



Title	カルデスモンの構造、機能および発現機構に関する研究
Author(s)	林, 謙一郎
Citation	大阪大学, 1993, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/38530
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉 大阪大学の博士論文について 〈/a〉 をご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

氏 名 ^{はやし}林 ^{けん}謙 ^{いち}一 ^{ろう}郎

博士の専攻分野の名称 博 士 (医 学)

学 位 記 番 号 第 1 1 0 0 8 号

学 位 授 与 年 月 日 平 成 5 年 12 月 15 日

学 位 授 与 の 要 件 学 位 規 則 第 4 条 第 2 項 該 当

学 位 論 文 名 カルデスモンの構造, 機能および発現機構に関する研究

論 文 審 査 委 員 (主査)
教 授 祖 父 江 憲 治

(副査)
教 授 谷 口 直 之 教 授 辻 本 賀 英

論 文 内 容 の 要 旨

〔目 的〕

カルデスモン (CaD) は骨格筋, 心筋を除くすべての組織や細胞に分布しており, 分子量により二種類に分類される。SDS-PAGE での分子量120-150kDa ものを高分子型 (high *Mr* CaD : *h*-CaD), 70-80kDa のものを低分子型 (low *Mr* CaD : *l*-CaD) と呼び, 前者は平滑筋に後者は非筋組織または細胞においてそれぞれ優先的に発現している。両 CaD とともに, カルモデュリン (CaM), アクチン, およびトロポミオシン (TM) 結合能を有し, アクトミオシン ATPase 活性を阻害する。この阻害は Ca^{2+}/CaM 依存性に解除される。以上のことから, CaD は平滑筋および非筋組織の Ca^{2+} 依存性アクチン-ミオシン相互作用をアクチン側で制御している蛋白質であると考えられている。また, CaD は平滑筋細胞の分化に伴い *l*-CaD から *h*-CaD へ現象変換を起こす。この現象は平滑筋細胞分化を示す最良の指標になっている。

本研究は cDNA クローニングにより, *h*- および *l*-CaD の構造と機能の相関について解析し, さらに, CaD 異性体の発現変換機構の解析のために, CaD 遺伝子構造を明らかにすることを目的とする。

〔方法ならびに成績〕

ニワトリ砂囊平滑筋由来の cDNA ライブラリーを抗 *h*-CaD 抗体を用いた免疫スクリーニングを行ない, 得られたクローンの塩基配列を決定した。この結果, *h*-CaD は771アミノ酸から構成され, 分子量は88,734と計算された。*h*-CaD の中間部にグルタミン酸に富んだ配列が10回繰り返して存在し, α -キモトリプシンの限定分解によって得られるカルボキシ末端側35kDa ドメインの中間部にトロポニン T のトロポミオシン結合部位 (T1および T2ドメイン) と相同性の高い領域が存在する。*h*-CaD cDNA を発現させると SDS-PAGE 上で天然型 *h*-CaD と同じ移動度 (150kDa) を示した。このように分子量の値が矛盾するのは *h*-CaD がグルタミン酸に富んだ蛋白質であることに起因すると考えられる。さらに, ニワトリ脳由来の cDNA ライブラリーをスクリーニングし, *l*-CaD cDNA クローンを得た。*l*-CaD は517アミノ酸からなり, 計算上の分子量は58,844であった。*l*-CaD のアミノ末端16アミノ酸配列は *h*-CaD と異なり, *h*-CaD の中間部に存在する繰り返し配列は欠失している。さらに *l*-CaD では508番目にアラニ

ンの挿入が認められたが、これら以外、両者の構造は全く相同であった。一連の truncated cDNA を大腸菌で発現させた組み換え体蛋白質群の機能を解析した結果、CaM、アクチンおよび TM 結合能を有し、アクチン相互作用の Ca^{2+} 制御に関与する最小機能領域は35kDa ドメインのカルボキシル末端側の両 CaD に共通する約50アミノ酸からなる領域に局限することが判明した。

ヒト型 CaD の cDNA クローニングを行った結果、HeLa 細胞では、二種類の *l*-CaD (*l*-CaD I と *l*-CaD II) が発現していた。*l*-CaD I は558アミノ酸から構成されるが、*l*-CaD II では *l*-CaD I の中間部に存在する26アミノ酸が欠失している。この両 *l*-CaD のアミノ末端の配列はヒト繊維芽細胞 (WI-38) の *l*-CaD II または動脈平滑筋の *h*-CaD の配列と異なっている。種々のヒト培養細胞で発現している *l*-CaD 異性体を reverse transcription-PCR を用いて調べたところ、ヒト型 *l*-CaD はアミノ末端配列により、HeLa 型と WI-38型の二種類に分類され、さらに挿入配列を配列をもつ *l*-CaD I とそれを持たない *l*-CaD II に細分された。いずれの細胞においても優先的に発現しているのは *l*-CaD II で *l*-CaD I の発現量は少ない。ヒト CaD 遺伝子の構造決定のためヒトゲノムライブラリーをスクリーニングし、得られたクローンの塩基配列を解析した。さらに、CaD 遺伝子の染色体上での局在場所を決定した。この結果、ヒト CaD 遺伝子は少なくとも14個のエクソンから構成され、7q33-q34の単一箇所にマップされた。HeLa 型または WI-38型に特異的なアミノ末端配列は、それぞれ独立したエクソン (エクソン1とエクソン1') にコードされる。エクソン3は、*h*-CaD に特徴的な繰り返し構造と全ての CaD 異性体に共通な配列を単一エクソン内にコードし、その境界には5'-splice siteが存在するというユニークな構造をとる。すなわち、エクソン3には二箇所5'-splice siteが存在し、その選択のされ方によって *h*- または *l*-CaD の発現が決定される。*l*-CaD I に特徴的な26アミノ酸の挿入配列はエクソン4にコードされ、*h*-CaD 及び *l*-CaD I の mRNA にのみスプライスされる。

[総括]

Ca^{2+} によるアクチン系制御に直接関与するのは CaD のカルボキシル末端側の約50アミノ酸から成る領域で、ニワトリ及びヒト由来の CaD のこの領域間での相同性は、89%と非常に高い。また、トロポニン T の T1ドメインと高い相同性を示す領域間の相同性も高い (85%)。このように CaD の機能領域及び構造上特徴的な領域は種を越えて保存されている。

CaD 異性体は、単一遺伝子からの転写物が alternative splicing を受けることにより発現調節されている。特に、平滑筋細胞分化に伴う *l*-CaD から *h*-CaD への発現変換は、エクソン3内の二箇所の5'-splice site の認識機構の変換によることが判明した。このユニークな splicing 機構の解析は、その上流域にあたる平滑筋細胞の分化誘導メカニズムの解明に結びつくものとして期待される。

論文審査の結果の要旨

カルデスモン (CaD) は平滑筋および非筋組織の Ca^{2+} 依存性アクチン-ミオシン相互作用を制御している蛋白質で高分子型 (*h*-CaD) と低分子型カルデスモン (*l*-CaD) に分類される。*h*-CaD は平滑筋細胞で優先的に発現しているのに対し *l*-CaD は非筋組織および細胞で発現している。平滑筋細胞の形質転換に伴い *h*-CaD と *l*-CaD の間で発現変化を起こす。本研究は cDNA クローニングにより、ニワトリまたはヒト由来の *h*-および *l*-CaD の構造を明らかにし、さらに機能ドメインのマッピングを行ない CaD の Ca^{2+} 制御に関与する最小限機能領域を同定した。また、CaD 遺伝子構造の解析を行ない平滑筋細胞の形質転換と関連した *h*-および *l*-CaD の発現制御が1つのエクソン内で起こるユニークな splicing 機構によることを見出した。さらに CaD 遺伝子の染色体上での局在場所が第7染色体の長腕 (7q33-p34) であることを明らかにした。これらの知見は細胞生物学上有意義なものであり、本論文は博士の学位に値する。