

魚類死後軟化を抑制する組織メタロプロテアーゼ
阻害剤の発現調節機構解析

(研究課題番号 12660185)

平成12年度～平成13年度 科学研究費補助金
基盤研究(C)(2)

研究成果報告書



平成14年3月

研究代表者 木下 政人
(京都大学大学院農学研究科助手)

魚類死後軟化を抑制する組織メタロプロテアーゼ
阻害剤の発現調節機構解析

(研究課題番号 12660185)

平成12年度～平成13年度 科学研究費補助金
基盤研究(C)(2)

研究成果報告書

平成14年3月

研究代表者 木下 政人
(京都大学大学院農学研究科助手)

研究組織

研究代表者：木下政人（京都大学大学院農学研究科助手）
研究分担者：豊原治彦（京都大学大学院農学研究科助教授）
研究分担者：久保田賢（高知大学農学部助手）
（研究協力者：宇治督、京都大学大学院農学研究科修士課程）

交付決定額（配分額）

（金額単位：千円）

	直接経費	間接経費	合計
平成12年度	2,500	0	2,500
平成13年度	1,600	0	1,600
総計	4,100	0	4,100

研究発表

論文発表

発表者名：M. Kinoshita, T. Yabe, M. Kubota, K. Takeuchi, S. Kubota, H. Toyohara, M. Sakaguchi :
テーマ：cDNA cloning and characterization of two gelatinases from Japanese flounder.
雑誌名：Fisheries Sci.
年月日：in press

口頭発表1

発表者；久保田賢、木下政人、宇治督、横山芳博、山本栄一、廣野育生、青木宙、豊原治彦、森岡克司、伊藤慶明
テーマ；2種のヒラメ Tissue inhibitor of metalloproteinase2 (TIMP-2)のcDNA クローニング
学会名；日本水産学会
年月日；平成12年9月29日

口頭発表2

発表者；宇治督、久保田賢、伊藤慶明、山本栄一、廣野育生、青木宙、豊原治彦、木下政人、坂口守彦
テーマ；ヒラメ TIMP-2 遺伝子構造解析
学会名；日本水産学会
年月日；平成12年9月29日

研究成果による工業所有権の出願・取得状況

なし

目次

序論	1
第一章 ヒラメ TIMP2 遺伝子の組織別発現量の検討	4
第2章 ヒラメ TIMP2b 遺伝子の転写調節エレメントの検索	9
第3章 ヒラメ TIMP 2 b 遺伝子の発現誘導	15
付録 ヒラメ TIMP2b タンパク質の肉質への影響の検討	23
謝辞	28
参考文献	29
図表	32

序論

近年、消費者は水産物に限らず食品の鮮度や安全性、そして、おいしさへの関心を高めている。そして、消費者の約8割が水産物を「できれば利用したい」または「積極的に利用したい」と考えており、水産物への関心は極めて高い¹⁾。そのような背景の中で、魚介類のテクスチャーの改良・保持法を開発することは消費者に美味しい魚介類を提供することになり、消費者のニーズに応えるものである。紙面を海に囲まれているという特徴を持つ我が国には、刺身・すしなどを生で食べる文化がある。これらのおいしさの指標には、うまみだけでなく魚肉のテクスチャーが大きなウエイトを占めている。例えば、ヒラメやタイでは硬い食感を楽しみ、マグロは柔らかい口触りを楽しむ。しかしながら、死後冷蔵保存中に急速にテクスチャーが失われる現象（死後軟化現象）が、食用哺乳動物に比べて、魚介類では急速に進行し、大きな特徴となっている。このことは、食品として魚介類を取り扱う上で大きな問題となっている。すなわち、漁獲後、速やかに流通させないと良好な肉質が失われ、商品価値が低下してしまう。これまでに、この魚類の急速な死後軟化現象機構の解明に関する様々な研究が行われてきた。その結果、現在では細胞外マトリックスの分解が、軟化現象の原因であることが示唆されるに至っている²⁻⁵⁾。

生体組織は、多様な細胞と種々の細胞外マトリックスから構成されている。細胞外マトリックスとは組織内で細胞外の隙間を満たしている生体高分子の複雑な集合体であり、組織構造を維持するだけでなく、細胞の足場あるいは、環境の一部として、細胞増殖のみならず、分化・発生・形態形成など幅広い細胞の機能を制御している。細胞外マトリックスは、コラーゲン、エラスチンなどの繊維性タンパク質、プロテオグリカン、グルコサミノグリカンなどの複合糖質、フィブロネクチン、ラミニン、ビトロネクチンなどの糖タンパク質からなり、生体の恒常性を保つために絶えず構成成分の制御された破棄と新生が行われている。

その細胞外マトリックスの分解をになう酵素として、マトリックスメタロプロテアーゼ群 (Matrix Metalloproteinases; MMPs) が知られており、そ

の MMPs の働きを特異的に抑制する物質として組織メタロプロテアーゼインヒビター (Tissue Inhibitor of Matrix Metalloproteinases; TIMPs) の存在が知られている⁶⁻⁸⁾。MMPs は、現在までに、約 20 種類が報告されており、主に一次構造と基質特異性から 5 群に分類されているが、基本的なドメイン構造はよく保存されており、これら複数の MMPs が協調して細胞外マトリックスのほとんどのタンパク質成分を分解できると考えられている。TIMPs は、これまでに 4 種類が報告されており、TIMPs の種類に関わらず、基本的には全ての MMPs の活性中心と結合することにより 1 : 1 の安定な複合体を形成して MMPs の活性を阻害するとされている。食品学的見地からしても、これらの酵素 MMPs およびその内因性阻害物質 TIMPs は、非常に重要である。つまり、先述のように、魚介類のテクスチャーは主に、筋肉中の細胞外マトリックス、特にその主成分であるコラーゲン、の分解に起因していると考えられており、魚介類の死後生じるこのテクスチャーの損失が商品価値を低下させるからである。

これまで行われてきた死後軟化現象の研究は、軟化機構の生化学的解明が種で、現実的に利用できるなんか抑制法の開発研究は皆無である。そこで、本課題研究の最終目標は、「現実的に利用できる死後軟化抑制法の開発」とした。これまでの研究結果から、生きている魚肉のコラーゲンの状態は、コラーゲンの合成とコラーゲンを分解する酵素である MMPs、そして MMPs の内因性阻害物質である TIMPs のバランスで決まるコラーゲンの分解が均衡していると考えられる。死後、この均衡状態が失われ、コラーゲンの分解に傾き、テクスチャーが損なわれ、ひいては商品価値の定価につながると考えられる。そこで、死後の魚類のテクスチャーを保持する新規な方法として、コラーゲン分解を担う MMPs の内因性阻害物質である TIMPs を活用することが効果的であると考えに至った。TIMPs のを生体内での存在量を増加させる方法として、その遺伝子を導入し、強制的に多量に発現させる“遺伝子導入”方法も考えられるが、現在の社会情勢として、遺伝子導入生物を食品として利用するには社会的同意が得られていない。このことを考慮し、魚が生存中に、外部刺激や何らかの操作 (例えば、UV 処理、熱刺激、高浸透圧処理など) により、本来魚が持っている TIMPs 遺伝子の発現量を増加させ、魚肉中の TIMPs を増加させ、

死後の肉質の保持をはかる、といった技術の提案を試みた。

本課題の研究機関では、上記の技術を開発するための基盤研究として、ヒラメ TIMPs 遺伝子の発現制御領域の単離とその解析を行った。

第一章

ヒラメ TIMP2 遺伝子の組織別発現量の検討

緒言

TIMPs 遺伝子は多種多様な細胞で発現しており、ほとんどの組織、体液に存在するとされている。しかしながら、軟体動物から初めて単離されたカキ (*Crassostrea gigas*) TIMP は血液細胞でのみ発現していた⁹⁾。これまでに魚類の TIMP 遺伝子の組織発現分布を検討した例はない。現在までに、ヒラメ TIMP 2 にはアイソフォーム (TIMP2a および TIMP2b) の存在が、これまでの我々の研究で明らかとなっていた。この二種のヒラメ TIMP 2 は、いずれも他の動物種で報告されている TIMP 2 遺伝子と高い相同性が確認され、TIMP1、TIMP3、TIMP4 とは相同性が低かった。そこで、本章では RT-PCR 法を用い二種のヒラメ TIMP 2 遺伝子の組織発現分布を明らかにし、いずれの遺伝子が肉質保持を目的とする本研究目標に合致するか検討した。

材料と方法

材料

鳥取県水産試験場の山本栄一先生が作出されたヒラメヘテロクローン (1.8 クローン) を分与していただき、本実験に用いた。

Total RNA の調製

ヒラメ各組織に対し 10 倍量の氷冷した 4 M GTG 溶液 (4 M グアニジンチオシアネート、10mM EDTA、2% sodium N-lauryl sarcosyl, 50mM Tris-HCl, pH 7.6) を加えてポリトロンホモジナイザーによりホモジナイズした後、室温で 3,000 x g、10 分間遠心分離し、不溶性の沈殿を取り除いた。こうして得られた上清を、HITACHI 5PA tube において 1.5ml の 5.7M 塩化セシウム上に重層し。50PA ローター(HITACHI)をもちいて、36,000 rpm 15°C で 13.5 時間遠心分離を行った。得られた RNA 沈殿を 70%エタノールで洗浄した後、1.5ml マイクロチューブに移し、DEPC 処理水に溶解し、水飽和フェノールを用いて不純物を抽出除去し、クロロホルムを用いて残

存するフェノールを除去した。この後、3回のエタノール沈殿処理を行い、適量の DEPC 処理水に溶解、total RNA とした。total RNA の濃度は、GeneQuant Pro”S” (Amersham Pharmacia Biotech) により測定した 260nm における吸光度の値をもとに決定した。

逆転写 PCR

ヒラメ各組織 total RNA 1 μ g を鋳型として逆転写酵素 200U (Superscript II, GIBCO BRL) および 50 pmol random 6 mer を含む緩衝液(50 mM Tris-HCl, pH8.3, 37.7 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, 10 mM DTT, 1 mM each dNTPs) 中で 25 °C、10 分間の後、42 °C、50 分間反応させ、一本鎖 cDNA を合成した。その後、70 °C、15 分間処理し、逆転写酵素を失活させ、これを PCR の鋳型とした。

上記の方法で得られた cDNA を鋳型をして、PCR を行った。プライマーは TIMP2aF1*、TIMP2a ProbePrimer2、FW3、RV2、 β -actinFW*、 β -actinRV*を用いた。PCR は、1 unit ExTaq (TAKARA) を含む反応液(10 mM Tris-HCl, pH8.3, 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, 0.2 mM each dNTP) 中で行った。PCR 反応条件は、95 °C 2 分、で鋳型を変性させた後、95 °C 30 秒、60 °C 30 秒、72 °C 1 分で 35 サイクル行った。使用した primer の塩基配列を以下に示す。

TIMP2aF1* :	GACTCCTGAAAAGACCAC
FW3:	CTACGATATGGGCTGCGA
RV2:	AATGCTGGAGATCCTCA
β -actinFW*:	ACTACCTCATGAAGATCCTG
β -actinRV*:	TTGCTGATCCACATCTGCTG

結果

ヒラメ TIMP2 遺伝子アイソフォームの組織別発現様式

クローンヒラメより、エラ、眼球、筋肉、後腎、頭腎、心臓、精巣、胆嚢、腸、脳、白血球、脾臓、ヒレ、幽門垂、卵巣、肝臓の全部で16の組織から total RNA を調製し、逆転写 PCR を行った。(Fig. 1) 内部コントロールとして、 β -アクチン遺伝子の増幅も行い、使用した全ての組織でその増幅が確認された。

エラ、眼球、筋肉、後腎、頭腎、心臓、精巣、胆嚢、腸、脳、白血球、脾臓、ヒレ、卵巣では、TIMP2a および TIMP2b のそれぞれに特異的なプライマーペアにより予想される PCR 産物が、いずれも観察された。しかしながら、幽門垂では、TIMP2b の増幅産物だけが確認され、TIMP2a のそれは観察されなかった。肝臓では、いずれの増幅産物も確認されなかった。

考察

ヒラメ TIMP2 遺伝子アイソフォームの性質の検討

TIMPs 遺伝子は、多種多様の細胞で発現することが知られており、今回のヒラメにおける観察も、その例外ではなかった。無脊椎動物であるカキでは血球細胞にのみ発現するという報告があるが、下等脊椎動物のヒラメでは、そのような結果は得られなかった。しかしながら、ヒラメにおいても血球細胞である白血球、および、造血・血球細胞の分化に関わる頭腎において、他の組織に比べて、TIMP2a および TIMP2b のいずれも多量の増幅産物が見られたことは、カキでの観察と一致し、血球細胞と TIMPs の関係を示唆するものである。

肝臓において、内部コントロールである β -アクチン遺伝子の増幅効率も他の組織に比べて低かったことを考慮すると、今回の PCR 条件が必ずしも、肝臓サンプルには適切ではなかったとも考えられる。肝臓において、今回いずれの TIMP2 遺伝子も増幅されなかったが、今後より詳細な検討が必要であると思われた。

興味深いことは、幽門垂では TIMP2b 遺伝子のみ増幅が観察されたことである。他の動物では、TIMP 2 遺伝子のアイソフォームの存在が知られておらず、現状ではヒラメのみに TIMP 2 遺伝子のアイソフォームが存在する。ヒラ

メでは、このアイソフォームの機能分化が行われており、幽門垂では TIMP2b が特化した機能を有するという仮説を可能にする。この件に関しては、今後さらなる研究が期待される。

いずれの TIMP2 遺伝子が肉質保持を目的とする本研究目標に合致するのかさて、本研究の最終目標は“肉質保持を目的”としている。

それでは、いずれの TIMP2 遺伝子を用いればよいのか検証する。まず、筋肉では、いずれの TIMP2 遺伝子の発現も他の組織に比べて高くはないが、このことは問題になるであろうか。TIMPs は細胞外分泌性のタンパク質であること、機能すべき所はコラーゲンの存在する細胞外であること（つまりリンパ液（白血球など）が存在する環境であること）を考え合わせると、必ずしも、筋肉で強く発現している必要はない。むしろ、今回、白血球でいずれの TIMP2 遺伝子の強い発現が確認されたことは、TIMP2 遺伝子を“肉質保持を目的”に使用することは合理的であると考えられる。では、TIMP2a または TIMP2b のいずれを用いるかであるが、今回の検討の結果から、いずれも広範な組織で発現する事から、どちらを用いても大差はないと考えられた。そこで、TIMP2b 遺伝子は TIMP2a 遺伝子の発現部位に加えて、幽門垂においても発現する事から、少しでも広範な組織で発現する方を採用するのが得策であると考え、今後は TIMP2b 遺伝子を用いて研究を遂行することにした。

第 2 章

ヒラメ TIMP2b 遺伝子の転写調節エレメントの検索

緒言

TIMPs はこれまでに4種が同定されており、これら組織特異性、溶解性、制御のような多くの点で異なっているが、すべての MMPs の活性中心と結合してその酵素活性を阻害するという点で共通している。MMPs と TIMPs 間のバランスは ECM の代謝回転をコントロールする重要な要因であり、それらの発現は MMPs と TIMPs の転写調節をする多種の成長因子やサイトカインの影響下にある 8)。たとえば、TIMP-1, TIMP-3 は、TPA(12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate)、TGF- β (transforming growth factor)によって転写が促進されるが、TIMP 2 は逆に転写が抑制される 10-12)。また、cAMP が TIMP 2 の転写を活性化すること 13)、shell のダメージのような外的刺激にも TIMP が発現誘導されることなどが報告されている 9)。そこで、本章ではヒラメ TIMP 2 b 遺伝子上流領域、コーディング領域、下流領域の塩基配列を決定し、成長因子やサイトカイン、外的刺激に応答するエレメントの検索を行った。

材料と方法

クローンヒラメゲノム DNA の調製

クローンヒラメの肝臓 64 mg を液体窒素中で乳鉢、乳棒を用いて凍結粉碎した後、2 ml の DNAZOL (GIBCO BRL) を加え、ガラスホモジナイザーを用いてホモジナイズした。4°C、15,000 rpm で10分間遠心分離し、上清を 1.5 ml 微量遠心チューブに移した。この上清に、0.5 ml 100% エタノール/1 ml DNAZOL の割合で、100% エタノールを加えチューブを反転混和後、室温で1~3分放置し、4°C、2,000 rpm で2分間遠心分離した。得られた沈殿物を 95% エタノールで2回洗浄した後、室温で10分間放置し、DNA を風乾させた。8 mM NaOH を組織 10~20 mg に対して、0.2~0.3 ml の割合で加え、4°C、3日間かけて溶解させた。その後、HEPES を加えて、DNA の pH を 7.2 に調整し、260 nm における吸光値と、電気泳動法によ

り濃度を測定した。

Inverse PCR (IPCR)

クロンヒラメゲノム DNA を Eco RI, Not I, Pst I, Sal I で完全消化した後、(Not I 処理ゲノム DNA は、フェノール処理を挟んで) エタノール沈殿し酵素を失活させ、70% エタノールで洗浄し、沈殿物を滅菌水に溶かした。制限酵素処理済みのゲノム DNA 1 μ g を T4 DNA ligase (GIBCO BRL) を用いて、16°Cで一晩セルフライゲーションさせた。反応液をエタノール沈殿した後、70% エタノールで洗浄し、滅菌水に溶解した。これを IPCR の鋳型とした。プライマーは未知領域近傍の制限酵素認識部位を参照して設計した。IPCR に用いたプライマーおよび手順を Fig. 2 および Fig. 3 に示した。

IPCR の反応条件は、95°C 10分の後、95°C 40秒・56°C 30秒・72°C 5分を30サイクル、最後に72°C 10分とした。IPCR はすべてホットスタート法を用いて行った。この IPCR 産物を鋳型として、Nested PCR を行い、得られた断片をおのおののプライマーに付加した制限酵素で処理後、pBluescript KS II+ (STRATAGENE) の同制限酵素サイトにサブクローニングした。

塩基配列決定

ALFred DNA シークエンサー (Amersham Pharmacia Biotech), ABI373 シークエンサー (ABI), CEQ200 (Beckman Coulter) を用いて、蛍光ジデオキシ法により塩基配列を決定した。

結果

5' 上流域の塩基配列決定

クローニングした 5' 上流域、約 3.5 kb 中には遺伝子発現に必要な TATA ボックス(-47~-33)、逆 CCAAT ボックス (-97~-86) が予想される転写開始点(+1) の上流に認められた(Fig. 5)。それぞれコンセンサスは 93%, 94%

であった。主な誘導的遺伝子の発現に関わる転写制御因子のエレメントとしては、CRE-BP1, AP-1, CREB, CRE-BP1/c-Jun などの結合エレメントが認められた。CRE-BP1 結合エレメントは一カ所しか存在せず、既報のコンセンサス配列と完全に一致した (-454~-446)。, AP-1, CREB, CRE-BP1/c-Jun 結合エレメントは複数箇所存在し、既報のコンセンサス配列との相同性は最大のものでそれぞれ、95 % (-921~-911), 94 % (-164~-153), 87 % (-762~-755) であった。また、既報のコンセンサス配列との相同性が 85 % 以上の STRE 結合エレメントが 9 カ所存在した。これらの代表的なエレメントの塩基配列および位置を Fig. 4 および Fig. 5 に示した。

コーディング領域および 3' 下流域塩基配列の決定

コーディング領域および 3' 下流域塩基配列の約 8.5kb 中には主な誘導的遺伝子の発現に関わるエレメントとして、CRE-BP-1/c-Jun, CREB, AP-1, STRE の配列が確認された。それぞれの既報のコンセンサス配列との相同性は、100 %, 100 %, 97 %, 97 % であり、全て複数箇所に点在していた。また、AATAAA に代表されるポリ A シグナルが 3' 下流域に 3 カ所 (それぞれ、終止コドンより、70~75, 290~295, 1922~1927) に確認された。

考察

5' 上流域に存在する誘導性遺伝子に存在する各種シスエレメントに関して

ヒト TIMP 2 の 5' 上流域は転写開始点から上流-300 bp までの間の 76 % を G/C を占めており、典型的な CpG アイランドを形成している (4)。これは組織特異的な発現を示さないいわゆるハウスキーピング遺伝子であることを示唆するものである。それに比べ、ヒラメ TIMP 2 b の 5' 上流域はにおいては、ヒトのそれとの相同性は 48 % とかなり低い。そのためヒラメ TIMP 2 b の 5' 上流域に存在するシスエレメントはヒトのものとは異なることが予想される。ヒト TIMP 2 の 5' 上流域は、PEA-3 や SP 1 にとむのに比べ、ヒラメ

TIMP 2 bの該当領域には CREBP1 や CREB に富む。しかしながら、逆 CCAAT ボックスが存在することや、AP1 に富む点では共通している。ここで興味深いのはヒト TIMP 2 b 5' 上流域で解析されている 2.5kb には CRE-BP1 や CREB が結合するエレメントが全く存在しないことである。ヒラメ TIMP2b5' 上流域ではクローニングした約 3.5kb 中に CRE-BP1 結合エレメントの完全コンセンサスが 1カ所存在し、CREB の結合エレメントは 6カ所存在し、CRE-BP1/Jun 結合配列は 5カ所存在する。このことは同じ遺伝子でありながら、ヒラメ TIMPs 2 bは、ヒトのそれとは異なり、ハウスキーピング遺伝子として働くのではなく、誘導的に働くことを示唆している。現在、まだ 5' 上流域が解析されていない TIMP2a がハウスキーピング遺伝子として働くのかもかもしれない。CRE-BP1, CREB はもともと、細胞内 cAMP の上昇に伴い発現が誘導される遺伝子に共通して存在する CRE (cAMP response element) に結合する因子としてクローニングされたもので、現在では、CRE に結合し類似の構造を有する因子が多数同定されて、ファミリーを形成していることがわかっている (15)。CREB/ATF ファミリーは全て C 末端領域に塩基性アミノ酸クラスターとロイシンジッパーからなる b-ZIP 構造を有しこの領域を介してホモダイマーあるいはヘテロダイマーを形成し、2量体として CRE に結合する。今回 TIMP 2 b 5' 上流域にみられた完全コンセンサスの CRE-BP1 結合エレメントは他の CRE/ATF ファミリーの因子は結合せず CRE-BP1 のみが結合することがわかっている (16)。CRE-BP1 は炎症性サイトカイン(TNF α) やストレス (UV、熱刺激、高浸透圧、 γ 先照射など) により、SAPK が活性化されると SAPK 自身に直接リン酸化され活性化することがわかっており (17)、今回の研究目的である外的刺激から TIMP 2 bを誘導発現させる上でターゲットになる可能性の高いエレメントであると判断できる。また、完全コンセンサスでだけでなく、TATA ボックス近傍 (-454~-446) にあることから、実際に機能しているものと期待される。

コーディングおよび 3' 下流領域に存在する誘導性遺伝子に存在する各種シスエレメントに関して

コーディング領域、3' 下流領域には多数の CRE-BP1/c-Jun, CREB の結合

エレメントが存在した。しかしながら、これらの因子はプロモーター内あるいはプロモーター付近で構成的転写の活性化に働くと考えられており TATA ボックスからの距離を考えると、機能していない可能性が高い。また、CREB は、CRE-BP1 と異なる経路で活性化され、今回の外的刺激から TIMP 2 b を発現誘導するという目的の上では適切ではないと考えた。その他に、発現誘導可能な転写因子の結合部位は塩基配列の相同性からは確認できなかった。

複数のポリ A 付加シグナルの存在

ヒトの TIMP 1 遺伝子の mRNA が 1 種類 (0.9kb) であるのに対して、ヒト TIMP 2 の mRNA は 2 種類 (1.2kb, 3.5kb) 存在することがしられている。ヒラメ TIMP 2 b の 3' non-coding region (3'UTR) の配列を検討すると、ポリ A 付加シグナルが 3 カ所存在することが示唆された。このことから、ヒラメ TIMP 2 b の mRNA は、ヒトの TIMP 2 と同様に複数存在することが示唆された。

第 3 章

ヒラメ TIMP 2 b 遺伝子の発現誘導

緒言

第2種で構造的な存在が明らかになった CRE-BP1(ATF-2) 結合エレメントが外的刺激の選択をする上で最適なエレメントと考えた。第1章の考察でも述べたように CRE-BP1(ATF-2)は、炎症性サイトカインやストレス (UV、 γ 線照射、熱刺激、高浸透圧など) により SAPK が活性化されると、ATF-2 が直接リン酸化され、活性化することが知られている。そこで、実際使用可能な種々の外的刺激 (UV、 γ 線照射、熱刺激、高浸透圧など) が CRE-BP1 エレメントを介して TIMP 2 b 遺伝子の転写を活性化させるかどうかを検討する。ヒラメ培養細胞株 HINAE にルシフェラーゼ遺伝子と検討するエレメントを含む DNA コンストラクトを導入し、一過的発現実験を行った。

材料と方法

ヒラメ BAC クローンの調製

RI 標識したヒラメ EST-WE12-6 をプローブとして、ヒラメ BAC ライブラリーより陽性クローン 50 個を単離した。次に、そのクローンを鋳型として EST-WE12-6 の塩基配列を元にしてデザインしたプライマーで PCR をおこない、真の陽性 BAC クローンを 2 つ単離した。これらは DNA 精製用 DEAE カラム(GIAGEN)を用いて精製した。なお、ヒラメ BAC ライブラリーは、東京水産大学、青木先生、広野先生、片桐先生および慶応大学の清水先生、浅川先生よりご提供いただいた。

細胞導入用ベクターの構築

Eco RI で処理した BAC クローンを、1%低融点アガロースゲルで電気泳動後、TIMP 2 b の 5' 上流域(-3.5k~-0.5k) の断片を切り出し、pBluescript KS (+) の Eco RI サイトにサブクローニングした。同時に BAC クローンを鋳型として FW11*と USRV1 プライマーを用いて PCR を行い、TIMP 2 b 5' 上流域 (-0.5k~開始コドン直前) の断片を増幅し、pBluescript KS (+) の Eco

RI/Xho I サイトにサブクローニングした (これを pBS-EI とする)。その後、pBS-EI の塩基配列を確認した後、Xho I および Sac I で切り出し、ルシフェラーゼ遺伝子を含むベクターである pGL3 (Promega) の Xho I/Sac I サイトにサブクローニングした (これを pGL3-EI とする)。続いて、pBluescript KS (+) にサブクローニングしておいた TIMP 2 b 5' 上流域(-3.5k~-0.5k)を Eco RI で切り出し、pGL3-EI の Eco RI サイトに挿入し、挿入方向を確認した (これを pGL3-EEI とする)。各コンストラクトの精製はすべて QIAGEN の DNA 精製カラムを用いた。

*FW11: cgtagaattcctgcagCCCATATATTGTCCCCTCTG

TIMP 2 b の 5' 上流域 deletion serise の調製

pGL3-EEI を Sma I, Kpn I で処理し Exo III (double-stranded nested deletion kit, Amersham Pharmacia Biotech) を用いて deletion serise (pTIMP2b-2524, -1940, 933,-380, -144) を作成した。deletion construct の塩基配列の確認を行い、実験に用いた。

COS-7 細胞株の培養

COS-7 細胞は 10% FCS, 100 unit/ml ペニシリン、100 μ g/ml ストレプトマイシン、0.16 % NaHCO₃ を含む Dulbecco MEM 培地 (ニッスイ) を用いて、37°C、5 % CO₂ 中で培養した。

HINAE 細胞株の培養

HINAE 細胞は 10% FCS, 1100 unit/ml ペニシリン、100 μ g/ml ストレプトマイシンを含む Leibovitz's L-15 medium (GIBCO BRL) を用いて 20°C で培養した。なお、HINAE 細胞は、北海道大学 吉水先生よりご提供いただいた。

COS-7 細胞への遺伝子導入

対数増殖期の COS-7 細胞、 1×10^7 個を 700 μ l の PBS に懸濁し、10 μ

g のレポータープラスミド pGL3-TIMP2b-promoter および 500ng の内部コントロールプラスミド phRL-tk (Promega) を加え、GENE PULSER II (BIO RAD)を用いて、220v, 975 μ F の条件で、パルスを与えた。電圧の実測値はいずれの場合も 220~250V の間であった。パルスを与えた細胞は、室温で5分間静置した後、10 ml の血清入り DMEM 培地 (ニッスイ) で懸濁し、96 穴プレートに 100 μ l ずつ撒いた。24 時間培養後に種々の実験を行った。

HINAE 細胞への遺伝子導入

対数増殖期の COS-7 細胞、 1×10^7 個を 700 μ l の PBS に懸濁し、10 μ g のレポータープラスミド pGL3-TIMP2b-promoter および 2 μ g の内部コントロールプラスミド phRL-tk (Promega) を加え、GENE PULSER II (BIO RAD)を用いて、300v, 625 μ F の条件で、パルスを与えた。電圧の実測値はいずれの場合も 328~330V の間であった。パルスを与えた細胞は、室温で5分間静置した後、10 ml の血清入り Leibovitz's L-15 medium (GIBCO BRL)で懸濁し、96 穴プレートに 100 μ l ずつ撒いた。24 時間培養後に種々の実験を行った。

外的刺激

熱処理は細胞の入ったプレートを 30 $^{\circ}$ C の恒温水槽に 30 分間浸した。UV 処理は、一時的に培地をのぞき、80 J.m² の UV を与え、のぞいた培地を戻した。浸透圧刺激は、プレート内の培地を NaCl の濃度の異なる 150, 200, 300, 400, 450, 500, 600 mOsm/Kg のいずれかの浸透圧に調製した MEM 培地 (ニッスイ) に交換することにより行った。

Dual-luciferase assay

細胞に種々の外的刺激を与えて後、おのこの実験に適した時間に上清を除き、PBS(-)で2回洗浄する。double-luciferase reporter assay system (Promega)の PLB (Passive lysis buffer)にて細胞を溶解する。ルシフェラーゼ発光測定は、1420ALVOSx (WALLAC)を用いておこなった。まず、firefly

luciferase 活性を dual-luciferase assay kit (Promega) の LAR II(luciferase assay reagent II)を細胞溶解液に入れ、2秒の delay 後、10秒間測定した。続いて STOP & Glo reagent を LAR II と同量加えて、2秒の delay の後、10秒間 Renilla luciferase 活性を測定した。ヒラメ TIMP 2 b のプロモーター活性は、Renilla luciferase 活性に対する Firefly luciferase 活性の相対値で表した。

結果

以下の実験は、ヒラメ細胞株 HINAE を用いて行った。

熱およびUV刺激によるルシフェラーゼ活性の経時的変化

熱およびUV刺激によるルシフェラーゼ活性の経時的変化を Fig.7 に示す。刺激を与えなかった細胞(control)では、経時的にルシフェラーゼ活性の減少がみられた。30℃30分の熱刺激を与えた場合、controlとの明瞭な違いは観察されず、経時的に徐々にルシフェラーゼ活性は減少していった。UV刺激を与えた細胞では、細胞に大きなダメージが与えられたためか、培養後3時間でのルシフェラーゼの活性は低く、その後も低レベルでのルシフェラーゼ活性を示した。

浸透圧刺激によるルシフェラーゼ活性の経時的変化

浸透圧刺激によるルシフェラーゼ活性の経時的変化を Fig. 8 に示す。浸透圧に変化は与えず、培地交換だけの処理をした control (300 mOsm/Kg)では、培地交換後12時間までは、ルシフェラーゼ活性に大きな変化はみられなかったが、24時間後に急速に同活性が低下した。低浸透圧処理を施した細胞(200mOsm/Kg)では、ほとんど変化がみられなかったが、刺激後12時間後まではわずかにルシフェラーゼ活性の上昇がみられた。高浸透圧刺激を与えた場合、刺激の強度に関わらずルシフェラーゼ活性の上昇が観察された。400 mOsm/Kg および 450 mOsm/Kg の浸透圧刺激を与えた細胞群ではルシフェラーゼ活性は6時間後にピークを迎え、12時間後までは変化がみられず、

その後、活性が低下し、24時間後には、3時間後と同等の活性を示した。500 mOsm/Kg の刺激を与えた細胞では、9時間後に活性のピークを示し、その後活性は低下し、24時間後には、3時間後と同等の活性レベルにまで減少した。600mOsm/Kg の刺激を与えた細胞では、経時的にルシフェラーゼ活性の上昇がみられ、観察終了時の24時間後でも、なお、活性は上昇傾向にあった。

このようにヒラメ TIMP 2 b 遺伝子の発現調節領域は、高浸透圧刺激に応答し、発現誘導をもたらすことが示された。そこで、より詳細な高浸透圧応答配列を検討するために、発現調節領域の **deletion series** を作成し、高浸透圧応答性の検討を行った。

deletion seriesにおける高浸透圧応答性の検討

外部刺激を与えていない培養細胞の基本転写活性は、5'側より削り込むに従い、一貫して減少した (Fig. 9)。pTIMP2b-144d では、pTIMP2b-2524 の5分の1の活性まで減少した。特に、pTIMP2b-933 と pTIMP2b-380 に基本転写活性の大きな差が見られた。300 mOsm/Kg の培地で培養した細胞 (浸透圧は変化していないもの) と 500 mOsm/Kg の培地で培養した細胞 (高浸透圧処理群) との活性の比は、どのコンストラクトにおいても 1.6~2.1 倍であり、CRE-BP1 結合エレメントを削除しても高浸透圧に応答した (Fig. 10)。

考察

外的刺激処理による誘導活性の経時的变化

上記の結果から、熱刺激、UV刺激に対してヒラメ TIMP 2 b 遺伝子の 5' 上流域は応答しないことがあきらかとなった。また、低浸透圧処理に対しても、ルシフェラーゼ活性がわずかに上昇するものの、レスポンスエレメントがありそれが、応答しているとは言い難いものであった。等浸透圧である 300 mOsm/Kg における24時間後のルシフェラーゼ活性の急激な低下は、新しい培地に交換した上に通常の培養条件下で培養しているので、細胞がコンフル

メントになり、増殖が低下したためであると考えられた。高浸透圧刺激においては、400 mOsm/Kg から 600 mOsm/Kg と生育条件が厳しくなるにしたがい応答時間の遅れが見られるようになり、また、応答レベルが増加するという傾向の原因としては共通して細胞の *viability* の低下が考えられる。応答時間が浸透圧の上昇と共に遅れる現象は、この様な厳しい生育条件になればなるほど細胞の *viability* が低下し、その環境に対応するための遺伝子応答の必要性が増加するためであろう。つまり、その環境に対応してから、TIMP 遺伝子の発現が行われるためであろう。応答レベルが増加する現象においても *viability* の低下により TIMP2b 遺伝子発現が厳しい状態になり、存在する TIMP 2 タンパク質の量が減少したためと考えられる。つまり、必要な TIMP 2 b タンパク質量が増加し、応答レベルが振盪あるの上昇と共に増加したと考えられた。400 mOsm/Kg のように通常の 300 mOsm/Kg に近い生育条件下では、穏やかにではあるが TIMP2b 遺伝子の発現は行われているが、500 mOsm/Kg、600 mOsm/Kg になるとほとんど発現できる状態ではないのだと考えられた。実際、顕微鏡観察によっても明らかのように 400 mOsm/Kg の条件下では細胞は 300 mOsm/Kg のものと同様に違いは見られないが、500 mOsm/Kg、600 mOsm/Kg という条件下では死んでいる細胞が多数観察されたからである。

高浸透圧応答エレメントはどこなのか？

基本転写活性が CRE-BP1 を含むプロモーター領域 (pTIMP2b-933) から CRE-BP1 を含まないプロモーター領域 (pTIMP2b-380) になると大きく減少した。また、CRE-BP1 を含まないプロモーター領域に高浸透圧刺激を加えても、応答性が保持されていた。これらのことから CRE-BP1 は構成的発現に大きく関与していると考えられた。そして、外部からの刺激を与えても、既に活性化されている同エレメントは、もはや新たな活性の誘導を引き起こさないのであろうと考察された。では、高浸透圧応答性エレメントはいつどこなのだろうか？残された可能性は、2つある。1つ目は、今回 *deletion* を行っていない -144~+199 までにその配列が存在する可能性。もう一つは、今回実験に用いた pGL3 vector 内にその配列が存在する可能性である。後者の可能

性に関して、pGL3 の塩基配列を検討したが、高浸透圧に応答しそうな配列は、4箇所 に点在している STRE のみであった。しかし、この配列はヒラメ TIMP2b 遺伝子の 5'上流域 3.5kbp 内にもコンセンサス配列が 9箇所 で確認されており、また、deletion series でそれらの配列を削っても高浸透圧応答性が減少しなかったことから、pGL3 vector 内の STRE が機能するとは考えられない。となると、前者の可能性が有力となるが、これを検証するために今後さらなる詳細な解析が必要である。

今回、データは示さなかったが、COS-7 細胞でも同様の一過性の発現実験を行った。しかしながら、ホタルルシフェラーゼ活性を全く測定することができなかった。このことは、細胞の由来、つまり、どの生物由来であるか、どの組織由来であるか、を精査して発現解析実験を行わないと、誤った結果を引き出すという危険性を示した。

付録

ヒラメ TIMP2b タンパク質の肉質への影響の検討

緒言

軟化現象の原因はコラーゲン分解であり、コラーゲンを分解を担うのが MMPs であるという仮説とその証拠が、近年、徐々に蓄積されてきている。この仮説を直接的に証明するには、MMPs の特異的インヒビターである TIMP を過剰発現させ、MMPs の働きを抑制し、軟化現象が起こるかどうかを観察すればよい。そこで、In Vivo Gene SHUTTLE (QUANTUM) を用いて、ヒラメ生体内で TIMP2b タンパク質を多量に発現させ、軟化現象に対する同タンパク質の影響の検討を試みた。

材料と方法

材料

ヒラメ (体重 1.0~1.25 kg) を株式会社 近畿活魚より購入し、人工海水で 24 時間飼育後、In Vivo injection に使用した。

発現ベクターの構築

メダカ骨格筋アクチン遺伝子の発現調節領域 (-1430~+743) を含む GFP 発現ベクター (pOIMA1-EGFP, Kusakabe et al., Int J Dev Biol, 43: 541-554, 1999) から、制限酵素 Sal I/Not I を用いて EGFP を切り出した後、同制限酵素サイトに、3'末端に FLAG エピトープをコードする配列を付加したヒラメ TIMP2b 遺伝子を連結した (pOIMA1-TIMP2b)。

In Vivo Injection

リポソームのさくせいには、In Vivo Gene SHUTTLE (QUANTUM) を用いた。

1.5 ml マイクロチューブ中で、D5W 90 μ l にリポソーム 60 μ l を加え混和する。別の 1.5 ml マイクロチューブ中でベクター 150 μ g に最終容量 150 μ l になるように D5W を加え、混和する。それぞれの混和物を混ぜ合わ

せ、サンプルとする。このサンプルをヒラメ尾柄部血管に 23G の注射針を用いて注入した。その後サンプルを注入したヒラメは、海水に戻して実験に即した時間に脊髄切断により即殺し、剪断強度測定およびウエスタンブロット解析に供した。

また、control として pOIMA1-EGFP をもちい、試験区には pOIMA1-TIMP2b を用いた。

ウエスタンブロット解析

組織抽出液を 13.5 % ポリアクリルアミドを用いた SDS-PAGE を行い、タンパク質は PVDF 膜に定電流 90 mA で約 1 時間転写した。その後、膜を 5 % スキムミルク/Phosphate buffered saline tween20 (PBS-T) に一晩浸漬し、ブロッキングした。1 % スキムミルク/PBS-T 20 ml に FLAG 抗体溶液 (SIGMA) を 1 次抗体として 1 ml 加え、膜を 4 °C で一晩浸漬した。1 次抗体反応後、PBS-T で 5 分間 5 回洗浄した後、1 % スキムミルク/PBS-T に 2 次抗体 10 ml を加えた 2 次抗体反応液と室温で 4 5 分間反応させた。2 次抗体にはアルカリフォスファターゼ標識された抗ウサギ IgG 抗体を用いた。その後、PBS-T で 5 分間 5 回洗浄した後、PBS で 5 分間 1 回洗浄し、発色試薬 (100 mM Tris-HCl, pH9.5, 100 mM NaCl, 5 mM MgCl, 20 mg/ml Nitro Blue Tetrazolium, 150 mg/ml 5-Bromo-4-chloro-3-indolylphosphate p-Toluidine Salt) でシグナルを検出した。

剪断強度測定

筋肉の硬さを評価するために、剪断強度測定を即殺直後および死後 6 時間後に行った。サンプルには、背部普通筋から体軸方向に対して垂直に 10 mm x 10 mm x 40~50 mm の棒状の筋肉を切りだし使用した。レオメーターは、RE-33005 (山電) を使用した。テーブル速度は 1 mm/sec で行った。プランジャーとしてカッターナイフの替え刃を使用し、切り出した筋肉を刃が筋細胞の方向に対して平行になるように、また、筋隔膜にあたらないように注意しながら切断し、筋肉の剪断が最初に起きたときの加重を記録し、剪断強度 (g) とした。

結果

インジェクションを行わなかったヒラメ 3 個体の即殺直後の剪断強度を 100 %としたとき、6 時間後のそれらは、84 %、74 %、59 %であった(Fig. 11)。

pOIMA1-EGFP を用いた結果を Fig.12 に示す。この場合、2 個体用いたが、結果が大きくばらつき、有効なデータは得られなかった。

TIMP2b 発現ベクターをインジェクションしたヒラメ 3 個体の剪断強度は、同様に即殺時のものを 100 %としたとき 6 時間後のそれらは、83 %、89 %、102 %であった(Fig. 13)。

インジェクションした発現ベクターから予定通り TIMP2b-FLAG 融合タンパク質が産生されているかどうかを検討するために、剪断強度測定に用いた筋肉をウエスタンブロット解析に供した。今回、検出には抗 FLAG 抗体を用いた。複数の筋肉片を解析に用いたが、残念ながら陽性シグナルは検出されなかった。

考察

ウエスタンブロット解析によって TIMP2b-FLAG 融合タンパク質が検出できなかったことから、TIMP2b タンパク質の軟化現象への関与を議論するのは早計であるが、TIMP2b-FLAG 融合タンパク質発現ベクターをインジェクションした個体群の方が、インジェクションしなかったヒラメより死後 6 時間後の剪断強度が高く現れた。このことを好意的に解釈すると「TIMP2b が軟化現象を抑制する」とできる。もちろん、先述のようにウエスタンブロット解析によって検出できないこと、また、個体差が大きかったこと、測定個体数が少ないことなど多くの問題点がある。

今回採用した In Vivo Gene SHUTTLE 方は、目的のタンパク質を固体で発現させ、その影響を観察するのに優れた方法であると思われる。今後は、本

法により習熟し、正確な結果を得られるようにすることが必要であろう。

謝辞

本研究を遂行するに当たり、ヒラメ EST data 並びにそのクローンは東京水産大学、青木 宙先生・廣野育生先生より、また、ヒラメ BAC library は東京水産大学、青木 宙先生・廣野育生先生・片桐孝之先生、慶応大学、清水信義先生・浅川修一先生より、また、クローンヒラメは鳥取県水産試験場、山本栄一先生より、また、ヒラメ細胞株 HINAE は、北海道大学、吉水 守先生より、ご提供いただきました。ここに、厚くお礼申し上げます。

参考文献

- 1) 平成11年 漁業白書 (農林統計協会)
- 2) Anso M, Toyohara H, Shimizu Y, Sakaguchi M (1991) Tenderization of fish muscle proceeds independently of resolution of rigor post-mortem mortis. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 57, 1165-1169
- 3) Ando M, Toyohara H, Shimizu Y, Sakaguchi M (1993) Postmortem tenderization of fish muscle weakening of pericellular connective tissue. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 59, 1073-1076
- 4) Sato K, Ando M, Kubota S, Origasa K, Kawase J, Toyohara H, Sakaguchi M, Nakagawa T, Makinodan Y, Ohtsuki K, Kawabata M (1997) Involvement of type V collagen in softening of fish muscle during short-term chilled storage. *J Agric Food Chem*, 45, 343-348
- 5) Kubota M, Kinoshita M, Kubota S, Yamashita M, Toyohara H, Sakaguchi M (2001) Possible implication of metalloproteinases in post-mortem tenderization of fish muscle. *Fisheries Sci*, 67, 965-968
- 6) 早川太郎(1997) 蛋白質核酸酵素、42, 2277-2283
- 7) 宮崎香、東昌市(1996) 生化学、68, 1791-1807
- 8) Gomez DE, Alonso DF, Yoshiji H, Thorgeirsson UP (1997) Tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, regulation and biological functions. *Eur J Cell Biol*, 74, 111-122
- 9) Montagnani C, Le Roux F, Berthe F, Escoubas JM (2001) Cg-TIMP, an inducible tissue inhibitor of metalloproteinase from the Pacific oyster *Crassostrea gigas* with a potential role in wound healing and defense mechanisms(1). *FEBS Lett*, 500, 64-70

- 1 0) Stetler-Stevenson WG, Brown PD, Onisto M, Levy AT, Liotta LA (1990) Tissue inhibitor of metalloproteinases-2 (TIMP-2) mRNA expression in tumor cell lines and human tumor tissues. *J Biol Chem*, 265, 13933-13938
- 1 1) Leco KJ, Khokha R, Pavloff N, Hawkes SP, Edwards DR (1994) Tissue inhibitor of metalloproteinases-3 (TIMP-3) is an extracellular matrix-associated protein with a distinctive pattern of expression in mouse cells and tissues. *J Biol Chem*, 269, 9352-9360
- 1 2) Lim YT, Sugiura Y, Laug WE, Sun B, Garcia A, DeClerck YA (1996) Independent regulation of matrix metalloproteinases and plasminogen activators in human fibrosarcoma cells. *J Cell Physiol*, 167, 333-340
- 1 3) Tanaka K, Iwamoto Y, Ito Y, Ishibashi T, Nakabeppu Y, Sekiguchi M, Sugioka Y (1995) Cyclic AMP-regulated synthesis of the tissue inhibitors of metalloproteinases suppresses the invasive potential of the human fibrosarcoma cell line HT1080. *Cancer Res*, 55, 2927-2935
- 1 4) Hammani K, Blakis A, Morsette D, Bowcock AM, Schmutte C, Henriet P, DeClerck YA (1996) Structure and characterization of the human tissue inhibitor of metalloproteinases-2 gene. *J Biol Chem*, 271, 25498-25505
- 1 5) Hai T, Hartman MG (2001) The molecular biology and nomenclature of the activating transcription factor/cAMP responsive element binding family of transcription factors: activating transcription factor proteins and homeostasis. *Gene*, 273, 1-11
- 1 6) Benbrook DM, Jones NC (1994) Different binding specificities and transactivation of variant CRE's by CREB complexes. *Nucleic Acids Res*, 25, 1463-1469

17) Gupta S, Campbell D, Derijard B, Davis RJ (1995) Transcription factor ATF2 regulation by the JNK signal transduction pathway. *Science*, 267, 389-393

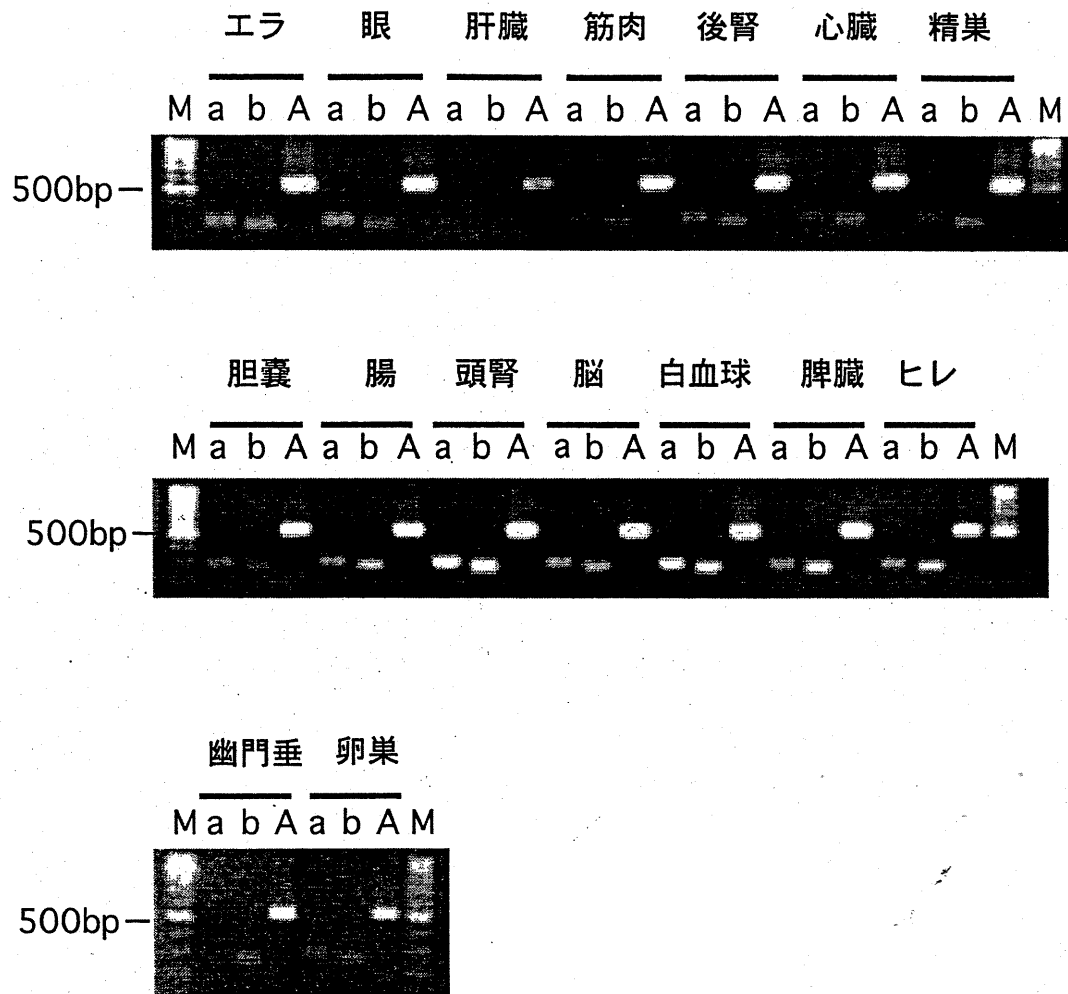


Fig.1 各種組織におけるTIMP2a および TIMP2bの発現様式
 a ; TIMP2a、 b ; TIMP2b、 A ; β -アクチン、 M ; 100pb ラダー

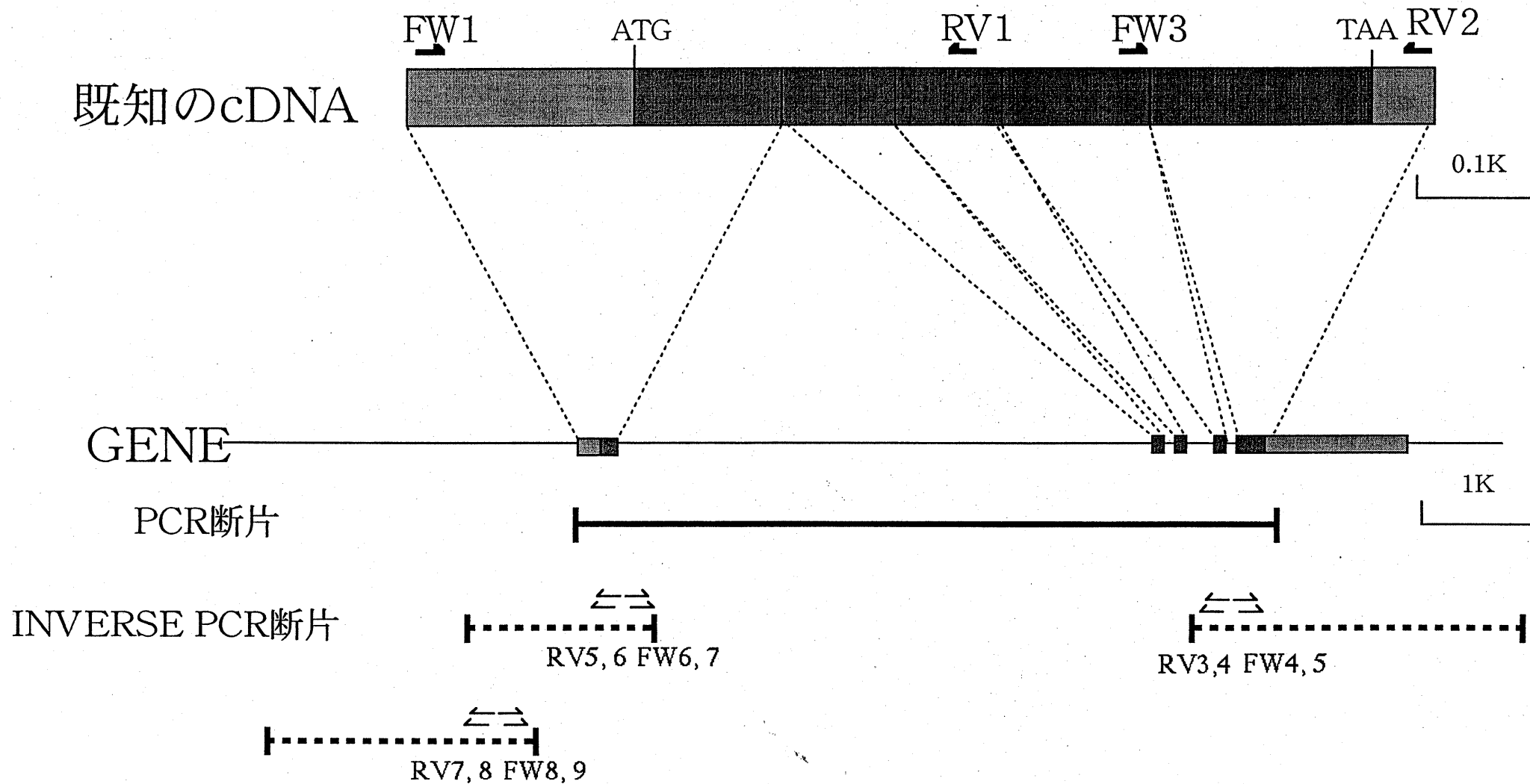


Fig. 2 CLONING STRATEGY

矢印はPCRプライマーを示す

FW4 5'- CGTACTGCAGTCGACTCTTGTGCCTGGTACAGA -3'
FW5 5'- CGTACTGCAGTCGACCCTTAACTCCACCACTGT -3'
FW6 5'- CGTAGAATTCGTCGACGGTGAGCAGCTGCTTTGT -3'
FW7 5'- CGTAGTCGACGAATTCCCCAGCTCATCCTCAGCA -3'
FW8 5'- CGTAGAATTCCTGCAGTGACTGACTGACAACTAGAG -3'
FW9 5'- CGTAGAATTCCTGCAGCTTCTCAGGAGCATATTTCCC -3'
FW10 5'- CGTAGAATTCCTGCAGGCCTGCTGATTTTCGTGAGAC -3'
FW11 5'- CGTAGAATTCCTGCAGCCATATATTGTCCCCTCTG -3'
RV3 5'- GCTAGTCGACTGCAGCCCATATCGTAGCGCT -3'
RV4 5'- CGTACTGCAGTCGACAACACTTCAGGTTCTCT -3'
RV5 5'- CGTAGAATTCGTCGACTTGGGTCCACCTGAAGT -3'
RV6 5'- CGTAGTCGACGAATTCTGCTTGTCAAACCTCCACA -3'
RV7 5'- CGTAGAATTCCTGCAGGTGAAGGTGTTCTGCTCTGG -3'
RV8 5'- CGTAGAATTCCTGCAGCCACCTTACAACCCACCCC -3'

Fig.3 Inverse PCRに使用したプライマー一覧

name	Consensus	TIMP-2b sequence	Score
CRE-BP1	TTACGTAA	TTACGTAA	100
	TTACGTAA	TTACGTAA	100
AP-1	NNTGACTCANN	AATGACTCAAT	95
	NNTGACTCANN	ACTGACTGACT	88
CCAAT	NNNRCCAATSA	CTCAGCCAATGA	94
CREB	NNGNTGACGYNN	CGGGTGACGTGG	94
TATA	STATAAAWRNNNNNN	GTATAAATAGGGTGG	93
	STATAAAWRNNNNNN	ATATAAAATCCCACC	88
	STATAAAWRNNNNNN	TTATAAAAACCTTACG	86
C/EBPbeta	NKNTTGCNYAAYNN	TTCTTGCATAACCA	91
Sp1	GRGGCRGGGW	GGGGTGGGGT	90
CRE-BP1/c-Jun	TGACGTYA	TGACCTTA	87
USF	NCACGTGN	CCACCTGA	87

Fig. 4 各種転写調節シスエレメントのコンセンサス配列とヒラメTIMP2b遺伝子5'上流域にみられる相同配列

-1285 GATCAGATGGAGGTCAAACCAGAGCAGAACACCTTCACAGATAATTATAGTGATTACAGG
 -1225 GGTGGGGTTGTAAGGTGGCCAGTGCTACCTTGGGTTTTTGGACGAATTAACAACCAAGA
 -1165 CATAACATGTTAATAAATTGGGTTTAGTAGTGCTGGTATTTTTGGACAGAGCCAGGCTTG
 -1105 CTGTTTCAAGTTTTAAGGTTAAGCTAAACTGACTGACTGACAAGTAGAGATTTCATATTTT
 -1045 CTTTCCTGCTTATCTTCTCAGGAGCATATTTCCCAAATTTCAAATACCCTTAATTTTAC
 -985 TGCAGATGTTCAAGGATTGTAGAAACCCTATTCTCCATTGACTTTGTCTCTGTCATGCA
 -925 CTGAATTGAGTCATTCACGCCCCAGTGGACATATTTGGCGATTTTCTGTGAATAGTTAAG
 -865 CTTTCACGGCAAACCACAAAATACTTGCCTGCTGATTTTCGTGAGACACAAATGACTCA
 -805 CATAAGATAATTAGATGAGGACATTCTGAGATAATGACATAATGACCTTATTTTTAATC
 -745 TGTTAAACCCTTATCTGTAAAGCTTAAGGGTTTGATAGGTTTTCAAATGTAAACATTTAA
 -685 TTTGTAATGAAAATAAACTATTCATCCATATATTGTCCCCTCTGTATTTTTGTTATACT
 -625 AATATATGTCTAGTTTTCTCTTTCATACTAATATATAACCAGTATAGAACTAAAAATCTA
 -565 AATTTCAAGAAAGAACTGATTTTTTTAACTTGAATTCCTATCTTTATATTCCATTCATT
 -505 TGGAAAAACAACCCTGTATATATTGTAATATTTCTATTATATTTCTTTTATTACGTAAA
 -445 ATAATATGTTTTATAAATTTTTTTCTTGCATAACCATAAAGTAACTTAAATTATAAAGTT
 -385 AGAATAATATAATATTTTTTTTTAAAAAGCTAAAAACTAAAAAGTTGTTCTCACATCTAAA
 -325 TCTGTTTTTTTTTTTTGTGGGGTGGGATTTTATATTATAAAAACTTACGGTTATGTGCTA
 -265 ATTATGAGGGGTGTAAGGAAATGTACAGGAGGATAAATGCATGTCTCTGTGTGCATCAGT
 -205 GATTAGATGTAAACAGTGAGGCAGCCATCATGAAGCAGCTCGGGTGACGTGGGTGTTGT
 -145 GGGTGGATGTGTAACTCTGGGAGACCCTGACCTCTGTACCCTCCTCCTCATTGGCTGAG
 -85 GCCTCAGTGTGGGAGGAGGCATGCTACAGTCTGTGTGTGTATAAATAGGGTGGCTGCTCC
 -25 AGACTGTGGAGGAAAACAGGAGGAGGTTTCAGTCTGCAGACTTCAGGTGGACCCAAGTC
 +36 CCTTTCATGAGTTGTATATGTGTGGAGTTTGACAAGCAGACTTCAGTGTGTTGATTCTCTT
 +96 GAGTGAAAGGGACATTTTTAAACTTCTCTTAAGGAAGTTGGCCCTGCTGCCTTCACAT
 +156 TTTCCCTCCAGCTCCTTGTTTTAATTTTTGTGTGCTTAAGATG

CRE-BP1
 inverted CCAAT box
 TATA box
 +1 Inr sequence

Fig. 5 ヒラメTIMP-2b遺伝子の転写調節領域塩基配列

コーディング領域			
name	Consensus	TIMP-2b sequence	Score
CRE-BP1/c-Jun	TGACGTYA	TGACGTCA	100
		TGACGTCA	100
CREB	TGACGTMA	TGACGTCA	100
		TGACGTCA	
AP-1	NTGASTCAG	GTGAGTCAG	97
STRE	TMAGGGGN	TCAGGGGA	97
3' 下流領域			
name	Consensus	TIMP-2b sequence	Score
STRE	TMAGGGGN	TTAGGGGT	90
AP-1	RSTGACTNMNW	ACTGACTCTGA	90

Fig. 6 各種転写調節シスエレメントのコンセンサス配列とヒラメTIMP2b遺伝子コーディング領域および3' 下流領域にみられる相同配列

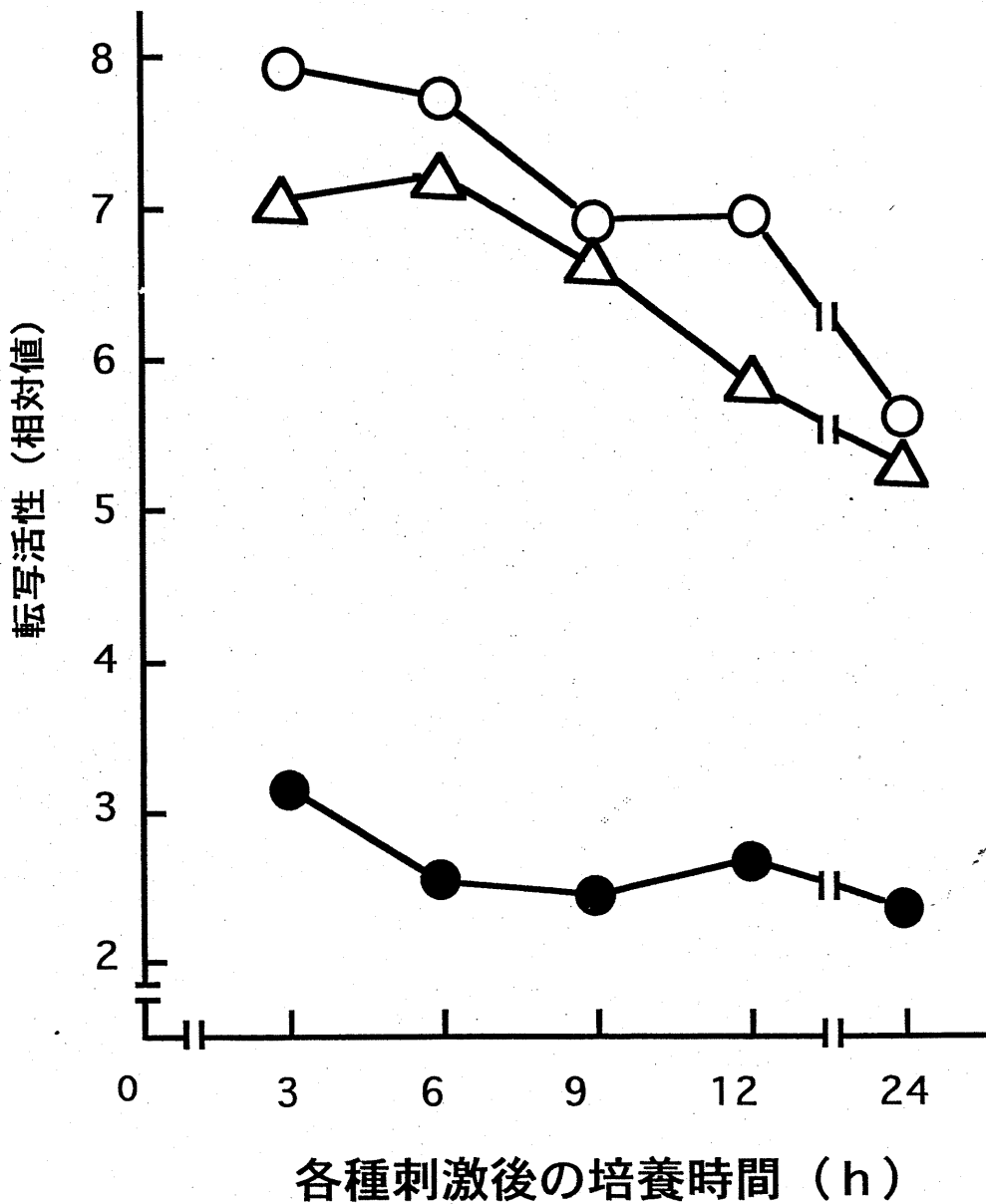


Fig. 7 各種刺激下におけるヒラメTIPM2b遺伝子上流域(EEI)の転写活性の経時変化

ヒラメTIPM2b遺伝子上流域(約3.5kbp; EEI)にFirefly luciferase 遺伝子を連結したコンストラクトとチミジンキナーゼプロモーターの下流にRenilla luciferase遺伝子を連結したコンストラクトをヒラメHENAE細胞にコトランスフェクションした。24時間培養後、各種刺激を与え、経時的にのluciferase活性を測定した。転写活性は、Firefly luciferase 活性のRenilla luciferaseに対する相対値で示した。

- △ ; 外部刺激を与えていないもの、○ ; 30°C 30分の熱刺激を与えたもの、
- ; UV (80J/m) の刺激を与えたもの

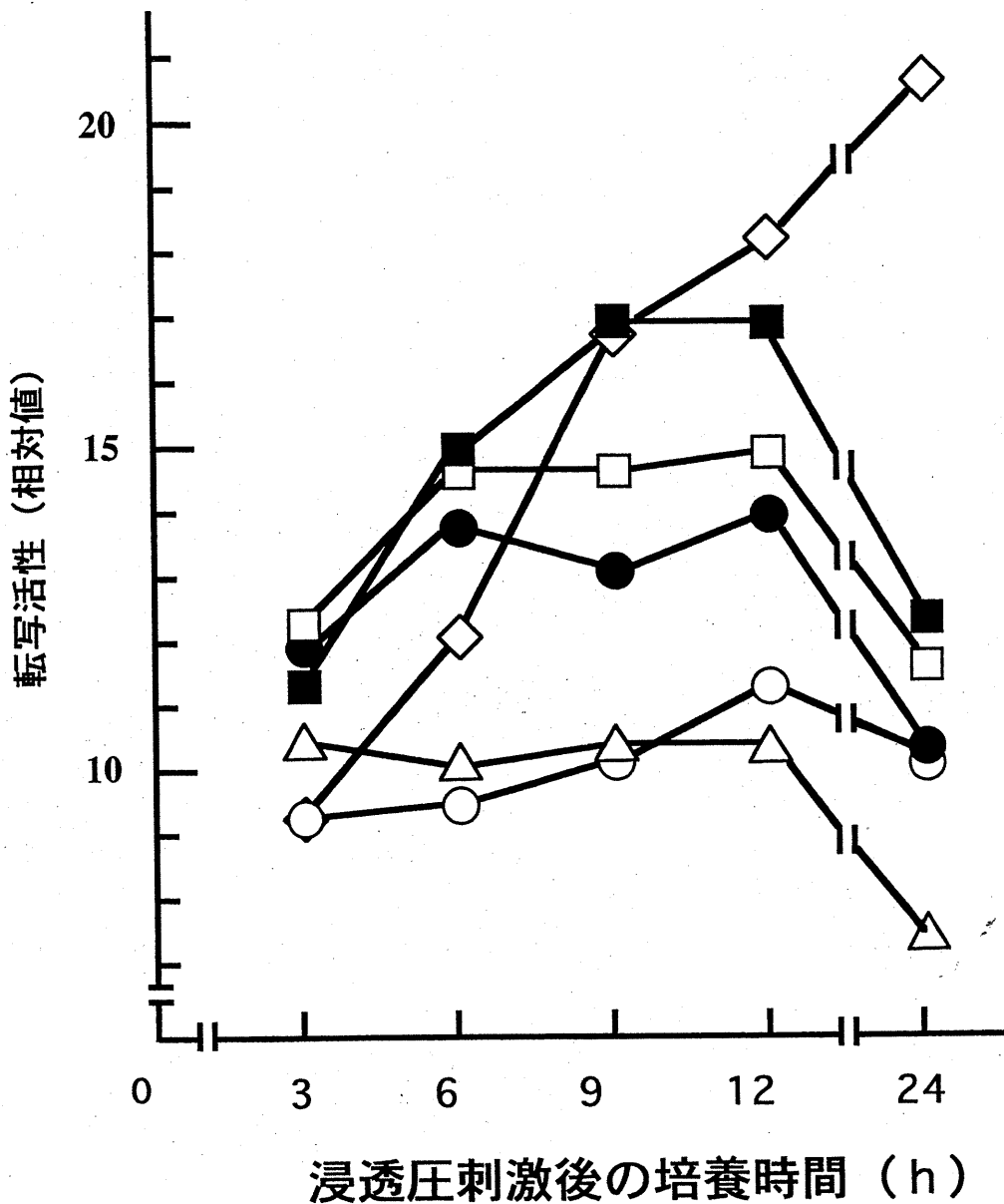


Fig. 8 浸透圧刺激下におけるヒラメTIPM2b遺伝子上流域(EEI)の転写活性の経時変化

ヒラメTIPM2b遺伝子上流域(約3.5kbp; EEI)にFirefly luciferase 遺伝子を連結したコンストラクトとチミジンキナーゼプロモーターの下流にRenilla luciferase 遺伝子を連結したコンストラクトをヒラメHENA細胞にコトランスフェクションした。24時間培養後、浸透圧の異なる培地に交換し(浸透圧刺激)、経時的にのluciferase活性を測定した。転写活性は、Firefly luciferase 活性のRenilla luciferaseに対する相対値で示した。

- ; 200mOsm/Kg, △ ; 300mOsm/Kg, ● ; 400mOsm/Kg,
 □ ; 450mOsm/Kg, ■ ; 500mOsm/Kg, ◇ ; 600mOsm/Kg

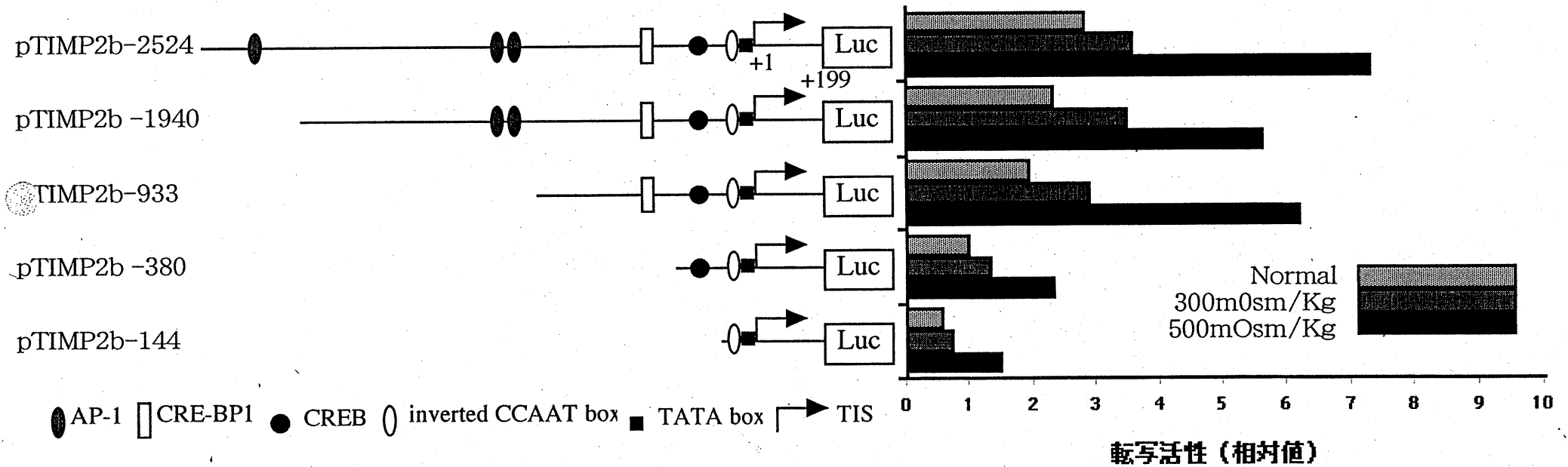


Fig. 9 ヒラメTIPM2b遺伝子上流域の転写活性に及ぼす浸透圧刺激の影響

5'側から削り込んだヒラメTIPM2b遺伝子上流域に Firefly luciferase 遺伝子を連結したコンストラクトとチミジンキナーゼプロモーターの下流に Renilla luciferase 遺伝子を連結したコンストラクトをヒラメHENAEC細胞にコトランスフェクションした。24時間培養後、培地交換により浸透圧刺激を与え、その9時間後のluciferase活性を測定した。転写活性は、Firefly luciferase 活性の Renilla luciferase に対する相対値で示した。

Normal ; 外部刺激を与えていないもの、300mOsm/Kg ; 300mOsm/Kgの培地に交換したもの、500mOsm/Kg ; 500mOsm/Kgの培地に交換したもの、TIS ; Transcription initiation site

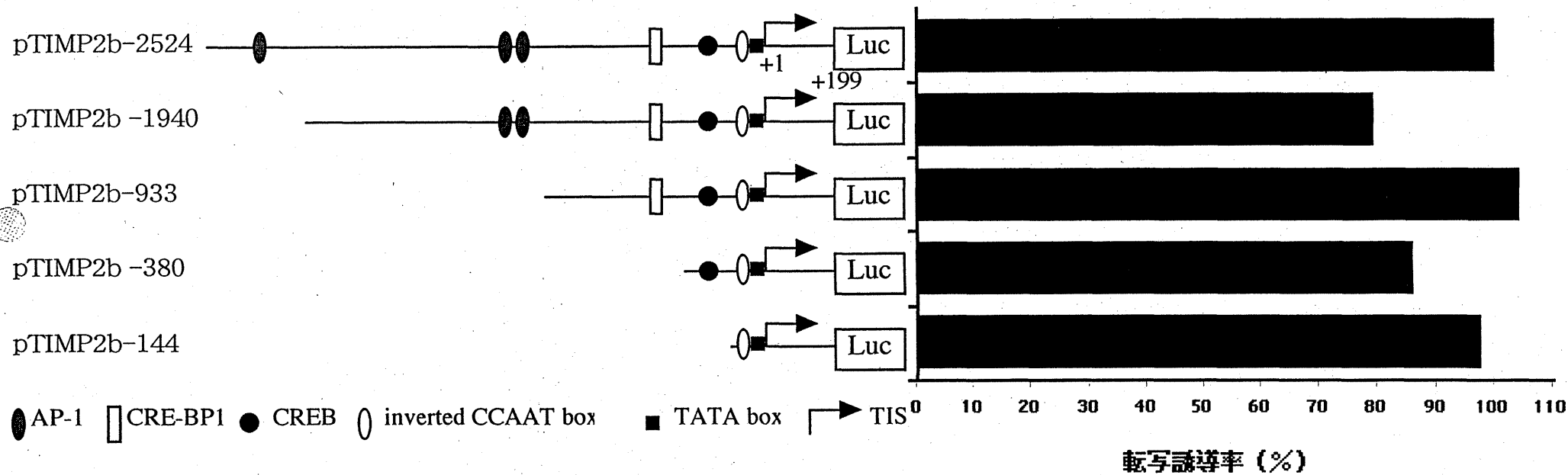


Fig. 10 ヒラメTIMP2b遺伝子上流域の高浸透圧応答エレメントの検索

5'側から削り込んだヒラメTIMP2b遺伝子上流域に Firefly luciferase 遺伝子を連結したコンストラクトとチミジンキナーゼプロモーターの下流に Renilla luciferase 遺伝子を連結したコンストラクトをヒラメHENAE細胞にコトランスフェクションした。24時間培養後、培地交換により高透圧刺激 (500mOsm/Kg) を与え、その9時間後のluciferase活性を測定した。pTIMP2b-2524の高浸透圧刺激による転写誘導率 (Fig. の500mOsm/Kgの300mOsm/Kgに対する比率) を100とし、他のコンストラクトにおける転写誘導率をその百分率で示した。TIS ; Transcription initiation site

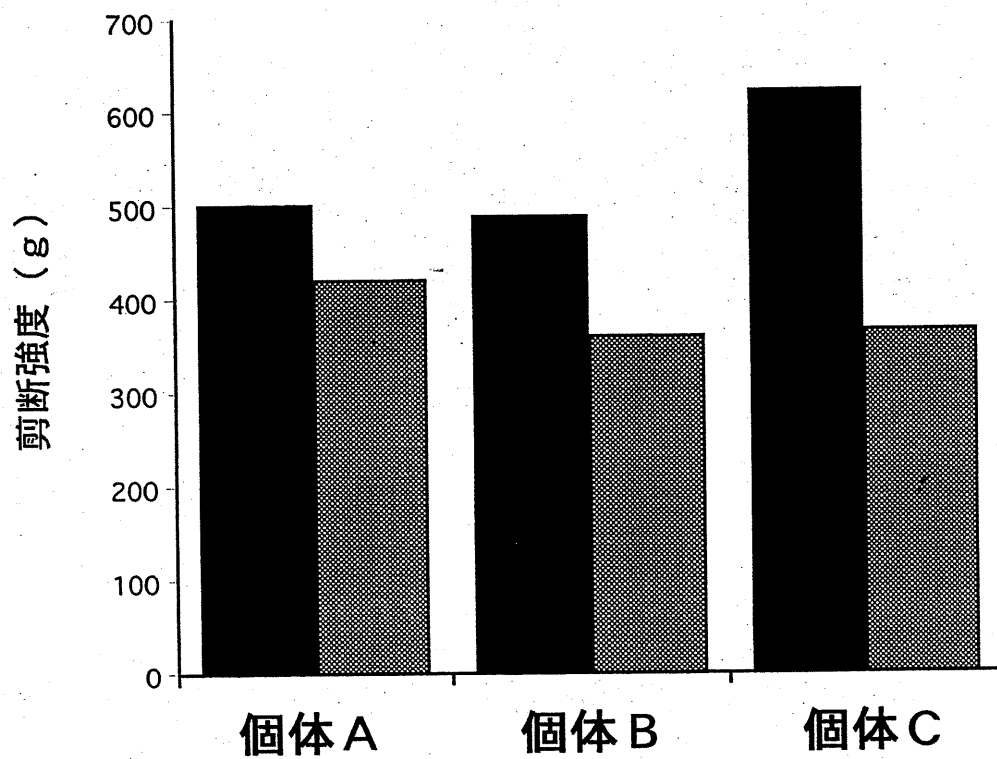


Fig. 11 即殺後6時間目のヒラメ筋肉剪断強度の変化(対照)
 注入を行っていない個体の剪断強度の変化を示す。測定値は、各
 試料、約15回の測定の平均値を示す。

■ ; 0 time、 ■ ; 6 時間後

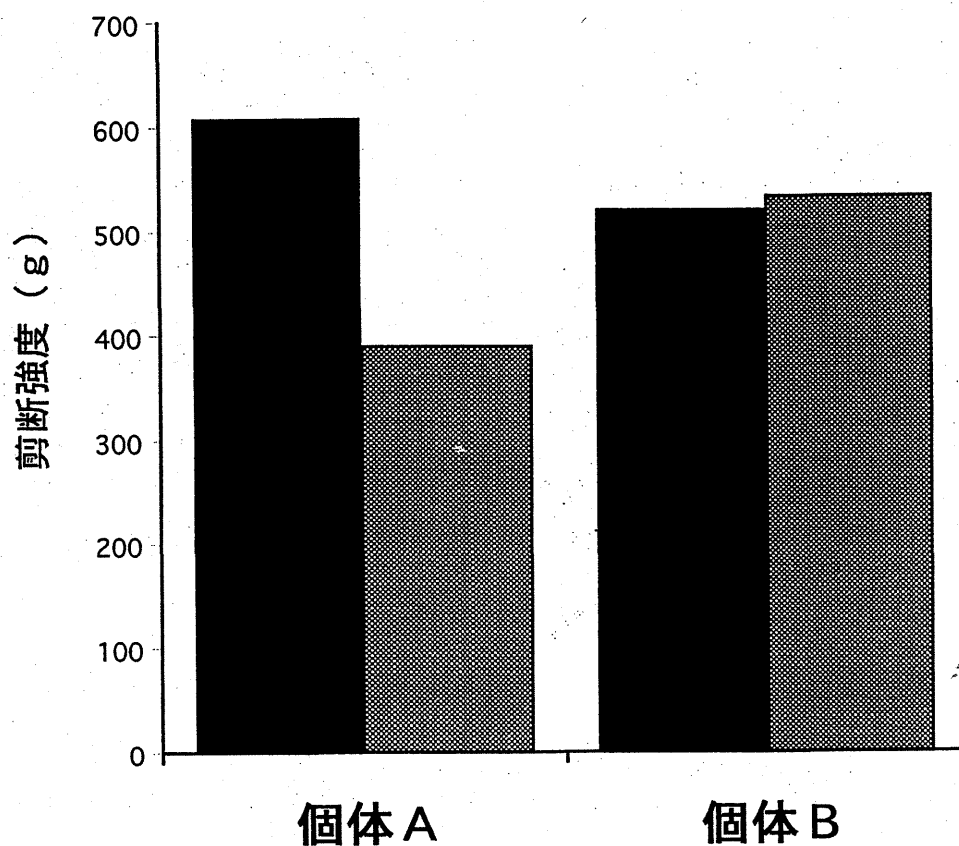


Fig. 12 pOIMA-EGFPを注入したのヒラメ筋肉剪断強度の経時的変化
in vivo gene shuttle を用いてpOIMA-EGFPをヒラメ尾柄部血管に注
 入し24時間飼育後、即殺した。即殺直後、および、6時間後の剪断強
 度を測定した。測定値は、各試料、約15回の測定の平均値を示す。

■ ; 0 time、 ▨ ; 6時間後

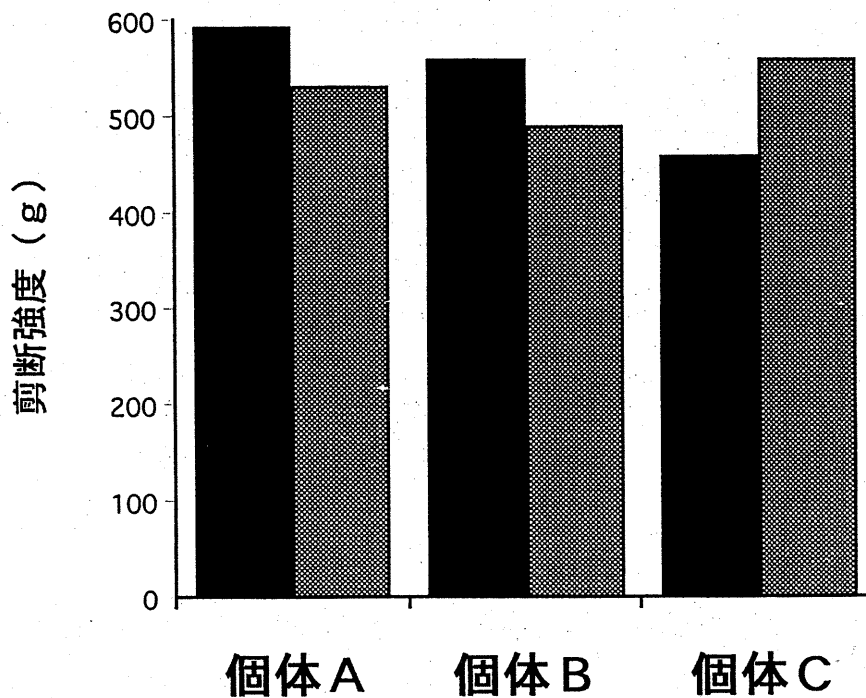


Fig. 13 pOIMA-TIMP2bを注入したのヒラメ筋肉剪断強度の経時的変化
in vivo gene shuttle を用いてpOIMA-EGFPをヒラメ尾柄部血管に注入し
 24時間飼育後、即殺した。即殺直後、および、6時間後の剪断強度を測定
 した。測定値は、各試料、約15回の測定の平均値を示す。

■ ; 0 time、 ▨ ; 6 時間後