

厚生科学研究費補助金（生活安全総合研究事業）
分担研究報告書

新規 *in vivo* スクリーニング法開発のための研究
－ α_{2u} -globulin の生体内動態と Endocrine disrupter screening 法への応用－

分担研究者 武吉正博 （財）化学物質評価研究機構

研究要旨

血清 α_{2u} -globulin (AUG) の Endocrine Disrupter (EDs) screening 法への応用の可能性について検討するため、EDs 研究に繁用されている Diethylstilbestrol (DES)、Bisphenol A (BisA) を正常雄ラットに投与した際の血清 AUG 濃度の変動を観察した結果、DES・BisA 投与動物のいずれにおいても血清 AUG の明らかな減少が観察され、DES 投与動物では病理組織学的に精巣の萎縮性変化を認めなかった動物においても明らかな血清 AUG の低下が認められた。AUG に関しては Estrogen による発現抑制のメカニズムや Androgen による発現誘導のメカニズムなど未だ解明されなければ課題も残されているが AUG の変動は通常行われる毒性試験の中で測定し、評価することが可能であるため、新規 *in vivo* EDs screening 法として期待できるものと思われる。

A. 研究目的

ELISA 法によるラット血清中の α_{2u} -globulin (AUG) の測定方法を開発し、その Endocrine Disrupter (EDs) screening 法への応用の可能性について検討する。

B. 研究方法

1 低用量 Diethylstilbestrol (DES) 投与による影響

1.1 使用動物

動物は日本チャールス・リバー株式会社(日野飼育センター、〒529-1633 滋賀県蒲生郡日野町下駒月 735)で生産された Crj: CD (SD) IGS ラット (SPF) を購入し、検疫・馴化した後、一般状態が良好なものを使用した。実験期間中、動物は温度 $23 \pm 2^\circ\text{C}$ 、相対湿度 $55 \pm 10\%$ 、換気回数 10~15 回/時間、明暗サイクル 12 時間間隔(7 時点灯-19 時消灯)に設定した飼育室内でステンレス製金網床ケージ(165 W×300 D×150 H mm、トキワ科学器械株式会社)に個別飼育した。

1.2 被験物質の調製及び投与

Diethylstilbestrol (DES, SIGMA CHEMICAL COMPANY) を購入し、olive oil を媒体として 1、0.1、0.01 mg/kg/day の用量で 14 日間反復強制経口投与を行った。

1.3 剖検及び血清の採取

14 日間の投与期間終了後、エーテル麻酔下で腹大動脈から採血し、3000 rpm、10 分遠心分離し血清を採取した。また、肉眼的に所見を記録し、精巣に関して重量測定を行った。

1.4 抗体固相化プレートの作製

Affinity 精製抗 α_{2u} -globulin (AUG) 抗体を 50mM 炭酸緩衝液(pH 9.6)を用いて 5 μ g/ml に調製した後、ポリスチレン製 ELISA プレート (Immulon 200, Greiner) の well 内に 100 μ l を加え 4°C 、一夜放置後、25%BlockAce でブロッキングを行った。

1.5 血清 AUG の測定

血清は 0.5%Tween 20 含有 Tris buffered saline (TBS-Tween, pH 7.2) で 500-1000 倍に希釈した後、抗体固相化プレートに添加し、室温で 1 時間反応させた。TBS-Tween でプレートを 3 回洗浄した後、TBS-Tween で希釈した酵素標識抗体を加え、室温で 1 時間反応させた。プレートを 3 回洗浄した後、o-phenylenediamine、 H_2O_2 を基質として発色させ、1N H_2SO_4 を加えて反応を停止した後、SpectraMAX™ (Molecular Devices Inc.) を用い、650 nm を参照波長として 490 nm の吸光度を測定し、既知の抗原を反応させた際の標準曲線から血清中 AUG 濃度を推定した。

1.6 肝 AUG mRNA の定量

剖検時に肝臓の組織(20-30 mg)を採取し、QIAGEN 社製 Total RNA 精製 Kit を用いて Liver Total RNA を調製した。Total RNA は RNase Free water を用いて 0.1 μ g/ μ l に調製し、その 5 μ l すなわち、0.5 μ g を用いて RT-PCR を行った。RT-PCR には TiTan™ One Tube RT-PCR kit (Boehringer Mannheim) を用い、Forward primer(5'-ACCAACATGAAGCTGTTGCT GC-3') 及び Reverse primer (5'-CTGGAGGCTCAGGCCTTTCTT-3') によって Mature peptide code 領域に相当する約 500 bp の fragment を増幅した。PCR Cycling は DNA Thermal Cycler (TAKARA) を用い、逆転写反応の後、(変性 95°C : 1 min、Annealing 60°C : 1 min、伸長反応 72°C : 1 min)の反応を 20 回繰り返した。反応産物は 1% agarose gel、1X TAE で電気泳動を行った後、泳動像を 256 階層 Gray scale digital 画像に変換した後、画像解析プログラム "NIH-Image™" を用いて定量化した。

1.7 病理組織学的検査

採取した精巣についてブアン液にて固定した後、パラフィン包埋薄切切片を作製し、ヘマトキシリン・エオシン染色を施して光学顕微鏡的に検査を行った。

2 Bisphenol A(BisA)投与による影響

2.1 使用動物

動物は日本チャールス・リバー株式会社(日野飼育センター、〒529-1633 滋賀県蒲生郡日野町下駒月 735)で生産された Crj: CD (SD)IGS ラット(SPF)を購入し、検疫・馴化した後、一般状態が良好なものを使用した。実験期間中、動物は温度 23 $\pm$ 2°C、相対湿度 55 $\pm$ 10%、換気回数 10~15 回/時間、明暗サイクル 12 時間間隔(7 時点灯-19 時消灯)に設定した飼育室内でステンレス製金網床ケージ(165 W $\times$ 300 D $\times$ 150 H mm、トキワ科学器械株式会社)に個別飼育した。

2.2 被験物質の調製及び投与

Bisphenol A (関東化学株式会社)を購入し、olive oil を媒体として 40mg/kg/day (低用量)、200mg/kg/day (中用量)、1,000 mg/kg/day (高用量) の 3 用量で 28 日間反復強制経口投与を行った。しかしながら、投与一週目に高用量群の動物の一般状態に著しい悪化がみられたため、高用量群の用量を 8 日後から 600 mg/kg/day に変更した。なお、本実験は GLP 基準に従って実施した。

2.3 剖検及び血清の採取

28 日間の投与期間終了後、エーテル麻酔下で腹大動脈から採血し、3000 rpm、10 分遠心分離し血清を採取した。また、肉眼的に所見を記録し、精巣及び副生殖腺(精巣上体、精囊、腹葉前立腺、背側葉前立腺)に関して重量測定を行った。

2.4 血清 AUG の測定

DES の場合と同様に実施した。

3. AUG 産生細胞株 (A49-SC2) に対する Estrogen 及び Androgen の影響

3.1 細胞

AUG 産生細胞株 A49-SC2 を米国 Colombia University, Chasin 博士より入手した。

3.2 細胞の維持

A49-SC2 は Insulin 100 pM、Dexamethasone 100 nM 及び FBS を 10% 添加した F12 培地にて維持した。本条件下で A49-SC2 細胞は AUG を培地中に分泌することを確認した。

3.3 Estrogen 及び Androgen の影響

Insulin 100 pM, Dexamethasone 100 nM, FBS 10% 添加 F12 培地で維持した A49-SC2 の培地中に 17 α -estradiol または Dihydrotestosterone を 1 μ M-1pM の濃度となるように添加し、産生される AUG 量を ELISA 法にて測定した。

4. AUG 遺伝子 5' promoter 領域の解析
Promoter 領域の cloning: ラットの Genomic DNA を BamHI で完全消化した後、既知塩基配列を含む Adapter を付加し、AUG 遺伝子 Exon 1 の Antisense primer 及び adapter 特異 primer を用いて AUG 遺伝子 5' promoter 領域の増幅を行った。

得られた Fragment の塩基配列中の転写因子結合配列の検索を行った。

C. 研究結果

1 Diethylstilbestrol(DES)投与が雄ラット血清 AUG 濃度に及ぼす影響(Figs. 1,2, Table 1)

精巣の相対重量ではいずれの群の間にも明白な差はみられなかった。一方、血清 AUG は用量依存的な減少がみられ、0.1 mg/kg/day 投与群及び 1 mg/kg/day 投与群では有意な減少が確認された。また、同時に肝における AUG coding mRNA を RT-PCR 法にて定量した結果、血清 AUG と同様に用量依存的な減少が観察された。

精巣の病理組織学的検査の結果、媒体対照群及び 0.01 mg/kg/day 投与群では異常は認められなかったが、1 mg/kg/day 投与群の全例と 0.1 mg/kg/day 投与群の 5 例中 4 例に軽度から中等度のパキテン期精母細胞の変性 (Degeneration of pachytene spermatocytes) が認められ、1 mg/kg/day 投与群の全例と 0.1 mg/kg/day 投与群の 5 例中 1 例に伸長精子細胞の停滞(Retention of elongated spermatids)及び精子細胞の精細管からの離脱抑制(Inhibited spermiation)が認められた。

2 Bisphenol A 投与が雄ラット血清 AUG 濃度に及ぼす影響 (Fig. 3)

精巣の相対重量では高用量群で有意な増加がみられたが、他の群では差は認められず、副生殖腺重量では高用量群で有意な腹葉前立腺相対重量の減少が認められた。一方、血清 AUG は用量依存的な減少がみられ、低用量群 (40 mg/kg/day) を含む全群で有意な減少が観察された。

3 AUG 産生株化細胞に対する Estrogen 及び Androgen の影響 (Fig. 4)

A49-SC2 細胞に合成 Estrogen である DES を 0.001nM-100nM の濃度で作用させた結果、0.01nM では有意な AUG 産生の増加が認められ、0.1nM 以上の濃度では用量依存的に AUG 産生は減少し、10nM 以上では有意な AUG 産生減少が認められた。一方、Androgen (DHT) を同様の濃度範囲で A49-SC2 細胞に作用させた場合、0.01nM 以上の濃度で AUG 産生の減少が観察された。

4 AUG 遺伝子 5' non-coding region の cloning 及び解析 (Figs 5, 6)

ラットの Genomic DNA を BamHI で完全消化した後、既知塩基配列を含む Adapter を付加し、AUG 遺伝子 Exon 1 の Antisense primer 及び adapter 特異 primer を用いて AUG 遺伝子 5' promoter 領域の増幅を行った結果、1294 塩基対の DNA 断片が得られた。この断片の Sequence を既に報告されている AUG promoter 領域の配列を比較した結果、Genbank accession No. U28152 と完全一致した。また、得られた塩基配列中の既知の転写因子結合配列を検索した結果、開始コドンの上流 -93 塩基の位置に TFII-D 結合配列 (TATA Box)、-432 塩基の位置に C/EBP、-656 塩基の位置に不完全な Estrogen responsive element (ERE) 等が

認められた。

D. 考察

Sandwich ELISA 法によるラット血清中の AUG の測定方法を開発し、その Endocrine Disrupter screening 法への応用の可能性について検討した。昨年度、DES を大量投与 (1-100 mg/kg x14 days) し血清中の AUG 濃度の変動を観察した結果、DES 投与に伴う精巣の萎縮性変化と付随して血清 AUG の著しい減少がみられた。今年度は血清 AUG の検出感度を検討するため、さらに低濃度の DES を投与した際の精巣の病理組織学的変化並びに血清 AUG の変動、弱い Estrogen 作用を持つといわれている Bisphenol A を 40-1000 mg/kg の用量で 28 日間投与した際の血清 AUG の変化並びに精巣及び副生殖腺重量を測定した。その結果、DES 投与動物の精巣の相対重量ではいずれの群の間にも明白な差はみられなかったが、血清 AUG は用量依存的な減少がみられ、0.1 mg/kg/day 投与群及び 1 mg/kg/day 投与群では有意な減少が確認された。また、同時に肝における AUG coding mRNA を RT-PCR 法にて定量した結果、血清 AUG と同様に用量依存的な減少が観察され、血清 AUG の減少は肝での AUG 生合成の減少によるものと推察された。また、精巣の病理組織学的検査の結果、媒体対照群及び 0.01 mg/kg/day 投与群では異常は認められなかったが、1 mg/kg/day 投与群の全例と 0.1 mg/kg/day 投与群の一部に萎縮性変化が観察され、その変化の程度は血清 AUG level 及び肝 AUG mRNA level の減少の程度とよく一致していた。また、弱い Estrogen 作用を持つといわれる Bisphenol A を 28 日間連続投与を行った結果、血清 AUG level は用量依存的に減少し、最低用量の 40 mg/kg/day 投与群においても有意な減少が観察された。同時に測定した精巣及び副生殖腺重量では高用量群で有意な精巣相対重量の増加及び腹葉前立腺相対重量の減少が認められた。腹葉前立腺は Androgen 依存性の組織として知られている。本実験で観察された腹葉前立腺相対重量の減少は Estrogenic chemical の作用による精巣からの Testosterone 分泌抑制に起因するものと推察され、Estrogenic chemical の作用を検出する指標となりうることを示すものであるが、感度の点で血清 AUG levelの方が高感度であった。

肝における AUG 遺伝子の発現は Androgen に依存すると報告されており、Estrogen 投与により著しく減少することが知られている。今回、AUG 産生株化細胞 (A49-SC2) を入手し *in vitro* において Estrogen 及び Androgen の

AUG 産生に及ぼす影響を観察した。

その結果、Estrogen では低濃度 (10pM) では産生増加がみられ、高濃度 (>10 nM) では産生低下が観察された。AUG 遺伝子の promoter 領域を cloning し、転写因子結合配列を検索した結果、不完全な Estrogen responsive element(1/2ERE)が確認されたが、Androgen responsive element(ARE)は確認できなかった。これらの結果は A49-SC2 細胞の AUG 産生に及ぼす Estrogen 及び Androgen の作用を支持するものであり、Androgen 依存性タンパクといわれる AUG の産生は Androgen によって制御される二次或いはさらに高次の因子が関与している可能性を示唆するものである。また、Estrogen による産生抑制も細胞 level での直接作用ではなく、少なくとも二次的な因子が関与するものと推察された。現時点で *in vivo* における Androgen の AUG 遺伝子の発現誘導機構や Estrogen による AUG 遺伝子の発現抑制機構は未だ解明されておらず、AUG 測定の意義を明確にするためにも今後の研究により Estrogenic chemical 投与による血清 AUG level 減少のメカニズムを明らかにする必要があるが、本蛋白質は通常行われる毒性試験の中で測定し、評価することが可能であるため、本法は Endocrine Disrupter の新規 *in vivo* screening 法として期待できるものと思われる。

E. 結論

血清 α_{2u} Globulin level を指標とする Endocrine Disrupter screening 法は高感度に Estrogenic chemical を検出することが可能で、さらに通常行われる毒性試験の中で測定し、評価することが可能であるため、の新規 *in vivo* screening 法として期待できるものである。

F. 研究発表

1. 論文発表

Masahiro Takeyoshi, Shunji Anai and Kazutoshi Shinoda, Changes in serum α_{2u} -globulin levels in male rats given diethylstilbestrol (DES) and their applicability to a screening test for endocrine-disrupting chemicals, Arch. Toxicol., (Now printing)

2. 学会発表

武吉正博、穴井俊二、飯田憲二、Diethylstilbestrol(DES)投与雄ラットの血清 α_{2u} -globulin level の変動と endocrine disrupter screening への応用、日本トキシコロジー学会総会、1999 (札幌)

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得
特になし。

2. 実用新案登録
特になし。

3. 実用新案登録
特になし。

成上の留意事項について

1. 日本工業規格A列4番の用紙を使用して下さい。
2. 文字の大きさは、11ポイントでお願いいたします。

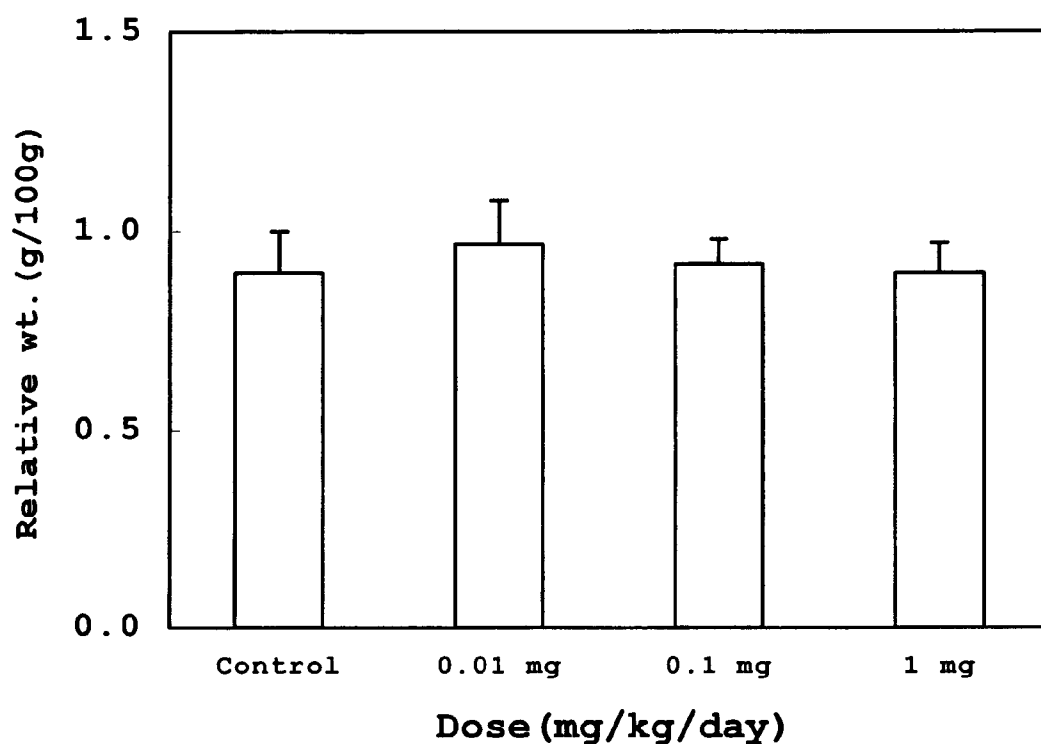


Figure 1-1 Relative testis weight of rats administered with diethylstilbestrol (DES) for 14 days

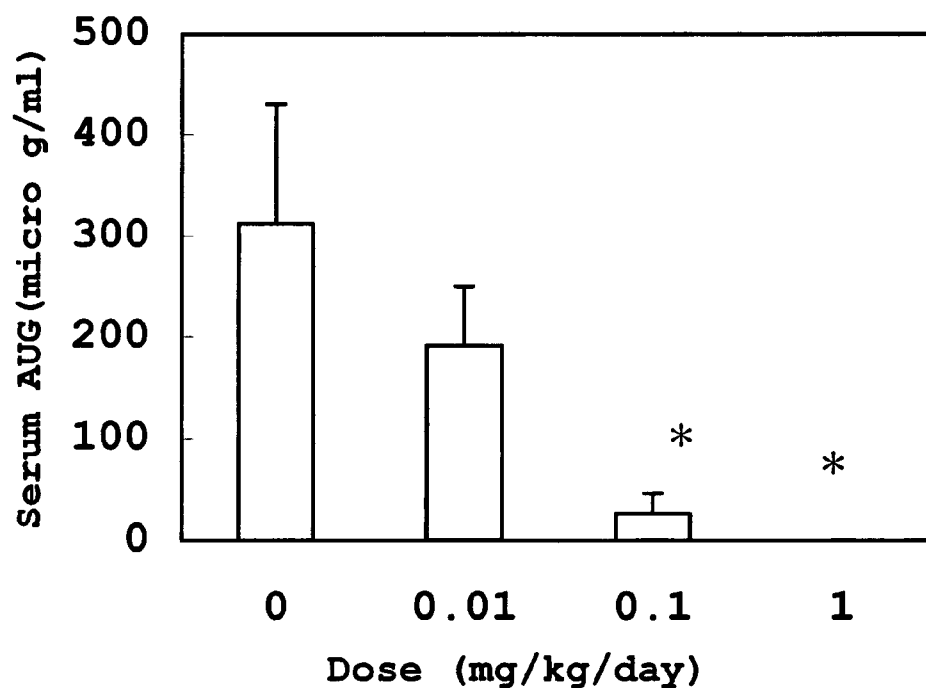


Figure 1-2 Changes in serum AUG levels in male rats administered with diethylstilbestrol (DES) for 14 days

*: Significantly different from the control ($P < 0.05$)

Control



0.01mg/kg/d



0.1mg/kg/d



1mg/kg/d

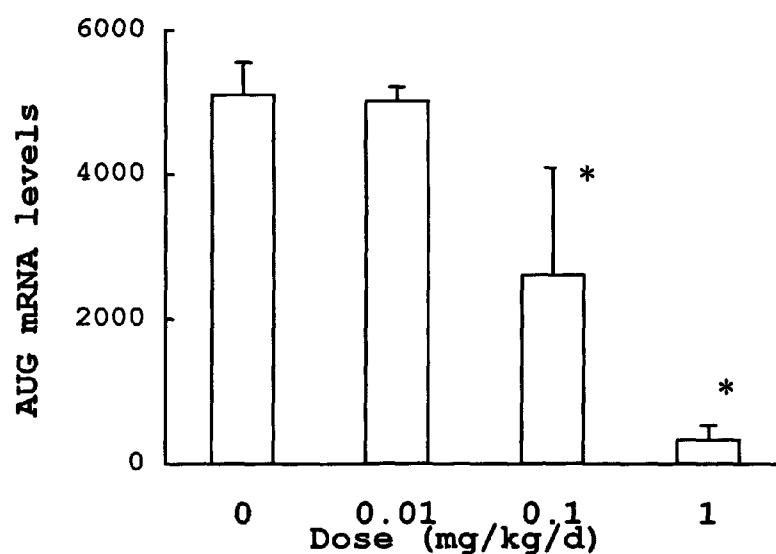


Figure 2 Hepatic AUG coding mRNA levels in rats administered with diethylstilbestrol at doses of 1, 0.1 or 0.01 mg/kg for 14 days

*: Significantly different from the control (0 mg/kg/d)

Table 1 Histopathological findings on testes, hepatic AUG mRNA levels and serum AUG levels of rats administered with DES for 14 days

Group	Animal No.	Histopathological Findings			Liver AUG mRNA Levels	Serum AUG Levels (micro g/ml)
		Degeneration of pachytene spermatocytes	Inhibited spermiation	Retention of elongated spermatids		
Control	1	—	—	—	4933	388
	2	—	—	—	4615	234
	3	—	—	—	4826	607
	4	—	—	—	5603	313
	5	—	—	—	5567	171
0.01mg/kg/d	6	—	—	—	5117	108
	8	—	—	—	4837	188
	9	—	—	—	5247	268
	10	—	—	—	4895	182
0.1mg/kg/d	11	+	—	—	2274	36
	12	±	—	—	3222	27
	13	+	±	±	330	27
	14	±	—	—	2856	25
	15	—	—	—	4358	55
1mg/kg/d	16	+	±	±	591	15
	17	+	±	±	442	18
	18	+	+	+	367	17
	19	+	+	+	115	15
	20	+	++	++	148	19

±;slight, +; modearate, ++; marked

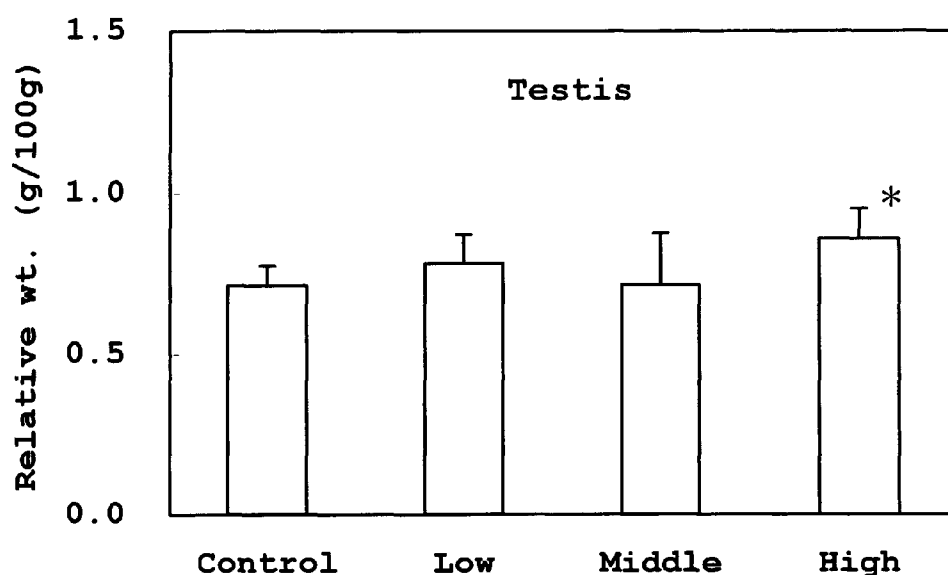


Figure 3-1 Relative testis weight of rats administered with Bisphenol A for 28 days

Animals in each groups were given 40mg(Low dose), 200mg(Middle dose) or 1000mg (High dose) /kg·d of Bisphenol A by gavage. However, general condition of some animals in the High dose group aggravated within first week of dosing period, so the dose of the group was reduced to 600 mg/kg from the 8th to the 28th d of the dosing period.

*: Significantly different from the control(P < 0.05)

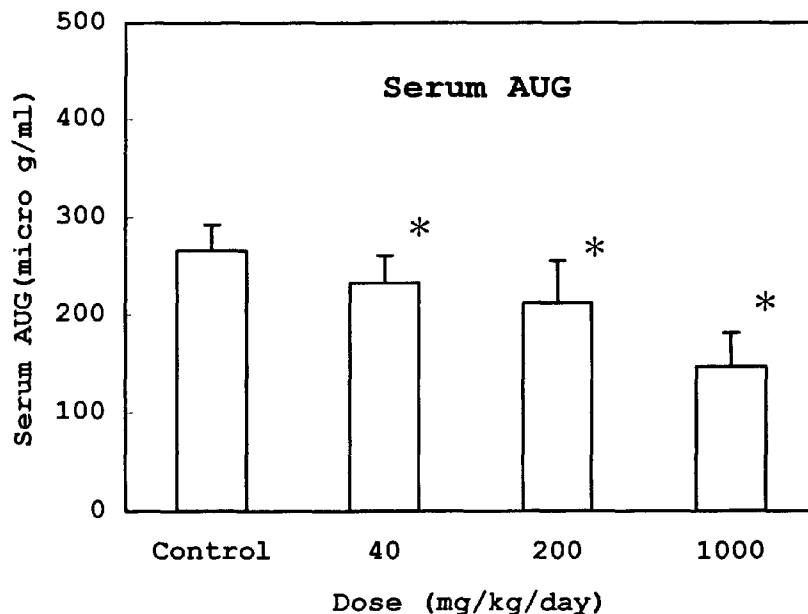


Figure 3-2 Changes in serum AUG levels in male rats administered with Bisphenol A for 28 days

Animals in each groups were given 40mg(Low dose), 200mg(Middle dose) or 1000mg (High dose) /kg·d of Bisphenol A by gavage. However, general condition of some animals in the High dose group aggravated within first week of dosing period, so the dose of the group was reduced to 600 mg/kg from the 8th to the 28th d of the dosing period.

*: Significantly different from the control(P < 0.05)

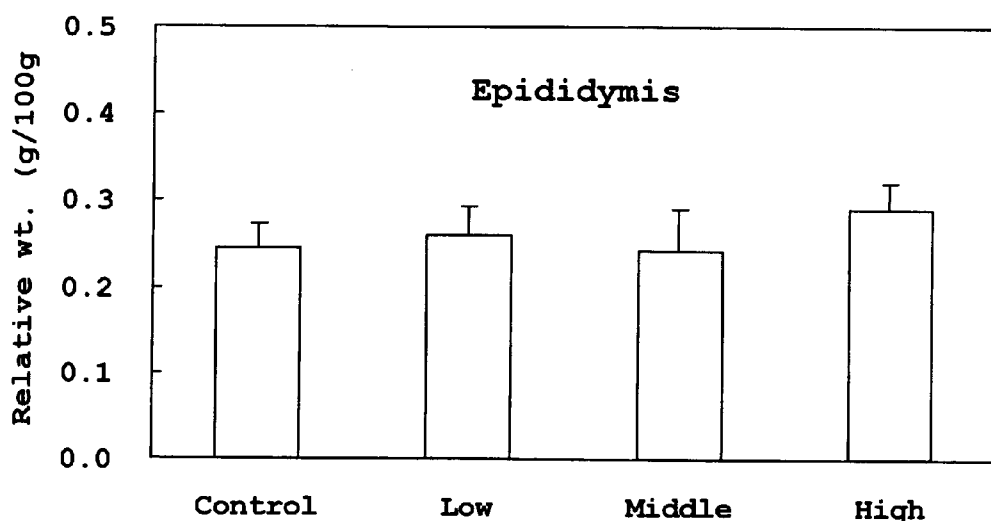


Figure3-3 Relative epididymis weight of rats administered with Bisphenol A for 28 Days

Animals in each groups were given 40mg(Low dose), 200mg(Middle dose) or 1000mg (High dose) /kg·d of Bisphenol A by gavage. However, general condition of some animals in the High dose group aggravated within first week of dosing period, so the dose of the group was reduced to 600 mg/kg from the 8th to the 28th d of the dosing period.

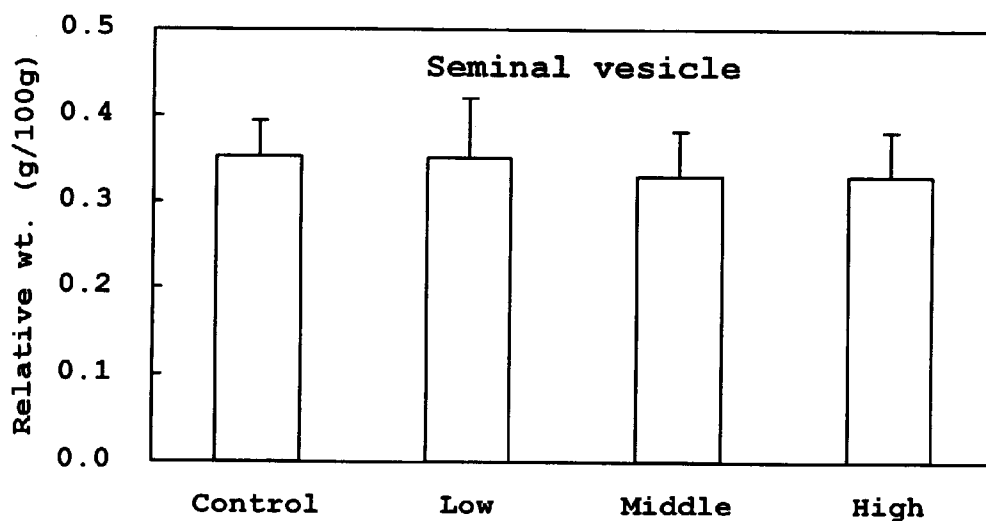


Figure3-4 Relative seminal vesicle weight of rats administered with Bisphenol A for 28 days

Animals in each groups were given 40mg(Low dose), 200mg(Middle dose) or 1000mg (High dose) /kg·d of Bisphenol A by gavage. However, general condition of some animals in the High dose group aggravated within first week of dosing period, so the dose of the group was reduced to 600 mg/kg from the 8th to the 28th d of the dosing period.

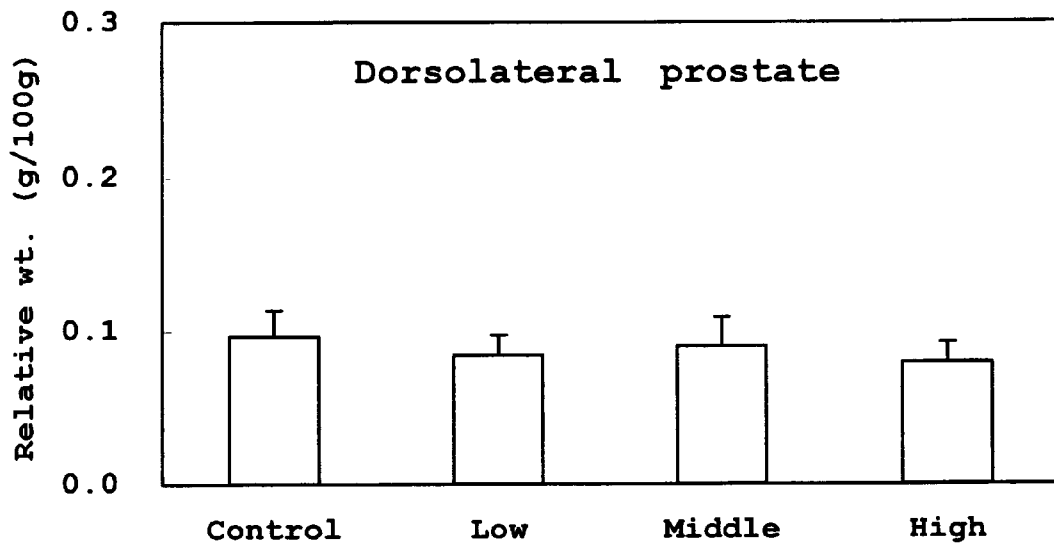


Figure3-5 Relative dorsolateral prostate weight of rats Administered with Bisphenol A for 28 days

Animals in each groups were given 40mg (Low dose), 200mg (Middle dose) or 1000mg (High dose) /kg·d of Bisphenol A by gavage. However, general condition of some animals in the High dose group aggravated within first week of dosing period, so the dose of the group was reduced to 600 mg/kg from the 8th to the 28th d of the dosing period.

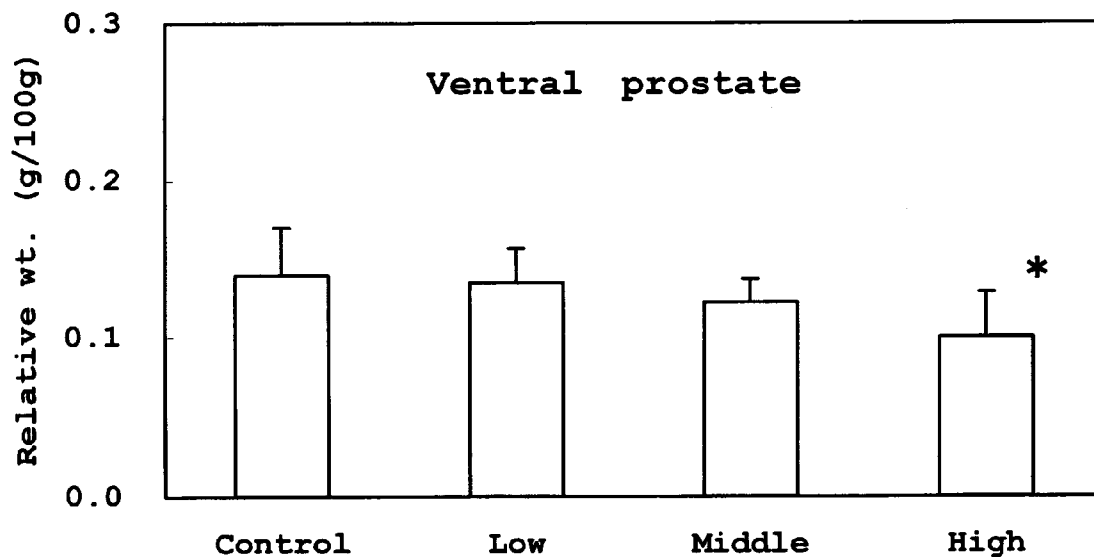


Figure3-6 Relative ventral prostate Weight of rats administered with bisphenol A for 28 days

Animals in each groups were given 40mg (Low dose), 200mg (Middle dose) or 1000mg (High dose) /kg·d of Bisphenol A by gavage. However, general condition of some animals in the High dose group aggravated within first week of dosing period, so the dose of the group was reduced to 600 mg/kg from the 8th to the 28th d of the dosing period.

*:Significantly different from the control ($P < 0.05$)

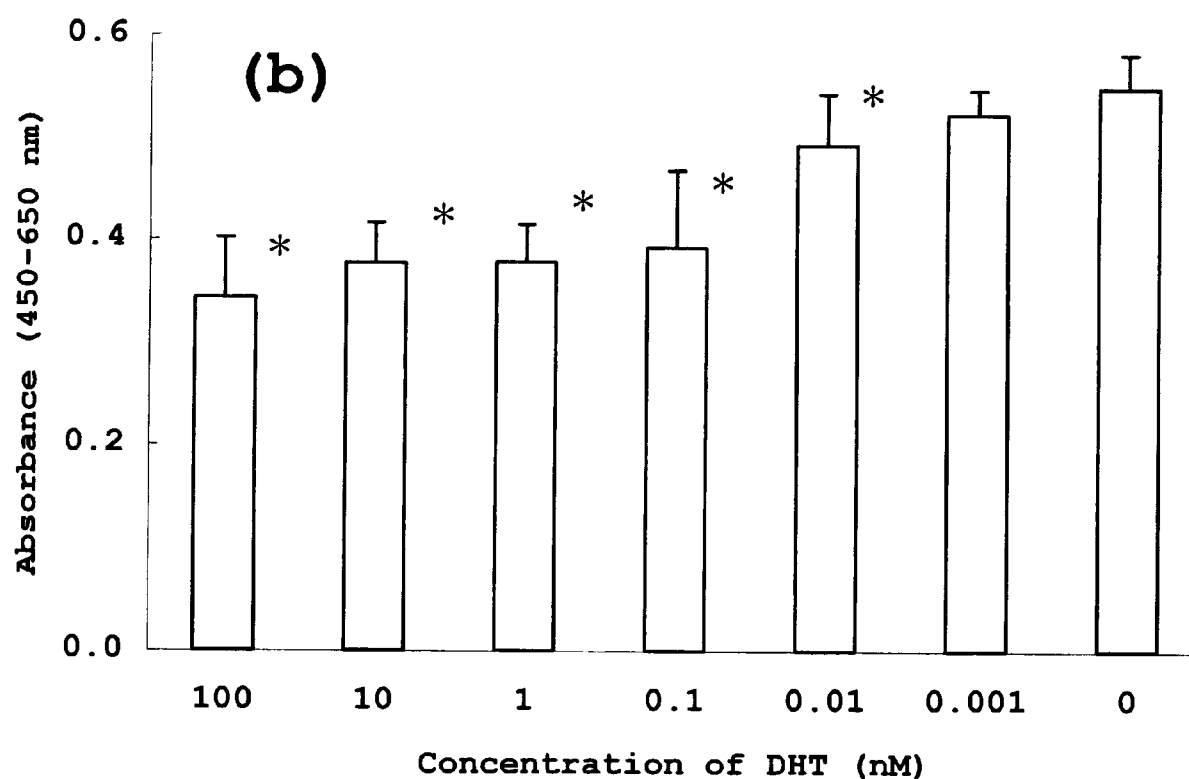
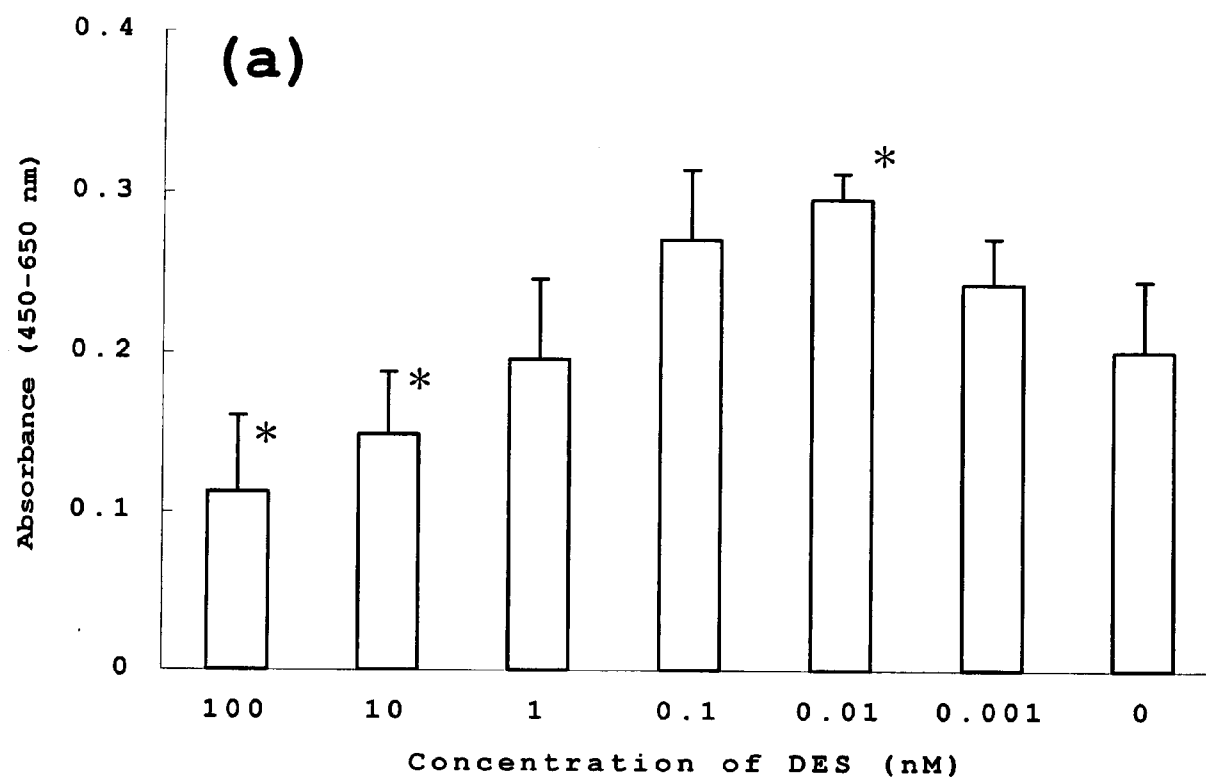


Figure 4 Effects of diethylstilbestrol (a) and dihydrotestosterone (b) on alpha 2u globulin production from A49-SC2 cell line

*: Significantly different from the control (0 nM)

Clustal W(1.4) multiple sequence alignment

3 Sequences Aligned. Alignment Score = 22337
Gaps Inserted = 4 Conserved Identities = 739

Pairwise Alignment Mode: Slow
Pairwise Alignment Parameters:

5' -AUG (U28152)	451	AAGTTAGCAGTTTGCATTCTGAGGACAATCTTTTGGGGTGGGTTTGGGGT	500
5' -AUG (X05614)	1	AATCTTTTGGGGTGGGTTTGGGGT	24
5' -AUG	445	AAGTTAGCAGTTTGCATTCTGAGGACAATCTTTTGGGGTGGGTTTGGGGT	494

5' -AUG (U28152)	501	TGGGGGCTGTCAGCTTTAGCTTCGGAAGATCCATCCTGATAATCTTTT	550
5' -AUG (X05614)	25	TGGGGGCTGTCAGCTT-AGCTNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN	73
5' -AUG	495	TGGGGGCTGTCAGCTTTAGCTTCGGAAGATCCATCCTGATAATCTTTT	544
		***** ***	
5' -AUG (U28152)	551	AATAACGATTTATTATTTTATGTCATATGTGACTGAATGAGTGAGTTCAT	600
5' -AUG (X05614)	74	NN	122
5' -AUG	545	AATAACGATTTATTATTTTATGTCATATGTGACTGAATGAGTGAGTTCAT	594
5' -AUG (U28152)	601	ATGTACCACATGTGTATAGGAGATCACAAGGACCAAAAGAGGGTCATTTTC	650
5' -AUG (X05614)	123	-NGTACCACATGTGTATAGGAGATCACAAGGACCAAAAGAGGGTCATTTTC	171
5' -AUG	595	ATGTACCACATGTGTATAGGAGATCACAAGGACCAAAAGAGGGTCATTTTC	644

5' -AUG (U28152)	651	CTGTGACTGGAGCTAGAGTCAGTTTGAGATGCCATGTGAGTGCGAGGAAT	700
5' -AUG (X05614)	172	CTGTGACTGGAGCTAGAGTCAGTTTGAGATGCCATGTGAGTGCGAGGAAT	221
5' -AUG	645	CTGTGACTGGAGCTAGAGTCAGTTTGAGATGCCATGTGAGTGCGAGGAAT	694

5' -AUG (U28152)	701	TGAACCTGGGTCCTCAGCAAGAAAAGGTTTCAAAGAATCTGACTCCTTCT	750
5' -AUG (X05614)	222	TGAACCTGGGTCCTCAGCAAGAAAAGGTTTCAAAGAATCTGACTCCTTCT	271
5' -AUG	695	TGAACCTGGGTCCTCAGCAAGAAAAGGTTTCAAAGAATCTGACTCCTTCT	744

5' -AUG (U28152)	751	TTCACATCCTTCTGACTTTCTTGGCCCCAGATGTGTGCATGGTACACATG	800
5' -AUG (X05614)	272	TTCACATCCTTCTGACTTTCTTGGCCCCAGATGTGTGCATGGTACACATG	321
5' -AUG	745	TTCACATCCTTCTGACTTTCTTGGCCCCAGATGTGTGCATGGTACACATG	794

5' -AUG (U28152)	801	CAAAACCAATGCTCATAACATGAAATGTGAATGTTTTAAAGAAAACCC	850
5' -AUG (X05614)	322	CAAAACCAATGCTCATAACATGAAATGTGAATGTTTTAAAGAAAACCC	371
5' -AUG	795	CAAAACCAATGCTCATAACATGAAATGTGAATGTTTTAAAGAAAACCC	844

5' -AUG (U28152)	851	AAGTAATTCAGCTTCTTCCACACTCCACTCAAGTCTTGAAGCAAAGATTC	900
5' -AUG (X05614)	372	AAGTAATTCAGCTTCTTCCACACTCCACTCAAGTCTTGAAGCAAAGATTC	421
5' -AUG	845	AAGTAATTCAGCTTCTTCCACACTCCACTCAAGTCTTGAAGCAAAGATTC	894

5' -AUG (U28152)	901	TCTCCATGCTTGACCTCCAGTTCAGTACCCACCCACTCCATTACTGGCTT	950
5' -AUG (X05614)	422	TCTCCATGCTTGACCTCCAGTTCAGTACCCACCCACTCCATTACTGGCTT	471
5' -AUG	895	TCTCCATGCTTGACCTCCAGTTCAGTACCCACCCACTCCATTACTGGCTT	944

Figure 5 DNA sequence of cloned 5'-non coding region of alpha 2u globulin gene and alignment with two reported sequences

5' -AUG (U28152)	951	TCTGATTCCAAGTCAGATCCAAAGTTCATCTGGTTCCAGATAGCCCTCTT	1000
5' -AUG (X05614)	472	TCTGATTCCAAGTCAGATCCAAAGTTCATCTGGTTCCAGATAGCCCTCTT	521
5' -AUG	945	TCTGATTCCAAGTCAGATCCAAAGTTCATCTGGTTCCAGATAGCCCTCTT	994

5' -AUG (U28152)	1001	GAACACCCACTGTTTTCTTGGAAATATGCTTTGTGAAATGTATTAGTGA	1050
5' -AUG (X05614)	522	GAACACCCACTGTTTTCTTGGAAATATGCTTTGTGAAATGTATTAGTGA	571
5' -AUG	995	GAACACCCACTGTTTTCTTGGAAATATGCTTTGTGAAATGTATTAGTGA	1044

5' -AUG (U28152)	1051	AAAAAATCAATCCATAGGAGATGAGATTGCCAAGTTGGAAAAGGGCAGGA	1100
5' -AUG (X05614)	572	AAAAAATCAATCCATAGGAGATGAGATTGCCAAGTTGGAAA-GGGCAGGA	620
5' -AUG	1045	AAAAAATCAATCCATAGGAGATGAGATTGCCAAGTTGGAAAAGGGCAGGA	1094

5' -AUG (U28152)	1101	ACAATCCTTGGCTTCACATCAGTACATGAGAAAACATTCCAAAAAGCCTG	1150
5' -AUG (X05614)	621	ACAATCCTTGGCTTCACATCAGTACATGAGAAAACATTCCAAAAAGCCTG	670
5' -AUG	1095	ACAATCCTTGGCTTCACATCAGTACATGAGAAAACATTCCAAAAAGCCTG	1144

5' -AUG (U28152)	1151	AGGGAAGGAGGCCCATATGAGAAGGAAAAAAAAAAACACTGGAACCCAGAG	1200
5' -AUG (X05614)	671	AGGGAAGGAGGCCCATATGAGAAGGAAAAAAAAAAACACTGGAACCCAGAG	720
5' -AUG	1145	AGGGAAGGAGGCCCATATGAGAAGGAAAAAAAAAAACACTGGAACCCAGAG	1194

5' -AUG (U28152)	1201	AGAGTATAAAGACGAGCAAAGTGCTGAAGGTGGAGTGTGGGCATCATCAG	1250
5' -AUG (X05614)	721	AGAGTATAAAGACGAGCAAAGTGCTGAAGGTGGAGTGTGGGCATCATCAG	770
5' -AUG	1195	AGAGTATAAAGACGAGCAAAGTGCTGAAGGTGGAGTGTGGGCATCATCAG	1244

5' -AUG (U28152)	1251	CAGAGAGAGATTGTCCCAACAGAGAGGCAATTCTATTCCCTACCAACATG	1300
5' -AUG (X05614)	771	CAGAGAG--ATTGTCCCAACAGAGAGGCAATTCTATTCCCTACCAACATG	818
5' -AUG	1245	CAGAGAGAGATTGTCCCAACAGAGAGGCAATTCTATTCCCTACCAACATG	1294

Figure 5 -Continued.

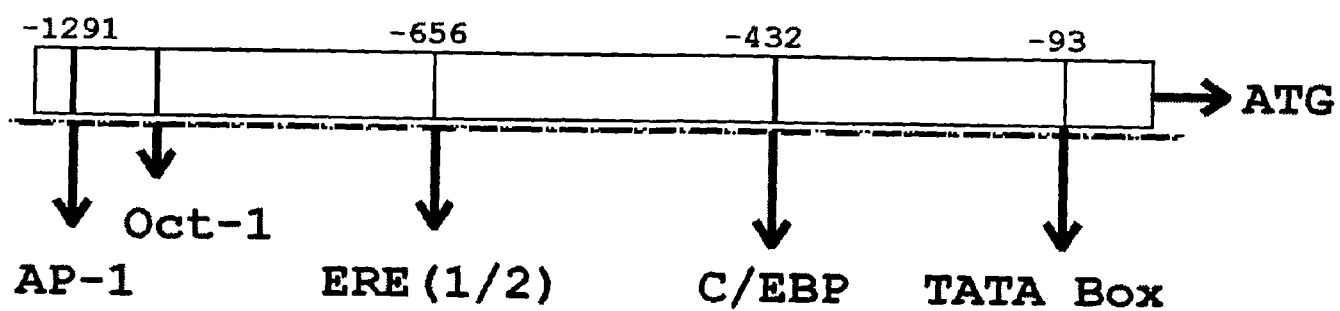


Figure 6 Typical DNA motifs found in 5' non coding region of alpha 2u globulin gene