

筑波大学

博士〔医学〕学位論文

寄	贈
川内康弘氏	平成 年 月 日

DA
1143
1992
(H)

T細胞分化抗原CD8 β 遺伝子プロモーター領域の
分子生物学的解析

1992

筑波大学大学院博士課程医学研究科

川内康弘

95003871

目次

I. 緒言

1. 序

2. CD8の構造

3. CD8の発現とT細胞分化との関連

4. CD8のT細胞分化・活性化における機能

II. 研究目的

III. 研究方法

1. 細胞株と培養方法

2. DNaseI hypersensitive site assay

3. プラスミド

4. DNAトランスフェクション

5. CATアッセイ

6. 細胞核抽出液の調整

7. ゲルシフトアッセイ

IV. 結果

1. マウスCD8遺伝子上流域の塩基配列の解析

2. CD8遺伝子上流域のCATアッセイによる機能的解析

3. DNaseI hypersensitive site assay によるCD8遺伝子の エンハンサーエレメントの検索

4. CD8 β 遺伝子プロモーターのコア領域の決定

5. ゲルシフトアッセイを用いたCD8 β プロモーター・コア領域に結合している核内蛋白の解析

6. CD8 β プロモーターのT細胞特異的な転写活性

V. 考察

VI. 総括

VII. 図

VIII. 文献

IX. 謝辞

I. 緒言

1. 序

CD8は従来ヒトではT8（またはOK T8、Leu2等）、マウスではLyt-2、Lyt-3と呼ばれていたリンパ球表面分子であり、主としてキラー／サプレッサー T細胞のマーカーである^{1,2)}。さらに1979年に、Lyt-2、Lyt-3に対する抗血清や抗体が、キラー T細胞のキラー活性を特異的に阻害することが報告され³⁾、CD8がキラー T細胞のキラー活性に機能的にも重要な分子であることが示された。しかし厳密には、CD8の発現はT細胞の機能サブセットと相関しておらず、より強い相関があるのはMHC拘束性である⁴⁾。すなわちCD8は、MHCクラス I 分子と抗原ペプチドの複合体を認識して反応するT細胞上に発現している。これと対照的にCD4はMHCクラス II 分子を認識して反応するT細胞上に発現している。1988年から1989年にかけて、CD8がMHCクラス I 分子に結合することが直接的に証明され^{5,6)}、CD8はT細胞レセプターとMHCクラス I 分子の結合を補助する「accessory molecule」として理解されていた。しかし1988年、CD8 α 鎖の細胞内ドメインに、src ファミリーのチ

ロシン・キナーゼ蛋白であるp56^{lck}が会合しており、T細胞レセプターとは独立して細胞内にシグナルを伝達できることが示された⁷⁾。さらにT細胞の抗原認識の際に、CD8がT細胞レセプターと会合していることも報告され⁸⁾、現在ではCD8はT細胞レセプターと共同して抗原を認識し、その情報を細胞内に伝達する役割を果たしている「co-receptor」であると考えられている⁹⁾。

また、CD8を胚細胞レベルで発現できないようにしたマウスでは、MHCクラスI拘束性T細胞がほとんど存在しないことから、CD8はMHCクラスI拘束性T細胞の胸腺内での分化、増殖においても不可欠の存在であることが再確認され¹⁰⁾、CD8はMHCクラスI拘束性T細胞の発生、分化過程から成熟T細胞の抗原認識に至るまで、重要な役割を果たしていると考えられている。

T細胞の分化の特徴は、他の細胞にも見られるような一般的な分化、成熟のほかに、自己反応性のT細胞が除かれるという「選択」の過程が、同時に起こっているところにある。このT細胞の胸腺内分化において、CD8は、CD4とともに各々の分化段階に特異的な発現形式をとることが知られており¹¹⁾、この発現調節機構の解明が、T細胞の胸腺内分化の分子機構の解明に、大きく寄与するものと考えられる。

2. CD8の構造

CD8はT細胞膜上に存在する糖蛋白で、マウスで38kD, ヒトで32kDの α 鎖と、マウスで30kD, ヒトで32kDの β 鎖が、S-S結合を介して結合したヘテロダイマーとして存在する^{12,13)}。1980年代後半にかけて、ヒト、マウスのCD8 α 鎖、 β 鎖のcDNAがクローニングされた¹⁴⁻¹⁸⁾。ヒトのCD8は、初め α 鎖のみのホモダイマーと考えられていたが、1987年にマウスの β 鎖とのホモロジーからヒトの β 鎖の遺伝子がクローニングされ¹⁹⁾、ヒトにおいてもCD8は α 鎖と β 鎖のヘテロダイマーとして存在することが明らかとなった。 α 鎖、 β 鎖はともに免疫グロブリンやT細胞レセプターの可変部領域様の構造をもち、ヒンジ様部、膜貫通部、細胞内部で構成されている。 β 鎖はさらにジャンクション部様の構造も合わせ持っている²⁰⁾。これは、CD8 α 鎖、 β 鎖が免疫グロブリンと共通の祖先から進化したimmunoglobulin supergene familyの一員であることを示している。しかし、免疫グロブリンやT細胞レセプター遺伝子のように、遺伝子の再構成は起さず、多様性に富んだ分子はつくらない。このことは、遺伝子の再構成により多様性を作り出しているT細胞レセプター分子が、抗原分子とMHC分子のpolymorphic portionとを

認識し、多様性を持たないCD8分子が、MHC分子のnon-polymorphic portion を認識するという事実とよく対応している。

CD8の α 鎖と β 鎖をコードする遺伝子は、マウスでは第6染色体上で36kb、ヒトでは第2染色体上で25kb離れて存在しており、遺伝子の向きも同じ方向である^{18,21)}(図1)。このことから α 鎖と β 鎖で共通の発現機構を想定する仮説もある。また免疫グロブリン軽鎖のうち、 κ 鎖の遺伝子も α 鎖と β 鎖の遺伝子座に非常に近接して存在することも分かっている²²⁾。ヒトにおいては β 鎖の遺伝子は重複しており²¹⁾、しかも重複した2つの遺伝子のホモロジーは98.5%もあり、これは2つの遺伝子が極めて最近(150-200万年前)分かれた遺伝子であることを示唆している。また我々が双方の遺伝子の発現を調べたところ、ほとんど同じ遺伝子といってもよいくらいホモロジーが高いのにもかかわらず、 α 鎖の遺伝子とリンクしていない(新たに重複した)方の β 鎖遺伝子は、発現していない偽遺伝子であることがわかった²¹⁾。新たに重複した方(すなわち免疫グロブリン κ 鎖とリンクしていない方)の β 鎖遺伝子の下流8kbのところに重複のbreak pointがあり、これよりも下流に β 鎖の発現に必須のcis-elementが存在すると考えられる。一方CD8 α 鎖と β 鎖の遺伝子は、ともにヒト-マウス間で50%強のホモロジーがあるが、

α 鎖と β 鎖の遺伝子間でのホモロジーは20%程度と低い。これは両鎖の遺伝子が、共通の遺伝子からかなり早い時期に分かれて独自の進化を遂げてきたことを伺わせる。

よく知られているように、CD8はMHCクラスI分子のnon-polymorphic portion と結合する⁵⁾。さらにマウスのCD8はヒトのMHC分子を認識できないことから、マウスとヒトのCD8の塩基配列を比較することによって、MHC分子との結合に必要なアミノ酸配列を推定することが出来る。さらに変異を導入したCD8のcDNAをCOS細胞上で発現させ、MHCとの結合を検定するという方法で、MHC分子との結合に重要なCD8分子中のアミノ酸残基が同定された²³⁾。CD4の細胞外ドメインは結晶化に成功し、X線解析によりその立体構造がくわしく解明されたが²⁴⁾、CD8に関してはまだ結晶化が成功していない。免疫グロブリンV領域をテンプレートとしたコンピュータ・グラフィックス解析により、CD8がMHC分子の $\alpha 3$ ドメインのループを認識する立体モデルが提唱されている²⁵⁾。

3. CD8の発現とT細胞分化との関連

T細胞は骨髄の多能性幹細胞に由来する細胞であるが、主な分化、成熟の場は胸腺である。T細胞の分化で特徴的なことは、他の細胞でも起こっている分化、成熟に加えて「選択」という過程が存在することである。骨髄から胸腺にホーミングしてきたT前駆細胞は、CD4,CD8のどちらも発現していないが（double negative:DN）、成熟するにしたがってCD4,CD8の両方を発現するようになる（double positive:DP）¹¹⁾（図2）。この時期T細胞レセプター（TCR）を弱く発現しており、このTCRとCD4,CD8のどちらか一方の分子を介してintrathymic selectionと呼ばれる選別を受ける。すなわち自己のMHCと強く反応するクローン、および自己のMHCと全く反応しないクローンを除去する負の選択と自己のMHCに「ある程度」親和性のあるものが選択されて残る正の選択である。このようなクローンだけが、自己MHC分子と外来抗原分子との複合体にうまく反応できると考えられている。すなわち、正の選択はMHC拘束性の獲得にほかならない。これらの選択を経て未熟T細胞はTCRを強く発現し、CD4/CD8のどちらか一方を発現した（single positive:SP）成熟T細胞となって末梢へと出て行く。この他に、CD8を弱く発現したTCR陰性のsingle positiveの未熟T細胞もあり、これらはさらにDP細胞へと分化するらしい^{11,26)}。

このようにCD4とCD8の発現は、T細胞の分化、成熟と機能的に深く関わっている。実際、遺伝子操作によりCD8をコードする遺伝子を不活化し、CD8が細胞表面に発現できないようにしたマウスでは、クラス I 拘束性 T 細胞の数と機能が著しく減少していることが報告されている¹⁰⁾。

それでは、どのような機構で、CD4もCD8も発現させたDP細胞から、どちらか一方の発現が down regulate されたSP細胞へと分化していくのであろうか。このT細胞に特徴的なCD4/CD8の発現の変化の機構についての詳細は、現在のところ明らかではない。モデルとしては、TCRとCD4/CD8の複合体がMHC クラスI, II分子のどちらを認識するかにより、TCR-CD8/CD4複合体からCD4/CD8遺伝子の一方の発現を抑制するシグナルがはいる、すなわちTCR+CD4のシグナルはCD8の発現を抑制し、TCR+CD8のシグナルはCD4の発現を抑制するとする「*instructive model*」がある。また他のモデルとしては、CD4とCD8はどちらかがランダムに down regulateされ、結果として適正なクラスのMHCを認識したクローンが生き残ったとする「*stochastic model*」がある。CD8トランスジェニックマウスを用いた実験では、*instructive model*を支持する結果が得られている。²⁷⁾

4. CD8のT細胞分化と活性化における機能

先に述べたように、CD8はCD4とともに、MHCのnon-polymorphic portionと結合することにより、T細胞と抗原提示細胞、標的細胞との物理化学的結合力 (avidity) を高める accessory molecule あるいは細胞間接着分子であると考えられてきた。

しかし抗CD4抗体や抗CD8抗体が、T細胞の増殖やIL-2産生、CTL活性を抑制することが報告され、当初これはT細胞とMHC分子との接着がこれらの抗体により阻害された結果であるとされたが、その後、MHC分子を介さないレクチン刺激によるT細胞活性化をも、抗CD4抗体や抗CD8抗体が抑制すること、クロスリンクを起こさないFab抗体ではその抑制効果がないことなどから、CD4/CD8を介したnegative signal伝達系の存在が想定された²⁸⁾。しかし、固相化した抗CD3抗体と抗CD4/CD8抗体により、T細胞のCD4/CD8をCD3とクロスリンクすると、CD3単独のクロスリンクに比べて、5 - 10 倍のT細胞活性化が起こることが報告され²⁹⁾、このことからCD4/CD8はTCR/CD3 complex と相乗的に働くシグナルの伝達を担うことが明らかとなった。さらに物理的にも

CD4/CD8がTCRに会合していることが、co-precipitation³⁰⁾や co-capping analysis³¹⁾などの実験で明らかにされ、現在では、CD8/CD4はTCRが認識するMHC分子そのものに結合して、TCR複合体の一部として機能する「co-receptor」と考えられるようになった⁹⁾。

CD4/CD8を介するシグナル伝達系の細胞内要素として、1988年、CD4/CD8に src family に属するチロシンキナーゼ p56^{lck}が会合していることが報告された⁷⁾。p56^{lck}は細胞内蛋白質であり、細胞膜に局在し、N末端部分のグリシン残基に結合したミリスチン酸により細胞膜内側に付着し、2個のシステイン残基によりCD4/CD8の細胞内ドメインと非共有結合で結合している³²⁾。また p56^{lck}は他のsrc familyのメンバーと同じ様に、SH2、SH3という機能ドメインを持ち、これらのドメインはGAP(GTPase activating protein)、PLC- γ (phospholipase C- γ)といったシグナル伝達に関わる蛋白質と相互作用する部位であることが報告されている^{33,34)}。これらのことから、p56^{lck}がCD8を介するシグナル伝達のセカンドメッセンジャーであると考えられている。

CD4/CD8をTCRとクロスリンクすると、T細胞の著明な活性化とCD3 ζ 鎖を含むいくつかの細胞質蛋白質のチロシン残基のリン酸化

が起きることが知られている³⁵⁾。また細胞内ドメインを欠失し $p56^{lck}$ と会合できなくなっている変異CD8をTCRとクロスリンクさせても、このような著明なT細胞の活性化と細胞質蛋白のチロシンリン酸化は起きないことから³⁶⁾、 $p56^{lck}$ がCD8の co-receptor としての機能に極めて重要な役割を果たしていることが分かってきた。しかし、CD8-TCRのクロスリンクにともなって起きる細胞質蛋白のチロシンリン酸化が、具体的に何を意味しているのかは、今後の研究の成果を待たなければならない。

最近T. MakらによりCD8, CD4, $p56^{lck}$ の遺伝子を不活化し、発現できないようにしたマウスが相次いで報告され^{10, 37, 38)}、CD4, CD8, $p56^{lck}$ の成熟T細胞活性化における役割だけではなく、その発生・分化における役割も明らかになってきている。

これらの研究の中のCD8に関するものは、いずれも主としてCD8 α 鎖の機能をみているもので、CD8 β 鎖の機能は長い間不明であった。これはCD8 β 鎖の膜表面への発現がCD8 α 鎖を必要とするためにCD8 β 鎖の機能を純粹にはみれなかったことなどによる。しかし最近になって、2つのグループからCD8 β 鎖がT細胞レセプター-特異的なT細胞のIL-2産生を増強することが報告された^{39, 40)}。しかしCD8 β 鎖には $p56^{lck}$ は会合しておらず、CD8 β 鎖がシグナル

伝達に関わっているかどうかはなお不明である。

II 研究目的

上述したようにCD4/CD8ダブルポジティブの段階からCD8シングルポジティブに至るCD4/CD8の発現の変化は、T細胞の胸腺内での分化、選択過程に重要な役割を果たしていることは明らかであるが、その発現調節の分子機構はまだ明らかではない。プロモーター領域は、RNAポリメラーゼIIが遺伝子の転写を開始する部位であり、その遺伝子の発現をon/offする情報が集中している領域である。すなわちCD8遺伝子のプロモーター領域を解析すれば、CD8遺伝子の発現を制御している分子機構の解明に結びつくことが期待される。そこで私はCD8の発現調節機構の解明するために、マウスCD8 α 鎖の遺伝子とCD8 β 鎖の遺伝子のプロモーター領域を解析した。

III 研究方法

1. 細胞株と培養方法

マウスの胸腺腫細胞株である BalbRLm6 (CD3+, CD4+, CD8a+, CD8b+) は長崎大学の中山 一博士から供与され、37℃、5%CO₂で培養した。培地は、10%FCS, 2 mM L-glutamine, 0.03 mM 2-mercaptoethanol, 12 mM HEPES, 100 µg/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin, 50 µg/ml gentamycinを含むRPMI1640培地をもちいた。マウスの骨髓腫細胞株であるP3U1は、BalbRLm6と同様の条件で培養した。マウスの前B細胞リンパ腫細胞株であるBa/F3(理研、戸所一雄博士から供与)は、IL-3の供給源としてWEHI-3B細胞の培養上清を10%の濃度で培地に加え、BalbRLm6と同様の培養条件で培養した。マウスの骨髓性白血病細胞株であるM1は、αMEM培地を用い、マウスの線維芽細胞株であるL細胞とNIH3T3細胞は、DMEM培地を用い、BalbRLm6と同じ培養条件で培養した。

2. DNase I hypersensitive site assay

細胞核分画は McKeon 等の方法⁴¹⁾に準じて調整した。すなわち BalbRLm6細胞 10^8 個を PBS で 3 回洗浄し、A 緩衝液 (0.25 M sucrose, 0.25 % nonidet P-40, 60 mM KCl, 15 mM NaCl, 1 mM EDTA, 0.5 mM spermidine, 15 mM TrisHCl (pH7.5), 0.1mM phenylmethylsulfonyl fluoride(PMSF))で細胞を溶解した後、1,500 rpm, 5分間遠心し、沈澱を核分画とした。この核分画を DNase I 緩衝液 (60 mM KCl, 15 mM NaCl, 15 mM Tris-HCl (pH 7.4), 0.5 mM dithiothreitol(DTT), 1 mM CaCl_2 , 0.25 M sucrose)で 2 回洗浄した。洗浄核分画は、DNase I を各々 0, 2, 10, 20, 100 単位含む DNase I 緩衝液 1 ml に浮遊させ、25 °C で 5分間反応させた。反応液に 25 μl の 0.5 M EDTA と 50 μl の 10 % SDS を加えて反応を停止し、さらに 50 μl の 10 mg/ml Proteinase K を加え、37 °C で 30 分間反応させ、フェノール抽出、クロロホルム抽出を行い、引き続いてエタノール沈澱を行った。沈澱を 600 μl の TE 緩衝液 (10 mM Tris-HCl (pH8.0), 1 mM EDTA)に溶解し、2.5 μl の 10 mg/ml RNase A を加え、RNA を消化した。反応液をフェノール・クロロホルム抽出、エタノール沈澱し、沈澱を TE 緩衝液に再溶解して制限酵素の消化に供した。制

限酵素消化後、DNA 10 μ g 相当分を0.75% アガロースゲルにて電気泳動した。さらにナイロン膜にトランスファーし、80℃、2時間で固定した。固定したナイロン膜をハイブリダイズ用緩衝液(6xSSPE, 0.5 % SDS, 2x Denhardt solution, 100 μ g/ml salmon sperm DNA) 中で、ランダムプライム法で³²PでラベルしたDNAプローブとともに57℃、16時間反応させた。ハイブリダイズしたナイロン膜を 2xSSPE, 0.1% SDSで2回、0.2x SSPE, 0.1% SDSで2回洗い、風乾の後、バイオイメージアナライザー(バス2000、富士フィルム社)を用いてオートラジオグラフィを行った。

3. プラスミド

pSV00CAT ベクター⁴²⁾のHindIII サイトに、マウスCD8 α 遺伝子の5' 上流域0.8kb、CD8 β 遺伝子の5' 上流域 1.0kbを各々サブクローニングし、pLy200CAT, pLy300CAT と命名した(図3)。pCAT-Control plasmid(プロメガ社)をテンプレートとしてPolymerase Chain Reaction (denature:94℃, 80秒, annealing:56℃, 50秒, polymerize: 72℃, 180秒:30サイクル)を

行い、229bpのSV40エンハンサー領域を増幅して、pLy200CAT、pLy300CATのBamHIサイトに組み込み、各々をpLy200CAT-SV40E、pLy300CAT-SV40Eと命名した。116bpのT細胞レセプター α 遺伝子のエンハンサー・エレメント⁴³⁾(ミシガン大学のJ. M. Leiden 博士から供与)を、同様にpLy300CATのBamHIサイトに組み込み、pLy300CAT-TCR α と命名した。

CD8 β プロモーターの欠失変異クローンは size fractionated uni-directional deletion 法⁴⁴⁾によって図7、8に示すように作製し、pSV00CATのHindIIIサイトに組み込んだ。すなわち、CD8 β プロモーターをSalI/SacIで消化し、段階的に消化時間を振ってMung Bean Nucleaseで消化した後、ExonucleaseIIIで消化し平滑端とした。セルフライゲーションの後、適切な長さに欠失しているクローンをアガロースゲル電気泳動により選り出した。

CD8 β プロモーターの点突然変異クローンは、以下のように作製した。pLy300CATにはBglIIサイトがプロモーター内部とベクター側の2箇所存在するので、まずpLy300CATを部分分解してベクター側のBglIIでのみ消化されたクローンをT4ポリメラーゼ処理してセルフライゲーションさせ、プロモーター内部のみにBglIIをもつクローンを作製し、pLy300CAT-BglIIと命名した。図9Aに示す

ような点突然変異を導入した5'プライマーを合成し、またベクターのNcoIサイト部分に3'プライマーを合成した。このプライマーと、pLy300CATをテンプレートとして用いてPCRを行い、0.67kbのPCR産物を、BglIIで消化しT4ポリメラーゼで平滑端としたpLy300CAT-BglIIに組み込み、プロモーター領域の点突然変異体を作製した。

4. DNAトランスフェクション

20 μ gのCATプラスミドDNAと10 μ gのpRSVgHプラスミド⁴⁵⁾ DNAをBalbRLm6、P3U1, Ba/F3, M1, NIH3T3, L細胞にDEAE-dextran法⁴⁶⁾を用いて共導入した。すなわち各細胞をFCSを含まないRPMI1640で2回洗浄し、さらにTS緩衝液(25 mM Tris-HCl (pH7.5), 137 mM NaCl, 5 mM KCl, 0.7 mM CaCl, 0.5m M MgCl₂, 0.6 mM NaHPO₄)で洗浄し、細胞10⁷個を1.5 mlのTS緩衝液に浮遊させた。この浮遊液に30 μ gのプラスミドDNA混合液と7.5 μ lの100 mg/ml DEAE-dextranを加え、よく攪拌して室温で45分間反応させた。反応後、5 mlのTS緩衝液を加えて反応を停止し、10 % FCSを含むRPMI1640で3回細胞を洗浄し、培養フラス

コにて48時間CO₂インキュベーターで培養した。

5. Chloramphenicol acetyltransferase (CAT) アッセイ

Gorman⁴⁷⁾らの方法に準じて行った。トランスフェクション後48時間培養した細胞を、TEN緩衝液 (0.1 M NaCl, 10m M Tris-HCl (pH8.0), 1 mM EDTA)で3回洗浄し、100 μ lの0.25 M Tris-HCl (pH8.0) に浮遊させた。細胞浮遊液をエタノール・ドライアイス・バスに5分間保ち、次いで37℃のウォーターバスに5分間保つfreezing/thawing法を3回繰り返した。15,000rpm、5分間遠心して上清を集め、細胞抽出液とした。上清の蛋白濃度をブラッドフォード法により測定し、50 μ g相当の上清を467 mM Tris-HCl(pH7.8), 4 mM acetyl CoA (Pharmacia社), 0.125 mCi [¹⁴C]-chloramphenicol (NEN社)と37℃、5時間反応させた。反応液をエチルアセテートで抽出し、シリカゲルプレート(Merk社)による薄層クロマトグラフィで、クロロホルム：メチルアルコールの95:5の混合液を溶媒とし、15分間展開した。風乾した後、バイオイメージアナライザー (富士フイルム社) を用いて、オートラジオグラフィを行い、アセチル化されたクロラムフェニコールと総

クロラムフェニコール放射活性の比を%Conversionとし、次式によりCAT活性の指標とした。

$$\%Conversion = \frac{\text{acetylated chloramphenicol intensity}}{\text{total chloramphenicol intensity}} \times 100$$

また細胞種間でのトランスフェクションの効率差を補正するために、pRSVgHベクターをCATベクターとともに共導入し、培養上清中のヒト成長ホルモン濃度を、ヒト成長ホルモン測定キット（ダイナボット社）を用いて測定した。各細胞培養上清中のヒト成長ホルモン濃度の比（BalbRLm6での濃度を1とする。）をトランスフェクションの効率比として、次式により補正%Conversionを算出した。

$$\text{補正}\%Conversion = \%Conversion \times 1 / \text{ヒト成長ホルモン濃度比}$$

本論の結果および図で用いている%Conversionは全てこの補正%Conversionである。

6. 細胞核抽出物の調製

細胞核抽出物の調製はWu⁴⁸⁾らの方法に準じて行った。細胞をPBSで2回洗浄し、細胞沈渣容積の2倍量のA緩衝液(10 mM HEPES(pH7.9), 10 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, 0.1 mM EGTA, 0.5 mM DTT, 0.5 mM PMSF)に浮遊させ、Dounceのホモジナイザー(タイプB)で20往復ホモジナイズした。3,000rpm(2,100xg)、5分間遠心して上清を除き、沈渣を核分画とした。沈渣を5倍量のA緩衝液に再浮遊させ、同様に遠心した。沈渣を2.5倍量のB緩衝液(10 mM HEPES(pH7.9), 0.4 M NaCl, 15 mM MgCl₂, 0.1 mM EGTA, 0.5 mM DTT, 0.5 mM PMSF, 5% glycerol)に浮遊させ、30分間室温でゆるやかにスターラーで攪拌した。さらに35,000 rpm(100,000xg)、50分間、4℃で遠心し、上清をC緩衝液(20 mM HEPES(pH7.9), 50 mM NaCl, 0.1 mM EGTA, 0.5 mM DTT, 0.5 mM PMSF, 20% glycerol)に対して4℃で6時間透析した。透析後、内容を1,500rpm(10,000xg)、5分間遠心して不溶物を除き、上清を細胞核抽出物とした。

7. ゲルシフトアッセイ

ゲルシフトアッセイはJones⁴⁹⁾らの方法に準じて行った。すなわち5-15 μ gの蛋白質を含む細胞核抽出液を25 μ lの緩衝液 (10 mM Tris-HCl (pH7.5), 50 mM NaCl, 0.5 mM DTT, 0.5 mM EDTA, 5 % glycerol, 200 ng/ml poly(dI)·poly(dC)) 中で、25℃、15分間反応させ、(Cold competition assay の場合はさらに100ngから300ngの非標識の変異体プローブを加えた)。さらに1ngの5'末端ラベルしたプローブを加え、25℃、30分間反応させ、反応停止には反応液に反応停止液(5 % glycerol, 50 mM EDTA, 0.05 % bromophenol blue, 0.05 % xylen cyanol)を加えた。4%アクリルアミドゲルを用い、0.5xTBE (89 mM Tris-borate, 89 mM boric acid, 2 mM EDTA)を泳動緩衝液として150V, 2時間電気泳動した。ゲルを乾燥させ、バイオイメージアナライザー (富士フイルム社) を用いてオートラディオグラフィーを行った。

IV. 結果

1. マウスCD8遺伝子上流域の塩基配列の検索

種々の遺伝子においてその発現を制御しているのは、翻訳開始コドンATGの上流域100bpから1000bpのプロモーター領域である。マウスCD8遺伝子は既に単離され、塩基配列も明らかにされている²⁰⁾。その塩基配列にもとずいて、ホモロジー検索を行い、すでに報告されている転写活性に重要な塩基配列がないかどうかを検討した。

図4に示すように、CD8 α , β プロモーター領域には、TATA boxやCAAT boxが存在しない。しかしGCに富む配列を持っており、転写因子Sp-1の結合認識配列であるGC boxがCD8 α プロモーターで2箇所、CD8 β プロモーターで3箇所存在する。またCD8 β プロモーターにはACが二十数回繰り返して存在する特異な「AC repeat」が2箇所、免疫グロブリン遺伝子のエンハンサーの配列に相同な部分が3箇所存在する。そのほかにCD8 α プロモーターにはT細胞レセプター β プロモーターに相同性のある部分が1箇所存在

する。

2. CD8遺伝子上流域の機能的解析

転写開始点を含むマウスCD8 α 遺伝子の5'上流域0.8kbと、CD8 β 遺伝子の5'上流域1.0kbをpSVOCATベクターに組み込み(図3)、CD8 α , β 鎖を発現しているマウス胸腺腫細胞株BalbRLm6に遺伝子導入して、転写活性を測定した。CD8 α 遺伝子上流の0.8kbの遺伝子上流1.0kbの領域も、いずれも転写活性を示さなかった。この細胞は実際にCD8 α , β 鎖を発現しており、CD8の発現のための情報は全て内在している。それにもかかわらず転写活性を示さなかったことは、CATベクターに組み込んだプロモーター領域のみでは不十分であり、転写活性の発現のためにはプロモーター以外のシスエレメントが必要であることが示唆された。このような例は、CD8と同じ免疫グロブリンファミリーに属するT細胞レセプター遺伝子⁵²⁾や免疫グロブリン遺伝子⁵³⁾にも報告されている。これらの遺伝子では数kbから数十kb離れた位置にエンハンサーエレメントが存在し、このエレメントをプロモーター領域とともにCATベクターに組み込んでやると、十分な転写活性がみられる。

そこでCD8のエンハンサーの検索をCD8 α , β 遺伝子のゲノム近傍で行った。

3. CD8遺伝子のエンハンサーエレメントの検索

経験的にエンハンサーエレメントなどのDNA-蛋白質相互作用部位は、細胞核内において、DNaseIに高感受性であることがわかっている⁵⁴⁾。そこでCD8 α - β 遺伝子近傍のDNaseI高感受性領域を検索して、その領域をpLy200CATやpLy300CATのBamHIサイトに組み込み（図3）、BalbRLm6細胞株にトランスフェクションし、CATアッセイによって、そのCD8 α , β プロモーターに対するエンハンサー活性を測定した。図5に、CD8 α - β 遺伝子近傍約60kbにわたって検索したDNaseI高感受性の部位を示す。これらの部位のCD8 α , β プロモーターに対するエンハンサー活性を調べたところ、いずれのDNase高感受性領域もエンハンサー活性を示さなかった。すなわち、CD8 α , β のエンハンサーは、図5に示した約60kbのゲノム領域以外の領域に存在するか、あるいはプロモーター／エンハンサー以外の機構によって、CD8 α , β 遺伝子の転写の活性化が行われていることが、考えられる。

そこで同じ免疫グロブリンファミリーに属し、 $CD8\alpha, \beta$ と同様にT細胞特異的に発現しているT細胞レセプター α 鎖のエンハンサーエレメント（以下TCR α エンハンサー）や、幅広く種々のプロモーターの転写活性を増強するSV40ウイルスのエンハンサーエレメント（以下SV40エンハンサー）を、上述のようにpLy200CAT, pLy300CATのBamHIサイトに組み込んでCATアッセイを行った。結果は図6に示すように、 $CD8\beta$ プロモーターを組み込んだpLy300CATは、TCR α エンハンサーで強いCAT活性、SV40エンハンサーでは弱い活性を示したが、 $CD8\alpha$ プロモーターを組み込んだpLy200CATは、TCR α のエンハンサーで弱い活性を示しただけであった。

4. $CD8\beta$ 遺伝子プロモーターのコア領域の決定

$CD8\beta$ 遺伝子のプロモーター（以下 $CD8\beta$ プロモーター）はTCR α エンハンサー、SV40エンハンサーの存在下で転写活性を示したので、これらのエンハンサーを用いて、 $CD8\beta$ プロモーターの転写活性の発現に必須の領域（コア領域）を決定することを試みた。

$CD8\beta$ プロモーターを5'端からsize fractionated uni-

directional deletion 法⁴⁴⁾によって段階的に欠失させ、欠失変異体を作製し、TCR α エンハンサー存在下での転写活性をCATアッセイにより検討した。転写開始点を+1として野性型プロモーターの-980bpから-195bpまで欠失した場合転写活性には変化がないが、さらに-195bpから-20bpまで欠失させると転写活性が著しく低下した(図7)。さらに詳細に調べるために、さらに欠失変異体を作製し、同様に検討したところ、-48bpから-35bpまで欠失させた場合に転写活性が著しく低下することが分かった(図8)。すなわち、-48bpから-35bpまでの14bpに、CD8 β 遺伝子の転写に必須の領域があることが示された。前述のT細胞レセプターのエンハンサーに相同な領域や、特異なAC繰り返し配列などを欠失させても、転写活性には影響がなかった。

CD8 β 遺伝子の転写に重要な14bpには何らかの核内蛋白質が結合していると考えられる。このような核内転写制御因子はDNAとの相互作用のためにDNAと結合する性質があり、しかもランダムにDNAと結合するのではなく、ある特定の配列を認識して塩基配列特異的にDNAと結合する性質を持っている⁵⁵⁾。したがって、この認識配列に変異を導入すれば、転写制御因子はDNAに結合できなくなり、CD8 β プロモーターの転写活性も著しく低下するはずであ

る。

そこで、上述のCD8 β 遺伝子の転写に重要な14bpの特性をしらべるために、14bp「GGCCCCGCCCTCTT」に、連続する2bpの点突然変異を導入したプロモーターを作製し（図9A）、BalbRLm6細胞株にトランスフェクションしてCATアッセイを行った。その結果、14bp（⁻⁴⁸GGCCCCGCCCTCTT⁻³⁵）のうち-44bpから-39bpまでの6bp（CCGCCC）に突然変異を導入した場合に、CD8 β プロモーターからの転写が特異的に減少することが判明した。これは、CD8 β 遺伝子の転写を調節している核内因子が、この「CCGCCC」という塩基配列を認識して結合していることを示している。そこでこの6bpを、CD8 β 遺伝子プロモーターのコア配列と命名した。またこの6bpの塩基配列は、GC box と呼ばれるプロモーター特異的な配列と完全に一致した。GC box は転写活性化因子Sp-1の認識配列として知られている⁵⁶⁾。図4で示した通り、CD8 β プロモーターには3つのGC box が存在するが、CATアッセイの系でCD8 β プロモーターからの転写に影響を与えたのは、2番目のGC box のみであった。

5. CD8 β プロモーター・コア領域に結合する核内蛋白質の解析

CD8 β プロモーターコア領域に実際に結合している核内蛋白質を解析するために、BalbRLm6から抽出した核蛋白分画を用いて前述のCD8 β プロモーター・コア領域を含む14bpの配列をプローブとしたゲルシフトアッセイを行った。図10に示すように計5本のシフトバンドが認められた（図10, レーン1）。この結果は、CD8 β プロモーター・コア領域にSp-1だけではなく、複数の核内蛋白質が結合していることを示している。この結合が真にコア領域特異的なものかを確認するために、cold competition assayを行った。モル比で100-300倍の過剰量の非標識プローブ（cold competitor）を加えた。このとき cold competitorとしては、機能的に転写活性を減少させる突然変異（図9B；4、5、6）を導入したものを扱い、図10Aのレーン1で認められたバンドのうちどのバンドが、実際にCD8 β プロモーター・コア配列に結合している蛋白にあたるかを検討した。図10Aレーン2-7に示すようにバンドA、B、C、Eが残り、バンドDは消失した。すなわち、CD8 β コア配列にはバンドA、B、C、Eに相当する蛋白質が結合し、バンドDに相当する蛋白はプローブの他の部分に結合していたことが、明らかとなった。このことをさらに確認するために、突然

変異を導入したプローブを直接放射ラベルして、同様にゲルシフトアッセイを行った。その結果、図 10 B に示すように、バンド D 以外のバンドが減少または消失した。

以上の結果をまとめると、CD8 β 遺伝子の転写に重要な CD8 β プロモーター・コア配列に結合して転写を制御している核内因子は、Sp-1を含めて複数あり、それらが複合体を形成して転写調節を行っていることが示された。

6. CD8 β プロモーターの T 細胞特異的転写活性

CD8 α , β 鎖の発現は T 細胞に限られているが、CD8 β の T 細胞特異的発現が何によって規定されているかを検討した。CD8 β の転写のためにはプロモーターのみでは十分ではなく、エンハンサーの存在が必要である。そのエンハンサーがその細胞特異性を規定していることも考えられる^{57,52})。そこで組織特異的な転写増強活性がなく、幅広い細胞種で活性を示す SV40 エンハンサーを、CD8 β プロモーターとともに CAT ベクターに組み込み、種々の細胞系列に導入してその転写活性を比較した。その結果、図 11 A に示すように、T 細胞系列である BalbR Lm6 で特異的に CD8 β プロモーターの転写

活性がみられた。

次にCD8 β プロモーター・コア領域が、このT細胞特異的な転写活性に、どのように関わっているかを検討するために、プロモーター領域に欠失変異を導入し、そのCAT活性を同様に測定した。その結果、図11B、Cに示すように、コア領域の5'直上まで削ってもT細胞特異的な転写活性には影響がなかった。この結果は、コア領域に結合している転写制御因子群が、CD8 β 遺伝子の基礎的な転写活性の発現だけではなく、T細胞特異的発現をも規定していることを強く示唆するものであるが、コア領域より下流領域(-38bp - +69bp)の関与も否定できない。

さらに、CD8 β プロモーターの転写活性のある細胞 (BalbRLm6) とならない細胞(L細胞)で、コア領域に結合している因子に差があるかどうかをゲルシフトアッセイで検討した。その結果、図12に示すようにバンドA、B、C、DはL細胞と共通であるが、BalbRLm6特異的にバンドEが認められた。すなわちバンドEに相当する転写因子は、CD8 β を発現していないL細胞ではCD8 β コア領域に結合していないが、CD8 β を発現しているBalbRLm6細胞株では結合していることが、明らかとなった。このことから、バンドEに相当する転写因子が、CD8 β プロモーターのT細胞特異性を規定している

可能性が示唆された。

V. 考察

一般に遺伝子の転写は、その遺伝子の 5' 直上のプロモーターと呼ばれる 100bp から 500bp の DNA 領域と、転写因子と呼ばれる核内蛋白質との DNA-蛋白質相互作用とにより、制御されているものと考えられている。本研究では CD8 の発現調節機構を解析するために、CD8 α , β 遺伝子直上の 5' 上流域（プロモーター領域）を CAT ベクターに組み込み、CAT アッセイを行ったが、CD8 α 、CD8 β ともにプロモーターのみでは転写活性を検出できなかった。すなわち、CD8 α , β 遺伝子はその発現のために、プロモーター領域だけではなく、離れた位置にあるなんらかのシスエレメントを必要とすることが、示唆された。そこで 36kb と極めて近接して存在する CD8 α , β 遺伝子の近傍 60kb の DNase I 高感受性部位を検索し、得られた DNase I 高感受性部位を CD8 α , β プロモーターとともに CAT ベクターに組み込んで、CAT アッセイを行ったが、いずれの DNase I 高感受性部位もプロモーターからの転写を増強させなかった。検索した範囲にはエンハンサーは存在せず、さらに離れた位置に存在するものと考えられる。一方、CD8 α , β 遺伝子と同じ免疫グロブリン遺伝子ファミリーに属している T 細胞レセプター α 遺伝子も、エンハン

サーの存在下で発現していることが知られているが、このエンハンサーエレメントを組み込んだところ、CD8 β プロモーターで十分な転写活性が認められた。そこでこのシステムを用いて、CD8 β プロモーターの解析を行った。欠失変異プロモーターによる実験の結果、CD8 β の転写に必須の領域は、転写開始点から-35bpから-48bpの14bpの領域に同定された。そしてこの領域の点突然変異プロモーターによる実験の結果、CD8 β の転写に必須の領域はさらに-44CCGCC-39の6bpに絞られた。この配列をCD8 β プロモーターのコア配列と名付けたが、この配列は転写因子SP-1の結合認識配列に完全に一致した。この結果を、CD8 β 遺伝子5'上流域の塩基配列のコンピューター解析の結果と比較してみると、特異なAC repeatや免疫グロブリン遺伝子のエンハンサーと相同性のある配列は、実際の転写活性に影響を与えなかった。しかし、AC repeatのようなプリン-ピリミジンの繰り返し配列は、Z型DNAコイルを形成し、遺伝子の発現を調節していることも報告されており^{58,59}、AC repeatがクロマチンレベルで、CD8 β 遺伝子の発現を調節していることも、否定できない。

真核生物の蛋白質をコードしている遺伝子のプロモーターは、大きくTATA boxのあるプロモーターと、TATA boxの存在しない

プロモーターの2種類に分けられる⁶⁰⁾。TATA box は典型的には転写開始点の25-30bp上流に存在し、RNAポリメラーゼIIがプロモーターに結合するための仲介役をするTBP (TATA box binding protein) が結合するための配列であることが報告されている⁶⁰⁾。

一方CD8 β プロモーターのようにTATA box を持たないプロモーターもRNAポリメラーゼによって、転写が行われており、多くの場合転写因子Sp-1が結合する配列であるGC boxが複数コピー存在する。転写因子Sp-1は初めSV40のプロモーターに結合する転写活性化因子としてクローニングされたが、幅広く哺乳動物細胞に発現していることが報告されている⁵⁰⁾。Sp-1はRNAポリメラーゼ複合体がDNAに結合するための接着剤の役目を果たしていると考えられているが、そのほかにそのプロモーターの組織特異的発現を規定する転写制御因子の存在が必要であると考えられている⁶¹⁾。

CD8 β プロモーターではTATA boxや CAAT box が存在せず、3コピーのGC boxが近接して存在し、そのうちの真中のGC box がCD8 β の転写に必須のものであった。ゲルシフトアッセイの結果、この領域には少なくとも数種類の蛋白が、複合体として結合していることが明らかになった。GC box の部分に点突然変異を導入すると、この複合体全体が結合しなくなることから、DNAに実際結合

しているのはSp-1であり、他の因子は蛋白-蛋白相互作用によりお互いに複合体を形成しているものと考えられる。

CD8 β のプロモーターと同様にその発現のためにエンハンサーを必要とする免疫グロブリン遺伝子やT細胞レセプター遺伝子ではプロモーターとエンハンサーの両方に細胞特異性がある。そこでCD8 β 遺伝子のプロモーターは、CD8 β のT細胞特異的発現に関与しているかどうかを検討したところ、T細胞株のみでその転写活性がみられた。そして、CD8 β のプロモーター自体にT細胞特異的転写活性があり、コア領域の直上までプロモーターを欠失させてもT細胞特異性を失わないことから、コア領域に結合しているSp-1複合体が基本的転写活性のみならず、T細胞特異的発現をも規定している可能性が示唆された。そこで線維芽細胞株とT細胞株でコア領域をプローブとしたときのゲルシフトのパターンを比較してみると、共通なバンドのほかにT細胞株特異的にバンドが認められ、このバンドに相当する転写因子がCD8 β 遺伝子のT細胞特異的発現に関与している可能性が示された。このことは上述の、基本的転写を司るSp-1複合体に加えてさらに組織特異性を規定する因子が作用して、プロモーターの組織特異性が発揮されるとするPughらの組織特異的発現の分子モデルにも合致する⁶¹⁾。以上の知見を基にして

CD8 β プロモーターのコア領域にSp-1転写因子複合体が結合して、転写を活性化する仮説モデルを図13に示した。

CD8の発現の変化はT細胞の分化選択過程と強い相関があり、CD8の発現調節機構はT細胞分化と連動していると考えられる。したがってT細胞分化を下流からさかのぼるアプローチの一つとして、CD8/CD4の発現を制御している因子の同定、遺伝子クローニングは重要である。そしてCD8固有のエンハンサーの検索と、ゲルシフトアッセイで同定した因子のCD4の発現調節への関わりなどを、今後検討する必要があると考えられる。

VI. 総括

1. マウスCD8 α , β 遺伝子の5'上流プロモーター領域には、一般的にプロモーターで見られるような典型的なTATA boxやCAAT boxは存在しないが、GCに富み、いわゆるGC boxがお互いに近接して3コピー、免疫グロブリンH鎖遺伝子のエンハンサーに相同性のある領域が3箇所、ACが50bpにわたって繰り返すAC repeatなどが、存在する。

2. CD8 α , β ともにプロモーター単独では転写活性がなく、エンハンサーなどの配列が必要であると考えられた。またCD8 β のプロモーターは、T細胞レセプター α のエンハンサーで強い転写活性を、SV40のエンハンサーで弱い転写活性を示した。

3. CD8 α , β 遺伝子周囲のゲノムを約60kbにわたって、DNase I hypersensitive site assay を用いて検索したが、エンハンサー活性のある領域は得られなかった。

4. CD8 β プロモーターのなかで、その転写活性の発現に不可欠な領域は、転写開始点から-44bpから-39bpの距離にある「CCGCCC」であり、この配列は転写活性化因子Sp-1の結合認識配列(GC box)に完全に一致していた。よってこの部位をCD8 β プロモーターのコア配列と名付けた。

5. コア配列には複数の転写因子が複合体として結合する。

6. CD8 β プロモーターは T 細胞特異的な転写活性を示し、この組織特異的転写には、コア領域に結合している転写因子複合体の構成因子の一つである、T 細胞特異的転写因子が関与していることが示唆された。

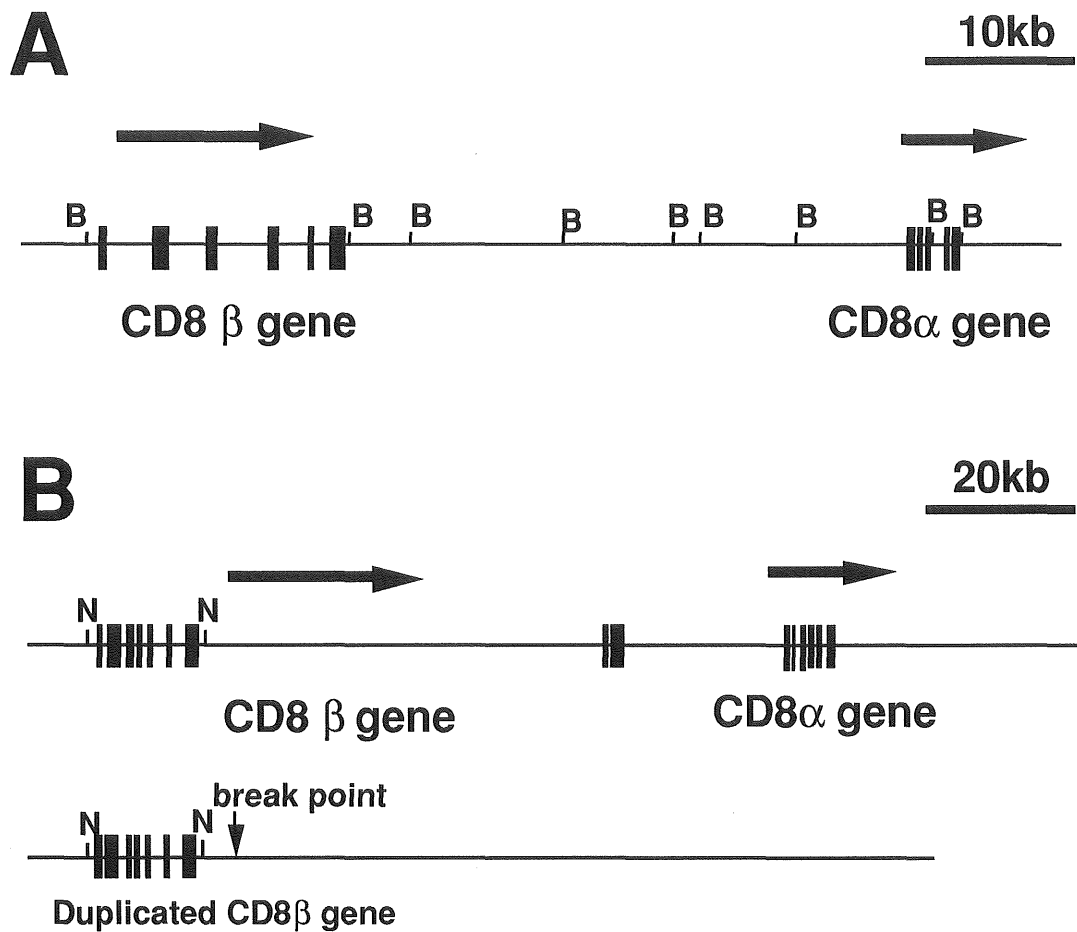


図1 マウスCD8 α 遺伝子とCD8 β 遺伝子（A）、ヒトCD8 α 遺伝子とCD8 β 遺伝子（B）のゲノム構造

B図下段は重複したCD8 β 遺伝子、縦矢印は遺伝子組換えのbreak pointを示す。CD8 α , β 遺伝子はマウスで36kb、ヒトで25kbとお互いに極めて接近して存在し、遺伝子の向きも同一である。

黒箱：各エクソン 横矢印：遺伝子の向き（mRNAが転写される方向）
B：BamHIサイト N：NotIサイト

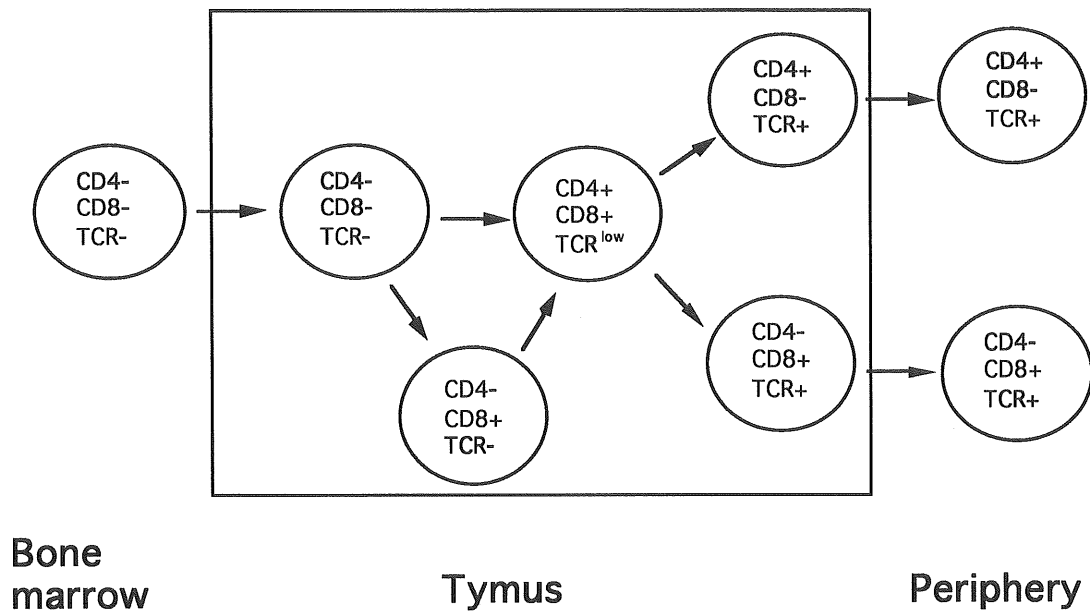


図2 T細胞の胸腺内分化と、CD4/CD8、T細胞レセプターの発現変化

骨髄由来のT前駆細胞は、胸腺内でのCD4/CD8の発現がDN (double negative) からDP (double positive)、SP (single positive)へと変化し、成熟していく。主としてDPの分化段階で自己反応性クローンの除去やMHC拘束性の獲得が行われ、これらの選択を経て、成熟T細胞であるSPの分化段階へ進んでいく。この他にCD8-SP (TCR-)からDPへと分化する経路もあるらしい。

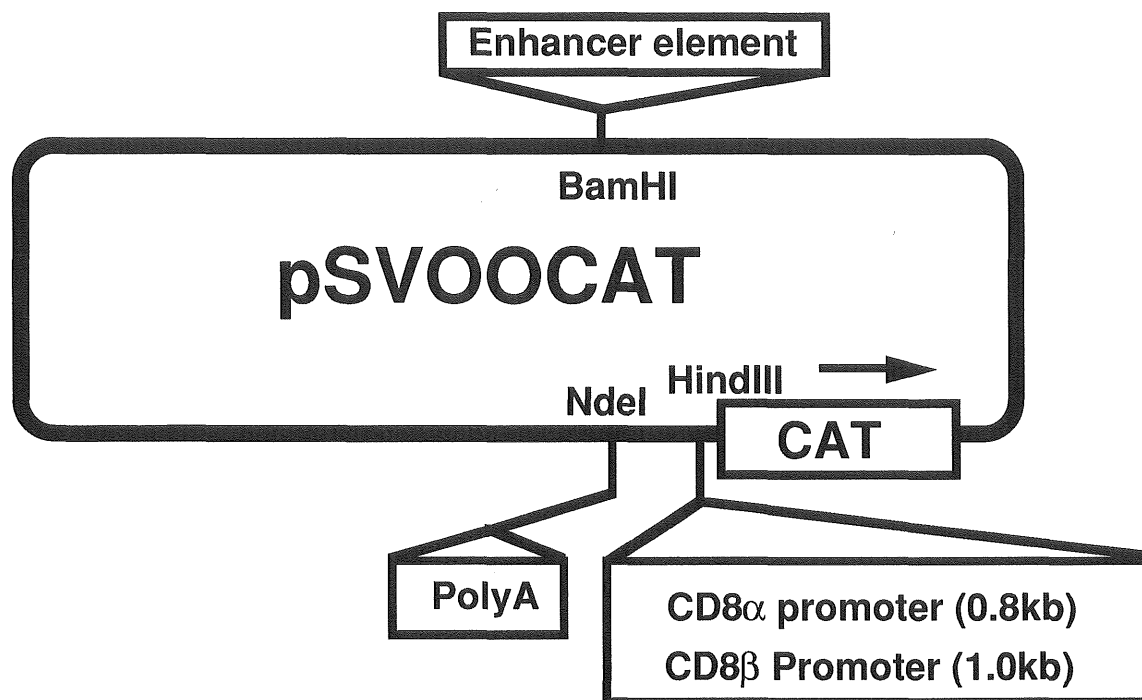


図3 CATベクター（pSV00CATとその組換え体）の構造

基本となるpSV00CATには、CAT（クロラムフェニコール・アセチルトランスフェラーゼ）遺伝子の直上にプロモーター領域を組み込むためのHindIIIサイトがあり、さらにその上流には非特異的な転写を抑制するためのpoly A付加シグナル(135bp)が挿入されている。このCATベクターを導入された細胞に、組み込まれたプロモーターをドライブさせる機構があれば、プロモーターからのCAT mRNAの転写が起こり、CAT蛋白が発現し、CATアッセイによって検出できる。またCAT遺伝子の下流にはエンハンサーエレメントを挿入するためのBamHIサイトがある。

エンハンサー プロモーター	TCR α	SV40
CD8 α	pLy200CAT-TCR α E	pLy200CAT-SV40E
CD8 β	pLy300CAT-TCR α E	pLLy300CAT-SV40E

CD8 α (Lyt-2)



CD8 β (Lyt-3)

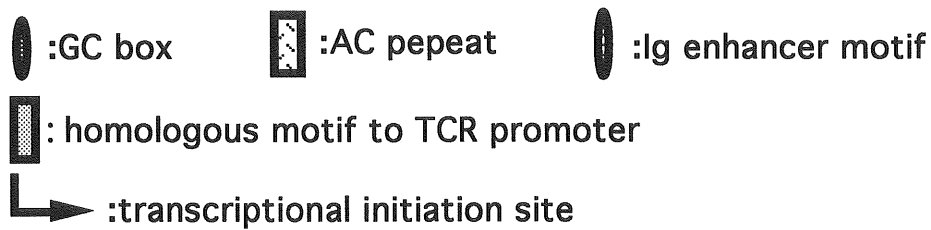
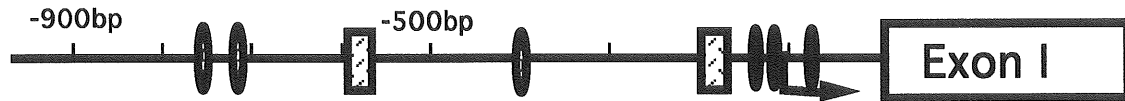


図4 マウスCD8 α 、CD8 β プロモーターに存在する既知の転写制御モチーフと相同性のある領域

CD8 α , β プロモーターには、ともにプロモーター領域に一般に存在するTATA boxやCAAT boxが存在しない。しかしGCに富む配列を持っており、転写因子Sp-1の結合認識配列であるGC boxがCD8 α プロモーターで2箇所、CD8 β プロモーターで3箇所存在する。またCD8 β プロモーターにはACが二十数回繰り返して存在する特異な「AC repeat」が2箇所、免疫グロブリン遺伝子のエンハンサーの配列に相同な部分が3箇所存在する。そのほかにCD8 α プロモーターにはT細胞レセプター β プロモーターに相同性のある部分が1箇所存在する。

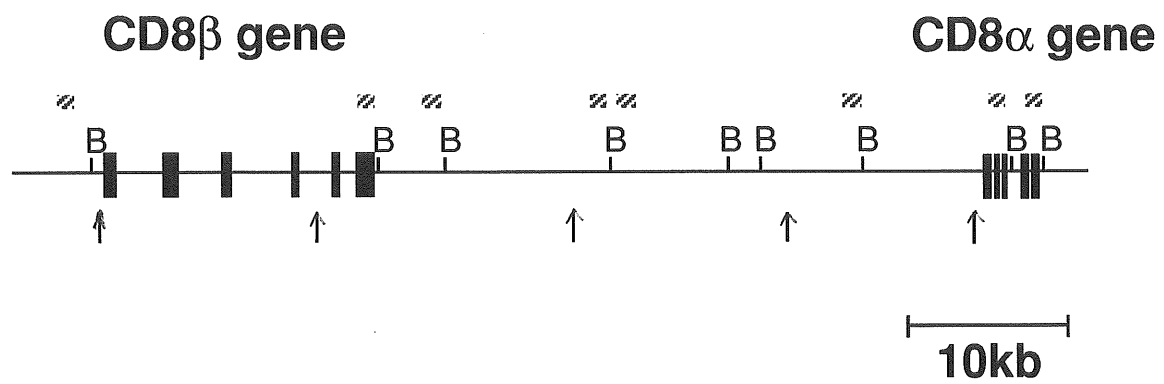


図5 マウスCD8 β -CD8 α 遺伝子周囲のDNase I高感受性部位の検討

矢印:検索できたDNase I高感受性部位の位置
 斜線箱:プローブの位置

黒箱:各エクソン
 B:BamHIサイト

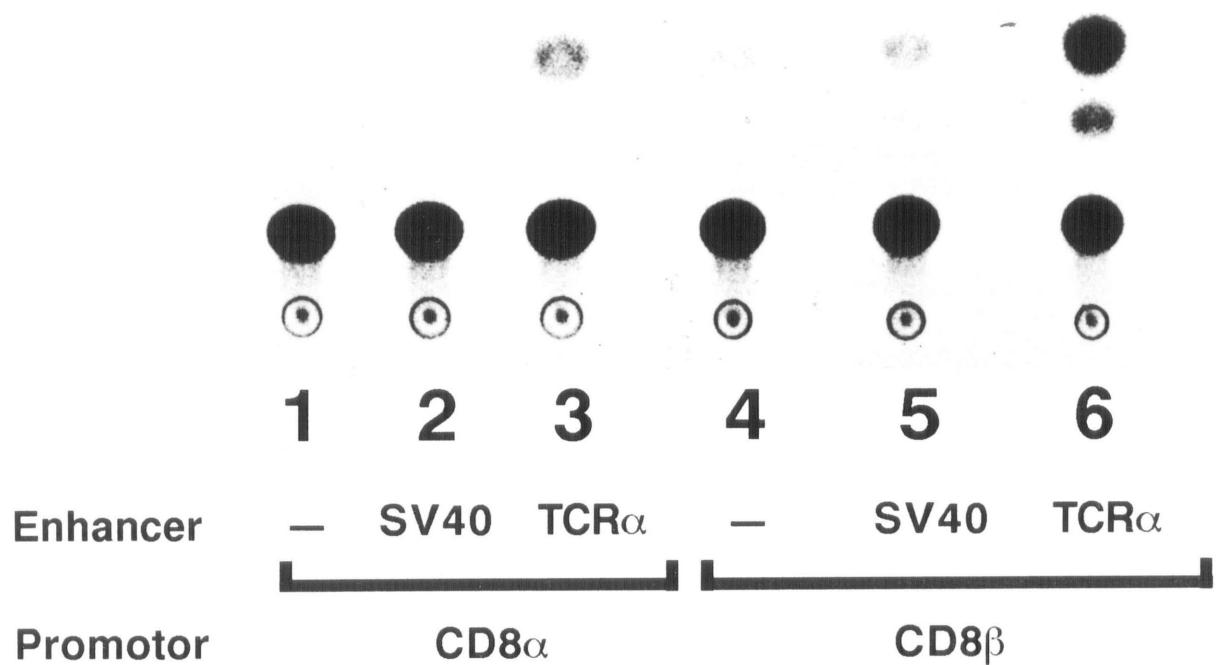


図6 CATアッセイによるCD8 α 、CD8 β プロモーターの転写活性の解析

CD8 α 、 β プロモーターの転写活性を、プロモーター単独、SV40エンハンサー存在下、T細胞レセプター α エンハンサー存在下で検討した。

- レーン1 : CD8 α プロモーター+エンハンサーなし
- レーン2 : CD8 α プロモーター+SV40エンハンサー
- レーン3 : CD8 α プロモーター+TCR α エンハンサー
- レーン4 : CD8 β プロモーター+エンハンサーなし
- レーン5 : CD8 β プロモーター+SV40エンハンサー
- レーン6 : CD8 β プロモーター+TCR α エンハンサー

mouse CD8 β 5'-flanking region

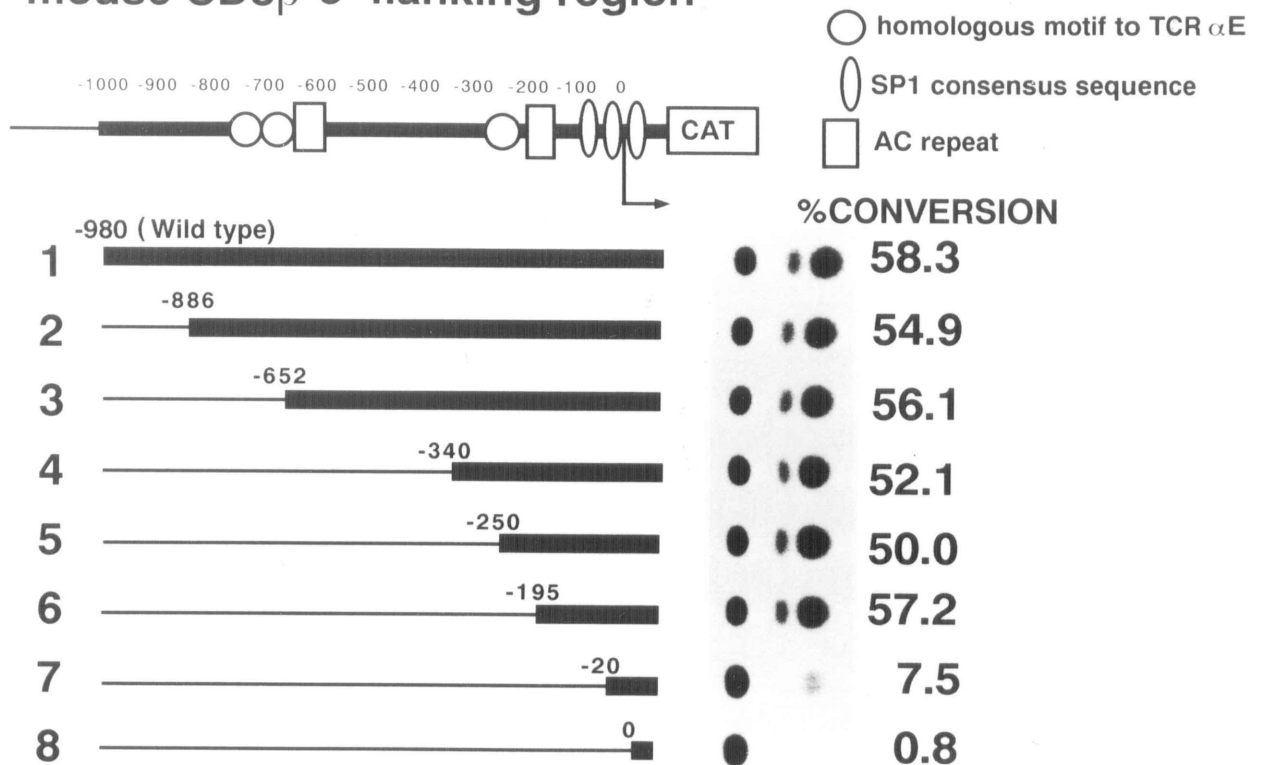


図7 欠失変異体を用いたCATアッセイによるCD8 β プロモーター・コア領域の解析 (1)

CD8 β プロモーターを size-fractionated uni-directional deletion 法により、図の如く段階的に削って欠失変異体クローンを作製した。TCR α エンハンサー存在下で、CD8陽性細胞であるBalbRLm6細胞に導入してCATアッセイを行った。-195bpから-20bpまで削ったときにCAT活性の激減を認めた。

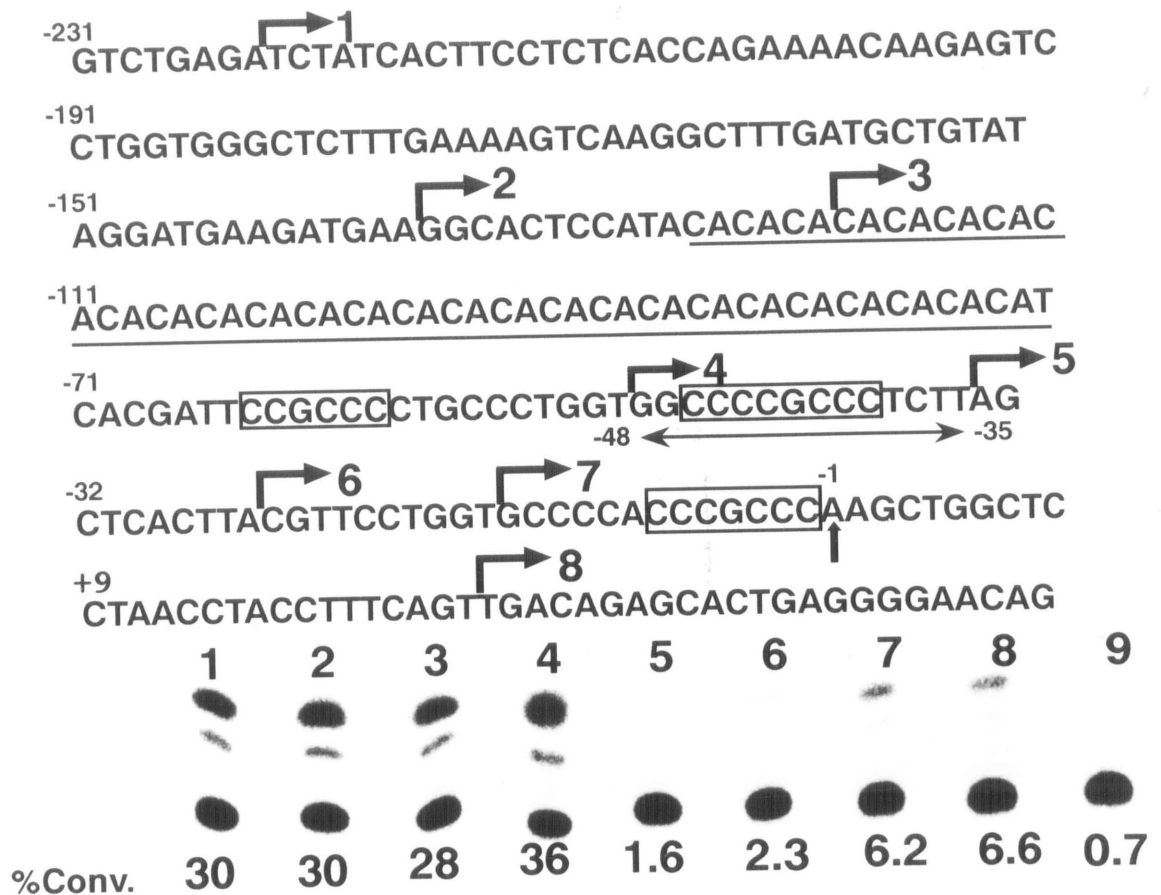


図8 欠失変異体を用いたCATアッセイによるCD8 β プロモーター・コア領域の解析 (2)

さらに細かく欠失させた種々の欠失変異体を作製して、CATアッセイを行った。かぎ矢印で欠失端を示す。下線部はAC repeat、上向き矢印は転写開始点である。四角は存在する3つのGC boxである。欠失変異体番号とCATアッセイの番号は同じである。CATアッセイのレーン9はネガティブコントロール（プロモーターを含まないCATベクター）である。4番から5番に削ったときにCAT活性が激減している。すなわちこの-48bpから-35bpの14bpにコア領域が存在することがわかる。

A

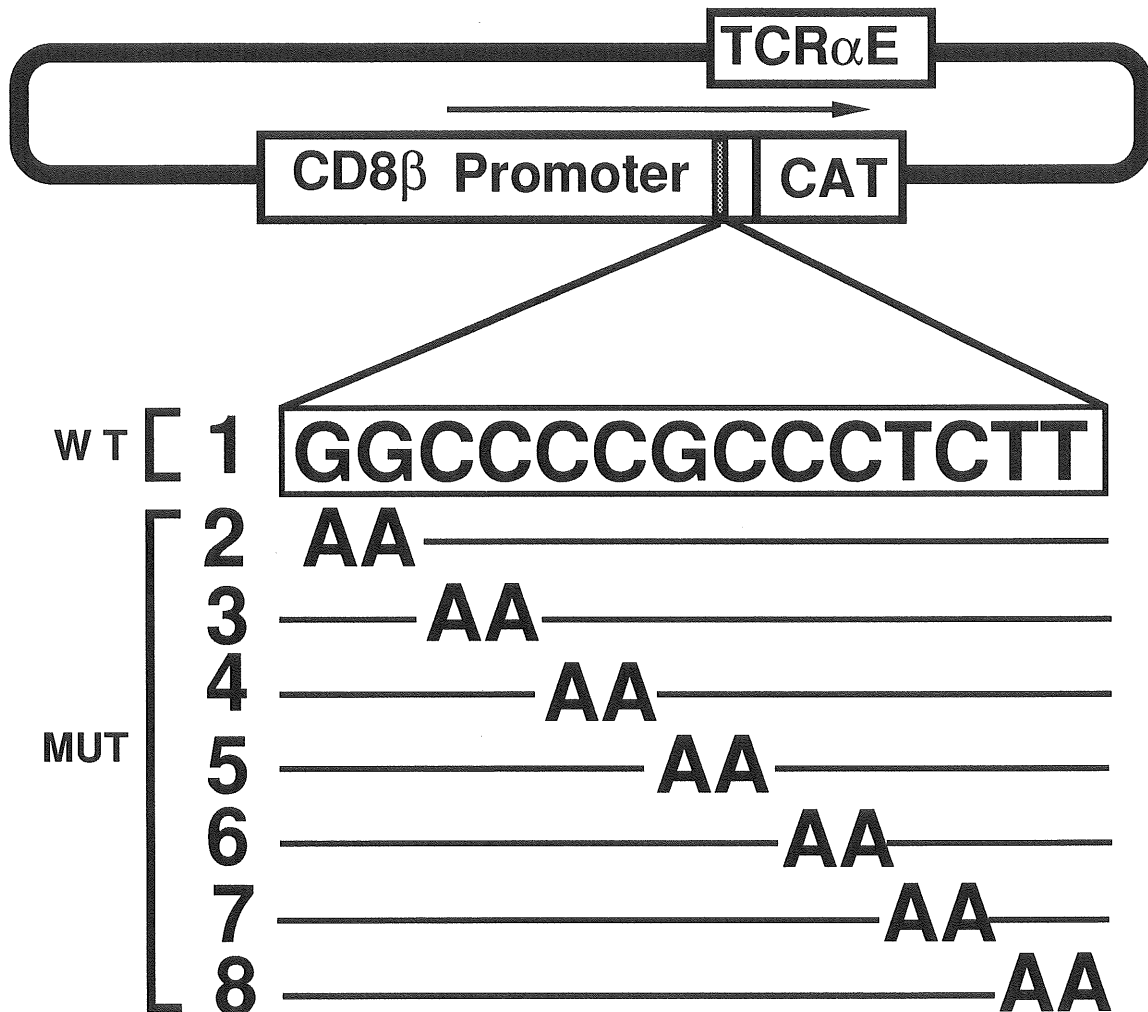


図9 A CD8βプロモーター・コア領域に点突然変異を導入したCATベクターの構造

CD8βプロモーター・コア領域に連続する2 bpの点突然変異を導入した。この点突然変異は、コア領域に結合する転写制御因子の結合能を失わせると考えられる。

WT: 野性型配列

MUT: 点突然変異体 (実線は野性型と同じ配列で

あることを示す)

B

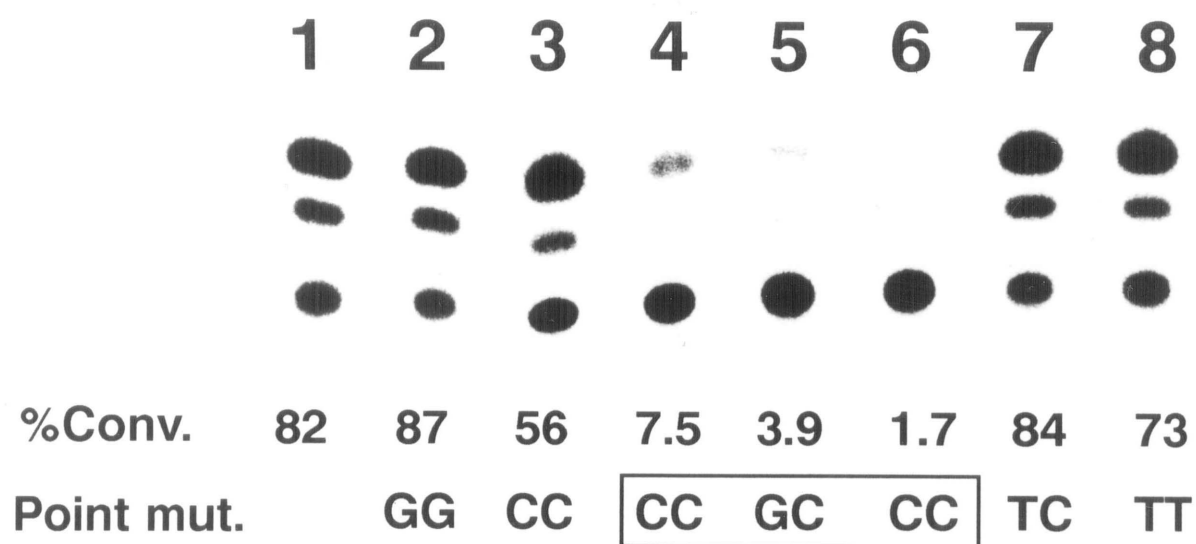


図 9 B 点突然変異CATベクターによるCATアッセイ

CD8陽性のBalbRLm6細胞株に、点突然変異CATベクターを遺伝子導入して、CATアッセイを行った。レーン番号は図 9 A のベクター番号と同じである。「CC・GC・CC」に点突然変異を導入すると、転写活性が著しく低下することがわかる。

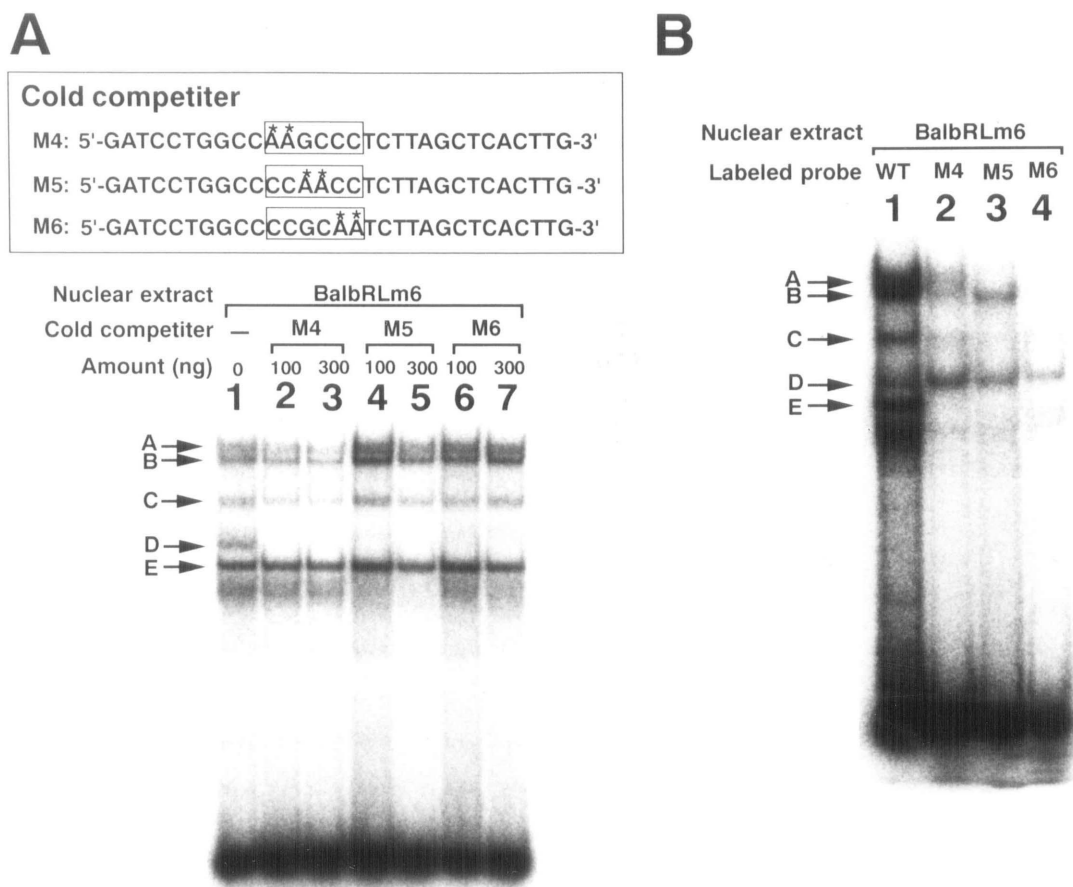


図 1 0 A ゲルシフトアッセイを用いたCD8βプロモーター・コア領域に結合する転写制御因子の解析

コア領域を含むCD8βプロモーターの14bp断片をプローブとして、CD8陽性 BalbRLm6細胞株の核抽出物を用いてゲルシフトアッセイを行った。さらにコア領域に点突然変異を導入した cold competitor を加えて cold competition assay を行ったcompetitorは四角で囲われた中に示したように M4、M5、M6 の3種類を作製した。

レーン 1 : competitorなしでのゲルシフトアッセイ、レーン 2、3 : コア領域に点突然変異を導入した M4 competitor (レーン 2 は100ng、レーン 3 は300ng) による cold competition assay、レーン 4、5 : M5 competitorによる cold competition、レーン 6、7 : M6 competitor による cold competition 矢印A-Eはバンドの仮称

図 1 0 B 放射性ラベルした点突然変異プローブを用いたゲルシフトアッセイ

Aで用いた点突然変異を導入した competitor を直接³²PでラベルしてBalbRLm6細胞株の核抽出液を用いてゲルシフトアッセイを行った。

レーン 1 : 野生型プローブ、レーン 2 : M4プローブ、レーン 3 : M5プローブ、レーン 4 : M6プローブ

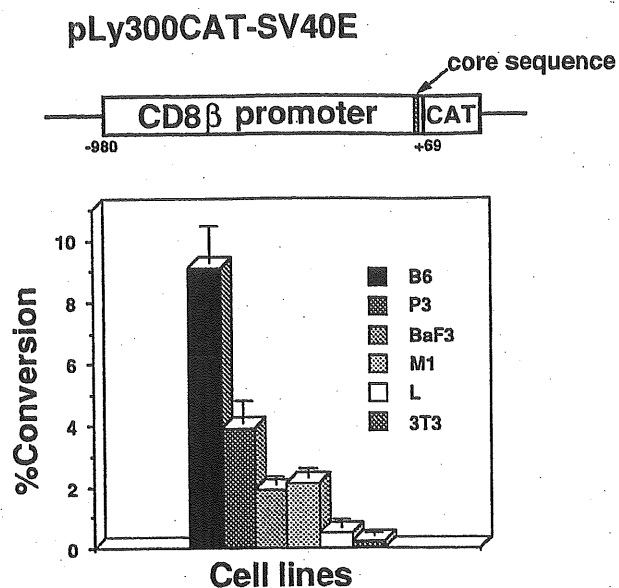
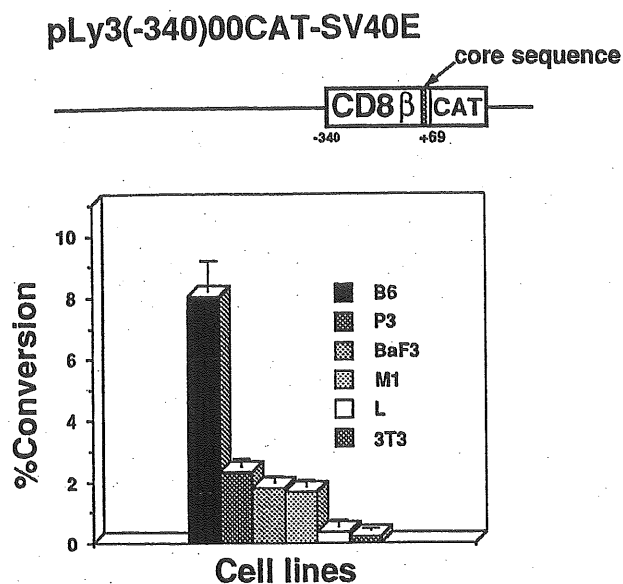
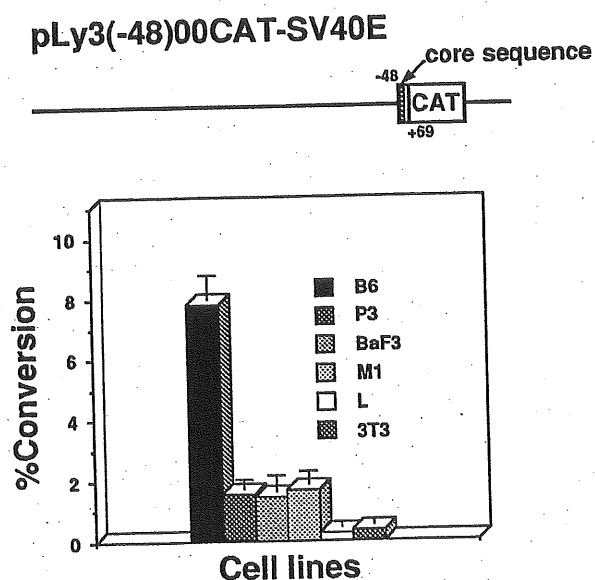
A**B****C**

図 1 1 各種細胞におけるCD8 β プロモーターとSV40エンハンサーを組み込んだCATベクターによる転写活性

CD8 β プロモーターとSV40エンハンサーを組み込んだCATベクターを種々の細胞株に遺伝子導入し、CD8 β プロモーターの組織特異的転写活性を検討した。A：野生型CD8 β プロモーター B：-340bpまで欠失したCD8 β プロモーター C：コア領域直上(-48bp)まで欠失したCD8 β プロモーター

B6: BalbRLm6 (T細胞株)、P3: P3U1 (B細胞株)、BaF3: BaF/3 (前B細胞株)、M1: M1 (骨髓細胞株)、L: L cell (線維芽細胞株)、3T3: NIH3T3 (線維芽細胞株)

probe

5'-GATCCTGGCCCCGCCCTCTTAGCTCACTTG-3'

Nuclear extract	L-cell		BalbRLm6		
amount (μg)	10	15	5	10	15
lane	1	2	3	4	5

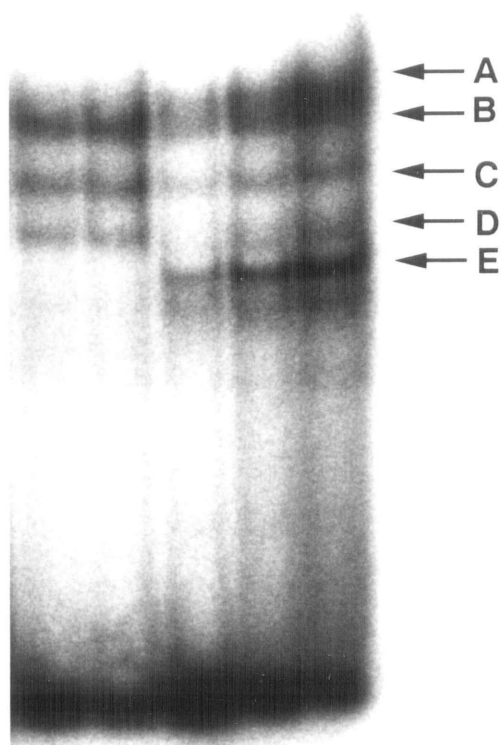


図 1 2 T細胞株と線維芽細胞株のコア領域に結合する核蛋白の比較

L細胞（線維芽細胞株）と BalbRLm6（T細胞株）から抽出した核抽出物を用いてゲルシフトアッセイを行った。矢印A-Eはバンドの仮称である。T細胞株には線維芽細胞株にはないバンドEが認められる。

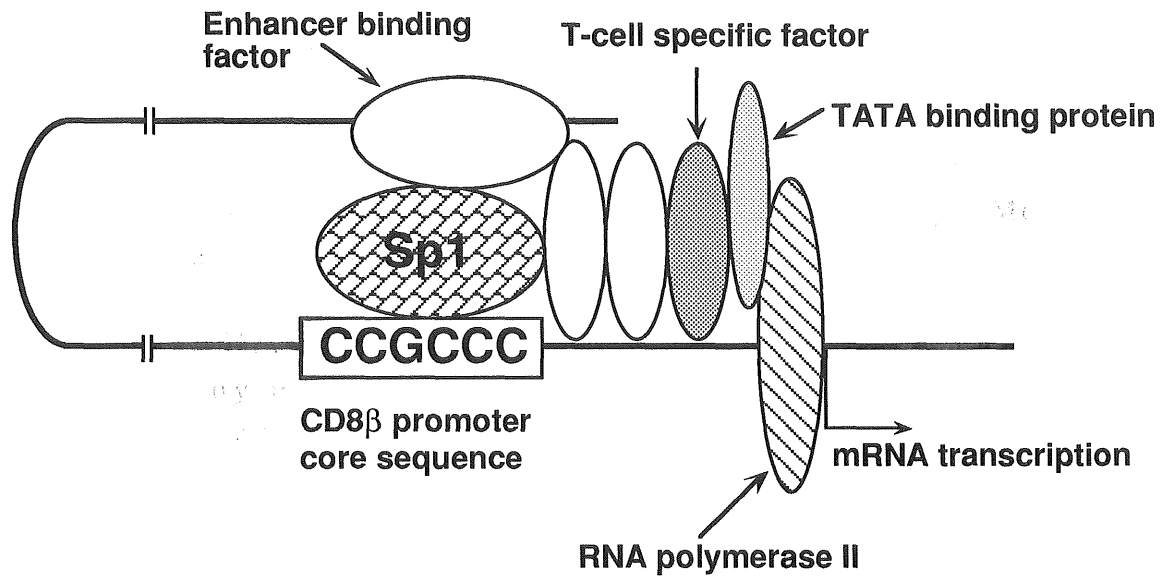


図 1 3 CD8βプロモーターのコア配列の機能と T細胞特異的転写活性の分子機構の仮説モデル

CD8βプロモーターのコア配列「CCGCCC」には転写活性化因子Sp-1が蛋白-DNA 結合により結合し、さらにそのSp-1を介して蛋白-蛋白結合によりT細胞特異的転写因子（この因子の存在によりT細胞特異的な転写が可能になる）を含むRNAポリメラーゼ複合体が、（未だ同定されない）エンハンサー結合蛋白と相互作用してmRNAの合成を開始する。

VIII. 文献

1. Cantor, H., and E. Boyse. 1975. Functional subclass of T lymphocytes bearing different Ly antigens. *J. Exp. Med.* 141 : 1376.
2. Cantor, H., and E. Boyse. 1977. Lymphocytes as models for the study of mammalian cellular differentiation. *Immunol. Rev.* 33 : 105.
3. Nakayama, E., H. Shiku, E. Stockert, H. F. Oettgen, and L. J. Old. 1979. Cytotoxic T cells: Lyt phenotype and blocking of killing activity by Lyt antisera. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 76 : 1977.
4. Swain, S. L. 1983. T cell subsets and recognition of MHC class. *Immunol. Rev.* 74 : 129.
5. Norment, A. M., R. D. Salter, P. Parham, V. E. Engelhard, and D. R. Littman. 1988. Cell-cell adhesion mediated by CD8 and MHC class I molecules. *Nature.* 336 : 79.
6. Rosenstein, Y., S. Ratnofsky, S. J. Burakoff, and S. H. Herrmann. 1989. Direct evidence for binding CD8 to HLA class I antigens. *J. Exp. Med.* 169 : 149.
7. Veillette, A., M. A. Bookman, E. M. Horak, and J. B. Bolen. 1988. The CD4 and CD8 T cell surface antigens are associated with the internal membrane tyrosine-protein kinase p56^{lck}. *Cell.* 55 : 301.
8. Anderson, P., M. L. Blue, and S. F. Schlossman . 1988. Co-modulation of CD3 and CD4. Evidence for a specific association between CD4 and approximately 5% of the CD3: T cell receptor complexes on helper T lymphocytes. *J. immunol.* 140 : 1732.

9. C. A. Janeway, J. 1992. The T cell receptor as a multicomponent signaling machine: CD4/CD8 coreceptors and CD45 in T cell activation. *Annu. Rev. Immunol.* 10 : 645.
10. Fung-Leung, W. P., M. W. Schilham, A. Rahemtulla, T. M. Kundig, M. Vollenweider, J. Potter, W. van Ewijk, and T. W. Mak. 1991. CD8 is needed for development of cytotoxic T cells but not helper T cells. *Cell.* 65 : 443.
11. Blackman, M., J. Kappler, and P. Marrack. 1990. The role of the T cell receptor in positive and negative selection of developing T cells. *Science.* 248 : 1335.
12. Ledbetter, J. A., W. E. Seaman, T. T. Tsu, and L. A. Herzenberg. 1981. Lyt-2 and Lyt-3 antigens are on two different peptide subunits linked by disulfide bonds. Relationship of subunits to T cell cytolytic activity. *J. Exp. Med.* 153 : 1503.
13. Jay, G., M. A. Palladino, G. Khoury, and L. J. Old. 1982. Mouse Lyt-2 antigen: Evidence for two heterodimers with a common subunit. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 79 : 2654.
14. Nakauchi, H., G. Nolan P., C. Hsu, H. S. Huang, P. Kavathas, and L. A. Herzenberg. 1985. Molecular cloning of Lyt-2, a membrane glycoprotein marking a subset of mouse T lymphocytes: molecular homology to immunoglobulin and T-cell receptor variable and joining regions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 82 : 5126.
15. Nakauchi, H., Y.-I. Shinkai, and K. Okumura. 1987. Molecular cloning of Lyt-3, a membrane glycoprotein marking a subset of mouse T lymphocytes: Molecular homology to immunoglobulin and T-cell receptor variable joining regions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 84 : 4210.
16. Littman, D. R., Y. Thomas, P. J. Maddon, L. Chess, and R. Axel. 1985. The isolation and sequence of the gene

encoding T8: a molecule defining functional classes of T lymphocytes. *Cell*. 40 : 237.

17. Panaccio, M., M. T. Gillespie, I. D. Walker, L. Kirszbaun, J. A. Sharpe, G. H. Tobias, I. F. C. McKenzie, and N. J. Deacon. 1987. Molecular characterization of murine cytotoxic T-cell membrane glycoprotein Lyt-3 (CD8). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 84 : 6874.

18. Gorman, S. D., Y. H. Sun, R. Zamolyska, and J. R. Parnes. 1988. Molecular linkage of the Ly-3 and Ly-2 genes. requirement of Ly-2 for Ly-3 surface expression. *J. Immunol*. 140 : 3646.

19. Johnson, P. 1987. A human homolog of the mouse CD8 molecule, Lyt-3: genomic sequence and expression. *Immunogenetics*. 26 : 174.

20. Nakayama, K.-I., Y.-I. Shinkai, K. Okumura, and H. Nakauchi. 1989. Isolation and characterization of the mouse CD8 β -chain(Ly-3). *J. Immunol*. 142 : 2540.

21. Nakayama, K.-I., Y. Kawachi, S. Tokito, N. Minami, R. Yamamoto, T. Imai, G. Gachelin, and H. Nakauchi. 1992. Recent duplication of the two human CD8 β -chain genes. *J. Immunol*. 148 : 1919.

22. Gottlieb, P. D. 1974. Genetic correlation of a mouse light chain variable region marker with a thymocyte surface antigen. *J. Exp. Med*. 140 : 1432.

23. Sanders, S. K., R. O. Fox, and P. Kavathas. 1991. Mutations in CD8 that affect interactions with HLA class I and monoclonal anti-CD8 antibodies. *J. Exp. Med*. 174 : 371.

24. Wang, J., Y. Yan, T. P. J. Garrett, J. Liu, D. W. Rodgers, R. L. Garlick, G. E. Tarr, Y. Husain, E. L. Reinherz, and S. C. Harrison. 1990. Atomic structure of a

fragment of human CD4 containing two immunoglobulin-like domains. *Nature*. 348 : 411.

25. 中内啓光, 皿井明倫. 1991. CD8のコンピュータグラフィックスによる解析. 代謝増刊号、免疫' 91. 28 : 巻頭カラー

26. Wilson, A., R. Scollay, R. A. Reichert, E. C. Butcher, I. L. Weissman, and K. Shortman. 1987. Correlation of lectin-stimulated proliferation and cytotoxicity in murine thymocytes with expression of the MEL-4-defined homing receptor. *J. Immunol.* 138 : 352.

27. Robey, E. A., B. J. Fowlkes, J. W. Gordon, D. Kioussis, H. v. Boehmer, F. Ramsdell, and R. Axel. 1991. Thymic selection in CD8 transgenic mice supports an instructive model for commitment to a CD4 or CD8 lineage. *Cell*. 64 : 99.

28. Bank, I., and L. Chess. 1985. Perturbation of T4 molecule transmits a negative signal to T cells. *J. Exp. Med.* 162 : 1294.

29. Rudd, C. E., P. Anderson, C. Morimoto, M. Streuli, and S. F. Schlossman. 1989. Molecular interactions, T-cell subsets and a role of the CD4/CD8:p56^{lck} complex in human T-cell activation. *Immunol. Rev.* 111 : 225.

30. Anderson, P., M. L. Blue, and S. F. Schlossman. 1988. Comodulation of CD3 and CD4. Evidence for a specific association between CD4 and approximately 5% of the CD3: T cell receptor complexes on helper T lymphocytes. *J. Immunol.* 140 : 1732.

31. Rojo, J. M., K. Saizawa, and C. A. J. Janeway. 1989. Physical association of CD4 and the T cell receptor can be induced by anti-Tcell receptor antibodies. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 86 : 3311.

32. Turner, J. M., M. H. Brodsky, B. A. Irving, S. D.

- Levin, R. M. Perlmutter, and D. R. Littman. 1990. Interaction of the unique N-terminal region of tyrosine kinase p56^{lck} with cytoplasmic domains of CD4 and CD8 is mediated by cysteine motifs. *Cell*. 60 : 755.
33. Koch, C. A., D. Anderson, M. F. Moran, C. Ellis, and T. Pawson. 1991. SH2 and SH3 domains: Elements that control interactions of cytoplasmic signaling proteins. *Science*. 252 : 668.
34. Veillette, A., I. D. Horak, E. M. Horak, M. A. Bookman, and J. B. Bolen. 1988. Alterations of the lymphocyte-specific protein tyrosine kinase (p56^{lck}) during T-cell activation. *Mol. Cell. Biol.* 8 : 4353.
35. Veillette, A., M. A. Bookman, E. M. Horak, L. E. Samelson, and J. B. Bolen. 1989. Signal transduction through the CD4 receptor involves the activation of the internal membrane tyrosine-protein kinase p56^{lck}. *Nature*. 338 : 257.
36. Zamoyska, R., P. Derham, S. D. Gorman, P. von Hoegen, J. B. Bolen, A. Veillette, and J. R. Parnes. 1989. Inability of CD8a' polypeptides to associate with p56^{lck} correlates with impaired function in vitro and lack of expression in vivo. *Nature*. 342 : 278.
37. Molina, T. J., K. Kishihara, D. P. Siderovski, W. v. Ewijk, A. Narendran, E. Timms, A. Wakeham, C. J. Paige, K. U. Hartmann, A. Veillette, D. Davidson, and T. W. Mak. 1992. Profound block in thymocyte development in mice lacking p56^{lck}. *Nature*. 357 : 161.
38. A. Rahemtulla, W. P. F.-L., M. W. Schiham, T. M. Kundig, S. R. Sambhara, A. Narendran, A. Arabian, A. Wakeham, C. J. Paige, R. M. Zinkernagel, R. G. Miller, and T. W. Mak. 1991. Normal development and function of CD8+ cells but markedly decreased helper cell activity in mice lacking CD4. *Nature*. 353 : 180.

39. Karaki, S., M. Tanabe, H. Nakauchi, and M. Takiguchi. 1992. β -chain broadens range of CD8 recognition for MHC class I molecule. *J. Immunol.* 149 : in press.
40. Wheeler, C. J., P. v. Hoegen, and J. R. Parnes. 1992. An immunological role for the CD8 β chain. *Nature.* 357 : 247.
41. McKeon, C., I. Pastan, and B. Crombrughe. 1984. DNase I sensitivity of the α (I) collagen gene: correlation with its expression but not with its methylation pattern. *Nucl. Acid. Res.* 12 : 3491.
42. Araki, E., F. Shimada, M. Shichiri, M. Mori, and Y. Ebina. 1988. pSV00CAT: low background CAT plasmid. *Nucl. Acid. Res.* 16 : 1627.
43. Ho, I. C., and J. M. Leiden. 1990. Regulation of the human T-cell receptor α gene enhancer: multiple ubiquitous and T-cell specific nuclear proteins interact with four hypomethylated enhancer elements. *Mol. Cell. Biol.* 10 : 4720.
44. Nakayama, K.-I., and H. Nakauchi. 1989. An improved method to make sequential deletion mutants for DNA sequencing. *Trends. Genet.* 5 : 325.
45. Selden, R. F., K. B. Howie, M. E. Rowe, H. M. Goodman, and D. D. Moore. 1986. Human growth hormone as a reporter gene in regulation studies employing transient gene expression. *Mol. Cell. Biol.* 6 : 3173.
46. Crosschedl, R., and D. Baltimore. 1985. Cell-type specificity of immunoglobulin gene expression is regulated by at least three DNA sequence elements. *Cell.* 41 : 885.
47. Gorman, C. M., L.F.M. Offat, and B. H. Howard. 1982. Recombinant genomes which express chloramphenicol

acetyltransferase in mammalian cells. *Mol. Cell. Biol.* 2 : 1044.

48. Wu, C. 1984. Activating protein factor binds in vitro to upstream control sequences in heat shock gene chromatin. *Nature.* 311 : 81.

49. Jones, K. A., J. T. Kadonaga, P. J. Rosenfeld, T. J. Kelly, and R. Tjian. 1987. A cellular DNA-binding protein that activates eukaryotic transcription and DNA replication. *Cell.* 48 : 79.

50. Luria, S., G. Gross, M. Horowitz, and G. Givol. 1987. promoter and enhancer elements in rearranged alpha chain gene of the human T cell receptor. *EMBO J.* 6 : 3307.

51. Kadonaga, J. T., K. R. Carner, F. R. Masiarz, and R. Tjian. 1987. Isolation of cDNA encoding transcription factor Sp1 and functional analysis of the DNA binding domain. *Cell.* 51 : 1079.

52. McDougall, S., C. L. Peterson, and K. Calame. 1988. A transcriptional enhancer 3' of C β 2 in the T cell receptor β locus. *Science.* 241 : 205.

53. Meyer, K. B., and M. S. Neuberger. 1989. The immunoglobulin κ locus contains a second, stronger B-cell-specific enhancer which is located downstream of the constant region. *EMBO J.* 8 : 1959.

54. Gross, D. S., and W. T. Garrard. 1988. Nuclease hypersensitive sites in chromatin. *Annu. Rev. Biochem.* 57 : 159.

55. Alberts, B., D. Bray, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts, and D. J. Watson. 1989. *Molecular Biology of the Cell* (2nd ed.). Garland Publishing, Inc. NY&London :553

56. Dynan, W. S., and R. Tjian. 1985. Control of eukaryotic

messenger RNA synthesis by sequence specific DNA binding proteins. *Nature*. 315 : 774.

57. Pettersson, S., G. P. Cook, M. Bruggemann, G. T. Williams, and M. S. Neuberger. 1990. A second B cell-specific enhancer 3' of the immunoglobulin heavy-chain locus. *Nature*. 344 : 165.

58. Pohl, F. M., and T. M. Jobin. 1972. Salt-induced cooperative conformational change of synthetic DNA: equilibrium and kinetic studies with poly(dG-dC). *J. Mol. biol.* 67 : 375.

59. Nordheim, A., E. M. Lafer, L. W. Peck, J. C. Wang, B. D. Stollar, and A. Rich. 1982. Negatively supercoiled plasmids contain left-handed Z-DNA segments as detected by specific antibody binding. *Cell*. 34 : 713.

60. Saltzman, A. G., and R. Weinmann. 1989. Promoter specificity and modulation of RNA polymerase II transcription. *FASEB J.* 3 : 1723.

61. Pugh, B. F., and R. Tjian. 1991. Transcription from a TATA-less promoter requires a multisubunit TFIID complex. *Genes & Development*. 5 : 1935.

IX. 謝 辞

本論文を作製するにあたり、御指導ならびに御校閲を賜りました田村昇教授に厚く御礼申し上げます。また私を特別派遣学生として受け入れてくださり、直接の御指導と御助言をいただいた理化学研究所筑波ライフサイエンスセンター・造血制御研究室主任研究員中内啓光博士に厚く御礼申し上げます。加えて常日頃から暖かい御協力をいただいた筑波大学基礎医学系免疫学教室、理化学研究所造血制御研究室の皆様に深く感謝いたします。