

Title	心筋小胞体カルシウム遊離チャンネル遺伝子の5' 上流調節領域の単離とその発現調節機構の検討
Author(s)	西田, 和彦
Citation	
Issue Date	
Text Version	none
URL	<a href="http://hdl.handle.net/11094/39883">http://hdl.handle.net/11094/39883</a>
DOI	
rights	
Note	

*Osaka University Knowledge Archive : OUKA*

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

氏 名	にし だ かず ひこ 西 田 和 彦
博士の専攻分野の名称	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	第 1 2 4 1 0 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 医学研究科内科系専攻
学 位 論 文 名	心筋小胞体カルシウム遊離チャネル遺伝子の5'上流調節領域の単離とその発現調節機構の検討
論 文 審 査 委 員	(主査) 教 授 多 田 道 彦  (副査) 教 授 岡 本 光 弘 教 授 辻 本 賀 英

### 論 文 内 容 の 要 旨

#### 【目的】

心筋小胞体カルシウム (Ca) 遊離チャネル (ryanodine receptor 2 = R Y R 2) は興奮収縮連関に重要な役割を果たしている。心筋では活動電位により筋形質膜の Ca チャネルが開き、細胞外から流入した少量の Ca が刺激となり、筋小胞体 Ca 遊離チャネルから多量の Ca が遊離する。この遊離した Ca がトロポニンCと結合することにより筋収縮が始まる。このメカニズムは心筋特異的であり Ca 誘発性 Ca 遊離と呼ばれる。筋小胞体 Ca 遊離チャネルには3つのアイソフォームの存在が明らかになっている。心筋型である R Y R 2 遺伝子は主に心筋、脳などで発現するが、骨格筋では発現しない。R Y R 2 遺伝子の mRNA は発生段階で増加し、また肥大心や不全心でもその発現量は変化しているなど、R Y R 2 遺伝子発現は転写レベルで調節されている。そこで、本研究では R Y R 2 遺伝子の5'調節領域の単離および発現調節機構の解明を試みた。

#### 【方法】

ウサギ R Y R 2 cDNA の5'端をプローブに用い、ウサギゲノムライブラリーからクローンを単離し、5'上流調節領域を含むと考えられる領域を pBluescript ベクターにサブクローニングし、その塩基配列を決定した。転写開始部位を primer extension 法を用いて決定した。5'上流調節領域を上流から順次欠失させ、各々をプロモーターもエンハンサーも持たないルシフェラーゼ遺伝子発現ベクターに順方向に挿入した。これらを新生仔ラットから単離した心筋細胞へ導入し、発現するルシフェラーゼ活性の測定にて転写活性を評価した。ゲルシフト法により正の調節領域や基本転写領域を検討した。心筋細胞からの核蛋白質の抽出は成熟ラット心臓から行った。正の調節領域および基本転写領域の GC ボックスに対して Kunkel 法または PCR 法により点変異を導入したコンストラクトを作製し、それらの転写活性を検討することで転写に関わる領域を同定した。5'上流調節領域を上流から順次欠失させたコンストラクトを骨格筋由来の cell line (C<sub>2</sub>C<sub>12</sub>) に導入し、それらの転写活性を測定し、心筋細胞における転写活性と比較検討した。

#### 【結果】

ウサギゲノムライブラリーより単離した18.2kbのクローンにおいて、5'上流調節領域を含む3.8kbのDNA断片をサブクローニングし、その塩基配列を決定した。転写開始部位は翻訳開始部位の上流335bpにあり、共通開始配列と高いホモロジーを示した。基本転写領域に T A T A ボックスは存在せず、3つの重複した GC ボックスが存在した。

5'上流調節領域の転写活性の検討において、5'端を-90まで欠失させたコンストラクトで、転写活性は最高値を示したが、-69まで欠失させたコンストラクトには転写活性はなかった。この結果より、-90~-69の間に正の調節領域が存在すると考えられた。ゲルシフト法により、-90~-70領域に結合する核蛋白質が存在した。同領域にはAP2結合部位配列が存在するが、核蛋白質との結合においてAP2コンセンサスオリゴヌクレオチドと競合しなかった。またこの部位に変異を導入しても、それらの転写活性には変化がなかった。このことより、-90~-70領域に結合する核蛋白質はAP2ではないと考えられた。-89~-84領域と-74~-66領域に変異を導入することにより転写活性が低下したことから2つの正の調節領域(RYR2P1, RYR2P2)の存在が示唆された。

ゲルシフト法で3つの重複したGCボックスが存在する領域にSp1が結合した。3'側のGCボックスの変異の導入で、転写活性が低下した。これらと-69まで欠失させたコンストラクトはGCボックスを持つが、転写活性を示さなかったことより、GCボックスはそれのみでは転写装置として不十分だが、転写調節に重要であるとわかった。

5'上流調節領域を上流から順次欠失させたコンストラクトを同様に(C<sub>2</sub>C<sub>12</sub>)に導入した検討より、RYR2遺伝子の正の調節領域は心筋特異的ではないことがわかった。また、骨格筋細胞には-209~-90の間にRYR2遺伝子を発現させない転写因子の存在が示唆された。

#### 【総括】

RYR2遺伝子の5'上流調節領域を解析した。基本転写領域にはTATAボックスやCAATボックスは存在せず、3つの重複したGCボックスが存在した。RYR2遺伝子は、GCボックスに結合するSp1とその上流に存在する正の調節領域(RYR2P1, RYR2P2)に結合する転写因子によって調節されていると考えられた。RYR2遺伝子を骨格筋で発現させない負の調節領域が-209~-90の間に存在すると考えられた。

### 論文審査の結果の要旨

心筋小胞体カルシウム遊離チャンネルは興奮収縮連関に重要な役割を果たしている。心筋小胞体カルシウム遊離チャンネル遺伝子発現は転写レベルで調節されているが、その分子メカニズムは明らかでない。そこで、本研究では心筋小胞体カルシウム遊離チャンネル遺伝子の5'上流調節領域を単離し、その発現調節機構を検討した。

本研究から、基本転写領域にはTATAボックスやCAATボックスは存在せず、3つの重複したGCボックスが存在し、3'側のGCボックスが機能的な役割を果たしていること、その転写活性はGCボックス及びGCボックスのごく上流に存在する2つの正の調節領域により調節されていることが明らかになった。これらの正の調節領域の配列は報告されている転写因子の結合配列とホモロジーを示さなかった。また、心筋小胞体カルシウム遊離チャンネルを骨格筋細胞で発現させない負の調節領域の存在が示唆された。

本研究は、心筋小胞体カルシウム遊離チャンネル遺伝子のプロモーター領域を明らかにするとともにその調節因子が従来報告されていない新しい転写因子である可能性を示したこと、この遺伝子の組織特異的発現の機構を解明しつつあることなど、学位論文に値するものと認められる。