

分化誘導された白血病細胞株における 細胞周期関連遺伝子の発現メカニズムについて ～定量的RT-PCR法によるmRNA発現量の解析～

松元英理子、山口 延男

我々は白血病細胞株HL-60を用いて、TPA (12-o-tetradecanoylphorbol 13-acetate) によって分化した白血病細胞の、サイクリンD1をはじめとする細胞周期関連遺伝子の発現量の変化とそのメカニズムを、これらの遺伝子のmRNAの検出を通じて検討してきた。

mRNAの検出方法の一つであるRT-PCR法は、まず逆転写酵素によりmRNAと相補的な塩基配列を持つcDNAを合成し、次にこのcDNAを鋳型にして目的とする遺伝子をPCR法で増幅し検出する方法であり、優れた検出感度を持つ。しかし通常のRT-PCR法では、PCR生成物の量は反応初期にはほぼ指数関数的に増加するが、ある程度蓄積すると生成物量の増加が停止してしまうという特性を持つため最終的なPCR生成物の量、即ちRT-PCRで得られた検出シグナルの強度が必ずしも当初のmRNA量を反映しないという欠点がある。

定量的解析が可能なRT-PCR法として、最近リアルタイムPCR装置など自動的にPCR生成物の量を解析する装置も開発されているが、今年度のテーマ別研究では、このような機器を用いずに定量的RT-PCR法が可能な「カイネティクス分析に基づく定量的RT-PCR法」及び「半定量法」の2つの方法について検討し、サイクリンD1 mRNAの発現についての定量的解析を試みた。

「カイネティクス法」による定量的RT-PCR法は、検討の結果ある程度の発現量のある遺伝子に関しては実施が可能なが確認できたが、われわれの目的とするHL-60細胞のサイクリンD1 mRNAは、その発現量が少ないために定量化が困難である事がわかった。

一方「半定量法」については、検討の結果HL-60細胞におけるサイクリンD1 mRNAの発現量の解析に応用できることが確認できた。そこでこの方法を用いて、HL-60細胞をTPAによって単球/マクロファージ系に分化誘導する際にみられるCyclin D1の過剰発現が、蛋白合成阻害剤であるシクロヘキシミドによってどのように影響を受けるかを検討した。その結果、あらかじめシクロヘキシミドで処理したHL-60細胞ではTPA刺激による分化誘導は起こらず、またサイクリンD1 mRNAの過剰発現も抑制された。即ちHL-60細胞のTPA処理によるサイクリンD1 mRNAの過剰発現には、何らかの新たな蛋白合成が必要であるのではないかということが示唆された。