

Molecular Mechanisms of Disorders of the Fourth Complement Component (C4) Synthesis

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/2297/8020

補体第4成分 (C4) 産生異常の分子機構

金沢大学がん研究所免疫生物部 (主任: 高橋守信教授)

中山 耕 造

(昭和63年2月4日受付)

ヒトの補体第4成分 (C4) は、C4A と C4B の2つのアイソタイプから成りたち、10~15%の高率で単独欠損が見られる。これらの欠損は、systemic lupus erythematosus (SLE) や副腎過形成症と強い連関を示す。C4欠損の約半数には、遺伝子の欠失が認められず、C4産生における調節機構の異常が欠損の原因であると考えられている。マウスには構成的に発現するC4と、テストステロンに誘導される sex-limited protein (Slp) の2つのアイソタイプが存在している。マウスC4及びSlpには、種々の発現変異種、すなわち産生異常が知られており、ヒトC4の産生異常のモデルとして重要である。本研究では、ヒトC4産生異常のモデル実験としてマウスの発現変異種の解析を行った。マウスC4の高発現系 (C4^h) と低発現系 (C4^l) との間には、血中濃度において10倍以上にも達する大きな差が生じている。この発現量の差の原因を明らかにするため、ノザンプロット及びドットプロットによるC4-mRNAの定量、核内C4-RNAの定量、chloramphenicol acetyltransferase (CAT) アッセイによる *in vitro* での、また nuclear transcription アッセイによる *in vivo* での転写活性の測定を行いC4^h とC4^l 間で比較した。その結果、転写活性にC4^h とC4^l 間で有意な差は認められないにもかかわらず、C4^h にはC4^l に比べて明らかに多量のC4-mRNAが検出された。この事より、post-transcription の段階でC4^h とC4^l の差が生じていると考えられた。またSlpは、一般にはテストステロンに誘導されるが、H-2^{w7} 等の特定の系統では構成的に発現している。H-2^{w7} におけるSlpの構成的発現の原因を明らかにするため、コスミドを用いてC4に関連した遺伝子のクローニング及び構造解析を行った。その結果、H-2^{w7} マウスはC4遺伝子を1つ、Slp遺伝子を1つ、そしてC4遺伝子とSlp遺伝子とのrecombinationの結果生じたと考えられる、5'側がC4由来、3'側がSlp由来のrecombinant遺伝子を3つ持つ事が明らかとなった。これらの3つのrecombinant遺伝子がC4由来の5'-flanking部位、すなわち遺伝子発現調節部位を持つ事が、H-2^{w7} マウスにおけるSlpの構成的発現の原因であると考えられた。

Key words promoter activity, post-transcriptional control, cosmid cloning, recombinant gene

補体系は、20種の血清タンパク質と数種のレセプターから成る生体反応系で、炎症や液性免疫のメディエーターとして生体防御において重要な役割を果たしている。補体系には、古典経路と別経路の2つの活性化反応が存在しており、補体第4成分 (C4) は、古典経路におけるC3転化酵素 (C3コンバーターゼ) の構成成分として必要な働きを行っている¹⁾。

遺伝学上C4で特に重要なのは疾患との関連である。ヒトの補体第4成分は、C4AとC4Bの2つのアイ

ソタイプから成りたっているが、正常人口の約10~15%という非常に高率でC4Aタンパク質もしくはC4Bタンパク質の単独欠損が見られる²⁾。C4A欠損は特にSystemic Lupus Erythematosus (SLE) 様の疾患と強く関連しており³⁾、C4B欠損では高頻度で21-hydroxylase (21-OH)欠損を合併し、その結果として先天性副腎過形成症となる⁴⁾。またI型の糖尿病とも強い連関を示す⁵⁾。サザンプロットによって、これらのC4欠損の遺伝子がすでに解析されている⁶⁾⁷⁾。その結

Abbreviations: DNA, deoxyribonucleic acid; RNA, ribonucleic acid; cDNA, complementary DNA; mRNA, messenger RNA; kb, kilobase (s); bp, base pair (s); cl, clone; MHC, major histocompatibility complex; Slp, sex-limited protein; SLE, systemic lupus

果, C4欠損の約半数には遺伝子の大きな欠失は認められず, C4産生における調節機構に異常をきたしていると考えられている。また C4A, C4B 共に非常に多様性に富み, 35 以上のアロタイプが同定されており⁸⁾, この多様性の生理的な意味も興味深い。

マウスの補体第4成分は構成的に発現する C4 (溶血活性を持つ) と一般にテストステロンに誘導される sex-limited protein (Slp, 溶血活性を持たない) の2つのアイソタイプから成り立っている。C4 と Slp の血中濃度を支配する要因は, 構造遺伝子と不可分に MHC の S 領域に位置しており, マウスの系統間で著しく異なっている⁹⁾。たとえば C4 の場合, 高発現系 (C4^h) と低発現系 (C4^l) が知られており, 血中濃度において 10 倍以上にも達する大きな差が生じている。ノザンプロットによる解析の結果, 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 倍以上の多量な C4-mRNA が存在している事が示され^{10)~12)}, 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る。一方 Slp の場合, 一般的なテストステロンで誘導される系統の他に, 全く発現しない系統, また構成的に発現する系統の3種の発現様式が知られている。Tosi ら¹³⁾, Levi-Strauss ら¹⁴⁾, Rosa ら¹⁵⁾はサザンプロットによる解析をおこない, ほとんどのマウスの系統では C4 遺伝子と Slp 遺伝子が1個ずつ存在しているのに対し, 構成的に Slp を発現している H-2^{w7} マウスでは, 4個もしくは5個の C4 に連関した遺伝子が存在している事を示しており, 遺伝子重複と発現様式の変化という観点で興味深い。

このような遺伝子発現調節に関する多数の変異種 (expression variant) の存在, すなわち種々の産生異常のパターンが見られる事より, マウス C4 はヒト C4 の産生異常の機構を解明するうえで極めて魅力的なモデルである。本研究はヒト C4 産生異常, さらにそれに伴う SLE 様疾患等の発症の機構を追究する第一歩として, 遺伝子発現のどのような機構の差によって C4 の高発現系と低発現系が生じているのかを明らかにする目的で, また一般にテストステロンで誘導される Slp が, なぜ特定のマウスでは構成的に発現しているのかを明らかにする目的で行われた。

材料および方法

I. 材 料

C3H.W7 (H-2^{w7}) マウスは Klein 博士, ヒト肝癌由

来 HepG2 細胞及びマウス Bf-cDNA は Colten 博士, ヒサジマアームは本庶博士, ウシ 21-ヒドロキシラーゼ (21-OH)-cDNA は藤井博士より分与された。C4 特異的及び Slp 特異的合成 DNA プローブは, 既に報告した FM 系マウスの C4-cDNA 及び Slp-cDNA の配列をもとに¹⁶⁾¹⁷⁾, 日科器 (東京) に作製を依頼した。プローブとして使用した FM 系マウスの C4 及び Slp の cDNA 及び遺伝子は既に報告している^{17)~19)}。制限酵素類は宝酒造 (京都), 東洋紡 (大阪) より, ラジオアイソトープ標識化合物はアマシャム・ジャパン (東京) より購入した。

II. ノザンプロット

Slp を発現していない B10 (H-2^b, C4^h) の雌と B10.BR (H-2^k, C4^l) の雌の肝臓から, Chirgwin らの方法²⁰⁾に従い全 RNA を抽出した。抽出した全 RNA を Lehrach らのフォルマリン法²¹⁾で電気泳動し, ニトロセルロース膜にプロットした。プローブとして FM 系マウスの C4-cDNA の 5' 端から得た EcoRI-Ava I 1.5 kb の断片をニックトランスレーション法²²⁾で標識して用いた。このプローブとニトロセルロース膜を 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, 50 mM トリス-塩酸緩衝液 (pH 7.4), 10 mM EDTA, 0.1% SDS, 100 μ g 変性サケ精子 DNA/ml 中で 65°C で反応させた。反応後, ニトロセルロース膜を 15 mM 塩化ナトリウム, 1.5 mM クエン酸ナトリウム, 0.01% 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おこなった。

III. C4^h 遺伝子の 5'-flanking 部位のクローニング

B10.BR マウスの肝高分子 DNA は Blin らの方法²³⁾に従い調製した。この高分子 DNA を BamH I で完全に消化し, 1% アガロース電気泳動によって, FM 系マウスの C4 遺伝子の 5' 端から得た Pst I-BamH I 1.5 kb の断片 (5' プローブ) と反応する 3 kb と 1.8 kb の2つの分画を分取し, λ -ファージ由来のヒサジマアームと結合した。in vitro パッケージング後, LE 392 に感染させプレートに撒いた。スクリーニングは Benton-Davis の方法²⁴⁾に従い, 前述の 5' プローブを用いておこなった。

IV. chloramphenicol acetyltransferase (CAT) アッセイ

CAT アッセイは Gorman らの方法²⁵⁾に従って行った。FM 系マウスの C4 遺伝子及び前述の B10.BR マ

erythematosus; 21-OH, 21-hydroxylase; SDS, sodium dodecyl sulfate; EDTA, ethylenediamine tetraacetic acid; CAT, chloramphenicol acetyltransferase; TLC, thin layer chromatography.

ウスの C4 遺伝子の 5' 非翻訳領域から上流 1.8 kb の配列を含む DNA 断片を、Hind III リンカーを用いて、pSVOCAT ベクターの Hind III サイトにクローニングした。この DNA 20 μ g をリン酸カルシウム法で 5×10^6 個のヒト肝臓由来 HepG2 細胞に導入した。導入の効率を上げるため、25%グリセロールで 1 分間処理し、48 時間後に細胞を集め超音波処理によってライセートとした。このライセートのタンパク質濃度をバイオラボ社の定量キットで定量した。タンパク量に換算して 100 μ g のライセートを含む 120 μ l の反応液 (0.25 M トリス-塩酸緩衝液, pH 7.0, 1 μ Cl¹⁴C-クロラムフェニコール, 4 mM アセチル CoA) 中で 37°C, 30 分間反応を行い、酢酸エチルで抽出した。アセチル化されたクロラムフェニコールの検出は、抽出液を TLC プレートで展開 (展開液はエタノール:クロロホルム = 5:95) し、オートラジオグラフィーで行った。

V. Nuclear transcription (run-on) アッセイ

Slp を発現していない B10 マウスの雌及び B10.BR マウスの雌の肝臓から、Marzluff らの方法²⁶⁾に従って核を単離した。反応は 70 mM 塩化カリウム, 6 mM マグネシウム, 0.5 mM ATP, 0.5 mM GTP, 0.5 mM CTP, 0.01 mM ³²P-UTP 中で 25°C 30 分間おこなった。その後半量のフェノール及び CIAA (クロロホルム:イソアミルアルコール=20:1) を加え、65°C で 5 分間放置し、さらに水中で 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 1 ml の Sephadex G-50 カラムでゲルろ過し、遊離のヌクレオチドを除いた。10 μ g の C4-cDNA, C3-cDNA, pBR322 の DNA を 0.4 N 水酸化ナトリウム溶液中で変性させ、ニトロセルロース膜にドットブロットを行い、ラベルした RNA と、50%ホルムアミド, 0.75 M 塩化ナトリウム, 75 mM クエン酸ナトリウム, 0.1% SDS, 1 mM EDTA, 10 mM トリス-塩酸緩衝液 (pH 7.4), 2 μ g 熱変性サケ精子 DNA/ml 中で、52°C, 12 時間反応させた。反応後、ニトロセルロース膜を 0.15 M 塩化ナトリウム, 15 mM 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、-70°C でオートラジオグラフィーを行った。

VI. ドットブロットによる RNA の定量

肝臓からの核の単離は、前述の nuclear transcription アッセイと同様に行った。全 RNA の抽出はノザンブロットの項で既に述べた。抽出した RNA を 10 倍量の 3 M 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ス膜上にスポットした。使用したプローブ及び反応の条件はノザンブロットと同様である。

VII. コスミドライブラリーの作製及びスクリーニング

高分子 DNA は Blin らの方法²³⁾に従い、C3H.W7 (H-2^{w7}) マウスの肝臓より調製した。この肝高分子 DNA を Taq I で部分的に消化し、0.3%アガロース電気泳動で 35~50 kb の断片を分取して 2.5 μ g をインサートとして使用した。selfligation を防ぐため、pJB8 コスミドベクターを Ava I, もしくは Pvu II で消化し、アルカリホスファターゼ処理で脱リン後、Cla I でさらに消化し、3 kb と 5 kb の 2 種類のアームを調製しインサートと結合した。その後 in vitro パッケージングを行い、490A に感染させ 30 μ g/ml のアンピシリンを含む LB プレート上のニトロセルロース膜に撒いた。その結果、25 万の独立したコロニーが得られた。スクリーニングは Hanahan-Meselson の方法²⁷⁾に従って行った。プローブとして FM 系マウスの C4 遺伝子の 5' 端から得た Pst I-BamH I 1.5 kb の断片 (5' プローブ) と、FM 系マウスの Slp-cDNA の 3' 端から得た Pst I-Hind III 1.0 kb 断片 (3' プローブ) をニックトランスレーション法²²⁾で標識して使用した。ハイブリダイズの条件は、ノザンブロットと同様である。なおコスミド DNA の単離は、Grosveld らの方法²⁸⁾に従った。

VIII. サザンブロット

Southern の方法²⁹⁾に従い、DNA を制限酵素で消化後、アガロース電気泳動によって DNA 断片を分離し、ニトロセルロース膜にブロットした。ニックトランスレーション法²²⁾によって標識したプローブによるハイブリダイズは、ノザンブロットと同様な条件でおこなった。合成ポリヌクレオチドプローブは、ポリヌクレオチドキナーゼを用いて 5' 端を ³²P で標識し使用した。ハイブリダイズはノザンブロットの項で述べた反応液中で、40°C, 15 時間おこない、その後 0.9 M 塩化ナトリウム, 90 mM クエン酸ナトリウム, 1% SDS 溶液中で 50°C, 30 分間 3 回洗い、-70°C でオートラジオグラフィーを行った。

IX. DNA 塩基配列の決定

Sanger らが開発し³⁰⁾, 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³¹⁾で行った。すべての配列に関して両鎖とも塩基配列を決定した。

成 績

I. C4^b 遺伝子と C4ⁱ 遺伝子の発現における, post-transcriptional control

1. C4^b マウスと C4ⁱ マウスの肝臓の全 RNA のノザンブロットによる解析

B10 マウス (H-2^b, C4^b) と B10.BR マウス (H-2^k,

C4^h)の肝臓から全RNAを抽出し、ノザンブロットを行った。その結果、C4^hマウス、C4^lマウス共に5.4 kbのC4-mRNAを認めた(図1)。その他の、たとえばスプライシングの途中の高分子C4-RNA等は検出されなかった。しかしながら、C4-mRNAの量は明らかにC4^hの方がC4^lに比較して多かった。図1においてC4^h、C4^l共にレーン1には22 μ gの、レーン2には8 μ gの、レーン3には2 μ gの全RNAを泳動している。図の左側はC4-cDNAをプローブとして使用した結果を、右側はC4-cDNAプローブでハイブリダイズした後、100°Cの10 mM トリス-塩酸緩衝液(pH 7.4)で膜を2回洗うことによりC4-cDNAプローブを除き、さらにインターナルコントロールとして、マウスの系統間で発現量に差のない血清アルブミンのcDNAをプローブとしてハイブリダイズした結果を示している。マウスの系統間で発現量に差の無い血清アルブミンのcDNAをプローブとして使用した場合、C4^hマウス、C4^lマウス共にほぼ同量の血清アルブミンmRNAを検出する事ができ、この実験においてトランスファ等技術的な問題は無いと考える事ができる。ところが、C4-cDNAをプローブとした場合には、明らかに、C4^hの方に多量のC4-mRNAを検出する事ができた。C4^hのレーン3には2 μ gの全RNAを、C4^lのレーン1には22 μ gの全RNAを泳動しているものでその差は10倍以上あると考えられた。

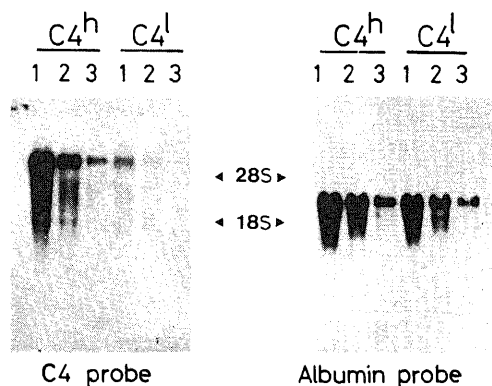


Fig.1. Northern blot analysis of total RNAs isolated from C4^h mouse liver and C4^l mouse liver. Different amounts of total RNAs isolated from B10 mouse (C4^h) liver and B10.BR mouse (C4^l) liver —22 μ g (lane 1), 8 μ g (lane 2), 2 μ g (lane 3) —were processed for Northern blotting. The same filter was screened subsequently with a C4-cDNA probe (left) and a Serum Albumin-cDNA probe (right). Migration distances of 28S (4.2 kb) and 18S (2.0 kb) ribosomal RNAs were indicated.

2. CAT アッセイによる C4^h 遺伝子と C4^l 遺伝子のプロモーター活性の比較

著者らは既に FM 系マウスを用いて、C4 遺伝子の主な転写調節部位はその 5'-flanking 部位に存在している事を示している³²⁾。よって、C4^h 遺伝子と C4^l 遺伝子の発現量の差は、5'-flanking 部位のプロモーター活性の差によって生じているのではないかと考え、CAT アッセイをおこなった。FM 系マウス (C4^h) 及び B10.BR マウス (C4^l) の C4 遺伝子の 5'-flanking 部位の断片を pSVOCAT ベクターにクローニングし、HepG2 細胞に導入して、一過性の発現量を定量した。その結果、図2に示したように、C4^h の方が C4^l よりもやや強いプロモーター活性を示す傾向が見られたが、インターナルコントロールが無いため、この差が有意であるかどうかは結論できなかった。しかしながら、血中濃度や mRNA 量の差を説明できるほどのプロモーター活性の差は無いと考えられ、次の実験をおこなった。

3. Nuclear transcription (run-on) アッセイによる in vivo での転写活性の測定

CAT アッセイはインターナルコントロールが取れない事及び 5'-flanking 部位以外にも遺伝子発現調節部位が存在する可能性を否定できない事より、in vivo での転写活性をどの程度反映しているのか疑問が残る。そこで、より直接的に in vivo での転写活性を測定するため、B10 マウス (C4^h) と B10.BR マウス (C4^l) の肝臓より核を単離し nuclear transcription アッセイを行った。ネガティブコントロールとして pBR322、インターナルコントロールとしてマウスの系統間で発現量に差の見られない C3 も合わせて測定した。図3に示したように、C4^h マウス、C4^l マウスの C4 遺伝子及び C3 遺伝子の転写量はほぼ同程度であった。すなわち、C4 遺伝子の転写活性において、C4^h 遺伝子と C4^l 遺伝子で大きな差は無い事が明らかとなった。

4. 核内 RNA と全 RNA 中の C4-RNA の定量

C4^h 遺伝子と C4^l 遺伝子間で転写活性に大きな差が認められないという nuclear transcription アッセイの結果をより明確にするため、C4^h マウスと C4^l マウスの肝臓から核を単離し、核内の RNA を抽出、その後ドットプロットを行い C4-RNA を定量した。また、全 RNA のドットプロットも合わせて行い、C4-mRNA を定量した。図4上部は C4-cDNA をプローブとして使用した結果を、下部には 100°C の 10 mM トリス-塩酸緩衝液 (pH 7.4) で膜を洗うことにより C4-cDNA プローブを除き、さらにインターナルコントロールとしてマウスの系統間で発現量に差の無い血清

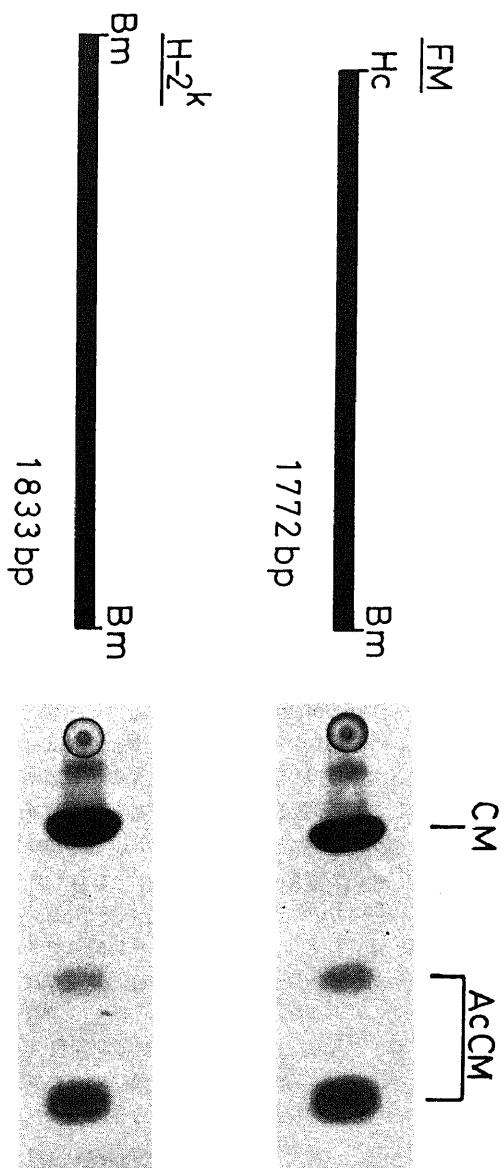


Fig. 2. Expression of CAT activities in HepG2 cells transfected with recombinant plasmids containing 5'-flanking fragments of the C4^h and C4ⁱ genes. (Left) Schematic representation of C4^h (FM mouse) and C4ⁱ (B10.BR mouse, H-2^k) gene. The 5'-flanking fragments of C4^h gene (1772bp) and C4ⁱ gene (1833bp) were subcloned into pSVOCAT. HepG2 cells were transfected with these recombinant plasmid and were used to assay for transcriptional activity. Restriction enzyme sites used were as follows: Bm, BamHI; Hc, HincII. (Right) Autoradiogram shows the conversion of chloramphenicol (CM) to its acetylated product (AcCM).

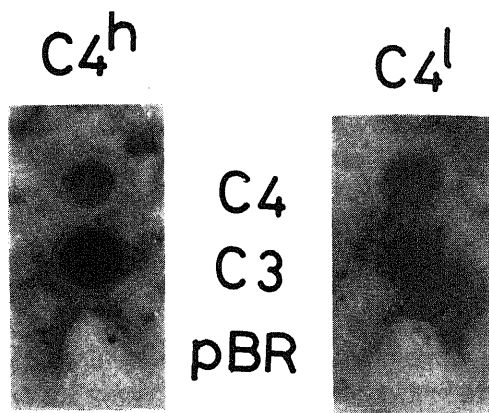


Fig. 3. Analysis of the C4 transcription rate of C4^h mouse and C4ⁱ mouse. Nuclear transcription assay with ³²P-labeled RNAs obtained from isolated nuclei prepared from B10 mouse (C4^h) liver (left) and B10.BR mouse (C4ⁱ) liver (right) were performed. Equal amounts of labeled RNAs (10⁶ dpm) were hybridized to nitrocellulose filters containing 10 μ g of C4-cDNA, C3-cDNA (internal control), pBR 322 plasmid DNA (negative control).

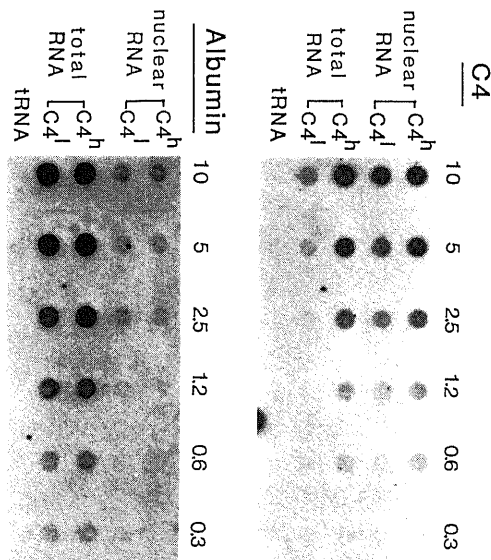


Fig. 4. Dot blot analysis of total RNAs and nuclear RNAs isolated from C4^h mouse liver and C4ⁱ mouse liver. Different amounts of total RNAs and nuclear RNAs isolated from B10 mouse (C4^h) liver and B10.BR mouse (C4ⁱ) liver: 10 μ g, 5 μ g, 2.5 μ g, 1.2 μ g, 0.6 μ g, 0.3 μ g, were spotted on nitrocellulose filter. The same filter was screened subsequently with a C4-cDNA probe (upper) and a Serum Albumin-cDNA probe (lower).

アルブミン cDNA をプローブとして使用した結果を示している。血清アルブミン cDNA をプローブとして使用した場合、核内 RNA、全 RNA 共に C4^h マウスと C4ⁱ マウス間で差が見られなかった。従ってほぼ同量の核内 RNA 及び全 RNA をドットしていると考ええる事ができた。C4-cDNA をプローブとした場合、全 RNA において明らかに C4^h マウスの方に多量の C4-mRNA を検出する量が見えた。10 μ g の C4ⁱ の全 RNA 中の C4-mRNA は 1.2 μ g から 0.6 μ g の C4^h の全 RNA 中の C4-mRNA に相当し、その差は 8 倍から 16 倍程度であった。この結果は前述のノザンプロットの結果と一致した。ところが核内の RNA 中の C4-RNA には、このような大きな差は見られず、2 倍程度 C4^h の方が多いだけであった。

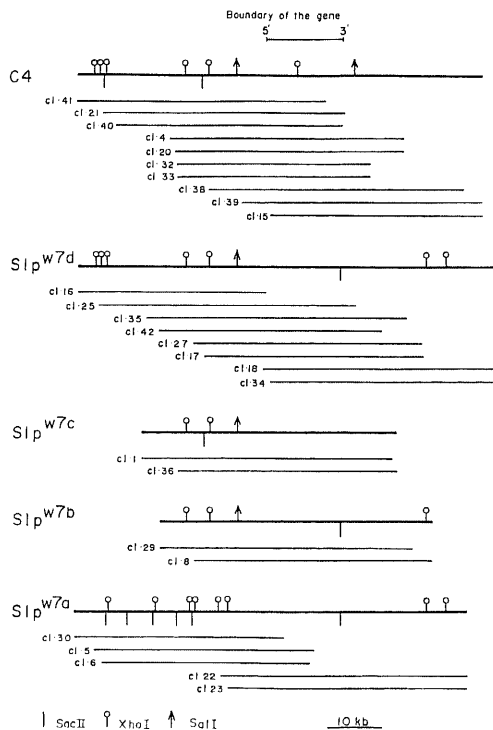


Fig. 5. Molecular maps of 27 overlapping cosmid clones containing five C4-related genes of the H-2^{W7} mouse. The 27 cosmid clones were divided into five groups according to the size of hybridizing fragment and the restriction maps were assembled using restriction enzymes, Sal I, Sac II, and Xho I. These five groups of cosmid clones are designated as containing the C4 gene and the Slp genes (Slp^{w7a}, Slp^{w7b}, Slp^{w7c}, Slp^{w7d}) on the basis of the results of Southern hybridization using the C4-specific and Slp-specific probes as shown in Figure. 6.

II. 構成的に Slp を発現している C3H.W7 マウスのコスミドクローニングによる解析

1. C4 及び Slp 遺伝子の単離

C3H.W7 マウスのコスミドライブラリーをスクリーニングした結果、41 のクローンを得た。このうち 5' プローブと反応する 27 クローンについて制限酵素地図の作成、サザンプロットによる解析を行い、27 クローンを 5 つのグループに分ける事ができた (図 5)。

2. 単離した遺伝子の同定

C4 と Slp は、全体的に非常に高い相同性があるが、CIS 切断部位では著しく塩基配列が異なっている¹⁶⁾¹⁷⁾。この著しい塩基配列の相違に従って合成された C4 特異的及び Slp 特異的オリゴヌクレオチドプローブ (図 6 の上部に配列を示す) を用いてサザンプロットを行い、これらの 5 つの遺伝子が、C4 であるのか Slp であるのかを調べた。前述の 5 つのグループから 1 つずつコスミドクローンを選び (cl.1, cl.4, cl.8,

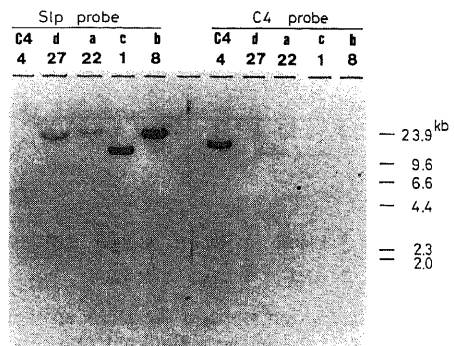
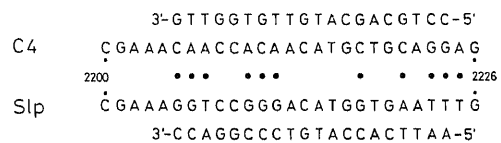


Fig. 6. Southern blot hybridization with the synthetic C4-specific and Slp-specific oligonucleotides. The nucleotide sequences of the C4-specific and Slp-specific probes and their complementary strands are shown at the upper part of the figure. Closed circles indicate nucleotide differences between C4 and Slp sequences. In the lower part of the figure was shown the autoradiogram of the Southern blot analysis using the C4-specific probe (right side) or the Slp-specific probe (left side). The result of experiment using cosmid clone 1 (representing Slp^{w7c}), clone 4 (C4^{w7}), clone 8 (Slp^{w7b}), clone 22 (Slp^{w7a}), and clone 27 (Slp^{w7d}) were shown in this figure.

cl.22, cl.27) Hind IIIで消化しサザンブロットを行った。その結果1つのクローンのみがC4プローブと反応し、他の4つはSlpプローブとのみ反応した(図6)。この結果に従って、C4プローブと反応した遺伝子をC4^{W7}、Slpプローブと反応した遺伝子をそれぞれSlp^{W7a}, Slp^{W7b}, Slp^{W7c}, Slp^{W7d}と名付ける事にした。これらのコスミドクローンをBamH Iで消化後、5'プローブを使用してサザンブロットを行ったところ、5つのグループにおいてそれぞれ4.2 kb (C4^{W7}), 4.1 kb (Slp^{W7d}), 2.9 kb (Slp^{W7a}), 2.7 kb (Slp^{W7c}), 1.9 kb (Slp^{W7b})の1本のパンドが検出された(図7中に太い矢印で示す)。肝臓の高分子DNAをBamH Iで

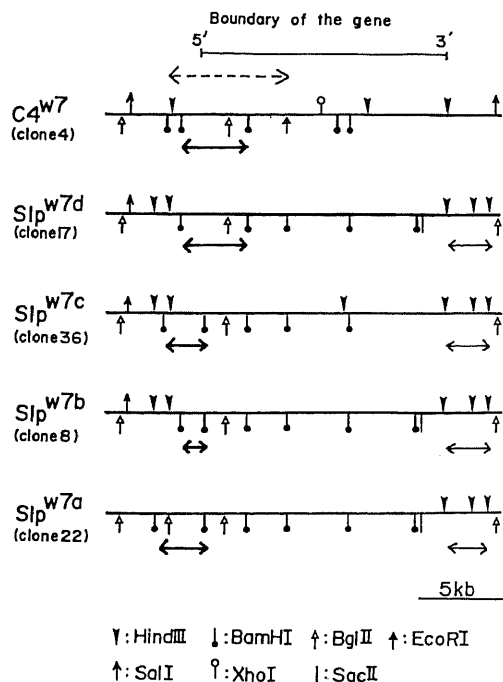


Fig. 7. Restriction maps of the DNA spanning the coding region and the 5'-flanking region of five C4-related genes of the H-2^{W7} mouse. The subclons containing five C4-related genes were characterized by digestion with the indicated restriction enzymes. The horizontal thick arrows under the genes indicated the polymorphic DNA segments hybridizing with the 5' end probe. The horizontal thin arrows indicated the 3' end segments containing the characteristic Hind III site. Horizontal dotted arrow over the C4^{W7} gene indicates an approximate location of the recombination site which was inferred from a unique Bgl II site in the 5'-end region of the Slp^{W7a} gene and a unique EcoR I site in the central region of the C4 gene.

消化し、サザンブロットを行ったところ、前述と同様な4.2 kb, 4.1 kb, 2.9 kb, 2.7 kb, 1.9 kbの5本のパンドが検出され、C3H.W7マウスには5つのC4に関連した遺伝子が存在し、それをすべて単離できた事が明らかとなった。

3. 詳細な制限酵素地図による解析

遺伝子の全体像を明らかにするため、cl.4 (C4^{W7}), Cl.22 (Slp^{W7a}), Cl.8 (Slp^{W7b}), cl.36 (Slp^{W7c}), cl.17 (Slp^{W7d})からEcoR Iで遺伝子部分を切り出し、pUC 19ベクターにサブクローニング後、詳細な制限酵素地図を作成した(図7)。その結果3'側はFM系マウスのSlp遺伝子にも見られる3つのHind IIIサイト(図7中に細い矢印で示す)が、Slp^{W7a}, Slp^{W7b}, Slp^{W7c}, Slp^{W7d}には共通して存在しているが、C4^{W7}には1つのサイトしか存在しない事、またFM系マウスのC4遺

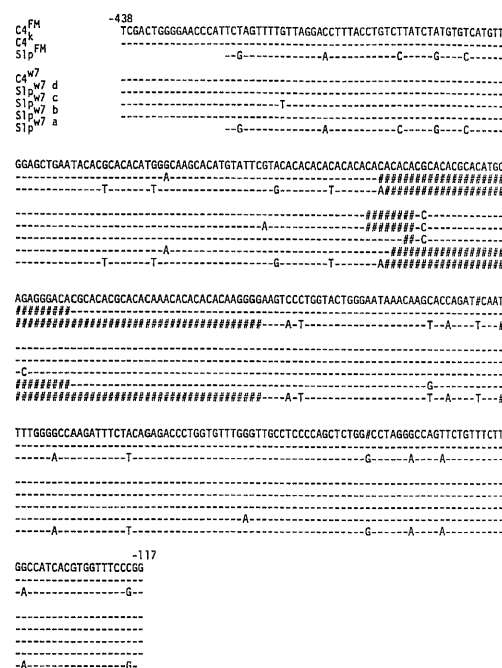


Fig. 8. DNA sequences of the 5'-flanking divergent region of the C4 and Slp genes of FM (H-2^d), B10.BR (H-2^k) and C3H.W7 (H-2^{W7}) strains. The nucleotide number of the C4^{FM} gene is presented at left side and all the other sequences are aligned with the C4^{FM} sequence. Nucleotide residues presented in the sequences are those of other gene sequences that are different from the C4^{FM} sequence. Dash indicate the positions where the sequence is the same as the C4^{FM}. # indicated the deletion introduced into the sequence to maximize the homology with the C4^{FM} sequence.

伝子に見られる EcoR I サイト, Xho I サイトが C4^{W7} のみに存在し, 他の4つの遺伝子には見られない事が明らかとなった。従って3'側において C4^{W7} のみがユニークであり, 他の4つの遺伝子は類似した構造を持つと考えられた。ところが5'側においては C4^{W7}, SIp^{W7b}, SIp^{W7c}, SIp^{W7d} には共通した Hind III サイト及び Sal I サイトが見られたが, SIp^{W7a} には見られず, SIp^{W7a} のみがユニークであった。つまり SIp^{W7b}, SIp^{W7c}, SIp^{W7d} の3つの遺伝子は C4^{W7} に類似した5'部分及び SIp^{W7a} に類似した3'部分を持つ, ハイブリッド様構造をとっている遺伝子である事が明らかとなった。

4. 5'-flanking 部位の塩基配列の決定

前述のハイブリッド様構造を持つ3つの遺伝子の構造をより詳細に解析するため, 5'-flanking 部位の塩基配列を部分的に決定した。既に報告しているように³²⁾, FM系マウスの C4 遺伝子及び SIp 遺伝子間で5'-flanking 部位にも非常に高い相同性 (95%) が認められるが, 開始コドンから約300 bp 上流に著しい相違が見られる。よって5つの遺伝子についてこの部位の塩基配列を決定した。合わせて B10.BR (H-2^k) の C4 遺伝子 (C4^k) の塩基配列も決定し, 比較した。図8に示したように FM系マウスの C4 (C4^{FM}) と SIp (Slp^{FM}) とを比較したところ, 322 bp 中22塩基の置換及び CA

を基本とした繰り返し構造中に SIp^{FM} に特徴的な60 bp の大きな欠失が見られる。得られた5つの遺伝子の配列をこれらと比較したところ, SIp^{FM} と SIp^{W7a} は完全に一致した。一方他の4つの遺伝子は明らかに, C4^{FM} に類似していた。C4^{W7} は, C4^{FM} に比べ8 bp の欠失が認められたが, 塩基置換はわずか1 bp しか見られなかった。Slp^{W7b} と C4^{FM} を比較すると, SIp^{W7b} に28 bp の欠失が認められたが, 塩基置換は1 bp しか見られなかった。Slp^{W7c} と C4^{FM} を比較すると, SIp^{W7c} に2 bp の欠失及び3 bp の塩基置換が認められただけであった。Slp^{W7d} と C4^{FM} を比較したところ, 8 bp の欠失が SIp^{W7d} に認められたが, 塩基置換は2 bp のみであった。従って前述の3つのハイブリッド様構造を持つ遺伝子 (Slp^{W7b}, SIp^{W7c}, SIp^{W7d}) の5'-flanking 部位は C4 遺伝子由来であると考えられる。

考 察

C4^h マウスと C4ⁱ マウスの肝臓から全 RNA を抽出し C4-mRNA を定量したところ, 既に報告されている結果^{10)~12)}と一致して, C4^h に C4ⁱ に比べ約10倍以上の多量な mRNA が検出された。このように mRNA 量が C4 の血中濃度の差を反映している事は, C4^h と C4ⁱ の差が翻訳以前の段階で生じている事を示している。次に転写活性を比較したところ, C4^h と C4ⁱ 間で有

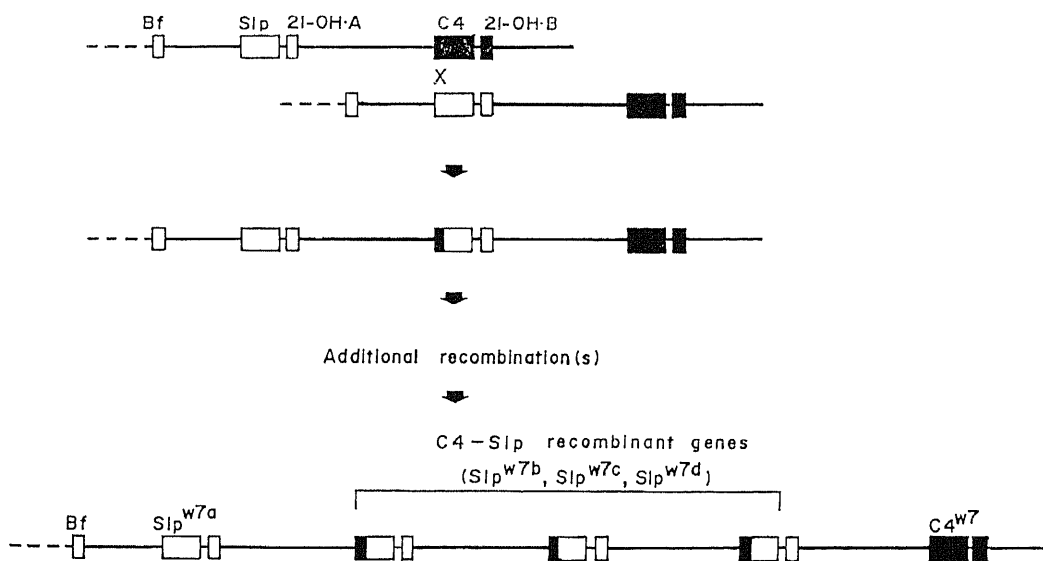


Fig. 9. Model describing unequal cross-over between two homologous chromosomes resulting in the recombination of the C4 and SIp gene in the H-2^{W7} mouse. X indicates a proposed region of cross-over probably located in the 5'-end region of the genes, although the precise site of recombination was not determined. Additional unequal cross-overs may have occurred in the limited region resulting in the multiplication of the recombinant C4-SIp genes.

意な差は認められなかった。また肝臓の核内 RNA を定量し比較したところ、2 倍程度の差が認められただけであった。この 2 倍程度の量の差が、どの程度転写活性の差を反映しているのかは現在のところ明確ではない。しかしながら現在まで考えられていたような転写活性の大きな差^{11)~13)}が無い事は明らかであり、post-transcriptional コントロールがこの問題で重要な役割を演じていると結論することができた。Hemenway らは、Slp を全く発現していない H-2^d (C4^b) マウスの雌、H-2^k (C4^d) マウスの雌、そして H-2^{w7} マウスの雌を使用し、DNase I 感受性部位を検出している³⁹⁾。その結果、C4 遺伝子の 5'-flanking 部位に 4 ケ所の感受性部位が存在している事を明らかにした。その部位の感受性は、H-2^d (C4^b) マウスと H-2^k (C4^d) マウスでは同程度の強さであり、H-2^{w7} マウスではこれらに比べて数倍程度強かった。この事は、C4^b と C4^d 間で転写活性に有意な差が無い事を、さらに後述するように、H-2^{w7} マウスには C4 由来の 5'-flanking 部位を持つ recombinant 遺伝子が 3 つ存在し、そのうちのいくつかが発現している事を支持していると考えられる。では post-transcription のどの段階で C4^b と C4^d の差が生じているかという問題であるが、現在のところ、ヒストン遺伝子³⁴⁾や c-myc 遺伝子³⁵⁾の発現及び成長ホルモンの誘導³⁶⁾やリンホカインの誘導³⁷⁾等が、mRNA の安定性を介して調節されていると考えられている。また、MHC のクラス I 遺伝子の発現は、核内 RNA の分解の程度によって調節されていると考えられている³⁸⁾。これ以外に RNA のスプライシングの段階での調節も考えられる。もし C4^b と C4^d において RNA スプライシングの段階で差が生じているならば、全 RNA のノザンプロットにおいてスプライシングの途中の高分子 C4-RNA が検出されるはずであるが、図 1 に示したようにそのような高分子 C4-RNA は検出できない。また、核内 C4-RNA 量の差は 2 倍程度しか認められない事より、核内での C4-RNA の分解に大きな差は生じていないと思われる。以上の事より、C4-mRNA の安定性の差が、C4^b と C4^d の発現量の差の原因である可能性が高いと思われるが、この点は今後の問題である。

コスミドを用いて C3H.W7 (H-2^{w7}) マウスの C4 遺伝子及び Slp 遺伝子の構造解析を行った。その結果、C3H.W7 マウスは C4 遺伝子を 1 つ (C4^{w7})、Slp 遺伝子を 1 つ (Slp^{w7a})、そして C4^{w7} に類似した 5' 部分及び Slp^{w7a} に類似した 3' 部分を持つハイブリッド様構造の遺伝子を 3 つ (Slp^{w7b}, Slp^{w7c}, Slp^{w7d}) 持つ事が明らかとなった。このようなハイブリッド様構造は、3 つの遺伝子 (Slp^{w7b}, Slp^{w7c}, Slp^{w7d}) が C4 遺伝子と

Slp 遺伝子との recombination の結果生じた recombinant 遺伝子だと考えれば説明する事ができる。recombination は、図 7 上部に破線の矢印で示した Slp^{w7a} に特異的な Bgl II サイトから C4^{w7} に特異的な EcoRI サイトの間で起こったと考えられた。実際、図 8 に示したようにハイブリッド様構造を持つ 3 つの遺伝子は C4 由来と考えられる 5'-flanking 部位を持っている。また既に発表されている H-2^{w7} の C4-cDNA³⁹⁾ と Slp-cDNA (Slp^{w7.1})⁴⁰⁾ の塩基配列を比較すると、翻訳開始のメチオニンから 163 番目のロイシンまでは完全に一致している。ところが、それ以降では 4 % 程度の置換が見られ、Slp^{w7.1} が recombinant 遺伝子由来である事を示唆している。図 9 のモデルは recombinant 遺伝子が生じて来た過程を示している。まず、不対接合の結果不等交叉が起こり、5' 側が黒で示した C4 由来、3' 側が白で示した Slp 由来の recombinant 遺伝子が生じた。同様な不等交叉がさらに起こり、最終的に 3 つの recombinant 遺伝子が生じたというモデルである。このモデルによると、典型的な Slp である Slp^{w7a} が最も 5' 側に位置し、また 3 つの recombinant 遺伝子はその 3' 側に 21-OH 遺伝子を伴う事になる。事実、Bf-cDNA を用いたサザンプロットにより、Slp^{w7a} 遺伝子の上流約 40 kb に Bf 遺伝子が存在している事を確認することができた。また、21-OH-cDNA を用いたサザンプロットにより、5 つの遺伝子はすべてその 3' 側に 21-OH 遺伝子を伴っている事が確認できた。これらの結果はこのモデルを支持していると考えられる。

著者らは既に FM 系マウスを用いて、C4 遺伝子と Slp 遺伝子の発現様式の相違は 5'-flanking 部位にある事、すなわち C4 遺伝子の 5'-flanking 部位には構成的な転写活性が見られるが、Slp 遺伝子には活性が認められない事を示している³²⁾。従って、これら 3 つの recombinant 遺伝子が機能的な C4 由来の 5'-flanking 部位を持つ事が H-2^{w7} マウスにおける構成的な Slp 遺伝子の発現の原因、つまり 3 つの recombinant 遺伝子のうち、少なくとも 1 つは C4 様の発現をしていると結論する事ができる。実際に Slp^{w7a}, Slp^{w7b}, Slp^{w7c} の 5'-flanking 部位を pSVOCAT ベクターに組み込み、ヒト肝癌由来 HepG2 細胞に導入して CAT アッセイを行ったところ、典型的な Slp である Slp^{w7a} では全く転写活性が検出されないのに対し、recombinant 遺伝子である Slp^{w7b}, Slp^{w7c} では構成的な転写活性が認められた。前述の結論をさらに支持する結果として Ogata らは cDNA の解析より、H-2^{w7} マウスでは少なくとも 2 種類の Slp-mRNA が発現している事を示している⁴⁰⁾⁴¹⁾。彼らが Slp^{w7.1} と呼んでいる cDNA は、CAP サイトのすぐ 3' 側に BamH I サ

イトを持つ事及び Hinc II サイトを持たない事より, SIp^{W7b} もしくは SIp^{W7c} のいずれかの遺伝子に対応すると考えられ, 少なくとも SIp^{W7b}, SIp^{W7c} のうちの一方の mRNA が肝臓で発現していると考えられる。また, Robins らは H-2^{W7} マウスから C4 遺伝子を1つ, SIp 遺伝子を3つ単離し, L 細胞に導入している⁴²⁾。その結果 C4 遺伝子と2つの SIp 遺伝子を導入した細胞は, C4 もしくは SIp を分泌するようになった。これらの結果は少なくとも2種の SIp 遺伝子が発現している事を示しており, 今回の結果を強く支持していると思われる。

結 論

1. C4 の高発現系 (C4^h) と低発現系 (C4^l) のマウスの肝臓から全 RNA を抽出し, C4-mRNA を定量したところ, 血中濃度を反映し C4^h に C4^l に比べて10倍以上多量の C4-mRNA を検出した。

2. CAT アッセイ, nuclear transcription (run-on) アッセイを行い, 転写活性を測定して C4^h と C4^l で比較したところ, 有意な差は認められなかった。

3. C4^h マウスと C4^l マウスの肝臓から核内 RNA を抽出し, 核内 C4-RNA を定量比較した。その結果 C4^h に C4^l に比べて約2倍量の C4-RNA を検出したが, とても血中濃度や mRNA 量の差を説明できる程の差ではなかった。

4. SIp を構成的に発現している発現変異種 C3H.W7 (H-2^{W7}) マウスから, 5つの C4 に連鎖した遺伝子を, コスミドを用いて, クローニングした。

5. 得られたコスミドクローンの解析の結果, H-2^{W7} マウスは C4 遺伝子を1つ, SIp 遺伝子を1つ, そして C4 遺伝子と SIp 遺伝子の recombination の結果生じたと考えられる, 5' 側が C4 由来, 3' 側が SIp 由来の recombinant 遺伝子を3つ持つ事が明らかとなった。

C4^h と C4^l の比較において, 転写活性に大きな差が無いにもかかわらず, C4-mRNA 量に10倍程度の大きな差が生じている事より, C4^h と C4^l の C4 発現量の差は post-transcriptional なコントロールの段階で生じていると考えられた。また, H-2^{W7} マウスは3つの5'側が C4 由来, 3' 側が SIp 由来の recombinant 遺伝子を持っており, これらのうち少なくとも1つは, 機能的な C4 由来の 5'-flanking 部位 (遺伝子発現調節部位) を持つ事が, H-2^{W7} マウスにおける SIp の構成的発現の原因であると考え事ができた。

謝 辞

稿を終えるに臨み, 御指導, 御校閲を賜った高橋守信教授

に深く感謝いたします。また御指導を賜った野中勝博士, 御教示を頂いた山本健一教授ならびに免疫生物部各位に深く感謝いたします。

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'Neill, 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. & Hughes, 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*, **i**, 152-156 (1983).
- 5) McCluskey, J., McCann, V. J., Kay, P. H., Zilko, P. J., Christiansen, F. T., O'Neill, G. J., & Dawkins, R. L.: HLA and complement allotypes in type I (insulin dependent) diabetes. *Diabetologia*, **24**, 162-165 (1983).
- 6) Carroll, M. C., Palsdottir, A., Belt, K. T. & Poter, R. R.: Deletion of complement C4 and steroid 21-hydroxylase genes in the HLA class III region. *EMBO J.*, **4**, 2547-2552 (1985).
- 7) Carroll, M. C., Belt, K. T., Palsdottir, A. & Yu, Y.: Molecular genetics of the fourth component of human complement and steroid 21-Hydroxylase. *Immunol. Rev.*, **87**, 39-60 (1985).
- 8) Mauff, G., Alper, C. A., Awdeh, Z., Bachelor, J. R., Bertrams, J., Braun-Petersen, G., Dawkins, R., Démant, P., Edwards, J., Grosse-Wilde, H., Hauptmann, G., Klonda, P., Lamm, L., Mullenhauer, E., Nerl, C., Olaisen, B., O'Neill, G., Rittner, C., Roos, M., Skanes, V., Teisberg, P. & Wells, L.: Statement on the nomenclature of human C4 allotypes. *Immunobiol.*, **164**, 184-191 (1983).

- 9) **Shreffler, D. C.**: MHC-linked complement components. In Parham P. and Strominger J. (eds.), *Histocompatibility Antigens: Structure and Function*, pl89-210, Chapman and Hall, London, 1982.
- 10) **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).
- 11) **Ogata, R. T.**: Structure and expression of murine fourth complement component (C4) and sex-limited protein (Slp). *Immunol. Rev.*, **87**, 101-122 (1985).
- 12) **Hemenway, C., Kalff, M., Walthall, D. & Robins, D.**: Sequence comparison of alleles of the fourth component of complement (C4) and sex-limited protein (Slp). *Nucleic Acids Res.*, **14**, 2539-2554 (1986).
- 13) **Tosi, M., Levi-Strauss, M., Georgatsou, E., Amor, A. & Meo, T.**: Duplications of complement and non-complement genes of the H-2 S region: Evolutionary aspects of the C4 isotypes and molecular analysis of their expression variants. *Immunol. Rev.*, **87**, 151-183 (1985).
- 14) **Levi-Strauss, M., Tosi, M., Steinmetz, M., Klein, J. & Meo, T.**: Multiple duplications of complement C4 gene correlate with H-2-controlled testosterone-independent expression of its sex-limited isoform, C4-Slp. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **82**, 1746-1750 (1985).
- 15) **Rosa, P. A., Sepich, D. S., Shreffler, D. C. & Ogata, R. T.**: Mice constitutive for sex-limited protein (Slp) expression contain multiple Slp gene sequences. *J. Immunol.*, **135**, 627-631 (1985).
- 16) **Nonaka, M., Takahashi, M., Natuume-Sakai, S., Nonaka, M., Tanaka, S., Shimizu, A. & Honjo, T.**: Isolation of cDNA clones specifying the fourth component of mouse complement and its isotype, sex-limited protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **81**, 6822-6826 (1984).
- 17) **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).
- 18) **Nonaka, M., Nakayama, K., Yu, D. Y. & Takahashi, M.**: Complete nucleotide and derived amino acid sequences of the fourth component of mouse complement (C4). *J. Biol. Chem.*, **260**, 10936-10943 (1985).
- 19) **Nonaka, M., Nakayama, K., Yu, D. Y. & Takahashi, M.**: Complete nucleotide and derived amino acid sequences of sex-limited protein (Slp). *J. Immunol.*, **136**, 2989-2993 (1986).
- 20) **Chirgwin, J. M., Rzybyla, A. E., MacDonald, R. J. & Rutter, W. J.**: Isolation of biologically active ribonucleic acid from sources enriched in ribonuclease. *Biochemistry*, **18**, 5294-5299 (1979).
- 21) **Lehrach, H., Diamond, D., Wozney, J. M. & Boedtker, H.**: RNA molecular weight determinations by gel electrophoresis under denaturing conditions, a critical reexamination. *Biochemistry*, **16**, 4743-4751 (1977).
- 22) **Rigby, P. W. J., Dieckmann, M., Rhodes, C. & Berg, P.**: Labeling deoxyribonucleic acid to high specific activity in vitro by nick translation with DNA polymerase I. *J. Mol. Biol.*, **113**, 237-251 (1977).
- 23) **Blin, N. & Stafford, D. W.**: A general method for isolation of high molecular weight DNA from eukaryotes. *Nucleic Acids Res.*, **3**, 2303-2308 (1976).
- 24) **Benton, W. D. & Davis, R. W.**: Screening λ gt recombinant clones by hybridization to single plaques in situ. *Science*, **196**, 180-182 (1977).
- 25) **Gorman, C. M., Moffat, L. F. & Howard, B. H.**: Recombinant genomes which express chloramphenicol acetyltransferase in mammalian cells. *Mol. Cell. Biol.*, **2**, 1044-1051 (1982).
- 26) **Marzluff, W. F. & Huang, R. C.**: Transcription of RNA in isolated nuclei. In Hames, B. D. & Higgins, S. J. (eds.), *Transcription and translation, a practical approach*. p89-129, IRL press, Washington DC, 1984.
- 27) **Hanahan, D. & Meselson, M.**: Plasmid screening at high colony density. *Gene*, **10**, 63-67 (1980).
- 28) **Grosfeld, F. G., Dale, H. H. Boer, E. & Flavel, R.**: Isolation of β -globin-related genes from a human cosmid library. *Gene*, **13**, 227-237 (1981).
- 29) **Southern, E. M.**: Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel

electrophoresis. *J. Mol. Biol.*, **98**, 503-517 (1975).

30) **Sanger, F., Nicklen, S. & Coulson, A. R.** : DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **74**, 5463-5467 (1977).

31) **Messing, J.** : New M13 vectors for cloning. *Meth. Enzymol.*, **101**, 20-78 (1983).

32) **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).

33) **Hemenway, C. & Robins, D. M.** : DNase I - hypersensitive sites associated with expression and hormonal regulation of mouse C4 and Slp genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **84**, 4816-4820 (1987).

34) **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).

35) **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).

36) **Paek, I. & Axel, R.** : Glucocorticoids enhance stability of human growth hormone mRNA. *Mol. Cell. Biol.*, **7**, 1496-1507 (1987).

37) **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).

38) **Vaessen, R. T. M., Houweling, A. & VanDerEb, A. J.** : Post-transcriptional control of class I MHC mRNA expression in Adenovirus 12-transformed cells. *Science*, **235**, 1486-1488 (1987).

39) **Sepich, D. S., Noonan, D. J. & Ogata, R. T.** : Complete cDNA sequence of the fourth component of murine complement. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **82**, 5895-5899 (1985).

40) **Ogata, R. T. & Sepich, D. S.** : Murine sex-limited protein: Complete cDNA sequence and comparison with murine fourth complement component. *J. Immunol.*, **135**, 4239-4244 (1985).

41) **Sepich, D. S., Rosa, P. A. & Ogata, R. T.** : cDNA sequence of a novel sex-limited protein (Slp) from mice constitutive for Slp expression. *J. Biol. Chem.*, **262**, 4935-4938 (1987).

42) **Robins, D. M., Malissen, M., Hood, L., Ferreira, A., Walthall, D. & Mitchell, M.** : Multiple C4/Slp genes distinguished by expression after transfection. *Mol. Cell. Biol.*, **6**, 134-141 (1986).

Molecular Mechanisms of Disorders of the Fourth Complement Component (C4) Synthesis Kohzo Nakayama, Department of Immunobiology, Cancer Research Institute, School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa 920—J. Juzen Med. Soc., **97**, 260—272 (1988)

Key words: promoter activity, post-transcriptional control, cosmid cloning, recombinant gene

Abstract

The fourth component of complement (C4) in humans is composed of two isotypes (C4A and C4B) encoded by two closely linked loci. Deficiency of C4A and C4B occur at very high frequency (10~15%), and have been closely associated with particular diseases such as Systemic Lupus Erythematosus (SLE) and Congenital Adrenal Hyperplasia (CAH). The deletion of the gene cannot be detected in one-half of C4 deficiency, which is probably the result of various defects at the level of gene expression. In the mouse, there are two isotypes, C4 and sex-limited protein (Slp). C4 is constitutively expressed, while Slp is testosterone-regulated in common inbred strains. In addition to this standard pattern, many expression variants exist for both C4 and Slp, thus providing an attractive model system for the study of molecular mechanisms of human C4 deficiencies. The present research was performed as a model experiment of disorder of human C4 synthesis. Low C4-producing strains (C4^l) have 10~20 fold less C4 protein in plasma than high C4-producing strains (C4^h). To understand the mechanism of this difference, RNA blotting, chloramphenicol acetyltransferase (CAT) assay, and nuclear transcription assay were performed. The results of comparative studies revealed that steady-state C4-mRNA levels are several-fold higher in C4^h strains than in C4^l strains. However, there is no significant difference between the relative rates of transcription of C4^h and C4^l. These results suggest that the major part of the regulation of plasma C4 levels in these strains occur at the level of posttranscription. In most mouse strains, expression of a gene encoding Slp is induced by testosterone, however, in the H-2^{w7} mouse, Slp is expressed constitutively in the same way as C4. To examine the structural basis for the testosterone-independent expression of Slp, all of the five C4-related genes were isolated from the cosmid library of the H-2^{w7} mouse. A comparison of the structural data yielded the conclusion that three of the apparent Slp genes of H-2^{w7} are indeed recombinant genes comprising C4-derived 5' region and Slp-derived 3' region. The fact that C4-Slp recombinant genes retain C4-derived 5'-flanking region including the promoter explains the C4-like constitutive expression of Slp in the H-2^{w7} mouse.