

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 16 日現在

機関番号：32203

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25461675

研究課題名(和文) I型コラーゲン転写活性化因子(COLF2)の精製とcDNAクローニング

研究課題名(英文) Function analysis of the promoter gene of the human COLA and analysis of DNA binding factors in the transcriptional enhancement region and cDNA cloning of the factors.

研究代表者

旗持 淳 (HATAMOCHI, ATSUSHI)

獨協医科大学・医学部・教授

研究者番号：90172923

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 1,800,000円

研究成果の概要(和文)：ヒト I 鎖 I 型コラーゲン遺伝子(COL1A1)プロモーター領域の欠失解析を施行し、転写増強領域に対してDNA結合因子の解析を行った。その結果、-402bpまでの欠失ではほぼ同レベルであった活性が-332bpまでの欠失で著しく低下し、この間に転写増強領域があると考えられた。-402bpから-332bpまでのDNA断片を放射性ラベルし、線維芽細胞の核抽出液を用いてゲルシフトアッセイを行ったところ蛋白の結合を示唆するバンドが認められた。置換変異を加えたDNA断片による競合アッセイにより蛋白は-386bp～-371bpの領域に結合することが判明。

研究成果の概要(英文)：We conducted a function analysis of the human type I collagen alpha1(1) chain gene (COL1A1) promoter and analyzed the DNA binding factors for the transcriptional enhancement region. A luciferase assay was carried out using DNA in which the COL1A1 promoter had gradually been deleted starting at the upstream side. A gel shift assay was performed by 32P radio-labeling DNA fragments from -401 to -332 and using fibroblast nuclear proteins. The luciferase assay showed almost the same level of activity in the deletions down to -402, but activity decreased markedly in the deletions down to -332, and the transcription regulatory region appeared to lie between them. When a gel shift assay was performed using DNA fragments from -402 to -332, a band that suggested binding of a protein was observed. As a result of a competition assay with DNA in which substitution mutations had been introduced, a protein that bound to the -386 to -371 region was found.

研究分野：医歯薬学

キーワード：I型コラーゲン 遺伝子プロモーター 転写 欠失解析 DNA結合因子

1. 研究開始当初の背景

I 型コラーゲンは線維芽細胞により産生され多くの病理的な現象で転写レベルで調節されている。皮膚の線維化が問題となる全身性強皮症では線維芽細胞の I 型コラーゲン産生が転写レベルで増加し治療にはそれを抑制することが求められる。近年私共はヒト COL1A1 上流域の deletion 解析を行い種々の検討から-386 から-371 に結合する因子が転写を上昇させることを証明した (Yoshida T et al: J Dermatol Sci 58:222,2010)。この因子は I 型コラーゲン転写を特異的に上昇させる因子と考えられ、これを精製し遺伝子クローニングすることは、皮膚疾患に生物製剤が用いられる今日、その抗体を用いて強皮症など線維性皮膚疾患の治療への応用が大いに期待される。

2. 研究の目的

I 型コラーゲンは真皮の膠原線維の主要成分であり、線維芽細胞により産生される。I 型コラーゲン生合成の調節は種々の生理的、病理的な現象において重要な役割を果たしており、その多くは転写レベルで調節されていることが知られている。また I 型コラーゲン発現の調節を研究することは、真皮膠原線維の増加する皮膚線維症と、逆に減少する皮膚萎縮症および皺のメカニズムや治療を考える上で重要である。皮膚線維症の 1 つである全身性強皮症においても線維芽細胞の I 型コラーゲン産生が転写レベルで増加している。全身性強皮症の治療は抗線維化因子 (薬剤) と言われているもの、たとえばインターフェロン  $\alpha$ 、D ペニシラミン、リコンビナント ヒト インターフェロン、リコンビナント ヒト リラキシンなど、はすでに全身性強皮症の線維化に対して治験的に試みられたがよい結果は出ていない。近年皮膚疾患の治療にも生物製剤が用いられ、また遺伝子 (核酸) 治療も試みられるようになってきた。従って I 型コラーゲンの転写調節機構に

関わる因子を解析し、その因子を精製、遺伝子クローニングすることは強皮症をはじめとする線維化の治療を考える上で非常に重要である。I 型コラーゲンは 2 本の  $\alpha 1(I)$ 鎖及び 1 本の  $\alpha 2(I)$ 鎖コラーゲン分子より成り、それぞれの遺伝子によりコードされている。そしてそれらの産生はその上流域に存在するプロモーター遺伝子における調節配列 (cis-DNA-element) 及びそれを特異的に認識して結合する調節因子 (trans-acting factor) が RNA ポリメラーゼ II と相互に作用することにより制御されている。

これまでに私共はマウス  $\alpha 2(I)$ コラーゲン・プロモーター遺伝子に結合し、転写を制御する因子すなわち、CCAAT 結合因子、Nuclear Factor 1 および近年私共がクローニングし、c-myc 上流遺伝子結合因子 Pura/Pur $\beta$  であることを明らかにした ColF1 についての同定、精製、特徴づけ等をマウス NIH3T3 細胞を用い行い、その転写制御機構を解析してきた。I 型コラーゲン遺伝子プロモーター領域の functional deletion analysis による転写調節の解析はこれまでにいくつかの検討がなされてきている。ヒト  $\alpha 1$ 鎖型コラーゲン遺伝子 (COL1A1) では Jimenez SA らのグループによる解析 (Jimenez SA et al: J Boil Chem 269:12684-12691, 1994) がなされているのみである。近年私共はヒト 1 鎖 I 型コラーゲン遺伝子 COL1A1 上流域の deletion 解析を行っており、すなわち exonuclease III を用いた Henikoff の方法で転写開始点方向への deletion を -804 より -332 の位置までの種々の長さの (-804,-610,-517,-402,-332) 欠失変異体キメラ遺伝子を作成、これを用いてルシフェラーゼアッセイ等の一過性発現実験で deletion 解析を行い、-332 から -402 の DNA 断片上に転写を上昇させる DNA エlement が存在していることを明らかにした。そしてさらなるアッセイにより -386 から -371 に結合する因子

の存在することを証明してきた (Yoshida T et al, J Dermatol Sci, 2010)。私共はこの因子を COLF2 と名付けた。この因子のコンセンサスな結合配列の予想を Genomatix Matinspector (Cartharius K et al: Bioinformatics 21:2933-2942, 2005) で検索した結果、相同性の高い因子はなく、COLF2 が新奇の因子である可能性が高い。

まず種々の substitution mutation を加えた断片を用いた Gel mobility shift assay で competition assay などにより結合する配列を明確にする。次いでヒト真皮線維芽細胞を大量培養し lysate を作成する。合成オリゴ DNA を用いた DNA アフィニティークロマトグラフィーでまず部分精製する。次年度は高速液体クロマトグラフィー、逆相液体クロマトグラフィーなどを用いてさらに精製する。次々年度はまず精製した蛋白のペプチドシーケンスを行い、それを用いて cDNA クローニングを行う。

I 型コラーゲンに結合して転写を上昇させる因子はマウス  $\alpha 2(I)$  コラーゲンの COLF1 を以前に私共が明らかにしたが、今回私共が明らかにした COLF2 はヒトの特異的コラーゲン転写活性化因子として全身性強皮症の特に治療面でこの蛋白に対する抗体を作成するなど大いに期待される。

### 3. 研究の方法

まず 2010 年に私共が明らかにしたヒト COL1A1 プロモーターに特異的に結合し、その転写を活性化させる因子 COLF2 の結合する正確なシーケンスを種々の competition assay を含む gel mobility shift assay など で明確にする。続いてヒト真皮線維芽細胞を大量培養、0.5% NP-40 を含むバッファーで核を単離、核タンパクを抽出、次にヘパリン・アガロースカラム、DNA-アフィニティークロマトグラフィーで精製、さらに高速液体クロマトグラフィー、逆相液体クロマトグラフィーなどを用いて精製する。なおこの因子のコ

ンセンサスな結合配列を Genomatix Matinspector で検索したところ、相同性の高い因子はなく COLF2 は新奇である可能性が高い。さらに精製した蛋白のペプチドシーケンスを行い、そのデータをもとにヒト cDNA ライブラリーを用いて cDNA クローニングを行う。

### 4. 研究成果

我々はヒト 1 鎖 I 型コラーゲン遺伝子 (COL1A1) プロモーター領域の欠失解析を施行し、転写増強領域に対して DNA 結合因子の解析を行った。ルシフェラーゼアッセイをヒト真皮由来線維芽細胞とヒト COL1A1 プロモーターの -2.3 キロ塩基対 (bp) から +42bp をルシフェラーゼ遺伝子に融合した DNA を基本とし、COL1A1 プロモーターを上流側より徐々に欠失させた変異体を用いて行った。その結果、-402bp までの欠失ではほぼ同レベルであった活性が -332bp までの欠失で著しく低下し、この間に転写増強領域があると考えられた。-402bp から -332bp までの DNA 断片を放射性ラベルし、線維芽細胞の核抽出液を用いてゲルシフトアッセイを行ったところ蛋白の結合を示唆するバンドが認められた。置換変異を加えた DNA 断片による競合アッセイにより蛋白は -386bp ~ -371bp の領域に結合することが判明。ルシフェラーゼアッセイで、その部に置換変異を加えたコンストラクトでは活性の減少がみられ、同領域が転写増強に関与している可能性が示唆された。

### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 13 件)

1. Kono M, Hasegawa-Murakami Y, Sugiura K, Ono M, Toriyama K, Miyake N, Hatamochi A, Kamei Y, Kosho T, Akiyama M: A 45-year-old Woman with Ehlers-Danlos

- Syndrome Caused by Dermatan 4-O-sulfotransferase-1 Deficiency: Implications for Early Ageing. *Acta Derm Venereol. Impress.* DOI : 10.2340/00015555-2390.
2. Mochida K, Amano M, Miyake N, Matsumoto N, Hatamochi A, Kosho T : Dermatan 4-O-sulfotransferase 1-deficient Ehlers-Danlos syndrome complicated by a large subcutaneous hematoma on the back. *J Dermatol. Impress.* DOI : 10.1111/1346-8138.13273.
  3. Nakagawa H, Wada H, Hajiro T, Nagao T, Ogawa E, Hatamochi A, Tanaka T, Nakano Y : Ehlers-Danlos Syndrome Type IV with Bilateral Pneumothorax. *Intern Med.* 54:3181-3184, 2015. DOI:10.2169/internalmedicine.54.4947.
  4. Kojima A, Saga I, Tomio R, Kosho T, Hatamochi A: Aggressive change of a carotid-cavernous fistula in a patient with Ehlers-Danlos syndrome type IV. *Interv Neuroradiol.* 21 : 341-345, 2015. DOI : 10.1177/1591019915582380.
  5. Inokuchi R, Kurata H, Endo K, Kitsuta Y, Nakajima S, Hatamochi A, Yahagi N : Vascular Ehlers-Danlos syndrome without the characteristic facial features: a case report. *Medicine.* 93 : e291, 2014. DOI : 10.1097/MD.0000000000000291.
  6. Hatamochi A, Hamada T, Yoshino M, Hashimoto T : The first Japanese case of the arthrochalasia type of Ehlers-Danlos syndrome with COL1A2 gene mutation. *Gene.* Mar 538 : 199-203, 2014. DOI : 10.1016/j.gene.2014.01.033.
  7. Ikeda H, Aida J, Hatamochi A, Hamasaki Y, Izumiyama-Shimomura N, Nakamura K, Ishikawa N, Poon SS, Fujiwara M, Tomita K, Hiraishi N, Kuroiwa M, Matsuura M, Sanada Y, Kawano Y, Arai T, Takubo K. : Quantitative fluorescence in situ hybridization measurement of telomere length in skin with/without sun exposure or actinic keratosis. *Hum Pathol.* 45 : 473-480, 2014. DOI : 10.1016/j.humpath.2013.10.009.
  8. Hatamochi A, Hamada T, Yoshino M, Hashimoto T: The first Japanese case of the arthrochalasia type of Ehlers-Danlos syndrome with COL1A2 gene mutation. *Gene.* 540 : 199-203, 2014. DOI : 10.1016/j.gene.2014.01.033.
  9. Hayashi S, Utani A, Iwanaga A, Yagi Y, Morisaki H, Morisaki T, Hamasaki Y, Hatamochi A: Co-existence of mutations in the FBN1 gene and the ABCC6 gene in a patient with Marfan syndrome associated with pseudoxanthoma elasticum. *J Dermatol Sci* 72:325-327, 2013. DOI : 10.1016/j.jdermsci.2013.07.007.

10. Shimaoka Y, Hayashi S, Hamasaki Y, Terui K, Hatamochi A : Patient with the vascular type of Ehlers-Danlos Syndrome, with a novel point-mutation in the *COL3A1* gene. *J Dermatol.* 40 : 226-228, 2013. DOI : 10.1111/1346-8138.12057.
  11. Kashizaki F, Hatamochi A, Misumi Y, Sato A, Yamaguchi Y, Ishii M, Shimokawa T, Hida N, Okamoto H : Vascular-type Ehlers-Danlos syndrome caused by a hitherto unknown genetic mutation : a case report. *J Med Case Rep.* 7 : 35, 2013. DOI : 10.1186/1752-1947-7-35.
  12. Kurokawa R, Kim P, Kawamoto T, Matsuda H, Hayashi S, Yamazaki S, Hatamochi A, Mori S, Shimoda M, Kubota K. : Intramedullary and retroperitoneal melanocytic tumor associated with congenital blue nevus and nevus flammeus: an uncommon combination of neurocutaneous melanosis and phacomatosis pigmentovascularis--case report. *Neurol Med Chir.* 53 : 730-734, 2013
  13. 浅井克則, 豊田真吾, 早川航一, 藤本康倫, 岩本文徳, 若山 暁, 金田真理, 籙持 淳, 吉峰俊樹 : 内頸動脈海綿静脈洞瘻で発症し経動脈的コイル塞栓術後に出血性合併症を繰り返した血管型 Ehlers-Danlos 症候群の 1 例. *JNET*, 7 : 94-100, 2013
- [学会発表](計 15 件)
1. 嶋岡 弥生, 林 周次郎, 濱崎 洋一郎, 籙持 淳, 濱田 尚宏, 橋本 隆, 芳野 信, 岸本 洋子, 古庄 知己, 藤岡 文夫 : 当科における多発関節弛緩型 (arthrochalasia type) Ehlers-Danlos 症候群 (EDS) の診断培養皮膚線維芽細胞の産生コラーゲン生化学的解析および遺伝子解析で確定診断された 2 症例. *日本皮膚科学会雑誌* 125 巻 7 号 Page1452, 2015.
  2. 笹田 久美子, 秦 まき, 籙持 淳 : 古典型 Ehlers-Danlos 症候群の 1 例. *日本皮膚科学会雑誌*, 125 巻 5 号 Page1072, 2015.
  3. 東海林 怜, 嶋岡 弥生, 林 周次郎, 濱崎 洋一郎, 籙持 淳, 岸本 洋子, 古庄 知己, 藤岡 文夫 : 椎骨脳底動脈蛇行を伴う arthrochalasia 型 Ehlers-Danlos 症候群の 1 家系. *日本皮膚科学会雑誌* 125 巻 4 号 Page931, 2015.
  4. 權守 隆, 嶋岡 弥生, 濱崎 洋一郎, 籙持 淳, 坏 大輔, 福田 邦明 : 突然の腹腔内出血で発症し急速に死の転帰をとった血管型 Ehlers-Danlos 症候群 (vEDS) の 1 例. *日本皮膚科学会雑誌* 124 巻 14 号 Page3184, 2014.
  5. 籙持 淳 : エーラスダンロス症候群 (EDS) 特にその分類・診断法および新しい型 (DD-EDS) について. *日本皮膚科学会雑誌* 124 巻 14 号 Page3174, 2014.
  6. 飯岡 弘至, 小川 浩平, 福本 隆也, 小林 信彦, 浅田 秀夫, 籙持 淳 : 臨床症状より Ehlers & Danlos syndrome を疑われた 1 例. *皮膚の科学* 13 巻 3 号 Page200, 2014.
  7. 池田 芳紀, 丸山 春子, 古庄 知己, 籙持 淳, 石田 時一 : 分娩中に自然子宮破裂を

- 発症した血管型 Ehlers-Danlos 症候群の一例. 日本周産期・新生児医学会雑誌 50 巻 3 号 Page1088-1094, 2014.
8. 持田 耕介, 天野 正宏, 瀬戸山 充, 古庄 知己, 三宅 紀子, 松本 直通, 簗持 淳: 巨大な背部皮下血腫を主訴とした新型エーラスダンロス症候群(D4ST1-deficient EDS; DD-EDS)の 1 例. 西日本皮膚科 76 巻 3 号 Page295, 2014.
  9. 小池 真美, 成井 諒子, 加志崎 史大, 古庄 知己, 濱崎 洋一郎, 簗持 淳: 親子で診断された血管型 Ehlers-Danlos 症候群(vEDS)の 2 家系. 西日本皮膚科, 76 巻 3 号 Page295, 2014.
  10. 嶋岡 弥生, 小池 真美, 濱崎 洋一郎, 古庄 知己, 福嶋 義光, 三宅 紀子, 松本 直通, 簗持 淳: デルマトン 4-O-硫酸基転移酵素-1(D4ST1)欠損に基づく新型エーラスダンロス症候群(DDEDS)の 1 例. 日本皮膚科学会雑誌, 124 巻 4 号 Page813, 2014.
  11. 長谷川 佳恵, 河野 通浩, 小野 昌史, 鳥山 和宏, 簗持 淳, 古庄 知己, 三宅 紀子, 秋山 真志: デルマトン 4-O-硫酸基転移酵素-1 の欠損による Ehlers-Danlos 症候群(古庄型)の 1 例. 日本皮膚科学会雑誌, 124 巻 4 号 Page812, 2014.
  12. 小池真美, 成井諒子, 加志崎史大, 古庄知己, 嶋岡弥生, 濱崎洋一郎, 簗持淳: 親子で診断された血管型 Ehlers-Danlos 症候群(vEDS)の 2 家系. 第 65 回日本皮膚科学会 西部支部学術大会, 鹿児島, 2013, 11
  13. 小池真美, 成井諒子, 古庄知己 濱崎洋一郎, 簗持 淳: 発端者の遺伝子診断にて症状出現前に遺伝子診断できた血管型 Ehlers-Danlos 症候群(vEDS)の親子例. 第 112 回日本皮膚科学会総会, 横浜, 2013, 6
  14. 小池真美, 成井諒子, 古庄知己, 濱崎洋一郎, 簗持 淳: 血管型 Ehlers-Danlos 症候群(vEDS)の親子例. 第 45 回日本結合組織学会学術大会・マトリックス研究会大会合同学術集会, 和歌山, 2013, 6
  15. 新宅 洋, 岡部百合子, 石橋 哲, 三木一徳, 石川欽也, 横田隆徳, 簗持 淳, 水澤英洋: 椎骨・脳底動脈解離による脳梗塞にて発症した血管型 Ehlers-Danlos 症候群の 30 歳女性例. 第 204 回日本神経学会関東地方会, 東京, 2013, 3
- 〔図書〕(計 1 件)
1. 簗持 淳: Werner 症候群. 日常診療において忘れてはならない皮膚科症候群, 皮膚科臨床アセット 20, 古江増隆, 土田哲也編, pp178-181, 2013 中山書店 東京
6. 研究組織
- (1)研究代表者  
簗持 淳 (HATAMOCHI ATSUSHI)  
獨協医科大学・医学部・教授  
研究者番号: 90172923
  - (2)研究分担者  
( )  
研究者番号:
  - (3)連携研究者  
濱崎洋一郎 (HAMASAKI YOICHIRO)  
獨協医科大学・医学部・准教授  
研究者番号: 10180936  
  
林 周次郎 (HAYASHII SHUJIRO)  
獨協医科大学・医学部・准教授  
研究者番号: 10180936