

ヒトアラニン：グリオキシル酸アミノ基転移酵素遺伝子 AGXTの5'側上流領域のLong PCR法による クローニングとルシフェラーゼレポータープラスミドの作製

川崎医科大学生化学教室

佐藤 学

(平成20年10月27日受理)

Cloning of the 5'-Flanking Region of the Human Alanine:Glyoxylate Aminotransferase Gene *AGXT* and the Construction of Reporter Plasmids

Manabu SATO

*Department of Biochemistry, Kawasaki Medical School,
577 Matsushima, Kurashiki, Okayama, 701-0192, Japan*

(Received on October 27, 2008)

概 要

ヒトアラニン：グリオキシル酸アミノ基転移酵素遺伝子AGXTの5'側上流領域のLong PCR法によるクローニングをおこなった。PCR産物をpT7Blue T-Vectorに挿入し、pT7Blue (AGTU)を作製した。このプラスミドを制限酵素Afl IIで消化し、Afl II消化DNA断片を得た。このDNA断片をルシフェラーゼレポータープラスミドpAGTU(-1203/-2)のAfl IIサイトに挿入し、pAGTU(PA)を作製した。このようにして作製されたプラスミドを制限酵素Xho I, Nde Iで消化し、ルシフェラーゼレポータープラスミドpAGTU(-2537/-2)を、Sma Iで消化しpAGTU (-3903/-2)を、Nhe Iで消化しpAGTU(-4691/-2)を作製した。

これらの三種類のレポータープラスミドを非肝臓由来のHelaに導入したところ、ルシフェラーゼ遺伝子の発現が弱いながら認められた。

キーワード：Long PCR クローニング

Abstract

The 5'-flanking region of the *AGXT* gene was cloned with long PCR methods. The PCR products were cloned into the pT7Blue T-Vector to construct pT7Blue(AGTU). The resulting plasmid was digested with *Afl* II to prepare the *Afl* II digested DNA fragment which contains the -701 to -5145 bp from the ATG translation start site of the *AGXT* gene. The resulting DNA fragment was inserted into the *Afl* II site of a luciferase reporter plasmid pAGTU(-1203/-2) to construct pAGTU(PA). This constructed plasmid was used to make the luciferase reporter gene constructs with restriction endonucleases *Xho* I and *Nde* I for pAGTU(-2537/-2), *Sma* I for pAGTU(-3903/-2) and *Nhe* I for pAGTU(-4691/-2).

The Luciferase gene of the resulting plasmids was also weakly expressed in Hela cells.
 Key words: Long PCR cloning

1. はじめに

ヒトアラニン：グリオキシル酸アミノ基転移酵素 (AGT) の遺伝子 (AGXT) は肝臓で特異的に強く発現することが知られている¹⁾。このAGXT遺伝子のプロモーターは佐藤ら²⁾によってすでに解析されている。このAGTの遺伝子が肝臓で特異的に強く発現するメカニズムを解析するために、AGXTの翻訳開始点より1,204 bp上流のいまだ解析されていない領域をLong PCRし、TAクローニング³⁾をおこなった。このようにしてクローニングされた領域を著者等によってすでに作製されているルシフェラーゼ遺伝子をレポーター遺伝子とするプラスミド pAGTU(-1203/-2)²⁾に挿入し (図2), 三種類のレポータープラスミド, pAGTU(-2537/-2), pAGTU(-3903/-2), pAGTU(-4691/-2)を作製する方法を確立したので報告する。これらのレポータープラスミドのルシフェラーゼ遺伝子がヒト子宮頸癌由来の培養細胞Helaにおいても弱いながら発現することを確認したのであわせて報告する。

2. 方法

(1) Long PCR法によるAGXTの5'側上流領域のクローニング

National Center for Biotechnology information (NCBI) から入手したヒト染色体2番のAGXT遺伝子の5'側上流領域の5,051 bpの塩基配列のPCRをTakara Long PCR kit (LA-Taq™)を用い以下の方法で行った。

テンプレートDNAとして当研究室の50才代男性の白血球からの染色体DNAを使用した。PrimerとしてSense : 5'-CCTCTTTCCTCACCCAATCCCACCAA-3' (-5,347 bp ~ -5,322 bp) と Antisense : 5'-GCACGTCCAGCCCCCTTATTCTG-3' (-320 bp ~ -297 bp) を用いPCRを行った。最初にPCR反応液を94℃で1分間熱処理した。次に、94℃, 30秒の熱変性の後に、59℃, 30秒のアニーリング, さらに72℃, 5分間の伸長反応を行った。この反

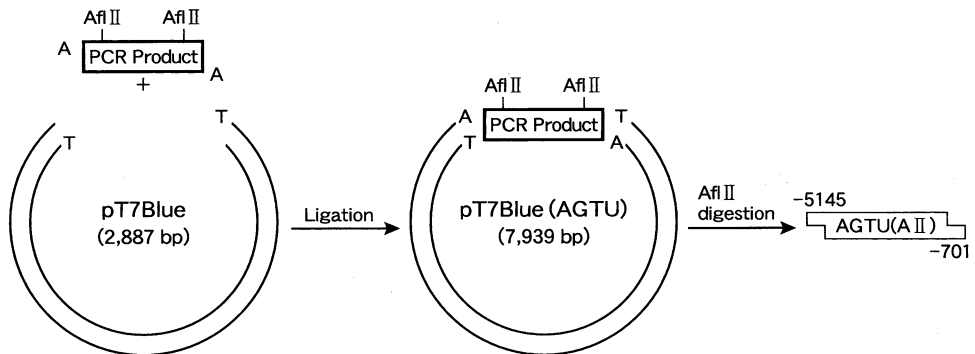


図1 pT7Blue(AGTU)の作製法およびAGTU(AII)の調製法

応サイクルを合計35回行った後に反応液を4℃で保存した。

このPCR産物をpT7Blue T-Vector(Novagen)にpT7Blue T-Vector TA cloning kit(Novagen)を用い挿入し、pT7Blue(AGTU)を作製した(図1)。

(2) ルシフェラーゼレポータープラスミドの作製

pT7Blue(AGTU)を制限酵素Afl IIで消化し、Afl II消化DNA断片(AGTU(AII))を調製した(図1)。次に、すでにPGV-Bより作製されているルシフェラーゼレポータープラスミドpAGTU(-1203/-2)²⁾(AGTU領域はAGXT遺伝子の5'側上流領域-1203 bp~-2 bpである)のAfl IIサイトにこのDNA断片を挿入し、pAGTU(PA)を作製した(図2)。このように作製したpAGTU(PA)を制限酵素Xho IとNde Iで消化し、ライゲーションキット(TaKaRa)を用い、pAGTU(-2537/-2)を作製した。同様に、Sma Iで消化しpAGTU(-3903/-2)を、Nhe Iで消化しpAGTU(-4691/-2)を作製した(図3)。

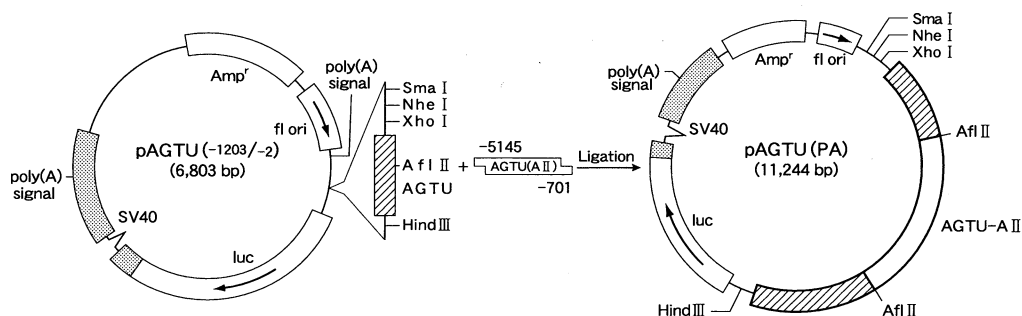


図2 pAGTU(PA)の作製法

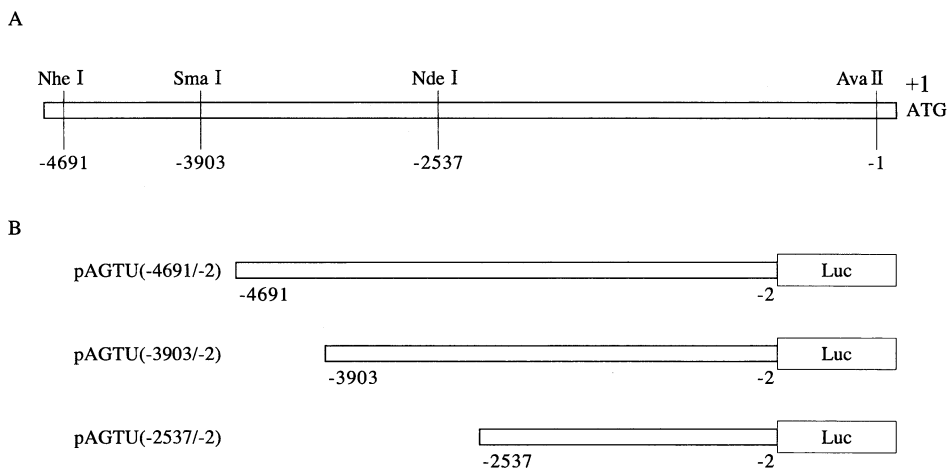


図3 ヒトAGXT遺伝子の5'側上流領域の制限酵素地図(A)とルシフェラーゼレポーター遺伝子産物(B)

制限酵素認識サイトが図示されており、翻訳開始点は+1で示されている。pAGTU(-4691/-2)、pAGTU(-3903/-2)、pAGTU(-2537/-2)は本文に示されているようにpAGTU(PA)の制限酵素の消化により作製された。Luc, ルシフェラーゼ遺伝子。

(3) ルシフェラーゼ活性の測定

AGXT遺伝子の5'側上流領域の転写調節機能を解析するためにpAGTUとウミシイタケルシフェラーゼ遺伝子をもつインターナルコントロール用のプラスミドpRL-TKのコトランスフェクションをHela細胞におこなった。pAGTU (4 μ g) とpRL-TK (0.6 μ g) をHela cells(8×10^5)に前報に従い²⁾導入した。これらの細胞のルシフェラーゼ活性を東洋インキ製造(株)のピッカジーンデュアル・シーパンジー (PGD-S) にもとづきルミノメーター (Lumat LB 9506, EG and G Berthold, Germany) をもちいて測定した。

(4) DNAシーケンシング

プラスミドDNAの塩基配列はABI DNA シーケンスアナライザー (モデル310, Japan Applied PE Biosystem, ToYo, Japan) により解析した。ビッグダイターミネーターサイクルシーケンシング (Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kits, PE Applied Biosystems, Chiba, Japan) の方法を用い, 合成オリゴヌクレオチドはSIGMA GENOSYS社の製品を使用した。

3. 結果と考察

図4に示されているようにpT7Blue T-Vectorのbp数が2,887であることからpT7 Blue (AGTU) には5,051 bpのPCR産物が挿入されていることになる。

図5に示されているようにプライマーとしてAntisenseIを用いてpT7 Blue (AGTU)のAGTU領域のDNAシーケンスをおこなったところAfl II サイトまではAGXT遺伝子の塩基配列 (約352 bp) に一致していた。

これらの結果より, pT7 Blue T-Vectorに挿入されたPCR産物はAGXT遺伝子のPCR産物であると判断された。

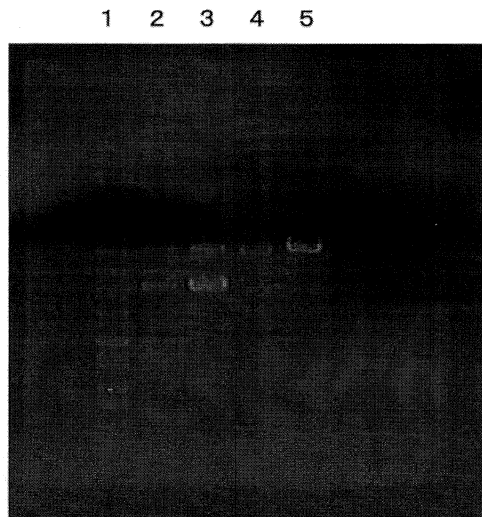


図4 pT7Blue (AGTU)の1.0%アガロースゲル電気泳動
1, Hilo DNA Marker (10 kbp) 2, 3, No enzyme 4, 5, Nco I digestion

図6に示されているようにpAGTU(-1203/-2)のbp数は6,803なのでpAGTU(PA)にはPCR産物のAfl II 消化 DNA 断片 (4,445 base) が挿入されていることになる。

図7に示されているように電気泳動の結果より推定される pAGTU(-3903/-2)の大きさ (bp数) は理論値 (9,499 bp) に一致していた。

図5に示されているようにプライマーとしてAntisense I を用いてpAGTU(-3903/-2)のDNAのシーケンスをおこなったところ、Afl II サイトより5'側上流領域の塩基配列 (約240 bp) はAGXT遺伝子の塩基配列に一致していた。pAGTU(-1203/-2)のセンスプライマーであるピカージンCWを用いてpAGTU(-3903/-2)のDNAのシーケンスをおこなったところ、図5に

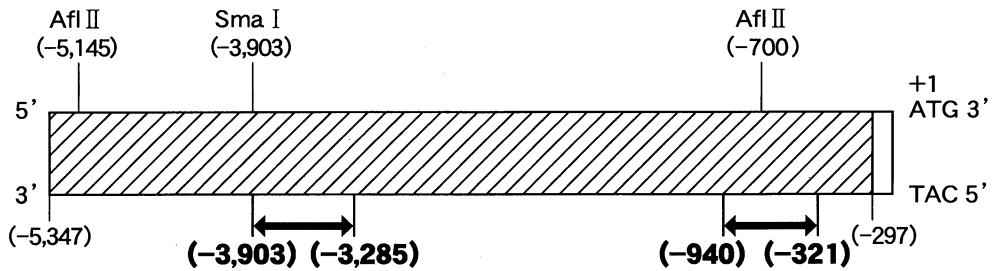


図5 pT7 Blue(AGTU)とpAGTU(-3903/-2)のシーケンス
 // : ヒトAGXT遺伝子のLong PCRされた領域
 ← → : プライマー, Antisense I を用いてシーケンスされた領域
(-940) (-321)
 ← → : プライマー, ピカージンCWを用いてシーケンスされた領域
(-3,903) (-3,285)
 Afl II(-5,145), Afl II(-700): Afl II の認識サイト
 Sma I(-3,903): Sma I の認識サイト

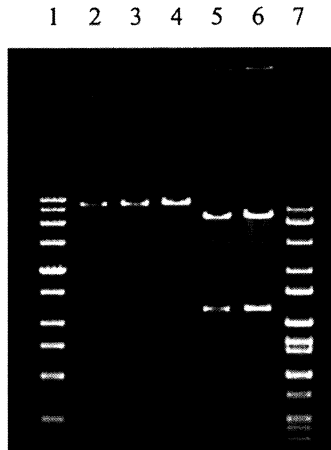


図6 pAGTU(PA)の1.0% アガロースゲル電気泳動
 1, Hilo DNA Marker (12 kbp) 2,3,4, Mlu I digestion 5,6, Hind III digestion
 7, Hilo DNA Marker (10 kbp)

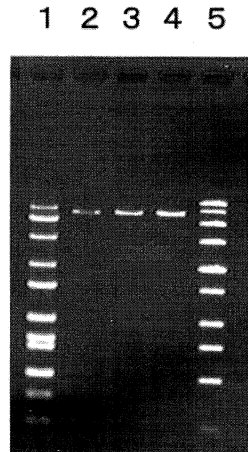


図7 pAGTU(-3903/-2)の1.0% アガロースゲル電気泳動
 1, Hilo DNA Marker (10 kbp) 2, 3, 4, Sma I digestion
 5, Hilo DNA Marker (12 kbp)

示されている領域の塩基配列がAGXT遺伝子の塩基配列に一致していた。以上の結果より、今回クローニングしたLong PCR産物はAGXT遺伝子のPCR産物と結論づけられる。

DNAのシーケンスの結果よりAGXT遺伝子の5'側上流領域のLong PCRを行うことにより二ヶ所で、すなわち-869 T→C, -901 C→Tになった可能性が考えられる。あるいはもともとこの五十代の男性の白血球のDNAの塩基配列(-869 T, -901 C)が自然にそれぞれC, Tに変異していたかもしれない。

表1 HeLa細胞における各種レポータープラスミドのルシフェラーゼ遺伝子の発現活性

レポーター プラスミド	RLU ₁	RLU ₂ (×10 ⁶)
PGV-B	1,470	6.17
pAGTU(-700/-2)	102,300	5.56
pAGTU(-2537/-2)	165,000	5.81
pAGTU(-3903/-2)	80,170	6.31
pAGTU(-4691/-2)	116,100	8.75

RLU₁: PGV-B, pAGTUのホタルルシフェラーゼ活性
 RLU₂: pRL-TKのウミシイタケルシフェラーゼ活性

表1に示されているように今回作製された三種類のレポータープラスミドを非肝臓由来のHeLaに導入したところ、ルシフェラーゼ遺伝子の発現が弱いながらpAGTU(-700/-2)²⁾を導入

した場合と同程度に認められた。これらのルシフェラーゼ遺伝子の発現には再現性がみられ、Hela細胞においてもAGXT遺伝子が弱いながら発現していると思われる。このAGXT遺伝子のHela細胞等における発現のメカニズムの解明がまたれる。

ヒトの酵素AGTに構造異常が生じると一次性高尿酸血症^{4), 5)}をきたす。この高尿酸血症はAGTの構造遺伝子に異常が生じている症例である。酵素AGTの産生量の低下に起因する高尿酸の症例もあるのではないかと考え、高尿酸血症の患者のAGXT遺伝子の転写調節領域の解析を行う予定である。

高尿酸血症の患者さんの白血球から染色体DNAを単離しAGXT遺伝子の5'側上流領域のLong PCRをおこない、このPCR産物をpT7BlueT-Vectorを用いてクローニングする。得られるクローニングベクターを大量に調製しAfl IIで消化する。得られるDNA断片をpAGTU(-1203/-2)のAfl II siteに挿入し、pAGTU(PA)を作製する。今回の結果のようにこの段階までは迅速に行うことができると思われる。次に、このpAGTU(PA)から各種制限酵素を用いpAGTU(-2537/-2), pAGTU(-3903/-2), pAGTU(-4691/-2) (図3)を作製する。これらのレポータープラスミドは制限酵素を用い容易に作製できることが今回示された。

これらのレポータープラスミドはHepG2細胞に導入しレポーター遺伝子の発現を調べることにより、5'側上流の転写調節領域の変異している患者さんを見出す際のレポータープラスミドとして使用できる。我々はすでにpAGTU(-1203/-2)を作製しているので、pAGTU(-2537/-2), pAGTU(-3903/-2), pAGTU(-4691/-2)の作製を迅速に行い、5'側上流転写調節領域の変異している患者さんを早期に発見できるかもしれない。

謝辞：白血球からの染色体DNAの単離に際し、刀祢准教授の助言に感謝します。

文 献

- 1) Kamoda N, Minatogawa Y, Nakamura M, Nakanishi J, Okuno E, Kido R : The organ distribution of human alanine-2-oxoglutarate aminotransferase and alanine-glyoxylate aminotransferase. *Biochem Med* 23 : 25-34, 1980
- 2) Sato M, Toné S, Ishikawa T, Purdue PE, Danpure CJ, Minatogawa Y : Functional analysis of the 5'-flanking region of the human alanine:glyoxylate aminotransferase gene *AGXT*. *Biochim Biophys Acta* 1574 : 205-209, 2002
- 3) Zhou MY, Gomez-Sanchez CE : Universal TA cloning. *Curr Issues Mol Biol* 2 : 1-7, 2000
- 4) van Woerden CS, Groothof JW, Wanders RJ, Waterham HR, Wijburg FR : From gene to disease; primary hyperoxaluria type I caused by mutations in the *AGXT* gene. *Ned Tijdschr Geneesk* 150 : 1669-1672, 2006
- 5) Nishiyama K, Funai T, Katafuchi R, Hattori F, Onoyama K, Ichiyama A : Primary hyperoxaluria type I due to a point mutation of T to C in the coding region of the serine:pyruvate aminotransferase gene. *Biochem Biophys Res Commun* 176 : 1093-1099, 1991

