◆トピックス◆

血液凝固第 IX 因子の転写制御

—HNF4, ARP1 を中心に—

中 宏 之*

Transcriptional Regulation of the Human Factor IX
by HNF4 and ARP1

Hiroyuki NAKA*

Key words: factor IX promoter, hemophilia B Leyden, HNF4, ARP1

はじめに

血友病 B は、第 IX 因子 (F IX) の遺伝子の異常に起因する X 連鎖の遺伝性出血性疾患である。F IX は vitamin K 依存性の glycoprotein で内因系の血液凝固 cascade において重要な働きをする¹⁾。血友病 B の中に血友病 B Leyden と呼称される一群の興味ある病型が存在する。血友病 B Leyden (以下 Leyden 病型) とは、小児期には F IX level が低く出血症状を伴うが、思春期以後 F IX level は上昇し、出血症状もなくなり、F IX 補充療法も必要でなくなる²⁾。典型的な Leyden 病型症例では、小児期の F IX level は 10% 以下であるが、思春期以後 40~60% にまで上昇する。F IX の転写制御の研究は、これらの症例をとおして進歩してきた。

Leyden 病型は、すべて F IX 遺伝子 promoter 上の 34bp の範囲内 (nt. -21, -20, -6, -5, +6, +8, +13) に点変異をもつ (nt.: nucleotide 番号は文献 3) による。以下略) (表 1)⁴⁾。このような点変異は、F IX の正常な発現を (特に小児期の) 障害をしていることおよび、F IX 自身 developmental に発現が調節されていることを示唆している。ところが、一方、pro-

moter 上に点変異を持つにもかかわらず、思春期以後も F IX level の上昇しない症例がある。Brandenburg 病型と呼称され、-26: G→C 変異を持つ⁵⁾。この症例の存在は、-26 の点変異が F IX の小児期における発現のみならず、developmental な発現をも破壊していることを示唆している。

現在までに、F IX promoter 上に数種類の DNA cis-element とその塩基配列を認識して DNA に結合し転写制御を行う転写因子が働いていることが既に報告され、Leyden 病型と Brandenburg 病型のメカニズムが説明されている (図 1)。-27~-15 の cis-element には、肝特異的転写因子である HNF4 (hepatocyte nuclear factor 4, 別名 LF-A1) が結合し、正の転写制御を行っている。よって、-21 と -20 の点変異はこの HNF4 の結合を破壊するために、Leyden 病型を示すと考えられる⁵⁾⁶⁾。また、+1~+13 の cis-element には、C/EBP family (CCAAT/enhancer binding protein, α , β , δ の family を構成している) が結合し、正の転写制御を行っている。よって、+6, +8, +13 の点変異では、この C/EBP family の結合を破壊するため Leyden 病型を示す⁷⁾。しかし、-5

* 国立療養所西奈良病院小児科 [〒 630 奈良市七条 2-789]; Department of Pediatrics, National Sanatorium Nishinara, 2-789 Hichijo, Nara 630, Japan.

表 1 第 IX 因子遺伝子 promoter 上の点変異 (文献 4) より抜粋)

Patient ⁷	Clotting (normal =100%)	Antigen (normal =100%)	Nucleotide ^{1,3,8} position & mutation	Amino acid ¹ change	Comments ³
HB5, Japan	<1	<1	-793, G → A	None	Double (scc 20, 551), N?
Brandenburg	<1	<1	-26, G → C	None	Promoter, LF-A1/HNF4- binding site, ARE
Unnamed (footnote 11)	<1→10 <1→60 ⁵	<1→10 <1→60	-21, T → G -20, T → A	None None	Promoter, HNF4 Promoter, LF-A1/HNF4- binding site
Marseille (footnote 11)	7→20 ⁵ 13→70 ⁵		-20, T → C -6, G → A ⁴	None None	Promoter, de novo in MGF Promoter
Toulouse	1→30 ⁵	1→30 ⁵	-6, G → C	None	Promoter
Toronto 20	3		-5, A → T	None	Promoter
(footnote 11)	7		-5, A → G	None	Promoter
Bangkok	5		6, 7 or 8, Δ1	None	Promoter
(footnote 11)	<1→37 ⁵		6, T → A	None	Promoter
Leyden, NZ	1→32 ⁵		8, T → C	None	Promoter, C/EBP binding site, de novo in mother
(footnote 11)	<1→60 ⁵	<1→60 ⁵	13, A → G	None	Promoter
Leyden 3	<1→60 ⁵	<1→60 ⁵	13, Δ1	None	Promoter
Aachen	<1		13, A → C	None	Promoter, C/EBP-binding site

図 1 第 IX 因子遺伝子 promoter 上 cis-element および転写因子と点変異の部位。矢印は、+1 あるいは +4 の転写開始部位。下段に今回使用した oligonucleotides を示す。

と-6の点変異に関して、どのような転写因子が関与しているのか不明である。一方、-26に点変異をもつ Brandenburg 病型では、androgen receptor (AR) が結合する cis-element (ARE: androgen responsive element) -36~-22と HNF4の結合する-27~-15の cis-element の overlap した部位に点変異が存在するため、その両方の転写因子の結合を破壊し、思春期後も F IX レベルが上昇しないと考えら

れている⁵⁾。この仮説は、従来より疑われていた testosterone/androgen の関与をうまく説明したものであると思われる。ただし、この仮説に対して、AREと考えられる部位に結合するのは、AR そのものではないとの反論もある⁸⁾。

他の仮説として、DBP (D-site binding protein) の関与を指摘するものである。-210~-202の cis-element に、正の転写制御をする DBP が結合して F IX の発現を調節しており、

DBP 自身が developmental に発現するため、F IX も二次的に developmental に発現するという仮説である⁹⁾。もっとも、この仮説では Brandenburg 病型を適切に説明することはできない。

最近の研究によると、ARP1 や COUP といった steroid hormone receptor superfamily に属する転写因子が、HNF4 の正の制御に antagonise して負の制御をするといった報告が相次ぎ¹⁰⁾¹¹⁾、F IX promoter においても、これらの転写因子が働いていることを検証する。

1. ARP1, COUP は F IX の発現制御に関与

ARP1, COUP が F IX の発現制御に関与しているかどうかを調べるために、まず CAT assay を行った。F IX promoter として、-200 ~ +40 の領域を CAT gene の上流につないだ

CATvector (pFIX-200/+40) を HepG2 細胞に transfection し、HNF4 発現 vector (pMT2-HNF4) 存在下、あるいは HNF4/ARP1 発現 vector (pMT2-ARP1) 存在下で行った。結果、HNF4 発現 vector を増量していくと、CAT 活性は上昇した。また、HNF4 発現下で ARP1 発現 vector を増量していくと、CAT 活性は抑制された (図 2)。COUP 発現 vector を用いた場合も全く同様の結果であった。このことは、文献 11, 12 の HNF4 刺激と ARP1/COUP 抑制は同じ cis-element に競合的にこれらの転写因子が結合する事により起こるという仮説を指示している。それでは、どの cis-element でこの競合が起こっているのか、すでに HNF4 部位として報告されている -27 ~ -17 が候補となるが、この element は ARP1/COUP の consensus である 5' -GGTCA-3' repeat と相同性が

図 2 第 IX 因子 promoter 領域 (-200 ~ +40) を用いた HepG2 細胞での CAT assay. Cotransfection した HNF4 expression vector (pMT2-HNF4) を、0, 0.5, 1.0, 2.0 (μg) と増加させた場合と pMT2-HNF4 を 0.5 (μg) で固定させておき、ARP1 expression vector (pMT2-ARP1) を 0, 0.5, 1.0, 2.0 (μg) と増加させた場合、何も cotransfection しない場合の CAT activity を、1.0 とする。

なく、他に HNF4 と ARP1/COUP が結合する cis-element の存在を示唆している。

II. 2つの cis-element の存在, -20~+3 (X element) と +15~+36 (Y element)

Rat 肝抽出液を用いて, FIX promoter-200~+40 の領域を, DNase I footprinting assay により cis-element を検索した。既に報告されている3つの cis-element (-99~-76: NF1 site, -35~-20: AR & HNF4 sites, +3~+15: C/EBP site) 以外に, 2つの cis-element (-20~+3: X element と +15~+36: Y element) を観察した (図3)。

Y element の sequence は, HNF4 のみならず ARP1 の consensus と相同性を持つため, COS1 細胞で発現した recombinant HNF4, ARP1, COUP を用いて, gel shift assay を行った。probe として, Y element, -27~-17 の HNF4 site (-20 element) と ApoC III の C III B site (HNF4, ARP1, COUP 結合部位として有名) を用いた。図4Aに示すように, HNF4 は Y element にも -20 element にも結合し (lanes 2, 7), またお互いに競合阻害した (lanes 3, 4, 8, 9)。一方, ARP1 は図4Bに示すように Y element には結合するが, -20 element には結合していない (lane 2, 7)。COUP を用いた場合も, ARP1 と全く同じ結果であった。以上より, Y element には, HNF4, ARP1, COUP のすべてが結合するが, -20 element には HNF4 のみが結合する。

X element の sequence も, 弱いながらも HNF4 と ARP1 の consensus と相同性を持つため, 同様の実験を行った。図5に示すように, X element には HNF4 が結合し, -20 と Y element で競合阻害が認められる (lanes 2, 6, 7)。また, ARP1 も結合し Y element で競合阻害が認められるが, -20 element では認められない (lanes 12, 16, 17)。よって, X element も Y element 同様 HNF4, ARP1, COUP のすべてが結合するものと考えられる。また, X element には Leyden 病型を示す点変異が報告されており, そのうちの2種 (-6: G→A と -6: G→C) について, HNF4 と ARP1 を用

図3 Rat 肝抽出液を用いた第 IX 因子 promoter 領域 (-200~+40) の DNase I footprinting assay. 右欄に, それに対応する転写因子を示す。

いて競合阻害を調べた。-6: G→C は全く競合阻害はなく (lanes 5, 15), -6: G→A は一部阻害を認めた (lanes 4, 14)。

Rat 肝抽出液を用いた gel shift では X element が造る shift complex を -20, Y, C III B element と明確な競合阻害をすることはできず, X element に関わる主な転写因子は HNF4, ARP1, COUP ではないことを示唆している。このため, -6 に点変異を持つ Leyden 病型と HNF4, ARP1, COUP の関わりは, この binding assay のみではなんとも言えない。

図 4 A, COS1 細胞で発現した recombinant HNF4 を用いた gel shift assay. 上欄に競合阻害に使用した oligonucleotides を示す. Probe として, Y, -20, C III B element を使用.
B, COS1 細胞で発現した recombinant ARP1 を用いた同様の gel shift assay.

III. HNF4 は, -20, X, Y の各 element で機能的に active

-20, X, Y の各 element が HNF4 に関して機能的に働いているかどうかを調べるために, 1 コピーの各 element を Herpes simplex

thymidine kinase (TK) promoter をもった CATvector (pBL2 CAT) に挿入し, HNF4 の発現下, HepG2 細胞で CATassay を行った. -20, X, Y の各 element は, それぞれ TK promoter のみに比べて, 5 倍, 2 倍, 2.8 倍と刺激された(図 6). これは, HNF4 がこれら 3

図5 COS1細胞で発現した recombinant HNF4, ARP1 を用いた gel shift assay. 上欄に競合阻害に使用した oligonucleotides を示す. Probe として, X element を使用. a は, COS1 細胞核抽出液中に含まれるものを示す.

図6 -20, X, Y の各 element を挿入した TKpromoter を用いた HepG2 細胞での CAT assay. Cotransfection する pMT2-HNF4 を, 0, 0.5, 1.0, 2.0 (μg) と増加させた場合, Cotransfection しない TKpromoter のみの CAT activity を 1.0 とする.

つの element を通して, magnitude のちがいはあるものの正の制御をしていることを示している.

点変異をもつ -20 element と X element について, TKpromoter を用いて同様の CAT assay を行った. まず, -20 element について図 7A に示すように, -20: T→A では HNF4 の発現下 TKpromoter のみの場合とほぼ同程度, -26: G→C ではほとんど background level というように, これらの点変異が HNF4 刺激をほぼ完全に障害している. X element について図 7B に示すように, -6: G→C では TKpromoter のみの場合とほぼ同程度で HNF4 刺激を障害しているが, -6: G→A の場合はそれほど大きな影響を受けていない. つまり X element について, HNF4 は確かに関与しているようであるが, すべての -6 の点変異が -20 の点変異と同様のメカニズムで Leyden 病型を引き起こしたとは考え難く, II で述べたように HNF4, ARP1, COUP 以外の転写因子

図 7 A, 点変異を導入した-20 element を挿入した TKpromoter を用いた HepG2 細胞での CATassay. Cotransfection する pMT2-HNF4 を, 0, 0.5, 1.0, 2.0 (μg) と増加させた場合。

B, 点変異を導入した X element を用いた同様の CATassay. Cotransfection しない TKpromoter のみの CATactivity を 1.0 とする。

図 8 第 IX 因子 promoter 上の cis-element とそれに対応する転写因子のまとめ。矢印は転写開始部位を示す。

の関与が示唆される。

IV. まとめ

HNF4 は, -20, X, Y の各 element を通して F IX の発現を正に制御し, ARP1 と COUP は X, Y の各 element を通して, HNF4 に antagonise する形で負の制御をしているものと考えられる(図 8)。また, X element に存在する Leyden 病型を示す点変異では HNF4 の関与が疑われるが, そのみでは説明できない。追記: 本研究は, 1991~1994 年に University of Oxford, Sir William Dunn School of

Pathology, Brownlee GG 教授のもとで行ったものである。なお, Wellcome Trust, EC grant および内藤医学振興財団より助成を受けた。

文 献

- 1) Thompson, A.R.: Structure, function, and molecular defects of factor IX. *Blood* **67**: 565-572, 1986.
- 2) Reitsma, P.H., Bertina, R.M., Briet, E., et al.: The putative factor IX gene promoter in Haemophilia B Leyden. *Blood* **72**: 1047-1076, 1988.
- 3) Yoshitake, S., Schach, B.G., Foster, D.C., et al.: Nucleotide sequence of the gene for factor IX

- (antihemophilic factor B) *Biochemistry* **24** : 3736-3750, 1985.
- 4) Giannelli, F., Green, P.M., Sommer, S.S., et al. : Haemophilia B : database of point mutations and short additions and deletions, fifth edition, 1994. *Nucle Acids Res* **22** : 2534-3546.
- 5) Crossley, M., Ludwig, M., Brownlee, G.G., et al. : Recovery from Haemophilia B Leyden : an androgen-responsive element in the factor IX promoter. *Science* **257** : 377-379, 1992.
- 6) Reijnen, M.J., Sladek, F.M., Reitsma, P.H., et al. : Disruption of a binding site for hepatic nuclear factor 4 results in hemophilia B Leyden. *Proc Natl Acad USA* **89** : 6300-6303, 1992.
- 7) Crossley, M. and Brownlee, G.G. : Disruption of a C/EBP binding site in the factor IX promoter is associated with haemophilia B. *Nature* **345** : 444-446, 1991.
- 8) Kurachi, S., Furukawa, M., Salier, J.P., et al. : Regulatory mechanism of human factor IX gene : protein binding at the Leyden-specific region. *Biochemistry* **33** : 1580-1591, 1994.
- 9) Picketts, D.J., Lillicrap, D.P., and Mueller, C.R. : Synergy between transcription factors DBP and C/EBP compensates for a haemophilia B Leyden factor IX mutation. *Nature Genet* **3** : 175-179, 1993.
- 10) Mietus-Snyder, M., Sladek, F.M., Ginsburg, G.S., et al. : Antagonism between apolipoprotein AI regulatory protein 1, Ear3/COUP-TF and hepatic nuclear factor 4 modulates apolipoprotein C III gene expression in liver and intestinal cells. *Mol. cell. Biol.* **12** : 1708-1718, 1992.
- 11) Ladas, J.A.A., Cladaras, H.M., Kardassis, D., et al. : Transcriptional regulation of human apolipoprotein genes, apoB, apoC III, apoA II by members of the steroid hormone receptor superfamily HNF-4, ARP-1, EAR-2, and EAR-3. *J. Biol. Chem.* **267** : 15849-15860, 1993.
- 12) Kimura, A., Nishiyori, A., Murakami, T., et al. : Chicken ovalbumin upstream promoter transcription factor (COUP-TF) represses transcription from the promoter of the gene for ornithine transcarbamylase in a manner antagonistic hepatic nuclear factor-4 (HNF-4). *J. Biol. Chem.* **268** : 11125-11133, 1993.
-