



Title	Coordinate Expression of $\alpha$ -Tropomyosin and Caldesmon Isoforms in Association with Phenotypic Modulation of Smooth Muscle Cells
Author(s)	柏田, 耕志
Citation	大阪大学, 1999, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/41649">https://hdl.handle.net/11094/41649</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=" <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">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	柏 田 耕 志 かしわ だ こう じ
博士の専攻分野の名称	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	第 1 4 4 4 3 号
学 位 授 与 年 月 日	平成 11 年 3 月 25 日
学 位 授 与 の 要 件	学位規則第 4 条第 1 項該当 医学系研究科生理系専攻
学 位 論 文 名	Coordinate Expression of $\alpha$ -Tropomyosin and Caldesmon Isoforms in Association with Phenotypic Modulation of Smooth Muscle Cells 平滑筋細胞の形質転換に伴う $\alpha$ -トロポミオシン及びカルデスモンアイソフォームの協調的発現
論 文 審 査 委 員	(主査) 教 授 祖父江憲治
	(副査) 教 授 平野 俊夫 教 授 米田 悅啓

### 論 文 内 容 の 要 旨

#### 【目的】

平滑筋細胞形質転換（分化・脱分化）機構の解明は、動脈硬化、高血圧症、平滑筋由来腫瘍などの発症機序を理解する上で重要である。この機構を解明していく方法の一つとして、平滑筋細胞の形質を特徴づけるマーカー蛋白質の発現制御を解明する必要がある。本研究ではトロポミオシン及びカルデスモンアイソフォームの平滑筋細胞形質転換に伴う発現変化について検討した。両蛋白質はアクチン線維上でアクトミオシン系の収縮制御に関わる主要細胞格蛋白質である。両者には複数のアイソフォームが存在し、中でも平滑筋細胞の形質転換に伴いカルデスモンアイソフォームが高分子量型 ( $h$ -CaD) から低分子量型 ( $l$ -CaD) に変化することは良く知られている。一方、トロポミオシンは極めて多様なアイソフォームを有しており、分化型の平滑筋細胞においてのみ平滑筋型  $\alpha$ -トロポミオシン ( $\alpha$ -TM-SM) 及び  $\beta$ -トロポミオシン ( $\beta$ -TM-SM) が発現している事が知られていた。しかし、形質転換後のアイソフォーム変化については不明であった。

本研究は、平滑筋細胞の代表的マーカー蛋白質であるカルデスモンとトロポミオシンの形質転換に伴うスプライシング機構を解析することを目的とした。

#### 【方法ならびに成績】

ニワトリ分化型砂囊平滑筋細胞および大動脈血管平滑筋細胞の血清刺激による形質転換に伴うトロポミオシンアイソフォームの発現変化を 2 次元電気泳動法及びウエスタンブロッティングにより解析した。 $\alpha$ -TM-SM 及び  $\beta$ -TM-SM は培養の経過に伴って消失し、代って両者よりも見かけ上の分子量が小さい 2 つのアイソフォームが新たに発現することを見い出した。

$\alpha$ -トロポミオシンアイソフォームの遺伝子構造を特定するために、脱分化型平滑筋細胞の cDNA ライブラリーよりトロポミオシン cDNA を単離した。新たな 2 つのアイソフォームは線維芽細胞型  $\alpha$ -トロポミオシン ( $\alpha$ -TM-F1 及び  $\alpha$ -TM-F2) であった。

mRNA レベルにおける変化を明らかにするために、各トロポミオシンアイソフォームを特徴づけるエキソンに特異的な DNA プローブを用いてノーザンブロッティング及び RT-PCR を行った。カルデスモンについても同様の解析を行い、トロポミオシンの場合と比較した。 $\alpha$ -TM-SM から  $\alpha$ -TM-F1 及び  $\alpha$ -TM-F2 への変化は、 $\alpha$ -

TM 遺伝子産物のスプライシングにおいて選択されるエキソン 2a から 2b への変化に対応している。同様に *h*-CaD ではエキソン 3ab が選択されるが、*l*-CaD ではエキソン 3a のみが選択される。分化型平滑筋細胞から血清あるいは PDGF-BB 刺激による脱分化型細胞への移行に伴い、両遺伝子産物のスプライシングは協調して変化した。

ニワトリ胚におけるトロポミオシンとカルデスモンの発現様式を明らかにするために、エキソン特異的オリゴプローブによる *in situ*-ハイブリダイゼーションを行った。エキソン 2a を含む  $\alpha$ -TM-SM とエキソン 3b を含む *h*-CaD の mRNA の発現は平滑筋組織に限局し、発生段階を通して一致した発現パターンを示した。

### 【総括】

平滑筋細胞の形質に対応した  $\alpha$ -トロポミオシン及びカルデスモンのアイソフォームの発現変化は、両遺伝子産物のスプライシングによるものであることを明らかにした。またその変化は時間的、空間的に協調していた。以上のことから、両者の発現を共通して制御するスプライシング機構の存在が示唆された。現在、平滑筋細胞形質に依存するスプライシング調節因子の検索を行っている。

### 論文審査の結果の要旨

本論文は、平滑筋細胞の形質転換に伴うトロポミオシンアイソフォームの発現変化を明らかにし、カルデスモンアイソフォームの発現変化との協調性を解析したものである。

具体的には、平滑筋細胞が脱分化した場合に発現していくトロポミオシンアイソフォームが 2 種類の線維芽細胞型  $\alpha$ -トロポミオシンであることを初めて特定した。また、この変化がカルデスモン遺伝子の発現と同様にスプライシング過程での調節によることを明らかにした。さらに、両遺伝子におけるスプライシング調節が平滑筋細胞形質転換に協調して起ることを見い出した。動脈硬化発症の病因として平滑筋細胞形質転換が近年注目されている。本研究はこの形質転換機構をスプライシング機構という視点から重要な知見を与えるものである。

以上のように本研究は、平滑筋細胞の代表的分子マーカー蛋白質であるカルデスモン及びトロポミオシンが、平滑筋細胞形質転換に伴い協調的スプライシングを示すことを初めて見い出し、そのスプライシング様式を解析したもので、学位の授与に値すると考えられる。