

Title	A single MEF-2 site Is a Major Positive Regulatory Element Required for Transcription of the Muscle-Specific Subunit of the Human Phosphoglycerate Mutase Gene in Skeletal and Cardiac Muscle Cells
Author(s)	Nakatsuji, Yuji
Citation	
Issue Date	
Text Version	ETD
URL	https://doi.org/10.11501/3065817
DOI	10.11501/3065817
rights	
Note	

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

氏名	中 辻 裕 司
博士の専攻分野の名称	博 士 (医 学)
学位記番号	第 1 0 6 4 6 号
学位授与年月日	平成 5 年 3 月 25 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当 医学研究科社会系専攻
学位論文名	A single MEF-2 site is a major positive regulatory element required for transcription of the muscle-specific subunit of the human phosphoglycerate mutase gene in skeletal and cardiac muscle cells (ヒト筋型ホスホグリセレートムターゼの骨格筋, 心筋特異的発現は MEF-2 site によって調節されている)
論文審査委員	(主査) 教 授 大河内寿一 (副査) 教 授 岸本 忠三 教 授 柳原 武彦

論 文 内 容 の 要 旨

(目 的)

細胞の増殖・分化に関する機構解明において、その対象として筋細胞が広く用いられてきた。そして 1987 年に筋分化の制御遺伝子である MyoD が発見されて以来、転写レベルにおける筋細胞分化の研究は飛躍的に進んできた。本研究では、先にクローニングされたヒト解糖系酵素ホスホグリセレートムターゼ筋型 (PGAM-M) 遺伝子を用い、その筋特異的かつ分化段階特異的遺伝子発現機構の解明を目的とした。

(方法ならびに成績)

方法：PGAM-M 遺伝子の調節領域を含むと考えられる 5' 上流領域をクロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ (CAT) 遺伝子の 5' 上流領域に挿入した PGAM-M-CAT を構築し、5' 上流領域を -3.3kbp (-3.3kCAT) より -72bp (-72CAT) までの種々の長さで削除し、さらにそのいくつかには置換変異を起こさせた。これら種々の PGAM-M-CAT をマウス骨格筋細胞 C2C12、線維芽細胞 C3H10T 1/2、ラット心筋細胞 (E18) にリポゾームを用いて遺伝子導入し、CAT 活性を測定することにより、PGAM-M 遺伝子の転写活性を検討した。また、各々の細胞より核蛋白を抽出し、electrophoretic mobility shift assay (EMSA) で DNA との結合性を調べた。

成績：(1) 骨格筋細胞への遺伝子導入 —— 種々の長さの 5' 上流領域を持つ PGAM-M-CAT を C2C12 筋芽細胞にトランスフェクトしたが、有意な CAT 活性は認められなかった。しかし筋管細胞に分化させた後トランスフェクトすると CAT 活性は増大し、-165 CAT で最大の活性を持ち、-141 CAT との間で有意な差を認めた。既知の調節エレメントとして -160bp に MEF-2 (muscle-specific enhancer factor 2) site、-90bp と -60bp に E-box が存在するため、この部位に各々変異を起こした -165mutMEFCAT、-165mutE 2 CAT、-165mutE 3 CAT を作製し、遺伝子導入した。E-box に変異を起こしても CAT 活性は変化しないが、MEF-2 site を変異させた時のみ活性が低下した。以上より、PGAM-M は筋芽細胞では転写されず、筋管細胞に分化すると転写され、これには MyoD ではなく MEF-2 が関与していることが示唆された。

(2) 非骨格筋細胞への遺伝子導入 —— C2C12 と同様に一連の PGAM-M-CAT を線維芽細胞 C3H10T 1/2 にトランスフェクトしたが、有意な CAT 活性は得られなかった。しかし MyoD 発現ベクターと一緒にトランスフェクトすると活性は増大した。その活性は E-box に変異を起こしても活性は変化せず、MEF-2 site を変異させた場合のみ低下した。これは筋管細胞にトランスフェクトした時と同じパターンであった。これより PGAM-M は非筋細胞では発現

せず、MyoDを強制発現させるとそれによって誘導されたと考えられるMEF-2によって調節されていることが示唆された。

(3) 心筋細胞への遺伝子導入 —— PGAM-Mは心筋にも発現していることから、心筋細胞にも同様の実験を行った。するとMyoDが発現していないとされる心筋においてもCAT活性は増大し、MEF-2が重要な働きをしている事がわかった。また、-505CATの活性は-165CATの約4分の1であり、-505bpと-165bpの間に負の調節エレメントが存在することが示唆された。

(4) EMSA —— CAT活性の結果重要であると考えられたMEF-2 siteをプローブとし、C2C12、C3H10T1/2、心筋の核蛋白を用いEMSAを行った。C2C12筋芽細胞の場合、特異的なバンドは認められなかったが、筋管細胞では認められ、非ラジオアイソトープ標識PGAM-MのMEF-2 site及び変異させたMEF-2 site、マウスのmuscle creatine kinaseのMEF-2 siteとの競合実験からPGAM-MのMEF-2 siteはMEF-2と特異的に結合することを示した。C3H10T1/2の場合、特異的なバンドは認められないが、MyoDを強制発現させた核蛋白中には、MEF-2が出現していることがわかった。また、心筋細胞の核蛋白中にもMEF-2の発現が認められた。

(総括)

多くの筋特異的遺伝子はMyoDによって直接調節されているが、PGAM-Mは筋管細胞特異的に発現し、これはMyoDによって誘導されるMEF-2によって調節を受けていることがわかった。また、MyoD familyの存在しないと考えられている心筋細胞においてもMEF-2が重要な働きをしており、さらに心筋特異的な負の調節領域の存在も示唆された。心筋においてMEF-2がどのようにして誘導されるかについては今後解明されるべき問題であると思われる。MyoD直接ではなく1つのMEF-2 siteによって骨格筋及び心筋特異的に発現する遺伝子について初めて報告した。

論文審査の結果の要旨

筋特異的遺伝子の発現調節は複雑な転写因子結合部位の組み合わせによって規定されており、その多くにMyoDが直接関与することが明らかにされてきた。本研究ではMyoDが直接関与するのではなく、MEF-2がMyoDによって誘導され、その誘導されたMEF-2によって筋型ホスホグリセレートムターゼ遺伝子(PGAM-M)の骨格筋における転写が主に調節されていることを証明した。また、心筋にはMyoD familyは存在しないとされているが、その心筋においても骨格筋の場合と同様に1つのMEF-2 siteによって正の転写調節を受けていることを示した。従来1つのMEF-2 siteではenhancer活性はほとんど認められないとされてきたが、1つのMEF-2 siteでも十分にenhancer活性を持つことを示した。また、骨格筋と心筋において同じsiteで制御されている遺伝子として報告されたのはこれが初めての報告である。以上の成績は筋分化における転写調節機構に新たな知見を加えたものである。