

[別紙 1]

論文の内容の要旨

論文題目 マウス IL-5R α 鎖遺伝子の発現調節機構の解析
—プロモーター領域に結合する転写因子群とその機能—

指導教官 高津 聖志 教授

東京大学大学院医学系研究科

平成9年4月 入(進)学

医学博士課程

病因・病理学専攻

氏名 芦澤 有紀

<序論>

IL-5 は主として Th2 型の T 細胞が産生するサイトカインで、B 細胞や好酸球の分化増殖因子として作用する。また、好塩基球に作用してヒスタミンなどの炎症メディエーターの放出を促進する。IL-5 の作用は IL-5 が特異的受容体 (IL-5R) に結合することにより生じる。IL-5R は α 鎖 (約 60kDa) および β 鎖 (約 130kDa) の2つの膜蛋白質より構築される。IL-5R α 鎖は IL-5 に特異的に結合するが、 β c鎖は IL-5IL-3R、GM-CSFR に共通の膜蛋白質で、単独では IL-5 に結合しない。 β c鎖が種々の血液細胞に広く発現しているのに対して、IL-5R α 鎖の発現は B 細胞、好酸球、好塩基球などの IL-5 反応性の細胞に限られており、IL-5R α 鎖の細胞特異的な発現が IL-5 の作用特異性に大きく寄与していると考えられる。Imamura らは mIL-5R α 鎖遺伝子の細胞特異的な発現調節機構を解明するため、mIL-5R α 鎖遺伝子ゲノムの構造を解析し、mIL-5R α 鎖遺伝子ゲノムが 11 個のエキソンから構成され、第 6 番目の染色体上にマップされていることを明らかにした。さらに、Imamura らは mIL-5R α 鎖のプロモーター領域の解析も行ったが、細胞特異的な発現調節機構に関してはほとんど解析されていなかった。本論文では mIL-5R α 鎖の細胞特異的な発現調節機構を解明することを目的として、mIL-5R α 鎖遺伝子のプロモーター

領域の解析を行った。最初に mIL-5R α 鎖遺伝子においても hIL-5R α 鎖遺伝子の場合と同様に複数の転写開始点が存在するのかどうか 5'RACE 法を用いて探索した。また、mIL-5R α 鎖遺伝子の 5'近傍領域において mIL-5R α 鎖陽性細胞特異的な転写活性化に重要な領域と、そこに結合する転写因子を同定し、その役割について検討した。

<方法と結果>

1. 5'RACE 法による転写開始点の探索

hIL-5R α 鎖のプロモーター領域の解析から、hIL-5R α 鎖にはエクソン 2 のすぐ上流にも転写開始点が存在し、複数のプロモーターによって転写制御されている可能性が報告された。そこで、mIL-5R α 鎖遺伝子にも複数の転写開始点が存在するのかどうか検討した。また、mIL-5R α 鎖の発現を誘導することが知られている抗 CD38 抗体架橋刺激した脾臓 B 細胞で、転写産物の構造や量に差が生じるのどうか検討を加えた。抗 CD38 抗体非存在下 (-) と存在下 (+) で培養した脾臓 B 細胞から 5'RACE 法により mIL-5R α 鎖 cDNA を増幅し、得られた PCR 産物に対してエクソン 1 及びエクソン 2 の合成オリゴマーをプローブに用いたサザンブロットを行った。その結果、エクソン 1、エクソン 2 を両方含む cDNA とエクソン 2 のみしか含まない cDNA の 2 種類の cDNA が存在することが明らかになり、特に後者は抗 CD38 抗体で架橋刺激した場合に前者に比べて 3 倍程度強く誘導されることがわかった。得られた cDNA の塩基配列を決定し、その構造解析から、これまで報告されていた転写開始点 (Exon1a) の 1kb 下流に新たな転写開始点 (Exon1b) が存在することが明らかになった。

2. mIL-5R α 鎖のプロモーター活性に重要な領域

2つの転写開始点からの転写を制御している領域を探索するために、それぞれの転写開始点を含む-581~+1105bp の DNA 断片を順次欠失させてホタルルシフェラーゼ cDNA の上流に結合させたレポーターコンストラクトを作製し、種々の細胞株に導入してプロモーター活性を測定した。その結果、Exon1b 近傍の領域は細胞非特異的なプロモーター活性を有していることが示唆された。一方、-250~+160 領域は mIL-5R α 鎖陽性未熟 B 細胞株 WEHI231 においてのみプロモーター活性を示し、-250~-115 領域を欠失するとプロモーター活性が消失したことから、-250~-115 領域が転写活性化の調節に関与していることが示唆された。さらに上流の領域ではプロモーター活性が認められなかった (図 1)。

3. mIL-5R α 鎖の-250~-115 領域に結合する転写因子の同定

レポーターアッセイから、-250~-115 領域が mIL-5R α 鎖陽性細胞特異的な転写調節に関与していることが示唆された。そこで、その調節領域に結合する調節因

子が存在するかどうかをゲルシフトアッセイにより探索した。mIL-5R α 鎖陽性 (WEHI231、BCL1、BAL17、抗 CD38 抗体刺激脾臓 B 細胞) および陰性 (EL-4、FDC-P1) の細胞群の核抽出液を用いた結果、複数の核内タンパク質-DNA 複合体が検出されたが、そのうち 2 種類 (C-I、C-V) が mIL-5R α 鎖陽性 B 細胞で顕著に認められた。オリゴヌクレオチドによる競合阻害実験と抗体によるスーパーシフト解析から、C-I 複合体には E12/E47 が含まれることが示唆された。C-V 複合体の形成は Sp1、C/EBP β および Oct-2 のコンセンサス配列で約 50 %、-144~-115 領域で 80 %以上競合阻害され、抗 C/EBP β 抗体、抗 Sp1 抗体により部分的にスーパーシフトされた。

4. mIL-5R α 鎖のプロモーター活性における各転写因子の役割

C-I、C-V 複合体の形成を阻害する転写因子のコンセンサス配列が mIL-5R α 鎖陽性細胞特異的な転写活性化にどのような役割を果たしているのかを検討するために、それらの配列に変異を導入したレポーターコンストラクトを作製して、WEHI231 細胞株に導入し、ルシフェラーゼアッセイにより変異導入に対するプロモーター活性の変化を測定した。その結果、E12 および E47、C/EBP β 、Sp1、Oct-2 のすべてが協調的に作用して転写活性化を正に調節している可能性が示唆された。

<考察>

1. 複数の転写開始点による mIL-5R α 鎖の発現調節

5'RACE 法を用いた cDNA の構造解析により、本研究で初めてヒトの場合と同様に mIL-5R α 鎖遺伝子にも複数の転写開始点が存在することが明らかになった。また、Exon1b からの転写が抗 CD38 抗体架橋刺激によって Exon1a よりも 3 倍程度強く誘導されることが示唆された。これより、刺激に応じた発現調節機構が存在する可能性が考えられた。

2. mIL-5R α 鎖の発現調節に関与する領域

-250~-115 領域が mIL-5R α 鎖陽性細胞特異的な転写活性化の調節に関与することが示唆された。この領域には 2 カ所の E-box、C/EBP β 、Sp1、Oct-2 および GATA-1 などのコンセンサス配列が存在する。このうち、hIL-5R α 鎖遺伝子に保存されているのは C/EBP 配列のみである。hIL-5R α 鎖遺伝子で転写活性化に関与していると報告されている RFX 配列は mIL-5R α 鎖遺伝子にも同様に存在するが、その配列を含む-581~+160 領域はプロモーター活性を示さなかった。このようにマウスとヒトでは異なる機構で発現調節が起こると考えられる。

3. mIL-5R α 鎖陽性細胞特異的に結合する転写因子とその役割

ゲルシフトアッセイの結果から、-250~-115 領域上に形成される mIL-5R α 鎖陽性細胞特異的な核内タンパク質-DNA 複合体には、E12 および E47 が含まれる C-I

複合体と、Sp1、C/EBPβ、Oct-2 およびこれら3つの転写因子と相互作用する未同定の転写因子が関与する C-V 複合体の2種類が存在することが示唆された。E12 および E47、Sp1、C/EBPβ および Oct-2 のコンセンサス配列に変異を導入したレポーターコンストラクトを用いたレポーターアッセイの結果、E12 および E47、C/EBPβ、Sp1、Oct-2 が協同的に働いて mIL-5Rα鎖の転写活性化を調節していることが示唆された。

4. mIL-5Rα鎖の発現調節機構

今回の私の解析結果から、E12 および E47 と、Sp1、C/EBPβ、Oct-2 およびそれらと相互作用する未同定な転写因子が協同的に作用して B 細胞における mIL-5Rα鎖の発現調節を行っているというモデルを提唱したい(図2)。C-V 複合体には-144~-115 領域に結合し、C/EBPβ、Sp1 および Oct-2 と相互作用する未同定な転写因子のみが含まれるモデル(図2右)と、未同定な転写因子、C/EBPβ、Sp1 および Oct-2 のすべてが含まれるモデル(図2左)の2つが考えられる。

<まとめと今後の展望>

本研究から、mIL-5Rα鎖遺伝子には複数の転写開始点が存在することが明らかとなり、Exon1b からの転写は抗 CD38 抗体架橋刺激によって誘導されることが示唆された。また、B 細胞における mIL-5Rα鎖遺伝子の発現調節には-250~-115 領域が関与しており、そこには E12 および E47、Sp1、C/EBPβ、Oct-2 および未同定の転写因子が結合し協同的に作用して発現を調節していることが示唆された。今後の課題としては、(1) 未同定の転写因子とは何か、(2) これらの因子はどのように相互作用しているのか (3) マウス好酸球や抗 CD38 抗体架橋刺激した B 細胞での発現調節機構の解明等が上げられる。

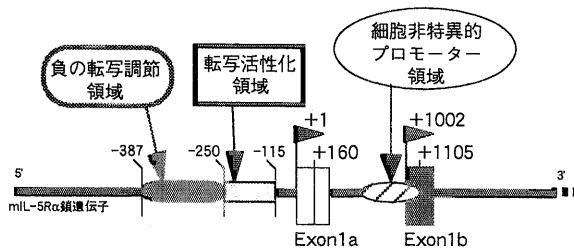


図1 mIL-5Rα鎖のプロモーター領域の構造と役割
レポーターアッセイの結果を模式図にまとめた。Exon1aとExon1bは約1kb離れている。-250~-115領域は転写活性化の調節に関与することが示唆された。-387~-250領域は負の転写調節に関与し、Exon1b近傍領域(+577~+1105領域)は細胞非特異的なプロモーター活性を有していると考えられた。

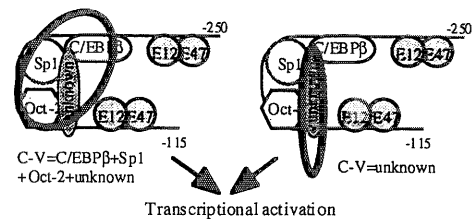


図2 E12/E47、C/EBPβ、Sp1、Oct-2および未同定因子による複合体形成のモデル
mIL-5Rα鎖遺伝子の-250~-115領域にはE12/E47とC/EBPβ、Sp1、Oct-2およびそれら3つと相互作用する未同定因子(unknown)が結合し、転写活性化の調節に重要な複合体を形成すると考えられる。