

Post-transcriptional Regulation of Complement Component C4 in C4-low Producing Mouse

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2017-10-04 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/2297/8166

転写後過程の異常による補体第4成分 (C4) の産生の低下

金沢大学がん研究所免疫生物学 (主任: 高橋守信教授)

Sa-nga Pattanakitsakul

(平成2年1月11日受付)

マウス補体第4成分 (complement component 4, C4) の血清濃度は高産生系と低産生系の間で20倍もの差異がある。C4^h遺伝子型, C4^l遺伝子型がそれぞれ, C4 高産生, C4 低産生を規定する。本研究は, C4 生合成のどの段階における調節が, C4 の血清濃度をコントロールしているかを, 分子レベルで解明しようと試みた。そのため C4 高産生系マウス (B10) と C4 低産生系マウス (B10. BR) の肝臓全 RNA 中の C4 メッセンジャー RNA (C4 messenger RNA, C4mRNA), 肝細胞核内の C4 特異 RNA の比較, 定量を行った。さらに, 高産生系マウスの C4 遺伝子の転写プロモーター活性を, 核転写アッセイによって比較した。その結果, C4 高産生系と低産生系のマウスの肝細胞の C4mRNA には10倍以上の差がみられるのに, 両者の C4 遺伝子の転写プロモーター活性には, ほとんど差がみられず, 低 C4 産生は転写以降のステップでの異常によることが示された。このような転写後調節がどのような機構で起こっているかを知るために, B10 マウスと B10.BR マウスの肝初代培養細胞での C4mRNA の安定性を比較したところ, C4 低産生系の B10.BR マウスでは C4mRNA が非常に不安定であることが示された。また B10.BR の肝臓の相補 DNA (complementary DNA, cDNA) ライブラリーからは, 約200ヌクレオチドの異常な挿入配列をもつ C4cDNA クローンが得られた。

Key words 転写プロモーター活性, complement C4, 補体欠損症, mRNA の安定性

補体第4成分 (complement component 4, C4) は, 補体の古典経路を介する活性化において必須の蛋白である。分子量, 約20万の糖蛋白で, α , β , γ の3本のポリペプチド鎖がジスフィド結合によって連結させた特異な構造をとるが, 生合成される時には, 一本の長大ポリペプチド鎖 (Pro-C4) として生合成され, 細胞からの分泌の前に蛋白分解酵素によって切断されて3本鎖構造をとる¹⁾。

ヒト C4 は, C4A と C4B の2つのアイソタイプから成りたっている²⁾。C4A や C4B の単独欠損は, 正常人口に高率にみられるが, C4A 欠損は汎発性紅斑性狼瘡との関連が認められ, C4B 欠損では, 副腎過形成や I 型糖尿病と関連することがある³⁻⁵⁾。C4A, C4B が共に欠損する症例は非常にまれであるが, 重篤な免

疫複合体病変を示す⁶⁾。本研究ではヒトの種々の補体欠損症の遺伝子機構のモデルとしてマウス C4 の血清濃度を支配する機構を分子レベルで追究した。マウス C4 の血清濃度を支配する要因は, 構造遺伝子と不可分に存在し第17クロモソームの組織適合性2 (histocompatibility 2, H-2) 複合体 S 領域に位置している⁷⁾。C4 の高産生系 (C4^h) と低産生系 (C4^l) のマウスの間では, 10~20倍もの血清濃度の差が生じている。ノザンプロットによる解析の結果では, 血中濃度の差を反映し, C4^hマウスの肝臓中には, C4^lマウスに比べて10倍以上の多量の C4 メッセンジャー RNA (C4messenger RNA, C4mRNA) が存在していることが示された。即ち翻訳以前の段階で C4^h と C4^l の差が生じていると考えられた⁸⁾⁻¹⁰⁾。本研究では, C4 高産生系マウス

Abbreviations: Act D, actinomycin D; bp, base pair (s); cDNA, complementary DNA; C3, complement component 3; C4, complement component 4; EDTA, ethylenediaminetetraacetic acid; H-2, Histocompatibility 2; kb, kilobase (s); mRNA, messenger RNA; pBR322, a recombinant plasmid vector; SDS, sodium dodecyl sulfate

(B10) と C4 低産生系マウス (B10.BR) から主要な C4 産生部位である肝臓における C4mRNA や核内 RNA 中の C4 特異 RNA の定量を行なった。さらに肝細胞における C4 遺伝子の転写活性を比較し、またアクチノマイシン D (actinomycin D, ActD) 処理後の初代肝細胞を用いて、C4mRNA 量の経時的な変化を測定した。さらに、B10.BR マウスの肝臓相補 DNA (complementary DNA, cDNA) ライブラリーを作製し、C4 低産生系マウスの C4cDNA を単離し、その構造を解析した。

材料および方法

I. 材料

ヒト肝癌由来 HepG2 培養細胞株は H. R. Colten 教授より、入ファージ由来 Hisajima arm は本庶佑教授より、マウスアルブミン cDNA は S.M. Tilgman 博士より、H-2^d マウスの C4 遺伝子 DNA は D.C. Shreffler 教授それぞれ供与をうけた。制限酵素類は宝酒造 (京都) と東洋紡 (大阪) から、アイソトープ標識化合物は、アマシヤム・ジャパン (東京) より、コラゲナーゼ I 型、サケ精子 DNA、酵母 RNA は、シグマ社 (セントルイス市, 米国) より、ウイリヤム E 培養液は、Flow Lab (Irvine, 英国) より入手した。近交系マウス B10 と B10.BR は三協ラボ (静岡) から得た。

II. ノザンプロット

B10 マウスと B10.BR マウスの雌の肝臓から Chirgwin らの方法¹¹⁾に従って全 RNA を抽出した。RNA は Lehrach らのフォルマリン法¹²⁾によって電気泳動し、ニトロセルローズ膜にプロットした。プローブとしては、FM マウス C4cDNA (pFC 4-5.4)¹³⁾の 5' 端から得た 1.5kilo base (kb) の AvaI-EcoRI 断片をニックトランスレーション法¹⁴⁾で標識して用いた。ハイブリダイゼーションは 1M 塩化ナトリウム、0.2% ウシ血清アルブミン、0.2% フィコール、0.2% ポリビニルピロリドン、50mM トリシュー塩酸緩衝液 (pH 7.4)、10mM ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA)、0.1% sodium dodecyl sulfate (SDS)、100 μ g/ml 変性サケ精子 DNA を含む溶液中で 65°C で行なった。反応後のニトロセルローズ膜は、15mM 塩化ナトリウム、1.5mM クエン酸ナトリウム、0.1% SDS 溶液中で 65°C、30分間ずつ 3 回洗い、-70°C でオートラジオグラフィーを行なった。

III. ドットプロット

B10 マウス、B10.BR マウスの雌から Marzluff らの方法¹⁵⁾に従って肝臓核を単離した。肝臓全 RNA の抽出は、ノザンプロット法の場合と同様に行なった。

抽出した RNA を 10 倍量の 3M 塩化ナトリウム、0.3 M クエン酸ナトリウム溶液で希釈し、ニトロセルローズ膜上にスポットした。使用したプローブ及び反応条件はノザンプロットと同様である。

IV. 核内転写活性の測定 (nuclear run-on アッセイ)

B10, B10.BR のマウスの雌の肝臓から Marzluff らの方法¹⁵⁾に従って核を単離した後、彼らの方法に従って 10^7 ~ 10^8 個の核を 70mM 塩化カリウム、6mM マグネシウム、0.5mM アデノシン三リン酸 (adenosine triphosphate, ATP)、0.5mM グアノシン三リン酸 (guanosine triphosphate, GTP)、0.5mM シトシン三リン酸 (cytosine triphosphate, CTP)、0.01mM ³²P-ウリジン三リン酸 (uridine triphosphate, UTP) の溶液中で、25°C、30分間反応させた。半量のフェノールクロロフォルム-イソアミルアルコール (25:24:1) 混合液を加えて、65°C で 5 分間放置後 10,000 \times g、20 分間遠心して RNA を抽出した。抽出した RNA を、1ml のセファデックス G-50 カラムでゲル濾過し、遊離のヌクレオチドを除いた。C4 cDNA、補体第 3 成分 cDNA (complement component 3cDNA, C3cDNA)、組換え体プラスミドベクター (recombinant plasmid vector, pBR322) DNA を、10 μ g ずつ 0.4N 水酸化ナトリウム溶液中で変性させて、ニトロセルローズ膜にドットプロットした。そのニトロセルローズ膜を放射性標識した RNA と、50%ホルムアルミド、0.75M 塩化ナトリウム、75mM クエン酸ナトリウム、0.1% SDS、1mM EDTA、10mM トリシュー塩酸緩衝液 (pH 7.4)、2 μ g/ml 変性サケ精子 DNA を含む溶液中で 52°C で 12 時間反応させた。反応後のニトロセルローズ膜を 0.15M 塩化ナトリウム、15mM クエン酸ナトリウム 0.1% SDS 溶液中で 52°C、30分間 3 回洗い、乾燥した後 -70°C でオートラジオグラフィーを行なった。

V. 肝細胞の初代培養

マウス肝細胞は、5 週令の B10 マウスと B10.BR マウスの雌から Berry らの方法¹⁶⁾によって得た。トリパンブルー染色によって、90%以上の生存率を示す細胞のみを実験に用いた。肝細胞は 10% 牛胎児血清加ウイリヤム E 培養液で $0.5 \sim 1.0 \times 10^7$ /ml に調整し、100mm 径のシャーレ中で培養した。

VI. mRNA の安定性の測定

B10 マウスと B10.BR マウスから採取した肝細胞は、5%CO₂存在下で 37°C、12時間培養して、シャーレ底に付着させた。ついで新しい培養液に交換して 24 時間培養した。その後、培養液を除いて 5 μ g/ml ActD^{17,18)}を含む新しい培養液に代えて 37°C での培養を

続け、その間に細胞を継続的に採取した。採取した細胞は直ちに -80°C に凍結し、2日以内にRNAの分析に用いた。全RNAの抽出と分析はノザンプロット法の項で述べた通りの如くに行なった。mRNAの半減期を推定するために、オートラジオグラフィーの結果を島津二重波長スキャナー (CS-9000 型) (島津, 京都) で分析した。

VII. B10.BR からの C4 cDNA クローンの単離

B10.BR マウスの肝臓から 28S poly (A) $^+$ RNA を分離し、Okayama らの法¹⁹⁾ によって cDNA ライブラリーを作製した。方法の詳細は、FM マウス肝臓からの cDNA ライブラリーの作製²⁰⁾ で記述した通りである。作製された cDNA ライブラリーを pFC 4-5.4 の 1.5kb HindIII 断片をプローブとして用いてスクリーニングした。スクリーニングの方法も既報²⁰⁾ の通りである。

VIII. B10.BR の C4cDNA クローンの延長

より長い C4cDNA クローンを得るために extension cDNA ライブラリーを作製した。B10.BR の C4cDNA (クローン 4) の 3' 端から 2.6kb の位置にある塩基配列に相補的な 17ヌクレオチドを合成してプライマーとして用い、逆転写によって cDNA の第一鎖を合成した。2重鎖 cDNA は、アマシャム製の cDNA 合成システムキットを用いて、使用説明書に従って合成し、pGEM-4 ベクターに組み込んだ。5 $\times 10^4$ 個の組換え型クローンが得られた。スクリーニングは pFC 4-5.4 の 1.5kb AvaI-EcoRI 断片をプローブとして用いて行なった。

IX. DNA の塩基配列の決定

Sanger ら²¹⁾ が開発し、Messing によって改良された M13 ファージを用いたジデオキシ法²²⁾ によって行なった。全ての配列に関して、必ず両方向について決

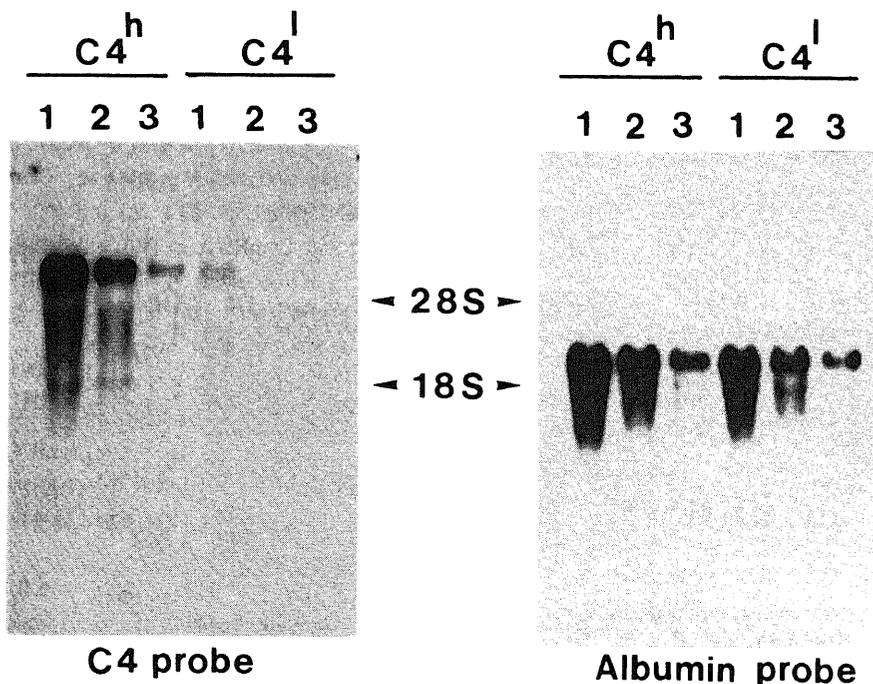


Fig. 1. Northern blot analysis of total RNAs isolated from the livers of B10 ($C4^h$) and B10.BR ($C4^l$) mice. Twenty-two micrograms (lane 1), 8 μg (lane 2), and 2 μg (lane 3) of total RNAs isolated from B10 ($C4^h$) and B10.BR ($C4^l$) mouse livers were processed for Northern blotting. The filter was hybridized successively with C4 cDNA probe (left) and serum albumin cDNA probe (right). Migration distances of 28S and 18S ribosomal RNAs were indicated. Note that hybridization with C4 probe of 2 μg B10 RNA is stronger than that of 22 μg B10.BR RNA.

定を行なった。

成 績

I. Nuclear run-on アッセイによる転写活性の測定

C4 高産生系 B10 マウスと C4 低産生系 B10.BR マウスの肝臓から抽出した全 RNA のノザンプロットの結果では、C4cDNA の量は明らかに10倍の差がみられた (図 1, 左側). C4cDNA プローブでハイブリダイゼーションを行なった後のニトロセルローズ膜を100°Cの 10mM トリス-塩酸緩衝液で洗い、次いでアルブミンを cDNA プローブとしてハイブリダイゼーションを行なった時のオートラジオグラフィーを図 1, 右側に示した. 血清アルブミンはマウス系統間において発現量の差がみられないので、この実験はインターナルコントロールとなる. B10 マウスと B10.BR の間に差はみられず本ノザンプロット実験においてニトロセルローズ膜への RNA の移行などの点で技術的欠陥がないことが示された. C4 遺伝子の肝細胞における転写活性を比較するため B10 マウスと B10.BR マウスの肝臓から核を単離し、核転写活性を測定した (nuclear run-on assay). インターナルコントロールとして、マウス系統間で発現量に差が見られ

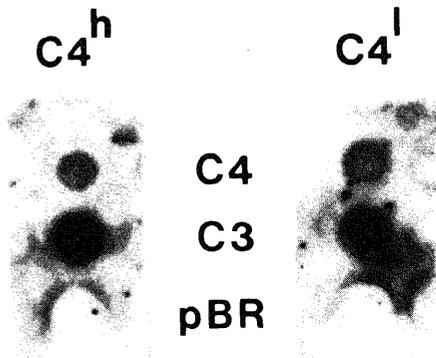


Fig. 2. Nuclear transcription assay for the C4 gene of B10 (C4^h) and B10.BR (C4^l) mice. Nuclear transcription (run-on) assay with ³²P-labelled RNA isolated from nuclei of the livers of B10 (C4^h) (left) and B10.BR (C4^l) mice (right) were performed. ³²P-labelled RNAs (10⁸dpm) were hybridized to nitrocellulose filters that carried the following immobilized plasmid DNAs: 10 μg of C4-cDNA (C4), 10 μg of C3-cDNA (C3) (internal control), and 10 μg of pBR 322 plasmid DNA (pBR) (negative control).

ない C3 についても測定を行なった. ネガティブコントロールとして pBR322 をプローブとして用いた実験も行なった. 図 2 に示したように、C4^hマウス、C4^lマウスの C4 遺伝子、C3 遺伝子の転写活性は、両系統の間に差はみられなかった.

この結果を確かめるために肝細胞核から RNA を抽出し、含まれる C4 特異 RNA をドットプロットによって定量して比較した結果は図 3 に示してある. インターナルコントロールとして、C4RNA を定量したあとのニトロセルローズ膜を、100°Cの 10mM トリス塩酸緩衝液 (pH7.4) で洗って C4cDNA プローブを除き、ついで血清アルブミン cDNA プローブとハイブリダイゼーションを行なって得た結果を図の下半分に示してある. B10 マウスと B10.BR マウスでは、核内の RNA 中に含まれる C4 特異 RNA にはせいぜい 2 倍以下の差異しか認められなかった. 一方、細胞の全 RNA 中に含まれる C4 特異 RNA の量は、ノザンプロットの結果と同様に10倍以上のちがいが認められた.

II. mRNA の安定性の測定

B10 マウスと B10.BR マウスの C4mRNA の恒常状態におけるレベルの違いが、両者における mRNA の安定性の差による可能性をテストするために、両系統のマウスの肝初代培養細胞を ActD で処理して RNA の新しい合成を停止させた後、C4mRNA の量を継続的に測定した. 図 4 (A) に示すように B10.BR マウスの C4mRNA が B10 よりも急速に減少してゆくことがわかった. 残存する C4mRNA 量を、ActD 処理後の時間に対してプロットして半減期を計算したところ、B10.BR では13時間であったのに対して B10 では、15時間よりはるかに長く、外挿法では 28.5時間であった (図 4 (B)). インターナルコントロールとして測定したアルブミンの mRNA の安定性については、B10 と B10.BR の間で差が認められなかった. 図 4 (B) には 3 回の実験の結果がまとめてある.

III. 異常な挿入配列を含む B10.BR 由来の C4cDNA の分離

B10.BR マウスの不安定な C4mRNA の本体を推定するために B10.BR マウス肝臓の高分子 mRNA から cDNA ライブラリーを作製し、C4cDNA クローンを分離した. 約80,000個の独立のクローンを pFC 4-5.4由来の 1.5kb HindIII 断片をプローブとして検索した.

得られた28個のクローンの内、クローン 4 が最長のインサート (3.4kb) をもっていた. このクローンを制限酵素地図を作って分析したところ、これまで報告さ

れた FM マウスや W7 マウスの C4cDNA と一致した。塩基配列の相同性も高く、FM の C4cDNA²⁰とは13個所、W7²⁰の C4cDNA とは15個所で置換がみられるだけだった。さらに長い cDNA を得るために、extension cDNA ライブラリーを作製し、pFC4-5.4由来の1.5kb *Ava*I-*Eco*RI 断片をプローブとして検索した。ライブラリーに含まれる約50,000個のクローンから得られた C4cDNA のうち、クローン7が最長であり、2.1kb のインサートを含んでいた。クローン7の3'側のヌクレオチド配列約800塩基体 (base pair, bp) はクローン4と完全に重なっていた (図6)。クローン7の制限酵素地図や、塩基配列の大部分はこれまで報告されている FM²⁰, W7²⁰, DBA/1 (未発表

データ)などの近交系マウスから得られた C4cDNA のそれと一致した。ただクローン7には約200bpのユニークな塩基配列が挿入されていることが大きな相違点であった (図7)。

考 察

C4 高産生系マウス (B10) と C4 低産生系マウス (B10.BR) の肝臓から抽出した全 RNA 中に含まれる C4 特異 RNA の量には、10倍以上の差が認められた。このように血清中の C4 濃度に比例して特異の mRNA の量に差がみられることから、B10 と B10.BR の C4 産生量の差は翻訳以前の段階で生じている事は明らかである。一方、肝遊離核を用いた転写

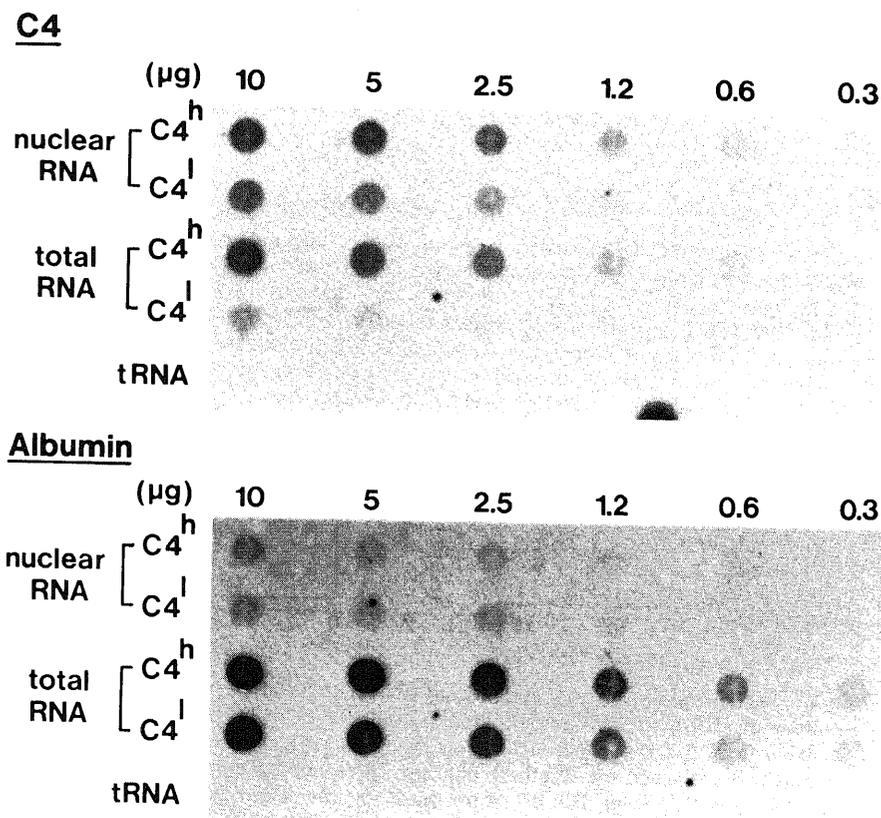


Fig. 3. Dot blot analysis of total RNA and nuclear RNA isolated from the livers of C4^h and C4^l mice. Total RNA and nuclear RNA were purified from fresh liver (total RNA) and isolated liver nuclei (nuclear RNA) by the guanidine isothiocyanate method¹⁰. To minimize the contamination of cytoplasmic RNA, liver nuclei were prepared by centrifugation on the 2.0M sucrose cushion. Various amounts of total RNA, nuclear RNA and tRNA (negative control) were spotted on nitro-cellulose filter. The same filter was hybridized with C4 cDNA probe (*upper panel*) and, after the C4 cDNA probe was washed off, reused for hybridization with mouse serum albumin cDNA probe (*lower panel*).

活性については、B10 と B10.BR の間に有意な差は認められなかった。また肝臓の核内 RNA 中の C4 特異 RNA の定量の結果でも B10 と B10.BR の間の違いは、2 倍以内であった。これらの結果から、マウス血清中の C4 産生量が C4 遺伝子の転写活性の大きな違いに基づくのではなく、転写後の調節の違いが主たる

原因であることが明らかになった。マウス C4 の転写は、転写開始点から 5' 上流約 400bp の領域によって調節されていることが報告されている¹³⁾²⁴⁾²⁵⁾²⁶⁾。B10.BR から分離した C4 遺伝子の 5' 上流領域の転写活性は C4 高産系の FM マウスの C4 遺伝子に比べて決して低くはないことがわかっており²⁶⁾、本研究の結論を支

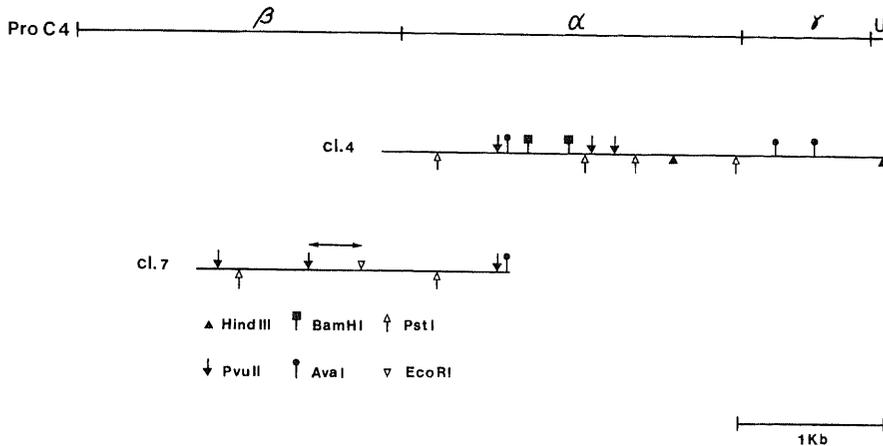


Fig. 5. Restriction map of C4 cDNA clones isolated from the cDNA library of B10.BR mouse liver. Clone 4 (Cl.4) is the longest C4 cDNA clone isolated from the liver cDNA library with the insert of 3.4kb. Clone7 (Cl.7) was the longest C4 cDNA clone isolated from the extension cDNA library. The 3' end region (0.8kb) of Cl.7 completely overlapped with the 5' end region of Cl.4 as shown by restriction mapping and by nucleotide sequence determination. Double-head arrow spanning PvuII and EcoRI sites indicates the region of inserted nucleotide sequence shown in Fig.7. In the upper part of the figure is shown the subunit structure of the precursor from of C4 (pro-C4).

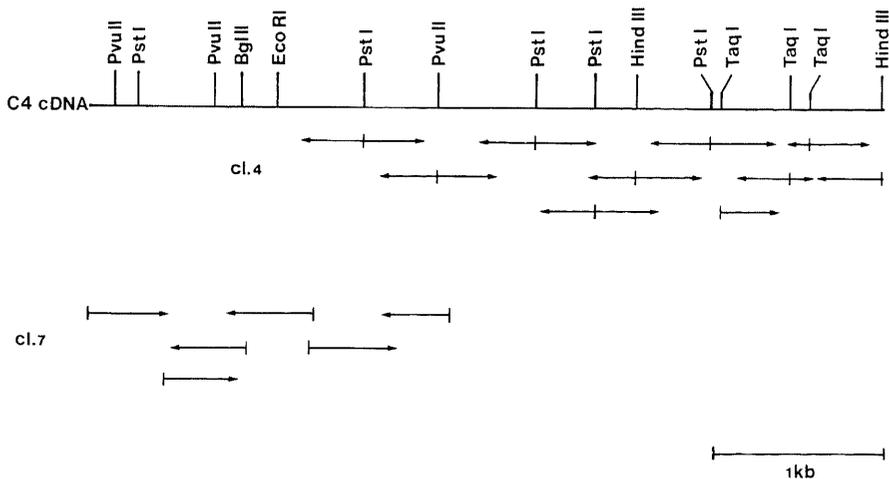


Fig. 6. DNA sequencing strategy for the nucleotide sequences of clone 4 and clone 7. Sequence determination was carried out using enzyme sites indicated. Arrows indicate the direction and length of DNA sequences determined by the dideoxy chain termination method.

持している。

B10.BR の C4 遺伝子は、C4 の主たる産生臓器である肝臓では、B10 に負けない位活発に転写されていることが示されたが B10.BR マウスの肝細胞中では C4mRNA は著しく不安定で、急速に分解されることが図 4 に示した実験によって明らかとなった。ヒストン遺伝子²⁷⁾、c-myc 遺伝子²⁸⁾の発現や、成長ホルモン、リンホカインの誘導²⁹⁾³⁰⁾が mRNA の安定性を介して

調節されていると考えられているが、補体遺伝子の産生についても同様の調節が行なわれることが、本研究によって初めて示されたことになる。

B10.BR の肝 cDNA ライブラリーからは明らかに異常な挿入配列を含む C4cDNA が分離された。この挿入配列の前半部 (塩基番号 106-232) は、B2 反復配列³¹⁾と相同性があり、それにポリ A 配列が続き、その後には明らかに C4 遺伝子のイントロン由来と思われる

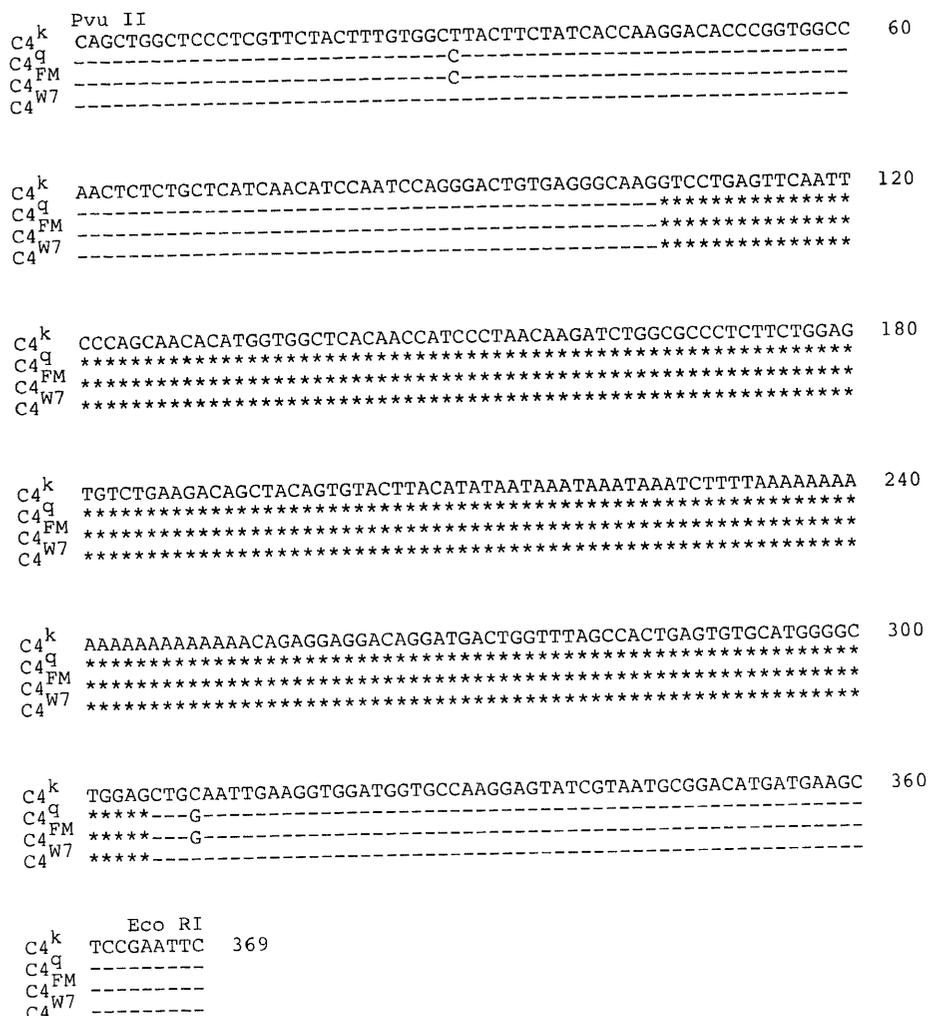


Fig. 7. Nucleotide sequence of PvuII-EcoRI sites of C4 cDNA of B10.BR mouse (C4^k). The nucleotide sequence of the PvuII-EcoRI fragment as indicated in Fig.5 was determined and compared with the sequences of the corresponding part of C4 cDNAs from DBA/1 (C4^h, C4^q), FM (C4^h, C4^{FM}) and B10.WR (C4^h, C4^{W7}). As for the sequences of these C4^h strains, only the nucleotides different from C4^k sequence are shown. Dashed line indicates an identical position and asterisk indicates the deletion introduced into the sequences to maximize the homology with the C4^k sequence.

配列が存在する。挿入配列の前端は AG, 後端は GT であって, スプライシングされずに残った配列と思われる。いずれにせよこの異常挿入配列をもつ C4mRNA には, 終止配列が何箇所にも出現しており, このような mRNA から C4 蛋白前駆体 (pro-C4) が翻訳されることはないと思われる。B10.BR マウスの血清中に存在する少量の C4 は補体活性をもつ正常の補体蛋白⁷であり, この異常 mRNA によってコードされたものである可能性はない。ただし本研究では, これまで B10.BR の肝 cDNA に含まれる C4cDNA の内, 異常挿入配列をもたない, 活性をもつ蛋白に対応する cDNA クローンは, 同定されていない。従って異常な cDNA と正常な C4cDNA との比率も不明のままである。またこの研究で同定された。またこの異常 C4mRNA が実際に不安定性なものである確率は高いが確証はない。これらの問題を解決するために, B10.BR の C4mRNA 分析を進めている。

結 論

1. C4 の高発現系 (C4^H) マウス B10 と, 低発現系 (C4^L) のマウス B10.BR の肝臓から, 全 RNA を抽出し, C4mRNA を定量したところ, C4^Hマウスの肝臓には C4^L に比べて10倍以上の多量の C4mRNA が含まれていた。一方, B10 マウスと B10.BR マウスの肝細胞遊離核を用いて転写活性を比較したところ, 有意の差は認められなかった。また B10 マウスの肝臓から核内 RNA を抽出し, 核内 C4 特異 RNA を定量したが前者に僅かに多いだけであった。

2. B10 マウスと B10.BR マウスから分離した初代肝細胞培養を用いて C4mRNA の安定性を比較した。その結果, B10.BR マウスの C4mRNA は B10 マウスの C4mRNA よりも明らかに不安定であった。

3. B10.BR マウスの肝臓 cDNA ライブラリーから C4cDNA 単離したところイントロン由来と思われる異常挿入配列をもつクローンが検出された。これらの実験成績から, C4 低産生系の B10.BR マウスの C4 遺伝子の発現が低下しているのは, 転写能力が低いためではなく, 転写以降翻訳以前のステップでの異常によることが明らかとなった。

謝 辞

稿を終えるに臨み, ご指導をいただいた高橋守信教授, 野中勝博士, 中山耕造博士を始め, がん研究所の諸先生方に感謝いたします。

文 献

1) Reid, K. B. M. & Porter, R. R.: The

proteolytic activation systems of complement. *Ann. Rev. Biochem.*, **50**, 433-464 (1981).

2) O'Neil, G. J., Yang, S. Y. & Dupont, B.: Two HLA-linked loci controlling the fourth component of human complement. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **75**, 5165-5169 (1978).

3) Fielder, A. H. L., Walport, M. J., Batchelor, J. R., Rynes, R. I., Black, C. M., Dodi, I. A. & Huges, G. R. V.: A family study of the MHC of patients with SLE Null alleles of C4A and C4B may determine the disease. *Br. Med. J.*, **186**, 425-428 (1983).

4) Fleischnick, E., Raum, D., Alasco, S. M., Gerald, P. S., Yunis, E. J., Awdeh, Z. L., Granados, J., Crigler, J. E., Giles, C. M. & Alper, C. A.: Extended MHC haplotypes in 21-hydroxylase deficiency congenital adrenal hyperplasia: shared haplotypes in unrelated patient. *Lancet*, **1**, 152-156 (1983).

5) McCluskey, J., McCann, V. J., Kay, P. H., Jilko, P. J., Christiansen, F. T., O'Neil, G. J., & Dawkins, R. L.: HLA and complement allotypes in type I (insulin dependent) diabetes. *Diabetologia*, **24**, 162-165 (1983).

6) Ochs, H. D., Rosenfeld, S. I., Thomas, D., Giblett, E. R., Alper, C. A., Dupont, B., Schaller, J. G., Gilliland, B. C., Hansen, J. A. & Wedgewood, R. J.: Linkage between the gene (or genes) controlling synthesis of the fourth component of complement and the major histocompatibility complex. *New Engl. J. Med.*, **296**, 470-473 (1977).

7) Shreffler, D. C.: MHC-linked complement components. In P. Parham & J. Strominger (eds), *Histocompatibility Antigens: Structure and Function*, 1st ed. p189-210, Chapman and Hall, London, 1982.

8) Chaplin, D. D., Woods, D. E., Whitehead, A. S., Goldberger, G., Colten, H. R. & Seidman, J. G.: Molecular map of the murine S region. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **80**, 6947-6951 (1983).

9) Shreffler, D. C.: The S region of the mouse major histocompatibility complex (H-2): genetic variation and functional role in the complement system. *Transplant. Rev.*, **32**, 140-167 (1976).

10) Ogata, R. T.: Structure and expression of

murine fourth component (C4) and sex-limited protein (Slp). *Immunol. Rev.*, **87**, 101-122 (1985).

- 11) **Chirgwin, J. M., Rzyzbyla, A. E., MacDonald, R. J. & Rutter, W. J.**: Isolation of biologically active ribonucleic acid from sources enriched in ribonuclease. *Biochemistry*, **18**, 5294-5299 (1978).
- 12) **Lehrach, H, Diamond, D., Wozney, J. M. & Boedtker, H.**: Molecular weight determinations by gel electrophoresis under denaturing conditions, a critical reexamination. *Biochemistry*, **16**, 4743-4751 (1977).
- 13) **Nonaka, M., Nakayama, K., Yu, D. -Y., Shimizu, A. & Takahashi, M.**: Molecular cloning and characterization of complementary and genomic DNA clones for mouse C4 and Slp. *Immunol. Rev.*, **87**, 81-99 (1985).
- 14) **Rigby, P. W. J., Dieckmann, M., Rhodes, C. & Berg, P.**: Labelling deoxyribonucleic acid to high specific activity in vitro by nick translation with DNA polymerase I. *J. Mol. Biol.*, **133**, 237-251 (1977).
- 15) **Marzluff, W. F. & Huang, R. C.**: Transcription of RNA in isolated nuclei. In B. D. Hames & S. J. Higgins (eds.), *Transcription and Translation, a Practical Approach*. 1st ed. p89-129, IRL press, Washington D. C., 1984.
- 16) **Berry, M. N. & Friend, D. S.**: High-yield preparation of isolated rat liver parenchymal cells. A biochemical and fine structural study. *J. Cell. Biol.*, **43**, 506-520 (1969).
- 17) **Jones, T. S. & Cole, M. D.**: Rapid cytoplasmic turnover of c-myc mRNA: Requirement of the 3' untranslated sequences. *Mol. Cell. Biol.*, **7**, 4513-4521 (1987).
- 18) **Schuler, G. D. & Cole, M. D.**: GM-CSF and oncogene mRNA stabilities are independently regulated in *trans* in a mouse monocytic tumor. *Cell*, **55**, 1115-1122 (1988).
- 19) **Okayama, H. & Berg, P.**: High efficiency cloning of full-length cDNA. *Mol. Cell. Biol.*, **2**, 161-170 (1982).
- 20) **Nonaka, M., Nakayama, K., Yu, D. -Y., & Takahashi, M.**: Complete nucleotide and derived amino acid sequences of the fourth complement of mouse complement (C4). *J. Biol. Chem.*, **260**, 10936-10943 (1985).
- 21) **Sanger, F., Nicklen, S. & Coulson, A. R.**: DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **74**, 5463-5467 (1977).
- 22) **Messing, J.**: New M13 vectors for cloning. *Meth. Enzymol.*, **101**, 20-78 (1983).
- 23) **Sepich, D. S., Noonan, D. J. & Ogata, R. T.**: Complete cDNA sequence of the fourth complement of murine complement. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **82**, 5894-5899 (1985).
- 24) **Nonaka, M., Kimura, H., Yu, D. -Y., Yokoyama, S., Nakayama, K. & Takahashi, M.**: Identification of the 5'-flanking regulatory region responsible for the difference in transcriptional control between mouse complement C4 and Slp genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **83**, 7883-7887 (1986).
- 25) **Yu, D. -Y., Nonaka, M. & Takahashi, M.**: Mapping of the transcriptional regulatory domains responsible for the difference in the promoter activity between mouse C4 and Slp (sex-limited protein) genes. *J. Immunol.*, **141**, 4381-4387 (1988).
- 26) **Nakayama, K., Nonaka, M., Yokoyama, S., Yu, D. -Y., Pattanakitsakul, S-N. & Takahashi, M.**: Recombination of two homologous MHC classIII genes of the mouse (C4 and Slp) that accounts for the loss of testosterone dependence of sex-limited protein expression. *J. Immunol.*, **138**, 620-627 (1987).
- 27) **Sittman, D. B., Graves, R. A. & Marzluff, W. F.**: Histone mRNA concentration are regulated at the level of transcription and mRNA degradation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **80**, 1849-1853 (1983).
- 28) **Blanchard, J. M., Piechazyk, M., Dani, C., Chambard, A., Franchi, J., Pouyssegur, J. & Jeanteur, P.**: c-myc gene transcribed at high rate in Go-arrested fibroblasts in post-transcriptionally regulated in response to growth factors. *Nature*, **317**, 443-445 (1985).
- 29) **Peak, I. & Axel, R.**: Glucocorticoids enhance stability of human growth hormone mRNA. *Mol. Cell. Biol.*, **7**, 1496-1507 (1987).
- 30) **Shaw, G. & Kamen, R.**: A conserved AU sequence from 3' untranslated region of GM-CSF

mRNA mediates selective mRNA degradation. Cell, 46, 659-667 (1987).

31) Krayev, A. S., Markusheva, T. V., Kramerov, D. A., Ryskov, A. P., Skryabin, K.

G., Bayev, A. A. & Georgiev, G. P.: Ubiquitous transposon-like repeats B1 and B2 of the mouse genome: B2 sequencing. Nucl. Acids Res., 10, 7461-7475 (1982).

Post-transcriptional Regulation of Complement Component C4 in C4-low Producing Mouse Sa-nga Pattanakitsakul, Department of Immunobiology, Cancer Research Institute, School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa 920—J. Juzen Med. Soc., 99, 31—41 (1990)

Key words promoter transcriptional activity, complement C4, complement deficiency, mRNA stability

Abstract

The expression of the fourth component of complement (C4) of the mouse can differ 20-fold and determined by C4-high (C4^h) or C4-low (C4^l) allele. To investigate the molecular mechanisms underlying the different expression of C4, the author compared the activity of transcription of the C4 genes between high C4 producer and low C4 producer strains of mice (B10 versus B10. BR), using nuclear transcriptional assay. The author also compared the level of C4 messenger RNA (C4 mRNA) in total RNA and C4-specific RNA in nuclear RNA of the liver. The results revealed no significant difference in the transcriptional activity between C4^h and C4^l genes. However, the steady state level of C4 mRNA are 10-fold lower in C4^l strains than in C4^h strains, suggesting that the major part of regulation of C4 plasma levels occurs at the level of post-transcription. To clarify the mechanism which contributes to the post-transcriptional regulation of C4 gene, the stability of C4 mRNA in the primary hepatocyte cultures of the C4^h and C4^l mouse strains was compared. The results obtained suggested that C4 mRNA decays much faster in the C4^l than in the C4^h mouse. Furthermore, aberrant C4 cDNA containing unspliced intron sequence of about 200bp was isolated from the cDNA library of B10. BR mouse liver.