

# アルギニノコハク酸合成酵素遺伝子の構造

—5' 端上流調節領域およびイントロン内反復 DNA 配列の一次構造の特徴—

研究協力者 松 田 一 郎

陣 野 吉 弘

島 田 和 典

(熊本大学医学部小児科, 第一生化学)

日本人に特有な遅発型（成人型）シトルリン血症の分子レベルでの病態解明を目的としてアルギニノコハク酸合成酵素（AS）遺伝子の構造解析の研究を開始した。前回ヒトの遺伝子ライブラリーより AS 様遺伝子を運ぶファージクローンを多数単離したこと、そしてそれらの多くは偽遺伝子で、一つのクローン、LmAS-8、が active gene 由来らしい DNA 断片を含んでいることを報告した<sup>1)</sup>。今回われわれはこの LmAS-8 からさらに上流の DNA 断片を運ぶファージクローンを単離し、60数千ロベイス（kb）にわたる巨大な AS 遺伝子の 5' 端を含む約半分を単離することができた。単離された AS 遺伝子について、制限酵素地図およびサザーン・プロット・ハイブリダイゼーションによって構造を解析し、調節領域については塩基配列を決定して構造の特徴を詳細に調べた。また AS 遺伝子内に多数存在していた反復 DNA 配列についても検討を加え、第 1 イントロン内の反復 DNA 配列に興味深い一次構造を見出した。これらの構造の特徴を遺伝子発現・調節の観点から論ずる。

## 方 法

### a) AS 遺伝子の単離と構造解析

LmAS-8 DNA より反復 DNA 配列を含まないイントロン部分を切り出し、ニックトランスレーション法によって <sup>32</sup>P でラベルしてこれをプローブとして、二つのヒト遺伝子ライブラリー（一つは胎盤より抽出された DNA の EcoRI 部分消化断片から作られたライブラリー、もう一つは胎児肝由来 DNA の Alu I および Hae III 部分消化断片から作られたライブラリー）をスクリーニングして、LmAS-8 より上流の DNA 配列を運ぶファージクローンを単離した。

こうして単離されたクローンについて Eco RI, Hind III および Bam HI などの制限酵素による制限酵素地図作成やサザーン・プロット・ハイブリダイゼーションによって構造を解析した。

### b) サブクローニング

プローブ用や一次構造決定のための DNA 小断片をもとのファージクローンより適当な制限酵素で切り出してプラスミド・ベクター pBR322 に組み込み、大腸菌にトランスフェクシ

ン (カルシウム・フォスフェイト法) してサブクローニングした。

c) 塩基配列決定

Maxam and Gilbert 法に従って行った。

d) 反復 DNA 配列の検出

核 DNA を制限酵素 Alu I, Hae III あるいは Hin fi で切断して小断片にした DNA をプローブとして遺伝子 DNA のサザーン・プロット・ハイブリダイゼーションを行って反復 DNA 配列の有無を調べた。また検出された反復 DNA 配列について、ヒトの高度反復 DNA 配列のもっとも典型的なものである Alu 反復 DNA 配列をプローブとして、その反復 DNA 配列の種類を調べた。

## 結 果

a) AS 遺伝子の単離

Eco RI ライブラリーより LmAS-9 が, Alu I/Hae III ライブラリーより LmAS-10 が単離された (図 1 A)。LmAS-9 は LmAS-8 よりさらに上流へ延びる 3 kb の DNA 断片を含み, LmAS-10 はこれよりさらに 10 kb 上流の延びる DNA 断片を含んでいた。LmAS-9 は AS cDNA の 5' 端より 9 番目から 70 番目の塩基に相当する第 2 エクソンを含んでいたが, AS 遺伝子の 5' 端は含まれていなかった。

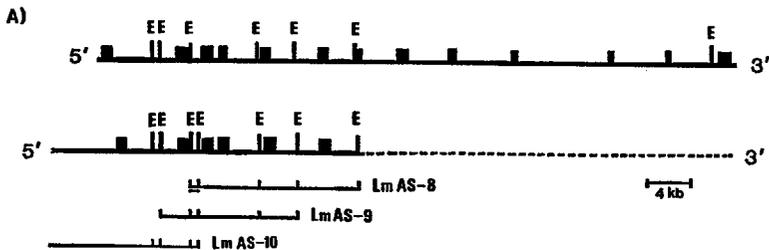


図 1 A) Restriction maps of the AS gene. The top line shows the AS gene structure reported by Freytag et al. (1984b). Solid boxes indicate exons or the restriction fragments hybridizing with the AS cDNA. Only EcoRI restriction sites (E) are indicated. The DNA regions carried with the three phage clones, Lm AS-8, Lm AS-9 and Lm AS-10, are also shown. An EcoRI DNA fragment used as a probe for the library screening is underlined below the map of the phage clone, Lm AS-8.

ところで, AS 偽遺伝子の解析から, われわれの単離した偽遺伝子  $\phi$ AS-A1,  $\phi$ AS-A2 および  $\phi$ AS-Y と Freytag らの単離した偽遺伝子  $\phi$ AS-1 の塩基配列が, AS cDNA の 5' 端より 20 数ベイス上流まで極めてよく似ていることがわかった。このことは Su らの単離した AS cDNA<sup>2)3)</sup> は完全長のものでなく 5' 端の一部を欠き, 実際の転写は偽遺伝子同志の相同性 (Homology) がよく保たれている 5' 端近傍で行われることを示唆するものと思われた。そこで,  $\phi$ AS-A1 から, HphI および AvaI で切り出されてくる 43 ベイス・ペア (bp) DNA 断

片 (AS cDNA 5' 端より上流の塩基配列38 bp を含む) をプローブとして Lm AS-10 のサザン・ハイブリダイゼーションを行ったところ, Lm AS-10 の最5' 側の EcoRI site より1.5 kb 離れて存在する1.2 kb の XbaI-BamHI DNA 断片にハイブリダイズした。このことは先の推察を支持し, おそらく AS 遺伝子の5' 端はこの部に含まれるものと考えられた。

これら三つのファージクローンによって拾い出された AS 遺伝子を最近 Freytag らによって単離された AS 遺伝子と比較すると, 制限酵素地図およびエクソンの局在部位などよく一致するようだった (図1 A)<sup>4)</sup>。また第1エクソンから第3エクソンまでのエクソンの塩基配列も全く一致し, 後述の5' 端上流の塩基配列も彼らの解析した150 bp まで極めてよく一致した。第1エクソンの位置が両者で異なるが, 彼らが解析した5' 端上流の塩基配列43 bp を共通に含み, さらにそれより上流に延びる300 bp の DraI-SmaI DNA 断片をプローブとして核DNA のサザン・プロット・ハイブリダイゼーションを行ったところ, 1本のポジティブバンドしか検出されなかった。以上よりわれわれの単離した AS 遺伝子と彼らの単離した AS 遺伝子は同一のアクティブ遺伝子 (active gene) であると結論した。

こうして60数 kb にわたる巨大な AS 遺伝子の5' 端および上流の調節領域を含む, 約半分の AS 遺伝子が単離されたことになる。

### b) 5' 端隣接領域の一次構造

現在までのところ, 真核遺伝子の発現・調節に重要な配列が5' 端上流に存在することが知られている。AS 遺伝子の発現・調節の研究を進めて行く上で, Freytag らの決定した塩基配

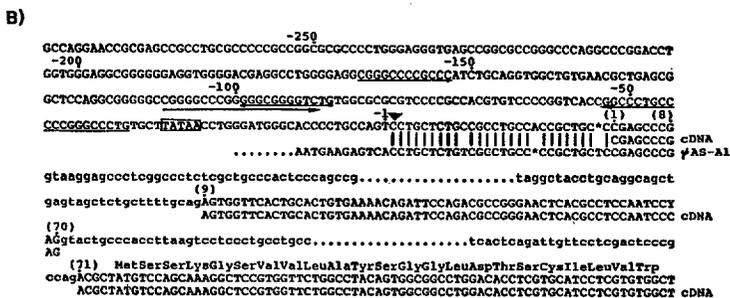


図1 B) Nucleotide sequences of the 5' end region of the AS gene. A part of the nucleotide sequences of the AS cDNA (Bock et al., 1983) and of an AS pseudogene,  $\phi$ AS-A1(unpublished data), are also included. The matched bases between AS gene and the pseudogene are indicated by vertical lines. Asterisks indicate gaps inserted to get the best alignment of homology between them. The "TATAA" sequence is shown by an open box. Two pairs of inverted repeats are indicated by arrows. The bases indicated by small characters represent sequences of introns. The numbers in the parentheses correspond to those described by Bock et al. (1983) for their AS cDNA sequence. The predicted cap site is indicated by an arrowhead. The nucleotides upstream from the putative cap site are negatively numbered. The amino acid sequences coded by the exons are given above the nucleotide sequence.

列は不充分であったため、われわれはさらに上流に延びる領域についてのその一次構造を決定し、コンピューターにより解析を行った (図 1 B)。

偽遺伝子の解析から推察したように AS cDNA 5' 端から上流 27 bp まで、偽遺伝子との相同性がよく保たれていた。この 27 塩基目のヌクレオチド、C を転写開始点と仮にすると、転写開始点より 29 bp 上流に、正確な転写開始が行われるために必要な配列—いわゆる “TATA box” —の TATA が存在していた。これは多くの真核遺伝子の “TATA box” の位置に一致するものである。しかし、転写効率に関係するといわれるいわゆる “CAAT box” は存在しなかった。この領域の一つのきわだった特徴として極めて GC-rich な塩基組成となっており、5' 端より上流 300 bp までの GC 含量は 80% にもおよんだ。また種々の同方向繰り返し配列 (direct repeats) や逆方向繰り返し配列 (inverted repeats) 構造が存在した。このうち二つの逆方向繰り返し配列を図に示した (図 1 B)。さらに肝で発現される遺伝子に共通の配列が存在する可能性を検討するため、このような遺伝子と AS 遺伝子の 5' 端上流の配列をコンピューターにより比較した。肝で発現される遺伝子として、最近報告されたヒト第 8 凝固因子遺伝子<sup>5)</sup> および教室の續らによって単離されたヒト・プレアルブミン遺伝子 (unpublished data) を、コントロールとして肝以外の組織で発現される遺伝子としてヒト・レニン遺伝子<sup>6)</sup> を利用した。AS 遺伝子、第 8 凝固因子遺伝子およびプレアルブミン遺伝子の三者で、AGAAGTGA の共通の配列が存在した。この配列はレニン遺伝子では存在しなかった。しかもこの配列は、参考として調べたラット  $\alpha$ -フィブリノーゲン遺伝子<sup>7)</sup> においてもよく保存されていた。

### c) AS 遺伝子内の反復 DNA 配列

ジーン・ウォーキングによって遺伝子ライブラリーをスクリーニングする際、プローブに反復 DNA 配列が含まれることを避けるため、反復 DNA 配列の有無を検討したところ、AS 遺伝子内に多数の反復 DNA 配列が存在することがわかった。AS 遺伝子内に反復 DNA 配列が多数存在することに注目し、単離した 5' 側半分の AS 遺伝子内の反復 DNA 配列の存在と種類を検討した。この AS 遺伝子に含まれる四つのイントロンと 5' 端上流に少なくとも八つの反復 DNA 配列が存在した。クローン化されている Alu 反復 DNA をプローブとするサザーン・ハイブリダイゼーションにより、これら八つのうち五つは Alu 反復 DNA 配列に属し、他の三つはこれとは種類の異なる反復 DNA 配列らしいと判定された (図 2)。そのうち Alu でないと判定された第 1 イントロン内の反復 DNA 配列についてさらに詳しく調べた。

### d) 第 1 イントロン内の反復 DNA 配列の一次構造

第 1 イントロンの反復 DNA 配列は、Alu DNA をプローブとしたサザーン・ハイブリダイゼーションによって明瞭なポジティブバンドが検出されなかったが、塩基配列決定の結果、Alu 反復 DNA 配列と相同性を持つ配列が 2 個たがいに逆向きに存在していた (図 2)。この領域の反復 DNA 配列の特徴として CACA…あるいは GTGT…のようなプリン-ピリミジンの交互配列が存在していた。さらに興味あることとして SV40 ウィルスなどの転写効率を著しく高めるエンハンサーと呼ばれる DNA 配列のなかでたがいによく塩基配列が保存されている

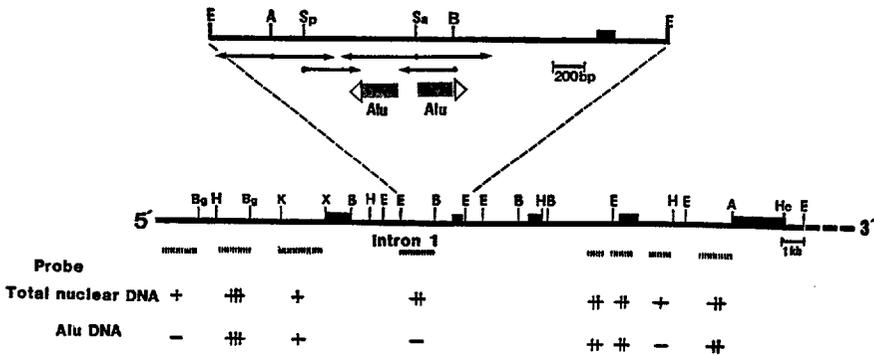


図2 Repetitive sequence in the AS gene and strategies used in sequencing the repetitive sequence of intron 1. A thick bar represents a part of the AS gene. Solid boxes indicate exons or fragments hybridizing with probes prepared from a AS cDNA or a AS pseudogene. Vertical striped bars denote repetitive sequences which were identified and characterized by Southern blot hybridization using a total nuclear DNA probe and a cloned Alu DNA probe. Hybridizable fragments are arbitrarily classified into four grade (- to ##) by the intensity of autoradiographic positive bands. To determine nucleotide sequence of the repeat of intron 1, a 3.0 kb EcoRI fragment was subcloned into pBR 322 and is enlarged to show sequencing strategies which are indicated by arrows. Two Alu repetitive sequences are shown by grey-coloured boxes with triangle indicating its direction (5' to 3'). Restriction sites: EcoRI, E; BamHI, B; HindIII, H; AvaI, A; BglII, Bg; HincII, Hc; KpnI, K; SphI, Sp; XbaI, X.

エンハンサー・コア配列 (enhancer-core sequence) “GTGG  $\frac{TTT}{AAA}$  G” に類似の配列が二度繰り返して存在していた。

## 考 察

シトルリン血症の異常の機構に関して、欧米症例では酵素学的<sup>8)</sup> および分子レベルでの研究<sup>9)</sup> がなされており、多くが酵素の構造の異常に帰せられる。しかし日本人に特有な遅発型シトルリン血症では、佐伯らによって酵素の性状は正常と差がない“量の異常”として分類され、欧米症例とは異常機構が異なることが推察されている<sup>10)</sup>。さらにもう一つの特徴として、酵素活性が肝組織で特異的に低下しており、皮膚線維芽細胞や腎組織ではこのような低下は指摘されない。

新しい機構の予想される、しかも日本人に特有な遅発型シトルリン血症の遺伝子レベルでの病態解明のため、私たちは正常ヒトの AS 遺伝子の構造を明らかにするところから研究を開始した。しかしヒト核中には AS の偽遺伝子が多数存在し、また Su らの報告から AS 遺伝子はかなり大きいことが推察され全構造を単離・解析することはかなり時日を要すると思われる。そこで、現在の知見に照らし合わせて、遺伝子発現調節に重要な機能を持つ 5' 側の構造に重点を置いて仕事を進めた。そして 60 数 kb にわたる AS 遺伝子の 5' 端隣接領域を含む半分にあたる AS 遺伝子を単離し、制限酵素地図やサザン・プロット法によってその構造を解

析した。さらに5'端隣接領域については5'端より750 bp 上流までの一次構造を決定して詳しく解析した。一方、AS 遺伝子内には多数の反復 DNA 配列が存在することを見だし、第1イントロン内の反復 DNA 配列について一次構造を明らかにした。

AS 遺伝子の調節領域の一次構造の大きな特徴は極めて GC-rich な配列となっていることである。このような DNA 配列は真核遺伝子では他にハムスター HMG CoA reductase 遺伝子<sup>11)</sup>やマウス HPRT 遺伝子<sup>12)</sup>で見られる。これらの遺伝子はいわゆる“housekeeping genes”と呼ばれる遺伝子で、特殊の組織でなく、多くの組織で発現されている。これは AS 遺伝子が線維芽細胞でも発現していることと一致する。しかし AS 活性は肝や腎で高く、線維芽細胞では非常に低くなっている。肝(および腎)での高い活性が単に基質濃度によるものでないとするれば、それは肝(および腎)特異的発現調節をうけているに違いない。組織特異的発現調節機構に関してはまだ必ずしも明瞭に理解されていないが、インスリンおよびキモトリプシン遺伝子の組織特異性を見た実験では、組織特異的な発現に必要な DNA 配列は、5'端上流200~300 bp の領域にあった<sup>13)</sup>。この点から、ヒト凝固第8因子遺伝子、ヒトプレアルブミン遺伝子の如き肝で発現される遺伝子と共通の配列“AGAAGTGA”が AS 遺伝子にも見いだされたことは興味を引く。

また近年、遺伝子の転写を著しく促進するエンハンサーと呼ばれる DNA 配列の報告が相ついでいるが、哺乳動物では免疫グロブリンヘビーチェーン遺伝子<sup>14)</sup>、κ ライトチェーン遺伝子<sup>15)</sup>および MHC 遺伝子<sup>16)</sup>などでその存在が知られている。前二者ではこのエンハンサー配列はイントロン内に存在していた。

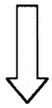
ところで反復 DNA 配列に関して、その機能は現在のところ不明であるが、先に述べた MHC 遺伝子のエンハンサー DNA 配列にはGTGT...のようなプリン-ピリミジンの交互反復配列が含まれていた。またエンハンサー・コア配列様の DNA 配列が存在していたことも AS 遺伝子第1イントロン内の反復 DNA 配列と同じで、この反復 DNA 配列が AS 遺伝子の発現調節になんらかの役割を果たしているかもしれないという期待を抱かせる。

今後、発現系ベクターを用いてこうした DNA 配列の機能を調べ、患者 DNA のそれらの部分の一次構造を正常者と比較するなどによって患者遺伝子の解析を進めて行く予定である。また、AS 遺伝子のユニーク配列を利用してポリモルフィズムによる診断などを検討中である。

## 文 献

- 1) Jinno, Y., Nomiyama, H., Wakasugi, S., Shimada, K., Matsuda, I. and Saheki, T. : Isolation and characterization of phage clones carrying the human argininosuccinate synthetase-like genes. *J. Inher. Metab. Dis.*, **7** : 133~134, 1984.
- 2) Su, T.S., Bock, H.G.O., O'Brien, W.E. and Beaudet, A.L. : Cloning of cDNA for argininosuccinate synthetase mRNA and study of enzyme overproduction in a human cell line. *J. Biol. Chem.*, **256** : 11826~11831, 1981.

- 3) Bock, H.G.O., Su, T.S., O'Brien, W.E. and Beaudet, A.L. : Sequence for human argininosuccinate synthetase cDNA. *Nucleic Acids Res.*, **11** : 6505~6512.
- 4) Freytag, S.O., Beaudet, A.L., Bock, H.G.O. and O'Brien, W.E. : Molecular structure of the human argininosuccinate synthetase gene : occurrence of alternative mRNA splicing. *Mol. Cell. Biol.*, **4** : 1978~1984, 1984.
- 5) Gitschier, J., Wood, W.I., Goralka, T.M., Wion, K.L., Chen, E.Y., Eaton, D.H., Vohar, G.A., Capon, D.J. and Lamu, R.M. : Characterization of the human factor VIII gene. *Nature*, **312** : 326~330, 1984.
- 6) Miyazaki, H., Fukamizu, A., Hirose, S., Hayashi, T., Hori, H., Ohkubo, H., Nakanishi, S. and Murakami, K. : Structure of the human renin gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **81** : 5999~6003, 1984.
- 7) Fowlkes, D.M., Mullis, N.T., Comeau, C.M. and Crabtree, G.R. : Potential basis for regulation of the coordinately expressed fibrinogen genes : homology in the 5' flanking region. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **81** : 2313~2316, 1984.
- 8) Kennaway, N.G., Harwood, P.J., Ramberg, D.A., Koler, R.D. and Buist, N.R.M. : Citrullinemia : enzymatic evidence for genetic heterogeneity. *Pediatr. Res.*, **9** : 554~558, 1975.
- 9) Su, T.S., Beaudet, A.L. and O'Brien, W.E. : Abnormal mRNA for argininosuccinate synthetase in citrullinemia. *Nature*, **301** : 533~534, 1983.
- 10) Saheki, T., Ueda, A., Hosoya, M., Kusumi, K., Takada, S., Tsuda, M. and Katsunuma, T. : Qualitative and quantitative abnormalities of argininosuccinate synthetase in citrullinemia. *Clin. Chim. Acta*, **109** : 325~335, 1981.
- 11) Reynold, G.A., Basu, S.K., Osborne, T.F., Chin, D.J., Gil, G., Brown, M.S., Goldstein, J.L. and Luskey, K.L. : HMG CoA reductase : a negatively regulated gene with unusual promoter and 5' untranslated regions. *Cell*, **38** : 275~285, 1984.
- 12) Melton, D.W., Konecki, D.S., Brennand, J. and Caskey, C.T. : Structure, expression, and mutation of the hypoxanthine phosphoribosyltransferase gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **81** : 2147~2151, 1984.
- 13) Walker, M.D., Edlund, T., Boulet, A.M. and Rutter, W.J. : Cell-specific expression controlled by the 5'-flanking region of insulin and chymotrypsin genes. *Nature*, **306** : 557~561, 1983.
- 14) Gillies, S.D., Morrison, S.L., Oi, V.T. and Tonegawa, S. : A tissue-specific transcription enhancer element is located in the major intron of a rearranged immunoglobulin heavy chain gene. *Cell*, **33** : 717~728, 1983.
- 15) Picard, D. and Schaffner, W. : A lymphocyte-specific enhancer in the mouse immunoglobulin  $\kappa$  gene. *Nature*, **307** : 80~82, 1984.
- 16) Gillies, S.D., Folsom, V. and Tonegawa, S. : Cell type-specific enhancer element associated with a mouse MHC gene,  $E\beta$ . *Nature*, **310** : 594~597, 1984.



## 検索用テキスト OCR(光学的文字認識)ソフト使用

論文の一部ですが、認識率の関係で誤字が含まれる場合があります



日本人に特有な遅発型(成人型)シトルリン血症の分子レベルでの病態解明を目的としてアルギニノコハク酸合成酵素(AS)遺伝子の構造解析の研究を開始した。前回ヒトの遺伝子ライブラリーより AS 様遺伝子を運ぶファージクローンを多数単離したこと,そしてそれらの多くは偽遺伝子で,一つのクローン, LmAS-8, が active gene 由来らしい DNA 断片を含んでいることを報告した 1)。今回われわれはこの LmAS-8 からさらに上流の DNA 断片を運ぶファージクローンを単離し, 60 数キロベース(kb)にわたる巨大な AS 遺伝子の 5' 端を含む約半分を単離することができた。単離された AS 遺伝子について, 制限酵素地図およびサザン・プロット・ハイブリダイゼーションによって構造を解析し, 調節領域については塩基配列を決定して構造の特徴を詳細に調べた。また AS 遺伝子内に多数存在していた反復 DNA 配列についても検討を加え, 第 1 イントロン内の反復 DNA 配列に興味深い一次構造を見出した。これらの構造の特徴を遺伝子発現・調節の観点から論ずる。