

# 遺伝子発現を負に制御する分子機構に関する研究 Molecular Mechanisms of Negative Regulation of Gene Expression

今川正良

Masayoshi IMAGAWA

大阪大学大学院薬学研究科・助教授 (現 名古屋市立大学薬学部・教授)

Osaka University, Associate Professor

(present address; Nagoya City University, Professor)

The rat glutathione transferase P (GST-P) gene is strongly and specifically expressed during chemical hepatocarcinogenesis, but is rarely detectable in the normal liver. It was found that the silencer located at 400bp upstream from the cap site of this gene. NF1 (Nuclear Factor 1) and C/EBP (CCAAT/Enhancer Binding Protein) were cloned as the silencer binding proteins. DNA-binding, transfection and domain mapping analyses have revealed that these multiple factors bind to the silencer region and contribute to the negative regulation of the GST-P gene expression.

## 1. 研究目的

近年の分子生物学の進歩に伴い、遺伝子の発現制御機構の解明が急速に進んだ。しかし、これらはほとんど転写活性化の面から検討されている。すなわち、これまで研究されてきた転写因子の多くは転写活性化遺伝子である。近年、エンハンサー結合蛋白質等転写活性化因子と共に、転写を抑制的に制御する遺伝子の重要性が指摘されているが、まだその報告は少ない。

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。GST-Pは多数の薬剤や生体異物の抱合、解毒に関与する酵素であり、2量体として存在し、数種以上のアイソフォームがある(1)。胎盤型のGST (GST-P) はその一つであるが、ヒトの胎盤型GSTであるGST- $\pi$ は食道癌や口腔癌などのマーカーとして最近臨床的にも注目されている(2)。ラットにおいては、正常肝では全く発現していないのに対し、肝化学発癌の過程で特異的に発現するため、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、細胞癌化の機構の一端を明らかにすることを目的として、ラットGST-P遺伝子の発現機構を分子生物学的な面から解析している。その過程において、-400bp付近に発現を負に制御する領域の存在が予想された(3)。そこでさらに詳細に検討したところ、この領域が遺伝

子発現を抑制する機能を有するサイレンサーとして働くことを見いだした。さらに、ここには少なくとも3種類の結合蛋白質SF-A, B, C (Silencer Factor-A, B, C) が結合することを明らかにした(4)。そこで、本研究では、これら3種類のサイレンサー結合蛋白質をクローニングし、さらにその機能発現機構を明らかにすることを目的とし以下の検討を行った。

## 2. 研究経過

### 2.1 サイレンサー結合蛋白質 SF-B のクローニング

DNase I フットプリント法やトランスフェクション法によりGST-P遺伝子のサイレンサーには少なくとも3種類のシスエレメントが存在し、そこには異なる蛋白質が結合することが予想された(4)。そこでまず初めに、サウスウエスタン法を用いてこれらの遺伝子クローニングを試みた。その結果、SF-BとしてC/EBP $\beta$  (CCAAT/Enhancer Binding Protein  $\beta$ ) がクローニングされた(5)。興味あることにSF-BはIL6誘導性の転写活性化因子NF-IL6と同一であった。またNF-IL6は構成的に転写を活性化するLAPと同一であり、同じ遺伝子よりLeaky Ribosome Scanning MechanismによりLAPに競合する不活性化因子LIPが、shorter formとして生成されることが最近報告された。このように、一つの遺伝子より活性化因子と不活性化因子ができることは非常に興味深い。実際にSF-B結合配列に対するLAPおよび

LIPの影響を検討したところ、LAPは活性化し、LIPは不活性化することが明らかとなった。また、LIPはLAPに対する単純な競合物というより、基本転写因子群に働いて、直接的に転写を阻害しているものと推察された。実際LIPを発現させると、種々のプロモーターに対して抑制的に働いた。したがって、正常肝においてGST-P遺伝子が全く発現していない一つの要因はC/EBP $\beta$ のアイソフォームであるLIPによるものと思われた(6)。

転写因子は複数の類似した遺伝子群よりなり、いわゆるファミリーを形成し、互いにヘテロダイマーを形成する例が多いことがわかってきた。C/EBPファミリーは現在のところ6種類知られているが、解析のよく進んでいるC/EBP $\alpha$ , $\beta$ , $\delta$ の結合特異性はよく似ていることを我々は明らかにしている(7)。そこで正常時及び癌化の過程におけるこれらの変動を検討したところ、正常肝ではC/EBP $\alpha$ が最も優勢に発現し、癌化にともないその発現は減少していた。一方C/EBP $\beta$ の発現は少量であり、癌化にともなう大きな変化は観察されなかった。C/EBP $\alpha$ はもともと転写活性化因子として単離されたものであるが、非常に興味あることに、正常肝ではGST-P遺伝子を負に制御しているものと推察された(図1)。さらに、C/EBP $\beta$ (LIP)による活性化に対してもC/EBP $\alpha$ が抑制的に働いていることが明らかとなった。すなわち、正常肝ではC/EBP $\alpha$ とC/EBP $\beta$ (LIP)が転写を不活性化しているのに対し、癌化にともないC/EBP $\alpha$ の発現が減少し、結果としてC/EBP $\beta$ (LIP)が働き、サイレンサーの機能を弱めていると推察された(8)。

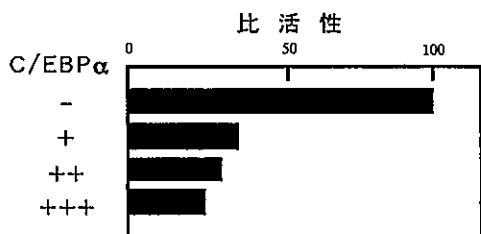


図1. SF-B結合部位におよぼすC/EBP $\alpha$ の効果  
Fig. 1. Effect of C/EBP $\alpha$  on transcription activity of SF-B binding site.

ルシフェラーゼをレポーターとしてトランスフェクション法により検討

## 2.2 サイレンサー結合蛋白質 SF-A のクローニング

上記のように、サウスウエスタン法では、SF-Bのクローニングのみ成功した。SF-Aは、サイレンサー内の数ヶ所に結合し、これらすべてがサイレンサーの機能に重要であることを見いだした(4)。しかし、サウスウエスタン法によるクローン化には成功しなかった。そこで次に、SF-Aについて正常ラット肝臓より各種カラムクロマトグラフィーやDNAアフィニティークロマトグラフィーを用いて精製した。次に部分アミノ酸配列を決定し遺伝子クローニングを行った。その結果、SF-AはNF1(Nuclear Factor 1)ファミリーの中のNF1-Aであることが明らかとなった。詳細は次項に述べる。

## 2.3 NF1ファミリーの結合特異性、発現制御および転写制御ドメインの解析

NF1もC/EBPと同様ファミリーを形成している。しかし、それらのDNA結合性の差異、転写制御機構の差異は報告されていない。転写制御ドメインに関しても報告は少ない。そこで次に上記の点について検討を行った。また、ゲノム遺伝子としてはブタのNF1-Cが報告されているのみであることから、ラットNF1-Aゲノム遺伝子のクローニングも行った。

## 2.4 サイレンサー結合蛋白質 SF-C のクローニング

SF-Cのクローニングについては、サウスウエスタン法、蛋白質精製法ともに成功しなかった。そこで次に酵母のone-hybrid systemを用いてクローニングを試みた結果、最近になって、その候補となる遺伝子を複数クローニングできた。

## 3. 研究成果

サイレンサー結合蛋白質SF-Aを精製し、部分アミノ酸配列を決定した結果、SF-AはNF1ファミリーの中のNF1-Aであることが明らかとなった。そこでNF1-A cDNAクローニングを行った結果、興味あることに少なくとも4種類のスプライシングアイソフォームを有することも明らかとなった。そこでこれらの転写活性に及ぼす影響を検討したところ、いずれも転写抑制活性を持つことがわかった。そこでさらに不活性化ドメインの同定を行った。その結果、セリン、グリシン、プロリンに富むドメインの存在を明らかにした(図2)。

NF1のゲノム遺伝子は現在のところ、ブタNF1-Cにおいて唯一報告されているのみである。そこで、NF1-Aのゲノムクローンを単離し全ゲノム構造を明

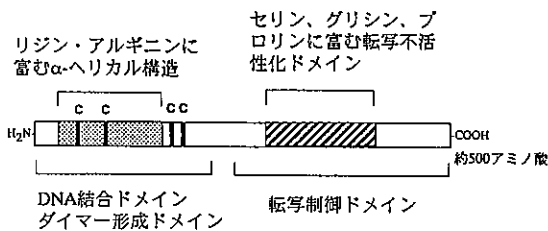


図2. NF1-Aの分子構造と機能ドメイン  
Fig. 2. Structure and functional domain of NF1-A.

らかにした。ラットNF1-A遺伝子は11個のエクソンを含み、70Kb以上におよぶ遺伝子であることが明らかになった。また、ブタNF1-Cとの比較の結果、エクソン/イントロンの関係はよく一致し、進化の起源は同一であると推察された。

NF1-Bについては3種類のスプライシングアイソフォームの存在を明らかにし、これらの転写調節に及ぼす影響について検討し、状況に応じて正負両方の機能を持つことを明らかにした。さらに、負の活性を示す機能ドメインのマッピングも行った。また、他の2つのファミリー、NF1-CおよびNF1-Xと上記のNF1-A、NF1-Bの4つのNF1ファミリーについて、DNA結合性の検討を行い4種類の性質の違いを明らかにした。さらに、NF1-C、NF1-Xを含め4種類のアイソフォームの結合性の差、発現パターンの変化もあわせて検討した。その結果、4種類のNF1はDNA結合性に明確な差はなく、発現パターンにも特異的な差異は見いだせなかった。これらの結果より、NF1ファミリーの機能発現の差異は相互作用する蛋白質の差異による可能性もあり、これらの点に関しては今後の課題である。

NF1は核内に存在する転写因子である。そこで核移行シグナルを同定した。その結果、4種のアイソフォームに存在する2つの核移行シグナルを同定した。これらは、おのおの単独でもある程度の核移行性を示すが、完全な移行には両方を必要とし、従来とは異なる様式が推定された。また、NF1-A3については、他と異なり1つの核移行シグナルを欠き、そのため核への移行性が不十分であった。この結果は、NF1の新たな遺伝子発現制御機構の可能性を示唆しており今後検討してゆきたい。

GST-P遺伝子のサイレンサーには、もう一つの未知蛋白質SF-Cについて、酵母のシステムを用いてその候補となる遺伝子を最近になって単離するこ

とに成功した。その結果、亜鉛フィンガーをDNA結合ドメインに持つ数種類の転写因子を同定した。これらはいずれも特異的にDNAに結合することより、目的のクローンを得た可能性が極めて高いと推察された。

#### 4. 今後の課題と発展

腫瘍マーカー遺伝子であるGST-P遺伝子の特異的発現調節について、転写レベルで検討を行い、エンハンサー、サイレンサーの同定およびそれに関わる特異的転写因子の解析を行ってきた。これまで転写因子としては、活性を上昇させる転写活性化因子のみが注目されてきたが、我々は早くから負の因子であるサイレンサーに注目しその役割を指摘してきた。現在では、エンハンサーとともにサイレンサーも遺伝子発現機構の中心をなしていることを考えるとその重要性は明らかである。本研究では特に、サイレンサーに的をしぼり、遺伝子発現を負に制御する機構について検討してきた。その結果、3種類のサイレンサー結合蛋白質のうち、2つについてはある程度の解析ができた。3番目の因子についても、今後早急に解析を行う予定である。GST-P遺伝子サイレンサーに結合する因子をまとめて図3に示した。

これらの因子は近接して存在しており、お互いに作用する可能性も十分に考えられる。さらにそれぞれに結合するコファクターの存在も予想される。今後は以上の点を中心に検討を進めてゆきたい。

転写因子の多機能性が最近明らかになりつつある。たとえば、C/EBPはもともと肝臓における転写活性化因子および炎症反応に関わる誘導性の転写因子として同定されてきた。しかし、本研究で明らかにしたように、転写を負に制御する因子としても重要な働きを有している。さらに、最近脂肪細胞の分化に関与し、肥満の原因になる可能性も明らかになりつつある。これらの特異性がいかなる機構により発揮されるかは現時点では明らかではない。しかし、21世紀を見据えて、細胞の癌化のみならず、生活習慣病との関連において今後益々詳細な解析が必要となると思われる。

#### 参考文献

- [1] Pickett, C. B., Lu, A. Y. H. Glutathione S-transferases: Gene structure, regulation, and biological function. *Ann. Rev. Biochem.*, 58: 743-764 (1989).
- [2] Sato, K. Glutathione S-transferases and hepato-

carcinogenesis. *Jpn. J. Cancer Res.*, 79: 556-572 (1988).

[3] Sakai, M., Okuda, A., Muramatsu, M. Multiple regulatory elements and phorbol 12-O-tetradecanoate 13-acetate responsiveness of the rat placental glutathione transferase gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 85: 9456-9460 (1988).

[4] Imagawa, M., Osada, S., Okuda, A., Muramatsu, M. Silencer binding proteins function on multiple cis-elements in the glutathione transferase P gene. *Nucl. Acids Res.*, 19: 5-10 (1991).

[5] Imagawa M., Osada S., Koyama Y., Suzuki T., Hirom P.C., Diccianni M.B., Morimura S., Muramatsu M. SF-B that binds to a negative element in glutathione transferase P gene is similar or identical to trans-activator LAP/IL6-DBP. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 179, 293-300 (1991).

[6] Osada S., Takano K., Nishihara T., Suzuki T., Muramatsu M., Imagawa M. CCAAT/enhancer-binding proteins  $\alpha$  and  $\beta$  interact with the silencer element in the promoter of glutathione S-transferase P gene during hepatocarcinogenesis. *J. Biol. Chem.*, 270, 31288-31293 (1996).

[7] Osada S., Yamamoto H., Nishihara T., Imagawa M. DNA binding specificity of the CCAAT/enhancer-binding protein transcription factor family. *J. Biol. Chem.*, 271, 3891-3896 (1996).

[8] 今川正良、癌発生過程における腫瘍マーカー遺伝子の特異的発現機構、薬学雑誌 116: 505-518 (1996).

発表論文リスト

[9] Osada, S., Daimon, S., Ikeda, T., Nishihara, T., Yano, K., Yamasaki, M., and Imagawa, M. Nuclear factor 1 family proteins bind to the silencer element in the rat glutathione transferase gene. *J. Biochem.*, 121: 355-363 (1997).

[10] Xu, M., Osada, S., Imagawa, M., and Nishihara, T. Genomic organization of the rat nuclear factor 1-A gene. *J. Biochem.*, 122: 795-801 (1997).

[11] Osada, S., Ikeda, T., Xu, M., Nishihara, T., and Imagawa, M. Identification of the transcriptional repression domain of nuclear factor 1-A. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 238: 744-747 (1997).

[12] Osada, S., Matsubara, T., Daimon, S., Terazu, Y., Xu, M., Nishihara, T., and Imagawa, M. Expression, DNA-binding specificity and transcriptional regulation of nuclear factor 1 family proteins from rat. *Biochem. J.*, 342: 189-198 (1999).

[13] 今川正良、NF1/CTF, Bio Science 新用語ライブラリー、細胞内シグナル伝達 第2版、pp. 200-201 (1999). 羊土社.

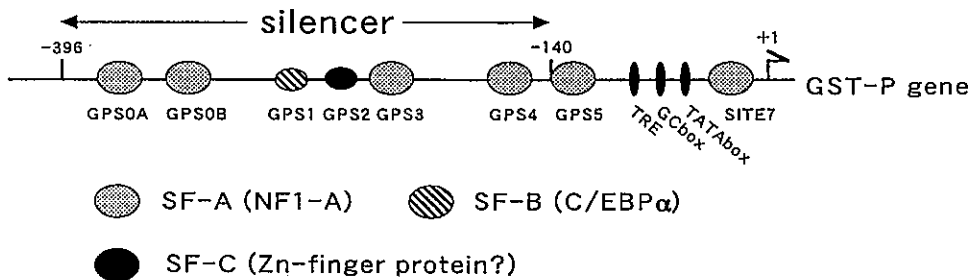


図3. GST-P遺伝子プロモーター上のサイレンサー  
Fig. 3. Silencer in the GST-P gene promoter.

約260bpからなるサイレンサーに3種類の転写抑制因子が近接して結合する。