

# ヒト皮膚線維芽細胞における I 型コラーゲン遺伝子の個人依存性発現制御機構

神奈川県大学 歯学部口腔生化学

畑 隆 一 郎

Previously we have shown the presence of two polymorphic dinucleotide repeats in the human type I collagen  $\alpha 2$  (*COL1A2*) gene, one in the 5' flanking region (upstream repeat) and the other in the 1st intron (1st intron repeat) and that the co-presence of these two repeats stimulates expression of the gene, and a specific haplotype of the two microsatellites of the human *COL1A2* gene correlates with susceptibility to systemic sclerosis.

A major part of the DNA double helix within cells exists in the right-handed B-form conformation. Structural transition from the B-form to the left-handed Z-form DNA at dinucleotide repeats is proposed to play an important role in the transcriptional regulation of various genes.

To investigate the association of the change of higher-order structure such as the transition from the B- to Z-form DNA (*B-Z transition*) with the two repeat regions and its role in transcriptional regulation, we performed two-dimensional (2D) gel electrophoretic analyses of constructs containing or not containing the repeat regions. The results indicated that constructs containing both of the repeats led to a structural transition from B- to Z-form but that the construct lacking either of them did not. Additional 2D gel analyses using several constructs containing either of the two repeats showed that this structural transition occurred only in the upstream repeat, but not in the 1st intron repeat. Total number of supercoil relaxation was measured among the constructs with different combinations of several repetitions of the two repeats. The result supported the idea that B-Z transitions occurred only in the upstream repeat regions. Our findings therefore indicate that the upstream repeat region has the ability to convert its conformation from B- to Z-DNA but that the 1st intron repeats did not, although both of the dinucleotide repeats are indispensable for enhancing transcriptional activity of the *COL1A2* gene.

## 1 緒言

我々は先に I 型コラーゲン  $\alpha 2$  鎖 (*COL1A2*) 遺伝子の転写性制御領域である遺伝子の 5' 上流及び第一イントロンに 2 つの反復配列を見出し<sup>1)</sup>、この反復配列の組み合わせにより、*COL1A2* 遺伝子の転写活性が制御されていること<sup>2)</sup>、及び、高い転写促進活性を示す反復配列の組み合わせ (ハプロタイプ) が全身に I 型コラーゲンが異常に蓄積する疾患である強皮症に対する感受性に関与していること<sup>3)</sup>を報告した。本研究ではこの転写制御機構を明らかにするために各種コンストラクトのトポアイソマーを二次元電気泳動法で分離し、転写制御領域の高次構造、特に右巻き B 型構造から左巻きの Z 型ラセンへの転移を解析した。

## 2 実験

### 2.1 コンストラクトとトポアイソマーの作製

*COL1A2* 遺伝子の 5' 上流の反復配列 (上流反復配列) 及び第一イントロンの反復配列 (イントロン反復配列) の 2 つの反復配列を含む各種の *COL1A2* 遺伝子コンストラク

トを PCR 法で作製し、塩基配列を確認した (Fig. 1)。これらのコンストラクトの溶液に種々の濃度 (0 ~ 7  $\mu$ M) のエチジウムブロミドを添加して負の超ラセンをリラックスした条件でトポイソメラーゼ I で 25°C、16 時間処理した<sup>4)</sup>。

### 2.2 二次元電気泳動によるトポアイソマーの分離

上記の各種コンストラクトのトポアイソマー混合物を精製後、0.7% アガロースゲル、トリス / ホウ酸緩衝液 (TBE) 中で一次元目の電気泳動を 110V で 16 時間行い、ついで 1  $\mu$ M のクロロキンで処理しラセンをリラックスさせた後、1  $\mu$ M のクロロキン存在下で二次元目の泳動を 100V で 18 時間行った。クロロキンを除いた後、エチジウムブロミドで染色し、写真撮影を行い、二次元電気泳動後のトポアイソマーの移動距離から超ラセン構造を解析した<sup>4)</sup>。

### 2.3 B 型ラセンから Z 型ラセンへの転移の測定<sup>5-8)</sup>

DNA ラセンの B-Z 転移に伴う超ラセンのリラクゼーションは以下の式により計算した。

$$i/10.4+i/12$$

この式で  $i$  は反復配列の塩基数、10.4、12 は各々右巻きおよび左巻きラセンの一回転当たりの塩基数を示す。また、B-Z 転移における超ラセン密度は以下の式で算出した。

$$-10.4y/z$$

この式で  $y$  は二次元電気泳動の一次元目の泳動で泳動距離のシフトを示したトポアイソマーの番号、 $z$  は用いたコンストラクト (プラスミド) の総塩基数を示す。



Topological analysis of the transcriptional regulatory regions of the human type I collagen  $\alpha 2$  chain (*COL1A2*) gene

Ryu-Ichiro Hata

Department of Biochemistry and Molecular Biology, Kanagawa Dental College

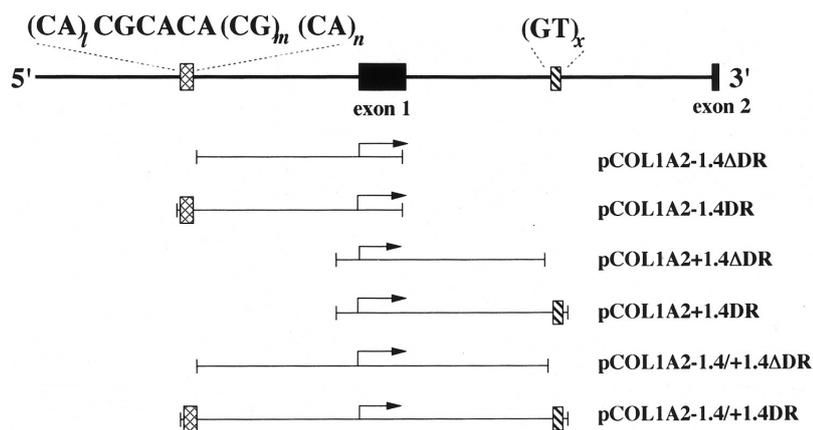


Fig. 1 Schematic diagrams of the 5' region of the *COL1A2* gene (uppermost) and gene fragments (lower diagrams) that were contained in the plasmid clones used for the study. Arrows indicate the transcriptional start site of the gene. Crosshatched and hatched boxes indicate the dinucleotide repeat in the upstream and in the 1st intron of the gene, respectively. Names of plasmid clones containing the DNA fragments are indicated on the right side.

### 3 結果

#### 3.1 二つの2塩基反復配列を持つコンストラクトの高次構造解析

溶液中で遺伝子 DNA は一般に右巻きラセンの B 型構造をとっている。今回のアガロースゲル二次元電気泳動の解析結果では *COL1A2* 遺伝子の二つの2塩基反復配列を持つコンストラクトでは一次元目の泳動で泳動距離が負に変化する点が検出され (Fig.2A)、反復配列を持たないコンストラクトではこの変化が検出されなかった (Fig.2B)。この結果は少なくとも二つの反復配列を持つコンストラクトには高次構造の異なる (Z 型構造) 領域が存在していることが示された。

#### 3.2 Z 型構造の局在部位の解析

ついで上流反復配列とイントロン反復配列の両者が Z 型構造を形成しているのか、あるいは反復配列のどちらか片方が Z 型構造を形成しているのか、または、Z 型構造の形成に二つの反復配列の共存が必要かを調べるために、各々の反復配列を持つコンストラクト (Fig.3A and 3B)、および反復配列を含まないコンストラクト (Fig.3C and 3D) を作成し、上記と同様に二次元ゲル電気泳動法で高次構造を解析した。その結果、上流の反復配列を含むコンストラクトは一次元目の泳動で泳動距離が負に変化する点が存在し、上流反復配列を含まないコンストラクトではトポアイソマーが連続して分離され、泳動距離の負に変化する点が存在しなかった (Fig.3A and 3C)。これらの結果から上流反復配列が Z 型構造を形成していることが示された。さらに、Z 型構造の形成に二つの反復配列の共存は

必要無いことが判明した。一方、イントロン反復配列を含むコンストラクト及び同様のコンストラクトで反復配列を持たないものは共に泳動距離の負に変化する点が存在せず (Fig.3B and 3D)、イントロン反復配列は同じ条件で Z 型構造を形成しないことが判明した。

#### 3.3 反復配列の長さとの Z 型構造の存在量との関係の解析

さらに、上流反復配列の長さとの Z 型構造の形成能との関係を調べるために、種々の長さの上流反復配列を含むコンストラクトを作成し、上記と同様に二次元電気泳動法で Z 型構造の形成量を調べた。その結果、Z 型構造の形成量は上流反復配列の反復数の総和にのみ比例すること (Fig.4A, 4B and 4C)、また、上流反復配列とイントロンの組み合わせによっては影響されないことが判明した (Fig.4C and 4D)。

### 4 考察

最近 DNA の高次構造が DNA の一次構造 (塩基配列) と同様に生物情報を持っていることが明らかになってきた<sup>9)</sup>。我々は先に *COL1A2* 遺伝子上流と第一イントロンに二つの2塩基反復配列が存在し、この二つの反復配列の組み合わせにより *COL1A2* 遺伝子の転写活性が促進されること<sup>2)</sup>、及びこの配列の組み合わせのうち (13,6,8) -12 の組み合わせをホモに持つものは I 型コラーゲン遺伝子の転写活性が促進されている強皮症患者ゲノムにのみ存在し、対照の正常な個体由来のゲノムでは存在しないことを報告した<sup>3)</sup>。そこでこれらの反復配列による *COL1A2* 遺伝子の転写促進機構を明らかにするために二つの反復配列

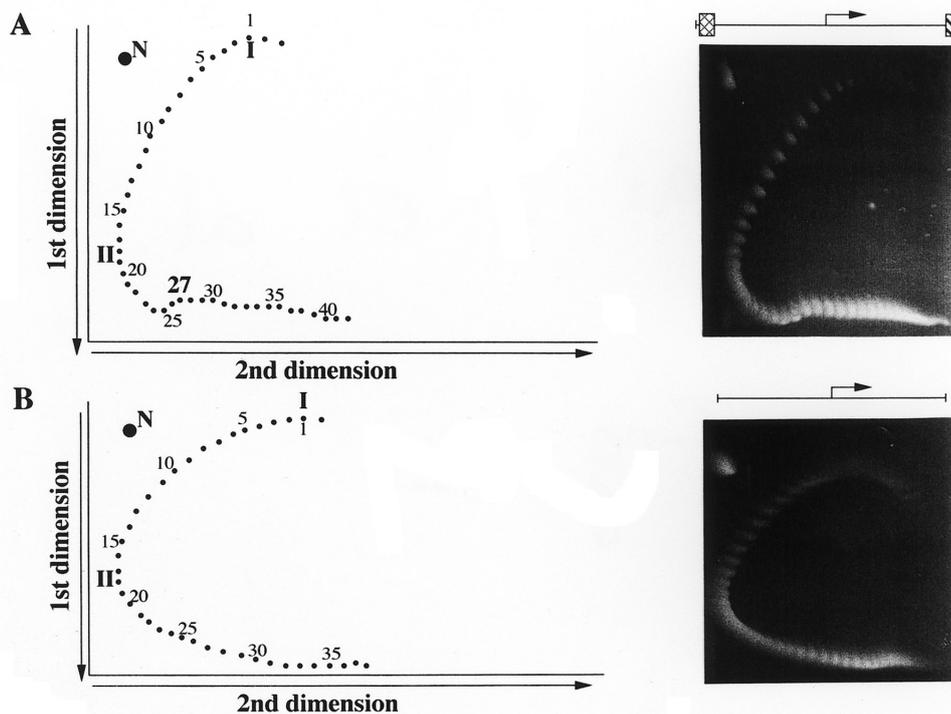


Fig. 2 Two-dimensional gel electrophoresis of topoisomers of pCOL1A2-1.4/+1.4DR, containing (19, 7, 8) of the upstream repeat and  $x=12$  of the 1st intron repeat (A), and pCOL1A2-1.4/+1.4 $\Delta$ DR, which does not contain either repeat (B). Electrophoretic patterns of the respective plasmids are shown on the right side of the figure, and schematic diagrams of the results, on the left side. The directions of each dimension of electrophoresis are indicated in the figure. Positions I and II correspond to the minima in electrophoretic mobility in the 1st and 2nd dimension, respectively, and relative topoisomer numbers counted from the minima in the first dimension are indicated. N indicates the position of nicked DNA.

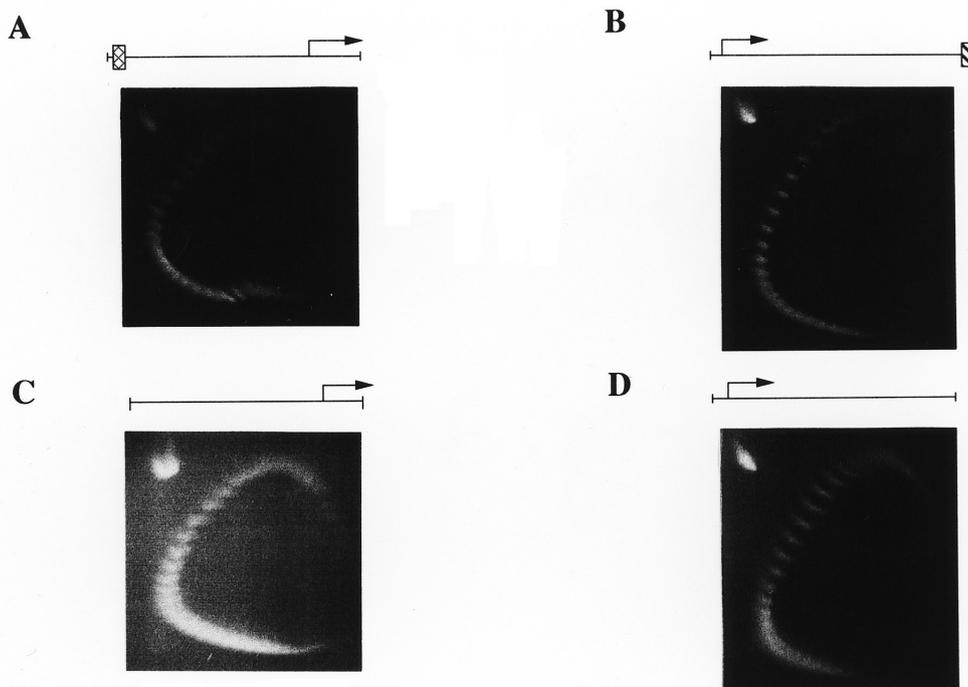


Fig. 3 Two-dimensional gel electrophoresis of topoisomers of pCOL1A2-1.4DR, containing (19, 7, 8) of the upstream repeat (A), pCOL1A2+1.4DR, containing  $x=12$  of the 1st intron repeat (B), and those not containing either dinucleotide repeat, pCOL1A2-1.4 $\Delta$ DR (C), and pCOL1A2+1.4 $\Delta$ DR (D), respectively. Diagrams shown at the upper part of the respective figures indicate gross structures of *COL1A2* gene segments contained in these constructs. Arrows indicate the transcriptional start site of the gene.

の高次構造を解析した。上流反復配列、イントロン反復配列の両者が塩基配列からはZ型構造を取りうる事が推定されたが、今回の結果は転写開始点の上流のみに左巻きラセンのZ型構造をとった領域が存在することが明らかになった。Z型構造の存在量は上流反復配列の長さに比例することから、反復配列部分がZ型構造をとっていると思われる。B型ラセンからZ型ラセンへの転移においては超ラセン密度の減少を伴い、これは2次元電気泳動の1次元目におけるトポアイソマーの泳動距離の負への変化によって示される。B型ラセンから十字架型構造への高次構造の変化によっても超ラセン密度の減少を伴う。上流反復配列はCG反復配列を含むので十字架型構造を取りうる。十字架型構造をとった時の超ラセンのリラクセーションの総量は $i/10.4$  ( $i$ はCG反復配列の長さ)で示される。(19,7,8)-12の反復配列を持つコンストラクトの上流反復配列が十字架型を取るとすると超ラセンのリラクセーションの総量はCG反復配列を構成する塩基が $2 \times 7 = 14$ なので1.35 (14/10.4)となる。一方、上流反復配列のみがB型ラセンからZ型ラセンへの転移に起こす際の超ラセンのリラクセーションの総量は13.28 (74/10.4 + 74/12, 74は上流反復配列の総塩基数)である。後者の値は2次元電気泳動による超ラセンのリラクセーションの実測値13 (40-27)と一致する (Fig.2A)。この結果から、用いたコンストラクトは上流反復配列がB型ラセンからZ型ラセンへの転移

を起こしたことを支持している。さらに本研究で用いた反復数の異なるコンストラクトの電気泳動における泳動距離の負へのシフトはトポアイソマー番号27で起こっており (Fig.4)、この値からB型ラセンからZ型ラセンへの転移における超ラセン密度はおよそ-0.036 (-10.4Y/Z, 4つのコンストラクトでそれぞれ、27/7742、27/7736、27/7732、27/7740)と算出され、これは過去の反復配列による値と一致する<sup>5-7)</sup>。以上の結果は用いたコンストラクトは上流反復配列のみがZ型構造を取っていることを示す。

しかし、本研究の結果で測定したZ型構造の存在量と転写促進活性は単純な比例関係を示さないので、COL1A2遺伝子の反復配列による転写促進活性を制御する因子はDNAのZ型構造以外にも存在することが示された。これらの結果は遺伝子の転写促進において現在の知見では説明できない新しい制御機構の存在を示唆しており、COL1A2遺伝子の研究はこの転写制御の分子機構の研究に好個の材料となるばかりでなく、遺伝子の転写制御と疾患感受性の解明に重要であると考えられる<sup>10-11)</sup>。

#### (文献)

- 1) Akai J, Kimura A, Arai K, Uehara K, Hata R: Fine structural analysis of the unique 5' region of the human COL1A2 gene containing two regions of dinucleotide repeats adjacent to the transcriptional

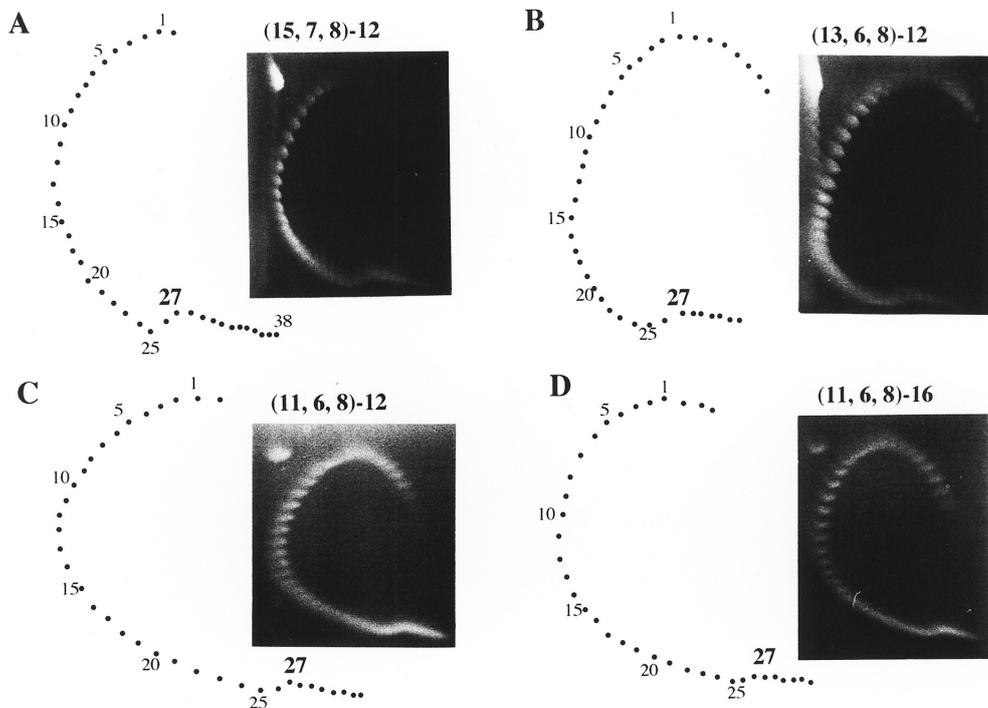


Fig. 4 Two-dimensional gel electrophoresis of topoisomers of pCOL1A2-1.4/+1.4DR, containing the following combination of the repeats: (15, 7, 8)-12 (A), (13, 6, 8)-12 (B), (11, 6, 8)-12 (C), and (11, 6, 8)-16 (D). The left side of each figure shows a schematic diagram, and relative topoisomer numbers from minima of the 1st dimension are also indicated.

- start site. *Connective Tissue* 1998; **30**: 1-6
- 2) Akai J, Kimura A, Hata R: Transcriptional regulation of the human type I collagen  $\alpha 2$  (COL1A2) gene by the combination of two dinucleotide repeats. *Gene* 1999; **239**: 65-73.
- 3) Hata R, Akai J, Kimura A, Ishikawa O, Kuwana M, Shinkai H : Association of functional microsatellites in the human collagen  $\alpha 2$  chain (COL1A2) gene with systemic sclerosis. *Biochem Biophys Res Commun* 2000; **272**: 36-40.
- 4) Akai J, Kimura A, Hata R: Analysis of the higher-order structure of the two dinucleotide repeat regions that enhance the transcriptional activity of the human type I collagen  $\alpha 2$  (COL1A2) gene promoter. *Connective Tissue* 2000; **32**: 259-265.
- 5) Haniford DB, Pulleyblank DE: Facile transition of poly[d(TG)·d(CA)] into a left-handed helix in physiological conditions. *Nature* 1983; **302**: 632-634.
- 6) Rahmouni AR, Wells RD: Stabilization of Z DNA in vivo by localized supercoiling. *Science* 1989; **246**: 358-363
- 7) Peck LJ, Wang JC Energetics of B-to-Z transition in DNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 1983; **80**: 6206-6210
- 8) Blaho JA, Larson JE, McLean MJ, Wells RD : Multiple DNA secondary structures in perfect inverted repeat inserts in plasmids. Right-handed B- DNA, cruciforms, and left-handed Z-DNA. *J Biol Chem* 1988; **263**: 14446-14455
- 9) Herbert A, Rich A : The biology of left handed Z-DNA. *J Biol Chem* 1996; **271**: 11595- 11598
- 10) Hata R, Izukuri K, Furue M, Kato Y, Koshika S : Complex gene diseases of the connective tissue. *Connective Tissue* 2001; **33**:9-16
- 11) 畑 隆一郎 I 型コラーゲンの遺伝子多型と結合組織の複合遺伝子病 *細胞工学* 2001; **20**: 592-598