

# CD4 サイレンサーの作用機構

「遺伝と変化」領域 澤田 新一郎

## 要旨

リンパ球表面糖蛋白CD4はTリンパ球の機能および分化において重要な役割を演じており、またヒトにおいては、HIVウイルスのリセプターとしても知られる。CD4/CD8の発現は、T細胞の分化過程で一方のみが抑制されるという特徴的な転写制御を受け、この発現制御機構はT細胞の機能的分化と密接に関連している。我々はトランスジェニックマウスを用いて、CD4遺伝子の第一イントロンにあるサイレンサー領域の機能的解析を行った。本研究において、以下の結論が得られた。CD4サイレンサーは転写抑制機構やクロマチン構造の変化や維持に関わる多くのリダンダントなエレメントから成り、それぞれのエレメントの機能が複合した結果、安定な機能的サイレンサー複合体を構築し、遺伝子の発現を抑制することが示唆された。



## 研究の狙い／目的

リンパ球表面糖蛋白CD4はTリンパ球の機能および分化において重要な役割を演じており、またヒトにおいては、HIVウイルスのリセプターとしても知られる。骨髄より胸腺に移住した前Tリンパ球はCD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup>で、CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>胸腺細胞を経て、成熟したCD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup>ヘルパーTリンパ球か、CD4<sup>-</sup>CD8<sup>+</sup>キラーTリンパ球のどちらかに分化する。すなわち、CD4/CD8の発現は、T細胞の分化過程で一方のみが抑制されるという特徴的な転写制御を受け、この発現制御機構はT細胞の機能的分化と密接に関連していると考えられる。我々はトランスジェニックマウスのシステムを用いて、CD4遺伝子の転写がプロモーター領域の他に、13kb上流にある正に発現を促進するエンハンサー領域と第一イントロンにある負に発現を調節するサイレンサー領域により支配されていることを見出した(図1、図2)。Tリンパ球の分化過程におけるCD4遺伝子の発現にエンハンサー領域が必須であり、一方、CD4のキラーTリンパ球における発現抑制にはサイレンサー領域が必要で

ある。マウス CD 4 遺伝子 locus から、このサイレンサーを含む領域をジーンターゲットングにより除くと、末梢 CD 8 T 細胞に CD 4 が発現することが示された (Killeen, Sawada, and Littman, 未発表データ)。CD 4 サイレンサーは、脊椎動物内で作用し、機能的定義をみだすサイレンサーとしては初めて同定されたものと考えられ、その作用機構の解明は T リンパ球の分化機構の理解に留まらず、遺伝子転写機構全般の理解にも大きく貢献すると考えられる。本研究では、CD 4 サイレンサーの作用をコントロールしている核内因子 (転写因子やクロマチン構造に関わる因子等) および核外因子 (細胞表面レセプターからのシグナル伝達因子等) を同定/解析し、CD 4 サイレンサーの転写抑制機構を解明することを目指す。

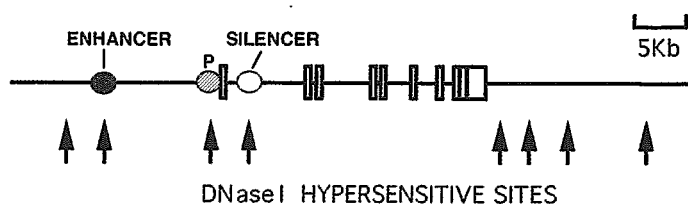


図1 マウス CD 4 遺伝子の転写制御領域  
転写開始部より約 13 キロベース上流に T 細胞特異的エンハンサーがある。T 細胞サブセット特異的サイレンサーは転写開始部より下流に 2 キロベース、第一イントロンにある。

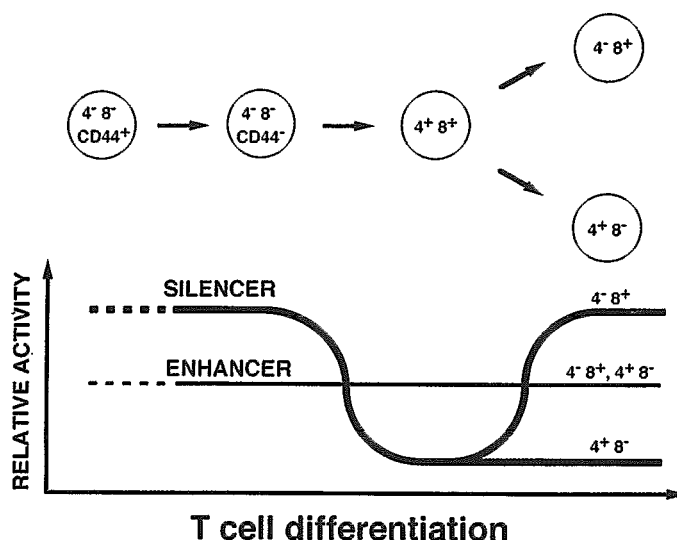


図2 CD 4 サイレンサーは、CD 4 エンハンサーとプロモーターの活性をドミナントに抑制する。従って、CD 4 サイレンサーが T 細胞分化過程における CD 4 の発現を制御している。

## 研究方法と成果

T 細胞株の核抽出物を用いた DNase I foot printing 法により、CD 4 サイレンサーの核蛋白結合領域を同定した (図 3、Sil1 - Sil6)。これらの領域の核酸配列のオリゴヌクレオチドを作製し、ゲルシフト法にて特異的結合蛋白を検出した。これらの蛋白の発現に T 細胞サブセット特異的なものは認められなかった。

これらの蛋白結合領域をもとに種々の 5' あるいは 3' 領域欠損型のサイレンサーを作製し、これをトランスジェニックコンストラクトに導入し、トランスジェニックマウスを作製した。トランスジェニックマウスの CD 4-CD 8+リンパ球におけるトランスジーンが発現

## Silencer Activity in

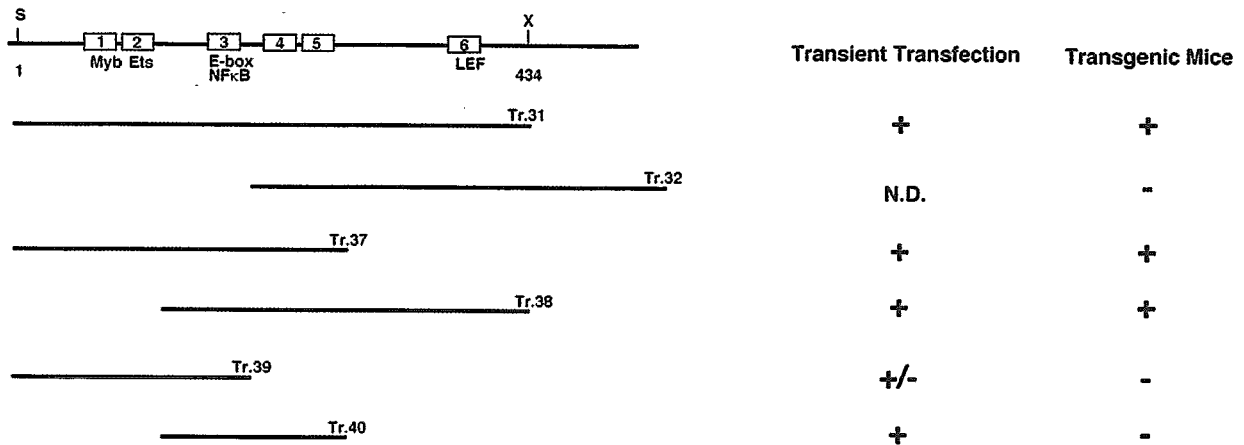


図3 上に示した Sil1 から Sil 6 は、CD 8 単陽性 T 細胞の核抽出蛋白を用いた DNase I footprinting assay により同定された蛋白結合領域である。転写因子の結合モチーフを含むものは図に示した。上流、下流領域を欠損したサイレンサーを CAT assay 或いは、トランスジェニックシステムにて、その活性を解析した。148bp のコア領域に加え、上流か下流のいずれかの領域が、in vivo のジーンサイレンシングに必要である。

を指標にサイレンサー活性を検討した。また、欠損型サイレンサーを含んだ CAT レポーターコンストラクトを CD 4 あるいは CD 8 T 細胞株へ一過性に遺伝子導入し、サイレンサー活性を in-vitro の系でも検討した。一過性の遺伝子導入の系では、サイレンサーを 148bp のコアフラグメントまで縮小することができたが、このフラグメントはトランスジェニックマウスではサイレンサー活性を示さず、このフラグメントに加え、5' あるいは 3' の領域が必要であった。このように、一過性導入の系とマウスゲノムへの恒常的導入の系での差異から、5' あるいは 3' の領域がゲノムの中でのクロマチンレベルでのサイレンサー機構に関わっていることを示唆している。5' あるいは 3' の領域に配列の類似性は見られないことより、この機能はリダンダントであると考えられた (図3)。

次に、5' あるいは 3' よりシーケンスを少しずつ削った CD 4 サイレンサーコアフラグメントを一過性の導入する系により解析し、サイレンサー機能に関与すると考えられる領域を複数同定した (図4、図5)。これらには蛋白結合部位も含まれていた。新たに同定された機能領域、Sil7 および Sil8 を欠損した (あるいはこの領域に変異をいれた) CD 4 サイレンサーをトランスジェニックコンストラクトにつなげてマウスに導入し、サイレンサー機能を検討した。これらの領域を欠損すると、一部の CD 8 T 細胞にて、サイレンサー機能の障害を認めたことから、in-vivo に於いても、これらの領域がサイレンサー活性になんらかの役割をしていることを示唆する (図5)。しかしサイレンサー機能は残りの CD 8 細胞では

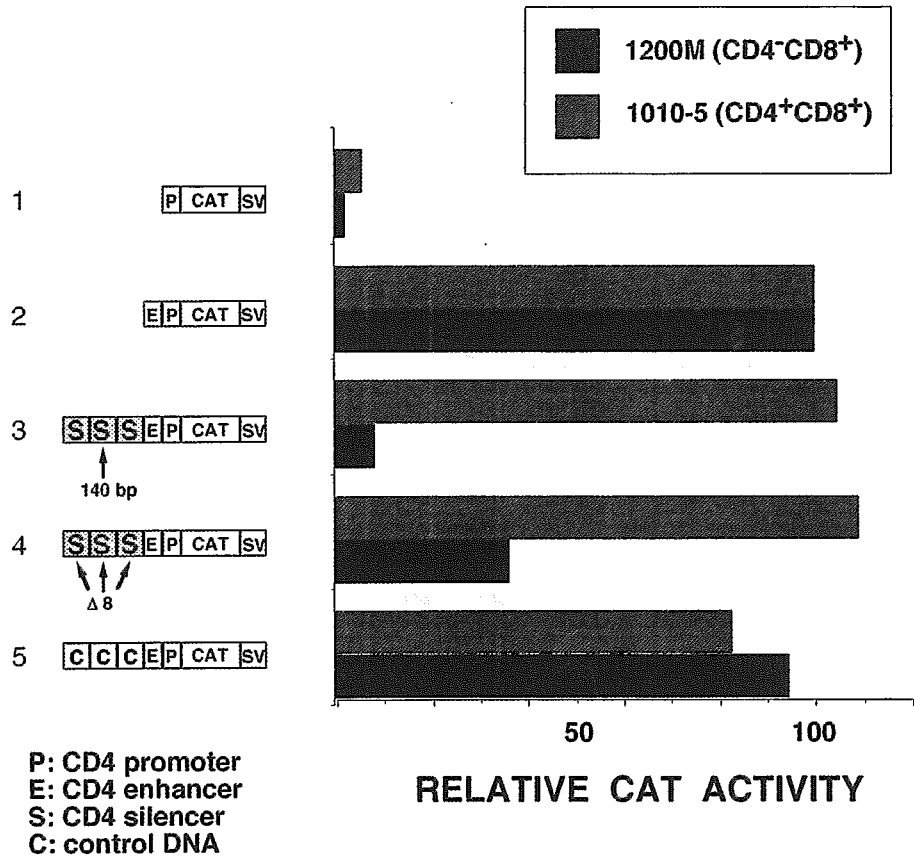


図4 148bpのコアサイレンサーはCD 8単陽性T細胞株特異的に、CD 4エンハンサー／プロモーターからの転写を抑制する。この抑制はSi18領域を欠損すると、部分的に解除される。

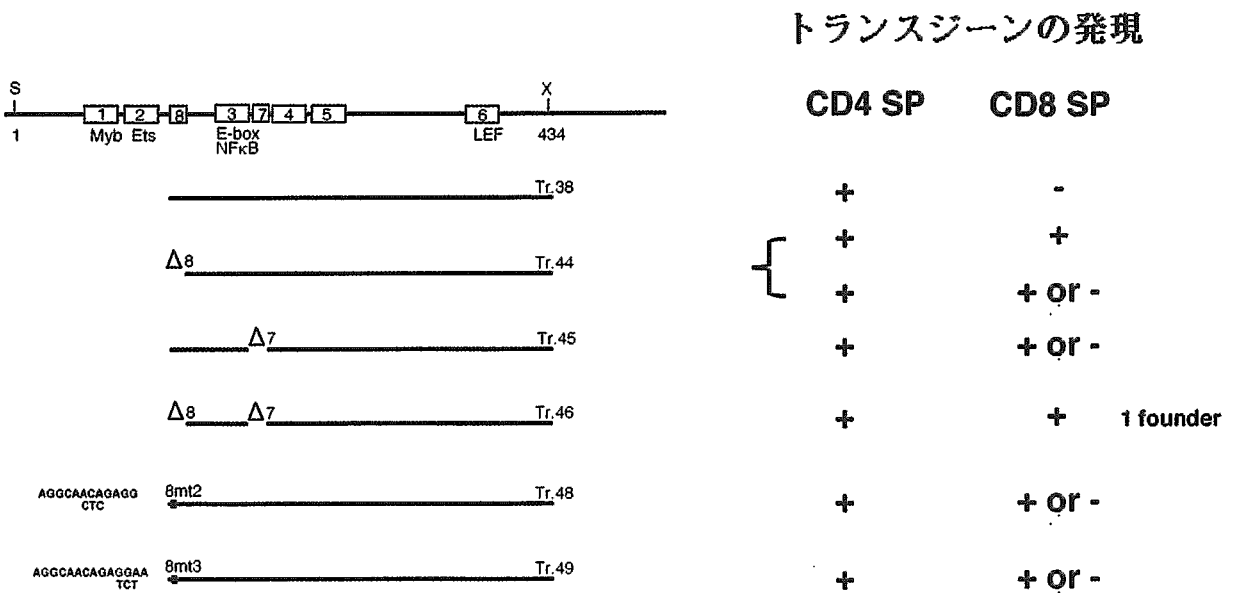


図5 CD 4サイレンサーに変異を導入するとCD 8単陽性T細胞におけるレポーターの発現にヴァリエーションがみられる。

完全に保たれており、これらの領域が必要不可欠ではないことを示唆する。このように、不完全型のサイレンサーではその機能が部分的に障害され、CD8細胞の中に、トランスジーンが完全にサイレンシングをうけているものと、完全にデプレッションされているものの二種類が存在した(図6)。この現象は、ハエにおけるポジションエフェクトヴァリエーションに類似しており、トランスジーンが発現がインテグレーション部のクロマチン構造に依存していることを示唆する。さらにこのバリエーションの割合が経時的にも次の代のマウスにおいても比較的安定に保たれていたことから、個々の細胞で一旦決定した発現パターンは、おそらく恒久的に維持されることが示唆された。以上の結果をまとめると、CD4サイレンサーは転写抑制機構やクロマチンの構造の変化や維持に関わる多くのリダンダントなエレメントから成り、それぞれのエレメントの機能が複合した結果、安定な機能的サイレンサー複合体を構築することが示唆された。CD4サイレンサーの作用機構のモデルを図7、図8に示す。

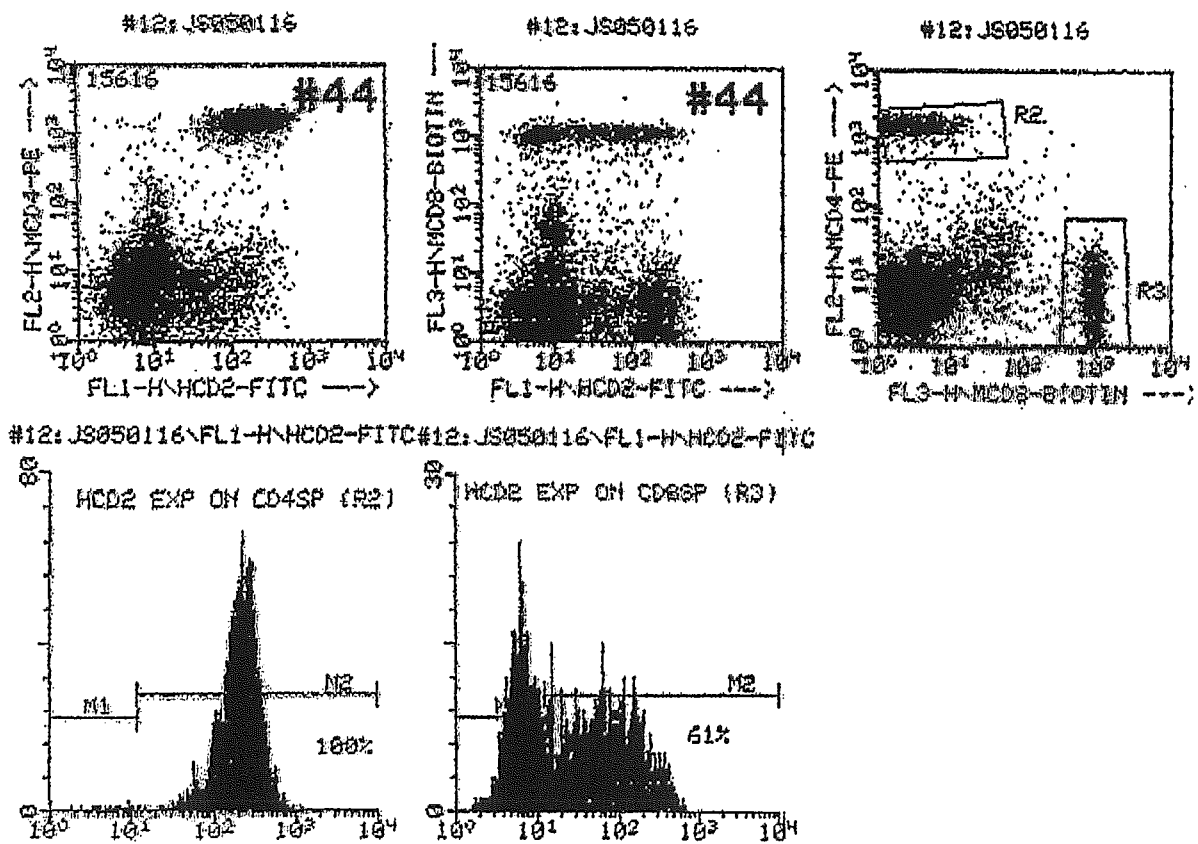
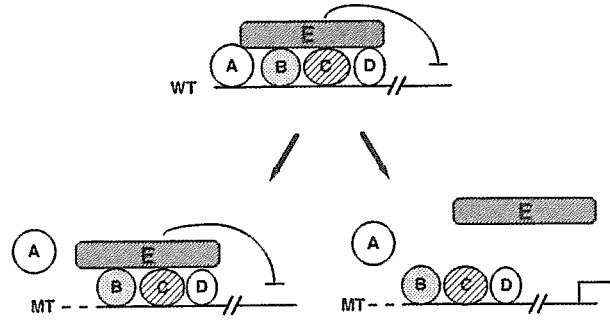


図6 Sii8領域を欠損したCD4サイレンサーによるレポーター発現のバリエーション  
トランスジェンクマウスのCD8単陽性T細胞(R3)におけるトランスジーン発現のヒストグラム(下図)。  
61%のCD8単陽性T細胞でトランスジーンが発現し、残りのCD8単陽性T細胞ではトランスジーンは発現していない。

I) Stochastic events at the chromosomal level



II) Differences in cellular properties

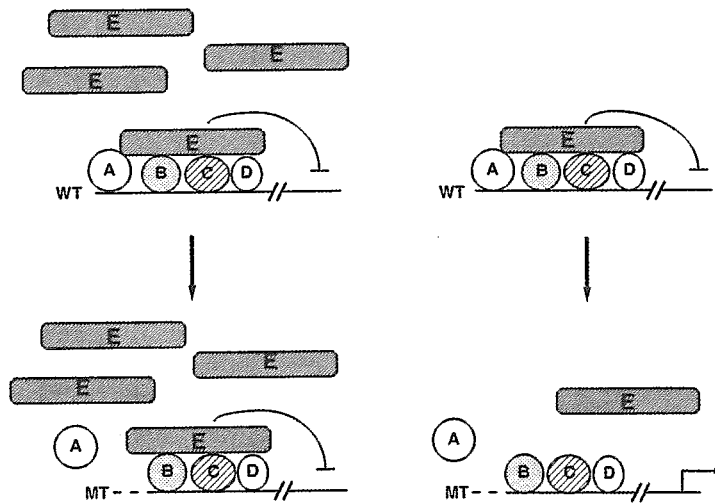


図7 CD 8単陽性 T細胞における変異型 CD 4サイレンサーによるヴァリエーション型発現の仮説モデル

I) 野性型CD 4サイレンサー

II) 変異型CD 4サイレンサー

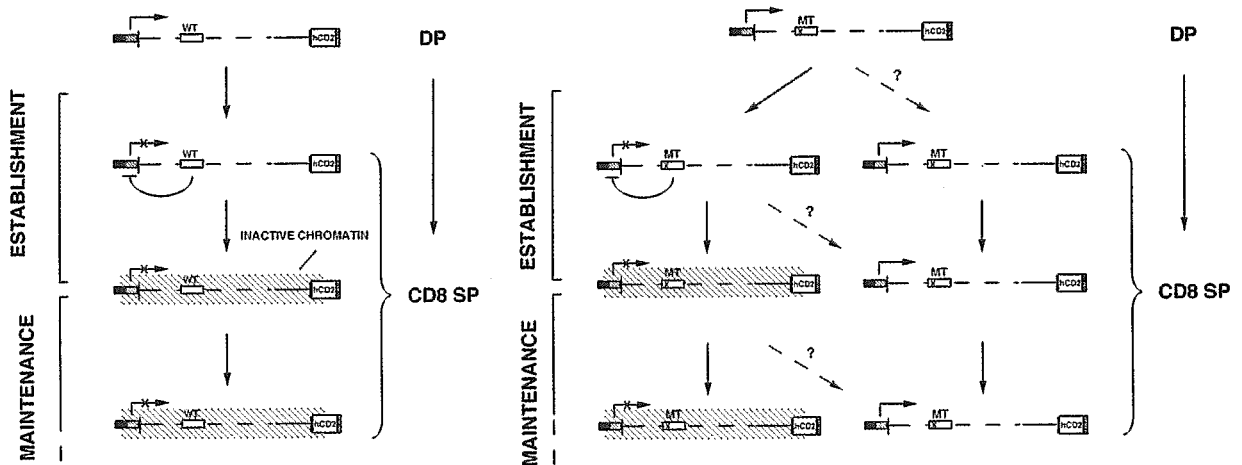


図8 CD 4サイレンサーによる遺伝子サイレンシング過程の仮説

CD 4サイレンサーによるサイレンシングの過程は、成立と維持という2つのプロセスからなる。遺伝子転写抑制機構とクロマチン構造修飾がこれらの過程に関わっているかもしれない。

## 今後の展望

本研究にて、CD4サイレンサーが複数のリダンタントなエレメントにより制御されていることが示唆された。今後はそれぞれのエレメントと結合する核蛋白の同定、解析を進めていく。ファンクショナルスクリーニングによるサイレンサーを調節する因子の同定も進めていく。これらの蛋白（総称してサイレンサー因子と呼ぶ）は転写抑制機構やクロマチン構造制御に関わる重要な核内因子であると考えられる。さらに、これらの中にはT細胞分化過程に特異的に発現（あるいは活性化）される因子も含まれると考えられ、これがT細胞の機能的サブセットへの分化を司るマスター遺伝子である可能性がある。

## 発表論文リスト

1. Sawada S., A transcriptional silencer regulates CD4 gene expression. (*Japanese*) *Experimental Medicine (Jikken Igaku)*, **13**, 66-68 (1995)
2. Sawada S., CD4 gene regulation during T lymphocyte development. (*Japanese*) *Immunology Frontier*, No.4, 19-24 (1995)
3. Sawada S., A silencer regulates CD4 gene expression. (*Japanese*) : *Molecular Medicine*, **33**, 32-37 (1996-97)
4. Sawada S., Gowrishankar K., Kitamura R., Suzuki M., Suzuki G., Tahara S., and Koito A., Disturbed CD4+ T cell homeostasis and in vitro HIV-1 susceptibility in transgenic mice expressing T-tropic HIV-1 receptors. *J. Exp. Med.*, **187(9)**, 1439-1449 (1998)
5. Ellmeier W., Sawada S. and Littman D.R., The regulation of CD4 and CD8 coreceptor gene regulation during T cell development. (*Review*) *The Annual Review of Immunology*, in press (1999)
6. Sawada S., Scarborough J.D. and Littman D.R., Characterization of a Transcriptional Silencer in the Murine CD4 Gene. *Implication for Chromatin Level Function Mediated by Multiple Redundant Elements*, (in preparation)

## 特許出願

Human CD4 and CXCR4 double transgenic mice. Patent Case no. H9-100615, 1997 (国内、海外)

## その他

口頭発表 8件（新聞発表1件）