



Title	Differential expression of an acidic domain in the amino-terminal propeptide of mouse pro- $\alpha$ 2 (XI) collagen by complex alternative splicing
Author(s)	妻木, 範行
Citation	大阪大学, 1996, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/39837">https://hdl.handle.net/11094/39837</a>
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">＜a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"&gt;https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed</a> >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	妻 木 範 行
博士の専攻分野の名称	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	第 1 2 4 1 9 号
学 位 授 与 年 月 日	平成 8 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	Differential expression of an acidic domain in the amino-terminal propeptide of mouse pro- $\alpha 2$ (XI) collagen by complex alternative splicing (マウスXI型コラーゲン $\alpha 2$ 鎖遺伝子のクローニングと組織特異的発現の解析)
論 文 審 査 委 員	(主査) 教 授 越智 隆弘  (副査) 教 授 吉川 邦彦    教 授 高井 義美

### 論 文 内 容 の 要 旨

#### 【目的】

XI型コラーゲン $\alpha 2$ 鎖( $\alpha 2$  (XI))は軟骨に多く存在し、 $\alpha 1$ 、 $\alpha 3$ 鎖とヘテロトライマーを形成してII型コラーゲンとともに軟骨コラーゲン細線維を構成する。 $\alpha 2$  (XI)鎖は発生過程における骨格の形態形成に必須の蛋白であり、その機能としてN-プロペプチド領域が細線維の径の調節に深く関与することが示唆されている。そこで本研究ではマウス $\alpha 2$  (XI)鎖遺伝子の全領域をクローニングしてN-プロペプチド領域の複雑な構造を明らかにした。さらに $\alpha 2$  (XI)鎖遺伝子の各組織での発現と、肢芽の軟骨分化過程における発現を検討するとともに、発現制御機構の一端を明らかにするためにこの遺伝子の調節領域の活性を解析した。

#### 【方法と成績】

##### 1) $\alpha 2$ (XI) N-プロペプチド領域の構造解析

ヒト $\alpha 2$  (XI)鎖cDNAをプローブとしてマウス genomic library をスクリーニングし、マウス $\alpha 2$  (XI)鎖遺伝子を完全に含む総計40kbに亘る genomic クローンを得た。更に生直後のマウス胸郭より抽出した mRNA を用いて5'-RACE法を行い、 $\alpha 2$  (XI) N-プロペプチド領域をコードする cDNA クローンを得た。これら genomic クローンと cDNA クローンの塩基配列を決定・比較することにより、 $\alpha 2$  (XI) N-プロペプチドの構造は14個のエクソンによってコードされ、推定されるアミノ酸配列から、basic domain, acidic domain, N-terminal triple-helical domain より成ることが明らかとなった。次にRT-PCR法を用いて各組織における $\alpha 2$  (XI)遺伝子の発現を調べたところ、N-プロペプチドのうち acidic domain をコードするエクソン番号が6, 7, 8の3個のエクソンは複雑な alternative splicing を受けており、組織によって発現パターンが異なっていた。即ち軟骨において $\alpha 2$  (XI)鎖の mRNA は最も多く認められたが、その転写産物はこれら3個のエクソンを全く含んでおらず、その結果N-プロペプチドは短く塩基性となる。一方非軟骨組織では、これら3つのエクソンが様々な組み合わせで発現していた。肢芽の発生過程における検討では、軟骨の分化とともにエクソン6, 7, 8を欠損する最も短いフォームの mRNA の相対的な発現量が著明に増加するのに対し、エクソン6, 7, 8のいずれかを含み他のマイナーなスプライスバリエントは明らかな軟骨発生が起こる以前に主に発現していた。

##### 2) $\alpha 2$ (XI) 遺伝子の転写制御領域の解析

本研究で得た genomic クローンは、塩基配列を決定した結果 $\alpha 2$  (XI)鎖遺伝子の5'-flanking 領域を完全に含

んでおり、転写開始位置の742bp上流に retinoid X receptor  $\beta$  遺伝子がコードされていることが明らかになった。この742bpには種々の調節配列が含まれることから、プロモーター活性はこの中に存在すると考えた。そこで  $\alpha 2$  (XI) 鎖遺伝子の軟骨特異的発現に関与する領域を特定するために、プロモーター領域及び第1イントロンを含む種々の組換えDNAを作製し、これらに reporter gene として大腸菌  $\beta$ -galactosidase 遺伝子を結合したDNAコンストラクトを導入したトランスジェニックマウスを作製した。各発生段階における reporter gene の発現を解析した結果、742bpの全プロモーターと第1イントロンを含むコンストラクトは四肢と体幹のほぼ全ての軟骨組織及び、脊索と椎間板髄核に reporter gene を特異的に発現できることが明らかになった。

#### 【総括】

本研究で明らかになった複雑な alternative splicing は酸性アミノ酸の含量が大幅に変化することで、 $\alpha 2$  (XI) N-プロペプチドの長さのみならず化学的性質にも多様性を与えるものである。この幾通りにも及ぶN-プロペプチドの多様な構造が、生体内で組織特異的・ステージ特異的に調節されることが、軟骨コラーゲン細線維の形成における制御機構の一つとして働いていると考えられた。またトランスジェニックマウスを用いた転写制御領域の解析により、 $\alpha 2$  (XI) 鎖遺伝子を軟骨組織で発現させるために必要な情報は、プロモーター領域と第1イントロンに存在することが示された。

### 論文審査の結果の要旨

XI型コラーゲンはII型コラーゲンとともに軟骨コラーゲン細線維を構成しており、その機能としてN-プロペプチド領域が細線維の径の調節に深く関与することが示唆されてきた。本研究ではXI型コラーゲン分子のサブユニットの一つであるXI型コラーゲン $\alpha 2$ 鎖( $\alpha 2$  (XI)) 遺伝子を初めてクローニングし、その一次構造を明らかにした。さらにはN-プロペプチド領域をコードするcDNAもクローニングし、この中のacidic domainが複雑な alternative splicing をうけることを明らかにした。即ち、 $\alpha 2$  (XI) N-プロペプチドは14個のエクソンによってコードされており、このうちエクソン6, 7, 8は組織特異的な splicing を受けることを示したのである。また肢芽の発生過程における splicing の検討も行い、軟骨の分化とともにエクソン6, 7, 8を欠損する最も短いフォームの mRNA の相対的な発現量が著明に増加することを示した。これらの結果は、従来より言われている軟骨コラーゲン細線維形成の調節に、新たなメカニズムが存在する可能性を示唆するものである。軟骨細胞外マトリックスを支えるコラーゲン細線維の構成成分である $\alpha 2$  (XI) 鎖の構造を明らかにし、その発現パターンに新たな知見を与えたという点で有意義な研究であり、学位に値すると思う。