



Title	CSEBP-2 (cartilage-specific enhancer binding protein)の発現パターンとゲノム構造解析
Author(s)	片岡, 英一郎
Citation	大阪大学, 2000, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/41832
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"〉 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	片岡英一郎
博士の専攻分野の名称	博士(医学)
学位記番号	第 15310 号
学位授与年月日	平成12年3月24日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 医学系研究科外科系専攻
学位論文名	CSEBP-2 (cartilage-specific enhancer binding protein) の発現パターンとゲノム構造解析
論文審査委員	(主査) 教授 吉川 秀樹 (副査) 教授 宮崎 純一 教授 越智 隆弘

論文内容の要旨

【目的】

Ⅱ型コラーゲンは軟骨に組織特異的に存在する細胞外マトリックスを構成する主要な分子である。Ⅱ型コラーゲンの合成は軟骨細胞により組織特異的、発生段階特異的に行なわれているが、その遺伝子発現は厳密に制御され、主に転写レベルで行われている。われわれはⅡ型コラーゲンの遺伝子の転写制御を司る trans-element を明らかにするために、Ⅱ型コラーゲンの軟骨特異的エンハンサー領域の DNA 配列に結合するクローンを軟骨 cDNA 発現ライブラリーより単離し、cartilage-specific enhancer binding protein (CSEBP) と命名した。今回、その一つである CSEBP-2 について解析をすすめ、組織での mRNA の発現パターンとゲノム上のエクソン-イントロン構造を明らかにした。

【方法ならびに成績】

組織での発現パターンの解析

胎生18日マウス胚の眼、脳、軟骨、肝臓、腎臓、筋肉、腸、肺および4週齢マウスの脳、心臓、肺、小腸、大腸、肝臓、脾臓、精巣、卵巣より RNA を抽出後、オリゴdT プライマーを用いて、cDNA を作成した。PCR サイクルは 95°C60秒から 94°C30秒、57°C30秒、72°C30秒35サイクル、72°C10分であり、使用したプライマーは ek-11 (5'-CATGACAGAGATATAGACTGTA) と ek-12 (5'-GACACTTGGAGTCGTACCG-3') であった。胎生18日のマウス胚では脳、心臓、眼球、軟骨で発現を認め、肝臓、腸、肺では発現を認めなかった。また4週齢マウスでは脳、精巣では発現を認めたが、他の組織では発現を認めなかった。

ゲノムライブラリースクリーニングとゲノム構造解析

CSEBP-2 の cDNA 全長をプローブとし、ECL-direct labelling system (Amersham) を用いて、SV129マウスの λ FIXII バクテリオファージゲノムライブラリー (Stratagene) を3次までスクリーニングし、4個のクローンが得られた。XbaI による切断の結果、えられたクローンは2つずつが同じものであった。続いて得られたクローンの DNA の XbaI 断片をサブクローニングし、その塩基配列を決定した。塩基配列決定には Applied Biosystems DNA sequencer model 373および377 (Perkin Elmer) を使用した。ゲノム上のエクソン-イントロン構造を、cDNA と対照することにより明らかにし、exon-intron 接合部の塩基配列を決定した。その結果、CSEBP-2 coding region はゲノム上で8 kb にわたって存在しており、13の exon からなることが、また、翻訳開始位置は exon 3 に、翻訳終始位置は exon11に存在することが明らかとなった。exon-intron 接合部はコンセンサス配列と約70%一致していた。

【総括】

CSEBP-2はヒトで明らかになっている zinc-finger type の転写因子 TIP60とアミノ酸レベルで95%、核酸レベルで90%以上の相同性を示している。この蛋白質と相同性を持つ CSEBP-2 はⅡ型コラーゲン遺伝子のエンハンサー配列に結合することでこのエンハンサー部位に結合する他の蛋白質と共働して、Ⅱ型コラーゲンのみならず他の軟骨特異的分子の発現を制御している可能性が示唆される。その発現パターンはⅡ型コラーゲン遺伝子の発現に同調しており、両者の密接な関係が示唆される。CSEBP-2の生体内での機能は、本研究の結果より今後、ジーンターゲットリングなどの手法を用いて、解明されると考える。

論文審査の結果の要旨

本研究は、Ⅱ型コラーゲン遺伝子の軟骨特異的発現を制御する cis-element に結合するタンパク質として単離された CSEBP (cartilage-specific enhancer binding protein) -2 について、組織での発現パターンとゲノム構造を解析したものである。その結果、CSEBP-2 遺伝子の発現はⅡ型コラーゲン遺伝子の発現と同調していることが明らかとなり、構造解析の結果 coding region が転写因子 TIP60とアミノ酸で90%以上の相同性を認めた。このことは、CSEBP-2 遺伝子がⅡ型コラーゲン遺伝子の軟骨特異的発現を転写レベルで制御していることを示唆する。また、ゲノム構造を明らかにしたことはジーンターゲットリングを含めた機能解析に有用と考えられる。以上のように、本論文は CSEBP-2 の解析を通して軟骨におけるⅡ型コラーゲン遺伝子発現制御の解明に多大な貢献をし、学位に値するものと認める。