

Title	Common structural and expressional properties of vertebrate caldesmon genes
Author(s)	春名, 優樹
Citation	
Issue Date	
oaire:version	
URL	https://hdl.handle.net/11094/38962
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、 https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed 大阪大学の博士論文について https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed をご参照ください。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

Osaka University

氏名	はるなまさき 春 名 優 樹
博士の専攻分野の名称	博 士 (医 学)
学位記番号	第 1 1 3 1 9 号
学位授与年月日	平成6年3月25日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 医学研究科外科系専攻
学位論文名	Common structural and expressional properties of vertebrate caldesmon genes (カルデスモン遺伝子の構造と発現制御機構)
論文審査委員	(主査) 教授 吉矢 生人 (副査) 教授 祖父江憲治 教授 米田 悦啓

論文内容の要旨

【目的】

カルデスモン (CaD) は平滑筋及び非筋肉組織におけるアクト・ミオシン系のアクチン側制御因子で, SDS-PAGE により, 高分子量型の *h*-CaD と低分子量型の *l*-CaD の2つの isoform に分けられる。2つの isoform の組織分布は異なり, *h*-CaD は主に平滑筋組織で, *l*-CaD は主に非筋肉組織で発現している。また平滑筋における *h*-CaD の発現量は非筋肉組織における *l*-CaD の発現量の数十倍以上となっている。更に平滑筋の分化に伴って, *l*-CaD から *h*-CaD へと発現変換が認められ, 平滑筋細胞の synthetic phase から contractile phase への形質変換の最良の分子 marker となっている。これまで, CaD 遺伝子はヒトにおいて部分的に構造解析がなされ, *h*- と *l*-CaD の発現制御がエクソン3に存在する2つの5'スプライス・サイトの選択によることが明らかとなっている。しかしながらプロモーターの構造及び5' noncoding 配列の構造は明らかになっていなかった。今回私は, 平滑筋の分化のメカニズムを解明する第一歩としてニワトリ CaD 遺伝子の全構造及びプロモーター領域の解析をおこなった。

【方法ならびに成績】

λ DASH II を用いて chicken genomic library を構築した。まず, *h*-CaD cDNA をプローベとしてスクリーニングし, 3つの overlapping clones (λ 12, λ 1, λ 9) を得た。次に, 砂のう型及び脳型の5' noncoding 配列/アミノ末端配列の antisense primer を用いて cassette primer-linked PCR を行い, 増幅した DNA 断片をプローベとして genomic library をスクリーニングし, λ G102, λ G211, λ B11 の3つのクローンを得た。これら3つのクローン間及び他の3つのクローン (λ 12, λ 1, λ 9) との間に overlap はなかった。各クローンはサザンブロットによりエクソンを含む DNA フラグメントを同定し, サブクローニングを行った後, ダイデオキシ法により DNA 配列を決定した。λ 12, λ 1, λ 9 には砂のう型及び脳型 CaD に共通のエクソン (エクソン2-14) がコードされていた。λ G102 には砂のう型5' noncoding 配列の一部, λ G211 には砂のう型5' noncoding/アミノ末端配列, λ B11 には脳型5' noncoding/アミノ末端配列がコードされていた。λ G102, λ G211, λ B11, λ 12 の間に overlap がなかったのでニワトリ CaD 遺伝子が single gene か multiple copy genes かを決定するため pulsed field electrophoresis を導入した。この結果ニワトリカルデスモン遺伝子は17のエクソンからなる single gene であることがわかった。λ G102, λ G211, λ B11 の位置関係を定めるため, λ G102 の一部, λ B11 の一部, 及び共通のエクソン2の一部をプローベとして normal genomic Southern blot を行った。この結果, λ G102, λ G211, λ B11, λ 12 の順に5'から3'へと並んでい

ることが明らかとなった。エクソン3には、1つのエクソン内に2つの5' スプライス・サイトが存在した。*h*-CaD と *l*-CaD の発現変換はこの2つの5' スプライス・サイトの選択によって決まり、上流のサイトを選択すると *l*-CaD が、下流のサイトを選択すると *h*-CaD が発現することがわかった。この構造はヒトの場合と同一で、*h*- と *l*-CaD の発現制御は種を越えた共通の機構によることが判明した。エクソン14には近接して2つの3' スプライス・サイトが存在した。砂のう型 CaD では下流のサイトが、脳型 CaD では上流のサイトが選択される。このことにより脳型 CaD にみられる Ala-508 の付加が生ずることが明らかになった。次に転写開始点を決定するために砂のう型 5' noncoding 配列及び脳型 5' noncoding 配列の antisense primer を用いて primer extension 法を行い、両者の転写開始点が異なっていることを見出した。砂のう型 CaD の転写開始点の上流30 base pairs (bp) に、また脳型 CaD の転写開始点の上流20 bp に TATA box が存在した。砂のう型及び脳型 5' 上流域がプロモーター活性を持つことを確かめるため CAT アッセイを行った。砂のう型の転写開始点上流600 bp を CAT 遺伝子の上流に組み込んだ pucGP1CAT 及び脳型の転写開始点上流800bp を CAT 遺伝子の上流に組み込んだ pucBP1CAT を構築し、*l*-CaD 及び *h*-CaD の両者を発現している chick embryo fibroblast (CEF) にリン酸カルシウム法でトランスフェクトし、CAT 活性を測定した。この結果、両5' 上流域ともにプロモーター活性を有し、砂のう型プロモーターが脳型よりもはるかに強力な活性を示すことが明らかになった。

【総括】

ニワトリ CaD 遺伝子のすべてのエクソン配列を決定した。CaD 遺伝子は17ケのエクソンよりなる100 - 150 kbp の single gene にコードされていた。プロモーターは砂のう型、脳型の2種類あり、砂のう型 CaD、脳型 CaD はそれぞれのプロモーターより別々に転写される。*h*-及び *l*-CaD の発現変換はエクソン3に存在する2つの5' スプライス・サイトの選択の違いにより制御されていた。これはヒトの場合と同一で種を越えて保存された機構であった。エクソン14には近接して2つの3' スプライス・サイトが存在し、砂のう型 CaD では下流のサイトを、脳型 CaD では上流のサイトを選択する。これにより脳型 CaD に Ala-508 の付加が生ずることが明らかになった。

論文審査の結果の要旨

カルデスモンは平滑筋および非筋肉組織のアクチン・ミオシン系のアクチン側制御因子で、筋収縮・細胞運動・細胞質分裂などの調節に重要な役割を果たしていると考えられている。また平滑筋の synthetic phase から contractile phase への形質転換の最良の分子マーカーでもある。本研究はニワトリ・カルデスモン遺伝子 (CaD 遺伝子) の全構造を解明し、そのプロモーター領域を解析したものである。その結果、CaD 遺伝子は17エクソンよりなる single gene にコードされていることがわかった。プロモーターは砂囊型、脳型の2種類あり、砂囊型 CaD、脳型 CaD はそれぞれ別のプロモーターより転写されることが明らかになった。*h*-及び *l*-CaD の発現変換はエクソン3に存在する2つの5' スプライス・サイトの選択の違いにより制御されていた。これはヒトの場合と同一で種を越えて保存された機構であった。エクソン14には近接して2つの3' スプライス・サイトが存在した。このサイトの選択の違いにより脳型 CaD に Ala-508 の付加が生ずることが明らかになった。これらの結果は平滑筋特異的スプライシング及び平滑筋で特に強力なプロモーター活性を示すメカニズムを解明する端緒となり、ひいては平滑筋分化のメカニズムの解明に役立つものと考えられ、博士の学位に値するものと認められる。