



Title	Molecular Cloning of Bovine Chondromodulin-II cDNA and Its Functional Expression
Author(s)	高橋, 和展
Citation	大阪大学, 1996, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/40361
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、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

氏 名	高 橋 和 展
博士の専攻分野の名称	博 士 (学 術)
学 位 記 番 号	第 1 2 6 0 4 号
学 位 授 与 年 月 日	平 成 8 年 4 月 2 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	Molecular Cloning of Bovine Chondromodulin-II cDNA and Its Functional Expression (ウシ Chondromodulin-II cDNA の分子クローニングとその機能的発現)
論 文 審 査 委 員	(主査) 教 授 鈴木不二男 (副査) 教 授 浜田 茂幸 講 師 岩本 容泰 講 師 井上 博之

論 文 内 容 の 要 旨

[目 的]

哺乳動物では、胎生期における長管骨の形成は、内軟骨性骨化によってもたらされる。まず、未分化間充織細胞の分化によって軟骨性の骨原基が形成され、軟骨細胞の旺盛な増殖と分化成熟によって骨原基は急速に成長する。さらに、骨原基の中央部周囲が膜性骨化により骨化を開始すると同時に、内部の軟骨細胞は肥大化し、やがて骨原基の中心部が石灰化する。石灰化軟骨に血管が侵入して、軟骨性骨原基は骨組織に置換される。近年、これら一連の過程が種々のホルモンや成長因子によって巧みに制御されている事が明らかとなってきた。最近、開らは、ウシ胎仔軟骨組織に新規な軟骨細胞増殖制御因子 Chondromodulin-I (ChM-I) を見出し、全一次構造の決定に成功した。一方、ウシ胎仔骨端軟骨抽出物中には、ChM-I と異なる活性成分 Chondromodulin-II (ChM-II) が存在することが明らかとなった。そこで、本研究では、ChM-II を単離・精製し、その全構造の決定及び cDNA の分子クローニングを試みた。

[材料と方法]

ウシ胎仔四肢骨端軟骨の 1 M グアニジン塩酸抽出物のアセトン画分 (45~65%) を 1 M NaCl を含む 4 M グアニジン塩酸に溶解し、限外濾過により分子量 10-50 kDa 画分を濃縮した。これを、さらに、Sephacryl S-200 カラム、ヘパリン親和性カラムに展開し、最後に逆相 HPLC にて ChM-II を精製した。生物活性の検定は、ウサギ肋軟骨骨移行部より分離培養した成長軟骨細胞培養系の DNA 合成促進活性ならびにプロテオグリカン合成促進活性およびマウス骨芽細胞株 MC3T3-E1 の増殖促進活性を指標に行った。アミノ酸配列解析は、精製標品をカルボキシメチル化後、リジルエンドペプチダーゼ消化断片、アセチル化後のトリブシン/キモトリブシン消化断片、BrCN 分解断片のアミノ酸配列をもとに ChM-II の全一次構造を決定した。C 末端アミノ酸配列は、チオヒダントイン法によって決定した。

cDNA の分子クローニングは Reverse Transcription-PCR (RT-PCR) 法および Rapid Amplification of cDNA Ends (RACE) 法により行った。分子クローニングした cDNA の塩基配列の決定は、ABI373A Sequencer を用いた Sanger 法により行った。

まず、ウシ胎仔四肢骨端軟骨を液体窒素中で粉碎し、グアニジンイソチオシアネート/塩化セシウム法により total

RNA を抽出した。抽出した total RNA から oligo-dT セルロースカラムを用いて poly(A)⁺RNA を精製し、逆転写酵素にて cDNA を合成して、cDNA ライブラリーを作製した。作製した cDNA ライブラリーを鋳型に、アミノ酸配列を基に設計したプライマーを用いて、RT-PCR 法で cDNA の増幅を行い、ChM-II cDNA の部分断片を取得した。

次に、5'-RACE 法ならびに 3'-RACE 法で cDNA の増幅を行った。推定 4 週齢 (体長 4 cm) のウシ胎仔全組織を材料に、total RNA を抽出し、oligo-dT セルロースカラムを用い、poly(A)⁺RNA を精製した。精製した poly(A)⁺RNA から cDNA を合成し、cDNA の両端にアダプタープライマーを結合した。増幅反応は、cDNA の部分断片から決定した配列を基に設計したプライマー、およびアダプタープライマーに相補的なプライマーを用いて行った。

さらに、ChM-II の発現部位を特定するために、ウシ胎仔全組織、ラット骨、ラット骨芽細胞株 UMR およびヒトの種々の臓器を用いたノーザンブロット解析を行い、ChM-II mRNA の発現を解析した。

また、組換え ChM-II の取得を目的として、ChM-II cDNA の大腸菌での発現を試みた。発現ベクター pPROEX-1 のクローニング部位に ChM-II cDNA を挿入し、大腸菌 JM109 株を形質転換した。形質転換体を培養し、IPTG で ChM-II cDNA の発現を誘導し、組換え蛋白質を SDS-PAGE により解析した。

[結果]

軟骨特異的増殖制御因子 ChM-I の精製過程で、ウシ胎仔軟骨抽出物の 10-50 kDa 画分には、ChM-I と異なる活性成分が存在することが明らかとなった。この活性は、ChM-I と同様にヘパリン親和性カラムに吸着し、NaCl 濃度 0.15 M - 0.5 M で溶出された。C4 逆相 HPLC における溶出位置も ChM-I と異なっていた。そこで、この活性成分を Chondromodulin-II (ChM-II) と命名した。ChM-II は、SDS-PAGE 上で見かけの分子量 16 kDa を示した。精製した ChM-II をウサギ成長軟骨細胞培養系に添加すると、約 10 ng/ml-2 µg/ml の濃度範囲で用量依存的にプロテオグリカン合成ならびに DNA 合成を促進した。また、至適濃度の Fibroblast Growth Factor-2 (FGF-2) 存在下で相乗的に DNA 合成を促進した。一方、ChM-II はマウス骨芽細胞株 MC3T3-E1 の増殖促進活性も有していた。ChM-II は 3 ng/ml から 30 ng/ml の濃度範囲で用量依存的に MC3T3-E1 の増殖を促進した。アミノ酸配列を決定したところ、ChM-II はリジン残基に富む、133 アミノ酸残基よりなる分子量 14,538 (計算値) の新規な蛋白質で、6 個の半シスチン残基を含んでいることが明らかとなった。

ChM-II の生体内での働きをさらに詳細に解析するために、ChM-II cDNA の分子クローニングを試みた。まず、ウシ胎仔四肢骨端軟骨 poly(A)⁺RNA から作製した cDNA ライブラリーを鋳型に、RT-PCR 法で cDNA の増幅を行った。プライマーは ChM-II アミノ酸配列に基づいて設計した。その結果約 300 bp の ChM-II cDNA の部分断片を取得した。

次に、得られた cDNA 断片をプローブに用いて、ChM-II mRNA の発現を解析した。その結果、軟骨では、ノーザンブロット解析で確認するのに十分な ChM-II mRNA の発現が認められなかった。その他の主要臓器 (心臓、腎臓、肺、肝臓、脳、等) においても ChM-II mRNA の発現は認められなかった。そこで、完全長 cDNA の取得を目的として、推定 4 週齢のウシ胎仔全組織から cDNA を調製して RACE 法により ChM-II cDNA の増幅を行った。

まず、ウシ胎仔全組織 poly(A)⁺RNA を基に、oligo-dT 配列を有するプライマーを用いて cDNA を合成し、cDNA の両端にアダプタープライマーを結合した。次に、RT-PCR 法により取得した ChM-II cDNA 部分断片の塩基配列を基に、新たにプライマーを設計した。アダプタープライマーに相補的なプライマーと、新たに設計したプライマーを用いて、3'-RACE 法により cDNA の増幅を試みた。その結果、約 200 bp の ChM-II cDNA の 3' 非翻訳領域を含む cDNA を取得した。3' 非翻訳領域の塩基配列を基に、新たに 5'-RACE 法に用いるプライマーを設計し、そのプライマーと、アダプタープライマーに相補的なプライマーを用いて、5'-RACE 法により cDNA の増幅を行った。その結果、約 500 bp の ChM-II 全コーディング領域と 5' 非翻訳領域を含む cDNA を取得し、ChM-II cDNA の全構造の解明に至った。ChM-II cDNA (720 bp) は、132 bp の 5' 非翻訳領域と 112 bp の 3' 非翻訳領域を持ち、151 アミノ酸残基からなる ChM-II 前駆体をコードしていることが判明した。また、ChM-II 前駆体は、その N 末端に 18 残基のアミノ酸よりなるシグナル配列を有していることが明らかとなった。

次に、ChM-II の発現部位を特定するためにノーザンブロット解析を行った。分子クローニングの材料のウシ胎仔全

組織 poly(A)⁺RNA, ラット骨 poly(A)⁺RNA, ラット骨芽細胞株 UMRpoly(A)⁺RNA を用いたノーザンブロット解析では, ウシ胎仔全組織 poly(A)⁺RNA で約 1 kb の位置に ChM-II mRNA のバンドを検出した。骨および骨芽細胞株には ChM-II mRNA の発現は認められなかった。一方, ヒトの各種臓器 poly(A)⁺RNA を用いたノーザンブロット解析の結果, 脾臓と胸腺で ChM-II mRNA の発現を確認した。

次に, 組換え ChM-II の取得を試みた。まず, 大腸菌発現ベクター pPROEX-1 に, 分子クローニングした ChM-II cDNA を組み込み, 大腸菌 JM109 株を形質転換した。形質転換体を培養し, 発現誘導を行い, 組換え ChM-II を得た。SDS-PAGE の結果, 大腸菌で発現した組換え ChM-II は, ウシ胎仔軟骨から精製した天然型 ChM-II と同じく, SDS-PAGE で 16 kDa の分子量を示した。また, 組換え ChM-II は, 天然型 ChM-II 同様にマウス骨芽細胞株 MC3T3-E1 の増殖を促進した。

[考察と結論]

成長軟骨細胞培養系の DNA 合成を促進するのみならず, 分化機能の一つであるプロテオグリカン合成を促進する新規の細胞増殖制御因子 ChM-II の全一次構造の決定に成功した。ChM-II はリジンに富む分子量 14,538 (計算値) の塩基性蛋白質で, 133 アミノ酸残基により構成されていることが明らかとなった。ChM-II cDNA の分子クローニングの結果, ChM-II は 151 アミノ酸残基からなる前駆体として生合成され, シグナル配列が切断されて細胞外に分泌されるものと考えられた。ChM-II の配列をデータベースで検索した結果, 興味深いことに, ChM-II はニワトリ前骨髄細胞に特異的に発現する MIM-1 と高い相同性を示した。*min-1* 遺伝子は, ニワトリの発癌遺伝子 *v-myb* がコードする転写因子の標的遺伝子であるが, MIM-1 の機能については未だ明らかではない。MIM-1 は 326 アミノ酸残基で構成される分子量約 35 kDa の蛋白質で, その分子内に, それぞれ 135 アミノ酸残基と 136 アミノ酸残基からなる, Repeat 1, Repeat 2 と呼ばれる互いに高い相同性を示す領域を持つことが知られている。その相同性は Repeat 1 と Repeat 2 の間で約 74% であると報告されている。コンピューターによる計算の結果, ChM-II のアミノ酸配列と Repeat 1 は約 57.7%, Repeat 2 とは約 56.4% の相同性が認められた。ChM-II は MIM-1 全体と相同性を有しているのではなく, MIM-1 の Repeat 構造と相同性を有していることが判明した。ChM-II には MIM-1 のような Repeat 構造が認められなかったことから, ChM-II は MIM-1 とは異なる新規な遺伝子産物であると推察された。

PCR 法によってウシ胎仔骨端軟骨 cDNA ライブラリーから cDNA が増幅されることから, ChM-II の産生部位は, 軟骨組織近傍である可能性が高い。しかし, ChM-II cDNA をプローブとして用いたノーザンブロット解析では, ChM-II mRNA を軟骨組織中に検出することはできなかった。一方, 4 kg の軟骨組織から 60 μ g もの ChM-II が精製される。これらの結果は, 軟骨に於ける ChM-II mRNA の発現量と蛋白質の発現量に大きな差があることを示唆している。その理由としては, 次の可能性が考えられる。すなわち, 軟骨組織中では ChM-II mRNA の分解が速く, 逆に ChM-II 蛋白質は安定に保持されるのか, あるいは ChM-II 遺伝子が軟骨近傍の特殊な時期の細胞で転写, 翻訳され, 軟骨に輸送されるのか, である。しかし, いずれの理由によるのかは現在のところ明らかではない。

一方, 分子クローニングの材料のウシ胎仔全組織 poly(A)⁺RNA を用いたノーザンブロット解析では, 約 1 kb の位置に ChM-II mRNA のバンドを検出した。このことから, 少なくとも胎仔期には全身のいずれかの部位で ChM-II 遺伝子は発現していると考えられた。そこで, さらに詳細に発現臓器を調べるために, ヒトの各種臓器から抽出した poly(A)⁺RNA を用いてノーザンブロット解析を行った。その結果, 脾臓と胸腺で ChM-II mRNA の発現を確認した。しかしながら脾臓と胸腺における ChM-II の作用については現在のところ不明である。

本研究で分子クローニングした ChM-II cDNA を大腸菌で発現させ, 組換え ChM-II を取得した。組換え ChM-II は天然型 ChM-II と同じく SDS-PAGE で 16 kDa の分子量を示した。組換え ChM-II を精製して, マウス骨芽細胞株 MC3T3-E1 の培養系に添加すると, 天然型 ChM-II とほぼ同様に, 用量依存的に MC3T3-E1 の増殖を促進し, 組換え ChM-II が生物活性を保持していることが確認された。

ChM-II 遺伝子の構造解明と, 生物活性の保持された組換え ChM-II 蛋白質の取得は, 今後の ChM-II の組織局在や生理活性の詳細を調べるのに大きく寄与すると考えられる。

論文審査の結果の要旨

本研究は、ウシ胎仔軟骨組織より新規な細胞増殖制御因子、Chondromodulin-II (ChM-II) を同定し、その全一次構造の決定および cDNA のクローニングを試みたものである。

その結果、ChM-II は133個のアミノ酸から成る塩基性蛋白質で、その配列はニワトリ前骨髄細胞に特異的に発現する MIM-1 と高い相同性を示した。次いで、ChM-II cDNA の分子クローニングおよび生理活性を保持した組換え ChM-II の取得にも成功した。従って本論文は ChM-II の作用機構を解明する上で重要な手掛かりを与えるものであり、博士（学術）の学位請求に十分値するものと認める。