

ケラチンK5遺伝子の転写制御因子  
-AP2, Sp1を含む- について

大槻 マミ 太郎

# ケラチンK5遺伝子の転写制御因子 ——AP2, Sp1を含む—— について

大槻マミ太郎

## 目的と背景

### ケラチン遺伝子発現のメカニズムについて

いわゆる細胞骨格（サイトスケルトン）とは、広く真核細胞の細胞質内で網状構造を形成している線維成分の総称であり、線維束の太さによりマイクロフィラメント（6nm）、中間径線維（10nm）、および微小管（24nm）に分類されている。上皮細胞で認められるケラチンは、その細胞骨格蛋白の一つである中間径線維に属し、間葉系細胞で認められるビメンチンや筋細胞で認められるデスミンなど他の中間径線維蛋白と異なり、きわめて多様性に富んだ一群の蛋白質である<sup>1)</sup>。

現在までにヒトの上皮細胞系では21種類のケラチン中間径線維（K1～K21）が知られており<sup>2-4)</sup>、そのうちK20<sup>3)</sup>は胃・小腸粘膜および表皮メルケル細胞に、またK21<sup>4)</sup>は小腸粘膜上皮に発現されていることが最近分かったもので、それらの他にも毛皮質から分離された、いわゆる硬ケラチン群が約8種類存在することが知られている<sup>5)</sup>。Mollら<sup>2)</sup>により、分子量と等電点の差によって二次元電気泳動的に、分子量の比較的大きい塩基性ないしtype II ケラチン群（K1～K8）、および分子量の比較的小さい酸性ないしtype I ケラチン群（K9～K19；K20とK21もこれに属す）に分類され、これらはケラチン目録として広く受け入れられている。さらにそのケラチン目録を作成していく過程で、数多くの正常および異常上皮を調べることにより、K9やK19など一部の例外を除いて、特定の塩基性ケラチンは常に特定の酸性ケラチンとペアで発現されていることが判明した<sup>6,7)</sup>。即ちケラチンは、中間径線維に属する他の蛋白とは異なり単独では線維状構造をとることができず、酸性および塩基性ケラチン群同士の組み合わせ、即ちヘテロダイマーが基本となってケラチン中間径線維が形成されるわけである。*in vitro*では、この両者のケラチンサブファミリー

の組み合わせには特定のルールはなく、それぞれのケラチン群から等量のケラチンを選べば安定な線維状構造をとるが<sup>8)</sup>、*in vivo*においては特定の酸性および塩基性ケラチンがケラチン同士の親和性により対を形成し、これによって個々のケラチン対が異なった物理的強靱度あるいは柔軟性を有し、固有の機能を発揮するものと類推される<sup>9)</sup>。

ケラチンペアの発現は細胞の種類、増殖、分化によって特異的に変化し、例えば上皮の中でも重層扁平上皮であるヒト表皮において、その最外層である角層の構成成分としても重要なケラチン蛋白は、基底細胞では塩基性のK5と酸性のK14という1組のケラチンペアから成り（厳密には微量のK15も含まれる）、このペアは粘膜を含め、重層扁平上皮基底細胞に特異的に出現するので扁平上皮型と呼ばれる<sup>6,10)</sup>。そして分化した上層の有棘細胞では、それに加えてK1とK10のペア（角化型あるいは皮膚型）が発現されるようになり、最終分化して角層に至るとこれらのケラチンは一部プロテアーゼにより分解され、分子量のやや小さい蛋白となって角質（死）細胞の線維を形成する<sup>6,10)</sup>。一方乾癬や外傷後など、表皮増殖が刺激されている状態では、K1/K10の代わりにK6/K16（およびK17）という"emergency keratin"（過増殖型）が発現されてくる<sup>11)</sup>。正常ヒト表皮の培養細胞について述べると、通常扁平上皮型のK5/K14と過増殖型のK6/K16の2組のペアケラチンが発現され、角化のマーカーであるK1/K10は発現されないが、培地の液量を培養細胞のコロニーの上面が空気に触れるように調整したり、培地からビタミンAを完全に除去したりすると角化型のK1/K10が合成されてくる<sup>12)</sup>。なお、K5/K14から成る基底層のケラチン線維を尿素抽出後*in vitro*で再構築すると、太さも長さも不定、即ち規則的な10nmフィラメントが形成されないため、不安定で比較的容易にサブユニットに解離することができるが、同様にして再構築された、K1/K10から成る有棘層のケラ

チン線維は10nmの安定した線維を形成する<sup>13)</sup>。このことは、基底細胞では細胞分裂時に動的に分布変換するケラチン線維の特性を反映し、また有棘細胞は保護構造としての表皮の主要な形成細胞であることと密に対応しているように思われる。

さて、これらのケラチンは各々個別の遺伝子によって規定されており、塩基性ケラチン群は12番染色体上、酸性ケラチン群では17番染色体上にそれぞれclusterとして位置しているが、このことは特異的なベアとしてのケラチン発現が単なる染色体上の位置関係によるものではなく、おそらくは主として転写レベルで何らかの共通の制御因子により調節されていることを示唆している<sup>14)</sup>。組織切片を用いたケラチン抗体との反応性、ケラチン蛋白抽出後の電気泳動およびブロッティング反応などの手法によれば、K5/K14蛋白はともに基底層のみならず有棘層においても生化学的には認められるが、*in situ* hybridization法によればそれらのmRNAは基底層のみ認められ、代わりに有棘層では、基底層では検出されない分化型のK1/K10ケラチン遺伝子mRNAが検出されるようになり、それに対応してK1/K10蛋白が発現されてくる<sup>15)</sup>。このことは、ケラチン発現が主として転写レベル、即ちmRNA合成のレベルで制御されていることが示すものであるが、転写後の翻訳レベルをはじめとする発現調節も重要であることを示唆する根拠もあり、例えばK5（塩基性）ケラチンがまず先に発現されてから何らかのpost-transcriptionalなメカニズムによってK14（酸性）ケラチン合成が誘導されてくることが、線維芽細胞へのトランスフェクションなどの方法を用いて明らかにされている<sup>16,17)</sup>。またK6/K16については、表皮細胞が正常の状態では発現されていないが細胞内にmRNAは存在しており、緊急事態で細胞増殖が必要な時にはじめて、蛋白レベルで合成されることが示されている<sup>18)</sup>。しかし、これらの遺伝子レベルでの制御機構の詳細については未だ明らかにされていない部分が多い。



### ケラチノサイト特異的転写制御について

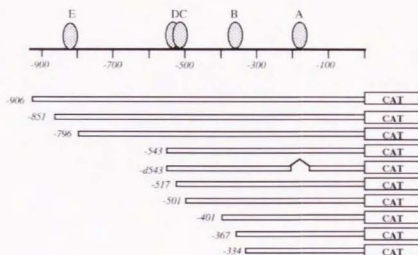
細胞の増殖と分化は主に転写レベルで調節されており、細胞特異的な転写調節が臓器の分化、発癌のメカニズムを解く鍵となることは広く認められている。近年細胞特異的転写因子による細胞分化の例としてMyoDによる筋細胞への分化誘導が発見され<sup>19)</sup>、またリンパ系細胞や肝細胞においても種々のレベルの細胞特異性をもつ転写因子や、普遍的な転写制御因子の相互作用によって転写が調節されていることが明らかにされてきている<sup>20-22)</sup>。ケラチノサイト（表皮角化細胞）においても、その分化に応じて転写調節を受けることが分かっている遺伝子として知られているケラチン、フィラグリン、インボルクリン、ロリクリンなどの遺伝子を用いて、ケラチノサイト特異的転写調節のメカニズムを解明しようと研究が続けられているが、未だMyoDに相当するような特異性の高い制御因子は見出されていない<sup>23)</sup>。とりわけこれまで述べてきたケラチン遺伝子について言えば、K5/K14をはじめ、K1/K10、K6/K16、K17など数多くのケラチン遺伝子がクローニングされており、材料として不足はないものの、Fuchsらのグループをはじめとする精力的な研究をもつても、その発現のpairwise controlのメカニズム、またそれらのペアが何故ケラチノサイトで特異的に発現されるのか、この鍵を解くmaster regulatorの発見に関しては未だにブラックボックスの中にある。

塩基配列分析というアプローチからは、K5/K14各遺伝子調節領域の塩基配列を丹念に分析してもユニークな共通のエLEMENTを発見することはできないが<sup>17)</sup>、かつてBlessingらはケラチンK6、K14遺伝子のみならず、ケラチノサイト特異性を有する別の遺伝子であるインボルクリンのプロモーター、またヒト乳頭腫ウイルスHPV16型E6、E7プロモーター領域にも存在する*cis*のエLEMENTを見出し、CK 8-merないし"Blessing" octamerと呼んだ<sup>24)</sup>。この塩基配列には転写因子NF-Iが結

合し得るが、それ以外の *trans* の因子の特異的な結合は報告されておらず、このエレメントの独自性については十分に検討されていない。現時点では、これのみでケラチノサイト特異性を発揮するというのではなく、他の転写因子との相互作用により機能するらしいという見方が有力である。

一方Fuchsらは近年、K14遺伝子上流にKER1<sup>25)</sup>という、ケラチノサイトに豊富な核蛋白が結合する部位を見出した。そしてこれが、Snapeらが報告した*Xenopus*のケラチンXK81A1遺伝子プロモーター上にある、KTF-1<sup>26)</sup>という特異的制御蛋白の結合部位と様々な共通点があり、KTF-1はKER1のカエルでのホモログであることを指摘してその重要性を説いたが、後にこのKER1は、上皮細胞のみならず広くneural crest由来の細胞に分布するとされる、転写因子AP2と同一ないし相同であることを自ら証明した<sup>27)</sup>。これらの他にも、HPV16型と相同性の高いHPV18型のエンハンサー領域に結合するとされるKRF-1<sup>28)</sup>や、230-kDa水疱性類天疱瘡抗原遺伝子(BPAG1)の上流に結合し(同じ部位にAP2も結合し得る)、BPAG1のケラチノサイト特異的発現に関与することがごく最近報告されたKTP-1<sup>29)</sup>など、ケラチノサイト特異的転写制御に関わるであろうとされる因子の候補は少なくないものの、ケラチン遺伝子調節領域へのAP1やレンチニン酸レセプターの結合を中心として進められている研究からも含めて、細胞特異的因子の同定には至っていない。むしろ既に述べたAP2以外にもTEF-1<sup>30)</sup>など、特異性の比較的低い既知の因子でもその組み合わせや、それら *trans* の因子に二次的に結合する因子の特異性によって高い細胞特異性が生まれることも十分考えられ、意見の一致を見ていないのが現状である。

A



B

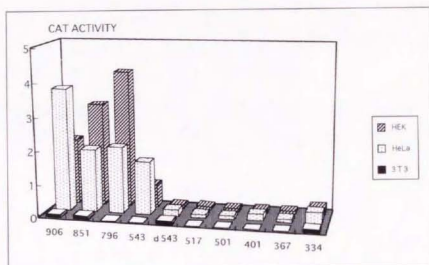


図 1

(A) K5遺伝子調節領域DNA (906bp) 上に同定した核蛋白 (A~E) 結合部位と種々のCAT construct (欠失変異) (B) CAT constructを3種類の細胞 (HEK: human epidermal keratinocyte, HeLa: HeLa cell, 3T3: 3T3 fibroblast) にトランスフェクトした結果をCAT活性の相対値で示す。d543 constructは -200/-166 (Site Aを含む) のinternal deletionであり, HEK, HeLaいずれにおいてもw.t. 543 constructと比べ, 転写活性がほとんど消失している。



GGATCCCCGGGTTTCTAAACCCCCACAGAGTCTTGCCCAGGCCAAAGAGCAAGGAAAGGTCA -841  
AAGGGCAGTAA<sup>E</sup>AAATGCTGAGTTAGGAGGAGCTATGGAAGGATAAACCTGGCCTTAAGA  
GGTCAAAAGTGGTTTATAGGGGGCGCTGAGGGCTTCCACATTCTCTGGCCTAAACCTTGC -721  
AGGCAGATCTGCCAGTGGGCTCTGGGATAGCTGTGCCTTCCCTAACAAAAAATTGTGC  
ACAAAAGGATGAAACTCTATTTTCCCTCTAGCACATAACCAAGAATATAAGGCTACAGAT -601  
TGCCTTTCCAGAGGGAAAAACCTGCAGCAACCTGCTGCCTGGAAAAGTGAAGAGCAGA  
TCACTGGGGAATCGTTTGGCCCCCTCTGATGGACAGCTCCCAAGCTCCAAGGGCAGGT -481  
GCTCAGCATGTACCGTACTGGGATGGTTGTCAATACTCCTGGTCTTGAAGAGTCCACGG  
ACA<sup>D</sup>CTGCCATGCCAATGCCCTCAGTTCTCGGCATCCTTTTGGGCTGCTCACAGCCG -361  
AGCCTCTATGGTGAAGACATACTTGCTAGCAGCGTACCAACTTGTGCAAGAGATCAG  
TGCTCGAAGGCAAGGTTATTCTAACTGAGCAGAGCCTGCCAGGAAGAAAGCGTTTGAC -241  
CCCACCACTGTGCAGGTGTGACCGTGAGCTCACAGCTGCCCCCAGGCATGCCAGC  
CCCTTAATCATCAGCTCGACAGCTCTCTCGCCAGCCAGTTCTGGAAGGGATAAAA -121  
AGGGGCATCACCGTTCCTGGGTAACAGAGGCCACTTCTGCGTCTGCTGAGCTCTGTCT  
CTCCAGCACCTCCCAACCACTAGTGCTGCTCTTGTCTCCACCAGGAACAAGCCACC ATG  
Met

## 図 2

K5遺伝子上流調節領域の塩基配列と5つの核蛋白（A～E）結合部位を示す。

▼～▼（約40bp）は図1のd543 constructにおいて欠失させた部分を、下線は retinoic acid responsive element（RARE）のpalindrome half site（GGTCA）類似塩基配列を表す。Site Aの近傍にAP2コンセンサス配列（CCCCAGGC）が存在する。

## 本研究のこれまでの背景と本論文の主旨

筆者の所属した研究グループでは以前より、上に述べたケラチン発現の転写レベルでの制御に焦点をあて、数多くのケラチン遺伝子調節領域DNAと核蛋白の相互作用について分析してきたが<sup>31-33)</sup>、とりわけK5ケラチン遺伝子上流にある調節領域DNA (約900bp)を検討することにより、preliminaryに大きく分けて5つの核蛋白結合部位を同定した<sup>31)</sup>。そのうち最も下流、即ち翻訳開始部位の近くに存在する部位 (Site A) を含んだ約40bpのエLEMENT (-200/-166) を欠失させた変異を、クロラムフェニコール・アセチルトランスフェラーゼ (CAT) ベクターに組み込んだプラスミドを用い、CATアッセイを行うと転写活性が消失することが示された<sup>31)</sup> (図1の-d543)。欠失変異だけでなく点突然変異を用いての検索は行っていないが、興味深いことに塩基配列上Site Aの近傍、同じ40bp内にコンセンサスAP2認識部位が存在していた (図2; ただしこの時のゲルシフトではAP2の結合は検出されなかった)。既に述べたように、転写因子AP2のケラチノサイト特異的発現制御における重要性についてはいくつかの報告があり<sup>27,29)</sup>、K5ケラチン遺伝子においても当然その関与が、それも場合によっては他の因子との相互作用を介して予想されるため、筆者はとくにこのK5遺伝子上流40bpのエLEMENTに興味をもち、この比較的短い領域に結合して転写制御に関わる核蛋白を同定しようと試みた<sup>34)</sup>。またとくにそれらの機能、独自性と相互作用について検討を試みた。その結果が本論文の主たる内容である。

論文の主旨はあくまでK5に焦点を当てたものであるが、先に述べたケラチノサイト特異的転写調節との関連について付け加えると、筆者の研究グループによる複数のケラチン遺伝子クローンを用いた多角的分析の結果では、転写制御に重要な役割を果たすと思われる核蛋白結合部位はRARE (retinoic acid responsive element)

の場合<sup>35)</sup>のみならず、K6やK16遺伝子調節領域の検索結果からも"cluster"として存在することが多く<sup>32,33)</sup>、それらの組み合わせこそが——つまりMyoDのようなsingle master regulatorではなく——高い細胞特異性を生むのではないかと、いうことであった。そこで本論文では、K5遺伝子上流40bpのエLEMENT上に同定された複数の*trans*の因子結合部位を、K5とおそらく共通の転写因子が結合してケラチノサイト特異的転写調節に関与するであろうと期待される他のヒト表皮ケラチンのうち、筆者の研究室で既にクローンがとれているK6、K14、K16、K17各遺伝子上流の*cis*のエLEMENTとも比較検討し、同定されたそれらの転写制御因子がケラチノサイト特異的転写調節に関与する可能性についても、若干の考察を加えることにした。

#### ケラチン遺伝子の異常と皮膚疾患

最後になったが、ケラチン遺伝子の異常が実際にどのような皮膚疾患を惹き起こすのか、この分野の研究では最近著しい進歩が見られるので一言加えておく。

ケラチンの構造と機能に関する専門的な研究はごく最近まで、ケラチン発現は病的状態において二次的に変化を受けることはあっても、病因に直接関与することはないであろうと信じられてきたこともあって、臨床の場で目の目をみることはなかったが、近年になって遺伝性水疱性皮膚疾患の発症機序の解明という思いがけない展開を見せ脚光を浴びることになった。その発端になったのはFuchsらの報告<sup>36)</sup>で、ケラチンが線維状構造をとるためには"rod domain"と呼ばれる領域(α-ヘリックス領域)が重要な役割を果たすことが分かっているが、彼らはもしこのrod domainに先天的に異常がある場合、ケラチンは細胞質内において正常な線維状構造をとれず、細胞骨格蛋白として細胞の形態を維持できないであろうと考えた。そこで彼らはこ

れを立証するため、rod domainを欠くセラチンを発現するトランスジェニックマウスを作成したところ、思いがけずそのマウスは単純型先天性表皮水疱症類似の所見を呈した<sup>36)</sup>。この結果は、構造に異常をもつセラチンが発現されると、本来セラチンが持っている細胞骨格蛋白としての機能が脆弱となり、細胞が軽微な外力により破壊されることを示すものであった。その後FuchsとEpsteinのグループにより、単純型表皮水疱症 (EBS) においてK14遺伝子に点突然変異が存在することがほぼ同時に発表され<sup>37,38)</sup>、続いてK14とセラチン対を形成するK5においても、そのrod domainに点突然変異を有することがLaneらにより報告された<sup>39)</sup>。またその後同様の視点に基づき、皮膚型のK1/K10遺伝子点突然変異が水疱型先天性魚鱗癬様紅皮症 (BCIE) の原因であることを示唆する報告が相次ぎ<sup>40~42)</sup>、さらにある種の遺伝性掌蹼角化症の原因がK9遺伝子に求められることも判明した。EBSとBCIEは、水疱が生じる位置がそれぞれ基底細胞およびその直上の有棘細胞であるが、その理由は、変異があるセラチンが各々の部位において特異的に発現されるためと説明されるわけである。

セラチン遺伝子の点突然変異を原因とする疾患が他にも存在するであろうと予想されており、引き続き検索が行われているが、いずれにせよセラチンの線維状構造の形成不全という *in vitro* の現象が水疱形成という *in vivo* の所見を見事に説明し、表現型是水疱症に分類される疾患が病因論的には実は角化異常症に属するという意外な結論を導いた功績は大であり、基礎研究の積み重ねが大きな飛躍となって結実した好例であるといえよう。筆者の本研究は、そのような疾患の病態生理などと直接結びつくものでは無論ない。しかしセラチン遺伝子がこのように注目を集めている中、その転写調節の研究は表皮細胞の分化、癌化のメカニズムの基本に迫るものであり、また遺伝子治療のターゲットとしてセラチノサイトを捉える時、その細胞特

異的転写制御の理解は必須のものであることを考え合わせ、本研究が昨今の目覚ましい研究の流れの中で、ささやかながら何らかの寄与をするものと信じたい。

## 材料 および 方法

### 1) オリゴヌクレオチドの合成

DNAトランスフェクションに用いるinternal deletion construct (欠失変異) およびmutation construct (点突然変異) を作成するためのPCRに必要な、Forward(F)およびReverse(R)のプライマーのセット、そしてゲルシフト法でプローブあるいはコンペティターとして用いるオリゴヌクレオチドはすべて、Pharmacia Gene-Assembler Plusを用いて合成し、それぞれ表1、2に示した。Positionの数字はいずれも翻訳開始部位からの塩基対数を示す。

### 2) プラスミドの作製

796および543bpのヒトK5ケラチン遺伝子上流の調節領域DNA (プロモーター領域を含む) 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) 遺伝子のベクターに組み込んだpK5CAT、CATアッセイでpositive controlとして用いるpSV2CAT、同じくCATアッセイでトランスフェクションの効率によりプロモーター活性を補正するのに必要な、いわばinternal controlとしてのpRSVZについては既述の方法<sup>31)</sup>で入手、作製した。

Internal deletion construct (欠失変異) は表2に示すごとく、削除すべき部分 (deletion) の上流と下流の2つのフラグメントをpK5CATを鋳型としてPCRを用いて別々に作製し、それらをまず削除部分の両端に付けたXba I siteで結合した後、





Kpn I と Pst I を利用してさらにCATベクターに組み込むことによって作製した。

Mutation construct (点突然変異) についても Xba I の代わりに Xho I, Kpn I / Pst I の代わりに Xba I / Hind III を用いる以外ほぼ同様であるが、基本的にDNAの蛋白結合部位の変異部分がほぼ Xho I site に置換されているだけで、欠失変異のように調節領域DNAの塩基対数を減ずることなく、即ちDNAを故意に短くし歪めることによって、エンハンサーなど遠隔の部位やそこに結合する因子との重要な *cis*, *trans* の相互作用を破壊してしまうことがないように留意してデザインを行った。

なお、プラスミドDNAはすべて Magic Megapreps DNA purification system (Promega) を用いて精製し、PCRを用いて作られたリコンビナントDNAはすべて制限酵素およびシークエンシングによって確認を行った。

### 3) 核蛋白の抽出

HeLa細胞およびヒト表皮ケラチノサイト (HEK) からの核蛋白抽出は、基本的には Dignam の方法<sup>43)</sup>に従ったが、プロテアーゼ・インヒビターの添加など既述の修正・補足<sup>44)</sup>を行った。

### 4) ゲルシフト法

表1に示した相補的オリゴヌクレオチドのアニーリングにより二本鎖DNAを作成したものはそのままコンペティターとして、またプローブとして使うものはさらに Klenow Fill-In Kit (Stratagene) を用いて<sup>32</sup>Pで標識してゲルシフト・アッセイに使用した。そして上述のHeLa細胞あるいはHEKから抽出した核蛋白5 $\mu$ gをまず過量(20~200; 通常は100 molar ratio excess)の無標識コンペティターと15分間、4 $^{\circ}$ Cにて反応させた後(コンペティションを行う場合)、80000 cpmのプロー

ブを添加してさらに20分間、4℃にて反応させたものを5% non-denaturing ポリアクリルアミドゲルに電気泳動させることによって、核蛋白と結合したプローブをフリー・プローブと分離せしめ、ゲルを乾燥後-70℃で16時間オートラジオグラフィーを行った（文献<sup>32, 33</sup>）に詳述）。

スーパーシフト（ゲルシフト）アッセイは5～500ngのSp1-specific antibody（Santa Cruz Biotech）を標識プローブ添加前に核蛋白と20分間、やはり4℃で反応させて同様のゲルシフトを行った。

### 5) 細胞培養, DNAトランスフェクションとCATアッセイ

HeLa細胞は10%FCSを加えたDulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) 中で、また有棘細胞癌SCC-F12細胞はそれにさらに0.5ng/mlヒドロコチゾンを追加した条件下で培養した。ヒト正常包皮由来のケラチノサイト (HEK) は米国ニューヨーク州立大学のDr. Marcia Simonより分与され、Bovine pituitary extractおよびEGFを加えたSerum-free Keratinocyte Medium (SFM) 中で培養した。

HeLaおよびSCC-F12細胞のトランスフェクションはChen&Okayamaの変法<sup>45, 46</sup>、またHEKは80% confluentの状態でpolybrene-DMSOショックによる方法<sup>47</sup>に従い、上述のpSV2CATおよびpRSVZのコントロールを用いて行った。そしてトランスフェクションの48時間後にharvest、凍結・融解サイクルを前者は3回、後者は5回繰り返して細胞を破壊した後、既述の方法<sup>46</sup>にてCATおよび $\beta$ -ガラクトシダーゼ ( $\beta$ -GAL) アッセイを行い、トランスフェクションの効率の如何によってCAT活性を補正したものをCATレベル相対値として図示した。

## 実験結果

### 1) 約40bpのK5 complexにはAP2, Sp1を含む制御蛋白が結合する

筆者が焦点を当てた、K5ケラチン遺伝子上流の調節領域中にある約40bpのエレメント(K5 -203/-166)をプローブとして、また種々の既知の転写因子結合部位のコンセンサス塩基配列を有するオリゴヌクレオチドをコンペティターとして、HeLa細胞抽出核蛋白とゲルシフトを施行した。なおこれから述べるゲルシフトの実験において、HEKからのものを使用した一部の実験を除いて、DNAと反応させる核蛋白はHEKより抽出が容易なHeLa細胞より得たものを用いたが、このような実験から得た結果でケラチノサイト特異性を論じるには、非常に制約があることをまず記しておかねばならない。詳しくは考察に譲るが、少なくとも5)で述べる転写活性について言えば、K5 CAT (wild type) は3T3 fibroblastなど非上皮系の細胞では活性が認められなかったが、HEKやSCC細胞のみならず、K5を発現していないHeLa細胞においても転写活性を有しており、定量的分析が可能であったためHeLa細胞での検索を中心に進めることとした。

図3に示すごとく、プローブが蛋白を結合しDNA-蛋白複合体を作るために形成されるバンドがいくつか認められ、それらはいずれもSif、即ち無標識のプローブと同じDNAをコンペティターとして用いた時に消失するので、プローブ塩基配列に特異的と考えられるのであるが、AP2とSp1 (いずれもコンセンサス配列) は各々コンペティションにより相異なるバンドを消失せしめることから、K5遺伝子上流の約40bpのエレメントは少なくともAP2とSp1蛋白を結合することが予想され、以後このエレメント(厳密には-203/-166の下流4bpを加えた-203/-162; 4 bpを欠くと後に述べるSite Aへの結合を検出できない)をK5 complexと呼ぶ(表1参照)。

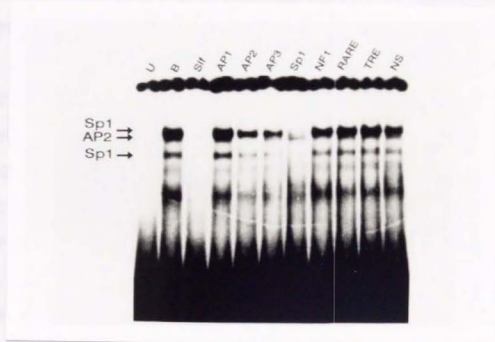


図 3

プローブ : K5 -203/-166, lane U : Unbound, B : Bound, Slf~NSはいずれもコンペティターをプローブの100 molar ratio excess 添加。Slf : probe itself, AP1~NF1 (表1に図示) はすべてコンセンサス配列 (commercially available) RARE : retinoic acid responsive element, TRE : thyroid hormone responsive element, NS : non-specific competitor (K5 Site B ; 図2参照)



なお後述の4)におけるK5 complex, およびそのmutantはすべてその4bpを追加した-203/-162を用いたものであり, これを用いて初めて, Site Aへの結合が認められるようになる。

なお, コンセンサスAP2とのコンペティションにおいて, AP2の結合と思われるバンドが消失するだけでなく, Sp1に帰せられるバンドも全体的に薄くpartial competitionが認められるが, 以後何度か繰り返し行ったゲルシフトでは同様の所見はみられなかった。コンセンサスAP3とのコンペティションにおいては, 検出されるバンドすべてにコンペティションが認められるが, これについてはそれ以上の検索を行っていない。また, 図3の矢印で示したバンドより下方の泳動度の遅いバンドは, 特異性がはっきりせず再現性もみられなかったもので, 変性した蛋白によるものかもしれない。さてもう一つ付け加えておくべき重要なことは, K5遺伝子上流の約40bpのエLEMENTは少なくともAP2とSp1蛋白を結合すると述べたが, その結合は相互排他的, つまり図3ではAP2とSp1がクラスターとなってELEMENTに同時に結合した複合体は捉えられておらず(最も泳動度の遅いバンドをそれと考えるのが不可能であることは, AP2とのコンペティションから容易に分かる), 認められたDNA-蛋白複合体は各々AP2単独, あるいはSp1単独の結合と考えられることである。

## 2) K5 Sp1結合部位の同定, およびK16 Sp1との比較

K5 complexにSp1結合部位が存在することを示唆する結果は, K5遺伝子調節領域塩基配列中にSp1のコンセンサス配列(CCGCCC)<sup>48)</sup>が存在しないことから, 意外に思われた。そこで筆者は次に, Sp1のコンセンサス・オリゴとプローブ自身(Self; 図3で用いたものと同じ)の2種類のコンペティターを濃度を変えて, 同じプロー

ブを用いゲルシフトを行って比較したところ、Sp1コンセンサス・オリゴはプローブ自身とほぼ同程度のコンペティション能力を有することが示された（図4）。約40 bpのK5 complex塩基配列中にはSp1のコンセンサス配列（CCGCCC）は存在しないものの、コンセンサスAP2認識部位（既に背景のところでも触れたように、K5 complex中に存在する）のすぐ近傍（下流）にGC richな領域があり、ゲルシフトの追加実験を施行してK5 Sp1結合部位をそこに同定した。そのコアの配列は、GCCCAGCCCAというGCCCAの繰り返しであり、K5 AP2結合部位のまさにすぐ下流に相接して存在することになる。

次なる疑問は、K5 Sp1として特異的コンペティションが認められるバンドは1本ではないことから（図3、4）、それら全部がSp1なのか、つまりダイマーを形成したり蛋白の変性のために生じたりしたものではないか、ということであった。そこでSp1-specific antibodyを用い、またK5 Sp1結合部位のみを含む短いオリゴヌクレオチドをプローブとして、スーパーシフト（抗体が特異的に結合するとさらに大きな複合体を形成するため、バンドが上方にシフトする）を施行したところ（図5）、転写因子Sp1そのものの結合と考えられるバンドは上のバンド（よく見るとdoubletを形成している）のさらに上半分のみであり、他のものは影響を受けないことから、K5 Sp1結合部位には転写因子Sp1以外にも他の核蛋白が結合し得ることが示唆された。Sp1以外のそれら核蛋白の機能については、同じ認識部位に競合的、排他的に結合しているのか、あるいはSp1そのものの結合を安定化するために存在しているのか（この場合は抗原性のないcomponentがまず先に結合している可能性がある）、興味深いところであるが、筆者はそれ以上の検索は行っていない。GC-richなエレメントに結合する蛋白なので、転写活性には直接関与のないものであるかもしれない。

さて、さらに筆者が意図したのは、やはり表皮のケラチンであるK16の遺伝子調節領域中に存在するSp1結合部位（こちらはコンセンサス配列）を、このunusualなK5 Sp1結合部位と比較してみようということであった。結果は図5の右半分に示すように、上述のスーパーシフトにおいてK5とK16は全く同一のパターンを呈し、しかも相互にコンペティションが認められた。この事実は、相異なるケラチン遺伝子の発現に共通の転写因子がしかも複数のグループとして関与するということを裏付ける意味で、初めての報告といえる。なおHeLa細胞だけでなく、HEKからも核蛋白を抽出して同様のゲルシフトをK5 Sp1をプローブとして施行してみたが、バンドはやはり全く同一のパターンを示した。今までの図3～5でも繰り返し見られるパターンから推察されるように、K5 Sp1認識部位への結合には、抽出蛋白変性によるアーチファクトではない、複数の異なる核蛋白が関与することが示唆された。なお同様のパターンは他の文献<sup>48)</sup>でも報告がある。

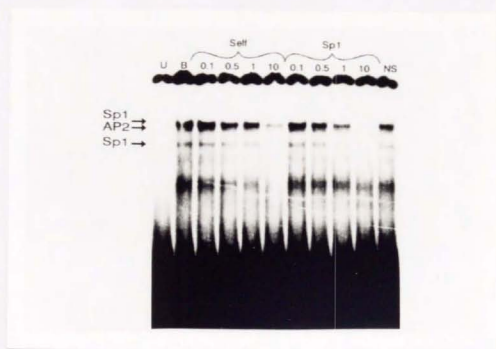


図 4

プローブ : K5 -203/-166, 2 種類のコンペティター Self・Sp1, および NS  
いずれもと図 3 のものと同一。コンペティターは 0.1~10ng (プローブの 0.2  
~20 molar ratio excess) を添加。U : Unbound, B : Bound

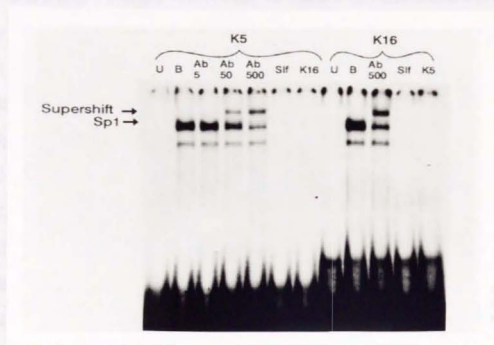


図 5

Sp1-specific antibody (5~500ng) を用いたスーパーシフト・アッセイ。

プローブ：パネル左はK5 Sp1, 右はK16 Sp1 (表1 参照)。U: Unbound,

B: Bound, Sif: Self competition, コンペティターとしてSif以外にK16/

K5 Sp1を使用し, 相互にコンペティションを行った。



3) 相接するK5 AP2, Sp1両部位はそれぞれ個別にAP2, Sp1を結合するヒト・メタロチオネイン遺伝子においては, AP2およびSp1結合部位は事実上同じエレメントの中に重複して存在しているが<sup>49, 50)</sup>, K5 complexではどうであろうか。K5 Sp1のすぐ上流に相接してAP2のコンセンサス配列が存在することは既に述べたが, 両者の結合部位の相互作用を検討するために, K5 AP2結合部位のみあるいはK5 Sp1結合部位のみを含む短いオリゴヌクレオチドをそれぞれプローブとして用い, 同じポリアクリルアミドゲル上で同時に電気泳動を行った。図6に示すごとく, 両者はこれまでの図3・4で見られたのとほぼ同じ位置でバンドを形成し, それぞれメタロチオネイン遺伝子上のAP2認識部位, SV40やHTLV-Iプロモーター上のSp1認識部位と特異的コンペティションが認められ, またもちろん相互のコンペティションは見られない。このことから, K5 AP2とK5 Sp1の両結合部位は相互に依存せず, 転写因子AP2およびSp1をそれぞれ個別に結合するらしいことが推測される。

K5 Sp1の結合(の一部)がSp1-specificであることは既にスーパーシフトで証明したが, K5 AP2の結合もAP2-specificであることを裏付けるために, ヒト・メタロチオネイン遺伝子上のAP2結合部位(図7A), およびK5 AP2結合部位(図7B)をプローブとし, またそれぞれをコンペティターとして用いゲルシフトを施行した。K5 Sp1の場合のようにスーパーシフトを行っていないが, 図7の結果よりK5 AP2に結合する核蛋白は, 転写因子AP2そのものであることが強く示唆される。

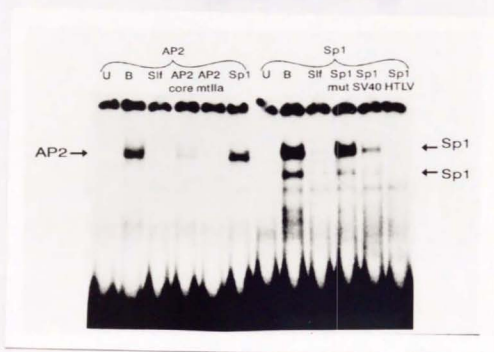
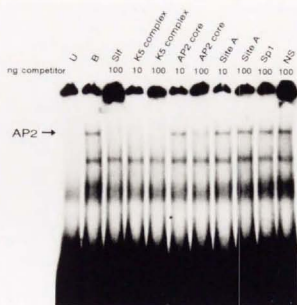


図 6

プローブ：パネル左はK5 AP2，右はK5 Sp1 (表1 参照)。U：Unbound，  
B：Bound，Sif：Self competition，コンペティターとしてSif以外にK5 AP2  
core，metallothionein IIa (mtlla) gene AP2，Sp1 consensus，K5 Sp1  
mutant (mut)，SV40 Sp1，HTLV Sp1を使用した。

A



B

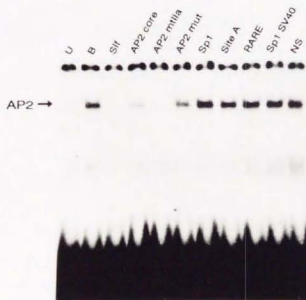


図 7

プローブ : (A) metallothionein Ila (mtla) gene AP2, (B) K5 AP2,

U : Unbound, B : Bound, Sif : Self competition, Sif以外のコンペティターは

図3, 図6に既出のもの他, K5 Site A, K5 AP2 mutant (mut) を用いた。

mtla AP2とK5 AP2は相互に特異的コンペティションが認められる。

#### 4) K5 complexにはAP2, Sp1結合部位の他にもう一つ部位が存在する

目的と背景のところで述べた、筆者が以前にK5ケラチン遺伝子調節領域に preliminaryに同定した5つの核蛋白結合部位のうち最も下流、即ち翻訳開始部位の近くに存在する部位(Site A)<sup>31)</sup>への結合は、今回これまでのゲルシフトでは検出できなかった。既に1)でも触れたが、Site Aへの結合にはさらに下流のいくつかの塩基対が必要である可能性も考えられるため、これまでのプローブ-203/-166の下流に4bpを加えた-203/-162を新たにK5 complexとし(表1)、ゲルシフトを行うことにした。そして、これまでのゲルシフトで示してきたようにSp1、とくにその上位のバンドは太く強力であり、すぐ下位のAP2のバンドとも重複して判別し難いことから、Sp1のその強力な結合を取り除いてみればさらに新しいバンド、即ち別の蛋白結合部位、例えばSite Aへの結合が検出できるかもしれないと考えた。

そこでまず、K5 complexの中でSp1の部位のみ変異を作り(表1のK5 Sp1 mutant; 変異箇所を★で示す)、それをプローブとしてゲルシフトを行った(図8)。すると予想されたごとく、Sp1で見られた特有のバンド・パターンはもはや認められないが、残存しているAP2のバンドとは別のバンドがSp1固有の位置よりやや上位に検出されるようになった。この結合はK5 complexのwild typeでもmutantでも同様にコンペティションが起こることから、人為的に生ぜしめたバンドではないと考えられ、さらに種々の長さのオリゴや変異オリゴとのコンペティションを行った結果、Site Aを含む短いオリゴヌクレオチド(K5 Site A; 表1参照)によって特異的コンペティションが認められたため、このバンドをSite Aへの特異的結合によるものと考えた。しかしながらここでも、1)の最後で触れたのと同様に、AP2認識部位とSite Aの両方に同時に蛋白が結合した、大きな複合体によると考えられる泳動度の遅いバンドは検出されなかった。

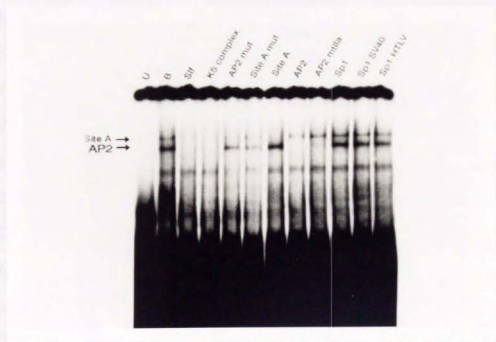


図 8

プローブ：K5 Sp1 mutant (-203/-162) コンペティター：プローブ自身  
 (Sp1)およびK5 complex wild type (-203/-162) はw.t.のAP2, Site Aをともに  
 含んでおり、2本のバンドの両方ともにコンペティションが起こるが、w.t.の  
 Site Aのみを含むK5 AP2 mut, K5 Site AではSite Aへの結合（上のバンド）  
 のみが見られなくなり、逆にw.t. AP2のみを含むK5 AP2ではAP2の結合のみ  
 （下のバンド）が消失する（Site A mutantでははっきりしない）。Sp1のみを  
 含む他のコンペティター（既出）を加えてもコンペティションは認められない。



さらにK5 complexの中でSp1認識部位だけでなく、AP2の箇所にも変異を作ったものをプローブとしてゲルシフトを行うと（表1のK5 double mutant）、AP2のバンドも消失してSite Aのバンドが認められるのみとなった（図9）。またK5 AP2、K5 Sp1の同定の時と同様に、Site Aのみを含み他の結合部位を含まない短いオリゴヌクレオチドをプローブとしても、同じ位置にバンドが生じ特異的コンペティションが認められた。以上の結果より、結局Site AはAP2とSp1結合部位のすぐ下流に位置することになり（図10A参照）、K5 complex中に新たな制御因子が結合してAP2、Sp1と*in vivo*においてクラスターを作る可能性が示唆された。ただし*in vitro*のゲルシフトにおいては、実際にクラスターとなって結合しているバンドを検出していないので、この解釈については後の考察で詳述することにする。

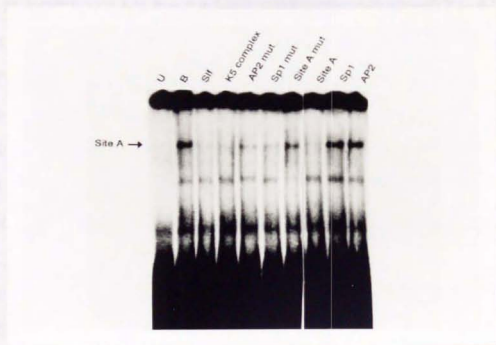


図 9

プローブ : K5 double mutant (-203/-162) はAP2, Sp1 結合部位ともに破壊したもの。図8でみられたAP2のバンドは認められない。intact Site Aを含むK5 complex, AP2 mut, Sp1 mut, Site Aを加えるとコンペティションが起こるが, w.t. Site Aを含まないK5 Site A mut, K5 Sp1, K5 AP2ではバンドは消失しない。

### 5) 3つの蛋白結合部位はいずれも転写調節機能において重要である

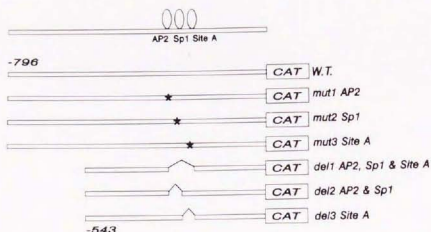
さて、以上のゲルシフトによってK5遺伝子調節領域中の約40bpのエLEMENTに同定された3つの蛋白結合部位が、実際に転写調節にどのように機能しているのかを検討するために、表2に示すごとくForward(F), Reverse(R)のPCRプライマーのセットを用意した。それを用いて、internal deletionとしては(*del* 1) 3つの部位すべてを除去したもの、(*del* 2) AP2とSp1の2つの結合部位を除去したもの、(*del* 3) Site Aのみ除去したもの、またmutant (DNAの長さは変えない) としては(*mut* 1) AP2のみ、(*mut* 2) Sp1のみ、(*mut* 3) Site Aのみそれぞれ変異を起こしたプラスミドを作製し、3種類の細胞即ちHeLa, SCC-F12, HEKにトランスフェクトしてCAT,  $\beta$ -GALアッセイを行い、それらの転写活性を補正CAT相対値として図示してwild type (w.t.) のそれと比較した(図10)。なお、3つの部位それぞれのミュータントは、表2にあるように変異箇所をすべてXho I siteで置換してあるが、その変異の作り方は4)のゲルシフトで用いた変異オリゴとは正確には異なるため、そのXho I siteで置換した変異オリゴを作り直して4)と同じゲルシフトを施行したところ、既出の結果と同一の結果が得られた——つまり3つのミュータントDNAは、いずれも対応する核蛋白を*in vitro*では結合しないのを確認したことと付け加えておく。

図10を見ると分かるように、いずれの*del* (1~3) でも、またいずれの*mut* (1~3) でも転写活性は低下するが、その低下の程度は当然のことながら後者より前者で顕著であった。また、その傾向は3種類の細胞いずれにおいても同様であるように見えるが、この点に関しては*mut* (-796) と*del* (-543) 両者のもと(鋳型)の長さには差があるので、断っておかねばならない。というのは、目的と背景(本研究のこれまでの背景)のところでも触れたが、HeLa細胞へのトランスフェクション

においては、-543のw.t. constructはコントロールの-796 w.t.と比べてその転写活性にほぼ差はないが、HEKでは大きな差が認められるので（図1），HeLaにおいては*mut*，*del*をそのまま比較することはできても、HEKでは*mut*，*del*の定量的比較はできないということである（SCC-F12細胞についても同様）。HeLaと異なり、HEKで有意な差が認められる-796/-543の領域の検索は非常に興味深いものであるが、preliminaryに行ったゲルシフト等の実験では再現性のある結果が得られず、本研究では残念ながら割愛することにした経緯がある。なお、*del* 1は図1における-d543に他ならない。

さて、以上の制約された事情を斟酌した上で図10より解釈できることをまとめると、次のようになる。即ち、K5 complex中の3つの蛋白結合部位は、そのどれか1つでも蛋白と結合できない状況下にしてしまうと転写活性が低下することから、いずれも本来の転写機能の発揮に重要であると考えられる。しかしながら、かなり広範な点突然変異を起こして各部位を破壊してもなお、HeLaで認められる*del*（1～3）のように転写活性は消失せず、HeLa、HEK、SCCいずれの細胞においてもコントロールの1/2～1/3程度の活性が保たれるということには、逆に注目しなくてはいけないであろう。ゲルシフトの結果でも何度か触れてきたように、各部位に対応する因子が実際にクラスターとなって結合するのを*in vitro*で証明してはならず、また2つ以上の部位を欠失ではなく点突然変異によって破壊した実験を行っていないため、各部位の相互作用については推測の域を出ないが、それに関して考えられる仮説については後の考察で述べることにする。

A



B

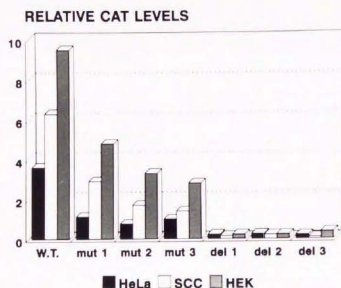


図10

(A) K5遺伝子調節領域796bp上の40bpエレメント中に同定した3つの核蛋白結合部位 (AP2, Sp1, SiteA) と種々のCAT construct (★ : point mutation, Δ : internal deletion) (B) CAT constructを3種類の細胞 (HeLa : HeLa cell, SCC : squamous cell carcinoma line SCC-F12, HEK : human epidermal keratinocyte) にトランスフェクトした結果をCAT活性の相対値で示す。



#### 6) 他のヒト表皮ケラチン遺伝子調節領域における3つの部位の位置関係

K14遺伝子調節領域におけるAP2結合部位の重要性については報告があり<sup>27)</sup>, またK16においてもAP2認識部位が既に同定されている<sup>33)</sup>。そこで筆者はK14, K16だけでなくK17, K6においてもAP2結合部位が存在する可能性を検索, またSite Aについても併せて検索を行い, K5のようにSp1結合部位を含めたそれらの部位が近接して存在する可能性について検討を試みた(図11)。

K16においては既に2)でも述べたようにコンセンサスSp1認識部位を有しており, そのすぐ近傍にAP2部位類似の配列を見出したが, これはK5 AP2をプローブとしたゲルシフトでコンペティションが起こらなかった。しかしSp1結合部位をはさんでその反対側の近傍にはSite A類似の配列が存在し, これはK5 Site Aをプローブとしたゲルシフトでコンペティションが起こり, K5と共通のSite A結合蛋白(Protein A)が関与する可能性が示唆された。K17においてもAP2部位類似の配列を発見し, こちらはK5 AP2をプローブとしたゲルシフトでコンペティションが起こったため, K17遺伝子調節領域にもAP2の関与が示唆されたが, 興味深いことにはそのAP2部位類似配列の近傍にSp1認識部位(コンセンサス配列)が存在し, さらにその両者の間にSite A類似の配列が見出され, K16のそれと同様コンペティションが認められたことから, ここでもまたSite A結合蛋白の関与の可能性が示唆された。

K14とK6に関してはゲルシフトを施行しておらず, 塩基配列分析のみの結果を示す。K14では2つのコンセンサスSp1とそれぞれに近接するAP2部位およびSite Aの存在が示唆されたが, 2つのSp1は約150bp離れて位置しており, またK6においてはK5 Sp1結合部位に極めて類似した配列が1つ同定されたが, putative AP2と考えられる部位とは離れて存在していた。

A

	AP2	Sp1	Site A
K#5	TGCCCCCAGGCAT //	GCCCAGCCCA	CCCACT TA ATGATT
K#16	CCTTCCCCAGCTGC(R) 	CCCCGCCT	CCCTCT -- AACTTGQR)
K#17	GGCCCTCCAGCTAT(R) 	GCCCGCCC	CCCA <sup>T</sup> TTAG GTCATGG
K#14	CGCCCCCTACCCAT ///	CCCCGCCU) TCCCGCCA(D)	CCCTGT GA ATCACGC
K#6	CCCTTCCCAACCTG	GCCCAGCCCT	
CONSENSUS	CCCCCANC TTTTT GT		CCC <sup>T</sup> NT N <sub>6</sub> AT <sup>T</sup> ATGG A GATCTG

## SUMMARY

B

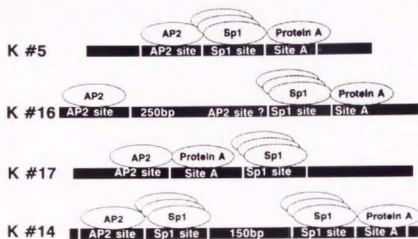


図 11

ヒト表皮ケラチン遺伝子調節領域において共通の関与が期待される転写制御部位 (AP2, Sp1, Site A) の塩基配列 (A) と位置関係 (B)。配列上, Rはreverse orientation, U/DはK14上流域中の2つのSp1 site (up/downstream) を表す。3者の位置関係ではK5が最もtightであり, K17がこれに次ぐ。K16ではすぐ上流のAP2類似のsiteはゲルシフトで結合が示唆されず, 代わりに250bp上流にAP2が結合する<sup>23)</sup>(考察参照)。K14では2つのSp1 siteは約150bp離れて存在する。

## 考 察

以上の結果より、ヒトK5ケラチン遺伝子のプロモーター上流域にある約40bpの領域は、比較的短い中に複数の制御蛋白が関与する、いわばhotなエレメントであることが証明された。それらの蛋白は転写因子AP2とSp1の他に、Sp1と同じ部位に何らかの形で作用すると考えられる核蛋白（転写制御機能については不明）、そしてSite Aに結合する未同定の制御蛋白を含む。それらの蛋白が結合する部位はAP2結合部位、Sp1結合部位、そしてSite Aという互いに隣接する3つから成っており、制御蛋白は各部位において*in vitro*では相互排他的に結合し、各部位はいずれも*in vivo*では本来の転写機能を発揮するために重要であると考えられる。つまり*in vitro*ではon-offの相互排他的関係に見えるが、*in vivo*ではどれか1つでも結合できない状況下にしてしまうと転写活性が低下するので、3つとも全部揃っていないといけない——つまり*in vivo*では3つ揃った上での相互作用があるらしいという結論になろう。

さて、この*in vitro*の所見と*in vivo*における現象とをどのように結びつけて解釈するか——これまで述べてきたように、複数の制御蛋白が実際にクラスターとなってK5 complexのエレメントに同時に結合した複合体は捉えられておらず、ゲルシフトでバンドとして認められたDNA-蛋白複合体はすべてAP2、Sp1、あるいはSite A結合蛋白それぞれ単独の結合と考えられる。つまり各蛋白は各々の部位において*in vitro*では相互排他的に結合するわけであるが、ゲルシフトで相互排他的だからといって*in vivo*でも二者（三者）択一であると考えるのは危険である。単純に考えれば、*in vivo*ではDNAが量的に少ないので2つ以上結合することも十分あり得るし、1つが結合すると残りはstabilizationに関係する可能性もある。また、*in*

*vivo*においてはエレメントに結合した制御因子にさらに結合する未知なる安定化因子が存在し、これによってはじめて複数の因子がエレメントに同時に結合してより高次の複合体形成が可能になるが、その安定化因子そのものは非常に不安定なために *in vitro* では検出できない、という可能性もあり得る。このような仮説を考えてみると、40bpの中で実際には多くの因子が複雑なクラスターを作って相加的、あるいは相乗的に転写機能を調節している可能性があるわけで、K5 complexエレメントの各部位はいずれも本来の転写機能を発揮するために必要である——即ち3つとも揃っていないてはならない、という5)の結論とも矛盾しないことになるが、追加するデータがないので、残念ながら実際には推測の域を出ない。

ところで5)でも述べたが、点突然変異により各部位を破壊してもなお、用いた細胞すべてにおいて、かなりの程度の転写活性が保たれるということは重要な所見であると思われる。3つの部位の中で言えば、1つ機能しなくても残りの2つが不完全ながら機能している証拠ともとれるが(ただし2つ以上の部位を点突然変異で破壊した検索はしていない)、K5遺伝子調節領域全体のcontextで考えると、3つの結合部位と遠隔のエンハンサーをはじめとする他の制御部位との *cis*、あるいは他の制御因子との *trans* の重要な相互作用がさらに存在する可能性が十分予想される。もしそのような相互作用が不可欠であるとする、K5 complexはそれ自体独立したエンハンサーとしては機能し得ないことになるが、筆者はその可能性を調べるために、3つの蛋白結合部位を含むK5 complex全体を"エンハンサー・トラップ"ベクターに組み込み、このエレメントがK5遺伝子から切り離れた状態で独立に機能するかどうかをCATアッセイにて検討した。筆者のグループでは以前同じエンハンサー・トラップを利用し、K6遺伝子調節領域中に独立機能を有するエンハンサーが存在することを発見しており<sup>32)</sup>、今回も同一の手技で立証を試みたが、K5 complexはそ

れ自体独立には機能し得ないことが判明した<sup>34)</sup>。この結果は、K5 complexがAP2とSp1という2つの強力な転写因子結合部位を含むことを考えると意外ともいえようが、いずれにせよこのエレメントは、K5遺伝子本来の転写効率を発揮するために他の制御部位、制御蛋白とのダイナミックな相互作用を必要とすることが示されたわけである。

3つの部位各々の重要性について、他のケラチン遺伝子調節領域における検索、またそれら相互の位置関係も含めて論じるとどうなるであろうか。まずSp1については、様々な細胞に広く分布する転写因子であり、ターゲット遺伝子上流のGC-richな領域に結合して転写を活性化することが分かっているが<sup>51)</sup>、筆者らが以前に報告したK16（コンセンサス）のみならずK5のプロモーター上流域にも、コンセンサス配列ではないがGCに富む領域が存在し、Sp1を結合することが本研究で証明された。K5に同定されたGC-richなSp1結合部位の塩基配列は、GCCCAGCCCC（コンセンサスではC）であり、同一の配列はK6遺伝子にも存在する。K5とK16を比較したスーパーシフト・アッセイにより、どちらの部位も転写因子Sp1以外にも同じ核蛋白のセットを結合することが示され、これによって相異なるケラチン遺伝子の発現に共通の転写制御蛋白が複数のグループとして関与することを初めて報告したが、このSp1と同じ部位に何らかの形で作用すると思われる核蛋白に実際何らかの転写制御機能があるかどうかについては不明である。なお、K16だけでなくK17においても（両者はともに病的表皮で発現する）、プロモーター上流域にやはりコンセンサス配列のSp1結合部位が存在し、興味深いことにそのすぐ上流にAP2結合部位があることが示唆された。また、K14に関しては塩基配列の比較だけであるが、約150bp隔てて2つのコンセンサスSp1の配列が存在し、その1つにはAP2結合部位類似の配列が、そしてもう1つにはSite A類似配列が隣接する（図11）。転写因子Sp1はダイマー



を形成することにより、遠隔に位置するエレメント同士を近づけ得ることが知られており<sup>52)</sup>、K14におけるこれら2つのSp1はともに、K5で示唆されたのと同じ複数の制御蛋白を含むtranscription complexの一部を成しているのかもしれない。Sp1は普遍的な転写因子であるため、無論そのまま表皮細胞特異性を考えることはできないが、K5とK14がともに表皮基底細胞で特異的に発現されるケラチン対であることを思えば、やはりそれらのターゲット遺伝子の発現に必要不可欠な転写因子の1つと考えられ、他のAP2やSite A結合蛋白などとの協調によりケラチノサイト特異性を発揮する可能性も考えられよう。

次にAP2に関しては、Sp1の場合のようにスーパーシフトによりK5遺伝子調節領域に蛋白が結合するのを直接証明してはいないが、塩基配列およびゲルシフトのコンペティション、CATアッセイの結果から考えて、AP2の関与はやはり必要不可欠のものと思われる。K17においては、ゲルシフトによりK5と同様、コンセンサスSp1配列のすぐ上流にAP2結合部位があることが示唆されたが、K16ではやはりコンセンサスSp1の近傍に塩基配列上AP2とホモロジーが認められたものの、ゲルシフトではコンペティションが起こらず、K5のようなAP2とSp1の密接な位置関係は否定的である。K16にはその250bp離れた上流にAP2が結合することが報告されているが<sup>33)</sup>(図11B参照)、それとSp1との相互作用については分かっていない。冒頭にも述べたが、近年FuchsらはK14遺伝子上流にKER1<sup>25)</sup>という、ケラチノサイトに豊富な核蛋白が結合する部位を見出し、その後の解析からこのKER1は転写因子AP2と同一ないし相同であることが判明した<sup>27)</sup>。AP2はもともとHeLa細胞からクローニングされた転写因子であるが<sup>53)</sup>、生体内では神経と皮膚に分布していることが明らかとなり<sup>54)</sup>、またK14以外にもK1、そして今回のK5(およびK17)の遺伝子上流にAP2結合部位が同定され、さらにKER1のカエルでのホモログであるとされる

KTF-1<sup>26)</sup>が、胎生期の皮膚を含む外胚葉系器官の分化と関連する転写因子であることを考え合わせると、KER1/AP2が表皮細胞の分化を調節する転写制御因子であることに疑いの余地はない。しかしながらK5/K14を発現しないHeLa細胞においてもAP2の存在を見ることから、それ以外にもケラチノサイト特異的遺伝子発現を司る別の（未知の？）因子が存在してそれらが相互に作用するものと推測され、筆者の研究も既知のSp1と未知のSite A結合蛋白という形で、それに対する一つの答えを提案するものといえる。一方で、ごく最近Uittoらのグループは、230-kDaの水疱性類天疱瘡抗原遺伝子（BPAG1）上流のAP2結合部位には、ケラチノサイトにのみ存在する新しい制御蛋白（KTP-1と命名）も結合が可能であり、BPAG1のケラチノサイト特異的発現に関与するという興味深い報告をし<sup>29)</sup>、これによって本質的な解明がなされるかもしれない。

3番目として、Site Aに結合して転写制御に関わる核蛋白は未同定であり、またその特異的塩基配列もバリエーションが大きい、K16、K17とともにAP2 and/or Sp1結合部位の近傍にK5 Site Aとゲルシフトでコンペティションを認めるエレメントが存在することが示された。それらの位置関係は、例えばSp1との関係をとってみるとK16、K17ではK5の場合と逆であるが、いずれにせよ相異なるケラチン遺伝子の発現に関与する共通の転写制御蛋白が、またもう1つ存在する可能性を提起したことになる。なお現在、塩基配列特異的DNAアフィニティークロマトグラフィーを用いて、K5 Site A結合蛋白を精製、クローニングする試みがなされつつある。

さて終わりになったが、本研究の実験で用いた主な細胞、即ちHeLa細胞およびHEKから得られた結果の相違について考察を加えねば、ケラチノサイト特異的転写調節の議論は意味を持たなくなってしまう。まずゲルシフトの実験において、HeLa細胞のみならずHEKからの核蛋白も使用したのはSp1の実験のみであり、AP2および

Site Aの同定の際はHEK抽出蛋白は用いていない。Site Aはともかく、AP2に関してはこの考察のAP2のところでも述べたように、ごく最近Uittoらのグループにより、ケラチノサイトにのみ存在するというKTP-1もAP2認識部位に結合し得ることが示されたため<sup>23)</sup>、HeLaとHEKでは同じAP2認識部位でもその転写制御が本質的に異なり、それがケラチノサイト特異的転写制御の鍵を握る可能性があることを言わねばならない。次にCATアッセイについて言えば、K5 CAT (wild type) は線維芽細胞など上皮系以外の細胞では活性が認められなかったが、HEKやSCC細胞のみならずHeLa細胞でも十分な転写活性を有していたので<sup>46)</sup>、本研究ではHeLa細胞での検索を中心に進めてきた。しかしながら、HeLa細胞は実際にはK5ケラチンを蛋白レベルで発現しておらず、では何故K5を発現しないのか、どこがHEKと違うのかという疑問に対しては、今回取り扱った1 kb足らずの調節領域以外の、おそらく遠隔に位置するサイレンサー、negative regulatorの存在や、あるいはposttranscriptionalなメカニズムによる負の制御機構の存在の可能性が考えられる。HEKでなくHeLa細胞主体の実験であれば本来、むしろそのような機構の解明に向かった方が目的に適っていると言えるかもしれず、今後の検討を要する。最後に、冒頭の図1にもう一度立ち戻っても分かるように、HeLaと異なりHEKで転写活性に有意な差が認められる-796/-543の領域の検索は非常に興味深いものであることは間違いない。筆者が何度かpreliminaryに行ったゲルシフト等の実験では再現性のある結果が得られず、本研究では残念ながら割愛したが、K5遺伝子におけるケラチノサイト特異的転写調節を論ずる際、この領域の今後更なる解析が望まれることは言うまでもない。

## ま と め

細胞の増殖と分化は主に転写レベルで調節されており、種々の細胞で様々なレベルの細胞特異性をもつ転写因子が明らかにされてきている。筆者はケラチノサイトにおける細胞特異的発現調節機構を解明するために、ケラチノサイトの分化に応じて転写制御を受けることが知られているヒト表皮ケラチン遺伝子の中で、とくに基底細胞において特異的に発現されるK5ケラチン遺伝子上流の調節領域に作用する転写制御蛋白を、DNAトランスフェクションとゲルシフト法を用いて分析した結果、約40bp中に複数の制御蛋白が関与するエレメントを見出した。それらの蛋白は転写因子AP2とSp1の他にいくつかの未同定の核蛋白を含み、それらの蛋白が作用する部位はAP2、Sp1両結合部位、そしてSite Aという隣接する3つから成っており、制御蛋白は各部位において*in vitro*では相互排他的に結合し、各部位はいずれも*in vivo*では本来の転写機能を発揮するために重要であると考えられた。さらに、それら3つの部位のクラスターを他のヒト表皮ケラチン遺伝子調節領域中でも検索し、それらの組み合わせがケラチノサイト特異的転写調節に関与する可能性があることが示唆された。細胞特異的な転写調節は臓器の分化、発癌のメカニズムを解く鍵であり、今後さらなる解析が望まれよう。

## 文 獻

- 1) Steinert PM, Roop DR: Molecular and cellular biology of intermediate filaments, *Ann Rev Biochem* 57: 593-625, 1988.
- 2) Moll R, Franke WW, Schiller DL, Geiger B, Krepler R: The catalog of human cytokeratins: patterns of expression in normal epithelia, tumors, and cultured cells, *Cell* 31: 11-24, 1982.
- 3) Moll R, Schiller DL, Franke WW: Identification of protein IT of the intestinal cytoskeleton as a novel type I cytokeratin with unusual properties and expression patterns, *J Cell Biol* 111: 567-580, 1990.
- 4) Chandler JS, Calnek D, Quaroni A et al: Identification and characterization of rat intestinal keratins. Molecular cloning of cDNAs encoding cytokeratins 8, 19, and a new 49-kDa type I cytokeratin (K21) expressed by differentiated intestinal epithelial cells, *J Biol Chem* 266: 11932-11938, 1991.
- 5) Lynch MH, O'Guin WM, Hardy C, Mak L, Sun T-T: Acidic and basic hair/nail ("hard") keratins: their colocalization in upper cortical and cuticle cells of the human hair follicle and their relationship to "soft" keratins, *J Cell Biol* 103: 2593-2606, 1986.
- 6) Sun T-T, Tseng SCG, Huang AJW et al: Monoclonal antibody studies of mammalian epithelial keratins; a review, *Annals NY Aca Sci* 455: 307-329, 1985.
- 7) Heid HW, Moll I, Franke WW: Patterns of expression of trichocytic



and epithelial cytokeratins in mammalian tissues, *Differentiation* 37: 215-230, 1988.

- 8) Hatzfeld M, Franke WW: Pair formation and promiscuity of cytokeratins: formation in vitro of heterotypic complexes and intermediate-sized filaments by homologous and heterologous recombination of purified polypeptides, *J Cell Biol* 101: 1826-1841, 1985.
- 9) Eichner R, Sun T-T, Aebi U: The role of keratin subfamilies and keratin pairs in the formation of human epidermal intermediate filaments, *J Cell Biol* 102: 1767-1777, 1986.
- 10) Schweizer J: Body site-specific variations of the basic epidermal keratin pattern, In: *Molecular biology of the skin*, Darmon M & Blumenberg M (eds), Academic Press, New York, 1993, pp46-56.
- 11) Weiss RA, Eichner R, Sun T-T: Monoclonal antibody analysis of keratin expression in epidermal diseases: A 48- and 56-kdalton keratin as molecular markers for hyperproliferative keratinocytes, *J Cell Biol* 98: 1397-1406, 1984.
- 12) Rogneir M, Schweizer J et al: Expression of high molecular weight (67kD) keratin in human keratinocytes cultured on dead deepdermized dermis, *Exp Cell Res* 165: 63-72, 1986.
- 13) Eichner R, Kaln M: Differential extraction of keratin subunits and filaments from normal human epidermis, *J Cell Biol* 110: 1149-1168, 1990.
- 14) Lessin SR, Huebner K, Isobe M, Croce CM, Steinert PM: Chromosomal

- mapping of human keratin genes: evidence of non-linkage, *J Invest Dermatol* 91: 572-578, 1988.
- 15) Roop DR, Nakazawa H, Mehrel T et al: Sequential changes in gene expression during epidermal differentiation, in *The Biology of Wool and Hair*, Rogers GE, Reis PJ, Ward KA, Marshall RC (eds), Chapman & Hall, London, 1989.
  - 16) Giudice GJ, Fuchs E: The transfection of epidermal keratin genes into fibroblasts and simple epithelial cells: evidence for inducing a type I keratin by a type II gene, *Cell* 48: 453, 1987.
  - 17) Lersch R, Stellmach V, Stocks C, Giudice GJ, Fuchs E: Isolation, sequence and expression of a human keratin K5 gene: transcriptional regulation of keratins and insights into pairwise control, *Mol Cell Biol* 9: 3685-3697, 1989.
  - 18) Tyner AL, Fuchs E: Evidence for post-transcriptional regulation of the keratins expressed during hyperproliferation and malignant transformation in human epidermis, *J Cell Biol* 103: 1945-1955, 1986.
  - 19) Weintraub H, Davis SJ, Tapscott S et al: The myoD gene family: nodal point during specification of the muscle cell lineage, *Science* 251: 761-766, 1991.
  - 20) Wuarin J, Schibler U: Expression of the liver-enriched transcriptional activator protein DBP follows a stringent circadian rhythm, *Cell* 63: 1257-1266, 1990.

- 21) Gilmore TD: NF- $\kappa$ B, KBF1, dorsal, and related matters, *Cell* 62: 841-843, 1990.
- 22) Kuo CJ, Conley PB, Chen L, Sladek FM, Darnell Jr JE, Crabtree GR: A transcriptional hierarchy involved in mammalian cell-type specification, *Nature* 355: 457-461, 1992.
- 23) Fuchs E: Epidermal differentiation: the bare essentials, *J Cell Biol* 111: 2807-2814, 1990.
- 24) Blessing M, Zentgraf H, Jorcano JL: Differentially expressed bovine cytokeratin genes: Analysis of gene linkage and evolutionary conservation of 5'-upstream sequences, *EMBO J* 6: 567-575, 1987.
- 25) Leask A, Rosenberg M, Vassar R, Fuchs E: Regulation of a human epidermal keratin gene: sequences and nuclear factors involved in keratinocyte-specific transcription, *Gene Dev* 4: 1985-1998, 1990.
- 26) Snape AM, Jonas EA, Sargent TD: KTF-1, a transcriptional activator of *Xenopus* embryonic keratin expression, *Development* 109:157-165, 1990.
- 27) Leask A, Byrne C, Fuchs E: Transcription factor AP2 and its role in epidermal-specific gene expression, *Proc Natl Acad Sci USA* 88: 7948-7952, 1991.
- 28) Mack DH, Laimins LA: A keratinocyte-specific transcription factor, KRF-1, interacts with AP1 to activate expression of human papillomavirus type 18 in squamous epithelial cells, *Proc Natl Acad Sci USA* 88: 9102, 1991.

- 29) Tamai K, Li K, Uitto J: Identification of a DNA-binding protein (keratinocyte transcriptional protein-1) recognizing a keratinocyte-specific regulatory element in the 230-kDa bullous pemphigoid antigen gene, *J Biol Chem* 269: 493-502, 1994.
- 30) Ishiji T, Lacey MJ, Parkkinen S et al: Transcriptional enhancer factor (TEF)-1 and its cell-specific co-activator activate human papillomavirus-16 E6 and E7 oncogene transcription in keratinocytes and cervical carcinoma cells, *EMBO J* 11: 2271-2281, 1992.
- 31) Ohtsuki M, Tomic-Canic M, Freedberg IM, Blumenberg M: Nuclear proteins involved in transcription of the human K5 keratin gene, *J Invest Dermatol* 99: 206-215, 1992.
- 32) Bernerd F, Maguadalo T, Freedberg IM, Blumenberg M: Expression of K6, the carcinoma-associated keratin, and the role of AP-1 proto-oncoproteins, *Gene Expr* 3: 187-199, 1993.
- 33) Maguadalo T, Bernerd F, Freedberg IM, Ohtsuki M, Blumenberg M: Transcriptional regulators of expression of K# 16, the disease-associated keratin, *DNA Cell Biol* 12: 911-923, 1993.
- 34) Ohtsuki M, Flanagan S, Freedberg IM, Blumenberg M: A cluster of five nuclear proteins regulates keratin gene transcription, *Gene Expr* 3: 201-213, 1993.
- 35) Ohtsuki M, Tomic-Canic M, Freedberg IM, Blumenberg M: Regulation of epidermal keratin expression by retinoic acid and thyroid hormone, *J Dermatol (Tokyo)*, 19: 774-780, 1992.

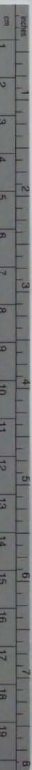
- 36) Vassar R, Coulombe PA, Degenstein L, Albers K, Fuchs E: Mutant keratin expression in transgenic mice causes marked abnormalities resembling a human genetic skin disease, *Cell* 64: 365-380, 1991.
- 37) Coulombe PA, Hutton ME, Letai A, Hebert A, Paller AS, Fuchs E: Point mutations in human keratin 14 genes of epidermolysis bullosa simplex patients: genetic and functional analyses, *Cell* 66: 1301-1311, 1991.
- 38) Bonifas JM, Rothmann AL, Epstein Jr EH: Epidermolysis bullosa simplex: evidence in two families for keratin gene abnormalities, *Science* 254: 1202-1205, 1991.
- 39) Lane EB, Rugg EL, Navsaria H et al: A mutation in the conserved helix termination peptide of keratin 5 in hereditary skin blistering, *Nature* 356: 244-246, 1992.
- 40) Cheng J, Syder AJ, Yu QC et al: The genetic basis of epidermolytic hyperkeratosis: a disorder of differentiation-specific epidermal keratin genes, *Cell* 70: 811-819, 1992.
- 41) Chipev CC, Korge BP, Markova N et al: A leucine-proline mutation in the H1 subdomain of keratin 1 causes epidermolytic hyperkeratosis, *Cell* 70: 821-828, 1992.
- 42) Rothnagel JA, Dominey AM, Dempsey LD et al: Mutations in the rod domains of keratins 1 and 10 in epidermolytic hyperkeratosis, *Science* 257: 1128-1130, 1992.



- 43) Dignam JD, Lebovitz RM, Roeder RG: Accurate transcription initiation by RNA polymerase II in a soluble extract from isolated mammalian nuclei, *Nucl Acids Res* 11: 1475-1489, 1983.
- 44) Jiang CK, Magnaldo T, Ohtsuki M, Freedberg IM, Bernerd F, Blumenberg M: EGF and TGF  $\alpha$  specifically induce the activation- and hyperproliferation-associated keratins K6 and K16, *Proc Natl Acad Sci USA* 90: 6786-6790, 1993.
- 45) Chen C, Okayama H: High-efficiency transformation of mammalian plasmid DNA, *Mol Cell Biol* 7: 2745-2752, 1987.
- 46) Jiang CK, Epstein HS, Tomic M, Freedberg IM, Blumenberg M: Functional comparison of the upstream regulatory DNA sequences of four human epidermal keratin genes, *J Invest Dermatol* 96: 162-167, 1990.
- 47) Jiang CK, Connolly D, Blumenberg M: Comparison of methods for transfection of human epidermal keratinocytes, *J Invest Dermatol* 97: 969-973, 1991.
- 48) Anderson GM, Freytag SO: Synergistic activation of a human promoter in vivo by transcription factor Sp1, *Mol Cell Biol* 11: 1935-1943, 1991.
- 49) Lee W, Haslinger A, Karin M, Tjian R: Activation of transcription by two factors that bind promoter and enhancer sequences of the human metallothionein gene and SV40, *Nature* 325: 368-372, 1987.

- 50) Williams T, Tjian R: Analysis of the DNA-binding and activation properties of the human transcription factor AP-2, *Genes Dev* 5: 670-682, 1991.
- 51) Briggs MR, Kadonaga JT, Bell SP, Tjian R: Purification and biochemical characterization of the promoter-specific transcription factor Sp1, *Science* 234: 47-52, 1986.
- 52) Mastrangelo IA, Courey AJ, Wall JS, Jackson SP, Hough PVC: DNA looping and Sp1 multimer links: a mechanism for transcriptional synergism and enhancement, *Biochemistry* 88: 5670-5674, 1991.
- 53) Williams T, Admon A, Luescher B, Tjian R: Cloning and expression of AP-2, a cell type-specific transcription factor that activates inducible enhancer elements, *Genes Dev* 2: 1557-1569, 1988.
- 54) Mitchell PJ, Timmons PM, Hebert JM, Rigby PWJ, Tjian R: Transcription factor AP2 is expressed in neural crest cell lineages during mouse embryogenesis, *Genes Dev* 5: 105-119, 1991.





## Kodak Color Control Patches

© Kodak, 2007 TM Kodak



## Kodak Gray Scale



© Kodak, 2007 TM Kodak

A 1 2 3 4 5 6 M 8 9 10 11 12 13 14 15 B 17 18 19

