

---



---

 原 著
 

---



---

## S100 蛋白 $\beta$ 鎖遺伝子の構造と発現

新潟大学脳研究所神経薬理学部門（主任：高橋康夫教授）

前 田 利 長

The Structure and Expression of S100 Protein  $\beta$  Subunit Gene

Toshinaga MAEDA

Department of Neuropharmacology, Brain Research Institute, Niigata University

(Director: Prof. Yasuo TAKAHASHI)

The gene structure of S-100  $\beta$ , an astroglial cell-specific protein, was clarified. This gene span about 8kbp and consists of three exons and two introns. The transcription initiation site was determined by S1 mapping procedure. In this 5'-flanking region, there are TATA-box like sequence and CAT-box like sequence. The expression of this S-100  $\beta$ -gene was examined by inducing the S-100  $\beta$ -lacZ fused gene to the cultured cells. The result showed the transcriptional important function in 1000bp 5'-flanking region.

Key words: brain specific protein, gene expression, transcription initiation site  
脳特異蛋白, 遺伝子発現, 転写開始点

### 略 語 表

mRNA: messenger RNA  
cDNA: complementary DNA  
poly(A)RNA: poly adenylic acid RNA  
PAP: Peroxidase Anti-peroxidase  
LTR: long terminal repeat

遺伝情報の発現調節の多くは、転写レベルで行われており、この転写調節機構を明らかにすることは、遺伝情報発現調節を理解する上で重要と考えられる。DNAの調節領域に関しては、特異的塩基配列を持つ調節シグナルが、多くの構造遺伝子の上流に存在することが示されてきた。中には、イントロン中にそのシグナルが存在す

る構造遺伝子も報告されている。

現在、中枢神経特異蛋白の遺伝子の発現調節機構について研究を進めている。中枢神経系特異蛋白の一つに S100 蛋白がある。S100 蛋白は、1965年に B.W. Moore<sup>1)</sup>によって発見された、脊椎動物の神経組織に高濃度で存在する、低分子（分子量 21,000）、酸性のカルシウム ( $\text{Ca}^{2+}$ ) 結合蛋白質である。その構造は、2種類のサブユニット ( $\alpha$  鎖と  $\beta$  鎖) の 2 量体であり、組織内では S100 a<sub>0</sub> ( $\alpha\alpha$ ), S100 a ( $\alpha\beta$ ), S100 b ( $\beta\beta$ ) の形で存在している<sup>2)</sup>。また、ラット脳において S100 蛋白は、 $\beta$  鎖 ( $\beta\beta$ ) として存在することも明らかにされた<sup>3)</sup>。神経系において、S100 蛋白  $\beta$  鎖は、アストログリア細胞に局在していることが、免疫組織化学的方法や *in situ*

Reprint requests to: Toshinaga Maeda,  
Department of Neuropharmacology, Brain  
Research Institute, Niigata University,  
Niigata City, 951, Japan.

別刷請求先: 〒951 新潟市旭町通り 1 番町  
新潟大学脳研究所神経薬理学部門

前田利長

ハイブリダイゼーションによって明らかにされている。すでに、我々は、ラット脳から S100 蛋白の cDNA のクローン化に成功した<sup>4)</sup>。この cDNA を用いてラット遺伝子ライブラリーより、S100 蛋白 $\beta$ 鎖遺伝子を単離した。本論文では、その構造、転写調節領域、融合遺伝子の細胞内導入とその発現、転写調節因子について記載し、考察をくわえる。

## 材料と方法

### 材料

制限酵素は、宝酒造、東洋紡及び New England Biolabs 社から購入した。T4 polynucleotide kinase は東洋紡から、S1 nuclease はシグマ社から、 $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$  ATP と  $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]$  ATP は、NEN 社から購入した。また、ニトロセルロースフィルターは、東洋ろ紙から購入した。ラット遺伝子ライブラリーは、J. Bonner 博士からいただいた。マウスの Molony 白血病ウイルスの LTR と大腸菌の  $\beta$ -ガラクトシダーゼ遺伝子との融合遺伝子は、近藤寿人博士（京都大・理）からいただいた。

## 実験方法

### 1. ラット高分子遺伝子 DNA の抽出

ラット脳から核を遠心分離し、Blin and Stafford の方法<sup>5)</sup>に従って高分子遺伝子 DNA を抽出した。

### 2. DNA プロープの作成

pBR322 にサブクローニングした DNA フラグメントを制限酵素で切断後、アクリルアミドゲル電気泳動により分離した。その後、DNA をゲルから電気泳動的に抽出し、 $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]$  dCTP を用いて nick-trnslation 法によりラベルをいれたり、 $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$  ATP と T4 polynucleotide kinase を用いてラベルを入れた。

### 3. Southern blot 分析

アガロースゲルから Southern の方法<sup>6)</sup>に従って、DNA をニトロセルロースフィルターに blotting した。その後、 $[\text{}^{32}\text{P}]$  でラベルした DNA プロープとハイブリダイゼーションを行い、洗浄後、autoradiography でバンドを観察した。ハイブリダイゼーションの条件は、基本的に Thomas の方法<sup>7)</sup>に従った。

### 4. plaque ハイブリダイゼーション

plaque ハイブリダイゼーション法は、Benton and Davis の方法<sup>8)</sup>に従った。

### 5. ファージ DNA の抽出

組み換え体ファージ charon 4A からの DNA の抽

出は、基本的に Davis らの方法<sup>9)</sup>に従った。

### 6. 塩基配列の決定

DNA フラグメントに、 $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$  ATP と T4 polynucleotide kinase によりラベルを入れ、Maxam and Gilbert の化学修飾法<sup>10)</sup>に従って塩基配列を決定した。

### 7. プラスミド DNA の分離

プラスミド DNA は、Birnboim and Doly の方法<sup>11)</sup>に従って大腸菌から分離した。

### 8. S1 スクレアーゼマッピング

相補鎖をサブクローニングした一本鎖 DNA を用い、プローブ DNA を一本鎖にし、RNA とハイブリダイズさせた。その後は、Sharp らの方法<sup>12)</sup>に従って行った。

### 9. 外来遺伝子の細胞内導入

作成した融合遺伝子は、Kondoh の記述<sup>13)</sup>に従って、リン酸カルシウム法を用いて導入した。20mg/ml の DNA 濃度で、DNA-リン酸カルシウム共沈澱を作り、細胞を培養している培地の 1/10 ~ 1/20 量の共沈澱液を加えた。

### 10. 培養細胞中で発現された $\beta$ -ガラクトシダー

#### ゼの X-gal を用いた酵素化学的染色法

培養細胞中で発現された  $\beta$ -ガラクトシダーゼは、X-gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl- $\beta$ -D-galactopyranoid) を最終濃度 1mM 以下になるように加えた反応液 [最終濃度：85mM リン酸バッファー (pH 7.5), 8.5mM KCl, 1mM MgCl, 3mM  $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ , 3mM  $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ , 0.1% TritonX-100] 中で X-gal を加水分解し、青い色素 (bromo-chloroindole) を生成する。

### 11. S100 蛋白 $\beta$ の免疫組織化学的染色法

培養細胞は、1% glutaraldehyde で固定し、0.75% の  $\text{H}_2\text{O}_2$  を含むメタノールで処理し、PAP 法 (発色反応には 3-amino-9-ethylcarbazole) を用いて染色した。

### 12. 細胞と培養

株細胞には、ラットの C6 グリオーマとニューロblastoma 103 を用いた。培地は、MEM1 (ニッスイ) に最終濃度が 10% になるよう FCS を、2mM になるようにグルタミンを、pH が 7.1~7.4 になるように重ソウを加えた。培養は、5%  $\text{CO}_2$  ガス中、37°C で行なった。

### 13. ゲルシフト分析

Takiya と Suzuki の記述<sup>14)</sup>に従って、特異的な DNA 配列と核内の蛋白を結合させ、電気泳動で分析す

る。

結 果

1. 遺伝子のクローニング

クローニングに成功した S100 蛋白  $\beta$  鎖 (S100  $\beta$ ) の cDNA をプローブに用いて, ラット肝遺伝子ライブラリーとプラークハイブリダイゼーションを行った. その結果, S100  $\beta$  遺伝子のクローンが 4 個得られた (図 1 C). これらのクローンは制限酵素 EcoRI-Hind III で切断され, pBR322 にサブクローンされ, 次の構造解析に用いられた.

2. 遺伝子地図

S100  $\beta$  遺伝子の制限酵素地図は, これらのクローン化 DNA の分析をまとめて作成した (図 1 A). さらに, ラット脳全 DNA を数種類の制限酵素で切り, cDNA をプローブとして Southern blot 分析を行った所, 遺伝子がゲノム中に 1 コピーしかないことが分かった. エクソンの位置をさめるため, ニック・トランスレーション法で  $^{32}\text{P}$  ラベルをいれた cDNA をプローブとして用い, クローン化した遺伝子 DNA をいくつかの制限酵素で切り, その断片とサザン・プロット・ハイブリダイゼーションを行い, おおまかな位置を決め, その後, エ

クソンを中心として塩基配列決定を行った. 塩基配列決定には, Maxam-Gilbert 法を用い, エクソンのすべてとイントロンの一部の塩基配列を決めた.

3. 転写開始点

転写開始点の推定に S1 マッピング法を用いた (図 2). 第 1 エクソンの一部を含む DNA 断片の 5' 端に  $^{32}\text{P}$  でラベルを入れ, 一本鎖にする. このラベルされた DNA の一本鎖 (アンチ・メッセージ) と脳の Poly (A) RNA を, ハイブリダイズし, できた RNA-DNA 複合体を S1 ヌクレアーゼで処理する. 保護された断片をポリアクリルアミド・尿素ゲルで泳動すると, いくつかのバンドが得られ, これらのバンドは, 塩基配列ラダーの 5'-A-3' に対応した. 3 種類の DNA 断片を用いた実験で推定された A が, 3 つとも同じになることから, S100  $\beta$  遺伝子の転写開始点と推定された. 転写開始点より約 30bp 上流に 5' TAAATT3' という AT rich な部分があり, -49bp と -113bp の所に 5' ATCAAT3' の配列が見出された (図 2 D).

4. 遺伝子の構造

この遺伝子は全長約 8.4kbp, 3 個のエクソンと 2 個のイントロンより成っていた (図 1 A). エクソンの長さは, I が 279bp (cDNA の 1~279bp に相当), II が 145

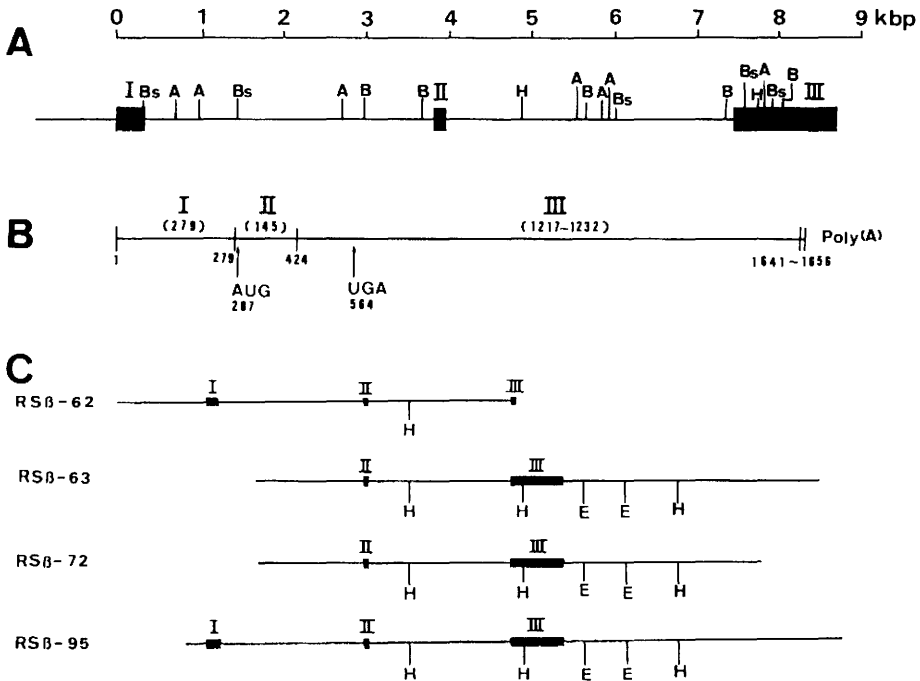


図 1 A: S100 蛋白  $\beta$  鎖遺伝子地図, B: cDNA 地図, C: 遺伝子のクローンの略図

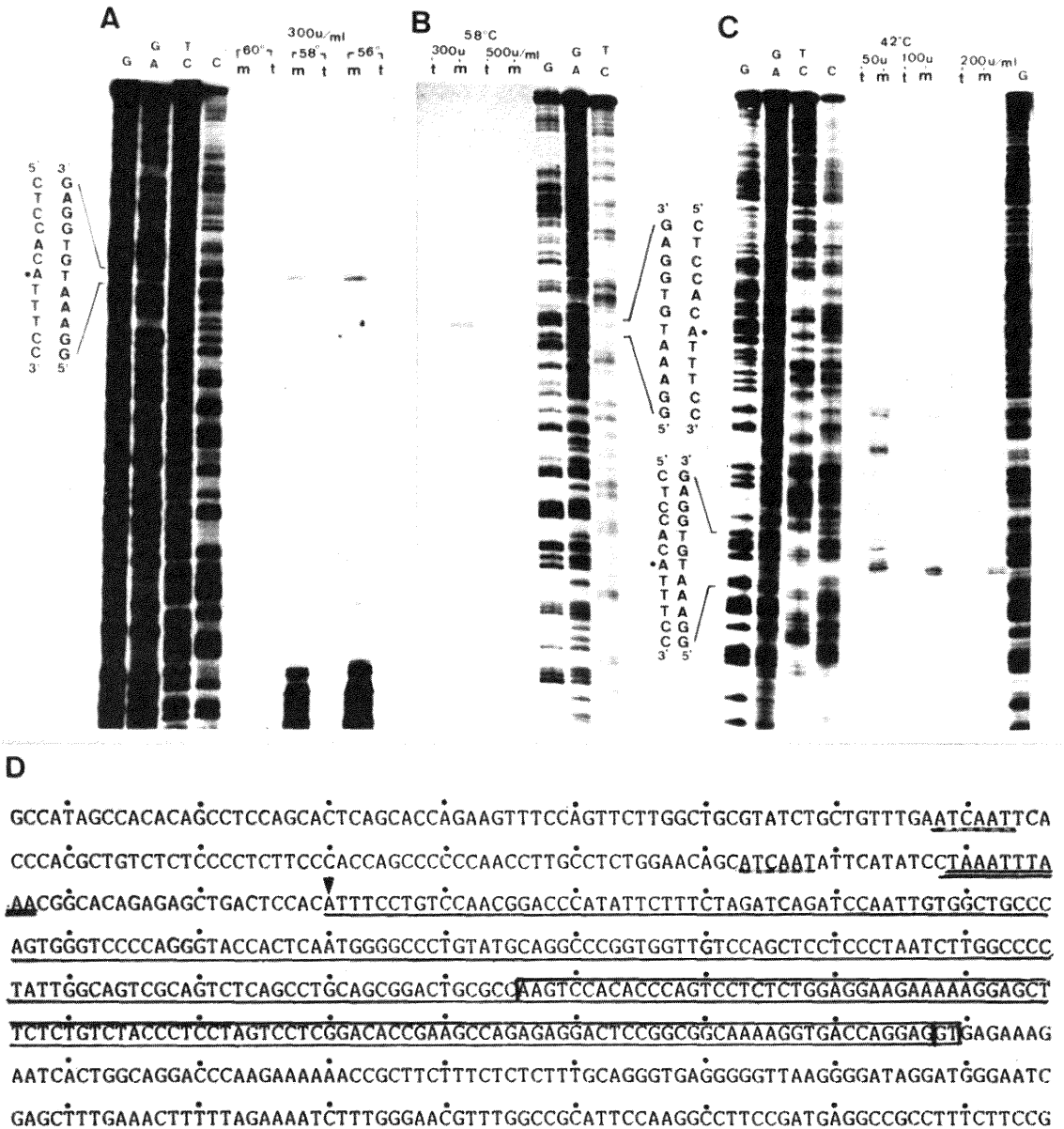


図 2 S1 マッピング法による転写開始点の決定

転写開始点から、A: 280bp, B: 224bp, C: 52bp, が期待される DNA 断片を用いて S1 マッピングを行った。横に、塩基配列のラダーを示した。D: 転写開始点付近の塩基配列, —はエクソンを, ▼は転写開始点を, - - -は TATA-box 類似配列を, .....は CAT-box 類似配列を示す。

Junction	sequence	Exon	Intron	Length
I/1	ACCAGGAG:GTGAGAAA	I		279
1/11	CTCCGAG:CCTCCGGG		1	ca 3.5k
11/2	TCCTGGAG:GTAAGCCT	11		145
2/111	TCTCTTAG:GAAATCAA		2	ca 3.0k
111/-	GAAAATTC:CAATTGCC	111		1232

図3 エクソン-イントロン接合部位付近の塩基配列

bp(cDNAの280~424bpに相当), IIIが1232bp(cDNAの425~1656bpに相当)であった。蛋白をコードしている領域は、エクソンIIとIII(翻訳開始コドンのMet: AUGのAは287bp目, 停止コドンのUGAのUは564bp目に位置する)に分かれていた。これらのエクソンの塩基配列は、cDNAのものと同じであった。エクソン-イントロンの接続部位は、遺伝子中で典型的な5'GT-AG3'のルールに従っていた(図3)。イントロンの長さは、Iが約3.5kbp, IIが約3kbpであった(図1B)。決定されたS100 $\beta$ 遺伝子の構造からmRNAの長さを求めると約1700塩基になる。3'側非翻訳領域の長さは、1092塩基ですべてエクソンIIIに含まれていた。5'非翻訳領域は、287塩基でエクソンIとIIに分かれて存在していた。

### 5. S100蛋白産生細胞と非産生細胞

S100蛋白産生細胞には、ラットC6グリオーマ細胞株、非産生細胞には、ニューロblastoma 103株細胞を用い、それぞれの株細胞を、実験前にS100 $\beta$ 抗体を用いたPAP法により、免疫組織化学的染色法でS100蛋白 $\beta$ 鎖の有無を調べた。確かに、C6グリオーマ細胞で、S100蛋白 $\beta$ 鎖は、作られていたが、ニューロblastoma 103では、作られていなかった。

### 6. 融合遺伝子のS100蛋白産生細胞での発現

5'側上流の調節領域に注目し転写調節機構を検討することにした。この遺伝子の転写開始点付近を含む5'側上流1kbpのDNA断片と $\beta$ -ガラクトシダーゼ遺伝子との融合遺伝子を作成した。融合遺伝子は、S100 $\beta$ 遺伝子の調節領域付近約1kbpを挿入したもの、代わりにレトロウイルスの調節領域を持つもの、そして調節領域を含まないものを用意した(図4)。これらの融合遺伝子をS100蛋白産生細胞に導入したところ、S100 $\beta$ 遺伝子の調節領域を正方向に持つものと、レトロウイルスの制御領域を持つもので発現しているのが見出された。しかし、発現の強さは、S100 $\beta$ 遺伝子調節領域を持つものがレトロウイルスの調節領域を持つものの二十分の一

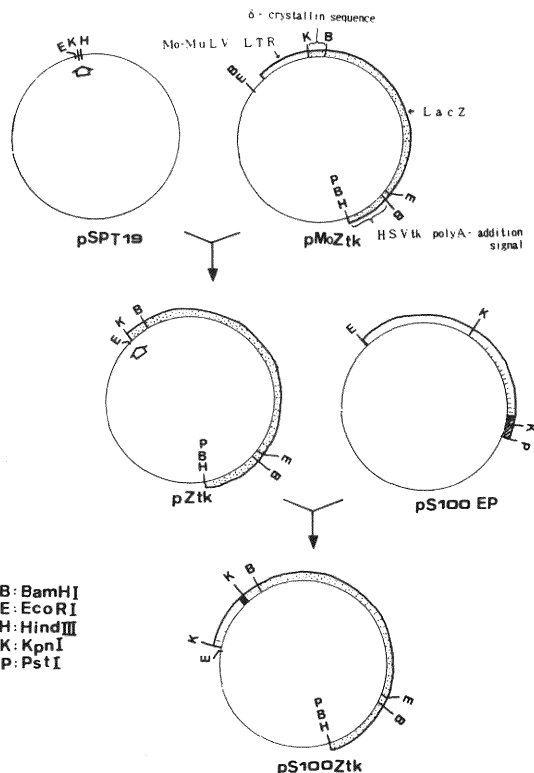


図4 融合遺伝子の作成

Molony ウイルスの調節領域を持つもの(pMo Ztk)から1 lacZ 遺伝子と poly(A) 付加シグナルを取りだし、ベクター pSPT 19 に入れる(pZtk). pZtk に S100 $\beta$  の調節領域約 1kbp を入れる(pS100Ztk). この S100 $\beta$  の調節領域を逆方向に持つものを pS100 RZtk とした。

位しかなかった。また、S100 $\beta$  遺伝子調節領域が逆方向に挿入されたものでは(pS100 RZtk), 発現は見られなかった(図5)。

### 7. 融合遺伝子の S100 蛋白非産生細胞での発現

次に、前述の融合遺伝子を S100 蛋白非産生細胞に導入した。この細胞は S100 蛋白産生細胞よりリン酸カルシウム塩に対して弱く、外来遺伝子の導入効率が S100 蛋白産生細胞の数分の一位におちるが、レトロウイルスの調節領域を持つものだけが発現していた(図6)。

### 8. 調節領域を欠失した融合遺伝子の

#### S100 蛋白産生細胞での発現

そこで、S100 $\beta$  遺伝子調節領域を上流から欠失させた変異体を作り、それらを S100 蛋白産生細胞に導入し、その発現を調べた。その結果、欠失が転写開始点上流 25bp まで及ぶと発現しなくなることがわかった(図は

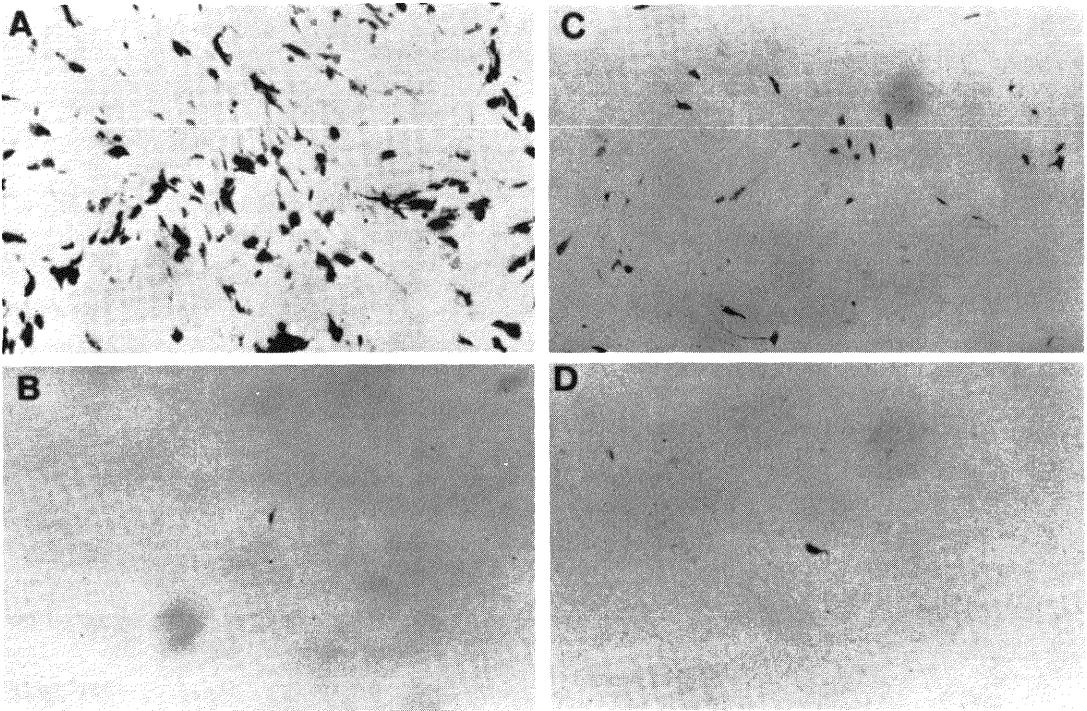


図 5 融合遺伝子の S100 蛋白産生細胞での発現  
A: pMo Ztk, B: pZtk, C: pS100Ztk, D: pS100RZtk, を  
導入し, 酵素化学的方法で染色した.

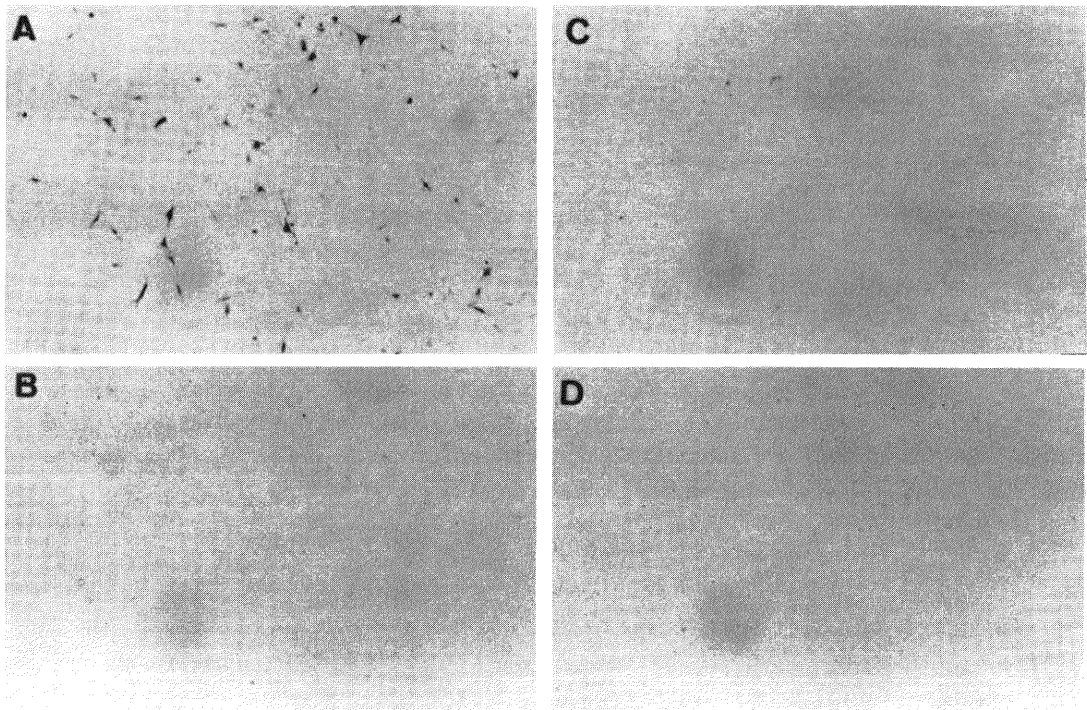


図 6 融合遺伝子の S100 蛋白非産生細胞での発現  
A: pMo Ztk, B: pZtk, C: pS100Ztk, D: pS100RZtk, を  
導入し, 酵素化学的方法で染色した.

省略)。

### 9. 細胞側の因子の存在

現在、特異的な DNA 配列を認識し結合する核内調節蛋白を検出し、同定するアッセイ法に、Gel shift assay がある。S100 $\beta$  遺伝子調節領域をいくつかの DNA 断片に分け Gel shift assay をしたところ、転写開始点より上流約 25bp の所からさらに上流 130bp までの DNA 断片で肝臓の核の蛋白には存在せず、脳の核の蛋白に存在する DNA 結合蛋白を確認した (図は省略)。

## 考 察

多くの真核生物の mRNA の転写開始点は、プリン塩基、特に、アデニン (A) で始まっていることから、S1 ヌクレアーゼマッピングで推定された A が、S100 $\beta$  遺伝子の転写開始点と推定される。転写開始点より約 30bp 上流に 5' TAAATT 3' という AT rich な部分があり、真核生物遺伝子の転写のためのプロモーター (TATA box) と類似性があった。しかし、典型的な TATA box ではなかった。-49bp と -113bp の所に 5' ATCAAT 3' の配列があり、多くの遺伝子に保存された CAT box と呼ばれる配列と高い類似性があった。

S100 $\beta$  遺伝子は、3つのエクソンと2つのイントロンよりなっている。

S100 $\beta$  遺伝子を S100 蛋白のカルシウム結合能力という点から見てみる。S100 蛋白はカルシウムを2分子結合させる。イントロンが、2つのカルシウム結合単位の間に入っていることも想像される。事実、イントロン II は、S100 蛋白を N 末端側半分と C 末端側半分に分けていた。そして、カルシウム結合単位もそれぞれの末端側に一つずつ (エクソン II と III に一つずつ) 入っていた。このような分断は、他のカルシウム結合蛋白の遺伝子でも見られた。たぶん、S100 遺伝子は遺伝子の重複とドメイン単位の欠失により進化してきたものと思われる。

S100 蛋白産生細胞で、導入した融合遺伝子の S100 $\beta$  遺伝子の調節領域が作用するのに方向性が見られることから、S100 $\beta$  遺伝子の転写開始点付近を含む約 1 kbp の DNA 断片には、転写に必要な領域があると考えられる。

また、融合遺伝子を S100 蛋白非産生細胞に導入した結果、S100 $\beta$  遺伝子の調節領域をもつものが、発現しないということは、この S100 蛋白非産生細胞に転写に

必要な因子がないのか、転写を抑制する因子があるのか、のどちらかが考えられる。

さらに、欠失が転写開始点上流 25bp まで及ぶと発現しなくなる。このことは、転写に必須で普遍的な共通配列が失われたためかもしれない。しかし、ゲルシフトアッセイの結果、転写開始点の上流の DNA 断片 (-25bp ~ -130bp) に結合する核内の蛋白が、脳に存在することから、転写開始点上流 25bp より上の方に (少なくとも、-130bp 位の所までに) S100 $\beta$  遺伝子の細胞特異的発現に関与する DNA シグナルのひとつがあると推定される。

S100 $\beta$  では少なくとも、限定された組織 (細胞) に分布する細胞側因子と遺伝子に付随した DNA シグナルとの相互作用が存在するということが示された。さらに、複数のメカニズムが、遺伝子の最終的な細胞特異性をもたらすのに重要な役割を果たしていると思われる。今回示した、DNA シグナルと調節因子の相互作用は、細胞特異性の機構の一部であろう。今後、細胞特異的エンハンサー機能を有する DNA シグナルを捜し、そこに相互作用する細胞側因子も検索していきたいと思う。

## 要 約

アストログリア細胞特異蛋白である、S100 蛋白  $\beta$  鎖遺伝子の構造を明らかにした。この遺伝子は、約 8 kbp の長さで、3つのエクソンと2つのイントロンから成っていた。転写開始点は、S1 マッピング法によって定められた。転写開始点より 5' 側上流に、TATA-box 類似の配列や、CAT-box 類似の配列があった。この遺伝子の発現を調べるため、S100 $\beta$  遺伝子と lacZ 遺伝子との融合遺伝子を作り培養細胞に導入した。その結果、転写開始点より 5' 上流領域 1,000bp (特に -25bp から -130bp) が、転写に重要な役割をはたすことを見出した。

稿を終えるにあたり、終始御指導、御校閲を賜った高橋康夫教授に深謝いたします。御助言ならびに御協力いただいた京都大学理学部の近藤寿人博士に感謝いたします。また、終始研究に御協力いただいた教室の方々に感謝いたします。

## 参 考 文 献

- 1) Moore, B.W.: A soluble protein characteristic of the nervous system, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **19**: 739~744, 1965.
- 2) Isobe, T. and Okuyama, T.: S100蛋白質, 神経化学 (共立出版): 1085~1100, 1984.
- 3) Masuda, T., Sakimura, K., Yosida, Y., Kuwano, R., Isobe, T., Okuyama, T. and Takahashi, Y.: Developmental changes in the translatable mRNA for  $\beta$  subunit of S100 protein in rat brain, *Biochim. Biophys. Acta.*, **740**: 249~254, 1983.
- 4) Kuwano, R., Usui, H., Maeda, T., Yamamari, N., Ohtsuka, E., Ikehara, M. and Takahashi, Y.: Molecular cloning and the complete nucleotide sequence of cDNA to mRNA for S100 protein of rat brain, *Nucleic Acids Res.*, **12**: 7455~7465, 1984.
- 5) Blin, N. and Stafford, D.W.: Isolation of high molecular-weight DNA, *Nucleic Acids Res.*, **3**: 2303~2306, 1976.
- 6) Southern, E.: Gel electrophoresis of restriction fragments, *Methods in Enzymol.*, **68**: 152~177, 1979.
- 7) Thomas, P.S.: Hybridization of denatured RNA and small fragment transferred to nitro-cellulose, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **77**: 5201~5205, 1980.
- 8) Benton, W.D. and Davis, R.W.: Screening  $\gamma$  gt recombinant clones by hybridization to single plaques in situ, *Science*, **196**: 180~182, 1977.
- 9) Davis, R.W., Botstein, D. and Roth, J.R.: Purification of phage, *Advanced Bacterial Genetics*: 80~82, Cold Spring Harbor Laboratory (USA) 1980.
- 10) Maxam, A.M. and Gilbert, W.: Sequencing end-labeled DNA with base-specific chemical cleavages, *Methods in Enzymol.*, **65**: 499~860, 1980.
- 11) Birnboim, H.C., and Doly, J.: A rapid alkaline extraction procedure for screening recombination plasmid DNA, *Nucleic Acids Res.*, **7**: 1513~1523, 1979.
- 12) Sharp, P. A., Berk, J. and Berget, S.: Transcription maps of Adenovirus, *Methods in Enzymol.*, **65**: 750~768, 1980.
- 13) Kondoh, H.: 細胞及び個体への外来遺伝子の導入とその発現, 遺伝子発現の解析技術テキスト (基礎生物学研究所): 65~76, 1986.
- 14) Takiya, S. and Suzuki, T.: 無細胞転写系における遺伝子転写機構の解析, 遺伝子発現の解析技術テキスト (基礎生物学研究所): 188~198, 1986.
- 15) Simmen, R.C.M., Tanaka, T., Ts'ui, K.F., Putkey, J. A., Scott, M. J., Lai, E.C. and Means, A.R.: The structural organization of the chicken calmodulin gene, *J. Biol. Chem.* **260**: 907~912, 1985.

(昭和62年9月18日受付)