

遺伝子発現を負に制御する転写因子の解析



研究ノート

今川正良*

Mechanisms of Negative Regulation of Gene Expression at Transcriptional Level

Key Words : Transcription, Gene Expression, Negative Regulation, Tumor Marker

1. はじめに

生体内では5万とも10万種類ともいわれる遺伝子が巧妙に制御され、秩序良く発現している。それらの多くは転写レベルで調節されていることが知られており、この数年のうちに転写制御機構の解析が活発になされた。その結果、遺伝子プロモーターなど発現制御領域に存在するシスエレメントとそれにトランスに働く転写因子の存在が明らかになった¹⁾。これらの多くは遺伝子発現を正に調節、すなわち活性を上昇させるものであった。正常状態では遺伝子の多くは不活性であり、必要に応じて発現している。ではこの正の調節だけで全てが説明できるのだろうか。我々は、負の調節も正の調節と並んで、又はそれ以上に重要な制御機構と考え研究を行ってきた。以下二つの遺伝子を例に概説する。

2. グルタチオントランスフェラーゼ 遺伝子のサイレンサー

ラット肝化学発癌過程で生じる過形成結節及び肝癌において、胎盤型グルタチオンS-トラ

ンスフェラーゼ (GST-P) 遺伝子の発現が著明に上昇する。この変化は肝臓において特異的であり、さらに正常肝では全く発現していないため、すぐれた腫瘍マーカーの一つであるとともに、発癌のメカニズムを解明するための最も良い材料の一つと考えられる。我々は、GST-P 遺伝子の発現機構を分子生物学的な面から解析し、サイレンサーおよびそれに結合する負の転写因子の性質を明らかにした。

1) GST-P 遺伝子のサイレンサーの同定

GST-P 遺伝子の5'上流調節領域をレポーター遺伝子 (大腸菌由来のクロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ遺伝子を使用) につなぎ、培養細胞にトランスフェクションすることによりその活性変化を検討した。各種欠失変異体を用いることにより、5'上流-396から-140の遺伝子断片が向き、位置およびプロモーターに関係なく負に働くサイレンサーであることを明らかにした²⁾。つぎにこの部位に結合する転写因子をDNaseI フットプリント法により解析したところ、数ヶ所に結合部位が見つかった。この部位 (GST-P Silencer, GPS 1~4 とよぶ) が実際に負に働いているか否か検討するために内部欠失変異体を作製し、その効果を検討したところ、いずれの場合もレポーター遺伝子の活性はGPS 1~4の欠失により活性が上昇した。すなわち、GPS 1~4すべてがこのサイレンサー断片の負の活性に重要であることがわかった。次にGPS 4に結合する蛋白質を部分精製したところ (Silencer Factor A, SF-A とよぶ)、興味あることにサイレンサー

* Masayoshi IMAGAWA
1951年12月8日生
1980年大阪大学大学院薬学研究科
博士課程修了
現在、大阪大学薬学部、助教授、薬
学博士、生化学、分子生物学
TEL 06-879-8241
FAX 06-879-8244
E-Mail imagawa@phs.
osaka-u.ac.jp



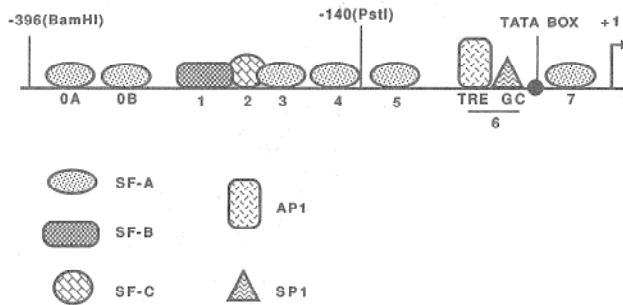


図1 ラット GST-P 遺伝子のプロモーターおよびサイレンサー領域に結合する転写因子の概略

断片上の数ヶ所に結合した。他の二つの結合蛋白質、SF-B, SF-Cと共にこれらの結合概略図を図1に示した。

2) SF-Aの精製およびクローニング

サイレンサー内には数種のエレメントがあるが、その中でも特に重要なGPS4に結合する転写因子SF-Aを精製しアミノ酸配列を決定した。その結果興味あることにNuclear Factor 1 (NF1)と全く同一のペプチド断片およびわずかに異なるアミノ酸配列を有する断片が存在することが明らかとなった。NF1は複製にも働く活性化因子として知られているが、不活性化因子としての報告は全くない。関連遺伝子の存在等を含めその機能の詳細は今後の課題である。

3) SF-Bのクローニングおよび転写抑制活性

もう一つのサイレンサー結合蛋白質の一つであるSF-Bをサウスウエスタン法によりクローニングした。その結果SF-Bは、転写活性化遺伝子であるC/EBP β (=NF-IL6=LAP/LIP)と同一と思われた³⁾。LIPは、LAPと同じ遺伝子から生成される蛋白質であり、転写活性化ドメインを欠くことにより、転写活性化因子と競合すると考えられた。しかし、単純な抗転写活性化因子ではなく、より積極的な作用をしていると推察された。この点を明らかにするため、酵母のGAL4の系を用いて検討したところ、SF-B (LIP)のN末端部分が直接的に転写を抑制することを明らかにした。さらに興味あることに、この部分のみを発現させたところ、DNA結合ドメインを持たなくても転写を阻害した。これは塩基配列特異的転写因子が、条件

によっては非特異的因子として働く可能性を示唆しており非常に興味深い結果と考えられる。

4) 癌化におけるSF-Bの役割

このようにサイレンサー内のGPS1はSF-B (C/EBP β)によって制御されていると思われるが、C/EBPはファミリーを形成していることから、これらの癌化における変動について検討した。その結果、癌化にともないC/EBP α の発現が減少した。一方、C/EBP β の発現量に変化は認められなかった。従って、癌化の過程においてはC/EBP β のLAPとLIPの比率よりも、C/EBP α の存在量が重要と思われる。C/EBP α は転写活性化因子といわれているが、GPS1に作用する場合には不活性化因子として働くようである。実際、トランスフェクションの実験において、C/EBP α は転写活性を抑制した。さらに、C/EBP β のなかで活性化因子として働いているLAPの影響を打ち消す結果も得られた。正常状態ではC/EBP α が抑制作用を発揮しているのに対して、癌化にともないC/EBP α は減少し、その結果、サイレンサーの作用が弱まり活性化に寄与していると考えられた。このようにC/EBP α とC/EBP β の微妙なバランスがGST-P遺伝子のサイレンサーの機能発現に重要であることが明らかとなった⁴⁾。

5) C/EBPファミリーの認識配列の同定

C/EBPはbZIP(basic leucine zipper)構造を持つ転写因子群であり、種々の遺伝子の調節領域に結合することが知られているが、明確な認識配列は明らかにされていない。そこで、ランダムセレクション法によりC/EBP α , β , δ のDNA結合認識配列を決定した。興味あることに、それぞれの認識配列にそれほど大きな差はなく、いずれもATTGCGCAATのパリンドローム配列を認識することが明らかとなった。従って、C/EBP α , β , δ の機能の違いは配列認識以外の段階に起因すると考えられる⁵⁾。

3. 神経成長抑制因子遺伝子のサイレンサー

最近、神経成長抑制因子(Growth Inhibitory Factor, GIF)が単離された。GIFはアルツハイマー病脳において、その発現が顕著に減少することにより、疾患との関連性が注目されて

いる。我々は、GIFが脳以外の組織では全く発現していないことに注目し、この遺伝子を負に抑制する因子の検索について検討した。

GIF遺伝子プロモーターの各種変異体(この場合にはルシフェラーゼ遺伝子をレポーター遺伝子として使用した)を用いて、負に制御する領域を検索したところ、CTGを25回繰り返す特異的な領域を同定した。この領域はGST-Pのサイレンサーと同じように、その向き、位置および細胞にかかわらず抑制活性を示した(図2)。この結果はいわゆるサイレンサーの範疇にはいるものである。しかし、興味あることに、この領域に結合する蛋白質は検出されなかった。この実験の条件は通常の転写因子を検出するのに十分な条件で検討していることを考え合わせると、従来とは違った阻害様式の可能性も考えられる⁶⁾。

4. お わ り に

これまで転写を活性化する因子について多くの報告がなされたのに対して、転写を不活性化する機構についてはそれほど知られていなかった。本研究において、複数のエレメントよりなるサイレンサーの存在を明らかにすることができた。さらにそこに結合する因子をクローニングした結果、従来より、転写活性化因子として知られていたものと同一または類似していることを明らかにした。これらはファミリーを形成しており、状況に応じてホモダイマーやヘテロダイマーを形成し、転写を調節していると考えられる。本研究ではCTGリピートの作用も明らかにした。非常に興味あることに、その相補配列CAGリピートがハンチントン舞踏病、筋ジストロフィーなどの遺伝子疾患の主因であることが最近明らかにされつつある。これらは主に遺伝子上の翻訳領域にありグルタミンをコードしているが、リピート数の増加により疾患が現われると考えられている。これらのリピート

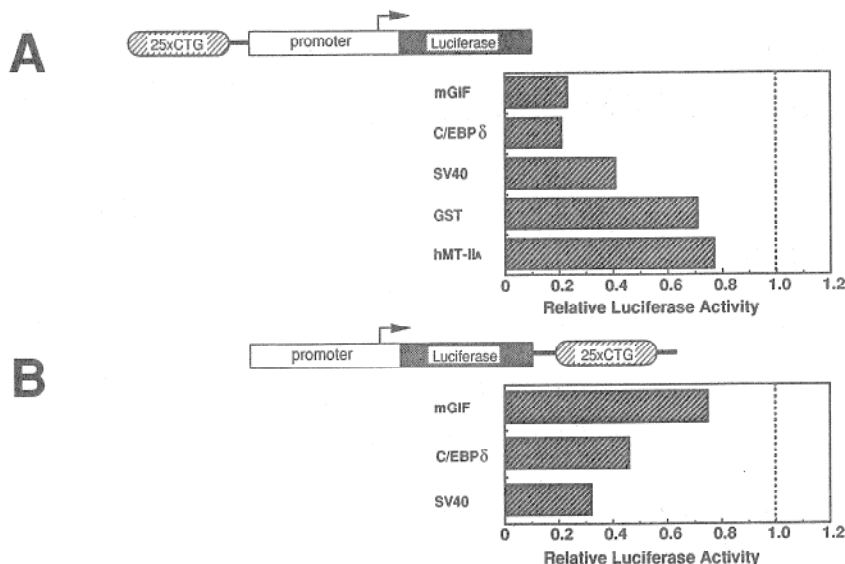


図2 種々の遺伝子プロモーター活性に及ぼすCTGリピートの影響

が遺伝子の5'上流調節領域に見いだされたのはGIFがはじめてであり、異なる機作による調節が予想される。このように一見無関係のように思われる遺伝子疾患が実は共通の因子によって影響を受けている可能性も示唆され、今後幅広い視野で研究をすることが必要と思われる。

参 考 文 献

- 1) 今川正良, 生物物理, 33,154 (1993).
- 2) Imagawa, M., Osada, S., Okuda, A., and Muramatsu, M., Nucl. Acids Res., 19, 5 (1991).
- 3) Imagawa, M., Osada, S., Koyama, Y., Suzuki, T., Hirom, P. C., Diccianini, M. B., Morimura, S., and Muramatsu, M., Biochem. Biophys. Res. Commun., 179, 293 (1991).
- 4) Osada, S., Takano, K., Nishihara, T., Suzuki, T., Muramatsu, M., and Imagawa, M., J. Biol. Chem., 270, 31288 (1995).
- 5) Osada, S., Yamamoto, H., Nishihara, T., and Imagawa, M., J. Biol. Chem., 271, 3891 (1996).
- 6) Imagawa, M., Ishikawa, Y., Shizmano, H., Osada, S., and Nishihara, T., J. Biol. Chem., 270, 20898 (1995).