

IL- β によるヒトタウリン代謝の調節

梶田 泰孝¹⁾, 細川 優²⁾, 戸谷 誠之²⁾

(¹⁾茨城キリスト教大学・生活科学*, (²⁾国立健康栄養研究所・母子健康栄養**)

Regulation of the Human Cysteine Dioxygenase Gene by IL-1 β

Yasutaka KAJITA¹⁾, Yu HOSOKAWA²⁾, and Masayuki TOTANI²⁾

¹⁾*Division of Maternal and Child health Science, National Institute of Health and Nutrition*

²⁾*Ibaraki Christian University*

Cysteine dioxygenase is the rate-limiting enzyme in the synthesis of taurine and sulfate. The transcriptional regulation of the human CDO gene by IL-1 β or PMA was studied by transient transfection assay of the promoter activity. The 5'-upstream region up to nt -2098 of human CDO gene was linked to the CAT reporter gene and the construct was transfected into HepG2 cells. The deletion of the region between nt -159 to -18, which contains several putative regulatory elements including TATA box like sequence, caused a complete loss of the promoter activity. In addition, the 5' progressive deletion showed that the removal of the region between nt -424 and -306, which contains a consensus sequence of the hepatocyte nuclear factor 5 (HNF5) binding site, resulted in a strong reduction of the promoter activity. IL-1 β inhibited the promoter activity even in the shortest construct linked downstream of nt -86. While, PMA did not have any effect on the promoter activity. The results from deletion studies indicate that the sequences involved in the expression of basal promoter activity and in the repression of the promoter activity by IL-1 β exist in the region downstream nt -86.

システインジオキシゲナーゼ (CDO) はタウリン代謝の律速酵素である。これまでの研究で、ヒト肝臓がん由来培養株HepG2細胞にCDOのmRNA発現を認め、種々のホルモンやサイトカインの効果を検討した¹⁾。予想とは異なり、ラットCDO活性を誘導するグルココルチコイドや抑制するcAMPには何ら作用はなかった。しかし、IL-1 β によりCDOのmRNAが著しく低下する現象が認められた²⁾。その作用機序

* 所在地：日立市大みか町6-11-1 (〒319-1295)

** 所在地：新宿区戸山1-23-1 (〒162-8636)

を解析した結果、IL-1 β の作用はプロテインキナーゼC (PKC) の阻害剤であるH7で完全に阻害されること、PKCの活性化剤であるPMAでもmRNAレベルが低下することが明らかとなり、IL-1 β はPKCを介してCDOのmRNAレベルを低下させる機序が推測された。

本研究では、IL-1 β によるCDO mRNAレベルの低下が、遺伝子の発現抑制に起因するかを明らかにするとともに、調節に関与するシスエレメントの同定を目的として、レポーター遺伝子アッセイを試みた。

実験方法

レポータープラスミドの作成

ヒトCDO遺伝子の5'上流2.5kbからイントロン1の半分を含むクローンphGCDO/Xho Iを、Sac I (nt - 2098) と BamHI (nt + 46) で切断し、pCAT3Basicベクター (プロメガ) につないで融合遺伝子 (ph-2098/CAT) を構築した。この遺伝子から制限酵素の切断部位を利用して5'領域を欠失した ph-881/CAT, ph-306/CAT, および nt - 159 ~ - 18 欠失した ph- Δ 2098/CAT を作製した。さらに、phGCDO/Xho I を鋳型としてPCR法で増幅し、pCAT3Basicベクターにつないで4種類の融合遺伝子 (ph-617/CAT, ph-424/CAT, ph-179/CAT, ph-86/CAT) も構築した (図1)。これらのプラスミドの作製では、クローニングサイトとして、5'プライマーにはSac I, 3'プライマーにはXho Iの切断サイトを組み込み込んだ。

細胞の培養と遺伝子の導入

ヒト肝がん由来培養株HepG2細胞 (ATCC HB-8065) は、10%牛胎児血清を含むDMEM培地で培養した。HepG2細胞を35mmディッシュに約70%コンフルエントまで培養した後、テストプラスミド2~5 μ gと対照とした β -ガラクトシダーゼプラスミド5 μ g (p-SV- β -galactosidase; プロメガ) をリン酸カルシウム法で導入した。一晚経過後、培地を血清不含DMEM-F12に変えて、IL-1 β (250 units/ml) の存在下、非存在下に2日間培養した。CATタンパクは、ELISA (ロッシュ・ダイアグノスティックス) で定量した。プロモーター活性は、CATタンパク量/ β -ガラクトシダーゼ活性 (ng/munit) で表した。

結果と考察

レポータープラスミドの構築

ヒトCDO遺伝子の5'上流領域には、CDOの転写活性に影響すると想像されるシスエレメントのコンセンサス配列が多く認められる¹⁾。特に、転写に必須なTATAボックス、肝臓での高い発現に関与すると想像される肝特異的転写因子5 (HNF5) の結合配列³⁾、およびPMAによる転写調節に関与すると報告されているTPA responsive element (TRE)⁴⁾、cAMP responsive element (CRE)⁵⁾およびNF- κ B⁶⁾の位置を考慮して、8種類のCATレポータープラスミドを構築した。図1には、CAT遺伝子につないで遺伝子の領域を示した。ph- Δ 2098/CATでは、ph-2098/CATから二カ所のSma Iサイトを利用してnt - 159 ~ - 18を欠失させた。これらのレポータープラスミドをHepG2細胞に導入して転写活性に与える影響を検討した (図2)。nt + 33から5'上流nt - 86までの領域をつないでph-86/CATでは、低いながらも転写活性が認められた。しかし、nt - 159 ~ - 18を欠失したph- Δ 2098/CATでは全く活性が検出出来なかつ

た。この結果から、nt -86~-18にCDOの転写に必須なエレメントが存在すると考えられる。この領域にはMyb結合部位 (MBS), TRE, TATA-ボックス様配列が存在するが、おそらくはTATA-ボックス様配列が、CDOの転写に必須であると想像される。一方、ph2098/CAT, ph-881/CAT, ph-617/CATおよびph-424/CATの転写活性に大きな違いはない。しかし、ph-2097は他の3種に比べて若干活性が低い。nt -2098~-882に転写を負に調節するエレメントが存在する可能性もある。一方、ph-424/CATに比べてph-306/CATは、転写活性が1/3に低下した。nt -424~-307には、TRE, muscle-specific転写因子の結合エレメント、およびHNF5結合エレメントが存在する。ヒトおよびラットCDO遺伝子は、肝臓に最も高い発現が認められる。また、ラットCDO遺伝子の5'上流にもHNF5結合エレメントが存在することから、肝臓由来細胞HepG2でのCDOの高い発現にHNF5結合配列が重要であると考えられる。

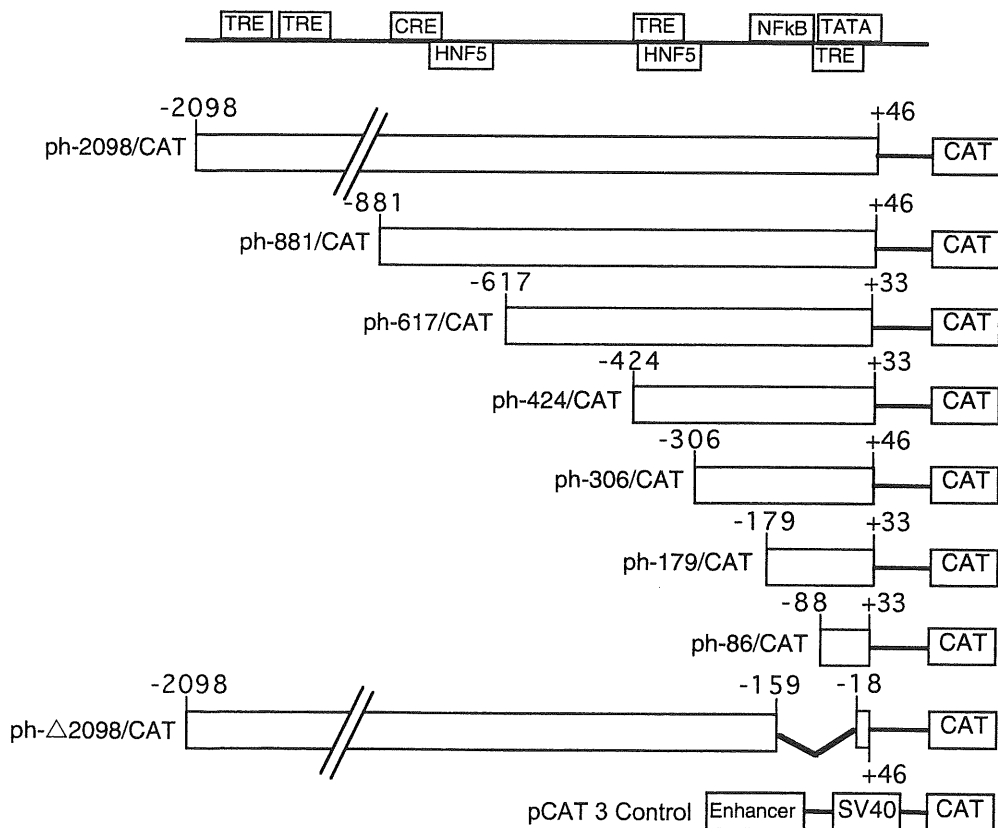


Figure 1 Construction of human CDO/CAT chimeric genes.

The deletion clones were generated either by restriction digestion or by PCR as described under experimental procedure. The numbers indicate the position relative to the transcription start site.

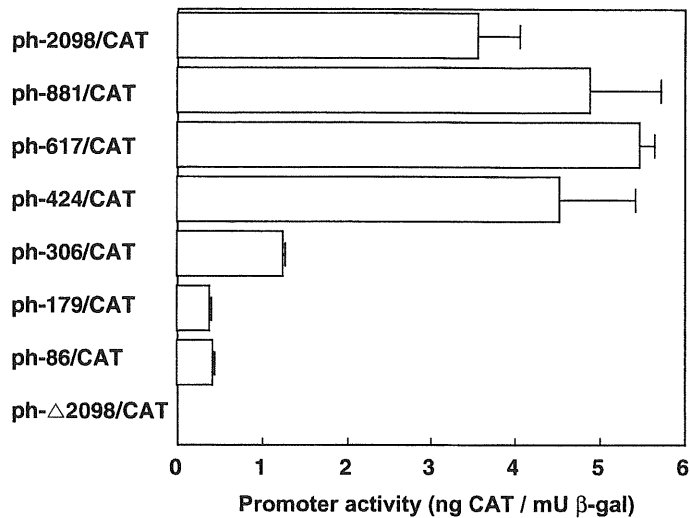


Figure 2 Basal promoter activity of the human CDO/CAT chimeric gene construct. HepG2 cells were transfected indicated human CDO/CAT chimeric genes and incubated for 48 hours in serum free DMEM-F12 medium. Promoter activity was expressed as the ratio of CAT protein and β -galactosidase activity expressed in the HepG2 cell extract. Results represent mean \pm SD of three independent cultures.

CDOの転写活性におよぼすIL-1 β およびPMAの影響

次に、IL-1 β を培地に添加して48時間後のCATタンパク量に与える影響を検討した。図3に示すように、SV40の初期プロモーターとエンハンサーをつないだpCAT3コントロールでは、IL-1 β の作用は見られない。しかし、ph $^{-\Delta}$ 2098/CATを除くいずれのプラスミドでも、IL-1 β の添加で転写活性は低下した。ph-2098/CAT, ph-881/CAT, ph-617/CAT, ph-424/CATでは、対照に比べて約40%の低下が観察された。ph-306/CAT, ph-179/CATおよびph-86CATでは欠失の領域が広がるにつれて低下の度合いが大きくなった。以上の結果から、IL-1 β によるCDOmRNAレベルの低下は転写活性の抑制によること、および調節に必要なシスエレメントがnt -86~+33に存在することが明らかになった。次に、PMAの影響を検討した(図4)。この場合は、PMA (10 $^{-7}$ M)の添加24時間後に細胞をハーベストした。対照に用いたp-SV- β -ガラクトシダーゼの発現がPMAで誘導されたことから、プロモーター活性を細胞溶解液1ml中のCATタンパク量で評価した。PMAでCAT3コントロールの活性が上昇したが、これはp-SV- β -ガラクトシダーゼと同様にSV40エンハンサー配列に起因すると考えられる。一方、ph-617/CAT, ph-424/CAT, ph-179/CATおよびph-86CATのいずれのプラスミドにおいてもPMAによる転写活性の低下は観察されなかった。この結果から、PMAによるCDOmRNAレベルの低下は、IL-1 β とは異なる機構を介することが明らかになった。CDO遺伝子のnt -86~+33には、MBS, TREおよびTATAボックスのコンセンサス配列が存在する。当初、IL-1 β による転写抑制機構には、nt -43に存在するTRE

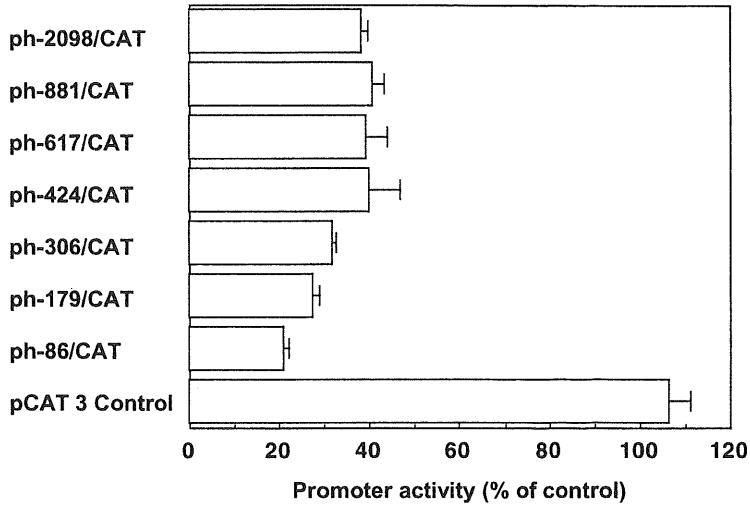


Figure 3 Effect of IL-1 β on the promoter activity of the human CDO/CAT chimeric genes. Cells were treated with 250 units/ml IL-1 β and harvested 48 hours later. Promoter activity was expressed as the percentage of CAT protein in untreated HepG2 cells.

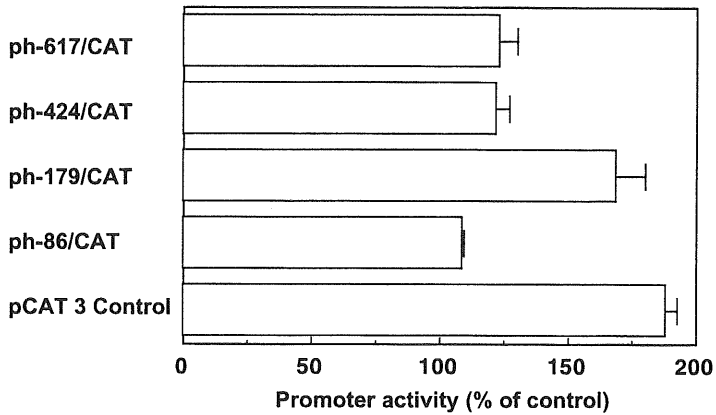


Figure 4 Effect of PMA on the promoter activity of the human CDO/CAT chimeric gene. Cells were treated with 10⁻⁷M PMA and harvested 24 hours later. Promoter activity was expressed as CAT protein per ml of the HepG2 cell extract.

への転写因子 AP-1 の結合が関与すると予測した。しかし, ph-179/CAT の TRE 配列にミューテーションを導入したプラスミドを作製し, IL-1 β の効果を検討したが転写抑制の解除は観察されなかった。従って, IL-1 β による転写抑制には, nt - 43 に存在する TRE 以外のシスエレメントが関与すると考えられ, その配列と結合する転写因子の決定が今後の課題である。

文 献

- 1) Tsuboyama-Kasaoka, N., Y. Hosokawa, H. Kodama, A. Matsumoto, J. Oka and M. Totani (1999) *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 63 : 1017-1024
- 2) 細川 優, 梶田泰孝, 谷河精規, 戸谷誠之 (1999) 微量栄養素研究 16 : 5-79
- 3) Grange, T., J. Roux, G. Rigaud and R. Pictet (1991) *Nucleic Acids Res.* 19 : 131-139
- 4) Angel, P., M. Imagawa, R. Chiu, B. Stein, R.J. Imbra, H.J. Rahmsdorf, C. Jonat, P. Herrlich and M. Karin (1987) *Cell* 49 : 729-739
- 5) Comb, M., N. Mermond, S.E. Hyman, J. Pearlberg, M.E. Ross and H.M. Goodman (1988) *EMBO J.* 7 : 3793-3805
- 6) Guerrini, L., L. Casalino, A. Corti and F. Blasi (1996) *FEBS Lett.* 393 : 69-73