

学位論文題名

補体第3成分(C3)遺伝子の発現調節機構

—サイトカインによる発現調節に関わる調節因子—

学位論文内容の要旨

I 研究目的

補体第3成分(C3)は急性期反応物質のひとつでもあり、感染防御・炎症反応等に関係する重要な血漿成分である。C3は主に肝臓で産生され、種々の刺激によってその産生は増加する。主な刺激因子としては、エンドトキシン、インターロイキン1(IL-1)、インターロイキン6(IL-6)、腫瘍壊死因子(TNF)、インターフェロン $\gamma$ (IFN- $\gamma$ )等が報告されている。また、いくつかの臨床的・実験的結果から、C3の産生は主に転写レベルで調節されていると推測されている。急性期反応蛋白遺伝子の発現調節機構については、CRP、血清アミロイドA、フィブリノーゲン、 $\alpha_1$ -アンチトリプシン、 $\alpha_2$ -マクログロブリン、酸性糖蛋白、補体などで精力的に研究が進められている。特にこれらの遺伝子は、急性期の各種の刺激によって、その発現が著明に増強されるため、発現調節機構の解析には、格好の材料を提供している。補体遺伝子に関しては、ファクターB遺伝子で、IL-1やIFN- $\gamma$ に対する反応に必須の塩基配列が決定されている。今回著者は、マウスとヒトC3遺伝子のゲノムDNAをクローニングし、その5'上流域の塩基配列を決定して、特にサイトカインによる発現調節に関わる因子についてCATアッセイにより解析を行った。

II 方法

C3ゲノムDNAは、マウス(B10.D2/nSn)肝細胞およびヒト白血球ライブラリーからクローニングし、C3遺伝子の転写開始位置より上流域の塩基配列をサンガー法により決定した。それから、マウスC3遺伝子の上流約1.5 kbのDNA断片をクロラムフェニコール・アセチルトランスフェラーゼ(CAT)遺伝子を含むプラスミドに挿入して、pC3-CATを作製した。さらに、種々の欠失変異および部位特異的変異をもつCATプラスミドを作製し、肝細胞由来のHepG2細胞にトランスフェクションして、そのCAT活性を測定することで、遺伝子の転写を制御するエレメントを同定した。また、それらのエレメントをチミジンキナーゼ遺伝子のプロモーターを含んだCATプラスミド(pTKCAT)に挿入して(pC3-TKCAT)、エンハンサー活性を持つか否かについて検討した。さらに、それらのエレメントの一部の塩基を置換したプラスミドを作製して、転写制御に必要な塩基配列をより詳細に解析した。

### III 結 果

#### 1) マウスおよびヒトC3遺伝子上流域の塩基配列

マウスおよびヒトC3遺伝子の転写開始位置より上流域の塩基配列の相同性は全体として51%であったが、特にマウスの-36 bp から-1 bp、-146 bp から-68 bp までの領域では80%の相同性が認められ、異種間で非常によく保存されていた。マウスC3の転写開始位置は、ATGコドンの56 bp 上流に1ヶ所のみ認められたが、ヒトC3では、ATGコドンの61 bp および59 bp 上流に2ヶ所同定された。マウスでは、4つのTATA配列を認めたが、ヒトでは、それに相当する部位にGATAAAという配列が存在した。その他にも、遺伝子の発現調節に重要と考えられている塩基配列が、マウスおよびヒトC3遺伝子上流域に認められた。

#### 2) C3遺伝子上流域の発現調節機能

pC3-CAT をトランスフェクションした無刺激のHepG2では弱いCAT活性が認められたが、IL-1、IL-6の刺激によって、それぞれ5.0倍、3.8倍の活性増強が認められた。さらに、IL-1とIL-6両者の刺激では、11.6倍の活性増強が認められた。これらの結果から、マウスC3遺伝子上流1.5 kb の領域にその発現調節に重要なエレメントが存在することが示された。

#### 3) C3遺伝子の発現調節エレメント

種々の欠失変異を用いたCATアッセイの結果から、C3遺伝子の恒常的発現には、-30 bp に位置するTATA配列に加えて、-280 bp から-111 bp までの配列が必要であること、少なくとも-110 bp から-70 bp の間にエンハンサーおよびIL-1、IL-6に対する反応性に重要な配列が存在すること、また、-1457 bp から-800 bp までの配列が、C3遺伝子のエンハンサーを抑制する可能性があることなどが示唆された。さらに小範囲の欠失変異を用いた検討により、-90 bp から-71 bp あるいは-70 bp から-46 bp までを欠失させると、エンハンサー活性と、IL-1、IL-6に対する反応性のいずれもが失われることが示された。

#### 4) エンハンサーおよび I L-1 / I L-6 反応性エレメント

C 3 遺伝子上流 - 9 0 bp から - 4 1 bp までに相当する合成 DNA を、チミジンキナーゼ・プロモーターの上流に挿入した pC3-TKCAT では、pTKCAT に比べて無刺激で約 2 倍、I L-1 あるいは I L-6 刺激後にはさらに約 2 倍の C A T 活性の上昇を認めた。また、C 3 の DNA 断片を 3 コピー含むプラスミド (pC3(x3)-TKCAT) では、無刺激で約 9 倍の C A T 活性の上昇を認め、それは挿入された DNA の方向性とは無関係であった。これらの結果から、C 3 遺伝子上流 - 9 0 bp から - 4 1 bp までの領域に、エンハンサーおよび I L-1 / I L-6 反応性エレメントが存在することが確認された。さらに、この領域の一部の塩基を置換したプラスミドを用いた C A T アッセイでは、- 7 7 bp から - 7 2 bp までの変異により、エンハンサー活性および I L-1 に対する反応性が消失し、- 8 8 bp から - 8 3 bp までの変異により、エンハンサー活性、I L-1 / I L-6 に対する反応性のすべてが失われた。これらの部位は、それぞれ DNA 結合蛋白である N F- $\kappa$  B あるいは C / E B P の結合部位と高い相同性を示す塩基配列であった。

#### IV 考 察

今回の研究によって、C 3 遺伝子上流域にはその転写制御に重要ないくつかの塩基配列が存在することが明らかとなった。遺伝子の発現を増強する領域ばかりではなく、抑制的に調節する領域も推定されたことから、それらが相互に作用しあって C 3 遺伝子の組織特異的発現に重要な役割を果たしているものと考えられる。また、I L-1、I L-6 に対する反応に重要な部位が互いに隣り合わせて存在することから、それらによる調節機構は密接に関連している可能性が推測された。さらに、これら転写制御に重要ないくつかの塩基配列の検討から、C 3 遺伝子の発現は C / E B P や N F- $\kappa$  B などに類似した複数の転写因子により調節されている可能性も示唆された。

## 学位論文審査の要旨

主 査 教 授 松 本 脩 三

副 査 教 授 柿 沼 光 明

副 査 教 授 葛 巻 暹

### 補体第3成分(C3)遺伝子の発現調節機構 - サイトカインによる発現調節に関わる調節因子 -

補体第3成分(C3)は、主に肝臓で産生される急性期反応物質のひとつであり、感染防御・炎症反応等に関係する重要な血漿成分である。C3産生は、種々のサイトカインによって増強され、その発現調節は主に転写レベルでなされていると推測されている。川村氏はC3が肝臓で常に一定量が産生され、IL-1、IL-6などのサイトカインによって産生が増強されるという点に着目し、まずマウスとヒトC3遺伝子のゲノムDNAをクローニングし、その5'上流域の塩基配列を決定すると共にクロラムフェニコール・アセチルトランスフェラーゼアッセイによる解析を行うことにより、発現調節に必要なDNAの塩基配列を決める研究に挑んだ。

マウスおよびヒトC3遺伝子の転写開始位置より上流域の塩基配列の相同性は全体として51%であったが、特にマウスの-146 bpより下流域では80%の相同性が認められ、異種間で非常によく保存されていた。またマウスC3遺伝子の上流1.5kbのDNA断片を含むCATプラスミドを、肝細胞由来のHepG2細胞に導入してCATアッセイを行った結果IL-1/IL-6両者の刺激では、11.6倍の活性増強が認められた。この事はマウスC3遺伝子の上流1.5kbの領域にその発現調節に重要なエレメントが存在することを示している。また種々の欠失変異を用いたCATアッセイの結果から-30bpに位置するTATA配列がC3遺伝子の発現に必須であること、少なくとも-90bpから-46bpまでの間にエンハンサーが存在すること、また、-280bpから-111bpおよび-1457bpから-800bpまでの配列がC3遺伝子のエンハンサーを抑制する可能性があることなどが示唆された。さらにC3遺伝子の上流-90bpから-41bpまでに相当する合成DNAを、チミジンキナーゼ・プロモーターの上流に挿入したプラスミドを用いたCATアッセイによって、この領域にエンハンサーおよびIL-1/IL-6反応性エレメントが存在することが確認された。

川村氏の今回の研究によって、C3遺伝子の上流域にはその転写制御に重要ないくつかの塩基配列が存在することが明らかとなった。遺伝子の発現を増強する領域ばかりではなく、抑制的に調節する領域も推定されたことから、それらが相互に作用しあってC3遺伝子の組織特異的発現に重要な役割を果たしているものと考えられる。また、IL-1、IL-6反応性エレメントが互いに隣り合わせで同定されたことから、それらの調節機構は密接に関連している可能性が推測された。さらに、これら転写制御に重要ないくつかの塩基配列の検討から、C3遺伝子の発現はC/EBPやNF- $\kappa$ Bなどに類似した複数の転写因子により調節されている可能性も示唆され、補体第3成分遺伝子の発現調節機構に関する研究に現時点で一石を投ずるものと考えられた。

以上の諸点につき、副査の柿沼、葛巻、両教授、並びに西教授から数問の質疑が交わされたがすべてに概ね順当な答えが得られ、学位の価値を持つ研究と判定された。