした場合に、PCR によってプロモーター領域が特異的に増幅されたバンドが 245 bp に検出された (Fig. 2-7B)。しかし、抗 Sp3 抗体及び対照としてウサギ IgG を用いたクロマチン免疫沈降で得た DNA を鋳型にした場合には、バンドは検出されなかった (Fig. 2-7B)。したがって、 β 4GalT3 遺伝子のプロモーター領域に SH-SY5Y 細胞では Sp3 が、一方 A549 細胞では Sp1 が結合することが判明した。これらの結果から、細胞種によって β 4GalT3 遺伝子のプロモーター領域に結合する転写因子が異なる可能性が示唆された。

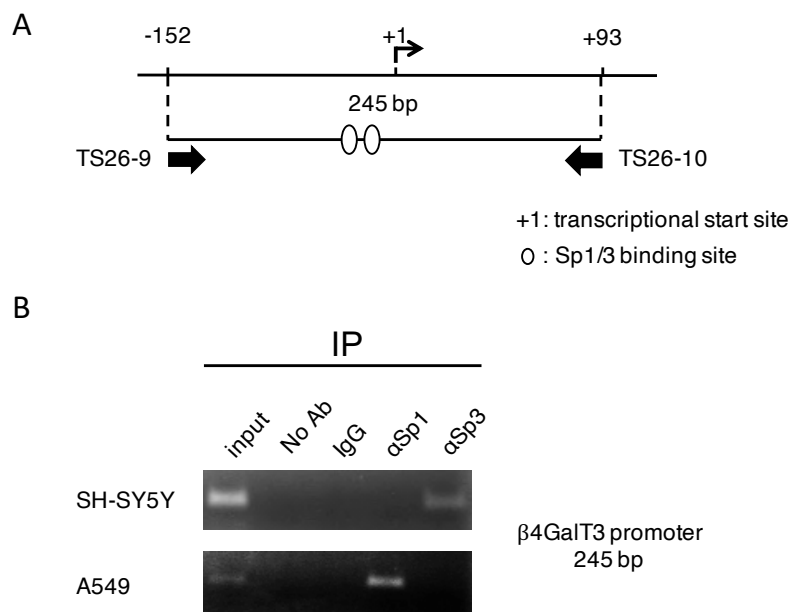


Fig. 2-7. β4GalT3 遺伝子のプロモーター領域への Sp1 と Sp3 の結合の解析

A: クロマチン免疫沈降法に用いたプライマーの模式図

矢印は使用したプライマーを示しており、2ヶ所の Sp1/3 結合部位を含む 245 bp を増幅するように設計した。楕円は、Sp1/3 結合部位を示す。転写開始点を+1 とした。

B: Sp1 と Sp3 のプロモーター領域への結合解析の結果

SH-SY5Y 細胞と A549 細胞から、抗 Sp1 抗体及び抗 Sp3 抗体を用いてクロマチン免疫沈降を行った。Fig. 2-7A のプライマーを用いて、免疫沈降したクロマチンから調製した DNA を鋳型にして PCR を行った。2%アガロースゲル中の PCR 産物を、EtBr を用いて染色した結果を示す。Input は、ポジティブコントロールとして細胞溶解液から精製した DNA を用いた。No Ab (抗体を加えていない) 及び IgG は、ネガティブコントロールとして用いた。αSp1 は抗 Sp1 抗体、αSp3 は抗 Sp3 抗体を示す。

第4節 考察

第2章において、5'-上流領域 2.3 kb の単離を行い、デリーションコンストラクトを作製し、プロモーター活性を解析することで β 4GalT3 遺伝子のプロモーター領域の特定を行った。その結果、SH-SY5Y 細胞及び A549 細胞で、5'-上流領域 -69 から -5 間に β 4GalT3 遺伝子のプロモーター活性を担う領域が存在することが示唆された (Fig. 2-4B)。また、特定したプロモーター領域中に Sp1/3 結合部位が-39/-30 と-19/-10 の位置に存在した (Fig. 2-5)。プロモーター領域中に複数の Sp1/3 結合部位が存在することが、VEGF 遺伝子や MYCN 遺伝子などの多くの遺伝子で報告されている (149-152)。その中でも、複数の Sp1/3 結合部位があることで、プロモーター活性が増強されるという報告もあり、VEGF 遺伝子は 8 bp しか離れていない 2 ヶ所の Sp1/3 結合部位が共に転写活性に重要であることを示している (152)。

さらに、pGL(-2190/+89) を用いて、デリーションコンストラクトを作製した。 β 4GalT3 遺伝子の 5'-上流領域の転写開始点付近は GC 含量が多い部分があるが、単離した 2.3 kb 全体でみると 56%となっている。他の β 4GalT 遺伝子の 5'-上流領域 2 kb における GC 含量を解析すると、 β 4GalT1 は 50%、 β 4GalT2 が 57%、 β 4GalT4 は 35%、 β 4GalT5 が 54%、 β 4GalT6 は 67%、 β 4GalT7 は 55%である。 β 4GalT4 の GC 含量が低く、 β 4GalT6 の GC 含量が高いことを示した。Table 2-5 に示したように、Sp1 及び Sp3 のコンセンサス配列は G や C を多く含むため、GC 含量の高い遺伝子を制御していることが多い。 β 4GalT ファミリーも、 β 4GalT3 を含めて転写制御が解明されている 5 種 (β 4GalT1、 β 4GalT2、 β 4GalT4、及び β 4GalT5) のうち β 4GalT2 以外は Sp1 あるいは Sp3 で転写が制御されている (61-64)。また、 β 4GalT3 遺伝子は、他の β 4GalT ファミリーと同様に TATA box のない遺伝子であることが特徴である。TATA box のない遺伝子は、ハウスキーピング遺伝子等の恒常的に発現する遺伝子にみられることが多い。次章では、作製したデリーションコンストラクトを用いて β 4GalT3 遺伝子のプロモーター領域を解析した。

両細胞において pGL(-140/+89) のプロモーター活性は、pGL(-2190/+89) と同程度だった (Fig. 2-4B)。しかし、SH-SY5Y 細胞において pGL(-595/+89) 及び pGL(-69/+89) のプロモーター活性は、pGL(-2190/+89) より増加したのに対し、A549 細胞では減少した (Fig. 2-4B)。これらのプロモーター活性の差異から、 β 4GalT3 遺伝子の 5'-上流領域 -595 と-141、及び -140 と-70 の間の領域には、細胞種によって異なる転写調節因

子が関与する可能性が示唆された。 $\beta 4\text{GalT3}$ 遺伝子の 5'-上流領域 -595 から-141 の塩基配列に存在する転写因子結合部位を TFBIND により検索したところ、Sp1/3 結合部位と同様にスコア値が 0.95 を超えるものは LYF1 のみだった。LYF1 は造血細胞の分化に寄与する転写因子で、胸腺、脾臓、末梢血の白血球とリンパ節に豊富に発現する (153-155)。Sp ファミリーとの関係は現在報告されておらず、 $\beta 4\text{GalT3}$ 遺伝子のプロモーター活性への関与は不明である。スコア値を 0.9 に下げて検索すると、Myb や GATA1、GATA4 等の転写因子結合部位が存在し、GATA1 遺伝子の転写活性に Sp1 が関与する報告はあるが (156)、タンパク質-タンパク質間の関係は現在報告されていない。同様に、 $\beta 4\text{GalT3}$ 遺伝子の 5'-上流領域 -140 と-70 の塩基配列を検索したところ、-102 から -91 に AP-2 結合部位が存在することが判明した。AP-2 は、神経冠誘導体、神経組織、表皮組織および泌尿生殖器組織を含む多様な異なる組織で発現している (157)。AP-2 の発現は、乳癌において発現が上昇することが報告されているが (158)、AP-2 の発現と神経芽腫や肺癌との相関は、未だ報告されていない。A549 細胞では $\beta 4\text{GalT3}$ 遺伝子の Sp1 が結合することを示しており、Sp1 は AP-2 と相互作用し、複合体を形成することが報告されている (159)。これらの知見から、A549 細胞において Sp1 と AP-2 が相互作用することで $\beta 4\text{GalT3}$ 遺伝子の転写活性に影響を与える可能性があり、細胞種により異なる $\beta 4\text{GalT3}$ 遺伝子の転写活性は転写因子の相互作用の変化が関与する可能性を示した。

私たちの予備的な研究から、Sp1 をノックダウンした A549 細胞での $\beta 4\text{GalT3}$ 遺伝子の発現が、対照細胞と比較して低下した。その結果からも、 $\beta 4\text{GalT3}$ 遺伝子の転写制御に Sp1、及び Sp1 と同じ配列に結合する Sp3 が関与している可能性が示された。そこで、Sp1 と Sp3 は $\beta 4\text{GalT3}$ 遺伝子のプロモーター領域に結合するかどうかをクロマチン免疫沈降法により解析した。その結果、SH-SY5Y 細胞において Sp3 が、一方 A549 細胞において Sp1 が、 $\beta 4\text{GalT3}$ 遺伝子のプロモーター領域に結合することを見出した (Fig. 2-7B)。

Sp1 と Sp3 は、 C_2H_2 タイプのジンクフィンガーをもつ Sp ファミリー転写因子に属し (105, 160)、Sp1/3 結合部位に対して同様の親和性を示すため、結合部位で互いに競合する (104, 161)。非常に興味深いことに、両方の細胞株で同じプロモーター領域が $\beta 4\text{GalT3}$ 遺伝子の転写に利用されているにもかかわらず、Sp3 は SH-SY5Y 細胞の $\beta 4\text{GalT3}$ 遺伝子のプロモーター領域に結合し、Sp1 は A549 細胞の領域に結合した。細胞種が異なると、 $\beta 4\text{GalT3}$ 遺伝子の転写を制御する転写因子が違うことが明らかと

なった。転写では、Sp1 は活性化因子として機能するが、Sp3 は細胞の状況によって活性化因子としても抑制因子としても機能することが報告されている (105, 160)。興味深いことに、腸上皮細胞内の免疫機能に関わる TLR5 遺伝子において、腸内細菌で生成される酪酸の濃度によって制御する転写因子が Sp1 と Sp3 で切り替わることが報告された (162)。酪酸処理前は TLR5 遺伝子のプロモーター領域に Sp1 が結合するが、酪酸処理すると Sp1 ではなく Sp3 が結合する。この切り替わりは、酪酸処理によって Sp1 が脱リン酸化して TLR5 遺伝子のプロモーター領域に結合しなくなり、Sp3 がリン酸化することでプロモーター領域に結合することが示されている (162)。

次章で、両細胞における Sp1 と Sp3 の $\beta 4\text{GalT3}$ 遺伝子の転写活性における効果をより詳しく解析した。

第3章

Sp1 及び Sp3 の β 4GalT3 遺伝子の転写活性への効果

第1節 緒言

β 4GalT ファミリーのうち、転写制御の解析が行われているのはヒト β 4GalT1、 β 4GalT2、 β 4GalT4、及び β 4GalT5 である (61–64)。ヒト β 4GalT1 は肺癌細胞で Sp1 が、 β 4GalT2 は HeLa ヒト子宮頸癌細胞で p53 が、 β 4GalT4 と β 4GalT5 は SH-SY5Y 細胞で Sp1 が転写を制御することが明らかにされている。第3章で β 4GalT3 遺伝子のプロモーター領域を特定し、その領域に、SH-SY5Y 細胞では Sp3 が、一方 A549 細胞では Sp1 が結合することを明らかにした。本章では、両細胞における Sp1 及び Sp3 の β 4GalT3 遺伝子の転写活性への効果を解析するために、Sp1 と Sp3 発現ベクターを作製し、 β 4GalT3 遺伝子のプロモーター領域と共導入して、プロモーター活性を測定した。また、 β 4GalT3 遺伝子のプロモーター領域には2ヶ所の Sp1/3 結合部位が存在する。この Sp1/3 結合部位が、 β 4GalT3 の転写活性にどのように関与するのかを解析するために、Sp1/3 結合部位に変異を導入し、プロモーター活性を測定した。

第2節 材料と方法

・Sp1 と Sp3 の遺伝子発現の解析

第1章の《定量的 RT-PCR による遺伝子の定量解析》にしたがって、Sepasol RNA I Super G (Nacalai Tesque Inc.) を用いて、SH-SY5Y 細胞と A549 細胞における Sp1 及び Sp3 遺伝子の発現量を解析した。Sp1 の定量的 RT-PCR 用プライマーとして TS28-13 と TS28-14、Sp3 の定量的 RT-PCR プライマーとして TS28-15 と TS28-16 を用いて PCR を行った。プライマーの塩基配列は、Table 3-1 に示した。

Table 3-1. 定量的 RT-PCR に用いたプライマーの塩基配列

名前	塩基配列 (5'-3')
TS28-13	GCCTCCAGACCATTAACCTCAG
TS28-14	TCATGTATTCCATCACCACCAG
TS28-15	CTGTCCCAACTGTAAAGAAGGTG
TS28-16	AGAATGCCAACGCAGATGAG

・Sp1 と Sp3 の細胞内局在の解析

(1) 細胞分画

NE-PER nuclear and cytoplasmic extraction reagents kit (Pierce) の実験操作手順書に従い、SH-SY5Y 細胞と A549 細胞から細胞質画分及び核画分を調製した (147)。はじめに、両細胞をφ100 mm dish に集密期になるまで培養し、回収した細胞のペレットに、タンパク質分解酵素阻害剤を加えた kit 付属の細胞質抽出溶液 (Cytoplasmic Extraction Reagent: CER) I を加えた。各抽出溶液のタンパク質分解酵素阻害剤の濃度は、Table 3-2 に示した。抽出溶液を攪拌した後、氷上で 10 分間静置した後、kit 付属の CER II を加え、攪拌後、4°C で 16,000×g、5 分間遠心し、上清として細胞質抽出液を得た。この細胞質抽出液に、タンパク質分解酵素阻害剤を加えた kit 付属の核抽出溶液 (Nuclear Extraction Reagent: NER) を加えた後、15 秒間の攪拌と、氷上で 10 分間の静置を、計 4 回繰り返した。この試料を、4°C で 16,000×g、5 分間遠心し、上清として核抽出液を得た。なお、得られた細胞質抽出液及び核抽出液は、BCA 法により、タンパク質含有量を測定した。

(2) SDS-Polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) 用試料の調製

得られた細胞質画分、核画分、及び細胞ペレットに 5% 2-メルカプトエタノールを含む SDS-PAGE サンプルバッファーを加え、攪拌により混合し、100℃で 5 分間煮沸した。次に、試料を室温になるまで冷やし、4℃で 10,000 rpm、10 分間遠心した後、上清を回収し、SDS-PAGE 用試料とした。

(3) ウェスタンブロット解析 (163, 164)

7.5%、10%分離及び濃縮用ポリアクリルアミドゲルを調製し、恒温式 2 連ミニゲル電気泳動装置 (日本エイドー株式会社) に設置した。次に、分子質量マーカーとして SDS-PAGE Standards Broad range (Bio-Rad) 及び希釈した SDS-PAGE 用試料をウェルにアプライした。ゲル 1 枚あたり 0.02 A で通電し、SDS-PAGE サンプルバッファー中に含まれるブロモフェノールブルーをゲルの下端から 1 cm まで泳動した。SDS-PAGE を行ったゲルを転写装置 Mini Trans-Blot Electrophoretic Transfer Cell (Bio-Rad) により、100 V、45 分間もしくは 75 分間通電することで、ポアサイズ 0.45 μm のポリビニリデンジフルオリド (PVDF) 膜 (Millipore Corp.) にタンパク質を転写した。転写膜を 5%スキムミルク溶液 (雪印乳業株式会社) もしくは 1% bovine serum albumin (BSA) 溶液 (Roche Diagnostics K.K.) に浸し、室温で 3 時間ブロッキングした後、抗体反応を行なった。1次抗体として抗 Sp1 抗体 (Santa Cruz Biotechnology Inc.)、抗 Sp3 抗体 (Santa Cruz Biotechnology Inc.)、抗 Lamin A/C 抗体 (Santa Cruz Biotechnology Inc.)、及び抗 G3PDH 抗体 (Santa Cruz Biotechnology Inc.) を用い、2次抗体は alkaline phosphatase (AP) 標識抗ウサギ IgG 抗体 (Promega)、AP 標識抗マウス IgG 抗体 (Santa Cruz Biotechnology Inc.)、及び AP 標識抗ヤギ IgG 抗体 (Promega) を用いた。Lamin A/C は核の分画マーカー、G3PDH は細胞質の分画マーカーとした。

Table 3-2. タンパク質分解酵素阻害剤の濃度

阻害剤	Stock	CER I	NER
benzamidine	250 mg/ml	0.5 mg/ml	0.5 mg/ml
aprotinin	2 mg/ml	2 µg/ml	2 µg/ml
leupeptin	2 mg/ml	2 µg/ml	2 µg/ml
phenylmethylsulfonyl fluoride	0.2 M	0.75 mM	2 mM

・ヒト Sp1 発現プラスミド

Sp1 発現ベクターCMV-Sp1 は、カリフォルニア大学バークレー校の Robert Tjian 教授から提供して頂いた。

・ヒト Sp3 遺伝子の単離と発現プラスミドの構築

(1) GeneRacer™ Super Script III RT Module を用いた cDNA の精製

第3章の《定量的 RT-PCR による遺伝子の発現量の解析》にしたがって、A549 細胞から cDNA を調製した。

(2) PCR による増幅

ヒト Sp3 遺伝子は、Accession number: BC126414 をもとに2種類のプライマー: BamHI 部位を含む TS28-19 及び HindIII 部位を含む TS28-20 により作製した。プライマーの塩基配列は、Table 3-3 に示した。上記の《GeneRacer™ Super Script III RT Module を用いた cDNA の精製》によって得られた cDNA を鋳型に PCR を行い、Sp3 遺伝子を増幅した。得られた PCR 産物は、pGEM-T Easy vector にサブクローニングし、プラスミド pGEM-Sp3 を作製した。得られたプラスミド DNA の塩基配列を解析した結果、目的のヒト Sp3 遺伝子の塩基配列 (Accession number: BC126414) と完全に一致した。

(3) 発現プラスミドの構築

得られた pGEM-Sp3 を、増幅に用いたプライマーの両端の制限酵素部位を用いて、哺乳動物細胞発現ベクター pBApo-EF1 α Pur (Takara Bio) へ組換え、pBA-Sp3 を得た。

Table 3-3. ヒト Sp3 遺伝子の増幅に用いたプライマーの塩基配列

塩基配列の下線部は、配列の後ろに示した制限酵素認識部位を示す。

名前	塩基配列 (5'-3')	位置
TS28-19	CGGGATCCATGACCGCTCCGAAAAGCCCG (BamHI)	1/22
TS28-20	CCAAGCTTTTACTCCATTGTCTCATTCCA (HindIII)	2325/2346

・ Sp1 及び Sp3 遺伝子導入による β 4GalT3 プロモーター活性の解析

CMV プロモーターの直下に Sp1 遺伝子を組込んだプラスミド、もしくは EF1 α プロモーターの直下に Sp3 遺伝子を組込んだプラスミドと、 β 4GalT3 遺伝子のレポータープラスミド pGL(-2190/+89) を、SH-SY5Y 細胞及び A549 細胞に導入して、ルシフェラーゼアッセイによりプロモーター活性を解析した。第2章に示した《細胞への形質導入用プラスミド DNA の調製》、《培養細胞への遺伝子導入》、及び《ルシフェラーゼアッセイ》に従い、実験を行った。

・ 2ヶ所の Sp1/3 結合部位への変異導入による β 4GalT3 プロモーター活性の解析

β 4GalT3 遺伝子のプロモーター領域に含まれる 2ヶ所の Sp1/3 結合部位のうち、片方の結合部位へ変異を導入した m1 と m2、及び 2ヶ所共に変異を導入した m3 を作製した。m1 は上流の Sp1/3 結合部位 -39/-30 への変異、m2 は下流の Sp1/3 結合部位 -19/-10 への変異を示す (Fig. 3-1)。O は、オリジナルの配列を示す。X は、変異を導入した配列を示す。プライマーの配列は、Table 3-4 に示した。2ヶ所の Sp1/3 結合部位への変異は、-39/-30 の配列 ACCCCGCCCC の下線部を AA に、-19/-10 の配列 GCCCGCCCC の下線部を AA に変えることで作製した (Fig. 3-1)。操作は、KOD -Plus- Mutagenesis Kit (TOYOBO) の実験操作手順書に従い行った (165, 166)。上記の《 β 4GalT3 遺伝子の 5'-上流領域の単離とレポータープラスミドの構築》で得られた pGL(-69/+5) を鋳型として用いて、Inverse PCR を行った。次に、PCR 産物に制限酵素 DpnI を加え、プラスミ

ドを消化した後、PCR 産物である直鎖状プラスミドを Self-ligation することにより環状化した。得られたプラスミド DNA を用いて、各 DNA 断片の塩基配列を解析した。

2 ヶ所の Sp1/3 結合部位に変異導入した 3 種のプラスミドを用いて、ルシフェラーゼアッセイによりプロモーター活性を解析した。第 2 章に示した《細胞への形質導入用プラスミド DNA の調製》、《培養細胞への遺伝子導入》、及び《ルシフェラーゼアッセイ》に従い、実験を行った。

Table 3-4. 2 ヶ所の Sp1/3 結合部位への変異導入に用いたプライマーの塩基配列

下線部は、変異を導入した塩基配列を示す。

名前	塩基配列 (5'-3')
TS25-8	CG <u>AA</u> CCATGACGCGAGACCCGCCC (m1, m3)
TS25-9	GGGCCTCGGGCGGAGCCACCCGGG (m1)
TS25-10	CG <u>AA</u> CCCGCAGCGCCCGCTTCCAAG (m2)
TS25-11	GGGTCTCGGTCATGGGGCGGGGCC (m2)
TS25-12	CG <u>AA</u> CCATGACGCGAGACCCG <u>AA</u> C (m3)

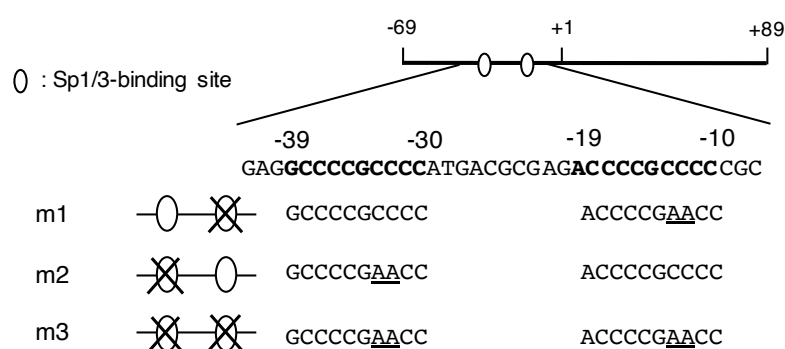


Fig. 3-1. 2 ヶ所の Sp1/3 結合部位への変異導入の模式図

楕円は、Sp1/3 結合部位を示す。下線部は、変異を導入した塩基配列を示す。

第3節 結果

1. Sp1 及び Sp3 の遺伝子発現

SH-SY5Y 細胞と A549 細胞における β 4GalT3 遺伝子のプロモーター領域に結合する転写因子の違いは、細胞種による Sp1 及び Sp3 遺伝子の発現量に起因するかどうかを定量的 RT-PCR により解析した。その結果、SH-SY5Y 細胞における Sp1 と Sp3 の発現は、A549 細胞における発現量よりも 2.1 倍、1.8 倍高かった (Fig. 3-2)。

したがって、同一細胞内での Sp1 及び Sp3 の発現はほぼ同程度であった (Fig. 3-2)。これらの結果から、両細胞における Sp1 及び Sp3 遺伝子の発現量に差異はないことが示唆された。

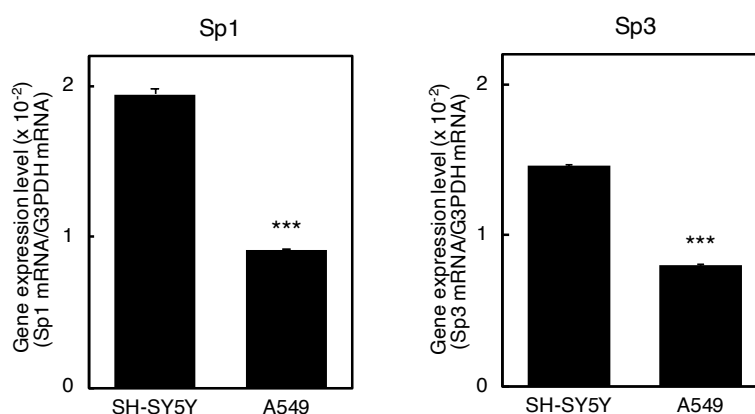


Fig. 3-2. SH-SY5Y 細胞と A549 細胞における Sp1 と Sp3 の発現

SH-SY5Y 細胞と A549 細胞から total RNA を精製し、定量的 RT-PCR を行った。遺伝子の発現量は、 $\Delta\Delta$ Ct 法により、内部標準としたそれぞれのサンプルの G3PDH 遺伝子の発現量で補正した。Sp1 と Sp3 の遺伝子発現量を比較するために、各プライマーペアを用いての Sp1 と Sp3 の mRNA 増幅効率を計算し、結果に反映させた。全ての実験の値は、3 回の実験の平均値を示す。エラーバーは、標準偏差を示す。*** $p < 0.001$ vs. SH-SY5Y cells.

2. Sp1 及び Sp3 の細胞内局在

次に、SH-SY5Y 細胞と A549 細胞における β 4GalT3 遺伝子のプロモーター領域に結合する転写因子の違いは、Sp1 及び Sp3 の細胞内局在に起因する可能性を考え、両細胞における Sp1 と Sp3 の細胞内局在を解析した。遠心法による細胞分画を行い、細胞質画分と核画分に分離した後、タンパク質を精製し、ウエスタンブロットを行った。

両細胞とも核画分のマーカーである LaminA/C は全細胞 (W) 及び核画分 (N) サンプルにおいてバンドが検出され (Fig. 3-3)、細胞質画分のマーカーである G3PDH は全細胞 (W) 及び細胞質画分 (C) サンプルにおいてバンドが検出されたことから、遠心法による分画が正確に行われていることが示された (Fig. 3-3)。両細胞において Sp1 及び Sp3 は N サンプルにおいてバンドが検出されたが、C サンプルにおいてバンドが検出されなかった (Fig. 3-3)。この結果から、両細胞において Sp1 及び Sp3 は核内に存在することが明らかになった。したがって、SH-SY5Y 細胞と A549 細胞における β 4GalT3 遺伝子のプロモーター領域に結合する転写因子の違いが、細胞内局在の違いによって起きていないことが示された。また、両細胞での Sp1 及び Sp3 のバンドを比較すると、SH-SY5Y 細胞の方が A549 細胞よりタンパク質発現量が高いと考えられ、Fig. 3-2 に示した両細胞における Sp1 と Sp3 の遺伝子発現の結果を反映していると考えられる。

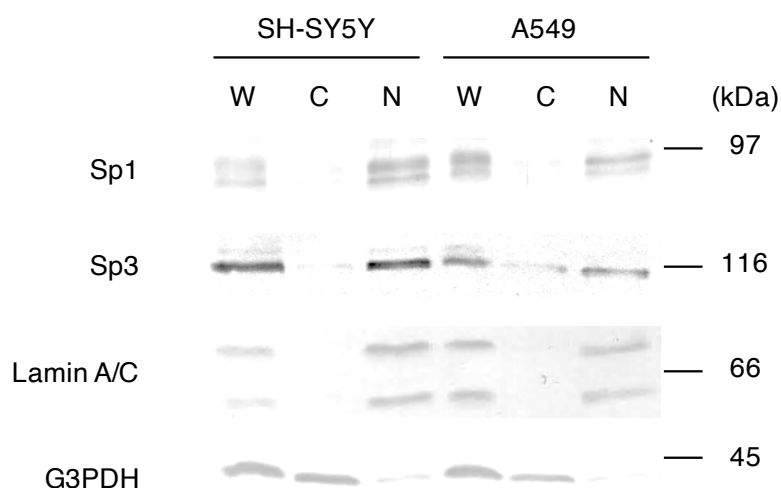


Fig. 3-3. Sp1 と Sp3 の細胞内局在

SH-SY5Y 細胞と A549 細胞を回収した後、遠心法により細胞質画分と核画分に分画し、ウェスタンブロットを行った。W は全細胞を、C は細胞質画分を、N は核画分を示す。LaminA/C は核画分、G3PDH は細胞質画分のマーカーとした。

3. Sp1 及び Sp3 遺伝子導入による β 4GalT3 転写活性の解析

CMV プロモーターの直下に Sp1 遺伝子を組込んだプラスミド、もしくは EF1 α プロモーターの直下に Sp3 遺伝子を組込んだプラスミドと、 β 4GalT3 遺伝子のレポータープラスミド pGL(-2190/+89) を、SH-SY5Y 細胞及び A549 細胞に導入して、ルシフェラーゼアッセイによりプロモーター活性を測定した。その結果、SH-SY5Y 細胞では、Sp1 及び Sp3 の発現により、プロモーター活性が対照と比較してそれぞれ 3.1 倍及び 4.2 倍増加し (Fig. 3-4)、Sp1 と Sp3 の両方が SH-SY5Y 細胞において転写活性化因子として機能することを示した。一方、A549 細胞では、Sp1 の発現はプロモーター活性を対照と比較して 3.0 倍増加したが (Fig. 3-5, Sp1)、Sp3 の発現はプロモーター活性を 0.7 倍低下した (Fig. 3-5, Sp3)。これらの結果から、A549 細胞において Sp1 は転写活性化因子として機能するが、Sp3 は転写抑制因子として機能すると考えられる。SH-SY5Y 細胞と A549 細胞において、Sp1 及び Sp3 遺伝子導入により β 4GalT3 遺伝子の制御は、細胞種によって異なることが示唆された。

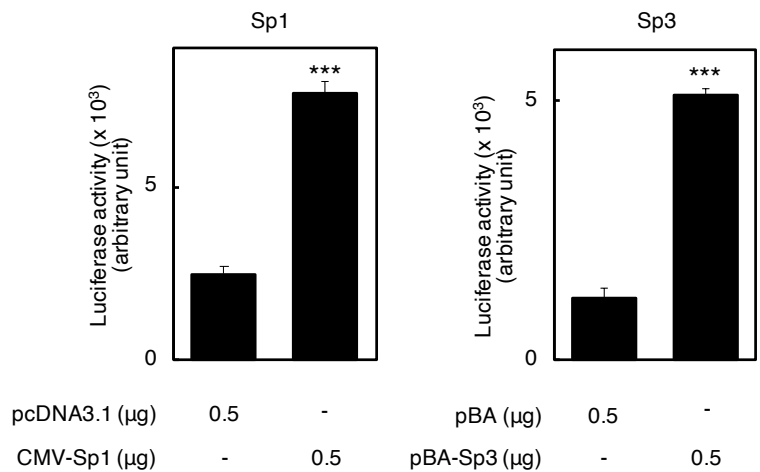


Fig. 3-4. Sp1 と Sp3 遺伝子の導入による β 4GalT3 遺伝子の転写活性の解析

SH-SY5Y 細胞を 24 時間培養した後、 β 4GalT3 遺伝子の 5'-上流領域 2.3 kb と、pcDNA3.1、CMV-Sp1、pBA 及び pBA-Sp3 のうち 1 つを細胞へそれぞれ導入した。その後、48 時間培養し、ルシフェラーゼアッセイによりプロモーター活性を測定した。ルシフェラーゼ活性は、それぞれのサンプルのタンパク質量で補正した。全ての実験の値は、3 回の実験の平均値を示す。エラーバーは、標準偏差を示す。*** $p < 0.001$ vs. pcDNA3.1 or pBA.

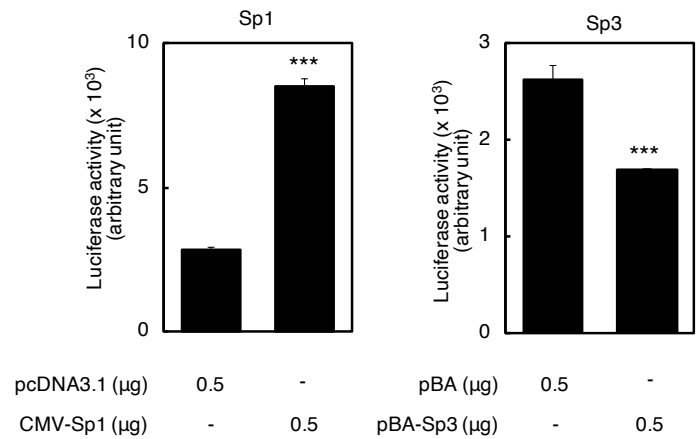


Fig. 3-5. Sp1 と Sp3 遺伝子の導入による β 4GalT3 遺伝子の転写活性の解析

A549 細胞を 24 時間培養した後、 β 4GalT3 遺伝子の 5'-上流領域 2.3 kb と pcDNA3.1、CMV-Sp1、pBA 及び pBA-Sp3 のうち 1 つを細胞へそれぞれ導入した。その後、48 時間培養し、ルシフェラーゼアッセイによりプロモーター活性を測定した。ルシフェラーゼ活性は、それぞれのサンプルのタンパク質量で補正した。全ての実験の値は、3 回の実験の平均値を示す。エラーバーは、標準偏差を示す。*** $p < 0.001$ vs. pcDNA3.1 or pBA.

4.2 2ヶ所の Sp1/3 結合部位への変異導入による β 4GalT3 転写活性の解析

β 4GalT3 遺伝子のプロモーター領域に Sp1 と Sp3 が結合すること、Sp1 と Sp3 の遺伝子導入は β 4GalT3 遺伝子のプロモーター活性に影響を及ぼすことが判明したことから、Sp1 と Sp3 は β 4GalT3 遺伝子のプロモーター活性において重要な役割を担っていることが明らかとなった。そこで、 β 4GalT3 遺伝子のプロモーター領域に含まれる 2 カ所の Sp1/3 結合部位の働きに興味をもち、2 ヶ所の Sp1/3 結合部位の機能解析を試みた。プロモーター活性の高かったレポータープラスミド pGL(-69/+89) を用いて (Fig. 2-5)、2 ヶ所の Sp1/3 結合部位のうち、上流の結合部位 (-39/-30) へ変異を導入した m1 と、下流の結合部位 (-19/-10) へ変異を導入した m2、及び 2 ヶ所共に変異を導入した m3 の 3 種類のレポータープラスミドを作製し (Fig. 3-6A)、ルシフェラーゼアッセイによりプロモーター活性を測定した。その結果、SH-SY5Y 細胞において、変異を導入していない対照のプロモーター活性を 100%とした場合、2 ヶ所の Sp1 結合部位に変異を導入した m3 のプロモーター活性が 6%まで有意に低下した (Fig. 3-6B, SH-SY5Y)。一方、下流の Sp1 結合部位に変異を導入した m1 のプロモーター活性は 36%とプロモーター活性が有意に低下した (Fig. 3-6B, SH-SY5Y)。同様に、上流の Sp1 結合部位に変異を導入した m2 のプロモーター活性は 43%であり、プロモーター活性が有意に低下した (Fig. 3-6B, SH-SY5Y)。また、A549 細胞において、変異を導入していない対照のプロモーター活性を 100%とした場合、2 ヶ所の Sp1 結合部位に変異を導入した m3 の場合は、プロモーター活性が 11%まで著しく低下した (Fig. 3-6B, A549)。一方、下流の Sp1 結合部位に変異を導入した m1 のプロモーター活性は 108%と対照と同程度であった (Fig. 3-6B, A549)。しかし、上流の Sp1 結合部位に変異を導入した m2 のプロモーター活性は、223%と有意に増加した (Fig. 3-6B, A549)。両細胞において 2 ヶ所の Sp1/3 結合部位に変異を導入した場合のプロモーター活性が著しく低下したことから、 β 4GalT3 遺伝子の転写開始点近傍の 2 ヶ所の Sp1/3 結合部位が転写を制御していることが明らかになった。さらに、前述した《Sp1 及び Sp3 遺伝子導入による β 4GalT3 遺伝子のプロモーター活性への影響の解析》の結果から、どの転写因子が Sp1/3 結合部位に結合するかに応じて、各 Sp1/3 結合部位の機能は SH-SY5Y 細胞と A549 細胞の間で異なることが示唆された。

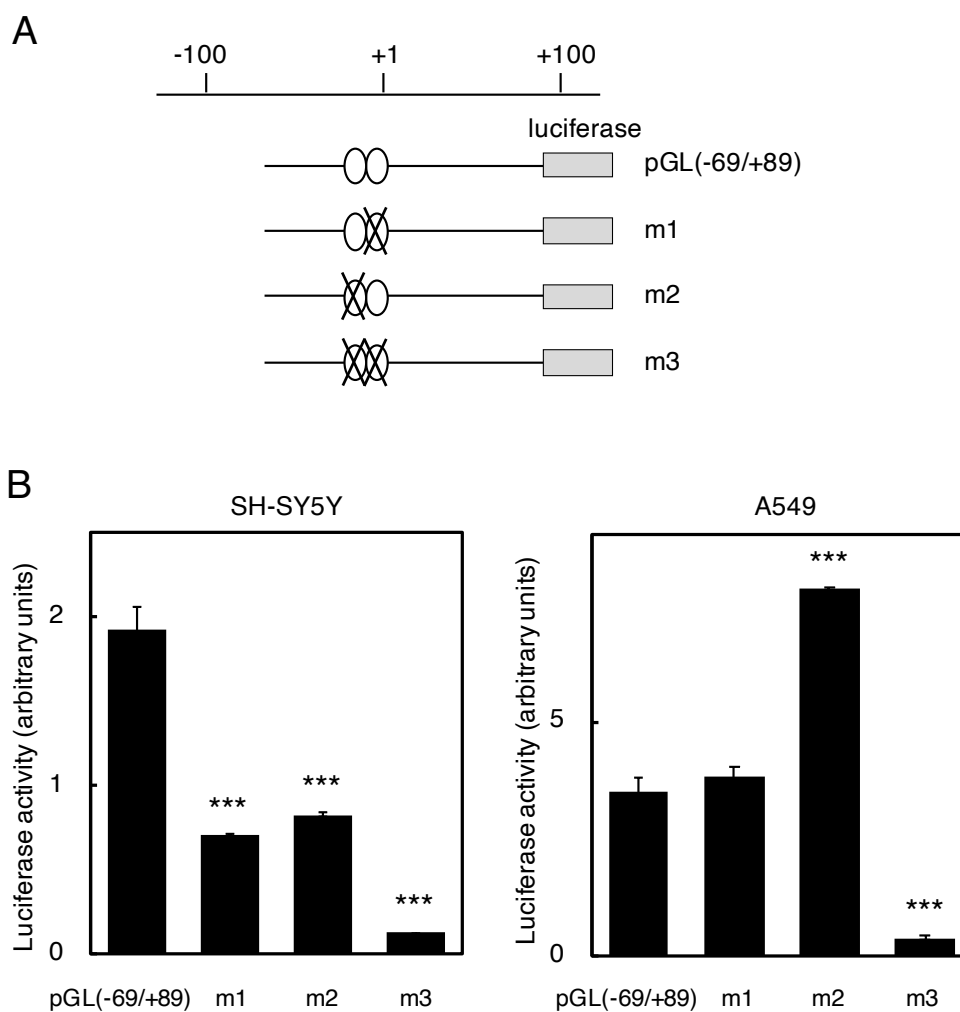


Fig. 3-6. β4GalT3 遺伝子の Sp1 と Sp3 結合部位の機能解析

A: Sp1/3 結合部位への変異導入の模式図

楕円は、Sp1 結合部位を示す。下線部は、変異を導入した配列を示す。転写開始点を、+1 とした。

B: β4GalT3 遺伝子に変異を導入したコンストラクトのプロモーター活性

SH-SY5Y 細胞と A549 細胞を 24 時間培養した後、各コンストラクトを導入した。その後、48 時間培養し、ルシフェラーゼアッセイにより、プロモーター活性を測定した。ルシフェラーゼ活性は、それぞれのサンプルのタンパク質量及びウミシイタケ由来ルシフェラーゼ活性による遺伝子導入率で補正した。全ての実験の値は、3 回の実験の平均値を示す。エラーバーは、標準偏差を示す。*** $p < 0.001$ vs. pGL(-69/+89).

第4節 考察

第3章において、SH-SY5Y細胞及びA549細胞において、 β 4GalT3遺伝子のプロモーター領域に2ヶ所 (-39/-30, -19/-10) ある Sp1/3 結合部位が共に転写活性化に重要であることを示した。この章までの結果をまとめると、SH-SY5Y細胞では Sp3 が、一方A549細胞では Sp1 が2ヶ所の Sp1/3 結合部位を含む β 4GalT3 遺伝子のプロモーター領域に結合しており、 β 4GalT3 遺伝子の転写を制御する転写因子が細胞種によって異なることを示した (Fig. 3-7)。

Sp1 と Sp3 は存在量比と結合比が遺伝子の制御に影響するという報告があるため (106)、両細胞における Sp1 及び Sp3 遺伝子の発現量を解析したが、有意な差ではなかった (Fig. 3-2)。また、癌遺伝子として知られる signal transducer and activator of transcription (STAT) 3 や性決定遺伝子の SRY-Box Transcription Factor (SOX) 1 などのいくつかの転写因子は細胞質内から核内に移動することで転写活性化因子として機能することが報告されている (167-169)。そのため、両細胞における Sp1 と Sp3 の細胞内局在を解析したが、共に核内に局在していることを示した (Fig. 3-3)。したがって、細胞特異的な β 4GalT3 遺伝子の転写制御の違いは、Sp1 及び Sp3 遺伝子の発現量や細胞内局在に起因しないことが示唆された。Sp1 と Sp3 は協同的に転写を活性化することや (107)、Sp1 による活性化を Sp3 が競合的に阻害することが報告されており (108)、この差異が生じる原因は明らかとなっていない。両細胞における Sp1 と Sp3 の機能を解析するために、Sp1 または Sp3 発現ベクターを β 4GalT3 遺伝子のプロモーター領域と共導入した。その結果、Sp1 及び Sp3 は、SH-SY5Y細胞において β 4GalT3 遺伝子の転写を正に調節した。一方、A549細胞において Sp1 は β 4GalT3 遺伝子の転写を正に調節し、Sp3 は負に調節することを示した (Fig. 3-4、Fig. 3-5)。SH-SY5Y細胞において、細胞種特異的に、 β 4GalT3 遺伝子の転写を Sp3 が活性化させている可能性が考えられた。Sp3 が同一遺伝子に対して細胞種によって機能を変化させることはこれまで報告されておらず、大変興味深い結果である。

Sp3 が、転写活性化因子として働くことが報告されている例はいくつかある。乳癌細胞においてアセチル化した Sp3 は cell surface receptor R II 遺伝子の転写を活性化し (170)、また繊維芽細胞において Ser73 がリン酸化した Sp3 は VEGF 遺伝子の転写を活性化する (169)。さらに、先に述べたように、腸上皮細胞において、酪酸の濃度によって TLR5 遺伝子の転写を制御する転写因子が Sp1 と Sp3 で切り替わることが報告

された (162)。酪酸処理すると Sp1 は脱リン酸化して TLR5 遺伝子のプロモーター領域に結合しなくなり、Sp3 はリン酸化することで結合するように切り替わることが示されている (162)。β4GalT3 遺伝子のプロモーター領域に Sp1 及び Sp3 が結合すること、Sp1 及び Sp3 遺伝子の導入が β4GalT3 遺伝子のプロモーター活性に影響を及ぼすことが判明したことから、Sp1 及び Sp3 が β4GalT3 遺伝子のプロモーター活性化することが明らかとなった。そこで、Sp1/3 結合部位が 2ヶ所あることに着目し、β4GalT3 遺伝子のプロモーター領域中の 2ヶ所の Sp1/3 結合部位の機能の解析を行った。その結果、2ヶ所共に変異を導入するとプロモーター活性が有意に減少した (Fig. 3-6B)。この結果から、2ヶ所の Sp1/3 結合部位が共に β4GalT3 遺伝子のプロモーター活性に重要であることを示している。プロモーター領域に複数の Sp1/3 結合部位が近距離に存在し、転写制御が行われている報告がいくつかあるが、詳細なメカニズムは明らかになっていない。A549 細胞では、下流の Sp1/3 結合部位に変異を導入しても、変異導入していない場合と活性は変わらず、上流の Sp1/3 結合部位に変異を導入すると活性が上昇した (Fig. 3-6B, A549)。この結果から、下流の Sp1/3 結合部位が β4GalT3 遺伝子のプロモーター活性に影響していない可能性が示された。Sp1 の DNA への結合時のフォールディングについて報告があり (172, 173)、Sp1 を含む転写開始複合体を囲むように DNA が変形し、Sp1 以外の転写開始複合体も DNA と結合している可能性が示されている。使用したレポータープラスミド pGL(-60/+89) は塩基配列が短いため、生体内で実際に転写が起きる時と異なるフォールディングが生じ、Sp1 や Sp3 以外の転写因子や転写活性化因子などが結合できる環境となった可能性を考えなければならない。

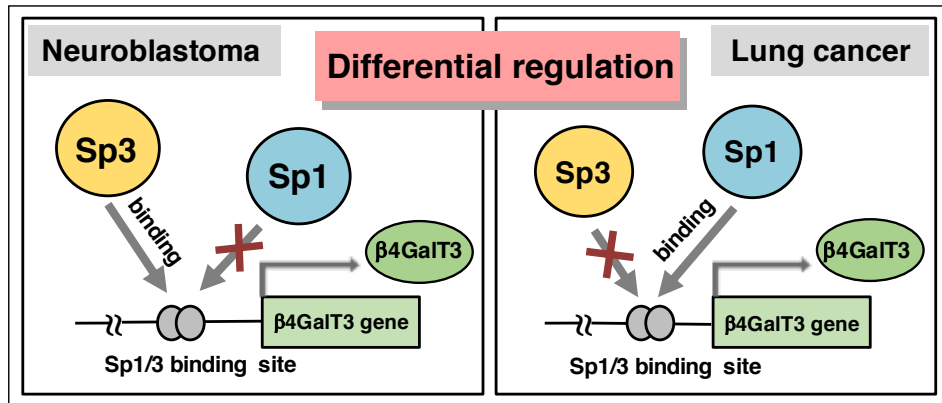


Fig. 3-7. 第 3 章までの小括

ヒト神経芽細胞腫においてβ4GalT3 遺伝子の転写は Sp3 が、一方ヒト肺癌細胞では Sp1 が転写を制御しており、細胞種によってβ4GalT3 遺伝子の転写を制御する転写因子が異なることを明らかにした (174)。

第4章

Sp3 の翻訳後修飾が β 4GalT3 遺伝子の転写活性へ与える影響の解析

第1節 緒言

転写因子の転写制御のメカニズムについて、近年盛んに研究されているが、最も研究されている分野の1つが転写因子の翻訳後修飾による制御である。Sp1 及び Sp3 は、リン酸化、アセチル化、small ubiquitin-related modifier (SUMO) 化、及び O-グリコシル化などの様々な翻訳後修飾を受けることが知られている (175)。これらの翻訳後修飾の種類や有無により、Sp1 及び Sp3 は、DNA の結合活性、転写活性、タンパク質の安定性、及び局在が制御されている (105)。TLR5 遺伝子において、腸内細菌に生成される酪酸の濃度によって制御する転写因子が Sp1 と Sp3 で切り替わることが報告された (162)。この切り替わりには Sp1 及び Sp3 それぞれの翻訳後修飾が変化することに起因しており、酪酸処理によって Sp1 が脱リン酸化してプロモーター領域に結合しなくなり、Sp3 がリン酸化することで結合することが示されている (162)。また、翻訳後修飾された Sp3 が転写活性化因子として機能する報告がいくつもあり、乳癌細胞においてアセチル化した Sp3 は転写活性化因子として機能し (170)、リン酸化された Sp3 は VEGF 遺伝子の転写を活性化することが報告されている (169)。これらの知見から、神経芽腫において β 4GalT3 の発現が増加するメカニズムは、 β 4GalT3 遺伝子のプロモーターに結合する Sp3 が受ける翻訳後修飾に起因するのではないかと考え、Sp3 の翻訳後修飾が β 4GalT3 遺伝子の転写活性へ与える影響を解析した。

第2節 材料と方法

・Sp3 内のアセチル化部位への変異導入

乳癌細胞において Sp3 内のリシン (Lys) 551 がアセチル化することで、Sp3 は転写活性化因子として機能することが報告されている (Fig. 4-1) (170)。この知見から、神経芽腫においても Sp3 のアセチル化が転写活性化因子として機能し、 β 4GalT3 遺伝子のプロモーター活性を増加させるのではないかと考え、Lys551 の代わりにアラニン (Ala) を有する Sp3 変異体の発現プラスミド Sp3KM を作製した。この作製の概略は Fig. 4-2 に示し、Splicing by Overlap Extension (SOE)-PCR 法を用いて変異を導入した (Fig. 4-3) (176, 177)。使用したプライマーの配列は、Table 4-1 に示した。プライマー TS1-16 と TS1-17 はそれぞれ XbaI、KpnI 部位を含み、TS1-18 と TS1-19 は Lys551 への Ala 変異の配列を含む。第3章の《Sp3 遺伝子の単離と発現プラスミドの構築》で得られた pBA-Sp3 を鋳型に、変異を含む2種類の重複した配列 815/1663 及び 1639/1842 を PCR で増幅した。その後、得られた2種類の DNA 断片を鋳型にして TS1-16 と TS1-17 を用いて PCR を行い、Ala 変異を含む 815/1842 を増幅した。得られた DNA 断片の塩基配列を解析し、変異が導入されていることを確認した。この DNA 断片を、両末端に位置する XbaI 及び KpnI で消化し、pBA-Sp3 の 815/1842 と置き換えることで Sp3KM を得た。

アセチル化部位 Lys551 へ変異導入した Sp3KM と pGL(-2190/+89) を共導入し、ルシフェラーゼアッセイによりプロモーター活性を解析した。第2章に示した《培養細胞への遺伝子導入》及び《ルシフェラーゼアッセイ》に従い、実験を行った。

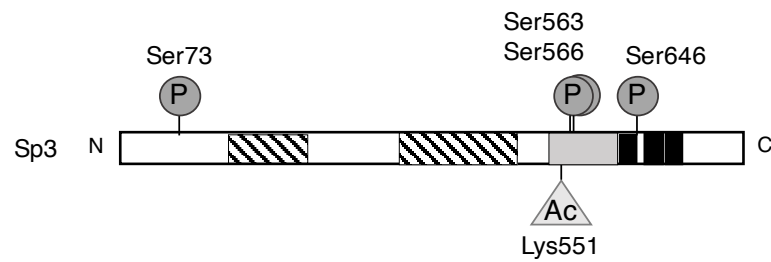


Fig. 4-1. ヒト Sp3 の翻訳後修飾の模式図

1 ヶ所のアセチル化部位 (Lys551) と、4 ヶ所のリン酸化部位 (Ser73、Ser563、Ser566、Ser646) を示す。斜線の box は転写活性化ドメイン、灰色の box は転写活性阻害ドメイン、黒色の box はジンクフィンガーを含む DNA 結合ドメインを示す。Ac はアセチル化を、P はリン酸化を示す。

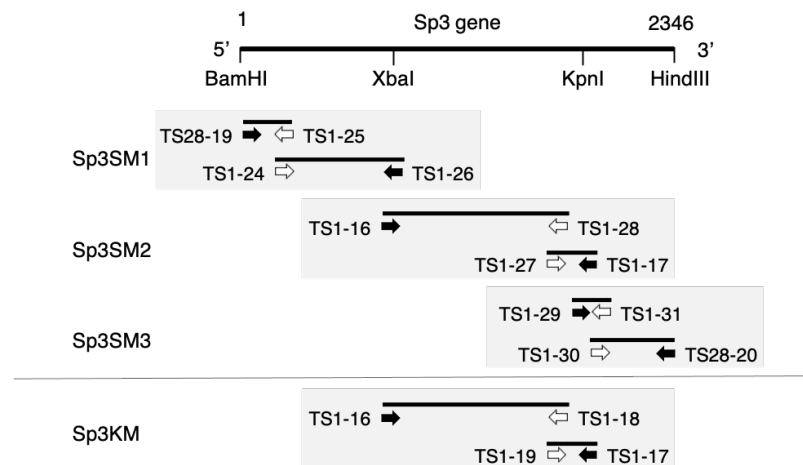


Fig. 4-2. Sp3 の翻訳後修飾部位への変異体を作製する概略図

矢印は使用したプライマーを示し、白い矢印は配列に変異を含む配列のプライマーを示す。プライマーの配列は、Table 5-1 に示した。Sp3SM1、Sp3SM2、及び Sp3SM3 はリン酸化部位への変異体を、Sp3KM はアセチル化部位への変異体を示す。

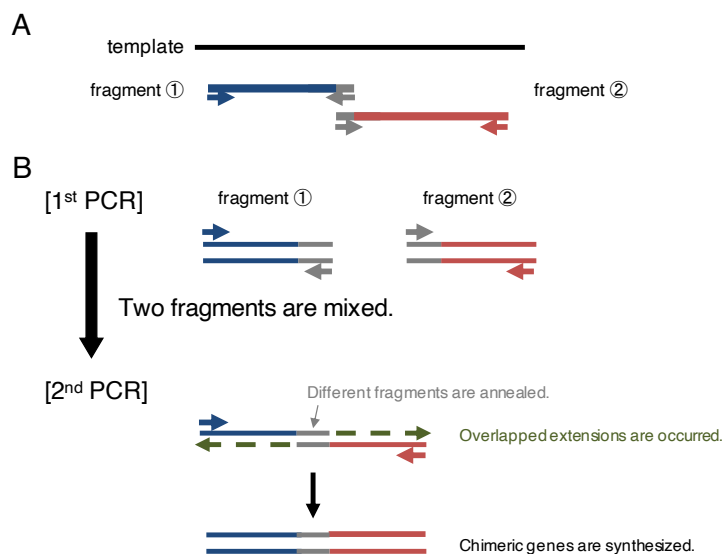


Fig. 4-3. SOE-PCR の概略図

A: SOE-PCR に用いるプライマーの模式図

矢印は、プライマーを示す。

B: SOE-PCR の概略図

SOE-PCR は、一部の配列が相補的となっている 2 種類の DNA 断片を混合して鋳型とし、PCR を行うことによってキメラ遺伝子を作製する方法である (176, 177)。矢印はプライマーを示しており、灰色の矢印は互いが相補的な塩基配列をもつ。

Table 4-1. Sp3 の変異体作製に用いたプライマー

塩基配列の下線部は、配列の後ろに示した制限酵素の認識部位を示す。太文字の塩基配列は、変異を導入した配列を示す。

名前	塩基配列 (5'-3')	位置
TS1-16	TCGAT <u>CTAG</u> ATTCTTTGGGACTCTC (XbaI)	815/837
TS1-17	GATTGG <u>TACC</u> TCTTCCACCACC TTC (KpnI)	1819/1842
TS1-18	GTTCTTCTTCC <u>CG</u> GATCC TAATATC	1674/1698
TS1-19	GATATTAGGATC <u>CG</u> GGAAGAAGAAC	1639/1663
TS1-24	GATAGGGCCGCCAGCGCCGGCGAC	204/229
TS1-25	GTCGCCCGGCGC <u>T</u> GGCGGCCCTATC	204/229
TS1-26	GAA <u>TCTAG</u> ATCGACACTATTGATTG (XbaI)	803/827
TS1-27	T <u>CGC</u> TGGTGATGCTACCTTGAATAC	1685/1709
TS1-28	AGCATCACCA <u>CG</u> GAGCTGCCACTCT	1674/1698
TS1-29	AAGAGG <u>TACCA</u> ATCTTGGGAAAAG (KpnI)	1830/1854
TS1-30	CTGCGTTGGCATGCTGGAGAACGCC	1924/1948
TS1-31	GGCGTTCTCCAGCATGCCAACGCAG	1924/1948
TS28-19	CGG <u>GATCC</u> ATGACCGCTCCGAAAAGCCG (BamHI)	1/22
TS28-20	CC <u>AAGCTT</u> TTACTCCATTGTCTCATTCCA (HindIII)	2325/2346

・ FBS 刺激

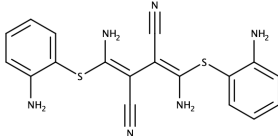
FBS 刺激により、MAPK シグナル伝達経路及び β 4GalT3 遺伝子の転写活性に影響があるかどうかを解析した。 $\phi 35$ mm dish に 2×10^5 cells を播種し、24 時間培養後、FBS を含まない DMEM で 3 回洗浄し、0.5% もしくは 10% FBS を含む DMEM に置換した。48 時間培養後、細胞溶解液に溶解し、FBS 刺激細胞を得た。

・ U0126 処理

2×10^5 個の細胞を $\phi 35$ mm dish に播種し、37°C、5% CO₂ 条件下で 24 時間培養した。その後、pGL(-2190/+89) を導入し、1 時間培養した後、MAPK キナーゼ阻害剤である 20 mM U0126 (Cell Signaling Technology Inc.) (Table 4-2) を含む DMEM 培地に交換し、48 時間培養後、細胞溶解液に溶解し、U0126 処理細胞を得た。

Table 4-2. U0126 の化学式

MAPK シグナル伝達経路のにおける MAPKK である、MAPK/ERK kinase (MEK) のリン酸化を阻害する。

化合物名	U0126
構造式	
ターゲット	MEK

・ MAPK リン酸化の解析

上記で得られた FBS 刺激細胞を、第 4 章に示した《SDS-Polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) 用試料の調製》に従い、SDS-PAGE 用試料を得た。この試料は、BCA 法により求めた各試料に含まれるタンパク質量で補正した。その後、第 3 章に示した《ウエスタンブロット解析》に従い、FBS 刺激が p44/p42 MAPK シグナル伝達経路へ与える影響の解析を行った。1 次抗体として、抗 p44/p42 MAPK 抗体 (Cell Signaling Technology Inc.) 及び抗リン酸化 p44/p42 MAPK (T202Y204) 抗体 (Cell Signaling Technology Inc.) を用い、2 次抗体として AP 標識抗マウス IgG 抗体 (Promega) を用いた。

・ FBS 刺激及び U0126 のβ4GalT3 遺伝子の転写活性への影響

上記で得られた FBS 刺激細胞または U0126 処理した細胞に pGL(-2190/+89) を導入し、ルシフェラーゼアッセイによりプロモーター活性を解析した。第 2 章に示した《培養細胞への遺伝子導入》及び《ルシフェラーゼアッセイ》に従い、実験を行った。

・ 内在性 Sp3 のセリン (Ser) リン酸化の解析 (164)

SH-SY5Y 細胞の内在性の Sp3 内の Ser 残基がリン酸化されているかどうか 10% FBS 存在下で培養した細胞を用いて解析するために、抗 Sp3 抗体を用いて免疫沈降を行い、抗リン酸化 Ser 抗体 (Sigma-Aldrich) で検出した。

(1) 細胞の回収

1×10^7 個の SH-SY5Y 細胞を $\phi 15$ cm dish に播種し、 37°C 、5% CO_2 条件下で 24 時間培養した。細胞溶解液に溶解し、細胞を回収した。回収した細胞溶解液は、BCA 法により求めた各試料に含まれるタンパク質量で補正した。

(2) 免疫沈降

免疫沈降は、 $\mu\text{MACS}^{\text{TM}}$ Protein G MicroBeads (Miltenyi Biotec) を用いて行った (137, 147, 164)。回収した細胞溶解液を、 4°C で 30 分間静置した後、 4°C で $10,000 \times g$ 、10 分間遠心した。得られた上清に $2 \mu\text{g}$ 相当の抗 Sp3 抗体 (Santa Cruz Biotechnology Inc.) と $50 \mu\text{l}$ の $\mu\text{MACS}^{\text{TM}}$ Protein G MicroBeads を添加し、 4°C で 30 分間静置した。Triton X-100 溶解バッファー (150 mM NaCl, 1% Triton X-100, 50 mM Tris-HCl, pH 8.0) で平衡化した μColumn にサンプルをアプライし、Triton X-100 溶解バッファーで 4 回、low-salt wash バッファー (20 mM Tris-HCl, pH 7.5) で 1 回洗浄した。 μColumn に SDS-PAGE サンプルバッファー (95°C) を添加し、室温で 5 分間静置することにより前溶出を行った。最後に、SDS-PAGE サンプルバッファー (95°C) を添加し、回収した溶出液を SDS-PAGE の試料とした。

(3) ウェスタンブロット解析

免疫沈降した SDS-PAGE の試料を、第 3 章で示した《ウェスタンブロット解析》に従い、内在性 Sp3 内の Ser リン酸化の有無を解析した。1 次抗体として抗 Sp3 抗体及び抗リン酸化 Ser 抗体を用い、2 次抗体として AP 標識抗マウス IgG 抗体を用いた。

・ Sp3 内のリン酸化部位への変異導入

Sp3 内の Ser73、Ser563、Ser566、及び Ser646 は、リン酸化される可能性が予測されている (Fig. 4-1) (<https://www.uniprot.org/uniprot/Q02447>) (105)。これらの Sp3 内の Ser 残基のリン酸化が、 $\beta 4\text{GalT3}$ 遺伝子の転写活性に影響するかどうかを解析するために、Ser の代わりに Ala を有する Sp3 変異体の発現プラスミド Sp3SM1 (Ala73Ser)、Sp3SM2 (Ala563Ser と Ala566Ser)、及び Sp3SM3 (Ala646Ser) を作製した。この作製の概略は Fig. 4-2 に示し、SOE-PCR 法を用いて変異を導入した (Fig. 4-3)。使用したプ

ライマーの配列は、Table 4-1 に示した。上記に示した《Sp3 のアセチル化部位への変異導入》と同様に、変異導入プラスミドを作製した。また、4 ヶ所の Ser 残基全てに変異を導入した変異体プラスミドも作製し、Sp3SM123 とした。得られた変異導入プラスミド 4 種か pBA-Sp3 を pGL(-2190/+89) と共導入し、ルシフェラーゼアッセイによりプロモーター活性を解析した。第 2 章に示した《培養細胞への遺伝子導入》及び《ルシフェラーゼアッセイ》に従い、実験を行った。

第 3 節 結果

1. Sp3 内のアセチル化部位への変異導入による $\beta 4\text{GalT3}$ 転写活性への影響

Lys の代わりに、アセチル化されない Ala を有する Sp3 変異体発現プラスミド Sp3KM を作製した。SH-SY5Y 細胞に pGL(-2198/+89) と Sp3 の共導入は、pBA ベクターとの共導入と比較して、プロモーター活性は 1.8 倍増加した (Fig. 4-4)。また、pGL(-2198/+89) と Sp3KM の共導入は、pBA ベクターとの共導入と比較して、プロモーター活性は 2.4 倍増加した (Fig. 4-4)。これらの結果から、Lys551 は SH-SY5Y 細胞の Sp3 による $\beta 4\text{GalT3}$ 遺伝子の転写活性化に関与しないことが示唆された。

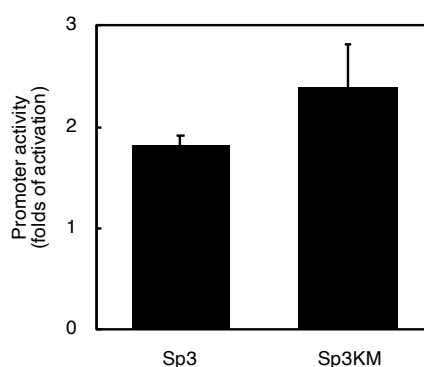


Fig. 4-4. Sp3 のアセチル化部位の $\beta 4\text{GalT3}$ 転写活性への影響

SH-SY5Y 細胞を 24 時間培養した後、pGL(-2190/+89) と Sp3 もしくは Sp3KM を共導入した。その後、48 時間培養し、ルシフェラーゼアッセイにより、プロモーター活性を測定した。ルシフェラーゼ活性は、それぞれのサンプルのタンパク質量で補正した。pGL(-2190/+89) と pBA ベクターを共導入した場合の活性を、1 とした。全ての実験の値は、3 回の実験の平均値を示す。エラーバーは、標準偏差を示す。

2. FBS 刺激による MAPK のリン酸化と $\beta 4\text{GalT3}$ 転写活性への影響

リン酸化された Sp3 は、TLR5 遺伝子と VEGF 遺伝子の転写を活性化することから (162, 171)、Sp3 のリン酸化が SH-SY5Y 細胞における $\beta 4\text{GalT3}$ 遺伝子のプロモーターの活性化に関与する可能性が示唆された。ERK-MAPK によって、Sp3 はリン酸化されることが報告されている (171)。FBS は上皮成長因子受容体-MAPK シグナル伝達を介して p44/p42 MAPK のリン酸化を増加するため (178)、FBS 刺激により SH-SY5Y 細

胞における p44/p42MAPK のリン酸化が変化するかどうかを解析した。SH-SY5Y 細胞を 0.5%及び 10% FBS を含む培地でそれぞれ 24 時間培養した後、細胞を回収し、ウェスタンブロット解析を行った。その結果、p44 MAPK のリン酸化は 10% FBS を含む培地で 2.1 倍増加し (Fig. 4-5A)、FBS が SH-SY5Y 細胞で MAPK シグナル伝達を活性化することを示した。同じ条件下で、SH-SY5Y 細胞に pGL(-2198/+8) を共導入し、プロモーター活性を測定した結果、0.5% FBS 処理細胞と比較して、10% FBS 処理細胞において β 4GalT3 遺伝子のプロモーター活性は 4.1 倍増加した (Fig. 4-5B)。これらの結果から、FBS は MAPK シグナル伝達を活性化し、SH-SY5Y 細胞における β 4GalT3 遺伝子のプロモーター活性を増加することが示唆された。

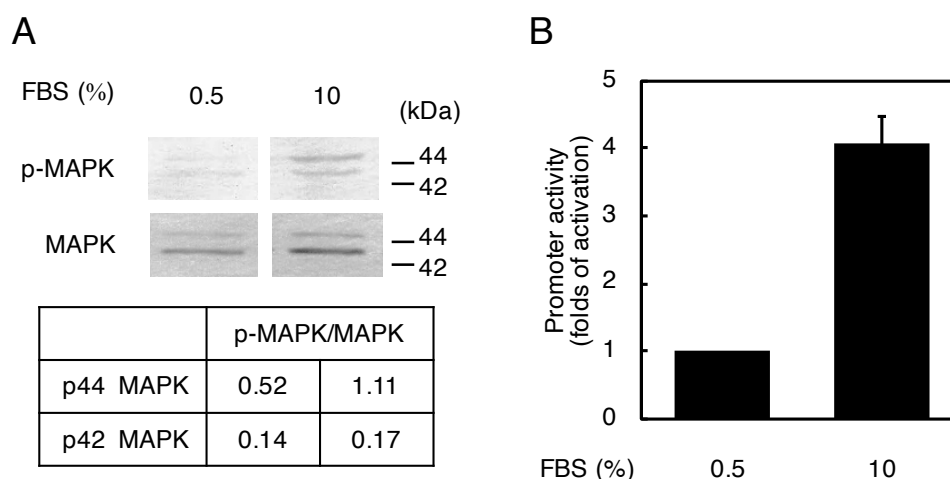


Fig. 4-5. FBS 刺激による MAPK リン酸化と β 4GalT3 遺伝子の転写活性の解析

A: イムノブロットによる MAPK の発現とリン酸化レベルの解析

SH-SY5Y 細胞を 24 時間培養し、それぞれ 0.5% と 10% FBS を含む培地に交換し 24 時間培養した後、細胞を回収した。回収した試料を抗 MAPK 抗体と抗リン酸化 MAPK 抗体を用いて、ウエスタンブロット解析を行った。p-MAPK は、リン酸化 MAPK を示す。バンドの定量には、Image J (ver. 1.52a) を使用した。p44 p-MAPK と p-42 p-MAPK を、それぞれ p44 MAPK と p42 MAPK によって補正した。

B: β 4GalT3 遺伝子のプロモーター活性の解析

SH-SY5Y 細胞を 24 時間培養した後、pGL(-2190/+89) を導入した。その後、それぞれ 0.5% と 10% FBS を含む培地に交換し 24 時間培養した後、ルシフェラーゼアッセイにより、プロモーター活性を測定した。ルシフェラーゼ活性は、それぞれのサンプルのタンパク質量で補正した。0.5% FBS で処理した細胞におけるプロモーター活性を、1 とおいた。全ての実験の値は、3 回の実験の平均値を示す。エラーバーは、標準偏差を示す。

3. U0126 処理による MAPK のリン酸化と β 4GalT3 転写活性への影響

β 4GalT3 遺伝子プロモーターの活性化において MAPK シグナル伝達が関与することを検証するために、MAPK キナーゼの阻害剤である U0126 を用いて (Table 4-2、Fig. 4-6)、プロモーター活性の解析を行った。U0126 で処理すると、p44 MAPK 及び p42 MAPK のリン酸化は対照と比較してそれぞれ 31% 及び 10% に減少し (Fig. 4-7A)、U0126 は SH-SY5Y 細胞の MAPK シグナル伝達を阻害することを示した。この条件下

で、pGL(-2198/+89) のプロモーター活性は、対照と比較して 23% に減少した (Fig. 4-7B)。これらの結果から、SH-SY5Y 細胞において、 β 4GalT3 遺伝子プロモーターの活性化は MAPK シグナル伝達を介して行われることが示唆された。

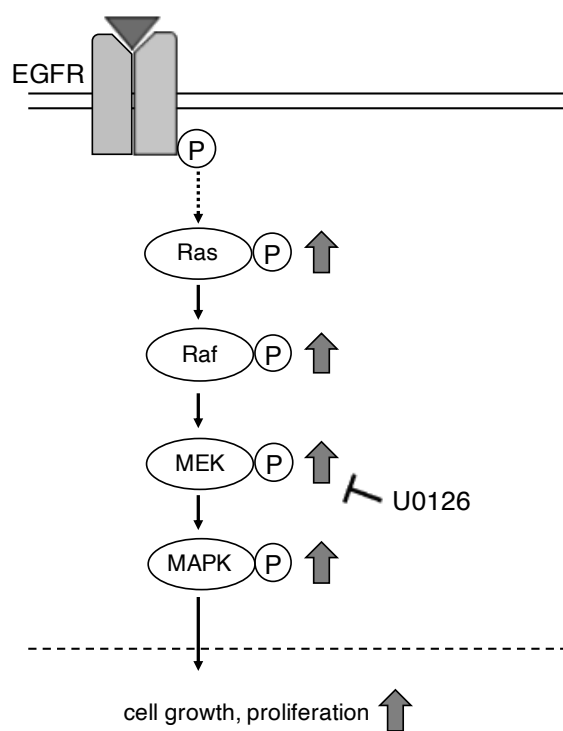


Fig. 4-6. U0126 の作用機序

MAPK シグナル伝達経路の模式図を示す。U0126 は、MEK のキナーゼ活性を阻害することにより MAPK の活性化を阻害する。

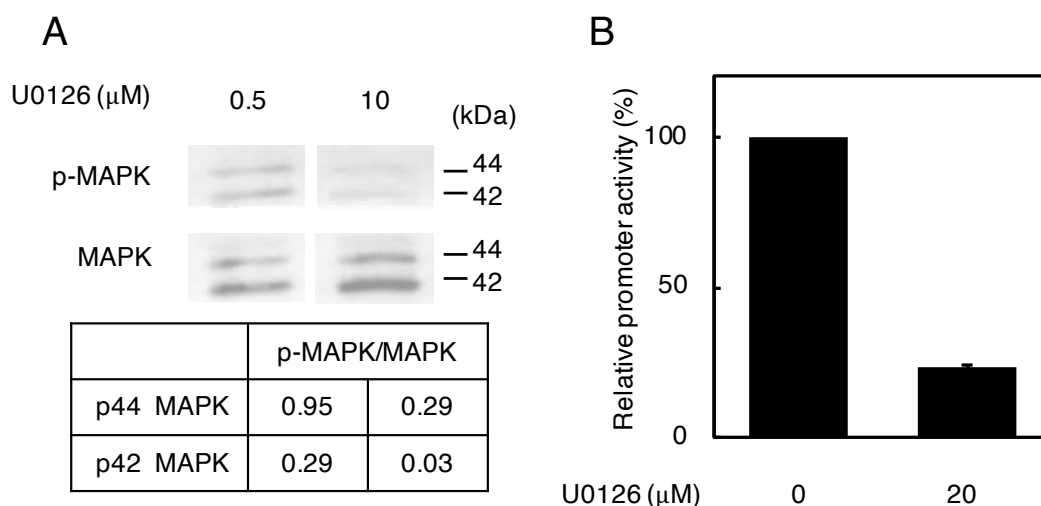


Fig. 4-7. U0126 処理による MAPK リン酸化と β GalT3 遺伝子の転写活性の解析

A: U0126 処理による MAPK の発現とリン酸化レベルの解析

SH-SY5Y 細胞を 24 時間培養し、それぞれ 0 μ M (U0126 の溶媒である DMSO のみでの処理) と 20 μ M U0126 を含む培地に置換し 24 時間培養した後、細胞を回収した。回収した試料を抗 MAPK 抗体と抗リン酸化 MAPK 抗体を用いて、ウェスタンブロット解析を行った。p-MAPK は、リン酸化 MAPK を示す。バンドの定量には、Image J (ver. 1.52a) を使用した。p44 p-MAPK と p-42 p-MAPK を、それぞれ p44 MAPK と p42 MAPK によって補正した。

B: β 4GalT3 遺伝子のプロモーター活性の解析

SH-SY5Y 細胞を 24 時間培養した後、pGL(-2190/+89) を導入した。その後、それぞれ 0 μ M (U0126 の溶媒である DMSO のみでの処理) と 20 μ M U0126 を含む培地に交換し 48 時間培養した後、ルシフェラーゼアッセイにより、プロモーター活性を測定した。ルシフェラーゼ活性は、それぞれのサンプルのタンパク質量で補正した。0 μ M U0126 処理の場合の活性を、1 とした。全ての実験の値は、3 回の実験の平均値を示す。エラーバーは、標準偏差を示す。

4. 内在性 Sp3 内のリン酸化 Ser 残基の解析

ヒト Sp3 にはリン酸化される Ser 残基が含まれており (Fig. 4-1)、MAPK シグナル伝達は腸上皮細胞における Sp3 の Ser 残基のリン酸化を増加することが報告されている (162)。Sp3 の Ser 残基が SH-SY5Y 細胞でリン酸化されているかどうかを解析するために、10% FBS を含む培地で培養した細胞で、抗 Sp3 抗体を用いた免疫沈降を行い、その後、抗リン酸化セリン抗体を用いたウエスタンブロット解析を行った。その結果、免疫沈降した Sp3 は抗リン酸化セリン抗体と反応し (Fig. 4-8)、Sp3 の Ser 残基が、10% FBS を含む培地で培養した SH-SY5Y 細胞においてリン酸化されていることを示した。

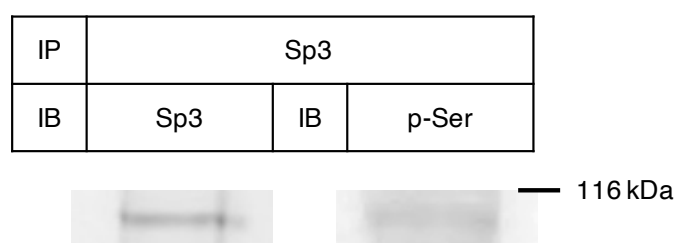


Fig. 4-8. SH-SY5Y 細胞内在性 Sp3 の Ser リン酸化の解析

SH-SY5Y 細胞を回収し、抗 Sp3 抗体を用いて免疫沈降を行い、抗 Sp3 抗体と抗リン酸化セリン抗体を用いてウエスタンブロット解析を行った。p-Ser は、リン酸化 Ser 残基を示す。

5. Sp3 内のリン酸化部位への変異導入によるβ4GalT3 転写活性への影響

ヒト Sp3 内の Ser 残基のうち、Ser563 と Ser566 は転写活性阻害ドメインに、Ser646 はジンクフィンガーを含む DNA 結合ドメインに存在する (Fig. 4-1)。Sp3 によるβ4GalT3 遺伝子のプロモーター活性化の分子メカニズムを解析するために、Sp3 のリン酸化部位の働きに焦点を当て、Sp3 変異体の 4 種類の発現プラスミド Sp3SM1 (Ser73Ala)、Sp3SM2 (Ser563Ala と Ser566Ala)、Sp3SM3 (Ser646Ala)、及び Sp3SM123 (4 ヶ所全てを Ala に置換) を作製した (Fig. 4-9A)。なお、Sp3 内の転写活性阻害ドメインにおける Ser563 と Ser566 の役割は、互いに近いと類似していると推測し、両方の Ser 残基の Ala への置換を含む Sp3 変異体の発現プラスミド Sp3SM2 を作製した。SH-SY5Y 細胞への pGL(-2198/+89) と Sp3 の共導入により、pBA ベクターとの共導入と比較して、プロモーター活性は 2.4 倍増加した (Fig. 4-9B)。また、pGL(-2198/+89) と Sp3SM1 の

共導入でも、pBA ベクターとの共導入と比較して、プロモーター活性は 2.4 倍増加した (Fig. 4-9B)。Sp3 内の Ser73 を欠損しても、欠損のない Sp3 を共導入した場合と同様のプロモーター活性を示した (Fig. 4-9B)。これらの結果から、Sp3 内の Ser73 のリン酸化は、Sp3 による β 4GalT3 遺伝子プロモーターの活性化に関与しないことが示唆された。一方、pGL(-2198/+89) と Sp3SM2 の共導入は、Sp3 との共導入と比較した場合、プロモーター活性は 1.5 倍増加し (Fig. 4-9B)、pGL(-2198/+89) と Sp3SM3 の共導入は、Sp3 との共導入と比較した場合、プロモーター活性は 1.6 倍増加した (Fig. 4-9B)。これらの結果から、Sp3 内の Ser563、Ser566、及び Ser646 への変異によりプロモーター活性化が著しく減少することが判明した。また、pGL(-2198/+89) と Sp3SM123 の共導入は、Sp3 との共導入と比較した場合、プロモーター活性はわずかに 1.2 倍増加した (Fig. 4-9B)。これは、pBA を共導入した細胞とほぼ同様の活性を示した (Fig. 4-9B)。したがって、Sp3 との共導入と比較した場合、Sp3 による β 4GalT3 遺伝子プロモーターの活性化が 4 ヶ所すべての Ser 残基の Ala への置換によって劇的に減少することが明らかとなった。以上の結果から、Sp3 内の特定の Ser 残基のリン酸化が、SH-SY5Y 細胞における Sp3 による β 4GalT3 遺伝子プロモーターの活性化に重要であることが示唆された。

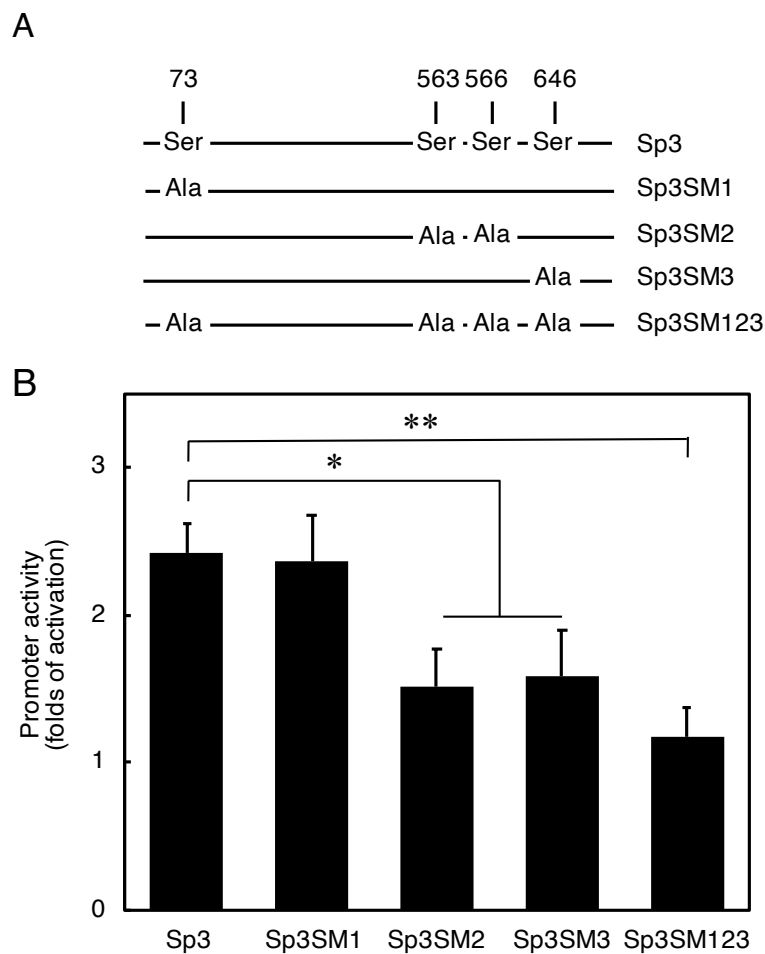


Fig. 4-9. Sp3 内の Ser 残基リン酸化のβ4GalT3 遺伝子の転写活性への影響

A: Sp³ のリン酸化部位への変異導入の模式図

B: Sp3 と Sp3 変異体の導入によるβ4GalT3 遺伝子プロモーターの活性化の解析

SH-SY5Y 細胞を 24 時間培養した後、pGL(-2190/+89) と、Sp3 または各 Sp3 変異体 (Sp3SM1、Sp3SM2、Sp3SM3、及び Sp3SM123) を共導入した。その後、48 時間培養し、ルシフェラーゼアッセイにより、プロモーター活性を測定した。ルシフェラーゼ活性は、それぞれのサンプルのタンパク質量で補正した。pGL(-2190/+89) と pBA ベクターを共導入した場合の活性を 1 とした。全ての実験の値は、3 回の実験の平均値を示す。エラーバーは、標準偏差を示す。* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

第4節 考察

第4章では、MAPK シグナル伝達によって媒介される Sp3 の Ser リン酸化が、SH-SY5Y 細胞における β 4GalT3 遺伝子の発現転写活性化に重要であることが示唆された。リン酸化される4ヶ所の Ser 残基のうち、Ser563、Ser566、及び Ser646 は、SH-SY5Y 細胞における Sp3 による β 4GalT3 遺伝子のプロモーター活性化に寄与する可能性が示された。また、Ser563 及び Ser566 は転写活性阻害ドメインに、Ser646 は DNA 結合ドメインに含まれており、本博士論文は、Sp3 の転写活性阻害ドメインと DNA 結合ドメインにおけるリン酸化部位の役割を示した。Fig. 4-1 に示すように、本博士論文では Sp3 のドメイン構造に着目し、転写活性阻害ドメインに含まれる Ser563 と Ser566 の両方に変異導入している。そのため、Ser563 及び Ser566 のどちらかのみが β 4GalT3 遺伝子のプロモーター活性化に寄与する可能性もある。Sp1 と Sp3 は同じファミリーに属しているが、分子構造は部分的に異なる (Fig. 4-10)。Sp1 の転写活性阻害ドメインは N 末端近くのアミノ酸 2~82 に存在するが、Sp3 の転写活性阻害ドメインは、転写活性化ドメインと DNA 結合ドメインの間のアミノ酸 534-620 に位置する (105)。Sp1 のリン酸化は、転写の活性化に関係しており、おそらく Sp1 のリン酸化部位の位置により転写制御への機能が変化すると考えられる (179-181)。Sp1 の転写活性阻害ドメインにある Ser59 のリン酸化は、ジヒドロ葉酸レダクターゼ遺伝子プロモーターへの DNA 結合能力を増加した (182)。同様に、本研究の結果は、Sp3 の転写活性阻害ドメインにおける Ser563 及び Ser566 のリン酸化が β 4GalT3 遺伝子プロモーターを活性化することを示した。これらの結果から、Sp1 及び Sp3 の分子構造は異なるが、転写活性阻害ドメインのリン酸化は、転写を活性化する同様の機能をもつ可能性がある。Sp1 及び Sp3 の転写活性化阻害ドメインのリン酸化が転写活性へどのようなメカニズムで影響を与えるのか詳細は明らかになっておらず、転写活性化ドメインや DNA 結合ドメインのリン酸化についても同様である。

リン酸化と DNA 結合能の関係については、オカダ酸処理による Sp1 リン酸化の増加により、標的 DNA への DNA 結合が増加したという知見がある (183)。Sp1 の DNA 結合ドメインでは、3 部位のリン酸化 (Thr668、Ser670、及び Thr681) は、血小板由来成長因子-D 遺伝子プロモーターへの DNA 結合能力を高め、それによってヒト平滑筋細胞においてプロモーター活性を増強した (184)。さらに、GATA4 のジンクフィンガーDNA 結合ドメインでは、Ser261 のリン酸化はナトリウム利尿ペプチド A 遺伝子

プロモーターへの DNA 結合に関与しており、リン酸化部位の変異はプロモーター活性化の低下をもたらした (185)。これらの知見から、Sp3 の DNA 結合ドメインにおける Ser646 のリン酸化は DNA 結合を増加させ、SH-SY5Y 細胞のβ4GalT3 遺伝子のプロモーター活性化をもたらしたと考えられる。Sp3 内の Ser73 は *in vitro* で p42 MAPK によって、*in vivo* で Erk によってリン酸化されることが示され、Ser73 のリン酸化は DNA 結合能力に影響を与えなかったが、VEGF 遺伝子プロモーターの転写活性化に寄与する報告がある (171)。〈Fig. 4-9. Sp3 内の S 残基リン酸化のβ4GalT3 遺伝子プロモーターの活性化への影響〉に示したように、SH-SY5Y 細胞における Ser73 のリン酸化は、Sp3 によるβ4GalT3 遺伝子の転写活性化には関与していないことが示されたが、Ser73 が SH-SY5Y 細胞でリン酸化されていない可能性がある。

興味深いことに、β4GalT3 遺伝子のプロモーター活性化の顕著な減少が Sp3 変異体 Sp3SM123 との共導入によって観察され、Ser563、Ser566、及び Ser646 のリン酸化が協調して機能してβ4GalT3 遺伝子プロモーターを活性化する Sp3 の機能を高めることが示唆された。転写活性阻害ドメインと DNA 結合ドメイン内の Ser 残基リン酸化によって誘導される、両ドメインの分子内相互作用が増加し、転写因子を動員することが考えられる。リン酸化に加えて、Ser 残基は O-グリコシル化を受けると考えられる (186)。Sp1 のリン酸化と O-グリコシル化のバランスが、カルモジュリン遺伝子の転写を調節する (187)。Sp3 の N 末端部分 (アミノ酸 1~490) が O-グリコシル化され、Sp3 は転写抑制因子として機能する (186)。Sp3 の O-グリコシル化がβ4GalT3 遺伝子の転写活性化に関与している場合、この研究で解析した Ser 残基リン酸化部位が O-グリコシル化部位をと共有しているかどうかを調べる必要がある。

Sp3 では、アセチル化は転写活性化因子として機能するもう 1 つの修飾である。アセチル化された Sp3 は、MCF-7L ヒト乳癌細胞の形質転換成長因子β受容体 II 型遺伝子プロモーターを活性化する (170)。しかし、SH-SY5Y 細胞における Sp3 のアセチル化は、Lys551 へ変異を導入した Sp3KM によってプロモーター活性が増加したため、Sp3 によるβ4GalT3 遺伝子の転写活性化には関与していないことが示唆された (Fig. 4-4)。Braun らの研究で、分岐鎖アミノ酸アミノ基転移酵素遺伝子において、Lys551 の変異を導入した Sp3 変異体による同様のプロモーター活性化が観察された (188)。Lys551 は Sp3 の転写活性阻害ドメインに含まれているため、Lys551 のアセチル化は Sp3 の阻害機能に必要であると考えられる。これらの知見から、本研究で示した、SH-SY5Y

細胞における Sp3KM による β 4GalT3 遺伝子のプロモーター活性化は、Sp3KM における Lys551 の欠損により転写活性阻害機能が弱まった可能性がある。あるいは、Sp3 の Lys551 は SUMO 化を受けることも考えられる (189)。一般に、SUMO 化はタンパク質の安定性、クロマチン構造の調節、細胞内区画化、及び転写因子の活性や抑制などの多様な調節機能に関係していることが知られている (190)。転写因子は、SUMO 化することでプロモーター活性を増加すること報告がある。SUMO 化する Lys 残基の欠損は、転写因子の活性化する Sp3 の機能も増加させる可能性があり、これは β 4GalT3 遺伝子のプロモーター活性の増加の要因とも考えられる (191)。

本研究の第3章で示した、細胞種によって β 4GalT3 遺伝子の転写を制御する転写因子が異なるメカニズムを明確にするには至らなかった。しかし、本章で SH-SY5Y 細胞における Sp3 内の翻訳後修飾が β 4GalT3 遺伝子の転写制御に重要なことを示した。また、<Fig. 3-3Sp1 と Sp3 の細胞内局在> に示した結果において、Sp1 のバンドは2本検出された。このバンドのうち、上のバンドはリン酸化された Sp1 であると考えられており (182)、両細胞においてリン酸化された Sp1 が検出されていることから、Sp1 の翻訳後修飾が β 4GalT3 遺伝子の転写に関与する可能性が考えられる。今後、両細胞から Sp1 及び Sp3 を精製し、質量分析法を用いてリン酸化やその他の翻訳後修飾を解析することで、両細胞間での Sp1 及び Sp3 の翻訳後修飾の位置を明らかにできれば、細胞種によって異なる β 4GalT3 遺伝子の転写制御メカニズム解明の糸口となると考える。

第4章で示したように、Sp3 は SH-SY5Y 細胞では β 4GalT3 遺伝子の転写活性化因子として機能するが、A549 細胞では転写抑制因子として機能することが示された。SH-SY5Y 細胞では Sp3 は、ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリリン酸オキシダーゼサブユニット4及びジッパープロテインキナーゼをコードする遺伝子の転写活性化因子として機能する (192, 193)。予備的な実験から、A549 細胞と同様に、Sp3 が SW480 ヒト大腸癌細胞及び MKN1 ヒト胃癌細胞における β 4GalT3 遺伝子の転写抑制因子として機能することが示された。これらの結果は、Sp3 が神経芽細胞腫では転写活性化因子として機能するが、他の種類の癌では転写抑制因子として機能することを示唆している。この研究から、Sp3 の神経芽腫特異的と考えられる機能は、癌の種類間での Sp3 のリン酸化状態及びリン酸化部位が異なることに起因する可能性がある。

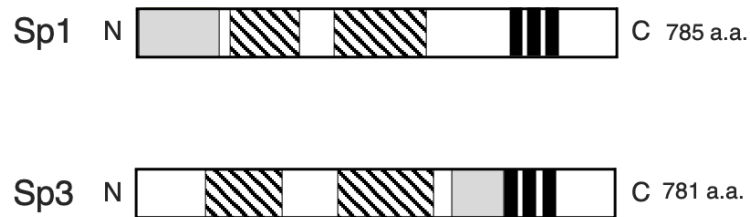


Fig. 4-10. Sp1 と Sp3 のドメイン構造の模式図

斜線の box は転写活性化ドメイン、灰色の box は転写活性阻害ドメイン、黒色の box はジンクフィンガーを含む DNA 結合ドメインを示す。

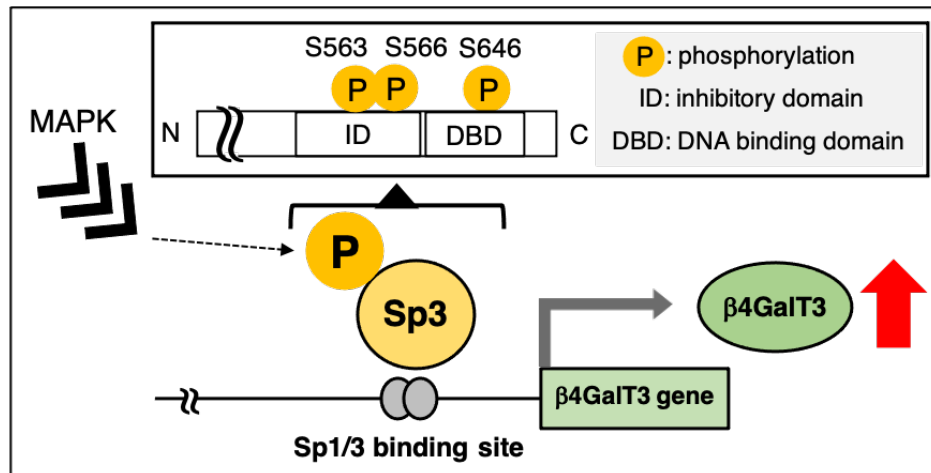


Fig. 4-11. 第 4 章までの小括

ヒト神経芽細胞腫において MAPK シグナル伝達の活性化により β4GalT3 遺伝子の転写は活性化し、転写活性化には Sp3 内の特定の Ser 残基のリン酸化が重要であることを明らかにした (194)。

第 5 章

$\beta 4\text{GalT3}$ 遺伝子プロモーター領域を含むレポータープラスミドの 各種化合物に対する応答性の解析

第 1 節 緒言

近年、細胞ベースアッセイを用いた新規の薬剤探索が行われている。中でもルシフェラーゼ遺伝子を用いたスクリーニングシステムは、簡便かつ高感度であり転写制御に着目した多くの化合物スクリーニング系で利用されている (129–134)。当研究室の Fukushima は、 $\beta 4\text{GalT4}$ の転写制御メカニズムを利用した大腸癌治療薬のスクリーニング法を提唱した (137)。 $\beta 4\text{GalT3}$ の発現は神経芽腫の転移及び増殖の増加と関連し、 $\beta 4\text{GalT3}$ の発現を抑制すると、これら悪性度が低下することが明らかとなっている (75)。これらの知見から、 $\beta 4\text{GalT3}$ 遺伝子の転写制御メカニズムに着目することで、 $\beta 4\text{GalT3}$ 遺伝子の発現を阻害する神経芽腫治療薬の発見につながる可能性があると考えた。

第 2 章及び第 3 章で、 $\beta 4\text{GalT3}$ 遺伝子のプロモーター領域に Sp3 が結合し、転写活性を制御する転写因子であることを示した (Fig. 3-8)。第 4 章で、Sp3 内の 3 ヶ所のリン酸化が $\beta 4\text{GalT3}$ 遺伝子の転写活性に重要であることを示した (Fig. 4-11)。また、MEK リン酸化阻害剤 U0126 を用いた実験から、Sp3 内のリン酸化は MAPK シグナル伝達経路を介している可能性が示唆された (Fig. 4-7)。本章では、Sp3 が DNA に結合するのを阻害する Mithramycin A を用いて、 $\beta 4\text{GalT3}$ 遺伝子のプロモーター領域を組込んだレポータープラスミドに応答性があるかどうかを解析した。さらに、U0126 と同様に細胞内シグナル伝達を阻害する化合物を用いて、 $\beta 4\text{GalT3}$ 遺伝子のプロモーター領域を組込んだレポータープラスミドに応答性があるかどうかを解析した。一連の研究を通じて、 $\beta 4\text{GalT3}$ 遺伝子の転写制御メカニズムを基盤とする細胞ベースアッセイが神経芽腫に奏功する薬剤の探索に有用性であるかどうかを検討した。

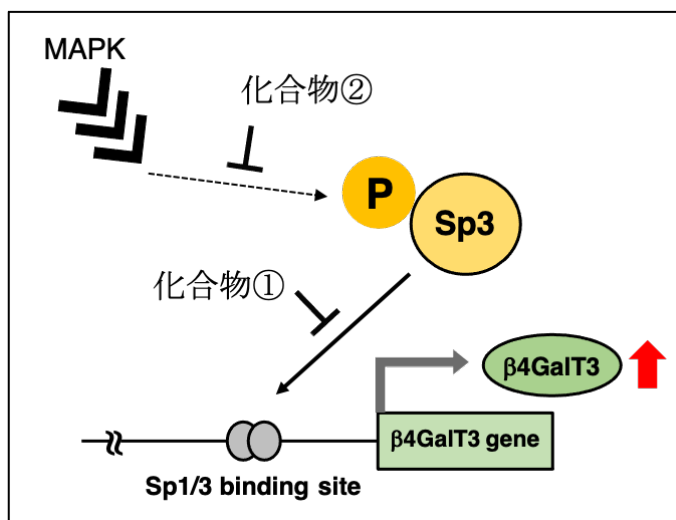


Fig. 5-1. 作用機序の異なる化合物を使用したレポータープラスミドの薬剤応答性の解析

β4GalT3 遺伝子プロモーター領域を用いたレポータープラスミドを、神経芽腫の薬剤探索に利用できるか有用性の解析を行った。Sp3 が DNA に結合するのを阻害する化合物①と、MAPK シグナル伝達経路を阻害する化合物②を用いて、β4GalT3 遺伝子プロモーター領域を含むレポータープラスミドの応答性を解析した。

第 2 節 材料と方法

・細胞の化合物処理

SH-SY5Y 細胞をφ100 mm dish に 1×10^6 cell を播種し、10% FBS を含む DMEM を用いて、37°C、5% CO₂ 存在下で培養した。24 時間後に、Mithramycin A (Cell Signaling Technology Inc.) (Table 5-1)、Tyrphostin AG1478 (Cell Signaling Technology Inc.) (Table 5-2)、U0126 及び LY294002 (Cell Signaling Technology Inc.) (Table 5-2)を、それぞれの結果に表記した濃度で培地に添加し、24 時間培養し、化合物処理細胞を得た。化合物の使用濃度は、当研究室の Fukushima の論文を参照した (137)。

Table 5-1. Mithramycin A の化学構造

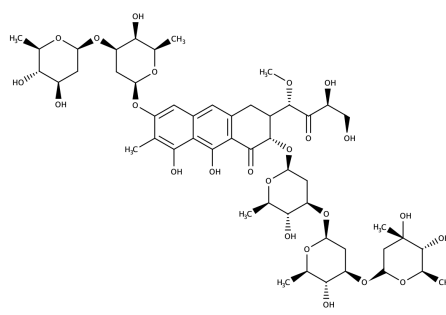
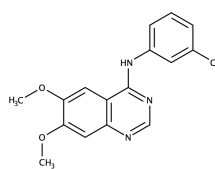
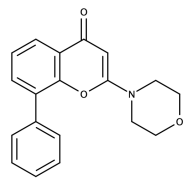
化合物名	Mithramycin A
構造式	
ターゲット	DNAのGCリッチ配列

Table 5-2. 2 種類の化合物の化学構造

化合物名	AG 1478	LY294002
構造式		
ターゲット	EGFR	PI3K

・化合物の β 4GalT3 遺伝子のプロモーター活性への影響の解析

SH-SY5Y 細胞に pGL(-2190/+89) を導入し、ルシフェラーゼアッセイによりプロモーター活性を解析した。レポータープラスミドの導入は、化合物処理の 1 時間前に行った。第 2 章に示した《細胞への形質導入用プラスミド DNA の調製》、《培養細胞への遺伝子導入》、及び《ルシフェラーゼアッセイ》に従い、実験を行った。

第 3 節 結果

1. Mithramycin A に対するレポータープラスミドの応答性の解析

β 4GalT3 遺伝子の転写を制御する Sp3 に着目することで、 β 4GalT3 遺伝子の発現を阻害する神経芽腫治療薬の発見に繋がる可能性があると考え、Sp3 が DNA への結合を阻害する Mithramycin A を用いて (195, 196)、 β 4GalT3 遺伝子のプロモーター活性を減少させるかどうかを解析した。その結果、0.1 μ M 及び 1.0 μ M の Mithramycin A で処理した SH-SY5Y 細胞でのプロモーター活性は、未処理の細胞を 100%とした場合、30%及び 4.8%と濃度依存的に有意に減少した (Fig. 5-2)。これらの結果から、Mithramycin A で処理した SH-SY5Y 細胞では β 4GalT3 遺伝子のプロモーター活性が著しく減少することが示された。したがって、 β 4GalT3 遺伝子のプロモーター領域を繋いだレポータープラスミドは、化合物に対して応答性があり、神経芽腫に奏功する薬剤の探索に有用であることが示された。

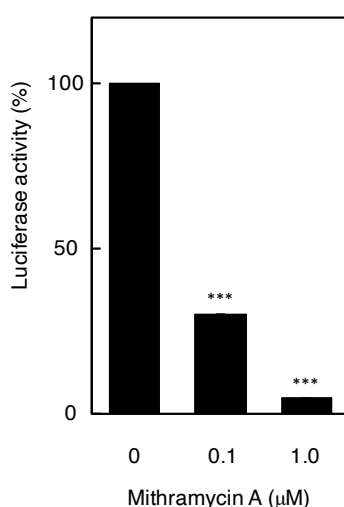


Fig. 5-2. Mithramycin A に対するレポータープラスミドの応答性の解析

SH-SY5Y 細胞を各濃度の Mithramycin A で処理し、24 時間培養した後、ルシフェラーゼアッセイにより、プロモーター活測定した。ルシフェラーゼ活性はそれぞれのサンプルのタンパク質量で補正し、薬剤未処理の場合のプロモーター活性を 100%とした。全ての実験の値は、3 回の実験の平均値を示す。エラーバーは、標準偏差を示す。*** $p < 0.001$ vs. 0 μ M Mithramycin A.

2. シグナル伝達経路阻害化合物に対するレポータープラスミドの応答性の解析

第 4 章において、MAPK キナーゼの阻害剤である U0126 で SH-SY5Y 細胞を処理すると β 4GalT3 遺伝子のプロモーター活性は 24% 減少することを示した (Fig. 4-7)。MAPK シグナル伝達経路は、EGFR、Ras、Raf、MEK そして MAPK へとキナーゼ活性が伝達していくことで活性化されていく (Fig. 5-3)。そこで、その他の MAPK シグナル伝達経路を阻害する化合物を用いて β 4GalT3 遺伝子のプロモーター領域を含むレポータープラスミドの応答性を解析した。U0126 より上流の EGFR のリン酸化を阻害する Tyrphostin AG1478 や、phosphatidylinositol-3 kinase (PI3K) の阻害剤である LY294002 (Table 5-2、Fig. 5-3) を用いて細胞を処理した。 β 4GalT3 遺伝子のプロモーター活性は、対照と比較して、Tyrphostin AG1478 で処理すると 41%、LY294002 で処理すると 5% 減少した (Fig. 5-4)。これらの結果から、 β 4GalT3 遺伝子のプロモーター領域を含むレポータープラスミドは細胞内シグナル伝達経路阻害化合物に対して応答性があることが示唆された。また、MAPK シグナル伝達経路以外の PI3K 細胞シグナル伝達経路も β 4GalT3 遺伝子のプロモーター活性に関与していることが示唆された。

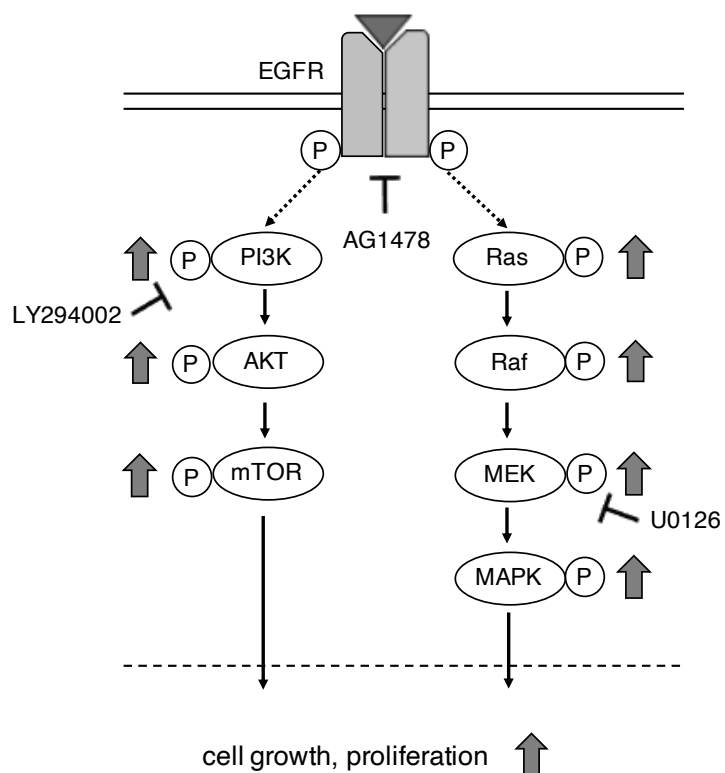


Fig. 5-3. 3 種類の化合物の作用機序

EGFR によって活性化される MAPK シグナル伝達経路と、PI3K シグナル伝達経路の模式図を示す。Tyrosphostin AG1478 は、EGFR のリン酸化を阻害する。U0126 は、Raf によりリン酸化された MEK を阻害する。LY294002 は、EGFR によりリン酸化された PI3K を阻害する。

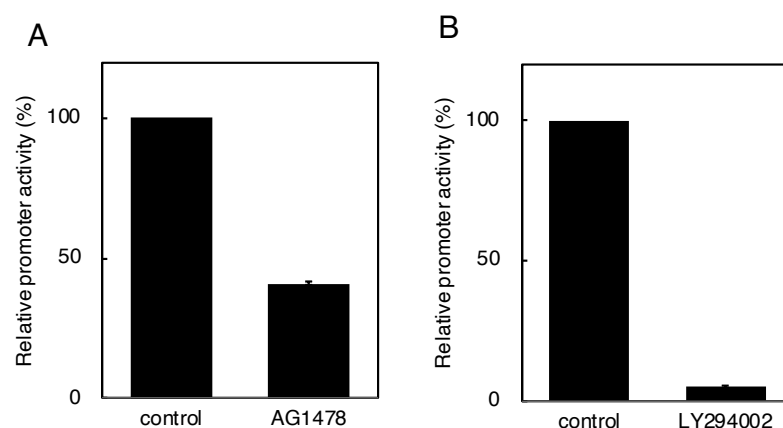


Fig. 5-4. シグナル伝達経路阻害化合物に対するレポータープラスミドの応答性の解析

A: Tyrphostin AG1478 に対するレポータープラスミドの応答性の解析

Tyrphostin AG1478 処理の SH-SY5Y 細胞を 24 時間培養した後、pGL(-2190/+89) を導入した。その後、それぞれ、無処理 (DMSO のみ) と 2 μ M Tyrphostin AG1478 を含む培地に交換し 24 時間培養した後、ルシフェラーゼアッセイにより、プロモーター活性を測定した。ルシフェラーゼ活性はそれぞれのサンプルのタンパク質量で補正し、薬剤未処理の場合のプロモーター活性を 100%とした。全ての実験の値は、3 回の実験の平均値を示す。エラーバーは、標準偏差を示す。

B: LY294002 に対するレポータープラスミドの応答性の解析

LY294002 処理の SH-SY5Y 細胞を 24 時間培養した後、pGL(-2190/+89) を導入した。その後、それぞれ、無処理 (DMSO のみ) と 20 μ M LY294002 を含む培地に交換し 24 時間培養した後、ルシフェラーゼアッセイにより、プロモーター活性を測定した。ルシフェラーゼ活性はそれぞれのサンプルのタンパク質量で補正し、薬剤未処理の場合のプロモーター活性を 100%とした。全ての実験の値は、3 回の実験の平均値を示す。エラーバーは、標準偏差を示す。

第 4 節 考察

これまでの癌治療の知見から、薬剤耐性によって抗癌剤の効果が消失することは頻繁に起きることが報告されている (197)。また、抗癌剤を探索する上で、複数の標的があることで探索効率が上がる。第 5 章までで明らかにしたことを踏まえ、① $\beta 4\text{GalT3}$ 遺伝子の転写制御を担っている Sp3 が結合するのを阻害する化合物、② $\beta 4\text{GalT3}$ 遺伝子の転写活性化に関与する Sp3 のリン酸化を担っているシグナル伝達経路を阻害する化合物の 2 種類の化合物を使用してレポータープラスミドの応答性を解析した (Fig. 5-1)。

バイオアッセイの中でも、細胞を用いて生理反応や応答を解析することを細胞ベースアッセイと呼ぶ。細胞ベースアッセイは、生命科学を理解する上で不可欠であり、細胞を用いた反応から生体内の反応を予測することが可能であり、薬剤の探索及び開発に多く導入されている (198, 199)。多くの種類の細胞株の樹立、細胞培養の技術発達により、細胞を用いた解析は容易となり、マウスやラット等の動物を用いた手法よりも操作性や処理能力に優れている。ルシフェラーゼ遺伝子を用いたスクリーニングシステムは、高感度かつ簡便なため、転写制御に着目した多くの化合物スクリーニング系で利用されている (131–134)。

神経芽腫において $\beta 4\text{GalT3}$ の発現増加が悪性度と正の相関を示し、 $\beta 4\text{GalT3}$ の発現を減少させると悪性度も低下することが報告されている (75)。高リスクの神経芽腫は依然として予後不良であるため、神経芽腫の効果的な治療戦略と薬剤を開発する必要がある。これらの知見から、 $\beta 4\text{GalT3}$ 遺伝子プロモーター領域をルシフェラーゼ遺伝子の上流に繋いだレポータープラスミドを用いて、効果的なスクリーニングシステムが開発できないかと考えた。 $\beta 4\text{GalT3}$ 遺伝子プロモーターのレポータープラスミドが化合物に対して応答性があるのかどうかを解析するため、第 3 章において神経芽細胞腫において $\beta 4\text{GalT3}$ 遺伝子の転写を制御することが示された Sp3 が、DNA へ結合するのを阻害する Mithramycin A で薬剤処理を行った。その結果、 $\beta 4\text{GalT3}$ 遺伝子のプロモーター活性は減少し、 $\beta 4\text{GalT3}$ 遺伝子のプロモーター領域を用いたレポータープラスミドは化合物に対して応答性を示した (Fig. 5-2)。この結果から、 $\beta 4\text{GalT3}$ 遺伝子のプロモーター領域を用いた細胞ベースアッセイは、神経芽腫に奏功する薬剤の探索に有用であると考えた。第 4 章で $\beta 4\text{GalT3}$ 遺伝子の転写制御に重要な Sp3 内のリン酸化は、MAPK 細胞シグナル伝達経路が関与している可能性が示唆された。この結果から、

$\beta 4\text{GalT3}$ 遺伝子のプロモーターのレポータープラスミドに応答性があるかどうかを、その他のシグナル伝達経路阻害化合物を用いて解析した。その結果、MAPK シグナル伝達経路だけでなく PI3K シグナル伝達経路によっても $\beta 4\text{GalT3}$ 遺伝子の転写制御に影響することが示された (Fig. 5-4)。U0126 と同様に、EGFR の下流である MAPK シグナル伝達経路及び PI3K シグナル伝達経路が SH-SY5Y 細胞における $\beta 4\text{GalT3}$ 遺伝子のプロモーター活性を減少することを示した。Tyrphostin AG1478 で処理しても、 $\beta 4\text{GalT3}$ 遺伝子のプロモーター活性が減少したことから、EGFR のリン酸化が関与するその他の細胞シグナル伝達経路も $\beta 4\text{GalT3}$ 遺伝子のプロモーター活性に関与する可能性が示された。その他の経路の 1 つである PI3K シグナル伝達経路を阻害する LY294002 で処理した場合も、 $\beta 4\text{GalT3}$ 遺伝子のプロモーター活性が減少したことから、MAPK シグナル伝達経路以外が $\beta 4\text{GalT3}$ 遺伝子のプロモーター活性に関与する可能性が高まった。しかし、MAPK シグナル伝達経路と同様に PI3K シグナル伝達経路も、細胞の活動維持に欠かせないものであるため、シグナル伝達経路の阻害は正常細胞へのダメージをもたらすことを考慮しなければならない。本実験で使用した 3 種類のシグナル伝達経路阻害化合物は、癌細胞を処理すると悪性度が低下することが示されている。例えば、U0126 で胚性横紋筋肉腫細胞を処理すると腫瘍の成長と血管新生を低下させ (200)、Tyrphostin AG1478 で鼻咽頭癌細胞を処理すると細胞増殖を低下させる (201)。また、LY294002 は子宮頸癌細胞においてアポトーシスを増加することが報告されている (202)。

$\beta 4\text{GalT3}$ 遺伝子のプロモーター活性に特異的に阻害する化合物の発見は、化合物投与と患者の予後の良さへとつながると考えられる。当研究室の Tomatsu や Miyazaki によって、SH-SY5Y 細胞における Sp3 による $\beta 4\text{GalT3}$ 遺伝子のプロモーター活性化に AP-2 が関与している可能性が示唆された。細胞種の違い、もしくは正常細胞との違いにより、 $\beta 4\text{GalT3}$ 遺伝子のプロモーター活性に関与する転写因子の他の転写因子との相互作用が変化している可能性があり、さらなる研究が必要である。また、近年の薬剤探索の研究は進み、ドラッグ・デリバリー・システムという狙った臓器に薬を送るシステムが構築されている (203)。癌化した組織は栄養を取り入れやすくするため血管の隙間が大きく開いていることから、高分子ミセルに分子標的薬を内包することで、正常な組織には侵入できず、癌化した組織の血管のみから細胞内に侵入する。侵入した高分子ミセルは、血管と細胞との水素イオン濃度の差によって破壊され、分子

標的薬が放出することで癌細胞にのみ薬が運ばれる。このような臓器選択的に輸送する手段と組み合わせることで、本研究で有用性を示した $\beta 4\text{GalT3}$ 遺伝子のプロモーター領域を用いた治療薬の探索で発見した化合物を利用できるのではないかと考える。

総 括

我々人類は、少なくとも旧石器時代から癌に苦しめられたことが明らかとなってきた。科学技術が進んだ現在でも、癌は世界中の国で問題となっており、2016 年の癌による死者数は 960 万人である。IARC によると、2035 年における新たな癌罹患者数は 2400 万人、死者数は 1460 万人まで増加していくと予測されており、癌の増殖や浸潤等のメカニズムの研究及び抗癌剤の開発が求められている。

β 4GalT ファミリーは 7 種類単離されており、癌化した細胞で β 4GalT3 遺伝子及び β 4GalT5 遺伝子の発現が上昇することが見出された。しかし、複合糖質糖鎖の GlcNAc 残基をガラクトシル化する酵素である β 4GalT3 の転写制御メカニズムは未だ明らかになっていない。近年、 β 4GalT3 の発現増加とヒト神経芽腫の悪性度が正の相関を示すことが報告され、 β 4GalT3 の合成する糖鎖が浸潤や移動能に関与していることが明らかとなった。神経芽腫は小児癌の一種であり、白血病や脳腫瘍に次いで患者数の多い病気である。神経芽腫患者の中でも、超低リスク及び低リスクグループの患者はほとんどが良好な予後を示し、長期生存は 80%以上である。しかし、高リスクグループの 5 年間生存期間は約 30%と低く、効果的な治療法がないのが現状である。そのため、神経芽腫の新規治療法を開発する必要がある。本博士論文では、未だ効果的な治療効果のない神経芽腫における β 4GalT3 の発現上昇を、転写制御メカニズムに着目して解明し、そのメカニズムを神経芽腫の治療や薬剤スクリーニングに応用していくことを目標とした。

第 1 章では、転写制御の研究を進めるにあたって基礎的な情報の 1 つである転写開始点の決定を行った。SH-SY5Y 細胞及び A549 細胞における転写開始点は同一で、翻訳開始コドンから 5'-上流 1440 bp に位置した。

第 2 章では、 β 4GalT3 遺伝子の 5'上流領域 2.3 kb を単離し、これをルシフェラーゼ遺伝子の 5'上流に組み込み、レポータープラスミドを作製した。単離した 2.3 kb を用いて、各種デリーションコンストラクトを作製し、プロモーター活性を測定することでプロモーター領域を特定した。SH-SY5Y 細胞及び A549 細胞において、プロモーター領域は -69 から -5 の間にあることが明らかとなった。さらに、この領域に結合しうる転写因子を TFBIND により検索し、Sp1/3 結合部位が 2 ヶ所存在することを見出した。実際に β 4GalT3 遺伝子のプロモーター領域に、Sp1 及び Sp3 が結合するかどうかを解

析するために、クロマチン免疫沈降法により、抗 Sp1 抗体及び抗 Sp3 抗体を用いて解析した。その結果、SH-SY5Y 細胞では Sp3 が、一方 A549 細胞では Sp1 が β 4GalT3 遺伝子のプロモーター領域に結合していることを明らかにした。細胞種によって、 β 4GalT3 遺伝子の転写を制御する転写因子が異なることが示唆された。

第 3 章では、Sp1 と Sp3 の β 4GalT3 遺伝子の転写活性への効果を解析した。Sp1 及び Sp3 発現プラスミドを β 4GalT3 遺伝子の 5'-上流領域と共導入し、プロモーター活性を解析した。その結果、SH-SY5Y 細胞において Sp1 と Sp3 は共に β 4GalT3 遺伝子の転写を活性させた。一方、A549 細胞において Sp1 は β 4GalT3 遺伝子の転写を活性化したが、Sp3 は転写を抑制した。細胞腫が異なると、 β 4GalT3 遺伝子の転写に対して Sp3 の機能が異なることを示した。また、 β 4GalT3 遺伝子のプロモーター領域に含まれる 2 ヶ所の Sp1/3 結合部位に着目し、Sp1/3 結合部位に変異を導入したレポータープラスミドを作製した。2 ヶ所共に変異を導入した場合、プロモーター活性が有意に減少したことから、2 ヶ所の Sp1/3 結合部位が共に β 4GalT3 遺伝子の転写を制御していることが明らかになった。Sp3 は、転写活性化因子としても転写抑制因子としても機能し、この機能の違いの要因の 1 つは、翻訳後修飾によるものと推測した。これらの知見から、Sp3 の翻訳後修飾が、神経芽腫における β 4GalT3 遺伝子プロモーターの活性化に起因するのではないかと考えた。

第 4 章では、Sp3 の翻訳後修飾が β 4GalT3 遺伝子プロモーターの活性化に関与するかどうかを解析した。Sp3 内の Lys551 がアセチル化することで、Sp3 が転写活性化因子として機能する報告があるため、Lys551 に変異を導入し、 β 4GalT3 遺伝子の 5'-上流領域と共導入し、プロモーター活性を解析した。その結果、プロモーター活性は増加したため、Sp3 内の Lys551 は、SH-SY5Y 細胞における β 4GalT3 遺伝子のプロモーター活性化に関与しないことが示された。FBS は、MAPK シグナル伝達のリン酸化を増加させ、MAPK を活性化する。活性化した MAPK によって Sp3 がリン酸化されるため、FBS 刺激により SH-SY5Y 細胞における MAPK のリン酸化及び β 4GalT3 遺伝子のプロモーター活性への影響を解析した。その結果、FBS は MAPK シグナル伝達及び β 4GalT3 遺伝子プロモーターを活性化した。一方、MAPK キナーゼの阻害剤 U0126 で処理すると、MAPK シグナル伝達及びプロモーター活性は減少した。これらの結果から、SH-SY5Y 細胞において、MAPK シグナル伝達によりリン酸化された Sp3 が、 β 4GalT3 遺伝子プロモーターを活性化する可能性が考えられた。さらに、Sp3 内の 4

ヶ所の Ser 残基 (Ser73、Ser563、Ser566、及び Ser646) がリン酸化されると推測されており、Ser563 と Ser566 は転写活性阻害ドメインに、Ser646 は DNA 結合ドメインに存在する。これら 4 ヲ所に変異を導入し、 β 4GalT3 遺伝子の 5'-上流領域と共導入し、プロモーター活性を解析した。その結果、4 ヲ所共に変異を導入した場合、プロモーター活性は有意に減少し、Sp3 内のリン酸化は、SH-SY5Y 細胞における β 4GalT3 遺伝子のプロモーター活性化に関与することが示された。また、Ser73 に変異を導入した場合、プロモーター活性は変化せず、Ser563 と Ser566、Ser646 にそれぞれ変異を導入した場合、プロモーター活性は減少した。これらの結果から、Sp3 内の転写活性阻害ドメインに及び DNA 結合ドメインに存在する Ser 残基のリン酸化が、 β 4GalT3 遺伝子のプロモーター活性化に関与する可能性が示唆された。

第 5 章では、 β 4GalT3 遺伝子プロモーター領域を含むレポータープラスミドの各種化合物に対する応答性の解析を行った。第 3 章で、 β 4GalT3 遺伝子の転写を Sp3 が制御していることを、第 4 章で、 β 4GalT3 遺伝子の転写活性化に Sp3 内の特定の Ser 残基のリン酸化が重要であることを示した。これらの知見から、プロモーター領域に Sp3 が結合するのを阻害する化合物と、Sp3 のリン酸化に関与する細胞シグナル伝達を阻害する化合物の作用機序の異なる阻害剤を解析した。Sp3 が DNA へ結合するのを阻害する Mithramycin A を用いて、 β 4GalT3 遺伝子のプロモーター活性への影響を解析した。その結果、プロモーター活性は濃度依存的に減少した。さらに、MAPK シグナル伝達経路及びPI3K シグナル伝達経路阻害化合物に対する応答性があるかどうかを解析した。EGFR のリン酸化阻害剤Tyrphostin AG1478 及びphosphatidylinositol-3 kinase 阻害剤 LY294002 で処理し、プロモーター活性を測定した。その結果、U0126 と同様に β 4GalT3 遺伝子のプロモーター活性が減少した。これらの結果から、 β 4GalT3 遺伝子のプロモーター領域を繋いだレポータープラスミドは、化合物に対する応答性があることが示された。今後、本研究で明らかにした β 4GalT3 遺伝子の転写制御メカニズムを基盤としたレポータープラスミドを用いてセンサー細胞を樹立し、ドラッグ・デリバリー・システム等の癌細胞特異的に薬剤を運ぶシステムと組み合わせることで、神経芽腫に奏功する治療法の考案が可能性であると考えられる。

本研究で、 β 4GalT3 遺伝子プロモーター領域を特定し、神経芽細胞腫において Sp3 が転写活性を制御することを示した。また、 β 4GalT3 遺伝子プロモーターの活性化には、Sp3 内の特定の Ser 残基のリン酸化が重要であることを明らかにした。さらに、

Sp3 が DNA へ結合するのを阻害する化合物及び細胞内シグナル伝達を阻害する化合物が神経芽腫に奏功する薬剤の探索に有用であることを見出し、得られた知見を用いた薬剤の探索や治療戦略への可能性を示唆した。

謝 辞

本論文は筆者が、長岡技術科学大学大学院 工学研究科 生物統合工学専攻に在籍した 5 年間の研究成果をまとめたものであり、多くの方のご支援によって完成に至りました。本研究を行うにあたり、実験技術や実験に対する姿勢、データとの向き合い方、研究の進め方、論文作成のご指導等、多大なるご支援をいただきました長岡技術科学大学 生物統合工学専攻 糖鎖生命工学研究室 佐藤 武史准教授に厚く御礼申し上げます。

本研究の第 3 章で用いた、Sp3 発現プラスミド作製及びそれを用いた解析に携わっていただきました戸松拓哉氏に感謝の意を表します。第 4 章で用いた Sp3 内の Lys 変異体発現プラスミドの作製に携わっていただきました立花龍式氏に感謝の意を表します。同研究室 1 期生として共に配属され、支え合いながら有意義な修士課程を過ごし、筆者を励ましてくれた名古屋大学 高橋映莉乃氏に深い感謝の意を表します。また、同じ研究室の同輩として支えあいながら研究室生活を共に過ごした新田美春氏に深い感謝の意を表します。博士課程に進む同輩として、筆者を支えてくれた環境微生物工学研究室的儀武菜美子氏に心より感謝の意を表します。また、この場では書ききれませんが、糖鎖生命工学研究室で関わった多くの方々、後輩たち、応援してくれた友達に心より感謝の意を表します。そして、博士課程に進むことを快く受け入れ、温かく見守り、いつも筆者のことを支え、辛抱強く支援してくれた家族に心より感謝の意を表します。

公表論文

Riho Tange, Takuya Tomatsu, Takeshi Sato. (2019) Transcription of human β 4-galactosyltransferase 3 is regulated by differential DNA binding of Sp1/Sp3 in SH-SY5Y human neuroblastoma and A549 human lung cancer cell lines. *Glycobiology*. **29**, 211-221.

Riho Tange, Ryuji Tachibana, Takeshi Sato. (2021) Phosphorylation of Specificity protein 3 is critical for activation of β 4-galactosyltransferase 3 gene promoter in SH-SY5Y human neuroblastoma cell line. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*. in press.

参考論文

Shimaa A. Abdellatef, Riho Tange, Takeshi Sato, Akihiko Ohi, Toshihide Nabatame, Akiyoshi. (2015) Taniguchi Nanostructures control the hepatocellular responses to a cytotoxic agent “cisplatin“. *BioMed Research International*. Article ID 925319

Kodai Muramoto, Riho Tange, Takayuki Ishii, Kana Miyauchi, Takeshi Sato. (2017) Downregulation of transcription factor Sp1 suppresses malignant properties of A549 human lung cancer cell line with decreased β 4-galactosylation of highly branched *N*-glycans. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*. **40**, 1282-1288.

引用文献

1. Morrison, S. J., and Spradling, A. C. (2008) Stem cells and niches: Mechanisms that promote stem cell maintenance throughout life. *Cell*. **132**, 598-611.
2. Jain, R. K. (1988) Determinants of tumor blood flow: A review. *Cancer Res.* **48**, 2641-2658.
3. Dunn, G. P., Old, L. J., and Schreiber, R. D. (2004) The immunobiology of cancer immunosurveillance and immunoediting. *Immunity*. **21**, 137-148.
4. Barberis, I., Martini, M., Iavarone, F., and Orsi, A. (2011) Hallmarks of cancer: The next generation. *J. Prev. Med. Hyg.* **144**, 646-674.
5. Odes, E. J., Randolph-Quinney, P. S., Steyn, M., Throckmorton, Z., Smilg, J. S., Zipfel, B., Augustine, T. N., Beer, F. De, Hoffman, J. W., Franklin, R. D., and Berger, L. R. (2016) Earliest hominin cancer: 1.7-million-year-old osteosarcoma from Swartkrans cave, South Africa. *S. Afr. J. Sci.* **112**, DOI: 10.17159/sajs.2016/20150471
6. Rous, P. (1911) A sarcoma of the fowl transmissible by an agent separable from the tumor cells. *Rockefeller Inst. Med. Res. New York*. **13**, 397-411.
7. Bagley, C. M., Bostick, F. W., and DeVita, V. T. (1973) Clinical pharmacology of cyclophosphamide. *Cancer Res.* **33**, 226-233.
8. Pinedo, H. M., and Peters, G. F. (1988) Fluorouracil: biochemistry and pharmacology. *J. Clin. Oncol.* **6**, 1653-1664.
9. Saltz, L. B., Cox, J. V., Blanke, C., Rosen, L. S., Fehrenbacher, L., Moore, M. J., Maroun, J. A., Ackland, S. P., Locker, P. K., Pirotta, N., Elfring, L. G., and Miller, L. L. (2000) Irinotecan plus fluorouracil and leucovorin for metastatic colorectal cancer. *N. Engl. J. Med.* **343**, 905-914.
10. Rosenberg, B. (1971) Some biological effects of platinum compounds. *Platin. Met. Rev.* **15**, 42-51.
11. Harper, M. J. K., and Walpole, A. L. (1967) A new derivative of triphenylethylene: effect on implantation and mode of action in rats. *J. Reprod. Fertil.* **13**, 101-119.
12. Cole, M. P., Jones, C. T. A., and Todd, I. D. H. (1971) A new anti-oestrogenic agent in late breast cancer an early clinical appraisal of ICI46474. *Br. J. Cancer.* **25**, 270-275.
13. Collins, I., and Workman, P. (2006) New approaches to molecular cancer therapeutics. *Nat. Chem. Biol.* **2**, 689-700.
14. Thomas, J. L., Daphne, W. B., Raffaella, S., Sarada, G., Ross, A. O., Brian, W. B., Patricia, L. H., Sara, M. H., Jeffrey, G. S., Frank, G. H., David, N. L., David, C. C., Jeff, S., and Daniel, A. H. (2004) Activating mutations in the epidermal growth factor receptor underlying responsiveness of non-small-cell lung cancer to gefitinib. *N. Engl. J. Med.* **350**, 2129-2139.
15. Paez, J. G., Jänne, P. A., Lee, J. C., Tracy, S., Greulich, H., Gabriel, S., Herman, P., Kaye, F. J., Lindeman, N., Boggon, T. J., Naoki, K., Sasaki, H., Fujii, Y., Eck, M. J., Sellers, W. R., Johnson, B. E., and Meyerson, M. (2004) EGFR mutations in lung cancer: Correlation with clinical response to gefitinib therapy. *Science*. **304**, 1497-1500.
16. Tahirov, T. H., Sato, K., Ichikawa-Iwata, E., Sasaki, M., Inoue-Bungo, T., Shiina, M., Kimura, K., Takata, S., Fujikawa, A., Morii, H., Kumasaka, T., Yamamoto, M., Ishii, S., and Ogata, K. (2002) Mechanism of c-Myb-C/EBP β cooperation from separated sites on a promoter. *Cell*. **108**, 57-70.
17. Kasahara, K., Shiina, M., Fukuda, I., Ogata, K., and Nakamura, H. (2017) Molecular mechanisms of cooperative binding of transcription factors Runx1-CBF β -Ets1 on the TCR α gene enhancer. *PLoS One*. **12**, 1-18.
18. Tang, Z., Chen, W. Y., Shimada, M., Nguyen, U. T. T., Kim, J., Sun, X. J., Sengoku, T., McGinty, R. K., Fernandez, J. P., Muir, T. W., and Roeder, R. G. (2013) SET1 and p300 act synergistically, through coupled histone modifications, in transcriptional activation by p53. *Cell*. **154**, 297-310.
19. Kasahara, K., Shiina, M., Higo, J., Ogata, K., and Nakamura, H. (2018) Phosphorylation of an intrinsically disordered region of Ets1 shifts a multi-modal interaction ensemble to an auto-inhibitory state. *Nucleic Acids Res.* **46**, 2243-2251.
20. Pufall, M. A., Lee, G. M., Nelson, M. L., Kang, H., Velyvis, A., and Kay, L. E. (2005) Variable control of Ets-1 DNA binding by multiple phosphates in an unstructured region. *Science*. **309**, 142-146.
21. Shiina, M., Hamada, K., Inoue-Bungo, T., Shimamura, M., Uchiyama, A., Baba, S., Sato, K., Yamamoto, M., and Ogata, K. (2015) A novel allosteric mechanism on protein-DNA interactions underlying the phosphorylation-dependent regulation of Ets1 target gene expressions. *J. Mol. Biol.* **427**, 1655-1669.
22. Hakomori, S. (2002) Glycosylation defining cancer malignancy: New wine in an old bottle. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **99**, 10231-10233.

23. Ohtsubo, K., and Marth, J. D. (2006) Glycosylation in cellular mechanisms of health and disease. *Cell*. **126**, 855-867.
24. Varki, A., and Kornfeld, S. (2017) Historical background and overview. in *Essentials of Glycobiology*, 3rd Ed. (Varki, A., Cummings, R. D., Esko, J. D., Stanley, P., Hart, G. W., Aebi, M., Darvill, A. G., Kinoshita, T., Packer, N. H., Prestegard, J. H., Schnaar, R. L., Seeberger, P. H., Eds.), Cold Spring Harbor Laboratory Press: New York, USA pp.1-18.
25. Stanley, P., Taniguchi, N., and Aebi, M. (2017) *N*-Glycans. in *Essentials of Glycobiology*, 3rd Ed. (Varki, A., Cummings, R. D., Esko, J. D., Stanley, P., Hart, G. W., Aebi, M., Darvill, A. G., Kinoshita, T., Packer, N. H., Prestegard, J. H., Schnaar, R. L., Seeberger, P. H., Eds.), Cold Spring Harbor Laboratory Press: New York, USA pp. 99-111.
26. Kannagi, R., Izawa, M., Koike, T., Miyazaki, K., and Kimura, N. (2004) Carbohydrate-mediated cell adhesion in cancer metastasis and angiogenesis. *Cancer Sci*. **95**, 377-384.
27. Heike, H., and Melitta, S. (1998) Laminins and their ligands: Involvement of carbohydrates in formation of the extracellular matrix and in cell adhesion. *Trends Glycosci. Glycotechnol.* **10**, 361-382.
28. Springer, T. A. (1994) Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration: The multistep paradigm. *Cell*. **76**, 301-314.
29. Fiete, D., Srivastava, V., Hindsgaul, O., and Baenziger, J. U. (1991) A hepatic reticuloendothelial cell receptor specific for SO₄-4GalNAc β 1, 4GlcNAc β 1, 2Man α that mediates rapid clearance of lutropin. *Cell*. **67**, 1103-1110.
30. Varki, A., and Gagneux, P. (2017) Biological Functions of Glycans. in *Essentials of Glycobiology*, 3rd Ed. (Varki, A., Cummings, R. D., Esko, J. D., Stanley, P., Hart, G. W., Aebi, M., Darvill, A. G., Kinoshita, T., Packer, N. H., Prestegard, J. H., Schnaar, R. L., Seeberger, P. H., Eds.), Cold Spring Harbor Laboratory Press: New York, USA pp.77-88.
31. Feizi, T. (1985) Demonstration by monoclonal antibodies that carbohydrate structures of glycoproteins and glycolipids are onco-developmental antigens. *Nature*. **314**, 53-57.
32. Varki, A., Kannagi, R., Toole, B., and Stanley, P. (2017) Glycosylation changes in cancer. in *Essentials of Glycobiology*, 3rd Ed. (Varki, A., Cummings, R. D., Esko, J. D., Stanley, P., Hart, G. W., Aebi, M., Darvill, A. G., Kinoshita, T., Packer, N. H., Prestegard, J. H., Schnaar, R. L., Seeberger, P. H., Eds.), Cold Spring Harbor Laboratory Press: New York, USA pp. 597-609.
33. Chandrasekaran, E. V., Xue, J., Neelamegham, S., and Matta, K. L. (2006) The pattern of glycosyl- and sulfotransferase activities in cancer cell lines: a predictor of individual cancer-associated distinct carbohydrate structures for the structural identification of signature glycans. *Carbohydr. Res.* **341**, 983-994.
34. Yamashita, K., Tachibana, Y., Ohkura, T., and Kobata, A. (1985) Enzymatic basis for the structural changes of asparagine-linked sugar chains of membrane glycoproteins of baby hamster kidney cells induced by polyoma transformation. *J. Biol. Chem.* **260**, 3963-3969.
35. Arango, J., and Pierce, M. (1988) Comparison of *N*-acetylglucosaminyltransferase V activities in Rous sarcoma-transformed baby hamster kidney (RS-BHK) and BHK cells. *J. Cell. Biochem.* **37**, 225-231.
36. Palcic, M., and Hindsgaul, O. (1990) Regulation of *N*-acetylglucosaminyltransferase V activity. *J. Biol. Chem.* **265**, 6759-6769.
37. Ronald, L. S., and Kinoshita, T. (2017) Glycosphingolipids. in *Essentials of Glycobiology*, 3rd Ed. (Varki, A., Cummings, R. D., Esko, J. D., Stanley, P., Hart, G. W., Aebi, M., Darvill, A. G., Kinoshita, T., Packer, N. H., Prestegard, J. H., Schnaar, R. L., Seeberger, P. H., Eds.), Cold Spring Harbor Laboratory Press: New York, USA pp.125-135.
38. Yamashita, T., Hashiramoto, A., Haluzik, M., Mizukami, H., Beck, S., Norton, A., Kono, M., Tsuji, S., Daniotti, J. L., Werth, N., Sandhoff, R., Sandhoff, K., and Proia, R. L. (2003) Enhanced insulin sensitivity in mice lacking ganglioside GM3. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **100**, 3445-3449.
39. Yoshikawa, M., Go, S., Takasaki, K., Kakazu, Y., Ohashi, M., Nagafuku, M., Kabayama, K., Sekimoto, J., Suzuki, S. I., Takaiwa, K., Kimitsuki, T., Matsumoto, N., Komune, S., Kamei, D., Saito, M., Fujiwara, M., Iwasaki, K., and Inokuchi, J. I. (2009) Mice lacking ganglioside GM3 synthase exhibit complete hearing loss due to selective degeneration of the organ of Corti. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **106**, 9483-9488.
40. Takamiya, K., Yamamoto, A., Furukawa, K., Yamashiro, S., Shin, M., Okada, M., Fukumoto, S., Haraguchi, M., Takeda, N., Fujimura, K., Sakae, M., Kishikawa, M., Shiku, H., Furukawa, K., and Aizawa, S. (1998) Mice with disrupted GM2/GD2 synthase gene lack complex gangliosides but exhibit only subtle defects in their nervous system. *Chemtracts*. **11**, 195-200.

41. Yamashita, T., Wada, R., Sasaki, T., Deng, C., Bierfreund, U., Sandhoff, K., and Proia, R. L. (2000) A vital role for glycosphingolipid synthesis during development and differentiation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **96**, 9142-9147.
42. Bosio, A., Binczek, E., and Stoffel, W. (1996) Functional breakdown of the lipid bilayer of the myelin membrane in central and peripheral nervous system by disrupted galactocerebroside synthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **93**, 13280-13285.
43. Coetzee, T., Fujita, N., Dupree, J., Shi, R., Blight, A., Suzuki, K., Suzuki, K., and Popko, B. (1996) Myelination in the absence of galactocerebroside and sulfatide: Normal structure with abnormal function and regional instability. *Cell*. **86**, 209-219.
44. Furukawa, K., and Sato, T. (1999) β -1,4-Galactosylation of *N*-glycans is a complex process. *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.* **1473**, 54-66.
45. Furukawa, K., Clausen, H., Sato, T. (2014) UDP-Gal: β GlcNAc β 1,4-galactosyltransferase, polypeptide 2-6; xylosylprotein β 1,4-galactosyltransferase, polypeptide 7 (galactosyltransferase I) (B4GALT2-7). in *Handbook of glycosyltransferases and related genes*. (Taniguchi N, Honke K, Fukuda M, Narimatsu H, Yamaguchi Y, Angata, T. Eds.), Tokyo: Springer pp. 63-72.
46. Shaper, N. L., Shaper, J. H., Meuth, J. L., Fox, J. L., Chang, H., Kirsch, I. R., and Hollis, G. F. (1986) Bovine galactosyltransferase: Identification of a clone by direct immunological screening of a cDNA expression library. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **83**, 1573-1577.
47. Amado, M., Almeida, R., Carneiro, F., Levery, S. B., Holmes, E. H., Nomoto, M., Hollingsworth, M. A., Hassan, H., Schwientek, T., Nielsen, P. A., Bennett, E. P., and Clausen, H. (1998) A Family of Human β 4-Galactosyltransferases: Cloning and expression of two novel UDP-galactose: β -*N*-acetylglucosamine β 1,4-galactosyltransferase, β 4Gal-T2 and β 4Gal-T3. *J. Biol. Chem.* **273**, 12770-12778.
48. Schwientek, T., Almeida, R., Levery, S. B., Holmes, E. H., Bennett, E., and Clausen, H. (1998) Cloning of a novel member of the UDP-galactose: β -*N*-acetylglucosamine β 1,4-galactosyltransferase family, β 4Gal-T4, involved in glycosphingolipid biosynthesis. *J. Biol. Chem.* **273**, 29331-29340.
49. Sato, T., Furukawa, K., Bakker, H., Van den Eijnden, D. H., and Van Die, I. (1998) Molecular cloning of a human cDNA encoding β -1,4-galactosyltransferase with 37% identity to mammalian UDP-Gal:GlcNAc β -1,4-galactosyltransferase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **95**, 472-477.
50. Nomura, T., Takizawa, M., Aoki, J., Arai, H., Inoue, K., Wakisaka, E., Yoshizuka, N., Imokawa, G., Dohmae, N., Takio, K., Hattori, M., and Matsuo, N. (1998) Purification, cDNA cloning, and expression of UDP-Gal: Glucosylceramide β -1,4-galactosyltransferase from rat brain. *J. Biol. Chem.* **273**, 13570-13577.
51. Almeida, R., Levery, S. B., Mandel, U., Kresse, H., Schwientek, T., Bennett, E. P., and Clausen, H. (1999) Cloning and expression of a proteoglycan UDP-Galactose: β -xylose β 1,4-galactosyltransferase I. *J. Biol. Chem.* **274**, 26165-26171.
52. Okajima, T., Yoshida, K., Kondo, T., and Furukawa, K. (1999) Human homolog of *Caenorhabditis elegans* sqv-3 gene is galactosyltransferase I involved in the biosynthesis of the glycosaminoglycan-protein linkage region of proteoglycans. *J. Biol. Chem.* **274**, 22915-22918.
53. Guo, S., Sato, T., Shirane, K., and Furukawa, K. (2001) Galactosylation of *N*-linked oligosaccharides by human β -1,4-galactosyltransferases I, II, III, IV, V, and VI expressed in Sf-9 cells. *Glycobiology*. **11**, 813-820.
54. Sato, T., Guo, S., and Furukawa, K. (2000) Involvement of recombinant human β -1,4-galactosyltransferase V in lactosylceramide biosynthesis. *Cell Mol. Biol.* **4**, 3-10.
55. Asano, M., Furukawa, K., Kido, M., Matsumoto, S., Umesaki, Y., Kochibe, N., and Iwakura, Y. (1997) Growth retardation and early death of β -1,4-galactosyltransferase knockout mice with augmented proliferation and abnormal differentiation of epithelial cells. *EMBO J.* **16**, 1850-1857.
56. Yoshihara, T., Sugihara, K., Kizuka, Y., Oka, S., and Asano, M. (2009) Learning/memory impairment and reduced expression of the HNK-1 carbohydrate in β 4-galactosyltransferase-II-deficient mice. *J. Biol. Chem.* **284**, 12550-12561.
57. Kumagai, T., Tanaka, M., Yokoyama, M., Sato, T., Shinkai, T., and Furukawa, K. (2009) Early lethality of β -1,4-galactosyltransferase V-mutant mice by growth retardation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **379**, 456-459.
58. Shirane, K., Sato, T., Segawa, K., and Furukawa, K. (1999) Involvement of β -1,4-galactosyltransferase V in malignant transformation-associated changes in glycosylation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **265**, 434-438.
59. Shirane, K., Kuji, R., Tareyanagi, C., Sato, T., Kobayashi, Y., Furukawa, S., Murata, T., Kubota, S., Ishikawa, Y., Segawa, K., and Furukawa, K. (2014) Gene expression levels of β 4-galactosyltransferase 5 correlate with the tumorigenic potentials of B16-F10 mouse melanoma cells. *Glycobiology*. **24**, 532-541.

60. Tagawa, M., Shirane, K., Yu, L., Sato, T., Furukawa, S., Mizuguchi, H., Kuji, R., Kawamura, K., Takahashi, N., Kato, K., Hayakawa, S., Sawada, S., and Furukawa, K. (2014) Enhanced expression of the β 4-galactosyltransferase 2 gene impairs mammalian tumor growth. *Cancer Gene Ther.* **21**, 219-227.
61. Zhu, X., Jiang, J., Shen, H., Wang, H., Zong, H., Li, Z., Yang, Y., Niu, Z., Liu, W., Chen, X., Hu, Y., and Gu, J. (2005) Elevated β 1,4-galactosyltransferase I in highly metastatic human lung cancer cells: Identification of E1AF as important transcription activator. *J. Biol. Chem.* **280**, 12503-12516.
62. Zhou, J., Wei, Y., Liu, D., Ge, X., Zhou, F., Jiang, X. Y. J., and Gu, J. (2008) Identification of β 1, 4GalT II as a target gene of p53-mediated HeLa cell apoptosis. *J. Biochem.* **143**, 547-554.
63. Sugiyama, A., Fukushima, N., and Sato, T. (2017) Transcriptional mechanism of the β 4-galactosyltransferase 4 gene in SW480 human colon cancer cell line. *Biol. Pharm. Bull.* **40**, 733-737.
64. Sato, T., and Furukawa, K. (2004) Transcriptional regulation of the human β -1,4-galactosyltransferase V gene in cancer cells: essential role of transcription factor Sp1. *J. Biol. Chem.* **279**, 39574-39583.
65. Ujita, M., Misra, A. K., McAuliffe, J., Hindsgaul, O., and Fukuda, M. (2000) Poly-*N*-acetylglucosamine extension in *N*-glycans and core 2- and core 4-branched O-glycans is differentially controlled by i-extension enzyme and different members of the β 1,4-galactosyltransferase gene family. *J. Biol. Chem.* **275**, 15868-15875.
66. Sato, T., Guo, S., and Furukawa, K. (2001) Occurrence of poly-*N*-acetylglucosamine synthesis in Sf-9 cells upon transfection of individual human β -1,4-galactosyltransferase I, II, III, IV, V and VI cDNAs. *Biochimie.* **83**, 719-725.
67. Sato, T., Takahashi, M., and Furukawa, K. (2008) β 1,4-galactosyltransferase III is involved in biosynthesis of highly branched *N*-linked oligosaccharides in WI38 human lung embryonic fibroblasts. *Res. Commun. Biochem. Cell Molec. Biol.* **12**, 61-71.
68. Sasaki, N., Manya, H., Okubo, R., Kobayashi, K., Ishida, H., Toda, T., Endo, T., and Nishihara, S. (2005) β 4GalT-II is a key regulator of glycosylation of the proteins involved in neuronal development. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **333**, 131-137.
69. Liao, R. F., Zhong, Z. L., Ye, M. J., Han, L. Y., Ye, D. Q., and Chen, J. J. (2016) Identification of mutations in myocilin and beta-1, 4-galactosyltransferase 3 genes in a chinese family with primary open-angle glaucoma. *Chin. Med. J. (Engl.)* **129**, 2810-2815.
70. Schwedler, C., Häupl, T., Kalus, U., Blanchard, V., Burmester, G., Poddubnyy, D., and Hoppe, B. (2018) Hypogalactosylation of immunoglobulin G in rheumatoid arthritis: relationship to HLA-DRB1 shared epitope, anticitrullinated protein antibodies, rheumatoid factor, and correlation with inflammatory activity. *Arthritis Res. Ther.* **20**, DOI: 10.1186/s13075-018-1540-0
71. Chen, C., Wang, S., Liu, C., Wu, Y., Wang, W., Huang, J., Hung, J., Lai, I., and Liang, J. (2014) β -1, 4-Galactosyltransferase III suppresses β 1 integrin-mediated invasive phenotypes and negatively correlates with metastasis in colorectal cancer. *Carcinogenesis.* **35**, 1258-1266.
72. Liu, H., Chen, D., Bi, J., Han, J., Yang, M., Dong, W., Lin, T., and Huang, J. (2018) Circular RNA circUBXN7 represses cell growth and invasion by sponging miR-1247-3p to enhance B4GALT3 expression in bladder cancer. *Aging (Albany, NY)*. **10**, 2606-2623.
73. Fang, T., Lv, H., Lv, G., Li, T., Wang, C., Han, Q., Yu, L., Su, B., Guo, L., Huang, S., Cao, D., Tang, L., Tang, S., Wu, M., Yang, W., and Wang, H. (2018) Tumor-derived exosomal miR-1247-3p induces cancer-associated fibroblast activation to foster lung metastasis of liver cancer. *Nat. Commun.* **9**, DOI: 10.1038/s41467-017-02583-0
74. Sun, Y., Yang, X., Liu, M., and Tang, H. (2016) B4GALT3 up-regulation by miR-27a contributes to the oncogenic activity in human cervical cancer cells. *Cancer Lett.* **375**, 284-292.
75. Chang, H. H., Chen, C. H., Chou, C. H., Liao, Y. F., Huang, M. J., Chen, Y. H., Wang, W. J., Huang, J., Hung, J. S., Ho, W. L., Jeng, Y. M., Che, M. I., Lee, H., Lu, M. Y., Yang, Y. L., Jou, S. T., Lin, D. T., Lin, K. H., Hsu, W. M., and Huang, M. C. (2013) β -1,4-Galactosyltransferase III enhances invasive phenotypes via β 1-integrin and predicts poor prognosis in neuroblastoma. *Clin. Cancer Res.* **19**, 1705-1716.
76. Nakagawara, A., Li, Y., Izumi, H., Muramori, K., Inada, H., and Nishi, M. (2018) Neuroblastoma. *Jpn. J. Clin. Oncol.* **48**, 214-241.
77. Shimada, H., Ambros, I. M., Dehner, L. P., Hata, J. I., Joshi, V. V., Roald, B., Stram, D. O., Gerbing, R. B., Lukens, J. N., Matthay, K. K., and Castleberry, R. P. (1999) The international neuroblastoma pathology classification (the Shimada system). *Cancer.* **86**, 364-372.
78. Maris, J. M., Hogarty, M. D., Bagatell, R., and Cohn, S. L. (2007) Neuroblastoma. *Lancet.* **369**, 2106-2120.
79. Pepper, W. (1901) A study of congenital saccoma of the livee and supeacenal with report of a case. *Am. J. Med. Sci.* **121**, 287.

80. Brodeur, G. M., Seeger, R. C., Schwab, M., Varmus, H. E., and Bishop, J. M. (1984) Amplification of N-myc in untreated human neuroblastomas correlates with advanced disease stage. *Science*. **224**, 1121-1124.
81. Mossé, Y. P., Laudenslager, M., Longo, L., Cole, K. A., Wood, A., Attiyeh, E. F., Laquaglia, M. J., Sennett, R., Lynch, J. E., Perri, P., Laureys, G., Speleman, F., Hakonarson, H., Torkamani, A., Nicholas, J., Brodeur, G. M., Tonini, G. P., Rappaport, E., Devoto, M., and Maris, J. M. (2009) Identification of ALK as a major familial neuroblastoma predisposition gene. *Nature*. **455**, 930-935.
82. Janoueix-Lerosey, I., Lequin, D., Brugières, L., Ribeiro, A., De Pontual, L., Combaret, V., Raynal, V., Puisieux, A., Schleiermacher, G., Pierron, G., Valteau-Couanet, D., Frebourg, T., Michon, J., Lyonnet, S., Amiel, J., and Delattre, O. (2008) Somatic and germline activating mutations of the ALK kinase receptor in neuroblastoma. *Nature*. **455**, 967-970.
83. Tomioka, N., Oba, S., Ohira, M., Misra, A., Fridlyand, J., Ishii, S., Nakamura, Y., Isogai, E., Hirata, T., Yoshida, Y., Todo, S., Kaneko, Y., Albertson, D. G., Pinkel, D., Feuerstein, B. G., and Nakagawara, A. (2008) Novel risk stratification of patients with neuroblastoma by genomic signature, which is independent of molecular signature. *Oncogene*. **27**, 441-449.
84. Katherine K. Matthay, John M. Maris, Gudrun Schleiermacher, Akira Nakagawara, Crystal L. Mackall, L. D. & W. A. W. (2016) Neuroblastoma. *Nat. Rev. Dis. Artic.* **2**, DOI: 10.1038/nrdp.2016.78
85. Li, Y., Ohira, M., Zhou, Y., Xiong, T., Luo, W., Yang, C., Li, X., Gao, Z., Zhou, R., Nakamura, Y., Kamijo, T., Kaneko, Y., Taketani, T., Ueyama, J., Tajiri, T., Zhang, H., Wang, J., Yang, H., Yin, Y., and Nakagawara, A. (2017) Genomic analysis-integrated whole-exome sequencing of neuroblastomas identifies genetic mutations in axon guidance pathway. *Oncotarget*. **8**, 56684-56697.
86. Ikeda, H., Iehara, T., Tsuchida, Y., Kaneko, M., Hata, J., Naito, H., Iwafuchi, M., Ohnuma, N., Mugishima, H., Toyoda, Y., Hamazaki, M., Mimaya, J., Kondo, S., Kawa, K., Okada, A., Hiyama, E., Suita, S., and Takamatsu, H. (2002) Experience with international neuroblastoma staging system and pathology classification. *Br. J. Cancer*. **86**, 1110-1116.
87. Hiyama, E., Iehara, T., Sugimoto, T., Fukuzawa, M., Hayashi, Y., Sasaki, F., Sugiyama, M., Kondo, S., Yoneda, A., Yamaoka, H., Tajiri, T., Akazawa, K., and Ohtaki, M. (2008) Effectiveness of screening for neuroblastoma at 6 months of age: a retrospective population-based cohort study. *Lancet*. **371**, 1173-1180.
88. Hallberg, B., and Palmer, R. H. (2016) The role of the ALK receptor in cancer biology. *Ann. Oncol.* **27**, iii4-iii15.
89. Communication, S. (2012) Anaplastic Lymphoma Kinase (ALK) regulates initiation of transcription of MYCN in neuroblastoma cells. *Oncogene*. **31**, 5193-5200.
90. Zhu, S., Lee, J., Guo, F., Shin, J., Perez-atayde, A. R., Kutok, J. L., Rodig, S. J., Neuberg, D. S., Helman, D., Feng, H., Stewart, R. A., Wang, W., George, R. E., Kanki, J. P., and Thomas, A. (2013) Activated ALK collaborates with MYCN in neuroblastoma pathogenesis. *Cancer Cell*. **21**, 362-373.
91. Hasan, M. K., Nafady, A., Takatori, A., Kishida, S., Ohira, M., Suenaga, Y., Hossain, S., Akter, J., Ogura, A., Nakamura, Y., Kadomatsu, K., and Nakagawara, A. (2013) ALK is a MYCN target gene and regulates cell migration and invasion in neuroblastoma. *Sci. Rep.* **3**, DOI: 10.1038/srep03450
92. Grosso, F. D., Mariano, M. D., Passoni, L., Luksch, R., Tonini, G. P., and Longo, L. (2011) Inhibition of N-linked glycosylation impairs ALK phosphorylation and disrupts pro-survival signaling in neuroblastoma cell lines. *BMC Cancer*. **11**, DOI: 10.1186/1471-2407-11-525.
93. Mossé, E. L. C. and Y. P. (2012) Targeting ALK in neuroblastoma-preclinical and clinical advancements. *Nat. Rev. Clin. cancer*. **9**, 391-399.
94. Prigione, I., Corrias, M. V., Airolidi, I., Raffaghello, L., Morandi, F., Bocca, P., Cocco, C., Ferrone, S., and Pistoia, V. (2004) Immunogenicity of human neuroblastoma. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1028**, 69-80.
95. Forlenza, C. J., Boudreau, J. E., Zheng, J., Luduec, J. B. Le, Chamberlain, E., Heller, G., Cheung, N. K. V., and Hsu, K. C. (2016) KIR3DL1 allelic polymorphism and HLA-B epitopes modulate response to Anti-GD2 monoclonal antibody in patients with neuroblastoma. *J. Clin. Oncol.* **34**, 2443-2451.
96. Suske, G., Bruford, E., and Philipsen, S. (2005) Mammalian SP/KLF transcription factors: Bring in the family. *Genomics*. **85**, 551-556.
97. Dynan, W. S., and Tjian, R. (1983) The promoter-specific transcription factor Sp1 binds to upstream sequences in the SV40 early promoter. *Cell*. **35**, 79-87.
98. Suske, G. (1999) The Sp-family of transcription factors. *Gene*. **238**, 291-300.
99. Kaczynski, J., Cook, T., and Urrutia, R. (2003) Sp1- and Krüppel-like transcription factors. *Genome Biol.* **4**, 206.1-206.8

100. Marin, M., Karis, A., Visser, P., Grosveld, F., and Philipsen, S. (1997) Transcription factor Sp1 is essential for early embryonic development but dispensable for cell growth and differentiation. *Cell*. **89**, 619-628.
101. Vollmer, M., Simmons, D., Elsa, H., and Philipsen, S. (2007) Sp1/Sp3 compound heterozygous mice are not viable: Impaired erythropoiesis and severe. *Dev. Dyn.* **236**, 2235-2244.
102. Bouwman, P., Go, H., Elsa, H., Eckhoff, G., Karis, A., Grosveld, F., Philipsen, S., and Suske, G. (2000) Transcription factor Sp3 is essential for post-natal survival and late tooth development. *EMBO J.* **19**, 655-661.
103. Hagen, G., Müller, S., Beato, M., and Suske, G. (1992) Cloning by recognition site screening of two novel GT box binding proteins: A family of Sp1 related genes. *Nucleic Acids Res.* **20**, 5519-5525.
104. Hagen, G., Müller, S., Beato, M., and Suske, G. (1994) Sp1-mediated transcriptional activation is repressed by Sp3. *EMBO J.* **13**, 3843-3851.
105. Li, L., and Davie, J. R. (2010) The role of Sp1 and Sp3 in normal and cancer cell biology. *Ann. Anat.* **192**, 275-283.
106. Wierstra, I. (2008) Sp1: Emerging roles-beyond constitutive activation of TATA-less housekeeping genes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **372**, 1-13.
107. Xu, R., Zhang, P., Huang, J., Ge, S., Lu, J., and Qian, G. (2007) Sp1 and Sp3 regulate basal transcription of the survivin gene. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **356**, 286-292.
108. Kumar, A. P., and Butler, A. P. (1997) Transcription factor Sp3 antagonizes activation of the ornithine decarboxylase promoter by Sp1. *Nucleic Acids Res.* **25**, 2012-2019.
109. Ammanamanchi, S., and Brattain, M. G. (2001) Sp3 is a transcriptional repressor of transforming growth factor- β receptors. *J. Biol. Chem.* **276**, 3348-3352.
110. Su, F., Geng, J., Li, X., Qiao, C., Luo, L., Feng, J., Dong, X., and Lv, M. (2017) SP1 promotes tumor angiogenesis and invasion by activating VEGF expression in an acquired trastuzumab-resistant ovarian cancer model. *Oncol. Rep.* **38**, 2677-2684.
111. Chen, Y., Wang, X., Li, W., Zhang, H., Zhao, C., Li, Y., Wang, Z., and Chen, C. (2011) Sp1 upregulates survivin expression in adenocarcinoma of lung cell line A549. *Anat. Rec.* **294**, 774-780.
112. Guan, H., Cai, J., Zhang, N., Wu, J., Yuan, J., Li, J., and Li, M. (2012) Sp1 is upregulated in human glioma, promotes MMP-2-mediated cell invasion and predicts poor clinical outcome. *Int. J. Cancer.* **130**, 593-601.
113. Wang, L., Wei, D., Huang, S., Peng, Z., Le, X., Wu, T. T., Yao, J., Ajani, J., and Xie, K. (2003) Transcription factor Sp1 expression is a significant predictor of survival in human gastric cancer. *Clin. Cancer Res.* **9**, 6371-6380.
114. Zannetti, A., Del Vecchio, S., Carriero, M. V., Fonti, R., Franco, P., Botti, G., D'Aiuto, G., Stoppelli, M. P., Salvatore, M., Vecchio, S. Del, and Aiuto, G. D. (2000) Coordinate up-regulation of Sp1 DNA-binding activity and urokinase receptor expression in breast carcinoma. *Cancer Res.* **60**, 1546-1551.
115. Chiefari, E., Brunetti, A., Arturi, F., Bidart, J.-M., Russo, D., Schlumberger, M., and Filetti, S. (2002) Increased expression of AP2 and Sp1 transcription factors in human thyroid tumors: a role in NIS expression regulation? *BMC Cancer.* **2**, 35-38.
116. Mertens-Talcott, S. U., Chintharlapalli, S., Li, X., and Safe, S. (2007) The oncogenic microRNA-27a targets genes that regulate specificity protein transcription factors and the G2-M checkpoint in MDA-MB-231 breast cancer cells. *Cancer Res.* **67**, 11001-11011.
117. Huang, Z., Huang, L., Shen, S., Li, J., Lu, H., Mo, W., Dang, Y., Luo, D., Chen, G., and Feng, Z. (2015) Sp1 cooperates with Sp3 to upregulate MALAT1 expression in human hepatocellular carcinoma. *Oncol. Rep.* **34**, 2403-2412.
118. Zhao, W. F., Wang, H. B., Xie, B., Hu, L. J., Xu, L. H., Kuang, B. H., Li, M. Z., and Zhang, X. (2012) Sp1 and Sp3 are involved in the full transcriptional activity of centromere protein H in human nasopharyngeal carcinoma cells. *FEBS J.* **279**, 2714-2726.
119. Essafi-Benkhadir, K., Grosso, S., Puissant, A., Robert, G., Essafi, M., Deckert, M., Chamorey, E., Dassonville, O., Milano, G., Auberger, P., and Pagès, G. (2009) Dual role of Sp3 transcription factor as an inducer of apoptosis and a marker of tumour aggressiveness. *PLoS One.* **4**, 1-10.
120. Kajita, Y., Kato, T., Tamaki, S., Furu, M., Takahashi, R., Nagayama, S., Aoyama, T., Nishiyama, H., Nakamura, E., Katagiri, T., Nakamura, Y., Ogawa, O., and Toguchida, J. (2013) The transcription factor Sp3 regulates the expression of a metastasis-related marker of sarcoma, actin filament-associated protein 1-like 1 (AFAP1L1). *PLoS One.* **8**, DOI: 10.1371/journal.pone.0049709
121. Lou, Z., O'Reilly, S., Liang, H., Maher, V. M., Sleight, S. D., and McCormick, J. J. (2005) Down-regulation of overexpression Sp1 protein in human fibrosarcoma cell lines inhibits tumor formation. *Cancer Res.* **65**, 1007-1017.

122. Cantley, L. C., Auger, K. R., Carpenter, C., Duckworth, B., Graziani, A., Kapeller, R., and Soltoff, S. (1991) Oncogenes and signal transduction. *Cell*. **64**, 281-302.
123. Gallego, C., Gupta, S. K., Heasley, L. E., Qian, N. X., and Johnson, G. L. (1992) Mitogen-activated protein kinase activation resulting from selective oncogene expression in NIH 3T3 and Rat 1a cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **89**, 7355-7359.
124. Morrison, D. K. (2012) MAP kinase pathways. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **4**, 1-6.
125. Cuevas, B. D., Abell, A. N., and Johnson, G. L. (2007) Role of mitogen-activated protein kinase kinases in signal integration. *Oncogene*. **26**, 3159-3171.
126. Whitmarsh, A. J. (2007) Regulation of gene transcription by mitogen-activated protein kinase signaling pathways. *Biochem. Biophys. Acta*. **1773**, 1285-1298.
127. Yang, S., Sharrocks, A. D., and Whitmarsh, A. J. (2003) Transcriptional regulation by the MAP kinase signaling cascades. *Gene*. **320**, 3-21.
128. Eleveld, T. F., Schild, L., Koster, J., Zwijnenburg, D. A., Alles, L. K., Ebus, M. E., Volckmann, R., Tijtgaat, G. A., Sluis, P. Van, Versteeg, R., and Molenaar, J. J. (2018) RAS-MAPK pathway-driven tumor progression is associated with loss of CIC and other genomic aberrations in neuroblastoma. *Cancer Res*. **78**, 6297-6308.
129. Lynch, R. A., Etchin, J., Battle, T. E., and Frank, D. A. (2007) A small-molecule enhancer of signal transducer and activator of transcription 1 transcriptional activity accentuates the antiproliferative effects of IFN- γ in human cancer cells. *Cancer Res*. **67**, 1254-1261.
130. Chen, P., Migita, S., Kanehira, K., Sonezaki, S., and Taniguchi, A. (2011) Development of sensor cells using NF- κ B pathway activation for detection of nanoparticle-induced inflammation. *Sensors*. **11**, 7219-7230.
131. Abdizadeh, M. F. (2017) A novel medium-throughput biological assay system for HTLV-1 infectivity and drug discovery. *Iran. J. Basic Med. Sci.* **20**, 1109-1118.
132. Huang, Z., Li, R., Tang, T., Ling, D., Wang, M., Xu, D., Sun, M., Zheng, L., Zhu, F., Min, H., Boonhok, R., Ding, Y., Wen, Y., Chen, Y., Li, X., Chen, Y., Liu, T., Han, J., Miao, J., Fang, Q., Cao, Y., Tang, Y., Cui, J., and Xu, W. (2020) A novel multistage antiplasmodial inhibitor targeting Plasmodium falciparum histone deacetylase 1. *Cell Discov*. **6**, DOI: 10.1038/s41421-020-00215-4
133. Cooksey, R. C., Crawford, J. T., Jacobs, W. R., and Shinnick, T. M. (1993) A rapid method for screening antimicrobial agents for activities against a strain of mycobacterium tuberculosis expressing firefly luciferase. *Antimicrob. Agents Chemother*. **37**, 1348-1352.
134. Amazaki, Y. Y., Gawa, K. E., Ose, K. N., Unimoto, S. K., and Akeuchi, T. T. (2003) HIF-1-Dependent VEGF reporter gene assay by a stable transformant of CHO cells. *Biol. Pharm. Bull.* **26**, 417-420.
135. Wu, J., Liu, W., Xue, C., Zhou, S., Lan, F., Bi, L., Xu, H., Yang, X., and Zeng, F. (2009) Toxicity and penetration of TiO₂ nanoparticles in hairless mice and porcine skin after subchronic dermal exposure. *Toxicol. Lett.* **191**, 1-8.
136. Chen, W. S., Chang, H. Y., Li, C. P., Liu, J. M., and Huang, T. S. (2005) Tumor β -1,4-galactosyltransferase IV overexpression is closely associated with colorectal cancer metastasis and poor prognosis. *Clin. Cancer Res*. **11**, 8615-8622.
137. Fukushima, N., Sugiyama, A., and Sato, T. (2018) Screening method for anti-colon cancer drugs using two sensor cell lines with human β 4-galactosyltransferase 4 gene promoters. *Sensors*. **18**, 2573.
138. Tokuda, G., Saito, H., and Watanabe, H. (2002) A digestive β -glucosidase from the salivary glands of the termite, *Neotermes kosshunensis* (Shiraki): Distribution, characterization and isolation of its precursor cDNA by 5'- and 3'-RACE amplifications with degenerate primers. *Insect Biochem. Mol. Biol.* **32**, 1681-1689.
139. Harvey, R. J., and Darlison, M. G. (1991) Random-primed cDNA synthesis facilitates the isolation of multiple 5'-cDNA ends by RACE. *Nucleic Acids Res*. **19**, 4002.
140. Mount, S. M. (1982) A catalogue of splice junction sequences. *Nucleic Acids Res*. **10**, 459-472.
141. Lo, N. W., Shaper, J. H., Pevsner, J., and Shaper, N. L. (1998) The expanding β 4-galactosyltransferase gene family: Messages from the databanks. *Glycobiology*. **8**, 517-526.
142. Smith, L. (2008) Post-transcriptional regulation of gene expression by alternative 5'-untranslated regions in carcinogenesis. *Biochem. Soc. Trans.* **36**, 708-711.
143. Koda, Y., Soejima, M., and Kimura, H. (1997) Structure and Expression of H-type GDP-L-Fucose : β -D-galactoside 2- α -L-Fucosyltransferase gene (FUT1). *J. Biol. Chem.* **272**, 7501-7505.
144. Taniguchi, A., Suga, R., and Matsumoto, K. (2000) Expression and transcriptional regulation of the human α 1,3-fucosyltransferase 4 (FUT4) gene in myeloid and colon adenocarcinoma cell lines. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **273**, 370-376.

145. Taniguchi, A., Kaneta, R., Morishita, K., and Matsumoto, K. (2001) Gene structure and transcriptional regulation of human Gal β 1,4(3) GlcNAc α 2,3-sialyltransferase VI (hST3Gal VI) gene in prostate cancer cell line. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **287**, 1148-1156.
146. Xu, L., Kurusu, Y., Takizawa, K., Tanaka, J., Matsumoto, K., and Taniguchi, A. (2003) Transcriptional regulation of human β -galactoside α 2,6-sialyltransferase (hST6Gal I) gene in colon adenocarcinoma cell line. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **307**, 1070-1074.
147. Sato, T., and Furukawa, K. (2007) Sequential action of Ets-1 and Sp1 in the activation of the human β -1,4-galactosyltransferase V gene involved in abnormal glycosylation characteristic of cancer cells. *J. Biol. Chem.* **282**, 27702-27712.
148. Tsunoda, T., and Takagi, T. (1999) Estimating transcription factor bindability on DNA. *Bioinformatics.* **15**, 622-630.
149. Dennig, J., Hagen, G., Beato, M., and Suske, G. (1995) Members of the Sp transcription factor family control transcription from the uteroglobin promoter. *J. Biol. Chem.* **270**, 12737-12744.
150. Kwon, H. S., Kim, M. S., Edenberg, H. J., and Hur, M. W. (1999) Sp3 and Sp4 can repress transcription by competing with Sp1 for the core cis-elements on the human ADH5/FDH minimal promoter. *J. Biol. Chem.* **274**, 20-28.
151. De Wolf, C. J. F., Cupers, R. M. J., Bertina, R. M., and Vos, H. L. (2006) The constitutive expression of anticoagulant protein S is regulated through multiple binding sites for Sp1 and Sp3 transcription factors in the protein S gene promoter. *J. Biol. Chem.* **281**, 17635-17643.
152. Schäfer, G., Cramer, T., Suske, G., Kemmner, W., Wiedenmann, B., and Höcker, M. (2003) Oxidative stress regulates vascular endothelial growth factor-A gene transcription through Sp1- and Sp3-dependent activation of two proximal GC-rich promoter elements. *J. Biol. Chem.* **278**, 8190-8198.
153. Nietfeld, W., and Meyerhans, A. (1996) Cloning and sequencing of hIk-1, a cDNA encoding a human homologue of mouse Ikaros/LyF-1. *Immunol. Lett.* **49**, 139-141.
154. Kim, J. H., Ebersole, T., Kouprina, N., Noskov, V. N., Ohzeki, J. I., Masumoto, H., Mravinac, B., Sullivan, B. A., Pavlicek, A., Dovat, S., Pack, S. D., Kwon, Y. W., Flanagan, P. T., Loukinov, D., Lobanenko, V., and Larionov, V. (2009) Human gamma-satellite DNA maintains open chromatin structure and protects a transgene from epigenetic silencing. *Genome Res.* **19**, 533-544.
155. Lo, K., Landau, N. R., and Smale, S. T. (1991) LyF-1, a Transcriptional Regulator That Interacts with a Novel Class of Promoters for Lymphocyte-Specific Genes. *Mol. Cell. Biol.* **11**, 5229-5243.
156. Hou, C. H., Huang, J., He, Q. Y., Zhang, C. N., Zhang, X. J., and Qian, R. L. (2008) Involvement of Sp1/Sp3 in the activation of the GATA-1 erythroid promoter in K562 cells. *Cell Res.* **18**, 302-310.
157. Hilger-Eversheim, K., Moser, M., Schorle, H., and Buettner, R. (2000) Regulatory roles of AP-2 transcription factors in vertebrate development, apoptosis and cell-cycle control. *Gene.* **260**, 1-12.
158. Pellikainen, J., Naukkarinen, A., Ropponen, K., Rummukainen, J., Kataja, V., Kellokoski, J., Eskelinen, M., and Kosma, V. M. (2004) Expression of HER2 and its association with AP-2 in breast cancer. *Eur. J. Cancer.* **40**, 1485-1495.
159. Qin, H., Sun, Y., and Benveniste, E. N. (1999) The transcription factors Sp1, Sp3, and AP-2 are required for constitutive matrix metalloproteinase-2 gene expression in astrogloma cells. *J. Biol. Chem.* **274**, 29130-29137.
160. Beishline, K., and Azizkhan-Clifford, J. (2015) Sp1 and the 'hallmarks of cancer.' *FEBS J.* **282**, 224-258.
161. Kingsley, C., and Winoto, A. (1992) Cloning of GT box-binding proteins: a novel Sp1 multigene family regulating T-cell receptor gene expression. *Mol. Cell. Biol.* **12**, 4251-4261.
162. Thakur, B. K., Dasgupta, N., Ta, A., and Das, S. (2016) Physiological TLR5 expression in the intestine is regulated by differential DNA binding of Sp1/Sp3 through simultaneous Sp1 dephosphorylation and Sp3 phosphorylation by two different PKC isoforms. *Nucleic Acids Res.* **44**, 5658-5672.
163. Muramoto, K., Tange, R., Ishii, T., Miyauchi, K., and Sato, T. (2017) Downregulation of transcription factor Sp1 suppresses malignant properties of A549 human lung cancer cell line with decreased β 4-galactosylation of highly branched N-glycans. *Biol. Pharm. Bull.* **40**, 1282-1288.
164. Kinouchi, S., Sato, M., Furukawa, H., and Sato, T. (2020) Suppression of malignant potentials of A549 human lung cancer cell line by downregulation of the β 4-galactosyltransferase 1 gene expression. *Biol. Pharm. Bull.* **43**, 747-751.
165. Nishioka, M., Mizuguchi, H., Fujiwara, S., Komatsubara, S., Kitabayashi, M., Uemura, H., Takagi, M., and Imanaka, T. (2001) Long and accurate PCR with a mixture of KOD DNA polymerase and its exonuclease deficient mutant enzyme. *J. Biotechnol.* **88**, 141-149.
166. Shiota, M., Yokomizo, A., Kashiwagi, E., Takeuchi, A., Fujimoto, N., Uchiumi, T., and Naito, S. (2011) Peroxiredoxin 2 in the nucleus and cytoplasm distinctly regulates androgen receptor activity in prostate cancer cells. *Free Radic. Biol. Med.* **51**, 78-87.

167. Bhattacharya, S., and Schindler, C. (2003) Regulation of Stat3 nuclear export. *J. Clin. Invest.* **111**, 553-559.
168. Liu, L., McBride, K. M., and Reich, N. C. (2005) STAT3 nuclear import is independent of tyrosine phosphorylation and mediated by importin- α 3. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **102**, 8150-8155.
169. She, Z. Y., and Yang, W. X. (2017) Nucleocytoplasmic shuttling of SOX14A and SOX14B transcription factors. *Oncotarget.* **8**, 46955-46968.
170. Ammanamanchi, S., Freeman, J. W., and Brattain, M. G. (2003) Acetylated Sp3 is a transcriptional activator. *J. Biol. Chem.* **278**, 35775-35780.
171. Page, G. (2007) Sp3-mediated VEGF regulation is dependent on phosphorylation by extra-cellular signals regulated kinases (Erk). *J. Cell. Physiol.* **213**, 454-463.
172. Näär, A. M., Beaurang, P. A., Robinson, K. M., Oliner, J. D., Avizonis, D., Scheek, S., Zwicker, J., Kadonaga, J. T., and Tjian, R. (1998) Chromatin, TAFs, and a novel multiprotein coactivator are required for synergistic activation by Sp1 and SREBP-1a *in vitro*. *Genes Dev.* **12**, 3020-3031.
173. Saha, A., Hammond, C. E., Gooz, M., and Smolka, A. J. (2008) The role of Sp1 in IL-1 β and H. pylori-mediated regulation of H, K-ATPase gene transcription. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* **295**, G977-G986.
174. Tange, R., Tomatsu, T., and Sato, T. (2019) Transcription of human β 4-galactosyltransferase 3 is regulated by differential DNA binding of Sp1/Sp3 in SH-SY5Y human neuroblastoma and A549 human lung cancer cell lines. *Glycobiology.* **29**, 211-221.
175. Waby, J. S., Bingle, C. D., and Corfe, B. M. (2008) Post-translational control of Sp-family transcription factors. *Curr. Genomics.* **9**, 301-311.
176. Warrens, A. N., Jones, M. D., and Lechler, R. I. (1997) Splicing by over-lap extension by PCR using asymmetric amplification: An improved technique for the generation of hybrid proteins of immunological interest. *Gene.* **186**, 29-35.
177. Liu, Y., Wei, Y., Wu, X., and Yu, L. (2005) Preparation of ChIL-2 and IBDV VP2 fusion protein by baculovirus expression system. *Cell. Mol. Immunol.* **2**, 231-235.
178. Giehl, K., Skripczynski, B., Mansard, A., Menke, A., and Gierschik, P. (2000) Growth factor-dependent activation of the Ras-Raf-MEK-MAPK pathway in the human pancreatic carcinoma cell line PANC-1 carrying activated K-ras: Implications for cell proliferation and cell migration. *Oncogene.* **19**, 2930-2942.
179. Chu, S., and Ferro, T. J. (2005) Sp1: Regulation of gene expression by phosphorylation. *Gene.* **348**, 1-11.
180. Juang, Y. T., Rauen, T., Wang, Y., Ichinose, K., Benedyk, K., Tenbrock, K., and Tsokos, G. C. (2011) Transcriptional activation of the cAMP-responsive modulator promoter in human T cells is regulated by protein phosphatase 2A-mediated dephosphorylation of SP-1 and reflects disease activity in patients with systemic lupus erythematosus. *J. Biol. Chem.* **286**, 1795-1801.
181. Rafty, L. A., and Khachigian, L. M. (2001) Sp1 phosphorylation regulates inducible expression of platelet-derived growth factor B-chain gene via atypical protein kinase C- ζ . *Nucleic Acids Res.* **29**, 1027-1033.
182. Chuang, J., Wang, Y., Yeh, S., Liu, Y., Chang, W., and Hung, J. (2008) Phosphorylation by c-Jun NH 2-terminal kinase 1 regulates the stability of transcription factor Sp1 during mitosis. *Mol. Biol. Cell.* **19**, 1139-1151.
183. Alroy, I., Soussan, L., Seger, R., and Yarden, Y. (1999) Neu differentiation factor stimulates phosphorylation and activation of the Sp1 transcription factor. *Mol. Cell. Biol.* **19**, 1961-1972.
184. Chu, S., Cockrell, C. A., and Ferro, T. J. (2003) Expression of α -ENaC2 is dependent on an upstream Sp1 binding motif and is modulated by protein phosphatase 1 in lung epithelial cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **303**, 1159-1168.
185. Ma, Y., Wang, J., Yu, Y., and Schwartz, R. J. (2016) PKG-1 α mediates GATA4 transcriptional activity. *Cell. Signal.* **28**, 585-594.
186. Ha, C., and Lim, K. (2015) O-GlcNAc modification of Sp3 and Sp4 transcription factors negatively regulates their transcriptional activities. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **467**, 341-347.
187. Majumdar, G., Harrington, A., Hungerford, J., Martinez-Hernandez, A., Gerling, I. C., Raghow, R., and Solomon, S. (2006) Insulin dynamically regulates calmodulin gene expression by sequential O-glycosylation and phosphorylation of Sp1 and its subcellular compartmentalization in liver cells. *J. Biol. Chem.* **281**, 3642-3650.
188. Braun, H. (2001) Transcription factor Sp3 is regulated by acetylation. *Nucleic Acids Res.* **29**, 4994-5000.
189. Ross, S., Best, J. L., Zon, L. I., and Gill, G. (2002) SUMO-1 modification represses Sp3 transcriptional activation and modulates its subnuclear localization. *Mol. Cell.* **10**, 831-842.
190. Müller, S., Ledl, A., and Schmidt, D. (2004) SUMO: A regulator of gene expression and genome integrity. *Oncogene.* **23**, 1998-2008.

191. Sapetschnig, A., Rischitor, G., Braun, H., Doll, A., Schergaut, M., Melchior, F., and Suske, G. (2002) Transcription factor Sp3 is silenced through SUMO modification by PIAS1. *EMBO J.* **21**, 5206-5215.
192. Katsuyama, M., Hirai, H., Iwata, K., Ibi, M., Matsuno, K., Matsumoto, M., and Yabe-Nishimura, C. (2011) Sp3 transcription factor is crucial for transcriptional activation of the human NOX4 gene. *FEBS J.* **278**, 964-972.
193. Itoh, A., Wang, Z., Ito, Y., Reddy, U. R., and Itoh, T. (2004) SP3 acts as a positive regulator on the core promoter of human ZPK gene. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **313**, 612-618.
194. Tange, R., Tachibana, R., and Sato, T. (2021) Phosphorylation of specificity protein 3 is critical for activation of β 4-galactosyltransferase 3 gene promoter in SH-SY5Y human neuroblastoma cell line. *Biol. Pharm. Bull.* **44**, in press.
195. Blume, S. W., Snyder, R. C., Ray, R., Thomas, S., Koller, C. A., and Miller, D. M. (1991) Mithramycin inhibits SP1 binding and selectively inhibits transcriptional activity of the dihydrofolate reductase gene *in vitro* and *in vivo*. *J. Clin. Invest.* **88**, 1613-1621.
196. Ray, R., Snyder, R. C., Thomas, S., Koller, C. A., and Miller, D. M. (1989) Mithramycin blocks protein binding and function of the SV40 early promoter. *J. Clin. Invest.* **83**, 2003-2007.
197. Vasan, N., Baselga, J., and Hyman, D. M. (2019) A view on drug resistance in cancer. *Nature.* **575**, 299-309.
198. Michelini, E., Cevenini, L., Mezzanotte, L., Coppa, A., and Roda, A. (2010) Cell-based assays: Fuelling drug discovery. *Anal. Bioanal. Chem.* **398**, 227-238.
199. Hughes, J. P., Rees, S. S., Kalindjian, S. B., and Philpott, K. L. (2011) Principles of early drug discovery. *Br. J. Pharmacol.* **162**, 1239-1249.
200. Marampon, F., Bossi, G., Ciccarelli, C., Di Rocco, A., Sacchi, A., Pestell, R. G., and Zani, B. M. (2009) MEK/ERK inhibitor U0126 affects *in vitro* and *in vivo* growth of embryonal rhabdomyosarcoma. *Mol. Cancer Ther.* **8**, 543-551.
201. Zhu, X. F., Liu, Z. C., Xie, B. F., Li, Z. M., Feng, G. K., Yang, D., and Zeng, Y. X. (2001) EGFR tyrosine kinase inhibitor AG1478 inhibits cell proliferation and arrests cell cycle in nasopharyngeal carcinoma cells. *Cancer Lett.* **169**, 27-32.
202. Lee, C. M., Fuhrman, C. B., Planelles, V., Peltier, M. R., Gaffney, D. K., Soisson, A. P., Dodson, M. K., Tolley, H. D., Green, C. L., and Zempolich, K. A. (2006) Phosphatidylinositol 3-kinase inhibition by LY294002 radiosensitizes human cervical cancer cell lines. *Clin. Cancer Res.* **12**, 250-256.
203. Patra, J. K., Das, G., Fraceto, L. F., Campos, E. V. R., Rodriguez-Torres, M. D. P., Acosta-Torres, L. S., Diaz-Torres, L. A., Grillo, R., Swamy, M. K., Sharma, S., Habtemariam, S., and Shin, H. S. (2018) Nano based drug delivery systems: recent developments and future prospects. *J. Nanobiotech.* **16**, DOI: 10.1186/s12951-018-0392-8