

核因子-1(NF1)類似因子の補体C4遺伝子の転写活性 における役割

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/2297/9190

核因子-1 (NF1) 類似因子の補体 C4 遺伝子の 転写活性における役割

金沢大学がん研究所免疫生物部 (主任: 高橋守信教授)

莫 如 然

マウス FM 系統の C4 と SIp 遺伝子は、95% 以上の塩基相同性を示す高度に保存されたプロモーターを持つ。しかし C4 遺伝子は恒常的に、Slp 遺伝子は男性ホルモン依存的に発現する。HepG2 細胞を用いたクロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ (chloramphenicol acetyltransferase, CAT) アッセイの結果から、男性ホルモンで刺激しない場合の C4 と SIp 遺伝子の転写活性の違いは、転写開始点上流 (-380) と転写開始点の間の領域によって規定されている事を示してきた。本研究はこの領域を更に限定するために、C4 と SIp のプロモーター-5' 欠失や中間欠失を行い、転写活性の違いは、主に -109 と -73 の間で決定されている事を明らかにした。更に、C4 遺伝子の -107 から -94 までにある、核因子-1 (nuclear factor 1, NF1) の結合のコンセンサス配列を見出し、ゲルシフト法とメチレーション阻害実験により、この配列に HepG2 核因子が特異的に結合する事を検出した。Slp プロモーターはこのコンセンサス配列中、一塩基置換を持ち、NF1 類似因子と結合しなかった。試験管内 (*in vitro*) 変異法で、C4 プロモーターの対応する配列中の 1ヶ所を SIp 型に置き換えると、CAT アッセイで調べた転写活性は SIp と同レベルまでに低下した。他方、Slp プロモーターの対応する配列中の 1ヶ所を C4 型に置き換えると、転写活性は一部上昇した。これらの結果から、男性ホルモンのない場合の、C4 と SIp プロモーター転写活性の差は、NF1 類似因子との結合の有無によって規定されていると結論された。

Key words the fourth component of complement (C4), sex-limited protein (Slp), NF1-like nuclear factor, NF- κ B-like nuclear factor, transcriptional activity

補体第四成分 (C4) は、古典経路 C3 転換酵素の成分として、補体の活性化に中心的役割を演じている¹⁾。C4 遺伝子は、ヒトとマウスで共に重複して存在し、主要組織適合抗原複合体 (MHC) のクラス III 領域にコードされている²⁾。2つの C4 遺伝子は、C4A と C4B と呼ばれる、わずかに生理活性の異なる蛋白質をコードしており、恒常的に発現している。マウスでは重複した C4 遺伝子の一方だけが、溶血活性を持つ C4 蛋白質をコードし、やはり、恒常的に発現している³⁾が、もう一方の遺伝子産物は、特定のマウス系統の成熟した雄だけに男性ホルモン依存的に発現され、性制限蛋白質 (Slp) と言われている。本研究はヒト肝癌由来の HepG2 細胞を用いて、クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ (chloramphenicol acetyltransferase, CAT) アッセイを行う事によって C4 と SIp 遺伝子プロモーター領域を解析した。その結果、転写開始点とその上流 -380塩基対 (base pair, bp) 間の領域が、男性ホルモンのない場合、強い C4 プロモーター活性と極弱い SIp プロモーター活性という違いを決める領域である事が判明した⁴⁾。また C4 プロモーター上流 -200bp 部位核因子 κ B (nuclear factor κ B, NF- κ B) 類似因子部位結合を報告してきた⁵⁾。Slp プロモーターの対応する部位への同因子の結合は、ヌクレオチド欠失と置換が起こっているため認められなかった。これらの結果は、C4 プロモーター活性が発現するのにこの結合部位が重要である事

を示唆したが、試験管内 (*in vitro*) 変異法で、C4 遺伝子のこの結合部位を壊しても、プロモーター活性の減少はわずかしか起こらなかった (Z. M. Huang ら、未発表)。本研究は C4 と SIp プロモーター活性を決定する、プロモーター上流 -109 から -73 までの部位に転写制御領域を特定した。更に、プロモーター上流 -100bp 付近に NF1 コンセンサス配列に非常に類似した HepG2 核因子の C4 特異結合部位を見出し、この結合部位が C4 と SIp 遺伝子の間に見られる、異なる発現様式の主要な決定部位である事を示した。

材料および方法

I. 材 料

制限酵素、クレンーフラグメント、ライゲーションキットは宝酒造 (京都) から、[α -³²P] dCTP と [¹⁴C] クロラムフェニコールはアマーシャム (Radiochemical Center, Buckinghamshire, UK) から、Poly dI-dC は Pharmacia (Uppsala, Sweden) から購入した。

II. プラスミドの構築

プラスミドの収率と純度を高めるため、またプラスミド調製中の不純物混入から来る CAT アッセイへの障害を避ける目的で、CAT 遺伝子は pGEM ベクターにサブクローンした。CAT の全コード領域を含む、pSVO⁶⁾ から Hind III/BamHI に

平成7年11月24日受付, 平成8年1月18日受理

Abbreviations: bp, base pair; CAT, chloramphenicol acetyltransferase; CTF, CCAAT-binding transcription factor; HMGCoA, hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A; LTR, long terminal repeat; NF1, nuclear factor 1

よって切り出した 1.5kb 断片をクレンジン酵素で末端処理後、pGEM4 ベクターのポリリンカー部位の XbaI サイトを用いて、プロモーター断片をサブクローニングした。C4 と Slp 遺伝子⁹ Aval (-1006)/BamHI (+45) 断片を切り出し、クレンジン酵素で処理後、pGEMCAT の XbaI リンカー部位に導入し、各々 pC1006CAT と pS1006CAT と名付けた。pC1006CAT 5' 末端を Bal31 で -694 と -477 まで削り、pC694CAT と pC477CAT を得た。同様にして、pC1006CAT から、Bal31 処理により pS743CAT と pS466CAT を作製した。pC135CAT と pC109CAT は PCR により、5' 末端に XbaI サイトを持つプライマーを用いて合成した。C4 と Slp プロモーターのアンチセンスプライマーは GCTCTAGACAGGAAAGGTCAGACCTGTCTG と GCTCTAGACAGGAGAGGTCAACCTGTCTGG で、これらの配列は BamHI サイト (+45) 5' 近傍の配列と対応する。pC135CAT と pS135CAT のセンスプライマーは GCTCTAGACCTGGTGTGGGTTGCCT で、pC109CAT と pS109CAT のセンスプライマーは各々 GCTCTAGACTCTGGCCTAGGGCCAGTTCT と GCTCTAGACTGGGCCTAGGACCAGATCT である。pC72CAT と pS72CAT の作製は、C4 と Slp 遺伝子の PmaCI (-72)/BamHI (+45) 断片を pGEM ベクターの XbaI リンカーを用いて、XbaI サイトにサブクローニングした。pC1006CAT の中間部欠失変異は、制限酵素とクレンジン酵素を用いて、平滑末端ライゲーションを行って作製した。したがって、pCdnRCAT は Nsp7524I (-289)/RsaI (-190) 部位の欠失を持ち、pCdnPCAT は Nsp7524I (-289)/PmaCI (-72) 部位の欠失を持つ。Nsp7524I (-289)/PmaCI (-72) 断片は各々 pC1006CAT と pS1006CAT との間で交換を行って、pCSNPCAT と pSCNPCAT 得た。pC1006CAT と pS1006CAT の試験管内 (*in vitro*) 変異法は、点突然変異を持つプライマーを用いて、PCR 増幅を行った。C4 と Slp で差が見られる、NF1 コンセンサス配列中の 1ヌクレオチド部位は、pC1006CAT と pS1006CAT の間で互いに別の型に変換した。全てのライゲーション部位と PCR 増幅断片はチェンターミネーション法⁹で配列を決定し、予期しないヌクレオチド欠失や挿入、置換のない事を確認した。

Ⅲ. クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ (CAT) アッセイ

クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ (CAT) アッセイは HepG2 細胞への一過性 DNA 導入系⁹を用いて行った。10⁶ 個細胞を径 60-mm のディッシュに播種し、翌日、磷酸カルシウム法を用いて、20μgDNA を導入した。グリセロールショックは、DNA 導入後、4 時間目に行った。2 日後、細胞を回収して、CAT アッセイを行った。スポットの放射活性の定量は Bio-image アナライザー-BA100 (富士フィルム、東京) を使って行った。

Ⅳ. ゲルシフトアッセイ¹⁰

C4 プロモーターのプロープ (-109 から -73 まで) は、pC109CAT を挿入部上流のベクターのポリリンカー域にある Aval サイトで切って線状化して、クレンジン酵素で標識し、PmaCI で消化して作製した。pS109CAT から切り出した対応する Slp 遺伝子断片を、コンペクターとして用いた。

Ⅴ. メチレーション阻害実験の解析¹¹

ゲルシフト実験で用いたのと同じプロープを用いて非コード鎖のメチレーション阻害実験を行った。コード鎖のプロープと

して、pC109CAT を PmaCI と Hinc II で酵素消化後、C4 遺伝子の -72 から +45 までの領域を欠失した DNA を調製した。セルフライゲーション後、-109 から -72 までの断片は、挿入部下流のベクター側ポリリンカー域にある HindIII サイトで切って線状化して、クレンジン酵素で標識し、更に、EcoRI で切り出した。プロープを部分的メチル化後、迅速法¹²で得た HepG2 核抽出物と混合反応させた。DNA-蛋白質複合体とフリーのプロープは、ゲル電気泳動法で分離、ピペリジンで分解後、8% 変性ゲルで解析した。

成 績

I. C4, Slp 遺伝子転写調節領域の同定と解析

本研究の以前の研究⁹で、C4 と Slp 遺伝子¹³の転写活性の差異は、各遺伝子のプロモーター近位部 -380 から転写開始点までの領域で決まる事を示してきた (図 1)。NF・KB 類似ヘパトマ核因子の結合サイトは Slp にはなく、C4 遺伝子の -200 部位 (-204 から -195 まで) にのみ存在した⁷。これらの結果から、この結合サイトは C4 遺伝子のプロモーター活性に重要である事が示唆された。しかし、この結合サイトを試験管内 (*in vitro*) 変異法で破壊しても、そのプロモーター活性にほんのわずかしかな影響が見られなかった (Z. M. Huang ら、未発表)。この結果を踏まえて、本研究では、C4 と Slp 両遺伝子の転写差異を与える調節領域を探索する事にした。図 2 に示すように、Slp プロモーターは、5' 末端 -1006 から -72 までの六種類違う長さの断片を欠失すると、定常的に低活性 (16-20% アセチレーション) を示した。一方、C4 プロモーターは、5' 末端 -1006 から -109 までの部位を欠失しても活性は変わらず、Slp プロモーターより 3-4 倍高い活性を示した。しかし、-72 部位まで更に欠失すると、Slp より低いプロモーター活性になる。この事は、C4 の -109 から -72 までの領域が高いプロモーター活性に重要である事を示している。この結論は、図 3 に示すような、C4 プロモーターの内部欠失により、また C4 と Slp プロモーターの一部を交換する事により確認された。核因子 kB

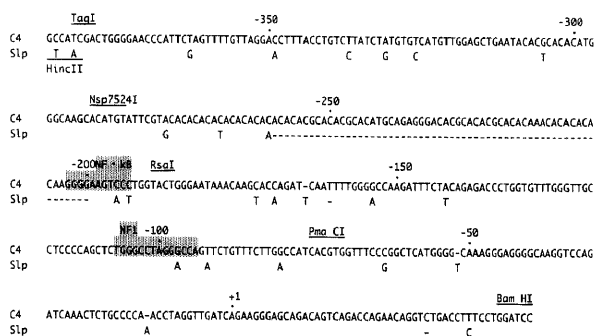


Fig. 1. Nucleotide sequence of the promoters of mouse C4 and Slp genes. The nucleotide sequence of the C4 promoter of FM strain mouse is presented. The Slp sequence is shown below the C4 sequence only at positions where the C4 and Slp sequences disagree. +1 shows the transcriptional initiation site¹⁰, and nucleotide numbers of the C4 sequence are presented. Consensus sequences for NF-kB and NF1 are shown by shading. Restriction enzyme sites used for plasmid construction are shown.

(NF・kB) 類似因子の結合サイトを含む, C4 プロモーターの Nsp7524I (-289)/RsaI (-190) 内部欠失は (図 2 の pCdNRCAT), プロモーター活性をほんのわずかしき低下させない. しかし, 大きな欠失を含む Nsp7524I (-289)/PmaCI (-72) の場合 (図 2 の pCdNPCAT), プロモーター活性は非常に低いレベルにまで低下した. これらの結果より, -188から-73までの間の領域は高いプロモーター活性に必要なシス作動性配列を含む事を示している. 図 3 でも示すように, pCSNPCAT (pC1006CAT の Nsp7524I (-289)/PmaCI (-72) 断片を pS1006CAT の対応する断片と交換したもの) のプロモーター活性がほとんど認められない事から, -289から-73までの間の領域は, C4 と Slp 転写活性に違いを与える主要決定部である事を示している.

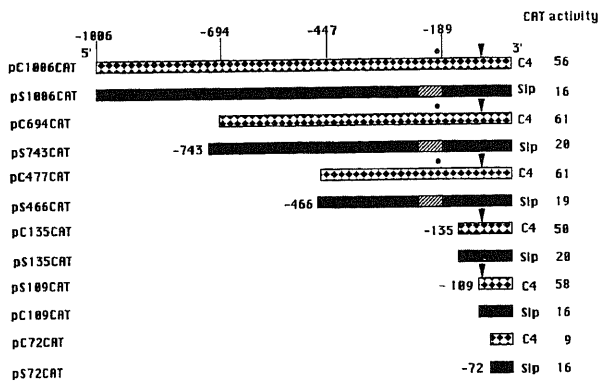


Fig. 2. Mapping of the transcriptional control region of the C4 and the Slp genes by 5' deletion. DNA fragments derived from the C4 and Slp promoters are shown by a checked and black bar, respectively. A shaded region in the Slp fragment represents a 60 nucleotide-long deletion compared to the C4 sequence. Consensus sequences for NF-kB and NF1 are shown by dot and star, respectively. CAT activities are shown as % acetylation, and these values are averages of three independent experiments.

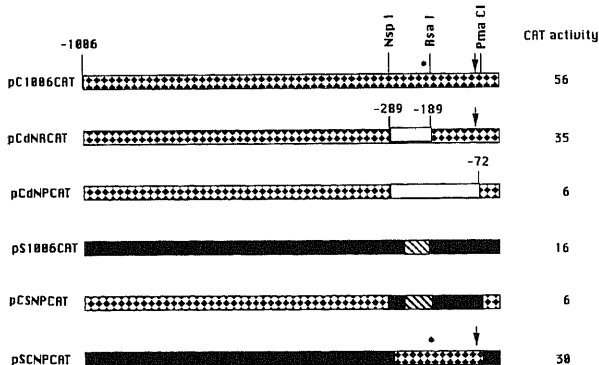


Fig. 3. Mapping of the transcriptional control region by deletion and exchange of the internal fragments. Promoter fragments assayed for CAT activity are schematically represented as described in the legend to Fig. 2. White regions in pCdNRCAT and pCdNPCAT show the internal deletion. pCSNPCAT and pSCNPCAT were obtained after exchanged the Nsp7524I (-289)/Pma CI (-73) fragments of the pC1006CAT and pS1006CAT to each other by subcloning. Restriction enzyme sites used for plasmid construction are shown above the pC1006CAT.

る事を示している.

II. C4 プロモーター領域への HepG2 核因子の結合

上に述べた結果から, C4 遺伝子の-109から-73までの領域は, Slp 遺伝子にないような転写因子の結合部位を含んでいる可能性が考えられた. この領域中可能な結合サイトを探索するために, C4 遺伝子の-109から-73までの断片をプローブとして, ゲルシフトアッセイを行った. 図 4 に示す様に, HepG2 核抽出物を用いて, 泳動の遅れたバンドを検出した (レーン 2). これらのバンドは C4 断片自身で競合阻害されるが (レーン 3, 4), 対応する Slp 断片では競合阻害が見られなかった (レーン 5, 6). この事から, バンドは配列特有の結合を示している事が示唆された. C4 遺伝子の-109から-73まで断片中の配列を調べて見ると, C4 遺伝子の-107から-94までの領域に核因子 NF1 結合に必要なコンセンサス配列¹⁰⁾が存在していた. Slp 遺伝子の対応する領域には塩基置換があるので, この事から, C4 特異結合にこの部位が関係している事が示唆された. そこで, C4 遺伝子の NF1 部位を含むオリゴヌクリオチドと Slp 遺伝子の対応する配列を合成して, コンペターとして競合実験を行った. 図 4 で示したように, C4 オリゴヌクリオチド (-109から-87まで) は, 遅延する全てのバンドを強く競合阻害したが (レーン 7), 対応する Slp オリゴヌクリオチドはほとんど競合阻害しなかった (レーン 8). これらの結果から, C4 遺伝子の-109から-73まで断片中の結合部位は NF1 コンセンサス配列と高い類似性が示唆された. この C4 プロモーターに見られる NF1 類似コンセンサス配列は, パリンドロム配列である. パリンドロム配列はしばしば, NF1 因子結合

Lane	1	2	3	4	5	6	7	8
HepG2 extract	-	+	+	+	+	+	+	+
Competitor (ng)	0	0.6	3	0.8	4	5	5	5
		C4F	SlpF	C4O	SlpO			

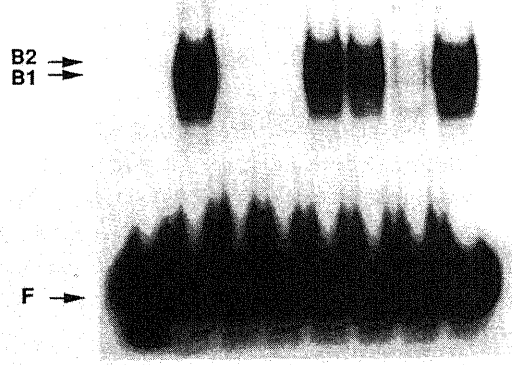


Fig. 4. Binding of a HepG2 nuclear factor to the transcriptional control region of the C4 promoter. A probe was the -109 to -73 fragment of the C4 promoter labeled by Klenow fragment. Competitors were C4F, the same fragment as the probe; SlpF, the corresponding Slp fragment; C4O, oligonucleotide representing NF1 consensus sequence of the C4 promoter; SlpO, the corresponding Slp oligonucleotide. Arrows F, B1 and B2 indicate free probe, fast moving complex band and slow moving band, respectively.

配列¹⁴⁻¹⁷)に見られるという理由から、アデノウィルス¹⁸、ハムスター由来のヘキサメチレングアニン補酵素 (hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A, HMGCoA)¹⁹、とヒトアルブミン遺伝子²⁰の三種の NF1 結合部位を含むオリゴヌクリオチドを用いて、ゲルシフトアッセイを行った。HepG2 核抽出因子を用いて、NF1 類似配列への、三種のオリゴヌクリオチドの競合実験を行った結果、図 5 で示すように、これらのオリゴヌクリオチド全てが、C4 断片自身の場合と同様に、特異バンドの全てを競合より完全に消失させた。

Ⅲ. メチレーション阻害実験による結合部位の解析

結合部位の特定のために、メチレーション阻害実験による解析を行った (図 6)。矢と点の位置で示す様に、コード鎖の -105, -104, と -97 位の 3ヶ所の G 残基と非コード鎖の -103, -96, -95 位の 3ヶ所の G 残基のメチル化が結合を阻害した。非コード鎖の場合は、ゲルシフトアッセイで検出できた 2本のバンド (図 4 と図 5 の B1 と B2) を別々に解析した (B1 のデータは示さなかった)。これらの場合、メチレーション阻害実験のパターンに何らの差異が認められなかった事から、B1 と B2 の複合物中の NF1 類似因子の結合部位は同一である事が示唆された。メチレーション阻害実験の解析から推定

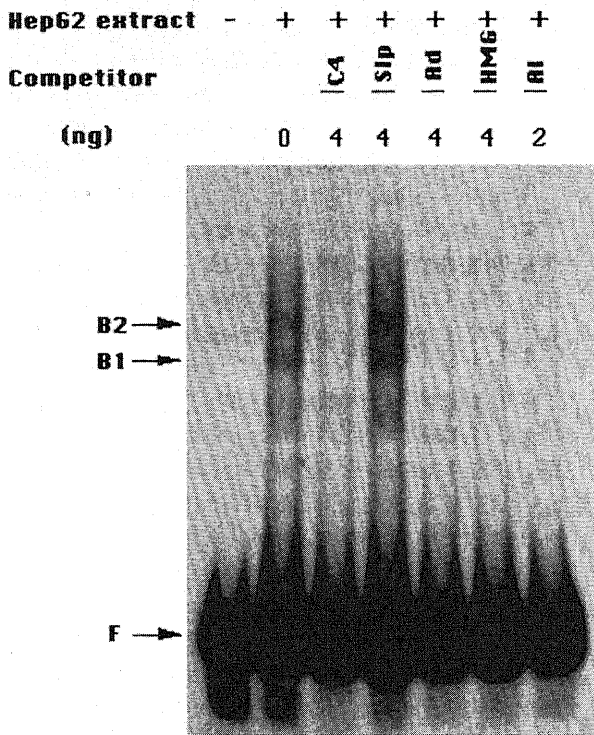


Fig. 5. Gel shift assay testing the ability of NF1 oligonucleotides in competition for binding of a HepG2 nuclear factor to the C4 NF1 consensus sequence. Probe is the same as used in Fig. 4. Competitors were C4, the same fragment as the probe; Slp, the corresponding Slp fragment; Ad, the oligonucleotide corresponding to the NF1 site of adenovirus origin¹⁸); HMG, the oligonucleotide corresponding to the NF1 site of hamster 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A gene¹⁹); Al; the oligonucleotide corresponding to the NF1 site of human albumin gene²⁰. Arrows F, B1 and B2 indicate free probe, fast moving complex band and slow moving complex band, respectively.

した結合に要する最小域は -105 から -95 までの位置であり、NF1 コンセンサスの -107 から -94 までの位置と良く一致していた。

Ⅳ. NF1 結合部位の C4 プロモーター活性に果たす機能

NF1 結合部位の機能的重要性を、試験管内 (*in vitro*) 変異法で構築した DNA で CAT アッセイする事によって検討した。pC1006CAT の、C4 遺伝子の NF1 コンセンサス配列中の 1

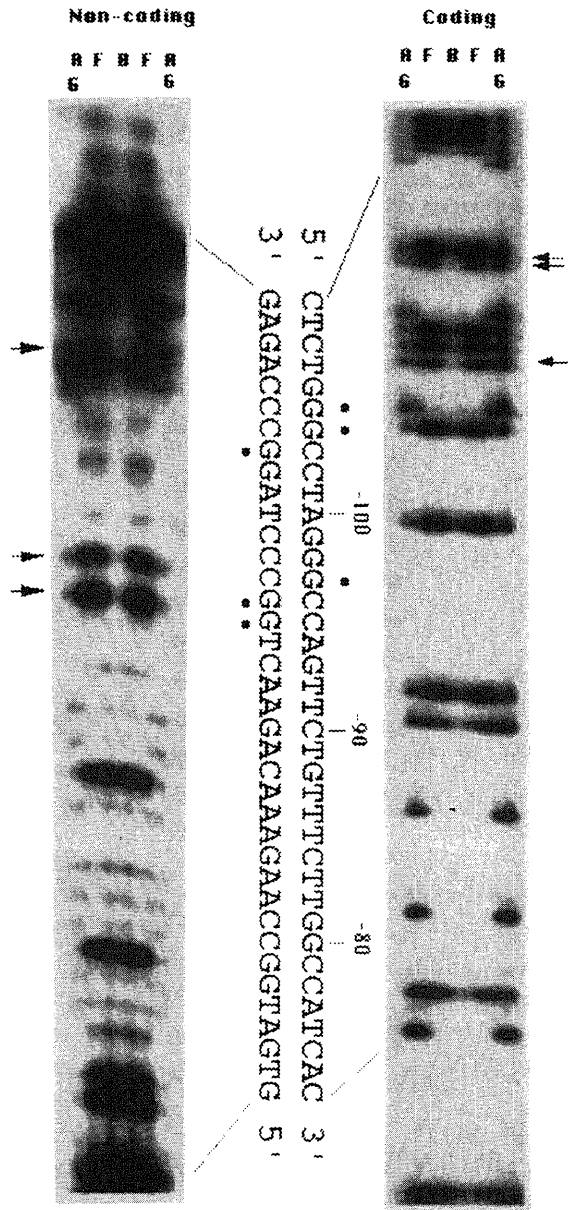


Fig. 6. Methylation interference analysis of binding of an NF1-like factor. Probes were prepared as described in Materials and Methods. The AG lanes showed the pattern obtained by chemically cleaving the probe at purines. F is the free probe, and B is the bound probe. Arrows represent the guanines, whose methylation blocks binding. These nucleotides are shown by dots above the coding strand sequence or below the non-coding strand sequence. To make the correspondence with the nucleotide sequence easy, the gel pattern of the non-coding strand experiment is shown in an upside-down position.

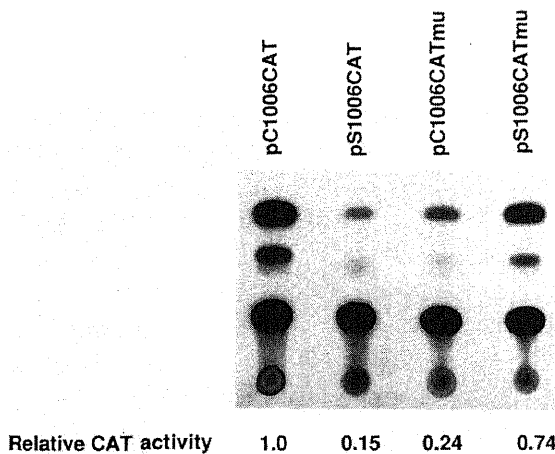


Fig. 7. CAT assay using C4 promoter, SIp promoter and their mutants at NF1 binding site. pC1006CATmu has SIp-type nucleotide at one position essential for NF1 binding, and therefore should not bind to an NF1-like factor. pS1006CATmu has C4 type nucleotide at this position, and should be positive for NF1 binding in spite of its SIp background. The figure shows a typical result. Relative CAT activities are shown below the figure. Relative CAT activities are averages of three independent experiments postulating % acetylation of pC1006CAT as 1.0.

ヶ所を SIp 型に変えられたものを作り, pC1006CATmu とした. 同様に, pS1006CAT の対応する部位を C4 型に変えられたものを作り, pS1006CATmu とした. 図 7 で示す様に, pC1006CATmu は pS1006CAT と同レベルの非常に低いプロモーター活性を示した. この事から, この結合部位は高いプロモーター活性に不可欠なものである事が示唆された. また, NF1 類似因子と結合すると思われる pS1006CATmu では, pC1006CAT の示す転写活性の 50% 以上が回復される事からも, この結合部位が機能的に重要である事を確認できた.

考 察

マウス FM 系統の C4 遺伝子は, 恒常的に発現をする遺伝子であるが, SIp 遺伝子は男性ホルモン依存的に発現をする遺伝子である⁴. 従って男性ホルモン刺激がない場合, C4 プロモーターのみ, 強い転写活性を示す⁹. 本研究では, NF1 類似核因子の結合が, C4 と SIp プロモーターの間で見られる基本的な転写活性の差異を決める主要な要因である事を示した. 元来, NF1 因子は, アデノウィルスの DNA 複製の開始に必要な細胞側の蛋白質として認められたものである¹⁸. 後になって, NF1 は真核動物のプロモーターが含む CCAAT 配列を選択的に認識する CCAAT 結合転写因子 (CCAAT-binding transcription factor, CTF) と同一である事が示された^{19,21}. NF1 結合コンセンサス配列は, 二量体蛋白質が結合する^{22,23} ところのパリンドロム配列 TGGCANNNTGCCA である¹⁴. 更に, NF1 類似 DNA に結合する蛋白質は, 肝臓特有の転写に役割を示すものとしてラット肝臓で同定された²⁴. この因子は, NF1-L と呼ばれ, 種々の肝組織特有の遺伝子に認められる, 典型的な NF1 結合部位 TGGCA の半分を認識し, その cDNA 配列は, HeLa 細胞由来の NF1/CTF cDNA と高い相同性を示した. こ

れまでのところ, NF1-L はヒトの NF1/CTF 遺伝子に対応するラットの遺伝子がコードされているかどうか明らかではない. しかし, 種々の細胞に, さまざまな形の NF1 類似因子が存在し, それらが複数の遺伝子でコードされている可能性を示す証拠があつまっている^{25,26}. C4 プロモーターで見られる NF1 結合部位はパリンドロム配列をしている. 図 5 で示したように, アデノウィルス¹⁸, HMGC_oA 遺伝子¹⁹, とヒトアルブミン遺伝子²⁰ 由来のそれぞれの NF1 部位は, C4 断片自身の場合と同じ位, C4 の NF1 類似配列と競合した. この結果から, HepG2 核抽出物中に, NF1 結合因子が存在し, しかも, この因子は NF1-L に対応するヒト相同因子である事が示唆された. 本論文で明らかにした様に, SIp プロモーターに NF1 類似肝核因子が結合できないという結果は, SIp 遺伝子が発現しない理由を説明できる. しかし, NF1 結合部位のない SIp 遺伝子が, なぜ男性ホルモン誘導で発現されるのか疑問である. SIp 遺伝子の上流-2000 付近にあるプロウイルスの末端繰り返し配列 (Long Terminal Repeat, LTR) に男性ホルモン受容体が結合して, SIp 発現を直接誘導する事を示唆した報告がある^{27,28}. 他方, 下垂体摘除術をすると, 男性ホルモンによる SIp 遺伝子の誘導が見えなくなる事を Danoff ら²⁹ が報告した. この事は, 下垂体の因子が SIp 誘導に必要であり, 男性ホルモンの SIp プロモーターへの作用は間接的である事を示唆した. このように, 男性ホルモンから SIp 発現に至る生理経路については確定していないのが現状である.

図 1 で示したように, マウス C4 遺伝子プロモーターの近くに 2 つの良く知られた転写因子, NF \cdot kB⁹ と NF1 結合サイトがある. 興味ある事に, SIp プロモーターはこれらの転写因子結合サイトに複数の塩基置換を含んでいる. そして, 5' 調節領域⁹ と蛋白質コード領域^{30,31} で共に, C4 と SIp 遺伝子間の塩基相同性がほぼ 95% 以上という高さであるにもかかわらず NF \cdot kB 類似または NF1 類似因子は SIp プロモーターに結合しない. C4 転写に果たす NF1 類似因子の決定的な役割は, 本論文で証明された. 他方, HepG2 核抽出物中の NF \cdot kB 類似因子は, 補体 B 因子遺伝子の IL-1 誘導に重要な役割をする事が示されている³². マウスの C4 と B 因子両遺伝子は H-2 複合体のクラス III 領域に局在し, 200kb しか離れていないし, これらの NF \cdot kB 結合部位は, NF \cdot kB 類似 HepG2 核因子と結合親和性の区別ができない³². しかし, C4 プロモーターの NF \cdot kB 部位を壊しても, 活性はほとんど減少しないから, NF \cdot kB 因子は, C4 遺伝子の基本転写に副次的役割しか示さない様に思われる (Z. M. Huang ら, 未発表). その上, C4 遺伝子は IL-1 によって誘導されないのであるから³³, C4 遺伝子の NF \cdot kB 部位が, IL-1 誘導に機能している可能性も排除できる. 図 7 で示したように, pC1006CAT の NF1 部位を壊しても, プロモーター活性は pS1006CAT と同レベルに完全に減少したわけではなかった. しかも, pS1006CATmu はプロモーター活性の完全回復をもたらすことはなかった. それ故, 現在のところ, C4 プロモーターの調節に NF1 以外の部位が関与している可能性は排除できない. しかし, 本研究の結果は, NF1 類似核因子の結合が, C4 と SIp 遺伝子の間で見られる転写の違いを決める主要な要因である事を明らかに示している.

本研究の転写調節領域の同定と解析の結果は, C4 と SIp 間の差が, -380 から転写開始点までの DNA 領域で決まるという以前の研究結果⁹ とほぼ一致している. しかし, SIp 遺伝子の

短い断片に関して、少し一致しない部分がある。以前の研究⁹⁾では、Slp プロモーターの-244までの欠失(本論文の表示法では-195に対応する)をすると、転写活性を回復するので、Slp プロモーター中に負制御領域の存在する可能性が示唆されたが、このような回復は、本研究ではより短い Slp 構築 DNA でも観察されなかった。この不一致の原因は、用いた CAT ベクターの違いにある程度起因するかも知れないが、現在のところ不明である。本論文の結果は、再現性が高く、Slp プロモーターの負制御は、C4 と Slp プロモーター転写活性の差に、仮にあったとしても、副次的役割しか果していないという事を示している。

結 論

マウス C4, Slp 遺伝子の間には 95% 以上高い相同性があるが、その転写活性に大きな違いがある。両遺伝子の転写開始点から上流-200までの塩基配列によって遺伝子機能の違いが規定されている。その領域には、C4 遺伝子の場合には、NF・kB と NF1 部位が同定されたが、Slp 遺伝子の方には両部位が欠損していた。これらの部位どちらがより転写活性に重要か検討し、以下の結論を得た。

1. C4, Slp 遺伝子の 5' 上流領域から種々の長さの断片を切り出し、NF・kB, NF1 の欠損変異を作り、CAT アッセイを行った。C4 遺伝子の NF・kB 部位を破壊しても、プロモーター活性の低下は認められなかった。しかし、NF1 部位を破壊すると、著しく低下した。一方、Slp 遺伝子に新たに NF1 部位を作ってやると、プロモーター活性の上昇が認められた。これらの結果より NF・kB 結合部位ではなく、NF1 結合部位の有無が C4 と Slp 両遺伝子の転写活性の差異を決める主要な要因と結論された。

2. C4 と Slp 両遺伝子に転写活性の差異を与える領域の解析をする為に、C4 プロモーター5' 末端や中間欠失を作ったり、C4 と Slp プロモーターの一部を交換し、CAT アッセイを行った。その結果、C4 プロモーター上流-109から-73までのところに転写制御領域がある事が確認された。

3. C4 プロモーターの転写制御領域中の細胞因子結合部位を探索した。C4 遺伝子の-109から-73までの断片をプローブとして、ゲルシフトアッセイを行った。この断片中の配列を調べて見ると、-107から-94までの領域に核因子 NF1 結合に必要なコンセンサス配列が存在する事が分かった。メチレーション阻害実験の解析から推定した結合に要する最小域は-105から-95までの領域であり、これは、NF1 コンセンサスの-107から-94までの位置と良く一致した。更に、コード鎖の-105、-104、と-97位と非コード鎖の-103、-96、-95位の各3ヶ所のG残基が特異的な結合部位として確認できた。

4. 試験管内 (*in vitro*) 変異法で、C4 プロモーターの対応する配列中の1ヶ所を Slp 型に置き換えると、CAT アッセイで調べた転写活性は Slp と同レベルまでに低下した。他方、Slp プロモーターの対応する配列中の1ヶ所を C4 型に置き換えると、転写活性は一部上昇した。これらの結果から、NF1 結合部位は、高いプロモーター活性に不可欠なものである事が確認された。

謝 辞

稿を終えるに臨み、御指導と御校閲を賜りました恩師高橋守信教授に

深甚の謝意を捧げます。終始御指導を頂いた当研究室の野中勝博士(現名古屋市立大学医学部助教授)に深く感謝いたします。

文 献

- 1) Reid, K. B. M. & Porter, R. R.: The proteolytic activation system of complement. *Ann. Rev. Biochem.*, **50**, 433-464 (1981).
- 2) Carroll, M. C., Campbell, R. D., Bentley, D. R. & Porter, R. R.: A molecular map of the human major histocompatibility complex class III region linking complement genes C4, C2 and factor B. *Nature*, **307**, 237-241 (1984).
- 3) Chaplin, D. D., Woods, D. E., Whitehead, A. S., Goldberger, G., Colton, H. R. & Seidman, J. G.: Molecular map of murine S region. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **80**, 6947-6951 (1983).
- 4) Shreffler, D. C., Atkinson, J. P., Chan, A. C., Karp, D. R., Killion, C. C., Ogata, R. T. & Rosa, P. A.: The C4 and Slp genes of the complement region of the murine H-2 major histocompatibility complex. *Phil. Trans. R. Soc. Lond.*, **B 306**, 395-403 (1984).
- 5) 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).
- 6) 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).
- 7) Yu, D. Y., Huang, Z. M., Murakami, S., Takahashi, M. & Nonaka, M.: Specific binding of a hepatoma nuclear factor to the NF・kB/H2TF1 recognition motif found in the C4 promoter but not in the Slp promoter. *J. Immunol.*, **143**, 2395-2400 (1989).
- 8) 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).
- 9) Sanger, F., Nicklen, S. & Coulson A. R.: DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **74**, 5463-5467 (1977).
- 10) Scheidereit, C., Heguy, A. & Roeder, R. G.: Identification and purification of a human lymphoid-specific octamer-binding protein (OTF-2) that activates transcription of an immunoglobulin promoter *in vitro*. *Cell*, **51**, 783-793 (1987).
- 11) Baldwin, A. S. & Sharp, P. A.: Binding of a nuclear factor to a regulatory sequence in the promoter of the mouse H-2Kb class I major histocompatibility gene. *Mol. Cell. Biol.*, **7**, 305-313 (1987).
- 12) Osborn, L., Kunkel, S. & Nabel, G. J.: Tumor necrosis factor α and interleukin 1 stimulate the human immunodeficiency virus enhancer by activation of the

- nuclear factor kB. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **86**, 2336-2340 (1989).
- 13) Rosa, P. A., Sepich, D. S., Robins, D. M. & Ogata, R. T.: Constitutive expression of SIp gene in mouse strain B10. WR directed by C4 regulatory sequences. J. Immunol., **139**, 1568-1577 (1984).
 - 14) Rosenfeld, P. J. & Kelly, T. J.: Purification of nuclear factor I by DNA recognition site affinity chromatography. J. Biol. Chem., **261**, 1398-1408 (1986).
 - 15) Laemmli, U. K.: Cleavage of structure proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature, **227**, 680-685 (1970).
 - 16) Jones, K. A., Kadonaga, J. T., Rosenfeld, P. J., Kelly, T. J. & Tjian, R.: A cellular DNA-binding protein that activates eukaryotic transcription and DNA replication. Cell, **48**, 79-89 (1987).
 - 17) Rupp, R. A. W. & Sippel, A. E.: Chicken liver TGGCA protein purified by preparative mobility shift electrophoresis (PMSE) shows a 36.8 to 29.8 kd microheterogeneity. Nucleic Acids Res., **15**, 9707-9726 (1987).
 - 18) Nagata, K., Guggenheimer, R. A. & Hurwitz, J.: Specific binding of a cellular DNA replication protein to the origin of replication of adenovirus DNA. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **80**, 6177-6181 (1983).
 - 19) Gil, G., Osborn, T. F., Goldstein, J. L. & Brown, M. S.: Purification of a protein doublet that binds to six TGG-containing sequences in the promoter for hamster 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase. J. Biol. Chem., **263**, 19009-19019 (1988).
 - 20) Urano, Y., Watanabe, K., Sakai, M. & Tamaoki, T.: The human albumin gene: characterization of the 5' and 3' flanking regions and polymorphic gene transcripts. J. Biol. Chem., **261**, 3244-3251 (1986).
 - 21) Santoro, C., Mermod, N., Andrews, P. C. & Tjian, R.: A family of human CCAAT-box-binding proteins activate in transcription and DNA replication: cloning and expression of multiple cDNAs. Nature, **334**, 218-224 (1988).
 - 22) Meisterernst, M. L., Rogge, L., Foekler, R., Karaghiosoff, M. & Winnacker, E. L.: Structural and functional organization of porcine gene coding for nuclear factor I. Biochemistry, **28**, 8191-8200 (1989).
 - 23) Mermod, N., O'Neill, E. A., Kelly, T. J. & Tjian, R.: The proline-rich transcriptional activator of CTF/NF-1 is distinct from the replication and DNA binding domain. Cell, **58**, 741-753 (1989).
 - 24) Paonessa, G., Gounari, F., Frank, R. & Cortese, R.: Purification of an NF 1-like DNA-binding protein from rat liver and cloning of the corresponding cDNA. EMBO J., **7**, 3115-3123 (1988).
 - 25) Gil, G., Smith, J. R., Goldstein, J. L., Slaughter, C. A., Brown, O. K. & Osborne, T. F.: Multiple genes encode nuclear factor 1-like proteins that bind to the promoter for 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **85**, 8963-8967 (1988).
 - 26) Rupp, R. A. W., Kruse, U., Multhaup, G., Gobel, U., Beyreuther, K. & Sippel, A. E.: Chicken NF 1/TGGCA proteins are encoded by at three independent genes: NF 1-A, NF 1-B and NF 1-C with homologues in mammalian genomes. Nucleic Acids Res., **18**, 2607-2616 (1990).
 - 27) Adler, A. J., Danielsen, M. & Robins, D. M.: Androgen-specific gene activation via a consensus glucocorticoid response element is determined by interaction with nonreceptor factors. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **89**, 11660-11663 (1992).
 - 28) Stavenhagen, J. B. & Robins D. M.: An ancient provirus has imposed androgen regulation on the adjacent mouse sex-limited protein gene. Cell, **55**, 247-254 (1988).
 - 29) Danoff, D. M., Goldman, M. B. & Goldman, J. N.: Murine sex-limited protein expression requires androgen and pituitary hormones. Immunogenetics, **23**, 7-10 (1986).
 - 30) Nonaka, M., Kimura, H., Yu, D. Y., Yokoyama, K., Nakayama, K. & Takahashi, M.: Complete nucleotide and deduced amino acid sequences of sex-limited protein (Slp), non-functional isotype of the fourth component of mouse complement (C4). J. Immunol., **136**, 2989-2993 (1986).
 - 31) Ogata, R. T. & Sepich, D.: Complete cDNA sequence and comparison with murine fourth complement component. J. Immunol., **135**, 4239-4244 (1985).
 - 32) Nonaka, M. & Huang, Z. M.: Interleukin-1 mediated enhancement of mouse factor B gene expression via NF-kB-like hepatoma nuclear factor. Mol. Cell. Biol., **10**, 6283-6289 (1990).
 - 33) Perlmutter, D. H., Dinarello, C. A., Punsal, P. I. & Colten, H. R.: Cachectin/tumor necrosis factor regulates hepatic acute phase gene expression. J. Clin. Invest., **78**, 1349-1354 (1986).

Differential Binding of an NF1-like Nuclear Factor to the Mouse C4 and SIp Promoters as a Major Determinant of Basal Transcriptional Activity Ru-Ran Mo, Department of Immunobiology, Cancer Institute, Kanazawa University, Kanazawa 920—J. Juzen Med Soc., 105, 136—143 (1996)

Key words the fourth component of complement, sex-limited protein, NF1-like nuclear factor, NF- κ B like nuclear factor, transcriptional activity

Abstract

The C4 and SIp genes of FM mouse strain have highly conserved nucleotide sequences of more than 95% identity in the promoter region, although the former is a constitutive gene and the latter is an androgen-dependent gene. Our previous results of CAT assay using HepG2 cells have shown that the region between -380 and the transcriptional start site is responsible for the differential transcriptional activity between C4 and SIp genes in the absence of androgen stimulus. To map further the responsible region, we performed 5' deletion and internal deletion of the C4 and SIp promoters and found that the major determinant for transcriptional difference resides between -109 to -73. We found a consensus sequence for a transcription factor, NF1, at -106 to -94 of the C4 gene, and specific binding of a HepG2 nuclear factor to this site by gel retardation and methylation interference analysis. The SIp promoter has one nucleotide substitution in an NF1 consensus sequence and did not bind to an NF1-like HepG2 nuclear factor. When this position of the C4 promoter was changed to the SIp type by *in vitro* mutagenesis, transcriptional activity estimated by CAT assay decreased to a similar level to the SIp promoter. On the other hand, substitution of this position of the SIp promoter for the C4 type nucleotide enhanced the transcriptional activity between the C4 and SIp promoters in the absence of androgen is mainly determined through the binding of an NF1-like nuclear factor.